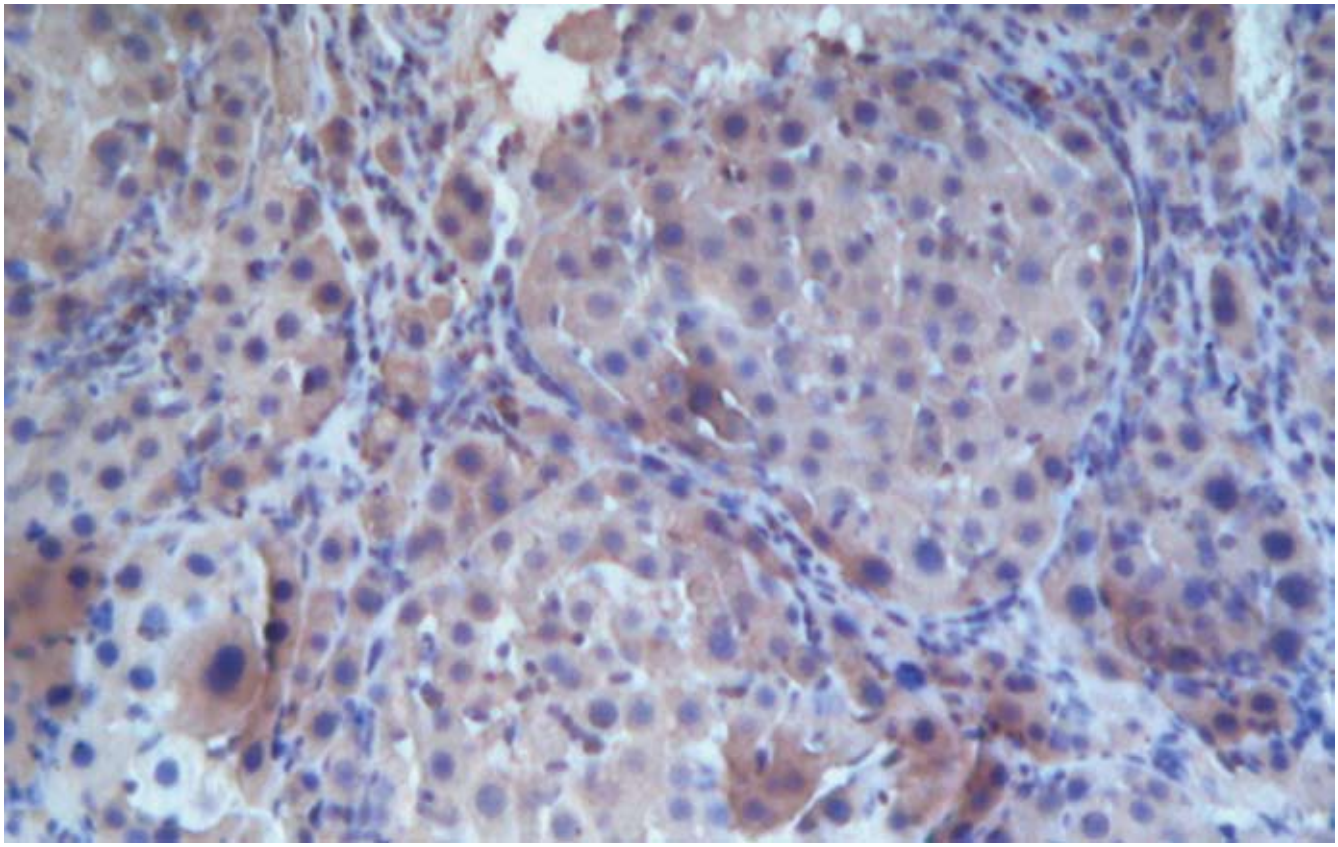
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 4 月 18 日　第 20 卷　第 11 期　(Volume 20 Number 11)



11/2012

ISSN 1009-3079

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

世界华人消化杂志
www.wjgnet.com
二零一二年四月十八日
第二十卷
第十一期

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄志强教授
纪小龙教授
王宝恩教授
王苑本教授
杨春波教授
杨思凤教授
姚希贤教授
张万岱教授
周学文教授

名誉主编

潘伯荣教授

主编

程英升教授
党双锁教授
江学良教授
刘连新教授
刘占举教授
吕宾教授
马大烈教授
王小众教授
张宗明教授
姚登福教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
陈国忠主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明教授
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
廖家智副主任医师
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛高平教授
孟庆华教授
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
唐世刚教授
田宇彬教授
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
王俊平教授
王晓艳副教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
杨建民教授
姚树坤教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周宇教授
邹晓平主任医师
诸琦教授
于珮主任医师

消化外科学

白雪巍副主任医师
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈凛教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高毅主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
荚卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李旭副教授
李永翔教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕云福教授
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民主任医师
邱伟华主任医师
仇毓东教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
邰升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王健生教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
赵刚副教授
智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
刘正稳教授
钱林学主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王凯教授
王怡主任医师
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
姚鹏副教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵秀英副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘绍能主任医师
南极星教授
牛英才研究员
王富春教授
邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘平教授
刘云鹏教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
官泳松教授
胡红杰主任医师
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐辉雄教授
严惟力副教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
李刚教授
李君文研究员
李增山副教授
刘克辛教授
刘淼副教授
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
魏继福研究员
吴道澄教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
阴赖宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
门秀丽教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2012 年 4 月 18 日　第 20 卷　第 11 期　(总第379期)

基础研究

901 TEAS复合药物全麻行控制性降压后胃血流的变化

张乐乐, 方剑乔, 邵晓梅, 连林立, 喻晓静, 董振华, 莫雅娣

907 臭氧对高脂喂养诱导新西兰兔非酒精性脂肪性肝炎的防治作用

陈兰, 朱新生, 桑伟, 希尔娜依•阿不都黑力力, 范晓棠, 何方平

916 人羊膜脐带源性间充质干细胞对大鼠肝硬化的治疗作用

高琳琳, 关方霞, 郑鹏远, 杨波, 迟连凯, 梁硕, 邹润钦, 刘志强

923 低表达Smad4对肝癌细胞SMMC-7721上皮间质转化的影响

薛慧婷, 王宏刚, 黄晓丹, 沈鹏, 季国忠

临床研究

930 ANXA2和ANXA4在胃腺癌中的表达及临床意义

张志强, 聂永梅, 李秀娟, 夏宇, 胡翠梨, 苏丽萍, 李建州, 宋娜, 蒋海, 张洁

文献综述

936 Th17、IL-17在幽门螺杆菌相关性胃癌中的研究进展

李伟, 杨桢, 黄德强, 吕农华

941 上皮间质转化与肝纤维化的研究进展

陈肯, 康权

946 循环肿瘤细胞及游离DNA甲基化在肝细胞癌患者中的研究进展

邱必军, 薛峰, 余坚, 夏强

953 上皮间质转化及相关信号通路在原发性肝细胞癌转移中的研究进展

齐明华

研究快报

959 钼对人食管癌细胞ECA-109的化疗增敏作用及对食管癌干细胞$p75^{NTR}$的影响

李珂, 龙辉, 王洁莲, 吴清明, 吴银霞, 程静

临床经验

964 持续血液滤过治疗高脂血症性急性胰腺炎24例

黄鹏, 王春友, 吴河水, 吴国俊, 黎建军

969 血液标志物与胰腺外炎症CT评分对急性胰腺炎严重性早期预测的比较

余贤恩

975 伊立替康治疗结直肠癌相关胆碱能综合征89例

刘慧龙, 李志宇, 刘彦芳, 李红英, 于忠和

病例报告

980 嗜酸粒细胞性胃肠炎致血性腹水1例

黄颖秋, 韩春丽, 刘旭妍

附　　录	984 《世界华人消化杂志》投稿须知 989 2012年国内国际会议预告
志　　谢	990 志谢世界华人消化杂志编委
消　　息	906 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 915 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 922 *WJG*成功通过评审被PMC收录 952 《世界华人消化杂志》修回稿须知 958 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 963 *WJG*总被引频次排名位于第174名 968 《世界华人消化杂志》外文字符标准 979 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694 983 《世界华人消化杂志》参考文献要求
封面故事	高琳琳, 关方霞, 郑鹏远, 杨波, 迟连凯, 梁硕, 邹润钦, 刘志强. 人羊膜脐带源性间充质干细胞对大鼠肝硬化的治疗作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 916-922 http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/916.asp
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名
(旬刊)

创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2012-04-18
原刊名 新消化病学杂志

期刊名称 世界华人消化杂志
主管单位 山西省科学技术厅
主办单位 太原消化病研治中心

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

出版 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

主编
程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心
党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科
江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科
刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科
刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科
吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科
马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科
王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科
姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心
张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编辑部主任 李军亮

印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局

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

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2012年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
		82-262	M 4481	每期68.00元 全年2448.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

April 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 11

BASIC RESEARCH

901 Changes in gastric blood flow in dogs undergoing transcutaneous electrical acupoint stimulation combined with general anesthesia for controlled hypotension
Zhang LL, Fang JQ, Shao XM, Lian LL, Yu XJ, Dong ZH, Mo YD

907 Protective and therapeutic effect of ozone on diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rabbits
Chen L, Zhu XS, Sang W, Abuduhelili X, Fan XT, He FP

916 Therapeutic effect of transplantation of human amniotic membrane- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis in rats
Gao LL, Guan FX, Zheng PY, Yang B, Chi LK, Liang S, Zou RQ, Liu ZQ

923 Loss of Smad4 expression inhibits epithelial-mesenchymal transition in SMMC-7721 cells
Xue HT, Wang HG, Huang XD, Shen P, Ji GZ

CLINICAL RESEARCH

930 Clinical significance of expression of ANXA2 and ANXA4 in gastric adenocarcinoma
Zhang ZQ, Nie YM, Li XJ, Xia Y, Hu CL, Su LP, Li JZ, Song N, Jiang H, Zhang J

REVIEW

936 Role of Th17 and IL-17 in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis
Li W, Yang Z, Huang DQ, Lv NH

941 Progress in understanding the relationship between epithelial-mesenchymal transition and liver fibrosis
Chen K, Kang Q

946 Advances in understanding clinical significance of circulating tumor cells and cell-free DNA methylation in patients with hepatocellular carcinoma
Qiu BJ, Xue F, Yu J, Xia Q

953 Signal pathways associated with epithelial-mesenchymal transition in metastasis of primary hepatocelluar carcinoma
Qi MH

RAPID COMMUNICATION

959 Molybdenum increases chemosensitivity of ECA-109 cells to cisplatin and cisplatin-induced inhibition of $p75^{NTR}$ expression in esophageal stem cells
Li K, Long H, Wang JL, Wu QM, Wu YX, Cheng J

CLINICAL PRACTICE

964 Treatment of hyperlipidemic acute pancreatitis by continuous venovenous hemofiltration: an analysis of 24 cases
Huang P, Wang CY, Wu HS, Wu GJ, Li JJ

969 Comparative evaluation of blood markers and extrapancreatic inflammatim on CT score in the early prediction of the severity of acute panereatitis
Yu XE

975 Irinotecan-related cholinergic symptoms in patients with colorectal cancer: an analysis of 89 cases
Liu HL, Li ZY, Liu YF, Li HY, Yu ZH

CASE REPORT

980 Eosinophilic gastroenteritis with bloody ascites: a case report
Huang YQ, Han CL, Liu XY

APPENDIX	984 Instructions to authors of *World Chinese Journal of Digestology* 989 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	990 Acknowledgments to reviewers of *World Chinese Journal of Digestology*
COVER	*Gao LL, Guan FX, Zheng PY, Yang B, Chi LK, Liang S, Zou RQ, Liu ZQ.* Therapeutic effect of transplantation of human amniotic membrane- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 916-922 http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/916.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: *Yuan Zhou* Review Editor: *Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang* Electronic Page Editor: *Ya-Jing Lu* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Shan-Shan Zhang* Proof Editor: *Jun-Liang Li* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date April 18, 2012

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

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

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

EDITOR-IN-CHIEF
Ying-Sheng Cheng, Professor, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China
Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China
Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China
Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China
Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China
Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

SCIENCE EDITORS
Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION
RMB 68 Yuan for each issue
RMB 2448 Yuan for one year

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

COPYRIGHT
© 2012 Published by *World Chinese Journal of Digestology* (*WCJD*). All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

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

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

Copyright © 2012 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 901-906
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

TEAS复合药物全麻行控制性降压后胃血流的变化

张乐乐, 方剑乔, 邵晓梅, 连林立, 喻晓静, 董振华, 莫雅娣

张乐乐, 上海中医药大学 上海市 201206
方剑乔, 邵晓梅, 连林立, 喻晓静, 董振华, 莫雅娣, 浙江中医药大学第三临床医学院 浙江省杭州市 310053
张乐乐, 博士, 主要从事针刺麻醉的效应研究.
国家重大基础研究计划(973)基金资助项目, No. 2007CB512506
浙江省"重中之重"学科(针灸推拿学)经费基金资助项目
作者贡献分布: 此课题由方剑乔指导设计, 由邵晓梅负责实施; 研究所需的实验仪器和试剂由邵晓梅提供; 由张乐乐、连林立、喻晓静、董振华及莫雅娣共同负责动物实验、指标检测和数据分析; 本论文写作由张乐乐完成.
通讯作者: 方剑乔, 教授, 博士生导师, 310053, 浙江省杭州市滨江区滨文路548号, 浙江中医药大学第三临床医学院神经生物学实验室. fangjianqiao7532@163.com
电话: 0571-87238288
收稿日期: 2012-01-02 修回日期: 2012-02-11
接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-04-18

Changes in gastric blood flow in dogs undergoing transcutaneous electrical acupoint stimulation combined with general anesthesia for controlled hypotension

Le-Le Zhang, Jian-Qiao Fang, Xiao-Mei Shao, Lin-Li Lian, Xiao-Jing Yu, Zhen-Hua Dong, Ya-Di Mo

Le-Le Zhang, Shanghai University of TCM, Shanghai 210206, China
Jian-Qiao Fang, Xiao-Mei Shao, Lin-Li Lian, Xiao-Jing Yu, Zhen-Hua Dong, Ya-Di Mo, the Third Clinical Medical School, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China
Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2007CB512506; and the Zhejiang Province" Chongzhong Zhizhong" Discipline (Acupuncture and Moxibustion) Foundation
Correspondence to: Jian-Qiao Fang, Professor, Laboratory of Neurobiology, the Third Clinical Medical School, Zhejiang University of TCM, 548 Binwen Road, Binjiang District, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China. fangjianqiao7532@163.com
Received: 2012-01-02 Revised: 2012-02-11
Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-04-18

Abstract

AIM: To observe the changes in gastric blood flow in dogs undergoing controlled hypotension by transcutaneous electrical acupoint stimulation (TEAS) combined with general anesthesia, so as to clarify the mechanism of gastro-protective effect of acupuncture-drug compound anesthesia.

METHODS: Fifty-four male beagles were randomly and equally divided into nine groups: simple anesthesia group, 60% control group, 60% experiment group, 50% control group, 50% experiment group, 40% control group, 40% experiment group, 30% control group, and 30% experiment group. General anesthesia was induced in all dogs by isofluane inhalation. Controlled hypotension was achieved in all the groups except for the simple anesthesia group to lower the mean arterial pressure (MAP) to 60%, 50%, 40%, and 30% of basic MAP and maintain at that level for 60 min. TEAS was applied in the experimental groups. The changes in gastric blood flow at various time points were monitored using a laser Doppler blood flow meter.

RESULTS: At the time of target blood pressure level of controlled hypotension (T0), the levels of gastric blood flow in all control groups were significantly lower than baseline level (all $P < 0.05$), while the 60% ($P = 0.316$) and 50% ($P = 0.539$) experiment groups showed no significant decrease in gastric blood flow. After maintaining target blood pressure level for 10 min (T1), except for the 50% experiment group ($P = 0.089$ *vs* baseline level, $P = 0.140$ *vs* simple anesthesia group, $P < 0.05$ *vs* control groups), the levels of gastric blood flow in other pressure-controlling groups were significantly lower than baseline levels and those in the general anesthesia group at the same time points (all $P < 0.05$). At the stage of blood pressure recovery, the levels of gastric blood flow in the 50% ($P = 0.174$), 30% ($P = 0.071$) and 40% ($P = 0.084$) experiment groups had returned to baseline level, while this did not occur in the control groups.

CONCLUSION: Gastro-protective effect of TEAS is apparent in case of mild blood pressure control (50% MAP) but is not obvious in case of strong blood pressure control (30% MAP). TEAS can promote the rapid recovery of gastric blood flow at the stage of blood pressure recovery.

Key Words: Transcutaneous electrical acupoint stimulation; Acupuncture-drug compound anesthesia; Controlled hypotension; Gastric blood flow; Gastro-protective effect

Zhang LL, Fang JQ, Shao XM, Lian LL, Yu XJ, Dong ZH,

■**背景资料**
长期以来, 人们对控制性降压的安全性仅考虑到心脑、肝、肾等重要脏器的血供, 而忽视了对胃肠道功能的保护. 胃肠道由于其自身功能和结构特点, 血液灌注较为丰富, 同时对缺血、缺氧较为敏感, 这也是本课题研究TEAS的胃保护效应目的之所在.

■**同行评议者**
任超世, 研究员, 中国医学科学院, 中国协和医科大学生物医学工程研究所

■研发前沿
寻找针药复合麻醉的新作用, 即发掘TEAS参与麻醉中的潜在价值-在全麻手术中参与良性的控制性降压以达到对脏器的保护作用, 寻找一种既能有效实施控制性降压, 又不产生脏器缺血性损伤的措施, 具有重大的临床意义.

Mo YD. Changes in gastric blood flow in dogs undergoing transcutaneous electrical acupoint stimulation combined with general anesthesia for controlled hypotension. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 901-906

摘要

目的: 探讨经皮穴位电刺激(transcutaneous electrical acupoint stimulation, TEAS)复合药物全麻行控制性降压至不同血压水平的胃血流变化, 从而明确针药复合麻醉的胃保护机制.

方法: 54只, ♂, 比格犬随机分为9组: 单纯全麻组、60%对照组、60%实验组、50%对照组、50%实验组、40%对照组、40%实验组、30%对照组、30%实验组, 每组6只, 后8组动物均以异氟醚联合硝普钠行控制性降压, 将动脉血压降至60%、50%、40%、30%基础平均动脉血压水平并维持60 min, 单纯全麻组不行控制性降压. 实验组采用TEAS干预处理, 采用激光多普勒组织血流仪监测不同水平相应时间点胃表面血流的变化.

结果: 在行控制性降压至目标低血压水平(T0)时, 所有对照组胃血流均显著低于各自基础水平(P<0.05), 而60%实验组、50%实验组胃血流未明显降低, 在维持10 min(T1)时, 除50%实验组外, 其他各控压组胃血流均显著低于各自基础水平和同期单纯全麻组水平(P<0.05), 50%实验组与同水平对照组相比有显著统计学差异(P<0.05), 在血压回升阶段, 50%、30%、40%实验组胃血流先后恢复至基础水平和同期单纯全麻组水平, 而同水平对照组未明显恢复.

结论: 轻度控压时(尤其是50%水平), TEAS的胃保护效应明显. 重度控压时(尤其是30%水平), TEAS基本无保护效应, 但在血压回升结束时, TEAS可促进胃血流的较快恢复.

关键词: 经皮穴位电刺激; 针药复合麻醉; 控制性降压; 胃血流; 胃保护效应

张乐乐, 方剑乔, 邵晓梅, 连林立, 喻晓静, 董振华, 莫雅娣. TEAS复合药物全麻行控制性降压后胃血流的变化. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 901-906

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/901.asp

0 引言

针刺麻醉是根据针灸具有镇痛和调节人体生理功能的作用, 在人体的某些穴位进行刺激达到痛觉迟钝或消失的效果, 从而能进行手术操作的一种特殊麻醉方法. 针麻的缺点[1](所谓“3关”: 镇痛不全、肌松不良和内脏牵拉反应)限制了他的发展. 针药复合麻醉是针刺麻醉与现代麻醉技术为互补, 增加药物麻醉效应、减少麻醉药物不良反应的一种新型麻醉方法[2], 传统针药复合麻醉的研究多采用电针疗法, 但其应用于手术麻醉有许多不便, 而且其穴位选用的规律性等问题一直没有很好解决.

经皮穴位电刺激(transcutaneous electrical acupoint stimulation, TEAS)是一种经皮神经电刺激(transcutaneous electrical nerve stimulation, TENS)与针灸穴位疗法结合的新型针灸治疗方法, 具有患者依从性好、外科医生易配合等优势[3], 已有研究表明, TEAS复合药物全麻能够减少术中失血[4]、有效缩短手术时间[5], 更能够有效改善脑组织微循环和氧代谢[6], 提高机体对急性脑缺氧的耐受性[7], 同时对胃黏膜pH值起到良好的双向调节作用[8]. 国内学者将TEAS与电针镇痛作用比较得出结论: (1)同一部位电针与TENS止痛效果无明显差异; (2)TEAS可能与电针具有相似的神经化学机制[9,10]. 控制性降压是临床常用的一种操作技术, 其主要目的是减少失血和输血, 改善术野的环境[11], 缩短手术时间, 使手术期的安全性增加等[12]. 作为体内最大的组织器官, 麻醉状态下, 机体发生一系列神经内分泌反应的变化, 血流重新分布, 血氧供应首先保证供应心、脑等重要器官, 胃肠黏膜血流减少, 如再进行控制性降压, 胃肠黏膜血流更加减少, 胃肠黏膜作为机体最易受缺血、缺氧影响的部位, 其损害在组织灌流量减少早期即可发生[13]. 因此, 本实验正是基于胃黏膜极易缺血缺氧的生理特点来探讨TEAS在针药复合麻醉中的胃保护作用.

1 材料和方法

1.1 材料 Beagle(比格)犬54只, ♂, 体质量8-10 kg, 购自上海新冈实验动物场, 由浙江中医药大学实验动物中心提供饲养, 饲养期间给予犬科动物标准饲料和自由饮水; 丙泊酚购自四川国瑞药业有限责任公司, 批号: 0910263; 盐酸阿托品注射液购自宁波大红鹰药业股份有限公司, 批号: 20080121; 异氟醚购自鲁南贝特制药有限公司, 批号: 080404; 维库溴铵购自浙江仙琚制药有限公司, 批号: 090701; 硝普纳注射液购自武汉人福药业有限责任公司, 批号: 090801-2; MODEL3000麻醉呼吸系统购自美国MATIX; 激光多普勒血流分析仪(瑞典PERIMED); HANS-

100A韩氏镇痛仪购自中国南京济生医疗科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 分组: 动物随机分为单纯药物全麻组(单纯全麻组), 单纯药物全麻行控制性降压至60%水平组(60%对照组), 经皮穴位电刺激复合药物全麻行控制性降压至60%水平组(60%实验组), 单纯药物全麻行控制性降压至50%水平组(50%对照组), 经皮穴位电刺激复合药物全麻行控制性降压至50%水平组(50%实验组), 单纯药物全麻行控制性降压至40%水平组(40%对照组), 经皮穴位电刺激复合药物全麻行控制性降压至40%水平组(40%实验组), 单纯药物全麻行控制性降压至30%水平组(30%对照组), 经皮穴位电刺激复合药物全麻行控制性降压至30%水平组(30%实验组), 每组6只. 实验过程中对动物的处置符合国家颁布的有关善待动物的指导性意见要求.

1.2.2 麻醉及降压处理: 实验动物于实验前12 h禁食, 桡静脉推注丙泊酚[50 mg/(犬·10 s)]进行诱导麻醉, 推注维库溴铵0.1 mg/kg, 行气管插管, 通气参数设置: 呼吸频率15-18次/min, 潮气量180-230 mL; 血气监测控制pH值在7.35-7.40范围. 维持麻醉异氟烷浓度1%, 吸入载体为氧气, 控制性降压前约间隔30 min静脉推注维库溴铵0.05 mg/kg以防止动物在术中有自主呼吸. 控制性降压时异氟烷调为3%, 左侧留置动静脉留置针以备泵注硝普钠行控制性降压, 初始浓度为1 μg/(kg·min), 以1 μg/(kg·min)速度递增, 维持60%、50%、40%、30%基础平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)1 h, 回升血压至基础MAP水平.

单纯全麻组和对照组仅作麻醉及手术处理, 单纯全麻组不行控制性降压, 实验组采用韩氏穴位暨神经刺激仪持续作经皮穴位电刺激行针药复合麻醉. 穴位选用双侧“合谷(LI 4)”、“足三里(ST 36)”、“三阴交(SP 6)”、“曲池(LI 11)”, 其中曲池与合谷、足三里与三阴交连接电极, 刺激参数4 mA±1 mA, 频率2/100 Hz. 维持基础MAP的60%、50%、40%、30%水平1 h后停止经皮穴位电刺激.

1.2.3 监测和检测指标: 本实验研究所涉及所有时间点(控压及血压回升全程大约2.5 h)如下: T0基础, T1目标, T2维持10 min, T3维持30 min, T4维持60 min, T5回升5 min, T6回升15 min, T7回升25 min, T8回升60 min, T9回升结束.

激光多普勒组织血流仪探头置于胃表面: 常规消毒后, 在动物胃脘部的体表投影区的左上腹部(约剑突与脐连线的中点所在水平线与肋弓的交点下方1 cm处)做一切口, 剥离肌层直至胃表面暴露于视野, 然后将激光多普勒组织血流仪探头(PROBE407-1)置于胃组织表面, 经探头座和专用胶水贴与胃组织表面, 探头另一端与血流仪血流模块连接, 以实时监测胃表面的血流变化. 在此说明, 由于此血流仪是适时动态监测, 故每一时间点胃血流的取值是前后1 min血流的平均值. 以上所有操作均在无菌环境下进行, 有创操作均严格遵守外科手术操作规范.

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计学处理, 数据以mean±SD表示. 方差齐性者, 采用单因素方差分析; 方差不齐者, 比较采用非参数检验和Dunnett-*t*检验. 均以$P<0.05$作为显著性差异的标准.

2 结果

60%水平, 在行控制性降压至目标低血压水平时(T1)时, 对照组胃血流显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$), 而实验组胃血流未明显降低; 在行控制性降压至目标低血压维持10 min至血压回升结束(T2-T9)时, 两控压组胃血流均显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$); 在控制性降压全程及血压回升阶段结束(T1-T9), 实验组胃血流较对照组维持较高水平, 但两组间各相应时间点比较无显著统计学差异($P>0.05$, 图1A).

50%水平, 在行控制性降压至目标低血压水平并维持10 min时(T1-T2)时, 与基础水平相比, 对照组胃血流有显著降低($P<0.05$), 而实验组未明显降低, 且在T2时间点, 尽管两控压组胃血流均显著低于同期单纯全麻组水平, 但实验组胃血流明显高于同水平对照组, 两组间比较有显著统计学差异($P<0.05$, $P = 0.008$), 在行控制性降压至目标低血压维持30 min至回升15 min(T3-T6)时, 两控压组胃血流均显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$), 在血压回升25 min至回升结束(T7-T9)时, 实验组胃血流已基本恢复至基础水平和同期单纯全麻组水平, 而对照组胃血流仍显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$, 图1B).

40%水平, 在行控制性降压至目标低血压水平(T1)时, 两控压组胃血流均显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$), 但两组间比较无显著统计学差异($P>0.05$), 在行控制性降压至

■名词解释

控制性降压: 在全麻手术期间, 在保证重要脏器氧供情况下, 采用降压药物与技术等方法, 人为地将平均动脉血压减低并维持一定水平, 从而使手术视野出血量减少, 不致有重要器官的缺血缺氧性损害, 终止降压后血压可以迅速恢复至正常水平, 不产生永久性器官损害.

■同行评价
本研究拟通过TEAS复合药物全麻行控制性降压至不同水平的胃血流变化实验, 探讨针药复合麻醉的胃保护机制, 并获得了一些较为可靠的结果, 具有一定的科研意义.

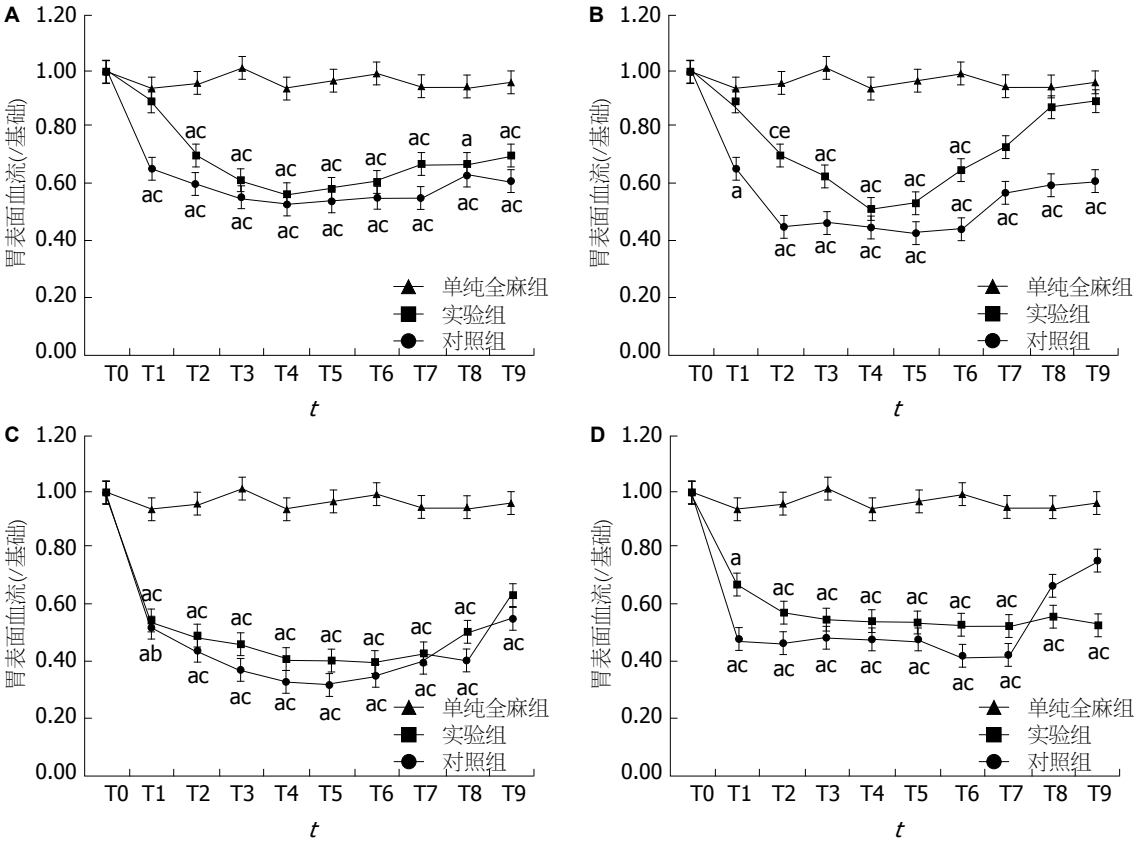


图 1 TEAS复合药物全麻行控制性降压后胃血流的变化. A: 降压至60%水平; B: 降压至50%水平; C: 降压至40%水平; D: 降压至30%水平; $^{a}P<0.05$ *vs* 同组基础水平(T0), $^{c}P<0.05$ *vs* 同期单纯全麻组; $^{e}P<0.05$ *vs* 同期相应对照组.

目标低血压维持10 min至血压回升25 min(T2-T7)时, 两控压组胃血流仍显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$); 但在此阶段, 实验组胃血流较对照组相比维持较高水平, 在血压回升60 min时(T8), 与对照组相比, 实验组胃血流趋势略有下降, 但两组间相比无显著统计学差异($P>0.05$); 在血压回升结束(T9)时, 对照组胃血流仍显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$), 而实验组未明显降低(图1C).

30%水平, 在行控制性降压至目标低血压水平(T1)时, 两控压组胃血流均显著低于其基础水平($P<0.05$), 但与同期单纯全麻组相比, 实验组胃血流明显降低($P<0.05$), 而对照组未明显降低, 在行控制性降压至目标低血压维持10 min至血压回升25 min(T2-T7)时, 两控压组胃血流仍显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$); 在此阶段, 实验组胃血流较对照组相比下降趋势更明显, 但两组间各相应时间点比较无显著统计学差异($P>0.05$), 在血压回升60 min至回升结束(T8-T9)阶段, 与对照组相比, 实验组胃血流有明显上升趋势, 且已基本恢复至基础水平和同期单纯全麻组水平, 而对照组胃血流仍显著低于其基础水平和同期单纯全麻组水平($P<0.05$, 图1D). 激光多普勒组织血流仪的动态监测图像如图2所示.

3 讨论

控制性降压是指在全麻手术期间, 在保证重要脏器氧供情况下, 采用降压药物与技术等方法, 人为地将平均动脉血压减低并维持一定水平, 从而使手术视野出血量减少, 不致有重要器官的缺血缺氧性损害, 终止降压后血压可以迅速恢复至正常水平, 不产生永久性器官损害[14]. 长期以来, 人们对控制性降压的安全性仅考虑到心[15,16]、脑[17]、肝[18]、肾[19]等重要脏器的血供, 而忽视了对胃肠道功能的保护. 已有研究显示, 当组织缺氧时胃肠道黏膜最先受累, 而当机体在缺氧状态改善后, 胃肠道黏膜的缺氧在最后才得到缓解[20,21]. 胃肠道血管的自身调节能力较差, 血液循环的调控较困难. 肠黏膜是肠道乃至整个集体代谢最活跃的部位, 最易受缺血、再灌注等病理因素影响, 且复苏时恢复最迟, 导致肠黏膜屏障功能受损[22].

胃肠道是全身储血量最大的器官, 占心输出量的20%-30%, 与脑、肾比较, 其血管的自动调

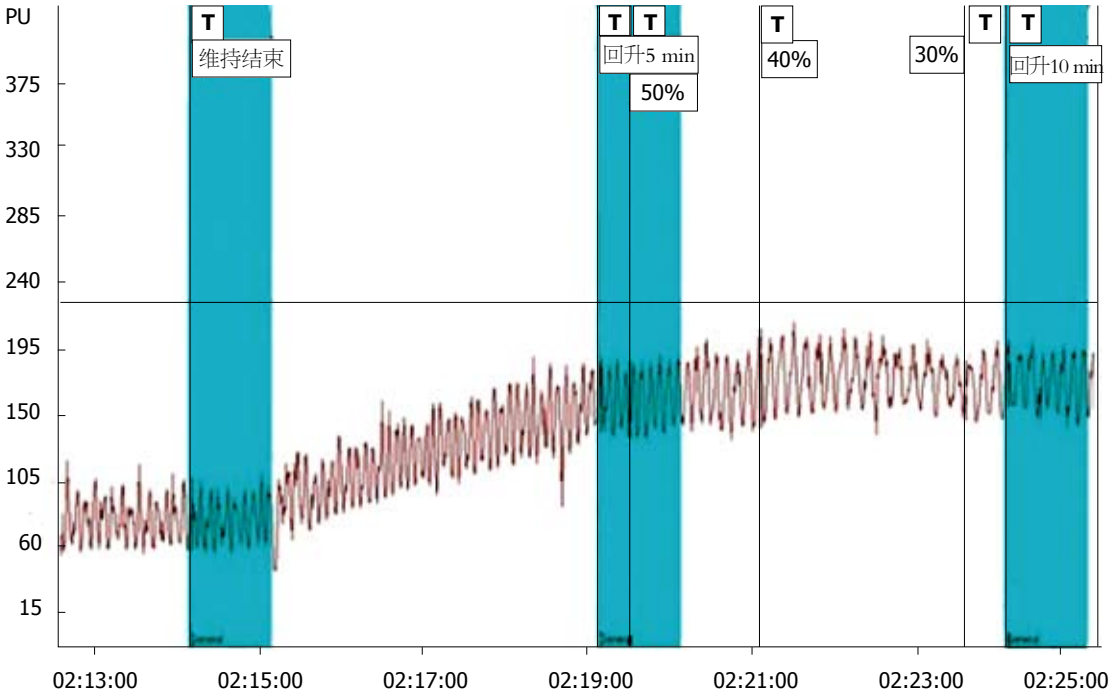


图 2 激光多普勒组织血流仪胃血流适时监测页面. T: 多普勒血流仪在实验过程中的即刻标记; 50%、40%、30%: 犬MAP在此时间点恢复至基础MAP水平的百分比; 蓝色部分: 胃血流在此时间点前后1 min内的平均值.

节功能极为微弱, 血压下降后血流重新分布以维持心、脑、肾等生命器官的灌注和供氧. 故当机体缺血缺氧时胃肠道最先受累[23]. 控制性降压具有低灌注的特点, 易导致重要脏器的缺氧、缺血损伤, 内脏组织器官缺血发生的早期, 许多器官没有明显的临床表现, 甚至可能在达到不可逆损害之前都不出现明显的临床症状[24], 因此, 仅根据临床表现难以发现其缺血存在. 有研究表明, 胃黏膜也是全身缺血休克血液代偿的主要器官, 其毛细血管床丰富, 但黏膜下毛细血管前动脉的并联结构易导致黏膜层的缺血及再灌注后无复流的发生[25]. 本实验发现, 不论行控制性降压至何种水平, 在血压回升结束时, 各控压组的胃血流均未完全恢复到原始水平, 当然, TEAS组的胃血流水平明显好于非TEAS组, 也验证了本实验结果与以往的研究报道一致.

到目前为止, 控制性降压的安全下限仍存在争议[26,27]. 控制性降压实施中首先需要明确降低动脉血压的水平, 多数文献认为降压幅度应掌握在基础血压的30%左右[28]. 有研究表明全身麻醉比局部麻醉出血多, 但在全身麻醉时将平均降到50-60 mmHg, 这样能降低血管内的张力, 减少出血, 手术视野清晰, 提高手术的精确度, 减少神经及血管的损伤, 有利于手术的操作, 减轻水肿程度, 伤口愈合快. 根据心脑肾等重要脏器对缺血缺氧的耐受情况, 目前公认的控制性低血压安全低限平均动脉压是50-55 mmHg[29], 但根据个体差异理想的低血压水平取决于年龄、身体状况、患者体位和手术的要求[30]. 这也与本实验的研究结果一致.

本实验发现, 在轻度控压(60%、50%)时, TEAS能有效减缓胃血流的下降, 尤其在控制性降压至基础MAP的50%水平时. 在控制性降压全程中, 与单纯药物全麻行控制性降压相比, TEAS均能使胃血流维持较高水平, 保护作用明显. 但在重度控压时(40%、30%)时, 控制性降压维持阶段以及血压回升早期, TEAS的保护效应不明显, 甚至在30%水平时出现负效应, 但在血压回升后期及回升结束时能促使胃血流的较快恢复. 可见, 在行控制性降压至基础MAP的50%水平时, TEAS的胃保护效应体现最为明显.

4 参考文献

1 黄艳红. 对针刺麻醉机理研究的回顾与反思–韩济生院士访谈录. 中国科技史杂志 2005; 26: 155-166
2 秦必光, 胡北喜, 张兰英. 中国近10年针刺复合麻醉临床研究概况. 针刺研究 2003; 28: 303-306
3 方剑乔, 陈云飞, 刘元亮. 经皮神经电刺激疗法镇痛的作用途径探讨. 浙江中医学院学报 1999; 23: 52-54
4 Saghaei M, Ahmadi A, Rezvani M. Clinical trial of nitroglycerin-induced controlled hypotension with or without acupoint electrical stimulation in microscopic middle ear surgery under general anesthesia with halothane. *Acta Anaesthesiol Taiwan* 2005; 43: 135-139
5 区锦燕, 洪海, 王文兰, 游玉媛. 经皮穴位电刺激与瑞芬太尼复合麻醉疗效观察. 中国针灸 2008; 28:

826-828
6 陈建良, 何升学, 吕文, 吴耀晨, 郭继龙, 骆均梵, 何爽. 针刺在开颅术中脑保护作用的临床研究. 中国针灸 2003; 23: 321-324
7 丁敏, 王艳君, 赵亚萍. 药氧针综合疗法临床应用与研究进展. 现代中西医结合杂志 2006; 15: 2292-2293
8 黎喜平, 严洁. 针灸对胃黏膜损伤保护作用机制的研究进展. 针刺研究 2005; 30: 60-63
9 王强, 毛利民, 韩济生. 电针镇痛与经皮电刺激镇痛的比较. 北京大学学报(医学版) 1990; 22: 430
10 谢文霞, 王均炉. 经皮穴位电刺激配合全麻行异氟醚控制性降压的可行性研究. 针刺研究 2005; 30: 3-8
11 Lessard MR, Trépanier CA, Baribault JP, Brochu JG, Brousseau CA, Coté JJ, Denault PH. Isoflurane-induced hypotension in orthognathic surgery. *Anesth Analg* 1989; 69: 379-383
12 Dolman RM, Bentley KC, Head TW, English M. The effect of hypotensive anesthesia on blood loss and operative time during Le Fort I osteotomies. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 834-839; discussion 840
13 王风学, 张铁铮, 周锦, 姚婧. 胃张力计法与胃管法检测Phi的相关性. 中华麻醉学杂志 2000; 20: 21-23
14 陈伯奎. 现代麻醉学. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1689-1708
15 邓硕曾. 应激与无应激麻醉. 临床麻醉学杂志 2003; 19: 574-575
16 吴韬, 王英伟, 尤新民, 金熊元. 钙拮抗剂复合异丙酚术中控制性降压的疗效观察. 解放军医学杂志 2006; 31: 370-371
17 林洪启, 韩冬梅, 孟凡民. 全髋置换术中控制性降压对内脏灌注的影响. 中华麻醉学杂志 2005; 25: 16-17
18 李小刚, 吕新生. 肝脏缺血再灌注损伤的保护机制. 中国现代医学杂志 2000; 10: 31-32
19 安刚, 薛富善. 现代麻醉学技术. 北京: 科学技术文献出版社, 1999: 467-475
20 Calvet X, Baigorri F, Duarte M, Joseph D, Saura P, Mas A, Royo C, Artigas A. Effect of sucralfate on gastric intramucosal pH in critically ill patients. *Intensive Care Med* 1997; 23: 738-742
21 Taylor DE, Gutierrez G. Tonometry. A review of clinical studies. *Crit Care Clin* 1996; 12: 1007-1018
22 贾一帆, 任汉琳, 夏中元, 黄赐雄. 参附注射液对肠缺血再灌注时大鼠肾组织iNOS表达的影响. 中国中医急症 2007; 16: 322-324
23 阮净, 张淑文, 袁振铎, 靳红, 王华, 张宝红, 纪华, 罗薇. 动脉血pH和二氧化碳分压差与胃黏膜pH监测组织氧合相关性的实验研究. 中国危重病急救医学 2000; 12: 109-112
24 葛衡江, 刘怀琼. 组织$PaCO_2$测量的临床应用. 国外医学•麻醉学与复苏分册 1999; 20: 280-281
25 李兆申, 湛先保, 许国铭. 胃黏膜损伤与保护−基础与临床. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 287-289
26 McDowall DG. Induced hypotension and brain ischaemia. *Br J Anaesth* 1985; 57: 110-119
27 Dong WK, Bledsoe SW, Eng DY, Heavner JE, Shaw CM, Hornbein TF, Anderson JL. Profound arterial hypotension in dogs: brain electrical activity and organ integrity. *Anesthesiology* 1983; 58: 61-71
28 徐启明. 临床麻醉学. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 11
29 Ducati A, Landi A, Cenzato M, Fava E, Rampini P, Giovanelli M, Villani R. Monitoring of brain function by means of evoked potentials in cerebral aneurysm surgery. *Acta Neurochir Suppl* (Wien) 1988; 42: 8-13
30 王宗峰, 张志莉, 李建东, 李剑弋. 控制性降压对鼻内镜手术视野及脑血流变化的影响. 山东大学耳鼻喉眼学报 2008; 22: 239-241

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 907-915
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

臭氧对高脂喂养诱导新西兰兔非酒精性脂肪性肝炎的防治作用

陈 兰, 朱新生, 桑 伟, 希尔娜依•阿不都黑力力, 范晓棠, 何方平

陈兰, 希尔娜依・阿不都黑力力, 范晓棠, 何方平, 新疆医科大学第一附属医院肝病科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011
朱新生, 新疆医科大学第六附属医院影像科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830002
桑伟, 新疆医科大学第一附属医院病理科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011
陈兰, 硕士, 主要从事代谢性肝脏病和动脉粥样硬化的基础研究.
国家自然科学基金资助项目, No. C030107/30760220
新疆维吾尔自治区科技计划基金资助项目, No. 201141137
新疆医科大学第一附属医院科研奖励基金资助项目, No. 2011YFY14
作者贡献分布: 课题设计由何方平完成; 研究过程操作由陈兰完成; 陈兰与何方平完成主要数据统计分析及撰写; 朱新生负责指导臭氧分子物理特性分析和治疗构思; 桑伟负责病理结果阅读及分析; 希尔娜依・阿不都黑力力与范晓棠指导文章撰写.
通讯作者: 何方平, 教授, 主任医师, 博士生导师, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市鲤鱼山南路137号, 新疆医科大学第一附属医院肝病科. hefp@sina.com
电话: 0991-4366305
收稿日期: 2012-01-12 修回日期: 2012-02-16
接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-04-18

Protective and therapeutic effect of ozone on diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rabbits

Lan Chen, Xin-Sheng Zhu, Wei Sang, Xiernayi·Abuduhelili, Xiao-Tang Fan, Fang-Ping He

Chen Lan, Xiernayi·Abuduhelili, Xiao-Tang Fan, Fang-Ping He, Department of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Xin-Sheng Zhu, Department of Imaging Medicine, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Wei Sang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. C030107/30760220; the Scientific and Technological Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 201141137; and the Scientific Research Award Fund of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, No. 2011YFY14
Correspondence to: He-Fang Ping, Professor, Chief Physician, Department of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. hefp@sina.com
Received: 2012-01-12 Revised: 2012-02-16
Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-04-18

Abstract

AIM: To assess whether ozone exerts a protective and therapeutic effect on inflammatory injury in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and atherosclerosis in rabbits.

METHODS: Twenty-four male New Zealand rabbits were randomly divided into three groups: model group (n = 10), ozone group (n = 4), and pravastatin plus aspirin group (n = 10). The experimental duration is 12 weeks. Rabbits were weighed once per week. Rabbits of all groups were given a high fat diet, and the ozone group and pravastatin plus aspirin group were additionally given ozone and pravastatin plus aspirin from the second week to the end of the experiment, respectively. The intimal-medial thickness (IMT) of the carotid artery and abdominal aorta was measured by ultrasound at weeks 2, 5, 8 and 12. HE staining was used to examine pathological changes in the carotid artery, aorta, liver, heart and kidney during the formation of NAFLD and AS. The contents of serum TC, LDL, HDL, ALT, γ-GT, Cr and UA were determined. ELISA was used to determine the changes in serum contents of 8-OHdG, TRX, 4-HNE, 8-iso-PGF2a, LEP, ADPN, FFA, ET, IL-6, TNF-α, MDA, MCP-1, hs-CRP, NOS, NO, GSH, reduced glutathione and GSH-Px.

RESULTS: At the end of the experiment, intimal thickening was observed, which suggests that nonalcoholic steatohepatitis was induced successfully. The body weight of rabbits in the ozone group was significantly lower than that in other groups. The percentage of area of aortic lipid deposition in the intima was statistically significant among the three groups (P = 0.037, P < 0.05), but no statistically significant difference was found in the thickness of lipid deposition (P > 0.05). The degree of balloon-like degeneration in the liver differed significantly among the three groups (P < 0.05); however, the degree of hepatic steatosis showed no statistically significant difference (P > 0.05). The degree of lipid deposition in the heart and lipid degeneration of tubular epithelial cells in the kidney showed no statistically significant difference among differ-

■背景资料
非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)与动脉粥样硬化进展的相关性是目前国际研究热点领域, 但临床缺乏有效干预手段.

■同行评议者
高泽立, 副教授, 周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院

■研发前沿
NAFLD对于肝脏本身的危害性已经得到认同，而与心血管疾病之间的相关性正日益被重视. 如何预防以及阻止NAFLD患者发生动脉硬化具有巨大应用价值.

ent groups. Compared to the model group, serum levels of LEP, ADPN, IL-6, TNF-α, MCP-1, hs-CRP, NOS, TRX, MDA, 4-HNE and 8-iso-PGF2a significantly increased and those of NO and reduced glutathione content decreased in the ozone group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Ozone reduces inflammatory injury in nonalcoholic steatohepatitis and may be useful in preventing atherosclerosis. Ozone as an antioxidant does not cause visible damage to the liver, kidney and heart. Ozone can improve serum levels of inflammatory cytokines which are involved in oxidative stress and lipid peroxidation.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Nonalcoholic steatohepatitis; Atherosclerosis; Ozone

Chen L, Zhu XS, Sang W, Abuduhelili X, Fan XT, He FP. Protective and therapeutic effect of ozone on diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rabbits. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 907-915

摘要

目的: 研究臭氧对非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)炎症水平的防治作用及安全性评估.

方法: 24只♂新西兰兔分为3组: 模型组10只, 臭氧组4只, 普拉固加阿司匹林组10只. 实验时间12 wk, 每周称量1次体质量. 超声检测第2周、第5周、第8周及第12周的颈总动脉和腹主动脉内膜-中层厚度(intimal-medial thickness, IMT). 病理观察颈总动脉、主动脉、肝、心及肾脏病理变化. 检测血清生化、血脂、肌酐和尿酸水平. ELISA测定血清8-OHdG、TRX、4-HNE、8-iso-PGF2a、LEP、ADPN、FFA、ET、IL-6、TNF-α、MDA、MCP-1、hs-CRP、NOS、NO、GSH、reduced glutathione、GSH-Px的含量.

结果: 实验动物超声检测内膜增厚, 提示模型成功, 臭氧组体质量明显轻于其他组. 各组主动脉内膜下脂质沉积斑块大小有统计学意义($P = 0.037$, $P<0.05$), 而脂质沉积厚度各组无统计学意义. 臭氧组肝脏气球样变性程度明显轻于模型组和普拉固加阿司匹林组($P = 0.04$, $P<0.05$), 但肝脂肪变性程度3组间无统计学意义. 病理心脏脂质沉积及肾脏肾小管上皮细胞空泡变性程度均无统计学意义. 各组血清生化指标均无统计学差异($P>0.05$). 氧化应激、脂质过氧化、炎症水平相关等18个血清细胞因子检测, 与模型组相比, 臭氧组除了ET、8-OHdG、GSH、GSH-Px及FFA无统计学意义, 其余13个因子均有统计学意义($P<0.05$), 其中LEP、ADPN、IL-6、TNF-α、MCP-1、hs-CRP、NOS、TRX、MDA、4-HNE、8-iso-PGF2a水平增高, NO、reduced glutathione水平降低, 但普拉固组加阿司匹林组上述所有因子与模型组间均无统计学意义.

结论: 臭氧减轻非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)炎症的同时可改善颈总动脉、腹主动脉粥样硬化斑块面积的趋势, 未发现臭氧作为抗氧剂对肝脏、肾脏和心脏造成的病理可见损伤. 臭氧全面提高了血清中众多涉及氧化应激、脂质过氧化、炎症细胞因子水平, 其作用机制值得进一步探讨.

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 非酒精性脂肪性肝炎; 动脉粥样硬化; 臭氧

陈兰, 朱新生, 桑伟, 希尔娜依·阿不都黑力力, 范晓棠, 何方平. 臭氧对高脂喂养诱导新西兰兔非酒精性脂肪性肝炎的防治作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 907–915
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/907.asp

0 引言

我国非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)普通人群流行率达12%-18%, 低龄化趋势明显, 目前已经成为一个严重的公共卫生问题. NAFLD对于肝脏本身的危害性已经得到认同, 而与心血管疾病之间的相关性正日益被重视. 如何预防以及阻止NAFLD患者发生动脉硬化具有巨大应用价值. 最新研究表明, 在NAFLD患者中, 内皮依赖的血管扩张受损以及颈动脉内膜中层厚度增加是独立于肥胖症和其他确切危险因素之外的可靠的亚临床动脉粥样硬化指标[1]. NAFLD可导致人体内的脂代谢及慢性炎症持续等方面的异常, 促进及加速动脉粥样硬化的进程. 近年来, 医用臭氧治疗缺血性疾病的有效性和安全性虽然获得肯定, 但主流医学并未接受臭氧作为治疗药物的观点. 研究表明臭氧在肝肾损伤[2-4]、心脏缺血再灌注及移植手术[5,6]、脓毒性休克[7,8]、改善动脉硬化并下肢血栓[9-11]等外周血管阻塞性疾病[12]具有保护作用. 并且, 臭氧在急性脑缺血及视网膜缺血、黄斑变性、病毒性肝炎、慢性感染中也有治疗作用[13]. 本研究通过高脂饮食建立实验性NAFLD兔模型, 以臭氧进行干预, 普拉固加阿司匹林经

典药物治疗为对照, 从肝脏炎症水平和动脉粥样硬化程度两方面验证臭氧药用潜力, 并观察臭氧对心脏、肾脏组织学及功能的安全性探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂纯种新西兰兔子24只, 体质量1.8 kg ±0.2 kg, 购自新疆医科大学实验动物中心. 高脂饲料配制为基础饲料85%(新疆维吾尔自治区实验动物医学中心), 猪油8%(市售板油自制), 胆固醇2%(Amresco进口分装), 蛋黄粉5%(Amresco进口分装). 高压臭氧是德国HERRMANN APPARA TEBAU GmbH产生的氧气与臭氧的混合气体, 市售拜耳阿司匹林肠溶片和施贵宝普伐他汀钠片. 血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、谷丙转氨酶(alanineaminotransferase, ALT)、γ-谷氨酰氨基转移酶(γ-glutamine-transferase, γ-GT)、肌酐(creatinine, Cr)和尿酸(uric acid, UA)检测试剂盒购自深圳迈瑞生物医疗股份有限公司. 8羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-deoxyguanosine, 8-OHdG)、硫氧还原蛋白(thioredoxin, TRX)、4-羟基壬稀酸(4-hydroxynonenal, 4-HNE)、8-异构前列腺素F2a(8-Iosmerie Porastglnadin-2a, 8-iso-PGF2a)、瘦素(leptin, LEP)、脂联素(adiponectin, ADPN)、游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)、内毒素(endotoxin, ET)、白介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)、一氧化氮合成酶(nitricoxide synthase, NOS)、一氧化氮(nitricoxide, NO)、谷胱甘肽(glutathione, GSH), 还原型谷胱甘肽(reduced glutathione form)及谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)的ELISA试剂盒为美国R&D公司进口分装.

1.2 方法

1.2.1 分组及干预: 适应性喂养2 wk后随机分为3组, 模型组10只, 臭氧组4只, 普拉固加阿司匹林组10只, 共12 wk. 模型组给予高脂饲料, 臭氧组高脂喂养同时给予臭氧, 第2周开始臭氧经直肠灌注[40 μg/(mL·kg)], 每周2次, 普拉固加阿司匹林组[普拉固5 mg/(kg·d), 阿司匹林12 mg/(kg·d)]高脂喂养同时给予不同干预, 高脂饲料. 整个实验期间由专业饲养员饲养于兔饲养室, 所有实验动物均单笼饲养, 饮水不限.

1.2.2 取材: 实验动物处理及标本收集由专业兽医按规程操作. 心脏采血离心15 min, -80 ℃冰箱保存. 处死动物, 心脏、肝脏右叶、右肾上极约1 cm×1 cm大小各脏器同一部位取材, 10%甲醛溶液固定, 常规病理学HE染色.

1.2.3 观察指标及检测: (1)实验过程中每周称重1次; (2)测量颈总和腹主动脉内膜中层厚度: 各组分别于第2周、第5周、第8周、第12周检测颈总动脉和腹主动脉的内膜-中层厚度(intimal-medial thickness, IMT). 使用多普勒超声诊断仪(SONOS5500型), 由同一超声专业医师盲法检测并记录数值; (3)血清生化: 测定血清TC、LDL、HDL、ALT、γ-GT、Cr、UA的含量. 采集的血液标本送交新疆医科大学第一附属医院医学研究中心实验动物科学研究部盲法完成; (4)组织学: 常规标本处理, HE染色, 观察颈总动脉、主动脉、肝、心及肾脏病理变化. 其中肝细胞脂肪变性分度标准为: 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2006-02修订); 肝气球样变性分度标准为: 轻度, <30%肝细胞水样变; 中度, 30%-70%肝细胞水样变; 重度, >70%肝细胞气球样变; (5)血清细胞因子检测: 采用ELISA法复孔检测8-OHdG、TRX、4-HNE、8-iso-PGF2a、LEP、ADPN、FFA、ET、IL-6、TNF-α、MDA、MCP-1、hs-CRP、NOS、NO、GSH、reduced glutathione、GSH-Px的含量, 实施盲法并严格按照试剂盒说明书的步骤操作.

统计学处理 所有统计学处理均采用SPSS17.0统计软件包进行. 计量资料采用mean ±SD, IMT及体质量采用重复测量的方差分析, 等级资料采用秩和检验, 多组间均数的总体比较方差齐采用单因素方差分析, 不满足方差分析条件时用调整检验水准的秩和检验. 所有数据进行方差齐性检验及正态性检验, 检验水准α = 0.05, 以P<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 体质量变化 臭氧组体质量显著轻于其他组(表1). 其中分组因素, 模型组与臭氧组(P = 0.026)和臭氧组与普拉固加阿司匹林组(P = 0.007)均有统计学意义(P<0.05), 但普拉固加阿司匹林组和模型组间体质量无统计学意义(P>0.05). 各组的体质量在实验前、4 wk、8 wk、12 wk这4个不同时间点因素上均有统计学意义(P = 0.000, P<0.05).

■**相关报道**
最新研究表明, 在NAFLD患者中, 内皮依赖的血管扩张受损以及颈动脉内膜中层厚度增加是独立于肥胖症和其他确切的危险因素之外的可靠的亚临床动脉粥样硬化指标.

■**创新盘点**
基于医用臭氧作用机制和代谢性慢性炎症发病机制而在肝脏炎症阻断方面进行该项原创性探索，具有明确的应用前景.

表 1 各组体质量变化(kg)

分组	*n*	0 d	4 wk	8 wk	12 wk
模型组	8	1.84 ± 0.16	3.14 ± 0.34[a]	3.45 ± 0.29[ac]	3.56 ± 0.25[ace]
普拉固加阿司匹林组	8	1.89 ± 0.18	3.15 ± 0.38[a]	3.56 ± 0.29[ac]	3.70 ± 0.37[ace]
臭氧组	4	1.88 ± 0.05	2.63 ± 0.29	3.00 ± 0.48	3.23 ± 0.22

[a]*P*<0.05 *vs* 臭氧组0 d; [c]*P*<0.05 *vs* 臭氧组4 wk; [e]*P*<0.05 *vs* 臭氧组8 wk.

表 2 各组不同时间兔颈总动脉及腹主动脉IMT(μm)

分组	*n*	部位	IMT			
			2 wk	5 wk	8 wk	12 wk
模型组	8	颈总动脉	203.80 ± 14.08	302.50 ± 29.64	311.30 ± 9.91	282.50 ± 40.62
		腹主动脉	310.00 ± 10.69	420.00 ± 30.24	431.30 ± 28.00	387.50 ± 44.00
普拉固加阿司匹林组	8	颈总动脉	203.80 ± 29.73	318.80 ± 22.32	295.00 ± 22.04	277.50 ± 36.15
		腹主动脉	301.30 ± 36.43	441.30 ± 46.43	395.00 ± 37.03	405.00 ± 51.55
臭氧组	4	颈总动脉	212.50 ± 29.86	292.50 ± 22.17	317.50 ± 15.00	260.00 ± 27.08
		腹主动脉	337.50 ± 1500.00	445.00 ± 43.59	397.50 ± 26.30	370.00 ± 53.54

表 3 各组显微镜下主动脉弓血管壁厚度、中膜厚度及内膜下脂质沉积

分组	*n*	管壁厚度 (μm)	中膜厚度 (μm)	内膜下脂质沉积厚度 (μm)	脂质沉积占管腔大小的百分比(%)			
					<30	30–50	50–75	75–100
模型组	8	2.56 ± 0.26	1.47 ± 0.35	3.61 ± 0.99	0	4	3	1
普拉固加阿司匹林组	8	2.81 ± 0.29	1.36 ± 0.50	2.77 ± 0.85	0	1	3	4
臭氧组	4	3.73 ± 0.69	2.44 ± 0.18	3.25 ± 1.87	1	2	1	0

2.2 颈总动脉和腹主动脉IMT 在第2周、第5周臭氧组颈总动脉IMT低于模型组和普拉固加阿司匹林组($P<0.001$). 在第5周和第8周各组颈总动脉IMT无统计学意义, 其他各时间点各组颈总动脉IMT均有统计学意义($P = 0.000$, $P<0.05$). 而腹主动脉IMT除在第8周和第12周各组无统计学意义外, 其余各时间点有统计学意义($P = 0.000$, $P<0.05$, 表2).

2.3 主动脉壁、肝脏、心脏及肾脏病理学变化

2.3.1 主动脉壁厚度: 各组血管壁厚度有统计学意义($P = 0.012$), 臭氧组血管壁厚度和中膜厚度均高于模型组和普拉固加阿司匹林组($P<0.017$), 相对于模型组和普拉固加阿司匹林组, 各组脂质斑块脂质沉积百分比有统计学意义($P = 0.037$, $P<0.05$), 臭氧组脂质斑块脂质沉积占管腔大小的百分比显著性减少($P<0.05$, 图1, 表3).

2.3.2 肝脏: 臭氧组肝细胞脂肪样变性分级在F0-F2之间, 1例达F4, 脂滴大小不均一, 以小脂滴为主, 肝细胞气球样变性低于30%有3例. 普拉固加阿司匹林组肉眼观肝细胞脂肪样变分级在F2-F4之间, 4例达F4, 6例超过70%肝细胞重度气球样变性. 各组肝脂肪变性程度间无统计学意义($P = 0.185$, $P>0.05$), 臭氧组气球样变性程度均轻于模型组和普拉固加阿司匹林组($P = 0.04$, $P<0.05$, 图2, 表4).

2.3.3 肾脏: 肉眼观各组肾脏大体无明显异常, 各组肾小管上皮细胞空泡变性程度无统计学意义($P>0.05$, 图3, 表5).

2.3.4 心脏: 各组心脏病理HE染色见图4. 经统计分析, 各组心脏脂质沉积例数无统计学意义($P = 0.580$). 各组心脏脂质沉积占管腔大小的百分比及厚度均无统计学意义($P>0.05$, 图4, 表6).

2.4 血脂、肝功能及肾功能变化 模型组和臭氧组血清呈不同程度乳白色浑浊. 各组血清TC、LDL及HDL-C含量, 肝功能的指标ALT和γ-GT, 肾功能的指标Cr和UA均无统计学意义($P>0.05$, 表7).

2.5 氧化应激、脂质过氧化、炎症水平相关细

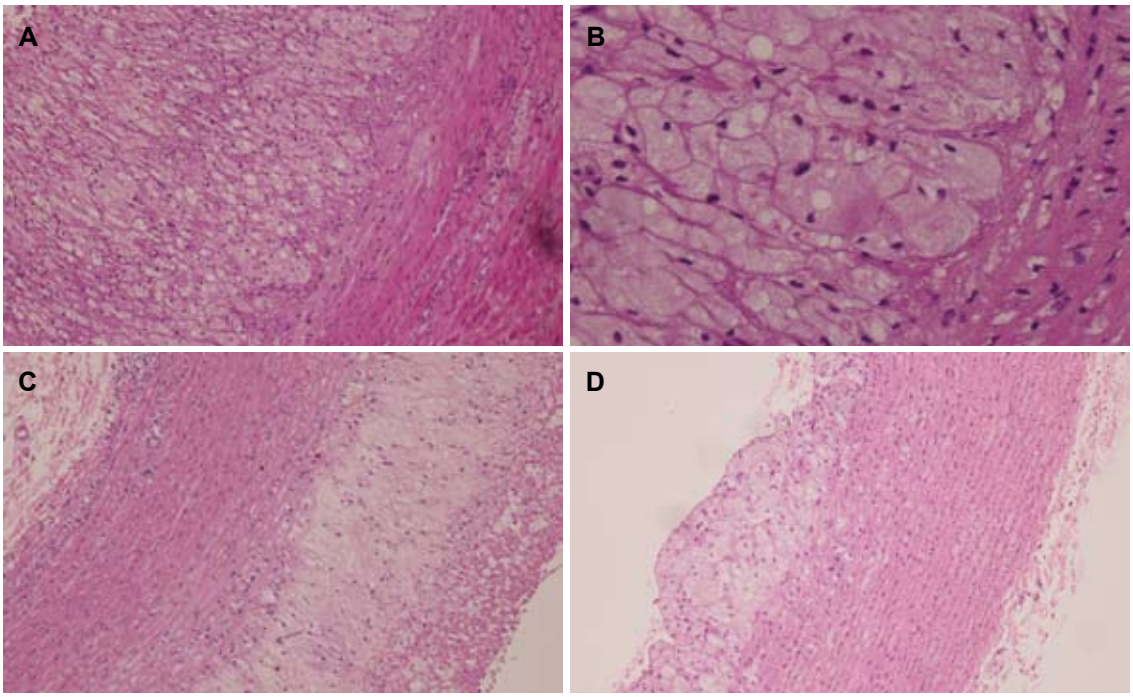


图 1 各组主动脉壁病理改变. A: 模型组(×100); B: 模型组(×400); C: 普拉固加阿司匹林组(×100); D: 臭氧组(×100).

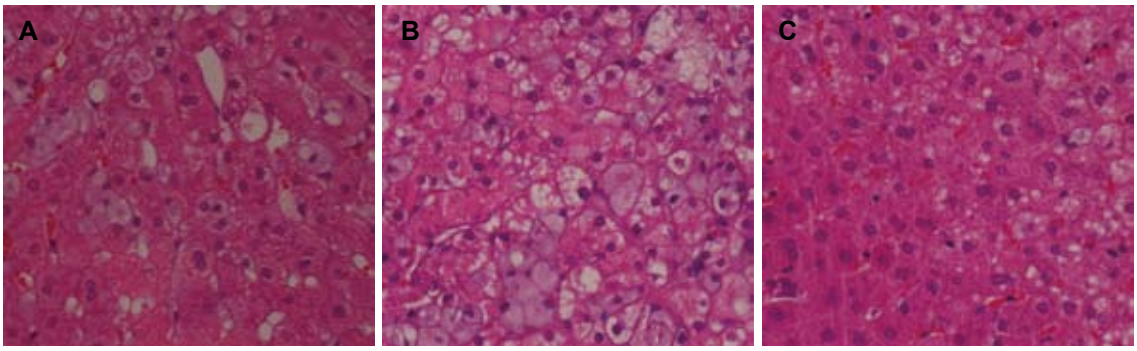


图 2 光镜下各组肝细胞病理改变(×400). A: 模型组; B: 普拉固加阿司匹林组; C: 臭氧组.

表 4 各组肝脏脂肪变性及气球样变性程度

分组	*n*	脂肪变性					*P*值	气球样变性			*P*值
		F0	F1	F2	F3	F4		轻度<30%	中度30%–50%	重度>75%	
模型组	8	0	2	2	2	2	0.185	2	4	2	0.040
普拉固加阿司匹林组	8	0	0	2	2	4		0	2	6	
臭氧组	4	1	1	1	0	1		3	0	1	

表 5 各组肾小管上皮细胞空泡变性程度

分组	*n*	0%	5%	5%–30%	30%–50%	50%–75%	>75%
模型组	8	0	3	5	0	0	0
臭氧组	4	0	3	0	0	1	0
普拉固加阿司匹林组	8	1	6	1	0	0	0

胞因子变化 与模型组相比, 臭氧显著提高了 LEP、ADPN、IL-6、TNF-α、MCP-1、hs-CRP、

■同行评价
本实验紧扣当前脂肪肝研究热点, 从动物模型建立到组织学形态观察, 从肝功能到细胞因子水平, 全面观察了臭氧对高脂喂养诱导新西兰兔NAFLD的作用, 具有较好的指导意义和参考价值.

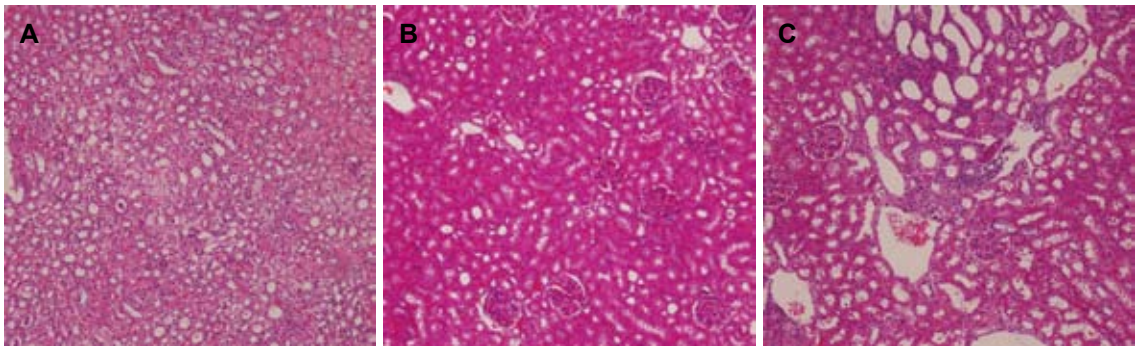


图 3 光镜下各组肾脏病理改变(×100). A: 模型组; B: 普拉固加阿司匹林组; C: 臭氧组.

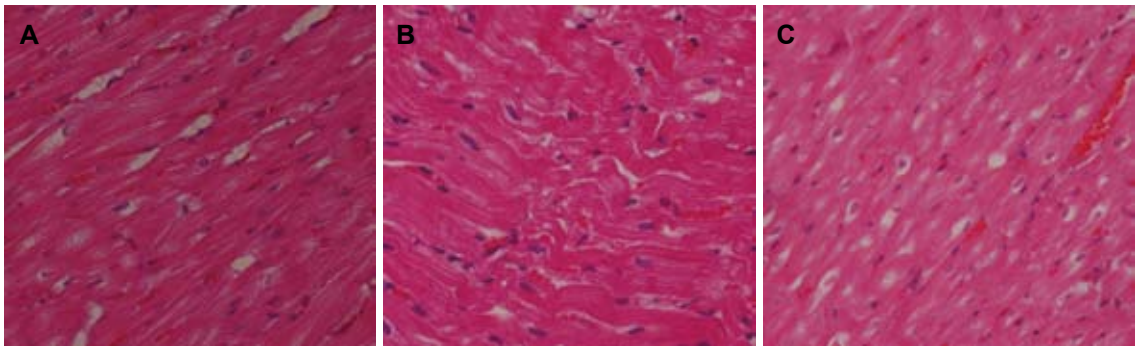


图 4 光镜下各组心脏病理改变(×400). A: 模型组; B: 普拉固加阿司匹林组; C: 臭氧组.

表 6 各组心脏脂质沉积厚度及沉积所占大小程度的变化

分组	*n*	无沉积	有沉积					
			小计	脂质沉积占管腔大小的百分比				脂质沉积厚度
				<30%	30%–50%	50%–75%	75%–100%	
模型组	7	4	3	0	0	1	2	0.400 ± 0.170
臭氧组	4	1	3	0	1	0	2	0.661 ± 0.150
普拉固加阿司匹林组	6	3	3	0	0	2	1	0.300 ± 0.200

表 7 各组血脂、肝功能和肾功变化

指标	模型组(n = 8)	臭氧组(n = 4)	普拉固加阿司匹林组(n = 8)
TC	52.74 ± 10.98	46.00 ± 19.43	55.67 ± 17.14
HDL	4.52 ± 1.57	4.19 ± 1.15	5.11 ± 1.45
LDL	32.39 ± 8.20	30.19 ± 10.14	33.74 ± 8.49
ALT	49.13 ± 35.90	49.70 ± 19.79	49.97 ± 29.49
r–GT	40.03 ± 18.93	40.97 ± 26.94	49.89 ± 20.48
Cr	202.21 ± 83.44	130.30 ± 45.19	274.52 ± 224.59
UA	575.69 ± 492.13	541.63 ± 863.54	651.67 ± 742.02

NOS、TRX、MDA、4-HNE、8-iso-PGF2a水平, 降低了NO、还原型谷胱甘肽含量(P<0.05); 但对ET、8-OHdG、GSH、GSH-Px及FFA含量无影响, 统计学无意义(表8).

3 讨论

NAFLD是目前全世界范围内高流行肝脏疾病, NAFLD肝内慢性炎症促进动脉粥样硬化发生发展, 与快速进展型动脉粥样硬化密切相关.

表 8 各组氧化应激、脂质过氧化、炎症水平相关细胞因子的改变

分类	因子	模型组(n = 8)	臭氧组(n = 4)	普拉固加阿司匹林组(n = 8)
DNA氧化损伤标志物	8-OHdG(μg/L)	21.34 ± 2.89	26.02 ± 2.17	20.36 ± 4.85
脂质氧化代谢产物	4-HNE(μmol/L)	17.90 ± 2.60	21.54 ± 1.02[a]	17.33 ± 2.74[c]
	8-iso-PGF2a	60.88 ± 7.03	84.41 ± 7.90[a]	59.61 ± 14.75[c]
	MDA(nmol/L)	4.49 ± 0.67	6.56 ± 0.42[a]	4.47 ± 1.18[c]
脂代谢相关因子	LEP(μg/L)	7.68 ± 0.98	9.92 ± 0.56[a]	7.21 ± 1.47[c]
	ADPN(ng/L)	433.81 ± 71.37	306.00 ± 29.16[a]	430.25 ± 60.95[c]
	FFA(μmol/L)	692.94 ± 101.18	825.00 ± 48.74	626.50 ± 124.19[c]
炎症因子	IL-6(ng/L)	58.78 ± 7.62	78.99 ± 6.08[a]	54.25 ± 12.70[c]
	ET (Eu/mL)	33.17 ± 8.12	42.95 ± 4.69	31.96 ± 11.61
	TNF-α(ng/L)	104.83 ± 17.69	146.29 ± 10.34[a]	100.61 ± 25.06[c]
	MCP-1(ng/L)	37.06 ± 4.72	51.67 ± 1.50[a]	36.33 ± 6.57[c]
	hs-CRP(mg/L)	7.36 ± 1.97	10.33 ± 1.21[a]	6.67 ± 2.13[c]
氧化应激因子	NO(μmol/L)	59.07 ± 10.53	37.70 ± 2.35[a]	69.11 ± 18.92[c]
	NOS(U/mL)	17.83 ± 3.40	23.59 ± 2.48[a]	17.36 ± 4.06[c]
	GSH(mg/L)	195.95 ± 47.83	148.18 ± 33.82	210.08 ± 48.09
	还原型GSH(mg/L)	108.01 ± 18.93	76.40 ± 9.24[a]	110.21 ± 21.75[c]
	GSH-Px(U/L)	75.55 ± 13.11	59.09 ± 6.26	74.17 ± 17.06
	TRX(ng/L)	209.89 ± 37.35	262.02 ± 16.73[a]	195.50 ± 46.89[c]

[a]P<0.05 *vs* 模型组; [c]P<0.05 *vs* 臭氧组.

Fan等[14-16]学者认为代谢性疾病尤其NAFLD的危险因素、流行病学及预后等与代谢综合征密切相关. 目前, 研究证实NAFLD与血管内皮损伤、颈动脉IMT和颈动脉斑块形成相关[17-19], 是动脉粥样硬化的一个早期标志[20]. 临床尚无治疗NAFLD的有效药物.

动脉粥样硬化发生机制在于脂质沉积刺激脂肪酸氧化, 产生大量活性氧簇, 氧化应激失衡, 启动慢性不可控炎症损伤, 发生内皮慢性损伤. 这种损伤与高血压、高胆固醇血症、高血脂、糖尿病、吸烟、免疫复合物及感染等致病因素相关, 常见于动脉分叉处或弯曲部位, 内皮损伤的后果是LDL和单核细胞在损伤部位的沉积.

临床上现有的有效阻断动脉粥样硬化的经典药物是他汀类联合阿司匹林[21], 但也仅对30%患者有效, 从动脉粥样硬化致病机制而言, 抗氧化剂的作用更值得推崇, 而临床并不具有循证医学证据的抗氧化药物可用.

本研究中模型组主动脉弓部位内膜下脂质沉积, 同时其肝细胞广泛脂肪性变伴大量气球样改变. 表明高脂饮食诱导动脉粥样硬化伴肝脏达到NASH阶段, 模型成功. 各组主动脉内膜下脂质沉积大小百分比有统计学意义(P<0.05), 而脂质沉积厚度无统计学意义. 研究者发现超声能准确测量动脉IMT, 且动脉粥样硬化时IMT的改变早于斑块的发生[22,23]. 超声检测兔颈总动脉及腹主动脉结果显示, IMT各组无差异, 仅在不同时间点有差异, 在第5周臭氧组颈总动脉IMT低于模型组和普拉固加阿司匹林组. 这提示随着病程的进展, 内膜损伤加重, IMT不断增厚. 并且, 臭氧组并未减少高脂饮食投喂量, 但臭氧组体质量却轻于模型组. 这可能与该组的瘦素水平明显高于其他两组有关, 而且, 该瘦素具有生理活性的可能性较大.

有关医用臭氧安全性研究报告比较多[24-27], 我们对肾脏、心脏的组织形态学改变以及肝肾功能的检测, 未发现臭氧治疗组组织学和生化水平的损伤证据. 该结果与Guanche等[28]研究结果一致, 甚至具有与普拉固加阿司匹林经典药物相同的安全性. Di Filippo等[29]研究也显示臭氧可保护急性心肌梗塞. 上述研究结果表明, 臭氧减轻NAFLD的炎症, 同时并未加重颈总动脉、腹主动脉IMT及相关动脉粥样硬化的进程.

在本研究中我们对臭氧作用机制做了细胞因子水平的初步探讨, 双盲法筛查了各组血清DNA氧化应激损伤标志物、脂质氧化代谢产物、脂质代谢相关的因子、炎症因子、氧化应激时体内氧化还原水平状态. 结果显示臭氧全面提升了总体的氧化应激、脂质过氧化水平, 炎症水平. Bocci等[13]发现臭氧可以提高内皮细

胞NO合成能力, 我们的研究显示NOS水平增加, 与Bocci观点一致, 但并未提高血清NO水平, 考虑与其消耗过多有关; 此外, 血清瘦素水平增加, 可能是臭氧同时减轻NAFLD的炎症损伤和动脉粥样硬化的另一个机制, 脂肪组织是瘦素分泌和作用的载体, 其分泌水平与NAFLD的发病密切相关, 生理性瘦素水平的增加可以通过抑制食欲、减少摄食、启动能量消耗和减轻体质量, 从而降低NAFLD病例的肝脂水平[30,31]; 同时, 胰岛素抵抗状态发生瘦素抵抗, 瘦素抵抗加重胰岛素抵抗. 本研究首次发现NAFLD炎症改善, 瘦素水平增加同时伴有兔体质量明显减轻, 这一系列结果提示臭氧干预组瘦素生理活性是增加的, 进一步研究明确臭氧是否改善瘦素抵抗是必要的.

该实验也存在缺陷, 臭氧剂量可能过大, 造成血液抗氧化系统物质被消耗过度. 这从NO、reduced glutathione form消耗过多可以显示; 另外, 兔的抗氧化系统与人体水平完全不同, 按照常规药物剂量转化公式折算方法, 并不适用于臭氧. 但检测结果臭氧未加重动脉粥样硬化及炎症. 臭氧是目前唯一发现会影响血清氧化应激细胞因子水平的“药物”, 臭氧改善肝脏组织学及动脉粥样硬化的机制, 目前仍不清楚其机制. 他与他汀类等经典药物作用机制不同. 这可能意味着一种新的治疗模式.

总之, 本研究主要进行了病理形态学及细胞因子氧化应激等结果的描述性报道, 原因在于该发现具有潜在的巨大的临床实用价值和意义. 尽管我们实验有很多不足之处, 本实验提示我们今后进一步探讨臭氧对NAFLD炎症阻断机制是非常必要的.

4 参考文献

1 Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 1341-1350

2 Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, Chen Z. Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2008; 581: 306-314

3 Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Martinez-Sanchez G, Re L, Giuliani A, Leon OS. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res* 2002; 45: 333-339

4 Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, Fernández OS. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver Int* 2004; 24: 55-62

5 Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpí E, Roselló-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998; 28: 768-773

6 Peralta C, Xaus C, Bartrons R, Leon OS, Gelpi E, Roselló-Catafau J. Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free Radic Res* 2000; 33: 595-605

7 Zamora ZB, Borrego A, López OY, Delgado R, González R, Menéndez S, Hernández F, Schulz S. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm* 2005; 2005: 16-22

8 Torossian A, Ruehlmann S, Eberhart L, Middeke M, Wulf H, Bauhofer A. Pre-treatment with ozonized oxygen (O3) aggravates inflammation in septic rats. *Inflamm Res* 2004; 53 Suppl 2: S122-S125

9 Hernandez. Intravenous ozone therapy on patients with heart disease to reduce blood cholesterol and anti-oxidation reaction stimulus. *FreeRadical Biology&Medicine* 1995; 1: 115-119

10 Tylicki L, Biedunkiewicz B, Nieweglowski T, Chamienia A, Slizien AD, Luty J, Lysiak-Szydlowska W, Rutkowski B. Ozonated autohemotherapy in patients on maintenance hemodialysis: influence on lipid profile and endothelium. *Artif Organs* 2004; 28: 234-237

11 Wentworth P, Nieva J, Takeuchi C, Galve R, Wentworth AD, Dilley RB, DeLaria GA, Saven A, Babior BM, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA. Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries. *Science* 2003; 302: 1053-1056

12 Giunta R, Coppola A, Luongo C, Sammartino A, Guastafierro S, Grassia A, Giunta L, Mascolo L, Tirelli A, Coppola L. Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. *Ann Hematol* 2001; 80: 745-748

13 Bocci V, Di Paolo N. Oxygen-ozone therapy in medicine: an update. *Blood Purif* 2009; 28: 373-376

14 Fan JG, Saibara T, Chitturi S, Kim BI, Sung JJ, Chutaputti A. What are the risk factors and settings for non-alcoholic fatty liver disease in Asia-Pacific? *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 794-800

15 Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol* 2009; 50: 204-210

16 Fan JG, Li F, Cai XB, Peng YD, Ao QH, Gao Y. Effects of nonalcoholic fatty liver disease on the development of metabolic disorders. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1086-1091

17 Fracanzani AL, Burdick L, Rasselli S,Pedotti P, Grigore L, Santorelli G, Valenti L, Maraschi A, Catapano A, Fargion S. 89 Risk of early atherosclerosis evaluated by carotid artery intima-media thickness in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a case control study. *Hepatology* 2005, 44: S39-S40

18 Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, Zoli M, Marchesini G. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 473-480

19 Volzke H, Robinson DM, Kleine V, Deutscher R, Hoffmann W, Ludemann J, Schminke U, Kessler

C, John U. Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1848-1853
20 Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: III27-III32
21 Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 2009; 373: 1849-1860
22 Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986; 74: 1399-1406
23 Wong M, Edelstein J, Wollman J, Bond MG. Ultrasonic-pathological comparison of the human arterial wall. Verification of intima-media thickness. *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 482-486
24 Ripamonti CI, Cislaghi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O(3)) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: Preliminary results of a phase I-II study. *Oral Oncol* 2011; 47: 185-190
25 Steppan J, Meaders T, Muto M, Murphy KJ. A meta-analysis of the effectiveness and safety of ozone treatments for herniated lumbar discs. *J Vasc Interv Radiol* 2010; 21: 534-548
26 Ragab A, Shreef E, Behiry E, Zalat S, Noaman M. Randomised, double-blinded, placebo-controlled, clinical trial of ozone therapy as treatment of sudden sensorineural hearing loss. *J Laryngol Otol* 2009; 123: 54-60
27 Anonymous. Safety of Ozone for Dental Therapy Established. *Biological Therapies in Dentistry* 2005; 21: S4
28 Guanche D, Zamora Z, Hernández F, Mena K, Alonso Y, Roda M, Gonzáles M, Gonzales R. Effect of ozone/oxygen mixture on systemic oxidative stress and organic damage. *Toxicol Mech Methods* 2010; 20: 25-30
29 Di Filippo C, Luongo M, Marfella R, Ferraraccio F, Lettieri B, Capuano A, Rossi F, D'Amico M. Oxygen/ozone protects the heart from acute myocardial infarction through local increase of eNOS activity and endothelial progenitor cells recruitment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; 382: 287-291
30 Bartek J, Bartos J, Galuska J, Galusková D, Stejskal D, Ivo K, Ehrmann J, Ehrman J, Chlup R. Expression of ob gene coding the production of the hormone leptin in hepatocytes of liver with steatosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2001; 145: 15-20
31 Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, Shulman GI. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest* 2002; 109: 1345-1350

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2011年度《世界华人消化杂志》发文情况

本刊讯 2011-01-01/2011-12-31,《世界华人消化杂志》共收到稿件1576篇, 退稿932篇, 退稿率59.13%, 发表文章644篇, 所有文章均经过编委专家同行评议. 其中, 发表述评35篇(5.43%), 基础研究135篇(20.96%), 临床研究71篇(11.02%), 焦点论坛17篇(2.64%), 文献综述111篇(17.24%), 研究快报58篇(9.01%), 临床经验189篇(29.35%), 病例报告24篇(3.73%); 文章作者分布遍及全国各地, 绝大多数来自高等院校及附属医院. 在此, 特别感谢为《世界华人消化杂志》进行同行评议的各位编委专家, 你们的同行评价对文章发表质量做出了重要贡献; 也希望各位编委踊跃为《世界华人消化杂志》继续撰写高质量的评论性文章, 为科学知识的传播做出贡献! (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 916-922
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

人羊膜脐带源性间充质干细胞对大鼠肝硬化的治疗作用

高琳琳, 关方霞, 郑鹏远, 杨 波, 迟连凯, 梁 硕, 邹润钦, 刘志强

■背景资料
肝硬化在我国为常见肝脏疾病, 严重威胁人类健康, 进入失代偿期后病情常难以逆转. 目前缺乏有效的治疗方法, 鉴于人羊膜和脐带间充质干细胞的诸多优势, 可能成为治疗肝硬化的新干细胞来源.

高琳琳, 郑鹏远, 刘志强, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014
关方霞, 迟连凯, 梁硕, 邹润钦, 郑州大学生物工程系 河南省郑州市 450001
关方霞, 河南省医学科学院 河南省郑州市 450003
杨波, 郑州大学第一附属医院神经外科 河南省郑州市 450052
高琳琳, 在读硕士, 主要从事肝病的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81071008
河南省杰出青年基金资助项目, No. 114100510005
作者贡献分布: 高琳琳、郑鹏远及关方霞对此文所作贡献均等; 此课题由高琳琳、郑鹏远及关方霞共同设计; 研究过程由高琳琳操作、迟连凯、梁硕及邹润钦协助完成; 研究所用试剂及分析工具由郑鹏远与关方霞提供; 研究平台由杨波教授提供; 数据分析由高琳琳完成; 本论文写作由高琳琳、郑鹏远、关方霞及刘志强完成.
通讯作者: 郑鹏远, 教授, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科. medp7123@126.com
电话: 0371-67781573
收稿日期: 2012-01-08 修回日期: 2012-01-20
接受日期: 2012-03-15 在线出版日期: 2012-04-18

Therapeutic effect of transplantation of human amniotic membrane- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis in rats

Lin-Lin Gao, Fang-Xia Guan, Peng-Yuan Zheng, Bo Yang, Lian-Kai Chi, Shuo Liang, Run-Qin Zou, Zhi-Qiang Liu

Lin-Lin Gao, Peng-Yuan Zheng, Zhi-Qiang Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Fang-Xia Guan, Lian-Kai Chi, Shuo Liang, Run-Qin Zou, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China
Fang-Xia Guan, Henan Academy of Medical Sciences, Zhengzhou 450003, Henan Province, China
Bo Yang, Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81071008; and the Excellent Youth Foundation of Henan Scientific Committee, No. 114100510005
Correspondence to: Peng-Yuan Zheng, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@126.com
Received: 2012-01-08 Revised: 2012-01-20
Accepted: 2012-03-15 Published online: 2012-04-18

■同行评议者
朴云峰, 教授, 吉林大学第一临床医院消化内科

Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic effect of transplantation of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells (hAM-MSCs) and human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced hepatic cirrhosis in rats.

METHODS: hAM-MSCs and hUC-MSCs were isolated and analyzed by flow cytometry for detection of expression of CD44, CD29 and CD34. Hepatic cirrhosis was induced in rats with CCl_4. At week 8, five rats were killed to conduct pathological examination to confirm successful induction of hepatic cirrhosis, and 30 rats with hepatic cirrhosis were randomly and equally divided into three groups: hAM-MSCs group, hUC-MSCs group and control group. The hAM-MSCs and hUC-MSCs groups were infused wit 2×10^6 MSCs in 2 mL of saline via the tail vein, while the control group was given equal volume of saline. Liver function was examined before cell transplantation and 4 wk after cell transplantation. HE staining and Masson dyeing were performed to observe pathological changes in the liver. The expression of alpha-smooth muscle actin (α-SMA) in the liver was determined by immunohistochemistry.

RESULTS: Both isolated hAM-MSCs and hUC-MSCs expressed CD29 and CD44, but did not express CD34. After cell transplantation, liver function parameters were markedly improved (all $P < 0.05$) and the expression of α-SMA was reduced in the hAM-MSCs and hUC-MSCs groups compared to the control group (130.6 ± 3.0, 127.0 ± 2.6 *vs* 152.2 ± 5.4, both $P < 0.05$). There were no statistically significant differences in liver function parameters and α-SMA expression between the hAM-MSCs and hUC-MSCs groups.

CONCLUSION: Transplantation of hAM-MSCs and hUC-MSCs could efficiently improve liver functions and inhibit liver fibrosis in rats.

Key Words: Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; Human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells; Transplantation; Hepatic cirrhosis

Gao LL, Guan FX, Zheng PY, Yang B, Chi LK, Liang S, Zou RQ, Liu ZQ. Therapeutic effect of transplantation of

human amniotic membrane- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 916-922

摘要

目的: 比较人脐带间充质干细胞(human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells, hAM-MSCs)和人羊膜间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)对模型大鼠肝硬化的治疗效果.

方法: 分离培养hAM-MSCs和hUC-MSCs, 流式检测CD29、CD44和CD34. CCl_4诱导大鼠肝硬化模型, 在第8周时, 杀死5只大鼠做病理检测以确诊为肝硬化. 30只成模大鼠随机分为脐带干细胞组(n = 10)、羊膜干细胞组(n = 10)和对照组(n = 10), 分别注入hAM-MSCs、hUC-MSCs 2 mL(细胞数量2×10^6)和等量生理盐水. 细胞移植前和移植4 wk后, 检测大鼠肝功能; 肝组织HE染色、Masson染色; 免疫组织化学法检测α-SMA在肝脏中的表达.

结果: 2种细胞表达CD29、CD44, 不表达CD34. 移植后, 与对照组相比, 脐带干细胞组和羊膜干细胞组ALT和AST明显降低(204.6±16.4, 195.6±21.2 *vs* 539.8±36.2; 180.1±25.2, 167.5±19.0 *vs* 337.4±23.4, P<0.05); 胶原沉积减少; 组织病理学评分有显著性差异(P<0.05); 肝脏α-SMA表达量减少(130.6±3.0, 127.0±2.6 *vs* 152.2±5.4, P<0.05). 脐带干细胞组和羊膜干细胞组的肝功能、肝组织病理学评分及肝脏α-SMA表达量均无明显差异.

结论: hAM-MSCs和hUC-MSCs能有效改善肝硬化大鼠模型的肝功能和肝硬化程度, 两者治疗效果无明显差异.

关键词: 人脐带间充质干细胞; 人羊膜间充质干细胞; 移植; 肝硬化

高琳琳, 关方霞, 郑鹏远, 杨波, 迟连凯, 梁硕, 邹润钦, 刘志强. 人羊膜脐带源性间充质干细胞对大鼠肝硬化的治疗作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 916–922

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/916.asp

0 引言

肝硬化(liver cirrhosis)是各种慢性肝病发展的晚期阶段, 原位肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)是治疗肝硬化的有效治疗方法, 但是存在供肝短缺、术后并发症、免疫排斥、高额费用及伦理道德等因素, 大部分患者不能进行有效治疗, 最终发展为肝癌或肝衰竭[1]. 近年来国内外研究的干细胞移植治疗方法具有光明前景. 目前, 已经有研究人员从人胎盘来源的脐带和羊膜中分离出间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs), 证明他们具有与骨髓间充质干细胞相似的表面标志物和多向分化潜能[2-6]. 近期发现, 脐带MSCs和羊膜MSCs能够分化为肝细胞样细胞, 移植到鼠肝硬化模型体内能够改善其肝功能和缓解肝纤维化. 胎盘是胎儿分娩后的弃物, 可以大量获取并且没有伦理道德限制, 是骨髓MSCs较好的替代物. 本研究旨在比较人脐带MSCs和人羊膜MSCs异体移植治疗CCl_4诱导的大鼠肝硬化模型的疗效差异, 旨在为提供最适宜的干细胞移植来源提供科学依据.

■研发前沿
人羊膜和脐带间充质干细胞的体内外分化和作用机制等问题是该领域的研究热点.

1 材料和方法

1.1 材料 ♀, SD大鼠35只, 胎牛血清, DMEM培养基, Ⅳ型胶原酶, CCl_4(分析纯, 浓度99.5%), 2.5 g/L胰酶消化液. 单抗CD29、CD44、CD34, 倒置相差显微镜, SP9000试剂盒.

1.2 方法

1.2.1 肝硬化大鼠模型的制备: 将CCl_4与大豆油溶液按1∶1混匀, 首次以5 mL/kg的剂量大鼠腹部皮下注射, 以后均以3 mL/kg皮下注射, 每周2次, 共注射8 wk. 8 wk后随机处死5只大鼠, 经病理切片证实成模(成模率80%).

1.2.2 人脐带MSCs的分离培养: 在无菌条件下取足月妊娠剖宫产健康胎儿的脐带, 以PBS缓冲液充分洗涤残留的血液. 将脐带剪切成约1 cm的小段, 去除脐带外膜、脐静脉(1条)和脐动脉(2条), 将剩余组织剪碎成大小约1 mm^3置于培养瓶中, 加入含体积分数为10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM/F12培养基, 放置在37 ℃、50 mL/L CO_2饱和湿度培养箱中培养. 培养瓶静置7 d左右, 细胞贴壁后换液, 此后3 d或4 d换液1次. 细胞达80%融合后用2.5 g/L的胰蛋白酶消化, 以1∶2-1∶3的比例传代培养.

1.2.3 羊膜MSCs的分离培养: 无菌条件下取足月妊娠剖宫术中的胎膜组织10 cm×10 cm, 钝性分离胎盘脐带面的羊膜, 用PBS缓冲液充分冲洗去除细胞碎片、血液. 将羊膜尽可能剪碎置于无菌的培养皿中, 加入2.5 g/L胰蛋白酶, 37 ℃消化30 min, 终止消化后用生理盐水冲洗, 再加入浓度为1.0 g/L的胶原酶Ⅳ和0.1 g/L DNA酶37 ℃消化120 min, 取出后吸取消化液分别过80、200

■相关报道
有研究发现羊膜和脐带间充质干细胞在体外能够分化为肝细胞样细胞, 移植到体内可以减轻CCl4诱导的肝纤维化大鼠模型的肝功能和纤维化程度.

不锈钢目网. 将消化下来的细胞1 000 r/min离心10 min, 台盼蓝染色, 计数活细胞, 以2×10^5/mL接种于75 mL培养瓶内, 加入含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM/F12培养液, 置于37 ℃、50 mL/L CO_2饱和湿度的孵箱内培养. 48-72 h后, 更换培养液, 弃去未贴壁的细胞, 以后每3-4 d全量换液1次. 待细胞达到80%-90%融合时用2.5 g/L的胰蛋白酶消化, 以1∶2-1∶3的比例传代培养.

1.2.4 人脐带MSCs和羊膜MSCs表面抗原分析: 待P3细胞融合至90%左右, 加0.25%胰蛋白酶消化1 min, PBS洗涤2次, 倒置显微镜下计数, 调整每个监测样本的细胞数为1×10^6, 分装至EP管中, 1 000 r/min室温离心7 min, 弃上清, 于待检测的样本中各加入90 μL PBS, 轻轻吹打成细胞悬液, 分别加入单抗CD29-PE、CD44-PE、CD34-PE及同行对照各10 μL, 充分吹打混匀, 37 ℃避光孵育30 min, 测试前再加400 μL PBS至总体积500 μL, 充分混匀, 用流式细胞仪检测CD29、CD44、CD34.

1.2.5 MSCs的移植: 成模大鼠随机分为3组: 对照组(n = 10)、脐带干细胞组(n = 10)和羊膜干细胞组(n = 10). 将第5-6代人脐带MSCs和人羊膜MSCs混悬液各2 mL(细胞数目为2×10^6)分别注入脐带干细胞组和羊膜干细胞组的大鼠尾静脉中, 生理盐水2 mL注入对照组大鼠尾静脉中.

1.2.6 肝功能的检测: 细胞移植前取大鼠尾静脉血2 mL和移植后第4周大鼠左心室采血3 mL, 分别检测谷氨酸转移酶(AST)、丙氨酸转移酶(ALT)、白蛋白(ALB)及总胆红素(TBIL)的水平.

1.2.7 肝组织HE和胶原染色: 细胞移植后4 wk处死所有大鼠, 取出肝脏, 生理盐水冲洗后观察肝硬化大体标本情况. 标本用100 g/L甲醛溶液固定72 h, 石蜡包埋切片后常规HE染色, 胶原三重染色(Masson染色)观察肝脏胶原沉积量. 光学显微镜下观察各组标本肝脏假小叶形成及肝细胞坏死情况, 参照文献[7]对纤维化程度、肝细胞坏死及脂肪变性程度进行病理分级评分: 肝细胞变性坏死程度分级: 0分为无, 1分为少量, 2分为轻度, 3分为中度, 4分为重度. 纤维化分级: 0级为正常肝脏, 1级为胶原增多而无间隔形成, 2级为不完全间隔形成, 3级为完全间隔形成(假小叶形成)但间隔较细, 4级为较厚的完全间隔形成及假小叶明显. 脂肪变性评分: 0分为无脂肪变性, 1分为有少量脂肪变细胞, 2分为脂肪变性占小叶比例<1/3, 3分为脂肪变性占小叶比例1/3-2/3, 4分为脂肪变性占小叶比例>2/3. 对病理分级评分进行统计学分析.

1.2.8 免疫组织化学检测α-平滑肌蛋白(α-SMA): 免疫组织化学采用Sp(streptavidin-perosidase)法. 将肝组织切片脱蜡脱水, PBS洗3遍, 柠檬酸抗原修复10 min. 室温3%H_2O_2封闭内源性过氧化物酶20 min. 滴加山羊血清50 μL封闭, 滴加一抗(单克隆兔抗鼠α-平滑肌蛋白, 1∶100), 4 ℃过夜. 滴加二抗, 37 ℃孵育30 min. 滴加辣根酶标记卵霉链白素, 37 ℃ 30 min. 各步之间用PBS充分洗涤. 显微镜下控制DAB显色, 自来水中止, 苏木素复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 光镜(×200)下观察, 阳性细胞核染为棕黄色. 每张切片(每例动物标本)随机选取4个视野, 每例切片共有5个数据, 用图像分析技术检测每个视野阳性细胞的积分(灰度值).

统计学处理 所有数据录入SPSS17.0统计软件包, 数据以mean±SD表示, 3组间样本采用完全随机设计两两均数比较(t检验)进行统计学分析, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 人脐带MSCs的培养生长及表型特征 人脐带MSCs培养至3 d, 有散在的细胞自组织块中游出, 培养7 d左右, 大量细胞从组织块中游出并贴壁, 大部分细胞形态呈梭形, 原代细胞培养15 d左右可达到80%-90%融合, 细胞呈平行排列或漩涡状集落生长. 传代后, 细胞增殖速度明显增快, 5-7 d即可长满培养瓶底. 多次传代后细胞形态均一, 以梭形细胞为主, 呈漩涡状生长(图1). FCM分析结果显示, 第3代人脐带MSCs表达CD44、CD29, 不表达CD34(图2).

2.2 羊膜MSCs的培养生长及表型特征 人羊膜MSCs接种24-48 h后细胞开始贴壁生长, 72 h观察, 细胞呈圆形、纤维样或小多角形, 通过全量换液逐渐去除未贴壁细胞, 10 d左右细胞可达培养瓶底面积的80%-90%融合, 细胞呈长梭形, 集落样生长, 排列紧密呈放射状或漩涡状分布. 传代后4 h后细胞基本贴壁, 7-10 d长满瓶底的80%-90%, 传至3代后, 细胞纯度好, 各代细胞形态无明显变化(图1). 流式细胞仪分析结果显示, 第3代人羊膜MSCs表达CD29、CD44, 不表达CD34(图2).

2.3 肝脏标本大体观察 移植前大鼠肝脏颜色呈暗红色, 边缘圆钝, 质地较硬, 表面粗糙, 可见大小不等的硬化结节分布. 对照组肝脏质地硬, 表面仍可见大小不等硬化结节分布; 脐带干细胞组和羊膜干细胞组肝脏边缘变钝, 表面结节均

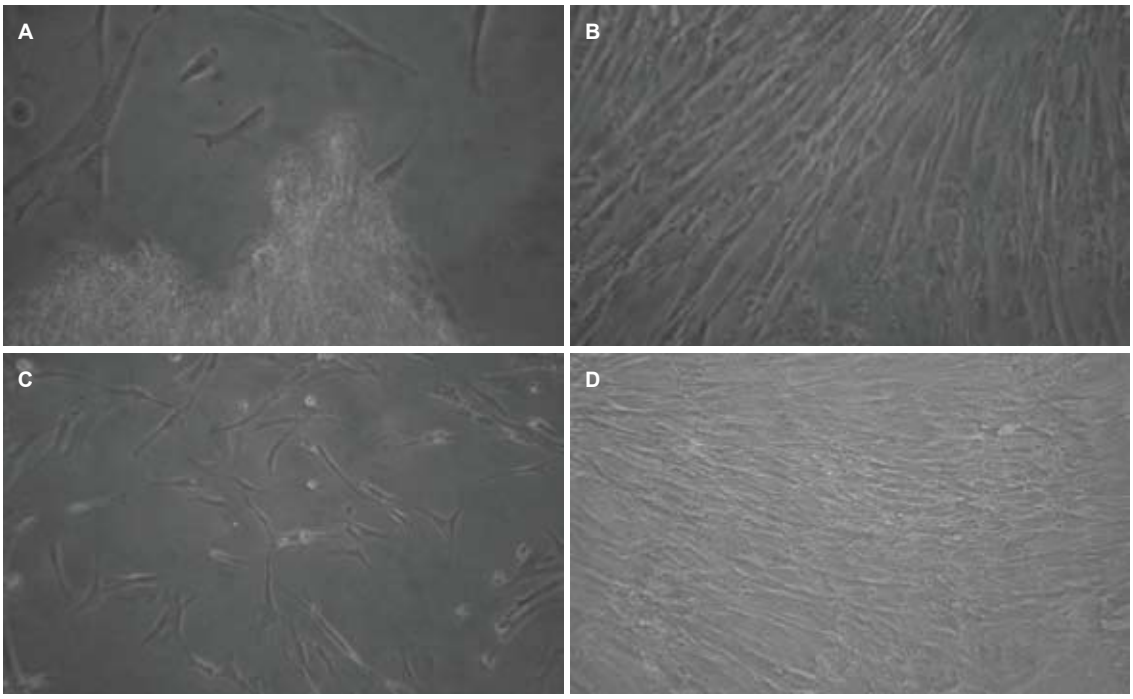


图 1 人脐带MSCs和人羊膜MSCs的细胞形态和生长情况(×100). A: 人脐带MSCs原代培养; B: 人脐带MSCs第3代; C: 人羊膜MSCs原代培养; D: 人羊膜MSCs第3代.

■创新盘点
本研究比较人羊膜和脐带间充质干细胞治疗肝硬化动物模型, 通过检测肝功能、进行病理评分及α-平滑肌蛋白检测, 比较其疗效有无差异.

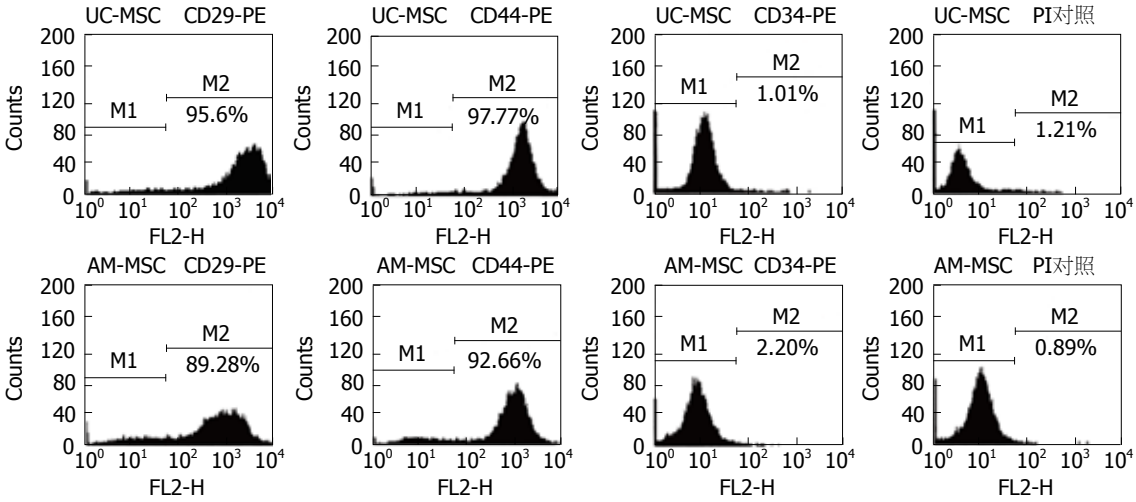


图 2 第3代人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)和人羊膜间充质干细胞(hAM-MSC)表面标志物的表达.

较对照组减少.

2.4 肝功能指标检测 细胞移植前, 脐带干细胞组、羊膜干细胞组与对照组大鼠肝功能指标AST、ALT、ALB及TBIL差异均无统计学意义(P>0.05, 未列表). 移植4 wk后, 脐带干细胞组和羊膜干细胞组分别与对照组做统计学对比, 其肝功能指标AST、ALT差异有统计学意义(P<0.05), ALB、TBIL差异无统计学意义(P>0.05); 脐带干细胞组和羊膜干细胞组大鼠肝功能指标AST、ALT、ALB、TBIL差异无统计学意义(表1).

2.5 组织病理学改变及病理评分 HE染色显示: 对照组大鼠肝脏组织切片显示重度纤维化, 纤维间隔增粗, 假小叶形成明显, 细胞脂肪样变性坏死; 脐带干细胞组大鼠肝脏轻中度纤维化, 亦可见假小叶形成, 平均视野下数量较对照组少, 肝脂肪变性较前者减轻; 羊膜干细胞组大鼠肝脏呈轻中度纤维化. Masson染色显示: 对照组可见明显的粗条状或片状染为绿色的胶原纤维, 包绕汇管区和中央静脉区; 脐带干细胞组和羊膜干细胞组大鼠肝组织内胶原纤维成细丝状, 明显少于对照组, 其中羊膜干细胞组胶原沉

■**应用要点**
本研究结果提示人羊膜和脐带间充质干细胞均可以缓解动物肝硬化程度, 两者之间疗效无明显差别, 为进一步深入研究提供初步实验基础.

表 1 细胞移植后各组大鼠肝功能指标检测结果(mean ± SD, U/L)

分组	ALT	AST	TBIL	ALB
脐带干细胞组	204.6 ± 16.4	180.1 ± 25.2	16.2 ± 1.8	21.2 ± 1.8
羊膜干细胞组	195.6 ± 21.2	167.5 ± 19.0	15.3 ± 1.3	22.1 ± 2.1
对照组	539.8 ± 36.2	337.4 ± 23.4	16.0 ± 1.6	20.7 ± 2.3

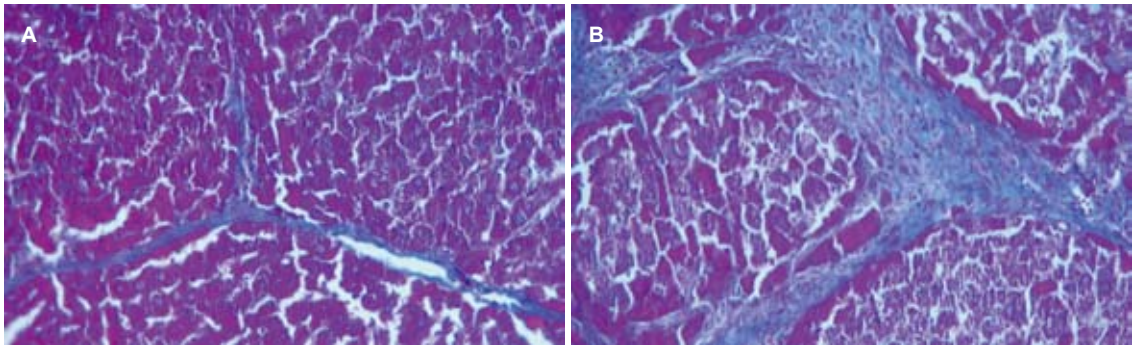


图 3 肝组织标本Masson染色镜下观察(×400). A: 脐带干细胞组; B: 对照组.

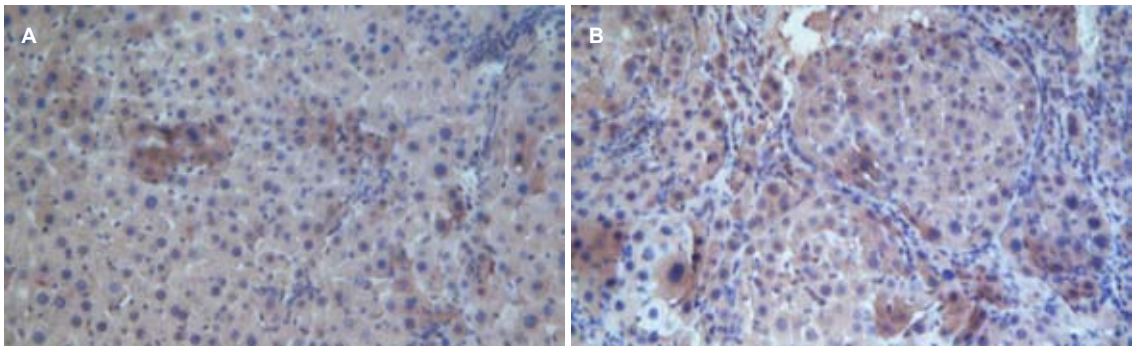


图 4 免疫组织化学分析α-SMA在肝组织标本中的表达. A: 羊膜干细胞组; B: 对照组.

积区较脐带干细胞组少(图3). 结果表明, 移植组较对照组在肝纤维化、肝细胞变性坏死及脂肪变性等方面均有不同程度改善, 组织病理学评分差异有统计学意义(P<0.05); 羊膜干细胞组和脐带干细胞组间组织病理学评分无明显差别(P>0.05, 表2).

2.6 肝组织α-SMA表达的变化 对照组α-SMA广泛分布于肝窦周围、汇管区、纤维间隔及增生的胆管周围细胞. 脐带干细胞组和羊膜干细胞组α-SMA阳性细胞的百分比减少(图4), 脐带干细胞组、羊膜干细胞组与对照组相比α-SMA表达差异有统计学意义(130.6±3.0, 127.0±2.6 *vs* 152.2±5.4, P<0.05); 脐带干细胞组和羊膜干细胞组α-SMA表达差异无统计学意义(P>0.05).

3 讨论

细胞移植(肝细胞移植或干细胞移植)作为原位肝移植过渡期治疗或替代治疗手段, 是失代偿期肝硬化患者极具潜力的治疗策略[8-11]. MSCs因其具有多向分化潜能、造血支持和促进干细胞植入、免疫调控和自我复制等特点而日益受到人们的关注[11,12]. 最早发现的骨髓MSCs已经明确具有肝源性分化和减轻肝纤维化的能力[3,11,13], 但因骨髓取材困难供者难以接受, 并且受年龄影响和容易引起病毒和细菌污染等限制了其使用.

目前研究证明脐带MSCs和羊膜MSCs具有骨髓MSCs相似的形态、免疫表型和多向分化潜能, 并表达胚胎干细胞标志如Oct4、SSEA-3、SSEA-4[2,4,6,14-19]. 本实验通过组织块法从人脐带中分离出人脐带MSCs, 采用胰酶-胶原酶二酶消化法从羊膜组织中分离出人羊膜MSCs. 流式检测分析2种细胞均高表达CD29、CD44, 而不表达CD34, 说明分离的人脐带MSCs和人羊膜MSCs纯度较高.

研究发现脐带MSCs能够在肝细胞生长因子、碱性成纤维生长因子和致瘤素M等的作用

表 2 细胞移植后各组大鼠肝组织标本病理评分 (n = 10, mean ± SD)

分组	肝纤维化	肝细胞变性坏死	脂肪变性
脐带干细胞组	2.54 ± 0.29	1.43 ± 0.22	1.60 ± 0.21
羊膜干细胞组	2.47 ± 0.23	1.40 ± 0.27	1.56 ± 0.24
对照组	3.5 ± 0.19	2.23 ± 0.34	3.53 ± 0.30

下, 分化为肝细胞样细胞(differentiated hepatocyte-like cells, DHC), DHC具有摄取LDL、合成糖原和尿素、分泌ALB等肝细胞特有的生物学功能[5,14,20-22]. 羊膜MSCs是从羊膜中胚层分化而来, 被证明比骨髓MSCs有更强的增殖能力和干细胞特征, 免疫源性低、无致瘤性, 在一定诱导因子作用下可以分化为DHC[23-25]. Tsai等[26]证明脐带MSCs移植到CCl_4诱导的肝硬化大鼠模型体内, 可以改善肝功能, 减轻肝纤维化, 移植后的脐带MSCs分散到肝组织内, 分泌各种修复肝功和促进肝再生的活性因子. Lee等[27]证明羊膜MSCs移植到CCl_4诱导肝损伤鼠体内, 可以改善肝功能, 鼠肝脏的α-SMA量和胶原沉积均减少. Zhang等[28]研究证明羊膜MSCs注入CCl_4诱导的肝纤维化鼠模型的脾内, 延缓了疾病进展并修复了肝功; 羊膜MSCs能够阻止HSC的活性; 羊膜MSCs移植可以减少肝细胞凋亡, 促进肝细胞增殖; 羊膜MSCs移植减轻肝细胞衰老; 移植的羊膜MSCs迁移到损伤肝脏中并表达人白蛋白和人甲胎蛋白.

肝纤维化主要与肝脏星状细胞的激活有关, 大量研究证实检测到α-SMA表达是肝星状细胞激活的可靠标志[29,30]. 本实验将未分化的脐带MSCs和羊膜MSCs经尾静脉移植入肝硬化大鼠模型体内, 肝脏α-SMA均减少, 说明人脐带MSCs和人羊膜MSCs移植后可以抑制肝纤维化的发展. 就脐带MSCs和羊膜MSCs的生物学特性比较有报道[2], 本试验首次比较了两种细胞治疗肝硬化模型的疗效. 两种细胞对改善肝硬化大鼠模型的肝功能、肝脏病理学评分和α-SMA水平均无明显差异. 两种细胞分别移植到大鼠体内后, 大鼠未出现排异反应, 这与以前研究的MSCs的低免疫源性相一致[12,31].

总之, 脐带和羊膜是胎儿分娩后的弃物, 可以大量获取, 伦理问题不显著, 分离培养的人脐带MSCs和人羊膜MSCs增殖能力强和免疫源性低, 使其有望成为治疗肝硬化的新的MSCs来源, 其确切疗效和可能的机制仍有待进一步探索.

志谢: 感谢郑州大学211三期工程项目干细胞研究的支持.

4 参考文献

1 Selzner N, Grant DR, Shalev I, Levy GA. The immunosuppressive pipeline: meeting unmet needs in liver transplantation. *Liver Transpl* 2010; 16: 1359-1372

2 Filioli Uranio M, Valentini L, Lange-Consiglio A, Caira M, Guaricci AC, L'Abbate A, Catacchio CR, Ventura M, Cremonesi F, Dell'Aquila ME. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Mol Reprod Dev* 2011; 78: 361-373

3 Yagi K, Kojima M, Oyagi S, Ikeda E, Hirose M, Isoda K, Kawase M, Kondoh M, Ohgushi H. [Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine]. *Yakugaku Zasshi* 2008; 128: 3-9

4 In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004; 22: 1338-1345

5 Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* 2011; 44 Suppl 1: 60-69

6 Cai J, Li W, Su H, Qin D, Yang J, Zhu F, Xu J, He W, Guo X, Labuda K, Peterbauer A, Wolbank S, Zhong M, Li Z, Wu W, So KF, Redl H, Zeng L, Esteban MA, Pei D. Generation of human induced pluripotent stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 11227-11234

7 谭国胜, 向贤宏, 于王, 范文哲, 陈伟, 杨建勇. 脂肪间质干细胞移植对大鼠肝硬化模型的治疗作用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1074-1078

8 Lanfranchi A, Porta F, Chirico G. Stem cells and the frontiers of neonatology. *Early Hum Dev* 2009; 85: S15-S18

9 Pai M, Spalding D, Xi F, Habib N. Autologous bone marrow stem cells in the treatment of chronic liver disease. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 307165

10 Sakai Y, Kaneko S. Mesenchymal stem cell therapy on murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Methods Mol Biol* 2012; 826: 217-223

11 Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl* 2010; 16: 118-129

12 Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 2011; 164: 1-8

13 Subramanian K, Owens DJ, O'Brien TD, Verfaillie CM, Hu WS. Enhanced differentiation of adult bone marrow-derived stem cells to liver lineage in aggregate culture. *Tissue Eng Part A* 2011; 17: 2331-2341

14 Liang XJ, Chen XJ, Yang DH, Huang SM, Sun GD, Chen YP. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells by hTERT gene transfection in vitro. *Cell Biol Int* 2012; 36: 215-221

15 Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2011; 7: 195-207

16 Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Cicione C, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I,

■**名词解释**
假小叶: 肝硬化时镜下可见正常肝小叶结构被破坏, 由广泛增生的纤维组织将肝细胞再生结节分割包绕成大小不等、圆形或椭圆形的肝细胞团, 称为假小叶.

■同行评价
该研究发现羊膜脐带源性间充质干细胞具有同样的增殖能力及较低的免疫原性,可成为新的间充质干细胞来源,选题新颖,设计合理,结论可靠.

de Toro FJ, Blanco FJ. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation* 2011; 81: 162-171
17 Shuang-zhi H, Ping S, Xi-ning P. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. *Chin Med Sci J* 2010; 25: 211-214
18 Manochantr S, Tantrawatpan C, Kheolamai P, U-pratya Y, Supokawej A, Issaragrisil S. Isolation, characterization and neural differentiation potential of amnion derived mesenchymal stem cells. *J Med Assoc Thai* 2010; 93 Suppl 7: S183-S191
19 Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 2009; 30: 2-10
20 Lin SZ, Chang YJ, Liu JW, Chang LF, Sun LY, Li YS, Luo GH, Liao CH, Chen PH, Chen TM, Lee RP, Yang KL, Harn HJ, Chiou TW. Transplantation of human Wharton's Jelly-derived stem cells alleviates chemically induced liver fibrosis in rats. *Cell Transplant* 2010; 19: 1451-1463
21 Campard D, Lysy PA, Najimi M, Sokal EM. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 833-848
22 Zhang YN, Lie PC, Wei X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy* 2009; 11: 548-558
23 Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res* 2010; 106: 1613-1623
24 Kita K, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Jeschke MG. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev* 2010; 19: 491-502
25 Sant'Anna LB, Cargnoni A, Ressel L, Vanosi G, Parolini O. Amniotic membrane application reduces liver fibrosis in a bile duct ligation rat model. *Cell Transplant* 2011; 20: 441-453
26 Tsai PC, Fu TW, Chen YM, Ko TL, Chen TH, Shih YH, Hung SC, Fu YS. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. *Liver Transpl* 2009; 15: 484-495
27 Lee MJ, Jung J, Na KH, Moon JS, Lee HJ, Kim JH, Kim GI, Kwon SW, Hwang SG, Kim GJ. Anti-fibrotic effect of chorionic plate-derived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl(4)-injured liver: potential application to the treatment of hepatic diseases. *J Cell Biochem* 2010; 111: 1453-1463
28 Zhang D, Jiang M, Miao D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. *PLoS One* 2011; 6: e16789
29 Szuster-Ciesielska A, Plewka K, Kandefer-Szerszeń M. Betulin, betulinic acid and butein are inhibitors of acetaldehyde-induced activation of liver stellate cells. *Pharmacol Rep* 2011; 63: 1109-1123
30 胡美迪, 郭贵海. 基于肝星状细胞的骨髓间充质干细胞治疗肝纤维化的研究现状. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2558-2562
31 Tipnis S, Viswanathan C, Majumdar AS. Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: role of B7-H1 and IDO. *Immunol Cell Biol* 2010; 88: 795-806. Epub 2010 Apr 13

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 923-929
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

低表达Smad4对肝癌细胞SMMC-7721上皮间质转化的影响

薛慧婷, 王宏刚, 黄晓丹, 沈 鹏, 季国忠

薛慧婷, 王宏刚, 黄晓丹, 沈鹏, 季国忠, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心 南京医科大学消化内镜研究所 江苏省南京市 210011
薛慧婷, 硕士, 主要从事肝癌发病机制的研究.
江苏省卫生厅科技基金资助项目, No. H201009
南京医科大学科技发展基金资助项目, No. 2010NJMUZ54
江苏省六大人才高峰基金资助项目, No. 2009041
南京市科技发展基金资助项目, No. 201104029
作者贡献分布: 此课题由薛慧婷、王宏刚、黄晓丹及季国忠设计; 实验操作由薛慧婷、王宏刚及沈鹏完成; 数据分析由薛慧婷完成; 论文写作由薛慧婷与黄晓丹完成.
通讯作者: 季国忠, 教授, 210011, 江苏省南京市下关区姜家园121号, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 南京医科大学消化内镜研究所. jgzzl@163.com
电话: 025-58509996
收稿日期: 2012-01-15 修回日期: 2012-02-15
接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-04-18

Loss of Smad4 expression inhibits epithelial-mesenchymal transition in SMMC-7721 cells

Hui-Ting Xue, Hong-Gang Wang, Xiao-Dan Huang, Peng Shen, Guo-Zhong Ji

Hui-Ting Xue, Hong-Gang Wang, Xiao-Dan Huang, Peng Shen, Guo-Zhong Ji, Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China
Sopported by: the Science and Technology Program of Health Department of Jiangsu Province, No. H201009; the Science and Technology Innovation Foundation of Nanjing Medical University, No. 2010NJMUZ054; the Six Talents Peak Foundation of Jiangsu Province, No. 2009041; and the Program of Science and Technology of Nanjing, No. 201104029
Correspondence to: Guo-Zhong Ji, Professor, Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Disease, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. jgzzl@163.com
Received: 2012-01-15 Revised: 2012-02-15
Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-04-18

Abstract

AIM: To investigate the influence of loss of Smad4 expression on TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition in the human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721.

METHODS: The influence of loss of Smad4 expression on the expression of β-catenin and Vimentin mRNAs and proteins was evaluated by RT-PCR and Western blot. Immunofluorescence was used to analyze the location and fluorescence intensity of Smad4, β-catenin, Vimentin in non-transfected SMMC-7721 cells and those transfected with Smad-specific siRNAs (RNAi-Smad4-2 and RNAi-Smad4-12) or unspecific siRNA (RNAi-NC).

RESULTS: Compared to non-transfected SMMC-7721 cells and those tranfected with RNAi-NC, the expression of β-catenin mRNA and protein remarkably increased in SMMC-7721 cells transfected with RNAi-Smad4-2 or RNAi-Smad4-12 (all $P < 0.05$). Loss of Smad4 expression promoted β-catenin nuclear translocation. Immunofluorescence assay revealed that β-catenin fluorescence was located in the nuclei of non-transfected SMMC-7721 cells and those tranfected with RNAi-NC, but in the cytoplasm of SMMC-7721 cells transfected with RNAi-Smad4-2 or RNAi-Smad4-12. On the other hand, loss of Smad4 expression down-regulated Vimentin protein expression ($P < 0.05$) and cytoplasmic fluorescence intensity, but had no significant impact on Vimentin mRNA expression in SMMC-7721 cells and those transfected with different siRNAs.

CONCLUSION: Loss of Smad4 expression regulates β-catenin and Vimentin and therefore plays an important role in inhibiting epithelial-mesenchymal transition in SMMC-7721 cells.

Key Words: Smad4; Hepatocellular carcinoma cell; Epithelial-mesenchymal transition; β-catenin; Vimentin

Xue HT, Wang HG, Huang XD, Shen P, Ji GZ. Loss of Smad4 expression inhibits epithelial-mesenchymal transition in SMMC-7721 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 923-929

摘要

目的: 探讨低表达Smad4调控上皮间质转化影响肝癌细胞(hepatocellular carcinoma cells, HCC)侵袭转移的相关机制.

方法: 采用Western blot法观察低表达Smad4对β-catenin和Vimentin总蛋白表达水平的影响; 逆转录PCR法测定低表达Smad4后, β-catenin和Vimentin mRNA表达的变化; 细胞免疫荧光

■**背景资料**
上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在胚胎发育、创口愈合和肿瘤侵袭转移中起着重要作用. Smad4是TGF-β通路的关键分子, 研究发现Smad4与多种肿瘤的侵袭转移密切相关.

■**同行评议者**
倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

■研发前沿
早期转移和复发是延长肝癌患者生存期、提高远期疗效的瓶颈问题. 肿瘤细胞通过EMT而实现转移过程, 是近年来肿瘤领域的研究热点.

法检测Smad4、β-catenin和Vimentin在肝癌细胞SMMC-7721及其转染组中的定位及荧光表达强度.

结果: 低表达Smad4后, 相较于CON组和RNAi-NC组, 在转染组RNAi-Smad4-2和RNAi-Smad4-12细胞中, β-catenin mRNA和相应总蛋白的表达水平明显增加(P<0.05), 并促使其发生了核转位的改变; 另一方面, 在RNAi-Smad4-2和RNAi-Smad4-12两转染组细胞中, Vimentin的蛋白表达水平和相应胞浆荧光的表达强度比对照组明显下调(P<0.05), 相应mRNA的表达水平在肝癌SMMC-7721细胞及其转染组无显著差异.

结论: 低表达Smad4可调控上皮间质转化相关标志物β-catenin和Vimentin的表达, 发挥抑制肝癌SMMC-7721细胞上皮间质转化的作用.

关键词: Smad4; **肝癌细胞**; **上皮间质转化**; β-catenin; Vimentin

薛慧婷, 王宏刚, 黄晓丹, 沈鹏, 季国忠. 低表达Smad4对肝癌细胞SMMC-7721上皮间质转化的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 923-929
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/923.asp

0 引言

肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 其中90%为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC). 全球每年的肝癌新发病例数为74.8万, 死亡数为69.6万[1,2]. 我国是全球肝癌发病率最高的国家, 在常见肿瘤中肝癌发病率居第2位[3,4]. HCC症状不明显, 早期诊断率较低, 5年生存率小于5%, 确诊时多数已发展为中晚期, 发生远处扩散转移[5]. 因此, 研究HCC侵袭转移的发生机制, 对改善肝癌患者预后、延长患者生存期, 具有重要的意义. 肿瘤的侵袭、转移受多种因素的调控和影响, 近几年发现上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是一个关键因素[6]. EMT是指有极性的上皮细胞失去其上皮细胞的表现型, 转化成具有活动能力的间质细胞生物学特征的过程. 他与胚胎发育、创口愈合和肿瘤侵袭转移等密切相关[7,8]. 越来越多的证据[9,10]表明TGF-β1是引发EMT的关键始动因素, 在EMT过程中发挥关键作用. TGF-β信号通路的核心是Smad4, 有研究发现在多种肿瘤中, Smad4与EMT的发生密切相关[11,12], 但两者在肝癌组织中的关系国内外尚无相关报道.

本研究拟观察在肝癌细胞SMMC-7721中, 低表达Smad4对TGF-β1诱发EMT的影响, 初步探讨低表达Smad4引起细胞迁移和侵袭能力改变的相关作用机制, 以期为进一步解释HCC的侵袭转移机制提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株SMMC-7721购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所; 小鼠抗人Smad4单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 鼠抗人Vimentin单克隆抗体购自美国abcam公司; 兔抗人β-catenin单克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 小鼠抗大鼠β-actin单克隆抗体和HRP标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗购自武汉博士德公司; 重组人TGF-β1购自美国R&D Systems公司; 山羊抗鼠/兔IgG(H&L)-FITC购自武汉博士德公司; 逆转录试剂盒购自加拿大Fermentas公司; PCR试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; TRIzol Reagent购自美国Invitrogen公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞转染: 课题组前期[13]构建的Smad4 RNA干扰(RNA interference, RNAi)慢病毒载体, 经包装、浓缩及检测病毒滴度后感染肝癌细胞SMMC-7721, 筛选出两组Smad4干扰效率高的细胞, RNAi-Smad4-2组和RNAi-Smad4-12组, 对照组为肝癌细胞CON和感染慢病毒空载体的肝癌细胞RNAi-NC.

1.2.2 细胞培养: CON组、RNAi-NC组及转染组细胞, 以含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养基, 于37 ℃、50 mL/L CO_2培养箱中培养, 胰酶消化、传代, 取对数生长期细胞实验.

1.2.3 细胞计数: 在24孔板中接种3×10^4个/孔的CON组细胞悬液, 培养至70%融合时, 用无血清的培养基同步化24 h, 分为5组, 分别用0 μg/L、1 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L的TGF-β1孵育, 0 h、24 h、48 h、72 h后分别计数.

1.2.4 Western blot检测Smad4、β-catenin和Vimentin蛋白的表达: 提取细胞总蛋白, BCA法测定各组蛋白浓度. 根据浓度上样行电泳后, 转膜至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h, 加一抗(β-actin 1∶500、Smad4 1∶300、Vimentin 1∶500、β-catenin 1∶1 000)4 ℃杂交过夜, TBST漂洗, 加二抗(1∶2 000)室温孵育2 h, TBST漂洗, 化学发光试剂检测蛋白条带, 测定各条带积分吸光度(A)值, 定量分析.

1.2.5 RT-PCR检测β-catenin和Vimentin mRNA的表达: 用PBS洗涤各组细胞3次, 每孔中加入

表 1 计数CON组在不同浓度、不同时间点TGF-β1刺激下相对前1 d的细胞增长差值(×10^4/mL)

	0 μg/L	1 μg/L	5 μg/L	10 μg/L	20 μg/L
0 h	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
24 h	5.7	8.2	15.4	22.9	18.9
48 h	13.0	15.3	19.1	26.8	17.8
72 h	5.3	6.2	9.0	11.2	8.3

1 mL TRIzol RNA提取液, 按说明书步骤提取总RNA, 紫外分光光度仪测A_{260}/A_{280}的比值, 重复3次, 计算RNA浓度. 将RNA逆转录为cDNA后进行循环扩增. PCR引物由美国Invitrogen公司上海分公司合成, 引物序列: GAPDH上游引物5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3', 下游引物5'-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3'; β-catenin上游引物5'-GCTGCTGTTTT-GTTCCGAATGT-3', 下游引物5'-GCCATTG-GCTCTGTTCTGAAGA-3'; Vimentin上游引物5'-CCAAACTTTTCCTCCCTGAACC-3', 下游引物5'-GTGATGCTGAGAAGTTTCGTTGA-3'.

反应条件均为: 95 ℃, 3 min预变性; 94 ℃, 30 s; 48 ℃, 30 s, 72 ℃, 1 min, 35个循环; 72 ℃终末延伸5 min. PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图像扫描系统成像并进行灰度扫描, 用GAPDH的表达量校正, 将两者A值的相对量进行分析, 重复3次.

1.2.6 细胞免疫荧光法检测Smad4、β-catenin和Vimentin的表达: 0.01%多聚赖氨酸处理盖玻片, 高压灭菌后备用. 在6孔板中分别加入一片处理好的盖玻片, 将细胞接种于此(细胞分组情况同前, 每组设3个孔). 待上述各组SMMC-7721细胞在盖玻片上生长融合到90%-95%时, 取4%多聚甲醛固定细胞15 min, 0.5% Triton X-100透化4 min, 5% BSA/PBS封闭20 min, 加入一抗Smad4、β-catenin(1∶120), Vimentin(1∶200), 4 ℃ 2 h, PBS漂洗, 加入二抗避光孵育1 h, 晾干、封片, 奥林巴斯正置荧光显微镜观察蛋白定位表达情况.

统计学处理 所有实验均重复3次以上, 用SPSS 18.0软件进行统计分析, 定量结果采用mean±SD表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析, 两两组间比较采用组间q检验, 以P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 细胞计数CON组在不同浓度、不同时间点的TGF-β1刺激下的生长 在1、5、10 μg/L浓度的TGF-β1孵育下, 细胞呈浓度依赖性增长; TGF-β1浓度达到20 μg/L后, 细胞增长的趋势明显减弱, 且有抑制现象. 而在同一浓度TGF-β1刺激下的CON组细胞, 在0 h、24 h、48 h时间点, 呈时间依赖性增长, 48-72 h间, 细胞增长趋势明显减弱, 即10 μg/L TGF-β1孵育48 h时, 细胞增殖幅度达顶峰(表1), 后续实验遂采用此浓度和时间点处理细胞.

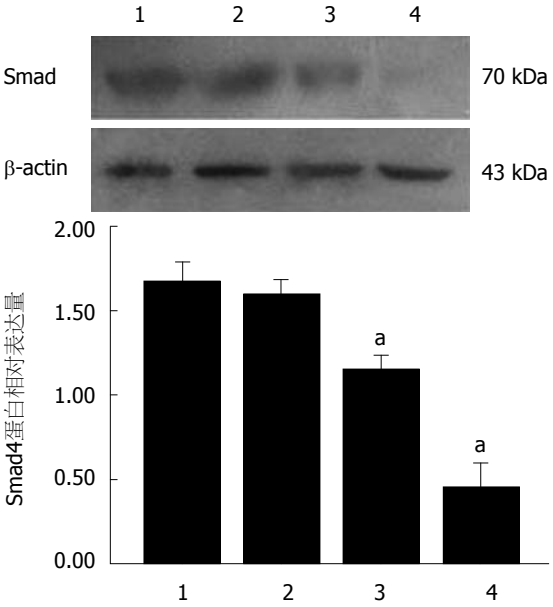


图 1 Western blot法检测SMMC-7721细胞敲低Smad4基因后相应蛋白的表达. ^aP<0.05 *vs* CON组和RNAi-NC组; 1: CON; 2: RNAi-NC; 3: RNAi-Smad4-12; 4: RNAi-Smad4-2.

2.2 低表达Smad4基因后其相应蛋白的表达 与CON组(1.60±0.06)及RNAi-NC组(1.60±0.14)相比, RNAi-Smad4-12组(1.15±0.02)和RNAi-Smad4-2组(0.45±0.11)细胞中Smad4蛋白表达明显降低(P<0.05, 图1); 而CON组和RNAi-NC组细胞间比较, Smad4蛋白的表达无明显差异.

2.3 低表达Smad4对β-catenin总蛋白的影响 与CON组和RNAi-NC组相比, TGF-β1刺激前RNAi-Smad4-2和RNAi-Smad4-12组β-catenin蛋白表达明显升高(P<0.05). 加入10 μg/L TGF-β1孵育细胞48 h后, CON组和RNAi-NC组β-catenin蛋白表达都较未处理时明显减少, RNAi-Smad4-12组相对减少, 而RNAi-Smad4-2组减少的趋势不显著(P<0.05, 图2).

2.4 低表达Smad4对Vimentin蛋白表达的影响 TGF-β1刺激前RNAi-Smad4-2和RNAi-Smad4-12组Vimentin蛋白表达相较于CON组和RNAi-NC组明显减少(P<0.05). 加入10 μg/L TGF-β1孵育细胞48 h后, CON组和RNAi-NC组Vimentin表达都较未处理时明显升高, RNAi-Smad4-12组相对升高, 而RNAi-Smad4-2组升高则不显著(P>0.05, 图3).

2.5 低表达Smad4对β-catenin和Vimentin mRNA

■应用要点
进一步明确EMT在HCC中的侵袭转移发生中的作用, 探讨HCC的侵袭转移机制, 将有利于早期预测预防肝癌转移发生, 从而提高肿瘤患者的生存率.

■创新盘点
本文创新性地在肝癌细胞SMMC-7721中, 初步探讨了Smad4通过调控EMT从而影响HCC侵袭和转移的机制.

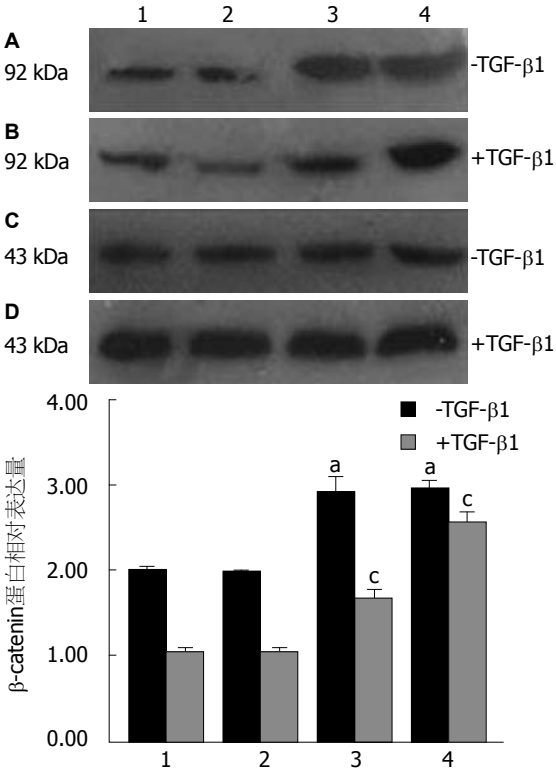


图 2 Western blot法检测TGF-β1刺激前后对Smad4敲低表达组β-catenin总蛋白表达的影响. [a]$P<0.05$ *vs* 未受刺激的CON组和RNAi-NC组; [c]$P<0.05$ *vs* TGF-β1孵育48 h后的CON组和RNAi-NC组; 1: CON; 2: RNAi-NC; 3: RNAi-Smad4-12; 4: RNAi-Smad4-2; A, B: β-catenin; C, D: β-actin.

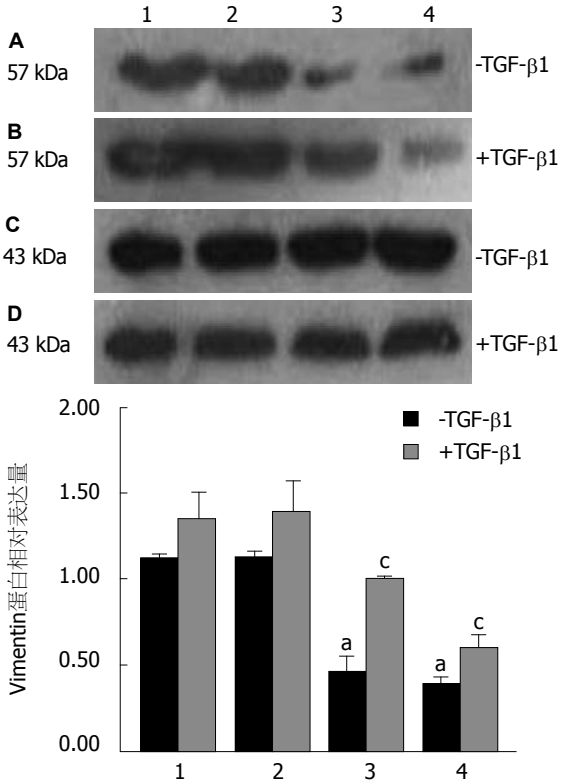


图 3 Western blot法检测TGF-β1刺激前后Smad4敲低表达组Vimentin蛋白的表达. [a]$P<0.05$ *vs* 未受刺激的CON组和RNAi-NC组; [c]$P<0.05$ *vs* TGF-β1孵育48 h后的CON组和RNAi-NC组; 1: CON; 2: RNAi-NC; 3: RNAi-Smad4-12; 4: RNAi-Smad4-2; A, B: Vimentin; C, D: β-actin.

表达的影响 以GAPDH作为内参照, 各组β-catenin mRNA相对表达量分别为: CON组(0.91±0.01), RNAi-NC组(0.81±0.01), RNAi-Smad4-12组(1.30±0.22), RNAi-Smad4-2组(1.19±0.01). 与CON组及RNAi-NC组相比, 2个转染组β-catenin mRNA表达明显升高($P<0.05$, 图4A). 4组间的Vimentin mRNA的表达无明显差异($P>0.05$, 图4B).

2.6 Smad4细胞荧光表达 免疫荧光染色结果显示, CON组和RNAi-NC组的Smad4表达在细胞浆处, 转染组的Smad4胞浆表达明显减少(图5).

2.7 低表达Smad4对β-catenin和Vimentin荧光表达的影响 CON组和RNAi-NC组的β-catenin主要表达在细胞核上, 胞浆几乎缺如; RNAi-Smad4-12和RNAi-Smad4-2组则主要定位于胞浆处, 细胞核上表达明显减少, β-catenin有明显的核转位变化. 而Vimentin在4组细胞中都主要定位于细胞浆和细胞膜上, 2个转染组的Vimentin细胞荧光表达较CON组和RNAi-NC组减弱, 核转位改变不明显(图6).

3 讨论

EMT主要的特征包括[14]: 上皮标志物表达的下调(E-cadherin、β-catenin等), 间质标志物表达的上调(Vimentin、N-cadherin等), 角蛋白为主的细胞骨架转化为波形蛋白为主的细胞骨架, 以及形态由上皮细胞转化为具有间充质特征的细胞等. 其中上皮标志物β-catenin表达的下调和间质细胞标志物Vimentin表达的增加是EMT发生的一个重要标志. β-catenin是分子量为92 kDa的一种多功能蛋白, 研究[15]表明, 由β-catenin与cadherin形成的蛋白复合物在细胞-细胞以及细胞-基质的相互关系中具有关键作用. 当β-catenin表达上调时, 增强细胞间的黏附作用, 使细胞不容易发生侵袭和转移; 相反, 当β-catenin表达下调时, 细胞间的黏附作用被破坏, 细胞更容易发生侵袭和转移. 而Vimentin是分子量为57 KDa的波形蛋白, 构成成纤维细胞中的中间纤维, 是细胞骨架成分, 具有调节细胞骨架蛋白、细胞黏附分子等蛋白间的相互作用, 在很多间叶组织中表达, 在EMT过程中可作为间叶组织的标志[16].

越来越多的证据表明, EMT参与多种肿瘤的侵袭和转移过程, 包括乳腺癌[17,18]、前列腺癌[19]、肝癌[20]、结肠癌[21]、肺癌[22]及宫颈癌[23]等, 而且肿瘤组织中发生EMT的肿瘤细胞数目与病变组织的侵袭转移程度有关[20].

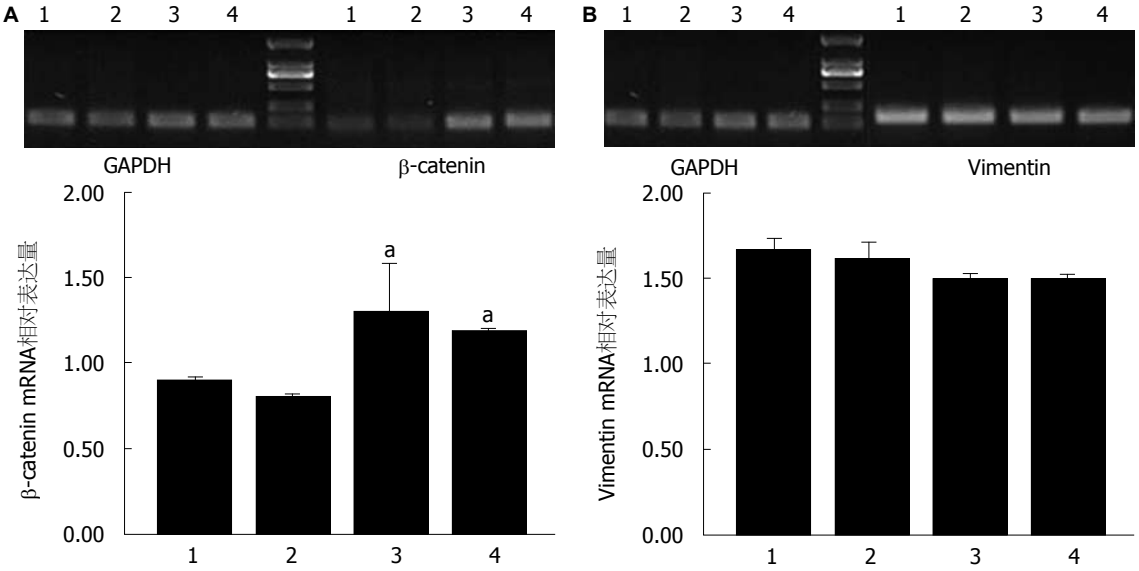


图 4 RT-PCR法检测Smad4低表达后β-catenin和Vimentin mRNA的表达. $^aP<0.05$ *vs* CON组和RNAi-NC组; A: β-catenin; B: Vimentin; 1: CON; 2: RNAi-NC; 3: RNAi-Smad4-12; 4: RNAi-Smad4-2.

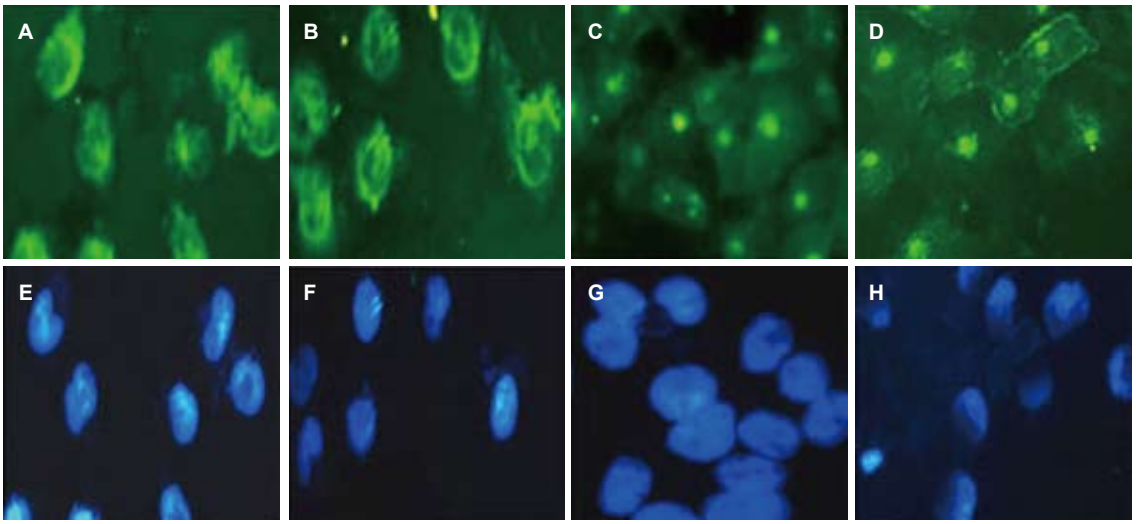


图 5 Smad4细胞荧光的表达. A, B, C, D: Smad4; E, F, G, H: DAPI核染; A, E: CON; B, F: RNAi-NC; C, G: RNAi-Smad4-12; D, H: RNAi-Smad4-2.

EMT的发生受到诸多因素的影响[24,25], 其中TGF-β是引发EMT的关键始动因素[26,27], 并且参与EMT的全过程. Smad4分子是TGF-β-Smad信号通路中的关键应答分子, 处于TGF-β信号转导的中枢地位, 他能够参与调控多种下游靶基因的表达[28]. 课题组前期[13]采用RNAi技术, 构建了针对Smad4的RNAi慢病毒载体, 使Smad4低表达并转染SMMC-7721细胞, 成功构建了多组低表达Smad4的SMMC-7721细胞. 前期研究发现, 低表达Smad4后SMMC-7721细胞的侵袭和迁移能力增加.

近年来的研究表明, Smad4在多种肿瘤进展、侵袭和转移中起重要作用[29,30]. EMT参与多种肿瘤侵袭转移的过程, 有研究[12,31,32]发现, Smad4参与肿瘤组织的EMT过程. 由此提出Smad4是否通过EMT介导细胞迁移和侵袭能力从而影响HCC的侵袭和转移的假设.

本实验中, 通过Western blot法来验证Smad4基因敲低后相应蛋白的表达情况, 显示2个转染组相较于对照组都有不同程度的减少; 细胞免疫荧光结果也显示, 转染组的Smad4在细胞浆上的荧光表达较CON组和RNAi-NC组明显减少, 均证实了转染的成功性和稳定性. 进一步研究结果显示: 与对照组相比, Smad4低表达会上调β-catenin mRNA和总蛋白表达量; 下调Vimentin蛋白表达量, Vimentin mRNA表达未受明显影

■同行评价

本文创新性地将TGF-β和Wnt/β-catenin信号通路联系在一起来研究肝癌细胞株SMMC-7721中Smad4表达水平降低后对EMT的影响, 进而探讨了其在HCC侵袭转移中的作用意义, 该文研究水平较高, 创新性强.

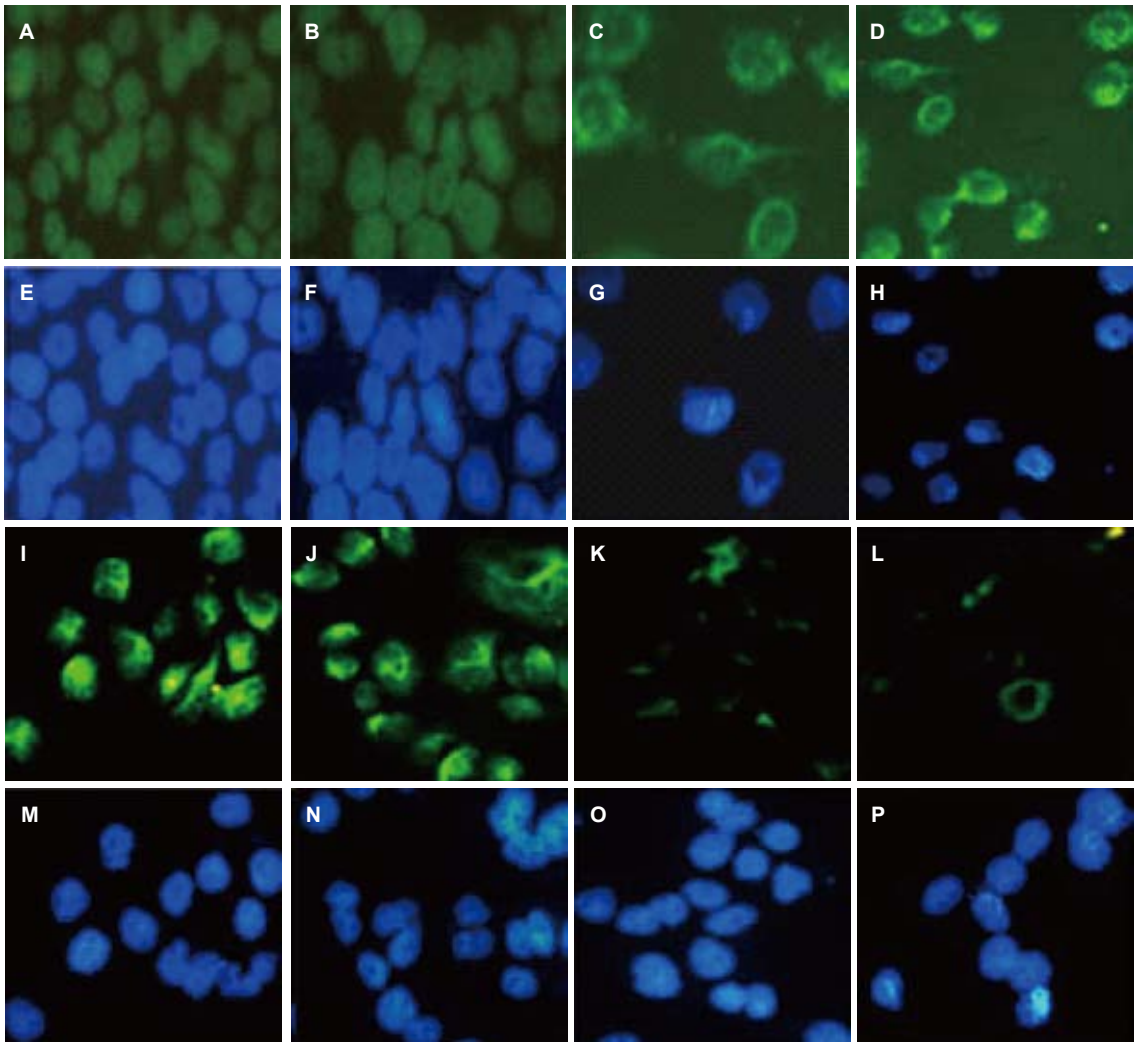


图 6 Smad4敲低表达后β-catenin和Vimentin荧光表达. A-H: β-catenin; I-P: Vimentin; A, B, C, D, I, J, K, L: β-catenin/Vimentin; E, F, G, H, M, N, O, P: DAPI核染; A, E, I, M: CON; B, F, J, N: RNAi-NC; C, G, K, O: RNAi-Smad4-12; D, H, L, P: RNAi-Smad4-2.

响. 利用免疫荧光技术, 发现低表达Smad4会使Vimentin在胞浆中的表达出现不同程度的缺失, β-catenin发生核转位. 这些研究均表明低表达Smad4会抑制EMT的发生. 当用10 μg/L TGF-β1孵育细胞48 h后, 空白对照组和转空组β-catenin总蛋白表达量都较未处理时明显减少, 而转染组减少的程度并不显著, Vimentin蛋白表达量在用TGF-β1刺激后则与β-catenin结果相悖. 众所周知, TGF-β1经由依赖Smad4途径和包括Wnt、Ras、MAPK等多条通路的非依赖Smad4途径[33-35]诱导了EMT的发生, 当低表达Smad4后, 极大程度地抑制了依赖Smad4途径, TGF-β1可能即循非依赖Smad4途径诱导了EMT的发生. 而在转染组中, 低表达Smad4会潜在抑制非依赖性途径诱发EMT的现象, 又再次证明了依赖性途径在TGF-β1诱发EMT过程中的主要性[36,37].

总之, 本实验的研究结果表明在肝癌细胞SMMC-7721中, 低表达Smad4可能通过抑制TGF-β1诱发的EMT来改变肝癌细胞的侵袭转移能力.

4 参考文献

1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90

2 Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 212-236

3 贾晋斌, 倪淑欣. 肝癌治疗新药临床研究进展. 中国医药生物技术 2011; 6: 131-133

4 Xu LB, Wang J, Liu C, Pang HW, Chen YJ, Ou QJ, Chen JS. Staging systems for predicting survival of patients with hepatocellular carcinoma after surgery. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5257-5262

5 Pak SI, Chang KS. Performance estimation of a Venturi scrubber using a computational model for capturing dust particles with liquid spray. *J Hazard Mater* 2006; 138: 560-573

6 Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer pro-

gression. *Br J Cancer* 2008; 99: 1375-1379
7 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890
8 Natalwala A, Spychal R, Tselepis C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumourigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3792-3797
9 Wendt MK, Allington TM, Schiemann WP. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol* 2009; 5: 1145-1168
10 Hills CE, Squires PE. The role of TGF-β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22: 131-139
11 Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, Vanbelle C, Morel AP, Gillet G, Mikaelian I, Rimokh R. Antagonistic regulation of EMT by TIF1γ and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep* 2011; 12: 665-672
12 Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold PL, Crystal RG, de Herreros AG, Moustakas A, Pettersson RF, Fuxe J. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 943-950
13 韩香, 黄晓丹, 薛慧婷, 黄曙, 张发明, 季国忠. Smad4通过fascin和cortactin影响肝癌细胞SMMC-7721迁移的研究. 医学研究生学报 2011; 24: 676-682
14 Padua D, Massagué J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* 2009; 19: 89-102
15 Huber O, Bierkamp C, Kemler R. Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 685-691
16 Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 3033-3046
17 Gjerdrum C, Tiron C, Høiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, Collett K, Li S, McCormack E, Gjertsen BT, Micklem DR, Akslen LA, Glackin C, Lorens JB. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 1124-1129
18 Micalizzi DS, Christensen KL, Jedlicka P, Coletta RD, Barón AE, Harrell JC, Horwitz KB, Billheimer D, Heichman KA, Welm AL, Schiemann WP, Ford HL. The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling. *J Clin Invest* 2009; 119: 2678-2690
19 Zhau HE, Odero-Marah V, Lue HW, Nomura T, Wang R, Chu G, Liu ZR, Zhou BP, Huang WC, Chung LW. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 601-610
20 Yang MH, Chen CL, Chau GY, Chiou SH, Su CW, Chou TY, Peng WL, Wu JC. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 50: 1464-1474
21 Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10356-10361
22 Saito RA, Watabe T, Horiguchi K, Kohyama T, Saitoh M, Nagase T, Miyazono K. Thyroid transcription factor-1 inhibits transforming growth factor-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2009; 69: 2783-2791
23 Lee MY, Chou CY, Tang MJ, Shen MR. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4743-4750
24 Boyer B, Vallés AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1091-1099
25 Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001; 23: 912-923
26 Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007; 282: 22089-22101
27 Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
28 Singh P, Wig JD, Srinivasan R. The Smad family and its role in pancreatic cancer. *Indian J Cancer* 2011; 48: 351-360
29 Huang S, Zhang F, Miao L, Zhang H, Fan Z, Wang X, Ji G. Lentiviral-mediated Smad4 RNAi induced anti-proliferation by p16 up-regulation and apoptosis by caspase 3 down-regulation in hepatoma SMMC-7721 cells. *Oncol Rep* 2008; 20: 1053-1059
30 张朋彬, 李宜辉. Smad4在消化系肿瘤发生中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1335-1338
31 Mesker WE, Liefers GJ, Junggeburt JM, van Pelt GW, Alberici P, Kuppen PJ, Miranda NF, van Leeuwen KA, Morreau H, Szuhai K, Tollenaar RA, Tanke HJ. Presence of a high amount of stroma and downregulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I-II colon cancer patients. *Cell Oncol* 2009; 31: 169-178
32 Zhao S, Venkatasubbarao K, Lazor JW, Sperry J, Jin C, Cao L, Freeman JW. Inhibition of STAT3 Tyr705 phosphorylation by Smad4 suppresses transforming growth factor beta-mediated invasion and metastasis in pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4221-4228
33 Rees JR, Onwuegbusi BA, Save VE, Alderson D, Fitzgerald RC. In vivo and in vitro evidence for transforming growth factor-beta1-mediated epithelial to mesenchymal transition in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 9583-9590
34 Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; 19: 156-172
35 Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007; 98: 1512-1520
36 Miyazono K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85: 314-323
37 Yu C, Liu Y, Huang D, Dai Y, Cai G, Sun J, Xu T, Tian Y, Zhang X. TGF-β1 mediates epithelial to mesenchymal transition via the TGF-β/Smad pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Rep* 2011; 25: 1581-1587

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 930-935
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

ANXA2和ANXA4在胃腺癌中的表达及临床意义

张志强, 聂永梅, 李秀娟, 夏 宇, 胡翠梨, 苏丽萍, 李建洲, 宋 娜, 蒋 海, 张 洁

■背景资料
ANXA2、ANXA4参与了多种肿瘤的生物学行为, 研究两种蛋白在胃癌的表达特点和二者的相关性, 探讨胃癌发病机制, 对胃癌早期诊断、预后评估及治疗靶标方面具有重要意义.

张志强, 夏宇, 胡翠梨, 新疆医科大学第一附属医院消化科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011
聂永梅, 新疆医科大学基础医学院生理学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011
李秀娟, 新疆医科大学基础医学院病理生理学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011
苏丽萍, 李建洲, 宋娜, 蒋海, 张洁, 新疆医科大学基础医学院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011
张志强, 博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事消化系肿瘤的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81001101
新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目, No. 2010211B20
新疆维吾尔自治区高校科研计划青年教师科研启动基金资助项目, No. XJEDU2010S24
自治区卫生厅青年科技人才专项科研基金资助项目, No. 2009Y06
作者贡献分布: 张志强与李秀娟对此文所作贡献均等; 此课题由张志强与李秀娟设计; 研究过程由张志强、李秀娟、聂永梅、夏宇、胡翠梨、苏丽萍、李建洲、宋娜、蒋海及张洁操作完成; 李秀娟提供理论指导; 研究所用新试剂及分析工具由张志强提供; 数据分析由李秀娟与聂永梅完成; 本论文写作由张志强与李秀娟完成.
通讯作者: 李秀娟, 硕士, 讲师, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新医路393号, 新疆医科大学基础医学院病理生理学教研室. lxjzzq7609@yahoo.com.cn
电话: 0991-4362447
收稿日期: 2012-01-04 修回日期: 2012-01-31
接受日期: 2012-03-15 在线出版日期: 2012-04-18

Clinical significance of expression of ANXA2 and ANXA4 in gastric adenocarcinoma

Zhi-Qiang Zhang, Yong-Mei Nie, Xiu-Juan Li, Yu Xia, Cui-Li Hu, Li-Ping Su, Jian-Zhou Li, Na Song, Hai Jiang, Jie Zhang

Zhi-Qiang Zhang, Yu Xia, Cui-Li Hu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Yong-Mei Nie, Department of Physiology, College of Preclinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Xiu-Juan Li, Department of Pathophysiology, College of Preclinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Li-Ping Su, Jian-Zhou Li, Na Song, Hai Jiang, Jie Zhang, College of Preclinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81001101; the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2010211B20; the Young Teacher Scientific Research Foundation of University Scientific Research Program of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. XJEDU2010S24; the Youth Science and Technology Talent Special Research Foundation of Health Department of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2009Y06
Correspondence to: Xiu-Juan Li, Department of Pathophysiology, College of Preclinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lxjzzq7609@yahoo.com.cn
Received: 2012-01-04 Revised: 2012-01-31
Accepted: 2012-03-15 Published online: 2012-04-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of annexin A2 (ANXA2) and annexin A4 (ANXA4) in human gastric adenocarcinoma (GAC) and to explore the relationship between their expression and biological behaviors of GAC.

METHODS: The expression of ANXA2 and ANXA4 was detected by immunohistochemistry in a tissue microarray containing 75 pairs of GAC and matched tumor-adjacent tissue specimens.

RESULTS: The positive rates of ANXA2 and ANXA4 expression in GAC were significantly higher than those in tumor-adjacent tissue (33.1% *vs* 1.3%, 68.0% *vs* 25.5%, both $P < 0.05$). The expression of ANXA2 was positively correlated with that of ANXA4 in GAC ($r = 0.335$, $P = 0.003$). The expression of ANXA2 and ANXA4 was closely associated with invasion depth, lymph node metastasis, TNM stage and differentiation grade in GAC (all $P < 0.05$), but not with sex, age or distant metastasis (all $P > 0.05$). Tumor size had a correlation with the expression of ANXA2 ($P < 0.05$), but not with that of ANXA4 ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Overexpression of ANXA2 and ANXA4 may play a synergistic role in the carcinogenesis, invasion and metastasis of GAC. ANXA2 and ANXA4 may be used as targets for GAC therapy and markers for prognostic prediction.

Key Words: Gastric adenocarcinoma; Annexin A2; Annexin A4; Tissue microarray

Zhang ZQ, Nie YM, Li XJ, Xia Y, Hu CL, Su LP, Li JZ, Song N, Jiang H, Zhang J. Clinical significance of expression of ANXA2 and ANXA4 in gastric adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 930-935

■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

摘要

目的: 研究膜联蛋白A2(Annexin A2, ANXA2)、膜联蛋白A4(Annexin A4, ANXA4)在人体胃腺癌(gastric adenocarcinoma cells, GAC)的表达, 探讨其表达与GAC生物学行为的关系及两种蛋白的相关性.

方法: 免疫组织化学SP法检测组织芯片中75对配对的GAC和其相应癌旁组织ANXA2和ANXA4的表达.

结果: 在GAC和癌旁组织中ANXA2、ANXA4的表达分别为: 33.1%(25) *vs* 1.3%(1)、68.0%(51) *vs* 25.5%(13), 二者在GAC的表达显著高于癌旁组织(χ^2 = 24.448, P = 0.000; χ^2 = 39.353, P = 0.000); ANXA2和ANXA4在GAC表达呈正相关(r = 0.335, P = 0.003); 两种蛋白的表达与GAC的浸润深度、淋巴结转移、TNM分期和分化程度有关(P<0.05), 与年龄、性别和远处转移无关(P>0.05); 肿瘤大小与ANXA2表达有关(P<0.01), 与ANXA4表达无关(P>0.05).

结论: ANXA2和ANXA4的表达上调可能共同参与了GAC的发生、发展、浸润和转移, 可作为临床预测GAC预后的标志物和治疗靶点.

关键词: 胃腺癌; 膜联蛋白A2; 膜联蛋白A4; 组织芯片

张志强, 聂永梅, 李秀娟, 夏宇, 胡翠梨, 苏丽萍, 李建洲, 宋娜, 蒋海, 张洁. ANXA2和ANXA4在胃腺癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 930-935
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/930.asp

0 引言

胃癌死亡率居恶性肿瘤第2位[1,2], 每年全世界有75万人死于胃癌[3], 大多胃癌确诊时已中晚期, 5年生存率仅20%-30%, 早期胃癌根治术5年生存率达90%-95%[4,5]. 分子标志物是肿瘤诊断、复发转移预测和预后评估最敏感、有效的指标, 因此寻找与胃癌发生发展密切相关的分子标志物, 探讨其发病机制, 对胃癌的早期诊断和治疗效果的提高具有重要意义[6]. 在前期工作中, 本课题组应用激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)及^{18}O标记结合纳升级反向液相色谱串联质谱(Nano-RPLC-MS/MS)定量蛋白质组技术, 筛选胃癌和正常胃黏膜的差异蛋白. 结果发现膜联蛋白A2(Annexin A2, ANXA2)、膜联蛋白A4(Annexin A4, ANXA4)在胃癌中明显上调[7-9]. 近年研究发现这两种蛋白参与了多种肿瘤的生物学行为[10]. 为进一步探讨他们在胃癌中的作用和可能机制, 本研究应用免疫组织化学技术检测组织芯片中的75对人体胃腺癌(gastric adenocarcinoma, GAC)和癌旁组织中ANXA2和ANXA4的表达特点, 分析蛋白表达与年龄、性别、分化程度、浸润深度、转移、临床TNM分期和肿瘤大小等GAC临床病理指标的关系, 并探讨两种蛋白在GAC表达的相关性.

■研发前沿
ANXA2、ANXA4因参与肿瘤发生发展、浸润转移而备受关注, 有望被开发为肿瘤及其转移的早期检测、辅助诊断及治疗的靶点, 故他们在肿瘤中的具体作用机制有待明确化.

1 材料和方法

1.1 材料 人类胃癌组织芯片购自上海芯超科技有限公司(批号: OD-CT-DgStm01), 含配对的胃癌组织和癌旁组织各75例, 男50例, 女25例, 年龄30-84岁, 平均63.6岁; 其中Ⅰ期病例12例, Ⅱ期病例25例, Ⅲ期病例32例, Ⅳ期病例4例(按照2009年国际抗癌联盟制定的第7版TNM分期标准). 临床病理资料完整, 肿瘤侵及黏膜下层、肌层、浆膜和浆膜外分别为6、13、46和10例; 高-中分化腺癌34例, 低-未分化腺癌41例; 无淋巴结转移者30例, 有淋巴结转移者45例; 未发现远处转移者69例, 有远处转移者6例; 38例肿瘤最大径≤5 cm, 37例肿瘤最大径>5 cm.

鼠抗人ANXA2单克隆抗体(sc-28385)购自Santa Cruz公司; 兔抗人多克隆ANXA4抗体(HPA007393)购自Sigma-Aldrich公司, S-P超敏免疫组织化学试剂盒(KIT-9701)和DAB酶显色试剂盒(DAB-0031)购自福州迈新生物技术公司; HRP标记的羊抗鼠二抗(ZB-2305)购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色检测ANXA2、ANXA4: 严格按照试剂盒说明书操作, 采用SP法: 组织芯片经常规脱蜡水化, 枸橼酸盐抗原修复, 3%H_2O_2-甲醛阻断内源性过氧化物酶, 加1∶100 ANXA2或1∶50 ANXA4一抗, 4 ℃孵育过夜. 加生物标记的二抗, 加链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液. 每步用PBS冲洗, 室温孵育; DAB显色, 苏木素复染、蓝化、梯度酒精脱水, 中性树胶封固. 用PBS液代替一抗作阴性对照, 用已知阳性反应片做阳性对照.

1.2.2 IHC染色评分判定标准: 每点随机选取至少10个高倍镜视野(×200), 至少计数1 000个细胞, 采用Fromowitz综合计分法[11], 根据染色强度和阳性细胞百分率判断染色结果, 双盲评分. 染

■相关报道
研究显示, ANXA-2在肝癌、肺癌、肾细胞癌和和神经胶质瘤等多种肿瘤组织上升, 其表达与几种肿瘤组织型、体积、分期及侵袭等有关; ANXA2、ANXA4与结肠癌的分期、转移相关.

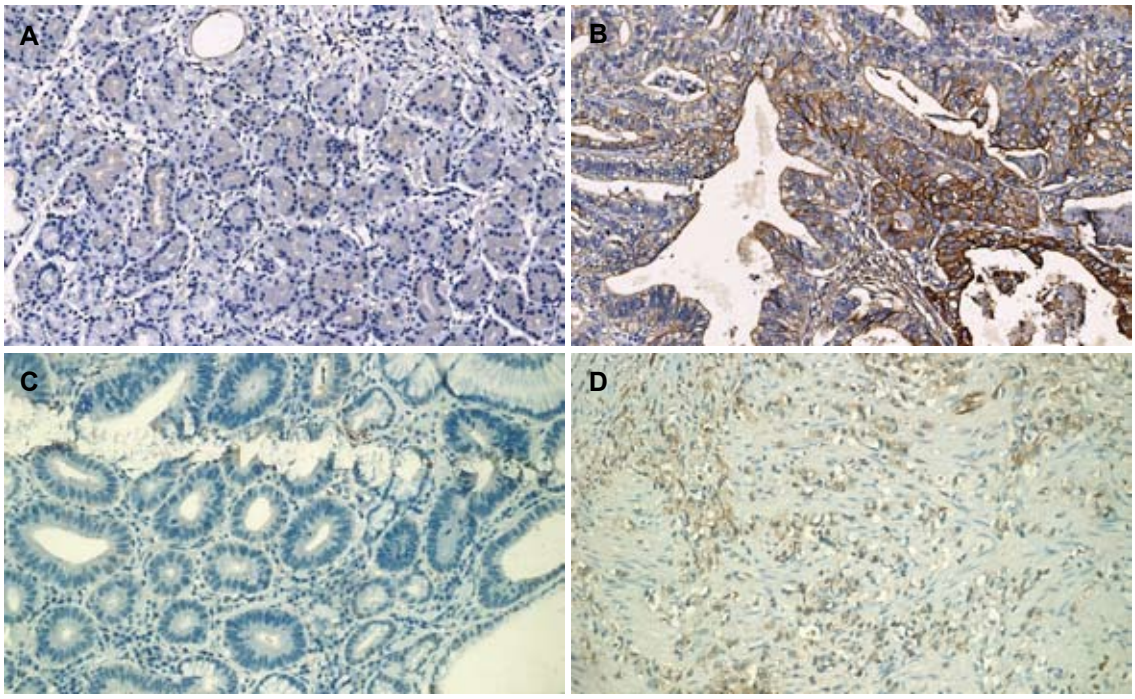


图 1 ANXA2、ANXA4在各组织的表达(IHC × 200). A: 癌旁组织ANXA2; B: GAC ANXA2; C: 癌旁组织ANXA4; D: GAC ANXA4.

表 1 IHC检测ANXA2、ANXA4在GAC和癌旁组织的表达(n = 75)

组织类型	ANXA2 n(%)	χ^2值	P值	ANXA4 n(%)	χ^2值	P值
GAC	25(33.3)	24.448	0.000	51(68.0)	39.353	0.000
癌旁组织	1(1.3)			13(17.3)		

色强度评分: 无染色0分, 浅黄色1分, 棕黄色2分, 棕褐色3分. 细胞中染色阳性细胞数5%为0分, 5%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分. 两项评分之和小于2为阴性(-), 记为1; 2-3分为弱阳性(+), 记为2; 4-5分为中度阳性(++), 记为3; 6-7分为强阳性(+++), 记为4. ≤(++)低表达, (+++)高表达.

统计学处理 实验数据用SPSS17.0统计软件分析: 不同组织间蛋白差异表达与胃腺癌临床病理参数间关系采用χ^2检验及Fisher确切概率法, ANXA2与ANXA4蛋白表达的关系用Spearman等级相关, P<0.05表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 ANXA2、ANXA4在GAC和癌旁组织的表达 75例GAC中, 25例ANXA2高表达, 51例ANXA4高表达; 75例癌旁组织中, 1例ANXA2高表达, 13例ANXA4高表达. ANXA2在GAC的胞浆和胞膜呈阳性表达, 而癌旁组织只在胞浆表达; ANXA4在GAC的胞浆和胞核阳性表达, 在癌旁组织的胞浆表达, 胞核为阴性(图1); ANXA2、ANXA4在GAC的表达显著高于其在癌旁组织的表达, 差异有统计学意义(P<0.01, 表1).

2.2 ANXA2、ANXA4表达与GAC临床病理参数的关系 ANXA2、ANXA4的表达与GAC的浸润深度、淋巴结转移、TNM分期和分化程度有关(P<0.05), 随着肿瘤浸润深度的增加、淋巴结转移的发生、TNM分期的提高及肿瘤分化程度的降低, 两种蛋白表达均增高. ANXA2、ANXA4的表达与性别、年龄及肿瘤有无远处转移无关(P>0.05). ANXA2在GAC最大径>5 cm的表达高于GAC最大径≤5 cm的表达(P<0.05), ANXA4的表达与肿瘤大小无关(P>0.05, 表2).

2.3 GAC中ANXA2和ANXA4表达的关系 ANXA2和ANXA4在75例GAC中表达均为强阳性、中阳性、弱阳性和阴性分别为26.67%(20例)、9.33%(7例)、1.33%(1例)和4%(3例), 表达一致率为41.33%(41/75, 表3). Spearman等级相关分析显示ANXA2和ANXA4在GAC的表达呈正相关(r = 0.335, P = 0.003).

表 2 ANXA2、ANXA4表达与GAC临床病理参数的关系

参数	n	AnnexinA2		χ^2值	P值	AnnexinA4		χ^2值	P值
		低	高			低	高		
性别									
男	50	35	15	0.750	0.386	18	32	1.103	0.294
女	25	15	10			6	19		
年龄(岁)									
≤60	24	18	6	1.103	0.294	10	14	1.516	0.218
>60	51	32	19			14	37		
组织分化									
高/中	34	27	7	4.546	0.033	15	19	4.197	0.041
低	41	23	18			9	32		
浸润深度									
T1–2	19	17	2	4.599	0.032	10	9	4.978	0.026
T3–4	56	33	23			14	42		
N期									
N0	30	24	6	4.000	0.045	14	16	4.943	0.026
N1–3	45	26	19			10	35		
M期									
M0	69	46	23	0.201	0.654	21	48	0.971	0.324
M1	6	4	2			3	3		
TNM分期									
Ⅰ-Ⅱ	37	29	8	4.508	0.034	17	20	6.527	0.011
Ⅲ-Ⅳ	38	21	17			7	31		
肿瘤大小									
≤5 cm	38	30	8	5.228	0.022	15	23	1.977	0.160
>5 cm	37	20	17			9	28		

表 3 ANXA2和ANXA4在GAC的表达

ANXA2表达	ANXA4表达			
	–	+	++	+++
–	3	1	3	1
+	0	1	3	10
++	1	0	7	20
+++	0	0	5	20

3 讨论

膜联蛋白(Annexins)是一类与Ca^{2+}结合的钙依赖性磷脂结合蛋白, 结构上均有保守的C-末端核心区和可变的N-末端结构域, 前者与膜相关磷脂结合, 后者决定了Annexins的特异性生物学功能[12]. Annexins具有参与膜的形成、膜转运、细胞信号转导及膜表面其他一系列依赖于钙调蛋白的细胞活动, 如胞吞、胞吐、细胞增殖、分化和凋亡等多种功能[13,14]. 近年来, Annexins在肿瘤学中的作用备受重视, 成为研究的热点. 研究显示: ANXA2在肝癌[15]、胰腺癌[16]、肺癌[17]、肾细胞癌[18]和神经胶质瘤等多种肿瘤组织表达上调[19,20]; Shen等[21]发现ANXA4在胰腺癌中表达升高, 陈滨等[22]发现ANXA4 mRNA在正常肝-肝硬化-肝癌组织表达逐渐上升, Annexins参与了肿瘤发生发展, 与肿瘤浸润转移及预后相关.

本研究前期我们应用Nano-RPLC-MS/MS定量蛋白质组技术筛选胃癌差异蛋白, 并用Western-blot免疫印迹验证, 发现ANXA2和ANXA4在胃癌中明显上调[7,8]. 为了进一步探讨两种蛋白表达和胃癌临床病理参数的关系以及两种蛋白表达是否有相关性, 本研究扩大样本量, 采用组织芯片和免疫组织化学证实ANXA2和ANXA4在GAC高表达; 并发现两种蛋白的表达和胃癌患者的年龄、性别和肿瘤是否有远处转移无关, 而与胃癌的分化程度、浸润深度、淋巴结转移和临床分期密切相关. 分化程度越低、浸润越深的GAC, ANXA2、ANXA4就越高表达, 两种蛋白在有淋巴结转移的GAC中的表达高于无淋巴结转移者, Ⅲ-Ⅳ期GAC患者ANXA2、ANXA4的表达高于Ⅰ-Ⅱ期患者. 此外, 胃癌最大径>5 cm的ANXA2表达显著高于其在肿瘤直径≤5 cm的表达, ANXA4的表达在两组无差异, 与肿瘤体积

■应用要点
本研究证明, ANXA2、ANXA4与GAC的浸润、转移、分期、分化程度等有关, 且ANXA2和ANXA4在GAC表达呈正相关, 可以为进一步探索他们在肿瘤中的作用机制及抗胃癌发生发展的研究积累资料.

■同行评价
本文针对临床常见的胃癌分子生物学特性进行研究, 具有一定的理论意义和潜在的临床价值. 本研究方法先进、结论中肯.

大小无关. Emoto等[23]通过免疫组织化学研究发现人原发性大肠癌中ANXA2表达与肿瘤组织型、体积、分期及侵袭有关; Ducan等[24]用蛋白质组学证实Annexins(ANXA1、A2、A4)与结肠癌的分期、转移等密切相关. 本研究与相关研究结果基本一致, 说明ANXA2、ANXA4参与了GAC的发生发展、侵袭转移; ANXA2、ANXA4在GAC的高低表达可间接反映胃癌的预后, 提示ANXA2、ANXA4可作为肿瘤分级评判和预后估计的指标. 两种蛋白在GAC表达关系分析显示: 二者呈正相关, $r = 0.335$, 提示ANXA2和ANXA4在GAC的发生发展中具有协同效应.

目前, ANXA2、ANXA4参与GAC的生物学行为机制尚不明确. 浸润和转移是恶性肿瘤的特征, 瘤细胞由其原发部位侵入血管、淋巴管, 并被血流、淋巴流带到另一部位或器官, 在该处繁殖生长. ANXA2作为细胞表面受体, 可与组织型纤维蛋白溶解酶原激活物(type plasminogen activator, t-PA)和纤溶酶原(plasminogen, PLG)结合[25], 3者在内皮细胞表面的共区域化促使PLG蛋白水解, 生成纤溶酶(plasmin, PL), 促进纤维蛋白的降解. 其结果一方面可能导致肿瘤细胞易出血和转移, 如白血病细胞表面以及由急性早幼粒细胞白血病衍生的细胞系中, ANXA2过表达与出血的临床表现及白血病细胞在活体外产生纤溶酶的能力相关[17,26]; 另一方面PLG被ANXA2激活并生成的PL可能通过活化促进金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)和各种生长因子的活化、膜蛋白的水解、细胞外基质的降解等, 加速血管生成可促进肿瘤的浸润和转移[25,27].

ANXA2和S100A10结合形成异源四聚体(AIIt), 此形式有助于ANXA2和S100A10转定位于膜上; 肿瘤细胞分泌的S100A4可以刺激ANXA2转定位于内皮细胞表面, S100A10、S100A4与ANXA2的结合和相互作用可促使t-PA依赖的PLG活化及PL产生等反应的起始及级联放大[28]. 本研究发现ANXA2在GAC的胞浆和胞膜均阳性表达, 而只在癌旁组织胞浆阳性表达, 胞膜呈阴性表达, 说明可能与S100A10、S100A4的参与有关, 他们可能介导了ANXA2在胞质-胞膜的转位, 诱导PL的生成, 导致胞外基质的重塑、促进肿瘤新生血管生成, 增强恶性肿瘤的侵袭和转移能力[29]. ANXA4在良性胃黏膜组织中的细胞浆表达, 但在胃癌组织癌细胞核亦可见强阳性表达, 这可能与癌细胞的扩散有关. ANXA4在Ca^{2+}作用下具有促肾上腺髓质颗粒聚集的作用, 即通过与膜结合、自身聚合、形成疏水蛋白桥, 从而实现膜与膜的联接, 这提示ANXA4可能参与细胞的生长、分化及转化; 通过运用人乳腺癌细胞系进行研究证实, 过表达的ANXA4与$\alpha v\beta 5$介导的人乳腺癌细胞(MCF27)与粘连蛋白的附着有关, 整连蛋白$\alpha v\beta 5$是玻璃粘连蛋白的主要受体, 其运动性与肿瘤在人体内的分布和转移有关[30]. 以上从某些方面解释了ANXA2、ANXA4参与GAC生物学行为的可能机制.

GAC的发生、发展是一个复杂的过程, 是多因素多机制共同参与、相互作用的结果[31]. 目前关于GAC的病因学和发病学研究较多, 但临床应用效果并不理想. 本实验通过组织芯片研究发现ANXA2、ANXA4参与GAC的生物学行为. 目前对ANXA2、ANXA4的了解尚不全面, 其参与GAC发生发展、浸润转移的具体机制和二者在GAC中的协同作用机制, 值得进一步研究. 随着相关研究的不断深入, ANXA2、ANXA4基因的表达、生物学功能及在肿瘤中的角色将会逐步明朗化, 两种蛋白有望应用于肿瘤的早期检测、诊断和治疗, 成为肿瘤预测预后的标志物和治疗靶点.

4 参考文献

1 Zhang J, Guo SB, Duan ZJ. Application of magnifying narrow-band imaging endoscopy for diagnosis of early gastric cancer and precancerous lesion. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 135

2 郭凌云, 刘涛, 李玉民. 胃癌实验模型建立的研究现况. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2609-2614

3 Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1269-1276

4 Peddanna N, Holt S, Verma RS. Genetics of gastric cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 2055-2064

5 梁勇. 中国人胃癌和肝癌血清蛋白质组的质谱研究. 浙江大学, 2007: 1

6 Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'rabi A, Forghani MN, Raziee HR, Mashhadinejad A, Jafarzadeh M, Esmaili-Shandiz E, Dadkhah E. p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2055-2060

7 Zhang Z, Li M, Zhang G, Fang P, Yao H, Xiao Z, Chen Z. Identification of human gastric carcinoma biomarkers by differential protein expression analysis using ^{18}O labeling and nanoLC-MS/MS coupled with laser capture microdissection. *Med Oncol* 2010; 27: 296-303

8 张志强, 李茂玉, 张桂英, 彭芳, 姚慧欣, 李美香, 肖志强, 陈主初. 激光捕获显微切割技术结合^{18}O标记定量蛋白质组技术在胃癌标志物筛查中的应用研究. 生物化学与生物物理进展 2009; 36: 311-322

9 张志强. ^{18}O标记定量蛋白质组学结合LCM技术筛查胃癌标志物. 中南大学, 2009: 28-40
10 李鹏鸽, 杨艳丽, 葛玉婷, 尹田乐, 侯颖春. 膜联蛋白A2在肿瘤生长调节与细胞骨架活动中的作用. 生理科学进展 2010; 41: 457-460
11 Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, Grimson R, Lundy J. ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol* 1987; 18: 1268-1275
12 黄昀, 傅松滨. AnnexinⅡ的遗传学研究. 国外医学•遗传学分册 2004; 27: 330-333
13 Laohavisit A, Davies JM. Annexins. *New Phytol* 2011; 189: 40-53
14 Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2623-2642
15 Frohlich M, Motté P, Galvin K, Takahashi H, Wands J, Ozturk M. Enhanced expression of the protein kinase substrate p36 in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 3216-3223
16 Chen R, Brentnall TA, Pan S, Cooke K, Moyes KW, Lane Z, Crispin DA, Goodlett DR, Aebersold R, Bronner MP. Quantitative proteomics analysis reveals that proteins differentially expressed in chronic pancreatitis are also frequently involved in pancreatic cancer. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 1331-1342
17 许月新, 刘东明, 段鸿梅, 官忠艳, 韩昱晨. AnnexinⅡ在肺鳞癌、腺癌中的表达及意义. 中国肺癌杂志 2009; 12: 375-380
18 Domoto T, Miyama Y, Suzuki H, Teratani T, Arai K, Sugiyama T, Takayama T, Mugiya S, Ozono S, Nozawa R. Evaluation of S100A10, annexin II and B-FABP expression as markers for renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2007; 98: 77-82
19 樊素珍, 苑中甫. 钙磷脂结合蛋白annexinA2与肿瘤发生发展. 国际生殖健康/计划生育杂志 2009; 28: 55-58
20 维峰, 汪昱. Annexins在恶性肿瘤中的表达及其临床意义. 中国现代普通外科进展 2010; 13: 302-305
21 Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res* 2004; 64: 9018-9026
22 陈滨, 彭民浩, 李佳荃. 膜联蛋白A4在原发性肝细胞癌中的表达及其意义. 广西医学 2009; 31: 308-311
23 Emoto K, Yamada Y, Sawada H, Fujimoto H, Ueno M, Takayama T, Kamada K, Naito A, Hirao S, Nakajima Y. Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 1419-1426
24 Duncan R, Carpenter B, Main LC, Telfer C, Murray GI. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008; 98: 426-433
25 魏丽丽, 张楠楠, 强荣兵, 侯颖春. 膜联蛋白A2与肿瘤浸润转移的关系. 生命的化学 2009; 29: 192-196
26 章蔼然, 潘宁, 侯颖春. 膜联蛋白A2与恶性肿瘤发展进程的关系. 细胞生物学杂志 2008; 30: 307-311
27 Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, Tuszynski GP, Sharma MC. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast cancer: selective expression in invasive breast cancer and contribution to tumor invasion and progression. *Exp Mol Pathol* 2006; 81: 146-156
28 Madureira PA, Surette AP, Phipps KD, Taboski MA, Miller VA, Waisman DM. The role of the annexin A2 heterotetramer in vascular fibrinolysis. *Blood* 2011; 118: 4789-4797
29 Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V. Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 2005; 280: 20833-20841
30 谢丽, 陈晓燕, 秦雪. Annexins与肿瘤的相关研究. 医学综述 2007; 13: 196-198
31 邓长生. 早期胃癌诊断研究现状与进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3309-3312

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 936-940
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

Th17、IL-17在幽门螺杆菌相关性胃癌中的研究进展

李 伟, 杨 桢, 黄德强, 吕农华

■背景资料
近年来, 人们对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)与宿主之间的相互作用关系进行了大量研究, 而辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)在*H. pylori*致癌过程中所扮演的角色显得日益重要.

李伟, 杨桢, 黄德强, 吕农华, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省消化系疾病研究所 江西省消化病研究重点实验室 江西省南昌市 330006
李伟, 硕士, 主要从事幽门螺杆菌与胃癌及癌前病变的关系研究.
作者贡献分布: 本文综述由李伟完成; 杨桢与黄德强修改; 吕农华审校.
通讯作者: 吕农华, 教授, 主任医师, 博士生导师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科, 江西省消化系疾病研究所, 江西省消化病研究重点实验室.
lunonghua@163.com
电话: 0791-8692705 传真: 0791-8623153
收稿日期: 2012-01-20 修回日期: 2012-02-18
接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-04-18

Role of Th17 and IL-17 in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis

Wei Li, Zhen Yang, De-Qiang Huang, Nong-Hua Lv

Wei Li, Zhen Yang, De-Qiang Huang, Nong-Hua Lv, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University; Gastroenterology Institute of Jiangxi Province; Jiangxi Provincial Key Laboratory for Digestive Diseases, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Nong-Hua Lv, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University; Gastroenterology Institute of Jiangxi Province; Key Laboratory of Digestive Diseases of Jiangxi Province, 17 Yongwaizheng Avenue, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. lunonghua@163.com
Received: 2012-01-20 Revised: 2012-02-18
Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-04-18

Abstract
T helper 17 (Th17) cells are a newly defined subset of CD4$^+$ effecter T cells characterized by the secretion of interleukin 17 (IL-17) and transcription factor RORγ. They play significant roles in the pathogenesis of various tumors and bacterial infectious diseases. Gastric carcinoma is closely related to *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection and has a very high mortality. Evidence shows that both Th17 and IL-17 play critical roles in the pathogenesis of *H. pylori*-associated gastric carcinoma and precancerous lesions. Elucidation of the roles of Th17 and IL-17 in *H. pylori*-related gastric carcinogenesis will provide new clues to the early diagnosis, personalized prevention and immunotherapy, vaccination and prognostic evaluation of gastric carcinoma.

■同行评议者
陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

Key Words: T helper cell 17; Interleukin 17; *Helicobacter pylori*; Gastric carcinoma; Precancerous lesions

Li W, Yang Z, Huang DQ, Lv NH. Role of Th17 and IL-17 in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 936-940

摘要
辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)是一种新发现的CD4$^+$ T细胞亚型, 他以分泌白介素17(interleukin 17, IL-17)和表达转录因子RORγ为特征, 在机体各种肿瘤和感染性疾病中起着重要作用. 胃癌是一种与慢性幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染密切相关的恶性肿瘤, 死亡率极高. 研究发现, Th17及其分泌的IL-17在*H. pylori*感染所致的慢性萎缩性胃炎、胃溃疡、不典型增生、肠上皮化生及胃癌的发生、发展中起着不可忽视的作用, 相关研究为胃癌的早期诊断、个性化防治、瘤苗开发和预后评价提供了新思路.

关键词: 辅助性T细胞17; 白介素17; 幽门螺杆菌; 胃癌; 癌前病变

李伟, 杨桢, 黄德强, 吕农华. Th17、IL-17在幽门螺杆菌相关性胃癌中的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 936-940
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/936.asp

0 引言
胃癌是一种最常见的消化系恶性肿瘤, 死亡率高居全球癌症第2位, 其发生是一个多因素、多步骤的过程. 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)作为体内最常见的一种慢性感染, 与胃癌及癌前病变的关系密切[1]. 目前, *H. pylori*致癌的确切机制尚不明晰, 加之早期胃癌的诊断困难、临床治疗的效果不佳, 使得*H. pylori*相关性胃癌的防治工作任重道远[2]. 辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)是一种新发现的CD4$^+$ T细胞亚型, 与其分泌的白介素17(interleukin 17, IL-17)共同参与了*H. pylori*感染的胃黏膜炎症反应[3]. 研究发现, *H. pylori*感染患者体内IL-17 mRNA表

达水平显著升高[4], IL-17A、IL-17F基因多态性与*H. pylori*感染性胃癌密切相关[5]. 此外, 胃腺癌患者肿瘤内IL-17低表达还可提示预后不良[6]. 近年来, Th17及IL-17在*H. pylori*相关性胃癌中所发挥的作用越发受到关注, 本文就相关研究报道作一综述.

1 Th17细胞及其细胞因子IL-17概述

Th17细胞是一类新发现的辅助性$CD4^+$ T细胞亚型, 活化后可分泌IL-17A、IL-6、TNF-α等细胞因子, 并且表达转录因子RORγ, 在机体多种肿瘤和慢性感染性疾病中起着关键性作用[7,8]. IL-17家族包括IL-17A(即通常所说的IL-17)、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E(IL-25)和IL-17F, IL-17可以上调IL-6、转化生长因子β(transforming growth factor β, TGF-β)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor α, TNF-α)的表达, 启动炎症级联反应. 此外, IL-17还可以参与中性粒细胞的增殖、成熟和趋化, 激活T细胞防御功能, 在肿瘤防御方面起着重要作用[9]. 研究发现, IL-17在*H. pylori*导致的胃黏膜恶性病变中起着不可忽视的作用[10].

2 Th17及IL-17表达的上游调控因子

2.1 TGF-β和IL-6是Th17细胞分化的必需因子 Veldhoen等[11]提出, TGF-β在诱导初始T细胞分化为Th17细胞过程中起着关键作用. IL-6是信号转导及转录激活因子3(signal transducers and activators of transcription 3, STAT3)的激活物, 而STAT3的激活能够诱导IL-17的高表达, TGF-β和IL-6能够取代活化的树突状细胞(dentritic cell, DC)培养液, 诱导初始T细胞分化为Th17[12].

2.2 IL-23是Th17细胞分化的诱导因子 IL-23由DC等分泌, 参与介导STAT3磷酸化, 刺激Th17细胞分泌IL-17[13]. 但IL-23只能促进记忆性Th17细胞增殖并维持其活性, 却不能诱导初始T细胞分化为Th17细胞[14,15].

2.3 IFN-γ、IL-4和IL-27是Th17细胞分化的抑制因子 干扰素γ(interferon γ, IFN-γ)和IL-4可以通过抑制TGF-β1下游Smad3的磷酸化作用, 从而抑制TGF-β1对Th17分化的诱导作用[16]. IL-27通过与IL-27受体链和gp130受体链组成的复合物结合, 对Th17进行负反馈调节[17].

2.4 ROR-γt是促进Th17分化的主要转录因子 研究发现, ROR-γt可以通过染色体重塑开放IL-17基因座位, 并促进其他因子与IL-17启动子相结合, 由此上调IL-17的表达水平[18]. 此外, ROR-γt还可以通过调节IL-23/IL-23R轴来诱导Th17的分化[19].

此外, IL-1β、IL-21对Th17、IL-17表达水平的上调作用和IL-2、IL-10对Th17分化的负调节作用, 均有所报道[8-14].

3 Th17及IL-17在*H. pylori*致癌过程中的作用

胃癌的发病是由*H. pylori*、环境、宿主等多种因素共同决定的, 且*H. pylori*与宿主之间的相互作用在*H. pylori*致癌过程中起着关键性作用[20]. 近年来, 大量论著证实了以Th17/IL-17为中心的免疫反应与*H. pylori*相关的胃黏膜恶性病变关系密切.

3.1 *H. pylori*与胃黏膜组织病理损伤 目前, *H. pylori*致癌的确切机制仍疑云重重. 现有研究主要围绕着宿主免疫介导的黏膜损伤、*H. pylori*毒力因子(尿素酶、黏附素、CagA、VacA、iceA等)、*p53*基因突变、ROS致DNA损伤、环氧合酶-2(COX-2)高表达等方面展开[21,22]. 就宿主抗感染的免疫损伤方面来说, *H. pylori*诱发胃癌的可能机制包括慢性炎症、免疫逃避和免疫抑制3部分[23]. Müller等[24]指出, *H. pylori*能够破坏并操纵Th细胞的信号转导通路从而抑制免疫应答, 利于持续感染, 导致不同程度的胃黏膜损伤.

3.2 *H. pylori*免疫逃逸 近年来, 不少学者针对*H. pylori*能够在免疫功能完好的宿主胃黏膜长期定植的机制进行了研究. Lewis等[25]发现, *H. pylori*可以通过诱导精氨酸酶-Ⅱ的表达来下调巨噬细胞一氧化氮合酶(NOS)的翻译水平, 从而进行免疫逃逸. Solnick等[26]认为, *H. pylori*能够积极地改变胞壁表面抗原, 以逃避宿主T细胞介导的免疫反应. 此外, Kao等[27]指出, *H. pylori*能够促进调节性T细胞(Treg)的分化, 从而使Th17所驱动的免疫反应受抑制, 利于持续感染.

3.3 Th17、IL-17对*H. pylori*的免疫应答 近年来, 大量研究关注于Th17细胞针对*H. pylori*所产生的特异性保护作用, 认为这主要是通过诱导中性粒细胞活化来发挥作用的. Akhiani等[28]提出, 细菌抗原刺激巨噬细胞和DC产生大量的IL-6与TGF-β, 共同诱导初始T细胞分化、成熟. 另外, *H. pylori*尿素酶B(UreB)也能诱导IL-17因子的表达[29]. 此外, IL-1β和TNF-α能促进TGF-β和IL-6对Th17细胞的诱导作用, 但不能取代TGF-β和IL-6[30]. 活化后的Th17细胞分泌IL-17、IL-6、TNF-α、IL-22等细胞因子发挥抗感染免疫应答.

3.3.1 IL-17(IL-17A): Sebkova等[31]采用IL-17分别刺激胃癌细胞MKN28和*H. pylori*的正常

■研发前沿

目前, *H. pylori*致胃癌的确切机制仍不清楚, Th17细胞及其分泌的细胞因子IL-17在机体抗感染免疫反应中发挥了重要作用, 明确Th17、IL-17与*H. pylori*相关性胃癌之间的关系, 有助于进一步理解*H. pylori*致胃癌的机制, 为胃癌的防治提供有效的指导.

■相关报道
大量研究发现, *H. pylori*感染的患者体内IL-17 mRNA表达水平显著升高, 且与胃黏膜病理损伤的严重程度高度相关. 此外, IL-17A和IL-17F基因多态性与*H. pylori*相关性胃癌的关联性, 也得到了证实.

胃上皮细胞, 均发现细胞外信号调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、激活蛋白-1(AP-1)、核因子κβ(NF-κβ)被激活, 启动了炎症瀑布反应. IL-17还可以诱导细胞间粘附因子的表达, 促进T细胞反应[32]. 此外, IL-17可以刺激成纤维细胞过度表达MMPs, 引起黏膜损伤[33].

3.3.2 IL-6: IL-6能够促进B细胞增殖分化, 诱导抗体分泌[34], 还可以促进造血干细胞增殖, 诱导中性粒细胞活化, 参与炎症反应[35].

3.3.3 TNF-α: TNF-α能够促进IL-2α、IFN-γ的表达, 并激活CTL, 诱导肿瘤细胞凋亡. Mosaffa等[36]发现广谱抗肿瘤物ABCG2短期(72 h)作用于胃癌细胞后可以导致TNF-α、IL-6、IL-1β的表达水平下降.

3.3.4 IL-22: IL-22可以促进C-反应蛋白(CRP)和抗菌肽的生成, 参与宿主上皮屏障的防御作用[37].

3.4 Th17与IL-17在*H. pylori*致癌过程中的作用

大量动物实验发现, 在*H. pylori*感染早期, 小鼠体内IL-17A和IL-22的mRNA水平显著升高, 此外, TNF-α、IL-17的外周血水平也有所升高[38,39]. Oertli等[40]指出, 小鼠体内Th17细胞介导的免疫应答水平与*H. pylori*感染所致的慢性萎缩性胃炎、异型增生和肠上皮化生有所关联. Allen等[41]在*H. pylori*慢性感染致胃炎的小鼠模型中发现, IL-17能够通过激活Ras/MAPK信号通路, 参与调节*H. pylori*感染所激活的单核巨噬系统应答水平. Flach等[42]发现, 小鼠胃黏膜的*H. pylori*感染水平和TNF、IL-12p40、IL-17、IFN-γ表达之间呈现明显的负相关. 还有研究采用多种细胞因子抑制剂腹腔注射的方法来比较各因子在*H. pylori*感染中发挥的作用, 发现尽管Th1活性有所增强, 但只有Th17分泌的IL-17所起的中和作用与*H. pylori*定植有关, 表明以IFN-γ为基础的IL-17免疫应答在抗*H. pylori*方面比TNF更为重要[43]. 然而, DeLyria等[44]在早期采用*H. pylori*主动免疫小鼠后, 检测到Th17细胞大量生成并发挥重要的免疫保护作用. 可进一步的实验结果却出人意料, 小鼠体内IL-17表达水平的上升反而伴随着*H. pylori*定植数量的增多. Olivares等[45]发现, 实验小鼠在中和IL-17和IL-17A受体基因靶位的控制下, 胃炎、胃溃疡、胃癌等检出率更高. Rolig等[46]采用免疫荧光法检测到, 具有诱导细胞凋亡作用的*H. pylori*趋化性突变体che(-)细胞内Th17 mRNA呈低表达, 且Th17针对*H. pylori*感染的免疫反应是由伴随着细菌感染的细胞凋亡信号所驱动的.

在临床方面, Jafarzadeh等[47]发现*H. pylori*感染阳性患者的IL-17、IL-23血清水平比阴性组明显升高, 并且IL-17的表达受cagA影响. Harris[48]和Freire[49]等研究组均发现*H. pylori*感染阳性的胃炎患者体内IL-17A、IL-23的水平以及Foxp3(+)细胞数量均大幅升高, 在儿童中尤为显著. Zhang等[50]发现胃癌患者比健康志愿者的外周血Th17检出水平更高, 且与晚期胃MALT淋巴瘤的关系尤为密切. 此外, 胃癌进展期患者接受治疗后, IL-17、IL-23p19、RORγ在肿瘤组织和外周血的浓度均显著增加. Mizuno等[51]对36例伴溃疡(GU)和29例非溃疡(NU)的*H. pylori*感染患者及*H. pylori*阴性对照者进行研究发现, IL-17和IL-8的表达水平: GU组>NU组>空白组; GU患者每个活检部位(溃疡: $R = 0.62$, $P<0.0001$; 胃窦: $R = 0.61$, $P<0.0001$). Zhou等[52]对人胃腺癌细胞AGS中IL-17A介导的细胞内信号通路进行了研究, 发现IL-17A能够激活3条MAPK通路(ERK, P38和JNK)和下游转录因子AP-1和P65 NF-κB并且可以诱导IL-8的表达, 提示IL-17与下游IL-17R的结合可以激活介导胃黏膜炎症和癌变发生的关键信号通路. Chen等[53]对192例胃腺癌手术切除标本进行研究发现, 肿瘤内IL-17高表达的胃腺癌切除患者5年存活率明显高于IL-17低表达者, COX多元风险分析提示, 肿瘤内IL-17表达水平是一个影响5年总体存活率的独立因子, 肿瘤内IL-17的低表达可能提示预后不良. Shibata等[54]对811例(胃癌287例, 非胃癌524例)*H. pylori*感染患者进行检测发现, IL-17A(rs2275913 G-197A)等位基因与胃癌病变进程显著相关, 且胃癌组的IL-17A/197A纯合子频率高于非癌组.

4 结论

一直以来, 早期胃癌的诊断较为困难, 临床就诊的胃癌患者多属中晚期, 加之治疗手段局限、*H. pylori*根除治疗后再感染现象普遍, 这大大加重了胃癌的危险性[55]. Th17细胞亚群的发现, 弥补了*H. pylori*相关性胃黏膜恶性病变过程中, 宿主Th1/Th2细胞介导免疫反应机制的不足, 相关研究对胃癌的早期检测、个性化防治、瘤苗开发和预后判断究竟具有怎样的实际意义呢? 让我们拭目以待.

5 参考文献

1 Resende C, Thiel A, Machado JC, Ristimäki A. Gastric cancer: basic aspects. *Helicobacter* 2011; 16 Suppl 1: 38-44

2 Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of

Helicobacter pylori. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 203-213
3 Selgrad M, Bornschein J, Rokkas T, Malfertheiner P. Clinical aspects of gastric cancer and Helicobacter pylori--screening, prevention, and treatment. *Helicobacter* 2010; 15 Suppl 1: 40-45
4 Otani K, Watanabe T, Tanigawa T, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Arakawa T. Anti-inflammatory effects of IL-17A on Helicobacter pylori-induced gastritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382: 252-258
5 Iida T, Iwahashi M, Katsuda M, Ishida K, Nakamori M, Nakamura M, Naka T, Ojima T, Ueda K, Hayata K, Nakamura Y, Yamaue H. Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncol Rep* 2011; 25: 1271-1277
6 Chen K, McAleer JP, Lin Y, Paterson DL, Zheng M, Alcorn JF, Weaver CT, Kolls JK. Th17 cells mediate clade-specific, serotype-independent mucosal immunity. *Immunity* 2011; 35: 997-1009
7 O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, Feighery C, Porcelli SA, Doherty DG. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4+, CD8α+ and CD4-CD8α- invariant natural killer T cells. *PLoS One* 2011; 6: e28648
8 Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M, Liotta F, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 222-230. e1-e4
9 Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 1263-1271
10 Velin D, Favre L, Bernasconi E, Bachmann D, Pythoud C, Saiji E, Bouzourene H, Michetti P. Interleukin-17 is a critical mediator of vaccine-induced reduction of Helicobacter infection in the mouse model. *Gastroenterology* 2009; 136: 2237-2246. e1
11 Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179-189
12 Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 9358-9363
13 Kennedy CL, Najdovska M, Jones GW, McLeod L, Hughes NR, Allison C, Ooi CH, Tan P, Ferrero RL, Jones SA, Dev A, Sievert W, Bhathal PS, Jenkins BJ. The molecular pathogenesis of STAT3-driven gastric tumourigenesis in mice is independent of IL-17. *J Pathol* 2011; 225: 255-264
14 de Wit J, Souwer Y, van Beelen AJ, de Groot R, Muller FJ, Klaasse Bos H, Jorritsma T, Kapsenberg ML, de Jong EC, van Ham SM. CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation. *Blood* 2011; 118: 6107-6114
15 Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, Powrie F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 2010; 464: 1371-1375
16 Miles FL, Tung NS, Aguiar AA, Kurtoglu S, Sikes RA. Increased TGF-β1-mediated suppression of growth and motility in castrate-resistant prostate cancer cells is consistent with Smad2/3 signaling. *Prostate* 2012; Jan 6. *[Epub ahead of print]*
17 Diegelmann J, Olszak T, Göke B, Blumberg RS, Brand S. A novel role for interleukin-27 (IL-27) as mediator of intestinal epithelial barrier protection mediated via differential signal transducer and activator of transcription (STAT) protein signaling and induction of antibacterial and anti-inflammatory proteins. *J Biol Chem* 2012; 287: 286-298
18 Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-1133
19 Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008; 28: 29-39
20 Shanks AM, El-Omar EM. Helicobacter pylori infection, host genetics and gastric cancer. *J Dig Dis* 2009; 10: 157-164
21 Jang BG, Kim WH. Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology* 2011; 78: 302-310
22 Lahner E, Bernardini G, Santucci A, Annibale B. Helicobacter pylori immunoproteomics in gastric cancer and gastritis of the carcinoma phenotype. *Expert Rev Proteomics* 2010; 7: 239-248
23 Compare D, Nardone G. Contribution of gut microbiota to colonic and extracolonic cancer development. *Dig Dis* 2011; 29: 554-561
24 Müller A, Oertli M, Arnold IC. H. pylori exploits and manipulates innate and adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection. *Cell Commun Signal* 2011; 9: 25
25 Lewis ND, Asim M, Barry DP, de Sablet T, Singh K, Piazuelo MB, Gobert AP, Chaturvedi R, Wilson KT. Immune evasion by Helicobacter pylori is mediated by induction of macrophage arginase II. *J Immunol* 2011; 186: 3632-3641
26 Solnick JV, Hansen LM, Salama NR, Boonjakuakul JK, Syvanen M. Modification of Helicobacter pylori outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2106-2111
27 Kao JY, Zhang M, Miller MJ, Mills JC, Wang B, Liu M, Eaton KA, Zou W, Berndt BE, Cole TS, Takeuchi T, Owyang SY, Luther J. Helicobacter pylori immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice. *Gastroenterology* 2010; 138: 1046-1054
28 Akhiani AA, Stensson A, Schön K, Lycke N. The nontoxic CTA1-DD adjuvant enhances protective immunity against Helicobacter pylori infection following mucosal immunization. *Scand J Immunol* 2006; 63: 97-105
29 Zhang JY, Liu T, Guo H, Liu XF, Zhuang Y, Yu S, Chen L, Wu C, Zhao Z, Tang B, Luo P, Mao XH, Guo G, Shi Y, Zou QM. Induction of a Th17 cell response by Helicobacter pylori Urease subunit B. *Immunobiology* 2011; 216: 803-810
30 Stojanović I, Cvjetićanin T, Lazaroski S, Stosić-Grujičić S, Miljković D. Macrophage migration inhibitory factor stimulates interleukin-17 expression and production in lymph node cells. *Immunology*

■应用要点

进一步明确Th17细胞介导的宿主抗*H. pylori*慢性感染的免疫应答机制及其在胃黏膜癌变进程中所起的调控作用，对胃癌及癌前病变的早期监测、个性化防治、肿瘤疫苗开发和预后判断均具有重要意义.

■同行评价
本文就Th17和IL-17在*H. pylori*相关性胃癌的研究方面进行综述，资料较新颖，文献量大，有一定的可读性和科学性，并有一定的研究参考价值.

2009; 126: 74-83

31 Sebkova L, Pellicanò A, Monteleone G, Grazioli B, Guarnieri G, Imeneo M, Pallone F, Luzza F. Extracellular signal-regulated protein kinase mediates interleukin 17 (IL-17)-induced IL-8 secretion in Helicobacter pylori-infected human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2004; 72: 5019-5026

32 Fujita K, Ewing CM, Sokoll LJ, Elliott DJ, Cunningham M, De Marzo AM, Isaacs WB, Pavlovich CP. Cytokine profiling of prostatic fluid from cancerous prostate glands identifies cytokines associated with extent of tumor and inflammation. *Prostate* 2008; 68: 872-882

33 Tanigawa S, Aida Y, Kawato T, Honda K, Nakayama G, Motohashi M, Suzuki N, Ochiai K, Matsumura H, Maeno M. Interleukin-17F affects cartilage matrix turnover by increasing the expression of collagenases and stromelysin-1 and by decreasing the expression of their inhibitors and extracellular matrix components in chondrocytes. *Cytokine* 2011; 56: 376-386

34 Ma X, Reynolds SL, Baker BJ, Li X, Benveniste EN, Qin H. IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes. *J Immunol* 2010; 184: 4898-4906

35 Kim YW, Baik YH, Yun YH, Nam BH, Kim DH, Choi IJ, Bae JM. Improved quality of life outcomes after laparoscopy-assisted distal gastrectomy for early gastric cancer: results of a prospective randomized clinical trial. *Ann Surg* 2008; 248: 721-727

36 Mosaffa F, Kalalinia F, Lage H, Afshari JT, Behravan J. Pro-inflammatory cytokines interleukin-1 beta, interleukin 6, and tumor necrosis factor-alpha alter the expression and function of ABCG2 in cervix and gastric cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2012; 363: 385-393

37 Ciccia F, Accardo-Palumbo A, Alessandro R, Rizzo A, Principe S, Peralta S, Raiata F, Giardina A, De Leo G, Triolo G. Interleukin-22 and IL-22-producing NKp44(+) NK cells in the subclinical gut inflammation of patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheu*m 2011; Dec 27. *[Epub ahead of print]*

38 Obonyo M, Rickman B, Guiney DG. Effects of myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) activation on Helicobacter infection in vivo and induction of a Th17 response. *Helicobacter* 2011; 16: 398-404

39 Algood HM, Gallo-Romero J, Wilson KT, Peek RM, Cover TL. Host response to Helicobacter pylori infection before initiation of the adaptive immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51: 577-586

40 Oertli M, Engler DB, Kohler E, Koch M, Meyer TF, Müller A. MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of Helicobacter pylori infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. *J Immunol* 2011; 187: 3578-3586

41 Algood HM, Allen SS, Washington MK, Peek RM, Miller GG, Cover TL. Regulation of gastric B cell recruitment is dependent on IL-17 receptor A signaling in a model of chronic bacterial infection. *J Immunol* 2009; 183: 5837-5846

42 Flach CF, Östberg AK, Nilsson AT, Malefyt Rde W, Raghavan S. Proinflammatory cytokine gene expression in the stomach correlates with vaccine-induced protection against Helicobacter pylori infection in mice: an important role for interleukin-17 during the effector phase. *Infect Immun* 2011; 79: 879-886

43 Shi Y, Liu XF, Zhuang Y, Zhang JY, Liu T, Yin Z, Wu C, Mao XH, Jia KR, Wang FJ, Guo H, Flavell RA, Zhao Z, Liu KY, Xiao B, Guo Y, Zhang WJ, Zhou WY, Guo G, Zou QM. Helicobacter pylori-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. *J Immunol* 2010; 184: 5121-5129

44 DeLyria ES, Redline RW, Blanchard TG. Vaccination of mice against H pylori induces a strong Th-17 response and immunity that is neutrophil dependent. *Gastroenterology* 2009; 136: 247-256

45 Olivares-Villagómez D, Algood HM, Singh K, Parekh VV, Ryan KE, Piazuelo MB, Wilson KT, Van Kaer L. Intestinal epithelial cells modulate CD4 T cell responses via the thymus leukemia antigen. *J Immunol* 2011; 187: 4051-4060

46 Rolig AS, Carter JE, Ottemann KM. Bacterial chemotaxis modulates host cell apoptosis to establish a T-helper cell, type 17 (Th17)-dominant immune response in Helicobacter pylori infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 19749-19754

47 Jafarzadeh A, Mirzaee V, Ahmad-Beygi H, Nemati M, Rezayati MT. Association of the CagA status of Helicobacter pylori and serum levels of interleukin (IL)-17 and IL-23 in duodenal ulcer patients. *J Dig Dis* 2009; 10: 107-112

48 Harris PR, Wright SW, Serrano C, Riera F, Duarte I, Torres J, Peña A, Rollán A, Viviani P, Guiraldes E, Schmitz JM, Lorenz RG, Novak L, Smythies LE, Smith PD. Helicobacter pylori gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology* 2008; 134: 491-499

49 Freire de Melo F, Rocha AM, Rocha GA, Pedroso SH, de Assis Batista S, Fonseca de Castro LP, Carvalho SD, Bittencourt PF, de Oliveira CA, Corrêa-Oliveira R, Magalhães Queiroz DM. A regulatory instead of an IL-17 T response predominates in Helicobacter pylori-associated gastritis in children. *Microbes Infect* 2012; 14: 341-347

50 Zhang B, Rong G, Wei H, Zhang M, Bi J, Ma L, Xue X, Wei G, Liu X, Fang G. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 533-537

51 Mizuno T, Ando T, Nobata K, Tsuzuki T, Maeda O, Watanabe O, Minami M, Ina K, Kusugami K, Peek RM, Goto H. Interleukin-17 levels in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and pathologic sequelae of colonization. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6305-6311

52 Zhou Y, Toh ML, Zrioual S, Miossec P. IL-17A versus IL-17F induced intracellular signal transduction pathways and modulation by IL-17RA and IL-17RC RNA interference in AGS gastric adenocarcinoma cells. *Cytokine* 2007; 38: 157-164

53 Chen JG, Xia JC, Liang XT, Pan K, Wang W, Lv L, Zhao JJ, Wang QJ, Li YQ, Chen SP, He J, Huang LX, Ke ML, Chen YB, Ma HQ, Zeng ZW, Zhou ZW, Chang AE, Li Q. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *Int J Biol Sci* 2011; 7: 53-60

54 Shibata T, Tahara T, Hirata I, Arisawa T. Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis. *Hum Immunol* 2009; 70: 547-551

55 Quiros RM, Desai DC. Multidisciplinary approach for the treatment of gastric cancer. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2011; 57: 53-68

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 941-945
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

上皮间质转化与肝纤维化的研究进展

陈 肯, 康 权

陈肯, 康权, 重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科 重庆市 400014
陈肯, 硕士, 主要从事儿科肝胆外科领域的研究.
重庆市自然科学基金资助项目, No. 2009BB5408
重庆医科大学校际重点课题基金资助项目, No. XBZD201015
作者贡献分布: 本文综述由陈肯完成; 由康权审校.
通讯作者: 康权, 副主任医师, 副研究员, 400014, 重庆市, 重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科. kq1028@yahoo. com
电话: 023-63632054
收稿日期: 2012-01-04 修回日期: 2012-01-29
接受日期: 2012-03-15 在线出版日期: 2012-04-18

Progress in understanding the relationship between epithelial-mesenchymal transition and liver fibrosis

Ken Chen, Quan Kang

Ken Chen, Quan Kang, Department of Hepatobiliary Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Chongqing, No. 2009BB5408; and the Interscholastic Key Research Program of Chongqing Medical University, No. XBZD201015
Correspondence to: Quan Kang, Associate Chief Physician, Associate Researcher, Department of Hepatobiliary Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China. kq1028@yahoo. com
Received: 2012-01-04 Revised: 2012-01-29
Accepted: 2012-03-15 Published online: 2012-04-18

Abstract
Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a complicated pathophysiological process and is thought to play an important role in the pathogenesis of liver fibrosis recently. Evidence suggests that epithelial cells in the liver (hepatocytes, cholangiocytes and hepatic epithelial progenitors) may undergo EMT and contribute to liver fibrosis. EMT is regulated in liver fibrosis mainly through the transforming growth factor beta1 signaling pathway, and various cytokines are involved in this process. This review aims to elucidate the roles of EMT in the pathogenesis of liver fibrosis.

Key Words: Epithelial-mesenchymal transition; Liver fibrosis; Transforming growth factor beta1; Cytokine

Chen K, Kang Q. Progress in understanding the relationship between epithelial-mesenchymal transition and liver fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 941-945

摘要
上皮间质转化是一个复杂的病理生理过程, 目前认为他在肝纤维化过程中起着重要的作用. 现有研究表明肝上皮细胞(肝细胞、胆管上皮细胞、肝祖细胞)可以通过上皮间质转化而促进肝纤维化. 该过程主要通过转化生长因子-β1信号通路调节, 并涉及多种细胞因子的参与. 本文就上皮间质转化与肝纤维化的关系作一综述.

关键词: 上皮间质转化; 肝纤维化; 转化生长因子-β1; 细胞因子

陈肯, 康权. 上皮间质转化与肝纤维化的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 941-945
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/941.asp

0 引言
肝纤维化是肝脏对各种慢性刺激的一种损伤修复反应, 是许多慢性肝病晚期所共有的病理改变, 其本质是不同病因损害下所导致的细胞外基质合成和降解稳态的失衡. Zeisberg等[1]发现在慢性肝脏损伤中, 肝内的上皮细胞可以通过上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)形成成纤维细胞, 促进细胞外基质生成、沉积. 目前已有大量的研究表明, 上皮细胞可通过EMT获得间充质细胞的表形及功能, 参与脏器的纤维化过程. 在肾脏、肺脏的纤维化进程中, 上皮细胞EMT已被证实是细胞外基质沉积的主要机制之一[2,3]. 本篇综述主要叙述EMT与肝纤维化的关系.

1 EMT的定义
EMT是一种基本的病理生理现象, 是指相互毗邻、具有极性的上皮细胞转化成缺乏细胞间连接、具有自由移动能力、非极性的间充质细胞

■背景资料
上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞在外界因素的作用下, 失去上皮细胞特性而获得间充质细胞表型的一种生物现象, 近年来, 他被认为在诸多脏器纤维化过程中发挥有重要的作用.

■同行评议者
董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科

■研发前沿
EMT可能是肝纤维化发生、进展过程中的重要机制之一, 但相关的实验报道尚不多见, 还需更多深入的实验研究. 另一方面, 目前对EMT的信号转导机制仍不十分清楚, 还需要在分子水平上对EMT进行动态的检测以进一步阐明.

的过程[4]. 在EMT过程中, 上皮细胞之间、上皮细胞与基质之间的紧密连接(tight junction, TJ)受损, TJ蛋白, 包括闭锁小带1(zonula occludens 1, ZO-1)、claudin 1、occludin等以及维持细胞极性、形态的粘附连接蛋白, 包括E-钙粘蛋白(E-cadherin)、β-连环蛋白(β-catenin)等丢失, 细胞骨架蛋白经历重排, 细胞极性丧失, 细胞形态发生梭型改变, 并且表达间充质细胞标志蛋白, 包括α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、成纤维细胞特异性蛋白-1(fibroblast-specific protein 1, FSP-1)、波形蛋白等, 获得了间充质细胞所具有的转移、侵入周围基质、分泌成纤维因子及合成胶原纤维的能力[5,6].

2 EMT的分类

EMT涉及参与胚胎的器官结构发育、组织修复再生及脏器纤维化、肿瘤转移. 鉴于EMT参与了以上3种不同的生物学过程, 并且产生了不同的影响, Kalluri等[6]于2008年在冷泉港举行的EMT会议中将其分为3类不同的生物学亚型: (1)EMT发生于胚胎的器官发育过程中[7], 原始上皮细胞经历EMT后形成具有移动能力的中胚层和内胚层间充质细胞, 部分间充质细胞经过诱导, 经历间充质上皮转化(MET)又形成上皮细胞, 从而导致各种器官的生成, 剩余的间充质细胞则发生凋亡; (2)EMT发生于脏器的慢性损伤和炎症过程中[8,9], 部分脏器上皮细胞经历EMT后形成成纤维细胞, 通过分泌成纤维因子及生成胶原从而引起进行性的器官纤维化; (3)EMT发生于癌细胞转移时[10,11], 癌细胞经历EMT后增强了向远处侵袭及扩散的能力, 迁移到远处的脏器后, 癌细胞又经历MET从而在转移部位形成新的病灶.

3 肝脏源性EMT的细胞类型

3.1 肝细胞 肝细胞是构成肝小叶的主要成分, 其功能十分复杂, 涉及到各种物质的合成、分解、转化、分泌等. 现有不少研究表明肝细胞可能通过EMT起到促进肝纤维化的作用. Nitta等[12]通过免疫印迹法证实肝硬化小鼠的肝细胞表达更多的波形蛋白. 此外, 国外有研究发现在转化生长因子β1(TGF-β1)的刺激下, 小鼠肝细胞中的丝状肌动蛋白(filamentous actin, FA)发生极化, 并进行了重排, 细胞形态也产生了梭型改变. 而且细胞内白蛋白表达丢失, E-钙粘蛋白mRNA水平明显降低, 而波形蛋白mRNA水平明显升高, FSP-1表达阳性, Ⅰ型胶原合成增多, 表明肝细胞获得了间充质细胞的表型[1,13]. Zeisberg等[1]在四氯化碳(CCl_4)诱导小鼠肝纤维化的体内实验中通过基因谱系分析发现45%FSP-1阳性的成纤维细胞来源于肝细胞EMT, 提示肝细胞EMT在体内肝纤维化过程中起到重要的作用. 然而, 与上述实验结果相矛盾的是, Taura等[14]发现在TGF-β1或CCl_4的诱导下, 小鼠肝细胞尽管形态上发生了成纤维细胞样的改变, 细胞内Ⅰ型胶原mRNA水平上调, 但是肝细胞却并未表达FSP-1及索蛋白(desmin)等间充质细胞标志, 并利用免疫荧光染色技术发现在表达Ⅰ型胶原的成纤维细胞中并未找到来源于肝细胞EMT转化的间充质细胞.

3.2 胆管上皮细胞 胆管上皮细胞衬附于从赫令管到胆总管十二指肠开口的所有胆管, 其参与水、电解质的运输、分泌及表达与炎症相关的细胞因子和黏附分子等生物学过程[15]. 现有研究表明胆管上皮细胞EMT可能是导致胆汁性肝纤维化的一种病理机制. Omenetti等[16]在原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)患者的肝脏标本中发现胆管上皮细胞FSP-1水平较正常组明显增高, FSP-1阳性的胆管上皮细胞数是正常组的12倍. 随后, 又在胆道结扎(bile duct ligation, BDL)诱导大鼠胆汁性肝纤维化的动物实验中, 利用RT-PCR技术证实BDL组大鼠胆管上皮细胞内FSP-1 mRNA水平是对照组的10倍, 而细胞内水通道蛋白1(aquaporin-1)、细胞角蛋白7(cytokeratin 7, CK7)、CK19等胆管上皮细胞标志蛋白的mRNA水平较对照组明显降低, 提示胆管上皮细胞可能在慢性胆汁淤积性肝病时发生EMT. Díaz等[17]亦在胆汁性肝纤维化患者的病理标本中发现胆管上皮细胞可共表达FSP-1、波形蛋白. 另外, 一些国外研究发现, 在TGF-β1刺激下, 胆管上皮细胞内E-钙粘蛋白、ZO-1表达下调, 而FSP-1、波形蛋白、纤维连接蛋白(fibronectin)、基质金属蛋白酶-2(matrix metal proteinase-2, MMP-2)、MMP-9等表达上调[18,19]. 然而与上述结果有争议的是Scholten等[20]利用Cre重组酶将黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)基因导入小鼠CK19阳性的胆管上皮细胞, 使大于40%的CK19阳性的胆管上皮细胞表达YFP, 随后通过BDL或给予CCl_4诱导小鼠肝纤维化, 运用免疫荧光染色法发现表达YFP的CK19阳性胆管上皮细胞并未表达α-SMA、FSP-1、索蛋白.

3.3 肝祖细胞 肝祖细胞是小上皮细胞, 整个细胞大部分为卵圆形胞核所占据, 当肝细胞或胆管上

皮细胞损伤丢失时可被激活, 在体内外具有分化为肝细胞和胆管上皮细胞的双向潜能[21]. 国外有研究发现体外培养的小鼠及人肝祖细胞可以共表达上皮细胞标志和间充质细胞标志, 提示肝祖细胞可能参与EMT[22]. 国内Ji等[23]在TGF-β1诱导肝纤维化过程中发现, 部分恒河猴肝上皮祖细胞(rhesus monkey liver epithelial progenitor cells, mLEPCs)表达α-SMA、波形蛋白, 同时丧失表达CK8, 并利用RT-PCR技术证实部分mLEPCs上调间充质细胞相关基因, 包括snail-l、Ⅰ型纤溶酶原激活物抑制剂及Ⅰ型胶原, 下调上皮细胞相关基因, 包括E-钙粘蛋白、ZO-1、CK18和occludin.

4 肝脏源性EMT的调控

目前研究认为TGF-β1信号通路的激活是导致上皮细胞EMT的主要途径[24]. TGF-β1是一种同源二聚体多肽分子, 分子量25 kDa, 其参与调节细胞的存活、分化、迁移、黏附和合成细胞外基质成分等诸多生物学活动[25]. 在不同种类的上皮细胞的培养中, TGF-β1主要通过Smad信号通路而介导EMT的发生[26,27]. TGF-β1通过结合细胞膜上富含丝氨酸/苏氨酸的Ⅰ和Ⅱ型TGF-β受体(TGF-β receptor, TβR)以激活Smad2/3复合体[13,28]. TGF-β1与TβRⅡ结合后随即募集TβRⅠ, 并磷酸化其胞内侧段的1个富含丝氨酸和甘氨酸的保守结构域, 即GS结构域, 活化的TβRⅠ又磷酸化Smad2/3复合体, 激活的Smad2/3与Smad4结合并移位至肝细胞核, 与各种转录因子、转录辅助阻遏因子、转录辅助活化因子相互作用, 从而调节靶基因的转录[29,30]. 现已有不少研究证实TGF-β1信号通路参与肺脏、肾脏、肝脏等器官上皮细胞EMT过程[1-3]. 以下是目前所发现的有关肝上皮细胞EMT过程中调控TGF-β1信号通路的主要细胞因子.

4.1 Smads蛋白 参与传导TGF-β1信号通路的胞内递质, 其在将TGF-β信号从细胞表面受体传导至细胞核的过程中起着关键性作用[31]. Smads蛋白按功能分成受体活化型Smads(R-Smads)、共同通路型Smads(Co-Smads)和抑制性Smads(I-Smads)3个亚家族, 至少包括8种Smad蛋白[30], 其中Smad2、Smad3属于R-Smads. Rygiel等[19]已证实在TGF-β1刺激下, 胆管上皮细胞内磷酸化的Smad2/3水平显著增高. Smad4属于Co-Smads, 能够与所有其他Smads成员结合, 是TGF-β家族各类信号传导过程中共同需要的介质[32]. Kaimori等[13]发现Smad4-siRNA可以使Smad4基因沉默, 抑制Smad4与Smad2/3复合体的结合, 从而抑制TGF-β1/Smad信号通路, 并利用TGF-β1诱导小鼠肝细胞EMT实验证实, 未转染Smad4-siRNA的小鼠肝细胞与实验组相比, 肝细胞内白蛋白和E-钙粘蛋白水平明显降低, 而Ⅰ型胶原合成水平明显增高.

4.2 snail-l蛋白 锌指转录因子snail家族中的成员之一, 可被上游TGF-β1/Smad信号通路中活化的Smad复合体激活[33]. 活化的snail-l可以与辅助阻遏因子Sin3A交互作用, 识别并与E-钙粘蛋白启动子部位的E2-box序列结合, 抑制E-钙粘蛋白的转录, 导致细胞内E-钙粘蛋白水平的降低, 推动EMT的发生[13,34]. Rowe等[35]利用RT-PCR技术证实了在TGF-β1刺激下, 小鼠肝细胞内的snail-l mRNA水平有显著的增高, 同时利用Western blot技术证实了通过慢病毒导入外源性snail-l基因的小鼠肝细胞表达的E-钙粘蛋白比对照组减少50%. 另外, 他们还通过基因敲除技术, 发现在CCL_4的作用下, snail-l基因敲除的小鼠肝细胞内的间质成分(Ⅰ型和Ⅲ型胶原)、间质细胞标志(FSP1、波形蛋白)、与间质相关的蛋白酶(MMP-1、组织蛋白酶B)、成纤维因子(结缔组织生长因子)等生成、表达减少.

4.3 组蛋白去乙酰化酶1(histone deacetylase 1, HDAC1) 一种能够催化组蛋白以及其他一些蛋白的赖氨酸残基去乙酰化的酶, 在调节基因转录以及信号转导方面起着重要作用[36]. Lei等[37]经实验证实, HDAC1可通过抑制ZO-1以及E-钙粘蛋白的启动子活性来调节TGF-β1诱导的小鼠肝细胞EMT, 通过给予HDAC1抑制剂TSA(trichostatin A)或利用RNAi干扰技术沉默细胞内HDAC1的水平能够上调细胞内ZO-1以及E-钙粘蛋白水平, 并抑制TGF-β1诱导的小鼠肝细胞迁移, 从而抑制小鼠肝细胞EMT.

4.4 Cortactin蛋白 一种调控细胞运动和黏附连接组装的F-肌动蛋白结合蛋白(F-actin binding protein), 在细胞足突和板状伪足的形成、膜胞输送、细胞内吞噬和肿瘤的形成及侵袭等方面起着重要的作用[38]. 国内Zhang等[39]发现在TGF-β1诱导小鼠肝细胞EMT的过程中, cortactin的酪氨酸发生去磷酸化, 通过给予钒酸钠抑制cortactin酪氨酸去磷酸化或利用RNAi干扰技术沉默cortacfin可以影响小鼠肝细胞内E-钙粘蛋白、ZO-1和纤维连接蛋白水平, 从而起到调节肝细胞EMT的作用.

4.5 骨形态形成蛋白-7(bone morphogenetic pro-

■相关报道
现已有大量实验研究表明TGF-β是几乎所有上皮组织发生EMT所必不可少的诱导因子, 然而TGF-β信号网络相当复杂, 其下游的各种细胞因子的相互作用机制仍不十分清楚.

■应用要点
对EMT与肝纤维化二者之间的关系进行更深入的探索, 将有助于从新的角度了解肝纤维化的发病机制, 并同时为肝纤维化的治疗提供新的思路.

tein 7, BMP7) TGF-β超家族中的成员之一, 具有调节多种类型细胞生长及分化的作用[40]. 目前认为BMP7与BMPⅠ型受体结合后通过磷酸化激活Smad1/5/8复合体, Smad1/5/8通过与TGF-β1激活的Smad2/3竞争性地结合Smad4, 从而阻遏TGF-β1/Smad通路[41,42]; 另一方面, BMP7还可抑制Smad3易位至细胞核, 这已在小鼠肾脏及肺脏纤维化实验中得到证实[43,44]. Zeisberg等[1]在实验中发现, 给予BMP7可以显著减轻肝纤维化程度, 抑制肝细胞表达FSP1. 国内Yang等[45]在重复腹腔注射猪血清诱导大鼠肝纤维化模型中发现, 给予BMP7治疗后, 大鼠肝细胞及肝星状细胞内Smad2/3水平明显降低, 提示BMP7可能还参与抑制肝细胞及肝星状细胞内Smad2/3的磷酸化过程.

4.6 Hedgehog(Hh)蛋白 一种由上皮细胞分泌的信号蛋白, 具有调节组织损伤后的重建和再生功能[46]. 两个跨膜蛋白Ptc和Smo是Hedgehog信号的细胞表面受体, 介导Hedgehog信号向胞内传递, 而锌指结构转录因子Gli家族蛋白则是脊椎动物Hedgehog信号通路下游的靶因子[47,48]. 国外有研究发现, TGF-β1在诱导上皮细胞EMT过程中, 激活的Smad3活化下游的Snail和Twist转录因子, 从而抑制E-钙粘蛋白的合成, 而由Hh激活的Gli蛋白可以加强诱导Snail和Twist的活化, 从而推动EMT发展[49]. 张志波等[50]在应用RT-PCR及Western blot等技术检测胆道闭锁患儿肝脏组织, 发现其Hh、波形蛋白表达水平明显增高, 提示Hh表达上调可能与EMT有关, 并促进肝纤维化过程. Omenetti等[16]在胆道结扎诱导大鼠肝纤维化过程中, 发现胆管上皮细胞中Ptc和Gli2蛋白增加且伴有间充质细胞标志蛋白表达上调, 并另通过实验证实胆管上皮细胞EMT可以被Hh中和抗体所抑制, 表明Hh蛋白是胆管上皮细胞EMT过程中重要的调节蛋白.

5 结论

上皮细胞EMT被认为参与了诸多组织器官的纤维化过程. 肝上皮细胞(肝细胞、胆管上皮细胞、肝祖细胞)EMT可能是肝纤维化发生发展过程中的重要机制之一, 但还需更多深入的实验研究, 尤其是体内实验来进一步明确EMT在肝纤维化过程中是否发生以及对肝纤维化进程所起的作用和影响程度. 另一方面, 在肝纤维化过程中, 调控肝上皮细胞EMT发生的信号通路十分复杂, 涉及到各种细胞因子的相互作用, 从而共同介导EMT的发生. 目前关于肝上皮细胞EMT的其他信号通路及各种细胞因子之间的相互作用分子机制还需通过实验研究来进一步阐明. 对上皮细胞EMT与肝纤维化二者之间的关系进行更深入的探索, 将有助于从新的角度了解肝纤维化的发病机制, 并同时为肝纤维化的治疗提供新的思路, 最终以达到逆转肝纤维化的目的.

6 参考文献

1 Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 23337-23347

2 Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13180-13185

3 Hills CE, Squires PE. The role of TGF-β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22: 131-139

4 Firrincieli D, Boissan M, Chignard N. Epithelial-mesenchymal transition in the liver. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34: 523-528

5 Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973-981

6 Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420-1428

7 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871-890

8 Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* (Berl) 2004; 82: 175-181

9 Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 2009; 40: 1365-1376

10 Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, Ostrowski MC, Leone G. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 937-945

11 Bagnato A, Rosanò L. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer progression: a crucial role for the endothelin axis. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 85-94

12 Nitta T, Kim JS, Mohuczy D, Behrns KE. Murine cirrhosis induces hepatocyte epithelial mesenchymal transition and alterations in survival signaling pathways. *Hepatology* 2008; 48: 909-919

13 Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007; 282: 22089-22101

14 Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH, Kodama Y, Penz-Osterreicher M, Brenner DA. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2010; 51: 1027-1036

15 周斌, 张培建. 胆管上皮细胞的生理及其与胆管疾病

的相关性. 中国普通外科杂志 2007; 16: 681-683
16 Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest* 2008; 118: 3331-3342
17 Díaz R, Kim JW, Hui JJ, Li Z, Swain GP, Fong KS, Csiszar K, Russo PA, Rand EB, Furth EE, Wells RG. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Hum Pathol* 2008; 39: 102-115
18 Rygiel KA, Robertson H, Willet JD, Brain JG, Burt AD, Jones DE, Kirby JA. T cell-mediated biliary epithelial-to-mesenchymal transition in liver allograft rejection. *Liver Transpl* 2010; 16: 567-576
19 Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, Jones DE, Burt AD, Kirby JA. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest* 2008; 88: 112-123
20 Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2010; 139: 987-998
21 陈珺明, 季光. 肝脏祖细胞的表型特征及生物学功能. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2482-2486
22 Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li YX, Rojkind M, Diehl AM. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G575-G583
23 Ji S, Wang X, Shu J, Sun A, Si W, Guo X, Zhao B, Ji W, Jin L. In vitro generation of myofibroblasts-like cells from liver epithelial progenitor cells of rhesus monkey (Macaca mulatta). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2011; 47: 383-390
24 Wendt MK, Allington TM, Schiemann WP. Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol* 2009; 5: 1145-1168
25 Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6954-6967
26 Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 659-693
27 Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
28 Miyazono K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85: 314-323
29 Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700
30 Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 2783-2810
31 Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K, Böttinger EP. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S45-S52
32 ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-273
33 Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 155-166
34 Kang Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004; 118: 277-279
35 Rowe RG, Lin Y, Shimizu-Hirota R, Hanada S, Neilson EG, Greenson JK, Weiss SJ. Hepatocyte-derived Snail1 propagates liver fibrosis progression. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 2392-2403
36 Brunmeir R, Lagger S, Seiser C. Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation. *Int J Dev Biol* 2009; 53: 275-289
37 Lei W, Zhang K, Pan X, Hu Y, Wang D, Yuan X, Shu G, Song J. Histone deacetylase 1 is required for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1489-1497
38 Ayala I, Baldassarre M, Giacchetti G, Caldieri G, Tetè S, Luini A, Buccione R. Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. *J Cell Sci* 2008; 121: 369-378
39 Zhang K, Wang D, Song J. Cortactin is involved in transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in AML-12 cells. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) 2009; 41: 839-845
40 Kim M, Choe S. BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep* 2011; 44: 619-634
41 Manson SR, Niederhoff RA, Hruska KA, Austin PF. The BMP-7-Smad1/5/8 pathway promotes kidney repair after obstruction induced renal injury. *J Urol* 2011; 185: 2523-2530
42 Kinoshita K, Iimuro Y, Otogawa K, Saika S, Inagaki Y, Nakajima Y, Kawada N, Fujimoto J, Friedman SL, Ikeda K. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* 2007; 56: 706-714
43 Wang S, Hirschberg R. BMP7 antagonizes TGF-beta-dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F1006-F1013
44 Izumi N, Mizuguchi S, Inagaki Y, Saika S, Kawada N, Nakajima Y, Inoue K, Suehiro S, Friedman SL, Ikeda K. BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L120-L126
45 Yang L, Yang CQ, Yuan M, Wang SL, Chang YZ, Xu LJ, Zhang ZJ. [Effects of bone morphogenic proteins-7 on production of collagen from hepatocytes and hepatic stellate cells during liver fibrosis]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2009; 89: 419-422
46 Ingham PW, Nakano Y, Seger C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 393-406
47 Mullor JL, Sánchez P, Ruiz i Altaba A. Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 562-569
48 Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* 2006; 133: 3-14
49 Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 548-558
50 张志波, 胡婷嫣, 何峰, 高红. 胆道闭锁肝脏组织中SHH信号与上皮间充质转化关系的研究. 中国医科大学学报 2010; 60: 305-307

■同行评价

本文就EMT的定义、分类及肝脏源性EMT的细胞类型和调控机制作了系统全面的综述, 对肝纤维化的发病机制及临床治疗提供了较好的参考价值.

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 946-952
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

循环肿瘤细胞及游离DNA甲基化在肝细胞癌患者中的研究进展

邱必军, 薛 峰, 余 坚, 夏 强

■背景资料
近年来随着对肿瘤认识的不断深入, 研究发现在肝细胞癌发生发展的早期阶段即有肿瘤细胞及其DNA释放入血, 基于循环肿瘤细胞及游离DNA表观遗传学改变的研究有望为肝细胞癌的早期诊断, 治疗效果的评价及随访复发带来新的有价值的信息和生物标志物.

邱必军, 薛峰, 夏强, 上海交通大学医学院附属仁济医院肝脏外科 上海市 200127
余坚, 上海交通大学医学院附属仁济医院上海肿瘤研究所 上海市 200032
邱必军, 在读硕士, 主要从事肝脏外科及肝移植的基础和临床研究.
癌基因及相关基因国家重点实验室基金资助项目, No. 90-10- 01
作者贡献分布: 文献检索, 资料分析及论文撰写由邱必军完成; 选题和审校分别由薛峰与夏强完成; 余坚对此文进行修改.
通讯作者: 夏强, 教授, 200127, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院肝脏外科. xiaqiang@medmail.com.cn
电话: 021-58752345
收稿日期: 2011-11-14 修回日期: 2011-12-23
接受日期: 2012-03-20 在线出版日期: 2012-04-18

Advances in understanding clinical significance of circulating tumor cells and cell-free DNA methylation in patients with hepatocellular carcinoma

Bi-Jun Qiu, Feng Xue, Jian Yu, Qiang Xia

Bi-Jun Qiu, Feng Xue, Qiang Xia, Department of Hepatic Surgery, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200127, China
Jian Yu, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200127, China
Correspondence to: Qiang Xia, Professor, Department of Hepatic Surgery, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200127, China. xiaqiang@medmail.com.cn
Received: 2011-11-14 Revised: 2011-12-23
Accepted: 2012-03-20 Published online: 2012-04-18

Abstract
During the early formation and growth of a primary tumor, tumor cells can be detached from the primary tumor and circulate through the bloodstream to form circulating tumor cells (CTCs). Also during the early stage of tumor development, apoptotic and necrotic tumor cells can release DNA into the bloodstream to form circulating cell-free DNA. Therefore, analysis of CTCs and circulating cell-free DNA is considered as a real-time "liquid biopsy" for cancer patients. CTCs are very heterogeneous and can be enriched and detected using different technologies based on their physical and biological properties. The use of modern molecular biological techniques to extract the cell-free DNA in circulating blood and detect aberrant genetic and epigenetic alterations can provide valuable information for the early diagnosis, prediction of response to therapy, recurrence monitoring and prognosis evaluation in cancer patients. In this paper, we will give a review of recent advances in understanding the clinical significance of CTCs and cell-free DNA in patients with hepatocellular carcinoma.

Key Words: Circulating tumor cells; Circulating cell-free DNA; Hepatocelluar carcinoma; Methylation; Biomarker

Qiu BJ, Xue F, Yu J, Xia Q. Advances in understanding clinical significance of circulating tumor cells and cell-free DNA methylation in patients with hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 946-952

摘要
随着对肿瘤认识的不断深入, 人们发现在原发肿瘤形成和生长的早期阶段, 肿瘤细胞即可以脱离原发肿瘤组织释放到外周血形成循环肿瘤细胞, 同样在肿瘤形成的早期阶段就会出现肿瘤细胞的坏死和凋亡, 这些凋亡或坏死的肿瘤细胞也可以释放其DNA入外周血形成血浆或血清游离的DNA, 因此对肿瘤患者循环肿瘤细胞及游离DNA的分析被认为是实时的"液相活检", 肿瘤患者中的循环肿瘤细胞具有非常强的异质性, 我们可以根据其物理和生物学性质采用不同的技术对其进行富集和检测; 可以借助现代分子生物学手段对循环游离DNA进行提取, 并对其遗传学和表观遗传学的异常改变进行分析, 这可为肿瘤的早期诊断、疗效评估、复发监测及预后判断提供重要的信息. 本文结合本课题组的研究重点, 就循环肿瘤细胞及游离DNA及其甲基化在肝细胞癌患者的研究进行综述.

关键词: 循环肿瘤细胞; 循环游离DNA; 肝细胞癌; 甲基化; 生物标志物

■同行评议者
倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

邱必军, 薛峰, 余坚, 夏强. 循环肿瘤细胞及游离DNA甲基化在肝细胞癌患者中的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 946-952
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/946.asp

0 引言

肝细胞癌(hepatocelluar carcinoma, HCC)是人类最常见的恶性肿瘤之一, 在肿瘤相关性死亡的病因中位列第3位[1]. 尽管在过去的10年里, HCC的治疗手段不断进步, 但其长期预后并未得到明显改善, 这其中最重要的原因是HCC往往无法得到早期诊断. 实际上, 很多患者在诊断为HCC时就已经出现疾病的局部进展或远处转移. 研究表明在肿瘤形成的早期阶段, 即可释放肿瘤细胞和肿瘤DNA至外周血, 形成循环肿瘤细胞及游离DNA[2,3], 这为我们对HCC的早期诊断、疗效判断及预后估计带来了新的载体.

1 循环肿瘤细胞及游离DNA的来源及生物学特性

早在1869年, Ashworth[4]在对一个转移性癌症的男性患者尸检时发现其外周血中存在和原发肿瘤组织相似的细胞, 他是一类脱离原发肿瘤组织进入外周血循环的肿瘤细胞, 这种脱离原发肿瘤组织的循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)可以转移至远处其他组织器官形成转移灶, 转移灶中的肿瘤细胞也可以脱离肿瘤组织入血再次形成CTC, 这是CTC的主要来源, 往往这两种方式来源的CTC具有一定的异质性[5,6].

肿瘤在发生发展中常伴有肿瘤细胞的不断坏死和凋亡, 坏死或凋亡的肿瘤细胞会释放其DNA入血形成循环游离肿瘤DNA, 同样地, CTC及转移灶中的肿瘤细胞也会因为坏死和凋亡向外周血释放DNA, 形成循环游离肿瘤细胞DNA. 肿瘤患者中循环肿瘤细胞DNA只是循环游离DNA的一部分, 其他非肿瘤细胞在坏死和凋亡时也可以向外周血释放DNA形成游离DNA[5]. 研究发现肿瘤患者循环中游离DNA的水平通常要高于健康个体, 说明肿瘤患者中循环肿瘤细胞DNA是循环游离DNA的主要来源. 最近, Diehl等[7]估算对于一个肿瘤负荷为100 g(= 3×10^{10}个癌细胞)患者来说, 每天将近有3.3%的肿瘤细胞DNA进入血循环. 这些DNA经过低浓度的琼脂糖凝胶电泳分析表明其片段大小在70-200 bp的小片段到近21 kb的大片段之间[8], 循环游离DNA的代谢机制至今尚未完全阐明, 目前认为肝脏、肾脏、血浆中的核酸酶在游离DNA的代谢清除中均发挥了重要的作用. 对分娩后母体血液循环中游离的胎儿DNA清除规律的研究表明, 游离DNA的消除半衰期仅为16.5 min[9], 循环中游离DNA的清除过程是迅速而又有效的[10,11].

通常情况下, 肿瘤患者中循环游离DNA的遗传学和表观遗传学异常改变是等同于原发肿瘤组织的, 这种异常改变包括点突变、DNA片段的高甲基化、微卫星序列的不稳定性以及杂合性的缺失. 然而, 血液循环游离DNA的异常改变并不总是和原发肿瘤一致[12], 这种差异至少可以部分归因于肿瘤患者中CTC及微小转移灶也可向外周血释放DNA所致.

2 循环游离DNA甲基化及其水平和HCC

近年来, 研究表明DNA序列以外的改变即表观遗传学改变在肿瘤的发生发展中发挥了重要作用, DNA甲基化修饰作为表观遗传学最重要的内容一直是人们研究的热点. 和非癌对照相比, 人类原发性肝细胞癌组织和已有的肝癌细胞系发现了多个基因的异常甲基化修饰, 特别是抑癌基因启动子区域的高甲基化引起的抑癌基因失活是肝癌发生发展的一个频繁的表观遗传学事件[13,14]. 在肿瘤患者中, 随着肿瘤细胞的凋亡和坏死伴有大量的DNA进入外周血形成循环游离DNA, 我们时常在肿瘤患者循环游离DNA中找到和原发肿瘤一致的遗传学及表观遗传学(包括DNA甲基化)改变[5], 健康个体的血浆游离DNA的浓度在0-100 μg/L之间, 平均值为30 μg/L. 肿瘤患者的血浆或血清中游离DNA的浓度波动在0到1 000 μg/L, 平均值为180 μg/L. 尽管肿瘤患者血液中游离DNA浓度要高于健康对照组, 但是两组中血浆或血清内全部游离DNA浓度变化区间均很大[15,16]. 在健康个体及良性和恶性疾病中, 血浆游离DNA浓度存在重叠现象, 因此仅对游离DNA浓度的定量分析似乎还不足以来进行良恶性疾病的诊断, 往往需要结合DNA的定性分析来进行诊断. 对于无局部进展及远处转移的部分肿瘤患者来说, 手术切除肿瘤后, 血浆游离DNA 的水平会降至健康个体的水平[17]. 然而, 如果手术后血浆游离DNA仍然保持较高的水平, 往往意味着肿瘤细胞的残留[18]. 过去的10多年里, 人们进行了大量关于循环游离DNA的水平及其甲基化在肝细胞癌的诊断、疗效判断及预后估计的研究.

2006年, 由Ren等[19]进行一项关于血清游离DNA水平和肝细胞癌患者长期预后的研究发现79例HCC患者血浆循环DNA浓度为47.1 μg/L

■**研发前沿**
尽管肝细胞癌患者循环游离DNA的遗传学改变和表观遗传学改变往往等同于原发肿瘤组织, 然而循环游离DNA到底从何而来, 在血液中如何代谢的机制还有待阐明.

■相关报道
Xu等以生物素化去唾液酸胎球蛋白作为配体与肝癌细胞结合, 然后用抗生物素抗体磁珠进行间接磁性标记, 从而磁性捕获循环肝癌细胞, 该系统解决了以前所报道方法的固有问题, 具有高度的特异性和敏感性.

±43.7 μg/L, 显著高于健康对照组(17.6 μg/L±9.5 μg/L), 但与肝硬化组(30.0 μg/L±13.3 μg/L)相比差异无统计学意义, 并且血清游离DNA水平和肿瘤大小及TNM分期密切相关, 和患者3年的无病生存率及整体生存率呈负相关. 同年, 由Iizuka等[20]的研究发现HCV相关性HCC患者血清游离DNA水平(141.1 μg/L±161.2 μg/L)较HCV携带者(34.4 μg/L±26.6 μg/L)或健康对照组(45.7 μg/L±22.6 μg/L)显著增高. 游离DNA在分化良好、中等分化及分化不良的肝细胞癌患者血清中的水平分别为90.5 μg/L±102.5 μg/L, 125.8 μg/L±80.4 μg/L及376.6 μg/L±408.5 μg/L. HCC患者中血清游离DNA水平和肿瘤的分化程度及大小相关, 和患者的年龄、性别、肿瘤的TNM分期及甲胎蛋白水平或凝血酶原前体蛋白水平没有明显相关性.

2007年, 上述研究小组[21]在一项回顾性对立研究中进一步证实了HCV相关性HCC患者血清中游离DNA的水平(115.9 μg/L±98.3 μg/L)要显著高于HCV携带者(34.4 μg/L±40.4 μg/L), 并且血清游离DNA水平高的HCC患者的总体生存期较血清游离DNA水平低的患者显著缩短. 血清游离DNA水平高的HCC患者术后更加容易发生肿瘤的远处转移. 相比之下, HCC患者术前血清游离DNA的水平和术后患者的无病生存期无明显相关性. 2011年, 由Huang等[22]通过对HCC患者、肝硬化患者及健康个体的血浆循环DNA的定量分析来评价其在HCC中的诊断及判断预后作用, 研究表明HCC患者血浆中循环DNA的水平(中位数: 173 μg/L)显著高于健康对照组(9 μg/L)及良性肝病对照组(46 μg/L), 此外, 还发现HCC患者血浆中循环DNA水平和肿瘤大小呈正相关的, 对于伴有肝内播散或血管侵犯的HCC患者血浆中循环DNA水平也显著升高.

2008年, Chan等[23]通过对HCC患者血清中游离DNA甲基化的定量分析发现: 高甲基化的RASSF1A基因片段在HCC、HBV携带者及健康对照个体中的检测率分别为93%、58%及8%. HCC患者和HBV携带者血清RASSF1A浓度的中位数分别为7.70×10^5 copies/L, 1.18×10^5 copies/L, 在刚诊断为HCC或肿瘤切除后1年时血清中RASSF1A浓度较高的患者无病生存率较低. 此外, 通过对HBV携带者的长期随访发现, 最终发展为HCC的HBV携带者循环中的RASSF1A浓度在诊断为HCC时显著增高.

2010年, Tsutsui等[24]进行了一项关于循环血液中甲基化的CCNDD2基因水平和HCV相关性HCC预后的研究, 在70例接受根治性肝切除的HCV相关性HCC患者中, 血清甲基化的CCND2基因为阳性(超过70 ng/L)共39例, 血清中甲基化的CCND2基因为阴性(不超过70 ng/L)的患者共31例, 与血清甲基化的CCND2阴性的患者相比阳性患者的无病生存期显著缩短, 血清甲基化的CCND2基因为阴性的患者中没有出现HCC早期肝内复发现象. COX多元统计分析发现血清中甲基化的CCND2基因水平是患者无病生存期的一个独立危险因素.

上述研究结果表明无论是何种原因引起的HCC患者, 其循环中游离DNA水平较良性肝病及病毒携带者或健康个体均明显升高, 游离DNA的水平和肿瘤分化程度及肿瘤大小密切相关, 往往游离DNA水平较高的患者远期预后较差.

*p16*基因又称之为CDKN2A, *p16*Ink4A基因, 是1994年美国冷泉实验室由Nobori等[25]发现的一种新的抑癌基因, 直接参与细胞周期的调控, 负调节细胞增殖及分裂. 目前认为*p16*是比*p53*更重要的一种新型抗癌基因, 有人把他比作细胞周期中的刹车装置, 一旦失灵则会导致细胞恶性增殖, 导致恶性肿瘤发生. 2011年由Zang等[26]进行的一项关于*p16*基因高甲基化在HCC及肝硬化中研究的荟萃分析, 研究表明*p16*基因高甲基化引起的*p16*基因失活在HCC形成中发生了重要的作用, 并与HCC及肝硬化的风险增大密切相关. 至今已有数项关于血浆或血清中*p16*基因甲基化和HCC的研究. 1999年, Wong等[27]首次在16例*p16*基因启动子区域甲基化阳性的HCC患者中, 检测到13例血清/血浆中存在*p16*基因的启动子区域甲基化, 而10名健康志愿者、38例慢性肝炎/肝硬化患者外周血中未检测到该区段DNA甲基化. 2000年, Wong等[28]将检测*p16*基因的启动子区域甲基化状态用于评价HCC治疗的疗效, 他们在49例HCC患者血浆中, 发现术后*p16*基因启动子区域甲基化水平中位数比术前降低12倍, 提示这种监测方法可以用来观察肝细胞癌疗效. 另外, Wong等[29]的研究还发现, 在HCC组织中, 分化良好、中等和不良3型的*p16*启动子甲基化率分别为67%、73%和75%; 临床分期T1、T2、T3和T4期患者甲基化率分别为40%、68%、69%和100%, 提示*p16*启动子甲基化水平与临床分期和病理分类有关; 而在T1、T2、T3和T4期*p16*启动子甲基化阳性患者中, 其血浆/血清*p16*甲基化阳性率分别为100%(2/2),

71%(12/17), 89%(8/9)和100%(2/2). 2004年, 韩国学者Chu等[30]对46例HCC及23例肝硬化患者血清中异常甲基化的*p16*INK4A基因进行检测, 研究发现HCC和肝硬化患者甲基化的*p16*INK4A基因检测率分别为47.8%(22/46), 17.4%(4/23). 2006年, Zhang等[31]通过对40份HCC组织及对应的39份血浆样本的甲基化*p16*基因进行检测, 研究发现组织和血浆中甲基化的*p16*基因检测率分别为62%(22/40)和32%(12/39), 血清中检测到甲基化*p16*基因的患者其对应的肝癌组织样本中也均出现了*p16*基因的甲基化. 2010年, Ahmed等[32]通过对HCV相关性的17例慢性活动性肝炎, 20例肝硬化及25例HCC患者血清中甲基化的*p16*INK4A基因研究发现, 血清中甲基化的*p16*INK4A基因在HCV相关性慢性活动性肝炎、肝硬化及HCC患者中的检测率分别为47.1%、5%和92%, 并且血清*p16*INK4A基因的甲基化和甲胎蛋白水平没有明显相关性.

2000年, Wong等[29]首次在25例HCC患者的肝癌组织中检测到16例存在*p15*基因启动子区域的异常甲基化, 在这16例*p15*基因启动子区域异常甲基化的HCC患者中有4例(25%)的血清/血浆中检测到了和肿瘤甲基化状态一致的表观遗传学改变. 在其余的9例未出现*p15*基因启动子区域异常甲基化的肝细胞癌或55例健康个体及无HCC的慢性肝炎或肝硬化患者的血清/血浆中均未能检测到甲基化的*p15*基因序列.

2006年, Wang等[33]研究发现26例肝癌组织中有23例检测到GSTP1基因启动子高甲基化, 并首次报道了在这23例患者的血清中有14例检测到了GSTP1基因的异常甲基化, 而在肝癌组织中未检测到GSTP1基因启动子高甲基化, HCC患者及健康个体的血清中均未检测到甲基化的GSTP1基因序列. 2007年, Zhang等[34]报道在诊断为HCC的50例患者中, 有35例(70%)可以在外周血中检测到RASSF1A启动子高甲基化.

最近由费伯健等[35]的一项关于血浆Ras相关区域家族蛋白1A基因甲基化在HCC分子诊断中价值的研究, 他们发现HCC患者血浆RASSF1A甲基化阳性率(47/72, 65.3%)显著高于健康对照(1/41, 2.4%)和肝良性病变组(3/37, 8.1%).

3 循环肿瘤细胞和HCC

肝切除手术被认为是HCC患者根治性的手段, 然而大约40%的患者会在术后早期即1年内复发[36], 这么高的早期复发率被认为和肝切除术前已经存在的CTC相关. 这些CTC可以定值在远处器官产生转移灶也可以再次返回并定植到剩余的肝组织(self-seeding)产生肝内复发[37]. 近年来, 关于肝癌肝移植术后肿瘤复发机制的研究渐成热点, HCC患者在进接受肝移植手术治疗后, 不仅切除了肝肿瘤, 也去除了可能存在硬化的肝脏, 为什么术后还会出现肿瘤的复发和转移呢, 不难理解, 这种肿瘤复发要么是隐性转移灶(occult metastasis)的生长要么是CTC的定植所致. CTC在HCC患者行肝切除或肝移植治疗后肿瘤复发转移中似乎扮演了重要的角色[38].

基于CTC物理及生物学特性的CTC检测技术发展迅速, 目前基于EpCAM抗体磁珠的Cell Search系统是唯一被美国FDA批准用于检测乳腺癌、结肠癌、前列腺癌CTCs的装置. 过去的数年里已有大量关于CTC在乳腺癌、前列腺癌及大肠癌中的研究, 研究表明CTC在肿瘤的复发转移、疗效监测及预后估计上具有重要的临床意义, 甚至已被引进最新的乳腺癌TNM分期标准[39-42]. 尽管肝癌细胞也属于上皮细胞, 但HCC组织标本表达上皮细胞表面粘附分子(EpCAM)的比例很少[43], 因此Cell Search系统并不适用于HCC患者的CTC的富集和检测. 正是由于HCC患者CTC检测技术上的原因, 目前关于HCC患者CTC的研究报道较少.

最近由香港玛丽医院Fan等[44]进行的一项关于循环肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSC)对HCC患者接受肝切除治疗后肿瘤复发预测的前瞻性研究, 他们利用流式细胞等技术对82例HCC患者循环CSC进行检测, 有56例(68.3%)检测到了循环CSC, 循环CSC的水平和肿瘤的大小及临床TNM分期显著相关, 与肿瘤的数目、微血管侵犯、分化程度或切除肿瘤组织中CSC所占的百分比没有明显相关性. 在有复发和无复发的HCC患者中循环CSC的中位水平分别为0.02%和0.01%(0.05%代表1 mL血液中存在5个CSC), 差异有统计学意义. 循环CSC水平超过0.01%对预测所有复发、肝内复发、肝外复发的准确度分别为73.2%、65.0%及73.2%. 通过单变量分析发现对肿瘤复发有显著影响的因素再次进行多参数分析表明, 循环CSC水平超过0.01%已成为肝癌术后肿瘤肝内复发及远处复发的最强预测因子.

最近由中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆医院Xu等[45]的一项基于去唾液酸糖蛋白受体的循环肝癌细胞分离/检测系统及其临床应用研究, 他们以生物素化去唾液酸胎球蛋白作为配体与肝癌细胞结合, 然后用抗生物素抗

■创新盘点

本文分别就循环肿瘤细胞和游离DNA及其甲基化在肝细胞肝癌患者诊断、治疗效果评价、复发监测、预后判断中的作用进行综述, 并对循环肿瘤细胞和循环游离DNA之间的潜在的联系进行了描述, 两者相互结合的研究将在肝细胞癌患者的早期诊断、疗效果评价、复发监测、预后判断中发挥更大的作用.

■应用要点
目前, 关于肝细胞癌生物标志物的研究已由蛋白向核酸转变, 循环肿瘤细胞对于肝细胞癌的诊断具有极高的特异性, 对肝细胞肝癌患者术后复发具有重要的预测价值, 基于循环肿瘤细胞及游离DNA甲基化的研究将为肝细胞癌的早期诊断、疗效评价、复发监测、预后判断提供重要的信息.

体磁珠进行间接磁性标记, 从而磁性捕获循环肝癌细胞, 接着用人肝细胞特异性Hep Par 1抗体进行免疫荧光染色鉴定, 并对阳性细胞进行计数. 由于肝细胞通常不会脱落进入血循环, 除非演变成肿瘤细胞, 因此检测到的细胞即为循环肝癌细胞. 该系统解决了以前所报道方法的固有问题, 具有高度的特异性和敏感性.

通过利用该系统对HCC患者、良性肝病患者和健康志愿者临床样本的检测, 探讨了该系统临床应用的可行性, 在受检的235例HCC患者外周血中, 195例可检出CTCs, 检出数为21个±25个, 阳性率为83%. 统计分析表明CTCs的阳性率和CTCs数目与门静脉癌栓、肿瘤大小、TNM分期、Milan标准符合情况具有显著相关性, 但与年龄、性别、病毒感染状况、Child-Pugh分级和血清AFP浓度均无相关性. 分析结果表明, CTCs阳性率从TNM分期的Stage Ⅰ的67%至Stage Ⅳ的100%, 与TNM分期成正相关; CTCs检出数从Stage Ⅰ的34个±5个至Stage Ⅳ的71个±34个, 与TNM分期也成正相关. 符合Milan标准的HCC患者CTCs阳性率为69%, 不符合Milan标准的HCC患者CTCs阳性率为91%, 符合Milan标准的HCC患者CTCs检出数为64个±8个, 不符合Milan标准的HCC患者CTCs检出数为294个±27个, 差异有统计学意义. CTCs阳性率与肿瘤大小成正相关, CTCs检出数与肿瘤大小也成正相关. 伴门静脉癌栓的HCC患者CTCs阳性率为93%, 不伴门静脉癌栓的HCC患者CTCs阳性率为69%; 伴门静脉癌栓的HCC患者CTCs检出数为324±28个, 不伴门静脉癌栓的HCC患者CTCs检出数为5±9个, 以上差异均具有统计学意义.

4 结论

我们基于良恶性疾病循环游离DNA及其甲基化模式的不同的研究来发展肿瘤的标志物[46]. 通过对HCC患者循环游离DNA及甲基化的分析, 为HCC的早期诊断、疗效判断、复发监测及预后估计带来了很多有价值的信息, 发展了一种微创的肿瘤标志物, 但仍有许多机制尚不完全明了, 循环游离DNA到底从何而来, 在血液中如何代谢? 在一些良性肝病中循环游离DNA浓度也会升高, 用循环游离DNA浓度作为HCC筛查的指标缺乏特异性, 需要结合对游离DNA的遗传学及表观遗传学分析(包括DNA甲基化)来提高其特异性, HCC患者循环中游离DNA不仅含有肿瘤基因组, 也含有正常细胞基因组. 无论是正常细胞还是肿瘤细胞, 其DNA片段进入血液循环具有随机性及不确定性. 这些都可能给基因分析带来干扰, 造成假阴性[47]. CTC在HCC患者肝切除或肝移植后肿瘤复发的机制上有着重要的地位. 但关于其在HCC患者中的研究报道还很少, 我们通过对HCC患者CTC的研究不但可以对肝癌的早期诊断、疗效判断、预后估计带来重要信息, 而且可能为改善肝癌患者在肝切除或肝移植后的长期预后找到新的靶点. CTC本身也是循环游离DNA的来源之一, 希望通过联合CTC及游离DNA的分析可以提高HCC的早期诊断率, 并为HCC患者接受根治性治疗(肝切除或肝移植)后的疗效评估及预后判断带来新的标准.

5 参考文献

1 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-2576
2 Schwarzenbach H, Alix-Panabières C, Müller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X, Pantel K. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1032-1038
3 Schwarzenbach H, Chun FK, Lange I, Carpenter S, Gottberg M, Erbersdobler A, Friedrich MG, Huland H, Pantel K. Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1465-1471
4 Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australian Medical Journal* 1869; 14: 146–147
5 Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 2012; 63: 199-215
6 Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr Opin Genet Dev* 2010; 20: 96-99
7 Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16368-16373
8 Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-1665
9 Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 218-224
10 Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 181-232
11 Emlen W, Mannik M. Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 185-192
12 Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426-437
13 Tischoff I, Tannapfe A. DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14:

1741-1748
14 Sceusi EL, Loose DS, Wray CJ. Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *HPB* (Oxford) 2011; 13: 369-376
15 Boddy JL, Gal S, Malone PR, Harris AL, Wainscoat JS. Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1394-1399
16 Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D, Han LY, Godwin A, Karlan BY, Simpson JL, Gershenson DM, Coleman RL, Bischoff FZ, Sood AK. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer* 2010; 116: 1918-1925
17 Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nogal A, Sousa A, Medeiros R. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol* 2008; 27: 415-421
18 Wimberger P, Roth C, Pantel K, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, Schwarzenbach H. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2011; 128: 2572-2580
19 Ren N, Ye QH, Qin LX, Zhang BH, Liu YK, Tang ZY. Circulating DNA level is negatively associated with the long-term survival of hepatocellular carcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3911-3914
20 Iizuka N, Sakaida I, Moribe T, Fujita N, Miura T, Stark M, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Elevated levels of circulating cell-free DNA in the blood of patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2006; 26: 4713-4719
21 Tokuhisa Y, Iizuka N, Sakaida I, Moribe T, Fujita N, Miura T, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Circulating cell-free DNA as a predictive marker for distant metastasis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 97: 1399-1403
22 Huang Z, Hua D, Hu Y, Cheng Z, Zhou X, Xie Q, Wang Q, Wang F, Du X, Zeng Y. Quantitation of Plasma Circulating DNA Using Quantitative PCR for the Detection of Hepatocellular Carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2011; Jul 21. *[Epub ahead of print]*
23 Chan KC, Lai PB, Mok TS, Chan HL, Ding C, Yeung SW, Lo YM. Quantitative analysis of circulating methylated DNA as a biomarker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chem* 2008; 54: 1528-1536
24 Tsutsui M, Iizuka N, Moribe T, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Fujita Y, Hamamoto Y, Tsunedomi R, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Tamesa T, Sakaida I, Oka M. Methylated cyclin D2 gene circulating in the blood as a prognosis predictor of hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 516-520
25 Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753-756
26 Zang JJ, Xie F, Xu JF, Qin YY, Shen RX, Yang JM, He J. P16 gene hypermethylation and hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3043-3048
27 Wong IH, Lo YM, Zhang J, Liew CT, Ng MH, Wong N, Lai PB, Lau WY, Hjelm NM, Johnson PJ. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 1999; 59: 71-73
28 Wong IH, Zhang J, Lai PB, Lau WY, Lo YM. Quantitative analysis of tumor-derived methylated p16INK4a sequences in plasma, serum, and blood cells of hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1047-1052
29 Wong IH, Johnson PJ, Lai PB, Lau WY, Lo YM. Tumor-derived epigenetic changes in the plasma and serum of liver cancer patients. Implications for cancer detection and monitoring. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906: 102-105
30 Chu HJ, Heo J, Seo SB, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US. Detection of aberrant p16INK4A methylation in sera of patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2004; 19: 83-86
31 Zhang YJ, Rossner P, Chen Y, Agrawal M, Wang Q, Wang L, Ahsan H, Yu MW, Lee PH, Santella RM. Aflatoxin B1 and polycyclic aromatic hydrocarbon adducts, p53 mutations and p16 methylation in liver tissue and plasma of hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 2006; 119: 985-991
32 Ahmed R, Salama H, Fouad A, Sabry D, AbdAlah el-S, Kamal M. Detection of aberrant p16INK4A methylation in sera of patients with HCV-related liver diseases: An Egyptian study. *Med Sci Monit* 2010; 16: CR410-CR415
33 Wang J, Qin Y, Li B, Sun Z, Yang B. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1 in the tumor and serum of Chinese human primary hepatocellular carcinoma patients. *Clin Biochem* 2006; 39: 344-348
34 Zhang YJ, Wu HC, Shen J, Ahsan H, Tsai WY, Yang HI, Wang LY, Chen SY, Chen CJ, Santella RM. Predicting hepatocellular carcinoma by detection of aberrant promoter methylation in serum DNA. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2378-2384
35 费伯健, 黄朝晖, 华东, 胡瑜, 程之红, 余坚. 血浆Ras相关区域家族蛋白1A基因甲基化在肝细胞癌分子诊断中的价值. 肿瘤 2011; 31: 742-747
36 Fan ST, Mau Lo C, Poon RT, Yeung C, Leung Liu C, Yuen WK, Ming Lam C, Ng KK, Ching Chan S. Continuous improvement of survival outcomes of resection of hepatocellular carcinoma: a 20-year experience. *Ann Surg* 2011; 253: 745-758
37 Pantel K, Alix-Panabières C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 339-351
38 Toso C, Mentha G, Majno P. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: five steps to prevent recurrence. *Am J Transplant* 2011; 11: 2031-2035
39 Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, Diener MK, Büchler MW, Koch M, Weitz J. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138: 1714-1726
40 Liu MC, Shields PG, Warren RD, Cohen P, Wilkinson M, Ottaviano YL, Rao SB, Eng-Wong J, Seillier-Moiseiwitsch F, Noone AM, Isaacs C. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5153-5159
41 Shaffer DR, Leversha MA, Danila DC, Lin O, Gonzalez-Espinoza R, Gu B, Anand A, Smith K, Maslak P, Doyle GV, Terstappen LW, Lilja H, Heller G, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant

■**同行评价**
本文对肝细胞癌患者循环肿瘤细胞及游离DNA甲基化的研究进展进行了较全面的综述, 文章有较好的可读性, 能够使读者熟悉该领域的研究概况.

prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2023-2029
42 Sun YF, Yang XR, Zhou J, Qiu SJ, Fan J, Xu Y. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 1151-1173
43 Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, Mazzoleni G, Gastl G, Went P. EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol* 2011; 64: 415-420
44 Fan ST, Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Yu WC, Wong J. Prediction of posthepatectomy recurrence of hepatocellular carcinoma by circulating cancer stem cells: a prospective study. *Ann Surg* 2011; 254: 569-576
45 Xu W, Cao L, Chen L, Li J, Zhang XF, Qian HH, Kang XY, Zhang Y, Liao J, Shi LH, Yang YF, Wu MC, Yin ZF. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3783-3793
46 Levenson VV. DNA methylation as a universal biomarker. *Expert Rev Mol Diag*n 2010; 10: 481-488
47 胡捷, 周俭, 王征, 樊嘉. 外周血循环DNA在肝细胞癌早期诊治的研究进展. 复旦学报(医学版) 2009; 36: 776-778

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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出版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 953-958
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

上皮间质转化及相关信号通路在原发性肝细胞癌转移中的研究进展

齐明华

齐明华, 北京大学深圳医院感染性疾病科 深圳市北京大学香港科技大学医学中心 广东省深圳市 518036
齐明华, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎、肝纤维化和原发性肝癌的基础和临床研究.
通讯作者: 齐明华, 主治医师, 518036, 广东省深圳市福田区莲花路1120号, 北京大学深圳医院感染性疾病科, 深圳市北京大学香港科技大学医学中心. qimh@yahoo.com.cn
电话: 0755-83923333-8147
收稿日期: 2012-01-03 修回日期: 2012-01-23
接受日期: 2012-03-15 在线出版日期: 2012-04-18

Signal pathways associated with epithelial-mesenchymal transition in metastasis of primary hepatocelluar carcinoma

Ming-Hua Qi

Ming-Hua Qi, Department of Hepatology, Beijing University Shenzhen PKU-HKUST Medical Center, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China
Correspondence to: Ming-Hua Qi, Attending Physician, Department of Hepatology, Beijing University Shenzhen PKU-HKUST Medical Center, 1120 Lianhua Road, Futian District, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China. qimh@yahoo.com.cn
Received: 2012-01-03 Revised: 2012-01-23
Accepted: 2012-03-15 Published online: 2012-04-18

Abstract
Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon in which epithelial cells lose their epithelial characters and acquire mesenchymal characters. EMT can be seen in embryogenesis, organ fibrosis and tumor metastasis. EMT can be observed in metastasis of primary hepatocelluar carcinoma (HCC). This review focuses on several signal pathways associated with EMT, such as TGF-β, Wnt (wingless-type)/β-catenin, and Hedgehog signal pathways. Other factors involved in EMTs, such as NF-κB, Notch, miRNA, CHD1L, ARHGEF9, HBX, and extracellular matrix are also discussed in this article. A better understanding of the mechanism of EMT can help us find new targets for HCC treatment.

Key Words: Hepatocelluar carcinoma; Epithelial mesenchymal transitions; Signal pathway; Tumor metastasis

Qi MH. Signal pathways associated with epithelial-mesenchymal transition in metastasis of primary hepatocelluar carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 953-958

摘要
上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)现象是指上皮细胞失去上皮表型, 获得间质细胞表型的过程. 存在于胚胎发生、器官纤维化和肿瘤转移过程中. 在原发性肝细胞癌的转移中存在这一现象. 本文重点介绍了TGF-β通路、Wnt(wingless-type)/β-catenin通路、Hedgehog通路的组成及其在原发性肝细胞癌的上皮间质转化过程中起到的重要调控作用. 此外, 还谈及了其他调控因子, 如NF-κB通路、Notch通路、转录因子、microRNA、CHD1L、ARHGEF9、乙肝病毒X基因(hepatitis B virus X gene, HBX)、细胞外基质等也参与了EMT的发生. 研究EMT的分子机制是一个有前景的课题, 可以为原发性肝细胞癌的治疗提供新的靶点, 更好地理解靶向治疗中的耐药机制.

关键词: 原发性肝细胞癌; 上皮间质转化; 信号通路; 肿瘤转移

齐明华. 上皮间质转化及相关信号通路在原发性肝细胞癌转移中的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 953-958
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/953.asp

0 引言
原发性肝细胞癌(hepatocelluar carcinoma, HCC)是严重危害人类健康的恶性肿瘤, 在所有实体肿瘤中, 其患病率已跃居世界第5位. 在欧美, 由于HCV感染导致的肝癌病例呈逐年上升的趋势[1], 在中国其年发病率更是高达0.1%[1]. HCC是高死亡率的疾病, 在男性癌症相关致死原因中位居第3, 每年导致全球约50万人死亡[1]. 高死亡率的原因是因为目前缺乏治疗HCC的有效手段. 尽

■背景资料
上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)现象是指上皮细胞失去上皮表型, 获得间质细胞表型的过程. 存在于胚胎发生、器官纤维化和肿瘤转移过程中. 在原发性肝细胞癌的转移中存在这一现象.

■同行评议者
王蒙, 副教授, 副主任医师, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院

■研发前沿
近年来, 人们在乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、食管癌模型中发现EMT现象, 说明上皮间质转化也是肿瘤转移的重要机制之一.

管早期患者可以进行手术和介入治疗, 但是复发率很高(有研究发现3年的复发率达50%)[2], 对于那些错过了早期治疗时机只能姑息治疗的晚期患者, 5年的生存率低至7%[3]. 说明目前肝癌的治疗效果差强人意. 因此, 如何防止复发, 并寻找新的治疗手段, 如针对信号通路作用的靶向治疗, 是一个值得深入探索和需要逐步解决的科学问题[4,5].

肝癌复发转移是一个多步骤、多环节的过程. 其分子机制涉及癌基因、抑癌基因、转移相关基因、生长因子及其受体、细胞外基质、肿瘤血管、机体免疫等多环节. 近年来, 人们在乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、食管癌模型中发现了上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)现象, 说明上皮间质转化也是肿瘤转移的重要机制之一[6]. 在原发性肝癌的细胞及动物模型、临床研究中同样发现上皮间质转化现象, 且EMT的发生与肝癌转移、化疗药物耐药相关[7]. 本文概述了HCC转移的EMT理论及其相关信号通路, 汇总了近年来研究原发性肝细胞癌EMT现象的动物模型和临床试验结果, 有利于深入了解HCC转移的分子机制, 为将来找到抑制肝癌转移的分子生物学靶点, 从而为临床上治疗肝癌提供更有效的方法.

1 原发性肝癌转移的EMT现象

EMT最早于1967年在原肠胚的研究中提出, 1982年发明了三维的胶原模型使EMT的体外研究成为可能后迅速形成热点. EMT病理机制在胚胎形成、组织损伤修复和肿瘤转移中都可见到[8]. EMT理论是指在适当条件下, 上皮细胞失去极性, 获得间质细胞的侵袭特征这一表型转化过程. 上皮间质转化的相反过程称为间质上皮转化(mesenchymal epithelial transition, MET). 现已证实, 癌上皮细胞可以通过EMT转化为间质细胞, 获得侵袭性和转移力, 离开原发灶, 实现癌细胞向远处转移的第一步. 因而, EMT/MET可能在癌症转移中起到重要作用. 癌上皮发生EMT的共同特点是: 上皮细胞尖-底极性消失; 上皮细胞间紧密连接、黏着连接、缝隙连接打开; 细胞表面蛋白变化(E-钙黏蛋白下调而N-钙黏蛋白上调); 细胞骨架重构(细胞角蛋白下调而波形蛋白上调), 立方上皮细胞变形为梭形间质细胞, 获得迁移游走能力, 同时, 细胞外基质金属蛋白酶上调, 细胞外基质重构(基膜蛋白下调, Ⅰ型胶原、纤维连接蛋白上调), 有利于癌细胞游走, 得以向邻近组织侵袭或进入血管向远处转移. 变形而成的间质细胞仍有可塑性, 还可以再次转化为上皮细胞, 称为MET, 形成远处的次级病灶. 现在认为, EMT/MET轮回对癌症的转移具有重要的意义[9].

然而EMT对肝癌转移的影响是多方面的, 不仅使癌细胞表型改变, 离开原发灶向远处迁移, 还抑制其衰老和凋亡, 逃避免疫, 耐受化疗等[10,11]. 因此, EMT理论也许不只用于解释肿瘤的转移, 他对于肿瘤的进展将产生全方位深远的影响, 对于EMT理论分子机制的深入研究将为临床治疗肝癌提供更多的选择.

最近的研究发现, 并不是所有的原发灶细胞同时、同等程度地发生EMT, EMT基本只在与基质交界处的少量癌上皮细胞中发生, 且癌症转移是EMT细胞与非EMT细胞共同作用的结果[12]. 而且, 人们发现, 除了单个细胞以EMT机制发生迁移外, 保持细胞间连接的细胞团联合迁移也是癌症转移的一个方式. 似乎不同的转移方式决定了不同的转移路径: 发生EMT的细胞向血管转移, 而细胞团迁移则向淋巴结转移[13].

2 调控原发性肝癌EMT的细胞信号通路

肝癌细胞EMT是在基因和微环境异常的基础上发生, 新近的研究通过构建细胞系模型, 发现许多信号通路可以调控肝癌EMT, 本文将详述转化生长因子β(transforming growth factor β, TGF-β)通路、Wnt/β-catenin通路、Hedgehog通路[14].

2.1 TGF-β通路 TGF-β通路是研究最多的, 较为公认的参与调节EMT的信号通路. TGF-β是一种组织中广泛存在的细胞因子, 是TGF的1个亚类. TGF-β信号通路有2个受体: TGF-βⅠ型和Ⅱ型受体, 启动下游多个信号通路, 如依赖Smads的通路和非依赖Smads的通路. 依赖Smads的通路又称为经典的TGF-β通路. TGF-β与其受体结合后, 通过磷酸化Smad2/3上的色氨酸残基而使之活化, 再与Smad4结合, 形成Smads2/3/4复合物, 发生核转位, 进入细胞核, 调节ZEB1、ZEB2、Snail1、Snail2等转录因子, 促进EMT发生. TGF-β通路的非经典途径很多, TGF-β/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)是重要的一条. MAPK通路有数条并行的通路, 包括ERK(extracellular signal-regulated kinase)通路、JNK/SAPK(stress activated protein kinase)通路以及p38MAPK通路. ERK通路被认为是经典的MAPK相关通路. TGF-β与细胞膜上的受体结合后, 可使受体形成二聚体, 激活自

身酪氨酸激酶; 磷酸化的受体可以激活GRB2/SHC/SOS复合物, 并依次激活RAF/MEK/ERK通路, 启动一系列磷酸化的级联反应[15]. 具体如下: 受体与生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor binding protein2, Grb2)的SH2结构域相结合, 后者同时与鸟苷酸交换因子SOS(son of sevenless)结合, 再使小分子鸟苷酸结合蛋白Ras的GDP解离而结合GTP, 从而激活Ras; 之后进一步与丝/苏氨酸蛋白激酶Raf-1的氨基酸结合, 通过未知机制激活Raf-1, Raf-1可以磷酸化MEK1/MEK2上的2个调节性丝氨酸, 从而激活MEKS; MEKS为双特异性激酶, 可以使丝/苏氨酸和酪氨酸发生磷酸化, 最终高选择性地激活ERK1和ERK2(即p44MAPK和p42MAPK). 体外实验发现, TGF-β具有明显的促EMT作用, 可以使上皮细胞极性消失, 上调间质细胞相关蛋白如波形蛋白等. TGF-β有双重作用, 一方面对细胞生长起抑制作用, 抑制细胞周期, 促进细胞凋亡; 一方面当癌症机制启动后, 通过诱导EMT参与到肿瘤的演进过程中. 使用细胞系研究发现, 在肝癌的发生中, TGF-β与原癌基因Ras对EMT有协同作用, 通过激活Smad2/3, 强有力地促进肿瘤的转移. 对EMT的动态研究发现, 起始阶段TGF-β与MAPK协同作用, 维持阶段则依赖p13K/Akt通路, 而c-Fos则是抑制肝癌转移的起负性调控作用的TGF-β下游信号[16].

2.2 Wnt(wingless-type)/β-catenin通路 Wnt途径是一条重要的信号转导通路, 由Wnt蛋白、卷曲蛋白(frizzled, Fz)、蓬乱蛋白(dishevelled, Dsh)、APC蛋白、糖原合成酶激酶GSK3β、Axin蛋白、β-连接素(catenin)、T细胞转录因子/淋巴增强因子(T cell transcription factor/lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)家族组成. Wnt是一类分泌型糖蛋白, 通过自分泌或旁分泌发挥作用. Wnt信号途径能引起胞内β-连接素的积累. β-连接素是一种多功能蛋白质, 一方面β-连接素是细胞黏着连接的一部分, 他将E-钙黏蛋白与α-连接素相结合, 介导细胞间黏附; 另一方面, 当β-连接素积聚到一定程度后, 发生核转位, 进入细胞核, 活化TCF/LEF, 激活下游的靶基因如slug、snail等, 进而诱导EMT的发生.

Wnt的受体是Fz, 为7次跨膜蛋白, 结构类似于G蛋白偶联型受体. Wnt与Fz受体结合后, 作用于Dsh, 使β-catenin降解复合体失活, 无法降解β-catenin, 导致β-catenin积聚. 降解复合体包括APC、GSK3β、Axin等, GSK3β能通过磷酸化β-catenin上的Thr41、Ser37、Ser33而进行降解. APC是一种抑癌基因, 其突变可以引起经结肠腺瘤样息肉(adenomatous polyposis coli, APC). APC蛋白可以增强GSK3β与β-catenin的亲和力, 因此是降解复合体的一部分. Axin是一种支架蛋白, 具有多个与其他蛋白作用的位点, 能将APC、β-catenin结合在一起. 人们发现Wnt信号通路中的组分在HCC中高表达, 超过10项研究发现HCC中伴有β-catenin突变. 其他一些研究则发现与对照组相比, 伴有β-catenin突变的癌前病变有更大的癌变风险. β-catenin突变率在一些肿瘤中约占0%-45%[17].

2.3 Hedgehog通路 由Hedgehog配体、2个跨膜蛋白受体Ptch(Patched)和Smo(smoothed)以及下游转录因子Gli蛋白等组成. Hedgehog配体包括哺乳动物中存在的Sonic(Sh), Indian(Ih), Desert(Dhh)和果蝇中存在的Hip(Hh), 均为分泌型蛋白. Pich和Smo是位于细胞膜上的跨膜蛋白, 其中Ptch为Hedgehog的受体, 能与3种Hedgehog配体结合. 当不存在Hedgehog蛋白时, Pich抑制Smo活性, 进而抑制下游基因的转录表达. 当Hedgehog蛋白与Pich结合时, Smo上的抑制效应被解除, 激活下游的转录调节因子Gli, 即可诱导目标基因表达[18-21]. 在许多肿瘤中, 2个膜蛋白受体Ptch和Smo发生变异, Hedgehog通路异常活化[22-26]. 在永生化的鼠肾上皮细胞系中, 可以见到Hedgehog通路活化后, 激活Gli, 进而诱导snail基因过表达, 促进EMT发生[27]; 相反, Hedgehog通路抑制剂环巴胺可以通过抑制胰腺癌细胞EMT而抑制胰腺癌浸润和转移[28]. 在原发性肝癌的研究中, 可以看到类似情况[29-30]. Hedgehog通路在正常肝细胞中不表达[31], 在肝癌细胞系中可以见到Hedgehog通路异常活化, 表现为Smo过表达, 且Smo/Pich比值与肿瘤大小正相关, 说明Smo与肿瘤的增生密切相关. 而且Hedgehog通路在低分化细胞中活化明显, 且与癌细胞EMT及侵袭力相关, 表现为EMT发生在Hedgehog通路活化的肝癌细胞中, 用阻滞剂环巴胺阻断该通路后, 肿瘤的EMT现象及肿瘤细胞迁移受限[32]. 因此推断, Hedgehog在调控肿瘤发生、生长和转移的过程中起到重要作用.

3 其他调控EMT的因子

除了上述信号通路外, PI3K/AKT/mTOR通路[15], NF-κB[33-35]通路, Notch[36-38]通路, 转录因子, 如snail、snail2(snug)[39-41]、Twist[42,43]等和

■应用要点
研究EMT的分子机制是一个有前景的课题, 可以为原发性肝细胞癌的治疗提供新的靶点, 更好地理解靶向治疗中的耐药机制.

■同行评价
本综述切入点较好, 属近年来的热点和方向, 值得研究者继续共同探讨.

Micro RNA[44]等也参与EMT调控. 最近还发现, 原癌基因-类似DNA结合蛋白1的染色质解旋酶(chromo domain helicase DNA binding protein 1-like, CHD1L)[45], Rho鸟嘌呤核苷酸互换因子9(Rho guanine nucleotide exchange factor 9, ARHGEF9)[46]及与之密切相关的Rho家族成员细胞分裂周期42蛋白(cell division cycle 42, Cdc42)也参与调控HCC; HBX也可通过活化转录因子5b使EMT活化[47]. 另外, 在对EMT的研究中, 人们发现, 癌灶细胞与周围基质的相互作用对EMT的发生发展起到重要的作用, 周围基质中的生长因子(如肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子)、炎症介质、细胞因子可以通过上述信号通路激活EMT, 肝脏肌成纤维细胞释放的某些信号蛋白可以诱导肿瘤细胞发生EMT[46,47]. 细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)的重构及其所导致的胶原蛋白分泌增加, 平滑肌动蛋白(SMA)分泌增加进而导致的收缩性增强, 都可以使肿瘤细胞侵袭和转移能力增强. 因此实质细胞与间充质细胞及周边基质的相互作用也将是EMT研究的方向之一[46,47].

4 EMT机制在肝癌治疗中的靶点作用

目前HCC的治疗方案还是依据临床分期来选择. 广泛使用的分期标准是巴塞罗那肝癌临床分期标准(Barcelona-Clinic-Liver-Cancer, BCLC标准)[48]. 按照这个标准, 0或A期患者适宜根治性治疗, 如手术切除、射频消融、肝移植; B或C期患者适宜姑息性治疗, 如化疗或放疗栓塞术; 而D期患者则只能接受支持治疗. 然而, C期患者所接受的治疗风险-效益比很不理想, 他们是靶向治疗的适宜人群. 研究者已经研制出一些靶向治疗的新药, 这些药物大多是选择性酪氨酸激酶抑制剂, 如Sorafenib是1个已通过Ⅲ期临床的新药, 是多种激酶的抑制剂, 可以抑制Raf-丝氨酸/苏氨酸激酶和VEGFR、PDGFR、p38酪氨酸激酶, 研究发现, 该药可以提高HCC患者的生存期[10,11]. 酪氨酸激酶受体及相关通路与肿瘤EMT的发生是有许多关联的. 如前所述的TGF-β受体及VEGFR、EGFR都属于酪氨酸激酶受体.

深入研究发现, EMT现象与肿瘤化疗的疗效相关. 比如整联蛋白相关激酶(integrin linked kinase, ILK)诱导的EMT现象可以降低针对EGFR的靶向治疗的疗效[49]. 这说明, 癌症患者对靶向治疗药物并不敏感的原因之一是与肿瘤细胞发生EMT有关. 另外, 许多常规化疗易出现耐药, 这也可能与化疗药物刺激肿瘤细胞发生EMT, 从而促进肿瘤转移有关, 比如研究发现: EMT现象与奥沙利铂和长春新碱的耐药有关[50]. 体外研究还发现, 低剂量的放疗不仅不能杀死癌细胞, 反而促进肿瘤转移, 这是否也与EMT现象相关呢? 我们期待进一步的研究来深入探讨. 有人从相反的方向着手, 通过抑制肿瘤细胞发生EMT, 来增强抗肿瘤药物的敏感性. 比如人们既已知道N-钙粘蛋白的表达是EMT现象的特征之一, 且发现他的表达与耐药相关. 有人将ADH-1这一N-钙粘蛋白的抑制剂作为化疗辅助用药, 发现他可以增强黑色素瘤细胞对化疗药物melphalan的敏感性[51]. 也许在将来, 使用EMT抑制药物联合靶向治疗或传统放疗可能是未来肿瘤治疗的方向. 因此, 对EMT信号通路的研究, 有利于人们研发更有效的靶向治疗药物, 是很有前景的课题[13].

5 结论

EMT的发现已有数10年, 近年来成为肿瘤转移机制中的研究热点之一. 相关的信号通路研究方兴未艾, 特别是转基因模型的建立, 为EMT的研究提供了更科学的工具. 近来Weinberg领导的研究小组在EMT的相关信号研究中取得进展, 证实TGF-β、经典及非经典Wnt 3条信号通路协同作用诱导激活细胞EMT程序, 之后以自分泌的方式维持最终的间质细胞状态. 研究证实下调内源的自分泌信号抑制因子可以诱导上皮细胞发生EMT. 与之相反, 信号通路抑制剂可以破坏自分泌信号, 使原代乳腺上皮细胞迁移受到抑制, 说明信号通路之间可以协同作用, EMT的调控是个复杂的过程[51]. 因为HCC的靶向治疗在近年刚刚开始, 需要积累更多的临床经验. 基础研究方面, 需要寻找更加特异的靶向抑制剂, 特异性地抑制调控EMT的信号通路, 兼顾临床疗效和不良反应及药物的逃逸现象. 这方面, 可做的工作很多, 比如: 迄今为止, 还没有发现有效的抑制Wnt通路的药物, 而Wnt是调控EMT的重要通路之一, 也许这是肿瘤治疗方面亟待突破的地方[14].

6 参考文献

1 Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 448-458
2 Mulcahy MF. Management of hepatocellular cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 423-435
3 Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: S5-S16

4 Simonetti RG, Liberati A, Angiolini C, Pagliaro L. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 1997; 8: 117-136

5 Zhu AX. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: how hopeful should we be? *Oncologist* 2006; 11: 790-800

6 Turley EA, Veiseh M, Radisky DC, Bissell MJ. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression? *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5: 280-290

7 Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 265-273

8 Acloque H, Thiery JP, Nieto MA. The physiology and pathology of the EMT. Meeting on the epithelial-mesenchymal transition. *EMBO Rep* 2008; 9: 322-326

9 Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011; 331: 1559-1564

10 Severi T, van Malenstein H, Verslype C, van Pelt JF. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31: 1409-1420

11 Huynh H. Molecularly targeted therapy in hepatocellular carcinoma. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 550-560

12 van Zijl F, Mair M, Csiszar A, Schneller D, Zulehner G, Huber H, Eferl R, Beug H, Dolznig H, Mikulits W. Hepatic tumor-stroma crosstalk guides epithelial to mesenchymal transition at the tumor edge. *Oncogene* 2009; 28: 4022-4033

13 De Wever O, Pauwels P, De Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Gespach C, Bracke M, Berx G. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol* 2008; 130: 481-494

14 Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2010; 29: 4989-5005

15 Avila MA, Berasain C, Sangro B, Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3866-3884

16 Battaglia S, Benzoubir N, Nobilet S, Charneau P, Samuel D, Zignego AL, Atfi A, Bréchot C, Bourgeade MF. Liver cancer-derived hepatitis C virus core proteins shift TGF-beta responses from tumor suppression to epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2009; 4: e4355

17 Huang D, Du X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1823-1827

18 Guarino M, Micheli P, Pallotti F, Giordano F. Pathological relevance of epithelial and mesenchymal phenotype plasticity. *Pathol Res Pract* 1999; 195: 379-389

19 Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172: 973-981

20 Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2003; 63: 3386-3394

21 Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 548-558

22 Bailey JM, Singh PK, Hollingsworth MA. Cancer metastasis facilitated by developmental pathways: Sonic hedgehog, Notch, and bone morphogenic proteins. *J Cell Biochem* 2007; 102: 829-839

23 Yoo YA, Kang MH, Kim JS, Oh SC. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway. *Carcinogenesis* 2008; 29: 480-490

24 Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003; 425: 851-856

25 Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 903-911

26 Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004; 431: 707-712

27 Zhou BP, Hung MC. Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3beta and beta-Trcp in the regulation of metastasis. *Cell Cycle* 2005; 4: 772-776

28 Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W, Maitra A. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res* 2007; 67: 2187-2196

29 Sicklick JK, Li YX, Melhem A, Schmelzer E, Zdanowicz M, Huang J, Caballero M, Fair JH, Ludlow JW, McClelland RE, Reid LM, Diehl AM. Hedgehog signaling maintains resident hepatic progenitors throughout life. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G859-G870

30 Omenetti A, Diehl AM. The adventures of sonic hedgehog in development and repair. II. Sonic hedgehog and liver development, inflammation, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G595-G598

31 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; 425: 846-851

32 Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, Kannangai R, Qi Y, Vivekanandan P, Ludlow JW, Owzar K, Chen W, Torbenson MS, Diehl AM. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2006; 27: 748-757

33 Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004; 114: 569-581

34 Bachelder RE, Yoon SO, Franci C, de Herreros AG, Mercurio AM. Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2005; 168: 29-33

35 Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, Dargemont C, de Herreros AG, Bellacosa A, Larue L. Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene* 2007; 26: 7445-7456
36 Grego-Bessa J, Díez J, Timmerman L, de la Pompa JL. Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle* 2004; 3: 718-721
37 Leong KG, Niessen K, Kulic I, Raouf A, Eaves C, Pollet I, Karsan A. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* 2007; 204: 2935-2948
38 Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, Poellinger L, Lendahl U. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 6392-6397
39 Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 931-940
40 Davidson NE, Sukumar S. Of Snail, mice, and women. *Cancer Cell* 2005; 8: 173-174
41 Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 2005; 8: 197-209
42 Fu J, Chen Y, Cao J, Luo T, Qian YW, Yang W, Ren YB, Su B, Cao GW, Yang Y, Yan YQ, Shen F, Wu MC, Feng GS, Wang HY. p28GANK overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1α pathways. *Hepatology* 2011; 53: 181-192
43 Matsuo N, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Tanaka S, Nishina S, Nakanishi Y, Uemura M, Takaki A, Nakamura S, Kobayashi Y, Nouso K, Yagi T, Yamamoto K. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9: 240
44 Cottonham CL, Kaneko S, Xu L. miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 35293-35302
45 Chen L, Chan TH, Yuan YF, Hu L, Huang J, Ma S, Wang J, Dong SS, Tang KH, Xie D, Li Y, Guan XY. CHD1L promotes hepatocellular carcinoma progression and metastasis in mice and is associated with these processes in human patients. *J Clin Invest* 2010; 120: 1178-1191
46 Zhu CQ, Popova SN, Brown ER, Barsyte-Lovejoy D, Navab R, Shih W, Li M, Lu M, Jurisica I, Penn LZ, Gullberg D, Tsao MS. Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11754-11759
47 Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Mercado P, Bean J, Monaghan M, Seymour SL, Argast GM, Epstein DM, Haley JD. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28: 137-155
48 Wei S, Hao X, Zhan D, Xiong M, Li K, Chen X, Huang Z. Are surgical indications of Barcelona Clinic Liver Cancer staging classification justified? *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2011; 31: 637-641
49 Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2391-2399
50 Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA. Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 2011; 145: 926-940
51 Beasley GM, Riboh JC, Augustine CK, Zager JS, Hochwald SN, Grobmyer SR, Peterson B, Royal R, Ross MI, Tyler DS. Prospective multicenter phase II trial of systemic ADH-1 in combination with melphalan via isolated limb infusion in patients with advanced extremity melanoma. *J Clin Oncol* 2011; 29: 1210-1215

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 959-963
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

钼对人食管癌细胞ECA–109的化疗增敏作用及对食管癌干细胞p75^{NTR}的影响

李 珂, 龙 辉, 王洁莲, 吴清明, 吴银霞, 程 静

李珂, 武汉科技大学医学院 湖北省武汉市 430065
龙辉, 王洁莲, 吴清明, 吴银霞, 程静, 武汉科技大学附属天佑医院 湖北省武汉市 430064
李珂, 硕士, 主要从事消化系统的流行病学研究.
作者贡献分布: 课题设计与实施由龙辉、王洁莲、吴清明、吴银霞及程静共同完成; 数据分析与论文写作由李珂完成; 审校由吴清明完成.
通讯作者: 吴清明, 教授, 430064, 湖北省武汉市, 武汉科技大学附属天佑医院. wuhe9224@sina.com
电话: 027–87301829
收稿日期: 2012–01–30 修回日期: 2012–02–17
接受日期: 2012–03–06 在线出版日期: 2012–04–18

Molybdenum increases chemosensitivity of ECA-109 cells to cisplatin and cisplatin-induced inhibition of p75^{NTR} expression in esophageal stem cells

Ke Li, Hui Long, Jie-Lian Wang, Qing-Ming Wu, Yin-Xia Wu, Jing Cheng

Ke Li, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei Province, China
Hui Long, Jie-Lian Wang, Qing-Ming Wu, Yin-Xia Wu, Jing Cheng, TianYou Hospital, Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China.
Correspondence to: Qing-Ming Wu, Professor, TianYou Hospital, Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China. wuhe9224@sina.com
Received: 2012-01-30 Revised: 2012-02-17
Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-04-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of molybdenum on the chemosensitivity of esophageal cancer ECA-109 cells to cisplatin and expression of p75^{NTR} in esophageal stem cells.

METHODS: ECA-109 cells were divided into four groups: blank control group, cisplatin group, molybdenum group, cisplatin plus molybdenum group. Cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The expression of p75^{NTR} in human esophageal stem cells was examined by flow cytometry.

RESULTS: Cisplatin reduced the percentage of p75^{NTR}-positive cells and the proliferation of ECA-109 cells in a dose-dependent manner. Treatment with molybdenum alone had no significant influence on the proliferation of ECA-109 cells and the percentage of p75^{NTR}-positive cells. However, treatment with molybdenum significantly enhanced the chemosensitivity of esophageal cancer ECA-109 cells to cisplatin and cisplatin-induced inhibition of p75^{NTR} expression in esophageal stem cells when compared to cells incubated with cisplatin alone or blank control cells (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Molybdenum can increase the inhibitory effect of cisplatin on the proliferation of ECA-109 cells, which provides an experimental basis for the use of molybdenum as adjuvant chemotherapeutic agent for esophageal cancer.

Key Words: Molybdenum; Tumor stem cells; Esophageal cancer; Cisplatin; p75^{NTR}

Li K, Long H, Wang JL, Wu QM, Wu YX, Cheng J. Molybdenum increases chemosensitivity of ECA-109 cells to cisplatin and cisplatin-induced inhibition of p75^{NTR} expression in esophageal stem cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 959-963

摘要

目的: 探讨钼对食管癌细胞ECA-109化疗敏感性的影响及对食管癌干细胞p75^{NTR}作用.

方法: 本实验选用人食管癌细胞(esophageal cancer cells, ECCs)ECA-109. 设计分为4组: 空白对照组、顺铂组、单纯加钼组、顺铂加钼组, 后3组均采用不同的浓度进行试验. 用MTT法检测各组对人食管癌细胞ECA-109的生长抑制作用; 流式细胞仪检测各组p75NTR百分率的变化.

结果: 顺铂组各浓度对食管癌细胞ECA-109有一定的抑制作用, 且对食管癌干细胞也有不同程度的抑制作用, 并且随着给药浓度和时间的增加均呈增强趋势; 单纯加钼组对食管癌

■背景资料
钼作为一种人体所必需的微量元素, 在现代医学研究中逐渐成为人类治癌、防癌研究中最为关注的领域. 目前人们对于钼的研究, 比较侧重于他对食管癌的预防作用.

■同行评议者
张力为, 副教授, 新疆医科大学第一附属医院胸外科

■相关报道
钼作为人体必需的一种微量元素，对生命的正常新陈代谢很重要，缺少会引起疾病的发生，过量则会出现毒理学反应. 有关钼中毒的资料极少，如果人体内钼过多，黄嘌呤氧化酶活性过多增加，生产尿酸过多，可导致痛风症.

细胞ECA-109和对食管癌干细胞的抑制作用均不明显; 顺铂加钼组对食管癌细胞ECA-109和食管癌干细胞的抑制作用则明显增强, 与单用同浓度顺铂组及空白对照组比较有差异性(P<0.05), 且呈一定的浓度、时间依赖性.

结论: 钼可明显增强顺铂对食管癌细胞ECA-109和食管癌干细胞的抑制作用, 而单用钼则达不到理想的效果, 说明钼可作为化疗增敏剂, 为其作为食管癌化疗的辅助剂提供了实验依据.

关键词: 钼; 肿瘤干细胞; 食管癌; 顺铂; p75^{NTR}

李珂, 龙辉, 王洁莲, 吴清明, 吴银霞, 程静. 钼对人食管癌细胞ECA-109的化疗增敏作用及对食管癌干细胞p75^{NTR}的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 959-963

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/959.asp

0 引言

食管癌(esophageal carcinoma, ECC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 据世界癌症研究基金会(world cancer research fund, WCRF)统计, 食管癌居全球癌症发病率第7位, 存活率较低[1-4]. 钼(Molybdenum, Mo)作为人体所必需的微量元素之一, 在现代医学研究中逐渐成为人类治癌、防癌研究中最为关注的领域[5,6]. 很多研究资料表明, 钼与食管癌的发生发展有着密切的联系. 食管癌患者在化疗过程中很容易出现耐受性, 无法达到令人满意的治疗效果. 经研究发现, 治疗过程中患者出现的耐受性与食管癌干细胞密切相关. 而肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)则是存在于肿瘤组织中的一小部分具有干细胞性质的细胞群体. 近年来, 越来越多的学者认为肿瘤干细胞的残存是恶性肿瘤复发的根源[7,8]. 本文主要研究钼是否对食管癌化疗具有增敏作用及钼是否抑制食管癌干细胞, 目前国内外关于钼对食管癌干细胞作用这方面的研究还比较欠缺.

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌细胞株ECA-109由太和医院馈赠; RPMI-1640培养粉购自Gibco公司; 新生胎牛血清购自杭州四季青有限公司; 胰蛋白酶粉购自Amresco公司; CO_2恒温细胞培养箱购自Heal Force公司; 倒置显微镜购自Olympus公司; 超净工作台(苏州净化); 酶联免疫检测仪(美国宝特ELX800); 超速低温离心机购自Sigma公司; 37 ℃恒温水浴箱购自华普达公司; 钼酸铵购自天津化学试剂工厂; 顺铂购自齐鲁制药有限公司; 免疫组织化学试剂盒及DAB显色液购自中杉公司; p75^{NTR}直标抗体购自BD公司; 鼠抗人C-myc蛋白单克隆抗体购自博士德公司; 流式细胞仪购自BECKMAN COULTER公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 食管癌细胞ECA-109常规培养于RPMI-1640(含100 mL/L胎牛血清)中, 置37 ℃、50 mL/L CO_2培养箱内培养, 注明细胞名称及日期.

1.2.2 MTT法检测钼对食管癌细胞ECA-109增殖抑制作用: 取对数生长期的食管癌细胞ECA-109, 接种于96孔板中, 分为: (1)空白组: 只接种细胞未加试剂; (2)顺铂组: 加入顺铂10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L; (3)单纯加钼组: 加入钼18.75 mg/L, 37.5 mg/L, 75 mg/L, 150 mg/L, 300 mg/L; (4)顺铂加钼组: 顺铂根据(1)步实验取用适宜浓度30 mg/L, 依次加入顺铂30 mg/L+钼酸铵18.75 mg/L, 顺铂30 mg/L+钼酸铵37.5 mg/L, 顺铂30 mg/L+钼酸铵75 mg/L, 顺铂30 mg/L+钼酸铵150 mg/L, 顺铂30 mg/L+钼酸铵300 mg/L, 每组每个浓度每个时间点6个复孔, 置37 ℃、50 mL/L CO_2培养箱内培养, 于24 h、48 h、72 h、96 h后吸去上清, 并用PBS清洗1遍后加入RPMI-1640培养液, 再将MTT溶液(5 g/L)10 μL加入至每孔, 继续在37 ℃、50 mL/L CO_2培养箱内孵育4 h后弃上清. 每孔加入100 μL DMSO, 放入摇床轻轻振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 在590 nm波长酶标仪上测定吸光度(A)值, 并记录结果, 计算出细胞生长抑制率, 抑制率(IR) = (1-实验组平均A_{490}值/对照组平均A_{490}值)×100%.

1.2.3 流式细胞仪检测p75^{NTR}细胞比例: 取用对数期生长的细胞, 分为: (1)顺铂组: 加入顺铂5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, 50 mg/L; (2)单纯加钼组: 加入钼18.75 mg/L, 37.5 mg/L, 75 mg/L, 150 mg/L, 300 mg/L; (3)顺铂加钼组: 加入顺铂30 mg/L+钼酸铵18.75 mg/L, 顺铂30 mg/L+钼酸铵37.5 mg/L, 顺铂30 mg/L+钼酸铵75 mg/L, 顺铂30 mg/L+钼酸铵150 mg/L, 顺铂30 mg/L+钼酸铵300 mg/L, 培养24 h后取出用PBS冲洗, 0.25%的胰蛋白酶消化, 1 000 r/min, 离心5 min弃上清, 再加入PBS冲洗离心2-3次, 把处理好的细胞加入20 μL p75^{NTR}直标抗体, 充分混匀, 避光放置25 min, 再每管加入500 μL鞘液, 滤膜过滤, 即可上流式细胞仪进行检测.

统计学处理 全部资料采用SPSS 17.0统计软

表 1 顺铂对食管癌细胞ECA-109增殖影响的MTT检测 ($\bar{A}$, n = 6, mean ± SD)

分组	24 h	48 h	72 h
空白组	0.736 ± 0.063	0.815 ± 0.061	0.862 ± 0.043
顺铂组			
10 mg/L	0.538 ± 0.053^b	0.455 ± 0.071^b	0.434 ± 0.134^b
20 mg/L	0.502 ± 0.051^b	0.429 ± 0.084^b	0.411 ± 0.051^b
30 mg/L	0.475 ± 0.007^b	0.368 ± 0.010^b	0.322 ± 0.012^b
40 mg/L	0.394 ± 0.016^b	0.342 ± 0.018^b	0.251 ± 0.016^b
50 mg/L	0.379 ± 0.015^b	0.317 ± 0.012^b	0.244 ± 0.019^b

^bP<0.01*vs* 空白组.

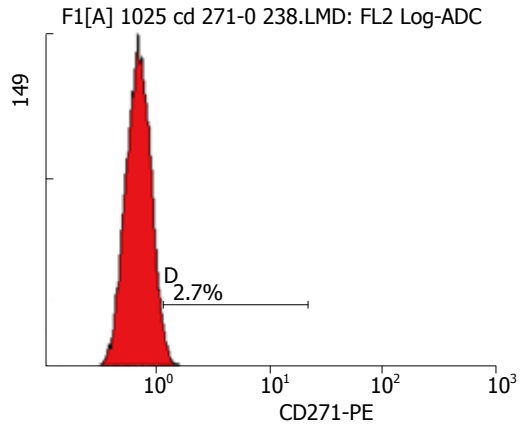


图 1 ECA-109经1640培养液培养后p75^{NTR}细胞比例.

件分析, 所有计数资料以mean±SD表示, 均数间差异采用方差分析, 两两比较采用t检验, 显著性水准为0.05.

2 结果

2.1 顺铂对食管癌细胞ECA-109的增殖抑制 顺铂组各浓度梯度对食管癌细胞ECA-109均有一定程度的抑制作用, 随着作用浓度和时间的增加其抑制作用也不断增强(表1).

2.2 顺铂对食管癌干细胞p75^{NTR}的抑制 顺铂组各浓度均对食管癌干细胞p75^{NTR}有抑制作用, 随着作用浓度和时间的增加其抑制作用也不断增强. 本实验中给予高浓度顺铂(>10 mg/L)作用后, p75^{NTR}细胞的百分率则呈现逐步下降的趋势. 给予5 mg/L的顺铂后, 测得24 h食管癌细胞ECA-109的p75^{NTR}细胞的百分率为6.8%, 而用10 mg/L的顺铂测得p75^{NTR}细胞的百分率为7.9%, 之后分别给予20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L的顺铂后, 测得p75^{NTR}细胞的百分率分别为5.5%、3.0%、1.9%、0.8%, 呈逐渐下降的趋势. 说明>10 mg/L的高浓度顺铂对食管癌干细胞具有较强的杀伤作用.

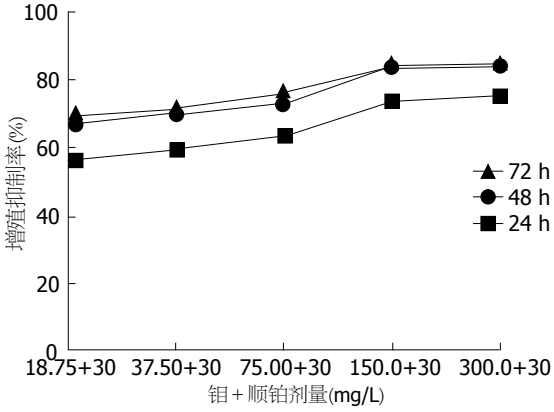


图 2 钼联合顺铂对ECA-109的生长抑制作用曲线.

■应用要点
本实验研究了钼对体外培养食管癌细胞ECA-109化疗敏感性的影响和化疗时加钼对食管癌干细胞P75NTR的作用, 说明钼可作为化疗增敏剂, 使其作为食管癌化疗的辅助剂提供了实验依据.

2.3 单独加钼组对食管癌细胞ECA-109的增殖抑制 加入不同浓度的钼处理细胞后, 发现钼对食管癌细胞ECA-109无明显抑制作用, 增加钼的浓度为300 mg/L时, 细胞出现极少量的死亡, 再增至600 mg/L时, 其对ECA-109的增殖抑制作用才比较明显. 考虑可能为单纯的化学反应, 而高浓度的钼也不能运用于临床, 会产生不良反应, 对临床应用价值不大. 与空白组以及单用顺铂的对照组比较, 差异无统计学意义(P>0.05).

2.4 单纯加钼组对食管癌干细胞p75^{NTR}的抑制 钼组测得24 h p75^{NTR}的百分率分别为2.9%、2.8%、2.4%、2.6%、2.5%, 而空白组p75^{NTR}的百分率为2%-3%(图1), 说明单独加钼组对食管癌干细胞并无明显影响, 且无统计学意义.

2.5 顺铂加钼组对食管癌细胞ECA-109的增殖抑制 各浓度顺铂加钼组与顺铂组相比, 对于食管癌细胞ECA-109的抑制作用则更强, 与未经任何试剂处理的空白组以及单用顺铂的对照组比较, 差异有统计学意义(P<0.05), 且呈一定的浓度、时间依赖性(表2). 顺铂加钼浓度为30 mg/L+150 mg/L作用72 h对ECA-109细胞抑制作用最强(图2).

2.6 顺铂加钼组对食管癌干细胞p75^{NTR}的抑制作用 p75^{NTR}细胞的比例比单用30 mg/L的顺铂测得的干细胞百分率的减少更为明显, 进而发现在给予150 mg/L的钼加顺铂后, p75^{NTR}的百分率从2.7%下降为0.6%, 之后再加大钼的浓度300 mg/L时测得p75^{NTR}的百分率为0.5%, 下降趋势并没有比较明显的增加, 说明150 mg/L的钼和顺铂联合应用对食管癌干细胞杀伤效果最强, 而继续增加钼的剂量对于食管癌干细胞的影响则不太明显(表3).

3 讨论

越来越多的研究资料表明, 钼与食管癌有着紧密的联系, 据陈伯扬[4]等的调查发现食管癌高发

■同行评价
本研究选题较好，有一定创新，设计尚合理，思路清晰，对临床上食管癌的化疗提供了较好的参考价值.

表 2 顺铂加钼对食管癌细胞ECA-109增殖影响的MTT检测($\bar{A}$, n = 6, mean ± SD)

分组	24 h	48 h	72 h
空白组	0.736 ± 0.073	0.815 ± 0.071	0.862 ± 0.053
顺铂+钼组(mg/L)			
30+18.75	0.439 ± 0.025[b]	0.331 ± 0.023[b]	0.309 ± 0.011[b]
30+37.50	0.406 ± 0.013[b]	0.302 ± 0.022[b]	0.286 ± 0.013[a]
30+75.00	0.368 ± 0.014[b]	0.269 ± 0.014[a]	0.233 ± 0.010[a]
30+150.0	0.259 ± 0.016[b]	0.161 ± 0.016[a]	0.159 ± 0.005[a]
30+300.0	0.247 ± 0.023[b]	0.158 ± 0.012[a]	0.145 ± 0.013[a]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 空白组.

表 3 ECA-109在不同浓度的顺铂加钼培养液中培养后$p75^{NTR}$细胞比例

顺铂+钼(mg/L)	30+18.75	30+37.5	30+75	30+150	30+300
$p75^{NTR}$ (%)	2.5	1.9	1.4	0.6	0.5

区饮水与作物中普遍缺钼，河南省林县是有名的食道癌高发区，应用光谱分析河南省7个县的粮食样品，发现食管癌高发地区林县的粮食中钼的含量低于其他县[9,10]. 钼在人体内主要通过影响钼酶的活性来实现其生物学功能. 钼是在新陈代谢中起重要作用的2种酶的组成成分，一是黄嘌呤氧化酶，二是亚硫酸盐氧化酶. 这几种酶对人体中的氧化代谢、铁代谢及毒性醛类的解除具有重要的生化功能；同时钼是植物亚硝酸盐还原酶的成分，缺钼直接导致作物中亚硝酸盐的增加，为合成亚硝胺提供前体；此外，钼可调节体内的铁代谢，促使肝脏铁蛋白中铁释放入血浆，催化Fe^{2+}转化为Fe^{3+}，并与β1-球蛋白结合成运铁蛋白供机体利用. 钼还是醛氧化酶的组分，醛氧化酶参与细胞内的电子传递过程和体内醛的氧化，将醛氧化成羧酸，消除有毒醛类物质对人体的危害[11].

肿瘤干细胞是肿瘤复发、转移、耐药及放疗抵抗的根源，众多研究资料表明干细胞与癌症治疗的耐受性有关[12-16]，$p75^{NTR}$是一种相对分子质量为75 kDa的蛋白受体，属Ⅰ型跨膜TNF受体超家族成员，可与NGF、BDNF、NT-3和NT-4等低亲合性结合，在Trk存在条件下被活化，提高对神经营养因子的反应性，曾被用来分离神经冠干细胞等. Okumura等[17]研究证明，正常食管上皮细胞中的$p75^{NTR}$阳性细胞具有增殖、自我更新及多向分化能力，经鉴定为食管上皮干细胞. 所以本实验选用食管癌干细胞$p75^{NTR}$分选法分离出食管癌干细胞，研究钼对其的抑制作用. 本实验结果显示，钼联合顺铂对食管癌细胞ECA-109的增殖均有明显抑制作用，与顺铂组和空白组比较有统计学意义(P<0.05)，且呈一定的浓度、时间依赖性；随着浓度的增加，时间的延长，对食管癌细胞ECA-109的增殖抑制作用也明显增强. 而单用钼则对食管癌增殖抑制作用不太明显，增加钼的浓度到600 mg/L时，其抑制作用才比较显著. 考虑其高浓度对癌细胞的杀伤作用可能仅为单纯的化学反应，在此不作细致研究. 所以钼本身不能作为一种单纯的化疗药物而是一种化疗增敏剂，将他与化疗药物联用可以达到很好的增敏效果.

流式仪检测食管癌干细胞$p75^{NTR}$的比例显示：在高浓度(>10 mg/L)顺铂组中$p75^{NTR}$细胞的比例随着化疗剂量的增加而逐渐减少，证明高浓度的化疗药物不仅能杀死普通的食管癌细胞也能杀死部分肿瘤干细胞，但是在给予低浓度的顺铂时(<10 mg/L)$p75^{NTR}$的比例则会逐渐增加，说明低浓度顺铂杀死的细胞多为普通食管癌细胞而对食管癌干细胞作用不大. 顺铂加钼组中$p75^{NTR}$的百分率比单用同浓度的顺铂下降趋势则更为明显，说明二者联用对食管癌干细胞的抑制作用更强，钼对化疗药物有显著的增敏效果，能够抑制食管癌干细胞$p75^{NTR}$. 但是钼对于顺铂的化疗增敏作用其增敏机制尚不明确，具体是作用于这个过程的哪个环节，还不是特别清楚，在这个方面还有待于进一步研究.

4 参考文献

1 Zhao Y, Hong L, Wang R, Fan D. Expression and

prognostic value of ZNRD1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 586-592
2 Wu L, Xu Z, Zhao X, Li J, Sun Y. Surgical treatment and prognosis of esophageal cancer after distal gastrectomy. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 32-37
3 陈晋, 吴清明. 硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3538-3542
4 陈伯扬. 微量元素钼的抗癌作用. 微量元素与健康研究 2008; 25: 68-69
5 Nath M, Offers M, Hummel M, Seissler J. Isolation and in vitro expansion of Lgr6-positive multipotent hair follicle stem cells. *Cell Tissue Res* 2011; 344: 435-444
6 Jeong SH, Han JH, Kim JH, Ahn MS, Hwang YH, Lee HW, Kang SY, Park JS, Choi JH, Lee KJ, Sheen SS, Lim HY. Bax predicts outcome in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin palliative chemotherapy. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 131-138
7 Li SH, Wang Z, Liu XY. Metastasis-associated protein 1 (MTA1) overexpression is closely associated with shorter disease-free interval after complete resection of histologically node-negative esophageal cancer. *World J Surg* 2009; 33: 1876-1881
8 郑璐玉, 张旭. 肿瘤干细胞的研究进展. 现代肿瘤医学 2009; 17: 959-961
9 Ulla M, Cavadas D, Muñoz I, Beskow A, Seehaus A, García-Mónaco R. Esophageal cancer: pneumo-64-MDCT. *Abdom Imaging* 2010; 35: 383-389
10 Jensen AD, Grehn C, Nikoghosyan A, Thieke C, Krempien R, Huber PE, Debus J, Münter MW. Catch me if you can-the use of image guidance in the radiotherapy of an unusual case of esophageal cancer. *Strahlenther Onkol* 2009; 185: 469-473
11 张朋, 王少康, 孙桂菊. 食物、营养与食管癌关系的研究进展. 肿瘤 2011; 31: 768-771
12 Oelschlager BK. Intramucosal esophageal cancer and high-grade dysplasia: which treatment frame the debate. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1169-1171
13 Marjanovic G, Schricker M, Walch A, zur Hausen A, Hopt UT, Imdahl A, Makowiec F. Detection of lymph node involvement by cytokeratin immunohistochemistry is an independent prognostic factor after curative resection of esophageal cancer. *J Gastrointest Surg* 2011; 15: 29-37
14 Hatiboglu MA, Wei J, Wu AS, Heimberger AB. Immune therapeutic targeting of glioma cancer stem cells. *Target Oncol* 2010; 5: 217-227
15 Barnes M, Eberhart CG, Collins R, Tihan T. Expression of p75NTR in fetal brain and medulloblastomas: evidence of a precursor cell marker and its persistence in neoplasia. *J Neurooncol* 2009; 92: 193-201
16 Sugiura A, Ohtori S, Yamashita M, Yamauchi K, Inoue G, Suzuki M, Norimoto M, Orita S, Eguchi Y, Kuniyoshi K, Ochiai N, Kishida S, Takaso M, Aoki Y, Ishikawa T, Arai G, Miyagi M, Kamoda H, Nakamura J, Takahashi K. Effect of applying p75NTR saporin to a punctured intervertebral disc on calcitonin gene-related peptide expression in rat dorsal root ganglion neurons. *J Orthop Sci* 2010; 15: 407-413
17 孙志刚, 黄盛东, 张宝仁, 徐志云, 刘晓红, 龚德军, 袁扬. 应用p75^{NTR}分选食管肿瘤干细胞并鉴定其生物学特性. 第二军医大学学报 2009; 30: 481-486

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 964-968
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

持续血液滤过治疗高脂血症性急性胰腺炎24例

黄 鹏, 王春友, 吴河水, 吴国俊, 黎建军

■背景资料
高脂血症是急性胰腺炎主要的病因, 其发病机制及临床治疗成为当前研究的热点.

黄鹏, 广西中医学院附属瑞康医院肝胆外科 广西壮族自治区南宁市 530011
王春友, 吴河水, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科 湖北省武汉市 430022
吴国俊, 黎建军, 武汉科技大学附属普仁医院肝胆外科 湖北省武汉市 430081
黄鹏, 副主任医师, 医学博士, 主要从事肝胆胰腺疾病基础与临床方面的研究.
作者贡献分布: 此课题由黄鹏、王春友及吴河水设计; 研究过程由黄鹏、王春友、吴河水、吴国俊及黎建军操作完成; 数据分析由黄鹏完成; 本论文写作由黄鹏完成.
通讯作者: 黄鹏, 副主任医师, 530011, 广西壮族自治区南宁市华东路10号, 广西中医学院附属瑞康医院肝胆外科. hpeng2003@sina.com
电话: 027-86360117
收稿日期: 2011-12-20 修回日期: 2012-01-17
接受日期: 2012-03-10 在线出版日期: 2012-04-18

Treatment of hyperlipidemic acute pancreatitis by continuous venovenous hemofiltration: an analysis of 24 cases

Peng Huang, Chun-You Wang, He-Shui Wu, Guo-Jun Wu, Jian-Jun Li

Peng Huang, Department of Hepatobiliary Surgery, Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Chun-You Wang, He-Shui Wu, Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Guo-Jun Wu, Jian-Jun Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Puren Hospital, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei Province, China
Correspondence to: Peng Huang, Associate Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. hpeng2003@sina.com
Received: 2011-12-20 Revised: 2012-01-17
Accepted: 2012-03-10 Published online: 2012-04-18

Abstract

AIM: To observe the treatment effect of continuous veno-venous hemofiltration (CVVH) in patients with hyperlipidemic acute pancreatitis (HLP).

METHODS: Forty-nine HLP patients were randomly divided into two groups: CVVH group (A, n = 24) and control group (B, n = 25). Both groups underwent conventional therapy, and patients in group A additionally underwent CVVH. Heart rate (HR), respiration, PO_2/FiO_2, SaO_2, triglyceride (TG), IL-6 and TNF-α were monitored. APACHE Ⅱ score was used to evaluate patients' condition. The incidences of acute complications and survival rate were compared between the two groups.

RESULTS: After treatment by CVVH, HR, respiration, APACHE Ⅱ (10.8 ± 5.1 *vs* 15.5 ± 6.9, P < 0.05) as well as serum levels of TG, IL-6 and TNF-α (6.8 ± 3.7 *vs* 18.5 ± 6.3, 39.8 ± 16.7 *vs* 72.4 ± 25.1, 37.5 ± 14.1 *vs* 61.2 ± 16.1, all P < 0.05) decreased significantly. Seven days later, shock was corrected in both groups (P < 0.05). In group A, the incidences of acute renal failure (ARF) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) were significantly decreased (5.0% *vs* 37.5%, 5.0% *vs* 25%, both P < 0.05). Compared to group B, group A had a higher survival rate (8.3% *vs* 20%).

CONCLUSION: CVVH is effective in treating HLP and is associated with a lower case fatality rate.

Key Words: Continuous venovenous hemofiltration; Hyperlipidemia; Acute pancreatitis

Huang P, Wang CY, Wu HS, Wu GJ, Li JJ. Treatment of hyperlipidemic acute pancreatitis by continuous venovenous hemofiltration: an analysis of 24 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 964-968

摘要

目的: 观察早期连续血液滤过(continuous veno-venous hemofiltration, CVVH)对高脂血症性急性胰腺炎(hyperlipidemic acute pancreatitis, HLP)的治疗效果.

方法: 49例HLP患者随机分为2组: 连续血液滤过组(A组, n = 24)和对照组(B组, n = 25). 在常规治疗的基础上, A组加用连续血液滤过. 观察治疗前后两组患者的心率(HR)、呼吸(R)、氧合指数(PO_2/FiO_2)、血氧饱和度(SaO_2)、

■同行评议者
谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

血清甘油三酯(TG)、白介素-6(IL-6)以及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等指标的变化; 并行APACHEⅡ动态评分; 比较两组治疗前后急性并发症的变化及治愈率.

结果: 经CVVH治疗后72 h, 患者临床症状改善明显, HR、R降至正常, APACHEⅡ评分下降明显(10.8±5.1 *vs* 15.5±6.9, $P<0.05$); 血清TG、IL-6及TNF-α亦明显下降(6.8±3.7 *vs* 18.5±6.3, 39.8±16.7 *vs* 72.4±25.1, 37.5±14.1 *vs* 61.2±16.1, $P<0.05$). 治疗7 d后, 两组休克均获纠正($P<0.05$). A组ARDS和急性肾功能障碍控制迅速, 发生率下降明显(5.0% *vs* 37.5%, 5.0% *vs* 25%, $P<0.05$). A组治愈22例, 死亡2例, 死亡率8.3%; B组治愈20例, 死亡5例, 死亡率20%, 治疗效果显著.

结论: CVVH治疗HLP有明显的效果, 能有效改善患者病情, 降低病死率.

关键词: 连续性静脉–静脉血液滤过; 高脂血症; 急性胰腺炎

黄鹏, 王春友, 吴河水, 吴国俊, 黎建军. 持续血液滤过治疗高脂血症性急性胰腺炎24例. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 964–968

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/964.asp

0 引言

随着我国人民生活水平的提高和饮食习惯的改变, 高脂血症所致急性胰腺炎的发病率呈上升趋势. 高脂血症(hyperlipidemia, HL)与急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的关系越来越受到临床医生的关注[1,2]. HL尤其是高甘油三酯血症已经成为AP的常见原因之一, 而治疗高脂血症性急性胰腺炎(hyperlipidemic acute pancreatitis, HLP)应积极降低血清甘油三酯(triglyceride, TG)的浓度. 近年来我们应用早期持续静脉-静脉血液滤过(continuous veno-venous hemofiltration, CVVH)治疗HLP, 取得较好的疗效, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 资料来源于我院2005-01/2010-12收治的49例HLP患者. 其中男28例, 女21例, 年龄21-63岁, 平均35.4±8.1岁. 入选标准: 发病48 h之内入院, 诊断均符合2003年中华医学会消化病分会制定的“中国急性胰腺炎诊治指南”标准[3], 并均为首次发病, 同时排除高脂血症外的任何病因. HLP诊断标准: 发病72 h内除有AP临床表现外, 血清TG值≥11.30 mmol/L, 若血清TG值在5.65-11.30 mmol/L之间, 但血清呈乳状者, 在排除其他AP常见病因即可诊断.

患者均以急性腹痛、腹胀为首发症状, 43例伴有恶心、频繁呕吐; 39例伴有明显腹膜炎体征, 以中上腹部为重. 37例有不同程度的发热, 体温为38.1 ℃-39.5 ℃. 49例患者全部经过胰腺B超及CT增强检查, B超及CT检查示肝脏脂肪浸润明显. 有家族性高脂血症2例, 有糖尿病8例, 有饮酒、脂肪餐诱因15例. 合并并发症: 急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrom, ARDS)15例, 急性肾功能障碍11例, 急性心力衰竭7例, 上消化道出血5例, 胰性脑病5例, 休克18例. 其中45例诊断为重型急性胰腺炎(SAP), 4例诊断为轻型急性胰腺炎(MAP). 按APACHEⅡ评分系统进行评分, <8分(n = 4), 9-16分(n = 28), 17-24分(n = 13), >24分(n = 4), 平均15.3分±5.1分. 49例随机分为2组: 连续血滤组(A组, n = 24), 对照组(B组, n = 25). 两组年龄、性别、APACHEⅡ评分无统计学差异.

1.2 方法

1.2.1 *治疗方法*: (1)常规治疗: 两组患者均给予禁食、胃肠减压、维持水及电解质平衡, 使用生长抑素及质子泵抑制剂抑制胰酶分泌、抗生素防治细菌感染、肠内或肠外营养支持治疗. 胃管内注入生大黄, 维护肠屏障功能治疗; 高血糖给予常规胰岛素控制, 急性肺损伤给予激素治疗, ARDS早期行呼吸末正压(PEEP)通气; 适时手术治疗; (2)CVVH: A组在进行上述常规治疗基础上, 行连续24 h CVVH治疗. 所用血液净化系统为德国Fresenius公司血滤器(Ultraflux AV 600), 德国Braun公司CRRT治疗仪及配套管道. 锁骨下静脉置入双腔管作血流通路, 采用高流量HF, 血液流速均控制在200-300 mL/min. 无肾性肾功能不全者滤过率4 000 mL/h, 前置换方式补充置换液(上海富民长征药业有限公司)4 000 mL/h; 对肾性肾功能不全患者在保证滤过率4 000 mL/h的同时, 酌情超滤. 低分子肝素钙抗凝, 首剂40 U/kg体质量, 追加速度8 U/(kg·h). 在血液滤过的过程中, 每1 h从静脉壶内抽取与血液分离的乳白色油脂, 并每12 h更换1个血滤器以尽快清除TG. 所有患者均入院后48 h内应用CVVH治疗, 平均治疗时间56 h. 血滤停止的指标: 在腹部症状和体征消失或心率下降至90次/min, 呼吸频率下降至20次/min或TG低于5.65 mmol/L时停止血滤.

■研发前沿

早期持续静脉-静脉血液滤过(continuous veno-venous hemofiltration, CVVH)被用来降低高脂血症性急性胰腺炎(hyperlipidemic acute pancreatitis, HLP)患者血液中甘油三酯水平正成为临床研究热点, 但仍缺乏大宗病例及多中心对照研究数据.

■相关报道
Furuya等认为HLP发病机制主要是由于血液中高水平甘油三酯分解的游离脂肪酸对胰腺本身的毒性作用及其引起的胰腺病理改变, 从而为CVVH用来治疗HLP提供了理论依据.

表 1 治疗前后心肺功能指标及APACHE II积分变化(n = 49, mean ± SD)

分组	指标	治疗前	治疗24 h	治疗48 h	治疗72 h	治疗7 d
A组	HR	109.0 ± 16.0	101.0 ± 13.0	97.0 ± 11.0[a]	87.0 ± 8.0[ac]	83.0 ± 6.0[ac]
	R	23.1 ± 5.1	22.9 ± 4.9	20.5 ± 3.1[a]	19.5 ± 2.7[ac]	19.2 ± 2.6[ac]
	PO_2/FiO_2	323.0 ± 58.0	301.0 ± 49.0	273.0 ± 45.0[a]	177.0 ± 37.0[ac]	121.0 ± 24.0[ac]
	SaO_2	0.93 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.94 ± 0.03	0.96 ± 0.03[ac]	0.97 ± 0.02[ac]
	APACHE Ⅱ积分	15.5 ± 6.9	15.1 ± 6.7	14.5 ± 6.1	10.8 ± 5.1[ac]	9.0 ± 4.0[ac]
B组	HR	108.0 ± 17.0	105.0 ± 14.0	103.0 ± 13.0	102.0 ± 14.0	94.0 ± 9.0[a]
	R	23.1 ± 5.3	22.7 ± 5.4	22.8 ± 5.1	22.9 ± 4.9	21.7 ± 4.8
	PO_2/FiO_2	321.0 ± 59.0	305.0 ± 58.0	298.0 ± 53.0	287.0 ± 49.0[a]	221.0 ± 32.0[a]
	SaO_2	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.03	0.92 ± 0.04	0.92 ± 0.03	0.93 ± 0.05
	APACHE Ⅱ积分	15.1 ± 7.1	15.2 ± 6.9	14.8 ± 6.8	14.5 ± 5.9	12.6 ± 5.2[a]

[a]P<0.05 *vs* 治疗前; [c]P<0.05 *vs* B组.

表 2 治疗前后TG、IL-6和TNF-α水平(n = 49, mean ± SD)

分组	指标	治疗前	治疗24 h	治疗48 h	治疗72 h	治疗7 d
A组	TG(mmol/L)	18.5 ± 6.3	16.3 ± 5.7	12.2 ± 5.1[a]	6.8 ± 3.7[ac]	4.8 ± 3.4[ac]
	IL-6(ng/L)	72.4 ± 25.1	71.9 ± 24.9	51.5 ± 21.1	39.8 ± 16.7[ac]	15.2 ± 7.6[ac]
	TNF-α(ng/L)	61.2 ± 16.1	59.5 ± 15.2	47.7 ± 14.3	37.5 ± 14.1[ac]	16.1 ± 7.9[ac]
B组	TG(mmol/L)	18.7 ± 6.4	17.5 ± 6.3	16.8 ± 6.1	16.3 ± 5.7	10.5 ± 4.9[a]
	IL-6(ng/L)	71.9 ± 25.3	83.9 ± 26.9	80.1 ± 25.1	78.8 ± 24.7	45.2 ± 20.6[a]
	TNF-α(ng/L)	62.9 ± 16.5	65.5 ± 17.2	64.7 ± 15.3	56.5 ± 14.1	31.1 ± 12.7[a]

[a]P<0.05 *vs* 治疗前; [c]P<0.05 *vs* B组.

1.2.2 观察指标: 分别测定治疗前、治疗后24 h、48 h、72 h和7 d的指标, 包括(1)心肺功能指标: 心率(HR)、呼吸(R)、氧合指数(PO_2/FiO_2)、血氧饱和度(SaO_2); (2)APACHE Ⅱ评分、血清TG浓度; (3)血清IL-6和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平; 比较两组治疗前后急性并发症的变化及治愈率. TNF-α、IL-6测定: 采用酶联免疫吸附试验(ELISA法). 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司.

统计学处理 数据以mean±SD表示. 采用SPSS12.0统计软件包进行统计分析, 计量资料用t检验, 计数资料用χ^2检验, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 心肺功能指标及APACHE Ⅱ评分 A组CVVH治疗48 h后效果明显, 患者心率和呼吸频率降低, 血流动力学趋于稳定; 治疗72 h后, 心率和呼吸频率降到正常范围, APACHE Ⅱ积分亦显著降低, 与B组相比, 差异有统计学意义(P<0.05, 表1).

2.2 TG、IL-6和TNF-α水平 A组CVVH治疗48 h后, TG、IL-6和TNF-α水平均显著降低, B组72 h内降低不明显, 组间差异显著(P<0.05, 表2).

2.3 治疗前后急性并发症和治愈率 治疗7 d后, 两组休克均纠正. A组除1例ARDS和1例急性肾功能障碍外, 其他急性并发症均得到控制. B组中, ARDS纠正2例, 新发2例; 新发急性肾功能障碍1例(表3). A组治愈22例, 死亡2例, 死亡率8.3%; B组治愈20例, 死亡5例, 死亡率20%.

3 讨论

HL是继胆源性和酒精性胰腺炎的第3大原因, 占全部胰腺炎病因的1.3%-3.8%[4]. 本研究资料中HLP占同期收治AP的5.7%, 比张瑜红等[5]报道稍低. HLP确切的病理生理学机制尚不清楚, 目前认为其发生与TG密切相关. 高脂血症主要通过影响胰液分泌、诱发胰腺微循环障碍和损伤胰腺腺泡细胞引发HLP[6]: (1)Zhao等[7]认为高脂血症可使胰腺血液处于高凝状态, 形成血栓, 堵塞胰腺微血管, 从而诱发胰腺微循环障碍, 从而引起胰腺炎; (2)高血脂诱发动脉粥样硬化致使内皮细胞损伤, 由内皮细胞合成释放的前列环素

表 3 治疗前后急性并发症发生率n (%)

并发症	A组		B组	
	治疗前	治疗7 d	治疗前	治疗7 d
ARDS	9(37.5)	1(5.0)[ac]	6(24.0)	6(24.0)
急性肾功能障碍	6(25.0)	1(5.0)[c]	5(20.0)	6(24.0)
急性心衰	3(12.5)	0(0)	4(16.0)	2(8.0)
上消化系出血	2(8.3)	0(0)	3(12.0)	1(4.0)
胰性脑病	2(8.3)	0(0)	3(12.0)	1(4.0)
休克	8(25.0)	0(0)[a]	10(28.0)	0(0)[a]

[a]P<0.05 *vs* 治疗前; [c]P<0.05 *vs* B组.

(PGI2)减少; 并可激活血小板, 释放缩血管的血栓素A2(TXA2), 致TXA2/PGI2平衡失调而影响胰腺微循环[8]; (3)过高的乳糜微粒栓塞于胰腺微血管或胰腺实质中形成黄色瘤, 乳糜血清也可引发肺水肿和胰腺微循环障碍; (4)TG被胰脂肪酶水解为游离脂肪酸(free fatty acid, FFAs), FFAs增多诱发酸中毒, 激活胰蛋白酶原, 进而引起腺泡细胞自身消化及加重胰腺炎的病理损害. Furuya等[9]通过实验证实, FFAs不仅可以造成胰腺的损伤, 而且会引发肺水肿, 这可能是高脂血症胰腺炎并发症发生率增高的原因. 尽管AP病情的轻重与血脂高低有无相关性仍存在争议[10,11], 但是一般认为高TG血症会加重病情, 且与AP的预后有关[12]. 高脂血症与过度炎症反应、胰腺微循环障碍共同在AP的病理过程中起重要作用. 高脂血症与AP的复发亦有一定相关性[13]; (5)有研究[14,15]认为家族性脂蛋白脂酶(lipo-protein lipase, LPL)缺乏是一种LPL基因突变引起的先天性缺陷, 可导致严重的高脂血症; (6)最近有文献报道囊性纤维化跨膜调节蛋白基因突变(CRTF)及肿瘤坏死因子启动子多态性与HLP发生密切相关[16].

在胰腺炎的发生发展过程中, 机体可释放大量的炎症介质如内毒素、TNF-α、IL-1、IL-6等, 引起全身炎症反应, 脏器受损和病情持续恶化. 因此, 迅速降低TG和阻断全身炎症反应是治疗HLP的关键所在. 在规范化治疗AP的基础上, 迅速去除引起高酯血症的原发性和继发性因素, 降低血TG值; 当TG值降至5.65 mmol/L以下时, 便可阻止病情的进一步发展[17].

近年来, 持续血液净化(continuous blood purification, CBP)治疗作为一种安全有效的方法已被广泛应用于危重病救治, CVVH是最常用的血滤模式. CVVH可通过对流、弥散、吸附等作用, 迅速清除体内循环内瀑布样连锁放大效应而产生的炎性介质(如内毒素、TNF-α、IL-1、IL-6等), 有效降低其血中水平, 减轻对肺、肾、心、肝和脑的损伤程度. 同时血滤器又能吸附TG, 故用于HLP早期(起病72 h内), 作为阻断炎症反应的主要有效治疗措施, 尤其是HLP的主要有效治疗措施之一.

研究表明[17]: CVVH在治疗HLP时, 能有效改善HLP患者的病情, 降低病死率. 一般情况下, 经CVVH治疗48-60 h后, TG水平可降至11.30 mmol/L以下. 本研究也证实: CVVH治疗能迅速清除体内的炎性介质, 有效降低血中TG、IL-6和TNF-α水平, CVVH治疗48 h后, TG、IL-6和TNF-α水平均已降低, 至72 h显著降低, 迅速改善HLP的临床症状和脏器的继发功能障碍, 维持患者水、电解质、酸碱平衡, 且无明显的不良反应, 明显降低了患者的急性并发症和病死率.

HLP治愈后仍应长期控制血TG值, 从根本上解决HL状况, 预防其复发; 患者应禁烟酒、避免暴饮暴食, 进低脂饮食、口服贝特类或他汀类降脂药及治疗引起血TG升高的相关疾病. 同时也应注意, CVVH只是HLP综合治疗的一个方面, 并不能取代必要的手术、引流、腹腔灌洗和抗感染等治疗措施; 另外, 血滤会影响某些药物的代谢, 改变其半衰期, 所以, 在CVVH实施过程中必须及时调整, 追加各主要治疗药物, 有条件时应全程监测血药浓度, 以保证有效的血药浓度.

总之, 辅助应用CVVH治疗HLP, 通过对细胞因子和炎性介质一定程度的清除, 有效降低血中TG水平, 提高治愈率, 降低并发症和死亡率, 是治疗HLP较好的辅助措施.

■**创新盘点**
本研究应用CVVH治疗HLP, 有效降低血中TG水平, 提高治愈率, 降低了并发症和死亡率.

4 参考文献

1 薛平, 黄宗文, 郭佳, 赵健蕾, 郑晓梅, 王忠朝. 高脂血症相关性重症急性胰腺炎临床特点的探讨. 胰腺病学 2006; 6: 27-29

2 万美华, 唐文富, 夏庆, 朱林. 高甘油三酯血症与急性胰腺炎. 职业卫生与病伤 2007; 22: 104-105

3 中华医学会消化病分会胰腺病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). 中华消化杂志 2004; 24: 190-192

4 Tsuang W, Navaneethan U, Ruiz L, Palascak JB, Gelrud A. Hypertriglyceridemic pancreatitis: presentation and management. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 984-991

5 张瑜红, 唐国都. 高脂血症性胰腺炎的临床研究. 中华临床医师杂志(电子版) 2011; 5: 2272-2274

6 王刚, 孙备, 姜洪池. 高脂血症急性胰腺炎的研究进展. 中国普通外科杂志 2005; 14: 857-859

7 Zhao T, Guo J, Li H, Huang W, Xian X, Ross CJ, Hayden MR, Wen Z, Liu G. Hemorheological abnormalities in lipoprotein lipase deficient mice with

■同行评价
本文设计严谨合理, 文章思路清晰, 为CVVH在高脂血症性急性胰腺炎治疗中又提供了较可靠的临床证据, 讨论较充分.

severe hypertriglyceridemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 1066-1071

8 孙诚谊, 潘耀振. 高脂血症性急性胰腺炎的发病机制及诊疗进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 343-349

9 Furuya T, Komatsu M, Takahashi K, Hashimoto N, Hashizume T, Wajima N, Kubota M, Itoh S, Soeno T, Suzuki K, Enzan K, Matsuo S. Plasma exchange for hypertriglyceridemic acute necrotizing pancreatitis: report of two cases. *Ther Apher* 2002; 6: 454-458

10 严际慎, 金海涛, 李佳, 王卫星, 王竹平. 高甘油三酯血症与急性胰腺炎关系的研究. 临床外科杂志 2003; 11: 76-78

11 吴郁珍. 甘油三脂/高密度脂蛋白胆固醇比值在重症急性胰腺炎诊断中的价值. 中华急诊医学杂志 2003; 12: 626-627

12 吴建新, 陈源文, 罗声政, 胡颖, 董国芳, 李定国, 陆汉明. 急性胰腺炎合并高甘油三酯血症的发病类型和预后. 中国实用内科杂志 2004; 24: 667-669

13 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

14 Pasalić D, Jurcić Z, Stipancić G, Ferencak G, Leren TP, Djurovic S, Stavljenić-Rukavina A. Missense mutation W86R in exon 3 of the lipoprotein lipase gene in a boy with chylomicronemia. *Clin Chim Acta* 2004; 343: 179-184

15 Pruneta-Deloche V, Marçais C, Perrot L, Sassolas A, Delay M, Estour B, Lagarde M, Moulin P. Combination of circulating antilipoprotein lipase (Anti-LPL) antibody and heterozygous S172 fsX179 mutation of LPL gene leading to chronic hyperchylomicronemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3995-3998

16 Chang YT, Chang MC, Su TC, Liang PC, Su YN, Kuo CH, Wei SC, Wong JM. Association of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutation/variant/haplotype and tumor necrosis factor (TNF) promoter polymorphism in hyperlipidemic pancreatitis. *Clin Chem* 2008; 54: 131-138

17 张宜明, 田军, 崔先泉, 鲜万华. 连续性血液净化佐治重症急性胰腺炎的疗效观察. 新医学 2007; 38: 166-169

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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, T1/2不能写成tl/2或$T_{\frac{1}{2}}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *Cl*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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 969-974
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

血液标志物与胰腺外炎症CT评分对急性胰腺炎严重性早期预测的比较

余贤恩

余贤恩, 右江民族医学院西南医院 百色市人民医院消化科 广西壮族自治区百色市 533000
余贤恩, 副主任医师, 主要从事肝、胆、胰腺疾病方面的研究.
通讯作者: 余贤恩, 副主任医师, 533000, 广西壮族自治区百色市城乡路8号, 右江民族医学院西南医院, 百色市人民医院消化科. yuxianenys@163.com
电话: 0776-2851303
收稿日期: 2012-01-17 修回日期: 2012-02-18
接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-04-18

Comparative evaluation of blood markers and extrapancreatic inflammatim on CT score in the early prediction of the severity of acute panereatitis

Xian-En Yu

Xian-En Yu, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, People's Hospital of Baise, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Correspondence to: Xian-En Yu, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, People's Hospital of Baise, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yuxianenys@163.com
Received: 2012-01-17 Revised: 2012-02-18
Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-04-18

Abstract

AIM: To compare the value of blood markers and extrapancreatic inflammation on CT score (EPIC) in early prediction of the severity of acute pancreatitis (AP).

METHODS: The clinical, laboratory and CT data obtained on admission (within 24 h of hospitalization) for 96 patients with AP who were hospitalized from September 2010 to September 2011 were analyzed. Severe AP (SAP) was defined as the presence of one or more of the following signs: mortality, persistent organ failure and/or admission ICU, and/or operation. Blood markers and EPIC were compared between SAP group and mild AP (MAP) using the *t* test. The correlation between blood markers, EPIC and severity of AP was analyzed. The value of blood markers and EPIC in predicting the severity of AP was assessed using receiver operation curve analysis. The sensitivity, positive predictive value and accuracy were also studied.

RESULTS: There were 20 patients with SAP and 76 patients with MAP. The levels of blood markers and EPIC in the SAP group were significantly higher than those in the MAP group [white blood cell (WBC): (15.16 ± 5.06) × 10^9/L *vs* (11.05 ± 1.76) × 10^9/L, neutrophil-lymphocyte ratio (NLR): 18.95 ± 12.13 *vs* 6.63 ± 3.44, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP): 58.35 mg/L ± 20.47 mg/L *vs* 28.59 mg/L ± 12.92 mg/L, D-dimer (DD): 1596.95 μg/L ± 1409.05 μg/L *vs* 412.52 μg/L ± 316.66 μg/L, EPIC: 3.30 ± 0.86 *vs* 1.50 ± 0.96, all P = 0.000]. The Spearman correlation coefficients (rs) between severity of AP and WBC, NLR, hs-CRP, DD and EPIC were 0.419, 0.571, 0.568, 0.434 and 0.613, respectively (all P = 0.000). The area under the curve (AUC) of WBC, NLR, hs-CRP, DD and EPIC in predicting the severity of AP were 0.798 (0.670-0.925), 0.906 (0.830-0.981), 0.904 (0.838-0.970), 0.808 (0.638-0.938) and 0.917 (0.851-0.983), respectively. The predictive sensitivities were 70.00%, 85.00%, 85.00%, 75.00% and 85.00%; the positive predictive values were 58.33%, 73.91%, 51.52%, 48.39% and 72.00%; and the accuracies were 83.33%, 90.63%, 80.21%, 78.13% and 90.63%, respectively.

CONCLUSION: WBC and DD have a moderate value in predicting the severity of AP, while NLR, hs-CRP, and EPIC have a much higher value.

Key Words: Marker; Extrapancreatic inflammation on CT score; Acute pancreatitis; Severity; Prediction

Yu XE. Comparative evaluation of blood markers and extrapancreatic inflammatim on CT score in the early prediction of the severity of acute panereatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 969-974

摘要

目的: 比较血液标志物及胰腺外炎症CT评分(extrapancreatic inflammation on CT score,

■背景资料
急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是消化系统第3位常见疾病, 其中约20%发展为重症急性胰腺炎(SAP), 而后者的病死率高达20%-30%, 严重影响人们健康. 所以早期识别及早期预测重症病例对于积极而恰当的治疗及改善其预后具有重要意义.

■同行评议者
黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科

■研发前沿
目前对预测AP严重性的研究主要采用血液或尿液单个指标、临床多因素评分系统、CT评分系统、磁共振检查以及超声内镜检查等, 而采用哪个或哪些简便、准确、有效的早期预测方法是研究的热点之一.

EPIC)对急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)严重性的早期预测价值.

方法: 对2010-09/2011-09住院的96例AP患者首个24 h内的临床、实验室及CT资料进行分析. 临床上重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的标准为: 死亡或持续器官衰竭及/或入住ICU, 及/或手术治疗. 对重症急性胰腺炎组及轻症急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)组患者血液标志物及胰腺外炎症CT评分进行*t*检验, 血液标志物及EPIC预测AP严重性的相关性检验及预测AP严重性的ROC分析, 并计算预测敏感性、阳性预测值及准确度.

结果: MAP76例, SAP20例. 重症患者的血液标志物及胰腺外炎症CT评分均明显较轻症患者的大[白细胞: (15.16±5.06)×10^9/L *vs* (11.05±1.76)×10^9/L, 中性粒细胞与淋巴细胞比值: 18.95±12.13 *vs* 6.63±3.44, 高敏C-反应蛋白: 58.35 mg/L±20.47 mg/L *vs* 28.59 mg/L±12.92 mg/L, D-二聚体: 1596.95 μg/L±1409.05 μg/L *vs* 412.52 μg/L±316.66 μg/L, 胰腺外炎症CT评分: 3.30±0.86 *vs* 1.50±0.96, P = 0.000]. 白细胞、中性粒细胞与淋巴细胞比值、高敏C-反应蛋白、D-二聚体及胰腺外炎症CT评分与AP严重性的Spearman相关系数(rs)分别为0.419、0.571、0.568、0.434及0.61(P = 0.000). 白细胞、中性粒细胞与淋巴细胞比值、高敏C-反应蛋白、D-二聚体及胰腺外炎症CT评分对AP严重性预测的曲线下面积分别为0.798(0.670-0.925)、0.906(0.830-0.981)、0.904(0.838-0.970)、0.808(0.638-0.938)以及0.917(0.851-0.983); 预测敏感性分别为70.00%、85.00%、85.00%、75.00%及85.00%; 阳性预测值分别为58.33%、73.91%、51.52%、48.39%及72.00%; 预测准确度分别为83.33%、90.63%、80.21%、78.13%及90.63%.

结论: 白细胞及D-二聚体对AP严重性的预测价值中等, 中性粒细胞与淋巴细胞比值、高敏C-反应蛋白及胰腺外炎症CT评分的预测价值较高, 其中中性粒细胞与淋巴细胞比值和胰腺外炎症CT评分预测的准确度最高, 胰腺外炎症CT评分与AP严重性的相关系数最大, 其预测AP严重性的受试者曲线下面积最大.

关键词: 标志物; 胰腺外炎症CT评分; 急性胰腺炎; 严重性; 预测

余贤恩. 血液标志物与胰腺外炎症CT评分对急性胰腺炎严重性早期预测的比较. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 969-974

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/969.asp

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是消化系疾病中第3位常见疾病, 是由胆系疾病、酒精、高脂血症、肥胖等引起的全身炎症性疾病. 大多数AP是轻症并多为自限性, 而约1/5患者会发展为重症急性胰腺(severe acute pancreatitis, SAP). SAP严重影响患者康复, 其病死率达20%-30%, 所以早期预测AP严重性以及给予相应处理显得很重要[1], 而采取哪些便捷方法能尽早识别及预测SAP是对AP患者进行科学分类、合理治疗、减少病死率及促进康复的关键. 多种单个因素如血糖、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白蛋白、红细胞压积等均能评估AP严重性[2]. Azab等[3]报道, 中性粒细胞(neutrophil, N)与淋巴细胞(lymphocyte, L)比值较白细胞(white blood cell, WBC)总数更能预测AP患者入住ICU及住院天数. Prongprasobchai等[4]报道, 在患者入院36 h, CRP≥150 mg/L对AP严重性预测的敏感性为86%, 特异性为87%, 阳性预测值为75%. Ke等[5]报道, D-二聚体(D-Dimer, DD)是预测AP严重性的一个易操作、价廉的指标. Ke等[5]研究发现, 患者入院24 h内CT评分对AP严重性预测准确度与临床多因素评分系统的预测结果相类似. 本研究拟比较WBC、N与L比值、CRP、DD和胰腺外炎症CT评分(extrapancreatic inflammation on CT score, EPLC)对AP严重性预测情况并探索各种因素预测的敏感性、特异性、阳性拟然比、阳性预测值及准确度.

1 材料和方法

1.1 材料 对2010-09/2011-09住院的96例AP患者资料进行回顾性分析. 纳入病例符合中华医学会胰腺病学组2003年制定《中国急性胰腺炎诊疗指南(草案)》的标准, 临床上诊断SAP的条件为: 死亡或持续器官衰竭及/或入住ICU, 及/或手术治疗[6]. 患者年龄22-81岁, 男77例, 女19例. 轻症急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)76例, SAP 20例, 其中肾衰12例, 呼衰8例, 手术6例, 死亡4例. 排除感染病例.

1.2 方法 患者入院24 h内采取外周静脉血2 mL, 采用ABX DX120全自动血球仪及ABX配套试剂进行血常规检查, 采用颗粒增强免疫透射比浊法[试剂盒由德赛诊断系统(上海)有限公司提供]进行高敏CRP(higher sensitivity CRP, hs-CRP)检

表 1 SAP组和MAP组患者血液单个指标及EPIC比较(mean ± SD, n = 96)

分组	n	WBC (× 10^9/L)	N与L比值	hs-CRP(mg/L)	DD(μg/L)	EPIC
SAP组	20	15.16 ± 5.06	18.95 ± 12.13	58.35 ± 20.47	1596.95 ± 1409.05	3.30 ± 0.86
MAP组	76	11.05 ± 1.76	6.63 ± 3.44	28.59 ± 12.92	412.52 ± 316.66	1.50 ± 0.96
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

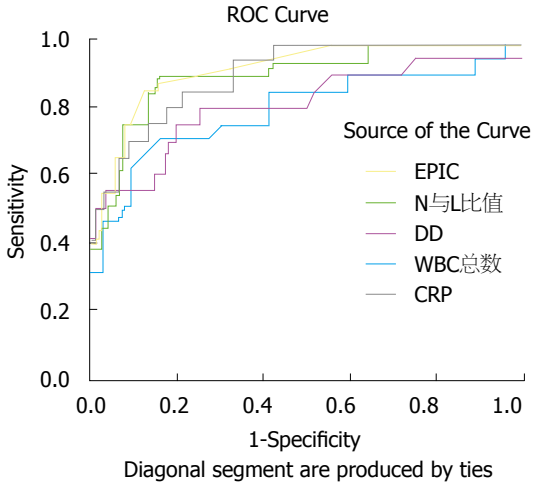


图 1 WBC总数、N与L比值、hs-CRP浓度、DD浓度及EPIC预测AP严重性的ROC曲线.

查及采用Destiny Max血凝仪(光学比浊法)进行DD检查. 患者入院24 h内接受64排螺旋CT进行腹部扫描检查及EPIC评分[7].

统计学处理 SAP组及MAP组患者的血WBC总数、N与L比值、hs-CRP浓度、DD浓度及EPIC评分结果以mean±SD表示, 使用SSPS17.0对数据进行t检验、相关性检验及ROC分析, 以P<0.05为差异具有统计学意义. 并分别计算各标志物及EPIC对SAP预测的敏感性、特异性、阳性拟然比、阳性预测值及准确度.

2 结果

2.1 SAP组及MAP组患者血液标志物及EPIC 96例AP患者中, SAP组患者的WBC总数、N与L比值、hs-CRP浓度、DD浓度及EPIC数值均较MAP组患者的相应数值高, 经t检验, 均具有明显差异(P = 0.000, 表1).

2.2 AP患者血液标志物及EPIC预测AP严重性的相关性检验 AP患者WBC总数、N与L比值、hs-CRP浓度、DD浓度和EPIC数据经非参数检验(Npar test)结果为不服从正态分布资料, 采用Spearman相关性检验显示WBC总数、N与L比值、hs-CRP浓度、DD浓度和EPIC数值与AP严重性的相关系数(rs)分别为0.419、0.571、0.568、0.434及0.613(P值均为0.000), 即这些指标均与AP严重性明显相关. 而且WBC总数与N与L比值的rs为0.391(P = 0.000), 即N与L比值大小与WBC总数明显相关.

2.3 AP患者血液标志物及EPIC预测SAP的ROC分析 AP患者的WBC总数、N与L比值、hs-CRP浓度、DD浓度及EPIC数值预测AP严重性的ROC曲线下面积(area under the cure, AUC)分别为0.798(95%CI: 0.670-0.925)、0.906(95%CI: 0.830-0.981)、0.904(0.838-0.970)、0.808(0.638-0.938)、0.917(0.851-0.983). 其中以EPIC的AUC最大, 即EPIC的预测有效性最大. AP患者的WBC总数、N与L比值、hs-CRP浓度、DD浓度及EPIC数值预测AP严重性的ROC曲线见图1.

2.4 AP患者血液标志物及EPIC分别预测SAP的有效性 在WBC总数、N与L比值、hs-CRP浓度、DD浓度及EPIC预测SAP的敏感性、特异性、阳性拟然比、阳性预测值及准确度的比较中, 以N与L比值及EPIC预测的特异性及准确性较高, 均超过90%(表2).

3 讨论

AP是以胰腺病变并全身性的炎症性疾病, 其发病机制是胰腺酶原激活、炎症介质释放、细胞因子产生, 导致多个系统、器官、组织及细胞受到影响, 可引起20% AP患者发生SAP, 而使病死率升高达20%-30%[2]. 对AP严重性进行早期识别, 以便于早期有效治疗, 改善SAP预后[1]. 多年来对AP严重性的预测方法进行了广泛研究, 分别建立了Ranson评分、APACHE Ⅱ评分、Glosgow评分等, 尽管这些评分标准都具有较好的预测价值, 但这些评分系统的评分项目较多, 操作不易. 所以对AP严重性的简捷预测方法一直处于探索之中, 临床上多种单一因素已用于对AP严重性的评估[2], 并取得了较好的结果.

WBC是AP的重要炎症细胞, Ramudo等[8]研究中发现外周血循环WBC在大鼠实验性AP中具有重要作用. WBC中的N具有趋化、粘附、吞

■应用要点
本研究表明重症与轻症AP患者的血液标志物及胰腺外炎症CT评分(EPIC)有显著差异, EPIC与AP严重性的相关系数最大, 而EPIC预测AP严重性的受试者曲线下面积也最大, 中性粒细胞与淋巴细胞比值及EPIC对AP严重性预测准确性最高, 这对早期预测AP严重性具有重要的临床意义.

■同行评价
该文采用中性粒细胞与淋巴细胞比值和胰腺外炎症CT评分预测急性胰腺炎的严重程度, 对临床有一定参考价值.

表 2 AP患者血液单个指标及EPIC对AP严重性的预测价值(n = 96)

实验室指标	AUC	预测分界值	敏感性(%)	特异性(%)	阳性拟然比	阳性预测值(%)	准确度(%)
WBC总数	0.798	12.55×10^9/L	70.00	86.84	5.32	58.33	83.33
N与L比值	0.906	7.85	85.00	92.11	10.77	73.91	90.63
hs-CRP	0.904	37.85 mg/L	85.00	78.95	4.04	51.52	80.21
DD	0.808	616.00 μg/L	75.00	78.95	3.56	48.39	78.13
EPIC	0.917	2.5	85.00	90.79	9.77	72.00	90.63

噬和杀菌等作用. AP时细胞因子生成增多, 使N表达抗凋亡蛋白A1、Bcl-x1等, 延迟N凋亡, 而且caspase-2也抑制N凋亡[9], SAP患者的核转录因子κB(NK-κB)也延迟N凋亡[10]. N数量增加后, 在趋化因子作用下聚集并粘附于胰腺腺泡细胞, 就会释放髓过氧化物酶、吞噬素、溶菌酶、β葡萄糖苷酸酶、碱性磷酸酶等, 并激活胰蛋白酶原[11], 导致胰腺自身消化并进一步损伤及加重炎症反应. Azab等[3]报道, N与L比值较WBC总数更能预测AP患者入住ICU及住院天数等情况. Dambrauskas等[12]对发作72 h内的108例AP患者进行研究发现, SAP具有典型的全身炎症反应及促细胞因子(IL-6、IL-8及巨噬细胞迁移抑制因子等)过度表达, 而且重症及坏死性AP的外周血淋巴细胞枯竭. 所以, SAP患者的外周血L明显减少, 那么就可能导致N与L的比值增大. 我院研究显示, SAP组较MAP组的WBC总数明显多[(15.16±5.060×10^9/L *vs* (11.05±1.76)×10^9/L, P = 0.000], 而且Spearman相关性检验显示WBC总数与AP严重性的rs为0.419(P = 0.000), 说明WBC总数与AP严重性明显相关. 研究还显示WBC总数与N与L比值的rs为0.391(P = 0.000), 即N与L比值大小与WBC总数明显相关. 而N与L比值与AP严重性的rs为0.571(P = 0.000), 说明两者明显相关, 且SAP组的N与L比值较MAP组的高(18.95±12.13 *vs* 6.63±3.43, P = 0.000), 说明WBC总数越大, N与L比值越大, AP就越严重, 这与文献报道相类似. 我院研究显示预测SAP的N与L比值为7.85, 更与文献报道的N与L比值≥7.6时患者入住ICU及住院时间延长的情况相一致. 经ROC分析, WBC预测SAP的AUC为0.798(95%CI: 0.670-0.925), 而N与L比值预测SAP的AUC为0.906(95%CI: 0.830-0.981), 两者预测AP严重性的敏感性、特异性、阳性拟然比、阳性预测值、准确度分别为70.00%、86.84%、5.32、58.33%、83.33%和85.00%、92.11%、10.77、73.91%、90.63%. 显示N与L比值较WBC总数更准确预测AP严重性.

CRP是由多种细胞因子等炎症分子刺激肝脏细胞合成的五聚体蛋白, 是炎症反应的急时象性蛋白, 是非特异炎症的标志物, 也用于AP的评估[13]. 尽管Andersson等[14]研究报道, CRP预测SAP的敏感性较组织因子(tissue factor, TF)的预测值低(AUC为0.653 *vs* 0.775), 但是Dambrauskas等[15]报道认为CRP仍然是预测SAP最有用的生化因子, 其具有准确、价廉及便捷的特点. 我院研究显示, hs-CRP与AP严重性的相关系数rs为0.568(P = 0.000), 说明CRP浓度越高, AP越严重, 明显相关. 研究还显示hs-CRP预测SAP的AUC为0.904(0.838-0.970), 表明其具有较高的预测价值. 我院研究显示CRP预测SAP的AUC为0.904, 而Andersson等[14]研究CRP预测SAP的AUC为0.653, 这种差异可能与我院是检测hs-CRP而非普通CRP有一定的关系. Gürleyik等[16]报道, 在患者入院48 h CRP≥150 mg/L对AP严重性预测的敏感性为85%, 特异性为74%, 阳性预测值为50%, 阴性预测值为94%, 准确度76%. 2010年Pongrasobchai等[4]报道, 在患者入院36 h, CRP≥150 mg/L对AP严重性预测敏感性86%、特异性87%、阳性预测值75%、阴性预测值为93%. Kim等[17]对119例住院的AP患者研究表明, CRP切割值为83 mg/L时, 患者持续疼痛的阳性拟然比为3.84, CRP可用于评估AP的严重性. 我院研究显示, 患者入院24 h内, hs-CRP预测分界值为37.85 mg/L时对SAP预测的敏感性、特异性、阳性拟然比、阳性预测值、准确度分别为85.00%、78.95%、4.04、51.52%及80.21%, 与文献报道相类似. 而且, Wang等[18]报道, 在AP患者入院24 h内CRP>170 mg/L及白蛋白<30 g/L增加SAP住院患者病死率, 即高浓度的CRP还预示高病死率.

AP时由于液体渗出等改变, 导致器官组织的血液循环障碍及体内纤溶功能改变或高凝状态. 而DD是继发纤溶时交联纤维蛋白特异性的降解产物, 其在炎症反应及器官衰竭时大量增

加, 所以DD是炎症反应的标志物之一. Ke等[5]报道, DD对预测AP严重性是一个易操作、价廉的指标, 在SAP患者, DD浓度为正常值高限的6倍[19], DD是判断SAP合并器官衰竭的敏感指标[20]. 我院研究显示, DD与AP严重性相关系数rs为0.434(P = 0.000), 也表明两者明显相关, 而且入院24 h内, DD预测AP严重性的AUC为0.808(0.638-0.938), DD在预测分界值为616 μg/L时其预测SAP的敏感性、特异性、阳性拟然比、阳性预测值及准确度分别为75.00%、78.95%、3.56、48.39%及78.13%, 属于中度预测水平.

CT在AP诊断、监测及严重性评估方面具有关键性的作用[13], CT平扫、增强CT成像或动态CT检查在能准确诊断胰腺及胰周炎症, 并用于AP病情评估及预后判断[21-24]. Gürleyik等[16]报道, CT严重指数(CT severity index, CTSI)对AP严重性预测的敏感性85%, 特异性98%, 阳性预测值92%, 阴性预测值为95%, 准确性为95%, 优于APACHE-Ⅱ对SAP的预测值. Papachristou等[25]报道, BIAP、Ranson评分、APACHE-Ⅱ评分及CTSI预测SAP的AUC分别为0.81、0.94、0.78及0.84. 最近Bollen等[6]报道, 入院第1天CT检查对AP严重性的预测准确性与临床多系统评分的预测价值相类似, 在Balthazar CT评分、CTSI、改良CT严重指数(modified CTSI, MCTSI)、胰腺体积指数、胰腺外评分、EPIC、肠系膜水肿及腹腔积液评分等CT评分预测系统中, Balthazar CT评分及CTSI具有最高的准确性, 但无统计学差异. Bollen等[26]也报道, CTSI及MCTSI与AP严重性明显相关(P<0.0001), 两者诊断SAP的准确性优于APACHE-Ⅱ(AUC为0.87). Heiss等[27]报道, CT检查发现胰腺坏死以及肾后间隙和结肠后积液都与SAP病死率有关, 这些CT影像可以预测SAP的预后. Imamura等[28]报道, AP患者腹部CT检查后的肾脏外周分级(1-3)可用来评估AP严重性, 肾脏外周分级评分与Balthazar评分、CTSI、Ranson评分及APACHE-Ⅱ评分对SAP及死亡率预测的AUC价值相当. 也说明CT对胰腺外炎症的判定结果对于SAP的预测具有很高的价值. De Waele等[7]研究报道, EPIC评分优于Balthazar CT评分及CTSI, 当EPIC评分≥4时, 对AP严重性预测的敏感性100%, 特异性为70.8%. 我院研究显示EPIC与AP严重性的相关系数rs为0.613(P = 0.000), 两者明显相关, EPIC预测SAP的AUC为0.917(0.851-0.983), 具有很高的价值. 在EPIC>2.5时, 其预测SAP敏感性为85%、特异性为90.79%、阳性拟然比为9.77, 阳性预测值为72.00%, 准确度90.63%, 与文献报道类似, 即EPIC对AP严重性有很高的预测价值.

我院研究显示, 在WBC、N与L比值、hs-CRP、DD及EPIC对AP严重性预测价值比较中, 各指标与AP严重性的相关系数rs分别为0.419、0.571、0.568、0.434及0.613, 以EPIC的相关系数最大, 而各指标预测AP严重性的AUC分别为0.798、0.906、0.904、0.808及0.917, N与L比值、hs-CRP及EPIC预测的AUC值均超过0.9, 说明这3个指标的预测价值较高, 而以EPIC的预测价值最高. N与L比值及EPIC预测SAP的准确度最高, 均为90.63%.

总之, 我院研究表明, SAP患者的血液标志物及EPIC数值均明显较MAP患者的相应指标大, WBC及DD对AP严重性预测价值中等, N与L比值、hs-CRP及EPIC对AP严重性预测价值较高, 其中N与L比值和EPIC预测的准确度最高, EPIC与AP严重性的相关性最大, 其预测的AUC最高. 所以, 可以单独或联合使用这些指标对AP严重性进行早期预测, 以便及时有效治疗AP并改善其预后.

4 参考文献

1 Frossard JL, Lescuyer P, Pastor CM. Experimental evidence of obesity as a risk factor for severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5260-5265

2 Brisinda G, Vanella S, Crocco A, Mazzari A, Tomaiuolo P, Santullo F, Grossi U, Crucitti A. Severe acute pancreatitis: advances and insights in assessment of severity and management. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 541-551

3 Azab B, Jaglall N, Atallah JP, Lamet A, Raja-Surya V, Farah B, Lesser M, Widmann WD. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of adverse outcomes of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2011; 11: 445-452

4 Pongprasobchai S, Jianjaroonwong V, Charatcharoenwitthaya P, Komoltri C, Tanwandee T, Leelakusolvong S, Pausawasdi N, Srikureja W, Chainuvati S, Prachayakul V, Manatsathit S, Kachintorn U. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein for the prediction of severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 2010; 39: 1226-1230

5 Ke L, Ni HB, Tong ZH, Li WQ, Li N, Li JS. D: -dimer as a marker of severity in patients with severe acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; Jun 11. *[Epub ahead of print]*

6 Bollen TL, Singh VK, Maurer R, Repas K, van Es HW, Banks PA, Mortele KJ. A Comparative Evaluation of Radiologic and Clinical Scoring Systems in the Early Prediction of Severity in Acute Pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2011; Dec 20. *[Epub ahead of print]*

7 De Waele JJ, Delrue L, Hoste EA, De Vos M, Duyck P, Colardyn FA. Extrapancreatic inflammation on abdominal computed tomography as an early predictor of disease severity in acute pancreatitis:

evaluation of a new scoring system. *Pancreas* 2007; 34: 185-190
8 Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Recio JS, Weruaga E, De Dios I. Effect of dexamethasone on peripheral blood leukocyte immune response in bile-pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Steroids* 2010; 75: 362-367
9 Nakamura Y, Do JH, Yuan J, Odinokova IV, Mareninova O, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Inflammatory cells regulate p53 and caspases in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: G92-G100
10 Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 1205-1211
11 Abdulla A, Awla D, Thorlacius H, Regnér S. Role of neutrophils in the activation of trypsinogen in severe acute pancreatitis. *J Leukoc Biol* 2011; 90: 975-982
12 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
13 Pezzilli R, Zerbi A, Di Carlo V, Bassi C, Delle Fave GF. Practical guidelines for acute pancreatitis. *Pancreatology* 2010; 10: 523-535
14 Andersson E, Axelsson J, Eckerwall G, Ansari D, Andersson R. Tissue factor in predicted severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 6128-6134
15 Dambrauskas Z, Gulbinas A, Pundzius J, Barauskas G. Value of the different prognostic systems and biological markers for predicting severity and progression of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45: 959-970
16 Gürleyik G, Emir S, Kiliçoglu G, Arman A, Saglam A. Computed tomography severity index, APACHE II score, and serum CRP concentration for predicting the severity of acute pancreatitis. *JOP* 2005; 6: 562-567
17 Kim YS, Lee BS, Kim SH, Seong JK, Jeong HY, Lee HY. Is there correlation between pancreatic enzyme and radiological severity in acute pancreatitis? *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2401-2405
18 Wang X, Cui Z, Li H, Saleen AF, Zhang D, Miao B, Cui Y, Zhao E, Li Z, Cui N. Nosocomial mortality and early prediction of patients with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1386-1393
19 Kong H, Ding Z, Zhu XC, Gao XY, Wu J, Qian W, Wang CY, Hou XH. d-Dimer change in human acute pancreatitis as determined by serumal triglyceride. *Pancreas* 2011; 40: 1103-1106
20 Radenkovic D, Bajec D, Ivancevic N, Milic N, Bumbasirevic V, Jeremic V, Djukic V, Stefanovic B, Stefanovic B, Milosevic-Zbutega G, Gregoric P. D-dimer in acute pancreatitis: a new approach for an early assessment of organ failure. *Pancreas* 2009; 38: 655-660
21 Beger HG, Rau BM. Severe acute pancreatitis: Clinical course and management. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5043-5051
22 Ocampo C, Zandalazini H, Kohan G, Silva W, Szelagowsky C, Oría A. Computed tomographic prognostic factors for predicting local complications in patients with pancreatic necrosis. *Pancreas* 2009; 38: 137-142
23 Takeda K, Yokoe M, Takada T, Kataoka K, Yoshida M, Gabata T, Hirota M, Mayumi T, Kadoya M, Yamanouchi E, Hattori T, Sekimoto M, Amano H, Wada K, Kimura Y, Kiriyama S, Arata S, Takeyama Y, Hirota M, Hirata K, Shimosegawa T. Assessment of severity of acute pancreatitis according to new prognostic factors and CT grading. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010; 17: 37-44
24 Bharwani N, Patel S, Prabhudesai S, Fotheringham T, Power N. Acute pancreatitis: the role of imaging in diagnosis and management. *Clin Radiol* 2011; 66: 164-175
25 Papachristou GI, Muddana V, Yadav D, O'Connell M, Sanders MK, Slivka A, Whitcomb DC. Comparison of BISAP, Ranson's, APACHE-II, and CTSI scores in predicting organ failure, complications, and mortality in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 435-441; quiz 442
26 Bollen TL, Singh VK, Maurer R, Repas K, van Es HW, Banks PA, Mortele KJ. Comparative evaluation of the modified CT severity index and CT severity index in assessing severity of acute pancreatitis. *AJR Am J Roentgenol* 2011; 197: 386-392
27 Heiss P, Bruennler T, Salzberger B, Lang S, Langgartner J, Feuerbach S, Schoelmerich J, Hamer OW. Severe acute pancreatitis requiring drainage therapy: findings on computed tomography as predictor of patient outcome. *Pancreatology* 2010; 10: 726-733
28 Imamura Y, Hirota M, Ida S, Hayashi N, Watanabe M, Takamori H, Awai K, Baba H. Significance of renal rim grade on computed tomography in severity evaluation of acute pancreatitis. *Pancreas* 2010; 39: 41-46

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 975-979
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

伊立替康治疗结直肠癌相关胆碱能综合征89例

刘慧龙, 李志宇, 刘彦芳, 李红英, 于忠和

刘慧龙, 李志宇, 刘彦芳, 李红英, 于忠和, 中国人民解放军北京军区总医院肿瘤科 北京市 100700
刘慧龙, 博士, 副主任医师, 主要从事恶性肿瘤的临床与应用基础的研究.
作者贡献分布: 刘慧龙与李志宇对本文所作贡献均等; 此课题由刘慧龙与李志宇共同设计; 临床治疗方案由于忠和与李红英负责制定; 临床数据收集和整理由刘慧龙、李志宇及刘彦芳完成; 数据分析由刘慧龙与刘彦芳完成; 论文写作由刘慧龙与李志宇完成.
通讯作者: 刘慧龙, 博士, 副主任医师, 100700, 北京市, 中国人民解放军北京军区总医院肿瘤科. lhllaser@yahoo.com.cn
电话: 010-66712629-8504 010-66721895
收稿日期: 2012-01-29 修回日期: 2012-03-05
接受日期: 2012-03-06 在线出版日期: 2012-04-18

Irinotecan-related cholinergic symptoms in patients with colorectal cancer patients: an analysis of 89 cases

Hui-Long Liu, Zhi-Yu Li, Yan-Fang Liu, Hong-Ying Li, Zhong-He Yu

Hui-Long Liu, Zhi-Yu Li, Yan-Fang Liu, Hong-Ying Li, Zhong-He Yu, Department of Oncology, General Hospital of Beijing Military Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China
Correspondence to: Hui-Long Liu, Associate Chief Physician, Department of Oncology, General Hospital of Beijing Military Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China. lhllaser@yahoo.com.cn
Received: 2012-01-29 Revised: 2012-03-05
Accepted: 2012-03-06 Published online: 2012-04-18

Abstract

AIM: To observe and analyze irinotecan-related cholinergic symptoms in patients with advanced colorectal cancer.

METHODS: A total of 89 patients with advanced colorectal cancer were assigned to receive two different FOLFIRI regimens. The incidence of cholinergic symptoms was recorded, and the correlation of the development of cholinergic symptoms with clinical characteristics, other adverse effects and chemotherapy regimens was analyzed.

RESULTS: Fifty-three patients developed cholinergic symptoms. From the start of infusion, cholinergic symptoms occurred at a median of 150 min (range: 30 min-25 h) and most of them regressed in 24 h. Prophylactic use of atropine could effectively prevent the development of cholinergic symptoms. Cholinergic symptoms were more common in senile patients (75.9% *vs* 51.7%, $P = 0.029$), but were not related with other clinical characteristics such as sex and ECOG score. Patients who developed cholinergic symptoms had a decreasing tendency to develop delayed-onset diarrhea. The regimen containing higher dose of fluorouracil was associated with a higher risk of developing mucocitis (50.0% *vs* 27.5%, $P = 0.029$).

CONCLUSION: The incidence rate of irinotecan-related cholinergic symptoms is unexpectedly high. The development of irinotecan-related cholinergic symptoms is not related with other adverse effects such as diarrhea and/or bone marrow depression.

Key Words: Irinotecan; Cholinergic symptoms; Colorectal cancer; Adverse effects

Liu HL, Li ZY, Liu YF, Li HY, Yu ZH. Irinotecan-related cholinergic symptoms in patients with colorectal cancer: an analysis of 89 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 975-979

摘要

目的: 观察和分析伊立替康治疗结直肠癌相关胆碱能综合征的发生情况.

方法: 应用2种FOLFIRI方案治疗转移性结直肠癌患者89例, 观察和记录胆碱能综合征发生情况, 并将其与患者临床资料、其他不良反应和所应用的治疗方案进行相关性分析.

结果: 53例(59.6%)患者发生胆碱能综合征, 中位发生时间为伊立替康开始滴注后150 min (30 min-25 h), 绝大多数在用药后24 h内逐渐消退, 预防性应用阿托品可以有效预防胆碱能综合征发生; ≥60岁老年患者胆碱能综合征明显高发(75.9% *vs* 51.7%, $P = 0.029$), 未发现其与性别、ECOG评分等临床特征有关; 出现胆碱能综合征患者迟发性腹泻有减少趋势(52.8% *vs* 34.0%, $P = 0.077$), 未发现胆碱能综合征与其他不良反应相关; 采用高剂量氟尿

■背景资料
胆碱能综合征是接受伊立替康治疗后常见的不良反应, 由于表现不典型、持续时间相对较短, 往往容易被临床医生所忽视, 但如果认识不到位、处理不及时, 会对患者生活质量和治疗安全性产生明显影响.

■同行评议者
刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

■研发前沿
目前已经基本明确伊立替康对乙酰胆碱酯酶的抑制是导致出现胆碱能综合征的主要机制，且具有明显的剂量相关性，高剂量组高发，但少有研究对胆碱能综合征与其他伊立替康相关不良反应以及患者的临床特征等因素进行相关分析.

嘧啶治疗方案患者黏膜炎明显高发(50.0% *vs* 27.5%, $P = 0.029$).

结论: 伊立替康相关胆碱能综合征高发，应引起临床医生重视; 胆碱能综合征对后续可能发生的迟发性腹泻和/或骨髓抑制无预测作用.

关键词: 伊立替康; 胆碱能综合征; 结直肠癌; 不良反应

刘慧龙, 李志宇, 刘彦芳, 李红英, 于忠和. 伊立替康治疗结直肠癌相关胆碱能综合征89例. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 975-979
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/975.asp

0 引言

伊立替康是喜树碱的衍生物，特异性地作用于拓扑异构酶Ⅰ，阻止DNA复制，抑制肿瘤细胞增殖，在转移性结直肠癌治疗中居重要地位[1,2]. 胆碱能综合征是接受伊立替康治疗后常见的不良反应，文献报告其发生率差异很大，在1.3%-79%之间[2-5]，由于表现不典型，往往容易被临床医生所忽视，如果处理不及时会对患者生活质量和治疗安全性产生明显影响. 我们对近3年来应用伊立替康联合氟尿嘧啶治疗的89例转移性结直肠癌患者相关胆碱能综合征进行观察、分析，现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2008-12/2011-12应用FOLFIRI方案治疗转移性结直肠癌89例，所有患者均经病理或细胞学检查确诊为结直肠癌. 其中男58例，女31例; 年龄23-80岁，中位年龄52岁，≥60岁老年患者29例(65岁以上患者14例)，<60岁患者60例; 一线治疗37例，二线治疗52例; 化疗前功能状态ECOG评分≤2分，重要脏器功能基本正常，无化疗禁忌证. 患者均签署知情同意书.

1.2 方法

1.2.1 治疗方案: 应用两种不同FOLFIRI方案施治[6,7]. 研究前期主要应用FOLFIRI方案1给药，即伊立替康180 mg/m^2, 90 min静脉给药，d1; 亚叶酸钙200 mg/m^2, 2 h静脉给药，d1、2; 氟尿嘧啶400 mg/m^2, 静脉推注d1、2; 600 mg/m^2, 22 h持续泵入d1、2；每2 wk重复. 研究后期主要应用FOLFIRI方案2给药，即伊立替康180 mg/m^2, 90 min静脉给药，d1; 亚叶酸钙400 mg/m^2, 2 h静脉给药，d1; 氟尿嘧啶400 mg/m^2, 静脉推注d1; 2 400 mg/m^2, 46 h持续泵入; 每2 wk重复. 对前3周期治疗中发生的相关不良反应进行评价.

1.2.2 不良反应评价: 认真观察和详细记录患者出现胆碱能综合征情况，包括早发性腹泻(用药后24 h内发生)、腹痛、结膜炎、鼻炎、低血压、血管舒张、出汗、寒战、全身不适、头晕、视力障碍、瞳孔缩小、流泪及流涎增多等. 认真观察和详细记录患者其他不良反应，包括迟发性腹泻、骨髓抑制、恶心呕吐、黏膜炎、脱发、发热等不良反应，按照美国癌症研究所常规毒性判定标准(NCI-CTC 3.0)对不良反应进行分级.

统计学处理 统计分析软件应用SPSS 13.0, 分析患者临床资料和其他不良反应对胆碱能综合征可能的影响，组间等级资料差异采用χ^2检验或Fisher's精确检验. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 伊立替康相关胆碱能综合征总体情况 本研究收入的89例患者中，有53例患者发生程度不等、表现各异的胆碱能综合征，发生率高达59.6%. 其中表现为腹痛不适28例，出汗25例，鼻炎20例，早发性腹泻18例，低血压15例，潮红11例，流涎8例，瞳孔缩小5例，多名患者出现一种以上症状和/或体征. 患者临床资料见表1.

如果患者前1周期发生较为严重的胆碱能综合征，下1周期伊立替康给药前预防性应用阿托品0.5 mg可以有效防止或减轻绝大多数胆碱能综合征的发生(患者无应用阿托品禁忌症，如青光眼、前列腺肥大等).

2.2 临床资料与胆碱能综合征的相关性 将胆碱能综合征与包括年龄、性别、ECOG评分、病灶部位、治疗方案、一线或二线治疗等临床资料进行分析后发现，在≥60岁老年患者较<60岁患者明显高发(75.9% *vs* 51.7%, $P = 0.029$)，未发现其他临床资料与胆碱能综合征有关(表2).

2.3 胆碱能综合征与其他不良反应的相关性 将胆碱能综合征与包括迟发性腹泻、骨髓抑制、恶心/呕吐、黏膜炎、脱发、发热等不良反应进行分析后发现，出现胆碱能综合征患者迟发性腹泻有减少趋势(52.8% *vs* 34.0%, $P = 0.077$)，主要表现在1-2度腹泻相对较低. 未发现其他不良反应与胆碱能综合征相关(表3).

2.4 不同给药方案与不良反应相关性 将不同给药方案与包括胆碱能综合征在内的不良反应进行分析后发现，应用方案2患者较方案1患者黏膜炎明显高发(50.0% *vs* 27.5%, $P = 0.029$)，同时

表 1 89例结直肠癌患者的临床资料

临床资料	*n*	百分比(%)
年龄(岁)		
中位年龄	52	
年龄范围	28–77	
性别		
男	58	65.2
女	31	34.8
ECOG评分		
0	18	20.2
1	55	61.8
2	16	18.0
病灶部位		
结肠	57	64.0
直肠	32	36.0
转移情况		
同时性转移	65	73.0
异时性转移	24	37.0
治疗方案		
方案1	53	59.6
方案2	36	40.4
一线或二线		
一线	37	41.6
二线	52	58.4

表 2 临床资料对胆碱能综合征的影响

临床资料	*n*	胆碱能综合征				χ^2值	*P*值
		无		有			
		n	%	*n*	%		
性别							
男	58	25	43.1	33	56.9	0.487	0.485
女	31	11	35.5	20	64.5		
年龄							
<60岁	60	29	48.3	31	51.7	4.751	0.029
≥60岁	29	7	24.1	22	75.9		
ECOG评分							
0	18	8	44.4	10	55.6	0.309	0.857
1	55	21	38.2	34	61.8		
2	16	7	43.8	9	56.3		
病灶部位							
结肠	57	22	38.6	35	61.4	0.226	0.635
直肠	32	14	43.8	18	56.3		
转移灶情况							
同时	65	24	36.9	41	63.1	1.244	0.265
异时	24	12	50.0	12	50.0		
治疗方案							
方案1	51	22	43.1	29	56.9	0.358	0.549
方案2	38	14	36.8	24	63.2		
一线或二线							
一线	37	16	43.2	21	56.8	0.205	0.651
二线	52	20	38.5	32	61.5		

■应用要点

本研究提示, 如果保持足够的重视, 通过详细问诊和细致观察, 可以发现更多胆碱能综合征; 对于发生严重胆碱能综合征的患者在后序应用伊立替康前预防性应用阿托品可以有效防止其发生, 明显提升用药的安全性和患者的顺应性.

迟发性腹泻和粒细胞减少也均有高发趋势, 未发现其他不良反应有明显差别(表4).

3 讨论

目前已经明确, 伊立替康主要通过非竞争性抑制体内乙酰胆碱酯酶活性, 引起乙酰胆碱异常堆积, 导致胆碱能神经异常兴奋, 而引发胆碱能综合征[8-10]. 研究显示, 伊立替康所致胆碱能综合征具有明显的剂量相关性, 高剂量组高发[11], 一般在用药后短时间内即可发生, 由于伊立替康的清除终末半衰期大约为5-12 h左右[12], 24 h后胆碱能综合征可逐渐缓解.

胆碱能综合征主要表现为用药后24 h内发生的早发性腹泻、腹痛、出汗、鼻炎、低血压、血管舒张、瞳孔缩小、流泪等不良反应. 严重者腹痛剧烈、腹泻频繁、大量出汗致衣物浸透、低血压致头晕, 若合并恶心、呕吐等不良反应, 易引发脱水、晕厥, 严重影响患者生活质量, 降低患者顺应性和用药安全性.

本研究应用FOLFIRI方案治疗89例转移性结直肠癌, 对治疗相关胆碱能综合征和其他不良反应分析后发现, 胆碱能综合征发生率高达59.6%, 与多数研究比较这是一个发生率偏高、有一些意外的结果[2-5]. 我们分析, 其中差别主要与研究者对胆碱能综合征的重视程度有关, 通过详细问诊和细致观察, 可以发现更多反应较轻, 表现不十分典型的胆碱能综合征.

我们将患者胆碱能综合征与临床资料进行分析后发现, 老年患者胆碱能综合征明显高发. 有研究显示, 伊立替康在老年患者中的终末清除半衰期为6 h, 而其他患者为5.5 h, 老年患者伊立替康清除代谢相对较慢, 具有更高的药物浓度, 可能是其胆碱能综合征高发的原因[1]. 无论如何, 加强监测和观察老年患者用药后可能发生的, 包括胆碱能综合征在内的多种不良反应, 对于用药安全有重要意义.

同胆碱能综合征不同, 迟发性腹泻、骨髓抑制等不良反应主要与伊立替康的活性代谢产物SN-38所致的细胞毒性相关, 其对拓扑异构酶Ⅰ的抑制作用是伊立替康的1 000倍. SN-38在肝脏UGT酶作用下葡萄糖醛酸化失活, 生成SN-38G, 随胆汁排泄进入肠道, 在肠道内可被细菌产生的酶重新分解生成SN-38, 对肠道黏膜产生损伤, 引起迟发性腹泻[13,14]. 本研究将胆碱能综合征与其他不良反应进行分析, 未发现有相关性, 但出

■名词解释
胆碱能综合征: 在静滴盐酸伊立替康时或结束后短时间内发生的, 由于伊立替康抑制胆碱酯酶活性所致的一系列症状和体征, 主要表现为早发性腹泻(用药后24 h内发生)、腹痛、结膜炎、鼻炎、低血压、血管舒张、出汗、寒战、全身不适、头晕、视力障碍、瞳孔缩小、流泪及流涎增多等.

表 3 胆碱能综合征与其他不良反应

不良反应	无胆碱能综合征(n = 36)				有胆碱能综合征(n = 53)				χ^2值	P值
	1–2度		3–4度		1–2度		3–4度			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
迟发性腹泻	16	44.4	3	8.3	14	26.4	4	7.5	3.125	0.077
白细胞减少	12	33.3	1	2.8	16	30.2	4	7.5	0.112	0.738
粒细胞减少	10	27.8	4	11.1	18	34.0	5	9.4	0.179	0.672
血小板减少	5	13.9	1	2.8	11	20.8	1	1.9	0.474	0.491
恶心/呕吐	17	47.2	3	8.3	27	50.9	3	5.7	0.075	0.784
黏膜炎	13	36.1	1	2.8	17	32.1	2	3.8	0.085	0.771
脱发	7	19.4	–	–	14	26.4	–	–	0.578	0.447
发热	2	5.6	–	–	3	5.7	–	–	0.000	0.983

表 4 不同方案与不良反应

不良反应	方案1(n = 51)				方案2(n = 38)				χ^2值	P值
	1–2度		3–4度		1–2度		3–4度			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
胆碱能综合征	29	56.9	–	–	24	63.1	–	–	0.026	0.871
迟发性腹泻	15	29.4	3	5.9	15	39.5	4	10.5	1.939	0.164
白细胞减少	15	29.4	2	3.9	13	34.2	3	7.9	0.428	0.513
粒细胞减少	13	25.5	5	9.8	15	39.5	4	10.5	1.939	0.164
血小板减少	8	15.7	1	2.0	8	21.1	1	2.6	0.492	0.483
恶心/呕吐	24	47.1	4	7.8	20	52.6	2	5.3	0.079	0.778
黏膜炎	13	25.5	1	2.0	17	44.7	2	5.3	4.746	0.029
脱发	12	23.5	–	–	9	23.7	–	–	0.985	0.321
发热	3	5.9	–	–	2	5.3	–	–	0.016	0.900

现胆碱能综合征患者1-2度迟发性腹泻相对较低. 这可能由于预防性应用阿托品具有一定止泻作用, 而很多早发性腹泻患者积极应用止泻药物进行干预, 对其后发生的轻度迟发性腹泻会产生积极的预防作用, 降低了迟发性腹泻的发生率.

本研究应用2种FOLFIRI方案施治, 其中氟尿嘧啶的给药剂量存在较大差别[6,7], 方案2的剂量强度几乎是方案1的2倍. 将2种方案与不良反应进行分析后发现, 虽然应用方案2的患者胆碱能综合征、迟发性腹泻和骨髓抑制的发生率相对较高, 但与方案1无统计学差异. 这主要可能因为2种方案采用了相同的伊立替康给药剂量, 所以其导致的胆碱能综合征未见有明显差别, 而更高的氟尿嘧啶剂量对迟发性腹泻和骨髓功能可能还是有一定影响. 黏膜炎是氟尿嘧啶的主要不良反应之一, 高剂量氟尿嘧啶是导致方案2黏膜炎高发的主要原因.

总之, 伊立替康相关胆碱能综合征高发, 特别是老年患者更甚, 应引起临床医生重视, 阿托品可以有效治疗并预防胆碱能综合征[15], 进一步提升患者顺应性和用药安全性. 伊立替康对乙酰胆碱酯酶的抑制是胆碱能综合征发生的主要原因, 与其细胞毒性关系不大, 所以有无胆碱能综合征对后续可能发生的迟发性腹泻和/或骨髓抑制无预测作用.

4 参考文献

1 Chua TC, Liauw W, Chu F, Morris DL. Viewing metastatic colorectal cancer as a curable chronic disease. *Am J Clin Oncol* 2012; 35: 77-80

2 Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Cartenì G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carrozza F, Nettis G, Valdesi M, Filippelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti C. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4866-4875

3 Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M,

Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-237
4 管忠震, 孙晓非, 冯奉仪, 金懋林, 许立功, 黄建瑾, 冯继峰, 隋广杰, 谭华. 依立替康(Irinotecan, CPT-11)治疗晚期大肠癌临床研究. 癌症 1999; 18: 686-690
5 开普拓临床研究协作组. 开普拓治疗大肠癌的临床应用. 中华肿瘤杂志 2003; 25: 607-609
6 André T, Louvet C, Maindrault-Goebel F, Couteau C, Mabro M, Lotz JP, Gilles-Amar V, Krulik M, Carola E, Izrael V, de Gramont A. CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. GERCOR. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1343-1347
7 Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 1041-1047
8 Dodds HM, Rivory LP. The mechanism for the inhibition of acetylcholinesterases by irinotecan (CPT-11). *Mol Pharmacol* 1999; 56: 1346-1353
9 Hyatt JL, Tsurkan L, Morton CL, Yoon KJ, Harel M, Brumshtein B, Silman I, Sussman JL, Wadkins RM, Potter PM. Inhibition of acetylcholinesterase by the anticancer prodrug CPT-11. *Chem Biol Interact* 2005; 157-158: 247-252
10 Harel M, Hyatt JL, Brumshtein B, Morton CL, Yoon KJ, Wadkins RM, Silman I, Sussman JL, Potter PM. The crystal structure of the complex of the anticancer prodrug 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin (CPT-11) with Torpedo californica acetylcholinesterase provides a molecular explanation for its cholinergic action. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 1874-1881
11 Schoemaker NE, Kuppens IE, Moiseyenko V, Glimelius B, Kjaer M, Starkhammer H, Richel DJ, Smaaland R, Bertelsen K, Poulsen JP, Voznyi E, Norum J, Fennelly D, Tveit KM, Garin A, Gruia G, Mourier A, Sibaud D, Lefebvre P, Beijnen JH, Schellens JH, ten Bokkel Huinink WW. A randomised phase II multicentre trial of irinotecan (CPT-11) using four different schedules in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 1434-1441
12 Abigerges D, Chabot GG, Armand JP, Hérait P, Gouyette A, Gandia D. Phase I and pharmacologic studies of the camptothecin analog irinotecan administered every 3 weeks in cancer patients. *J Clin Oncol* 1995; 13: 210-221
13 Di Paolo A, Bocci G, Polillo M, Del Re M, Di Desidero T, Lastella M, Danesi R. Pharmacokinetic and pharmacogenetic predictive markers of irinotecan activity and toxicity. *Curr Drug Metab* 2011; 12: 932-943
14 O'Dwyer PJ, Catalano RB. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4534-4538
15 Yumuk PF, Aydin SZ, Dane F, Gumus M, Ekenel M, Aliustaoglu M, Karamanoglu A, Sengoz M, Turhal SN. The absence of early diarrhea with atropine premedication during irinotecan therapy in metastatic colorectal patients. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 609-610

■同行评价
本课题设计合理, 统计资料真实, 分析得当, 对临床有一定指导意义.

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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 0.694

本刊讯 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果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, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 980-983
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

病例报告 CASE REPORT

嗜酸粒细胞性胃肠炎致血性腹水1例

黄颖秋, 韩春丽, 刘旭妍

■背景资料
嗜酸粒细胞性胃肠炎是一种不明原因的罕见疾病, 以周围血中嗜酸粒细胞升高及胃肠道嗜酸粒细胞浸润为特征, 临床表现各异, 自1937年Kaijser首次描述该病迄今, 国外仅见100多例报道.

黄颖秋, 韩春丽, 中国医科大学第五临床学院 本溪钢铁(集团)总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000
刘旭妍, 中国医科大学第五临床学院 本溪钢铁(集团)总医院病理科 辽宁省本溪市 117000
黄颖秋, 主任医师, 教授, 研究生导师, 主要从事胃肠动力疾病、消化系肿瘤及肝硬化的基础与临床研究.
作者贡献分布: 本文写作由黄颖秋完成; 韩春丽与刘旭妍提供部分资料.
通讯作者: 黄颖秋, 教授, 主任医师, 117000, 辽宁省本溪市平山区人民路29号, 中国医科大学第五临床学院, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科. huangyingqiu_bx@126.com
电话: 0414-2215137
收稿日期: 2012-01-17 修回日期: 2012-02-09
接受日期: 2012-02-27 在线出版日期: 2012-04-18

Eosinophilic gastroenteritis with bloody ascites: a case report

Ying-Qiu Huang, Chun-Li Han, Xu-Yan Liu

Ying-Qiu Huang, Chun-Li Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group); the Fifth Clinical College of China Medical University, Benxi 117000, Liaoning Province, China
Xu-Yan Liu, Department of Pathology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group); the Fifth Clinical College of China Medical University, Benxi 117000, Liaoning Province, China
Correspondence to: Ying-Qiu Huang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron(Group), the Fifth Clinical College of China Medical University, 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000, Liaoning Province, China. huangyingqiu_bx@126.com
Received: 2012-01-17 Revised: 2012-02-09
Accepted: 2012-02-27 Published online: 2012-04-18

Abstract
Eosinophilic gastroentertis (EG) is a very rare disease of unknown cause, characterized by peripheral eosinophilia and focal or difuse eosinophilic infiltration of the gastrointestinal tract. Here we report a case of eosinophilic gastroenteritis with bloody ascites in a 15-year-old male patient who presented to our hospital with nausea, vomiting, debilitation, and intermittent diarrhea for 10 d. Laboratory data showed that his WBC count was 18.28 × 10^9/L and his eosinophil percentage was 57.61%. He developed bloody ascitic fluid, in which the protein level was 46 g/L, WBC count was 7 040 × 10^6/L, and eosinophil percentage was 68%. The Rivalta test was positive. Ultrasound and CT demonstrated bowel wall thickness in the right colon and ascites. Gastroendoscopy showed severe multifocal erythematous esophagitis, gastritis and duodenitis, and a ring-like discoloration with mucosal particle hyperplasia in the lower esophagus. Colonoscopy revealed severe inflammation in the lower ileum, the opening of vermiform appendix, and right colon, with erosions, thickening, exudates, mucosal particle hyperplasia, and stricture formation. Microscopic examination of the biopsied specimens showed eosinophilic infiltration. After treatment with prednisone, his clinical manifestations regressed.

Key Words: Eosinophilic gastroenteritis; Eosinophilic esophagitis; Eosinophils; Bloody ascites

Huang YQ, Han CL, Liu XY. Eosinophilic gastroenteritis with bloody ascites: a case report. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(11): 980-983

摘要
嗜酸粒细胞性胃肠炎(eosinophilic gastroentertis, EG)是一种不明原因的罕见疾病, 以周围血中嗜酸粒细胞增高及胃肠道局部或弥漫性嗜酸粒细胞浸润为特征. 本文报道EG致血性腹水1例. 患者, 男, 15岁, 以恶心、呕吐、乏力、间断腹泻10 d入院. 化验检查显示血WBC 18.28×10^9/L, 嗜酸粒细胞57.61%. 腹水血性, 蛋白46 g/L, 白细胞7 040×10^6/L, 嗜酸性粒细胞68%, 李凡它试验(+). 彩超和CT示腹水和右半结肠管壁增厚. 胃镜示重度多灶性红斑渗出性食管炎、胃炎和十二指肠炎, 食管下段黏膜色泽晦暗, 呈环形色素沉着和颗粒样增生. 结肠镜示回肠末段、阑尾开口处及升结肠黏膜呈显著的水肿、肥厚、渗出、颗粒样增生和管腔狭窄等炎性改变. 内镜活检病理示大量的嗜酸粒细胞浸润. 该患者经强的松治疗症状明显缓解.

关键词: 嗜酸粒细胞性胃肠炎; 嗜酸粒细胞性食管炎; 嗜酸粒细胞; 血性腹水

黄颖秋, 韩春丽, 刘旭妍. 嗜酸粒细胞性胃肠炎致血性腹水1例. 世界华人消化杂志 2012; 20(11): 980-983

■同行评议者
顾国利, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普通外科

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/980.asp

0 引言

嗜酸粒细胞性胃肠炎, 亦称嗜酸性胃肠炎(eosinophilic gastroenteritis, EG), 是一种极其罕见的疾病[1,2], 以周围血中嗜酸粒细胞增高、胃肠道嗜酸粒细胞浸润及胃肠道水肿增厚为特点[2,3]. 嗜酸粒细胞性食管炎, 简称嗜酸性食管炎(eosinophilic oesophagitis, EoE), 是一种以食管壁嗜酸粒细胞浸润为特征的炎症性疾病, 于1990年代初被首次描述[4], 多发于儿童, 临床罕见. EoE是独立的疾病抑或是EG中的一种类型, 目前尚存争议. EG的发病年龄一般在20-50岁, 通常累及胃窦和近端空肠, 也可累及结肠, 肠壁浆膜层受累时可致腹水[5-7]. 自1937年Kaijser等[8]首次描述EG迄今, 国外报道100多例, 国内仅见数10例报道. 现将本钢总医院1例EG致血性腹水同时伴有EoE的病例报告如下.

1 病例报告

男, 15岁, 以“恶心、呕吐、乏力、间断腹泻10 d”于2011-12-19入院. 患者入院前10 d无明显诱因自觉恶心, 呕吐少许胃内容物5次, 无咖啡渣样物, 无吞咽困难及食道异物感, 无胸骨后及胃区疼痛, 无反酸、嗳气, 自觉乏力, 间断腹泻7-8次, 为黄色糊状便, 量中等, 无脓血便, 无里急后重感. 病来无发热盗汗, 无四肢关节肿痛, 自服“胃药”无缓解来院就诊. 否认肠道寄生虫及食物和药物过敏史, 既往健康.

入院查体: 神清, 一般状态尚可, 体温正常, 皮肤黏膜无黄染及皮疹, 全身浅表淋巴结无肿大, 心肺检查无异常, 腹略膨隆, 无腹壁静脉曲张, 全腹无压痛、反跳痛、肌紧张, 肝脾肋下未触及, 移动性浊音(+), 双下肢无水肿, 四肢关节无红肿热痛及功能障碍, 双侧肌力5级, 双侧Babinski征(-).

实验室检查: 血WBC 18.28×10^9/L, 嗜酸粒细胞57.61%, 中性粒细胞26.42%, 淋巴细胞13.82%, 单核细胞2.10%, RBC 5.19×10^{12}/L, Hb 159 g/L, PLT 281×10^9/L; 尿常规: 正常; 便常规: 黄色糊状便, WBC(0), RBC(0), 便潜血(-), 虫卵(-); ALT 16 U/L, AST 13 U/L, ALP 62 U/L, γ-GT 11U/L, 总蛋白59.3 g/L, 白蛋白41.0 g/L, 总胆红素19.8 μmol/L; BUN 2.82 mmol/L, Cr 82 μmol/L; HBsAb(+), HBsAg(-), HBeAg(-), HBeAb(-), HBcAb(-), S1(-), HAVAb(-), HCVAb(-); 血清结核抗体(-); 凝血酶原时间13.3 s, 凝血酶原活动度70.5%; 肿瘤标志物AFP 1.63 IU/mL, CEA 1.12 ng/mL; 血清IgE 1 932 ng/mL, IgG 5.14 g/L, IgA 0.552 g/L, IgM 0.750 g/L, C3: 1.03 g/L, C4: 0.260 g/L.

腹水常规: 血性, 微浊, 比重1.020, 白细胞计数7 040×10^6/L, 腹水涂片染色显示: 淋巴细胞10%, 中性粒细胞22%, 嗜酸性粒细胞68%, 蛋白定量46 g/L, 李凡它试验(+).

骨髓活检报告: 嗜酸粒细胞各阶段百分比均增高, 总计30%, 形态大致正常, 红系增生活跃, 各阶段百分比及形态正常, 淋巴细胞正常, 单核细胞正常.

腹部彩超示右半结肠管壁增厚, 回声不均, 腹腔最大液平深度约5.3 cm. 腹部CT示肝胆脾胰未见异常, 右半结肠管壁增厚, 密度不均, 管腔狭窄, 腹腔积液(图1A). 电子胃镜: 食管黏膜呈颗粒样增生, 色泽晦暗, 散在片状水肿糜烂, 中下段食管黏膜环形点片状色素沉着, 胃窦部黏膜粗大、增生、水肿, 似橡皮样, 散在大片状充血糜烂(图1B), 十二指肠球部及降部黏膜弥漫性粗大、水肿、糜烂. 电子结肠镜: 升结肠黏膜弥漫性充血水肿, 呈细颗粒样改变, 管腔狭窄, 回盲瓣口黏膜充血肿胀, 表面呈颗粒样增生, 阑尾开口星月形, 周缘黏膜充血肿胀, 末端回肠散在颗粒样黏膜增生.

胃镜活检组织病理报告: 食管鳞状上皮较完整, 无异型性, 间质内见大量嗜酸粒细胞及淋巴细胞浸润, 胃黏膜腺体排列较规整, 腺上皮细胞无异型性, 间质疏松水肿, 可见较多的嗜酸粒细胞、浆细胞等炎性细胞浸润. 十二指肠黏膜、间质可见大量嗜酸粒细胞浸润. 结肠镜活检组织病理报告: 镜下见阑尾口周围、回盲瓣瓣口、升结肠中段黏膜被覆上皮较完整, 固有膜内腺体排列规整, 间质见淋巴细胞、浆细胞及大量嗜酸粒细胞浸润(图1C).

根据上述资料, 该患者诊断为嗜酸性胃肠炎, 嗜酸性食管炎. 采用强的松及泮托拉唑治疗半月, 患者胃肠道症状明显缓解, 血清嗜酸粒细胞降至正常, 腹水消退.

2 讨论

EG是一种十分罕见的疾病, 以胃肠道嗜酸粒细胞浸润[9]及周围血中嗜酸粒细胞增多为特征[6], 目前尚无任何潜在的主要致病因素, 如寄生虫感染、药物反应、恶性肿瘤等[6,10], 病理生理学机制尚不十分清楚, 但应用皮质类固醇激素治

■相关报道
Miyata等报道了以食管下段环形色素沉着为特征的1例嗜酸性食管炎, 迄今仅见1例该特点的病例报道.

■**创新盘点**
本病例不仅是食管、胃、十二指肠、回盲部、阑尾开口及整个升结肠同时受累并导致血性腹水的弥漫型嗜酸粒细胞性胃肠炎, 而且本病例患者的食管黏膜表现为色泽晦暗、颗粒样增生及下段黏膜呈现环形点片状色素沉着的特征, 有助于人们对其临床表现多样性的认识.

图 1 EG患者CT、内镜及病理资料. A: CT示右半结肠管壁增厚, 密度不均, 腹腔积液; B: 胃镜示胃窦部黏膜粗大、增生、水肿, 似橡皮样, 散在大片状充血糜烂; C: 病理切片示阑尾开口处固有膜内腺体排列规整, 间质见大量嗜酸粒细胞浸润(HE染色×100).

疗有效[6]. 组织中大量的嗜酸粒细胞浸润[11]以及多数病例的IgE显著升高[10], 提示他可能与其他过敏性疾病所诱发的超敏反应有关[6]. 最近研究认为, EG的发病机制涉及环境和遗传因素, 特别是食物过敏以及白介素5和选择性趋化因子的表达水平[12]. 1995年Kelly最先发现食物变态反应和EG关系密切, 近年来研究显示, EG患者中约50%-70%有过敏性疾病史[13]. 目前认为EG很可能是发病机制不尽相同的一组疾病, 包括嗜酸性食管炎、嗜酸性胃炎、嗜酸性小肠结肠炎及嗜酸性直肠炎[14]. 此病发病高峰年龄为20-50岁. 男女比例约为2∶1[14].

EG分为局限和弥漫2种类型[5,14], 后者又分为3个亚型, Ⅰ型为黏膜型, Ⅱ型为肌层型, Ⅲ型为浆膜型, Ⅲ型者易出现腹水. EG的组织学特征为大量的嗜酸粒细胞浸润[10,15].

本例患者周围血中嗜酸粒细胞高达57.61%, 内镜示胃窦、十二指肠黏膜皱襞粗大、肥厚、水肿, 回盲部、阑尾开口处及整个升结肠管壁明显增厚, 肠腔狭窄; 彩超和CT示腹腔积液, 右半结肠管壁增厚, 肠腔狭窄, 诊断性腹穿示血性腹水, 腹水中白细胞计数显著升高, 嗜酸性粒细胞为68%; 胃肠道活检病理示大量的嗜酸粒细胞浸润, 故本例患者诊断为EG, 属于弥漫型中的Ⅲ型.

EG患者组织中的嗜酸性粒细胞浸润被认为是某种因素破坏了胃肠道黏膜的完整性, 抗原进入组织通过嗜酸性粒细胞脱颗粒, 释放各种酶类, 进一步造成组织损伤形成恶性循环[5,12,15]. 免疫功能异常在EG的发病中可能也起重要作用[13]. 本例患者否认食物及药物过敏史, 体内是否有潜在的致敏因素不得而知, 其血清IgE显著升高, 与多数报道一致, 但其血清IgG和IgA降低, IgM和补体C3、C4均正常, 原因尚不清楚.

本例患者除胃肠道受累外, 其食管黏膜呈颗粒样增生, 散在片状水肿糜烂, 下段食管黏膜可见环形的点片状的色素沉着, 活检病理示大量嗜酸粒细胞浸润, 故诊断为EoE, 其内镜特点与Miyata等[16]报道的病例相似. EoE患者存在食管纵行肌异常, 食管蠕动纵向收缩功能选择性的障碍, 常致吞咽困难和急性食物梗阻[4], 多数患者还有反酸、烧心、胸骨后灼痛等胃食管反流症状[17]. 但本例患者除恶心、呕吐症状外, 并无上述临床表现, 这可能与个体差异或病程较短有关. 本例患者骨髓活检报告显示嗜酸粒细胞各阶段百分比均增高, 但形态大致正常, 可除外嗜酸粒细胞性白血病.

本例患者同时患有EoE和EG并致血性腹水实属罕见, 提示对于周围血中嗜酸粒细胞显著增高的患者, 不管有无胃肠道症状, 应及时行内镜检查及病理活检, 同时应与嗜酸粒细胞增高的其他相关疾病鉴别.

3 参考文献

1 Hepburn IS, Sridhar S, Schade RR. Eosinophilic ascites, an unusual presentation of eosinophilic gastroenteritis: A case report and review. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2010; 1: 166-170
2 Gaertner WB, Macdonald JE, Kwaan MR, Shepela C, Madoff R, Jessurun J, Melton GB. Eosinophilic colitis: university of Minnesota experience and literature review. *Gastroenterol Res Pract* 2011; 2011: 857508
3 Lee J, Dierkhising R, Wu TT, Alexander J, Weiler C. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID) with peripheral eosinophilia: a retrospective review at Mayo Clinic. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 3254-3261
4 Straumann A. Eosinophilic esophagitis: rapidly emerging disorder. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13513
5 Alfadda AA, Storr MA, Shaffer EA. Eosinophilic colitis: an update on pathophysiology and treatment. *Br Med Bull* 2011; 100: 59-72
6 Shifflet A, Forouhar F, Wu GY. Eosinophilic digestive diseases: eosinophilic esophagitis, gastroenteritis, and colitis. *J Formos Med Assoc* 2009; 108: 834-843
7 Yep Gamarra V, Matos Nova A, Aldave Herrera A. [Eosinophilic gastroenteritis with ascites: clinical case report]. *Rev Gastroenterol Peru* 2011; 31: 173-177
8 Whitaker IS, Gulati A, McDaid JO, Bugajska-Carr U, Arends MJ. Eosinophilic gastroenteritis presenting as obstructive jaundice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 407-409
9 Lwin T, Melton SD, Genta RM. Eosinophilic gastri-

tis: histopathological characterization and quantification of the normal gastric eosinophil content. *Mod Pathol* 2011; 24: 556-563
10 Okpara N, Aswad B, Baffy G. Eosinophilic colitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2975-2979
11 Hurrell JM, Genta RM, Melton SD. Histopathologic diagnosis of eosinophilic conditions in the gastrointestinal tract. *Adv Anat Pathol* 2011; 18: 335-348
12 Bischoff SC. Food allergy and eosinophilic gastroenteritis and colitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10: 238-245
13 Pratt CA, Demain JG, Rathkopf MM. Food allergy and eosinophilic gastrointestinal disorders: guiding our diagnosis and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2008; 38: 170-188
14 Mueller S. Classification of eosinophilic gastrointestinal diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 425-440
15 Collins MH. Histopathology associated with eosinophilic gastrointestinal diseases. *Immunol Allergy Clin North Am* 2009; 29: 109-17, x-xi
16 Miyata R, Torimaru H, Shimaoka S, Matsuda A, Tashiro K, Nioh T, Tsukasa K, Nishimata N, Kawabata T, Imamura T, Nagata Y, Niihara T, Hori M, Nishimata Y, Tanaka S, Nishimata H, Tokushige M. A case of eosinophilic gastroenteritis with ring-like discoloration in the lower end of the esophagus. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2011; 108: 2010-2015
17 Cohen MC, Rao P, Thomson M, Al-Adnani M. Eosinophils in the oesophageal mucosa: clinical, pathological and epidemiological relevance in children: a cohort study. *BMJ Open* 2012; 2: e000493

■同行评价
本研究有一定新颖性, 科学结论较明确, 实验证据基本充足, 反映了我国胃肠病学的基本临床水平, 对临床诊治具有较强的指导意义.

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣等[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp)和*World Journal of Gastroenterology*(http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号 ; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 984-988
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊.

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊. OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍. OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展.

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版. 《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术.

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录. 《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01.

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、－及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 ℃±1.2 ℃, 45.6岁±24岁, 56.4 d±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56 ng/L±0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用1×10^{12}/L, WBC数用1×10^{9}/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2011年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写υ; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用$^aP<0.05$, $^bP<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第三套为$^eP<0.05$, $^fP<0.01$等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名，按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线"-"分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: "潘伯荣"的汉语拼写法为"Bo-Rong Pan".

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写*P*, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$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*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用"顺序编码制"的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在"Pang等"的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣等[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进.

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/sp.asp

4.2 研究原著写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/yjyz.asp

4.3 焦点论坛写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/jdlt.asp

4.4 文献综述写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/wxzs.asp

4.5 研究快报写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/yjkb.asp

4.6 临床经验写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/lcjy.asp

4.7 病例报告写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/blbg.asp

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf. 审稿过程平均时间需要14-28 d. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬).

6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

《世界华人消化杂志》编辑部
北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http: //www.wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年4月18日; 20(11): 989
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

2012年国内国际会议预告

2012-01-04/10
2011全国中医药创新发展学术交流大会
会议地点: 南宁市
联系方式: yxhy2000@163.com

2012-03-16/19
第三十二期全国超声诊断新进展暨介入超声高级研修班
会议地点: 北京市
联系方式: 13311335788@163.com

2012-03-22/25
2012年北京第六届疝和腹壁外科国际学术研讨会
会议地点: 北京市
联系方式: cmameeting@163.com

2012-03-23/25
国际肝胆胰协会中国分会第五届全国学术研讨会
会议地点: 武汉市
联系方式: lilu19870509@163.com

2012-03-31
第二届国际消化道内镜活检和病理学诊断研讨会
会议地点: 杭州市
联系方式: fyanfei@sina.com

2012-04-06/08
2012年脂质代谢与器官损害国际学术研讨会
会议地点: 重庆市
联系方式: islt2012@yahoo.com.cn

2012-04-27/30
中华医学会2012年第十三届中华肝胆胰脾外科专业学术论坛
会议地点: 九江市
联系方式: zhgdwkzz@vip.163.com

2012-04-20/22
中国医学影像技术研究会第二十六次全国学术大会
会议地点: 济南市
联系方式: camit@vip.163.com

2012-05-26/31
2012年世界医学物理与生物医学工程大会
会议地点: 北京市
联系方式: info@wc2012.org

2012-06-01/03
2012中国北京超声医师学术大会
会议地点: 北京市
联系方式: zhumin301@163.com

2012-06-15/17
第一届糖尿病大会、第二届内分泌与代谢大会
会议地点: 北京市
联系方式: medical585@163.com

2012-06-15/17
第九届全国抗菌药物临床药理学术会议
会议地点: 北京市
联系方式: doctorzhengbo@163.com; liyun1907@sina.com

2012-06-29/07-01
第二十四次全国中西医结合消化学术会议
会议地点: 宁波市
联系方式: qgzxyjhxh@163.com

2012-06-30/07-01
中华医学会肝病与代谢学术研讨会
会议地点: 哈尔滨市
联系方式: lilyjia@163.com

2012-07-01/31
第一届全国普通外科青年医师学术论坛
会议地点: 北京市
联系方式: cmacjs@cma.org.cn

2012-07-01/31
第二届全国普通外科手术技术学术会议
会议地点: 青岛市
联系方式: lining@126.com

2012-08-25/29
第八届世界华人药物化学研讨会暨第九届IUPAC化学生物学国际研讨会
会议地点: 北京市
联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

2012-08-29/09-01
中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议
会议地点: 广州市
联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-14/16
中华医学会第十二次全国超声医学学术会议
会议地点: 青岛市
联系方式: lilyjia@163.com

2012-10-25/28
第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)
会议地点: 北京市
联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

•志谢•

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
南昌大学第一附属医院消化内科

白雪巍 副教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院肝胆胰外科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈治水 主任医师
中国人民解放军第二一一医院中医科

代智 副研究员
复旦大学附属中山医院肝癌研究所

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

高英堂 研究员
天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

顾国利 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科

黄昆 教授
华中科技大学同济药学院

李刚 教授
北京大学医学部生物化学与分子生物学系

李革 副教授
延边大学附属医院普外1科

李军祥 教授
北京中医药大学附属东方医院消化内科

李胜 研究员
山东省肿瘤防治研究院 肝胆外科

李淑德 主任医师
中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

刘宝瑞 教授
南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

倪才方 教授
苏州大学附属第一医院介入科

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

邱伟华 副主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

沈克平 主任医师
上海龙华医院肿瘤五科

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

唐南洪 教授
福建医科大学附属协和医院省肝胆外科研究所

王蒙 副教授
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

魏继福 副研究员
江苏省人民医院中心实验室

徐泱 副教授
上海复旦大学附属中山医院肝肿瘤外科

张凤春 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心主任

郑素军 副主任医师
首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心

周南进 研究员
江西省医学科学研究所