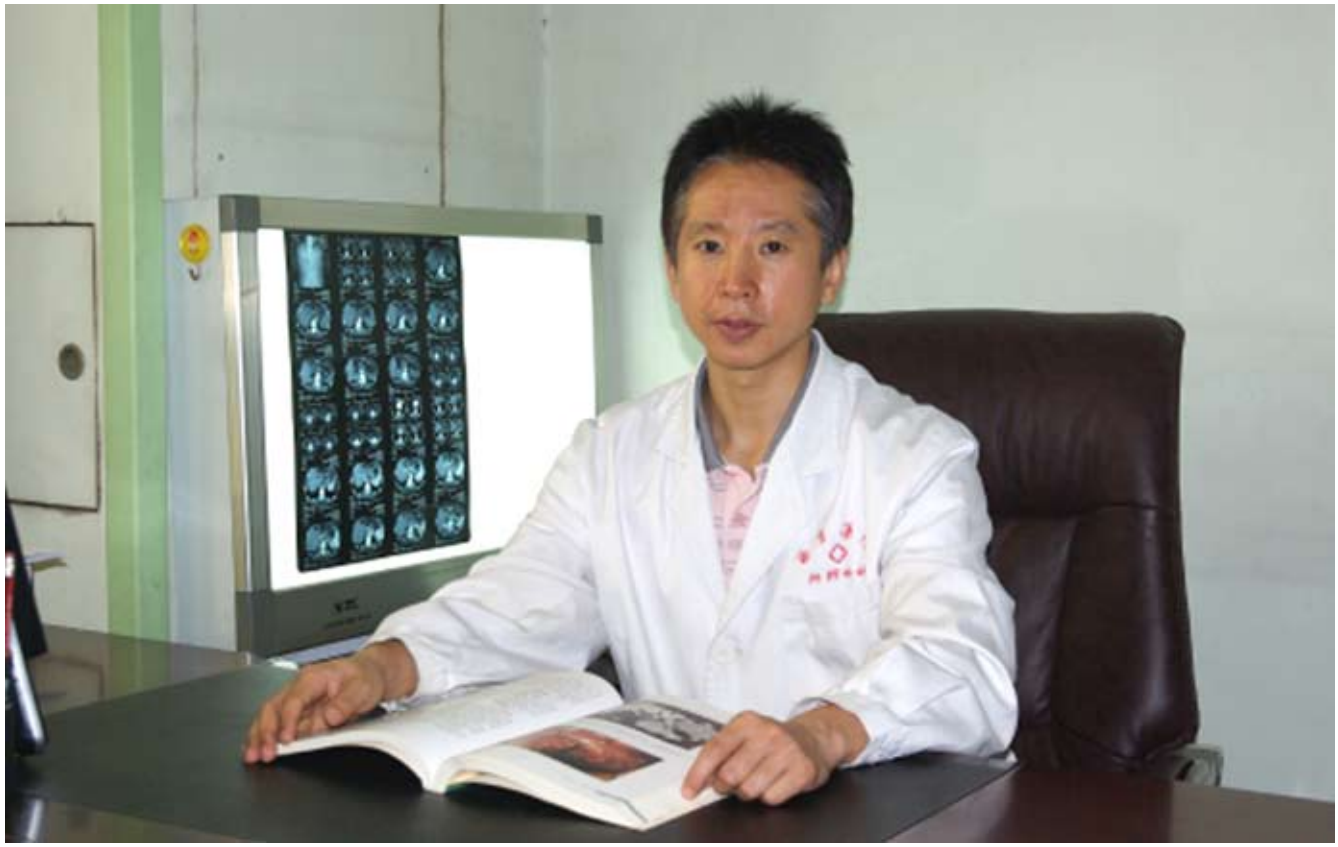
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 8 月 18 日　第 20 卷　第 23 期　(Volume 20 Number 23)



23 / 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
二零一二年八月十八日
第二十卷
第二十三期

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
姚登福教授
张宗明教授

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
郝丽萍副教授
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
王蔚虹教授
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
张庆瑜教授
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
英卫东教授
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
麻勇副研究员
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
孙星副教授
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
王道荣主任医师
王德盛副主任医师
王凤山教授
王刚副研究员
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
王铮副研究员
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
俞继卫副主任医师
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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

方今女教授
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
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王建明副教授
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
江建新副主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢晓梅教授
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
袁建业副研究员
张春虎副教授
朱西杰教授

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
洪艳教授
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
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
杜祥教授
邓昊副教授
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 8 月 18 日　第 20 卷　第 23 期　(总第391期)

述　评

2125 Fascin-1与消化系恶性肿瘤
周亮, 王德盛

基础研究

2131 茵陈蒿汤及其变方对ConA诱导慢性免疫性肝损伤小鼠IP-10、CXCR3的影响
刘果, 王凤云, 唐旭东, 张引强, 杨俭勤, 卞立群, 赵迎盼, 张北华

2138 “一肝三受”动物实验的可行性
周峻, 王政, 李龙, 陈芳林, 崔龙, 谢华伟, 侯文英, 张金山, 刘树立, 明安晓, 李胜利, 王海斌

临床研究

2146 针刺足少阳胆经穴对功能性消化不良患者脑葡萄代谢的影响
曾芳, 兰蕾, 刘迈兰, 卢圣峰, 唐勇, 刘旭光, 梁繁荣

2151 Oncoprotein 18在肝癌侵袭转移过程中的作用
甘淋, 段承刚, 龚舒, 郭坤, 舒宏, 刘银坤

2157 结直肠癌P27表达与Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6的关系及意义
顾国利, 杜长征, 薛卫成, 顾晋, 赵军

文献综述

2162 经皮内镜下胃造瘘在治疗中风后患者中的应用进展
姜跃龙, Xin-Sheng Liu, Daniel KY Chan

2167 肝衰竭的营养代谢异常与营养支持治疗的研究进展
王岩, 翟永贞, 冯国和

2173 FXR促进肝脏再生作用的研究进展
于昊, 崔云甫

2179 幽门螺杆菌感染与糖化血红蛋白表达相关性的研究进展
李伟, 杨桢, 黄德强, 吕农华

研究快报

2184 洛贝林逆转胃癌细胞SGC7901/VCR多药耐药的作用
谷苗, 李国庆, 彭昌能

2189 VEGFR-3小干扰RNA对结肠癌裸鼠移植瘤生长的影响
吕志诚, 苏芝兰, 王海忠, 杨文元, 张锋军

临床经验

2194 胃癌患者术前腹腔冲洗液游离DNA中TIMP-3基因甲基化与腹腔微转移的相关性
余江流, 韩静, 余齐鸣, 郑智国, 方铣华, 凌志强

2200 肝组织病理学检查在婴儿胆汁淤积症鉴别诊断中的价值
刘艳, 黄志华, 徐三清, 黄永健, 周华, 董永绥, 冯杰雄

2205 经皮肝穿胆道引流术在晚期肝泡性包虫中的应用价值
马存凯

2208 结直肠息肉水通道蛋白3、4的表达
陈更新, 邓海霞, 张梅兰, 原宁

2213 不同分化程度的大肠癌患者肠黏膜血管紧张素Ⅱ及其Ⅰ型受体的表达差异与意义
杨胜兰, 沈霖, 高洁嫦, 樊琼, 黄璐, 吴嫣然

2218 幽门螺杆菌上皮接触诱导基因*iceA1*的克隆及序列特征
邵长江, 张尤历, 王文兵, 陈慧娟, 孔梅, 陈鑫, 宋永站

附　　录	2224 《世界华人消化杂志》投稿须知 2229 2012年国内国际会议预告
志　　谢	2230 志谢世界华人消化杂志编委
消　　息	2130 《世界华人消化杂志》正文要求 2145 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 2150 《世界华人消化杂志》栏目设置 2156 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2166 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 2172 《世界华人消化杂志》出版流程 2178 百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录 2183 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 2188 《世界华人消化杂志》 再次入选 《中文核心期刊要目总览》 (2011年版) 2199 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2204 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2212 《世界华人消化杂志》参考文献要求
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 王德盛, 教授, 副主任医师, 710033, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科
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 田滢; 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

世界華人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名

(旬刊)

创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2012-08-18
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消化内科
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

August 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 23

EDITORIAL

2125 Fascin-1 and digestive system carcinomas
Zhou L, Wang DS

BASIC RESEARCH

2131 Effect of modified decoction of Yinchenhaotang on IP-10 and CXCR3 expression in concanavalin A-induced liver injury in mice
Liu G, Wang FY, Tang XD, Zhang YQ, Yang JQ, Bian LQ, Zhao YP, Zhang BH

2138 An experimental study of triple split-liver transplantation in dogs
Zhou J, Wang Z, Li L, Chen FL, Cui L, Xie HW, Hou WY, Zhang JS, Liu SL, Ming AX, Li SL, Wang HB

CLINICAL RESEARCH

2146 Cerebral responses to acupuncture at acupoints of gallbladder meridian in patients with functional dyspepsia
Zeng F, Lan L, Liu ML, Lu SF, Tang Y, Liu XG, Liang FR

2151 Role of Oncoprotein 18 in metastasis of hepatocellular carcinoma
Gan L, Duan CG, Gong S, Guo K, Shu H, Liu YK

2157 P27 expression in colorectal cancer: Significance and correlation with expression of Ki-67, P170, MLH1, MSH2, and MSH6
Gu GL, Du CZ, Xue WC, Gu J, Zhao J

REVIEW

2162 Use of percutaneous endoscopic gastrostomy in stroke patients: Recent progress
Jiang YL, Liu XS, Chan DK

2167 Nutritional and metabolic abnormalities and nutritionsupport therapy in patients with liver failure
Wang Y, Zhai YZ, Feng GH

2173 Progress in understanding the role of FXR in promoting liver regeneration
Yu H, Cui YF

2179 Correlation between *Helicobacter pylori* infection and hemoglobin A1c expression
Li W, Yang Z, Huang DQ, Lv NH

RAPID COMMUNICATION

2184 Lobelin reverses multidrug resistance of human gastric carcinoma cell line SGC7901/ VCR
Gu M, Li GQ, Peng CN

2189 SiRNA-mediated down-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 3 inhibits the growth of human colorectal cancer cell xenografts in nude mice
Lv ZC, Su ZL, Wang HZ, Yang WY, Zhang FJ

CLINICAL PRACTICE

2194 Correlation between TIMP-3 hypermethylation in peritoneal lavage fluid and peritoneal micrometastasis in patients with gastric cancer
Yu JL, Han J, Yu QM, Zheng ZG, Fang XH, Ling ZQ

2200 Value of histopathologic examination in differential diagnosis of infantile cholestasis
Liu Y, Huang ZH, Xu SQ, Huang YJ, Zhou H, Dong YS, Feng JX

2205 Percutaneous transhepatic cholangio-drainage for treatment of end-stage hepatic alveolar echinococcosis
Ma CK

2208 Expression of aquaporin 3 and 4 proteins in colorectal polyps
Chen GX, Deng HX, Zhang ML, Yuan N

2213 Expression of Angiotensin Ⅱ and AT_1R in colorectal cancer
Yang SL, Shen L, Gao JC, Fan Q, Huang L, Wu YR

2218 Cloning and sequence analysis of ithe *iceA1* gene of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with various gastric disorders
Shao CJ, Zhang YL, Wang WB, Chen HJ, Kong M, Chen X, Song YZ

APPENDIX

2224 Instructions to authors of *World Chinese Journal of Digestology*
2229 Meeting events calendar in 2012

ACKNOWLEDGMENT

2230 Acknowledgments to reviewers of *World Chinese Journal of Digestology*

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, De-Sheng Wang, Professor, Associate Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

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: *Ying Tian* 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 August 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8月18日; 20(23): 2125-2130
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

述评 EDITORIAL

Fascin-1与消化系恶性肿瘤

周 亮, 王德盛

周亮, 王德盛, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科 陕西省西安市 710032
王德盛, 教授, 副主任医师, 主要从事肝癌转移和肝脏移植的基础与临床研究.
作者贡献分布: 文献检索及论文撰写由周亮完成; 王德盛负责审校工作.
通讯作者: 王德盛, 教授, 副主任医师, 硕士生导师, 710032, 陕西省西安市长乐西路126号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科. wangds@fmmu.edu.cn
电话: 029-84775259
收稿日期: 2012-04-12 修回日期: 2012-07-13
接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-18

Fascin-1 and digestive system carcinomas

Liang Zhou, De-Sheng Wang

Liang Zhou, De-Sheng Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Correspondence to: De-Sheng Wang, Professor, Associate Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, 126 Changlexi Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. wangds@fmmu.edu.cn
Received: 2012-04-12 Revised: 2012-07-13
Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-18

Abstract
Invasion and metastasis are major reasons for poor prognosis of digestive system carcinomas. Motility and migratory capacity are important in contributing to tumor cell invasion and metastasis. Fascin-1 is a globular actin crosslinking protein that can form parallel actin bundles in cell protrusions and is involved in cell adhesion, movement, and signal transduction. *In vitro* up-regulation of Fascin-1 can increase migration and invasion capacity of cells, while down-regulation of Fascin-1 can decrease migration and invasion capacity of cells. Many studies show that up-regulation of Fascin-1 expression is significantly associated with worse prognosis, poorer differentiation, advanced TNM stage, lymph node metastasis, and distant metastasis in patients with digestive system carcinomas. Therefore, Fascin-1 may have prognostic value as an early biomarker for more aggressive digestive system carcinomas and may be a potential therapeutic target for tumor invasion and metastasis.

Key Words: Fascin; Invasion; Metastasis; Carcinoma; Digestive system

Zhou L, Wang DS. Fascin-1 and digestive system carcinomas. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2125-2130

摘要
侵袭转移是造成消化系恶性肿瘤患者预后不良的主要原因之一. 而肿瘤细胞的运动和迁徙能力在肿瘤的侵袭转移过程中起到了重要作用. Fascin-1是一种肌动蛋白结合蛋白, 其主要功能是在细胞突起内形成平行束结构, 并参与细胞黏附、移动以及信号转导等. 体外实验发现过表达Fascin-1能够增加细胞的侵袭和迁移能力, 而抑制Fascin-1的表达则能够降低细胞的侵袭转移. 在许多消化系恶性肿瘤组织中, 研究发现Fascin-1的上调表达与预后不良, 肿瘤的低分化, TNM分期以及淋巴结和远处器官转移密切相关. 因此Fascin-1可能作为消化系恶性肿瘤新的预后预测分子及肿瘤侵袭转移可能的治疗靶点.

关键词: Fascin; 侵袭; 转移; 肿瘤; 消化系

周亮, 王德盛. Fascin-1与消化系恶性肿瘤. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2125-2130
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2125.asp

0 引言
运动和迁移能力对于肿瘤细胞来说十分重要, 因为他们决定了肿瘤细胞的侵袭和转移潜能. 肿瘤细胞获得高迁移能力的一个重要途径就是通过重组细胞骨架来形成促进细胞运动的结构如伪足[1]. Fascin-1是一种肌动蛋白(actin)结合蛋白, 他能够通过聚合肌动蛋白催化其成束而改变细胞骨架, 使细胞膜表面突起增多, 从而增加上皮细胞的运动性, 同时他能降低细胞与细胞、细胞与细胞外基质的黏附, 降低细胞间联系的完整性, 从而加快细胞的迁移, 促进肿瘤细胞的侵袭与转移[2,3]. 正常条件下, Fascin-1主要分布在正常的间质细胞、内皮细胞、树突状细胞和神经细胞, 但在正常上皮细胞中不表达[4].

■背景资料
Fascin-1是一种肌动蛋白结合蛋白, 其主要功能是在细胞突起内形成平行束结构, 并参与细胞黏附、移动以及信号转导等. 目前研究发现Fascin-1参与许多肿瘤的侵袭转移过程, 并与患者的预后密切相关.

■同行评议者
禹正杨, 副教授, 南华大学附属第一医院

■研发前沿
关于Fascin-1在恶性肿瘤中上调的机制以及其促进肿瘤细胞侵袭转移的机制尚待进一步研究.

但是在许多肿瘤中都能发现Fascin-1的表达上调, 如肺癌[5]、膀胱癌[6]、乳腺癌[7]、食管癌[8]、胰腺癌[9]、结肠癌[1]、卵巢癌[10]和胃癌[11]. 进一步研究发现上调Fascin-1的表达能够增加肿瘤细胞的侵袭转移能力, 其上调表达也与许多肿瘤的预后不良密切相关[4,5]. 所以Fascin-1有望成为肿瘤新的预后预测分子和可能作为肿瘤侵袭转移的治疗靶点. 本文就Fascin-1在消化系肿瘤中的研究现状和进展作一综述.

1 Fascin-1的结构和功能

在20世纪70年代, 从海胆的卵母细胞质中纯化出一种分子量为55 kDa的肌动蛋白结合蛋白, 即Fascin, 他能与F-actin紧密结合并稳定成束状结构[12,13]. 目前已知的人类Fascin有3种不同形式, 即 Fascin-1, 通常简称为Fascin, 基因定位于染色体7q22, 主要分布在间质组织和神经系统中; Fascin-2基因定位于染色体17q25, 主要在视网膜细胞中表达; Fascin-3基因定位于染色体7q31, 在睾丸中特异表达[2-4]. Fascin基因在11-50之间的氨基酸残基高度保守, 其中第39位的丝氨酸, 为蛋白激酶C的磷酸化位点. Fascin蛋白属于β-三叶虫蛋白质族, 在结构上由4个β-三叶虫结构域组成, 以β-三叶虫折叠为特征[14]. Fascin的主要功能是与F-actin结合, 并使其平行排列呈束状, 而Fascin则定位于束的核心, 这样能够使细胞形成伪足样结构, 从而增加细胞的运动和迁移能力[15]. 最早关于Fascin-1表达和细胞内定位的研究是在脊椎动物细胞中进行的, Fascin-1在不同的细胞类型中表达不同. Fascin-1在T细胞和许多上皮细胞中不表达或者低表达; 而在神经细胞、胶质细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、内皮细胞以及一些上皮性肿瘤中呈高表达[16-19]. 通过对体外培养的侵袭性肿瘤细胞的研究, 发现Fascin主要分布在具有运动能力或有丝分裂后的细胞膜边缘的微绒毛和皱褶中[18,20-22]. 而在Fascin-1阳性表达的上皮肿瘤细胞系中, 还发现其位于细胞与细胞之间的黏着连接区[23]. 在上皮细胞中, 过表达的Fascin-1与细胞之间的黏着连接分解相关, Fascin-1通过影响β-连环素(β-catenin)在钙黏素(cadherin)-连环素中的功能, 从而降低细胞间的黏附活性[20,23,24]. 这些说明Fascin-1不仅参与细胞迁移结构的形成, 还参与细胞与细胞之间的黏附, 从而提示Fascin-1在细胞的侵袭转移中可能也起到一定的作用. 但是关于Fascin-1在肿瘤中上调表达的具体机制尚不明确. 研究发现在不同的肿瘤中, 调控Fascin-1上调的机制不同. 在乳腺癌中, Fascin-1可能是c-erbB-2的效应蛋白, c-erbB-2可通过活化NF-γB和TATA核心因子激活Fascin-1基因的转录[21]. 而在食管癌中还发现, 转录因Sp1能够通过直接绑定与Fascin-1的启动子直接调控Fascin-1的表达. 转录因Sp1上调则Fascin-1表达上调, 反之亦然. ERK1/2的特异性抑制剂能够降低转录因Sp1的磷酸化水平从而抑制Fascin-1基因的转录, 造成表达下调. 刺激表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的表达能够通过活化ERK1/2通路来增加转录因Sp1的磷酸化水平, 从而增加Fascin-1的表达[25]. 除此之外, 肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha, TNF-α)[26]、Wnt[27]和白介素-6(interleukin-6, IL-6)[28]等信号通路亦能上调Fascin-1的表达. 所以关于Fascin-1在肿瘤中的调控机制尚需进一步研究.

2 Fascin-1与消化系恶性肿瘤

2.1 Fascin-1与口腔鳞状细胞癌 口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是最常见的头颈部肿瘤之一, 其易复发并伴有很高的转移从而造成预后不良. 从OSCC临床标本中观察到, Fascin-1的过表达与淋巴结转移、肿瘤复发以及总体生存率差密切相关[29,30]. 而体外研究发现在培养的OSCC细胞中, 采用siRNA的方法下调Fascin-1的表达能够直接造成细胞表面伪足减少, 细胞间黏附性增加, 从而抑制细胞的侵袭转移. 同时下调Fascin-1表达能够不同程度的增加E-cadherin、β-catenin和Twist的表达[31]; 类似的实验发现Fascin-1的表达水平与OSCC细胞的侵袭能力相关. Fascin-1的表达与E-cadherin的表达成负相关, 过表达Fascin-1能够通过下调E-cadherin来提高OSCC细胞的侵袭能力[29]. 而E-cadherin、β-catenin和Twist与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)关系密切. 同时Fascin-1能够通过增加磷酸化的AKT, ERK1/2和JNK1/2来激活AKT和MAPK通路参与OSCC的发展过程[30]. 因此, 这些结果都提示在OSCC中, Fascin-1在调节肿瘤的发展和EMT过程中发挥了重要作用.

2.2 Fascin-1与食管鳞状细胞癌 免疫组织化学的结果显示Fascin-1在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中的表达比正常食管上皮高. 单因素分析显示Fascin-1的高表达与预后不良, 低分化, T4分期, 淋巴结以及远

处转移密切相关[32,33]. 多因素分析提示Fascin-1蛋白的表达可以作为食管癌独立的预后预测分子[8]. Fascin-1阳性表达的食管癌患者5年生存时间明显低于未表达者[33]. 体外实验显示在KYSE170细胞中(一种Fascin-1过表达细胞)由于Fascin-1表达下调, 细胞的运动和侵袭能力明显下调[34]. 而Fascin-1对食管癌细胞侵袭的影响可能与金属蛋白酶(matrix metalloproteases, MMP)如MMP-2和MMP-9的活性相关[35]. 而在永生化的食管上皮细胞中上调Fascin-1的表达, 能够加速细胞的增殖和侵袭[36]. 并且在食管癌细胞中发现microRNAs(miRNAs)-143、miR-145和miR-133能够通过调控Fascin-1来参与食管癌的发生及转移[37,38]. 在探讨Fascin-1调控细胞侵袭转移的机制中, 发现恢复基因中含半胱氨酸61(cysteine-rich 61, CYR61)或者结缔组织生长因子(connectire tissue growth factor, CTGF)能够逆转由于Fascin下调所造成的细胞增殖和侵袭能力抑制. 在ESCC中CYR61和CTGF蛋白上调表达, 并且与Fascin-1过表达相关. Fascin-1能够通过转化生长因子-β通路来改变CYR61和CTGF的表达[36].

2.3 Fascin-1与胃癌 胃癌是最常见的消化系肿瘤之一, 淋巴结转移是胃癌预后不良的主要原因之一. 通过免疫组织化学的方法, 观察到Fascin-1在胃癌组织中的表达高于正常组织[39]; Fascin-1在胃癌和胃腺瘤中的表达高于临近的非肿瘤组织, 而且在低分化的胃癌中Fascin-1蛋白呈中强度表达[11]. 体外实验提示不同侵袭能力的胃癌细胞中Fascin-1的表达不同, 下调Fascin-1能够改变肿瘤细胞形态, 并且降低细胞的运动和侵袭能力[39]. 通过对比临床病理资料, 发现Fascin-1的阳性表达与年龄, 浆膜侵犯, 淋巴结转移, 病例学分级, TNM分期和肿瘤复发密切相关[11,40]. Fascin-1阳性表达的患者总体生存率明显低于Fascin-1阴性表达的患者[41]. 这些都提示Fascin-1可能与胃癌的侵袭转移密切相关, 并且可作为胃癌预后评估的独立分子.

2.4 Fascin-1和结肠癌 免疫组织化学的结果显示Fascin-1在正常结肠上皮中不表达, 而在结肠癌标本中呈现大量表达[42]. 在肿瘤组织中心和侵袭边缘, Fascin-1的表达比率更高[43]. 在体外培养的结肠癌细胞中上调Fascin-1的表达能够增加细胞的侵袭和转移, 并且能够造成细胞在体内扩散和转移; 而抑制Fascin-1表达则能够降低细胞的侵袭. 有趣的是尽管在原发肿瘤中Fascin-1蛋白的表达与转移相关, 但是Fascin-1在转移灶内并不表达. 当肿瘤细胞到达转移部位时Fascin-1表达下调, 细胞侵袭停止, 增殖能力提高[44]. 这提示Fascin-1在肿瘤的侵袭转移过程中起到重要的作用. 临床研究显示在三期的结肠癌患者中, Fascin-1阳性表达者的5年生存率明显降低, 而远处复发率明显增加[45]. Fascin-1能够独立于TNM分期来预测患者的预后[43,45]. 因此Fascin-1可以作为一个很好的结肠癌侵袭预测的生物标记.

2.5 Fascin-1与肝癌 Iguchi等[46]采用免疫组织化学的方法发现肝癌组织中Fascin-1大量表达, 并且Fascin-1表达的肝癌组织比不表达Fascin-1的肝癌组织分化更差. 在Fascin-1阳性表达的肝癌中, 门静脉侵犯, 胆管侵犯及肝内转移更常发生. 另外, 在肝癌中高甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)的表达与Fascin-1表达密切相关, 这些研究说明Fascin-1与肝癌的侵袭转移关系密切. 结合临床病历资料及患者生存时间分析显示, Fascin-1阳性表达的肝癌患者较阴性表达者, 预后更加不良且生存时间明显缩短[47], Fascin-1可以作为肝癌患者预后的独立预测分子[46]. 在探讨Fascin-1参与肝癌侵袭转移的机制的实验中, 发现Fascin-1表达的肝癌组织常伴有E-cadherin的下调. 体外实验发现, 肝癌细胞系HLE细胞呈Fascin-1高表达同时E-cadherin低表达, 细胞侵袭能力明显增加. 在HLE细胞中敲除Fascin-1能够显著抑制细胞的侵袭同时增加E-cadherin的表达. 而另一种肝癌细胞系Huh7细胞Fascin-1低表达和E-cadherin高表达. 在该细胞中上调Fascin-1的表达后侵袭能力增加不明显并且E-cadherin表达不受抑制, 说明Fascin-1不可能独立的诱导侵袭或EMT过程. 但是上调Fascin-1的表达能够通过另外一种机制明显增加Huh7的侵袭潜力. 该机制是MMP-2和MMP-9卷入了Fascin-1调控侵袭转移的过程. 仅仅在HLE细胞中发现MMP大量分泌, 而在Fascin-1过表达的Huh7细胞中MMP分泌增加不多. 将Fascin-1过表达的Huh7细胞与HLE细胞共培养, 发现Huh7细胞的侵袭能力明显增加, 并且可以通过MMP抑制剂抑制该过程. 说明在肝癌细胞中Fascin-1伴随EMT过程促进肝癌的迁移过程而通过MMPs促进细胞的侵袭[48]. 上述研究也说明Fascin-1不仅能够作为肝癌预后的预测分子而且可能作为针对肝癌侵袭转移的作用靶点.

2.6 Fascin-1与胆道肿瘤 关于Fascin-1在胆道肿瘤中研究较少, 有限的研究发现Fascin-1在正常

■相关报道
许多报道提出Fascin-1与肿瘤的转移密切相关, Fascin-1阳性表达的肿瘤患者生存率明显低于未表达者.

■应用要点
Fascin-1作为一种消化系恶性肿瘤预后预测分子前景广阔；鉴于Fascin-1参与了不同消化系恶性肿瘤的侵袭转移过程，因此其可能作为肿瘤侵袭转移的治疗靶点.

胆管上皮中不表达或偶尔表达, 而在胆管癌中呈高表达[49]. Fascin-1主要分布在胆管癌细胞的细胞膜和细胞质中. 从原位胆囊癌到浸润性胆囊癌及胆管癌中都能观察到Fascin-1的高表达, 这说明Fascin-1参与了肿瘤的发展过程[50]. 而且Fascin-1的高表达与肿瘤的低分化密切相关; 在低分化的肝内胆管癌中, 大的肿瘤(>5 cm)往往伴有高的Fascin-1表达, Fascin-1高表达的患者往往预后不良, 所以Fascin-1可以作为胆道肿瘤独立的预测分子[49].

2.7 Fascin-1与胰腺癌 Yamaguchi等[51]在切除的胰腺癌组织中观察到Fascin-1大量表达, Fascin-1在肿瘤边缘及肿瘤中表达明显高于非肿瘤组织, 但是在肿瘤边缘及肿瘤中的表达并没有明显差异. 在肿瘤亚分型中, 肠型肿瘤比胃型肿瘤更多的表达Fascin-1. Fascin-1 mRNA在中低分化的肿瘤中表达比高分化的肿瘤高[51]. 还有研究显示过表达的Fascin-1主要局限于肿瘤的细胞膜和细胞质中, Fascin-1在胰腺肿瘤从原位到侵袭性肿瘤的转化过程中表达逐渐增高[50]. 在胰腺癌细胞系MIA PaCa-2中上调Fascin-1的表达, 结果发现该细胞的移动和转移能力明显增加. 并且将上调Fascin-1的胰腺癌细胞进行裸鼠体内试验发现, 该细胞成瘤虽稍慢, 但是侵袭转移能力明显增强[52], 其具体机制尚不明. 这些研究提示Fascin-1与胰腺癌的发生展过程密切相关.

3 结论

肿瘤细胞的侵袭转移是消化系肿瘤普遍存在的现象, 其与患者的预后密切相关. 细胞的微结构改变尤其是细胞的骨架的改变在肿瘤发生、发展过程中起到重要作用. Fascin-1作为一种肌动蛋白结合蛋白, 在调控细胞的形态和功能方面起到了十分重要的作用, 而对Fascin-1的研究则是对细胞骨架和生物学研究的扩展. 随着对Fascin-1在消化系肿瘤中的研究逐渐深入, 发现高表达的Fascin-1与患者的预后, 肿瘤的分化、转移密切相关, 而体外实验发现抑制Fascin-1能够通过不同的途径有效降低肿瘤细胞的侵袭转移过程. 因此Fascin-1作为一种消化系肿瘤预后预测分子前景广阔; 鉴于Fascin-1参与了不同肿瘤的侵袭转移过程, 因此其可能作为肿瘤侵袭转移的治疗靶点. 但关于Fascin-1在肿瘤中的作用仍需进一步的研究.

4 参考文献

1 Jawhari AU, Buda A, Jenkins M, Shehzad K, Sarraf C, Noda M, Farthing MJ, Pignatelli M, Adams JC. Fascin, an actin-bundling protein, modulates colonic epithelial cell invasiveness and differentiation in vitro. *Am J Pathol* 2003; 162: 69-80

2 Adams JC. Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 590-596

3 Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC. Roles of fascin in human carcinoma motility and signaling: prospects for a novel biomarker? *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1787-1804

4 Kureishy N, Sapountzi V, Prag S, Anilkumar N, Adams JC. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays* 2002; 24: 350-361

5 Pelosi G, Pastorino U, Pasini F, Maissoneuve P, Fraggetta F, Iannucci A, Sonzogni A, De Manzoni G, Terzi A, Durante E, Bresaola E, Pezzella F, Viale G. Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage I nonsmall cell lung cancer. *Br J Cancer* 2003; 88: 537-547

6 Tong GX, Yee H, Chiriboga L, Hernandez O, Waisman J. Fascin-1 expression in papillary and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. *Hum Pathol* 2005; 36: 741-746

7 Yoder BJ, Tso E, Skacel M, Pettay J, Tarr S, Budd T, Tubbs RR, Adams JC, Hicks DG. The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 186-192

8 Hashimoto Y, Ito T, Inoue H, Okumura T, Tanaka E, Tsunoda S, Higashiyama M, Watanabe G, Imamura M, Shimada Y. Prognostic significance of fascin overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2597-2605

9 Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res* 2003; 63: 8614-8622

10 Cao D, Ji H, Ronnett BM. Expression of mesothelin, fascin, and prostate stem cell antigen in primary ovarian mucinous tumors and their utility in differentiating primary ovarian mucinous tumors from metastatic pancreatic mucinous carcinomas in the ovary. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24: 67-72

11 Hashimoto Y, Shimada Y, Kawamura J, Yamasaki S, Imamura M. The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma. *Oncology* 2004; 67: 262-270

12 Bryan J, Kane RE. Separation and interaction of the major components of sea urchin actin gel. *J Mol Biol* 1978; 125: 207-224

13 Otto JJ, Kane RE, Bryan J. Formation of filopodia in coelomocytes: localization of fascin, a 58,000 dalton actin cross-linking protein. *Cell* 1979; 17: 285-293

14 Ponting CP, Russell RB. Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J Mol Biol* 2000; 302: 1041-1047

15 Duh FM, Latif F, Weng Y, Geil L, Modi W, Stackhouse T, Matsumura F, Duan DR, Linehan WM, Lerman MI. cDNA cloning and expression of the human homolog of the sea urchin fascin and Drosophila singed genes which encodes an actin-bundling protein. *DNA Cell Biol* 1994; 13: 821-827

16 Edwards RA, Bryan J. Fascins, a family of actin bundling proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; 32: 1-9
17 Adams JC. Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J Cell Sci* 1995; 108: 1977-1990
18 Adams JC. Characterization of cell-matrix adhesion requirements for the formation of fascin microspikes. *Mol Biol Cell* 1997; 8: 2345-2363
19 Adams JC, Kureishy N, Taylor AL. A role for syndecan-1 in coupling fascin spike formation by thrombospondin-1. *J Cell Biol* 2001; 152: 1169-1182
20 Yamashiro S, Yamakita Y, Ono S, Matsumura F. Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 993-1006
21 Grothey A, Hashizume R, Ji H, Tubb BE, Patrick CW, Yu D, Mooney EE, McCrea PD. C-erbB-2/HER-2 upregulates fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 2000; 19: 4864-4875
22 Kawano K, Kantak SS, Murai M, Yao CC, Kramer RH. Integrin alpha3beta1 engagement disrupts intercellular adhesion. *Exp Cell Res* 2001; 262: 180-196
23 Tao YS, Edwards RA, Tubb B, Wang S, Bryan J, McCrea PD. beta-Catenin associates with the actin-bundling protein fascin in a noncadherin complex. *J Cell Biol* 1996; 134: 1271-1281
24 Wong V, Ching D, McCrea PD, Firestone GL. Glucocorticoid down-regulation of fascin protein expression is required for the steroid-induced formation of tight junctions and cell-cell interactions in rat mammary epithelial tumor cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 5443-5453
25 Lu XF, Li EM, Du ZP, Xie JJ, Guo ZY, Gao SY, Liao LD, Shen ZY, Xie D, Xu LY. Specificity protein 1 regulates fascin expression in esophageal squamous cell carcinoma as the result of the epidermal growth factor/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway activation. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 3313-3329
26 Cameron S, Haller F, Dudas J, Moriconi F, Gunawan B, Armbrust T, Langer C, Füzesi L, Ramadori G. Immune cells in primary gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 327-334
27 Hölsken A, Buchfelder M, Fahlbusch R, Blümcke I, Buslei R. Tumour cell migration in adamantinomatous craniopharyngiomas is promoted by activated Wnt-signalling. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 631-639
28 Li R, Li G, Deng L, Liu Q, Dai J, Shen J, Zhang J. IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1. *Oncol Rep* 2010; 23: 1553-1559
29 Lee TK, Poon RT, Man K, Guan XY, Ma S, Liu XB, Myers JN, Yuen AP. Fascin over-expression is associated with aggressiveness of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 2007; 254: 308-315
30 Alam H, Bhate AV, Gangadaran P, Sawant SS, Salot S, Sehgal L, Dange PP, Chaukar DA, D'cruz AK, Kannanl S, Gude R, Kane S, Dalal SN, Vaidya MM. Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012; 12: 32
31 Chen SF, Lin CY, Chang YC, Li JW, Fu E, Chang FN, Lin YL, Nieh S. Effects of small interfering RNAs targeting Fascin on gene expression in oral cancer cells. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 722-730
32 Hsu KF, Lin CK, Yu CP, Tzao C, Lee SC, Lee YY, Tsai WC, Jin JS. Cortactin, fascin, and survivin expression associated with clinicopathological parameters in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22: 402-408
33 Qin YR, Tang H, Qiao JJ, Li FF, Ai JY. [Expression of fascin in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2011; 31: 1216-1219
34 Xue LY, Hu N, Song YM, Zou SM, Shou JZ, Qian LX, Ren LQ, Lin DM, Tong T, He ZG, Zhan QM, Taylor PR, Lu N. Tissue microarray analysis reveals a tight correlation between protein expression pattern and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2006; 6: 296
35 Xie JJ, Xu LY, Zhang HH, Cai WJ, Mai RQ, Xie YM, Yang ZM, Niu YD, Shen ZY, Li EM. Role of fascin in the proliferation and invasiveness of esophageal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 355-362
36 Xie JJ, Xu LY, Wu JY, Shen ZY, Zhao Q, Du ZP, Lv Z, Gu W, Pan F, Xu XE, Xie D, Li EM. Involvement of CYR61 and CTGF in the fascin-mediated proliferation and invasiveness of esophageal squamous cell carcinomas cells. *Am J Pathol* 2010; 176: 939-951
37 Liu R, Liao J, Yang M, Sheng J, Yang H, Wang Y, Pan E, Guo W, Pu Y, Kim SJ, Yin L. The cluster of miR-143 and miR-145 affects the risk for esophageal squamous cell carcinoma through co-regulating fascin homolog 1. *PLoS One* 2012; 7: e33987
38 Kano M, Seki N, Kikkawa N, Fujimura L, Hoshino I, Akutsu Y, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Matsubara H. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 127: 2804-2814
39 Kim SJ, Choi IJ, Cheong TC, Lee SJ, Lotan R, Park SH, Chun KH. Galectin-3 increases gastric cancer cell motility by up-regulating fascin-1 expression. *Gastroenterology* 2010; 138: 1035-1045. e1-e2
40 Tsai WC, Jin JS, Chang WK, Chan DC, Yeh MK, Cherng SC, Lin LF, Sheu LF, Chao YC. Association of cortactin and fascin-1 expression in gastric adenocarcinoma: correlation with clinicopathological parameters. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 955-962
41 Li X, Zheng H, Hara T, Takahashi H, Masuda S, Wang Z, Yang X, Guan Y, Takano Y. Aberrant expression of cortactin and fascin are effective markers for pathogenesis, invasion, metastasis and prognosis of gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2008; 33: 69-79
42 Hashimoto Y, Skacel M, Lavery IC, Mukherjee AL, Casey G, Adams JC. Prognostic significance of fascin expression in advanced colorectal cancer: an immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2006; 6: 241
43 Chan C, Jankova L, Fung CL, Clarke C, Robertson G, Chapuis PH, Bokey L, Lin BP, Dent OF, Clarke S. Fascin expression predicts survival after potentially curative resection of node-positive colon cancer. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 656-666
44 Vignjevic D, Schoumacher M, Gavert N, Janssen KP, Jih G, Laé M, Louvard D, Ben-Ze'ev A, Robine S. Fascin, a novel target of beta-catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 6844-6853
45 Oh SY, Kim YB, Suh KW, Paek OJ, Moon HY. Prog-

■同行评价

本文对Fascin-1与消化系恶性肿瘤的关系作了较详细的综述，对基础研究有一定指导意义.

nostic impact of fascin-1 expression is more significant in advanced colorectal cancer. *J Surg Res* 2012; 172: 102-108

46 Iguchi T, Aishima S, Umeda K, Sanefuji K, Fujita N, Sugimachi K, Gion T, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Fascin expression in progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol* 2009; 100: 575-579

47 Huang X, Ji J, Xue H, Zhang F, Han X, Cai Y, Zhang J, Ji G. Fascin and cortactin expression is correlated with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 633-639

48 Hayashi Y, Osanai M, Lee GH. Fascin-1 expression correlates with repression of E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma cells and augments their invasiveness in combination with matrix metalloproteinases. *Cancer Sci* 2011; 102: 1228-1235

49 Iguchi T, Aishima S, Taketomi A, Nishihara Y, Fujita N, Sanefuji K, Sugimachi K, Yamashita Y, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Fascin overexpression is involved in carcinogenesis and prognosis of human intrahepatic cholangiocarcinoma: immunohistochemical and molecular analysis. *Hum Pathol* 2009; 40: 174-180

50 Swierczynski SL, Maitra A, Abraham SC, Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Cameron JL, Schulick RD, Yeo CJ, Rahman A, Hinkle DA, Hruban RH, Argani P. Analysis of novel tumor markers in pancreatic and biliary carcinomas using tissue microarrays. *Hum Pathol* 2004; 35: 357-366

51 Yamaguchi H, Inoue T, Eguchi T, Miyasaka Y, Ohuchida K, Mizumoto K, Yamada T, Yamaguchi K, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Fascin overexpression in intraductal papillary mucinous neoplasms (adenomas, borderline neoplasms, and carcinomas) of the pancreas, correlated with increased histological grade. *Mod Pathol* 2007; 20: 552-561

52 Xu YF, Yu SN, Lu ZH, Liu JP, Chen J. Fascin promotes the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4470-4478

编辑 李军亮 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》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化．A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. P值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, t = 4.56 *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年8月18日; 20(23): 2131-2137
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

茵陈蒿汤及其变方对ConA诱导慢性免疫性肝损伤小鼠IP-10、CXCR3的影响

刘 果, 王凤云, 唐旭东, 张引强, 杨俭勤, 卞立群, 赵迎盼, 张北华

刘果, 王凤云, 唐旭东, 张引强, 杨俭勤, 卞立群, 赵迎盼, 张北华, 中国中医科学院西苑医院 北京市 100091
刘果, 西苑医院消化科博士后, 主要从事中医药防治消化系统疾病研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30973735; No. 30672688
作者贡献分布: 此课题由唐旭东与王凤云设计; 研究过程由刘果、王凤云、张引强、杨俭勤、卞立群、赵迎盼及张北华操作完成; 数据分析由卞立群完成; 本论文写作由刘果完成.
通讯作者: 唐旭东, 教授, 主任医师, 中国中医科学院首席研究员, 100091, 北京市, 中国中医科学院西苑医院.
liuguo980131@163.com
收稿日期: 2012-05-16 修回日期: 2012-07-10
接受日期: 2012-08-07 在线出版日期: 2012-08-18

Effect of modified decoction of Yinchenhaotang on IP-10 and CXCR3 expression in concanavalin A-induced liver injury in mice

Guo Liu, Feng-Yun Wang, Xu-Dong Tang, Yin-Qiang Zhang, Jian-Qin Yang, Li-Qun Bian, Ying-Pan Zhao, Bei-Hua Zhang

Guo Liu, Feng-Yun Wang, Xu-Dong Tang, Yin-Qiang Zhang, Jian-Qin Yang, Li-Qun Bian, Ying-Pan Zhao, Bei-Hua Zhang, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China
Correspondence to: Xu-Dong Tang, Professor, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China. liuguo980131@163.com
Received: 2012-05-16 Revised: 2012-07-10
Accepted: 2012-08-07 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To observe the effect of modified decoction of Yinchenhaotang on concanavalin A (ConA) induced chronic hepatic injury in mice.

METHODS: Seventy Balb/c mice were randomly divided into 7 groups: normal group, model group, Yinchenhaotang group, Yinchenhaotang plus salvia miltiorrhiza group, Ynchenhaotang plus milkvetch root group, Rongganheji group, and Rongganxiaofang group. Mice in the normal group were injected with 0.3 mL of PBS solution via the tail vein, while mice in other groups were injected with ConA at a dose of 6 μg/g of body weight once a week for 8 wk. Mice in each groups were administrated with each treatment reagent for 4 wk, and the same volume of normal saline was given to the normal and model groups. Twenty-four hours after the last administration, blood samples were taken to determine the levels of IP-10, CXCR3 and TNF-α. The degree of inflammation and fibrosis was observed under a light microscope.

RESULTS: Serum levels of IP-10, CXCR3 and TNF-α (ng/mL) were reduced in all the treatment groups (Yinchenhaotang group, Yinchenhaotang plus salvia miltiorrhiza group, Ynchenhaotang plus milkvetch root group, Rongganheji group, and Rongganxiaofang group) compared to the model group (IP-10: 44.56 ± 0.30, 42.18 ± 0.54, 32.18 ± 0.37, 36.46 ± 0.47, 35.98 ± 0.65 *vs* 52.73 ± 0.46; CXCR-3: 64.86 ± 0.63, 37.88 ± 0.63, 40.18 ± 0.57, 38.58 ± 0.62, 36.94 ± 0.26 *vs* 64.86 ± 0.63; TNT-α: 43.45 ± 0.65, 32.78 ± 0.27, 42.18 ± 0.37, 28.69 ± 0.85, 24.46 ± 0.57 *vs* 93.32 ± 0.81, all $P<0.05$). Compared to the model group, liver fibrosis and cell necrosis were significantly improved in Rongganheji and Yinchenhaotang groups (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Rongganheji has a good protective effect against concanavalin A-induced liver injury in mice.

Key Words: Yinchenhaotang; Modified decoction; Chronic liver injury

Liu G, Wang FY, Tang XD, Zhang YQ, Yang JQ, Bian LQ, Zhao YP, Zhang BH. Effect of modified decoction of Yinchenhaotang on IP-10 and CXCR3 expression in concanavalin A-induced liver injury in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2131-2137

摘要

目的: 观察茵陈蒿汤及其变方对刀豆蛋白(concanavalin A, ConA)诱导小鼠慢性免疫性肝损伤的保护作用.

方法: 选用Balb/c小鼠70只, 雌雄各半, 随机分为正常对照组、模型组、茵陈蒿汤组、茵陈

■**背景资料**
慢性肝病致病机制复杂, 清热利湿之法当贯穿始终, 必须综合与其他治法灵活合用. 本研究比较了清热利湿法、清利健脾法、清利活血法、清理健脾活血法的茵陈蒿汤及其变方对慢性免疫性肝损伤小鼠病理组织、趋化因子及其受体和炎症因子的效用差异.

■**同行评议者**
许玲, 主任医师, 教授, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科

■相关报道
本课题组在前期研究中, 通过小剂量刀豆蛋白(ConA)刺激制作慢性肝损伤模型模拟HBV慢性感染状态取得了成功.

蒿汤加丹参组、茵陈蒿汤加黄芪组、荣肝合剂组和荣肝小方组. 正常组小鼠尾静脉注射PBS溶液0.3 mL, 其他各组按ConA 6 μg/g体质量尾静脉注射造模, 1次/wk, 连续8 wk, 制备慢性肝损伤模型. 造模成功后, 模型组和正常组以等体积蒸馏水灌胃. 各治疗组灌胃给药, 每日1次, 连续4 wk, 末次给药后24 h, 检测血清中IP-10、CXCR-3和TNF-α活性; 肝组织光镜下观察其病理变化.

结果: 与模型组比较, 各用药组(茵陈蒿组、茵陈蒿汤加丹参组、茵陈蒿汤加黄芪组、荣肝合剂组和小方组)血清IP-10、CXCR-3、TNF-α的水平(ng/mL)均降低(IP-10: 44.56±0.30、42.18±0.54、32.18±0.37、36.46±0.47、35.98±0.65 *vs* 52.73±0.46; CXCR-3: 64.86±0.63、37.88±0.63、40.18±0.57、38.58±0.62、36.94±0.26 *vs* 64.86±0.63; TNT-α: 43.45±0.65、32.78±0.27、42.18±0.37、28.69±0.85、24.46±0.57 *vs* 93.32±0.81, 均$P<0.05$), 各组间无统计学差异($P>0.05$); 与模型组比较, 中药组肝细胞坏死减轻、变性减少、炎细胞浸润和肝纤维化减轻(均$P<0.05$); 茵陈蒿汤加丹参组、荣肝合剂组和小方组肝组织纤维增生程度较小(均$P<0.05$).

结论: 清利湿热, 健脾活血的荣肝合剂及荣肝小方组对ConA所致小鼠肝损伤具有较好的综合保护作用.

关键词: 茵陈蒿汤; 变方; 慢性肝损伤

刘果, 王凤云, 唐旭东, 张引强, 杨俭勤, 卞立群, 赵迎盼, 张北华. 茵陈蒿汤及其变方对ConA诱导慢性免疫性肝损伤小鼠IP-10、CXCR3的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2131-2137
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2131.asp

0 引言

清利肝胆湿热的茵陈蒿汤抗肝损伤作用的研究已经得到了临床和实验研究的证实. 由于慢性肝损伤中医病机的复杂性, 在临床实践中单纯使用清热利湿法效果尚不能令人满意, 需辨证与其他治法合用. 王凤云等[1]报道荣肝合剂 在临床调治慢性肝损伤取得了满意的疗效. 为了进一步探讨其作用和与茵陈蒿汤及其变方的效应机制差异, 我们采用刀豆蛋白A(con-canavalin A, ConA)诱导小鼠肝损伤的模型, 模拟慢性肝损伤状态, 观察模型小鼠血清学趋化因子和病理组织学及相关指标的变化, 探讨体现不同治法的中药复方防治慢性肝损伤的物质基础.

1 材料和方法

1.1 材料 采用Balb/c小鼠, 由北京维通利华公司提供, 许可证编号SCAC(京)2006-0009, 共70只, ♂35只, ♀35只, 体质量18-20 g, 昼夜节律12∶12, 即早6:00开灯, 晚6:00熄灯. 实验动物由中国中医科学院西苑医院实验动物中心饲养, SPF级, 22 ℃, 55%湿度. ConA规格为25 mg/支购自Sigma公司. 荣肝合剂(茵陈、黄芪和鸡骨草等)浓缩液含生药2.5 g/mL, 茵陈蒿汤(茵陈、栀子和大黄)浓缩液含生药2 g/mL, 荣肝小方(茵陈和鸡骨草等)浓缩液含生药1.81 g/mL, 茵陈蒿汤加丹参组(茵陈、栀子、大黄和丹参)含生药1.81 g/mL, 茵陈蒿汤加黄芪组(茵陈、栀子、大黄和黄芪)含生药1.81 g/mL, 均由中国中医科学院西苑医院制剂室制备.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 小鼠随机分为正常组、模型组、茵陈蒿组、茵陈蒿汤加丹参组、茵陈蒿汤加黄芪组、荣肝合剂组和小方组, 每组10只, 雌雄各半. 正常对照组小鼠尾静脉注射PBS溶液0.3 mL, 其他各组按ConA 6 μg/g以0.9%的生理盐水稀释, 浓度为1 mg/mL, 尾静脉注射造模, 1次/wk, 连续8 wk. 造模结束后, 从模型组和正常组各随机抽取1只处死观察, 以肝组织出现纤维条索病理改变和血清血清丙氨酸基转移酶(alamine aminotransferase, ALT)活性超过正常值上限2倍以上为造模成功. 造模成功后, 按体表面积折算法, 以荣肝小方组15.57 g/kg、荣肝合剂组30.56 g/kg, 茵陈蒿汤组10.38 g/kg、茵陈蒿汤加丹参组18.13 g/kg和茵陈蒿汤加黄芪组18.13 g/kg(相当于60 kg成人临床用量的10倍)灌胃给药; 正常组和模型组蒸馏水0.02 mL/g灌胃, 每天1次, 共4 wk, 给药时间为每天上午9:00-11:00.

1.2.2 检测指标: (1)形态观察: 实验期间每天观察记录各组小鼠一般状况(精神状态、活动情况、毛发光泽度、食欲和大小便情况等)和死亡情况; (2)病理标本的采集. 在每鼠肝脏同一部位取肝组织2 mm, 用体积分数为40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5 μm厚切片, 行HE染色及Masson三色染色, 光镜定位肝小叶及周边炎症浸润区和坏死区; (3)病理检测: 标本由中国中医科学院西苑医院病理室检测. 病理形态学观察和肝组织炎症活动度积分标准按王泰龄等[2]方案进行分析, 多样本比较用单因素方差分析和/或秩和

检验, 计数资料用χ^2检验; (4)血清检测: 小鼠摘眼球取血, 室温静置30 min, 3 000 r/min(离心半径87 mm)离心15 min后, 分离血清, 置于-20 ℃冰箱待测. 采用双抗体夹心ABC-ELISA法. 试剂盒购自北京华肽先锋有限公司, 为进口试剂分装.

所用酶标仪为奥地利生产的SPECTRA酶标比色计. 检测程序按照试剂盒说明书进行, 具体如下: (1)建立标准曲线: 设标准孔8孔, 每孔中各加入样品稀释液100 μL, 第1孔加标准品100 μL,混匀后用加样器吸出100 μL, 移至第2孔. 如此反复操作对倍稀释至第7孔. 最后, 从第7孔中吸出100 μL弃去, 使每孔体积均为100 μL. 第8孔为空白对照; (2)加样: 待测品孔各加入待测样品100 μL; (3)将反应板置37 ℃, 120 min; (4)洗板: 用洗涤液将反应板充分洗涤4-6次, 向滤纸上印干; (5)每孔中加入第一抗体工作液50 μL; (6)将反应板充分混匀后置37 ℃, 60 min; (7)洗板: 同前; (8)每孔加酶标抗体工作液100 μL; (9)将反应置37 ℃, 30 min; (10)洗板: 同前; (11)每板加入底物工作液100 μL, 置37 ℃处暗处反应5-10 min; (12)每孔加入1滴终止液混匀; (13)在492 nm处测吸光(A)值.

结果计算与判断: (1)所有A值都应减去空白值后再进行计算; (2)以标准品1 000、500、250、125、62.5、32、16和0 ng/mL的A值用SPSS作散点图, 并求出直线回归方程. 根据样品A值, 用方程求出IP-10、CXCR3和TNF-α含量.

统计学处理 计量资料均进行正态性检验, 采用非参数检验的单样本K-S拟合优度检验(1-Sample K-S Test). 如符合或近似符合正态分布, 治疗前后比较采用配对t检验, 两样本均数比较采用两个独立样本的t检验; 多个样本均数比较用方差分析; 对不符合正态分布者, 采用非参数检验的秩和检验, 治疗前后采用两相关样本比较的Wilcoxon符号秩和检验, 两组比较采用两独立样本比较的Wilcoxon秩和检验. 等级资料采用秩和检验. 正态性检验、方差齐性检验及可比性检验显著性水平α = 0.10, 其他α = 0.05. 统计软件采用SPSS13.0 for Windows.

2 结果

2.1 *一般情况* 造模过程中, ConA造模组, 第2周、4周和8周各有1只♂小鼠死亡. 给药过程中, 模型组有3只小鼠死亡, 茵陈蒿汤组死亡1只, 其余各组均无小鼠死亡. 实验过程中, 未造模前各组动物形态及活动无明显差异. 造模后, 正常组小鼠运动活泼、快速有力、有精神、进食良好、毛浓密而有光泽, 并且腿部肌肉结实; 而模型组随实验的进行小鼠变得不喜欢活动、动作较为迟钝、常作萎靡状、弓背喜卧、体温下降、进食欠佳、毛稀疏而干并且粗乱蓬松. 各中药治疗组小鼠在活动和进食方面均较模型组好, 毛密而不蓬松，有光泽, 并且弓背喜卧者少.

2.2 *大体形态观察* 正常对照组肝脏质地柔软、呈褐色、表面光滑, 并且无肿大; 模型组动物肝脏明显淤血肿大、呈暗红色, 并且可见点状或小片状出血. 各治疗组小鼠肝脏与对照组比较, 肝脏颜色深浅不一、体积大小不等, 并且表面较光滑无明显结节.

2.3 *光镜表现* 正常组肝小叶结构完整、肝索以中央静脉为中心呈放射状排列、肝细胞呈多面形、核大而圆、位于肝细胞中央、肝窦内及汇管区可见少量淋巴细胞浸润、未见纤维组织增生; 模型组肝小叶失去正常结构、肝索排列紊乱、肝细胞普遍变性、浑浊肿胀和胞浆疏松, 甚至呈气球样变; 肝血窦变狭窄, 可见广泛的脂肪变性并有散在的嗜酸性变、嗜酸性小体形成、灶性坏死甚至大片状坏死、坏死灶及汇管区淋巴细胞浸润; 肝细胞再生活跃、核大、深染, 有的可见双核, 偶见核分裂相、汇管区增宽、有大量的成纤维细胞和纤维细胞; 增生的胶原纤维自中央静脉及汇管区向周围延伸并包绕肝小叶, 并分割肝小叶而形成假小叶; 肝血窦周围可见纤维组织增生. 荣肝合剂组和小方组可见炎症轻微, 有肝细胞再生, 无纤维间隔形成, 茵陈组与茵陈蒿汤加黄芪组有纤维间隔形成, 甚至有假小叶的形成. 中药组与模型组比较, 在减轻肝细胞坏死、减少变性、减轻炎细胞浸润以及减轻肝纤维化方面有统计学差异(P<0.05, 表1, 图1, 2).

2.4 *小鼠血清IP-10、CXCR3、TNF-α含量* 小鼠血清IP-10、CXCR3、TNF-α含量变化见表2.

3 讨论

ConA是一种植物凝集素, 可诱导淋巴细胞巨噬细胞的细胞毒作用, 由于肝脏内含有大量的巨噬细胞, 当给动物静脉注射ConA后, 首先活化肝细胞中的T细胞, 对肝细胞造成损伤[1]. 课题组在前期研究中, 通过小剂量ConA刺激制作慢性肝损伤模型模拟HBV慢性感染状态取得了成功[3]. 本研究沿用了其造模方法, 以清热利湿的茵陈蒿汤、清热利湿健脾的茵陈蒿汤加黄芪方、清

■应用要点
荣肝合剂、荣肝小方、茵陈蒿汤及其变方均能对肝组织的慢性病理损伤有较好的改善作用, 其中以体现清利湿热、健脾益气、活血化瘀法的荣肝合剂和小方在减轻肝纤维化方面与茵陈蒿汤和茵陈蒿汤加黄芪组相比显示出一定的优势, 显示出较好的综合疗效.

■创新盘点
本文研究了茵陈蒿汤及其变方对趋化因子IP-10及其受体CXCR3表达的影响. 证明了茵陈蒿汤及其变方在保护肝细胞和减轻肝纤维化中的优势.

表 1 各组小鼠肝组织病理光镜表现

分组	*n*	肝细胞坏死				肝细胞变性				炎细胞浸润				肝纤维化				
		–	+	++	+++	–	+	++	+++	–	+	++	+++	0	I	II	III	IV
正常组	10	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0	0
模型组	7	0	1	1	5	0	0	2	5	0	0	0	7	0	1	3	2	0
茵陈蒿汤组	9[a]	0	1	4	4	0	2	3	5	0	2	5	3	0	2	5	3	0
茵陈蒿汤加丹参组	10[a]	0	2	3	5	0	2	4	4	0	4	4	2	1	4	4	1	0
茵陈蒿汤加黄芪组	10[a]	0	5	2	3	1	2	3	4	0	4	3	3	0	3	4	3	0
小方组	10[a]	0	6	4	0	1	5	4	0	1	5	4	0	2	8	0	0	0
荣肝合剂组	10[a]	2	4	2	2	2	4	3	1	1	6	2	1	1	6	2	1	0

[a]$P<0.05$ *vs* 模型组.

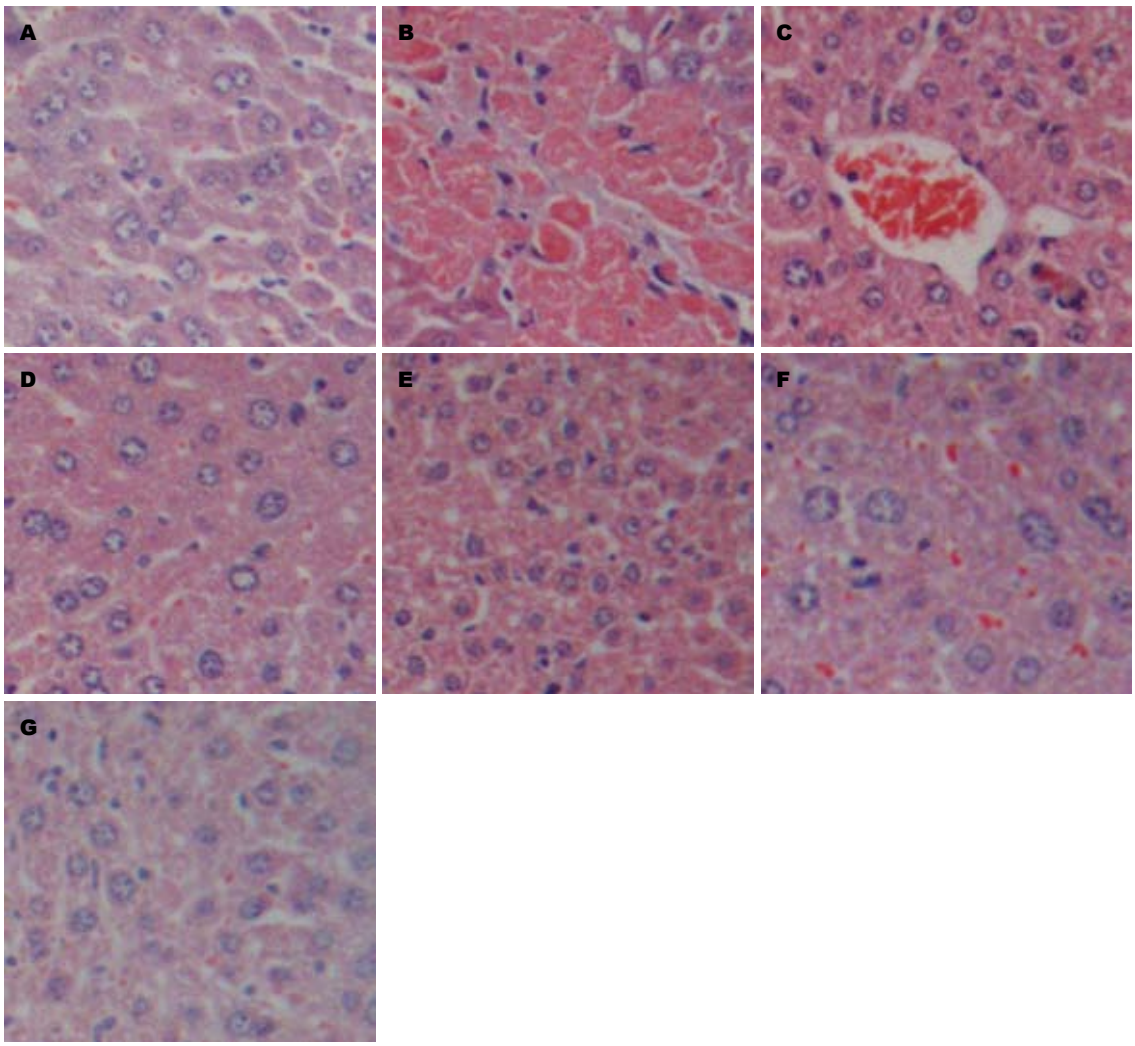


图 1 各组小鼠光镜下病理变化图(HE × 200). A: 正常组; B: 模型组; C: 茵陈蒿汤组; D: 茵陈蒿汤加黄芪组; E: 茵陈蒿汤加丹参组; F: 荣肝合剂组; G: 小方组.

热利湿活血的茵陈蒿汤加丹参方、清热利湿健脾活血的荣肝合剂及其精简方加以干预, 研究表明, 荣肝合剂、荣肝小方、茵陈蒿汤及其变方均能对肝组织的慢性病理损伤有较好的改善作用, 其中以体现清利湿热、健脾益气、活血化瘀法的荣肝合剂和小方在减轻肝纤维化方面与茵陈蒿汤和茵陈蒿汤加黄芪组相比显示出一定的优势, 显示出较好的综合疗效.

趋化因子(chemokine)作为一种能引起炎性细胞聚集的重要的炎性细胞因子, 参与慢性肝

■同行评价
本研究对于经典复方作用机制的阐明有一定的意义.

表 2 小鼠血清IP-10、CXCR3和TNF-α含量的变化 (ng/mL)

分组	IP-10	CXCR3	TNF-α
正常组	31.09 ± 0.30[a]	36.89 ± 0.38[a]	23.28 ± 0.28[a]
模型组	52.73 ± 0.46	64.86 ± 0.63	93.32 ± 0.81
茵陈蒿汤组	44.56 ± 0.30[a]	43.88 ± 0.36[a]	43.45 ± 0.65[a]
茵陈蒿汤加黄芪组	32.18 ± 0.37[a]	40.18 ± 0.57[a]	42.18 ± 0.37[a]
茵陈蒿汤加丹参组	42.18 ± 0.54[a]	37.88 ± 0.63[a]	32.78 ± 0.27[a]
荣肝合剂组	36.46 ± 0.47[a]	38.58 ± 0.62[a]	28.69 ± 0.85[a]
小方组	35.98 ± 0.65[a]	36.94 ± 0.26[a]	24.46 ± 0.57[a]

[a]$P<0.05$ *vs* 模型组.

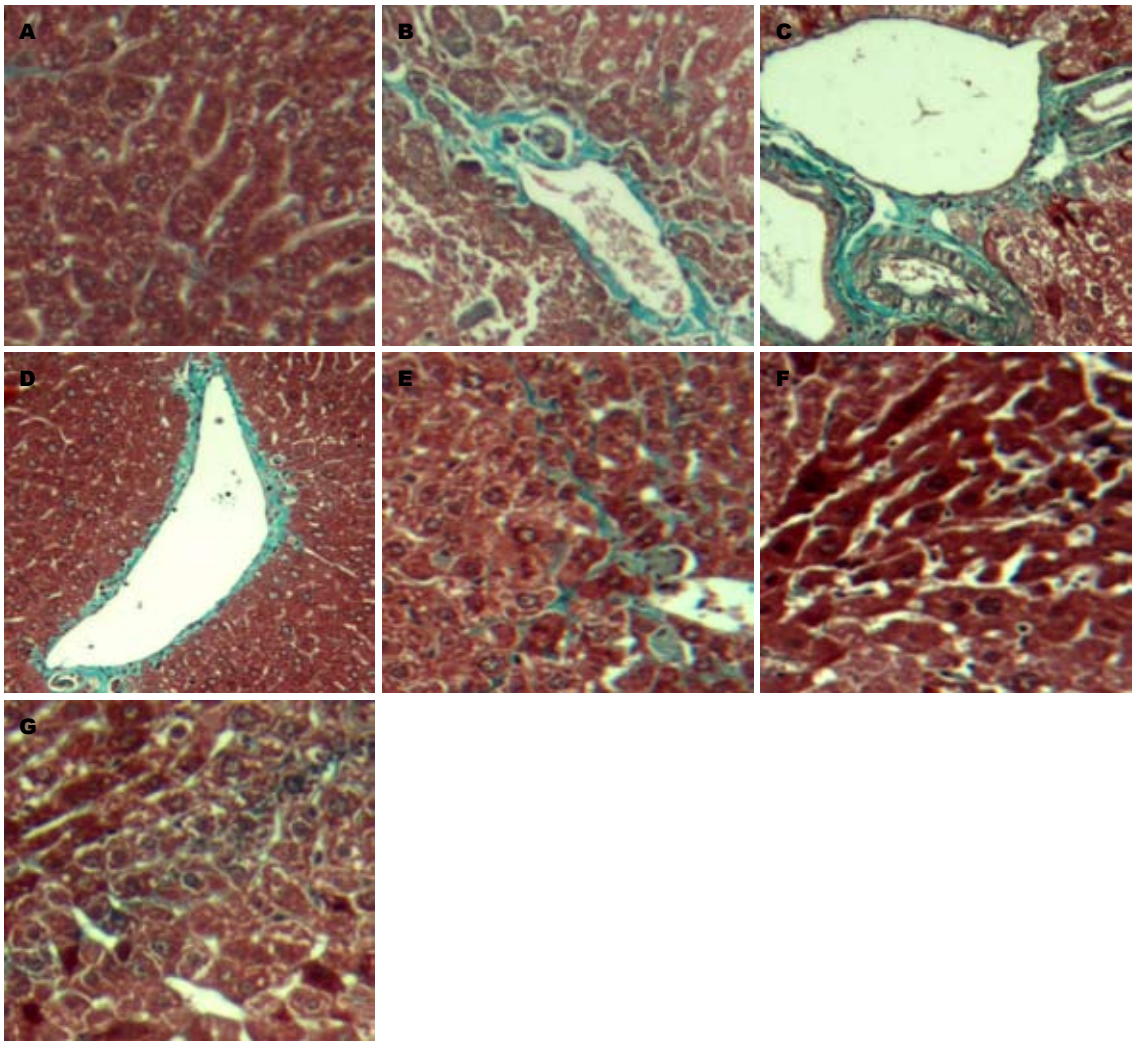


图 2 各组小鼠光镜下病理变化(Masson × 200). A: 正常组; B: 模型组; C: 茵陈蒿汤组; D: 茵陈蒿汤加黄芪组; E: 茵陈蒿汤加丹参组; F: 荣肝合剂组; G: 小方组.

病的免疫调节和免疫病理反应. 趋化因子的过度释放, 一方面介导炎性细胞向病灶部位聚集浸润, 加重局部炎症程度; 另一方面趋化因子/趋化因子受体促使白细胞、淋巴细胞释放各种降解酶和氧自由基等造成组织器官损伤, 引起炎性细胞在肝脏聚集, 导致宿主肝细胞损伤甚至重症肝炎中起着重要的作用[4]. 趋化因子能够趋化、激活中性粒细胞、单核细胞、NK细胞和淋巴细胞等在炎症部位聚集, 参与组织损伤和修复[5].

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)以Th1细胞性炎症反应为主. Th1细胞表达CXCR3

和CXCR5[6], 其中, CXC亚家族趋化因子如γ干扰素诱导蛋白10(interferon-gamma inducible protein-10, IP-10), 通过与其受体CXCR3作用趋化Thl细胞.

大量研究证实了IP-10在慢性肝损伤发挥着重要的机制. 王健等[7]对慢性丙型肝炎患者PBMC内IP-10 mRNA研究发现, 其水平与对照组相比, 差异具有显著性. 赵金红等[8]对乙型肝炎患者PBMC内IP-10 mRNA水平研究, 发现其表达水平也升高, 具有显著性差异. IP-10趋化非特异性单核细胞及其他炎性细胞浸润于肝脏, 造成肝组织免疫损伤. Mihm等[9]报道结果与之类似.

目前有关IP-10功能的研究主要在以下几个方面: IP-10趋化非特异性单核细胞及其他炎性细胞浸润于肝脏, 造成肝组织免疫损伤. Mihm等[9]通过RT-PCR技术发现慢性丙肝患者中IP-10 mRNA和血清中IP-10蛋白浓度表达均增高, 但CHB患者中虽表达增高, 但未达到显著性差异. 在上述研究中, 其发现CHB、慢性丙型肝炎患者肝脏炎症局部浸润细胞均主要为Th1和Th0, 无Th2细胞, 也有天然T细胞、NK细胞和单核/巨噬细胞浸润, 这与IP-10作用的靶细胞一致. 在自身免疫性肝病、慢性丙型肝炎和乙型肝炎病毒感染动物模型IP-10和CXCR3的分泌增加[10-12]. CHB患者血清IP-10水平升高, 肝组织表达IP-10及IP-10 mRNA, 肝组织中浸润的炎性细胞高表达CXCR3, 且与疾病进展密切相关[12]. 通过检测HBV患者外周血淋巴细胞表面CXCR3的表达发现, CXCR3阳性的淋巴细胞和单核细胞明显增多, 且以CXCR3 $CD8^+$T细胞的增加更加明显, 且重型肝炎较轻中型增加更加显著[13]. 在丙型肝炎病毒(hepatitis c virus, HCV)患者肝脏内亦检测到CXCR3的高表达, 淋巴细胞浸润明显的肝组织表达强于其他组织. 大量的$CXCR3^+$T细胞进入肝小叶, 这种正反馈机制是导致肝炎病毒的慢性损伤的关键机制[14]. Kakimi等[15]在HBV转基因小鼠模型中采用抗IP-10治疗炎症反应, 可明显减少CTL炎症浸润及病变程度, 从另一角度证实了此论点.

在慢性肝损伤的发生过程中, TNF-α也是造成肝炎肝细胞坏死的重要介质之一. TNF-α参与肝纤维化和肝硬化, 可能主要通过激活储脂细胞转化为肌纤维母细胞, 并刺激成纤维细胞增殖, 从而促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成有关, 提示TNF-α在肝硬化发生发展中起重要作用. TNF-α可直接杀伤正常肝细胞, 并介导毛细管炎症, 引起肝细胞性黄疸, 促进黄疸加重. 细菌、病毒感染、免疫复合物和化学药物等因素可导致枯否细胞大量释放TNF-α参与肝损伤过程, 是介导肝损伤的主要终末介质[16], 有文献表明CHB患者血清TNF-α水平非常显著地高于正常对照组[17,18]. 有的研究证明血清TNF-α水平与肝细胞炎症和坏死程度密切相关.

中医认识到慢性肝病之所以反复发作个迁延难愈, 与其“湿、热、毒、瘀和虚”交杂的病理特点密切相关, 尤以湿热邪气为重. 因此, 清热利湿法当贯穿治疗的始终, 茵陈蒿汤是常用方剂之一. 现代研究证实: 本方具有促进胆红素代谢, 解除胆汁瘀积[19,20]、抗肝损伤[21,22]、抑制肝细胞凋亡[23]、抑制星状细胞活化及胶原合成等药理作用[24,25]. 同时能改善脂肪代谢[26], 广泛应用于多种肝病治疗领域.

然而慢性肝病中的湿热病邪多伴有脏腑内伤的基础, 故在临床治疗上要标本兼顾, 在清利湿热的同时, 不要忽视其与其他治法的合用. 现代研究证实, 慢性肝病的患者存在免疫功能的下降. 如谢学军[27]检测103例慢性肝炎中医辨证为肝郁脾虚和肝胆湿热患者外周血NK细胞活性, 并与30名健康人作对照, 发现上述两种中医证型的患者NK活性均降低, 而慢迁肝中肝胆湿热型NK活性更低, 说明慢肝本虚的部分实质, 强调治疗慢肝时扶正祛邪的重要性.

湿热之邪缠绵日久, 湿为阴邪, 其性粘腻, 易遏阳气, 致气滞血淤, 热为阳邪, 热壅气机, 阳气拂郁, 气郁血瘀, 实乃“湿可致瘀, 热可致瘀, 湿与热合, 更易致瘀”[28]. 病理情况下, 过食膏粱厚味, “浊气”有余, 化为湿热痰浊, 浸淫血脉, 遂成血中湿热证, 故湿热内伤, 日久多易深入血分. 王孟英言: “湿热熏蒸不已, 自气入营血矣”[29]较之气分湿热证更难治疗, 表现为病情深重, 湿热瘀血相互胶结, 日久难愈. 如华岫云在《临证指南医案》所言: “郁则气滞, 气滞则必化热, 热郁则津液耗而不流, 升降之机失度, 必伤气分, 久延血分, 延及郁劳沉苛”[30]. 湿热之邪易于致瘀. 认识这一病理特点, 我们在清热利湿的茵陈蒿汤基础上加入具有活血的丹参, 阻止肝纤维化的进展, 提高慢性肝病的疗效.

实验表明, 茵陈蒿汤及其变方能通过减低趋化因子IP-10及其受体CXCR3的异常表达, 减轻或消除慢性肝损伤的始动因素, 是防治慢性肝

损伤重要的环节, 并且能够降低炎症因子TNF-α含量, 减小其对肝细胞的破坏作用. 在病理学改变方面, 荣肝合剂及其小方组既能保护肝细胞, 又可以减轻肝纤维化, 体现出一定的综合优势.

4 参考文献

1 王凤云, 唐旭东, 刘燕玲, 金龙, 葛争艳, 卞立群. 荣肝合剂对ConA诱导慢性免疫性肝损伤小鼠的影响. 胃肠病学与肝病学杂志 2008; 17: 492-495

2 王泰龄, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. 中华肝脏病杂志 1998; 6: 195-197

3 Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992; 90: 196-203

4 Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445

5 Zeremski M, Petrovic LM, Talal AH. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2007; 14: 675-687

6 Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 187: 129-134

7 王健, 赵金红, 江水清, 项桂菊. 丙型肝炎病毒慢性感染与IL-8、IP-10、Mig表达相关性研究. 第三军医大学学报 2006; 28: 1420-1423

8 赵金红, 王健, 江水清, 项桂菊. HBV慢性感染与CXC趋化因子表达相关性研究. 现代预防医学 2006; 33: 1068-1071

9 Mihm S, Schweyer S, Ramadori G. Expression of the chemokine IP-10 correlates with the accumulation of hepatic IFN-gamma and IL-18 mRNA in chronic hepatitis C but not in hepatitis B. *J Med Virol* 2003; 70: 562-570

10 Zhai Y, Shen XD, Hancock WW, Gao F, Qiao B, Lassman C, Belperio JA, Strieter RM, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. CXCR3+CD4+ T cells mediate innate immune function in the pathophysiology of liver ischemia/reperfusion injury. *J Immunol* 2006; 176: 6313-6322

11 Wang J,Wang P P,Xiang G J. Relationship between the ex-pression of IP-10 and IP-10 mRNA in peripheral blood and HBV DNAlevel in patients with cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 280-286

12 Diago M, Castellano G, García-Samaniego J, Pérez C, Fernández I, Romero M, Iacono OL, García-Monzón C. Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2006; 55: 374-379

13 史丽云, 张立煌, 李明伟. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞上CXCR3表达的初步观察. 细胞与分子免疫学杂志 2003; 19: 380-382

14 Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L. Intrahepat ic levels of CX-CR 3 associat ed chemokines correlat e with liver inflammat ion and f ibro-sis in chronic hepat it is C. *Hepatology* 2008; 48: 1440-1450

15 Kakimi K, Lane TE, Chisari FV, Guidotti LG. Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J Immunol* 2001; 167: 6701-6705

16 周延冲. 多肽生长因子. 北京: 中国科技出版社, 1998: 166-170

17 龚正. 慢性乙型肝炎患者血清IGF-Ⅰ、TNF-α与脂质过氧化的关系. 放射免疫学杂志 2009; 22: 365-366

18 王西栋, 张广兰. 乙型肝炎患者血清IL2、IL6、IL8和TNFα水平研究. 预防医学论坛 2008; 14: 309-310

19 Nomura M. 茵陈蒿汤和熊脱氧胆酸对α-异硫氢酸萘酯引起胆汁瘀积的协同作用. 国外医学中医中药分册 1997; 19: 40

20 Shoda J, Miura T, Utsunomiya H, Oda K, Yamamoto M, Kano M, Ikegami T, Tanaka N, Akita H, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y. Genipin enhances Mrp2 (Abcc2)-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver. *Hepatology* 2004; 39: 167-178

21 王喜军, 李廷利, 孙晖. 茵陈蒿汤及其血中移行成分6, 7二甲氧基香豆素的肝保护作用. 中国药理学通报 2004; 20: 239-240

22 Yamashiki M, Mase A, Arai I, Huang XX, Nobori T, Nishimura A, Sakaguchi S, Inoue K. Effects of the Japanese herbal medicine 'Inchinko-to' (TJ-135) on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Clin Sci* (Lond) 2000; 99: 421-431

23 Yamamoto M, Ogawa K, Morita M, Fukuda K, Komatsu Y. The herbal medicine Inchin-ko-to inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor beta 1. *Hepatology* 1996; 23: 552-559

24 陈廷玉, 卢春凤, 扈清云, 王淑香, 谭宏. 茵陈蒿汤对实验性肝纤维化大鼠肝细胞的保护作用及超微结构观察. 黑龙江医药科学 2004; 27: 11-12

25 Inao M, Mochida S, Matsui A, Eguchi Y, Yulutuz Y, Wang Y, Naiki K, Kakinuma T, Fujimori K, Nagoshi S, Fujiwara K. Japanese herbal medicine Inchin-ko-to as a therapeutic drug for liver fibrosis. *J Hepatol* 2004; 41: 584-591

26 贡瑞生, 崔苏镇, 潘函清, 马秀璟, 陈文华, 张世国. 茵陈蒿汤降血脂的药理研究. 中成药 1992; 14: 34-35

27 谢学军. 慢性肝炎中医证型NK细胞活性的研究. 浙江中医杂志 1995; 30: 38-39

28 艾军. 湿热致瘀证治浅探. 新中医 2005; 37: 83-84

29 王孟英. 王孟英医学全书. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 316

30 叶天士. 临证指南医案. 上海: 上海人民出版社, 1959: 377

编辑 李军亮 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8月18日; 20(23): 2138-2145
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

“一肝三受”动物实验的可行性

周 峻, 王 政, 李 龙, 陈芳林, 崔 龙, 谢华伟, 侯文英, 张金山, 刘树立, 明安晓, 李胜利, 王海斌

■背景资料
目前肝脏移植仍然是治疗终末期肝病最有效的手段, 但全球范围内供肝匮乏的现状严重地阻碍着肝脏移植的临床应用, 劈离式肝移植是增加供肝绝对数量的革命性方式. 此项研究尝试将一个肝脏劈离成3个供肝单位, 用犬制作动物模型来探索这一新技术的可行性.

周峻, 南京医科大学附属南京儿童医院 江苏省南京市 210008
王政, 中国人民解放军总医院小儿外科 北京市 100853
李龙, 崔龙, 侯文英, 张金山, 刘树立, 明安晓, 李胜利, 王海斌, 首都儿科研究所 北京市 100020
陈芳林, 南京医科大学附属南京儿童医院 江苏省南京市 210008
谢华伟, 中国人民解放军北京军区总医院附属八一儿童医院 北京 100070
周峻, 博士, 主要从事小儿消化道畸形诊断及治疗方面的研究.
国家“十一五”科技支撑计划基金资助项目, No. 2006BAI05A06
北京市科技计划项目基金资助项目, No. D101100050010064
作者贡献分布: 此课题由李龙与周峻设计; 动物手术由周峻、王政、李龙、陈芳林、崔龙、谢华伟、侯文英、张金山、刘树立、明安晓、李胜利及王海斌共同操作完成; 术后处理及动物尸体解剖由周峻与王政完成; 数据分析由周峻完成; 本论文写作由周峻、王政及李龙共同完成.
通讯作者: 李龙, 教授, 主任医师, 100020, 北京市朝阳区雅宝路2号, 首都儿科研究所外科. lilong23@126.com
收稿日期: 2012-05-02 修回日期: 2012-06-29
接受日期: 2012-07-20 在线出版日期: 2012-08-18

An experimental study of triple split-liver transplantation in dogs

Jun Zhou, Zheng Wang, Long Li, Fang-Lin Chen, Long Cui, Hua-Wei Xie, Wen-Ying Hou, Jin-Shan Zhang, Shu-Li Liu, An-Xiao Ming, Sheng-Li Li, Hai-Bin Wang

Jun Zhou, Department of General Surgery, Affiliated Nanjing Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Zheng Wang, Department of Pediatric Surgery, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Long Li, Long Cui, Wen-Ying Hou, Jin-Shan Zhang, Shu-Li Liu, An-Xiao Ming, Sheng-Li Li, Hai-Bin Wang, Department of Surgery, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China
Fang-Lin Chen, Department of Pharmacy, Affiliated Nanjing Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Hua-Wei Xie, Department of Urology, Bayi Children's Hospital Affiliated to General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China
Supported by: the National Key Technology R&D Program during the 11th Five-year Plan Period, No. 2006BAI05A06; and the Beijing Municipal Science and Technology Program, No. D101100050010064
Correspondence to: Long Li, Professor, Department of Surgery, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China. lilong23@126.com
Received: 2012-05-02 Revised: 2012-06-29
Accepted: 2012-07-20 Published online: 2012-08-18

■同行评议者
徐泱, 副主任医师, 上海复旦大学附属中山医院

Abstract

AIM: To explore the feasibility of a strategy of tripartition of a whole deceased liver graft for use in 3 recipients in dogs to ultimately maximize donor organ use.

METHODS: Adult healthy mongrel dogs were selected to be donors (n = 30, weighing between 20-25 kg) and recipients (n = 30, weighing between 8-15 kg). Donor/recipient pairs were randomly matched. For donor operation, transection of the parenchymal bridge was performed between the right lateral lobe and right middle lobe, and between the left middle lobe and the quadrate lobe. After *in vivo* perfusion, the left, middle and right liver grafts were procured, and their primary branches were cut near the main stem. Among the three liver grafts, the one was chosen to be implanted if it's GRWR (graft-to-recipient weight ratio) was more than 1.0% and was nearest to 1.5%. Recipients entered Groups A, B and C if the left, middle and right grafts were chosen, respectively. With the piggyback technique, the outflow orifice of liver graft was anastomosed to the anterolateral wall of the recipient vena cava. The graft was revascularized via reconstructed hepatic vein and portal vein, and then the hepatic artery and bile duct were anastomosed both in an end-to-end manner. Biliary and abdominal drainage was inspected postoperatively. Autopsies were performed promptly after recipients' death to investigate the possibility of technical complications.

RESULTS: By prominent fissures, the canine liver was divided into 7 lobes, among which the parenchymal bridges were thin. The parenchymal bridge connecting the right lateral lobe to the right middle lobe was much thinner than that connecting the left middle lobe to the quadrate lobe. No major conduit was found during transection of these two parenchymal bridges. The portal vein was split into three branches. The common bile duct was formed by the union of three hepatic ducts-the left, middle and right hepatic ducts. The hepatic vein consisted of the left, median and right hepatic veins. Anatomical variations in the hepatic arteries could be found. Among three recipient groups, the operation time, anhepatic time and blood loss did not show significant dif-

ferences ($P > 0.05$), but the mean recipient weight, liver graft weight, and GRWR differed significantly (all $P < 0.01$). In the three groups, none of the recipients died during surgery. Once the hepatic vein and the portal vein were anastomosed and declamped, the implanted liver regained its color soon and its appearance returned to normal following arterial revascularization. There was no statistical difference in survival duration among the three groups (128.3 h ± 48.5 h *vs* 102.7 h ± 59.8 h *vs* 98.7 h ± 46.8 h, $P = 0.234$). Ascites and liver necrosis were not found at autopsy. Bile was present in the bile duct and all anastomoses were patent.

CONCLUSION: Our experimental results indicate that the whole liver of a big dog can be split into three parts, every one of which can be transplanted to a small recipient as an independent allograft.

Key Words: Animal models; Partial liver graft; Split liver transplantation; Triple-split-liver transplantation

Zhou J, Wang Z, Li L, Chen FL, Cui L, Xie HW, Hou WY, Zhang JS, Liu SL, Ming AX, Li SL, Wang HB. An experimental study of triple split-liver transplantation in dogs. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2138-2145

摘要

目的: 研究1个肝脏劈离成3个供肝单位的动物实验可行性.

方法: 普通级健康犬分成供体组($n = 30$, 体质量20-25 kg)和受体组($n = 30$, 体质量8-15 kg), 供受体随机配对. 供体手术断离右外叶和右中叶、左中叶和方叶之间的2处肝组织桥, 原位灌注后将左侧区、中央区和右侧区供肝各自的一级肝蒂在近主干处切断, 移植物受体体质量比(graft-to-recipient weight ratio, GRWR)>1.0%且最接近1.5%的供肝入选为移植物, 植入左侧区、中央区和右侧区供肝的受体分别分入A组、B组和C组. 供肝背驮式植入受体, 流出口和腔静脉壁端侧吻合, 供肝一级肝蒂分别和受体门管三联的主干端端吻合. 术后观察受体腹腔及胆汁引流, 死亡后进行尸检, 移植物取标本进行病理检查.

结果: 犬肝外观呈分叶状, 深陷的叶间裂将各叶分隔开来, 各叶间由较少的肝组织桥相连接, 右外叶和右中叶间的肝桥组织较左中叶和方叶间的肝桥组织更薄更少, 2处肝桥离断时均未发现有大的血管及胆管. 门静脉主要分成左支、中支和右支; 胆总管也由左、中及右肝管三支肝管汇合而成; 肝动脉可存在变异; 肝血液经由肝左、中、右3支静脉回流. 3组供体的平均体质量、手术时间及失血量差异的比较无统计学意义. 体内劈离技术全部得以完成, 供肝无热缺血损伤. 3组受体体质量、供肝质量和GRWR之间的差异均存在显著的统计学意义(P<0.01), 但手术时间、无肝期、失血量及输血量间的差异无统计学意义(P>0.05). 3组受体中无术中死亡者, 30个供肝均成功植入, 所有血管及胆道的吻合均不需要移植物间置, 门静脉和动脉重建后均能排泌胆汁, 各组新肝均无淤血、缺血区. 3组受体存活时间分别为128.3 h±48.5 h、102.7 h±59.8 h和98.7 h±36.8 h, 各组之间的差异无统计学意义(P = 0.234). 死亡后尸检均未发现有吻合口出血、血栓等外科技术性并发症者, 移植物标本病理检查肝细胞无淤血肿胀和缺血坏死者.

结论: 此项动物实验证明: 一个大受体的肝脏能劈离成3个部分, 且每一部分都能作为独立完整的供肝移植给不同体质量的小受体.

关键词: 动物模型; 部分供肝; 劈离式肝移植; 一肝三受

周峻, 王政, 李龙, 陈芳林, 崔龙, 谢华伟, 侯文英, 张金山, 刘树立, 明安晓, 李胜利, 王海斌. “一肝三受”动物实验的可行性. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2138–2145
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2138.asp

0 引言

肝脏移植目前仍然是治疗终末期肝病的最有效手段, 但供肝匮乏的现状严重阻碍了肝脏移植的临床应用, 劈离式供肝的出现革命性地增加了供肝的绝对数量. 为了将劈离式肝移植(split liver transplantation, SLT)技术向前推进一步, 此项研究尝试将一个肝脏劈离成3个供肝单位, 用犬制作动物模型来探索这一新技术的可行性.

1 材料和方法

1.1 材料 实验于2010-09/2011-01完成, 动物全部购自中国人民解放军总医院动物实验中心, 经过体检、血常规和肝功能筛查后, 选用普通级健康犬(外科手术用杂交犬), 犬龄1-4岁, 雌雄不限, 供体组30只(体质量20-25 kg), 受体组30只(体质量8-15 kg), 供血组另设. 供、受体随机配对, 动物实验方法符合动物伦理学要求.

1.2 方法

1.2.1 实验设计及手术方法: 每次实验对一对配对的供受体进行手术, 将其安排在相邻的2个手术间内, 由供体手术组和受体手术组人员同时

■**研发前沿**

现阶段活体供肝在亚洲国家被广泛采用, 但由于伦理问题, 活体供肝肝移植注定也只能是一种临时性的、过渡性解决方案. 劈离式技术能增加供肝的绝对数量, 是现在西方国家移植中心常规采用的方法, 到目前已出现了沿着肝中静脉的劈离方式, 两半肝都可以提供给成人受体. 于是本课题组设想将一个供肝分割成3份, 以满足一个供肝3个小受体的移植需求.

■相关报道
劈离式肝移植在西方国家仍被广泛采用, 且还在改良发展, 现已出现了沿着肝中静脉的劈离方式, 两半肝都可以提供给成人受体. 甚至右后叶供肝也有早有在临床应用的报道, 经检索目前还没有一肝多受的临床报道.

开始手术, 修肝台安置于供体手术间内. 供受体犬术前均禁食24 h、禁水12 h, 用25 mg/kg硫喷妥钠静脉注射诱导麻醉后, 取平卧位, 身下置加热垫, 固定头部和四肢, 气管内插管, 麻醉机维持呼吸, 吸入异氟醚维持麻醉. 颈外静脉插管输液/输血并监测中心静脉压, 受体犬取颈外静脉一段备门腔分流用. 术中连续监测心率、氧饱和度、动脉血压、心电及肛温. 设协调员1名, 负责手术中的记录、计算及两组间进度的协调等. 在供肝完全劈离之前, 2组手术人员及协调员对供受体犬的体质量均不知情, 2组手术人员对对方的术中情况也互不知情.

1.2.2 供体手术: 取上腹部屋顶状切口进腹, 先仔细解剖肝蒂, 分离出门静脉及肝固有动脉的主要分支, 并辨认各肝胆管之间的解剖关系, 胆总管远端结扎并切断. 然后游离第二肝门, 再翻转肝脏结扎、切断所有的肝短静脉, 将肝脏从后腔静脉(相当人类的下腔静脉, 下同)上完全游离, 只保留直径>4 mm的粗大副肝静脉. 结扎起自门静脉左支供应舌状叶乳突的小分支, 切除舌状叶. 用电刀先后断离右外叶和右中叶、左中叶和方叶之间的2处肝组织桥, 断面妥善止血. 于是, 除了肝蒂相连外, 整个供体肝已经被分割为左侧区、中央区和右侧区3个部分, 每区均包含2个肝叶. 肝总动脉和门静脉主干分别插管以4 ℃的上海多器官保存液(SMO液)重力灌注, 整体取出供体肝. 最后于腹主动脉穿刺采血供受体输血用, 麻醉下放血处死.

1.2.3 修肝台: 供体手术组取出供体肝后转入修肝台组, 将供肝迅速置入混合冰屑的SMO液中, 冲洗胆道. 一般将左侧区、中央区和右侧区供肝各自的一级肝蒂分别在接近主干处切断, 得到3份独立的供肝(图1), 如遇到有2支动脉供应同一区的情况, 则将肝固有动脉保留于此区. 修剪静脉出口, 3部分分别称取质量, 此时由协调员分别计算三区供肝和受体的移植物受体体质量比(graft-to-recipient weight ratio, GRWR), GRWR>1.0%且最接近1.5%的供肝入选为移植物. 受体如果植入左侧区供肝则分入A组, 植入中央区供肝的分入B组, 植入右侧区供肝的分入C组.

1.2.4 受体手术: 解剖第一、二肝门后, 将备用的颈外静脉在门腔静脉间架桥, 建立临时性门腔分流[1]. 肝脏自后腔静脉上充分分离后整体切除(术后进行解剖), 尽量保留门静脉主干、肝固有动脉和胆总管的长度以利于吻合. 如果预备植入的是左侧区或中央区供肝, 则缝闭肝右静脉根部, 在肝左、中静脉共干的根部以下部分阻断后腔静脉, 根据供肝流出道口径大小修剪侧壁[1]; 如果准备植入右侧区供肝, 则缝闭肝左、中静脉共干, 在肝右静脉根部进行相应修整. 供肝背驮式植入, 流出口和腔静脉壁行端侧吻合, 直径>4 mm的粗大副肝静脉予以重建. 供肝门静脉支和受体门静脉主干行端端吻合后恢复新肝血流, 结扎关闭临时门腔分流, 计算自门静脉开放血流至新肝排泌胆汁的时间. 在10×手术显微镜下, 供肝的肝动脉支和受体的肝固有动脉端端吻合, 供肝的一级肝管和受体胆总管端端吻合. 腹腔引流管置于肝断面附近, 胆囊造瘘置管观察胆汁分泌情况, 彩色多普勒超声仪(GE LOGIQ Book)确认各吻合口的通畅性后关腹.

1.2.5 免疫抑制剂及术后处理: 受体术中新肝门脉血流开放前静脉注射甲基强的松龙10 mg/kg预防急性排斥反应, 术后逐渐减半量至1 mg/(kg·d)后维持. 手术当日至术后5 d, 25 mg/kg头孢呋辛钠2次/d预防感染. 术后第1-3天, 强痛定12.5 mg/12 h肌肉注射镇痛. 术后每日输注葡萄糖盐水补充液体、电解质及热量, 直至能正常进食流质. 术后注意各项监测, 观察胆汁引流和腹腔引流, 死亡后及时进行尸体解剖查找死亡原因, 并检查各吻合口通畅情况, 取移植物标本进行病理检查.

统计学处理 数据用SPSS15.0软件包进行统计学处理, 计量资料均用mean±SD表示, 3组间的多重比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA)方法(Scheffe法), 方差不齐时应用变量转换. $P<0.05$认为差异有统计学意义, $P<0.01$认为差异有显著的统计学意义.

2 结果

2.1 解剖学观察 犬肝外观呈明显的分叶状[2], 深陷的叶间裂将各叶分隔开来. 左外叶、左中叶位于脐裂的左侧, 自脐裂向右依次排列着方叶、右中叶、右外叶和尾状叶, 位于腔静脉左侧和尾状叶相连的部分是舌状叶乳突, 解剖较其他各叶更为独立, 一共7叶. 各叶之间由较少的肝组织桥相连接, 右外叶和右中叶间的肝桥组织较左中叶和方叶间的肝桥组织更薄更少, 供体组手术中2处肝桥离断时均未发现有大的血管及胆管通过. 胆囊附着于方叶和右中叶之间的胆囊床上. 在解剖和功能上, 各叶均保持着较高的独立性, 存在着专属的供应血管及引流

表 1 供体和3组受体情况统计表

	左侧区供肝(A组)	中央区供肝(B组)	右侧区供肝(C组)	*P*值
n	6	15	9	/
供体体质量(kg)	20.8 ± 0.5	22.8 ± 1.9	20.5 ± 7.8	0.411
供体手术时间(min)	242.0 ± 72.6	225.0 ± 44.7	264.0 ± 54.7	0.536
供体失血量(mL)	231.5 ± 75.1	203.0 ± 57.7	278.8 ± 45.7	0.154
供肝质量(g)	256.3 ± 28.8	176.5 ± 20.0	113.9 ± 7.2	<0.01
冷缺血时间(min)	40.9 ± 6.9	46.1 ± 10.7	48.7 ± 9.1	0.213
受体体质量(kg)	14.9 ± 0.7	12.6 ± 1.3	9.1 ± 0.8	<0.01
GRWR(%)	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.1	<0.01
受体手术时间(min)	394.0 ± 69.6	306.5 ± 55.3	330.4 ± 85.5	0.201
受体失血量(mL)	405.5 ± 105.3	437.5 ± 85.7	496.2 ± 78.8	0.096
受体输血量(mL)	336.5 ± 105.3	412.3 ± 138.9	389.7 ± 83.4	0.186
无肝期(min)	42.9 ± 3.5	39.9 ± 9.9	34.1 ± 6.4	0.140
胆汁排出时间(min)	8.8 ± 3.3	10.0 ± 5.1	12.2 ± 6.1	0.338
存活时间(h)	128.3 ± 48.5	102.7 ± 59.8	98.7 ± 36.8	0.234

■创新盘点
此研究从新的思路探索如何拓展供肝来源, 不仅从技术的可行性方面进行了论证, 还初步摸索了一肝多受的全新模式并积累了经验. 实验设计上采用了随机配对、盲法设计和自身对照, 大大减少了动物的数量, 简化了实验步骤, 但结果同样能证明结论, 同时也更加符合动物实验的伦理学要求.

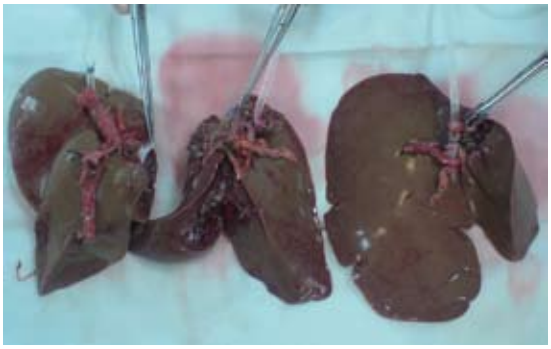


图 1 三区供肝分离后. 一个供肝的一级肝蒂在接近主干处切断, 得到右侧区、中央区和左侧区独立的三区供肝(左起), 每区均含两个肝叶(胆囊、舌状叶乳突已切除), 镊子所指处为各自的流出口.

系统. 除了舌状叶乳突的小分支外, 门静脉主要分成3大支: 左支、中支和右支, 而胆总管也由左肝管、中肝管及右肝管3支肝管汇合而成. 而肝动脉可存在变异, 30只供体犬中21只的肝左、肝中及肝右动脉各为1支, 5只无单一的肝右动脉, 右外叶及尾状叶的2支供应动脉分别起自肝固有动脉(尾状叶动脉均从门静脉后方绕过), 另外4只无肝左动脉, 左外叶及左中叶各有1支专属的动脉. 肝血液经由肝左、中、右3支静脉回流, 肝左静脉由左外叶和左中叶的两个属支汇合而成, 而肝中静脉接受方叶和右中叶的血液回流, 肝左、中静脉先形成共干后再开口于后腔静脉, 肝右静脉则收集右外叶和尾状叶的静脉血, 单独开口于后腔静脉的右侧壁. 13/30供体中存在直径>4 mm的副肝静脉, 9/30位于右侧区, 4/30位于中央区右中叶. 供肝劈离后左侧区供肝包含左外叶、左中叶, 一级肝蒂由门静脉左支、肝左动脉和左肝管组成, 流出口为肝左静脉; 中央区供肝包括方叶和右中叶, 门静脉中支、肝中动脉和中肝管构成其一级肝蒂, 肝中静脉收集静脉血液; 右侧区供肝则由右外叶及尾状叶组成, 由门静脉右支和肝右动脉营养, 静脉血经肝右静脉回流, 胆汁收集至右肝管. 经过所有供受体肝脏的解剖, 发现除了肝动脉分支存在上述变异外, 犬肝三分区的解剖特点相当恒定.

2.2 *供体情况* 各组供体的平均体质量差异无统计学意义(P = 0.411), 取供肝过程中均无严重并发症者, 3组供体的平均手术时间和失血量差异的比较结果无统计学意义(P = 0.536, P = 0.154), 体内劈离技术全部得以完成, 原位灌注避免了供肝的热缺血损伤(表1).

2.3 *供肝及受体术中情况* 供肝劈离后三区肝块GRWR>1.0%且最接近1.5%者植入, 结果6只受体犬植入左侧区供肝(A组, n = 6), 15只受体植入中央区供肝(B组, n = 15), 9只受体接受右侧区供肝(C组, n = 9). 3组受体平均体质量、供肝质量之间的差异均存在显著的统计学意义(P<0.01), 但手术时间、无肝期、失血量及输血量间的差异无统计学意义(P>0.05). 3组中无术中死亡者, 30个供肝均成功植入, 所有血管及胆道的吻合均不需要移植物间置, 经重建的门静脉恢复灌注后新肝颜色逐渐转红, 开放动脉血流后新肝呈正常红润色(图2), 排泌胆汁时间差异的比较无统计学差异(P = 0.338).

2.4 *受体术后情况* 1/A和2/B术后3 d内出现胆漏, 3/B和2/C腹腔内少量渗血, 保守治疗后好转, 均

■应用要点
此研究中一个供肝3分之后能供给3个不同体质量的小受体, 若欲提供给较大受体则必须先克服小肝综合征带来的一系列问题, 作为辅助肝移植的供肝提供给成人受体的方案也是很有应用前景的. 如果将来的器官保存研究取得重大突破, 受体手术突破器官保存时间的限制, 则一肝多受的肝移植模式将具有巨大的潜在优势.

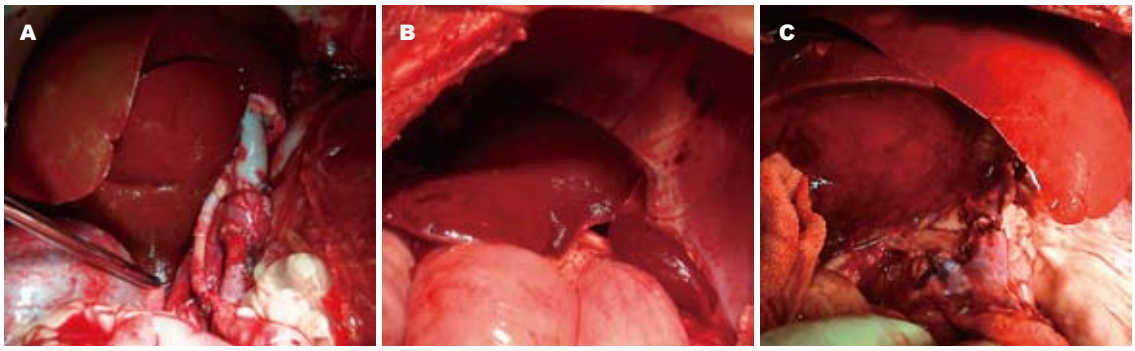


图 2 三区供肝植入后外观. 经重建的门静脉恢复灌注后，新肝颜色逐渐转红, 开放动脉血流后新肝呈正常红润色. A: 右区供肝植入后; B: 中区供肝植入后; C: 左区供肝植入后.

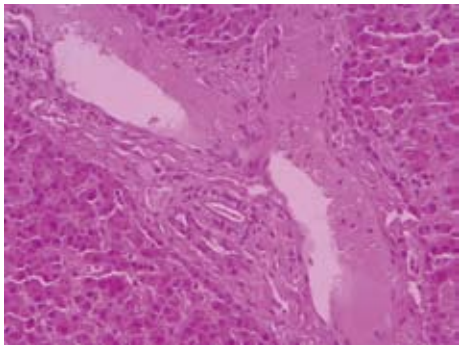


图 3 1例受体方叶肝组织病理. B组受体1例术后110 h死亡, 方叶肝组织光镜下观察(HE染色, ×200), 肝小叶结构正常, 肝细胞无坏死及淤胆, 小叶间动、静脉通畅, 小叶间胆管内可见胆汁.

非致死原因. 后48 h内死亡5只(1/B和1/A心跳骤停, 2/C肾功能衰竭, 1/B死于弥散性血管内凝血), 剩余25只均存活48 h以上, 最长存活9.8 d(死于严重肺部感染), 3组平均存活时间分别为128.3 h±48.5 h、102.7 h±59.8 h和98.7 h±36.8 h, 差异无统计学意义(P = 0.234). 死亡后尸检均未发现有死于外科技术性并发症者, 移植物标本病理检查肝细胞无淤血肿胀和缺血坏死者(图3).

3 讨论

对于终末期肝病的患者, 肝脏移植不仅是一种能够挽救生命的治疗方法, 还提供了使其长期健康存活的机会[3,4]. 但是由于全球范围内的供肝匮乏, 许多患者在等待中失去了生存的机会, 这一供需矛盾对于儿童受体更为突出[5-7]. 尽管现阶段活体供肝在亚洲国家被广泛采用, 但由于涉及到关键的伦理问题, 活体供肝肝移植注定也只能是一种临时性的、过渡性解决方案. 与之不同的是, SLT技术能增加供肝的绝对数量, 现已成为西方国家移植中心常规采用的方法, 劈离式供肝占各类型供肝总数量的比例逐年上升[8-10], 大有占领主导地位之势. 改良的SLT沿着肝圆韧带右侧0.5-1.0 cm断肝, 将供肝分割成一大一小两个部分[11,12], 能同时满足一个儿童受体和一个成人受体的需要, 同时成人和儿童患者的利益也得到了平衡. 随着外科技术的日趋进步, 现已出现了沿着肝中静脉的劈离方式, 两半肝都可以提供给成人受体[13-15]. 如此一来, 儿童受体可能得到的供肝总数无疑将会有所减少, 为了平衡儿童受体的潜在利益, 客观上要求开发出另外一种倾向于儿童受体的全新劈离技术, 于是本课题组设想将一个供肝分割成3份, 每一份供肝都能作为独立的器官用来移植, 这样1个成人供肝就可以满足3个小受体的移植需求.

肝脏外科的进步在很大程度上依赖于我们对于肝脏解剖认识的不断深入, 最初肝脏被看作是一个不成对的器官, 外科医师对很多肝脏外科疾病束手无策. 但自从Cantlie线被提出后, 左、右半肝的观念逐步被接受. 最早供肝劈离线也是沿着Cantlie线的[11,16], 经过不断改进后供肝劈离技术才逐渐成熟, 而实际上这一抽象的分界线在肝脏外观和实质内部并无解剖学标志[17]. 对肝脏的认识从一个浑然统一的整体发展到多个独立功能的肝段, 是另一个认识上的飞跃[18], 使肝脏手术有可能向更深、更细和更完善的领域发展. 在外科学和解剖学上“段”的含义是指在一个脏器内, 具有独立的功能、独立的血管供应及分泌物引流的一部分[18]. Couinaud功能性肝段8分法以及中华医学会的五叶六段法都是现在最常用的肝脏分段方法[19]. 理论上来说, 每个肝段都是一个独立的器官单位, 应该能单独分离出来, 且同时保持其解剖和功能的完整性[20], 但是目前的外科工具和技术都远远无法达到这一目标. 因此对现阶段的劈离式肝移植技术来说, 这些分段的理论尚缺乏真正的实际指导意义. 理论始终是要为实践服务的, 既然这些过于详细的肝段无法劈离出来, 那么在现有1分为2成熟劈离供肝技术

表 2 人类肝脏的三分区法

三分法	左侧区	中央区	右侧区	
人肝	左外侧叶	左内侧叶+右前叶	右后叶	尾状叶
流出道	肝左静脉	肝中静脉	肝右静脉	
一级肝蒂	左肝蒂	Glisson蒂右前支	Glisson蒂右后支	

■名词解释

劈离式肝移植: 将一个肝脏分割成两个较小的肝组织块, 两部分均作为供肝用来移植的技术; Cantlie线: 1898年Cantlie发现人的肝左右叶是对等份, 由下腔静脉左侧壁至胆囊窝中份的平面分开, 相当于肝脏的正中裂, 所以后来称此线为Rex-Cantlie线.

的基础上, 本课题组提出肝脏为一个三分器官的定义, 经反复的犬肝解剖学观察, 证实这种分区方法是相当恒定的, 根据犬肝分叶和人类肝脏分段间的对应关系[2], 按照生物发育理论推论到人类肝脏[21], 类似地, 人肝可能也能分为3个区域, 三分法见表2.

此项研究的目标是一肝三受, 要求将一个供肝分割成3个部分, 并且每个部分都能用作单独的器官, 同时满足3个受体的移植需要, 但如果这样生硬的建立动物模型, 由于器官保存时间受限, 在供体手术时就需要同时进行3台受体肝移植手术, 此外还需要一组人员修肝, 对实验条件和人员要求太高, 如此设计实验可行性较差. 本研究采用盲法设计, 实验前将供受体编号并随机配对, 所有实验人员都在对犬体质量全不知情的情况下开始实验, 而且手术时两组手术人员均对对方术中情况互不知情, 供体手术组取出供肝后转入修肝组, 将供肝完全分割成三区后分别称重, 此时再由协调员分别计算各区供肝的GRWR, 最接近1.5%的一区供肝入选作为移植物植入. 尽管这样的设计不完全是真正意义上的“一肝三用”, 但是通过供受体体质量要求、供受体随机配对及盲法的实验设计, 实验结果是每个受体均能安全接受移植手术, 且每部分供肝植入后均有足够的代谢功能, 这样的实验设计和结果, 同样也能证明3部分供肝均有作为供肝的可行性.

众所周知, 供肝质量和受体体质量的匹配必须适当, 相对受体如果供肝过大则易产生“大肝综合征”, 如果过小则相反易形成“小肝综合征”, 多项研究总结适宜的GRWR应在1.0%-4.0%之间[22,23]. 尽管以往的经验显示在活体肝移植中0.8%的GRWR也是可行的[24], 但对于劈离式肝移植, 通常认为还是应当将1.0%的GRWR作为低限值[22,23], 再考虑到劈离供肝的冷、热缺血-再灌注损伤以及供体原先的疾病对肝脏的影响, 一般将GRWR定在一个1.5%的安全值[23], 这是此次试验中我们选择供肝最适合GRWR的依据. 实际上犬肝为左大右小的质量分布, 前期实验结果显示3个区域肝块各自的质量均存在显著性差异[2], 此次实验结果是三区供肝适合3组不同体质量的受体. 而人类肝脏则为左小右大的形状, 相应地分为左侧区(左外侧叶)、中央区(左内侧叶+右前叶)、右侧区(右后叶), 由于也是左右不对称形状, 如此劈离的3部分质量也应该存在较大差异, 这样不同分区的供肝就能满足不同体质量受体的需要.

实验中, 修肝时供肝的胆总管、肝固有动脉、门静脉主干成分全部被去除, 只保留三区供肝各自的一级分支, 受体肝切除时则尽量保留肝蒂结构的长度, 由于实验的供受体均选用健康犬, 所以植入后血管、胆管吻合均无需移植物间置, 而大供体和小受体的配对设计使得各出入肝的管道吻合时口径较匹配. 将来如果临床应用, 供肝的胆总管、肝固有动脉、门静脉主干则都必须保留. 这样就可根据供肝的解剖条件和各个受体门管三联的具体情况灵活处理, 而供肝劈离前的影像学检查与评估尤其重要, 如果遇到罕见的门静脉无分支的情况绝对是劈离的反指证[25]. 由于门管三联各自一级分支的肝外部分长度不同, 传统的供体肝劈离一般是将胆总管及门静脉主干保留于右侧供肝, 而肝固有动脉多留在左侧供肝[25]. 若将来“一肝三受”实际临床应用, 儿童受体大多数是胆道闭锁的患儿, 供肝植入后都要进行肝管空肠吻合, 而且为了保护新肝肝管血供, 肝管切断平面还要求靠近肝实质, 所以肝胆管分配应该比较容易. 即使碰到少见的右后支肝管汇入左肝管的情形(6%)[26], 只要断肝前准确判断出变异, 劈肝后右侧区供肝断面上仍可保留有肝管开口. 肝动脉的吻合方面, 目前已是常规应用显微血管吻合技术, 所以也无需一定要求腹腔干袖片的动脉重建. 儿童受体大多数是婴幼儿, 从供肝流出口到门静脉断端之间的距离往往大于受体这两者之间的距离, 故要特别注意吻合后的门静脉容易产生过长、扭曲的问题[27], 而不用担心两断端的长度不够. 因此, 总的说来临床“一肝三受”中肝蒂的分配可能冲突不大. 动物实验中,

■同行评价
供肝短缺是肝移植手术中面对的主要问题, 探索供体肝新的来源已成为目前肝移植领域的重要课题之一. 该文对拓展劈离式肝移植的应用范围进行了较为可贵的术前探索, 虽然与临床应用仍有一定的距离, 但仍然值得鼓励.

由于肝动脉变异较多, 遇到左侧区或右侧区有两支动脉供应的情况, 在修肝台时就将肝固有动脉保留于此区, 保证各区供肝植入时始终只需对单一动脉进行吻合, 从而减少了操作和吻合后动脉血栓形成的几率.

另外一个值得关注的问题是肝后腔静脉的处理, 实验中采用的是背驮式肝移植方式, 在供体手术时即将供肝从腔静脉上完全游离, 提供的三区供肝中均不包含有腔静脉的成分, 这样做的目的是利用供体良好的凝血功能防止新肝植入后分离面麻烦的渗血. 实际上, 腔静脉随整肝同时取下将会大大减少供体的手术时间, 对于脑死亡供体体内其他脏器的获取也会更为有利. 将第三肝门解剖的时机放在第一、二肝门之后也是基于考虑: 如果脑死亡供体的循环状态突然发生变化, 则可将原位劈离迅速转换成快速多器官切取程序, 把供肝和腔静脉一起快速取出. 临床应用时, 肝后腔静脉的保留也会使供肝流出口的重建方式变得更加灵活[28], 尤其是右侧区供肝存在有粗大的右副肝静脉[29,30], 这种情况下腔静脉壁可制作成相应的袖片, 如此重建的流出道更有利于血液回流. 现在已知, 一个小体积的肝移植物很难承受相对高流量的入肝血流和低流量的离肝血流, 由此产生的流出道相对梗阻会导致移植肝功能不全[31,32], 因此临床中常常需要保留供肝上直径>5 mm的副肝静脉[33,34]. 为了避免供肝瘀血, 实验中对于含粗大副肝静脉的供肝(直径>4 mm), 采用单独重建的方式.

在前期实验成功制作中叶供肝肝移植动物模型的基础上[2], 此次实验我们更进一步对一个供肝分割成三份独立供肝的新劈离技术进行了尝试, 并对“一供三受”肝移植的全新模式也进行了一些初步的探索和经验积累. 经过体内原位劈离, 大供体的肝脏被分割成3个独立完好的小供肝, 但保持肝蒂结构相连. 未来实际应用时, 肝蒂的分割也应该在修肝时进行, 根据3个受体的不同情况做相应处理. 例如, 供肝修整后, 根据第一个受体的体质量先确定适合植入哪一区供肝, 然后再根据供肝肝蒂具体情况及受体门管三联的条件决定供肝肝蒂的第一次分配, 先分离出一区供肝后, 剩下的2个供肝肝块则再按照第二、三个受体的相应情况做适当的处理, 再次分配余下的门管三联结构, 事实上胆总管、肝固有动脉及门静脉主干可以保留于任意一区, 只需将其他区供肝一级结构切断后的开口缝闭即可. 由于犬肝分叶明显的解剖特点, 分区恒定, 容易分割, 而实际人肝一级肝蒂结构可能存在一些变异类型, 劈离前必须进行细致的影像学评价. 一个供肝三分之后能供给3个不同体质量的小受体, 若欲提供给较大受体则必须先克服小肝综合征带来的一系列问题, 作为辅助肝移植的供肝提供给成人受体的方案也是很有应用前景的. 设想若将来的器官保存研究取得重大突破, 受体手术突破器官保存时间的限制[35], 则一肝多受的肝移植模式将具有巨大的潜在优势.

此项动物实验的研究证明: 一个大受体的肝脏能劈离成3个部分, 且每一部分都能作为独立完整的供肝移植给不同体质量的小受体.

志谢: 感谢中国人民解放军总医院实验动物中心提供的动物手术设施.

4 参考文献

1 周峻, 王政, 李龙, 侯文英, 谢华伟, 崔龙, 王文晓, 张金山, 刘树立, 李胜利, 明安晓. 临时性门腔静脉架桥联合流出道改良重建方法在部分供肝肝移植中应用的实验研究. 临床小儿外科杂 2011; 10: 180-184
2 周峻, 王政, 李龙, 谢华伟, 崔龙, 侯文英, 王文晓, 张金山, 李胜利, 刘树立, 明安晓. 中叶供肝肝移植可行性的动物实验研究. 中国普通外科杂志 2012; 21: 23-29
3 陈知水, 王海灏. 中国肝癌肝移植的现状与展望. 世界华人消化杂志 2006; 14: 939-941
4 肖朝辉, 张培瑞, 余灵祥, 常伟华, 胡雄伟, 孙颖哲, 李志伟. 原发性肝癌肝移植135例. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2072-2075
5 McDiarmid SV, Anand R, Martz K, Millis MJ, Mazariegos G. A multivariate analysis of pre-, peri-, and post-transplant factors affecting outcome after pediatric liver transplantation. *Ann Surg* 2011; 254: 145-154
6 Karnsakul W, Intihar P, Konewko R, Roy A, Colombani PM, Lau H, Schwarz KB. Living donor liver transplantation in children: A single North American center experience over two decades. *Pediatr Transplant* 2012; 16: 486-495
7 Emre S, Umman V, Cimsit B, Rosencrantz R. Current concepts in pediatric liver transplantation. *Mt Sinai J Med* 2012; 79: 199-213
8 Mallik M, Callaghan CJ, Hope M, Gibbs P, Davies S, Gimson AE, Griffiths WJ, Pettigrew GJ. Comparison of liver transplantation outcomes from adult split liver and circulatory death donors. *Br J Surg* 2012; 99: 839-847
9 Vagefi PA, Parekh J, Ascher NL, Roberts JP, Freise CE. Outcomes with split liver transplantation in 106 recipients: the University of California, San Francisco, experience from 1993 to 2010. *Arch Surg* 2011; 146: 1052-1059
10 Lee WC, Lee CS, Soong RS, Lee CF, Wu TJ, Chou HS, Chan KM. Split liver transplantation in adults: preoperative estimation of the weight of right and left hemiliver grafts. *Liver Transpl* 2011; 17: 93-94
11 Nesher E, Island E, Tryphonopoulos P, Moon J, Nishida S, Selvaggi G, Tekin A, Levi DM, Tzakis A. Split liver transplantation. *Transplant Proc* 2011; 43:

1736-1741
12 Hong JC, Yersiz H, Busuttil RW. Where are we today in split liver transplantation? *Curr Opin Organ Transplant* 2011; 16: 269-273
13 Cescon M, Grazi GL, Ravaioli M, Ercolani G, Del Gaudio M, Vivarelli M, Cucchetti A, Zanello M, Vetrone G, Lauro A, Pinna AD. Conventional split liver transplantation for two adult recipients: a recent experience in a single European center. *Transplantation* 2009; 88: 1117-1122
14 Quintini C, Aucejo F, Miller CM. Split liver transplantation: Will it ever yield grafts for two adults? *Liver Transpl* 2008; 14: 919-922
15 Zambelli M, Andorno E, De Carlis L, Rossi G, Cillo U, De Feo T, Carobbio A, Giacomoni A, Bottino G, Colledan M. Full-Right-Full-Left Split Liver Transplantation: The Retrospective Analysis of an Early Multicenter Experience Including Graft Sharing. *Am J Transplant* 2012 May 11. *[Epub ahead of print]*
16 Emre S, Umman V. Split liver transplantation: an overview. *Transplant Proc* 2011; 43: 884-887
17 L.H. Blumgart, Historical Perspective. In: Blumgart, Surgery of the Liver, Biliary Tract, and Pancreas, 4th ed, Philadelphia: Saunders, 2006: 72-82
18 黄志强, 黄晓强. 肝脏外科手术学. 第2版. 北京: 人民军医出版社, 2007: 1-4
19 杨镇. 肝脏外科学图解. 上海: 上海科学技术出版, 2009: 9-13
20 沈柏用, 施源. 肝脏分段解剖的新认识. 世界华人消化杂志 2008; 16: 913-918
21 韩德恩, 宿华威, 李玉兰. 人肝脏劈离的解剖实验研究. 中华器官移植杂志 2003; 24: 21-23
22 Frühauf NR, Malagó M, Frilling A, Beckebaum S, Broelsch CE. Latest development in split liver transplantation. *Surg Technol Int* 2004; 13: 183-189
23 Heaton N. Small-for-size liver syndrome after auxiliary and split liver transplantation: donor selection. *Liver Transpl* 2003; 9: S26-S28
24 Selzner M, Kashfi A, Cattral MS, Selzner N, Greig PD, Lilly L, McGilvray ID, Therapondos G, Adcock LE, Ghanekar A, Levy GA, Renner EL, Grant DR. A graft to body weight ratio less than 0.8 does not exclude adult-to-adult right-lobe living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 1776-1782
25 Busuttil RW, Goss JA. Split liver transplantation. *Ann Surg* 1999; 229: 313-321
26 黄志强, 黄晓强, 宋青. 黄志强胆道外科手术学. 北京: 人民军医出版社, 2010: 27-30
27 Kasahara M, Kiuchi T, Haga H, Uemoto S, Uryuhara K, Fujimoto Y, Ogura Y, Oike F, Yokoi A, Kaihara S, Egawa H, Tanaka K. Monosegmental living-donor liver transplantation for infantile hepatic hemangioendothelioma. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 1108-1111
28 Quintini C, Miller CM, Hashimoto K, Philip D, Uso TD, Aucejo F, Kelly D, Winans C, Eghtesad B, Vogt D, Fung J. Side-to-side cavocavostomy with an endovascular stapler: Rescue technique for severe hepatic vein and/or inferior vena cava outflow obstruction after liver transplantation using the piggyback technique. *Liver Transpl* 2009; 15: 49-53
29 Dulundu E, Sugawara Y, Kaneko J, Kishi Y, Akamatsu N, Matsui Y, Kokudo N, Makuuchi M. Short hepatic vein reconstruction in biliary atresia patients with absent inferior vena cava. *Clin Transplant* 2007; 21: 13-17
30 Humar A, Khwaja K, Sielaff TD, Lake JR, Payne WD. Split-liver transplants for two adult recipients: technique of preservation of the vena cava with the right lobe graft. *Liver Transpl* 2004; 10: 153-155
31 Goralczyk AD, Obed A, Beham A, Tsui TY, Lorf T. Posterior cavoplasty: a new approach to avoid venous outflow obstruction and symptoms for small-for-size syndrome in right lobe living donor liver transplantation. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396: 389-395
32 Lei JY, Wang WT, Yan LN. Risk Factors of SFSS in Adult-to-Adult Living Donor Liver Transplantation Using the Right Liver: A Single-Center Analysis of 217 Cases. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 1491-1497
33 Kiuchi T, Tanaka K, Ito T, Oike F, Ogura Y, Fujimoto Y, Ogawa K. Small-for-size graft in living donor liver transplantation: how far should we go? *Liver Transpl* 2003; 9: S29-S35
34 Humar A, Khwaja K, Sielaff TD, Lake JR, Payne WD. Technique of split-liver transplant for two adult recipients. *Liver Transpl* 2002; 8: 725-729
35 卢思聪, 吕凌, 张峰. 移植肝的保存. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2805-2808

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》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8月18日; 20(23): 2146-2150
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

针刺足少阳胆经穴对功能性消化不良患者脑葡萄代谢的影响

曾 芳, 兰 蕾, 刘迈兰, 卢圣峰, 唐 勇, 刘旭光, 梁繁荣

■背景资料
有研究证实, 针刺足少阳胆经穴能显著改善功能性消化不良(FD)患者症状, 以边缘系统为主的中枢神经系统功能异常可能是FD的重要病理特征. 因此, 本研究通过正电子发射计算机断层扫描(PET-CT)技术, 探讨针刺足少阳胆经穴对FD的治疗效应是否与调控边缘系统异常有关.

曾芳, 兰蕾, 刘迈兰, 唐勇, 刘旭光, 梁繁荣, 成都中医药大学针灸推拿学院 四川省成都市 610075
卢圣峰, 南京中医药大学针灸推拿学院 江苏省南京市 210046
曾芳, 博士, 副教授, 主要从事针刺治疗功能性胃肠病的中枢响应机制研究.
国家重点基础研究发展计划"973"基金资助项目, No. 2012CB518501
国家自然科学基金资助项目, No. 81001504
作者贡献分布: 主要实验、数据分析和文章起草由曾芳完成; 病例选择和临床资料整理由兰蕾、刘迈兰、卢圣峰及唐勇完成; 影像操作由刘旭光完成; 课题设计、质量控制和文章审阅由梁繁荣完成.
通讯作者: 梁繁荣, 教授, 610075, 四川省成都市十二桥路37号, 成都中医药大学针灸推拿学院. acuresearch@126.com
电话: 028-6180006
收稿日期: 2012-04-24 修回日期: 2012-06-29
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Cerebral responses to acupuncture at acupoints of gallbladder meridian in patients with functional dyspepsia

Fang Zeng, Lei Lan, Mai-Lan Liu, Sheng-Feng Lu, Yong Tang, Xu-Guang Liu, Fan-Rong Liang

Fang Zeng, Lei Lan, Mai-Lan Liu, Yong Tang, Xu-Guang Liu, Fan-Rong Liang, School of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China
Sheng-Feng Lu, School of Acupuncture and Tuina, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangshu Province, China
Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2012CB518501; and the National Natural Science Foundation of China, No. 81001504
Correspondence to: Fan-Rong Liang, Professor, School of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 37 Shierqiao Road, Chengdu 610075, Sichuan Province, China. acuresearch@126.com
Received: 2012-04-24 Revised: 2012-06-29
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To explore the central mechanism of therapeutic effect of acupuncture on functional dyspepsia (FD) by investigating cerebral responses to acupuncture treatment in FD patients.

METHODS: Ten FD patients were enrolled in this study. PET-CT scan was performed on each patient at baseline and after electro-acupuncture treatment. The nepean dyspepsia index (NDI) was used to evaluate the therapeutic effects of acupuncture treatment. Statistical Parametric Mapping 5.0 was used to analyze changes in cerebral glucose metabolism elicited by acupuncture treatment.

RESULTS: After electro-acupuncture treatment, the NDI symptom scores were significantly decreased (32.30 ± 13.17 *vs* 52.10 ± 14.69, $P < 0.05$) and the NDI quality of life scores were increased (88.57 ± 11.59 *vs* 75.45 ± 17.52, $P < 0.05$) in FD patients. Glucose metabolism in the bilateral cerebellum, anterior cingulate cortex, hippocampus and para-hippocampus, and left insula was significantly decreased ($P < 0.005$, uncorrected).

CONCLUSION: Acupuncture treatment improved the symptoms of FD patients. The therapeutic effect of acupuncture treatment for FD might be associated with regulating the cerebral activities of the regions in the limbic system, especially the cerebellum, anterior cingulate cortex, and insula.

Key Words: Acupuncture; Functional dyspepsia; Central mechanism

Zeng F, Lan L, Liu ML, Lu SF, Tang Y, Liu XG, Liang FR. Cerebral responses to acupuncture at acupoints of gallbladder meridian in patients with functional dyspepsia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2146-2150

摘要

目的: 观察针刺对功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)患者脑功能的影响, 探讨针刺治疗FD的中枢机制.

方法: 以肝郁型FD患者为研究对象, 以正电子发射计算机断层扫描技术为研究手段, 以疏肝解郁常用的足少阳胆经穴为电针刺激点, 观察针刺治疗FD患者的临床疗效及针刺前后患者脑葡萄糖代谢的变化. 采用尼平消化不良指数(nepean dyspepsia index, NDI)评价针刺治疗效

■同行评议者
王富春, 教授, 长春中医药大学

应, 采用统计参数图软件分析针刺治疗前后患者脑功能的变化.

结果: 与治疗前相比, 针刺治疗后患者NDI症状积分显著减低(32.30±13.17 *vs* 52.10±14.69), NDI生活质量评分显著增高(88.57±11.59 *vs* 75.45±17.52, $P<0.05$); 患者双侧小脑、前扣带回、海马、海马旁回以及左侧脑岛等边缘系统脑区的葡萄糖代谢显著降低($P<0.005$).

结论: 针刺足少阳胆经穴可以有效改善肝郁型FD患者临床症状, 其治疗效应的发挥可能与改善FD患者边缘系统为主脑功能活动异常, 调节与病情相关的脑岛、前扣带回和小脑功能有关.

关键词: 针刺; 功能性消化不良; 中枢机制

曾芳, 兰蕾, 刘迈兰, 卢圣峰, 唐勇, 刘旭光, 梁繁荣. 针刺足少阳胆经穴对功能性消化不良患者脑葡萄代谢的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2146-2150
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2146.asp

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是一种以非器质性、代谢性疾病引起的长期、持续的餐后饱胀不适、早饱、上腹部疼痛和上腹部烧灼感为主要特征的临床常见消化系疾病. 目前, FD以其高发病率[1]、高社会经济负担[2]和对生活质量的显著影响[3]而成为重要的社会公共卫生问题. 针刺治疗FD疗效确切. 大量的古代文献记载表明针灸治疗FD相关症状历史悠久且安全有效. 现代的临床研究也证实了针刺治疗FD的有效性. 课题组前期开展的多中心、大样本、临床随机对照研究显示[4], 针刺足少阳胆经穴能显著改善FD患者症状、提高患者生活质量, 且其疗效优于非经非穴组和西药对照组. 但针刺足少阳胆经穴治疗FD的中枢机理尚不清晰. 近年来的神经影像学研究显示, 以边缘系统为主的中枢神经系统功能异常可能是FD的重要病理特征[5-7]. 我们前期的研究也证实, FD患者以边缘系统为主的多个脑区葡萄糖代谢显著增高[8]. 那么, 针刺足少阳胆经穴对FD的治疗效应是否与降低边缘系统异常增高的葡萄糖代谢、调节中枢神经系统功能有关? 因此, 本研究以肝郁气滞型FD患者为研究对象, 正电子发射计算机断层扫描(positron emission tomography-computed tomography, PET-CT)为研究手段, 观察针刺足少阳胆经穴对FD患者脑葡萄糖代谢的影响, 探讨针刺足少阳胆经穴治疗FD的中枢机制, 为针刺治疗FD的临床运用提供可视化的试验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究共纳入FD患者10例, 均来自成都中医药大学附属医院消化内科门诊. 患者纳入标准包括: 符合FD罗马Ⅲ诊断标准者; 中医辨证属于肝郁气滞型者; 右利手, 20岁≤年龄≤30岁者; 在进入研究前至少15 d内未服用过任何胃肠促动力药, 未参加其他临床研究者; 签署知情同意书, 自愿参加本项研究者. 排除标准包括: 合并心血管、肝、肾、消化、造血系统等严重原发性疾病者; 伴有严重痛经症状的女性患者; 伴有头痛、偏头痛及头部外伤史者; 孕妇及哺乳期妇女. PET-CT扫描仪采用西门子公司生产Biograph DUO BGO型扫描仪; 示踪剂为氟18脱氧葡萄糖(fluorine-18 fluorodeoxyglucose, 18F-FDG), 由MINItrace回旋加速器生产, 化学纯>95%, 放化纯>95%, pH 6.0, 无色透明, 无菌无热源; 针灸针采用苏州医疗用品有限公司生产的华佗牌一次性针灸针: 电针仪采用南京济生医疗科技有限公司生产的LH200韩氏穴位神经刺激仪(HANS).

1.2 方法

1.2.1 针刺治疗及疗效评价: 患者每天接受1次电针治疗, 5次为1疗程, 疗程之间间隔2 d, 连续治疗4个疗程, 共20次. 穴位包括足少阳胆经原穴丘墟、络穴光明、合穴(下合穴)阳陵泉和郄穴外丘. 上述穴位针刺得气后, 连接电针仪, 取疏密波, 频率2 Hz/100 Hz, 电流强度在0.1-1.0 mA, 以患者耐受为度, 定时为30 min. 针刺治疗前后采用尼平消化不良指数(nepean dyspepsia index, NDI)症状评分和NDI生活质量评分评价针刺疗效, 以焦虑自评量表(self-rating anxiety scale, SAS)和抑郁自评量表(self-rating depression scale, SDS)评价患者情绪状态的变化.

1.2.2 PET-CT扫描: 患者于针刺治疗前和针刺治疗后分别进行PET-CT扫描. 扫描流程为: 患者禁食6 h以上、封闭视听平静休息40 min后进入扫描室. 继续封闭视听平卧于检查床, 头放于头托内, 保持舒适位置, 切无偏转, 眶耳线(orbito meatal line, OML)与地面垂直. 先同机进行CT扫描, 再同机进行PET扫描. CT扫描参数: 电压: 120 kV; 电流: 200 mAs; 矩阵: 128×128, 放大2倍; 层厚: 3 mm, 层间间距: 1.5 mm. PET扫描参数: 扫描模式: 3D扫描, 1

■研发前沿
针刺治疗FD疗效确切, 但其中枢作用机制尚不清楚. 目前运用多种神经影像学技术进行研究已成为针刺研究的热点之一.

■相关报道
已有的影像学研究证实, 针刺可能是通过抑制默认脑功能网络(包括边缘系统), 激活躯体感觉皮层来发挥调节作用. 然而, 不同疾病具有不同的中枢响应特征. 目前, 针刺影像学研究的疾病主要集中在疼痛、功能性疾病、情绪认知障碍等.

■**创新盘点**
本文选取针刺治疗FD疗效确切的1组足少阳胆经穴, 而不是单纯针刺单一穴位, 研究设计更贴近临床, 结果更能充分体现针灸临床疗效的中枢机制.

表 1 针刺对FD患者症状及情绪状况的影响 (mean ± SD)

评分项目	治疗前	治疗后	统计值	*P*值
NDI				
症状	52.10 ± 14.69	32.30 ± 13.17	9.933	0.000
生活质量	75.45 ± 17.52	88.57 ± 11.59	−3.315	0.009
SAS	40.88 ± 9.47	33.73 ± 6.89	2.842	0.019
SDS	40.38 ± 9.07	33.25 ± 5.14	3.022	0.014

表 2 针刺治疗后FD患者脑葡萄糖降低的区域

脑区	Talairach坐标			*t* 值	Brodmman Area分区
	X	Y	Z		
小脑					
左	−18	−30	−15	6.11	
右	20	−46	−18	8.51	
前扣带回					
左	−2	29	−6	8.18	BA24
右	2	33	0	10.5	BA24
海马旁回					
左	−33	35	−4	8.21	BA37
右	28	−45	−10	4.91	BA37
梭状回					
左	−40	−15	−23	5.58	BA37
右	36	−47	−11	4.71	BA37
脑岛					
左	−32	23	3	5.49	BA13
海马					
左	−30	−26	−7	7.76	
右	30	−37	2	7.15	
颞极					
左	−48	8	−29	6.94	BA21
右	59	7	−5	6.81	BA38
楔前叶					
左	−6	−58	61	7.08	BA7
右	7	−59	53	5.13	BA7

个床位; 扫描时间: 8-10 min; 总计数: 3×10^8.

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件对患者针刺前后临床数据进行分析. 采用统计参数图软件(statistical parametric mapping 5.0, SPM5)对PET-CT数据进行分析, 统计检验采用配对*t*检验, *P*值设置为0.005, 连续20个激活像素定义为激活区, 将FD患者针刺前后的PET图像进行对比后得到针刺后FD患者的脑葡萄糖代谢变化情况, 用Talairach坐标图和Mni-Space utility软件对所得代谢变化的脑区进行神经解剖定位.

2 结果

2.1 针刺临床疗效观察 针刺治疗后, FD患者NDI症状评分较治疗前显著降低, NDI生活质量评分则显著增高($P<0.05$); 针刺治疗后, FD患者SAS评分和SDS评分均较治疗前显著降低($P<0.05$, 表1).

2.2 针刺对患者葡萄糖代谢的影响 针刺治疗后, FD患者双侧小脑、前扣带回(anterior cingulate cortex , ACC, BA24)、海马、海马旁回(BA37)、梭状回(BA37)、颞极(BA21、BA38)、楔前叶(BA7), 左侧脑岛(BA13)葡萄糖代谢显著降低($P<0.005$, 表2, 图1).

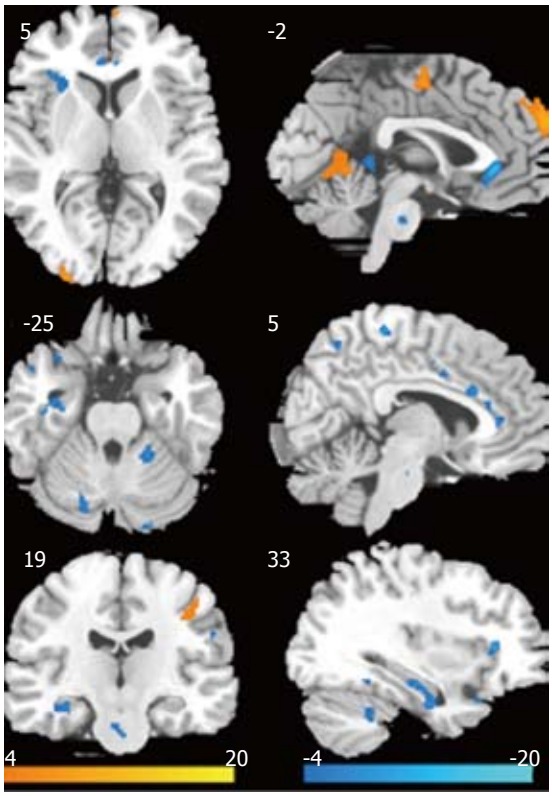


图 1 针刺治疗后FD患者脑葡萄糖降低的区域.

3 讨论

祖国医学虽无“功能性消化不良”这一病名, 但根据FD的临床症状及发病特点, 2001年中华中医药学会内科脾胃病专业委员会通过的《功能性消化不良中医诊治规范(草案)》确定FD对应的中医病名为“胃脘痛”和“痞满”. 中医认为FD病位在胃, 涉及肝脾. 病因多与饮食不节或情志失调等有关, 治疗多从健脾、和胃、疏肝、理气着眼, 针灸取穴多依据辩证结果, 如脾胃失和者多取以足阳明胃经、足太阴脾经穴, 肝郁气滞者多取足少阳胆经穴为主等. 西医认为FD的发病主要与胃肠动力障碍、胃容受性损伤、内脏高敏感、幽门螺旋杆菌感染以及心理因素等有

■**应用要点**
本文从疗效有效的针刺选穴入手, 观察针刺足少阳胆经穴对FD患者脑葡萄糖代谢的影响, 探讨针刺足少阳胆经穴治疗FD的中枢机制, 可为针刺治疗FD的临床运用提供可视化的试验依据.

关[9]. 而近年来, 越来愈多的证据表明, 以边缘系统为主的中枢神经系统的功能异常在包括FD在内的功能性胃肠病(functional gastrointestinal diseases, FGID)的发病中扮演着重要的角色[10]. Vandenberghe等[5]利用H_2O^{15}-PET技术观察发现: 在相同的胃近端疼痛性球囊扩张下, FD患者与健康受试者相比, 出现了脑岛、额下回、小脑、丘脑以及颞下回的显著激活. 提示以边缘系统为主的中枢神经系对FD患者内脏疼痛信号的处理有别于健康人. Van Oudenhove等[6]也证实内脏高敏感FD患者中枢神经系统对胃胀刺激及假刺激的处理异于健康受试者. 在前期的研究中[8], 我们利用18F-FDG PET-CT技术, 对比观察FD患者与健康受试者静息态脑功能活动的差异, 结果显示: 与健康受试者相比, FD患者静息状态下脑葡萄糖代谢显著增高, 呈现出以边缘系统脑区为主的多个脑区的功能异常. 其中, FD患者双侧丘脑、ACC、中扣带回(middle cingulate cortex, MCC)、脑岛和小脑葡萄糖代谢的异常增高与患者病情的严重程度显著相关; 且与病情较轻FD患者相比, 病情较重FD患者双侧丘脑、ACC、MCC、脑岛和小脑的葡萄糖代谢显著增高. 因而认为丘脑、ACC、MCC、脑岛和小脑可能是与FD病情密切相关的核心脑区.

边缘系统对内脏活动有极为重要的调节作用, 素有“内脏脑”之称. 他除通过下行纤维影响内脏活动外, 还可以通过下丘脑-垂体的神经体液途径影响内脏活动, 在调节胃肠道感觉和运动功能中, 边缘系统发挥着重要的作用, 尤其以扣带回、脑岛、丘脑、下丘脑对消化系的影响最为显著[11,12]. 本研究中, 针刺足少阳胆经穴可以降低FD患者异常增高的脑葡萄糖代谢, 减低的区域包括双侧小脑、ACC、海马、海马旁回、梭状回、颞极、楔前叶和左侧脑岛. 上述区域大多属于边缘系统. 其中, 小脑、ACC和脑岛在我们前期研究中被认为是与FD病情密切相关的核心脑区. 脑岛是重要的“内感受皮层”(interoceptive cortex), 属于边缘系统的一部分. 他通过接收来自丘脑、孤束核、杏仁核和ACC的躯体和内脏传入纤维, 从而将内脏和情绪信息进行整合. 脑岛的传出纤维则主要到达杏仁核、下丘脑、前额叶(prefrontal cortex, PFC)、ACC以及脑干等区域. 这种解剖上的密切联系进一步证实了脑岛是内脏自主活动的高级整合中枢[13-15]. 事实上, 几乎所有关于FGID的影像学研究中都可以看到脑岛的激活[16]. 在本研究中, 针刺足少阳胆经穴可以显著降低FD患者脑岛异常增高的葡萄糖代谢, 这可能与针刺改善患者的消化不良症状有关.

扣带回是边缘系统的重要组成部分, 其中ACC与脑岛、PFC等边缘系统脑区和其他皮质下结构有着非常密切的联系, 被认为与疼痛、应激和FGID密切相关. 多项研究证实ACC是一个处理胃肠道信号的重要脑区[17], ACC的激活也几乎在所有FGID的神经影像学研究中都可以看到[16]. 同时, 神经电生理研究也证实ACC与胃肠调节关系密切. 如研究者发现, 刺激猴的ACC, 可以使幽门部运动及张力受到抑制, 切断迷走神经后抑制反应消失[18]. 此外, ACC在情绪调节中也具有重要的作用. 在本研究中, 针刺足少阳胆经穴可以显著降低FD患者ACC异常增高的葡萄糖代谢, 这可能与针刺改善患者消化不良症状和调节患者情绪异常有关.

小脑与大脑皮层和邻近的中脑区域有着极其复杂的传入、传出神经联系, 因而在调节内脏活动、高级认知功能和情绪行为等方面发挥着重要的作用. 电刺激小脑可影响内脏功能, 出现血压、排便及胃肠蠕动的变化[19]. IBS患者在直肠刺激下[20]、FD患者在疼痛性胃近端刺激时[5], 小脑半球都显著激活. 这些研究都提示小脑异常激活可能与FGID的病机有关. 在本研究中, 针刺足少阳胆经穴可以显著降低FD患者小脑异常增高的葡萄糖代谢, 这可能与针刺改善患者消化不良症状和改善患者自我内省意识有关.

总之, 针刺足少阳胆经穴可以有效改善肝郁型FD患者临床症状、提高患者生活质量, 改善患者情绪状态. 针刺足少阳胆经穴对肝郁型FD的治疗效应可能与改善FD患者边缘系统为主脑功能活动异常, 调节与病情相关的脑岛、ACC和小脑功能有关.

■名词解释

正电子发射计算机断层扫描(PET-CT): 目前应用较广泛的神经影像学技术之一, 主要是通过注射示踪显影剂观察特定部位的葡萄糖代谢, 进而反映其功能影像学的变化.

4 参考文献

1 Ghoshal UC, Singh R, Chang FY, Hou X, Wong BC, Kachintorn U. Epidemiology of uninvestigated and functional dyspepsia in Asia: facts and fiction. *J Neurogastroenterol Motil* 2011; 17: 235-244

2 Brook RA, Kleinman NL, Choung RS, Melkonian AK, Smeeding JE, Talley NJ. Functional dyspepsia impacts absenteeism and direct and indirect costs. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 498-503

3 Chang JY, Locke GR, McNally MA, Halder SL, Schleck CD, Zinsmeister AR, Talley NJ. Impact of functional gastrointestinal disorders on survival in the community. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 822-832

4 Ma TT, Yu SY, Li Y, Liang FR, Tian XP, Zheng H, Yan J, Sun GJ, Chang XR, Zhao L, Wu X, Zeng F.

■同行评价
本文通过观察针刺对功能性消化不良患者脑功能的影响，从一个侧面提示了针刺治疗FD的中枢机制，实验设计比较完善，采用的观察方法也比较先进，学术价值较高.

Randomised clinical trial: an assessment of acupuncture on specific meridian or specific acupoint vs. sham acupuncture for treating functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 552-561
5 Vandenberghe J, Dupont P, Van Oudenhove L, Bormans G, Demyttenaere K, Fischler B, Geeraerts B, Janssens J, Tack J. Regional cerebral blood flow during gastric balloon distention in functional dyspepsia. *Gastroenterology* 2007; 132: 1684-1693
6 Van Oudenhove L, Vandenberghe J, Dupont P, Geeraerts B, Vos R, Dirix S, Van Laere K, Bormans G, Vanderghinste D, Demyttenaere K, Fischler B, Tack J. Regional brain activity in functional dyspepsia: a H(2)(15)O-PET study on the role of gastric sensitivity and abuse history. *Gastroenterology* 2010; 139: 36-47
7 Van Oudenhove L, Vandenberghe J, Dupont P, Geeraerts B, Vos R, Dirix S, Bormans G, Vanderghinste D, Van Laere K, Demyttenaere K, Fischler B, Tack J. Abnormal regional brain activity during rest and (anticipated) gastric distension in functional dyspepsia and the role of anxiety: a H(2)(15)O-PET study. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 913-924
8 Zeng F, Qin W, Liang F, Liu J, Tang Y, Liu X, Yuan K, Yu S, Song W, Liu M, Lan L, Gao X, Liu Y, Tian J. Abnormal resting brain activity in patients with functional dyspepsia is related to symptom severity. *Gastroenterology* 2011; 141: 499-506
9 Brun R, Kuo B. Functional dyspepsia. *Therap Adv Gastroenterol* 2010; 3: 145-164
10 Ringel Y. New directions in brain imaging research in functional gastrointestinal disorders. *Dig Dis* 2006; 24: 278-285
11 Baklavadzhian OG, Nersesian LB, Avetisian EA, Avetisian IN, Arshakian AV, Bagdasarian KG, Eganova VS, Pogosian NL. [The neuronal organization of the limbic (cingulo-)-visceral reflex arc]. *Usp Fiziol Nauk* 2000; 31: 11-23
12 Suyama S, Takano E, Iwasaki Y, Nakata M, Yada T. [Roles and functional interplay of the gut, brain stem, hypothalamus and limbic system in regulation of feeding]. *Nihon Rinsho* 2009; 67: 277-286
13 Van Oudenhove L, Demyttenaere K, Tack J, Aziz Q. Central nervous system involvement in functional gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 663-680
14 Derbyshire SW. A systematic review of neuroimaging data during visceral stimulation. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 12-20
15 Phillips ML, Gregory LJ, Cullen S, Coen S, Ng V, Andrew C, Giampietro V, Bullmore E, Zelaya F, Amaro E, Thompson DG, Hobson AR, Williams SC, Brammer M, Aziz Q. The effect of negative emotional context on neural and behavioural responses to oesophageal stimulation. *Brain* 2003; 126: 669-684
16 Mayer EA, Aziz Q, Coen S, Kern M, Labus JS, Lane R, Kuo B, Naliboff B, Tracey I. Brain imaging approaches to the study of functional GI disorders: a Rome working team report. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 579-596
17 Aziz Q, Thompson DG, Ng VW, Hamdy S, Sarkar S, Brammer MJ, Bullmore ET, Hobson A, Tracey I, Gregory L, Simmons A, Williams SC. Cortical processing of human somatic and visceral sensation. *J Neurosci* 2000; 20: 2657-2663
18 于继英, 李雷斌. 动物食欲调控的神经生理学探讨. 饲料工业 2005; 26: 23-25
19 Allen G, Buxton RB, Wong EC, Courchesne E. Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* 1997; 275: 1940-1943
20 Berman S, Munakata J, Naliboff BD, Chang L, Mandelkern M, Silverman D, Kovalik E, Mayer EA. Gender differences in regional brain response to visceral pressure in IBS patients. *Eur J Pain* 2000; 4: 157-172

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》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年8月18日; 20(23): 2151-2156
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

Oncoprotein 18在肝癌侵袭转移过程中的作用

甘 淋, 段承刚, 龚 舒, 郭 坤, 舒 宏, 刘银坤

甘淋, 段承刚, 龚舒, 泸州医学院医学基础研究中心 四川省泸州市 646000
郭坤, 舒宏, 刘银坤, 复旦大学中山医院肝癌研究所 上海市 200032
甘淋, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤分子机制的研究
国家重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-021
作者贡献分布: 此课题由郭坤与甘淋设计; 研究过程由甘淋、段承刚及龚舒完成; 研究所用试剂及经费由刘银坤提供; 数据分析由舒宏完成; 本论文写作由甘淋完成.
通讯作者: 刘银坤, 教授, 200032, 上海市枫林路180号, 复旦大学中山医院肝癌研究所. liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn
电话: 021-54237962
收稿日期: 2012-05-03 修回日期: 2012-06-03
接受日期: 2012-08-07 在线出版日期: 2012-08-18

Role of Oncoprotein 18 in metastasis of hepatocellular carcinoma

Lin Gan, Cheng-Gang Duan, Shu Gong, Kun Guo, Hong Shu, Yin-Kun Liu

Lin Gan, Cheng-Gang Duan, Shu Gong, the Research Centre for Preclinical Medicine, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Kun Guo, Hong Shu, Yin-Kun Liu, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
Supported by: the National Science and Technology Key Project, No. 2008ZX10002-021
Correspondence to: Yin-Kun Liu, Professor, Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, 180 Fenglin Road, Shanghai 20032, China. liu.yinkun@zs-hospital.sh.cn
Received: 2012-05-03 Revised: 2012-06-03
Accepted: 2012-08-07 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To explore the role of Oncoprotein 18 (Op18) in metastasis of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Op18 expression was repressed in HCCLM3 cells by RNA interference, and interference effect was evaluated by RT-PCR and Western blot. Cell adhesion, migration and invasion were analyzed by cell adhesion assay and Transwell assay *in vitro*. Op18 expression was detected by RT-PCR and immunohistochemistry in 96 HCC specimens with or without metastasis.

RESULTS: Op18 expression was effectively inhibited by RNA interference in HCCLM3 cells. Cell adhesion was significantly suppressed in the RNAi group compared to the mock group (20 min: 0.616 ± 0.057 *vs* 0.944 ± 0.068; 40 min: 0.740 ± 0.0713 *vs* 1.196 ± 0.115; 60 min: 1.001 ± 0.083 *vs* 1.441 ± 0.053; all $P < 0.05$). Transwell assay revealed that cell migration and invasion decreased in the RNAi group compared to the mock group (migration: 0.145 ± 0.011 *vs* 0.206 ± 0.008; invasion: 0.127 ± 0.008 *vs* 0.168 ± 0.012; both $P < 0.01$). Op18 expression was detected in 96 HCC tissues with or without metastasis. RT-PCR demonstrated that Op18 was overexpressed in HCC tissues with metastasis ($n = 48$) compared with HCC tissues without metastasis ($n = 48$, Op18/GAPDH relative ratio: 0.560 ± 0.128 *vs* 0.414 ± 0.086); and IHC results also indicated that Op18 expression was up-regulated in HCC tissues with metastasis in comparison with HCC tissues without metastasis (integrated density: 624.771 ± 100.032 *vs* 413.786 ± 71.833, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Overexpression of Op18 may play an important role in HCC metastasis.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Oncoprotein 18; RNA interference; Metastasis

Gan L, Duan CG, Gong S, Guo K, Shu H, Liu YK. Role of Oncoprotein 18 in metastasis of hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2151-2156

摘要

目的: 探讨原癌蛋白18(Oncoprotein 18, Op18)在肝癌侵袭转移过程中的作用机制.

方法: 采用RNA干扰, 抑制人肝癌细胞HCCLM3中Op18的表达, RT-PCR和Western blot评价干扰效率; 通过细胞粘附分析、体外Transwell分析法检测Op18表达缺失后对HCCLM3细胞粘附、运动和侵袭能力的改变; RT-PCR和免疫组织化学分别在48例未伴转移的肝癌组织和48例伴转移的肝癌组织中解析Op18表达与肝癌侵袭转移的关系.

结果: RT-PCR和Western blot结果显示: 在HCCLM3细胞中行RNAi后Op18表达被有效抑制, 抑制率达到80%以上; Op18表达缺失后,

■**背景资料**
肝细胞癌(HCC)是一种常见的恶性肿瘤, 死亡率在我国恶性肿瘤中居第2位, 其高转移高复发是导致死亡率居高不下的主要原因, 目前尚缺乏一种高效敏感的HCC转移复发的诊断标志物.

■**同行评议者**
代智, 副研究员, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所; 田字彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院

■研发前沿
最近研究发现在乳腺癌、前列腺癌、肉瘤、肝癌、白血病等多种肿瘤中原癌蛋白(Op18)的表达参与了肿瘤的发生, 可作为肿瘤辅助诊断、治疗分子标志物和药物靶点.

在不同时间点(20、40和60 min)实验组细胞粘附能力(0.616±0.057、0.740±0.0713和1.001±0.083)较阴性对照组(0.944±0.068、1.196±0.115和1.441±0.053)明显下降(P<0.05); Transwell实验结果提示: 经RNAi后实验组细胞运动、侵袭能力(运动: 0.145±0.011, 侵袭0.127±0.008)较阴性对照组(运动: 0.206±0.008, 侵袭: 0.168±0.012)显著降低(P<0.01); 分别在伴转移和未伴转移的肝癌组织中检测Op18的表达, RT-PCR(Op18与GAPDH相对比值: 0.560±0.128 *vs* 0.414±0.086)和IHC(积分吸光度值为: 624.771±100.032 *vs* 413.786±71.833)实验结果均提示Op18在伴转移的肝癌组织中的表达更高(P<0.01).

结论: Op18在肝癌的侵袭转移过程中发挥重要作用.

关键词: 肝细胞癌; 原癌蛋白18; RNA干扰; 侵袭

甘淋, 段承刚, 龚舒, 郭坤, 舒宏, 刘银坤. Oncoprotein 18在肝癌侵袭转移过程中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2151-2156
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2151.asp

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的恶性肿瘤, 死亡率在我国恶性肿瘤中居第2位, 其高转移高复发是导致死亡率居高不下的主要原因[1-4]. 原癌蛋白18(Oncoprotein 18, Op18), 也称Op17、Op19、stathmin等, 是一种重要的微管解离蛋白, 参与微管二聚体的形成[5-7]. 本研究采用RNA干扰技术, 在HCCLM3细胞中抑制Op18的表达后, 观察Op18表达缺失对HCCLM3细胞粘附、侵袭和运动能力的影响; 并进一步在伴转移和未伴转移的肝癌组织中探讨Op18表达与肝癌侵袭转移的关系, 解析Op18在肝癌侵袭转移过程中发挥的作用.

1 材料与方法

1.1 材料 人HCCLM3肝癌细胞由复旦大学肝癌研究所建系; 所有HCC组织标本(广西医科大学附属第一人民医院, 2004-01/2004-12)均经术后病理检查证实, 其中伴转移肝癌(由病理和临床检查证实患者在肝外存在源于肝癌细胞的转移病灶)和未伴转移的肝癌组织各48例; Trizol和lipofectamine™ 2000均购自美国Invotrogene公司; 逆转录试剂盒购自Promega公司; 半定量PCR试剂盒购自莱枫生化; 增强化学发光试剂盒购自美国Pierce公司; Op18单抗购自ABcam公司; GAPDH抗体购自上海KANGCHEN; Transwell孔板购自美国Costa公司.

1.2 方法

1.2.1 小干扰(small interference, si)RNA序列的设计和合成: 人Op18基因的siRNA由上海吉凯公司设计合成. Op18 siRNA正义链: 5'-GAA ACG AGA GCA CGA GAA Att-3', 反义链: 5'-UUU CUC GUG CUC UCG UUU Ctt-3'; 阴性对照双链小RNA正义链: 5'- UUC UCC GAA CGU GUC ACG Utt-3', 反义链: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA Att-3'.

1.2.2 细胞培养、转染和干扰效率的鉴定: 方法如前所示, 详见文献[8], 即人肝癌细胞HCCLM3在含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中, 置37 ℃、50 mL/L CO_2的细胞培养箱内培养; 消化计数后按3×10^5个/孔接种于6孔板; 至细胞融合率达60%左右, 按lipofectamine™ 2000试剂说明书进行转染, 以80 nmol/L Op18 siRNA转染HCCLM3细胞48 h, 收集细胞检测RNA和蛋白质表达, 鉴定Op18干扰效率. 设转染Op18 siRNA的为实验组, 设转染非编码序列双链小RNA为阴性对照组, 设不作转染的为空白对照组.

1.2.3 细胞粘附实验: 用FN(20 μg/mL)包埋96孔板, 置37 ℃、50 mL/L CO_2孵箱中放置1 h. 分别将RNA干扰实验组、空白对照组和阴性对照组细胞(每组各设3个复孔)消化计数, 按2×10^4细胞/孔加入孔板, 37 ℃分别培养20、40、60 min后4%多聚甲醛固定10 min; 龙胆紫染色15 min; 加入龙胆紫溶解液37 ℃温育30 min, 用酶标仪检测其A_{540}.

1.2.4 体外Transwell分析: 侵袭实验先在Transwell侵袭上室中用1 mg/mL Matrigel基质铺板, 置37 ℃、50 mL/L CO_2孵箱中培养6 h. 将Op18 RNA干扰的实验组、空白对照组和阴性对照组细胞(每组各设3个复孔)按1×10^5细胞/孔加入上室. 同时在Transwell孔板的下室中加入600 μL含20% FBS的培养基. 培养30 h弃去上室细胞培养液, 拭净上室细胞. 40 g/L多聚甲醛固定, 结晶紫染色15 min, 33%醋酸脱去染液, 用酶标仪测定A_{570}. 运动实验除Transwell侵袭上室不用Matrigel基质包被外, 其余步骤同侵袭实验.

1.2.5 RT-PCR: TRIzol试剂提取肝癌组织的RNA, 测定RNA浓度行逆转录. PCR扩增Op18基因和内参. 引物序列如下, Op18基因: 正义链5'-ATGAGGCAAACCCTGTGAAC-3', 反义链5'-AGCTTG-

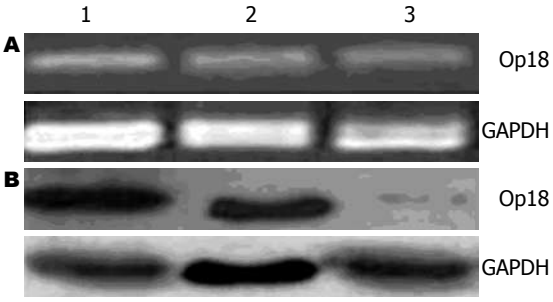


图 1 RNA干扰后HCCLM3肝癌细胞水平的表达. A: Op18 RNA; B: 蛋白质; 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 实验组.

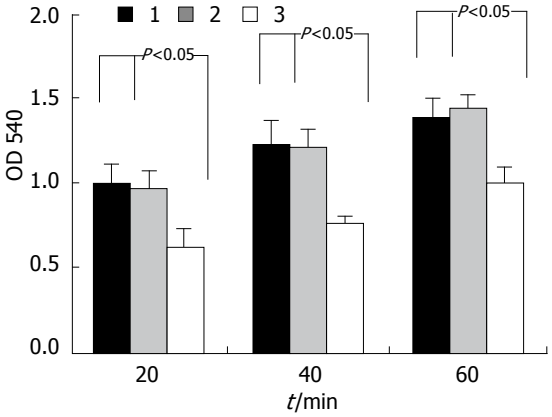


图 2 HCCLM3细胞中RNA干扰抑制细胞粘附. 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 实验组在不同时间点(20、40和60 min)的细胞粘附, 发现与阴性对照组相比较, 实验组细胞的粘附明显降低.

GCACAGATCCTTGT-3'(158 bp); GAPDH正义链为5'-ATGACCCCTTCATTGACC-3', 反义链为5'-GAAGATGGTGATGG GATTTC-3'(131 bp). PCR反应条件: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s, 52 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 共30个循环. 2%琼脂糖电泳分离, 观察结果.

1.2.6 免疫组织化学: 将HCC石蜡切片烤片脱蜡, 微波抗原修复10 min, 5%山羊血清封闭1 h, 加入Op18抗体(1∶200)4 ℃过夜, 二抗室温孵育30 min. DAB显色, 苏木精复染、脱水、封片. 并用ImagePro Plus 6.0(IPP)软件分析结果.

统计学处理 所有统计分析应用SPSS13.0软件进行. 数据用mean±SD表示, 均数两两比较应用配对t检验, 多样本均数比较采用单因素方差分析. $P<0.05$视差异有统计学意义.

2 结果

2.1 RNAi抑制HCCLM3细胞中Op18的表达 选择高表达Op18的人肝癌细胞株HCCLM3中行Op18的siRNA干扰. 转染siRNA 48 h后分别提取空白对照组、阴性对照组和RNAi实验组细胞的总RNA和蛋白质, 用RT-PCR和Western blot检测Op18的表达. RT-PCR结果显示在空白对照组、阴性对照组和实验组细胞中Op18与GAPDH的相对表达量分别为0.568±0.045、0.579±0.038、0.199±0.022, 与PCR结果相似, WB结果显示在空白对照组、阴性对照组和实验组细胞中Op18与GAPDH蛋白相对表达量为0.841±0.048、0.887±0.078、0.154±0.016. 以上结果提示: 无论是RNA水平还是蛋白质水平, RNAi都能明显抑制HCCLM3实验组细胞中Op18表达($P<0.01$), 干扰率达到80%以上; 而空白对照组和阴性对照组之间没有统计学差异(图1).

2.2 Op18表达缺失抑制HCCLM3的细胞粘附 在HCCLM3细胞中行RNA干扰后, 收集空白对照组、阴性对照组和实验组细胞, 计数后铺入96孔板中, 分别在不同时间点(20、40和60 min)检测细胞粘附能力. 实验发现: 与3个时间点阴性对照组细胞粘附(0.944±0.068、1.196±0.115、1.441±0.053)相比较, 实验组细胞粘附能力(0.616±0.057、0.740±0.0713、1.001±0.083)降低($P<0.05$); 而空白对照组和阴性对照组之间没有明显统计学差异(图2).

2.3 Op18的RNAi可显著抑制HCCLM3细胞运动侵袭能力 在HCCLM3细胞中行RNA干扰后, 采用Transwell实验检测RNAi对HCCLM3细胞侵袭、运动的影响. 运动实验的结果发现与空白对照组和阴性对照组(0.208±0.01、0.206±0.008)相比较, RNAi实验组细胞的运动能力明显降低(0.145±0.011, $P<0.01$), 而空白对照与阴性对照之间没有差异. 侵袭实验结果与运动实验一致, 和空白组与阴性对照组相比较(0.163±0.019、0.168±0.012), RNAi后实验组细胞的侵袭能力(0.127±0.008)也被显著抑制($P<0.01$, 图3).

2.4 肝癌组织(未伴转移和伴转移)中Op18的表达 采用RT-PCR分别检测10例未伴转移肝癌和10例伴转移肝癌组织中Op18的表达, 发现伴转移的肝癌组织中Op18表达更高(Op18/GAPDH: 0.560±0.128 *vs* 0.414±0.086), 二者具有统计学意义($P<0.01$, 图4A). 另采用免疫组织化学的方法在肝癌组织(未伴转移肝癌和伴转移肝癌各48例)的石蜡切片中检测Op18的表达, 以细胞胞浆中出现棕褐色的颗粒为阳性. IPP软件系统分析免疫组化结果, 计算阳性区域的积分光密度. 发现伴转移的肝癌组织中Op18表达更高(积分光密度为624.771±100.032 *vs* 413.786±71.833). 用SPSS13.0分析发现: Op18在未伴转移和伴转移的肝癌组织中表达具有显著的差异($P<0.01$, 图4B).

■相关报道

有多个研究小组发现, 在直肠癌、子宫内膜癌、乳腺癌等多种属多类型的肿瘤细胞中Op18的蛋白表达可以促进肿瘤细胞的运动, 改变细胞的形态, 并参与肿瘤的侵袭运动.

■创新盘点
该研究进一步研究Op18蛋白表达与肝癌侵袭转移的关系，为探讨HCC侵袭转移的分子机制，筛选肝癌转移的诊断标志物提供了实验基础.

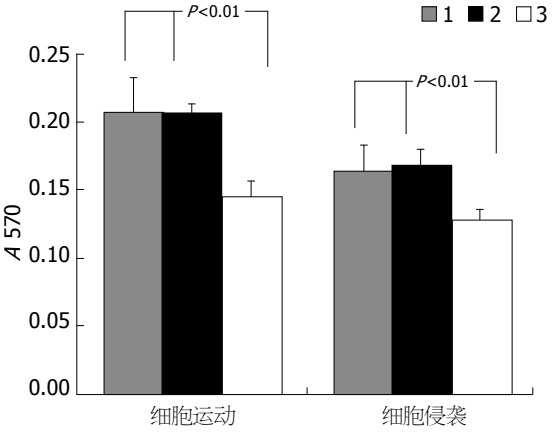


图 3 Op18表达缺失对HCCLM3细胞运动侵袭能力的影响. 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 实验组采用Transwell实验分别检测各组别HCCLM3肝癌细胞运动侵袭变化, 发现和阴性对照组相比较, 实验组细胞的侵袭运动明显降低.

3 讨论

肝癌是我国最常见的高致死率的恶性肿瘤, 目前尚缺乏敏感高效的HCC转移复发的分子标志物, 其发病机制仍不清楚[9]. 提示探讨HCC侵袭转移的分子机制, 对降低肝癌患者的转移率和复发率, 提高患者的生存率和预后具有重要临床和现实意义.

Op18是重要的微管解离蛋白, 主要通过结合微管蛋白二聚体, 参与微管稳态平衡的维持、纺锤体和极体的形成分离、细胞分裂运动等多种细胞生物过程, 并作为信号传导因子在信号通路中发挥重要作用[10-13]. 研究发现在乳腺癌、前列腺癌、肉瘤、白血病等多种肿瘤中Op18蛋白高表达, 提示Op18的表达可能参与了肿瘤的发生, 可作为肿瘤辅助诊断、治疗分子标志物和药物靶点[14-18]. 而本小组前期实验也发现在HCC组织中Op18高表达, 提示Op18与肝癌的发生相关, 这和Kung小组的实验结果一致[19,20]. 但是Op18是否参与肝癌的侵袭转移过程, 目前尚不清楚, 有待进一步研究.

我们在高表达Op18的人肝癌细胞HCCLM3中, 通过RNA干扰的方法, 使Op18的表达缺失后发现: Op18的表达抑制可明显抑制HCCLM3的粘附、运动和侵袭能力. 在2002年Ozon小组第一次报道在果蝇中如果降低Op18的表达能抑制精子的运动, 另有多个研究都发现在直肠癌、子宫内膜癌等多种属多类型细胞中stathmin的表达可以增加细胞的运动, 改变细胞的形态, 参与肿瘤的侵袭运动等[21-24]. 这些研究都支持我们的实验结果, 即Op18的表达缺失的确可以抑制肿瘤细胞的侵袭、运动. 我们在细胞实验的基础上, 进一步在肝癌组织检测Op18的表达, 验证我们假设, 即Op18在肝癌的侵袭转移过程中发挥重要作用. 选择未转移的肝癌组织和伴转移的肝癌组织各48例, 用PCR和IHC的方法检测Op18的表达. 实验显示无论是mRNA水平还是蛋白质水平, Op18在伴转移的肝癌组织中表达显著增高, 提示Op18的表达可能预示肝癌的侵袭转移. Kasper小组在前列腺肿瘤组织中研究Op18表达时发现: 较未转移的前列腺肿瘤组织, Op18在转移、复发的肿瘤中表达更高, 且Op18的表达上调与肿瘤体积大小、病理分级、血管侵犯、肝内播散和5年生存率密切相关, 暗示Op18可能与肿瘤的发展过程有关; Mikihiro小组报道Op18的高表达与滋层细胞的转移侵袭相关; 同时在乳腺癌、内分泌肿瘤和卵巢癌等组织中实验也发现了相似的结果[17,25-29]. 这些研究都与我们的实验结果相吻合, 即Op18的高表达可能与肿瘤的发展过程相关, 能预示肿瘤的侵袭、转移, 成为肝癌转移的一个潜在诊断标志物.

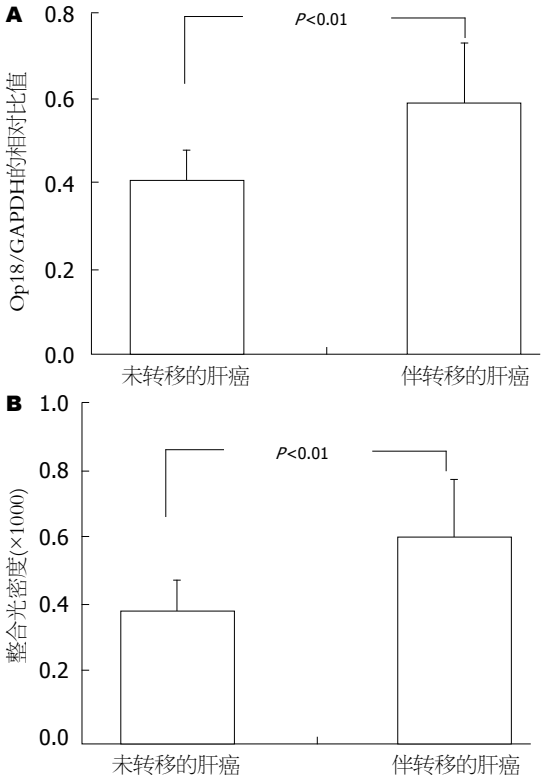


图 4 伴转移的肝癌组织中Op18的表达明显增强. A: RT-PCR检测未转移肝癌和转移肝癌组织中Op18的表达直方图; B: 免疫组织化学检测未转移肝癌和转移肝癌组织中Op18的表达的直方图.

Baldassarre小组进一步探讨了Op18参与肿瘤运动侵袭的分子机制, 研究发现Op18能与胞浆中的p27skip(一个细胞素依赖性蛋白激酶)相结合后, 失去解离微管的能力, 从而抑制肉瘤

细胞HT-1080的侵袭运动能力. 还有研究发现鸟苷磷酸酶PhoA、Stat3也能结合Op18, 直接或者间接调节微管的动态变化, 最终通过对微管动态平衡的调节发挥对细胞的运动能力的重要作用[30,31]. 这些都可能提示了Op18参与肿瘤侵袭转移的分子机制.

总之, 本研究从细胞和组织标本中都发现Op18表达上调参与肝癌的侵袭转移过程, 在肝癌发展过程中发挥重要作用. 但是, Op18是否能作为一个新的诊断肝癌侵袭转移、预测肝癌预后转归的分子标志物, 或者成为一个肝癌药物治疗的分子靶点还有待进一步研究.

■应用要点
侵袭转移是肝癌恶性程度的具体表现, Op18基因表达沉默可抑制肝癌细胞的粘附、运动和侵袭; 肝癌组织中Op18蛋白表达水平与肝癌的转移呈正相关, 提示Op18的表达可能预示肝癌的侵袭转移.

4 参考文献

1 Carmi L, Georgiades C. Combination percutaneous and intraarterial therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: a review. *Semin Intervent Radiol* 2010; 27: 296-301

2 Gu Z, Zhang C, Wang J. Gene regulation is governed by a core network in hepatocellular carcinoma. *BMC Syst Biol* 2012; 6: 32

3 Tazi el M, Essadi I, M'rabti H, Touyar A, Errihani PH. Systemic treatment and targeted therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *N Am J Med Sci* 2011; 3: 167-175

4 Bethge A, Schumacher U, Wree A, Wedemann G. Are metastases from metastases clinical relevant? Computer modelling of cancer spread in a case of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012; 7: e35689

5 Holmfeldt P, Sellin ME, Gullberg M. Upregulated Op18/stathmin activity causes chromosomal instability through a mechanism that evades the spindle assembly checkpoint. *Exp Cell Res* 2010; 316: 2017-2026

6 Hu JY, Chu ZG, Han J, Dang YM, Yan H, Zhang Q, Liang GP, Huang YS. The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 321-333

7 Houghtaling BR, Yang G, Matov A, Danuser G, Kapoor TM. Op18 reveals the contribution of non-kinetochore microtubules to the dynamic organization of the vertebrate meiotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 15338-15343

8 Gan L, Li J, Guo K, Li Y, Shu H, Wang L, Song J, Liu YK. [The effects of stathmin on cell proliferation and tumor-related genes expressions in HCCLM3 cells]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2011; 19: 571-576

9 Alves RC, Alves D, Guz B, Matos C, Viana M, Harriz M, Terrabuio D, Kondo M, Gampel O, Polletti P. Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. *Ann Hepatol* 2011; 10: 21-27

10 Manna T, Thrower DA, Honnappa S, Steinmetz MO, Wilson L. Regulation of microtubule dynamic instability in vitro by differentially phosphorylated stathmin. *J Biol Chem* 2009; 284: 15640-15649

11 Ringhoff DN, Cassimeris L. Stathmin regulates centrosomal nucleation of microtubules and tubulin dimer/polymer partitioning. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 3451-3458

12 Dong B, Mu L, Qin X, Qiao W, Liu X, Yang L, Xue L, Rainov NG, Liu X. Stathmin expression in glioma-derived microvascular endothelial cells: a novel therapeutic target. *Oncol Rep* 2012; 27: 714-718

13 Lin X, Tang M, Tao Y, Li L, Liu S, Guo L, Li Z, Ma X, Xu J, Cao Y. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 triggers regulation of the ERK-mediated Op18/stathmin signaling pathway in association with cell cycle. *Cancer Sci* 2012; 103: 993-999

14 Shi X, Wang D, Ding K, Lu Z, Jin Y, Zhang J, Pan J. GDP366, a novel small molecule dual inhibitor of survivin and Op18, induces cell growth inhibition, cellular senescence and mitotic catastrophe in human cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2010; 9: 640-650

15 Sabherwal Y, Mahajan N, Helseth DL, Gassmann M, Shi H, Zhang M. PDEF downregulates stathmin expression in prostate cancer. *Int J Oncol* 2012; 40: 1889-1899

16 Belletti B, Baldassarre G. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15: 1249-1266

17 Morimura S, Takahashi K. Rac1 and Stathmin but Not EB1 Are Required for Invasion of Breast Cancer Cells in Response to IGF-I. *Int J Cell Biol* 2011; 2011: 615912

18 Wang F, Wang LX, He W, Li K, Wang RL, Zhao PR, Fan QX. [Up-regulation of stathmin induces growth arrest of esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cell]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2010; 90: 2140-2144

19 Gan L, Guo K, Li Y, Kang X, Sun L, Shu H, Liu Y. Up-regulated expression of stathmin may be associated with hepatocarcinogenesis. *Oncol Rep* 2010; 23: 1037-1043

20 Wang X, Chen Y, Han QB, Chan CY, Wang H, Liu Z, Cheng CH, Yew DT, Lin MC, He ML, Xu HX, Sung JJ, Kung HF. Proteomic identification of molecular targets of gambogic acid: role of stathmin in hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 2009; 9: 242-253

21 Tan HT, Wu W, Ng YZ, Zhang X, Yan B, Ong CW, Tan S, Salto-Tellez M, Hooi SC, Chung MC. Proteomic analysis of colorectal cancer metastasis: stathmin-1 revealed as a player in cancer cell migration and prognostic marker. *J Proteome Res* 2012; 11: 1433-1445

22 Li N, Jiang P, Du W, Wu Z, Li C, Qiao M, Yang X, Wu M. Siva1 suppresses epithelial-mesenchymal transition and metastasis of tumor cells by inhibiting stathmin and stabilizing microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 12851-12856

23 Trovik J, Wik E, Stefansson IM, Marcickiewicz J, Tingulstad S, Staff AC, Njolstad TS, Vandenput I, Amant F, Akslen LA, Salvesen HB. Stathmin overexpression identifies high-risk patients and lymph node metastasis in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3368-3377

24 Zheng P, Liu YX, Chen L, Liu XH, Xiao ZQ, Zhao L, Li GQ, Zhou J, Ding YQ, Li JM. Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer. *J Proteome Res* 2010; 9: 4897-4905

25 Su D, Smith SM, Preti M, Schwartz P, Rutherford TJ, Menato G, Danese S, Ma S, Yu H, Katsaros D. Stathmin and tubulin expression and survival of ovarian cancer patients receiving platinum treatment with and without paclitaxel. *Cancer* 2009; 115: 2453-2463

26 Björklund P, Cupisti K, Fryknäs M, Isaksson A, Willenberg HS, Akerström G, Hellman P, Westin G. Stathmin as a marker for malignancy in pheochromo-

■同行评价
本论文从细胞水平研究显示Op18表达能促进肝癌细胞的侵袭运动, 在肝癌发展中发挥作用, 实验设计比较完善, 有一定创新性.

cytomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 118: 27-30
27 Xi W, Rui W, Fang L, Ke D, Ping G, Hui-Zhong Z. Expression of stathmin/op18 as a significant prognostic factor for cervical carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 837-846
28 Zhang CY, Xiao ZA, Zeng YC, Yang XM, Xie DH, Xia K, Liu FY, Huang BY. [Expression of stathmin mRNA and protein in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical implication]. *Zhonghua Erbiyanhoutoujing Waike Zazhi* 2008; 43: 291-295
29 Wang F, Wang LX, He W, Zhu LN, Zhao PR, Fan QX. [Expression of stathmin in esophageal squamous cell carcinoma and its biological significance]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2010; 30: 1552-1557
30 Verma NK, Dourlat J, Davies AM, Long A, Liu WQ, Garbay C, Kelleher D, Volkov Y. STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 12349-12362
31 Bsibsi M, Bajramovic JJ, Vogt MH, van Duijvenvoorden E, Baghat A, Persoon-Deen C, Tielen F, Verbeek R, Huitinga I, Ryffel B, Kros A, Gerritsen WH, Amor S, van Noort JM. The microtubule regulator stathmin is an endogenous protein agonist for TLR3. *J Immunol* 2010; 184: 6929-6937

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8月18日; 20(23): 2157-2161
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

结直肠癌P27表达与Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6的关系及意义

顾国利, 杜长征, 薛卫成, 顾 晋, 赵 军

顾国利, 中国人民解放军空军总医院普通外科 北京市 100142
杜长征, 顾晋, 赵军, 北京大学肿瘤医院结直肠外科 北京市 100142
薛卫成, 北京大学肿瘤医院病理科 北京市 100142
顾国利, 硕士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事遗传性结直肠肿瘤的临床和基础研究.
作者贡献分布: 顾国利与赵军对此文所作贡献均等; 此课题由顾国利与赵军共同设计; 试验过程由赵军, 杜长征及顾国利完成; 试验结果判定由薛卫成与杜长征完成; 数据统计分析由顾国利与杜长征完成; 本论文写作由顾国利, 赵军及顾晋完成; 顾晋参与论文审阅.
通讯作者: 赵军, 博士, 副主任医师. 100142, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学肿瘤医院结直肠外科. hero1822@163.com
电话: 010-88196085
收稿日期: 2012-06-23 修回日期: 2012-07-27
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

P27 expression in colorectal cancer: Significance and correlation with expression of Ki-67, P170, MLH1, MSH2, and MSH6

Guo-Li Gu, Chang-Zheng Du, Wei-Cheng Xue, Jin Gu, Jun Zhao

Guo-Li Gu, Department of General Surgery, the Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China
Chang-Zheng Du, Jin Gu, Jun Zhao, Department of Colorectal Surgery, Beijing Cancer Hospital, Beijing 100142, China
Wei-Cheng Xue, Department of Pathology, Beijing Cancer Hospital, Beijing 100142, China
Correspondence to: Jun Zhao, Associate Chief Physician, Department of Colorectal Surgery, Beijing Cancer Hospital, Beijing 100142, China. hero1822@163.com
Received: 2012-06-23 Revised: 2012-07-27
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between P27 expression and tumor invasion, metastasis, multidrug resistance and prognosis of colorectal cancer (CRC), and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Two hundred and sixty-three sporadic CRC patients who underwent surgery in the Department of Colorectal Surgery, Beijing Cancer Hospital from March 2008 to March 2012 were included in this study. All patients were diagnosed by histological examination and did not undergo chemoradiotherapy before surgery. Immunohistochemistry was used to detect P27, Ki-67, P170, MLH1, MSH2 and MSH6 protein expression in samples from these patients. The association between expression and clinical data was analysed retrospectively.

RESULTS: The positive rates of P27, Ki-67, P170, MLH1, MSH2 and MSH6 expression in CRC were 71.1%, 81.4%, 82.5%, 86.7%, 87.8% and 71.1%, respectively. Deficient expression of P27 was closely associated with tumour size, location, differentiation, invasion depth, vascular invasion and lymph node metastasis, but had no association with patients' gender, age, or tumor macroscopic morphology. P27 expression was negatively correlated with Ki-67 and P170 expression (r = -0.315, -0.163, P = 0.00, 0.01), but positively with MLH1, MSH2 and MSH6 expression (r = 0.129, 0.136, 0.159, P = 0.03, 0.03, 0.01).

CONCLUSION: P27 expression is closely associated with the development, invasion and metastasis of CRC. P27 protein expression can be regarded as an important parameter for evaluation of colorectal cancer progression and for selection of chemotherapy drugs and prevention of multidrug resistance.

Key Words: Colorectal cancer; P27; Ki-67; Multidrug resistance; Mismatch repair protein; Histopathology; Immunohistochemistry; Prognosis

Gu GL, Du CZ, Xue WC, Gu J, Zhao J. P27 expression in colorectal cancer: Significance and correlation with expression of Ki-67, P170, MLH1, MSH2, and MSH6. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2157-2161

摘要

目的: 探讨P27表达与结直肠癌侵袭转移、多药耐药及预后的关系, 并初步分析其机制.

方法: 随机选取北京大学肿瘤医院结直肠外科2008-03/2012-03收治的散发性结直肠癌患

■背景资料
疾病治疗的突破有赖于人们对其生物学行为机制的认识和掌握. 结直肠癌是我国最常见的消化系恶性肿瘤之一. 目前, 临床治疗结直肠癌采用手术、化疗等综合措施, 但其病死率仍居我国所有恶性肿瘤的前列. 因此, 对结直肠癌的生物学行为及其机制进行深入的研究具有迫切的现实意义.

■同行评议者
杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院

■**创新盘点**
结直肠癌组织P27、Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6表达及其关系的报道鲜见. 本研究发现随着结直肠癌肿瘤的进展, P27蛋白表达的缺失率也明显增加, 其表达与Ki-67和P170呈明显的负相关, 与MLH1、MSH2、MSH6表达呈明显的正相关. 因此, P27可以作为临床评估结直肠癌侵袭转移能力、指导化疗和判定预后的一个客观参考指标.

者263例, 所有病例均经组织学证实, 全部肿瘤病例术前均未行放化疗. 应用免疫组织化学SP法检测大肠癌组织中P27、Ki-67、P170、MLH1、MSH2和MSH6的表达; 并结合其临床病理特征进行回顾性分析.

结果: P27、Ki-67、P170、MLH1、MSH2和MSH6在结直肠癌组织中的阳性表达率依次为71.1%、81.4%、82.5%、86.7%、87.8%和71.1%. P27蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤的大体形态无关; 而其表达缺失与肿瘤的大小、部位、分化类型、侵袭深度、脉管癌栓和淋巴结转移密切相关. P27表达与Ki-67(r = -0.315, P = 0.00)、P170(r = -0.163, P = 0.01)呈明显的负相关. 而P27与MLH1(r = 0.129, P = 0.03)、MSH2(r = 0.136, P = 0.03)、MSH6(r = 0.159, P = 0.01)的表达均呈明显的正相关.

结论: P27蛋白与结直肠癌发生发展、侵袭转移密切相关, 其状态与结直肠癌MSI状态密切相关. P27蛋白的检测可以作为一个反映结直肠癌疾病进展的重要指标, 并对临床化疗用药和预防多药耐药具有一定的指导意义.

关键词: 结直肠肿瘤; P27; 核增殖抗原; 多药耐药; 错配修复蛋白; 免疫组织化学; 预后

顾国利, 杜长征, 薛卫成, 顾晋, 赵军. 结直肠癌P27表达与Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6的关系及意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2157-2161
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2157.asp

0 引言

结直肠癌已成为我国最常见的消化系恶性肿瘤之一, 且发病率呈逐年上升的趋势[1,2]. 目前, 临床治疗结直肠癌采用手术、化疗等综合措施, 但其病死率仍居我国所有恶性肿瘤的前列. 肿瘤对化疗药物的多药耐药是导致结直肠癌预后不佳的一个重要原因[3]. 因此, 对结直肠癌的生物学行为及其机制进行深入的研究具有迫切的现实意义. 研究显示[4-6]: 抑癌基因*p27*及其蛋白产物与肿瘤的发生发展关系密切, P27蛋白的表达与恶性肿瘤的侵袭转移密切相关. 本研究采用免疫组织化学法研究结直肠癌组织P27蛋白表达与临床病理特征之间的关系, 以及P27表达与错配修复蛋白、核增殖抗原、多药耐药蛋白的相关性, 旨在探讨P27表达与结直肠癌侵袭转移、多药耐药及预后的关系, 并初步分析其机制. 这有助于为临床评估结直肠癌侵袭转移能力、指导化疗和判定预后提供一个客观的参考指标.

1 材料和方法

1.1 *材料* 随机选取北京大学肿瘤医院结直肠外科2008-03/2012-03收治的散发性结直肠癌患者263例, 所有病例均经组织学证实, 全部肿瘤病例术前均未行放化疗. 取其手术切除的、经甲醛液固定和石蜡包埋的结直肠癌标本进行实验, 即用型P27鼠抗人mAb(ZM-0340)、即用型Ki-67鼠抗人mAb(ZM-0165)、即用型P170鼠抗人mAb(ZM-0179)、即用型MLH1鼠抗人mAb(ZM-0154)、即用型MSH2鼠抗人mAb(ZM-0156)、即用型MSH6鼠抗人mAb(ZM-0387)均购自北京中杉金桥生物公司. 试验由LAB vision Autostainer 360自动染色仪系统(福建迈新公司)程控完成、镜下图像以Olympus Dp70图像采集分析仪进行采集、分析.

1.2 *方法* 实验按产品说明书操作. 切片常规脱蜡至水, P27、Ki-67、P170采用高压热修复, MLH1、MSH2、MSH6经1 mmol/L pH 8.0的EDTA抗原修复液高压热修复. 30 mL/L H_2O_2孵育10 min, 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, 滴加正常兔血清工作液, 孵育10 min后倾去, 不洗; 滴加一抗37 ℃孵育2 h, PBS冲洗3 min×3次. 滴加二抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次. 滴加三抗, 孵育15 min, PBS冲洗3 min×3次, DAB显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片. PBS代替一抗作阴性对照, 正常大肠黏膜上皮表达情况作阳性对照. 在200倍的视野下随机选取10个视野, 记数每个视野中正常黏膜或肿瘤细胞的染色情况, 取平均值. P170定位于细胞膜, P27、Ki-67、MLH1、MSH2、MSH6均定位于细胞核. 依据染色强度和阳性细胞率来计算评分[6-8]. 染色强度: 0为无染色, 1为染色弱, 2为中等染色强度, 3为染色强. 阳性细胞率: 0为<1%, 1为<25%, 2为<50%, 3为<75%, 4为≥75%. 以染色强度与阳性细胞率之和计算评分, 0-2分为阴性(-), 3-5分为阳性(+), 6-7分为强阳性(++). 评分过程由两名高年资病理科医生双盲法独立完成.

统计学处理 应用SPSS19.0统计软件包进行统计分析. 计数资料采用2个(或多个)样本率比较的χ^2检验; 积分相关性采用Spearman等级相关分析, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *临床资料及P27、Ki-67、P170、MLH1、*

表 1 病例临床资料和P27、Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6的表达

项目	*n*	年龄(mean, 岁)	性别		组织部位		P27		Ki-67		P170		MLH1		MSH2		MSH6	
			男	女	结肠	直肠	–	++	–	++	–	++	–	++	–	++	–	++
结直肠癌病例	263	35-86(62.7)	143	120	165	98	76	187	49	214	46	217	35	228	32	231	76	187
表达阳性率							71.1%		81.4%		82.5%		86.7%		87.8%		71.1%	

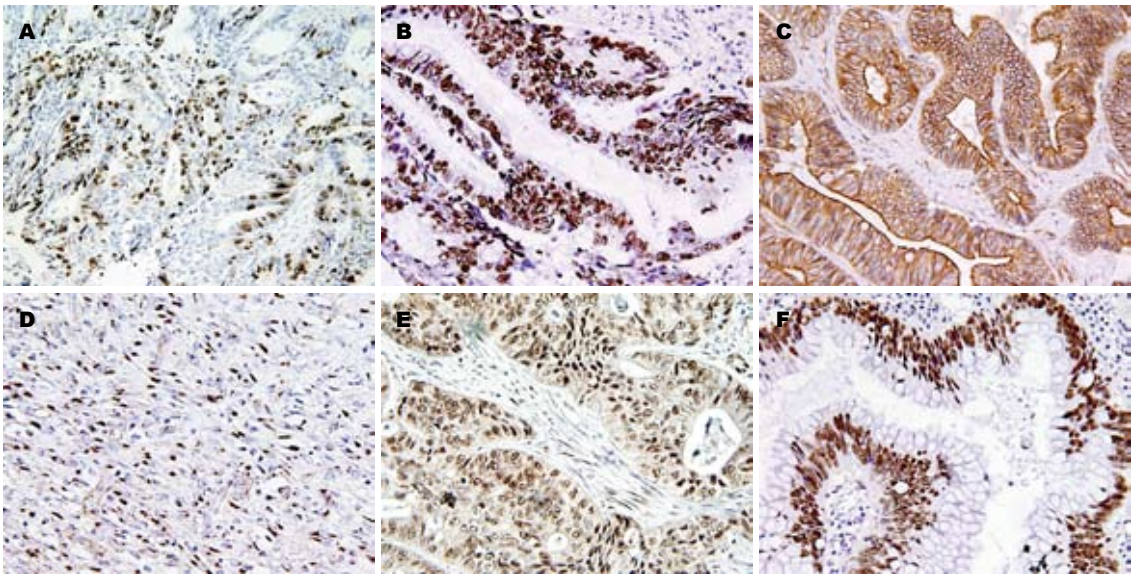


图 1 结直肠癌组织P27、Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6的表达(SP × 200). A: P27核表达; B: Ki-67核表达; C: P170膜表达; D: MLH1核表达; E: MSH2核表达; F: MSH6核表达.

■应用要点

本研究通过研究结直肠癌组织P27蛋白表达与临床病理特征之间的关系, 以及P27表达与错配修复蛋白、核增殖抗原、多药耐药蛋白的相关性, 旨在探讨P27表达与结直肠癌侵袭转移、多药耐药及预后的关系, 并初步分析其机制. 这有助于为临床评估结直肠癌侵袭转移能力、指导化疗和判定预后提供一个客观的参考指标.

MSH2、MSH6表达 入组病例的临床资料见表1. 免疫组织化学染色显示: P170定位于细胞膜, 镜下可见肿瘤细胞膜呈棕黄色颗粒染色, 胞质轻染, 胞核和肿瘤间质不染色. P27、Ki-67、MLH1、MSH2、MSH6均定位于肿瘤细胞核, 镜下可见胞核呈棕褐色或棕黄色颗粒, 胞质可轻染, 胞膜和肿瘤间质不染色(图1).

2.2 结直肠癌P27表达缺失与临床病理特征之间的关系 散发性结直肠癌中P27蛋白的表达见表2. P27蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤的大体形态无关; 而其表达缺失与肿瘤的大小、部位、分化类型、侵袭深度、脉管癌栓和淋巴结转移密切相关. 高分化腺癌、右半结肠癌的P27蛋白表达缺失率较高; 而随着肿瘤增大、侵袭加深、发生脉管癌栓和淋巴结转移时, P27蛋白表达的缺失率也明显增加.

2.3 结直肠癌P27与Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6表达的相关性 结直肠癌组织P27与Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6的共同表达见表3. 按照配对资料四格表计算可知: P27与Ki-67、P170、MLH1、MSH2的表达呈现明显相关. 而将P27、Ki-67、P170、MLH1、MSH2、MSH6的表达积分资料按照Spearman等级相关分析计算可知: 结直肠癌组织中P27与Ki-67、P170呈明显的负相关(r = -0.315, -0.163, P = 0.00, 0.01). 而P27与MLH1、MSH2、MSH6的表达均呈明显的正相关(r = 0.129, 0.136, 0.159, P = 0.03, 0.03, 0.01).

3 讨论

疾病治疗的突破有赖于人们对其生物学行为机制的认识和掌握. 我们目前尚未彻底认识和掌握结直肠癌侵袭转移、多药耐药等生物学行为的具体机制. 研究发现[9-11]: 抑癌基因*p27*的蛋白产物与结直肠癌的发生发展、侵袭转移关系密切. 非特异细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制物P27(又称KIP1), 属于细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂CIP/KIP蛋白家族成员之一, 他可阻止细胞由G_1期进入S期, 从而抑制细胞增殖. 本研究发现: 随着结直肠癌肿瘤的增大、侵袭加深、发生脉管癌栓和淋巴结转移, P27蛋白表达的缺失率也明显增加, 且其表达与代表肿瘤增殖能力的Ki-67呈明显的负相关. 这说明P27蛋白具有抑制结直肠癌发生发展、侵袭转移的作用,

■名词解释
肿瘤的多药耐药性(MDR): 指肿瘤细胞被一种药物诱发耐药后, 同时对其他多种结构和作用机制完全不同的药物产生交叉耐药的一种现象; 这是导致大肠癌化疗失败的主要原因之一. MDR是一个多基因参与、涉及多种基因产物的复杂过程. 目前已明确机制的MDR有4种: 典型MDR(由MDR1及其产物P170介导); 非典型MDR(由Topo-Ⅱ介导); GST-π表达; TS表达.

表 2 结直肠癌P27表达缺失与临床病理特征的关系

项目	n	P27表达		χ^2值	P值
		–	++		
性别				2.98	>0.05
男	143	35	108		
女	120	41	79		
年龄(岁)				8.40	>0.05
≤40	14	0	14		
41–50	22	9	13		
51–60	72	19	53		
61–70	93	25	68		
>70	62	13	49		
形态				1.13	>0.05
溃疡型	205	56	149		
隆起型	58	20	38		
肿瘤大小(cm)				12.76	<0.01
<3	43	11	32		
3–5	134	28	106		
>5	86	37	49		
部位				14.66	<0.01
右半结肠	75	34	41		
左半结肠	90	23	67		
直肠	98	19	79		
分化				13.01	<0.01
高分化	20	12	8		
中分化	165	49	116		
低分化、黏液	78	15	63		
侵袭深度				6.32	<0.05
肌层内	48	11	37		
浆膜	184	61	123		
浆膜外	31	4	27		
脉管癌栓				7.31	<0.01
无	205	51	154		
有	58	25	33		
淋巴结转移				9.03	<0.05
无	114	22	92		
1–3	85	31	54		
≥4	64	23	41		

结直肠癌肿瘤组织P27蛋白的检测可以作为一个反映疾病进展的重要指标.

P170是多药耐药基因MDR1的蛋白产物, 参与介导肿瘤的典型多药耐药[3]. P170属于ABC(ATP binding cassette)跨膜转运蛋白超家族成员; 对疏水性抗癌药(如: 蒽环类、长春碱类、表鬼臼毒素类、放线菌素D、米托蒽醌、紫杉碱等)起作用, 通过与细胞内化疗药物结合、借助ATP供能将药物“泵”出细胞外, 使细胞内化疗药物浓度下降、毒性减低或消失, 从而达到耐药作用[12-14]. 本研究发现: 结直肠癌中P170的阳性表达率高达82.5%, 且其表达与P27呈明显的负相关; 而P27的表达与结直肠癌的病程(大小、侵袭、转移)呈负相关. 这提示我们: 疏水性抗癌药可能应尽量避免应用于那些P27低表达、P170高表达的结直肠癌患者. 因此, P27和P170的联合检测对于结直肠癌的临床化疗用药和预防多药耐药具有一定的指导意义.

表 3 结直肠癌P27与Ki–67、P170、MLH1、MSH2、MSH6共同表达

结直肠癌	n	Ki–67		P170		MLH1		MSH2		MSH6	
		(–)	(++)	(–)	(++)	(–)	(++)	(–)	(++)	(–)	(++)
P27											
(–)	76	10	66	4	72	19	57	15	61	22	54
(++)	187	39	148	42	145	16	171	17	170	54	133
χ^2值		6.94		7.89		23.03		24.82		0.00	
P值		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		>0.05	

错配修复基因(mismatch repair genes, MMR)的突变在散发性结直肠癌的发生中也扮演着重要角色[15]. MMR突变所导致微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)可引起众多下游基因的突变失活. 转化生长因子β(transforming growth factor beta, TGFβ)的Ⅱ型受体(TGFβRⅡ)就是MMR的一个下游基因[16,17]. 而TGFβRⅡ和TGFβ的结合是TGFβ/Smad信号通路的启动环节[18]. 因此, MMR的突变失活将使TGFβ无法启动肿瘤细胞中的TGFβ/Smad下游通路. 研究发现[19-22]: TGFβ通过抑制CDK4的合成而减少G_1中期细胞内形成的Cyclin D1-CDK4-P27三元复合物，从而使细胞内可利用的、游离的P27相对增加. 因此, MMR基因突变、MMR蛋白失活可以间接地影响P27的表达. 这可能就是本研究发现MLH1、MSH2、MSH6这3种错配修复蛋白的表达均与P27呈明显正相关的原因之一. 由于MLH1、MSH2、MSH6表达的减少预示着肿瘤细胞处于微卫星不稳定状态[23]. 因此, 本研究进一步印证了P27表达状态与结直肠癌MSI状态密切相关的科学结论[24-26].

4 参考文献

1 顾晋. 浅析我国结直肠癌领域存在的问题. 中国医学前沿杂志(电子版) 2011; 3: 1-4

2 项芳芳, 毛高平. 大肠癌与抑癌基因相关性的研究现状. 世界华人消化杂志 2012; 20: 394-398

3 魏学明, 顾国利, 任力, 李德昌, 王石林, 宁守斌, 熊梅. 多药耐药基因产物在大肠癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2463-2468

4 Luo J, Chen YJ, Wang WY, Zou SQ. Effect of mutant p27(kipl) gene on human cholangiocarcinoma cell line, QBC(939). *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5344-5348

5 Al-Maghrabi J, Al-Ahwal M, Buhmeida A, Syrjänen K, Sibyani A, Emam E, Ghanim A, Al-Qahtani M. Expression of cell cycle regulators p21 and p27 as predictors of disease outcome in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer* 2012; 43: 279-287

6 李铸, 周宁新, 张德林, 吕雅莉. P27蛋白和PCNA在肝门部胆管癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2478-2482

7 顾国利, 王石林, 魏学明, 任力, 熊梅, 胡益云, 李德昌, 邹福先, 成健. COX-2、β-cat、MMP-7表达与遗传性非息肉病性大肠癌特殊侵袭转移行为的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 151-157

8 Ohrling K, Edler D, Hallström M, Ragnhammar P. Mismatch repair protein expression is an independent prognostic factor in sporadic colorectal cancer. *Acta Oncol* 2010; 49: 797-804

9 Ye JM, Deng T, Zhang JB. Influence of paeonol on expression of COX-2 and p27 in HT-29 cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4410-4414

10 张沛怡, 苏连明, 杜明, 胡立华, 李庆华. 结直肠癌PTEN基因表达及与ERK2、p27kip1的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16: 156-162

11 Gao FH, Hu XH, Li W, Liu H, Zhang YJ, Guo ZY, Xu MH, Wang ST, Jiang B, Liu F, Zhao YZ, Fang Y, Chen FY, Wu YL. Oridonin induces apoptosis and senescence in colorectal cancer cells by increasing histone hyperacetylation and regulation of p16, p21, p27 and c-myc. *BMC Cancer* 2010; 10: 610

12 隋华, 周利红, 殷佩浩, 王炎, 范忠泽, 周树峰, 李琦. JNK信号通路介导MDR1/P-gp调控人结肠癌多药耐药. 世界华人消化杂志 2011; 19: 892-898

13 张利, 于红刚, 于皆平, 罗和生. PI3K/Akt/p27kip1通道介导胃癌细胞对阿霉素、足叶乙甙化疗的耐药性及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 575-581

14 Takakura Y, Hinoi T, Oue N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W, Ohdan H. CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res* 2010; 70: 6767-6778

15 Yoon YS, Yu CS, Kim TW, Kim JH, Jang SJ, Cho DH, Roh SA, Kim JC. Mismatch repair status in sporadic colorectal cancer: immunohistochemistry and microsatellite instability analyses. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 1733-1739

16 顾国利, 魏学明, 王石林, 任力, 胡益云, 李德昌. 遗传性非息肉病性大肠癌中hMSH2, hMLH1, TβRⅡ, MMP-7及TIMP-2的表达和其特殊生物学行为间的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1738-1744

17 Zhao DB, Chandler I, Chen ZM, Pan HC, Popat S, Shao YF, Houlston RS. Mismatch repair, minichromosome maintenance complex component 2, cyclin A, and transforming growth factor β receptor type II as prognostic factors for colorectal cancer: results of a 10-year prospective study using tissue microarray analysis. *Chin Med J* (Engl) 2011; 124: 483-490

18 Buschke S, Stark HJ, Cerezo A, Prätzel-Wunder S, Boehnke K, Kollar J, Langbein L, Heldin CH, Boukamp P. A decisive function of transforming growth factor-β/Smad signaling in tissue morphogenesis and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 782-794

19 Lecanda J, Ganapathy V, D'Aquino-Ardalan C, Evans B, Cadacio C, Ayala A, Gold LI. TGFbeta prevents proteasomal degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 for cell cycle arrest. *Cell Cycle* 2009; 8: 742-756

20 Xu Y, Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum Mol Gene*t 2007; 16: R14-R20

21 Romero M, Ortega A, Izquierdo A, López-Luna P, Bosch RJ. Parathyroid hormone-related protein induces hypertrophy in podocytes via TGF-beta(1) and p27(Kip1): implications for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2447-2457

22 李娟娟, 闵大六. Skp2和p27kip1与肿瘤关系的研究进展. 癌症进展 2009; 7: 529-532

23 Gu M, Kim D, Bae Y, Choi J, Kim S, Song S. Analysis of microsatellite instability, protein expression and methylation status of hMLH1 and hMSH2 genes in gastric carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 899-904

24 Sarli L, Bottarelli L, Azzoni C, Campanini N, Di Cola G, Barilli AL, Marchesi F, Mazzeo A, Salvemini C, Morari S, Di Mauro D, Donadei E, Necchi F, Roncoroni L, Bordi C. Loss of p27 expression and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Surg Oncol* 2006; 15: 97-106

25 Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Yamaji T, Loda M, Fuchs CS. Loss of nuclear p27 (CDKN1B/KIP1) in colorectal cancer is correlated with microsatellite instability and CIMP. *Mod Pathol* 2007; 20: 15-22

26 Ogino S, Shima K, Nosho K, Irahara N, Baba Y, Wolpin BM, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Fuchs CS. A cohort study of p27 localization in colon cancer, body mass index, and patient survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1849-1858

■同行评价

本研究结果对临床治疗结直肠癌有一定的指导意义.

编辑 曹丽鸥 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8月18日; 20(23): 2162-2166
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

经皮内镜下胃造瘘在治疗中风后患者中的应用进展

姜跃龙, Xin-Sheng Liu, Daniel KY Chan

姜跃龙, 卫生部北京医院消化内科 北京市 100730
Xin-Sheng Liu, Daniel KY Chan, Department of Geriatric, Bankstown-Lidcombe Hospital, New South Wales 2200, Australia
作者贡献分布: 本文综述由姜跃龙与Xin-Sheng Liu完成; Daniel KY Chan审校.
通讯作者: 姜跃龙, 副主任医师, 100730, 北京市东单大华路1号, 卫生部北京医院消化内科. jylong99@hotmail.com
电话: 010-85133834
收稿日期: 2012-03-21 修回日期: 2012-07-12
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

■背景资料
经皮内镜下胃造瘘术(PEG)自1980年由Gauderer和Ponsky首先使用以来, 这种新方法通过不断地改进和革新已经日趋成熟, 越来越普遍的在临床上应用. 在美国每年大约有200 000例PEG管置放治疗. 这种仅需通过内镜介导放置胃造瘘管的技术, 避免了外科手术和全身麻醉, 适用于各种原因造成的吞咽困难而又需要长期营养支持的患者.

Use of percutaneous endoscopic gastrostomy in stroke patients: Recent progress

Yue-Long Jiang, Xin-Sheng Liu, Daniel KY Chan

Yue-Long Jiang, Department of Gastroenterology and Hepatology, Beijing Hospital of Ministry of Health, Beijing 100730, China
Xin-Sheng Liu, Daniel KY Chan, Department of Geriatrics, Bankstown-Lidcombe Hospital, New South Wales 2200, Australia
Correspondence to: Yue-Long Jiang, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology and Hepatology, Beijing Hospital of Ministry of Health, 1 Dongdan Dahua Road, Beijing 100730, China. jylong99@hotmail.com
Received: 2012-03-21 Revised: 2012-07-12
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract
There is much controversy over the use of percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) for management of dysphagia in stroke patients. An analysis of recent studies in this field indicates that appropriate timing of PEG in selected appropriate patients will provide therapeutic benefit.

Key Words: Gastrostomy; Stroke; Percutaneous endoscopic gastrostomy

Jiang YL, Liu XS, Chan DK. Use of percutaneous endoscopic gastrostomy in stroke patients: Recent progress. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2162-2166

摘要
中风后很多患者都会出现吞咽困难，并且在短时间内无法恢复. 经皮内镜下胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)可以为中风后吞咽功能障碍的患者提供长期的营养支持, 与静脉营养以及传统的鼻胃管治疗相比有很多的优势, 因此传统的观念认为PEG可以减少并发症, 提高患者的生活质量, 但是近年来的关于并发症和死亡率的研究有相反的结果. 因此如何选择合适的患者, 合适的时机, 预测可能出现的各种并发症以及生存时间才能使患者从中获益. 本文全面地分析了近年来的研究并对比了早期的研究, 阐述了PEG在中风患者中的应用应该个体化综合分析的理念, 为临床上PEG应用前提供参考依据.

关键词: 胃造瘘; 中风; 经皮内镜下胃造瘘术

姜跃龙, Liu XS, Chan DK. 经皮内镜下胃造瘘在治疗中风后患者中的应用进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2162-2166
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2162.asp

0 引言
没有一种疾病会在没有营养支持的情况下得到好转, 提供足够的营养支持是疾病治疗的基石, 中风当然也不例外. 营养不是简单地对生命的支持, 他也是判断社会状态、健康状态, 甚至快乐状态的重要标志. 经皮内镜下胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)自1980年由Gauderer和Ponsky首先使用以来, 这种新方法通过不断地改进和革新已经日趋成熟, 越来越普遍的在临床上应用[1]. 在美国每年大约有200 000例PEG管(percutaneous endoscopic gastrostomy tube, PEGT)放置治疗[2]. 这种仅需通过内镜介导放置胃造瘘管的技术, 避免了外科手术和全身麻醉, 适用于各种原因造成的吞咽困难而又需要长期营养支持的患者.

1 中风患者的肠内外营养
对于中风患者来说, 有29%-81%(因为地域和评估方法的差别)的患者承受着中风后吞咽功能障碍的痛苦[3-9]. 糟糕的营养状态会导致器官功能恢复缓慢, 感染风险增加[10,11], 预后不良率及死亡率上升[12-15]. 口咽部肌肉功能恢复不良会造成

■同行评议者
何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

消化系恶性循环. 胃肠道内长时间没有食物会导致肠内感染的出现. 对于这些吞咽困难的患者, 如何补充营养以应对将来可能出现或已经出现的营养不良, 对于医生来说十分具有挑战性. 肠内营养(enteral nutrition, EN)与胃肠外营养(parenteral nutrition, PN)相比具有明显的优越性, 营养素直接经肠吸收并利用, 更符合生理需要, 同时给药方便, 尤其是具有维持肠黏膜结构和屏障功能完整性的优点, 同时还可以避免肠内感染. 胃肠道不单是消化吸收器官, 也是重要的免疫器官, 在营养支持的同时调动胃肠的主动免疫机制. 有报道显示早期使用置管营养可以降低患者死亡的危险5%-8%[16].

2 经皮内镜下胃造瘘术与传统的鼻胃管治疗比较

因为患者无法通过口部进食, 医生们多会选择用插鼻胃管(naso-gastro tube, NGT)的方法提供营养和水分, 这种方法有近400年的历史[17]. NGT容易放置, 但是也容易阻塞和脱出, 无法安全可靠的提供营养支持. PEG技术则更为持久、安全, 克服了NGT的弊端[18,19], 为肠内营养的供给提供了全新的选择. 与NGT相比, PEGT具有不刺激鼻腔、脱位少、易于护理、放置时间长、胃内部刺激小和更能充分补充足够的营养等优点[20,21]. 但这种方法也存在缺点, 如: 放管时需要用镇静、麻醉药物, 可能进一步影响中风患者的意识状态; 可能会出现局部感染、疼痛、皮肤过敏及出血等并发症; 对老年人来说手术相关性吸入性肺炎和腹膜炎的出现是一个导致死亡的原因; 价格比NGT高出10倍[22,23]. 与鼻胃置管相比PEG除了能有效地改善患者的营养状态, 还能改善患者的康复效果[24,25]. 但是我们更关心的是这种方法是否能够降低患者的总死亡率、并发症率及改善预后, 如何通过选择合适的患者以及合适的时机放置PEGT而使患者受益.

3 中风发生后如何决定患者使用经皮内镜下胃造瘘术治疗

在西方国家, 患者经常无法容忍鼻部的刺激而宁愿选择PEG也不愿意放置NGT, 对于病变较轻的患者PEG除了可以减轻患者的不适(鼻部刺激), 还有助于早期康复训练以及吞咽功能的恢复[26]. 早期一项对于吞咽功能不良的患者, 分别用PEGT和NGT治疗的对照研究发现, 通过吞咽康复训练, 使用PEGT的轻、中度吞咽功能障碍患者比使用NGT的患者吞咽功能改善明显, 而使用NGT的对照组只是在语言交流方面改善较好[27]. 在自主吞咽功能恢复之后, PEGT可以拔除. 但是近年来更多的研究显示, 中风患者中高龄、合并症多、预后不良的患者出现吞咽功能障碍的时间更长, 在早期经过评估后可以预测需要使用PEG, 这样的患者更应该在早期开始营养支持, 防止营养状态的恶化[28]. 出现了肺炎、心血管事件和意识状态明显恶化的患者病情明显加重, 则更需要PEG的治疗[3,6,29]. 2010年一项关于了解急性缺血性中风患者美国国立卫生研究所脑卒中评分(National Institute of Health stroke scale, NIHSS)与PEG关系的研究发现, NIHSS以及是否有中风后吸入性肺炎的出现可以预测是否开始PEG治疗, 其中吸入性肺炎可以作为需用PEG的独立因素[30]. 2011年关于颅内出血中风患者的研究显示: PEG的放置与中风的严重程度相关, 预测因素分析显示: NIHSS分值高、格拉斯哥昏迷评分(Glasgow coma scale, GCS)低, 以及并发闭塞性脑水肿、败血症或需要机械通气的患者更需要PEG的治疗[31]. 因此, 较轻的患者可能通过早期使用PEG接受营养支持的同时, 有利于吞咽功能的恢复, 但是要面临好转后再次拔管的问题. 病情较重的患者理论上说更有必要使用PEG治疗, 因此早期的评估十分重要, 除了对患者中风的意识状态、大脑受损程度、合并症以及并发症进行评估外, 最重要的是对吞咽功能的评估. 有研究显示, 通过评估不仅可以减少并发症, 而且可以缩短住院时间和减少治疗总费用[32], 然而这是一个连续的过程, 多在中风发生后1-2 wk内开始评估, 之后每周进行评估, 观察吞咽功能是否有改善. 在澳大利亚和美国等发达的西方国家, 对评估非常重视, 有专科语言病理师(speech pathologist)或者语言治疗师(speech therapist), 完善的吞咽评估系统, 在中风发生的早期就开始评估并跟踪患者. 当然PEG操作也要排除禁忌证, 包括大量腹水、食管完全阻塞、凝血功能障碍以及败血症等[33].

4 经皮内镜下胃造瘘术放置时机的选择

PEG是一种有创性的操作, 如何选择放置PEG管的时机一直以来是一个饱受争议的问题. 如果过于积极的放置PEG后患者的吞咽功能很快恢复或者放PEG后不久患者死亡这就失去了放置PEG管的意义. 年龄<60岁, 合并症较少、非出血型中风和轻度吞咽功能障碍的在4 wk内大

■研发前沿
近年来的研究显示并不是所有胃造瘘后的患者都会从中受益, 如果选择不当还会造成并发症和死亡率的升高, 这与传统的观念并不一致.

■相关报道
最新的随机对照及配对研究显示, PEG组的并发症和死亡率均高于对照组, 甚至经过积极的康复治疗之后也没有降低.

■**创新盘点**
本文综述了近来的PEG在中风患者中的应用情况, 同时与较早的研究对照发现目前的观点与以往明显不同.

多可以恢复吞咽功能[26]. 发病后30 d内急性颅内出血型中风的死亡率29%-49%, 而缺血型为13.0%-17.6%[34-36]. 2011年最新的一项关于缺血型中风早期死亡率的对照研究发现, 在没有卒中单元的医院死亡率为12.5%, 有卒中单元的医院死亡率降低到10.1%[37]. 一般来说, 急性中风后1 wk吞咽功能障碍多会持续存在, 从2 wk开始部分患者的吞咽功能会陆续恢复, 到1 mo时大部分患者的吞咽功能恢复, 只有很少的一部分持续时间会超过6 mo[6,7]. 而且与其他原因引起的吞咽功能障碍疾病相比, 由中风引起的吞咽功能障碍更容易恢复[29]. 在一项有859例患者入组的早期使用置管肠内营养和静脉营养的随机对照试验显示, 早期置管营养组的死亡率和预后不良的人数并没有下降[16]. 即使为患者提供了更有营养的高蛋白营养餐, 中风的死亡率和预后不良也没有被改善[16]. 所以从1 wk开始用NG来提供营养支持就足够了. 早期使用NG的好处是可以及时提供营养防止营养状态恶化, 也避免了PEG放置带来的风险[38-40]. 预测患者的存活期及监测吞咽功能的恢复情况可以帮助确定合适的时机使用PEG. 但因为个体的差异预测存活期十分困难, 目前比较公认的观点是, 2 wk内开始的吞咽评估工作非常的重要[26], 之后的每周都有继续评估的对照, 评估包括测试患者的吞咽功能、语言交流功能和吸入性肺炎的风险等, 在中风后的4 wk, 如果患者的条件许可则做改良吞钡试验(modified barium swallow, MBS)评估吞咽功能. 存活期超过4 wk, 但仍然没有恢复吞咽功能的患者, 就可以开始用PEG治疗. 放置PEG之后继续康复治疗, 仍然有一部分人可以恢复吞咽功能, Teasell等[41]报道带PEGT回家的患者能够生存到1年的人中, 有75%都恢复了吞咽功能.

5 放置经皮内镜下胃造瘘管对患者预后的影响

PEG的放置目标应该是能够挽救生命和改善患者的预后, 使生命质量得到改善, 并不是简单的为了延长终末期生命而采取的妥协方法[42]. 随着时间的推移关于PEG对预后影响关系的研究也越来越多, 观点也发生了重要的变化. 吸入性肺炎是中风后最常见的并发症, 也是中风后导致患者死亡的最重要的并发症, 大约三分之一有吞咽功能障碍的患者会出现误吸. 76%的患者死于呼吸系统并发症[43,44]. 放置PEG管后食物直接通过管道进入胃腔, 可能会减少吸入性肺炎的发生. 较早的一项前瞻性的关于PEG和NTG的随机对照实验显示, 观察6 mo后, PEG组发生肺炎的致死率和总死亡率较低, 而且营养状态的改善也较好[21]. 但是吞咽功能障碍造成的误吸与诸多因素有关, 如: 口部清洁不良、咽喉部分泌物堆积、反流及咽喉部保护气道功能下降等[45-48]. 近年来的一项配对对照试验显示: PEG置管组与静脉营养组比较(观察90 d), PEG置管组肺炎、心血管事件以及中风恶化率均较对照组增高[1]. 另外一项研究将321例患者随机分入PEGT组和NGT组, 观察到6 mo时, PEGT组与NGT组比较死亡率没有降低, 均在50%左右, 没有显著性差异, 但是PEGT组与NGT组相比严重残疾率增加了7%-8%[16]. 功能锻炼和康复是减少预后不良的重要手段, 如果进行积极的功能康复训练是否会减少PEG患者预后不良事件的发生? 另一项配对对照研究充分比较了有PEG管和无PEG管的两组中风后吞咽功能不良的患者的康复训练情况, 通过90 d的观察发现有PEG管组的死亡率、肺炎、心血管事件以及中风恶化率均较对照组增高, 而且存活下来的患者康复结果也没有比对照组的好[42].

6 经皮内镜下胃造瘘术在中风患者治疗中决策

并不是所有的中风患者都会从PEG治疗中受益, 对于迅速恶化的疾病和无法改变不良预后的疾病并没有太大价值[33]. 所以如何评估患者的生存状态, 监测吞咽功能, 对于决策PEG是关键性的问题. 评估吞咽功能需要专科语言病理师或者语言治疗师在早期开始并连续性观察. 在4 wk后仍然没有恢复吞咽功能恢复的患者可以考虑用PEG治疗. 但是PEG的放置操作和PEG所带来的预后对于个体来说无法准确预测, 所以在PEG管放置之前要请专科语言病理师或者语言治疗师、消化科内窥镜医生、神经内科医生、营养师、物理治疗师、社会工作者以及患者或患者家属来共同参与评估这种有创操作所带来的利弊. 当然PEG管放置了之后患者的营养状态会有所改善, 换管周期长, 护理也相对方便. 但是这种置管操作及使用的镇静药物本身就可能加重患者的病情, 有6%-8%的术后并发症率, 有1%-2%的患者的死亡与操作相关[33], 而且也不能减少预后不良和降低中风后的死亡率. 虽然有大部分患者有可能通过功能锻炼将来重新恢复吞咽进食的功能, 但是也有一部分要终身带管, 甚至一直残疾卧床. 因此, 及时的全面的考虑PEG对于个体的益弊才能做出正确满意的决策.

7 结论

脑中风是一种急症, 在西方发达国家, 很多医院开设了专门的卒中单元病房, 而且有专科语言病理师或者语言治疗师评估吞咽功能, 同时还有物理治疗师和营养师共同参与康复训练, 在患者回家后还有社会工作者跟踪, 提供必要的协助, 充分体现了对脑卒中患者的关心和人文关怀. 对于放置PEG管的问题, 也非常的慎重, 实际操作中往往涉及社会道德观念、伦理、法律和法规等诸多问题. 需多方共同参与的情况下制定治疗的方案. 因为意识形态和对生命的观点的差异, 在国内多强调珍惜挽救生命而不惜一切代价, 随着社会的发展和人们思想观念的转变, 这种观念也在发生着变化, 现代医学要求我们更强调生命神圣、尊严、质量和价值的统一.

■应用要点

临床上选择合适的患者应用PEG, 需要多个学科共同细致的评估分析才能既不浪费医疗资源又能使患者从中受益.

8 参考文献

1 Iizuka M, Reding M. Use of percutaneous endoscopic gastrostomy feeding tubes and functional recovery in stroke rehabilitation: a case-matched controlled study. *Arch Phys Med Rehabil* 2005; 86: 1049-1052

2 Duszak R, Mabry MR. National trends in gastrointestinal access procedures: an analysis of Medicare services provided by radiologists and other specialists. *J Vasc Interv Radiol* 2003; 14: 1031-1036

3 Mann G, Hankey GJ, Cameron D. Swallowing function after stroke: prognosis and prognostic factors at 6 months. *Stroke* 1999; 30: 744-748

4 Smithard DG, O'Neill PA, Parks C, Morris J. Complications and outcome after acute stroke. Does dysphagia matter? *Stroke* 1996; 27: 1200-1204

5 Horner J, Massey EW, Riski JE, Lathrop DL, Chase KN. Aspiration following stroke: clinical correlates and outcome. *Neurology* 1988; 38: 1359-1362

6 Gordon C, Hewer RL, Wade DT. Dysphagia in acute stroke. *BMJ* 1987; 295: 411-414

7 Barer DH. The natural history and functional consequences of dysphagia after hemispheric stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52: 236-241

8 Martino R, Foley N, Bhogal S, Diamant N, Speechley M, Teasell R. Dysphagia after stroke: incidence, diagnosis, and pulmonary complications. *Stroke* 2005; 36: 2756-2763

9 Meng NH, Wang TG, Lien IN. Dysphagia in patients with brainstem stroke: incidence and outcome. *Am J Phys Med Rehabil* 2000; 79: 170-175

10 Chandra RK. Graying of the immune system. Can nutrient supplements improve immunity in the elderly? *JAMA* 1997; 277: 1398-1399

11 Fiatarone MA, Evans WJ. The etiology and reversibility of muscle dysfunction in the aged. *J Gerontol* 1993; 48: 77-83

12 Axelsson K, Asplund K, Norberg A, Alafuzoff I. Nutritional status in patients with acute stroke. *Acta Med Scand* 1988; 224: 217-224

13 Dávalos A, Ricart W, Gonzalez-Huix F, Soler S, Marrugat J, Molins A, Suñer R, Genís D. Effect of malnutrition after acute stroke on clinical outcome. *Stroke* 1996; 27: 1028-1032

14 Finestone HM, Greene-Finestone LS, Wilson ES, Teasell RW. Malnutrition in stroke patients on the rehabilitation service and at follow-up: prevalence and predictors. *Arch Phys Med Rehabil* 1995; 76: 310-316

15 Gariballa SE, Parker SG, Taub N, Castleden M. Nutritional status of hospitalized acute stroke patients. *Br J Nutr* 1998; 79: 481-487

16 Dennis MS, Lewis SC, Warlow C. Effect of timing and method of enteral tube feeding for dysphagic stroke patients (FOOD): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 365: 764-772

17 Kirby DF, Delegge MH, Fleming CR. American Gastroenterological Association technical review on tube feeding for enteral nutrition. *Gastroenterology* 1995; 108: 1282-1301

18 Möller P, Lindberg CG, Zilling T. Gastrostomy by various techniques: evaluation of indications, outcome, and complications. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 1050-1054

19 Goretsky MF, Johnson N, Farrell M, Ziegler MM. Alternative techniques of feeding gastrostomy in children: a critical analysis. *J Am Coll Surg* 1996; 182: 233-240

20 Park RH, Allison MC, Lang J. Randomised comparison of percutaneous endoscopic gastrostomy and nasogastric tube feeding in patients with persisting neurological dysphagia. *BMJ* 1992; 304: 1406

21 Norton B, Homer-Ward M, Donnelly MT, Long RG, Holmes GK. A randomised prospective comparison of percutaneous endoscopic gastrostomy and nasogastric tube feeding after acute dysphagic stroke. *BMJ* 1996; 312: 13-16

22 Wijdicks EF, McMahon MM. Percutaneous endoscopic gastrostomy after acute stroke: complications and outcome. *Cerebrovasc Dis* 1999; 9: 109-111

23 Larson DE, Burton DD, Schroeder KW, DiMagno EP. Percutaneous endoscopic gastrostomy. Indications, success, complications, and mortality in 314 consecutive patients. *Gastroenterology* 1987; 93: 48-52

24 Wanklyn P, Cox N, Belfield P. Outcome in patients who require a gastrostomy after stroke. *Age Ageing* 1995; 24: 510-514

25 James A, Kapur K, Hawthorne AB. Long-term outcome of percutaneous endoscopic gastrostomy feeding in patients with dysphagic stroke. *Age Ageing* 1998; 27: 671-676

26 James S. Scolapio, Michelle Romano. PEG feeding tube placement following a stroke: when to place, when to wait. *Nutr Clin Pract* 2000; 15: 36

27 Schulz RJ, Nieczaj R, Moll A, Azzaro M, Egge K, Becker R. [Dysphagia treatment in a clinical-geriatric setting PEG and functional therapy of dysphagia]. *Z Gerontol Geriatr* 2009; 42: 328-335

28 Ha L, Hauge T. Percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG) for enteral nutrition in patients with stroke. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 962-966

29 Sala R, Muntó MJ, de la Calle J, Preciado I, Miralles T, Cortés A, Molla R, Alcaide M. [Swallowing changes in cerebrovascular accidents: incidence, natural history, and repercussions on the nutritional status, morbidity, and mortality]. *Rev Neurol* 1998; 27: 759-766

30 Alshekhlee A, Ranawat N, Syed TU, Conway D, Ahmad SA, Zaidat OO. National Institutes of Health stroke scale assists in predicting the need for percutaneous endoscopic gastrostomy tube place-

■同行评价
本文对经皮内镜下胃造瘘术在中风后吞咽功能障碍患者中的应用和意义进行了综述和讨论, 选题结合临床, 有积极的指导和参考意义.

ment in acute ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2010; 19: 347-352

31 Kiphuth IC, Kuramatsu JB, Lücking H, Kloska S, Schwab S, Huttner HB. Predictive factors for percutaneous endoscopic gastrostomy in patients with spontaneous intracranial hemorrhage. *Eur Neurol* 2011; 65: 32-38

32 Martino R, Pron G, Diamant N. Screening for oropharyngeal dysphagia in stroke: insufficient evidence for guidelines. *Dysphagia* 2000; 15: 19-30

33 Johnston SD, Tham TC, Mason M. Death after PEG: results of the National Confidential Enquiry into Patient Outcome and Death. *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 223-227

34 Anderson CS, Chakera TM, Stewart-Wynne EG, Jamrozik KD. Spectrum of primary intracerebral haemorrhage in Perth, Western Australia, 1989-90: incidence and outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57: 936-940

35 Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral hemorrhage versus infarction: stroke severity, risk factors, and prognosis. *Ann Neurol* 1995; 38: 45-50

36 Razzaq AA, Hussain R. Determinants of 30-day mortality of spontaneous intracerebral hemorrhage in Pakistan. *Surg Neurol* 1998; 50: 336-342; discussion 342-343

37 Xian Y, Holloway RG, Chan PS, Noyes K, Shah MN, Ting HH, Chappel AR, Peterson ED, Friedman B. Association between stroke center hospitalization for acute ischemic stroke and mortality. *JAMA* 2011; 305: 373-380

38 Clarkston WK, Smith OJ, Walden JM. Percutaneous endoscopic gastrostomy and early mortality. *South Med J* 1990; 83: 1433-1436

39 Lang A, Bardan E, Chowers Y, Sakhnini E, Fidder HH, Bar-Meir S, Avidan B. Risk factors for mortality in patients undergoing percutaneous endoscopic gastrostomy. *Endoscopy* 2004; 36: 522-526

40 Abuksis G, Mor M, Plaut S, Fraser G, Niv Y. Outcome of percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG): comparison of two policies in a 4-year experience. *Clin Nutr* 2004; 23: 341-346

41 Teasell R, Foley N, McRae M, Finestone H. Use of percutaneous gastrojejunostomy feeding tubes in the rehabilitation of stroke patients. *Arch Phys Med Rehabil* 2001; 82: 1412-1415

42 Pennington C. To PEG or not to PEG. *Clin Med* 2002; 2: 250-255

43 Yim HB, Kaushik SP, Lau TC, Tan CC. An audit of percutaneous endoscopic gastrostomy in a general hospital in Singapore. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 183-186

44 Siddique R, Neslusan CA, Crown WH, Crystal-Peters J, Sloan S, Farup C. A national inpatient cost estimate of percutaneous endoscopic gastrostomy (PEG)-associated aspiration pneumonia. *Am J Manag Care* 2000; 6: 490-496

45 Daniels SK, Brailey K, Foundas AL. Lingual discoordination and dysphagia following acute stroke: analyses of lesion localization. *Dysphagia* 1999; 14: 85-92

46 Daniels SK, McAdam CP, Brailey K. Clinical assessment of swallowing and prediction of dysphagia severity. *Am J Speech Lang Pathol* 1997; 6: 17-24

47 Smithard DG, O'Neill PA, Park C, England R, Renwick DS, Wyatt R, Morris J, Martin DF. Can bedside assessment reliably exclude aspiration following acute stroke? *Age Ageing* 1998; 27: 99-106

48 Robbins J, Levine RL, Maser A, Rosenbek JC, Kempster GB. Swallowing after unilateral stroke of the cerebral cortex. *Arch Phys Med Rehabil* 1993; 74: 1295-1300

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》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8月18日; 20(23): 2167-2172
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

肝衰竭的营养代谢异常与营养支持治疗的研究进展

王 岩, 翟永贞, 冯国和

王岩, 翟永贞, 冯国和, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004
王岩, 副教授, 副主任医师, 主要从事重症肝病的发病机制及综合治疗研究.
作者贡献分布: 王岩与冯国和对此文所作贡献均等; 本综述由王岩与翟永贞完成, 冯国和负责修改审校.
通讯作者: 冯国和, 教授, 主任医师, 博士生导师, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院感染科. fenggh@sj-hospital.org
电话: 024-96615-62111
收稿日期: 2012-05-08 修回日期: 2012-07-05
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Nutritional and metabolic abnormalities and nutrition support therapy in patients with liver failure

Yan Wang, Yong-Zhen Zhai, Guo-He Feng

Yan Wang, Yong-Zhen Zhai, Guo-He Feng, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Guo-He Feng, Chief Physician, Professor, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. fenggh@sj-hospital.org
Received: 2012-05-08 Revised: 2012-07-05
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract
Nutritional and metabolic damage is an important manifestation of severe liver disease and is significantly associated with prognosis. In this paper, we review nutritional and metabolic abnormalities and nutritional support therapy in patients with liver failure by summarizing the indicators for evaluating the nutritional and metabolic status and the features of nutrients and energy metabolism. We point out that resting energy expenditure can be measured using CCM-D nutrition metabolism test system in liver failure patients. Energy supply is primarily contributed by fat oxidation in patients with chronic liver failure, and their respiratory quotient is significantly lower than the predicted values. In addition, we discuss nutritional support intervention methods and intake for different stages of liver failure. Our aim is to raise the awareness of clinicians for malnutrition in patients with liver failure to formulate individualized nutrition support therapy.

Key Words: Nutritional support; Energy metabolism; Resting energy expenditure; Respiratory quotient; Liver failure

Wang Y, Zhai YZ, Feng GH. Nutritional and metabolic abnormalities and nutrition support therapy in patients with liver failure. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2167-2172

摘要
营养和代谢损害是严重肝病的重要表现, 并已成为影响患者预后的明确危险因素. 本文对肝衰竭患者的营养代谢异常与营养支持治疗作一综述, 总结了肝脏疾病营养代谢状况评价的指标, 以及肝衰竭患者营养物质及能量代谢特点, 指出利用CCM-D营养代谢测试系统可以测定肝衰竭患者的静息能量消耗, 慢性肝衰竭患者能量供给以脂肪氧化为主、呼吸商明显低于预测值, 并进一步讨论了不同阶段肝衰竭营养支持干预的方式及摄入量等. 目的在于提高临床医师对肝衰竭患者营养代谢异常的认知程度, 制定个体化的营养支持治疗, 从而为提高肝衰竭的抢救成功率、改善患者的中远期预后提供条件.

关键词: 营养治疗; 能量代谢; 静息能量消耗; 呼吸商; 肝衰竭

王岩, 翟永贞, 冯国和. 肝衰竭的营养代谢异常与营养支持治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2167-2172
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2167.asp

0 引言
肝衰竭病程中常发生明显的物质代谢异常, 进而影响机体能量代谢, 可导致肝功能进一步恶化, 影响预后. 遵循个体化的原则, 给予患者最适当的营养干预, 已逐渐成为肝衰竭综合治疗中的重要一环.

1 肝脏疾病营养代谢状况评价的指标
既往的营养评价往往仅依靠体质量、生化指标

■背景资料
营养和代谢损害是严重肝病的重要表现, 并已成为影响患者预后的明确危险因素. 肝衰竭病程中常发生明显的物质代谢异常, 进而影响机体能量代谢, 可导致肝功能进一步恶化, 影响预后.

■同行评议者
唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

■研发前沿
营养支持治疗不仅在于单纯能量供给，还要通过提供营养底物维持正常或近似正常的组织细胞代谢，目前已成为肝衰竭综合治疗中的重要一环.

等简单判断, 准确性欠佳, 比如严重肝病患者常有腹水形成, 需要判断体质量增加是脂肪还是无脂组织增加或者仅仅是体液潴留所致. 我们通过文献回顾与整理, 筛选出以下方法可用于肝衰竭患者的营养程度评价, 包括主观全面评定法(subjective global assessment, SGA), 微型营养评定法(mini nutritional assessment, MNA), 静息能量消耗(resting energy expenditure, REE), 身体组成测定法(bioelectrical impedance analysis, BIA)、人体测量(包括身高、体质量、三头肌皮褶厚度、上臂肌围、体质量指数)、生化检查及膳食摄入改变等[1,2].

REE是反应机体能量代谢的重要指标, 是调整能量供给的重要依据, 目前REE最佳的测定方法是采用“代谢车”间接热量测定法, “代谢车”即CCM-D营养代谢测试系统, 他可以通过检测受试者平均每分钟的O_2消耗量及CO_2产生量, 根据Weir公式自动计算出实际的REE, 并同时计算出呼吸商(respiratory quotient, RQ), RQ可直接反映3大营养底物氧化代谢比例. 目前CCM-D营养代谢测试系统已应用于肝硬化、肝衰竭、肝移植、肝胆外科手术等各类肝疾病患者的能量消耗监测[3,4].

生化指标中血清蛋白浓度也是有效的营养监测指标, 当血清白蛋白<30 g/L, 前白蛋白<0.16 g/L或转铁蛋白<1.5 g/L时, 都提示患者存在营养不良, 测定值越低, 营养不良越严重. SGA及MNA目前一般均采用国际通用的调查表, 上臂肌围(arm muscle circumference, AMC)及体质量指数(body mass index, BMI)等计算可按照标准公式. 近年来利用多频率生物电阻抗仪连续检测患者体脂及瘦组织消耗情况, 也已被较多应用于肝衰竭等危重症患者的营养监测[5,6].

2 肝衰竭患者营养物质及能量代谢特点

2.1 肝衰竭营养物质代谢特点 目前已证实肝细胞大量坏死时, 对胰岛素灭活功能减弱, 同时肝细胞源性血清胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)表达减少, 使肝衰竭患者出现严重低血糖及糖的氧化利用率下降, 转以蛋白质、脂肪分解供能为主. 有学者应用外源性IGF1治疗可以改善慢性肝衰竭患者的能量代谢及预后[7].

在脂肪代谢方面严重肝病患者大多表现为低脂血症, 血浆中胆固醇水平, 特别是高密度脂蛋白和载脂蛋白AⅠ降低, 其下降程度与肝脏疾病的预后呈显著的正相关[8]. 各型肝衰竭时血清白蛋白、前白蛋白等均明显下降, 另外因高胰岛素血症和高血氨导致血液内支链氨基酸(branched-chain amino acid, BCAA)水平降低, 同时芳香氨基酸(aromatic amino acid, AAA)清除减少, 最终表现为BCAA/AAA的比值由3.5-4.0的正常范围, 下降至0.8-1.2[9].

维生素、矿物质和微量元素的缺乏也是各型肝病的共同特点. 缺锌可促进肝纤维化, 并诱发肝性脑病; 硒缺乏可致谷胱甘肽过氧化物酶活性下降, 影响其分解过氧化物、清除自由基的作用. 肝衰竭时维生素和微量元素的代谢异常, 可造成机体能量代谢途径中关键酶的数量和活性下降, 进一步加重了营养不良, 相互叠加又再次促进了肝功能破坏[10,11].

2.2 肝衰竭能量代谢特点 测定严重肝病患者的代谢及营养参数, 评判具体能量代谢状态, 是进一步制定个体化营养干预方案的基础. Walsh等[12]对16例对乙酰氨基酚所致急性肝衰竭患者的能量代谢研究发现, 尽管出现大量肝细胞坏死, 急性肝衰竭的能量消耗仍增加18%, 处于高代谢状态, 这可能与急性肝衰竭伴随的严重全身炎症反应相关. 更多的研究者以慢性肝衰竭患者为研究对象, 采用CCM-D营养代谢测试系统, 发现其REE明显低于预测值, 表现为低能量代谢状态, 随肝功能改善后, REE无明显变化, 但碳水化合物氧化率升高, 脂肪氧化率降低, RQ值有逐渐升高趋势[13].

既往有报道肝病患者禁食一夜与正常人禁食3 d的营养物质底物氧化率是相似的, 即以脂肪氧化为主[14,15]. 其他研究者也指出慢性肝衰竭患者夜间禁食晨起空腹时RQ值为全天中最低, 虽然胰岛素的分泌量正常或增高, 然而因葡萄糖转运蛋白或胰岛素受体的作用受到抑制, 糖的氧化代谢发生障碍, 糖的利用受限, 而脂肪氧化的速度为之增快, 甚至可达正常速度的200%, 进一步通过Pearson相关分析, 发现慢性肝衰竭患者3大营养素的氧化率依次为脂肪、蛋白质、碳水化合物, 即以脂肪分解为主, 且脂肪氧化率越高, 预后越差[16].

3 肝衰竭患者营养干预的方式及摄入量

3.1 适宜的用量 既往临床实践已证实, 高热量的供给并不能显著改善重症患者的预后, 反而会出现器官功能障碍, 特别是肝细胞受损, 所以提出了危重症患者“低热量供给”的原则[17]. 肝衰竭患者的营养摄入总量既要维持机体的能量供应,

也要考虑纠正器官功能障碍所致的代谢异常, 同时将衰竭肝脏的代谢负荷减至最低水平[18,19].

对于成年的肝衰竭患者, 建议基本热量予20-25 kcal/(kg·d), 合并感染时可酌情增加10%左右, 即一般每天供给总量以1 500-2 000 kcal为宜, 其中碳水化合物摄入量可在总热量的60%左右. 同时需注意热量供给应该在不同阶段作不同处理, 早期可适当减少, 甚至有研究者认为治疗初期可让患者处于轻度的负氮平衡状态, 待病情好转后, 再逐渐增加供给量, 如果一味为追求正氮平衡而提供更多的营养物质, 反而会因为肝功能受损而使病情恶化. 即热量摄入总量逐渐增加的方式更有利于肝衰竭患者病情的恢复[20-22].

有关蛋白质摄入量, 既往失代偿期肝硬化患者蛋白质供给量一般按照1.0-1.2 g/(kg·d)供给, 约相当于供氮0.15 g/(kg·d), 总结多项有关肝衰竭营养治疗研究, 认为未发生肝性脑病等并发症的肝衰竭患者也可参照此量, 食物中蛋白质的来源应以优质蛋白为主, 如鱼类和豆类蛋白[23-25]. 蛋白质供给应以患者耐受、保持正氮平衡、促进肝细胞再生、不诱发肝性脑病为准. 对血氨已经升高而有肝性脑病的患者, 应限制或禁食蛋白质, 待病情好转后在某些药物的辅助下逐渐增加蛋白质的量, 提倡食用富含支链氨基酸的高能量植物蛋白饮食[10,26]. 有研究者认为肝衰竭患者进行肝移植术后早期, 由于甲泼尼龙的应用使患者的蛋白质代谢明显加快, 可参照1.5-2.0 g/(kg·d)适当增加蛋白质供给[27].

3.2 肝衰竭的肠内营养 肠内营养(enteral nutrition, EN)有利于防止肠道黏膜萎缩、减少肠道炎症因子释放, 不易造成肝功能损害, 所以优先提倡EN[28]. 食物以高能量、高蛋白质、足量维生素、易消化为宜, 肝衰竭患者由于肝性脑病或肝移植术后不能自主进食等情况下, 可依具体情况应用胃管或空肠营养管进行EN, 应注意选取易消化吸收的营养素, 等渗者不易导致腹泻, 营养液温度应保持在37 ℃-40 ℃.

本文前面曾经提到, 慢性肝衰竭患者能量代谢失衡主要表现为能源底物重点由葡萄糖转化为脂肪. Nakaya等[29]研究表明, 夜间加餐可以降低脂肪、蛋白质的氧化率, 提高RQ值, 改善患者预后. 我们通过整理分析, 认为对于慢性肝衰竭患者, 治疗过程中保证总能量供应的同时, 可适当增加葡萄糖的摄入, 并尽量选择口服, 结合多项研究结果建议睡前进食40-50 g富含碳水化合物的食物, 以提高糖的氧化利用率, 节约蛋白质和脂肪营养素的消耗[30,31].

有研究将谷氨酰胺(glutamine, Gln)强化的EN应用于肝脏移植术后患者, 有降低术后感染的倾向[32,33]. Gln为目前免疫营养的主要添加物, 强化Gln有利于防止肠黏膜的底物限制性代谢, 从而维护肠黏膜屏障的完整, 以减少各种病理生理过程中的细菌和毒素易位[34]. 但是多位学者认为Gln不适用于肝衰竭患者, 因其分解后产生NH_3, 衰竭的肝脏不足以将其代谢[35].

另外, 最近研究显示一些以往未获重视的成人必需营养物质, 如核苷酸、锌及精氨酸, 能对免疫系统起正性调节作用, 含有这些营养物质的新型配方其临床效应可能优于标准EN配方[36].

3.3 肝衰竭的肠外营养 当肝衰竭患者存在较重的消化系统症状、严重肝性脑病、消化系出血等情况影响进食时, 需实施肠外营养(parenteral nutrition, PN)以促进合成代谢[37]. <14 d的PN可选用周围静脉输入, 如预计长期全量应用则建议经皮穿刺, 由颈内静脉或锁骨下静脉达上腔静脉途径输入[38]. 依照肝衰竭患者不同病程阶段, 也可采用部分PN+EN再逐步向完全EN过渡的营养支持疗法[39].

葡萄糖是首选PN供能物质, 每日摄入葡萄糖100 g就能显著节省蛋白质分解. 高浓度葡萄糖液输注可能刺激周围静脉血管; 肝衰竭患者在应激状态下利用糖的能力更差, 未被及时氧化可能引起或加重肝脏的脂肪变性; 少数合并有糖尿病的患者过快、过量输入糖类可导致高血糖、糖尿, 甚至高渗性非酮性昏迷, 在葡萄糖的临床应用中需注意上述情况. 血糖较高的患者可给予适量的果糖来代替葡萄糖, 以减少胰岛素的应用[40].

PN唯一氮源是复方氨基酸液, 肝功能不良者宜应用含BCAA较多、含AAA较少的氨基酸液. 目前复方氨基酸液除标准配方外, 又研制出高支链氨基酸(BCAAs), 其特点为BCAA(*L*-亮氨酸、*L*-异亮氨酸和*L*-缬氨酸)的浓度较高, 占总氨基酸量的40%-50%, 而AAA(色氨酸、*L*-酪氨酸和苯丙氨酸)的浓度较低. 由于BCAAs是唯一可经外周代谢的氨基酸, 增加其浓度并不增加肝脏负担, 且可与芳香族氨基酸竞争性进入血脑屏障, 用于肝功能衰竭和肝性脑病, 但对其在急性肝衰竭及合并严重感染等伴有严重分解代谢病例中的节氮效果, 尚难确定是否优于标准配方[41]. Gln作为抗氧化剂GSH的前体, 也参与肝脏尿素生成的过程, 在PN中起到特殊作用, Gln

■应用要点

目前危重症患者提倡“低热量能量供给”, 本文强调肝衰竭患者个体化的营养治疗, 根据疾病不同进展阶段进行评估和能量供给, 避免进一步加重肝脏负担.

■名词解释
静息能量消耗: 机体静息状态, 即空腹、室温在20 ℃-25 ℃, 安静平卧或静坐30 min后的能量消耗, 主要用于维持机体细胞、器官的正常功能和人体的觉醒状态.

水溶性差且在溶液中不稳定, 因此用于PN的Gln制剂都呈二肽形式, 如甘氨酰-谷氨酰胺、丙氨酰-谷氨酰胺, 此类二肽物质的水溶性好、稳定, 进入体内会很快分解出Gln而被利用[42,43].

脂肪乳剂是提供热量的高效能物质, 10%脂肪乳剂即含热量4.18 kJ/(kcal·mL), 10%及20%乳剂属等渗液, 可经周围静脉输入[44]. 兼含长链甘油三酯(long chain triglycerides, LCT)、中链脂肪乳剂(MCT)的乳剂(重量比1∶1)适应于肝功不良等特殊患者, 有报道即使肝功能为Child C级的患者, 其对MCT/LCT混合乳剂的清除仍不受影响, 但对于血清总胆红素值超过50 μmol/L的患者脂肪乳剂用量以不超过1 g/(kg·d)为宜[45,46]. 还有研究者建议间断应用脂肪乳剂, 并加强血脂的动态监测, 以使甘油在间歇期被清除, 同时脂肪乳剂最好加入其他液体中均匀输注, 若单独输注应在12 h内均匀输注完毕, 这样既能为机体所利用, 又不会因MCT过快氧化而增加肝的负担. 需要说明的是, 对于一部分肝功异常的患者短期输注脂肪乳剂可能是安全有效的, 但诊断明确、病情进展中的肝衰竭患者, 肝功能严重受损造成对脂肪的利用转化能力下降, 可能导致脂肪酸和甘油在血清中堆积, 所以一般不建议含有中长链脂肪乳的PN配方[47,48].

同时, 应用PN时, 除K、Na、Cl之外, 还需补充Ca、Mg及P等离子及维生素, 常用制剂分别为10%葡萄糖酸钙、25%硫酸镁、10%甘油磷酸钠以及含有水溶性及脂溶性维生素的复方制剂, 禁食1 mo以上者还应注意微量元素的补给[49,50].

4 结论

营养和代谢的损害是肝衰竭患者的重要表现, 并已成为影响患者预后的明确危险因素. 营养支持治疗应成为肝衰竭综合治疗中的重要一环, 不仅在于单纯供给能量, 更要通过提供营养底物维持正常或近似正常的组织细胞代谢. 治疗过程中供给营养物质的种类、用量及途径等均需慎重选择, 以免进一步加重肝脏负担. 重症肝病患者常常合并有感染、腹水、肝性脑病等, 所以我们强调针对肝衰竭患者不同的疾病进展程度, 进行个体化的综合营养状况及能量代谢评估, 按照患者的代谢需求与代谢能力提供适当的能量, 及时地调整营养支持方案, 促进肝细胞的修复, 缓解临床症状、改善肝功能、提高药物疗效, 从而提高肝衰竭的抢救成功率.

5 参考文献

1 Tsai AC, Hsu WC, Chan SC, Chang TL. Usefulness of the mini nutritional assessment in predicting the nutritional status of patients with liver cancer in Taiwan. *Nutr Cancer* 2011; 63: 334-341

2 Pereyra GI, Erazo BM. [Evaluation of the diet of women attended by the Chilean Public Health System]. *Arch Latinoam Nutr* 2011; 61: 254-261

3 Fontaine E, Müller MJ. Adaptive alterations in metabolism: practical consequences on energy requirements in the severely ill patient. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14: 171-175

4 Coëffier M, Déchelotte P. Combined infusion of glutamine and arginine: does it make sense? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 70-74

5 Assy N. Nutritional recommendations for patients with non-alcoholic fatty liver diseases. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3375-3376

6 Cui ML, Ahn HS, Kim JY, Shin HJ, Lee DS, Kim HJ, Yun SS. Bioelectrical impedance may predict cell viability during ischemia and reperfusion in rat liver. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 577-582

7 Hijikawa T, Kaibori M, Uchida Y, Yamada M, Matsui K, Ozaki T, Kamiyama Y, Nishizawa M, Okumura T. Insulin-like growth factor 1 prevents liver injury through the inhibition of TNF-alpha and iNOS induction in D-galactosamine and LPS-treated rats. *Shock* 2008; 29: 740-747

8 Numeroso F, Barilli AL, Delsignore R. Prevalence and significance of hypoalbuminemia in an internal medicine department. *Eur J Intern Med* 2008; 19: 587-591

9 Amathieu R, Nahon P, Triba M, Bouchemal N, Trinchet JC, Beaugrand M, Dhonneur G, Le Moyec L. Metabolomic approach by 1H NMR spectroscopy of serum for the assessment of chronic liver failure in patients with cirrhosis. *J Proteome Res* 2011; 10: 3239-3245

10 Mesejo A, Juan M, Serrano A. [Liver cirrhosis and encephalopathy: clinical and metabolic consequences and nutritional support]. *Nutr Hosp* 2008; 23 Suppl 2: 8-18

11 Kalaitzakis E, Bjornsson E. Hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis: is there a role of malnutrition? *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3438-3439

12 Walsh TS, Wigmore SJ, Hopton P, Richardson R, Lee A. Energy expenditure in acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 2000; 28: 649-654

13 Meng QH, Hou W, Yu HW, Lu J, Li J, Wang JH, Zhang FY, Zhang J, Yao QW, Wu J, Wang X, Liu Y. Resting energy expenditure and substrate metabolism in patients with acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 456-461

14 Maurya I, Pawar M, Garg R, Kaur M, Sood R. Comparison of respiratory quotient and resting energy expenditure in two regimens of enteral feeding - continuous vs. intermittent in head-injured critically ill patients. *Saudi J Anaesth* 2011; 5: 195-201

15 Schutz Y. Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis. *Int J Vitam Nutr Res* 2011; 81: 101-107

16 Miwa Y, Moriwaki H. Nocturnal energy and BCAA supplementation in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2004; 30S: 63-66

17 Port AM, Apovian C. Metabolic support of the obese intensive care unit patient: a current per-

spective. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 184-191
18 Hennecke M, Freund AM. Staying on and getting back on the wagon: age-related improvement in self-regulation during a low-calorie diet. *Psychol Aging* 2010; 25: 876-885
19 Schilsky ML, Honiden S, Arnott L, Emre S. ICU management of acute liver failure. *Clin Chest Med* 2009; 30: 71-87, viii
20 Doig GS, Simpson F, Finfer S, Delaney A, Davies AR, Mitchell I, Dobb G. Effect of evidence-based feeding guidelines on mortality of critically ill adults: a cluster randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 300: 2731-2741
21 Sriram K, Cyriac T, Fogg LF. Effect of nutritional support team restructuring on the use of parenteral nutrition. *Nutrition* 2010; 26: 735-739
22 Ambühl PM. Protein intake in renal and hepatic disease. *Int J Vitam Nutr Res* 2011; 81: 162-172
23 Genton L, Pichard C. Protein catabolism and requirements in severe illness. *Int J Vitam Nutr Res* 2011; 81: 143-152
24 Chen B, Zhou Y, Yang P, Wan HW, Wu XT. Safety and efficacy of fish oil-enriched parenteral nutrition regimen on postoperative patients undergoing major abdominal surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2010; 34: 387-394
25 Kida Y. Estimation of protein intake using urinary urea nitrogen in patients with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44: 615-618
26 Bémeur C, Desjardins P, Butterworth RF. Role of nutrition in the management of hepatic encephalopathy in end-stage liver failure. *J Nutr Metab* 2010; 2010: 489823
27 Yoshida R, Yagi T, Sadamori H, Matsuda H, Shinoura S, Umeda Y, Sato D, Utsumi M, Nagasaka T, Okazaki N, Date A, Noguchi A, Tanaka A, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Fujiwara T. Branched-chain amino acid-enriched nutrients improve nutritional and metabolic abnormalities in the early post-transplant period after living donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2012; 19: 438-448
28 McClave SA, Heyland DK. The physiologic response and associated clinical benefits from provision of early enteral nutrition. *Nutr Clin Pract* 2009; 24: 305-315
29 Nakaya Y, Okita K, Suzuki K, Moriwaki H, Kato A, Miwa Y, Shiraishi K, Okuda H, Onji M, Kanazawa H, Tsubouchi H, Kato S, Kaito M, Watanabe A, Habu D, Ito S, Ishikawa T, Kawamura N, Arakawa Y. BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. *Nutrition* 2007; 23: 113-120
30 Okamoto M, Sakaida I, Tsuchiya M, Suzuki C, Okita K. Effect of a late evening snack on the blood glucose level and energy metabolism in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2003; 27: 45-50
31 Aoyama K, Tsuchiya M, Mori K, Kubo Y, Shiraishi K, Sakaguchi E, Yamashita S, Sakaida I. Effect of a late evening snack on outpatients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2007; 37: 608-614
32 Qiu Y, Zhu X, Wang W, Xu Q, Ding Y. Nutrition support with glutamine dipeptide in patients undergoing liver transplantation. *Transplant Proc* 2009; 41: 4232-4237
33 Merli M, Giusto M, Gentili F, Novelli G, Ferretti G, Riggio O, Corradini SG, Siciliano M, Farcomeni A, Attili AF, Berloco P, Rossi M. Nutritional status: its influence on the outcome of patients undergoing liver transplantation. *Liver Int* 2010; 30: 208-214
34 Li Y, Ping X, Yu B, Liu F, Ni X, Li J. Clinical trial: prophylactic intravenous alanyl-glutamine reduces the severity of gastrointestinal toxicity induced by chemotherapy--a randomized crossover study. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 452-458
35 荆科, 孙梅. 谷氨酰胺对肠组织TLR2、4及NF-κB的调节与内毒素致肠损伤保护作用的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2220-2225
36 Barclay AR, Beattie LM, Weaver LT, Wilson DC. Systematic review: medical and nutritional interventions for the management of intestinal failure and its resultant complications in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33: 175-184
37 Filipović BF, Gajić M, Milinić N, Milovanović B, Filipović BR, Cvetković M, Sibalić N. Comparison of two nutritional assessment methods in gastroenterology patients. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1999-2004
38 Drover JW, Cahill NE, Kutsogiannis J, Pagliarello G, Wischmeyer P, Wang M, Day AG, Heyland DK. Nutrition therapy for the critically ill surgical patient: we need to do better! *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2010; 34: 644-652
39 Heidegger CP, Romand JA, Treggiari MM, Pichard C. Is it now time to promote mixed enteral and parenteral nutrition for the critically ill patient? *Intensive Care Med* 2007; 33: 963-969
40 Chen SS, Santomango TS, Williams PE, Lacy DB, McGuinness OP. Glucagon-mediated impairments in hepatic and peripheral tissue nutrient disposal are not aggravated by increased lipid availability. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296: E1172-E1178
41 Satyanarayana A, Klarmann KD, Gavrilova O, Keller JR. Ablation of the transcriptional regulator Id1 enhances energy expenditure, increases insulin sensitivity, and protects against age and diet induced insulin resistance, and hepatosteatosis. *FASEB J* 2012; 26: 309-323
42 Vermeulen MA, van de Poll MC, Ligthart-Melis GC, Dejong CH, van den Tol MP, Boelens PG, van Leeuwen PA. Specific amino acids in the critically ill patient--exogenous glutamine/arginine: a common denominator? *Crit Care Med* 2007; 35: S568-S576
43 Montejo González JC, Mesejo A, Bonet Saris A. Guidelines for specialized nutritional and metabolic support in the critically-ill patient: update. Consensus SEMICYUC-SENPE: liver failure and liver transplantation. *Nutr Hosp* 2011; 26 Suppl 2: 27-31
44 Mo YH, Rhee J, Lee EK. Effects of nutrition support team services on outcomes in ICU patients. *Yakugaku Zasshi* 2011; 131: 1827-1833
45 Hamani D, Kuhn M, Charrueau C, Waligora-Dupriet AJ, Neveux N, Butel MJ, Cynober L, Moinard C. Interactions between ω3 polyunsaturated fatty acids and arginine on nutritional and immunological aspects in severe inflammation. *Clin Nutr* 2010; 29: 654-662
46 Lilja HE, Finkel Y, Paulsson M, Lucas S. Prevention and reversal of intestinal failure-associated liver disease in premature infants with short bowel syndrome using intravenous fish oil in combination with omega-6/9 lipid emulsions. *J Pediatr Surg* 2011; 46: 1361-1367
47 Cober MP, Killu G, Brattain A, Welch KB, Kunisaki SM, Teitelbaum DH. Intravenous fat emulsions reduction for patients with parenteral nutrition-associated liver disease. *J Pediatr* 2012; 160: 421-427

■同行评价
该文层次清楚, 较为深入和全面地综述了肝衰竭的营养代谢异常状况以及营养支持治疗现状, 对临床中肝衰竭的治疗提供了积极的指导意义和实用价值.

48 Cober MP, Teitelbaum DH. Prevention of parenteral nutrition-associated liver disease: lipid minimization. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; 15: 330-333
49 Teixeira A, Müller L, dos Santos AA, Reckziegel P, Emanuelli T, Rocha JB, Bürger ME. Beneficial effects of gradual intense exercise in tissues of rats fed with a diet deficient in vitamins and minerals: a pilot study. *Nutrition* 2009; 25: 590-596
50 Sadowska J. [Evaluation of the effect of diet composition and its supplementation with selected B vitamins on distribution of calcium and magnesium in the body]. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2009; 60: 361-365

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》出版流程

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

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

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

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

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

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

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

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

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

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章四月内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年8月18日; 20(23): 2173-2178
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

FXR促进肝脏再生作用的研究进展

于 昊, 崔云甫

于昊, 崔云甫, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外一科 黑龙江省哈尔滨市 150001
于昊, 硕士, 主要从事肝胆胰疾病方面的研究.
黑龙江省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. 12511247
作者贡献分布: 本文综述由于昊完成; 崔云甫审校.
通讯作者: 崔云甫, 教授, 主任医师, 博士生导师, 150001, 黑龙江省哈尔滨市保健路148号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外一科. yfcui777@hotmail.com
电话: 0451-86605113
收稿日期: 2012-05-31 修回日期: 2012-07-09
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Progress in understanding the role of FXR in promoting liver regeneration

Hao Yu, Yun-Fu Cui

Hao Yu, Yun-Fu Cui, Department of General Surgery, the second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Supported by: The Science and Technology Research Project of Department of Education of Heilongjiang Province, No. 12511247
Correspondence to: Yun-Fu Cui, Professor, Chief Physician, Department of General Surgery, the second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 148 Baojian Road, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. yfcui777@hotmail.com
Received: 2012-05-31 Revised: 2012-07-09
Accepted: 2012-08-18 Published online: 2012-08-18

Abstract
The regenerative capacity of the liver is well known, and it can regenerate itself by a compensatory regrowth in response to partial hepatectomy or injury. Farnesoid X receptor (FXR) is a member of the nuclear hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors. Bile acids are FXR physiological ligands. As a metabolic regulator, FXR plays key roles in regulating metabolism of bile acids, lipids and glucose. Recently, activation of intercellular signal transduction has been shown to play an important role in liver regeneration by binding of bile acids to their receptor FXR. Bile acid/FXR signaling pathway is required for normal liver regeneration. Furthermore, FXR promotes liver repair after injury, and activation of FXR is able to alleviate age-related defective liver regeneration. These novel findings suggest that FXR-mediated bile acid signaling is an important component of normal liver regeneration and highlight the potential use of FXR ligands to promote liver regeneration after segmental liver transplantation or resection of liver tumors. This review summarizes the recent progress in understanding the role of FXR in promoting liver regeneration.

Key Words: Farnesoid X receptor; Nuclear receptor; Bile acid; Liver regeneration; Liver repair

Yu H, Cui YF. Progress in understanding the role of FXR in promoting liver regeneration. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2173-2178

摘要
肝脏具有再生的能力是众所周知的, 他在部分切除或损伤后通过代偿增生的方式能够实现自我再生. 法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR)是配体激活转录因子的核激素受体超家族中的一员, 胆汁酸是FXR的内源性配体. 作为一种代谢调节因子, FXR在调节胆汁酸、脂质和葡萄糖的代谢中起到了至关重要的作用. 近来, 研究发现胆汁酸与其受体FXR结合激活细胞间的信号转导对肝再生起重要作用, 胆汁酸/FXR信号通路是正常肝再生所必需的. 此外, FXR能促进肝脏损伤后的修复, 且FXR的活化能够减轻年龄相关性的肝脏再生缺陷. 这些新的发现提示FXR介导的胆汁酸信号在正常肝再生中是一个不可或缺的组成部分, 同时也突出了FXR配体对促进部分肝移植或肝癌切除术后的肝脏再生的潜在应用. 这篇综述概述了FXR的基本资料和对肝脏再生作用的研究进展.

关键词: 法尼酯X受体; 核受体; 胆汁酸; 肝再生; 肝脏修复

于昊, 崔云甫. FXR促进肝脏再生作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2173-2178
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2173.asp

0 引言
肝脏是在其局部切除或损伤后为数不多的能够

■背景资料
法尼酯X受体(FXR)是配体激活转录因子的核激素受体超家族中的一员. 他除了具有控制胆汁酸、胆固醇、脂质以及葡萄糖代谢的作用外, 在促进肝脏再生和肝癌发生等方面的作用越来越受到人们的关注.

■同行评议者
李文岗, 教授, 福建医科大学附属厦门第一医院肝胆胰血管外科

■研发前沿
尽管目前肝再生的许多细节已经被阐释清楚，然而在肝部分切除或损伤后启动、促进、终止肝再生的确切的信号依然不甚明了.

再生的器官之一, 肝再生自1931年在啮齿动物部分肝切除模型的引入后被广泛研究. 这个过程包含了很多精密调控的阶段, 并有许多信号通路和转录因子参与其中[1-4]. 尽管目前肝再生的许多细节已经被阐释清楚, 然而在肝部分切除或损伤后启动、促进、终止肝再生的确切的信号依然不甚明了. 老龄化对肝脏的再生能力有着负面的影响, 他在很大程度上增加了肝脏恶性肿瘤切除术后、肝移植后、或是肝损伤后老年患者的致死率[5,6]. 以前研究表明: (1)老龄化主要抑制肝的再生能力, 并且这种抑制是可逆的; (2)多种途径可能独立地参与到促进肝再生的过程中去[7,8]. 因此这给我们提供了一个能促进老年人肝脏再生并且没有明显不良反应的特定途径的机会.

法尼酯X受体(farnesoid X receptor, FXR, NR1H4)最初于1995年被克隆, 他属于代谢性核受体的一个亚族, 代谢性核受体还包括维生素D受体(VDR, NR1I1), 本构雄烷受体(CAR, NR1I3), 孕烷X受体(PXR, NR1I2)和肝脏X受体α和β(LXRα, NR1H3; LXRβ, NR1H2). 作为一种转录因子, FXR以单体形式或与黄醇类X受体(RXR, NR2B1)构成异二聚体的形式与DNA相结合, 去调节多种FXR靶基因的表达. FXR在肝脏、肠、肾脏、肾上腺高表达, 而在脂肪组织和心脏中低表达[9,10]. FXR作为一种关键的代谢调节剂, 有着比人们以往认为的更广泛的作用. 例如, FXR介导胆汁酸信号促进正常的肝再生. 此外, FXR的活化能够直接激活Foxm1b基因的转录, 从而在鼠肝再生过程中能够很大程度上减轻年龄相关的增殖缺陷[5]. 这些新的发现说明FXR在肝脏再生过程中起到了至关重要的作用. 本文将总结FXR在代谢调节中的基本功能并深入探讨他在肝脏再生中的作用.

1 核胆汁酸受体FXR

FXR是一种核胆汁酸受体, 他在代谢调节和代谢病中具有重要作用. 近来, FXR除了具有代谢调节的作用以外, 很多新的功能已被证实[11-14]. FXR是胆汁酸的主要感应器, 结合的与非结合的胆盐都能够在生理浓度激活FXR[12]. 初级胆汁酸中的鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)是一种强力的FXR的内源性激动剂. 次级胆汁酸: 脱氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)和石胆酸(lithocholic acid, LCA)都能够激活FXR, 但其激活效应弱于CDCA, 而亲水的熊脱氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)不能激活FXR[15]. 胆汁酸激活FXR的作用效应由强到弱排列顺序是: CDCA>DCA>LCA>胆酸(CA)[16].

通过与FXR应答元件(FXR response element, FXREs)结合, FXR可调节许多属于不同代谢途径的基因[17]. 过去的10年中, 大量关于FXR的研究已经证实FXR是一种关键的代谢调节剂, 他能调节胆汁酸内环境稳态和脂蛋白与葡萄糖的代谢[18-21]. 以前研究认为FXR可能充当着代谢压力的一般感应器和调节特定群组基因表达的调节器的角色从而达到保护肝脏的目的. 然而, 近来研究证实, FXR通过促进肝脏的再生和修复而起到另一种肝脏保护的作用.

2 FXR与肝再生

肝脏再生是肝脏在组织发生缺损后进行损伤修复的重要功能, 是通过特定外界信号刺激而产生的一种适应性反应, 包括后来基因表达的连续变化和形态学重建. 他由多个阶段组成: (1)增殖因子的快速诱导激活了静止的肝细胞并为这些肝细胞通过细胞周期做好准备; (2)重建到正常肝脏大小; (3)肝细胞恢复到静止状态[1]. 细胞因子、生长因子和代谢信号参与到了这个过程涉及的基本循环中[22]. 多种细胞因子和生长因子(如HGF、TGF-β、TNF-α、IL-6、EGF)的分泌是肝再生过程中重要的早期反应, 其中HGF是促进肝细胞再生最重要的物质, 也是最早被认识到在肝再生过程中起重要作用的细胞因子之一[23,24]. 尽管有报道称肝再生过程中涉及了很多的基因和信号通路, 但与细胞因子和生长因子相比, 人们对肝再生中代谢信号作用的了解还是知之甚少.

胆汁酸可能是肝脏再生过程中所需要的却被忽视的一种信号. 胆汁酸是FXR的内源性配体[25], 同时也是肠正常吸收胆固醇、脂质及脂溶性维生素所必需的物质. 胆汁酸是在肝脏中合成并储存于胆囊中, 进食后被分泌到肠道中, 但大部分胆汁酸(95%)会被重吸收并通过门静脉运回到肝脏. 这个过程被称为肝肠循环. 有研究发现阻断正常的肝肠循环能够抑制肝脏再生, 胆汁酸(或胆汁酸衍生因子)在肠道中的缺乏(例如胆汁外引流、胆道梗阻)也能够延缓肝脏再生[26-28]. 胆汁酸被认为是一种关键的促细胞分裂原, 当剩余的肝细胞暴露在增加的胆汁酸负荷中, 能够促进肝脏再生. 小鼠在被给予0.2%的胆酸(cholic acid, CA)饲料后增加了胆汁酸池的含

量, 同时加速了肝脏的再生. 而小鼠在被给予含2%消胆胺饲料饲养后降低了胆汁酸池的含量, 继而明显降低了肝脏再生的速度.

再对FXR敲除的小鼠重复以上的实验, 发现无论消胆胺还是胆酸都失去了原有的效果[12,29]. 提示在肝脏再生的胆汁酸信号通路中FXR具有非常重要的信号传递作用. 事实上, FXR被胆汁酸激活后诱导了Foxm1b等转录因子的表达, 提高了肝细胞DNA的复制, 从而促进肝脏的再生. 因此, 在肝衰竭期间用体外肝脏支持设备去除胆汁酸的做法需要被重新的评价. 那么, 胆汁酸池含量越高, 促进肝再生的作用就越明显吗? 答案是否定的. Zhang等[30]曾做过这样一个实验, 他们用含有1%CA的饲料饲养小鼠4 d后对这些小鼠行70%部分肝切除术, 术后所有的小鼠都死亡, 说明高水平的胆汁酸并没有促进肝脏再生, 相反却是有毒甚至是致命的. 胆汁酸不是典型的促细胞分裂原, 胆汁酸水平的提高激活了FXR从而促进肝脏的再生, 用于抵抗胆汁酸产生的潜在毒性. 当FXR被胆酸激活后, FXR上调了小异二聚体伴侣(small heterodimer partner, SHP)的表达[31], SHP继而与肝脏相关同系物(LRH)结合, 抑制LRH转录激活CYP7A1基因的功能[32,33]. FXR-SHP-LRH参与的通路是胆酸介导的反馈抑制CYP7A1基因表达的重要途径. 除FXR/SHP外, MAPK和其他的信号通路也可能参与到抑制CYP7A1的表达过程中[30,34]. CYP7A1表达的抑制很大程度上降低了胆固醇向胆汁酸的转化, 从而减轻了剩余肝脏的胆汁酸的负荷. 这与FXR促使肝脏再生来减轻胆酸的负荷的作用是一致的, 都是起到保护肝脏的目的[35].

3 FXR促进肝脏损伤后修复

除肝再生外, 肝脏损伤后的修复对于肝脏的保护也是至关重要的. 那么FXR在肝脏损伤后修复的过程中是否有作用, 又是何种作用呢? Meng等[36]做过如下实验: 分别给予野生型和FXR敲除的小鼠腹腔注射四氯化碳(CCl_4), 用CCl_4处理啮齿动物是研究毒素导致的肝脏损伤的常见方法, 通常会造成肝脏小叶中心的坏死, 继而发生肝脏纤维化. 与70%肝切除模型相比, 此模型对肝脏的损伤是弥漫性的. 他们观察到由CCl_4引起的肝损伤扰乱了胆汁酸的肝肠循环, 并导致了肝脏中胆汁酸的积聚. 特别是在FXR敲除的小鼠中表现出严重的胆汁淤积和肝损害[36]. 这说明FXR对于控制胆汁酸水平具有重要作用. 而高水平的胆汁酸能够导致肝细胞死亡并很大程度上增加了如TNF-α等炎性细胞因子的含量, 过量的炎性细胞因子又增加了细胞凋亡. 因此, 高水平的胆汁酸所诱导产生的大量炎性细胞因子与肝脏损伤有直接的关系. 这也恰恰说明FXR在保护肝脏, 促进肝脏损伤修复中是必须的. 一方面, FXR的活化能直接将胆汁酸超载的压力转化为促进肝脏修复的动力, FXR可能控制基因表达的程序而促进肝脏损伤后修复[37]; 另一方面, FXR的活化有助于减轻肝脏的胆汁酸超载[38], 这对预防胆汁酸诱发的细胞死亡和其他正常肝细胞修复过程的有害影响有重要作用. 所以我们认为FXR可能是一种新的肝脏保护因子.

另外, 细胞增殖和抗细胞凋亡在肝再生或修复过程中也是非常重要的, Meng等观察到在CCl_4引起肝损伤的急性期, STAT3在FXR敲除的小鼠中的表达被严重的抑制. STAT3基因是近年来发现的凋亡抑制基因, 具有抑制凋亡和参与细胞周期调控的双重功能. FXR敲除的小鼠由于FXR的缺乏导致胆汁酸超载降低了STAT3的磷酸化, 延迟了STAT3对肝脏损伤的反应, 增加了细胞凋亡和肝脏损伤修复的缺陷. 此外, FXR的激活能上调ERK信号通路从而保护肝细胞免受凋亡[14], 这也是从另一方面对肝脏的保护. FXR这种能够促进肝脏损伤修复的能力对抑制肝癌发生也是非常重要的. FXR敲除的小鼠老年时可自发肝脏肿瘤[39-41]. 如果没有FXR在促进肝脏损伤修复中的作用, 肝脏将更易进入损伤/修复的无休止的循环中, 这将持续产生炎性细胞因子和其他生长因子, 这些都是潜在的促肿瘤物质. 此外, 如果胆汁酸水平不受FXR控制的话, 他将导致DNA的损伤并诱导细胞转化. 因此, FXR既能促进肝脏损伤后的修复, 又能抑制肝脏肿瘤的形成, 可见其在保护肝脏中的至关重要的作用. 我们预计, 在未来的研究中, FXR在肝脏保护和肝癌发生中作用的确切联系将是一个令人关注的领域, FXR可能将作为促进肝脏修复和治疗肝脏损伤相关疾病的药物研发的一个新的靶点.

4 FXR的激活促进老化肝脏的再生

尽管肝脏自身能够再生, 但老化显著地降低了这种能力. 老化肝脏增殖能力下降的机制仍不明确. 根据目前掌握的知识, 增殖反应的延迟和减低归因于一些对肝脏损伤后有反应的关键的转录因子如c-Myc和Foxm1b等表达的减低. 这可能是由于老化肝脏中的C/EBPα-Brm-HDAC1

■创新盘点

本综述重点对近年来FXR在肝再生领域内的研究进行了总结, 系统概述了FXR如何联合胆汁酸促进肝脏再生的基本过程和对肝脏修复的重要作用, 以及对老化肝脏再生的促进作用, 为后续研究提供参考.

■应用要点
FXR可能作为促进肝脏修复和治疗肝脏损伤相关疾病的药物研发的一个新靶点, FXR激动剂配体的应用可能是促进肝脏部分移植和肝癌切除术后肝脏再生的潜在方法, 有望加快那些肝脏部分切除术后患者肝脏再生的速度.

蛋白复合体的出现而产生的, 他占据了c-Myc和Foxm1b的启动子从而抑制了他们的活化[7,8,42-45]. Costa和Rando的研究小组发现通过把年幼和年老小鼠的循环系统连在一起, 成为一个"异共生"对[46], 使肝细胞Foxm1b的高表达或者C/EBPα复合体减低能够促进70%肝部分切除术后老化肝脏的增殖. Foxm1b是对许多促进G_1/S与G_2/M的转变和染色体的稳定与分离所必要的细胞周期调节因子的及时表达所必不可少的[47,48]. 他是肝再生过程中细胞复制的关键的调节因子. 年幼小鼠肝脏中Foxm1b功能的缺失可导致肝细胞DNA复制的显著减少和肝部分切除后有丝分裂的抑制[42]. 更重要的是, Foxm1b在年老小鼠再生肝脏中的强制表达能充分的恢复肝细胞DNA的复制和必需的细胞周期调节基因的表达, 从而达到与年幼动物相同水平上[44,45]. 这些结果突出了Foxm1b作为肝再生中的一个关键的调节因子的作用, 并表明激活Foxm1b可有效的促进老化肝脏的再生.

Foxm1b是FXR的一个直接的靶基因, FXR的活化能提高Foxm1b的表达. 在生长激素或年幼动物的血清影响下, 老化肝脏可恢复再生的能力, 意味着老化的肝细胞保留了他们的再生潜能, 并在年轻动物的血清作用下可恢复这种能力. 这表明在老化的再生肝脏的Foxm1b基因表达中, 存在着FXR的缺陷活化和FXR与FXRE的结合力的减低[5]. 然而, 与年幼小鼠相比, 年老小鼠没有FXR和RXR的蛋白水平的改变. 因此, 老龄化可能减低了如胆汁酸、氧化型胆固醇和其他可能导致老化肝细胞再生过程中FXR的缺陷活化的未知因子等内生性FXR配体的水平[12]. 用合成的FXR配体处理年老小鼠能有效的诱导Foxm1b基因表达并促进肝脏再生这一事实能够证实这点. 另外, FXR的缺陷活化能够解释年老小鼠肝再生的减弱以及FXR配体通过诱导Foxm1b的表达和肝细胞DNA的复制能够减轻这些年龄相关的肝再生缺陷[49,50].

5 结论

FXR的功能从最初的控制代谢到调节细胞生长和肿瘤发生等被迅速的扩展. 然而, FXR促进肝脏再生的新作用与曾经确定的调节胆汁酸代谢和抵抗肝毒性的作用是相一致的. FXR的活化导致肝脏胆汁酸水平的降低, 激活Foxm1b和其他参与细胞周期进展的基因, 并促进肝脏的再生. 这有助于调节和释放增加的代谢压力. 因此对FXR在肝脏再生中作用的进一步研究将为这个过程的复杂机制提供新颖的见解. FXR促进肝脏修复的功能对预防肝癌发生和其他的肝脏病理如纤维化等都是必不可少的. 快速的肝脏修复的过程将使肝脏恢复稳态; 反之则将会使肝脏进入慢性损伤和再生的循环中, 这将导致肝的慢性炎症并为肝脏发展成纤维化和癌变创造了环境. 目前没有有效的促进肝脏再生的治疗方法, FXR激动剂配体的应用可能是促进肝脏部分移植和肝癌切除术后肝脏再生的潜在方法. 应用FXR配体促进肝脏再生有以下诸多优点: (1)FXR的活化将改善肝脏代谢功能; (2)预防细胞死亡; (3)直接促进肝脏再生. 所以在不远的将来, 开发有效的、安全的FXR配体进入临床试验, 可以加快那些肝脏部分切除术后患者肝脏再生的速度.

6 参考文献

1 Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31
2 Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 836-847
3 Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 2010; 176: 2-13
4 Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman AX, Wang X. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* 2003; 38: 1331-1347
5 Chen WD, Wang YD, Zhang L, Shiah S, Wang M, Yang F, Yu D, Forman BM, Huang W. Farnesoid X receptor alleviates age-related proliferation defects in regenerating mouse livers by activating forkhead box m1b transcription. *Hepatology* 2010; 51: 953-962
6 Fortner JG, Lincer RM. Hepatic resection in the elderly. *Ann Surg* 1990; 211: 141-145
7 Iakova P, Awad SS, Timchenko NA. Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell* 2003; 113: 495-506
8 Wang GL, Shi X, Salisbury E, Sun Y, Albrecht JH, Smith RG, Timchenko NA. Growth hormone corrects proliferation and transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase in livers of old mice via elimination of CCAAT/enhancer-binding protein alpha-Brm complex. *J Biol Chem* 2007; 282: 1468-1478
9 Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM, Weinberger C. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 1995; 81: 687-693
10 Bishop-Bailey D, Walsh DT, Warner TD. Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3668-3673
11 Wang YD, Chen WD, Huang W. FXR, a target for different diseases. *Histol Histopathol* 2008; 23: 621-627
12 Wang YD, Chen WD, Moore DD, Huang W. FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res* 2008; 18: 1087-1095
13 Wang YD, Chen WD, Wang M, Yu D, Forman BM,

Huang W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology* 2008; 48: 1632-1643
14 Wang YD, Yang F, Chen WD, Huang X, Lai L, Forman BM, Huang W. Farnesoid X receptor protects liver cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and fasting in vivo. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 1622-1632
15 Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; 284: 1362-1365
16 Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 1999; 284: 1365-1368
17 Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Zhang Y. FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 572-580
18 Zhang Y, Edwards PA. FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett* 2008; 582: 10-18
19 Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116: 1102-1109
20 Teodoro JS, Rolo AP, Palmeira CM. Hepatic FXR: key regulator of whole-body energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 458-466
21 Claudel T, Staels B, Kuipers F. The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2020-2030
22 Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-S53
23 刘学丽, 王海涛. 细胞因子和生长因子在肝再生中的作用. 中国比较医学杂志 2010; 20: 60-66
24 安永, 别平. 细胞因子与肝再生. 世界华人消化杂志 2001; 9: 575-578
25 Walters JR. Bile acids are physiological ligands for a nuclear receptor. *Gut* 2000; 46: 308-309
26 Ueda J, Chijiiwa K, Nakano K, Zhao G, Tanaka M. Lack of intestinal bile results in delayed liver regeneration of normal rat liver after hepatectomy accompanied by impaired cyclin E-associated kinase activity. *Surgery* 2002; 131: 564-573
27 Csanaky IL, Aleksunes LM, Tanaka Y, Klaassen CD. Role of hepatic transporters in prevention of bile acid toxicity after partial hepatectomy in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G419-G433
28 Cui JY, Aleksunes LM, Tanaka Y, Fu ZD, Guo Y, Guo GL, Lu H, Zhong XB, Klaassen CD. Bile acids via FXR initiate the expression of major transporters involved in the enterohepatic circulation of bile acids in newborn mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G979-G996
29 Dong X, Zhao H, Ma X, Wang S. Reduction in bile acid pool causes delayed liver regeneration accompanied by down-regulated expression of FXR and c-Jun mRNA in rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2010; 30: 55-60
30 Zhang L, Huang X, Meng Z, Dong B, Shiah S, Moore DD, Huang W. Significance and mechanism of CYP7a1 gene regulation during the acute phase of liver regeneration. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 137-145
31 Li G, Thomas AM, Hart SN, Zhong X, Wu D, Guo GL. Farnesoid X receptor activation mediates head-to-tail chromatin looping in the Nr0b2 gene encoding small heterodimer partner. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 1404-1412
32 Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000; 6: 517-526
33 Anakk S, Watanabe M, Ochsner SA, McKenna NJ, Finegold MJ, Moore DD. Combined deletion of Fxr and Shp in mice induces Cyp17a1 and results in juvenile onset cholestasis. *J Clin Invest* 2011; 121: 86-95
34 Hebanowska A. [Mechanisms of bile acid biosynthesis regulation--autoregulation by bile acids]. *Postepy Biochem* 2011; 57: 314-323
35 Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, Moore DD. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 2006; 312: 233-236
36 Meng Z, Wang Y, Wang L, Jin W, Liu N, Pan H, Liu L, Wagman L, Forman BM, Huang W. FXR regulates liver repair after CCl4-induced toxic injury. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 886-897
37 Lee CG, Kim YW, Kim EH, Meng Z, Huang W, Hwang SJ, Kim SG. Farnesoid X receptor protects hepatocytes from injury by repressing miR-199a-3p, which increases levels of LKB1. *Gastroenterology* 2012; 142: 1206-1217. e7
38 Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. The role of FXR in disorders of bile acid homeostasis. *Physiology* (Bethesda) 2008; 23: 286-295
39 Wolfe A, Thomas A, Edwards G, Jaseja R, Guo GL, Apte U. Increased activation of the Wnt/β-catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in farnesoid X receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 338: 12-21
40 Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* 2007; 67: 863-867
41 Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, Gonzalez FJ. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 2007; 28: 940-946
42 Wang X, Kiyokawa H, Dennewitz MB, Costa RH. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16881-16886
43 Wang X, Krupczak-Hollis K, Tan Y, Dennewitz MB, Adami GR, Costa RH. Increased hepatic Forkhead Box M1B (FoxM1B) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27Kip1 protein levels and increased Cdc25B expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 44310-44316
44 Wang X, Quail E, Hung NJ, Tan Y, Ye H, Costa RH. Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 11468-11473
45 Krupczak-Hollis K, Wang X, Dennewitz MB, Costa RH. Growth hormone stimulates proliferation of old-aged regenerating liver through forkhead box m1b. *Hepatology* 2003; 38: 1552-1562
46 Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 2005; 433: 760-764
47 Costa RH. FoxM1 dances with mitosis. *Nat Cell Biol*

■同行评价

本文系统地介绍了法尼酯X受体(FXR)介导的胆汁酸信号在正常肝再生的重要性, 提示了FXR配体对促进部分肝移植或肝癌切除术后的肝脏再生的潜在应用, 具有一定的创新性和参考价值.

2005; 7: 108-110
48 Laoukili J, Stahl M, Medema RH. FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 92-102
49 Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors in liver disease. *Hepatology* 2011; 53: 1023-1034
50 Neuschwander-Tetri BA. Farnesoid x receptor agonists: what they are and how they might be used in treating liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2012; 14: 55-62

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 •

百世登出版集团推出12种开放获取生物医学期刊全部被PubMed和PMC收录

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

1 World Journal of Biological Chemistry (世界生物化学杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1495/

2 World Journal of Cardiology (世界心脏病学杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1320/

3 World Journal of Clinical Oncology (世界临床肿瘤学杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1494/

4 World Journal of Diabetes (世界糖尿病杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1498/

5 World Journal of Gastrointestinal Endoscopy (世界胃肠内镜杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1323/

6 World Journal of Gastrointestinal Oncology (世界胃肠肿瘤学杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1324/

7 World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology (世界胃肠病理生理学杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1496/

8 World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics (世界胃肠药理学与治疗杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1497/

9 World Journal of Gastrointestinal Surgery (世界胃肠外科杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1325/

10 World Journal of Hepatology (世界肝病学杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1321/

11 World Journal of Radiology (世界放射学杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1322/

12 World Journal of Stem Cells (世界干细胞杂志)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1470/

(总编辑: 马连生2011-05-30)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年8月18日; 20(23): 2179-2183
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

幽门螺杆菌感染与糖化血红蛋白表达相关性的研究进展

李 伟, 杨 桢, 黄德强, 吕农华

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, 在读硕士, 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: 2012-05-22 修回日期: 2012-07-09
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Correlation between *Helicobacter pylori* infection and hemoglobin A1c expression

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: 2012-05-22 Revised: 2012-07-09
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a gram-negative bacterium that is closely related with the pathogenesis of chronic gastritis, peptic ulcer, gastric carcinoma as well as many extra-gastrointestinal tract diseases such as coronary heart disease, iron deficiency anemia, idiopathic thrombocytopenic purpura, and diabetes mellitus (DM). Hemoglobin A1c (HbA1c) level is useful in diagnosing and monitoring DM. Recent studies showed that *H. pylori* is involved in the up-regulation of HbA1c level in DM patients through modulating the expression of leptin and ghrelin, whose interactions affect obesity, insulin sensitivity, glucose homeostasis and DM. Further studies on the association between *H. pylori* infection and HbA1c will certainly provide new prospects for early diagnosis and treatment of *H. pylori*-related DM and its complications.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Diabetes mellitus; Hemoglobin A1c; Insulin resistance

Li W, Yang Z, Huang DQ, Lv NH. Correlation between *Helicobacter pylori* infection and hemoglobin A1c expression. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2179-2183

摘要

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种与胃黏膜疾病关系密切的革兰阴性菌, 研究发现其与糖尿病、冠心病、缺铁性贫血、特发性血小板减少性紫癜等胃肠外疾病亦紧密相关, 然而个中机制却仍不明确. 糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者血糖水平长期监控的重要指标, 研究发现, *H. pylori*感染阳性的DM患者外周血HbA1c水平较*H. pylori*阴性DM患者显著升高, 这很有可能是*H. pylori*通过下调胃黏膜瘦素和脑肠肽的表达, 造成宿主代谢紊乱和胰岛素抵抗而导致的. 关于*H. pylori*和HbA1c关系的早期研究具有一定的局限性, 更为全面、深入的研究势必为*H. pylori*感染相关性糖尿病的早期防治提供新的方向.

关键词: 幽门螺杆菌; 糖尿病; 糖化血红蛋白; 胰岛素抵抗

李伟, 杨桢, 黄德强, 吕农华. 幽门螺杆菌感染与糖化血红蛋白表达相关性的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2179-2183
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2179.asp

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种病因不明的、遗传易感的代谢紊乱疾病, 在全球发病率逐年上升, 主要表现为胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)和胰岛B细胞功能减退, 导致高血糖症(glucose homeostasis, GH), 引发一系列代谢紊乱综合征[1]. 长期高血糖会使血红蛋白发生非酶促

■背景资料
幽门螺杆菌(*H. pylori*)是一种与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌等胃黏膜疾病关系密切的革兰阴性菌, 其与糖尿病(DM)、冠心病、缺铁性贫血、特发性血小板减少性紫癜等胃肠外疾病亦紧密关联, 然而其中机制却仍不明确.

■同行评议者
李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

■研发前沿
DM患者的*H. pylori*感染率普遍高于非DM人群, 且根除后再感染更为常见, 此外, 实验还发现*H. pylori*感染状况与HbA1c表达水平之间关系密切, 这很有可能是由*H. pylori*过度激活机体炎症反应, 并抑制瘦素和脑肠肽在胃黏膜的表达而导致的.

的糖基化反应, 形成糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c), 后者进一步结合交联未糖化分子, 引起慢性并发症[2]. HbA1c的个体差异很小, 他反映机体近3-4 mo的血浆葡萄糖水平, 可为较长时间段的血糖浓度提供回顾性评估, 是更有效的血糖长期监控指标[3-5]. 大量前瞻性研究证明, 加强控制HbA1c水平能够显著降低DM患者心肌梗死等慢性并发症的发生[6,7]. 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)作为一种与胃黏膜疾病关系密切的革兰阴性菌, 其亦与代谢紊乱、IR和DM有所关联, 然而其中具体机制仍不明确[8]. 大量研究显示, DM患者的*H. pylori*感染率显著高于非DM组, *H. pylori*感染状况与HbA1c表达水平之间密切相关, 揭示出*H. pylori*很有可能通过抑制瘦素和脑肠肽在胃黏膜的表达, 从而导致宿主各种代谢相关性疾病的发生[9,10].

1 幽门螺杆菌与糖化血红蛋白、糖尿病

*H. pylori*是一种定植在人胃黏膜的革兰阴性菌, 在发展中国家感染率很高, 与慢性胃炎、消化道溃疡、肠上皮化生、非典型增生、MALT淋巴瘤及胃癌的关系密切[11]. 近年来, *H. pylori*与胃肠外疾病之间的关系日益得到关注, 而关于*H. pylori*与DM的研究为数不多[12], 大致分以下几个方面.

1.1 DM患者的*H. pylori*感染率高于非DM人群

Hamed等[13]在实验中发现, DM患者更易感染*H. pylori*, 导致血管相关并发症的发病率也有所增加. Devrajani等[14]也发现DM患者较非DM人群更易感染*H. pylori*, 建议临床上加强对DM患者的血糖监测和*H. pylori*感染筛查. 此外, EL-Eshmawy等[15]检测了162名DM患者和80名健康志愿者的血清抗*H. pylori* IgG、IgA水平, 发现*H. pylori*感染与DM发生率呈正相关, 建议对DM患者进行*H. pylori*筛查. Jeon等[16]通过前瞻性队列研究发现, *H. pylori*感染与DM发病率的增高有关, 提出胃肠道抗生素治疗在DM防治中具有极大的潜能. 近期, Chen等[17]在美国进行的全国性大规模普查发现, *H. pylori*感染程度与HbA1c表达水平呈正相关, 这一现象在≥18周岁的调查对象中尤为显著.

■相关报道
近期美国一项全国性大规模调研发现, *H. pylori*感染程度与HbA1c表达水平呈正相关, 这一现象在≥18周岁的调查对象中尤为显著.

1.2 *H. pylori*感染者罹患DM及其并发症的几率增高

Rahman等[18]在亚裔印度人群中发现, *H. pylori* cagA阳性菌株感染者的血清高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)水平显著高于对照组, 提出*H. pylori*感染与宿主糖耐受和胰岛素分泌障碍密切相关. Zbrahim等[19]通过前瞻性实验证实, cagA+*H. pylori*菌株感染增加了DM患者发生尿微蛋白症和血糖控制不佳的概率. Polyzos等[20]进行的系统性回顾分析显示, *H. pylori*感染与IR密切相关, 认为*H. pylori*感染可能是DM和非酒精性脂肪肝的重要危险因素.

1.3 DM患者的*H. pylori*根除率

Ataseven等[21]发现接受*H. pylori*序贯治疗的DM患者, 其*H. pylori*根除率显著低于非DM组. 此外, 他们进一步对比了成人和儿童DM患者之间*H. pylori*根除率的差异, 认为这是由于儿童没有*H. pylori*反复感染病史和抗生素使用史、抗生素耐药菌株更少所造成的. Ojetti等[22,23]均在对接受*H. pylori*根除治疗的DM患者的随访中发现, DM患者的*H. pylori*根除治疗后复发率显著高于非DM患者.

1.4 DM合并*H. pylori*感染加大了DM并发症和胃癌的风险

Ikeda等[24]按照HbA1c水平将2 603名受试者进行分组, 发现*H. pylori*感染合并高血糖症增加了罹患胃癌的危险度. Toporowska-Kowalska等[25]发现, *H. pylori*感染显著恶化了DM患者代谢调控, 建议在DM患者中合理筛查*H. pylori*感染状况以控制并发症. Baradaran等[26]发现DM肾病患者血清镁水平与*H. pylori*特异性IgG抗体水平呈正相关. Tanriverdi等[27]在93名DM患者中发现*H. pylori*感染过度激活了机体免疫应答, 间接导致尿微蛋白发生, 但由于实验样本量太小, 结果不具统计学意义. Ibrahim等[19]称感染cagA阳性*H. pylori*菌株的DM患者发生尿微蛋白症的概率显著高于对照组, 提出cagA基因型或可作为DM尿微蛋白的早期标志.

1.5 其他

Schimke等[28]进行的样本量为1 179的统计研究发现, *H. pylori* cagA抗体与T2DM及其并发症之间并无联系. Khalil等[29]对100名T1DM患者进行为期1年的随访, 发现*H. pylori*感染患者与非感染者的HbA1c水平无统计学差异. Gunji等[30]称, 尽管*H. pylori* IgG血清阳性和DM之间无统计学关联, 但*H. pylori*感染显著增加了IR的发生率, 且DM患者中*H. pylori*相关性胃炎的发病率却远高于对照组. Akanuma等[31]指出, 根除*H. pylori*能够改善DM患者BMI指数, 但对于控制HbA1c却无显著效果. 这些研究结果使得*H. pylori*感染在DM血糖水平中所扮演的角色更加扑朔迷离.

2 幽门螺杆菌上调糖化血红蛋白表达的可能机制

瘦素和脑肠肽是哺乳动物体内参与能量代谢的

激素, 二者协同调节脂代谢、胰岛素平衡和糖自稳. 脑肠肽是一种由胃底腺细胞、十二指肠内皮细胞等分泌的缩氨酸多肽类激素, 他能抑制胰岛素的分泌, 降低能量消耗并促进体质量增加[32]. 瘦素是由白色脂肪组织产生, 能够减少食物摄入、增强机体能量消耗[33]. 目前普遍认为, *H. pylori*慢性感染不断刺激辅助性T细胞1(T helper cells 1, Th1)极化, 抑制Th2细胞介导的过敏反应, 并刺激大量炎症因子的释放, 在保护机体的同时也可以造成炎症损伤[34], 进一步参与调节瘦素和脑肠肽这两种与代谢相关的激素水平, 从而影响宿主HbA1c表达水平, 最终导致代谢紊乱疾病. *H. pylori*感染与低水平的脑肠肽循环密切相关, 这可能是通过降低胃黏膜脑肠肽生成细胞的功能、增强胃部瘦素水平来实现的[35].

2.1 *H. pylori*感染过度的效应 研究报道, *H. pylori* cagA能够诱导大量促炎因子的释放, 介导胃黏膜上皮细胞信号转导, 导致了免疫炎症瀑布, 进一步引起代谢相关的炎症紊乱[36,37]. Arslan等[38]发现, 肥胖症患者的*H. pylori*特异性IgG水平显著高于对照组(57.2% *vs* 27.0%).

2.2 *H. pylori*感染与糖尿病 Slomiany等[39]称脑肠肽能够调节一氧化氮合酶(NOS)水平, 在*H. pylori*感染引发的炎症应答中起着重要作用. 此外, 他们还发现*H. pylori*菌壁抗原能够刺激胃黏膜产生大量脑肠肽, 后者通过诱导Src活化而削弱*H. pylori*感染引起的胃黏膜炎症反应. Kawashima等[40]在*H. pylori*感染阳性的萎缩性胃炎患者的血浆中检测到低水平的脑肠肽, 这种下降与胃黏膜损伤程度有所关联. Celinsk等[41]发现在消化性溃疡修复过程中, 褪黑素和瘦素的水平显著升高. Jeffery等[42]发现, *H. pylori*感染能够下调脑肠肽和脑肠肽酰基转移酶(GOAT)的表达, 从而影响机体内分泌, 而*H. pylori*根除后脑肠肽的分泌则得以恢复. Ozen等[43]对经济滞后地区的473名儿童进行调研, 提出*H. pylori*感染很可能通过抑制瘦素、脑肠肽、胰岛素样生长因子的表达, 导致青少年生长发育迟缓. Francois等[44]人通过前瞻性实验发现, *H. pylori*根除治疗对于血清瘦素、脑肠肽水平以及体质量指数大有影响, 认为*H. pylori*感染与瘦素和脑肠肽的低表达直接相关.

2.3 代谢相关性疾病与*H. pylori*的胃黏膜定植 Wehrens等[45]发现瘦素受体缺陷组小鼠*H. pylori*感染水平远高于野生组, 表明瘦素受体缺乏小鼠抗*H. pylori*免疫应答能力显著降低. 有学者在链脲霉素构建的T1DM大鼠模型中发现, *H. pylori*感染导致胃黏膜损伤的严重程度和HbA1c水平呈正相关[46].

2.4 *H. pylori*根除治疗与脑肠肽的分泌和胰岛素抵抗的缓解 日本学者称, *H. pylori*能造成宿主免疫功能低下, 有助于DM发生; 当根除*H. pylori*后, IR症就有可能得到缓解[47]. Jang等[48]发现根除*H. pylori*有助于胃黏膜脑肠肽的释放. Thor等[49]发现*H. pylori*感染阳性的胃食管返流患者的血浆脑肠肽水平显著降低并且随着*H. pylori*根除治疗逐渐回升, 提出脑肠肽和迷走神经活动可能是*H. pylori*感染与反流性疾病研究中被忽视的重要环节.

■**名词解释**
糖化血红蛋白(HbA1c): 血液中的葡萄糖与血红蛋白A的链缬氨酸残基发生不可逆的、非酶促的缩合反应而形成的一类次要血红蛋白, 他是DM诊断和长期监测更为有效的指标.

3 结论

研究表明*H. pylori*感染与糖尿病性视网膜、神经系统及肾脏病变的关系密切[50], 通过积极开展*H. pylori*根除治疗以辅助达到降低DM并发症发生率这一控制方式具有良好的发展前景. 此外, 胃肠道抗生素治疗可能会对高BMI和糖耐受的DM患者大有裨益. *H. pylori*感染与HbA1c水平之间的关系研究需要综合考虑宿主基因型和不同环境影响因素, 因此我们迫切需要开展多人种、多地区、多层面的调研, 为*H. pylori*感染相关DM的防治寻找新的方向.

4 参考文献

1 Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M. Medical risk factors for severe west nile virus disease, United States, 2008-2010. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87: 179-184

2 Sacks DB. A1C versus glucose testing: a comparison. *Diabetes Care* 2011; 34: 518-523

3 Stolker JM, Spertus JA, McGuire DK, Lind M, Tang F, Jones PG, Inzucchi SE, Rathore SS, Maddox TM, Masoudi FA, Kosiborod M. Relationship between glycosylated hemoglobin assessment and glucose therapy intensification in patients with diabetes hospitalized for acute myocardial infarction. *Diabetes Care* 2012; 35: 991-993

4 Shima K, Chujo K, Yamada M, Komatsu M, Noma Y, Mizuguchi T. Lower value of glycated haemoglobin relative to glycaemic control in diabetic patients with end-stage renal disease not on haemodialysis. *Ann Clin Biochem* 2012; 49: 68-74

5 Christensen DL, Witte DR, Kaduka L, Jørgensen ME, Borch-Johnsen K, Mohan V, Shaw JE, Tabák AG, Vistisen D. Moving to an A1C-based diagnosis of diabetes has a different impact on prevalence in different ethnic groups. *Diabetes Care* 2010; 33: 580-582

6 Stolker JM, Sun D, Conaway DG, Jones PG, Masoudi FA, Peterson PN, Krumholz HM, Kosiborod M, Spertus JA. Importance of measuring glycosylated hemoglobin in patients with myocar-

■应用要点

研究表明*H. pylori*感染与糖尿病性视网膜、神经系统及肾脏病变的关系密切，通过积极开展*H. pylori*根除治疗以辅助达到降低DM并发症发生率，这一控制方式具有良好的发展前景.

dial infarction and known diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2010; 105: 1090-1094

7 Blonde L. Benefits and risks for intensive glycemic control in patients with diabetes mellitus. *Am J Med Sci* 2012; 343: 17-20

8 Figura N, Franceschi F, Santucci A, Bernardini G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Extragastric manifestations of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2010; 15 Suppl 1: 60-68

9 Demir M, Gokturk HS, Ozturk NA, Kulaksizoglu M, Serin E, Yilmaz U. Helicobacter pylori prevalence in diabetes mellitus patients with dyspeptic symptoms and its relationship to glycemic control and late complications. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2646-2649

10 Lutsey PL, Pankow JS, Bertoni AG, Szklo M, Folsom AR. Serological evidence of infections and Type 2 diabetes: the MultiEthnic Study of Atherosclerosis. *Diabet Med* 2009; 26: 149-152

11 Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of Helicobacter pylori. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 203-213

12 Suzuki H, Franceschi F, Nishizawa T, Gasbarrini A. Extragastric manifestations of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2011; 16 Suppl 1: 65-69

13 Hamed SA, Amine NF, Galal GM, Helal SR, Tag El-Din LM, Shawky OA, Ahmed EA, Abdel Rahman MS. Vascular risks and complications in diabetes mellitus: the role of helicobacter pylori infection. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2008; 17: 86-94

14 Devrajani BR, Shah SZ, Soomro AA, Devrajani T. Type 2 diabetes mellitus: A risk factor for Helicobacter pylori infection: A hospital based case-control study. *Int J Diabetes Dev Ctries* 2010; 30: 22-26

15 El-Eshmawy MM, El-Hawary AK, Abdel Gawad SS, El-Baiomy AA. Helicobacter pylori infection might be responsible for the interconnection between type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis. *Diabetol Metab Syndr* 2011; 3: 28

16 Jeon CY, Haan MN, Cheng C, Clayton ER, Mayeda ER, Miller JW, Aiello AE. Helicobacter pylori infection is associated with an increased rate of diabetes. *Diabetes Care* 2012; 35: 520-525

17 Chen Y, Blaser MJ. Association between gastric Helicobacter pylori colonization and glycated hemoglobin levels. *J Infect Dis* 2012; 205: 1195-1202

18 Rahman MA, Cope MB, Sarker SA, Garvey WT, Chaudhury HS, Khaled MA. Helicobacter pylori Infection and Inflammation: Implication for the Pathophysiology of Diabetes and Coronary Heart Disease in Asian Indians. *J Life Sci* 2009; 1: 45-50

19 Ibrahim A, Zaher T, Ghonemy TA, El-Azim SA, El-Azim MA, Ramadan A. Impact of cytotoxin-associated gene A of Helicobacter pylori strains on microalbuminuria in type 2 diabetes. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2010; 21: 694-700

20 Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Deretzi G. The association between Helicobacter pylori infection and insulin resistance: a systematic review. *Helicobacter* 2011; 16: 79-88

21 Ataseven H, Demir M, Gen R. Effect of sequential treatment as a first-line therapy for Helicobacter pylori eradication in patients with diabetes mellitus. *South Med J* 2010; 103: 988-992

22 Ojetti V, Pellicano R, Fagoonee S, Migneco A, Berrutti M, Gasbarrini A. Helicobacter pylori infection and diabetes. *Minerva Med* 2010; 101: 115-119

23 Ojetti V, Migneco A, Silveri NG, Ghirlanda G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. The role of H. pylori infection in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2005; 1: 343-347

24 Ikeda F, Doi Y, Yonemoto K, Ninomiya T, Kubo M, Shikata K, Hata J, Tanizaki Y, Matsumoto T, Iida M, Kiyohara Y. Hyperglycemia increases risk of gastric cancer posed by Helicobacter pylori infection: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2009; 136: 1234-1241

25 Toporowska-Kowalska E, Wasowska-Królikowska K, Szadkowska A, Bodalski J. [Helicobacter pylori infection and its metabolic consequences in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus]. *Med Wieku Rozwoj* 2007; 11: 103-108

26 Baradaran A, Nasri H. Helicobacter pylori specific IgG antibody and serum magnesium in type-2 diabetes mellitus chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2011; 22: 282-285

27 Tanriverdı O. Association of Helicobacter pylori infection with microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Turk J Gastroenterol* 2011; 22: 569-574

28 Schimke K, Chubb SA, Davis WA, Davis TM. Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene-A antibodies do not predict complications or death in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Atherosclerosis* 2010; 212: 321-326

29 Khalil T, Dorchy H, Scaillon M, Melot C. [Helicobacter pylori infection and eradication are not related to glycosylated hemoglobin levels (HbA1c) in young patients with type 1 diabetes]. *Presse Med* 2007; 36: 1191-1195

30 Gunji T, Matsuhashi N, Sato H, Fujibayashi K, Okumura M, Sasabe N, Urabe A. Helicobacter pylori infection significantly increases insulin resistance in the asymptomatic Japanese population. *Helicobacter* 2009; 14: 144-150

31 Akanuma M, Yanai A, Sakamoto K, Hirata Y, Yamaji Y, Kawazu S, Maeda S. Influence of Helicobacter pylori Eradication on the Management of Type 2 Diabetes. *Hepatogastroenterology* 2012; 59

32 Pirolla EH, Jureidini R, Barbosa ML, Ishikawa LC, Camargo PR. A modified laparoscopic sleeve gastrectomy for the treatment of diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome in obesity. *Am J Surg* 2012; 203: 785-792

33 Granado M, Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Argente J, Chowen JA. Leptin in early life: a key factor for the development of the adult metabolic profile. *Obes Facts* 2012; 5: 138-150

34 Amedei A, Codolo G, Del Prete G, de Bernard M, D'Elios MM. The effect of Helicobacter pylori on asthma and allergy. *J Asthma Allergy* 2010; 3: 139-147

35 Slomiany BL, Slomiany A. Ghrelin protection against lipopolysaccharide-induced gastric mucosal cell apoptosis involves constitutive nitric oxide synthase-mediated caspase-3 S-nitrosylation. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 280464

36 Zhong Q, Shao S, Mu R, Wang H, Huang S, Han J, Huang H, Tian S. Characterization of peptidoglycan hydrolase in Cag pathogenicity island of Helicobacter pylori. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 503-509

37 Lu DY, Chen HC, Yang MS, Hsu YM, Lin HJ, Tang CH, Lee CH, Lai CK, Lin CJ, Shyu WC, Lin FY, Lai CH. Ceramide and Toll-like receptor 4 are mobilized into membrane rafts in response to Helicobacter pylori infection in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2012; 80: 1823-1833

38 Arslan E, Atilgan H, Yavaşoğlu I. The prevalence of Helicobacter pylori in obese subjects. *Eur J Intern Med* 2009; 20: 695-697

39 Slomiany BL, Slomiany A. Role of ghrelin-induced cSrc activation in modulation of gastric mucosal inflammatory responses to Helicobacter pylori. *Inflammopharmacology* 2011; 19: 197-204
40 Kawashima J, Ohno S, Sakurada T, Takabayashi H, Kudo M, Ro S, Kato S, Yakabi K. Circulating acylated ghrelin level decreases in accordance with the extent of atrophic gastritis. *J Gastroenterol* 2009; 44: 1046-1054
41 Celinski K, Konturek PC, Konturek SJ, Slomka M, Cichoz-Lach H, Brzozowski T, Bielanski W. Effects of melatonin and tryptophan on healing of gastric and duodenal ulcers with Helicobacter pylori infection in humans. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 521-526
42 Jeffery PL, McGuckin MA, Linden SK. Endocrine impact of Helicobacter pylori: focus on ghrelin and ghrelin o-acyltransferase. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1249-1260
43 Ozen A, Furman A, Berber M, Karatepe HO, Mutlu N, Sarıçoban HE, Büyükgebiz B. The effect of Helicobacter pylori and economic status on growth parameters and leptin, ghrelin, and insulin-like growth factor (IGF)-I concentrations in children. *Helicobacter* 2011; 16: 55-65
44 Francois F, Roper J, Joseph N, Pei Z, Chhada A, Shak JR, de Perez AZ, Perez-Perez GI, Blaser MJ. The effect of H. pylori eradication on meal-associated changes in plasma ghrelin and leptin. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 37
45 Wehrens A, Aebischer T, Meyer TF, Walduck AK. Leptin receptor signaling is required for vaccine-induced protection against Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2008; 13: 94-102
46 Ukarapol N, Bégué RE, Hempe J, Correa H, Gómez R, Vargas A. Association between Helicobacter felis-induced gastritis and elevated glycated hemoglobin levels in a mouse model of type 1 diabetes. *J Infect Dis* 2002; 185: 1463-1467
47 Imai J, Yamada T, Saito T, Ishigaki Y, Hinokio Y, Kotake H, Oka Y, Katagiri H. Eradication of insulin resistance. *Lancet* 2009; 374: 264
48 Jang EJ, Park SW, Park JS, Park SJ, Hahm KB, Paik SY, Sin MK, Lee ES, Oh SW, Park CY, Baik HW. The influence of the eradication of Helicobacter pylori on gastric ghrelin, appetite, and body mass index in patients with peptic ulcer disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 2: S278-S285
49 Thor PJ, Błaut U. Helicobacter pylori infection in pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 3: 81-90
50 Agrawal RP, Sharma R, Garg D, Pokharna R, Kochar DK, Kothari RP. Role of Helicobacter pylori in causation of diabetic gastropathies and non-gastrointestinal complications in type 2 diabetes. *J Indian Med Assoc* 2010; 108: 140-143

■同行评价
本文有较好的科学性和实用性, 对糖尿病的临床诊断和治疗提供了较好的参考价值.

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8月18日; 20(23): 2184-2188
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

洛贝林逆转胃癌细胞SGC7901/VCR多药耐药的作用

谷 苗, 李国庆, 彭昌能

■背景资料
半边莲, 桔梗科植物, 主要化学成分含生物碱、黄酮甙、皂甙和氨基酸等, 国内有学者证实其对胃癌细胞有抑制作用. 洛贝林, 是半边莲的主要组成部分, 隶属哌啶类生物碱, 别名山梗菜碱、祛痰菜碱、北美山梗菜碱.

谷苗, 李国庆, 南华大学附属第二医院消化内科 湖南省衡阳市 421001
彭昌能, 郴州市第一人民医院消化内科 湖南省郴州市 423000
谷苗, 硕士, 医师, 主要从事消化系肿瘤防治方面的基础研究.
作者贡献分布: 此课题由谷苗与李国庆设计; MTT、RT-PCR和Western blot分析由谷苗与彭昌能操作完成; 论文写作由谷苗与李国庆完成.
通讯作者: 李国庆, 主任医师, 421001, 湖南省衡阳市石鼓区解放路30号, 南华大学附属第二医院消化内科. ligq1970@yahoo.com
电话: 0734-8899907
收稿日期: 2011-12-15 修回日期: 2012-01-15
接受日期: 2012-07-08 在线出版日期: 2012-08-18

Lobelin reverses multidrug resistance of human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR

Miao Gu, Guo-Qing Li, Chang-Neng Peng

Miao Gu, Guo-Qing Li, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China
Chang-Neng Peng, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 423000, Hunan Province, China
Correspondence to: Guo-Qing Li, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China. ligq1970@yahoo.com
Received: 2011-12-15 Revised: 2012-01-15
Accepted: 2012-07-08 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To investigate the reversal effects of lobeline on multidrug resistance (MDR) of human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR, and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: The human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR that had multidrug resistant phenotype was used in this study. MTT assay was used to determine the IC_{50} of VCR and 5-Fu for non-treated SGC7901/VCR cells and SGC7901/VCR cells treated with non-toxic concentration of lobeline (10 μmol/L). RT-PCR was used to detect MDR1 mRNA expression in non-treated SGC7901/VCR cells and SGC7901/VCR cells treated with different final concentrations (5, 10, 20, 50, 100 μmol/L) of lobeline. Western blot was used to determine intracellular P-gp protein expression.

RESULTS: Treatment with 10 μmol/L lobeline increased the chemotherapy sensitivity of SGC7901/VCR cells, and the IC_{50} of VCR declined from 16.55 μg/L ± 0.13 μg/L to 7.27 μg/L ± 0.65 μg/L, with a reversion index of 2.28. The IC_{50} of 5-Fu declined from 11.01 μg/L ± 0.43 μg/L to 9.53 μg/L ± 0.79 μg/L, and the reversion index is 1.16. RT-PCR analysis demonstrated that SGC7901/VCR cells highly expressed MDR1 mRNA, and lobeline decreased MDR1 mRNA expression in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). Western blot analysis indicated that SGC7901/VCR cells highly expressed P-glycoprotein, and lobeline decreased P-glycoprotein expression in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Lobeline can reverse the multidrug resistance of SGC7901/VCR cell line and increase chemotherapy sensitivity of SGC7901/VCR cell line to VCR and 5-Fu possibly via mechanism associated with inhibiting the expression of P-glycoprotein.

Key Words: Lobeline; Gastric carcinoma cells; Multidrug resistance; P-glycoprotein

Gu M, Li GQ, Peng CN. Lobelin reverses multidrug resistance of human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2184-2188

摘要

目的: 探讨哌啶类生物碱洛贝林(Lobeline)能否逆转人胃癌多药耐药细胞株SGC7901/VCR的多药耐药, 并进一步探讨洛贝林逆转其多药耐药的机制, 评估其有效性.

方法: 以人胃癌多药耐药细胞株SGC7901/VCR为研究对象, 用四氮唑蓝(MTT)法分别测定在无和有洛贝林(细胞无毒浓度10 μmol/L)作用下多药耐药细胞株SGC7901/VCR对VCR及5-Fu的半数生长抑制率, 并由此求其耐药逆转的倍数; RT-PCR分别检测在无和不同终浓度洛贝林(5、10、20、50、100 μmol/L)作用下多药耐药细胞株SGC7901/VCR的多药耐

■同行评议者
傅春彬, 主任医师, 吉化集团公司总医院一院消化内科

药基因MDR1 mRNA表达情况; Western blot分别检测在无和不同终浓度洛贝林(5、10、20、50、100 μmol/L)作用下多药耐药细胞株SGC7901/VCR的P-gp蛋白表达.

结果: 在洛贝林无毒作用浓度(10 μmol/L)作用下, 多药耐药细胞株SGC7901/VCR对化疗药的敏感性增加, VCR对耐药细胞株的IC_{50}由原来的16.55 μg/L±0.13 μg/L变成7.27 μg/L±0.65 μg/L, 逆转指数约为2.28; 5-Fu对耐药细胞株的IC_{50}由原来的11.01 μg/L±0.43 μg/L变成9.53 μg/L±0.79 μg/L, 逆转指数约为1.16; RT-PCR检测示多药耐药细胞株SGC7901/VCR呈现MDR1 mRNA高度表达, 随洛贝林终作用浓度的增大, MDR1 mRNA表达逐渐下降, 各组间差距有统计学意义(P<0.05); Western blot检测表明多药耐药细胞株SGC7901/VCR高度表达P-gp蛋白, 随洛贝林作用终浓度依次增加P-gp蛋白表达依次减弱, 组间呈浓度依赖性, 差别有统计学意义(P<0.05).

结论: 无细胞毒作用浓度的洛贝林可以逆转胃癌多药耐药细胞株SGC7901/VCR的多药耐药, 增强VCR和5-Fu的化疗敏感性. 洛贝林对SGC7901/VCR细胞多药耐药的逆转可能机制为抑制P-gp蛋白的表达.

关键词: 洛贝林; SGC7901/VCR细胞株; 多药耐药; P-gp蛋白

谷苗, 李国庆, 彭昌能. 洛贝林逆转胃癌细胞SGC7901/VCR多药耐药的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2184-2188
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2184.asp

0 引言

在我国, 胃癌死亡率已居主要恶性肿瘤(胃癌、肝癌、肺癌、食管癌)死亡的首位. 胃癌的预后不佳, 其5年生存率低于20%[1]. 化疗是目前治疗恶性肿瘤的主要手段之一, 尽管新的抗癌药物和化疗方案不断推出, 但治疗效果仍不理想, 其中一个重要原因就是肿瘤对化疗药物产生耐药性, 而多药耐药性是肿瘤细胞免受化疗药物攻击最重要的细胞防御机制. 洛贝林, 是半边莲的主要组成部分, 隶属哌啶类生物碱, 别名山梗菜碱、祛痰菜碱、北美山梗菜碱, Ma等[2]研究证实用无细胞毒作用的洛贝林(10 μmol/L)作用于多药耐药结肠癌Caco-2及白血病CEM/ADR5000细胞后, P-glycoprotein(P-gp)活性的表达被抑制, 且在对阿霉素化疗的细胞中可表现出对多药耐药(multidrug resistance, MDR)有逆转作用, 其可以提高肿瘤耐药细胞株对耐药药物的化疗敏感、杀伤性. 目前洛贝林逆转胃癌多药耐药细胞株的相关研究鲜有报道, 本实验通过洛贝林干预胃癌多药耐药细胞株SGC7901/VCR, 对其不同作用下的细胞耐药作用做进一步研究, 观察其是否通过抑制P-gp的表达来逆转MDR, 初步探讨其逆转多药耐药细胞株的作用机制.

■研发前沿
研究证实, 一定浓度的洛贝林可逆转人结肠癌和人乳腺癌多药耐药细胞株的多药耐药,但目前洛贝林逆转胃癌多药耐药细胞株的相关研究鲜有报道.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌多药耐药细胞株SGC7901/VCR由中南大学细胞中心购买, 维持在VCR终浓度为0.1 g/L的RPMI 1640培养液中连续传代培养, 实验前2 wk撤除VCR. 长春新碱(VCR: 1 mg/支)购自深圳万乐药业有限公司; 5-氟尿嘧啶(5-Fu, 0.25 g/10 mL)购自天津金耀氨基酸有限公司; 盐酸洛贝林(3 g/L)购自北京市燕京药业有限公司; 即用PCR扩增试剂盒购自瑞士Fluda; S100A6鼠抗人单克隆抗体购自Santa cruz公司; 抗鼠二抗购自武汉博士德公司; 鼠抗人P-gp单克隆抗体购自Sigma公司; DNA Marker DL 2000购自TaKaRa. 其他试剂均为进口或国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 SGC7901/VCR细胞的培养: 细胞维持在VCR终浓度为0.1 g/L的RPMI 1640培养液中连续传代培养, 在37 ℃、95%饱和湿度、50 mL/L CO_2培养箱中培养, 每2 d换液1次, 用0.25%的胰酶消化液消化, 1∶2传代1次. 于实验前2 wk撤除VCR.

1.2.2 MTT法测洛贝林逆转SGC7901/VCR的多药耐药: (1)按照VCR、5-Fu血药浓度高峰的不同倍数加入不同浓度的药物(VCR血药浓度高峰为50 mg/L, 取其0.02、0.10、0.20、0.40、0.80倍浓度; 5-Fu血药浓度高峰为10 mg/L, 取其0.1、0.5、1.0、2.0、4.0倍浓度; (2)无毒剂量的洛贝林(10 μmol/L)的浓度在Ma等[2]的文献参考下制定, MTT法具体分组方式见表1.

1.2.3 RT-PCR法测定洛贝林干预下SGC7901/VCR细胞MDR1 mRNA的表达: 采用Primer Premier 5.0软件设计引物, 序列见表2. 对各个实验组进行不同处理并收集各个处理组细胞, 采用TRIzol法提取RNA, 用逆转录试剂盒进行反转录, 半定量PCR进行MDR1的检测.

1.2.4 Western blot法测定洛贝林干预下SGC7901/VCR细胞中P-gp蛋白的表达: 对各个实验组进行不同处理并收集各个处理组细胞, 按照标准程序进行Western blot, 检测不同处理组P-gp蛋白的

■相关报道
Ma等研究证实，用无细胞毒作用的洛贝林(10 μmol/L)作用于多药耐药结肠癌Caco-2及白血病CEM/ADR5000细胞后，P-gp活性的表达被抑制，且在对阿霉素化疗的细胞中可以表现出对MDR有逆转作用，其可以提高肿瘤耐药细胞株对耐药药物的化疗敏感、杀伤性.

表 1 MTT法实验细胞分组及给药

分组	处理因素
阴性对照组	不加药物的细胞悬液
空白对照组	不含细胞的RPMI-1640全培养液
细胞处理组	分别为单加倍数浓度稀释的化疗药(VCR/5-Fu)处理组
药物处理组	无毒剂量的洛贝林(10 μmol/L)+各组倍数浓度稀释的化疗药处理组

表 2 MDR1及GAPDH引物序列

名称	序列	长度[1]
MDR1	上游: 5'-CCGAACCGTTGTTTCTTTGACT-3'	317
	下游: 3'-ATAGTCGTCGGGTGTAGTAGTA-5'	
GAPDH	上游: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3'	310
	下游: 3'-TAACGACTACTAGAACTCCG-5'	

[1]单位bp.

表达差异.

统计学处理 各组实验数据以mean±SD表示，采用SPSS16.0统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)，组间均数比较采用LSD检验，$P<0.05$认为有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT法测洛贝林逆转SGC7901/VCR多药耐药的作用结果 Ma等[2]研究证明在洛贝林无毒浓度(10 μmol/L)作用下可以逆转肿瘤细胞的多药耐药. 我们分别在不同VCR、5-Fu浓度的SGC7901/VCR处理组中加入洛贝林，使其终浓度维持在10 μmol/L，发现同等浓度的VCR和5-Fu显示了对SGC7901/VCR的耐药性有部分逆转，提高了细胞中化疗药物的浓度，增加了化疗药的敏感性，VCR对的IC_{50}由原来的16.55 mg/L±1.05 mg/L变成7.27 mg/L±0.65 mg/L，逆转倍数约为2.28；5-Fu对SGC7901/VCR株的IC_{50}由原来的11.01 μg/L±0.43 μg/L变成9.53 μg/L±0.79 μg/L，逆转倍数约为1.16. 结果显示洛贝林对VCR的逆转倍数高于对5-Fu的逆转倍数. 现研究已经证明VCR本身就是P-gp底物，是P-gp底物转运部位的竞争性配体，可被P-gp泵到细胞外，而5-Fu耐药机制为部分P-gp介导. 数据提示VCR的逆转倍数大于5-Fu的逆转倍数，又可以间接说明洛贝林的逆转机制和P-gp密切相关.

2.2 RT-PCR测定洛贝林干预下SGC7901/VCR细胞MDR1 mRNA的表达 SGC7901/VCR细胞在300 bp左右的位置有清晰条带，与预计产物大小为317 bp相符，多药耐药细胞株SGC7901/VCR存在MDR1 mRNA的过度表达，灰度扫描定量分析显示，SGC7901/VCR细胞MDR1 mRNA水平随着洛贝林的作用浓度增大，其表达水平依次降低，各组间比较存在统计学差异($P<0.05$，图1).

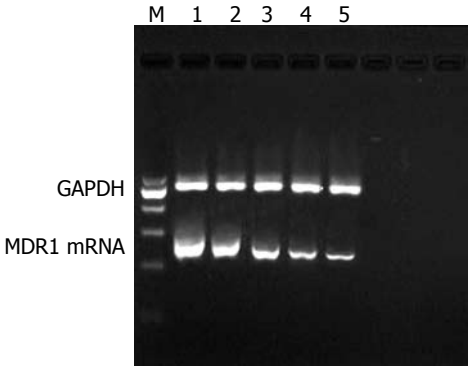


图 1 RT-PCR法测定洛贝林干预下SGC7901/VCR细胞MDR1 mRNA的表达. M: Marker; 1: SGC7901/VCR细胞组; 2-5: 洛贝林的作用终浓度分别为10、20、50、100 μmol/L时MDR1 mRNA的表达.

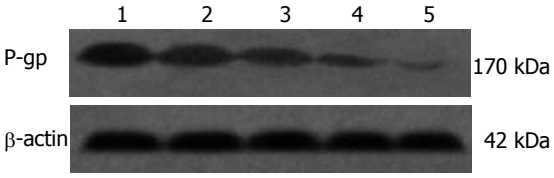


图 2 Western blot法测定洛贝林干预下SGC7901/VCR细胞中P-gp蛋白的表达. 1: SGC7901/VCR细胞组; 2-5: 洛贝林的作用终浓度分别为10、20、50、100 μmol/L时的MDR1表达.

2.3 Western blot法测定洛贝林干预下SGC7901/VCR细胞中P-gp蛋白的表达 耐药细胞株存在P-gp的过度表达，经过不同浓度的洛贝林处理组(终浓度分别为10、20、50、100 μmol/L)作用于SGC7901/VCR后检测细胞内P-gp蛋白的表达水平，灰度扫描定量分析显示，随着洛贝林浓度的增加P-gp的表达逐渐下调，呈浓度依赖性降低，与对照组、不同洛贝林浓度分组比较差异具有显著性($P<0.05$，图2).

3 讨论

在我国，胃癌死亡率已居主要恶性肿瘤(胃癌、肝癌、肺癌、食管癌)死亡的首位. 胃癌的预后不佳，其5年生存率低于20%. 研究证明，肿瘤细胞的MDR和P-gp在肿瘤细胞膜上的过量表达有密切相关性[3-4]，P-gp通过水解ATP酶获得能量，将化疗药物及离子如Ca^{2+}跨膜主动转运出细胞达到细胞内化疗药物浓度下降，从而化疗

作用减弱而产生耐药, 其是典型的能量依赖性“药物泵”. 本实验通过RT-PCR检测, 发现在SGC7901/VCR细胞表面有MDR1 mRNA的高度表达, 并随洛贝林终作用浓度的增大, 分别表现为MDR1 mRNA的表达水平逐渐下降, 提示洛贝林逆转耐药的作用可能与下调MDR1 mRNA表达有关. 通过Western blot检测不同组别SGC7901/VCR的P-gp表达情况, 发现耐药细胞株高度表达的P-gp随各组洛贝林终作用浓度的增大而表达下降, 提示洛贝林可以抑制在MDR中起关键作用的P-gp的表达, 二者之间存在剂量依存关系, 进一步表明其逆转作用可能通过降低P-gp的表达及跨膜转运作用来逆转MDR1, 增强耐药细胞对抗肿瘤药物的敏感性, 从而逆转MDR1.

Ma等[2]通过检测P-gp特异性的荧光底物罗丹明123, 已证实在洛贝林无毒、低细胞毒浓度作用下, 耐药细胞株内罗丹明123浓度可明显增高. 说明在洛贝林存在时, 肿瘤细胞蓄积和外排罗丹明123能力下降, 通过降低P-gp的功能, 增强耐药细胞对抗肿瘤药物的敏感性, 达到逆转MDR. 国内有研究证实通过一定终浓度的洛贝林干预人结肠癌多药耐药细胞株HCT-8/VCR和人乳腺癌多药耐药细胞株MCF-7/ADM, 结果显示洛贝林可分别逆转二者的多药耐药, 且耐药细胞株内P-gp荧光底物罗丹明123的荧光强度增加, 说明其抑制了P-gp的外排[5,6].

目前, 研究中成药制剂对肿瘤细胞生物学的影响主要从细胞毒作用、诱导肿瘤细胞凋亡、逆转多药耐药、提高机体免疫力等方面研究. 高永琳等[7]报道, 半边莲作用于Hela细胞时, 其对细胞增殖的直接抑制作用不明显, 但其可以通过细胞外钙离子的内流来增加细胞内游离钙的浓度来诱导细胞凋亡, 并在其他对诱导肝癌细胞凋亡的实验中得到证实[8]. 细胞内钙耗竭是一种细胞凋亡信号, 通过内质网的DNase Ⅰ和核骨架蛋白酶库等进入近核区或引起生物小分子的释放, 促使细胞外钙离子的内流而达到诱导凋亡的目的[9]. 而洛贝林属于半边莲植物的哌啶生物碱, 我们通过半边莲的作用机制, 推论洛贝林除了抑制P-gp的表达外, 还可能通过一系列未知后续反应来增加细胞内钙离子的浓度来诱导肿瘤细胞的凋亡.

细胞内游离钙离子的浓度改变也是多种受体激活后信号传递过程的中心环节, 特别是对MDR1和P-gp的表达和细胞生物学功能[10,11]. Belpomme等[11]报道, 钙通道阻滞剂维拉帕米可以逆转P-gp介导的MDR, 增加肿瘤细胞内化疗药物的浓度及敏感性, 延长患者的生存期, 主要就是其降低细胞内游离钙离子浓度.

蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是钙离子的重要靶蛋白, 在与钙结合后, PKC被激活, 发生磷酸化, 研究表明[12-14]其在多种表达MDR的肿瘤细胞中活性提高, 提示与P-gp、MDR密切相关, 且增强PKC在细胞中的表达可诱导肿瘤细胞对化疗药物的耐受[15], 其机制可能跟PKC对P-gp转运功能及调节有关[16], 可见PKC与MDR关系密切相关.

洛贝林通过抑制P-gp的表达后, 是否通过调节细胞内基础钙的水平从而导致PKC功能下降? 是否是钙信号和PKC等上游信号从而引起下游因素功能的改变, 进而导致逆转多药细胞的耐药? 而要提高细胞内钙离子浓度是通过激活细胞膜上的钙离子通道, 从而使细胞外的钙离子内流, 还是将细胞内的钙离子释放出来, 洛贝林是哪种途径占优势? 洛贝林是否是BCRP和P-gp全部或者部分的作用底物? 其主次、机制、平衡如何？这些我们都要进一步证实.

■同行评价

本研究证明无细胞毒浓度的洛贝林可以抑制P-gp的表达, 从而逆转其SGC7901/VCR的多药耐药, 具有一定的科研价值和临床意义.

4 参考文献

1 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9

2 Ma Y, Wink M. Lobeline, a piperidine alkaloid from Lobelia can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells. *Phytomedicine* 2008; 15: 754-758

3 Loo TW, Clarke DM. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* 2002; 277: 44332-44338

4 Kim IJ, Bae YT, Kim SJ, Kim YK, Kim DS, Lee JS. Determination and prediction of P-glycoprotein and multidrug-resistance-related protein expression in breast cancer with double-phase technetium-99m sestamibi scintimammography. Visual and quantitative analyses. *Oncology* 2006; 70: 403-410

5 吴敏. 洛贝林逆转结肠癌细胞株HCT-8/VCR多药耐药的实验研究. 中南大学, 2009

6 陈嘉, 申良方, 周蓉蓉, 姚蔚, 钟美佐, 朱虹, 曾珊. 洛贝林逆转人乳腺癌细胞MCF-7/ADM耐药作用及其机制. 中南大学学报(医学版) 2009; 34: 738-743

7 高永琳, 高冬, 林德馨, 白平. 半边莲对Hela细胞钙信号系统的影响. 福建中医学院学报 2002; 12: 23-26

8 范秀珍. 半边莲生物碱和山梗菜碱对人血管内皮细胞保护作用的机制研究. 山东大学, 2005: 10

9 Smit MJ, Leurs R, Bloemers SM, Tertoolen LG, Bast A, De Laat SW, Timmerman H. Extracellular ATP elevates cytoplasmatic free Ca2+ in HeLa cells by the interaction with a 5'-nucleotide receptor. *Eur J Pharmacol* 1993; 247: 223-226

10 Stradal TB, Gimona M. Ca(2+)-dependent association of S100A6 (Calcyclin) with the plasma membrane and the nuclear envelope. *J Biol Chem* 1999;

274: 31593-31596
11 Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E, Facchini T, Goudier MJ, Krakowski I, Netter-Pinon G, Frenay M, Gousset C, Marié FN, Benmiloud M, Sturtz F. Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol* 2000; 11: 1471-1476
12 Drew L, Groome N, Hallam TJ, Warr JR, Rumsby MG. Changes in protein kinase C subspecies protein expression and activity in a series of multidrug-resistant human KB carcinoma cell lines. *Oncol Res* 1994; 6: 429-438
13 Hu YP, Robert J. Inhibition of protein kinase C in multidrug-resistant cells by modulators of multidrug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 201-210
14 Budworth J, Gant TW, Gescher A. Co-ordinate loss of protein kinase C and multidrug resistance gene expression in revertant MCF-7/Adr breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 1997; 75: 1330-1335
15 Bond TD, Valverde MA, Higgins CF. Protein kinase C phosphorylation disengages human and mouse-1a P-glycoproteins from influencing the rate of activation of swelling-activated chloride currents. *J Physiol* 1998; 508: 333-340
16 Yuan YW, Sun AM, Li CG. Correlation of multidrug resistance with up-regulation of protein kinase C expression in KBV200 cells. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2005; 25: 1341-1343, 1356

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》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊.

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法. 定量评价指标体系采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种. 参加核心期刊评审的学科专家达8200多位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊.

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录. 在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心的感谢! (编辑部主任: 李军亮 2012-03-08).

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年8月18日; 20(23): 2189-2193
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

VEGFR-3小干扰RNA对结肠癌裸鼠移植瘤生长的影响

吕志诚, 苏芝兰, 王海忠, 杨文元, 张锋军

吕志诚, 苏芝兰, 王海忠, 杨文元, 张锋军, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院肿瘤科 甘肃省兰州市 730050
苏芝兰, 甘肃武威市医院消化科 甘肃省武威市 733000
甘肃省对外合作基金资助项目, No. 1104WCGA190
作者贡献分布: 此课题由吕志诚设计; 研究过程由吕志诚、苏芝兰、王海忠、杨文元及张锋军操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吕志诚提供; 数据分析由王海忠、杨文元及张锋军完成; 本论文写作由吕志诚与苏芝兰完成.
通讯作者: 吕志诚, 7300500, 甘肃省兰州市七里河区南滨河中路333号, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院肿瘤科.
lyuzc@sohu.com
电话: 0931-8994057
收稿日期: 2012-05-20 修回日期: 2012-06-08
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

SiRNA-mediated down-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 3 inhibits the growth of human colorectal cancer cell xenografts in nude mice

Zhi-Cheng Lv, Zhi-Lan Su, Hai-Zhong Wang, Wen-Yuan Yang, Feng-Jun Zhang

Zhi-Cheng Lv, Hai-Zhong Wang, Wen-Yuan Yang, Feng-Jun Zhang, Department of Oncology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Zhi-Lan Su, Department of Gastroenterology, Wuwei City Hospital, Wuwei 733000, Gansu Province, China
Correspondence to: Zhi-Cheng Lv, Department of oncology, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. lyuzc@sohu.com
Received: 2012-05-20 Revised: 2012-06-08
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To investigate the inhibory effect of siRNA-mediated down-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) on the growth of human colorectal carcinoma cell xenografts in nude mice.

METHODS: Human colorectal carcinoma LoVo cells were transplanted subcutaneously into Balb/c nude mice to establish a xenograft tumor model. Fifteen model mice were randomized into three groups and were injected with recombinant plasmid carrying the siRNA (pG-siRNA/VEGFR-3), empty plasmid (pG-HK), and tranfection reagent (control), respectively. Tumor volume and weight were measured, and the reduced rate of tumor growth was calculated. VEGFR-3 mRNA and protein expression was detected by qRT-PCR and Western blot. Microlyphamatic vessels were counted by immunohistochemistry.

RESULTS: Tumor volume and weight were significantly less in the pG-siRNA/VEGFR-3 group than in the pG-HK and control group (both $P < 0.001$). Compared to the control group, the reduced rate of tumor growth was 52.75%, and VEGFR-3 expression was down-regulated in the pG-siRNA/VEGFR-3 group. However, there was no similar inhibitory effect in the control group and pG-HK group. Significant differences in microlymphatic counts were noted between the pG-siRNA/VEGFR-3 group and the two control groups (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: SiRNA-mediated down-regulation of VEGFR-3 could inhibit the growth of human colorectal cancer cell xenografts in nude mice and reduce lymphangiogenesis.

Key Words: Colorectal neoplasms; Vascular endothelial growth factor receptor 3; Nude mice; siRNA

Lv ZC, Su ZL, Wang HZ, Yang WY, Zhang FJ. SiRNA-mediated down-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 3 inhibits the growth of human colorectal cancer cell xenografts in nude mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2189-2193

摘要

目的: 研究血管内皮生长因子受体3(vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR-3)小干扰RNA对结肠癌细胞移植瘤模型生长的影响.

方法: 构建VEGFR-3小干扰RNA表达载体. 将结肠癌LoVo细胞注射入裸鼠皮下建造裸鼠移植瘤模型. 将15只裸鼠结肠癌模型随机分成3组: 实验组(pG-siRNA/VEGFR-3重组质粒)、阴性对照组(pG-HK重组质粒)与空白对照组. 分别瘤体内注射相应的siRNA混合物或转染剂混合液, 每3 d注射1次, 共注射3次, 观

■背景资料
我国结肠癌的发病率有逐渐增加的趋势, 结肠癌淋巴途径转移是最重要的转移方式, Gore和Newman等研究发现VEGFR-3通过和VEGF-C、-D的结合, 促进淋巴管的生成, 起着重要的作用, 阻断该信号途径可以为肿瘤生物治疗提供重要途径.

■同行评议者
王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

■研发前沿
本研究通过应用小干扰RNA表达载体阻断VEGFR-3, 观察该表达质粒对结肠癌体内生长的影响, 期望为结肠癌的临床的治疗开辟一条新的途径.

■相关报道
Lui等通过VEGFR-3的小干扰RNA降低其表达, 抑制了肿瘤细胞的生长. He等将可溶性VEGFR3-Ig的融合蛋白通过载体阻断VEGFR-3信号途径, 从而抑制了肿瘤的淋巴管血管生成和淋巴结转移.

察肿瘤体积的变化; 6 wk后处死裸鼠, 肿瘤称取质量, 并进行qRT-PCR和Western blot测定VEGFR-3 mRNA和蛋白的变化, 通过免疫组织化学进行微淋巴管计数.

结果: 实验组移植瘤体积和质量明显小于阴性对照组和空白对照组, 有显著的统计学意义(P<0.001). 实验组抑制率为52.75%, 与对照组相比, 差异有显著(P<0.001). qRT-PCR和Western blot测定VEGFR-3 mRNA和蛋白的变化比较, 实验组有明显降低(P<0.001). 实验组淋巴管计数较对照组差异显著(P<0.05).

结论: VEGFR-3 siRNA可以抑制裸鼠结肠癌细胞移植瘤的生长, 并减少裸鼠移植瘤淋巴管生成, 能有效抑制结肠癌细胞的生长.

关键词: 结肠癌; 血管内皮生长因子3; 裸鼠; siRNA

吕志诚, 苏芝兰, 王海忠, 杨文元, 张锋军. VEGFR-3小干扰RNA对结肠癌裸鼠移植瘤生长的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2189-2193
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2189.asp

0 引言

结肠癌在我国的发病率有逐渐增加的趋势, 结肠癌和其他恶性肿瘤一样, 晚期几乎都会发生远处转移. 淋巴途径转移是胃肠道肿瘤最重要的转移方式, 但淋巴转移的研究相对滞后. 血管内皮生长因子受体3(vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR-3)是最主要的淋巴管生成因子, 在肿瘤的发生和发展中起着非常重要的作用[1,2]. VEGFR-3通过和VEGF-C、-D的结合, 激活下游的信号通路, 不仅促进淋巴管的生成, 而且对肿瘤的侵袭、增殖和转移密切相关, 其在肿瘤治疗上的应用已成为研究的热点[3,4]. 本研究通过建立裸鼠的结肠癌模型, 构建针对VEGFR-3基因的siRNA真核表达质粒pG-siRNA/VEGFR-3, 将其注射入裸鼠的结肠癌肿瘤中, 观察该表达质粒对结肠癌体内生长的影响, 期望为结肠癌的临床的治疗开辟一条新的途径.

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌LoVo细胞株购自中国科学院上海细胞所; 胎牛血清购自杭州四季青生物制品有限公司; RPMI 1640培养基购自Gibco公司; 细胞培养使用含100 mL/L胎牛血清, 青霉素100 U/mL, 链霉素100 mg/ mL, 在37 ℃、50 mL/L CO_2细胞孵育箱内培养. 脂质体Lipofectarmine™ 2000购自lnvitrogen公司, 限制性内切酶*Hind* Ⅲ、*BamH* Ⅰ, T4 DNA连接酶RT-PCR试剂盒均为大连TaKaRa生物公司产品; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生工公司; RNA提取试剂TRIzol、DEPC购自美国Roche公司; 醋酸纤维膜购自瑞典Amersham公司; 小鼠抗人VEGFR-3单克隆抗体购自美国Abcom公司; 兔抗人β-actin抗体、HRP标记的羊抗兔二抗及兔抗鼠二抗均购自北京中杉生物技术公司; Balb/c雌性裸鼠购自上海斯莱克实验动物中心.

1.2 方法

1.2.1 siRNA的设计和siRNA表达载体的构建: 在Genbank中找到VEGFR-3基因的cDNA序列(NM_002020), 根据Elbashir的设计原则, 并参考在线siRNA靶点设计软件(http: //www.ambion.com/techlib/mis/siRNA-finder.html)确定靶序列. 根据质粒载体质粒载体Genesil的多克隆位点特点, 设计了靶向VEGFR-3家族同源基因片段451-472位点的序列: 5'-GAGAGACTTTGAGCAGCCATT-3'(sense) and 5'-AATGGCTGCTCAAAGTCTCTC-3'(antisense), 命名为pG-siRNA/VEGFR-3. 同时, 设计非特异性dsRNA的序列作为对照: 5'-GACTTCATAAGGCGCATGC-3'(sense) and 5'-GCATGCGCCTTATGAAGTC-3'(antisense), 命名为pG-HK, 由武汉晶赛生物工程公司合成.

1.2.2 动物饲养: 4周龄♀ Balb/c裸小鼠15只, 4-6 mo, 体质量为12.5-14.5 g, 饲养于中国人民解放军兰州军区兰州总医院实验动物中心. 25 ℃-37 ℃无菌恒温、恒湿(45%-50%)的SPF层流罩中饲养, 所有饲料、饮用水及垫料经高压灭菌处理, 每3 d 更换饲料、饮用水及垫料. 为减少进出次数避免污染, 每次更换前进行体质量和肿瘤大小的测量.

1.2.3 结肠癌移植瘤模型的建立: 人结肠癌LoVo细胞株在含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基内加青霉素100 U/mL、链霉素100 U/mL, 置于37 ℃、50 mL/L CO_2及饱和湿度条件下培养. 取对数生长期的LoVo细胞, 用胰酶消化后, 离心去除上清液, PBS溶液重悬细胞, 制备获得1.5×10^6个/mL的细胞悬液, 取0.2 mL接种于裸鼠左颈部皮下. 观察移植瘤生长情况. 1 wk后待肿瘤形成开始用游标卡尺每隔7 d测量一次肿瘤的长径(a)及宽径(b), 肿瘤体积计算公式如下: $V = (ab^2)/2$, 待肿瘤体积达40 mm^3左右时, 将其随机分为3组, 分别为实验组(pG-siRNA/VEGFR-3

重组质粒)、阴性对照组(pG-HK重组质粒)与空白对照组. 每组5只裸鼠, 各组瘤体内注射相应的siRNA混合物或转染剂混合液进行瘤内注射治疗. 实验组每次每只用无菌微量注射器肿瘤体内分别多点注射含有pG-siRNA/VEGFR-3重组质粒的转染试剂混合液(转染试剂按照Invitroen公司的Lipofectamine™ 2000的说明书配制, 质粒为50 μg) 200 μL; 阴性对照组注射仍为内含有pG-HK质粒50 μg的转染剂混合液200 μL, 空白对照组仅为转染剂混合液, 内无任何质粒. 6 d和第9 d分别再注射1次, 共3次, 每隔7 d测量肿瘤最大和最小直径, 计算肿瘤体积. 6 mo后处死裸鼠, 取出肿瘤标本, 称其质量, 计算抑瘤率. 部分放置于-80 ℃冷冻保存以进行下一步基因测定, 部分于10%多聚甲醛溶液中固定, 常规石蜡包埋切片. 抑瘤率(%) = (空白对照组肿瘤质量-实验组肿瘤质量)/空白对照组肿瘤质量×100%.

1.2.4 qRT-PCR法检测血管内皮生长因子受体3mRNA的表达: 提取总RNA, 将收集的细胞在1 mL Trizol试剂中匀浆, 经离心后与异丙酮混合, 室温孵育10 min. 于4 ℃离心15 min, 弃上清, 沉淀块用700 mL/L乙醇冲洗后, 以50 μL DEPC水溶解. 经纯化后将RNA沉淀溶解于DEPC处理的水中, 用分光光度计测量RNA浓度, 于-80 ℃保存备用. 在50 μL的反应体系中加入5 μg总RNA, 5×反应缓冲液10 μL, 10 mmol/L dNTPs 5 μL, RNasin(40 U/μL) 0.5 μL, Oligo(dT) 0.25 μg, 反转录酶(Superscript Ⅱ, 200 U/μL) 2 μL, 0.1 mol/L DTT 0.5 μL, 置37 ℃孵育1 h, 然后在65 ℃加热5 min终止反应. 将cDNA保存于-20 ℃. 采用Primer 5.0引物设计软件设计引物. VEGFR-3特异性PCR引物为上游引物(F): 5'-GACCAGACCATGCTTCAGTGAGA-3'; 下游引物(R): 5'-GTTGCATGGCTGTTCACAGGA-3', 扩增产物为151 bp. 内参β-actin引物序列上游引物为: 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGCATCCGT-3'; 下游引物为: 5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGCCGATG-3', 扩增产物片段长100 bp. 分别将各样品行10倍稀释. 浓度梯度为10^5/2 mL-10^{10}/2 μL. 反应体系如下: PremixExTaq™(2×) 12.5 μL、引物(10 μmol/L)1.0 μL、SYBRGreen Ⅰ稀释液2.5 μL、dH_2O 7.0 μL, 模板2 μL, 总体积25 μL. 1-6号作为标准曲线管. 按浓度梯度加入标准品DNA 2 μL, 7号管作为空白对照管. 其余12管按次序加入样本cDNA 2 μL. 荧光定量PCR的扩增条件同标准品的制备. 通过顺序检测系统观察各扩增曲线、融解曲线, 标准曲线的线形回归系数R值, 统计软件自动进行各样本的mRNA拷贝数的计算. 以VEGFR-3 mRNA与β-actin mRNA拷贝数之比对结果进行标准化.

1.2.5 Western blot检测VEGFR-3表达: 取各组移植瘤组织各50 mg, 加约5倍湿重的裂解缓冲液, 碾磨粉碎匀浆, 裂解细胞提取总蛋白, 于4 ℃离心, 15 000 r/min×10 min, 取上清, 用酚试剂法测蛋白浓度. 用凝胶加样缓冲液将各管蛋白浓度调为2 g/L, 电泳, 4%浓缩胶, 12.5%分离胶, 120 V、50 mA、1.5 h; 转膜, 50 V、100 mA、2 h. 用含5%脱脂奶粉的TBS将膜封闭2 h, TBST漂洗2次×10 min, 分别入VEGFR-3抗体(1∶500)、β-actin抗体(1∶1 000)孵育, 4 ℃过夜, TBST洗2次×10 min, 分别加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG(1∶2 000)室温孵育2 h, TBST洗2次×5 min. 将滤膜放入配好的显色液中显色15-30 min, 取出滤膜, 蒸馏水冲洗, 晾干, 扫描, 软件分析条带的吸光度(A)值, 以VEGFR-3 A值与β-actin A值之比进行标准化处理.

1.2.6 免疫组织化学并淋巴管计数: 标本用10%多聚甲醛固定, 石蜡包埋组织连续4 μm连续切片, 二甲苯脱蜡, VEGFR-3工作浓度为1∶200; DAB显色; SP法染色操作按说明书. PBS代替一抗作为阴性对照. 结果判定: 胞质或者胞膜出现棕黄色颗粒者为VEGFR-3阳性细胞. VEGFR-3阳性微淋巴管结果判断及计数方法按照文献进行[5].

统计学方法 所有数据均经SPSS11.0软件进行统计分析, 计量资料采用mean±SD表示; 两组均数的比较采用t检验; 两组以上均数的比较用方差分析(ANVOA). 以P<0.05为差异有显著性.

2 结果

2.1 裸鼠肿瘤生长曲线 人结肠癌细胞株LoVo接种小鼠7 d, 所有裸鼠体内均肿瘤形成, 各组开始多点注射质粒, 肿瘤生长良好. 结果表明: 在观察的3 mo开始, 实验组pG-siRNA/VEGFR-3与阴性对照组pG-HK和空白对照组比较, 差异有统计学意义(P<0.001), 后两组生长明显快于实验组, 而阴性对照组和空白对照组之间经比较, 则差异无统计学意义(图1).

2.2 裸鼠肿瘤6 mo后移植瘤的质量 所有小鼠6 mo后处死, 取出肿瘤, 称取肿瘤质量并计算抑瘤率. 42 d时裸鼠移植瘤平均质量为: 实验组2.03 g±0.32 g, 阴性对照组5.21 g±0.25 g, 空白对照

■**创新盘点**
本试验通过RNA干扰的方法抑制人结肠癌VEGFR-3的表达, 减少了移植瘤的增长, 具有一定的创新性.

■**应用要点**
利用RNA干扰抑制VEGFR-3的表达, 为进一步阐明VEGFR-3的作用机制和预防淋巴结转移提供了方法和途径, 有着十分重要的理论和实践意义.

■名词解释
siRNA: 是一种短片段双链RNA分子, 能够以同源互补序列的mRNA为靶目标降解特定的mRNA, 从而下调相应基因的表达.

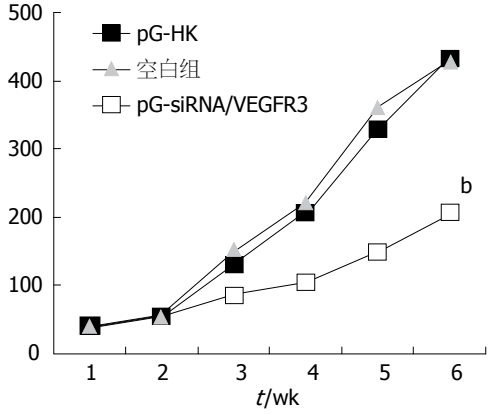


图 1 各组移植瘤不同时期的瘤体积. [b]$P<0.001$ *vs* 其他组.

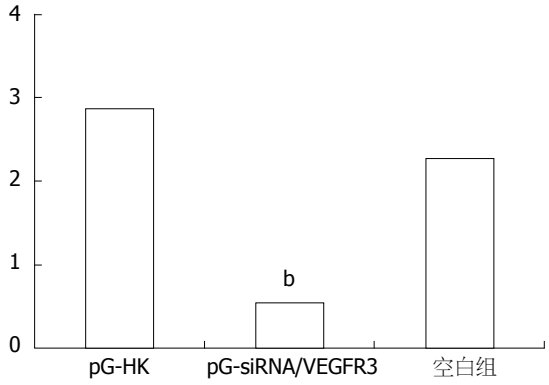


图 2 结肠癌裸鼠移植瘤各组VEGFR-3 mRNA的表达. [b]$P<0.001$ *vs* 其他组.

组5.18 g±0.30 g. 结果表明, 实验组抑制率为60.81%, 与对照组相比, 差异有显著($P<0.001$)阴性对照组的肿瘤抑制率分别为5.79%, 与空白对照组, 差异不显著.

2.3 siRNA对结肠癌LoVo裸鼠移植瘤VEGFR-3表达的影响 实时荧光定量PCR结果表明, VEGFR-3和β-actin的标准曲线的制备均在线性范围内, PCR扩增产物融解曲线满足要求. 阴性对照组和空白对照组的VEGFR-3的基因表达水平(VEGFR-3/β-actin)无显著差异($P>0.05$), 明显高于实验组的表达水平, 与对照组相比, 实验组有41.08%减少, 差异有统计学意义($P<0.001$, 图2). Western blot检测发现在实验组中VEGFR-3蛋白的表达明显低于阴性对照组和空白对照组(图3).

2.4 VEGFR-3蛋白表达 各组裸鼠移植瘤细胞中VEGFR-3蛋白染色主要定位于细胞质, 细胞膜和淋巴管中, 呈棕黄色, 对照组与干扰组相比淋巴管较丰富, 在肿瘤间质出现被染成棕黄色的毛细淋巴管, 部分淋巴管扩张, 每组肿瘤组织切片的LVD值计算结果, 差异有统计学意义($P<0.05$, 图4).

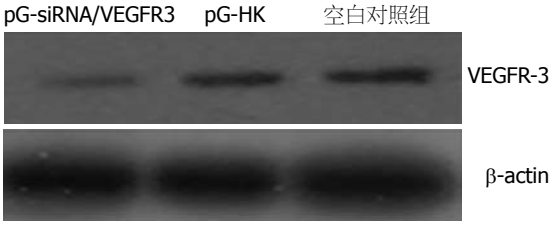


图 3 胰结肠癌裸鼠移植瘤各组VEGFR-3蛋白表达.

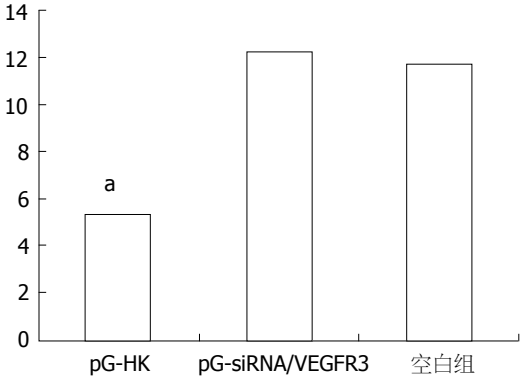


图 4 各组免疫组织化学计数各瘤组织中微淋巴管密度. [a]$P<0.05$ *vs* 其他组.

3 讨论

淋巴转移是恶性肿瘤发生转移的主要途径之一. 血管/淋巴管新生在恶性肿瘤进展和浸润转移过程中发挥着重要作用, 淋巴结转移是判断结肠癌患者预后和确定治疗方案的重要依据, 晚期患者几乎都会发生淋巴转移, 故以结肠癌血管淋巴管生成的各个环节为靶点, 通过其对结肠癌抗淋巴管生成的治疗, 有效地抑制结肠癌的转移、生长和复发, 提高结肠癌患者5年生存率具有重要意义.

VEGFR-3(也称Flt4)是膜受体介导的酪氨酸蛋白激酶受体家族成员, 是淋巴管特异性标志物. 主要的生理作用是参与淋巴管的生成, 其与配体VEGF-C结合后, 诱导内皮细胞的增殖和迁移, 调控淋巴管的生成. 同时VEGFR-3与肿瘤的淋巴道转移密切相关. 在对VEGFR-3的研究中发现, 在非小细胞肺癌、大肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、原发性乳腺癌、前列腺癌、胃癌中VEGFR-3表达与患者的生存时间有相关性, 且认为VEGFR-3的是一个独立的预后因素; VEGFR-3的高表达与淋巴管浸润, 淋巴结转移及不良生存预后相关[6-11].

小干扰RNA技术由于其基因阻断的有效性和特异性已成为疾病基因疗法的理想的工具. 在肿瘤的研究中, 应用siRNA技术可以特异地下调原癌基因、抑癌基因、凋亡相关基因等靶基

因使肿瘤细胞生长受抑制, 从而达到治疗肿瘤的目的. 由于其高稳定性、高效性、高特异性和高穿透性地发挥其RNA抑制肿瘤基因表达, siRNA可为肿瘤的靶向治疗开辟一条新的途径. 本研究将VEGFR-3作为靶位点, 设计并化学合成针对VEGFR-3的siRNA小片段并构建相关的表达载体, 通过裸鼠的移植瘤模型进行实验来研究siRNA VEGFR-3能否利用RNA干扰技术特异、有效地抑制结肠癌细胞株LoVo细胞中VEGFR-3的表达和癌细胞的生长能力.

我们待肿瘤形成后, 选择每3 d肿瘤内多点注射混有转染剂Lipofectamine™ 2000的载体和单纯转染剂的混合液, 观察肿瘤生长情况. 和空白对照组和阴性对照组相比, siRNA组肿瘤生长明显受到抑制, 而阴性对照组和空白对照组相比没有差异. 待6 mo后, 处死动物后, 对移植瘤进行VEGFR-3 mRNA和蛋白表达分析表明, siRNA组VEGFR-3表达明显受到抑制. 而移植瘤免疫组化和HE染色分析发现, siRNA组的肿瘤细胞出现细胞凋亡现象, 说明通过小干扰RNA技术抑制结肠癌细胞VEGFR-3的表达, 可以有效抑制肿瘤的生长. 而免疫组织化学分析也发现siRNA组的肿瘤中淋巴管密度较其他两对照组有明显减少. 通过本研究显示: 靶向VEGFR-3的小干扰RNA表达载体可以抑制结肠癌细胞的生长, 减少肿瘤组织中淋巴管的生成, 提示我们通过靶向VEGFR-3的RNA干扰技术可以有效控制结肠癌肿瘤的生长, 为结肠癌靶向治疗提供新的思路.

4 参考文献

1 Smith NR, Baker D, James NH, Ratcliffe K, Jenkins M, Ashton SE, Sproat G, Swann R, Gray N, Ryan A, Jürgensmeier JM, Womack C. Vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3548-3561

2 Lui Z, Ma Q, Wang X, Zhang Y. Inhibiting tumor growth of colorectal cancer by blocking the expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 using interference vector-based RNA interference. *Int J Mol Med* 2010; 25: 59-64

3 Gore AV, Swift MR, Cha YR, Lo B, McKinney MC, Li W, Castranova D, Davis A, Mukouyama YS, Weinstein BM. Rspo1/Wnt signaling promotes angiogenesis via Vegfc/Vegfr3. *Development* 2011; 138: 4875-4886

4 Newman B, Lose F, Kedda MA, Francois M, Ferguson K, Janda M, Yates P, Spurdle AB, Hayes SC. Possible genetic predisposition to lymphedema after breast cancer. *Lymphat Res Biol* 2012; 10: 2-13

5 He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, Harding T, Jooss K, Takahashi T, Alitalo K. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 2005; 65: 4739-4746

6 Donnem T, Andersen S, Al-Saad S, Al-Shibli K, Busund LT, Bremnes RM. Prognostic impact of angiogenic markers in non-small-cell lung cancer is related to tumor size. *Clin Lung Cancer* 2011; 12: 106-115

7 Khromova N, Kopnin P, Rybko V, Kopnin BP. Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms. *Oncogene* 2012; 31: 1389-1397

8 Donoghue JF, Lederman FL, Susil BJ, Rogers PA. Lymphangiogenesis of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Hum Reprod* 2007; 22: 1705-1713

9 Klasa-Mazurkiewicz D, Jarząb M, Milczek T, Lipińska B, Emerich J. Clinical significance of VEGFR-2 and VEGFR-3 expression in ovarian cancer patients. *Pol J Pathol* 2011; 62: 31-40

10 Raica M, Cimpean AM, Ceausu R, Ribatti D. Lymphatic microvessel density, VEGF-C, and VEGFR-3 expression in different molecular types of breast cancer. *Anticancer Res* 2011; 31: 1757-1764

11 Ozmen F, Ozmen MM, Ozdemir E, Moran M, Seçkin S, Guc D, Karaagaoglu E, Kansu E. Relationship between LYVE-1, VEGFR-3 and CD44 gene expressions and lymphatic metastasis in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3220-3228

■同行评价

本文进行靶向VEGFR-3基因RNA干扰表达载体的构建, 并应用于裸鼠移植瘤模型, 研究过程复杂, 总体设计合理, 方法得当, 结论有一定的科学性, 为肿瘤基因治疗体内研究提供新途径.

编辑 曹丽鸥 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8月18日; 20(23): 2194-2199
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

胃癌患者术前腹腔冲洗液游离DNA中TIMP-3基因甲基化与腹腔微转移的相关性

余江流, 韩 静, 余齐鸣, 郑智国, 方铣华, 凌志强

■背景资料
DNA甲基化是不涉及DNA序列改变的修饰, 是DNA的一种可逆变化, 他可以改变DNA分子的高级结构, 改变基因的转录活性, 从而影响基因的表达水平.

余江流, 凌志强, 温州医学院 浙江省温州市 325035
余江流, 韩静, 郑智国, 凌志强, 浙江省肿瘤医院 浙江省肿瘤研究所 浙江省杭州市 310022
余齐鸣, 浙江省肿瘤医院腹部肿瘤外科 浙江省杭州市 310022
方铣华, 浙江省肿瘤医院病理科 浙江省杭州市 310022
余江流, 在读硕士, 主要从事表观遗传学研究.
浙江省科技计划基金资助项目, No. 2009C33143
作者贡献分布: 文献检索、实验操作、结果分析及论文撰写由余江流完成; 临床病例随访资料及部分实验由韩静协助完成; 标本收集由余齐鸣完成; 数据分析由郑智国完成; 病理诊断由方铣华完成; 选题、指导及论文修改由凌志强完成.
通讯作者: 凌志强, 副研究员, 310022, 浙江省杭州市半山桥区广济路38号, 浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤研究所.
lingzq@hotmail.com
电话: 0571-88122423 传真: 0571-88122587
收稿日期: 2012-05-31 修回日期: 2012-07-03
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Correlation between TIMP-3 hypermethylation in peritoneal lavage fluid and peritoneal micrometastasis in patients with gastric cancer

Jiang-Liu Yu, Jing Han, Qi-Ming Yu, Zhi-Guo Zheng, Xi-Hua Fang, Zhi-Qiang Ling

Jiang-Liu Yu, Zhi-Qiang Ling, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China
Jiang-Liu Yu, Jing Han, Zhi-Guo Zheng, Zhi-Qiang Ling, Department of Oncological Surgery, Zhejiang Cancer Research Institute, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China
Qi-Ming Yu, Department of Oncological Surgery, Cancer Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China
Xi-Hua Fang, Department of Pathology, Cancer Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China
Supported by: the Science and Technology Program of Zhejiang Province, No. 2009C33143
Correspondence to: Zhi-Qiang Ling, Associate Professor, Department of Oncological Surgery, Zhejiang Cancer Research Institute, 38 Guangji Road, Banshanqiao District, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China. lingzq@hotmail.com
Received: 2012-05-31 Revised: 2012-07-03
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

■同行评议者
陈国忠, 主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科

Abstract

AIM: To investigate the relationship between ectopic methylation of the tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP-3) gene in preoperative peritoneal lavage fluid and peritoneal micrometastasis in patients with gastric cancer.

METHODS: Methylation-specific real-time polymerase chain reaction (qMSP) was used to detect the methylation status of CpG islands in the promoter of the TIMP-3 gene in 92 preoperative peritoneal lavage fluid samples. The relationship between ectopic methylation of the TIMP-3 gene and clinicopathologic features and prognosis was then analyzed.

RESULTS: Abberant TIMP-3 gene methylation occurred in 49 (53.26%) samples. Correlation was observed between TIMP-3 gene methylation and tumor size (P = 0.015), distant metastasis (P = 0.013) and venous invasion (P = 0.030), and there is a significant correlation between TIMP-3 gene methylation and tumor growth pattern, differentiation, lymph node metastasis and clinical stage (P = 0.000). However, the level of TIMP-3 methylation had no significant association with patient's gender and age, *Helicobacter pylori* infection, or lesion location (P = 0.833, 0.236, 0.300, 0.236, respectively). Survival analysis indicate that patients who had no TIMP-3 gene methylation had a higher survival rate (P = 0.000).

CONCLUSION: Ectopic methylation of TIMP-3 gene in preoperative lavage fluid samples is associated with peritoneal micrometastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer.

Key Words: Gastric Cancer; Tissue inhibitor of metalloproteinase 3; Methylation; Peritoneal micrometastasis; Prognosis

Yu JL, Han J, Yu QM, Zheng ZG, Fang XH, Ling ZQ. Correlation between TIMP-3 hypermethylation in peritoneal lavage fluid and peritoneal micrometastasis in patients with gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2194-2199

摘要

目的: 探讨胃癌患者术前腹腔冲洗液中组

织金属蛋白酶抑制因子-3(tissue inhibitor of metalloproteinase 3, TIMP-3)基因启动子CpG岛异常甲基化与腹腔微转移的相关性.

方法: 应用甲基化特异性实时荧光聚合酶链反应技术检测92例胃癌患者术前腹腔冲洗液中TIMP-3基因启动子CpG岛甲基化状态, 分析TIMP-3基因异常甲基化与患者临床病理参数及预后之间的关系.

结果: 在92例胃癌患者术前腹腔冲洗液标本中, 有49(53.26%)例检测到了TIMP-3基因甲基化, 且TIMP-3基因甲基化与肿瘤大小(P = 0.013)、静脉侵犯(P = 0.030)和远处转移(P = 0.013)间均存在相关性, 与生长方式、分化程度、淋巴管侵犯、淋巴结转移、浸润深度和临床分期间存在显著相关性(P = 0.000), 而与性别、年龄、*Helicobacter pylori*感染状况以及肿瘤部位等不存在相关性(P分别为0.833、0.236、0.300、0.236). 生存分析发现TIMP-3基因非甲基化患者具有独立的生存优势(P = 0.000).

结论: 胃癌患者术前腹腔冲洗液游离DNA中TIMP-3基因异常甲基化可反映腹腔微转移发生, 并提示预后不良.

关键词: 胃癌; 组织金属蛋白酶抑制因子-3; 甲基化; 腹腔微转移; 预后

余江流, 韩静, 余齐鸣, 郑智国, 方铣华, 凌志强. 胃癌患者术前腹腔冲洗液游离DNA中TIMP-3基因甲基化与腹腔微转移的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2194-2199
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2194.asp

0 引言

胃癌(gastric carcinoma)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 其发生发展是一个多基因参与的多阶段过程. 表观遗传学是近年来热门研究领域之一, 业已证实异常表观调控机制在胃癌的发生、发展中起着重要作用[1]. DNA甲基化是表观遗传的主要作用形式之一. DNA甲基化修饰主要发生在基因启动子CpG岛上, 是在甲基转移酶作用下由S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)作为甲基供体将甲基转移到CpG岛胞嘧啶第5位碳原子上的过程[2,3]. 甲基化后的DNA构象发生改变, 从而影响基因表达.

迄今已发现众多肿瘤相关基因的失活都与其启动子区域的异常甲基化有关, 如hMLH1(human mutl homolog 1)、p16、CDH1等. 组织金属蛋白酶抑制因子-3(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-3)家族目前有4个已经确定的成员, 分别是TIMP-1、2、3和4, TIMP-1、2、4存在于细胞外空间, 而TIMP-3结合在细胞外基质上, 该家族成员的生物学功能是抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)的活性, 并参与调节多种细胞的增殖[4]. 本研究采用甲基化特异性实时荧光PCR(real-time methylation-specific PCR, real-time MSP)技术对92例胃癌患者术前腹腔冲洗液游离DNA中TIMP-3基因启动子区域CpG岛的甲基化状态进行检测, 并探讨其临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2008-01/2009-12浙江省肿瘤医院、浙江省人民医院及杭州市淳安县第一人民医院92例病理确诊的原发性胃腺癌患者术前腹腔冲洗液标本, 病例均经术前内镜活检病理确诊, 术后组织标本均经石蜡切片病理诊断证实, 术前均未行放疗和化疗. 92例患者中男53例、女39例; 年龄36-73岁, 平均年龄53.9岁; 肿瘤位置贲门30例、胃体31例、胃窦31例; 肿瘤直径<5 cm 60例、≥5 cm 32例; 高/中分化62例、低分化30例; 肿瘤生长方式(按Ming氏分型)为膨胀型20例, 浸润型72例; 浸润深度为T1/T2 38例、T3/T4 54例; 淋巴结转移阴性46例, 阳性46例; 静脉侵犯阴性69例, 阳性23例; 淋巴管侵犯阴性25例, 阳性67例; 远处转移阴性85例, 阳性7例; pTNM分期Ⅰ期17例、Ⅱ期29例, Ⅲ期37例、Ⅳ期9例. 收集所有患者术前腹腔冲洗液, 3 000 r/min离心10 min, 分离血液, 再12 000 r/min离心10 min, 取血细胞, 分装每管200 μL置-76 ℃备用.

全部患者由本研究组成员随访负责人专门跟踪随访, 具有完整的随访资料, 均自手术日计生存和随访时间, 至患者死亡或截止时间2011-06.

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取: 采用磁珠法试剂盒(Xygen公司)提取腹腔冲洗液中DNA. 200 μL冲洗液经裂解液处理后, 加入结合液和磁珠, DNA吸附于磁珠上, 以磁体吸附磁珠, 吸弃液体后, 经洗液多次清洗, 最后以洗脱液洗脱DNA, 吸出的上清液即为目的DNA. 以紫外分光光度计测定DNA浓度和纯度, 要求A_{260}/A_{280}比值在1.8-2.0之间. 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性.

1.2.2 DNA亚硫酸氢盐修饰及扩增: 采用亚硫酸氢钠法修饰DNA并纯化回收, 按EpiTect

■研发前沿
目前DNA甲基化研究主要有: 特定基因甲基化与疾病的相关性研究、特定基因甲基化与患者药物敏感性及耐药性研究、甲基化逆转在疾病治疗中的作用.

■相关报道
Gu等研究发现散发型胃癌患者中存在较高频率的TIMP-3异常甲基化现象, 且与肿瘤细胞低分化和患者低生存率相关; Peterson等研究报道TIMP-2、TIMP-3与乳腺癌患者生存率相关, 并影响患者的治疗敏感性.

■**创新盘点**
本研究探讨胃癌患者腹腔冲洗液游离DNA中TIMP-3基因甲基化与患者临床病理特征及预后的关系, 相对于手术切取组织标本, 本实验具有微创性.

Bisulfite(Qiagen公司)使用说明书操作. 10 μg基因组DNA内加入3 mol/L的NaOH裂解液5 μL, 37 ℃变性20 min, 加入2 mol/L(pH 5.0)亚硫酸氢钠520 μL和0.2 mol/L的氢醌30 μL, 50 ℃水浴16-18 h, 于1 mL DNA纯化树脂中加入DNA样品及8%异丙醇2 mL滤析, 3 mol/L的醋酸钠与100%乙醇沉淀, 离心弃上清, 自然干燥, 加20 μL TE溶液溶解, 采用全基因组扩增技术对亚硫酸氢盐修饰DNA进行扩增, -20 ℃保存.

1.2.3 Real-time MSP分析: 设计TIMP-3甲基化及非甲基化特异性引物序列如下: TIMP-3(M)_(F)5'-CGTTTCGTTATTTTTTGTTTTCG-GTTTC-3'; (R)5'-CCGAAAACCCCGCCTCG-3', 扩增子: 116 bp; TIMP-3(UM)_(F)5'-TTTT-GTTTTGTTATTTTTTGTTTTTGGTTTT-3'; (R)5'-CCCCCAAAAACCCCACCTCA-3', 扩增子: 122 bp; 引物由Invitrogen公司合成. 在ABI7500 PCR(ABI system, 美国)仪器上对亚硫酸氢钠法修饰DNA进行real-time MSP分析, 按SYBR Premix Ex Taq Kit(TaKaRa公司)说明书进行. 各样品分别使用甲基化、非甲基化引物进行定量分析, 根据所测CT值通过标准曲线计算在各样品DNA中甲基化的拷贝数. 其甲基化百分率计算公式如下: 甲基化百分率(M%) = 100×(甲基化DNA拷贝数÷甲基化与非甲基化DNA拷贝数之和). 甲基化DNA拷贝数+非甲基化DNA拷贝数的总和用作靶基因DNA总拷贝数. M%<20.0为0分, 20.0<M%<40.0为1分, 40.0<M%<60.0为2分, 60.0<M%<80.0为3分, M%>80.0为4分; 0分定义为非甲基化、1-3分为部分甲基化, 4分为完全甲基化. PCR反映结束后由溶解曲线判定扩增结果: 其中出现甲基化扩增信号, 而没有非甲基化信号的判定为甲基化(M); 出现非甲基化产物信号而没有甲基化产物信号的判定为非甲基化(U); 同时出现甲基化和非甲基化产物信号的判定为半甲基化结果(UM). 用在体外经Sss Ⅰ甲基转移酶处理过的人类基因组DNA(NEB公司)作为阳性对照, 未处理的正常人外周血DNA作为阴性对照, 蒸馏水代替模板作为阴性对照.

统计学处理 应用SPSS18.0统计学软件, 各组间率的差异统计学意义比较采用χ^2检验、似然比χ^2检验或Fisher确切概率法, 用乘积极限法(Kaplan-Meier)进行单因素生存分析并绘制生存曲线, 对数秩检验(Log-Rank Test)进行生存曲线比较, 用Cox比例风险回归模型进行多因素生存分析, 显著性检验采用Wald检验. P<0.05有统计学意义.

2 结果

2.1 胃癌术前腹腔冲洗液中TIMP-3基因的甲基化状态 在92例胃癌患者的术前腹腔冲洗液标本中, TIMP-3基因启动子区域CpG岛完全甲基化有28(30.43%)例, 部分甲基化有21(22.83%)例, 未甲基化的有43(46.74%)例. 本实验将完全甲基化和部分甲基化均做异常甲基化计, 则92例胃癌患者腹腔冲洗液中TIMP-3基因的异常甲基化率达53.26%(49/92).

2.2 TIMP-3基因启动子区域甲基化状态与胃癌临床病理特征 患者的年龄、性别、有无幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染, 以及肿瘤位置与TIMP-3基因的甲基化状态差异无统计学意义(P>0.05), TIMP-3基因甲基化状态与静脉侵犯和远处转移相关(表1, P<0.05), 而TIMP-3基因甲基化状态与肿瘤的生长方式、分化程度、淋巴管侵犯、浸润深度和临床分期之间有显著相关性. 膨胀型和浸润型的甲基化率分别为15%(3/20)和63.9%, 两者差异显著(P = 0.000); 高中分化和低分化的甲基化率分别是38.7%(24/62)和83.3%(25/30), 差异有统计学意义(P = 0.000); TIMP-3基因甲基化与淋巴管侵犯间有显著的相关性(P = 0.000), 阴性患者TIMP-3基因甲基化率为35.82%(24/67), 阳性患者的甲基化率高达100%(25/25); 另外, TIMP-3基因甲基化与胃肿瘤的浸润深度和淋巴结转移也有显著的相关性(P = 0.000), T1、T2患者甲基化率为20.1%, T3、T4患者的甲基化率为75.9%, N0的患者甲基化率是10.9%, N1-N3的患者甲基化率高达95.7%. 在本实验所考虑的13项临床病例和其他特征中, 肿瘤的临床分期与TIMP-3基因甲基化之间的相关性最为显著(P = 0.000), Ⅰ/Ⅱ期患者的甲基化率为8.7%, 而Ⅲ/Ⅳ期患者的甲基化率高达97.8%.

2.3 TIMP-3基因启动子区域甲基化状态与胃癌预后 对所有入组病例进行了术后跟踪随访, 以发生复发、转移或死亡作为随访终点事件, 统计无进展生存期(progress free survival, PFS). 随访截止到2011-06, 92例胃癌患者中43例TIMP-3基因未甲基化病例均没有出现疾病进展或者死亡, 49例TIMP-3基因甲基化的患者只有4例没有出现疾病进展, 其他45例随访15-28 mo时全部出现进展或者死亡, 两者之间的差异显著. 作Kaplan-

表 1 TIMP-3基因甲基化与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	TIMP-3基因(n)		χ^2值	P值
		甲基化	非甲基化		
性别				0.106	0.833
男	53	29	24		
女	39	20	19		
年龄				1.758	0.236
<60	68	39	29		
≥60	24	10	14		
H. pylori				1.218	0.300
(–)	50	24	26		
(+)	42	25	17		
肿瘤位置				1.753	0.236
贲门	30	18	12		
胃体/胃窦	62	31	31		
肿瘤大小				6.829	0.015
<5 cm	60	26	34		
≥5 cm	32	23	9		
生长方式				22.033	0.000
膨胀型	20	3	17		
浸润型	72	46	26		
分化程度				16.172	0.000
高/中	62	24	38		
低	30	25	5		
淋巴管侵犯				30.125	0.000
阴性	67	24	43		
阳性	25	25	0		
静脉侵犯				5.254	0.030
阴性	69	32	37		
阳性	23	17	6		
浸润深度				26.979	0.000
T1/T2	38	8	30		
T3/T4	54	41	13		
淋巴结转移				66.413	0.000
N0	46	5	41		
N1–3	46	44	2		
远处转移				6.649	0.013
M0	85	42	43		
M1	7	7	0		
临床分期				73.399	0.000
I/II期	46	4	42		
III/IV期	46	45	1		

Meier分析, 提示TIMP-3基因非甲基化患者具有明显的生存优势(P = 0.000, 图1). 对实验结果进行Cox回归分析, 分析结果显示肿瘤的临床分期和TIMP-3基因的甲基化状态是胃癌患者术后生存率的独立影响因子, 相对危险度(relative risk, RR)分别为307.058(95%CI: 21.190-4 449.397)和157.300(95%CI: 12.065-2 050.880), 即III/IV期患者术后发生肿瘤进展的可能性是II期患者的307.876倍, TIMP-3基因甲基化的患者术后发生肿瘤进展的可能性是非甲基化患者的157.300倍. 肿瘤大小对术后进展的影响较小(RR = 2.425, 95%CI: 1.350-4.359), 其他临床病例特征与术后进展间相关性均无统计学意义.

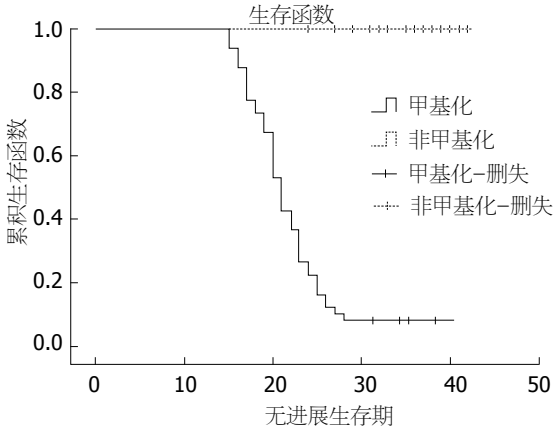


图 1 CDH1甲基化状态相关的生存曲线.

■应用要点
胃癌患者术前腹腔冲洗液游离DNA中TIMP-3基因甲基化水平可在一定程度上反映肿瘤的进展程度, 并提示患者预后不良, 可为临床胃癌诊治及预后评估提供客观依据.

3 讨论

TIMP-3基因位于22号染色体的q13.1位置, 表达21 kDa蛋白, 具有抑制上皮细胞转移、抑制肿瘤血管生成、抑制细胞增殖及促进细胞分化和凋亡的功能[5-9]. Ebrahem等[10]和Janssen等[5]通过小鼠实验证实TIMP-3抑制血管内皮生长因子调节的血管生成. miRNA调节和DNA甲基化都能引起TIMP-3表达缺失, 从而导致肿瘤的发生发展[11].

肿瘤的发生发展与表观遗传有着密切的联系, 以甲基化、乙酰化和microRNA调控等组成的表观遗传调控网络在恶性肿瘤中起着至关重要的作用[12,13]. CpG岛异常甲基化可导致基因表达沉默, 业已证实众多肿瘤抑制基因, 如DAPK(death-associated protein kinase)、BNIP3、p16和CDH5等基因的异常甲基化与肿瘤的发生发展关系密切, 是肿瘤发生的始动因素之一[14-16]. Gu等[17]对胃癌组织中TIMP-3基因甲基化进行了研究, 发现散发型胃癌患者中存在较高频率的TIMP-3异常甲基化现象, 且与肿瘤细胞低分化和患者低生存率相关(P = 0.04). 本研究发现在胃癌患者术前腹腔冲洗液游离DNA中同样存在较高频率的TIMP-3异常甲基化, 且低分化胃癌患者TIMP-3基因甲基化率显著高于高中分化患者, 提示TIMP-3基因可能调节细胞的分化过程. Bernot等[9]研究发现TIMP-3基因在处于分化状态的细胞中表达量降低, 并在分化完成的细胞中恢复表达, 他们进一步研究显示TIMP-3蛋白可抑制转录因子Klf4基因和增强子结合蛋白β(enhancer-binding protein β,

■名词解释
CpG岛: 基因组中长度为300-3 000 bp的富含CpG二核苷酸的一些区域, 主要存在于基因5'的启动子区域. 启动子区中CpG岛的未甲基化状态是基因转录所必需的, 而CpG序列中C的甲基化可导致基因转录被抑制.

EBPβ)的表达, 从而抑制细胞分化.

TIMP-3基因异常甲基化的胃癌患者术后DFS明显低于TIMP-3非甲基化患者, TIMP-3基因甲基化可以作为胃癌患者独立的预后因子(P = 0.000). Castro等[18]应用甲基化特异性多重连接探针扩增技术对7株肺癌细胞株和54例肺癌组织中TIMP-3基因甲基化状况进行检测, 结果显示TIMP-3基因甲基化率在肺鳞癌和肺腺癌之间存在显著性差异, 且TIMP-3基因异常甲基化与肺癌患者的预后相关. Peterson等[19]实验表明TIMP-2、3与乳腺癌患者生存率相关, 并影响患者的治疗敏感性.

我们将胃癌患者的性别、年龄等13项临床病理特征与TIMP-3基因甲基化水平的关系进行分析, 结果显示TIMP-3基因甲基化与不同年龄、性别、*H. pylori*感染状况及肿瘤部位之间均不存在显著性差异. 然而, TIMP-3基因甲基化水平在不同肿瘤大小的患者间存在显著性差异, 这与TIMP-3参与细胞增殖调控理论[4]相吻合. TIMP-3基因甲基化与胃癌不同生长方式、淋巴管或静脉管侵犯与否、TNM分期及临床分期之间分别存在显著性差异, 提示胃癌术前冲洗液游离DNA中TIMP-3基因甲基化状态在一定程度上可以反映胃癌的进展情况及恶性程度. Smith等[20]发现食管癌组织中TIPMP-3基因甲基化水平与患者年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、临床分期及患者生存率均无相关性. 是否TIMP-3基因在食管癌与胃癌中存在着组织差异性有待进一步研究证实.

总之, TIMP-3基因启动子区域CpG岛异常甲基化是TIMP-3基因表达缺失的主要机制之一, 在胃癌进展中起着重要作用. 胃癌患者术前腹腔冲洗液游离DNA中TIMP-3基因甲基化水平可在一定程度上反映肿瘤的进展程度, 并提示患者预后不良, 可为临床胃癌诊治及预后评估提供客观依据.

4 参考文献

1 Hou L, Wang H, Sartori S, Gawron A, Lissowska J, Bollati V, Tarantini L, Zhang FF, Zatonski W, Chow WH, Baccarelli A. Blood leukocyte DNA hypomethylation and gastric cancer risk in a high-risk Polish population. *Int J Cancer* 2010; 127: 1866-1874

2 Luo J, Li YN, Wang F, Zhang WM, Geng X. S-adenosylmethionine inhibits the growth of cancer cells by reversing the hypomethylation status of c-myc and H-ras in human gastric cancer and colon cancer. *Int J Biol Sci* 2010; 6: 784-795

3 Corvalan AH, Maturana MJ. Recent patents of DNA methylation biomarkers in gastrointestinal oncology. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2010; 4: 202-209

4 Li F, Curry TE. Regulation and function of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 1 and TIMP3 in periovulatory rat granulosa cells. *Endocrinology* 2009; 150: 3903-3912

5 Janssen A, Hoellenriegel J, Fogarasi M, Schrewe H, Seeliger M, Tamm E, Ohlmann A, May CA, Weber BH, Stöhr H. Abnormal vessel formation in the choroid of mice lacking tissue inhibitor of metalloprotease-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 2812-2822

6 Zerrouqi A, Pyrzynska B, Febbraio M, Brat DJ, Van Meir. EG.P14ARF inhibits human glioblastoma-induced angiogenesis by upregulating the expression of TIMP3. *Clin Invest* 2012; 122: 1283-1295

7 Lee JK, Shin JH, Suh J, Choi IS, Ryu KS, Gwag BJ. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) expression is increased during serum deprivation-induced neuronal apoptosis in vitro and in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: a potential modulator of Fas-mediated apoptosis. *Neurobiol Dis* 2008; 30: 174-185

8 Yang Y, Jalal FY, Thompson JF, Walker EJ, Candelario-Jalil E, Li L, Reichard RR, Ben C, Sang QX, Cunningham LA, Rosenberg GA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mediates the death of immature oligodendrocytes via TNF-α/TACE in focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 108

9 Bernot D, Barruet E, Poggi M, Bonardo B, Alessi MC, Peiretti F. Down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) expression is necessary for adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2010; 285: 6508-6514

10 Ebrahem Q, Qi JH, Sugimoto M, Ali M, Sears JE, Cutler A, Khokha R, Vasanji A, Anand-Apte B. Increased neovascularization in mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 6117-6123

11 Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankeu A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo M, Condorelli G, Croce CM. miR-221& amp; 222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation. *Cancer Cell* 2009; 16: 498-509

12 Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31: 27-36

13 Wang B, Hsu SH, Majumder S, Kutay H, Huang W, Jacob ST, Ghoshal K. TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene* 2010; 29: 1787-1797

14 Sugita H, Iida S, Inokuchi M, Kato K, Ishiguro M, Ishikawa T, Takagi Y, Enjoji M, Yamada H, Uetake H, Kojima K, Sugihara K. Methylation of BNIP3 and DAPK indicates lower response to chemotherapy and poor prognosis in gastric cancer. *Oncol Rep* 2011; 25: 513-518

15 Wang X, Lau KK, So LK, Lam YW. CHD5 is down-regulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *J Biomed Sci* 2009; 16: 95

16 Barzily-Rokni M, Friedman N, Ron-Bigger S, Isaac S, Michlin D, Eden A. Synergism between DNA methylation and macroH2A1 occupancy in epigenetic silencing of the tumor suppressor gene p16(CDKN2A). *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 1326-1335

17 Gu P, Xing X, Tänzer M, Röcken C, Weichert W, Ivanauskas A, Pross M, Peitz U, Malfertheiner P,

Schmid RM, Ebert MP. Frequent loss of TIMP-3 expression in progression of esophageal and gastric adenocarcinomas. *Neoplasia* 2008; 10: 563-572
18 Castro M, Grau L, Puerta P, Gimenez L, Venditti J, Quadrelli S, Sánchez-Carbayo M. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *J Transl Med* 2010; 8: 86
19 Peterson NB, Beeghly-Fadiel A, Gao YT, Long J, Cai Q, Shu XO, Zheng W. Polymorphisms in tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -3 and breast cancer susceptibility and survival. *Int J Cancer* 2009; 125: 844-850
20 Smith E, De Young NJ, Tian ZQ, Caruso M, Ruszkiewicz AR, Liu JF, Jamieson GG, Drew PA. Methylation of TIMP3 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 203-210

■**同行评价**
DNA甲基化是表观遗传学的重要内容之一, 在肿瘤的发生发展转移过程中起着重要作用. 本研究设计合理, 研究方法先进, 具有一定的科学性和创新性.

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》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

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

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

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年8月18日; 20(23): 2200-2204
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

肝组织病理学检查在婴儿胆汁淤积症鉴别诊断中的价值

刘 艳, 黄志华, 徐三清, 黄永建, 周 华, 董永绥, 冯杰雄

■背景资料
胆道闭锁是引起婴儿病理性黄疸最常见的原因之一, 占婴儿胆汁淤积症的30%以上, 在西方发病率为1∶(15 000-19 000), 而在亚洲发病率更高. 其发病原因和致病机制尚不清楚, 可能与病毒感染、免疫损伤、遗传和发育不良等有关. 淤胆型婴儿肝炎病因也较复杂, 二者均可表现为皮肤持续不退或进行性加重的黄疸, 大便浅黄或白陶土色和肝脏病理征, 临床不易鉴别.

刘艳, 黄志华, 徐三清, 黄永建, 周华, 董永绥, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科 湖北省武汉市 430030
冯杰雄, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿外科 湖北省武汉市 430030
刘艳, 主治医师, 主要从事儿科消化系统疾病的研究.
作者贡献分布: 刘艳对此文作主要贡献; 此课题由刘艳与黄志华设计; 研究过程由刘艳与黄志华完成; 研究所用临床资料由黄志华、徐三清、黄永建、周华、董永绥及冯杰雄提供; 数据分析由刘艳完成; 本论文写作由刘艳完成.
通讯作者: 黄志华, 教授, 主任医师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科. huangzh@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-83662684
收稿日期: 2012-04-30 修回日期: 2012-06-29
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Value of histopathologic examination in differential diagnosis of infantile cholestasis

Yan Liu, Zhi-Hua Huang, San-Qing Xu, Yong-Jian Huang, Hua Zhou, Yong-Sui Dong, Jie-Xiong Feng

Yan Liu, Zhi-Hua Huang, San-Qing Xu, Yong-Jian Huang, Hua Zhou, Yong-Sui Dong, Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Jie-Xiong Feng, Department of Pediatric Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Zhi-Hua Huang, Professor, Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. huangzh@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2012-04-30 Revised: 2012-06-29
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract
AIM: To compare differences in liver histopathology between extrahepatic biliary atresia (EHBA) and infantile cholestatic infantile hepatitis (IH) and to explore the value of liver histopathologic examination in differential diagnosis of these diseases.

METHODS: The clinical data for 65 patients with EHBA and 24 patients with IH who were pathologically diagnosed from April 2002 to December 2009 were retrospectively analyzed.

RESULTS: There were some common histopathologic features between EHBA and IH. The major histopathological features of EHBA were bile duct proliferation, portal fibrosis and inflammatory cell infiltration (all $P < 0.05$), while the outstanding features of IH were hepatic giant cell transformation and extramedullary hematopoiesis (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Although there are some differences between EHBA and IH in histopathologic features, some features are overlapped. Therefore, clinical features for the patients should also be considered. In some cases, exploratory laparotomy is required for differential diagnosis.

Key Words: Cholestasis; Histopathology; Extrahepatic biliary atresia; Infantile cholestatic hepatitis

Liu Y, Huang ZH, Xu SQ, Huang YJ, Zhou H, Dong YS, Feng JX. Value of histopathologic examination in differential diagnosis of infantile cholestasis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2200-2204

摘要
目的: 对比胆道闭锁与淤胆性婴儿肝炎的肝组织病理学的异同点, 探讨肝组织病理学检查在鉴别诊断中的实际应用价值.

方法: 将我院2002-04/2009-12经病理诊断的胆道闭锁65例与淤胆性婴儿肝炎病例24例进行回顾性分析.

结果: 胆道闭锁与淤胆性婴儿肝炎肝组织病理学均可表现为肝小叶结构变化、肝细胞变性坏死、汇管区炎症、胆汁淤积、汇管区纤维化、胆管增生、巨细胞样变和髓外造血. 其中胆道闭锁以汇管区纤维化、胆管增生及汇管区炎症最常见($P<0.05$), 而淤胆性婴儿肝炎则以巨细胞样变及髓外造血最常见($P<0.05$).

结论: 胆道闭锁与淤胆性婴儿肝炎肝组织病理学各有特点, 但有一定的重叠性. 在诊断时仍需结合临床, 必要时行剖腹探查.

关键词: 胆汁淤积; 病理学检查; 肝外胆道闭锁; 淤胆性婴儿肝炎

■同行评议者
巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

刘艳, 黄志华, 徐三清, 黄永建, 周华, 董永绥, 冯杰雄. 肝组织病理学检查在婴儿胆汁淤积症鉴别诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2200-2204
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2200.asp

0 引言

婴儿胆汁淤积是目前儿童肝病就诊及住院的首位原因, 是婴儿期致死或致残的重要原因之一. 最常见病因是肝外胆道闭锁(extrehe-patic biliary atresia, EHBA)与淤胆型婴儿肝炎(infantile hepatitis, IH), 不同的病因, 治疗和预后不同. 目前临床医生所面临的最大挑战就是如何将二者尽早的鉴别诊断, 从而进行有效的治疗, 尤其是对EHBA患儿, 早期手术可以更好的改善预后[1]. 胆道闭锁如果不治疗, 均在2岁前进展为肝硬化而死亡[2]. 肝活检组织学检查是诊断和鉴别诊断的金标准[3]. 现将我院2002-04/2009-12经病理和常规检查诊断的婴儿胆汁淤积症病例进行回顾性的分析.

1 材料和方法

1.1 材料 选择我科2002-04/2009-12经病理及常规检查诊断为胆道闭锁与淤胆性婴儿肝炎的89例患儿作为研究对象进行回顾性分析. 其中诊断为EHBA 65例, 男47例, 女18例, 入院时年龄40-160 d(中位年龄70 d), 经皮肝穿刺活检1例, 手术探查64例; 诊断为IH 24例, 男15例, 女9例, 入院时年龄45-180 d(中位年龄95 d). 病程10-150 d(中位病程56 d), 经皮肝穿刺活检18例, 手术探查6例. 所有患儿均表现为持续不退或进行性加重的黄疸, 且以直接胆红素升高为主(直接胆红素/总胆红素>20%)、肝脏病理征(肝脏肿大或质地异常)、粪便颜色为浅黄或白色.

1.2 方法

1.2.1 常规检查: 所有患儿入院后常规行血生化(包括ALT、AST、TB、DB、γ-GT等)、凝血功能、遗传代谢病筛查及肝胆彩超和/或MRCP检查.

1.2.2 经皮肝穿刺肝组织活检病理检查: (1)肝穿刺指征及术前准备: 共19例经肝穿刺, 其中18例诊断为IH, 1例诊断为EHBA. 指征, 肝胆B超和/或MRCP未提示有肝外胆道闭锁, 但内科护肝退黄治疗效果不佳者; 术前常规查血小板及凝血功能基本正常; 近期无及发热、咳嗽等感染征象; (2)肝穿刺术前准备及方法: 术前几天常规给予静脉输入脂溶性维生素. 术前30 min给予6%水合氯醛口服. 患儿取仰卧位, 双上肢上举. B超定位后, 常规消毒铺巾局麻, 用Menghini肝穿刺针行1 s穿刺法获取肝组织, 术后立即B超检查, 观察有无出血. 穿刺处腹带加压包扎24 h; (3)肝穿刺标本病理学检查: 肝穿刺取出肝组织后, 迅速置于40 g/L甲醛液中固定, 常规石蜡包埋切片, 行苏木精-伊红染色(HE染色), 光镜观察.

1.2.3 外科手术探查及肝组织病理检查: 共70例患儿行肝胆B超和/或MRCP提示肝外胆管发育不良, 高度怀疑为胆道闭锁者转入我院小儿外科行手术探查. 术中如未见明显肝外胆管, 或肝外胆管呈条索状且不通畅者行Kasai手术; 如胆道冲洗证实肝外胆道通畅者, 不予Kasai手术, 所有患儿常规取肝组织送病理检查. 其中6例诊断为IH, 64例诊断为EHBA.

统计学处理 采用SPSS11.5进行χ^2检验, $P<0.05$认为有统计学意义.

2 结果

2.1 经外科手术探查支持淤胆型婴儿肝炎诊断的6例患儿临床及病理特点 手术探查的70例患儿中有6例肝外胆道存在胆汁黏稠, 冲洗后胆道通畅, 证实为IH. 其临床特征(包括血生化TB/DB、影像学检查、手术中所见及肝组织病理, 表1). 此6例病例中, 有3例病理报告考虑为胆道闭锁, 但结合临床最终诊断为IH.

2.2 肝外胆道闭锁和淤胆型婴儿肝炎患儿不同病理改变的比较 EHBA和IH组肝组织病理均可见明显胆汁淤积. 此外, EHBA主要表现为汇管区纤维化、胆管增生及汇管区炎症, 而IH主要表现为巨细胞样变及髓外造血(表2). 主要病理表现见图1.

3 讨论

胆道闭锁是引起婴儿病理性黄疸最常见的原因之一, 占婴儿胆汁淤积症的30%以上[4], 在西方发病率为1∶(15 000-19 000)[5], 而在亚洲发病率更高[6]. 其发病原因和致病机制尚不清楚, 可能与病毒感染、免疫损伤、遗传和发育不良等有关. 淤胆型婴儿肝炎病因也较复杂, 二者均可表现为皮肤持续不退或进行性加重的黄疸, 大便浅黄或白陶土色和肝脏病理征, 临床不易鉴别.

肝组织病理学检查是鉴别诊断的重要手段. 有研究报道, 组织学上预测EHBA最好的病理指标包括胆管增生、肝门纤维化[7]. 而组织学特征表现为髓外造血、巨细胞改变则更多的支持淤胆型婴儿肝炎[8,9]. 最近有来自印度的研究报道, 对EHBA进行剖腹探查前的肝穿刺组织病理学检查, 以了解其病理特征及诊断的准确度. 55

■**研发前沿**
尽管肝组织活检是最有效的鉴别诊断的工具, 肝组织病理学检查是诊断的金标准, 然而, 对胆道闭锁与淤胆性婴儿肝炎肝脏病理切片的判读仍是一种挑战.

■相关报道
有研究报道, 组织学上预测EHBA最好的病理指标包括胆管增生、肝门纤维化. 而组织学特征表现为髓外造血、巨细胞改变则更多的支持淤胆型婴儿肝炎.

表 1 6例经剖腹探查诊断为IH的临床资料

患儿	年龄(d)	TB/DB(μmol/L)	γ-GT(U/L)	B超	MRCP	术中所见	病理
1	150	164.3/99.3	740	肝肿大, 胆囊小\1.6 cm×0.3 cm	肝脾大, 胆囊小, 胆总管可见	肝大质硬, 可见胆囊, 可见肝总管和胆总管, 管腔内胆泥淤积, 完全阻塞管腔, 冲洗后注射美兰通畅	肝细胞羽毛变性, 淤胆明显, 纤维组织增生
2	30	136.2/85.2	354	胆囊小\2.1 cm×0.6 cm	肝内胆管可见, 胆囊显示不清	肝色暗, 质尚软, 胆囊3.0 cm×1.0 cm, 肝外胆管可见, 胆汁黏稠, 用美兰冲洗胆道见流入十二指肠	肝细胞广泛水变性, 胞质疏松, 部分肝细胞内可见胆色素沉积, 小胆管淤胆
3	60	185.4/127.2	856	肝大, 胆囊显示不清	肝大, 胆囊显示欠佳	肝大, 胆囊及肝外胆管可见, 胆汁黏稠, 用美兰冲洗胆道见流入十二指肠	肝细胞广泛变性水肿, 胞质内胆汁淤积, 纤维组织增生
4	90	146.5/105.4	578	肝大, 胆囊小\1.3 cm×0.6 cm	肝脏增大, 肝内胆管可见, 胆囊小	肝大, 质稍硬, 胆囊2.5 cm×1.5 cm, 肝外胆管可见, 胆汁黏稠, 用美兰冲洗胆道见流入十二指肠	肝细胞羽毛变性, 点状坏死, 胆汁淤积, 纤维组织增生
5	52	118.6/81.1	727	肝肿大, 胆囊1.6 cm×0.6 cm	肝脏增大, 肝内胆管可见, 胆囊小	肝肿大, 胆囊可见, 肝外胆管可见, 胆汁黏稠, 用美兰冲洗胆道见流入十二指肠	肝细胞广泛水变性和气球样变性, 见少许中性粒细胞淋巴细胞侵润
6	46	101.1/63	368	胆囊小\1.5 cm×0.4 cm	未做	肝色暗, 质尚软, 胆囊及肝外胆管可见, 胆道内胆汁黏稠, 用美兰冲洗胆道见流入十二指肠	肝细胞水变性, 淤胆, 肝小叶结构存在, 汇管区少许炎性细胞

表 2 EHBA和IHS组不同病理改变的比较 *n*(%)

分组	*n*	肝小叶结构变化	肝细胞变性坏死	汇管区炎症	胆汁淤积	汇管区纤维化	胆管增生	巨细胞样变	髓外造血
EHBA	65	34(52.3)	57(87.7)	47(72.3)	65(100.0)	60(92.3)	51(78.4)	8(12.3)	9(13.8)
IH	24	10(41.7)	24(100.0)	7(29.1)	24(100.0)	8(33.3)	6(25.0)	17(70.8)	16(66.7)
χ^2		0.425	1.916	11.924	–	30.623	19.496	26.896	21.666
P		0.514	0.166	<0.01	–	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

例婴儿胆汁淤积患儿进行经皮肝穿刺活检, 发现胆管增生、胆栓形成及门脉纤维化是预测EHBA较好的指标, 其中胆管增生是区别EHBA和IH最重要的指标[10]. 采用具有7个组织学特征(包括肝门胆管增生、小胆管内胆栓形成、肝门淋巴细胞浸润、多核巨细胞、中性粒细胞浸润、肝细胞肿胀、桥接坏死)的15分评分系统对婴儿胆汁淤积的肝组织进行鉴别, 对于鉴别胆道闭锁和新生儿肝炎有较高的敏感性和特异性, 分值越高, 往往预示胆道闭锁的可能性越大[11].

对本组89例患儿的病理资料进行回顾性分析总结, 发现EHBA组和IH组肝组织病变均有以下这些改变: 肝小叶结构变化; 肝细胞变性坏死; 汇管区炎症; 胆汁淤积; 汇管区纤维化; 胆管增生; 巨细胞样变; 髓外造血. 但二者在每种病理变化中的比例不一样. EHBA更多的表现为汇管区纤维化及炎症、胆管增生, 管内多为胆栓, 而IH以巨细胞样变和髓外造血为主. 与上述临床研究结果基本一致.

在临床工作中医生由于过多的担忧延误手术时机对EHBA会带来不良影响, 往往在内科治疗效果不好且影像学检查提示有胆道闭锁时就急于剖腹探查, 从而导致剖腹探查阴性的出现. 本研究中有6例患儿肝胆B超或MRCP均提示胆囊小或显示不清, 临床表现为黄疸持续不退, 大便颜色浅黄至白陶土色, 经内科治疗黄疸消退不显著, 临床拟诊为EHBA, 最终行剖腹探查, 术中发现患儿胆囊小, 肝外胆管存在, 并有不同程度的胆汁黏稠或胆泥淤积, 冲洗后胆道通畅, 术后黄疸消退较快, 最终诊断为IH. 此外, 有1例患儿肝胆B超或MRCP均未提示有肝外胆管发育不良, 但内科退黄护肝治疗效果不佳, 经肝穿刺肝组织学检查提示为EHBA. 影像学检查在鉴别EHBA和IH上存在一定的局限性, 对临床治疗效果不好者可视情况考虑先进行肝穿刺病理诊断, 而不是急于剖腹探查. 临床研究发现肝

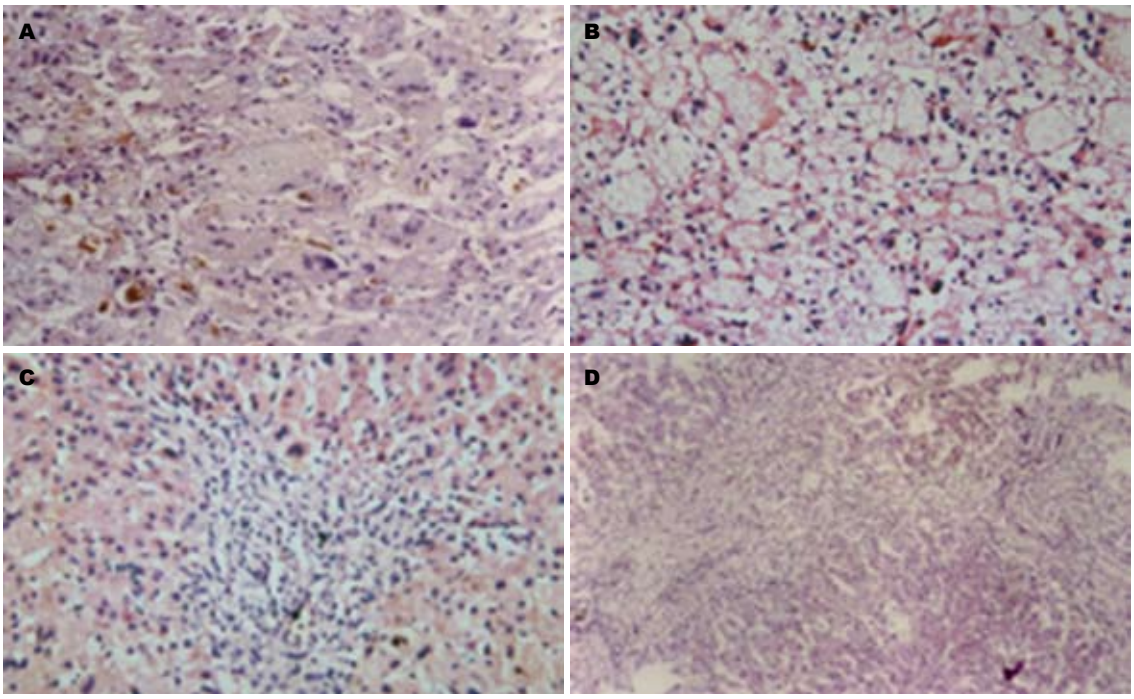


图 1 EHBA和IH组肝组织病理变化(×100). A: IH示肝细胞广泛变性, 胞质疏松, 部分细胞内可见胆红素沉积, 小胆管淤胆; B: IH示局灶性肝细胞巨细胞样变; C: EHBA示肝细胞变性、羽毛状变性, 汇管区纤维结缔组织增生并分割肝小叶慢性炎症细胞浸润; D: EHBA示汇管区大量胆管增生, 增生的小胆管大小不一形态不规则, 其间有多量纤维组织增生和炎性细胞浸润.

■同行评价
本研究设计合理, 结果可靠, 具有重要的临床价值.

穿刺活检诊断胆道闭锁的敏感性和特异性均为88.2%[10]. 因此, 在剖腹探查前先进行肝穿刺活检诊, 不仅减少剖腹手术所带来的并发症及死亡率, 而且减轻部分患者经济负担.

尽管肝组织活检是最有效的鉴别诊断的工具, 肝组织病理学检查是诊断的金标准, 然而, 即使是有经验的病理科医师对胆道闭锁与淤胆性婴儿肝炎肝脏病理切片的判读仍是一种挑战. 在本组资料中, 肝脏病理标本病理诊断为EHBA而最终被临床证实的百分比为95.6%. 据报道[10], 在不知道病史、影像学检查机实验室检查的情况下, 10位病理科医师对97份婴儿胆汁淤积的肝脏病理标本进行读片, 病理诊断为EHBA而最终被临床证实的为79%-98%, 阳性预测值为90.7%. 这一方面取决于病理医师的经验, 另一方面取决于肝活检的时间, 即是在病程的什么阶段取标本. 研究显示[12,13]胆道闭锁肝内病变是进行性的, 早期胆管增生, 随后发生纤维化, 导致最后胆消失[14,15]. 国内临床研究报道[16], 胆道闭锁患儿肝脏组织学检查发现胆管增生、汇管区纤维化和胆汁淤积多在生后5-8 wk内出现, 并随日龄增加逐渐加重; 而巨细胞样变在整个病程中均可出现, 在病程早期较为显著. 在病程的早期即使是进行了肝穿刺组织学检查, 可能会因为胆管增生及纤维化不明显而将胆道闭锁诊断为淤胆型婴儿肝炎. 因此, 在临床工作中对二者进行鉴别时不仅仅局限于病理诊断, 还要结合患儿的血生化、影像学检查及对内科保守治疗的反应, 必要时可进行第2次肝穿刺活检或考虑手术探查.

4 参考文献

1 Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, Karrer FM. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 4-21
2 Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet* 2009; 374: 1704-1713
3 Bassett MD, Murray KF. Biliary atresia: recent progress. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 720-729
4 Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 21-42
5 Pakarinen MP, Rintala RJ. Surgery of biliary atresia. *Scand J Surg* 2011; 100: 49-53
6 Hsiao CH, Chang MH, Chen HL, Lee HC, Wu TC, Lin CC, Yang YJ, Chen AC, Tiao MM, Lau BH, Chu CH, Lai MW. Universal screening for biliary atresia using an infant stool color card in Taiwan. *Hepatology* 2008; 47: 1233-1240
7 Russo P, Magee JC, Boitnott J, Bove KE, Raghunathan T, Finegold M, Haas J, Jaffe R, Kim GE, Magid M, Melin-Aldana H, White F, Whitington PF, Sokol RJ. Design and validation of the biliary atresia research consortium histologic assessment system for cholestasis in infancy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 357-362. e2
8 Torbenson M, Hart J, Westerhoff M, Azzam RK, Elgendi A, Mziray-Andrew HC, Kim GE, Scheimann A. Neonatal giant cell hepatitis: histological and etiological findings. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1498-1503

9 Balamourougane P, Dattagupta S, Bhatnagar V. Evaluation of ultrastructural changes by electron microscopy in neonatal cholestasis. *Trop Gastroenterol* 2009; 30: 167-170
10 Rastogi A, Krishnani N, Yachha SK, Khanna V, Poddar U, Lal R. Histopathological features and accuracy for diagnosing biliary atresia by prelaparotomy liver biopsy in developing countries. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 97-102
11 Lee WS, Looi LM. Usefulness of a scoring system in the interpretation of histology in neonatal cholestasis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5326-5333
12 董蒨, 李龙, 肖现民. 小儿肝胆外科学. 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 2005: 287
13 Nio M, Ohi R, Miyano T, Saeki M, Shiraki K, Tanaka K. Five- and 10-year survival rates after surgery for biliary atresia: a report from the Japanese Biliary Atresia Registry. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 997-1000
14 McKiernan PJ, Baker AJ, Kelly DA. The frequency and outcome of biliary atresia in the UK and Ireland. *Lancet* 2000; 355: 25-29
15 Hadzić N, Davenport M, Tizzard S, Singer J, Howard ER, Mieli-Vergani G. Long-term survival following Kasai portoenterostomy: is chronic liver disease inevitable? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 430-433
16 吴薇, 黄志华, 董永绥, 刘艳. 肝组织病理学检查在肝外胆道闭锁与婴儿肝炎综合征鉴别诊断中的意义. 临床儿科杂志 2009; 27: 912-915

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》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8月18日; 20(23): 2205-2207
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

经皮肝穿胆道引流术在晚期肝泡性包虫中的应用价值

马存凯

马存凯, 青海大学附属医院介入科 青海省西宁市 810001
马存凯, 主治医师, 主要从事良恶性肿瘤、梗阻性黄疸、神经及外周血管病变的介入治疗研究.
通讯作者: 马存凯, 主治医师, 810001, 青海省西宁市同仁路29号, 青海大学附属医院介入科. mack2514@163.com
电话: 0971-6162101
收稿日期: 2012-05-30 修回日期: 2012-07-10
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Percutaneous transhepatic cholangio-drainage for treatment of end-stage hepatic alveolar echinococcosis

Cun-Kai Ma

Cun-Kai Ma, Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China
Correspondence to: Cun-Kai Ma, Attending Physician, Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Qinghai University, 29 Tongren Road, Xining 810001, Qinghai Province, China. mack2514@163.com
Received: 2012-05-30 Revised: 2012-07-10
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To determine the clinical value of percutaneous transhepatic cholangio drainage (PTCD) in the treatment of end-stage hepatic alveolar echinococcosis.

METHODS: Seventeen patients with end-stage hepatic alveolar echinococcosis received PTCD, and serum levels of total bilirubin, alanine transaminase and alkaline phosphatase were determined before and 1 wk, 1 mo after PTCD.

RESULTS: Serum levels of total bilirubin (298 mmol/L *vs* 47 mmol/L, $P < 0.05$), alanine transaminase (167 mmol/L *vs* 63 mmol/L, $P < 0.05$) and alkaline phosphatase (611 mmol/L *vs* 216 mmol/L, $P < 0.05$) significantly decreased in all the patients 1 month after PTCD. One week after PTCD, serum levels of total bilirubin (298 mmol/L *vs* 137 mmol/L, $P < 0.05$) decreased significantly in all the patients, while the decrease in serum levels of alanine transaminase (167 mmol/L *vs* 132 mmol/L, $P > 0.05$) and alkaline phosphatase (611 mmol/L *vs* 587 mmol/L, $P > 0.05$) was not statistically significant.

CONCLUSION: PTCD can improve liver function and reduce jaundice index in patients with end-stage hepatic alveolar echinococcosis.

Key Words: Hepatic alveolar echinococcosis; Percutaneous transhepatic cholangio-drainage; Jaundice

Ma CK. Percutaneous transhepatic cholangio-drainage for treatment of end-stage hepatic alveolar echinococcosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2205-2207

摘要

目的: 探讨经皮肝穿胆道引流术(percutaneous transhepatic cholangio drainage, PTCD)在晚期肝泡性包虫中的应用价值.

方法: 17例伴发黄疸的晚期肝泡性包虫患者, 经皮肝穿胆道引流, 并对术前、术后1 wk及术后1 mo的肝功能、黄疸指标总胆红素、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶数值进行测定及比较.

结果: 17例患者术后1 mo总胆红素(298 mmol/L *vs* 47 mmol/L, $P<0.05$)、谷丙转氨酶(167 mmol/L *vs* 63 mmol/L, $P<0.05$)、碱性磷酸酶(611 mmol/L *vs* 216 mmol/L, $P<0.05$)数值均较术前明显下降; 术后1 wk总胆红素值(298 mmol/L *vs* 137 mmol/L, $P<0.05$)明显下降, 谷丙转氨酶(167 mmol/L *vs* 132 mmol/L, $P>0.05$)、碱性磷酸酶(611 mmol/L *vs* 587 mmol/L, $P>0.05$)亦有所下降, 但差异不明显.

结论: PTCD可使晚期泡性肝包虫患者的黄疸指数下降、肝功能改善, 为药物及手术治疗争取机会.

关键词: 肝泡性包虫; 经皮肝穿胆道引流; 黄疸

马存凯. 经皮肝穿胆道引流术在晚期肝泡性包虫中的应用价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2205-2207
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2205.asp

■**背景资料**
晚期肝泡性包虫患者肝功能差、黄疸指数高, 无法行肝切除及移植手术, 并无法耐受药物治疗. 而经皮肝穿胆道引流术(PTCD)可使晚期泡性肝包虫患者的黄疸指数下降、肝功能改善, 为药物及手术治疗争取机会.

0 引言

肝泡性包虫是由多房棘球绦虫虫卵感染引起的具有地方流行性和自然疫原性的动物源性人畜

■**同行评议者**
肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

■研发前沿
肝泡性包虫早中期的治疗方法有根治性肝切除、姑息性肝切除、肝移植、介入和药物治疗等，但晚期肝包虫因肝功能差、黄疸指数高、患者一般情况差，缺乏有效治疗方法.

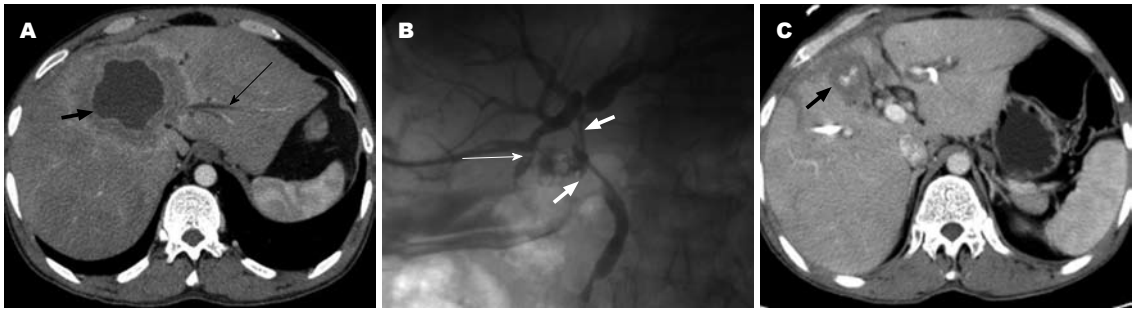


图 1 PTCD术前、术中及术后影像学资料. A: 肝泡性包虫, CT增强示病灶内有液化区(粗箭头), 肝内胆管扩张(细箭头); B: DSA下行PTCD术造影, 见肝门部胆管及胆总管多处侵犯、狭窄(粗箭头), 并有瘘道通向包虫残腔(细箭头); C: 引流1 mo后复查CT增强示胆道扩张缓解, 包虫残腔缩小(粗箭头).

表 1 17例患者术前及术后黄疸指数及肝功能比较 (mean ± SD)

	术前	术后1 wk	术后1 mo
总胆红素(mmol/L)	298 ± 67.28	137 ± 41.32	47 ± 15.83[a]
谷丙转氨酶(mmol/L)	167 ± 52.11	132 ± 34.25	63 ± 12.57[a]
碱性磷酸酶(mmol/L)	611 ± 78.36	587 ± 68.44	216 ± 33.41[a]

[a]$P<0.05$ *vs* 术前.

共患寄生虫病, 具有侵袭性生长的特点[1]. 该病临床表现为肝区胀痛、乏力、纳差、黄疸等非特异性症状, 早期表现轻微不易察觉, 治疗以肝切除、介入及药物治疗为主[2]. 多数患者至医院就诊时已属病程晚期, 有较广泛的肝脏和邻近脏器的浸润, 肝功能差、黄疸指数高, 无法行肝切除及移植手术, 并无法耐受药物治疗. 而经皮肝穿胆道引流术(percutaneous transhepatic cholangio drainage, PTCD)可使晚期泡性肝包虫患者的黄疸指数下降、肝功能改善, 为药物及手术治疗争取机会.

1 材料和方法

1.1 材料 青海大学附属医院介入科自2006-2010年收住17例伴发黄疸的晚期肝泡性包虫患者, 术前均经B超、CT及包虫抗体实验诊断明确. 其中男5例, 女2例, 患者年龄22-45岁, 平均30.5岁. 14例有腹胀、纳差, 9例伴明显肝区疼痛. CT资料显示肝内包虫病灶5-12 cm不等, 均有不同程度胆道受压、侵犯, 肝内导管扩张.

1.2 方法 DSA下患者取仰卧位, 根据肝内导管扩张部位及程度, 选右侧腋中线第8-10肋间或剑突下偏左1-2 cm处为穿刺点, 2%利多卡因局麻, 用PTCD穿刺针穿入胆道, 置入超滑胆道引流管行外引流或内外引流, 胆汁引流量控制在500-800 mL/d, 术后保肝、退黄、支持治疗, 定期用生理盐水冲洗胆道, 根据需要行胆道造影, 必要时调整引流管及行胆道狭窄成形术. 所有17例病例术前、术后1 wk及1 mo均行B超、CT增强检查, 行肝功能、黄疸指数测定.

统计学处理 使用SPSS12.0软件行t检验, $P<0.05$为有显著性差异.

2 结果

PTCD术前、术中及术后影像学资料见图1.

17例患者术前总胆红素121-486 μmol/L, 谷丙转氨酶80-230 mmol/L, 碱性磷酸酶211-980 mmol/L; 术后1 wk总胆红素降至50-180 μmol/L, 谷丙转氨酶72-181 mmol/L, 碱性磷酸酶185-760 mmol/L, 均有不同程度下降; 患者原有黄疸症状均有效缓解, 腹胀、纳差及肝区疼痛明显减轻, B超示肝内导管扩张程度减轻. 1例患者2 wk时死于多器官功能衰竭, 其余患者1 mo复查, 总胆红素35-87 μmol/L, 谷丙转氨酶52-85 mmol/L, 碱性磷酸酶降至112-302 mmol/L, B超及CT检查包虫病灶无明显变化, 原肝内扩张导管基本恢复正常, 部分肿大之肝脏体积回缩. 16例患者1 mo后均开始阿苯达唑抗包虫治疗, 7例行高强度超声聚焦刀治疗, 1年后复查患者病情好转, 包虫体积不同程度缩小(表1).

3 讨论

肝泡性包虫是多房棘球蚴的幼虫, 聚集成群成为数毫米至数厘米大小的小囊泡, 囊内有很多育囊、原头节及胶质样液[3], CT扫描多为大小不一、边界模糊、密度不均地图样浸润的低密度灶, 70%-90%有钙化, 增强后边缘轻度强化, 内部液化坏死区无强化[4,5]. 泡性包虫在肝内浸润性生长, 慢性损害肝组织, 晚期可至整个肝脏坏死, 肝功能丧失, 并可侵犯邻近脏器及腹膜, 生长方式类似于肝癌, 对患者的危害无异于肝癌.

■创新盘点
既往PTCD很少应用于肝包虫治疗，此研究表明PTCD应用于中晚期肝泡性包虫的辅助治疗可取得良好效果.

泡性包虫与肝癌的鉴别主要靠包虫抗体试验及影像学检查, CT示肝泡性包虫常有结节状、团块状不规则钙化, 增强后仅有边缘强化, 肝癌无明显强化, 增强后“快进快出”为其特点[6]. 依据影像学所示肝脏受累范围及患者的临床表现、体征, 泡性包虫早期仅局限于一个肝段; 至中期, 包虫侵犯2个及以上肝段; 晚期: 并发梗阻性黄疸, 门脉高压, 腹水, 肺或脑转移, 出现消瘦、衰竭等[7,8]. 青海省地处高原, 从事农牧业人口众多且牧区医疗条件落后, 人畜混居, 农牧民感染包虫机会较多, 肝泡性包虫是本地区一种常见的寄生虫病, 而该病早期症状轻微, 易致错过最佳治疗时间, 多数患者入院诊治时已是中晚期. 泡性包虫早中期的治疗方法有根治性肝切除、姑息性肝切除、肝移植、介入和药物治疗等[9,10], 但晚期肝包虫因肝功能差、黄疸指数高、患者一般情况差, 无法行上述治疗[11-14]. 本组研究将PTCD应用于并发黄疸的晚期肝包虫患者, 17例患者术后1 mo总胆红素、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶数值均较术前明显下降, 且肝内扩张导管基本恢复正常, 部分肿大肝脏体积回缩, 患者术后结合药物及病灶切除治疗后病情好转, 包虫体积不同程度缩小. 提示PTCD可有效改善肝功能, 降低黄疸指数, 使患者一般情况改善, 为患者争取积极治疗的机会, 进而提高治疗效果和患者预后[15,16], 在并发梗阻性黄疸的晚期肝包虫治疗中, 是一种值得推广且有效的治疗手段.

4 参考文献

1 孙家骏. 实用包虫病外科学. 西宁: 青海人民出版社, 1995: 7

2 阿依甫汗•阿汗, 曹峻, 吐尔干艾力, 张金辉, 邵英梅, 邰沁文, 温浩. 晚期肝泡型包虫病47例治疗分析. 中华普通外科杂志 2007; 26: 617-618

3 杨继团, 胡旭萍, 王文鼎, 闻燕妮. 泡型肝包虫病肝内外转移的CT及MRI诊断. 宁夏医学杂志 2008; 30: 823-824

4 徐明谦, 戈小虎, 孔长青, 张林川, 于兰, 王龙文, 马莉. 肝泡性包虫病的影像学诊断. 中华医学杂志 2002; 82: 249-252

5 温浩, 刘文亚, 邵英梅, 赵晋明, 宋涛, 吐尔干艾力•阿吉, 冉博. 包虫病影像诊断技术和手术治疗进展. 国际医学寄生虫病杂志 2009; 36: 299-306

6 陈志烈. 肝多房棘球蚴病的螺旋CT诊断价值. 实用医学影像杂志 2008; 9: 405-406

7 李松年, 唐光建. 现代全身CT诊断学. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 721

8 施海彬, 李麟荪, 徐泽宽, 钱祝银, 王杰, 冯耀良, 刘圣, 陈惠珠, 陈玉勤. 经皮胆道引流术治疗恶性梗阻性黄疸. 介入放射学杂志 2001; 10: 292-295

9 Mamarajabov S, Kodera Y, Karimov S, Abdiev S, Sabirov B, Krotov N, Kurbaniyazov Z, Arziev I, Sattarov S, Fayziev T, Yoshida Y, Nakao A, Sakamoto J. Surgical alternatives for hepatic hydatid disease. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1859-1861

10 Sekulic S, Sekulic-Frkovic AS, Secen S, Vasic J, Popovic M. Liver hydatidosis - surgical treatment. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1343-1348

11 温浩, 栾梅香, 杨文光, 李俊, 邱杰. 肝包虫病的标准化分型及临床意义探讨. 新疆医科大学学报 2002; 25: 129-130

12 吐尔干艾力, 温浩, 邵英梅. 肝泡状棘球蚴术前可根治性切除的综合评估. 肝胆外科杂志 2006; 14: 154-156

13 彭心宇, 吴向未, 张示杰, 牛建华. 肝包虫囊肿周围纤维囊壁病理结构的再认识. 世界华人消化杂志 2005; 13: 276-279

14 阿依甫汗•阿汗, 曹峻, 吐尔干艾力, 张金辉, 邵英梅, 赵晋明, 邰沁文, 周成明, 温浩. 肝泡型包虫病的手术治疗: 附43例病例分析. 中华肝胆外科杂志 2011; 17: 213-215

15 吴可夫, 苏文智, 姚建军, 曹建华, 王建宁. PTCD治疗晚期恶性梗阻性黄疸的效果. 宁夏医学杂志 2010; 32: 260-261

16 王华, 汪涛, 刘炼炼. 经皮经肝胆道内置引流术治疗恶性梗阻性黄疸60例回顾性分析. 西南国防医药 2011; 21: 602-604

■应用要点

中晚期肝泡性包虫并发梗阻性黄疸后无法行肝切除及移植手术, 并无法耐受药物治疗; 而PTCD可使晚期泡性肝包虫患者的黄疸指数下降、肝功能改善, 可以实现原发病的治疗.

■同行评价

PTCD是梗阻性黄疸常用介入手术, 但用在晚期肝泡性包虫并发梗阻性黄疸患者报道不多, 此研究对临床应用有较大的借鉴作用.

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8月18日; 20(23): 2208-2212
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

结直肠息肉水通道蛋白3、4的表达

陈更新, 邓海霞, 张梅兰, 原 宁

■背景资料
结直肠息肉常见的病理类型有腺瘤性息肉、增生性息肉、炎性息肉等, 其中腺瘤是公认的癌前病变, 增生性息肉也具有癌变的倾向, 因此, 对结直肠息肉的正确认识、性质的准确判断以及防治是预防结直肠癌发生的重要环节. 早期学者普遍认为, 内镜下摘除结直肠息肉, 可使结直肠癌发病率下降, 但近期研究发现, 摘除后的高再发率, 使得内镜下早期治疗的预防效果变得不容乐观, 有必要深入研究结直肠息肉的发病机制, 寻找新的防治手段. AQPs是一组对水具有高度选择性的膜通道蛋白, 在消化系统中有着大量的表达, 他们不仅在消化系统水的代谢中起着关键的作用, 而且与消化系疾病密切相关.

■同行评议者
王正康, 教授, 中日友好医院普外科

陈更新, 邓海霞, 张梅兰, 原宁, 广州中医药大学第二附属医院 广东省广州市 510120
陈更新, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事消化系统疾病的中西医结合研究.
广东省自然科学基金资助项目, No. 06300028
作者贡献分布: 课题设计、主要实验、数据分析和文章撰写由陈更新与邓海霞完成; 病例收集、样本取材及部分实验由张梅兰与原宁完成.
通讯作者: 陈更新, 副主任医师, 510120, 广东省广州市大德路111号, 广州中医药大学第二附属医院. cgx0101@126. com
电话: 020-81887233-39402 传真: 020-81887233-39402
收稿日期: 2012-06-26 修回日期: 2012-07-27
接受日期: 2012-08-06 在线出版日期: 2012-08-18

Expression of aquaporin 3 and 4 proteins in colorectal polyps

Geng-Xin Chen, Hai-Xia Deng, Mei-Lan Zhang, Ning Yuan

Geng-Xin Chen, Hai-Xia Deng, Mei-Lan Zhang, Ning Yuan, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 06300028
Correspondence to: Geng-Xin Chen, Associate Chief Physician, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, 111 Dade Road, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. cgx0101@126.com
Received: 2012-06-26 Revised: 2012-07-27
Accepted: 2012-08-06 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of aquaporin 3 and 4 (AQP3, 4) proteins in colorectal polyps.

METHODS: One hundred and three patients with colorectal polyp and 10 healthy volunteers were selected, and 115 polyp tissue samples and 10 normal bowel mucosal tissue samples were collected from these subjects by colonoscopy. The protein expression of AQP3 and 4 was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The expression of AQP3 and 4 proteins was detected in colorectal epithelial cells that were located in the basolateral membrane. The protein expression of AQP3 and 4 in the inflammatory polyps group was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The protein expression of AQP3 was significantly lower in hyperplastic polyps and adenomas than in normal bowel mucosal tissue (both $P < 0.01$). There was a positive correlation between AQP3 and AQP4 expression in colorectal polyps and normal bowel mucosa ($r = 0.61$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: AQP3 and 4 proteins are abnormally expressed in colorectal polyps and there is a positive correlation between AQP3 and AQP4 expression.

Key Words: Colorectal polyps; Aquaporin 3; Aquaporin 4; Precancerous lesions

Chen GX, Deng HX, Zhang ML, Yuan N. Expression of aquaporin 3 and 4 proteins in colorectal polyps. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2208-2212

摘要

目的: 观察水通道蛋白(aquaporin, AQP)3、4蛋白在结直肠息肉中的表达.

方法: 选择结直肠息肉患者103例, 肠镜下收集115个息肉组织样本和10例正常人结直肠黏膜组织样本, 采用免疫组织化学方法检测AQP3、4的蛋白表达.

结果: AQP3、4蛋白在人结直肠黏膜上皮细胞呈阳性表达, 均表达在细胞的基底部与侧面. AQP3、4蛋白在炎性息肉中的表达均明显高于正常组, 差异有显著性意义($P<0.01$, $P<0.05$); 增生性息肉AQP3蛋白表达低于正常组, 差异有显著性意义($P<0.01$); 腺瘤AQP4蛋白表达低于正常组, 差异有显著性意义($P<0.01$). AQP3与AQP4在结直肠息肉及正常结直肠黏膜中的表达呈正相关($r = 0.61$, $P = 0.000$).

结论: AQP3、4蛋白在结直肠息肉中存在异常表达, 二者之间呈正相关.

关键词: 结直肠息肉; 水通道蛋白3; 水通道蛋白4; 癌前病变

陈更新, 邓海霞, 张梅兰, 原宁. 结直肠息肉水通道蛋白3、4的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2208-2212
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2208.asp

0 引言

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一. 全世界每年有63.9万人死于结直肠癌[1]. 近年来, 随着饮食习惯的改变和生活水平的提高, 我国结直肠癌发病率逐年增长, 已上升至各类恶性肿瘤第3位[2]. 因此, 预防结直肠癌的发生具有重要意义. 结直肠息肉具有一定的恶变倾向, 其中结直肠腺瘤是公认的结直肠癌癌前病变. 对结直肠息肉尤其是结直肠腺瘤的积极治疗, 是预防结直肠癌发生的重要措施. 目前关于结直肠息肉的发病机制尚缺乏深入的研究. 近年来, 关于水通道蛋白(aquaporins, AQPs)的研究逐渐深入. 研究发现, AQPs有多个亚型在结直肠黏膜表达, 与多种结直肠疾病的发生发展有着密切的关系[3]. 目前, AQPs在结直肠息肉中的表达尚未见报道. 本研究旨在通过观察AQP3、4在结直肠息肉中的表达情况, 探讨结直肠息肉发病的内在机制.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2009-07/2009-10就诊于广东省中医院内窥镜室的结直肠息肉患者103例, 共收集115个息肉样本进行检测. 病理检查证实为腺瘤的76个, 其中男40例, 女36例, 平均年龄61.20岁±11.43岁; 增生性息肉17个, 其中男11例, 女6例, 平均年龄57.35岁±15.85岁; 炎性息肉22个, 其中男12例, 女10例, 平均年龄59.55岁±16.47岁. 并选择正常健康体检者10例作为正常对照组, 其中男4例, 女6例, 平均年龄56.10岁±15.01岁. 所有患者及正常对照者标本留取前均签署知情同意书. 各组一般情况基本相同, 经统计学检验无显著性差异(P>0.05), 资料具有可比性. 羊抗人AQP3的多克隆抗体(C-18, SC9885)、羊抗人AQP4的多克隆抗体(H-19, SC9887)均购自美国Santa Cruz公司; 即用型SABC免疫组织化学染色试剂盒(产品编号SA1023-山羊IgG)购自武汉博士德生物工程有限公司.

1.2 方法

1.2.1 取材: 各组受试对象进入观察时均行CF-2401电子肠镜检查, 检查前3 d进食少渣、低脂饮食, 检查当天禁食, 并行肠镜清洁准备. 检查时, 分别以病理活检钳钳取结直肠息肉组织或肠黏膜组织2块, 每块约0.5 cm×0.5 cm大小, 放入多聚甲醛固定待测.

1.2.2 免疫组织化学检测及评分: 采用SABC(链霉亲合素生物素过氧化物酶复合物)免疫组织化学方法检测AQP3、4的蛋白表达. 所有标本常规固定、脱水、透明后石蜡包埋, 石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 内源性过氧化物酶封闭, 抗原修复, PBS冲洗后, 血清封闭, 滴加一抗(AQP3工作浓度1∶600, AQP4工作浓度1∶100), 37 ℃孵育60 min, 同时以PBS代替一抗作为阴性对照. PBS冲洗, 滴加二抗, 37 ℃水浴20 min, 滴加试剂SABC, 37 ℃水浴20 min, DAB(二氨基联苯胺)显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片, 光镜下组织学观察并摄片. 采用半定量的结果评分方法, 选择5个高倍视野, 光学显微镜下观察阳性细胞的阳染强度(未着色记为0分, 轻度记为1分, 中度记为2分, 重度记为3分), 并计数至少500个细胞中染色阳性的细胞数, 计算阳染面积(以百分数表示), 以阳染面积×阳染强度作为评价指标.

统计学处理 采用SPSS for windows 17.0软件包进行统计学分析. 计量数据以mean±SD表示, 两组间比较用t检验, P<0.05表示差异有显著性. AQP3和AQP4蛋白表达之间的相关性采用Pearson相关分析.

表 1 结直肠息肉及正常结直肠黏膜AQP3、AQP4蛋白的表达

病理分型	n	蛋白表达(阳染面积×阳染强度)%	
		AQP3	AQP4
腺瘤	76	96.18±50.64	65.39±32.16[b]
炎性息肉	22	190.82±64.31[b]	156.41±63.62[a]
增生性息肉	17	57.41±21.25[b]	86.71±33.21
正常黏膜	10	122.50±30.93	105.50±27.13

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 正常黏膜.

2 结果

2.1 AQP3蛋白在结直肠息肉中的表达 显微镜下观察, 免疫组织化学阳性染色呈棕黄色. AQP3蛋白表达在结直肠黏膜上皮细胞的基底部与侧面, 细胞的顶部未见阳性表达(图1). AQP3蛋白在炎性息肉中的表达高于正常黏膜, 差异有显著性意义(t = 4.056, P = 0.000); 增生性息肉AQP3蛋白表达低于正常黏膜, 差异有显著性意义(t = 5.887, P = 0.000, 表1).

2.2 AQP4蛋白在结直肠息肉中的表达 显微镜下观察, 免疫组织化学阳性染色呈棕黄色. AQP4蛋白表达在结直肠黏膜上皮细胞的基底部与侧面, 细胞的顶部未见阳性表达(图2). AQP4蛋白在炎性息肉的表达高于正常黏膜, 差异有显著性意义(t = 2.415, P = 0.022); 腺瘤AQP4蛋白表达低于正常黏膜, 差异有显著性意义(t = 3.766, P =

■相关报道
研究发现, AQPs有多个亚型在结直肠黏膜表达, 与多种结直肠疾病的发生发展有着密切的关系.

■**创新盘点**
目前, AQPs在结直肠息肉中的表达尚未见报道. 本研究旨在通过检测AQP3、4在结直肠息肉中的表达情况, 探讨结直肠息肉发病的内在机制.

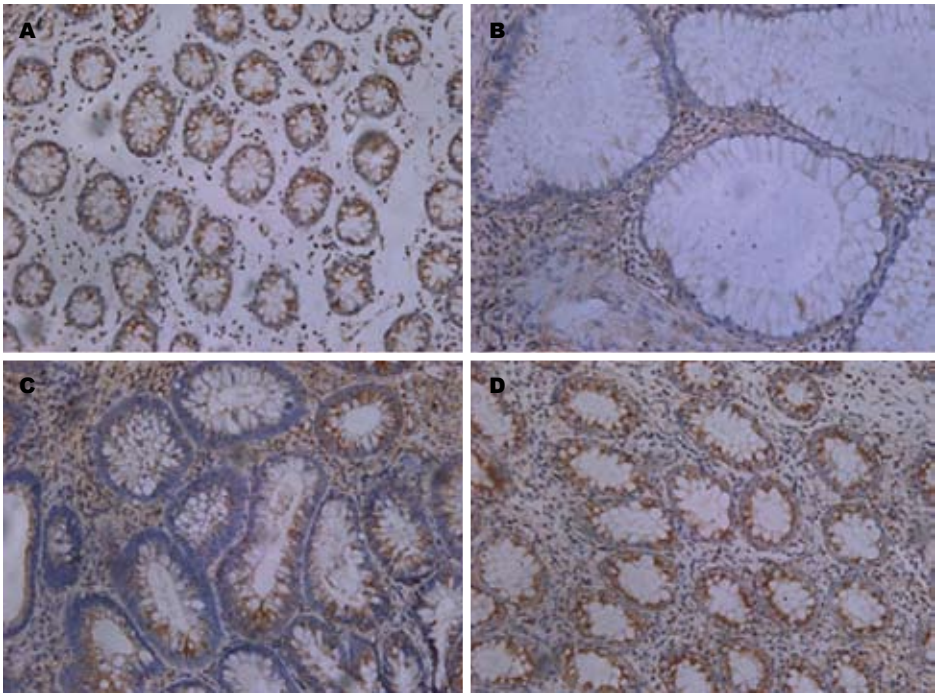


图 1 AQP3免疫组织化学染色(×200). A: 正常黏膜; B: 增生性息肉; C: 腺瘤; D: 炎性息肉.

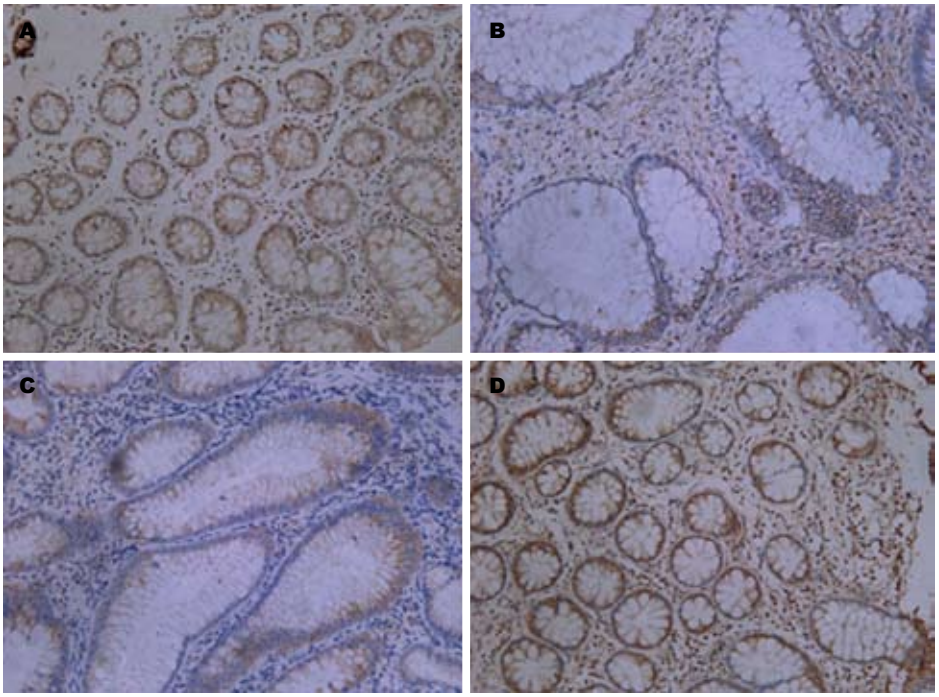


图 2 AQP4免疫组织化学染色(×200). A: 正常黏膜; B: 增生性息肉; C: 腺瘤; D: 炎性息肉.

0.000, 表1).

2.3 AQP3、4蛋白表达的相关性分析 经Pearson相关分析, 在结直肠息肉及正常结直肠黏膜中AQP3与AQP4的蛋白表达之间存在正相关, 且有统计学意义($r = 0.61$, $P = 0.000$).

3 讨论

结直肠息肉常见的病理类型有腺瘤性息肉、增生性息肉、炎性息肉等, 其中腺瘤是公认的癌前病变, 增生性息肉也具有癌变的倾向, 因此, 对结直肠息肉的正确认识、性质的准确判断以及防治是预防结直肠癌发生的重要环节[4]. 早期学者普遍认为, 内镜下摘除结直肠息肉, 可使结直肠癌发病率下降, 但近期研究发现, 摘除后的高再发率, 使得内镜下早期治疗的预防效果变得不容乐观[5-7], 有必要深入研究结直肠息肉的发病机制, 寻找新的防治手段.

AQPs是一组对水具有高度选择性的膜通道蛋白, 在消化系统中有着大量的表达, 他们不仅在消化系统水的代谢中起着关键的作用, 而且与消化系疾病密切相关[8-11]. 目前已发现在人的正常结肠黏膜上, AQP1、3、7、8、11亚型呈大

量的表达, AQP4、9、10亚型呈低水平表达, 其中, AQP3、4主要表达在肠黏膜上皮细胞的基底侧[3]. Koyama等[12]研究发现大鼠从食管到结肠均有AQP3表达. Silberstein等[13]对人体胃肠道AQP3的分布和功能进行了研究, 结果发现在人的胃、空肠、回肠、结肠上均有AQP3的表达, 其中在结肠的表达局限在绒毛上皮细胞, 且表达明显强于胃、空肠和回肠. Moon等[14]研究也表明AQP3表达于人正常结肠表面上皮. 我们的研究也表明, 人的结直肠黏膜上皮有AQP3的表达, 且以肠腺的柱状细胞与杯状细胞的基侧膜表达为主, 这与AQP3在胃黏膜中以细胞膜顶部表达为主有所不同[15]. 汪泳等[16]研究发现大鼠结肠全段均有AQP4的表达, 近段的表达水平高于远段; AQP4阳性细胞主要分布在黏膜的顶端, 以吸收细胞为主, 杯状细胞无表达; AQP4主要位于细胞膜上, 以基底侧为主. 我们的研究也表明, 人的结直肠黏膜上皮有AQP4的表达, 且以肠腺的柱状细胞与杯状细胞的基侧膜表达为主.

越来越多的研究发现, AQP3、4的异常表达与多种结直肠疾病有密切关系. Moon等[14]研究表明AQP3表达于人结肠腺瘤以及结肠癌组织中. 裴海平等[17]研究发现, AQP3在结直肠癌、腺瘤及癌旁组织中的阳性表达率分别为52%、44%和56%, 但差异无统计学意义. 唐会峰等[18]采用RT-PCR、免疫印迹法对AQP4在人大肠癌组织和癌旁正常组织中的表达进行了研究. 张玉等[19]研究观察了胃泌素对人结肠癌细胞株HT-29水通道蛋白4表达的影响. 也有人对结肠炎动物模型进行了研究, 如Thiagarajah等[20]研究显示, AQP3敲除的结肠炎小鼠结肠上皮细胞增殖受到损害, 提示AQP3对于结肠炎小鼠的肠上皮细胞增殖至关重要. 李松等[21]研究发现水通道蛋白4、7、8 mRNA在新生鼠坏死性小肠结肠炎的肠组织中表达下降.

迄今为止, 关于AQP3、4在结直肠息肉中的研究尚未见报道. 本研究结果显示, AQP3、4在结直肠息肉中存在异常表达, 与正常结直肠黏膜相比, AQP3、4在炎性息肉中表达均显著增强, AQP3在增生性息肉中、AQP4在腺瘤中的表达显著降低, 且AQP3与AQP4在结直肠息肉及正常结直肠黏膜中的表达呈正相关. 这表明不同病理类型的结直肠息肉AQP3、4蛋白表达趋势不同, 其中, AQP3、4在结直肠癌相关病变中的低表达及相关性, 提示AQP3、4可能在结直肠癌发生的早期协同发挥作用.

4 参考文献

1 代敏, 李霓, 李倩, 杨琳, 陈玉恒. 全球肿瘤预防控制概况. 中国肿瘤 2011; 20: 21-25

2 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 雷正龙, 李光琳, 邹小农, 赵平. 中国肿瘤登记地区2007年肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤 2011; 20: 162-169

3 Laforenza U. Water channel proteins in the gastrointestinal tract. *Mol Aspects Med* 2012 Mar 21. *[Epub ahead of print]*

4 房静远. 重视结直肠息肉的临床诊治. 胃肠病学 2009; 14: 321-323

5 中华医学会消化病学分会. 中国结直肠肿瘤筛查、早诊早治和综合预防共识意见(一). 中华消化杂志 2012; 32: 1-10

6 Martínez ME, Baron JA, Lieberman DA, Schatzkin A, Lanza E, Winawer SJ, Zauber AG, Jiang R, Ahnen DJ, Bond JH, Church TR, Robertson DJ, Smith-Warner SA, Jacobs ET, Alberts DS, Greenberg ER. A pooled analysis of advanced colorectal neoplasia diagnoses after colonoscopic polypectomy. *Gastroenterology* 2009; 136: 832-841

7 Gao QY, Chen HM, Sheng JQ, Zheng P, Yu CG, Jiang B, Fang JY. The first year follow-up after colorectal adenoma polypectomy is important: a multiple-center study in symptomatic hospital-based individuals in China. *Front Med China* 2010; 4: 436-442

8 Zhang SJ, Chen GX, Cui YP, Lao SX, Lin YW, Chen ZX, Cheng YH. Expression of AQP3 gene in chronic atrophic and chronic superficial gastritis patients. *J Res Med Sci* 2007; 12: 286-292

9 Shen L, Zhu Z, Huang Y, Shu Y, Sun M, Xu H, Zhang G, Guo R, Wei W, Wu W. Expression profile of multiple aquaporins in human gastric carcinoma and its clinical significance. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 313-318

10 Laforenza U, Miceli E, Gastaldi G, Scaffino MF, Ventura U, Fontana JM, Orsenigo MN, Corazza GR. Solute transporters and aquaporins are impaired in celiac disease. *Biol Cell* 2010; 102: 457-467

11 Zahn A, Moehle C, Langmann T, Ehehalt R, Autschbach F, Stremmel W, Schmitz G. Aquaporin-8 expression is reduced in ileum and induced in colon of patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1687-1695

12 Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1999; 276: C621-C627

13 Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, Zotta E, Bigi F, Berkowski D, Ibarra C. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 1303-1313

14 Moon C, Soria JC, Jang SJ, Lee J, Obaidul Hoque M, Sibony M, Trink B, Chang YS, Sidransky D, Mao L. Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 6699-6703

15 陈更新, 劳绍贤, 胡玲, 黄志新, 匡中生, 刘泳冬, 周正, 黄列平, 罗琦. 清热化湿方对脾胃湿热证患者胃黏膜AQP3、AQP4蛋白表达的影响. 中医杂志 2005; 46: 772-774

16 汪泳, 张方信, 令晓玲, 石向群. 大鼠结肠中水通道蛋白4的表达与分布. 第四军医大学学报 2004; 25: 142-143

17 裴海平, 刘卓, 黄林生, 朱红. 水通道蛋白1和3在结直肠癌组织中的表达及其意义. 中华胃肠外科杂志 2011; 14: 275-278

■**同行评价**

本研究方法比较简单, 但提供了一些有关结直肠息肉AQP表达的信息, 具有一定的学术价值.

18 唐会峰, 张玉华, 徐皓, 魏尉, 肇毅, 吴文溪. 水通道蛋白4在大肠癌组织中的表达. 南京医科大学学报 2007; 27: 1236-1239
19 张玉, 罗和生. 胃泌素对结肠癌细胞株HT-29水通道蛋白4表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1234-1237
20 Thiagarajah JR, Zhao D, Verkman AS. Impaired enterocyte proliferation in aquaporin-3 deficiency in mouse models of colitis. *Gut* 2007; 56: 1529-1535
21 李松, 崔其亮. 水通道蛋白4、7、8基因mRNA在新生鼠小肠结肠炎模型中的表达. 中国医药导报 2010; 7: 16-19

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》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®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年8月18日; 20(23): 2213-2217
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

不同分化程度的大肠癌患者肠黏膜血管紧张素Ⅱ及其Ⅰ型受体的表达差异与意义

杨胜兰, 沈 霖, 高洁嫦, 樊 琼, 黄 璐, 吴嫣然

杨胜兰, 沈霖, 高洁嫦, 樊琼, 黄璐, 吴嫣然, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科 湖北省武汉市 430022
杨胜兰, 副教授, 副主任医师, 医学博士, 硕士生导师, 主要从事中西医结合消化专业的临床与基础研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30873225
作者贡献分布: 杨胜兰负责课题设计、实验方案的全面指导; 沈霖协助指导课题设计; 高洁嫦完成免疫组织化学实验; 樊琼进行全部实验实施协调工作; 黄璐与吴嫣然完成实验数据分析总结
通讯作者: 樊琼, 430022, 湖北省武汉市江汉区解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科. 378855749@qq.com
收稿日期: 2012-05-28 修回日期: 2012-07-15
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Expression of Angiotensin Ⅱ and AT_1R in colorectal cancer

Sheng-Lan Yang, Lin Shen, Jie-Chang Gao, Qiong Fan, Lu Huang, Yan-Ran Wu

Sheng-Lan Yang, Lin Shen, Jie-Chang Gao, Qiong Fan, Lu Huang, Yan-Ran Wu, Department of Traditional Chinese Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30873225
Correspondence to: Qiong Fan, Department of Traditional Chinese Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Jianghan District, Wuhan 430022, Hubei Province, China. 378855749@qq.com
Received: 2012-05-28 Revised: 2012-07-15
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of Angiotensin Ⅱ and AT_1R in colorectal cancer.

METHODS: Fresh colonic specimens were obtained from 6 healthy volunteers and 24 patients suffering from colorectal cancer (including 6 patients with poorly differentiated adenocarcinoma, 9 patients with moderately differentiated adenocarcinoma and 9 patients with well differentiated adenocarcinoma) by endoscopic punch biopsy. The diagnosis was confirmed pathologically. Immunohistochemistry was used to examine the expression of Angiotensin Ⅱ and AT_1R in the colon of patients with colorectal cancer and healthy volunteers.

RESULTS: The expression of Angiotensin Ⅱ and AT_1R proteins in the colon of patients with colorectal cancer with different differentiation grades was significantly higher than that in normal controls (21.24 ± 4.60, 19.90 ± 5.16, 17.87 ± 5.30 *vs* 2.45 ± 0.83; 15.98 ± 3.66, 8.13 ± 2.49, 8.12 ± 2.13 *vs* 2.53 ± 0.82, all $P < 0.01$). The expression of Angiotensin II had no difference among colorectal cancer with different differentiation grades ($P > 0.05$). Compared to moderately and well differentiated adenocarcinoma, the expression of AT_1R was higher in poorly differentiated grade (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: These data suggest that Angiotensin Ⅱ and AT_1R perhaps play an important role in the pathogenesis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Angiotensin Ⅱ; Ngiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor; Signal pathway

Yang SL, Shen L, Gao JC, Fan Q, Huang L, Wu YR. Expression of Angiotensin Ⅱ and AT_1R in colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2213-2217

摘要

目的: 比较分化程度不同的大肠癌患者与无器质性肠道疾病志愿者肠黏膜血管紧张素Ⅱ(AngiotensinⅡ)及其Ⅰ型受体(Angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor, AT_1R)表达差异.

方法: 肠镜室募集大肠癌患者24例(病理学检查证实其中9例为大肠高分化腺癌患者, 9例为大肠中分化腺癌患者, 6例为大肠低分化腺癌患者)及6例无器质性肠道疾病志愿者, 电子结肠镜下取活检获得新鲜的肠黏膜组织. 免疫组织化学法检测各组肠黏膜AngiotensinⅡ及AT_1R蛋白表达强度, 单因素方差分析各组之间的差异.

结果: 大肠腺癌(低、中、高分化组)患者肠黏膜AngiotensinⅡ和AT_1R的表达较无器质性肠道疾病志愿者肠组织AngiotensinⅡ和AT_1R表达明显增强(21.24±4.60, 19.90±5.16, 17.87

■背景资料
血管紧张素(Angiotensin)Ⅱ是肾素血管紧张素系统中重要的血管活性肽, 主要功能为调节血压和维持心血管稳态. AngiotensinⅡ受血管紧张素转化酶调节, 血管紧张素转化酶抑制剂及AngiotensinⅠ型受体抗体也可阻滞其功能. 血管紧张素转化酶抑制剂主要用于治疗高血压、心力衰竭及糖尿病肾病等. 值得注意的是越来越多的证据表明AngiotensinⅡ参与细胞增殖、血管发生、炎症反应与组织重建, 这些功能均提示其可能在肿瘤的发生发展中起某种作用.

■同行评议者
许玲, 教授, 主任医师, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科

■相关报道
Pahor等学者将750例年龄超过70岁的无肿瘤疾病史的高血压患者分为3组: β受体阻滞剂组、血管紧张素转化酶抑制剂组及钙离子拮抗剂组, 随访4年结果显示: 与β受体阻滞剂组相比较(校正年龄、性别、种族、吸烟与否、体质量指数及入院次数等影响因素后), 血管紧张素转化酶抑制剂组罹患癌症风险为0.73(95%CI: 0.30-1.78), 钙离子拮抗剂组罹患癌症风险为2.02(95%CI: 1.16-3.54).

±5.30 *vs* 2.45±0.83; 15.98±3.66, 8.13±2.49, 8.12±2.13 *vs* 2.53±0.82, 均$P<0.01$); 不同分化程度的各组之间Angiotensin Ⅱ表达未见明显差异($P>0.05$); 分化程度越高AT_1R表达越少($P<0.01$).

结论: AngiotensinⅡ及其Ⅰ型受体的表达与大肠癌存在一定的关系, 其深入机制需要进一步通过动物实验及体外实验来证实.

关键词: 大肠癌; 血管紧张素Ⅱ; 血管紧张素Ⅱ及其Ⅰ型受体; 信号通路

杨胜兰, 沈霖, 高洁嫦, 樊琼, 黄璐, 吴嫣然. 不同分化程度的大肠癌患者肠黏膜血管紧张素Ⅱ及其Ⅰ型受体的表达差异与意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2213–2217
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2213.asp

0 引言

结直肠癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, Ⅰ期结直肠癌患者术后5年生存率接近100%; 若肿瘤侵犯淋巴结(Ⅲ期)患者术后5年生存率大约为50%; 如果肿瘤发生远处转移(Ⅳ期), 患者术后生存率只有5%左右[1]. 血管紧张素(Angiotensin)Ⅱ是肾素血管紧张素系统中重要的血管活性肽, 主要功能为调节血压和维持心血管稳态. AngiotensinⅡ受血管紧张素转化酶调节, 血管紧张素转化酶抑制剂Ⅱ及AngiotensinⅠ型受体抗体也可阻滞其功能. 血管紧张素转化酶抑制剂主要用于治疗高血压、心力衰竭及糖尿病肾病等. 值得注意的是越来越多的证据表明AngiotensinⅡ参与细胞增殖、血管发生、炎症反应与组织重建, 这些功能均提示其可能在肿瘤的发生发展中起某种作用[2-4]. 本文拟观察不同分化程度大肠癌患者与无器质性肠道疾病志愿者肠组织AngiotensinⅡ及其Ⅰ受体(Angiotensin Ⅱ type Ⅰ receptor, AT_1R)表达差异.

1 材料和方法

1.1 *材料* 大肠高分化腺癌患者9例, 大肠中分化腺癌患者9例, 大肠低分化腺癌患者6例, 无器质性肠道疾病志愿者6例被纳入试验, 肠组织通过电子结肠镜下取活检获得. AngiotensinⅡ抗体、AT_1R抗体及DAB试剂盒购自武汉博士德生物公司(货号分别为BA0639、BA0582、SA1022).

1.2 *方法* 活检获得的肠组织置于4%的多聚甲醛中固定→脱水→石蜡包埋→切片(厚度为4 μm)→二甲苯脱蜡(3次, 每次15 min)→水化(无水乙醇浸泡5 min, 950 mL/L乙醇浸泡5 min, 750 mL/L乙醇浸泡5 min)→PBS溶液洗涤玻片(3次, 每次5 min)→抗原修复(将玻片放入装有pH值为6.0的0.01 mmol/L枸橼酸钠溶液的抗原修复盒中, 高火微波修复3 min, 自然冷却至室温)→PBS溶液洗涤玻片(3次, 每次5 min)→玻片上滴加3%H_2O_2避光反应10 min(H_2O_2可抑制内源性过氧化物酶、使DAB显色及降低非特异性染色)→PBS溶液洗涤玻片(3次, 每次5 min)→羊血清封闭30 min(将载有玻片的湿盒置于37 ℃恒温床中, 此步骤可降低非特异性染色), 滴加兔抗人Angiotensin Ⅱ和AT_1R抗体(1∶150稀释, 4 ℃孵育过夜)→复温(将载有玻片的湿盒置于37 ℃度恒温床中10 min)→PBS溶液洗涤玻片(3次, 每次5 min)→滴加二抗(将载有玻片的湿盒置于37 ℃度恒温床中40 min)→PBS溶液洗涤玻片(3次, 每次5 min)→滴加HRP标记链亲和素(将载有玻片的湿盒置于37 ℃恒温床中30 min)→PBS溶液洗涤玻片(3次, 每次5min)→滴加DAB显色液(玻片在镜下可见棕黄色即用自来水充分冲洗)→苏木素复染(5 s)→盐酸酒精分化→PBS溶液洗涤玻片(3次, 每次5 min)→酒精脱水(750 mL/L乙醇浸泡5 min, 950 mL/L乙醇浸泡5 min, 无水乙醇浸泡5 min)→二甲苯中浸泡(2次, 每次15 min)→中性树胶封片→显微镜下观察拍照后运用显微图像分析系统分析试验结果.

统计学处理 免疫组织化学染色结果以DAB染色后普通显微镜下显示棕黄色为阳性表达. 每张切片随机选择5个视野以分析其阳性指数(阳性指数 = 100倍显微镜下阳性细胞数/总细胞数×100%, 此数值越大表明该蛋白表达越多). 计量数据以mean±SD表示, 单因素方差分析各组肠黏膜Angiotensin Ⅱ和AT_1R表达差异, 若$P<0.05$则表明差异具有统计学意义.

2 结果

Angiotensin Ⅱ和AT_1R主要在细胞膜与细胞浆内表达(图1, 2和表1). 无器质性肠道疾病志愿者肠组织Angiotensin Ⅱ和AT_1R表达很少, 大肠腺癌患者肠组织Angiotensin Ⅱ和AT_1R表达则较其明显增强($P<0.01$); 不同分化程度的各组之间Angiotensin Ⅱ表达未见明显差异; 分化程度越高AT_1R表达越少($P<0.01$).

3 讨论

结直肠癌全球发病率达3.6-59.1/100 000(发病率

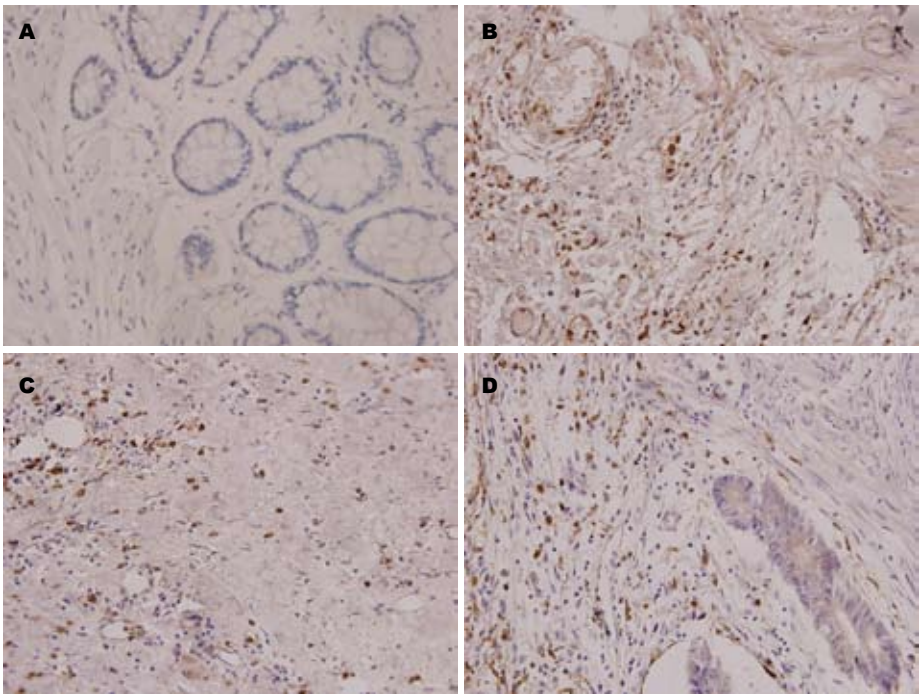


图 1 各组肠组织Angiotensin Ⅱ免疫组织化学结果. A: 无器质性肠道疾病组; B: 低分化结直肠癌组; C: 中分化结直肠癌组; D: 高分化结直肠癌组.

■应用要点

本课题组实验结果表明大肠腺癌患者肠黏膜Angiotensin Ⅱ和AT_1R表达较无器质性肠道疾病志愿者肠组织明显增强; 不同分化程度的各组之间Angiotensin Ⅱ表达未见明显差异; 分化程度越高AT_1R表达越少. 这些结果提示ANGⅡ-AT_1R信号通路参与大肠癌的发病过程, AT_1R表达与结直肠癌分化程度呈负相关.

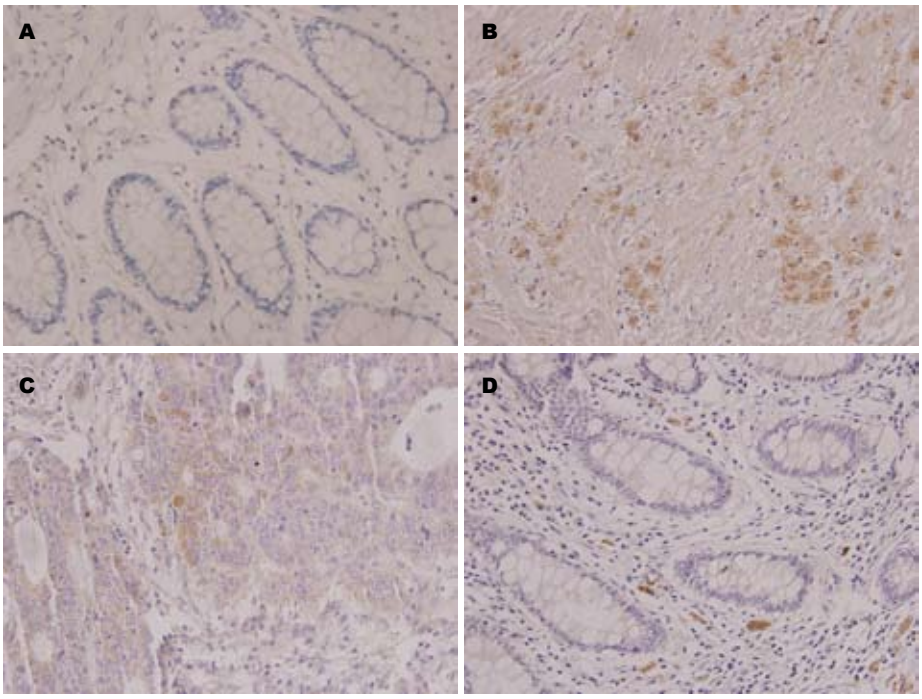


图 2 各组肠组织AT_1R免疫组织化学检测结果. A: 无器质性肠道疾病组; B: 低分化结直肠癌组; C: 中分化结直肠癌组; D: 高分化结直肠癌组.

差异与种族、性别、年龄、地理区域及饮食习惯等有关), 每年新增病例大约为940 000人、死亡病例大约为500 000人, 近年大肠癌发病率与患病率呈增加趋势, 其原因可能与“西洋化的生活方式”(Westernization)有关. 尽管在发达国家, 该病死亡率呈下降趋势, 但是在资源欠缺地区(如亚洲、南美及东欧国家等), 其病死率仍很高[5-7].

新近有学者报道长时间应用肾素血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)抑制剂的高血压患者罹患癌症的风险降低. Pahor等学者将750例年龄超过70岁的无肿瘤疾病史的高血压患者分为3组: β受体阻滞剂组、血管紧张素转化酶抑制剂组及钙离子拮抗剂组, 随访4年结果显示: 与β受体阻滞剂组相比较(校正年龄、性别、种族、吸烟与否、体质量指数及入院次数等影响因素后), 血管紧张素转化酶抑制剂组罹患癌症风险为0.73(95%CI: 0.30-1.78), 钙离子拮抗剂组罹患癌症风险为2.02(95%CI: 1.16-3.54)[7]. Lever等[8]学者回顾性分析5 207例高血压患者的临床

■同行评价
本课题立题新颖, 设计合理, 结果可靠, 具有很好的可读性.

表 1 各组肠黏膜AT1R的表达

分组	Angiotensin Ⅱ	AT_1R
无器质性肠疾病组	2.45 ± 0.83	2.53 ± 0.82
低分化组	21.24 ± 4.60[b]	15.98 ± 3.66[b]
中分化组	19.90 ± 5.16[b]	8.13 ± 2.49[bd]
高分化组	17.87 ± 5.30[b]	8.12 ± 2.13[bd]

[b]*P*<0.01 *vs* 无器质性肠道疾病志愿者; [d]*P*<0.01 *vs* 结直肠癌低分化组.

资料结果显示: 与对照组相比, 1 559例长期服用血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitors)的患者罹患癌症的相对风险为0.72(95%CI: 0.55-0.92)-0.65(95%CI: 0.44-0.93), 3 648例长期服用非血管紧张素转化酶抑制剂者(其中服用钙离子拮抗剂者1 416例, 服用利尿剂者2 099例, 服用β受体阻滞剂者2 681例)的相对风险为110(95%CI: 0.97-1.22)-1.03(95%CI: 0.87-1.20). 该课题组由此认为长时间服用血管紧张素转化酶抑制剂可能防癌, 但需要大样本的随机对照研究加以证实. Jick等[9]学者采用分组病例对照研究法分析长期服用钙离子拮抗剂、血管紧张素转化酶抑制剂及β受体阻滞剂的高血压患者抑制罹患癌症的风险, 结果显示: 与β受体阻滞剂组相比较, 钙离子拮抗剂组与血管紧张素转化酶抑制剂组罹患癌症风险分别为1.27(95%CI: 0.98-1.63)与0.79(95%CI: 0.58-1.06). Ronquist等[10]学者也用分组病例对照研究法发现长期服用卡托普利患者罹患前列腺癌的风险较低(0.7, 95%CI: 0.4-1.2). Neo等[11]学者观察卡托普利与依贝沙坦对小鼠肿瘤模型肿瘤生长的影响时发现: 这两种血管紧张素转化酶抑制剂都可显著肿瘤生长(P = 0.003, 0.004). Attoub等[12]学者利用高致瘤性人肺LNM35细胞移植于裸鼠制作肺癌动物模型为研究平台, 治疗组裸鼠每日灌服卡托普利2.8 mg, 3 wk后检测发现: 与模型组比较, 卡托普利可显著抑制肿瘤生长(P<0.01). van der Knaap等[2]学者随访7 679例既往无肿瘤病史的志愿者9年半, 其中730例罹患癌症, 利用Cox比例风险模型分析ACEI/D基因型与患病之间的关系发现: 高表达DD基因型者罹患乳腺癌风险较低表达Ⅱ/ⅠD基因型者高(危险比为1.47, 95%CI: 1.05-2.04), 肾素血管紧张素系统抑制剂能降低高表达DD基因型者罹患癌症的可能性. Suganuma[13]课题组用免疫组织化学法检测99例卵巢肿瘤组织病理切片AT_1R及VEGF的表达, 结果显示侵袭性腺癌组织、癌前病变组织及良性肿瘤组织AT_1R阳性表达率为85%、66%及14%, AT_1R的表达与VEGF的表达呈正相关. 且他们的体外实验表明Angiotensin Ⅱ能显著增加AT_1R阳性的卵巢癌细胞SKOV-3分泌VEGF, AT_1R拮抗剂坎地沙坦可完全阻断此变化. Röcken等[14]学者利用定量逆转录聚合酶链反应和免疫组织化学法比较141例结直肠癌患者与189例结直肠腺瘤患者肠组织血管紧张素转化酶表达的差异, 发现结直肠癌患者肠组织血管紧张素转化酶表达明显增加(P<0.01). 文献资料显示体外实验证实血管紧张素转化酶抑制剂可修饰基因表达、抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭能力、抑制上皮细胞迁移、拮抗血管新生, 体内实验证实其可抑制肿瘤生长与转移[15].

但Friis等[16]学者通过大样本人群研究未能证实血管紧张素转化酶抑制剂的防癌作用. 该课题组耗时3年半随访17 897例长期服用血管紧张素转化酶抑制剂的高血压患者, 将此类人群癌症发病率与普通人群癌症发病率相比较, 结果显示: 17 897例长期服用血管紧张素转化酶抑制剂的高血压患者中有909例罹患癌症, 相同样本量的普通人群有846例罹患癌症. Li等[17]学者1997-1999年招募到华盛顿州975例乳腺癌患者与1 007例健康志愿者, Logistic回归分析乳腺癌发生于长期服用降压药的关系, 结果表明: 服用降压药与否与罹患癌症与否两者之间没有相关性, 服用3种不同降压药(钙离子拮抗剂、β受体阻滞剂及血管紧张素转化酶抑制剂)的高血压患者罹患乳腺癌风险没有统计学意义. 有学者也报道过类似的研究结果[17-20]. 因此需进一步扩大样本量进行深入研究.

尽管前人的研究存在这样那样的争议, 我们课题组实验结果表明大肠腺癌患者肠黏膜Angiotensin Ⅱ和AT_1R表达较无器质性肠道疾病志愿者肠组织明显增强; 不同分化程度的各组之间Angiotensin Ⅱ表达未见明显差异; 分化程度越高AT_1R表达越少. 这些结果提示我们ANG Ⅱ-AT_1R信号通路参与大肠癌的发病过程, AT_1R表达与结直肠癌分化程度呈负相关. 当然, 这些初步结论需要进一步通过动物实验及体外实验来证实.

4 参考文献

1 Nicolay C, Purkayastha S, Darzi A. Minimally invasive surgery for colorectal cancer. *Expert Rev Anti-*

cancer Ther 2010; 10: 469-471
2 van der Knaap R, Siemes C, Coebergh JW, van Duijn CM, Hofman A, Stricker BH. Renin-angiotensin system inhibitors, angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, and cancer: the Rotterdam Study. *Cancer* 2008; 112: 748-757
3 Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 293-299
4 Louis SN, Wang L, Chow L, Rezmann LA, Imamura K, MacGregor DP, Casely D, Catt KJ, Frauman AG, Louis WJ. Appearance of angiotensin II expression in non-basal epithelial cells is an early feature of malignant change in human prostate. *Cancer Detect Prev* 2007; 31: 391-395
5 Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 366-378
6 Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* 2000; 88: 2398-2424
7 Neo JH, Ager EI, Angus PW, Zhu J, Herath CB, Christophi C. Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases. *BMC Cancer* 2010; 10: 134
8 Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, McCallum IR, McInnes GT, MacKinnon PL, Meredith PA, Murray LS, Reid JL, Robertson JW. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998; 352: 179-184
9 Jick H, Jick S, Derby LE, Vasilakis C, Myers MW, Meier CR. Calcium-channel blockers and risk of cancer. *Lancet* 1997; 349: 525-528
10 Ronquist G, Rodríguez LA, Ruigómez A, Johansson S, Wallander MA, Frithz G, Svärdsudd K. Association between captopril, other antihypertensive drugs and risk of prostate cancer. *Prostate* 2004; 58: 50-56
11 Neo JH, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Christophi C. Effect of ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in a mouse model of colorectal cancer liver metastases. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 577-584
12 Attoub S, Gaben AM, Al-Salam S, Al Sultan MA, John A, Nicholls MG, Mester J, Petroianu G. Captopril as a potential inhibitor of lung tumor growth and metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1138: 65-72
13 Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F. Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2686-2694
14 Röcken C, Neumann K, Carl-McGrath S, Lage H, Ebert MP, Dierkes J, Jacobi CA, Kalmuk S, Neuhaus P, Neumann U. The gene polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme correlates with tumor size and patient survival in colorectal cancer patients. *Neoplasia* 2007; 9: 716-722
15 Lindberg H, Nielsen D, Jensen BV, Eriksen J, Skovsgaard T. Angiotensin converting enzyme inhibitors for cancer treatment? *Acta Oncol* 2004; 43: 142-152
16 Friis S, Sørensen HT, Mellemkjaer L, McLaughlin JK, Nielsen GL, Blot WJ, Olsen JH. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and the risk of cancer: a population-based cohort study in Denmark. *Cancer* 2001; 92: 2462-2470
17 Li CI, Malone KE, Weiss NS, Boudreau DM, Cushing-Haugen KL, Daling JR. Relation between use of antihypertensive medications and risk of breast carcinoma among women ages 65-79 years. *Cancer* 2003; 98: 1504-1513
18 Meier CR, Derby LE, Jick SS, Jick H. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers, and breast cancer. *Arch Intern Med* 2000; 160: 349-353
19 González-Pérez A, Ronquist G, García Rodríguez LA. Breast cancer incidence and use of antihypertensive medication in women. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2004; 13: 581-585
20 Perron L, Bairati I, Harel F, Meyer F. Antihypertensive drug use and the risk of prostate cancer (Canada). *Cancer Causes Control* 2004; 15: 535-541

编辑 李军亮 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8月18日; 20(23): 2218-2223
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

幽门螺杆菌上皮接触诱导基因*iceA1*的克隆及序列特征

邵长江, 张尤历, 王文兵, 陈慧娟, 孔 梅, 陈 鑫, 宋永站

■**背景资料**
*iceA1*基因是幽门螺杆菌(*H. pylori*)与胃上皮细胞接触后诱导表达的一种基因, 是一新的*H. pylori*毒力相关基因. *iceA1*基因与胃病之间的联系目前还有争议. 这可能是由于在全球不同地理区域内*H. pylori*基因型分布不均一引起的, 也反映了*H. pylori*菌株与其致病的临床表现的地理上差异.

■**同行评议者**
崔莲花, 副教授, 青岛大学医学院公共卫生系

邵长江, 连云港市第二人民医院消化科 江苏省连云港市 222006
张尤历, 陈慧娟, 孔梅, 陈鑫, 宋永站, 江苏大学附属医院消化科 江苏省镇江市 212001
王文兵, 江苏大学生命科学研究院 江苏省镇江市 212013
邵长江, 硕士, 主治医师, 主要从事幽门螺杆菌与消化系统疾病研究.
作者贡献分布: 邵长江与张尤历对此文所作贡献均等; 此课题由张尤历与王文兵共同设计; 研究过程由邵长江、陈慧娟、孔梅、陈鑫及宋永站操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张尤历提供; 分析由邵长江完成; 本论文写作由邵长江完成.
通讯作者: 张尤历, 教授, 212001, 江苏省镇江市解放路438号, 江苏大学附属医院消化科. zjyouli@yahoo.com.cn
电话: 0511-85011787
收稿日期: 2012-05-23 修回日期: 2012-06-29
接受日期: 2012-08-01 在线出版日期: 2012-08-18

Cloning and sequence analysis of the *iceA1* gene of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with various gastric disorders

Chang-Jiang Shao, You-Li Zhang, Wen-Bing Wang, Hui-Juan Chen, Mei Kong, Xin Chen, Yong-Zhan Song

Chang-Jiang Shao, Department of Gastroenterology, Lianyungang Second People's Hospital, Lianyungang 222006, Jiangsu Province, China
You-Li Zhang, Hui-Juan Chen, Mei Kong, Xin Chen, Yong-Zhan Song, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Wen-Bing Wang, Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China
Correspondence to: You-Li Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, 438 Jiefang Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zjyouli@yahoo.com.cn
Received: 2012-05-23 Revised: 2012-06-29
Accepted: 2012-08-01 Published online: 2012-08-18

Abstract
AIM: To clone and sequence the *iceA1* gene of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) strains isolated from patients with various gastric disorders in Zhenjiang area.

METHODS: *H. pylori* strains were isolated from the gastric mucosa of patients with chronic gastritis, peptic ulcer or gastric cancer, and cultured on solid agar medium. The *iceA1* gene was amplified from *H. pylori* DNA by PCR, cloned into T vector, sequenced and analyzed using bioinformatics methods.

RESULTS: The *iceA1* gene was cloned from 12 *H. pylori* strains derived from patients with chronic gastritis, peptic ulcer or gastric cancer and sequenced. Sequence analysis led to identification of three deletion hot spots (780del6, 809del5, 914del7) within the *iceA1* open reading frame. All these deletion mutations were identified in strains from patients with peptic ulcer or chronic gastritis, but only 809del5 was detected in strains from cancer patients. Local DNA sequence analysis revealed that the endpoints of all there deletions coincided with direct repeats. We also found deletion hot spots that were associated with direct repeats in *iceA1* and that favored a small-deletion model of slipped mispairing events during replication.

CONCLUSION: Analysis of *iceA1* sequence variations may be a useful tool for analysis of the population genetics of *H. pylori*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; *iceA1*; Cloning; Sequence analysis; Molecular marker

Shao CJ, Zhang YL, Wang WB, Chen HJ, Kong M, Chen X, Song YZ. Cloning and sequence analysis of the *iceA1* gene of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with various gastric disorders. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(23): 2218-2223

摘要
目的: 克隆和分析镇江地区来源于不同疾病的(胃癌、溃疡和胃炎)幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)的表皮接触诱导基因*iceA1*.

方法: 从胃十二指肠疾病患者胃黏膜组织中分离培养获得*H. pylori*, PCR扩增检测*iceA1*基因, 并克隆至pMD18-T载体上, 进行测序和序列分析.

结果: 克隆和测序了镇江地区来源于不同疾病的(胃癌、溃疡和胃炎)共12株*H. pylori*的*iceA1*基因片段, 并与标准菌株60190比对,

结果显示镇江地区的*H. pylori*的*iceA1*基因中存在着3处框内缺失突变热点(780del6、809del5、914del7), 这些缺失突变在溃疡和胃炎中均存在, 但是胃癌株只存在809del5. 对缺失片段周围的序列进行分析, 这些缺失序列的两端基本都与同向重复序列相连, 这可能与复制过程中滑动错配的小片段缺失模型有关.

结论: *iceA1*序列的变异性有可能作为分析*H. pylori*群体遗传学的有用工具.

关键词: 幽门螺杆菌; 上皮接触诱导基因; 克隆; 序列分析; 分子标记

邵长江, 张尤历, 王文兵, 陈慧娟, 孔梅, 陈鑫, 宋永站. 幽门螺杆菌上皮接触诱导基因*iceA1*的克隆及序列特征. 世界华人消化杂志 2012; 20(23): 2218-2223
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2218.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种定植于人胃部的革兰氏阴性杆菌, 是慢性胃炎、消化性溃疡的主要病因, 并与胃癌和胃黏膜相关淋巴组织恶性淋巴瘤等疾病的发生密切相关[1,2], 世界卫生组织已将其列为Ⅰ级致癌因子[3]. *iceA*基因是*H. pylori*与胃上皮细胞接触后诱导表达的一种基因, 是1996年美国学者Donahue等[4]在比较1例溃疡和1例胃炎患者的*H. pylori*菌株的mRNA转录时发现的一新的*H. pylori*毒力相关基因. 该基因位于cysE(丝氨酸乙酰基转移酶的同源基因)下游, hpyIM上游. *iceA*基因有两个等位基因型, 分别称为*iceA1*和*iceA2*. *iceA1*基因与胃病之间的联系目前还有争论. 有的研究显示*iceA1*基因型与胃病之间无明显联系, 而也有一些研究表明, *iceA1*的基因型和*H. pylori*感染的临床预后之间有联系[5-7]. 这可能是由于在全球不同地理区域内*H. pylori*基因型分布不均一引起的, 也反映了*H. pylori*菌株与其致病的临床表现的地理上差异. 陈慧娟等[8]研究来自镇江地区分离的*H. pylori*的*iceA1*基因的阳性率与亚洲其他国家报道的报道相近, *iceA1*在胃癌中的检出率高于慢性胃炎与消化性溃疡的患者, 但与胃癌、消化性溃疡和慢性胃炎等疾病类型的发生无显著相关性. 陈惠娟等分析了4例来源于镇江地区*iceA1*基因的结构特征, 发现镇江地区*H. pylori*菌株的*iceA1*基因有较独特的结构特征, 镇江地区*H. pylori*的*iceA1*基因读码框有3个翻译起始点, 镇江株以第3个起始点翻译为主, 形成较小的蛋白结构. 因此, 我们进一步研究镇江地区*iceA1*序列特征, 并与标准菌株60190进行序列比对, 找出其核苷酸突变的位点及热点, 以进一步了解*iceA1*的地域特征.

■研发前沿
有的研究显示*iceA1*基因型与胃病之间无明显联系, 而也有一些研究表明, *iceA1*的基因型和*H. pylori*感染的临床预后之间有联系.

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori*基础培养基、微需氧环境发生袋、选择性抗生素及厌氧培养罐购自德国Merck公司. 改良布氏肉汤培养基由上海腹泻疾病控制中心提供, 无菌羊全血为金坛欣迪公司产品; Escherichia coli DH5α为江苏大学生命科学研究院实验室保存. pMD18-T载体、Taq DNA聚合酶、质粒抽提试剂盒购自TaKaRa大连公司. 酵母提取物、蛋白胨为OXOID公司产品. 其他常规试剂为市售分析纯.

1.2 方法

1.2.1 *H.pylori*菌株的来源: 分离的*H. pylori*来自2008-05/2008-12因消化系症状来江苏大学附属医院消化科胃镜室检查患者的胃窦黏膜(距幽门5 cm以内)活检组织, 每例取新鲜胃黏膜3块, 其中1块置于输送液中用于分离培养*H. pylori*, 1块用于快速尿素酶检测, 1块用于病理组织学检查. 疾病的诊断依据胃镜和病理学检查.

1.2.2 *H. pylori*的培养: 自输送液中取出胃黏膜标本, 将活检新鲜组织用接种环均匀涂于固体琼脂培养基, 在微需氧环境, 37 ℃下培养, 3-5 d后收集细菌. 经菌落形态、涂片染色显微镜下观察以及生化反应(尿素酶、化酶和触酶)证实. 尿素酶试验阳性-细菌使尿素酶试剂变红; 触酶试验阳性-细菌使3%H_2O_2产生连续的气泡; 氧化酶试验阳性-细菌使浸有氧化酶试剂的滤纸变黑.

1.2.3 *H. pylori*基因组DNA提取: 刮取培养的菌落, 悬于适量TE缓冲液, 以GES液(EDTA, sarkosyl)-氯仿法提取DNA, 加适量TE液, 4 ℃过夜溶解. 于-20 ℃保存备用.

1.2.4 引物设计与合成: 根据陈惠娟研究的镇江地区*H. pylori*菌株的*iceA1*基因读码框有3个翻译起始点, 镇江株以第3个起始点翻译为主, 形成较小的蛋白结构, 因此我们设计目的片段引物的思路是要包含从第1个翻译起始点到第3个翻译起始点这一区域. 根据NCBI数据库中的*H. pylori iceA1*基因(GenBank登录号: U43917)分别设计*iceA1*的上下游引物(表1). 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成.

1.2.5 PCR扩增*iceA1*片段: 以获得的*H. pylori*基因组DNA为模板, P1和P2为引物, 用Taq DNA聚合

■**创新盘点**
镇江地区*H. pylori*菌株的*iceA1*基因有较独特的结构特征, 存在3个框内缺失突变热点.我们发现缺失序列末端都与同向重复序列相邻, 有可能是同向重复序列导致了镇江地区的*H. pylori iceA1*基因内部缺失突变的产生.

表 1 *H. pylori*菌株*iceA1*引物及扩增产物长度

基因	引物名称	核苷酸序列(5'–3')	PCR产物大小(bp)
iceA1	*iceA1F*	AATGCGGTGGTGCT–TTCAGAT	472
	iceA1R	TTTGAGTGTTTTCAG–AGTTGCCGTG	

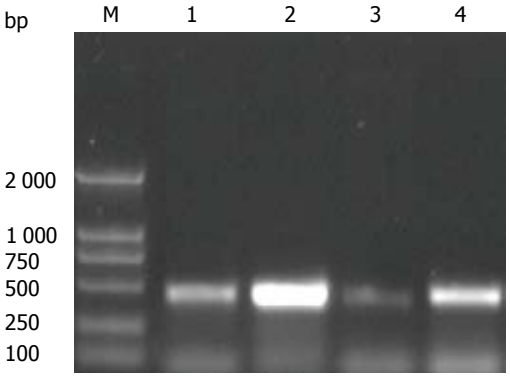


图 1 *iceA1*基因PCR产物. M: DNA标准(DL2000); 1–4分别为来源s24, s26, s65, w158的*iceA1*的PCR产物.

酶进行PCR扩增(在20 μL反应体系中, 分别加入dNTP 2.0 μL, 10×PCR buffer 2.0 μL, DNA模板1 μL, P1和P2引物各0.5 μL, Taq DNA聚合酶0.3 μL, ddH_2O 13.7 μL, 按照PCR条件扩增, 扩增条件为: 94 ℃预变性5 min后, 按94 ℃ 1 min, 56.2 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 38个循环, 最后72 ℃延伸10 min. PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.6 TA克隆: 胶回收试剂盒回收目的片段, 回收 PCR产物与pMD18-T载体在16 ℃连接过夜. 连接产物转化DH5α感受态细胞, 转化后的细菌涂布于含100 μg/mL氨苄青霉素的LB平板上, 37 ℃培养12 h. 挑取菌落转种于含氨苄青霉素100 μg/mL的LB液体培养基, 37 ℃振荡培养12 h后收集细菌, 质粒抽提试剂盒抽提质粒.

1.2.7 重组质粒的酶切鉴定和序列测定: 获得重组质粒pMD18-T-*iceA1*后用*Hind* Ⅲ和*EcoR* Ⅰ双酶切, 酶切产物经1%的凝胶电泳鉴定. 为了进一步从序列的准确性上得到验证, 将阳性克隆菌株送到上海生物工程有限公司测序.

1.2.8 *iceA1*序列比对: 应用Expasy在线翻译蛋白; 应用生物软件MEGA 4.0, 将本实验室的12个*H. pylori*菌株与国际标准菌株60190 *iceA1*基因(GenBank登录号: U43917)的核苷酸序列进行序列进行比对.

2 结果

2.1 PCR结果 以不同胃十二指肠疾病来源的*H. pylori*菌株基因组DNA为模板, 扩增出*iceA1*基因大小为472 bp左右(图1)对于*iceA1*片段的扩增, PCR产物的大小会有细小的差别, 测序结果表明这些区域内存在缺失突变.

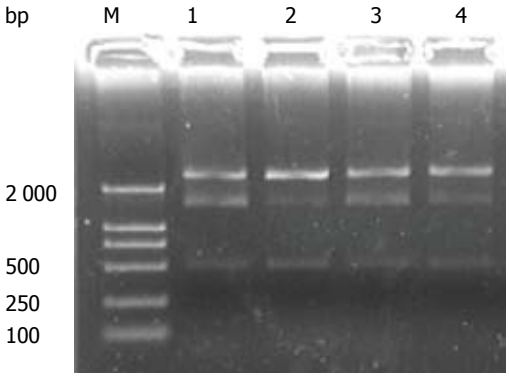


图 2 pMD18–simple–T–*iceA1*的双酶切鉴定物. M: DNA标准(DL2000); 1–4来源于分别为来源s24, s26, s65, w158菌株的*iceA1*酶切产物.

2.2 pMD18-T-*iceA1*克隆和酶切鉴定 将不同疾病来源菌株的*iceA1*克隆于pMD18-T载体后用*Hind* Ⅲ和*EcoR* Ⅰ双酶切鉴定, 所获片段大小与预期相符(图2).

2.3 不同菌株*iceA1*序列可变区的比对 分培养出不同胃十二指肠疾病来源的*H. pylori*, 挑取*iceA1*进行TA克隆, 筛出12个阳性克隆(胃癌3株, 溃疡6株, 胃炎3株)的*iceA1*基因片段, 测序结果大小从428-472 bp不等(图3).

本研究扩增了镇江地区来源于不同疾病的(胃癌、溃疡和胃炎)共12株*H. pylori*的*iceA1*基因片段并与标准菌株60190比对(GenBank登录号: U43917), 比对结果显示镇江地区的*H. pylori*的*iceA1*基因中存在着框内缺失突变. 本研究发现了对应于标准菌株60190开放读码框第780个核苷酸位置缺失了6个bp(为了方便表述, 记作780del6)核苷酸序列(TAATTT), 第781个核苷酸位置缺失了6 bp核苷酸序列(AATTTG), 这些缺失突变的产生可能是因为同样的缺失机制(位于在同一个同向重复序列中), 其中780del6比781del6产生的频率更高(表2). 我们还发现了另外两个缺失位点, 即60190 *iceA1*开放读码框的第809个核苷酸位置(809del5)缺失了5 bp的核苷酸序列(TAGGA), 第914个核苷酸位置(914del7)缺失了7 bp的核苷酸序列, 这两个位置的缺失导致了移码突变, 从而导致*iceA1*转录的提前终止, 从而产生较小的蛋白结构. 这2处缺失突变在镇江地区*H. pylori*的*iceA1*中存在频率较高. 其中, 809del5的阳性率为83.3%(10/12), 914del7为

表 2 镇江地区*iceA1*序列分析

菌株标号	疾病来源	框内缺失		
		780del6	809del5	914del7
S49	CSG	+	+	+
S9	CAG	–	+	–
S26	CAG	–	–	–
S10	DU	–	–	–
S16	DU	–	+	+
S47	DU	–	+	–
S61	DU	–	+	–
S65	DU	+	+	+
Z48	DU	+	+	+
S17	GC	–	+	–
S24	GC	–	+	–
W158	GC	–	+	–
60190		–	–	–

CSG: 慢性浅表性胃炎; CAG: 慢性萎缩性胃炎; DU: 十二指肠溃疡; GC: 胃癌.

33.3%(4/12). 而且有3株*H. pylori*同时存在3处缺失突变(780del6、809del5和914del7), 3株胃癌*H. pylori*只含有809del5缺失突变, 而溃疡和胃炎株则含有3个缺失突变. 对缺失片段周围的序列进行分析, 这些缺失序列的两端基本都与5-10 bp核苷酸的同向重复序列相连(表3).

3 讨论

DNA序列分析表明*iceA1*与nla IIIR在结构上十分相似, 后者有一个690 bp的开放读码框架(open reading frame, ORF), 能编码230个氨基酸的蛋白产物nla IIIR. Xu等[9]在对HpCH4株的研究中发现, 其*iceA1*有一全长为684 bp的ORF, 经IPTG诱导重组大肠杆菌后可成功表达, 其基因产物为228个氨基酸, 非常类似于nla IIIR, 并且证实该基因产物具有nla IIIR样限制性内切酶的功能, 表达该产物的*H. pylori*与临床疾病发生的严重程度关系密切[10-12], 但各家报道并不完全一致[5-7]. 并非所有*iceA1*皆可编nla IIIR样蛋白, 其原因为不同地域的*iceA1*基因其ORF有着菌群特异性框移突变和无义突变, 故不能翻译出完整的nla IIIR样蛋白. Donhaue等[4]认为, *iceA1*在大部分*H. pylori*菌株中的功能并非编码功能蛋白, 而是在转录水平调节其下游hpy IM基因的表达, 通过DNA甲基化水平的改变来调控相关毒性基因的表达, 从而间接参与*H. pylori*的致病作用.

*iceA1*在不同地区的及与疾病的关系并不相同. Kidd等[13]在对南非患者*H. pylori*的研究中发现, *iceA1*存在情况为: 胃炎24%, 胃溃疡40%, 胃癌67%, *iceA1*与胃癌有关. 在日本*iceA1*在胃癌中的比例61%略高于其他消化性溃疡(53%), 未见统计学差异, 但发现*iceA1*菌株与消化性溃疡及胃粘膜IL-8水平有显著相关性. 北美及荷兰研究的显示, *iceA1*比*iceA2*更普遍存在, 且*iceA1*阳性的*H. pylori*能刺激胃黏膜产生高水平的IL-8, 与*iceA2*相比, *iceA1*与十二指肠溃疡关系更为密切[14]. 东亚以*iceA1*基因型为主[15], 美国中东部地区则以*iceA2*为优势基因[16]. Wu等[17]研究台湾东部地区的*iceA1*与慢性胃炎有关. *iceA*基因的分布存在地域性差异, 在亚洲、非洲主要表达为*iceA1*基因, 在美洲大陆则以*iceA2*为主导, 而欧洲大陆的*iceA*基因则表现出与亚洲、美洲菌株的相似性, 在大多数地区的研究中未发现*iceA1*毒力菌株感染与临床疾病发生的因果联系[18], 因此与*H. pylori*的其他毒力基因相似, *iceA1*基因对于疾病的意义在不同地区是不一样的.

*H. pylori*可通过点突变、等位基因交换、基因重排及序列插入等使基因呈现出多样性, 从而导致*H. pylori*不同基因组间的差异极大[19]. 不同地区流行的*H. pylori*基因组结构明显不同, 而基因组多样性则影响细菌毒力因子的功能及抗原形成, 即在细菌进化过程中毒力因素也存在生物-地理变异[14]. 我们对镇江地区来源于不同疾病的(胃癌、溃疡和胃炎)共12株*H. pylori*的*iceA1*基因片段与标准菌株60190比对, 我们发现一个有趣的现象, 即与标准菌株60190相比, 镇江地区的*H. pylori*的*iceA1*基因中存在着3个框内缺失突变热点, 而且这些缺失突变存在的频率很高. 包含重复序列(同向重复序列或者反向重复序列)的局部DNA序列在复制或者重组的过程中可能由于错配的原因而导致序列缺失, 在本项研究中, 我们发现缺失序列末端都与同向重复序列相邻. 因此, 很有可能是同向重复序列导致了镇江地区的*H. pylori*的*iceA1*基因内部的这些缺失突变的产生. 我们还发现了3株同时存在3个缺失突变的*H. pylori*, 而且镇江地区的有高度同源的*cagA*, *vacA*和*ureI*等基因[20,21]. 因此, 我们推测“建立者效应”[5]可能也是导致镇江地区框内突变热点产生的原因之一. 研究表明*iceA1*不同的等位基因型说明了[20,21]在不同地区基因库中的进化多样性, 对于菌株型的追踪有一定帮助. *iceA1*序列的变异性可以作为不同地

■应用要点

*iceA1*序列的变异性可以作为不同地域菌株多样性的一个分子标记, 有可能成为分析*H. pylori*群体遗传学的有用工具.

■名词解释

建立者效应：一些异常基因频率在小隔离群体中特别高，可能是由于该群体中少数始祖所具有的基因，由于遗传漂变而逐渐达到较高水平.

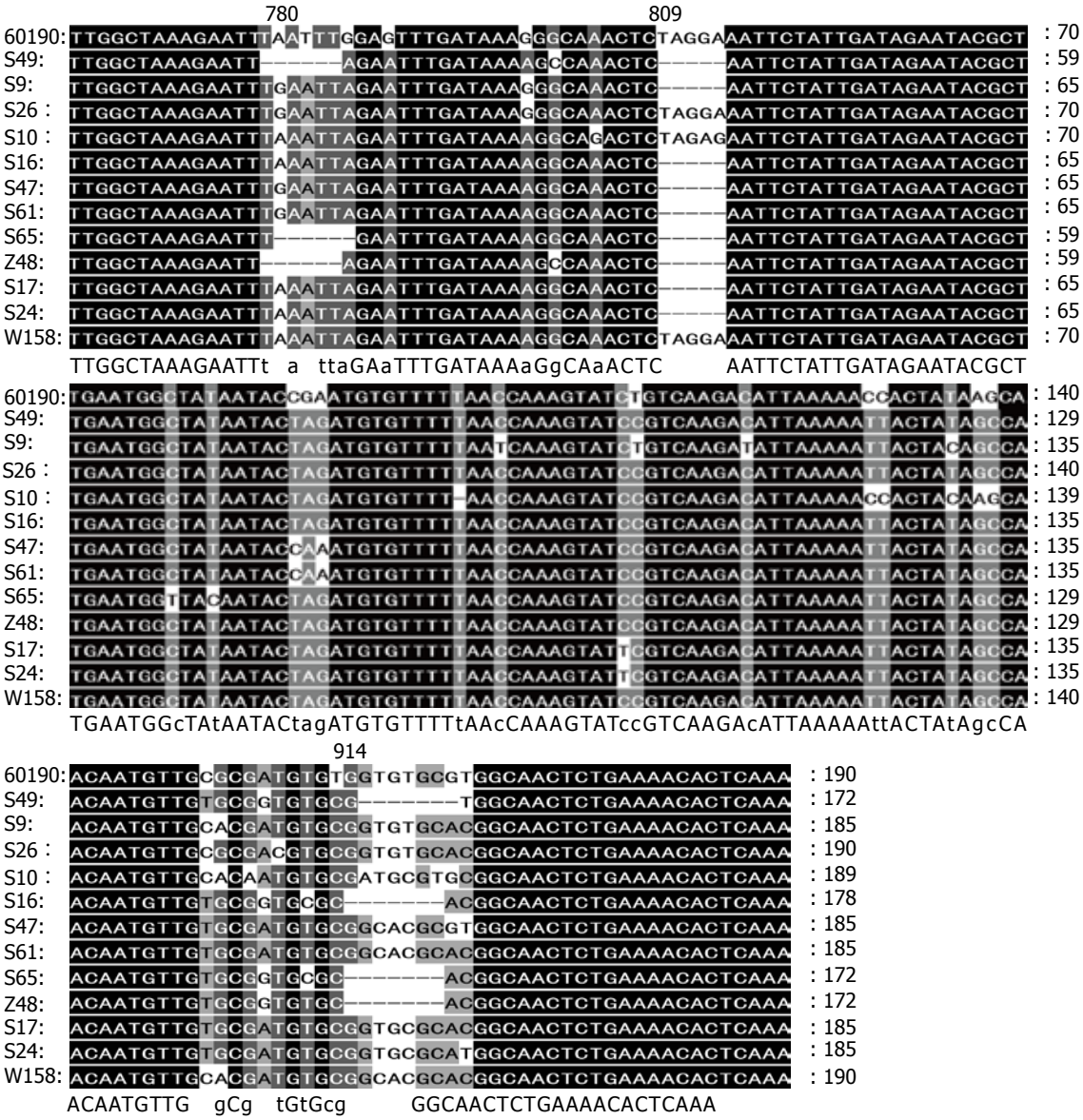


图 3 *iceA1*序列比对. 60190为标准菌株, S49, S9, S26为胃炎株, S10, S16, S47, S61, S65, Z48为溃疡株, S17, S24, W158为胃癌株.

表 3 *iceA1*缺失突变及两端的核苷酸序列

缺失位置[b]	菌株	核苷酸序列[a]	缺失突变两端的重复序列	阳性缺失株数量(%)
780del6	60190	AGAATTTAATTTGGAGTTT	AGAATTT或AATTT	3/12(25.0)
	S26	AGAATTTGAATTAGAATTT		
	S49	AGAATT---------- AGAATTT		
809del5	60190	AAACTCTAGGAAATTCTA	AAAYTCTA	10/12(83.3)
	S26	AAACTCTAGGAAATTCTA		
	S49	AAACTC----------AATTCTA		
914del7	60190	GTGTGGTGTGCGTGGC	GTGCR或GTGTGS	4/12(33.3)
	S26	GTGCGGTGTGCACGGC		
	S49	GTGCG----------TGGC		

[a]核苷酸序列对应的是标准菌株60190 *iceA1*的开放读码框和它的上游序列(GenBank登录号: U43917); del代表缺失; [b]标准菌株60190和菌株S26分别代表西方菌株和镇江菌株, 菌株S26和S49分别代表携带不同突变位点的镇江菌株, 下划线部分的核苷酸序列标明的是同向重复序列(其中914del7含重叠部分), Y代表T或者C, R代表G或者A, S代表G或者C.

域菌株多样性的一个分子标记, 有可能成为分析[20,21]群体遗传学的有用工具.

4 参考文献

1 Arfaoui D, Elloumi H, Ben Abdelaziz A. [Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma]. *Tunis Med* 2009; 87: 231-236

2 Peter S, Beglinger C. Helicobacter pylori and gastric cancer: the causal relationship. *Digestion* 2007; 75: 25-35

3 Herrera V, Parsonnet J. Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 971-976

4 Donahue JP, Peek RM, Van Doorn LJ, Thompson SA, Xu Q, Blaser MJ, Miller GG. Analysis of iceA1 transcription in Helicobacter pylori. *Helicobacter* 2000; 5: 1-12

5 Ito Y, Azuma T, Ito S, Suto H, Miyaji H, Yamazaki Y, Kato T, Kohli Y, Keida Y, Kuriyama M. Sequence analysis and clinical significance of the iceA gene from Helicobacter pylori strains in Japan. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 483-488

6 Ciftci IH, Uslan I, Dilek FH, Aşık G, Ozgür MA, Dilek ON. [Investigation of Helicobacter pylori iceA1 and iceA2 genes in patients with chronic gastritis and gastric cancer]. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45: 228-233

7 Amjad N, Osman HA, Razak NA, Kassian J, Din J, bin Abdullah N. Clinical significance of Helicobacter pylori cagA and iceA genotype status. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4443-4447

8 陈慧娟, 张尤历, 唐炜. 幽门螺杆菌iceA1, babA2基因型与临床消化疾病的关系. 江苏大学学报(医学版) 2009; 19: 173-175

9 Xu Q, Morgan RD, Roberts RJ, Xu SY, van Doorn LJ, Donahue JP, Miller GG, Blaser MJ. Functional analysis of iceA1, a CATG-recognizing restriction endonuclease gene in Helicobacter pylori. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3839-3847

10 Peek RM, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a Helicobacter pylori gene, iceA, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 531-544

11 van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66

12 Sheu SM, Sheu BS, Yang HB, Li C, Chu TC, Wu JJ. Presence of iceA1 but not cagA, cagC, cagE, cagF, cagN, cagT, or orf13 genes of Helicobacter pylori is associated with more severe gastric inflammation in Taiwanese. *J Formos Med Assoc* 2002; 101: 18-23

13 Kidd M, Peek RM, Lastovica AJ, Israel DA, Kummer AF, Louw JA. Analysis of iceA genotypes in South African Helicobacter pylori strains and relationship to clinically significant disease. *Gut* 2001; 49: 629-635

14 Kauser F, Hussain MA, Ahmed I, Srinivas S, Devi SM, Majeed AA, Rao KR, Khan AA, Sechi LA, Ahmed N. Comparative genomics of Helicobacter pylori isolates recovered from ulcer disease patients in England. *BMC Microbiol* 2005; 5: 32

15 Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2274-2279

16 Wong BC, Yin Y, Berg DE, Xia HH, Zhang JZ, Wang WH, Wong WM, Huang XR, Tang VS, Lam SK. Distribution of distinct vacA, cagA and iceA alleles in Helicobacter pylori in Hong Kong. *Helicobacter* 2001; 6: 317-324

17 Wu CC, Chou PY, Hu CT, Liu ZC, Lin CY, Tseng YH, Lin NT. Clinical Relevance of the vacA, iceA, cagA, and flaA genes of Helicobacter pylori strains isolated in Eastern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2913-2915

18 黄敬敬, 战淑慧, 董全江, 董开芯. 幽门螺杆菌iceA1基因地域分布特征. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3058-3063

19 Falush D, Kraft C, Taylor NS, Correa P, Fox JG, Achtman M, Suerbaum S. Recombination and mutation during long-term gastric colonization by Helicobacter pylori: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 15056-15061

20 吴莺, 张尤历, 王文兵, 陈劲频, 沈琰. 不同地区幽门螺杆菌cagA基因羧基端可变区及其蛋白EPIYA基序的研究. 世界华人消化杂志 2007; 15: 746-749

21 邵长江, 张尤历, 王文兵, 孔梅, 陈鑫, 宋永站. 幽门螺杆菌尿素通道蛋白基因ureI的检测、克隆及序列分析. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3684-3687

■同行评价

本研究选题科学, 创新性较好, 实用性较强, 具有一定的学术价值.

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2012年8月18日; 20(23): 2224-2228
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8月18日; 20(23): 2229
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

2012年国内国际会议预告

2012-07-27/29
第十届全国胃病学术大会
会议地点: 哈尔滨市
联系方式: xiaohuahuiyi2012@163.com

2012-07-30/08-08
国际中医药与亚健康学术大会
会议地点: 加拿大蒙特利尔市
联系方式: wuping@126.com

2012-08-17/19
第九届中国人民解放军肿瘤学术大会(长征肿瘤大会)
会议地点: 重庆市
联系方式: huangxiaoyu@stapricot.com

2012-08-25/29
第八届世界华人药物化学研讨会
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

2012-08-30/09-02
2012年中华医学会全国麻醉学术年会
会议地点: 重庆市
联系方式: csa2012@live.cn

2012-09-01/30
中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议
会议地点: 郑州市
联系方式: lijiuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30
第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会
会议地点: 济南市
联系方式: doclf@163.com

2012-09-06/09
第七届中国肿瘤学术大会暨第十一届海峡两岸肿瘤学术会议
会议地点: 北京市
联系方式: shengwangyan@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

2012-09-20/23
2012中国消化病学大会
会议地点: 上海市
联系方式: abstract@ccdd2012.org

2012-09-21/30
2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛
会议地点: 长春市
联系方式: ting@dxyer.com

2012-10-19/21
中欧胰腺外科专业新技术、新进展学术研讨会
会议地点: 长沙市
联系方式: yu198610@163.com

2012-10-19/10-21
2012年(第二届)中日国际消化疾病论坛暨挑战直肠癌-战略与艺术综合研讨会
会议地点: 北京市
联系方式: cjds@htbr.cn

2012-10-21/11-10
第十四次全国中医肛肠学术交流大会
会议地点: 长沙市
联系方式: gcfh2012@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

2012-10-31/11-03
第十届中国介入放射学学术大会(2012CSIR)暨2012国际栓塞会议
会议地点: 南京市
联系方式: liufang@cyberzone.cn

2012-11-25/27
第九届国际糖尿病联盟西太平洋地区学术大会暨第四届亚洲糖尿病学会学术年会
会议地点: 日本京都
联系方式: meeting@bimtdoctor.com

2012-11-25/30
2012北美放射学年会RSNA
会议地点: 美国芝加哥
联系方式: panting_expo@126.com

2012-12-21/23
2012生物医学工程生物信息学国际会议
会议地点: 昆明市
联系方式: beb2012@126.com

•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!

蔡开琳 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈汝福 教授
中山大学第二附属医院肝胆胰外科

陈亚军 主任医师
首都医科大学附属北京儿童医院普外科

崔立红 教授
中国人民解放军海军总医院消化内科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

杜祥 教授
复旦大学附属肿瘤医院病理科

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院

范学工 教授
中南大学湘雅医院

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

傅华群 教授
南昌大学第二附属医院普外科

管冬元 副教授
上海中医药大学基础医学院实验中医学教研室

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)总医院消化内科

季菊玲 副教授
南通大学医学院病理教研室

芙卫东 教授
安徽省立院肝脏外科

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医医院消化科

李宗芳 教授
西安交通大学医学院第二附属医院

刘成海 研究员
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

刘占举 教授
同济大学附属上海市第十人民医院

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

汪思应 教授
安徽医科大学实验动物中心

王富春 教授
长春中医药大学针灸推拿学院

王健生 教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王凯 教授
山东大学齐鲁医院肝病科

吴军 研究员
中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所

夏时海 副教授
中国人民解放军武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科(中心)

向德兵 副教授
中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心

许剑民 教授
上海市复旦大学附属中山医院普外科

宣世英 教授
山东省青岛市市立医院肝病内科

杨江华 副教授
皖南医学院弋矶山医院感染科

姚树坤 教授
卫生部中日友好医院消化内科