ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)

世界华人消化杂志

世界华人消化杂志®

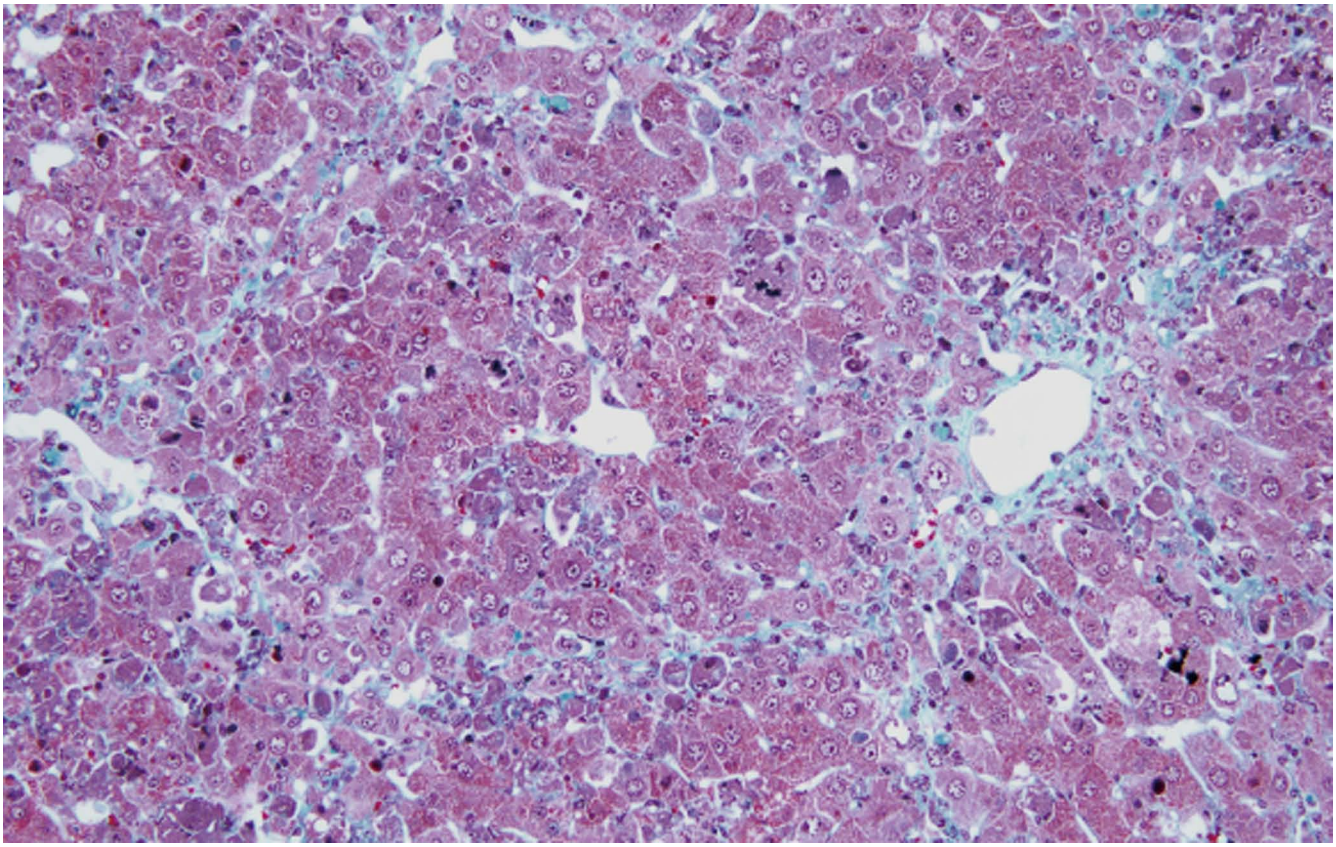
WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2014 年 5 月 18 日　第 22 卷　第 14 期　(Volume 22 Number 14)

www.wjgnet.com

二零一四年五月十八日　第二十二卷　第十四期



14/2014

《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(中国科技核心期刊 2012年版)》和《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录.

ISSN 1009-3079
14>
9 771009 307056

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

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员，由485位专家组成，分布在30个省市，自治区，特别行政区．其中，上海市81位、北京市71位、广东省40位、江苏省39位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位．

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
王俊平教授
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
白岚教授
卜平教授
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
邓鑫教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊冬梅副主任医师
樊晓明教授
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
甘华田教授
高凌副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
郝丽萍副教授
何继满教授
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
刘亮明副教授
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛恩强教授
毛高平教授
孟庆华教授
缪应雷主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
潘阳林副教授
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
庹必光教授
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
王蔚虹教授
王晓艳副教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐灿霞教授
徐可树教授
杨建民教授
张国主任医师
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
郑培永教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
郑勇教授
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

白雪副主任医师
白雪巍副主任医师
白玉作教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈炳官教授
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
傅思源副教授
傅晓辉副教授
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
何向辉教授
何晓顺教授
何裕隆教授
胡安斌副教授
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
康春博副主任医师
孔静副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李升平教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔教授
李正荣副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘宏鸣副教授
刘建教授
刘亮副主任医师
刘颖斌主任医师
卢军华教授
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕凌副教授
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
崔清波副教授
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
宋新明教授
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙文兵教授
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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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
喻春钊教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
邹小明教授

消化感染病学

白浪副教授
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
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
郭永红副主任医师
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
林潮双副教授
刘正稳教授
彭亮副主任医师
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
周陶友副教授
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
扈晓宇主任医师
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
鲁玉辉副教授
南极星教授
牛英才研究员
谭周进教授
王富春教授
王来友副教授
王笑民主任医师
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
侯凤刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李苏宜教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
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
杨薇副教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
李家平教授
刘杰民副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
吴沛宏教授
余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

范恒教授
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
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
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
李孟森教授
李文贵副教授
李焱副研究员
李增山副教授
刘长征副教授
刘克辛教授
刘森副教授
宁钧宇副研究员
彭宗根副研究员
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
邵华副主任药师
沈东炎副教授
沈涛副教授
斯坎德尔·白克力教授
台桂香教授
谭学瑞教授
汤静主管药师
滕旭副教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
王书奎教授
魏继福研究员
文彬研究员
吴道澄教授
吴江锋副教授
吴军研究员
吴俊华副教授
吴志强副教授
夏敏教授
徐健副主任医师
徐宁志研究员
许文燮教授
杨晓明教授
阴赖宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
曾柱教授
张红教授
张淑坤副研究员
赵平教授
赵铁建教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
朱益民教授
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
邓昊副教授
杜祥教授
樊祥山副主任医师
郭炜教授
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
莫发荣副教授
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 ●　2014 年 5 月 18 日　第 22 卷　第 14 期　(总第454期)

基础研究

1915 汉丹肝乐对大鼠肝纤维化PI3K/Akt信号通路的影响及意义
胡晓霞, 王艳, 王晋星一

1921 蟾毒灵对人肝癌细胞增殖与侵袭的影响
盖吉钦, 秦建民, 范跃祖

1928 白藜芦醇对酒精诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用及相关基因表达的变化
何培元, 高淑梅, 侯志平, 马立新, 李炳庆

1936 幽门螺杆菌菌毛蛋白FlaA IgY的制备及体外抑菌实验
彭姣, 卢超, 祁振强, 张国海

临床研究

1943 MicroRNA-34a、Notch1在肝细胞癌组织中的表达及临床意义
于泳, 李霄, 周亮, 窦科峰, 李小磊, 阮柏, 张卓超, 戴斌, 汪建林, 杨西胜, 王德盛

文献综述

1953 肝性胸水诊治的进展
胡铭洋, 彭燕

1959 肝螺杆菌感染与原发性肝癌相关性的研究进展
蒋旗, 黄衍强, 黄赞松

1966 新型钙离子通道TRPV5和TRPV6与胃肠肿瘤的研究进展
刘微, 刘模荣, 张慧

研究快报

1972 整合素a5b1对胃癌细胞黏附、转移及耐药的影响
贺宇, 齐洁敏, 谢朝辉, 张杰

1977 $CD133^{+}CXCR4^{+}$胃癌KATO-III细胞的侵袭能力
俞远林, 姜波健, 俞继卫

1984 紫草素对人共刺激细胞杀伤胃癌细胞的影响及其机制
郭雪兴, 刘军权, 陈复兴, 吕小婷, 陈永强, 陈剑群

1992 LNAzyme设计及其体外特异性抑制丙型肝炎病毒C基因的表达
邓益斌, 农乐根, 梁祚仁, 张梁, 覃羽华, 何平

1998 肝纤维化能够保护小鼠抵抗D-Gal/LPS诱导的致死性损伤
白丽, 孔明, 张晓慧, 丁美, 郑素军, 陈煜, 段钟平

2003 Genistein与5-FU通过p42/44 MAPK通路调控Bax诱导肝癌细胞凋亡
赵忠新, 迟大鹏, 王钰粟, 梅庆步, 于海涛, 岳丽玲, 王玉, 王秀华, 刘丹

2008 不同比例ω-3/ω-6多不饱和脂肪酸对DSS诱导大鼠急性结肠炎的影响
田玉玲, 王化虹, 田雨, 张维, 滕贵根, 何群

临床经验

2016 食管鳞癌患者血清Stathmin的表达及临床意义
赵楠, 韩波, 吴宗勇, 周兰萍, 刘芳, 颜露, 赵晓航, 许杨

2023 HBeAg阳性慢性乙型肝炎不同肝组织炎症与纤维化时期血清HBsAg含量的动力学特点
谭雷, 吴泽倩, 刘婷, 高志良, 柯伟民

2028 国产恩替卡韦对慢性乙型肝炎抗病毒治疗的Meta分析
郑人源, 张琴, 高勇, 卓强

2034 奥曲肽注射液联合前列地尔注射液在常规治疗肝硬化合并HES患者中的作用
刘剑, 景照峰, 晏家华, 罗敏, 胡蓉

2039 射波刀联合TACE治疗原发性肝癌108例
陈樱, 朱俊, 张火俊, 张晓青, 居小萍, 卢明智, 刘永明, 曹洋森, 于春山, 王晓艳

2045 妊娠合并急性胰腺炎的临床特点
喻研, 但自力

2049 人类真核延伸因子1A2与生长因子受体结合蛋白2在胰腺癌组织中的表达及临床病理意义
周维霞, 蒋晓红, 杨勇, 陈瑞东, 胡端敏

2055 腹腔镜辅助治疗巨大消化性溃疡穿孔53例
杨先智, 陈龙宇

2059 利多卡因联合帕瑞昔布在老年人腹腔镜结肠癌根治术中的应用
唐珩, 张培俊, 李艳华, 马庆杰

2064 胆囊结石与胆囊壁黏膜幽门螺杆菌定植的关系
王炜, 朱建华, 韩江, 吴衍, 丁佩芬
2069 小组心理干预对妊娠期糖尿病患者焦虑抑郁情绪及妊娠结局的影响
杜献, 阮淑萍, 朱剑峰

附　　录
Ⅰ－Ⅴ 《世界华人消化杂志》投稿须知
Ⅰ 2014年国内国际会议预告

志　　谢
Ⅰ 志谢世界华人消化杂志编委

消　　息
1952 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》影响因子0.873
2015 《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)
2027 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊
2054 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号
2063 《世界华人消化杂志》参考文献要求

封面故事
白丽, 孔明, 张晓慧, 丁美, 郑素军, 陈煜, 段钟平. 肝纤维化能够保护小鼠抵抗D-Gal/LPS诱导的致死性损伤. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1998-2002
http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1998.asp
http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1998

本期责任人
编务 李香; 送审编辑 鲁亚静, 郭鹏; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 郭鹏; 形式规范审核 编辑部主任 田滢; 最终清样审核总编 马连生

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名
(旬刊)
创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2014-05-18
原刊名 新消化病学杂志

期刊名称
世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编
程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科
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
王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科
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
田滢, 主任
《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: 010-59080035　手机: 13901166126
传真: 010-85381893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

出版
百世登出版集团有限公司
Baishideng Publishing Group Co., Limited
Flat C, 23/F., Lucky Plaza, 315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

制作
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: 010-85381892
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊 2012年版)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录.

《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊.

《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.

定价
每期90.67元 全年36期3264.00元

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

World Chinese Journal of Digestology

May 2014 Contents in Brief Volume 22 Number 14

BASIC RESEARCH

1915 Handan Ganle inhibits PI3K/Akt signaling pathway in liver fibrosis in rats
Hu XX, Wang Y, Wang JXY

1921 Bufalin inhibits proliferation and invasion of human liver cancer cells
Gai JQ, Qin JM, Fan YZ

1928 Resveratrol protects against alcohol-induced oxidative stress in human HepG2 cells
He PY, Gao SM, Hou ZP, Ma LX, Li BQ

1936 *In vitro* bacteriostatic activity of IgY against recombinant *Helicobacter pylori* FlaA protein
Peng J, Lu C, Qi ZQ, Zhang GH

CLINICAL RESEARCH

1943 Clinical significance of expression of microRNA-34a and Notch1 in hepatocellular carcinoma
Yu Y, Li X, Zhou L, Dou KF, Li XL, Ruan B, Zhang ZC, Dai B, Wang JL, Yang XS, Wang DS

REVIEW

1953 Progress in diagnosis and treatment of hepatic hydrothorax
Hu MY, Peng Y

1959 Relationship between *Helicobacter hepaticus* infection and hepatocellular carcinoma
Jiang Q, Huang YQ, Huang ZS

1966 Novel calcium ion channels TRPV5 and TRPV6 and gastrointestinal tumors
Liu W, Liu MR, Zhang H

RAPID COMMUNICATION

1972 Role of integrin a5b1 in adhesion, migration and extramedullary infiltration of gastric cancer cells
He Y, Qi JM, Xie ZH, Zhang J

1977 High invasive capacity of $CD133^{+}CXCR4^{+}$ gastric cancer cells
Yu YL, Jiang BJ, Yu JW

1984 Shikonin induces cytotoxicity of co-stimulated human cells to gastric cancer cell lines
Guo XX, Liu JQ, Chen FX, Lv XT, Chen YQ, Chen JQ

1992 Hepatitis C virus gene-specific locked nucleic acid enzyme significantly inhibits C gene expression *in vitro*
Deng YB, Nong LG, Liang ZR, Zhang L, Qin YH, He P

1998 Liver fibrosis protects mice against lethal injury induced by D-GalN/LPS
Bai L, Kong M, Zhang XH, Ding M, Zheng SJ, Chen Y, Duan ZP

2003 Genistein and 5-FU inhibit apoptosis of human hepatocellular cancer cells by regulating Bax *via* p42/44 MAPK pathway
Zhao ZX, Chi DP, Wang YS, Mei QB, Yu HT, Yue LL, Wang Y, Wang XH, Liu D

2008 Effects of different ratios of ω-3/ω-6 polyunsaturated fatty acids on experimental acute colitis in rats
Tian YL, Wang HH, Tian Y, Zhang W, Teng GG, He Q

CLINICAL PRACTICE

2016 Clinical significance of serum Stathmin in esophageal squamous cell carcinoma
Zhao N, Han B, Wu ZY, Zhou LP, Liu F, Yan L, Zhao XH, Xu Y

2023 Dynamic changes in serum HBsAg levels in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with different liver inflammation grades and fibrosis stages
Tan L, Wu ZQ, Liu T, Gao ZL, Ke WM

2028 China-made entecavir for treatment of chronic hepatitis B: A Meta-analysis
Zheng RY, Zhang Q, Gao Y, Zhuo Q

2034 Therapeutic effects of octreotide combined with alprostadil on cirrhosis with hepatorenal syndrome
Liu J, Jing ZF, Yan JH, Luo M, Hu R

2039 Short-term effects of cyberknife combined with TACE for treatment of primary liver cancer
Chen Y, Zhu J, Zhang HJ, Zhang XQ, Ju XP, Lu MZ, Liu YM, Cao YS, Yu CS, Wang XY

2045 Clinical characteristics of acute pancreatitis in pregnancy
Yu Y, Dan ZL

2049 Clinicopathologic significance of expression of EEF1A2 and GRB2 in pancreatic adenocarcinoma
Zhou WX, Jiang XH, Yang Y, Chen RD, Hu DM

2055 Laparoscopic-assisted surgery for perforated peptic ulcer: Analysis of 53 cases
Yang XZ, Chen LY

2059 Application of lidocaine combined with parecoxib in elderly patients undergoing laparoscopic radical resection for colon cancer
Tang H, Zhang PJ, Li YH, Ma QJ

2064 Relationship between gallbladder stones and *Helicobacter pylori* colonization of the gallbladder mucosa
Wang W, Zhu JH, Han J, Wu Y, Ding PF

2069 Influence of group psychological intervention on anxiety, depression and pregnancy outcomes in primiparous women
Du X, Ruan SP, Zhu JF

APPENDIX

Ⅰ－Ⅴ Instructions to authors of *World Chinese Journal of Digestology*

Ⅰ Meeting events calendar in 2014

ACKNOWLEDGMENT

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

COVER

Bai L, Kong M, Zhang XH, Ding M, Zheng SJ, Chen Y, Duan ZP. Liver fibrosis protects mice against lethal injury induced by D-GalN/LPS. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1998-2002
http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1998.asp
http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1998

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiang Li* Review Editor: *Ya-Jing Lu, Peng Guo* Electronic Page Editor: *Ya-Jing Lu* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Peng Guo* Proof Editor: *Ying Tian* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date May 18, 2014

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

ISSN
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF
Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, 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, Hang-zhou 310006, Zhejiang Province, China
Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, 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

EDITORIAL OFFICE
Ying Tian, Director
World Chinese Journal of Digestology
Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-59080035 13901166126
Fax: +86-10-85381893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

PUBLISHER
Baishideng Publishing Group Co., Limited
Flat C, 23/F., Lucky Plaza,
315-321 Lockhart Road, Wan Chai,
Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188
E-mail: bpg@baishideng.com
http://www.wjgnet.com

PRODUCTION CENTER
Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited
Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-85381892
Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION
RMB 90.67 Yuan for each issue
RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT
© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved. Articles published by this Open Access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

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.

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1915-1920
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

汉丹肝乐对大鼠肝纤维化PI3K/Akt信号通路的影响及意义

胡晓霞, 王 艳, 王晋星一

胡晓霞, 王艳, 王晋星一, 贵阳医学院生理学教研室 贵州省贵阳市 550004
胡晓霞, 讲师, 主要从事肝纤维化防治的研究.
作者贡献分布: 此课题由胡晓霞设计; 实验内容由胡晓霞与王艳负责操作完成; 研究所用试剂由胡晓霞提供; 数据分析由王晋星一完成; 本论文写作由胡晓霞完成.
通讯作者: 胡晓霞, 讲师, 550004, 贵州省贵阳市北京路9号, 贵阳医学院生理学教研室. hxx2000@163.com
收稿日期: 2014-03-04 修回日期: 2014-03-20
接受日期: 2014-03-28 在线出版日期: 2014-05-18

Handan Ganle inhibits PI3K/Akt signaling pathway in liver fibrosis in rats

Xiao-Xia Hu, Yan Wang, Jin-Xing-Yi Wang

Xiao-Xia Hu, Yan Wang, Jin-Xing-Yi Wang, Department of Physiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Correspondence to: Xiao-Xia Hu, Lecturer, Department of Physiology, Guiyang Medical College, 9 Beijing Road, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. hxx2000@163.com
Received: 2014-03-04 Revised: 2014-03-20
Accepted: 2014-03-28 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To observe the change of the PI3K/Akt signaling pathway in CCl_4 induced liver fibrosis and to explore the effect of Handan Ganle on this signaling pathway in hepatic fibrosis in rats.

METHODS: Thirty SD rats were randomly divided into a normal control group, a liver fibrosis group and a Handan Ganle treated group. The rats of the liver fibrosis group and Handan Ganle treated group were treated by hypodermic injection of 40% CCl_4 at 0.3 mL/100 g body weight to induce hepatic fibrosis. Then, the rats in the Handan Ganle group were treated with 1.0 g/kg Handan Ganle once daily for 8 weeks. The expression of Akt1 and phospho-Akt1 was detected by immunohistochemistry and Western blot, and the apoptosis of HSCs was determined by TUNEL assay.

RESULTS: Compared with the normal control group, the expression of Akt1 (2.73 ± 0.52 *vs* 9.60 ± 2.28, $P < 0.01$) and phospho-Akt1 (0.92 ± 0.40 *vs* 6.51 ± 1.39, $P < 0.01$) in the liver fibrosis group was increased. Handan Ganle treatment decreased the levels of Akt1 (9.60 ± 2.28 *vs* 5.36 ± 1.59, $P < 0.01$) and phospho-Akt1 (6.51 ± 1.39 *vs* 2.08 ± 0.85, $P < 0.01$) but increased the apoptosis of HSCs (1.07 ± 0.32 *vs* 4.24 ± 0.86, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The PI3K/Akt signaling pathway may play an important role in CCl_4 induced liver fibrosis. Handan Ganle can suppress this signaling pathway and increase the apoptosis of HSCs, which might be related with its anti-hepatic fibrosis activity.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Liver fibrosis; PI3K/Akt; Hepatic stellate cells; Apoptosis

Hu XX, Wang Y, Wang JXY. Handan Ganle inhibits PI3K/Akt signaling pathway in liver fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1915-1920 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1915.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1915

摘要

目的: 观察磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶(phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, PI3K/Akt)信号通路在CCl_4诱导的肝纤维化大鼠肝组织中的变化并探讨中药汉丹肝乐对他的影响.

方法: 选取SD大鼠30只, 随机分为正常对照组、肝纤维化8 wk组及汉丹肝乐治疗组, 每组各10只. 肝纤维化组及汉丹肝乐治疗组大鼠按0.3 mL/100 g体质量的剂量皮下注射40%CCl_4花生油溶液, 每隔3 d注射1次, 造模时间为8 wk; 对照组大鼠皮下注射等量花生油溶液. 造模结束后汉丹肝乐治疗组大鼠给予1.0 g/kg的汉丹肝乐灌胃治疗, 1次/d, 治疗时间为8 wk. HE染色观察肝组织病理学改变; 采用免疫组织化学技术及Western blot检测肝组织中PI3K/Akt信号通路中关键分子Akt1、磷酸化Akt1的表达变化, 同时应用TUNEL法检测肝星状细

■背景资料
肝纤维化是各种慢性肝脏疾病所共有的病理特征, 是肝脏在病因的长期作用下, 经历持续的损伤及抗损伤修复过程, 导致细胞外基质在肝脏内大量沉积所造成的. 肝纤维化的发生、发展涉及到多种肝脏实质、间质细胞及细胞因子之间的复杂作用, 因此关于肝纤维化的发生机制及防治研究一直是肝病研究的热点内容.

■同行评议者
王蒙, 副教授, 第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

■研发前沿
目前临床上应用的治疗肝纤维化的西药大多只能针对其发病机制中某一环节起效，而很难做到多靶点、多层次覆盖的药效作用；而中药抗肝纤维化具有药效机制多层次、多靶点，注重整体调节的特点，且具有不良反应轻等优点，因此中药防治肝纤维化疾病受到越来越多的关注.

胞(hepatic stellate cells, HSC)凋亡情况.

结果: 与正常对照组比较，肝纤维化8 wk组大鼠肝组织中Akt1(2.73±0.52 *vs* 9.60±2.28, $P<0.01$)、磷酸化Akt1(0.92±0.40 *vs* 6.51±1.39, $P<0.01$)的表达均显著增加，差异具有显著性；经汉丹肝乐治疗后，肝组织中Akt1(9.60±2.28 *vs* 5.36±1.59, $P<0.01$)、磷酸化Akt1(6.51±1.39 *vs* 2.08±0.85, $P<0.01$)的表达均显著下降；同时，TUNEL法检测发现汉丹肝乐组大鼠肝组织中HSC凋亡率显著高于肝纤维化8 wk组(1.07±0.32 *vs* 4.24±0.86, $P<0.01$).

结论: PI3K/Akt信号通路在肝纤维化的发生发展过程中发挥重要作用，而汉丹肝乐可通过抑制该信号通路，促进HSC的凋亡来发挥抗肝纤维化的作用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝纤维化; 磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶; 肝星状细胞; 细胞凋亡

核心提示: 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)激活转化为肌成纤维细胞并大量分泌细胞外基质是肝纤维化发生发展的中心环节，汉丹肝乐可通过抑制PI3K/Akt信号通路的激活，促进HSC的凋亡来发挥抗肝纤维化的作用.

胡晓霞, 王艳, 王晋星一. 汉丹肝乐对大鼠肝纤维化PI3K/Akt信号通路的影响及意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1915-1920
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1915.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1915

0 引言

肝纤维化是多种慢性肝脏疾病向肝硬化发展的必经阶段，其主要的病理特征是以胶原为主的细胞外基质过度增加而在肝脏内沉积[1-3]. 目前研究认为，肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)激活并转变为肌成纤维细胞，同时分泌大量的细胞外基质是肝纤维化发生的中心环节[4]. PI3K/Akt信号通路是体内重要的信号转导通路之一，他不仅在细胞代谢、增殖、存活等多种生物学过程中发挥关键作用，同时也能够抑制细胞凋亡过程[5,6]. 汉丹肝乐是根据中医活血化瘀，通络软坚的理论研制而成的中药复方制剂，主要由丹参、赤芍、黄芪、银杏叶等组成，既往研究表明该药可通过抗氧化损伤、促进细胞外基质降解以及促进HSC凋亡等途径对肝纤维化发挥一定的治疗作用[7,8]，但是其具体的药物作用靶点及作用机制尚不十分清楚. 本研究拟用CCl_4复制大鼠肝纤维化动物模型，观察各组大鼠肝组织中PI3K/Akt信号通路的变化，探讨中药汉丹肝乐对该信号通路的影响及其对HSC凋亡的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级SD大鼠由贵阳医学院实验动物中心提供；兔抗大鼠多克隆Akt1及p-Akt1抗体购自美国Santa Cruz公司；免疫组织化学SABC试剂盒、DAB显色剂及TUNEL检测试剂盒均购自武汉博士德公司；丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、甘氨酸均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司；PVDF膜及ECL化学发光试剂盒购自美国Millipore公司.

1.2 方法

1.2.1 动物分组及动物模型复制：♂SD大鼠30只，体质量160-200 g，在恒温(25 ℃)、光照周期12-12 h环境中适应性饲养1 wk后进行实验. 将实验动物随机分为3组：正常对照组、肝纤维化8 wk组和汉丹肝乐治疗组，每组各10只. 肝纤维化组及汉丹肝乐治疗组大鼠采用皮下注射40% CCl_4花生油溶液诱导肝纤维化模型，剂量为0.3 mL/100 g体质量，每隔3 d注射1次，造模时间为8 wk；对照组大鼠皮下注射等量花生油溶液. 造模成功后汉丹肝乐治疗组大鼠给予1.0 g/kg的汉丹肝乐灌胃治疗[9]，1次/d，治疗时间为8 wk. 大鼠处死前称体质量，3%戊巴比妥钠0.1 mL/100 g腹腔麻醉后，股动脉放血处死大鼠，留取血液及全部肝脏，每只大鼠取相同部位肝叶固定于4%中性甲醛溶液中，48 h后，转移到0.1 mol/L PBS溶液中保存，剩余肝组织保存于-80 ℃低温冰箱保存.

1.2.2 实验指标的检测：(1)肝组织病理学检查：每只大鼠取相同部位肝叶固定于4%中性甲醛溶液中，然后肝组织经石蜡包埋，常规组织切片及HE染色后在光学显微镜下观察肝组织的病理学改变；(2)血清生化指标检测：血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic-oxalacetic transaminase, AST)采用日立7170A全自动生化分析仪测定；(3)肝组织免疫组织化学检测：切片常规脱蜡水化，3%H_2O_2封闭内源性过氧化物酶，微波修复抗原，加封闭液后，滴加兔抗大鼠Akt1及p-Akt1多克隆抗体(工作浓度为1∶100)，4 ℃过夜. 次日加生物素化羊抗兔IgG，在37 ℃孵育30 min，加SABC工作液，DAB

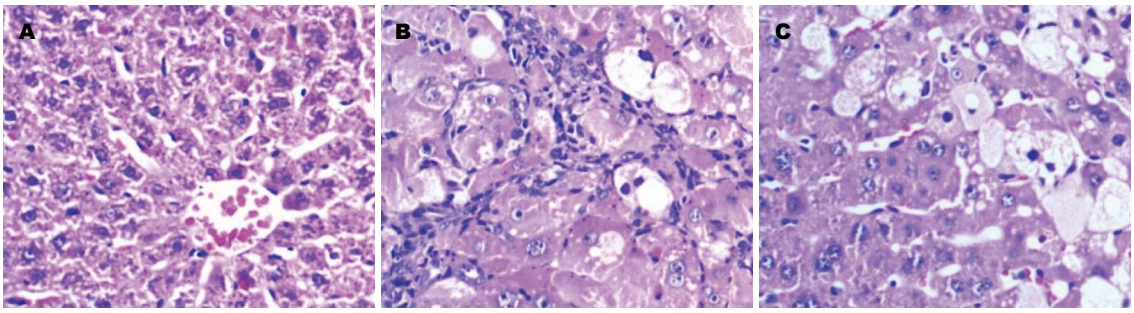


图 1 HE染色显示各组大鼠肝组织病理学变化(×400). A: 正常对照组; B: 肝纤维化8 wk组; C: 汉丹肝乐组.

■相关报道
PI3K/Akt是体内重要的信号转导通路之一, 在维持细胞的正常生理功能, 如生长、分化、代谢等方面起关键作用。有研究人员发现在胆道闭锁所致的肝纤维化过程中, PI3K/Akt信号通路的激活可促进HSC的增殖, 从而加速肝纤维化的发生和发展.

表 1 各组大鼠血清ALT、AST浓度比较 (n = 10, mean ± SD, U/L)

分组	ALT	AST
正常对照组	47.3 ± 11.7	71.2 ± 22.5
肝纤维化8 wk组	329.1 ± 78.5[b]	396.0 ± 109.9[b]
汉丹肝乐组	61.9 ± 13.2[d]	107.3 ± 28.1[d]

[b]P<0.01 *vs* 正常对照组; [d]P<0.01 *vs* 肝纤维化8 wk组. ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶.

显色, 苏木素复染. 阴性对照以PBS缓冲液代替一抗. 随机抽取5个高倍镜下视野, 观察阳性表达的定位及Akt1及p-Akt1阳性表达细胞数占细胞总数的百分比; (4)Western blot检测肝组织中Akt1及p-Akt1表达情况: 提取肝组织总蛋白, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质后, 采用半干电转移将蛋白质分子转移到PVDF膜上, 电转移结束后PVDF膜置于封闭缓冲液中室温下封闭1 h. 封闭完成后洗膜缓冲液洗膜3次, 然后将PVDF膜与一抗稀释液(1∶500)4 ℃封闭过夜. 次日早上用洗膜缓冲液洗膜3次后, PVDF膜与二抗稀释液(1∶1000)在室温下孵育1 h, 洗膜缓冲液洗膜3次后加入增强化学发光试剂A、B液各0.5 mL, 室温反应1 min后暗室中将PVDF膜迅速封入保鲜膜中, Kodak X-ray film压片, 放射自显影1 min. 然后进行显影、定影, 清水冲洗晾干; (5)TUNEL法检测细胞凋亡: 严格按照试剂盒说明书操作.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示, 用SPSS13.0统计软件进行组间方差分析, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组大鼠血清ALT、AST浓度比较 从表1可知, 肝纤维化8 wk组大鼠血清中AST、ALT浓度较正常对照组大鼠明显增多; 经汉丹肝乐治疗后, 大鼠血清中AST、ALT浓度较肝纤维化组大鼠明显降低, 但仍未恢复到正常水平. 各组大鼠ALT及AST结果如表1.

2.2 肝组织病理学改变 经HE染色后光镜下可见正常对照组大鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝组织内未见细胞外基质沉积; 肝纤维化8 wk组大鼠肝小叶结构破坏, 肝索排列紊乱, 汇管区纤维结缔组织增生, 胶原纤维向肝实质延伸, 分割正常肝组织, 形成假小叶, 纤维化程度较正常组显著增加; 汉丹肝乐治疗组大鼠肝组织结构改善明显, 结缔组织增生显著减少, 各组大鼠肝脏病理学改变如图1.

2.3 免疫组织化学检测肝组织中Akt1、磷酸化Akt1蛋白表达情况 免疫组织化学结果显示: 正常对照组大鼠肝组织中仅有少量Akt1、磷酸化Akt1阳性表达, 肝纤维化8 wk时肝组织中Akt1、磷酸化Akt1阳性表达显著增多; 而汉丹肝乐组Akt1、磷酸化Akt1阳性表达较肝纤维化8 wk组显著减少. Akt1、磷酸化Akt1阳性表达呈棕黄色, 主要表达在肝细胞及间质细胞的胞浆中. 各组大鼠肝组织中Akt1、磷酸化Akt1表达情况如表2, 图2.

2.4 Western blot检测肝组织中Akt1、磷酸化Akt1蛋白表达情况 与正常对照组比较, 肝纤维化8 wk时, 大鼠肝组织中Akt1、磷酸化Akt1蛋白表达显著增高; 而经汉丹肝乐治疗后, 大鼠肝组织中Akt1、磷酸化Akt1蛋白表达较肝纤维化8 wk组显著减少. 各组大鼠肝组织中Akt1、磷酸化Akt1蛋白表达情况如图3.

2.5 TUNEL法检测肝组织中HSC凋亡情况 TUNEL法检测HSC凋亡结果显示, 正常对照组及肝纤维化8 wk组大鼠肝组织中仅有少量细胞发生凋亡; 而汉丹肝乐组大鼠肝组织中HSC凋亡的数目明显增加, 与肝纤维化8 wk组比较有显著差异. 各组大鼠HSC凋亡情况如表2, 图4.

3 讨论

肝纤维化是肝脏对各种慢性刺激进行损伤修复

■创新盘点
前期研究发现汉丹肝乐可通过促进HSC凋亡发挥抗肝纤维化的作用，但其具体机制尚不清楚. 本次研究发现，汉丹肝乐可抑制PI3K/Akt信号通路的激活，减少肝纤维化大鼠肝组织中Akt1及p-Akt1的表达，从而促进HSC的凋亡，达到减轻肝纤维化的目的.

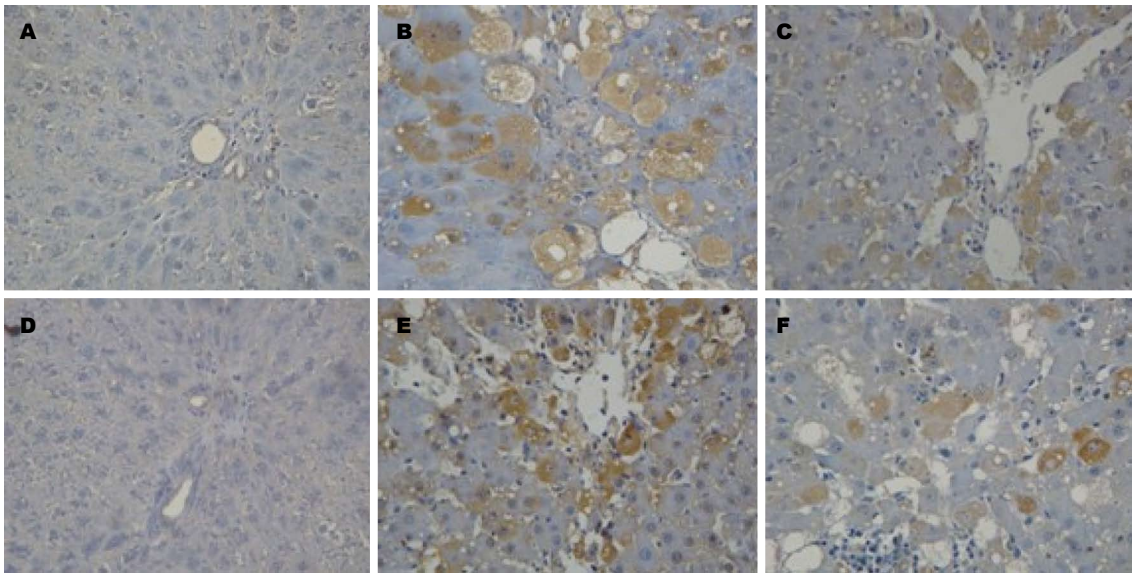


图 2 大鼠肝组织Akt1、磷酸化Akt1的表达(×400). A: 正常组大鼠肝组织Akt1; B: 肝纤维化8 wk组大鼠肝组织Akt1; C: 汉丹肝乐组大鼠肝组织Akt1; D: 正常组大鼠肝组织p-Akt1; E: 肝纤维化8 wk组大鼠肝组织p-Akt1; F: 汉丹肝乐组大鼠肝组织p-Akt1.

表 2 免疫组织化学及TUNEL法检测大鼠肝组织中Akt1、磷酸化Akt1蛋白表达和细胞凋亡情况 (mean ± SD, n = 5, %)

分组	Akt1	p-Akt1	凋亡指数
正常对照组	2.73 ± 0.52	0.92 ± 0.40	0.69 ± 0.18
肝纤维化8 wk组	9.60 ± 2.28[b]	6.51 ± 1.39[b]	1.07 ± 0.32
汉丹肝乐组	5.36 ± 1.59[d]	2.08 ± 0.85[d]	4.24 ± 0.86[bd]

[b]P<0.01 *vs* 正常对照组; [d]P<0.01 *vs* 肝纤维化8 wk组.

表 3 Western blot 检测大鼠肝组织中Akt1及p-Akt1表达情况 (mean ± SD, n = 5)

分组	Akt1/β-actin	p-Akt1/β-actin
正常对照组	0.45 ± 0.11	0.19 ± 0.08
肝纤维化8 wk组	0.99 ± 0.17[b]	0.41 ± 0.19[b]
汉丹肝乐组	0.50 ± 0.20[c]	0.27 ± 0.15[c]

[b]P<0.01 *vs* 正常对照组; [c]P<0.05 *vs* 肝纤维化8 wk组.

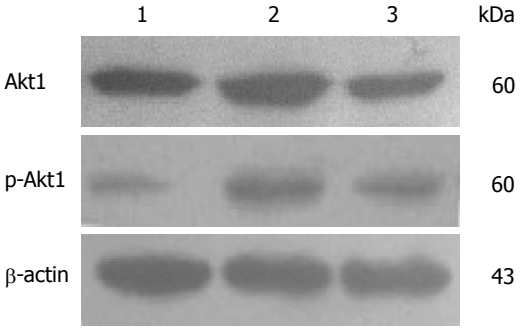


图 3 Western blot检测各组大鼠肝组织中Akt1、磷酸化Akt1的表达. 1: 正常对照组; 2: 肝纤维化8 wk组; 3: 汉丹肝乐组.

反应时，以胶原为主的细胞外基质在肝脏内大量沉积的病理过程[10]. HSC是肝纤维化的主要效应细胞，当各种慢性肝损伤因素作用于肝脏时，HSC可被激活并大量增殖，同时合成、分泌细胞外基质等多种物质，从而导致肝纤维化的发生[11-13]. PI3K/Akt是体内重要的信号转导通路之一，在维持细胞的正常生理功能，如生长、分化、代谢等方面起着关键作用[14-16]. 该信号通路中的PI3K是生长因子受体超家族信号转导过程中的重要成员，在体内可被多种细胞因子激活. Akt为PKA和PKC家族成员，是PI3K下游的直接靶蛋白，而p-Akt是Akt的活化状态，当Akt转变为p-Akt才能发挥生物学功能[17-19]. 近年来的多项研究表明，PI3K/Akt通路在HSC增殖、凋亡中扮演重要角色[20-24]. Akt激活后能够使GSK-3β磷酸化并失活，从而丧失诱导细胞凋亡的作用[25-27]; 同时p-Akt还可以抑制促凋亡蛋白Bad、Bax和Caspase的形成，从而发挥抑制细胞凋亡的

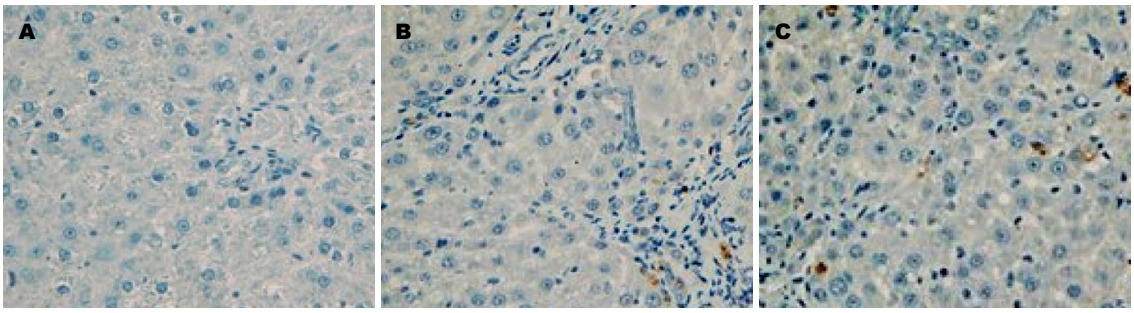


图 4 TUNEL法检测肝组织中HSC凋亡情况(×400). A: 正常对照组; B: 肝纤维化8 wk组; C: 汉丹肝乐组.

作用[28-31].

本次研究发现, 采用CCl_4复制肝纤维化模型8 wk后, 大鼠血清中ALT、AST水平较正常对照组大鼠显著增高, 说明肝细胞发生了一定程度的损伤; 此外, 病理检查结果显示肝纤维化8 wk组大鼠肝组织内有大量胶原纤维增生, 肝纤维化程度较正常组大鼠明显增加. 上述结果与杜锡潮等[32]的研究结果一致, 提示我们的肝纤维化大鼠模型复制是成功的. 同时, 免疫组织化学及Western blot结果发现, 肝纤维化8 wk组大鼠肝组织中Akt1及p-Akt1的表达较正常对照组明显增加; 由于Akt是PI3K下游的效应分子, 因此我们推测PI3K/Akt信号通路的活化可能参与了肝纤维化的发生过程. Xiao等[22]在研究胆道闭锁所引起的肝纤维化时发现, miR-200b可通过激活PI3K/Akt信号通路, 促进HSC的增殖, 从而加速肝纤维化的发生和发展. 这说明PI3K/Akt信号通路可能在肝纤维化过程中发挥了重要作用, 而抑制这一信号通路的活化有可能成为抗肝纤维化的有效途径之一. 汉丹肝乐是根据中医活血化瘀, 通络软坚的理论研制而成的中药复方制剂, 以往的研究发现他可通过促进HSC凋亡而发挥抗肝纤维化的作用[33], 但其具体的作用机制尚不清楚. 在本次研究中发现, 经汉丹肝乐治疗8 wk后, 大鼠血清中ALT、AST水平及纤维化程度均较肝纤维化8 wk组明显减少; 同时, 我们还发现, 汉丹肝乐组大鼠肝组织中Akt1及p-Akt1的表达与肝纤维化8 wk组比较明显降低, 而肝组织中HSC的凋亡则较肝纤维化8 wk组显著增加. 由于Akt1激活及p-Akt1增加可抑制细胞凋亡过程, 而相反Akt1及p-Akt1表达下调则可促进细胞凋亡, 因此我们推测, 汉丹肝乐抗肝纤维化的作用可能是通过抑制PI3K/Akt信号通路的激活, 下调肝组织中Akt1及p-Akt1的表达, 从而促进HSC的凋亡来实现的.

4 参考文献

1 王豫萍, 程明亮, 关丽, 陆爽. 蓝莓对免疫性肝纤维化大鼠HGF表达影响. 中国公共卫生 2012; 28: 1051-1054

2 Arriazu E, Ruiz de Galarreta M, Cubero FJ, Varela-Rey M, Pérez de Obanos MP, Leung TM, Lopategi A, Benedicto A, Abraham-Enachescu I, Nieto N. Extracellular Matrix and Liver Disease. *Antioxid Redox Signal* 2014 Jan 8. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24219114 DOI: 10.1089/ars.2013.5697]

3 Wirkowska A, Paczek L. [Liver fibrosis and cirrhosis--causes. Part I]. *Przegl Lek* 2011; 68: 222-227 [PMID: 21853678]

4 Mehal W, Imaeda A. Cell death and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 226-231 [PMID: 20665375 DOI: 10.1055/s-0030-1255352]

5 刘友平, 严冬梅, 陈川宁, 段春燕, 陈绍坤, 李洪, 代荣阳. PI3K/Akt调控内质网应激对GRP78的诱导. 中国病理生理杂志 2011; 27: 749-754

6 Zhou JD, Shen F, Ji JS, Zheng K, Huang M, Wu JC. FAM9C plays an anti-apoptotic role through activation of the PI3K/Akt pathway in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2013; 30: 1275-1284 [PMID: 23836295 DOI: 10.3892/or.2013.2592]

7 Geng XX, Yang Q, Xie RJ, Luo XH, Han B, Ma L, Li CX, Cheng ML. In vivo effects of Chinese herbal recipe, Danshaohuaxian, on apoptosis and proliferation of hepatic stellate cells in hepatic fibrotic rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 561-566 [PMID: 15641146]

8 程明亮, 付荣泉. 中药复方对猪血清免疫性肝纤维化肝中氧化及抗氧化的影响. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 217-218

9 Li C, Luo J, Li L, Cheng M, Huang N, Liu J, Waalkes MP. The collagenolytic effects of the traditional Chinese medicine preparation, Han-Dan-Gan-Le, contribute to reversal of chemical-induced liver fibrosis in rats. *Life Sci* 2003; 72: 1563-1571 [PMID: 12551745 DOI: 10.1016/S0024-3205(02)02448-7]

10 黄成, 李俊, 马陶陶. PI3K/Akt信号通路与肝纤维化. 中国药理学通报 2011; 27: 1037-1041

11 Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 223-229 [PMID: 19396960 DOI: 10.1097/MOG.0b013e3283279668]

12 Ma R, He S, Liang X, Yu H, Liang Y, Cai X. Decorin prevents the development of CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Chin Med J* (Engl) 2014; 127: 1100-1104 [PMID: 24622442]

13 Dong Y, Qu Y, Xu M, Wang X, Lu L. Catalase ameliorates hepatic fibrosis by inhibition of hepatic stellate cells activation. *Front Biosci* (Land-

■应用要点

肝纤维化是肝硬化、肝癌发展过程中一个关键的中间环节. 汉丹肝乐能够减少血清ALT、AST水平, 对肝功能具有一定的保护作用; 同时他还能促进HSC凋亡, 减少细胞外基质的沉积, 通过本次研究可为汉丹肝乐的临床应用提供理论依据.

■同行评价
本文具有一定指导意义.

mark Ed) 2014; 19: 535-541 [PMID: 24389201 DOI: 10.2741/4224]
14 严冬梅, 李敏军, 刘友平, 段春燕. 内质网应激下肝癌细胞Akt和ERK通路间的cross-talk研究. 中国现代医学杂志 2011; 21: 2361-2364
15 施凤, 朱萱. NOX介导的MAPK、PI3K/Akt信号通路与肝纤维化的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 2685-2690
16 Gunda V, Bucur O, Varnau J, Vanden Borre P, Bernasconi MJ, Khosravi-Far R, Parangi S. Blocks to thyroid cancer cell apoptosis can be overcome by inhibition of the MAPK and PI3K/AKT pathways. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1104 [PMID: 24603332 DOI: 10.1038/cddis.2014.78]
17 鞠莉, 贾振宇, 蒋兆强, 王晶, 陈日萍, 张幸, 周华仕. PI3K/Akt通路在大鼠矽肺纤维化中的作用研究. 中国工业医学杂志 2011; 24: 282-284
18 Song T, Wang L, Mo Z, Mao L, Ma X, Niu R, Gu K, Yan R, Ma P, Qi Y, Jiao Q. Expression of p-Akt in ovarian serous carcinoma and its association with proliferation and apoptosis. *Oncol Lett* 2014; 7: 59-64 [PMID: 24348821]
19 Liu K, Shi Y, Guo XH, Ouyang YB, Wang SS, Liu DJ, Wang AN, Li N, Chen DX. Phosphorylated AKT inhibits the apoptosis induced by DRAM-mediated mitophagy in hepatocellular carcinoma by preventing the translocation of DRAM to mitochondria. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1078 [PMID: 24556693 DOI: 10.1038/cddis.2014.51]
20 Wang Y, Jiang XY, Liu L, Jiang HQ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates hepatic stellate cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5186-5191 [PMID: 18777595 DOI: 10.3748/wjg.14.5186]
21 Sancho-Bru P, Juez E, Moreno M, Khurdayan V, Morales-Ruiz M, Colmenero J, Arroyo V, Brenner DA, Ginès P, Bataller R. Hepatocarcinoma cells stimulate the growth, migration and expression of pro-angiogenic genes in human hepatic stellate cells. *Liver Int* 2010; 30: 31-41 [PMID: 19929904 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.02161.x]
22 Xiao Y, Wang J, Chen Y, Zhou K, Wen J, Wang Y, Zhou Y, Pan W, Cai W. Up-regulation of miR-200b in biliary atresia patients accelerates proliferation and migration of hepatic stallate cells by activating PI3K/Akt signaling. *Cell Signal* 2014; 26: 925-932 [PMID: 24412919 DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.01.003]
23 Zhang F, Zhang Z, Kong D, Zhang X, Chen L, Zhu X, Lu Y, Zheng S. Tetramethylpyrazine reduces glucose and insulin-induced activation of hepatic stellate cells by inhibiting insulin receptor-mediated PI3K/AKT and ERK pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382: 197-204 [PMID: 24071517 DOI: 10.1016/j.mce.2013.09.020]
24 Bai T, Lian LH, Wu YL, Wan Y, Nan JX. Thymoquinone attenuates liver fibrosis via PI3K and TLR4 signaling pathways in activated hepatic stellate cells. *Int Immunopharmacol* 2013; 15: 275-281 [PMID: 23318601 DOI: 10.1016/j.intimp.2012.12.020]
25 Wang CD, Yuan CF, Bu YQ, Wu XM, Wan JY, Zhang L, Hu N, Liu XJ, Zu Y, Liu GL, Song FZ. Fangchinoline inhibits cell proliferation via Akt/GSK-3beta/ cyclin D1 signaling and induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 769-773 [PMID: 24568493]
26 Xu G, Li Y, Yoshimoto K, Wu Q, Chen G, Iwata T, Mizusawa N, Wan C, Nie X. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin stimulates proliferation of HAPI microglia by affecting the Akt/GSK-3β/cyclin D1 signaling pathway. *Toxicol Lett* 2014; 224: 362-370 [PMID: 24231000 DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.11.003]
27 Zhang Q, Fu H, Zhang H, Xu F, Zou Z, Liu M, Wang Q, Miao M, Shi X. Hydrogen sulfide preconditioning protects rat liver against ischemia/reperfusion injury by activating Akt-GSK-3β signaling and inhibiting mitochondrial permeability transition. *PLoS One* 2013; 8: e74422 [PMID: 24058562 DOI: 10.1371/journal.pone.0074422]
28 唐莹, 刘金东. PI3K/Akt信号通路与心肌保护. 医学综述 2009; 15: 1470-1473
29 Jeon HG, Yoon CY, Yu JH, Park MJ, Lee JE, Jeong SJ, Hong SK, Byun SS, Lee SE. Induction of caspase mediated apoptosis and down-regulation of nuclear factor-κB and Akt signaling are involved in the synergistic antitumor effect of gemcitabine and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in human bladder cancer cells. *J Urol* 2011; 186: 2084-2093 [PMID: 21944112 DOI: 10.1016/j.juro.2011.06.053]
30 Xue X, You Y, Tao J, Ye X, Huang J, Yang S, Lin Z, Hong Z, Peng J, Chen L. Electro-acupuncture at points of Zusanli and Quchi exerts anti-apoptotic effect through the modulation of PI3K/Akt signaling pathway. *Neurosci Lett* 2014; 558: 14-19 [PMID: 24157854 DOI: 10.1016/j.neulet.2013.10.029]
31 Quan JH, Cha GH, Zhou W, Chu JQ, Nishikawa Y, Lee YH. Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent Bad phosphorylation in Toxoplasma gondii-mediated inhibition of host cell apoptosis. *Exp Parasitol* 2013; 133: 462-471 [PMID: 23333591 DOI: 10.1016/j.exppara.2013.01.005]
32 杜锡潮, 韩冰, 谢汝佳, 邹河, 杨勤. 肝纤维化大鼠肝脏中内质网应激相关分子CHOP和TRB3的表达变化. 中国病理生理杂志 2013; 29: 906-912
33 杨勤, 罗新华, 耿晓霞, 谢汝佳, 韩冰, 李诚秀, 程明亮. 丹芍化纤胶囊治疗大鼠肝纤维化后肝星状细胞凋亡及细胞周期的变化. 中国病理生理杂志 2005; 21: 975-979

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1921-1927
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

蟾毒灵对人肝癌细胞增殖与侵袭的影响

盖吉钦, 秦建民, 范跃祖

盖吉钦, 同济大学医学院 上海市 200065
盖吉钦, 秦建民, 上海中医药大学附属普陀医院普外科 上海市 200062
范跃祖, 同济大学附属同济医院普外科 上海市 200065
作者贡献分布: 实验操作、论文撰写由盖吉钦完成; 此课题由秦建民与范跃祖设计; 数据分析与文献检索由盖吉钦与秦建民共同完成.
通讯作者: 秦建民, 主任医师, 200062, 上海市普陀区兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院普外科. jianminqin@yahoo.com
电话: 021-22233219
收稿日期: 2014-03-03 修回日期: 2014-03-13
接受日期: 2014-03-18 在线出版日期: 2014-05-18

Bufalin inhibits proliferation and invasion of human liver cancer cells

Ji-Qin Gai, Jian-Min Qin, Yue-Zu Fan

Ji-Qin Gai, Medical School of Tongji University, Shanghai 200065, China
Ji-Qin Gai, Jian-Min Qin, Department of General Surgery, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese, Shanghai 200062, China
Yue-Zu Fan, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Shanghai Tongji University, Shanghai 200065, China
Correspondence to: Jian-Min Qin, Chief Physician, Department of General Surgery, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese, 164 Lanxi Road, Putuo District, Shanghai 200062, China. jianminqin@yahoo.com
Received: 2014-03-03 Revised: 2014-03-13
Accepted: 2014-03-18 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To assess the effect of bufalin on cell proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402.

METHODS: BEL-7402 cells were cultured *in vitro*. The effect of bufalin on cell proliferation and cell cycle was measured by CCK-8 colorimetric method and flow cytometry. Cell migration and invasion were assessed by Transwell assay.

RESULTS: Bufalin significantly inhibited the growth and proliferation of BEL-7402 cells in a dose- and time-dependent manner. Bufalin at a dose of 0.085 μg/mL blocked the cell cycle of BEL-7402 cells in G_2/S phase [48 h (G_2: t = -6.618, P < 0.01; S: t = -5.339, P < 0.01), 72 h (G_2: t = -14.273, P < 0.01; S: t = -4.812, P < 0.01)]. Treatment with bufalin at a dose of 0.085 μg/mL for 72 h significantly inhibited the migration (t = 11.717, P < 0.01) and invasion (t = 5.437, P < 0.01) of BEL-7402 cells.

CONCLUSION: Bufalin inhibits the migration and invasion of human liver cancer cells. Besides, bufalin can inhibit the proliferation of human liver cancer cells by blocking the cell cycle in G_2/S phase. The anti-proliferative effect of bufalin is dose- and time-dependent.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Bufalin; Liver cancer cells; Proliferation; Invasion; Effect

Gai JQ, Qin JM, Fan YZ. Bufalin inhibits proliferation and invasion of human liver cancer cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1921-1927 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1921.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1921

摘要

目的: 研究蟾毒灵(bufalin, Bu)对肝癌BEL-7402细胞生长、迁移侵袭的作用.

方法: 体外培养人肝癌BEL-7402细胞, 应用CCK-8比色法、流式细胞仪、Transwell小室迁移侵袭实验观测不同浓度和作用时间Bu对肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响.

结果: Bu明显抑制肝癌BEL-7402细胞生长和增殖, 呈浓度-时间效应关系; 0.085 μg/mL Bu分别作用于肝癌BEL-7402细胞48、72 h, 肝癌细胞周期阻滞于G_2/S期[48 h(G_2: t = -6.618, P<0.01; S: t = -5.339, P<0.01), 72 h(G_2: t = -14.273, P<0.01; S: t = -4.812, P<0.01)]; 0.085 μg/mL Bu作用肝癌BEL-7402细胞72 h, 显著抑制肝癌细胞迁移(t = 11.717, P<0.01)和侵袭(t = 5.437, P<0.01).

结论: Bu能抑制肝癌细胞迁移、侵袭, 并且通过阻滞肝癌细胞周期于G_2/S期, 抑制肝癌细胞增殖, 其生长抑制作用呈时间和剂量依赖效应.

■背景资料
原发性肝癌是较常见的消化系肿瘤, 其发病率及死亡率均较高, 严重威胁人类健康, 现有的治疗方法存在一定的限制性. 蟾毒灵(bufalin, Bu)是传统抗肿瘤中药蟾酥中主要的活性成分之一, 具有明确的抗肿瘤效果. 为了进一步明确Bu抗肝癌的机制, 本研究对Bu对肝癌细胞增殖侵袭作用的影响进行了观察.

■同行评议者
姚登福, 教授, 南通大学附属医院

■研发前沿
Bu的抗肝癌作用机制比较复杂，目前尚未完全阐明，尤其是Bu抑制肝癌BEL-7402细胞的迁移和侵袭的机制目前尚不明确，需要进一步深入研究.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 蟾毒灵; 肝癌细胞; 增殖; 侵袭; 作用

核心提示: 蟾毒灵影响肝癌Bel-7402细胞凋亡及迁移、侵袭转移的机制可能与影响肝癌细胞中P53、survivin、Bcl-xL、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)等因子表达有关.

盖吉钦, 秦建民, 范跃祖. 蟾毒灵对人肝癌细胞增殖与侵袭的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1921-1927 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1921.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1921

0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是较常见的消化系肿瘤, 其发病率在我国占第3位, 世界范围占第5位, 每年全球约有100万例以上的新增肝癌患者, 同时有60万例死于该肿瘤, 严重威胁人类健康[1,2]. 蟾毒灵(bufalin, Bu)为抗肿瘤传统中药蟾酥中抗肿瘤作用最强的毒性配基[3], 除了具有强心、升压、平喘、镇咳、兴奋呼吸中枢、利尿、抗炎、增强机体免疫力、抗辐射、抗血小板凝聚等药理作用, 还具有很强的抗肿瘤作用[4]. 本研究在观察Bu对肝癌细胞增殖及周期的作用的同时, 进一步观察了Bu对肝癌BEL-7402细胞迁移侵袭能力的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌BEL-7402细胞株(中国科学院上海细胞生物学研究所提供), Bu(上海博谷生物科技有限公司), 细胞培养基RPMI 1640(美国Gibco公司), 胎牛血清(杭州四季青生物公司), CCK-8试剂(上海博谷生物科技有限公司), 细胞周期即时检测试剂盒(南京凯基生物公司), 胰蛋白酶(美国Sigma公司), Matrigel胶(美国BD公司), 0.1%结晶紫染色液(江苏碧云天生物公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞系培养: 在37 ℃, 5%CO_2和饱和湿度的培养箱中用10%胎牛血清的RPMI 1640培养基常规培养. 取单层贴壁、对数期生长的细胞进行试验.

1.2.2 CCK-8比色实验测定细胞生长抑制率: 消化收集细胞后用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液稀释细胞浓度, 调整细胞浓度至8×10^4/mL, 以每孔100 μL接种于96孔培养板中, 饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养12 h使其贴壁生长后加药, 实验设10%胎牛血清RPMI 1640培养液阴性对照组和Bu实验组. 根据预实验的结果, Bu实验组选择低于各作用时间100%抑制率的浓度, 最终浓度设定如下: 24 h Bu: 0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 μg/mL; 48 h Bu: 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 μg/mL; 72 h Bu: 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 μg/mL. 每个浓度组分别设置5个复孔, 置于饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养24、48和72 h后吸去上清液, 每孔加无血清培养液100 μL及CCK-8 10 μL, 继续培养1.5 h后, 在自动酶标仪上检测各孔吸光度450 nm, 以空白组平均值调零. 按以下公式计算生长抑制率. 抑制率(%) = (1-实验组平均A值/对照组平均A值)×100%.

1.2.3 流式细胞仪技术检测细胞周期改变: 消化收集细胞后用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液稀释细胞浓度, 调整细胞浓度至5×10^4/mL, 以每孔2 mL接种于6孔培养板中, 饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养12 h使其贴壁生长, 然后吸弃培养液后再加入无血清的RPMI 1640培养液2 mL于6孔培养板中, 饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养12 h后加药. 实验设10%胎牛血清RPMI 1640培养液阴性对照组和Bu实验组, Bu实验组的最终浓度选取CCK-8比色实验所得到的IC_{50}浓度. 各组置于饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养24、48和72 h后收集细胞, PBS清洗细胞碎片后用细胞周期即时检测试剂盒中Solution A、B、C处理细胞并染色, 1 h内行流式细胞仪检测荧光标记检测凋亡率和细胞周期分布, ModiFit软件分析细胞周期.

1.2.4 细胞迁移实验: 消化收集细胞后用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液稀释细胞浓度, 将细胞接种于10 cm培养皿中, 每个培养皿接种8×10^5个细胞, 饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养12 h使其贴壁生长后加药. 实验设10%胎牛血清RPMI 1640培养液阴性对照组和Bu实验组, Bu实验组的最终浓度选取CCK-8比色实验所得到的IC_{50}浓度. 各组置于饱和湿度, 5%CO_2孵箱37 ℃常规培养72 h后吸弃含药培养液, 用PBS洗涤培养皿, 去除残余药物后再加入无血清的RPMI 1640培养液置于饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养12 h后收集细胞, 用无血清的RPMI 1640培养液制备成1×10^6/mL的细胞悬液, 每个Transwell小室上室接种100 μL细胞悬液, 下室加入600 μL含10%胎牛血清的RPMI 1640, 每

表 1 不同浓度和作用时间蟾毒灵对肝癌BEL-7402细胞增殖的抑制率 (n = 3, mean ± SD)

浓度(μg/mL)	24 h	48 h	72 h
0.05		22.09 ± 3.63[d]	35.52 ± 4.16[f]
0.10		33.94 ± 3.34	53.17 ± 8.65
0.15			59.21 ± 8.11
0.20		47.72 ± 2.24	78.88 ± 3.93
0.25			86.86 ± 1.54[f]
0.30		68.84 ± 1.98	
0.40		82.57 ± 1.09[d]	
0.70	31.34 ± 6.73[b]		
0.80	48.05 ± 8.52		
0.90	51.62 ± 5.79		
1.00	60.38 ± 5.69		
1.10	70.97 ± 5.19		
1.20	72.98 ± 4.15[b]		

[b]F = 40.624, [b]P<0.01 *vs* 0.90 μg/mL; [d]F = 427.344, [d]P<0.01 *vs* 0.20 μg/mL; [f]F = 69.585, [f]P<0.01 *vs* 0.15 μg/mL.

■相关报道
已有报道Bu对多种肿瘤细胞的增殖、侵袭具有抑制作用, 其机制可能是Bu促进了细胞的凋亡, 同时能够抑制与侵袭转移有关的细胞通路和通路中相关因子.

组各设置3个复孔. 5%CO_2孵箱37 ℃常规培养24 h后将上室培养液吸弃清洗结晶紫染色后倒置相光学显微镜下选取上、中、下三个视野进行观察, 并拍照计数计算迁移细胞.

1.2.5 细胞侵袭实验: 消化收集细胞后用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液稀释细胞浓度, 将细胞接种于10 cm培养皿中, 每个培养皿接种8×10^5个细胞, 饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养12 h使其贴壁生长后加药. 实验设10%胎牛血清RPMI 1640培养液阴性对照组和Bu实验组, Bu实验组的最终浓度选取CCK-8比色实验所得到的IC_{50}浓度. 各组置于饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养72 h后吸弃含药培养液, 用PBS洗涤培养皿, 去除残余药物后再加入无血清的RPMI 1640培养液置于饱和湿度、5%CO_2孵箱37 ℃常规培养12 h后收集细胞, 用无血清的RPMI 1640培养液制备成1×10^6/mL的细胞悬液, Transwell小室上室铺设Matrigel胶后每个Transwell小室上室接种100 μL细胞悬液, 下室加入600 μL含10%胎牛血清的RPMI 1640, 每组各设置3个复孔. 5%CO_2孵箱37 ℃常规培养48 h后将上室培养液吸弃清洗, 结晶紫染色后倒置相光学显微镜下选取上、中、下3个视野进行观察, 并拍照计数计算侵袭细胞.

统计学处理 实验数据均以mean±SD表示, 并用SPSS19.0统计软件进行统计学处理, 首先进行方差齐性检验, 方差齐的两组间比较采用t检验, 多组间比较采用单因素方差分析数据, 组间两两比较采用LSD法; 方差不齐者两组间比较采用矫正t检验, 多组间比较将数据转换后得到齐方差数据后再采用单因素方差分析检验数据.

2 结果

2.1 Bu对肝癌BEL-7402细胞的增殖抑制 肝癌BEL-7402细胞经不同浓度Bu处理24、48、72 h, 随药物浓度逐渐提高, Bu对肝癌BEL-7402细胞抑制率逐渐提高(P<0.05), (表1). 24、48、72 h的IC_{50}分别为0.87 μg/mL±0.07 μg/mL, 0.16 μg/mL±0.02 μg/mL, 0.085 μg/mL±0.01 μg/mL, 提示其随药物作用时间延长逐渐降低(F = 429.881, 24 h *vs* 48 h, 48 h *vs* 72 h, 均P<0.01).

2.2 Bu对肝癌BEL-7402细胞周期的影响 Bu处理BEL-7402肝癌细胞24、48、72 h, 24 h后G_2和S期细胞比例与阴性对照组无差异(P>0.05); 48、72 h后, G_2期和S期细胞比例与阴性对照组相比增加, 表现出G_2期和S期阻滞(P<0.01, 表2, 图1); 但48 h与72 h的G_2期(1.17±0.28 *vs* 1.25±0.35)、S期(0.37±0.18 *vs* 1.12±0.67)增幅比较无差异(P>0.05). 表明, 同一药物浓度下Bu对肝癌BEL-7402细胞的增殖周期影响, 具有一定时间依赖性, 但超过48 h未表现时间依赖性.

2.3 Bu对肝癌BEL-7402细胞迁移的影响 Bu作用BEL-7402细胞72 h, 与阴性对照相比, 显著抑制肝癌BEL-7402细胞迁移能力(t = 11.717, P<0.01), (图2, 3).

2.4 Bu对肝癌BEL-7402细胞侵袭的影响 Bu作用

■**创新盘点**
我们通过观察Bu对肝癌BEL-7402细胞增殖、细胞周期、迁移、侵袭的影响，为进一步探索其影响机制奠定了基础.

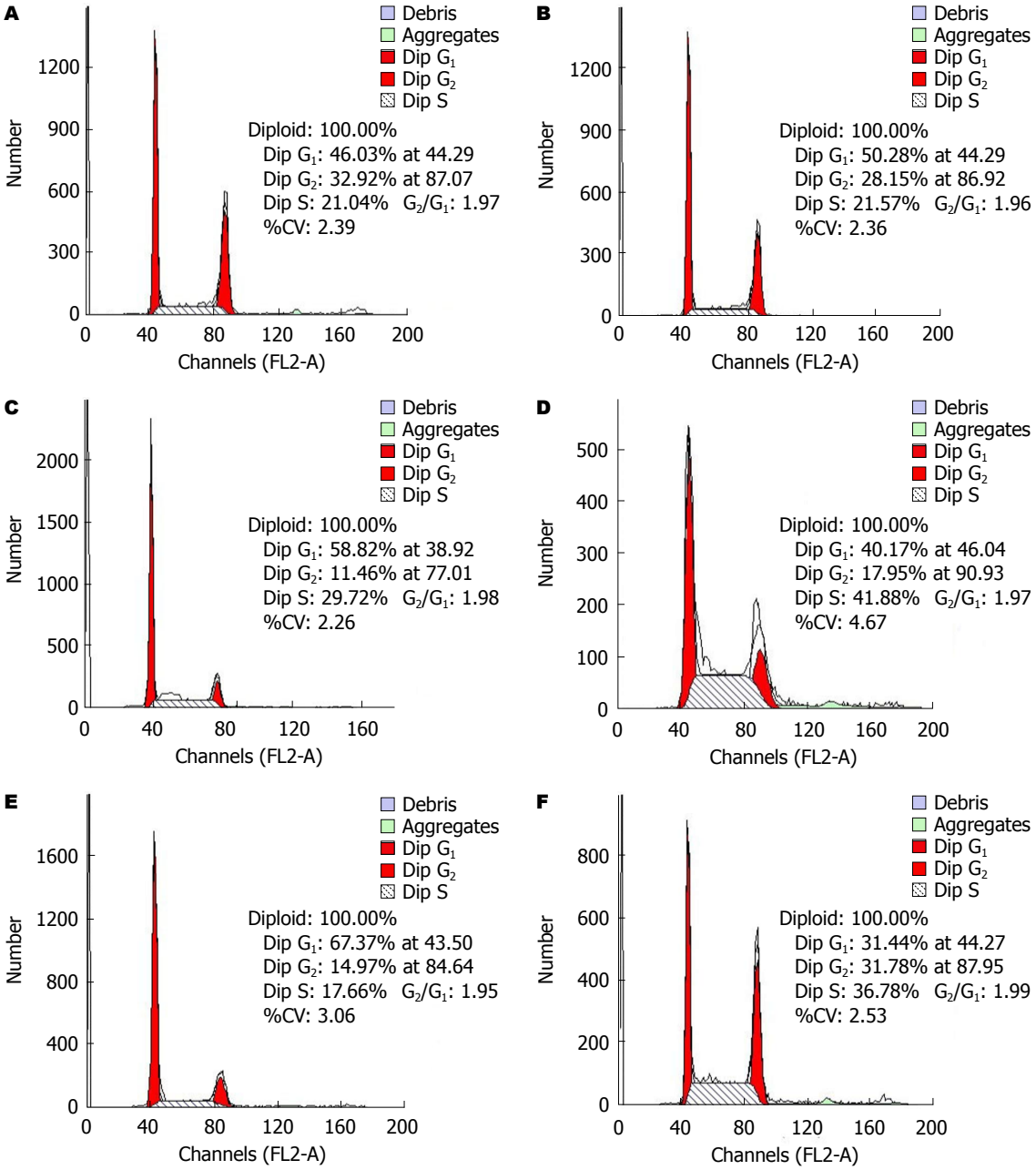


图 1 同一浓度不同作用时间蟾毒灵对肝癌BEL-7402细胞增殖周期影响. A: 24 h阴性对照; B: 24 h 0.085 μg/mL蟾毒灵; C: 48 h阴性对照; D: 48 h 0.085 μg/mL蟾毒灵; E: 72 h阴性对照; F: 72 h 0.085 μg/mL蟾毒灵.

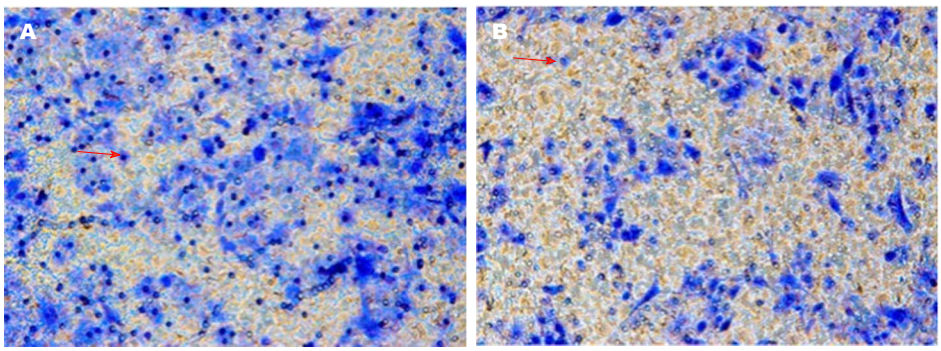


图 2 0.085 μg/mL蟾毒灵作用肝癌BEL-7402细胞72 h后对细胞迁移能力的影响(结晶紫染色×200). A: 阴性对照; B: 0.085 μg/mL蟾毒灵. 箭头处为迁移细胞.

表 2 同一浓度不同作用时间蟾毒灵对肝癌BEL-7402细胞增殖周期的影响 (n = 3, mean ± SD, %)

周期	24 h		48 h		72 h	
	阴性对照	蟾毒灵	阴性对照	蟾毒灵	阴性对照	蟾毒灵
G_1期	48.26 ± 5.09	48.34 ± 2.72	62.20 ± 3.48	41.2 ± 1.27	68.49 ± 2.48	31.98 ± 1.52
G_2期	28.98 ± 3.67	29.78 ± 2.14	9.28 ± 2.06	19.78 ± 1.82[b]	14.27 ± 1.49	31.75 ± 1.51[b]
S期	22.76 ± 3.68	21.88 ± 0.60	28.53 ± 1.49	39.02 ± 3.06[b]	17.24 ± 3.66	34.94 ± 5.22[b]

[b]P<0.01 *vs* 阴性对照[48 h(G_2: t = −6.618; S: t = −5.339), 72 h(G_2: t = −14.273; S: t = −4.812)].

■应用要点
由于Bu对多种实体及血液恶性肿瘤均表现出良好的抗肿瘤效果, 因此在中药现代化研究的背景下, 将其应用于临床治疗将为无法手术的恶性肿瘤患者治疗提供了一个新的手段.

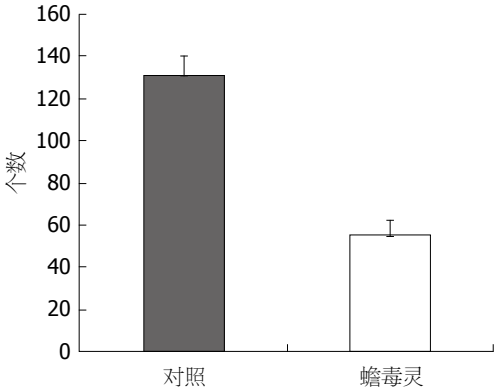


图 3 0.085 μg/mL蟾毒灵作用肝癌BEL-7402细胞72 h后迁移细胞数.

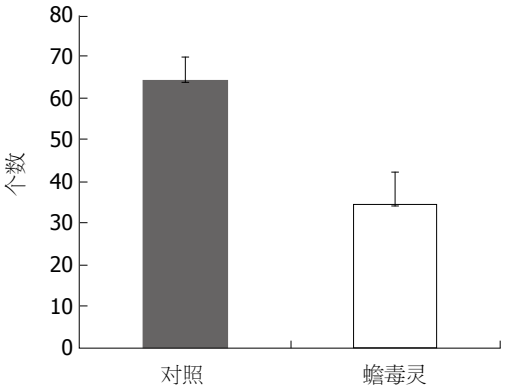


图 5 0.085 μg/mL蟾毒灵作用肝癌BEL-7402细胞72 h后侵袭细胞数.

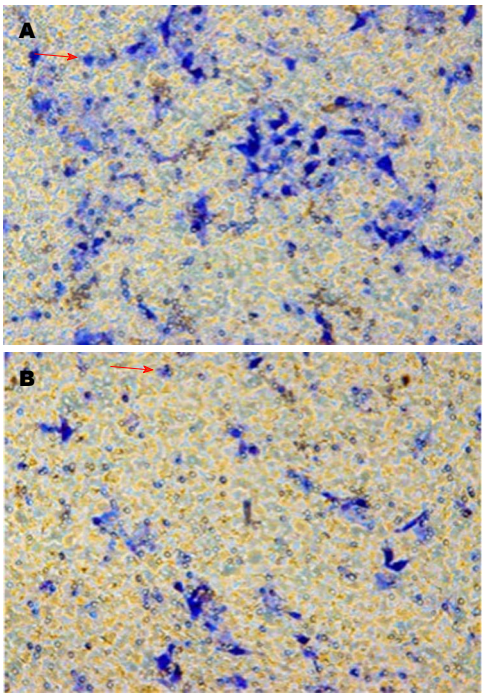


图 4 0.085 μg/mL蟾毒灵作用肝癌BEL-7402细胞72 h后对细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色 × 200). A: 阴性对照; B: 0.085 μg/mL蟾毒灵. 箭头处为侵袭细胞.

BEL-7402细胞72 h, 与阴性对照相比, 显著抑制肝癌BEL-7402细胞侵袭能力(t = 5.437, P<0.01), (图4, 5).

3 讨论

Bu是一种多羟基的甾体化合物, 其抗肿瘤作用效果, 已受到越来越多的关注[5-8]. 苏永华等[9]通过将经Bu作用48 h的人肝癌SMMC-7721和BEL-7402细胞进行锥虫蓝染色, 发现Bu对肝癌细胞膜具有明显破坏作用, 提示Bu对肝癌细胞的毒性作用与破坏癌细胞膜、导致细胞直接死亡有关. 王旭等[10]应用Bu作用于大肠癌HCT116细胞, 结果发现Bu可使大肠癌细胞阻滞在S期, 且电镜见到细胞浆疏松、染色质边集、凋亡小体等典型细胞凋亡特征, 推断Bu可以通过使肠癌细胞周期阻滞而诱导细胞凋亡. 多项研究均证明细胞周期阻滞与细胞凋亡密切相关[11-13]. 王艳丽等[14]认为细胞周期的阻滞最终将导致细胞的凋亡. 细胞周期受到细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinases)、细胞周期蛋白(Cyclin)、Polo样聚合酶、Aurora激酶和周期抑制蛋白(cyclin-dependent-kinase inhibitor)等因素调控[15-17]. 其中Cyclin A和Cyclin B与细胞周期中的G_1/S期和G_2/M期的转换调控有关, Cyclin A参与细胞从G_1期到S期的转换过程, 而细胞由G_2期进入M期需要Cyclin B与周期依赖性蛋白激酶结合物的调控[18,19]. 研究发现, 恶性肿瘤中Cyclin A和Cyclin B较正常细胞高[20,21], Bu可降低肝癌

■同行评价
Bu能够抑制多种恶性肿瘤细胞增殖、侵袭, 但在肝癌细胞研究报道较少, 本研究通过体外培养人肝癌细胞, 详细观察了Bu对肝癌细胞生长、迁移和侵袭具有显著抑制作用, 结果可靠, 为进一步深入研究Bu抗肝细胞癌作用和机制奠定了理论基础.

HepG2细胞中Cyclin B的表达[22], 而含有Bu成分的抗肿瘤药物华蟾素具有下调肿瘤细胞Cyclin A表达能力[23]. Bu还可能通过下调P53蛋白[3]、降低survivin蛋白表达使促凋亡蛋白Smac/DIABLO从线粒体释放入胞浆[24], 抑制*Bcl-xL*基因表达和促进*Bax*基因表达[25]等途径引起癌细胞凋亡. 本实验结果发现Bu对肝癌BEL-7402细胞具有细胞毒性、增殖抑制作用, 呈时间和剂量依赖性, 肝癌BEL-7402细胞被阻滞在G_2期和S期, 表明Bu抑制肝癌Bel-7402细胞的增殖与细胞周期被阻滞在S期和G_2期密切相关. 其机制可能与Bu降低肝癌Bel-7402细胞Cyclin A和Cyclin B表达, 影响凋亡相关因子P53、survivin、Bcl-xL等表达, 从而使细胞周期发生阻断后导致了肝癌细胞的凋亡.

转移是恶性肿瘤的特征性表现, HCC极易发生转移, 术后5年复发率可达70%, 是导致肝癌患者死亡的一个主要原因[26]. 癌细胞降解基底膜和细胞外基质及迁移运动是恶性肿瘤转移的关键步骤, 其过程与E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达降低, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)与金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)之间平衡被打破等多种因素有关[27-29]. Hong等[30]研究发现Bu能加强细胞间紧密连接, 并通过增加细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein kinases)通路磷酸化从基因和蛋白层面减少MMP-7和-9, 增加TIMP-1和-2, 从而降低膀胱癌T24细胞侵袭. Chueh等[31]发现Bu可通过阻止MAPK信号抑制MMP-2生成, 降低骨肉瘤U-2细胞侵袭转移. 本实验研究结果表明Bu明显抑制肝癌细胞迁移侵袭能力, 其抑制迁移与侵袭转移可能与影响肝癌细胞MMPs和E-cadherin表达有关, 但其确切的机制尚需进一步深入研究.

4 参考文献

1 常林, 杨瑞丽. 肝癌实验室诊断研究进展. 生物技术通讯杂志 2010; 21: 136-138

2 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90 [PMID: 21296855 DOI: 10.3322/caac.20107]

3 王晋, 尹军强, 贾强, 沈靖南, 黄纲, 谢显彪, 邹昌业. 蟾毒灵诱导骨肉瘤U-2OS和U-2OS/MTX300细胞系的凋亡. 中华肿瘤杂志 2010; 32: 734-738

4 张慧卿, 殷子斐, 盛佳钰, 苏永华. 蟾毒灵抗肿瘤作用机制研究进展. 中药药理与临床 2012; 28: 130-133

5 Huang H, Cao Y, Wei W, Liu W, Lu SY, Chen YB, Wang Y, Yan H, Wu YL. Targeting poly (ADP-ribose) polymerase partially contributes to bufalin-induced cell death in multiple myeloma cells. *PLoS One* 2013; 8: e66130 [PMID: 23762475 DOI: 10.1371/journal.pone.0066130]

6 李恩泽, 刘阳阳, 王锴, 徐明昊, 哈敏文, 朱志图. 蟾蜍灵对食管癌ECA109细胞凋亡的影响及机制探讨. 军医进修学院学报 2012; 33: 393-395

7 张晔, 赵明芳, 刘云鹏, 曲秀娟, 刘静, 侯科佐, 徐玲. 蟾蜍灵诱导人胃癌SGC7901细胞自噬与凋亡的研究. 现代肿瘤医学 2013; 21: 2155-2157

8 李梅影, 李际盛, 于学军, 孙丽美, 王艾君, 刘奇迹, 王秀问. 蟾毒灵对CAPAN-2胰腺癌细胞增殖和细胞周期的影响. 山东大学学报(医学版) 2013; 51: 37-41

9 苏永华, 尹西才, 谢觉民, 高波, 凌昌全. 三种蟾毒单体对SMMC-7721和BEL-7402人肝癌细胞生长的抑制作用. 第二军医大学学报 2003; 24: 393-395

10 王旭, 陈腾, 奉典旭, 陈超, 殷佩浩, 左青松, 陈亚峰. 蟾毒灵对人大肠癌HCT116细胞增殖的影响. 时珍国医国药 2011; 22: 1513-1514

11 Chang WA, Lin ES, Tsai MJ, Huang MS, Kuo PL. Isolinderalactone inhibits proliferation of A549 human non small cell lung cancer cells by arresting the cell cycle at the G0/G1 phase and inducing a Fas receptor and soluble Fas ligand-mediated apoptotic pathway. *Mol Med Rep* 2014; 9: 1653-1659 [PMID: 24604009 DOI: 10.3892/mmr.2014.2015]

12 Chen J, Wang FL, Chen WD. Modulation of apoptosis-related cell signalling pathways by curcumin as a strategy to inhibit tumor progression. *Mol Biol Rep* 2014 Mar 7. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24604727 DOI: 10.1007/s11033-014-3329-9]

13 Kang N, Wang MM, Wang YH, Zhang ZN, Cao HR, Lv YH, Yang Y, Fan PH, Qiu F, Gao XM. Tetrahydrocurcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis involving p38 MAPK activation in human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2014; 67: 193-200 [PMID: 24593988 DOI: 10.1016/j.fct.2014.02.024]

14 王艳丽, 朱晓琳, 段丽丽, 陈杰鹏, 牛哲峰, 曲迎春, 丛培芳, 李岭, 张美侠. 维康醇对肝癌细胞增殖抑制和诱导凋亡的作用. 中国医科大学学报 2013; 42: 999-1002

15 Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Miranda A, Cascante M. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2013; 138: 255-271 [PMID: 23356980 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.011]

16 Cholewa BD, Liu X, Ahmad N. The role of polo-like kinase 1 in carcinogenesis: cause or consequence? *Cancer Res* 2013; 73: 6848-6855 [PMID: 24265276 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2197]

17 Nikonova AS, Astsaturov I, Serebriiskii IG, Dunbrack RL, Golemis EA. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 661-687 [PMID: 22864622 DOI: 10.1007/s00018-012-1073-7]

18 Santala S, Talvensaari-Mattila A, Soini Y, Honkavuori-Toivola M, Santala M. High expression of cyclin A is associated with poor prognosis in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Tumour Biol* 2014 Feb 12. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24519066 DOI: 10.1007/s13277-014-1703-9]

19 孙蓓, 钱钧强. JNJ-7706621对人乳腺癌细胞周期及凋亡的影响. 中国肿瘤临床 2013; 40: 828-831

20 刘馨莲, 李淑蓉, 孙静, 殷舞. 细胞周期蛋白在食管癌中的表达及意义. 中国实验诊断学 2012; 16: 1249-1252

21 刘馨莲, 殷舞, 李欣. 脑胶质瘤组织中的细胞周期分析与意义. 天津医药 2012; 40: 440-442

22 张宁, 汪晨, 顾伟, 凌昌全. 蟾毒灵对人肝癌细胞HepG2细胞周期的影响及其机制研究. 现代肿瘤医学

2010; 18: 439-442
23 孙宇, 卢辛辛, 梁鑫淼, 崔晓楠. 华蟾素注射液对人肝癌HepG-2细胞增殖及周期的影响. 中国医药指南 2011; 9: 206-208
24 Zhu Z, Li E, Liu Y, Gao Y, Sun H, Wang Y, Wang Z, Liu X, Wang Q, Liu Y. Bufalin induces the apoptosis of acute promyelocytic leukemia cells via the downregulation of survivin expression. *Acta Haematol* 2012; 128: 144-150 [PMID: 22890165 DOI: 10.1159/000339424]
25 王杰, 奉典旭, 陈超, 倪振华, 左青松, 陈亚峰, 王旭, 张勇, 陈腾. 蟾毒灵对裸鼠大肠癌原位移植瘤的抗肿瘤作用及其对凋亡相关基因Bcl-xL, Bax表达的影响. 肿瘤防治研究 2011; 38: 1121-1125
26 樊嘉, 王征. 原发性肝癌综合治疗新进展. 国际消化病杂志 2013; 33: 73-74, 92
27 Shapiro L, Weis WI. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a003053 [PMID: 20066110 DOI: 10.1101/cshperspect.a003053]
28 周新木, 陈丽荣. GS、E-cadherin和β-catenin在肝细胞癌中的表达及其临床意义. 中国组织化学与细胞化学杂志 2013; 22: 140-144
29 Daniele A, Divella R, Quaranta M, Mattioli V, Casamassima P, Paradiso A, Garrisi VM, Gadaleta CD, Gadaleta-Caldarola G, Savino E, Maci R, Bellizzi A, Fazio V. Clinical and prognostic role of circulating MMP-2 and its inhibitor TIMP-2 in HCC patients prior to and after trans-hepatic arterial chemoembolization. *Clin Biochem* 2014; 47: 184-190 [PMID: 24355694 DOI: 10.1016/j.clinbiochem]
30 Hong SH, Kim GY, Chang YC, Moon SK, Kim WJ, Choi YH. Bufalin prevents the migration and invasion of T24 bladder carcinoma cells through the inactivation of matrix metalloproteinases and modulation of tight junctions. *Int J Oncol* 2013; 42: 277-286 [PMID: 23128598 DOI: 10.3892/ijo.2012.1683]
31 Chueh FS, Chen YY, Huang AC, Ho HC, Liao CL, Yang JS, Kuo CL, Chung JG. Bufalin-inhibited migration and invasion in human osteosarcoma U-2 OS cells is carried out by suppression of the matrix metalloproteinase-2, ERK, and JNK signaling pathways. *Environ Toxicol* 2014; 29: 21-29 [PMID: 21922632 DOI: 10.1002/tox.20769]

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1928-1935
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

白藜芦醇对酒精诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用及相关基因表达的变化

何培元，高淑梅，侯志平，马立新，李炳庆

■背景资料
我国酒精性肝病发病率逐年升高，不久的将来可能超越病毒性肝炎成为我国肝病的第1大病因. 严重的酒精性肝病会发展成酒精性肝硬化甚至出现肝功能衰竭. 目前对酒精性肝病发病机制认识有限，临床上缺乏特效的治疗方案及药物.

何培元，马立新，李炳庆，承德医学院附属医院消化内科 河北省承德市 067000
高淑梅，承德医学院附属医院心电室 河北省承德市 067000
侯志平，承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000
何培元，主治医师，主要从事消化系统疾病的研究.
河北省卫生厅基金资助项目，No. 20110179
作者贡献分布：本课题设计由何培元、高淑梅、侯志平及李炳庆完成；研究过程由何培元、侯志平及高淑梅完成；数据统计分析由马立新完成；论文写作由何培元与侯志平完成；由李炳庆完成论文的修改.
通讯作者：李炳庆，教授，主任医师，067000，河北省承德市南营子大街6号，承德医学院附属医院消化内科. libq@sohu.com
电话：0314-2279514　传真：0314-2279514
收稿日期：2014-02-17　修回日期：2014-03-22
接受日期：2014-03-28　在线出版日期：2014-05-18

Resveratrol protects against alcohol-induced oxidative stress in human HepG2 cells

Pei-Yuan He, Shu-Mei Gao, Zhi-Ping Hou, Li-Xin Ma, Bing-Qing Li

Pei-Yuan He, Li-Xin Ma, Bing-Qing Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
Shu-Mei Gao, Department of Cardiac Electrophysiology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
Zhi-Ping Hou, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
Supported by: Foundation of Health Department of Hebei Province, No. 20110179
Correspondence to: Bing-Qing Li, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, 6 Nanyingzi Street, Chengde 067000, Hebei Province, China. libq@sohu.com
Received: 2014-02-17　Revised: 2014-03-22
Accepted: 2014-03-28　Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To assess the effect of resveratrol as an antioxidant on alcohol-induced oxidative stress in HepG2 cells and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: HepG2 cells were pretreated with resveratrol for 24 h before treatment with alcohol to induce oxidative stress. MTT assay was performed to detect the viability of resveratrol-treated HepG2 cells and control cells. ELISA was used to detect the activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of total intracellular reactive oxygen species (ROS). Finally, RT-PCR was performed to detect the expression levels of SOD1, SOD2 and catalase, which are key genes involved in anti-oxidation pathway.

RESULTS: In comparison with control cells (not treated with resveratrol), the toxicity of resveratrol (12.5, 25, 50, 100 μmol/L) towards HepG2 cells during pre-treatment was below 20%. Treatment with 300 mmol/L alcohol without pre-treatment with resveratrol resulted in the death of around 50% of cells. Resveratrol at concentrations ranging from 25 to 100 μmol/L had an antagonistic effect against cytotoxicity of 300 mmol/L alcohol to HepG2 cells. SOD activity was significantly higher in cells pre-treated with 100 mmol/L resveratrol (0.391 ± 0.011) compared to non-treated controls (0.391 ± 0.011 *vs* 0.286 ± 0.019, $P < 0.05$). After alcohol induction, non-treated cells showed a higher ROS level compared to cells treated with 25, 50, and 100 μmol/L resveratrol (29234.79 ± 2288.00 *vs* 18023.26 ± 1359.66, 13528.44 ± 1078.99, 8219.87 ± 635.99). Compared to cells induced with 300 mM alcohol, resveratrol increased the expression levels of SOD1 (0.5535 ± 0.0035, 0.586 ± 0.0113, 0.623 ± 0.0127), SOD2 (1.249 ± 0.011, 1.369 ± 0.028, 1.377 ± 0.021, 1.401 ± 0.0578) and catalase (0.1955 ± 0.004, 0.2275 ± 0.00707).

CONCLUSION: Resveratrol as an antioxidant protects against alcohol-induced oxidative stress by regulating the expression of genes involved in anti-oxidant pathways.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Resveratrol; Oxidative stress; HepG2; Anti-oxidant

He PY, Gao SM, Hou ZP, Ma LX, Li BQ. Resveratrol protects against alcohol-induced oxidative stress in human HepG2 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1928-1935
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1928.asp
DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1928

■同行评议者
张进祥，副教授，华中科技大学同济医学院附属协和医院

摘要

目的: 探讨白藜芦醇在酒精诱导的HepG2细胞氧化应激中的抗氧化作用, 揭示白藜芦醇抗酒精性肝损伤的作用机制.

方法: 白藜芦醇预处理HepG2细胞24 h后, 用酒精诱导氧化应激的产生. MTT方法检测白藜芦醇处理组与对照组HepG2细胞活力; 用ELISA试剂盒检测不同实验组的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和细胞内总活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量; 采用RT-PCR方法检测抗氧化通路中关键基因*SOD1*、*SOD2*和过氧化氢酶的mRNA表达水平.

结果: MTT结果显示, 与对照组比较, 白藜芦醇(12.5、25、50、100 μmol/L)对HepG2细胞的细胞毒性均在20%以下, 300 mmol/L酒精可致近50%HepG2细胞死亡; 25-100 μmol/L白藜芦醇可有效对抗300 mmol/L酒精对HepG2引起的细胞毒性作用; SOD活性显示100 μmol/L白藜芦醇预处理组SOD含量(0.391±0.011)明显高于非处理组(0.286±0.019), 而ROS结果显示酒精诱导组(29234.79±2288)明显高于白藜芦醇25、50、100 μmol/L预处理组(18023.26±1359.66; 13528.44±1078.99; 8219.87±635.99); RT-PCR结果显示, 与300 mmol/L酒精比较, 25、50和100 μmol/L白藜芦醇可上调SOD1 mRNA表达量(0.5535±0.0035; 0.586±0.0113; 0.623±0.0127); 12.5、25、50、100 μmol/L白藜芦醇均可上调SOD2 mRNA表达量(1.249±0.011; 1.369 ±0.028; 1.377±0.021; 1.401±0.0578); 50和100 μmol/L白藜芦醇均可上调过氧化氢酶(0.1955±0.004; 0.2275±0.00707)mRNA的表达量.

结论: 本研究提示酒精可诱导氧化应激的产生, 而白藜芦醇通过调节抗氧化通路中基因的表达发挥抗氧化功能, 从而削弱酒精的细胞损伤作用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 白藜芦醇; 氧化应激; HepG2; 抗氧化

核心提示: 本研究发现经白藜芦醇处理后, 酒精诱导的细胞内总活性氧(reactive oxygen species)含量明显下降, 氧化应激(oxidative stress)较未处理组减轻. 随后应用Real-time PCR技术对超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)和过氧化氢酶mRNA表达水平的检测证明白藜芦醇可以通过增加抗氧化酶的表达提高抗氧化酶活性, 加快活性氧自由基代谢, 从而起到细胞保护作用.

何培元, 高淑梅, 侯志平, 马立新, 李炳庆. 白藜芦醇对酒精诱导的HepG2细胞氧化损伤的保护作用及相关基因表达的变化. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1928-1935 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1928.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1928

0 引言

白藜芦醇属于非黄酮类多酚化合物, 主要存在于各种红葡萄果实和红葡萄酒中[1], 是一种天然的植物抗毒素, 研究证据表明白藜芦醇具有抗衰老、抗氧化、抗肿瘤、抗炎和免疫调节作用[2-5]. 目前其在肝脏疾病的治疗方面有一些研究, 其作用机制主要为消除自由基和抗氧化[6].

过量饮酒成为当今世界范围内一个重要的公共卫生问题. 嗜酒者的肝脏、神经系统疾患的发病率比一般人群高20%[7]. 酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)为长期大量饮酒所致肝脏损伤性疾病. 虽然很多学者致力于酒精性肝病的研究, 但依然缺乏有效的治疗方法[8]. 之前的相关研究表明氧化应激在发病过程中发挥了重要作用[8-10]. 肝细胞癌细胞(HepG2)被广泛用于肝细胞毒性、肝脂质代谢和体外代谢研究[11], 是在细胞水平研究肝病的一种良好模型. 目前, 还没有关于白藜芦醇对抗酒精诱导的细胞毒性作用及其机制的研究. 本实验旨在研究白藜芦醇对酒精所诱导的氧化应激的抗氧化作用及其分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝细胞癌HepG2细胞株购于美国ATCC公司; 酒精、二甲基亚砜(DMSO)购自天津化工厂; DMEM培养基、胎牛血清、MTT购自Sigma公司; 总RNA提取试剂盒、RT-PCR扩增试剂盒购自上海生工公司; 细胞培养箱(美国Thermo)、倒置显微镜为日本Olympus公司产品, 由承德医学院基础研究所提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养人肝细胞癌HepG2细胞: 于DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养液, 包含10%(V/V)小牛血清和50 μg/mL庆大霉素, 37℃、5%CO_2培养箱中培养. 细胞密度达到80%以上后种在96孔细胞培养板上, 密度为每孔1×10^5个.

1.2.2 毒性检测: 使用MTT[3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]方法检测细胞活性, 方法同参考文献[14]. HepG2细胞(1×10^5)种于96孔细胞培养板中, 培养24 h后

■研发前沿

氧化应激是酒精性肝病中导致肝细胞损伤的重要发病机制. 多种自由基、抗氧化酶及非酶性抗氧化物参与其中构成了一个较为复杂的网络式反应体系. 各种不同的组分在整个氧化应激体系中的地位及其相互关系成为研究的热点. 如何应用各种人工合成药物及中草药对抗氧化应激保护肝细胞是研究的重点.

■相关报道
从酒精在体内的生物化学代谢过程可以确定，酒精的代谢过程中生成了大量的活性氧，氧化应激所致的脂质过氧化是肝细胞受损的主要机制，同时酒精代谢的中间产物也会降低抗氧化物质的活性. 国内外已有研究证实酒精性肝病患者血清SOD、过氧化氢酶及还原型谷胱甘肽等抗氧化物质活性低于健康人群. 但其活性降低的机制尚需更深入的研究.

表 1 复合扩增基因列表

基因名称	GeneBank 号	加标记(带下划线部分)的引物序列	
		上游引物	下游引物
ACTBa	NM_001101	AGGTGACACTATAGAATAGATCATTGCTCCT CCTGAGC	GTACGACTCACTATAGGGAAAAGCCATGCC AATCTCATC
KanRb		AGGTGACACTATAGAATA	AGGTGACACTATAGAATA
SOD1	NM_000454	AGGTGACACTATAGAATATCATCAATTTCGA GCAGAAGG	GTACGACTCACTATAGGGA TGCTTTTTCATGGACCACC
SOD2	NM_	AGGTGACACTATAGAATA	GTACGACTCACTATAGGGA
Catalase	NM_	AGGTGACACTATAGAATA	GTACGACTCACTATAGGGA

以不同浓度的白藜芦醇(0-100 μmol/L)处理24 h后测细胞活性以观察白藜芦醇的细胞毒性；同样以不同浓度的酒精[12](0-400 mmol/L)处理细胞24 h后检测细胞活性以观察酒精的细胞毒性.

1.2.3 白藜芦醇对抗酒精毒性细胞活力检测：以不同浓度的白藜芦醇(0-100 μmol/L)预处理HepG2细胞24 h后，用300 mmol/L浓度的酒精诱导24 h，之后在每孔中加入20 μL MTT，孵育4 h，弃去培养液，加入100 μL DMSO，摇床震荡15 min，待紫色结晶完全溶解后，酶标仪570 nm处读取吸光值.

1.2.4 SOD、ROS检测：使用武汉华美生物工程有限公司的ELISA试剂盒检测SOD、ROS表达，分别按照说明书严格进行操作，用荧光酶标仪在490 nm处读取SOD吸光度值；以激发波长480 nm，发射波长530 nm读取ROS吸光度值.

1.2.5 RT-PCR检测细胞内SOD1，SOD2及过氧化氢酶mRNA的表达：使用上海生工总RNA提取试剂盒严格按照说明书提取HepG2细胞总RNA；使用紫外分光光度计检测$A_{260/230}$和$A_{260/280}$以检测RNA纯度及计算RNA浓度. 引物设计参考文献[13,14]并在GenBank中比对，由上海生工合成，表1为相关基因上下游引物基本信息. 根据上海生工一步法反转录试剂盒说明书配制RT-PCR混合物. 反转录体系为：RNA样本(50 ng/μL)1 μL，5×RT Buffer 4 μL，反转录引物2 μL，反转录酶1 μL，双蒸水12 μL，总共20 μL. 使用PCR仪48 ℃ 1 min，42 ℃ 60 min，95 ℃ 5 min进行反转录. PCR复合扩增体系为：各基因cDNA 9.3 μL，10.7 μL PCR反应混合物，包含5×PCR Buffer、25 μmol/L $MgCl_2$和上下游引物. 扩增条件：95 ℃ 10 min，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃延长1 min，34个循环，4 ℃保存. 内参基因为*β-actin*. 应用GeXP基因分析仪分析抗氧化酶基因(*SOD1*、*SOD2*和过氧化氢酶)mRNA水平的变化.

统计学处理 采用SPSS20.1软件进行分析，统计结果以mean±SD表示，计量资料采用方差分析. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 细胞毒性检测 白藜芦醇与酒精的细胞毒性结果如图1A，B. 图1A为不同浓度酒精(0-400 mmol/L)作用于HepG2细胞24 h后的细胞活力. 各不同酒精浓度组细胞活性较对照组均有所下降，差异均有统计学意义($P>0.05$). 图1B为不同浓度的白藜芦醇(0-100 μmol/L)作用于HepG2细胞24 h后的细胞毒性. 100 μmol/L组细胞活性较对照组有所下降，两组间差异有统计学意义($P<0.05$)，其余各组与对照组相比均无明显变化($P<0.05$).

2.2 细胞活力检测 白藜芦醇对抗酒精毒性的细胞活力检测图1C显示了不同浓度的白藜芦醇减弱300 mmol/L酒精诱导的细胞毒性作用，12.5 μmol/L白藜芦醇组细胞活性与酒精组相比无统计学差异($P>0.05$). 25、50和100 μmol/L的白藜芦醇与酒精组比较具有统计学意义($P<0.05$). 对上述3个处理组进行组间比较，25 μmol/L组细胞活性较50及100 μmol/L组低，差异有统计学意义($P<0.05$)，50 μmol/L组与100 μmol/L比较无统计学差异($P>0.05$).

2.3 SOD、ROS检测 细胞内SOD、ROS含量改变如图2A所示SOD活性改变：与对照组比较，酒精组细胞内SOD活性明显下降，具有统计学差异($P<0.05$)；与酒精组比较100 μmol/L白藜芦醇组细胞内SOD活性明显升高，有统计学差异($P<0.05$)，而其他三组较低浓度白藜芦醇预处理组SOD活性略有升高与酒精组比较无统计学差异($P>0.05$). 图2B所示为ROS水平：与对照组比较，酒精组细胞内ROS水平明显升高. 与酒精组比较，25、50及100 μmol/L组白藜芦醇组细胞内

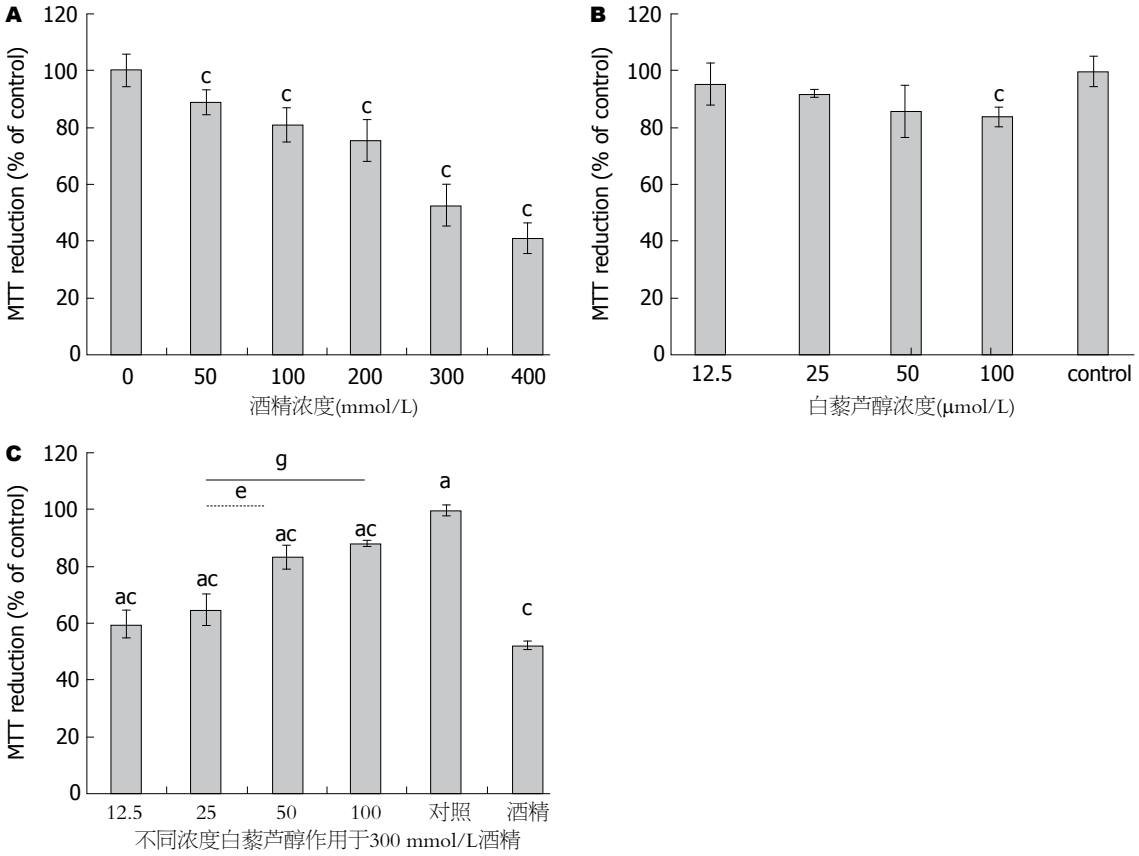


图 1 细胞活力检测. A: 不同浓度酒精作用于HepG2细胞后的细胞活性检测; B: 不同浓度白藜芦醇对HepG2细胞后的细胞活性检测; C: 不同浓度白藜芦醇作用HepG2细胞24 h后, 300 mmol/L酒精作用24 h后的细胞活力. $^{a}P<0.05$ *vs* 酒精组; $^{c}P<0.05$ *vs* 对照组; $^{e}P<0.05$ *vs* 50 μmol/L组; $^{g}P<0.05$ *vs* 100 μmol/L.

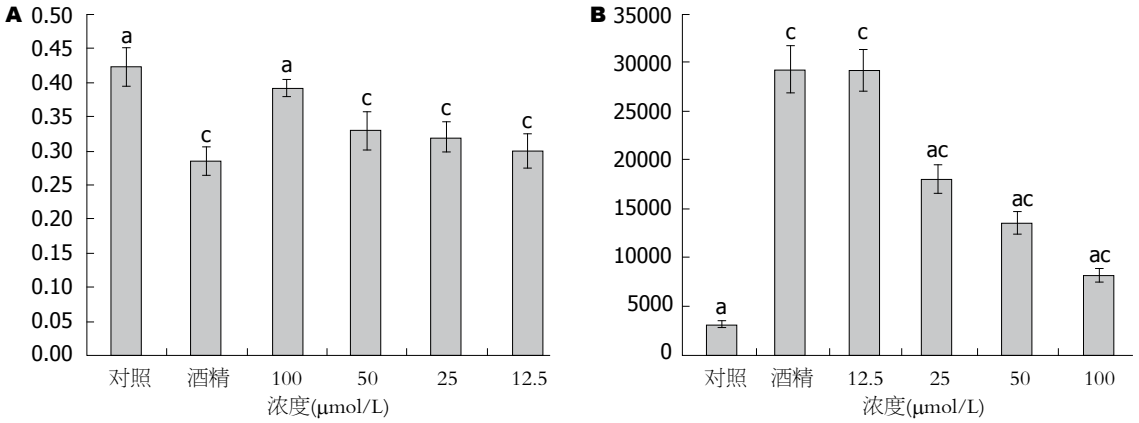


图 2 不同浓度白藜芦醇对抗300 mmol/L酒精诱导的氧化应激反应. A: SOD活性检测; B: 细胞内总ROS水平检测. $^{a}P<0.05$ *vs* 300 mmol/L酒精诱导组; $^{c}P<0.05$ *vs* 对照组.

ROS水平明显下降, 有统计学差异($P<0.05$), 而最低浓度的12.5 μmol/L组ROS水平与酒精组比较无统计学差异($P>0.05$).

2.4 细胞内SOD1、SOD2、过氧化氢酶 mRNA表达变化 图3显示经不同浓度白藜芦醇预处理再以300 mmol/L酒精诱导后HepG2细胞内SOD1、SOD2和过氧化氢酶3种基因mRNA水平. 图3A示SOD1 mRNA水平: 与未施加任何处理的对照组比较, 酒精组SOD1 mRNA水平明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$); 不同浓度的白藜芦醇预处理组SOD1 mRNA水平均有所升高, 其中12.5 μmol/L组升高幅度较小与酒精组比较无统计学差异($P>0.05$), 其他3个浓度组均有统计学差异($P<0.05$). 图3B示SOD2 mRNA水

■创新盘点

本文测定了肝细胞内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及总活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量, 并应用Real-time PCR技术检测了SOD及过氧化氢酶mRNA水平, 从而对酒精性肝病中氧化应激发生的机制有了新的认识. 并通过毒性检测获得了用酒精和白藜芦醇处理肝细胞的浓度, 为后续的科研工作提供了有价值的参数.

■**应用要点**

本研究检测了经白藜芦醇处理前后细胞内ROS含量和SOD活性以及SOD和过氧化氢酶的mRNA表达水平，证实白藜芦醇可以通过增加抗氧化酶的基因表达提高抗氧化应激能力，对酒精诱导的氧化应激所致细胞损伤有保护作用，提供了一种有潜在研发价值的酒精性肝病治疗药物，并为其可能的临床应用提供理论基础.

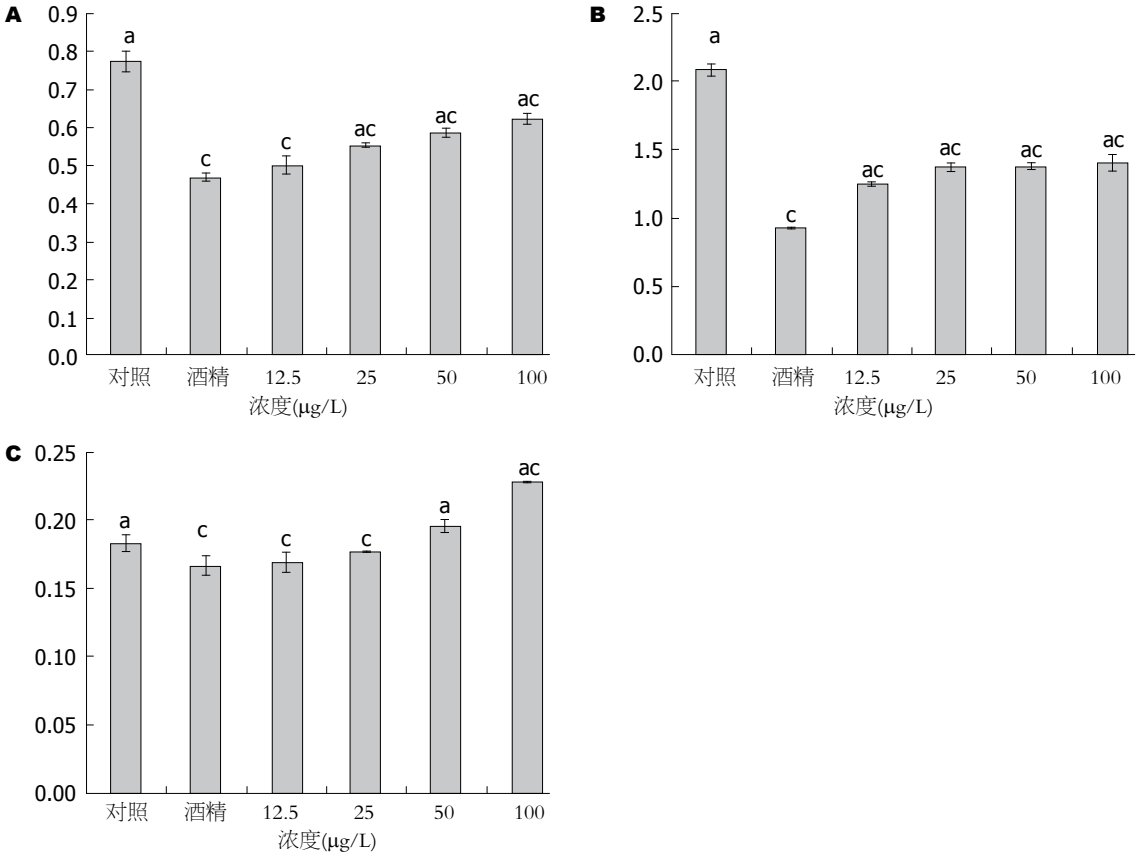


图 3 *SOD1*、*SOD2*和*Catalase*基因在HepG2细胞中mRNA水平的表达. A: *SOD1*; B: *SOD2*; C: *Catalase*基因. 柱形图代表同一个组别的平均mRNA表达量，误差线代表标准差. $^{a}P<0.05$ *vs* 酒精组; $^{c}P<0.05$ *vs* 对照组.

平: 与对照组比较酒精组SOD2 mRNA水平明显下降; 与酒精组比较各不同浓度的白藜芦醇预处理组SOD2 mRNA水平均有所升高, 且有统计学差异($P<0.05$). 图3C示过氧化氢酶mRNA水平变化: 与对照组比较酒精组过氧化氢酶mRNA水平有所下降, 有统计学意义($P<0.05$); 与酒精组相比50和100 μmol/L两个高浓度预处理组过氧化氢酶mRNA水平明显升高有统计学差异($P<0.05$), 而两个低浓度预处理组与酒精组比较无统计学差异($P>0.05$).

3 讨论

在酒精性肝病中氧化应激已成为公认的致病机制, 应用抗氧化剂减轻氧化应激程度以改善酒精引起的肝脏损伤已成为一种治疗手段. 抗氧化药物在动物水平体内实验和细胞水平体外实验都显现出了明显的治疗效果. 以往研究表明水飞蓟素通过上调还原型谷胱甘肽等抗氧化物质对抗酒精的氧化应激, 从而起到保护肝细胞的作用[15]. 同样, 以桷皮素预处理肝细胞也可以减弱酒精诱导的肝细胞内氧化应激水平[16,17]. 利用原代培养的大鼠肝脏细胞进行的体外实验研究证实, 抗氧化剂β-胡萝卜素可以减轻酒精诱导的氧化应激[18]. 用大鼠进行的动物实验也表明口服抗氧化剂维生素C及硫胺素等抗氧化剂可以有效减轻酒精诱导的血清肝脏酶学异常[19]. 周俊英等[20]检测到酒精性肝病大鼠存在氧化应激指标的改变, 并且已有人验证酒精性肝病大鼠发病机制与氧化应激密切相关[21]. 这些研究表明, 氧化应激引起肝细胞损伤, 而抗氧化剂是阻止酒精性肝损害的有效策略.

绝大多数药物都是在一定浓度范围内发挥其治疗作用, 浓度过低对疾病起不到治疗效果, 浓度过高必将对机体产生不良反应. 为了确保本研究所采用的药物浓度处于安全并且有效的浓度范围, 实验操作中首先进行了白藜芦醇及酒精细胞毒性的检测. 实验数据显示: 从12.5-50 μmol/L浓度的白藜芦醇对细胞活性无影响, 100 μmol/L浓度白藜芦醇组细胞活性虽有所下降, 但细胞活性可达80%以上, 仍处于药物毒理实验可接受的范围内. 酒精对细胞的毒性作用非常明显, 从100-400 mmol/L不同酒精处理组细胞活性均有所下降, 最高酒精浓度组细胞活性仅约40%. 为便于后续实验中白藜芦醇效果的观察,

采用了细胞活性接近50%的300 mmol/L组作为后续实验的酒精处理浓度.

20世纪40年代发现的白藜芦醇是一种天然多酚类化合物, 以往研究表明其对多种疾病有治疗作用, 并且证实其作用与抗氧化功能相关[7]. 白藜芦醇可通过清除ROS、减弱ROS生成酶活性和增强SOD等ROS代谢酶活性[22,23]等不同途径发挥抗氧化作用. Kitada等[24]研究发现白藜芦醇可以通过恢复SOD2的正常功能减轻氧化应激以减少糖尿病肾病的发病. 郑毅等[25]研究表明白藜芦醇可以增加过氧化氢酶、血红素加氧酶及SOD1的表达对抗过氧化氢诱导的氧化应激从而起到保护晶状体上皮细胞的作用. 为明确白藜芦醇对酒精所致的肝细胞损伤有无保护作用, 对经白藜芦醇预处理及未经预处理的细胞活性分别进行了检测. 结果证实从25、50和100 μmol/L浓度白藜芦醇处理组均有细胞保护作用, 且50 μmol/L组较25 μmol/L组效果好, 50和100 μmol/L两组效果无明显差异. 该结果为今后实际应用中药物剂量的选择提供了参考数据及理论依据.

ROS是一类含氧的具有较强氧化性的自由基氧和非自由基氧的总称, 包括超氧阴离子、过氧化氢和一氧化氮等. SOD和过氧化氢酶是两个氧自由基代谢的关键酶, 细胞内不同的亚细胞结构存在不同的SOD亚型, SOD1也叫铜/锌SOD, SOD2也称锰SOD, 分别存在于细胞浆和细胞线粒体内. SOD可以催化氧化能力强的超氧化物生成H_2O_2, 过氧化氢酶可进一步催化H_2O_2生成H_2O和氧化能力更低的O_2. 为了研究白藜芦醇抗氧化损伤的作用靶点, 本课题检测了细胞内ROS水平和SOD活性, 结果表明: 酒精可致使细胞内ROS水平升高而SOD活性降低, 以白藜芦醇预处理细胞可使细胞内ROS明显减少, 同时还能提高SOD活性.

为进一步研究白藜芦醇作用的机制, 对SOD1、SOD2和过氧化氢酶3种酶的mRNA水平进行了检测, 结果表明酒精诱导后SOD1、SOD2和过氧化氢化氢酶mRNA水平均有所下降, 其中SOD1和SOD2下降幅度明显高于过氧化氢酶. 说明酒精主要是通过降低SOD活性减缓活性氧的代谢速度. 经白藜芦醇预处理后SOD1、SOD2和过氧化氢化氢酶mRNA水平均有所升高, 说明白藜芦醇通过增加上述三种基因的转录水平达到加速活性氧代谢的效果而最终起到对细胞的保护作用.

肝炎病毒一直是我国肝病的最主要病因, 酒精性肝病的发病率仅次于病毒性肝炎, 是我国肝病的第2大病因. 我国医疗条件不断改善, 1992年乙型肝炎疫苗在全国范围内列入计划免疫管理, 这必将使肝炎病毒感染人数逐渐减少. 与此同时, 人们生活水平明显提高, 各种酒精类饮料的消费量也逐年攀升, 酒精性肝病的患病率不断升高, 不难预测酒精性肝病在不久的将来会成为我国肝病的首要病因. 酒精性肝病的发病机制及治疗方案的研究意义重大. 本试验结果显示酒精可通过降低SOD和过氧化氢酶活性致使细胞内ROS升高, 从而使细胞内出现氧化应激, 细胞活性明显下降. 白藜芦醇的抗氧化应激作用已被多项在体内及体外模型上进行的研究所证实, 但其作用机制仍需进一步研究. 本试验结果表明白藜芦醇可通过增加SOD和过氧化氢酶mRNA水平提高活性氧代谢通路中关键酶的活性, 从而降低细胞内ROS含量, 减轻细胞损伤. 本研究从氧化应激的角度研究酒精导致细胞损伤的机制, 并且观察到白藜芦醇对酒精诱导的细胞氧化损伤有保护作用, 为其今后的实际应用提供了理论基础.

人体内的抗氧化系统除了上述以SOD及过氧化氢酶为代表的抗氧化酶还包括一类非酶类抗氧化物质, 如：还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、维生素E、维生素C、辅酶Q等, 其中还原型谷胱甘肽是最具代表性的内源性非酶类抗氧化物, 是巯基的主要供体[26]. Gupta等[27]和Singh等[28]进行的临床研究证实酒精性肝病患者血液中还原型谷胱甘肽的浓度较正常对照组明显下降. Checa等[29]的进一步研究表明消除自由基过程中的过度消耗及酒精对还原型谷胱甘肽合成的抑制共同导致其含量明显下降. 高健等[30]曾研究还原型谷胱甘肽对酒精性肝病的治疗作用, 结果表明还原型谷胱甘肽可以有效降低酒精性肝病患者ALT、AST、γ-GT, 同时对肝纤维化的发展有抑制作用. 本试验中对白藜芦醇处理前后细胞内ROS含量、SOD和过氧化氢酶活性及酶的基因表达水平进行了检测, 由实验数据可知白藜芦醇可以通过提高抗氧化酶活性来减少ROS含量. 但ROS含量的减少是抗氧化酶及还原型谷胱甘肽等非酶类抗氧化物共同起作用的结果[31]. 白藜芦醇是否也能通过提高还原型谷胱甘肽等非酶类抗氧化物水平而起到抗氧化作用呢？这个课题值得设计相关的研究项目去进一步探索.

■**同行评价**
本文结果较明确, 具有一定创新性, 可读性和科学性.

4 参考文献

1 Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992; 339: 1523-1526 [PMID: 1351198 DOI: 0140-6736(92)91277-F]

2 Singh CK, Kumar A, Lavoie HA, Dipette DJ, Singh US. Diabetic complications in pregnancy: is resveratrol a solution? *Exp Biol Med* (Maywood) 2013; 238: 482-490 [PMID: 23436883 DOI: 10.1177/1535370212473704]

3 Sinha K, Chaudhary G, Gupta YK. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life Sci* 2002; 71: 655-665 [PMID: 12072154 DOI: S0024320502016910]

4 Polycarpou E, Meira LB, Carrington S, Tyrrell E, Modjtahedi H, Carew MA. Resveratrol 3-O-D-glucuronide and resveratrol 4'-O-D-glucuronide inhibit colon cancer cell growth: evidence for a role of A3 adenosine receptors, cyclin D1 depletion, and G1 cell cycle arrest. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 1708-1717 [PMID: 23650147 DOI: 10.1002/mnfr.201200742]

5 Puca AA, Carrizzo A, Ferrario A, Villa F, Vecchione C. Endothelial nitric oxide synthase, vascular integrity and human exceptional longevity. *Immun Ageing* 2012; 9: 26 [PMID: 23153280 DOI: 10.1186/1742-4933-9-26]

6 Rivière C, Richard T, Quentin L, Krisa S, Mérillon JM, Monti JP. Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 1160-1167 [PMID: 17049256 DOI: 10.1016/j.bmc.2006.09.069]

7 Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciag A, Puca AA, Vecchione C. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 215-226 [PMID: 23872128 DOI: 10.1016/j.fct.2013.07.021]

8 Majano PL, Medina J, Zubía I, Sunyer L, Lara-Pezzi E, Maldonado-Rodríguez A, López-Cabrera M, Moreno-Otero R. N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J Hepatol* 2004; 40: 632-637 [PMID: 15030979 DOI: 10.1016/j.jhep.2003.12.009]

9 Gutiérrez-Ruiz MC, Quiroz SC, Souza V, Bucio L, Hernández E, Olivares IP, Llorente L, Vargas-Voráckova F, Kershenobich D. Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde, and LPS. *Toxicology* 1999; 134: 197-207 [PMID: 10403637]

10 Nah HY, Lee WS, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ, Jung YD, Ahn BW, Park JS, Shin BA. Resveratrol protects HepG2 and Chang liver cells from oxidative stress. *Chonnam Med J* 2005; 41: 243-252

11 Knasmüller S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S, Darroudi F, Huber WW, Hoelzl C, Bichler J, Majer BJ. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* 2004; 198: 315-328 [PMID: 15138058 DOI: 10.1016/j.tox.2004.02.008]

12 Senthil Kumar KJ, Liao JW, Xiao JH, Gokila Vani M, Wang SY. Hepatoprotective effect of lucidone against alcohol-induced oxidative stress in human hepatic HepG2 cells through the up-regulation of HO-1/Nrf-2 antioxidant genes. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 700-708 [PMID: 22484158 DOI: 10.1016/j.tiv.2012.03.012]

13 Azmi NH, Ismail N, Imam MU, Ismail M. Ethyl acetate extract of germinated brown rice attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of anti-apoptotic, pro-survival and antioxidant genes. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 177 [PMID: 23866310 DOI: 10.1186/1472-6882-13-177]

14] Ismail N, Ismail M, Fathy SF, Musa SN, Imam MU, Foo JB, Iqbal S. Neuroprotective effects of germinated brown rice against hydrogen peroxide induced cell death in human SH-SY5Y cells. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 9692-9708. [PMID- 22949825] doi: 10.3390/ijms13089692

15 Song Z, Deaciuc I, Song M, Lee DY, Liu Y, Ji X, McClain C. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 407-413 [PMID: 16499481 DOI: 10.1111/j.1530-0277.2006.00063.x]

16 Liu S, Hou W, Yao P, Zhang B, Sun S, Nüssler AK, Liu L. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 516-522 [PMID: 19327393 DOI: 10.1016/j.tiv.2009.03.006]

17 Oliva J, Bardag-Gorce F, Tillman B, French SW. Protective effect of quercetin, EGCG, catechin and betaine against oxidative stress induced by ethanol in vitro. *Exp Mol Pathol* 2011; 90: 295-299 [PMID: 21352821 DOI: 10.1016/j.yexmp.2011.02.006]

18 Peng HC, Chen JR, Chen YL, Yang SC, Yang SS. beta-Carotene exhibits antioxidant and anti-apoptotic properties to prevent ethanol-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Phytother Res* 2010; 24 Suppl 2: S183-S189 [PMID: 19957244 DOI: 10.1002/ptr.3068]

19 Ambadath V, Venu RG, Madambath I. Comparative study of the efficacy of ascorbic acid, quercetin, and thiamine for reversing ethanol-induced toxicity. *J Med Food* 2010; 13: 1485-1489 [PMID: 20946019 DOI: 10.1089/jmf.2009.1387]

20 周俊英, 赵彩彦, 甄真. 酒精性肝病发病过程中氧化应激指标的变化. 中国组织化学与细胞化学杂志 2006; (6): 644-648

21 金武还, 权修权, 孟繁平, 崔香丹, 朴海今. 大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素P4502E1和氧化应激的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2181-2185

22 Rocha KK, Souza GA, Ebaid GX, Seiva FR, Cataneo AC, Novelli EL. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 1362-1367 [PMID: 19298841 DOI: 10.1016/j.fct.2009.03.010]

23 Kohnen S, Franck T, Van Antwerpen P, Boudjeltia KZ, Mouithys-Mickalad A, Deby C, Moguilevsky N, Deby-Dupont G, Lamy M, Serteyn D. Resveratrol inhibits the activity of equine neutrophil myeloperoxidase by a direct interaction with the enzyme. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 8080-8087 [PMID: 17844991 DOI: 10.1021/jf071741n]

24 Kitada M, Kume S, Imaizumi N, Koya D. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway. *Diabetes* 2011; 60: 634-643 [PMID: 21270273 DOI: 10.2337/db10-0386]

25 Zheng Y, Liu Y, Ge J, Wang X, Liu L, Bu Z, Liu P.

Resveratrol protects human lens epithelial cells against H2O2-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression. *Mol Vis* 2010; 16: 1467-1474 [PMID: 20806083]
26 Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end. *Free Radic Res* 1999; 31: 261-272
27 Gupta S, Pandey R, Katyal R, Aggarwal HK, Aggarwal RP, Aggarwal SK. Lipid peroxide levels and antioxidant status in alcoholic liver disease. *Indian J Clin Biochem* 2005; 20: 67-71 [PMID: 23105497 DOI: 10.1007/BF02893045]
28 Singh M, Gupta S, Singhal U, Pandey R, Aggarwal SK. Evaluation of the oxidative stress in chronic alcoholics. *J Clin Diagn Res* 2013; 7: 1568-1571 [PMID: 24086841 DOI: 10.7860/JCDR/2013/5596.3210]
29 Fernández-Checa JC, Hirano T, Tsukamoto H, Kaplowitz N. Mitochondrial glutathione depletion in alcoholic liver disease. *Alcohol* 1993; 10: 469-475 [PMID: 8123202]
30 高健, 吴显才, 李孝生, 沈鼎明. 还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病的研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 809-811
31 Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol* 2009; 83: 519-548 [PMID: 19448996 DOI: 10.1007/s00204-009-0432]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1936-1942
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

幽门螺杆菌菌毛蛋白FLaA IgY的制备及体外抑菌实验

彭 姣, 卢 超, 祁振强, 张国海

■背景资料
由于幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)引发胃癌和其他一些疾病, 关于*H. pylori*的研究已受到越来越多的关注, 但针对*H. pylori*的治疗目前还是采用抗生素联合治疗等方式, 造成*H. pylori*的耐药性越来越严重, 极大地影响了*H. pylori*的治疗效果. 采用抗体类药物进行*H. pylori*的治疗得到了众多研究者的重视. 卵黄抗体是一种禽类抗体, 具有很好的生物活性, 常用于动物疾病的口服类药物的研发和治疗, 是消化系疾病传染病的有效治疗和预防药物.

彭姣, 卢超, 祁振强, 张国海, 深圳市宝舜泰生物医药股份有限公司 广东省深圳市 518057
卢超, 张国海, 广西师范大学药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室培育基地 广西壮族自治区桂林市 541004
彭姣, 工程师, 主要从事抗体的研究.
广西自然科学基金资助项目, No. 2013GXNSFBA019159
广西医药产业人才小高地基金资助项目, No. 1312
广西科学研究与技术开发基金资助项目, No. 13349002
深圳市科创委深圳市战略性新兴产业发展专项基金资助项目, No. CXZZ20120823103224373
作者贡献分布: 此课题由张国海与祁振强设计; 实验部分由卢超与彭姣完成; 论文写作由彭姣与张国海完成.
通讯作者: 张国海, 助理研究员, 541004, 桂林市育才路15号, 广西师范大学药用资源化学与药物分子工程国家重点实验室培育基地. zgh1207@mailbox.gxun.edu.cn
电话: 0773-2120958
收稿日期: 2014-02-17 修回日期: 2014-03-23
接受日期: 2014-04-03 在线出版日期: 2014-05-18

In vitro bacteriostatic activity of IgY against recombinant *Helicobacter pylori* FlaA protein

Jiao Peng, Chao Lu, Zhen-Qiang Qi, Guo-Hai Zhang

Jiao Peng, Chao Lu, Zhen-Qiang Qi, Guo-Hai Zhang, Shenzhen Boostie Biological Pharmaceutical CO., LTD, Shenzhen 518057, Guangdong Province, China
Chao Lu, Guo-Hai Zhang, State Key Laboratory Cultivation Base for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, School of Chemistry & Pharmacy, Guangxi Normal University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: Natural Science Foundation of Guangxi, No. 2013GXNSFBA019159; Guangxi Pharmaceutical Industry Talent Small Highland Project, No.1312; Guangxi Scientific Research and Technology Development Project, No. 13349002; and Shenzhen Special Funds for Development of Strategic Emerging Industries, No. CXZZ20120823103224373
Correspondence to: Guo-Hai Zhang, Assistant Professor, State Key Laboratory Cultivation Base for the Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, School of Chemistry & Pharmacy, Guangxi Normal University, 15 Yucai Road, Guilin 541004, Guangdong Province, China. zgh1207@mailbox.gxun.edu.cn
Received: 2014-02-17 Revised: 2014-03-23
Accepted: 2014-04-03 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To evaluate the *in vitro* antibacterial activity of anti-*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) FlaA IgY.

METHODS: Recombinant *H. pylori* FlaA was prepared by prokaryotic expression and used to immunize hens. Anti-FlaA IgY was purified and IgY titer was determined by ELISA. The antibody was then tested to check if there was any cross-reaction with the common intestinal flora like *Lacticacid bacteria*, *Bifidobacterium* and *Escherichia coli*. The antibacterial activity of different concentrations of anti-*H. pylori* FlaA IgY (0.1, 1 and 5 mg/mL) was finally determined.

RESULTS: The concentration of purified FlaA protein was 2.97 mg/mL, and the titer of anti-FlaA IgY was 1:12800 three weeks after immunization. Anti-FlaA IgY did not react with the common intestinal flora, but reacted well with *H. pylori* and FlaA protein. *In vitro* results showed that there were significant differences ($P < 0.01$) in the *H. pylori* concentrations between the control group and the groups treated with 0.1, 1, or 5 mg/mL FlaA IgY, indicating that FlaA IgY of various concentrations could inhibit the growth of *H. pylori* in a certain degree. The antibacterial activity of 0.1 mg/mL FlaA IgY was mainly present between 1 and 6 h, and was mostly lost after 6 h. The growth of *H. pylori* treated with 1 mg/mL FlaA IgY was relatively slow, and the bacterial concentration of the group treated with 5 mg/mL FlaA IgY did not alter significantly between 1 and 24 h. After 10^8 CFU/mL *H. pylori* was treated with three different doses (0.1, 1, 5 mg/mL) of FlaA IgY for 24 h, a significant difference in bacterial concentration was observed between the low dose group and the other two groups ($P < 0.01$). Anti-FlaA IgY at 5 mg/mL could completely inhibit the growth of *H. pylori*.

CONCLUSION: High-titer anti-FlaA IgY can specifically react with *H. pylori*, and has no cross-reaction with the common intestinal flora. Anti-FlaA IgY at 5 mg/mL has a strong inhibitory effect on the growth of *H. pylori*.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Flagellar protein A; IgY; Antibacterial test

Peng J, Lu C, Qi ZQ, Zhang GH. *In vitro* bacteriostatic

■同行评议者
谭周进, 教授, 湖南中医药大学

activity of IgY against recombinant *Helicobacter pylori* FlaA protein. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1936-1942
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1936.asp
DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1936

摘要

目的: 制备抗幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)菌毛蛋白FlaA卵黄免疫球蛋白(yolk immunoglobulin, IgY), 并进行体外抑菌实验, 为治疗*H. pylori*口服药物的研发奠定基础.

方法: 采用原核表达制备的FlaA蛋白, 将重组FlaA菌毛蛋白免疫蛋鸡获取FlaA IgY, 采用间接ELISA的方法检测FlaA IgY的效价. 通过将其与肠道中常见菌群乳酸杆菌、双歧杆菌、大肠杆菌进行抗体抗原结合反应, 检测其是否与肠道中其他菌群存在交叉反应. 评价0.1、1、5 mg/mL低、中、高3种不同浓度的FlaA IgY的体外抑菌实验效果.

结果: 纯化后的FlaA蛋白浓度为2.97 mg/mL. 经重组FlaA IgY免疫制备IgY在第3次免疫1 wk后效价可达到1∶12800, 特异性检测结果显示, FlaA IgY不与肠道中常见菌发生交叉反应, 与*H. pylori*全菌和重组FlaA反应强烈. 体外抑菌结果显示, 0.1、1、5 mg/mL的FlaA IgY处理后的*H. pylori*菌液浓度与对照组菌液浓度相比具有显著差异(0.324±0.033, 0.078±0.012, 0.014±0.003 *vs* 0.539±0.023, $P<0.01$), 表明低、中、高3组浓度的FlaA IgY均能一定程度的抑制*H. pylori*的生长. 0.1 mg/mL IgY的抑菌作用主要表现在1-6 h之间, 6 h后抑菌作用基本丧失. 1 mg/mL FlaA IgY处理组的*H. pylori*在1-24 h之间生长较为缓慢, 5 mg/mL FlaA IgY处理组菌液浓度在1-24 h之间基本无变化. 10^8 CFU/mL *H. pylori*经3组不同浓度FlaA IgY处理24 h后, 低IgY浓度组菌液浓度与其余2组菌液浓度相比差异显著(0.078±0.012, 0.014±0.003 *vs* 0.324±0.033, $P<0.01$), 5 mg/mL FlaA IgY在24 h内能彻底抑制*H. pylori*的生长.

结论: 制备的FlaA IgY效价较高, 特异性强, 不与肠道常见菌群发生交叉反应. 5 mg/mL的FlaA IgY在体外对*H. pylori*具有很强的抑制作用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 幽门螺杆菌; 菌毛蛋白FlaA; 卵黄抗体; 抑菌试验

核心提示: 采用重组幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)菌毛蛋白FlaA为免疫抗原制备卵黄抗体, 该卵黄抗体效价高, 特异性强, 不会与肠道常见菌群发生交叉反应, 在体外能有效抑制*H. pylori*的生长.

彭姣, 卢超, 祁振强, 张国海. 幽门螺杆菌菌毛蛋白FlaA IgY的制备及体外抑菌实验. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1936-1942
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1936.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1936

■研发前沿
目前有大量关于*H. pylori*卵黄免疫球蛋白(yolk immunoglobulin, IgY)的文献报道, 主要集中在抗*H. pylori* IgY的制备和体内体外试验, 已证实了能有效保护和治疗鼠类模型的*H. pylori*感染.

0 引言

幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种革兰氏阴性菌, 被证实与慢性萎缩性胃炎、十二指肠溃疡、胃腺癌和胃黏膜相关性淋巴组织淋巴瘤的发生有关, 此外, *H. pylori*还与全身多系统疾病的发病密切相关[1], 目前成功治疗和根除*H. pylori*需要复合抗生素治疗, 如甲硝唑、阿莫西林、克拉霉素、铋剂以及质子泵抑制剂(proton pump inhibitors)等[2-4]. 虽然抗生素能够成功治疗*H. pylori*的感染, 但耐药性*H. pylori*的产生使得这类治疗方案存在着一定失败几率, 患者复发率高, *H. pylori*耐药性日趋严重, 不同国家和地区其耐药率和耐抗生素种类常存在很大差别, 由于耐药性导致的*H. pylori*复发率能高达40%[5]. 有研究表明, 对小鼠模型采用特异性抗体进行*H. pylori*的控制和治疗能取得良好的治疗效果[6,7]. 尽管*H. pylori*的致病多样性机制尚未完全清楚, *H. pylori*的毒力因子也很多, 但*H. pylori*必须首先定植于人胃黏膜才能进一步发挥作用, 鞭毛在*H. pylori*的定植和移动中起重要作用, 并存在于所有*H. pylori*中. 对豚鼠模型胃黏膜*H. pylori*定植情况的研究表明, 鞭毛不仅是*H. pylori*在胃黏膜中的定植因子, 也是毒力因子[8]. 鞭毛蛋白由FlaA和FlaB 2个亚基组成, 其中FlaA具有更为重要的致病性和免疫性[9]. 采用口服特异性抗体能够有效的抑制肠道感染和多种消化系病原体[10,11]. 卵黄免疫球蛋白(yolk immunoglobulin, IgY)是一种禽类抗体, 目前已有大量应用实例证明IgY可用于疾病的预防和治疗[12]. 口服卵黄免疫球蛋白被证实能用于肠道感染的治疗, 且效果显著[13], 此外, IgY具有提取量大、廉价易获取等优点. 本研究对以重组的*H. pylori* FlaA菌毛蛋白为抗原免疫蛋鸡获取特异性卵黄免疫球蛋白, 对获得的重组FlaA IgY的效价、免疫原性、特异性以及体外抑菌实验进行了研究.

■相关报道
近年来关于幽门螺杆菌卵黄抗体的研究已经陆续开展, Roe和Shin等报道了全菌制备的抗*H. pylori* IgY能有效减轻因*H. pylori*引发的沙鼠胃炎, 在国内, 陈翠萍等证明了全菌制备的抗*H. pylori* IgY能有效中和*H. pylori*毒素细胞毒活性以及对小鼠的保护作用. 在*H. pylori*毒力因子制备IgY方面也不断有新的研究进展, 毛小琴等研究了重组VacA卵黄抗体的体外活性, 黄进等制备了抗HpaA IgY, 邓颖等制备了抗Nap卵黄抗体, 目前还未见FlaA IgY的相关报道.

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori*标准株购自北京中原公司, pET-32a-flaA由本公司分子生物学实验室构建和保存. 低分子量蛋白Marker购自北京索莱宝科技有限公司, IPTG购自上海源叶生物科技有限公司, 布氏肉汤培养基购自上海信裕生物科技有限公司, NTA亲和层析柱购自QIAGEN, 弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂购自Sigma, HRP-羊抗鸡IgY购自艾美捷科技有限公司, TMB单组份显色液购自碧云天, *H. pylori*检测试剂盒(脲酶法)购自上海卒瑞生物科技有限公司. SPF来亨鸡, 4只, 105日龄, 体质量1.5-1.6 kg, 由本公司自行孵化培育.

1.2 方法

1.2.1 重组蛋白表达: 将本实验室构建并经验证的pET-32a-FlaA转化至BL21(DE3), 同时以pET-32a空质粒转化BL21(DE3)为对照, 同时用0.4 mmol/L IPTG诱导4 h. 收集菌液, 4 ℃10000 *g*离心5 min, 弃去上清, 沉淀用0.01 mol/L的PBS清洗3次后, 加入10 mL 0.01 mol/L PBS重悬后经超声波破碎, 12000 *g*离心10 min后分别取上清和沉淀, 用12%SDS-PAGE检测表达结果, 以NTA亲和层析法(BBST)按照产品说明书收集目的蛋白, 12% SDS-PAGE分析纯度, 双紫外法测定蛋白浓度, -20 ℃保存备用.

1.2.2 免疫: 选择150日龄SPF来亨蛋鸡4只, 按每只蛋鸡300 μg蛋白量接种, 将纯化的重组FlaA和等量弗氏佐剂混合乳化, 分胸肌4点注射. 首次免疫采用弗氏完全佐剂乳化抗原, 第14天进行第2次免疫, 免疫佐剂为弗氏不完全佐剂, 第30天进行第3次免疫, 免疫方式同第2次. 第3次免疫结束后1 wk收集鸡蛋, 4 ℃保存备用.

1.2.3 FlaA IgY的分离提取: 采用硫酸铵法两步法纯化提取FlaA IgY. 将卵黄无菌分离后, 以1∶9的比例加入pH 5.0的醋酸-醋酸钠缓冲液, 搅拌20 min后4 ℃静置过夜. 10000 *g*离心20 min, 上清加入饱和硫酸铵至终浓度为40%, 静置6 h后离心, 10000 *g*离心20 min, 沉淀用PBS重悬, 加入饱和硫酸铵至终浓度为40%, 静置过夜后10000 *g*离心20 min, 沉淀用0.01 mol/L的PBS重悬后透析过夜, 经0.22 μm滤膜过滤除菌, 用双紫外法测定纯化的IgY浓度, 经SDS-PAGE检测IgY纯度, -20 ℃保存.

1.2.4 ELISA检测FlaA IgY的效价: 以方阵滴定法确定ELISA的最佳抗原包被浓度为10 μg/mL, 酶标二抗工作浓度为1∶3000. 将重组FlaA用包被液稀释至为10 μg/mL, 包被96孔酶标板. 4 ℃过夜后37 ℃封闭1 h, 依次加入稀释度为1∶800, 1∶1600, 1∶3200, 1∶6400, 1∶12800, 1∶25600, 1∶51200的IgY, 每个稀释度重复一组, 37 ℃温育1 h后加入1∶3000稀释的HRP-羊抗鸡IgY, 37 ℃温育1 h后TMB显色15 min. 阴性对照为未经免疫的鸡蛋提取的IgY, 酶标仪读取A_{450}, 检测样品A_{450}值/阴性对照A_{450}(P/N)大于2.1为阳性.

1.2.5 FlaA IgY特异性检测: 采用建立的间接ELISA方法检测重组FlaA IgY的特异性, 以肠胃中常见的乳酸杆菌、双歧杆菌、大肠杆菌以及*H. pylori*经0.4%甲醛灭活后与重组FlaA分别包被酶标板, 使得各组包被蛋白浓度为10 μg/mL, 将FlaA IgY以1∶500的稀释度稀释, 同时以未经免疫的IgY为对照, 采用1.2.4中的方法进行检测.

1.2.6 FlaA IgY体外抑菌实验: 调整新培养的*H. pylori*菌液浓度至10^8 CFU/mL. 取-20 ℃保存的已除菌的重组FlaA IgY, 重新测定浓度. 用无菌布氏肉汤将FlaA IgY稀释后按等体积比例加入*H. pylori*菌液, 使得FlaA IgY的终浓度为0.1、1、5 mg/mL. 将菌液和不同浓度的FlaA IgY混合均匀后按照*H. pylori*培养条件培养, 另以不加FlaA IgY为对照, 分别于1、2、4、6、12、24 h取1 mL培养液稀释至3 mL后测定培养液的A_{490}值, 并取10 μL培养液涂布培养. 对比分析各组结果.

统计学处理 计量资料采用mean±SD表示, 采用SPSS19.0统计学软件进行统计学处理组内的比较采用单因素方差分析, 组间比较采用独立样本*t*检验, $P<0.05$为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 FlaA融合蛋白的表达 构建的pET-32a-flaA-BL21(DE3)经0.4 mmol/L IPTG诱导4 h, 诱导结果采用12%SDS-PAGE检测. 电泳检测结果显示在相对分子量66 kDa处可见明显融合蛋白条带. 表达产物主要存在于超声破碎离心后的沉淀中(图1). 用NTA亲和层析法纯化目的蛋白, 经双紫外法测定的蛋白浓度为2.97 mg/mL.

2.2 FlaA IgY的制备和效价检测 将FlaA免疫蛋鸡, 经3次免疫后收集鸡蛋, 采用硫酸铵两步沉淀法制备IgY. 经双紫外法测定的IgY浓度为: 7.92 mg/mL. 12%SDS-PAGE检测IgY纯化效果. 结果如图2所示, 在66 kDa和30 kDa左右处可见蛋白带, 且无明显杂带, 纯化效果较好. 采用间接ELISA法以重组FlaA蛋白包被酶标板检测纯化后的FlaA IgY效价, 结果显示经3次免疫1 wk

■创新盘点
本文制备的FlaA IgY采用的*H. pylori*毒力因子FlaA存在于所有的*H. pylori*菌株中, 且具有高度保守性, 能对所有*H. pylori*分离株型作用.

表 1 FlaA IgY特异性检测

	包被抗原	乳酸杆菌	双歧杆菌	大肠杆菌	幽门螺杆菌	重组FlaA
A_{450}	FlaA IgY	0.113	0.102	0.107	1.283	1.289
	阴性IgY	0.087	0.073	0.085	0.083	0.074

IgY: 卵黄免疫球蛋白.

表 2 不同取样时间*H. pylori*处理菌液A_{490}值

FlaA IgY浓度 (mg/mL)	不同取样时间A_{490}值					
	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
0	0.096	0.144	0.161	0.254	0.336	0.539
0.1	0.042	0.053	0.073	0.080	0.140	0.324
1	0.020	0.035	0.051	0.078	0.075	0.077
5	0.006	0.013	0.013	0.015	0.012	0.014

H. pylori: 幽门螺杆菌; IgY: 卵黄免疫球蛋白.

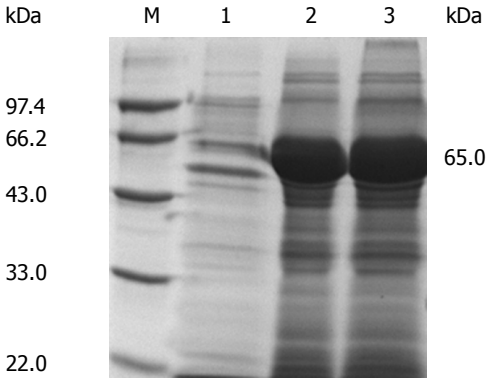


图 1 重组FlaA表达形式验证电泳图. M: 低分子量蛋白标准; 1: 表达产物超声破碎离心后上清; 2: 表达产物超声破碎离心后沉淀; 3: 未经超声破碎表达产物.

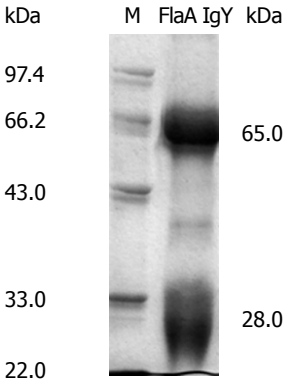


图 2 纯化FlaA IgY SDS-PAGE结果图. M: 低分子量蛋白标准; IgY: 卵黄免疫球蛋白.

后的FlaA IgY效价为1∶12800.

2.3 FlaA IgY特异性检测 以肠道中常见的细菌为检测对象, 检测FlaA IgY是否会与肠道中的其他细菌发生交叉反应, 以*H. pylori*全菌和重组的FlaA为对照, 参照建立的间接ELISA方法进行检测, 以阴性对照的A_{450}的平均值为0.080, 以P/N大于2.1计算, 当检测孔A_{450}值大于0.169时即判断为阳性. 结果显示只有*H. pylori*和重组蛋白FlaA的检测结果为阳性, 其余抗原检测结果均为阴性. 这表明FlaA IgY具有很好的特异性, 不会与肠道中的某些益生菌和中性菌发生交叉反应(表1).

2.4 FlaA IgY的体外抑菌实验 3组不同浓度FlaA IgY的抑菌结果如表2, 对抑菌结果进行分析可知, 与对照组相比, 经高、中、低3种浓度FlaA IgY 24 h处理后的*H. pylori*的菌液A_{490}值存在显著差异(0.324±0.033, 0.078±0.012, 0.014±0.003 *vs* 0.539±0.023, $P<0.01$), 结果表明所有浓度的FlaA IgY均能一定程度抑制*H. pylori*的生长, 且这种抑制作用随着FlaA IgY浓度的增加而加强. 对高、中、低3组不同浓度FlaA IgY处理组之间的抑菌结果进行分析显示, 1、5 mg/mL IgY抑菌效果与0.1 mg/mL IgY抑菌效果存在显著差异(0.078±0.012, 0.014±0.003 *vs* 0.324±0.033, $P<0.01$), 0.1 mg/mL和1 mg/mL浓度的FlaA IgY与对照相比虽然也具有一定的抑菌效果, 但不能完全抑制*H. pylori*的生长. 0.1 mg/mL IgY的抑菌作用主要表现在1-6 h之间, 此时菌液浓度变化较缓慢, 6 h后*H. pylori*菌液浓度急剧上升, 表明6 h后0.1 mg/mL IgY的抑菌作用基本丧失, 1 mg/mL的FlaA IgY处理后的*H. pylori*在6 h后生长较为缓慢, 5 mg/mL FlaA IgY组的*H. pylori*在

■应用要点
制备的FlaA IgY能有效的与FlaA菌毛蛋白结合，阻止*H. pylori*在细胞表面的黏附和定植，且对所有株型*H. pylori*均有作用，具有良好的应用前景.

表 3 不同取样时间*H. pylori*处理液培养菌落数 (CFU/mL)

IgY浓度(mg/mL)	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h
0	$>10^8$	$>10^8$	$>10^8$	$>10^8$	$>10^8$	$>10^8$
0.1	135	175	263	497	1897	32869
1	56	73	164	271	256	269
5	0	0	0	0	0	0

H. pylori: 幽门螺杆菌; IgY: 卵黄免疫球蛋白.

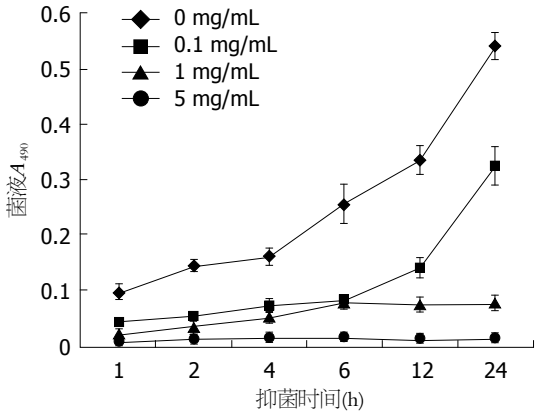


图 3 不同浓度FlaA IgY对幽门螺杆菌的抑菌结果.

1-24 h之间菌液浓度基本在较低水平不变(图3). 在各监测时间点采样进行菌落培养，结果显示当FlaA IgY浓度达到5 mg/mL时，能完全抑制*H. pylori*的生长，其在各时间段的采样培养*H. pylori*菌落数为0，对*H. pylori*的抑制作用能表现在整个实验过程中，而其他两个浓度组各时间段培养物均有若干菌落，这与菌液A_{490}检测结果相符(表3). FlaA IgY的抑菌实验结果表明FlaA IgY具有较高的抑菌活性，能明显抑制*H. pylori*的生长，其中5 mg/mL的FlaA IgY在24 h内对*H. pylori*的生长具有完全的抑制作用.

3 讨论

*H. pylori*的毒力因子主要包括细胞空泡毒素(vacuolating cytotoxin A, VacA)、细胞毒素相关蛋白(cytotoxin associated gene A, CagA)、黏附素、尿素酶、黏液酶、酯酶和凝脂酶、脂多糖、醇脱氢酶等7种[14]. 虽然所有的*H. pylori*都含有*VacA*基因，但只有50%的菌株能分泌有活性的细胞毒素，只有60%的*H. pylori*菌株含有*CagA*基因[15]. 尽管*H. pylori*的致病多样性机制尚未完全清楚，*H. pylori*的毒力因子也很多，但*H. pylori*必须首先定植于人胃黏膜才能进一步发挥作用，鞭毛在*H. pylori*的定植和移动中起重要作用，并存在于所有*H. pylori*中，对豚鼠模型胃黏膜*H. pylori*定植情况的研究表明，鞭毛不仅是*H. pylori*在胃黏膜中的定植因子，也是毒力因子，被认为是*H. pylori*得以在胃内存在并致病的重要因素之一[16]，与*H. pylori*的定植、持续感染、诱导炎症反应有关[17,18]. *FlaA*基因序列高度保守，与其他细菌鞭毛蛋白无抗原交叉，具有重要的致病性和免疫性[19]. IgY与哺乳动物初乳中的抗体一样，都是由母体产生，通过特殊机制从血液中转运而来，作为预防和治疗的药物，卵黄抗体具有较高的免疫活性，可直接与相应抗原产生快速免疫反应，作为一种天然蛋白，IgY在发挥作用后即可被机体作为营养物质分解吸收，不会残留有害物质，没有不良作用[20,21]. 目前已有众多关于抗*H. pylori* IgY研究的相关报道. Yang等[22]对全菌*H. pylori*免疫蛋鸡制备的特异性IgY的体外和体内特性研究结果表明，16 mg/mL的特异性IgY能彻底地抑制*H. pylori*的生长，以小鼠为模型的体内试验结果表明，采用200 mg/kg的IgY口服量可以使得*H. pylori*的根除率达到75%，且能有效地缓解小鼠胃部炎症. Shin等[23]的研究也证明了采用全菌制备的抗*H. pylori* IgY不仅能根除沙鼠胃部*H. pylori*感染，还能有效治疗由*H. pylori*感染导致的胃部炎症. Suzuki等[24]用抗HpU IgY对17例*H. pylori*阳性但未患病志愿者进行了口服治疗，经4 wk治疗后，接受治疗者的脲酶检测值显著下降，与抗酸剂联合使用能有效地缓解因*H. pylori*感染引发的胃炎. 此外还有采用重组方法获取*H. pylori*其他细胞毒力因子如VacA、中性粒细胞激活蛋白(neutrophil activating protein, Nap)等进行蛋鸡免疫制备特异性IgY[25,26]，其中一定浓度的VacA-IgY被证明能完全中和*H. pylori*菌体蛋白的Hela细胞毒活性[25]. 此外还有将2种*H. pylori*毒力因子经过分子生物学手段进行融合表达并以此制备相应的IgY，将其灌胃小鼠，结果表明了该IgY对小鼠的*H. pylori*感染具有一定的预防效果[27]. 但后续的

研究表明, 全菌*H. pylori*为抗原制备的IgY除了能特异的识别*H. pylori*外, 还能与人肠道其他菌群发生交叉反应, 采用*H. pylori*特异抗原免疫蛋鸡能获得特异性更强的*H. pylori* IgY[28], 采用CagA和VacA制备的IgY虽然具备特异性更强的优点, 但其只能针对$CagA^+$和$VacA^+$型*H. pylori*. *H. pylori*具有2种鞭毛蛋白, FlaA和FlaB, 其中以FlaA在*H. pylori*的黏附与定植中发挥主要作用[29]. 相较于FlaB, FlaA具有更强的免疫原性和免疫反应性[17], 此外FlaA保守性高, 对东西方*H. pylori*不同分离株的FlaA特征差异性进行比较结果显示, 东西方菌株间无明显特征性差异[30]. Yan等[31]采用重组的FlaA检测125例*H. pylori*感染患者血清中*H. pylori*抗体, 检出率可达98.04%, 用重组FlaA制备的兔抗血清对从98例确诊为*H. pylori*感染患者体内分离培养的*H. pylori*进行检测, 检出率为100%, 这也证明了FlaA是一种广泛的*H. pylori*特异性抗原, 重组FlaA具有良好的免疫原性. 本研究以重组的菌毛蛋白FlaA为抗原免疫蛋鸡获取卵黄免疫球蛋白, 经3次免疫后产生的抗体效价为1∶12800. 该抗体能与FlaA以及*H. pylori*全菌发生免疫结合反应, 表明了FlaA融合蛋白具有较好的免疫原性, 这与Yan等的报道相符[31]. 为研究重组FlaA IgY的特异性, 检测其是否与肠道中常见菌群存在交叉反应, 本实验以肠道中常见的乳酸杆菌、双歧杆菌以及大肠杆菌为包被抗原, 采用间接ELISA检测FlaA IgY是否能与肠胃中常见菌群特别是益生菌群发生交叉反应. 检测结果显示FlaA IgY特异性好, 不会与肠道中的益生菌群以及其他常见细菌发生交叉反应, 这表明当将FlaA IgY用于口服治疗时影响肠胃菌群生态可能性小.

为验证重组FlaA IgY的体外活性, 本研究将纯化的FlaA IgY除菌后按高、中、低3种浓度梯度与*H. pylori*混匀后培养, 检测在24 h内FlaA IgY对*H. pylori*的抑菌效果. 3种不同浓度的FlaA IgY均对*H. pylori*的生长具有一定的抑制作用, 在高浓度时能完全抑制*H. pylori*的生长, 在高剂量IgY处理组培养至12 h以后出现明显的菌体沉降现象, 而其余相应处理组无此现象产生. FlaA IgY作为一种针对*H. pylori*鞭毛蛋白的特异性抗体, 其对*H. pylori*的抑制作用主要通过与*H. pylori*菌毛蛋白发生特异性结合体现, 在体内主要表现为抑制*H. pylori*的定植和转移, 但在体外同样表现出对*H. pylori*生长的抑制作用, 原因可能是FlaA IgY特异的与*H. pylori*鞭毛蛋白结合, 除了能抑制其游动和定植外, 可能还会改变*H. pylori*外周蛋白的疏水性或空间构象, 导致*H. pylori*之间发生凝集沉降从而影响*H. pylori*的生长, 具体的抑制机制需要进一步的研究.

本研究结果表明重组FlaA具有较强的免疫原性, 制备的FlaA IgY除了与重组FlaA结合反应强烈外, 还与*H. pylori*全菌特异性结合. 该FlaA IgY特异性好, 不会与肠胃中乳酸杆菌和双歧杆菌以及大肠杆菌发生交叉反应. 当*H. pylori*浓度达到5 mg/mL时能完全抑制*H. pylori*的生长, 为将来FlaA IgY应用于口服时剂量选择提供了理论依据.

■名词解释
IgY: 一种禽类抗体, 与哺乳动物IgG相似, 主要从禽蛋中分离获取, 具有良好的生物活性.

4 参考文献

1 任建丽, 刘建. 幽门螺杆菌感染及相关性疾病的研究进展. 医学综述 2013; 19: 1253-1255

2 Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of Helicobacter pylori infections. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 321-331 [PMID: 18446147 DOI: 10.1038/ncpgasthep1138]

3 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781 [PMID: 17170018 DOI: 10.1136/gut.2006.101634]

4 Gisbert JP, Gisbert JL, Marcos S, Jimenez-Alonso I, Moreno-Otero R, Pajares JM. Empirical rescue therapy after Helicobacter pylori treatment failure: a 10-year single-centre study of 500 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 346-354 [PMID: 17999716 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03573.x]

5 欧碧云, 刘代华. 我国幽门螺旋杆菌抗生素耐药现状. 中国医药指南 2013; 7: 68-69

6 Marnila P, Rokka S, Rehnberg-Laiho L, Kärkkäinen P, Kosunen TU, Rautelin H, Hänninen ML, Syväoja EL, Korhonen H. Prevention and suppression of Helicobacter felis infection in mice using colostral preparation with specific antibodies. *Helicobacter* 2003; 8: 192-201 [PMID: 12752731 DOI: 10.1046/j.1523-5378.2003.00144.x]

7 Casswall TH, Nilsson HO, Björck L, Sjöstedt S, Xu L, Nord CK, Borén T, Wadström T, Hammarström L. Bovine anti-Helicobacter pylori antibodies for oral immunotherapy. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1380-1385 [PMID: 12523586 DOI: 10.1080/00365520 2762671242]

8 Ritter G. [Health status of men aged 18--60 in West Germany]. *Lebensversicher Med* 1977; 29: 66-72 [PMID: 17044]

9 梁韶辉. 幽门螺杆菌鞭毛素基因flaA、flaB的克隆、表达和其融合蛋白免疫反应性的研究. 浙江大学, 2003

10 Carlander D, Kollberg H, Wejåker PE, Larsson A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res* 2000; 21: 1-6 [PMID: 10803878 DOI: 10.1385/IR:21:1:1]

11 Tacket CO, Losonsky G, Link H, Hoang Y, Guesry P, Hilpert H, Levine MM. Protection by milk im-

■同行评价
本文制备了抗幽门螺杆菌菌毛蛋白FlaA IgY, 通过体外抑菌实验证明了其特异性及效果, 为治疗*H. pylori*口服药物的研发打下了基础. 选题较好, 有一定的应用前景. 实验设计合理, 分析较深入.

munoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic Escherichia coli. *N Engl J Med* 1988; 318: 1240-1243 [PMID: 3283555 DOI: 10.1056/NEJM198805123181904]
12 段琳, 赵文锋, 丁建坤, 吴梧桐, 刘景晶. 卵黄抗体开发现状及应用进展. 中国生化药物杂志 2010; 31: 212-215
13 宋维平, 徐福洲, 王金洛, 杨兵, 赖平安, 孟彦妮. 抗猪流行性腹泻病毒卵黄抗体治疗效果研究. 华北农学报 2003; 18: 114-115
14 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌致病因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 455-458
15 Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-99 [PMID: 8978347 DOI: 10.1016/S0016-5085(97)70223-3]
16 Ottemann KM, Lowenthal AC. Helicobacter pylori uses motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infect Immun* 2002; 70: 1984-1990 [PMID: 11895962 DOI: 10.1128/IAI.70.4.1984-1990.2002]
17 Eaton KA, Suerbaum S, Josenhans C, Krakowka S. Colonization of gnotobiotic piglets by Helicobacter pylori deficient in two flagellin genes. *Infect Immun* 1996; 64: 2445-2448 [PMID: 8698465]
18 Ohta-Tada U, Takagi A, Koga Y, Kamiya S, Miwa T. Flagellin gene diversity among Helicobacter pylori strains and IL-8 secretion from gastric epithelial cells. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 455-459 [PMID: 9175206 DOI: 10.3109/00365529709025080]
19 Ji WS, Hu JL, Qiu JW, Peng DR, Shi BL, Zhou SJ, Wu KC, Fan DM. Polymorphism of flagellin A gene in Helicobacter pylori. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 783-787 [PMID: 11854901]
20 范刚, 杨海民, 盛东风, 汪张贵. 禽卵黄抗体的应用与开发. 上海畜牧兽医通讯 2005; (1): 4-6
21 李艳, 江晓燕. 蛋黄抗体IgY在禽病预防中的应用. 国外畜牧学: 猪与禽 2008; (2): 31-33
22 Yang YH, Park D, Yang G, Lee SH, Bae DK, Kyung J, Kim D, Choi EK, Son JC, Hwang SY, Kim YB. Anti-Helicobacter pylori effects of IgY from egg york of immunized hens. *Lab Anim Res* 2012; 28: 55-60 [PMID: 22474475 DOI: 10.5625/lar.2012.28.1.55]
23 Shin JH, Yang M, Nam SW, Kim JT, Myung NH, Bang WG, Roe IH. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1061-1066 [PMID: 12204960 DOI: 10.1128/CDLI.9.5.1061-1066.2002]
24 Suzuki H, Nomura S, Masaoka T, Goshima H, Kamata N, Kodama Y, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-Helicobacter pylori-urease immunoglobulin Y on Helicobacter pylori infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 1: 185-192 [PMID: 15298626 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.02027.x]
25 毛小琴, 杨致邦, 张绍兰, 田一玲, 黄进. 幽门螺杆菌重组VacA蛋黄抗体的体外活性. 世界华人消化杂志 2006; 14: 789-794
26 邓颖, 杨致邦, 黄伟, 林珊珊, 黄进, 叶翠莲. 幽门螺杆菌重组中性粒细胞激活蛋白蛋黄抗体的制备. 世界华人消化杂志 2007; 15: 471-475
27 夏丽君, 杨致邦, 黄伟, 张任飞, 蒋任举, 蒋英. HpaA-VacA IgY对小鼠胃内感染幽门螺杆菌的预防作用. 中国生物制品学杂志 2011; 24: 34-40
28 Shin JH, Nam SW, Kim JT, Yoon JB, Bang WG, Roe IH. Identification of immunodominant Helicobacter pylori proteins with reactivity to H. pylori-specific egg-yolk immunoglobulin. *J Med Microbiol* 2003; 52: 217-222 [PMID: 12621086 DOI: 10.1099/jmm.0.04978-0]
29 Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the Helicobacter pylori and Helicobacter mustelae flaB flagellin genes and construction of H. pylori flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* 1993; 175: 3278-3288 [PMID: 8501031]
30 季万胜, 胡家露, 仇军文, 彭道荣, 丁杰, 吴开春, 樊代明. 东西方幽门螺杆菌鞭毛素A差异分析. 现代消化及介入诊疗 2002; 7: 38-41
31 Yan J, Liang SH, Mao YF, Li LW, Li SP. Construction of expression systems for flaA and flaB genes of Helicobacter pylori and determination of immunoreactivity and antigenicity of recombinant proteins. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2240-2250 [PMID: 14562386]

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1943-1952
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

MicroRNA-34a、Notch1在肝细胞癌组织中的表达及临床意义

于 泳, 李 霄, 周 亮, 窦科峰, 李小磊, 阮 柏, 张卓超, 戴 斌, 汪建林, 杨西胜, 王德盛

于泳, 李霄, 周亮, 窦科峰, 李小磊, 阮柏, 张卓超, 戴斌, 汪建林, 杨西胜, 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
于泳, 主治医师, 在读硕士, 主要从事肝胆胰脾疾病的基础与临床研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30872480
陕西省社会发展攻关基金资助项目, No. 2012SF2-09-1
中国人民解放军第四军医大学西京医院助推计划基金资助项目, No. XJZT11Y15
作者贡献分布: 此课题于泳、李霄、周亮、窦科峰及王德盛设计; 研究过程由于泳、李霄、周亮、李小磊、阮柏、张卓超、戴斌、汪建林及杨西胜完成; 此研究所提供用试剂及经费由王德盛提供; 数据分析由于泳、李霄及周亮完成; 本论文写作由于泳、李霄及周亮完成.
通讯作者: 王德盛, 教授, 710032, 陕西省西安市长乐西路127号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科.
wangdesh@163.com
电话: 029-84775260
收稿日期: 2014-02-21 修回日期: 2014-03-11
接受日期: 2014-04-14 在线出版日期: 2014-05-18

Clinical significance of expression of microRNA-34a and Notch1 in hepatocellular carcinoma

Yong Yu, Xiao Li, Liang Zhou, Ke-Feng Dou, Xiao-Lei Li, Bai Ruan, Zhuo-Chao Zhang, Bin Dai, Jian-Lin Wang, Xi-Sheng Yang, De-Sheng Wang

Yong Yu, Xiao Li, Liang Zhou, Ke-Feng Dou, Xiao-Lei Li, Bai Ruan, Zhuo-Chao Zhang, Bin Dai, Jian-Lin Wang, Xi-Sheng Yang, De-Sheng Wang, Department of Hepato-Biliary and Pancreato-Splenic Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872480; Shaanxi Science and Technology Research and Development Projects, No. 2012SF2-09-1; and Xijing Hospital Discipline Boosting Project, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, No. XJZT11Y15
Correspondence to: De-Sheng Wang, Professor, Department of Hepato-Biliary and Pancreato-Splenic Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, 127 Changle West Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. wangdesh@163.com
Received: 2014-02-21 Revised: 2014-03-11
Accepted: 2014-04-14 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To detect the expressions of microRNA-34a and Notch1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and to explore their relationships with HCC occurrence and development and the clinical and pathological features of HCC.

METHODS: Real-time RT-PCR and immunohistochemistry were used to detect the expression of microRNA-34a and Notch1 protein in 132 HCC tissues, matched tumor-adjacent tissues and 49 normal liver tissues, respectively.

RESULTS: The expression of microRNA-34a in HCC tissues were significantly lower than that in tumor-adjacent tissues (P = 0.003) and normal liver tissues (P < 0.001). The expression of microRNA-34a in HCC tissues with metastasis was significantly lower than that in HCC tissues without metastasis (P = 0.014). The expression of Notch1 was significantly higher in HCC tissues than in tumor-adjacent tissues (P = 0.001) and normal liver tissues (P < 0.001). The expression of Notch1 in HCC tissues with metastasis was significantly lower than that in HCC tissues without metastasis (P = 0.008). The expression of microRNA-34a was negatively correlated with that of Notch1 in HCC and tumor-adjacent tissues (r = -0.259, P = 0.003; r = -0.274, P = 0.002). The expression of microRNA-34a and Notch1 in HCC had no correlation with patient age, gender, liver cirrhosis, tumor site, viral hepatitis, or AFP (P > 0.05 for all), but was closely correlated with tumor malignancy, tumor size, lymph node metastasis, tumor number, infiltration depth, and TNM stage (P < 0.05 for all). The 3-year survival rate in the group with low expression of microRNA-34a and high expression of Notch1 (11.3%) was significantly lower than that in the group with high expression of microRNA-34a and low expression of Notch1 (34.7%)(χ^2 = 38.163, P = 0.011).

CONCLUSION: The expression of microRNA-34a is significantly down-regulated in HCC tissues, which may reversely regulate its target protein Notch1. Detecting the expression of microRNA-34a and Notch1 in HCC had a potential

■背景资料
MicroRNAs是一类内生的、长度约为18-25个核苷酸的小RNA, 具有多种重要的调节作用. 每个miRNA可以有多个靶基因, 在生物胚胎发育和肿瘤形成等生理或病理发展过程中发挥其重要作用. Notc信号系统在多种肿瘤中异常表达, 他与肿瘤的发生、发展过程也密切相关. 在肝癌中二者的共同表达和作用情况尚无报道, 故此项研究会对肝癌相关分子机制的进一步认识产生积极影响.

■同行评议者
李孟森, 教授, 海南医学院/海南省肿瘤发生和干预重点实验室

■研发前沿
MicroRNAs和Notch信号系统的表达与多种肿瘤密切相关，其中microRNA10b、-93、-122、-224、-337等在肝癌中均呈异常表达，与恶性肿瘤的生物学特征及患者生存周期存在着非常密切的联系，直接影响着疾病的转归. MicroRNA-34a和Notch1在恶性胶质瘤、膀胱癌、乳腺癌等恶性肿瘤中均呈低表达，与肿瘤的发生、发展、侵袭、转移相关

significance for diagnosis, therapy and prognosis of HCC.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Liver neoplasms; Hepatocellular carcinoma; Pericarcinomatous tissue; MicroRNA-34a; Notch 1; Survival analysis; Immunohistochemistry

Yu Y, Li X, Zhou L, Dou KF, Li XL, Ruan B, Zhang ZC, Dai B, Wang JL, Yang XS, Wang DS. Clinical significance of expression of microRNA-34a and Notch1 in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1943-1952 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1943.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1943

摘要

目的: 观察microRNA-34a、Notch1在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织的表达，探讨其与HCC发生、发展、临床病理特征的关系及可能的临床意义.

方法: 在132例HCC组织及癌旁组织、49例正常肝脏组织中应用实时荧光定量PCR法检测microRNA-34a的表达和免疫组织化学染色检测Notch1表达.

结果: HCC组织中microRNA-34a表达水平明显低于癌旁组织(2.57±0.71, P = 0.003)及正常肝组织(8.65±0.21, P<0.001)，在转移性癌组织中microRNA-34a表达水平明显低于非转移性癌组织(1.34±0.13, P = 0.014)，差异均有统计学意义. Notch1的免疫组织化学染色结果: HCC组织中Notch1表达水平明显高于癌旁组织(3.12±0.67, P = 0.001)及正常肝组织(4.65±0.14, P<0.001)，转移性癌组织高于非转移性癌组织(2.14±0.37, P = 0.008)，差异有统计学意义. MicroRNA-34a与Notch1在HCC及癌旁组织中均成负相关，相关系数分别为(r = -0.259, P = 0.003)、(r = -0.274, P = 0.002)，两者在HCC组织中的表达与患者年龄、性别、肝功能、肿瘤部位、是否合并肝硬变、是否伴随肝炎病毒感染及甲胎蛋白(α-fetoprotein, αFP或AFP)含量无相关性(P>0.05)，而与肿瘤恶性程度、肿瘤个数、肿瘤体积、淋巴结转移、浸润深度、TNM分期密切相关(P<0.05). Kaplan-Meier分析显示: microRNA-34a低表达、Notch1高表达组患者术后3年生存率(11.3%)，明显低于microRNA-34a高表达、Notch1低表达组(34.7%)，差异具有统计学意义(χ^2 = 38.163, P = 0.011).

结论: MicroRNA-34a在HCC组织中较癌旁和正常肝脏组织明显减低，其通过逆向调节靶蛋白Notch1参与肿瘤肿瘤恶性行为；检测microRNA-34a及Notch1在HCC组织中的表达情况，对HCC的临床诊断、治疗及预后判断有潜在的重要意义.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝脏肿瘤；肝细胞癌；癌旁组织；MicroRNA-34a; Notch1; 生存分析; 免疫组织化学

核心提示: 该文应用qRT-PCR法和SP法联合检测了肝癌、癌旁及正常肝脏组织显示肝癌中microRNA-34a表达减低，Notch1表达增高；两者在各组织中均呈负相关. 因此，MicroRNA-34a与Notch1的此种表达异常可能共同参与了肝癌细胞的恶性生物学行为，对临床肝癌的诊疗具有一定的参考价值.

于泳，李霄，周亮，窦科峰，李小磊，阮柏，张卓超，戴斌，汪建林，杨西胜，王德盛. MicroRNA-34a、Notch1在肝细胞癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1943-1952 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1943.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1943

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)简称肝癌，恶性程度极高，是全球发病率和死亡率均很高的肝脏恶性肿瘤，病死率在恶性肿瘤中居第2位[1]. 虽然该病的治疗方法日新月异，但总体预后仍然很差[2]. 究其原因，主要与肝癌的早期诊断方法及结果敏感性的局限，肝癌细胞在发展过程中易发生侵袭转移等相关. 所以目前许多研究热点关注于肝癌的早期诊断及如何针对其侵袭转移进行治疗.

随着对肝癌发生发展分子机制的深入研究[3-5]，发现microRNAs可以引起靶基因的翻译抑制和直接降解，从转录后水平调控各种癌基因和抑癌基因的表达，在肿瘤进程中发挥着重要作用. 有研究表明microRNA-34a与多种肿瘤的发生、发展密切相关，如恶性胶质瘤[6]、成神经管细胞瘤[7]、儿童神经母细胞瘤[8]、前列腺癌[9]、膀胱癌[10]、结直肠癌[11,12]、骨肉瘤[13]、宫颈癌[14]、绒毛膜癌[14]、胰腺癌[15]、非小细胞型肺癌[16]和肝癌[17].

Notch信号通路广泛存在于多种组织细胞中，影响细胞分化、发育及凋亡，*Notch1*基因是Notch家族中4个同源体之一，与人类肿瘤的发

生、发展相关. 近几年的研究显示其与肿瘤的发生、发展过程也密切相关. 有研究[18]发现在肝癌中Notch1受体也呈现高表达, 并参与了肝癌细胞的侵袭迁移过程, 这说明Notch信号通路在肝癌的发生、发展过程中也起到了重要的作用.

研究[19,20]发现在一些肿瘤中, microRNA-34a可抑制包括*Notch1*在内的多种基因, 发挥抑癌作用. 迄今为止, 关于肝癌组织中两者之间的关系知之甚少. 本研究通过对microRNA-34a与Notch1在肝癌组织、癌旁正常组织与正常肝组织中共表达的差异进行检测, 初步探讨了两者在肝癌中的相互关系.

1 材料和方法

1.1 材料 132组HCC组织标本取自2010-01/2010-12在我院行手术切除的HCC组织及癌旁组织(规定距癌组织5 cm以上), 49例正常肝组织取自在此期间行肝脏良性肿瘤手术切除的正常活检肝组织, 所有标本均分别保存于液氮(50%体积)及40 g/L甲醛固定(50%体积), 后常规石蜡包埋, 切片保存. 肝癌患者: 男性70例, 女性62例; 中位年龄50.3岁, 所有标本均经术后病理证实, 术前均未接受抗肿瘤治疗. 试验经第四军医大学西京医院伦理委员会批准, 严格遵照《赫尔辛斯基宣言》医学伦理道德准则实施, 与所有患者或家属进行充分沟通并签署试验知情同意书. 肿瘤长径≤5.0 cm 52例, 直径>5.0 cm 80例. 肿瘤按TNM分期[2003-01-01, 美国癌症联合会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)/国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC), 第6版]: Ⅰ期30例, Ⅱ期19例, Ⅲ期51例, Ⅳ期32例. 低分化59例, 中分化44例, 高分化29例. 伴远处转移68例, 卫星灶69例. 抗人Notch1单克隆抗体和二抗试剂盒购自Abcam公司. SP试剂盒和浓缩型DAB试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司. U6内参引物(U6-forward 5'-CGCTTCGGCAGCACATATACTA-3', U6-reverse 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3')、microRNA-34a引物由德国QIAGEN公司合成. miRNeasy Mini Kit(50)提取试剂盒、miscript Primer Assays引物试剂盒、miscript ⅡRT(50)反转录试剂盒和miscript SYBR Green PCR kit(200)定量试剂盒购自QIAGEN公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测: 组织经4%甲醛溶液固定; 石蜡包埋后按照5 μm厚度常规切片; 切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化; 后进行抗原修复、封闭内源性过氧化物酶及正常山羊血清封闭抗原; 依据试剂说明滴加稀释后兔抗人Notch1单克隆抗体4 ℃冰箱过夜; 湿盒室温复温1 h后滴加生物素标记二抗, 37 ℃孵育30 min; PBS冲洗后DAB显色; 苏木紫衬染; 重新脱水透明; 封片; 显微镜下观察.

1.2.2 实时荧光定量PCR: MicroRNA-34a提取: 无菌层流实验室分别取液氮保存的HCC、癌旁、正常肝组织块约0.3 cm^3于研钵中加液氮充分研磨至极细粉末, 转入1.5 mL离心管, 加入700 μL QIAzollysisreagent封盖混匀, 室温匀浆5 min, 加140 μL氯仿震荡15 s后室温静置3 min, 4 ℃ 12000 *g*离心15 min, 转上清液至新1.5 mL离心管, 加525 μL 100%乙醇混匀, 取700 μL混匀液至过滤柱上管, 室温封盖≥8000 *g*离心15 s弃去滤过液并重复此步, 依次加入RWT缓冲液、RPE缓冲液室温封盖≥8000 *g*离心15 s均弃去滤过液, 加RPE缓冲液室温下封盖≥8000 *g*离心15 s弃去滤过液, 重复并离心后将过滤柱上管转移至新的收集管室温封盖≥8000 *g*离心1 min再次甩干, 将过滤柱上管转移至新的1.5 mL离心管加RNase-free water室温封盖≥8000 *g*离心洗脱3 min后保留下方滤过液并重复. 反转录: 在冰盒中依次加入各反转录试剂及指定量的HCC、癌旁、正常肝样本至各0.2 mL离心管, 完成20 μL反转录体系并实施. qRT-PCR: 在2套8联管中依次加入各试剂和引物完成25 μL体系, 室温下封盖1000 *g*离心1 min去气泡, 设定IQ5型定量PCR仪(BIA- RAD公司)程序为: 变性: 95 ℃ 15 min; 40个循环: 94 ℃ 15 s; 复性: 55 ℃ 30 s; 新链DNA合成: 70 ℃ 30 s. Notch1的检测步骤同理. 在扩增待测miRNAs的同时, 我们还扩增了U6-RNA作为内参对照.

1.2.3 结果判定标准: (1)免疫组织化学染色: 以出现淡黄-棕褐色颗粒作为阳性结果, 由2名副高级职称病理医师进行独立双盲评分. 每张病理切片随机选取5个10×40倍光学显微镜视野, 将Notch1的染色范围及染色强度依据以下标准半定量化, 结果取平均值. 标准如下: A: 染色范围: 染色阳性细胞数占总细胞数的比率按≤5%、6%-25%、26%-50%、51%-75%、≥76%分别记为0、1、2、3、4分; B染色强度: 按照未染色、淡黄色、棕色、棕褐色分别记为0、1、2、3.

■相关报道

在浸润性膀胱癌细胞系中miR-34a可与Notch1结合, 靶向抑制*Notch1*基因表达, 从而导致Notch1信号通路活化, 异常活化的Notch1信号通路可与多个信号通路相互作用, 影响浸润性膀胱癌细胞系的增殖、迁移等生物学行为.

■创新盘点
本文拟通过试验提出在肝癌的中microRNA-34a呈现低表达, Notch1呈现高表达, 他们可能在肿瘤的发生、发展过程中起到了逆向协同作用. 两者可能成为肝癌新的分子标志物.

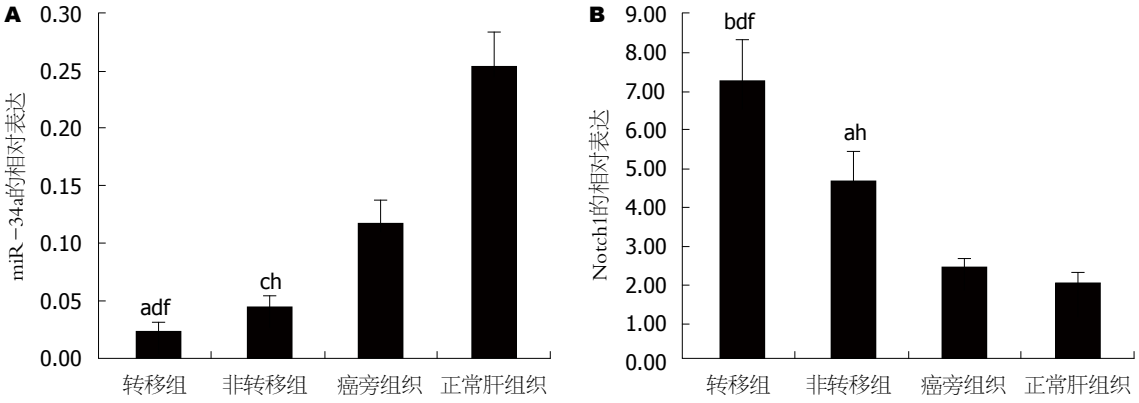


图 1 MicroRNA-34a、Notch1在肝细胞肝癌、癌旁、正常肝脏组织中的表达. A: MicroRNA-34a在各组织中的表达. $^{a}P<0.05$ *vs* 非转移组; $^{d}P<0.01$, $^{c}P<0.05$ *vs* 癌旁组织; $^{f}P<0.01$, $^{b}P<0.01$ *vs* 正常肝组织; B: Notch1在各组织中的表达. $^{b}P<0.01$ *vs* 非转移组; $^{a}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 癌旁组织; $^{f}P<0.01$, $^{b}P<0.01$ *vs* 正常肝组织.

将染色范围与染色强度计分相乘得出结果: 0分为阴性, 1-4分为弱阳性, 5-8分为阳性, 9-12分为强阳性. 不同Notch1表达的HCC组织分成两组: 0-4分: 低表达组, 5-12分: 高表达组; (2)实时荧光定量PCR: MicroRNA-34a与U6-RNA表达水平通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法确定, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miRNA}-Ct_{U6RNA})$待测样品$-(Ct_{miRNA}-Ct_{U6RNA})$对照组. 对照组为相应的癌旁组织, 并经病理学证实, 实时PCR反应结果为3次独立实验的校正结果.

1.2.4 随访: 所有患者术后进行3年定期随访, 开始时间为接受手术的时间, 截止日期为2013-12-31. 采用门诊随访及电话随访, 平均1次/3 mo. 规定死亡患者死亡时间为终止时间. 中途失访7例, 终止时间为最后一次随访时间, 亦纳入生存分析.

统计学处理 采用SPSS19.0 统计软件进行统计学分析, 采用Pearson χ^2检验计算microRNA-34a、Notch1的表达与不同临床病理特征的关系; 按照试验小组的原始设计及研究目的选取microRNA-34a低表达、Notch1高表达以及microRNA-34a高表达、Notch1低表达组为研究对象, Spearman's相关性分析microRNA-34a与Notch1的关系; 运用Kaplan-Meier法进行生存分析, Log-rank检验分析曲线有无统计学差异. 可信区间为95%, $P<0.05$为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 microRNA-34a表达情况

2.1.1 microRNA-34a的qRT-PCR表达: microRNA-34a与U6-RNA在反应体系中均有效扩增, 依据CT值间的比较, 通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分别计算每个被检HCC组织样品中microRNA-34a相对癌旁组织及正常肝脏组织的表达变化比率. 对所得到的每一变化比率取平均值(n = 132), 用以评估microRNA-34a在HCC中的变化. 我们发现HCC组织中转移组的microRNA-34a表达水平低于非转移组(P = 0.014), 癌旁组织(P = 0.003)及正常肝组织($P<0.001$); 非转移组的microRNA-34a表达水平低于癌旁组织(P = 0.017)及正常肝组织($P<0.001$), 差异均有统计学意义(图1A).

2.1.2 microRNA-34a与临床病理指标: microRNA-34a在HCC组织中的表达与患者年龄、性别、肝功能、肿瘤部位、肿瘤体积、是否合并肝硬变及是否伴随肝炎病毒感染及AFP含量无统计学意义($P>0.05$), 而与肿瘤数量、肿瘤分化等级、转移情况、静脉侵袭、卫星状损害及TNM分期有统计学意义($P<0.05$), 并且随着HCC病理分级的增高而减低($P<0.05$)(表1).

2.2 Notch1表达情况

2.2.1 Notch1的qRT-PCR及免疫组织化学染色结果: qRT-PCR结果显示HCC组织中转移组的Notch1表达水平高于非转移组(P = 0.008), 癌旁组织(P = 0.001)及正常肝组织($P<0.001$), 非转移组的Notch1表达水平高于癌旁组织(P = 0.011)及正常肝组织(P = 0.006), 差异均有统计学意义(图1B). 免疫组织化学染色结果显示Notch1阳性染色主要存在于细胞膜中, 呈棕色、棕黄色颗粒样, 细胞浆中仅有少量表达. 在132例HCC组织中, 26例(19.70%)阴性表达(图2A), 34例(25.76%)弱阳性表达(图2B), 37例(28.02%)中等阳性表达(图2C), 35例(26.52%)强阳性表达(图2D); 染色结果低表达者60例(45.45%), 高表达者72例(54.55%). Notch1在癌旁组织及正常肝组织中, 35例(26.52%)染色显示为弱阳性, 其余均为阴性, 且染色结果均为低表达.

2.2.2 Notch1与临床病理指标: Notch1在HCC组织中的表达与患者年龄、性别、肝功能、肿

表 1 MicroRNA-34a在肝细胞癌组织表达与临床病理特征的关系 *n*(%)

临床病理因素	*n*	MicroRNA-34a		*P*值	χ^2
		低表达	高表达		
性别				0.222	1.494
男性	70	39(55.71)	31(44.29)		
女性	62	41(66.13)	21(33.87)		
年龄(岁)				0.398	0.715
≤50	60	34(56.67)	26(43.33)		
>50	72	46(63.89)	26(36.11)		
肝功能(Child-Pugh分级)				0.422	0.644
A级	73	41(56.20)	32(43.80)		
B级+C级	59	29(49.15)	30(50.85)		
合并肝硬变				0.601	0.274
是	75	44(58.67)	31(41.33)		
否	57	36(63.16)	21(36.84)		
肝炎病毒感染				0.468	0.526
是	71	41(58.57)	30(41.43)		
否	61	39(63.93)	22(36.07)		
肿瘤部位				0.517	0.420
左肝	63	40(63.49)	23(46.51)		
右肝	69	40(57.97)	29(42.03)		
肿瘤数量				0.029	0.864
单发	84	53(63.10)	31(36.90)		
多发	48	31(64.60)	17(35.40)		
肿瘤体积(cm)				0.014	6.009
≤5	52	25(48.10)	27(51.90)		
>5	80	54(67.50)	26(32.50)		
肿瘤等级(分化)				0.005	7.977
高分化	29	13(44.83)	16(55.17)		
中或低度分化	103	75(72.80)	28(27.20)		
转移				0.039	4.256
是	68	47(69.12)	21(30.88)		
否	64	33(51.56)	31(48.44)		
静脉侵袭				0.002	9.369
+	70	51(72.86)	19(27.14)		
−	62	29(46.77)	33(53.23)		
卫星灶损害				0.010	6.560
+	69	49(72.01)	20(27.99)		
−	63	31(49.21)	32(50.79)		
TNM分期				0.005	8.054
Ⅰ+Ⅱ	49	22(44.90)	27(54.10)		
Ⅲ+Ⅳ	83	58(69.88)	25(30.12)		
AFP(ng/mL)				0.944	0.005
≤400	33	21(63.64)	12(36.36)		
>400	99	68(68.69)	40(31.31)		

AFP: 甲胎蛋白.

■应用要点

应用分子生物学相关技术可靠检测肝癌中microRNA-34a和Notch1的共同表达情况, 以后有望可以成为常规的临床肿瘤检测手段, 使其成为早期诊断标志物、潜在的治疗靶点及预后预测因子.

瘤部位、肿瘤体积、是否合并肝硬变及是否伴随肝炎病毒感染及AFP含量无统计学意义(P>0.05), 而与肿瘤数量、肿瘤分化等级、转移情况、静脉侵袭、卫星状损害及TNM分期有统计学意义(P<0.05), 并且随着HCC病理分级的增高而增高(P<0.05)(表2).

2.3 microRNA-34a与Notch1关系 应用qRT-PCR、免疫组织化学染色方法检测HCC及癌旁

■同行评价
本文通过严格的试验设计、合理的试验方法、科学的检测手段, 联合检测了microRNA-34a和Notch1两种分子, 较之日常检测某一种肿瘤相关分子, 获得了更加丰富的试验数据, 结论分析可靠, 理论推理充分, 具有较好的基础研究特点, 对临床开展肿瘤防治工作可以产生一定的指导性意义.

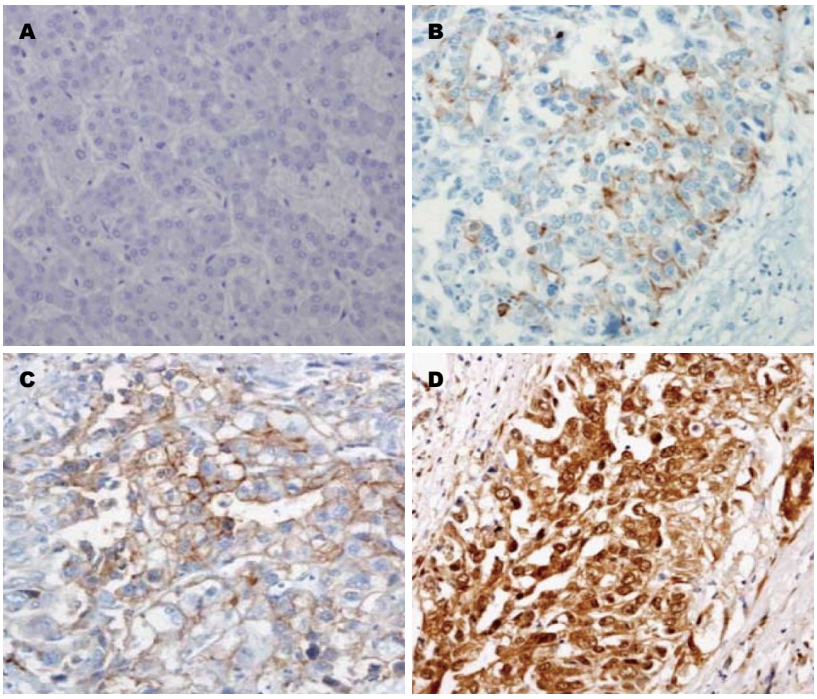


图 2 肝细胞癌组织中Notch1免疫组织化学染色(×400). A: Notch1阴性; B: Notch1弱阳性; C: Notch1阳性; D: Notch1强阳性.

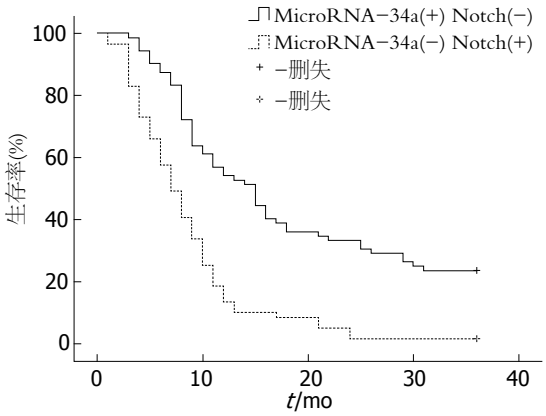


图 3 MicroRNA-34a、Notch1不同表达和生存时间t的关系(Kaplan-Meier线).

组织标本中microRNA-34a、Notch1, 如文献报道我们将Notch1评分值5作为分界值将患者分成两组, 其中Notch1值低患者26例(19.7%), 较高患者106例(80.3%). 分析发现microRNA-34a与Notch1在HCC及癌旁组织中均成负相关, 相关系数分别为-0.259(P = 0.003)、-0.274(P = 0.002)(表3, 4).

2.4 生存分析 入组患者的随访时间1-36 mo, 平均随访时间17 mo, 中位随访时间10.2 mo. 对132例肝癌患者的生存资料进行Kaplan-Meier分析显示: microRNA-34a低表达、Notch1高表达者3年生存率为11.3%, 平均生存时间为9.7 mo, 中位生存时间为7.4 mo; microRNA-34a高表达、Notch1低表达者3年生存率为34.7%, 平均生存时间为19.4 mo, 中位生存时间为13.7 mo. microRNA-34a低表达、Notch1高表达者生存时间较后者明显降低, 差异具有统计学意义(χ^2 = 38.163, P = 0.011)(图3).

3 讨论

HCC是成年人常见恶性肿瘤, 恶性程度高, 极易转移和复发, 预后一直较差[21], 诊断后存活率常少于1年. 虽然随着手术(包括同种异体肝脏移植术)技术的日新月异、现代高清影像技术的普遍推广[22]和非手术治疗方式的广泛认可与普及, 其治疗效果已明显改善, 但均未能达到医患双方预期的疗效. 现临床上多依靠肿瘤分化程度、TNM分期、是否转移等病理指标进行预后判断及实施后续治疗. 同时, 以AFP、组织多肽抗原(tissue polypeptide antigen, TPA)、α-L-岩藻糖苷酶(α-L-fucosidase, AFU)为代表的肿瘤标志物所进行的早期诊断亦不能十分准确, 对预后判断存在局限性[23]. 目前暂未发现满足临床需求的敏感、特异、简便、易测的HCC标志物. 因此, 在分子水平寻求HCC的标志物, 以预测患者预后、指导临床治疗的指标业已成为目前医学科学研究的热点.

mRNA基因大多位于染色体某些脆性位点或杂合子缺失区域, 可以参与细胞的增殖、分化及凋亡的调节, 与肿瘤、银屑病和糖尿病等疾病的发生、发展密切相关[24,25], 但具体作用机制不明. 其中, 作为p53的直接转录靶标,

表 2 Notch1在132例肝细胞肝癌组织表达与临床病理特征的关系 *n*(%)

临床病理因素	*n*	Notch1		*P*值	χ^2
		低表达(0-4分)	高表达(5-12分)		
性别				0.210	1.572
男性	70	33(47.10)	37(52.90)		
女性	62	36(58.10)	26(41.90)		
年龄(岁)				0.055	3.682
≤50	60	31(51.70)	29(48.30)		
>50	72	49(68.10)	23(31.90)		
肝功能(Child-Pugh分级)				0.124	2.370
A级	73	48(65.80)	25(34.20)		
B级+C级	59	31(52.50)	28(47.50)		
合并肝硬变				0.214	1.543
是	75	39(52.00)	36(48.00)		
否	57	37(62.70)	22(37.30)		
肝炎病毒感染				0.748	0.104
是	71	45(63.40)	26(36.60)		
否	61	37(60.70)	24(39.30)		
肿瘤部位				0.899	0.016
左肝	63	34(54.00)	29(46.00)		
右肝	69	38(55.10)	31(44.90)		
肿瘤数量				0.029	0.864
单发	84	53(63.10)	31(36.90)		
多发	48	31(64.60)	17(35.40)		
肿瘤体积(cm)				0.002	9.265
≤5	52	36(69.20)	16(30.80)		
>5	80	33(41.25)	47(58.75)		
肿瘤等级(分化)				0.000	18.876
高分化	29	23(79.30)	6(20.70)		
中或低度分化	103	35(34.00)	68(66.00)		
转移				0.001	11.565
是	68	39(57.40)	29(42.60)		
否	64	54(84.40)	10(15.60)		
静脉侵袭				0.009	6.894
+	70	39(55.70)	31(44.30)		
-	62	48(77.40)	14(22.60)		
卫星灶损害				0.043	4.111
+	69	45(65.20)	24(34.80)		
-	63	51(81.00)	12(19.00)		
TNM 分期				0.009	6.854
Ⅰ+Ⅱ	49	25(51.00)	24(49.00)		
Ⅲ+Ⅳ	83	61(73.50)	22(26.50)		
AFP (ng/mL)				0.686	0.163
≤400	33	19(57.60)	14(42.40)		
>400	99	53(53.50)	46(46.50)		

AFP: 甲胎蛋白.

microRNA-34a可下调多种细胞周期相关基因[26], 具有调节细胞周期、抑制细胞生长等作用[13]. 在人类多种肿瘤中microRNA-34a表达异常, 如胰腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌中microRNA-34a表达缺失或低表达, 与肿瘤的发生、发展、侵袭、转移等生物功能密切相关, 发挥着癌基因或抑癌基因的作用. Pang等[14]发现非小细胞型肺癌组织中miR-34家族的高表达降低了肿瘤的

表 3 肝细胞肝癌组织中MicroRNA-34a与Notch1的关系 (n)

变量	MicroRNA-34a		P值	r值
	高表达	低表达		
Notch1			0.003	−0.259
高表达	32	74		
低表达	16	10		

表 4 癌旁组织中MicroRNA-34a与Notch1的关系 (n)

变量	MicroRNA-34a		P值	r值
	高表达	低表达		
Notch1			0.002	−0.274
高表达	9	18		
低表达	70	35		

发生, miR-34基因表达恢复能抑制非小细胞型肺癌细胞生长. Welch等[8]研究发现microRNA-34a基因经常在儿童神经母细胞瘤中缺失, 试验提高microRNA-34a表达能抑制肿瘤细胞增殖, 同时激活细胞凋亡途径. 我们的试验同样显示HCC组织中microRNA-34a表达水平明显低于癌旁组织及正常肝组织, 转移性癌组织低于非转移性癌组织; 同时其表达与肿瘤数量、肿瘤分化等级、转移情况、静脉侵袭、卫星状损害及TNM分期相关, 随着HCC病理分级的增高而减低, 提示microRNA-34a可能在肝癌的发生、发展中起到了抑制作用.

Notch是在进化过程中结构具有高度保守性的一种生物信号通路, 在诸如正常细胞的分化、发育、增殖、凋亡、黏附, 及恶性肿瘤细胞的侵袭、迁移、血管形成、致癌作用等方面都起着重要的调节作用, 保持细胞增殖、分化和凋亡之间的动态平衡. 失控的Notch信号与肿瘤细胞的生长相关, 异常活化Notch信号可促使正常细胞向恶性转化. Notch信号在多数情况下作为癌基因促进肿瘤生长, 我们实验室前期的研究[27]表明高表达的Notch1与HCC进展及患者预后不良是密切相关的. 已有试验研究[28,29]显示Notch1通过调节Snail蛋白(snail protein, Snail)、E-钙黏连蛋白(E-cadherin, EC)、金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 进而影响HCC细胞的侵袭和迁移能力. 同时, 这些试验证据也支持了在HCC细胞中下调Notch1, 肿瘤细胞的侵袭和迁移能力被抑制的事实. 我们试验中同样表现出相似结果, HCC组织中Notch1表达水平明显高于癌旁组织及正常肝组织, 转移性癌组织高于非转移性癌组织. 提示Notch1可能在肝癌的发生、发展中起到了促进作用.

但是这两者在肝癌中又是怎样的关系尚需进一步研究. 既往研究提示在前列腺癌中microRNA-34a几乎均为低表达, 同时引起有助于前列腺癌发展和增殖的Notch1上调. 引入过表达microRNA-34a可以导致Notch1表达降低, 同时显著地抑制了前列腺癌细胞系的生长和自我更新能力[30]. 所以, 在前列腺癌中Notch1是microRNA-34a的直接靶标, 并且microRNA-34a表达减低与前列腺癌袭能力是相关的. Ji等[31]对于胰腺癌的研究表明: microRNA-34a通过直接调控下游靶标Notch1/2, 参与了胰腺癌干细胞的自我更新和凋亡, 试验恢复microRNA-34a表达水平, 有望成为缺失或低表达p53-miR34的胰腺癌患者新的治疗方法. 为探讨microRNA-34a与Notch1在肝癌中的关系, 我们分析了所得结果, 发现microRNA-34a与North1在HCC及癌旁组织中均成负相关, 生存分析显示microRNA-34a低表达、Notch1高表达者生存时间较microRNA-34a高表达、Notch1低表达者明显降低, 与上述试验结论是非常吻合的. 所以, 我们认为Notch1可能是microRNA-34a的下游靶标, microRNA-34a可能通过抑制Notch1的表达来抑制肝癌的发生和发展过程. 但尚需通过体外实验进一步验证, Notch1是否直接受microRNA-34a的调控.

总之, microRNA-34a和Notch1在HCC组织中表达情况及其与临床病理特征、预后的关系提示两者可能同时影响着HCC的发生、发展过程, 并且microRNA-34a与Notch1呈现出负相关的调控作用. 因此, microRNA-34a、Notch1也可能成为HCC早期诊断的分子标志物、潜在的治疗靶点及预后预测因子, 但是关于两者在肝癌中具体的作用机制尚待进一步研究.

志谢: 中国人民解放军第四军医大学附属西京医院肝胆胰脾外科实验室的张福琴老师、李侠老师及细胞工程研究中心李郁副教授对于本研究课题和试验小组的技术支持及倾力帮助.

4 参考文献

1 彭承宏. 肝细胞癌早期诊断的研究热点与进展. 中华普通外科杂志 2012; 27: 89-91

2 许秀华, 向晓星. 肝细胞癌的病因及发病机制研究进

展. 医学综述 2013; 19: 832-834
3 汪福昌, 郭武华. 肝细胞癌生物标志物研究进展. 山东医药 2012; 52: 87-89
4 Huang YS, Dai Y, Yu XF, Bao SY, Yin YB, Tang M, Hu CX. Microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues without viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 87-94 [PMID: 18171346 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05223.x]
5 Midorikawa Y, Makuuchi M, Tang W, Aburatani H. Microarray-based analysis for hepatocellular carcinoma: from gene expression profiling to new challenges. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1487-1492 [PMID: 17461438]
6 Marnila P, Rokka S, Rehnberg-Laiho L, Kärkkäinen P, Kosunen TU, Rautelin H, Hänninen ML, Syväoja EL, Korhonen H. Prevention and suppression of Helicobacter felis infection in mice using colostral preparation with specific antibodies. *Helicobacter* 2003; 8: 192-201 [PMID: 12752731 DOI: 10.1046/j.1523-5378.2003.00144.x]
7 Guessous F, Zhang Y, Kofman A, Catania A, Li Y, Schiff D, Purow B, Abounader R. microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle* 2010; 9: 1031-1036 [PMID: 20190569 DOI: 10.4161/cc.9.6.10987]
8 Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2007; 26: 5017-5022 [PMID: 17297439 DOI: 10.1038/sj.onc.1210293]
9 赵春娟, 翟庆娜, 余振东, 王俊豪, 周亮. microRNA-34a在前列腺癌血清中的表达意义. 中国男科学杂志 2011; 25: 6-9
10 姚志勇, 张超, 马鑫, 朱鸣阳, 张瑜, 史涛平, 司马晋, 艾青, 刘尚文, 黄庆波, 杨素霞, 张旭. microRNA-34a靶向抑制Notch-1基因对膀胱癌J82细胞增殖和迁移的影响. 中华泌尿外科杂志 2012; 33: 210-214
11 田智丹, 任勇亚, 戚晓红, 冯振卿. microRNA-34a在结直肠癌中的表达及其临床意义. 临床与实验病理学杂志 2011; 27: 347-350
12 Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15472-15477 [PMID: 17875987 DOI: 10.1073/pnas.0707351104]
13 Yan K, Gao J, Yang T, Ma Q, Qiu X, Fan Q, Ma B. MicroRNA-34a inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells both in vitro and in vivo. *PLoS One* 2012; 7: e33778 [PMID: 22457788 DOI: 10.1371/journal.pone.0033778]
14 Pang RT, Leung CO, Ye TM, Liu W, Chiu PC, Lam KK, Lee KF, Yeung WS. MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 2010; 31: 1037-1044 [PMID: 20351093 DOI: 10.1093/carcin/bgq066]
15 Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26: 745-752 [PMID: 17540599 DOI: 10.1016/j.molcel.2007.05.010]
16 Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR, Fearon ER. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 2007; 17: 1298-1307 [PMID: 17656095 DOI: 10.1016/j.cub.2007.06.068]
17 Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2005; 10: 43-52 [PMID: 15691314 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2005.00290.x]
18 张勇, 王德盛, 周亮, 孙伟, 王建锋, 韩炜, 苟泽鹏, 祝普利. Notch1在肝细胞癌组织中的表达情况及其临床意义. 中华消化外科杂志 2013; 12: 378-382
19 张超, 姚志勇, 朱鸣阳, 史涛坪, 司马晋, 马鑫, 李宏召, 张瑜, 张旭. MicroRNA-34a通过Notch1对膀胱肿瘤细胞株T24增殖的影响. 解放军医学杂志 2012; 37: 426-430
20 Yu X, Zhang W, Ning Q, Luo X. MicroRNA-34a inhibits human brain glioma cell growth by downregulation of Notch1. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2012; 32: 370-374 [PMID: 22684560 DOI: 10.1007/s11596-012-0064-0]
21 Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2012; 379: 1245-1255 [PMID: 22353262 DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61347-0]
22 邱双健. 肝细胞癌的分子诊断和治疗. 肝脏 2012; 17: 651-655
23 Li P, Wang SS, Liu H, Li N, McNutt MA, Li G, Ding HG. Elevated serum alpha fetoprotein levels promote pathological progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4563-4571 [PMID: 22147961 DOI: 10.3748/wjg.v17.i41.4563]
24 Li W, Lebrun DG, Li M. The expression and functions of microRNAs in pancreatic adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Chin J Cancer* 2011; 30: 540-550 [PMID: 21801602 DOI: 10.5732/cjc.011.10197]
25 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-1801 [PMID: 16251535 DOI: 10.1056/NEJMoa050995]
26 王苟思义, 袁贤瑞, 蒋星军. 新型microRNA-miR-34在肿瘤中的研究进展. 生命科学 2009; 21: 418-424
27 Zhou L, Zhang N, Li QJ, Sun W, Zhang Y, Wang DS, Dou KF. Associations between high levels of Notch1 expression and high invasion and poor overall survival in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2013; 34: 543-553 [PMID: 23179396]
28 Zhou L, Wang DS, Li QJ, Sun W, Zhang Y, Dou KF. The down-regulation of Notch1 inhibits the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by inactivating the cyclooxygenase-2/Snail/E-cadherin pathway in vitro. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 1016-1025 [PMID: 23053901 DOI: 10.1007/s10620-012-2434-7]
29 Zhou L, Wang DS, Li QJ, Sun W, Zhang Y, Dou KF. Downregulation of the Notch signaling pathway inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by inactivation of matrix metalloproteinase-2 and -9 and vascular endothelial growth factor. *Oncol Rep* 2012; 28: 874-882 [PMID: 22736202 DOI: 10.3892/or.2012.1880]

30 Kashat M, Azzouz L, Sarkar SH, Kong D, Li Y, Sarkar FH. Inactivation of AR and Notch-1 signaling by miR-34a attenuates prostate cancer aggressiveness. *Am J Transl Res* 2012; 4: 432-442 [PMID: 23145211]
31 Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Yang M, Li L, Xiang D, Desano JT, Bommer GT, Fan D, Fearon ER, Lawrence TS, Xu L. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 2009; 4: e6816 [PMID: 19714243 DOI: 10.1371/journal.pone.0006816]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》影响因子0.873

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布.《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6 979次, 影响因子0.873, 综合评价总分88.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位; 其他指标: 即年指标0.219, 他引率0.89, 引用刊数619种, 扩散因子8.84, 权威因子2 144.57, 被引半衰期4.7, 来源文献量758, 文献选出率0.94, 地区分布数26, 机构分布数1, 基金论文比0.45, 海外论文比0.71.

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界胃肠病学杂志(英文版)》再度被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊). 根据2011年度中国科技论文与引文数据库（CSTPCD 2011）统计结果,《世界胃肠病学杂志（英文版）》荣获2011年“百种中国杰出学术期刊”称号.

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1953-1958
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

肝性胸水诊治的进展

胡铭洋, 彭 燕

胡铭洋, 彭燕, 四川省泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000
作者贡献分布: 本文综述由胡铭洋完成; 彭燕审校.
通讯作者: 彭燕, 教授, 主任医师, 646000, 四川省泸州市太平街25号, 泸州医学院附属医院消化内科. 1806857826@qq.com
电话: 0830-3165331
收稿日期: 2014-03-16 修回日期: 2014-04-07
接受日期: 2014-04-20 在线出版日期: 2014-05-18

Progress in diagnosis and treatment of hepatic hydrothorax

Ming-Yang Hu, Yan Peng

Ming-Yang Hu, Yan Peng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China.
Correspondence to: Yan Peng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. 1806857826@qq.com
Received: 2014-03-16 Revised: 2014-04-07
Accepted: 2014-04-20 Published online: 2014-05-18

Abstract
Hepatic hydrothorax is defined as the presence of a significant pleural effusion that develops in a patient with cirrhosis of the liver who does not have an underlying cardiac or pulmonary disease. Hepatic hydrothorax is not rare in end-stage liver diseases. The clinical symptoms are various and many patients are misdiagnosed or never diagnosed. Approximately 21%-26% of cases of hepatic hydrothorax are refractory to salt and fluid restriction and diuretics and warrant consideration of additional treatment measures. Patients' poor conditions make treatment more difficult and unfavorable. This article aims to discuss the research progress in hepatic hydrothorax in terms of mechanisms, diagnosis and treatment.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Hydrothorax; Cirrhosis; Diagnosis; Treatment

Hu MY, Peng Y. Progress in diagnosis and treatment of hepatic hydrothorax. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1953-1958 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1953.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1953

摘要
肝性胸水(hepatic hydrothorax, HH)是肝硬化患者出现的胸腔积液, 并排除心肺疾病引起的胸水. 常出现于临床肝病晚期, 临床表现多样, 易发生误诊、漏诊. 大约21%-26%的HH患者对常规限制水钠摄入及使用利尿剂等治疗措施有抵抗作用, 需要考虑其他治疗方法. 患者一般情况差使治疗较为棘手, 预后差. 本文就HH的发生机制、诊断、治疗的研究进展做一综述.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胸水; 肝硬化; 诊断; 治疗

核心提示: 肝性胸水(hepatic hydrothorax, HH)常见于临床肝病晚期, 其发病机制尚未彻底阐明, 临床表现多样, 治疗效果欠理想. 本文就近年来HH的发生机制、诊断、治疗的研究进展做一综述, 对临床HH的诊治提供一定帮助.

胡铭洋, 彭燕. 肝性胸水诊治的进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1953-1958 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1953.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1953

0 引言
肝性胸水(hepatic hydrothorax, HH)是肝硬化患者出现的胸腔积液, 并排除心肺疾病引起的胸水, 国外报道发生率约为5%-10%, 国内约为2.1%-30.3%[1-3]. HH一般同时存在大量腹水, 少量腹水或无腹水的患者亦可发生[4,5]. 由于HH可合并细菌性胸膜炎或乳糜胸、血胸, 易发生误诊、漏诊. 由于多数患者有严重的肝功能障碍及代谢紊乱, 使治疗较为棘手, 预后差. 本文就HH近年来的研究进展作一综述.

■背景资料
肝性胸水(hepatic hydrothorax, HH)常见于临床肝病晚期, 其发病机制尚未彻底阐明, 临床表现多样, 治疗效果欠理想. 近年来对HH病因、合并症的诊断及内外科治疗方法等方面有了不少新进展.

■同行评议者
杨家和, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院综合治疗三科

■研发前沿
对HH形成机制、诊断、治疗有进一步的了解，利于HH的早期诊断，综合治疗，延缓其发展，为临床工作服务. 目前对一些新疗法临床应用较少，研究样本量不足.

1 发病机制

肝硬化时肝功能障碍、血流动力学改变、代谢紊乱等一系列因素打破了胸膜腔内液体的滤过和吸收平衡, 使液体积聚导致HH的产生. 但具体的发病机制尚不清楚, 可能与以下因素有关.

1.1 全身性因素 (1)血流动力学改变: 奇静脉系统以及肺循环高压使血管渗出增多, 对水分的重吸收减少; (2)淋巴引流障碍: 肝硬化时肝淋巴液生成过多, 一方面外溢形成腹水; 另一方面使胸导管内压增高, 胸膜淋巴管扩张、淋巴液淤滞、外溢[6]; (3)神经-内分泌紊乱: 肝硬化高排低阻状态使大量血液瘀滞, 有效循环血量下降, 激活交感神经系统、肾素-血管紧张素-醛固酮系统等, 发生水钠潴留[7,8]; (4)低蛋白血症.

1.2 局部性因素 (1)左右横隔发育不平衡: 在胚胎学上右侧横膈较易出现发育缺陷, 胶原腱索不连续或间隙形成, 当腹腔内的压力增加时(如腹水、咳嗽及用力), 横膈腱索部的胶原束分开形成缺损, 腹膜通过缺损形成胸腹膜小疱[9]. 另外, 横膈膜两侧的淋巴网右侧比左侧发达. 肝脏淋巴流量增加, 主要引起右侧胸膜淋巴管扩张, 淋巴回流障碍和淋巴液外溢; (2)右肺静脉压力相对高, 门-肺分流更易引起右肺静脉渗出, 形成胸腔积液; (3)横膈裂孔: 被多数学者认为是胸腔积液形成的主要原因. Rubinstein等[10]通过分别向胸腹腔内注入^{99m}Tc硫化胶体, 同时行胸腹腔闪烁照相发现胸腔内有放射性标志物, 证实了胸腹腔交通的存在, 且液体在胸腹腔之间的流动是单向的, 即只能从腹腔到胸腔. Yutaka等[9]向腹腔内注入染料并用气腹术清晰显示了横膈上的缺陷.

Huang等[11]发现所有的横膈缺损都位于横膈膜的腱性部分, 并按形态学特征将膈膜缺损分成了4类, 分别是TypeⅠ, 无明显缺损; TypeⅡ, 隔膜上水泡形成, 呈卵圆形, 直径1-2 cm; TypeⅢ, 膈膜上破碎的缺损, 常呈条纹状分布, 由破口和破裂的水泡组成; TypeⅣ, 隔膜多个缺口. TypeⅡ和TypeⅢ常在临床中发现, 以上4种缺损类型可同时出现. 膈膜缺损类型与胸腔积液体积间未发现相关性.

Lin等[12]根据横膈裂孔的大小将其分为4种类型, 分别为TypeⅠ: 大裂孔型, 气体和液体可以通过裂孔自由地穿越; TypeⅡ: 小裂孔型, 液体可以通过, 但气体无法通过, 裂孔呈单向活瓣, 腹水随呼吸运动单向进入胸腔; TypeⅢ: 微小裂孔型, 相对负压的胸内压就可将腹水泵入胸腔内, 当腹水量少或等于胸腔负压的吸引量时, HH可不伴有腹水; TypeⅣ: 超微裂孔型, 气体和液体均无法通过, 但重力作用可以使少量胸水流入腹腔. 在临床中TypeⅡ、TypeⅢ较为常见.

1.3 各因素相互影响 全身性因素与局部性因素相互影响, 共同作用产生了HH, 并使病情进一步恶化, 步入恶性循环. 而HH以右侧居多也与上述因素有关, 目前各文献报道的比例较一致: Bhattacharya等[13]发现HH患者中右侧胸腔积液约85%, 左侧胸腔积液约13%, 双侧胸腔积液约2%. Dinu等[14]发现右侧胸腔积液约79.16%, 左侧胸腔积液约12.5%, 双侧胸腔积液约8.34%.

2 诊断

HH的临床表现取决于胸水形成的速度及量、患者耐受程度等. 可无症状或有呼吸困难、干咳, 甚至出现低氧血症、呼吸功能衰竭等. 对于肝硬化并发HH通过临床表现及实验室、影像学检查等诊断并不困难. 常规的胸腔积液检查对评价HH性质很重要, 其特点如下: 分叶核细胞计数<0.25×10^9/L、蛋白质定量<25 g/L、胸水与血清中的总蛋白质比值<0.5、乳酸脱氢酶比值<0.6、白蛋白比值>1.1、胆红素比值<0.6, pH>7.4, 胸水葡萄糖与血糖的浓度相近[15,16]. 超声、CT检查横膈裂孔存在与否常较困难, 可以通过超声对比增强、放射性核医学扫描或胸腔镜证明腹膜-胸膜交通而做出最后的诊断[17,18]. 少见情况可有血性HH、乳糜性HH及自发性细菌性胸膜炎, 易发生误诊和漏诊.

马镇江[19]在40例HH患者中发现了4例血性胸水, 血性胸水的出现提示病情重, 预后差. 其产生机制主要为肝硬化出血倾向, 横膈小泡破裂出血, 红细胞从门静脉侧支血管和肝淋巴管漏出导致. 诊断需要排除肿瘤、结核等因素.

肝性乳糜性胸水是因肝硬化患者生成的淋巴液超过一定负荷时使胸膜淋巴管扩张、破裂或淋巴管通透性异常, 淋巴液外溢所致[20]. 胸液呈乳白色, 蛋白含量高, 比重大, 乳糜试验阳性等表现, 可初步考虑诊断乳糜胸; 同时要重视同乳白色胸液的鉴别, 对黄色或粉红色胸液也应作乳糜定性试验, 以免误诊, 而苏丹Ⅲ染色是诊断的金指标[21].

无论有无腹水, 自发性细菌性胸膜炎均可发生于HH患者. 国内学者发现其发病率可达20%-33.6%[22,23]. 而自发性细菌性胸膜炎患者均有自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial

peritonitis, SBP), 且胸水细菌培养结果常为大肠杆菌, 与SBP的腹水培养结果一致, 说明二者关系密切, 并提示细菌侵入胸腔的途径可能是在SBP基础上细菌经横膈膜裂孔或胸-腹腔交通的淋巴管或产生了菌血症随血流进入了胸腔[22-25]. 胸水常规提示为渗出液或介于渗-漏之间, 胸水细菌培养阳性且胸片未提示肺炎征象及邻近脏器的感染则可确立诊断.

3 治疗

HH的治疗是一个极具挑战的临床问题, 因为它是末期肝病的并发症, 大多数病例的结果不尽人意. 虽然目前的治疗方法很多, 但尚无一理想, 更多的时候是综合运用.

3.1 内科治疗

3.1.1 *一般治疗*: 改善肝脏功能和调整营养是其他一切治疗的基础, 其内容包括(1)卧床休息; (2)限制水、钠的摄入. 钠摄入量限制在2 g/d以内, 有稀释性低钠血症者摄入水量在500-1000 mL/d. 但过度、长期限钠对肝硬化腹水消退并无帮助, 快速纠正低钠血症可能更有害, 易增加各种并发症的发生率[26]; (3)营养支持. 80%-100%的肝硬化患者均存在不同程度的营养不良, 而且80%为蛋白质和/或能量不足[27]. 2000年欧洲营养协会达成共识[28]: 大多数患者可以耐受正常甚至更高的蛋白质摄入, 而不产生肝性脑病; 有必要晚上加餐; 对重症营养不良患者, 应考虑补充氨基酸; 肝性脑病者, 可以考虑以支链氨基酸作为氮源. 营养支持的方法尽量采用口服, 不能口服者置鼻肠管行肠内营养支持, 不能耐受者可采用肠外营养[29]; (4)使用利尿剂, 主要使用螺内酯和呋塞米, 目前主张两者联用, 可起协同作用, 并减少电解质紊乱的发生率. 螺内酯和呋塞米的开始剂量各为100和40 mg/d(剂量比为10∶4), 若效果不明显可逐渐加量至400和160 mg/d[2]; (5)强调原发病的治疗, 保肝、着重改善肝功能等. 乙型病毒性肝炎后肝硬化所致HH, 只要HBV DNA阳性. 应尽早进行抗病毒治疗. 2007年美国肝病研究协会(American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD)关于《慢性乙型肝炎的临床实践指南》[30]及2008年新版的《亚太肝病学会慢性乙型肝炎管理指南》[31]均提出将核苷(酸)类似物作为失代偿期肝硬化患者抗病毒治疗的首选, 酒精性肝硬化、自身免疫性肝硬化及血吸虫性肝硬化等进行相应的对因治疗. 护肝治疗可酌情选用改善微循环及抗氧化剂, 如N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)和还原型谷胱甘肽等. 通过以上治疗, 很多患者的胸水明显减少或消失, 但往往随着肝脏原发病的恶化而复发. 各种文献报道的临床上运用一般方法治疗HH的有效率约为71%-88%[32-35].

3.1.2 *胸腔穿刺或胸导管置入放液*: 对一般治疗无效, 胸水量大, 影响呼吸循环功能的患者, 可考虑胸腔穿刺或胸导管置入放液来缓解症状. 该方法简单易行, 费用低, 痛苦小, 能迅速缓解患者呼吸困难症状. Mercky等[36]运用隧道式胸腔引流管置入治疗难治性HH患者, 治疗后6 mo未再出现胸水. Goto等[37]用胸导管引流胸水后经导管处注入OK-432(溶链菌制剂)行胸膜固定黏合术, 术后1 mo胸水完全消失. 国内学者运用中心静脉导管留置胸腔持续引流, 待胸水完全排净后联合注入高渗葡萄糖溶液[34]或白介素-2[38]的方法治疗HH患者, 发现较常规胸腔穿刺抽胸水治疗更为有效, 且胸水消退的天数、穿刺费用和住院天数均明显缩短($P<0.05$). 不过以上方法都不同程度出现了堵管、发热、微胸痛、一过性肾功能恶化等不良反应, 经对症支持治疗后均缓解.

频繁放胸水打破了胸腹腔压力平衡不利于膈肌缺损处愈合, 还可引起胸腔细菌感染. 而大量含蛋白质及电解质液体的丢失可使患者一般情况恶化甚至诱发肝性脑病, 故放胸水有时被认为是一种禁忌症, 形成了一个两难的境地. 多数学者并不推荐常规使用, 除非大量胸水影响呼吸.

3.1.3 *经颈静脉门体分流术*(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS): 是在肝内门静脉和肝静脉间建立分流道以降低门静脉压力, 自1994年首次用于治疗HH以来, 现已广泛地用于其他方法治疗无效的HH. 与外科的门体静脉分流比较, TIPS创伤小且手术病死率较低. 文献[39,40]报道对超过150例的HH患者行TIPS后的结果分析发现, 68%-82%的患者临床症状缓解, 57%-71%的患者HH完全缓解. 且TIPS能改善肾功能和门脉血管对移植物的血供, 明显提高了肝移植物及患者的存活率, 为等待肝移植起到桥梁作用, 这可能支持将TIPS运用在肝移植的候选人身上[41].

在广泛接受聚四氟乙烯覆盖支架前, 狭窄和闭塞是TIPS常见的并发症. 最常见的狭窄部位在肝静脉端, 其发生率为18%-78%[42]. 带膜支架的应用使分流道血流与肝组织隔离, 通过阻止

■相关报道
HH的形成解剖基础是膈肌缺陷, 显示膈肌缺损的技术如超声对比增强、放射性核医学扫描或胸腔镜等在诊治中得到应用. 治疗手段也更着重于介入治疗如TIPS及外科治疗如横膈修补术、肝移植等方面的研究.

■创新盘点
本文对HH的形成机制进行了较为全面的阐述, 对诊断、治疗的最新进展有较为系统的总结和介绍.

胆汁向分流道漏出或肝组织向分流道内部生长, 有效降低分流道阻塞的发生率. 患者若怀疑阻塞需要行TIPS静脉造影, 如果以前用的金属裸支架, 置入一个覆盖支架可能改善长期分流通畅[43]. TIPS的另一缺点是增加肝性脑病的发生率以及对肝功能的不良影响, 接受TIPS的患者中约30%出现肝性脑病, 临床上肝性脑病常在TIPS术后的2-3 wk出现[44]. 因此, 经TIPS治疗HH需权衡利弊.

3.2 外科治疗

3.2.1 横膈裂孔修补术: 横膈裂孔被认为是HH形成的主要解剖学原因, 但单独应用修补术成功的报道较少, 常与持续性气道正压通气(continuous positive airway pressure, CPAP), 胸膜固定黏连术等联合, 一般在胸腔镜下进行. 按形态学分类的横膈缺损TypeⅡ和TypeⅢ可采取一期缝合, 而对于TypeⅣ缺损, 仅仅用一期缝合或重复胸膜固定术可能并没多大好处, 网、组织胶或皮瓣认为可阻止从隔膜缺损处的持续渗漏. Yutaka等[9]运用气腹技术联合腹腔内注入吲哚菁绿(indocyanine green, ICG)将横膈水泡染成了绿色, 清晰地显示出不同的修补范围, 缝合缺损后缝线处由喷洒了纤维蛋白的聚乙二醇酸片加强, 术后CPAP来阻止扩张性肺水肿和控制胸腔积液, 取得了较好的治疗效果. Mutter等[45]通过微创的胸腔镜检查将肝膈膜区用心脏修补网状织物黏附起来, 成功治疗了4例腹膜透析引起的胸水患者, 可以为我们治疗HH提供借鉴.

3.2.2 化学胸膜固定术: 是用人工方法将化学性胸膜刺激剂导入胸膜腔, 诱发无菌性炎症. 以产生胸膜黏连. 现应用较成功的有滑石粉及四环素, 趋向在胸腔镜下吸尽胸水后进行. 胸腔镜可在局麻下进行, 因此它成本低, 风险小并能广泛运用. Lin等[12]在胸腔镜下喷洒无菌性滑石粉治疗26例HH患者成功率为92%, 完全应答率58%, 部分应答率33%, 无应答率8%, 但此法可引起部分HH患者转氨酶升高, 故需小心检查肝功能. 化学胸膜固定术的副作用还包括胸痛、发热等, 一般无特殊处理. 有学者报道化学胸膜固定术联合CPAP可能更为有效, 因为既可以形成一个胸内压正压梯度以阻止腹水流入胸腔, 又可为脏壁胸膜彼此黏连提供时间[36].

3.2.3 胸膜静脉分流术: 是从胸膜腔分流到锁骨下静脉或颈静脉治疗非恶性胸水的方法. 该分流有效, 创伤小但有局限性, 且合并有胸水感染是禁忌症.

3.2.4 腹膜静脉分流术: 通过置入腹膜静脉分流管, 将腹水直接引流人静脉系统. 这是一种不改变门静脉压而可减少腹水形成的方法, 但不能完全阻止胸水形成, 只适于血管结构异常而不宜行TIPS的患者, 对单纯性HH患者无效. 加之操作并发症多, 又不能提高生存率, 限制了其的应用.

3.2.5 肝移植: HH常发生于肝病的晚期, 上述方法只能暂时缓解症状, 提高生活质量, 最终治疗仍为肝移植. Xiol等[46]报道接受肝移植的28例HH患者, 术后1 mo有9例尚有胸水; 3 mo后仅有l例有胸水, 且与心功能衰竭有关; 1年生存率82%, 5年生存率70%. 针对目前全世界肝脏移植的瓶颈问题-供肝匮乏, 各学者对新的肝移植方式进行了探索. 李宏为等[47]建立了体外供肝劈离技术和综合防治活体肝移植SFSS的关键技术, 至今共完成4对8例, 手术成功率100%, 其中6例获6年以上长期存活. Sun等[48]实施了世界上首例原本拟摒弃的带血管瘤的左半肝成人间边缘供肝肝移植, 术后半年供者和受者均顺利恢复并重返工作岗位, 供肝体积明显增大, 但血管瘤体积无明显改变. Lu等[49]切取供者肝左动脉和肝右动脉共干, 使之成形为宽阔的“喇叭口”, 与受者肝动脉吻合, 重建供者剩余肝脏肝动脉, 这样既能保证供者安全, 又相对扩大了供肝来源. 目前我国肝移植总例数已超过2万例, 经典原位肝移植、背驮式肝移植、减体积肝移植、劈裂式肝移植等多种肝移植术式的发展使患者术后生存率获得了大幅度提高[50].

3.3 中医治疗 所有的胸腔积液, 在中医中都归之为“悬饮”范畴. HH常与“鼓胀”同时发病, 根据其特征可以参照“悬饮”、“鼓胀”、“积聚”、“黄疸”等病进行辨治, 其病机主要是肝脾肾三脏受病, 气血水瘀积胸腹而成, 故多数学者采用益气健脾、活血利水等治法进行选药组方. 陈兰玲等[51]采用益气活血消臌汤合葶苈大枣泻肺汤治疗HH40例(总有效率82.50%), 并与西医常规治疗40例比较(总有效率65.00%), 两组显有效率及总有效率差异有统计学意义(P<0.05). 邹同[32]对120例HH患者随机分为对照组运用常规治疗方式进行治疗, 和观察组在常规治疗方式上给予患者四妙回春汤, 观察组的总有效率为95%, 较对照组85%相比差异具有显著性(P<0.05).

4 结论

目前, HH的发病机制尚未彻底阐明. 临床表现的多样性和不典型性易发生误诊、漏诊. 治疗方法虽多, 但没有一种是完全而有效的, 且患者身体状况差、部分治疗方法也常导致并发症而限制了其的使用. HH的预后取决于病情轻重、肝硬化失代偿的严重程度及是否合并其他并发症等, 故需及早诊断, 综合治疗, 延缓其发展.

5 参考文献

1 Hepatic Hydrothorax. *Clin Liver Dis* 2014; 18: 439-449 [PMID: 24679505 DOI: 10.1016/j.cld.2014.01.005]

2 Garcia N, Mihas AA. Hepatic hydrothorax: pathophysiology, diagnosis, and management. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 52-58 [PMID: 14679328]

3 Siddappa PK, Kar P. Hepatic hydrothorax. *Trop Gastroenterol* 2009; 30: 135-141 [PMID: 20306741]

4 Porcel JM, Mas E, Reñé JM, Bielsa S. [Hepatic hydrothorax: report of a series of 77 patients]. *Med Clin* (Barc) 2013; 141: 484-486 [PMID: 24018252 DOI: 10.1016/j.medcli.2013.06.017]

5 胡茂东, 刘青杰. 23例单纯性肝性胸水临床分析. 实用医技杂志 2003; 10: 391

6 项妍姝. 肝性胸水的产生机制及诊治现状. 中国创新医学 2009; 6: 90-92

7 Hsu SJ, Huang HC. Management of ascites in patients with liver cirrhosis: recent evidence and controversies. *J Chin Med Assoc* 2013; 76: 123-130 [PMID: 23497963 DOI: 10.1016/j.jcma]

8 陆再英. 内科学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 446-448

9 Yutaka Y, Fukao A, Shirase T, Takahashi K, Katakura H, Sakai N, Yamanaka A. A novel surgical approach to refractory hepatic hydrothorax. *Ann Thorac Surg* 2013; 96: e75-e76 [PMID: 23992736 DOI: 10.1016/j.athoracsur.2013.03.112]

10 Rubinstein D, McInnes IE, Dudley FJ. Hepatic hydrothorax in the absence of clinical ascites: diagnosis and management. *Gastroenterology* 1985; 88: 188-191 [PMID: 3964765]

11 Huang PM, Chang YL, Yang CY, Lee YC. The morphology of diaphragmatic defects in hepatic hydrothorax: thoracoscopic finding. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 141-145 [PMID: 15999054]

12 Lin DJ, Wang MF, Gao GX, Li B, Su LL, Zhu L, Chen F, Xue LF. [The value of thoracoscopy for diagnosis and management of refractory hepatic hydrothorax]. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi* 2006; 29: 665-667 [PMID: 17129493]

13 Bhattacharya A, Mittal BR, Biswas T, Dhiman RK, Singh B, Jindal SK, Chawla Y. Radioisotope scintigraphy in the diagnosis of hepatic hydrothorax. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 317-321 [PMID: 11339424]

14 Dinu M, Georgescu AC, Ciurea RN, Ştefan M. The role of cytology in the diagnosis of fluid collection syndromes associated with liver cirrhosis. Clinical, epidemiological, cytological and biochemical study of pleural effusion. *Rom J Morphol Embryol* 2012; 53: 989-995 [PMID: 23303023]

15 Cárdenas A, Arroyo V. Management of ascites and hepatic hydrothorax. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 55-75 [PMID: 17223497]

16 Gurung P, Goldblatt M, Huggins JT, Doelken P, Nietert PJ, Sahn SA. Pleural fluid analysis and radiographic, sonographic, and echocardiographic characteristics of hepatic hydrothorax. *Chest* 2011; 140: 448-453 [PMID: 21273292 DOI: 10.1378/chest.10-2134]

17 Foschi FG, Piscaglia F, Pompili M, Corbelli C, Marano G, Righini R, Alvisi V, Gasbarrini G, Bolondi L, Bernardi M, Stefanini GF. Real-time contrast-enhanced ultrasound--a new simple tool for detection of peritoneal-pleural communications in hepatic hydrothorax. *Ultraschall Med* 2008; 29: 538-542 [PMID: 19241513 DOI: 10.1055/s-2008-1027328]

18 Garrote A, Giraldez E, de Lange S, Galban C. [Using intraperitoneal contrast in X-ray study in the diagnosis of hepatic hydrothorax]. *Med Intensiva* 2011; 35: 260-261 [PMID: 21109329 DOI: 10.1016/j.medin.2010.07.010]

19 马镇江. 肝性胸水40例临床分析. 国际消化病杂志 2009; 29: 424-425

20 吕超, 王雨田. 肝硬化乳糜性腹水治疗进展. 国际消化病杂志 2008; 8: 106

21 李晓燕, 朱森林, 陈晏湖, 胡品津. 肝硬化所致乳糜性胸水的临床分析–附4例报告.临床消化病杂志 2011; 23: 195-197

22 孙国兴, 刘林. 肝硬化肝性胸水并发自发性细菌性胸膜炎46例分析. 中国误诊学杂志 2008; 8: 2942-2943

23 李慧. 肝硬化肝性胸水并发自发性细菌性胸膜炎42例临床分析. 医学理论与实践 2012; 25: 541-542

24 王永刚, 王宇明. 肝性胸水. 肝脏 2003; 8: 51-53

25 Tu CY, Chen CH. Spontaneous bacterial empyema. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18: 355-358 [PMID: 22450302 DOI: 10.1097/MCP.0b013e328352b50f]

26 陈东风, 艾正琳. 肝硬化腹水和肝性胸水的治疗. 胃肠病学和肝病学杂志 2009; 18: 303-304

27 王艳梅, 李楠, 吴凯, 翟俊山, 朱超慧, 朱建华. 肝硬化患者营养支持及疗效评价. 临床消化病杂志 2012; 24: 234-237

28 Marchesini G, Bianchi G, Rossi B, Brizi M, Melchionda N. Nutritional treatment with branched-chain amino acids in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 2000; 35 Suppl 12: 7-12 [PMID: 10779207]

29 杨先芬, 荚卫东. 肝硬化患者营养状况与营养支持. 实用肝脏病杂志 2012; 15: 174-176

30 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539 [PMID: 17256718]

31 任红. 亚太肝病学会慢性乙型肝炎管理指南(2008年版)解读. 中华肝脏病杂志 2008; 16: 243-246

32 邹同. 肝硬化肝性胸水的临床诊治体会. 中国现代药物应用 2013; 7: 36-37

33 高晓玲. 肝性胸水临床特征分析. 当代医学 2012; 18: 53-54

34 周健, 刘黎. 中心静脉导管联合高渗葡萄糖治疗肝性胸水的疗效观察. 胃肠病学和肝病学杂志 2011; 20: 745-747

35 Singh A, Bajwa A, Shujaat A. Evidence-based review of the management of hepatic hydrothorax. *Respiration* 2013; 86: 155-173 [PMID: 23571767 DOI: 10.1159/000346996]

36 Mercky P, Sakr L, Heyries L, Lagrange X, Sahel J, Dutau H. Use of a tunnelled pleural catheter for the management of refractory hepatic hydrothorax: a new therapeutic option. *Respiration* 2010; 80: 348-352 [PMID: 20145382 DOI: 10.1159/000282493]

37 Goto T, Oyamada Y, Hamaguchi R, Shimizu K, Kubota M, Akanabe K, Kato R. Remission of hepatic

■应用要点

对HH的形成机制有较为全面的阐述, 加深对HH的了解, 对其合并症及不典型症状的介绍可提高临床警惕性, 降低误诊、漏诊率. 同时各种治疗新技术的探索开拓了HH的临床治疗思路.

■同行评价
本文思路清晰，分别从HH的发生机制、诊断及治疗方面进一步探讨，还加入中医方面的研究，对于HH的临床诊治有一定帮助.

hydrothorax after OK-432 pleurodesis. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 17: 208-211 [PMID: 21597425]
38 周年兰, 陈超伍, 向晓星. 中心静脉导管引流联合白细胞介素-2注射治疗肝性胸水患者21例疗效观察. 临床肝胆病杂志 2012; 28: 616-617
39 Dhanasekaran R, West JK, Gonzales PC, Subramanian R, Parekh S, Spivey JR, Martin LG, Kim HS. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for symptomatic refractory hepatic hydrothorax in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 635-641 [PMID: 19904245 DOI: 10.1038/ajg.2009.634]
40 Wilputte JY, Goffette P, Zech F, Godoy-Gepert A, Geubel A. The outcome after transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) for hepatic hydrothorax is closely related to liver dysfunction: a long-term study in 28 patients. *Acta Gastroenterol Belg* 2007; 70: 6-10 [PMID: 17619531]
41 Guerrini GP, Pleguezuelo M, Maimone S, Calvaruso V, Xirouchakis E, Patch D, Rolando N, Davidson B, Rolles K, Burroughs A. Impact of tips preliver transplantation for the outcome posttransplantation. *Am J Transplant* 2009; 9: 192-200 [PMID: 19067664 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02472.x]
42 Boyer TD, Haskal ZJ. American Association for the Study of Liver Diseases Practice Guidelines: the role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation in the management of portal hypertension. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 615-629 [PMID: 15872315]
43 Jirkovsky V, Fejfar T, Safka V, Hulek P, Krajina A, Chovanec V, Raupach J, Lojik M, Vanasek T, Renc O, Ali SM. Influence of the secondary deployment of expanded polytetrafluoroethylene-covered stent grafts on maintenance of transjugular intrahepatic portosystemic shunt patency. *J Vasc Interv Radiol* 2011; 22: 55-60 [PMID: 21106389 DOI: 10.1016/j.jvir.2010.09.016]
44 Riggio O, Angeloni S, Salvatori FM, De Santis A, Cerini F, Farcomeni A, Attili AF, Merli M. Incidence, natural history, and risk factors of hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt with polytetrafluoroethylene-covered stent grafts. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2738-2746 [PMID: 18775022 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2008.02102.x]
45 Mutter D, Callari C, Diana M, Bencheikh L, Heibel F, Marescaux J. A novel technique to treat hydrothorax in peritoneal dialysis: laparoscopic hepato-diaphragmatic adhesion. *Perit Dial Int* 2011; 31: 692-694 [PMID: 22123855 DOI: 10.3747/pdi.2010.00297]
46 Xiol X, Tremosa G, Castellote J, Gornals J, Lama C, Lopez C, Figueras J. Liver transplantation in patients with hepatic hydrothorax. *Transpl Int* 2005; 18: 672-675 [PMID: 15910292]
47 李宏为, 彭承宏, 沈柏用, 陈拥军, 邓侠兴, 詹茜, 陈皓. 多模式部分肝移植关键技术及其临床应用. 上海交通大学学报(医学版) 2012; 32: 1198-1202
48 Sun B, Mu X, Wang X. Successful adult-to-adult liver transplantation of an otherwise discarded partial liver allograft with a cavernous hemangioma: new strategy for expanding liver donor pool. *Transpl Int* 2013; 26: e79-e80 [PMID: 23721088 DOI: 10.1111/tri.12119]
49 Lu L, Qian XF, Li XC, Li GQ, Kong LB, Wang K, Wang XH, Zhang F. The technique and outcomes of branch-patch arterial reconstruction in living donor liver transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42: 2607-2610 [PMID: 20832554 DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.04.046]
50 王学浩, 李国强. 我国肝移植现状与面临的挑战. 中华消化外科杂志 2013; 12: 641-643
51 陈兰玲, 马薇, 阳航, 朱文芳, 谌宁生. 益气活血消臌汤合葶苈大枣泻肺汤治疗肝性胸水临床观察. 中国中医急诊 2010; 19: 1683-1684

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1959-1965
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

肝螺杆菌感染与原发性肝癌相关性的研究进展

蒋 旗, 黄衍强, 黄赞松

蒋旗, 广西医科大学研究生学院 广西壮族自治区南宁市 530021
黄衍强, 右江民族医学院微生物学和免疫学教研室 广西壮族自治区百色市 533000
黄赞松, 右江民族医学院消化疾病研究所附属医院消化内科 广西壮族自治区百色市 533000
蒋旗, 在读硕士, 主要从事肝癌基础与临床的研究.
广西自然科学基金资助项目, No. 科教自0542119
广西教育厅重点课题基金资助项目, No. 201202ZD078
广西卫生厅课题基金资助项目, No. Z2010082
作者贡献分布: 本文综述由蒋旗完成; 黄衍强与黄赞松审校.
通讯作者: 黄赞松, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 533000, 广西壮族自治区百色市城乡路98号, 右江民族医学院消化疾病研究所附属医院消化内科. huangzansong@hotmail.com
电话: 0776-2846532, 2825103
收稿日期: 2014-02-24 修回日期: 2014-03-18
接受日期: 2014-04-04 在线出版日期: 2014-05-18

Relationship between *Helicobacter hepaticus* infection and hepatocellular carcinoma

Qi Jiang, Yan-Qiang Huang, Zan-Song Huang

Qi Jiang, Graduate College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Yan-Qiang Huang, Department of Microbiology and Immunology, Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Zan-Song Huang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China, No. 0542119; the Focal Topic Foundation of Guangxi Education Department, No. 201202ZD078; the Health Department Foundation of Guangxi, No. Z2010082
Correspondence to: Zan-Song Huang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, 98 Chengxiang Road, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. huangzansong@hotmail.com
Received: 2014-02-24 Revised: 2014-03-18
Accepted: 2014-04-04 Published online: 2014-05-18

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) has a high incidence worldwide, with a low diagnostic rate in the early period and therefore a high death rate. Causes for some cases of liver cancer are not completely clear. The finding that the rate of liver cancer in male A/Jr mice is significantly higher makes researchers realize that *Helicobacter hepaticus* may cause HCC in human beings. To get a new perspective for exploring causes of liver cancer, this paper introduces the biological nature of and detecting methods for *Helicobacter hepaticus*, as well as the relationship between *Helicobacter hepaticus* infection and HCC. *Helicobacter hepaticus* infection may play an important role in some HCC cases.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: *Helicobacter hepaticus*; Hepatocellular carcinoma; Relationship

Jiang Q, Huang YQ, Huang ZS. Relationship between *Helicobacter hepaticus* infection and hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1959-1965 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1959.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1959

摘要

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)全球发病率高, 早期诊断率低, 死亡率高, 部分肝癌患者的病因仍不十分明确, 随着A/Jr小鼠感染肝螺杆菌(*Helicobacter hepaticus*, *Hh*)后致雄性小鼠肝癌发生率明显升高现象的发现, 人们开始思考是否存在肝螺杆菌感染人群致人类肝癌的发生率升高, 为肝癌的病因提供一个新的视野, 本文简述了*Hh*生物特性、检测方法、与肝癌的相关性及致病机制, 研究表明肝螺杆菌可能在部分原发性肝癌中充当着十分重要的角色.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝螺杆菌; 原发性肝癌; 相关性

核心提示: 肝螺杆菌(Helicobacter hepaticus, *Hh*)无论在动物实验或人类研究都可能参与原发性肝癌的发病过程, 其可能机制是: (1)*Hh*自身及其代谢产物的影响; (2)*Hh*感染继发炎症过程中释放多种细胞因子、一氧化氮和自由基等多因素协同作用.

■背景资料
原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)部分病因尚不十分明确, 肝螺杆菌(*Helicobacter hepaticus*, *Hh*)感染动物模型导致动物HCC的发病率增高, 同时HCC患者的肝脏、胆汁、胆囊组织发现*Hh* DNA, 提示*Hh*可能参与HCC的发病, 因此, 对*Hh*感染与HCC的相关性研究成为热点.

■同行评议者
傅晓辉, 副教授, 副主任医师, 东方肝胆外科医院

■研发前沿
肝螺杆菌的检测方法，如何提高肝螺杆菌检测的特异性，还有肝螺杆菌致肝癌的可能的作用机制，目前最主要的难点是肝螺杆菌的体外培养技术.

究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1959-1965 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1959.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1959

0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)在全球范围内是一种常见导致死亡的恶性肿瘤，在一些地区占癌症相关的死因的首位[1]，我国为HCC的高发区，死亡率在消化系肿瘤中排名第2位，城市中仅次于肺癌，农村仅次于胃癌[2-4]，遗传和环境因素与HCC的发生密切相关，在美国，乙型肝炎、丙型肝炎、酒精导致的肝硬化为HCC发生主要病因；我国病毒性肝炎和肝硬化、黄曲霉素及饮用水污染为主要病因，但是仍有多达30%危险因素是不清楚的[5]. 自从1983年Marshall和Warren从慢性胃炎患者胃黏膜中培养出一种弯曲的细菌，于1989年这种弯曲菌被证实命名为幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)[6]. 越来越多的螺杆菌株被鉴定，目前至少有30种以上从哺乳动物及鸟类胃肠道或肝脏分离出来，被分为胃螺杆菌和肠肝螺杆菌[7]，他们能致人或动物肝、胆、肠疾病. 肝螺杆菌(*Helicobacter hepaticus*, *Hh*)定植于小鼠下消化系，包括盲肠、结肠及肝胆系统，可引起所系小鼠：A/Jcr、C3H/HeNcr、SJL/Ncr发生活动性肝炎，并可引起敏感小鼠肝癌的发生[8-10]. 1994年国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)将*H. pylori*列为I类致癌因子[11]，*Hh*与*H. pylori*具有许多相同的特性，对宿主持续性感染，导致慢性炎症，同时慢性炎症均可导致癌症的发生[12]. 近年来的研究发现*Hh*感染可能与肝癌的发生有一定的相关性[13]，使人们联想是否也存在*Hh*-肝炎-肝癌模式，许多研究证实HCC患者能检测到螺杆菌DNA[14-16]，尤其是*Hh* DNA在原发性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化患者的肝脏、胆汁、胆囊组织中发现[17]. 因此对*Hh*与HCC的相关关系的研究是十分必要，将对肝癌的病因研究提供新的视野.

1 *Hh*生物特性

*Hh*为革兰阴性菌，在暗视-相差显微镜下，细菌弯曲呈螺旋状，具有动力，长1.5-5.0 μm，宽约0.2-0.3 μm，电镜下表现为表面光滑，胞浆周围无纤维，典型表现为菌体两端各含一条带鞘的鞭毛，*Hh*为微需氧菌，对营养培养条件要求高，一般在哥伦比亚培养基或布氏肉汤培养基上能良好生长，生长较缓慢，需要3-7 d，可见1-2 mm针尖样透明菌落，无明显溶血，为防杂菌生长，培养基中常需加入万古霉素、多黏菌素B、两性霉素等，与*H. pylori*一样能产生尿素酶、过氧化氢酶、氧化酶，但不同*H. pylori*是能将氮化物还原成硝酸盐及和水解吲哚酸盐，对甲硝唑敏感，对头孢及萘啶酸耐药. Suerbaum等[18]对*Hh* ATCC51449进行全基因测序发现，*Hh*是一个含有1799146(G+C所占比例为35.9%)环状染色体，比*H. pylori* 26695和J99稍大[19](1.64和1.67 Mbp)，预测能编码1875个蛋白，缺乏一些*H. pylori*熟知的毒力因子，如黏附素、VacA、和cag致病岛，但具有与空肠弯曲菌相似的黏附蛋白1(periplasmic solute-binding protein 1, PEB1)及细胞致死膨胀毒素，同时具有一个71 kb肝螺杆菌基因岛1(*Hh* genomic island 1, *HHGI1*)能编码IV分泌系统的基本组件和其他毒力蛋白.

2 *Hh*的检测手段

作为金标准的细菌培养，目前虽然通过各种努力和方法却未能从人肝脏组织中培养出*Hh*，人们推测*Hh*在肝脏中生长使之丧失了在人工培养基成活的能力或许是*Hh*一过性菌血症未能在肝脏组织中存留，给*Hh*在肝脏疾病的诊断中带来了困难. 目前对*Hh*主要的诊断方法为特异性16S rRNA PCR技术，rRNA是所有细菌进化最保守的遗传物质，被称之为细菌的“分子化石”，对细菌rRNA序列进行比较是鉴别细菌种系最有价值的方法[20]，但Fox等[21]报道从感染Hh的小鼠培养阳性仅有11.5%，而使用PCR测定却有66.6%. 同时许多研究表明肝脏组织中*H. pylori* 16S rRNA阳性，但*H. pylori*血清学检测阴性[22]，所以16S rRNA PCR的可信度大大减低了. 目前免疫血清学抗体检测广泛的运用于病毒性肝炎的诊断中，但抗-*Hh*抗体存在低的特异性，一些实验证实螺杆菌属可能存在一些相同的抗原[23]，这样就可能出现血清学交叉反应，使可信度下降，Ananieva等[24]使用*H. pylori*抗体去除其他可能引起抗*Hh*抗体产生交叉反应的抗原，提高特异性；Shimoyama等[25]使用Western blot方法证实*Hh*可引起人类胆道及胰腺疾病；Murakami等[26]使用特异性单克隆II-*Hh*-51抗体检测肝脏组织中*Hh*感染情况；我国高正琴等[27]以毒力基因*flaB*、*ureA*、*cdtB*和*cdtC*作为靶基因，建立*Hh*的多重PCR检测方法，为*Hh*流行病学调查提供了有利的科学工具.

3 *Hh*感染与HCC相关性研究

3.1 动物研究 动物实验研究对理解人类疾病提供一个坚实的基础, 螺杆菌属能感染几乎所有的脊椎动物, 包括人类. 不同的螺杆菌寄生在不同的部位, 包括胆总管、胆囊、肝内胆管和肝脏[28]. 1992年, 美国国家癌症研究所的Frederick癌症研究和发展中心, 在小鼠体内发现一种新型的慢性活动性肝炎, 同时肝癌的发生率明显升高, 这种疾病不能用目前已知的致病源所解释, 一般认为小鼠肝脏肿瘤多为化学致癌物质所诱发, 所以起初人们主要集中在化学物质的研究, 经过排除所有可能致癌物质后通过病理组织学检测发现100%♂小鼠患有活动性肝炎[8,29], 同时这种肝炎可以通过接种患病小鼠的肝脏组织匀浆而被传染, 最后通过特殊的银染方法发现一种大小、形态如同螺杆菌的病原体存在动物的肠道和肝脏组织, 并通过生化检测、DNA测序、及电镜观察, 证实与*H. pylori*相关的新的螺杆菌属, 1994年他被命名为*Hh*[8,29], 从而打开了研究*Hh*的序幕. *Hh*也能引起其他鼠类慢性活动性肝炎和肝肿瘤, 如C3H/HeNCr、SJL/NCr、Balb/c AnNCr和SCID/NCr. 根据Koch法则, 成功的复制出Hh感染A/Jr小鼠导致慢性活动性肝炎同时显著地增加肝肿瘤的发生的动物模型, 实验表明肝脏最早的组织形态学损伤是在2-6 mo, 表现为肝局灶性坏死和亚急性非化脓性炎症, 到6-10 mo, 慢性损伤加重, 包括卵圆细胞增殖、淋巴细胞浸润、胆道炎、肝脏增大[21], 尽管没有观察到肝癌的发生[21]. 但是, 另一个实验中, 有一只雌性瑞士韦斯特小鼠演变为肝癌[30]; Rogers等[31]研究感染*Hh*啮齿动物癌前病变的病理机制时发现, 除了雄性易感外, 感染*Hh*时的年龄也是疾病发生的一个关键因素; Alexis García等[32]使用13只A/J和C57BL/6杂交小鼠F1实验发现, 其中三只雄性小鼠感染*Hh* 18 mo患上了肝癌. 我国高正琴等[33]在2008-01, 对CBL57/6小鼠进行细菌学培养、血清学试验、多重PCR检测、病理组织学检查等方法进行鉴别, 并对细菌的分子生物学特征进行分析, 成功分离出一种能产生多种毒素的细菌, 经鉴别为*Hh*(HHm0801), 这是中国首次从小鼠中分离出的*Hh*, 为进一步研究该菌及展开流行病学调查提供了坚实的基础; 丁聪等[34]调查了上海及周边地区实验大小鼠螺杆菌携带情况, 结果表明平均35.8%小鼠*Hh* 16S rRNA PCR阳性.

3.2 人类研究 螺杆菌与人类肝脏疾病存在多发方面的联系已经进行评估, 尤其是*H. pylori*, 临床研究关注幽门螺杆在肝性脑病的作用, 是导致肝性脑病的发生或是加重肝性脑病, 对螺杆菌属在肝胆疾病的作用同样感兴趣, *Hh*感染A/Jr小鼠雄性鼠易发生肝癌与人类HCC男性高发相吻合, 是否同样存在螺杆菌感染致肝癌或促进肝癌发生同样值得关注. Al-Soud等[35]通过回顾性分析肝肠螺杆菌株DNA在HCC及胆管癌癌组织及癌旁组织的表达, 其中HCC12例, 胆管癌13例, 患者来源于低乙型肝炎、丙型肝炎患病率和低肝癌发病率地区, 同时选取24例肝脏良性病变作为对照, 通过使用螺杆菌基因特异性PCR, 及使用PCR方法分析其他肠杆菌、拟杆菌属、乳酸杆菌属、肠球菌属, 如果特异性螺杆菌PCR阳性患者再通过变性梯度凝胶电泳及DNA测序, 结果表明, HCC有7例(58%)、胆管癌有8例(63%)螺杆菌基因特异性PCR阳性, 而对照组3例阳性(12.5%), 两组相比$P<0.01$, 同时其他肠道细菌仅有1例在HCC组、1例在对照组(4%), 通过使用变性梯度凝胶电泳及DNA测序发现PCR产物, 与螺杆菌相似率达90%, 实验表明螺杆菌属与肝脏致癌作用有关, 而非其他常见的肠道细菌; Pandey等[36]用MATE分析评价螺杆菌属是否可能增加肝胆癌症的风险, 从PubMed、斯高帕斯、及谷歌数据库收集了15篇关于螺杆菌属和肝胆癌症的综述, 5篇是单一群体组研究, 10篇是病例对照研究, 病例对照组累积病例达205例, 其中115例(56%)螺杆菌是阳性, 而单组病例达263例, 其中仅有53例(20%)螺杆菌是阳性, 结果表明病例对照组螺杆菌阳性明显高于单一群体组研究, 累计优势比8.72(95%CI: 4.78-15.91, $Z = 7.07$, $P<0.00001$). 这有足够的依据表明螺杆菌属在肝胆致癌过程中充当了一个积极的角色; 我国黄燕等[37]对38例肝癌组织、15例肝硬化、12例慢性肝炎、15例肝良性肿瘤采用聚合酶链反应(PCR)扩增螺杆菌16S rRNA检测螺杆菌, 扩增产物经Southern杂交证实, 结果: 52.6%(20/38)的肝癌组织中发现螺杆菌存在, 而非肝癌组无一例阳性($P<0.01$). 提示螺杆菌与肝癌可能存在一定的联系; 林英豪等[38]对47例原发性肝细胞癌及24例结肠直肠癌肝转移患者胆汁使用PCR及DNA测序进行螺杆菌属及*Hh*特异性16S rRNA检测, 同时使用酶联免疫吸附法检测胆汁中Hh抗体, 结果发现12例(占25.5%)原发性肝细胞癌患者胆汁中检测*Hh*特异性16S rRNA, 15例(占31.9%)患者胆汁中检测出*Hh*抗体, 而对照组

■相关报道
我国学者覃月秋在*H. pylori*与原发性肝癌相关性研究的文献中提到*H. pylori*感染肝脏组织的病因学意义, 指出: *H. pylori*感染在肝炎向肝硬化、肝癌发展起到桥梁或协同作用, 这个机制可能同样适合*Hh*与HCC.

■**创新盘点**
目前HCC病因的研究主要集中病毒感染，细菌感染病因研究不多，特别是*Hh*与HCC的研究比较少.

只有1例(占4.2%)检测出*Hh*特异性16S rRNA，其中3(占12.5%)例患者胆汁中检测出*Hh*抗体，提示*Hh*可能参与HCC的发病机制. 同时吉林大学附属医院的学者对50例HCC患者进行*Hh*血清抗体学检测，结果发现50%的患者血清学抗体阳性，而肝脏良性肿瘤组为仅7.7%，正常肝组织为6.3%(P<0.001)具有统计学意义；同时对25例*Hh*血清抗体阳性患者行*Hh* 16S rRNA检测，发现9例阳性(占36%)；这9例患者中有4例表达*Hh cdtB*基因，而肝良性肿瘤及正常肝组织中未发现表达[39].

4 *Hh*进入肝脏的途径

*Hh*通过口-口传播，使*Hh*通过胃、十二指肠、胆总管、肝总管、肝内胆管到达肝脏成为可能，*Hh*通过这条途径必须与胆汁接触，胆汁由胆盐、胆固醇、胆色素及无机盐等组成，其中胆汁酸具有两种不同的形式：结合型胆汁酸和非结合型胆汁酸，使得他具有不同抗菌效价，其中非结合型胆汁酸抗菌能力更强，Okoli等[40]通过体外实验证实*Hh*上调分子伴侣GrpE和GroEL对抗胆汁酸对细胞蛋白和细胞膜的损害及在胆汁作用下可以通过上调*flaAB*、*galU*和*pldA*基因利于细菌的定值，同时通过改变能量代谢等适应胆汁环境而存活，证实*Hh*能在胆汁中生存提供了依据，由此推测*Hh*可能通过胆管逆流进入肝脏；我国学者陈东风等[41]在人胆囊炎患者的胆囊中检测出螺杆菌属，为这一途径提供有利的证据，同时一些实验表明螺杆菌属能产生菌血症[42,43]，通过肝静脉进入肝脏.

5 *Hh*致肝癌的可能机制

*Hh*致肝癌的确切机制尚未明了，现有研究资料认为*Hh*在肿瘤中的作用机制包括：(1)*Hh*自身及其代谢产物的影响；(2)*Hh*感染继发炎症过程中释放多种细胞因子、一氧化氮和自由基等多因素协同作用[44]. 同时许多研究表明慢性感染或其他一些肝脏损害在肿瘤的发生机制和途径是多样性[45]，目前认为，癌基因与抑癌基因在肝癌的发生中起到重要的作用[46]. *Hh*可能通过以下参与肝癌的发生：(1)*Hh*感染AJr及C57BL6两种不同的鼠系，表现出不同的病理特点，与C57BL6小鼠相比在AJr小鼠的肠道菌群较少，同时表现较轻的肠道反应，而且主要定值在AJr小鼠的肝脏中，导致慢性活动性肝炎或肝癌，表明*Hh*导致肝癌可能与宿主易感因素[47]及调控转录的*IKBKJ*基因、促炎基因*Ccl5*、*Cd44*上调、主要组织相容性复合体基因增加F1小鼠对*Hh*的易感性有关[34]；(2)*Hh*表达热休克蛋白70，从而导致自身免疫性肝炎的发生[48]，从而诱导肝癌中表皮生长因子，转化生长因子，细胞周期蛋白cyclinD1原癌基因高表达，而细胞周期蛋白cyclinD1研究表明参与肿瘤的发生、发展，被认为是一种原癌基因，在进展期肝癌中cyclinD1扩增及高表达，表明可能参与肝癌的发生[49]；(3)*Hh*还可以诱导Th1型免疫反应，提高血清IgG2a水平，并在体外刺激动物脾单核细胞增多，这也可能与肝癌的发生有关[50]；(4)Fox等[51]研究*Hh*引起AJr小鼠慢性增殖性肝炎的同时，采用5-溴脱氧核苷渗入法进行研究，结果发现实验小鼠肝细胞的增殖指数明显高于对照组，尤其是雄性小鼠，Nyska等[52]采用增殖细胞核抗原免疫组化染色法及TUNEL法对感染*Hh*B6C3F1肝动力学改变研究，感染*Hh*并导致肝炎的小鼠细胞增殖率及凋亡率高于对照组，*Hh*可能通过破坏肝细增殖及凋亡的平衡而导致肝癌的发生；(5)*Hh*能分泌细胞致死膨胀毒素cdt，包括3个亚型cdtA、cdtB、cdtC[53]，同时cdtB被证实具有脱氧核糖核酸酶1活性，cdt影响细胞周期[54]，从而可能促发肿瘤的形成，还有虽然*Hh*不同*H. pylori*缺乏cag致病岛，但具有一个71 kb基因区(HHGI1)能编码Ⅳ分泌系统的基本组件和其他毒力蛋白[18]，可能直接致细胞损害而促进肝脏肿瘤的形成.

6 结论

*Hh*感染也许对肝癌的发生、发展有重要的作用. *Hh*可能通过不同的作用机制导致或促进HCC的发生，然而迄今的研究资料表明仅为初步探讨，对肝癌组织*Hh*存在的研究主要依赖于螺杆菌16S rRNA和DNA测序，很多研究表明，螺杆菌属16S rDNA序列不够长，对螺杆菌种系内亚群的鉴别不够灵敏[55]，所以仍不能明确肝癌组织中是*H. pylori*充当着致病因子还是*Hh*、或是其他肝肠螺杆菌，同时*Hh*是导致肝癌的病因，还是促进乙型肝炎或丙型肝炎的病程或是协同致病仍然不是十分清楚，对于慢性肝病患者，我们应该更加全面的寻找病因，不要局限于病毒性肝炎、酒精性肝炎等常见病因的考虑，应综合是否存在有螺杆菌属感染，尤其是*Hh*感染及*Hh*与肝病的基础研究进一步深入，以阐明致病机制. 目前*Hh*感染与肝癌之间的确切关系如何？其确切作用机制如何？*Hh*感染与嗜肝病毒在肝癌的发生

过程中的相互关系如何? 如何从肝组织中分离培养出*Hh*并建立相应的动物模型? 如何解决这些问题我们还有大量的实验研究工作要做. 随着这些实验研究的不断深入开展, *Hh*感染与肝癌的关系就将进一步阐明, 这将为抗感染和疫苗注射防治肝癌可能提供实验理论依据.

■应用要点
综述*Hh*与HCC的相关性研究进展, 对了解*Hh*的生物学性质、检测方法及可能的致病机制有全面的认识, 对HCC患者临床病因寻找提供新的线索.

7 参考文献

1 Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 191-211, v [PMID: 15831268 DOI: 10.1016/j.cld.2004.12.009]

2 Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW. Liver cancer incidence and mortality in China, 2009. *Chin J Cancer* 2013; 32: 162-169 [PMID: 23489585 DOI: 10.5732/cjc.013.10027]

3 叶胜龙. 2013年肝癌领域新进展. 中华肝脏病杂志 2014; 22: 2-4

4 黄赞松, 仇仪英. 中医药治疗原发性肝癌的研究现状. 时珍国医国药 2012; 23: 2851-2853

5 Davila JA, Petersena NJ, Nelson HA, El-Serag HB. Geographic variation within the United States in the incidence of hepatocellular carcinoma. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 487-493 [PMID: 12812824 DOI: 10.1016/S0895-4356(02)00605-4]

6 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315 [PMID: 6145023 DOI: 10.1016/S0140-6736(84)91816-6]

7 Yokota K, Kita M, Okada H, Matsushita O, Oguma K. [New Helicobacters other than H. pylori]. *Nihon Rinsho* 2013; 71: 1374-1379 [PMID: 23967666]

8 Ward JM, Fox JG, Anver MR, Haines DC, George CV, Collins MJ, Gorelick PL, Nagashima K, Gonda MA, Gilden RV. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel Helicobacter species. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1222-1227 [PMID: 8040890 DOI: 10.1093/jnci/86.16.1222]

9 Ward JM, Anver MR, Haines DC, Benveniste RE. Chronic active hepatitis in mice caused by Helicobacter hepaticus. *Am J Pathol* 1994; 145: 959-968 [PMID: 7943185]

10 Stout MD, Kissling GE, Suárez FA, Malarkey DE, Herbert RA, Bucher JR. Influence of Helicobacter hepaticus infection on the chronic toxicity and carcinogenicity of triethanolamine in B6C3F1 mice. *Toxicol Pathol* 2008; 36: 783-794 [PMID: 18812577 DOI: 10.1177/0192623308322312]

11 Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 61: 1-241 [PMID: 7715068]

12 Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-1186 [PMID: 12374879 DOI: 10.1056/NEJMra020542]

13 覃月秋, 黄赞松. 幽门螺杆菌感染与原发性肝癌研究进展. 右江民族医学院学报 2011; 33: 514-515

14 Rocha M, Avenaud P, Ménard A, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P, de Magalhães Queiroz DM, Mégraud F. Association of Helicobacter species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* 2005; 54: 396-401 [PMID: 15710989 DOI: 10.1136/gut.2004.042168]

15 Murakami K. Infection of Helicobacter species and liver disease. *J Gastroenterol* 2012; 47: 724-725 [PMID: 22492219 DOI: 10.1007/s00535-012-0584-1]

16 Krüttgen A, Horz HP, Weber-Heynemann J, Vucur M, Trautwein C, Haase G, Luedde T, Roderburg C. Study on the association of Helicobacter species with viral hepatitis-induced hepatocellular carcinoma. *Gut Microbes* 2012; 3: 228-233 [PMID: 22572832 DOI: 10.4161/gmic.19922]

17 Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadström T. Identification of Helicobacter pylori and other Helicobacter species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1072-1076 [PMID: 10698999]

18 Suerbaum S, Josenhans C, Sterzenbach T, Drescher B, Brandt P, Bell M, Droge M, Fartmann B, Fischer HP, Ge Z, Horster A, Holland R, Klein K, Konig J, Macko L, Mendz GL, Nyakatura G, Schauer DB, Shen Z, Weber J, Frosch M, Fox JG. The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium Helicobacter hepaticus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7901-7906 [PMID: 12810954 DOI: 10.1073/pnas.1332093100]

19 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzegerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature* 1997; 388: 539-547 [PMID: 9252185 DOI: 10.1038/41483]

20 Gray MW, Sankoff D, Cedergren RJ. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 5837-5852 [PMID: 6462918 DOI: 10.1093/nar/12.14.5837]

21 Fox JG, Li X, Yan L, Cahill RJ, Hurley R, Lewis R, Murphy JC. Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent Helicobacter hepaticus infection: a model of helicobacter-induced carcinogenesis. *Infect Immun* 1996; 64: 1548-1558 [PMID: 8613359]

22 Castéra L, Pedeboscq A, Rocha M, Le Bail B, Asencio C, de Lédinghen V, Bernard PH, Laurent C, Lafon ME, Capdepont M, Couzigou P, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Mégraud F, Ménard A. Relationship between the severity of hepatitis C virus-related liver disease and the presence of Helicobacter species in the liver: a prospective study. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7278-7284 [PMID: 17143941]

23 Nilsson I, Lindgren S, Eriksson S, Wadström T. Serum antibodies to Helicobacter hepaticus and Helicobacter pylori in patients with chronic liver disease. *Gut* 2000; 46: 410-414 [PMID: 10673306 DOI: 10.1136/gut.46.3.410]

24 Ananieva O, Nilsson I, Vorobjova T, Uibo R, Wadström T. Immune responses to bile-tolerant helicobacter species in patients with chronic liver

■同行评价
*Hh*感染和原发性肝癌的相关性研究并不多见，此文选题较为新颖，内容完整，可以补充广大临床研究工作人员的知识.

diseases, a randomized population group, and healthy blood donors. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 1160-1164 [PMID: 12414744]
25 Shimoyama T, Takahashi R, Abe D, Mizuki I, Endo T, Fukuda S. Serological analysis of Helicobacter hepaticus infection in patients with biliary and pancreatic diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25 Suppl 1: S86-S89 [PMID: 20586873 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06224.x]
26 Murakami K, Takahashi R, Ono M, Watanabe K, Okimoto T, Kodama M, Abe D, Kimura M, Fujioka T. Serodiagnosis of Helicobacter hepaticus infection in patients with liver and gastrointestinal diseases: western blot analysis and ELISA using a highly specific monoclonal antibody for H. hepaticus antigen. *J Gastroenterol* 2011; 46: 1120-1126 [PMID: 21656014 DOI: 10.1007/s00535-011-0414-x]
27 高正琴, 张强, 贺争鸣, 刑进, 岳秉飞, 冯育芳. Hh多重PCR的检测方法的建立和应用. 中国人兽共患病学报 2008; 18: 891-894
28 Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse Helicobacter species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 59-97 [PMID: 11148003 DOI: 10.1128/CMR.14.1.59-97.2001]
29 Fox JG, Dewhirst FE, Tully JG, Paster BJ, Yan L, Taylor NS, Collins MJ, Gorelick PL, Ward JM. Helicobacter hepaticus sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1238-1245 [PMID: 8051250]
30 Fox JG, Yan L, Shames B, Campbell J, Murphy JC, Li X. Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with Helicobacter hepaticus. *Infect Immun* 1996; 64: 3673-3681 [PMID: 8751916]
31 Rogers AB, Boutin SR, Whary MT, Sundina N, Ge Z, Cormier K, Fox JG. Progression of chronic hepatitis and preneoplasia in Helicobacter hepaticus-infected A/JCr mice. *Toxicol Pathol* 2004; 32: 668-677 [PMID: 15513910 DOI: 10.1080/01926230490524247]
32 García A, Ihrig MM, Fry RC, Feng Y, Xu S, Boutin SR, Rogers AB, Muthupalani S, Samson LD, Fox JG. Genetic susceptibility to chronic hepatitis is inherited codominantly in Helicobacter hepaticus-infected AB6F1 and B6AF1 hybrid male mice, and progression to hepatocellular carcinoma is linked to hepatic expression of lipogenic genes and immune function-associated networks. *Infect Immun* 2008; 76: 1866-1876 [PMID: 18285497 DOI: 10.1128/IAI.01044-07]
33 高正琴, 岳秉飞, 贺争鸣. 首次从中国小鼠中分离到Hh及鉴定. 中国人兽共患病学报 2009; 25: 210-213
34 丁聪, 冯洁, 谢建云, 高诚, 胡建华. 两种方法对上海及周边地区实验大小鼠螺杆菌携带情况的调查. 中国比较医学杂志 2011; 12: 66-69
35 Abu Al-Soud W, Stenram U, Ljungh A, Tranberg KG, Nilsson HO, Wadström T. DNA of Helicobacter spp. and common gut bacteria in primary liver carcinoma. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 126-131 [PMID: 18083084 DOI: 10.1016/j.dld.2007.09.011]
36 Pandey M, Shukla M. Helicobacter species are associated with possible increase in risk of hepatobiliary tract cancers. *Surg Oncol* 2009; 18: 51-56 [PMID: 18715780]
37 黄燕, 范学工, 陈永平, 汤立军. 肝癌组织中16SrRNA基因检测. 世界华人消化杂志 2002; 10: 878-881
38 林英豪, 王亚东, 熊婧, 付金金. Hh感染与人类原发性肝细胞癌相关性研究. 现代消化及介入诊疗 2013; 18: 63-66
39 Yang J, Ji S, Zhang Y, Wang J. Helicobacter hepaticus infection in primary hepatocellular carcinoma tissue. *Singapore Med J* 2013; 54: 451-457 [PMID: 24005452 DOI: 10.11622/smedj.2013153]
40 Okoli AS, Raftery MJ, Mendz GL. Effects of human and porcine bile on the proteome of Helicobacter hepaticus. *Proteome Sci* 2012; 10: 27 [PMID: 22533459 DOI: 10.1186/1477-5956-10-27]
41 陈东风, 胡辂, 易萍, 刘为纹, 房殿春, 曹红. 人胆囊炎标本中幽门螺杆菌的检出及意义. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1814-1817
42 Kaplan M, Yavuz SS, Cinar B, Koksal V, Kut MS, Yapici F, Gercekoglu H, Demirtas MM. Detection of Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori in atherosclerotic plaques of carotid artery by polymerase chain reaction. *Int J Infect Dis* 2006; 10: 116-123 [PMID: 16183317 DOI: 10.1016/j.ijid.2004.10.008]
43 Kilic A, Onguru O, Tugcu H, Kilic S, Guney C, Bilge Y. Detection of cytomegalovirus and Helicobacter pylori DNA in arterial walls with grade III atherosclerosis by PCR. *Pol J Microbiol* 2006; 55: 333-337 [PMID: 17416070]
44 覃月秋, 黄赞松. 幽门螺杆菌感染与原发性肝癌相关性研究. 中国医药科学 2011; 1: 47-49
45 Nissen NN, Menon V, Bresee C, Tran TT, Annamalai A, Poordad F, Fair JH, Klein AS, Boland B, Colquhoun SD. Recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplant: identifying the high-risk patient. *HPB* (Oxford) 2011; 13: 626-632 [PMID: 21843263 DOI: 10.1111/j.1477-2574.2011.00342.x]
46 黄赞松, 仇仪英, 周喜汉. 原发性肝癌现代医学治疗的研究进展. 医学综述 2012; 18: 4169-4172
47 Whary MT, Cline J, King A, Ge Z, Shen Z, Sheppard B, Fox JG. Long-term colonization levels of Helicobacter hepaticus in the cecum of hepatitis-prone A/JCr mice are significantly lower than those in hepatitis-resistant C57BL/6 mice. *Comp Med* 2001; 51: 413-417 [PMID: 11924800]
48 Ward JM, Benveniste RE, Fox CH, Battles JK, Gonda MA, Tully JG. Autoimmunity in chronic active Helicobacter hepatitis of mice. Serum antibodies and expression of heat shock protein 70 in liver. *Am J Pathol* 1996; 148: 509-517 [PMID: 8579113]
49 李启炯, 宋军民, 陆敏, 刘芳芳, 邢宝才. CyclinD1在肝细胞癌中的表达及与肝细胞癌患者预后的关系. 中华临床医师杂志(电子版) 2012; 6: 355-360
50 Biswas A, Liu YJ, Hao L, Mizoguchi A, Salzman NH, Bevins CL, Kobayashi KS. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 14739-14744 [PMID: 20679225 DOI: 10.1073/pnas.1003363107]
51 Cahill RJ, Foltz CJ, Fox JG, Dangler CA, Powrie F, Schauer DB. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with Helicobacter hepaticus. *Infect Immun* 1997; 65: 3126-3131 [PMID: 9234764]
52 Nyska A, Maronpot RR, Eldridge SR, Haseman JK, Hailey JR. Alteration in cell kinetics in control B6C3F1 mice infected with Helicobacter hepaticus. *Toxicol Pathol* 1997; 25: 591-596 [PMID: 9437804 DOI: 10.1177/019262339702500609]
53 Young VB, Chien CC, Knox KA, Taylor NS, Schauer DB, Fox JG. Cytolethal distending toxin in avian

and human isolates of Helicobacter pullorum. *J Infect Dis* 2000; 182: 620-623 [PMID: 10915100 DOI: 10.1086/315705]

54 Liyanage NP, Manthey KC, Dassanayake RP, Kuszynski CA, Oakley GG, Duhamel GE. Helicobacter hepaticus cytolethal distending toxin causes cell death in intestinal epithelial cells via mitochondrial apoptotic pathway. *Helicobacter* 2010; 15: 98-107 [PMID: 20402812 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2010.00749.x]

55 O'Rourke JL, Solnick JV, Neilan BA, Seidel K, Hayter R, Hansen LM, Lee A. Description of 'Candidatus Helicobacter heilmannii' based on DNA sequence analysis of 16S rRNA and urease genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 2203-2211 [PMID: 15545459 DOI: 10.1099/ijs.0.63117-0]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1966-1971
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

新型钙离子通道TRPV5和TRPV6与胃肠肿瘤的研究进展

刘 微, 刘模荣, 张 慧

■背景资料
胃肠肿瘤的发生率目前呈现升高趋势, 钙及维生素D能显著降低结肠癌的发生率. 瞬时受体阳离子通道亚家族V成员5(transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5, TRPV5)和TRPV6是新发现的高选择性的Ca^{2+}跨膜转运通道, 与人体内多种肿瘤(如骨肿瘤、乳腺癌、前列腺癌及结肠癌等)形成过程相关. 本文作者主要从TRPV5和TRPV6与胃肠肿瘤关系等方面进行论述.

刘微, 刘模荣, 张慧, 遵义医学院附属医院消化内科 贵州省遵义市 563003
刘微, 在读硕士, 主要从事大肠肿瘤的防治.
贵州省自然科学基金资助项目, No. 黔科合J字(2009)2205号
作者贡献分布: 本文综述由刘微完成; 张慧协助资料整理; 刘模荣审校.
通讯作者: 刘模荣, 主任医师, 563003, 贵州省遵义市汇川区大连路149号, 遵义医学院附属医院消化内科. zylmr@163.com
电话: 0852-8609224
收稿日期: 2014-02-25 修回日期: 2014-03-20
接受日期: 2014-04-03 在线出版日期: 2014-05-18

Novel calcium ion channels TRPV5 and TRPV6 and gastrointestinal tumors

Wei Liu, Mo-Rong Liu, Hui Zhang

Wei Liu, Mo-Rong Liu, Hui Zhang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China
Supported by: the Guizhou Provincial Science and Technology Fund, No. (2009)2205
Correspondence to: Mo-Rong Liu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 149 Dalian Road, Zunyi 563000, Guizhou Province, China. zylmr@163.com
Received: 2014-02-25 Revised: 2014-03-20
Accepted: 2014-04-03 Published online: 2014-05-18

Abstract
Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5 (TRPV5) and TRPV6 are the subfamily members of the transient receptor potential (TRP), representing new highly selective Ca^{2+} membrane transport channels, which are mainly responsible for active transport of Ca^{2+} across the cell membrane and participate in regulation of many physiological activities in the body. This paper discusses the structures and electrophysiological properties of TRPV5 and TRPV6, their related factors and their relationship with gastrointestinal tumors, highlighting the role of TRPV5 and TRPV6 in the formation of gastrointestinal tumors.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Calcium ion channels; TRPV5; TRPV6; Gastrointestinal tumors

■同行评议者
张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

Liu W, Liu MR, Zhang H. Novel calcium ion channels TRPV5 and TRPV6 and gastrointestinal tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1966-1971 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1966.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1966

摘要
瞬时受体阳离子通道亚家族V成员5(transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5, TRPV5)和TRPV6为瞬时性受体电位通道(transient receptor potential, TRP)的亚家族成员, 是新发现的高选择性的Ca^{2+}跨膜转运通道, 其主要负责Ca^{2+}由细胞外向细胞内的主动跨膜运输, 在机体内参与多项生理活动的调节, 本文作者从TRPV5和TRPV6的结构、电生理特性和调控相关因素及其与胃肠肿瘤关系等方面进行论述, 探索TRPV5和TRPV6在胃肠肿瘤形成过程中的作用及其机制.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 钙离子通道; TRPV5; TRPV6; 胃肠道肿瘤

核心提示: 通过对新型钙离子通道瞬时受体阳离子通道亚家族V成员5(transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5, TRPV5)和TRPV6的蛋白结构、生理特性、组织表达及其与肿瘤关系方面的研究进展进行总结, 阐述了TRPV5和TRPV6在人类胃肠肿瘤形成过程中的作用及其机制.

刘微, 刘模荣, 张慧. 新型钙离子通道TRPV5和TRPV6与胃肠肿瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1966-1971
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1966.asp
DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1966

0 引言
随着我国工业化城市化进程加快, 人民生活水平逐步提高, 胃肠肿瘤的发生率也呈现升高趋势, 如何预防胃肠肿瘤的发生已经引起研究者的普遍重视[1]. 流行病学研究表明, 钙及维生素D能显著降低结肠癌的发生率[2-4]. Lamprecht等[5]研究指出, 结肠隐窝表面与细胞内维持正常的钙离子梯

度对于结肠细胞的终末分化和凋亡起着重要的调节作用, 这种钙离子梯度与维生素D水平有关. 在结肠肿瘤发生的过程中, 钙离子梯度则被破坏. 此外, 钙离子也可以通过干预细胞血管形成和调控细胞周期来影响结直肠癌的发展进程[6,7]. Sheinin等[8]发现细胞外钙浓度升高对分化程度高的的结肠癌细胞有抑制作用, 但是对低分化的细胞则影响很小. 但钙离子对结肠肿瘤影响的具体机制目前仍尚不清楚.

1999年以前, 对钙离子的跨膜转运的研究主要集中在Ca^{2+}-ATP酶和钠-钙交换这2种形式上, 也就是钙离子从细胞中转运到细胞外的过程, 但对细胞外钙离子如何进入小肠、肾、和骨细胞的机制并不了解. 自1999年Hoenderop等[9,10]首次报道瞬时受体阳离子通道亚家族V成员5(transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 5, TRPV5)和TRPV6, 并证实其和钙离子细胞转运有关后, 近十年间, 相继发现了多种钙离子的跨膜转运通道, 且主要集中在瞬时性受体电位通道(transient receptor potential, TRP)超家族这一类新型钙离子转运蛋白通道. 因其位于细胞膜, 最早发现于果蝇的视觉系统, 突变体果蝇对持续的光刺激只产生瞬时而非持续的锋电位而得名. 目前, 大约30种TRP通道已被明确, 他们分为TRPC、TRP超家族中V亚家族(transient receptor potential vanilloid receptor, TRPV)、TRPM、TRPML、TRPP、TRPA和TRPN七个不同的家族[11]. TRPV5和TRPV6是TRPV中唯一已知的2种钙离子高选择性通道. 因为首先发现其存在于上皮组织, 曾分别被命名为上皮性钙通道1(etpithelial calcium channel, ECaC1)和ECaC2. 研究表明, TRPV5和TRPV6同源性高达75%, 具有高度的钙离子选择性(PCa/PNa>100). 雌激素、甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)、维生素D、钙离子等通过影响TRPV5/TRPV6通道的表达, 调节钙离子的代谢[12,13].

1 TRPV5和TRPV6蛋白的结构

TRPV5和TRPV6受体最初分别克隆于兔的肾脏和鼠的小肠, 实验研究表明, 其蛋白序列具有高度的同源性, 某些功能区结构完全相同. 研究人员用多种实验方法对TRPV5和TRV6复合物进行分子量测定, 证实这些通道可以形成同源或异四倍体通道复合物, 当构成包括4个TRPV5和/或TRPV6亚基的连环通道时, TRPV5和TRPV6亚基比例的差异导致了TRPV5和TRPV6通道的混合特性. Hellwig等[14]在2005年时发现, 鉴于TRPV其他通道优先形成同源四聚体, TRPV5和TRPV6似乎是唯一形成异四倍体的通道. 因此, 在TRPV5和TRPV6共同表达的组织中对TRPV5和TRPV6相对表达量的调节可能是精细调节钙转运动力学的机制. 此外, 两者的化学结构仍存在着区别. 如TRPV6的TM6羧基端存在组氨酸残基(H587)突变体, 而TRPV5则未发现该突变体. TRPV6的羧基末端没有蛋白激酶C磷酸化位点, 而TRPV5羧基末端存在3个蛋白激酶C磷酸化位点. 通道化学结构的差别引起电生理学特点的差异, 表现为: (1)TRPV6的失活特点首先是一个快速失活过程, 随后是一个缓慢的过程, 而TRPV5在整个过程中都表现为一个缓慢失活的过程; (2)TRPV5中Ba^{2+}/Ca^{2+}电流比值明显比TRPV6高; (3)通道阻滞剂钌红对TRPV6阻滞作用比TRPV5弱100倍. 由于TRPV5和TRPV6化学结构与电生理学的差别, 决定了两者表达部位及生理功能的差异[15].

2 TRPV5和TRPV6的组织表达

TRPV5和TRPV6作为钙离子高选择性通道, 在多数具有钙离子跨细胞转运功能的器官, 包括肾脏、十二指肠、空结肠、骨组织、胎盘等组织和前列腺、胰腺、乳腺等外分泌器官均有不同程度的表达[16]. 但最主要表达在肾脏和小肠的上皮细胞中[17-19]. TRPV5主要发生在肾脏, TRPV6主要表达在肠上皮细胞, 在实验中发现人结肠癌细胞(Caco-2与SW480细胞株)也存在表达[20-22]. 此外, 在大鼠表达胆囊收缩素1(cholecystokinin 1)受体的迷走神经节状神经元也发现TRPV5表达[23].

3 TRPV5和TRPV6的生理作用

3.1 TRPV5和TRPV6在胃肠道中的功能及影响

TRPV5和TRPV6是TRP离子通道家族成员中最显著的Ca^{2+}选择性通道, 对肠道Ca^{2+}吸收发挥了重要作用[17-19]. 实验证明, TRPV5和TRPV6的功能是相互连接的, *TRPV5*基因敲除的小鼠, 由于TRPV5介导的Ca^{2+}在肾脏重吸收的损失, 而立即上调肠道TRPV6的表达来补偿以致达到负钙平衡. 相反, *TRPV6*基因敲除的小鼠发生继发性甲状旁腺功能亢进, 却没有显示任何补偿机制. TRPV5和TRPV6的表达和功能还共同受饮食条件及多种钙调激素的调节[18,24]. 其中, 饮食中

■研究前沿
近十年间, 相继发现了多种钙离子的跨膜转运通道, 且主要集中在瞬时性受体电位通道(transient receptor potential, TRP)超家族这一类新型钙离子转运蛋白通道. 而TRPV5和TRPV6是该家族中V亚家族中唯一已知的两种钙离子高选择性通道, 目前研究发现TRPV5和TRPV6与人体内多种肿瘤(如骨肿瘤、乳腺癌、前列腺癌及结肠癌等)形成过程相关.

■相关报道
研究表明TRPV5、TRPV6通过调控细胞内钙离子的浓度影响细胞生物学行为, 在人乳腺癌, 前列腺癌, 结肠癌等多种肿瘤中呈高表达.

■**创新盘点**
本文反映出了近期在TRPV5和TRPV6与胃肠肿瘤形成关系方面的最新研究成果，对今后此领域的研究方向提出了自己的见解，认为TRPV5和TRPV6在胃肠道一些慢性炎症、癌前疾病和癌前病变中的表达可成为胃肠肿瘤防治的一个新的研究方向.

的钙缺乏对增加TRPV6在小鼠十二指肠黏膜的表达是一个重要的因素[25]; 除此之外, 短链脂肪酸、低聚果糖的发酵产品、姜黄素等也可发挥类似作用, 增加大鼠结肠上皮细胞及Caco-2细胞中TRPV6的表达[13], 促进钙的吸收, 对结肠癌起防御作用[20].

此外, 与肠道黏膜TRPV5和TRPV6的表达相关的还有甲状旁腺激素和1,25-二羟维生素D_3[1,25-dihydroxyvitamin D_3, 1,25-$(OH)_2D_3$][18,21]. 在鸡的肠上皮细胞, 1,25-$(OH)_2D_3$和甲状旁腺激素通过刺激蛋白激酶A途径释放β葡萄糖醛酸来增加钙吸收, 这反过来又激活了TRPV6通道[26]. 因此, 1,25-$(OH)_2D_3$诱导的钙吸收是可以被TRPV6 siRNA阻断的. 实验研究发现十二指肠黏膜中TRPV6的表达可随1,25-$(OH)_2D_3$暴露的增加而增加[27]. 但是, 维生素D和肠道*TRPV6*基因之间虽具有密切的功能连接, 二者功能却也可彼此独立发挥. 在实验研究发现, 在*TRPV6*基因敲除的小鼠中也发生肠钙的吸收现象, 提示1,25-$(OH)_2D_3$诱导的小鼠十二指肠钙转运并不完全依赖TRPV6[28]; 反之, 在肠钙吸收增加和十二指肠TRPV6表达上调的孕期和哺乳期大鼠中, 发现甚至缺乏维生素D受体[29]. 除此之外, 另一些激素对肠钙吸收也具有影响, 例如, 泌乳素与1,25-$(OH)_2D_3$协同诱导大鼠十二指肠上皮TRPV6 mRNA的表达等[30].

3.2 TRPV5和TRPV6通道的调节 目前为止, 仍没有发现确切的TRPV5和TRPV6直接激活剂. 但有研究表明, 在质膜内的TRPV5和TRPV6通道表现出持续的活性, 因此, 所有可影响质膜通道密度的化学生理因子都有可能会调节TRPV5和TRPV6的表达. 因此, TRPV5的表达受1,25-$(OH)_2D_3$[31]、钙结合蛋白S100A10、膜联蛋白Ⅱ[32]及胞外碱化的影响[33]; 钙调素与TRPV5和TRPV6结合后至少可促进TRPV6的激活[34].

此外, 另一个重要的调节途径是由组织的丝氨酸蛋白酶激肽释放酶引起的. 激肽释放酶激活缓激肽受体-2, 从而反过来通过磷脂酶C家族β异构体(phospholipase C-β, PLC-β)途径激活了蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)依赖的甘油二酯途径, 使TRPV5发生磷酸化作用增加了通道的膜插入并延迟其恢复[35]. 因此, PKC激活剂二酰基甘油类似物OAG(1-oleoyl-acetyl-sn-glycerol)也可增加细胞表面TRPV5的表达量; PTH可通过增加TRPV5通道在细胞内的电流密度, 来共表达TRPV5和1型PTH受体. 这种由PTH引起的TRPV5的增加也可由PKC抑制剂、磷酸化A-Raf抗体anti-phospho-A Raf(Ser299)/磷酸化相似肿瘤抑制基因HUGL抗体(human homolog to the D-lgl gene protein)(ser654)及caveolin-1拮抗剂阻止. PKC的调控机制可能有助于PTH对肾脏Ca^{2+}重吸收和TRPV5通道的短期激活作用[36].

TRPV5还受赖氨酸缺陷蛋白激酶4(protein kinase with no lysine 4, WNK4)的高度调控. *WNK4*基因的表达可增加细胞表面TRPV5的表达, 由此来调节该通道并介导钙的重吸收. 前蛋白尿激素Klotho(一种β葡萄糖醛酸苷酶)的影响主要限于上皮钙离子通道TRPV5和TRPV6, 可水解胞外TRPV5/6通道上的糖残基, 截留细胞膜内的TRPV5/6通道, 促进TRPV5和TRPV6的积累[37].

当IC_{50}值介于0.1-1 μmol/L之间时, 内膜钙通道抑制剂钌红(ruthenium red, RR)和抗真菌益康唑是TRPV5通道电流最有效的抑制剂. 当IC_{50}值介于1到大约10 μmol/L之间时, 二价阳离子对TRPV5的阻断情况是Pb^{2+} = Cu^{2+}>Zn^{2+}>Co^{2+}>Fe^{2+}. 值得注意的是, RR可阻断TRPV6, 但对于TRPV6的亲和力却要比TRPV5低100倍[38]. 胞外Ca^{2+}诱导的TRPV6通道失活发生在超极化时期, Ca^{2+}引起的半数最大失活发生在钙浓度为约100 μmol/L时, 而TRPV6通道失活这一过程, 可被Ca^{2+}依赖性PLC途径的激活和磷脂酰肌醇PIP2的消耗触发. 因此, PLC抑制剂U73122和依地福新在十二指肠可诱导TRPV6持续激活, PLC调节剂则可作为新型的TRPV6通道钙离子吸收调节剂[39].

细胞外Mg^{2+}对TRPV5和TRPV6通道的拮抗具有电压依赖性, 且关键依赖于TRPV5/6孔隙选择过滤器中的单个天冬氨酸残基. 同时, 胞内Mg^{2+}也具有电压依赖性拮抗作用, 且此作用在通道去极化时被削弱, 并有助于TRPV6通道时间依赖性的激活和失活[40,41].

TRPV6通道与蛋白酪氨酸磷酸酶1B(protein tyrosine phosphatase-1B, PTP-1B)相互作用, 可能通过某种活性氧成份被Ca^{2+}抑制. PTP-1B被拮抗导致酪氨酸去磷酸化作用被抑制, 从而保证了TRPV6对钙离子内流的维持, 产生正反馈作用[42,43].

4 TRPV5和TRPV6与肿瘤的关系

与正常组织或细胞相比, TRPV6 mRNA或蛋白的表达在前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、甲状腺癌和卵巢癌组织中有大幅度的增加[44,45]. 研究显示,

前列腺癌组织切片中TRPV6 mRNA的表达与肿瘤侵袭程度成正比, 其可作为前列腺癌临床诊治的一个预测指标[46-48]. TRPV6特定的siRNA处理可通过以下几个方面来控制人前列腺LNCaP细胞的增殖: (1)直接降低细胞增殖率; (2)减少在细胞S期积聚的细胞数量; (3)降低增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen)的表达[49]. 此外, TRPV6在乳腺癌组织中也有强烈表达, 且可通过雌激素、孕激素及他莫昔芬等来调节, 对乳腺癌细胞增殖产生较大影响, 可能会成为钙通道抑制剂治疗乳腺癌的新的靶基因. 在大鼠嗜碱性粒细胞白血病细胞中TRPV5/TRPV6也被证明有表达, 其存在于白血病细胞裂解液和粗膜制剂内. 另一方面, Vasil'eva等[50]采用RT-PCR分析出, 在人类Jurkat白血病细胞株和K562红白血病细胞系中均有TRPV5 mRNA的表达. 其中K562细胞可共表达TRPV5和TRPV6钙通道, 两通道相互作用, 调节白血病细胞分化和增殖.

目前研究显示, 结肠TRPV6表达水平的增加与早期结肠癌相关[19]. TRPV6在Ⅰ期结肠肿瘤中66%过表达, 在Ⅱ期结肠肿瘤中17%过表达, 但在Ⅲ、Ⅳ期结肠肿瘤中却几乎检测不到. 在高水平表达TRPV6mRNA的结肠癌细胞株Caco-2实验中, 经用TRPV6特异性siRNA来处理后, TRPV6 mRNA水平显著降低了约50%, 同时减少了40%细胞增殖和增加了两倍以上的细胞凋亡. 在结肠隐窝增生模型实验中显示出, TRPV6 mRNA表达发生显著性增强, 且广泛分布于结肠隐窝的增殖区, 而当动物被喂以高钙饮食时, 增生模型中TRPV6的过表达可被逆转[51,52]. 由此, 我们可预测TRPV6促进结肠上皮细胞增殖, 可能是早期结肠癌发生发展的一个重要致病因素, 这需要更多的实验来证明.

5 结论

TRPV5和TRPV6作为钙离子高选择性通道, 其表达与多种肿瘤的发生发展密切相关, 尤其是在胃肠肿瘤组织的早期发展阶段. 但TRPV5和TRPV6是通过何种机制来影响细胞生长及肿瘤的发生, 仍需要进一步研究. 特别是对TRPV5和TRPV6在胃肠道一些慢性炎症、癌前疾病和癌前病变中的表达的研究, 将为胃肠肿瘤的防治研究提供新的方向.

6 参考文献

1 Serrano D, Lazzeroni M, Decensi A. Chemoprevention of colorectal cancer: an update. *Tech Coloproctol* 2004; 8 Suppl 2: s248-s252 [PMID: 15666100 DOI: 10.1007/s10151-004-0170-5]

2 Peters U, Chatterjee N, McGlynn KA, Schoen RE, Church TR, Bresalier RS, Gaudet MM, Flood A, Schatzkin A, Hayes RB. Calcium intake and colorectal adenoma in a US colorectal cancer early detection program. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1358-1365 [PMID: 15531687]

3 Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Pietinen P, Potter JD, Rohan TE, Terry P, Toniolo P, Virtanen MJ, Willett WC, Wolk A, Wu K, Yaun SS, Zeleniuch-Jacquotte A, Hunter DJ. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1015-1022 [PMID: 15240785 DOI: 10.1093/jnci/djh185]

4 Satia-Abouta J, Galanko JA, Martin CF, Potter JD, Ammerman A, Sandler RS. Associations of micronutrients with colon cancer risk in African Americans and whites: results from the North Carolina Colon Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 747-754 [PMID: 12917206]

5 Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 601-614 [PMID: 12894248 DOI: 10.1038/nrc1144]

6 Umar S, Morris AP, Kourouma F, Sellin JH. Dietary pectin and calcium inhibit colonic proliferation in vivo by differing mechanisms. *Cell Prolif* 2003; 36: 361-375 [PMID: 14710853 DOI: 10.1046/j.1365-2184.2003.00291.x]

7 Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays* 2004; 26: 21-28 [PMID: 14696037 DOI: 10.1002/bies.10368]

8 Sheinin Y, Kállay E, Wrba F, Kriwanek S, Peterlik M, Cross HS. Immunocytochemical localization of the extracellular calcium-sensing receptor in normal and malignant human large intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 595-602 [PMID: 10769043 DOI: 10.1177/002215540004800503]

9 Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ. Molecular identification of the apical Ca2+ channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia. *J Biol Chem* 1999; 274: 8375-8378 [PMID: 10085067]

10 Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ. The epithelial calcium channel, ECaC, is activated by hyperpolarization and regulated by cytosolic calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 488-492 [PMID: 10425212 DOI: 10.1006/bbrc.1999.1059]

11 Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 1999; 274: 22739-22746 [PMID: 10428857]

12 Hoenderop JG, Müller D, Van Der Kemp AW, Hartog A, Suzuki M, Ishibashi K, Imai M, Sweep F, Willems PH, Van Os CH, Bindels RJ. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1342-1349 [PMID: 11423563]

13 Weber K, Erben RG, Rump A, Adamski J. Gene structure and regulation of the murine epithelial

■应用要点

本文总结论述了近几年新型钙离子通道TRPV5和TRPV6与胃肠肿瘤的研究进展, 认为对TRPV5和TRPV6在胃肠道一些慢性炎症、癌前疾病和癌前病变中的表达的研究, 将为胃肠肿瘤的防治研究提供新的方向.

■名词解释
TRPV5和TRPV6是TRP超家族中V亚家族中唯一已知的两种钙离子高选择性通道. 因为首先发现其存在于上皮组织, 曾分别被命名为上皮性钙通道1(etpithelial calcium channel, ECaC1)和ECaC2. 研究表明, TRPV5和TRPV6同源性高达75%, 具有高度的钙离子选择性, 其存在于具有钙离子跨细胞转运功能的器官.

calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 1287-1294 [PMID: 11741335 DOI: 10.1006/bbrc.2001.6121]
14 Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* 2005; 118: 917-928 [PMID: 15713749 DOI: 10.1242/jcs.01675]
15 Lee KP, Nair AV, Grimm C, van Zeeland F, Heller S, Bindels RJ, Hoenderop JG. A helix-breaking mutation in the epithelial Ca(2+) channel TRPV5 leads to reduced Ca(2+)-dependent inactivation. *Cell Calcium* 2010; 48: 275-287 [PMID: 21035851 DOI: 10.1016/j.ceca.2010.09.007]
16 Hoenderop JG, Vennekens R, Müller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ, Nilius B. Function and expression of the epithelial Ca(2+) channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol* 2001; 537: 747-761 [PMID: 11744752]
17 Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 427-450 [PMID: 16382100 DOI: 10.1124/pr.57.4.6]
18 Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflugers Arch* 2005; 451: 181-192 [PMID: 16044309 DOI: 10.1007/s00424-005-1430-6]
19 Peleg S, Sellin JH, Wang Y, Freeman MR, Umar S. Suppression of aberrant transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 expression in hyperproliferative colonic crypts by dietary calcium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299: G593-G601 [PMID: 20508153 DOI: 10.1152/ajpgi.00193.2010]
20 Fukushima A, Aizaki Y, Sakuma K. Short-chain fatty acids induce intestinal transient receptor potential vanilloid type 6 expression in rats and Caco-2 cells. *J Nutr* 2009; 139: 20-25 [PMID: 19056662 DOI: 10.3945/jn.108.096230]
21 Schoeber JP, Hoenderop JG, Bindels RJ. Concerted action of associated proteins in the regulation of TRPV5 and TRPV6. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 115-119 [PMID: 17233615 DOI: 10.1042/BST0350115]
22 Bartik L, Whitfield GK, Kaczmarska M, Lowmiller CL, Moffet EW, Furmick JK, Hernandez Z, Haussler CA, Haussler MR, Jurutka PW. Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with implications for colon cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 2010; 21: 1153-1161 [PMID: 20153625 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2009.09.012]
23 Zhao H, Simasko SM. Role of transient receptor potential channels in cholecystokinin-induced activation of cultured vagal afferent neurons. *Endocrinology* 2010; 151: 5237-5246 [PMID: 20881249 DOI: 10.1210/en.2010-0504]
24 Suzuki Y, Landowski CP, Hediger MA. Mechanisms and regulation of epithelial Ca2+ absorption in health and disease. *Annu Rev Physiol* 2008; 70: 257-271 [PMID: 17850211 DOI: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.161003]
25 Ko SH, Lee GS, Vo TT, Jung EM, Choi KC, Cheung KW, Kim JW, Park JG, Oh GT, Jeung EB. Dietary calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulate transcription of calcium transporter genes in calbindin-D9k knockout mice. *J Reprod Dev* 2009; 55: 137-142 [PMID: 19106481]
26 Khanal RC, Peters TM, Smith NM, Nemere I. Membrane receptor-initiated signaling in 1,25(OH)2D3-stimulated calcium uptake in intestinal epithelial cells. *J Cell Biochem* 2008; 105: 1109-1116 [PMID: 18773429 DOI: 10.1002/jcb.21913]
27 Balesaria S, Sangha S, Walters JR. Human duodenum responses to vitamin D metabolites of TRPV6 and other genes involved in calcium absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1193-G1197 [PMID: 19779013 DOI: 10.1152/ajpgi.00237.2009]
28 Benn BS, Ajibade D, Porta A, Dhawan P, Hediger M, Peng JB, Jiang Y, Oh GT, Jeung EB, Lieben L, Bouillon R, Carmeliet G, Christakos S. Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-D9k. *Endocrinology* 2008; 149: 3196-3205 [PMID: 18325990 DOI: 10.1210/en.2007-1655]
29 Fudge NJ, Kovacs CS. Pregnancy up-regulates intestinal calcium absorption and skeletal mineralization independently of the vitamin D receptor. *Endocrinology* 2010; 151: 886-895 [PMID: 20051486 DOI: 10.1210/en.2009-1010]
30 Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Meyer MB, Pike JW, Christakos S. Evidence for a role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinal transient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption, and the 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha hydroxylase gene by prolactin. *Endocrinology* 2010; 151: 2974-2984 [PMID: 20463051 DOI: 10.1210/en.2010-0033]
31 Yamauchi D, Raveendran NN, Pondugula SR, Kampalli SB, Sanneman JD, Harbidge DG, Marcus DC. Vitamin D upregulates expression of ECaC1 mRNA in semicircular canal. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 1353-1357 [PMID: 15883024 DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.04.053]
32 van de Graaf SF, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F1295-F1302 [PMID: 16682485 DOI: 10.1152/ajprenal.00443.2005]
33 Lambers TT, Oancea E, de Groot T, Topala CN, Hoenderop JG, Bindels RJ. Extracellular pH dynamically controls cell surface delivery of functional TRPV5 channels. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1486-1494 [PMID: 17178838 DOI: 10.1128/MCB.01468-06]
34 Lambers TT, Weidema AF, Nilius B, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of the mouse epithelial Ca2(+) channel TRPV6 by the Ca(2+)-sensor calmodulin. *J Biol Chem* 2004; 279: 28855-28861 [PMID: 15123711 DOI: 10.1074/jbc.M313637200]
35 Gkika D, Topala CN, Chang Q, Picard N, Thébault S, Houillier P, Hoenderop JG, Bindels RJ. Tissue kallikrein stimulates Ca(2+) reabsorption via PKC-dependent plasma membrane accumulation of TRPV5. *EMBO J* 2006; 25: 4707-4716 [PMID: 17006539 DOI: 10.1038/sj.emboj.7601357]
36 Cha SK, Wu T, Huang CL. Protein kinase C inhibits caveolae-mediated endocytosis of TRPV5. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F1212-F1221 [PMID: 18305097 DOI: 0.1152/ajprenal.00007.2008]
37 Jiang Y, Ferguson WB, Peng JB. WNK4 enhances TRPV5-mediated calcium transport: potential role in hypercalciuria of familial hyperkalemic hypertension caused by gene mutation of WNK4. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F545-F554 [PMID: 17018846 DOI: 10.1152/ajprenal.00187.2006]
38 Nilius B, Prenen J, Vennekens R, Hoenderop JG,

Bindels RJ, Droogmans G. Pharmacological modulation of monovalent cation currents through the epithelial Ca2+ channel ECaC1. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 453-462 [PMID: 11588099 DOI: 10.1038/sj.bjp.0704272]
39 Thyagarajan B, Benn BS, Christakos S, Rohacs T. Phospholipase C-mediated regulation of transient receptor potential vanilloid 6 channels: implications in active intestinal Ca2+ transport. *Mol Pharmacol* 2009; 75: 608-616 [PMID: 19073818 DOI: 10.1124/mol.108.052449]
40 Voets T, Janssens A, Prenen J, Droogmans G, Nilius B. Mg2+-dependent gating and strong inward rectification of the cation channel TRPV6. *J Gen Physiol* 2003; 121: 245-260 [PMID: 12601087 DOI: 10.1085/jgp.20028752]
41 Voets T, Prenen J, Fleig A, Vennekens R, Watanabe H, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Penner R, Nilius B. CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem* 2001; 276: 47767-47770 [PMID: 11687570 DOI: 10.1074/jbc.C100607200]
42 Bogeski I, Bozem M, Sternfeld L, Hofer HW, Schulz I. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by reactive oxygen species leads to maintenance of Ca2+ influx following store depletion in HEK 293 cells. *Cell Calcium* 2006; 40: 1-10 [PMID: 16678897 DOI: 10.1016/j.ceca.2006.03.003]
43 Sternfeld L, Krause E, Schmid A, Anderie I, Latas A, Al-Shaldi H, Köhl A, Evers K, Hofer HW, Schulz I. Tyrosine phosphatase PTP1B interacts with TRPV6 in vivo and plays a role in TRPV6-mediated calcium influx in HEK293 cells. *Cell Signal* 2005; 17: 951-960 [PMID: 15894168 DOI: 10.1016/j.cellsig.2004.11.012]
44 Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* 2001; 276: 19461-19468 [PMID: 11278579 DOI: 10.1074/jbc.M009895200]
45 Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR. Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 2002; 82: 1755-1764 [PMID: 12480925]
46 Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, Hediger MA, Freeman MR. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 729-734 [PMID: 11401523 DOI: 10.1006/bbrc.2001.4638]
47 Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca2+-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 2003; 22: 7858-7861 [PMID: 14586412 DOI: 10.1038/sj.onc.1206895]
48 Bödding M. TRP proteins and cancer. *Cell Signal* 2007; 19: 617-624 [PMID: 17029734 DOI: 10.1016/j.cellsig.2006.08.012]
49 Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 2007; 26: 7380-7385 [PMID: 17533368 DOI: 10.1038/sj.onc.1210545]
50 Vasil'eva IO, Neguliaev IuA, Marakhova II, Semenova SB. [TRPV5 and TRPV6 calcium channels in human T cells]. *Tsitologiia* 2008; 50: 953-957 [PMID: 19140341]
51 Santoni G, Farfariello V, Amantini C. TRPV channels in tumor growth and progression. *Adv Exp Med Biol* 2011; 704: 947-967 [PMID: 21290335 DOI: 10.1007/978-94-007-0265-3_49]
52 Lehen'kyi V, Raphaël M, Prevarskaya N. The role of the TRPV6 channel in cancer. *J Physiol* 2012; 590: 1369-1376 [PMID: 22331416 DOI: 10.1113/jphysiol.2011.225862]

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

■同行评价

本文对近十年来TRPV5和TRPV6与胃肠肿瘤形成关系方面的研究进展进行了总结论述，文章的科学性和可读性能较好地反映该领域基础研究的先进水平．对同行在TRPV5和TRPV6钙离子通道方面的研究有一定的参考价值．

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1972-1976
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

整合素a5b1对胃癌细胞黏附、转移及耐药的影响

贺 宇, 齐洁敏, 谢朝辉, 张 杰

■背景资料
本文采用Western blot检测法及RT-PCR分别测量HTB-103、CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973等不同对数生长期的白细胞株整合素a5b1蛋白表达水平及整合素a5b1 mRNA水平. 将不同胃癌细胞株随机分为实验组及对照组, 实验组加入整合素a5b1抗体, 对照组加入同型IgG, 观察两组胃癌细胞与ECV304细胞系的黏附率、细胞迁移率及白细胞穿过人工基质膜的浸润能力.

贺宇, 河北省承德市中心医院消化内科 河北省承德市 067000
齐洁敏, 河北省承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000
谢朝辉, 河北承德市第三医院肿瘤科 河北省承德市 067000
张杰, 河北省承德市中心医院老年病科 河北省承德市 067000
贺宇, 主治医师, 主要从事消化内科及内镜方面的研究.
作者贡献分布: 此课题由贺宇与齐洁敏设计; 标本由贺宇与谢朝辉留取; 实验由齐洁敏与张杰完成; 病理由齐洁敏分析; 论文写作由贺宇与张杰完成.
通讯作者: 贺宇, 主治医师, 067000, 河北省承德市西大街路北11号, 河北省承德市中心医院消化内科. heyu6695@163.com
电话: 0314-2029282
收稿日期: 2014-02-22 修回日期: 2014-03-29
接受日期: 2014-04-04 在线出版日期: 2014-05-18

Role of integrin a5b1 in adhesion, migration and extramedullary infiltration of gastric cancer cells

Yu He, Jie-Min Qi, Zhao-Hui Xie, Jie Zhang

Yu He, Department of Gastroenterology, Chengde Central Hospital of Hebei Province, Chengde 067000, Hebei Province, China
Jie-Min Qi, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
Zhao-Hui Xie, Department of Oncology, Chengde Third Hospital of Hebei Province, Chengde 067000, Hebei Province, China
Jie Zhang, Department of Geriatrics, Chengde Central Hospital of Hebei Province, Chengde 067000, Hebei Province, China
Correspondence to: Yu He, Attending Doctor, Department of Gastroenterology, Chengde Central Hospital of Hebei Province, 11 Xidajie North Road, Chengde 067000, Hebei Province, China. heyu6695@163.com
Received: 2014-02-22 Revised: 2014-03-29
Accepted: 2014-04-04 Published online: 2014-05-18

Abstract
AIM: To investigate the role of the adhesion molecule integrin a5b1 in adhesion, migration and extramedullary infiltration of gastric cancer cells.

METHODS: Immunohistochemistry and RT-PCR were used to measure integrin a5b1protein and mRNA expression levels in cell lines HTB-103, CRL-5822, CRL-5971 and CRL-5973. Different cell lines were randomly divided into an experimental group and a control group. The experimental group was incubated with anti-integrin a5b1 antibody, and the control group was incubated with control IgG. After incubation, the adhesion, migration and extramedullary infiltration of the above cells and ECV304 cells were assessed.

RESULTS: The relative mRNA expression levels of integrin a5b1 were significantly higher in CRL-5822, CRL-5971 and CRL-5973 cells than in HTB-103 cells (0.0821 ± 0.0128, 0.185 ± 0.0082, 0.798 ± 0.042 *vs* 0.0002 ± 0.0000, $P < 0.05$). The rates of adhesion, migration and extramedullary infiltration in CRL-5822, CRL-5971 and CRL-5973 cells in the experimental groups were significantly lower than those in the control groups (adhesion (%): 52.16 ± 2.52 *vs* 83.89 ± 7.21, 44.22 ± 2.59 *vs* 71.17 ± 7.38, 33.58 ± 4.06 *vs* 60.89 ± 10.59; migration (%): 45.96 ± 1.21 *vs* 75.41 ± 9.51, 38.86 ± 1.99 *vs* 65.78 ± 14.62, 24.65 ± 3.28 *vs* 49.91 ± 13.47; infiltration rate (%): 29.85 ± 4.63 *vs* 42.63 ± 7.69, 21.31 ± 3.24 *vs* 29.92 ± 5.47, 13.67 ± 3.48 *vs* 21.59 ± 6.72; $P < 0.05$ for all), but the above indexes did not differ in HTB-103 cells between the two groups ($P > 0.05$ for all).

CONCLUSION: The adhesion molecule integrin a5b1 may be involved in the adhesion, migration and extramedullary infiltration of gastric cancer cells.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Adhesion molecule integrin a5b1; Leukemia cells; Extramedullary infiltration

He Y, Qi JM, Xie ZH, Zhang J. Role of integrin a5b1 in adhesion, migration and extramedullary infiltration of gastric cancer cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1972-1976 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1972.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1972

摘要
目的: 探讨整合素a5b1 mRNA表达水平对胃癌细胞黏附、迁移、髓外浸润过程的影响.

■同行评议者
刘平, 教授, 主任医师, 南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肿瘤内科

方法: 采用Western blot检测法及RT-PCR分别测量HTB-103、CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973等不同对数生长期的白细胞株整合素a5b1蛋白表达水平及整合素a5b1 mRNA水平. 将不同胃癌细胞株随机分为实验组及对照组, 实验组加入整合素a5b1抗体, 对照组加入同型IgG, 观察两组胃癌细胞与ECV304细胞系的黏附率、细胞迁移率及白细胞穿过人工基质膜的浸润能力.

结果: CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973细胞整合素a5b1 mRNA相对表达量分别为(0.0821±0.0128)、(0.185±0.0082）、(0.798±0.042)明显高于HTB-103细胞(0.0002±0.0000)(P<0.05). 观察组CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973细胞株黏附率(52.16%±2.52%、44.22%±2.59%、33.58%±4.06%)、迁移率(45.96%±1.21%、38.86%±1.99%、24.65%±3.28%)及浸润率(29.85%±4.63%、21.31%±3.24%、13.67%±3.48%)、显著低于对照组黏附率(83.89%±7.21%、71.17%±7.38%、60.89%±10.59%)、迁移率(75.41%±9.51%, 65.78%±14.62%, 49.91%±13.47%)及浸润率(42.63%±7.69%, 29.92%±5.47%, 21.59%±6.72%)(P<0.05), 而两组HTB-103细胞黏附率、迁移率及浸润率无统计学差异(P>0.05).

结论: 黏附因子整合素a5b1可能参与胃癌细胞的形成、聚集、生长及浸润的过程, 其表达水平与胃癌病程进展具有密切的关系.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 整合素a5b1; 胃癌细胞; 髓外浸润

核心提示: 本研究采用Western blot检测法及RT-PCR分别测量HTB-103、CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973等不同对数生长期的白细胞株整合素a5b1蛋白表达水平及整合素a5b1 mRNA水平. 将不同胃癌细胞株随机分为实验组及对照组, 实验组加入整合素a5b1抗体, 对照组加入同型IgG, 观察两组胃癌细胞与ECV304细胞系的黏附率、细胞迁移率及白细胞穿过人工基质膜的浸润能力.

贺宇, 齐洁敏, 谢朝辉, 张杰. 整合素a5b1对胃癌细胞黏附、转移及耐药的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1972-1976
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1972.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1972

0 引言

整合素a5b1是由白细胞分化的抗原分化簇, 其主要由T细胞分泌并存储在记忆T细胞中, 其主要作用是介导淋巴细胞向炎症部位归位、促进淋巴细胞归巢, 并可与细胞外基质如胶原蛋白、透明质酸、层纤蛋白及多种细胞因子相互作用, 参与造血细胞生成、迁移、黏附[1,2]. 近年相关研究[3]指出整合素a5b1分子与众多恶性肿瘤的生成、侵袭及转移有关, 但关于整合素a5b1对胃癌细胞黏附及髓外浸润的影响目前国内外研究甚少. 为此, 本文将对不同胃癌细胞株进行培养, 并观察整合素a5b1在胃癌细胞中的黏附、迁移、浸润中的作用, 旨在为胃癌临床防治提供实验参考依据.

1 材料和方法

1.1 材料 整合素a5b1单克隆抗体为美国西格玛公司产品, 兔抗人整合素a5b1抗体及羊抗兔IgG抗体为北京康维生物公司产品, 胎牛血清为上海生物科技有限公司产品, 无血清培养基RPMI、IMDM均为杭州四季青生物公司产品, 人工基质膜为英国Abcam公司产品. RT-PCR扩增仪为大连生物工程有限公司产品. RT-PCR引物为上海生物工程有限公司产品. 人慢性粒细胞胃癌细胞株(HTB-103)、人急性单核胃癌单核细胞株(CRL-5822、CRL-5971)以及人急性早幼粒细胞胃癌细胞株(CRL-5973)均购于浙江杭州血液生物研究所. 上述细胞株均置于37 ℃的5%CO_2中隔代培养, 每2-3 d传代培养1次, 取传代生长对数期的细胞进行研究.

1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞株整合素a5b1 mRNA表达: 据miRBase数据库中miRNA序列, 参照Gu等[4]提供的miRNA表达谱分析方法, 建立了血清miRNA表达谱分析的多重茎环RT-PCR技术. 根据相关文献报道的miRNA检测茎环RT-qPCR方法, 以let-7a miRNA作为内参基因, 分析miR-199a-3p和miR-199a-5p表达情况. 选取胃癌及配对组织进行整合素a5b1 mRNA表达水平检测, 设计反应引物. 分别以整合素a5b1 mRNA及let-7a颈环RT引物进行RNA逆转录, 反应条件为: 先在42 ℃中反向转录30 min, 随后将温度变为95 ℃将mRNA变性2 min, 然后于55 ℃中15 s、72 ℃中30 s以及95 ℃中30 s反复循环扩增, 并在退火阶段收集荧光信号, 并记录每个反应管中荧光信号到达预设阈值时所经历的循环数, 并计算miR-199a-3p和miR-199a-5p相对表达量. 基因相对表达量 = 目的基因/内参基因.

■研发前沿
近年胃癌发病率呈上升趋势, 晚期胃癌患者预后较差. 从细胞学角度对胃癌进行研究是近年研究的热点, 近来不少研究表明整合素在细胞生理过程中起到重要的作用, 但其与胃癌的关系尚不见报道.

■相关报道
本研究采用Western blot检测法及RT-PCR分别测量HTB-103、CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973等不同对数生长期的白细胞株整合素a5b1蛋白表达水平及整合素a5b1 mRNA水平.

■**创新盘点**
近来不少研究表明整合素在细胞生理过程中起到重要的作用，但其与胃癌的关系尚不见报道.

表 1 不同的胃癌细胞株整合素a5b1 mRNA表达水平分析 (n = 5, mean ± SD)

胃癌细胞株	整合素a5b1 mRNA水平
CRL-5822	0.0821 ± 0.0128[a]
CRL-5971	0.185 ± 0.0082[a]
CRL-5973	0.798 ± 0.042[a]
HTB-103	0.0002 ± 0.0000

[a]P<0.05 *vs* HTB-103组.

表 2 不同的胃癌细胞株整合素a5b1 蛋白表达水平分析 (n = 5, mean ± SD)

胃癌细胞株	整合素a5b1 mRNA水平
CRL-5822	0.42 ± 0.11[a]
CRL-5971	0.44 ± 0.13[a]
CRL-5973	0.62 ± 0.18[a]
HTB-103	0.007 ± 0.0002

[a]P<0.05 *vs* HTB-103组.

1.2.2 整合素a5b1蛋白水平：采用Western blot检测法检测4种白细胞整合素a5b1蛋白表达情况，由美国Pierce公司提供BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度. 取40 μg总蛋白进行SDS-PAGE电泳、转膜及封闭实验，并加入由博士德公司提供的NR2A及NR2B抗体进行孵育震荡过夜. 次日将膜取出经TBS漂洗后加入美国Gell signaling公司提供的羊抗兔二抗于室温下孵育1 h，采用ECL发光法进行漂洗染色 . 同时采用Image 1 36b软件测定蛋白条带灰度值，蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/GAPDH灰度值.

1.2.3 体外黏附实验：分别于96孔平底细胞培养板中每孔加入10 μL样品液，于室温下培养48 h，采用PBS洗涤后，用20 g/L牛血清蛋白温育1 h后加入4种胃癌细胞，对照组加入IgG，观察组加入20 μg/mL的整合素a5b1单抗，并将细胞液浓度调整为1×10/mL. 分别于培养板中加入细胞液，并于37 ℃中恒温培养30 min. 培养结束后采用PBS冲洗2次去除未黏附细胞，并加入20 μL/孔MMT工作液，采用酶联免疫检测仪测定每孔570 nm处的吸光度，计算胃癌细胞黏附率.

1.2.4 胃癌细胞髓外迁移能力：参照相关文献[5]将ECV304细胞接种于培养皿中进行培养，于室温下静止放置24 h，待培养皿中长满ECV304细胞后弃去上清液，将4种胃癌细胞分别加入培养皿中，实验组同时加入整合素a5b1单抗，对照组加入IgG，将培养液置于室温下培养12 h后取出培养皿，计数下层细胞迁移数.

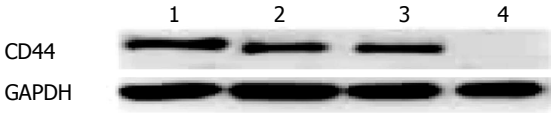


图 1 胃癌细胞株的免疫组织化学法测定整合素a5b1蛋白表达水平. 1: CRL-5822cells; 2: CRL-5971cells; 3: CRL-5973cells; 4: HTB-103cells.

1.2.5 体外浸润实验：将人工基质膜胶稀释至5 mg/mL，取80 μL置于培养皿中，并置于室温下成膜，并置于24孔板中，分别加入4种胃癌细胞，同时于室温下培养24 h，将培养皿取出，吸尽器皿中液体，并将未穿过膜的细胞采用棉签搽掉，将其置于400倍光学显微镜下采用5个视野细胞数进行计算，并记录穿过基质膜细胞平均值，记录读数.

统计学处理 采用SPSS17.0进行统计学分析，计量资料采用mean±SD表示，组间计量资料比较采用t检验，计数资料采用率表示，P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 不同白细胞株整合素a5b1 mRNA表达水平分析 CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973细胞整合素a5b1 mRNA相对表达量为与HTB-103细胞整合素a5b1 mRNA相对表达量相比，差异有统计学意义(P<0.05)(表1).

2.2 不同白细胞株整合素a5b1蛋白表达水平分析 通过免疫组织化学测定可知，整合素a5b1蛋白在CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973细胞核中棕黄色颗粒，而整合素A5B1在HTB-103内几乎不表达. CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973蛋白表达水平与HTB-103相比，差异有统计学意义(P<0.05)(表2, 图1).

2.3 观察组与对照组不同白细胞株黏附率、迁移率及浸润率分析 观察组CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973细胞株黏附率、迁移率及浸润率显著低于对照组，差异有统计学意义(P<0.05)，而两组HTB-103细胞黏附率、迁移率及浸润率无统计学差异(P>0.05)(表3).

3 讨论

整合素a5b1属于细胞表面跨膜糖蛋白受体，其可与透明质酸(hyaluronic acid, HA)结合生成高分子黏多糖，介导淋巴细胞归巢、细胞外基质

表 3 不同胃癌细胞株与对照组细胞株黏附率、迁移率及浸润情况分析(mean ± SD, %)

分组	CRL-5973	CRL-5822	CRL-5971	HTB-103
黏附率				
观察组	52.16 ± 2.52[ac]	44.22 ± 2.59[ac]	33.58 ± 4.06[ac]	101.25 ± 11.36
对照组	83.89 ± 7.21	71.17 ± 7.38	60.89 ± 10.59	100.62 ± 18.25
迁移率				
观察组	45.96 ± 1.21[ac]	38.86 ± 1.99[ac]	24.65 ± 3.28[ac]	2.02 ± 0.45
对照组	75.41 ± 9.51	65.78 ± 14.62	49.91 ± 13.47	2.12 ± 0.78
浸润率				
观察组	29.85 ± 4.63[ac]	21.31 ± 3.24[ac]	13.67 ± 3.48[ac]	0.008 ± 0.002
对照组	42.63 ± 7.69	29.92 ± 5.47	21.59 ± 6.72	0.007 ± 0.001

[a]$P<0.05$ *vs* HTB-103组; [c]$P<0.05$ *vs* 对照组.

■应用要点

本文通过分析整合素a5b1 mRNA表达水平对胃癌细胞黏附、迁移、髓外浸润过程的影响, 为临床胃癌的防治提供指导.

黏附等多种生理病理反应[6]. 近年众多的研究表明[7], 整合素a5b1高度表达与肿瘤生成、转移过程关系密切. 近年众多学者[8]以整合素a5b1为靶点分子, 通过阻断整合素a5b1与HA结合从而抑制肿瘤生成及转移, 起到靶向治疗的作用. Sun等[8]通过运用整合素a5b1单克隆抗体、整合素a5b1v10受体蛋白及整合素A5B1s蛋白阻断肺癌小鼠细胞中整合素a5b1与HA的结合, 结果显示, 肺癌小鼠不经任何治疗的情况下, 其整合素a5b1v10及受体蛋白在肺部的转移量分别下降了60%及70%. Fedorchenko等[9]发现急性胃癌患者血清整合素a5b1水平显著高于正常体检者, 其患者放化疗后血清整合素A5B1水平居高不下者较血清整合素a5b1正常者更容易出现复发, 从而推测胃癌病情进展可能与血清整合素a5b1水平增高有关. 吕慧等[10]指出肺癌患者淋巴结外转移、临床分期较高的患者其血清整合素a5b1水平较高. Zhang等[11]发现急性胃癌Ⅱ-Ⅲ期患者血清整合素a5b1水平显著高于0-I期患者. 从以上研究可推断出, 整合素a5b1表达水平可作为某些肿瘤病情发展的预测指标, 通过测定血清整合素a5b1可有效评价肿瘤恶性程度及预后效果[12,13].

本研究中免疫组织化学法结果均显示, CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973细胞整合素a5b1蛋白表达量均高于HTB-103, 整合素a5b1早HTB-103细胞中表达量极低, 甚至不表达. 经PCR进一步证实表明, 整合素a5b1在HTB-103细胞中的表达非常微小甚至不表达[14]. 黏附实验显示, 观察组整合素A5B1单抗经预处理后CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973细胞株黏附率显著低于对照组, 且CRL-5973下降水平较为显著. CRL-5822、CRL-5971及CRL-5973细胞迁移及髓外浸润能力显著高于HTB-103, 且整合素a5b1单抗可阻断这些细胞的迁移及浸润能力, 而HTB-103细胞迁移及浸润则不受整合素a5b1单抗的影响. 与其他细胞相比, CRL-5973细胞黏附、迁移、浸润能力最高, 从而推断出整合素a5b1可参与胃癌细胞基质外黏附、迁移、浸润过程, 与胃癌病情进展关系密切.

目前关于整合素a5b1在胃癌中髓外浸润的机制还有待进一步研究, 但相关研究指出[15], 整合素a5b1参与肿瘤的形成、生长、转移及髓外浸润与基质金属蛋白酶活性有关. 整合素a5b1可介导肿瘤细胞转移, 并参与信号传统, 介导肿瘤细胞转移及肿瘤侵袭, 此外还可参与肿瘤细胞免疫逃逸及诱导肿瘤细胞Fas表达[16,17]. 因此关于整合素a5b1与胃癌髓外浸润的相关性还需要结合临床病例进一步研究.

4 参考文献

1 陈冰琳, 郭坤, 刘银坤. 黏附分子CD44的表达及其糖基化与肝癌转移的相关性. 中华肝脏病杂志 2011; 19: 898-903

2 Singh V, Erb U, Zöller M. Cooperativity of CD44 and CD49d in leukemia cell homing, migration, and survival offers a means for therapeutic attack. *J Immunol* 2013; 191: 5304-5316 [PMID: 24127558]

3 Wu H, Deng J, Zheng J, You Y, Li N, Li W, Wu D, Zhou Y. Functional polymorphisms in the CD44 gene and acute myeloid leukemia cancer risk in a Chinese population. *Mol Carcinog* 2013 Sep 4. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24038513 DOI: 10.1002/mc.22078]

4 Gu X, Xing X, Yang W, Hu J, Dai D. High expression of integrin-linked kinase predicts aggressiveness and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Acta Histochem* 2014 Feb 3. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24502999 DOI: 10.1016/j.acthis.2014.01.005]

5 Ren J, Xu S, Guo D, Zhang J, Liu S. Increased expression of α5β1-integrin is a prognostic marker for

■同行评价
本文新颖，重点突出，思路明确，对临床具有一定的指导意义.

patients with gastric cancer. *Clin Transl Oncol* 2013 Nov 19. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24248895]

6 Daines DA, Sun J, Uchakina ON, McKallip RJ. Development of a novel treatment for leukemia directed at tumor-associated mRNA splicing. *Leuk Res* 2013; 37: 1125-1131 [PMID: 23830513 DOI: 10.1016/j.leukres.2013.06.017]

7 张雁, 关雪晶, 吴宏, 周玥, 姜蓉, 何晓莉. 当归多糖对放射损伤小鼠骨髓单个核细胞黏附分子表达及细胞周期的影响. 中国组织化学与细胞化学杂志 2010; 19: 587-592

8 Sun YH, Sun YL, Ran XH, Cui JY, Zhang HL, Chen ZX. [The influence of CD44 on the adhesive, migratory and infiltrative abilities of leukemia cells]. *Zhonghua Xueyexue Zazhi* 2013; 34: 60-63 [PMID: 23597468]

9 Fedorchenko O, Stiefelhagen M, Peer-Zada AA, Barthel R, Mayer P, Eckei L, Breuer A, Crispatzu G, Rosen N, Landwehr T, Lilienthal N, Möllmann M, Montesinos-Rongen M, Heukamp L, Dürig J, Hallek M, Fingerle-Rowson G, Herling M. CD44 regulates the apoptotic response and promotes disease development in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121: 4126-4136 [PMID: 23547049 DOI: 10.1182/blood-2012-11-466250]

10 吕慧. 原发性IgA肾病患儿肾组织免疫病理及A5B1的表达. 中国妇幼保健 2010; 25: 4394-4396

11 Zhang S, Wu CC, Fecteau JF, Cui B, Chen L, Zhang L, Wu R, Rassenti L, Lao F, Weigand S, Kipps TJ. Targeting chronic lymphocytic leukemia cells with a humanized monoclonal antibody specific for CD44. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 6127-6132 [PMID: 23530247]

12 王华毅, 谢先木, 付德琴, 王虹. 腹腔冲洗液L3-PP和整合素α5β1检测对胃癌腹膜种植转移预测价值分析. 中华肿瘤防治杂志 2013; 20: 281-284

13 Kamazani FM, Bahoush GR, Aghaeipour M, Vaeli S, Amirghofran Z. CD44 and CD27 expression pattern in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia and its clinical significance. *Med Oncol* 2013; 30: 359 [PMID: 23263849 DOI: 10.1007/s12032-012-0359-9]

14 梁桦. 七氟醚对人肺腺癌A549细胞生长、转移能力及化疗敏感性的影响. 南方医科大学, 2012: 1-128

15 朱大伟, 陈俊俊, 裴红蕾. 胃癌组织中粘附分子整合素CD11c的表达及对预后的影响. 临床肿瘤学杂志 2013; 18: 782-785

16 赵雪艳, 王娟, 荣小伟, 徐远义. DS对胃癌细胞整合素β1表达及腹腔种植转移的影响. 临床与实验病理学杂志 2013; 29: 365-368

17 洪宇, 陈冬梅, 李扬志, 李春花, 谢梅青. 整合素αvβ3和孕激素受体在子宫内膜异位症患者黄体中期子宫内膜中的表达. 中国妇幼保健 2012; 27: 2024-2027

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1977-1983
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

CD133$^+$CXCR4$^+$胃癌KATO-III细胞的侵袭能力

俞远林, 姜波健, 俞继卫

俞远林, 安徽省蚌埠医学院研究生部 安徽省蚌埠市 233030
俞远林, 姜波健, 俞继卫, 上海交通大学医学院附属第三人民医院普外一科 上海市 201999
俞远林, 在读硕士, 主要从事胃癌与胆囊癌的基础与临床研究.
蚌埠医学院研究生创新计划基金资助项目, No. Byycx1323
国家自然科学基金资助项目, No. 81101850
作者贡献分布: 此课题由俞继卫、姜波健及俞远林设计; 研究过程、数据分析由俞远林完成; 本论文写作由俞远林完成; 审校过程由姜波健、俞继卫完成.
通讯作者: 俞继卫, 主任医师, 201999, 上海市漠河路280号, 上海交通大学医学院附属第三人民医院普外一科.
jiweiyu919@hotmail.com
收稿日期: 2014-03-13 修回日期: 2014-04-10
接受日期: 2014-04-28 在线出版日期: 2014-05-18

High invasive capacity of CD133$^+$CXCR4$^+$ gastric cancer cells

Yuan-Lin Yu , Bo-Jian Jiang , Ji-Wei Yu

Yuan-Lin Yu, Postgraduate School, Benbu Medical College, Benbu 233030, Anhui Province, China
Yuan-Lin Yu, Bo-Jian Jiang, Ji-Wei Yu, the first Department of General Surgery, No. 3 People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China
Supported by: Postgraduate Innovation Research Program of Benbu Medical College, No. Byycx1323; and National Nature Science Foundation of China, No. 81101850
Correspondence to: Ji-Wei Yu, Chief Physician, Department of General Surgery, No. 3 People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 280 Mohe Road, Shanghai 201999, China. jiweiyu919@hotmail.com
Received: 2014-03-13 Revised: 2014-04-10
Accepted: 2014-04-28 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To assess the invasive capacity of CD133$^+$CXCR4$^+$ gastric cancer cells.

METHODS: The invasive and migration capacities of CD133$^-$CXCR4$^-$, CD133$^-$CXCR4$^+$, CD133$^+$CXCR4$^-$, and CD133$^+$CXCR4$^+$ gastric cancer cells were assessed by Transwell assays. The mRNA expression of EMT related factors in CD133$^+$CXCR4$^-$ and CD133$^+$CXCR4$^+$ cells was detected by semi-quantitative RT-PCR. After SDF-1α and AMD3100 were used to stimulate and inhibit KATO-III cells, respectively, the invasive ability of CD133$^+$CXCR4$^+$ and CD133$^+$CXCR4$^-$ cells was assessed, and the mRNA expression of EMT related factors was detected by semi-quantitative RT-PCR.

RESULTS: The mean number of migrated cells in the CD133$^+$CXCR4$^+$ group was significantly more than that in the CD133$^+$CXCR4$^-$ group (136.67 ± 14.36 *vs* 55.33 ± 7.37, P = 0.01). The expressive level of E-cadherin mRNA in the CD133$^+$CXCR4$^+$ group was significantly lower than that in the CD133$^+$CXCR4$^-$ (0.3068 ± 0.0399 *vs* 0.7665 ± 0.0899, P = 0.005). The expressive levels of N-cadherin and Snail mRNAs in CD133$^+$CXCR4$^+$ cells were significantly stronger than those in CD133$^+$CXCR4$^-$ cells (0.5852 ± 0.0453 *vs* 0.2980 ± 0.0626, P = 0.006; 0.9178 ± 0.0788 *vs* 0.6468 ± 0.1506, P = 0.03). In CD133$^+$CXCR4$^+$ cells, SDF-1α treatment significantly increased the number of invasive cells (P = 0.033), decreased the expressive level of E-cadherin mRNA (P = 0.018), and increased the expressive level of Snail mRNA (P = 0.028). AMD3100 treatment significantly increased E-cadherin mRNA expression (P = 0.008) and decreased Snail mRNA expression (P = 0.006). In CD133$^+$CXCR4$^-$ cells, SDF-1α or AMD3100 treatment did not significantly alter the invasion and expressive levels of E-cadherin and Snail mRNAs.

CONCLUSION: The high invasion ability of CD133$^+$CXCR4$^+$ gastric cancer cells may be mediated by EMT and SDF-1α/CXCR4.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gastric cancer; Invasion; CD133; SDF-1α/CXCR4

Yu YL, Jiang BJ, Yu JW. High invasive capacity of CD133$^+$CXCR4$^+$ gastric cancer cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1977-1983 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1977.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1977

摘要

目的: 研究CD133$^+$CXCR4$^+$胃癌细胞侵袭能力.

方法: Transwell检测CD133$^-$CXCR4$^-$、CD133$^-$

■背景资料
胃癌是消化系常见恶性肿瘤之一, 其死亡原因主要是胃癌高侵袭能力和高转移能力. 肿瘤起始细胞(tumor initiating cells, TICs)是近年来的研究热点, 多种证据表明TICs与肿瘤复发转移密切相关. 研究不同亚群的胃癌TICs侵袭能力差异, 有利于进一步阐明胃癌发生转移的机制.

■同行评议者
刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学

■研发前沿
明确CD133$^+$CXCR4$^+$亚群胃癌细胞可能通过EMT和SDF-1α/CXCR4轴获得高侵袭能力,属于运动型TICs. 然而, 具体机制尚待深入探究.

CXCR4$^+$、CD133$^+$CXCR4$^-$、CD133$^+$CXCR4$^+$四组细胞迁移和侵袭能力. 半定量酶链聚合反应检测CD133$^+$CXCR4$^+$组与CD133$^+$CXCR4$^-$组细胞上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)相关因子表达. 分别用基质细胞衍生因子-1α(stromalcellderivedfactor-1α, SDF-1α)、AMD3100作用KATO-III细胞后, Transwell检测CD133$^+$CXCR4$^+$组与CD133$^+$CXCR4$^-$组细胞侵袭能力. 半定量酶链聚合反应检测KATO-III细胞中EMT相关因子表达.

结果: CD133$^+$CXCR4$^+$组平均迁移细胞数(136.67±14.36)高于CD133$^+$CXCR4$^-$组(55.33±7.37, P = 0.01). CD133$^+$CXCR4$^+$组E-cadherin mRNA相对灰度值(0.3068±0.0399)低于CD133$^+$CXCR4$^-$组(0.7665±0.0899, P = 0.005). CD133$^+$CXCR4$^+$组N-cadherin mRNA表达(0.5852±0.0453)、Snail mRNA表达(0.9178±0.0788)均高于CD133$^+$CXCR4$^-$组(0.2980±0.0626, P = 0.006; 0.6468±0.1506, P = 0.03). CD133$^+$CXCR4$^+$组中, 与对照组相比, SDF-1α组侵袭细胞数明显上升(P = 0.033). SDF-1α组E-cadherin mRNA表达下降(P = 0.018), 而AMD3100组E-cadherin mRNA表达上升(P = 0.008). SDF-1α组Snail mRNA表达上升(P = 0.028), 而AMD3100组Snail mRNA表达下降(P = 0.006). 然而CD133$^+$CXCR4$^-$组中, SDF-1α组侵袭细胞数无明显变化. SDF-1α与AMD3100组E-cadherin mRNA与Snail mRNA表达均无明显变化.

结论: CD133$^+$CXCR4$^+$胃癌细胞可能通过EMT和SDF-1α/CXCR4获得高侵袭能力.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胃癌; 侵袭; CD133; SDF-1α/CXCR4

核心提示: 本研究初步明确CXCR4与CD133双阳性胃癌细胞的迁移与侵袭能力, 并深入地揭示了基质细胞衍生因子-1α(stromalcellderivedfactor-1α)/CXCR4轴与上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition)现象在CXCR4与CD133双阳性胃癌细胞的迁移与侵袭能力扮演的重要作用.

俞远林, 姜波健, 俞继卫. CD133$^+$CXCR4$^+$胃癌KATO-III细胞的侵袭能力. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1977-1983
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1977.asp
DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1977

0 引言

胃癌的发病率在恶性肿瘤中位居前列, 其高死亡率主要由胃癌易侵袭和转移所致[1]. 肿瘤起始细胞(tumor initiating cells, TICs)又称肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs), 是一类与正常干细胞相似的具有多能特性的祖细胞, 能够自我更新、无限增殖及多向分化[2]. CD133作为TICs的重要标志物近年来引起广泛关注[3-6]. 近来发现, 基质细胞衍生因子-1α(stromalcellderivedfactor-1α, SDF-1α)/CXCR4轴在乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌迁移、侵袭和转移过程中发挥关键作用[7]. 在结肠癌中, CXCR4和CD133联合表达提示高转移特性[8]. 此外, 在胃癌KATO-III细胞中SDF-1α/CXCR4轴参与调控CD133的表达[9]. 本研究旨在探索CXCR4和CD133联合表达对胃癌KATO-III细胞侵袭能力的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌KATO-III细胞细胞株(ATCC公司, 美国); 胎牛血清(Hyclone公司, 美国); ATCC培养基(ATCC公司, 美国); CXCR4兔抗人多克隆抗体(Abcam公司, 英国); CD133鼠抗人单克隆抗体(Miltenyi公司, 德国); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(Jackson公司, 美国); CD133分选试剂盒、CXCR4分选试剂盒(Miltenyi公司, 德国); HRP标记的二抗(Jackson公司, 美国); 人重组SDF-1α(PeproTech公司, 美国); CXCR4特异性受体抑制剂AMD3100(Sigma公司, 美国); TRIzol试剂和PCR试剂盒(Takara公司, 日本); 目的引物(上海生工生物工程公司, 中国);

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及免疫磁珠分选: 细胞培养: KATO-III细胞用含20%胎牛血清, 100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的ATCC培养基, 置37 ℃、5%CO_2饱和湿度培养箱中, 每2-3 d传代1次. 收集KATO-III细胞, 调整密度至1×10^{7}个/mL, 用300 μL缓冲液重悬, 按操作步骤经MiniMACS分离柱分选, 用无血清含20 ng/mL EGF及10 ng/mL bFGF的ATCC培养基重悬, 并设定为CD133$^+$CXCR4$^+$组、CD133$^+$CXCR4$^-$组、CD133$^-$CXCR4$^+$组、CD133$^-$CXCR4$^-$组. 实验分为3组: (1)空白对照组: 即不加任何药物的细胞组; (2)SDF-1α组: 100 ng/mL SDF-1α刺激2 h; (3)AMD3100组: CXCR4特异性的抑制剂AMD3100(40 μmol/L)预处理细胞30 min[10].

1.2.2 免疫蛋白印迹法(Western blot)检测: 用100 μL裂解液作用于1×10^{5}个胰酶消化后的KATO-III细胞, 冰上裂解30 min, 4 ℃12000 r/min, 5 min

表 1 各类检测指标相关引物序列及其功能

因子	引物序列	产物长度(bp)	功能
Snail	上游: 5'-CCTCCCTGTCAGATGAGGAC-3' 下游: 5'-CCAGGCTGAGGTATTCCTTG-3'	234	EMT调节因子
E-cadherin	上游: 5'-TGCCCAGAAAATGAAAAAGG-3' 下游: 5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3'	200	上皮细胞表面标志物
N-cadherin	上游: 5'-ACAGTGGCCACCTACAAAGG-3' 下游: 5'-CCGAGATGGGGTTGATAATG-3'	201	间质细胞表面标志物
CD133	上游: 5'-TTACGGCACTCTTCACCT-3' 下游: 5'-TATTCCACAAGCAGCAAA-3'	172	TICs表面标志物
GAPDH	上游: 5'-ACGGATTTGGTCGTATTGGGCG-3' 下游: 5'-CTCCTGGAAGATGGTGATGG-3'	197	内参

■相关报道
近来发现, SDF-1α/CXCR4轴在多种恶性肿瘤的迁移、侵袭和转移过程中发挥关键作用. 在结肠癌中, CXCR4和CD133联合表达提示高转移可能性. 本课题组前期发现CXCR4和CD133在胃癌原发灶中高表达, 两者呈正相关, 其联合表达与转移淋巴结比率和转移淋巴结数呈正相关, 推测胃癌CD133阳性细胞亚群可能在CXCR4介导下更易导致淋巴管浸润和淋巴结转移.

离心, 取上清液60 μL+15 μL蛋白上样缓冲液, 即得该组细胞的蛋白, 每次均取15 μL上样量在10%分离胶、5%浓缩胶上面进行SDS-PAGE凝胶电泳分离, 经电转膜仪转至PVDF膜. 然后用5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 用5%脱脂奶稀释的兔抗人CXCR4抗体(1∶1000)、鼠抗人抗体CD133(1∶200), 4 ℃轻摇过夜, 用吐温-20三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(TBST)振洗, 洗3次, 每次10 min, 分别加HRP标记的山羊抗兔和抗鼠IgG二抗(1∶2000), 室温下孵育2 h, 再用TBST振洗2次, 每次10 min; TBS振洗1次, 每次10 min. 加增强化学发光(ECL)底物显色, 曝光洗片. 取胶片于扫描仪上获取图像, 图像分析软件进行半定量分析, 实验重复3次取平均值[11].

1.2.3 半定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测: TRIzol法提取总RNA, 逆转录成cDNA后行PCR反应(表1). 反应条件为94 ℃ 3 min, 94 ℃ 30 s、50 ℃-57 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s 35个循环, 4 ℃ 10 min, 应用凝胶成像系统及凝胶图像分析软件行半定量分析目的产物与对应GAPDH产物的灰度值, 目的mRNA表达水平以目的mRNA扩增条带灰度值与GAPDH mRNA扩增条带灰度值比值表示, 图像分析软件进行半定量分析, 实验重复3次取平均值[11].

1.2.4 Transwell法检测KATO-III细胞侵袭能力: 将基质胶以1∶1比例用无血清ATCC培养基稀释后, 取50 μL铺于Transwell上室中, 置于37 ℃培养箱中, 待上室的基质胶凝结, 收集对数生长期KATO-III细胞, 以无血清ATCC培养基重悬, 取100 μL加入Transwell上室中, 调整细胞浓度为1×10^5-5×10^5个/孔, 下室中加入含有20%胎牛血清的ATCC完全培养基, 37 ℃培养箱培养24 h后, 取出Transwell小室, 用棉签擦去上室中的基质胶及细胞, 4%多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 在高倍镜下平移非重叠观察9个视野, 计数其中的穿膜细胞数, 并计算平均数, 实验结果最终以平均穿膜细胞数表示.

1.2.5 Transwell法检测KATO-III细胞迁移能力: 收集对数生长期KATO-III细胞, 以无血清ATCC培养基重悬, 取100 μL加入Transwell上室中, 调整细胞浓度为(1-5)$\times10^5$个/孔, 下室中加入含有20%胎牛血清的ATCC完全培养基, 37 ℃培养箱培养24 h后, 取出Transwell小室, 用棉签擦去上室的细胞, 4%多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 在高倍镜下平移非重叠观察9个视野, 计数其中的穿膜细胞数, 并计算平均数, 实验结果最终以平均穿膜细胞数表示.

统计学处理 采用SPSS17.0软件进行统计学分析, 计量数据以mean±SD表示, 组间比较采用单因素方差分析. $P<0.05$为差异有统计学意义. CXCR4及CD133联合表达和胃癌临床病理的关系采用卡方检验分析.

2 结果

2.1 CD133$^-$CXCR4$^-$、CD133$^-$CXCR4$^+$、CD133$^+$CXCR4$^-$、CD133$^+$CXCR4$^+$四组细胞迁移能力检测 Transwell法迁移能力检测发现, CD133$^+$CXCR4$^+$组平均迁移细胞数(136.67±14.36), 显著高于CD133$^+$CXCR4$^-$组(55.33±7.37, P = 0.01), CD133$^-$CXCR4$^+$组(31.33±5.51, P = 0.01), CD133$^-$CXCR4$^-$组(33.33±5.69, P = 0.002)(图1).

2.2 CD133$^+$CXCR4$^+$组与CD133$^+$CXCR4$^-$组细胞上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition,

■创新盘点

本研究在体外实验的层面上，首次利用免疫磁珠法从胃癌细胞株中分选出CD133$^+$CXCR4$^+$亚群细胞，并对其迁移和侵袭能力进行检测，随即对其机制进行深入的探索，从而为胃癌的转移和复发寻找更加充分的理论依据.

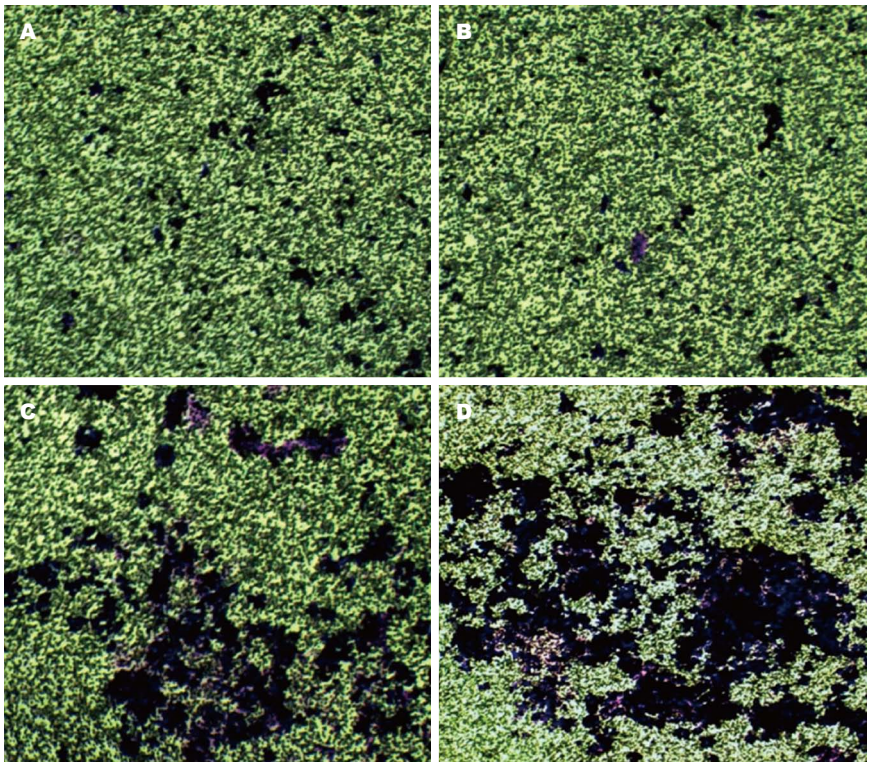


图 1 Transwell法检测四组细胞迁移能力. A: CD133$^-$CXCR4$^-$; B: CD133$^-$CXCR4$^+$; C: CD133$^+$CXCR4$^-$; D: CD133$^+$CXCR4$^+$.

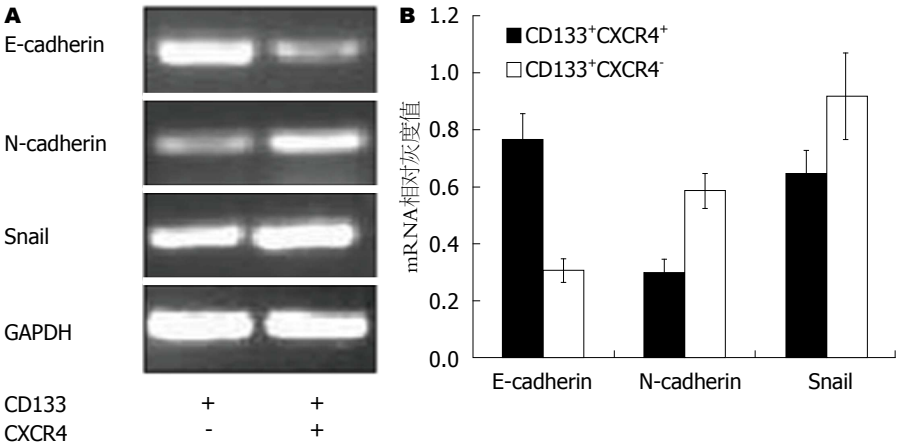


图 2 CD133$^+$CXCR4$^+$组与CD133$^+$CXCR4$^-$组EMT相关因子mRNA表达. A: EMT相关因子mRNA电泳条带图; B: 柱状图.

EMT)相关因子mRNA检测 RT-PCR检测发现，CD133$^+$CXCR4$^+$组E-cadherin mRNA相对灰度值(0.3068±0.0399)显著低于CD133$^+$CXCR4$^-$组(0.7665±0.0899, P = 0.005). CD133$^+$CXCR4$^+$组N-cadherin mRNA相对灰度值(0.5852±0.0453)显著高于CD133$^+$CXCR4$^-$组(0.2980±0.0626, P = 0.006). CD133$^+$CXCR4$^+$组Snail mRNA相对灰度值(0.9178±0.0788)显著高于CD133$^+$CXCR4$^-$组(0.6468±0.1506, P = 0.03)(图2).

2.3 SDF-1α刺激后CD133$^+$CXCR4$^+$组与CD133$^+$CXCR4$^-$组细胞侵袭能力变化 Transwell法侵袭能力检测发现，CD133$^+$CXCR4$^+$组中，与对照组(42.33±6.51)相比，SDF-1α组侵袭细胞数(81.67±12.10, P = 0.033)明显上升. 然而在CD133$^+$CXCR4$^-$组中，与对照组(17.67±3.51)相比，SDF-1α组侵袭细胞数(17.33±4.93, P = 0.475)无明显变化(图3).

2.4 SDF-1α、AMD3100刺激后CD133$^+$CXCR4$^+$组与CD133$^+$CXCR4$^-$组细胞中EMT相关因子表达变化 RT-PCR检测发现，CD133$^+$CXCR4$^+$组中，与对照组(0.4102±0.0675)相比，SDF-1α组E-cadherin mRNA相对灰度值(0.2170

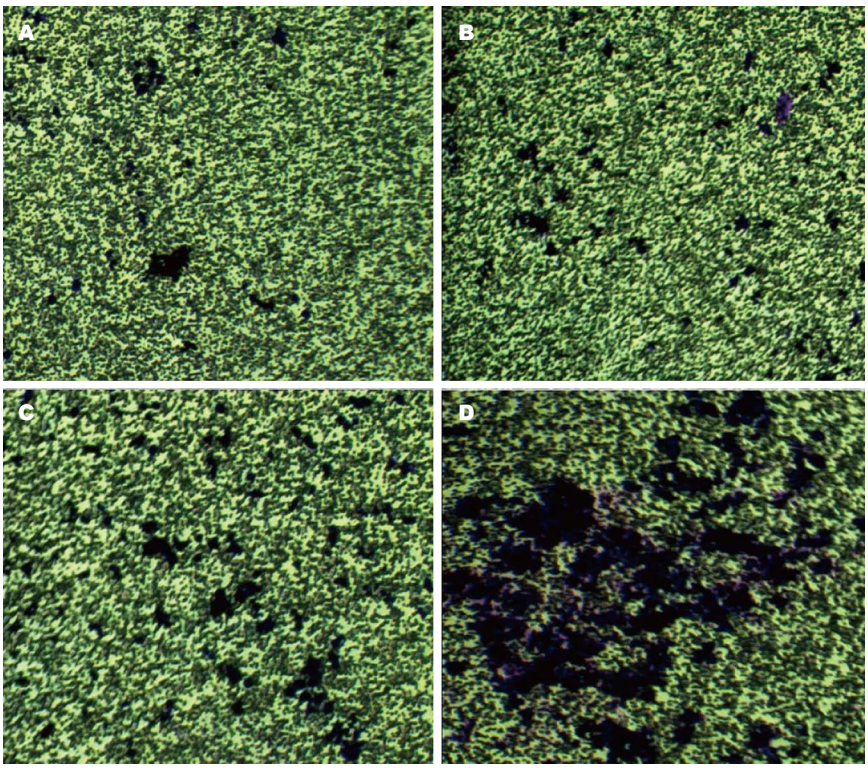


图 3 SDF-1α刺激后CD133$^+$CXCR4$^+$组与CD133$^+$CXCR4$^-$组侵袭能力变化. A: Control组CD133$^+$CXCR4$^-$; B: SDF-1α组CD133$^+$CXCR4$^-$; C: Control组CD133$^+$CXCR4$^+$; D: SDF-1α组CD133$^+$CXCR4$^+$. SDF-1α: 基质细胞衍生因子-1α.

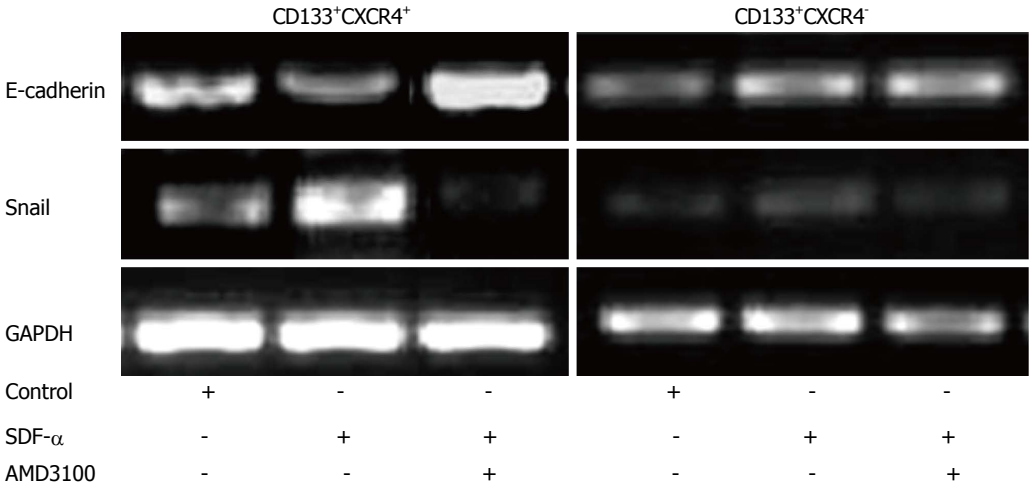


图 4 SDF-1α、AMD3100刺激后CD133$^+$CXCR4$^+$组与CD133$^+$CXCR4$^-$组EMT相关因子mRNA表达的变化. SDF-1α: 基质细胞衍生因子-1α.

±0.0220, P = 0.018)下降, 而AMD3100组E-cadherin mRNA相对灰度值(0.8415±0.0934, P = 0.008)上升. 与对照组(0.3034±0.0501)相比, SDF-1α组Snail mRNA相对灰度值(0.5660±0.0715, P = 0.028)上升, 而AMD3100组Snail mRNA相对灰度值(0.1280±0.0274, P = 0.006)下降. CD133$^+$CXCR4$^-$组中, 与对照组(0.3281±0.0657)相比, SDF-1α组E-cadherin mRNA相对灰度值(0.3014±0.0282, P = 0.335)无明显变化, AMD3100组E-cadherin mRNA相对灰度值(0.3300±0.0312, P = 0.480)无明显变化. 与对照组(0.1908±0.0471)相比, SDF-1α组Snail mRNA相对灰度值(0.1759±0.0361, P = 0.391)无明显变化, AMD3100组Snail mRNA相对灰度值(0.1715±0.0598, P = 0.187)无明显变化(图4),

2.5 胃癌原发灶CXCR4和CD133 mRNA及蛋白表达与淋巴转移的关系 半定量RT-PCR示, CXCR4 mRNA及CD133 mRNA相对灰度值在淋

■应用要点

由于胃癌侵袭转移的机制尚未明确, 基于本课题组前期研究成果及国内外文献报道, 本研究通过免疫磁珠分选的方法分离CD133$^+$CXCR4$^+$亚群胃癌细胞, 通过检测侵袭能力及EMT相关因子的表达情况, 初步阐明CD133$^+$CXCR4$^+$亚群胃癌细胞侵袭能力机制, 从而为进一步探寻胃癌的转移和复发提供理论依据.

■同行评价
本文选题具有重要的基础研究及临床应用的意义.

巴结转移组高于无淋巴结转移组, 差异均有统计学意义(P = 0.011, P = 0.038). CXCR4蛋白相对灰度值在N1组明显高于无淋巴结转移的N0组, 差异有统计学意义(P = 0.023), 而明显低于N2+N3组(P = 0.008); 在淋巴管浸润组明显高于无淋巴管浸润组(P = 0.020). CD133蛋白灰度值在N1组、N2+N3组与N0组之间差异有统计学意义(P = 0.04, P = 0.01), N1组与N2+N3组之间无明显差异; 在淋巴管浸润组高于无淋巴管浸润组(P = 0.047).

3 讨论

Bonnte等[12]最早研究发现在白血病中, 存在一特定亚群细胞与正常干细胞相似的具有多能特性的祖细胞, 能够自我更新、无限增殖及多向分化, 并由此提出了TICs理论. 近年来, TICs理论已在多种实体肿瘤相继得到验证[13]. 人AC133抗原也称为CD133, 是PROM1基因编码的5次跨膜糖蛋白, 被认为是包括脑肿瘤、胰腺癌、结肠癌、前列腺癌中陆续得到实验论证[3-6]等多种TICs的标志. 在对KATO-Ⅲ胃印戒细胞癌的研究中发现, CD133$^+$亚群KATO-Ⅲ细胞相对于CD133$^-$亚群具有更强的克隆形成能力、分化能力、裸鼠移植成瘤能力及耐药的潜能, 同时, 后续实验[14]已成功转染并抑制KATO-Ⅲ CD133$^+$胃癌细胞CD133基因的表达, CD133基因表达被抑制以后, 细胞的增殖活性、侵袭和克隆球形成能力显著降低, 由此推测CD133或可作为胃癌TICs的表面标志物之一[11].

SDF-1α/CXCR4轴是由趋化因子SDF-1α与其特异性受体CXCR4相互作用而构成的一个与细胞间信息传递、细胞迁移有密切关系的偶联分子对[15]. 体外实验中, 本研究利用免疫磁珠分选成功分离出以CD133和CXCR4为标志物的不同亚群细胞. 随后, 通过Transwell法检测发现, CD133$^+$CXCR4$^+$亚群细胞迁移能力显著高于其它亚群, 由此推测CD133$^+$CXCR4$^+$亚群细胞可能具备高侵袭潜能. 深入地, 通过SDF-1α激活SDF-1α/CXCR4轴后, CD133$^+$CXCR4$^+$亚群细胞侵袭能力明显上升, 而CD133$^+$CXCR4$^-$亚群细胞侵袭能力无明显变化.

EMT是指上皮细胞发生形态转变, 变为间质细胞的一个过程[16]. 本课题组前期研究表明CD133可以通过诱导EMT的发生而促进胃癌的侵袭与转移. 通过RT-PCR检测CD133$^+$CXCR4$^+$与CD133$^+$CXCR4$^-$两个亚群细胞EMT相关因子mRNA表达发现, 对应于CD133$^+$CXCR4$^-$亚群, CD133$^+$CXCR4$^+$亚群细胞上皮标志物E-cadherin表达降低, 而间质标志物N-cadherin和Snail表达升高. 由此推断, CD133$^+$CXCR4$^+$亚群更倾向于发生EMT现象, 其机制可能是CD133通过CXCR4诱导EMT发生促进胃癌的侵袭和转移.

为了进一步验证CD133$^+$胃癌KATO-Ⅲ细胞中SDF-1α/CXCR4轴与EMT现象之间的关系. 本研究利用SDF-1α或CXCR4特异性抑制剂AMD3100激活或抑制SDF-1α/CXCR4轴, 观察CD133$^+$CXCR4$^+$与CD133$^+$CXCR4$^-$两个亚群细胞EMT相关因子的表达变化. 结果发现, 在CD133$^+$CXCR4$^+$亚群中, 激活或抑制SDF-1α/CXCR4轴能够调控EMT相关因子的表达. 然而, CD133$^+$CXCR4$^-$亚群中, 激活或抑制SDF-1α/CXCR4轴, EMT相关因子表达无明显变化. TICs理论认为, 因侵袭能力不同, TICs可分为运动型TICs与静止型TICs. 由此, 我们可认为在CD133$^+$胃癌KATO-Ⅲ细胞中, CD133$^+$CXCR4$^+$亚群细胞属于运动型TICs, 负责侵袭和转移的启动与发生.

总之, CD133$^+$CXCR4$^+$胃癌细胞可能通过EMT和SDF-1α/CXCR4获得高侵袭能力的一群运动型TICs, 同时, CD133与CXCR4蛋白双阳性与胃癌淋巴结转移正相关.

4 参考文献

1 Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8-29 [PMID: 14974761]

2 Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, Giardina B. Cancer stem cells: the development of new cancer therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 875-892 [PMID: 21463158 DOI: 10.1517/14712598]

3 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110 [PMID: 17122772]

4 Rappa G, Fodstad O, Lorico A. The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma. *Stem Cells* 2008; 26: 3008-3017 [PMID: 18802032 DOI: 10.1634/stemcells.2008-0601]

5 Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 313-323 [PMID: 18371365 DOI: 10.1016/j.stem.2007.06.002]

6 Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, Duniho S, Jonas M, Anderson M, Zabinski RF, Sutherland MK, Gerber HP, Van Orden KL, Moore PA, Ruben SM, Carter PJ. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer* 2008; 99: 100-109 [PMID: 18542072 DOI: 10.1038/sj.bjc.6604437]

7 Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ, Wang J. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29: 709-722 [PMID: 20839032 DOI: 10.1007/s10555-010-9256-x]
8 Zhang SS, Han ZP, Jing YY, Tao SF, Li TJ, Wang H, Wang Y, Li R, Yang Y, Zhao X, Xu XD, Yu ED, Rui YC, Liu HJ, Zhang L, Wei LX. CD133(+)CXCR4(+) colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. *BMC Med* 2012; 10: 85 [PMID: 22871210 DOI: 10.1186/1741-7015-10-85]
9 姜海广, 陆瑞祺, 吴巨钢, 周国才, 俞继卫, 姜波健. 基质细胞源性因子-1α/CXC趋化因子受体-4轴经PI3K/Akt通路对胃癌细胞CD133表达的调控作用. 中华实验外科杂志 2012; 29: 378-380
10 Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Kruizinga RC, Ananias HJ, Kliphuis NM, Huls G, De Vries EG, de Jong IJ, Walenkamp AM. CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia* 2012; 14: 709-718 [PMID: 22952424]
11 陆瑞祺, 俞继卫, 吴巨钢, 周国才, 姜海广, 姜波健. 胃癌CD133阳性细胞亚群肿瘤起始细胞样特性的检测. 中华胃肠外科杂志 2012; 15: 174-179
12 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737 [PMID: 9212098]
13 Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012; 21: 283-296 [PMID: 22439924 DOI: 10.1016/j.ccr.2012.03.003]
14 王守练, 俞继卫, 蔡成, 陆瑞琪, 吴巨钢, 倪晓春, 姜波健. RNA干扰抑制KATO-III CD133胃癌细胞CD133基因表达及对其生物学特性的影响. 中华胃肠外科杂志2013; 16: 889-894
15 陆瑞祺, 俞继卫, 姜波健. CXCL12(SDF-l)-CXCR4轴在胃癌中作用的研究进展. 中国普通外科杂志 2010; 19: 430-433
16 Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011; 331: 1559-1564 [PMID: 21436443 DOI: 10.1126/science.1203543]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1984-1991
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

紫草素对人共刺激细胞杀伤胃癌细胞的影响及其机制

郭雪兴, 刘军权, 陈复兴, 吕小婷, 陈永强, 陈剑群

■背景资料
人共刺激细胞是一种由外周血淋巴细胞经7种细胞因子在体外诱导获得的异质群T淋巴细胞, 其为胃癌的新兴治疗方案. 紫草素是一种能抑制胃癌细胞增殖及调控机体免疫功能的中药. 本研究主要探讨紫草素对人共刺激细胞增殖和功能的影响.

郭雪兴, 徐州医学院研究生学院 江苏省徐州市 221000
刘军权, 陈复兴, 吕小婷, 陈永强, 中国人民解放军第九七医院实验科 江苏省徐州市 221000
陈剑群, 徐州医学院附属医院消化内科 江苏省徐州市 221000
郭雪兴, 主要从事消化系肿瘤的研究.
作者贡献分布: 陈剑群确定研究内容并审校文章; 郭雪兴查阅文献、实验操作及撰写文章; 刘军权指导进行CCK8、MTT及LDH实验; 吕小婷指导进行FCM实验; 陈永强指导进行Western blot实验, 陈复兴参与确定研究内容.
通讯作者: 陈剑群, 主任医师, 221000, 江苏省徐州市泉山区环海西路99号, 徐州医学院附属医院消化内科. xyfyzzk@163.com
收稿日期: 2014-03-13 修回日期: 2014-04-03
接受日期: 2014-04-09 在线出版日期: 2014-05-18

Shikonin induces cytotoxicity of co-stimulated human cells to gastric cancer cell lines

Xue-Xing Guo, Jun-Quan Liu, Fu-Xing Chen, Xiao-Ting Lv, Yong-Qiang Chen, Jian-Qun Chen

Xue-Xing Guo, Department of Gastroenterology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China
Jun-Quan Liu, Fu-Xing Chen, Xiao-Ting Lv, Yong-Qiang Chen, Department of Central Laboratory, 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China
Jian-Qun Chen, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Jian-Qun Chen, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, 99 Huanhai West Road, Quanshan District, Xuzhou 221000, Jiangsu Province, China. xyfyzzk@163.com
Received: 2014-03-13 Revised: 2014-04-03
Accepted: 2014-04-09 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To observe the effect of shikonin on the growth of co-stimulated human cells and the cytotoxicity of co-stimulated cells to gastric cancer cell lines NCI-N87, BGC-823 and HGC-27, and to explore the underlying mechanisms.

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells were separated form healthy volunteers and induced with various cytokines (CD3 mAb, IL-2, IFN-γ, IL-1α, CD28 mAb, IL-15 and IL-21) to result in co-stimulated human cells *in vitro*. After co-stimulated cells were incubated with shikonin of different concentrations for 24, 48 and 72 h and co-cultured with the three gastric cancer cell lines, CCK8 assay was used to assess the proliferation of co-stimulated cells, and MTT assay was used to measure the reduced rate of growth of gastric cancer cells. FCM was used to detect the expression of GraB, PFP, CD107a and IFN-γ on co-stimulated cells before and after shikonin treatment. LDH release assay was used to measure the influence of shikonin on cytotoxic activity of co-stimulated cells to gastric cancer cells. Western blot assay was used to measure β-catenin, P-ERK1/2, Bcl-2 and P-AKT expression in co-stimulated cells before and after shikonin induction.

RESULTS: After incubation with shikonin at concentrations ranging from 0.2 to 50 μg/L for 48 h, the proliferation rate of co-stimulated cells increased significantly ($P < 0.05$). The expression of GraB, PFP, CD107a, IFN-γ, β-catenin, P-ERK1/2, Bcl-2 and P-AKT on co-stimulated cells treated with shikonin at concentrations from 6 to 25 μg/L were significantly higher than that in the control group ($P < 005$). In addition, the cytotoxic activity of co-stimulated cells treated with shikonin against the three gastric cancer cell lines were significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: These results suggest that shikonin can promote the growth of co-stimulated cells and increase the cytotoxic activity of co-stimulated cells against gastric cancer cells *via* mechanisms possibly associated with enhancing the activity of β-catenin, P-ERK1/2, Bcl-2 and P-AKT expression and increasing the expression of PFP, GraB, CD107a and IFN-γ.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Shikonin; Gastric cancer cells; Co-stimulated cells; Cytotoxic activity

Guo XX, Liu JQ, Chen FX, Lv XT, Chen YQ, Chen JQ. Shikonin induces cytotoxicity of co-stimulated human cells to gastric cancer cell lines. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1984-1991 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1984.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1984

■同行评议者
徐灿霞, 教授, 主任医师, 中南大学湘雅三医院消化内科; 郑鹏远, 教授, 主任医师, 河南省郑州市, 郑州大学第二附属医院消化科

摘要

目的: 观察紫草素作用前后对人共刺激细胞的增殖及对胃癌细胞NCI-N87、BGC-823、HGC-27杀伤活性的影响, 并探讨其作用机制.

方法: 分离健康者外周血单个核细胞, 在体外经CD3单克隆抗体(CD3 monoclon antibody, CD3 mAb)、白介素2(interleukin-2, IL-2)、干扰素γ(interferon-γ, IFN-γ)、白介素1α(interleukin-1α, IL-1α)、CD28 mAb、IL-15和IL-21共同诱导为人共刺激细胞, 予不同浓度紫草素诱导人共刺激细胞和3株胃癌细胞24、48、72 h后, 水溶性四唑盐(cell counting kit-8, CCK8)法检测人共刺激细胞增殖率, 四甲基偶氮唑蓝(colorimetric methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测胃癌细胞的抑制率, 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测人共刺激细胞颗粒酶B(granzyme B, GraB)、穿孔素(perforin, PFP)、CD107a、IFN-γ的表达, Western blot检测人共刺激细胞β-catenin、P-ERK1/2、P-AKT和Bcl-2的表达, 乳酸脱氢酶释放法(lactate dehydrogenase, LDH)检测紫草素对人共刺激细胞杀伤3株胃癌细胞的活性影响.

结果: 经紫草素诱导48 h后, 人共刺激细胞0.2-50 μg/L浓度组增殖明显(P<0.05), 6-25 μg/L浓度组GraB、PFP、CD107a、IFN-γ和β-catenin、p-ERK1/2、Bcl-2、P-AKT的表达显著高于对照组(P<0.05), 且对NCI-N87、BGC-823、HGC-27的杀伤活性较对照组增强(P<0.05).

结论: 紫草素在一定浓度范围内能够促进人共刺激细胞增殖, 并增强其对胃癌细胞NCI-N87、BGC-823、HGC-27的杀伤活性, 其机制可能与活化β-catenin、P-ERK1/2、Bcl-2、P-AKT和PFP、GraB、CD107a、IFN-γ的表达有关.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 紫草素; 胃癌细胞; 人共刺激细胞; 杀伤活性

核心提示: 紫草素在一定浓度范围内能促进人共刺激细胞增殖并提高其杀伤活性, 其可能机制为紫草素能激活β-catenin、磷酸化细胞外信号调节激酶1/2、Bcl-2和P-AKT信号通路促进人共刺激细胞增殖, 提高人共刺激细胞颗粒酶B(granzyme B)、穿孔素(perforin)、CD107a和干扰素γ(interferon-γ)表达促进人共刺激细胞对胃癌细胞的杀伤活性.

郭雪兴, 刘军权, 陈复兴, 吕小婷, 陈永强, 陈剑群. 紫草素对人共刺激细胞杀伤胃癌细胞的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1984-1991 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1984.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1984

0 引言

胃癌是消化系最常见恶性肿瘤之一, 其发病率居世界第4位, 在全球肿瘤致死原因中排名第2位[1]. 胃癌的常规治疗方法有手术、化疗、放疗等, 但其均会对机体造成不同程度的组织损伤和免疫功能减退[2]. 肿瘤过继细胞免疫治疗被认为是对肿瘤具有确切效果的又一治疗方法, 其主要是利用肿瘤患者的自身免疫细胞来治疗肿瘤[3]. 人共刺激细胞是肿瘤过继细胞免疫治疗中的一种效应细胞, 其是在常规细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)培养体系中增加刺激因子CD28单克隆抗体(CD28 monoclon antibody, CD28 mAb)、白介素15(interleukin-15, IL-15)和IL-21后获得的以$CD3^+CD56^+$为功能特征的异质群T淋巴细胞, 其增殖能力、细胞因子分泌和杀伤活性明显提高[4]. 如何获得足够数量并具有高细胞毒活性的效应细胞已成为人共刺激细胞治疗成功的关键[5]. 紫草素(shikonin)是一种从中药紫草中的提取的萘醌类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性[6]. 紫草素能明显抑制人胃癌细胞增殖[7]. 同时其也能调控机体的免疫功能, 例如提高免疫细胞活性, 促进淋巴细胞转化, 保护免疫器官和免疫功能免受肿瘤损伤[8]. 本研究主要探讨紫草素作用前后人共刺激细胞增殖和功能的变化, 为进一步提高人共刺激细胞的治疗效果提供参考.

1 材料和方法

1.1 材料 紫草素(Sigma公司); 人胃癌HGC-27、BGC-823细胞株(上海细胞研究所), NCI-N87细胞株(昆明细胞研究所); IL-15和IL-21(R&D公司); CD3(上海免疫研究所); CD28 mAb(苏州大学生物技术研究所); FITC和PerCP标记的抗人CD3、PE标记的穿孔素(perforin, PFP)、颗粒酶B(granzyme B, GraB)和APC标记的CD107a抗体购自杭州联科生物公司; 干扰素γ(interferon-γ, IFN-γ)试剂盒(Abender公司); 乳酸脱氢酶释放法(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(日本世诺临床诊断制品株式会社); 鼠抗人β-catenin、磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated extracellular signal regulated kinase, p-ERK1/2), 兔抗人

■研发前沿

如何获得足够数量并具有高细胞毒活性的效应细胞已成为人共刺激细胞治疗成功的关键. 紫草素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性. 同时紫草素能提高淋巴细胞活性. 本研究主要为进一步提高人共刺激细胞的治疗效果提供参考.

■相关报道
既往研究发现紫草素对胃癌细胞SGC-7901的抑制率呈剂量和浓度依赖性. 刘军权等体外研究发现人共刺激细胞对能明显抑制SGC-7901、SW-1990和SW-1116细胞的增殖. 本研究主要应用紫草素对人共刺激细胞杀伤3株不同分化胃癌细胞影响机制.

Bcl-2和P-AKT抗体(CST公司); Encore生化分析仪(北京希亚克技术有限公司); FACS Caliber流式细胞仪(BD公司); ST-360酶标仪(上海科华实验系统有限公司).

1.2 方法

1.2.1 人共刺激细胞的培养: 取健康者外周血100 mL, 淋巴细胞分离液分离得到单个核细胞, RPMI 1640培养液(含IFN-γ 2×10^6 U/L、10%小牛血清、5%人AB血清)调整细胞数为5×10^8/L, 接种于6孔板, 置37 ℃、5%CO_2培养箱中培养24 h后收集细胞, 用RPMI 1640完全培养液(含10%小牛血清、5%人AB血清、IL-1α 10 μg/L、IL-2 5×10^4 U/L、CD3 mAb 1 mg/L、IL-15 20 μg/L、IL-21 10 μg/L和CD28 mAb 10 mg/L)调整细胞数为5×10^8/L, 接种于6孔板, 于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养, 每2天换培养基(含IL-15、IL-21、CD28)1次.

1.2.2 CCK8法检测紫草素对人共刺激细胞生长的影响: 收集培养10 d的人共刺激细胞, 1×10^8/L细胞数接种于96孔板, 200 μL/孔, 加入紫草素(终浓度为0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3、6、12.5、25、50、100、200、400 μg/L), 孵育24、48、72 h后, 每孔加入CCK8 10 μL, 37 ℃孵育4 h后, 于酶标仪450 nm处检测各孔吸光度(*A*)值. 重复3次. 增殖率 = (实验*A*值-对照*A*值)/(对照*A*值)×100%.

1.2.3 MTT法检测紫草素对3株胃癌细胞生长的影响: HGC-27、BGC-823、NCI-N87分别以1×10^7、2×10^8、5×10^7/L细胞数分别接种于96孔板, 200 μL/孔, 加入紫草素(浓度分别为为0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3、6、12.5、25、50、100、200、400 μg/L), 孵育24、48、72 h后, 每孔加MTT 20 μL, 37 ℃孵育4 h后弃上清, 每孔加入DMSO 150 μL, 沉淀产物溶解后于酶标仪450 nm处检测各孔*A*值. 抑制率(%) = (对照*A*值-实验*A*值)/(对照*A*)×100%.

1.2.4 FCM检测紫草素对人共刺激细胞中CD107a、GraB、PFP和IFN-γ表达的影响: 取经紫草素(终浓度分别为0、0.4、1.6、6、25、100 μg/L)诱导48 h后的人共刺激细胞, 调整细胞数至1×10^7/L, 取100 μL细胞悬液, 加入PerCP-Cy5.5标记的CD3抗体和FITC标记的CD56抗体各20 μL, 室温避光孵育30 min; (1)用于检测CD107a的管加入APC标记的鼠抗人anti-CD107a 5 μL; (2)用于检测GraB、PFP和IFN-γ的管, 加入100 μL破膜剂A, 室温避光孵育15 min, 加入100 μL破膜剂B, 同时分别在试管中加入anti-GraB-PE、anti-PFP-PE 和anti-IFN-γ-APC各5 μL; 均设置同型对照抗体管, 共同孵育15 min, 流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测CD107a、GraB、PFP和IFN-γ的含量.

1.2.5 LDH释放法检测人共刺激细胞杀伤活性: 收集培养10 d的人共刺激细胞, 2×10^9/L细胞数加入6孔板, 3 mL/孔, 加人紫草素(终浓度分别为0、0.4、1.6、6、25、100 μg/L), 培养48 h, 收集人共刺激细胞作为效应细胞. 取HGC-27、BGC-823和NCI-N87细胞配成2×10^8/L细胞悬液为靶细胞, 将效靶细胞等量混合, 置37 ℃、5%CO_2培养箱中孵育6 h后混合, 取上清, 按LDH试剂盒说明书要求操作, 在生化分析仪340 nm处测定*A*值. 杀伤活性(%) = (*A*实验组-*A*效应细胞自然释放组)/(*A*靶细胞最大释放组-*A*靶细胞自然释组)×100%.

1.2.6 Western-blot检测紫草素作用前后人共刺激细胞β-catenin、P-ERK1/2、P-AKT和Bcl-2的表达: 取培养10 d的人共刺激细胞, 5×10^8/L细胞数接种于6孔板, 3 mL/孔, 加入紫草素(终浓度分别为0、0.4、1.6、6、25、100 μg/L), 培养48 h后, 收集人共刺激细胞, 提取蛋白, BCA法测蛋白浓度, 每管加入蛋白处理液30 mL, 煮沸5 min, 按每泳道蛋白样品40 μg加入SDS-PAGE样品孔内, 电泳后半干电转移至硝酸纤维膜上, 一抗、二抗孵育及显色、扫描条带, Imagel软件分析灰度值.

统计学处理 采用软件SPSS13.0进行统计学处理, 计量资料采用mean±SD表示, 多组间采用单因素方差分析(One-way ANOVA). $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 人共刺激细胞的培养 培养前, PBMC中$CD3^+CD56^+$T细胞比例<4%, 培养10 d后$CD3^+CD56^+$T细胞比例增至42.31%, 倒置显微镜观察培养第10天的人共刺激细胞形态如图1A, FCM检测人共刺激细胞表型$CD3^+CD56^+$表达如图1B.

2.2 CCK-8检测结果 与对照组比较, 浓度为0.4-50 μg/L的紫草素诱导人共刺激细胞24、48、72 h后, 人共刺激细胞增殖明显($P<0.05$); 相同浓度的紫草素作用后, 48 h时人共刺激细胞增殖达最高峰, 与24、72 h组比较有统计学意义

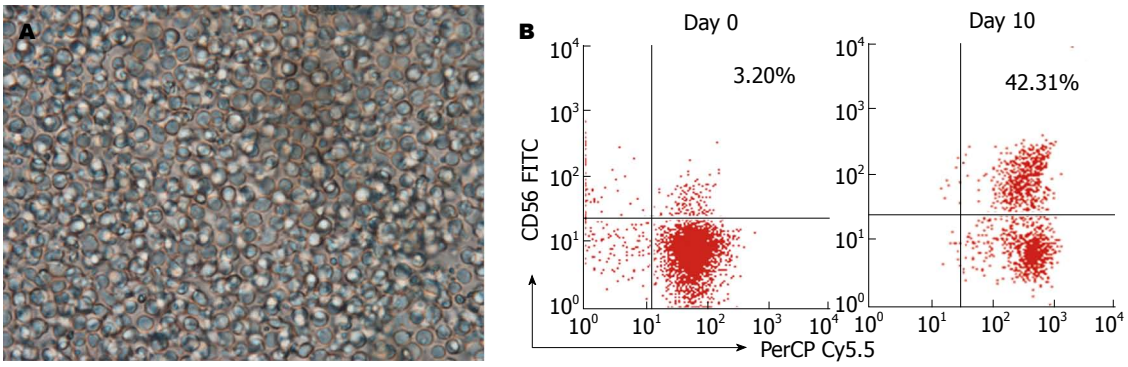


图 1 人共刺激细胞的培养. A: 培养10 d的人共刺激细胞(×400); B: 扩增前和扩增10 d后人共刺激细胞FCM分析.

■创新盘点
本文首先研究紫草素对人共刺激细胞增值率的影响, 后探讨紫草素促进人共刺激细胞增殖及增强人共刺激细胞对高分化胃癌细胞NCI-N87, 低分化胃癌细胞BGC-823和未分化胃癌细胞HGC-27杀伤活性的影响, 此研究国内外尚未见报道.

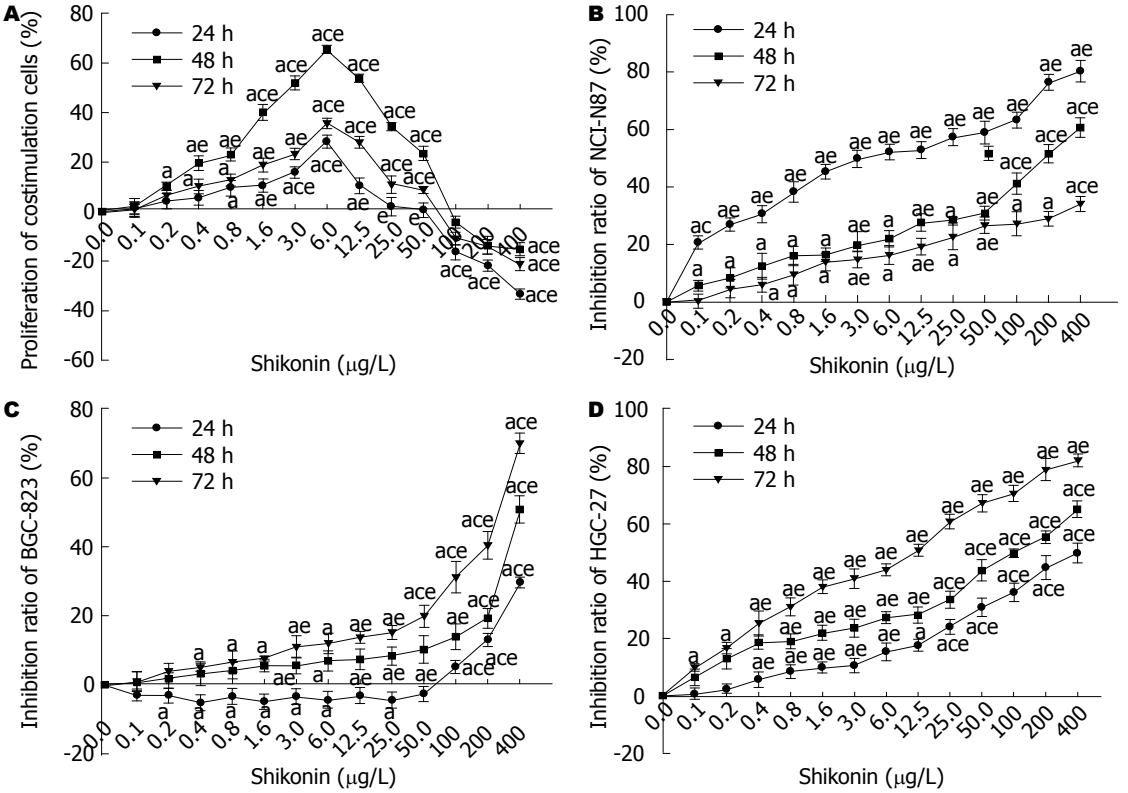


图 2 紫草素对人共刺激细胞增殖率及胃癌细胞抑制率的影响. A: 紫草素对人共刺激细胞增值率的影响; B: 紫草素对NCI−N87抑制率的影响; C: 紫草素对BGC−823抑制率的影响; D: 紫草素对HGC−27抑制率的影响; $^{a}P<0.05$ *vs* 对照组; 时间相同时, $^{c}P<0.05$ *vs* 其他浓度组; 浓度相同时, $^{e}P<0.05$ *vs* 其他时间组.

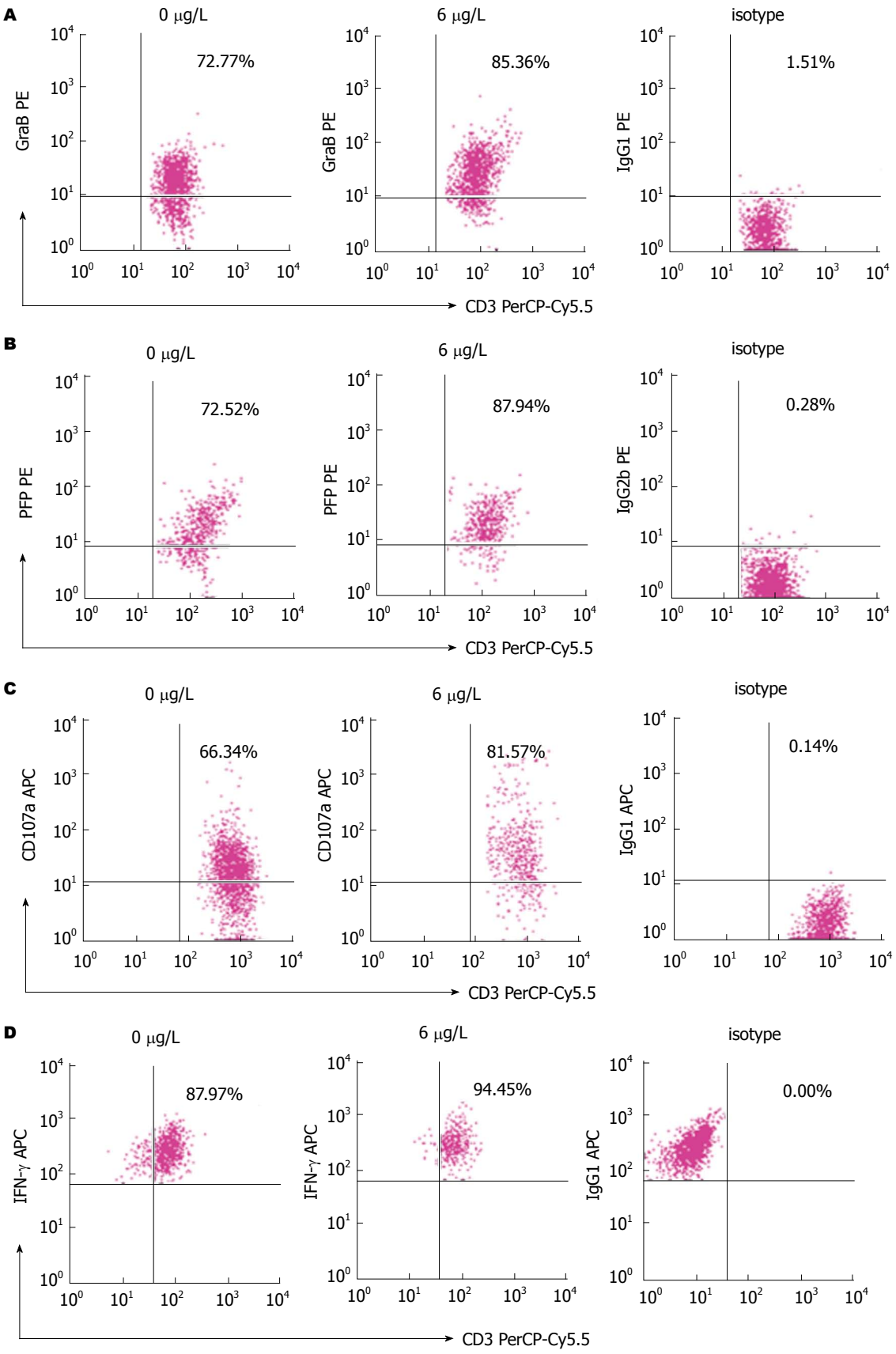
($P<0.05$); 紫草素浓度为100-400 μg/L时, 人共刺激细胞增殖率为负值($P<0.05$), 提示高浓度紫草素对人共刺激细胞具有杀伤作用, 可能为高浓度的紫草素产生的细胞毒作用所致(图2A).

2.3 MTT检测 与对照组比较, 0.4-400 μg/L的紫草素对NCI-N87抑制明显($P<0.05$), 且NCI-N87细胞的生长抑制率均随紫草素浓度增加而上升, 呈剂量依赖性; 紫草素浓度相同时, NCI-N87细胞生长抑制率24 h组达最高峰, 与48、72 h组比较, 均有显著差异($P<0.05$), 结果如图2B. 紫草素浓度为100-400 μg/L时, 紫草素对BGC-823细胞抑制明显($P<0.05$), 紫草素浓度相同时, BGC-823细胞生长抑制率72 h组达最高峰, 与24、48 h组比较, 均有显著差异($P<0.05$)(图2C). 与对照组比较, 0.8-400 μg/L的紫草素对HGC-27抑制明显($P<0.05$), 且HGC-27细胞的生长抑制率均随紫草素浓度增加而上升; 紫草素浓度相同时, HGC-27细胞生长抑制率72 h组达最高峰, 与24、48 h组比较, 均有显著差异($P<0.05$)(图2D).

2.3 FCM检测 紫草素与人共刺激细胞共培养48 h后, 人共刺激细胞GraB、PFP、CD107a和IFN-γ的表达不同程度升高, 且6和25 μg/L浓度

■应用要点

此研究为培养细胞毒性更强和安全性更高的人共刺激细胞提供了新的思路. 但此研究局限于体外实验, 如何使人共刺激细胞在体内持续发挥作用和引起体内的肿瘤免疫记忆并激发新一轮抗肿瘤免疫反应, 仍需进一步研究.



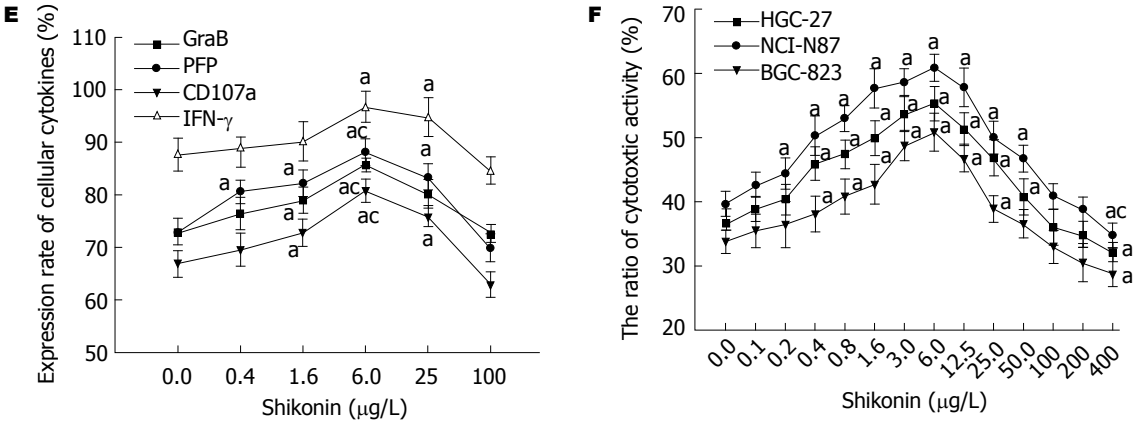


图 3 紫草素对人共刺激细胞功能的影响. A: 紫草素作用48 h后, 人共刺激细胞GraB表达的FCM结果; B: 紫草素作用48 h后, 人共刺激细胞PFP表达的FCM结果; C: 紫草素作用48 h后, 人共刺激细胞CD107a表达的FCM结果; D: 紫草素作用48 h后, 人共刺激细胞IFN-γ表达的FCM结果; E: 紫草素作用48 h后, 各组人共刺激细胞GraB、PFP、CD107a及IFN-γ表达的FCM结果的折线图; F: 紫草素作用人共刺激细胞48 h后, 对胃癌细胞NCI-N87、BGC-823、HGC-27杀伤活性的变化; $^aP<0.05$ *vs* 对照组, $^cP<0.05$ *vs* 其他浓度组.

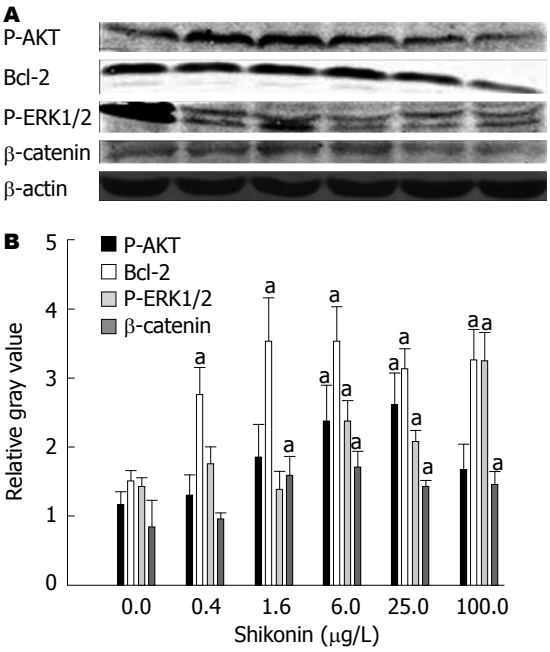


图 4 紫草素作用人共刺激细胞48 h后的蛋白表达. A: 不同浓度紫草素作用人共刺激细胞48 h后的蛋白条带图; B: 紫草素作用后人共刺激细胞β-catenin、P-ERK1/2、Bcl-2和P-AKT灰度值比较, $^aP<0.05$ *vs* 对照组.

组与对照组比较均有统计学意义($P<0.05$); 各实验组中, 6 μg/L组GraB、PFP和CD107a的表达最高, 与其他浓度组相比有统计学差别($P<0.05$)(图3E).

2.4 杀伤活性检测 经不同浓度紫草素作用48 h后, 人共刺激细胞对胃癌细胞NCI-N87、BGC-823和HGC-27的杀伤活性随着药物浓度的增加逐渐增强, 浓度在6 μg/L时杀伤活性达最高峰, 分别为55.30%、50.82%、60.86%, 0.4-25 μg/L, 与对照组比较, 差异显著($P<0.05$)(图3F).

2.5 Western blot检测 不同浓度紫草素作用48 h后, 人共刺激细胞中β-catenin、P-ERK1/2、Bcl-2和P-AKT蛋白的表达不同程度增高, 紫草素1.6-100 μg/L时β-catenin的表达高于对照组($P<0.05$); 紫草素6-100 μg/L时P-ERK1/2的表达高于对照组($P<0.05$), 且100 μg/L时P-ERK1/2表达最高; 紫草素0.4-100 μg/L时Bcl-2的表达高于对照组($P<0.05$); 6-25 μg/L时P-AKT的表达高于对照组($P<0.05$)(图4).

3 讨论

人共刺激细胞是PBMC在体外经多种细胞因子CD3 mAb、IL-2、IFN-γ、IL-1α、CD28 mAb、IL-15和IL-21诱导10 d后而获得的免疫效应细胞. 因CD3 mAb、IL-2、IFN-γ、IL-1α、CD28 mAb、IL-15和IL-21可以介导T细胞的增殖, 促进T细胞的活化及增强细胞毒活性, 并促其分泌IFN-γ及TNF-α等细胞因子, 所以人共刺激细胞的增殖率和细胞毒活性较CIK细胞明显提高[9]. Liu等[10]体外研究发现人共刺激细胞对能明显抑制SGC-7901、SW-1990和SW-1116细胞的增殖, 此细胞毒活性主要来源于$CD3^+CD56^+$T细胞比例较CIK细胞明显增高[11]. 本实验发现0.2-50 μg/L紫草素作用人共刺激细胞48 h后能明显促进其增殖, 增强人共刺激细胞对胃癌细胞的杀伤活性.

PFP和GraB是活化的T细胞和自然杀伤(natural killer, NK)细胞发挥细胞毒性作用的主要效应分子, 并协同发挥杀伤靶细胞的细胞毒

■同行评价
本文具有一定指导意义.

性作用[12]. PFP在靶细胞膜上聚合形成活性孔道, 在靶细胞膜内外形成明显的渗透压反差, 导致靶细胞胀裂而死; GraB也可通过此PFP形成的孔道进入靶细胞, 导致靶细胞凋亡[13]. T细胞表面的CD107a分子, 与T细胞活化以后脱颗粒过程相关, 其比值可以直接反应该效应细胞具有的特异性杀伤活性[14]. IFN-γ可增强NK细胞、巨噬细胞和T淋巴细胞的活力, 促进其分泌各种细胞因子从而起到免疫调节作用, 并增强抗肿瘤能力[15]. 本研究发现紫草素促进人共刺激细胞GraB、PFP、CD107a和IFN-γ的表达并提高其对胃癌细胞的杀伤活性, 此印证了既往研究紫草素能通过免疫调节途径抗肿瘤理论[16]. 紫草素6-25 μg/L时人共刺激细胞的GraB、PFP、CD107a和IFN-γ表达均有不同程度的增加, 其杀伤活性在此范围内明显增强, 紫草素浓度为6 μg/L时达最大值, 与人共刺激细胞对胃癌细胞的杀伤结果相一致.

研究发现ERK1/2信号通路的激活能促进T淋巴细胞的活化、增殖并抑制其凋亡, 并促进IL-2生成[17]. 本研究发现, 紫草素促进人共刺激细胞P-ERK1/2的表达, 且100 μg/L时P-ERK1/2表达最高, 而此浓度紫草素抑制人共刺激细胞增殖, 这与ERK瞬态活化促进细胞增殖、持续活化促进细胞凋亡的理论一致[18]. 近来研究发现, Wnt/β-catenin信号通路在T细胞的增殖、分化、成熟等方面起着重要作用[19]. PI3K/Akt信号传递途径是T细胞最为重要的信号转导途径之一, 其功能主要表现为与CD28协同刺激信号一道促进T细胞活化; 调节周期蛋白和促T细胞增殖因子等表达使T细胞周期正常进行; 通过调控凋亡信号转导相关激酶活性和凋亡调控因子表达以拮抗P53、Fas等诱导的T细胞凋亡以等[20]. 在细胞凋亡过程中, Bcl-2是细胞死亡的负调因子, 其高表达能促进T细胞的增殖及活化. β-catenin的活化激活ERK分子, 进而上调抗凋亡分子Bcl-2的表达, 促进免疫细胞的存活, 从而控制自身免疫应答反应[21]. 鉴于β-catenin、P-ERK1/2、Bcl-2、P-AKT表达与免疫细胞增殖及活化的重要作用, 本研究发现紫草素能不同程度提高人共刺激细胞β-catenin、P-ERK1/2、Bcl-2、P-AKT的表达, 并且相同浓度范围下对人共刺激细胞的增殖及杀伤活性有明显的促进作用, 因此可以推断紫草素对人共刺激细胞的增殖和活化作用可能与激活β-catenin、P-ERK1/2、Bcl-2、P-AKT信号通路有关.

总之, 紫草素能促进人共刺激细胞增殖并提高其杀伤活性, 其可能机制为紫草素能激活β-catenin、P-ERK1/2、Bcl-2和P-AKT信号通路促进人共刺激细胞增殖, 提高GraB、PFP、CD107a和IFN-γ表达促进人共刺激细胞对胃癌细胞的杀伤活性, 此为培养细胞毒性更强和安全性更高的免疫活性细胞提供了新的思路.

4 参考文献

1 Yang Q, Jie Z, Cao H, Greenlee AR, Yang C, Zou F, Jiang Y. Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. *Carcinogenesis* 2011; 32: 713-722 [PMID: 21349817 DOI: 10.1093/carcin/bgr035]

2 Li XD, Xu B, Wu J, Ji M, Xu BH, Jiang JT, Wu CP. Review of Chinese clinical trials on CIK cell treatment for malignancies. *Clin Transl Oncol* 2012; 14: 102-108 [PMID: 22301398 DOI: 10.1007/s12094-012-0768-4]

3 Ma Y, Xu YC, Tang L, Zhang Z, Wang J, Wang HX. Cytokine-induced killer (CIK) cell therapy for patients with hepatocellular carcinoma: efficacy and safety. *Exp Hematol Oncol* 2012; 1: 11 [PMID: 23210562 DOI: 10.1186/2162-3619-1-11]

4 Tumeh PC, Koya RC, Chodon T, Graham NA, Graeber TG, Comin-Anduix B, Ribas A. The impact of ex vivo clinical grade activation protocols on human T-cell phenotype and function for the generation of genetically modified cells for adoptive cell transfer therapy. *J Immunother* 2010; 33: 759-768 [PMID: 20842061 DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181f1d644]

5 Shi L, Zhou Q, Wu J, Ji M, Li G, Jiang J, Wu C. Efficacy of adjuvant immunotherapy with cytokine-induced killer cells in patients with locally advanced gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 2251-2259 [PMID: 22674056 DOI: 10.1007/s00262-012-1289-2]

6 Wang R, Yin R, Zhou W, Xu D, Li S. Shikonin and its derivatives: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2012; 22: 977-997 [PMID: 22834677 DOI: 10.1517/13543776.2012.709237]

7 Wang HB, Ma XQ. [Mechanisms of (2-methyl-n-butyl) shikonin induced apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells]. *Yaoxue Xuebao* 2012; 47: 816-821 [PMID: 22919733]

8 Long S, Guang ZY, Bao JG, Wei X, Yan YH, YingLi W, Yang Z, Li HL. Shikonin derivatives protect immune organs from damage and promote immune responses in vivo in tumour-bearing mice. *Phytother Res* 2012; 26: 26-33 [PMID: 21538626 DOI: 10.1002/ptr.3503]

9 Ramanathan S, Dubois S, Chen XL, Leblanc C, Ohashi PS, Ilangumaran S. Exposure to IL-15 and IL-21 enables autoreactive CD8 T cells to respond to weak antigens and cause disease in a mouse model of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2011; 186: 5131-5141 [PMID: 21430227 DOI: 10.4049/jimmunol.1001221]

10 Liu JQ, Zhu Y, Chen FX, Zhang NZ, Lv XT, Zhou ZH, Zhang J, Zhang S, Tao ZZ, Li Y. [Co-stimulation of multiple activating factors on proliferation and

phenotype of T lymphocytes in peripheral blood in vitro]. *Xibao Yu Fenzinianyixue Zazhi* 2012; 28: 367-370 [PMID: 22482405]

11 Pievani A, Borleri G, Pende D, Moretta L, Rambaldi A, Golay J, Introna M. Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood* 2011; 118: 3301-3310 [PMID: 21821703 DOI: 10.1182/blood-2011-02-336321]

12 Saito S, Murakoshi K, Kotake S, Kamatani N, Tomatsu T. Granzyme B induces apoptosis of chondrocytes with natural killer cell-like cytotoxicity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008; 35: 1932-1943 [PMID: 18785318]

13 Brown DM, Lee S, Garcia-Hernandez Mde L, Swain SL. Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection. *J Virol* 2012; 86: 6792-6803 [PMID: 22491469 DOI: 10.1128/JVI.07172-11]

14 Parkinson-Lawrence EJ, Dean CJ, Chang M, Hopwood JJ, Meikle PJ, Brooks DA. Immunochemical analysis of CD107a (LAMP-1). *Cell Immunol* 2005; 236: 161-166 [PMID: 16168398]

15 Becker C, Lienenklaus S, Jablonska J, Bauer H, Weiss S. CD8(+) T cells armed with retrovirally transduced IFN-gamma. *J Mol Med* (Berl) 2007; 85: 63-73 [PMID: 17109130]

16 Chen HM, Wang PH, Chen SS, Wen CC, Chen YH, Yang WC, Yang NS. Shikonin induces immunogenic cell death in tumor cells and enhances dendritic cell-based cancer vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61: 1989-2002 [PMID: 22527248 DOI: 10.1007/s00262-012-1258-9]

17 Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007; 26: 3100-3112 [PMID: 17496909]

18 Norambuena A, Metz C, Vicuña L, Silva A, Pardo E, Oyanadel C, Massardo L, González A, Soza A. Galectin-8 induces apoptosis in Jurkat T cells by phosphatidic acid-mediated ERK1/2 activation supported by protein kinase A down-regulation. *J Biol Chem* 2009; 284: 12670-12679 [PMID: 19276072 DOI: 10.1074/jbc.M808949200]

19 Gattinoni L, Ji Y, Restifo NP. Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 4695-4701 [PMID: 20688898 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0356]

20 Wang X, Hao J, Metzger DL, Ao Z, Chen L, Ou D, Verchere CB, Mui A, Warnock GL. B7-H4 Treatment of T Cells Inhibits ERK, JNK, p38, and AKT Activation. *PLoS One* 2012; 7: e28232 [PMID: 22238573 DOI: 10.1371/journal.pone.0028232.]

21 Charo J, Finkelstein SE, Grewal N, Restifo NP, Robbins PF, Rosenberg SA. Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T-cell survival. *Cancer Res* 2005; 65: 2001-2008 [PMID: 15753400]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1992-1997
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

LNAzyme设计及其体外特异性抑制丙型肝炎病毒C基因的表达

邓益斌, 农乐根, 梁祚仁, 张 梁, 覃羽华, 何 平

■背景资料
反义核酸技术, 包括反义寡核苷酸、反义寡聚脱氧核苷酸、核酶等技术, 其中, 核酶技术又包括核酶和脱氧核酶技术, 已被证实是研究、治疗病毒感染性疾病、遗传性疾病、恶性肿瘤等多种疾病的有效手段之一, 主要通过针对在疾病发生、发展过程中发挥重要作用的生长因子、受体、关键酶、原癌基因、抑癌基因或凋亡相关基因, 通过导入外源治疗基因(DNA、RNA、核酶等)短序列, 特异性识别、结合、封闭或调控其功能及产物表达, 从而达到治疗目的.

邓益斌, 农乐根, 梁祚仁, 张梁, 覃羽化, 何平, 右江民族医学院附属医院医学检验中心 广西壮族自治区百色市533000
邓益斌, 副教授, 医学博士, 主要从事基因诊断与治疗的研究.
广西自然科学基金资助项目, No. 2011GXNSFA018285
作者贡献分布: 该研究实验及锁核酸核酶分子设计由邓益斌完成; 研究经费来源于邓益斌主持的广西自然科学基金项目; 细胞培养及锁核酸核酶转染由张梁完成; 病毒核酸检测由梁祚仁完成; 病毒荧光素酶基因表达检测由覃羽华完成; 锁核酸核酶细胞毒性检测由何平完成; 数据分析及论文撰写由邓益斌完成; 农乐根提出修改意见.
通讯作者: 邓益斌, 副教授, 医学博士, 533000, 广西壮族自治区百色市右江区中山二路18号, 右江民族医学院附属医院医学检验中心. enbin0776@sina.com
电话: 0776-2852592
收稿日期: 2014-02-22 修回日期: 2014-03-20
接受日期: 2014-04-04 在线出版日期: 2014-05-18

Hepatitis C virus gene-specific locked nucleic acid enzyme significantly inhibits C gene expression *in vitro*

Yi-Bin Deng, Le-Gen Nong, Zuo-Ren Liang, Liang Zhang, Yu-Hua Qin, Ping He

Yi-Bin Deng, Le-Gen Nong, Zuo-Ren Liang, Liang Zhang, Yu-Hua Qin, Ping He, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: Guangxi Natural Science Foundation of China, No. 2011GXNSFA018285
Correspondence to: Yi-Bin Deng, Associate Professor, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical College for Nationalities, 18 Zhongshan Second Road, Youjiang District, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. enbin0776@sina.com
Received: 2014-02-22 Revised: 2014-03-20
Accepted: 2014-04-04 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of locked nucleic acid enzyme targeting the hepatitis C virus (HCV) C gene on HCV RNA replication and expression in HepG2.9706 cells.

METHODS: The sequences encoding DNAzyme, thiolmodificated DNAzyme and LNAzyme targeting the HCV C gene were designed and synthesized. The following experimental groups were set up: lipo-DNAzyme, lipo-S-DNAzyme, lipo-LNAzyme, blank control, empty liposomes, and lipo-random-LNAzyme. Transfection was performed using cationic liposomes. The level of HCV RNA and luciferase gene expression in supernatants were tested by real-time fluorescent quantitative PCR and chemiluminescence technique 24, 48 and 96 h after treatment, respectively. Cytotoxicity of LNAzyme was evaluated by MTT assay.

RESULTS: Significant down-regulation of HCV RNA replication and luciferase gene expression was noted in the lipo-LNAzyme group, lipo-DNAzyme group and lipo-S-DNAzyme group compared with the control group ($P < 0.05$ for all). Relative to the lipo-DNAzyme group and lipo-S-DNAzyme group, the average inhibition rates in the lipo-LNAzyme group were 47.55% and 52.44%, respectively. With the prolongation of the treatment time, the inhibition rate increased. At 96 h, HCR RNA replication and fluorescent protein expression were significantly lower than those before treatment in the lipo-LNAzyme group ($P < 0.01$ for both), and the average inhibition rates were 79.40% and 84.05%, respectively. No obvious toxicity was observed.

CONCLUSION: LNAzyme has a significant inhibitory effect on HCV C gene replication and expression *in vitro*, which is stronger than that of the thiolmodificated DNAzyme.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Hepatitis C; Hepatitis C virus; LNAzyme; Non-coding region; Gene expression

Deng YB, Nong LG, Liang ZR, Zhang L, Qin YH, He P. Hepatitis C virus gene-specific locked nucleic acid enzyme significantly inhibits C gene expression *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1992-1997
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1992.asp
DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1992

■同行评议者
唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

摘要

目的: 探讨针对丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)C基因的锁核酸核酶对病毒RNA复制与表达的特异性抑制作用.

方法: 设计合成能切割HCV C基因位点的DNAzyme、硫代DNAzyme和LNAzyme. 实验设对照组和实验组. 对照组包括空白对照组、脂质体对照组和脂质体-无关LNAzyme对照组. 实验组包括脂质体-DNAzyme、脂质体-硫代DNAzyme组和脂质体-LNAzyme组. 以阳离子脂质体介导转染HepG2.9706细胞. 采用荧光定量PCR和化学发光技术分别监测24、48、96 h细胞培养上清液中HCV RNA含量及荧光素酶基因表达; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法监测细胞代谢.

结果: 加入药物后, 脱氧核酶、硫代脱氧核酶及锁核酸核酶组对HCV RNA复制和荧光素酶基因表达的抑制作用均较对照组强(P<0.01), 其中, 锁核酸核酶的抑制作用均较脱氧核酶及硫代脱氧核酶明显(P<0.05), 平均抑制率分别达47.55%和52.44%, 且随用药时间延长, 抑制率呈增高趋势, 96 h后, HCV RNA复制和荧光蛋白表达的下降率均较用药前明显(P<0.01), 其中, 锁核酸核酶的抑制作用均较脱氧核酶及硫代脱氧核酶明显(P<0.05), 平均下降率分别达79.40%和80.05%. 而LNAzyme对细胞活性基本无影响.

结论: LNAzyme能特异性抑制HCV C基因的复制与表达, 且优于硫代修饰的DNAzyme.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 丙型肝炎; 丙型肝炎病毒; 锁核酸核酶; 非编码区; 基因表达

核心提示: 针对丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)C基因位点的锁核酸核酶, 体外能特异性抑制病毒基因调控, 为抗HCV基因治疗提供理论和实验依据, 有望成为RNA病毒基因治疗的新型反义核酸药物.

邓益斌, 农乐根, 梁祚仁, 张梁, 覃羽华, 何平. LNAzyme设计及其体外特异性抑制丙型肝炎病毒C基因的表达. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1992-1997 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1992.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1992

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是单股正链RNA病毒, 含5'非编码区、结构区(C、E区)、非结构区(NS区)、和3'非编码区, 其中, C区是丙型肝炎病毒复制所必需的元件, 是HCV十分保守的序列之一. C区开放读码框架(open reading frame, ORF)的编码蛋白是大分子多聚蛋白前体, 在宿主信号肽酶及NS3蛋白激酶的作用下, 裂解成各种小分子病毒蛋白, 很显然, C区在病毒基因表达调控中发挥着重要的作用. 因此, 推测切割破坏该位点RNA序列可能有效阻断病毒的基因表达. 锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是新发现的一种带环状结构的核苷酸衍生物, 与其他寡核苷酸相比, 具有热稳定性好[1-5]、分子杂交能力强[6-10]、抗酶解能力强[11-15]、脂溶性好[16-20]和低毒性[21-24]等优势. 锁核酸核酶(locked nucleic acid enzyme, LNAzyme)是在脱氧核酶的2条结合臂上引入1个或多个锁核酸单体构建而成的新型核酸酶, 与其他核酸酶相比, 具有更强的分子杂交能力、更高的酶切活性和切割效率[25-28]. 因此, 在前期研究基础上[29-31], 进一步针对HCV C区ORF的AUG位点设计合成两侧臂长约7-10 nt, 环结构由GGCTAGCTACAACGA碱基组成的LNAzyme, 以阳离子脂质体介导转染HepG2.9706细胞株, 观察其对病毒复制与表达的抑制作用, 以期为抗HCV治疗寻找专一、高效的新型分子药物.

■研发前沿

核酶技术作为分子生物学的新型基因治疗技术, 目前不仅广泛应用于生物学、病理学、药理学等学科的基础研究, 而且已成为药物发展的新兴策略. 在核酶技术基础上发展起来的锁核酸核酶技术, 是目前研究的新热点. 当前抗病毒基因治疗亟待解决的问题一是没有一种满意的肝靶向性药物载体, 另外就是缺乏特异性抗病毒核酸药物.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2.9706细胞是一种转染有质粒pHCV-neo的转基因HepG2细胞, 含荧光素酶基因, 由中国人民解放军广州军区空军医院刘光泽博士惠赠, 本室常规培养于含G418(380 ITI1)、10%胎牛血清的DMEM培养基中, 37 ℃、5%CO_2条件下5-6 d传代1次; DMEM培养基、G418等购自GIBCO公司; 胎牛血清购自杭州四季清公司; Lipofectamine™ 2000购自Invitrogen公司; TRIzol RNA提取试剂盒购自GIBCO公司; 荧光定量PCR检测HCV RNA试剂盒购自深圳匹基公司; 化学发光试剂盒(Bright-Glo™荧光素酶分析系统)购自Promega公司; Victor™ Wallac 1420多标记检测仪购自Promega公司; EVOS® FL Auto全自动荧光倒置显微镜系统购自美国LIFE公司.

1.2 方法

1.2.1 核酶分子设计与合成: 针对HCV C区ORF的AUG位点(341-356 nt)分别设计以下几段序列: (1)DNAzyme: 5'-UAGGAUUGGCTAGCTA-

■相关报道
邓益斌等针对乙肝病毒S保守区S基因mRNA的翻译起始位点，设计合成反义LNA片段，进行体内外实验研究，结果发现，反义LNA对靶mRNA基因表达的抑制作用明显强于其他寡核苷酸，并且存在剂量和时间效应，当反义LNA片段长度在20-25个核苷酸时，更容易进入细胞内，与靶mRNA形成LNA-RNA杂交分子，封闭靶mRNA基团翻译的同时，激活RNase H酶活性，引起靶mRNA的降解，从翻译水平阻断病毒靶基因表达，降低病毒蛋白的合成，抑制病毒装配、成熟和分泌过程，从而抑制HBV病毒的复制.

表 1 LNAzyme对HepG2.9706细胞HCV RNA复制的影响 (n = 6, mean ± SD, × 10^5 copies/mL)

分组	0 h	24 h	48 h	96 h
空白对照组	1.52 ± 0.44	1.55 ± 0.47	1.61 ± 0.52	1.65 ± 0.44
脂质体对照组	1.62 ± 0.45	1.58 ± 0.46	1.67 ± 0.44	1.65 ± 0.43
脂质体-无关LNAzyme对照组	1.55 ± 0.45	1.57 ± 0.43	1.62 ± 0.48	1.68 ± 0.42
脂质体-DNAzyme组	1.65 ± 0.58	1.23 ± 0.49	1.02 ± 0.55	0.83 ± 0.53
脂质体-硫代DNAzyme组	1.62 ± 0.48	1.02 ± 0.53	0.81 ± 0.58	0.75 ± 0.42
脂质体-LNAzyme组	1.65 ± 0.44	0.83 ± 0.31	0.50 ± 0.22	0.34 ± 0.15[bceh]

[b]P<0.01 *vs* 对照组; [c]P<0.05 *vs* 脂质体-DNAzyme组; [e]P<0.05 *vs* 脂质体-硫代DNAzyme组; [h]P<0.05 *vs* 用药前. DNAzyme: 寡聚脱氧核酶.

CAACGACGAGUGCUCAU-3'; (2)硫代DNAzyme: 5'-UA^{S}GGA^{S}U^{S}UGGCTAGCTACAACGACGAGU^{S}GCU^{S}CA^{S}U-3', 即在DNAzyme基础上对5'端前5个碱基及3'端前5个碱基进行硫代修饰, 以上标“S”表示; (3)LNAzyme: 5'-UA^{L}GGA^{L}U^{L}UGGCTAGCTACAACGACGAGU^{L}GCU^{L}CA^{L}U-3', 即在DNAzyme的2个结合臂碱基A或T分别引入2个LNA单体, 以上标“L”表示; (4)无关DNAzyme: 5'-TCCAGAGGGGCTAGCTACAACGACATACAGC-3'. 其中, GGCTAGCTACAACGA为DNAzyme的催化活性序列, 其2侧为靶位特异性识别序列. 以上各序列经BLAST排除与人同源后由美国GENELINK公司合成修饰.

1.2.2 实验分组与脂质体转染: 本实验设对照组和实验组. 对照组包括空白对照组、脂质体对照组、脂质体-无关DNAzyme对照组. 实验组包括脂质体-DNAzyme组、脂质体-硫代DNAzyme组、脂质体-LNAzyme组. 将HepG2.9706细胞按1×10^5个/mL接种于16孔培养板, 每孔100 μL, 共设定6个组, 每组各设6个复孔, 待细胞贴壁后吸取培养上清液(-20 ℃保存), 分别在各组每孔中一次性加入含核酶量为10 μmol/L的DMEM混合液1 mL, 分别于24、48、96 h收集各孔培养上清液500 μL, 保存于-20 ℃待测. 脂质体转染严格按说明书操作.

1.2.3 培养上清液HCV RNA含量检测: 采用荧光定量PCR试剂盒法. (1)在预先准备好的1.5 mL灭菌离心管中加入RNA酶抑制剂20 μL, 然后分别加入待测液, 阴、阳性对照和标准品各100 μL, 再加入裂解液100 μL, 振荡混匀; (2)将上述混合液全部转移至核酸提取柱中, 开启负压装置, 抽干液体, 然后分别用洗涤液A和B液各500 μL, 各洗涤1次, 抽干; (3)关闭负压装置, 将提取柱转入2 mL离心管中, 15000 r/min, 离心1 min; (4)将提取转入新2 mL离心管中, 加入50 μL洗脱液, 静置1 min, 10000 r/min, 离心1 min, 取12.5 μL洗脱液加样, 余下步骤和PCR扩增条件严格按说明书操作. 结果采用计算对数平均值的方法获得cDNA平均拷贝数.

1.2.4 培养细胞内荧光蛋白表达检测: 分别于基因转染后24、48、96 h终止培养, 将培养板平衡至室温, 向每孔中加入经室温平衡后的荧光素酶发光试剂100 μL, 轻轻摇匀2 min以使细胞完全裂解, 立即应用Victor^{TM} Wallac 1420多标记检测仪检测1 s发光强度, 输出值以每秒计算值(counts per second, CPS)表示.

1.2.5 荧光显微镜系统观察细胞荧光蛋白表达: 培养细胞转染96 h后, 用倒转荧光显微镜系统在488 nm激发波长下观察绿色荧光的表达情况, 并拍照.

1.2.6 LNAzyme对细胞的毒性检测: 采用MTT比色法检测LNAzyme对细胞活性的影响. 加入LNAzyme后, 5%CO_2, 37℃培养96 h, 每孔加入20 μL 0.5%MTT液, 继续培养4 h后, 终止培养, 小心吸弃培养上清液; 每孔加入150 μL二甲基亚砜, 低速振荡孵育10 min, 使结晶物充分融解; 在酶联免疫监测仪上检测各孔吸光度值, 波长490 nm/570 nm, 同时设置调零孔和对照孔.

统计学处理 所有数据均采用mean±SD表示, 应用SPSS13.0统计软件处理, 组间比较采用重复测量设计方差分析, P<0.05为差异具有统计学意义. 抑制率(%) = (用药前N-用药后N)/用药前N×100%, 或(对照组N-实验组N)/对照组N×100%, 其中, N表示测定值.

2 结果

2.1 LNAzyme对HCV RNA复制的抑制作用 加入药物后, 各实验组对HCV RNA的复制均显示

表 2 LNAzyme对HepG2.9706细胞荧光素酶基因表达的影响 (n = 6, mean ± SD, $\times 10^4$ CPS)

分组	0 h	24 h	48 h	96 h
空白对照组	4.97 ± 2.92	4.95 ± 2.89	4.96 ± 2.81	4.97 ± 2.79
脂质体对照组	4.89 ± 2.91	4.91 ± 2.85	4.89 ± 2.75	4.91 ± 2.87
脂质体-无关LNAzyme对照组	4.93 ± 2.88	4.89 ± 2.78	4.91 ± 2.83	4.89 ± 2.78
脂质体-DNAzyme组	4.87 ± 2.66	3.57 ± 2.66	3.02 ± 2.69	2.41 ± 2.44
脂质体-硫代DNAzyme组	4.91 ± 2.87	3.04 ± 2.61	2.44 ± 2.15	2.21 ± 1.88
脂质体-LNAzyme组	4.89 ± 2.45	2.11 ± 1.52	1.66 ± 1.23	0.78 ± 0.25[bceh]

[b]P<0.01 *vs* 对照组; [c]P<0.05 *vs* 脂质体-DNAzyme组; [e]P<0.05 *vs* 脂质体-硫代DNAzyme组; [h]P<0.05 *vs* 用药前. DNAzyme: 寡聚脱氧核酶.

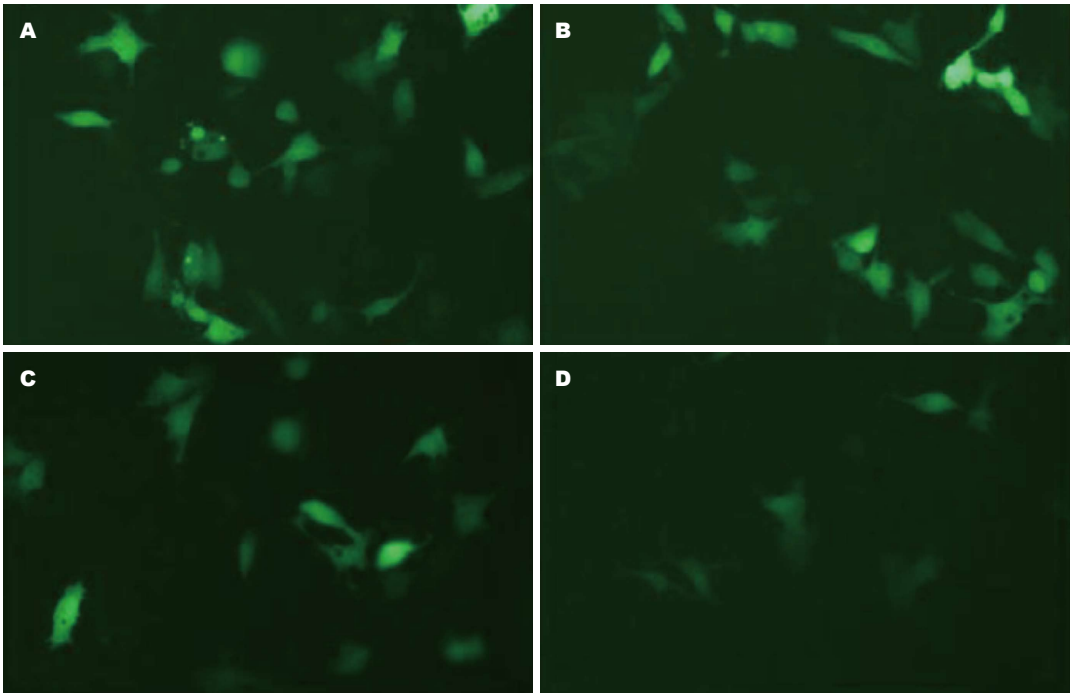


图 1 荧光电子显微镜下LNAzyme抑制细胞荧光蛋白表达作用比较(化学发光法 × 200). A: 空白对照组; B: 脂质体-DNA-zyme组; C: 脂质体-硫代DNAzyme组; D: 脂质体-LNAzyme组. LNAzyme: 锁核酸核酶; DNAzyme: 寡聚脱氧核酶.

出较强的抑制作用(F = 227.50, P<0.01), 其中, 脂质体-LNAzyme组的抑制作用最强(F = 67.50, P<0.05), 平均抑制率为47.55%. 与用药前比较, HCV RNA的复制量也明显下降(F = 156.27, P<0.01), 96 h后, 脂质体-LNAzyme组的平均下降率达79.40%(表1).

2.2 LNAzyme对培养细胞荧光素酶基因表达的抑制作用 加入药物后, 各实验组对细胞荧光素酶基因的表达均显示出较强的抑制作用(F = 78.65, P<0.01), 其中, 脂质体-LNAzyme组的抑制作用最强(F = 72.35, P<0.05), 平均抑制率为52.44%. 与用药前比较, HCV RNA的表达量也明显下降(F = 186.21, P<0.01), 96 h后, 脂质体-LNAzyme组的平均下降率达84.05%(表2).

2.3 LNAzyme对细胞荧光蛋白表达的抑制作用 转染96 h后在荧光电子显微镜下观察, 脂质体-LNAzyme组细胞内荧光蛋白的表达明显少于对照组、脱氧核酶组及硫代脱氧核酶组(图1).

2.4 LNAzyme对细胞的毒性 用药7 d后, 采用MTT比色法测定各组A值, 脂质体-DNAzyme、脂质体-硫代DNAzyme和脂质体-LNAzyme组的A值分别为1.14±0.04、1.15±0.04和1.15±0.04, 与空白对照组的1.37±0.04比较均无差异, 表明锁核酸脂质体混合物对细胞活性基本无影响.

3 讨论

本研究针对丙型肝炎病毒5'非编码区内源性核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)

■创新盘点
锁核酸(locked nucleic acid, LNA)是一种新兴环状核苷酸衍生物, 具有热稳定性好、分子杂交能力强、抗核酸酶解能力高等特性, 本研究在以寡聚脱氧核酶分子的双侧臂上各引入2-4个LNA分子构建成锁核酸核酶(LNAzyme), 从而增强核酶分子与底物RNA的杂交亲和力, 同时, 增强其在细胞内稳定性和酶切能力.

■应用要点
锁核酸核酶在以RNA序列为切割底物的基因治疗研究中具有潜在研究价值, 特别是RNA病毒, 如丙型肝炎病毒、艾滋病病毒等.

位点设计合成LNAzyme, 并以阳离子脂质体介导转染HepG2.9706细胞, 采用分子生物学技术分别检测培养上清液中HCV RNA含量及荧光素酶基因表达, 观察锁核酸核酶对病毒基因表达的影响, 结果显示, 脱氧核酶、硫代脱氧核酶及锁核酸核酶对丙型肝炎病毒RNA的复制及细胞内荧光素酶基因的表达均显示出较强的抑制作用(P<0.01), 其中, 锁核酸核酶的抑制作用均较脱氧核酶及硫代脱氧核酶强(P<0.05), 平均抑制率分别达48.02%和53.05%, 而且, 随用药时间延长, 抑制率呈增高趋势, 用药后96 h, HCV RNA复制和荧光蛋白表达的下降率均较用药前明显(P<0.01), 其中, 锁核酸核酶的抑制作用均较脱氧核酶及硫代脱氧核酶明显(P<0.05), 平均抑制率分别达81.21%和84.25%. 此外, MTT比色结果表明, LNAzyme脂质体混合物对细胞活性基本无影响.

总之, 针对HCV 5'非编码区IRES位点的锁核酸核酶, 体外能特异性抑制病毒基因调控, 为抗丙型肝炎病毒基因治疗提供理论和实验依据, 有望成为RNA病毒基因治疗的新型反义核酸药物.

4 参与文献

1 Crouzier L, Dubois C, Edwards SL, Lauridsen LH, Wengel J, Veedu RN. Efficient reverse transcription using locked nucleic acid nucleotides towards the evolution of nuclease resistant RNA aptamers. *PLoS One* 2012; 7: e35990 [PMID: 22558297 DOI: 10.1371/journal.pone.0035990]

2 Hildebrandt-Eriksen ES, Aarup V, Persson R, Hansen HF, Munk ME, Ørum H. A locked nucleic acid oligonucleotide targeting microRNA 122 is well-tolerated in cynomolgus monkeys. *Nucleic Acid Ther* 2012; 22: 152-161 [PMID: 22545703 DOI: 10.1089/nat.2011.0332]

3 Mishra S, Ghosh S, Mukhopadhyay R. Ordered self-assembled locked nucleic acid (LNA) structures on gold(111) surface with enhanced single base mismatch recognition capability. *Langmuir* 2012; 28: 4325-4333 [PMID: 22309111 DOI: 10.1021/la204026j]

4 Robertson KL, Vora GJ. Locked nucleic acid flow cytometry-fluorescence in situ hybridization (LNA flow-FISH): a method for bacterial small RNA detection. *J Vis Exp* 2012; (59): e3655 [PMID: 22258228 DOI: 10.3791/3655]

5 Hull C, Szewcyk C, St John PM. Effects of locked nucleic acid substitutions on the stability of oligonucleotide hairpins. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2012; 31: 28-41 [PMID: 22257208 DOI: 10.1080/15257770.2011.639825]

6 Owczarzy R, You Y, Groth CL, Tataurov AV. Stability and mismatch discrimination of locked nucleic acid-DNA duplexes. *Biochemistry* 2011; 50: 9352-9367 [PMID: 21928795 DOI: 10.1021/bi200904e]

7 Bhattacharyya J, Maiti S, Muhuri S, Nakano S, Miyoshi D, Sugimoto N. Effect of locked nucleic acid modifications on the thermal stability of noncanonical DNA structure. *Biochemistry* 2011; 50: 7414-7425 [PMID: 21774551 DOI: 10.1021/bi200477g]

8 Doessing H, Vester B. Locked and unlocked nucleosides in functional nucleic acids. *Molecules* 2011; 16: 4511-4526 [PMID: 21629180 DOI: 10.3390/molecules]

9 Zhang Y, Qu Z, Kim S, Shi V, Liao B, Kraft P, Bandaru R, Wu Y, Greenberger LM, Horak ID. Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection. *Gene Ther* 2011; 18: 326-333 [PMID: 21179173]

10 Chabot S, Orio J, Castanier R, Bellard E, Nielsen SJ, Golzio M, Teissié J. LNA-based oligonucleotide electrotransfer for miRNA inhibition. *Mol Ther* 2012; 20: 1590-1598 [PMID: 22617110 DOI: 10.1038/mt.2012.95]

11 Johannsen MW, Veedu RN, Madsen AS, Wengel J. Enzymatic polymerisation involving 2'-amino-LNA nucleotides. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22: 3522-3526 [PMID: 22503454 DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.03.073]

12 Chaubey AK, Dubey KD, Ojha RP. Stability and free energy calculation of LNA modified quadruplex: a molecular dynamics study. *J Comput Aided Mol Des* 2012; 26: 289-299 [PMID: 22456858 DOI: 10.1007/s10822-012-9548-z]

13 Sun Z, Xiang W, Guo Y, Chen Z, Liu W, Lu D. Inhibition of hepatitis B virus (HBV) by LNA-mediated nuclear interference with HBV DNA transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 409: 430-435 [PMID: 21596023 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.016]

14 Moschos SA, Frick M, Taylor B, Turnpenny P, Graves H, Spink KG, Brady K, Lamb D, Collins D, Rockel TD, Weber M, Lazari O, Perez-Tosar L, Fancy SA, Lapthorn C, Green MX, Evans S, Selby M, Jones G, Jones L, Kearney S, Mechiche H, Gikunju D, Subramanian R, Uhlmann E, Jurk M, Vollmer J, Ciaramella G, Yeadon M. Uptake, efficacy, and systemic distribution of naked, inhaled short interfering RNA (siRNA) and locked nucleic acid (LNA) antisense. *Mol Ther* 2011; 19: 2163-2168 [PMID: 21971426 DOI: 10.1038/mt.2011.206]

15 Ivanova MI, Shivarov VS, Hadjiev EA, Naumova EJ. Novel multiplex bead-based assay with LNA-modified probes for detection of MPL exon 10 mutations. *Leuk Res* 2011; 35: 1120-1123 [PMID: 21570117 DOI: 10.1016/j.leukres.2011.04.012]

16 Seth PP, Allerson CR, Siwkowski A, Vasquez G, Berdeja A, Migawa MT, Gaus H, Prakash TP, Bhat B, Swayze EE. Configuration of the 5'-methyl group modulates the biophysical and biological properties of locked nucleic acid (LNA) oligonucleotides. *J Med Chem* 2010; 53: 8309-8318 [PMID: 21058707 DOI: 10.1021/jm101207e]

17 Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 687-700 [PMID: 17182632 DOI: 10.1093/nar/gkl1071]

18 Yang CJ, Wang L, Wu Y, Kim Y, Medley CD, Lin H, Tan W. Synthesis and investigation of deoxyribonucleic acid/locked nucleic acid chimeric molecular beacons. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 4030-4041 [PMID:

17557813 DOI: 10.1093/nar/gkm358]
19 Brunet E, Corgnali M, Cannata F, Perrouault L, Giovannangeli C. Targeting chromosomal sites with locked nucleic acid-modified triplex-forming oligonucleotides: study of efficiency dependence on DNA nuclear environment. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 4546-4553 [PMID: 16951289 DOI: 10.1093/nar/gkl630]
20 Levin JD, Fiala D, Samala MF, Kahn JD, Peterson RJ. Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e142 [PMID: 17071964 DOI: 10.1093/nar/gkl756]
21 Johnson MP, Haupt LM, Griffiths LR. Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e55 [PMID: 15047860 DOI: 10.1093/nar/gnh046]
22 Crinelli R, Bianchi M, Gentilini L, Palma L, Sørensen MD, Bryld T, Babu RB, Arar K, Wengel J, Magnani M. Transcription factor decoy oligonucleotides modified with locked nucleic acids: an in vitro study to reconcile biostability with binding affinity. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1874-1885 [PMID: 15051810 DOI: 10.1093/nar/gkh503]
23 Sørensen JJ, Nielsen JT, Petersen M. Solution structure of a dsDNA: LNA triplex. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 6078-6085 [PMID: 15550567 DOI: 10.1093/nar/gkh942]
24 Hertoghs KM, Ellis JH, Catchpole IR. Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 5817-5830 [PMID: 14530430 DOI: 10.1093/nar/gkg801]
25 Dolinsek J, Dorninger C, Lagkouvardos I, Wagner M, Daims H. Depletion of unwanted nucleic acid templates by selective cleavage: LNAzymes, catalytically active oligonucleotides containing locked nucleic acids, open a new window for detecting rare microbial community members. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79: 1534-1544 [PMID: 23263968 DOI: 10.1128/AEM.03392-12]
26 Suryawanshi H, Lalwani MK, Ramasamy S, Rana R, Scaria V, Sivasubbu S, Maiti S. Antagonism of microRNA function in zebrafish embryos by using locked nucleic acid enzymes (LNAzymes). *Chembiochem* 2012; 13: 584-589 [PMID: 22315191 DOI: 10.1002/cbic.201100789]
27 Kaur H, Scaria V, Maiti S. "Locked onto the target": increasing the efficiency of antagomirzymes using locked nucleic acid modifications. *Biochemistry* 2010; 49: 9449-9456 [PMID: 20879750 DOI: 10.1021/bi101185k]
28 Donini S, Clerici M, Wengel J, Vester B, Peracchi A. The advantages of being locked. Assessing the cleavage of short and long RNAs by locked nucleic acid-containing 8-17 deoxyribozymes. *J Biol Chem* 2007; 282: 35510-35518 [PMID: 17908692 DOI: 10.1074/jbc.M706993200]
29 邓益斌, 温旺荣. 反基因锁核酸体外抑制乙肝病毒前S1基因表达. 基础医学与临床 2013; 33: 722-725
30 邓益斌, 张梁, 王燕菲. HBV S基因的反义锁核酸抑制病毒体外复制. 基础医学与临床 2010; 30: 360-363
31 邓益斌, 农乐根, 黄炜, 潘国刚. 乙型肝炎病毒S/C基因位点反义锁核酸在小鼠体内抗病毒疗效研究. 中华肝脏病杂志 2009; 17: 900-904

■**同行评价**
该文设计了针对丙型肝炎病毒C基因的LNAzyme, 体外特异性抑制病毒基因调控, 具有一定研究价值.

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 1998-2002
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

肝纤维化能够保护小鼠抵抗D-GalN/LPS诱导的致死性损伤

白 丽, 孔 明, 张晓慧, 丁 美, 郑素军, 陈 煜, 段钟平

■背景资料
肝纤维化是许多肝脏病变的最终共同结局. 当前人们对纤维化的认知往往强调其导致病理损害的一面, 而忽视了纤维化本身也是一种针对慢性肝损伤的伤口愈合反应. 近年来有研究显示, 纤维化可能通过其强大的损伤修复能力发挥肝脏保护效应. 然而, 关于四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)诱导的肝纤维化中是否存在对致死性损伤的耐受效应尚无明确报道.

白丽, 孔明, 张晓慧, 丁美, 郑素军, 陈煜, 段钟平, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069
白丽, 主要从事肝病相关的临床和基础研究.
国家"十二五"科技重大专项基金资助项目, Nos. 2012ZX10002004-006, 2012ZX10004904-003-001, 2013ZX10002002-006-001
北京市卫生系统高层次卫生技术人才基金资助项目, No. 2011-3-083
首都医科大学基础-临床合作基金资助项目, Nos. 14JL72, 14JL73
作者贡献分布: 此课题由白丽与段钟平设计; 研究过程由白丽、孔明、张晓慧及丁美完成; 数据分析由白丽、郑素军及陈煜完成; 本文由白丽完成写作.
通讯作者: 段钟平, 教授, 主任医师, 100069, 北京市丰台区右外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院.
duan2517@163.com
电话: 010-63291621
收稿日期: 2014-02-20 修回日期: 2014-03-27
接受日期: 2014-03-28 在线出版日期: 2014-05-18

Liver fibrosis protects mice against lethal injury induced by D-GalN/LPS

Li Bai, Ming Kong, Xiao-Hui Zhang, Mei Ding, Su-Jun Zheng, Yu Chen, Zhong-Ping Duan

Li Bai, Ming Kong, Xiao-Hui Zhang, Mei Ding, Su-Jun Zheng, Yu Chen, Zhong-Ping Duan, Beijing Youan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China
Supported by: the National Major Science and Technology Project during the "Twelfth Five-Year Plan" Period, Nos. 2012ZX10002004-006, 2012ZX10004904-003-001, and 2013ZX10002002-006-001; Beijing Municipal Health System High-level Health Technical Personnel Program, No. 2011-3-083; Basic-Clinical Cooperation Project of Capital Medical University, Nos. 14JL72 and 14JL73
Correspondence to: Zhong-Ping Duan, Professor, Chief Physician, Artificial Liver Center, Beijing Youan Hospital Affiliated to Capital Medical University, 8 Youwai Xitoutiao, Fengtai District, Beijing 100069, China. duan2517@163.com
Received: 2014-02-20 Revised: 2014-03-27
Accepted: 2014-03-28 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To assess the tolerance of mice with carbon tetrachloride (CCl_4)-induced fibrosis to a lethal dose of D-galactosamine/lipopolysaccharide (D-GalN/LPS).

METHODS: A mouse model of hepatic fibrosis was established by intraperitoneal injection of CCl_4 (in mineral oil), twice a week for 6 wk. At the end of fibrosis induction, mice were challenged intraperitoneally with D-GalN (700 mg/kg)/LPS (50 μg/kg). Normal mice treated in the same way were used as controls. Mice were sacrificed 24 h after acute insult. Sera and liver tissues were harvested for analyses. To evaluate the tolerance of normal and fibrotic mice to a lethal dose of D-GalN/LPS, survival rate, serum alanine aminotransferase (sALT) levels and histological changes of the liver were compared between before and after acute challenge.

RESULTS: The survival rate of fibrotic mice subjected to a lethal dose of D-GalN/LPS was significantly higher than that of normal mice treated in the same way (100% *vs* 20%). After challenged by D-GalN/LPS, sALT in normal mice increased by 455.9 folds (49.2 U/L ± 12.9 U/L *vs* 22429 U/L ± 5446 U/L, $P < 0.01$), which was significantly higher than that in fibrotic mice (14.3 folds) [(463.7 U/L ± 109.0 U/L *vs* 6630 U/L ± 1675 U/L, $P < 0.01$). The tolerance of fibrotic mice to D-GalN/LPS was confirmed by well-preserved liver architecture as compared with controls.

CONCLUSION: CCl_4-induced liver fibrosis protects mice against a lethal dose of D-GalN/LPS.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Liver fibrosis; Lethal injury; Tolerance

Bai L, Kong M, Zhang XH, Ding M, Zheng SJ, Chen Y, Duan ZP. Liver fibrosis protects mice against lethal injury induced by D-GalN/LPS. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 1998-2002 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1998.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1998

摘要

目的: 证明四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)诱导的肝纤维化小鼠对致死性D-氨基半乳糖/脂多糖(D-galactosamine and lipopolysaccharide, D-GalN/LPS)攻击的耐受性.

■同行评议者
鲁玉辉, 副教授, 福建中医药大学中医学院

方法: 建立CCl_4诱导的肝纤维化小鼠模型, 于纤维化6 wk时以致死剂量的D-GalN(700 mg/kg)/LPS(50 μg/kg)进行攻击, 以同样处理的正常小鼠作为对照, 即实验共分为4组: 正常对照组(Nor)、急性损伤组(Nor+D-GalN/LPS)、肝纤维化组(Fib)、肝纤维化+急性攻击组(Fib+D-GalN/LPS). 根据攻击前后小鼠生存率、转氨酶水平及肝组织学的变化来评估正常和纤维化小鼠对致死性D-GalN/LPS损伤的耐受性.

结果: 生存分析显示, Fib+D-GalN/LPS组的生存率显著高于Nor+D-GalN/LPS组(100% *vs* 20%). 血清转氨酶结果表明, Fib+D-GalN/LPS组肝损伤程度明显轻于Nor+D-GalN/LPS组, 其sALT水平分别为(6630 U/L±1675 U/L)和(22429 U/L±5446 U/L)(P<0.01). 接受攻击的纤维化和正常小鼠的sALT分别升高了14.3倍和455.9倍. 肝组织学检查结果也证明, 接受致死性D-GalN/LPS攻击的纤维化小鼠的肝损伤较同样处理的正常小鼠明显减轻.

结论: CCl_4诱导的肝纤维化可保护小鼠抵抗致死性D-GalN/LPS损伤的攻击.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝纤维化; 损伤; 耐受

核心提示: 肝纤维化是一把"双刃剑", 除导致病变外, 还具有很强的组织修复能力. 本研究利用致死剂量的D-氨基半乳糖/脂多糖(D-galactosamine and lipopolysaccharide, D-GalN/LPS)对正常和肝纤维化小鼠进行攻击, 观察二者对损伤的耐受性. 结果证明, CCl_4诱导的肝纤维化可以保护小鼠抵抗致死性D-GalN/LPS攻击.

白丽, 孔明, 张晓慧, 丁美, 郑素军, 陈煜, 段钟平. 肝纤维化能够保护小鼠抵抗D-Gal/LPS诱导的致死性损伤. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 1998-2002 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/1998.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.1998

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病的共同终末途径, 以肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)活化、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过量沉积、正常肝组织结构破坏和血液循环紊乱为特征. 一旦肝内胶原组织过度沉积和增生, 假小叶形成, 可进一步发展为肝硬化, 甚至进展为致死性肝衰竭[1-4]. 因此, 大多数临床医生将肝纤维化视为一种有害的病理反应. 然而, 不容忽视的是, 肝纤维化还是一种针对慢性肝损伤的伤口愈合反应, 是促使组织修复、进而保护自身的一种正常反应[5-8]. 近年来国外有研究显示, 胆管结扎(bile duct ligation, BDL)或硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)诱导的肝纤维化可通过促进肝细胞生存/肝再生、抑制肝细胞凋亡而发挥有益的肝脏保护效应[9-11]. 然而, 关于四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)诱导的肝纤维化中是否存在该保护性效应尚无明确报道. 本研究中, 我们利用致死剂量的D-氨基半乳糖/脂多糖(D-galactosamine and lipopolysaccharide, D-GalN/LPS)对正常和肝纤维化小鼠进行攻击, 观察二者对损伤的耐受性. 我们的研究证明, CCl_4诱导的肝纤维化可以保护小鼠抵抗致死性D-GalN/LPS攻击.

■研究前沿
近年来, 临床医生和研究者逐渐将研究重心转移到肝纤维化作为"双刃剑"的另一面, 即其强大的组织修复能力可能具有的肝脏保护效应. 这种认知的转变促使我们能够对肝纤维化这种疾病产生全面而正确的认识.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂Balb/c小鼠, 8-12周龄, 购自军事医学科学院实验动物中心. 普通饲养, 自由饮水, 维持12 h亮/12 h暗昼夜节律. CCl_4购自国药集团(分析纯), 矿物油为Amresco产品, D-GalN和LPS购自Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 小鼠肝纤维化损伤模型的建立: 给Balb/c小鼠腹腔注射CCl_4(溶于矿物油中), 2次/wk, 共6 wk. CCl_4的初始剂量为2% (0.1 mL/10 g), 然后逐渐增加剂量至30%, 即遵从2%→5%→10%→20%→30%的给药模式.

1.2.2 急性攻击: 分别给正常小鼠和纤维化小鼠腹腔注射D-GalN(700 mg/kg)/LPS(50 μg/kg)进行急性攻击.

1.2.3 实验分组: 共分为4组: 正常对照组(Nor)、D-GalN/LPS诱导的急性肝损伤组(Nor+D-GalN/LPS)、肝纤维化组(Fib)、肝纤维化+急性攻击组(Fib+D-GalN/LPS). 于急性攻击后24 h处死小鼠, 收集血液和肝组织标本以供检测分析.

1.2.4 生存率分析: 记录各组小鼠在72 h内的死亡时间点, 并计算生存率.

1.2.5 肝细胞损害检测: 采用全自动生化分析仪检测反映肝细胞损害程度的指标血清丙氨酸氨基转移酶(serum alanine aminotransferase, sALT)的水平.

1.2.6 肝组织病理学检测: 肝组织经常规福尔马林固定、石蜡包埋、切片, HE染色及Masson染色, 在光学显微镜下观察肝组织细胞损伤情况及胶原纤维增生情况.

■相关报道
国外研究报道，胆管结扎(bile duct ligation, BDL)或硫代乙酰胺(thio-acetamide, TAA)诱导肝纤维化小鼠能够抵抗Fas介导的急性肝损伤.

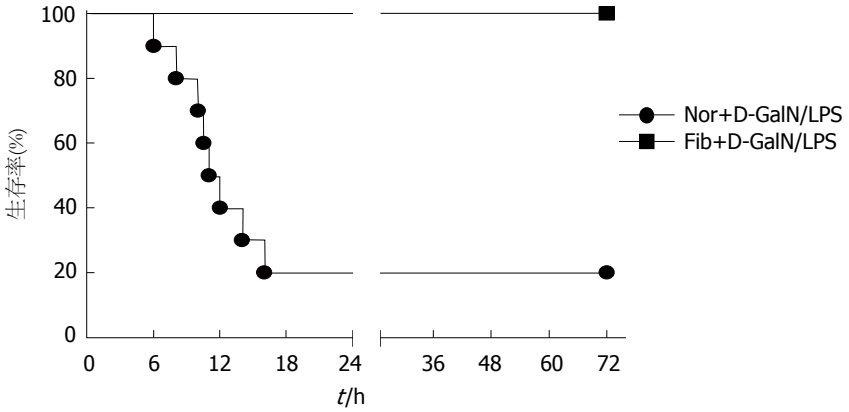


图 1 接受D-GalN/LPS攻击的正常和纤维化小鼠的生存率比较. D-GalN/LPS: D-氨基半乳糖/脂多糖. Nor+D-GalN/LPS: 正常小鼠接受D-Gal/LPS攻击; Fib+D-GalN/LPS: 肝纤维化小鼠接受D-GalN/LPS攻击.

表 1 接受D-GalN/LPS攻击的正常和纤维化小鼠的转氨酶水平比较

分组	动物数(只)	ALT(U/L)
Nor	8	49.2 ± 12.9[b]
Nor+ D-GalN/LPS	10	22429 ± 5446[d]
Fib	8	463.7 ± 109.0[d]
Fib+D-GalN/LPS	8	6630 ± 1675

[b]P<0.01 *vs* Nor+D-GalN/LPS; [d]P<0.01 *vs* Fib+D-GalN/LPS; Nor: 正常小鼠; Nor+D-GalN/LPS: 正常小鼠接受D-Gal/LPS攻击; Fib: CCl4诱导的肝纤维化小鼠; Fib+D-GalN/LPS: 肝纤维化小鼠接受D-GalN/LPS攻击; ALT: 丙氨酸转氨酶; D-GalN/LPS: D-氨基半乳糖/脂多糖.

统计学处理 所有数据以mean±SD表示. 利用Graphpad Prism 5.0软件包处理数据, 组间差异的比较采用One-way ANOVA分析. P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 接受D-GalN/LPS攻击的正常和纤维化小鼠生存率的比较 给正常小鼠腹腔注射致死剂量的D-GalN/LPS, 小鼠的死亡率可高达80%, 而给纤维化小鼠腹腔注射同样剂量的D-GalN/LPS, 小鼠均未死亡(图1). 这就提示, 纤维化小鼠并非像我们预期的那样“脆弱”, 相反, 他对致死性损伤的耐受性较正常小鼠明显增强, 因而生存率远远高于后者(100% *vs* 20%).

2.2 接受D-GalN/LPS攻击的正常和纤维化小鼠sALT水平的比较 正常小鼠经D-GalN/LPS急性攻击后, 血清转氨酶水平由49.2U/L±12.9 U/L急剧升高至22429 U/L±5446 U/L, 而在肝纤维化基础上给予D-GalN/LPS攻击时, 其sALT由463.7 U/L±109.0 U/L升高为6630 U/L±1675 U/L, 差异均有统计学意义(Nor *vs* Nor+D-GalN/LPS, Fib *vs* Fib+D-GalN/LPS, Nor+D-GalN/LPS *vs* Fib+D-GalN/LPS, P<0.01)(表1). 接受攻击前后, 正常组小鼠的sALT水平升高了455.9倍, 而纤维化小鼠的sALT水平仅升高了14.3倍. 该结果进一步证实, 纤维化小鼠对急性致死性损伤的耐受性较正常小鼠显著增强.

2.3 接受D-GalN/LPS攻击的正常和纤维化小鼠肝组织学改变的比较 病理结果显示: 正常小鼠肝小叶形态结构完整, 未见变性、坏死及炎症细胞浸润等. 纤维化组小鼠的正常肝小叶破坏, 汇管区纤维结缔组织增生, 形成线条状纤维间隔, 分割肝组织而形成假小叶. 急性损伤组小鼠肝损害严重, 肝小叶结构明显紊乱, 肝细胞明显肿胀、变性、凋亡及坏死, 汇管区可见大量炎细胞浸润. 而在肝纤维化基础上接受急性攻击的小鼠, 其肝细胞变性、坏死程度较急性损伤组明显减轻, 浸润的炎细胞也明显减少. Masson染色显示, 纤维化组小鼠纤维组织明显增生, 证明纤维化模型建立成功(图2).

3 讨论

肝纤维化的有害作用已为广大临床医生和研究者所熟知. 然而, 人们往往忽视, 除导致病变外, 肝纤维化还是一种针对慢性肝损伤的伤口愈合反应, 能够促使组织修复、进而保护自身. 近年来, 研究者不再过度关注肝纤维化的危害性, 单纯将其视为一种有害的病理过程, 反而将研究重心逐渐转移到肝纤维化作为“双刃剑”的另一面, 即其通过损伤修复可能呈现出的有益的肝脏保护效应.

本研究中, 当同时给正常小鼠和CCl_4诱导的纤维化小鼠腹腔注射D-GalN/LPS进行急性攻击时, 结果出乎意料: 接受急性攻击的纤维化小鼠的损伤程度明显轻于同样处理的正常小鼠, 表现为: 生存率更高(100% *vs* 20%); sALT水平明显降低; 肝组织学明显改善. 这就表明, 纤维化肝

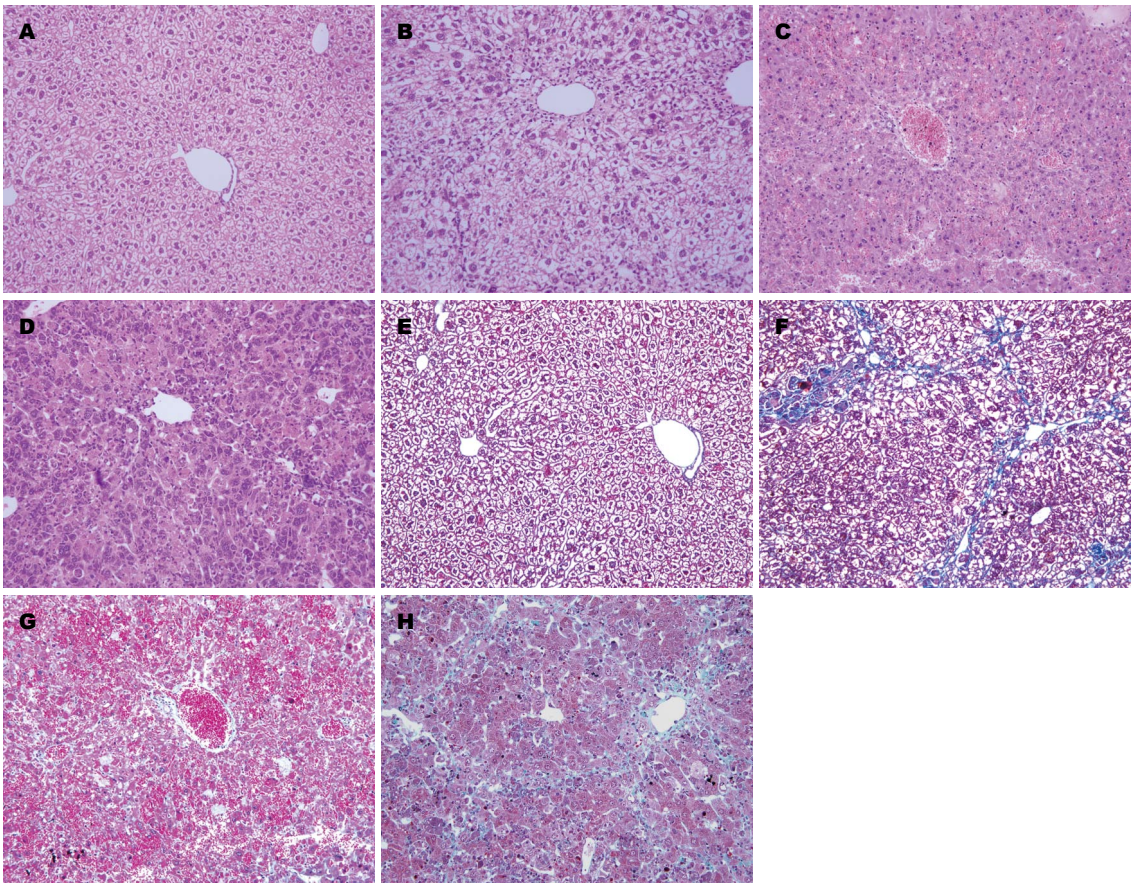


图 2 接受D-GalN/LPS攻击的正常和纤维化小鼠的病理改变(×200). A-D: HE; E-H: Masson. A, E: Nor; B, F: Fib; C, G: Nor+D-GalN/LPS; D, H: Fib+D-GalN/LPS. Nor: 正常小鼠; Nor+D-GalN/LPS: 正常小鼠接受D-Gal/LPS攻击; Fib: CCl4诱导的肝纤维化小鼠; Fib+D-GalN/LPS: 肝纤维化小鼠接受D-GalN/LPS攻击.

■创新盘点
本文从新的角度(即肝纤维化的组织修复功能)验证了纤维化小鼠对急性致死性攻击的保护性损伤耐受效应, 研究结果对于全面正确认识肝纤维化有积极意义.

脏并不像我们所预期的那样“脆弱”, 相反, 他对损伤的耐受性较正常小鼠明显增强, 可以保护小鼠抵抗急性致死性损伤的攻击.

我们所报道的关于肝纤维化诱导损伤耐受这一现象并非无迹可寻. Chalasani等[12]首次阐述了关于基线肝酶升高患者对他汀类药物的肝毒性是否更为敏感的问题. 研究发现, 基线肝酶升高患者的轻-中度(而非重度)生化指标升高较基线肝酶正常者更为多见, 然而这些生化指标的升高与是否服用他汀类药物无关, 也就是说, 肝酶升高者对他汀类药物肝毒性的敏感性并不高于肝酶正常者. 该结果提示肝损伤患者存在对肝毒性物质的耐受性. 部分胆管结扎(partial bile duct ligation, PBDL)小鼠模型(可快速形成纤维化)中, 与非结扎叶相比, 结扎叶对TNF-α/D-GalN诱导的肝细胞凋亡的耐受性更强, 并可阻止广泛出血的发生. BDL诱导的这种保护性凋亡抵抗可延缓或阻止肝衰竭的发生[9]. 同样, TAA诱导的肝纤维化小鼠也可以抵抗Fas介导的肝细胞凋亡及肝损害[11]. 体外实验也证明, 经Ⅰ型胶原(type Ⅰ collagen, COL1)处理的肝细胞对于多种肝毒素的耐受性增强(呈剂量依赖方式), 其促凋亡蛋白(Bad、Bid和Bax)的表达明显受到抑制[11].

上述临床和实验室证据证明了慢性肝损伤(肝纤维化)诱导的损伤耐受现象的存在. 那么, 这种保护性损伤耐受是通过何种细胞和分子途径发挥作用的呢? 利用PBDL小鼠模型进行的研究显示, 结扎叶所具有的肝脏保护效应(即对TNF-α/D-GalN诱导的肝细胞凋亡和肝损害的抵抗)与肝细胞内AKT(一种重要的促生存信号分子)的活化密切相关. 与非结扎叶相比, 结扎叶中AKT的磷酸化及活化显著增强. 然而, 抑制AKT时(Ad5DN-AKT), 结扎叶和非结扎叶对TNF-α/D-GalN诱导的肝损伤的反应相同, 此时结扎叶所具有的肝脏保护效应丧失[9]. 在TAA诱导的肝纤维化中也存在肝组织AKT磷酸化活性的增强[11]. 另外, ERK, 特别是ERK1, 也是涉及纤维化诱导的肝脏保护效应的关键效应信号分子. 在体外, 暴露于COL1的肝细胞中ERK1/2的

■同行评价
本文证明了肝纤维化诱导的损伤耐受现象的存在，有一定的创新性，能反映我国肝纤维化基础研究的先进水平.

活化更强、更快速. 然而，抑制ERK信号通路可逆转COL1的凋亡抵抗效应. 在体内，野生型纤维化小鼠肝脏中ERK1的磷酸化活性明显高于ERK1$^{-/-}$纤维化小鼠，并且前者对Fas诱导细胞死亡的抵抗效应也明显强于后者[11].

以上提到的AKT和ERK都是重要的促生存信号分子，其介导的肝保护效应主要与增强肝细胞的生长、增生、凋亡抵抗反应有关[13-15]. 在细胞水平，肝纤维化诱导的损伤耐受与Kupffer细胞密切相关. 在PBDL小鼠模型中，利用alendronate liposomes耗竭Kupffer细胞后，结扎叶对TNF-α诱导的肝细胞凋亡的敏感性增强，而肝细胞的再生则明显削弱，从而致使结扎叶所具有的肝脏保护效应丧失[10]. Kupffer细胞在肝纤维化形成和消融中的关键作用已经明确[16-19]，因此，经纤维化诱导活化的Kupffer细胞可能通过抑制肝细胞凋亡及促进肝细胞再生而保护小鼠抵抗随后的损伤攻击，进而阻止肝衰竭或死亡的发生.

表面上，肝纤维化诱导的肝脏保护效应似乎与临床医生对肝纤维化的认知相违背，然而，这一新认知实际上与肝脏强大而卓越的组织修复能力相符. 需要强调的是，肝纤维化诱导的损伤耐受中对肝细胞凋亡的抵抗、肝细胞再生的促进是针对剩余正常肝细胞(而非已经发生异常转变的肝细胞)而言的[11]. 虽然肝纤维化诱导的保护效应在短期内是有益的. 然而，长远来看，如纤维化损伤过重，则修复、保护效应远远弱于损伤效应，最终仍会导致不可逆性肝损害.

4 参考文献

1 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218 [PMID: 15690074 DOI: 10.1172/JCI200524282]

2 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]

3 Qin L, Han YP. Epigenetic repression of matrix metalloproteinases in myofibroblastic hepatic stellate cells through histone deacetylases 4: implication in tissue fibrosis. *Am J Pathol* 2010; 177: 1915-1928 [PMID: 20847282 DOI: 10.2353/ajpath.2010.100011]

4 Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 425-436 [PMID: 20585339 DOI: 10.1038/nrgastro.2010.97]

5 Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 583-594 [PMID: 15286725 DOI: 10.1038/nri1412]

6 Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 2008; 88: 125-172 [PMID: 18195085 DOI: 10.1152/physrev.00013.2007]

7 Wynn TA. Fibrosis under arrest. *Nat Med* 2010; 16: 523-525 [PMID: 20448575 DOI: 10.1038/nm0510-523]

8 Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2011; 208: 1339-1350 [PMID: 21727191 DOI: 10.1084/jem.20110551]

9 Osawa Y, Hannun YA, Proia RL, Brenner DA. Roles of AKT and sphingosine kinase in the antiapoptotic effects of bile duct ligation in mouse liver. *Hepatology* 2005; 42: 1320-1328 [PMID: 16317686 DOI: 10.1002/hep.20967]

10 Osawa Y, Seki E, Adachi M, Suetsugu A, Ito H, Moriwaki H, Seishima M, Nagaki M. Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. *Hepatology* 2010; 51: 237-245 [PMID: 19821528 DOI: 10.1002/hep.23262]

11 Bourbonnais E, Raymond VA, Ethier C, Nguyen BN, El-Leil MS, Meloche S, Bilodeau M. Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury. *Gastroenterology* 2012; 142: 130-139. e4 [PMID: 21945831 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.09.033]

12 Chalasani N, Aljadhey H, Kesterson J, Murray MD, Hall SD. Patients with elevated liver enzymes are not at higher risk for statin hepatotoxicity. *Gastroenterology* 2004; 126: 1287-1292 [PMID: 15131789 DOI: 10.1053/j.gastro.2004.02.015]

13 Frémin C, Ezan F, Guegan JP, Gailhouste L, Trotard M, Le Seyec J, Rageul J, Theret N, Langouët S, Baffet G. The complexity of ERK1 and ERK2 MAPKs in multiple hepatocyte fate responses. *J Cell Physiol* 2012; 227: 59-69 [PMID: 21437905 DOI: 10.1002/jcp.22742]

14 Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 2007; 26: 3203-3213 [PMID: 17496916]

15 Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Pouysségur J, Pagès G, De Windt LJ, Doevendans PA, Molkentin JD. MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation* 2004; 109: 1938-1941 [PMID: 15096454 DOI: 10.1161/01.CIR]

16 Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005; 115: 56-65 [PMID: 15630444]

17 Thomas JA, Pope C, Wojtacha D, Robson AJ, Gordon-Walker TT, Hartland S, Ramachandran P, Van Deemter M, Hume DA, Iredale JP, Forbes SJ. Macrophage therapy for murine liver fibrosis recruits host effector cells improving fibrosis, regeneration, and function. *Hepatology* 2011; 53: 2003-2015 [PMID: 21433043 DOI: 10.1002/hep.24315]

18 Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol* 2014 Jan 8. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24412603 DOI: 10.1016/j.jhep.2013.12.025]

19 Male P. [Problems of the 1st development disorders in their relations with the psychopathology of the adolescent]. *Rev Neuropsychiatr Infant* 1970; Suppl: 97-108 [PMID: 4115204 DOI: 10.1002/hep.26754]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2003-2007
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

Genistein与5-FU通过p42/44 MAPK通路调控Bax诱导肝癌细胞凋亡

赵忠新, 迟大鹏, 王钰粟, 梅庆步, 于海涛, 岳丽玲, 王 玉, 王秀华, 刘 丹

赵忠新, 齐齐哈尔市建华医院普外科 黑龙江省齐齐哈尔市 161006
迟大鹏, 上海中医药大学附属岳阳医院神经外科 上海市 200437
王钰粟, 梅庆步, 于海涛, 岳丽玲, 王玉, 王秀华, 刘丹, 齐齐哈尔医学院基础医学院 黑龙江省齐齐哈尔市 161006
赵忠新, 主治医师, 主要从事普外科疾病的诊疗、教学及科研.
黑龙江省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. 12531792
作者贡献分布: 此课题由刘丹、岳丽玲及于海涛设计; 研究过程由刘丹、赵忠新、迟大鹏、王钰粟及王秀华操作; 研究方法由王玉指导; 数据分析由梅庆步完成; 本论文写作由赵忠新、刘丹及王钰粟完成.
通讯作者: 刘丹, 讲师, 161006, 黑龙江省齐齐哈尔市建华区卜奎北大街333号, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室.
7896078_cn@sina.com
电话: 0452-2663174
收稿日期: 2014-03-16 修回日期: 2014-04-02
接受日期: 2014-04-09 在线出版日期: 2014-05-18

Genistein and 5-FU inhibit apoptosis of human hepatocellular cancer cells by regulating Bax *via* p42/44 MAPK pathway

Zhong-Xin Zhao, Da-Peng Chi, Yu-Su Wang, Qing-Bu Mei, Hai-Tao Yu, Li-Ling Yue, Yu Wang, Xiu-Hua Wang, Dan Liu

Zhong-Xin Zhao, Department of General Surgery, Qiqihar Jianhua Hospital, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China
Da-Peng Chi, Department of Neurosurgery, Yueyang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China
Yu-Su Wang, Qing-Bu Mei, Hai-Tao Yu, Li-Ling Yue, Wang Yu, Xiu-Hua Wang, Dan Liu, Basic Medical Science College, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China
Supported by: the Science and Technology Research Project of Heilongjiang Provincial Department of Education, No. 12531792
Correspondence to: Dan Liu, Lecturer, Qiqihar Medical University, 333 Bukui North Road, Jianhua District, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China. 7896078_cn@sina.com
Received: 2014-03-16 Revised: 2014-04-02
Accepted: 2014-04-09 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To explore whether genistein and 5-FU induce apoptosis of human hepatic cancer MHCC97-L cells by regulating Bax *via* the p42/44 MAPK pathway.

METHODS: MHCC97-L cells were treated with genistein, 5-FU, PD98059, genistein + 5-FU, PD98059 + genistein, PD98059 + 5-FU, or PD98059 + genistein + 5-FU, respectively. The density and morphology of MHCC97-L cells were observed under an inverted microscope. Apoptosis and cell death were detected after annexin V-FITC/PI staining under a fluorescence microscope. The expression of Bax protein was detected by Western blot.

RESULTS: All drug groups showed decreased cell density, cell death and debris, cell shrinkage or deformation, reduced cytoplasmic transparency, and vacuoles structure within the cells, with PD98059 + genistein + 5-FU group having the most obvious changes. Apoptotic cells and dead cells were detected in all drug groups. The relative expression of Bax protein was the highest in the genistein + 5-FU group, followed by the genistein, 5-FU, PD98059 + genistein + 5-FU, PD98059 + 5-FU, PD98059 + genistein, PD98059 and control groups. The expression of Bax protein in the PD98059 + genistein group was very close to that in the PD98059 group, but was significantly lower than that in the genistein group.

CONCLUSION: Genistein and 5-FU can induce the apoptosis of MHCC97-L cells and increase Bax expression possibly by regulating Bax mainly through the p42/44 MAPK pathway.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Mitogen-activatedproteinkinase; Genistein; 5-fluorouracil; Apoptosis; Bax; Hepatocellular cancer

Zhao ZX, Chi DP, Wang YS, Mei QB, Yu HT, Yue LL, Wang Y, Wang XH, Liu D. Genistein and 5-FU inhibit apoptosis of human hepatocellular cancer cells by regulating Bax *via* p42/44 MAPK pathway. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2003-2007 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2003.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2003

■背景资料
p42/44丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是调节细胞增殖、分化及发育的信号网络核心, Bax为Bcl-2家族中促凋亡蛋白. 在药物诱导肿瘤细胞凋亡的研究中, 明确p42/44 MAPK通路与Bax的关系有利于发现药物的作用机制及指导临床用药.

■同行评议者
唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

■研发前沿
木黄酮(genistein, Gen)增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性，降低肿瘤细胞耐药性的产生，减轻患者对化疗药物的不良反应，已成为国内外学者研究的热点之一. 联合用药的协同疗效与p42/44 MAPK通路相关性的大小有可能成为评价药物联用的可行性和有效性的指标.

摘要

目的: 探讨在染料木黄酮(genistein, Gen)与氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)诱导肝癌MHCC97-L细胞凋亡作用中p42/44丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)对Bax的调控.

方法: 倒置显微镜观察细胞密度和细胞形态; 荧光显微镜(Annexin V-FITC/PI)检测细胞凋亡及细胞死亡; Western blot检测Bax蛋白表达.

结果: 倒置显微镜下, 所有药物组细胞密度均下降, 死亡细胞及碎片散落在培养液中, 贴壁细胞皱缩或变形, 胞浆透明度下降, 可见空泡结构, 其中以PD98059+Gen+5-FU组变化最明显; 荧光显微镜下, 所有药物组均可检测到凋亡和死亡细胞; Western blot检测各组Bax蛋白的相对表达量由高到低依次为Gen+5-FU、Gen、5-FU、PD98059+Gen+5-FU、PD98059+5-FU、PD98059+Gen、PD98059、对照组, PD98059+Gen组的Bax蛋白表达与PD98059组十分接近, 且明显低于Gen组; PD98059+5-FU组和PD98059+Gen+5-FU组的Bax蛋白表达介于单用抑制剂组与未用抑制剂预处理的对应药物组之间.

结论: Gen、5-FU和Gen+5-FU均能诱导MHCC97-L细胞凋亡, 并与上调Bax有关; Gen对Bax的调控与p42/44 MAPK通路关系密切; 5-FU和联用组调控Bax需要有p42/44 MAPK通路参与.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶; 染料木黄酮; 氟尿嘧啶; 细胞凋亡; Bax; 肝癌

核心提示: 降低p42/44丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases)的活性能拮抗木黄酮(genistein)和氟尿嘧啶(5-fluorouracil)单用及联用对MHCC97-L细胞上调Bax的作用, 但所有经PD98059预处理的药物组抗肝癌细胞增殖的效果并没有减弱, 反而增强, 提示存在其他机制与之相互作用.

赵忠新, 迟大鹏, 王钰莹, 梅庆步, 于海涛, 岳丽玲, 王玉, 王秀华, 刘丹. Genistein与5-FU通过p42/44 MAPK通路调控Bax诱导肝癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2003-2007
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2003.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2003

0 引言

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号通路是将细胞外刺激信号从细胞表面转导至细胞核内的重要传递者[1]. 细胞外信号调节激酶(p42/44 MAPK, 又称ERK)是MAPK家族的重要成员, 是一个三级酶促级联反应链, 即Ras-Raf-MEK-p42/44 MAPK, 是调节细胞增殖、分化及发育的信号网络核心. 染料木黄酮(genistein, Gen)是天然异黄酮物质, 具有抗肿瘤功效, 氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是消化系肿瘤常用的化疗药物, 二者联合有可能增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 降低肿瘤细胞耐药性的产生. 本研究延续前期实验[2], 进一步探讨在Gen与5-FU诱导肝癌MHCC97-L细胞凋亡作用中p42/44 MAPK对Bax的调控机制.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌MHCC97-L细胞购自复旦大学肝癌研究所. Gen(Sigma), 5-FU(天津金耀氨基酸有限公司), PD98059(Promega), 优级胎牛血清(Hyclone), 胰蛋白酶、DMSO(Amresco), DMEM高糖培养基(Gibco), Annexin V-FITC/PI试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司), Bax polyclonal antibody(Santa Cruz), β-actin(武汉博士德生物工程有限公司), 蛋白Marker(MBI), 哺乳动物蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、一步法快速WB(HRP)试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司), ECL超敏发光液(北京普利莱基因技术有限公司), NC膜(Pall), 胶片(富士), 余为进口分装或国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: MHCC97-L细胞生长于DMEM高糖培养液中, 内含10% FBS及100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素, 置于37 ℃、5.0%CO_2的培养箱中培养, 实验所用细胞均取对数生长期.

1.2.2 实验分组: 实验分为对照组、Gen组(80 μmol/L)、5-FU组(40 μmol/L)、PD98059组(50 μmol/L)(p42/44 MAPK抑制剂)、Gen(80 μmol/L)+5-FU(40 μmol/L)组、PD98059(50 μmol/L)+Gen(80 μmol/L)组、PD98059(50 μmol/L)+5-FU(40 μmol/L)组、PD98059(50 μmol/L)+Gen(80 μmol/L)+5-FU(40 μmol/L)组, 后3组为抑制p42/44 MAPK的药物组(PD98059预处理1 h后, 再加入联用药物).

1.2.3 倒置显微镜: 细胞以3×10^5个/孔接种于6孔板, 每孔2 mL细胞悬液, 每组设3个复孔, 培养24 h后, 加入不同药物处理的培养液, 处理48 h后, 倒置显微镜下观察细胞密度及形态学变化.

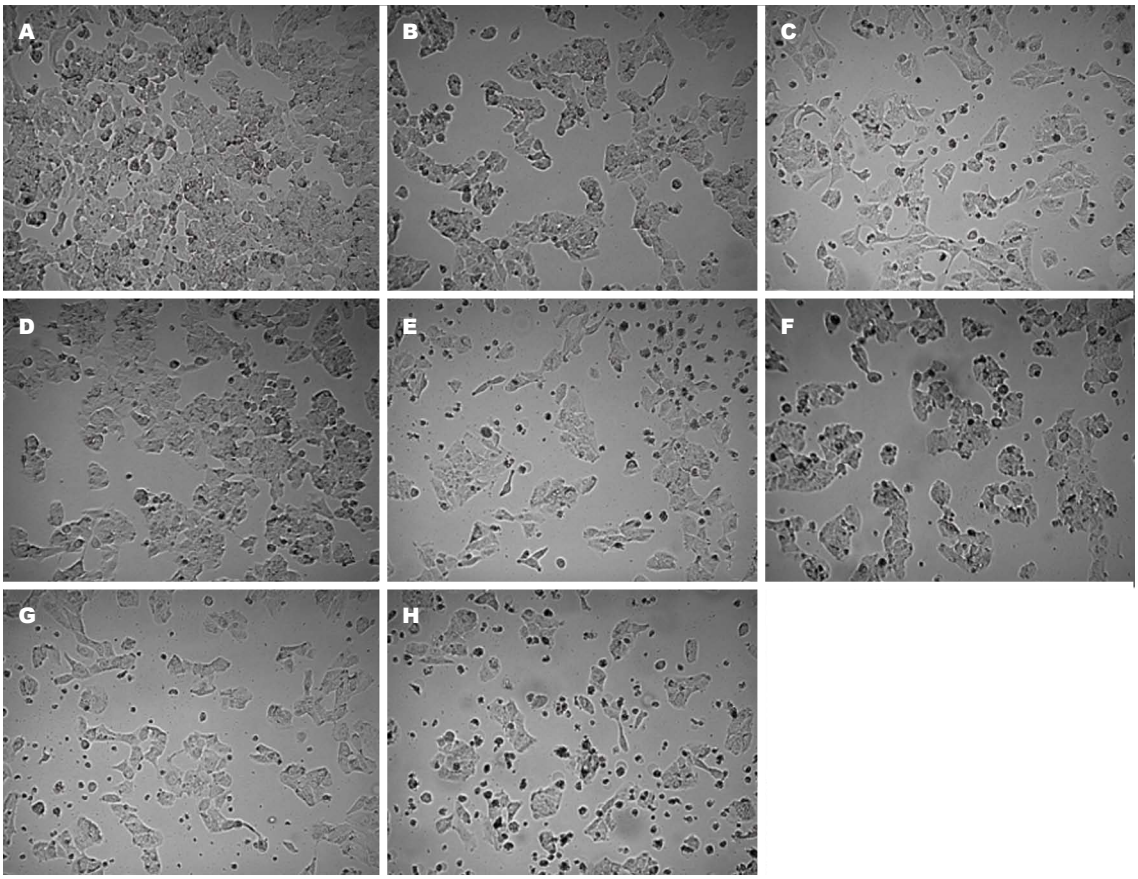


图 1 倒置显微镜下各组细胞密度及形态学变化(×100). A: 对照组; B: Gen组; C: 5-FU组; D: PD98059组; E: Gen+5-FU组; F: PD98059+Gen组; G: PD98059+5-FU组; H: PD98059+Gen+5-FU组. 5-FU: 氟尿嘧啶; Gen: 木黄酮.

■相关报道
Gen诱导肝癌细胞凋亡作用与上调Bax、下调Bcl-2及激活Caspase9和Caspase3有关. 5-FU可激活Caspase8和Caspase3的活性, 诱导肝癌细胞凋亡. p42/44 MAPK与Bcl-2家族蛋白关系密切, p42/44 MAPK的激活可上调Bcl-2等抗凋亡蛋白的表达而抑制细胞凋亡, 也可下调Bcl-2和Bcl-xL, 增强Caspases3、6、8、9的活性而促进细胞凋亡.

1.2.4 荧光显微镜: 细胞以5×10^4个/孔接种于24孔板, 每孔0.5 mL细胞悬液, 每组设2个复孔, 培养24 h后, 加入不同药物处理的培养液, 处理48 h后, PBS洗涤细胞2次, 加入提前混匀的500 μL Binding Buffer、5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI的混合液, 室温避光反应5 min, 于荧光显微镜下, 用双色滤光片观察, Annexin V-FITC呈现绿色信号, PI呈现红色信号.

1.2.5 细胞蛋白的抽提: 细胞以3×10^5个/孔接种于6孔板中, 每孔2 mL细胞悬液, 每组设2个复孔, 培养24 h后, 加入不同药物处理的培养液, 培养48 h后, PBS(预冷)洗涤细胞2次, 冰上加入400 μL的蛋白抽提试剂(裂解液与蛋白酶抑制剂的混合物), 冰上用枪头小心吹打贴壁细胞, 将裂解液转移至EP管中, 冰上孵育30 min, 4 ℃ 14000 *g* 离心10 min, 小心转移上清液至新EP管中, 并记录各组转移体积.

1.2.6 BCA蛋白定量: 将稀释好的A-G组BSA标准品和待测蛋白样品(稀释10倍)各25 μL分别加入96孔板, 每组设3个复孔, 加入200 μL BCA工作液, 混匀后, 37 ℃孵育30 min, 冷却至室温, 于自动酶标仪检测570 nm的吸光度值, 绘制标准曲线, 计算待测样品的蛋白浓度, 用5×上样缓冲液和细胞裂解液稀释, 调整待测样品蛋白浓度为2 μg/μL, 100 ℃加热5 min, 冷却后混匀, -20 ℃保存.

1.2.7 Western blot: 取各组样品15 μL(30 μg)上样, 经SDS-PAGE电泳分离蛋白样品后, 转移至NC膜上, 封闭液封闭10 min, 再用抗体反应液处理后的一抗4 ℃孵育过夜, 经洗涤3次(每次5 min)后, 进行ECL发光, 显影, 定影, 用Photoshop13.0软件分析胶片泳带, 靶蛋白表达量用相对比率来表示.

统计学处理 数据用mean±SD表示, 采用SPSS16.0软件进行统计学分析, 两组间均数比较采用*t*检验. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 倒置显微镜观察细胞密度及细胞形态学变化 所有药物组细胞密度均下降, 死亡细胞及碎片散落在培养液中, 贴壁细胞皱缩或变形, 胞浆透明度下降, 可见空泡结构, 其中以

■**创新盘点**
本实验结果显示，加入p42/44 MAPK抑制剂后Gen上调Bax的作用与单用抑制剂的相仿，又明显不及单用Gen，提示Gen可能主要通过p42/44 MAPK通路上调Bax；而5-FU和联用组上调Bax只有部分需要由p42/44 MAPK通路介导.

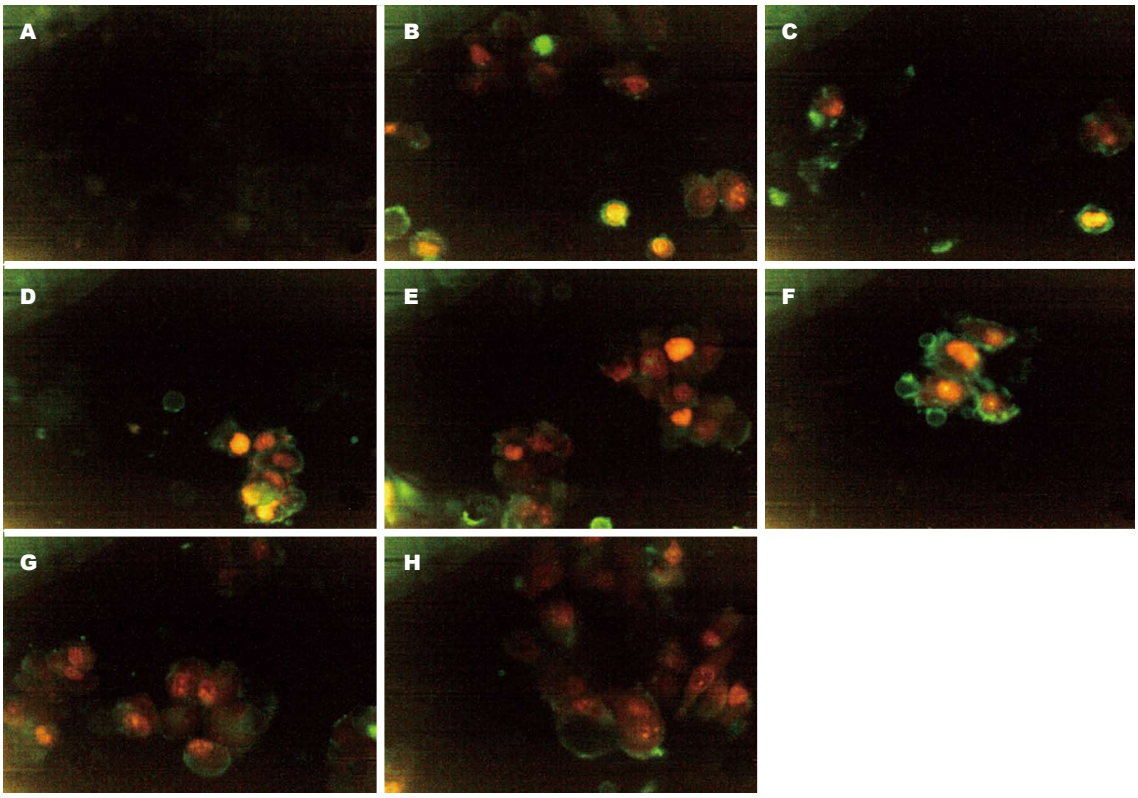


图 2 荧光显微镜显示各组细胞凋亡及死亡情况(×400). A: 对照组; B: Gen组; C: 5-FU组; D: PD98059组; E: Gen+5-FU组; F: PD98059+Gen组; G: PD98059+5-FU组; H: PD98059+Gen+5-FU组. 5-FU: 氟尿嘧啶; Gen: 木黄酮.

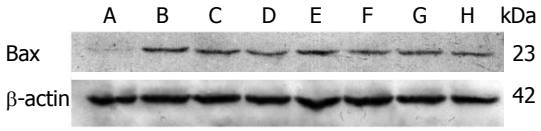


图 3 Western blot检测各组细胞Bax蛋白表达情况. A: 对照组; B: Gen组; C: 5-FU组; D: PD98059组; E: Gen+5-FU组; F: PD98059+Gen组; G: PD98059+5-FU组; H: PD98059+Gen+5-FU组. 5-FU: 氟尿嘧啶; Gen: 木黄酮.

PD98059+Gen+5-FU组变化最明显，而对照组胞浆内偶见空泡，其余未见异常(图1).

2.2 荧光显微镜(Annexin V-FITC/PI)观察细胞凋亡与细胞死亡 药物组荧光信号显示，绿色为早期凋亡的细胞，细胞内红色而细胞膜周围绿色的为晚期凋亡的细胞，红色的为死亡的细胞，所有药物组均可检测到凋亡和死亡细胞，对照组未见明显的绿色和红色信号(图2).

2.3 Western blot检测Bax蛋白表达 各组Bax蛋白的相对表达量由高到低依次为Gen+5-FU、Gen、5-FU、PD98059+Gen+5-FU、PD98059+5-FU、PD98059+Gen、PD98059、对照组；PD98059+Gen组的Bax蛋白表达与PD98059组十分接近，但明显低于Gen组，抑制p42/44 MAPK磷酸化未增加Gen上调Bax的作用；PD98059+5-FU组和PD98059+Gen+5-FU组的Bax蛋白表达介于单用抑制剂组与未用抑制剂预处理的对应药物组之间(图3). 结果提示，Gen、5-FU和Gen+5-FU诱导MHCC97-L细胞凋亡与上调Bax有关，Gen对Bax的调控与p42/44 MAPK通路关系密切，5-FU和联用组调控Bax需要有p42/44 MAPK通路参与.

3 讨论

国内外众多学者通过实验证明，Gen具有明显诱导肝癌细胞凋亡作用与上调Bax[3-5]、下调Bcl-2[4-6]及激活Caspase9[5]和Caspase3[5,7,8]有关. 5-FU是历史悠久的基础化疗药物，一般认为他是抗代谢药，但最新研究表明他还可通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用[9]. 5-FU导致Fas受体增加，激活Fas信号途径，引起Caspase8和Caspase3的活化，诱导肝癌细胞凋亡[10,11]. 有研究表明，过表达的*Bax*基因能进一步抑制Bcl-2的功能，促进肝癌细胞凋亡[12]. 本实验结果显示，Gen、5-FU和Gen+5-FU组均能诱导肝癌MHCC97-L细胞凋亡，并与上调促凋亡蛋白Bax有关.

Bcl-2家族蛋白包括两大类，一类是抗凋亡

蛋白, 如Bcl-2和Bcl-xL等; 另一类是促凋亡蛋白, 如Bax、Bak、Bid和Bad等[13]. p42/44 MAPK是此信号转导通路的最下游, 当他活化后可使其底物磷酸化, Bax是其底物之一. 一般认为, p42/44 MAPK激活能促进细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 这主要是因为p42/44 MAPK与Bcl-2家族蛋白有着密切的关系[14]. p42/44 MAPK的激活不仅可以上调Bcl-2等抗凋亡蛋白的表达, 而且还可以诱导其磷酸化[15-18]. 另外, 也有实验发现, p42/44 MAPK信号途径也可促进细胞凋亡, 在人B细胞的研究中, p42/44 MAPK参与诱导细胞凋亡[14]. Boucher等[19]以胰腺癌细胞为模型, 分析p42/44 MAPK在细胞生存中的调节作用以及相关机制时, 发现p42/44 MAPK抑制剂可以诱导细胞G_0/G_1期的阻滞及下调抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-xL的表达, 增强Caspase3、Caspase6、Caspase8、Caspase9的活性, 但不影响促凋亡蛋白Bax和Bak的表达. 本实验结果显示, 加入p42/44 MAPK抑制剂后Gen上调Bax的作用与单用抑制剂的相仿, 又明显不及单用Gen, 提示Gen可能主要通过p42/44 MAPK通路上调Bax的蛋白表达; 而5-FU和联用组上调Bax只有部分需要由p42/44 MAPK通路介导.

总之, 降低p42/44 MAPK的活化能拮抗Gen、5-FU和联用组对MHCC97-L细胞上调Bax的作用, 但所有经PD98059预处理的药物组抗肝癌细胞增殖的效果并没有减弱, 反而增强, 说明仍存在其他机制与之相互作用, 尚待进一步研究.

4 参考文献

1 陈誉华. 医学细胞生物学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 290

2 刘丹, 赵忠新. Genistein与5-FU联合对人肝癌细胞MHCC97-L的抗增殖作用. 世界华人消化杂志 2012; 20: 2474-2478

3 马兴标, 张继红, 梁力建, 黄洁夫. 金雀异黄素调节肝癌HepG2细胞bax基因表达诱导细胞凋亡的实验研究. 中国普外基础与临床杂志 2008; 15: 245-249

4 王宝海, 田晓丰, 曹宏. 金雀异黄素诱导人肝癌细胞SMMC-7721细胞凋亡的研究. 中国老年学杂志 2008; 28: 1888-1889

5 Jiang H, Ma Y, Chen X, Pan S, Sun B, Krissansen GW, Sun X. Genistein synergizes with arsenic trioxide to suppress human hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101: 975-983 [PMID: 20219070 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01464.x]

6 Ma Y, Wang J, Liu L, Zhu H, Chen X, Pan S, Sun X, Jiang H. Genistein potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma: role of Akt and nuclear factor-κB. *Cancer Lett* 2011; 301: 75-84 [PMID: 21078540 DOI: 10.1016/j.canlet.2010.10.022]

7 Chodon D, Ramamurty N, Sakthisekaran D. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 887-891 [PMID: 17391909 DOI: 10.1016/j.tiv.2007.01.023]

8 Chodon D, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by genistein in experimental hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biochem* 2007; 297: 73-80 [PMID: 17006617 DOI: 10.1007/s11010-006-9324-2]

9 张厚莉, 裴可灵, 崔淑香. 5-FU类药物抗癌新调控机制研究进展. 中华肿瘤防治杂志 2012; 19: 1437-1440

10 Chen Z, Xu K. [Effect of fluorouracil combined with FK228 on the proliferation, apoptosis and Fas mRNA level in HepG2 hepatoma cell lines]. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2009; 34: 124-129 [PMID: 19270351]

11 Okamura M, Shimada J, Sakagami H. Comparative analysis of cell death induction by cisplatin and 5-FU in human oral squamous and hepatocellular carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2008; 28: 253-259 [PMID: 18383853]

12 Wang JM, Xiao BL, Zheng JW, Chen HB, Zou SQ. Effect of targeted magnetic nanoparticles containing 5-FU on expression of bcl-2, bax and caspase 3 in nude mice with transplanted human liver cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3171-3175 [PMID: 17589894]

13 刘志, 郑军. Bcl-2家族蛋白及其在细胞凋亡中的作用. 生命的化学 2007; 27: 22-25

14 郑铭, 韩启德. 参与细胞凋亡的丝裂原活化蛋白激酶及其作用机制. 生理科学进展 2000; 31: 157-160

15 Stadheim TA, Xiao H, Eastman A. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase (ERK) mediates cell cycle phase independent apoptosis in vinblastine-treated ML-1 cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1533-1540 [PMID: 11245462]

16 Romerio F, Zella D. MEK and ERK inhibitors enhance the anti-proliferative effect of interferon-alpha2b. *FASEB J* 2002; 16: 1680-1682 [PMID: 12206994]

17 Boucher MJ, Duchesne C, Lainé J, Morisset J, Rivard N. cAMP protection of pancreatic cancer cells against apoptosis induced by ERK inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 207-216 [PMID: 11444827 DOI: 10.1006/bbrc.2001.5147]

18 Gebauer G, Peter AT, Onesime D, Dhanasekaran N. Apoptosis of ovarian granulosa cells: correlation with the reduced activity of ERK-signaling module. *J Cell Biochem* 1999; 75: 547-554 [PMID: 10572238]

19 Boucher MJ, Morisset J, Vachon PH, Reed JC, Lainé J, Rivard N. MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 2000; 79: 355-369 [PMID: 10972974]

■同行评价

本文设计合理, 具有一定指导意义.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2008-2015
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

不同比例ω-3/ω-6多不饱和脂肪酸对DSS诱导大鼠急性结肠炎的影响

田玉玲, 王化虹, 田 雨, 张 维, 滕贵根, 何 群

■背景资料
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性非特异性肠道炎症, 发病机制尚不明确. 近年来大规模研究发现"西方化"饮食的传播和炎症性病在以前非高发地区发病率升高有关系. 有研究发现ω-3/ω-6多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)摄入比例的变化与IBD的发病有重要关系. 还有研究发现与ω-3PUFA和ω-6 PUFA的含量相比, 两者的比例更能影响肠道的炎症过程.

■同行评议者
江学良, 教授, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科; 杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院; 张庆瑜, 教授, 主任医师, 天津医科大学总医院科研处

田玉玲, 王化虹, 田雨, 张维, 滕贵根, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034
何群, 北京大学第一医院泌尿外科病理研究室 北京市 100034
田玉玲, 主要从事炎症性肠病的研究.
作者贡献分布: 试验设计由田玉玲、王化虹及田雨共同完成; 动物模型制作、试验检测、数据分析、论文写作主要有田玉玲完成; 张维、腾贵根及何群参与部分研究过程.
通讯作者: 王化虹, 主任医师, 100034, 北京市西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科. wanghuahong@medmail.com.cn
电话: 010-83572226
收稿日期: 2014-02-24 修回日期: 2014-04-02
接受日期: 2014-04-09 在线出版日期: 2014-05-18

Effects of different ratios of ω-3/ω-6 polyunsaturated fatty acids on experimental acute colitis in rats

Yu-Ling Tian, Hua-Hong Wang, Yu Tian, Wei Zhang, Gui-Gen Teng, Qun He

Yu-Ling Tian, Hua-Hong Wang, Yu Tian, Wei Zhang, Gui-Gen Teng, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Qun He, Pathology Institute of Urology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Correspondence to: Hua-Hong Wang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 9 Xishenku, Beijing 100034, China. wanghuahong@medmail.com.cn
Received: 2014-02-24 Revised: 2014-04-02
Accepted: 2014-04-09 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of different ratios of ω-3/ω-6 of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on acute colitis induced with dextran sulfate sodium (DSS) in rats and explore the possible mechanisms.

METHODS: Thirty-two male SD rats were randomly divided into four groups (n = 8 for each): A (control), B (ω-3/ω-6, 1:1), C (ω-3/ω-6, 1:3) and D (ω-3/ω-6, 1:30). After six weeks of feeding with different diets, acute colitis in rats in groups B, C and D were induced by giving 3% DSS in drinking water for seven days. Then all the rats were sacrificed. Overall inflammatory severity score and histological damage score were calculated. The levels of prostaglandin E_2 (PGE_2), tumor necrosis factor-α (TNF-α), nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) in the colon, and the level of interleukin-6 (IL-6) in serum were measured by ELISA.

RESULTS: The overall inflammatory severity score in group B was significantly lower than those in groups C and D (2.8 ± 1.2 *vs* 4.3 ± 1.1, 5.6 ± 1.3, $P < 0.05$, $P < 0.01$). The histological damage score in group B was also significantly lower than those in groups C and D (3.2 ± 2.0 *vs* 35.0 ± 28.8, 27.0 ± 25.8, $P < 0.01$ for both). The levels of PGE_2 and TNF-α in the colon were significantly lower in groups B and C than in group D [443.4 ± 67.3 (ng/100 g tissue), 419.5 ± 52.6 (ng/100 g tissue) *vs* 541.2 ± 68.5 (ng/100 g tissue), $P < 0.05$, $P < 0.01$; 189.2 ± 27.0 (ng/100 g tissue), 173.2 ± 50.2 (ng/100 g tissue) *vs* 270.3 ± 49.1 (ng/100 g tissue), $P < 0.01$ for both). The level of IL-6 in serum was significantly lower in group B than in groups C and D (97.1 ng/L ± 8.2 ng/L *vs* 129.1 ng/L ± 5.5 ng/L, 125.4 ng/L ± 19.6 ng/L, $P < 0.01$, $P < 0.05$). There were no statistical differences in the level of nuclear NF-κB between groups B, C and D [497.9 ± 50.7 (ng/100 g tissue), 569.1 ± 121.2 (ng/100 g tissue), 582.5 ± 123.1 (ng/100 g tissue)].

CONCLUSION: Higher ratios of ω-3/ω-6 PUFAs have a more significant protective effect against acute colitis, especially when the ratio is 1:1. The overall inflammatory severity score, histological damage score, the levels of PGE_2 and TNF-α in colon and the level of IL-6 in serum are significantly lower in the 1:1 (ω-3/ω-6) group than in the 1:30 group. Adding moderate amount of ω-3 PUFA may be a new way to treat IBD.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: ω-3 polyunsaturated fatty acid; ω-6 polyunsaturated fatty acid; Dextran sulfate sodium induced acute colitis; Inflammatory bowel disease; Inflammatory cytokines

Tian YL, Wang HH, Tian Y, Zhang W, Teng GG, He Q. Effects of different ratios of ω-3/ω-6 polyunsaturated fatty acids on experimental acute colitis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2008-2015 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2008.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2008

摘要

目的: 探讨不同比例ω-3/ω-6多不饱和脂肪酸对葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导大鼠急性结肠炎影响及其可能的作用机制.

方法: 32只1月龄♂SD大鼠随机分为4组, 每组8只, A: 普通饲料对照组, B: ω-3/ω-6 PUFA 1∶1组、C: ω-3/ω-6 PUFA 1∶3组, D: ω-3/ω-6 PUFA 1∶30组. 4组大鼠不同饲料喂养6 wk; 随后B、C、D组大鼠自由饮用3%DSS溶液7 d, 诱发急性结肠炎模型; A组大鼠自由引用普通水7 d. 比较各组大鼠结肠炎症状评分、病理炎症评分和结肠组织前列腺素E_2(prostaglandin E_2, PGE_2)、核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、血清白介素-6(interleukin- 6, IL-6)的含量.

结果: B组大鼠结肠炎症程度积分显著低于C、D组, 分别为2.8±1.2、4.3±1.1、5.6±1.3(P<0.05, P<0.01). B组大鼠结肠炎病理学评分显著低于C、D组, 分别为3.2±2.0、35.0±28. 8、27.0±25.8(P<0.01, P<0.01). B、C组大鼠结肠组织中PGE2含量低于D组, 分别为443.4ng/100 g组织±67.3 ng/100 g组织、419.5 ng/100 g组织±52.6 ng/100 g组织、541.2 ng/100 g组织±68.5 ng/100 g组织(P<0.05, P<0.01). B、C组大鼠结肠组织中TNF-α含量低于D组, 分别为189.2 ng/100 g组织±27.0 ng/100 g组织、173.2 ng/100 g组织±50.2 ng/100 g组织、270.3 ng/100 g组织±49.1 ng/100 g组织(P<0.01, P<0.01). B组大鼠血清中IL-6含量低于C、D组, 分别为97.1 ng/L±8.2 ng/L、129.1 ng/L±5.5 ng/L、125.4 ng/L±19.6 ng/L(P<0.01, P<0.05). B、C、D大鼠结肠组织中NF-κB含量分别为497.9 ng/100 g组织±50.7 ng/100 g组织、569.1 ng/100 g组织±121.2 ng/100 g组织、582.5 ng/100 g组织±123.1 ng/100 g组织, 无统计学差异.

结论: 提高以ω-3/ω-6 PUFA的比例对于DSS诱导的大鼠急性结肠炎症具有保护作用, 尤其是当ω-3/ω-6 PUFA比例提高到1∶1保护作用最明显. 随着ω-3 PUFA的比例升高, ω-3/ω-6 PUFA1∶1组较ω-3/ω-6 PUFA1:30组大鼠的炎症评分、病理评分以及相关的炎症因子如PGE2、TNF-α、IL-6都有所下降. 向饮食中添加适量ω-6 PUFA或可成为治疗炎症性肠病新方向.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: ω-3多不饱和脂肪酸; ω-6多不饱和脂肪酸; 急性结肠炎; 炎症性肠病; 炎症因子

核心提示: 提高ω-3/ω-6 PUFA的比例对于葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium)诱导的大鼠急性结肠炎症可能具有保护作用, 提高膳食中ω-3 PUFA的比例可能成为炎症性肠病(inflammatory bowel disease)新的治疗手段.

田玉玲, 王化虹, 田雨, 张维, 滕贵根, 何群. 不同比例ω-3/ω-6多不饱和脂肪酸对DSS诱导大鼠急性结肠炎的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2008-2015 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2008.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2008

■研发前沿
目前ω-3 PUFA与ω-6 PUFA比例失衡导致的肠道炎症免疫反应的变化机制还存在很多未知领域. 深入研究相关方面的机制有利于我们对炎症性肠病肠道急性炎症发生机制的理解, 也有利于对患者进行合理的健康指导.

0 引言

大规模流行病学调查发现西方经济发达国家炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病率明显高于经济欠发达国家[1,2]. 近年来IBD在世界范围内区域性发病率的增高与“西方化饮食”的传播相平行的现象提示, 该病的发病可能和饮食结构变化相关[2]. 观察饮食中脂肪成分明显变化, 即随着植物油脂的摄入增加多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)的构成发生了明显的改变. ω-3 PUFA与ω-6 PUFA的摄入比例从70年代的1∶1变为90年代的大约1∶15-1∶20[3,4]. 2009年欧洲一项大型前瞻性调查发现, 摄入高含量ω-6 PUFA和溃疡性结肠炎的发病具有相关性[5]. 虽然针对ω-3 PUFA对炎症性肠病的作用开展了许多研究, 但目前尚无定论. Cabre等[6]一项关于ω-3 PUFA和炎症性肠病系统综述得出结论: 目前的相关研究数据不能为ω-3 PUFA对于活动性或非活性炎症性肠病患者有益提供肯定性依据. 究其原因可能和目前大多数研究没有调整ω-3 PUFA和ω-6 PUFA比例相关. 而且目前大多数研究主要是关于多不饱和脂肪酸和慢性结肠炎症的关系, 对于其对急性炎症研究甚少. 目前ω-3 PUFA与ω-6 PUFA比例失衡导致的肠道炎症免疫反应的变化机制还存在很多未知领域. 深入研究相关方面的机制有利于我们对炎症性肠病肠道急性炎症发生机制的理

■相关报道
研究发现ω-3/ω-6 PUFA摄入比例的变化与IBD的发病有重要关系，又有研究认为ω-3 PUFA可以通过监控促炎因子如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、血清白介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-1a、IL-8以及参与核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)途径等抑制炎症的过程. 目前针对ω-3 PUFA对IBD炎症过程的影响尚无定论. 大部分临床及试验研究认为补充ω-3 PUFA对于炎症性肠病具有保护作用. 然而也有不少研究认为ω-3 PUFA对于炎症性肠病没有保护作用.

表 1 结肠炎症症状评分

评分	粪便性状	便血情况	体质量
0	干球或干条形	便潜血试验阴性	增加或维持原有体质量
1	成型软便	便潜血试验阳性	下降＜5%
2	不成形软便	附着新鲜血迹, 肛门口无血迹	下降≥5%且＜10%
3	水样便	肛门口大量血迹	下降≥10%

表 2 组织学损伤评分标准

评分	炎症	病变深度	隐窝破坏	病变范围(%)
0	无	无	无	无
1	轻	黏膜下层	基底1/3破坏	1–25
2	重	肌层	基底2/3破坏	26–50
3		浆膜层	仅有完整上皮	51–75
4			全部破坏	76–100

解, 也有利于对患者进行合理的健康指导.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂SPF级SD大鼠32只, 4周龄, 体质量95-117 g. 动物于北京大学第一医院动物中心SPF级实验室饲养, 昼夜节律12 h/12 h. 购入后供应正常饲料和饮水饲养4 d, 习惯环境后进行实验. 本研究经北京大学第一医院实验动物福利伦理委员会审查通过. 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)36000-50000购自北京毕特博生物科技有限公司. 前列腺素E_2(prostaglandin E_2, PGE_2)、核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)、血清白介素-6(interleukin- 6, IL-6)酶联免疫检测试剂盒购自北京方程生物公司.

1.2 方法

1.2.1 饲料改造: 基础饲料中总油脂含量约4%-5%, 其中ω-3 PUFA含量约1.5 g/kg, ω-6 PUFA含量约23.5 g/kg, ω-3/ω-6 PUFA比例为1∶15. 向基础纯饲料按比例添加鱼油和亚麻油改造饲料, 3种改造后的饲料总油脂含量均增至约5%-10%. 其中鱼油购自海洋恒昌集团每1 g含DHA和EPA 210 mg. 亚油酸购自安庆市中创生物工程有限公司, 纯度为95%.

1.2.2 大鼠实验分组及结肠炎模型建立: 第一阶段(诱发结肠炎前期), 32只大鼠随机分为A、B、C、D 4组, 每组8只. B、C、D组分别给予ω-3/ω-6 PUFA为1∶1、1∶3及1∶30的改造饲料进行饲养; A组给予普通饲料饲养, 共喂养6 wk, 其他饲养条件均相同. 每周称量各组大鼠体质量, 记录大便、一般情况. 第二阶段(诱发结肠炎期), B、C、D组大鼠给予3%DSS做自由饮用诱发结肠炎. DSS诱发大鼠结肠炎参考文献[7,8]具体方案: 3%DSS水溶液给大鼠自由饮用7 d, 制造急性期结肠炎动物模型. A组大鼠自由引用普通用水7 d.

1.2.3 实验动物处理及相关指标测定: 各组实验大鼠于急性结肠炎造模结束后(对照组亦在同时)12%乌拉坦过量麻醉处死. 解剖分离出全部结肠, 自肛门至盲肠测量长度后, 沿肠系膜缘剪开肠管, 生理盐水清洗去除肠腔内容物, 采取标本. 结肠炎症症状评分, 根据参考文献[7,8]按表1从3方面评价, 以总分计算. 结肠炎组织学评分按表2进行, 用炎症、病变深度、隐窝破坏、病变范围评分的乘积表示[9]. 距肛门4 cm处取结肠组织, 迅速置于液氮中冷冻, -80℃保存. 剪出1.0 cm×0.5 cm大小的结肠组织, 称质量标本后按照检测试剂盒说明书进行检测结肠组织中PGE_2、TNF-α、NF-κB. 迅速经大鼠腹主动脉取血, 按照检测试剂盒说明书进行检测血清中IL-6.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件, 计量资料以mean±SD表示, 组间比较采用单因素方差分析, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠诱发结肠炎前期生长情况 诱发结肠炎前期4组大鼠生长情况良好, 体质量无统计学差异(图1).

2.2 不同比例ω-3/ω-6 PUFA对大鼠结肠炎(诱发结肠炎期)症状影响 3组大鼠自由饮用3%DSS诱发结肠炎, 饮用第2天大便开始变软, 第3天大便潜血出现阳性, 第4天开始出现懒动、竖毛、毛色变差. 至第5天出现可见血便, 肛门附着血迹, 第6天体质量开始下降. 结肠炎造模结束时B组大鼠较C、D大鼠血便评分显著性降低, 分别为1.0±0. 5、 2.4±0. 7、 2.8±0.5(均P<0.01); C组和D组之间无统计学差异; B组大鼠较C、D

表 3 大鼠肠炎症程度评分

分组	体质量变化积分	粪质积分	血便积分	总积分
B	0.38±0.74	1.38±0.52	1.00±0.53	2.75±1.16
C	0.50±0.53	1.75±0.46	2.38±0.74	4.26±1.13
D	1.13±0.83	1.75±0.46	2.75±0.46	5.62±1.30

B: ω-3/ω-6 PUFA 1∶1组; C: ω-3/ω-6 PUFA 1∶3组; D: ω-3/ω-6 PUFA 1∶30组.

表 4 各组大鼠结肠PGE_2、TNF-α、NF-κB量(ng/100 g组织)

	A	B	C	D	*P*值
PGE_2	368.1±43.9	443.4±67.3	419.5±52.6	541.2±68.5	<0.01
TNF-α	170.5±29.5	189.2±27.0	173.2±50.2	270.3±49.1	<0.01
NF-κB	555.1±83.8	497.9±50.7	569.1±121.2	582.5±123.1	>0.05

A: 普通饲料对照组; B: ω-3/ω-6 PUFA 1∶1组; C: ω-3/ω-6 PUFA 1∶3组; D: ω-3/ω-6 PUFA 1∶30组. TNF: 肿瘤坏死因子; NF-κB: 核因子-κB; PGE_2: 前列腺素E_2.

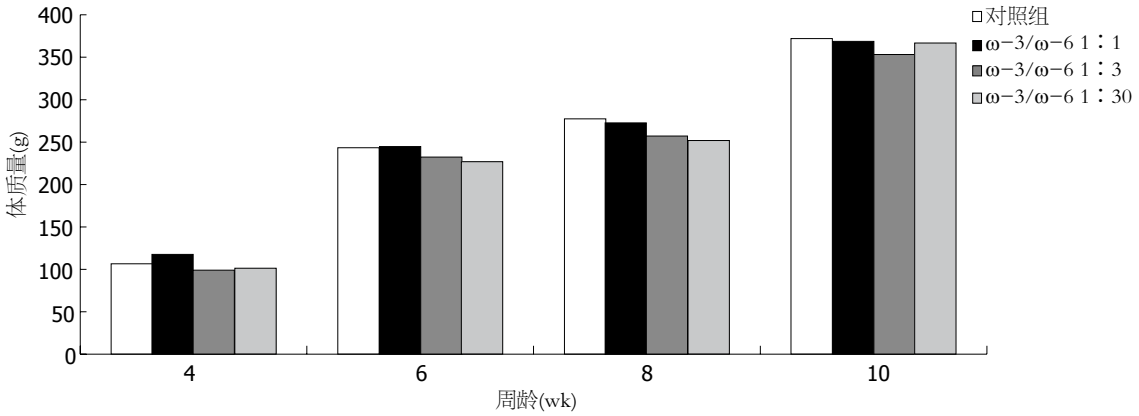


图 1 各组大鼠生长情况体质量变化.

大鼠总积分显著性降低, 分别为2.8±1.2、4.3±1.1、5.6±1.3(均*P*<0.01), C组和D组之间无统计学差异(表3).

2.3 不同比例ω-3/ω-6PUFA对大鼠病理组织学评分影响 大体观察A组大鼠结肠黏膜光滑; B组大鼠肠壁轻度水肿, 黏膜糜烂及溃疡少见; C、D组大鼠结肠黏膜水肿明显, 可见较多糜烂, 部分可见深大溃疡, 结肠壁变薄. 光镜下观察A大鼠结肠完全正常; B、C、D组结肠炎模型大鼠不同程度远段肠上皮损伤, 可见糜烂及溃疡形成, 腺体变形, 排列紊乱, 甚至消失, 隐窝破坏, 黏膜及黏膜下层可见淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞浸润, 并可见中性粒细胞浸润及淋巴小结形成(图2A). 其中B组大鼠镜下观察病变较轻, 仅有1只大鼠形成小溃疡. B组大鼠肠黏膜炎症评分显著低于C、D组, 分别为3.2±2.0、35.0±28.8、27.0±25.8, 具有统计学差异(均*P*<0.05); C、D两组无统计学意义.

2.4 不同比例ω-3/ω-6 PUFA对大鼠炎症因子影响 3组结肠炎模型大鼠结肠组织中PGE2较对照组均有升高, 其中B、C组大鼠结肠组织中PGE2含量低于D组, 分别为443.4 ng/100 g组织±67.3 ng/100 g组织、419.5 ng/100 g组织±52.6 ng/100 g组织、541.2 ng/100 g组织±68.5 ng/100 g组织(*P*<0.05, *P*<0.01)(图3, 表4). 3组结肠炎大鼠结肠TNF-α与对照组相比均有不同程度的升高, D组大鼠升高显著. B、C组大鼠结肠组织中TNF-α含量低于D组, 分别为189.2 ng/100 g组织±27.0 ng/100 g组织、173.2 ng/100 g组织±50.2 ng/100 g组织、270.3 ng/100 g组织±49.1 ng/100 g组织

■应用要点
本研究可以看出, 提高ω-3/ω-6 PUFA的比例对于DSS诱导的大鼠急性结肠炎症具有保护作用, 其中ω-3/ω-6 PUFA 1:1组效果最佳. 提示我们对于炎症性肠病治疗过程中, 提高膳食中ω-3 PUFA的比例可能成为新的治疗手段.

■同行评价
本文对阐明溃疡性结肠炎发病机制有一定意义, 并且对临床营养治疗也有一定启示.

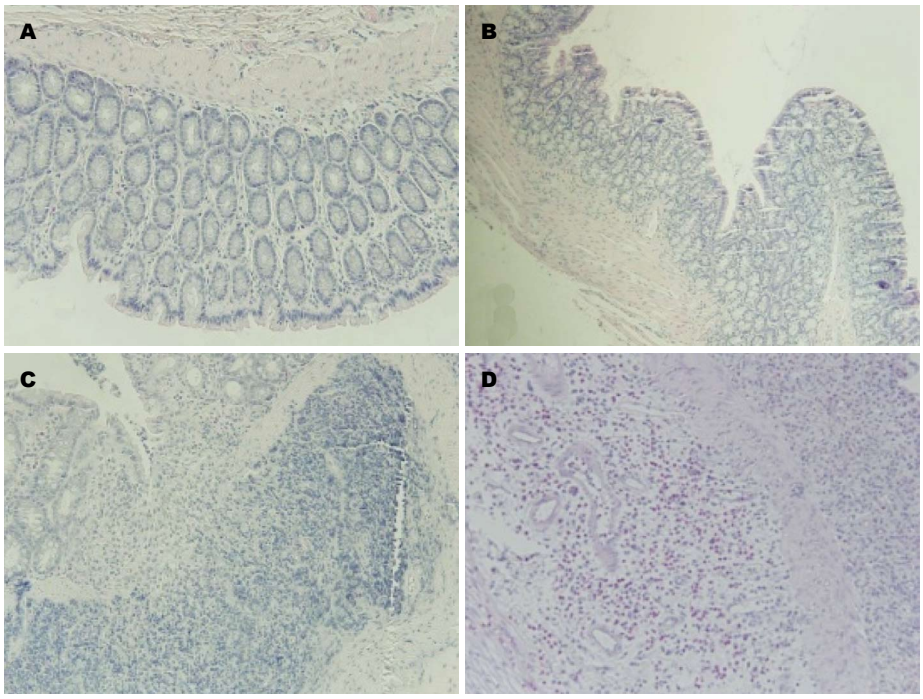


图 2 各组大鼠结肠组织HE染色(×40). A: 对照组大鼠结肠组织正常大鼠结肠黏膜; B: ω-3/ω-6 1∶1组; C: ω-3/ω-6 1∶3组; D: ω-3/ω-6 1∶30组, 大鼠结肠, 可见黏膜炎症逐渐加重, C组可见淋巴小结及小溃疡, D组可见大溃疡, 腺体完全消失, 黏膜及黏膜下层大量炎症细胞浸润.

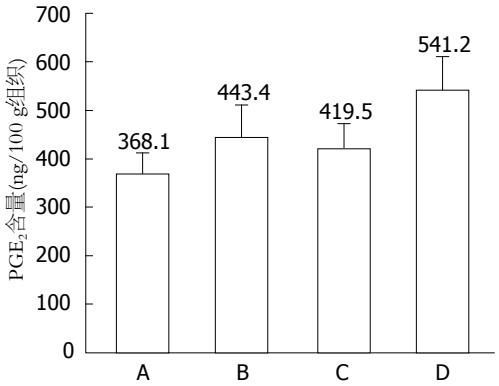


图 3 各组大鼠结肠PGE_2含量. A: 对照组大鼠结肠组织正常大鼠结肠黏膜; B: ω-3/ω-6 1∶1组; C: ω-3/ω-6 1∶3组; D: ω-3/ω-6 1∶30组.

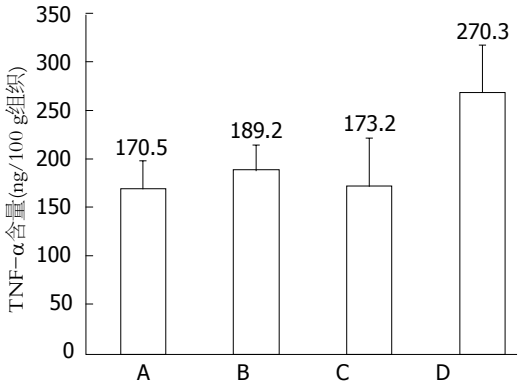


图 4 各组大鼠结肠TNF-α含量. A: 对照组大鼠结肠组织正常大鼠结肠黏膜; B: ω-3/ω-6 1∶1组; C: ω-3/ω-6 1∶3组; D: ω-3/ω-6 1∶30组. TNF: 肿瘤坏死因子.

(P<0.01, P<0.01)(图4, 表4). B组大鼠血清中IL-6含量低于C、D组, 分别为97.1 ng/L±8.2 ng/L、129.1 ng/L±5.5 ng/L、125.4 ng/L±19.6 ng/L (P<0.01, P<0.05). 具有统计学差异. B、C、D大鼠结肠组织中NF-κB含量分别为497.9 ng/100 g组织±50.7 ng/100 g组织、569.1 ng/100 g组织±121.2 ng/100 g组织、582.5 ng/100 g组织±123.1 ng/100 g组织, 不具有统计学差异.

3 讨论

IBD是一种慢性非特异性肠道炎症, 发病机制尚不明确. 近年来大规模研究发现“西方化”饮食的传播和炎症性病在以前非高发地区发病率升高有关系[10]. 有研究发现ω-3/ω-6 PUFA摄入比例的变化与IBD的发病有重要关系[11]. 还有研究发现与ω-3 PUFA和ω-6 PUFA的含量相比, 两者的比例更能影响肠道的炎症过程[12,13]. 针对IBD的营养治疗因为其不良反应低、花费相对低成为治疗新方向. 其中ω-3 PUFA又成为关键点之一. 目前针对ω-3 PUFA对IBD炎症过程的影响尚无定论. 大部分临床及试验研究认为补充ω-3 PUFA对于炎症性肠病具有保护作用[14,15]. 然而

也有不少研究认为ω-3 PUFA对于炎症性肠病没有保护作用, 甚至有害[16,17]. 既往动物实验中少有调整ω-3/ω-6 PUFA比例, 而且大多针对慢性炎症. 本实验研究的目的就是设立不同比例ω-3和ω-6 PUFA, 观察各组对急性结肠炎模型大鼠的影响.

本实验通过改造饲料, 设定ω-3/ω-6 PUFA 1∶1组、1∶3组、1∶30组, 观察不同比例ω-3 PUFA和ω-6 PUFA对急性结肠炎作用. Feagan等[17]认为ω-3/ω-6 PUFA在1∶1至1∶4对于炎症性疾病有益. 我们实验室曾对比ω-3/ω-6 PUFA 1∶3, 1∶15, 1∶30组对于DSS诱导大鼠溃疡性结肠炎慢性期影响, 未发现ω-3/ω-6 PUFA 1∶3对炎症有改善作用, 所以提高ω-3 PUFA剂量, 设立1∶1组观察对肠道炎症影响.

从本研究结果可以明显看出ω-3/ω-6 PUFA为1∶1组大鼠的结肠炎从症状评分到病理改变均较ω-3/ω-6 PUFA 1∶3及1∶30组大鼠有所改善, 提示高比例ω-3/ω-6对于溃疡性结肠炎急性期可能有保护作用, ω-3 PUFA的补充可以减轻肠道炎症, 适量补充ω-3 PUFA可能能够预防或者减轻肠道炎症, ω-3/ω-6 PUFA为1∶1组作用效果明显.

通过对炎症因子的影响观察, 本实验发现ω-3/ω-6 PUFA为1∶1组和1∶3组大鼠结肠组织中PGE2、TNF-α含量明显低于1∶30组(P<0.01), 结果提示提高ω-3/ω-6 PUFA的比例可以通过减少结肠组织中PGE2、TNF-α含量, 达到抑制急性结肠炎炎症过程. ω-3/ω-6 PUFA 1∶1组大鼠血浆中IL-6含量低于其余两组, P值分别为<0.05、<0.01, 结果提示高比例ω-3/ω-6 PUFA可以通过影响循环中炎症因子如IL-6减轻炎症反应.

早期研究认为由Cox-1途径介导产生的前列腺素对于肠道黏膜损伤所致炎症具有保护作用[18], PGE_2可以促进肝细胞生长[19], 抑制T细胞的增殖、细胞间黏附因子、细胞因子产生等[20,21]. 然而亦有研究表明PGE_2可以通过促进T细胞分化、炎症因子受体表达等达到促炎作用[22,23]. 本研究发现ω-3/ω-6 PUFA高比例组(1∶1, 1∶3)大鼠结肠中PGE_2含量较1∶30组明显下降, 与炎症程度有平行趋势. 说明提高ω-3/ω-6 PUFA比例到1∶1至1∶3可以通过抑制局部组织中PGE_2产生, 而达到抑制急性结肠炎的炎症过程. 这与Mbodji等[24]研究补充ω-3 PUFA可以减少肠道局部PGE_2的产生的结果一致. 有研究表明ω-3 PUFA可以与ω-6 PUFA竞争性结合细胞膜磷脂, 从而抑制花生四烯酸进入细胞膜, 抑制花生四烯酸向类花生酸的代谢. 推测结肠上皮细胞膜上的ω-3/ω-6 PUFA比例变化改变了细胞膜的生物物理化学特性, 导致下游信号传导、细胞因子分泌和转录调解发生变化, 是影响炎症轻重程度的核心机制[28]. 目前ω-3 PUFA对于PGE_2影响及其如何通过PGE_2调节炎症过程的机制尚不明确, 需要进一步研究.

另外有研究认为ω-3 PUFA可以通过监控促炎因子如TNF-α、IL-6、IL-1α、IL-8以及参与NF-κB途径等抑制炎症的过程[6]. 本实验发现ω-3/ω-6 PUFA为1∶1组和1∶3组大鼠结肠组织中TNF-α含量明显低于1∶30组. ω-3/ω-6 PUFA 1∶1组大鼠血浆中IL-6含量低于其余两组目前对于ω-3 PUFA. 该结果表明提高ω-3 PUFA在饮食中的比例可以降低TNF-α、IL-6等促炎因子, 从而达到降低急性期溃疡性结肠炎炎症反应. 本实验发现各组大鼠结肠NF-κB的含量有随着ω-6 PUFA比例升高而升高的趋势, 但没有统计学差异. 有研究报道ω-3可以通过降低NF-κB而起到抗炎作用[6,13,24,27,28]. 文献报道多通过电泳迁移率改变法测定NF-κB活性, 本实验采用ELISA检测, 有可能影响结果.

从本研究可以看出, 提高ω-3/ω-6 PUFA的比例对于DSS诱导的大鼠急性结肠炎症具有保护作用, 大鼠的炎症评分、病理评分以及相关的炎症因子PGE_2、TNF-α、IL-6都有所下降, 其中ω-3/ω-6 PUFA 1∶1组效果最佳. 提示我们对于炎症性肠病治疗过程中, 提高膳食中ω-3 PUFA的比例可能成为新的治疗手段. 但该实验仍然有待于进一步研究: (1)该试验设立的模型是急性结肠炎, 并没有模拟炎症性典型慢性、反复发作的临床过程, 这可能影响ω-3 PUFA对于IBD的疗效更加明确的影响. 进一步研究应该设置慢性期溃疡性结肠炎, 以观察疗效; (2)ω-3 PUFA对于肠道炎症过程作用机制尚不明确, 是如何调节PGE_2、IL等炎症因子需要进一步探讨. ω-3 PUFA作为一种重要的营养物质, 不良反应少, 相对于传统药物花费低, 应该加强其对IBD的作用及其作用机制的研究, 为IBD患者的治疗提供一种新选择.

4 参考文献

1 Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A.

Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1785-1794 [PMID: 21530745 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.01.055]
2 Bernstein CN. New insights into IBD epidemiology: Are there any lessons for treatment? *Dig Dis* 2010; 28: 406-410 [PMID: 20926864 DOI: 10.1159/000320394]
3 Eaton SB, Konner M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N Engl J Med* 1985; 312: 283-289 [PMID: 2981409 DOI: 10.1056/NEJM198501313120505]
4 Eaton SB, Eaton SB, Sinclair AJ, Cordain L, Mann NJ. Dietary intake of long-chain polyunsaturated fatty acids during the paleolithic. *World Rev Nutr Diet* 1998; 83: 12-23 [PMID: 9648501 DOI: 10.1159/000059672]
5 Tjonneland A, Overvad K, Bergmann MM, Nagel G, Linseisen J, Hallmans G, Palmqvist R, Sjodin H, Hagglund G, Berglund G, Lindgren S, Grip O, Palli D, Day NE, Khaw KT, Bingham S, Riboli E, Kennedy H, Hart A. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut* 2009; 58: 1606-1611 [PMID: 19628674 DOI: 10.1136/gut.2008.169078]
6 Cabré E, Mañosa M, Gassull MA. Omega-3 fatty acids and inflammatory bowel diseases - a systematic review. *Br J Nutr* 2012; 107 Suppl 2: S240-S252 [PMID: 22591898 DOI: 10.1017/S0007114512001626]
7 Kwon HS, Oh SM, Kim JK. Glabridin, a functional compound of liquorice, attenuates colonic inflammation in mice with dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 165-173 [PMID: 18005263 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2007.03539.x]
8 Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1458-1475 [PMID: 10489934]
9 Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391 [PMID: 9844047]
10 Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 563-573 [PMID: 21468064 DOI: 10.1038/ajg.2011.44]
11 Andersen V, Olsen A, Carbonnel F, Tjønneland A, Vogel U. Diet and risk of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2012; 44: 185-194 [PMID: 22055893 DOI: 10.1016/j.dld.2011.10.001]
12 Simopoulos AP. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 502-507 [PMID: 17045449 DOI: 10.1016/j.biopha.2006.07.080]
13 Gravaghi C, La Perle KM, Ogrodwski P, Kang JX, Quimby F, Lipkin M, Lamprecht SA. Cox-2 expression, PGE(2) and cytokines production are inhibited by endogenously synthesized n-3 PUFAs in inflamed colon of fat-1 mice. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 360-365 [PMID: 20655721 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.03.003]
14 Kono H, Fujii H, Ogiku M, Tsuchiya M, Ishii K, Hara M. Enteral diets enriched with medium-chain triglycerides and N-3 fatty acids prevent chemically induced experimental colitis in rats. *Transl Res* 2010; 156: 282-291 [PMID: 20970751 DOI: 10.1016/j.trsl.2010.07.012]
15 Bogolepov NN, Pushkin AS. [Structural basis of cerebral plasticity]. *Vestn Akad Med Nauk SSSR* 1978; (12): 21-29 [PMID: 216178]
16 Middleton SJ, Naylor S, Woolner J, Hunter JO. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of essential fatty acid supplementation in the maintenance of remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1131-1135 [PMID: 12030955]
17 Feagan BG, Sandborn WJ, Mittmann U, Bar-Meir S, D'Haens G, Bradette M, Cohen A, Dallaire C, Ponich TP, McDonald JW, Hébuterne X, Paré P, Klvana P, Niv Y, Ardizzone S, Alexeeva O, Rostom A, Kiudelis G, Spleiss J, Gilgen D, Vandervoort MK, Wong CJ, Zou GY, Donner A, Rutgeerts P. Omega-3 free fatty acids for the maintenance of remission in Crohn disease: the EPIC Randomized Controlled Trials. *JAMA* 2008; 299: 1690-1697 [PMID: 18398081 DOI: 10.1001/jama.299.14.1690]
18 Wang D, Mann JR, DuBois RN. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2005; 128: 1445-1461 [PMID: 15887126]
19 Kimura M, Osumi S, Ogihara M. Stimulation of DNA synthesis and proliferation by prostaglandins in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2000; 404: 259-271 [PMID: 10996591]
20 Ruggeri P, Nicocia G, Venza I, Venza M, Valenti A, Teti D. Polyamine metabolism in prostaglandin E2-treated human T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2000; 22: 117-129 [PMID: 10737261 DOI: 10.3109/08923970]
21 Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; 23: 144-150 [PMID: 11864843]
22 Bonta IL, Parnham MJ. Prostaglandins and chronic inflammation. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 1611-1623 [PMID: 358989]
23 Napolitani G, Acosta-Rodriguez EV, Lanzavecchia A, Sallusto F. Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2009; 39: 1301-1312 [PMID: 19384872 DOI: 10.1002/eji.200838969]
24 Mbodji K, Charpentier C, Guérin C, Querec C, Bole-Feysot C, Aziz M, Savoye G, Déchelotte P, Marion-Letellier R. Adjunct therapy of n-3 fatty acids to 5-ASA ameliorates inflammatory score and decreases NF-κB in rats with TNBS-induced colitis. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 700-705 [PMID: 22841543]
25 Melgar S, Drmotova M, Rehnström E, Jansson L, Michaëlsson E. Local production of chemokines and prostaglandin E2 in the acute, chronic and recovery phase of murine experimental colitis. *Cytokine* 2006; 35: 275-283 [PMID: 17088072 DOI: 10.1016/j.cyto.2006.09.007]
26 Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 885-897 [PMID: 18504706 DOI: 10.1002/mnfr.200700289]
27 Chapkin RS, Davidson LA, Ly L, Weeks BR, Lupton JR, McMurray DN. Immunomodulatory effects of

(n-3) fatty acids: putative link to inflammation and colon cancer. *J Nutr* 2007; 137: 200S-204S [PMID: 17182826]
28 Ibrahim A, Mbodji K, Hassan A, Aziz M, Boukhettala N, Coëffier M, Savoye G, Déchelotte P, Marion-Letellier R. Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. *Clin Nutr* 2011; 30: 678-687 [PMID: 21632157 DOI: 10.1016/j.clnu.2011.05.002]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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! (《世界华人消化杂志》编辑部).

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2016-2022
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

食管鳞癌患者血清Stathmin的表达及临床意义

赵 楠, 韩 波, 吴宗勇, 周兰萍, 刘 芳, 颜 露, 赵晓航, 许 杨

■背景资料
食管鳞癌是我国常见的消化系恶性肿瘤，其早期症状不明显，大部分食管癌患者确诊时已属中晚期，以手术为主治疗后的五年生存率一直徘徊在25%-30%. 近年已有众多研究者正在努力寻找食管癌的各种标志物以用于食管癌的诊断、治疗效果评价和术后随访.

赵楠, 韩波, 周兰萍, 刘芳, 颜露, 赵晓航, 许杨, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021
吴宗勇, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院检验科 北京市 100021
赵晓航, 中国人民解放军海军总医院 北京市 100037
赵楠, 在读硕士, 主要从事食管癌生物学的研究.
国家自然科学基金资助项目, Nos. 81372385, 81071811
国家高技术发展计划项目“863”专题基金资助项目, Nos. 2012AA02A503, 2012AA020206
作者贡献分布: 此课题由赵楠与许杨设计; 研究过程由赵楠、韩波及颜露操作完成; 数据分析由赵楠和许杨完成; 病例采集和资料整理由吴宗勇、赵楠、周兰萍及刘芳完成; 论文起草由赵楠完成; 赵晓航与许杨审校.
通讯作者: 许杨, 副研究员, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室. xuyang@cicams.as.cn
电话: 010-87788423　传真: 010-87778360
收稿日期: 2013-12-30　修回日期: 2014-02-11
接受日期: 2014-02-18　在线出版日期: 2014-05-18

Clinical significance of serum Stathmin in esophageal squamous cell carcinoma

Nan Zhao, Bo Han, Zong-Yong Wu, Lan-Ping Zhou, Fang Liu, Lu Yan, Xiao-Hang Zhao, Yang Xu

Nan Zhao, Bo Han, Lan-Ping Zhou, Fang Liu, Lu Yan, Xiao-Hang Zhao, Yang Xu, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Zong-Yong Wu, Clinical Laboratory, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China
Xiao-Hang Zhao, Center for Basic Medical Science, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81372385 and 81071811; National High-Tech R&D Program, Nos. 2012AA02A503 and 2012AA020206
Correspondence to: Yang Xu, Associate Professor, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 17 Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. xuyang@cicams.ac.cn
Received: 2013-12-30　Revised: 2014-02-11
Accepted: 2014-02-18　Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To detect serum Stathmin in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and evaluate its correlation with clinicopathological parameters in ESCC.

METHODS: Serum levels of Stathmin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 74 patients with ESCC and 81 healthy individuals. Serum levels of Cyfra21-1 were measured by ELISA, and those of CEA, CA19-9 and CA72-4 were measured by chemiluminescence.

RESULTS: Serum levels of Stathmin in ESCC patients were significantly higher than those in healthy controls ($P < 0.001$). Serum levels of Stathmin were correlated with lymph node metastasis ($P = 0.036$), but not with age, gender, tumor differentiation, TNM stage or tumor size. According to the ROC curve, the sensitivity and specificity of serum Stathmin were significantly higher than those of Cyfra21-1 for diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. The sensitivity of serum Stathmin for diagnosis of ESCC was 94.6%.

CONCLUSION: Serum Stathmin levels increase in ESCC patients. Detection of serum Stathmin is helpful for diagnosis and prognostic evaluation of esophageal cancer. Stathmin may serve as a new potential serum tumor marker for clinical detection, therapy and prognostic evaluation of ESCC.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Stathmin; Esophageal squamous cell carcinoma; Enzyme-linked immunosorbent assay

Zhao N, Han B, Wu ZY, Zhou LP, Liu F, Yan L, Zhao XH, Xu Y. Clinical significance of serum Stathmin in esophageal squamous cell carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2016-2022 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2016.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2016

摘要

目的: 探讨血清Stathmin的表达水平对食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的诊断价值及临床意义.

方法: 采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测74例ESCC与

■同行评议者
姜春萌, 教授, 主任, 大连医科大学附属第二医院消化科

81例健康对照血清Stathmin含量; 采用ELISA检测34例食管鳞癌与40例健康对照血清角蛋白19片段抗原21-1(cytokeratin 19 fragment antigen 21-1, Cyfra21-1)的水平; 采用化学发光法检测血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、癌抗原19-9(cancer antigens 19-9, CA19-9)、癌抗原72-4(cancer antigens 72-4, CA72-4)水平; 统计学分析血清中Stathmin浓度与临床参数的相关性.

结果: ESCC组血清Stathmin水平显著高于健康对照组(P<0.001), ESCC组血清Stathmin水平与伴有淋巴结转移相关(P = 0.036), 血清Stathmin水平与患者性别、年龄、分化程度、TNM分期和肿瘤大小无显著相关. 比较Stathmin和Cyfra21-1的受试者工作特性曲线(receiver operating characteristic curve, ROC曲线), 提示Stathmin的灵敏度和特异性均优于Cyfra21-1, 血清Stathmin水平对ESCC的诊断灵敏度可达94.6%.

结论: 血清Stathmin升高在食管鳞癌的发生发展中起重要作用, 食管癌患者血清的Stathmin检测, 对ESCC的诊断和预后判定具有一定意义. Stathmin可作为食管鳞癌诊断、治疗和判断预后的一个新的血清标志物, 辅助临床诊断.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: Stathmin; **食管鳞癌; 酶联免疫吸附法**

核心提示: 本研究发现Stathmin在食管鳞癌患者血清中浓度升高, 血清Stathmin水平与食管癌淋巴结转移相关, Stathmin的灵敏度和特异性均显著优于目前已有肿瘤标志物, 提示Stathmin可作为食管鳞癌诊断、治疗和判断预后的一个新的血清标志物, 辅助临床诊断.

赵楠, 韩波, 吴宗勇, 周兰萍, 刘芳, 颜露, 赵晓航, 许杨. 食管鳞癌患者血清Stathmin的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2016-2022 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2016.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2016

0 引言

食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是我国常见的消化系恶性肿瘤, 食管癌的早期症状不明显, 诊断时多为中晚期, 5年生存率低[1,2]. 目前, 已发现和可用于食管癌的血清标志物包括癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、癌抗原19-9(cancer antigens 19-9, CA19-9)、癌抗原72-4(cancer antigens 72-4, CA72-4)和角蛋白19片段抗原21-1(cytokeratin 19 fragment antigen 21-1, Cyfra21-1). 用免疫分析方法检测这些标志物, 4种标志物的敏感性分别为: CEA 11.9%; CA19-9 4.9%; CA72-4 7.0%; Cyfra21-1 33%[3,4], 可见在多种标志物中Cyfra21-1灵敏度相对较好. Brockmann等[5]报道Cyfra21-1在食管癌诊断中的灵敏度达45.5%. 可见上述用于食管癌检测的标志物敏感性偏低, 单独应用于食管癌的诊断价值不大. 因此, 临床上仍然缺乏食管鳞癌特异的诊断标志物, 应用蛋白质组学技术筛选用于诊断和监测的食管鳞癌特异标志物成为研究热点. 本实验室前期工作采用二维电泳(two dimensional electrophoresis, 2DE)分离-基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)的常规蛋白质组分析技术, 分析了8对伴随淋巴结转移和无淋巴结转移ESCC组织的差异蛋白质组表达谱, 提示Stathmin是一种在食管鳞癌中高表达的蛋白[6]. Stathmin(STMN1)是近年来研究较多的一个微管解聚蛋白, 通过磷酸化调节自身活性从而影响细胞内微管系统动力平衡, 对细胞周期的变化起着重要作用. 研究发现在多种人类恶性肿瘤中Stathmin过表达, 亦称为癌蛋白18(Op18)[7]. 本研究探讨血清Stathmin对食管鳞癌的临床诊断价值, ELISA检测74例食管鳞癌患者以及81例正常人血清Stathmin水平, 统计学分析血清中Stathmin浓度与临床参数的相关性. 并采用ELISA检测34例食管鳞癌与40例健康对照血清Cyfra21-1的水平. 探讨血清Stathmin水平对食管鳞癌诊断和判断预后的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 食管鳞癌血清样本取自中国医学科学院肿瘤医院检验科, 患者经病理证实. 正常对照血清样本来自北京煤炭总医院的健康体检中心. 其中ESCC样本共74例, 其中男性63例, 女性11例, 平均年龄60岁±9.8岁. 健康对照血清样本81例, 其中男性51例, 女性30例, 平均年龄42岁±14.6岁. ESCC诊断按照2007年世界卫生组织(World Health Organization, WHO)分类标准分为高分化15例, 中分化28例, 低分化20例, 11例信息不详. ESCC临床分期按照2013美国国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南[8]分为Ⅰ期16例, Ⅱ期20例, Ⅲ期25

■研发前沿
Stathmin在多种肿瘤中表达异常, 目前发现, 食管鳞状细胞癌患者组织中Stathmin表达显著高于癌旁组织, 临床病理参数分析显示Stathmin表达与分化程度相关. 但Stathmin在食管癌患者血清水平及与临床参数的相关性尚无深入研究.

■相关报道
以往研究发现Stathmin在多种恶性肿瘤中升高，可作为恶性肿瘤诊断、治疗和判断预后一个新参数.

表 1 血清Stathmin表达水平及临床参数相关性

临床病理参数	*n*	血清Stathmin浓度(ng/mL)		*P*值
		mean ± SD	范围	
年龄(岁)				0.587
<50	9	6.25 ± 0.90	3.29–11.74	
≥50	65	6.99 ± 0.49	0.72–24.41	
性别				0.500
男性	11	7.02 ± 0.48	0.72–24.41	
女性	63	6.18 ± 1.13	1.48–14.47	
分化程度				0.219
高分化	15	7.58 ± 0.72	3.16–14.37	
中分化	27	7.05 ± 0.70	1.48–13.96	
低分化	20	6.48 ± 1.12	0.72–24.41	
肿瘤大小(cm)				0.225
<5	22	6.00 ± 0.74	0.72–14.47	
≥5	45	7.23 ± 0.60	1.48–24.41	
TNM分期(期)				0.101
Ⅰ	16	6.04 ± 0.65	0.72–10.05	
Ⅱ	20	6.02 ± 0.60	1.65–10.11	
Ⅲ	25	8.68 ± 0.99	1.47–24.41	
淋巴结转移情况				0.036
是	34	7.92 ± 0.81	1.48–24.41	
否	31	5.94 ± 0.42	0.72–10.05	
ESCC患者	74	6.90 ± 0.44	0.72–24.41	<0.001
健康对照	81	0.73 ± 0.06	0.00–2.41	

例, 13例信息不详. 所有受试者均获得知情同意.

1.2 方法

1.2.1 ELISA检测血清Stathmin和Cyfra21-1浓度: 血清取材后迅速离心, 冰上分离血清, 干冰上分装后转入-80 ℃冰箱保存备用. 血清样本各100 μL用于Stathmin和Cyfra21-1检测, ELISA试剂盒均购自美国Cloud-Clone公司, 货号分别为SEC892Hu和SEB246Hu, 各项操作均严格按照说明进行. 血清样品及标准品分别稀释后加至反应孔, 37 ℃孵育2 h. 将孔板中液体去除, 每孔加入100 μL反应液A的工作液, 37 ℃孵育1 h吸出液体, 清洗3次. 加入100 μL/孔反应液B, 封膜后37 ℃ 30 min. 清洗5次. 加入底物溶液90 μL/孔, 避光37 ℃ 20 min. 每孔加入50 μL的终止液, 混合均匀, 液体由蓝变黄. 酶标仪(Bio-rad公司)上读取A_{450}. 根据试剂盒标准品的浓度和A值绘制标准曲线. 根据样品A_{450}值, 计算血清样品中Stathmin浓度并进行统计学分析. 每个样本重复3次, 取平均值作为该样本的血清Stathmin浓度.

1.2.2 化学发光法检测血清CEA、CA19-9和CA72-4浓度: 化学发光试剂盒购自罗氏(Roche), 经罗氏Cobas-601全自动化学发光免疫分析系统检测, 实验步骤严格按照试剂盒说明书进行, 将血清加入相应的样品杯中, 设定程序, 为我院检验科仪器自动进行定量检测. 按试剂盒提供的参考值, 确定CEA、CA19-9和CA72-4阳性界值分别为5 ng/mL、37 U/mL和9.8 U/mL.

统计学处理 应用SPSS16.0统计软件对计量资料采用秩和检验, 计量资料选择Student's *t*检验、Kruskal-Wallis nonparametric检验和Mann-Whitney检验, $P<0.05$为差异有统计学意义. 特异性、灵敏度、阳性预测值、Youden指数作为诊断价值的评价指标.

2 结果

2.1 食管鳞癌患者与健康对照血清Stathmin表达水平比较 在74例食管鳞癌和81例健康对照血清样本中, 食管癌血清Stathmin浓度中位值为6.9 ng/mL(浓度范围是0.72-24.41 ng/mL), 对照血清Stathmin浓度中位值为0.73 ng/mL(浓度范围是0-2.41 ng/mL), 经Mann-Whitney检验分析, 食管鳞癌患者血清Stathmin水平显著高于正常对照组, 两组具有极显著性差异($P<0.001$, 表1, 图1).

2.2 食管鳞癌血清Stathmin水平与与淋巴结转移

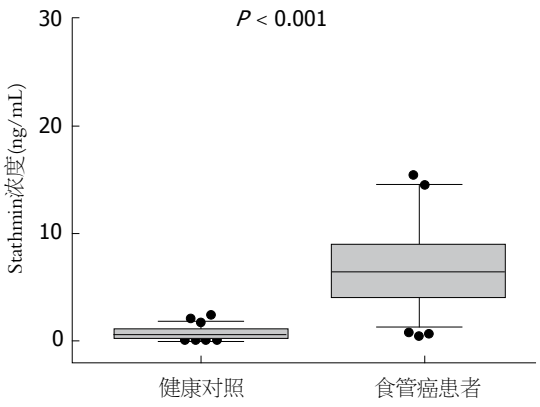


图 1 食管鳞癌和健康对照血清Stathmin浓度分布箱式图.

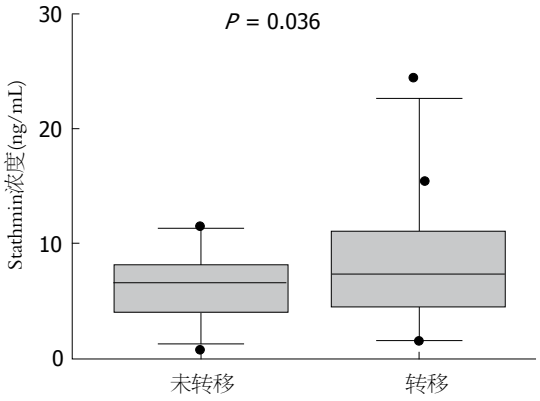


图 2 淋巴结转移血清Stathmin浓度分布箱式图.

参数的关系 74例食管鳞癌患者中, 其中34例为淋巴结转移, 31例为无淋巴结转移, 9例信息不详. 食管癌淋巴结转移患者血清Stathmin浓度中位值为7.92 ng/mL, 无淋巴结转移样本Stathmin浓度中位值为5.94 ng/mL, 经Mann-Whitney相关分析, 食管癌淋巴结转移患者血清Stathmin水平显著高于无转移组($P = 0.036$), 提示血清中Stathmin浓度与淋巴结转移相关(表1, 图2).

2.3 食管鳞癌血清Stathmin水平与临床病理参数的关系 为了比较Stathmin表达水平与临床参数的相关性, 统计学分析结果提示食管鳞癌患者血清Stathmin浓度与性别、年龄、TNM分期与分化程度以及肿瘤大小等因素无关(表1, 图3), (P>0.05).

2.4 Stathmin与Cyfra21-1联合检测对ESCC的诊断评价 基于上述74例食管鳞癌及81例健康对照血清样本随机选择34例ESCC血清样本和40例健康对照血清样本, 应用ELISA检测Cyfra21-1浓度, 其中位值分别是3.45 ng/mL和1.1 ng/mL. 经ROC曲线分析, Stathmin与Cyfra21-1的曲线下面积(area under curve, AUC)分别为0.968和0.817,

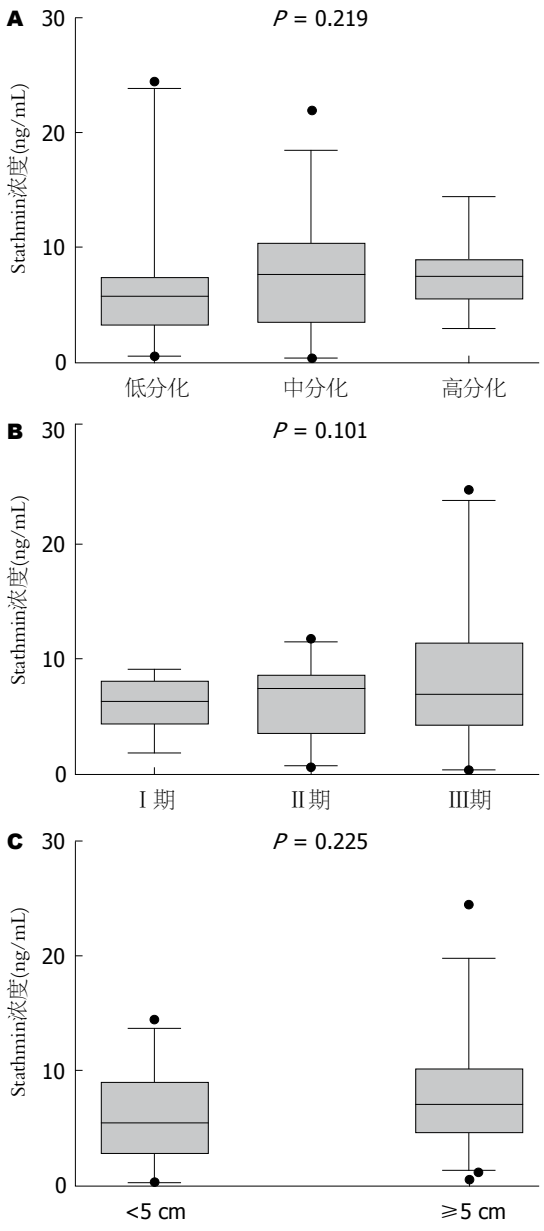


图 3 血清Stathmin浓度与相关临床参数分布箱式图. A: 血清Stathmin浓度与分化程度的关系; B: 血清Stathmin浓度与TNM分期的关系; C: 血清Stathmin浓度与肿瘤大小间的关系.

Stathmin确定阳性界值为1.77 ng/mL, Cyfra21-1确定阳性界值为3.4 ng/mL, 基于阳性界值确定Stathmin与Cyfra21-1单项检测对食管鳞癌诊断的灵敏度分别为94.6%和73.5%, 特异性分别为97.5%和80%. 提示Stathmin和Cyfra21-1在食管癌的血清诊断中都具有一定诊断价值, Stathmin的检测结果优于Cyfra21-1, 更灵敏有效. 联合检测的灵敏度, 特异性和Youden指数未见显著上升(表2, 3), 提示单独Stathmin检测具有较高的有效性和准确性.

2.5 ESCC血清中Stathmin表达水平与临床肿瘤标志物相关性分析 为了比较Stathmin与目前临床

■创新盘点

本研究采用ELISA方法研究食管癌患者血清中Stathmin表达水平, 分析血清Stathmin水平与食管癌各临床病理参数的关系, 发现食管鳞癌患者血清Stathmin显著高于健康人, 且Stathmin检测灵敏度显著优于目前已有食管癌肿瘤标志物, 提示Stathmin可作为一种食管癌潜在的肿瘤标志物.

■应用要点
食管癌患者血清Stathmin水平较正常人明显升高，且与肿瘤的生长、侵袭和转移等肿瘤恶性生物学行为相关，因此，通过检测食管癌患者血清中的Stathmin水平，可有助于食管癌的诊断、判断预后及术后随访.

表 2 血清Stathmin与Cyfra21-1联合测定对ESCC诊断的评价

标志物	灵敏度(%)	特异性(%)	Youden指数
Stathmin	94.6	97.5	92.1
Cyfra21-1	73.5	80	53.5
Stathmin+Cyfra21-1	94.6	97.5	92.1

Cyfra21-1: 角蛋白19片段抗原21-1.

所有肿瘤标志物的诊断效果，计算各种肿瘤标志物检测食管鳞癌的灵敏度，如表3所示，经ROC曲线分析，Stathmin确定阳性界值为1.77 ng/mL，基于阳性界值确定Stathmin的灵敏度为94.6%，Cyfra21-1确定阳性界值为3.4 ng/mL，基于阳性界值确定灵敏度为73.5%，基于本院CEA、CA72-4和CA19-9的阳性界值，确定灵敏度分别为6.9%、1.8%和1.8%. 提示Stathmin的灵敏度显著优于CEA、Cyfra21-1、CA19-9、CA72-4.

3 讨论

Stathmin是由149个氨基酸组成的分子量为19 kDa微管解聚蛋白，包含2个不同的亚型α和β. 结构上可分成3部分：N端的结构调节域、中心区和C端的蛋白相互作用结构域. 蛋白水解后的中心区包括4个结构域(Ⅰ-Ⅳ)，其核心区域(第42-126位氨基酸)连接N端和C端，可构成与微管蛋白相互作用的最小片段[9]. N端包含4个丝氨酸磷酸化位点，分别为Ser16、Ser25、Ser38和Ser63，经磷酸化后Stathmin与微管蛋白异二聚体之间亲和力的下降从而失去微管解聚活性，其中Ser16、Ser63磷酸化显著影响微管稳定性. C端的功能区域，包括了一个α螺旋结构，与微管的α/β异源二聚体螯合形成紧密的复合物从而抑制微管聚合[10]. Stathmin通过磷酸化调节自身活性影响细胞内微管系统的动力平衡影响细胞增殖，Stathmin磷酸化导致活性降低，微管蛋白得以聚合；Stathmin去磷酸化，促进微管蛋白解聚[11]. 在多种肿瘤包括子宫内膜癌、骨肉瘤、乳腺癌、非激素依赖性的前列腺癌的体外模型研究发现，敲除Stathmin可诱导细胞周期停滞及细胞凋亡[7,12].

Stathmin作为微管解聚蛋白，主要定位于细胞浆[11]. 近年来研究发现Stathmin在口腔鳞癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、白血病、头颈癌、结肠癌、肝癌、淋巴瘤等多种恶性肿瘤组织表达增高[13]. 王峰等[14]应用免疫组织化学和原位杂交的方法分析了75例食管鳞癌组织、25例癌旁不典型增生组织和正常食管黏膜组织中Stathmin mRNA和蛋白的表达，发现在食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织和正常食管黏膜组织中Stathmin蛋白的阳性率分别为81.3%、48.0%和30.0%，组间比较有显著性差异(P<0.01)，Stathmin mRNA和蛋白的阳性表达率分别为82.7%和90.2%，与癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织比较有显著性差异(P<0.01). 提示食管鳞癌组织中Stathmin蛋白高表达，Stathmin表达与食管癌的发生发展相关. Yousefi等[15]采用二维电泳与液相质谱联用的方法对两种肺癌细胞系的分泌蛋白进行研究发现Stathmin在分泌上清中特异性高表达，说明Stathmin能够分泌到细胞外，进入血循环中，可从血清中检测Stathmin的水平. Bhagirath等[16]用ELISA的方法对30例移型性膀胱上皮癌，15例健康对照和15例良性前列腺增生的血清和尿液进行检测，结果显示在肿瘤患者中Stathmin表达显著升高(P<0.001)，ROC曲线下面积为0.984，灵敏度为93.3%，特异性为86.7%，临界值为0.7 ng/mL. 提示其可能作为一种肿瘤标志物用于移型性膀胱癌的检测.

表 3 不同肿瘤标志物在食管鳞癌诊断中的阳性率

标志物	n	临界值	阳性率[n(%)]
Stathmin(ng/mL)	74	1.77	94.6(70)
Cyfra21-1(ng/mL)	34	3.4	73.5(25)
CEA(ng/mL)	58	5.0	6.9(4)
CA72-4 (U/mL)	56	9.8	1.8(2)
CA19-9 (U/mL)	56	37.0	1.8(2)

Cyfra21-1: 角蛋白19片段抗原21-1; CEA: 癌胚抗原; CA19-9: 癌抗原19-9; CA72-4: 癌抗原72-4.

在肿瘤细胞中Stathmin过表达与侵袭转移相关，研究发现微管蛋白解聚与细胞的迁移、运动有关，研究证实Stathmin具有促进细胞运动的功能，Jin等[17]发现Stathmin敲降可降低小鼠再生神经元的运动能力. Borghese等[18]在果蝇中发现Stathmin减少使胚胎细胞和边缘细胞的运动能力降低. Gan等[19]发现Stathmin在肝癌特别是高转移性的肝癌组织中高表达. siRNAs敲降人高转移肝癌细胞(human highly potentially metastatic liver cancer cell line, HCCLM3)的Stathmin后，明显抑制了细胞的黏附能力，抑制细胞的迁移和侵袭能力，提示Stathmin的表达与肝癌癌变和转移有很大的关联. Trovik等[20]采用免疫组织化学染

色的方法对1067例子宫内膜癌组织样本检测发现Stathmin的表达与不良预后和淋巴结转移具有显著相关性. 我们进一步将食管癌患者分为淋巴结转移和未转移两组, ESCC伴有淋巴结转移组Stathmin在血清中浓度中位值为7.92 ng/mL, 显著高于ESCC未发生转移的中位值(5.94 ng/mL), 提示Stathmin的表达与食管癌的转移密切相关与文献报道一致. 本课题组前期研究也发现Stathmin在食管癌组织中表达强度显著高于癌旁组织, 临床病理参数分析显示Stathmin表达与分化程度相关, 在低分化程度的组织中表达较强, 高分化组织中表达较弱[6]. 本研究中血清学的Stathmin检测未见其与肿瘤分化的相关性, 但与淋巴结转移显著相关. 吴彬等[21]对470例食管癌患者进行回顾性分析显示随着细胞分化程度的降低, 区域淋巴结转移数显著增高(P<0.01), 与高分化食管癌相比中分化癌淋巴结转移度增加3倍, 中低分化癌增加4.5倍, 低分化癌增加6倍, 提示食管癌分化程度越低, 发生淋巴结转移的可能性越高. 而本研究的Stathmin与淋巴结转移显著相关, 与前期研究的Stathmin在低分化程度的食管癌组织中表达高具有一致性, 进一步说明Stathmin与食管癌的转移密切相关.

目前食管癌缺乏特异诊断标志物, 我院检测食管癌相关标志物为CEA、CA19-9、CA72-4和Cyfra21-1等常规肿瘤标志物. CEA是一种具有人类胚胎抗原特异性的酸性糖蛋白, 主要作为监测结、直肠癌标志物, 最新研究其在肺腺癌诊断中也有显著作用[22]. CA19-9是来自结直肠癌细胞系的单抗, 在消化系恶性肿瘤中和胰腺癌中有良好的应用价值, CA72-4对于胃癌的检测特异性较高. Chen等[23]研究发现将CA19-9与CA72-4联合使用对中国人群的胃癌检测具有更好的效果. 提示CEA、CA19-9和CA72-4都不是食管癌特异性标志物. Cyfra21-1是一种上皮来源的抗原, 作为肺癌标志物被广泛应用. 研究发现其在食管癌中也发挥一定作用, Wakatsuki等[24]检测51例食管癌患者放疗前后血清Cyfra21-1含量, 化疗后Cyfra21-1浓度低于临界值的患者不易复发, 结果显示血清Cyfra21-1具有评估和监测放疗效果的作用; Yi等[25,26]研究提示血清中Cyfra21-1的浓度可以作为预测食管癌放化疗效果的敏感性指标; Yan等[27]对192例食管癌患者血清Cyfra21-1的检测发现血清Cyfra21-1浓度低的患者在接受放化疗后具有更高的存活率. 本研究发现血清Stathmin水平在食管癌中表达显著升高, 其灵敏度和特异性分别达到94.6%和97.5%, 显著高于Cyfra21-1、CEA、CA72-4、CA19-9等标志物. Stathmin与Cyfra21-1联合检测与Stathmin单项检测相比, 其联合检测的灵敏度未见提高. 说明Stathmin可成为辅助食管癌诊断的重要血清学指标.

总之, 食管癌患者血清Stathmin水平升高, 与肿瘤转移代表肿瘤恶性生物学行为的因素相关, 可作为一种食管癌特异的肿瘤标志物用于早期诊断、转移和复发监测. 同时充分认识到上述结果仍有待于进一步扩大样本和多中心验证. 今后进一步检测高危人群的Stathmin的水平, 同时联合腔镜和食管拉网筛查、诊断和判断预后具有重要的意义.

■同行评价
论文研究内容较新, 具有临床潜在应用前景, 具有转化医学价值.

4 参考文献

1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249 [PMID: 19474385 DOI: 10.3322/caac.20006]

2 Lin DC, Du XL, Wang MR. Protein alterations in ESCC and clinical implications: a review. *Dis Esophagus* 2009; 22: 9-20 [PMID: 18564170 DOI: 10.1111/j.1442-2050.2008.00845.x]

3 Shimada Y, Watanabe G, Kawamura J, Soma T, Okabe M, Ito T, Inoue H, Kondo M, Mori Y, Tanaka E, Imamura M. Clinical significance of osteopontin in esophageal squamous cell carcinoma: comparison with common tumor markers. *Oncology* 2005; 68: 285-292 [PMID: 16015046 DOI: 10.1159/000086961]

4 Wang XB, Jiang XR, Yu XY, Wang L, He S, Feng FY, Guo LP, Jiang W, Lu SH. Macrophage inhibitory factor 1 acts as a potential biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma and is a target for antibody-based therapy. *Cancer Sci* 2014; 105: 176-185 [PMID: 24383865 DOI: 10.1111/cas.12331]

5 Brockmann JG, St Nottberg H, Glodny B, Heinecke A, Senninger NJ. CYFRA 21-1 serum analysis in patients with esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4249-4252 [PMID: 11106239]

6 Liu F, Sun YL, Xu Y, Liu F, Wang LS, Zhao XH. Expression and phosphorylation of stathmin correlate with cell migration in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013; 29: 419-424 [PMID: 23229199 DOI: 10.3892/or.2012.2157]

7 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 [PMID: 21978024 DOI: 10.1517/14728222.2011.620951]

8 NCCN Guidelines(R) Updates. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11: xxxii-xxxvi [PMID: 24029131]

9 Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 18-24 [PMID: 11792540]

10 Charbaut E, Curmi PA, Ozon S, Lachkar S, Redeker V, Sobel A. Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. *J Biol Chem* 2001; 276: 16146-16154 [PMID: 11278715 DOI: 10.1074/jbc.M010637200]

11 Ringhoff DN, Cassimeris L. Stathmin regulates centrosomal nucleation of microtubules and tubulin dimer/polymer partitioning. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 3451-3458 [PMID: 19515833 DOI: 10.1091/mbc.E09-02-0140]

12 Nemunaitis J. Stathmin 1: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 631-634 [PMID: 22686589 DOI: 10.1517/14728222.2012.696101]

13 Ying L, Su D, Zhu J, Ma S, Katsaros D, Yu H. Genotyping of stathmin and its association with clinical factors and survival in patients with ovarian cancer. *Oncol Lett* 2013; 5: 1315-1320 [PMID: 23599786 DOI: 10.3892/ol.2013.1144]

14 王峰, 王留兴, 何伟, 朱利楠, 赵培荣, 樊青霞. Stathmin基因在食管鳞癌中的表达及生物学意义. 南方医科大学学报 2010; 30: 1552-1557

15 Yousefi Z, Sarvari J, Nakamura K, Kuramitsu Y, Ghaderi A, Mojtahedi Z. Secretomic analysis of large cell lung cancer cell lines using two-dimensional gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50: 368-374 [PMID: 23042266 DOI: 10.5603/18762]

16 Bhagirath D, Abrol N, Khan R, Sharma M, Seth A, Sharma A. Expression of CD147, BIGH3 and Stathmin and their potential role as diagnostic marker in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1641-1646 [PMID: 22626996 DOI: 10.1016/j.cca.2012.05.005]

17 Jin K, Mao XO, Cottrell B, Schilling B, Xie L, Row RH, Sun Y, Peel A, Childs J, Gendeh G, Gibson BW, Greenberg DA. Proteomic and immunochemical characterization of a role for stathmin in adult neurogenesis. *FASEB J* 2004; 18: 287-299 [PMID: 14769823 DOI: 10.1096/fj.03-0973com]

18 Borghese L, Fletcher G, Mathieu J, Atzberger A, Eades WC, Cagan RL, Rørth P. Systematic analysis of the transcriptional switch inducing migration of border cells. *Dev Cell* 2006; 10: 497-508 [PMID: 16580994 DOI: 10.1016/j.devcel.2006.02.004]

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 [PMID: 20204289]

20 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 [PMID: 21242118 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2412]

21 吴彬, 徐志飞, 孙耀昌, 李建秋, 赵学维. 食管癌的侵犯深度及分化程度与区域淋巴结转移的关系. 第二军医大学学报 2000; 21: 771-773

22 Yamao T, Kai S, Kazami A, Koizumi K, Handa T, Takemoto N, Maruyama M. Tumor markers CEA, CA19-9 and CA125 in monitoring of response to systemic chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1999; 29: 550-555 [PMID: 10678558]

23 Chen XZ, Zhang WK, Yang K, Wang LL, Liu J, Wang L, Hu JK, Zhang B, Chen ZX, Chen JP, Zhou ZG, Mo XM. Correlation between serum CA724 and gastric cancer: multiple analyses based on Chinese population. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 9031-9039 [PMID: 22752725 DOI: 10.1007/s11033-012-1774-x]

24 Wakatsuki M, Suzuki Y, Nakamoto S, Ohno T, Ishikawa H, Kiyohara H, Kiyozuka M, Shirai K, Nakayama Y, Nakano T. Clinical usefulness of CYFRA 21-1 for esophageal squamous cell carcinoma in radiation therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 715-719 [PMID: 17444861 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04498.x]

25 Yi Y, Li B, Wang Z, Sun H, Gong H, Zhang Z. CYFRA21-1 and CEA are useful markers for predicting the sensitivity to chemoradiotherapy of esophageal squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2009; 14: 480-485 [PMID: 19863186 DOI: 10.3109/13547500903180265]

26 Yi Y, Li B, Sun H, Zhang Z, Gong H, Li H, Huang W, Wang Z. Predictors of sensitivity to chemoradiotherapy of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 2010; 31: 333-340 [PMID: 20490963 DOI: 10.1007/s13277-010-0041-9]

27 Yan HJ, Wang RB, Zhu KL, Jiang SM, Zhao W, Xu XQ, Feng R. Cytokeratin 19 fragment antigen 21-1 as an independent predictor for definitive chemoradiotherapy sensitivity in esophageal squamous cell carcinoma. *Chin Med J* (Engl) 2012; 125: 1410-1415 [PMID: 22613644]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2023-2027
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

HBeAg阳性慢性乙型肝炎不同肝组织炎症与纤维化时期血清HBsAg含量的动力学特点

谭 雷, 吴泽倩, 刘 婷, 高志良, 柯伟民

谭雷, 中山大学附属第三医院超声科 广东省广州市 510630
吴泽倩, 高志良, 柯伟民, 中山大学附属第三医院感染科 广东省广州市 510630
刘婷, 中山大学附属孙逸仙纪念医院感染科 广东省广州市 510236
谭雷, 住院医师, 主要从事肝胆疾病超声诊断的研究.
作者贡献分布: 此回顾性分析课题由柯伟民、高志良、谭雷及吴泽倩共同设计; 由谭雷、吴泽倩及刘婷收集患者相关资料; 吴泽倩完成数据的统计分析; 谭雷完成本论文初步撰写; 吴泽倩修改加工论文原稿; 本论文撰写由柯伟民指导.
通讯作者: 柯伟民, 教授, 510630, 广东省广州市天河路600号, 中山大学附属第三医院感染科. tcl3626@gmail.com
电话: 020-85253171
收稿日期: 2014-02-23 修回日期: 2014-03-24
接受日期: 2014-04-03 在线出版日期: 2014-05-18

Dynamic changes in serum HBsAg levels in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with different liver inflammation grades and fibrosis stages

Lei Tan, Ze-Qian Wu, Ting Liu, Zhi-Liang Gao, Wei-Min Ke

Lei Tan, Department of Medical Ultrasound, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Ze-Qian Wu, Zhi-Liang Gao, Wei-Min Ke, Department of Infectious Diseases, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China
Ting Liu, Department of Infectious Diseases, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510236, Guangdong Province, China
Correspondence to: Wei-Min Ke, Professor, Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, 600 Tianhe Road, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. tcl3626@gmail.com
Received: 2014-02-23 Revised: 2014-03-24
Accepted: 2014-04-03 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To investigate the dynamic changes in serum HBsAg levels in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with different liver histological inflammation grades and hepatic fibrosis stages.

METHODS: Serum HBsAg levels in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients were detected by electrochemiluminescence. Serum HBsAg levels were compared between patients with grades 1, 2, 3 and 4 liver histological inflammation, and between those with stages 1, 2, 3 and 4 hepatic fibrosis.

RESULTS: Serum HBsAg levels in patients with grades 1, 2, 3 and 4 liver histological inflammation were 2998 COI/mL ± 2515 COI/mL, 4064 COI/mL ± 2468 COI/mL, 5513 COI/mL ± 2390 COI/mL and 5736 COI/mL ± 1838 COI/mL, respectively; while the values in patients with stages 1, 2, 3 and 4 hepatic fibrosis were 3159 COI/mL ± 2577 COI/mL, 4075 COI/mL ± 2149 COI/mL, 5670 COI/mL ± 2189 COI/mL and 5976 COI/mL ± 2128 COI/mL, respectively. There were significant differences in serum HBsAg levels between different liver inflammation grades, as well as between different hepatic fibrosis stages ($F = 9.986$, $P < 0.000$; $F = 13.955$, $P < 0.000$).

CONCLUSION: Serum HBsAg levels increase dynamically along with the damage of hepatic tissues in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Chronic hepatitis B; HBsAg; Pathological damage; Liver inflammation grade; Hepatic fibrosis stage

Tan L, Wu ZQ, Liu T, Gao ZL, Ke WM. Dynamic changes in serum HBsAg levels in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients with different liver inflammation grades and fibrosis stages. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2023-2027 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2023.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2023

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒e抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)阳性在慢性乙型肝炎(chronic

■背景资料
目前, 关于乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)水平的研究是乙型肝炎研究领域的黄金热点. 近年来, 已有诸多高质量文章研究其在CHB自然病程中的表达特点, 血清HBsAg含量变化在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的病情监测和抗病毒治疗疗效预测等方面取得了较大进展. 本研究观察CHB自然病程中免疫清除期血清HBsAg含量在肝组织炎症分级与肝组织纤维化分期的表达规律.

■同行评议者
张明辉, 副主任医师, 河北医科大学第一医院肝病中心(传染病)

■研发前沿
肝内共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)含量与合成释放入外周血的HBV DNA含量以及HBsAg含量有着良好的正相关性. 血清HBsAg含量可否间接反映病毒复制的活跃程度, 评价慢乙型肝炎活动期肝细胞的损伤程度, 甚至于基线血清HBsAg含量应用于预测HBsAg清除.

hepatitis B, CHB)自然病程中, 不同肝组织炎症分级和肝纤维化分期时, 血清HBsAg含量的动力学特点.

方法: 应用电化学发光法检测血清HBsAg含量. 各自两两比较在肝组织炎症分级1、2、3和4级的四级之间、肝组织纤维化分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期的四期之间血清HBsAg的含量.

结果: HBeAg阳性CHB患者的血清HBsAg含量, 在肝组织炎症1、2、3和4级时分别为2998 COI/mL±2515 COI/mL、4064 COI/mL±2468 COI/mL、5513 COI/mL±2390 COI/mL和5736 COI/mL±1838 COI/mL; 在肝组织纤维化Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期时分别为3159 COI/mL±2577 COI/mL、4075 COI/mL±2149 COI/mL、5670 COI/mL±2189 COI/mL和5976 COI/mL±2128 COI/mL. 血清HBsAg含量在肝组织炎症分级四级之间、肝组织纤维化分期四期之间均存在差异(F = 9.986, P<0.000和F = 13.955, P<0.000).

结论: HBeAg阳性CHB, 其血清HBsAg含量随肝组织损伤程度的进展而增加.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 慢性乙型肝炎; 乙型肝炎表面抗原; 病理损伤; 肝组织炎症; 肝纤维化

核心提示: 本文通过大样本回顾性分析, 比较了不同肝组织炎症分级与纤维化分期时血清HBsAg表达的动力学特点, 为慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B)自然史的研究提供有力依据.

谭雷, 吴泽倩, 刘婷, 高志良, 柯伟民. HBeAg阳性慢性乙型肝炎不同肝组织炎症与纤维化时期血清HBsAg含量的动力学特点. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2023-2027 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2023.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2023

0 引言

乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的外膜蛋白, 由S-开放读码框架(S-open reading frames, S-ORS)编码合成, 是成熟病毒颗粒的必要成分[1]. 无论乙型肝炎患者的病程及转归如何, HBsAg仍是当前诊断乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的最经典、最基本的病毒标志物[2]. HBsAg清除是临床治疗的最理想目标[3]. 近年来, 血清HBsAg含量变化在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的病情监测[4-6]和抗病毒治疗疗效预测[7-10]等方面取得了较大进展. 因此, 弄清CHB自然病程中免疫清除期血清HBsAg含量在肝组织炎症分级1级到4级与肝组织纤维化分期Ⅰ期到Ⅳ期的表达规律, 有助于进一步阐明HBeAg阳性CHB的发病机制, 监测病情进展, 为优化抗病毒治疗策略提供理论依据.

表 1 HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者的肝组织炎症分级及他们所处的肝组织纤维化分期

肝组织纤维化分期	肝组织炎症分级				合计
	G1	G2	G3	G4	
S1	26	17	1	0	44
S2	1	37	5	2	45
S3	0	4	28	4	36
S4	0	0	13	25	38
合计	27	58	47	31	163

HBeAg: 乙型肝炎病毒e抗原.

1 材料和方法

1.1 材料 2009-01/2012-10中山大学附属第三医院感染科住院的HBeAg阳性CHB患者163例, 其中, 男性137例, 女性26例, 平均年龄33.5岁±10.1岁. 所有患者未应用过核苷(酸)类似物、干扰素和胸腺素等抗HBV药物, 无合并或重叠甲型、丙型和戊型肝炎病毒感染, 排除抗病毒药物与嗜肝病毒间的相互干扰对e抗原状态、血清HBsAg含量和肝组织病理的影响. 163例CHB患者的肝组织炎症分级以及他们所处的肝组织纤维化分期如表1.

1.2 方法

1.2.1 嗜肝病毒血清标志物的检测: 电化学发光法定量检测采用罗氏ECL-2010仪器及配套试剂. 检测结照果按以下指标作为判别标准: HBsAg参考值范围为<1.0(cut off index, COI), HBeAg参考值范围为0-10 IU/L, Anti-HBe参考值范围为>1.0 COI, Anti-HBc参考值范围为>1.0 COI. 检测结果的COI值在参考值范围以内为阴性, 参考值范围以外为阳性. 采用酶联免疫吸附法分别检测甲型肝炎病毒标志物(北京科卫临床诊断试剂有限公司)、丙型肝炎病毒标志物(北京现代高达生物技术有限责任公司)和戊型肝炎病毒标志物(生物医学亚太私人有限公司), 以上嗜肝病毒标志物的检测均按照试剂盒的说明书进行.

1.2.2 肝组织病理诊断: 163例HBeAg阳性CHB患

表 2 肝组织炎症分级和肝组织纤维化分期的病理诊断依据

肝组织炎症分级	汇管区炎症	腺泡内炎症	肝组织纤维化分期	纤维化程度
G1	汇管区炎	点、灶性坏死	S1	汇管区纤维化, 芒状纤维
G2	界面炎症较轻	灶性坏死, 嗜酸小体	S2	少数纤维间隔形成
G3	界面炎症较重	灶性坏死重, 桥接坏死	S3	纤维间隔伴小叶结构变形
G4	界面炎症重	多小叶融合坏死, 花结形成	S4	结节形成(前期肝硬化)

表 3 HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者在不同肝组织炎症分级与纤维化分期的血清HBsAg含量

肝组织炎症分级	*n*	血清HBsAg含量(COI/mL)	肝组织纤维化分期	*n*	血清HBsAg含量(COI/mL)
G1	27	2998 ± 2515	S1	44	3159 ± 2577
G2	58	4064 ± 2468	S2	45	4075 ± 2149
G3	47	5513 ± 2390	S3	36	5670 ± 2189
G4	31	5736 ± 1838	S4	38	5976 ± 2128

HBeAg: 乙型肝炎病毒e抗原.

表 4 HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者在不同肝组织炎症分级与纤维化分期血清HBsAg含量比较的统计学分析

肝组织炎症分级	血清HBsAg含量	肝组织纤维化分期	血清HBsAg含量
G1与G2	0.053	S1与S2	0.060
G1与G3	0.000	S1与S3	0.000
G1与G4	0.000	S1与S4	0.000
G2与G3	0.002	S2与S3	0.002
G2与G4	0.002	S2与S4	0.000
G3与G4	0.681	S3与S4	0.564
G1–G4组间	F = 9.986, P = 0.000	S1–S4组间	F = 13.955, P = 0.000

HBeAg: 乙型肝炎病毒e抗原.

■相关报道
Hadziyannis等报道HBeAg阳性CHB患者血清HBV DNA水平往往呈高水平复制, 肝组织炎症活动较活跃, 肝细胞炎症坏死可伴随快速进展肝纤维化.

者均以Esaote Au4型彩色多普勒机(美国产品)做引导, 使用其配套的16 G活检枪进行肝活检, 切割大约20 mm长度肝组织. 肝活检标本用Bouin's液固定和石蜡包埋. 分别用苏木素-伊红(HE)染色和Masson法网状纤维染色. 由我院病理科医师根据Desmet等慢性肝炎的分类进行肝组织炎症分级和肝纤维化分期[11]. 肝组织炎症分级和纤维化分期依据如表2.

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计学分析. HBeAg阳性CHB肝组织炎症分级1、2、3和4级以及肝组织纤维化分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期, 血清HBsAg含量在4组之间的比较采用ANOVA检验, P<0.05为差异有统计学意义; 4组之间的两两比较采用ANOVA检验, P<0.008(0.05/6)为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 不同肝组织炎症分级与纤维化分期中血清HBsAg的含量特点 163例HBeAg阳性CHB患者, 在肝组织炎症分级1、2、3和4级以及肝组织纤维化分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期的血清HBsAg含量如表3. 由表3可知, HBeAg阳性CHB患者的血清HBsAg含量随着肝组织炎症和纤维化严重程度的增加而逐渐升高.

2.2 不同肝组织炎症分级与纤维化分期中血清HBsAg含量的统计分析 163例HBeAg阳性CHB患者, 血清HBsAg含量在肝组织炎症分级四级之间、肝组织纤维化分期四期之间比较的统计学分析如表4. 由表4可见, HBeAg阳性CHB患者的血清HBsAg含量在肝组织炎症分级1、2、3和4级之间存在明显差异(F = 9.986, P<0.000);

■**创新盘点**
本研究以CHB自然病程肝组织病理学改变的角度, 大样本回顾性分析不同肝组织炎症分级和肝组织纤维化分期中血清HBsAg含量的变化, 为进一步弄清HBeAg阳性CHB自然病程HBsAg含量的动力学特点提供有力依据.

HBeAg阳性CHB患者的血清HBsAg含量在肝组织纤维化分期Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期之间也存在明显差异(F = 13.955, P<0.000).

3 讨论

已有多项研究[12-15]显示, 肝内共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)含量与合成释放入外周血的HBV DNA含量以及HBsAg含量有着良好的正相关性. 血清HBsAg含量可间接反映病毒复制的活跃程度, 评价慢乙型肝炎活动期肝细胞的损伤程度, 甚至于基线血清HBsAg含量是预测HBsAg清除的唯一最有效指标[16].

HBeAg阳性CHB患者, 其血清HBV DNA水平往往呈高水平复制, 伴随有转氨酶水平的升高或波动, 使得肝组织炎症活动较活跃, 肝细胞炎症坏死可伴随快速进展的肝纤维化[17].

在此肝细胞炎症坏死活跃和肝纤维化不断进展的过程中, 随着纤维组织的累积增加, 提供给HBV复制的肝实质细胞体积在进行性地减少. 肝组织损伤程度的进展将导致肝实质细胞数量的下降, 这是否会影响释放入血清的HBsAg含量呢?

本研究结果显示, HBeAg阳性CHB患者, 在肝组织炎症1、2、3和4级之间以及肝组织纤维化Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ期之间, 其血清HBsAg含量均存在明显差异(F = 9.986, P<0.000和F = 13.955, P<0.000). HBeAg阳性CHB患者的血清HBsAg含量随着肝组织炎症与纤维化的逐步进展而不断增加. 由此可知, 随着HBeAg阳性CHB肝组织损伤以及肝纤维化的累积进展, 虽然提供给HBV复制的场所-肝实质细胞总数在不断减少, 但HBV的复制表达并没有下降或静止, 反而更加活跃. 据此我们推测, 可能随着肝病的进展, 即肝组织不断炎症坏死与纤维化不断累积增加的过程, 虽然HBV复制场所-肝实质细胞总数在不断减少, 但可能单个肝实质细胞内的HBV复制较前活跃, 可促进更多的血清HBsAg表达, 加重由T细胞等介导的特异性免疫损伤, 致使肝脏产生更为严重的炎症坏死.

弄清HBeAg阳性CHB病程进展中血清HBsAg含量的变化, 是对HBV自然史和宿主免疫应答的进一步研究. 与HBV DNA相比, HBsAg定量是更为简易、经济的检测手段. 动态监测其血清HBsAg含量的变化, 可更为有效地预测HBsAg清除等抗HBV治疗效果. 对于处于免疫清除期的CHB患者, 制定抗病毒治疗方案时, 除HBV DNA外, 或许应考虑到患者血清HBsAg含量高低. 对于血清HBsAg含量较高的患者, 需使用高效、低耐药率的抗病毒药物, 才能产生良好的持续应答, 长期有效地控制肝组织炎症坏死的进展, 部分逆转肝纤维化.

4 参考文献

1 Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* 2009; 49: S13-S21 [PMID: 19399811 DOI: 10.1002/hep.22881]

2 Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009; 373: 582-592 [PMID: 19217993 DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60207-5]

3 European Association For The Study Of The Liver. [EASL clinical practice guidelines. Management of chronic hepatitis B]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: 539-554 [PMID: 19481389 DOI: 10.1016/j.gcb.2009.03.002]

4 Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, Croagh C, Bell S, Desmond PV, Levy M, Locarnini SA. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: a perspective on Asia. *J Hepatol* 2010; 52: 508-513 [PMID: 20206400 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.01.007]

5 Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, Deterding K, Schlue J, Raupach R, Flisiak R, Bock CT, Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol* 2010; 52: 514-522 [PMID: 20207438 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.01.014]

6 Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, Su TH, Wang CC, Chen CL, Kuo SF, Liu CH, Chen PJ, Chen DS, Kao JH. Determinants of spontaneous surface antigen loss in hepatitis B e antigen-negative patients with a low viral load. *Hepatology* 2012; 55: 68-76 [PMID: 21858846 DOI: 10.1002/hep.24615]

7 Wursthorn K, Jung M, Riva A, Goodman ZD, Lopez P, Bao W, Manns MP, Wedemeyer H, Naoumov NV. Kinetics of hepatitis B surface antigen decline during 3 years of telbivudine treatment in hepatitis B e antigen-positive patients. *Hepatology* 2010; 52: 1611-1620 [PMID: 20931556 DOI: 10.1002/hep.23905]

8 Brunetto MR, Moriconi F, Bonino F, Lau GK, Farci P, Yurdaydin C, Piratvisuth T, Luo K, Wang Y, Hadziyannis S, Wolf E, McCloud P, Batrla R, Marcellin P. Hepatitis B virus surface antigen levels: a guide to sustained response to peginterferon alfa-2a in HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009; 49: 1141-1150 [PMID: 19338056 DOI: 10.1002/hep.22760]

9 Moucari R, Mackiewicz V, Lada O, Ripault MP, Castelnau C, Martinot-Peignoux M, Dauvergne A, Asselah T, Boyer N, Bedossa P, Valla D, Vidaud M, Nicolas-Chanoine MH, Marcellin P. Early serum HBsAg drop: a strong predictor of sustained virological response to pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-negative patients. *Hepatology* 2009; 49: 1151-1157 [PMID: 19115222 DOI: 10.1002/hep.22744]

10 Sonneveld MJ, Rijckborst V, Boucher CA, Hansen BE, Janssen HL. Prediction of sustained response

to peginterferon alfa-2b for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using on-treatment hepatitis B surface antigen decline. *Hepatology* 2010; 52: 1251-1257 [PMID: 20830787 DOI: 10.1002/hep.23844]

11 Chen M, Sällberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV, Billaud JN, Milich DR. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 2005; 79: 3016-3027 [PMID: 15709022]

12 Ben Slama N, Ahmed SN, Zoulim F. [HBsAg quantification: virological significance]. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34 Suppl 2: S112-S118 [PMID: 21095514 DOI: 10.1016/S0399-8320(10)70030-0]

13 Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Moriconi F, Ciccorossi P, Coco B, Romagnoli V, Cherubini B, Moscato G, Maina AM, Cavallone D, Bonino F. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010; 139: 483-490 [PMID: 20451520 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.04.052]

14 Locarnini S, Bowden S. Hepatitis B surface antigen quantification: not what it seems on the surface. *Hepatology* 2012; 56: 411-414 [PMID: 22454331 DOI: 10.1002/hep.25732]

15 Chan HL, Wong VW, Tse AM, Tse CH, Chim AM, Chan HY, Wong GL, Sung JJ. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 1462-1468 [PMID: 18054753]

16 Arai M, Togo S, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis B surface antigen can help predict spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 414-418 [PMID: 22273987 DOI: 10.1097/MEG.0b013e328350594d]

17 Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D, Hadziyannis E. The natural course of chronic hepatitis B virus infection and its management. *Adv Pharmacol* 2013; 67: 247-291 [PMID: 23886003 DOI: 10.1016/B978-0-12-405880-4.00007-X]

■同行评价

本文的研究为HBV自然史和宿主免疫应答的进一步研究提供了充足的有意义的信息, 研究较具有新颖性, 工作做得很细很扎实、严谨, 科学性与可读性较强.

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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. (《世界华人消化杂志》编辑部)

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2028-2033
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

国产恩替卡韦对慢性乙型肝炎抗病毒治疗的Meta分析

郑人源, 张 琴, 高 勇, 卓 强

■背景资料
慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)可发展为肝衰竭、肝硬化、肝癌等疾病, 目前, 抗病毒治疗是乙型肝炎治疗的核心. 恩替卡韦(entecavir, ETV)(博路定)是一种新型抗乙型肝炎病毒药物, 近年来已作为乙型肝炎抗病毒治疗的首选药物之一, 但价格昂贵. 近年来, 国产ETV逐渐上市, 价格相对较低, 已成为一些乙型肝炎患者临床治疗的选择.

■同行评议者
林潮双, 教授, 中山大学附属第三医院感染科

郑人源, 张琴, 卓强, 成都医学院 四川省成都市 610500
高勇, 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083
郑人源, 医学硕士, 助理研究员, 主要从事消化内科学的相关研究.
四川省卫生厅科研基金资助项目, No. 130311
四川省教育厅科研基金资助项目, No. 14ZB0243
作者贡献分布: 郑人源与张琴对此文的贡献均等; 此课题由张琴与郑人源设计; 由郑人源、张琴及卓强负责文献检索、文献质量评价、资料提取、数据分析; 本文写作由郑人源与张琴完成; 高勇对本文提出修改意见并给予极大的工作支持.
通讯作者: 张琴, 主管药师, 610500, 四川省成都市新都区新都大道783号, 成都医学院, barya.mail@163.com
收稿日期: 2014-03-10 修回日期: 2014-03-27
接受日期: 2014-03-28 在线出版日期: 2014-05-18

China-made entecavir for treatment of chronic hepatitis B: A Meta-analysis

Ren-Yuan Zheng, Qin Zhang, Yong Gao, Qiang Zhuo

Ren-Yuan Zheng, Qin Zhang, Qiang Zhuo, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan Province, China
Yong Gao, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China
Supported by: Scientific Fund of Sichuan Province Health Department, No. 130311; Scientific Fund of Sichuan Province Education Department, No. 14ZB0243
Correspondence to: Qin Zhang, Chief Pharmacist, Chengdu Medical College, 783 Xindu Dadao, Xindu District, Chengdu 610500, Sichuan Province, China. barya.mail@163.com
Received: 2014-03-10 Revised: 2014-03-27
Accepted: 2014-03-28 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of China-made entecavir in the antiviral treatment of chronic hepatitis B by comparing with baraclude.

METHODS: A computer-based search of Medline, PubMed, China Journal Full-text Database and CBM database from the inception to February 2014, in combination with a manual search of relevant journals, was performed to identify relevant randomized controlled trials that evaluated the use of entecavir in the treatment of chronic hepatitis B, regardless of language. Heterogeneity was examined by Chi-square test, the relative risk was calculated, subgroup analysis was performed by treatment course, and forest graph was plot.

RESULTS: Six trials involving 587 patients, including 312 treated with China-made entecavir and 275 treated with baraclude, were included in the systematic review. There were no statistical significances in the rates of undetected serum HBV DNA, serum ALT normalization, HBeAg loss and the incidence of adverse reactions between the two groups ($P > 0.1$ for all).

CONCLUSION: China-made entecavir is effective and safe in antiviral treatment of chronic hepatitis B in comparison with baraclude. However, high-quality RCTs are still needed to further clarify its efficacy.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Entecavir; Baraclude; Antiviral treatment; Chronic hepatitis B; Treatment effect; Safety; Meta-analysis

Zheng RY, Zhang Q, Gao Y, Zhuo Q. China-made entecavir for treatment of chronic hepatitis B: A Meta-analysis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2028-2033 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2028.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2028

摘要

目的: 评价国产恩替卡韦(entecavir, ETV)对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)抗病毒治疗的疗效和安全性.

方法: 检索Medline、PubMed及中国期刊全文数据库, 中国生物医学文献数据库等中外文数据库临床对照试验, 检索年限从建库检索到2014-02, 并辅以文献追溯、手工检索等方法收集查阅文献. 凡评价国产ETV治疗CHB的临床随机对照研究, 无论语种均纳入, 采用χ^2检验分析研究间的异质性, 以相对危险度为疗效分析统计量进行合并研究, 对疗程进行亚组分析, 并绘制森林图.

结果: 共纳入临床随机对照试验6个, 包括587个患者, 试验组312例, 对照组275例. 国产ETV组与博路定组比较, 2组的谷丙转氨酶(alanine

aminotransferase, ALT)复常率、血清HBeAg阴转率、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)DNA阴转率及不良反应发生率的差异均无统计学意义(均P>0.1).

结论: 国产ETV在促使ALT回复正常水平、血清HBeAg阴转率、降低患者血清HBV DNA载量及不良反应发生方面与博路定两者相当, 是安全、有效的. 有必要展开更多高质量的临床随机对照研究, 进一步明确其疗效.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 恩替卡韦; 博路定; 慢性乙型肝炎; 抗病毒治疗; 疗效; 安全性; Meta分析

核心提示: 国产恩替卡韦(entecavir, ETV)在乙型肝炎病毒治疗指标及不良反应发生方面与进口博路定两者相当, 是安全、有效的. 今后有必要开展更多高质量、大样本、长期随访的临床随机对照研究为国产ETV的疗效和安全性提供更加充分的证据.

郑人源, 张琴, 高勇, 卓强. 国产恩替卡韦对慢性乙型肝炎抗病毒治疗的Meta分析. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2028-2033
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2028.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2028

0 引言

我国现有慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者约3000万例, 每年有近50万人死于CHB相关的肝衰竭、肝硬化和肝癌等疾病, 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是其主要的病因, 抗病毒治疗是其治疗的核心[1]. 恩替卡韦(entecavir, ETV), 由Bristol-Myers Squibb(美国百时美施贵宝公司)2005年获美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市, 2006年引进我国销售, 商品名为博路定(baraclude), 是一种具有很强的抗HBV作用的核苷类似物, 具有疗效好、耐药率低、不良反应小、安全性高等优点, 且疗效优于拉米夫定等一线药物, 近年在乙型肝炎的抗病毒治疗中被广泛使用并作为首选药物之一. 但对于大多数消费者而言, 博路定价格昂贵[2]. 近年来, 国内制药商已开始生产销售恩替卡韦, 价格相对较低廉, 但其治疗效果和安全性还有待考证. 本研究旨在通过系统评价和分析现有国产恩替卡韦治疗CHB的临床随机对照试验, 评价国产恩替卡韦对CHB抗病毒治疗的疗效和安全性.

1 材料和方法

1.1 材料 以英文关键词“chronic hepatitis B”, “entecavir”, “clinical trial”, “chinese”, “baraclude”等检索式在Medline、PubMed数据库、FMJS(EMCC)数据库中检索; 以“慢性乙型肝炎”、“临床试验”、“恩替卡韦”、“国产”、“博路定”等检索式在中国生物医学文献数据库(CBMDisc)、维普中文科技期刊全文数据库、中国期刊全文数据库检索. 检索年限均从建库到2014-02. 并检索近3年来国内外有关慢性乙型病毒性肝炎治疗的学术会议及论文集. 并严格按纳入和排除标准筛选.

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: 纳入同时符合以下条件的研究: (1)研究类型为随机对照临床试验(randomized controlled clinical trials, RCCT); (2)受试者为18岁以上成人, 乙型肝炎病史 6 mo以上, 诊断符合我国2011年《慢性乙型肝炎防治指南》[3]的诊断标准; (3)恩替卡韦用量为0.5 mg/d; 6 mo内未接受其他抗病毒药物治疗.

1.2.2 排除标准: (1)仅有摘要无全文的文献资料以及数据不完整无法利用的文献; (2)恩卡替韦联合其他药物治疗的文献, 未采用进口或合资恩卡替韦做对照的文献以及综述性的文献; (3)重复发表的文献, 雷同文献; (4)综述、短篇报道、自身对照试验以及不能提供全文的文献; (5)有其他肝炎病毒感染或人类免疫缺陷病毒感染, 以及有酒精性、自身免疫性肝炎或肝癌以及肝移植患者的研究文献.

1.2.3 评价标准: 所有文献的纳入由2名评价员独立进行, 然后交叉核对, 存在意见分歧时, 由第3名研究者参与决定纳入与否. 质量评价主要从是否采用随机分组、分配方案是否隐藏, 是否实施了盲法、是否报道了退出和失访、是否进行意向性分析、对比组间是否有可比性6个方面进行, 即Jadad质量评分法[4](1-2分为低质量研究, 3-5分为高质量研究). 资料提取包括研究的样本量、基本情况、干预措施、用药种类、剂量、疗程、随访时间、受试者特征[血清HBV DNA水平、血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)水平、血清HBeAg情况、不良反应]及结果. 所有评价指标均用治疗后到随访时间点的有效人数和受试对象总人数表示.

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的Revman 5.2软件进行系统评价, 采用相对危险度(relative risk, RR)为疗效分析统计量, 记录95%

■研发前沿
目前, 证明药物有效性和安全性最可靠的依据是临床随机对照试验的Meta分析, 国产ETV的疗效和安全性有待考证, 有必要通过Meta分析评价其疗效和安全性.

■相关报道
国产ETV上市以来，有关临床研究显示其疗效稳定，安全性好. 但各研究样本量不大，疗程及疗效结果不一，缺少对其疗效和安全性的系统评价.

表 1 纳入研究的基本情况

研究	n(试验组/对照组)	疗程	Jadad评分
徐星娥2012[6]	70(35/35)	16	3
李超群2012[7]	110(54/56)	48	2
李青2011[8]	46(23/23)	24	3
王建芳2013[9]	56(28/28)	48	3
谢益明2012[10]	240(140/100)	48	3
邬亚妙2013[11]	65(32/33)	16	3

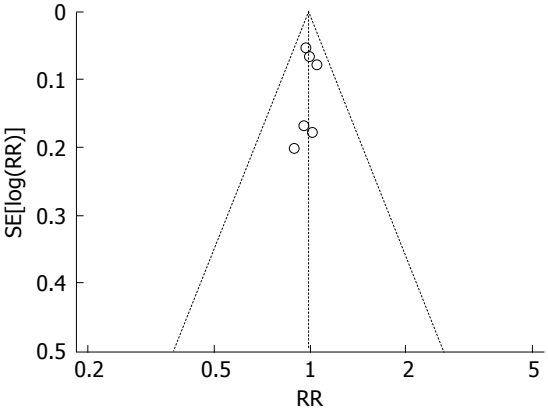


图 1 漏斗图. RR: 相对危险度.

可信区间(confidence interval, CI), 检验分析研究间的异质性, 并绘制森林图. 试验间异质性采用χ^2检验, P>0.1为研究间无统计学异质性. 根据美国医学会杂志(*JAMA*)建议的办法, 同时使用固定效应模型和随机效应模型计算合并统计量, 当组内各研究间无统计学异质性(P≥0.1, I^2≤50%)时, 采用固定效应模型, 若存在统计学异质性(P<0.1, I^2>50%)时, 分析可能产生临床异质性和统计学异质性的原因, 确定是否能采用随机效应模型[5].

2 结果

2.1 基本情况及研究方法学质量 初检文献119篇, 经过阅读摘要和全文, 排除重复文献, 按纳入和排除标准, 最终纳入6篇RCCT研究文献[6-11], 均为国内研究, 无符合标准的英文文献. 共587例患者, 试验组312例, 对照组275例, 所有受试对象的ALT均异常. 试验组均采用国产恩卡替韦片, 对照组均采用博路定(百时美施贵宝公司), 用药剂量均为常规剂量(0.5 mg/d). 6个RCCT文献中3个为短疗程(1个24 wk, 2个16 wk), 3个为常规疗程(48 wk), 研究的基本情况如表1. 对纳入研究中测量血清ALT复常指标的试验进行Egger回归分析, 并绘制漏斗图, 无明显不对称, 发表性偏倚不大(图1).

2.2 研究结果

2.2.1 ALT复常率: 纳入的6个RCCT研究[6-11]均报道了血清ALT复常, 各研究试验组间无统计学异质性(χ^2 = 1.05, P = 0. 96, P>0.1, I^2 = 0%, I^2<50%), 采用固定效应模型进行综合分析. 结果显示, 分别使用国产恩替卡韦和博路定治疗后, 血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 0.25, P>0.1); RR = 0.99. 因6个研究间存在疗程差异, 其中3个为短疗程(1个24 wk, 2个16 wk), 3个为常规疗程(48 wk). 故对纳入试验按疗程(短疗程和常规疗程)进行亚组分析. 短疗程和常规疗程各试验组间均无统计学异质性(P值分别为0.69和0.86). 合并分析后, 短疗程试验组和对照组血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 0.23, P>0.1); RR = 0.99, 常规疗程试验组和对照组血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 0.16, P>0.1); RR = 0.99(图2).

2.2.2 血清HBeAg阴转率: 有5个RCCT研究[6-10]报道了血清HBeAg阴转率, 各研究试验组间无统计学异质性(χ^2 = 0.83, P = 0. 93, P>0.1, I^2 = 0%, I^2<50%), 采用固定效应模型进行综合分析. 结果显示, 分别使用国产恩替卡韦和博路定治疗后, 血清HBeAg阴转率的差异无统计学意义(Z = 0.45, P>0.1); RR = 0.94. 因5个研究间存在疗程差异, 其中3个为短疗程(1个24 wk, 2个16 wk), 2个为常规疗程(48 wk). 故对纳入试验按疗程(短疗程和常规疗程)进行亚组分析. 短疗程和常规疗程各试验组间均无统计学异质性(P值分别为0.84和0.50). 合并分析后, 短疗程试验组和对照组血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 0.22, P>0.1); RR = 0.96, 常规疗程试验组和对照组血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 0.41, P>0.1); RR = 0.90(图3).

2.2.3 HBV DNA阴转率: 6个RCCT研究[6-11]均报道了血清HBV DNA阴转率, 各研究试验组间无统计学异质性(χ^2 = 0.37, P = 1.00, P>0.1, I^2 = 0%, I^2<50%), 采用固定效应模型进行综合分析. 结果显示, 分别使用国产恩替卡韦和博路定治疗

Study or Subgroup	Experimental Events	Experimental Total	Control Events	Control Total	Weight	Risk Ratio M-H, Fixed,95%CI
ETV 0.5 mg. *qd*, duration 24 wk or 16 wk						
徐星娥2012	23	35	24	35	12.9%	0.96[0.69, 1.33]
李青2011	22	23	21	23	11.3%	1.05[0.90, 1.22]
邬亚妙2013	30	32	32	33	17.0%	0.97[0.87, 1.08]
Subtotal(95%CI)		90		91	41.3%	0.99[0.88, 1.11]
Total events	75		77			
Heterogeneity: Chi^2 = 0.76, df = 2(P = 0.69); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.23(P = 0.82)						
ENV 0.5 mg. *qd*, duration 48 wk						
李超群2012	48	54	50	56	26.5%	1.00[0.87, 1.13]
王建芳2013	17	28	19	28	10.2%	0.89[0.60, 1.32]
谢益明2012	50	140	35	100	22.0%	1.02[0.72, 1.44]
Subtotal(95%CI)		222		184	58.7%	0.99[0.84, 1.16]
Total events	115		104			
Heterogeneity: Chi^2 = 0.29, df =2(P = 0.86); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.16(P = 0.87)						
Total(95%CI)		312		275	100.0%	0.99[0.89, 1.10]
Total events	190		181			
Heterogeneity: Chi^2 = 1.05, df = 5(P = 0.96); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.25(P = 0.81)						
Test for subgroup differences: Chi^2 = 0.00, df =1(P = 0.99); I^2 = 0%						

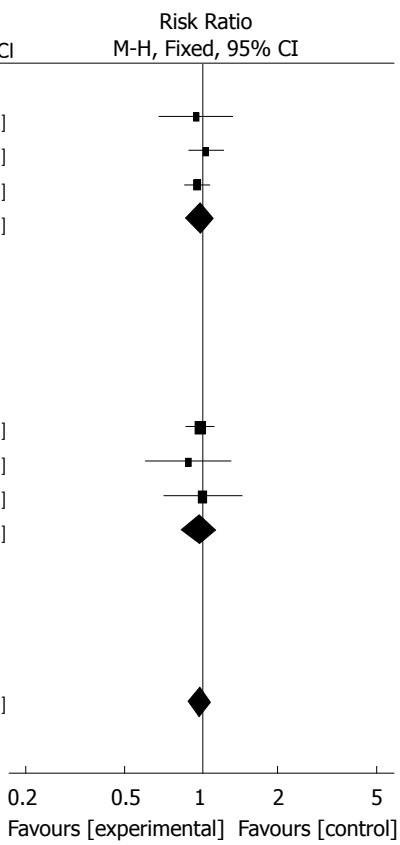


图 2 试验组与对照组血清ALT复常率的比较. ALT: 谷丙转氨酶.

Study or Subgroup	Experimental Events	Experimental Total	Control Events	Control Total	Weight	Risk Ratio M-H, Fixed,95%CI
ETV 0.5 mg. *qd*, duration 24 wk or 16 wk						
徐星娥2012	22	35	23	35	41.2%	0.96[0.67, 1.36]
李青2011	5	23	4	23	7.2%	1.25[0.38, 4.07]
邬亚妙2013	4	21	5	20	9.2%	0.76[0.24, 2.44]
Subtotal(95%CI)		79		78	57.6%	0.96[0.68, 1.36]
Total events	31		32			
Heterogeneity: Chi^2 = 0.34, df =2(P =0.84); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.22(P = 0.82)						
ETV 0.5 mg. *qd*, duration 48 wk						
李超群2012	18	54	19	56	33.4%	0.98[0.58, 1.66]
王建芳2013	3	28	5	28	9.0%	0.60[0.16, 2.27]
Subtotal(95%CI)		82		84	42.4%	0.90[0.55, 1.47]
Total events	21		24			
Heterogeneity: Chi^2 = 0.46, df =1(P = 0.50); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.41(P = 0.68)						
Total(95%CI)		161		162	100.0%	0.94[0.70, 1.25]
Total events	52		56			
Heterogeneity: Chi^2 = 0.83, df = 4(P = 0.93); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 0.45(P = 0.65)						
Test for subgroup differences: Chi^2 = 0.05, df = 1(P = 0.83); I^2 = 0%						

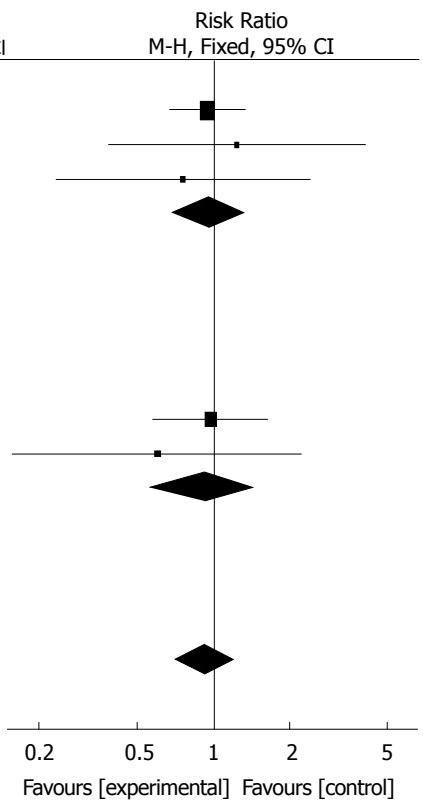


图 3 试验组与对照组血清HBeAg阴转率的比较.

■创新盘点

本研究严格按照Cochrane协作网推荐的系统评价步骤，纳入了6个国产ETV治疗CHB的临床随机对照试验，系统评价和分析了国产ETV治疗CHB的疗效和安全性.

■应用要点
ETV是目前乙肝抗病毒治疗中，高疗效低耐药且不良反应最小的药物，但价格昂贵，治疗中停药会影响疗效，甚至使病情进一步加重. 一些患者由于经济原因中断治疗得不偿失，国产ETV价格相对低廉，疗效和安全性与博路定相当，可作为CHB临床治疗的参考.

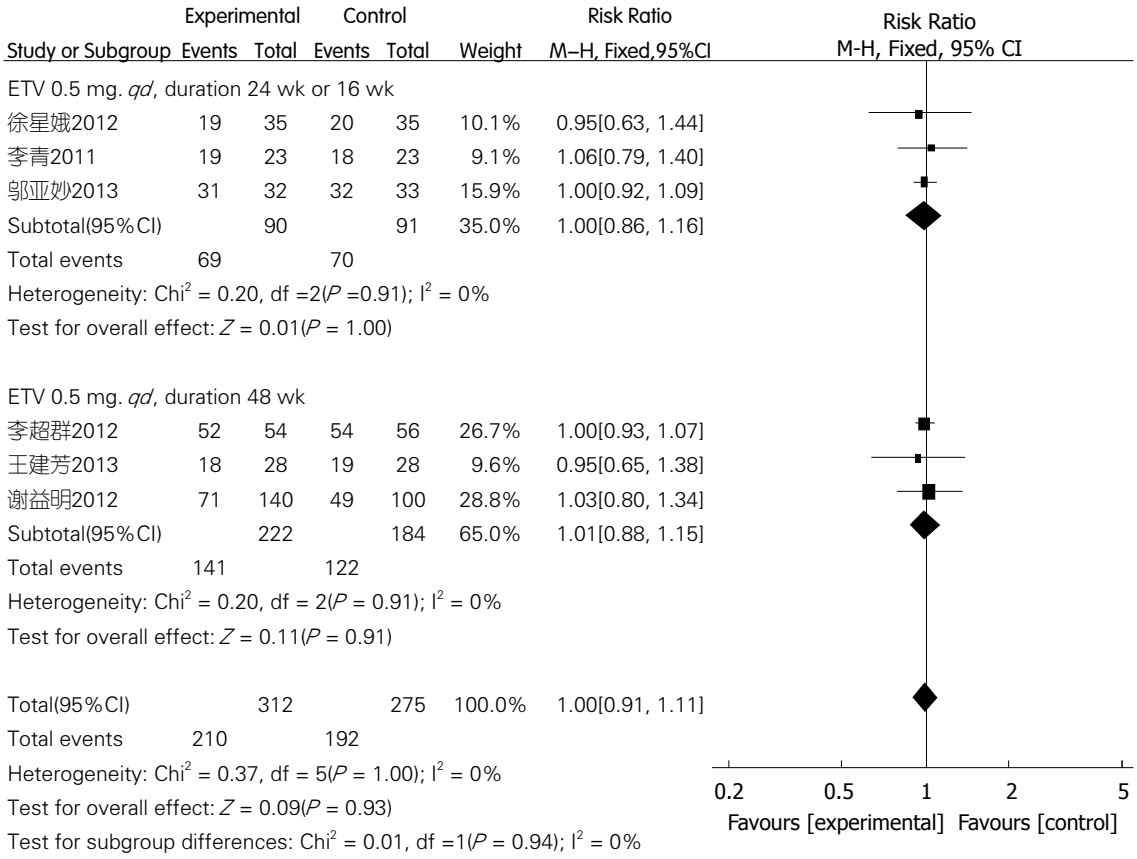


图 4 试验组与对照组HBV DNA阴转率的比较. HBV: 乙型肝炎病毒.

后，血清HBV DNA阴转率的差异无统计学意义(Z = 0.09, P>0.1); RR = 1.00. 因5个研究间存在疗程差异，其中3个为短疗程(1个24 wk, 2个16 wk), 3个为常规疗程(48 wk). 故对纳入试验按疗程(短疗程和常规疗程)进行亚组分析. 短疗程和常规疗程各试验组间均无统计学异质性(P值均为0.91). 合并分析后，短疗程试验组和对照组血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 0.01, P>0.1); RR = 1.00, 常规疗程试验组和对照组血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 0.11, P>0.1); RR = 1.01(图4).

2.2.4 不良反应: 有4个RCCT研究[6,9-11]报道了不良反应，各研究试验组间无统计学异质性(χ^2 = 1.87, P = 0.17, P>0.1, I^2 = 46%, I^2<50%), 采用固定效应模型进行综合分析. 结果显示，分别使用国产恩替卡韦和博路定治疗中出现不良反应的差异无统计学意义(Z = 0.50, P>0.1); RR = 1.31. 因4个研究间存在疗程差异，其中2个为短疗程(16 wk), 2个为常规疗程(48 wk). 故对纳入试验按疗程(短疗程和常规疗程)进行亚组分析. 短疗程试验组和对照组血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 1.30, P>0.1); RR = 4.12, 常规疗程试验组和对照组血清ALT复常率的差异无统计学意义(Z = 0.48, P>0.1); RR = 0.71. 4个试验中提及的不良反应主要是轻微腹痛、头痛、恶心，均未提及严重不良反应.

3 讨论

目前，CHB的治疗目标主要是抗HBV病毒，通过持续抑制HBV病毒复制，减少HBV突变，延缓疾病进展为失代偿性肝病、肝硬化或肝癌[12]. 恩替卡韦是一种新型抗HBV药物，是鸟嘌呤核苷类似物，他能作用于反转录酶和HBV DNA聚合酶，抑制病毒基因组RNA逆转录复制HBV DNA负链及正链的合成，从而阻止HBV DNA的装配和延伸，他能有效地选择性抑制HBV复制，阻断HBV DNA复制的全部3个阶段. 该药起效快，抗病毒活性强，变异率低，是目前强效低耐药的抗HBV药[13]，已作为乙型肝炎临床治疗的一线药物，临床研究表明，成人每日口服0.5 mg能有效抑制HBV DNA复制，疗效优于拉米夫定，且对发生YMDD变异者能有效抑制HBV DNA复制，对初治患者治疗1年时的耐药发生率为0[14]，中国国家食品药品监督管理总局(China Food

and Drug Administration, CFDA)也已批准其用于治疗CHB.

恩替卡韦(博路定)对乙型肝炎抗病毒治疗效果好, 不良反应少, 但价格较贵, 用其治疗的同时也给众多的国内CHB患者带来了经济负担. 近几年, 国产的恩替卡韦逐渐上市, 价格相对低廉, 为CHB患者的抗病毒治疗降低了较大的经济成本, 但对其疗效还没有明确的报道. 目前, 证明某种药物的有效性和安全性最可靠的依据是临床随机对照试验的Meta分析. 本研究从检索策略、纳入和排除标准、文献的质量评价、信息采集和统计分析, 都严格按照Cochrane协作网推荐的系统评价步骤进行, 以森林图显示分析结果. 共收集了2014-02之前国内外有关国产恩替卡韦治疗CHB的临床对照研究, 分析了ALT复常率、血清HBeAg阴转率、HBV DNA阴转率抗病毒治疗指标以及不良反应的发生情况, 评价国产恩替卡韦在不同疗程下的有效性和安全性. 纳入6个临床临床随机对照研究, 共587例受试患者, 样本量较大, 均为国内人群, 针对适用性强. Meta分析结果表明经同剂量同疗程国产恩替卡韦组与博路定组治疗后在CHB患者的ALT复常率、血清HBeAg阴转率、HBV DNA阴转率治疗指标以及不良反应的发生上均无显著差异. 绘制的漏斗图无明显不对称, 发表偏倚不大.

从现有资料和Meta分析结果来看, 国产恩替卡韦对CHB的抗病毒治疗的疗效和安全性与博路定相当. 博路定是四大口服核苷酸类抗病毒药物中价格最高的药物, 抗病毒活性强, 不良反应小, 耐药性低, 但若在治疗中盲目停药会造成病毒反弹, 影响治疗效果, 更有甚者会引起病情加重[15]. 一些患者由于经济原因在治疗一半时被迫停止抗病毒治疗, 得不偿失, 而国产恩替卡韦价格相对低廉, 经济适用, 为临床治疗提供参考. 但国产恩替卡韦上市时间较短, 本研究纳入的6个试验中, 高质量研究较少, 主要问题是部分试验样本量较小、试验疗程较短、未描述随机分配方案、研究对象退出及失访等. 因此, 尚需开展更多高质量、大样本、长期随访的临床随机对照研究为国产恩替卡韦的疗效和安全性提供更加充分的证据.

■同行评价
本文方法合理, 结果可信, 具有一定临床指导意义.

4 参考文献

1 邹俐, 郑萍, 侯连兵. 慢性乙型肝炎患者健康相关生命质量评价研究现状. 热带医学杂志 2012; 12: 112-115
2 刘士敬. 恩替卡韦是治疗乙肝的首选药物. 求医问药 2010; (11): 18-19
3 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
4 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12 [PMID: 8721797]
5 Cummings KJ, Lee SM, West ES, Cid-Ruzafa J, Fein SG, Aoki Y, Sulkowski MS, Goodman SN. Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: A meta-analysis of randomized trials. *JAMA* 2001; 285: 193-199 [PMID: 11176813 DOI: 10.1001/jama.285.2.193]
6 徐星娥, 邹林霞. 国产与进口恩替卡韦治疗病毒性乙型肝炎的药物经济学分析. 海峡药学 2012; 24: 247-248
7 李超群, 唐莉梅. 国产恩替卡韦分散片对慢性乙型肝炎初次抗病毒的疗效分析. 中国医药 2012; 7: 839-840
8 李青. 国产恩替卡韦治疗初治HBeAg阳性慢乙肝患者24周的早期临床疗效观察. 中国医疗前沿 2011; 6: 20-21
9 王建芳. 国产恩替卡韦与进口恩替卡韦的疗效分析. 实用医技杂志 2013; 20: 334-335
10 谢益明, 朱建荣, 周文光. 进口与国产恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎成本-效果分析. 医学理论与实践 2012; 25: 2438-2439
11 邬亚妙. 合资国产恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎的最小成本分析. 药学实践杂志 2013; 31: 388-389
12 Choe WH, Hong SP, Kim BK, Ko SY, Jung YK, Kim JH, Yeon JE, Byun KS, Kim KH, Ji SI, Kim SO, Lee CH, Kwon SY. Evolution of hepatitis B virus mutation during entecavir rescue therapy in patients with antiviral resistance to lamivudine and adefovir. *Antivir Ther* 2009; 14: 985-993 [PMID: 19918102 DOI: 10.3851/IMP1417]
13 Suh DJ, Um SH, Herrmann E, Kim JH, Lee YS, Lee HJ, Lee MS, Lee YJ, Bao W, Lopez P, Lee HC, Avila C, Zeuzem S. Early viral kinetics of telbivudine and entecavir: results of a 12-week randomized exploratory study with patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1242-1247 [PMID: 20028815 DOI: 10.1128/AAC.01163-09]
14 Chang TT, Lai CL, Kew Yoon S, Lee SS, Coelho HS, Carrilho FJ, Poordad F, Halota W, Horsmans Y, Tsai N, Zhang H, Tenney DJ, Tamez R, Iloeje U. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 51: 422-430 [PMID: 20049753 DOI: 10.1002/hep.23256]
15 李生英. 恩替卡韦停药不当致肝衰竭1例. 人民军医 2012; 55: 251

编辑 田滢 电编 都珍珍

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2034-2038
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

奥曲肽注射液联合前列地尔注射液在常规治疗肝硬化合并HES患者中的作用

刘 剑, 景照峰, 晏家华, 罗 敏, 胡 蓉

■背景资料
肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)是终末期肝病患者的严重并发症之一, 与肝硬化和门静脉高压有紧密联系, 属于进展性肾功能衰竭. 目前对于HRS的发病机制尚无明确研究结果, Ⅰ型HRS患者生存期较短, 在2 wk左右, Ⅱ型HRS患者的生存期月为6 mo, 患者死亡率较高. 目前临床上对HRS的发病机制尚无明确研究结果, 但多数专家认为该病与门静脉高压以及机体肝功能减退有紧密联系, 是上述因素导致患者血管舒张因子水平升高, 促进内脏血管舒张, 导致有效循环血容量减少, 交感神经系统和肾素血管紧张素醛固酮系统被激活, 患者肾内血管收缩导致肾脏血流灌注减少、肾小球滤过率下降, 最终引发肾功能衰竭.

■同行评议者
李涛, 副主任医师, 北京大学人民医院肝胆外科

刘剑, 景照峰, 晏家华, 罗敏, 胡蓉, 贵州省六盘水市人民医院肾内科 贵州省六盘水市 553001
刘剑, 副主任医师, 主要从事肝硬化合并肝肾综合征疾病的研究.
作者贡献分布: 此课题由刘剑设计; 研究过程由刘剑与景照峰完成; 数据分析由晏家华、罗敏及胡蓉完成; 写作由刘剑、景照峰、晏家华、胡蓉及罗敏共同完成.
通讯作者: 刘剑, 副主任医师, 553001, 贵州省六盘水市钟山西路56号, 六盘水市人民医院肾内科. 4962482@qq.com
收稿日期: 2014-01-15 修回日期: 2014-03-03
接受日期: 2014-03-18 在线出版日期: 2014-05-18

Therapeutic effects of octreotide combined with alprostadil on cirrhosis with hepatorenal syndrome

Jian Liu, Zhao-Feng Jing, Jia-Hua Yan, Min Luo, Rong Hu

Jian Liu, Zhao-Feng Jing, Jia-Hua Yan, Min Luo, Rong Hu, Department of Urology, Liupanshui People's Hospital, Liupanshui 553001, Guizhou Province, China
Correspondence to: Jian Liu, Associate Chief Physician, Department of Urology, Liupanshui People's Hospital, 56 Zhongshan West Road, Liupanshui 553001, Guizhou Province, China. 4962482@qq.com
Received: 2014-01-15 Revised: 2014-03-03
Accepted: 2014-03-18 Published online: 2014-05-18

Abstract
AIM: To explore the therapeutic effects of octreotide combined with alprostadil on cirrhosis with hepatorenal syndrome.

METHODS: Sixty patients with cirrhosis and hepatorenal syndrome were randomly divided into two groups: a control group and an experimental group. The control group was treated by conventional treatment, while the experimental group was additionally given octreotide combined with alprostadil on the basis of conventional treatment. The indexes of renal function, hemodynamic parameters, diameters of the portal vein and splenic vein, and clinical effects were compared.

RESULTS: In the experiment group, the levels of BUN and SCr were significantly lower (10.15 mmol/L ± 5.02 mmol/L *vs* 19.02 mmol/L ± 7.45 mmol/L, 136.13 μmol/L ± 18.62 μmol/L *vs* 211.42 μmol/L ± 17.66 μmol/L, $P < 0.05$) and the level of 24 h urine volume was significantly higher (1644.36 mL/d ± 178.30 mL/d *vs* 443.41 mL/d ± 77.88mL/d, $P < 0.05$) after treatment than before treatment. In the control group, the level of SCr was significantly lower (152.60 μmol/L ± 16.89 μmol/L *vs* 207.12 μmol/L ± 16.27 μmol/L, $P < 0.05$) and the level of 24 h urine volume was significantly higher (1207.26 mL/d ± 177.05 mL/d *vs* 459.51 mL/d ± 90.37mL/d, $P < 0.05$) after treatment than before treatment. The levels of BUN and SCr were significantly lower (10.15 mmol/L ± 5.02 mmol/L *vs* 15.72 mmol/L ± 7.71 mmol/L, 136.13 μmol/L ± 18.62 μmol/L *vs* 152.60 μmol/L ± 16.89 μmol/L, $P < 0.05$) and the level of 24 h urine volume was significantly higher (1644.36 mL/d ± 178.30 mL/d *vs* 1207.26 mL/d ± 177.05 mL/d, $P < 0.05$) in the experimental group than in the control group. There were no significant differences in the levels of MAP and HR between before and after treatment in both groups (78.45 mmHg ± 4.01 mmHg *vs* 76.44 mmHg ± 4.06 mmHg, 84.08/min ± 4.70/min *vs* 86.22/min ± 4.67/min, 78.53 mmHg ± 4.17 mmHg *vs* 78.22 mmHg ± 4.08 mmHg, 84.77/min ± 4.34/min *vs* 85.55/min ± 4.58/min, $P > 0.05$). The diameters of the portal vein and splenic vein were significantly lower (11.99 mm ± 1.33 mm *vs* 14.02 mm ± 1.37 mm, 8.16 mm ± 1.20 mm *vs* 10.65 mm ± 1.57 mm, 13.05 mm ± 1.16 mm *vs* 13.94 mm ± 1.27 mm, 9.36 mm ± 1.61 mm *vs* 10.50 mm ± 1.61 mm, $P < 0.05$) after treatment than before treatment in both groups. The diameters of the portal vein and splenic vein in the experiment group were significantly lower than those in the control group (11.99 mm ± 1.33 mm *vs* 13.05 mm ± 1.16 mm, 8.16 mm ± 1.20 mm *vs* 9.36 mm ± 1.61 mm, $P < 0.05$). The improvement rate and the total response rate in the experimental group were significantly higher than those in the control group (20.00% *vs* 6.67%, 83.33% *vs* 46.67%, $P < 0.05$), although there was no significant difference in mortality (6.67% *vs* 6.67%, $P > 0.05$).

CONCLUSION: Octreotide combined with alprostadil can improve renal function, reduce the portal pressure, has less impact on haemodynamics and high safety in patients with cirrhosis with hepatorenal syndrome.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Octreotide; Alprostadil; Cirrhosis; Hepatorenal syndrome

Liu J, Jing ZF, Yan JH, Luo M, Hu R. Therapeutic effects of octreotide combined with alprostadil on cirrhosis with hepatorenal syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2034-2038 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2034.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2034

摘要

目的: 探讨奥曲肽联合前列地尔治疗肝硬化并肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)的临床疗效.

方法: 按照随机数字表法将我院消化内科收治的60例肝硬化合并HRS患者均分为试验组和对照组, 两组患者均给予常规综合治疗, 试验组患者加用奥曲肽注射液联合前列地尔注射液治疗, 对照组患者加用前列地尔注射液治疗, 比较两组患者治疗前后肾功能指标、血流动力学水平、门静脉内径和脾静脉内径变化情况以及临床疗效.

结果: 试验组患者治疗后尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血肌酐(serum creatinine, SCr)水平明显降低, 24 h尿量明显增加, 与治疗前比较(10.15 mmol/L±5.02 mmol/L *vs* 19.02 mmol/L±7.45 mmol/L、136.13 μmol/L±18.62 μmol/L *vs* 211.42 μmol/L±17.66 μmol/L、1644.36 mL/d±178.30 mL/d, *vs* 443.41 mL/d±77.88 mL/d)差异具有统计学意义($P<0.05$); 对照组患者治疗后SCr水平明显降低, 24 h尿量明显增加, 与治疗前比较(152.60 μmol/L±16.89 μmol/L *vs* 207.12 μmol/L±16.27 μmol/L)、(1207.26 mL/d±177.05 mL/d *vs* 459.51 mL/d±90.37 mL/d), 差异具有统计学意义($P<0.05$); 试验组患者治疗后BUN和SCr水平明显低于对照组(10.15 mmol/L±5.02 mmol/L *vs* 15.72 mmol/L±7.71 mmol/L)、(136.13 μmol/L±18.62 μmol/L *vs* 152.60 μmol/L±16.89 μmol/L), 24 h尿量明显高于对照组, (1644.36 mL/d±178.30 mL/d, *vs* 1207.26 mL/d±177.05 mL/d)差异具有统计学意义($P<0.05$); 两组患者治疗前后平均动脉压(mean artery pressure, MAP)、心率(heart rate, HR)水平无明显变化(78.45 mmHg±4.01 mmHg *vs* 76.44 mmHg±4.06 mmHg)、(84.08次/min±4.70次/min *vs* 86.22次/min±4.67次/min), (78.53 mmHg±4.17 mmHg *vs* 78.22 mmHg±4.08 mmHg)、(84.77次/min±4.34次/min *vs* 85.55次/min±4.58次/min), 差异无统计学意义($P>0.05$); 两组患者治疗后门静脉内径和脾静脉内径均明显降低, 与治疗前比较(11.99 mm±1.33 mm *vs* 14.02 mm±1.37 mm)、(8.16 mm±1.20 mm *vs* 10.65 mm±1.57 mm), (13.05 mm±1.16 mm *vs* 13.94 mm±1.27 mm)、(9.36 mm±1.61 mm *vs* 10.50 mm±1.61 mm), 差异具有统计学意义($P<0.05$); 试验组患者治疗后门静脉内径和脾静脉内径均明显低于对照组(11.99 mm±1.33 mm *vs* 13.05 mm±1.16 mm)、(8.16 mm±1.20 mm *vs* 9.36 mm±1.61 mm), 差异具有统计学意义($P<0.05$); 试验组患者显效率和总有效率均明显高于对照组(20.00% *vs* 6.67%、83.33% *vs* 46.67%), 差异具有统计学意义($P<0.05$); 两组患者死亡率比较(6.67% *vs* 6.67%), 差异无统计学意义($P>0.05$).

结论: 奥曲肽联合前列地尔能够有效改善肝硬化并HRS患者肾功能、降低门静脉的压力, 对患者血流动力学影响小、安全性高, 是临床治疗的首选.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 奥曲肽; 前列地尔; 肝硬化; 肝肾综合征

核心提示: 本研究在白蛋白输注的基础上使用奥曲肽联合前列地尔治疗肝硬化合并肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS). 其中前列地尔为前列腺E1的脂微球载体制剂, 具有高效、持续、安全性高等优点, 能够有效改善肝硬化合并HRS患者血浆中肿瘤坏死因子-α和内毒素水平, 也能够保护肝细胞、抑制炎症反应及缓解平滑肌痉挛. 本研究中单用前列地尔注射液治疗组患者肾功能均有不同程度改善, 表明其具有改善HRS患者肾功能的作用, 与相关文献报道相符.

刘剑, 景照峰, 晏家华, 罗敏, 胡蓉. 奥曲肽注射液联合前列地尔注射液在常规治疗肝硬化合并HES患者中的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2034-2038 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2034.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2034

■研发前沿
HRS是在终末期肝病的基础上发生的功能性肾功能衰竭, 患者肾脏虽然并无器质性病理改变, 但由于病情严重且进展迅速, 预后效果不佳.

0 引言

肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)是终末

■相关报道
Nazar等的研究结果表明, 应用血管收缩药(奥曲肽、去甲肾上腺素、鸟氨加压素等)联合白蛋白临床疗效确切.

表 1 两组患者临床资料比较 (n = 30)

分组	性别		平均年龄(岁)	体质量(kg)	肝硬化病因			HRS类型	
	男	女			乙型	酒精性	其他	Ⅰ型HRS	Ⅱ型HRS
试验组	12	6	57.82 ± 8.13	24.13 ± 4.97	7	9	2	2	16
对照组	13	8	58.57 ± 8.76	24.77 ± 4.68	10	6	5	3	18

HRS: 肝肾综合征.

期肝病患者的严重并发症之一, 与肝硬化和门静脉高压有紧密联系, 属于进展性肾功能衰竭[1]. 目前对于HRS的发病机制尚无明确研究结果, Ⅰ型HRS患者生存期较短, 在2 wk左右, Ⅱ型HRS患者的生存期月为6 mo, 患者死亡率较高[2]. 临床研究表明, 血管收缩药物联合白蛋白对改善患者的生存情况具有显著效果[3]. 我院采用奥曲肽联合前列地尔治疗肝硬化合并HRS取得了良好的临床效果, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2011-10/2013-10我院收治的60例肝硬化合并HRS的患者作为研究对象. 所有患者均符合中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病学分会制定的《慢性乙型肝炎防治指南》[4]中肝硬化相关诊断标准和2010年欧洲肝脏研究协会制定的《肝硬化腹水、自发性细菌性腹膜炎、肝肾综合征临床实践指南》中HRS相关诊断标准[5]. 实验室检查显示血清肌酐水平高于133 μmol/L且停用利尿剂并给予白蛋白扩容治疗2 d以上无改善. 排除入选前4 wk内服用氨基糖苷类抗生素或两性霉素B等肾毒性药物治疗、合并肾实质性疾病以及妊娠期患者. 按照随机数字表法将60例患者均分为试验组和对照组, 两组患者在性别、年龄、体质量、肝硬化病因及HRS类型等差异无统计学意义(P>0.05)(表1), 具有可比性. 所有患者均签署知情同意书. 奥曲肽注射液购自瑞士Novartis Pharma AG公司(批准文号H20020229, 0.1 mg/mL/支), 前列地尔注射液购自北京泰德制药有限公司[国药准字H10980023, 10 μg/(2 mL•支)].

1.2 方法

1.2.1 治疗: 两组患者均给予常规综合治疗, 包括保肝、利尿、抗感染、营养支持治疗及人血白蛋白静脉输入(10 g/d)[6]. 试验组患者加用奥曲肽注射液联合前列地尔注射液治疗, 奥曲肽注射液肌注100 μg/次, 每次间隔8 h, 前列地尔注射液静脉推注, 10 μg/次, 1次/d; 对照组患者加用前列地尔注射液治疗, 用药方法和剂量与试验组相同. 两组患者均连续治疗2 wk, 观察临床疗效.

1.2.2 观察指标: 比较两组患者治疗前后肾功能指标[尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血肌酐(serum creatinine, SCr)、24 h尿量, 酶法]、血流动力学水平[平均动脉压(mean artery pressure, MAP)、心率(heart rate, HR), 无创血流动力学检测仪]、门静脉内径和脾静脉内径(彩色多普勒超声诊断仪)变化情况以及临床疗效.

1.2.3 疗效评价标准: 显效: 血肌酐水平下降50%以上或恢复正常; 有效: 血肌酐水平下降20%-50%; 无效: 血肌酐水平下降低于50%. 总有效 = 显效+有效[7].

统计学处理 本研究数据均采用SPSS18.0进行统计学处理, 计量资料采用mean±SD表示, 差异性比较使用t检验, 记数资料比较使用χ^2检验, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 两组患者治疗前后肾功能指标变化情况比较 试验组患者治疗后BUN和SCr水平明显降低, 24 h尿量明显增加, 与治疗前比较, 差异具有统计学意义(P<0.05); 对照组患者治疗后SCr水平明显降低, 24 h尿量明显增加, 与治疗前比较, 差异具有统计学意义(P<0.05); 试验组患者治疗后BUN和SCr水平明显低于对照组, 24 h尿量明显高于对照组, 差异具有统计学意义(P<0.05)(表2).

2.2 两组患者治疗前后血流动力学水平变化情况比较 两组患者治疗前后MAP、HR水平无明显变化, 差异无统计学意义(P>0.05)(表3).

2.3 两组患者治疗前后门静脉内径和脾静脉内径变化情况比较 两组患者治疗后门静脉内径和脾静脉内径均明显降低, 与治疗前比较, 差异具有统计学意义(P<0.05); 试验组患者治疗后门静脉内径和脾静脉内径均明显低于对照组, 差异具有统计学意义(P<0.05)(表4).

表 2 两组患者治疗前后肾功能指标变化情况比较 (n = 30)

分组	BUN(mmol/L)		SCr(μmol/L)		24 h尿量(mL/d)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
试验组	19.02 ± 7.45	10.15 ± 5.02[bc]	211.42 ± 17.66	136.13 ± 18.62[bc]	443.41 ± 77.88	1644.36 ± 178.30[bc]
对照组	18.66 ± 8.15	15.72 ± 7.71	207.12 ± 16.27	152.60 ± 16.89[b]	459.51 ± 90.37	1207.26 ± 177.05[b]

[b]P<0.01 *vs* 同组治疗前; [c]P<0.05 *vs* 对照组. BUN: 尿素氮; SCr: 血肌酐.

表 3 两组患者治疗前后血流动力学水平变化情况比较 (n = 30)

分组	MAP(mmHg)		HR(次/min)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
试验组	76.44 ± 4.06	78.45 ± 4.01	86.22 ± 4.67	84.08 ± 4.70
对照组	78.22 ± 4.08	78.53 ± 4.17	85.55 ± 4.58	84.77 ± 4.34

MAP: 平均动脉压; HR: 心率.

表 4 两组患者治疗前后门静脉内径和脾静脉内径变化情况比较 (n = 30, mm)

分组	门静脉内径		脾静脉内径	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
试验组	14.02 ± 1.37	11.99 ± 1.33[ac]	10.65 ± 1.57	8.16 ± 1.20[ac]
对照组	13.94 ± 1.27	13.05 ± 1.16[a]	10.50 ± 1.61	9.36 ± 1.61[a]

[a]P<0.05 *vs* 同组治疗前; [c]P<0.05 *vs* 对照组.

表 5 两组患者临床疗效比较 [n = 30, n(%)]

分组	显效	有效	无效	总有效	死亡
试验组	6(20.00)[a]	19(63.33)	5(16.67)[a]	25(83.33)[a]	2(6.67)
对照组	2(6.67)	12(40.00)	16(53.33)	14(46.67)	2(6.67)

[a]P<0.05 *vs* 对照组.

■应用要点
奥曲肽联合前列地尔能够有效改善肝硬化并HRS患者肾功能、降低门静脉的压力，对患者血流动力学影响小、安全性高，是临床治疗的首选.

2.4 两组患者治疗前后临床疗效比较 试验组患者显效率和总有效率均明显高于对照组，差异具有统计学意义(P<0.05)；试验组患者死亡2例，均为多脏器功能衰竭致死，对照组患者死亡2例，1例为多脏器功能衰竭致死，1例为病情突然加重、食管胃底静脉曲张破裂出血致死. 两组患者死亡率比较，差异无统计学意义(P>0.05)(表5). 两组患者均未发生明显不良反应.

3 讨论

HRS是在终末期肝病的基础上发生的功能性肾功能衰竭，患者肾脏虽然并无器质性病理改变，但由于病情严重且进展迅速，预后效果不佳[8]. 目前临床上对HRS的发病机制尚无明确研究结果，但多数专家认为该病与门静脉高压以及机体肝功能减退有紧密联系，是上述因素导致患者血管舒张因子水平升高，促进内脏血管舒张，导致有效循环血容量减少，交感神经系统和肾素血管紧张素醛固酮系统被激活，患者肾内血管收缩导致肾脏血流灌注减少、肾小球滤过率下降，最终引发肾功能衰竭[9].

Nazar等[10]的研究结果表明，应用血管收缩药(奥曲肽、去甲肾上腺素、鸟氨加压素等)联合白蛋白临床疗效确切. 血管收缩药物的作用机制主要为用药后患者内脏血管收缩，促使有效循环血容量增加，抑交感神经系统和肾素血

■同行评价
本研究选题尚可，治疗方法具体，有一定的临床参考价值.

管紧张素醛固酮系统活性以及抑制抗利尿激素分泌，改善肾脏血流灌注和肾小球滤过率[11]. 应用血管收缩药不仅能够改善患者肾功能，还可以延长患者的生存期，改善预后效果，因此发达国家将其广泛应用于肝移植之前的过渡治疗[12].

本研究在白蛋白输注的基础上使用奥曲肽联合前列地尔治疗肝硬化合并HRS. 其中前列地尔为前列腺E1的脂微球载体制剂，具有高效、持续、安全性高等优点，能够有效改善肝硬化合并HRS患者血浆中肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和内毒素水平[13]，也能够保护肝细胞、抑制炎症反应及缓解平滑肌痉挛[14]. 本研究中单用前列地尔注射液治疗组患者肾功能均有不同程度改善，表明其具有改善HRS患者肾功能的作用，与相关文献报道相符.

奥曲肽为人工合成的生长抑素类似物，能够通过抑制胰高血糖素释放预防患者餐后门静脉高压和肝血流量升高的发生[15]；能够降低肝内血流阻力，改善门脉压力；还可直接作用于血管平滑肌，诱导肠系膜血管收缩；另外其对内皮素ET-1的血管收缩作用也有一定增强效果[16]，尤其适用于肝硬化门静脉高压患者. 本研究结果显示，奥曲肽和前列地尔联合治疗组在改善患者肾功能上效果更优于单用前列地尔组，表明奥曲肽能够进一步改善患者肾功能. 本研究中两组患者血流动力学水平均未发生明显改变，表明两种药物安全性较高.

总之，奥曲肽联合前列地尔能够有效改善肝硬化并HRS患者肾功能、降低门静脉的压力，对患者血流动力学影响小、安全性高，是临床治疗的首选. 但本研究优于入选样本基数较小且临床疗效也仅分析了治疗后2 wk内的近期疗效，因此研究也具有一定局限性. 今后需要增加研究样本数量进行前瞻性研究，以进一步探讨奥曲肽和前列地尔联合治疗肝硬化并HRS的远期疗效以及预后效果.

4 参考文献

1 董建平, 田国保, 谢雯, 张维燕, 张黔英, 曾争. 终末期肝病肾脏损坏的临床与病理关系. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2184-2187

2 倪燕娜, 郭传勇. 肝肾综合征早期诊断和预后评估研究进展. 胃肠病学和肝病学杂志 2011; 20: 975-978

3 钟晓琴, 周飞. 血管活性物质与肝肾综合征发病机制的研究进展. 实用心脑肺血管病杂志 2013; 21: 3-5

4 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 肝脏 2011; 16: 02-16

5 冯鑫, 闫杰. 2010年欧洲肝脏研究协会《肝硬化腹水、自发性细菌性腹膜炎、肝肾综合征临床实践指南》简介. 胃肠病学和肝病学杂志 2011; 20: 291-294

6 Wong F, Raina N, Richardson R. Molecular adsorbent recirculating system is ineffective in the management of type 1 hepatorenal syndrome in patients with cirrhosis with ascites who have failed vasoconstrictor treatment. *Gut* 2010; 59: 381-386 [PMID: 19710033 DOI: 10.1136/gut.2008.174615]

7 Saracyn M, Patera J, Kocik J, Brytan M, Zdanowski R, Lubas A, Kozłowski W, Wańkowicz Z. Strain of experimental animals and modulation of nitric oxide pathway: their influence on development of renal failure in an experimental model of hepatorenal syndrome. *Arch Med Sci* 2012; 8: 555-562 [PMID: 22852015 DOI: 10.5114/aoms.2012.29281]

8 傅强, 唐彤宇. 肝肾综合征的研究进展. 临床肝胆病杂志 2010; 26: 557-560

9 郭莲怡, 刘沛. 肝肾综合征肾血管收缩机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 982-986

10 Nazar A, Pereira GH, Guevara M, Martín-Llahi M, Pepin MN, Marinelli M, Solá E, Baccaro ME, Terra C, Arroyo V, Ginès P. Predictors of response to therapy with terlipressin and albumin in patients with cirrhosis and type 1 hepatorenal syndrome. *Hepatology* 2010; 51: 219-226 [PMID: 19877168 DOI: 10.1002/hep.23283]

11 Ni J, McLoughlin RM, Brodovitch A, Moulin P, Brouckaert P, Casadei B, Feron O, Topley N, Balligand JL, Devuyst O. Nitric oxide synthase isoforms play distinct roles during acute peritonitis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 86-96 [PMID: 19706695 DOI: 10.1093/ndt/gfp415]

12 Gluud LL, Christensen K, Christensen E, Krag A. Systematic review of randomized trials on vasoconstrictor drugs for hepatorenal syndrome. *Hepatology* 2010; 51: 576-584 [PMID: 19885875 DOI: 10.1002/hep.23286]

13 肖倩, 张旸, 谭善忠. 温肾利水法联合前列地尔治疗肝硬化并发肝肾综合征29例. 临床肝胆病杂志 2012; 28: 189-191

14 Narahara Y, Kanazawa H, Sakamoto C, Maruyama H, Yokosuka O, Mochida S, Uemura M, Fukui H, Sumino Y, Matsuzaki Y, Masaki N, Kokubu S, Okita K. The efficacy and safety of terlipressin and albumin in patients with type 1 hepatorenal syndrome: a multicenter, open-label, explorative study. *J Gastroenterol* 2012; 47: 313-320 [PMID: 22038555 DOI: 10.1007/s00535-011-0485-8]

15 巩林强, 汪素文, 曹晔华, 王倩, 张化岭. 奥曲肽联合前列地尔治疗肝硬化并肝肾综合征的疗效观察. 中华医学会第十六次全国病毒性肝炎及肝病学术会议论文汇编, 2013: 383

16 余春四, 程家亮. 奥曲肽联合前列地尔治疗肝肾综合征38例疗效观察. 九江学院学报(自然科学版) 2013; 22: 82-83

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2039-2044
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

射波刀联合TACE治疗原发性肝癌108例

陈 樱, 朱 俊, 张火俊, 张晓青, 居小萍, 卢明智, 刘永明, 曹洋森, 于春山, 王晓艳

陈樱, 张火俊, 张晓青, 居小萍, 卢明智, 刘永明, 曹洋森, 于春山, 王晓艳, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院放疗科 上海市 200433
朱俊, 张火俊, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院放射科 上海市 200433
朱俊, 江苏省如皋市城西医院 江苏省南通市 226500
陈樱, 住院医师, 主要从事射波刀在体部恶性肿瘤治疗中的临床应用与基础研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81171435
上海高校青年教师培养资助计划基金资助项目, No. 沪教委人201187
上海长海医院"1255"学科建设计划基金资助项目, No. CH125520800
作者贡献分布: 陈樱参与射波刀治疗、资料收集及论文撰写; 朱俊参与介入治疗、临床资料随访和收集、及论文撰写; 张火俊进行课题指导、介入治疗、射波刀治疗及论文审校; 张晓青、居小萍及卢明智参与射波刀治疗计划及临床随访; 刘永明、曹洋森及于春山参与射波刀治疗物理计划制定及实施; 王晓艳参与资料收集及统计分析.
通讯作者: 张火俊, 副教授, 副主任医师, 200433, 上海市长海路168号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院放疗科. chyyzhj@163.com
收稿日期: 2013-09-18 修回日期: 2014-02-23
接受日期: 2014-02-28 在线出版日期: 2014-05-18

Short-term effects of cyberknife combined with TACE for treatment of primary liver cancer

Ying Chen, Jun Zhu, Huo-Jun Zhang, Xiao-Qing Zhang, Xiao-Ping Ju, Ming-Zhi Lu, Yong-Ming Liu, Yang-Sen Cao, Chun-Shan Yu, Xiao-Yan Wang

Ying Chen, Huo-Jun Zhang, Xiao-Qing Zhang, Xiao-Ping Ju, Ming-Zhi Lu, Yong-Ming Liu, Yang-Sen Cao, Chun-Shan Yu, Xiao-Yan Wang, Department of Radiation Oncology, Shanghai Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Jun Zhu, Huo-Jun Zhang, Department of Radiology, Shanghai Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Jun Zhu, Chengxi Hospital, Rugao City, Jiansu Province, Nantong 226500, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81171435; the Training Project for Young Teachers in Shanghai Colleges and Universities, No. 201187; and the 1255 Academic Discipline Project of Shanghai Changhai Hospital, No. CH125520800
Correspondence to: Huo-Jun Zhang, Department of Radiology, Shanghai Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, 168 Changhai Road, China. chyyzhj@163.com
Received: 2013-09-18 Revised: 2014-02-23
Accepted: 2014-02-28 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To evaluate the short-term clinical effects and adverse reactions of cyberknife combined with transarterial chemoembolization (TACE) for the treatment of primary liver cancer.

METHODS: The medical records for 108 patients with primary liver cancer who received cyberknife and TACE between January 2012 and May 2013 were retrospectively reviewed. Patient demographics, tumor characteristics, treatment details and post-treatment complications were recorded for each patient.

RESULTS: There were 96 males and 12 females. Intra-arterial chemoembolization and cyberknife (DT 35-60 Gy/3-6 fraction/3-7 d) were performed successfully, resulting in a substantial reduction or complete disappearance of tumors in nearly all patients, with a total effective rate (CR + PR + SD) of 100%. No major complications were encountered.

CONCLUSION: Cyberknife combined with TACE for the treatment of primary liver cancer is effective with mild adverse reactions.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Primary liver cancer; Cyberknife; TACE

Chen Y, Zhu J, Zhang HJ, Zhang XQ, Ju XP, Lu MZ, Liu YM, Cao YS, Yu CS, Wang XY. Short-term effects of cyberknife combined with TACE for treatment of primary liver cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2039-2044 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2039.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2039

摘要

目的: 观察射波刀联合经肝动脉化疗栓塞术(transarterial chemoembolization, TACE)治疗原发性肝癌的近期临床疗效和不良反应.

方法: 回顾性分析2012-01/2013-05采用TACE及射波刀联合治疗的108例肝癌患者的临床资

■背景资料
我国是肝癌的高发区, 不适合手术治疗的中晚期患者或术后复发的患者需依靠综合治疗. 经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是肝癌综合治疗的重要手段之一并得到了广泛应用, 但TACE仍然存在治疗不彻底、容易复发等不足. 近年来, 临床研究的方向之一是将其他一些治疗方法与TACE相结合以提高肝癌综合治疗疗效.

■同行评议者
麻勇, 副研究员, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝脏外科

■研发前沿
TACE联合放疗以提高疗效近年来得到逐步地重视, 但普通放疗疗程长、定位欠精确、对肝功能的可能影响较大. 射波刀是一种新型的立体定向放射外科治疗系统, 其独有的呼吸同步追踪功能与金标植入相结合可以对肿瘤和治疗区进行准确定位追踪, 有效地克服了其他放疗技术的不足. 由于射波刀应用于临床的时间尚不长, 其联合TACE治疗肝癌的优缺点值得临床深入研究.

料, 并对其疗效和不良反应进行分析.

结果: 纳入本组分析的108例患者中男性96例, 女性12例, 男女比例8∶1; 患者年龄32-85岁(平均年龄52.6岁). 所有患者在射波刀治疗前接受过1-11次TACE治疗(平均2.3次), 末次TACE与射波刀治疗间隔14-84 d(平均32 d); 射波刀治疗剂量: DT 35-60 Gy/3-6 Fraction 3-7 d; 随访时间3-19 mo(平均12.8 mo). 随访期内, 完全缓解(complete response, CR)20例、部分缓解(partial response, PR) 70例、病灶稳定(stable disease, SD) 18例, 治疗近期有效率(CR+PR)83.3%, 临床受益率(CR+PR+SD) 100%; 108例患者中65例射波刀治疗前血清AFP>400 μg/L的病例治疗后1-12 wk AFP值下降>50%者42例, 其中降至正常范围者28例, 治疗过程中及治疗后无3级以上不良反应.

结论: 射波刀联合TACE术治疗原发性肝癌近期疗效明确, 且不良反应较轻, 是肝癌综合治疗的安全、有效模式, 其长期疗效及副反应需要进一步研究.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 原发性肝癌; 射波刀; TACE

核心提示: 经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是治疗肝脏恶性肿瘤的常用手段之一, 但单纯采用TACE只能使很少一部分肝癌得到根治, 而多数情况下肿瘤很难完全坏死或治疗后一段时间后便出现复发, 射波刀可以利用软件和硬件的优势有效地提高部分肝癌患者的综合治疗效果.

陈樱, 朱俊, 张火俊, 张晓青, 居小萍, 卢明智, 刘永明, 曹洋森, 于春山, 王晓艳. 射波刀联合TACE治疗原发性肝癌108例. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2039-2044 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2039.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2039

0 引言

我国是原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)的高发区, 全球约一半以上的肝癌患者在中国. 早期肝癌的治疗以手术为主, 中晚期患者或术后复发的患者则有赖于其他一些综合治疗. 经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是肝癌综合治疗的重要手段之一并得到了广泛应用, 但TACE仍然存在治疗不彻底、容易复发等不足[1,2]. 因此, 将其他一些治疗方法与TACE相结合以提高肝癌综合治疗疗效得到越来越多的重视. TACE联合放疗是临床探索的方向之一[3,4]. 近年来, 射波刀做为体部立体定向放疗的先进技术在临床得到逐步推广, 但其与TACE联合治疗肝癌的研究尚少有报道[5,6]. 本文回顾性分析了射波刀联合TACE治疗原发性肝癌的临床价值, 报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2012-01/2013-05在长海医院放疗科(射波刀中心)行射波刀治疗的原发性肝癌患者108例. 入组对象: 符合以下条件者纳入本文回顾性分析: (1)经病理或临床诊断为原发性肝癌并且影像学表现为结节型或块型. 临床诊断标准为: AFP≥400 μg/L, 能排除妊娠、生殖系统胚胎源性肿瘤、活动性肝病、转移性肝癌, CT或MRI检查中一种有肝癌特征的占位性病变者; AFP<400 μg/L, 能排除妊娠、生殖系统胚胎源性肿瘤、活动性肝病及转移性肝癌, 并有两种影像学检查有肝癌特征的占位性病变; (2)在射波刀治疗前至少进行过1次TACE治疗, 包括因TACE效果欠理想或TACE后患者及家属要求行射波刀治疗者; (3)射波刀治疗后随访期不低于3 mo, 随访期内至少有一次可评估的影像学检查(CT或MR); (4)射波刀治疗后未再采取手术、射频等可能局部根治的治疗方案, 也未口服疗效明确的分子靶向药物如索拉非尼等. 完全缓解(complete response, CR)20例、部分缓解(partial response, PR)70例、病灶稳定(stable disease, SD).

1.2 方法

1.2.1 分析内容: 包括一般临床资料、TACE治疗具体方法、射波刀治疗具体参数、临床实验室检查、影像学检查、治疗后不良反应及并发症等.

1.2.2 评价标准: 参照WHO制定的实体瘤疗效评价标准. 射波刀治疗后1-6 mo, CT或MR复查, 肿瘤完全消失者为CR, 肿瘤最大直径乘积缩小>50%者为PR, 缩小<50%、增大<25%为SD, 较治疗前肿瘤增大>25%为进展(progressive disease, PD). 射波刀治疗前影像学富血供病灶部分采用2008年美国肝病研究会及国家癌症协会杂志(AASLD-JNCI)修订版RECIST(mRECIST)标准判断疗效. 安全性评价参照WHO制定的不良反应分级标准.

2 结果

2.1 患者一般情况 2012-01/2013-05在长海医院放疗科接受射波刀治疗的各类原发性肝癌患者

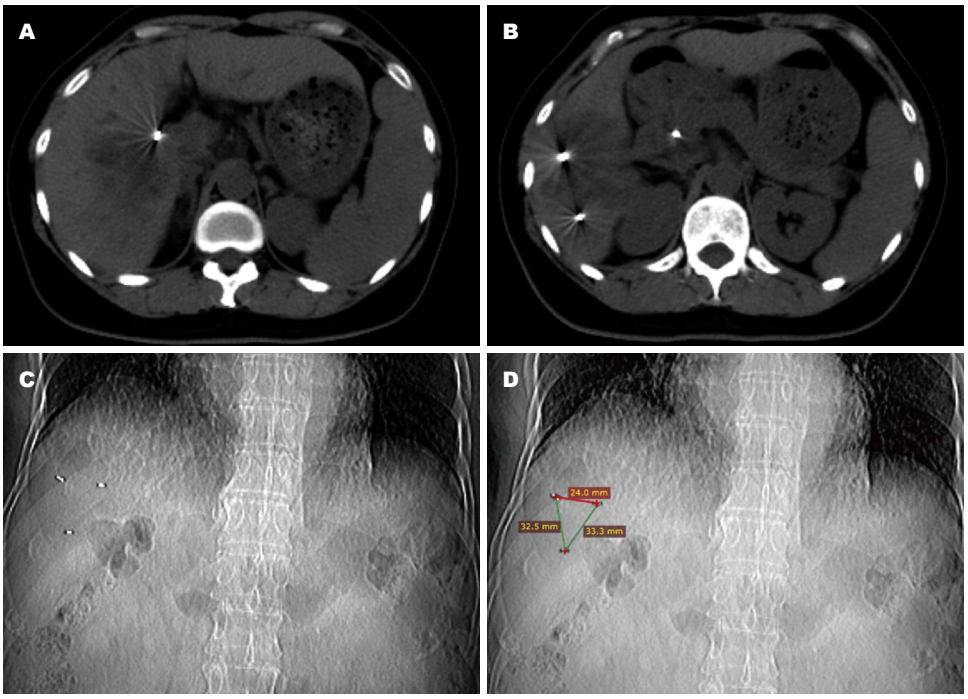


图 1 金标置放实例. A, B: 在肿瘤边缘2 cm内置放3枚金标; C, D: 相互之间距离不小于2 cm.

136例, 符合本研究纳入条件进行回顾性分析的患者108例. 其中男性96例、女性12例, 男女比例为8∶1; 年龄32-85岁, 平均52.6岁; 射波刀治疗前接受TACE治疗1-11次(平均2.3次); 接受射波刀治疗时肝功能Child分级A级100例, B级8例; 影像学分型均为结节型或肿块型, 可评估病灶数量1-3个; 所有患者在接受放疗时KPS评分均不低于70分.

2.2 *治疗方法及参数*

2.2.1 TACE术: 腹股沟穿刺点区消毒、局部麻醉后采用Seldinger技术经皮穿刺股动脉插管至腹腔动脉, 行腹腔干造影, 了解血管解剖和肿瘤供血等情况后超选至肿瘤供血动脉(其中29例患者采用3 F微导管进行荷瘤动脉超选择性插管)行灌注化疗和栓塞术. 化疗药物(2-3种联合用药): 吡柔比星20-40 mg, 5-氟尿嘧啶500-1500 mg, 羟基喜树碱10-30 mg, 奥沙利铂50-150 mg. 栓塞剂为超液化碘油5-14 mL(部分肿块型病例加用适量明胶海绵补充栓塞). 相邻两次TACE间隔时间为6-9 wk. 末次TACE与射波刀治疗间隔14-84 d, 平均32 d.

2.2.2 *射波刀治疗*: 108例患者中有76例在治疗前7-14 d于CT引导下在肝肿瘤附近3 cm范围内植入1-4枚金标(平均2.2枚)(图1), 治疗前CT平扫及增强定位, 层距1.5 mm, 使用G4型射波刀, TPS 4.0.2版本设计治疗计划, 治疗剂量: 35-60 Gy/3-6 Fx/3-7 d(其中96例采用5次分割), 处方剂量线范围为68.1%-82.3%. 植入金标的患者采用呼吸同步及金标追踪技术, 其余32例患者中12例采用脊柱追踪技术, 20例膈下病灶者采用XSIGHT-LUNG追踪方法.

2.2.3 *临床其他治疗*: 射波刀治疗期间针对不同患者予止吐、保肝、抑酸及胃黏膜保护剂等处理.

2.3 *疗效及不良反应*

2.3.1 *疗效观察*: 射波刀治疗前65例患者血清AFP>400 μg/L, 治疗后1-12 wk AFP值下降>50%者42例, 其中降至正常范围者28例, AFP值下降20%-50%者21例. 治疗后1-6 mo复查动态增强CT或MR, 按照疗效评价标准标准, 全组108例患者CR 20例, 其中包括经1-2次TACE治疗后因相对乏血供而介入效果欠佳的小肝癌5例(图2); PR 70例; SD 18例, 治疗CR+PR 83.3%, 临床受益率(CR+PR+SD)100%.

2.3.2 *不良反应*: 治疗期间54例(50%)患者出现一过性乏力, 63例(58.3%)出现1-2级胃肠道反应(恶心、呕吐、纳差、腹泻等), 经对症及支持治疗后症状在1-2 wk内明显缓解或消失; 39例患者出现Ⅰ-Ⅱ度骨髓抑制, 经口服或皮下应用升白药后恢复正常. 除5例患者因上述不良反应强烈要求暂停1-2 d治疗外其余病例均未影响正常治疗. 射波刀治疗后除11例患者肝功能一过性升高(8例转氨酶升高、3例总胆红素升高)外其余患

■相关报道

鉴于TACE治疗肝癌很难达到彻底控制肿瘤的效果, 很多学者近年来在积极尝试其他方法联合TACE以进一步提高肝癌综合治疗疗效, 比如TACE联合射频治疗、冷冻治疗、电化学治疗、无水乙醇消融等等, 取得了较好的临床效果. 放疗作为可能的手段之一与TACE联合治疗肝癌也得到了初步的研究, 调强放疗能提高肝癌的综合治疗疗效已得到初步肯定, 但近年来出现的以影像引导下精确放疗为代表的先进放疗技术如射波刀等在肝癌综合治疗过程中的作用尚未得到应有的充分研究.

■创新盘点

本回顾性研究基于较多病例数(108例)的随访发现射波刀做为一种先进的立体定向放疗技术联合TACE可以提高原发性肝癌的疗效,部分患者中短期可以达CR的治疗效果,而不良反应较轻,说明射波刀联合TACE是治疗肝癌的有效手段,但相关研究较少,其长期疗效及联合治疗后可能产生的远期并发症尚需要进一步的研究.

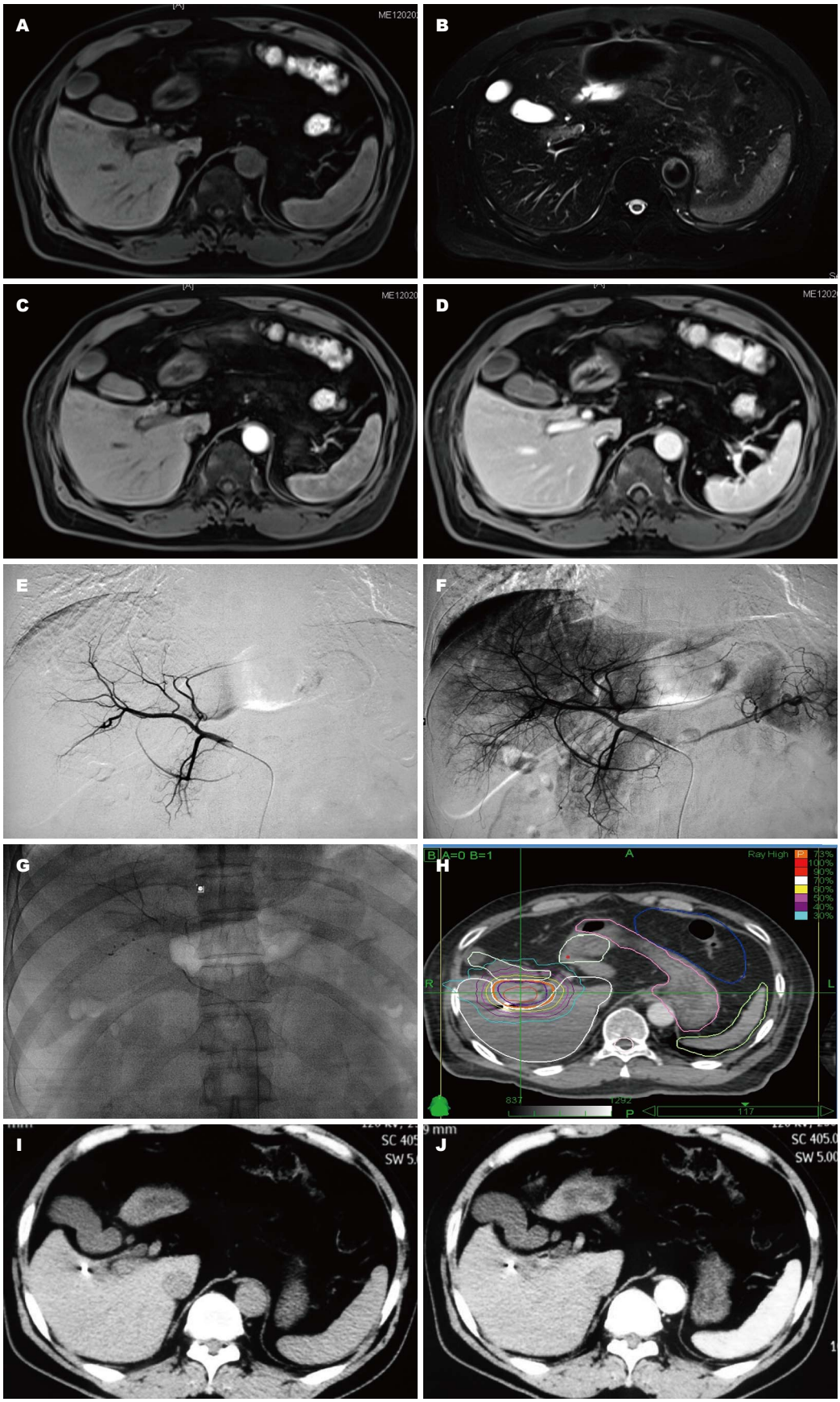


图 2 典型病例. 男, 62岁, 体检发现肝占位, AFP 980 μg/L. MR T1WI示肝右叶门脉右支前方近胆囊处肝实质异常信号影, 大小约7 mm×21 mm. A: T1WI为低信号; B: T2WI为高信号; C: 增强后动脉期明显强化; D: 门脉期强化退出; E: 行TACE治疗时造影示动脉早期肿瘤染色不明显; F: 动脉晚期隐约可见; G: 碘油沉积欠理想; H: 1 mo后因AFP下降不明显(730 ng/mL), 家属要求行射波刀治疗. 植入金标后射波刀计划: 9 Gy×5 Fx, 以73%等剂量线计算; I: 治疗后AFP进行性下降. 1年后AFP 3.6 ng/mL, CT平扫示原肿瘤消失, 局部肝组织明显萎缩; J: 增强后未见异常强化.

者肝功能治疗前后无显著变化, 无上消化道穿孔、出血或肝功能衰竭等严重并发症发生.

3 讨论

原发性肝癌在我国是常见恶性肿瘤之一, 自1976年Goldstein首先报道TACE治疗肝脏恶性肿瘤后逐步成为治疗肝癌的常用手段之一, 对部分中晚期患者及术后复发的患者采用TACE治疗已得到广泛的认可[7]. 但是, 单纯采用TACE只能使很少一部分肝癌得到根治, 而多数情况下肿瘤很难完全坏死或治疗后一段时间后便出现复发, 主要原因有: (1)肝癌供血动脉经TACE治疗后部分病灶易形成侧枝循环从而导致局部控制失败; (2)部分病灶栓塞剂(比如碘化油)用量不足, 经血流冲刷后肿瘤血管栓塞不彻底从而致局部活性残留或复发, 这种现象在肿瘤周边更常见; (3)部分病灶为相对乏血供, 即使采用微导管超选后加压栓塞的技术亦很难使碘化油在肿瘤内得到很好的聚集; (4)TACE治疗后会刺激EGFR的分泌从而导致肿瘤新生血管的形成[8].

鉴于TACE治疗的局限性, 越来越多的学者近年来在积极探讨其他方法联合TACE以提高肝癌综合治疗效果, 比如TACE联合射频治疗、冷冻治疗、电化学治疗、放疗(包括外照射及内照射)、无水乙醇消融等等, 取得了较好的临床效果[9,10].

射波刀, 又称“立体定位射波手术平台”, 曾被称为“网络刀”或“电脑刀”, 是一种新型的立体定向放射外科治疗系统, 由美国斯坦福大学John Alder教授发明, 属于影像引导下精确放射治疗, 于2001年获得FDA认证后逐步在世界各大医疗中心或医院得到推广应用. 射波刀是目前为止世界上唯一一套整合机器人技术和影像引导自动摆位的治疗系统, 他在影像引导系统的实时监控下, 将质量仅150 kg、能发出6 MV X线的微型医用直线加速器与具有六个自由度关节的机械手臂相结合, 根据立体定向原理, 使用大剂量、低分割(通常为1-5次)、窄束高能X射线准确聚焦照射靶区, 使之产生强烈局部放射生物学反应, 达到肿瘤消融的目的. 射波刀产生的X线能以12种不同直径(5-60 mm)、从100个节点、1200个方向中选择最合适的100-250个方向的射束聚焦照射肿瘤. 由于射束精准、分散, 高剂量的分布按肿瘤轮廓高度适形和高度均匀地涵盖治疗靶区, 并且靶区附近的射线剂量急速下降, 可以起到最大程度消灭肿瘤和最大限度保护周围正常组织(或危及器官)的作用, 具有很高的治疗增益比. 具有“三无”(无创、无痛、无血)、”三非”(非等中心、非共面、非聚焦)、”三精”(精确定位、精确引导、精确治疗)的特点, 安全、有效, 患者容易接受. 自射波刀应用临床后, 其优异的性能在很多实质性器官恶性肿瘤的治疗中得到了验证[11].

由于肝脏肿瘤随呼吸运动移位明显, 普通的放疗很难进行精确的定位和出束治疗, 而射波刀独有的呼吸同步追踪功能与金标植入相结合可以对肿瘤和治疗区进行准确定位追踪, 治疗过程中可以按照设定的频率自动对靶区移位作修正, 总体临床治疗精度可达0.95 mm[12]. 为了定位精确, 最好在肝脏肿瘤周围植入金标不少于3枚并且相互之间的距离不少于2 cm.

目前, 射波刀在原发性肝癌及转移性肝癌的治疗已得到认可, 但射波刀联合TACE治疗肝癌的成果尚少有报道[5]. 本研究表面, 射波刀和TACE联合能够起到优势互补的作用从而提升肝癌的综合治疗效能. 可能的主要原因是: (1)TACE治疗通过栓塞化疗可使肿瘤缩小、负荷下降, 缩小放疗范围; (2)TACE后由于碘油的沉积使得肿瘤靶区的边缘更加清晰, 靶区勾画更加精确. 对于发生肝内播散的肝癌患者, 由于播散病灶小, 在放射治疗时模拟CT机扫描很难发现, TACE后由于碘油沉积可避免在勾画靶区时遗漏这些病灶, 从而提高治疗效果, 当然对多个(3个以上)病灶进行射波刀治疗的临床经验尚很有限, 需要进一步探讨, 本组病例肝内病灶均在3个以内; (3)TACE治疗时通常将化疗药物与碘油混合振荡形成悬液后注入肿瘤供血动脉, 化疗药物能较长时间滞留于肿瘤中, 这一方面能持续发挥化疗药物的抗肿瘤作用, 同时介入治疗时常用的化疗药物如氟尿嘧啶类化疗药等能对放射治疗起增敏作用; 而化疗也可以使肿瘤细胞周期同步化, 有利于射线对肿瘤的杀灭[13]; (4)由于正常肝组织放疗耐受性差, 过量射线照射后易导致肝功能损害甚至肝纤维化, 常规外照射很难给予肝癌根治剂量, 仅能起到抑制肿瘤作用, 疗效不明显, 而射波刀由于具有在线校位、实时跟踪的特点, 对周围肝组织的影响小, 可以在充分保护肿瘤周围正常肝组织的前提下增加肿瘤的照射剂量, 提高治疗效果, 本组病例肿瘤照射的生物有效剂量BED除个别患者外均在80 Gy以上; (5)射波刀可以破坏肿瘤血管, 或可以降低

■应用要点

本文的研究结果对肝癌综合治疗提供了一个新的选择, 对一些TACE术后活性残留或乏血供肝癌患者可以有效提高治疗效果, 但射波刀设备昂贵、治疗费用亦较高, 在一定程度会影响其临床推广. 在实际治疗过程中, 适应症的掌握、治疗参数的优化、严重并发症的预防是需要高度注意的内容.

■同行评价
本文对肝癌综合治疗有一定临床指导意义.

TACE后门静脉供血及代偿性供血的几率从而降低TACE后复发概率; (6)虽然原发性肝癌尤其是肝细胞肝癌多为富血供肿瘤但仍有一部分病例相对乏血供而使介入治疗时碘油充盈不良影响疗效, 射波刀在这部分的病例应用可以明显提高肿瘤局部控制率[14-16], 本组有5例BCLC-I期的相对乏血供肝癌1-2次TACE后发现碘油沉积不理想及时联合射波刀取得了良好的效果; (7)肝癌的综合治疗有利于提高效果, 射波刀由于单次剂量大、治疗时间短(本组最长治疗时间为7 d, 绝大多数在5 d内), 一般不会在时间上影响其他治疗手段的应用; (8)射波刀治疗肝癌每次治疗时间在30-90 min之间, 治疗中采用真空垫等无创伤体位固定装置, 患者无特殊不适, 治疗依从性高, 不会对患者心理产生过大压力; (9)短期内反复多次进行TACE治疗无疑会对肝功能造成较大影响, 对一些多次TACE治疗后效果欠佳的结节性肝癌患者及时联合射波刀治疗可以避免不必要的肝功能损伤. 为了有利于肝功能恢复. 当然, TACE治疗后需要一段时间待肝功能恢复后再行射波刀治疗, 本组患者多在末次TACE结束后4 wk左右进行射波刀治疗.

本回顾性研究发现, 射波刀做为一种先进的立体定向放疗技术联合TACE可以提高原发性肝癌的疗效, 部分患者中短期可以达CR的治疗效果, 而不良反应较轻, 说明射波刀联合TACE是治疗肝癌的有效手段, 但其长期疗效及联合治疗后可能产生的远期并发症尚需要进一步研究.

4 参考文献

1 常宗宏, 汪泳, 吴汉平. 肝癌的综合治疗及肿瘤抗血管联合疗法. 世界华人消化杂志 2012; 20: 385-388

2 李臻, 张文广, 韩新巍. 原发性肝细胞癌介入治疗的现状与进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 221-226

3 Zhao JD, Liu J, Ren ZG, Gu K, Zhou ZH, Li WT, Chen Z, Xu ZY, Liu LM, Jiang GL. Maintenance of Sorafenib following combined therapy of three-dimensional conformal radiation therapy/intensity-modulated radiation therapy and transcatheter arterial chemoembolization in patients with locally advanced hepatocellular carcinoma: a phase I/II study. *Radiat Oncol* 2010; 5: 12 [PMID: 20149262 DOI: 10.1186/1748-717X-5-12]

4 Kong M, Hong SE, Choi WS, Choi J, Kim Y. Treatment outcomes of helical intensity-modulated radiotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Gut Liver* 2013; 7: 343-351 [PMID: 23710317 DOI: 10.5009/gnl.2013.7.3.343]

5 Dewas S, Bibault JE, Mirabel X, Fumagalli I, Kramar A, Jarraya H, Lacornerie T, Dewas-Vautravers C, Lartigau E. Prognostic factors affecting local control of hepatic tumors treated by Stereotactic Body Radiation Therapy. *Radiat Oncol* 2012; 7: 166 [PMID: 23050794 DOI: 10.1186/1748-717X-7-166]

6 Shen ZT, Wu XH, Li B, Wang L, Zhu XX. Preliminary efficacy of CyberKnife radiosurgery for locally advanced pancreatic cancer. *Chin J Cancer* 2010; 29: 802-809 [PMID: 20800022 DOI: 10.5732/cjc.010.10112]

7 Si Y, Hu X, Du H, Lou W, Zhang H, Cao F, Yu W, Wang W, Jin K. Transarterial chemoembolization for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a retrospective study of a 5-year experience in a single institution. *Hepatogastroenterology* 2013; 60: 1405-1408 [PMID: 23933931]

8 王滨, 徐辉, 曹贵文, 孙业全, 于德新, 宁厚法. 肝动脉化疗栓塞对肝癌肿瘤新生血管生成及血管内皮细胞生长因子表达的影响. 中华放射学杂志 2005; 39: 204-206

9 Liao M, Huang J, Zhang T, Wu H. Transarterial chemoembolization in combination with local therapies for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8: e68453 [PMID: 23844203 DOI: 10.1371/journal.pone.0068453]

10 Ni JY, Liu SS, Xu LF, Sun HL, Chen YT. Meta-analysis of radiofrequency ablation in combination with transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 3872-3882 [PMID: 23840128 DOI: 10.3748/wjg.v19.i24.3872]

11 Ding C, Solberg TD, Hrycushko B, Xing L, Heinzerling J, Timmerman RD. Optimization of normalized prescription isodose selection for stereotactic body radiation therapy: conventional vs robotic linac. *Med Phys* 2013; 40: 051705 [PMID: 23635253 DOI: 10.1118/1.4798944]

12 Ozhasoglu C, Saw CB, Chen H, Burton S, Komanduri K, Yue NJ, Huq SM, Heron DE. Synchrony--cyberknife respiratory compensation technology. *Med Dosim* 2008; 33: 117-123 [PMID: 18456163 DOI: 10.1016/j.meddos.2008.02.004]

13 Seong J, Kim SH, Suh CO. Enhancement of tumor radioresponse by combined chemotherapy in murine hepatocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 883-889 [PMID: 11555102 DOI: 10.1046/j.1440-1746.2001.02533.x]

14 冷祝强, 梁赵玉, 石栅, 胡自省. 肝癌介入治疗放射治疗及综合治疗的疗效分析. 中华放射肿瘤学杂志 2000; 9: 99-101

15 赵景胜, 陈群, 向志碧, 涂向阳. 肝动脉栓塞化疗联合三维适形放疗治疗原发性肝癌的临床分析. 肿瘤基础与临床 2010; 23: 487-489

16 Zhou ZH, Liu LM, Chen WW, Men ZQ, Lin JH, Chen Z, Zhang XJ, Jiang GL. Combined therapy of transcatheter arterial chemoembolisation and three-dimensional conformal radiotherapy for hepatocellular carcinoma. *Br J Radiol* 2007; 80: 194-201 [PMID: 17038412 DOI: 10.1259/bjr/33521596]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2045-2048
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

妊娠合并急性胰腺炎的临床特点

喻 研, 但自力

喻研, 但自力, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
喻研, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的临床研究.
作者贡献分布: 但自力设计课题、提供病例及修改论文; 喻研调整课题、收集数据、统计分析及撰写论文.
通讯作者: 但自力, 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消化内科. dzlzg7061@qq.com
电话: 027-83663333
收稿日期: 2014-02-12 修回日期: 2014-03-25
接受日期: 2014-04-03 在线出版日期: 2014-05-18

Clinical characteristics of acute pancreatitis in pregnancy

Yan Yu, Zi-Li Dan

Yan Yu, Zi-Li Dan, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Zi-Li Dan, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. dzlzg7061@qq.com
Received: 2014-02-12 Revised: 2014-03-25
Accepted: 2014-04-03 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To summarize the clinical characteristics of acute pancreatitis in pregnancy (APIP).

METHODS: Clinical data for 31 cases of APIP (group A) and 36 cases of acute pancreatitis (AP) in non-pregnant females (group B) in the same period were retrospectively analyzed to compare the etiology, clinical characteristics and treatment measures.

RESULTS: The great majority of APIP occured in the late trimester of pregnancy. The main etiologies in patients of groups A and B included hyperlipidemia (45.2% *vs* 22.2%, $P < 0.05$), biliary system diseases (22.6% *vs* 47.2%, $P < 0.05$) and binge overeating (19.4% i 2.7%, $P < 0.05$). The percentage of severe cases in group A was significantly higher than that in group B (45.2% *vs* 19.4%, $P < 0.05$). The incidences of shock, renal insufficiency, multiple organ failure, pancreatic pseudocyst, acute respiratory failure and pancreatic abscess in group A were significantly higher than those in group B (25.8% *vs* 8.3%, 22.6% *vs* 5.6%, 16.1% *vs* 2.8%, 16.1% *vs* 2.8%, 16.1% *vs* 2.8%, 9.7% *vs* 2.8%, $P < 0.05$ for all). The incidences of hypertriglyceridemia, hypocalcemia, anemia, and hyperglycemia in group A were also significantly higher than those in group B (45.2% *vs* 22.2%, 67.7% *vs* 36.1%, 64.5% *vs* 9.7%, 32.3% *vs* 11.1%, $P < 0.05$ for all). Somatostatin was given to 14 severe cases of APIP, of which 4 and 2 accepted continuous veno-venous hemofiltration (CVVH) because of hypertriglyceridemia and renal insufficiency, respectively. Babies of these pregnant women showed no obvious abnormality. In group A, 2 cases suffered from threatened abortion and gave up the babies, 12 cases underwent uterine-incision delivery, 6 cases had spontaneous delivery, and 1 case underwent cholecystectomy. After the delivery, the patients' conditions were improved. All babies and mothers were alive. In group B, 4 cases were operated because of gallstone pancreatitis and 2 cases died.

CONCLUSION: The great majority of APIP occurs in the late trimester of pregnancy. The major causes of APIP are hyperlipidemia and biliary system diseases. Severe cases are more common in APIP patients. Choosing the suitable time to use somatostatin and CVVH or to end the pregnancy can improve the prognosis of both infants and pregnant women in severe cases of APIP.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Acute pancreatitis; Pregnancy; Etiology; Treatment

Yu Y, Dan ZL. Clinical characteristics of acute pancreatitis in pregnancy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2045-2048
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2045.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2045

摘要

目的: 研究妊娠合并急性胰腺炎(acute pan-

■背景资料
妊娠合并急性胰腺炎(acute pancreatitis in pregnancy, APIP)是一种严重的妊娠并发症, 如果诊治不及时, 孕产妇及围产儿病死率高, 严重威胁母婴健康.

■同行评议者
郭晓钟, 教授, 沈阳军区总医院消化内科

■研发前沿
近年来的研究表明妊娠期女性生理机能的变化对胰腺炎的发生有促进作用，同时胎儿的存在又给治疗增加了困难，分析APIP的临床特点、治疗效果及预后对指导治疗有重要的意义.

creatitis in pregnancy, APIP)的临床特点以指导治疗.

方法: 收集我院同期31例APIP(A组)和36例未孕女性急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)(B组)的病例资料，对比分析二者的病因、临床特征及治疗特点.

结果: 大多数APIP发生在妊娠晚期. A、B两组患者的病因分别为：高脂血症(45.2% *vs* 22.2%)、胆系疾病(22.6% *vs* 47.2%)、暴饮暴食(19.4% *vs* 2.7%)(P<0.05). A组中重型胰腺炎的比例显著高于B组(45.2% *vs* 19.4%, P<0.05). A组中休克、肾功能不全、多器官功能衰竭、胰腺假性囊肿、急性呼吸衰竭和胰腺脓肿的发生率显著高于B组(25.8% *vs* 8.3%、22.6% *vs* 5.6%、16.1% *vs* 2.8%、16.1% *vs* 2.8%、16.1% *vs* 2.8%和9.7% *vs* 2.8%, P<0.05). A组高甘油三酯血症、低钙血症、贫血、高血糖的发生率显著高于B组(45.2% *vs* 22.2%、67.7% *vs* 36.1%、64.5% *vs* 9.7%、32.3% *vs* 11.1%, P<0.05). A组中14例重型AP患者使用生长抑素，其中4例因高脂血症、2例因肾功能不全行连续性静脉-静脉血液滤过(continuous veno-venous hemofiltration, CVVH)治疗. 这些产妇所生的胎儿未见明显异常. A组中2例先兆流产后行人工流产，12例行剖宫产，6例顺产，1例行胆囊切除术. 终止妊娠后患者的胰腺炎病情好转. A组孕妇和所有出生胎儿均存活. B组4例胆源性胰腺炎行手术. B组死亡2例，余病例预后良好.

结论: APIP主要发生在妊娠晚期，主要病因为高脂血症和胆系疾病，其中重症型APIP比例显著高于非妊娠AP组. 对于重症APIP适时使用生长抑素、血液净化治疗及终止妊娠有利于改善母婴预后.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 急性胰腺炎; 妊娠; 病因; 治疗

核心提示: 妊娠合并急性胰腺炎主要发生在妊娠晚期，主要病因为高脂血症和胆系疾病，易重症化，对于重症患者可以使用生长抑素和血液净化治疗，适时终止妊娠有利于改善母婴预后.

喻研，但自力. 妊娠合并急性胰腺炎的临床特点. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2045–2048 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2045.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2045

■相关报道
最新的文献表明血液净化治疗能迅速有效地降低APIP患者的血甘油三酯水平，减少相关致死性并发症的风险.

0 引言

妊娠合并急性胰腺炎(acute pancreatitis in pregnancy, APIP)是一种严重的妊娠并发症，如果诊治不及时，孕产妇及围产儿病死率高，严重威胁母婴健康. 妊娠使女性的生理机能发生很大变化的同时胎儿的存在又给治疗增加了困难，APIP的临床特点和治疗策略与非妊娠急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)相比有所不同，目前相关报道较少. 本文旨在通过对比分析二者的临床特点为APIP的治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 研究组(A组)为2005-01/2011-01武汉同济医院收治的31例APIP患者，年龄20-40岁，平均27.87岁±4.75岁. 发病时孕期小于12 wk 1例，12-27 wk 3例，28 wk以上24例，产褥期3例. 对照组(B组)为36例同期住院的同年龄组非妊娠女性AP患者，平均30.75岁±5.17岁. 所有患者均无心、肺、肝、肾及内分泌疾病史，A组无其他妊娠并发症. 两组患者的年龄无统计学意义(P>0.05).

1.2 方法 APIP诊断标准参照2013-04制定的中国急性胰腺炎诊治指南的标准[1]. 分析两组病例的病因种类，轻、重症的构成比及并发症的发生率，血液生化指标(如血常规、血糖、血脂、血清钙离子浓度)，药物、血液净化治疗和产科处理的效果和母婴预后的特点.

统计学处理 用SPSS13.0统计学软件进行分析，采用χ^2检验和t检验，P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 病因 A组病因分别为：高脂血症14例(45.2%)，胆系疾病7例(22.6%)(胆石症5例、胆囊蛔虫1例、胆囊炎1例)、暴饮暴食6例(19.4%)，不明诱因4例(12.9%). B组病因分别为：胆系疾病17例(47.2%)(胆石症13例、胆囊炎4例)，高脂血症8例(22.2%)，饮酒5例(13.9%)，暴饮暴食1例(2.7%)，不明诱因5例(13.9%). 高脂血症、胆系疾病、暴饮暴食在两组中的构成比不同，差异具有显著统计学意义(P<0.05).

2.2 临床特点 A组重型AP 14例，轻型17例；B组重型AP 7例，轻型29例，两组比较P<0.05. A组并发症有：休克25.8%(8/31)、肾功能不全22.6%(7/31)、多器官功能衰竭16.1%(5/31)、胰腺假性囊肿

表 1 两组异常指标的比较 (mean ± SD)

指标	A组	B组
血红蛋白(g/L)	99.5 ± 5.3	104 ± 5.5
血钙(mmol/L)	1.94 ± 0.16	1.94 ± 0.12
血糖(mmol/L)	14.5 ± 3.9	8.9 ± 2.4[a]
甘油三酯(mmol/L)	14.3 ± 4.5	10.7 ± 2.4[a]

[a]$P<0.05$ *vs* A组. A组: 研究组; B组: 对照组.

16.1%(5/31)、急性呼吸衰竭16.1%(5/31)和胰腺脓肿9.7%(3/31). B组并发症有: 休克8.3%(3/36)、肾功能不全5.6%(2/36)、多器官功能衰竭2.8%(1/36)、胰腺假性囊肿2.8%(1/36)、急性呼吸衰竭2.8%(1/36)和胰腺脓肿2.8%(1/36). 各并发症的发生率在两组间比较$P<0.05$.

2.3 实验室检查 A组高甘油三酯血症14例(45.2%)、低钙血症21例(67.7%)、贫血20例(64.5%)、高血糖10例(32.3%). B组高甘油三酯血症8例(22.2%)、低钙血症13例(36.1%)、贫血3例(9.7%)、高血糖4例(11.1%). 上述指标异常的发生率和异常绝对值在两组间的差异有显著统计学意义($P<0.05$)(表1).

2.4 *治疗方法和预后* B组常规给予禁食、胃肠减压、生长抑素、制酸剂、补液和对症支持治疗, 感染者给予抗菌药物治疗. A组给予抗生素(有感染征象者)和制酸剂, 14例重型AP患者加用生长抑素(施他宁), 其中4例因高脂血症、2例因肾功能不全行连续性静脉-静脉血液滤过治疗, 3例使用BiPAP呼吸机辅助通气. 此外, A组中2例患者先兆流产, 遂放弃胎儿后行内镜下逆行胰胆管造影术加胆管取石术, 病情稳定后行人工流产, 其中1例因合并胆囊炎随后择期行胆囊切除术; 18例孕晚期APIP患者适时终止妊娠(12例行剖宫产、6例顺产)后AP的病情明显减轻; 8例在AP好转后继续妊娠至足月再分娩. A组孕妇均存活, 出生胎儿均存活(Apgar评分8-10分), 其中使用过生长抑素和血液净化治疗的孕妇所产婴儿随访3-6 mo未发现其存在明显的发育畸形或生长异常. B组4例胆源性胰腺炎行手术. B组死亡2例(1例合并冠心病、1例并发多器官功能衰竭), 余病例预后良好.

3 讨论

本研究中APIP的主要病因为高脂血症, 其次为胆系疾病. APIP多发生在妊娠晚期, 其中重型APIP比例显著高于非妊娠AP组, 对于重型APIP使用生长抑素和血液净化治疗效果好, 且未发现其对胎儿存在不良影响. 适时终止妊娠有利于改善母婴预后.

本组资料表明APIP的首要病因是高脂血症(45.2%), 其次为胆系疾病(22.6%), 与Li等[2]报道一致, 而非妊娠组主要病因为胆系疾病. 由于妊娠期受激素的影响, 加上大量高脂、高糖饮食, 引起血脂及血液黏稠度升高, 微循环障碍, 从而导致高脂血症性胰腺炎的发生率有增加趋势[3,4]. 胆系疾病是普通AP的最常见的病因. 孕期雌激素水平增高使胆汁中胆固醇的浓度增高, 孕激素水平增高使胆囊排空时间延长, 进而促进胆固醇沉淀形成结石. 因此, 胆系疾病是APIP的第2大病因[5].

APIP多发生于妊娠晚期(71.4%, 10/14), 其中重型AP的比例较非妊娠组AP显著增高, 其休克、肾功能不全、多器官功能衰竭、胰腺假性囊肿和胰腺脓肿等并发症均较非妊娠组AP增多, 与文献[6-8]报道一致. 这可能与妊娠促进AP的病理生理过程有关: (1)妊娠期胎盘激素对平滑肌的抑制作用致使肠道平滑肌处于低动力状态, 致使肠道菌群移位和肠源性内毒素的吸收, 加重多器官功能障碍综合征; (2)妊娠期各器官负荷增加, 对损伤的耐受能力降低. 妊娠晚期腹腔压力增加, 导致肺容积缩小, 肾脏灌注减少, 更易并发呼吸衰竭和肾功能不全; (3)孕妇存在不同程度的贫血, 增大的子宫压迫胰腺, 加重了胰腺的缺血、缺氧, 促进了AP的发生和发展; (4)胎盘催乳素有明显的促脂肪分解作用, 甘油三酯分解释放大量游离脂肪酸, 引起胰腺小动脉的脂肪栓塞, 加重了胰腺的缺血坏死, 故胰腺假性囊肿的发生率增加[9].

出于对胎儿安全性的考虑, APIP患者的治疗有特殊性. 生长抑素能抑制促胰酶的分泌, 是治疗AP的重要药物. 对于普通AP常规使用生长抑素治疗. 天然生长抑素(施他宁)主要作用于胃肠道受体, 与中枢神经系统受体亲和力差, 而生长抑素衍生物(奥曲肽)主要作用于中枢神经系统受体. 考虑到二者均可通过胎盘屏障, 前者对中枢神经系统影响小, 而后者可能对胎儿有潜在的不良影响, 我们仅对14例重型APIP给予施他宁治疗, 结果显示其不仅起到了良好的治疗作用, 而且未发现其对新生儿有不良作用, 与国外报道一致[10,11]. 对于高脂血症性APIP可采用CVVH治疗迅速降低血脂水平, 减少相关致死性并发症的风险[12]. 本组4例高脂血症性APIP患者行CVVH后血脂水平迅速显著降低, 病情好转. 2

■创新盘点

本文将APIP和女性非妊娠期胰腺炎作对比分析, 发现前者的主要病因为高脂血症和胆系疾病, 相对于后者易重症化. 对于重症APIP可以使用生长抑素和血液净化治疗, 适时终止妊娠有利于改善母婴预后.

■名词解释

Apgar评分是临床评价新生儿出生时窒息程度的经典而简易的方法. 分别于胎儿出生后1、5和10 mim进行常规评分. 1 min评分反映窒息严重程度, 5、10 min评分除反映窒息严重程度外, 还可反映抢救效果及帮助判断预后. 连续静脉-静脉血液滤过(continuous veno-venous hemofiltration, CVVH)是在连续动脉-静脉血液滤过原理的基础上借助单针双腔管建立单静脉通道, 外加血泵驱动血液维持一定的血流量, 建立起来的一种持续性血液滤过疗法. 清除患者体内过多的水分和溶质, 减少血管通路的并发症.

■应用要点
对于重症APIP患者可以使用生长抑素和血液净化治疗，适时终止妊娠有利于改善母婴预后.

例并发肾功能不全APIP患者经血液净化治疗后多器官功能不全的情况有明显好转. CVVH有稳定内环境的作用，能在早期清除过多的细胞因子和炎症介质，显著减少肠道细菌易位和内毒素血症，可能有利于减轻全身炎症反应，改善心、肺、肾等器官功能[13]. 因此，我们认为对重症APIP患者适时使用天然生长抑素和血液净化治疗能改善患者的预后.

AP产生的细胞因子和炎症介质可能影响胎儿的生长发育，严重者出现休克、DIC和多器官功能衰竭可能导致胎儿宫内窘迫，甚至宫内死亡[14]. 终止妊娠有利于AP病情的缓解，孕妇分娩后血甘油三酯明显下降[15]. 对于妊娠晚期患者，经评估认为胎儿出生后存活的可能性大，即应果断终止妊娠；孕早、中期患者应加强对胎儿的监测，一旦发现胎儿死亡应及早采取措施排出死胎. 对有下列情况应尽快终止妊娠：(1)明显的流产或早产征象；(2)胎儿窘迫或死胎；(3)已到临产期[16]. 终止妊娠的方法应选择最快，对母体影响最小的方法，一般应选择剖宫产术. 本研究中有1例孕早期和1例孕中期重型APIP患者出现先兆流产后放弃胎儿，经积极治疗后胰腺炎痊愈. 10例孕晚期重型APIP患者行急诊剖宫产，6例孕晚期轻型APIP患者在胰腺炎好转后顺产，胎儿娩出后产妇的急性AP的病情很快好转，出生胎儿和APIP患者均存活且预后佳，说明适时终止妊娠对APIP者有重要意义.

总之，APIP主要发生在妊娠晚期，主要病因为高脂血症和胆系疾病，易重症化，对于重症患者可以使用生长抑素和血液净化治疗，适时终止妊娠有利于改善母婴预后.

■同行评价
该文章通过对比分析APIP和非妊娠期女性急性胰腺炎的临床特点，明确二者在病因构成、相关并发症和血液、生化指标中存在显著差异，前者相对于后者易重症化. 对重症APIP使用生长抑素在短期内未发现其对胎儿有不良作用. 血液净化治疗和适时终止妊娠对改善母婴预后有重要的意义.

4 参考文献

1 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组，中华胰腺病杂志编辑委员会，中华消化杂志编辑委员会. 中国急性胰腺炎诊治指南(2013年，上海). 中华消化杂志 2013; 33: 217-222

2 Li HL, Jiang YH, Wei Y, Zhao YY, Zhu X, Yao GQ. [Clinical analysis of acute hyperlipidemic pancreatitis during pregnancy and postpartum period]. *Beijing Daxue Xuebao* 2014; 46: 125-129 [PMID: 24535364]

3 张孝艳，乔玉环，郭瑞霞. 妊娠合并急性胰腺炎16例诊治体会. 实用医学杂志 2011; 27: 2480-2481

4 顾京红，赵中辛. 妊娠期急性胰腺炎血脂代谢异常与临床发病特点相关性分析. 中华临床医师杂志(电子版) 2011; 5: 1173-1175

5 陈燕，黄宗文. 妊娠合并急性胰腺炎临床进展. 中国误诊学杂志 2008; 8: 6821-6823

6 Nanda S, Gupta A, Dora A, Gupta A. Acute pancreatitis: a rare cause of acute abdomen in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2009; 279: 577-578 [PMID: 18726109 DOI: 10.1007/s00404-008-0755-8]

7 Gilbert A, Patenaude V, Abenhaim HA. Acute pancreatitis in pregnancy: a comparison of associated conditions, treatments and complications. *J Perinat Med* 2014 Feb 12. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24519714 DOI: 10.1515/jpm-2013-0322]

8 Zhang DL, Huang Y, Yan L, Phu A, Ran X, Li SS. Thirty-eight cases of acute pancreatitis in pregnancy: a 6-year single center retrospective analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2013; 33: 361-367 [PMID: 23771661 DOI: 10.1007/s11596-013-1125-8]

9 张华，漆洪波. 妊娠合并急性胰腺炎. 中国实用妇科与产科杂志 2011; 27: 730-732

10 Boulanger C, Vezzosi D, Bennet A, Lorenzini F, Fauvel J, Caron P. Normal pregnancy in a woman with nesidioblastosis treated with somatostatin analog octreotide. *J Endocrinol Invest* 2004; 27: 465-470 [PMID: 15279081]

11 Maffei P, Tamagno G, Nardelli GB, Videau C, Menegazzo C, Milan G, Calcagno A, Martini C, Vettor R, Epelbaum J, Sicolo N. Effects of octreotide exposure during pregnancy in acromegaly. *Clin Endocrinol* (Oxf) 2010; 72: 668-677 [PMID: 19769624 DOI: 10.1111/j.1365-2265.2009.03706.x]

12 Basar R, Uzum AK, Canbaz B, Dogansen SC, Kalayoglu-Besisik S, Altay-Dadin S, Aral F, Ozbey NC. Therapeutic apheresis for severe hypertriglyceridemia in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 287: 839-843 [PMID: 23479052 DOI: 10.1007/s00404-013-2786-z]

13 Tang Y, Zhang L, Fu P, Kang Y, Liu F. Hemoperfusion plus continuous veno-venous hemofiltration in a pregnant woman with severe acute pancreatitis: a case report. *Int Urol Nephrol* 2012; 44: 987-990 [PMID: 21424372]

14 Vandenbroucke L, Seconda S, Lassel L, Le Bouar G, Poulain P. [Acute pancreatitis induced by major hypertriglyceridemia during pregnancy. A case report]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* (Paris) 2009; 38: 436-439 [PMID: 19477080 DOI: 10.1016/j.jgyn.2009.04.006]

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

16 黄珍珍. 妊娠合并急性胰腺炎的诊治进展. 实用心脑肺血管病杂志 2011; 19: 695-697

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2049-2054
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

人类真核延伸因子1A2与生长因子受体结合蛋白2在胰腺癌组织中的表达及临床病理意义

周维霞, 蒋晓红, 杨 勇, 陈瑞东, 胡端敏

周维霞, 蒋晓红, 杨勇, 陈瑞东, 胡端敏, 苏州大学附属第二医院消化科 江苏省苏州市 215004
周维霞, 主管护师, 主要从事消化系肿瘤的分子病理诊断.
作者贡献分布: 研究过程和论文撰写由周维霞与蒋晓红完成; 文献检索和数据分析由杨勇与陈瑞东完成; 课题设计和审校由胡端敏完成.
通讯作者: 胡端敏, 副主任医师, 硕士生导师, 215004, 江苏省苏州市三香路1055号, 苏州大学附属第二医院消化科.
huduanmin@163.com
收稿日期: 2013-12-11 修回日期: 2014-03-02
接受日期: 2014-03-19 在线出版日期: 2014-05-18

Clinicopathologic significance of expression of EEF1A2 and GRB2 in pancreatic adenocarcinoma

Wei-Xia Zhou, Xiao-Hong Jiang, Yong Yang, Rui-Dong Chen, Duan-Min Hu

Wei-Xia Zhou, Xiao-Hong Jiang, Yong Yang, Rui-Dong Chen, Duan-Min Hu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Duan-Min Hu, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, 1055 Sanxiang Road, Suzhou 215004, Jiangsu Provence, China. huduanmin@163.com
Received: 2013-12-11 Revised: 2014-03-02
Accepted: 2014-03-19 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of eukaryotic elongation factor 1A2 (EEF1A2) and growth factor receptor-bound 2 (GRB2) in pancreatic adenocarcinoma (PA) and to analyze their clinicopathologic significance.

METHODS: Expression of EEF1A2 and GRB2 was examined by immunohistochemistry in 97 PA specimens and surrounding pancreatic tissues.

RESULTS: EEF1A2 expression was absent in normal pancreatic tissue. In contrast, EEF1A2 showed positive immunoreactivity in 77.8% (76/97) of PA cases. The increased eEF1A2 expression was significantly associated with the presence of nodal metastasis (χ^2 = 4.28, P = 0.039) and perineural invasion (χ^2 = 4.11, P = 0.043). The expression rate of GRB2 in 97 PA specimens and surrounding pancreatic tissues were 82.5% (80/97) and 30.2% (31/97), respectively. The expression level of GRB2 in PA was significantly higher than that in surrounding pancreatic tissues (χ^2 = 48.5, P < 0.001). The positive rate of GRB2 expression was significantly correlated with lymph node metastasis (χ^2 = 4.63, P = 0.031). There was a positive expression between the expression of EEF1A2 and that of GRB2 in PA (r_s = 0.451, P < 0.001).

CONCLUSION: The expression of GRB2 and EEF1A2 is closely correlated with the biological behavior of PA. The expression of GRB2 is significantly correlated with that of EEF1A2.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Pancreatic adenocarcinoma; EEF1A2; GRB2; Metastasis

Zhou WX, Jiang XH, Yang Y, Chen RD, Hu DM. Clinicopathologic significance of expression of EEF1A2 and GRB2 in pancreatic adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2049-2054 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2049.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2049

摘要

目的: 探讨人类真核延伸因子1A2(eukaryotic elongation factor 1A2, EEF1A2)和生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor-bound 2, GRB2)在胰腺癌组织中的表达、相互关系及临床病理意义.

方法: 应用免疫组织化学方法检测97例胰腺癌及其周边胰腺组织中EEF1A2和GRB2蛋白表达情况.

结果: EEF1A2蛋白在胰腺癌周边组织中不

■背景资料
我们前期研究中发现生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor-bound2, GRB2)可能是人类真核延伸因子1A(eukaryotic elongation factor1A2, EEF1A2)促进胰腺癌发生、发展的关键分子. 为进一步明确EEF1A2和GRB2在胰腺癌病情发展中的作用, 本研究采用免疫组织化学方法检测了胰腺癌及周边组织中EEF1A2和GRB2的表达, 探讨二者与胰腺癌临床病理特点的关系.

■同行评议者
白雪巍, 副主任医师,哈尔滨医科大学

■研发前沿
EEF1A2可能通过GRB2的介导来促进胰腺癌生物学行为的恶性转化. 但EEF1A2和GRB2表达与胰腺癌临床病理特点的是否存在相关性, 目前尚未见报道.

表达, 但在77.8%(76/97)的胰腺癌组织中表达阳性. EEF1A2的异常表达与胰腺癌周边淋巴结转移(χ^2 = 4.28, P = 0.039)和神经浸润显著相关(χ^2 = 4.11, P = 0.043). GRB2蛋白在胰腺癌和周边胰腺组织中阳性表达率分别为82.5%(80/97)和30.2%(31/97), 胰腺癌组织中GRB2蛋白阳性率显著高于周边胰腺组织(χ^2 = 48.5, P<0.001). GRB2阳性表达率与淋巴结转移显著相关(χ^2 = 4.63, P = 0.031). 胰腺癌中EEF1A2和GRB2表达具有显著等级正相关(r_s = 0.451, P<0.001).

结论: EEF1A2和GRB2的表达与胰腺癌的生物学行为密切相关, 且两者之间的表达强度具有显著等级正相关.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胰腺癌; 人类真核延伸因子1A2; 生长因子受体结合蛋白2; 转移

核心提示: 我们前期发现生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor-bound 2, GRB2)可能是真核延伸因子1A2(eukaryotic elongation factor 1A2, EEF1A2)促进胰腺癌发生、发展的关键分子. 本研究中我们进一步证实胰腺癌中EEF1A2和GRB2分子高表达, 二者与肿瘤的侵袭和转移关系密切, 故者EEF1A2和GRB2可作为胰腺癌预后判断的指标以及抑制肿瘤复发和转移的潜在靶点.

周维霞, 蒋晓红, 杨勇, 陈瑞东, 胡端敏. 人类真核延伸因子1A2与生长因子受体结合蛋白2在胰腺癌组织中的表达及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2049-2054 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2049.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2049

0 引言

我国胰腺癌的发病率近年来逐年增加, 目前胰腺癌患者占所有癌症患者的2.3%, 是第6大癌症死亡原因[1]. 临床诊治中, 胰腺癌发病隐匿, 进展迅速, 预后极差, 其5年生存率仅为1%-3%[2]. 因此, 进一步积极深入探讨影响胰腺癌发生发展的机制将会为上述问题的解决提供良好的理论与实践依据. 人类真核延伸因子1A2(homo sapiens eukaryotic elongation factor 1A2, EEF1A2)直接与氨基酰-tRNA结合, 将其运至核糖体A位, 使肽链延长, 保证蛋白质合成的准确性和速度[3]. 传统观点认为*EEF1A2*是管家基因, 但我们的前期工作[4-8]提示EEF1A2的过度和异位表达参与了胰腺癌的发生、发展. 生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor-bound 2, GRB2)是位于细胞膜上的一种衔接蛋白, 承接细胞外信号向细胞内的传递, 在肿瘤发生[9], 侵袭和转移[10]过程中起重要作用. 我们最近的研究中发现[11]GRB2可能是EEF1A2促进胰腺癌发生、发展的关键分子. 为进一步明确EEF1A2和GRB2在胰腺癌病情发展中的作用, 本研究采用免疫组织化学方法检测了胰腺癌及周边组织中EEF1A2和GRB2的表达, 探讨二者与胰腺癌临床病理特点的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 包含97例胰腺癌手术标本的组织芯片购自上海生物芯片有限公司. 其中男性59例, 女性38例, 年龄39-76岁, 平均年龄59岁. 术前未予放疗、化疗. 同一病灶的周边胰腺组织作为对照. 胰头及钩突部肿瘤68例, 胰体尾部肿瘤29例, 病理组织分型: 标本经病理证实为腺癌, 其中低分化腺癌27例, 高、中分化腺癌分别为23和47例. 病理分期采用国际抗癌联盟(UICC)2008年公布的胰腺癌TNM分期法, 其中Ⅰ期9例、Ⅱ期32例、Ⅲ期51例和Ⅳ5例(表1). EEF1A2和GRB2多克隆抗体(兔抗)购于Abcam公司, 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化染色试剂盒采用武汉博士德生物工程有限公司产品, 免疫组织化学染色技术的具体操作步骤按照试剂盒要求进行.

1.2 方法 EEF1A2和GRB2蛋白均定位于细胞膜和细胞浆, 浅黄、棕黄、或更深的棕褐色的细小颗粒作为阳性染色. 采用3个参数[12](即染色强度、阳性细胞数和两者记分的和)半定量记数方法. 染色强度记分标准: 无着色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分. 光镜下随机观察并记录5个高倍视野中染色阳性细胞的百分率, 记分标准: ≤10%为0分, 10%-25%为1分, 26%-50%为2分, ≥51%为3分. 染色强度记分与阳性细胞数记分之和为判断依据: 0-1分为(+), 2分为(++), 3-4分为(+++), 5-6分为(++++). 最终得分>2分判定为阳性结果.

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件包进行统计分析, 组间采用χ^2检验, 两指标间采用有序分组资料的等级相关检验. P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 EEF1A2与GRB2在胰腺癌及周边组织中的表达情况 EEF1A2在97例胰腺癌组织中表达为

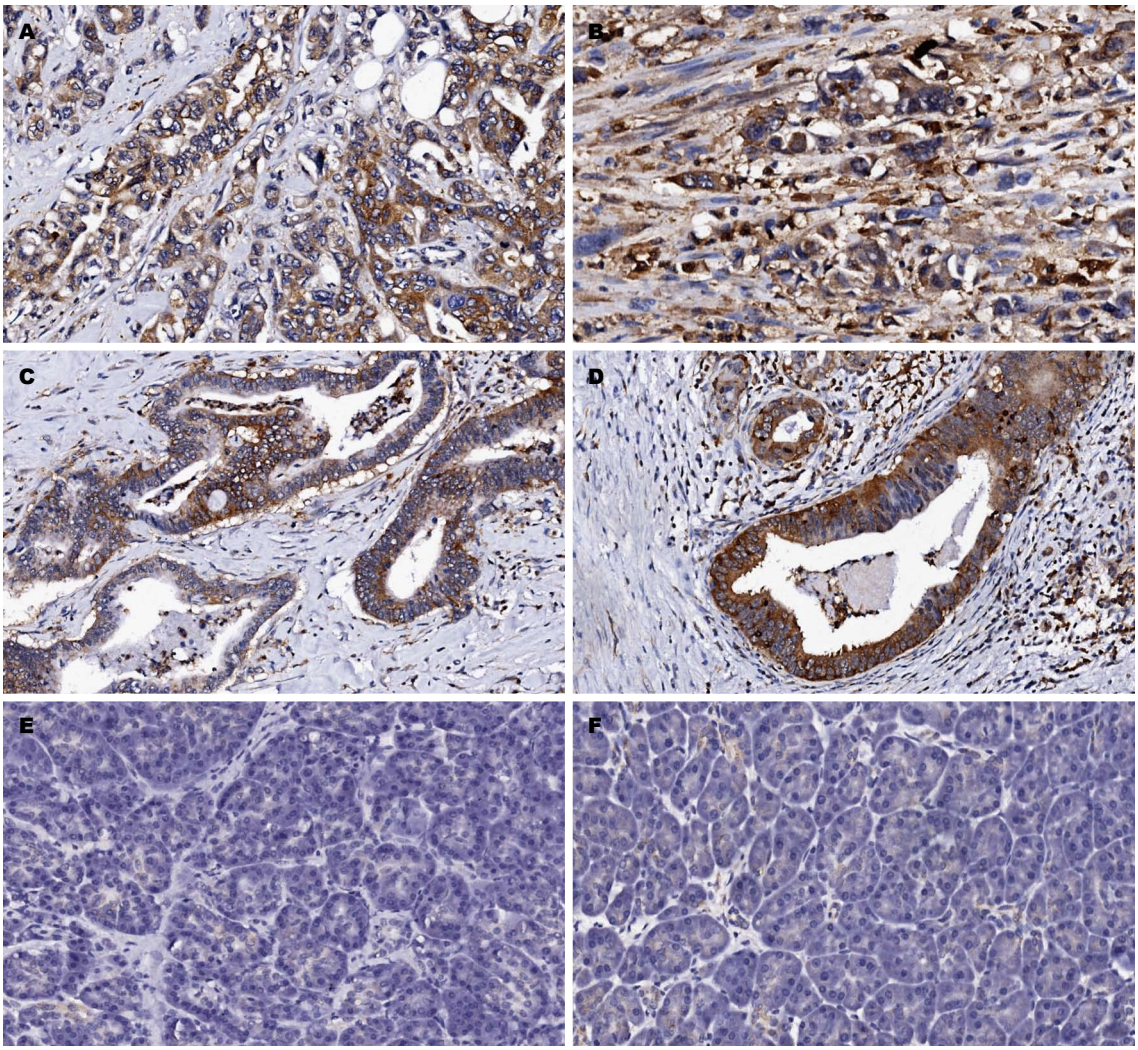


图 1 免疫组织化学检测EEF1A2及GRB2在胰腺癌及周边胰腺组织中的定位(×100). A: EEF1A2在低分化胰腺癌中表达阳性; B: GRB2在低分化胰腺癌中表达阳性; C: EEF1A2在高分化胰腺癌中表达阳性; D: GRB2在高分化胰腺癌中表达阳性; E: EEF1A2在正常胰腺组织中表达阴性; F: GRB2在正常胰腺组织中表达阴性. EEF1A2: 真核延伸因子1A; GRB2: 生长因子受体结合蛋白.

■相关报道
EEF1A2在肿瘤中呈异常表达, 可能具备癌基因的特征, 当其转录表达异常时可以导致肿瘤的发生. 但是, EEF1A2促进肿瘤细胞侵袭转移的分子机制目前仍不清楚,我们前期研究中发现GRB2可能是EEF1A2促进胰腺癌发生、发展的关键分子.

76例阳性、21例阴性, 阳性率为77.8%, EEF1A2在肿瘤细胞的胞膜及胞浆中表达(图1A, C), 间质细胞中无表达, EEF1A2的阳性染色分布异质性明显, 阳性染色的细胞常分布于深部浸润的癌巢, 尤其在浸润的前沿, 在肿瘤周围的正常胰腺(图1E)中未见EEF1A2阳性表达. GRB2在97例胰腺癌组织中表达为80例阳性, 有17例表达阴性, 阳性率为82.5%, 阳性染色主要见于癌细胞的细胞浆, 胞膜及癌间质组织(图1B, D), 在肿瘤周边的胰腺组织中, 有31例表达阳性, 66例为阴性(图1F), 阳性率为30.2%,经卡方检验显示胰腺癌组中GRB2阳性率显著高于癌周边组织(χ^2 = 48.5, P<0.001).

2.2 EEF1A2与GRB2表达与胰腺癌临床及病理特点的关系 EEF1A2与GRB2的阳性表达在各性别组和各年龄组之间无显著差异, EEF1A2表达在有无淋巴结转移(χ^2 = 4.28, P = 0.039)和有无神经累及(χ^2 = 4.11, P = 0.043)的胰腺癌间差异明显, 而与肿瘤大小、分级和TNM分期无显著相关(P>0.05). GRB2表达在伴有淋巴结转移的胰腺癌中明显高于无淋巴结转移组(χ^2 = 4.63, P = 0.031), 但在TNM分期之间, 有无神经累及的胰腺癌间, GRB2表达无显著性差异(P>0.05)(表1).

2.3 胰腺癌组织中EEF1A2与GRB2表达之间的关系 经等级相关检验表明胰腺癌组织中EEF1A2与GRB2表达具有显著正相关(r_s = 0.451, P<0.001)(表2).

3 讨论

胰腺癌是一种预后极差的恶性肿瘤, 远处转移是胰腺癌患者治疗失败和死亡的主要原因之一,

■创新盘点
本研究不仅发现胰腺癌组织中EEF1A2和GRB2蛋白存在高表达，且EEF1A2和GRB2与胰腺癌的侵袭和转移关系密切.

表 1 EEF1A2与GRB2表达与胰腺癌临床及病理特点的关系

	n	EEF1A2阳性	EEF1A2阴性	*P*值	GRB2阳性	GRB2阴性	*P*值
年龄(岁)				0.684			0.656
≤60	47	36(76.6)	11(23.4)		38(80.9)	9(19.1)	
>60	50	40(80.0)	10(20.0)		42(84.0)	8(16.0)	
性别				0.696			0.852
男	59	47(79.7)	12(20.3)		49(83.1)	10(16.9)	
女	38	29(76.3)	9(23.7)		31(81.6)	7(18.4)	
部位				0.491			0.592
胰头及钩突	68	52(76.5)	16(23.5)		57(83.8)	11(16.2)	
胰腺体尾部	29	24(82.8)	5(17.2)		23(79.3)	6(20.7)	
肿瘤大小(cm)				0.241			0.072
≤2	19	13(76.5)	6(23.5)		13(68.4)	6(31.6)	
>2	78	63(82.8)	15(17.2)		67(85.9)	11(14.1)	
肿瘤分级				0.215			0.378
低分化	23	15(65.2)	8(34.8)		17(73.9)	6(26.1)	
中分化	47	38(80.9)	9(19.1)		39(83)	8(17.0)	
高分化	27	23(85.2)	4(14.8)		24(88.9)	3(11.1)	
淋巴结转移				0.039			0.031
有	76	63(82.9)	13(17.1)		66(86.9)	10(13.2)	
无	21	13(61.9)	8(38.1)		14(66.7)	7(33.3)	
血管累及				0.397			0.445
有	34	25(73.5)	9(26.5)		27(79.4)	7(20.6)	
无	63	51(81.0)	12(19.0)		53(85.5)	10(14.5)	
神经累及				0.043			0.110
有	72	60(83.3)	12(16.7)		62(86.1)	10(13.9)	
无	25	16(64.0)	9(36.0)		18(72.0)	7(28.0)	
TNM 分期				0.091			0.191
Ⅰ	9	6(66.7)	3(33.3)		7(77.8)	2(22.2)	
Ⅱ	32	22(68.8)	10(31.3)		23(71.9)	9(28.1)	
Ⅲ	51	45(88.2)	6(11.8)		46(90.2)	5(9.8)	
Ⅳ	5	3(78.4)	2(21.6)		4(80.0)	1(20.0)	

EEF1A2: 真核延伸因子1A; GRB2: 生长因子受体结合蛋白.

表 2 胰腺癌组织EEF1A2和GRB2表达之间的关系 (*n*)

GRB2	EEF1A2				合计
	+	++	+++	++++	
+	3	2	1	1	7
++	1	6	2	1	10
+++	1	5	28	9	43
++++	1	2	20	14	37
合计	6	15	51	25	97

EEF1A2: 真核延伸因子1A; GRB2: 生长因子受体结合蛋白.

即使是肿瘤得到早期手术切除且切缘阴性的患者，其中的75%在5年内仍最终因远处转移而死亡[13]. 因此探明与胰腺癌生物学行为密切相关的蛋白分子将对患者的预后判断及抑制肿瘤进展的靶向治疗极其重要.

传统观点认为，*EEF1A2*仅是一个管家基因，在蛋白翻译过程中发挥重要作用[3]. 然而，最新的研究结果显示，EEF1A2在肿瘤中呈异常表达，可能具备癌基因的特征，当其转录表达异常时可以导致肿瘤的发生[14]. 本课题组前期工作显示，EEF1A2在正常胰腺组织中不表达，但在胰腺癌组织中表达水平明显上调，过表达EEF1A2可增强胰腺癌细胞的增殖能力和裸鼠体内移植瘤的生长[8]. 此外，我们发现上调EEF1A2的表达可促进胰腺癌细胞SW1990的运动和黏附能力，而特异性的siRNA靶向干扰EEF1A2可抑制胰腺癌细胞BxPC-3体外迁移和侵袭[4-6]. 因此，EEF1A2的异常表达不仅可导致肿瘤细胞增殖和发展，在肿瘤侵袭、转移过程中也发挥重要作用. 但

是EEF1A2表达与胰腺癌临床病理特点的是否存在相关性, 目前尚未见报道.

本研究的免疫组化结果显示, 伴有淋巴结转移的胰腺癌组织中EEF1A2表达明显高于无淋巴结转移的胰腺癌组织. 这一发现和最近的一项研究结果相符, Edmonds等[15]发现, EEF1A2在具有转移潜能的大鼠乳腺癌细胞中表达水平明显高于无转移能力的细胞. 随后的体外实验证实, 在乳腺癌BT549细胞中过表达EEF1A2可明显增强肿瘤细胞的迁移和侵袭能力; 相反, 在乳腺癌HCC1937细胞中沉默EEF1A2表达则可抑制细胞的侵袭能力[16]. 嗜神经性是胰腺癌的较为特异的临床特点, 很多患者在疾病早期就有内脏神经侵犯, 已有研究证实神经受累是胰腺癌术后复发转移的独立预测因子[17], 本研究中, 我们发现EEF1A2高表达与神经累及存在明显正相关. 这些结果提示EEF1A2参与了胰腺癌的侵袭、转移过程, 与患者的临床预后密切相关.

但是, EEF1A2促进肿瘤细胞侵袭转移的分子机制目前仍不清楚, 我们最近应用蛋白芯片技术证实[11], 在过表达EEF1A2之后, 与肿瘤密切相关的GRB2的表达明显增加. 进一步[4]我们使用特异性siRNA沉默Bxpc-3胰腺癌细胞的EEF1A2后, 发现GRB2的mRNA和蛋白水平相应明显下调. 在本研究中, 我们又发现胰腺癌组织中的EEF1A2与GRB2的表达呈显著正相关, 这些结果均提示EEF1A2与GRB2之间存在密切联系. GRB2蛋白与肿瘤细胞周期的调控, 细胞增殖的变化及细胞分化的改变密切相关, 直接参与乳腺癌、膀胱癌及白血病的发病、进展及转移过程[18,19]. 我们发现GRB2在伴有淋巴结转移的胰腺癌组中表达明显高于无淋巴结转移组, 这一结果提示GRB2蛋白参与了胰腺癌的转移和临床进展. 结合我们的前期发现, 干扰GRB2可使内源性高表达EEF1A2的胰腺癌BxPC-3运动能力明显减弱. 故GRB2可能是EEF1A2促进胰腺癌侵袭和转移的重要要分子.

总之, 本研究发现胰腺癌组织中EEF1A2和GRB2蛋白存在高表达, EEF1A2和GRB2与胰腺癌的侵袭和转移关系密切, 且二者在胰腺癌中的表达正相关, 二者可作为胰腺癌预后判断的指标以及抑制肿瘤复发和转移的潜在靶点.

■应用要点
EEF1A2和GRB2蛋白可能作为胰腺癌预后判断的指标以及抑制肿瘤复发和转移的潜在靶点.

4 参考文献

1 Guo X, Cui Z. Current diagnosis and treatment of pancreatic cancer in China. *Pancreas* 2005; 31: 13-22 [PMID: 15968242 DOI: 10.1097/01.mpa.0000168220.97967.d1]

2 Pannala R, Basu A, Petersen GM, Chari ST. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol* 2009; 10: 88-95 [PMID: 19111249 DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70337-1]

3 Lukash TO, Turkivska HV, Negrutskii BS, El'skaya AV. Chaperone-like activity of mammalian elongation factor eEF1A: renaturation of aminoacyl-tRNA synthetases. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1341-1347 [PMID: 15109577 DOI: 10.1016/j.biocel.2003.11.009]

4 许朝, 胡端敏, 诸琦. 靶向沉默人类真核翻译延长因子1A2可抑制胰腺癌细胞BxPC-3体外迁移和侵袭. 肿瘤 2012; 32: 567-571

5 黄佳, 黎曙明, 诸琦, 曹海霞, 章永平. 静默人类真核延伸因子1A2对胰腺癌裸鼠移植瘤生长的影响. 中华消化杂志 2012; 2: 98-102

6 黄佳, 诸琦, 曹海霞, 章永平. 靶向封闭EEF1A2对胰腺癌细胞凋亡的作用及其机制研究. 中华消化杂志 2010; 30: 606-609

7 曹海霞, 诸琦, 丁健青, 张愫, 姚玮艳, 钱爱华, 周琳, 章永平. EEF1A2基因对胰腺癌细胞生长和增殖的影响. 中华胰腺病杂志 2008; 08: 376-378

8 Cao H, Zhu Q, Huang J, Li B, Zhang S, Yao W, Zhang Y. Regulation and functional role of eEF1A2 in pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 11-16 [PMID: 19138673 DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.12.171]

9 项洪刚, 王强, 胡志前, 徐健, 王伟军, 卫子然. 人结直肠癌组织中EGFR/Grb2/p-mTOR/VEGF的表达及意义. 第二军医大学学报 2009; (7): 775-779

10 Xu XL, Wang X, Chen ZL, Jin M, Yang W, Zhao GF, Li JW. Overexpression of Grb2-associated binder 2 in human lung cancer. *Int J Biol Sci* 2011; 7: 496-504 [PMID: 21552417 DOI: 10.7150/ijbs.7.496]

11 胡端敏, 许朝, 诸琦. 生长因子受体结合蛋白2在人类真核翻译延长因子1A2促进胰腺癌发生发展中的作用. 中华消化杂志 2012; 32: 23-28

12 Kim HS, Lee SH, Do SI, Lim SJ, Park YK, Kim YW. Clinicopathologic correlation of beclin-1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2011; 207: 247-252 [PMID: 21420796 DOI: 10.1016/j.prp.2011.02.007]

13 Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1200-1210 [PMID: 15028824 DOI: 10.1056/NEJMoa032295]

14 Tomlinson VA, Newbery HJ, Wray NR, Jackson J, Larionov A, Miller WR, Dixon JM, Abbott CM. Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. *BMC Cancer* 2005; 5: 113 [PMID: 16156888 DOI: 10.1186/1471-2407-5-113]

15 Edmonds BT, Wyckoff J, Yeung YG, Wang Y, Stanley ER, Jones J, Segall J, Condeelis J. Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 11): 2705-2714 [PMID: 8937988]

16 Amiri A, Noei F, Jeganathan S, Kulkarni G, Pinke DE, Lee JM. eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration. *Oncogene* 2007; 26: 3027-3040 [PMID: 17130842 DOI: 10.1038/sj.onc.1210101]

17 Xu Q, Zhang TP, Zhao YP. Advances in early diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011; 10: 128-135 [PMID: 21459718

■同行评价
本文学术价值好，具有一定的指导意义.

DOI: 10.1016/S1499-3872(11)60021-0]
18 Lim SJ, Lopez-Berestein G, Hung MC, Lupu R, Tari AM. Grb2 downregulation leads to Akt inactivation in heregulin-stimulated and ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene* 2000; 19: 6271-6276 [PMID: 11175341 DOI: 10.1038/sj.onc.1204014]
19 Boerner JL, Danielsen AJ, Lovejoy CA, Wang Z, Juneja SC, Faupel-Badger JM, Darce JR, Maihle NJ. Grb2 regulation of the actin-based cytoskeleton is required for ligand-independent EGF receptor-mediated oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 6679-6689 [PMID: 14555981 DOI: 10.1038/sj.onc.1206830]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》于 2012-12-26 获得 RCCSE 中国权威学术期刊 (A+) 称号

本刊讯 《世界华人消化杂志》在第三届中国学术期刊评价中被武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)评为“RCCSE中国权威学术期刊(A+)”. 本次共有6 448种中文学术期刊参与评价, 计算出各刊的最终得分, 并将期刊最终得分按照从高到低依次排列, 按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围. 其中A+(权威期刊)取前5%；A(核心期刊)取前5%-20%; A-(扩展核心期刊)取前20%-30%; B+(准核心期刊)取前30%-50%; B(一般期刊)取前50%-80%; C(较差期刊)为80%-100%.

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2055-2058
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

腹腔镜辅助治疗巨大消化性溃疡穿孔53例

杨先智, 陈龙宇

杨先智, 陈龙宇, 贵州省遵义医学院第三附属医院胃肠外科 贵州省遵义市 563000
杨先智, 副主任医师, 主要从事胃肠疾病的研究.
作者贡献分布: 此课题由杨先智设计; 研究过程由杨先智实施完成; 数据分析及手术由杨先智与陈龙宇共同完成; 本论文写作由杨先智完成.
通讯作者: 杨先智, 副主任医师, 563002, 贵州省遵义市凤凰路98号, 贵州省遵义医学院第三附属医院胃肠外科.
wawayutt@qq.com
收稿日期: 2014-02-28 修回日期: 2014-03-27
接受日期: 2014-03-28 在线出版日期: 2014-05-18

Laparoscopic-assisted surgery for perforated peptic ulcer: Analysis of 53 cases

Xian-Zhi Yang, Long-Yu Chen

Xian-Zhi Yang, Long-Yu Chen, Department of Gastrointestinal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China
Correspondence to: Xian-Zhi Yang, Associate Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 98 Fenghuang Road, Zunyi 563000, Guizhou Province, China. wawayutt@qq.com
Received: 2014-02-28 Revised: 2014-03-27
Accepted: 2014-03-28 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To explore the effect of laparoscopic-assisted surgery for perforated peptic ulcer to provide evidence for the clinical treatment of such disease.

METHODS: One hundred and six patients with perforated peptic ulcer were enrolled in this study from February 2010 to October 2013 at our hospital. The patients were randomly assigned to receive traditional laparotomy (control group) or laparoscopic-assisted surgery (treatment group), with 53 patients in each group. The operative time, blood loss, flatus time and other perioperative indicators, as well as pain score, painkiller utilization and complication rate were recorded and compared between the two groups.

RESULTS: The treatment group had significantly lower postoperative blood loss, ambulation time, flatus time, hospitalization time and time to recovery of bowel sounds than the control group (42.0 mL ± 12.1 mL *vs* 156.0 mL ± 34.6 mL, 10.4 h ± 2.9 h *vs* 38.7 h ± 9.7 h, 16.8 h ± 2.3 h *vs* 40.6 h ± 6.9 h, 6.6 d ± 2.1 d *vs* 12.8 d ± 3.5 d, 18.4 h ± 5.6 h *vs* 45.6 h ± 7.7 h, $P < 0.05$). The pain scores on postoperative days 1, 2 and 7 were significantly lower in the treatment group than in the control group (3.1 ± 0.4 *vs* 5.3 ± 0.3, 2.4 ± 0.6 *vs* 4.4 ± 0.4, 1.6 ± 0.2 *vs* 3.2 ± 0.3, 11.3% *vs* 43.4%, $P < 0.05$). The incidences of wound infection and inflammation were significantly lower in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The effect of laparoscopic-assisted surgery is superior to that of traditional laparotomy in the management of perforated peptic ulcer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Laparoscopic-assisted surgery; Laparotomy surgery; Perforated peptic ulcer

Yang XZ, Chen LY. Laparoscopic-assisted surgery for perforated peptic ulcer: Analysis of 53 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2055-2058 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2055.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2055

摘要

目的: 研究腹腔镜下辅助小切口治疗巨大消化性溃疡穿孔的临床效果, 为临床上该类疾病的治疗提供依据.

方法: 选择2010-02/2013-10于我院入院治疗的巨大消化性溃疡穿孔患者106例, 随机分为两组, 对照组采用传统的开腹修补术, 治疗组采用腹腔镜加辅助小切口修补术, 记录并比较两组患者手术时间、出血量、肛门排气时间等围手术期指标, 并比较疼痛评分、镇痛药的使用率以及并发症发生率.

结果: 治疗组患者手术中出血量、术后下床活动时间、肛门排气时间、住院时间以及肠

■背景资料
胃及十二指肠溃疡穿孔是常见的普外科急腹症. 随着腹腔镜器械的改进和操作技术的进步, 腹腔镜下溃疡穿孔修补术已经在外科急腹症方面开始广泛应用. 但在腹腔镜手术探查的过程中, 如果遇到巨大溃疡穿孔的患者, 很多术者都会放弃微创治疗, 选择中转开腹手术. 目前腹腔镜在急腹症外科方面得到了广泛的应用, 本文研究了巨大消化性溃疡穿孔的一种新手术方式.

■同行评议者
陈贻胜, 教授, 福建省立医院

■研发前沿
如何更好地应用腹腔镜辅助治疗外科急腹症是目前急腹症外科研究的热点之一.

鸣音恢复时间均明显少于对照组, 差异有统计学意义(42.0 mL±12.1 mL *vs* 156.0 mL±34.6 mL, 10.4 h±2.9 h *vs* 38.7 h±9.7 h, 16.8 h±2.3 h *vs* 40.6 h±6.9 h, 6.6 d±2.1 d *vs* 12.8 d±3.5 d, 18.4 h±5.6 h *vs* 45.6 h±7.7 h, $P<0.05$); 治疗组患者手术后1、3及7 d的疼痛评分明显低于对照组, 镇痛药物的使用率也明显低于对照组, 差异有统计学意义(3.1±0.4 *vs* 5.3±0.3, 2.4±0.6 *vs* 4.4±0.4, 1.6±0.2 *vs* 3.2±0.3, 11.3% *vs* 43.4%, $P<0.05$); 治疗组患者切口感染、炎性肠梗阻等并发症的发生率明显低于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$).

结论: 腹腔镜辅助小切口治疗巨大消化性溃疡穿孔的临床效果明显好于传统开腹手术, 创伤小, 并发症少, 患者的痛苦轻, 值得临床推广应用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 腹腔镜; 开腹手术; 巨大溃疡

核心提示: 腹腔镜辅助小切口治疗巨大溃疡穿孔患者手术中出血量、术后下床活动时间、肛门排气时间、住院时间以及肠鸣音恢复时间、镇痛药物的使用率、切口感染、炎性肠梗阻等并发症均明显少于对照组.

杨先智, 陈龙宇. 腹腔镜辅助治疗巨大消化性溃疡穿孔53例. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2055-2058 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2055.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2055

0 引言

消化性溃疡穿孔是一种临床常见疾病, 治疗过程以手术治疗为主, 常规方法为开腹手术进行治疗[1]. 随着微创腹腔镜技术的发展, 采用腹腔镜手术治疗消化性溃疡穿孔开始广泛应用于临床[2]. 但在腹腔镜手术探查的过程中, 如果遇到巨大溃疡穿孔(指溃疡穿孔直径大于2.5 cm)的患者, 很多术者都会放弃微创, 选择中转开腹手术[3-5]. 经过临床摸索总结, 我们选择了腹腔镜辅助小切口修补治疗巨大消化性溃疡穿孔, 取得了较好的疗效, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2010-02/2013-10我院收治的巨大消化性溃疡穿孔患者106例, 其中男性66例, 女性40例, 年龄27-58岁, 平均年龄36.4岁±9.4岁. 将106例患者随机分为两组, 各53例, 两组患者的一般资料如表1所示, 无明显差异, 具有可比性($P>0.05$).

1.2 方法

1.2.1 手术: 采用气管插管全麻, 建立气腹, 插入腹腔镜, 吸净腹腔积液, 探查穿孔部位, 如果发现溃疡为巨大溃疡穿孔(溃疡穿孔直径>2.5 cm), 行腹腔镜下缝合修补困难者, 对照组选择采用常规手术方法; 选择经右上腹直肌切口约12 cm, 进行修补及腹腔冲洗, 同时放置隔下及盆腔引流管[6]. 治疗组选择腹腔镜加辅助小切口修补法; 在腹腔镜下用凡士林纱条暂时填塞穿孔处防止胃肠内容物持续流出, 然后在腹腔镜下用大量生理盐水冲洗腹腔, 冲洗干净后在腹壁上定位穿孔处的体表投影, 根据体表投影选择长约3-4 cm的上腹部横切口或斜切口, 在直视下行穿孔修补术. 修补完毕后常规缝合切口, 重新建立气腹, 腹腔镜下再次用适量盐水冲洗穿孔修补处及安放引流管. 手术结束后均常规采用抗溃疡药物进行治疗[7].

1.2.2 疗效判定标准: 记录并比较两组患者的手术时间、手术出血量、肛门排气时间、住院时间、肠鸣音恢复时间以及下床时间等围手术期指标; 同时比较手术后1、3和7 d的VAS评分及镇痛药物的使用率; 并比较炎性肠梗阻、腹腔残余感染等并发症的发生率. 其中疼痛判定标准采用VSA评分; 0分为无痛; 1-3分为轻度疼痛; 4-6分为中度疼痛; 7-10分为重度疼痛.

统计学处理 所有数据均采用SPSS 13.0进行分析, 计量数据采用mean±SD表示. 采用t检验, 计数资料采用χ^2检验. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 两组患者围手术期指标比较 两组患者围手术期指标比较如表2所示, 治疗组患者手术出血量、肛门排气时间、住院时间、肠鸣音恢复时间以及下床活动时间均明显少于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$).

2.2 两组患者VAS疼痛评分比较 两组患者VAS疼痛评分比较如表3所示, 治疗组术后1、3以及7 d的VAS评分明显低于对照组, 两组比较差异明显, 有统计学意义($P<0.05$); 且治疗组患者镇痛药物的使用率为11.3%, 明显低于对照组43.4%, 差异有统计学意义($P<0.05$).

2.3 两组患者并发症比较 两组患者并发症比较如表4所示, 治疗组患者的并发症发生率为5.7%,

■创新盘点
本文研究了巨大消化性溃疡穿孔如何应用腹腔镜辅助小切口治疗减小患者的创伤.

表 1 两组患者一般资料比较

分组	胃溃疡n(%)	十二指肠溃疡n(%)	穿孔时间(h)	腹腔积液(mL)
治疗组	9(17.0)	44(83.0)	20.4 ± 6.9	398.6 ± 112.7
对照组	10(18.9)	43(81.1)	21.9 ± 5.9	408.2 ± 89.9

表 2 两组患者围手术期指标比较 (mean ± SD, n = 53)

分组	手术时间(min)	手术出血量(mL)	肛门排气时间(h)	住院时间(d)	肠鸣音恢复时间(h)	下床活动时间(h)
治疗组	45.9 ± 12.9	42.0 ± 12.1[a]	16.8 ± 2.3[a]	6.6 ± 2.1[a]	18.4 ± 5.6[a]	10.4 ± 2.9[a]
对照组	48.9 ± 23.4	156.0 ± 34.6	40.6 ± 6.9	12.8 ± 3.5	45.6 ± 7.7	38.7 ± 9.7

[a]P<0.05 *vs* 对照组.

表 3 两组患者VAS疼痛评分比较 [n = 53, n(%)]

分组	VAS疼痛评分			镇痛药物使用率
	术后1 d	术后3 d	术后7 d	
治疗组	3.1 ± 0.4[a]	2.4 ± 0.6[a]	1.6 ± 0.2[a]	6(11.3)[a]
对照组	5.3 ± 0.3	4.4 ± 0.4	3.2 ± 0.3	23(43.4)

[a]P<0.05 *vs* 对照组.

表 4 两组患者并发症比较n(%)

分组	切口感染	切口开裂	炎性肠梗阻	肠间隙脓肿	盆腔脓肿	肺部感染	总发生率 (%)
治疗组	0(0.0)	0(0.0)	1(1.9)	1(1.9)	1(1.9)	0(0.0)	5.7[a]
对照组	4(7.5)	1(1.9)	4(7.5)	3(5.7)	2(3.8)	3(5.7)	32.1

[a]P<0.05 *vs* 对照组.

对照组患者并发症为32.1%, 两组比较差异明显, 有统计学意义(P<0.05).

3 讨论

胃及十二指肠溃疡穿孔是常见的普外科急腹症. 随着腹腔镜器械的改进和操作技术的进步, 腹腔镜下溃疡穿孔修补术已经在外科急腹症方面开始广泛应用[8]. 但在腹腔镜手术探查的过程中, 如果遇到巨大溃疡穿孔的患者, 很多术者都会放弃微创治疗, 选择中转开腹手术[9].

本次课题专门研究了腹腔镜下辅助小切口行巨大消化疡穿孔修补术与传统开腹修补术的对比. 研究发现, 治疗组患者的出血量、术后下床活动时间、手术后1、3及7 d的疼痛评分明显低于对照组, 镇痛药物的使用率也明显低于对照组. 手术后并发症如切口感染、切口裂开及术后炎性肠梗阻及肺部感染及腹腔残余感染等等方面比较, 治疗组也有明显的优势. 分析原因, 可能与下列因素有关[10]. (1)治疗组患者因为在腹腔镜下已经行了彻底的冲洗, 仅仅需行缝合修补. 因此可以根据穿孔处的体表投影有针对性地选择上腹部较小的横或斜切口, 横、斜切口张力较小, 术后疼痛较轻, 从而导致呼吸功能受限不明显. 因此患者术后发生肺部感染的机会明显减低, 同时患者更愿意早期下床活动, 促进了肠功能的恢复; (2)治疗组患者因为在腹腔镜下冲洗干净后再行小切口直视下修补, 相当于把三类切口变成二类切口, 所以切口愈合情况明显优于对照组. 另外在腹腔镜直视下冲洗, 腹腔脓液冲洗得更加彻底, 发生腹腔残余感染的几率明显减低. 本手术的关键之处就是必须先在腹腔镜下行彻底的腹腔冲洗, 从而在行开

■同行评价
腹腔镜辅助小切口治疗巨大消化性溃疡穿孔的临床效果明显好于传统开腹手术, 创伤小, 并发症少, 患者的痛苦轻, 值得临床推广应用.

放式小切口修补术时能避免污染切口. 既往部分学者认为腹腔镜下行冲洗有一定的困难[11,12], 不如开腹手术彻底. 但本次研究发现治疗组术后发生腹腔残余感染明显少于对照组. 说明随着腹腔镜操作技术的进步和改进, 冲洗不彻底性的问题已经得到了很好的解决. 我们冲洗的经验是用生理盐水行持续的腹腔冲洗, 边冲边吸引, 可以利用五叶钳帮助暴露和翻动肠管以利用彻底冲洗, 吸引到最后少量腹腔积液的时候, 因为吸引管负压的关系, 经常导致肠管堵塞吸引管头部, 因此不能很好吸尽少许残余的冲洗液, 这时可在吸引管头部放置一小纱布, 用吸引头在小纱布上吸引可完全吸尽冲洗液[13,14]. 另外冲洗时一般在上腹部和膈下区域操作比较容易, 部分患者身高较高导致下腹部及盆腔距离操作孔较远, 尤其在盆腔等处不能行彻底的吸引, 此时可根据患者的情况在下腹部另建一5 mm的戳孔专门用于吸引和冲洗, 从而保证冲洗的彻底性, 避免腹腔残余感染的发生. 冲洗的另外一个关键是合理的戳孔建立[15]. 我们的经验是在脐部置入镜子后观察穿孔的部位, 然后分别在右中腹部腹直肌外缘及左侧上、下腹部腹直肌外缘处建立戳孔[16]. 因为不考虑行腹腔镜下修补, 戳空建立的原则就是方便彻底冲洗及术后利用戳空摆放引流管.

总之, 腹腔镜辅助下小切口手术修补巨大消化性溃疡穿孔具有明显的优势, 主要表现为创伤小, 疼痛轻, 恢复快. 并发症少等特点. 有一定临床推广应用价值.

4 参考文献

1 李小冬, 胡昇庠, 刘子君. 老年消化性溃疡穿孔患者腹腔镜下胃穿孔修补术与开腹手术比较. 中国老年学杂志 2012; 32: 3997-3998
2 丁杰, 廖国庆, 张忠民. 腹腔镜与开腹消化性溃疡穿孔修补术比较的Meta分析. 中华胃肠外科杂志 2011; 14: 785-789
3 黄时杰. 腹腔镜十二指肠溃疡穿孔非缝合修补术. 中国内镜杂志 2002; 8: 21-22
4 任骏, 吴彪, 龚昭. 胃穿孔腹腔镜修补术与开腹修补术术后胃肠动力恢复的对比研究. 腹腔镜外科杂志 2009; 14: 38-40
5 张东秀. 腹腔镜胃十二指肠溃疡穿孔修补术与开腹术疗效比较. 贵阳医学院学报 2013; 38: 657-659
6 郭久冰, 纪程宏, 徐文军, 颜松龄, 张道建, 陈刚, 王华斌. 腹腔镜下十二指肠球部溃疡穿孔修补术治疗体会(附58例报告). 临床消化病杂志 2009; 21: 76-77
7 吴志明, 娄建平, 孟兴成, 代明盛, 沈华强, 包百根. 腹腔镜与开腹胃十二指肠溃疡穿孔修补术的对比研究. 腹腔镜外科杂志 2007; 12: 12-13
8 李振洪, 李立志, 黄文文, 许景洪, 张涌泉, 甘雨. 腹腔镜胃十二指肠溃疡穿孔修补辅助H2受体拮抗剂治疗急性胃十二指肠溃疡穿孔. 腹腔镜外科杂志 2006; 11: 378-379
9 王秀文. 胃十二指肠溃疡急性穿孔42例联合治疗体会. 当代医学 2010; 15: 51-52
10 颜璟, 罗涛, 岳晓林, 吴艳军, 蔺原, 杨映弘 . 经脐单一部位腹腔镜手术治疗消化性溃疡穿孔. 中国微创外科杂志 2013, 13: 841-843.
11 陆光生, 张斌. 胃十二指肠溃疡穿孔治疗方法的对比分析. 山东医药 2012; 52: 70-72
12 周海华. 经腹腔镜消化性溃疡穿孔修补术临床应用价值. 现代医药卫生 2013; 29: 2325-2326
13 翁伟建, 林孝和, 李新华, 贾保全, 曹农, 杨伟林. 腹腔镜胃十二指肠溃疡穿孔修补的探讨. 局解手术学杂志 2004; 13: 378-379
14 蔡小勇, 陆文奇, 卢榜裕. 腹腔镜治疗外科急腹症122例临床分析. 中国微创外科杂志 2004; 4: 322-323
15 黄东. 腹腔镜手术治疗急性胃十二指肠溃疡穿孔60例分析. 中外医学研究 2011; 9: 140-141
16 王健, 张文伟, 林波, 陈浩, 黄滨, 阳峻, 江自卓, 曹天生. 腹腔镜消化性溃疡穿孔修补术的临床应用. 腹腔镜外科杂志 2012; 17: 50-52

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2059-2063
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

利多卡因联合帕瑞昔布在老年人腹腔镜结肠癌根治术中的应用

唐 珩, 张培俊, 李艳华, 马庆杰

唐珩, 张培俊, 李艳华, 马庆杰, 云南省第一人民医院麻醉科 云南省昆明市 650032
唐珩, 主治医师, 主要从事麻醉学的研究.
作者贡献分布: 此课题由唐珩设计; 临床研究部分由唐珩、张培俊及马庆杰操作完成; 实验研究所用试剂与分析工具由李艳华联系提供与唐珩完成; 数据分析由唐珩与张培俊共同完成; 本论文写作由唐珩完成.
通讯作者: 唐珩, 主治医师, 650032, 云南省昆明市金碧路157号, 云南省第一人民医院麻醉科. tangheng2320@aliyun.com
电话: 0871-63623857
收稿日期: 2014-02-14 修回日期: 2014-03-19
接受日期: 2014-03-31 在线出版日期: 2014-05-18

Application of lidocaine combined with parecoxib in elderly patients undergoing laparoscopic radical resection for colon cancer

Heng Tang, Pei-Jun Zhang, Yan-Hua Li, Qing-Jie Ma

Heng Tang, Pei-Jun Zhang, Yan-Hua Li, Qing-Jie Ma, Department of Anesthesiology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Correspondence to: Heng Tang, Attending Physician, Department of Anesthesiology, the First People's Hospital of Yunnan Province, 157 Jinbi Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. tangheng2320@aliyun.com
Received: 2014-02-14 Revised: 2014-03-19
Accepted: 2014-03-31 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To evaluate the effect of lidocaine combined with parecoxib on postoperative recovery in elderly patients undergoing laparoscopic radical resection for colon cancer.

METHODS: Ninety patients undergoing elective laparoscopic radical resection for colon cancer, aged 65-85 yrs, were randomly divided into a lidocaine plus parecoxib (group Ⅰ) group and a control group (group Ⅱ). After intubation, the patients in group I were given parecoxib 40 mg and a bolus dose of intravenous lidocaine (1.0 mg/kg), followed by continuous infusion of lidocaine 0.5 mg/(kg•min) until the end of the operation. In the control group, normal saline was given at the same volume. Neuropsychological testing was performed with mini-mental state examination (MMSE) on the preoperative day, postoperative days 3 and 7. Venous blood samples were collected before induction (T0), the end of the operation (T1) and 24 h postoperatively. Serum level of S100β protein was measured. The score of pain was recorded within the first 24 h postoperatively. The adverse effects of general anesthesia, such as postoperative cognitive dysfunction (POCD), postoperative nausea and vomit (PONV) and sore throat, were observed. The time to recovery of gastrointestinal function, time in bed and time of hospital stay were compared between the two groups.

RESULTS: The incidence of POCD in group Ⅰ was significantly lower than that in group Ⅱ (3 d: 15.6% *vs* 35.6%, 7 d: 13.3% *vs* 33.3%, $P < 0.05$ for both). The effect of analgesia in group Ⅰ was significantly better than that in group Ⅱ in the first 12 h postoperatively (VAS score 1 h: 22 ± 3 *vs* 33 ± 7, 6 h: 19 ± 7 *vs* 30 ± 6, 12 h: 10 ± 1 *vs* 19 ± 1, $P < 0.05$ for all). Time in bed in group I was significantly shorter than that in group Ⅱ (1.61 d ± 0.34 d *vs* 2.91 d ± 0.54 d, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Intravenous lidocaine combined with parecoxib can decrease the incidence of complications in elderly patients undergoing laparoscopic radical resection for colon cancer; hence, it is good for postoperative recovery.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Lidocaine; Parecoxib; Postoperative cognitive dysfunction; Analgesia

Tang H, Zhang PJ, Li YH, Ma QJ. Application of lidocaine combined with parecoxib in elderly patients undergoing laparoscopic radical resection for colon cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2059-2063 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2059.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2059

摘要

目的: 评估静脉利多卡因联合帕瑞昔布对老

■背景资料
腹腔镜结肠癌根治术由于具有微创、安全、术后恢复快等优点, 目前已经广泛应用于临床. 但术后伤口疼痛和老年人全麻术后的一些并发症如术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD), 可能影响患者的术后恢复, 增加护理难度, 从而降低患者术后的生活质量. 本文试图探讨联合应用利多卡因和帕瑞昔布是否可以降低以上并发症, 从而改善老年患者术后的生活质量.

■同行评议者
刘海峰, 主任医师, 北京市武警总医院消化科

■研发前沿
老年POCD和术后镇痛是目前关于老年人术后恢复问题的研究热点，目前临床上希望应用某些药物可以达到改善老年人术后认知功能，减轻术后疼痛，而不增加其他相关并发症的发生率，从而达到改善老年患者术后生活质量的目的. 本文选择联合应用利多卡因和帕瑞昔布探讨以上问题.

■相关报道
相关研究表明，感染和手术能引起炎症的细胞因子增加，而炎症与认知功能下降相关，老年人术后的早期炎症反应与POCD的发生有关，S100β蛋白可以作为评估老年患者肠癌手术后发生POCD的重要指标. 帕瑞昔布能有效抑制围术期炎症反应，发挥良好的术后镇痛作用并可能降低POCD的发生率.

年全麻下行结肠癌手术患者全麻术后恢复的价值.

方法：择期行结肠癌根治术的老年患者90例，年龄65-85岁，随机分为2组，利多卡因联合帕瑞昔布组(Ⅰ组)和对照组(Ⅱ组)，每组45例. Ⅰ组在麻醉诱导插管后予帕瑞昔布40 mg静脉注射，持续静脉输注利多卡因[负荷量1.0 mg/kg，维持量0.5 mg/(kg•min)至术毕]，对照组则予等容量的生理盐水. 采用简易智能量表(mini-mental state examination)在术前1 d、术后3 d和7 d进行认知功能测定. 麻醉诱导前(T0)、术毕(T1)、术后24 h(T2)3个时间点抽取静脉血，测定血清S100β蛋白含量. 记录术后24 h内两组患者不同时间视觉模拟镇痛评分(visual analgesia score, VAS)以评价术后镇痛效果. 观察术后认知功能障碍、恶心呕吐、咽痛等老年人较常见的全麻术后不良反应的发生情况并对两组患者术后胃肠功能恢复时间、下床活动时间、住院时间等进行比较.

结果：Ⅰ组患者术后认知功能障碍发生率较对照组下降(3 d: 15.6% *vs* 35.6%, 7 d: 13.3% *vs* 33.3%)，差异有统计学意义($P<0.05$). Ⅰ组患者12 h内镇痛效果优于Ⅱ组(VAS 1 h: 22±3 *vs* 33±7, 6 h: 19±7 *vs* 30±6, 12 h: 10±1 *vs* 19±1，均$P<0.05$)，下床活动时间早于Ⅱ组(1.61 d±0.34 d *vs* 2.91 d±0.54 d, $P<0.05$).

结论：静脉利多卡因联合帕瑞昔布可以降低老年全麻下结肠癌根治术的术后不良反应发生率，利于患者术后恢复.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词：利多卡因；帕瑞昔布；术后认知功能障碍；镇痛

核心提示：利多卡因联合帕瑞昔布由于可以降低老年患者腹腔镜结肠癌根治术术后认知功能障碍的发生率，明显减轻患者术后疼痛，且不增加其他老年患者全麻术后并发症如术后恶心、呕吐的发生率，使患者可以更早地下床活动，改善了老年患者腹腔镜结肠癌根治术后的生活质量.

唐珩，张培俊，李艳华，马庆杰. 利多卡因联合帕瑞昔布在老年人腹腔镜结肠癌根治术中的应用. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2059-2063 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2059.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2059

0 引言

腹腔镜结肠癌根治术由于具有微创、安全、术后恢复快等优点，目前已经广泛应用于临床[1,2]. 但术后伤口疼痛和老年人全麻术后的一些并发症如术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)可能影响患者的术后恢复，增加护理难度，从而降低患者术后的生活质量. 已经有研究证明利多卡因可以降低颅压，防治中枢神经缺血性疾病，对颅脑外伤的脑损伤有保护作用[3]. 亦有研究表明利多卡因可以改善老年髋关节手术术后早期认知功能[4]. 帕瑞昔布是高选择性环氧化酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)抑制剂，能同时抑制外周和中枢COX-2的表达，有效抑制围术期炎症反应，发挥良好的术后镇痛作用[5]. 本研究拟通过在老年全麻下行结肠癌手术中静脉应用利多卡因联合帕瑞昔布，评估其对老年患者全麻术后恢复的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2011-01/2012-09择期全麻下行腹腔镜结肠癌根治术的患者90例，年龄65-85岁，ASA Ⅰ-Ⅲ级. 术前均得到我院伦理委员会批准，取得患者及家属的知情同意，术前1 d经简易精神状态量表评分认知功能正常. 无神经系统和精神病史，无长期服用镇静镇痛药，无磺胺过敏，无活动性消化道溃疡，无严重心、肝、肺、肾功能障碍. 随机分为2组，利多卡因联合帕瑞昔布组(Ⅰ组)和对照组(Ⅱ组)，每组45例，2组患者在年龄、性别、体质量、手术时长、术中失血量等方面比较无统计学差异($P>0.05$).

1.2 方法

1.2.1 认知功能测定：术前1 d及术后3、7 d由1名不知患者分组的临床心理科医师对患者进行简易精神状态量表(mini-mental state examination, MMSE)评分，术后MMSE得分降低值≥术前值的1个标准差即认为发生POCD，术后MMSE得分降低值≥术前值的2个标准差为重度POCD.

1.2.2 麻醉：所有患者免术前用药，入手术室后开放外周静脉，监测心电图、无创血压和脉搏血氧饱和度(SPO_2). 采用静脉复合麻醉，静脉注射咪唑安定0.05 mg/kg，舒芬太尼0.5 μg/kg，维库溴胺0.1 mg/kg，丙泊酚1.5 mg/kg麻醉诱导，气管插管后机械通气. 术中均以瑞芬太尼0.1-0.3 μg/(kg•min)，异丙酚5-6 mg/(kg•h)维持麻醉，必要时追加维库溴胺，维持SPO_2在95%以上，呼气末二氧化碳分压在35-40 mmHg，脑电双频谱指数值40-60. 利多卡因联合帕瑞昔布组在麻醉诱导插

表 1 两组患者术后POCD、术后咽痛、恶心呕吐发生率比较 (n = 45, n(%))

分组	术后3 d POCD	术后7 d POCD	术后7 d重度POCD	咽痛	恶心呕吐
Ⅰ组	7(16)	6(13)	2(4)	5(11)	6(13)
Ⅱ组	16(36)[a]	15(33)[a]	3(7)	9(20)	7(16)

[a]P<0.05 *vs* Ⅰ组. POCD: 术后认知功能障碍.

表 2 两组患者不同时间血清S100β蛋白水平的比较 (mean ± SD, μg/L)

分组	T0	T1	T2
Ⅰ组	0.135 ± 0.010	0.198 ± 0.012[d]	0.135 ± 0.010
Ⅱ组	0.134 ± 0.010	0.234 ± 0.013[bd]	0.137 ± 0.010[d]

[b]P<0.01 *vs* Ⅰ组; [d]P<0.01 *vs* T0.

表 3 两组患者不同时点VAS评分 (n = 45, mean ± SD, 分)

分组	术后1 h	术后6 h	术后12 h	术后24 h
Ⅰ组	22 ± 3	19 ± 7	10 ± 1	8 ± 1
Ⅱ组	33 ± 7[a]	30 ± 6[a]	19 ± 1[a]	10 ± 1

[a]P<0.05 *vs* Ⅰ组. VAS: 视觉模拟镇痛评分.

管后予静注帕瑞昔布40 mg, 负荷量利多卡因1.0 mg/kg, 此后予维持量利多卡因0.5 mg/(kg•min)至术毕. 对照组则输等容量的生理盐水. 术毕患者清醒拔除气管导管后送麻醉恢复室.

1.2.3 标本采集与检测及观察指标: 分别于术前(T0)、术毕(T1)、术后24 h(T2)3个时间点抽取静脉血, 血样离心后取血清, 采用酶联免疫吸附法测定血清S100β蛋白含量. 术前1 d及术后3、7 d MMSE评分. 术后1(出麻醉恢复室时)、6、12、24 h记录视觉模拟镇痛评分(visual analgesia score, VAS): 0分表示无痛, <30分为良好, 30-40分为基本满意, ≥50分为差, 100分为剧痛. 观察术后恶心呕吐、咽喉痛等不良反应. 比较两组患者术后胃肠功能恢复时间、下床活动时间、住院时间.

统计学处理 利用SPSS19.0统计软件. 计量资料以mean±SD表示, 采用t检验; 计数资料采用χ^2检验. P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 全麻术后并发症发生情况 Ⅰ组POCD发生率(3 d: 15.6%, 7 d: 13.3%)较对照组(3 d: 35.6%, 7 d: 33.3%)下降(P<0.05). 对照组术后7 d有3例重度POCD(发生率6.7%), 而Ⅰ组术后7 d有2例重度POCD(发生率4.4%), 两组术后7 d重度POCD发生率无统计学差异(P>0.05). 两组咽痛和术后恶心呕吐的发生率无统计学差异(P>0.05)(表1).

2.2 血清S100β蛋白含量 两组在T1时血清S100β蛋白含量与T0相比均增加(P<0.01), Ⅱ组在T2时血清S100β蛋白含量与T0相比增加(P<0.01). Ⅰ组在T1时血清S100β蛋白含量低于Ⅱ组(P<0.01)(表2).

2.3 患者术后不同时点VAS评分 Ⅰ组患者在术后1(出麻醉恢复室时)、6、12 h VAS评分均低于Ⅱ组(P<0.05)(表3).

2.4 术后两组胃肠功能恢复时间和住院时间比较 Ⅰ组患者术后下床活动时间较Ⅱ组缩短, 差异有统计学意义(P<0.05)(表4).

3 讨论

POCD好发于65岁以上老年人, 作为老年人术后较常见的中枢神经系统并发症, 对老年患者术后的生活质量有较大的影响, 近年来逐渐得到临床医生的重视. Moller等[6]的研究发现, 老年患者术后1 wk POCD发生率为25%, 3 mo为10%. POCD的确切病因不明, 近期有研究发现, 感染和手术能引起炎症细胞因子的增加, 而炎症与

■**创新盘点**
本文从在老年人腹腔镜结肠癌根治术中联合应用利多卡因和帕瑞昔布入手, 全面观察其改善老年人术后认知功能, 减轻术后疼痛的效果, 同时观察其是否增加其他相关并发症的发生率, 从而判断其能否达到改善老年患者术后生活质量的目的.

■**应用要点**
术中联合应用利多卡因和帕瑞昔布方法简单可行, 能改善老年人术后认知功能, 减轻术后疼痛, 同时不增加其他相关并发症的发生率, 从而达到改善老年患者术后生活质量的目的. 在临床上值得推广应用.

■名词解释
POCD: 老年人全麻术后常出现中枢神经系统的并发症, 表现为精神错乱、焦虑、人格改变及记忆受损. 这种麻醉手术后患者记忆力、抽象思维及定向力等方面的障碍, 同时伴有社会活动能力的减退, 即人格、社交能力及认知能力和技巧的变化称术后认知功能障碍.

表 4 术后两组胃肠功能恢复时间和住院时间比较 (n = 45, mean ± SD, d)

分组	胃肠功能恢复时间	术后下床活动时间	住院时间
Ⅰ组	2.15 ± 0.62	1.61 ± 0.34	5.08 ± 1.12
Ⅱ组	2.04 ± 0.49	2.91 ± 0.54[a]	5.34 ± 1.92

[a]P<0.05 *vs* Ⅰ组.

认知功能下降相关, 老年人术后的早期炎症反应与POCD的发生有关[7,8], 而内皮素生成失调在加重神经炎症反应和POCD的发生中起到重要的作用[9]. 利多卡因通过抑制交感肾上腺系统, 抑制应激反应和拮抗内皮素作用, 从而抑制脑炎症反应[10]. 有研究结果显示, 小剂量静脉注射利多卡因具有良好的消炎、镇痛及抗氧化作用, 且毒性小, 不良反应少[11]. 此外, 利多卡因能阻断Na^+、K^+、Ca^{2+}通道, 降低细胞内Na^+和Ca^{2+}浓度, 减少K^+外流, 改善脑血流, 以及抗氧自由基及膜稳定作用, 减轻缺血再灌注损伤, 发挥脑保护作用[12]. 作为选择性(COX-2)抑制剂, 近期研究对单独使用帕瑞昔布是否能降低POCD发生率仍存在争议, 但已经明确帕瑞昔布能降低患者术后早期炎症因子的释放[13,14]. 本研究中静脉利多卡因联合帕瑞昔布应用于老年全麻下行腹腔镜结肠癌根治术, 患者术后3 d和7 d POCD发生率较对照组显著下降可能与前述机制相关. 最近研究证实血清S100β蛋白可以作为评估老年患者肠癌手术后发生POCD的重要指标[15]. 本研究中, 术毕时两组患者血清S100β蛋白含量均较术前明显升高, 而利多卡因联合帕瑞昔布组血清S100β蛋白含量在术毕时显著低于对照组, 从另一方面证明利多卡因联合帕瑞昔布能改善老年患者腹腔镜结肠癌根治术术后的认知功能, 降低POCD发生率. 对于本文中两组患者术后7 d重度POCD发生率无差异, 作者认为可能与样本量不够大有关.

术后疼痛是影响患者术后恢复的另一大原因, 老年患者合并症较多, 更需要安全有效的术后镇痛. 帕瑞昔布起效快、镇痛效果确切, 可减少术后患者躁动, 目前广泛应用于术后镇痛[16]. 本文利多卡因联合帕瑞昔布组术后1、6、12 h内VAS评分均低于对照组, 取得了良好的术后镇痛效果, 在老年患者腹腔镜结肠癌根治术术后镇痛的应用中有很好的临床使用价值.

利多卡因联合帕瑞昔布由于可以降低老年患者腹腔镜结肠癌根治术术后认知功能障碍的发生率, 明显减轻患者术后疼痛, 且不增加其他老年患者全麻术后并发症如术后恶心、呕吐的发生率, 使患者可以更早地下床活动, 改善了老年患者腹腔镜结肠癌根治术后的生活质量.

总之, 术中静脉应用利多卡因联合帕瑞昔布可以降低老年全麻下结肠癌根治术的术后不良反应发生率, 利于患者术后恢复, 值得推广.

4 参考文献

1 范应方, 黄宗海, 方驰华. 手助腹腔镜结直肠癌根治术. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2922-2923
2 马怀昌. 腹腔镜与开腹行右半结肠癌根治术的疗效对比. 河南科技大学学报(医学版) 2013; 31: 290-291
3 华震, 王东信, 吴新民, 王沛玉. 利多卡因对大鼠微栓栓塞致脑损伤的保护作用. 中华麻醉学杂志 2005; 25: 527-531
4 倪艳, 葛继荣, 王忠云. 静注利多卡因对老年患者术后早期认知功能的影响. 江苏医药 2010; 36: 2646-2647
5 王庆, 李真, 王志鹏, 崔灿. 帕瑞昔布钠在腹腔镜结肠癌根治术中的超前镇痛作用. 南方医科大学学报 2010; 30: 2556-2561
6 Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, Houx P, Rasmussen H, Canet J, Rabbitt P, Jolles J, Larsen K, Hanning CD, Langeron O, Johnson T, Lauven PM, Kristensen PA, Biedler A, van Beem H, Fraidakis O, Silverstein JH, Beneken JE, Gravenstein JS. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. *Lancet* 1998; 351: 857-861 [PMID: 9525362]
7 李颖川, 安一凡, 董维华, 周明. 老年患者全髋关节置换术后认知功能障碍与围术期炎性反应的相关性. 上海医学 2011; 34: 249-252
8 Ji MH, Yuan HM, Zhang GF, Li XM, Dong L, Li WY, Zhou ZQ, Yang JJ. Changes in plasma and cerebrospinal fluid biomarkers in aged patients with early postoperative cognitive dysfunction following total hip-replacement surgery. *J Anesth* 2013; 27: 236-242 [PMID: 23085747 DOI: 10.1007/s00540-012-1506-3]
9 Riedel B, Browne K, Silbert B. Cerebral protection: inflammation, endothelial dysfunction, and postoperative cognitive dysfunction. *Curr Opin Anaesthesiol* 2014; 27: 89-97 [PMID: 24300462 DOI: 10.1097/ACO.0000000000000032]
10 邹毅清, 聂海贵, 魏斌, 曾淑珍, 李小宝, 杨志星. 静脉输注利多卡因对腹部大手术炎症反应的影响. 现代中西医结合杂志 2009; 18: 3276-3277, 3292
11 Kang H, Kim BG. Intravenous lidocaine for effective pain relief after inguinal herniorrhaphy: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Int Med Res* 2011; 39: 435-445

[PMID: 21672347]
12 李琪, 张俊峰. 利多卡因预处理对膝关节镜手术中止血带引起的脂质过氧化的影响. 上海医学 2013; 36: 301-303
13 赵璞, 何龙, 李志松, 张卫. 帕瑞昔布钠对老年患者膝关节置换术患者术后早期认知功能的影响. 中国老年学杂志 2012; 32: 4115-4117
14 李井柱, 李晓征, 王晓敏, 王明山, 于海芳, 时飞, 苗丹, 毕燕琳. 帕瑞昔布钠镇痛对老年急诊股骨头置换术患者神经系统的影响. 中华医学杂志 2013; 93: 2152-2154
15 林舜艳, 高巨, 尹正录, 戴载深, 徐少群. 老年肠癌患者术后认知功能障碍与血清S-100β蛋白关系及中医证型分布的研究. 广东医学 2011; 32: 1282-1284
16 余永华, 王琦, 姚尚龙. 帕瑞昔布钠与曲马多对七氟醚麻醉后苏醒期躁动的比较. 临床麻醉学杂志 2011; 27: 950-952

编辑 郭鹏 电编 都珍珍

■同行评价

本文提出利多卡因联合帕瑞昔布, 可以降老年患者POCD的发生率, 明显减轻患者术后疼痛, 不增加其他老年患者全麻术后并发症如术后恶心呕吐的发生率, 使患者可以更早地下床活动, 改善老年患者术后的生活质量, 同时此方法在临床老年手术中应用方法简便易行, 可行性高, 在临床手术中可以推广使用.

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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. (《世界华人消化杂志》编辑部)

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2064-2068
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

胆囊结石与胆囊壁黏膜幽门螺杆菌定植的关系

王 炜, 朱建华, 韩 江, 吴 衍, 丁佩芬

■背景资料
胆囊结石的形成机制比较复杂, 目前认为可能与遗传、胆固醇及脂质代谢平衡紊乱、胆囊动力学异常、胆汁促一抗成核因子平衡紊乱以及细菌感染等有关. 自从在胆道系统检测出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), 其与胆囊结石形成的关系成为研究的热点.

王炜, 韩江, 吴衍, 上海市浦东新区周浦医院普通外科 上海市 201318
朱建华, 上海市浦东新区周浦医院急诊外科 上海市 201318
丁佩芬, 上海市浦东新区周浦医院病理科 上海市 201318
王炜, 主治医师, 主要从事肝胆胃肠外科的临床研究.
上海市卫生和计划生育委员会基金资助项目, No. 2010Y085
作者贡献分布: 课题的设计与论文写作由王炜与朱建华完成. 研究过程与数据分析由韩江与吴衍共同完成; 试剂的提供由丁佩芬完成.
通讯作者: 朱建华, 副主任医师, 201318, 上海市浦东新区周浦镇周园路1500号, 上海市浦东新区周浦医院急诊外科.
viviankent@163.com
电话: 021-68135590-2132
收稿日期: 2014-02-25 修回日期: 2014-03-31
接受日期: 2014-04-04 在线出版日期: 2014-05-18

Relationship between gallbladder stones and *Helicobacter pylori* colonization of the gallbladder mucosa

Wei Wang, Jian-Hua Zhu, Jiang Han, Yan Wu, Pei-Fen Ding

Wei Wang, Jiang Han, Yan Wu, Department of General Surgery, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201318, China
Jian-Hua Zhu, Department of Emergency Medicine, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201318, China
Pei-Fen Ding, Department of Pathology, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, Shanghai 201318, China
Supported by: the Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission Fund Project, No. 2010Y085
Correspondence to: Jian-Hua Zhu, Associate Chief Physician, Department of Emergency Medicine, Zhoupu Hospital of Pudong New Area, 1500 Zhouyuan Road, Zhoupu Town, Shanghai 201318, China. viviankent@163.com
Received: 2014-02-25 Revised: 2014-03-31
Accepted: 2014-04-04 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between gallbladder stones and *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) colonization of the gallbladder mucosa.

METHODS: *H. pylori* was detected in bile and gallbladder mucosa of 64 patients with gallbladder stones (experimental group) and 16 patients without gallbladder stones (control group). Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect specific DNA fragments. Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) was used to detect *H. pylori* IgG antibody. Immunohistochemistry was also used to detect *H. pylori* specific protein in gallbladder mucosa specimens.

RESULTS: ELISA analysis showed that the rate of *H. pylori* infection did not differ significantly between the experimental group and control group (48.44% *vs* 43.75%, $P < 0.05$). PCR analysis showed that the rate of *H. pylori* colonization of the gallbladder mucosa was significantly higher in the experimental group than in the control group (39.06% *vs* 12.50%, $P = 0.04$), but the rate of *H. pylori* in bile did not significantly between the two groups (59.38% *vs* 56.25%, $P < 0.05$). Immunohistochemistry analysis detected 19 positive cases in the experimental group and only 1 positive case in the control group.

CONCLUSION: *H. pylori* infection in the biliary tract does not play a major role in the process of gallbladder stone formation, but *H. pylori* colonization in the gallbladder mucosa is involved in the formation of gallstones.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Gallbladder stones; Formation

Wang W, Zhu JH, Han J, Wu Y, Ding PF. Relationship between gallbladder stones and *Helicobacter pylori* colonization of the gallbladder mucosa. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2064-2068 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2064.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2064

摘要

目的: 研究和探讨幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)在胆囊壁黏膜中的定植与胆囊结石形成的相关性.

方法: 分别对结石性胆囊炎和非结石性胆囊切除患者的胆囊组织和胆汁进行幽门螺杆菌检测, 采用多聚酶链式反应检测幽门螺杆菌特异性DNA片段、酶联免疫吸附试验检测幽门

■同行评议者
陈进宏, 副主任医师, 复旦大学附属华山医院普外科

螺杆菌抗体蛋白IgG、并对两组胆囊黏膜标本行幽门螺杆菌免疫组织化学技术染色检测.

结果: 采用ELISA方法检测结石组和非结石组中*H. pylori*抗体蛋白, 结石组中48.44%阳性, 非结石组43.75%阳性, 两者之间无统计学差异. 采用PCR方法检测结石组和非结石组胆囊黏膜和胆汁标本中*H. pylori*特异性DNA片段, 胆囊黏膜中结石组25例阳性(39.06%), 非结石组2例阳性(12.50%), 两者之间有统计学差异(P = 0.04); 而胆汁中结石组59.38%阳性, 非结石组56.25%阳性, 两者之间无统计学差异. 对两组胆囊黏膜标本行免疫组织化学检测, 结石组有19例阳性, 在胆囊黏膜腺腔中可见棒状、弯曲杆状或球形的菌体, 呈棕黄色或棕褐色. 而非结石组仅有1例检出.

结论: 胆道中*H. pylori*感染在胆囊结石形成的过程中不起主要作用, 而*H. pylori*在胆囊黏膜的定植则参与胆囊结石的形成.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 幽门螺旋杆菌; 胆囊结石; 成因

核心提示: 胆汁中的幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)阳性率远远高于和胆囊黏膜的阳性率, 结石组和非结石组之间无统计学差异, 结石患者黏膜中*H. pylori*检出率高于非结石患者, 本课题认为胆道中*H. pylori*感染在胆囊结石形成的过程中不起主要作用, 而*H. pylori*在胆囊黏膜的定植则参与胆囊结石的形成.

王炜, 朱建华, 韩江, 吴衍, 丁佩芬. 胆囊结石与胆囊壁黏膜幽门螺杆菌定植的关系. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2064-2068
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2064.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2064

0 引言

胆囊结石是一种严重影响人民身体健康的常见病和多发病, 胆结石的形成机制比较复杂, 目前认为可能与遗传、胆固醇及脂质代谢平衡紊乱、胆囊动力学异常、胆汁促-抗成核因子平衡紊乱以及细菌感染等有关. 自从在胆道系统检测出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)之后, 相关研究屡见报道, 但相关*H. pylori*在胆囊壁黏膜定植对胆囊结石的形成是否有影响鲜见报道, 为此, 我们观察了胆囊结石患者和非结石患者的胆囊组织、胆汁中的*H. pylori*感染情况, 探讨胆囊壁黏膜*H. pylori*定植对结石形成的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 结石组: 收集我院普通外科2011-01/2013-06 64例因胆囊结石合并慢性胆囊炎择期行腹腔镜胆囊切除术(男性29例, 女性35例, 年龄26-80岁, 平均年龄57.6岁±9.47岁患者的胆囊壁、胆汁标本. 非结石组: 收集同期16例因非胆结石疾病行胆囊切除术(13例为胆囊胆固醇息肉, 2例为肝内胆管结石行肝切除及胆囊切除, 1例为胆囊癌)患者的胆囊组织、胆汁标本. 胆囊组织在手术室无菌条件下收集, 胆汁标本术中采用腹腔镜下穿刺吸引收集, 所有标本立即放置于液氮罐冻存, 并及时移送-80 ℃超低温冰箱中保存待测.

1.2 方法

1.2.1 胆汁抗*H. pylori*免疫球蛋白(*H. pylori* IgG)检测: 应用ELISA法, 上海研吉生物科技有限公司提供人*H. pylori* IgG试剂盒要求对胆汁进行*H. pylori* IgG检测, 胆汁标本在室温下解冻并确保样品均匀地充分解冻, 1∶1稀释后, 依照次序对应加入阴性、阳性对照液和待测样品于酶标板空白微孔中, 标记样本编号, 在对照孔和样品孔中加入酶标溶液, 混匀, 恒温孵育, 洗板, 加入底物, 孵育, 终止反应, 15 min内在波长450 nm的酶标仪上读取各孔的A值. 试验有效性: 阳性对照孔平均值≥1.00; 阴性对照平均值≤0.10. 临界值(CUT OFF)计算: 临界值 = 阴性对照孔平均值+0.15. 阴性判定: 样品A值<临界值(CUT OFF)者为人*H. pylori* IgG(Hp-IgG)阴性. 阳性判定: 样品A值≥临界值(CUT OFF)者为人*H. pylori* IgG(Hp-IgG)阳性.

1.2.2 胆囊黏膜和胆汁PCR检测: 采用*H. pylori* 16S rRNA、*H. pylori* Ure A两对不同引物, 从*H. pylori* 基因文库采用Primer 5.0自行设计, 引物序列如表1, 引物由中国科学院上海高等研究院协助合成纯化, 对所取标本进行PCR扩增, 扩增产物经凝胶电泳分析, 如果在电泳中出现与引物相符的DNA带, 可判断为阳性.

1.2.3 胆囊组织*H. pylori* 免疫组织化学检测: 采用PV9000免疫组织化学二步法对两组胆囊黏膜标本进行*H. pylori* 检测. 同时以PBS缓冲液代替一抗作阴性对照, 以胃溃疡患者胃黏膜*H. pylori*阳性切片作为为阳性参照. 菌体位于胆囊黏膜腺腔中, 杆状、短杆状或球形, 染色呈棕黄色或棕褐色为阳性.

统计学处理 计数资料以率(%)表示, 数据输

■研发前沿
关于*H. pylori*与胆道结石的相关研究屡见报道, 但关于*H. pylori*在胆囊壁黏膜定植对胆囊结石的形成是否有影响鲜见报道.

■相关报道
Zhou等在2011年进行的一项Meta分析认为: 胆道系统*H. pylori*感染与胆结石形成有密切关系. 2013年Attaallah等的研究显示37%的胆结石患者的胆囊黏膜中有*H. pylori*定植.

■**创新盘点**

本课题研究通过ELISA、PCR、免疫组织化学(SP)等多种方法检测显示*H. pylori*存在与胆囊结石和非胆囊结石患者的胆道中，其中胆汁中的阳性率远远高于和胆囊黏膜的阳性率，结石组和非结石组胆道*H. pylori*感染之间无统计学差异，而PCR基因检测显示结石患者黏膜中*H. pylori*特异基因检出率高于非结石患者(P<0.05)，免疫组织化学*H. pylori*染色也观察到类似结果，因此本课题认为胆道中*H. pylori*感染在胆囊结石形成的过程中不起主要作用，而*H. pylori*在胆囊黏膜的定植则参与胆囊结石的形成.

表 1 PCR引物表

引物名称		序列	扩增大小(bp)
H. pylori 16S rRNA	Hp1	5'-CTGGAGAGACTAAGCCCTCC-3'	109
	Hp2	5'-ATTACTGACGCTGATTGTGC-3'	
H. pylori Ure A	P1	5'-CGGGATCCAAGTTTCAACCATTAGGA-3'	675
	P2	5'-CGGAATTCTTAGTGTTTTTTGTGATC-3'	

H. pylori: 幽门螺杆菌.

表 2 胆汁中抗*H. pylori*免疫球蛋白IgG检测 (ELISA)

分组	胆汁中*H. pylori*检出		合计
	阳性	阴性	
结石组	31	33	64
非结石组	7	9	16
合计	38	42	80
χ^2值	0.11		
P值	0.74		

H. pylori: 幽门螺杆菌.

表 3 胆囊黏膜和胆汁标本中*H. pylori*特异性DNA片段检测(PCR)

分组	黏膜		合计	胆汁		合计
	阳性	阴性		阳性	阴性	
结石组	25	39	64	38	26	64
非结石组	2	14	16	9	7	16
合计	27	53	80	47	33	80
χ^2值	4.04			0.05		
P值	0.04			0.82		

H. pylori: 幽门螺杆菌.

入SPSS18.0进行统计分析，采用χ^2检验，P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 检测

2.1.1 ELISA检测结石组和非结石组中*H. pylori*抗体蛋白：结石组中48.44%阳性，非结石组43.75%阳性，两者之间无统计学差异(P>0.05)(表2).

2.1.2 PCR检测结石组和非结石组胆囊黏膜和胆汁标本中*H. pylori*特异性DNA片段(图1)：胆囊黏膜中结石组25例阳性(39.06%)，非结石组2例阳性(12.50%)，两者之间有统计学差异(P = 0.04)；而胆汁中结石组59.38%阳性，非结石组56.25%阳性，两者之间无统计学差异(P>0.05)(表3).

表 4 胆囊黏膜*H. pylori*定植免疫组织化学染色检测

分组	黏膜		合计
	阳性	阴性	
结石组	19	45	64
非结石组	1	15	16
合计	20	60	80
χ^2值	3.75		
P值	0.05		

H. pylori: 幽门螺杆菌.

表 5 两种胆汁*H. pylori*检测方法的差异

方法	胆汁		合计
	阳性	阴性	
ELISA	38	42	80
PCR	47	33	80
合计	85	75	160
χ^2值	2.03		
P值	0.15		

H. pylori: 幽门螺杆菌.

2.1.3 免疫组织化学对*H. pylori*的检测：对两组胆囊黏膜标本行免疫组织化学检测，结石组有19例阳性，在胆囊黏膜腺腔中可见棒状、弯曲杆状或球形的菌体，呈棕黄色或棕褐色(图2). 而非结石组仅有1例检出. 两者之间有一定的差异，P = 0.051，结合PCR检测结果，可以认为两组的检出率不同(表4).

2.2 3种检测方法*H. pylori*检测阳性率的比较 对3种方法检测数据行统计学分析，均P>0.05，无统计学意义，表明检测方法的不同对结果的判定无差异(表5, 6).

3 讨论

H. pylori 是上消化道疾病的重要致病菌，弯曲形、S形、螺旋形或棒状，主要通过其产生的毒素蛋白

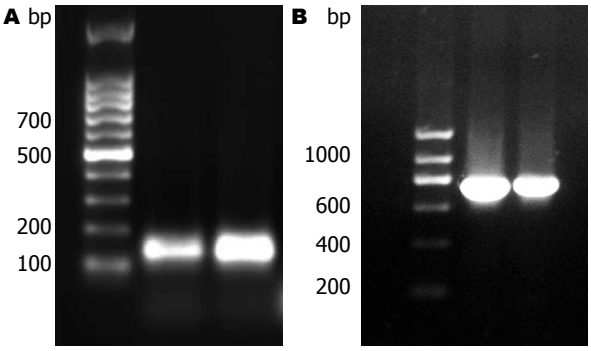


图 1 *H. pylori*特异基因片段PCR电泳图. A: 16S rRNA, Marker 100 bp; B: UreA, Marker 200 bp. *H. pylori*: 幽门螺杆菌.

■应用要点
胆结石的发病率逐年上升, 本研究结果可以为各级医院肝胆外科、普通外科临床治疗、预防胆囊结石, 降低医疗费用, 减轻广大患者痛苦与负担起到一定的借鉴作用, 并为相关研究提供理论参考.

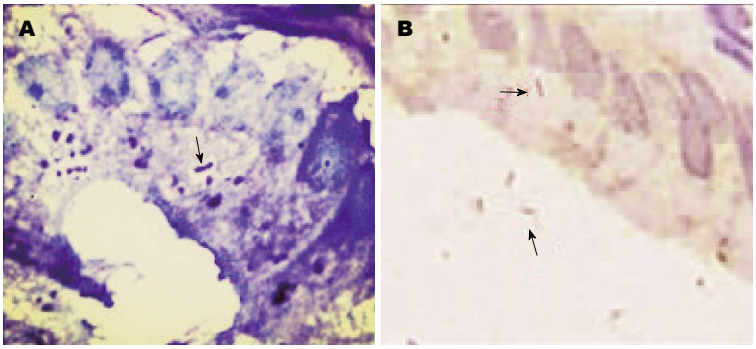


图 2 胆囊黏膜免疫组织化学染色(×400). A: 箭头所指为*H. pylori*, 在胆囊黏膜腺腔中可见棒状; B: 箭头所指为*H. pylori*, 在胆囊黏膜腺腔中可见弯曲杆状或球形的菌体. *H. pylori*: 幽门螺杆菌.

表 6 两种黏膜*H. pylori*检测方法差异

方法	黏膜		合计
	阳性	阴性	
PCR	27	53	80
免疫组织化学	20	60	80
合计	47	113	160
χ^2值	1.48		
*P*值	0.22		

H. pylori: 幽门螺杆菌.

如空泡毒素(VacA)与细胞毒素相关蛋白(CagA蛋白)和相关酶类如尿素酶、黏液酶和磷脂酶以及诱导的炎症反应造成黏膜屏障的损害[1-4]. *H. pylori* 具有鞭毛和黏附因子使其在黏性环境中表现出很强的移行能力和定植能力. 本研究采用ELISA方法在胆囊结石患者和非胆囊结石患者的胆囊胆汁中都发现了*H. pylori*, 前者阳性率为48.44%, 后者为43.75%, 说明*H. pylori*能在碱性的胆汁环境中存活. 这与Galdwell等[5]的研究结果基本相符. 由此可推测胆汁可能对*H. pylori*起到一个选择作用, 使那些能耐受胆盐的*H. pylori*被筛选存活下来, 说明胆汁对*H. pylori*的杀灭作用是相对的, 在某些情况下如胆道感染、Oddis括约肌功能紊乱, 螺杆菌可通过松弛Oddis括约肌逆行感染胆道. Zhou等[6]通过病理学研究认为胆囊黏膜中的*H. pylori*感染与胃中*H. pylori*存在密切相关, 也从另一个侧面证明了该观点.

本研究采用PCR方法检测发现, *H. pylori*存在于胆囊结石和非胆囊结石患者的胆道中, 胆汁中的阳性率远远高于胆囊黏膜的阳性率, 结石组和非结石组胆道(胆汁)*H. pylori*感染之间无统计学差异, 据此, 我们认为, 胆汁中*H. pylori*特异基因的检测结果与胆囊结石的形成无相关性. 同时, PCR基因检测显示结石患者黏膜中*H. pylori*特异基因检出率高于非结石患者($P<0.05$), 免疫组织化学*H. pylori*染色也观察到类似结果, 因此笔者认为, *H. pylori*在胆囊黏膜的定植参与胆囊结石的形成. Zhou等[7]在2011年进行的一项Meta分析认为: 胆道系统*H. pylori*感染与胆结石形成有密切关系. 2013年Attaallah等[8]的研究显示37%的胆结石患者的胆囊黏膜中有*H. pylori*定植也支持此观点. *H. pylori*在胆囊黏膜的定植可以引起急、慢性胆囊炎, 导致胆囊黏膜分泌紊乱, 胆囊运动功能障碍, 最终导致胆汁淤积、胆汁理化性质及成分的改变[9-11]. *H. pylori*在胆囊黏膜的定植致胆囊结石形成的机制可能涉及以下几个方面: (1)通过其CagA蛋白增加及磷脂酶A2活性增加促进胆固醇沉淀; (2)*H. pylori*在胆囊黏膜的定植破坏黏膜屏障, 诱导局部炎症反应, 粘蛋白表达增加, 与其他促成核因子共同导致促、抗成核因子失衡, 并形成一个色素核心,吸附沉积的钙盐和胆固醇; (3)*H. pylori*在胆囊黏膜定植损伤胆囊黏膜、破坏了胆囊黏膜功能, 促

■同行评价
该课题立题有一定的新颖性，内容较为详实，对同类研究有一定的参考价值.

使胆汁淤滞，同时胆囊、胆管损伤后又利于其他细菌的侵袭，共同促进结石形成[12-18].

总之，本研究认为，胆道中*H. pylori*感染在胆囊结石形成的过程中不起主要作用，而*H. pylori*在胆囊黏膜的定植则参与胆囊结石的形成.

4 参考文献

1 秦俭，韩天权，蔡杏兴，姜志宏，杨小妹，张宇，杨士勇，蒋兆彦，张圣道. 一个大型胆囊结石病家系的遗传特征及流行病学分析. 中华流行病学杂志 2005; 26: 448-450

2 任建军，牛剑祥，王万祥，孟兴凯. 综合性治疗措施对老年肝硬化合并胆囊结石患者的干预效果. 中国老年学杂志 2013; 33: 5533-5535

3 张雪梅，刘丽娜，马红霞，高勇. 幽门螺杆菌、高胃泌素血症对结肠腺瘤形成的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1390-1394

4 张展，刘志强，郑鹏远，唐芙爱. 外排泵抑制剂对幽门螺杆菌多重耐药性的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 262-267

5 Caldwell MT, McDermott M, Jazrawi S, O'Dowd G, Byrne PJ, Walsh TN, Hourihane DO, Hennessy TP. Helicobacter pylori infection increases following cholecystectomy. *Ir J Med Sci* 1995; 164: 52-55 [PMID: 7890538 DOI: 10.1007/BF02968117]

6 Zhou D, Guan WB, Wang JD, Zhang Y, Gong W, Quan ZW. A comparative study of clinicopathological features between chronic cholecystitis patients with and without Helicobacter pylori infection in gallbladder mucosa. *PLoS One* 2013; 8: e70265 [PMID: 23936177 DOI: 10.1371/journal.pone.0070265]

7 Zhou D, Zhang Y, Gong W, Mohamed SO, Ogbomo H, Wang X, Liu Y, Quan Z. Are Helicobacter pylori and other Helicobacter species infection associated with human biliary lithiasis? A meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6: e27390 [PMID: 22087306 DOI: 10.1371/journal.pone.0027390]

8 Attaallah W, Yener N, Ugurlu MU, Manukyan M, Asmaz E, Aktan AO. Gallstones and Concomitant Gastric Helicobacter pylori Infection. *Gastroenterol Res Pract* 2013; 2013: 643109 [PMID: 23762037 DOI: 10.1155/2013/643109]

9 Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* 1968; 47: 1043-1052 [PMID: 5645851 DOI: 10.1172/JCI105794]

10 Bode G, Barth R, Song Q, Adler G. Phospholipase C activity of Helicobacter pylori is not associated with the presence of the cagA gene. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 344-348 [PMID: 11298782 DOI: 10.1046/j.1365-2362.2001.00814.x]

11 陈东风，胡辂，易萍，刘为纹，房殿春，曹红. 幽门螺杆菌对体外原代培养的人胆囊上皮细胞损伤作用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1835-1839

12 Vilkin A, Nudelman I, Morgenstern S, Geller A, Bar Dayan Y, Levi Z, Rodionov G, Hardy B, Konikoff F, Gobbic D, Niv Y. Gallbladder inflammation is associated with increase in mucin expression and pigmented stone formation. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1613-1620 [PMID: 17385041 DOI: 10.1007/s10620-006-9162-9]

13 孙登群，孟翔凌，龚仁华，王敬民. 胆囊动力学变化对胆囊结石形成的作用. 中华消化外科杂志 2009; 8: 228-299

14 张万星，郭怀斌，曹月敏，王兰辉，彭彦辉，孟惠彦. 胆囊幽门螺杆菌感染与胆囊壁胆囊收缩素受体mRNA表达的关系. 中华实验外科杂志 2006; 23: 931-933

15 宋敏，吴杰，王萍，黄晓东，邓昊. 幽门螺杆菌与原发性胆总管结石形成的关系. 广东医学 2011; 32: 607-609

16 于岚，何小东，武峤，刘卫，洪涛. 胆囊结石相关危险因素的探讨. 中华肝胆外科杂志 2011; 17: 711-713

17 崔鸿斌，李培武，王秉钧，魏丽娜. 内镜与腹腔镜联合治疗胆囊结石合并胆总管结石的疗效. 中国老年学杂志 2012; 32: 721-722

18 吴波，郑长青. 幽门螺杆菌、胃肠激素与糖尿病胃轻瘫的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1616-1619

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): 2069-2072
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

小组心理干预对妊娠期糖尿病患者焦虑抑郁情绪及妊娠结局的影响

杜 献, 阮淑萍, 朱剑峰

杜献, 浙江省温岭市妇幼保健院妇产科 浙江省温岭市 317500
阮淑萍, 浙江省温岭市妇幼保健院内科 浙江省温岭市 317500
朱剑峰, 浙江省嘉兴市嘉善县中医医院消化科 浙江省嘉兴市 314100
杜献, 主管护师, 主要从事妇产科临床护理工作.
作者贡献分布: 此课题由杜献设计; 研究过程由杜献与阮淑萍完成; 数据分析由阮淑萍完成; 写作由杜献、阮淑萍及朱剑峰完成.
通讯作者: 杜献, 主管护师, 317500, 浙江省温岭市城东街道下保路102号, 浙江省温岭市妇幼保健院妇产科. duxianyisheng@163.com
收稿日期: 2014-02-28 修回日期: 2014-04-03
接受日期: 2014-04-09 在线出版日期: 2014-05-18

Influence of group psychological intervention on anxiety, depression and pregnancy outcomes in primiparous women

Xian Du, Shu-Ping Ruan, Jian-Feng Zhu

Xian Du, Department of Gynaecology and Obstetrics, Wenling Women's and Children's Hospital, Wenling 317500, Zhejiang Province, China
Shu-Ping Ruan, Department of Internal Medicine, Wenling Women's and Children's Hospital, Wenling 317500, Zhejiang Province, China
Jian-Feng Zhu, Department of Gastroenterology, TCM Hospital of Jiashan, Jiaxing 314100, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Xian Du, Charge Nurse, Department of Gynaecology and Obstetrics, Wenling Women's and Children's Hospital, 102 Xiabao Road, Wenling 317500, Zhejiang Province, China. duxianyisheng@163.com
Received: 2014-02-28 Revised: 2014-03-03
Accepted: 2014-04-09 Published online: 2014-05-18

Abstract

AIM: To analyze the influence of group psychological intervention on anxiety, depression and pregnancy outcomes in primiparous women.

METHODS: Eighty primiparous women who accepted regular inspection and delivered at our hospital from January 2011 to January 2013 were randomly divided into either a control group or an observation group. The control group was given regular health education, while the observation group was given group psychological intervention. The anxiety, depression and pregnancy outcome between the two groups were compared.

RESULTS: The scores of anxiety and depression in the observation group were significantly lower than those in the control group (33.01 ± 3.51 *vs* 43.83 ± 3.04, t = 26.74, P < 0.05; 31.83 ± 6.22 *vs* 39.71 ± 4.37, t = 15.31, P < 0.05). The pregnancy outcomes in the observation group were better than those in the control group (10.00% *vs* 47.50%, P < 0.05).

CONCLUSION: Group psychological intervention can improve anxiety, depression and pregnancy outcomes in primiparous women.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Group psychological intervention; Gestational diabetes mellitus; Anxiety; Depression; Pregnancy outcome

Du X, Ruan SP, Zhu JF. Influence of group psychological intervention on anxiety, depression and pregnancy outcomes in primiparous women. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(14): 2069-2072 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2069.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2069

摘要

目的: 探讨小组心理干预对改善妊娠期糖尿病患者焦虑抑郁情绪和妊娠结局的影响.

方法: 选取2011-01/2013-01在我院就诊的妊娠期糖尿病患者80例, 应用随机数字表法将患者分成观察组和对照组, 观察组施以小组心理干预, 而对照组仅施以常规健康教育, 对比分析两组患者的焦虑、抑郁结果的评价得分以及妊娠结局的结果.

结果: 观察组患者焦虑和抑郁评分明显低于对照组(33.01±3.51 *vs* 43.83±3.04, t = 26.74, P<0.05)(31.83±6.22 *vs* 39.71±4.37, t = 15.31, P<0.05), 同时较对照组, 母婴结局也相对较差(10.00% *vs* 47.50%, P<0.05).

结论: 将小组心理干预的方法应用于妊娠糖

■背景资料
妊娠期糖尿病是指在原有糖尿病的基础上出现合并妊娠症, 或者是妊娠前为隐性糖尿病、妊娠后逐渐发展为糖尿病的情况, 属高危妊娠, 对母体及胎儿有较大危害, 临床过程较为复杂, 母婴死亡率较高, 如控制不良可导致母婴不良妊娠结局. 随着社会经济的发展, 人们生活方式的改变, 晚婚晚育的女性比例逐渐增高, 妊娠糖尿病发病率有上升趋势, 由于患者对病情的不了解, 孕妇常常产生抑郁焦虑情绪, 严重危害着胎儿的正常发育, 因此必须引起足够重视.

■同行评议者
郝丽萍, 副教授, 华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

■研发前沿
随着人们生活方式的改变妊娠期糖尿病发病率有逐年增高的趋势，由于患者处于妊娠期，活动的不方便以及对病情的不了解，患者极易出现焦虑、抑郁情绪，严重危害着孕妇以及胎儿的健康发育.

尿病患者的护理之中，可以有效降低孕妇焦虑抑郁的发生率，减少产科并发症及围产儿并发症出现的概率，值得进一步推广.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 小组心理干预; 妊娠糖尿病; 焦虑; 抑郁; 妊娠结局

核心提示: 由本研究结果可知，干预期结束后，两组患者的焦虑和抑郁测评得分情况较干预前都有所降低，但经过小组心理干预的观察组患者的状况明显优于使用常规手段的对照组，说明小组心理干预对抑制患者妊娠糖尿病患者的焦虑抑郁情况效果更好；而在妊娠结局方面，观察组产生妊娠并发症的患者只有4例，而对照组却高达19例，发生率几乎是观察组的5倍，妊娠糖尿病患者一般伴有严重的心理压力，这种不良情绪可以导致生长激素、胰高血糖素、去甲肾上腺素等应激性激素分泌增加，继而引起血糖增高，极易导致产生妊娠高血压综合征等并发症，严重危害孕妇自身以及胎儿的健康发育，而小组心理干预以“自我认知疗法”和“身心语法”为基础，结合“道德体谅模式”，指导患者以正确的视角面对各种问题，以积极的心态面对疾病，增加的治疗动机，有效地降低孕妇产生妊娠并发症的概率.

杜献，阮淑萍，朱剑峰. 小组心理干预对妊娠期糖尿病患者焦虑抑郁情绪及妊娠结局的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(14): 2069-2072 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2069.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i14.2069

0 引言

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指在原有糖尿病的基础上出现合并妊娠症，或者是妊娠前为隐性糖尿病、妊娠后逐渐发展为糖尿病的情况，属高危妊娠，对母体及胎儿有较大危害，临床过程较为复杂，母婴死亡率较高，如控制不良可导致母婴不良妊娠结局[1,2]. 随着社会经济的发展，人们生活方式的改变，晚婚晚育的女性比例逐渐增高，妊娠糖尿病发病率有上升趋势，由于患者对病情的不了解，孕妇常常产生抑郁焦虑情绪，严重危害着胎儿的正常发育，因此必须引起足够重视[3,4]. 为了降低孕妇分娩时的风险，保证胎儿的正常健康发育，我院尝试将小组心理干预的手段应用于对妊娠期糖尿病患者的护理之中，取得理想效果，现总结如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2011-01/2013-01于我院就诊的妊娠期糖尿病患者80例，经过检查，患者均符合《妊娠合并糖尿病临床诊断与治疗推荐指南(草案)》诊断标准，应用随机数字表法将患者分成观察组和对照组，其中观察组孕妇年龄最大29岁，最小23岁，平均年龄25.03岁±2.43岁，孕次最多3次，最少1次，其中高中以下学历14例，高中15例，高中以上11例；对照组孕妇年龄最大29岁，最小23岁，平均年龄24.62岁±2.71岁，孕次为1-3次，其中高中以下学历13例，高中17例，高中以上10例，两组孕妇在年龄、职业、学历、病情等一般资料方面均无明显差异(P>0.05)，具有可比性，患者无精神病史和言语障碍者.

1.2 方法 首先将此次研究方案报送医疗道德委员会批准，所有参与此次研究的患者、医生以及护理人员均签署自愿书，保证此次研究室所有参与者真实自愿. 在此基础上，将患者按照随机原则分成观察组和对照组，对照组施以常规健康教育以及治疗方法，观察组在常规治疗以及教育的基础上施以小组心理干预的手段，其中，具体小组心理干预手段如下.

1.2.1 小组心理干预步骤：对护理人员和患者进行分组，每组10人，其中每组孕妇7人，护理人员3人，每次小组活动应在护理人员的组织指导下进行，地点在我院的患者活动中心，室内配备了多媒体影音播放装置，座椅成圆形排列，每次时间从下午15点开始，16点结束，定期在每周日举行，干预期为5 mo，初步分为5个阶段，并确定每个阶段的主题，定期合理的对孕妇进行指导干预. 我院在查阅大量文献的基础上，并咨询相关心理辅导专家，结合我院实际情况，以团体辅导中的“身心语法”和“自我认知法”为基础[5]，结合德育模式中的“体谅模式”，制定了小组心理干预的具体实施步骤，具体主题、目标、内容如下表1所示.

1.2.2 小组心理干预的注意事项：我院在此次研究中，将小组心理干预的时间固定在每周周末下午15-16点，时长约为60 min，在日常护理中，护理人员要留心患者在平时生活的细微表情变化，以微笑表情对患者进行服务，以此拉近医患之间的距离，尽早建立信任感；协助患者进行日常适当的行为活动，多聆听患者倾诉，了解目前所担忧的问题，并给予适当的安慰和开导，以此产生共鸣，力求通过共情的方式准确定位组内每位患者的心理症结所在，为小组心理干预的第三阶段(探索阶段)奠定基础.

加强对本组患者的安全健康教育，每天护理人员都要对患者的身体状况，了解患者的病情，向患者讲述妊娠糖尿病的病因以及注意事项，

■相关报道
有研究表明妊娠糖尿病孕妇较正常孕妇更担心胎儿的健康, 更容易产生抑郁焦虑等不良情绪.

表 1 小组心理干预护理阶段步骤、目标

阶段	时长	主题	目标	内容
初始阶段	2 wk	心心相印	互相认识小组成员, 做到初步了解, 引起孕妇心理共鸣, 初步建立成员间的信任感.	参与的护理人员介绍本次小组心理干预的活动目的, 激发小组成员兴趣, 相互自我介绍, 留下联系方式.
过渡阶段	4 wk	守望相助	通过第一阶段的小组成员介绍, 初步了解成员间所存在的问题, 互相鼓舞小组成员之间的情绪, 同舟共济.	以“身心语法”为基础, 建立每个小组的留言册, 鼓励每位成员将自己目前的问题以匿名的方式写在留言册上, 如时机成熟可以鼓励成员大胆的对自己目前存在的焦虑和担心问题进行当面表达; 然后结合德育中的”体谅模式”为基础, 以”角色扮演”的方式, 首先由成员对患者所出问题进行安慰劝解, 使每位成员有机会参与到心理的解决中, 深入患者内心, 做到感同身受, 最后由护理人员进行总结、开导安慰,
探索阶段	6 wk	心灵探索	了解成员出现情绪问题的根本原因所在, 在护理人员的指导下, 通过小组成员的共同的探讨, 进一步认识每位成员的心理问题, 增进成员间的感情.	结合”自我认知法”, 通过上一阶段的扮演不同角色, 通过亲身感受, 小组成员已经体会到不良情绪产生的原因, 然后护理人员要以专业的角度对成员所出现问题进行指导, 劝解, 了解心理问题出现的症结所在, 并向小组成员传授学习恰当的沟通技巧, 心理咨询师引导、总结.
活动阶段	6 wk	同心同德	力求使每位成员初步学会如何管理自我情绪.	通过案例、视屏等手段, 护理人员要对组员进行情绪管理干预, 使组员领悟到遇事时的不良情绪反应.
结束阶段	2 wk	拥抱明天	通过观看专题片, 看到自身的价值, 增强战胜病魔的信心, 对自己以及孩子的明天增强信心.	小组成员谈谈参与此次心理干预的感受, 以及结合自己实际, 总结自己笑对人生的技巧.

表 2 两组患者术前术后焦虑、抑郁情况比较 (n = 40)

分组	焦虑自评量表		抑郁自评量表	
	干预前	干预后	干预前	干预后
观察组	51.83 ± 3.74	33.01 ± 3.51	47.33 ± 5.91	31.83 ± 6.22
对照组	50.81 ± 3.13	43.83 ± 3.04	46.83 ± 6.11	39.71 ± 4.37
t值	2.46	26.74	0.91	15.31
P值	>0.05	<0.01	>0.05	<0.05

以此消除患者对病情本身的焦虑, 根据每位患者的具体状况, 有针对性的缓解患者心理疑虑, 有效配合患者的常规治疗.

1.2.3 观察指标: 采用国际上流行的焦虑自评量表(self-rating anxiety scale, SAS)和抑郁自评量表(self-rating depression scale, SDS)对分别对两组患者进行干预前和干预后进行测评, 得分以(平均值±标准差)表示, 将测评得粗分×1.25 = 标准分, 标准分≥50分者即可以确定为焦虑状态或抑郁状态[6]; 对于妊娠结局方面, 妊娠糖尿病患者极易产生一些并发症, 例如妊高症、羊水过多、巨大儿、产后出血等症状, 因此, 将这四种并发症作为观察指标作为对于小组心理干预治疗妊娠糖尿病效果指标[4].

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行数据分析, SAS与SDS评分以mean±SD表示, 计量资料进行t检验, 4个观察指标用百分数表示, 采计数资料进行χ^2检验, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 两组患者干预前后焦虑、抑郁情况对比 在干预前后分别对两组患者进行焦虑抑郁情况调查, 经过研究发现, 观察组患者的心理焦虑、抑郁得分明显低于对照组, 可以看出小组心理干预较常规健康教育方法对患者的心理焦虑、抑郁有更好的抑制作用(表2).

2.2 两组患者妊娠结局比较 经过此次研究, 施以小组心理干预的观察组患者在妊娠糖尿病患者出现并发症例数明显低于施以常规对照组患者, 两组患者具有明显性差异(P<0.01)(表3).

■同行评价
本文设计合理，具有一定借鉴价值.

表 3 两组患者干预后妊娠结局情况比较 (n = 40)

分组	妊高症	羊水过多	巨大儿	产后出血	合计	χ^2	P值
观察组	1	2	0	1	4	14.60	<0.01
对照组	6	5	4	4	19		

3 结果

随着人们生活方式的改变妊娠期糖尿病发病率有逐年增高的趋势，由于患者处于妊娠期，活动的不方便以及对病情的不了解，患者极易出现焦虑、抑郁情绪，严重危害着孕妇以及胎儿的健康发育. 有研究表明妊娠糖尿病孕妇较正常孕妇更担心胎儿的健康，更容易产生抑郁焦虑等不良情绪，我院此次研究将小组心理干预应用于对妊娠糖尿病的护理中，效果显著. 由本研究结果可知，干预期结束后，两组患者的焦虑和抑郁测评得分情况较干预前都有所降低，但经过小组心理干预的观察组患者的状况明显优于使用常规手段的对照组，说明小组心理干预对抑制患者妊娠糖尿病患者的焦虑抑郁情况效果更好；而在妊娠结局方面，观察组产生妊娠并发症的患者只有4人，而对照组却高达19人，发生率几乎是观察组的5倍，妊娠糖尿病患者一般伴有严重的心理压力，这种不良情绪可以导致生长激素、胰高血糖素、去甲肾上腺素等应激性激素分泌增加，继而引起血糖增高，极易导致产生妊娠高血压综合征等并发症，严重危害孕妇自身以及胎儿的健康发育，而小组心理干预以“自我认知疗法”和“身心语法”为基础，结合“道德体谅模式”，指导患者以正确的视角面对各种问题，以积极的心态面对疾病，增加的治疗动机，有效地降低孕妇产生妊娠并发症的概率[6-9].

小组心理干预是一种团体心理干预形式，在团体情境下，借助团体的力量和护理人员的心理咨询技术，使团体成员自知并自助，借以次达到消除症状、改善适应、发展人格的目的[8,9]. 我院在此次研究中，以自我认知疗法和身心语法为基础，而德育可以培养人正确的思想观和意识，结合我院的实际情况，将心理团辅和德育模式创造性的结合起来，制定出我院特色的小组心理干预方式，尤其是通过心理角色扮演，可以让每位患者了解自己以及他人，同时也为患者提供了一次心理交流，学会管理自我情绪，处理自己生活中情绪问题的机会，为进行常规治疗提供思想保障.

小组心理干预是一个有组织复杂的过程，需要专门的护理人员进行定期组织，策划[10-16]；其次小组心理干预不是一成不变的，应该根据患者的具体情况，不断充实和丰富干预护理内容，确保小组心理干预可以持续成为一种有效地预防围产期疾病消除患者不良情绪的手段.

4 参考文献

1 邹丹，金丰梅. 早期护理干预对妊娠期糖尿病妊娠结局的影响. 临床护理杂志 2013; 11: 12-14
2 林苑，钟红珠，李卓华. 妊娠期糖代谢异常对妊娠结局的影响. 中国现代医生 2010; 48: 26-27
3 赖爱如，苏凤笑，袁笑玲. 浅谈综合护理干预对妊娠糖尿病孕期的血糖和负性情绪的影响. 国际医药卫生导报 2013; 19: 2619-2620
4 陈国新，周善明. 果糖胺及糖化血红蛋白在妊娠糖尿病诊断中的临床应用. 中国现代医生 2010; 48: 78-79
5 于丽月，王爱民. 高龄妊娠糖尿病病人的心理问题及护理. 全科护理 2011; 9: 76-78
6 张林，李子明. 妊娠期糖尿病病人常见心理问题及干预研究进展. 护理研究 2010; 24: 1317-1320
7 刘小玲，董振银. 身心语法程序和团体辅导改善孕产妇心理状况的对照研究. 中国初级卫生保健 2011; 25: 63-64
8 周艳瑢. 护理干预对初产妇焦虑和分娩质量的影响. 中国医药导报 2010; 7: 161-162
9 王小霞. 针对性心理干预对初产妇产后焦虑抑郁的影响研究. 中国现代医生 2010; 49: 63-64
10 贺美玲，隆春玲. 小组心理干预对空巢老年人焦虑抑郁情绪的影响. 中华护理杂志 2013; 48: 450-452
11 明雅焜，李丽芳，梅晓芳，黄娟苗. 开设妊娠期糖尿病护理专科门诊的实践与体会. 现代临床护理 2010; 11: 61-62, 66
12 曾雅畅，李慕军. 格列本脲治疗妊娠期糖尿病临床进展. 中国实用妇科与产科杂志 2013; 18: 590-594
13 张娅，徐先明. 妊娠期糖尿病病因学研究进展. 中国实用妇科与产科杂志 2013; 21: 299-302
14 尹月娥，郭霞，王金华，高儒. 孕产期全程护理对流动人口妊娠期糖尿病影响的研究. 当代医学 2010; 23: 1-2
15 徐莉辉. 妊娠期糖尿病120例临床分析. 当代医学 2011; 13: 2-3
16 张敏. 妊娠期糖尿病的护理. 中国实用医药 2013; 8: 233-234

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): Ⅰ-Ⅴ
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

《世界华人消化杂志》投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569)》是一份同行评议和开放获取期刊(Open Access Journal, OAJ), 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版. 《世界华人消化杂志》编辑委员会成员, 由483位专家组成, 分布在30个省市、自治区和特别行政区.

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病学, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章. 最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病学实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平.

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group, BPG)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上. OAJ最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊. 论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本. BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑.目前编辑和出版42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平.

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊 2012年版)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录. 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号.《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊.

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, 循证医学, 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》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期刊(中国科技核心期刊2012年版)》,《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊.

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

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录.

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 , *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.

《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: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

《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.

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天. 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.

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, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 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》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.

《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 2014年5月18日; 22(14): I
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

2014年国内国际会议预告

2014-03-12/15
2014年亚太肝病研究协会肝病周(APASL)
会议地点: 澳大利亚
联系方式: http://apasl2014.com/

2014-04-05/09
2014年美国癌症研究协会大会(AACR)
会议地点: 美国
联系方式: http://www.aacr.org/home/scientists/meetings--workshops/meetings--workshops-calendar.aspx

2014-04-09/13
2014年第49届欧洲肝病研究协年会(EASL)
会议地点: 英国
联系方式: http://www.easl.eu/_the-international-liver-congress/general-information

2014-04-18/05-20
2014中国超声医学学术大会
会议地点: 北京市
联系方式: http://www.cuda.org.cn/new/meeting

2014-04-26/27
中华医学会临床药学分会2014年全国学术会议
会议地点: 成都市
联系方式: http://www.cncscp.org/

2014-05-04/06
2014年美国消化疾病周(DDW)
会议地点: 美国
联系方式: http://www.ddw.org/attendees/faqs

2014-05-16/18
2014第七届世界癌症大会
会议地点: 南京市
联系方式: http://www.bitlifesciences.com/cancer2014/cn/meeting.asp

2014-05-23/24
第六届药源性疾病与安全用药中国论坛-消化系统与肝病药物专题研讨会
会议地点: 北京市
联系方式: adrhuiyi@126.com

2014-05-30/06-03
2014年美国临床肿瘤协会年会(ASCO)
会议地点: 美国
联系方式: http://www.asco.org/meetings/calendar-events

2014-06-04/07
2014年第20届国际肝移植协会年会(ILTS)
会议地点: 英国
联系方式: http://www.ilts.org/meetings/

2014-06-09/12
2014年第47届欧洲儿科胃肠病, 肝病和营养学协会大会(ESPGHAN)
会议地点: 以色列
联系方式: http://www.espghan2014.org/

2014-06-18/21
2014年欧洲胃肠与腹部放射学协会肝部成像研讨会(ESGAR)
会议地点: 奥地利
联系方式: http://www.esgar.org/files/File/ESGAR14

2014-06-25/28
2014年世界胃肠癌大会(WGIC)
会议地点: 西班牙
联系方式: http://worldgicancer.com/WCGI

2014-06-25/28
2014年第14届欧洲内窥镜手术协会国际大会(EAES)
会议地点: 法国
联系方式: hdimcs@163.com

2014-06-27/28
2014中华医学会肝病与代谢学术研讨会
会议地点: 上海市
联系方式: lilyjia@163.com

2014-07-26/31
2014年世界移植大会
会议地点: 美国
联系方式: http://www.wtc2014.org/

2014-07-28/30
第3届国际肠胃病学与泌尿学大会
会议地点: 美国
联系方式: http://www.omicsgroup.com/gastroenterology-urology-conference-2014/registration.php

2014-09-05/07
2014年第8届国际肝癌协会大会(ILCA)
会议地点: 日本
联系方式: http://www.ilca2014.org/

2014-09-26/30
2014年欧洲临床肿瘤协会年会(ESMO)
会议地点: 西班牙
联系方式: http://www.esmo.org/

2014-10-18/22
2014年第22届欧洲联合胃肠病学周(UEG)
会议地点: 奥地利
联系方式: http://www.ueg.eu/week/past-future/future-ueg-week/

世界华人消化杂志 2014年5月18日; 22(14): I
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

• 志谢 •

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
江西省南昌大学第一附属医院消化病研究所

白雪 副主任医师
中国人民解放军北京军区总医院普通外科

陈云昭 副教授
新疆石河子大学医学院/一附院病理科

程树群 副教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

崔莲花 副教授
青岛大学医学院公共卫生系

段义农 教授
南通大学医学院病原生物学系

范学工 教授
中南大学湘雅医院感染病科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

顾国利 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科

何松 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

侯风刚 副主任医师
上海中医药大学附属市中医医院肿瘤科

江学良 教授
中国人民解放军济南军区总医院消化科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李革 副教授
延边大学附属医院

李涛 副主任医师
北京大学人民医院肝胆外科

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

刘超 教授
中山大学孙逸仙纪念医院(附属第二医院)肝胆胰外科

刘丽江 教授
江汉大学医学院病理学

刘亮 副主任医师
复旦大学胰腺癌研究所, 复旦大学附属肿瘤医院胰腺肝胆外科

禄韶英 博士
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

吕云福 教授
海南省人民医院外一科

毛高平 教授
中国人民解放军空军总医院

莫发荣 副教授
广西医科大学组织学与胚胎学教研室

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

钱林学 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院

施诚仁 教授
上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

石毓君 副研究员
四川大学华西医院移植工程与移植免疫实验室

宋振顺 教授
西京医院肝胆外科

谭学瑞 教授
汕头大学医学院第一附属医院内科

汤朝晖 副主任医师
上海交大医学院附属新华医院普外科

汤华 研究员
重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室

王道荣 主任医师
江苏省苏北人民医院胃肠外科

世界华人消化杂志
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

《中文核心期刊要目总览》收录证书

《中文核心期刊要目总览》入编通知

尊敬的主编先生/女士：

我们谨此郑重通知：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、统计和分析，以及学科专家评审，贵刊《**世界华人消化杂志**》入编《中文核心期刊要目总览》2011 年版（即第六版）之 **临床医学/特种医学类** 的核心期刊。该书由北京大学出版社出版。书中按《中国图书馆分类法》的学科体系，列出了 73 个学科的核心期刊表，并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括：题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN 号、CN 号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。

评选核心期刊的工作，是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动，研究工作量浩大。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

课题组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究，进一步改进了核心期刊评价方法，使之更趋科学合理，力求使评价结果符合客观实际。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。

需要特别指出的是，该研究成果只是一种参考工具书，主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考，例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等，不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂

撰安

《中文核心期刊要目总览》2011 年版编委会

代章：

2012 年 1 月

北京大学图书馆

百世登

Baishideng®

Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**
Flat C, 23/F., Lucky Plaza,
315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079
14>
9 771009 307056

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.