

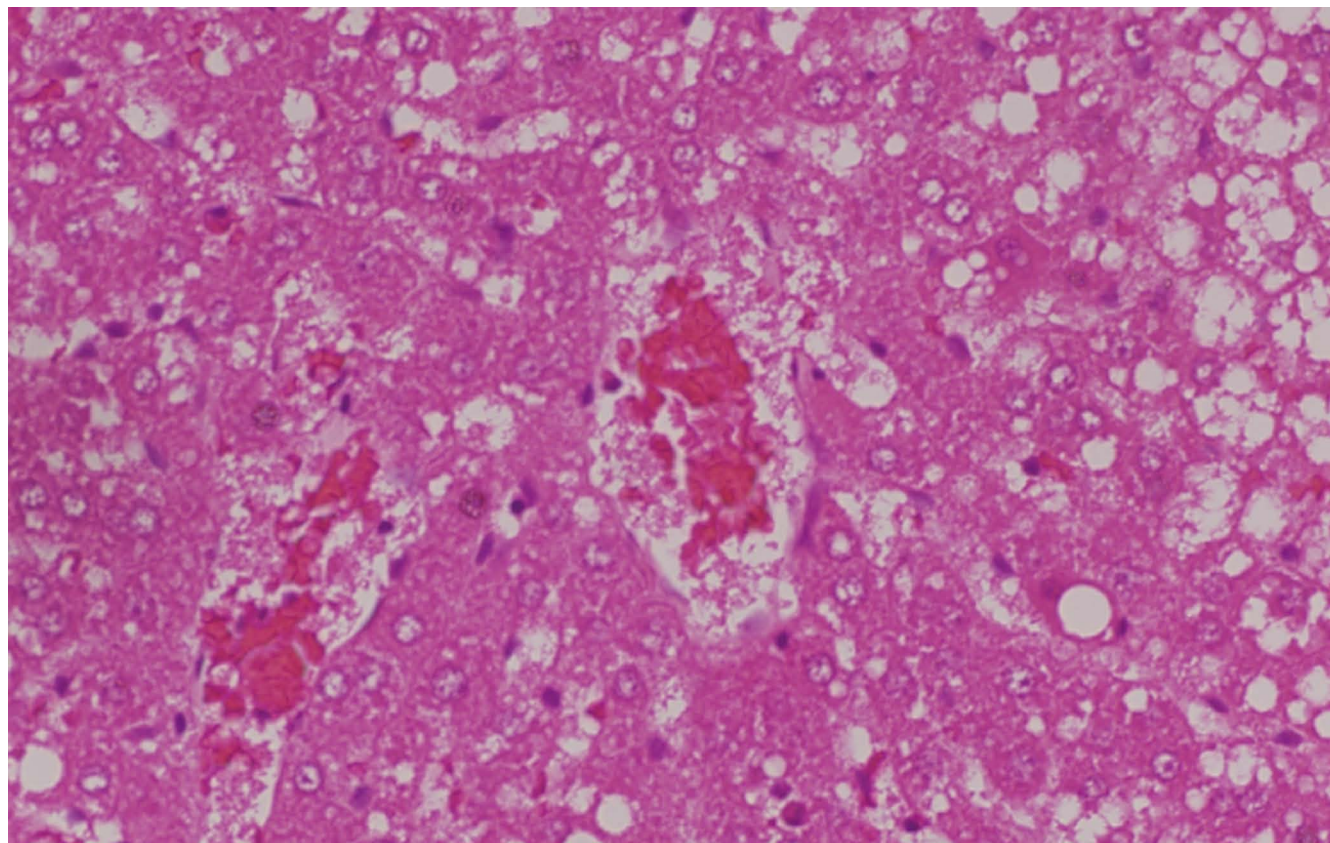
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2014 年 7 月 8 日 第 22 卷 第 19 期 (Volume 22 Number 19)



19/2014

ISSN 1009-3079



《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(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。

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
杨思风教授
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
度必光教授
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
陈凜教授
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
姜卫东教授
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
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授

田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
王道荣主任医师
王德盛副主任医师
王凤山教授
王刚副研究员
王健生教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王铮副研究员
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
俞继卫副主任医师
于则利教授
禹正杨副教授
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
侯风刚副教授
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
阴赓宏研究员
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7月8日 第22卷 第19期 (总第459期)

述 评	2665 胃食管反流性咳嗽发病机制的研究进展 弓三东, 崔立红
基 础 研 究	2671 Smo小干扰RNA对人食管癌CAES-17细胞凋亡的影响 刘山, 张倬, 陈天佑 2679 ChREBP及其靶基因 <i>PNPLA3</i> 在大鼠非酒精性脂肪性肝病发病中的作用 季玲, 李昌平 2686 内源性一氧化氮/一氧化氮合酶体系及一氧化碳/血红素合酶体系对大鼠肝硬化门静脉压力的影响 宋丽秀, 陈卫刚, 郑勇, 张宁, 齐翠花 2692 酒精性肝纤维化大鼠模型的建立及Smad7/TGF- β 表达变化 何培元, 侯志平, 高淑梅, 王明娟, 马立新, 李炳庆
文 献 综 述	2703 STATs与肝纤维化关系的研究进展 蒋亚玲, 周贤 2710 NADPH氧化酶家族成员促肝纤维化的研究进展 余珊珊, 朱莹 2716 消化外科手术的内镜化途径: 磁吻合联合内镜 严小鹏, 刘雯雁, 李涤尘, 吕毅 2722 金属硫蛋白在消化系肿瘤中的研究进展 孟红恩, 刘忠渊
研 究 快 报	2728 SiRNA技术沉默成纤维细胞生长因子受体基因促进胃癌化疗的效果及其机制 杨雪梅 2734 顺铂植入剂对人胃癌裸鼠移植瘤生长以及SYK、HER2表达的影响 蔡婷婷, 颜丽萍, 李弘 2740 Calnexin及GRP78在大鼠非酒精性脂肪肝细胞凋亡中的作用 胡晓霞, 王艳, 王晋星一 2746 <i>Smad4</i> 基因敲低对结肠癌阿霉素化疗敏感性的影响 李金鹏, 刘昊, 于皆平, 于红刚 2752 慢病毒表达载体的构建及沉默 <i>FOXQ1</i> 基因在大肠癌细胞系DLD-1中的表达 白璇, 唐慧, 郎丰超, 郭强
临 床 经 验	2758 补中益气活血方对胃溃疡患者血清VEGF和NO含量的影响及意义 秦建设, 郑波, 付正丰 2763 血浆内脏脂肪素在非酒精性脂肪性肝病中的表达及其意义 蔡怀阳, 李运泽, 李莉, 邹劲涛, 涂强 2768 慢性乙型肝炎湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化FibroScan测定与肝组织病理学诊断的比较 蒋开平, 李建鸿, 胡洪涛, 任健, 邱腾宇, 黄清华, 毛荣军 2774 实时组织弹性成像评价肝纤维化分级的Meta分析 张碧莹, 李晓光, 胥婕 2780 肝癌切除联合断流术治疗原发性肝癌合并门静脉高压症的疗效 杨科, 杨启 2784 肝移植术后早期肠内营养不同途径的对比 李晖, 郑丹, 熊会玲, 吴杰 2789 新生儿胃肠外营养相关性胆汁淤积的发生及危险因素评估 云翔, 罗彬, 漆光紫, 唐清, 单庆文, 陈秀奇, 陈玉君, 王琳琳 2795 能全力行肠内营养支持配合综合性护理干预对出血昏迷患者的疗效 仲桂英, 马丽萍 2800 耳穴贴压联合系统护理干预预防脑卒中患者便秘的临床效果 黄萍, 廖红梅 2804 EMG肌电生物反馈训练系统治疗功能性便秘患者的远期疗效及护理对策 王少萍, 刘欢欢, 许晨耘

	2809 含左氧氟沙星5日伴同疗法根除幽门螺杆菌感染的疗效 周颖, 许琦华, 周忠杰, 董跃滨
病例报告	2813 肾移植术后腹痛为首发表现的胃肠道功能障碍1例 李益飞, 曾仲, 马超龙, 刘涛
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	2678 《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) 2691 《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 2762 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 2779 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊
封面故事	何培元, 侯志平, 高淑梅, 王明娟, 马立新, 李炳庆. 酒精性肝纤维化大鼠模型的建立及Smad7/ TGF- β 表达变化. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2692-2702 http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2692.asp http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2692
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 郭鹏; 最终清样审核总编 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2014-07-08

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

郭鹏, 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: 18311378628

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 Inc

8226 Regency Drive, Pleasanton,

CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

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, 分别位居内科学领域域类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

July 2014 Contents in Brief Volume 22 Number 19

EDITORIAL	2665 Advances in understanding pathogenesis of gastroesophageal reflux-related cough <i>Gong SD, Cui LH</i>
BASIC RESEARCH	2671 Transfection with small interfering RNA targeting smoothened promotes cell apoptosis in human esophageal carcinoma cell line CAES-17 <i>Liu S, Zhang Z, Chen TY</i> 2679 Role of ChREBP and its target gene <i>PNPLA3</i> in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats <i>Ji L, Li CP</i> 2686 Effect of endogenous nitric oxide/nitric oxide synthase and carbon monoxide/heme oxygenase-1 on portal pressure in rats with hepatic cirrhosis <i>Song LX, Chen WG, Zheng Y, Zhang N, Qi CH</i> 2692 Establishment of a rat model of alcoholic liver fibrosis and detection of hepatic expression of Smad7/TGF-β <i>He PY, Hou ZP, Gao SM, Wang MJ, Ma LX, Li BQ</i>
REVIEW	2703 STATs and hepatic fibrosis <i>Jiang YL, Zhou X</i> 2710 Role of NADPH oxidase family members in promoting liver fibrosis <i>Yu SS, Zhu X</i> 2716 Magnamosis combined with endoscopy: A new endoscopic technique in digestive surgery <i>Yan XP, Liu WY, Li DC, Lv Y</i> 2722 Metallothioneins and digestive system tumors <i>Meng HE, Liu ZY</i>
RAPID COMMUNICATION	2728 SiRNA-mediated silencing of fibroblast growth factor receptor improves chemotherapy effect in a xenograft mouse model of gastric cancer <i>Yang XM</i> 2734 Effect of cisplatin implantation in human gastric carcinoma xenograft growth in nude mice and tumor expression of SYK and HER2 <i>Cai TT, Yan LP, Li H</i> 2740 Role of calnexin and GRP78 on hepatocyte apoptosis in rats with nonalcoholic fatty liver disease <i>Hu XX, Wang Y, Wang JXY</i> 2746 <i>Smad4</i> gene knockdown enhances chemosensitivity of colon cancer cells to doxorubicin <i>Li JP, Liu H, Yu JP, Yu HG</i> 2752 Construction of lentiviral expression vectors to silence expression of <i>FOXQ1</i> gene in colorectal cancer cell line DLD-1 <i>Bai X, Tang H, Lang FC, Guo Q</i>
CLINICAL PRACTICE	2758 Buzhong Yiqi Huoxue prescription increases serum VEGF and NO levels in patients with gastric ulcer <i>Qin JS, Zheng B, Fu ZF</i> 2763 Clinical significance of plasma visfatin level in patients with non-alcoholic fatty liver disease <i>Cai HY, Li YZ, Li L, Zou JT, Tu Q</i> 2768 FibroScan vs hepatic histopathology for diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome or damp and heat accumulation syndrome <i>Jiang KP, Li JH, Hu HT, Ren J, Qiu TY, Huang QH, Mao RJ</i> 2774 Assessment of hepatic fibrosis stage by real-time tissue elastography: A meta-analysis <i>Zhang BY, Li XG, Xu J</i> 2780 Hepatectomy combined with devascularization for treatment of primary hepatocellular carcinoma with portal hypertension <i>Yang K, Yang Q</i> 2784 Clinical effects of early enteral nutrition via a nasogastric tube vs a gastric-jejunal tube in patients after liver transplantation <i>Li H, Zheng D, Xiong HL, Wu J</i> 2789 Incidence of and risk factors for parenteral nutrition associated cholestasis in neonates <i>Yun X, Luo B, Qi GZ, Tang Q, Shan QW, Chen XQ, Chen YJ, Wang LL</i> 2795 Efficacy of enteral nutrition combined with comprehensive nursing in patients with coma due to hypertensive cerebral hemorrhage <i>Zhong GY, Ma LP</i> 2800 Clinical effects of auricular application and comprehensive nursing intervention in stroke patients with constipation <i>Huang P, Liao HM</i> 2804 Biofeedback therapy for functional constipation: Long-term efficacy and nursing measures <i>Wang SP, Liu HH, Xu CY</i>

	2809 Efficacy of 5-day levofloxacin-containing concomitant therapy in eradicating <i>Helicobacter pylori</i> infection <i>Zhou Y, Xu QH, Zhou ZJ, Dong YB</i>
CASE REPORT	2813 Abdominal pain as first clinical manifestation of gastrointestinal dysfunction following renal transplantation: A case report <i>Li YF, Zeng Z, Ma CL, Liu T</i>
APPENDIX	I – V Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> I Meeting events calendar in 2014
ACKNOWLEDGMENT	I Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	<i>He PY, Hou ZP, Gao SM, Wang MJ, Ma LX, Li BQ.</i> Establishment of a rat model of alcoholic liver fibrosis and detection of hepatic expression of Smad7/TGF- β in this model. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2014; 22(19): 2692-2702 http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2692.asp http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2692
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xiang Li</i> Review Editor: <i>Ya-Jing Lu, Peng Guo</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Peng Guo</i> Proof Editor: <i>Peng Guo</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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 July 8, 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 Pathol

ogy, 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

Peng Guo, 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 18311378628

Fax: +86-10-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA

Fax: +1-925-223-8242

Telephone: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.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 Inc. 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 journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, and not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

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.

胃食管反流性咳嗽发病机制的研究进展

弓三东, 崔立红

弓三东, 崔立红, 中国人民解放军海军总医院消化内科 北京市 100048

崔立红, 教授, 主任医师, 主要从事功能性胃肠疾病、微生态与消化系统疾病及内镜消化系早癌诊治方面的研究.

作者贡献分布: 本文由弓三东综述; 崔立红指导审阅.

通讯作者: 崔立红, 教授, 主任医师, 博士生导师, 100048, 北京市海淀区阜成路6号, 中国人民解放军海军总医院消化内科.

luckycui861@sina.com

电话: 010-66957541

收稿日期: 2014-04-16 修回日期: 2014-05-26

接受日期: 2014-06-02 在线出版日期: 2014-07-08

Advances in understanding pathogenesis of gastroesophageal reflux-related cough

San-Dong Gong, Li-Hong Cui

San-Dong Gong, Li-Hong Cui, Department of Gastroenterology, Naval General Hospital, Beijing 100048, China
Correspondence to: Li-Hong Cui, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Naval General Hospital, 6 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100048, China. luckycui861@sina.com

Received: 2014-04-16 Revised: 2014-05-26

Accepted: 2014-06-02 Published online: 2014-07-08

Abstract

Gastroesophageal reflux-related cough (GERC) refers to chronic cough caused by gastroesophageal reflux disease (GERD) and is one of the common causes of chronic cough in adults. Compared with typical GERD, GERC has its own characteristics in the pathogenesis of cough. The main mechanisms involve direct refluxate stimulation and indirect esophageal-bronchial reflection. In addition, the high sensitivity of cough receptors, acid-producing bacteria, non-gastric H^+/K^+ -ATPases and psychological factors are also important in the pathogenesis of GERC. GERC may be the result of the combined effects of multiple factors.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Gastroesophageal reflux; Chronic cough; Pathogenesis

Gong SD, Cui LH. Advances in understanding pathogenesis of gastroesophageal reflux-related cough. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2665-2670
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2665.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2665>

摘要

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)导致的慢性咳嗽即为胃食管反流性咳嗽(gastroesophageal reflux cough, GERC), 是成年人慢性咳嗽常见病因之一. 与典型胃食管反流病相比, 胃食管反流性咳嗽在发病机制方面有其特点, 主要是反流物直接刺激和食管-支气管间接反射两大方面机制, 此外咳嗽感受器敏感性增高、产酸菌、非胃型 H^+/K^+ -ATP酶、精神心理等均为重要机制, 胃食管反流性咳嗽可能是多因素综合作用的结果.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胃食管反流; 慢性咳嗽; 发病机制

核心提示: 胃食管反流性咳嗽(gastroesophageal reflux cough, GERC)的发病机制主要涉及食管近端反流通过咽喉反流、误吸及经咽喷洒等直接刺激气道、食管低位反流通过食管-支气管间接反射等引起咳嗽. 此外尚有咳嗽感受器敏感性增高、产酸菌、非胃型 H^+/K^+ -ATP酶、精神心理因素等参与疾病发生过程. 咳嗽与反流可互为因果, GERC的发生可能是多因素综合作用结果.

弓三东, 崔立红. 胃食管反流性咳嗽发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2665-2670 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2665.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2665>

0 引言

咳嗽是人体对外界粉尘、颗粒物等的一种防御机制, 但其同时作为疾病发病的信号及一种令人痛苦的临床症状而存在. 慢性咳嗽(chronic cough, CC)是指时间>8 wk, X线胸片无明显异常, 以咳嗽为主或惟一症状的咳嗽^[1]. 其病因复杂, 治疗效果不佳, 给广大患者带来极大的痛苦.

■背景资料

慢性咳嗽病因复杂, 治疗效果不佳, 给广大患者带来极大的痛苦, 故而越来越受到关注. 随着对胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)研究的深入, 发现GERD与多种临床症状密切相关, 其中GERD与慢性咳嗽存在紧密联系, 给临床诊治提出更高要求.

■同行评议者

刘占举, 教授, 同济大学附属上海市第十人民医院

■ 研发前沿

胃食管反流性咳嗽(gastroesophageal reflux cough, GERC)与酸反流、弱酸反流和非酸反流相关,其发病机制及临床诊治已成为目前国内外研究热点,但仍需进一步阐述和深入研究其发病机制,从而更好的指导临床诊治。

苦,故而越来越受到关注。咳嗽至少涉及4个专业学科知识:肺病学、耳鼻喉科学、免疫学和胃肠病学^[2]。胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是指胃内容物反流入食管、口腔(包括喉部)或肺所致的症状和并发症^[3]。由GERD导致的慢性咳嗽即为胃食管反流性咳嗽(gastroesophageal reflux cough, GERC),是胃酸和其他胃内容物反流进入食管,导致以咳嗽为突出表现的临床综合征^[1],是继哮喘和鼻后滴流综合征之后慢性咳嗽的第3大最常见的原因^[4]。国外研究表明GERC可占慢性咳嗽的40%^[5],而GERC在我国相对少见,仅占咳嗽的4%-10%^[6]。

胃食管反流病与慢性咳嗽之间的关系有3个方面值得引起重视^[7]。首先,人类独特的呼吸消化系统进化结构易患GERC。其他脊椎动物的食管和胃存在一直角关系,可最大限度地减少反流物通过食管下段括约肌,而人类食管直接下降到胃,从胸腔低压直接到腹腔高压,因此易发生反流事件。近年胃食管反流病的发病机制的研究主要集中于食管下括约肌功能障碍、食管上皮渗透性改变、唾液防御作用减弱、蛋白酶激活受体-2表达、基因水平易感性以及幽门螺杆菌感染等方面^[8]。此外其他因素如阻塞性睡眠呼吸暂停、生长激素释放激素信号途径损伤、囊性纤维化疾病、肥胖、腹内压增高、胃排空障碍、食管动力障碍均会导致反流的发生^[9-11]。而人类具有独特的语言功能,说话可引起软腭远离勺状软骨及会厌运动,从而打开咽喉括约肌,从而有可能发生反流误吸。其次,反流物成分不只是酸或液体,也有非酸或气体以及胃蛋白酶和胆汁盐。胃液反流表现为反酸或吐苦水,气体反流则表现为嗝气和呃逆。目前检测技术中,24 h食管pH监测能测定是否存在病理性酸反流,阻抗监测可判断反流物性质(固体、液体、气体以及混合物),24 h食管pH联合阻抗监测不仅可监测酸反流,还可以监测非酸反流,并且还能对反流的成分进行分析,使反流监测的灵敏度提升至90%^[3]。再次,反流物可直接或通过神经源性介质、免疫细胞等引起呼吸道上皮组织炎性损伤,造成气道激惹、痉挛,甚至窒息,因此可出现如反酸、咳嗽、喘息、咳痰、憋气、胸闷、呛咳等胃食道气道综合征表现^[12]。

GERC的发病机制主要涉及反流物直接刺激气道、食管-支气管间接反射等引起咳嗽。此外尚有咳嗽感受器敏感性增高、产酸菌、非胃型H⁺/K⁺-ATP酶、精神心理因素等学说,咳嗽与

反流可互为因果,GERC的发生可能是多因素综合作用结果。本文就胃食管反流性咳嗽的发病机制的研究进展做一探讨。

1 反流物直接刺激

完整的食管下端括约肌(lower esophagus sphincter, LES)和食管上括约肌(upper esophagus sphincter, UES)屏障通常可以防止胃食管-咽喉反流,是防守机制的一部分。UES压力通常可以防止反流物与咽和喉接触。咽部和上呼吸道的食管声门闭合反射可保护进一步保护气道避免接触反流物。此外,吞咽或咳嗽功能可清除到达UES的反流物。上述任何一种机制的破坏均可导致胃食管反流致咽喉及肺等。反流物穿过食管后可通过直接刺激咽喉或吸入气管及支气管引发咳嗽^[13]。

1.1 咽喉反流 已经有研究表明慢性咳嗽患者中,反流物偶尔可到达食管近端^[14],更有甚者可达咽喉部^[15]。反流物到达喉和咽可引起潜在各种症状,其中包括梅核气、沙哑、清嗓以及慢性咳嗽,一般是由反流物中的胃酸及胃蛋白酶接触咽喉引起组织损伤或炎症所导致^[16]。姚东英等^[17]的研究亦证实咽喉对胃酸和胃蛋白酶更敏感。Patterson等^[15]认为近端无酸反流是最重要的。胃内容物反流可直接刺激咽喉部咳嗽感受器,通过迷走神经反射引起气道黏液分泌增加引发咳嗽。但是也有研究表明慢性咳嗽患者的咽喉反流并不比健康对照组更频繁^[18]。Songür等^[19]对55例慢性咳嗽伴有反流症状患者进行研究,发现92.7%的患者出现反流,但只有32.7%为食管近端反流。因此这种少见的咽喉反流不足以解释患者的严重咳嗽。

1.2 误吸 胃内容物近端反流而误吸入肺引起吸入性肺炎,可直接刺激气道黏膜引发咳嗽^[20]。吞咽功能障碍被认为是反流性咳嗽机制的重要因素。正常的吞咽功能受到任何干扰,都可能会导致吸入和慢性咳嗽^[21]。Raghavendran等^[22]认为误吸是导致肺部损伤的重要因素。据报道,在动物模型中,微量误吸可引起由Th2淋巴细胞主导的气道炎症^[23]。但是Grabowski等^[24]研究认为慢性咳嗽患者中,T淋巴细胞因子在气道炎症中可能并不起主要角色。目前研究认为至少存在两种类型的迷走神经负责发起咳嗽反射^[25,26]。一种是对机械刺激或酸化气道上皮快适应为特征的有髓神经纤维传入神经,这种神经对辣椒素不敏感,在吸入性咳嗽及气道防御中起重要调节

作用;另一种是辣椒素敏感的C-纤维传入神经,其神经传入机制类似于组织损伤引起疼痛感觉一样。临床研究证实,呼吸道感染、胃食管反流性疾病和炎症性气道疾病患者中,吸入低浓度的C纤维刺激物可引起强烈咳嗽感^[27]。气道C传入神经纤维最有可能调节反流对咳嗽的影响^[28]。气道C传入神经纤维上含有辣椒素敏感的瞬时感受器电位香草素I型(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)受体是一种配体门控的非选择性阳离子通道蛋白,对酸(pH<5.9)等刺激比较敏感,兴奋后可引起Ca²⁺内流而产生动作电位,神经冲动可上传至咳嗽中枢^[29]。因此,酸性反流物(pH<4)误吸入下呼吸道,可降低黏膜表面pH值,激活TRPV1受体而引起咳嗽^[30]。几乎所有的肺移植患者的支气管肺泡灌洗液中可发现胃蛋白酶,而近一半的肺移植患者支气管肺泡灌洗液中可发现胆汁酸,二者均可明显损伤支气管上皮^[31]。Wassenaar等^[32]研究证实:通过支气管活检或痰液检查,经常可在气道中检测到胃蛋白酶,进一步证实胃内容物误吸机制。但是若发生误吸,则反流必定首先到达咽喉,而咽喉反流并不常见。其次咽喉部咳嗽反射和闭喉放射共存,这种声门闭合放射还存在于气管和较大气道中,在吞咽时保护呼吸道和响应可能吸入有害刺激物时发挥重要作用^[25,26],除非呼吸道保护机制受损,或吞咽功能障碍^[16],否则是不可能被误吸的。有研究证实慢性咳嗽患者的支气管肺泡灌洗液中的胃蛋白酶浓度与健康志愿者的相比并无明显不同^[14]。Grabowski等^[33]的研究亦表明GERC患者和健康对照组间的胃内容物误吸并无明显差别。且误吸理论主要是源自于肺移植患者,而这些患者术后的咳嗽反射机制是减弱的。故误吸理论不足以解释GERC机制。

1.3 经咽喷洒(3S现象) 汪忠镐等^[34]认为咽部在食管反流状态下呈鸟嘴状,也即喷嘴。当高位反流量少并在低压情况下经咽喷嘴时引起溢出(spilling),表现为反酸或吐苦水。嗝气、嗝逆也是高位反流,但其基本不含液性物。当反流量多并在高压情况下经咽喷嘴反流时,引起喷射性呕吐(spurting),咽喷嘴被一过性扩张而在刹那间消失,罕有引起严重后果者。当含气液体反流物的量不多且流速一般时则反而会引咽部喷洒或喷雾(spraying),形成无数的飞粒或雾状物或微滴而吸入呼吸道,导致呼吸道即刻刺激和后继高敏状态。通过神经反射途径或免疫炎症途径诱发或加重咳嗽等呼吸道症状。

2 食管-支气管间接反射

大部分GERC患者的胃内容物仅反流至食管下端,短暂性下食管括约肌松弛是造成远端反流的主要原因。食管-支气管反射学说认为气管和食管有共同胚胎起源和神经支配^[17],食管机械感受器AD传入纤维、伤害刺激感受器C纤维与气管快适应感受器(rapid adapting recept, RAR)均来自迷走神经的节状神经节和颈神经节,传入神经纤维都投射到脑干孤束核。气管与食管共同存在4种类型的神经纤维:肾上腺素能、胆碱能、兴奋性非肾上腺素能非胆碱能神经、抑制性非肾上腺素能非胆碱能神经。该理论强调神经食道和呼吸道间的神经元连接作用,胃内容物刺激食道后可引起神经肽释放,从而导致神经免疫性气道炎症。

GERD组织病理学特征主要有:食管上皮细胞间隙扩大和细胞旁通透性增加,食管上皮细胞间隙扩大可导致细胞对酸的通透性增加,可作为一种调节信号而引起反射性咳嗽^[35]。GERC患者中,反流物刺激食管下端黏膜感受器,可通过食管-支气管反射兴奋咳嗽中枢引起咳嗽,同时引起相应的传出神经末梢释放P物质(substance P, SP)、神经激肽A和B、钙基因相关肽等神经肽^[36],辣椒素咳嗽敏感性增高,引起神经源性炎症,或间接通过激活肥大细胞释放组胺、肥大细胞类胰蛋白酶、前列腺素E2、前列腺素D2和白三烯等炎性介质,刺激咳嗽感受器而引发咳嗽^[37]。食管内酸性物质可激活局部的神经轴索反射,通过局部神经反射引起支气管黏膜释放炎性物质,从而导致呼吸道炎症反应,呼吸道黏膜水肿,增加气道高反应性^[38]。姚卫民等^[39]研究发现多次食管灌注盐酸可引起迷走神经介导的食管-支气管反射,引起递质SP释放增加,引起气管的神经源性炎症,致气管阻力增加。Smith等^[40]研究亦证实大多数患者反流发生在食管远端,食管-支气管敏感增高,考虑可能为反流刺激食管-支气管反射所致。也有研究对食管进行利多卡因局部麻醉后,发现反流对咳嗽的影响被抑制,可能是麻醉后神经传导受抑制,食管-支气管反射受抑制,导致反流对咳嗽的影响被抑制,证实反流引起咳嗽由神经反射引起。根据反流物pH值可分为酸性(pH<4)反流和非酸性(pH>4)反流,前者以胃酸成分为主,后者包括酸性成分较少的胃内容物、胆汁和空气^[30]。食管黏膜感受器包括化学感受器(瞬时感受器电位香草素I型受体)及机械牵张感受器。酸性反流主要通过刺激

■ 相关报道

咳嗽是胃食管反流病最常见的食管外症状。GERC的咳嗽特征和时相与其他病因所致咳嗽相比并无特异性,咳嗽主要发生在白天、直立位、发声、起床或进食后。胃内容物可经咽对口、鼻腔、喉和气管带来直接刺激,也可吸入气道导致支气管炎、支气管扩张症、肺纤维化、反复性肺炎及哮喘,甚至危及患者生命。

■创新盘点

本文详尽地阐述了国内外对GERC发病机制研究的最新进展,且对不同发病机制作出辩证分析。

化学感受器而兴奋迷走神经,通过食管-支气管反射兴奋咳嗽中枢引起咳嗽;而非酸性反流可能主要兴奋食管下端机械牵张感受器,通过AD纤维传递冲动而引起咳嗽^[30]。但是,在正常生理中是否存在食管-支气管反射机制仍不清楚。有研究证实对健康志愿者进行食管酸灌注未能引起咳嗽或致敏咳嗽反射^[41],故食管-支气管反射学说也难于完全解释GERC发生机制。

3 咳嗽感受器敏感性增高

反流刺激引起的神经冲动是咳嗽发生的始动因素,而GERC患者咳嗽敏感性增高可能为咳嗽发生的直接原因。Javorkova等^[41]研究证实食管远端酸反流的GERD患者伴慢性咳嗽患者咳嗽反射敏感性增高。气道神经传入神经元在正常情况下并不表达TRPV1,但气道炎症则可启动TRPV1和TRPA1表达^[42]。TRPV1受体可由辣椒素、酸(pH<5.9)、细胞内钙离子减少、细胞内氧化还原等刺激激活。多种配体样物质如神经源性介质和组织损伤刺激物不仅激活TRPV1,还通过上调、寡聚化增多、磷酸化等重塑行改变致敏TRPV1,导致Ca²⁺内流要求的刺激阈值下降,咳嗽敏感性增高,更容易受内外源型刺激而引起咳嗽^[43]。Smith等^[40]亦认为反流可诱发致敏支气管反射从而加重咳嗽。

4 产酸菌

反流可引起食管及口咽微环境改变,人体口腔及食道可发现较多的产酸菌如链球菌类及乳酸菌等,这些细菌有些是人类正常菌群的一部分,有些是通过摄入奶制品和其他发酵食品获得的,可通过自身的质子泵产酸,即使没有胃食管反流,这些细菌自身产生的H⁺也可通过上述途径刺激咳嗽中枢而咳嗽^[44]。

5 非胃型H⁺/K⁺-ATP酶

胃型H⁺/K⁺-ATP酶是P型ATP酶家族成员之一,而非胃型H⁺/K⁺-ATP酶及Na⁺/K⁺-ATP酶同样也是其成员之一。因此H⁺/K⁺-ATP酶不仅表达于胃,还表达于身体其他地方。有研究表明,人体咽喉及肺组织中可发现非胃型H⁺/K⁺-ATP酶^[45]。免疫组织化学染色证实,人体唾液腺、静脉窦及舌黏膜均可发现非胃型H⁺/K⁺-ATP酶^[44]。非胃型H⁺/K⁺-ATP酶活动产酸可参与反流发生,也可通过上述途径刺激咳嗽中枢而咳嗽。

6 精神心理因素

近年来有研究显示,精神心理因素与胃食管反流病的发生、发展有密切关系^[46]。精神心理因素可以通过脑肠反射改变胃肠道的激素分泌以及动力反应^[47]。何智敏等^[48]研究41例GERC患者,得出抑郁和/或焦虑患病率为80.5%。加用小剂量抗抑郁药黛力新后,全部病例消化系统症状明显改善。因而,抑郁、焦虑因素可能是GERC发病的重要病因或者GERC可激发抑郁、焦虑症状还有待进一步研究。

7 咳嗽与反流可互为因果

Kahrilas等^[49]认为咳嗽可能通过中枢神经调节而增加食管下括约肌短暂松弛加重反流。咳嗽时腹腔和胸腔之间的压力梯度变化可引发反流^[50]。气管上的迷走神经兴奋也可通过食管-气管神经通路激动共同的中枢,引起胃食管运动功能异常,产生反流。胃食管反流又加重咳嗽,从而形成咳嗽与反流的恶性循环。然而亦有研究表明酸性和弱酸性反流可能会导致不明原因的慢性咳嗽,但是咳嗽不会引起胃食管返流^[51]。

8 结论

迄今为止的研究证实胃食管反流性咳嗽的慢性咳嗽与酸反流、弱酸反流和非酸反流相关。发病机制可能与反流物直接刺激气道、食管-支气管间接反射、咳嗽感受器敏感性增高、产酸菌、非胃型H⁺/K⁺-ATP酶、精神心理等相关。咳嗽与反流相互影响,但胃食管反流与慢性咳嗽发生机制仍需进一步阐述和深入研究。需要借助更多新技术来明确反流-咳嗽的发生机制,从而更好的指导临床诊治。

9 参考文献

- 1 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 咳嗽的诊断与治疗指南. 中华结核和呼吸杂志 2009; 32: 407-413
- 2 Cobeta I, Pacheco A, Mora E. The role of the larynx in chronic cough. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2013; 64: 363-368 [PMID: 23305863 DOI: 10.1016/j.otorri.2012.10.001]
- 3 Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 308-28; quiz 329 [PMID: 23419381 DOI: 10.1038/ajg.2013.314]
- 4 Hom C, Vaezi MF. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2013; 42: 71-91 [PMID: 23452632 DOI: 10.1016/j.gtc.2012.11.004]
- 5 Kahrilas PJ. Chronic cough and gastroesophageal

- reflux disease: new twists to the riddle. *Gastroenterology* 2010; 139: 716-718 [PMID: 20659461 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.07.014]
- 6 张宁, 孙慧博, 徐振荣, 张晓君, 王欢. 慢性咳嗽的诊疗研究进展. *现代生物医学进展* 2013; 13: 3795-3797
- 7 Pacheco-Galván A, Hart SP, Morice AH. Relationship between gastro-oesophageal reflux and airway diseases: the airway reflux paradigm. *Arch Bronconeumol* 2011; 47: 195-203 [PMID: 21459504 DOI: 10.1016/j.arbres.2011.02.001]
- 8 史燕妹, 赵公芳, 黄华. 胃食管反流病的发病机制及其诊治的进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 3713-3718
- 9 Nahata M, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G42-G53 [PMID: 22517773 DOI: 10.1152/ajpgi.00462.2011]
- 10 Pauwels A, Blondeau K, Dupont LJ, Sifrim D. Mechanisms of increased gastroesophageal reflux in patients with cystic fibrosis. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1346-1353 [PMID: 22777342 DOI: 10.1038/ajg.2012.213]
- 11 Derakhshan MH, Robertson EV, Fletcher J, Jones GR, Lee YY, Wirz AA, McColl KE. Mechanism of association between BMI and dysfunction of the gastro-oesophageal barrier in patients with normal endoscopy. *Gut* 2012; 61: 337-343 [PMID: 21873737 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300633]
- 12 Wang ZG, Wu JM, Liu JJ, Wang LY, Lai YG, Ibrahim IM, Wang XJ, Dardik H. Respiratory distress resulting from gastroesophageal reflux is not asthma, but laryngotracheal irritation, spasm, even suffocation. *Chin Med Sci J* 2009; 24: 130-132 [PMID: 19618613 DOI: 10.1016/S1001-9294(09)60076-6]
- 13 Saritas Yuksel E, Vaezi MF. Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease: cough, asthma, laryngitis, chest pain. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13544 [PMID: 22442097 DOI: 10.4414/smw.2012.13544]
- 14 Decalmer S, Stovold R, Houghton LA, Pearson J, Ward C, Kelsall A, Jones H, McGuinness K, Woodcock A, Smith JA. Chronic cough: relationship between microaspiration, gastroesophageal reflux, and cough frequency. *Chest* 2012; 142: 958-964 [PMID: 22797535 DOI: 10.1378/chest.12-0044]
- 15 Patterson N, Mainie I, Rafferty G, McGarvey L, Heaney L, Tutuian R, Castell D, Johnston BT. Nonacid reflux episodes reaching the pharynx are important factors associated with cough. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 414-419 [PMID: 19197196 DOI: 10.1097/MCG.0b013e31818859a3]
- 16 Smith JA, Abdulqawi R, Houghton LA. GERD-related cough: pathophysiology and diagnostic approach. *Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13: 247-256 [PMID: 21465223 DOI: 10.1007/s11894-011-0192-x]
- 17 姚东英, 刘菲. 胃食管反流病与慢性咳嗽的关系. *国际消化病杂志* 2011; 31: 201-203
- 18 Oelschlager BK, Quiroga E, Isch JA, Cuenca-Abente F. Gastroesophageal and pharyngeal reflux detection using impedance and 24-hour pH monitoring in asymptomatic subjects: defining the normal environment. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 54-62 [PMID: 16368491 DOI: 10.1016/j.gassur.2005.09.005]
- 19 Songür N, Songür Y, Cerci SS, Oztürk O, Sahin U, Senol A, Yarktaş MH. Gastroesophageal scintigraphy in the evaluation of adult patients with chronic cough due to gastroesophageal reflux disease. *Nucl Med Commun* 2008; 29: 1066-1072 [PMID: 18987527 DOI: 10.1097/MNM.0b013e32831313d8]
- 20 赵荣莱. 胃食管反流病相关性呼吸系病及咽喉病研究. *中国医药导报* 2012; 9: 5-7
- 21 Sandhu GS, Kuchai R. The larynx in cough. *Cough* 2013; 9: 16 [PMID: 23732122 DOI: 10.1186/1745-9974-9-16]
- 22 Raghavendran K, Davidson BA, Hutson AD, Helinski JD, Nodzo SR, Nottter RH, Knight PR. Predictive modeling and inflammatory biomarkers in rats with lung contusion and gastric aspiration. *J Trauma* 2009; 67: 1182-1190 [PMID: 20009665 DOI: 10.1097/TA.0b013e318187a2bf]
- 23 Barbas AS, Downing TE, Balsara KR, Tan HE, Rubinstein GJ, Holzknacht ZE, Collins BH, Parker W, Davis RD, Lin SS. Chronic aspiration shifts the immune response from Th1 to Th2 in a murine model of asthma. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 596-602 [PMID: 18717828 DOI: 10.1111/j.1365-2362.2008.01976.x]
- 24 Grabowski M, Seys S, Decraene A, Kasran A, Dilissen E, Barg W, Medrala W, Dupont LJ, Panaszek B, Bullens DM. Airway inflammation in patients with chronic non-asthmatic cough. *Thorax* 2013; 68: 125-130 [PMID: 23093651 DOI: 10.1136/thoraxjnl-2012-201895]
- 25 Pacheco A, Cobeta I. Refractory chronic cough, or the need to focus on the relationship between the larynx and the esophagus. *Cough* 2013; 9: 10 [PMID: 23552099 DOI: 10.1186/1745-9974-9-10]
- 26 Pacheco A, Cobeta I, Wagner C. Refractory chronic cough: new perspectives in diagnosis and treatment. *Arch Bronconeumol* 2013; 49: 151-157 [PMID: 23165122 DOI: 10.1016/j.arbres.2012.09.009]
- 27 Canning BJ. Functional implications of the multiple afferent pathways regulating cough. *Pulm Pharmacol Ther* 2011; 24: 295-299 [PMID: 21272660 DOI: 10.1016/j.pupt.2011.01.008]
- 28 Kollarik M, Brozmanova M. Cough and gastroesophageal reflux: insights from animal models. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22: 130-134 [PMID: 19138751 DOI: 10.1016/j.pupt.2008.12.017]
- 29 Adcock JJ. TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22: 65-70 [PMID: 19141328 DOI: 10.1016/j.pupt.2008.12.014]
- 30 王宇, 余莉, 邱忠民. 胃食管反流性咳嗽的发病机制及诊疗. *中华哮喘杂志* 2010; 4: 308-311
- 31 Blondeau K, Mertens V, Vanaudenaerde BA, Verleden GM, Van Raemdonck DE, Sifrim D, Dupont LJ. Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur Respir J* 2008; 31: 707-713 [PMID: 18057058 DOI: 10.1183/09031936.00064807]
- 32 Wassenaar E, Johnston N, Merati A, Monteno M, Petersen R, Tatum R, Pellegrini C, Oelschlager B. Pepsin detection in patients with laryngopharyngeal reflux before and after fundoplication. *Surg Endosc* 2011; 25: 3870-3876 [PMID: 21695583 DOI: 10.1007/s00464-011-1813-z]
- 33 Grabowski M, Kasran A, Seys S, Pauwels A, Medrala W, Dupont L, Panaszek B, Bullens D. Pepsin and bile acids in induced sputum of chronic cough patients. *Respir Med* 2011; 105: 1257-1261 [PMID: 21592756 DOI: 10.1016/j.rmed.2011.04.015]
- 34 汪忠镐, 高翔, 来运刚, 季峰, 张成超, 胡志伟, 宁雅婵, 李治全, 吴继敏, 卞策, 牛炎鑫. 咽喉嘴及3S现象: 胃食

■应用要点

本文全面系统阐述了GERC发病机制的最新研究进展, 提供了大量有价值的信息, 为GERC的临床诊断、治疗及预后提供重要的指导意义。

■同行评价

本文分析了胃食管反流性咳嗽的发病机制,包括反流物直接刺激、食管-支气管间接反射、咳嗽感受器敏感性增高、产酸菌、非胃型H⁺/K⁺-ATP酶、精神心理等。对临床上了解胃食管反流性咳嗽的发病机制和临床治疗提供了重要帮助作用。

- 35 Orlando RC. Dilated intercellular spaces and chronic cough as an extra-oesophageal manifestation of gastroesophageal reflux disease. *Pulm Pharmacol Ther* 2011; 24: 272-275 [PMID: 20970514 DOI: 10.1016/j.pupt.2010.10.007]
- 36 Qiu Z, Yu L, Xu S, Liu B, Zhao T, Lü H, Qiu Z. Cough reflex sensitivity and airway inflammation in patients with chronic cough due to non-acid gastro-oesophageal reflux. *Respirology* 2011; 16: 645-652 [PMID: 21342332 DOI: 10.1111/j.1440-1843.2011.01952.x]
- 37 王宇, 余莉, 吕寒静, 邱忠民. 胃食管反流性咳嗽患者诱导痰中肥大细胞相关介质的改变及其意义. *同济大学学报: 医学版* 2010; 31: 55-61
- 38 Lai YG, Wang ZG, Ji F, Wu JM, Chen X, Li Z, Dong SK. Animal study for airway inflammation triggered by gastroesophageal reflux. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 2775-2778 [PMID: 19951613 DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999]
- 39 姚卫民, 赖克方, 罗远明, 刘春丽, 陈如冲, 罗炜, 钟南山. 多次食管酸灌注对豚鼠气道阻力和气道反应性的影响及其机制探讨. *南方医科大学学报* 2009; 29: 1313-1316
- 40 Smith JA, Decalmer S, Kelsall A, McGuinness K, Jones H, Galloway S, Woodcock A, Houghton LA. Acoustic cough-reflux associations in chronic cough: potential triggers and mechanisms. *Gastroenterology* 2010; 139: 754-762 [PMID: 20600028 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.06.050]
- 41 Javorkova N, Varechova S, Pecova R, Tatar M, Balaz D, Demeter M, Hyrdel R, Kollarik M. Acidification of the oesophagus acutely increases the cough sensitivity in patients with gastro-oesophageal reflux and chronic cough. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 119-124 [PMID: 17999650]
- 42 Zhang G, Lin RL, Wiggers M, Snow DM, Lee LY. Altered expression of TRPV1 and sensitivity to capsaicin in pulmonary myelinated afferents following chronic airway inflammation in the rat. *J Physiol* 2008; 586: 5771-5786 [PMID: 18832423 DOI: 10.1113/jphysiol.2008.161042]
- 43 Chung KF, Pavord ID. Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough. *Lancet* 2008; 371: 1364-1374 [PMID: 18424325 DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60595-4]
- 44 Vesper BJ, Altman KW, Elseth KM, Haines GK, Pavlova SI, Tao L, Tarjan G, Radosovich JA. Gastroesophageal reflux disease (GERD): is there more to the story? *ChemMedChem* 2008; 3: 552-559 [PMID: 18076011 DOI: 10.1002/cmdc.200700176]
- 45 Altman KW, Waltonen JD, Hammer ND, Radosovich JA, Haines GK. Proton pump (H⁺/K⁺-ATPase) expression in human laryngeal seromucinous glands. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 133: 718-724 [PMID: 16274799 DOI: 10.1016/j.otohns.2005.07.036]
- 46 王慧珍, 邓苏芳, 周庆金, 张凯. 胃食管返流病患者的心理因素分析并疗效观察. *中国医药导刊* 2010; 7: 1255-1257
- 47 任素芳, 邱服斌. 黛力新联合埃索美拉唑治疗非糜烂性胃食管反流病的疗效观察. *山西医科大学学报* 2011; 42: 905-907
- 48 何智敏, 江广理, 王章锋. 胃食管反流性咳嗽治疗体会. *中国卫生产业* 2011; 8: 50-52
- 49 Kahrilas PJ, Howden CW, Hughes N, Molloy-Bland M. Response of chronic cough to acid-suppressive therapy in patients with gastroesophageal reflux disease. *Chest* 2013; 143: 605-612 [PMID: 23117307 DOI: 10.1378/chest.12-1788]
- 50 Galmiche JP, Zerbib F, Bruley des Varannes S. Review article: respiratory manifestations of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 449-464 [PMID: 18194498 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03611.x]
- 51 Blondeau K, Mertens V, Dupont L, Pauwels A, Farré R, Malfroot A, De Wachter E, De Schutter I, Hauser B, Vandenplas Y, Sifrim D. The relationship between gastroesophageal reflux and cough in children with chronic unexplained cough using combined impedance-pH-manometry recordings. *Pediatr Pulmonol* 2011; 46: 286-294 [PMID: 20967945 DOI: 10.1002/ppul.21365]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



Smo小干扰RNA对人食管癌CAES-17细胞凋亡的影响

刘山, 张倬, 陈天佑

刘山, 张倬, 陈天佑, 武汉市第三医院胸外科 湖北省武汉市 430060

刘山, 住院医师, 主要从事食管癌、肺癌及乳腺癌方面的研究。
作者贡献分布: 此课题由刘山设计, 并得到陈天佑的精心指导; 研究过程由刘山与张倬负责操作完成; 研究使用试剂与分析工具由刘山提供; 数据分析由张倬完成; 本论文写作由刘山完成。

通讯作者: 刘山, 住院医师, 430060, 武汉市武昌区彭刘杨路241号, 武汉市第三医院胸外科. huanghun642@126.com
电话: 027-68894921

收稿日期: 2014-02-28 修回日期: 2014-04-15

接受日期: 2014-04-24 在线出版日期: 2014-07-08

Transfection with small interfering RNA targeting smoothened promotes cell apoptosis in human esophageal carcinoma cell line CAES-17

Shan Liu, Zhuo Zhang, Tian-You Chen

Shan Liu, Zhuo Zhang, Tian-You Chen, Department of Thoracic Surgery, the Third Hospital of Wuhan, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Shan Liu, Resident Physician, Department of Thoracic Surgery, the Third Hospital of Wuhan, 241 Pengliuyang Road, Wuchang District, Wuhan 430060, Hubei Province, China. huanghun642@126.com

Received: 2014-02-28 Revised: 2014-04-15

Accepted: 2014-04-24 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of transfection with small interfering RNA (siRNA) targeting smoothened (Smo) on the expression of Bcl-2 in esophageal cancer CAES-17 cells.

METHODS: Smo siRNA was transfected into CAES-17 cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the levels of Smo and Bcl-2 mRNAs and proteins. TUNEL assay and flow cytometry were used to detect cell apoptosis.

RESULTS: Compared with the control groups, after transfection with Smo siRNA for 24, 48 and 72 h, the levels of Smo mRNA were significantly down-regulated (0.524 ± 0.011 , 0.422 ± 0.008 , 0.332 ± 0.019 , $P < 0.05$ for all). After transfection with Smo siRNA for 72 h, the levels of Smo and Bcl-2 proteins were also significantly lower

compared with the control groups (0.330 ± 0.016 , 0.391 ± 0.019 , $P < 0.05$ for all). The number of apoptotic cells was greatly increased after Smo siRNA transfection.

CONCLUSION: Smo gene may play an important role in the apoptosis of esophageal cancer cells. Smo may be used as a novel biomarker for the treatment of esophageal carcinoma.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Smo gene; Bcl-2 gene; CAES-17 cells; Apoptosis

Liu S, Zhang Z, Chen TY. Transfection with small interfering RNA targeting smoothened promotes cell apoptosis in human esophageal carcinoma cell line CAES-17. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2671-2678 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2671.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2671>

摘要

目的: 探讨Smoothened(Smo)小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)对食管癌的CAES-17细胞的凋亡及凋亡相关基因Bcl-2表达的影响。

方法: Smo siRNA转染食管癌CAES-17细胞, 采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组食管癌CAES-17细胞中Smo、Bcl-2 mRNA的表达; 采用Western blot检测各组食管癌CAES-17细胞中Smo、Bcl-2的蛋白表达; 采用TUNEL及流式细胞术检测CAES-17细胞的凋亡情况。

结果: 与各对照组相比, Smo siRNA转染细胞24、48和72 h Smo、Bcl-2蛋白及mRNA的表达均明显降低, 其中Smo siRNA的mRNA转录水平为 0.524 ± 0.011 、 0.422 ± 0.008 和 0.332 ± 0.019 ; Bcl-2 mRNA的转录水平为 0.571 ± 0.024 、 0.512 ± 0.017 和 0.492 ± 0.011 , 具有明显下调($P < 0.05$); 转染72 h后, Smo siRNA和Bcl-2蛋白翻译水平与对照相比, 分别为 0.330 ± 0.016 和 0.391 ± 0.019 , 差异均有显著性

■背景资料

食管癌为食道肿瘤, 存在许多亚型。食道的肿瘤长会导致吞咽困难(dysphagia), 疼痛和不舒服, 并需要通过活组织切片检查做诊断。小的且没有转移的肿瘤可靠外科手术治疗, 而侵犯性强的肿瘤则须靠化学疗法、放射线疗法或合并使用治疗。此病的预后要看病症不同的程度而定, 但普遍来说都是极差的。

■同行评议者

黄缘, 教授, 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

■研发前沿

RNAi 技术的应用, 不仅能大大推动人类后基因组计划(蛋白组学)的发展, 还有可能设计出RNAi芯片, 高通量地筛选药物靶基因, 逐条检测人类基因组的表达抑制情况来明确基因的功能, 并且他还应用于基因治疗、新药开发、生物医学研究等领域。

($P<0.05$); 各实验组凋亡细胞数与对照组相比均明显增多($P<0.05$).

结论: Smo siRNA可能通过抑制CAES-17细胞中Smo基因表达, 进而下调Bcl-2表达, 促进CAES-17细胞凋亡.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: Smo基因; Bcl-2基因; 食管癌CAES-17细胞; 凋亡

核心提示: Smoothened(Smo)小干扰RNA(small interfering RNA)可能通过抑制CAES-17细胞中Smo基因表达, 进而下调Bcl-2表达, 促进CAES-17细胞凋亡. 为食管癌的治疗提供临床参考价值.

刘山, 张倬, 陈天佑. Smo小干扰RNA对人食管癌CAES-17细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2671-2678
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2671.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2671>

0 引言

Hedgehog(Hh)信号通路是调控细胞增殖和组织分化的重要信号通路, Smoothened(Smo)蛋白是Hh信号通路上的膜蛋白, 他是Hh信号通路的转换器, 把细胞外的Hh信号转换成细胞内的Gli信号, 进而激活Hh相应基因Bcl-2等的转录, 影响细胞凋亡^[1]. 本研究应用小干扰RNA(small interference RNA, siRNA)沉默Smo基因, 观察其对人食管癌CAES-17中凋亡相关基因Bcl-2表达及细胞凋亡的影响, 为食管癌的基因治疗提供了理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人食管鳞癌CAES-17细胞株由中国科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室赠送. Lipofectamine™ 2000及TRNzol试剂盒购自美国Invitrogen公司; Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit购自Fermentas公司; Quant cDNA第一链合成试剂盒; Smo、Bcl-2、β-actin引物由上海生工生物工程有限公司合成; RPMI 1640培养液由北京索莱宝科技有限公司提供. TUNEL试剂盒购自瑞士Roche公司. Smo一抗、β-actin一抗及Bcl-2兔抗人多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司. Smo siRNA(包括3条不同的Smo siRNA、阴性对照siRNA、阴性对照FAM-siRNA)由上海吉玛公司合成. 序列如表1.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将人食管癌CAES-17细胞于

RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清, 青霉素100 U/mL, 链霉素100 U/mL), 37 °C、5%CO₂孵箱内贴壁培养.

1.2.2 转染: 将CAES-17细胞以 4.5×10^5 的密度接种于6孔板中, 细胞覆盖率达到30%-50%时进行转染. 将10 μL siRNA加入250 μL无血清无抗生素的RPMI 1640培养液中; 在250 μL无血清无抗生素的培养液中加入5 μL Lipofectamine™ 2000, 室温孵育5 min后, 把两者轻轻混匀, 室温再孵育20 min为了形成siRNA/RNAi-Mate复合物, 逐滴加入孔中, 前后轻轻晃动6孔板使混合均匀. 在37 °C、5%CO₂培养箱中继续培养, 5 h后更换含血清含抗生素的RPMI 1640培养液.

1.2.3 Smo siRNA转染浓度的筛选: 采用浓度为33、66、99 nmol/L的FAM-siRNA转染人的食管癌CAES-17细胞24 h后, 荧光显微镜下观察, 浓度为99 nmol/L的siRNA转染效率最高, 将99 nmol/L的siRNA作为后续实验浓度.

1.2.4 最佳siRNA序列筛选: 共分6组: Smo siRNA-1组、Smo siRNA-2组、Smo siRNA-3组、无关序列组、转染试剂组、细胞对照组. 在3条特异的序列中筛选抑制效率最好的Smo siRNA-3序列用于后续实验.

1.2.5 细胞分组: 分为4组: Smo siRNA-3组、无关序列组、转染试剂组, 细胞对照组, 在不同的转染时间点上又分3组: 24 h组、48 h组、72 h组.

1.2.6 RT-PCR检测Smo、Bcl-2 mRNA表达: 用TRNzol提取转染后各组总RNA, 用紫外分光光度仪测量A值, 所有A_{260/280}值都在1.9-2.1之间. 按照逆转录合成cDNA试剂盒说明书合成cDNA. Smo上游引物序列为5'-CGCTACCCTGCTGT-TATTCTCT-3', 下游引物序列为5'-CAGGTG-GAAGTAGGAGGTCTTG-3'; Bcl-2上游引物序列为5'-AACTCGAGTGACAAGCCCGATG-3', 下游引物序列为5'-GTACCACCAGTTG-GTTGTCTTTGA-3'; β-actin上游引物序列为5'-CCTAGAAGCATTGCGGTGG-3', 下游引物序列为5'-GAGCTACGAGCTGCTGCCT-GACG-3'. Smo、Bcl-2、β-actin反应条件为: 95 °C预变性5 min; 95 °C, 变性30 s, 63 °C/68 °C/67 °C退火45 s, 72 °C延伸45 s, 共30个循环; 72 °C终延伸5 min, Smo、Bcl-2、β-actin扩增产物大小为306、201、416 bp. RT-PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳, Alpha多功能凝胶成像系统成像, 用Alpha View软件图像分析, 分别以Smo、Bcl-2与β-actin的电泳条带吸光度(A)值之比来表

表 1 Smo siRNA试剂盒中siRNA序列

Smo目的基因	siRNA
Smo siRNA-1	5'-UUUGAAGGAAGUGUGCCAGTT-3' 5'-CUGGCACACUCCUCAAATT-3'
Smo siRNA-2	5'-GGAGUCAUGACUCUGUUCUTT-3' 5'-AGAACAGAGUCAUGACUCCTT-3'
Smo siRNA-3	5'-GGGACUAUGUGCUAUGUCATT-3' 5'-UGACAUAGCACAUAGUCCCTT-3'
阴性对照FAM-siRNA	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'
阴性对照siRNA	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

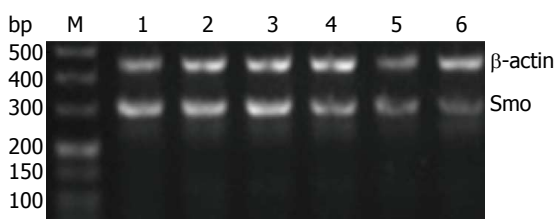


图 1 各组CAES-17细胞中Smo mRNA的表达. M: DNA Marker; 1: 细胞对照组; 2: 转染试剂组; 3: 无关序列组; 4: Smo siRNA-1组; 5: Smo siRNA-2组; 6: Smo siRNA-3组.

示Smo、Bcl-2 mRNA的相对表达量.

1.2.7 Western blot法检测Smo、Bcl-2蛋白的表达: 经转染处理过的细胞用胰酶消化离心, 分别收集各组细胞, 并在冰上裂解, 提取各组蛋白质, 采用BCA法用酶标仪在96孔板中测定波长562 nm时的A值, 并绘制标准曲线, 计算蛋白浓度. 用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 各组蛋白上样量为55 μg/孔, 蛋白Marker为5 μg/孔, 先100 V, 后120 V恒压电泳, 用半干式电转仪将蛋白转于PVDF膜上. TBST洗后, 用含5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h. PVDF膜与一抗结合Smo和Bcl-2、β-actin抗体(1:1000稀释), 在4℃反应过夜, TBST洗过之后, 二抗结合(1:5000稀释)室温孵育1 h, TBST洗过之后, 用二氨基联苯胺(DAB)显色. 用Alpha多功能凝胶成像系统采集图像, 用Alpha View软件分析, 用目的条带与β-actin的A值之比来表示目的蛋白的相对表达量.

1.2.8 流式细胞仪检测细胞凋亡: 收集转染后各组细胞, 保证每组细胞密度 $>1 \times 10^6/\text{mL}$. PBS洗涤3遍, 用100 μL预冷的1×Binding Buffer重悬细胞, 加入5 μL FITC Annexin V和5 μL PI混匀避光孵育15 min, 再加入400 μL 1×Binding Buffer混匀后, 用流式细胞仪检测各组凋亡细胞比例.

1.2.9 原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡: 转

染处理的细胞爬片, PBS洗3次, 4%多聚甲醛固定20 min, 用中行树脂胶固定在载玻片上. PBS洗3次, 0.3%TritonX-100冰上通透液30 min; PBS洗3次, 加3% H_2O_2 孵育10 min; PBS洗3次, 把试剂1(Enzyme Solution)50 μL加入到450 μL试剂2(Label Solution)中, 轻轻混匀, 配制成TUNEL反应混合液; 滴加50 μL TUNEL反应混合液37℃避光孵育1 h; PBS洗3次, 滴加试剂3(converter-POD)50 μL, 37℃避光孵育; PBS洗3次, 用DAB显色, 镜下控制显色时间; 自来水充分冲洗、苏木素复染、1%盐酸乙醇分化、脱水、透明、封片.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行统计学处理, 计量结果, 符合正态分布的计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 多组均数的比较使用单因素方差分析(ANOVA), 对有显著性差异的计量资料, 使用LSD-*t*检验进行多组均数间的两两比较, 检验水准采取 $\alpha = 0.05$. $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 最佳Smo siRNA 3条Smo siRNA(siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3)转染食管癌CAES-17细胞后, 各转染组Smo mRNA表达水平平均明显低于各对照组($P < 0.05$), 其中Smo siRNA-3抑制效率最高($P < 0.05$). 后续实验采用Smo siRNA-3进行, 各对照组(无关序列组、转染试剂组、细胞对照组)间Smo mRNA的表达差异无显著性($P > 0.05$)(图1).

2.2 Smo siRNA-3对CAES-17细胞中Smo及Bcl-2 mRNA表达的影响 Smo siRNA-3转染细胞24、48和72 h与各对照组细胞相比, Smo和Bcl-2 mRNA表达水平均降低, 以转染72 h最为显著, 且各组间差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2, 图2, 3).

■ 相关报道

目前, 国内外相关RNA干扰(RNA interfering, RNAi)用于疾病的治疗已有大量报道, 均充分肯定了RNAi在肿瘤治疗方面的价值, 在临床上具有较高的应用价值.

■创新盘点

用RNAi技术来抑制基因的异常表达, 为治疗癌症、遗传病等疾病开辟了新的途径。

表 2 Smo siRNA-3对食管癌CAES-17细胞中Smo mRNA表达的影响 (mean ± SD)

分组	Smo mRNA表达量	Bcl-2 mRNA表达量
细胞对照组	0.644 ± 0.023	0.783 ± 0.032
转染试剂组	0.632 ± 0.026	0.790 ± 0.036
无关序列组	0.660 ± 0.035	0.797 ± 0.036
转染Smo siRNA-3后24 h组	0.524 ± 0.011 ^{bdf}	0.571 ± 0.024 ^{bdf}
转染Smo siRNA-3后48 h组	0.422 ± 0.008 ^{bdfh}	0.512 ± 0.017 ^{bdfh}
转染Smo siRNA-3后72 h组	0.332 ± 0.019 ^{bdfhj}	0.492 ± 0.011 ^{bdfhj}
F值	327.87	212.14
P值	<0.01	<0.01

^b*P*<0.01 vs 细胞对照组; ^d*P*<0.01 vs 转染试剂组; ^f*P*<0.01 vs 无序列组相比; ^h*P*<0.01 vs 转染Smo siRNA-3后24 h组; ^j*P*<0.01 vs 转染Smo siRNA-3后48 h组。

表 3 Smo siRNA-3对食管癌CAES-17细胞中Smo和Bcl-2蛋白表达的影响 (mean ± SD)

分组	Smo蛋白表达量	Bcl-2蛋白表达量
细胞对照组	0.624 ± 0.017	0.671 ± 0.023
转染试剂组	0.622 ± 0.031	0.664 ± 0.028
无关序列组	0.628 ± 0.037	0.651 ± 0.030
转染Smo siRNA-3后72 h组	0.330 ± 0.016 ^{bdf}	0.391 ± 0.019 ^{bdf}
F值	151.31	180.20
P值	<0.01	<0.01

^b*P*<0.01 vs 细胞对照组; ^d*P*<0.01 vs 转染试剂组; ^f*P*<0.01 vs 无序列组相比。

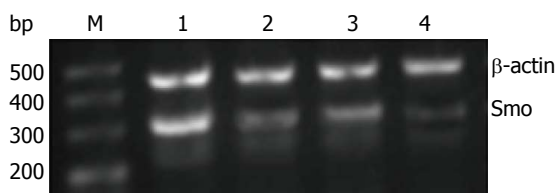


图 2 各组CAES-17细胞中Smo mRNA的表达。M: DNA Marker; 1: 细胞对照组; 2: 转染Smo siRNA-3后24 h组; 3: 转染Smo siRNA-3后48 h组; 4: 转染Smo siRNA-3后72 h组。

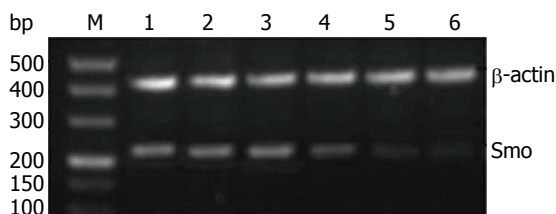


图 3 各组CAES-17细胞中Bcl-2 mRNA的表达。M: DNA Marker; 1: 细胞对照组; 2: 转染试剂组; 3: 无关序列组; 4: 转染Smo siRNA-3后24 h组; 5: 转染Smo siRNA-3后48 h组; 6: 转染Smo siRNA-3后72 h组。

2.3 Smo siRNA-3对CAES-17细胞中Smo及Bcl-2蛋白表达的影响 Western blot检测结果显示, 与

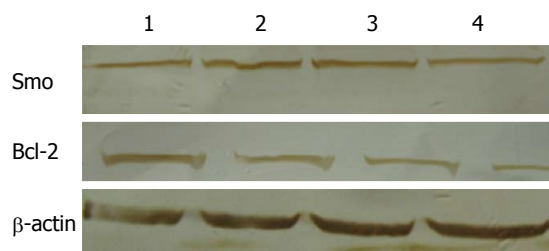


图 4 Smo siRNA对食管癌CAES-17细胞Smo蛋白和Bcl-2蛋白表达的影响。1: 细胞对照组; 2: 转染试剂组; 3: 无关序列组; 4: 转染Smo siRNA-3后72 h组。

对照组细胞相比, Smo siRNA-3转染细胞24、48和72 h, Smo和Bcl-2 mRNA表达水平均降低, 以转染72 h最为显著, 且各组间差异有统计学意义 (*P*<0.05)(表3, 图4)。

2.4 原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡的结果 结果显示: 细胞对照组、转染试剂组、无关序列组凋亡指数(apoptotic index, AI)分别为3.00%±1.58%、3.80%±1.92%、4.20%±1.92%, 转染Smo siRNA-3后48 h组细胞凋亡指数为20.40%±3.61%, 转染Smo siRNA-3后48 h组与各对照组相比, 细胞凋亡指数上升有统计

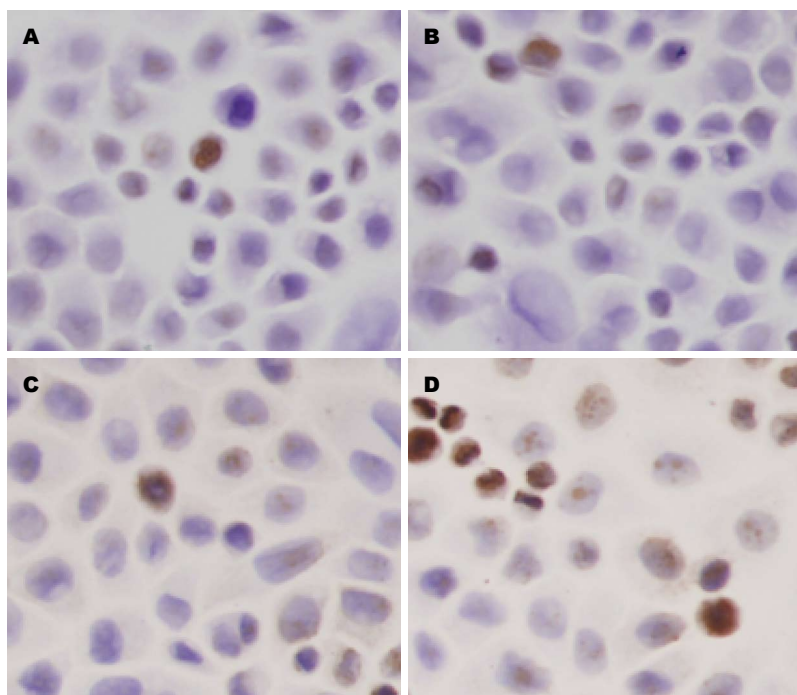


图5 Smo siRNA对食管癌CAES-17细胞凋亡的影响(TUNEL $\times 400$). A: 细胞对照组; B: 转染试剂组; C: 无关序列组; D: Smo siRNA-3转染48 h组.

■应用要点

在疾病治疗方面, 双链小分子RNA或siRNA已被用于临床测试用于几种疾病治疗, 如老年视黄斑退化、肌肉萎缩性侧索硬化症、类风湿性关节炎、肥胖症等. 在抗病毒治疗方面, 帕金森病等神经系统疾病已经开始初步采用RNA干扰疗法. 肿瘤治疗方面也已经取得了一些成果.

表4 Smo siRNA-3对各组食管癌CAES-17细胞凋亡指数的影响 (mean $\pm$ SD)

分组	凋亡指数
正常对照组	3.00 $\pm$ 1.58
转染试剂组	3.80 $\pm$ 1.92
无关序列组	4.20 $\pm$ 1.92
转染Smo siRNA-3后48 h组	20.40 $\pm$ 3.61 ^{bdf}
F值	66.27
P值	<0.01

^b $P < 0.01$ vs 细胞对照组; ^d $P < 0.01$ vs 转染试剂组; ^f $P < 0.01$ vs 无关序列组相比.

学意义($F = 66.27$, $P < 0.05$), 各对照组之间比较细胞凋亡指数均无统计学意义(表4, 图5).

2.5 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况 Smo siRNA-3转染食管癌CAES-17细胞48 h, 晚期凋亡细胞和早期凋亡细胞所占的比例均明显高于各对照组(均 $P < 0.05$), 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表5, 图6).

3 讨论

Hh信号通路是调控细胞增殖和组织分化的重要信号通路. 近年来的研究表明, 多种肿瘤的发生和发展与Hh信号通路的异常激活及过表达有着密切的关系, 如肺小细胞癌^[2,3]、基底细胞癌^[4,5]、膀胱癌^[6,7]、胰腺癌^[8,9]、髓母细胞瘤^[10-12]、肝癌^[13,14]、前列腺癌^[15,16]、胃癌^[17,18]、乳腺癌^[19-21]等.

Smo基因位于7q31-7q32染色体, 编码一个含有1024个氨基酸的蛋白. Smo基因是原癌基因, Smo蛋白有3个区域: 一个细胞内的羧基端区域、一个细胞外氨基端区域和7个疏水跨膜区^[22]. 当Hh蛋白不存在时, 受体蛋白Ptch抑制Smo蛋白的活性, 进而阻断Hh信号通路^[23]. 当Hh蛋白存在时, HH蛋白与Ptch蛋白结合, 解除了对Smo蛋白的抑制, 激活的Smo蛋白可以把细胞外的Hh信号转换成细胞内的Gli信号, 进而激活Hh相应基因的转录, 包括*Hhip*、*ptch*、*Gli1*、*cyclinD*、*Bmi1*、*Bcl-2*等^[24].

近年来, 通过抑制Hh信号转导通路关键基因进而抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为研究热点. 相关研究表明^[25-29], 通过siRNA抑制胃癌MGC803细胞、乳腺癌MCF-7细胞、肝癌Huh-7细胞、胰腺癌PANC-1细胞中Smo和Gli1的表达, 可以抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 增强对化疗药物的敏感性, 表明Smo可能是肿瘤基因治疗的有效靶点.

本课题组前期研究表明^[30,31], Smo在人食管鳞癌组织及裸鼠食管癌移植瘤中高表达, Smo siRNA可通过下调裸鼠食管癌移植瘤细胞中Smo基因的表达, 进而体内诱导裸鼠食管癌移植瘤细胞的凋亡. 本实验采用3条Smo siRNA(siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3)转染食管癌CAES-17细胞后, 各转染组Smo mRNA表达水平平均明显低于各对照组($P < 0.05$), 其中Smo siRNA-3抑制效率

■同行评价

构建了一种Smo siRNA作用于食管癌, 研究结果表明, 该系统在食管癌的治疗中疗效显著, 为进一步用于临床提供了理论价值。

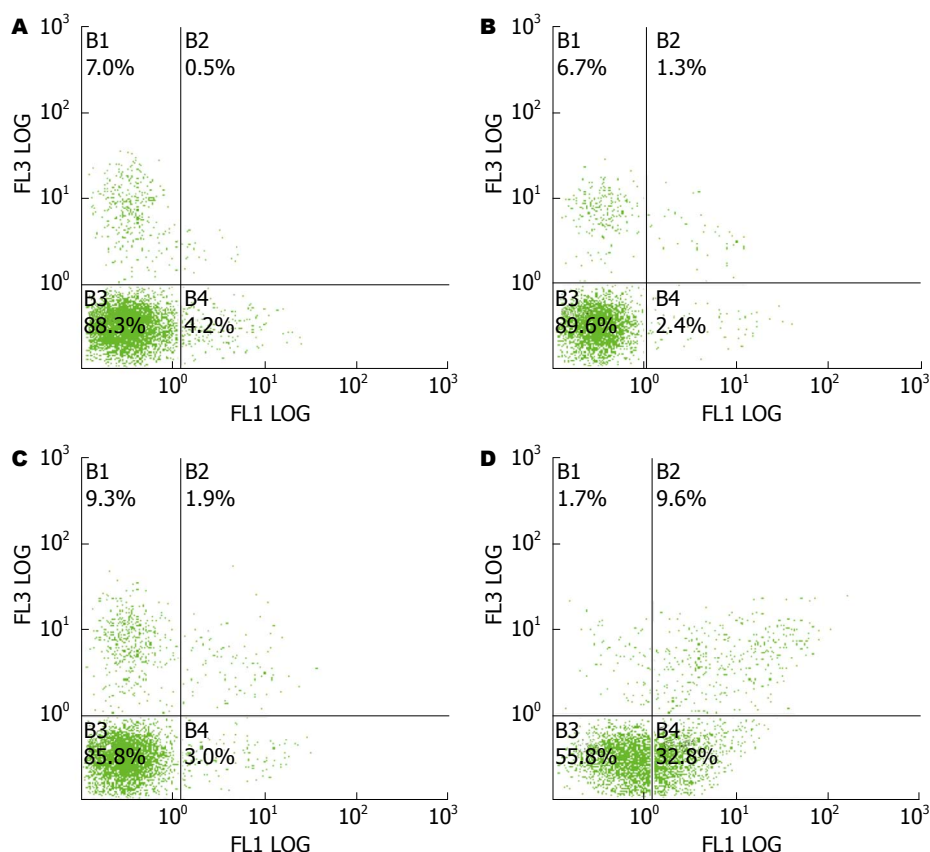


图6 Smo siRNA对食管癌CAES-17细胞凋亡的影响。A: 细胞对照组; B: 转染试剂组; C: 无关序列组; D: Smo siRNA-3转染72 h组。

表5 Smo siRNA对CAES-17细胞凋亡的影响 (% , mean $\pm$ SD)

分组	损伤细胞(Q1区)	晚期凋亡细胞(Q2区)	活细胞(Q3区)	早期凋亡细胞(Q4区)
细胞对照组	6.40 $\pm$ 1.25	1.08 $\pm$ 0.50	84.26 $\pm$ 4.83	3.40 $\pm$ 1.18
转染试剂组	5.52 $\pm$ 1.45	1.60 $\pm$ 0.28	88.96 $\pm$ 0.95	2.26 $\pm$ 0.32
无关序列组	6.62 $\pm$ 2.56	1.68 $\pm$ 0.51	86.06 $\pm$ 1.23	2.20 $\pm$ 0.77
Smo siRNA-3组	5.48 $\pm$ 1.83 ^{bdf}	8.78 $\pm$ 0.44 ^{bdf}	77.22 $\pm$ 1.90 ^{ace}	11.32 $\pm$ 1.31 ^{bdf}
F值		221.61		355.08
P值		<0.05		<0.05

^bP<0.01 vs 细胞对照组; ^dP<0.01 vs 转染试剂组; ^fP<0.01 vs 无序列组相比。

最高($P<0.05$)。后续实验采用Smo siRNA-3转染CAES-17细胞后, Western blot及RT-PCR检测结果显示, Smo siRNA-3可有效在蛋白和mRNA水平上显著抑制Smo和Bcl-2的表达。Smo siRNA-3转染细胞24、48和72 h与各对照组细胞相比, Smo和Bcl-2蛋白及mRNA表达水平平均降低, 以转染72 h最为显著, 且各组间差异有统计学意义($P<0.05$)。TUNEL法及流式细胞术检测结果显示在Smo和Bcl-2蛋白、mRNA表达水平下调的同时, 可诱导CAES-17细胞凋亡。引导细胞凋亡的可能机制是通过Smo siRNA沉默Smo表达, 下

调Gli表达, 进而抑制Hh相应基因Bcl-2的转录实现的。

4 参考文献

- Jiang J, Hui CC. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* 2008; 15: 801-812 [PMID: 19081070 DOI: 10.1016/j.devcel.2008.11.010]
- Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* 2003; 422: 313-317 [PMID: 12629553]
- 黄淑红, 张红卫. Sonic hedgehog信号通路及其在肺癌中的研究进展. *国外医学(肿瘤学分册)* 2004; 31: 618-620

- 4 Caro I, Low JA. The role of the hedgehog signaling pathway in the development of basal cell carcinoma and opportunities for treatment. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3335-3339 [PMID: 20439455]
- 5 Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, Ivy SP. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 97-106 [PMID: 21151206]
- 6 Shin K, Lee J, Guo N, Kim J, Lim A, Qu L, Mysorekar IU, Beachy PA. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* 2011; 472: 110-114 [PMID: 21389986 DOI: 10.1038/nature09851]
- 7 Fei DL, Sanchez-Mejias A, Wang Z, Flaveny C, Long J, Singh S, Rodriguez-Blanco J, Tokhunts R, Giambelli C, Briegel KJ, Schulz WA, Gandolfi AJ, Karagas M, Zimmers TA, Jorda M, Bejarano P, Capobianco AJ, Robbins DJ. Hedgehog signaling regulates bladder cancer growth and tumorigenicity. *Cancer Res* 2012; 72: 4449-4458 [PMID: 22815529]
- 8 Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003; 425: 851-856 [PMID: 14520413]
- 9 Kelleher FC. Hedgehog signaling and therapeutics in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2011; 32: 445-451 [PMID: 21186299 DOI: 10.1093/carcin/bgq280]
- 10 Kelleher FC, Cain JE, Healy JM, Watkins DN, Thomas DM. Prevailing importance of the hedgehog signaling pathway and the potential for treatment advancement in sarcoma. *Pharmacol Ther* 2012; 136: 153-168 [PMID: 22906929 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.08.004]
- 11 Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene* 2010; 29: 469-481 [PMID: 19935712 DOI: 10.1038/onc.2009.392]
- 12 Li Y, Maitah MY, Ahmad A, Kong D, Bao B, Sarkar FH. Targeting the Hedgehog signaling pathway for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16: 49-66 [PMID: 22243133 DOI: 10.1517/14728222.2011.617367]
- 13 Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, Kannangai R, Qi Y, Vivekanandan P, Ludlow JW, Owzar K, Chen W, Torbenson MS, Diehl AM. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2006; 27: 748-757 [PMID: 16339184]
- 14 Huang S, He J, Zhang X, Bian Y, Yang L, Xie G, Zhang K, Tang W, Stelter AA, Wang Q, Zhang H, Xie J. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1334-1340 [PMID: 16501253]
- 15 Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004; 431: 707-712 [PMID: 15361885]
- 16 Berman DM, Desai N, Wang X, Karhadkar SS, Reynon M, Abate-Shen C, Beachy PA, Shen MM. Roles for Hedgehog signaling in androgen production and prostate ductal morphogenesis. *Dev Biol* 2004; 267: 387-398 [PMID: 15013801]
- 17 Yoo YA, Kang MH, Lee HJ, Kim BH, Park JK, Kim HK, Kim JS, Oh SC. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 7061-7070 [PMID: 21975935 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1338]
- 18 Song Z, Yue W, Wei B, Wang N, Li T, Guan L, Shi S, Zeng Q, Pei X, Chen L. Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *PLoS One* 2011; 6: e17687 [PMID: 21394208]
- 19 Moraes RC, Zhang X, Harrington N, Fung JY, Wu MF, Hilsenbeck SG, Allred DC, Lewis MT. Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia. *Development* 2007; 134: 1231-1242 [PMID: 17287253]
- 20 Jiao X, Wood LD, Lindman M, Jones S, Buckhaults P, Polyak K, Sukumar S, Carter H, Kim D, Karchin R, Sjöblom T. Somatic mutations in the Notch, NF-KB, PIK3CA, and Hedgehog pathways in human breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51: 480-489 [PMID: 22302350 DOI: 10.1002/gcc.21935]
- 21 Souzaki M, Kubo M, Kai M, Kameda C, Tanaka H, Taguchi T, Tanaka M, Onishi H, Katano M. Hedgehog signaling pathway mediates the progression of non-invasive breast cancer to invasive breast cancer. *Cancer Sci* 2011; 102: 373-381 [PMID: 21091847 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01779.x]
- 22 Fiaschi M, Rozell B, Bergström A, Toftgård R. Development of mammary tumors by conditional expression of GLI1. *Cancer Res* 2009; 69: 4810-4817 [PMID: 19458072 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3938]
- 23 Liao X, Siu MK, Au CW, Wong ES, Chan HY, Ip PP, Ngan HY, Cheung AN. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. *Carcinogenesis* 2009; 30: 131-140 [PMID: 19028702 DOI: 10.1093/carcin/bgn230]
- 24 Watson S, Serrate C, Vignot S. [Sonic Hedgehog signaling pathway: from embryology to molecular targeted therapies]. *Bull Cancer* 2010; 97: 1477-1483 [PMID: 21220225 DOI: 10.1684/bdc.2010.1231]
- 25 Li SH, Fu J, Watkins DN, Srivastava RK, Shankar S. Sulforaphane regulates self-renewal of pancreatic cancer stem cells through the modulation of Sonic hedgehog-GLI pathway. *Mol Cell Biochem* 2013; 373: 217-227 [PMID: 23129257 DOI: 10.1007/s11010-012-1493-6]
- 26 Wang XD, Inzunza H, Chang H, Qi Z, Hu B, Malone D, Cogswell J. Mutations in the hedgehog pathway genes SMO and PTCH1 in human gastric tumors. *PLoS One* 2013; 8: e54415 [PMID: 23349881 DOI: 10.1371/journal.pone.0054415]
- 27 Agyman A, Mazumdar T, Houghton JA. Regulation of DNA damage following termination of Hedgehog (HH) survival signaling at the level of the GLI genes in human colon cancer. *Oncotarget* 2012; 3: 854-868 [PMID: 23097684]
- 28 Ding YL, Wang QS, Zhao WM, Xiang L. Expression of smoothened protein in colon cancer and its prognostic value for postoperative liver metastasis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 4001-4005 [PMID: 23098507]
- 29 Tao Y, Mao J, Zhang Q, Li L. Overexpression of Hedgehog signaling molecules and its involvement

- in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett* 2011; 2: 995-1001 [PMID: 22866163]
- 30 李俊平, 陈奎生. Smo蛋白及mRNA在食管鳞状细胞癌组织中的表达及意义. *肿瘤基础与临床* 2011; 24: 1-3
- 31 孙海斌, 张虎, 丁胭脂, 张红, 陈奎生, 张虎, 张红. Smo siRNA对裸鼠食管癌移植瘤细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 1579-1588

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》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引量、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)。

ChREBP及其靶基因*PNPLA3*在大鼠非酒精性脂肪性肝病发病中的作用

季玲, 李昌平

季玲, 李昌平, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

季玲, 硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题的设计、研究过程及本论文写作均由季玲与李昌平共同完成。

通讯作者: 李昌平, 教授, 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。506854209@qq.com
电话: 0830-3161276

收稿日期: 2014-04-05 修回日期: 2014-04-21

接受日期: 2014-04-28 在线出版日期: 2014-07-08

Role of ChREBP and its target gene *PNPLA3* in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats

Ling Ji, Chang-Ping Li

Ling Ji, Chang-Ping Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Chang-Ping Li, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Street, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. 506854209@qq.com

Received: 2014-04-05 Revised: 2014-04-21

Accepted: 2014-04-28 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To explore the role of carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and its target gene patatin-like phospholipase domain containing family member A3 (*PNPLA3*) in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: Forty-eight adult male rats were randomly and equally divided into two groups to receive a normal fed diet (control group) or a high-fat diet (NAFLD model group). At the end of the 4th, 8th and 12th week, 8 rats in each group were killed to determine serum biochemical parameters, observe pathological changes in hepatic tissue under a light microscope, detect the expression of ChREBP protein by immunohistochemistry, and detect the expression of ChREBP and *PNPLA3* mRNAs in the liver by RT-PCR.

RESULTS: NAFLD was successfully induced in rats after feeding a high-fat diet. In the control group, rat liver lobule structure was intact under a light microscope, the biochemical parameters were in the normal ranges, and expression of ChREBP protein was weak in the liver tissue. Compared with the control group, rat weight was increased, the volume of the liver was obviously increased, fat drop deposition was visible in liver cells, and the levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), fasting blood glucose (FBG), and fasting serum insulin (FINS) were significantly elevated in the model group ($P < 0.05$ for all). With the prolongation of feeding time, blood AST, ALT, TC, TG, FBG and FINS levels were gradually elevated and ISI significantly declined ($P < 0.05$). ChREBP protein expression and ChREBP and *PNPLA3* mRNA expression in rat liver tissue were increased in the model group compared with the control group ($P < 0.05$). With the prolongation of feeding time, ChREBP protein expression and ChREBP and *PNPLA3* mRNA expression were significantly increased ($P < 0.05$). ChREBP mRNA expression in the model group was positively correlated with *PNPLA3* expression, serum levels of AST, ALT, and hepatic inflammatory activity score ($r = 0.409$, $P < 0.05$; $r = 0.498$, $P < 0.05$; $r = 0.677$, $P < 0.01$; $r = 0.729$, $P < 0.01$; $r = 0.566$, $P < 0.01$), but had a negative correlation with ISI ($r = -0.611$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: High fat diet induces the expression of ChREBP, which may activate the expression of lipid synthesis related gene *PNPLA3* and promote the formation of fatty liver through regulation of insulin resistance.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; *ChREBP* gene; *PNPLA3* gene; Insulin resistance

Ji L, Li CP. Role of ChREBP and its target gene *PNPLA3*

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)现已成为常见肝病之一, 现今越来越多的人患有NAFLD, 严重危害着人们的生命健康。因此阐明NAFLD的发病机制, 对NAFLD的预防和诊治具有重要的理论价值和临床价值。

■同行评议者

孙学英, 教授, 哈尔滨医科大学第一附属医院

■ 研究前沿

近年较多研究发现碳水化合物反应元件结合蛋白转录因子(carbohydrate responsive element binding protein, ChREBP)及其靶基因含patatin样磷脂酶域3(patatin-like phospholipase domain containing family member A3, *PNPLA3*)可以增加NAFLD的发病易感性,与胰岛素抵抗、肝炎的发生发展密切联系,参与NAFLD的发病机制,但其具体发病机制至今仍不完全清楚。

in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(19): 2679-2685 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2679.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2679>

摘要

目的: 研究碳水化合物反应元件结合蛋白转录因子(carbohydrate responsive element binding protein, ChREBP)及其靶基因含patatin样磷脂酶域3(patatin-like phospholipase domain containing family member A3, *PNPLA3*)在非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)中的作用以及NAFLD的发病机制。

方法: 将48只200 g $\pm$ 20 g体质量的成年♂SD大鼠,随机分为对照组24只(普通饲料喂养)和模型组24只(高脂饲料喂养),分别于第4周末,第8周末和第12周末处死各组大鼠8只,并进行血清生化的测定;在光镜下观察肝组织病理变化;用免疫组织化学方法检测ChREBP蛋白的表达水平;用RT-PCR技术检测肝脏ChREBP以及*PNPLA3*基因的mRNA的表达。

结果: (1)成功构建NAFLD大鼠模型,光镜下观察可见对照组大鼠肝脏组织结构正常,各项生化指标均在正常范围,肝组织内表达少量ChREBP蛋白;(2)模型组大鼠较肥胖,肝脏明显增大,肝细胞内可见脂滴沉积,血清生化天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)水平升高($P<0.05$),空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)及空腹血清胰岛素(fasting serum insulin, FINS)水平升高($P<0.05$),并随着喂养时间的增加而逐渐增加($P<0.05$),而胰岛素敏感指数(insulin sensitive index, ISI)明显下降($P<0.05$);(3)模型组大鼠肝组织ChREBP蛋白和*ChREBP*、*PNPLA3* mRNA的表达水平升高,与对照组差异具有统计学意义($P<0.05$),且随造模时间的延长其表达量也增加($P<0.05$);(4)相关分析显示,在模型组中,*ChREBP* mRNA的相对表达量与*PNPLA3*、血清AST、ALT水平、肝脏炎症活动度计分呈正相关($r=0.409, P<0.05$; $r=0.498, P<0.05$; $r=0.677, P<0.01$; $r=0.729, P<0.01$; $r=0.566, P<0.01$),与ISI呈负相关($r=-0.611, P<0.01$)。

结论: 高脂饮食引起ChREBP的表达增强,其可能激活了脂质合成相关基因*PNPLA3*的表达,并可能通过参与胰岛素抵抗的调控促进脂肪肝的形成。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; *ChREBP*基因; *PNPLA3*基因; 胰岛素抵抗

核心提示: 碳水化合物反应元件结合蛋白转录因子(carbohydrate responsive element binding protein)及其靶基因磷脂酶域3(patatin-like phospholipase domain containing family member A3)在非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)发病中起着非常重要的作用,可以利用他们与NAFLD的关系,阻止NAFLD发生发展的过程,延缓疾病的进展,以期待对NAFLD的治疗有新的方法。

季玲, 李昌平. *ChREBP*及其靶基因*PNPLA3*在大鼠非酒精性脂肪性肝病发病中的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2679-2685 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2679.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2679>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史,但肝病病理学改变与酒精性肝病相似的临床病理综合征。NAFLD包括非酒精性单纯性脂肪肝(non-alcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、NASH相关肝纤维化和肝硬化^[1]。近年来随着人们生活水平和饮食习惯的改变,其患病率也不断的攀升^[2],已然在我国成为第2大肝病^[3]。据统计NAFLD在我国约占15%^[4],在肥胖人群中高达75%^[5]。NAFLD可通过非酒精性单纯性脂肪肝向非酒精性脂肪性肝炎甚至肝硬化发展^[6-8],所以NAFLD受到了越来越多的重视。其具体发病机制到目前仍然尚不完全清楚,而有关NAFLD发病机制大多数人较为认可Day等^[9]提出的“二次打击”理论,其中胰岛素抵抗更被认为中心环节。本实验主要是通过检测碳水化合物反应元件结合蛋白转录因子(carbohydrate responsive element binding protein, ChREBP)及其靶基因*PNPLA3*在非酒精性脂肪性肝病模型中的表达以及与胰岛素抵抗的关系,进一步研究NAFLD的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验大鼠由简阳达硕动物科技有限公司提供,普通饲料由泸州医学院实验动物中心提供,高脂饲料(基础饲料82.5%+猪油10%+胆酸

钠0.5%+胆固醇2%+蔗糖5%)由泸州医学院实验动物中心加工。ChREBP抗体购自博奥森科技有限公司; EnVision™试剂盒购自DaKo生物科技有限公司; DAB显色试剂盒购自上海博谷生物科技有限公司; RT-PCR试剂盒购自成都生物技术有限公司; DNA Marker购自天根生化科技有限公司; TRIzol试剂和焦碳酸二乙酯购自Invitrogen公司; RNA抽提试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 建立NAFLD模型: 将体质量为200 g±20 g的48只健康♂SD大鼠, 适应性喂养1 wk后随机分为正常对照组和模型组, 每组24只。正常对照组大鼠给予普通饲料喂养, 模型组给予高脂饲料喂养, 实验中大鼠自由饮水和进食, 并观察大鼠的一般情况, 分别于第4、8和12周末随机选取各组中大鼠8只处死, 常规制备血清和肝脏组织石蜡切片, 并保留少量肝组织用于mRNA的检测。

1.2.2 血清生化指标的检测: 采用全自动生化分析仪测定丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG); 放免法测定血清空腹胰岛素(fasting serum insulin, FINS)水平; 并计算胰岛素敏感指数 $ISI = \ln[1/(FINS \times FBG)]$ 。

1.2.3 肝组织病理学: 将取出的肝脏组织固定于4%的多聚甲醛中24 h后逐级的进行乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡, 最后石蜡包埋切片, 行常规HE染色, 在光镜下观察肝组织病理变化。石蜡切片行ChREBP的Envision免疫组织化学染色。按照EnVision™二步法免疫组织化学试剂盒说明书进行, 一抗的浓度为1:100。以正常的肝组织作为阳性对照, 用PBS液替代一抗作为阴性空白对照, DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶脂封片。采用Imagepro plus图像分析软件分析, 计算累积光密度值。

1.2.4 逆转录聚合酶连反应(RT-PCR): 采用TRIzol法提取肝脏组织的总RNA, 依照试剂盒提供的说明书进行逆转录反应。PCR引物序列: PNPLA3: 上游引物: 5'-GTGCTGGTGTCTGATTTCCG-3', 下游引物: 5'-CCCAGTGTAGATGCCGTTCT-3'; ChREBP: 上游引物: 5'-AAAGGCCTCAAGTGGCTATG-3', 下游引物: 5'-AGACAACAGCCTCAGGTTTC-3'。PCR反应条件: 预变性(PNPLA3: 94℃ 5 min, ChREBP: 94℃ 5 min), 变性

(PNPLA3: 94℃ 35 s, ChREBP: 94℃ 3 s), 退火(PNPLA3: 57℃ 40 s, ChREBP: 56℃ 35 s), 延伸(PNPLA3: 72℃ 35 s, ChREBP: 72℃ 30 s), 30个循环后于72℃延伸5 min。GADPH上游引物: 5'-GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3', 下游引物: 5'-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3', PCR反应条件: 预变性94℃ 5 min, 变性94℃ 30 s, 退火55℃ 30 s, 延伸72℃ 30 s, 28个循环后于72℃延伸5 min; 产物分析: 将扩增产物加入1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 以DNA Marker为分子量参照标准, 凝胶成像系统下观察记录结果, 并用图像分析软件对得到的条带进行灰度扫描, 目标基因mRNA的相对含量用目标基因条带光密度/GAPDH基因条带光密度。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学分析, 计量资料用mean±SD表示, 采用t检验(independent-samples t Test)或方差齐性检验后采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较采用LSD-t检验, 参数间进行Pearson相关分析。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、TC、TG的比较 与正常对照组比较, 非酒精性肝病模型组血清ALT、AST、TC、TG均明显上升(P<0.05), 且随造模时间的延长, ALT、AST、TC、TG也逐渐升高(P<0.05)(表1)。

2.2 各组FBG、FINS及ISI的比较 与正常对照组比较, 非酒精性肝病模型组血清FBG、FINS均明显上升(P<0.05), ISI均明显下降(P<0.05), 且随造模时间的延长, FBG、FINS也逐渐升高(P<0.05)(表2)。

2.3 肝组织病理变化 HE染色光镜下观察显示: 正常对照组大鼠肝组织的形态学表现正常, 肝小叶结构完整, 肝索排列整齐围绕中央静脉呈放射状分布。4 wk末模型组大鼠可见肝细胞轻度散在的脂肪空泡伴轻度水肿, 肝小叶结构无明显紊乱, 无炎细胞浸润。8 wk末模型组大鼠可见肝小叶结构紊乱, 肝细胞肿胀, 肝小叶内可见少量炎细胞浸润, 较多的肝细胞充满脂滴, 以大泡性脂肪变为主, 较大的脂滴可将细胞核挤到细胞的一侧。12 wk末模型组大鼠可见广泛的肝细胞脂肪变性, 胞质疏松, 呈气球样改变, 小叶结构明显紊乱, 肝索排列紊乱, 小叶内和汇管区炎细胞不同程度浸润, 可见局灶性坏死(图1)。

2.4 ChREBP免疫组织化学 ChREBP蛋白主要

■相关报道

Dentin等研究敲除ChREBP基因的小鼠发现, 基因敲除后小鼠的胰岛素敏感性增加, 表明ChREBP与胰岛素抵抗(insulin resistance)有关, 而抑制肝脏ChREBP可以纠正小鼠脂肪肝和葡萄糖耐受情况, 成为解决肥胖、脂肪肝等一系列健康问题的又一途径。

■创新盘点

本文探讨ChREBP及其靶基因*PNPLA3*在NAFLD中的作用,大鼠肝脏ChREBP mRNA的表达升高,可能通过上调其靶基因*PNPLA3*等成脂基因的表达,通过触发胰岛素抵抗的调控参与高脂饮食大鼠非酒精性脂肪性肝病的形成。

表 1 血清AST、ALT、TC、TG结果 (mean ± SD)

分组	AST(U/L)	ALT(U/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
4 wk末				
对照组	54.76 ± 8.51	37.43 ± 4.15	0.96 ± 0.32	0.67 ± 0.32
模型组	62.89 ± 6.41 ^a	49.68 ± 6.99 ^b	1.43 ± 0.42 ^a	1.01 ± 0.24 ^a
8 wk末				
对照组	54.74 ± 8.01	39.45 ± 7.74	1.25 ± 0.33	0.65 ± 0.22
模型组	98.56 ± 7.83 ^{bd}	69.99 ± 9.88 ^{bd}	2.16 ± 0.61 ^{bc}	1.68 ± 0.41 ^{bd}
12 wk末				
对照组	94.64 ± 13.97	43.59 ± 9.20	1.50 ± 0.56	0.69 ± 0.22
模型组	136.51 ± 6.83 ^{bd}	93.17 ± 11.83 ^{bd}	3.38 ± 0.62 ^{bd}	2.52 ± 0.51 ^{bd}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 同期对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 4 wk末模型组. AST: 谷草转氨酶; ALT: 丙氨酸转氨酶; TC: 血清总胆固醇; TG: 甘油三酯。

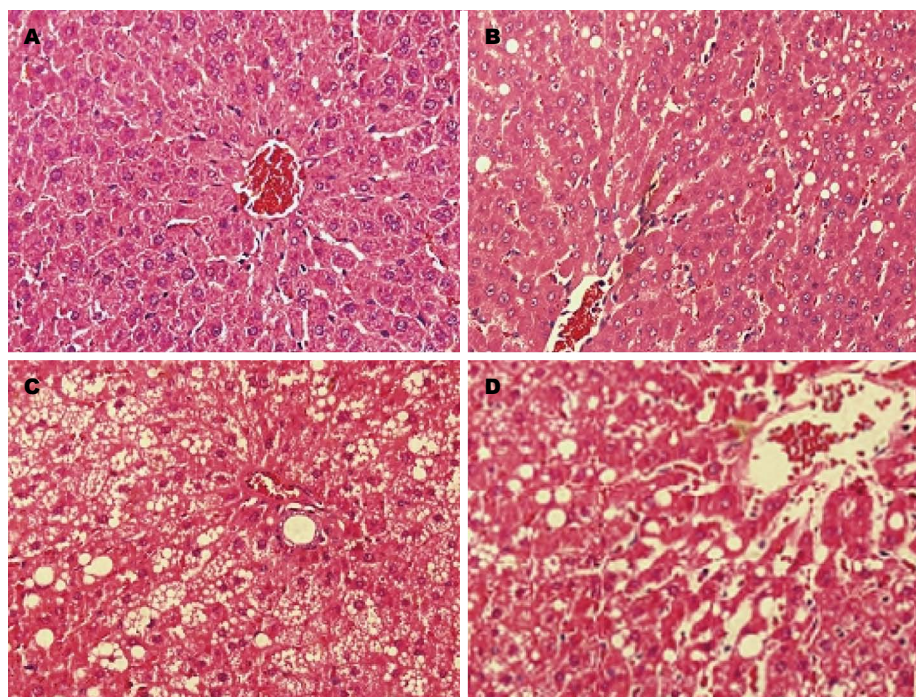


图 1 大鼠肝脏病理HE染色(HE × 400). A: 正常对照组; B: 模型组4 wk; C: 模型组8 wk; D: 模型组12 wk.

在中央静脉周围及汇管区表达,正常对照组ChREBP表达于胞质中,为散在分布的浅棕黄色颗粒.NAFLD组4 wk时ChREBP表达与正常对照组相比表达增强.8 wk时ChREBP表达明显增强,细胞质中棕黄色颗粒增多,同时少数肝细胞核出现棕黄色阳性颗粒;随着肝细胞脂肪变程度加重,在12 wk时ChREBP表达更强,细胞质中可见大量棕褐色颗粒沉积,同时大部分细胞核也呈阳性着色(图2),所以在模型组大鼠肝细胞内,细胞核中的ChREBP水平较正常对照组大鼠增加.第4、8、12周大鼠与同期对照组比较,模型组肝组织ChREBP蛋白表达显著升高(*P*<0.05);

且随喂养周期增长而显著升高(*P*<0.05)(表3).

2.5 RT-PCR法检测大鼠肝组织*ChREBP*、*PNPLA3* mRNA的表达 *ChREBP*和*PNPLA3* mRNA的表达分别以*ChREBP*或*PNPLA3*/*GAPDH*的基因条带光密度比值作为*ChREBP*和*PNPLA3* mRNA表达的相对含量.NAFLD组与正常对照组相比*ChREBP*和*PNPLA3* mRNA表达增多,并随脂肪肝程度的加重逐渐增加,与正常组相比有显著性差异(*P*<0.05)(表4,表5).

2.6 模型组ChREBP水平与各项指标相关性分析 在模型组中,*ChREBP* mRNA的相对表达量与*PNPLA3*、血清AST、ALT水平、肝脏炎症活

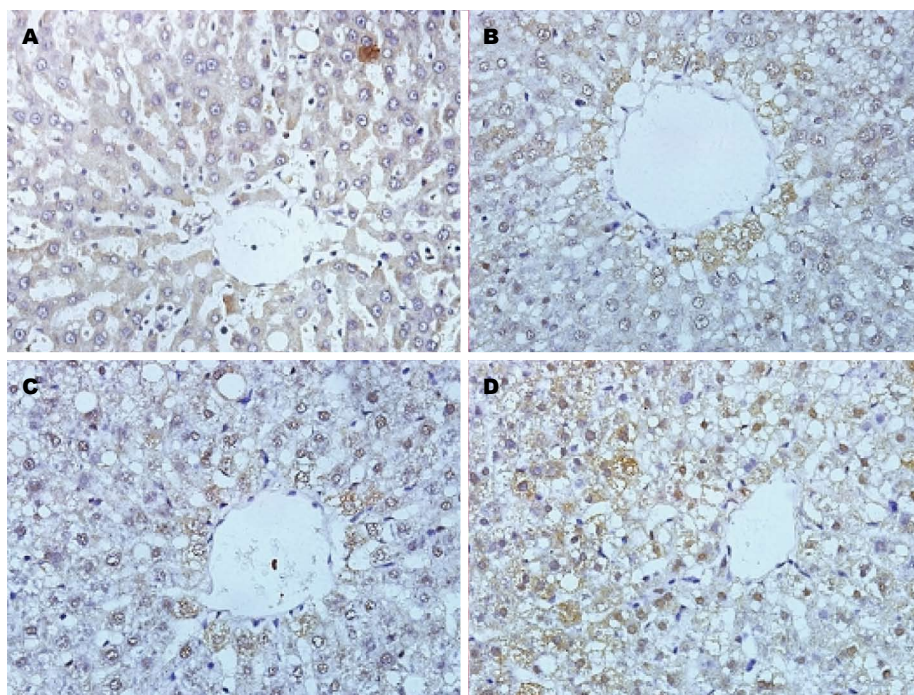


图 2 大鼠肝脏ChREBP免疫组织化学染色($\times 400$)。A: 正常对照组; B: 模型组4 wk; C: 模型组8 wk; D: 模型组12 wk。

■应用要点

对 *ChREBP* 基因及其靶基因 *PNPLA3* 在非酒精性脂肪性肝病发病中的作用的深入研究, 进一步了解其发病机制, 改善脂肪肝并延缓疾病的进展, 有望为非酒精性脂肪性肝病的临床预防和治疗提供新的理论依据。

表 2 血清FBG、FINS、ISI结果 (mean $\pm$ SD)

分组	FBG(mmol/L)	FINS(U/L)	ISI
4 wk末			
对照组	5.00 $\pm$ 1.23	12.38 $\pm$ 5.50	-4.02 $\pm$ 0.47
模型组	7.07 $\pm$ 1.13 ^b	19.40 $\pm$ 7.40 ^a	-4.82 $\pm$ 0.35 ^b
8 wk末			
对照组	5.38 $\pm$ 1.47	15.84 $\pm$ 5.04	-4.37 $\pm$ 0.47
模型组	9.27 $\pm$ 1.70 ^{bc}	35.15 $\pm$ 11.65 ^{bc}	-5.73 $\pm$ 0.38 ^{bd}
12 wk末			
对照组	5.25 $\pm$ 1.16	20.73 $\pm$ 11.12	-4.67 $\pm$ 0.48
模型组	11.65 $\pm$ 1.87 ^{bd}	55.73 $\pm$ 14.26 ^{bd}	-6.43 $\pm$ 0.34 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 同期对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 4 wk末模型组。FBG: 空腹血糖; FINS: 空腹胰岛素; ISI: 胰岛素敏感指数。

表 3 两组大鼠ChREBP蛋白表达结果 (mean $\pm$ SD)

分组	4 wk	8 wk	12 wk
对照组	0.09 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.05
模型组	0.19 $\pm$ 0.05 ^b	0.24 $\pm$ 0.04 ^{bc}	0.28 $\pm$ 0.04 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 同期对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 4 wk末模型组。

表 4 两组大鼠PNPLA3 mRNA表达结果(mean $\pm$ SD)

分组	4 wk	8 wk	12 wk
对照组	1.19 $\pm$ 0.98	1.55 $\pm$ 1.39	1.50 $\pm$ 1.54
模型组	3.29 $\pm$ 1.44 ^b	5.0 $\pm$ 1.34 ^{bc}	6.76 $\pm$ 1.27 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 同期对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 4 wk末模型组。

动度计分呈正相关($r = 0.409$, $P < 0.05$; $r = 0.498$, $P < 0.05$; $r = 0.677$, $P < 0.01$; $r = 0.729$, $P < 0.01$; $r = 0.566$, $P < 0.01$), 与ISI呈负相关($r = -0.611$, $P < 0.01$)。

3 讨论

NAFLD是遗传、代谢等因素相关的一种疾病^[10], 其发病机制非常复杂, 由多个相关病理生理因

■同行评价

本文有一定科学意义,具有一定指导意义.

表 5 两组大鼠ChREBP mRNA表达结果 (mean ± SD)

分组	4 wk	8 wk	12 wk
对照组	0.19 ± 0.14	0.26 ± 0.15	0.25 ± 0.21
模型组	0.37 ± 0.19 ^a	0.61 ± 0.20 ^{bc}	0.87 ± 0.27 ^{bd}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 同期对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 4 wk模型组.

素组成^[11], 而由Day等^[12]提出的氧化应激、脂质过氧化损伤的“二次打击”学说是较被公认的学说, 其中胰岛素抵抗被认为在NAFLD的发病中起比较重要的作用. 许多研究证实NAFLD患者存在比较明显的IR^[13-16]. 胰岛素抵抗时外周脂肪组织分解释放游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)增多, 进入肝脏后使肝内脂肪蓄积、甘油三酯合成增多, 最后形成NAFLD^[17]. 而升高的FFA又会增加胰岛素抵抗^[18,19], 形成恶性循环. 所以, 胰岛素抵抗促进NAFLD的发生发展^[20-24].

ChREBP属于转录因子家族^[25], 是由864个氨基酸组成的碱性螺旋-环-螺旋/亮氨酸拉链(bHLH/ZIP)大分子DNA结合蛋白, 是葡萄糖过程中的关键转录因子^[26], 主要与糖脂代谢和IR有关^[27], 通过激活其靶基因*PNPLA3*引起肝脏内脂肪沉积^[28]. 本实验用高脂饮食成功复制了非酒精性脂肪肝模型, 结果可见大鼠肝脏形成了不同程度的肝脏脂肪变, 肥胖体型、高脂血症、高胰岛素血症以及胰岛素抵抗伴转氨酶增高. 通过与对照组进行相关指标的观测和比较, 发现正常组大鼠表达少量的ChREBP蛋白, 模型组*ChREBP* mRNA及蛋白表达量、*PNPLA3* mRNA的表达量增加, 之间呈相同变化趋势, 并与血清AST、ALT水平呈正相关, 与ISI呈负相关. 与相关研究一致, 正常情况下大鼠肝脏表达很少量的ChREBP, 当喂养高脂饮食时, 其表达就会明显增高, 即经过长期高脂饮食的喂养可引起大鼠肝脏*ChREBP* mRNA的表达升高, 并可能通过上调*PNPLA3*等成脂基因的表达^[29-32], 参与触发胰岛素抵抗的调控损伤脂肪细胞对胰岛素的反应性, 使外周大量脂肪动员, 血中不断增多的游离脂肪酸运往肝脏, 破坏了肝脏内脂肪的动态平衡, 并刺激微粒体脂质过氧化使肝脏发生氧化应激, 而导致糖脂代谢失衡, 甘油三酯合成增多, 使肝脏内脂肪积聚, 引起NAFLD.

ChREBP在肝脏的糖脂代谢中起着非常重要的作用, 相关研究表明敲除*ChREBP*基因的小

鼠体质量明显下降, 代谢综合症状和胰岛素抵抗也明显改善, 所以ChREBP可能成为治疗非酒精性脂肪性肝病等代谢综合征的新靶点. 虽然关于非酒精性脂肪性肝病的发病的研究一直在进行, 但是其发病机制至今仍未完全清楚, 非酒精性脂肪性肝病的早期预防和治疗又非常重要, 所以需要进一步了解其发病机制, 改善脂肪肝并延缓疾病的进展. 对*ChREBP*基因及其靶基因*PNPLA3*在非酒精性脂肪性肝病发病中的作用的深入研究, 有望为非酒精性脂肪性肝病的临床预防和治疗提供新的理论依据.

4 参考文献

- 1 李瑜元. 非酒精性脂肪性肝病的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21: 109-115
- 2 Ayata G, Gordon FD, Lewis WD, Pomfret E, Pomposelli JJ, Jenkins RL, Khettry U. Cryptogenic cirrhosis: clinicopathologic findings at and after liver transplantation. *Hum Pathol* 2002; 33: 1098-1104 [PMID: 12454814]
- 3 Manco M, Bottazzo G, DeVito R, Marcellini M, Mingrone G, Nobili V. Nonalcoholic fatty liver disease in children. *J Am Coll Nutr* 2008; 27: 667-676 [PMID: 19155426]
- 4 Fan JG, Zhu J, Li XJ, Chen L, Lu YS, Li L, Dai F, Li F, Chen SY. Fatty liver and the metabolic syndrome among Shanghai adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1825-1832 [PMID: 16336439]
- 5 Kirovski G, Schacherer D, Wobser H, Huber H, Niessen C, Beer C, Schölmerich J, Hellerbrand C. Prevalence of ultrasound-diagnosed non-alcoholic fatty liver disease in a hospital cohort and its association with anthropometric, biochemical and sonographic characteristics. *Int J Clin Exp Med* 2010; 3: 202-210 [PMID: 20827318]
- 6 Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152 [PMID: 15254578]
- 7 Smith BW, Adams LA. Non-alcoholic fatty liver disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011; 48: 97-113 [PMID: 21875310 DOI: 10.3109/10408363.2011.596521]
- 8 Argo CK, Northup PG, Al-Osaimi AM, Caldwell SH. Systematic review of risk factors for fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2009; 51: 371-379 [PMID: 19501928 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.03.019]
- 9 Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-1075 [PMID: 10772651]
- 10 Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, Shiffman ML, Heuman D, Coterrell A, Fisher RA, Contos MJ, Mills AS. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43: 682-689 [PMID: 16502396]
- 11 Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 230-237 [PMID: 19396962]
- 12 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two

- "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845 [PMID: 9547102]
- 13 邹玲梅. 脂肪肝患者胰岛素抵抗的临床观察. *淮海医药* 2004; 22: 375-376
- 14 刘迎并, 闫自强. 脂代谢异常与脂肪肝相关性分析. *实用医技杂志* 2004; 11: 496-497
- 15 蔡葵, 何玉怡. 非酒精性脂肪肝与脂代谢紊乱及胰岛素抵抗的关系. *实用医技杂志* 2006; 13: 2636-2637
- 16 Choi SS, Diehl AM. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 295-300 [PMID: 18460922 DOI: 10.1097/MOL.0b013e3282ff5e55]
- 17 Duez H, Lamarche B, Valéro R, Pavlic M, Proctor S, Xiao C, Szeto L, Patterson BW, Lewis GF. Both intestinal and hepatic lipoprotein production are stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in humans. *Circulation* 2008; 117: 2369-2376 [PMID: 18443237 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107]
- 18 裴强, 王晓素, 王宪波. 非酒精性脂肪性肝炎发病机制的研究进展. *临床肝胆病杂志* 2008; 04: 1001-5256
- 19 涛吴, 季光. 非酒精性脂肪性肝病的代谢发病机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2908-2914
- 20 Zhou WD, Yang YL, Che ZH. [Non-alcoholic fatty liver, high sensitivity C reactive protein and insulin resistance]. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2008; 33: 565-570 [PMID: 18667766]
- 21 Sakurai M, Takamura T, Ota T, Ando H, Akahori H, Kaji K, Sasaki M, Nakanuma Y, Miura K, Kaneko S. Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 312-317 [PMID: 17464461]
- 22 Park SH, Kim BI, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Kim H, Keum DK, Kim HD, Park JH, Kang JH, Jeon WK. Body fat distribution and insulin resistance: beyond obesity in nonalcoholic fatty liver disease among overweight men. *J Am Coll Nutr* 2007; 26: 321-326 [PMID: 17906183]
- 23 Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am* 2007; 91: 1125-1149, ix [PMID: 17964913]
- 24 Petrides AS, Schulze-Berge D, Vogt C, Matthews DE, Strohmeyer G. Glucose resistance contributes to diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 284-291 [PMID: 8340056]
- 25 Li MV, Chang B, Imamura M, Pongvarin N, Chan L. Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes* 2006; 55: 1179-1189 [PMID: 16644671]
- 26 卢建雄, 陈粉粉, 杨公社. 调控糖酵解和生脂的重要转录因子: 碳水化合物反应元件结合蛋白. *生理科学进展* 2006; 37: 266-269
- 27 卢建雄, 杨公社, 陈粉粉. TNF仅影响胰岛素对原代培养大鼠脂肪细胞增殖及生脂基因的转录表达. *动物学报* 2006; 52: 123-129
- 28 Perttilä J, Huaman-Samanez C, Caron S, Tanhuanpää K, Staels B, Yki-Järvinen H, Olkkonen VM. PNPLA3 is regulated by glucose in human hepatocytes, and its I148M mutant slows down triglyceride hydrolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302: E1063-E1069 [PMID: 22338072 DOI: 10.1152/ajpendo.00125.2011]
- 29 Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, Roos C, Westerbacka J, Hamsten A, Bergholm R, Arkkila P, Arola J, Kiviluoto T, Fisher RM, Ehrenborg E, Orholm-Melander M, Ridderstråle M, Groop L, Yki-Järvinen H. A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* 2009; 52: 1056-1060 [PMID: 19224197 DOI: 10.1007/s00125-009-1285-z]
- 30 Johansson LE, Hoffstedt J, Parikh H, Carlsson E, Wabitsch M, Bondeson AG, Hedenbro J, Tornqvist H, Groop L, Ridderstråle M. Variation in the adiponutrin gene influences its expression and associates with obesity. *Diabetes* 2006; 55: 826-833 [PMID: 16505250]
- 31 Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab* 2006; 4: 107-110 [PMID: 16890538]
- 32 郑芳. 碳水化合物反应元件结合蛋白研究进展. *医学研究生学报* 2011; 24: 1008-8199

编辑 田滢 电编 鲁亚静



内源性一氧化氮/一氧化氮合酶体系及一氧化碳/血红素合酶体系对大鼠肝硬化门静脉压力的影响

宋丽秀, 陈卫刚, 郑勇, 张宁, 齐翠花

■背景资料

一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化碳(carbonic oxide, CO)作为气体信号分子在门静脉高压发病过程中发挥着重要的生物学作用, 具体机制尚不明确。

宋丽秀, 陈卫刚, 郑勇, 张宁, 齐翠花, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832000
宋丽秀, 主治医师, 主要从事肝硬化门静脉高压的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30850004

作者贡献分布: 本课题由陈卫刚与郑勇设计; 实验过程由宋丽秀完成; 数据分析由宋丽秀、张宁及齐翠花共同完成; 实验试剂由陈卫刚与郑勇提供; 文章撰写由宋丽秀完成。

通讯作者: 郑勇, 教授, 博士生导师, 832000, 新疆维吾尔自治区石河子市北二路, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科。
zy2850@126.com

收稿日期: 2014-04-07 修回日期: 2014-05-10

接受日期: 2014-05-19 在线出版日期: 2014-07-08

Effect of endogenous nitric oxide/nitric oxide synthase and carbon monoxide/heme oxygenase-1 on portal pressure in rats with hepatic cirrhosis

Li-Xiu Song, Wei-Gang Chen, Yong Zheng, Ning Zhang, Cui-Hua Qi

Li-Xiu Song, Wei-Gang Chen, Yong Zheng, Ning Zhang, Cui-Hua Qi, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30850004

Correspondence to: Yong Zheng, Professor, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Beier Road, Shihezi 832000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zy2850@126.com

Received: 2014-04-07 Revised: 2014-05-10

Accepted: 2014-05-19 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To assess the effect of endogenous nitric oxide/nitric oxide synthase (NO/NOS) and carbon monoxide/heme oxygenase-1 (CO/HO-1) on the portal pressure (PP) in rats with hepatic cirrhosis, and to explore the role of NO/NOS and CO/HO-1 system in the development of portal hypertension (PH).

METHODS: Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: a normal control group (NC), a cirrhosis model group

(CIRM), and a cirrhosis model + L-NAME + ZnPP-IX group (CIRM + L-NAME + ZnPP-IX). PP was measured using indwelling catheters. Plasma concentration of NO was detected using the nitrate reductase method, and the plasma CO was measured using the Chalmers method. The expression and localization of eNOS, iNOS and HO-1 in endothelial cells of the portal vein (PV) were studied by immunohistochemistry. Western blot was used to analyze hepatic tissue eNOS, iNOS and HO-1 protein expression.

RESULTS: Compared with the NC group, the CIRM group had significant increases in plasma NO and CO ($160.12 \mu\text{mol/L} \pm 4.18 \mu\text{mol/L}$, $111.12 \mu\text{mol/L} \pm 2.26 \mu\text{mol/L}$ vs $81.11 \mu\text{mol/L} \pm 2.91 \mu\text{mol/L}$, $70.51 \mu\text{mol/L} \pm 3.10 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$), PP ($16.08 \text{ mmHg} \pm 1.16 \text{ mmHg}$ vs $9.85 \text{ mmHg} \pm 1.10 \text{ mmHg}$, $P < 0.01$), and the expression of eNOS, iNOS and HO-1 (165.59 ± 1.71 , 164.66 ± 1.34 , 166.38 ± 1.17 , $P < 0.01$), but a significant decrease in hepatic expression of eNOS (118.65 ± 1.29 vs 160.77 ± 2.12 , $P < 0.01$); however, the NC + L-NAME + ZnPP-IX group showed significant decreases in plasma NO and CO ($52.06 \mu\text{mol/L} \pm 3.17 \mu\text{mol/L}$ vs $52.51 \mu\text{mol/L} \pm 2.63 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$), and the hepatic expression of eNOS, iNOS and HO-1 (130.83 ± 1.57 , 120.81 ± 1.47 , 111.03 ± 1.45 , $P < 0.01$), although the PP showed no significant difference. Compared with the CIRM group, the CIRM + L-NAME + ZnPP-IX group had significant decreases in plasma NO and CO ($100.24 \mu\text{mol/L} \pm 3.80 \mu\text{mol/L}$, $83.73 \mu\text{mol/L} \pm 1.78 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$), PP ($14.13 \text{ mmHg} \pm 0.56 \text{ mmHg}$, $P < 0.01$), and hepatic expression of eNOS, iNOS, and HO-1 (87.50 ± 1.07 , 150.66 ± 1.42 , 139.88 ± 1.73 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: NO and CO as new messengers may have a very close correlation with the PH, and the NO/NOS and CO/HO-1 system serve as an important regulatory system for the PH.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

■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

Key Words: Nitric oxide; Carbon monoxide; Nitric oxide synthase; Heme oxygenase-1; Hepatic cirrhosis; Portal hypertension

Song LX, Chen WG, Zheng Y, Zhang N, Qi CH. Effect of endogenous nitric oxide/nitric oxide synthase and carbon monoxide/heme oxygenase-1 on portal pressure in rats with hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2686-2691 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2686.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2686>

摘要

目的: 研究内源性一氧化氮(nitric oxide, NO)/一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)体系及一氧化碳(carbonic oxide, CO)/血红素合酶(heme oxygenase, HO-1)体系对肝硬化大鼠门静脉压力的影响, 探讨NO/NOS体系及CO/HO-1体系在大鼠肝硬化门静脉高压中的作用。

方法: 将SD大鼠随机分为4组: 正常对照组(NC组)、正常对照+左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)+锌原卟啉-IX(Znpp-IX)组(NC+L-NAME+ ZnPP-IX组)、肝硬化模型组(CIRM组)、肝硬化模型+左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)+锌原卟啉-IX(Znpp-IX)组(CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组)。均用插管法测定门静脉压力, 用硝酸还原酶法测定血浆中NO含量, 联二亚硫酸盐还原法测定血浆CO含量, 运用蛋白免疫印迹技术(Western blot)测定肝组织中内皮细胞一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及HO-1蛋白的表达情况。

结果: 与NC组相比, CIRM组血浆NO、CO含量明显升高($160.12 \mu\text{mol/L} \pm 4.18 \mu\text{mol/L}$, $111.12 \mu\text{mol/L} \pm 2.26 \mu\text{mol/L}$ vs $81.11 \mu\text{mol/L} \pm 2.91 \mu\text{mol/L}$, $70.51 \mu\text{mol/L} \pm 3.10 \mu\text{mol/L}$, 均 $P < 0.01$), 门静脉压力明显升高($16.08 \text{ mmHg} \pm 1.16 \text{ mmHg}$ vs $9.85 \text{ mmHg} \pm 1.10 \text{ mmHg}$, $P < 0.01$), 肝组织中iNOS及HO-1蛋白含量明显升高(165.69 ± 1.17 , 155.79 ± 1.29 vs 135.22 ± 0.54 , 125.44 ± 0.94 , 均 $P < 0.01$), 但eNOS在肝组织的表达却明显降低(118.65 ± 1.29 vs 160.77 ± 2.12 , $P < 0.01$), 而NC+L-NAME+ZnPP-IX组NO、CO含量则明显降低($52.06 \mu\text{mol/L} \pm 3.17 \mu\text{mol/L}$, $52.51 \mu\text{mol/L} \pm 2.63 \mu\text{mol/L}$, 均 $P < 0.01$), 门静脉压力无统计学意义, 肝组织中eNOS、iNOS及HO-1蛋白含量亦明显降低(130.83 ± 1.57 , 120.81 ± 1.47 , $111.03 \pm$

1.45 , 均 $P < 0.01$); 与CIRM组相比, CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组血浆NO、CO含量明显降低($100.24 \mu\text{mol/L} \pm 3.80 \mu\text{mol/L}$, $83.73 \mu\text{mol/L} \pm 1.78 \mu\text{mol/L}$, 均 $P < 0.01$), 门静脉压力明显降低($14.13 \text{ mmHg} \pm 0.56 \text{ mmHg}$, $P < 0.01$), 肝组织中eNOS、iNOS及HO-1蛋白含量明显降低(87.50 ± 1.07 , 150.66 ± 1.42 , 139.88 ± 1.73 , 均 $P < 0.01$)。

结论: NO、CO作为新型气体信号分子, 与肝硬化门静脉压力的变化密切相关, 而NO、CO抑制剂的干预研究则进一步证明了内源性NO/NOS体系及CO/HO-1体系对肝硬化门静脉高压的形成具有重要的调节作用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 一氧化氮; 一氧化碳; 一氧化氮合酶; 血红素合酶; 肝硬化; 门静脉高压

核心提示: 内源性一氧化氮(nitric oxide)/一氧化氮合酶(nitric oxide synthase)体系及一氧化碳(carbonic oxide)/血红素合酶(heme oxygenase)体系参与了肝硬化门静脉高压的形成, 对门静脉压力具有重要的调节作用。

宋丽秀, 陈卫刚, 郑勇, 张宁, 齐翠花. 内源性一氧化氮/一氧化氮合酶体系及一氧化碳/血红素合酶体系对大鼠肝硬化门静脉压力的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2686-2691 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2686.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2686>

0 引言

门静脉高压症是以门静脉系统血流动力学异常为特征, 而高动力循环是肝硬化门脉高压的特征性改变, 这种高动力循环的状态的发生机制中, 目前国内外的研究结果已经达成共识, 即内脏及外周血管广泛扩张是其主要原因所在。气体信号分子一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化碳(carbonic oxide, CO)是近几年发现的血管活性物质, 参与血管张力的调节, 在肝硬化门静脉高压中的形成中具有重要的作用。本研究通过抑制内源性NO、CO的产生, 观察肝硬化大鼠门静脉压力变化, 测定NO、CO相关酶学的含量, 以探讨内源性一氧化氮(nitric oxide, NO)/一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)体系及一氧化碳(carbonic oxide, CO)/血红素合酶(heme oxygenase, HO-1)体系在肝硬化门静脉高压的形成中的作用。

■ 相关报道

国内外研究发现NO、CO参与了门静脉高压的形成与发展, 两者相互作用共同发挥复杂的生物学作用。

■创新盘点

外源性给予NO、CO抑制剂后观察门静脉压力变化及肝组织中eNOS、iNOS及HO-1蛋白的表达,目前在肝硬化门静脉高压研究中报告甚少。

1 材料和方法

1.1 材料 左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)、锌原卟啉-IX(Znpp-IX)购自Sigma公司;即用型NO测定试剂盒购自南京建成生物工程研究院,内皮细胞一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、HO-1多克隆抗体购自Santa Cruz公司;其他试剂均为市售化学纯。T1800紫外分光光度计、美国BIOPAC公司MP150型多导生理仪、凝胶图像系统(BIO-RAD Gel 2000)等。

1.2 方法

1.2.1 肝硬化模型的制备:给实验组大鼠皮下注射40%的四氯化碳植物油溶液,首次注射0.5 mL/100 g,以后4 d/次,每次0.3 mL/100 g,用30%的乙醇溶液代替饮用水,前2 wk用20%猪油+80%玉米面饲养,后用0.5%胆固醇粉+玉米面饲养。对照组大鼠皮下注射生理盐水,频度及剂量同实验组,采用标准饲养法。根据本课题组以往造模经验,在造模52 d时,大鼠可形成典型的肝硬化表现。

1.2.2 实验动物分组:将SD大鼠随机分为4组:正常对照组(NC组, $n = 6$)、正常对照+左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)+锌原卟啉-IX(Znpp-IX)组(NC+L-NAME+ZnPP-IX组, $n = 6$)、肝硬化模型组(CIRM组, $n = 8$)、肝硬化模型+左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)+锌原卟啉-IX(Znpp-IX)组(CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组, $n = 8$)。NC+L-NAME+ZnPP-IX组和CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组在造模52 d后给予腹腔注射L-NAME(5 mg/kg)、皮下注射Znpp-IX(20 μ mol/kg), 1次/d, 共7 d;同等方式、同等剂量予NC组、CIRM组生理盐水, 1次/d, 共7 d。

1.2.3 门静脉压力测定:用10%的水合氯醛腹腔麻醉(0.35 mL/100 g),门静脉插管(本课题组改良此方法,利用头皮针穿刺测定)。将头皮针一端连接于生理多导仪的三通管测压端,三通管的侧端连接一5 mL注射器,注射器内充满肝素钠,推动注射器,使注射器内的肝素钠充满头皮针管腔,以防血液凝固,并排除头皮针管腔内气泡,以免影响门静脉压力的测定结果。将大鼠固定在手术台上,于大鼠腹中线部位剪开皮肤和腹肌,然后再剪开大鼠侧面的皮肤和肌肉,以充分暴露腹腔,寻找门静脉主干,钝性分离门静脉,然后用眼科镊的柄端固定门静脉,将连接于多

导生理仪上的头皮针倾斜5度向大鼠尾端刺入,使头皮针在门静脉中处于悬浮状态,观察大鼠门静脉压力的变化,待计算机上的压力曲线趋于稳定时,记录此时门静脉压力数据。

1.2.4 血浆NO、CO的检测:大鼠处死前抽取门静脉血,硝酸还原酶法测定血浆中NO含量,联二亚硫酸盐还原法测定血浆CO含量^[1]。

1.2.5 形态学观察:肝组织用40 g/L的甲醛溶液固定,常规制成石蜡切片,行苏木精-伊红染色,光镜下观察肝脏形态学改变。

1.2.6 Western blot检测分析:取制备好的组织蛋白提取液行Western blot分析,测定肝组织中eNOS、iNOS、HO-1蛋白的表达。用凝胶成像系统测定曝光后条带的灰度值(A),以相应区带的A值相对于对照组的倍数表示,并用 β -actin作为内参校正上样量。

统计学处理 采用SPSS13.0统计学软件包,数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,多组间比较采用完全随机设计方差分析法(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏形态学观察 肝硬化大鼠肝脏变形,表面凹凸不平呈结节状,质地硬,镜下见肝细胞再生,脂肪变性、纤维结缔组织增生及假小叶形成(图1)。

2.2 门静脉压力测定 与NC组相比, CIRM组门静脉压力明显升高($16.08 \text{ mmHg} \pm 1.16 \text{ mmHg}$ vs $9.85 \text{ mmHg} \pm 1.10 \text{ mmHg}$, $P < 0.01$), NC+L-NAME+ZnPP-IX组门静脉压力则无明显差异;与CIRM组相比, CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组门静脉压力明显降低($14.13 \text{ mmHg} \pm 0.56 \text{ mmHg}$)($P < 0.01$)(表1)。

2.3 血浆NO和CO水平变化 CIRM组血浆NO、CO含量与NC组相比明显升高($160.12 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 4.18 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $111.12 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 2.26 \text{ } \mu\text{mol/L}$ vs $81.11 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 2.91 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $70.51 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 3.10 \text{ } \mu\text{mol/L}$ (均 $P < 0.01$);与CIRM组相比, CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组血浆NO、CO含量明显降低($100.24 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 3.80 \text{ } \mu\text{mol/L}$, $83.73 \text{ } \mu\text{mol/L} \pm 1.78 \text{ } \mu\text{mol/L}$ (均 $P < 0.01$)(表2)。

2.4 肝组织中eNOS、iNOS、HO-1蛋白表达 测定CIRM组肝组织中iNOS及HO-1蛋白含量较NC组明显升高(165.69 ± 1.17 , 155.79 ± 1.29 vs 135.22 ± 0.54 , 125.44 ± 0.94 , 均 $P < 0.01$),但eNOS在肝组织的表达却明显降低(118.65 ± 1.29 vs

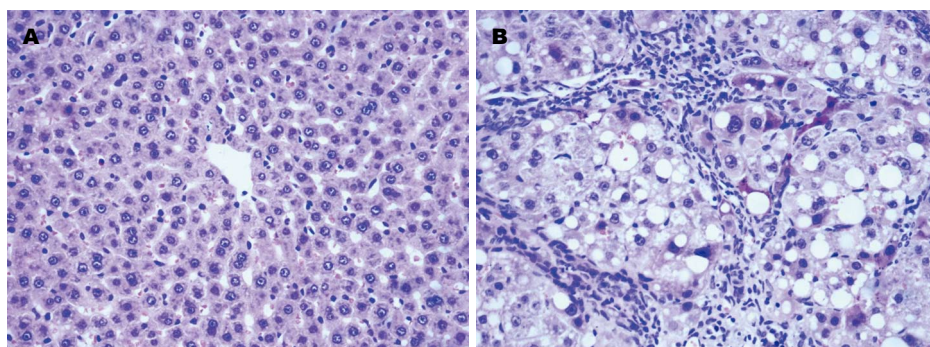


图1 肝脏形态学(×200). A: 对照组; B: 肝硬化模型组.

■同行评价
本文立意新颖, 具有一定指导意义.

表1 大鼠门静脉压力测定值 (mean ± SD)

分组	n	压力值(mmHg)
NC组	6	9.84 ± 1.10
NC+L-NAME+ZnPP-IX组	6	9.16 ± 1.17
CIRM组	8	16.08 ± 1.16 ^a
CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组	8	14.13 ± 0.56 ^c

^a*P*<0.05 vs NC组; ^c*P*<0.05 vs CIRM组. NC组: 正常对照组; NC+L-NAME+ZnPP-IX组: 正常对照+左旋硝基精氨酸甲酯+锌原卟啉-IX组; CIRM组: 肝硬化模型组; CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组: 肝硬化模型+左旋硝基精氨酸甲酯+锌原卟啉-IX组.

表2 大鼠NO、CO含量 (mean ± SD, μmol/L)

分组	n	NO含量	CO含量
NC组	6	81.11 ± 2.91	70.51 ± 3.10
NC+L-NAME+ZnPP-IX组	6	52.06 ± 3.17 ^a	52.51 ± 2.63 ^a
CIRM组	8	160.12 ± 4.18 ^a	111.12 ± 2.26 ^a
CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组	8	100.24 ± 3.80 ^c	83.73 ± 1.78 ^c

^a*P*<0.05 vs NC组; ^c*P*<0.05 vs CIRM组. NC组: 正常对照组; NC+L-NAME+ZnPP-IX组: 正常对照+左旋硝基精氨酸甲酯+锌原卟啉-IX组; CIRM组: 肝硬化模型组; CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组: 肝硬化模型+左旋硝基精氨酸甲酯+锌原卟啉-IX组. NO: 一氧化氮; CO: 一氧化碳.

160.77 ± 2.12, *P*<0.01), NC+L-NAME+ZnPP-IX组肝组织中eNOS、iNOS及HO-1蛋白含量亦明显降低(130.83 ± 1.57, 120.81 ± 1.47, 111.03 ± 1.45, 均*P*<0.01); 与CIRM组相比, CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组肝组织中eNOS、iNOS及HO-1蛋白含量明显降(87.50 ± 1.07, 150.66 ± 1.42, 139.88 ± 1.73, 均*P*<0.01)(表3, 图2).

3 讨论

肝硬化门静脉高压症发生发展存在两种因素, 一种是启动因素即门静脉流出道血管阻力增高, 主要由各种病因导致的肝硬化所致; 另一种是维持和发展因素即高动力循环状态, 对其发生机制, 可能与血管扩张物质增多、缩血管物质相对减少以及血管对内源性缩血管物质反应性降低有关^[2,3]. 参与门静脉高压高动力循环的因子主要有NO、CO、肿瘤坏死因子、内毒素和内皮素等.NO在许多生理系统和病理生理状态中具有介质、信使或细胞功能调节因子的功能, 是一种很活跃的自由基, 他是由左旋精氨酸通过NOS的催化与氧结合而成的. 有研究表明^[4,5]肝硬化时NO合成酶的活性降低, 导致肝窦内皮细胞NO产

生减少, 使星状细胞收缩性增强从而使肝内血管阻力增加, 造成门静脉高压. 所以, NO/NOS体系是高动力循环形成和维持的关键. CO也是重要的扩血管物质, 对保持门脉血管的松弛状态, 尤其是保持肝窦的舒张状态起着极其重要的作用, 血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)的生理降解为CO的主要来源. 在肝硬化门静脉高压时, HO的表达明显增强, 全血CO水平也明显升高^[6-8], 当用ZnPP(HO抑制剂)消除内源性CO, 能引起肝血管阻力的明显升高^[9], 门静脉压力显著降低, 但对正常大鼠只能引起平均动脉压轻度升高, 这表明了门静脉高压时大鼠CO生成增多, 在门静脉高血流高动力循环状态中发挥了重要的作用^[10], 主要机制是通过作用于肝窦周围的肝星状细胞而发挥的^[11,12].

NOS与HO目前证明在门静脉中有表达, 且多存在于内皮细胞中. NO、CO虽然均为扩血管物质, 对肝脏的血液循环有重要的调节作用, 但两者对肝脏微循环的作用是不同的: NO主要为

表 3 肝组织中eNOS、iNOS、HO-1蛋白的含量 (mean $\pm$ SD)

分组	n	eNOS	iNOS	HO-1
NC组	6	160.77 $\pm$ 2.12	135.22 $\pm$ 0.54	125.44 $\pm$ 0.94
NC+L-NAME+ZnPP-IX组	6	130.83 $\pm$ 1.57 ^a	120.81 $\pm$ 1.47 ^a	111.03 $\pm$ 1.45 ^a
CIRM组	8	118.65 $\pm$ 1.29 ^a	165.69 $\pm$ 1.17 ^a	155.79 $\pm$ 1.29 ^a
CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组	8	87.50 $\pm$ 1.07 ^c	150.66 $\pm$ 1.42 ^c	139.88 $\pm$ 1.73 ^c

^a $P < 0.05$ vs NC组; ^c $P < 0.05$ vs CIRM组. HO-1: 血红素合酶; eNOS: 一氧化氮合酶; iNOS: 一氧化氮合酶. NC组: 正常对照组; NC+L-NAME+ZnPP-IX组: 正常对照+左旋硝基精氨酸甲酯+锌原卟啉-IX组; CIRM组: 肝硬化模型组; CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组: 肝硬化模型+左旋硝基精氨酸甲酯+锌原卟啉-IX组.

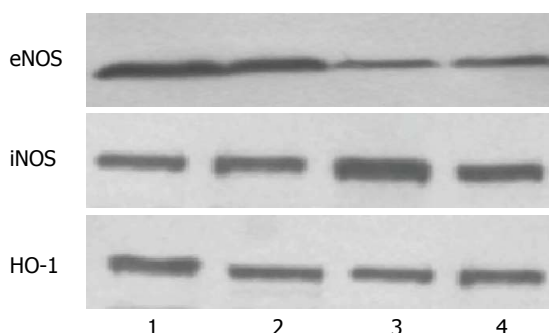


图 2 肝组织中eNOS、iNOS、HO-1蛋白表达测定. 1: NC组; 2: NC+L-NAME+ZnPP-IX组; 3: CIRM组; 4: CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组. HO-1: 血红素合酶; eNOS: 一氧化氮合酶; iNOS: 一氧化氮合酶.

肝动脉扩张剂, 对门脉血管床影响较小, 但CO是肝血管阻力的主要调节者, 对维持门脉舒张、保持肝窦松弛状态有着重要的作用.

本课题组以往研究^[13]发现, 在大鼠肝硬化发展的不同阶段, 血浆NO、CO含量是不同的, 郑勇等^[4]、赵海峰^[14]通过对肝硬化患者进行门静脉压力及血浆NO、CO含量的测定, 均说明了NO、CO在肝硬化门静脉高压的形成和维持中发挥了重要的作用. 本研究发现, 在肝硬化发生发展过程中, NO、CO的含量明显升高, 这与目前的研究报道相一致. Pannen等^[9]用ZnPP消除内源性CO, 能引起肝血管阻力的明显升高, 而L-NAME则仅能引起肝血管阻力的轻微上升. 本研究同时抑制了内源性NO和CO的产生, 通过Western blot法测定了肝组织中eNOS、iNOS、HO-1蛋白的含量, 结果发现iNOS、HO-1蛋白在肝组织中的表达较NC组明显升高, 而CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组各项观察指标则较CIRM组明显降低, 这同目前的研究报道以及本课题组以往的研究一致, 这说明了通过外源性给予NO

和CO的抑制剂, 可以改变与其相关的酶的变化, 进而改变血浆中NO和CO含量. 在实验过程中, 还发现了eNOS在肝组织中的表达却是相反的, CIRM组的蛋白表达明显低于NC组, 结果说明了肝硬化血浆中NO的过量生成主要是iNOS高表达所致.

除此之外, 本研究最重要的一项是观察了各组大鼠门静脉压力的变化, 从而更直接的说明了NO和CO对门静脉压力的影响. 结果发现: CIRM组门静脉压力明显高于NC组, NC+L-NAME+ZnPP-IX组与NC组相比, 门静脉压力无明显改变, 而CIRM+L-NAME+ZnPP-IX组的压力则明显低于CIRM组, 说明了NO和CO对门静脉压力具有重要的影响.

总之, 本研究结果表明NO/NOS体系及CO/HO-1体系参与了肝硬化门静脉高压的形成, 对门静脉压力具有重要的调节作用, 而其具体的作用机制还有待进一步的研究.

4 参考文献

- Chalmers AH. Simple, sensitive measurement of carbon monoxide in plasma. *Clin Chem* 1991; 37: 1442-1445 [PMID: 1868608]
- Erario MA, Gonzales S, Romay S, Eizayaga FX, Castro JL, Lemberg A, Tomaro ML. Role of heme oxygenase/carbon monoxide pathway on the vascular response to noradrenaline in portal hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 196-201 [PMID: 15743403 DOI: 10.1111/j.1440-1681.2005.04171.x]
- Bolognesi M, Di Pascoli M, Verardo A, Gatta A. Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2555-2563 [PMID: 24627591 DOI: 10.3748/wjg.v20.i10.2555]
- 郑勇, 李睿, 孙侃, 常向云, 周婷, 王吉耀. 肝硬化患者一氧化氮、一氧化碳浓度与门静脉压力的关系. *中华消化杂志* 2006; 26: 424-425
- 常向云, 郑勇, 孙侃. 肝硬化患者一氧化氮浓度与门静脉压力关系的探讨. *临床荟萃* 2006; 21: 721-722

- 6 郑勇, 周婷, 孙侃, 杨军, 王吉耀. 不同时期肝硬化大鼠下腔静脉与门静脉血中一氧化氮浓度比较. 农垦医学 2003; 25: 5-7
- 7 Gonzales S, Perez MJ, Perazzo JC, Tomaro ML. Antioxidant role of heme oxygenase-1 in prehepatic portal hypertensive rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4149-4155 [PMID: 16830363]
- 8 Tran TT, Martin P, Ly H, Balfe D, Mosenifar Z. Carboxyhemoglobin and its correlation to disease severity in cirrhotics. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 211-215 [PMID: 17245222 DOI: 10.1097/01.mcj.0000225574.35267.32]
- 9 Pannen BH, Köhler N, Hole B, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* 1998; 102: 1220-1228 [PMID: 9739056 DOI: 10.1172/JCI3428]
- 10 Yang SP, Guo JS, Wang JY, Lin L, Shi RH. [The role of HO-CO system in the hemodynamic disturbance of cirrhotic rats]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2011; 19: 174-177 [PMID: 21586233]
- 11 Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1333-1337 [PMID: 7802666 DOI: 10.1006/bbrc.1994.2811]
- 12 Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998; 101: 604-612 [PMID: 9449694 DOI: 10.1172/JCI1324]
- 13 周婷, 郑勇, 孙侃, 杨军. 肝硬化形成过程中大鼠下腔静脉与门静脉血中一氧化氮浓度的变化. 兵团医学 2003; 2: 17-20
- 14 赵海峰. 闻勤生肝硬化患者血浆一氧化氮水平的变化及其临床意义. 中国现代医学杂志 2013; 17: 65-68

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%。

酒精性肝纤维化大鼠模型的建立及Smad7/TGF- β 表达变化

何培元, 侯志平, 高淑梅, 王明娟, 马立新, 李炳庆

■背景资料

随着生活水平的提高, 各种酒精饮料的消费量不断升高, 人群的饮酒率不断增加。酒精性肝病的发病率自然也随之大幅度升高, 成为我国医学工作者必须要应对的研究课题。国内外多以大鼠或小鼠的动物模型作为研究平台, 但目前的造模方法仍在某些方面存在欠缺, 需进一步完善。

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

侯志平, 王明娟, 承德医学院病理教研室 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

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、侯志平及高淑梅完成; 研究过程由何培元、侯志平、高淑梅及王明娟完成; 数据统计分析由马立新与李炳庆完成; 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36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: 2014-04-22 修回日期: 2014-05-20

接受日期: 2014-05-29 在线出版日期: 2014-07-08

Establishment of a rat model of alcoholic liver fibrosis and detection of hepatic expression of Smad7/TGF- β

Pei-Yuan He, Zhi-Ping Hou, Shu-Mei Gao,
Ming-Juan Wang, 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
Zhi-Ping Hou, Ming-Juan Wang, Department of Pathology, 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

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, 36 Nanyingzi Street, Chengde 067000, Hebei Province, China. libq@sohu.com

Received: 2014-04-22 Revised: 2014-05-20

Accepted: 2014-05-29 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To develop a suitable rat model of alcoholic liver fibrosis, which is easily available and low in cost with a high success rate, and to detect the alteration of expression of genes involved in the pathogenesis of alcoholic liver disease.

METHODS: Rats were raised individually in respective cages and were fed ad libitum. Rats

were divided into two groups: a normal control group and an experimental group. The normal control group was given a normal diet with alcohol-free water. The experimental group was further divided into three subgroups, namely, a normal diet subgroup, a high fat diet subgroup and a limited high fat diet subgroup. Commercially available Chinese spirit was diluted into different concentrations (6%, 9%, 12%, 20%) using distilled water and used as the source of alcohol consumption for rats in the experimental group. Rats in the experimental group were fed distilled water containing 6% (v/v) alcohol at the beginning of the experiment, and the concentration of alcohol was gradually increased to 20% within 4 wk. Ultimately, water containing 20% alcohol was maintained towards the end of the study. At the end of the experiment, livers of rats were dissected for histological studies whereas serum samples were taken to detect the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The mRNA and protein expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and Smad7 in liver tissues was detected by real-time PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: No pathological changes were observed in the liver of rats in the normal control group. However, rats in the experimental group demonstrated histopathological changes such as fatty change, inflammation as well as fibrosis. The histopathological changes were most severe in the subgroup fed a limited high fat diet, followed by those fed a high fat diet. Fatty changes were observed in the liver of rats in the experimental subgroup fed a normal diet. A small amount of collagen fibrils, inflammation and a more severe fatty change were found in the liver of rats fed a high fat diet. Bundles of closely packed collagen fibrils, inflammation, and fatty change were observed in rats fed a limited high fat diet. Serum levels of AST and ALT were higher in the experimental group compared to the normal control group. The subgroup fed a normal diet had lower levels of AST and ALT compared to the other two subgroups, although

■同行评议者

牛英才, 研究员,
齐齐哈尔医学院
医药科学研究所

no significant difference was seen between subgroups fed a high fat diet and a limited high fat diet. Protein expression of TGF- β 1 and Smad7 was positively correlated with their mRNA levels, respectively. TGF- β 1 expression level in the normal control group was lower compared to the three experimental subgroups, and the level was positively correlated with the severity of hepatic pathological changes. Smad7 expression was shown to be higher in the normal control group compared to the experimental subgroups. However, there was no correlation between the level of Smad7 and hepatic pathological changes.

CONCLUSION: Feeding a limited high fat diet with alcohol ad libitum in rats is a convenient, low cost method for developing an animal model of alcoholic liver disease with a high rate of success. Inability of Smad7 to inhibit the TGF- β 1 pathway contributes to the development of alcoholic liver fibrosis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Alcoholic liver fibrosis; Rat model; Transforming growth factor- β 1; Smad7; High fat diet

He PY, Hou ZP, Gao SM, Wang MJ, Ma LX, Li BQ. Establishment of a rat model of alcoholic liver fibrosis and detection of hepatic expression of Smad7/TGF- β . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2692-2702 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2692.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2692>

摘要

目的: 为酒精性肝病发病机制及治疗研究提供简便、经济、成模率高的动物模型并探究酒精性肝病的发病机制。

方法: 以单笼喂养, 自由摄取食水的方式饲养大鼠。对照组不予饮酒, 自由摄取食水; 实验组予饮酒, 分为正常饲料组、高脂饲料组及高脂限食组。将市售白酒稀释成(6%、9%、12%、20%)等不同浓度的水溶液, 以其作为大鼠的唯一水源。先给予6%的白酒水溶液, 待大鼠适应白酒气味之后, 逐渐提高白酒浓度, 第4周时将白酒浓度提高至20%, 一直到实验结束。实验结束后取肝组织观察病理学变化, 用生化检测仪检测大鼠血浆丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)变化。用Real-time PCR检测肝组织转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)和Smad7 mRNA水平变化, 并用Western blot检测蛋白水平变化。

1, TGF- β 1)和Smad7 mRNA水平变化, 并用Western blot检测蛋白水平变化。

结果: 对照肝组织形态正常, 实验组中正常饲料组肝组织出现脂肪肝表现, 高脂饲料组脂肪变性程度加重并出现了肝炎及胶原纤维增生。限食高脂组肝组织出现了大量成束的胶原纤维并伴有肝炎及脂肪肝表现。血清ALT、AST结果显示: 至实验结束时, 对照组比实验组转氨酶活性明显升高($P < 0.05$), 不同实验组间比较高脂饮食组和限食高脂组转氨酶活性无差别, 但均较正常饲料组高($P < 0.05$)。TGF- β 1和Smad7这两个基因的蛋白丰度与他们各自的mRNA表达水平呈正相关, 与对照组比较3个实验组TGF- β 1表达水平升高, 并与肝脏病理损伤程度呈正相关, 实验组Smad7表达水平降低, 但与肝脏病理变化无相关性。

结论: 饮用白酒水溶液结合限食及高脂饮食的方法可以成功建立酒精性肝纤维化的大鼠模型, Smad7不能有效抑制TGF- β 1促进了肝纤维化的形成。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 酒精性肝纤维化; 大鼠模型; 转化生长因子 β 1; Smad7; 高脂饲料

核心提示: 本实验选用雌性Wistar大鼠制备酒精性肝病模型, 用白酒水溶液作为其唯一水源, 逐步增加酒精浓度的方法克服了大鼠厌酒的问题, 并成功制备出酒精性肝纤维化动物模型。随后用Real-time PCR和Western blot检测肝纤维化相关基因的表达情况, 发现TGF- β 1表达的升高及其抑制物Smad7的降低共同发挥了促纤维化作用。

何培元, 侯志平, 高淑梅, 王明娟, 马立新, 李炳庆. 酒精性肝纤维化大鼠模型的建立及Smad7/TGF- β 表达变化. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2692-2702 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2692.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2692>

0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是长期大量饮酒导致的一种肝脏疾病。ALD占有肝病的比率由1991年的4.2%猛增至1996年的21.3%^[1]。依病情轻重分为酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化。临床诊疗实践证明肝硬化不可逆转, 而肝纤维化仍有治愈的可能, 对肝纤维化发病机制的研究

■ 研究前沿

酒精性肝病发病率高, 发展到晚期病情危重, 对人群的生命健康造成严重威胁。其发病机制和治疗方法是近年研究的热点。大量相关研究需要利用大鼠等动物模型进行, 模型的质量和科研成果的价值直接相关, 理想动物模型的制备至关重要。目前动物模型制备过程中动物死亡率过高, 造模时间过长, 动物模型的肝脏病变轻微, 造模过程与人类患病过程相似性差等问题都需要解决。

■ 相关报道

近几十年来众多研究者制备了多种酒精性肝硬化动物模型,其各有优缺点:以TSUKAMOTO-FRENCH模型为代表的大鼠模型能很好地控制酒精及各种营养素的摄入量,便于研究酒精和其他营养素在酒精性肝病中的作用。用狒狒等灵长类动物也成功制备出了酒精性肝病模型,模型的制备过程与人类发病过程非常相似。

表 1 *TGF-β1*、*Smad7*、*GAPDH*基因上下游引物序列

基因	上游引物序列	下游引物序列
<i>TGF-β1</i>	5'-CAAGTGGACATCAACGGGTT-3'	5'-GCAGGAGCGCACGATCATGT-3'
<i>Smad7</i>	5'-GCTTGCTGGCCTAATAGCAG-3'	5'-GCAGGACACCCTGATAGGAA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CGGATTGTGTCGTATTGGGC-3'	5'-GTCATACCAGGAAATGAGCTTG-3'

TGF-β1: 转化生长因子β1。

至关重要。对酒精性肝病发病机制及治疗方法的研究能否成功很大程度取决于所使用的动物模型的可重复性及与人类ALD发病过程的相似性。以往国内多采用白酒灌胃法造模,但死亡率很高。也有研究借助四氯化碳等化学药物建立肝纤维化动物模型,但发病机制及组织形态学改变与酒精性肝纤维化有较大差异。肝组织转化生长因子β1(transforming growth factor β1, TGF-β1)是肝纤维化过程中起主要促进作用的细胞因子,Smad7蛋白是TGF-β1通路中的主要抑制因子^[2]。本实验旨在建立一种操作简便、死亡率低且发病机制与人类酒精性肝病相近的动物模型,并检测TGF-β1和Smad7蛋白的表达以研究酒精性肝纤维化的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♀ Wistar大鼠36只,6-7周龄,体质量180-220 g,由天津医科大学实验动物中心提供。大鼠酒精性肝病模型建立过程中使用市售山庄老酒,浓度38%(v/v),由承德避暑山庄企业集团酒业有限公司生产。实验用玉米油购自美国Sigma公司。全自动生化检测仪(日本OLYMPUS640)。透射电镜(日本日立H-7650)。Real-time PCR仪(德国Eppendorf realplex)总RNA和蛋白提取试剂盒、反转录试剂盒及Real-time PCR购自德国凯杰公司(分类号:80004、205311、204054)。TGF-β1和Smad7抗体购自美国圣克鲁斯生物公司(产品编号分别为:SC-134013、SC-146)。PCR反应中所需上下游引物由上海生工合成,引物序列如表1所列。

1.2 方法

1.2.1 分组: 共分为4组,每组9只。正常对照组,该组予基础饲料喂养,不施加任何处理因素;饮用白酒的实验组根据饮食结构不同分为:正常饲料组,高脂饲料组及限食高脂组。正常饲料组食用基础饲料且对食量不加限制;高脂饲料组:以基础饲料(85%)及玉米油(15%)制成高脂饲料,

其中玉米油热量约占总热量的25%^[3]。食量不限。限食高脂组:食用高脂饲料,食量减半。

1.2.2 酒精性肝纤维化大鼠模型的建立: 将市售38%(v/v)山庄老酒用蒸馏水稀释成6%、9%、12%、20%等不同浓度。先以6%白酒喂养大鼠3 d,之后逐渐增加酒精浓度,9%白酒喂养3 d,12%白酒喂养2 wk,之后以20%白酒喂养,第7周时以38%白酒喂养3 d,期间大鼠饮水体积明显减少,故将酒精浓度再次降至20%直至第16周末实验结束。

1.2.3 大鼠饮酒量及体质量变化的记录: 实验中大鼠均采用单笼饲养,每日添加白酒稀释液之前均记录每只大鼠前1天饮用酒精量。以每kg体质量摄入乙醇量计量大鼠饮酒量,按以下乙醇换算公式计算:每kg体质量摄入乙醇量(g) = 饮酒量(mL) × 乙醇含量(%) × 0.8/1000 g。于实验开始后每个月第1周称量各组大鼠体质量。

1.2.4 大鼠血浆谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic-oxalacetic transaminase, AST)检测: 内眦静脉取血,用EDTA抗凝,离心后取上层血浆,用生化仪测定血浆中ALT、AST活性。实验开始前检测1次作为基础值,之后每个月月末检测1次以观察其变化情况。

1.2.5 总RNA提取、反转录及Real-time PCR检测 TGF-β1和Smad7表达水平:严格按照试剂盒说明书步骤提取肝脏总RNA,用紫外分光光度计检测RNA的纯度及浓度,所得RNA保存于-80℃冰箱。每次反转录以1 μg总RNA为模版,反应体系20 μL,步骤完全按照试剂盒说明书进行,所得1 μg cDNA保存于-20℃冰箱。Real-time PCR反应于96孔板中进行,以*GAPDH*为内参基因,每个样本设3个复孔,每孔中依次加入2 × SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μL, cDNA 1 μL,上下游引物各1 μL,双蒸水9.5 μL,总体积25 μL。PCR仪参数设定:95℃预变性5 min,再于95℃变性10 s,复性温度60℃,延伸30 s,循环次数35,最终温度于20 min内匀速上升至95℃以绘

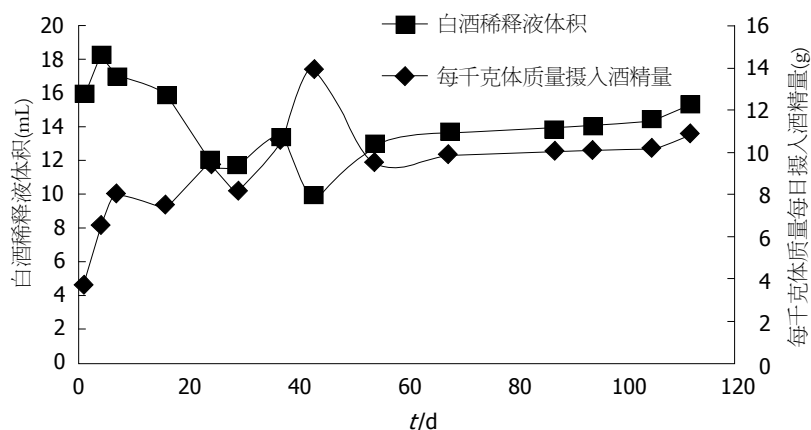


图 1 大鼠摄入酒精量及白酒稀释液体积.

■ 创新盘点

国外有研究证明热量摄入不足会加重酒精引起的肝脏损伤, 而且雌性大鼠肝脏对酒精更敏感. 本实验选用雌性大鼠并在造模过程中限制其进食量, 结果大鼠肝脏出现了肝纤维化等病理改变.

表 2 每日大鼠饮酒量

时间 点(d)	白酒水溶液 浓度(v/v, %)	每1 kg体质量每天 摄入酒精量(g)	每只大鼠每日摄入 白酒稀释液体积(mL)
1	6	3.7 ± 0.7	16.00 ± 3.33
4	9	6.5 ± 1.0	18.24 ± 2.98
7	12	8.0 ± 1.5	17.00 ± 3.19
16	12	7.5 ± 1.3	15.94 ± 3.13
24	20	9.4 ± 2.1	12.00 ± 2.85
29	20	8.2 ± 1.4	11.78 ± 2.01
37	20	10.6 ± 1.8	13.38 ± 2.27
43	38	13.9 ± 1.9	9.94 ± 1.96
54	20	9.5 ± 1.3	12.92 ± 2.18
68	20	9.9 ± 1.6	13.70 ± 2.37
87	20	10.1 ± 1.9	13.84 ± 2.71
94	20	10.1 ± 1.1	14.02 ± 2.17
105	20	10.2 ± 1.4	14.47 ± 2.32
112	20	10.9 ± 1.5	15.35 ± 2.41

制溶解曲线. 所得结果由 $\Delta\Delta Ct$ 算法得出, 数值以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示.

1.2.6 Western blot法检测TGF- β 1及Smad7蛋白水平: 按蛋白提取试剂盒操作提取肝脏组织总蛋白. 在10%聚丙烯酰胺凝胶中电泳后转膜至聚丙烯二氟乙烯膜. 用含10%脱脂奶粉Tris Tween缓冲液(TTBS)封闭, 加入一抗后孵育过夜, TTBS洗掉多余的一抗后加入以1:1000稀释的二抗, 37 °C温育1 h, TTBS冲洗尚未结合的二抗终止反应后染色, 于凝胶图像分析系统照相, 应用软件BandScan分析每个条带的吸光度值. 参照蛋白为 β -actin. 以目标蛋白数值/参照蛋白数值得出目标蛋白的相对丰度, 数值以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示.

1.2.7 光镜下观察大鼠肝脏病理学改变: 打开腹腔, 取出大鼠肝脏, 固定于40 g/L的中性甲醛中, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜下观察组织病理学变化.

1.2.8 电镜下观察大鼠肝脏病理学改变: 处死大鼠后取小块肝组织切割成小米粒大小, 固定于电镜液中. 常规电镜切片, 染色, 于电镜下观察肝细胞超微结构变化.

统计学处理 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 用SPSS10.0统计软件对实验数据进行统计学分析, 计量资料采用方差分析统计方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠一般情况 正常对照组大鼠毛发有光泽, 灵活好动, 反应灵敏, 食欲及大便均正常, 体质量持续增加. 饮酒的实验组大鼠毛发乱而无光泽, 精神萎靡, 反应迟钝, 活动量减少, 体质量增加缓慢. 第4周末饮酒后部分大鼠表现为活动减少, 行动迟缓, 步态蹒跚, 食欲减退. 而另外一部分表现为烦躁, 好斗, 易激惹. 第10周1/4大鼠出现尾尖红肿、渗血甚至坏死, 2只大鼠出现鼻衄. 第16周时一半实验组大鼠出现尾尖红肿渗血, 另一半大鼠尾尖坏死、变黑、脱落. 高脂饲料组有1只大鼠于第14周死亡, 限食高脂组有2只大鼠于第12周死亡, 均于醉酒出现意识障碍之后死亡, 解剖后未发现明确死因, 考虑可能为大量酒精抑制呼吸中枢所致.

2.2 每日饮白酒稀释液体积及每1 kg体质量摄入酒精量 开始以6%的白酒水溶液为唯一水源喂养大鼠, 第4周逐渐增加至20%, 在前6 wk内大鼠摄入酒精量由 $3.7 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \pm 0.7 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 增至 $10.6 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \pm 1.8 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 饮用白酒稀释液体积由每天 $16.00 \text{ mL} \pm 3.33 \text{ mL}$ 降至 $13.38 \text{ mL} \pm 2.27 \text{ mL}$. 第7周予饮用未经稀释的38%市售白酒3 d, 摄入酒精量可增至 $13.9 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \pm 1.9 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 但饮用白酒体积降至每天 $9.94 \text{ mL} \pm 1.96 \text{ mL}$, 大鼠饮水量过少, 故将白酒稀释液浓度降至20%

■应用要点

本研究中的酒精性肝病大鼠模型的制备方法简单、大鼠死亡率低、造模成本低、成模时间相对较短、且研究者不需特殊的技术培训和昂贵的仪器设备,适用于不同水平的科研实验单位。

表 3 不同处理组大鼠不同时间体重变化 (mean $\pm$ SD, g)

分组	第1月	第2月	第3月	第4月
对照组	207.30 $\pm$ 13.00	232.40 $\pm$ 17.45	255.86 $\pm$ 26.74	298.60 $\pm$ 35.91
普通饲料组	202.75 $\pm$ 16.78	201.43 $\pm$ 19.78	232.80 $\pm$ 22.20	244.80 $\pm$ 20.65
高脂饲料组	201.75 $\pm$ 14.63	245.11 $\pm$ 16.70	257.62 $\pm$ 19.25	258.45 $\pm$ 32.71
限食高脂组	204.95 $\pm$ 14.50	221.96 $\pm$ 18.70	229.74 $\pm$ 23.87	217.85 $\pm$ 25.16

表 4 不同处理组ALT、AST变化 (mean $\pm$ SD, U/L)

分组	第1天	第1月末	第2月末	第3月末	第4月末
正常对照组					
ALT	42.18 $\pm$ 4.86	44.20 $\pm$ 3.91	27.59 $\pm$ 4.16	34.48 $\pm$ 3.20	36.54 $\pm$ 5.23
AST	130.45 $\pm$ 21.45	121.20 $\pm$ 16.54	140.38 $\pm$ 25.64	151.68 $\pm$ 30.03	141.6 $\pm$ 28.14
正常饲料组					
ALT	40.06 $\pm$ 4.19	66.09 $\pm$ 6.10	50.48 $\pm$ 4.60	58.76 $\pm$ 6.34	61.68 $\pm$ 7.66
AST	138.53 $\pm$ 18.31	147.67 $\pm$ 28.10	170.24 $\pm$ 35.60	169.87 $\pm$ 38.84	178.31 $\pm$ 24.58
高脂饲料组					
ALT	38.67 $\pm$ 3.86	69.14 $\pm$ 6.55	52.74 $\pm$ 10.02	58.89 $\pm$ 9.41	68.83 $\pm$ 12.38
AST	142.98 $\pm$ 22.08	155.70 $\pm$ 34.65	171.68 $\pm$ 30.80	193.65 $\pm$ 35.4	238.45 $\pm$ 41.5
限食高脂组					
ALT	42.69 $\pm$ 5.6	66.70 $\pm$ 7.80	68.55 $\pm$ 8.12	77.48 $\pm$ 9.08	71.95 $\pm$ 11.01
AST	147.16 $\pm$ 20.88	210.83 $\pm$ 37.20	236.16 $\pm$ 25.50	288.56 $\pm$ 40.5	242.17 $\pm$ 46.50

ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天门冬氨酸氨基转移酶。

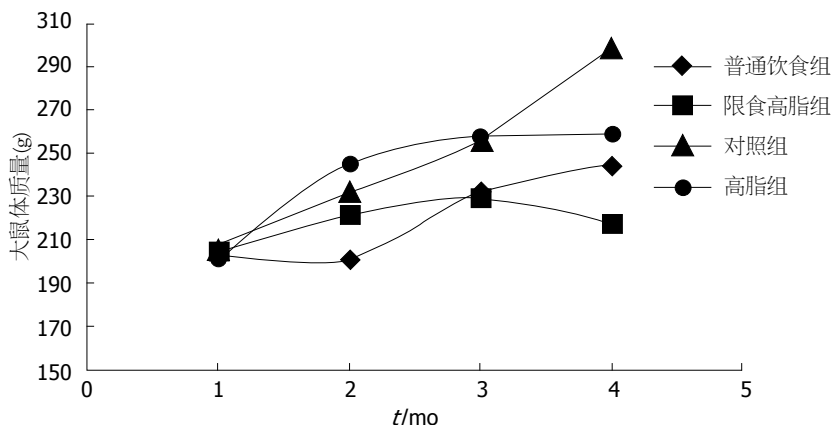


图 2 不同时间各处理组大鼠体重变化。

直至实验结束, 每1 kg体重摄入酒精量维持在10 g左右, 每天饮用白酒稀释液体积约14 mL(表2, 图1)。

2.3 各组大鼠体重变化 对照组大鼠呈持续匀速增长, 到第4个月时最重达298.6 g $\pm$ 35.91 g; 高脂饲料组大鼠体重在第1个月增长最快, 之后明显减慢, 第4个月时体重258.45 g $\pm$ 32.71 g; 普通饲料组体重增加非常缓慢, 第4个月时体重244.8 g $\pm$ 20.65 g, 较实验开始时每只大鼠体重仅平均增长32 g; 限食高脂组前两个月体重

略有增加最高达229.74 g $\pm$ 23.87 g, 之后出现体重下降, 第4个月时体重217.85 g $\pm$ 25.16 g, 较实验之初没有明显增加。至第4个月时正常对照组体重明显高于实验组($P < 0.05$)。三个实验组之间无明显差异($P > 0.05$)(表3, 图2)。

2.4 血浆ALT及AST变化 随着时间的推移, 对照组ALT、AST在不同的时间点无明显升高, 而三个实验组在饮用稀释白酒后ALT、AST水平都有不同程度升高, 到实验结束时, 与开始实验前所测基础值相比有显著差异($P < 0.05$)。三个实验

表 5 TGF- β 1、Smad7在不同处理组中大鼠肝脏中 mRNA 表达水平的变化(mean $\pm$ SD)

分组	TGF- β 1	Smad7
正常对照组	0.70 $\pm$ 0.119	1.14 $\pm$ 0.102
普通饲料组	0.91 $\pm$ 0.146	0.94 $\pm$ 0.091
高脂饲料组	0.95 $\pm$ 0.131	0.87 $\pm$ 0.093
限食高脂组	1.18 $\pm$ 0.198	0.89 $\pm$ 0.077

TGF- β 1: 转化生长因子 β 1.

组间比较, 高脂饲料组及限食高脂组AST升高的幅度无明显差别($P>0.05$), 但均大于正常饲料组($P<0.05$). 三个实验中间ALT水平无明显差异($P>0.05$)(表4).

2.5 肝脏组织形态学改变 正常对照组肝脏组织形态学正常. 进食正常饲料的9只实验组大鼠均出现了不同程度的脂肪肝表现, 其中22%(2/9)脂肪变性程度轻, 根据酒精性肝病诊疗指南的诊断标准属于F1级^[4], 11%(1/9)出现F2级脂肪肝表现, 其余67%(6/9)脂肪肝程度较重属于F3级. 进食高脂饲料的大鼠脂肪肝程度加重达到了F4级, 其中62.5%的大鼠(5/8)还出现了G1-G2级酒精性肝炎的表现, 37.5%的大鼠(3/8)肝脏在电镜下还观察到S1级胶原纤维的增生; 限食高脂组中71.4%(5/7)的大鼠出现了S2-S3级轻重不等的肝纤维化改变同时伴有G1-G2级肝炎和F1级脂肪肝改变; 另外28.6%(2/7)的大鼠肝脏只出现了脂肪肝及肝炎表现.

2.5.1 光镜下改变: 正常对照组: 肝细胞大小及形态正常, 肝细胞境界清晰, 细胞核圆, 位于细胞中央. 细胞索以小叶中央静脉为中心呈放射状排列, 肝窦清晰, 无扩张及充血. 正常饲料组: 肝脏可见酒精性脂肪肝表现, 肝组织内可见呈弥漫性分布的肝细胞脂肪变性, 肝细胞胞浆内可见大小不等的圆形或类圆形脂肪滴, 细胞质疏松, 可见散在嗜酸性变. 高脂饲料组: 光镜下可见肝组织内弥漫的细胞脂肪变性, 胞浆内可见大小不等的脂肪滴, 部分重度脂肪肝可见肝细胞增大细胞核被大的圆形脂肪滴挤至细胞边缘, 肝细胞索排列紊乱. 腺泡3带可见明显肝细胞气球样变、点状坏死灶及少量深染的双核肝细胞. 限食高脂组: 腺泡3带可见明显肝细胞气球样变, 有点片状坏死灶, 可见少量深染的双核肝细胞, 有淋巴细胞及中性粒细胞浸润. 腺泡内肝细胞周围纤维化, 可见大量成束胶原纤维及广泛桥接纤维化. 部分区域可见细胞脂肪变性, 脂肪变

性的肝细胞在30%以下. 上述炎症、脂肪变性及纤维化改变在肝内呈不均匀分布(图3).

2.5.2 肝组织超微结构改变: 正常对照组: 肝细胞核呈圆形或类圆形, 核仁位于细胞核中央或近中央区. 部分细胞胞浆内含有少量脂滴. 肝细胞间隙及窦周隙无胶原纤维增生及淋巴细胞等炎性细胞浸润, 无线立体肿胀变形及细胞质异常溶解等变化. 正常饲料组: 可见脂肪肝表现. 核仁边集, 核膜略显迂曲, 核周间隙扩张, 细胞质疏松. 线粒体增生、肿胀, 多呈球形, 胞浆内可见大小不等的圆形或类圆形脂滴. 高脂饲料组: 肝细胞面间隙增加, 并出现微绒毛, 窦周间隙和肝细胞间隙可见淋巴细胞浸润, 线粒体增生, 肿胀, 呈球形, 线粒体嵴减少、变短, 细胞质疏松. 细胞间隙中可见少量胶原纤维增生. 细胞内可见圆形及类圆形脂滴. 限食高脂组: 窦周隙被成束的胶原蛋白占据, 肝细胞微绒毛减少, 线粒体呈球形, 线粒体嵴减少、变短, 内质网表面光滑, 呈囊状. 细胞间可见成束的胶原纤维. 细胞内可见少量圆形及类圆形脂滴(图4).

2.6 大鼠肝组织TGF- β 1及Smad7 mRNA表达水平变化 与正常对照组比较实验组肝组织中TGF- β 1 mRNA表达水平升高($P<0.05$), 在实验组中限食高脂组TGF- β 1 mRNA水平表达较普通饲料组及高脂饲料组升高($P<0.05$), 而普通饲料组和高脂饲料组比较没有差别($P>0.05$). 与正常对照组比较实验组肝组织中Smad7 mRNA表达水平降低($P<0.05$), 在实验组中普通饲料组、高脂饲料组及限食高脂组三组组间比较没有差别($P>0.05$)(表5, 图5).

2.7 不同实验组大鼠肝组织TGF- β 1及Smad7蛋白表达水平变化 对照组比较各实验组TGF- β 1表达均有所升高, 而Smad7表达水平均下降. 从普通饮食组到高脂饮食组再到限食高脂组TGF- β 1表达量也逐步升高, 但Smad7表达水平在3个实验中无明显差异(图6).

3 讨论

近年来生活条件的不断提高, 人群的饮酒率明显增加酒精饮料的消费量不断上升. 我国四大地区饮酒情况的调查表明, 一般人群饮酒率为59.5%, 人均年饮酒量折合纯酒精为3.6 L^[5]. 酒精饮料有潜在的成瘾性并可以对人体多种脏器造成损伤. 其中最具代表性的是酒精性肝损伤. 最初表现为脂肪肝和肝炎, 之后可逐渐发展为肝纤维化及肝硬化. 酒精性肝病已经成为我国

■同行评价

本文设计合理, 研究内容丰富, 具有一定指导意义.

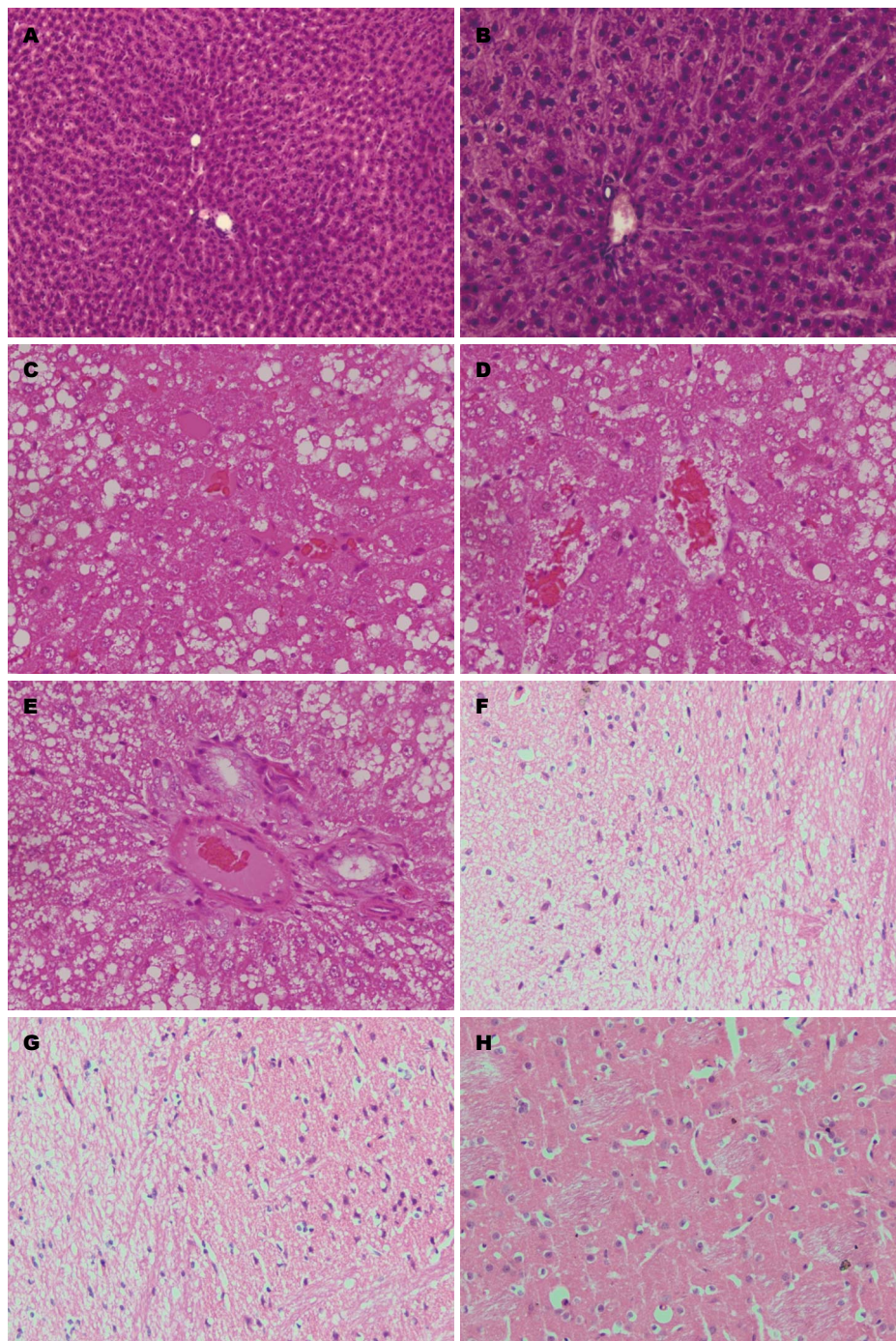


图3 不同处理组大鼠肝脏HE染色结果. A: 对照组($\times 100$); B: 对照组($\times 200$); C: 正常饲料组($\times 200$); D: 正常饲料组($\times 400$); E: 高脂饲料组($\times 400$); F: 限食高脂组($\times 200$); G: 限食高脂组($\times 200$); H: 限食高脂组($\times 200$).

第2大肝病,是目前医务工作者面临的重大课题.该类研究目前主要在动物模型上进行.有学者用狢狢等灵长类动物历时一年多制作出肝硬化的动物模型,但动物稀缺、历时长、费用高,不适于推广使用^[6].大鼠生来厌酒,国内多采用酒精灌胃法制备大鼠模型^[7-9],这确实解决了厌酒的问题,但也存在不可忽视的问题: (1)大鼠死亡率高,导致模型制备的时间受到限制.常见的死因为消化系穿孔、酒精误吸入气管引起窒息及

吸入性肺炎等; (2)用于灌胃的酒精浓度不能太高,否则会灼伤大鼠的消化道黏膜,加之大鼠胃容积仅约3.4 mL^[10],使灌胃的酒精量受到了很大的限制.肝脏病理学损伤轻微,绝大多数只能看到脂肪肝、急性或慢性肝炎的病理改变^[8]; (3)大鼠饮酒一段时间后会易激惹等异常表现,灌胃者有被咬伤或抓伤的风险.少数研究中出现了肝纤维化,但用时长达24 wk^[11].有研究为了加重肝损伤缩短造模时间而加用四氯化碳、吡

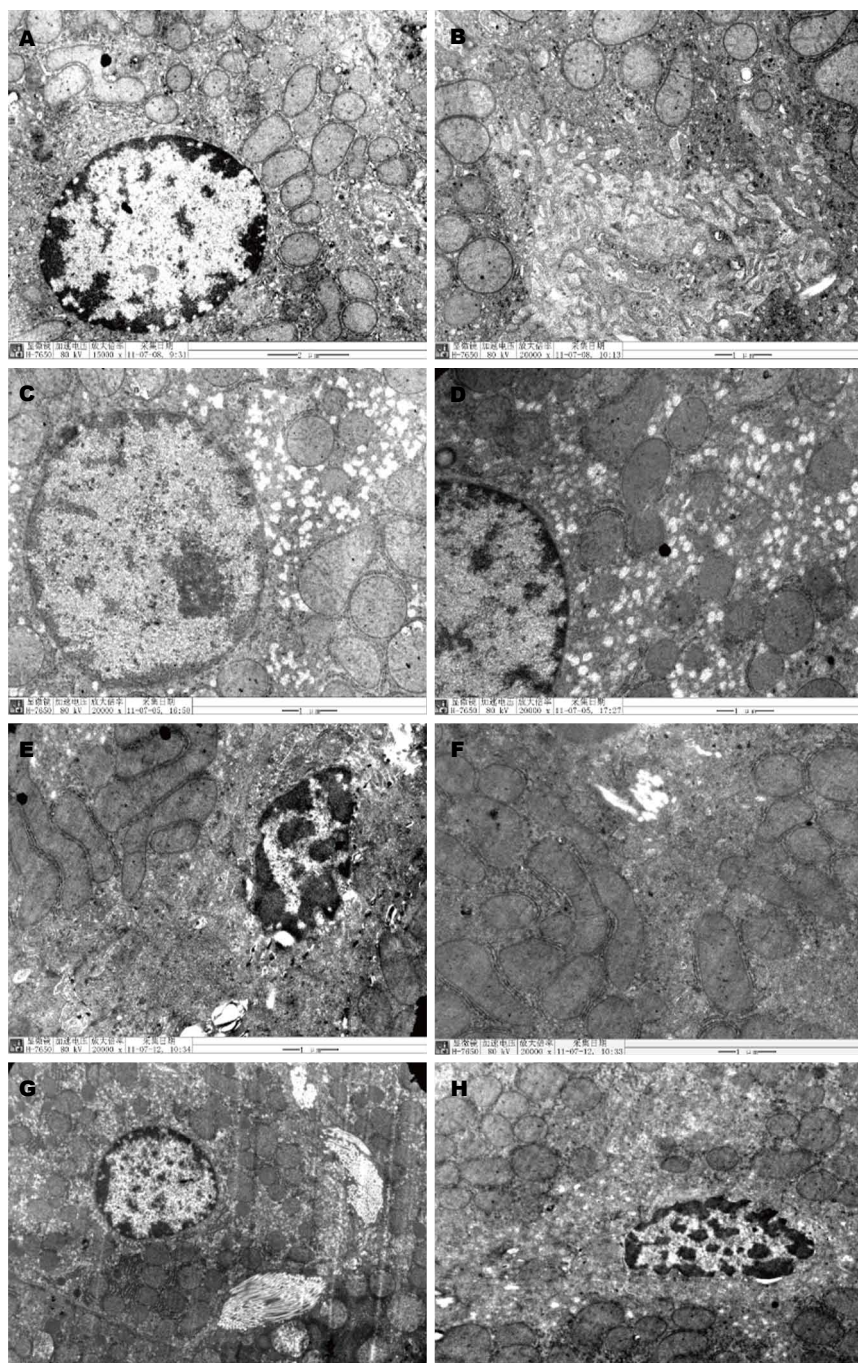


图 4 不同处理组大鼠肝脏电镜超微结构改变 ($\times 20000$)。A, B: 正常对照组. 细胞核、线粒体和内质网等细胞器大小及形态均正常; C: 正常饲料组. 核仁边集, 核膜迂曲, 胞浆可见大量脂滴, 线粒体水肿; D: 高脂饲料组. 线粒体肿胀, 呈球形, 线粒体嵴减少、变短, 细胞质疏松. 细胞内可见大量圆形及类圆形脂滴; E: 高脂饲料组. 线粒体增生, 体积增大, 细胞间隙见淋巴细胞浸润; F: 高脂饲料组. 细胞间隙见少量胶原纤维增生; G: 限食高脂组. 细胞间隙被大量成束的胶原纤维所占据; H: 限食高脂组. 细胞间隙见淋巴细胞浸润.

唑等药物^[9], 该类模型是在酒精及药物的双重作用下形成的, 与人类酒精性肝病的病理过程相差较远. 有研究证明不同病因所致的肝纤维化其细胞外基质形态等存在明显差别^[12]. 有研究者通过手术置入导管再用微量泵持续注入酒精的方法控制酒精摄入量^[13,14], 但术者需要特殊培训, 手术有一定死亡率, 还要特殊的设备持续注入酒精, 对人员和设备要求高, 应用受到了很大的局限. 酒精性肝硬化动物模型的建立方法有待进一步改进和提高.

在生活中, 饮酒的同时往往进食肉类、油炸

食品等高脂饮食. 长期饮酒对肝脏、胰腺及消化系的损伤都非常明显, 食欲不振在长期饮酒的人群中普遍存在. Mezey等^[15]研究发现厌食是酒精性肝病患者饮食摄入减少的主要原因, 酒精引起的消化不良也是造成营养不良的因素. 既往的研究也表明, 高脂饮食和热量摄入不足这两个因素均可加重酒精的肝损伤作用^[16,17]. 总之, 高脂饮食和热量摄入不足这两个因素既能加重酒精的肝细胞损伤又符合酒精性肝病患者的饮食特点. 因此, 本研究采用酒精、高脂饮食及限制热量摄入这3个处理因素共同作用于大

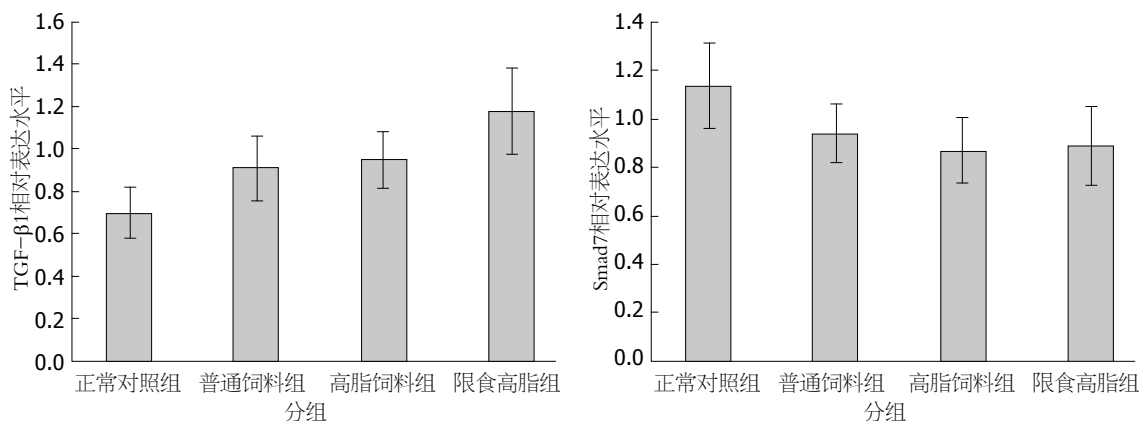


图 5 TGF-β1和Smad7在不同处理组肝组织中mRNA表达的变化. TGF-β1: 转化生长因子β1.

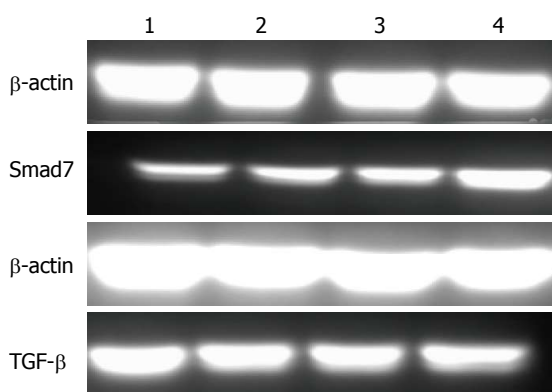


图 6 不同实验组大鼠肝组织TGF-β1及Smad7蛋白表达水平变化. A: 不同实验组中Smad7及管家基因β-actin在肝组织蛋白中的表达; B: 不同实验组中TGF-β及管家基因β-actin在肝组织蛋白中的表达. 1: 正常对照组; 2: 普通饲料组; 3: 高脂饲料组; 4: 限食高脂组. TGF-β1: 转化生长因子β1.

鼠,以期能缩短酒精性肝纤维化大鼠模型的制备.不同种类的脂肪酸的作用不同,鱼油、玉米油等不饱和脂肪酸可加重肝损伤,而牛油等饱和脂肪酸可起到肝细胞保护作用^[18,19],因此研究中采用玉米油制备高脂饲料.此外,有研究表明雌性大鼠比雄性大鼠对酒精更敏感^[20-22],故实验中选择雌性大鼠.

首先,用低浓度的白酒水溶液作为大鼠唯一水源迫使大鼠饮酒,之后逐渐提高浓度增加摄入酒精量.本实验中最初大鼠可以耐受浓度为6%(v/v),之后逐渐提高酒精浓度,在1 mo内酒精浓度可以提高到20%(v/v),第3周时每1 kg体质量摄入酒精量逐渐增至7.5 g/(kg·d)±1.3 g/(kg·d),第6周达10.6 g/(kg·d)±1.8 g/(kg·d),饮用白酒稀释液体积13.38 mL/d±2.27 mL/d.第7周曾尝试给大鼠饮用38%(v/v)未经稀释的白酒,每1 kg体质量摄入酒精量升至13.9 g/(kg·d)±1.9 g/(kg·d),但饮用白酒体积下降至9.94 mL/d±1.96 mL/d,大鼠

饮水量不足,如长期如此必将导致大鼠死亡.遂将浓度再次降至20%(v/v),直到第16周实验结束,大鼠摄入白酒量一直保持稳定.以第14周为例,大鼠摄入酒精10.1 g/(kg·d)±1.1 g/(kg·d),白酒稀释液体积14.02 mL±2.17 mL.实验结果证明,以白酒稀释液为唯一水源并逐步提高酒精浓度的方法可以成功克服大鼠的厌酒习性,第10周之后大鼠甚至出现不同程度的嗜酒表现.另外,通过自由饮用的方式酒精摄入量可达10 g/(kg·d).林红等^[7]应用灌胃法制备酒精性肝病大鼠模型,酒精量以8 g/(kg·d)起始,至第9周增至10 g/(kg·d).本实验中第6周就达到了10.6 g/(kg·d)±1.8 g/(kg·d).周东方等^[23]用灌胃法制备大鼠模型,酒精量为5-9 g/(kg·d).本研究中大鼠摄入酒精量已达到甚至超过酒精灌胃法注入的酒精量.

饮用白酒稀释液的实验组大鼠ALT及AST较对照组明显升高.实验组间比较发现,高脂饲料组及限食高脂组血浆AST较普通饲料组明显升高,ALT水平在3个实验组间无明显差别.可见酒精可致大鼠肝功能受损,高脂饮食及限食可增强酒精对肝细胞的损伤作用.本研究应用光镜及电镜2种方法观察大鼠肝组织形态学变化.进食正常饲料的实验组大鼠肝脏出现了F1及F3程度不等的脂肪肝表现;进食高脂饲料的大鼠脂肪肝程度加重达到了F4级,其中62.5%的大鼠(5/8)还出现了G2级酒精性肝炎的表现,37.5%的大鼠(3/8)肝脏在电镜下还观察到S1级胶原纤维的增生;限食高脂组中71.4%(5/7)的大鼠出现了S2-S3级轻重不等的肝纤维化改变同时伴有G2级肝炎F1级脂肪肝改变;另外28.6%(2/7)的大鼠肝脏只出现了脂肪肝及肝炎表现.光镜及电镜下的改变证明高脂饲料饮食及限制热量摄入能加重肝脏损伤,从而缩短模型制备时间.研究中

发现, 脂肪变性, 炎症及纤维化等病理改变在肝脏呈不均匀分布, 这对临床工作中肝脏组织活检有一定的指导意义. 在临床工作中从B超及CT结果可知酒精性脂肪肝可以呈局灶性分布, 在CT结果表现为肝内低密度病灶, B超下可见块状强回声, 需与原发肝癌进行鉴别诊断. 临床上没有能清晰显示肝炎及肝纤维化的影像学检查, 多采用肝穿活检, 取出几万分之一肝组织进行病理学检查, 难以观察到炎症及纤维化在整个肝脏的分布. 我们在不同部位取活检可能得到不同结果, 多部位活检可以提高检出率, 更准确评估病变严重程度.

对肝纤维化形成机制的研究表明: 酒精性肝纤维化的出现是由各种促纤维化因子的增多和/或胶原蛋白酶等抑纤维化因子相对不足导致的^[24]. TGF- β 1是一种属于转化生长因子 β 超家族的细胞因子, 首次在人的血小板中被发现, 有促进创伤愈合的作用^[25]. 此后在人体内还陆续发现了TGF- β 2及TGF- β 3两个亚型. 这个生长因子家族在纤维化、血管生成、造血和细胞增生等多方面发挥广泛的生物学作用^[26]. TGF- β 1是为数不多的具有促进纤维化形成及抑制细胞外基质降解双重作用的促纤维化因子, 在肝纤维化形成过程中起到重要作用^[27]. 一方面, TGF- β 可以诱导部分肝细胞发生上皮间质转化而成为成纤维细胞^[28], 从而促进肝纤维化的形成. 另一方面, TGF- β 通路可以促进纤溶酶原激活抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)的转录, 纤溶酶原激活减少, 活性下降, 纤维蛋白生成和降解失衡, 最终造成肝纤维化的形成^[29]. 此外, TGF- β 1还能通过调节ADH1来增强细胞内氧化应激来加重肝细胞损伤^[30]. Smad家族是TGF- β 通路的细胞内信号传导分子^[2]. Smad7通过阻断Smad2/3磷酸化来阻断信号的传导, 是该通路的主要抑制物^[31-33]. Rui等进行的临床实验证实, 酒精性肝纤维化患者肝组织中TGF- β 1表达水平较正常对照组升高, 说明TGF- β 1在肝纤维化的发生过程中起到了促进作用^[31]. 为进一步深入探讨TGF- β 1在酒精性肝病中的作用机制, 本实验在mRNA及蛋白两个水平同时检测TGF- β 1及其抑制物Smad7在肝组织中的表达情况. 结果表明与对照组比较实验组TGF- β 1表达均有所升高, 而Smad7表达水平平均下降. 本实验中不同的实验组出现了从酒精性脂肪肝、酒精性肝炎到酒精性肝纤维化不同程度的病变, 随着肝脏组织病理学改变的加重TGF- β 1表达量也逐步升高, 但

Smad7表达水平在3个实验中无明显差异. 实验结果表明在酒精性肝病中TGF- β 1表达的升高及其抑制物Smad7的降低共同发挥了促纤维化作用, 其中TGF- β 1表达水平与肝脏损伤程度呈正相关.

实验结果表明, 以白酒稀释液作为唯一水源, 之后逐渐增加酒精浓度可以成功克服大鼠的厌酒习性, 且酒精的摄入量可以达到或超过同类研究中的酒精摄入量. 高脂饮食及限食可加重酒精的肝脏损伤, 到第16周末限食高脂组大鼠中有71.4%(5/7)出现了轻重不等的肝纤维化表现. 应用酒精灌胃法造模的同类研究中实验组大鼠死亡率达22.2%、46.6%, 高低不等^[7,34], 而本实验组中死亡率为11.1%(3/27)较灌胃法明显降低. 本研究采用的模型制备方法操作简便、成本低、成模时间相对较短、大鼠死亡率低, 应用的高脂饮食及限食等干预因素符合酒精性肝病患者的饮食特点, 动物模型制备过程更接近于人类发病过程. 实验中发现几乎所有实验组大鼠出现尾尖红肿、渗血, 有一半大鼠的尾尖坏死、变黑并最终脱落. 在之前同类研究中未见相关报道, 发生机制也不清楚, 可能与长期大量饮酒导致末梢循环障碍及末梢神经炎有关, 有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 王辉, 王江滨. 肝炎病毒感染与酒精性肝硬化关系的研究(附182例酒精性肝病临床病例报告). 白求恩医科大学学报 1998; 24: 652-653
- 2 Taylor IW, Wrana JL. SnapShot: The TGF β pathway interactome. *Cell* 2008; 133: 378.e1 [PMID: 18423207 DOI: 10.1016/j.cell.2008.04.007]
- 3 Nanji AA, Mendenhall CL, French SW. Beef fat prevents alcoholic liver disease in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1989; 13: 15-19 [PMID: 2646971]
- 4 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南. 胃肠病学 2010; 15: 617-621
- 5 凌奇荷, 卿笃信. 重视对酒精性肝病的研究. 中华消化杂志 2001; 21: 517-518
- 6 Lieber CS, DeCarli LM, Mak KM, Kim CI, Leo MA. Attenuation of alcohol-induced hepatic fibrosis by polyunsaturated lecithin. *Hepatology* 1990; 12: 1390-1398 [PMID: 2258155]
- 7 林红, 吕淼, 张义侠, 王炳元, 傅宝玉. 酒精性肝病大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2001; 9: 24-28
- 8 伏建峰, 史清海, 岳新华, 张东辉. 改进的酒精灌胃法建立大鼠酒精性肝病模型. 解放军预防医学杂志 2006; 24: 336-338
- 9 陈珺明, 田淑霞, 邢练军, 郑培永, 季光. 基质金属蛋白酶纤溶系统在大鼠酒精性肝纤维化形成中的作用. 世界华人消化杂志 2013; 21: 1595-1601
- 10 McConnell EL, Basit AW, Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60: 63-70 [PMID: 18423207 DOI: 10.1016/j.cell.2008.04.007]

- 18088506 DOI: 10.1211/jpp.60.1.0008]
- 11 李伟平, 任浩洋, 张宝阳, 虞朝辉, 厉有名. VEGF在大鼠慢性酒精性肝损伤中的表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1766-1770
 - 12 刘秀英, 胡怡秀, 胡余明, 丘丰, 周月婵, 臧雪冰, 聂焱. 四氯化碳和猪血清肝纤维化模型组织病理比较. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1875-1879
 - 13 Han D, Ybanez MD, Johnson HS, McDonald JN, Mesrobian L, Sancheti H, Martin G, Martin A, Lim AM, Dara L, Cadenas E, Tsukamoto H, Kaplowitz N. Dynamic adaptation of liver mitochondria to chronic alcohol feeding in mice: biogenesis, remodeling, and functional alterations. *J Biol Chem* 2012; 287: 42165-42179 [PMID: 23086958 DOI: 10.1074/jbc.M112.377374]
 - 14 朱强, 王科, 钱晓峰, 饶建华, 王学浩, 李相成, 吕凌, 张峰. 改良小鼠酒精性肝损伤模型的建立. *中华临床医师杂志* 2010; 4: 1532-1536
 - 15 Mezey E. Interaction between alcohol and nutrition in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Seminars in Liver Disease* 1991; 11: 340-348
 - 16 Mendenhall CL, Anderson S, Weesner RE, Goldberg SJ, Crolic KA. Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis. Veterans Administration Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis. *Am J Med* 1984; 76: 211-222 [PMID: 6421159]
 - 17 Reinke LA, McCay PB. Spin trapping studies of alcohol-initiated radicals in rat liver: influence of dietary fat. *J Nutr* 1997; 127: 899S-902S [PMID: 9164259]
 - 18 Buko VU. Beef fat prevents alcoholic liver disease in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14: 632 [PMID: 2221295]
 - 19 Ronis MJ, Korourian S, Zipperman M, Hakkak R, Badger TM. Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition. *J Nutr* 2004; 134: 904-912 [PMID: 15051845]
 - 20 Enomoto N, Takei Y, Kitamura T, Hirose M, Ikejima K, Sato N. Estriol enhances lipopolysaccharide-induced increases in nitric oxide production by Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 66S-69S [PMID: 12198378 DOI: 10.1097/01.ALC.0000026979.64602.24]
 - 21 Nanji AA, Jokelainen K, Fotouhinia M, Rahemtulla A, Thomas P, Tipoe GL, Su GL, Dannenberg AJ. Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1348-G1356 [PMID: 11705739]
 - 22 Thurman RG. Sex-related liver injury due to alcohol involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Can J Gastroenterol* 2000; 14 Suppl D: 129D-135D [PMID: 11110625]
 - 23 周东方, 魏峰, 周俊英. 腺苷酸激活蛋白激酶在大鼠酒精性肝病中表达减少. *基础医学与临床* 2012; 32: 1154-1160
 - 24 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]
 - 25 Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258: 7155-7160 [PMID: 6602130]
 - 26 Falletti E, Fabris C, Toniutto P, Fontanini E, Cussigh A, Bitetto D, Fornasiere E, Avellini C, Minisini R, Pirisi M. TGF-beta1 genotypes in cirrhosis: relationship with the occurrence of liver cancer. *Cytokine* 2008; 44: 256-261 [PMID: 18809335 DOI: 10.1016/j.cyt.2008.08.008]
 - 27 Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292 [PMID: 7935686]
 - 28 Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 23337-23347 [PMID: 17562716 DOI: 10.1074/jbc.M700194200]
 - 29 Furukawa F, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yoshida K, Sugano Y, Yamagata H, Matsushita M, Seki T, Inagaki Y, Nishizawa M, Fujisawa J, Inoue K. p38 MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts. *Hepatology* 2003; 38: 879-889 [PMID: 14512875 DOI: 10.1053/jhep.2003.50384]
 - 30 Ciucan L, Ehnert S, Ilkavets I, Weng HL, Gaitantzi H, Tsukamoto H, Ueberham E, Meindl-Beinker NM, Singer MV, Breitkopf K, Dooley S. TGF-beta enhances alcohol dependent hepatocyte damage via down-regulation of alcohol dehydrogenase I. *J Hepatol* 2010; 52: 407-416 [PMID: 20129692 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.12.003]
 - 31 Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 1997; 389: 631-635 [PMID: 9335507 DOI: 10.1038/39369]
 - 32 Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Wrana JL, Falb D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 1997; 89: 1165-1173 [PMID: 9215638]
 - 33 Souchelnytskyi S, Nakayama T, Nakao A, Morén A, Heldin CH, Christian JL, ten Dijke P. Physical and functional interaction of murine and Xenopus Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 1998; 273: 25364-25370 [PMID: 9738003]
 - 34 孙怡宁, 尚荣军, 罗金燕, 张宽学. 白酒灌胃法建立大鼠早期酒精性肝病模型. *陕西医学杂志* 2002; 32: 565-567

编辑 田滢 电编 鲁亚静



STATs与肝纤维化关系的研究进展

蒋亚玲, 周 贤

蒋亚玲, 周贤, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

蒋亚玲, 在读硕士, 主要从事肝纤维化的基础与临床研究.

作者贡献分布: 本文综述由蒋亚玲撰写; 周贤审校.

通讯作者: 周贤, 教授, 主任医师, 646000, 四川省泸州市江阳区太平街25号, 泸州医学院附属医院消化内科. zhouxian68@163.com
电话: 0830-3165331

收稿日期: 2014-03-25 修回日期: 2014-04-21

接受日期: 2014-04-28 在线出版日期: 2014-07-08

STATs and hepatic fibrosis

Ya-Ling Jiang, Xian Zhou

Ya-Ling Jiang, Xian Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Xian Zhou, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, 25 Taiping Road, Jiangyang District, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. zhouxian68@163.com

Received: 2014-03-25 Revised: 2014-04-21

Accepted: 2014-04-28 Published online: 2014-07-08

Abstract

Hepatic fibrosis is a response to repair of chronic hepatic injury caused by different diseases. Its pathological features are inflammatory cell aggregation and associated cascade reaction. There are myofibroblast formation (MFB) and excessive deposition of extracellular matrix (ECM) in the liver, and the structure of the liver is destroyed. The recent research finds that Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) plays an important role in the development of hepatic fibrosis. In general, STAT1 and STAT5 act as anti-fibrotic signaling molecules preventing injury-driven liver fibrosis. Although the antiviral effect of STAT2 is well documented, it is not clear whether or not STAT2 also plays a role in contributing to the interferon- α/β -mediated anti-fibrotic effects in the liver. What's more, the biological functions of STAT3, STAT4 and STAT6 in hepatic fibrosis remains largely unknown. Therefore, this review focuses on the role of STAT family members and cytokines in hepatic fibrosis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatic fibrosis; Signal transducer and activator of transcriptions; Cytokines

Jiang YL, Zhou X. STATs and hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2703-2709 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2703.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2703>

摘要

肝纤维化是肝脏对不同病因所致的慢性肝损伤后组织修复的代偿反应. 其病理特征表现为炎性细胞募集并诱发级联反应, 肝脏肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)形成, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积及分布异常、正常肝结构破坏. 关于肝纤维化发生的信号转导通路研究已成为目前的研究热点, 其中Janus kinase/signal transducer and activator of transcription(JAK-STAT)信号通路是其中较新且近年来研究较多的一条. 一般来说, STATs家族成员中STAT1和STAT5可能通过各种机制防止损伤性肝纤维化. 尽管STAT2的抗病毒效果良好, 但STAT2是否在促进干扰素(interferon, IFN)- α/β 介导的抗纤维化中也扮演了同样重要的角色目前尚不清楚. STAT3、STAT4和STAT6在肝纤维发生的生物学功能仍然不太为人所知. 本文就STATs家族成员及相关细胞因子与肝纤维化研究最新进展作一综述.

© 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; STATs家族; 细胞因子

核心提示: STATs家族成员包括STAT1-4、STAT5A、STAT5B和STAT6, 在肝纤维化过程中, 不同的STATs家族成员均参与其中, 但却发挥着截然不同的效应. 近年来的研究进一步表明, 肝纤维化相关细胞因子也可能是通过调节不同STATs家族成员的表达从而促进或抑制肝纤维化进程. 如何上调保护性STAT1、STAT5的表达从而抑制肝纤维化的发展进程将成为亟待研究的新课题.

蒋亚玲, 周贤. STATs与肝纤维化关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2703-2709 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2703.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2703>

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病向肝硬化发展所共有的病理改变和必经途径. 从分子水平上研究肝纤维化相关的各种信号转导通路已成为目前重要的研究课题, 本文简要总结了近年来研究最多的一条信号通路JAK-STAT通路与肝纤维化关系的研究进展.

■同行评议者

牛英才, 研究员, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所

■ 研发前沿

JAK-STAT信号通路已被证实广泛参与包括细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤、炎症等多种生理病理过程。近年来的相关研究发现, STATs家族在肝纤维化发生、发展过程中亦具有重要的地位, 但其不同的家族成员及相同家族成员在不同诱导因子作用下可能产生促肝纤维化或抗纤维化截然相反的效应。其具体机制还有待进一步研究明确。

0 引言

肝纤维化发生主要是由于各种慢性肝损伤激活肌成纤维细胞, 使各种细胞外基质合成增多而降解相对不足, 最终导致肝纤维化。尽管多种慢性肝脏疾病可导致肝纤维化, 但经研究发现, 肝纤维化是一个可逆的病理过程^[1]。因此, 肝纤维化发生所包含的信号通路、分子机制以及如何逆转肝纤维化已成为目前重要的研究课题, 其主要涉及的信号转导通路包括: 转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)/Smad通路、PI3K通路、MAPK通路、核因子(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)通路、Janus kinase/signal transducer and activator of transcription(JAK/STAT)通路、过氧化物酶体增殖物激活受体通路等, 在以上信号通路中, JAK/STAT是一条较新且最近研究最多的通路之一, 广泛参与包括细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤、炎症等多种生理病理过程^[2]。STATs家族成员目前发现的有7个, 分别为STAT1-4、STAT5A、STAT5B和STAT6^[3]。本文就近年JAK/STAT信号转导通路中STATs及相关细胞因子在肝纤维化形成过程中的最新研究做一综述。

1 STAT1

研究表明, STAT1参与肝纤维化过程, 是肝纤维化的负调节因子, 其机制是通过激活自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)从而杀伤肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)和抑制HSC的增殖而发挥作用^[4], 而在STAT1激活过程中有多个细胞因子参与, 其中最重要的有血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、干扰素(interferons, IFNs)、白介素-27(interleukin-27, IL-27)等。

HSC是产生ECM的最主要细胞, 而PDGF是目前已知的促HSC增殖和活化最强的细胞因子。Jeong等^[4]利用CCl₄诱导小鼠肝纤维化模型发现, STAT1基因敲除组小鼠肝纤维化进展较对照组明显加快, PDGF β 受体及PDGF的表达明显增多, 且NK细胞通过多聚肌苷酸杀死肝星状细胞作用减弱, 这表明在小鼠肝纤维化的进程中, STAT1是通过下调HSC PDGF的表达而抑制HSC增殖以及刺激NK细胞杀伤活化的肝星状细胞, 最终抑制肝纤维化。因此, 通过激活STAT1来抑制HSC活化增殖, 促进NK细胞细胞毒作用的发挥, 这可能成为治疗肝纤维化的新靶点。

STAT1在肝脏主要被IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ 激活, 在动物

实验中, IFN- α 能通过磷酸化STAT1和p300的相互作用直接抑制胶原蛋白基因转录^[5]。另一项研究发现, IFN- β 可通过抑制肝纤维化转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、成纤维细胞生长因子、胶原蛋白IA2、金属蛋白酶组织抑制剂1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)mRNA表达, 从而降低ConA诱导的肝纤维化^[6]。同时, Chen等^[7]在以AAV为载体介导IFN- γ 表达的动物实验中, 成功阻止了肝纤维化进展; 进一步也有研究表明, IFN- γ 诱导STAT1磷酸化, 上调Smad7的表达, 破坏TGF- β 信号转导以及通过STAT1抑制腺苷酸环化酶表达从而改变A2A受体介导的信号转导, 降低A2A受体介导的胶原蛋白的mRNA和蛋白表达水平, 导致HSC周期停滞并发生凋亡^[4,8,9]。以上研究提示IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ 可能通过STAT1通路起到抗肝纤维化作用。

除PDGF、IFNs外, IL-27也与STAT1抗肝纤维化作用密切相关。在对人HSC株研究发现, IL-27可激活STAT1和小部分STAT3, 继而诱导STAT1靶基因如干扰素响应因子-1、黏病毒抵抗蛋白A和STAT1自身表达; 同样, 在大鼠原代HSC研究发现, IL-27也具有相同的效应。上述研究表明, IL-27可能通过STAT1的激活抑制肝纤维化^[10]。然而, IL-27/STAT1途径在体内是否同样具有抗纤维化作用还有待进一步的研究。

2 STAT2

STAT2能被IFN- $\alpha/\beta/\lambda$ 激活, 目前关于STAT2在肝脏疾病的研究主要集中于抗病毒(如丙型肝炎病毒)^[11], 参与IFN- α 抗肝癌活性^[12]的表达等方面。研究表明, 活化的STAT1和STAT2不仅在宿主抗HCV感染也在IFN- α 治疗丙型肝炎过程中起着关键的作用。一方面, 宿主感染HCV后, 被感染的肝细胞产生IFN- β , 然后与IFN- α/β 受体结合, 激活邻近的非感染肝细胞STAT1和STAT2, 并随后上调各种抗病毒蛋白的表达以防止进一步感染^[12]。另一方面, IFN- α 抗HCV的作用被认为是通过IFN- α 与IFN- α R1、2组成的异源二聚体受体复合物结合后, 激活NK细胞、STAT1/STAT2及多种抗病毒蛋白, 促进NK细胞直接或间接通过产生IFN- γ 杀灭HCV感染的肝细胞, 最终抑制丙型肝炎病毒的复制^[13,14]。然而, STAT2在肝纤维化或肝炎后肝硬化中的作用尚未见相关报道。

3 STAT3

目前, STAT3是纤维化疾病的一个研究热点。然

而, STAT3在肝纤维化进程中所扮演的角色至今仍未完全阐明. 在CCl₄诱导的小鼠肝纤维化模型中, 肝细胞STAT3基因敲除组的小鼠胶原蛋白和平滑肌肌动蛋白的表达量明显高于野生型小鼠, 即肝细胞STAT3基因敲除组的小鼠表现出更高层次的肝脏纤维化^[15]. 最近的一项研究表明, 肝细胞STAT3激活后, 刺激肝细胞产生抑制肝纤维化未知的可溶性因子, 抑制肝星状细胞的活化^[16], 但该可溶性因子的成分仍不能确定. 也有临床实验研究表明, 与正常健康人肝脏相比, STAT3-DNA整合后可明显的抑制酒精性和丙型肝炎患者肝纤维化的发生, HCV感染者肝纤维化程度与STAT3-DNA整合持续下降程度呈正相关, 这提示STAT3抑制了肝纤维化患者纤维化进展^[17]. STAT3的保肝作用可能是由于激活肝细胞表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)信号通路, 促进肝细胞再生及抑制肝星状细胞早期活化, 从而防止肝损伤和肝纤维化^[18,19]. 但相反的研究发现, 敲除肝脏细胞因子信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS3)基因的小鼠, 注射腺病毒来源的STAT3, 能导致STAT3过度活化, 并通过促进TGF- β 1的产生促进肝纤维化^[20]. 另一项研究亦证实, 活化的STAT3通过上调促HSC存活因子TIMP-1的表达, 加剧肝脏纤维化^[21]. 这些不同的研究结论, 可能与STAT3表达的肝脏细胞类型不同, 表达量多少不同, STAT3上游激活因子种类不同以及不同细胞所表达的STAT3上游激活因子受体、下游效应因子差异有关. 研究发现, STAT3主要由IL-6、IL-22、瘦素等激活而发挥作用.

IL-6是一种急性期炎症因子, 具有促炎效应. 同时, IL-6在肝损伤及肝纤维化方面仍有重要作用, 但其确切作用尚存在争议. 一方面, 一些研究表明, IL-6是抑制肝纤维化的细胞因子, IL-6基因敲除小鼠更容易被CCl₄诱导肝纤维化, 通过DDC喂养小鼠, 肝细胞缺乏gp130/STAT3转导信号, 增加慢性淤胆型肝炎损伤和加快纤维化进程^[22]; 肝硬化大鼠部分肝切除后, IL-6/STAT3低表达, 从而抑制残肝肝细胞再生, 维持大鼠肝硬化状态^[23]. 另一方面, 有报道IL-6是促肝纤维化的细胞因子, IL-6基因表达下调的小鼠能防止肝脏损伤和纤维化^[24]; 在体外细胞培养中发现, 枯否细胞产生的IL-6能使HSC存活及增殖^[25]; IL-6可通过明显上调激活JAK2和STAT3 mRNA

的表达, 增加HSC的早期分化, 促进纤维化基因包括胶原mRNA, 平滑肌动蛋白- α (smooth muscle actin- α , α -SMA)mRNA, PDGFR mRNA和TGF- β R mRNA的表达, 这可能是IL-6促肝纤维化机制之一^[18]. 也有临床研究表明, 在肝血吸虫性肝纤维化及非酒精性脂肪性肝病中, IL-6表达的上调与肝纤维化程度呈正相关^[26]. 这些研究所得出的不同结论的具体原因仍不清楚. 可能与肝纤维化所处的阶段、产生纤维化的病因、表达IL-6受体的不同肝脏细胞类型有关, IL-6可能是针对不同类型的肝脏细胞正向或负向调节肝纤维化, 这些正向或负向调节因素之间的平衡点, 决定了结局是抑制还是促进肝纤维化.

已证实, IL-22在抗菌免疫、炎症反应、肝损伤保护中起着关键作用^[27], 近年来研究发现, IL-22与肝纤维化发生亦紧密相关. 在培养的原代大鼠及人肝星状细胞, IL-22可诱导STAT3活化, 阻止体内外HSC凋亡. 但是, 过表达IL-22(例如: IL-22转基因小鼠)或使用腺病毒来源的IL-22干预均降低肝纤维化程度^[28]. 在体外培养的肝纤维化患者肝星状细胞, IL-22的过表达增加衰老相关的 β -半乳糖苷酶阳性的HSC数量和降低 α -SMA的表达, 从而抑制肝纤维化^[29]. 就目前而言, 虽然没有证据表明STAT3能直接促进细胞衰老, 但STAT3的下游靶基因包括p53、p21和SOCS家族已被证明能够诱导细胞衰老^[30]. 研究发现, IL-22活化STAT3通过p53和p21依赖的信号途径促进HSC衰老, 在敲除STAT3基因后IL-22诱导HSC衰老的作用大大降低^[28]. 这可能是过表达IL-22降低肝纤维化程度的主要机制.

瘦素是由肥胖基因(*ob*基因)编码合成的一种蛋白质类激素, 主要由白色脂肪组织产生. 利用先天性缺乏瘦素表达的小鼠和先天性缺乏功能性瘦素受体的Zucker大鼠建立的动物模型中^[31,32], 表现出不发生肝纤维化或肝纤维化程度很轻, 这表明瘦素是一种促纤维化因子. 近年来多项研究表明, 瘦素促纤维化效应可能与以下因素有关: (1)间接通过Kupffer细胞来激活HSC, 活化的HSC在瘦素作用下, 通过JAK/STAT3、PI3K/AKT、MAPK/ERK1/2、NF- κ B等信号通路上调I型胶原、基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1)、TGF- β mRNA和 α -SMA的表达^[33]; (2)瘦素可能通过直接促进肝星状细胞存活、增殖.

瘦素促进肝纤维化, 而脂联素可抑制瘦素激活JAK2/STAT3, 从而发挥抑制肝纤维化效应.

■ 相关报道

王艳等阐述了JAK-STAT信号通路及STAT蛋白在包括慢性丙型肝炎、肝脏肿瘤等慢性肝病中的作用, 这是STATs与肝脏疾病中较新的报道.

■创新盘点

本文就STATs家族成员与肝纤维化发生的直接关系,以及近年来研究较多的肝纤维化相关的重要细胞因子间接通过JAK/STAT这一信号通路发挥作用的相关机制做了较新且全面阐述。

此外,脂联素还通过两种新机制抑制肝纤维化:(1)增强SOCS3与Ob-Rb的作用,阻断瘦素相关性基质金属蛋白酶组织抑制剂-1-基质金属蛋白酶-1(tissue inhibitor of metalloproteinases-1, matrix metalloproteinase-1, TIMP-1-MMP-1)复合物的形成;(2)脂联素信号通过脂联素受体1(AdipoR1)增加蛋白酪氨酸磷酸酶1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)表达和活化,这将成为抑制JAK2-STAT3途径的多个靶点^[34,35]。

4 STAT4

文献证实IL-12、IFN- α/β 在多种免疫细胞中可以激活STAT4,引起保护性免疫应答及免疫性疾病^[36]。IL-10可通过诱导SOCS表达,减少肝纤维化的发生。研究表明,IL-10、IL-12/23(p40)、IL-13R α 2三重基因敲除小鼠更易患曼氏血吸虫诱导的肝纤维化,门脉高压,肝脾肿大,消化系统出血等^[37],表明IL-10、IL-12、IL-13R α 2可能通过JAK/STAT4信号通路共同抑制小鼠曼氏血吸虫引起的肝纤维化。一项全基因组关联研究(genome wide association studies, GWAS)荟萃分析结果进一步表明,除了HLA位点外,STAT4、DENND1B和CD80等新的候选基因也与原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)发生有关^[38];而在一个高度同质的肝移植人群HCV复发的调查中,采用组织活检术研究发现,STAT4 T等位基因与移植肝纤维化发展有着紧密联系,而GG基因型在该病理过程中具有保护作用,虽然其机制尚不清楚,与纤维化进展更快的T等位基因表明JAK/STAT4通路在丙型肝炎病毒引起的肝纤维化的重要性。因此,STAT4基因型被认为可能是未来识别高危患者肝纤维化进展的诊断工具^[39]。

5 STAT5

STAT5分为STAT5a、STAT5b,多项研究结果显示STAT5激活后,通过促进细胞增殖、抗凋亡、促进侵袭等,在HCC、脂肪性肝病、肝损伤修复等方面起到重要作用^[40,41]。近年来研究发现,STAT5同时也具有抗纤维化效应,使用STAT5基因敲除小鼠进行实验,经CCl₄处理肝细胞后可导致TGF- β 水平升高和GH诱导的STAT3表达增强,这表明STAT5抑制肝纤维化是通过下调TGF- β 和STAT3表达而起作用^[42,43]。同时全部敲除多药耐药性基因2以及肝细胞和胆管上皮细胞STAT5最终引起早期、严重肝纤维化,该效应

是通过减少肝细胞重要保护性基因(如EGFR、核因子 κ B、催乳激素受体等)的表达以及增加肝细胞凋亡数量实现的^[44]。此外,STAT5抑制肝纤维的效应在另一项研究也得到证实,在小鼠体内外研究发现,Th17淋巴细胞通过STAT5磷酸化途径选择性降低IL-17的产生,从而减少肝纤维化的发生^[45]。

6 STAT6

STAT6与肝纤维化关系密切,其主要是由Th2细胞因子IL-4和IL-13激活,且他们都被认为是促纤维化因子。对IL-4和IL-13在肝纤维化的作用已进行了广泛的研究,特别是在日本血吸虫感染模型中^[46]。

在体外实验中,IL-4与IL-4R结合激活STAT6信号通路,从而直接活化肝内(肌)成纤维细胞[intrahepatic (myo) fibroblasts, hIHF]和诱导胶原蛋白的分泌,具有强烈的致纤维化作用^[47,48]。利用siRNA阻断STAT6相应地减弱hIHF激活,降低纤维化程度^[47]。在另一项体外实验中进一步证实,IL-4可呈剂量依赖性诱导LX-2中I型胶原的表达,IL-4通过提高JAK1、STAT6二者的磷酸化水平而发挥作用^[49]。

IL-13也是一种促纤维化细胞因子,其促肝纤维化效应可能是通过上调多种诱导肝星状细胞活化的相关蛋白实现^[50]。通过分离提取降低肝细胞IL-13水平,并下调脾细胞GATA3 mRNA的转录,能够减轻感染日本血吸虫后肝纤维化^[51]。在芍药苷(paeoniflorin, PAE)治疗血吸虫相关的肝纤维化的一项研究中发现,PAE不仅通过抑制JAK2的磷酸化和/或STAT6的表达,直接抑制选择性激活的巨噬细胞(alternatively activated macrophages, AAMs),导致AAMs相关标志物减少和精氨酸酶1(arginase-1, ARG-1)活性降低,也可通过降低IL-13的分泌间接抑制巨噬细胞选择性激活而起作用^[52]。然而,最新研究发现,IL-13可能不是通过经典的JAK/STAT6信号通路产生其促纤维化效应,而是通过ERK/MAPK途径激活TGF- β 独立激活素受体样激酶/Smad信号,诱导HSC中结缔组织生长因子表达,刺激肝脏细胞外基质的沉积,最终导致肝纤维化程度加剧^[53]。故IL-13促纤维化的确切信号通路还有待进一步研究。

7 结论

在控制肝纤维化过程中JAK/STAT信号通路中

起着复杂的作用. STAT1通过诱导HSC凋亡和抑制HSC增殖充当抗纤维化信号分子; STAT3可能不同的肝脏细胞中发挥不同的作用; STAT4根据不同的基因型决定在肝纤维化过程中发挥保护还是促进肝纤维的效应; STAT5可能通过保护肝细胞功能而充当抗纤维化信号分子, 从而防止损伤性肝纤维化, 而STAT2和STAT6在肝纤维化中扮演的角色目前尚不十分清楚. 尽管STATs与肝纤维化发生之间的关系已有较多研究, 但STATs在肝纤维化发生发展中所起作用仍需进一步研究明确.

8 参考文献

- 1 Ismail MH, Pinzani M. Reversal of liver fibrosis. *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15: 72-79 [PMID: 19568569 DOI: 10.4103/1319-3767.45072]
- 2 Nobori K, Munehisa Y. [Intracellular signaling pathways for cardiac hypertrophy: ERK, JAK-STAT, S6 kinase]. *Nihon Rinsho* 2007; 65 Suppl 4: 196-200 [PMID: 17511075]
- 3 Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007; 282: 20059-20063 [PMID: 17502367 DOI: 10.1074/jbc.R700016200]
- 4 Jeong WI, Park O, Radaeva S, Gao B. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 2006; 44: 1441-1451 [PMID: 17133483 DOI: 10.1002/hep.21419]
- 5 Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, de Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I. Interferon alfa down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 890-899 [PMID: 14512876 DOI: 10.1053/jhep.2003.50408]
- 6 Tanabe J, Izawa A, Takemi N, Miyauchi Y, Torii Y, Tsuchiyama H, Suzuki T, Sone S, Ando K. Interferon-beta reduces the mouse liver fibrosis induced by repeated administration of concanavalin A via the direct and indirect effects. *Immunology* 2007; 122: 562-570 [PMID: 17645499 DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02672.x]
- 7 Chen M, Wang GJ, Diao Y, Xu RA, Xie HT, Li XY, Sun JG. Adeno-associated virus mediated interferon-gamma inhibits the progression of hepatic fibrosis in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4045-4051 [PMID: 15996030]
- 8 Weng H, Mertens PR, Gressner AM, Dooley S. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *J Hepatol* 2007; 46: 295-303 [PMID: 17125875 DOI: 10.1016/j.jhep.2006.09.014]
- 9 Block ET, Cronstein BN. Interferon-gamma inhibits adenosine A2A receptor function in hepatic stellate cells by STAT1-mediated repression of adenylyl cyclase. *Int J Interferon Cytokine Mediator Res* 2010; 2010: 113-126 [PMID: 21132069]
- 10 Schoenherr C, Weiskirchen R, Haan S. Interleukin-27 acts on hepatic stellate cells and induces signal transducer and activator of transcription 1-dependent responses. *Cell Commun Signal* 2010; 8: 19 [PMID: 20719000 DOI: 10.1186/1478-811x-8-19]
- 11 Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 2009; 119: 1745-1754 [PMID: 19587449 DOI: 10.1172/jci39133]
- 12 Testoni B, Schinzari V, Guerrieri F, Gerbal-Chaloin S, Blandino G, Levrero M. p53-paralog DNp73 oncogene is repressed by IFN α /STAT2 through the recruitment of the Ezh2 polycomb group transcriptional repressor. *Oncogene* 2011; 30: 2670-2678 [PMID: 21399658 DOI: 10.1038/onc.2010.635]
- 13 Ahlenstiel G, Edlich B, Hogdal LJ, Rotman Y, Nouredin M, Feld JJ, Holz LE, Titerence RH, Liang TJ, Rehmann B. Early changes in natural killer cell function indicate virologic response to interferon therapy for hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 141: 1231-129, 1231-129, [PMID: 21741920 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.06.069]
- 14 Wang SH, Huang CX, Ye L, Wang X, Song L, Wang YJ, Liang H, Huang XY, Ho WZ. Natural killer cells suppress full cycle HCV infection of human hepatocytes. *J Viral Hepat* 2008; 15: 855-864 [PMID: 18637071 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2008.01014.x]
- 15 Wang H, Lafdil F, Wang L, Park O, Yin S, Niu J, Miller AM, Sun Z, Gao B. Hepatoprotective versus oncogenic functions of STAT3 in liver tumorigenesis. *Am J Pathol* 2011; 179: 714-724 [PMID: 21684247 DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.05.005]
- 16 Shigekawa M, Takehara T, Kodama T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406: 614-620 [PMID: 21356197 DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.105]
- 17 Stärkel P, Saeger CD, Leclercq I, Horsmans Y. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in liver fibrosis progression in chronic hepatitis C-infected patients. *Lab Invest* 2007; 87: 173-181 [PMID: 17318196 DOI: 10.1038/labinvest.3700496]
- 18 Lakner AM, Moore CC, Gullledge AA, Schrum LW. Daily genetic profiling indicates JAK/STAT signaling promotes early hepatic stellate cell transdifferentiation. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5047-5056 [PMID: 20976841]
- 19 Mair M, Zollner G, Schneller D, Musteanu M, Fickert P, Gumhold J, Schuster C, Fuchsbichler A, Bilban M, Tauber S, Esterbauer H, Kenner L, Poli V, Blaas L, Kornfeld JW, Casanova E, Mikulits W, Trauner M, Eferl R. Signal transducer and activator of transcription 3 protects from liver injury and fibrosis in a mouse model of sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 2010; 138: 2499-2508 [PMID: 20193684 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.02.049]
- 20 Ogata H, Chinen T, Yoshida T, Kinjyo I, Takaesu G, Shiraishi H, Iida M, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production. *Oncogene* 2006; 25: 2520-2530 [PMID: 16474852 DOI: 10.1038/sj.onc.1209281]
- 21 Lin S, Saxena NK, Ding X, Stein LL, Anania FA. Leptin increases tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) gene expression by a specificity protein 1/signal transducer and activator of

■应用要点

本文对防治肝纤维化具有一定的指导作用. 未来我们可以针对如何上调STAT1及STAT5的表达开发相关药物, 从而达到抑制甚至逆转肝纤维化的目的, 为肝纤维化的治疗提供了一条新思路.

■同行评价

本文总结了STATs与肝纤维化发生、发展关系的相关研究进展,为肝纤维化的治疗提供了新靶点,具有重要的理论意义和临床价值。

- transcription 3 mechanism. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 3376-3388 [PMID: 16931573 DOI: 10.1210/me.2006-0177]
- 22 Plum W, Tschaharganeh DF, Kroy DC, Corsten E, Erschfeld S, Dierssen U, Wasmuth H, Trautwein C, Streetz KL. Lack of glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3-mediated signaling in hepatocytes enhances chronic liver injury and fibrosis progression in a model of sclerosing cholangitis. *Am J Pathol* 2010; 176: 2236-2246 [PMID: 20382701 DOI: 10.2353/ajpath.2010.090469]
- 23 袁晟光, 农卡特, 廖维甲, 覃理灵, 王莉. 肝硬化大鼠肝部分切除后IL-6/STAT3信号通路的变化. *重庆医学* 2012; 40: 2188-2190
- 24 Li PC, Chiu YW, Lin YM, Day CH, Hwang GY, Pai P, Tsai FJ, Tsai CH, Kuo YC, Chang HC, Liu JY, Huang CY. Herbal Supplement Ameliorates Cardiac Hypertrophy in Rats with CCl(4)-Induced Liver Cirrhosis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 139045 [PMID: 23243427 DOI: 10.1155/2012/139045]
- 25 Nieto N. Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of [corrected] Kupffer cells on stellate cells. *Hepatology* 2006; 44: 1487-1501 [PMID: 17133487 DOI: 10.1002/hep.21427]
- 26 Sripa B, Mairiang E, Thinkhamrop B, Laha T, Kaewkes S, Sithithaworn P, Tessana S, Loukas A, Brindley PJ, Bethony JM. Advanced periductal fibrosis from infection with the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini* correlates with elevated levels of interleukin-6. *Hepatology* 2009; 50: 1273-1281 [PMID: 19676135 DOI: 10.1002/hep.23134]
- 27 Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007; 27: 647-659 [PMID: 17919941 DOI: 10.1016/j.immuni.2007.07.023]
- 28 Kong X, Feng D, Mathews S, Gao B. Hepatoprotective and anti-fibrotic functions of interleukin-22: therapeutic potential for the treatment of alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28 Suppl 1: 56-60 [PMID: 23855297 DOI: 10.1111/jgh.12032]
- 29 Kong X, Feng D, Wang H, Hong F, Bertola A, Wang FS, Gao B. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2012; 56: 1150-1159 [PMID: 22473749 DOI: 10.1002/hep.25744]
- 30 Calabrese V, Mallette FA, Deschênes-Simard X, Ramanathan S, Gagnon J, Moores A, Ilangumaran S, Ferbeyre G. SOCS1 links cytokine signaling to p53 and senescence. *Mol Cell* 2009; 36: 754-767 [PMID: 20005840 DOI: 10.1016/j.molcel.2009.09.044]
- 31 Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 2003; 38: 281-288 [PMID: 12586293]
- 32 Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001; 34: 288-297 [PMID: 11481614 DOI: 10.1053/jhep.2001.26518]
- 33 Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, Valente AJ, Steffensen B, Vincenti M, Barnes JL, Chandrasekar B. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta, NF-kappaB, and AP-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H3356-H3365 [PMID: 17921324 DOI: 10.1152/ajpheart.00928.2007]
- 34 Handy JA, Saxena NK, Fu P, Lin S, Mells JE, Gupta NA, Anania FA. Adiponectin activation of AMPK disrupts leptin-mediated hepatic fibrosis via suppressors of cytokine signaling (SOCS-3). *J Cell Biochem* 2010; 110: 1195-1207 [PMID: 20564215 DOI: 10.1002/jcb.22634]
- 35 Handy JA, Fu PP, Kumar P, Mells JE, Sharma S, Saxena NK, Anania FA. Adiponectin inhibits leptin signalling via multiple mechanisms to exert protective effects against hepatic fibrosis. *Biochem J* 2011; 440: 385-395 [PMID: 21846328 DOI: 10.1042/bj20102148]
- 36 Kaplan MH. STAT4: a critical regulator of inflammation in vivo. *Immunol Res* 2005; 31: 231-242 [PMID: 15888914]
- 37 Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wilson MS, Madala SK, Beers LM, Ramalingam TR, Wynn TA. Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Ralpha2. *Gastroenterology* 2011; 141: 2200-2209 [PMID: 21864478 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.08.008]
- 38 Mells GF, Floyd JA, Morley KI, Cordell HJ, Franklin CS, Shin SY, Heneghan MA, Neuberger JM, Donaldson PT, Day DB, Ducker SJ, Muriithi AW, Wheeler EF, Hammond CJ, Dawwas MF, Jones DE, Peltonen L, Alexander GJ, Sandford RN, Anderson CA. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* 2011; 43: 329-332 [PMID: 21399635 DOI: 10.1038/ng.789]
- 39 Eurich D, Boas-Knoop S, Struecker B, Neuhaus R, Neuhaus P, Bahra M. Genetic variants of STAT-4 affect the development of graft fibrosis after liver transplantation for HCV-induced liver disease. *Transplantation* 2013; 95: 203-208 [PMID: 23202532 DOI: 10.1097/TP.0b013e318277e2f6]
- 40 Friedbichler K, Themanns M, Mueller KM, Schleiderer M, Kornfeld JW, Terracciano LM, Kozlov AV, Haindl S, Kenner L, Kolbe T, Mueller M, Snibson KJ, Heim MH, Moriggl R. Growth-hormone-induced signal transducer and activator of transcription 5 signaling causes gigantism, inflammation, and premature death but protects mice from aggressive liver cancer. *Hepatology* 2012; 55: 941-952 [PMID: 22031092 DOI: 10.1002/hep.24765]
- 41 Mueller KM, Kornfeld JW, Friedbichler K, Blaas L, Egger G, Esterbauer H, Hasselblatt P, Schleiderer M, Haindl S, Wagner KU, Engblom D, Haemmerle G, Kratky D, Sexl V, Kenner L, Kozlov AV, Terracciano L, Zechner R, Schuetz G, Casanova E, Pospisilik JA, Heim MH, Moriggl R. Impairment of hepatic growth hormone and glucocorticoid receptor signaling causes steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2011; 54: 1398-1409 [PMID: 21725989 DOI: 10.1002/hep.24509]
- 42 Hosui A, Kimura A, Yamaji D, Zhu BM, Na R, Hennighausen L. Loss of STAT5 causes liver fibrosis and cancer development through increased TGF-beta and STAT3 activation. *J Exp Med* 2009; 206: 819-831 [PMID: 19332876 DOI: 10.1084/jem.20080003]
- 43 Baik M, Yu JH, Hennighausen L. Growth hormone-

- STAT5 regulation of growth, hepatocellular carcinoma, and liver metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229: 29-37 [PMID: 21793836 DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06100.x]
- 44 Blaas L, Kornfeld JW, Schramek D, Musteanu M, Zollner G, Gumhold J, van Zijl F, Schneller D, Esterbauer H, Egger G, Mair M, Kenner L, Mikulits W, Eferl R, Moriggl R, Penninger J, Trauner M, Casanova E. Disruption of the growth hormone--signal transducer and activator of transcription 5--insulin-like growth factor 1 axis severely aggravates liver fibrosis in a mouse model of cholestasis. *Hepatology* 2010; 51: 1319-1326 [PMID: 20162728 DOI: 10.1002/hep.23469]
- 45 Guillot A, Hamdaoui N, Bizy A, Zoltani K, Souktani R, Zafrani ES, Mallat A, Lotersztajn S, Lafdil F. Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver. *Hepatology* 2014; 59: 296-306 [PMID: 23813495 DOI: 10.1002/hep.26598]
- 46 Barron L, Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G723-G728 [PMID: 21292997 DOI: 10.1152/ajpgi.00414.2010]
- 47 Aoudjehane L, Pissais A, Scatton O, Podevin P, Massault PP, Chouzenoux S, Soubrane O, Calmus Y, Conti F. Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest* 2008; 88: 973-985 [PMID: 18626468 DOI: 10.1038/labinvest.2008.61]
- 48 Jin Z, Sun R, Wei H, Gao X, Chen Y, Tian Z. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: involvement of natural killer T cells. *Hepatology* 2011; 53: 219-229 [PMID: 21140473 DOI: 10.1002/hep.23983]
- 49 王晓红, 曹琦, 胡成穆. JAK/STAT通路调节IL-4诱导的肝星状细胞系LX-2 I型胶原基因的表达. *基础医学与临床* 2012; 32: 423-427
- 50 Weng HL, Liu Y, Chen JL, Huang T, Xu LJ, Godoy P, Hu JH, Zhou C, Stickel F, Marx A, Bohle RM, Zimmer V, Lammert F, Mueller S, Gigou M, Samuel D, Mertens PR, Singer MV, Seitz HK, Dooley S. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology* 2009; 50: 230-243 [PMID: 19441105 DOI: 10.1002/hep.22934]
- 51 Huang YF, Zhang SL, Jin F, Cheng D, Zhou YP, Li HR, Tang ZM, Xue J, Cai W, Dong JH, Zhao L. Activity of corilagin on post-parasiticide liver fibrosis in Schistosomiasis animal model. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013; 26: 85-92 [PMID: 23527711]
- 52 Chu D, Du M, Hu X, Wu Q, Shen J. Paeoniflorin attenuates schistosomiasis japonica-associated liver fibrosis through inhibiting alternative activation of macrophages. *Parasitology* 2011; 138: 1259-1271 [PMID: 21810309 DOI: 10.1017/s0031182011001065]
- 53 Liu Y, Meyer C, Müller A, Herweck F, Li Q, Müllenbach R, Mertens PR, Dooley S, Weng HL. IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- β -independent Smad signaling. *J Immunol* 2011; 187: 2814-2823 [PMID: 21804025 DOI: 10.4049/jimmunol.1003260]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



NADPH氧化酶家族成员促肝纤维化的研究进展

余珊珊, 朱 萱

■背景资料

肝纤维化是各种病因所致慢性肝损伤的创伤愈合反应, 是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段。近年研究发现, NADPH氧化酶在肝纤维化发病中起关键作用, NADPH氧化酶通过产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)调控HSC的激活及细胞内信号转导, 被认为是防治纤维化疾病的重要新靶点。

余珊珊, 朱萱, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

余珊珊, 主要从事肝纤维化的相关研究。

作者贡献分布: 本文综述由余珊珊完成; 朱萱审校。

通讯作者: 朱萱, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科。jyyfy@163.com
电话: 0791-8692505

收稿日期: 2014-03-24 修回日期: 2014-05-19

接受日期: 2014-05-29 在线出版日期: 2014-07-08

Role of NADPH oxidase family members in promoting liver fibrosis

Shan-Shan Yu, Xuan Zhu

Shan-Shan Yu, Xuan Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Xuan Zhu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jyyfy@163.com

Received: 2014-03-24 Revised: 2014-05-19

Accepted: 2014-05-29 Published online: 2014-07-08

Abstract

Liver fibrosis is one of hepatic wound-repair responses to a variety of chronic liver injuries, which is characterized by excessive deposition of extracellular matrix. Increasing evidence indicates that nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and oxidative stress caused by reactive oxygen species play a key role in liver fibrosis. NADPH oxidase is a multi-subunit complex. In the liver, both phagocytic and non-phagocytic NADPH oxidases are functionally expressed. They have a significant fibrogenic effect on the hepatic stellate cells, the main cell type causing liver fibrosis. In this paper, we review the recent advances in understanding the role of the NADPH oxidase family in the occurrence and development of liver fibrosis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; Liver fibrosis; Reactive oxygen

species; Hepatic stellate cells; NOX1; NOX4; NOX2

Yu SS, Zhu X. Role of NADPH oxidase family members in promoting liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2710-2715 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2710.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2710>

摘要

肝纤维化是由肝脏在各种慢性肝损伤条件下的损伤修复反应造成, 以细胞外基质过度沉积为主要特征。许多证据表明NADPH氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX)及其产生的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)引起的氧化应激在肝纤维化中起关键作用。NOX是一个多亚基复合体, 在肝脏中, 吞噬细胞型和非吞噬细胞型的NOX均有功能性表达, 并对引起肝纤维化的主要细胞-肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)均具有明显的促纤维化作用。本文就NOX家族在肝纤维化的发生、发展中的作用的近几年研究进展做一综述。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: NADPH氧化酶; 肝纤维化; 活性氧簇; 肝星状细胞; NOX1; NOX4; NOX2

核心提示: NADPH氧化酶家族成员还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NADPH oxidase, NOX)1、NOX2及NOX4分别通过不同的途径直接参与肝脏纤维化的发生、发展, 抑制NOX的表达能够从发病机制阻断肝纤维化的发生, 因此研发使用NOX特异性的抑制剂有望成为肝纤维化治疗有效新方法。

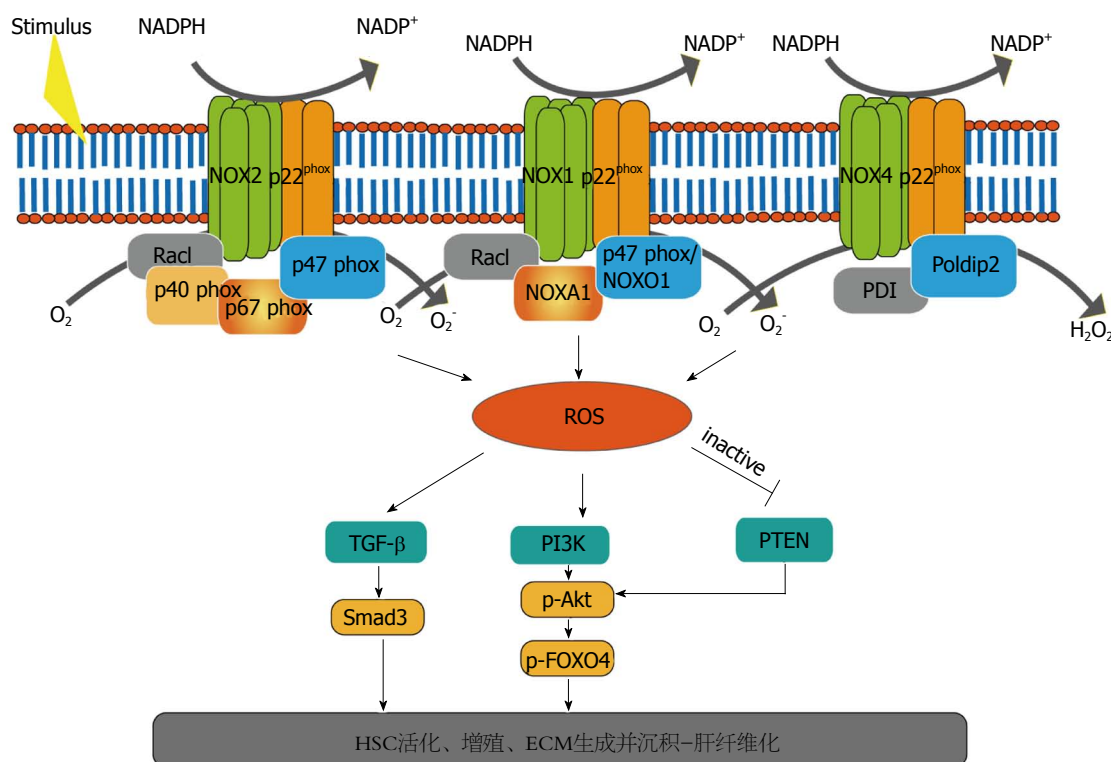
余珊珊, 朱萱. NADPH氧化酶家族成员促肝纤维化的研究进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2710-2715 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2710.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2710>

0 引言

在病理组织修复过程中, 包括肝脏在内的许多

■同行评议者

陈红松, 研究员, 北京人民医院肝病研究所



■**研发前沿**
明确NADPH氧化酶家族在肝纤维化中的重要作用,以NADPH氧化酶及其调控的信号通路为靶点,研发出能够从发病机制上逆转肝纤维化的药物具有可行性,但仍需要我们的进一步探索研究。

图1 NADPH氧化酶家族促肝纤维化作用机制. TGF- β : 转化生长因子 β ; NOX: 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶; HSC: 肝星状细胞。

脏器由于过度的损伤修复反应而发生纤维化^[1]。许多慢性肝脏疾病都可导致肝纤维化,肝纤维化由肝细胞死亡及以I型胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积造成^[2]。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝纤维化反应中主要效应细胞,也是ECM的主要来源^[3]。越来越多的研究显示,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NADPH oxidase, NOX)家族及其产生的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)诱导的氧化应激在肝纤维化中具有关键作用(图1)。

1 ROS

ROS可来源于几种酶系统,包括黄嘌呤氧化酶^[4]、线粒体呼吸链^[5]、脂质过氧化酶^[6]、细胞色素p450酶^[7]和NADPH氧化酶。早期学者们普遍认为ROS的主要生物学功能是对缺血再灌注的器官和组织产生氧化应激损伤^[8],近年来研究发现,低浓度的ROS可以作为细胞对各种生理刺激产生应答的第二信使,在许多信号通路中发挥重要作用,如转录调节、细胞分化、癌变作用及细胞凋亡^[9]等,但是高浓度的ROS是具有细胞毒性的。活化的HSC内表达高水平ROS,但在HSC

的活化过程中细胞内谷胱甘肽浓度也明显升高从而可以抵抗ROS毒性造成的细胞坏死,并且细胞内的抗氧化氢酶也能够发挥抵抗ROS引起的细胞凋亡的作用^[10]。在HSCs内,ROS利用氧化还原敏感蛋白激酶和转录因子来调节各种介质的活化与表达^[11]。ROS诱导HSC向肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)转化^[12],并作为重要介质调控组织转化生长因子 β (tissue growth factor beta, TGF- β)等的促纤维化效应和ECM沉积^[13],在肝脏纤维化中具有重要意义。研究指出NOX是纤维化肝脏中ROS的主要来源^[14]。

2 NADPH氧化酶

NOX是一种多亚基的跨膜酶复合体,最早在吞噬细胞中被发现^[15]。他利用NADPH将电子传递给O₂分子从而产生O₂⁻和H₂O₂^[16]。NOX家族由七种成员组成,NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5及两个双重氧化酶Duox1和Duox2^[17]。在NOX家族中,NOX1、NOX2、NOX3和NOX4在发挥酶活性前都需要与P22^{phox}形成异二聚体,但NOX5、DUOX1和DUOX2的功能与P22^{phox}无关。每种NOX在不同的组织中表达,具有不同亚细胞定位,甚至产生不同的ROS产物^[18]。其中,NOX1、NOX2和NOX5主要产生超氧化物,而

■相关报道

GKT137831是一种特异性NOX1/4双向抑制剂,对还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NADPH oxidase, NOX)的抑制效应优于DPI,能够有效抑制肝脏炎症、纤维化反应相关细胞因子的表达及ROS的产生,对于肝纤维化是一种新的潜在有效治疗药物。

NOX4则主要生成 H_2O_2 ^[19]。Samuele等^[14]使用基因敲除小鼠和野生小鼠骨髓移植等方法研究发现,骨髓来源的和非骨髓来源的肝脏细胞内的NOX都参与了肝脏纤维化的发生, p47^{phox}的缺失能显著降低肝脏纤维化,同时他们指出NOX在肝脏的纤维化中发挥极其重要的作用,但NOX对实验性肝脏脂肪变性及肝实质细胞内的ROS产生并不具有促进作用。Paik等^[20]实验证明NOX家族中的NOX1、NOX2、NOX4及相关亚基p22^{phox}、p40^{phox}、p47^{phox}、p67^{phox}和Rac1在CCl₄及BDL诱导肝纤维化的HSC中的mRNA水平明显高于静息态HSC中的水平。所以,在NOX家族中,不论吞噬型NADPH氧化酶NOX2,还是非吞噬型NADPH氧化酶如NOX1、NOX4等在HSC中均有表达,并在肝脏纤维化的发病中都发挥重要作用^[20,21]。NOX能够调节HSC在血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)、瘦素(leptin)和TGF- β 等各种促纤维化因子作用下细胞的活化^[22-25]。研究表明,NOX亚基与肺脏^[26]、肾脏^[14]和肝脏^[27]等多脏器纤维化的发生均有关,他在各纤维化脏器中的表达均显著增加,因此,NOX是各脏器在受到的纤维化刺激后向纤维化发展过程中的中心介质^[28]。

3 NOX2与肝纤维化

NOX2是在中性粒细胞中发现的经典吞噬型NOX。他由位于细胞膜上的催化亚基gp91^{phox}(又名NOX2)和调节亚基p22^{phox},及位于细胞浆内的其他四个调节亚基p47^{phox}、p40^{phox}、p67^{phox}和小G蛋白Rac组成,其中Rac为NOX2活化所必需成分。一旦受到激动剂刺激,胞浆内的四个亚基即移位至胞膜并与其他两个亚基结合形成复合体,激发NOX酶活性^[29]。研究显示,吞噬型NOX2在纤维化的肝脏中表达明显上升,他与HSCs的活化及纤维化反应的发生密切相关^[20,30]。肝细胞凋亡及HSC活化是肝纤维化的中心事件,Zhan等^[31]研究证明,肝细胞凋亡后HSC对凋亡小体的吞噬作用对纤维化反应,如I型胶原蛋白和TGF- β 的表达上调及NOX相关超氧化物的产生均具有直接促进作用。此后,Jiang等^[30]证明,HSC对肝细胞凋亡小体的吞噬可直接活化HSC,该过程受NOX2(gp91^{phox})的介导,NOX2介导产生的ROS可直接引起HSC内胶原蛋白启动子的活力。Subhadip等^[32]发现长期三氧化二砷接触能诱发肝脏纤维化,肝脏中gp91^{phox}(NOX2)和NOX p67^{phox}

亚基表达增加明显,他就是通过增加NOX产生的氧化应激引起枯否细胞(kuffer cell, KC)激活,随后引起肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)信号机制的表达,从而导致肝细胞凋亡、HSC活化及肝脏纤维化的发生。NOX2基因敲除小鼠经CCl₄注射或胆总管结扎后,肝纤维化程度明显低于正常野生型小鼠^[20,33],这也是NOX2在肝纤维化中具有重要作用的另一间接有力证明。

4 NOX1与肝纤维化

在所有的NOX家族中,NOX1具有与NOX2相似的结构和功能。尽管NOX1也具有p22^{phox}依赖性,但是它利用p47^{phox}同系物NOXO1组合酶复合体, p67^{phox}同系物NOXA1催化酶活性^[34]。纤维化的肝脏中NOX2与NOX1的表达均明显增加,但NOX2在内源性肝脏细胞和骨髓转化肝脏细胞中均能发挥促纤维化作用,而NOX1主要在内源性肝脏细胞,如HSC和肝实质细胞中介导促纤维化作用^[20]。超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)与活化的NOX复合体中的Rac1相互作用能刺激NOX的活力^[35,36]。Tomonori等^[36]研究表明, SOD1G37R突变型HSC可通过增加NOX1的活性,上调NOX4的表达、增加ROS的产生,促进肝脏纤维化, Ang II刺激引起的NOX4水平上调及促纤维化效应依赖于NOX1,而TGF- β 的这些效应则与NOX1无关。用NOX1基因敲除(NOX1KO)小鼠研究NOX1在肝纤维化发展中的作用,发现胆总管结扎术(bile duct ligation, BDL)后,NOX1KO小鼠肝脏内I型胶原蛋白mRNA的表达水平、羟脯氨酸的含量、活化HSC的数量及肝纤维化程度均降低明显^[20,21],同时Cui等^[21]还发现,NOX1来源的ROS可氧化磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶(phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, PI3K/Akt)信号通路负性调控因子-磷酸酶和张力蛋白同系物(protein phosphatase and tension homologue, PTEN)并使其失活,继而促进Akt/FOXO4/p27^{kip1}信号通路的表达以促进HSCs的增殖并加速肝纤维化的发展。除此之外,最新研究发现NOX1还可通过与诱导型一氧化氮合酶相互作用明显上调糖尿病患者肾小球系膜内促纤维化因子TGF- β 及纤连蛋白的表达^[37]。

5 NOX4与肝纤维化

NOX4是NADPH氧化酶的催化性亚基中分布最广泛的一种。NOX4在肝脏中的表达水平增加与

肝脏纤维化密切相关. Jiang等^[38]研究发现BDL诱导肝纤维化的小鼠HSC中, NOX4以TGF- β /Smad3依赖性机制表达上调, 促进HSC的活化, 并且NOX4在死亡配体诱导的肝细胞凋亡中也具有十分关键的作用. 同时, NOX4基因敲除肝细胞对FasL或TNF- α /放线菌素D诱导的细胞凋亡更具有抵抗力, NOX4基因缺失HSC的活化也显著减少. 越来越多的证据表明, NOX氧化还原信号的促纤维化反应受TGF- β 的介导, NOX4通过TGF- β 介导HSC向MFB转化及其形态的维持^[39], TGF- β 1以Smad3依赖形式增加NOX4的mRNA和蛋白的表达以及NOX4来源的ROS水平^[20,38], NOX4是TGF- β /Smad诱导的纤维化反应中的一个重要的下游因子^[40]. 然而NOX4又可以反馈形式调节TGF- β /Smad信号的促纤维化^[41], NOX4在TGF- β 诱导的纤维化反应中具有促进胶原产生等作用^[42], 并且NOX4来源的ROS促进TGF- β 介导的HSC活化^[38]. 在肝细胞株内, 丙型肝炎病毒(hepatitis c virus, HCV)依赖TGF- β 来增加NOX4 mRNA的表达水平, NOX4进而增加ROS的产生, 引发肝脏疾病的发生^[43,44]. Remina等^[45]研究发现多烯磷脂酰胆碱就是通过抑制TGF- β 诱导的NOX4和ROS从而发挥抑制人类HSC活化的功能. 除此之外, Chan等^[42]研究发现, 对心脏中心肌成纤维细胞转染显性阴性NOX4突变体以减弱细胞内NOX4活力或是利用siRNA沉默NOX4基因表达后, TGF- β 介导的H₂O₂的产生和I型胶原的表达存在显著降低.

6 NOX与抗纤维化

肝纤维化是现今全球范围内一个严重影响生命健康的疾病, 而有效的、可利用的治疗措施却非常的少. 有研究表明, 即使是晚期肝纤维化患者或实验性肝纤维化动物模型的肝纤维化都是可以逆转的^[12,46]. 最新研究显示, 欧苄菊能诱导肝星状细胞的凋亡并发挥抗纤维化效应^[47], 紫钾因抑制乙醇和乙醛诱导的HSC活化, 发挥抗氧化及抗纤维化作用^[48]. 但他们仍未能从发病机制上完全逆转纤维化. NOX在肝纤维化中的重要作用为我们提供了新方向. DPI是一种广泛的黄素蛋白抑制剂, 他对各种NOX亚型都具有类似的抑制效应, 但他抑制NOX抗纤维化的同时, 也抑制了体内的黄嘌呤氧化酶和内皮型一氧化氮合酶^[49]. 因此, 理想的NOX抑制剂应该具有NOX特异性. 研究发现, GKT137831是一种NOX1/NOX4高度特异性抑制剂, 对NOX4及NOX1的

抑制效应优于DPI^[35]. 不论预防性还是治疗性使用GKT137831后, 肝脏内ROS的生成、NOX1和NOX4基因水平和纤维化标志物的表达及肝细胞的凋亡均明显降低^[36,38]. 与此同时, 研究显示基因或药理阻滞NOX4对糖尿病肾病中促炎症和促纤维化标志物的表达也具有一定的抑制作用^[9]. 然而也有研究证明, NOX4能够抑制肝脏肿瘤的进展, 对NOX4抑制可能对肝癌细胞有利, 可能导致早期肿瘤形成并增加肿瘤大小^[50].

7 结论

NOX家族与肝脏纤维化的发生、发展密切相关, 在肝纤维化仍缺乏突破性治疗药物的情况下, NOX在肝纤维化中的作用与地位为我们提供了潜在的新治疗靶点. 研制以NOX为作用靶点的高效特异性NOX抑制剂, 阻断其ROS的产生及促纤维化效应, 将为现今肝纤维化的治疗带来重要新方向, 但他仍需要进一步的深入研究.

8 参考文献

- 1 Ghosh AK, Quaggin SE, Vaughan DE. Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches. *Exp Biol Med* (Maywood) 2013; 238: 461-481 [PMID: 23856899 DOI: 10.1177/1535370213489441]
- 2 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218 [PMID: 15690074 DOI: 10.1172/JCI200524282]
- 3 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]
- 4 McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, Harrison DG. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H2290-H2297 [PMID: 12958034]
- 5 Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 1996; 29: 169-202 [PMID: 8870073]
- 6 Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277: 46116-46122 [PMID: 12359714]
- 7 Fleming I, Michaelis UR, Bredenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res* 2001; 88: 44-51 [PMID: 11139472]
- 8 Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Rodés J, Peralta C. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion. *Free Radic Res* 2013; 47: 555-568 [PMID: 23738581 DOI: 10.3109/10715762.2013.811721]
- 9 Genetic Targeting or Pharmacologic Inhibition of

■创新盘点

本文全面专一地介绍NADPH氧化酶家族及其产生的ROS介导的肝星状细胞激活、细胞外基质沉积等致肝纤维化反应, 分别介绍了NOX2、NOX1和NOX4在肝纤维化过程中的突出作用, 同时总结了NOX家族参与的抗肝纤维化的多方研究成果.

■应用要点

本文对近几年来研究的NADPH氧化酶在肝纤维化中作用机制及重要作用做了简要综述,为以NOX为作用靶点治疗肝纤维化这一观点提供了坚实的理论依据,为今后抗纤维化治疗相关研究指明了另一方向。

- NADPH Oxidase Nox4 Provides Renoprotection in Long-Term Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 1237-1254 [PMID: 24511132]
- 10 Dunning S, Ur Rehman A, Tiebosch MH, Hannivoort RA, Haijter FW, Woudenberg J, van den Heuvel FA, Buist-Homan M, Faber KN, Moshage H. Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832: 2027-2034 [PMID: 23871839 DOI: 10.1016/j.bbdis.2013.07.008]
- 11 De Minicis S, Brenner DA. NOX in liver fibrosis. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462: 266-272 [PMID: 17531188 DOI: 10.1016/j.abb.2007.04.016]
- 12 Fink SA, Jacobson IM. Managing patients with hepatitis B-related or hepatitis C-related decompensated cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 285-295 [PMID: 21695841]
- 13 Rhyu DY, Park J, Sharma BR, Ha H. Role of reactive oxygen species in transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix accumulation in renal tubular epithelial cells. *Transplant Proc* 2012; 44: 625-628 [PMID: 22483454 DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.12.054]
- 14 De Minicis S, Seki E, Paik YH, Osterreicher CH, Kodama Y, Kluwe J, Torozzi L, Miyai K, Benedetti A, Schwabe RF, Brenner DA. Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis. *Hepatology* 2010; 52: 1420-1430 [PMID: 20690191 DOI: 10.1002/hep.23804]
- 15 Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 342-344 [PMID: 11795892]
- 16 Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313 [PMID: 17237347]
- 17 Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int* 2011; 79: 944-956 [PMID: 21307839 DOI: 10.1038/ki.2010.516]
- 18 Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1239-1253 [PMID: 19628035 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.016]
- 19 Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, Brandes RP. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem* 2011; 286: 13304-13313 [PMID: 21343298 DOI: 10.1074/jbc.M110.192138]
- 20 Paik YH, Iwaisako K, Seki E, Inokuchi S, Schnabl B, Osterreicher CH, Kisseleva T, Brenner DA. The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91(phox) mediate hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2011; 53: 1730-1741 [PMID: 21384410 DOI: 10.1002/hep.24281]
- 21 Cui W, Matsuno K, Iwata K, Ibi M, Matsumoto M, Zhang J, Zhu K, Katsuyama M, Torok NJ, Yabe-Nishimura C. NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) oxidase promotes proliferation of stellate cells and aggravates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Hepatology* 2011; 54: 949-958 [PMID: 21618578 DOI: 10.1002/hep.24465]
- 22 Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383-1394 [PMID: 14597764]
- 23 De Minicis S, Seki E, Oesterreicher C, Schnabl B, Schwabe RF, Brenner DA. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase mediates fibrotic and inflammatory effects of leptin on hepatic stellate cells. *Hepatology* 2008; 48: 2016-2026 [PMID: 19025999 DOI: 10.1002/hep.22560]
- 24 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281 [PMID: 15915457]
- 25 Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, Pennathur S, Martinez FJ, Thannickal VJ. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med* 2009; 15: 1077-1081 [PMID: 19701206 DOI: 10.1038/nm.2005]
- 26 Amara N, Goven D, Prost F, Muloway R, Crestani B, Boczkowski J. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGFbeta1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts. *Thorax* 2010; 65: 733-738 [PMID: 20685750 DOI: 10.1136/thx.2009.113456]
- 27 Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Domínguez M, Moreno M, Fornis X, Bruguera M, Arroyo V, Brenner DA, Ginès P. Effects of losartan on hepatic expression of nonphagocytic NADPH oxidase and fibrogenic genes in patients with chronic hepatitis C. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G726-G734 [PMID: 19628656 DOI: 10.1152/ajpgi.00162.2009]
- 28 Mehal WZ, Iredale J, Friedman SL. Scraping fibrosis: expressway to the core of fibrosis. *Nat Med* 2011; 17: 552-553 [PMID: 21546973 DOI: 10.1038/nm0511-552]
- 29 Leto TL, Morand S, Hurt D, Ueyama T. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2607-2619 [PMID: 19438290 DOI: 10.1089/ARS.2009.2637]
- 30 Jiang JX, Venugopal S, Serizawa N, Chen X, Scott F, Li Y, Adamson R, Devaraj S, Shah V, Gershwin ME, Friedman SL, Török NJ. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 plays a key role in stellate cell activation and liver fibrogenesis in vivo. *Gastroenterology* 2010; 139: 1375-1384 [PMID: 20685364 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.05.074]
- 31 Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, Torok NJ. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology* 2006; 43: 435-443 [PMID: 16496318]
- 32 Ghatak S, Biswas A, Dhali GK, Chowdhury A, Boyer JL, Santra A. Oxidative stress and hepatic stellate cell activation are key events in arsenic induced liver fibrosis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 251: 59-69 [PMID: 21134390 DOI: 10.1016/j.taap.2010.11.016]
- 33 Aram G, Potter JJ, Liu X, Wang L, Torbenson MS, Mezey E. Deficiency of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase en-

- hances hepatocellular injury but attenuates fibrosis after chronic carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 2009; 49: 911-919 [PMID: 19072832 DOI: 10.1002/hep.22708]
- 34 Bánfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* 2003; 278: 3510-3513 [PMID: 12473664]
- 35 Harraz MM, Marden JJ, Zhou W, Zhang Y, Williams A, Sharov VS, Nelson K, Luo M, Paulson H, Schöneich C, Engelhardt JF. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest* 2008; 118: 659-670 [PMID: 18219391 DOI: 10.1172/JCI34060]
- 36 Aoyama T, Paik YH, Watanabe S, Laleu B, Gaggini F, Fioraso-Cartier L, Molango S, Heitz F, Merlot C, Szyndralewicz C, Page P, Brenner DA. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology* 2012; 56: 2316-2327 [PMID: 22806357 DOI: 10.1002/hep.25938]
- 37 Gao L, Huang W, Li J. NOX1 abet mesangial fibrogenesis via iNOS induction in diabetes. *Mol Cell Biochem* 2013; 382: 185-191 [PMID: 23801050 DOI: 10.1007/s11010-013-1733-4]
- 38 Jiang JX, Chen X, Serizawa N, Szyndralewicz C, Page P, Schröder K, Brandes RP, Devaraj S, Török NJ. Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo. *Free Radic Biol Med* 2012; 53: 289-296 [PMID: 22618020 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.007]
- 39 Sancho P, Mainez J, Crosas-Molist E, Roncero C, Fernández-Rodríguez CM, Pinedo F, Huber H, Eferl R, Mikulits W, Fabregat I. NADPH oxidase NOX4 mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development. *PLoS One* 2012; 7: e45285 [PMID: 23049784 DOI: 10.1371/journal.pone.0045285]
- 40 Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal* 2013; 25: 264-268 [PMID: 23063463 DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.10.003]
- 41 Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses. *Redox Biol* 2014; 2: 267-272 [PMID: 24494202]
- 42 Chan EC, Peshavariya HM, Liu GS, Jiang F, Lim SY, Dusting GJ. Nox4 modulates collagen production stimulated by transforming growth factor β 1 in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430: 918-925 [PMID: 23261430 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.058]
- 43 Boudreau HE, Emerson SU, Korzeniowska A, Jendrysik MA, Leto TL. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *J Virol* 2009; 83: 12934-12946 [PMID: 19812163 DOI: 10.1128/JVI.01059-09]
- 44 de Mochel NS, Seronello S, Wang SH, Ito C, Zheng JX, Liang TJ, Lambeth JD, Choi J. Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010; 52: 47-59 [PMID: 20578128 DOI: 10.1002/hep.23671]
- 45 Ikeda R, Ishii K, Hoshikawa Y, Azumi J, Arakaki Y, Yasui T, Matsuura S, Matsumi Y, Kono Y, Mizuta Y, Kurimasa A, Hisatome I, Friedman SL, Kawasaki H, Shiota G. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 induced by transforming growth factor β 1 are the therapeutic targets of polyenylphosphatidylcholine in the suppression of human hepatic stellate cell activation. *Inflamm Res* 2011; 60: 597-604 [PMID: 21318733 DOI: 10.1007/s00011-011-0309-6]
- 46 Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies. *Hepatology* 2009; 50: 1294-1306 [PMID: 19711424 DOI: 10.1002/hep.23123]
- 47 Kim IH, Kim SW, Kim SH, Lee SO, Lee ST, Kim DG, Lee MJ, Park WH. Parthenolide-induced apoptosis of hepatic stellate cells and anti-fibrotic effects in an in vivo rat model. *Exp Mol Med* 2012; 44: 448-456 [PMID: 22581380 DOI: 10.3858/emmm.2012.44.7.051]
- 48 Szuster-Ciesielska A, Mizerska-Dudka M, Daniluk J, Kandefer-Szerszeń M. Butein inhibits ethanol-induced activation of liver stellate cells through TGF- β , NF κ B, p38, and JNK signaling pathways and inhibition of oxidative stress. *J Gastroenterol* 2013; 48: 222-237 [PMID: 22722906 DOI: 10.1007/s00535-012-0619-7]
- 49 Wind S, Beuerlein K, Eucker T, Müller H, Scheurer P, Armitage ME, Ho H, Schmidt HH, Winkler K. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *Br J Pharmacol* 2010; 161: 885-898 [PMID: 20860666 DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00920.x]
- 50 Crosas-Molist E, Bertran E, Sancho P, López-Luque J, Fernando J, Sánchez A, Fernández M, Navarro E, Fabregat I. The NADPH oxidase NOX4 inhibits hepatocyte proliferation and liver cancer progression. *Free Radic Biol Med* 2014; 69: 338-347 [PMID: 24509161 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.040]

同行评价

本文就近几年学界关注的问题, 引用近几年的文献, 简明扼要地对NADPH氧化酶家族对于肝纤维化的影响进行了综述, 具有一定指导意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



消化外科手术的内镜化途径: 磁吻合联合内镜

严小鹏, 刘雯雁, 李涤尘, 吕毅

■背景资料

磁吻合(magnamosis)也称磁压迫吻合(magnetic compression anastomosis, MCA)或磁压迫技术(magnetic compression technique, MCT)是指借助磁体间的吸力来实现空腔脏器吻合重建的方法。磁吻合与内镜技术结合可使一些传统的消化外科手术在内镜下即可完成, 这将对这些疾病的治疗带来里程碑式的意义。

严小鹏, 刘雯雁, 吕毅, 西安交通大学第一附属医院肝胆外科 陕西省西安市 710061

严小鹏, 刘雯雁, 吕毅, 西安交通大学先进外科技术与工程研究所 陕西省西安市 710061

李涤尘, 西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室 陕西省西安市 710049

严小鹏, 在读博士, 主要从事肝移植、门脉高压症、磁外科的研究。

卫生部部属(管)医院临床学科重点基金资助项目, No. 2010105

中央高校基本科研业务费专项基金资助项目, No. XKJC2013003

国家自然科学基金科学仪器专项基金资助项目, No. 81127005

作者贡献分布: 本文综述由严小鹏与刘雯雁完成; 严小鹏与刘雯雁对本文所做贡献相等; 李涤尘与吕毅审校。

通讯作者: 吕毅, 教授, 主任医师, 710061, 陕西省西安市雁塔西路277号, 西安交通大学第一附属医院肝胆外科。luyi169@126.com
电话: 029-82657541

收稿日期: 2014-03-24 修回日期: 2014-04-22

接受日期: 2014-05-06 在线出版日期: 2014-07-08

Magnamosis combined with endoscopy: A new endoscopic technique in digestive surgery

Xiao-Peng Yan, Wen-Yan Liu, Di-Chen Li, Yi Lv

Xiao-Peng Yan, Wen-Yan Liu, Yi Lv, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Xiao-Peng Yan, Wen-Yan Liu, Yi Lv, Research Institution of Advanced Surgical Technology and Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Di-Chen Li, State Key Laboratory of Mechanical System Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi Province, China

Supported by: the Key Foundation Project of Clinical Discipline, Affiliated to the Ministry of Health, No. 2010105; Special Fund of Basic Research Project to Central Universities, No. XKJC2013003; Scientific Instruments Special Fund of National Natural Science Foundation of China, No. 81127005

Correspondence to: Yi Lv, Professor, Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, 277 Yanta West Road, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. luyi169@126.com
Received: 2014-03-24 Revised: 2014-04-22

Accepted: 2014-05-06 Published online: 2014-07-08

Abstract

Conventional hand-sewn technique is the basic method for anastomosis in the gastrointestinal tract. However, with the rapid development of minimally invasive surgery and the spread of

fast track surgery, hand-sewn technique cannot satisfy the requirements of modern surgery. The common goal that the majority of surgeons seek to achieve has changed: to reduce surgical invasion and operative time as minimally as possible, on the premise that therapeutic and anastomotic effects can be guaranteed. Therefore, after more than 30 years of exploration and development, magnamosis as a novel anastomosis technique shows its significant superiority in anastomosis or recanalization in the gastrointestinal tract. Furthermore, the combination of magnamosis and endoscopy may transform part of the surgical procedures into endoscopic procedures. This review aims to elucidate the application and future development of magnamosis combined with endoscopy in anastomosis or recanalization in the gastrointestinal tract.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Digestive system; Surgical intervention; Endoscopy; Magnamosis

Yan XP, Liu WY, Li DC, Lv Y. Magnamosis combined with endoscopy: A new endoscopic technique in digestive surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2716-2721
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2716.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2716>

摘要

传统手工缝线吻合作为消化系吻合重建最基本的方法可以用于任何部位的吻合。但随着微创外科的发展和快速康复外科理念的深入, 手工缝线吻合已不能满足迅速发展的现代外科的需要。在满足治疗效果和保证吻合质量的前提下, 尽可能地减小创伤和缩短手术时间已成为所有外科医生所追求的共同目标。磁吻合作为一种新的吻合方法经历了三十多年的探索和发展后, 在消化系吻合重建中显示出了极大的优越性, 磁吻合与内镜技术结合可将部分外科手术变成内镜操作。本文就磁吻合联合内镜在消化系吻合重建中的应用及未来发展作一综述。

■同行评议者

姜相君, 主任医师, 青岛市市立医院消化科

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 消化系统; 外科手术; 内镜; 磁吻合

核心提示: 磁吻合(magnamosis)作为研究热点, 国外已有大量报道, 但国内仅有西安交大一附院吕毅团队进行了深入研究, 而大部分学者持观望态度, 对磁吻合原理、临床应用范围、吻合效果和安全性认识不足. 本文通过综述国内外相关文献对上述问题进行了探讨.

严小鹏, 刘雯雁, 李涤尘, 吕毅. 消化外科手术的内镜化途径: 磁吻合联合内镜. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2716-2721
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2716.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2716>

0 引言

磁吻合(magnamosis)由Jamshidi^[1]于2009年首先提出, 但其渊源可追溯到20世纪70年代末. 1978年日本学者Obora^[2]创新性地用磁环进行了微血管的无缝线吻合实验并获得成功. 之后, 大量学者用磁环或磁柱来进行空腔器官的吻合重建, 并逐步形成了以磁压迫吻合(magnetic compression anastomosis, MCA)^[3,4]和磁压迫技术(magnetic compression technique, MCT)^[5-8]为主流的提法. 目前, 磁吻合可用来实现消化系管腔、泌尿系管腔和血管的吻合重建, 应用该方法操作简单、吻合速度快、并发症少, 安全性和效果可与传统手工缝线吻合和机械吻合器吻合效果相媲美甚至更好. 磁吻合借助于特殊形式的磁场力从根本上改变了传统的吻合模式, 将磁吻合与内镜技术结合可将消化系统一些原本需要外科手术处理的疾病在内镜操作下就能实现. 本文就磁吻合与内镜技术结合治疗一些消化系统疾病的基础和临床研究报道作一综述.

1 磁吻合的发展历史

1978年Obora等^[2]利用磁体间的吸力设计出了用于血管吻合的无缝线磁吻合器, 并进行了犬和大鼠微血管的端端吻合实验, 平均吻合时间可在8 min内完成, 吻合方法简单、短期血管通畅性良好, 这是有关磁吻合最早的实验研究. 同年, 俄罗斯学者Kanshin^[9]将磁压迫技术用于消化系吻合, 他利用磁体进行了犬的胃十二指肠吻合和空肠侧侧吻合的吻合重建实验, 显示出了良好的吻合效果. 1980年美国学者Jansen^[10]利用聚酯涂层的磁环进行了小肠吻合的动物实验, 结果显示吻合口通畅, 黏膜下层愈合良好. 次年, Jansen等^[11]将此磁

环用于临床, 对21例患者进行了结直肠吻合, 最终2例患者出现了肠漏, 术后磁环排出体外平均时间为9 d, 随访1年未发现吻合口狭窄等并发症. 1992年俄罗斯Stepanov^[12]利用磁吻合器对46例肠漏的儿童进行了旁路吻合, 使儿童肠漏的死亡率由当时的31%降至13%. 1993年俄罗斯Saveliev^[13]报道了内镜下利用磁压迫技术进行胆囊-胃吻合、胆囊-空肠吻合和肠肠吻合的动物实验, 以期用于梗阻性黄疸的治疗. 90年代末, 磁吻合的研究进入到飞速发展阶段, 其中以日本Yamanouchi团队的研究成果最为突出. 经过磁性压迫吻合模式在空腔脏器的成功尝试, 于2002年Yamanouchi将钐-钴稀土永磁材料作为吻合器主体进行压迫吻合的方式正式命名为“山内法(Yamanouchi's method)”^[14]. 2003年美国Ventrica公司推出了产品化的血管侧侧磁性吻合装置, 并称为MVP系统(magnetic vascular positioner system)^[15], 该系统被用于冠状动脉搭桥手术, 取得了良好的临床效果^[16-22]. 国内吕毅教授利用MCT进行了犬门腔分流的实验研究, 虽然尚未进入临床试验, 但这也为MCT的应用研究拓展了思路^[8]. 2013年, “The New England Journal of Medicine”报道了食管下段扩约肌磁性增强元件用于治疗胃食管返流病的临床研究, 其研究结果令人鼓舞^[23], 虽然此研究并未涉及吻合的过程, 但我们认为这仍然可归结于MCT, 这是对MCT更为灵活巧妙的应用范例.

2 磁吻合的原理

在应用磁吻合时, 通常将两个磁体分别置于吻合口两侧, 这两个磁体的形状、尺寸可以完全一样, 也可以不一样. 习惯上将体积较大的或者在压迫吻合过程中位置相对变化较小的磁体称之为母磁体(parent magnet, PM), 而体积较小或位置变化相对较大的磁体称为子磁体(daughter magnet, DM), 当然这样的叫法并非绝对的. 有时也把带有固定牵拉装置的磁体称之为母磁体. 在吻合时, 子母磁体压迫吻合部位组织, 使其发生缺血-坏死-脱落的病理变化过程, 而压榨旁组织则黏连-修复-愈合, 最终完成管腔的吻合重建. 磁吻合实现空腔脏器吻合的原理属于压迫吻合的范畴, 但有别于手工缝线吻合和钉式吻合. 传统的手工缝线和钉式吻合仅需要保证空腔脏器吻合部位良好的接触和连续性即可实现管腔吻合端黏连-修复-愈合, 而压迫吻合则要完成上述两种病理变化过程.

■ 研发前沿

本文通过对国内外磁吻合在消化道吻合中应用的文献进行综述, 来探讨磁吻合的概念、吻合原理, 介绍磁吻合的相关研究现状及临床应用实例, 提出磁吻合研究中的难点和瓶颈, 为磁吻合的研究和临床应用提供重要的理论依据.

■相关报道

国外磁吻合联合内镜最早由Yamanouchi提出并在临床上获得成功,内镜下胃肠磁吻合则由Chopita最先用于临床,Takamizawa首先报道了磁吻合治疗食管闭锁的成功病例。国内西安交大一附院吕毅于2010年率先开展了磁吻合联合内镜进行肝移植术后狭窄胆道的疏通。

3 磁吻合的特点

磁吻合与传统吻合的区别主要体现在压迫力的产生和压迫过程中压迫力的变化两个方面。一方面,磁吻合中压迫力的产生依赖的是特殊的“非接触性”磁场力,也就是说子母磁体并不需要直接接触就能完成组织间的压迫,而传统吻合时吻合口两端的装置(缝线或吻合器)必须接触才能实现压迫,这也正是此技术能用于一些复杂病例解决特殊外科难题的根本所在。另一方面,一般的机械压迫吻合的压迫力在手术操作完之后就为恒定的力,而磁压迫吻合的压迫力随着受压组织的缺血、组织变薄、组织坏死的变化,子母磁体间的距离在减小,磁场力在增加,因而压迫力是逐步增加的趋势。再者,磁吻合时被压迫组织承受的是一个平面的压力,这有别于手工缝线吻合或钉式吻合时组织受到的纵向牵拉切割力,这使磁吻合能够在组织炎症水肿状态下实现一期吻合^[24-26]。

4 磁吻合联合内镜在消化系统疾病中的应用

4.1 内镜下胆道梗阻的处理 山内法(Yamanouchi's method)将磁压迫技术与内镜技术结合起来通过微创手段处理复杂的胆道梗阻获得成功。2001年,Takao等^[3]利用MCT联合内镜治疗一位胆总管完全梗阻的患者,该患者因胃癌行胃次全切除,术后由于胆管炎造成胆总管完全梗阻,Takao通过内镜在Billroth2术式的输入袢放置一磁体,另一磁体经皮经肝穿刺在导丝引导下置入胆总管,两个磁体相吸32 d后两个磁体贯穿胆总管和肠管形成胆肠吻合。该病例开创了MCT联合内镜处理胆道狭窄或闭塞的先例。2005年Muraoka等^[27]在内镜下应用MCT成功治疗1例活体供肝肝移植术后胆道狭窄的患者,取得了良好的效果。此后,内镜联合MCT处理各种原因引起的胆道狭窄的大量病例被报道^[28-37]。国内西安交通大学第一附属医院磁外科研究团队将MCT与内镜技术结合于2011年进行了我国首例狭窄胆道磁压榨疏通获得成功。

4.2 内镜下胃肠吻合 Cope等^[38,39]在1995年进行了内镜下磁压迫胃肠吻合的动物实验,吻合取得成功并初步探索出手术路径。随后Cope又通过动物实验观察了在磁压迫胃肠吻合口建立之后置入Z型支架(Z stent)和YO-YO支架的长期通畅性^[40,41]。在此基础上,Chopita等^[42]于2005年进行了15例肿瘤引起的恶性十二指肠梗阻患者通过内镜下磁压榨技术建立胃肠吻合口后置入

YO-YO支架的报道,结果显示成功率为88.66%,平均生存期为5.23 mo,有4例患者出现小的并发症。2010年Van Hoof等^[43]报道了内镜下磁压榨技术联合YO-YO支架治疗胃出口恶性梗阻前瞻性多中心研究结果,在该项结果中由于支架导致了严重的并发症和死亡率。因此,有研究^[44-49]认为该项技术暂时不推荐在临床使用,应该继续探索出更加安全可行的技术方法。此后,又有不少学者进行了内镜联合腹腔镜下的胃肠、肠肠磁吻合的相关动物实验研究。

4.3 食管闭锁的内镜下治疗 2007年Takamizawa等^[50]为1例食管吻合术后狭窄的患者用磁压迫技术进行了再疏通,取得了满意的效果。2009年Zaritzky等^[51]用磁压迫技术治疗5位食管闭锁的患儿,除1例需要外科手术治疗外其余4例均获得了成功。MCT联合内镜处理先天性食管闭锁的重大意义在于将以往必须由外科手术治疗的疾病通过内镜处理得以治愈,大大减小了对患者的创伤。

4.4 炎症感染状态下的消化系一期吻合 磁压迫技术以其特殊的吻合原理,还可以用于特殊病理状态(严重感染)下的消化系的一期吻合重建。2008年吕毅团队利用带有子母磁体的磁性胆肠吻合支架进行犬胆道损伤的一期吻合,首次探索了磁压迫技术在炎症感染状态下的应用效果^[24]。2011年又进行了犬小肠漏的一期修补^[25]。这两个动物实验研究结果表明,在炎症感染存在的状态下磁压迫技术仍然能够实现消化系吻合,并且较手工缝线吻合成功率大大提高。这是因为磁吻合时被压迫组织承受的是一个平面的压力,替代了手工缝线吻合或钉式吻合时组织受到的纵向牵拉切割力。这一点提示我们,磁吻合有可能改变以前的炎症感染状态下不能实现一期修复的传统治疗观念,具有极其重大的意义。

5 磁吻合研究亟待解决的问题

尽管大量学者进行了消化系磁吻合的实验和临床研究,但就目前而言,还有许多基础问题亟待解决:(1)胃肠道吻合重建中,子母磁体间吸力(吻合组织间的压迫力)究竟在何范围为安全。磁体间的吸力与所选择的永磁材料、磁体的形状尺寸设计、机械加工程序、充磁条件和参数都有密切关系,就目前相关文献中使用的磁体在以上几方面都不同,因而磁体的吸力也是不同的,这就需要进行一些基础研究,探索出胃肠道磁压迫吻合中子母磁体间的最适吸力;(2)子母

磁体的形状设计. 在研究中, 大部分研究者们所设计的磁体形状为圆柱形和圆环形, 也有学者将其设计成阶梯状的环形^[50]和斜面环形^[51], 究竟哪种形状设计最适合用于胃肠道吻合还需要大量实验进行论证. 在消化系吻合重建时, 吻合口一般要求比较大, 吻合用的磁体截面积也要随之增加, 而这又恰恰不利于内镜操作. 为解决该矛盾, 2011年Cho等^[47]设计了SAMSEN(smart self-assembling magnets for endoscopy)组合式磁体, 并在猪上进行了验证性试验取得成功. 该装置巧妙地利用磁铁间的吸力和斥力, 在置入过程中磁体被压缩成条状, 到达预定位置释放后磁体自动变成四边形, 这样可以扩大吻合口. 这种新颖的设计为以后磁吻合器的设计开辟了一个新的思路, 有极大的借鉴价值; (3)磁压迫技术辅助器械的设计. 为避免手术中磁体与铁磁性手术器械相吸而干扰操作, 需要有一套钛合金手术器械(包括开腹下的常规手术器械和腹腔镜下的手术器械). 此外, 为方便操作, 还应有帮助吻合用的支撑管、推拉杆或释放装置等; (4)多个磁体间的磁力屏蔽. 在同一机体内当需要建立多个吻合时, 距离较近的吻合口部位的磁体会相互吸引, 造成肠管扭曲, 甚至还会压迫周围肠管或重要组织, 因此如何有效避免相邻磁体非计划性相吸也是需要解决的问题. 就作者所在团队多年的研究而言, 我们认为有两种方法可以解决: (1)通过支架进行支撑隔离; (2)在磁体非吸合面包裹磁屏蔽壳, 将非吸合面的磁力线引导至吸合面, 减少非吸合面的磁力线泄漏. 这两种方法各有利弊, 应根据吻合部位的实际情况来看决定.

6 结论

磁吻合联合内镜技术可将原本需要外科手术处理的疾病变成了内镜下可治疗的疾病, 这对于减轻患者创伤和痛苦, 深化快速康复理念有着重大影响. 纵观这些研究可以发现, 大部分仍停留在动物实验验证阶段, 尚未在临床上大规模开展. 因此, 磁吻合的安全性和可靠性仍有待多中心大样本的随机对照实验来验证. 另外, 磁吻合联合内镜的标准化操作规范和适应症有待建立统一标准, 以此才能充分发挥磁吻合简便、高效、安全、微创的特点, 推进医学的发展.

7 参考文献

- Jamshidi R, Stephenson JT, Clay JG, Pichakron KO, Harrison MR. Magnamosis: magnetic compression anastomosis with comparison to suture and staple techniques. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 222-228 [PMID: 19159747 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2008.10.044]
- Obora Y, Tamaki N, Matsumoto S. Nonsuture microvascular anastomosis using magnet rings: preliminary report. *Surg Neurol* 1978; 9: 117-120 [PMID: 625696]
- Takao S, Matsuo Y, Shinchi H, Nakajima S, Aikou T, Iseji T, Yamanouchi E. Magnetic compression anastomosis for benign obstruction of the common bile duct. *Endoscopy* 2001; 33: 988-990 [PMID: 11668410 DOI: 10.1055/s-2001-17923]
- Fan C, Yan XP, Liu SQ, Wang CB, Li JH, Yu L, Wu Z, Lv Y. Roux-en-Y choledochojejunostomy using novel magnetic compressive anastomats in canine model of obstructive jaundice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012; 11: 81-88 [PMID: 22251474 DOI: 10.1016/S1499-3872(11)60129-X]
- Akita H, Hikita H, Yamanouchi E, Marubashi S, Nagano H, Umeshita K, Dono K, Tsutsui S, Hayashi N, Monden M. Use of a metallic-wall stent in the magnet compression anastomosis technique for bile duct obstruction after liver transplantation. *Liver Transpl* 2008; 14: 118-120 [PMID: 18161766 DOI: 10.1002/lt.21273]
- Marubashi S, Nagano H, Yamanouchi E, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Maeda N, Tomoda K, Hikita H, Tsutsui S, Doki Y, Mori M. Salvage cystic duct anastomosis using a magnetic compression technique for incomplete bile duct reconstruction in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2010; 16: 33-37 [PMID: 20035518 DOI: 10.1002/lt.21934]
- Yan XP, Ma J, Li JH, Dong DH, Wang HH, Liu SQ, Wan Z, Wang SP, Ma F, Lv Y. Using novel magnetic compressive portacaval shunt in dog: an experimental study. *HPB* 2013; 15(Suppl. 2): 184
- Yan X, Fan C, Ma J, Li J, Dong D, Wang H, Ma F, Zheng X, Lv Y. Portacaval shunt established in six dogs using magnetic compression technique. *PLoS One* 2013; 8: e76873 [PMID: 24098809 DOI: 10.1371/journal.pone.0076873]
- Kanshin NN, Permiakov NK, Dzhagoniia RA, Nikulin BI, Kuznetsov AA. [Sutureless anastomoses in gastrointestinal surgery with and without steady magnetic field (experimental study)]. *Arkh Patol* 1978; 40: 56-61 [PMID: 365148]
- Jansen A, Keeman JN, Davies GA, Klopper PJ. Early experiences with magnetic rings in resection of the distal colon. *Neth J Surg* 1980; 32: 20-27 [PMID: 7366876]
- Jansen A, Brummelkamp WH, Davies GA, Klopper PJ, Keeman JN. Clinical applications of magnetic rings in colorectal anastomosis. *Surg Gynecol Obstet* 1981; 153: 537-545 [PMID: 7280943]
- Stepanov EA, Vasil'ev GS, Nikolaev VV. [The treatment of intestinal fistulae in children by applying a by-pass anastomosis using magnetic devices]. *Khirurgiia (Mosk)* 1992; (11-12): 93-95 [PMID: 1294807]
- Saveliev VS, Avaliani MV, Bashirov AD. Endoscopic magnetic cholecystodigestive anastomoses: personal technique for palliative treatment of distal bile duct obstruction. *J Laparoendosc Surg* 1993; 3: 99-112 [PMID: 7686058]
- Yamanouchi E, Kumano R, Kobayashi K, Hattori T, Matsumoto J, Oonishi T, Hayakawa M, Tani

■创新盘点

本文在回顾大量磁吻合文献的基础上, 全面综述了磁吻合联合内镜技术将某些消化外科手术变成内镜下治疗的实验研究和临床应用, 并结合作者自己多年的磁吻合研究经验和思考, 提出了当下磁外科发展面临的难点和亟需解决瓶颈.

■应用要点

本文通过对磁吻合联合内镜技术的大量文献的综述, 不仅为磁吻合实验研究提出了新的研究思路而且也为磁吻合的临床应用和推广提出了理论支持。

- I. [Treatment for bowel or biliary obstruction by magnetic compression anastomosis development of Yamanouchi's method and its clinical evaluation]. *J Nippon Med Sch* 2002; 69: 471-475 [PMID: 12382010 DOI: 10.1272/jnms.69.471]
- 15 Falk V, Walther T, Stein H, Jacobs S, Walther C, Rastan A, Wimmer-Greinecker G, Mohr FW. Facilitated endoscopic beating heart coronary artery bypass grafting using a magnetic coupling device. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 1575-1579 [PMID: 14666035 DOI: 10.1016/S0022-5223(03)00793-1]
- 16 Klima U, Falk V, Marinka M, Bargenda S, Badack S, Moritz A, Mohr F, Haverich A, Wimmer-Greinecker G. Magnetic vascular coupling for distal anastomosis in coronary artery bypass grafting: a multicenter trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126: 1568-1574 [PMID: 14666034 DOI: 10.1016/S0022-5223(03)01314-X]
- 17 Klima, Macvaugh Iii, Marinka, Kirschner, Haverich. Clinical experience with the Ventrica distal anastomotic device in coronary surgery. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2004; 13: 26-31 [PMID: 16754121 DOI: 10.1080/13645700410024805]
- 18 Casselman FP, Meco M, Dom H, Foubert L, Van Praet F, Vanermen H. Multivessel distal sutureless off-pump coronary artery bypass grafting procedure using magnetic connectors. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: e38-e40 [PMID: 15276590 DOI: 10.1016/j.athoracsur.2003.07.050]
- 19 Falk V, Walther T, Jacobs S, Wolf RK, Mohr FW. Facilitated MIDCAB using a magnetic coupling device. *Ann Thorac Surg* 2005; 79: 691-693 [PMID: 15680865 DOI: 10.1016/S0003-4975(03)01403-6]
- 20 Vicol C, Eifert S, Oberhoffer M, Boekstegers P, Knez A, Christ F, Reichart B. Early clinical results with a magnetic connector for distal coronary artery anastomoses. *Ann Thorac Surg* 2005; 79: 1738-1742; discussion 1738-1742 [PMID: 15854967 DOI: 10.1016/j.athoracsur.2004.04.096]
- 21 Vicol C, Eifert S, Oberhoffer M, Boekstegers P, Reichart B. Mid-term patency after magnetic coupling for distal bypass anastomosis in coronary surgery. *Ann Thorac Surg* 2006; 82: 1452-1456 [PMID: 16996952 DOI: 10.1016/j.athoracsur.2006.04.090]
- 22 Athanasiou T, Ashrafian H, Krasopoulos G, Purkayastha S, Malinowski V, Al-Ruzzeh S, Glenville B, De La Stanbridge R, Casula R. Clamless arterial coronary artery bypass grafting with the use of magnetic coupling devices. *J Card Surg* 2006; 21: 69-74; discussion 75-6 [PMID: 16426353 DOI: 10.1111/j.1540-8191.2006.00172.x]
- 23 Ganz CM, Peters JH, Horgan S, Bemelman WA, Dunst RA, Edmundowicz SA, Lipham JC, Luketich JD, Melvin WS, Oelschlager BK, Schlack-Haerer SC, Smith CD, Smith CC, Dunn D, Taiganides PA. Esophageal sphincter device for gastroesophageal reflux disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 719-727 [PMID: 23425164 DOI: 10.1056/NEJMoa1205544]
- 24 Li J, Lü Y, Qu B, Zhang Z, Liu C, Shi Y, Wang B. Application of a new type of sutureless magnetic biliary-enteric anastomosis stent for one-stage reconstruction of the biliary-enteric continuity after acute bile duct injury: an experimental study. *J Surg Res* 2008; 148: 136-142 [PMID: 18511078 DOI: 10.1016/j.jss.2007.09.014]
- 25 马海军, 王善佩, 樊超, 刘仕琪, 尚亚飞, 严小鹏, 车向明, 吕毅. 应用磁压榨吻合术行肠漏一期修补的实验研究. *中华消化外科杂志* 2011; 10: 64-67
- 26 李建辉, 吕毅, 张智勇, 刘昌, 史源, 王博, 季学闻, 于良, 耿智敏. 急性胆管损伤后应用磁性胆肠吻合支架一期修复胆肠连续性的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2007; 13: 767-770
- 27 Muraoka N, Uematsu H, Yamanouchi E, Kinoshita K, Takeda T, Ihara N, Matsunami H, Itoh H. Yamanouchi magnetic compression anastomosis for bilioenteric anastomotic stricture after living-donor liver transplantation. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 1263-1267 [PMID: 16151070 DOI: 10.1097/01.RVI.0000173280.56442.9E]
- 28 Mimuro A, Tsuchida A, Yamanouchi E, Itoi T, Ozawa T, Ikeda T, Nakamura R, Koyanagi Y, Nakamura K. A novel technique of magnetic compression anastomosis for severe biliary stenosis. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 283-287 [PMID: 12872106 DOI: 10.1067/mge.2003.353]
- 29 Itoi T, Yamanouchi E, Ikeda T, Sofuni A, Kurihara T, Tsuchiya T, Tsuchida A, Kasuya K, Moriyasu F. Magnetic compression anastomosis: a novel technique for canalization of severe hilar bile duct strictures. *Endoscopy* 2005; 37: 1248-1251 [PMID: 16329026 DOI: 10.1055/s-2005-870269]
- 30 Okajima H, Kotera A, Takeichi T, Ueno M, Ishiko T, Hirota M, Asonuma K, Yamauchi E, Inomata Y. Magnet compression anastomosis for bile duct stenosis after duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2005; 11: 473-475 [PMID: 15776404 DOI: 10.1002/lt.20364]
- 31 Matsuno N, Uchiyama M, Nakamura Y, Iwamoto H, Hama K, Ashizawa T, Nagao T, Yamanouchi E. A nonsuture anastomosis using magnetic compression for biliary stricture after living donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 47-49 [PMID: 19453026]
- 32 Avaliani M, Chigogidze N, Nechipai A, Dolgushin B. Magnetic compression biliary-enteric anastomosis for palliation of obstructive jaundice: initial clinical results. *J Vasc Interv Radiol* 2009; 20: 614-623 [PMID: 19393505 DOI: 10.1016/j.jvir.2009.01.019]
- 33 Itoi T, Yamanouchi E, Ikeuchi N, Kasuya K, Iwamoto H, Tsuchida A. Magnetic Compression Duct-to-duct Anastomosis for Biliary Obstruction in a Patient with Living Donor Liver Transplantation. *Gut Liver* 2010; 4 Suppl 1: S96-S98 [PMID: 21103303 DOI: 10.5009/gnl.2010.4.S1.S96]
- 34 Suyama K, Takamori H, Yamanouchi E, Tanaka H, Sakamoto Y, Ikuta Y, Maki Y, Sakurai K, Hirota M, Baba H. Recanalization of obstructed choledochojunostomy using the magnet compression anastomosis technique. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 230-231 [PMID: 20054323 DOI: 10.1038/ajg.2009.473]
- 35 Itoi T, Kasuya K, Sofuni A, Itokawa F, Tsuchiya T, Kurihara T, Ikeuchi N, Takeuchi M, Nagano T, Iwamoto H, Yamanouchi E, Shimazu M, Tsuchida A. Magnetic compression anastomosis for biliary obstruction: review and experience at Tokyo Medical University Hospital. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18: 357-365 [PMID: 21127913 DOI: 10.1007/s00534-010-0350-9]
- 36 Jang SI, Kim JH, Won JY, Lee KH, Kim HW, You JW, Itoi T, Lee D. Magnetic compression anastomosis is useful in biliary anastomotic strictures after living donor liver transplantation. *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 1040-1048 [PMID: 21855872 DOI: 10.1016/j.gie.2011.06.026]

- 37 Oya H, Sato Y, Yamanouchi E, Yamamoto S, Hara Y, Kokai H, Sakamoto T, Miura K, Shioji K, Aoyagi Y, Hatakeyama K. Magnetic compression anastomosis for bile duct stenosis after donor left hepatectomy: a case report. *Transplant Proc* 2012; 44: 806-809 [PMID: 22483501 DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.01.021]
- 38 Cope C. Evaluation of compression cholecystogastric and cholecystojejunal anastomoses in swine after peroral and surgical introduction of magnets. *J Vasc Interv Radiol* 1995; 6: 546-552 [PMID: 7579862 DOI: 10.1016/S1051-0443(95)71132-0]
- 39 Cope C. Creation of compression gastroenterostomy by means of the oral, percutaneous, or surgical introduction of magnets: feasibility study in swine. *J Vasc Interv Radiol* 1995; 6: 539-545 [PMID: 7579861 DOI: 10.1016/S1051-0443(95)71131-9]
- 40 Cope C, Clark TW, Ginsberg G, Habecker P. Stent placement of gastroenteric anastomoses formed by magnetic compression. *J Vasc Interv Radiol* 1999; 10: 1379-1386 [PMID: 10584655 DOI: 10.1016/S1051-0443(99)70248-4]
- 41 Cope C, Ginsberg GG. Long-term patency of experimental magnetic compression gastroenteric anastomoses achieved with covered stents. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 780-784 [PMID: 11375591 DOI: 10.1067/mge.2001.114964]
- 42 Chopita N, Vaillaverde A, Cope C, Bernedo A, Martinez H, Landoni N, Jmelnitzky A, Burgos H. Endoscopic gastroenteric anastomosis using magnets. *Endoscopy* 2005; 37: 313-317 [PMID: 15824939 DOI: 10.1055/s-2005-861358]
- 43 van Hooft JE, Vleggaar FP, Le Moine O, Bizzotto A, Voermans RP, Costamagna G, Devière J, Siersema PD, Fockens P. Endoscopic magnetic gastroenteric anastomosis for palliation of malignant gastric outlet obstruction: a prospective multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2010; 72: 530-535 [PMID: 20656288 DOI: 10.1016/j.gie.2010.05.025]
- 44 Myers C, Yellen B, Evans J, DeMaria E, Pryor A. Using external magnet guidance and endoscopically placed magnets to create suture-free gastro-enteral anastomoses. *Surg Endosc* 2010; 24: 1104-1109 [PMID: 20033734 DOI: 10.1007/s00464-009-0735-5]
- 45 Pichakron KO, Jelin EB, Hirose S, Curran PF, Jamshidi R, Stephenson JT, Fechter R, Strange M, Harrison MR. Magnamosis II: Magnetic compression anastomosis for minimally invasive gastrojejunostomy and jejunojejunostomy. *J Am Coll Surg* 2011; 212: 42-49 [PMID: 21184956 DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2010.09.031]
- 46 Ryou M, Cantillon-Murphy P, Azagury D, Shaikh SN, Ha G, Greenwalt I, Ryan MB, Lang JH, Thompson CC. Smart Self-Assembling MagnetS for Endoscopy (SAMSEN) for transoral endoscopic creation of immediate gastrojejunostomy (with video). *Gastrointest Endosc* 2011; 73: 353-359 [PMID: 21183179 DOI: 10.1016/j.gie.2010.10.024]
- 47 Cho YB, Park JH, Chun HK, Park CM, Kim HC, Yun SH, Lee WY. Multimedia article. Natural orifice transluminal endoscopic surgery applied to sigmoidectomy in survival animal models: using paired magnetic intra-luminal device. *Surg Endosc* 2011; 25: 1319-1324 [PMID: 21046162 DOI: 10.1007/s00464-010-1365-7]
- 48 Gonzales KD, Douglas G, Pichakron KO, Kwiat DA, Gallardo SG, Encinas JL, Hirose S, Harrison MR. Magnamosis III: delivery of a magnetic compression anastomosis device using minimally invasive endoscopic techniques. *J Pediatr Surg* 2012; 47: 1291-1295 [PMID: 22703808 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.03.042]
- 49 Leroy J, Perretta S, Diana M, Wall J, Lindner V, Harrison M, Marescaux J. An original endoluminal magnetic anastomotic device allowing pure NOTES transgastric and transrectal sigmoidectomy in a porcine model: proof of concept. *Surg Innov* 2012; 19: 109-116 [PMID: 22143749 DOI: 10.1177/1553350611429029]
- 50 Takamizawa S, Yamanouchi E, Muraji T, Nishijima E, Satoh S, Tsugawa J. MCRA of an anastomotic stenosis after esophagoesophagostomy for long gap esophageal atresia: a case report. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 769-772 [PMID: 17502180 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2006.12.042]
- 51 Zaritzky M, Ben R, Zylberg GI, Yampolsky B. Magnetic compression anastomosis as a nonsurgical treatment for esophageal atresia. *Pediatr Radiol* 2009; 39: 945-949 [PMID: 19506849 DOI: 10.1007/s00247-009-1305-7]

同行评价

本文对磁吻合联合内镜在消化系吻合重建中的应用做了全面介绍, 为磁吻合的临床应用和推广提供了理论依据, 对外科医生具有重要学习和借鉴意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



金属硫蛋白在消化系肿瘤中的研究进展

孟红恩, 刘忠渊

■背景资料

在我国每年因为肿瘤死亡的病例中有2/3是消化系统肿瘤,除了癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、糖类抗原CA50等之外还有没有其他消化系统肿瘤生物标志物?与多种肿瘤的发生、发展、预后密切相关的金属硫蛋白是否也是一种生物标志物。

孟红恩, 刘忠渊, 新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市830046

孟红恩,在读硕士,主要从事金属硫蛋白分子生物学的研究。

自治区科技支撑计划基金资助项目, No. 201291304

作者贡献分布: 本文综述由孟红恩完成; 刘忠渊审校。

通讯作者: 刘忠渊, 副教授, 830046, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市天山区胜利路14号, 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室。lzy1168@163.com

电话: 0991-8583517

收稿日期: 2014-04-26 修回日期: 2014-05-19

接受日期: 2014-05-29 在线出版日期: 2014-07-08

Metallothioneins and digestive system tumors

Hong-En Meng, Zhong-Yuan Liu

Hong-En Meng, Zhong-Yuan Liu, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: Science and Technology Supporting Project of Xinjiang Autonomous Region, China, No. 201291304

Correspondence to: Zhong-Yuan Liu, Associate Professor, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, 14 Shengli Road, Tianshan District, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. lzy1168@163.com

Received: 2014-04-26 Revised: 2014-05-19

Accepted: 2014-05-29 Published online: 2014-07-08

Abstract

Metallothioneins (MTs) are low-molecular weight, cysteine-rich, intracellular metal-binding proteins involved in diverse functions, such as metal homeostasis and/or detoxification, scavenging free radicals and stress response. Recent studies show that MTs play an important role in cell differentiation, proliferation and carcinogenesis by displaying different expression patterns and through different signaling pathways, have important value for the clinical diagnosis, treatment and prognosis of tumors, and can be used as a cancer biomarker. This article aims to discuss the research progress in MTs as a cancer maker in human digestive system tumors.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Metallothioneins; Digestive system tumors; Biomarker

Meng HE, Liu ZY. Metallothioneins and digestive system tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2722-2727
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2722.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2722>

摘要

金属硫蛋白是一类低相对分子质量、高巯基含量、能结合金属离子等独特性能的蛋白质。金属硫蛋白具有参与体内微量元素储存、运输和代谢,解重金属中毒,清除自由基和参与应激反应等生物学功能。最近的研究发现其通过不同的表达模式以及不同的信号通路在细胞的分化、增殖、癌变过程中也发挥着重要作用,对于肿瘤的临床诊断、治疗、预后分析等具有重要参考价值,可以作为肿瘤细胞表面表达的一个生物标志物。本文就金属硫蛋白作为人类消化系统肿瘤的生物标志物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: 金属硫蛋白; 消化系统肿瘤; 生物学标志

核心提示: 金属硫蛋白各亚型以及各基因型通过不同的表达模式以及不同的信号调节通路参与细胞的分化、增殖、癌变过程中,可作为肿瘤的标志物,本文就金属硫蛋白作为消化系统肿瘤的生物标志物的研究进展做一综述。

孟红恩, 刘忠渊. 金属硫蛋白在消化系统肿瘤中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2722-2727 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2722.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2722>

0 引言

金属硫蛋白(metallothionein, MT)于1957年由哈佛大学的Margoshes和Valee从马的肾脏中首次分离出来,发现其相对分子质量低、富含半胱氨酸、具有丰富的金属离子结合位点及独特的分子生物学功能,此后在真核微生物、高等植

■同行评议者

任粉玉, 教授, 延边大学附属医院消化内科

物、原核生物等均发现有MT并相继分离得到。尽管他们的进化起源可能还未完全清楚^[1], 但研究发现MT与多种肿瘤的发生、发展、预后密切相关, 肿瘤组织中MT的表达水平与细胞增殖、凋亡、肿瘤耐药性有关^[2,3], 例如呼吸系统肺癌^[4]等, 生殖系统中的前列腺癌^[5]、乳腺癌^[6]等, 而且MT基因的多态性也与肿瘤密切相关^[7]。MT广泛被作为肿瘤免疫组织化学生物标志物^[8]。在我国每年因为肿瘤死亡的病例中有2/3是消化系肿瘤, 患者5年的生存率是30%。消化系恶性肿瘤的标志物有多种, 目前应用广泛的主要包括癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)、甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、糖类抗原CA50、糖类抗原CA19-9、糖类抗原CA72-4等^[9]。本文就MT的结构与功能及其在消化系肿瘤发生、发展及预后等方面的作用进行综述。

1 MT的结构与功能

在哺乳动物中存在4种不同亚型的MT, 分别为MT-1、MT-2、MT-3和MT-4。典型的哺乳动物MT具有60-68个氨基酸残基, 其中含有20个半胱氨酸残基, 形成两个结构域, α 结构域和 β 结构域, 可以同时与必须的金属元素如锌、铜等和有毒金属如镉、汞等结合, Chen等^[10]发现人MT-2A金属化过程中铬离子先与 α 结合域形成Cd4MT中间体, Cd4MT中间体协助过量的镉离子结合 β 结构域形成完全金属化的Cd7MT而去金属化过程与此相反。MT-1和MT-2亚型可以被金属离子、消炎药和毒品等一系列刺激物广泛的诱导表达。而MT-3、MT-4对这些诱导物质不敏感, MT-3主要表达于中枢神经系统, MT-4主要表达于角化上皮细胞中。MT中丰富的半胱氨酸残基使得其具有独特的生理作用, 主要有保护细胞免受氧化物的损伤, 促进金属离子在细胞间的转运, 参与微量元素的代谢及重金属的解毒, 清除自由基、拮抗脂质过氧化作用, 对生物膜具有保护作用, 还有拮抗电离辐射、参与应激反应/调控机体生长发育和细胞代谢等功能^[11-13]。

2 MT在消化系肿瘤中的表达

2.1 在舌鳞状细胞癌中的表达 舌癌原发灶中MT与Cu/Zn-SOD的表达主要分布在癌巢中, 癌旁组织中表达较少或基本不表达, 高倍镜下在转移淋巴结中可见淋巴组织间的癌细胞MT与Cu/Zn-SOD均呈阳性表达, 而在无转移淋巴结中未见

MT与Cu/Zn-SOD表达, 且表达差异有统计学意义, MT的表达与肿瘤的分化程度和转移相关^[14]。Theocharis等^[15]在49例舌鳞状细胞癌中研究发现MT全部阳性表达, 与正常舌鳞状细胞的MT表达及临床病例分析结果显示MT的阳性表达与浸润深度、淋巴结转移有关, 其作用可能与角蛋白珠相关, 而影响舌鳞状细胞癌预后的主要因素是临床分期、组织学分级、局部复发^[16], 因此可以作为一项预后指标。也有研究发现与MT具有类似性质的抗DNA损伤的MSH2、MLH1和MGMT也与舌鳞状细胞癌患者的临床病理特征以及生存率相关^[17]。

2.2 在甲状腺肿瘤中的表达 MT在甲状腺良恶性肿瘤中均有阳性表达, 在甲状腺恶性肿瘤的发生发展中合成明显增强^[18], 且MT的高表达与TNM分级、淋巴结转移以及肿瘤的侵袭性相关^[19]。有研究发现MT-1G基因在PTC(乳头状甲状腺瘤)的表达可以降低肿瘤的成活率与致癌性, 通过PI3K/Akt和Rb/E2F通路, 起到抑癌基因的角色^[20,21]。通过钙抑制剂或者ERK1/2抑制剂可以阻断MT-1和MT-2亚型的表达, 从而使得癌细胞的周期循环消失而抑制肿瘤^[22]。

2.3 在食管癌中的表达 MT-1、MT-2和MT-3在食管癌组织中表达均高于切缘正常组织, 其表达水平与食管癌的发生、发展及组织分化密切相关, 而且MT-3在食管癌组织中的表达规律与占MT主体的MT-1、MT-2有显著不同^[23]。MT-3的表达使得食管癌细胞G₀/G₁期的时间相对延长, 而S期相对缩短, 凋亡率升高, 增殖受到抑制^[24], 而管鳞状细胞癌细胞株中MT-3基因CpG岛超甲基化可抑制其mRNA表达^[25,26], 降低MT的表达, 达到抑癌的作用。因此, MT-3基因的CpG岛可作为食管鳞癌治疗的新靶点。田薇等^[27]比较哈萨克族和汉族之间癌组织和癌旁组织MT-3基因启动子区甲基化率的差异均无统计学意义, 提示其可能不具有民族特异性。

2.4 在胃癌中的表达 MT-2A在正常胃细胞中不表达, 而在胃癌细胞中过表达, 在胃肠道间质瘤和早期胃癌细胞中有相对较低表达, 且与肿瘤分化程度、肿瘤分期、类型无关, 且胃癌患者的第一直系亲属有很大概率会患上胃癌^[28,29]。MT-2A是miR-23的靶基因, 在胃癌细胞中, miR-23a的上调伴随着MT-2A的下调, 敲除miR-23a基因会抑制BGC823的生长^[30]。通过上调I κ B- α 和下调p-I κ B- α 和细胞周期蛋白D1的表达, 抑制NF- κ B信号通路, 从而引发癌细胞凋亡或者G₂/

■研究前沿

大量的研究表明, 金属硫蛋白与消化系肿瘤相关, 而且各亚型在各个消化系肿瘤的表达不尽相同, 参与不同的信号调节通路, 但MT各亚型具体参与的信号通路以及在肿瘤发生、发展中独立作用及其相互作用尚待进一步的研究。

■ 相关报道

Jaromir Gumulec等运用Meta-analysis分析可得金属硫蛋白与多种肿瘤(尤其是头颈部肿瘤)的转移性、肿瘤分级、肿瘤分期以及患者的生存等相关, 可以作为肿瘤免疫组织化学的生物标志物。

M停滞, MT2A抑制肿瘤细胞生长^[31]。而MT-3在胃癌组织中与在正常胃组织相比表达显著下调, 可能由于胃癌组织中较高的MT-3基因CpG岛超甲基化引起^[32]。蔡小红等^[33]在162例晚期胃癌患者中, 筛选出108例循环肿瘤细胞。应用含铂方案化疗后有效组MT-1H mRNA表达水平显著低于无效组。无效组化疗后MT-1H mRNA表达水平明显高于化疗前, 无效的晚期胃癌患者MT-1H mRNA表达水平升高, 提示MT-1H的表达可能与铂类药物继发性耐药有关。而且MT还参与胃癌原发性耐药中^[34]。

2.5 在胰腺癌中的表达 胰腺癌致死在英国排在所有癌症中的第5位, 而在美国排在了第4位^[35]。Luckett等^[36]发现南圣路易斯安纳州胰腺癌高发与镉密切相关。人胰腺癌细胞株中的MT由7种MT基因编码, 其中MT-1B、MT-1E、MT-1X及MT-2A和MT在人胰腺癌耐药细胞株中的表达水平显著增高, 提示其与胰腺癌细胞株的增殖及化疗耐药性相关^[37]。江华等^[38]分别采用外源性锌离子及反义寡聚核酸(As)转染P3、Pan-1、MIA、SW1990、Cap、ASPC等6株胰腺癌细胞, 调节MT表达, 随后应用ELISA及集落实验检测MT表达水平及放射敏感性指标存活分数(SF2)的变化, 结果显示MT表达水平与胰腺癌细胞耐放射性有明显相关性。冯智毅等^[39]构建MT1E基因真核表达载体, 转染SW1990细胞并获得阳性单克隆细胞。用Western blot技术检测转染前后MT1E蛋白表达, MTT实验检测其增殖能力的变化, 流式细胞仪分析细胞周期时相分布。同时检测Cyclin D1与p53的表达。结果显示MT1E融合蛋白在SW1990MT1E细胞中表达, 与SW1990和SW1990MT1E空细胞比较, SW1990MT1E细胞增殖速度明显快。SW1990MT1E细胞与SW1990和SW1990空细胞比较, G₀/G₁期细胞明显减少, S期明显增多, 差异有统计学意义。SW1990MT1E较SW1990空的细胞Cyclin D1与p53表达明显升高, 提示MT1E能够促进SW1990增殖, 可能和上调Cyclin D1促使细胞进入S期增多, 通过失活P53蛋白使细胞恶性变相关。

2.6 在肝癌中的表达 正常肝组织、肝癌周围肝组织和肝癌组织中, 以Cu-MT或者Zn、Cu-MT形式存在的铜离子的积累量逐渐升高, 而凋亡细胞数降低, 肝细胞中MT这种积累重金属离子的作用与肝癌的形成相关^[40]。与非癌肝细胞相比, 肝癌细胞中MT-1X和MT-2A的表达及其mRNA的表达都明显下降, 且与p53基因、Ki-67

基因无关, 而阳性乙型肝炎病毒抗原致使的MT阳性率显著比阴性乙型肝炎抗原导致的低^[41]。而含有A-G-T单倍体MT-1的人容易患上肝癌, 尤其是吸烟者^[42]。有研究显示肝癌中MT-1和MT-2A表达下调是转录抑制导致的, PI3K/AKT信号通路和C/EBP α 对MT表达的调节在肝癌发生过程有重要作用^[43]。在多数肝癌细胞中MT-1M基因启动子存在甲基化现象, 而在体内和体外实验中恢复MT-1M基因的表达可以抑制肿瘤的生长, 或者通过肿瘤坏死因子 α 阻断I κ B α 的降解从而抑制NF- κ B的活性, 促使细胞凋亡^[44]。肝癌细胞中MT-1和MT-2在核中表达的缺失, 与高的Edmondson-Steiner分期和微血管侵犯相关^[45], 而MT-1E基因在小鼠肝癌形成的后期表达明显升高, 其高表达与肿瘤细胞的恶性增殖有关^[46]。因此, MT-1和MT-2在肝癌的形成和发展过程中存在重要作用, 可以作为肝癌患者的一种预后指标。

2.7 在大肠癌中的表达 在正常大肠黏膜向大肠癌转变过程中, MT-1G、MT-1E、MT-1F、MT-1H和MT-1M表达缺失, 而MT-1X和MT-2A表达下调, 且与总蛋白正相关。在细胞株和29%的肿瘤样品中存在MT-1G基因甲基化, 而组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以诱导表达所有亚型的表达。MT表达的下调与不好的预后相关^[47]。MT与p53联合可以更好地预示大肠癌的发展状况^[48]。谢忆山等^[49]对65例大肠癌标本检测MT表达并随访6-48 mo, 发现MT阳性表达与大肠癌肿瘤大小、组织分级、浸润深度均无显著相关。而将37例完成术后辅助化疗者分为阳性表达与阴性表达两组比较, 发现两组无病生存率和无远处转移生存率有显著性差异, 大肠癌MT阳性表达与不良预后相关, 可能与术后辅助化疗相对不敏感有关。陈华等^[50]利用SP免疫组织化学技术检测180例晚期大肠癌组织中MT的表达情况与奥沙利铂耐药及生存时间的关系, 发现论MT与晚期大肠癌对奥沙利铂的耐药存在一定的关联, MT阴性患者对奥沙利铂有较好敏感性, 疗效较好。

2.8 在结直肠癌中的表达 在结直肠癌细胞中MT-1F、MT-1G、MT-1X和MT-2A表达显著下调。外源添加MT-1F可以促进RKO细胞凋亡和抑制RKO细胞转移、侵袭、黏附以及其体内的致癌性。MT-1F表达的下调主要是通过其基因杂合性的缺失引起的, 其基因的CpG岛甲基化只在低分化的、MSI阳性RKO和LoVo结肠癌细胞株中存在。因此, MT-1F是潜在的抑癌基因^[51]。结直肠癌

原发灶、转移淋巴结和肝转移组织中MT表达阳性率均高于正常肠黏膜组织, 转移淋巴结和肝转移灶中MT表达阳性率高于癌原发灶和无转移淋巴结组织, Dukes C、D期MT表达阳性率高于Dukes A、B期, 低分化腺癌和黏液腺癌MT表达阳性率高于高分化和中分化腺癌, MT表达增强与结直肠癌的浸润和淋巴结、肝转移有关, 可作为评价结直肠癌患者预后的重要指标^[52]。同时检测肿瘤中MT对制定化疗方案有指导意义^[53]。

3 结论

尽管MT在消化系不同部位肿瘤中阳性表达情况不同, 即使在相同部位不同的研究中也存在阳性表达情况不同, 但MT在肿瘤的发生、发展中具有非常重要的作用, 检测MT不仅可以提示肿瘤细胞的增殖活性, 还可以提供预后的相关信息, 同时还可作为肿瘤化疗耐药的标志物, 但关于MT在癌症发展过程中发挥着怎样的作用及具体的机制, 虽有报道PI3K/AKT信号通路、C/EBPA通路、钙和ERK1/2、潜在的抑癌基因MT-1G和MT-1F等、CpG岛甲基化和MeCP-2^[54]等作用方式, 完善的机制与作用方式还有待于进一步研究。另外, MT各亚型在肿瘤发生、发展中独立作用及其相互作用尚未阐明, 放化疗及术后化疗对MT表达水平的影响及预后不同, 如何利用不同亚型MT的功能特点逆转金属性化疗药物的耐药性及降低化疗药物的不良反应, 以及如何以不同亚型的MT为靶点通过口服经过消化系给药抑制或者激活其表达来达到抑制肿瘤生长、促进凋亡等, 都未被明确证实。MT具有广阔的临床研究前景, 为肿瘤的早期发现、治疗及预后提供新思路、新方法。

4 参考文献

- 1 Capdevila M, Atrian S. Metallothionein protein evolution: a miniassay. *J Biol Inorg Chem* 2011; 16: 977-989 [PMID: 21633816 DOI: 10.1007/s00775-011-0798-3]
- 2 Zhang Y, Xiao TT, Shen XC. The advance role and pharmacological effects of metallothionein. *Chinese Pharmacological Bulletin* 2010; 26: 821-824
- 3 Namdarghanbari M, Wobig W, Krezoski S, Tabatabai NM, Petering DH. Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy. *J Biol Inorg Chem* 2011; 16: 1087-1101 [PMID: 21822976 DOI: 10.1007/s00775-011-0823-6]
- 4 Liang GY, Lu SX, Xu G, Liu XD, Li J, Zhang DS. Expression of metallothionein and Nrf2 pathway genes in lung cancer and cancer-surrounding tissues. *World J Surg Oncol* 2013; 11: 199 [PMID: 23947958 DOI: 10.1186/1477-7819-11-199]
- 5 Krizkova S, Ryvolova M, Gumulec J, Masarik M,

- Adam V, Majzlik P, Hubalek J, Provaznik I, Kizek R. Electrophoretic fingerprint metallothionein analysis as a potential prostate cancer biomarker. *Electrophoresis* 2011; 32: 1952-1961 [PMID: 21557258 DOI: 10.1002/elps.201000519]
- 6 Kim HG, Kim JY, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Park BH, Jeong HG. Metallothionein-2A overexpression increases the expression of matrix metalloproteinase-9 and invasion of breast cancer cells. *FEBS Lett* 2011; 585: 421-428 [PMID: 21187089 DOI: 10.1016/j.febslet.2010.12.030]
- 7 Raudenska M, Gumulec J, Podlaha O, Sztalmachova M, Babula P, Eckschlager T, Adam V, Kizek R, Masarik M. Metallothionein polymorphisms in pathological processes. *Metalomics* 2014; 6: 55-68 [PMID: 24068159 DOI: 10.1039/c3mt00132f]
- 8 Gumulec J, Raudenska M, Adam V, Kizek R, Masarik M. Metallothionein - immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e85346 [PMID: 24416395 DOI: 10.1371/journal.pone.0085346]
- 9 刘庆峰, 王涛, 刘贵建. 肿瘤标记物在消化系统肿瘤诊断中的研究进展. *中华临床医师杂志(电子版)* 2011; 5: 1397-1399
- 10 Chen SH, Russell WK, Russell DH. Combining chemical labeling, bottom-up and top-down ion-mobility mass spectrometry to identify metal-binding sites of partially metalated metallothionein. *Anal Chem* 2013; 85: 3229-3237 [PMID: 23421923 DOI: 10.1021/ac303522h]
- 11 Mehus AA, Muhonen WW, Garrett SH, Somji S, Sens DA, Shabb JB. Quantitation of human metallothionein isoforms: a family of small, highly conserved, cysteine-rich proteins. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13: 1020-1033 [PMID: 24493013 DOI: 10.1074/mcp.M113.033373]
- 12 赵晓迎. 金属硫蛋白研究进展. *徐州医学院学报* 2010; 30: 349-350
- 13 Vašák M, Meloni G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* 2011; 16: 1067-1078 [PMID: 21647776 DOI: 10.1007/s00775-011-0799-2]
- 14 姚小武, 朱郁文, 陈仕生, 杨利和, 黄慧燕, 卢子正. 舌鳞癌组织及转移淋巴结中MT和Cu/Zn-SOD的表达及意义. *广东牙医防治* 2007; 15: 208-210
- 15 Theocharis S, Klijanienko J, Giaginis C, Rodriguez J, Jouffroy T, Girod A, Point D, Tsourouflis G, Sastre-Garau X. Metallothionein expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patient survival. *Histopathology* 2011; 59: 514-525 [PMID: 22034891 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03947.x]
- 16 吴延升, 张丽, 赵景会, 赵仑, 王旭东. 舌鳞状细胞癌预后多因素分析. *实用肿瘤杂志* 2012; 27: 136-139
- 17 Theocharis S, Klijanienko J, Giaginis C, Rodriguez J, Jouffroy T, Girod A, Point D, Tsourouflis G, Sastre-Garau X. Expression of DNA repair proteins, MSH2, MLH1 and MGMT in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients' survival. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 218-226 [PMID: 21029181 DOI: 10.1111/j.1600-0714.2010.00945.x]
- 18 陈林兴, 陈慎仁, 陈泽钦, 吴俊伟, 黄华, 陈式仪. 金属硫蛋白在人甲状腺肿瘤中的表达. *广东医学* 2007; 25: 516-518
- 19 Wang N, Dong CR, Jiang R, Tang C, Yang L, Jiang QF, Chen GG, Liu ZM. Overexpression of HIF-1 α ,

■创新盘点

本文综合分析金属硫蛋白各亚型在甲状腺癌、食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌等消化系统肿瘤中表达情况, 以及可能参与的信号通路, 比较全面地阐述了其作为肿瘤生物标志物的可能以及对诊断、预后分析、耐药性等的最新进展。

■应用要点

通过对金属硫蛋白作为消化系统肿瘤生物标志物以及可能参与的信号调节通路的全方面阐述,为消化系统肿瘤的诊断提供新方法和进一步研究的方向,同时也为肿瘤的治疗、耐药性及预后提供新思路。

- metallothionein and SLUG is associated with high TNM stage and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 322-330 [PMID: 24427353]
- 20 Ferrario C, Lavagni P, Gariboldi M, Miranda C, Losa M, Cleris L, Formelli F, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A. Metallothionein 1G acts as an oncosuppressor in papillary thyroid carcinoma. *Lab Invest* 2008; 88: 474-481 [PMID: 18332874 DOI: 10.1038/labinvest.2008.17]
- 21 Fu J, Lv H, Guan H, Ma X, Ji M, He N, Shi B, Hou P. Metallothionein 1G functions as a tumor suppressor in thyroid cancer through modulating the PI3K/Akt signaling pathway. *BMC Cancer* 2013; 13: 462 [PMID: 24098937 DOI: 10.1186/1471-2407-13-462]
- 22 Liu ZM, Hasselt CA, Song FZ, Vlantis AC, Cherian MG, Koropatnick J, Chen GG. Expression of functional metallothionein isoforms in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 302: 92-98 [PMID: 19356627 DOI: 10.1016/j.mce.2008.12.017]
- 23 李振华, 田子强, 从斌, 张月峰, 温士旺, 李勇. 食管癌组织中MT-1 -2与-3的表达差异及临床意义. *中国肿瘤临床* 2012; 39: 1091-1095
- 24 Tian ZQ, Xu YZ, Zhang YF, Ma GF, He M, Wang GY. Effects of metallothionein-3 and metallothionein-1E gene transfection on proliferation, cell cycle, and apoptosis of esophageal cancer cells. *Genet Mol Res* 2013; 12: 4595-4603 [PMID: 24222235 DOI: 10.4238/2013.October.17.2]
- 25 苗毅, 李保庆, 刘晖, 马玉泉, 贾涛, 田子强. 食管鳞癌细胞株金属硫蛋白3基因CpG岛超甲基化的临床意义. *山东医药* 2009; 48: 17-20
- 26 Peng D, Hu TL, Jiang A, Washington MK, Moskaluk CA, Schneider-Stock R, El-Rifai W. Location-specific epigenetic regulation of the metallothionein 3 gene in esophageal adenocarcinomas. *PLoS One* 2011; 6: e22009 [PMID: 21818286 DOI: 10.1371/journal.pone.0022009]
- 27 田薇, 张慧霞, 陈艳. 新疆哈萨克族和汉族食管癌患者金属硫蛋白-3 CpG岛甲基化的研究. *癌变·畸变·突变* 2013; 25: 357-359
- 28 Soo ET, Ng CT, Yip GW, Koo CY, Nga ME, Tan PH, Bay BH. Differential expression of metallothionein in gastrointestinal stromal tumors and gastric carcinomas. *Anat Rec (Hoboken)* 2011; 294: 267-272 [PMID: 21235001 DOI: 10.1002/ar.21321]
- 29 Ebert MP, Günther T, Hoffmann J, Yu J, Miehleke S, Schulz HU, Roessner A, Korc M, Malfertheiner P. Expression of metallothionein II in intestinal metaplasia, dysplasia, and gastric cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 1995-2001 [PMID: 10766190]
- 30 An J, Pan Y, Yan Z, Li W, Cui J, Yuan J, Tian L, Xing R, Lu Y. MiR-23a in amplified 19p13.13 loci targets metallothionein 2A and promotes growth in gastric cancer cells. *J Cell Biochem* 2013; 114: 2160-2169 [PMID: 23553990 DOI: 10.1002/jcb.24565]
- 31 Pan Y, Huang J, Xing R, Yin X, Cui J, Li W, Yu J, Lu Y. Metallothionein 2A inhibits NF- κ B pathway activation and predicts clinical outcome segregated with TNM stage in gastric cancer patients following radical resection. *J Transl Med* 2013; 11: 173 [PMID: 23870553 DOI: 10.1186/1479-5876-11-173]
- 32 Deng D, El-Rifai W, Ji J, Zhu B, Trampont P, Li J, Smith MF, Powel SM. Hypermethylation of metallothionein-3 CpG island in gastric carcinoma. *Carcinogenesis* 2003; 24: 25-29 [PMID: 12538345]
- 33 蔡小红, 沈丽琴, 焦安娜, 陆玉峰, 庄志祥. 晚期胃癌患者铂类药物化疗前后外周血MT1H mRNA的表达及其意义. *世界临床药物* 2011; 32: 535-538
- 34 叶超平, 丁海滨, 魏剑锋. MT和LRP在胃癌中的表达及其临床意义. *中国中医药现代远程教育* 2009; 7: 123-124
- 35 Barry S, Chelala C, Lines K, Sunamura M, Wang A, Marelli-Berg FM, Brennan C, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T. S100P is a metastasis-associated gene that facilitates transendothelial migration of pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2013; 30: 251-264 [PMID: 23007696 DOI: 10.1007/s10585-012-9532-y]
- 36 Luckett BG, Su LJ, Rood JC, Fonham ET. Cadmium exposure and pancreatic cancer in south Louisiana. *J Environ Public Health* 2012; 2012: 180186 [PMID: 23319964 DOI: 10.1155/2012/180186]
- 37 谢勇, 赵玉沛, 陈革, 原春辉, 李丽君. 金属硫蛋白及其基因在人胰腺癌细胞株中的表达及意义. *中国医学科学院学报* 2005; 27: 619-623
- 38 江华, 赵玉沛, 陈革, 谢勇, 张福泉, 吴斌, 吴元德, 李静. 金属硫蛋白与人胰腺癌细胞耐放射性的关系初步探讨. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 754-756
- 39 冯智毅, 李伟明, 黄波, 胡世雄. 金属硫蛋白1E对胰腺癌SW1990细胞生长的影响. *中华实验外科杂志* 2010; 27: 1104-1106
- 40 Ebara M, Fukuda H, Hatano R, Saisho H, Nagato Y, Suzuki K, Nakajima K, Yukawa M, Kondo F, Nakayama A, Sakurai H. Relationship between copper, zinc and metallothionein in hepatocellular carcinoma and its surrounding liver parenchyma. *J Hepatol* 2000; 33: 415-422 [PMID: 11019997 DOI: org/10.1016/S0168-8278(00)80277-9]
- 41 Tao X, Zheng JM, Xu AM, Chen XF, Zhang SH. Downregulated expression of metallothionein and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2007; 37: 820-827 [PMID: 17517078 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00113.x]
- 42 Wong RH, Huang CH, Yeh CB, Lee HS, Chien MH, Yang SF. Effects of metallothionein-1 genetic polymorphism and cigarette smoking on the development of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 2088-2095 [PMID: 22805858 DOI: 10.1245/s10434-012-2456-6]
- 43 Datta J, Majumder S, Kutay H, Motiwala T, Frankel W, Costa R, Cha HC, MacDougald OA, Jacob ST, Ghoshal K. Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinomas and is mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade. *Cancer Res* 2007; 67: 2736-2746 [PMID: 17363595 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4433]
- 44 Mao J, Yu H, Wang C, Sun L, Jiang W, Zhang P, Xiao Q, Han D, Saiyin H, Zhu J, Chen T, Roberts LR, Huang H, Yu L. Metallothionein MT1M is a tumor suppressor of human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2012; 33: 2568-2577 [PMID: 22971577 DOI: 10.1093/carcin/bgs287]
- 45 Park Y, Yu E. Expression of metallothionein-1 and metallothionein-2 as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 1565-1572 [PMID: 23662831 DOI: 10.1111/jgh.12261]
- 46 管冬元, 方肇勤, 代小平, 梁超, 胡卫, 吴中华, 高必峰. MT1E在肝癌形成过程中的表达及其在肝癌细胞中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1707-1712
- 47 Arriaga JM, Levy EM, Bravo AI, Bayo SM, Amat M, Aris M, Hannonis A, Bruno L, Roberti MP, Loria FS, Pairola A, Huertas E, Mordoh J, Bianchini M. Metallo-

- thionein expression in colorectal cancer: relevance of different isoforms for tumor progression and patient survival. *Hum Pathol* 2012; 43: 197-208 [PMID: 21820154 DOI: 10.1016/j.humpath.2011.04.015]
- 48 Arriaga JM, Bravo IA, Bruno L, Morales Bayo S, Hannon A, Sanchez Loria F, Pairola F, Huertas E, Roberti MP, Rocca YS, Aris M, Barrio MM, Baffa Trasci S, Levy EM, Mordoh J, Bianchini M. Combined metallothioneins and p53 proteins expression as a prognostic marker in patients with Dukes stage B and C colorectal cancer. *Hum Pathol* 2012; 43: 1695-1703 [PMID: 22516242 DOI: 10.1016/j.humpath.2011.12.014]
- 49 谢忆山, 王蕊, 陶卫平. 大肠癌及正常肠粘膜组织中金属硫蛋白阳性表达的临床意义. *武汉大学学报(医学版)* 2010; 31: 43-46
- 50 陈华, 应卫星, 郑维镭, 陈文俊, 张武, 李芙瑶. 晚期大肠癌金属硫蛋白的表达及其与奥沙利铂化疗耐药的关系. *中国现代医生* 2012; 50: 1-3
- 51 Yan DW, Fan JW, Yu ZH, Li MX, Wen YG, Li DW, Zhou CZ, Wang XL, Wang Q, Tang HM, Peng ZH. Downregulation of metallothionein 1F, a putative oncosuppressor, by loss of heterozygosity in colon cancer tissue. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 918-926 [PMID: 22426038 DOI: 10.1016/j.bbdis.2012.02.021]
- 52 苏宏, 金伟森, 于波, 左富义, 白雪, 蔡惠云. 金属硫蛋白和组织蛋白酶B在结直肠癌中的表达及意义. *武警医学院学报* 2010; 19: 102-104
- 53 徐斌, 张力, 张辉, 薄爱华. 金属硫蛋白和DNA修复酶在胃癌, 结直肠癌中表达的临床意义. *中国医师杂志* 2010; 12: 421-422
- 54 Suzuki S, Nakano H, Takahashi S. Epigenetic regulation of the metallothionein-1A promoter by PU.1 during differentiation of THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 433: 349-353 [PMID: 23501100 DOI: org/10.1016/j.bbrc.2013.03.007]

■同行评价

本文比较全面地介绍了金属硫蛋白在消化系肿瘤中的研究进展, 内容新颖, 文献全面, 可读性强。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



SiRNA技术沉默成纤维细胞生长因子受体基因促进胃癌化疗的效果及其机制

杨雪梅

■背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率在世界范围之内一直居高不下。传统的治疗手段除了手术之外,还有放化疗。但由于手术切除率低,放化疗不良反应大,肿瘤多耐药等缺点,使得当前传统胃癌治疗的疗效仍难以令人满意。因此,寻找一种新的胃癌治疗方法成为目前胃癌研究中的一个重要课题。

杨雪梅, 贵州省开阳县人民医院药剂科 贵州省贵阳市 550300
杨雪梅, 副主任药师, 主要从事药理学的相关研究。

作者贡献分布: 本文由杨雪梅独立完成。

通讯作者: 杨雪梅, 副主任药师, 550300, 贵州省贵阳市开阳县城关镇南街6号, 贵州省开阳县人民医院药剂科。

zhousufeng123@126.com

收稿日期: 2014-05-06 修回日期: 2014-05-20

接受日期: 2014-05-29 在线出版日期: 2014-07-08

SiRNA-mediated silencing of fibroblast growth factor receptor improves chemotherapy effect in a xenograft mouse model of gastric cancer

Xue-Mei Yang

Xue-Mei Yang, Kaiyang People's Hospital of Guiyang City, Guiyang 550300, Guizhou Province, China

Correspondence to: Xue-Mei Yang, Associate Chief Pharmacist, People's Hospital of Guizhou Kaiyang, 6 Chengguanzhen South Street, Kaiyang Country, Guiyang 550300, China. zhousufeng123@126.com

Received: 2014-05-06 Revised: 2014-05-20

Accepted: 2014-05-29 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of siRNA-mediated gene silencing of fibroblast growth factor receptor (FGFR) on the chemotherapy effect in a xenograft mouse model of gastric cancer and to explore the possible mechanism.

METHODS: The expression of FGFR in MRC-5 cells and MGC80-3 cells was detected by flow cytometry. The siRNA against FGFR was constructed and transfected into BGC-823 cells via Lipofectamine™ 2000. The reduced rate of cell proliferation was assessed by MTT assay, and apoptosis rate was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the protein expression of FGFR, Caspase3 and Bax after gene silencing. A xenograft nude mouse model of gastric cancer was established, and fluorescence quantitative PCR was used to detect FGFR

mRNA expression levels after transfection with siRNA. Tumor size was measured to assess the effects of treatment in different groups (model group, cisplatin group, and cisplatin + siRNA group).

RESULTS: The expression of FGFR in MGC80-3 cells was higher than that in MRC-5 cells ($P < 0.05$). After transfection with siRNA, compared with the cisplatin group and model group, the cisplatin + siRNA group showed significantly inhibited cell proliferation and promoted apoptosis ($P < 0.05$). After FGFR gene silencing, the expression of FGFR on cell surface decreased and the expression levels of intracellular Caspase3 and Bax improved ($P < 0.05$). The level of FGFR mRNA expression significantly decreased in tumor-bearing nude mice after siRNA transfection ($P < 0.05$). Besides, tumor volume decreased and tumor recession rate increased ($P < 0.05$).

CONCLUSION: SiRNA-mediated FGFR inhibition promotes the therapeutic effect of cisplatin against gastric cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: siRNA; FGFR; Gastric cancer; Cisplatin

Yang XM. SiRNA-mediated silencing of fibroblast growth factor receptor improves chemotherapy effect in a xenograft mouse model of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2728-2733 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2728.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2728>

摘要

目的: 研究siRNA基因沉默成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)促进胃癌化疗的效果及其作用机制。

方法: 流式细胞仪检测人正常细胞MRC-5和胃癌细胞MGC80-3中FGFR的表达量。设计合成FGFR特异性siRNA序列, Lipofectamine™

■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

2000转入BGC-823细胞中. 将实验分为对照组、顺铂组、顺铂+siRNA组及siRNA组, 通过MTT法及流式细胞仪检测BGC-823细胞的增值及凋亡, Western blot检测FGFR沉默后相关蛋白表达情况. 建立胃癌裸鼠模型, 转染siRNA后通过荧光定量PCR检测FGFR mRNA表达量, 测量不同分组(模型组、顺铂组和顺铂+siRNA组)瘤体的大小以检测治疗的效果.

结果: 胃癌细胞MGC80-3中FGFR的表达量明显高于人正常细胞MRC-5($P<0.05$). 转染siRNA后, 与顺铂组及siRNA组相比, 顺铂+siRNA组显著抑制细胞增殖及促进细胞凋亡($P<0.05$), 并且FGFR基因沉默后, 细胞表面FGFR表达量减少, 细胞内Caspase3及Bax表达量提高. 胃癌裸鼠的瘤体在转染siRNA后, FGFR mRNA的表达量明显降低($P<0.05$), 且瘤体体积减小, 瘤体衰退率提高($P<0.05$).

结论: FGFR特异性siRNA与顺铂联合使用可促进胃癌的治疗效果, 为探索胃癌治疗的新方法奠定了基础.

© 2014年版权归归世登出版集团有限公司所有.

关键词: siRNA; 成纤维细胞生长因子受体; 胃癌; 顺铂

核心提示: 顺铂与siRNA联合治疗可促进胃癌治疗的效果, 为化疗联合基因治疗的方法奠定了应用基础, 也为未来胃癌治疗提供了一个新的研究方向.

杨雪梅. SiRNA技术沉默成纤维细胞生长因子受体基因促进胃癌化疗的效果及其机制. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2728-2733 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2728.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2728>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其死亡率在世界范围之内一直居高不下^[1]. 传统的治疗手段除了手术之外, 还有放化疗. 但由于手术切除率低, 放化疗不良反应大, 肿瘤多药耐药等缺点, 使得当前传统胃癌治疗的疗效仍难以令人满意. 因此, 寻找一种新的胃癌治疗方法成为目前胃癌研究中的一个重要课题.

成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)是免疫球蛋白基因超家族成员, 其通过与FGFs结合而产生多种生物学效应^[2]. 研究表明, FGFRs基因在胃癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌等组织中表达过度, 其可能

与多种恶性肿瘤的发生、发展有密切关系^[3-8].

干扰RNA技术是一种由双链RNA所引起的序列特异性基因沉默技术. 目前, 该技术作为一种抗癌新疗法, 被广泛应用于各种肿瘤研究^[9,10]. 在胃癌治疗方面, 其不仅可以直接作用于胃癌的靶向基因, 而且可以通过抑制肿瘤血管的新生间接地治疗胃癌, 并且对胃癌化疗多药耐药也起到了一定作用^[11].

本研究将胃癌BGC-823细胞进行顺铂化疗处理及FGFR特异性siRNA转染处理, 分析siRNA基因沉默FGFR及顺铂化疗对BGC-823细胞的增殖、凋亡及相关蛋白表达的影响, 并通过建立胃癌裸鼠模型, 证明siRNA基因沉默FGFR与顺铂联用对胃癌瘤体的衰退有促进作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Balb(nu/nu)无胸腺裸鼠60只, 4-6周龄, 体质量 $18\text{ g}\pm 2\text{ g}$, 由国家医药管理局上海医药工业研究所提供. 实验鼠在SPF条件下繁殖、饲养. 人正常细胞MRC-5和胃癌细胞MGC80-3购自中国科学院上海细胞研究所. siRNA基因片段由珠海英平生物技术有限公司合成. RPMI 1640培养液、胎牛血清(美国Gibco公司); Lipofectamine™ 2000脂质体转染试剂(美国Invitrogen公司); 顺铂(江苏瑞安医药公司); MTT试剂、DMSO试剂、Annexin V试剂及PI试剂(Sigma公司); 抗体(上海优宁维公司). 流式细胞仪(美国Coulter公司); 酶标仪(Thermo公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将人正常细胞MRC-5和胃癌细胞MGC80-3培养在含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 放置在饱和湿度5%CO₂, 37 °C恒温培养箱中培养, 每2 d传代1次.

1.2.2 流式细胞仪检测细胞表面FGFR表达量: MRC-5细胞和MGC80-3细胞培养至48 h时, 收集细胞, 制成单细胞悬液, 调节密度至约 1×10^6 cells/管. 用PBS液洗细胞两遍, 加15%小牛血清200 μL孵育30 min以封闭非特异性抗体. PBS洗两遍, 加FGFR-单克隆抗体200 μL(0.5 mg/mL), 室温孵育1.5 h. 加IgG-FITC 200 μL(0.5 mg/mL), 室温孵育45 min, 洗涤后流式细胞仪上机检测, 实验重复3次.

1.2.3 siRNA设计、合成及转染: 根据Genbank中提供的FGFR相关信息, 应用相应计算机软件设计靶向FGFR mRNA序列的21个碱基组成的核苷酸链, 序列为: 5'-AAGTCGGACGCAA-

■ 研发前沿

干扰RNA技术是一种由双链RNA所引起的序列特异性基因沉默技术. 目前, 该技术作为一种抗癌新疗法, 被广泛应用于各种肿瘤研究. 在胃癌治疗方面, 其不仅可以直接作用于胃癌的靶向基因, 而且可以通过抑制肿瘤血管的新生间接地治疗胃癌, 并且对胃癌化疗多药耐药也起到了一定作用.

■创新盘点

本研究将胃癌BGC-823细胞进行顺铂化疗处理及成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)特异性siRNA转染处理,分析siRNA基因沉默FGFR及顺铂化疗对BGC-823细胞的增殖、凋亡及相关蛋白表达的影响,并通过建立胃癌裸鼠模型,证明siRNA基因沉默FGFR与顺铂联用对胃癌瘤体的衰退有促进作用。

表 1 顺铂+siRNA联合使用对细胞BGC-823增殖的影响 (mean $\pm$ SD, %)

分组	增值抑制率	P值
对照组	3.41 $\pm$ 0.98	
顺铂组	45.65 $\pm$ 3.21 ^a	<0.05
顺铂+siRNA组	63.13 $\pm$ 1.78 ^{ab}	<0.05
siRNA组	39.11 $\pm$ 6.19 ^a	<0.05

^a P <0.05 vs 对照组; ^b P <0.05 vs 顺铂组; ^c P <0.05 vs siRNA组。

CAGAGAAA-3', 同时合成互补链, 经退火形成双链RNA, 即特异性siRNA分子。阴性对照siRNA序列为: 5'-CGAACGCGGUAUACUUC-GADTDT-3', 此序列不与人类任何基因序列同源。实验时取对数生长期MGC80-3细胞, 以 2×10^5 cells/孔的密度接种于24孔板中, 当细胞密度达70%时, 按Lipofectamine™ 2000试剂盒的说明书, 以脂质体法进行转染。实验组分为四组: (1)MGC80-3细胞对照组; (2)MGC80-3+顺铂化疗组; (3)MGC80-3+顺铂+siRNA组; (4)MGC80-3+siRNA组。其中顺铂的浓度为2 μ g/L。

1.2.4 MTT法测定细胞增殖: 取各实验组中处于对数生长期的细胞, 以 5×10^4 个/mL的细胞密度接种于96孔培养板中。各组在培养48 h后, 每孔加入20 μ L的MTT溶液, 置于37 $^{\circ}$ C条件下培养4 h。吸出上清液后, 每孔加入200 μ L DMSO溶液中止反应, 待紫色结晶完全溶解后, 用酶标仪在492 nm处测定每孔的A值, 从而计算增值抑制率, 增值抑制率(%) = (1-实验组A值/对照组A值) $\times$ 100%。

1.2.5 流式细胞仪测定细胞凋亡: 取各实验组中处于对数生长期的细胞, PBS洗涤两次后, 加入100 μ L AnnexinV Binding Buffer轻轻重悬细胞, 后将5 μ L AnnexinV加入到95 μ L AnnexinV Binding Buffer中, 轻轻混匀。室温避光孵育15 min后离心弃上清, 加入100 μ L AnnexinV Binding Buffer轻轻重悬细胞。将10 μ L PI染色液加入到90 μ L AnnexinV Binding Buffer中, 混匀后冰上避光孵育5 min, 用流式细胞仪在488 nm处检测, 软件分析细胞凋亡率, 细胞凋亡率为早期凋亡细胞和中晚期凋亡细胞之和。重复检测3次。

1.2.6 Western blot法检测细胞内蛋白表达: 提取各实验组细胞总蛋白, 测定蛋白含量定量后, 于100 $^{\circ}$ C水浴5 min使蛋白变性, 进行8%SDS-PAGE电泳。电泳后蛋白转移至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加入相关蛋白一抗, 于4 $^{\circ}$ C

孵育过夜。次日用TBST洗涤膜3次, 后加入相关蛋白二抗, 于37 $^{\circ}$ C孵育45 min, TBST洗涤3次后, 在暗室中压片、显影、定影。图像应用Alpha Imager 2200软件进行分析。

1.2.7 胃癌裸鼠肿瘤模型的建立及瘤体体积测定: 取对数生长期细胞MGC80-3, 以 2×10^7 cells/只的细胞密度接种于Balb(nu/nu)裸鼠腋下皮下, 建立移植瘤模型。待裸鼠瘤体长至1 cm时, 将裸鼠分为3组, 每组20只, 分别为: (1)模型组, 每只老鼠注射200 μ L的RPMI 1640培养液; (2)顺铂组, 每只老鼠注射100 μ L(2 μ g/L)顺铂和100 μ L RPMI 1640培养液; (3)顺铂+siRNA组, 每只老鼠注射100 μ L(2 μ g/L)和100 μ L siRNA脂质体混合物。注射3 d后将裸鼠处死, 测量瘤体体积并计算瘤体衰退率, 衰退率 = (1-实验组/模型组) $\times$ 100%。

1.2.8 荧光定量PCR检测瘤体中FGFR mRNA的表达量: 转染24 h后, 各实验组处死10只裸鼠, 取移植瘤组织。用TRIzol法提取总RNA, 然后用逆转录试剂盒转录形成cDNA进行荧光定量PCR扩增FGFR和内参GAPDH, 反应体系为: 2 $\times$ PCR buffer 25 μ L, Primers(25 μ mol/L)1.2 μ L, 2 $\times$ SYBR Green I 0.3 μ L, DNA模板1 μ L, dH₂O 22.5 μ L; 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s循环35次, 72 $^{\circ}$ C检测信号。FGFR引物序列: 正义5'-GCTTAGCTGCTGTGGCAATG-3', 反义5'-CCCACTTTGGGTCTGTGTCA-3', 扩增片段长度386 bp; GAPDH: 正义5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 反义5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3', 扩增片段长度142 bp。

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件处理数据, 数据用mean $\pm$ SD表示, 结果比较用t检验。 P <0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人正常细胞MRC-5和胃癌细胞MGC80-3中FGFR的表达量 通过流式细胞仪检测发现, 细胞MGC80-3中FGFR的荧光强度较高, gate值为35.76% $\pm$ 1.28%, 细胞MRC-5的荧光强度较低, gate值为13.69% $\pm$ 2.15%, 表明胃癌细胞MGC80-3中FGFR的表达量高于人正常细胞中FGFR的表达量(P <0.05)。

2.2 顺铂+siRNA联合使用对细胞BGC-823增殖的影响 如表1所示, 与对照组相比, 顺铂组、顺铂+siRNA组及siRNA组的增值抑制率均显著增高(P <0.05)。其中, 顺铂+siRNA组对细胞

表 2 顺铂+siRNA联合使用对细胞BGC-823凋亡的影响 (%)

分组	凋亡率	值	P值
对照组	6.26 ± 3.98		
顺铂组	25.83 ± 2.26 ^a	8.68	<0.05
顺铂+siRNA组	48.99 ± 1.34 ^{abc}	14.11	<0.05
siRNA组	34.88 ± 4.41 ^a	7.68	<0.05

^aP<0.05 vs 对照组; ^bP<0.05 vs 顺铂组; ^cP<0.05 vs siRNA组。

表 3 裸鼠瘤体体积大小及衰退率

分组	瘤体体积(cm ³)	瘤体衰退率(%)	P值
模型组	2.65 ± 0.16		
顺铂组	1.78 ± 0.32 ^a	49.8	<0.05
顺铂+siRNA组	0.82 ± 0.23 ^{abc}	64.2	<0.05
siRNA组	1.35 ± 0.33 ^a	53.5	<0.05

^aP<0.05 vs 对照组; ^bP<0.05 vs 顺铂组; ^cP<0.05 vs siRNA组。

BGC-823增殖抑制率最高,而顺铂组增殖抑制率又略高于siRNA组的增殖抑制率。由此可知,顺铂+siRNA联合使用可明显抑制细胞BGC-823的增殖,而单独使用化疗药物顺铂的增殖抑制率又优于单独使用siRNA。

2.3 顺铂+siRNA联合使用对细胞BGC-823凋亡的影响 如表2所示,顺铂组、顺铂+siRNA组及siRNA组中细胞BGC-823的凋亡率均显著高于对照组($P<0.05$)。顺铂组细胞BGC-823凋亡率仅为顺铂+siRNA组的64.5%,而顺铂组的细胞凋亡率又是siRNA组的1倍。由此可知,顺铂+siRNA联合使用可显著促进细胞BGC-823的凋亡,而顺铂组的凋亡率又优于siRNA组。

2.4 成纤维细胞生长因子受体及死亡受体途径相关蛋白表达 通过Western blot检测FGFR与相关凋亡相关蛋白Caspase3、Bax的表达发现,与对照组相比,各实验组中FGFR的表达均下调,而Caspase3、Bax的表达均上调,其中顺铂+siRNA组的差异性最明显($P<0.05$)。与顺铂组相比,siRNA组的FGFR表达量较低,但Caspase3表达量较高($P<0.05$)。说明与化疗相比,FGFR特异性siRNA可明显沉默FGFR的表达,激活死亡受体途径相关蛋白表达,从而诱导细胞凋亡(图1)。

2.5 荧光定量PCR检测裸鼠瘤体中FGFR mRNA的相对表达量 经荧光定量PCR可知,顺铂组和顺铂+siRNA组裸鼠瘤体中FGFR mRNA的相对表达量均低于模型组,其中顺铂+siRNA组的

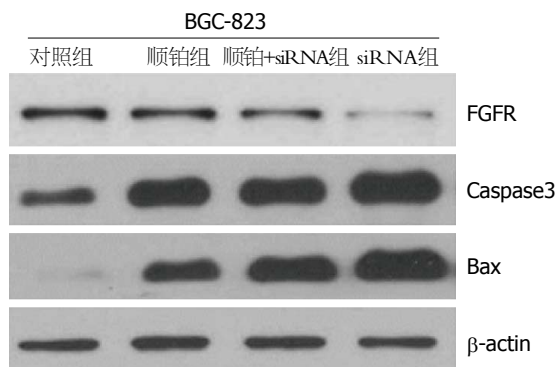


图 1 FGFR基因沉默后FGFR、Caspase3和Bax的表达。FGFR: 成纤维细胞生长因子受体。

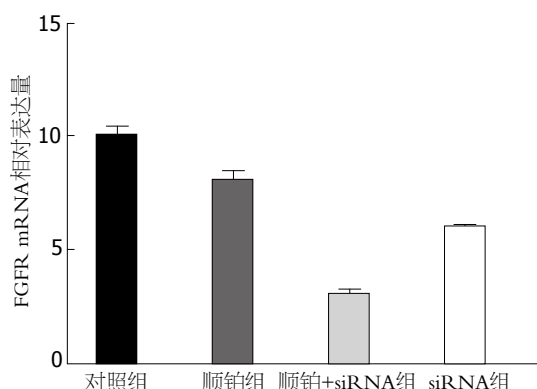


图 2 荧光定量PCR检测裸鼠瘤体中FGFR mRNA的相对表达量。FGFR: 成纤维细胞生长因子受体。

FGFR mRNA相对表达量最低,仅为对照组的一半($P<0.05$),而顺铂组的FGFR mRNA的相对表达量仅略低于模型组($P>0.05$)。表明,FGFR特异性siRNA在实体瘤中的转染效率高,24 h内即可明显降低FGFR mRNA的表达量(图2)。

2.6 胃癌裸鼠瘤体体积大小及衰退率 如表3所示,在接受顺铂化疗及顺铂+siRNA联合治疗后,胃癌裸鼠瘤体的体积均有减小。但与模型组相比,顺铂组的瘤体体积减小了1倍,而顺铂+siRNA的瘤体体积减小了3倍,其瘤体衰退率高达75.3%,明显高于模型组,从而证明顺铂+siRNA联合使用治疗胃癌裸鼠的效果优于单独使用顺铂化疗治疗。

3 讨论

目前,针对胃癌这种高发恶性肿瘤疾病,主要的治疗手段除了手术以外,还有化疗。虽然当前化疗药物众多,但多数效率低。顺铂就是胃癌化疗方案中的常用药之一,他可以使DNA损伤,破坏DNA复制,具有抗肿瘤活性。但临床所使用的化

■应用要点

因此,根据患者的基因分型而制定的胃癌用药治疗将是未来努力的方向,而干扰RNA技术所具有的基因高度特异性特点,为他在未来肿瘤化疗中的应用奠定了基础。

■同行评价

本文通过siRNA技术沉默FGFR, 探讨胃癌细胞化疗的治疗效果, 有一定科学性与临床意义。

疗药物除了诱导肿瘤细胞凋亡以外, 还同时杀伤正常细胞, 严重影响了化疗的耐受性和依从性。因此, 根据患者的基因分型而制定的胃癌用药治疗将是未来努力的方向^[12], 而RNA干扰技术所具有的基因高度特异性特点, 为他在未来肿瘤化疗中的应用奠定了基础。研究表明, 干扰RNA技术可特异性地抑制原癌基因、癌症相关基因或突变基因的过度表达, 从而抑制肿瘤的发生、发展^[13]。此外, siRNA化学性质的高度稳定性, 抑制作用的迅速性和无药物抑制剂毒副作用等优点, 使其在基因治疗领域中逐渐成为了重要的治疗手段^[14]。

体内几乎所有组织的细胞表面都含有FGFR, 而恶性肿瘤细胞中FGFR的含量明显增多, 他们可以通过胞外配体结构域与配体成纤维细胞生长因子FGF结合, 刺激细胞的分裂增殖, 从而发挥生物学效应。本研究根据干扰RNA技术的原理, 合成针对纤维细胞生长因子受体FGFR特定基因序列的小干扰siRNA, 使其与细胞内FGFR mRNA的特定序列结合, 沉默FGFR表达, 使其不能与FGF结合, 从而不能发挥生物学效应, 起到抗癌的作用。

本研究中, 在细胞水平上首先通过流式细胞仪检测人正常细胞MRC-5和胃癌细胞MGC80-3中FGFR的表达量, 证明胃癌细胞中的FGFR表达量高于人正常细胞。然后根据FGFR基因序列制备特异性siRNA, 通过脂质体转染法将siRNA转入胃癌细胞BGC-823中, 观察顺铂组、siRNA组及顺铂+siRNA组中胃癌细胞的增值及凋亡情况。MTT法与流式细胞仪检测发现, 各实验组中, 顺铂+siRNA组的细胞增殖抑制率及凋亡率最高, 其次是顺铂组, 最后才是siRNA组($P<0.05$)。表明, 顺铂化疗比siRNA治疗胃癌的效果好, 但是两者的联合作用可以达到更好的疗效。通过Western blot检测发现, FGFR作为一种促进肿瘤生长和转移所必需的受体, 在胃癌治疗中也起着关键作用^[15]。在FGFR被siRNA基因沉默后, 其表达量也减少了, 促进抑癌作用的发挥。此外, 对胃癌细胞的死亡受体相关蛋白Caspase3, Bax的检测发现, 顺铂+siRNA组中他们的表达量也明显增多。但与顺铂组相比, siRNA组的FGFR表达量较低, Caspase3表达量却较高($P<0.05$), 这说明与化疗相比, FGFR特异性siRNA不仅可明显沉默FGFR的表达, 还可以下调FGFR的表达, 激活死亡受体途径相关蛋白表达, 从而诱

导细胞凋亡。在动物中, 本研究将siRNA转入了胃癌裸鼠的实体瘤中, 通过荧光定量PCR测定FGFR mRNA的表达量发现, 向实体瘤中转染FGFR特异性siRNA可明显降低FGFR mRNA的表达量($P<0.05$)。通过对模型组、顺铂组和顺铂+siRNA组裸鼠的瘤体体积的测量, 发现顺铂+siRNA组可以明显减小瘤体体积的大小, 使瘤体衰退率高达75.3%, 比单独使用顺铂化疗组高23.4%($P<0.05$), 从而证明相比单独使用顺铂化疗治疗胃癌, 顺铂与siRNA联合治疗可促进胃癌治疗的效果, 为化疗联合基因治疗的方法奠定了应用基础, 也为未来胃癌治疗提供了一个新的研究方向。

4 参考文献

- 1 Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 354-362 [PMID: 16489633 DOI: 10.3748/wjg.v12.i3.354]
- 2 Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 2011; 149: 121-130 [PMID: 20940169 DOI: 10.1093/jb/mvq121]
- 3 Roidl A, Foo P, Wong W, Mann C, Bechtold S, Berger HJ, Streit S, Ruhe JE, Hart S, Ullrich A, Ho HK. The FGFR4 Y367C mutant is a dominant oncogene in MDA-MB453 breast cancer cells. *Oncogene* 2010; 29: 1543-1552 [PMID: 19946327 DOI: 10.1038/ncr.2009.432]
- 4 Marmé F, Werft W, Benner A, Burwinkel B, Sinn P, Sohn C, Lichter P, Hahn M, Schneeweiss A. FGFR4 Arg388 genotype is associated with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: 1636-1642 [PMID: 20147743 DOI: 10.1093/annonc/mdq017]
- 5 Nan H, Qureshi AA, Hunter DJ, Han J. Genetic variants in FGFR2 and FGFR4 genes and skin cancer risk in the Nurses' Health Study. *BMC Cancer* 2009; 9: 172 [PMID: 19500394 DOI: 10.1186/1471-2407-9-172]
- 6 Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Nishio K, Yamada Y. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer* 2012; 106: 727-732 [PMID: 22240789 DOI: 10.1038/bjc.2011.603]
- 7 Yang F, Zhang Y, Ressler SJ, Ittmann MM, Ayala GE, Dang TD, Wang F, Rowley DR. FGFR1 is essential for prostate cancer progression and metastasis. *Cancer Res* 2013; 73: 3716-3724 [PMID: 23576558 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3274]
- 8 Coleman SJ, Chioni AM, Ghallab M, Anderson RK, Lemoine NR, Kocher HM, Grose RP. Nuclear translocation of FGFR1 and FGF2 in pancreatic stellate cells facilitates pancreatic cancer cell invasion. *EMBO Mol Med* 2014; 6: 467-481 [PMID: 24503018 DOI: 10.1002/emmm.201302698]
- 9 Xiong Y, Guo W, Li T, Li K. Influence of survivin-targeted siRNA on the biological features of colorectal carcinoma cells. *Front Med China* 2007; 1: 304-307 [PMID: 24573871 DOI: 10.1007/s11684-007-0058-7]
- 10 Zuo Q, Shi M, Li L, Chen J, Luo R. Development

- of cetuximab-resistant human nasopharyngeal carcinoma cell lines and mechanisms of drug resistance. *Biomed Pharmacother* 2010; 64: 550-558 [PMID: 20630698 DOI: 10.1016/j.biopha.2010.03.003]
- 11 Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 116-129 [PMID: 20094046 DOI: 10.1038/nrc2780]
- 12 Katoh M, Katoh M. Pharmacogenomics on gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 566-567 [PMID: 15197357]
- 13 Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* 2003; 424: 797-801 [PMID: 12917690 DOI: 10.1038/nature01811]
- 14 李菁菁, 马正海, 张富春. RNA干扰技术治疗疾病. *细胞生物学杂志* 2007; 29: 657-660
- 15 朱元增, 孙培春, 吴刚. 血管内皮生长因子-C在胃癌中表达情况及对淋巴结转移作用. *中华实用诊断与治疗杂志* 2010; 24: 433-437

编辑 田滢 电编 鲁亚静



顺铂植入剂对人胃癌裸鼠移植瘤生长以及SYK、HER2表达的影响

蔡婷婷, 颜丽萍, 李弘

■背景资料

早期胃癌症状不明显易被忽略, 确诊时常已属晚期。所以胃癌治疗的基础和临床研究一直备受关注。顺铂便是首选化疗药物之一。但常规注射用顺铂引起的多种不良反应极大限制了其应用范围。新型制剂顺铂植入剂改变顺铂给药途径、减少不良反应, 为临床治疗胃癌提供了新思路。因此顺铂植入剂治疗胃癌的基础研究对指导临床用药意义重大。

蔡婷婷, 桂林医学院 广西壮族自治区桂林市 541001

颜丽萍, 李弘, 桂林市第二人民医院消化内科 广西壮族自治区桂林市 541001

蔡婷婷, 主要从事消化系统疾病的基础与临床研究。

作者贡献分布: 本课题由颜丽萍与蔡婷婷共同设计; 颜丽萍负责实验的指导; 本实验的具体实施、数据分析及论文写作由蔡婷婷完成; 李弘负责试剂的提供。

通讯作者: 颜丽萍, 主任医师, 541001, 广西壮族自治区桂林市叠彩区叠彩路2号, 桂林市第二人民医院消化内科。

yanlp@soho.com

电话: 0773-2855202

收稿日期: 2014-04-01 修回日期: 2014-04-29

接受日期: 2014-05-06 在线出版日期: 2014-07-08

Effect of cisplatin implantation on human gastric carcinoma xenograft growth in nude mice and tumor expression of SYK and HER2

Ting-Ting Cai, Li-Ping Yan, Hong Li

Ting-Ting Cai, Graduate School, Guilin Medical School, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Li-Ping Yan, Hong Li, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Guilin, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Li-Ping Yan, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Guilin, 2 Diecai Road, Diecai District, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. yanlp@soho.com

Received: 2014-04-01 Revised: 2014-04-29

Accepted: 2014-05-06 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To assess the effect of cisplatin implantation on human gastric carcinoma xenograft growth and tumor expression of SYK and HER2 in nude mice, and to discuss the mechanism of action of sustained-release cisplatin.

METHODS: A xenograft model of human gastric carcinoma was established by subcutaneous injection of SGC7901 cells in Balb/c nude mice. The mice were then randomly divided into four groups to receive intravenous injection of PBS (group A), intravenous injection of cispla-

tin (group B), intratumor injection of cisplatin (group C), and implantation of cisplatin (group D). After drug intervention, tumor weight and tumor inhibition rate were measured. Tumor tissues were observed after HE staining. Expression of SYK/HER2 was detected by immunohistochemistry. Besides, the cell suspensions prepared from the tumor tissues from the four groups were tested by FCM.

RESULTS: Sustained-release cisplatin could promote apoptosis and suppress tumor growth significantly, and it also could enhance the expression of SYK (group D: 73.42 ± 4.92 vs group C: 30.42 ± 3.92 , $P < 0.05$; group B: 14.14 ± 2.84 vs group A: 5.06 ± 2.96 , $P < 0.05$) and reduce the expression of HER2 (group D: 16.32 ± 4.82 vs group C: 34.82 ± 7.32 , $P < 0.05$; group B: 45.8 ± 6.60 vs group A: 77.34 ± 9.04 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Cisplatin implantation induces tumor cell apoptosis and exerts anticancer function possibly by enhancing the expression of SYK and reducing the expression of HER2.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Cisplatin implantation; Gastric cancer; Nude mice; Apoptosis; SYK; HER2

Cai TT, Yan LP, Li H. Effect of cisplatin implantation on human gastric carcinoma xenograft growth in nude mice and tumor expression of SYK and HER2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2734-2739 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2734.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2734>

摘要

目的: 观察顺铂植入剂植入对人胃癌裸鼠移植瘤模型中肿瘤细胞凋亡以及对脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, SYK)与人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)蛋白在胃癌组织中表达的影响, 探讨其作用的相关机制。

■同行评议者

陈国忠, 主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科

方法: 用人胃癌SGC7901细胞株建立Balb/c裸鼠皮下移植瘤模型, 随机分4组(5只/组): PBS尾静脉注射组(A组)、顺铂尾静脉注射组(B组)、顺铂瘤内注射组(C组)、顺铂植入剂植入组(D组)。药物干预后, 记录瘤质量, 计算抑瘤率, 对瘤体进行HE染色, 免疫组织化学法检测SYK及HER2表达水平, 并取每组部分瘤体制成细胞混悬液进行流式细胞凋亡检测。

结果: 顺铂植入剂能显著抑制移植瘤的生长, 促进其凋亡并能较显著提高SYK的表达[D组(73.42 ± 4.92)与C组(30.42 ± 3.92)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); B组(14.14 ± 2.84)组与A组(5.06 ± 2.96)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)], 降低HER2表达[D组(16.32 ± 4.82)与C组(34.82 ± 7.32)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); B组(45.8 ± 6.60)与A组(77.34 ± 9.04)比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)].

结论: 顺铂植入剂可能通过下调HER2或上调SYK的表达来促进癌细胞的凋亡以发挥抗肿瘤的作用, 从而为临床胃癌的治疗提供新思路。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 顺铂植入剂; 胃癌; 裸鼠; 细胞凋亡; 脾酪氨酸激酶; 人表皮生长因子受体2

核心提示: 本研究通过对比观察脾酪氨酸激酶、人表皮生长因子受体2等与胃癌的早期、进展期、凋亡及预后密切相关的蛋白表达情况和细胞凋亡情况的流式细胞术散点图发现在胃癌的发生发展过程中顺铂植入剂能更为高效地抑制胃癌细胞增殖, 促进其凋亡。这很可能是由于顺铂植入剂在用药部位使药物浓度呈现稳定持续的高水平状态从而达到抑制癌细胞增殖, 促进其凋亡, 杀灭微小转移灶及游离癌细胞, 明显降低胃癌转移侵袭的机率, 显著改善预后, 提高生活质量的目的, 这一发现对肿瘤的早期预防, 进展期治疗以及预后均提出了新思路。

蔡婷婷, 颜丽萍, 李弘. 顺铂植入剂对人胃癌裸鼠移植瘤生长以及SYK、HER2表达的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2734-2739 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2734.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2734>

0 引言

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 发病率17.6/100000, 在消化系恶性肿瘤排行中居首位。我国是胃癌发生率远高于世界平均水平, 每年有26万多人死于

胃癌, 占有肿瘤死亡的23.93%, 其病程较短, 恶性程度高, 胃癌患者尤其当病情进展到中晚期时死亡率极高, 生存率低^[1], 生活质量也受到严重影响。新型植入用顺铂是长效抗肿瘤制剂, 能明显改善恶性肿瘤如肝癌^[2]、食管癌等预后, 其优势在临床已有报道^[3]。但有关其治疗胃癌的基础实验方面研究较少。本研究旨在探讨其对人胃癌裸鼠皮下种植瘤的抑制作用, 初步阐明顺铂缓释制剂诱导凋亡的机制, 并验证其在抗肿瘤方面的优势, 为该缓释药物的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 20只SPF级Balb/c裸鼠, 雌雄各10只, 均为5周龄, 体质量18-20 g, 由桂林医学院实验动物中心提供; SGC7901细胞系由广西医科大学实验中心提供。DMEM培养基及胎牛血清(Hyclone公司); 兔抗人脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, SYK)多克隆抗体(博士德公司); 鼠抗人c-erbB-2单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司); 流式细胞凋亡Annexin/PI双染试剂(购自eBioscience), 检测仪器采用美国BD公司生产FACSAria™ III型流式细胞仪; 顺铂(CDDP)注射液(上海旭东海普药业有限公司, 25 mg/mL); 顺铂缓释制剂(生产厂家: 安徽丰原中人药业公司, 剂型: 植入剂; 规格: 20 mg, 批号: 20120403)。

1.2 方法

1.2.1 建立动物模型并干预: 培养SGC7901细胞株, 收集对数期细胞并制成 1.5×10^8 /mL的细胞悬液, 于裸鼠右前肢腋下注射0.2-0.3 mL(约 3.0×10^7 个/只), 约15 d肿瘤可长至直径约5 mm大小表明致瘤成功, 一组5只, 随机分为4组: A组: PBS尾静脉注射组、B组: 顺铂尾静脉注射组、C组: 顺铂瘤内注射组, D组: 顺铂植入剂植入组。于20、25、30 d分别给予A组PBS(1 mg/kg)、B组CDDP(1 mg/kg)、C组CDDP(1 mg/kg)处理, D组仅在成瘤后20 d植入顺铂缓释剂(0.4 mg/kg)。35 d后, 取出瘤体并称质量, 用千分尺测出肿瘤的最长径(a)和最短径(b)并计算出瘤体体积 $[V(\text{mm}^3) = 0.5 \times a \times b^2]$ 及抑瘤率 $\{\text{抑瘤率} = [1 - \text{实验组平均瘤质量}(\text{B、C、D组为实验组}) / \text{A组平均瘤质量}] \times 100\%\}$ 。同一瘤组织分两部分处理: 一部分用甲醛固定, 经石蜡包埋后严格按照相应的步骤进行常规HE染色及免疫组织化学检测SYK、HER2的表达; 另一部分制成细胞混悬液, 严格按照凋亡试剂盒的操作步骤进行处理。

1.2.2 免疫组织化学法及其结果判定: (1)SP免

■ 研发前沿

顺铂植入剂具备良好的药物代谢动力学研究, 但在胃癌早期、进展期, 顺铂植入剂是否均能比常规顺铂注射液更加有效地抑制肿瘤生长至关重要, 因此经顺铂不同剂型干预后对比观察相关蛋白表达变化成为研究热点, 尤其是与胃癌早期、进展期密切相关的蛋白表达。

■相关报道

研究报道顺铂植入剂具备良好的药物代谢动力学研究,具有稳定维持局部药物高浓度的特点,减少了全身不良反应,在临床肿瘤的治疗中操作简单可行。

表 1 各组SYK及HER2的表达、瘤质量及抑瘤率 ($n = 5$, mean $\pm$ SD)

分组	SYK(%)	HER2(%)	瘤质量	抑瘤率(%)
A组	5.06 $\pm$ 2.96 ^a	77.34 $\pm$ 9.04 ^a	1.53 $\pm$ 0.17 ^a	—
B组	14.14 $\pm$ 2.84 ^a	45.8 $\pm$ 6.6 ^a	1.12 $\pm$ 0.17 ^a	27.1 ^a
C组	30.42 $\pm$ 3.92 ^a	34.82 $\pm$ 7.32 ^a	0.64 $\pm$ 0.05 ^a	43.0 ^a
D组	73.42 $\pm$ 4.92	16.32 $\pm$ 4.82	0.23 $\pm$ 0.12	63.8

^a $P < 0.05$ vs D组. A组: PBS尾静脉注射组; B组: 顺铂尾静脉注射组; C组: 顺铂瘤内注射组; D组: 顺铂植入剂植入组. SYK: 脾酪氨酸激酶; HER2: 人表皮生长因子受体2.

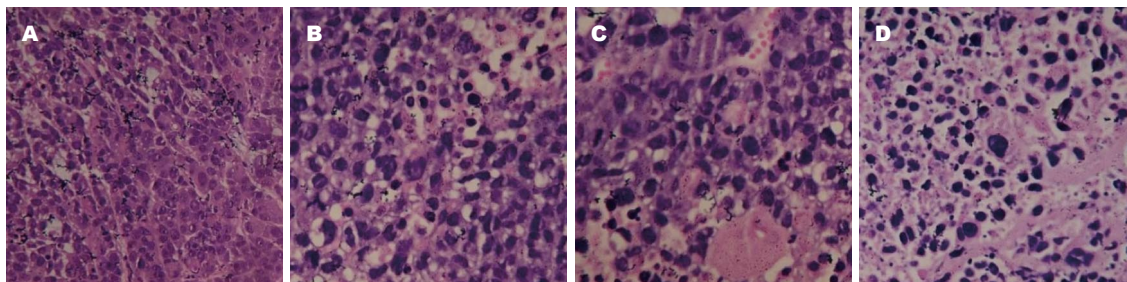


图 1 各组HE染色结果. A: PBS尾静脉注射组($\times 200$); B: 顺铂尾静脉注射组($\times 400$); C: 顺铂瘤内注射组($\times 400$); D: 顺铂缓释剂植入组($\times 400$).

疫组织化学法检测SYK、HER2蛋白表达: 石蜡切片脱蜡水化后, 每隔3 min用pH为7.4的PBS冲洗1次(共3次); 对组织抗原进行相应的修复; 13% H_2O_2 (50 μ L/张)室温孵育10 min. PBS冲洗3次, 间隔3 min; 弃PBS液, 每张切片滴加50 μ L对应的一抗, 室温孵育60 min, PBS冲洗3次, 间隔3 min; 弃PBS液, 滴1滴即用型MaxvisionTM快捷免疫组织化学试剂, 室温孵育10 min, PBS冲洗3次, 间隔3 min; 除去PBS, 滴100 μ L DAB, 冲洗, 苏木精复染, PBS 冲洗反蓝, 脱水干燥, 二甲苯透明, 晾干封片待干燥后镜检计数; (2)免疫组织化学结果判定: SYK和HER2蛋白阳性染色均以细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性. 400 $\times$ 镜下从每张组织切片染色的最强区域中选10个视野, 使用目镜网格微尺计数1000个细胞计算阳性细胞率(阳性细胞率 = 阳性细胞数/肿瘤细胞数 $\times 100\%$).

1.2.3 流式细胞术测细胞凋亡: 取出四组新鲜的肿瘤组织进行适度研磨, 用PBS冲洗经筛网过滤后制成细胞混悬液, 2000 r/min离心5 min, 弃上清, 用200 μ L PBS混悬, 2000 r/min离心5 min, 弃上清后用100 μ L 1 $\times$ buffer混悬至 1×10^6 分别装于4个1.5 mL的EP管内, 加5 μ L Annexin V, 室温避光放置30 min, 经1 $\times$ buffer洗涤后用200 μ L 1 $\times$ buffer制成细胞混悬液, 加入5 μ L Propidium iodides, 2 $^{\circ}C$ -8 $^{\circ}C$ 避光孵育10 min, 过滤上机.

统计学处理 用SPSS17.0统计软件进行分

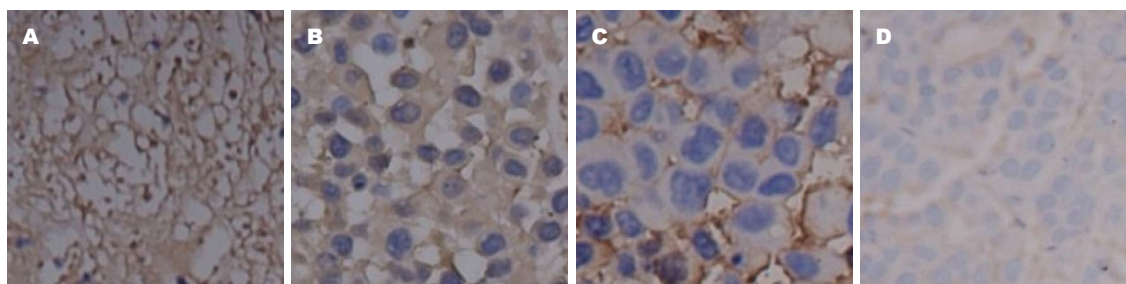
析, 所有数据描述用mean $\pm$ SD表示, 采用实验组与对照组、顺铂植入组与常规顺铂注射组两样本组间的 t 检验, 各组之间用方差分析 F 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 移植瘤体生长情况、瘤质量及抑瘤率 20只裸鼠均在预期的时间内成瘤, 成瘤率100%. 体积: A组1564 mm³ $\pm$ 180 mm³、B组883 mm³ $\pm$ 46 mm³、C组584 mm³ $\pm$ 91 mm³、D组296 mm³ $\pm$ 146 mm³. D组体积与A、B、C组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $F = 160.568$), D组瘤质量与A、B、C组比较均降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), D组的抑瘤率明显高于其他三组(表1).

2.2 HE染色 A组中可见腺管样结构, 有少量细胞凋亡和片状坏死, 肿瘤组织侵袭到脂肪和肌肉组织. B组肿瘤细胞有明显的异型性, 未见明显腺管样结构, 可见小片凋亡及坏死; 肿瘤局部侵袭到脂肪组织. C组肿瘤细胞有明显的异型性, 未见明显腺管样结构, 可见片状凋亡及坏死灶; 肿瘤组织侵袭不明显. D组细胞异型性不明显, 未见腺管样结构, 可见明显细胞凋亡和大量坏死; 未见侵袭其他组织, 长势慢(图1).

2.3 SYK和HER2免疫组织化学结果及相关性分析 A、B、C、D组HER2的表达逐渐下降, 而SYK的表达则呈逐渐升高的趋势($P = 0.000$, $F = 96.04$)(图2, 3).



■ 创新盘点

本研究从与肿瘤发生发展密切相关的多种蛋白表达角度比较分析顺铂植入剂与常规顺铂注射液在抗肿瘤方面的差异。

图 2 HER2的表达情况. A: PBS尾静脉注射组($\times 200$); B: 顺铂尾静脉注射组($\times 400$); C: 顺铂瘤内注射组($\times 400$); D: 顺铂缓释剂植入组($\times 400$).

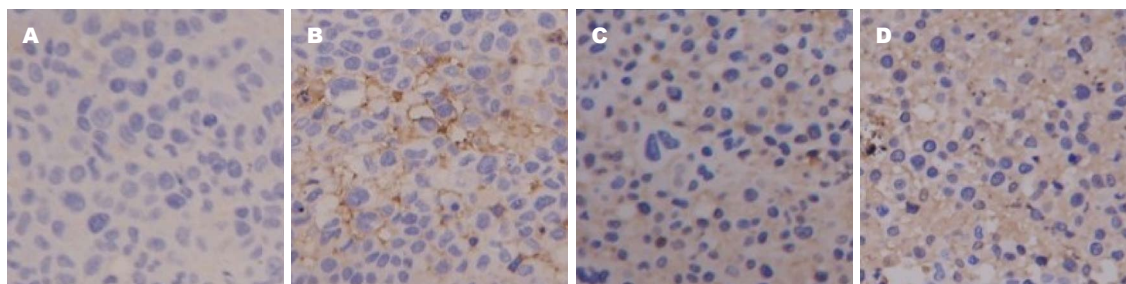


图 3 SYK的表达情况. A: PBS尾静脉注射组($\times 200$); B: 顺铂尾静脉注射组($\times 400$); C: 顺铂瘤内注射组($\times 400$); D: 顺铂缓释剂植入组($\times 400$).

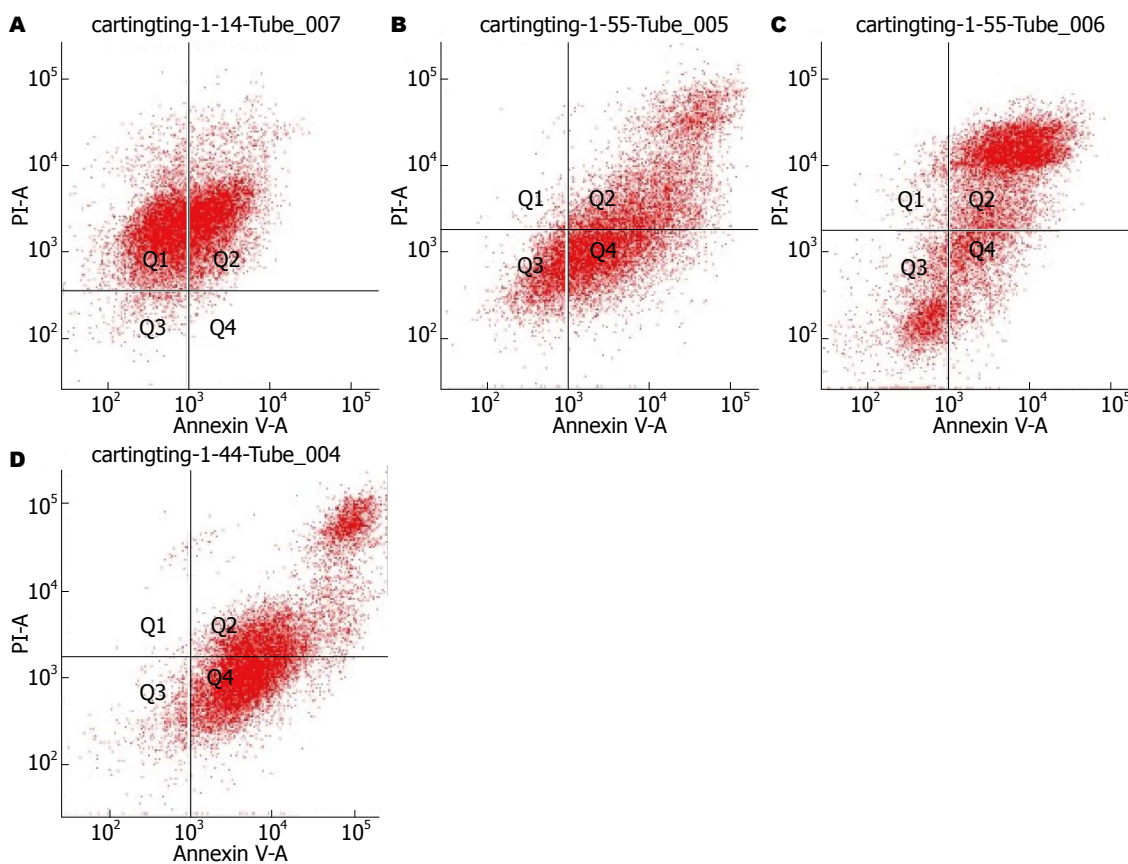


图 4 细胞凋亡的流式细胞术散点图. A: PBS尾静脉注射组; B: 顺铂尾静脉注射组; C: 顺铂瘤内注射组; D: 顺铂缓释剂植入组.

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 A、B、C、D组肿瘤组织中细胞凋亡率呈逐渐升高趋势(图4).

■应用要点

对于临床医生来说,确诊为胃癌的患者可通过在癌变局部植入适量顺铂植入颗粒进行治疗,减少不良反应,操作简单易行;对于病理医生而言,应充分认知与胃癌早期和进展期密切联系的相关因子评分标准,准确判断,为临床医生判断顺铂植入剂的用量提供确切依据。

3 讨论

细胞凋亡调控失衡对肿瘤发生发展的影响极为重要^[4]。顺铂具有促肿瘤细胞凋亡的作用成为临床治疗肿瘤的常用药^[5,6],但常规注射用顺铂会引起全身多个系统的不良反应,如肾毒性,中枢神经受损引起的耳鸣耳聋等。本研究HE染色和抑瘤率结果表明顺铂缓释剂在促肿瘤细胞凋亡方面比常规顺铂制剂效果更好,这可能因为缓释给药系统使药物能够达到较高的浓度,且作用持久^[2],将其用于胃癌术后的植入,对促肿瘤凋亡、抑制转移和改善预后具有相当大的作用,是晚期或不适合做手术的患者较为理想的选择。SYK作为一种抑癌基因在很多正常细胞中表达,Zyss等^[7]发现SYK有抑制细胞分裂和增殖的作用,其表达与胃癌细胞凋亡之间呈明显的负相关,提示SYK作为一种抑癌基因,存在通过促进肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤生长的可能性^[8-10]。Mahabeleshwar等^[9]、Toyama等^[10]经研究发现SYK可通过抑制HER2的表达而发挥抑癌作用。原癌基因HER2具有致癌作用,其作用机制为抑制凋亡,促进增殖,增加肿瘤细胞的侵袭能力,促进肿瘤血管新生和淋巴管新生^[11-18]。通常HER2在晚期胃癌和转移的淋巴结中呈高表达,提示HER2与胃癌转移关系更为密切,丁春明^[19]和刘春忻^[20]发现原癌基因HER2具有致癌作用,在胃癌转移的淋巴结中,HER2蛋白呈高表达,与原位癌比较有显著差异,其作用机制为抑制肿瘤细胞的凋亡,促进增殖,增加其侵袭能力,促进肿瘤血管和淋巴管的新生。HER2蛋白及其mRNA在人类多种肿瘤中都存在高表达现象,HER2基因的扩增可能是关系胃癌患者预后的一个独立因素^[21],在使用药物的条件下抑制HER2基因蛋白表达则能达到诱导肿瘤细胞凋亡的效果^[22]。本研究通过采用不同的干预方式对裸鼠荷瘤进行处理后,发现SYK与HER2的表达呈负相关,这一结果暗示了顺铂缓释剂有可能通过下调her2的表达、上调SYK的表达来促进肿瘤细胞的凋亡,从而发挥抗癌作用。这与赵亚娟等^[23]、周翡等^[24]的研究相符合。同时顺铂缓释剂组表现为更高的SYK表达,这与其使局部达到更高的药物浓度密切相关,提示其促凋亡作用呈剂量相关性。此外,通过应用FCM进行细胞凋亡的检测结果表明植入用顺铂缓释剂能更有效的促进细胞凋亡。

总之,顺铂缓释剂更能有效抑制肿瘤细胞的增殖,促进其凋亡,减少其异型性,并通过上调SYK蛋白和下调her2蛋白的表达而充分发挥其

在促肿瘤细胞凋亡方面的作用,在肿瘤临床治疗上提供了一种新思路。

4 参考文献

- 1 Gordon MA, Gundacker HM, Benedetti J, Macdonald JS, Baranda JC, Levin WJ, Blanke CD, Elatre W, Weng P, Zhou JY, Lenz HJ, Press MF. Assessment of HER2 gene amplification in adenocarcinomas of the stomach or gastroesophageal junction in the INT-0116/SWOG9008 clinical trial. *Ann Oncol* 2013; 24: 1754-1761 [PMID: 23524864 DOI: 10.1093/annonc/mdt106]
- 2 王世亮, 陈殿良, 丁满志, 储成顶, 叶红杨, 周丽春, 吴静, 王军. 顺铂植入剂兔舌内植入药动学研究. *安徽医药* 2007; (6): 487-489
- 3 刘培杰, 徐志巧, 李宁, 帖晓静, 高岭, 张燕, 任宏政. 缓释顺铂瘤体植入联合放疗治疗原发性肝癌的研究. *医药论坛杂志* 2013; 06: 41-42
- 4 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776 [PMID: 11048727]
- 5 潘洪明, 费洪新, 杜静平, 陈正华, 张涛. 人胃癌顺铂耐药细胞系的建立过程. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2009-20135
- 6 孙俊. 铂类抗肿瘤药物及其临床研究进展. *中国药业* 2008; 17: 1-3
- 7 Zyss D, Montcourrier P, Vidal B, Anguille C, Mérezègue F, Sahuquet A, Mangeat PH, Coopman PJ. The Syk tyrosine kinase localizes to the centrosomes and negatively affects mitotic progression. *Cancer Res* 2005; 65: 10872-10880 [PMID: 16322234 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1270]
- 8 Sada K, Takano T, Yanagi S, Yamamura H. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem* 2001; 130: 177-186 [PMID: 11481033 DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002970]
- 9 Mahabeleshwar GH, Kundu GC. Syk, a protein-tyrosine kinase, suppresses the cell motility and nuclear factor kappa B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3'-kinase activity in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 6209-6221 [PMID: 12477728]
- 10 Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Hara Y, Omoto Y, Sugiura H, Zhang Z, Fujii Y. Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett* 2003; 189: 97-102 [PMID: 12445683 DOI: 10.1016/S0304-3835(02)00463-9]
- 11 Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 2001; 19: 554-568 [PMID: 11458821]
- 12 Siddiqua A, Long LM, Li L, Marciniak RA, Kazhdan I. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. *BMC Cancer* 2008; 8: 129 [PMID: 18454859 DOI: 10.1186/1471-2407-8-129]
- 13 Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G. Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. *Mod Pathol* 2007; 20: 192-198 [PMID: 17361205 DOI: 10.1038/modpathol]
- 14 Ananiev J, Gulubova MV, Manolova IM. Prognostic significance of CD83 positive tumor-infiltrating

- dendritic cells and expression of TGF-beta 1 in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1834-1840 [PMID: 22086706 DOI: 10.5754/hge10320]
- 15 Yan SY, Hu Y, Fan JG, Tao GQ, Lu YM, Cai X, Yu BH, Du YQ. Clinicopathologic significance of HER-2/neu protein expression and gene amplification in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1501-1506 [PMID: 21472111 DOI: 10.3748/wjg.v17.i11.1501]
- 16 Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, Nonogaki S, Montagnini AL, da Costa WL, Soares FA. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3030-3036 [PMID: 21709195 DOI: 10.1200/JCO.2010.33.6313]
- 17 Cho EY, Srivastava A, Park K, Kim J, Lee MH, Do I, Lee J, Kim KM, Sohn TS, Kang WK, Kim S. Comparison of four immunohistochemical tests and FISH for measuring HER2 expression in gastric carcinomas. *Pathology* 2012; 44: 216-220 [PMID: 22437741 DOI: 10.1097/PAT.0b013e3283513e8b]
- 18 Im SA, Kim JW, Kim JS, Kim MA, Jordan B, Pickl M, Han SW, Oh DY, Lee HJ, Kim TY, Kim WH, Yang HK, Bang YJ. Clinicopathologic characteristics of patients with stage III/IV (M0) advanced gastric cancer, according to HER2 status assessed by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 2011; 20: 94-100 [PMID: 21532492 DOI: 10.1097/PDM.0b013e3181fc02b7]
- 19 丁春明, 喻钢, 朱宝华. P53和c-erbB-2表达与胃癌进展的关系. *实用癌症杂志* 2011; 26: 31-33
- 20 刘春忻. P53、c-erbB-2、nm23在胃癌组织和转移淋巴结中的表达. *中国老年学杂志* 2011; (31): 2838-2840
- 21 Munro AJ, Niblock PG. Cancer research in the global village. *Lancet* 2010; 376: 659-660 [PMID: 20728211 DOI: 10.1016/S0140]
- 22 廖玲, 刘泓基. Syk基因甲基化与HER2基因在胃癌组织表达的研究. *广东医学* 2011; 5: 660-661
- 23 赵亚娟, 刘海芳, 朱献斐, 黄震. 胃腺癌组织HER-2/neu基因表达及其临床意义. *中华肿瘤防治杂志* 2010; 17: 357-359
- 24 周翥, 李宁, 高勇, 方珏敏, 王理伟. HER-2/neu与胃癌临床病理及预后的相关性研究. *临床肿瘤学杂志* 2010; 15: 518-522

■同行评价

本文设计合理, 结论可靠, 具有一定临床意义.

编辑 田滢 电编 鲁亚静



Calnexin及GRP78在大鼠非酒精性脂肪肝细胞凋亡中的作用

胡晓霞, 王艳, 王晋星一

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病是肝硬化和肝癌的重要病因, 近年来其发病率不断上升, 在我国它已成为仅次于病毒性肝炎的常见肝病。目前非酒精性脂肪性肝病的发生机制尚未完全阐明, 因此关于其发病机制的研究一直是肝病研究的热点。

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, 主要从事肝脏疾病防治的研究。

作者贡献分布: 本研究由胡晓霞设计; 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; 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. 251982143@qq.com

收稿日期: 2014-03-18 修回日期: 2014-04-11

接受日期: 2014-05-29 在线出版日期: 2014-07-08

Role of calnexin and GRP78 in hepatocyte apoptosis in rats with nonalcoholic fatty liver disease

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. 251982143@qq.com

Received: 2014-03-18 Revised: 2014-04-11

Accepted: 2014-05-29 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To observe the changes in calnexin and GRP78 expression in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced with a high-fat, high-sugar diet and to explore their role in hepatocyte apoptosis in rats with nonalcoholic fatty liver disease.

METHODS: Twenty male SD rats were randomly divided into either a normal control group or an NAFLD group. The rats of the NAFLD group were given a high-fat, high-sugar diet for 12 wk to induce NAFLD, while the rats of normal control group were given an ordinary diet. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL) and free fatty acids (FFA) were evaluated. Real-time fluorescence quantitative PCR was applied to detect the mRNA expression of calnexin and GRP78 in liver tissues, and Western blot was ap-

plied to detect the protein expression of calnexin, GRP78, CHOP and p-JNK. Meanwhile, cell apoptosis in the liver was detected by TUNEL assay.

RESULTS: Compared with the control group, serum levels of TG, TC, LDL and FFA significantly increased in the NAFLD group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the level of HDL was decreased ($P < 0.01$). Western blot analysis showed that the expression of calnexin, GRP78, CHOP and p-JNK proteins in the NAFLD group was significantly higher than that in the control group. Compared with the control group, the mRNA expression of calnexin and GRP78 was also increased in the NAFLD group ($P < 0.05$). TUNEL assay showed that the apoptosis of hepatocytes in the NAFLD group was significantly elevated ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The up-regulation of calnexin and GRP78 may be involved in the pathogenesis of NAFLD.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Calnexin; GRP78; Apoptosis

Hu XX, Wang Y, Wang JXY. Role of calnexin and GRP78 in hepatocyte apoptosis in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2740-2745 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2740.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22i19.2740>

摘要

目的: 观察大鼠在非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)形成过程中肝细胞钙联蛋白(calnexin, CNX)及葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)的表达变化, 旨在探讨CNX及GRP78在非酒精性脂肪肝发生发展中的作用。

方法: ♂ SD大鼠20只, 随机分为正常组和

■同行评议者

郭永红, 副主任医师, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

NAFLD组, 每组各10只. NAFLD组大鼠采用高脂高糖饮食制备非酒精性脂肪肝动物模型, 正常组大鼠则给予普通饲料喂养, 造模时间为12 wk. 测定各组大鼠血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)及游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)的含量; 采用实时荧光定量PCR检测肝组织中CNX和GRP78 mRNA的表达变化; 采用Western blot检测肝组织中CNX、GRP78、CCATT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCATT/enhancer-binding protein homology protein, CHOP)及磷酸化JNK(p-JNK)蛋白的表达变化; 同时采用TUNEL法检测肝细胞凋亡情况.

结果: 与正常组比较, NAFLD组大鼠血清中TG、TC、LDL、FFA含量明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而HDL则明显下降($P<0.01$); Western blot结果显示NAFLD组大鼠肝组织中CNX、GRP78、CHOP及p-JNK蛋白的表达显著高于正常组大鼠; 实时荧光定量PCR结果显示, 与正常组大鼠比较, NAFLD组大鼠肝脏中CNX及GRP78 mRNA水平明显增高($P<0.05$); 同时, TUNEL法检测肝细胞凋亡发现NAFLD组大鼠肝细胞凋亡数目较正常组大鼠显著增加($P<0.01$).

结论: 钙联蛋白及GRP78表达上调可能参与了非酒精性脂肪肝的发生发展过程.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 非酒精性脂肪肝; 钙联蛋白; 葡萄糖调节蛋白78; 细胞凋亡

核心提示: 内质网应激参与了非酒精性脂肪性肝病的发生发展过程, 其介导肝细胞损伤的机制可能与内质网应激时凋亡信号通路中CHOP和p-JNK的表达增加有关.

胡晓霞, 王艳, 王晋星. Calnexin及GRP78在大鼠非酒精性脂肪肝细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2740-2745 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2740.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2740>

0 引言

随着人们饮食结构、生活方式的改变, 日常膳食中以脂肪为代表的高热量食物所占比例明显增加, 因此伴随与代谢异常密切相关的非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease,

NAFLD)的发病率大幅上升, 已成为21世纪全球重要的公共健康问题之一. NAFLD是一种与饮酒无关、由多种病因引起的以肝细胞内脂质蓄积过多为病理特征的疾病, 病情由轻到重包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎及脂肪性肝硬化^[1,2]. 在我国, NAFLD是仅次于病毒性肝炎的常见肝脏疾病, 但目前关于NAFLD的发病机制尚未完全阐明. 近年来研究人员对内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)信号通路在代谢综合征中的作用进行了大量研究^[3,4], 但ERS与NAFLD的相关研究鲜有报道. 钙联蛋白(calnexin, CNX)及葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)均为内质网分子伴侣, 在ERS时CNX及GRP78的表达上调, 以维持内质网的稳定, 但如果ERS持续存在, 也可介导细胞凋亡的发生, 从而导致组织的损伤^[5,6]. 本研究以非酒精性脂肪肝大鼠为对象, 观察在非酒精性脂肪肝发生过程中CNX及GRP78的表达变化, 并探讨他们在非酒精性脂肪肝发生发展中的可能作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级SD大鼠购自贵阳医学院实验动物中心[许可证号: SCXK-(黔)2002-0001]; 兔抗大鼠多克隆CNX、GRP78、CCATT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCATT/enhancer-binding protein homology protein, CHOP)及p-JNK抗体购自美国Santa Cruz公司; 甘氨酸、十二烷基硫酸钠、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷、过硫酸铵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; 逆转录试剂盒及SYBR Green购自大连宝生物工程有限公司; 原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒由碧云天试剂公司提供; CNX、GRP78及内参 β -actin引物委托上海生工设计合成. 引物序列如下: CNX: 上游引物5'-CCTCTGCCGCTGTCTCCACT-3'; 下游引物5'-AAAGCACTTGAGGTCATTCT-3'. GRP78: 上游引物5'-TGGAATCTTCACCTCAGAGTG-3'; 下游引物5'-ATATCCAAGGTGAACACACAC-3'. β -actin: 上游引物5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCT-3'; 下游引物5'-GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGA-3'.

1.2 方法

1.2.1 动物分组及动物模型复制: 健康♂SD大鼠20只, 体质量160-180 g, 在恒温(25℃)、光照周

■ 研发前沿

内质网应激是指由于某种病因引起内质网的生理功能发生紊乱, 从而导致大量错误折叠或未折叠的蛋白质在内质网腔内聚集的一种亚细胞器的病理过程. 近年来关于内质网应激信号通路在代谢综合征中的研究十分广泛, 但其与非酒精性脂肪性肝病发病机制之间的关系鲜有报道.

■相关报道

有研究人员发现用软脂酸钠诱导体外培养的肝细胞发生脂肪变性的过程中存在内质网应激反应,且内质网应激时可通过上调CHOP和p-JNK的表达介导脂肪变性的肝细胞发生凋亡。

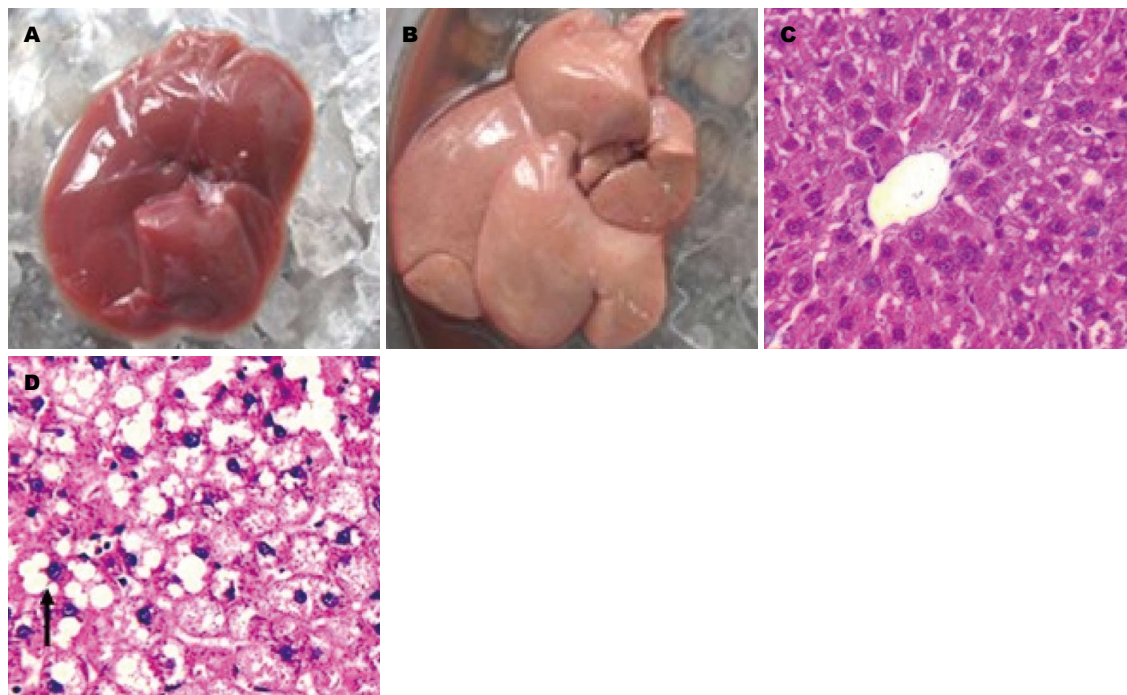


图1 各组大鼠肝脏病理学变化. A: 正常对照组大鼠肝组织大体标本; B: NAFLD组大鼠肝组织大体标本; C: 正常对照组大鼠肝组织HE染色($\times 400$); D: NAFLD组大鼠肝组织HE染色($\times 400$). NAFLD: 非酒精性脂肪肝.

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2组: 正常对照组和非酒精性脂肪肝组(NAFLD组), 每组各10只. NAFLD组大鼠给予高脂高糖饲料(78%基础饲料, 15%猪油, 5%蔗糖, 2%胆固醇)喂养, 造模时间为12 wk; 正常对照组大鼠则给予普通饲料喂养. 造模结束后股动脉放血处死大鼠, 留取血液及全部肝脏组织, 肝组织保存于 -80°C 低温冰箱以备进行Western blot及PCR检测; 血液1000 r/min离心15 min后将血清分装置于 -80°C 低温冰箱保存.

1.2.2 肝组织病理学检查: 新鲜肝组织于4%多聚甲醛溶液中固定48 h后, 经石蜡包埋、切片及HE染色后在显微镜下观察肝组织的病理学改变.

1.2.3 血清生化指标检测: 血清甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)及游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)的含量采用日立7170A全自动生化分析仪测定.

1.2.4 实时荧光定量PCR检测肝组织中CNX和GRP78 mRNA的表达: 按试剂盒说明书提取肝组织总RNA, 逆转录合成cDNA; 以合成的cDNA为模板进行实时荧光定量PCR检测, 反应体系为25 μL : 2 $\times$ SYBR Green I 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各1.0 μL , 反转录产物 2 μL , DEPC H_2O 补足体积. 反应条件为 50°C 2 min, 95°C 10 min,

95°C 15 s, 60°C 1 min, 最后两步重复40个循环. 以每例标本组织的目的片段与内参 β -actin的循环值的比值作为该样本的基因表达的相对数值.

1.2.5 Western blot检测肝组织中CNX、GRP78、CHOP及p-JNK蛋白的表达情况: 按试剂盒说明书提取肝组织总蛋白, 采用BCA法进行蛋白定量, 蛋白样品(含80 μg 总蛋白)经SDS-PAGE电泳后, 采用半干电转移将蛋白质分子从聚丙烯酰胺凝胶转移到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(CNX、GRP78、CHOP稀释比例为1:1000, p-JNK稀释比例为1:500) 4°C 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(1:3000)在室温下孵育1 h. 洗膜缓冲液洗膜3次后加入化学发光试剂, 室温下与PVDF膜孵育1 min, 然后在暗室中用Kodak胶片进行放射自显影.

1.2.6 TUNEL法检测肝组织中肝细胞凋亡情况: 严格按照试剂盒说明书进行操作. 在显微镜下观察凋亡的细胞, 以胞核被标记上绿色荧光的细胞作为凋亡细胞, 并计算凋亡指数. 凋亡指数 = (凋亡细胞数/细胞总数) $\times 100\%$.

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

表 1 各组大鼠血清TG、TC、LDL、HDL及FFA浓度 (mean ± SD, $n = 10$)

分组	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	LDL(mmol/L)	HDL(mmol/L)	FFA(μ mol/L)
正常组	1.06 ± 0.27	1.94 ± 0.31	0.79 ± 0.26	0.94 ± 0.15	602.50 ± 51.28
NAFLD组	2.65 ± 0.11 ^a	3.88 ± 0.23 ^a	2.53 ± 0.63 ^b	0.31 ± 0.06 ^b	1249.70 ± 96.53 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组. TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; LDL: 低密度脂蛋白; HDL: 高密度脂蛋白; FFA: 游离脂肪酸; NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病.

表 2 各组大鼠肝组织中CNX、GRP78 mRNA表达及肝细胞凋亡结果(mean ± SD, $n = 10$)

分组	CNX mRNA	GRP78 mRNA	凋亡指数(%)
正常组	163.50 ± 23.6	152.37 ± 35.20	2.57 ± 0.59
非酒精性脂肪性肝病组	399.38 ± 37.92 ^a	316.85 ± 49.62 ^a	10.73 ± 2.05 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组. CNX: 钙联蛋白; GRP78: 葡萄糖调节蛋白78.

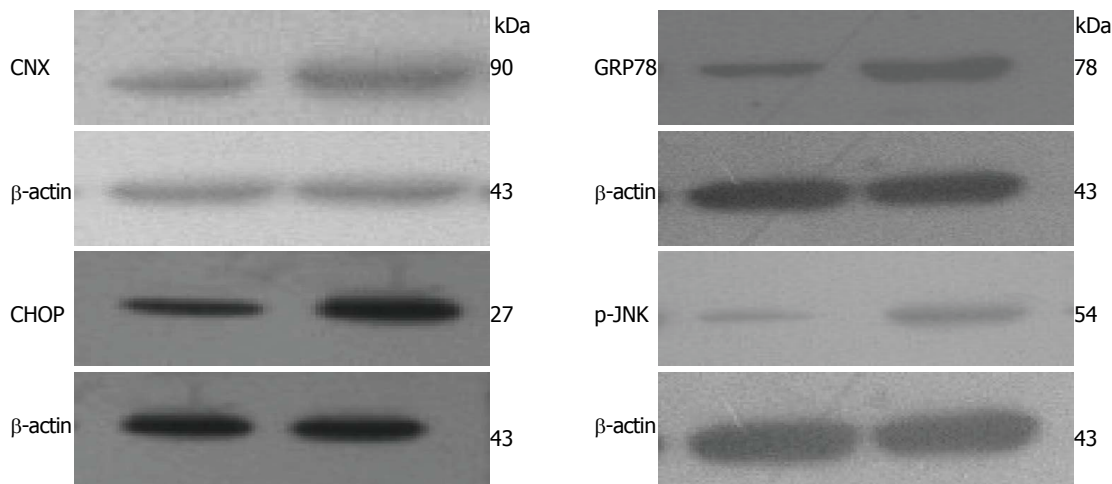


图 2 Western blot显示各组大鼠肝组织中CNX、GRP78、CHOP及p-JNK的表达. CNX: 钙联蛋白; GRP78: 葡萄糖调节蛋白78.

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏病理学变化 如图1所示, 正常组大鼠肝脏外观为暗红色, 表面光滑; NAFLD组大鼠肝脏体积较正常组大鼠有所增大, 且包膜紧张, 肝脏颜色呈乳黄色, 触之有油腻感; 肝组织切片经HE染色后在光学显微镜下观察发现, 正常组大鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝细胞分界清晰, 大小较一致, 肝窦排列规则, 汇管区清晰, 无炎症反应. NAFLD组大鼠肝小叶结构明显紊乱, 肝细胞发生肿大, 胞质内充满大量大小不等的圆形脂滴, 肝细胞发生明显的空泡样变性, 呈中重度单纯性脂肪肝改变.

2.2 各组大鼠血清TG、TC、LDL、HDL及FFA浓度变化 与正常对照组大鼠比较, NAFLD组大鼠血清TG、TC、LDL与FFA浓度均显著增加,

而HDL水平则明显降低, 差异具有统计学意义. 各组大鼠血清TG、TC、LDL、HDL及FFA结果如表1.

2.3 实时荧光定量PCR检测肝组织中CNX和GRP78 mRNA表达变化 实时荧光定量PCR结果显示, 与正常对照组比较, NAFLD组大鼠肝组织中CNX及GRP78 mRNA表达明显增高, 差异具有显著性($P < 0.05$). 各组大鼠肝组织中CNX及GRP78 mRNA表达情况如表2.

2.4 Western blot检测肝组织中CNX、GRP78、CHOP及p-JNK蛋白的表达情况 Western blot结果显示, 正常肝组织内有少量CNX、GRP78、CHOP及p-JNK蛋白表达, 而NAFLD组大鼠肝组织中CNX、GRP78、CHOP及p-JNK的表达均显著增加. 各组大鼠肝组织中CNX、GRP78、

■创新盘点

本次研究发现, 在非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织中GRP78及calnexin的表达增加, 进一步证实了非酒精性脂肪肝的发生过程中有内质网应激的参与, 且内质网应激可能通过上调CHOP和p-JNK的表达介导脂肪变性的肝细胞发生凋亡, 导致肝组织的损伤, 这可能是非酒精性脂肪性肝病重要的发病机制之一.

■应用要点

内质网应激是非酒精性脂肪性肝病发生发展过程中一个重要的环节。减少内质网应激导致的肝细胞凋亡有望成为防治非酒精性脂肪性肝病的有效途径之一。

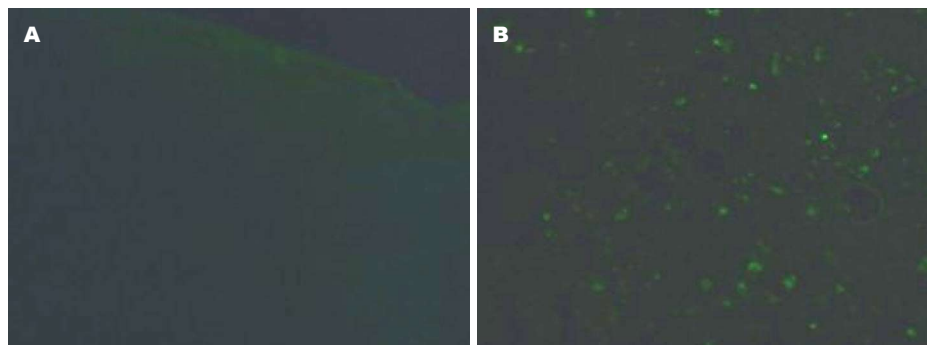


图3 TUNEL法显示各组大鼠肝细胞凋亡情况($\times 400$)。A: 正常对照组大鼠肝组织; B: NAFLD组大鼠肝组织。

CHOP及p-JNK蛋白表达情况如图2。

2.5 TUNEL法检测肝组织中肝细胞凋亡情况

TUNEL法检测肝细胞凋亡结果显示, 与正常对照组比较, NAFLD组大鼠肝组织中肝细胞凋亡数目明显增多, 差异具有显著性($P < 0.01$)。各组大鼠肝细胞凋亡情况如表2, 图3。

3 讨论

肝脏是脂类代谢的重要场所, 大量研究表明高脂血症是导致脂肪肝的主要原因之一。NAFLD患者临床上常存在着明显的脂质代谢紊乱, 提示NAFLD与血脂异常存在着密切的关系^[7,8]。本实验采用高脂高糖饮食喂养大鼠, 12 wk后NAFLD组大鼠发生了明显的脂质代谢紊乱及高脂血症, 血清生化检查结果表明大鼠血清TG、TC、LDL、FFA水平明显高于正常组, 而HDL水平则较正常组显著降低。同时, 肝组织病理学检查也发现NAFLD组大鼠肝脏呈现单纯性脂肪肝改变, 上述实验结果表明非酒精性脂肪肝大鼠动物模型的复制是成功的。

内质网是真核细胞内重要的亚细胞器, 具有调节细胞内蛋白质合成后的折叠与聚集、细胞的应激反应以及维持细胞内钙离子水平等功能^[9], 同时内质网也参与脂类的代谢过程。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指在多种生理或病理条件下细胞内质网钙稳态失衡或蛋白质加工运输障碍、生理功能发生紊乱的一种亚细胞器的病理过程^[10]。CNX是内质网中的I型跨膜蛋白, 是一种重要的类凝集素分子伴侣, 参与细胞内的许多重要生物学功能, 如辅助新合成肽链的折叠、装配和转位等^[11,12]。关于CNX与非酒精性脂肪性肝病的研究国内外鲜有报道。GRP78同样是分布于内质网的分子伴侣, 其主要作用与CNX类似, 也是协助蛋白质的折叠、装配和运输。在ERS条件下, CNX和GRP78

的表达会显著增加, 故他们可以作为ERS的标志蛋白^[13]。本次研究发现, 给予高脂高糖饮食诱导NAFLD 12 wk后, 大鼠肝组织中CNX和GRP78在蛋白及基因水平的表达显著增高, 说明在NAFLD的发生发展过程中存在内质网应激反应。适当的ERS有利于细胞内环境稳态的恢复和维持细胞存活, 是细胞启动的一种自我保护反应机制, 但长期持续的ERS则可以损伤内质网的功能, 此时细胞将启动内质网相关的凋亡程序^[14]。ERS触发细胞凋亡的机制有以下几条途径: (1)活化Caspase12; (2)JNK磷酸化; (3)转录产生CHOP增多, 通过上述3条途径使肝细胞凋亡增加, 从而导致肝细胞损伤^[15]。在本次研究中发现, 高脂高糖饮食诱导大鼠NAFLD 12 wk后, 大鼠肝组织中CHOP及p-JNK的表达显著高于正常组大鼠, 这一结果与曹洁等^[16]在软脂酸钠诱导的脂肪变性肝细胞凋亡中的研究结果一致。此外, 我们采用TUNEL法检测发现NAFLD组大鼠肝细胞凋亡较正常对照组显著增加, 提示在NAFLD的发生发展过程中不仅发生了明显的ERS反应, 同时还启动了ERS相关的凋亡程序。ERS发生时可能通过上调CHOP和p-JNK的表达介导脂肪变性的肝细胞发生凋亡, 从而导致肝组织的损伤, 这可能是NAFLD发生的重要机制之一。

4 参考文献

- 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 临床肝胆病杂志 2010; 26: 120-124
- Kim CH, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a manifestation of the metabolic syndrome. *Cleve Clin J Med* 2008; 75: 721-728 [PMID: 18939388]
- 夏志, 张英梅, 任骏. 内质网应激与代谢综合征的机制及治疗潜能. *神经药理学报* 2012; 2: 34-44
- Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006; 86: 1133-1149 [PMID: 17015486]
- 张海燕, 温韬, 丁淑芹, 卢静, 李胜利, 王晶晶, 武彦宁, 朴正福. 内质网及氧化应激在大鼠慢性肝损伤中的变

- 化. 肝脏 2009; 14: 23-26
- 6 Guérin R, Arseneault G, Dumont S, Rokeach LA. Calnexin is involved in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in the fission yeast. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 4404-4420 [PMID: 18701708 DOI: 10.1091/mbc.E08-02-0188]
- 7 苏致琰. 辛伐他汀在非酒精性脂肪肝患者高脂血症中的效用. 中国实用医药 2012; 7: 197
- 8 韩英, 韩者艺. 高脂血症与肝病. 中国实用内科杂志 2011; 31: 668-670
- 9 Hosoi T, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci (Lond)* 2010; 118: 19-29 [PMID: 19780718 DOI: 10.1042/CS20080680]
- 10 温韬, 张海燕, 卢静, 李胜利, 王晶晶, 朴正福. 内质网应激在四氯化碳致大鼠急性肝损伤中的作用探讨. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 786-789
- 11 李爱玲, 修瑞娟. 钙联蛋白调控内质网应激诱导的细胞凋亡. 基础医学与临床 2011; 31: 335-338
- 12 Powers-Fletcher MV, Jambunathan K, Brewer JL, Krishnan K, Feng X, Galande AK, Askew DS. Impact of the lectin chaperone calnexin on the stress response, virulence and proteolytic secretome of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 2011; 6: e28865 [PMID: 22163332 DOI: 10.1371/journal.pone.0028865.]
- 13 Inokuchi Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Kurita T, Kubo M, Saito A, Sajiki H, Kudo T, Aihara M, Imaizumi K, Araie M, Hara H. Effect of an inducer of BiP, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (ER) stress-induced retinal cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 334-344 [PMID: 18757512 DOI: 10.1167/iops.08-2123]
- 14 Prins D, Michalak M. Endoplasmic reticulum proteins in cardiac development and dysfunction. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87: 419-425 [PMID: 19526035 DOI: 10.1139/y09-032]
- 15 Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 2009; 14: 996-1007 [PMID: 19360473 DOI: 10.1007/s10495-009-0341-y]
- 16 曹洁, 杨朝霞, 沈薇, 姚隆. 内质网应激在软脂酸钠诱导的脂肪变性LO2肝细胞凋亡中的作用. 第三军医大学学报 2011; 33: 1935-1938

■同行评价

本文对内质网应激在非酒精性脂肪性肝病中的作用进行了初步探讨, 具有一定的学术价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静



Smad4基因敲低对结肠癌阿霉素化疗敏感性的影响

李金鹏, 刘昊, 于皆平, 于红刚

■背景资料

本课题组的前期研究显示, 低剂量阿霉素长时间作用于人结肠癌HCT116细胞能诱导对阿霉素的作用不敏感现象, 并上调了上皮细胞间质细胞样转化相关的标志物和转录因子的表达, 我们推测阿霉素可能诱导了结肠癌细胞发生了间质细胞样转化。很多研究表明转化生长因子 β 参与了多种癌细胞的上皮细胞间质细胞样转化过程。

李金鹏, 刘昊, 于皆平, 于红刚, 武汉大学人民医院消化内科湖北省武汉市 430060

李金鹏, 主要从事消化系统肿瘤的防治研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81272693

作者贡献分布: 实验操作与论文撰写由李金鹏完成; 刘昊参与实验设计和实验指导; 于皆平与于红刚参与论文修改。

通讯作者: 于红刚, 主任医师, 430060, 湖北省武汉市武昌区解放路238号, 武汉大学人民医院消化内科。yuhonggang@126.com
电话: 027-88041919-8455

收稿日期: 2014-03-23 修回日期: 2014-04-26

接受日期: 2014-04-30 在线出版日期: 2014-07-08

Smad4 gene knockdown enhances chemosensitivity of colon cancer cells to doxorubicin

Jin-Peng Li, Hao Liu, Jie-Ping Yu, Hong-Gang Yu

Jin-Peng Li, Hao Liu, Jie-Ping Yu, Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81272693

Correspondence to: Hong-Gang Yu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuchang District, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yuhonggang@126.com

Received: 2014-03-23 Revised: 2014-04-26

Accepted: 2014-04-30 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To evaluate whether small hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of the *Smad4* gene influences resistance of colon cancer cells to doxorubicin *in vitro*.

METHODS: An *Smad4* shRNA was stably transfected into human colon cancer HCT116 cells to silence the *Smad4* gene. Cells were basically divided into three groups: shRNA-negative control cells (RNAi-NC), shRNA-*Smad4* cells (RNAi-*Smad4*) and HCT116 cells untreated by doxorubicin (CONTROL). Doxorubicin (50 nmol/L) was applied to treat cells for 7 d. The expression of *Smad4* was examined by Western blot and RT-PCR to test shRNA transfection efficiency. Cell viability was determined by MTT assay, the concentration of transforming growth

factor beta 1 (TGF- β 1) was measured by ELISA, and expression of multidrug resistance gene plasma membrane glycoprotein (MDR P-gp), epithelial mesenchymal transition (EMT) related markers E-cadherin and vimentin, related transcription factors Snail and Slug, *Smad2/3* and phosphorylation of *Smad2/3* expression were detected by Western blot.

RESULTS: The protein and mRNA levels of *Smad4* were significantly reduced after *Smad4* shRNA transfection. After doxorubicin (50 nmol/L) administration for 7 d, MTT assay showed that cell viability ratio in the RNAi-*Smad4* group was lower than that in the RNAi-NC group, and declined in a time dependent manner. ELISA assay revealed that TGF- β 1 concentration in the RNAi-*Smad4* and RNAi-NC groups were significantly augmented by doxorubicin ($P < 0.05$). Western blot results indicated that protein expression of MDRP-gp, vimentin, Snail and Slug in the RNAi-NC group was higher than that in the CONTROL group, but RNAi-*Smad4* inhibited such increases. In contrast, expression of E-cadherin in the RNAi-NC group was lower than that in the CONTROL group, but RNAi-*Smad4* enhanced its expression. Doxorubicin administration did not change the expression of *Smad2/3* but enhanced phosphorylation of *Smad2/3* expression in the RNAi-*Smad4* and RNAi-NC groups.

CONCLUSION: *Smad4* gene knockdown to block the TGF- β /*Smad4* signal pathway increases chemosensitivity of colon cancer cells to doxorubicin.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *Smad4*; RNA interference; Doxorubicin; Colon cancer; Drug resistance

Li JP, Liu H, Yu JP, Yu HG. *Smad4* gene knockdown enhances chemosensitivity of colon cancer cells to doxorubicin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2746-2751 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2746.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2746>

■同行评议者

李家平, 教授, 主任医师, 中山大学附属第一医院肿瘤介入科

摘要

目的: 探讨应用小发卡RNA(small hairpin RNA, shRNA)干扰技术敲低*Smad4*基因对结肠癌细胞阿霉素(doxorubicin)化疗敏感性的影响。

方法: 应用shRNA干扰技术敲低人结肠癌HCT116细胞*Smad4*基因, 分空白细胞对照Control组, shRNA阴性对照RNAi-NC组和shRNA干扰RNAi-*Smad4*组, 采用终浓度为50 nmol/L doxorubicin用7 d, 蛋白免疫印迹和逆转录聚合酶链反应鉴定*Smad4*敲低效果。MTT检测细胞存活率。酶联免疫吸附测定检测转化生长因子 β (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1)的表达水平。蛋白免疫印迹检测多药耐药基因糖蛋白(multi drugs resistance gene plasma membrane glycoprotein, MDR P-gp), 上皮细胞间质细胞样转化相关的标志物E-cadherin、Vimentin和相关的转录因子Snail、Slug、*Smad2/3*和磷酸化*Smad2/3*的蛋白表达。

结果: *Smad4* shRNA能够显著敲低*Smad4*基因的表达。MTT结果显RNAi-*Smad4*组较RNAi-NC组的细胞存活率降低, 且呈时间依赖性。50 nmol/L阿霉素作用于癌细胞7 d后, ELISA结果提示阿霉素能显著提高RNAi-*Smad4*组和RNAi-NC组的TGF- β 1的表达($P < 0.05$)。蛋白免疫印迹提示MDR p-gp、Vimentin、Snail和Slug的表达RNAi-NC组较对照组升高而RNAi-*Smad4*能抑制这种高表达, E-cadherin蛋白RNAi-NC组较对照组减低而RNAi-*Smad4*组则能升高该蛋白的表达; 阿霉素处理后不影响*Smad2/3*的表达, 但提高了RNAi-*Smad4*组和RNAi-NC组的磷酸化*Smad2/3*的表达。

结论: 敲低*Smad4*基因以阻断TGF- β /*Smad4*信号通路可提高结肠癌的阿霉素化疗敏感性。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: *Smad4*; RNA干扰; 阿霉素; 结肠癌; 耐药性

核心提示: 低剂量的阿霉素长时间处理人结肠癌HCT116细胞株, 可诱导其产生阿霉素化疗耐药性, 其大体机制可能与阿霉素诱导了转化生长因子 β (transforming growth factor beta 1)/*Smad4*信号通路的激活, 进一步导致癌细胞发生上皮细胞间质细胞样转化, 联合应用*Smad4*基因沉默载体可提高阿霉素的作用敏感性。

李金鹏, 刘昊, 于皆平, 于红刚. *Smad4*基因敲低对结肠癌阿霉素化疗敏感性的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2746-2751

URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2746.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2746>

0 引言

本课题组的前期研究显示, 低剂量阿霉素(doxorubicin)长时间作用于人结肠癌HCT116细胞能诱导对阿霉素的作用不敏感现象, 并上调了上皮细胞间质细胞样转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关的标志物和转录因子的表达, 我们推测阿霉素可能诱导了结肠癌细胞发生了间质细胞样转化。很多研究表明转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β)参与了多种癌细胞的上皮细胞间质细胞样转化过程^[1,2]。本研究拟应用RNA干扰技术敲低结肠癌HCT116细胞*Smad4*基因以阻断TGF- β /*Smad4*信号通路, 加以低剂量阿霉素长时间作用, 观察细胞存活率、耐药蛋白和EMT相关蛋白的表达情况, 拟探讨TGF- β /*Smad4*信号通路是否在结肠癌的阿霉素化疗不敏感中起调节作用。

1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌HCT116细胞购自中科院上海细胞库, 并由湖北省消化系疾病重点实验室传代保存。RPMI 1640培养基来源于美国Gibco公司; 多药耐药基因糖蛋白(multi drugs resistance gene plasma membrane glycoprotein, MDR P-gp)抗体, E-cadherin、vimentin抗体和Snail、Slug抗体购自Santa Cruz公司; 四甲基偶氮唑盐MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐], 二甲基亚砜购自美国Sigma公司; doxorubicin购自美国Alex公司; 逆转录试剂盒购自加拿大Fermentas公司; PCR试剂盒和TGF- β 1 ELISA试剂盒购自上海美轩生物科技有限公司; TRIzol购自美国Invitrogen公司; 提取总蛋白试剂盒及Western blot所需其他试剂购自上海碧云天生物技术研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染: 由季国忠教授团队课题组前期构建^[3]并赠予的*Smad4* RNA干扰(RNA interference, RNAi)慢病毒载体, 经包装、浓缩及检测病毒滴度后人结肠癌HCT116细胞, 筛选出一组*Smad4*干扰效率高的细胞, 即RNAi-*Smad4*组, 对照组为HCT116细胞Control组和感染慢病毒空载体的HCT116细胞RNAi-NC组。

1.2.2 细胞培养: 传代培养Control组, RNAi-NC组和RNAi-*Smad4*组的结肠癌HCT116细胞于含100

■ 研发前沿

RNA干扰(RNAi或RNA沉默(RNA silencing))是指采用一段特异性的非编码RNA序列结合靶基因的mRNA, 形成细胞核内复合物以阻止目的基因表达的一项分子生物学技术。有研究报道癌细胞获得耐药性与细胞分化过程中的表观遗传学改变有关, 上皮细胞间质细胞样转化过程(epithelial to mesenchymal transitions, EMT)可能参与了这一过程。EMT过程在近年来很多研究中发现其参与了癌细胞的侵袭、转移和耐药性的产生。

■ 相关报道

Melissa等报道指出, 上皮细胞被vimentin或vimentin cDNA作用后能够迅速地获得间质细胞样特性. Snail和Slug等EMT相关的转录因子在广泛的环境下参与了EMT的调控和进程. Vuori-luoto等研究发现vimentin还可通过Slug基因调控乳腺癌细胞的EMT过程, 可见EMT的标志物和相关转录因子能够发生相互作用, 共同调控EMT发生发展.

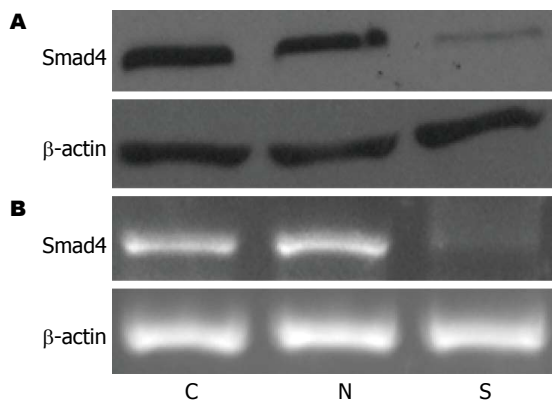


图1 *Smad4*基因敲低后Smad蛋白和mRNA的表达. A: Smad4蛋白; B: Smad4 mRNA. C: Control组; N: RNAi-NC组; S: RNAi-Smad4组.

mL/L小牛血清的RPMI 1640培养液中, 50 mL/L CO₂浓度, 37 °C培养环境下培养. 经胰酶消化, 传代, 取对数生长期细胞进行下列实验.

1.2.3 *Smad4*基因敲低的鉴定: 分别应用Western blot和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测*Smad4*基因敲低后Smad4蛋白和mRNA的表达. 蛋白部分: 提取稳定转染后的细胞总蛋白, BCA法测定各组蛋白浓度, 根据浓度上样行电泳后转膜至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h, 加一抗(1:500)4 °C杂交过夜, TBST漂洗, 加二抗(1:1000)室温孵育2 h, TBST漂洗, 化学发光试剂检测蛋白条带. mRNA部分: 提取稳定转染后的细胞总mRNA, 用PBS洗涤各组细胞3次, 每孔中加入1 mL TRIzol RNA提取液, 按说明书步骤提取总RNA, 紫外分光光度计测A_{260/280}比值, 重复3次, 计算RNA浓度. 将RNA逆转录为cDNA后进行循环扩增. PCR引物由美国Invitrogen公司上海分公司合成, 引物序列: *Smad4*上游引物5'-GGGCTGGAAGTGTATCTG-3'和下游引物5'-CATCATGGTATCCCGATT-3'. β-actin上游引物5'-ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3'和下游引物5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'. 反应条件为: 95 °C, 3 min预变性; 94 °C 30 s; 48 °C 30 s; 72 °C 1 min, 35个循环, 72 °C终末延伸5 min. PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图像扫描系统成像并进行灰度扫描.

1.2.4 MTT检测细胞增殖: 用含100 mL/L胎牛血清的培养液将贴壁细胞配成单个细胞悬液, 浓度为10000-20000/mL, 每孔体积200 μL细胞接种到96孔板. 细胞贴壁后即加药. 三组均设5个孔. 采用50 nmoL/L的阿霉素终浓度作用各组细胞7 d,

隔天更换培养液, 并再次加入等量的阿霉素继续处理, 检测每天癌细胞的存活率. 阿霉素均混匀于无血清培养基后再加入到相应孔中. 作用既定的时间后, 每孔加MTT溶液(5 g/L用PBS配制, pH 7.4)10 μL继续孵育4 h后终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加100 μL DMSO, 置摇床上低速振荡10 min, 使结晶物充分融解. 然后选择490 nm波长在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值, 记录结果并计算细胞存活率. 细胞存活率 = (各浓度组吸光度值均值/空白组吸光度值均值) × 100%, 并绘制直方图.

1.2.5 孔板加药处理: 将传代培养的细胞重悬后种植于6孔板, Control组设2个孔(不加任何药物), 处理组RNAi-NC组和RNAi-Smad4组(均使阿霉素终浓度为50 nmoL/L)各2个孔, 以细胞长至80%-90%孔域并处于对数生长期开始加药, 作用7 d后提取各组总蛋白(期间于隔天更换培养液, 并再次加入相同用量的阿霉素继续培养). 行Western blot检测各组目的蛋白(以β-actin为内对照).

1.2.6 酶联免疫吸附测定: 加药方式同上述“孔板加药处理”, 然后按照TGF-β1 ELISA试剂盒提供的方法逐步操作, 分别检测3组TGF-β1的浓度.

统计学处理 实验均重复3次, 用SPSS17.0软件进行统计分析, 定量结果采用mean ± SD表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析, 两两组间比较采用组间 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *Smad4*基因敲除的鉴定 将稳定转染后的细胞分别提取总蛋白和总mRNA进行Western blot和RT-PCR检测Smad蛋白和mRNA水平的表达. 结果发现应用特异性设计的*Smad4* shRNA转染进入HCT116细胞后能够显著地降低*Smad4*蛋白(图1A)和mRNA(图1B)的表达, 说明转染成功.

2.2 细胞存活率的变化 终浓度50 nmoL/L的阿霉素作用于RNAi-NC组和RNAi-Smad4组细胞7 d, 检测每天癌细胞的存活率. 从折线图(图2)中可以发现, RNAi-NC组第1天到第3天细胞存活率逐渐下降, 而从第4天开始到第7天细胞存活率呈缓慢上升趋势. RNAi-Smad4组每天的细胞存活率均较RNAi-NC组降低, 且呈时间依赖性下降. 说明敲低*Smad4*联合应用阿霉素能够有效地抑制癌细胞的生长.

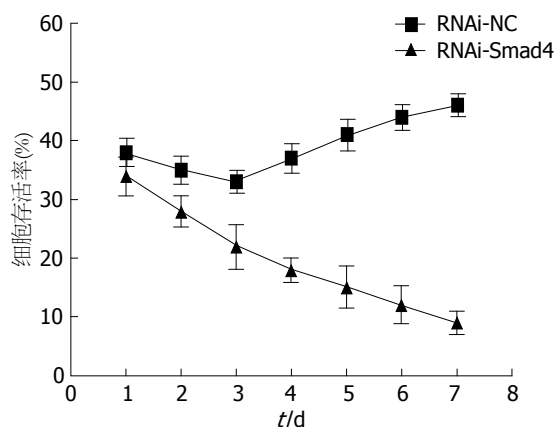


图2 各组阿霉素处理后的细胞存活率。

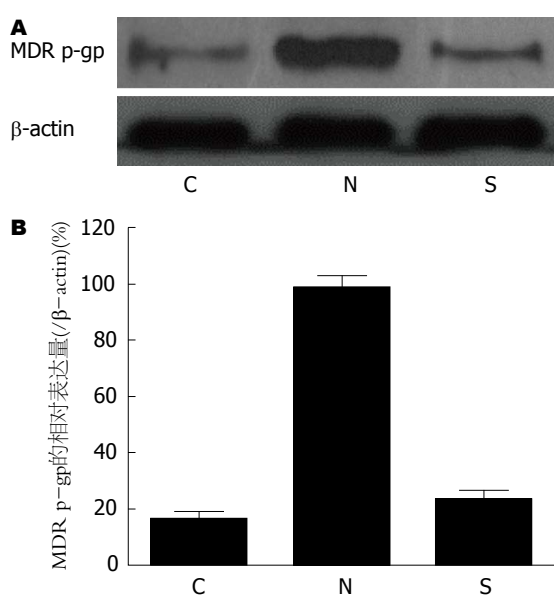


图3 各组阿霉素处理后的细胞MDR p-gp的表达。A: Western blot; B: 相对表达量。C: Control组; N: RNAi-NC组; S: RNAi-Smad4组。MDR p-gp: 药耐药基因糖蛋白。

2.3 耐药蛋白的表达 阿霉素处理细胞7 d后检测各组多药耐药基因糖蛋白MDR p-gp的表达, 从Western blot结果(图3)可以看到, RNAi-NC组MDRp-gp表达量较对照组明显增加, 而RNAi-Smad4组则能抑制这种高表达, 说明敲低*Smad4*基因有利于减低阿霉素的用药抵抗。

2.4 EMT标志物的表达 阿霉素处理细胞7 d后检测各组EMT相关标志物E-cadherin、vimentin和EMT相关转录因子Snail, Slug的表达。从Western blot结果(图4)可以看到vimentin、Snail和Slug的表达RNAi-NC组较对照组升高而RNAi-Smad4能抑制这种高表达, E-cadherin蛋白RNAi-NC组较对照组减低而RNAi-Smad组则能升高该蛋白的表达。

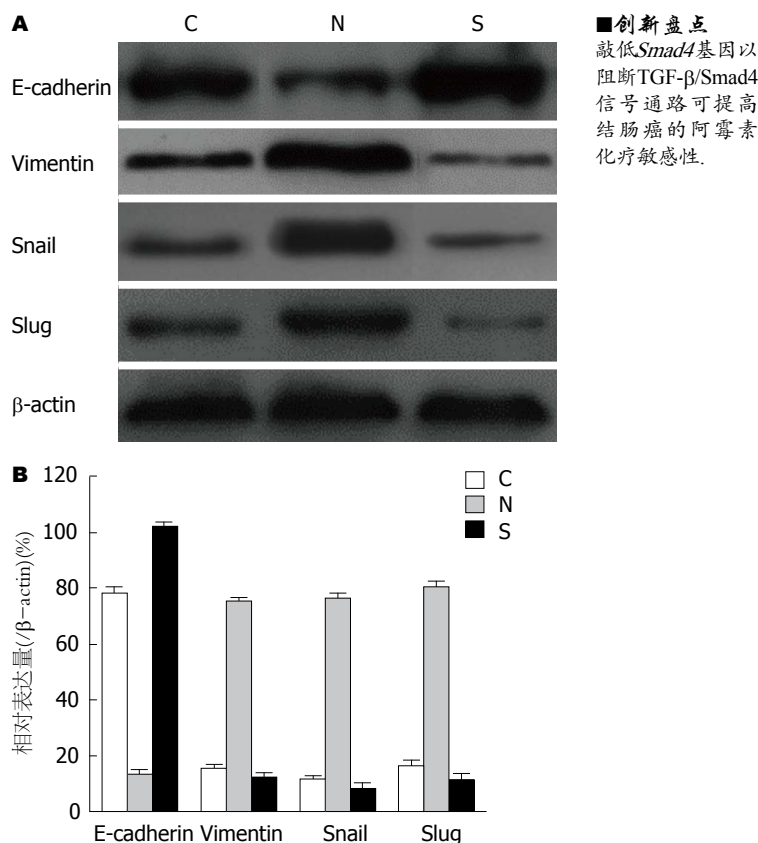


图4 各组阿霉素处理后的细胞EMT相关标志物和转录因子的表达。A: Western blot; B: 相对表达量。C: Control组; N: RNAi-NC组; S: RNAi-Smad4组。

2.5 阿霉素对TGF-β/Smad信号通路的影响 阿霉素处理后分别检测TGF-β1的含量和Smad2/3蛋白及磷酸化Smad2/3(p-Smad2/3)的表达水平。ELISA结果(图5A)显示RNAi-NC组和RNAi-Smad4组的TGF-β1浓度均明显高于Control组($P < 0.05$)。免疫印迹结果(图5B和C)显示阿霉素长时间作用并没有改变Smad2/3的蛋白水平, 但提高了RNAi-NC组和RNAi-Smad4组的p-Smad2/3水平。本组结果表明, 长时间低剂量的阿霉素作用于HCT116细胞通过提高TGF-β1和p-Smad2/3的水平来调节TGF-β/Smad信号通路。正像预期的那样, 敲低*Smad4*基因没有显著影响Smad2/3和p-Smad2/3水平。

3 讨论

我们的前期研究发现长时间低剂量的阿霉素(50 nmol/L)作用于人结肠癌HCT116细胞后, 阿霉素对细胞的杀伤效力逐渐减弱, 且诱导了多药耐药基因糖蛋白MDR p-gp的表达上调。还发现这一过程可能与EMT过程有关, 因为阿霉素同时上调了EMT相关的标志物vimentin及转录因

■创新盘点
敲低*Smad4*基因以阻断TGF-β/Smad4信号通路可提高结肠癌的阿霉素化疗敏感性。

■应用要点

敲低*Smad4*基因用于基因治疗,以阻断TGF- β /*Smad4*信号通路,可能提高结肠癌的阿霉素化疗敏感性,增强阿霉素的用量,较少毒性作用和um提高杀伤肿瘤细胞的效果。本研究成果将为设计新的肿瘤化疗方案或开发新型抗肿瘤药物提供新的思路。

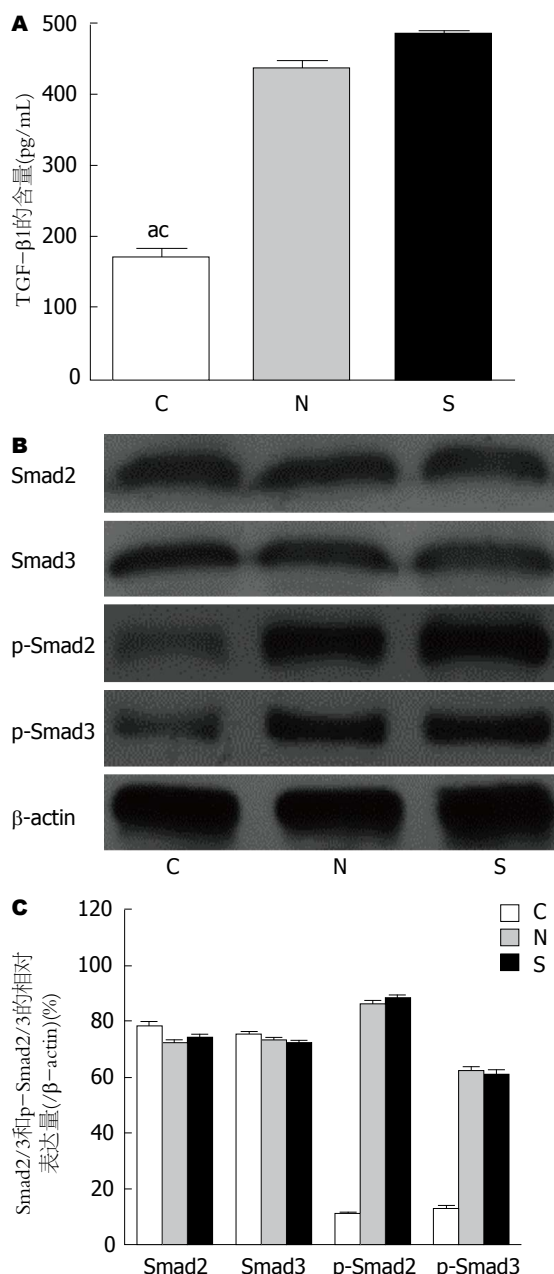


图5 阿霉素对TGF- β /Smad信号通路的影响。A: TGF- β 1的含量。* P <0.05 vs RNAi-NC组; * P <0.05 vs RNAi-Smad4组; Western blot; B: 相对表达量; C: Control组; N: RNAi-NC组; S: RNAi-Smad4组。TGF- β 1: 转化生长因子- β 1。

子Snail和Slug的表达。许多研究表明TGF- β 参与了癌细胞的EMT过程, 并起调节作用^[4,5]。

RNAi或RNA沉默(RNA silencing)是指采用一段特异性的非编码RNA序列结合靶基因的mRNA, 形成细胞核内复合物以阻止目的基因表达的一项分子生物学技术^[6]。本次实验我们采用了慢病毒载体基因沉默的方法转染特异的shRNA来敲低TGF- β /Smad信号通路中的Smad4基因(RNAi-Smad4组)以阻断该通路, 并以空慢病毒载体作为转染对照(RNAi-NC组), 不加阿霉

素作用的空细胞作为内对照(Control组)。应用低剂量的阿霉素(50 nmol/L)长时间地(7 d)作用于上述3组人结肠癌HCT116细胞, RNAi-NC组连同阿霉素作用后癌细胞的存活率起初下降, 随着作用时间的延长, 存活率呈缓慢上升的趋势。MDR p-gp蛋白和EMT相关的标志和转录因子vimentin、Snail、Slug在RNAi-NC组较Control组升高, 这提示随着作用时间的延长, 阿霉素处理的细胞发生了某种改变。阿霉素连同RNAi-Smad4组作用, 细胞存活率呈时间依赖性下降, 且都较RNAi-NC组降低, vimentin、Snail、Slug在RNAi-Smad4组较RNAi-NC升高, 这提示阿霉素长时间作用于HCT116细胞, 诱导了细胞的耐药, 并可能发生上皮细胞间质细胞样转化过程。

TGF- β 是一种广泛存在的多效性的生长因子, 调节细胞增殖、分化和凋亡等多种细胞内过程^[7]。TGF- β 有TGF- β 1、TGF- β 2和TGF- β 3三个亚型, 通过结合细胞表面的受体发挥生物学效应。细胞表面有3种受体TGF- β 受体即受体I、受体II和受体III。受体II是一类持续活性的丝氨酸/苏氨酸激酶, 与配体结合磷酸化受体II使其发挥效应, 继而磷酸化Smad2/Smad3, 随后与Smad4结合形成复合物, 进入细胞核以细胞特异性的方式启动TGF- β 靶基因的转录^[8]。有研究显示信号通路TGF- β /Smad4在阿霉素的耐药方面发挥着调节作用, TGF- β 可诱导EMT过程, 增强癌细胞的运动和侵袭能力, 使细胞间的连接丧失, 失去极性和细胞骨架重塑, 导致化疗药物对癌细胞的不敏感^[9]。Vimentin在胚胎发生和肿瘤转移中被广泛用作EMT的标志物, 有研究人员Melissa^[10]报指出, 上皮细胞被vimentin或vimentin cDNA作用后能够迅速地获得间质细胞样特性, Snail和Slug等EMT相关的转录因子在广泛的环境下参与了EMT的调控和进程^[11,12], Vuoriluoto等^[13]、Chaw等^[14]和Argast等^[15]研究发现vimentin还可通过*Slug*基因调控乳腺癌细胞的EMT过程, 可见EMT的标志物和相关转录因子能够发生相互作用, 共同调控EMT的发生发展。

在上述实验发现的基础上我们应用TGF- β 1 ELISA试剂盒检测了阿霉素处理后TGF- β 1的含量变化, 发现RNAi-NC组和RNAi-Smad4组的TGF- β 1都较Control组增高(P <0.05)。我们还发现阿霉素还上调了RNAi-NC组和RNAi-Smad4组的磷酸化Smad2/3的表达, 但并没有显著改变Smad2/3的表达。据此我们推测人结肠癌HCT116细胞对阿霉素的不敏感可能与癌细胞

发生了上皮细胞间质细胞样转化过程有关,可能是由于阿霉素上时间的应用诱导了TGF- β 1含量的升高,并上调了Smad2/3的磷酸化水平,进而诱导了EMT过程.而应用基因沉默技术干扰*Smad4*基因的表达来阻断TGF- β /Smad4信号通路,进而逆转了EMT过程,增加了阿霉素对HCT116细胞的敏感性.

总之,我们推测,低剂量的阿霉素长时间处理人结肠癌HCT116细胞株,可诱导其产生阿霉素化疗耐药性,其大体机制可能与阿霉素诱导了TGF- β /Smad4信号通路的激活,进一步导致癌细胞发生上皮细胞间质细胞样转化,联合应用*Smad4*基因沉默载体可提高阿霉素的作用敏感性,这为明确阿霉素的化疗耐药的具体机制提出了一条新的思路.但其中的确切分子生物化学机制,尤其是启动子水平的研究尚待进一步探索和发现.

4 参考文献

- 1 Naber HP, Drabsch Y, Snaar-Jagalska BE, ten Dijke P, van Laar T. Snail and Slug, key regulators of TGF- β -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 435: 58-63 [PMID: 23618854 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.037]
- 2 Katsuno Y, Lamouille S, Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol* 2013; 25: 76-84 [PMID: 23197193 DOI: 10.1097/CCO.0b013e32835b6371]
- 3 韩香, 黄晓丹, 薛慧婷, 黄曙, 张发明, 李国忠. *Smad4*通过fascin和cortactin影响肝癌细胞SMC-7721迁移的研究. *医学研究生学报* 2011; 24: 676-682
- 4 Wendt MK, Schiemann BJ, Parvani JG, Lee YH, Kang Y, Schiemann WP. TGF- β stimulates Pyk2 expression as part of an epithelial-mesenchymal transition program required for metastatic outgrowth of breast cancer. *Oncogene* 2013; 32: 2005-2015 [PMID: 22710711 DOI: 10.1038/ncr.2012.230]
- 5 Taylor MA, Davuluri G, Parvani JG, Schiemann BJ, Wendt MK, Plow EF, Schiemann WP, Sossey-Alaoui K. Upregulated WAVE3 expression is essential for TGF- β -mediated EMT and metastasis of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 142: 341-353 [PMID: 24197660 DOI: 10.1007/s10549-013-2753-1]
- 6 Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, Li Y, Jay F, Ding SW, Voinnet O. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* 2013; 342: 235-238 [PMID: 24115438 DOI: 10.1126/science.1241930]
- 7 Jain M, Rivera S, Monclus EA, Synenki L, Zirk A, Eisenbart J, Feghali-Bostwick C, Mutlu GM, Budinger GR, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem* 2013; 288: 770-777 [PMID: 23204521 DOI: 10.1074/jbc.M112.431973]
- 8 Zhang L, Zhou F, ten Dijke P. Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends Biochem Sci* 2013; 38: 612-620 [PMID: 24239264 DOI: 10.1016/j.tibs.2013.10.001]
- 9 Yeung TL, Leung CS, Wong KK, Samimi G, Thompson MS, Liu J, Zaid TM, Ghosh S, Birrer MJ, Mok SC. TGF- β modulates ovarian cancer invasion by upregulating CAF-derived versican in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2013; 73: 5016-5028 [PMID: 23824740 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0023]
- 10 Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 2010; 24: 1838-1851 [PMID: 20097873 DOI: 10.1096/fj.09-151639]
- 11 Lander R, Nordin K, LaBonne C. The F-box protein Ppa is a common regulator of core EMT factors Twist, Snail, Slug, and Sip1. *J Cell Biol* 2011; 194: 17-25 [PMID: 21727196 DOI: 10.1083/jcb.201012085]
- 12 Wettstein G, Bellaye PS, Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, Marchal-Somme J, Hazoume A, Gauldie J, Gunther A, Mischeau O, Gleave M, Camus P, Garrido C, Bonniaud P. Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* 2013; 27: 1549-1560 [PMID: 23288928 DOI: 10.1096/fj.12-220053]
- 13 Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C, Lorens JB, Ivaska J. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* 2011; 30: 1436-1448 [PMID: 21057535 DOI: 10.1038/ncr.2010.509]
- 14 Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol* 2012; 48: 997-1006 [PMID: 22704062 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.011]
- 15 Argast GM, Krueger JS, Thomson S, Sujka-Kwok I, Carey K, Silva S, O'Connor M, Mercado P, Mulford IJ, Young GD, Sennello R, Wild R, Pachter JA, Kan JL, Haley J, Rosenfeld-Franklin M, Epstein DM. Inducible expression of TGF- β , snail and Zeb1 recapitulates EMT in vitro and in vivo in a NSCLC model. *Clin Exp Metastasis* 2011; 28: 593-614 [PMID: 21643654 DOI: 10.1007/s10585-011-9394-8]

同行评价

本研究通过体外实验发现敲低*Smad4*基因以阻断TGF- β /Smad4信号通路可提高结肠癌的阿霉素化疗敏感性,具有一定的创新性,实验设计科学合理,为设计新的肿瘤治疗方法的或开发新型抗肿瘤药物提供新的思路.

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



慢病毒表达载体的构建及沉默FOXQ1基因在大肠癌细胞系DLD-1中的表达

白璇, 唐慧, 郎丰超, 郭强

■背景资料

FOXQ1(forkhead box Q1)是一种转录因子, 在大肠癌组织中呈高表达, FOXQ1基因的高表达可促进大肠癌肿瘤细胞的浸润和转移。

白璇, 郭强, 昆明医科大学 云南省第一人民医院(昆明医科大学附属昆华医院)消化内科 云南省昆明市 650032

唐慧, 云南省第一人民医院(昆明医科大学附属昆华医院)临床基础医学研究所 云南省昆明市 650032

郎丰超, 中国科学院昆明动物研究所 云南省昆明市 650032
白璇, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤分子机制的基础研究和消化内镜的临床应用。

国家自然科学基金资助项目, No. 81260323

云南省科技厅-昆明医科大学联合基金资助项目, No. 2012FB095

昆明医科大学研究生创新基金资助项目, No. 2012J004

云南省中青年学术技术带头人后备人才培养基金资助项目, No. 2013HB083

作者贡献分布: 此课题由郭强与唐慧设计; 研究过程由白璇操作完成; 唐慧负责实验指导; 郎丰超负责FOXQ1 shRNA的设计; 郭强与唐慧负责论文指导与修改; 论文写作由白璇完成。

通讯作者: 郭强, 教授, 主任医师, 650032, 云南省昆明金碧路157号, 云南省第一人民医院(昆明医科大学附属昆华医院)消化内科。gqkj003@sina.com

电话: 0871-63638772 传真: 0871-63648772

收稿日期: 2014-03-28 修回日期: 2014-04-17

接受日期: 2014-04-28 在线出版日期: 2014-07-08

Construction of lentiviral expression vectors to silence expression of FOXQ1 gene in colorectal cancer cell line DLD-1

Xuan Bai, Hui Tang, Feng-Chao Lang, Qiang Guo

Xuan Bai, Qiang Guo, Department of Gastroenterology, Kunming Medical University, the First People's Hospital of Yunnan Province (Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical University), Kunming 650032, Yunnan Province, China

Hui Tang, Institute of Basic Medicine, the First People's Hospital of Yunnan Province (Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical University), Kunming 650032, Yunnan Province, China

Feng-Chao Lang, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81260323; Science and Technology Department of Yunnan Province-Kunming Medical University Joint Foundation, No. 2012FB095; Graduate Innovation Fund of Kunming Medical University, No. 2012J004; Middle Younger Academic and Technological Foregoer and Reserve Talents Cultivation Foundation of Yunnan Province, No. 2013HB083

Correspondence to: Qiang Guo, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Yunnan Province (Affiliated Kunhua Hospital of

Kunming Medical University), 157 Jinbi Street, Kunming 650032, Yunnan Province, China. gqkj003@sina.com

Received: 2014-03-28 Revised: 2014-04-17

Accepted: 2014-04-28 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To construct lentiviral vectors to silence the expression of the FOXQ1 gene in colorectal cancer cell line DLD-1.

METHODS: According to the FOXQ1 gene sequence, three pairs of shRNAs were designed and synthesized, and then ligated to the lentiviral PLKO.1 vector. After the resulting plasmids were transfected into STB13 competent cells and cultured on ampicillin resistant culture plates, single colonies were picked to prepare plasmid DNA. The plasmids were identified by enzyme digestion and DNA sequencing. The identified plasmids and auxiliary packaging plasmids including pRSV-rev, pMDlg-pRRE, pCMV-VSV-G were jointly infected into 293-T cells by the calcium phosphate transfection method, and the lentivirus supernatants were obtained and used for infecting DLD-1 cells. After selection with puromycin, the FOXQ1-silenced cells were obtained. The efficiency of gene knockdown was then determined by real-time PCR and Western blot.

RESULTS: Enzyme digestion and DNA sequencing results showed that the shRNAs were successfully inserted into the PLKO.1 vector. Recombinant plasmids were transfected into 293-T cells and high-titer lentiviruses were formed. The lentiviruses was transduced into DLD-1 cells. FOXQ1-silenced cells were obtained after selection. Real-time PCR data and Western blot showed that the highest inhibitory efficiency for FOXQ1 expression was approximately 90.4%.

CONCLUSION: FOXQ1-silenced cells have been successfully obtained by constructing a lentivirus interference system, which provide an experimental foundation for further study of the

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

function of the *FOXQ1* gene in tumorigenesis.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *FOXQ1* gene; Lentiviral vector; RNA interference; Gene silencing

Bai X, Tang H, Lang FC, Guo Q. Construction of lentiviral expression vectors to silence expression of *FOXQ1* gene in colorectal cancer cell line DLD-1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2752-2757 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2752.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2752>

摘要

目的: 构建*FOXQ1*基因shRNA慢病毒干扰系统, 沉默*FOXQ1*基因在大肠癌细胞系DLD-1中的表达。

方法: 根据 *FOXQ1*基因的序列, 设计合成3对shRNA干扰序列, 退火后连接到载体质粒PLKO.1-puro, 将重组质粒转化至STB13感受态中, 涂板培养挑取单菌落, 摇菌后小提质粒, 选取酶切及测序鉴定正确的重组质粒去内毒素大提, 将质粒与辅助包装质粒pRSV-rev、pMDlg-pRRE和pCMV-VSV-G利用磷酸钙法共转染293-T细胞, 收集病毒上清, 感染目的细胞DLD-1, 嘌呤霉素筛选*FOXQ1*沉默细胞, 经荧光定量PCR及Western blot检测干扰效果。

结果: 酶切及测序结果显示shRNA成功插入载体PLKO.1-puro中, 共转染293-T细胞成功获取病毒上清, 感染DLD1细胞, 经嘌呤霉素筛选出*FOXQ1*沉默细胞, 荧光定量PCR及Western blot鉴定*FOXQ1*基因表达最高抑制率为90.4%。

结论: 通过构建*FOXQ1*基因shRNA慢病毒干扰系统, 成功获取*FOXQ1*基因沉默细胞, 为后续*FOXQ1*基因在肿瘤发生发展的研究奠定实验基础。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: *FOXQ1*基因; 慢病毒载体; RNA干扰; 基因沉默

核心提示: 研究*FOXQ1*(forkhead box Q1)基因在大肠癌肿瘤生成中的功能及其分子机制, 有望发现*FOXQ1*基因在大肠癌发生发展中涉及的相关信号通路及其下游靶分子, 为人类大肠癌基因诊治提供新思路。

白璇, 唐慧, 郎丰超, 郭强. 慢病毒表达载体的构建及沉默*FOXQ1*基因在大肠癌细胞系DLD-1中的表达. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2752-2757 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2752.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2752>

0 引言

叉头框(forkhead, Fox)蛋白是一类转录因子(transcription factor, TF), 其家族成员众多生物学功能广泛, 涉及胚胎发育、细胞周期、糖类和脂类代谢、生物老化、免疫调节等多种生物学过程, 且其突变和表达异常与发育畸形、代谢性疾病以及肿瘤发生均有关^[1]. *FOXQ1*(forkhead box Q1)基因属于Fox家族的Q亚族, 近年研究发现*FOXQ1*基因在不同来源肿瘤的发生发展中起着重要作用^[2-6], 研究探讨*FOXQ1*在肿瘤发生发展中的功能, 对未来人类肿瘤的诊治具有深远意义. 核酸干扰(RNA interference, RNAi)是由双链RNA(double strand RNA, dsRNA)介导的、具有序列特异性的转录后基因沉默现象, 其作用机制具有普遍性、特异性、高效性、位置效应等特点^[7]. 在沉默基因的表达方面, 因为任何导致或者促进疾病发生的蛋白质都容易受RNAi影响, 已被广泛应用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域^[8]. 本文通过构建*FOXQ1*基因shRNA慢病毒表达载体, 并获得*FOXQ1*基因沉默细胞, 为进一步研究*FOXQ1*在肿瘤发生发展中的功能奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 慢病毒表达载体质粒PLKO.1-puro, 包装结构质粒 pRSV-rev、pMDlg-pRRE, 包膜蛋白质粒pCMV-VSV-G以及STB13感受态细胞均由中国科学院昆明动物研究所馈赠; shRNA由上海生工生物工程有限公司合成; 293-T细胞及大肠癌细胞系DLD-1均购自中国科学院细胞库; 质粒小提试剂盒及无内毒素质粒大提试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 限制性内切酶 *Age* I、*Eco*R I、*Nco* I、T4 DNA ligase购自Takara公司; RPMI 1640培养基、DMEM培养基及0.05%胰蛋白酶均购自Hyclone公司; 澳洲特级胎牛血清及青霉素-链霉素溶液购自Bioind公司; 2×HBS及25 mol/L CaCl₂由中国科学院昆明动物研究所馈赠并自行配制; 嘌呤霉素购自Solarbio公司; Biozol Reagent购自Biomiga公

■ 研发前沿

FOX(forkhead box)转录因子家族分子参与多种生物学活性的调控, 近年研究表明, 作为家族成员的*FOXQ1*基因在肿瘤发生发展中发挥重要作用, 但该基因在大肠癌中的功能机制尚未阐明。

■ 相关报道

Abba、Kaneda、Myatt、郭强及唐慧等分别研究了FOXQ1在大肠癌组织中的表达,结果表明FOXQ1基因在大肠癌组织中高表达,并与肿瘤细胞的浸润和转移密切相关。

表 1 FOXQ1基因的siRNA靶序列

序列名称	序列(5'→3')
siRNA-A	CTCCATCAAACGTGCCTTA
siRNA-B	GCTATTGACCGATGCTTCA
siRNA-C	CTTGAAAGCAAGTGTGATT

司, GoScontroliptTM Reverse Transcontroliption System试剂盒购自Promega公司, SYBR Premix Ex Taq II购自Takara公司; 鼠抗人FOXQ1抗体和兔抗人 β -actin抗体均购自Abcam公司; HRP-Goat Anti-Mouse IgG(H+L)与HRP-Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)均购自Proteintech公司; Tween-20购自Amresco; 疏水性PVDF转印膜购自Millipore公司; 脱脂奶粉购自完达山公司; 细胞蛋白提取液、蛋白酶抑制剂混合物III型、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒及SDS蛋白上样缓冲液均购自武汉博士德生物有限工程公司; BCA蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所; SuperSignal West Pico HRP化学发光底物购自美国Pierce公司; 预染蛋白Marker购自Thermo公司; 6孔细胞培养板及10 cm²细胞培养皿购自BD falcon公司; 病毒超滤离心管购自Millipore公司; 琼脂糖凝胶成像及Western blot凝胶成像所用仪器为Chemidoc XRS化学发光成像系统; RNA浓度测定所用仪器为NanoDrop; 实时定量PCR扩增仪为罗氏LightCycler 480; 测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 设计合成shRNA: 根据FOXQ1的mRNA全序列, 得到siRNA靶序列(表1), 设计合成两条shRNA的模板单链, 包括Age I 酶切位点, 19 nt 靶核苷酸序列, 茎环结构(CTCGAG), 靶序列互补序列, RNA ployIII聚合酶转录终止点(TTTTT), EcoR I 酶切位点, 共设计3条干扰序列, 命名为shRNA-A、shRNA-B和shRNA-C(表2)。shRNA序列由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 设计合成RT-PCR引物: 根据FOXQ1的基因序列设计引物, 上游引物FOXQ1-F: 5'-GGCAACGGGCTACAGCTTTA-3', 下游引物FOXQ1-R: 5'-GGCACCCACACATACATAATCAA-3'。GAPDH作为内参基因, 序列为: 上游引物GAPDH-F: 5'-TGA CTTCAACAGCGACACCCA-3', 下游引物GAPDH-R: 5'-CACCCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.3 慢病毒载体构建与鉴定: 将合成的shRNA寡核苷酸定量混合, 退火后形成双链的shRNA, 载体质粒PLKO.1-puro经限制性内切酶Age I 和EcoR I 双酶切后, 电泳, 切胶回收, 用T4 DNA ligase将shRNA与载体质粒PLKO.1-puro连接, 形成重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A、PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B和PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C, 将各重组质粒转化至感受态STB13中, 分别涂布于氨苄青霉素抗性LB平板中, 37 °C培养14 h, 挑取单菌落PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A、PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B和PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C, 每组5个, 摇菌12 h, 小提质粒, 送上海生工测序。每组挑选一个序列正确的重组质粒, 用去内毒素大提试剂盒提取质粒, 测浓度, 限制性内切酶EcoR I 和Nco I 酶切鉴定。

1.2.4 慢病毒的包装: 接种 3×10^6 个293-T细胞于10 cm²培养皿中, 用DMEM完全培养基, 5%CO₂、37 °C孵箱培养, 待24 h后细胞密度长至50%-70%时转染, 利用磷酸钙转染法将重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA与辅助包装质粒pRSV-rev、pMDlg-pRRE和pCMV-VSV-G以8 μ g : 4 μ g : 4 μ g : 4 μ g共转染293-T细胞, 转染6 h后更换新鲜培养液, 转染48 h后分别收集病毒上清培养液, 0.45 μ m筛子过滤病毒液至超滤离心管, 获得浓缩病毒液VshRNA-A、VshRNA-B和VshRNA-C, 以相同的方法包装不含siRNA-FOXQ1序列的空病毒载体为VshRNA-control, 四组浓缩病毒液分装后保存于-80 °C保存或直接用于感染DLD1细胞。

1.2.5 感染DLD1细胞: 分为四个实验组: (1)VshRNA-A; (2)VshRNA-B; (3)VshRNA-C; (4)VshRNA-mix, 第四组即前三组病毒按1 : 1 : 1混合, 并同时设立一个对照组: VshRNA-control。接种DLD1细胞于6孔板, 每孔 3×10^5 个细胞, 用1640完全培养液5%CO₂、37 °C孵箱培养, 24 h后细胞密度长至50%-70%, 更换新鲜培养液, 加入浓缩病毒液, 每组3孔, 病毒感染24 h后用10 μ g/mL的嘌呤霉素筛选细胞, 同时设置阴性组(不加病毒不加嘌呤霉素, 单纯的DLD1细胞), 阴性加药组(不加病毒加8 μ g/mL嘌呤霉素, 用于观察阴性细胞死亡情况), 筛选3-5 d, 每2 d更换培养液, 最终获得五株细胞: DshRNA-A、DshRNA-B、DshRNA-C、DshRNA-mix和DshRNA-control。

1.2.6 RT-PCR检测FOXQ1基因相对表达量:

表 2 FOXQ1基因的shRNA序列

名称	Age I	正义链	Loop	反义链	终止子	EcoR I
shRNA-A	5'-CCGG	CTCCATCAAACGTGCCTTA	CTCGAG	TAAGGCACGTTTGTATGGAG	TTTTT	G-3'
	3'-	GAGGTAGTTTGCACGGAAT	GAGCTC	ATTCGTGCAAACCTACCTC	AAAAA	CTTAA-5'
shRNA-B	5'-CCGG	GCTATTGACCGATGCTTCA	CTCGAG	TGAAGCATCGGTCAATAGC	TTTTT	G-3'
	3'-	CGATAACTGGCTACGAAGT	GAGCTC	ACTTCGTAGCCAGTTATCG	AAAAA	CTTAA-5'
shRNA-C	5'-CCGGT	CTTGAAAGCAAGTGTGATT	CTCGAG	AATCACACTTGCTTTCAAG	TTTTT	G-3'
	3'-AA	GAACTTTCGTTCACTACTAA	GAGCTC	TTAGTGTGAACGAAAGTTC	AAAAA	CTTAA-5'

■创新盘点

本文首次通过构建FOXQ1慢病毒表达载体获得大肠癌FOXQ1基因沉默细胞系, RT-PCR及Western blot证实FOXQ1 mRNA及蛋白在大肠癌细胞系DLD-1中的表达显著降低。

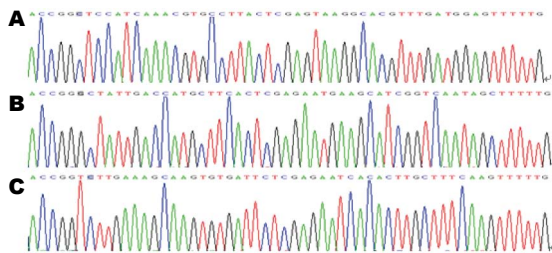


图 1 重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA测序结果。A: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A; B: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B; C: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C。

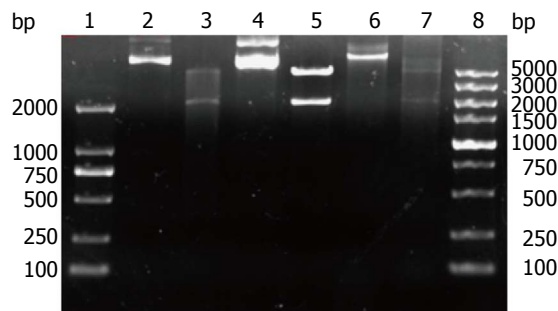


图 2 重组质粒电泳及双酶切鉴定电泳。1: DL2000; 2: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A; 3: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A双酶切; 4: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B; 5: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B双酶切; 6: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C; 7: PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C双酶切; 8: DL5000。

DLD1细胞感染慢病毒72 h后, 弃去培养液, 用Biozol Reagent试剂裂解以上5株细胞和DLD1细胞, 提取细胞总RNA, 取2 μ g RNA经Promega逆转录试剂盒逆转录获得cDNA第一链, 取2 μ L cDNA作为模板, 利用SYBR Green及实时定量PCR扩增仪扩增FOXQ1基因, 收集荧光信号, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出FOXQ1基因在各组细胞中的相对表达量。

1.2.7 Western blot分析FOXQ1蛋白质: DLD1细胞感染慢病毒96 h后, 弃去培养液, 5组细胞各用PBS洗1次, 加入150 μ L细胞裂解液, 并快速将裂解的细胞刮离皿底壁, 4 $^{\circ}$ C下继续裂解30 min, 收集蛋白至1.5 mL离心管中, 12000 r/min离心15 min, 吸取上清液, 利用BCA法蛋白浓度检测试剂盒进行蛋白定量后, 加入等体积的上样缓冲液煮沸5 min。以每孔20 μ g的蛋白量进行10%SDS-PAGE电泳, 将蛋白电转至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h后, 分别加入FOXQ1和 β -actin一抗摇床4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST液洗膜3-5次后, 分别以辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG-HRP及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG-HRP为二抗, 室温摇床孵育1 h, 经TBST液洗膜30 min, 表面滴加SuperSignal West Pico HRP化学发光底物, 于Chemidoc XRS化学发光成像系统中曝光显影。

统计学处理 实验所得数据采用mean $\pm$ SD

表示, 各组之间的比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间差异显著性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA测序鉴定 将选取的15个样本送至上海生工生物工程有限公司测序, 检测载体插入位点外源的shRNA是否正确插入, 将测序得到插入位点核酸序列与前期设计的shRNA对比, 结果显示3个实验组PLKO.1-FOXQ1-shRNA-A, PLKO.1-FOXQ1-shRNA-B, PLKO.1-FOXQ1-shRNA-C准确率分别为2/5, 3/5, 2/5(图1), 双链shRNA已正确插入慢病毒表达载体中。

2.2 重组质粒PLKO.1-FOXQ1-shRNA电泳检测及双酶切鉴定 将测序正确的3个重组慢病毒表达载体去内毒素大提, 经电泳, 可见一>5000 bp的条带, 与预期的7000 bp相符, 经EcoR I和Nco I双酶切后, 可见大小约为5000和2000 bp的两条带, 均与预期相符(图2)。

2.3 RT-PCR检测FOXQ1基因相对表达量 结果显示, 各组FOXQ1基因shRNA慢病毒感染DLD1细胞, FOXQ1基因的表达量均有降低(图3), 与

■应用要点

本文成功构建了大肠癌FOXQ1沉默细胞,为后续进行体内实验,研究FOXQ1基因在大肠癌发生发展中的功能、分子机制等奠定实验基础。

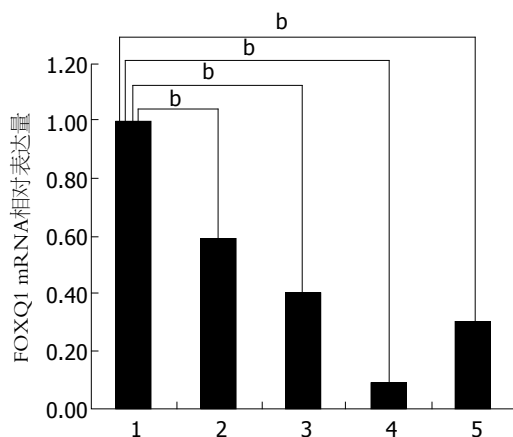


图3 RT-PCR检测FOXQ1基因mRNA相对表达量。1: DshRNA-control; 2: DshRNA-A; 3: DshRNA-B; 4: DshRNA-C; 5: DshRNA-mix. ^b $P < 0.01$.

DshRNA-control组细胞相比, DshRNA-A、DshRNA-B、DshRNA-C和DshRNA-mix组细胞FOXQ1表达抑制率分别约为39.7% ($P < 0.01$), 59.6% ($P < 0.01$), 90.4% ($P < 0.01$), 70.5% ($P < 0.01$). 可见shRNA-C干扰片段对FOXQ1基因表达抑制效果最为明显. 说明实验中设计的慢病毒携带shRNA干扰片段能有效抑制FOXQ1基因在大肠癌细胞系DLD1中的表达, 并且shRNA-C干扰片段对FOXQ1基因表达抑制效果最为显著.

2.4 Western blot分析FOXQ1蛋白质 结果显示, 与DshRNA-control组细胞相比, 各组FOXQ1基因shRNA慢病毒感染DLD1细胞, FOXQ1蛋白表达均降低(图4), 其中shRNA-C干扰片段对FOXQ1蛋白表达抑制效果最为明显. 说明实验中设计的慢病毒携带shRNA干扰片段能有效抑制FOXQ1基因和蛋白质在大肠癌细胞系DLD1中FOXQ1蛋白的表达.

3 讨论

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是我国发病率最高的三大肿瘤之一, 并且每年以4.2%的速度增长, 远超2%的国际增长水平^[9]. 人FOXQ1基因定位于人体6号染色体短臂25.3区(6p25.3), 全长2319 bp, 仅含1个外显子, 编码403个氨基酸^[10], 其功能可以稳定结合靶基因启动子区域的GC盒等核心元件, 控制基因转录活性而发挥生物效应^[11]. 近年研究证实FOXQ1 mRNA在大肠癌中呈高表达, 同时FOXQ1的高表达能增强大肠癌肿瘤细胞的转移和浸润^[3,5]. 我们的前期研究表明, FOXQ1 mRNA和蛋白质的表达水平随着大肠腺瘤→大肠腺癌这一病理进程逐步升

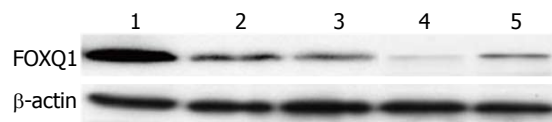


图4 Western blot检测FOXQ1基因蛋白相对表达量。1: DshRNA-control; 2: DshRNA-A; 3: DshRNA-B; 4: DshRNA-C; 5: DshRNA-mix.

高^[6,12], 同时FOXQ1基因在大肠腺瘤癌变过程中, 在包括表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)信号通路在内的众多信号通路中发挥一定作用^[13,14]. 为进一步研究FOXQ1基因在大肠癌发生发展中的功能, 本文通过构建FOXQ1基因shRNA慢病毒表达载体, 沉默大肠癌细胞DLD1中FOXQ1基因的表达, 建立稳定的FOXQ1基因沉默细胞, 为下一步开展体内实验奠定实验基础.

RNAi技术近年发展突飞猛进, 成为基因组学和蛋白组学研究的主要手段之一, 在人类基因功能、信号转导和基因诊断治疗研究方面显示出巨大的前景. 慢病毒载体因其转染效率高, 可以感染分裂期细胞和非分裂期细胞, 免疫反应小, 无复制能力, 可转移基因片段较大, 目的基因与宿主基因组整合, 实现目的基因的较长时间表达等优点, 成为基因功能研究和基因治疗的有力手段^[15,16]. 以HIV-1来源为代表的慢病毒载体由载体成分和包装成分组成. 载体成分含有包装、逆转录和整合所需的顺式作用元件, 同时具有异源启动子控制下的多克隆位点, 以及插入的外源目的基因. 包装成分含有编码产生病毒颗粒所必需的蛋白的结构基因^[8]. 本文用VSV-G代替HIV-I的包膜蛋白使病毒感染细胞能力增强, 四质粒共转染293T细胞, 可获得高滴度、高感染力而不能复制的安全性慢病毒载体^[15]. shRNA是包括两个短反向重复序列的RNA序列, 他可以克隆到表达载体并表达短的siRNA的DNA分子. 利用慢病毒构建的shRNA载体, 可以在感染后整合到受感染细胞的基因组, 进行长时间地稳定表达, 具有高效、稳定、特异性强等特点^[17,18].

本实验针对FOXQ1基因设计干扰片段shRNA, 利用慢病毒携带shRNA感染人大肠癌细胞DLD1, 并将目的基因整合到细胞的基因组中, 高效、稳定、持续地产生siRNA特异性地抑制FOXQ1基因的表达. 三组干扰片段是针对FOXQ1基因的不同位点设计的, 通过RT-

PCR及Western blot检测FOXQ1基因干扰效果, shRNA-C组抑制效率最高, 达90.4%。为后续今后深入研究FOXQ1基因在结直肠癌发生发展中的作用机制奠定了良好的实验基础。

4 参考文献

- 1 曹冬梅, 卢建. 叉头框(Fox)转录因子家族的结构与功能. 生命科学 2006; 18: 491-496
- 2 Xia L, Huang W, Tian D, Zhang L, Qi X, Chen Z, Shang X, Nie Y, Wu K. Forkhead box Q1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by transactivating ZEB2 and VersicanV1 expression. *Hepatology* 2014; 59: 958-973 [PMID: 24005989 DOI: 10.1002/hep.26735]
- 3 Kaneda H, Arai T, Tanaka K, Tamura D, Aomatsu K, Kudo K, Sakai K, De Velasco MA, Matsumoto K, Fujita Y, Yamada Y, Tsurutani J, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. *Cancer Res* 2010; 70: 2053-2063 [PMID: 20145154 DOI: 10.1158/0008-5472]
- 4 Christensen J, Bentz S, Sengstag T, Shastri VP, Anderle P. FOXQ1, a novel target of the Wnt pathway and a new marker for activation of Wnt signaling in solid tumors. *PLoS One* 2013; 8: e60051 [PMID: 23555880 DOI: 10.1371/journal.pone.0060051]
- 5 Abba M, Patil N, Rasheed K, Nelson LD, Muduluru G, Leupold JH, Allgayer H. Unraveling the role of FOXQ1 in colorectal cancer metastasis. *Mol Cancer Res* 2013; 11: 1017-1028 [PMID: 23723077 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0024]
- 6 唐慧, 郭强, 李丽, 张进萍, 王金丽, 严新民. 叉头框蛋白Q1在结直肠癌和结直肠腺瘤中的异常表达和基因突变. 中华消化杂志 2011; 31: 106-111
- 7 毛俊, 牟秋菊, 李连宏, 陶雅军, 范姝君, 王波, 于晓棠. RNA干扰Notch1基因对乳腺癌MCF-7细胞增殖及凋亡的影响. 临床与实验病理学杂志 2012; 28: 11-14
- 8 李妍, 杜红延, 李红卫. 慢病毒载体及其在RNA干扰技术中的应用与发展. 分子诊断与治疗杂志 2013; 5: 55-60
- 9 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 李光琳, 赵平, 赫捷, 陈万青. 中国肿瘤登记地区2008年恶性肿瘤发病和死亡分析. 中国肿瘤 2012; 21: 11-12
- 10 Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004; 25: 1495-1500 [PMID: 15492844]
- 11 Bieller A, Pasche B, Frank S, Gläser B, Kunz J, Witt K, Zoll B. Isolation and characterization of the human forkhead gene FOXQ1. *DNA Cell Biol* 2001; 20: 555-561 [PMID: 11747606]
- 12 Tang H, Guo Q, Zhang C, Zhu J, Yang H, Zou YL, Yan Y, Hong D, Sou T, Yan XM. Identification of an intermediate signature that marks the initial phases of the colorectal adenoma-carcinoma transition. *Int J Mol Med* 2010; 26: 631-641 [PMID: 20878084]
- 13 唐慧, 邹云莲, 寿涛, 郭强, 严新民. 应用基因芯片技术检测参与大肠腺瘤癌变的表皮生长因子受体信号通路. 昆明医学院学报 2010; 31: 25-29
- 14 唐慧, 董虹, 寿涛, 何旭, 邹云莲, 李丽, 严新民, 郭强. 参与大肠腺瘤癌变过程的信号通路初探. 中华临床医师杂志(电子版) 2010; 4: 28-34
- 15 梁艳, 李涛, 周克元. 慢病毒载体在RNA干扰中的应用进展. 国际检验医学杂志 2010; 31: 1282-1284
- 16 Kaur P, Nagaraja GM, Asea A. Combined lentiviral and RNAi technologies for the delivery and permanent silencing of the hsp25 gene. *Methods Mol Biol* 2011; 787: 121-136 [PMID: 21898232 DOI: 10.1007/978-1-61779-295-3_10]
- 17 Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 2003; 9: 493-501 [PMID: 12649500]
- 18 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6047-6052 [PMID: 11972060]

同行评价

本文具有一定指导意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



补中益气活血方对胃溃疡患者血清VEGF和NO含量的影响及意义

秦建设, 郑波, 付正丰

■背景资料

胃溃疡(gastric ulcer, GU)是临床消化系统的常见疾病,充分运用中医理论对胃溃疡实施辨证施治是中医药治疗的特色和优势,因此探讨中医药治疗胃溃疡的机制具有重要意义。

秦建设, 郑波, 付正丰, 重庆三峡医药高等专科学校中医系重庆市 404120

秦建设, 讲师, 主要从事中医基础理论的研究。

作者贡献分布: 本研究的设计、数据分析及论文撰写主要由秦建设负责; 临床观察、数据收集与处理主要由郑波与付正丰负责。

通讯作者: 秦建设, 讲师, 404120, 重庆市万州区天星路366号, 重庆三峡医药高等专科学校中医系. iamqjshe@163.com
电话: 13594819353

收稿日期: 2014-04-16 修回日期: 2014-05-05

接受日期: 2014-05-12 在线出版日期: 2014-07-08

Buzhong Yiqi Huoxue prescription increases serum VEGF and NO levels in patients with gastric ulcer

Jian-She Qin, Bo Zheng, Zheng-Feng Fu

Jian-She Qin, Bo Zheng, Zheng-Feng Fu, TCM Department, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China

Correspondence to: Jian-She Qin, Lecturer, TCM Department, Chongqing Three Gorges Medical College, 366 Tianxing Road, Wanzhou District, Chongqing 404120, China. iamqjshe@163.com

Received: 2014-04-16 Revised: 2014-05-05

Accepted: 2014-05-12 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To observe the effect of Buzhong Yiqi Huoxue prescription on serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in patients with gastric ulcer due to spleen-stomach weakness, and to explore the underlying therapeutic mechanism.

METHODS: Seventy-seven patients with gastric ulcer due to spleen-stomach weakness were randomly divided into two groups to receive Buzhong Yiqi Huoxue prescription (TCM group) and omeprazole (Western medicine group), respectively. The symptoms, gastroscopic results, and serum VEGF and NO levels were compared between the two groups before and after treatment to observe their therapeutic effect on gastric ulcer.

RESULTS: After treatment, the clinical curative effect was better in the TCM group than in the Western medicine group ($P < 0.05$), and serum levels of VEGF and NO were significantly improved in the TCM group (VEGF: 102.36 ± 12.33 vs 60.85 ± 8.47 , $P < 0.01$; NO: 78.57 ± 8.57 vs 51.87 ± 8.76 , $P < 0.01$) and Western medicine group (VEGF: 102.36 ± 12.33 vs 93.87 ± 9.31 , $P < 0.01$; NO: 78.57 ± 8.57 vs 71.91 ± 8.77 , $P < 0.01$). The improvement was more significant in the TCM group than in the Western medicine group.

CONCLUSION: Buzhong Yiqi Huoxue prescription exerts its therapeutic effects possibly by regulating expression of VEGF and NO in the gastric mucosa of patients with gastric ulcer due to spleen-stomach weakness.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: TCM; Buzhong Yiqi Huoxue prescription; Gastric ulcer; Vascular endothelial growth factor; Nitric oxide

Qin JS, Zheng B, Fu ZF. Buzhong Yiqi Huoxue prescription increases serum VEGF and NO levels in patients with gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2758-2762 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2758.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2758>

摘要

目的: 通过观察补中益气活血方对脾胃虚弱型胃溃疡患者血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和一氧化氮(nitric oxide, NO)含量的影响, 探讨补中益气活血方治疗脾胃虚弱型胃溃疡的治疗机制。

方法: 将符合纳入标准的77例病例随机分为补中益气活血方治疗组(简称中药组)和奥美拉唑治疗组(简称西药组), 通过比较治疗前后的症状分析、胃镜检查结果、测定血清

■同行评议者

李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

VEGF和NO的水平, 观察两组药物对胃溃疡的治疗效果。

结果: 治疗后, 中药组临床疗效和胃镜疗效的评定量化后经卡方检验, 治疗效果优于西药组($P<0.05$)。中药组治疗后胃溃疡患者血清中VEGF和NO的含量水平比治疗前提升明显(VEGF: 102.36 ± 12.33 vs 60.85 ± 8.47 , $P<0.01$; NO: 78.57 ± 8.57 vs 51.87 ± 8.76 , $P<0.01$), 且中药组治疗效果明显高于西药组(VEGF: 102.36 ± 12.33 vs 93.87 ± 9.31 , $P<0.01$; NO: 78.57 ± 8.57 vs 71.91 ± 8.77 , $P<0.01$), 两组比较差异有统计学意义。

结论: 补中益气活血方治疗脾胃虚弱型胃溃疡的作用机制可能与调节胃黏膜中VEGF和NO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: 中医药; 补中益气活血方; 胃溃疡; 血管内皮生长因子; 一氧化氮

核心提示: 补中益气活血类方药能显著提高脾胃虚弱型胃溃疡患者血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)和一氧化氮(nitric oxide)含量, 促进胃黏膜再生与修复, 治疗胃溃疡, 防止复发。

秦建设, 郑波, 付正丰. 补中益气活血方对胃溃疡患者血清VEGF和NO含量的影响及意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2758-2762 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2758.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2758>

0 引言

胃溃疡(gastric ulcer, GU)是一种临床消化系统的常见病、多发病, 其致病因素复杂, 病理机制迄今未完全清楚. 中医药治疗胃溃疡有深厚的理论基础和临床实践经验, 补中益气类方剂是临床上用于治疗胃溃疡属脾胃虚弱证的常用药物. 本研究的目的是探讨补中益气活血方对胃溃疡脾胃虚弱型患者血清中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和一氧化氮(nitric oxide, NO)含量的影响, 进一步阐明补中益气类方药治疗胃溃疡的药理机制, 为治疗慢性胃溃疡提供科学理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究对象为重庆三峡医药高等专科学校附属医院门诊收治的符合胃溃疡脾胃虚弱

型诊断标准的患者77例(2011-09/2013-10)。根据患者就诊时间将病例随机分成补中益气活血治疗组(简称中药组)和奥美拉唑治疗组(简称西药组), 其中中药组42例, 西药组35例。诊断标准、纳入标准、排除标准均参照文献[1,2]所给定的脾胃虚弱证候的诊断标准判定。凡年龄18-70岁男女不限, 无胃溃疡并发症, 无严重心、脑、肾血管疾病及精神疾病, 中医辨证属于脾胃虚弱证能较好配合治疗的患者均纳入研究对象。凡年龄<18岁或>70岁者, 有胃溃疡严重并发症、严重心、肺、肝、肾功能不全者, 妊娠、哺乳期妇女, 中医辨证不属于脾胃虚弱证、不能配合治疗及随访者作为排除对象。VEGF试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司(批号: AK-0014FEB26007), NO试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号: 20131109), 奥美拉唑(规格: 20 mg, 批号: 110325, 重庆华邦制药有限公司), 阿莫西林分散片(规格: 0.5 mg, 批号: 110515, 华北制药股份有限公司), 美国Bio-Tek ELX800多功能酶标仪。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 中药组: 口服补中益气活血方, 药物主要为黄芪20 g、党参20 g、白术15 g、当归20 g、陈皮10 g、升麻8 g、柴胡15 g、炙甘草10 g、五灵脂10 g、蒲黄6 g、赤芍15 g、大枣6枚, 煎汤口服, 1剂/d。西药组: 给予奥美拉唑20 mg和阿莫西林分散片1 g, 口服, 1次/d。两组均以8 wk为1个疗程。在治疗期间, 两组不再使用其他药物。治疗1个疗程后复查胃镜及抽血检测。

1.2.2 疗效判定: 中医证候疗效判断标准: 参照文献[2]对患者的胃脘部疼痛、腹胀、饮食不振、神疲乏力、面色等主要症状和体征采用分级量化的方法进行记分, 即分无、轻、中、重4级, 记为0、1、2、3分。对舌、脉变化则分为正常和非正常两级, 分别记0、1分。临床痊愈: 症状、体征消失或基本消失, 积分减少 $\geq 95\%$; 显效: 症状、体征明显改善, 积分减少 $\geq 70\%$, 但 $<95\%$; 有效: 症状、体征均有好转, 积分减少 $\geq 30\%$, 但 $<70\%$; 无效: 症状、体征均无明显改善, 甚或加重, 积分减少 $<30\%$ 。积分计算公式为: (治疗前积分-治疗后积分)/治疗前积分 $\times 100\%$ 。胃镜疗效判定标准: 临床痊愈: 溃疡及周围炎症全部消失; 显效: 溃疡基本消失, 但仍有炎症表现; 有效: 溃疡面缩小 $\geq 50\%$ 以上; 无效: 溃疡无变化或缩小 $<50\%$ 者。

■研究前沿

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和一氧化氮(nitric oxide, NO)是胃黏膜的重要保护因子, 对胃溃疡的修复和再生起着重要的作用, 尤其是针对VEGF的研究已成为探索治疗胃溃疡和消化系统癌性疾病的研究热点。

■创新盘点

本研究依据临床经验,系统、规范地研究了补中益气活血类方药治疗胃溃疡的作用靶点、具有较高的应用价值。

表 1 患者一般情况比较

分组	n	性别		年龄(岁)			溃疡病史	
		男	女	<30	30-60	>60	初发病	复发病
中药组	42	27	15	6	26	10	33	9
西药组	35	25	10	7	23	5	28	7

表 2 临床疗效比较

分组	n	临床痊愈	显效	有效	无效	总有效率(%)
中药组	42	34	5	3	0	100
西药组	35	20	6	9	0	100

表 3 胃镜下疗效比较

分组	n	临床痊愈	显效	有效	无效	总有效率(%)
中药组	42	35	4	3	0	100
西药组	35	22	7	6	0	100

1.2.3 血清VEGF测定:抽取患者空腹静脉血5 mL,室温静置1 h后3500 r/min,离心10 min,吸出上层血清存放在-85 °C冰箱保存。采用酶联免疫吸附法(ELISA法)检测血清VEGF含量。设定空白孔、样品孔和标准品孔。空白孔加样品稀释液作为空白对照,样品孔依次加样品血清100 μL,标准孔依次加稀释为0、31.25、62.5、125、250、500、1000、2000 pg/mL的标准品100 μL,37 °C孵育反应90 min。弃液甩干后每孔加入生物素化抗体工作液100 μL,37 °C孵育反应60 min。洗板3次后,每孔加入酶结合物工作液100 μL,37 °C孵育反应60 min。洗板5次后,每孔加底物液90 μL,37 °C避光孵育反应15 min后,每孔加入50 μL终止液,终止反应。用多功能酶标仪在450 nm波长测定各孔A值。用标准品得到的数据用Excel作标准曲线,根据标准曲线回归方程计算样品的浓度。

1.2.4 血清NO含量检测:采用一步法,按试剂盒要求设定空白孔、标准孔和测定孔,分别加双蒸水、20 μmol/L亚硝酸钠标准液、样品、显色剂后,静置15 min。用多功能酶标仪在550 nm波长测定各孔A值,依据计算公式得出各样本NO含量。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件,计量资料以mean±SD表示,采用t检验,等级资料采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般情况比较 经卡方检验,两组患者一般情况比较无统计学差异($P>0.05$)(表1)。

2.2 临床疗效与胃镜下疗效比较 依据中医证候疗效诊断标准进行记分,根据记分结果把治疗

效果分别评定为临床痊愈、显效、有效和无效4个层次。经卡方检验,两组临床疗效整体比较有显著性差异($P<0.05$),中药组疗效明显优于西药组(表2)。而在胃镜观察下的疗效比较两组无显著性差异($P>0.05$)(表3)。

2.3 治疗前后两组血清VEGF和NO的含量变化 结果显示,经过一个疗程治疗后,中药组与西药组患者血清中的VEGF和NO含量与治疗前相比均有明显提升($P<0.01$),且中药组患者治疗后血清中VEGF和NO含量明显高于西药组患者($P<0.01$),说明中药组的治疗作用要优于西药组(表4)。

3 讨论

GU的发生与修复是一个十分复杂的过程,是多种细胞、生长因子及细胞外基质相互作用的结果。现代研究表明,胃黏膜防御屏障功能下降,防御保护因子减少是形成胃溃疡的重要病理基础之一。VEGF是一类血管生长调节因子,又称血管通透因子。其生物作用主要体现为两个方面^[3,4],一是通过其受体直接刺激血管内皮细胞增殖、增生,促进毛细血管形成;另一方面通过特殊受体激活磷脂酶C,诱导钙离子对血管内皮细胞直接作用,增加微血管的通透性。在胃溃疡的修复过程中,VEGF起着重要的作用,能够促进溃疡部位的血管再生、增加胃黏膜血流、促进胃黏膜增生及维持黏膜完整的作用,是溃疡愈合的重要促进因子^[5-7]。临床研究亦显示,在胃溃疡患者中VEGF的表达在胃溃疡活动期、愈合期、瘢痕期中呈逐渐下降趋势,说明VEGF在胃溃疡的愈合中起重要的促进作用^[8]。有研究者提出可把VEGF作为诊断消化性溃疡的风险评

表 4 治疗前后血清VEGF和NO的含量变化 (mean ± SD)

分组	n	VEGF(pg/mL)		NO(μmol/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
中药组	42	60.85 ± 8.47	102.36 ± 12.33 ^b	51.87 ± 8.76	78.57 ± 8.57 ^b
西药组	35	58.88 ± 8.43	93.87 ± 9.31 ^{bd}	51.76 ± 7.66	71.91 ± 8.77 ^{bd}

^bP<0.01 vs 治疗前; ^dP<0.01 vs 中药治疗组. VEGF: 血管内皮生长因子; NO: 一氧化氮.

估预测因子^[9].

NO是一种由血管内皮细胞释放, 具有舒张血管活性的小分子蛋白, 具有抑制胃酸分泌、清除氧自由基、促进胃黏蛋白合成, 保护胃黏膜作用^[10]. 同时, NO是重要的胃黏膜保护因子, 能扩展血管、改善胃黏膜微循环, 对维持黏膜血管壁的完整性和微血管屏障功能有重要作用^[11,12].

胃溃疡属祖国医学“胃痛”的范畴, 其发生主要是由于外感寒邪、饮食不节、七情失和、久病体虚等因素引起. 根据临床表现又分为寒邪客胃证、饮食停滞证、肝气犯胃证、胃阴亏虚证、脾胃虚弱证等证候. 本虚标实, 正虚邪恋是临床胃溃疡病复发、迁延不愈的重要病理基础^[13], 故此, 针对临床慢性脾胃虚弱型胃溃疡患者, 笔者采用补中益气活血的方法治疗并取得了较好的疗效. 本方以补中益气汤为基础方, 加活血化瘀的五灵脂、蒲黄、赤芍等, 共凑补中益气, 行气活血化瘀之功效. 补中益气汤是金元时期名医李东垣创制的治疗脾胃病的代表方剂, 分别见于《内外伤辨惑论》和《脾胃论》, 主要由黄芪、人参、白术、升麻、柴胡、当归、陈皮、甘草等组成, 全方功在补中益气, 升阳举陷. 研究表明, 补中益气汤能明显减少胃溃疡的炎症反应, 促进胃黏膜细胞的迁移、增殖和修复, 具有胃黏膜保护及促进胃黏膜修复重建的作用^[14,15].

本实验结果表明, 以补中益气汤为基础方的补中益气活血方能明显提升患者血清中VEGF和NO的表达水平(P<0.01), 且治疗效果明显优于西药组. 这说明补中益气活血方治疗脾胃虚弱型胃溃疡的作用机制可能与调节胃黏膜中VEGF和NO的表达有关, 通过提高胃黏膜中VEGF和NO的含量, 促进胃黏膜微血管的生成, 促进胃黏膜的增殖与修复, 从而达到保护胃黏膜、治疗胃溃疡的作用. 关于补中益气活血方

促进胃黏膜中VEGF和NO的生成与表达、促进胃溃疡的修复与愈合的机制问题, 还有待进一步深入研究.

4 参考文献

- 李乾构, 周学文, 单兆伟. 中医消化病诊疗指南. 北京: 中国中医药出版社, 2006
- 陆付耳, 胡永红, 涂胜豪. 中医临床诊疗指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2013
- 卓越, 李敬岩. Ang-2、Cox-2及VEGF在食管癌组织中表达的研究. 黑龙江医药科学 2010; 33: 88
- Zhuang J, Jiang T, Lu D, Luo Y, Zheng C, Feng J, Yang D, Chen C, Yan X. NADPH oxidase 4 mediates reactive oxygen species induction of CD146 dimerization in VEGF signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 227-236 [PMID: 20403426 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.007]
- 杨连生. VEGF在慢性萎缩性胃炎胃黏膜组织中的表达. 白求恩医学院学报 2010; 8: 408-410
- 李成军, 王丽萍, 夏立丁, 姜鑫, 孙卉, 刘晓维, 李小伟, 周丽, 王国忠. 大鼠乙酸胃溃疡愈合过程中EGF和VEGF对胃黏膜组织形态的影响. 医学研究杂志 2010; 39: 57-59
- Tanigawa T, Watanabe T, Otani K, Nadatani Y, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. Leptin promotes gastric ulcer healing via upregulation of vascular endothelial growth factor. *Digestion* 2010; 81: 86-95 [PMID: 20068308 DOI: 10.1159/000243719]
- 袁兴洪. 胃溃疡患者胃粘膜血管内皮生长因子表达水平研究. 四川医学 2012; 33: 457-458
- Kim YS, Park SW, Kim MH, Jang EJ, Park JS, Park SJ, Baik HW, Chung G, Hahm KB. Novel single nucleotide polymorphism of the VEGF gene as a risk predictor for gastroduodenal ulcers. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 2: S131-S139 [PMID: 19120886 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05404.x]
- 严海密, 李运科. 慢性胃病中一氧化氮的研究进展. 世界华人消化杂志 1999; 7: 355-356
- 王海燕, 刘亚明, 李海燕, 冯前进, 郭建友, 牛欣. 高良姜油对胃溃疡小鼠模型血清NO、SOD及MDA的影响. 中华中医药杂志 2011; 26: 1640-1642
- 时昭红, 张介眉, 周慧芳, 杨海芳, 陈洲, 冯云被. 促愈颗粒对大鼠乙酸胃溃疡愈合质量的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1713-1718
- 李志勇, 吴耀南. 中医药治疗消化性溃疡研究进展. 江西中医学院学报 2011; 23: 77-80
- 刘晓玲, 王汝俊, 付铨盛. 补中益气汤对脾虚大鼠胃粘膜MEK_ERK mRNA表达的影响. 中药药理与临床

同行评价

本文对补中益气活血方对胃溃疡患者血清VEGF和NO含量的影响做了一定研究, 具有一定的临床研究价值.

2013; 29: 5-8
15 潘华山, 钟国林, 邱文梅, 许金叶, 赵自明, 赖秋媛, 冯

毅. 补中益气汤对运动性疲劳大鼠胃肠功能的影响.
广州中医药大学学报 2013; 30: 864-866

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 •

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。

血浆内脏脂肪素在非酒精性脂肪性肝病中的表达及其意义

蔡怀阳, 李运泽, 李莉, 邹劲涛, 涂强

蔡怀阳, 李运泽, 柳州市人民医院消化内科 广西壮族自治区柳州市 545006

李莉, 柳州市人民医院感染科 广西壮族自治区柳州市 545006

邹劲涛, 柳州市人民医院核医学科 广西壮族自治区柳州市 545006

涂强, 柳州市人民医院体检部 广西壮族自治区柳州市 545006

蔡怀阳, 主治医师, 主要从事肝脏疾病的研究。

广西柳州市科学技术局健康安全技术开发与应用研究基金资助项目, No. 2008031423

作者贡献分布: 蔡怀阳与李运泽对此文做主要贡献; 此课题由李运泽设计; 研究过程由李运泽、蔡怀阳、李莉、邹劲涛及涂强等共同完成; 数据分析由蔡怀阳与李运泽完成; 本论文写作由蔡怀阳与李运泽完成。

通讯作者: 李运泽, 教授, 545006, 广西壮族自治区柳州市文昌路8号, 柳州市人民医院消化内科。lyze@163.com

电话: 0772-2662775

收稿日期: 2014-04-04 修回日期: 2014-05-21

接受日期: 2014-05-29 在线出版日期: 2014-07-08

Clinical significance of plasma visfatin level in patients with non-alcoholic fatty liver disease

Huai-Yang Cai, Yun-Ze Li, Li Li, Jin-Tao Zou, Qiang Tu

Huai-Yang Cai, Yun-Ze Li, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Li Li, Department of Infectious Diseases, the People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Jin-Tao Zou, Department of Nuclear Medicine, the People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Qiang Tu, Department of Physical Examination, the People's Hospital of Liuzhou, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Research Fund for Health Safety and Technological Development & Application of Liuzhou Administration of Science & Technology, No. 2008031423

Correspondence to: Yun-Ze Li, Professor, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Liuzhou, 8 Wenchang Road, Liuzhou 545006, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lyze@163.com

Received: 2014-04-04 Revised: 2014-05-21

Accepted: 2014-05-29 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To detect plasma visfatin level in patients with non-alcoholic fatty liver disease and to analyze its significance.

METHODS: One hundred and seventy subjects were enrolled in the study, including 110 cases of non-alcoholic fatty liver disease and 60 cases of healthy controls. Blood pressure (BP), height, weight, waist circumference (WC), hip, body mass index (BMI), waist-hip ratio (WHR), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), fasting blood glucose, fasting insulin, liver function and plasma visfatin were measured in each patient and the HOMA-IR was calculated according to the typical HOMA model.

RESULTS: The visfatin level, BMI, WHR, SBP, DBP, ALT, AST and HOMA-IR were significantly higher in the patient group than in the normal control group ($P < 0.05$ for all). Plasma visfatin levels were significantly positively correlated with BMI, WHR and HOMA-IR, and the correlations became more significant with the aggravation of non-alcoholic fatty liver disease ($r = 0.557, 0.398, 0.508, 0.579, 0.508, 0.650, P < 0.05$ for all).

CONCLUSION: Plasma visfatin levels were significantly higher in patients with non-alcoholic fatty liver disease, which increased with the aggravation of the disease. There was an important correlation between plasma visfatin and non-alcoholic fatty liver disease, which implied that plasma visfatin may play a role in the pathogenesis of this disease.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Plasma visfatin

Cai HY, Li YZ, Li L, Zou JT, Tu Q. Clinical significance of plasma visfatin level in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2763-2767 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2763.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2763>

摘要

目的: 探讨非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者与健康人群血

■背景资料

近年来随着人们生活水平的提高和人口老龄化,我国脂肪肝尤其是非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的患病率明显上升,内脏脂肪素是新近发现的一种由内脏脂肪细胞分泌的脂肪细胞因子,内脏脂肪素与NAFLD的关系报道甚少。

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科

■研究前沿

近年来许多研究发现, 内脏脂肪素具有类胰岛素样作用, 还能促进脂肪的合成和聚集, 可能与肥胖、胰岛素抵抗和脂代谢密切相关, 其与NAFLD的关系尚不明确, 研究较少。

浆内脏脂肪素水平的变化及其意义。

方法: 选择进行健康体检的人员共170例; 分成两组: 即非酒精性脂肪性肝病组110例(分轻度40例、中度40例和重度30例), 健康对照组60例。入选者空腹检查血压、身高、体质量、臀围、腰围、甘油三脂、总胆固醇、血糖、肝功能、胰岛素水平和内脏脂肪素测定, 计算体质量指数(body mass index, BMI)、腰臀比(waist-hip ratio, WHR), 并用稳态模型评估的胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment, HOMA-IR)。

结果: (1)健康对照组与非酒精性脂肪性肝病组比较, BMI、WHR、内脏脂肪素、收缩压、舒张压、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、HOMA-IR等指标差异存在统计学意义($P<0.05$)。内脏脂肪素在轻度、中度、重度NAFLD中依次升高, 轻度非酒精性脂肪性肝病组与中重度非酒精性脂肪性肝病组差异有统计学意义; (2)相关分析显示, 内脏脂肪素与BMI、WHR、HOMA-IR等呈正相关, 随脂肪肝加重, 其相关性更强(r 值依次为0.557、0.398、0.508; 0.579、0.508、0.650, 均 $P<0.05$)。

结论: NAFLD患者血浆内脏脂肪素水平明显高于健康人群。随着NAFLD的加重, 血浆内脏脂肪素水平逐渐升高。内脏脂肪素与NAFLD关系密切, 其可能在NAFLD的发病过程中起一定作用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 内脏脂肪素

核心提示: 本研究表明内脏脂肪素与非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)关系密切, 其可能成为一项早期监测及诊断NAFLD的有效指标。

蔡怀阳, 李运泽, 李莉, 邹劲涛, 涂强. 血浆内脏脂肪素在非酒精性脂肪性肝病中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2763-2767 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2763.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2763>

0 引言

近年来随着人们生活水平的提高和人口老龄化, 我国脂肪肝尤其是非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的患病率

明显上升, 与国外脂肪肝的患病率相接近^[1]。在我国, 脂肪肝也有取代病毒性肝炎成为最常见肝病的趋势。内脏脂肪素是新近发现的一种由内脏脂肪细胞分泌的脂肪细胞因子。近年来许多研究发现, 内脏脂肪素具有类胰岛素样作用, 还能促进脂肪的合成和聚集, 可能与肥胖、胰岛素抵抗和脂代谢密切相关。本研究旨在观察NAFLD患者与健康人群血浆内脏脂肪素水平的变化, 探讨内脏脂肪素与NAFLD的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 NAFLD的诊断标准采用2010年中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组制定的NAFLD诊断标准^[2]。选择柳州市人民医院体检部进行健康体检的人员共170例; 剔除过量饮酒(乙醇摄入量男性140 g/wk, 女性70 g/wk)、慢性病毒性肝炎、肝硬化、妊娠和哺乳期妇女、自身免疫性和遗传性肝病及入选时已有多元代谢紊乱和心脑血管疾病的人群。分成两组: 即非酒精性脂肪性肝病组110例, 按照中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组2010年修订的非酒精性肝病诊疗指南中的脂肪肝超声诊断标准进行脂肪肝的超声诊断。按回声衰减程度^[3]分3度: (1)轻度: 肝脏大小形态正常, 肝内实质回声密集、增强, 后场回声减弱不明显, 肝内管状结构尚清晰; (2)中度: 肝脏大小形态正常或轻中度增大, 前场回声增强, 后场衰减, 管状结构走行模糊, 尚可辨认; (3)重度: 肝脏增大, 形态饱满, 前场回声明显增强, 后场衰减明显, 甚至近似无回声区, 管状结构难以辨认。其中轻度40例、中度40例和重度30例, 正常对照组60例。

1.2 方法

1.2.1 生理指标的测定: 采用台式水银血压计, 受检者坐位测量肱动脉压, 连续测量3次, 取平均值为个体血压值。受检者空腹、免冠、脱鞋, 仅穿单衣测量其身高、体质量、腰围、臀围。腰围: 取腋中线肋弓下缘至髂前上棘连线的中点水平面周径。臀围: 取两侧股骨粗隆水平面周径。体质量指数(body mass index, BMI) = 体质量(kg)/身高(m²)。腰臀比(waist-hip ratio, WHR) = 腰围/臀围。

1.2.2 生化指标的测定: 抽取禁食12 h后的次日清晨空腹肘静脉血, 分离血清2 mL, 用酶联免疫法(日立7170-S全自动生化分析仪)测定甘油三脂、总胆固醇、血糖、肝功能等。分离血清4 mL, 采用BL-9600化学发光分析仪(天津贝尔公

■相关报道

有研究表明, 在大鼠非酒精性肝病模型中, 随着高脂饲料饲养大鼠NAFLD的逐渐形成, 在肝组织中内脏脂肪素表达逐渐升高, 内脏脂肪素的表达变化与肝脂肪变程度相一致。

表 1 对照组与各NAFLD组相关资料

	健康对照组	轻度脂肪肝组	中度脂肪肝组	重度脂肪肝组
男/女	35/25	24/16	30/10	22/8
年龄(岁)	47 ± 13	49 ± 11	49 ± 14	43 ± 13
身高(cm)	165.7 ± 5.5	165.8 ± 6.6	167.6 ± 5.7	167.1 ± 6.5
体质量(kg)	62.34 ± 8.56	72.64 ± 12.28 ^b	80.38 ± 8.45 ^{bc}	81.78 ± 12.49 ^{bc}
BMI(kg/m ²)	23.3 ± 2.9	26.3 ± 3.1 ^b	28.5 ± 2.4 ^{bc}	28.6 ± 3.2 ^{bc}
WHR	0.84 ± 0.05	0.89 ± 0.07 ^b	0.92 ± 0.6 ^b	0.91 ± 0.05 ^b
收缩压(mmHg)	129 ± 13	135 ± 12 ^a	139 ± 16 ^b	141 ± 12 ^b
舒张压(mmHg)	78 ± 12	84 ± 8 ^a	85 ± 8 ^b	85 ± 5 ^b
HOMA-IR	1.06 ± 0.59	1.78 ± 0.73 ^b	2.49 ± 0.82 ^{bc}	2.64 ± 1.37 ^{bc}
甘油三酯(mmol/L)	1.68 ± 1.37	2.22 ± 1.36	3.32 ± 2.15 ^{bc}	2.22 ± 1.19
胆固醇(mmol/L)	4.95 ± 0.85	5.27 ± 0.94	5.37 ± 1.37	5.16 ± 0.94
总胆红素(μmol/L)	13.70 ± 3.36	13.91 ± 3.25	16.16 ± 7.41	16.19 ± 4.21
直接胆红素(μmol/L)	4.31 ± 1.38	4.14 ± 1.50	4.24 ± 1.95	4.73 ± 1.15
间接胆红素(μmol/L)	9.39 ± 2.22	9.78 ± 2.21	11.92 ± 5.77	11.50 ± 3.48
白蛋白(g/L)	47.99 ± 3.43	48.54 ± 3.16	48.44 ± 3.18	49.55 ± 2.55
谷丙转氨酶(U/L)	21.6 ± 10.7	25.2 ± 10.7	39.2 ± 19.3 ^{bc}	40.5 ± 18.6 ^{bc}
谷草转氨酶(U/L)	23.3 ± 8.3	22.3 ± 5.6	28.3 ± 8.6 ^{ac}	32.4 ± 12.5 ^{bc}
内脏脂肪素(μg/L)	17.33 ± 3.22	41.51 ± 20.05 ^b	57.71 ± 23.20 ^{bc}	58.96 ± 23.27 ^{bc}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 健康对照组; ^c $P < 0.05$ vs 轻度脂肪肝组。BMI: 体质量指数; WHR: 腰臀比; HOMA-IR: 胰岛素抵抗指数。

司)测定血清空腹胰岛素水平。稳态模型评估的胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment, HOMA-IR) = 空腹血糖(fasting blood glucose, FBG) × 空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)/22.5。

1.2.3 血浆内脏脂肪素的标本采集及测定: 采生化指标血样同时留取肘静脉血2 mL, EDTA抗凝, 室温静置30 min后, 离心机3000 r/min离心15 min, 分离血浆0.5 mL, -80 °C保存待检。试剂盒购自武汉博士德公司, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血浆内脏脂肪素水平。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件包进行统计, 计数资料以率(%)表示, 采用卡方检验; 所有计量资料以mean ± SD表示, 各组之间比较均进行方差齐性检验, 两组间显著性比较用 t 检验。多因素相关性用逐步法多元线性回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床及实验室指标的比较 健康对照组与非酒精性脂肪性肝病组的性别构成、年龄、身高、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、白蛋白、胆固醇、甘油三酯比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。而体质量、BMI、WHR、内脏脂肪素、收缩压、舒张压、HOMA-IR等指标差异

存在统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01)。内脏脂肪素在轻度、中度、重度NAFLD中依次升高, 轻度非酒精性脂肪性肝病组与中重度非酒精性脂肪性肝病组差异有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.2 相关分析 以内脏脂肪素为因变量, 年龄、身高、体质量、BMI、WHR、收缩压、舒张压、胰岛素、甘油三酯、胆固醇、血糖、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、白蛋白、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、HOMA-IR等为自变量进行逐步法多元线性回归分析, 内脏脂肪素与年龄、身高、直接胆红素、胆固醇、白蛋白等均无相关性(r 值依次为0.099、0.029、0.068、0.164、0.045, 均 $P > 0.05$), 在轻度NAFLD组, 内脏脂肪素与BMI、HOMA-IR有微弱相关性(r 值依次为0.276、0.253, P 均 < 0.05), 与WHR无相关性(r 值为0.120, 均 $P > 0.05$)。在中度、重度NAFLD组, 内脏脂肪素与BMI、WHR、HOMA-IR有明显相关性, 随着脂肪肝加重, 其相关性更强(r 值依次为0.557、0.398, 0.508; 0.579, 0.508, 0.650, 均 $P < 0.05$)(表2)。

3 讨论

长期以来, 脂肪组织一直被认为是仅供能量贮

■创新盘点

研究表明, 内脏脂肪素与肥胖、2型糖尿病、动脉粥样硬化、缺血性脑血管病等均有密切关系, 本文探讨内脏脂肪素与NAFLD的关系, 目前其关系尚不清楚。

■应用要点

血浆内脏脂肪素与糖、脂代谢有重要的关系,已有的研究表明,内脏脂肪素是评价肥胖、代谢综合征的一个重要指标。本研究表明血浆内脏脂肪素水平可能成为一项早期监测及诊断NAFLD有效指标。

表 2 以BMI、WHR、HOMA-IR为自变量逐步法多元线性回归分析结果

变量	回归系数	标准误	标准化偏回归系数	t值	P值
轻度脂肪肝组					
BMI	1.447	0.509	0.276	2.844	0.005
WHR	32.980	27.614	0.120	1.194	0.235
HOMA-IR	6.030	2.324	0.253	2.594	0.011
中度脂肪肝组					
BMI	3.714	0.559	0.557	6.639	0.000
WHR	146.244	34.047	0.398	4.295	0.000
HOMA-IR	12.774	2.187	0.508	5.840	0.000
重度脂肪肝组					
BMI	3.528	0.530	0.579	6.658	0.000
WHR	198.544	35.879	0.508	5.534	0.000
HOMA-IR	13.128	1.636	0.650	8.024	0.000

BMI: 体质指数; WHR: 腰臀比; HOMA-IR: 胰岛素抵抗指数。

备的终末分化器官;随着众多脂肪细胞因子如瘦素(leptin)、脂联素(adiponectin)、抵抗素(resistin)等的发现,脂肪组织旺盛的内分泌功能亦逐渐为人们所认识。目前认为,脂肪因子分泌失调参与了多种肥胖相关性疾病的发生,如胰岛素抵抗、代谢综合征、2型糖尿病、脂肪肝等。2005-01日本大阪大学的Fukuhara等^[4]在内脏脂肪组织中发现一种高度表达的mRNA,序列分析显示与前B细胞克隆增强因子结构一致,临床试验及动物实验均发现其主要在内脏脂肪中高度表达与皮下脂肪组织关系不大,故将其命名为内脏脂肪素。荧光免疫原位杂交法显示其还主要在骨髓、肝脏、肌肉、淋巴组织及胎膜中表达^[5]。研究表明,内脏脂肪素与肥胖、2型糖尿病、动脉粥样硬化、缺血性脑血管病等均有密切关系^[6-9]。

本研究结果显示,在NAFLD患者中,BMI、WHR、HOMA-IR均较健康对照组升高,差异有统计学意义(表1),这表明BMI、WHR、HOMA-IR与NAFLD有密切关系。本研究显示血浆内脏脂肪素在NAFLD患者中表达增加,且随着脂肪肝的加重,血浆内脏脂肪素水平逐渐升高。内脏脂肪素与年龄、身高、直接胆红素、胆固醇、白蛋白等均无相关性。有研究表明,在大鼠NAFLD模型中,随着高脂饲料饲养大鼠NAFLD的逐渐形成,在肝组织中内脏脂肪素表达逐渐升高,内脏脂肪素的表达变化与肝脂肪变程度相一致^[10]。本研究结果表明中、重度NAFLD与轻度NAFLD相比较,血浆内脂素水平明显升高,且有显著统计学差异。这说明血浆内脂素水平

在一定程度上可以反映NAFLD的严重程度。关于内脏脂肪素在NAFLD病理变化中的影响的研究结果显示肝组织活检的几种病理学改变可以用胰岛素浓度、胰岛素抵抗、脂肪量说明。而且,内脏脂肪素血浆浓度可预测NAFLD患者肝门炎症的存在^[11]。这与本研究结果一致。这表明血浆内脏脂肪素与NAFLD有密切关系。

NAFLD与多种因素有关,其中肥胖是常见的危险因素,本研究相关分析表明,在轻度NAFLD组,内脏脂肪素与BMI、HOMA-IR有微弱相关性,与WHR无相关性。在中度、重度NAFLD组,内脏脂肪素与BMI、WHR、HOMA-IR有明显相关性,随着脂肪肝加重,其相关性更强。而BMI、WHR是反映肥胖的有效指标,在健康对照组与各NAFLD组的比较中,血浆内脂素、BMI、WHR存在统计学差异,这表明血浆内脂素水平与肥胖密切相关。Berndt等^[12]发现血浆内脏脂肪素浓度与BMI及体脂百分比相关。在台湾人群中的研究显示WHR与血浆内脏脂肪素水平独立相关,内脏脂肪素与WHR呈正相关,回归分析显示WHR是血浆内脏脂肪素水平的独立相关因素^[13]。Berndt等^[12]研究发现内脏脂肪组织中的内脏脂肪素mRNA与皮下脂肪组织中的相同,血浆内脏脂肪素水平与BMI呈正相关。本研究与上述研究结论一致。

近年大量研究表明,NAFLD与代谢综合征的各个组分密切伴随,甚至有学者将其作为代谢综合征的组分之一,并发现胰岛素抵抗在NAFLD发病机制中起关键作用^[14,15]。胰岛素抵抗是代谢综合征的中心环节,也是糖尿病和

心血管病发病的重要机制之一。内脏脂肪素不仅增加胰岛素的敏感性, 而且具有类胰岛素作用, 能降低糖尿病小鼠的血糖水平和胰岛素水平, 甚至诱导脂肪和肌肉组织中的葡萄糖摄取并抑制肝脏组织中葡萄糖生成。这表明内脏脂肪素可能在防止胰岛素抵抗的发生中起重要作用。胰岛素抵抗状态常与肥胖特别是腹型肥胖并存, 两者可互为因果。而NAFLD与肥胖特别是腹型肥胖关系密切。本研究结果表明, 健康人群与NAFLD患者比较, 胰岛素抵抗指数有统计学差异, 相关性分析表明, 血浆内脏脂肪素水平与HOMA-IR呈正相关。

血浆内脏脂肪素与糖、脂代谢有重要的关系, 已有的研究表明, 内脏脂肪素是评价肥胖、代谢综合征的一个重要指标。NAFLD与肥胖及代谢综合征有密切关系, 目前关于内脏脂肪素与NAFLD的相关研究甚少, 血浆内脏脂肪素水平可能与NAFLD的发生、发展有关; 本研究表明内脏脂肪素与NAFLD关系密切, 其可能在NAFLD的发病过程中起一定作用。其具体的生理及病理生理机制尚不清楚, 有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 范建高, 曾民德. 脂肪性肝病. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 200-229
- 2 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝病杂志 2010; 18: 163-166
- 3 王纯正, 徐智章. 超声诊断学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 229-231
- 4 Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307: 426-430 [PMID: 15604363]
- 5 Ognjanovic S, Bryant-Greenwood GD. Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 1051-1058 [PMID: 12389004]
- 6 Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Bodles AM, Phanavanh B, Lee MJ, Starks T, Kern LM, Spencer HJ, McGehee RE, Fried SK, Kern PA. Human visfatin expression: relationship to insulin sensitivity, intramyocellular lipids, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 666-672 [PMID: 17090638]
- 7 Dogru T, Sonmez A, Tasci I, Bozoglu E, Yilmaz MI, Genc H, Erdem G, Gok M, Bingol N, Kilic S, Ozgurtas T, Bingol S. Plasma visfatin levels in patients with newly diagnosed and untreated type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 76: 24-29 [PMID: 16956691]
- 8 Adya R, Tan BK, Chen J, Randeve HS. Nuclear factor-kappaB induction by visfatin in human vascular endothelial cells: its role in MMP-2/9 production and activation. *Diabetes Care* 2008; 31: 758-760 [PMID: 18184904 DOI: 10.2337/dc07-1544]
- 9 齐艳, 李东艳. 急性脑梗塞患者血清内脏脂肪素水平及其相关性. 兰州大学学报(医学版) 2010; (36): 557
- 10 杨丽, 陈东风. 内脏脂肪素在大鼠非酒精性脂肪性肝病模型中的变化及作用. 重庆医学 2008; 37: 1948-1955
- 11 Aller R, de Luis DA, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Velasco MC, Alvarez T, Pacheco D, González JM. Influence of visfatin on histopathological changes of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1772-1777 [PMID: 19005759 DOI: 10.1007/s10620-008-0539-9]
- 12 Berndt J, Klötting N, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* 2005; 54: 2911-2916 [PMID: 16186392]
- 13 Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, Lee YJ. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 295-299 [PMID: 16234302]
- 14 高鑫. 非酒精性脂肪性肝病与代谢综合征. 国际内分泌代谢杂志 2006; 26: 73-79
- 15 Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Py-paert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL, Shulman GI. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7522-7527 [PMID: 11390966]

■同行评价

本文探讨NAFLD患者与健康人群血浆内脏脂肪素水平的变化及其意义, 学术价值较好, 有一定的参考意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



慢性乙型肝炎湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化FibroScan测定与肝组织病理学诊断的比较

蒋开平, 李建鸿, 胡洪涛, 任健, 邱腾宇, 黄清华, 毛荣军

■背景资料

基于肝脏瞬时弹性成像技术的FibroScan, 可通过检测肝脏硬度值判断肝纤维化, 代表了肝纤维化无创诊断技术的新高度。将FibroScan前沿新技术引入慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)中医诊疗领域, 动态跟踪中医中药对CHB肝纤维化发生、发展或逆转的干预作用, 具有重要临床意义。

蒋开平, 李建鸿, 胡洪涛, 任健, 邱腾宇, 黄清华, 毛荣军, 广州中医药大学附属佛山中医院肝病科 广东省佛山市 528000 蒋开平, 教授, 主任医师, 主要从事中西医结合治疗肝病的临床研究。

作者贡献分布: 此课题由蒋开平设计; 研究病例入组由蒋开平、李建鸿及胡洪涛完成; 研究资料汇集、数据整理由任健与邱腾宇完成; FibroScan测定由黄清华完成; 肝组织病理学诊断由毛荣军完成; 统计学处理及论文写作由蒋开平完成。

通讯作者: 蒋开平, 教授, 主任医师, 528000, 广东佛山市禅城区亲仁路6号, 广州中医药大学附属佛山中医院肝病科, jkpingfs@126.com 电话: 0757-83062073

收稿日期: 2014-04-25 修回日期: 2014-05-19

接受日期: 2014-05-29 在线出版日期: 2014-07-08

FibroScan vs hepatic histopathology for diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome or damp and heat accumulation syndrome

Kai-Ping Jiang, Jian-Hong Li, Hong-Tao Hu, Jian Ren, Teng-Yu Qiu, Qing-Hua Huang, Rong-Jun Mao

Kai-Ping Jiang, Jian-Hong Li, Hong-Tao Hu, Jian Ren, Teng-Yu Qiu, Qing-Hua Huang, Rong-Jun Mao, Department of Hepatology, Foshan Hospital of TCM, the Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Foshan 528000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Kai-Ping Jiang, Professor, Chief Physician, Department of Hepatology, Foshan Hospital of TCM, the Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, 6 Qiren Road, Chancheng District, Foshan 528000, Guangdong Province, China. jkpingfs@126.com

Received: 2014-04-25 Revised: 2014-05-19

Accepted: 2014-05-29 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To assess the application of FibroScan, a new non-invasive diagnostic technique, in the diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis B (CHB) patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome or damp and heat accumulation syndrome.

METHODS: According to the clinical diagnosis of CHB and the TCM diagnostic criteria, we

selected 180 CHB patients with damp and heat accumulation syndrome and 159 CHB patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome. The liver fibrosis stage was assessed by the liver stiffness measurement (LSM) evaluated by FibroScan, and the pathological diagnosis of liver fibrosis was determined using the META-VIR scoring system.

RESULTS: The total incidence rates of liver fibrosis exceeding F2 diagnosed by pathology in CHB patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome and those with damp and heat accumulation syndrome were 65.56% and 62.89%, with no significant difference ($P > 0.05$). The incidence rate of F4 liver fibrosis in CHB patients with damp and heat accumulation syndrome was 25.56%, which was significantly higher than that in patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome (16.35%) ($\chi^2 = 4.2748, P < 0.05$). The incidence rate of F4 liver fibrosis determined by FibroScan in CHB patients with damp and heat accumulation syndrome was 15%, which was significantly higher than that in patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome (5.67%) ($\chi^2 = 7.7586, P < 0.01$). Based on the "gold standard" diagnosis by hepatic histopathology, the total accuracy rates for diagnosis of liver fibrosis from $\geq F2$ to F4 by FibroScan in CHB patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome and those with damp and heat accumulation syndrome were 75.42% and 66%, respectively, with no significant difference ($P > 0.05$). The accuracy rate for diagnosis of liver fibrosis $\geq F2$ by FibroScan in CHB patients with damp and heat accumulation syndrome was significantly higher than that in patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome (84.85% vs 63.04%, $\chi^2 = 4.5396, P < 0.05$), while the accuracy rate for liver fibrosis $\geq F3$ or F4 was similar between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: There is a high incidence rate of liver fibrosis in CHB patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome or damp

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

and heat accumulation syndrome. CHB patients with damp and heat accumulation syndrome are more susceptible to F4 liver fibrosis (cirrhosis). FibroScan can be used for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in CHB patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome or damp and heat accumulation syndrome, especially for the initial stage of liver fibrosis in CHB patients with damp and heat accumulation syndrome.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Chronic hepatitis B; Damp and heat accumulation syndrome; Liver stagnation and spleen deficiency syndrome; Liver fibrosis; FibroScan; Hepatic histopathology

Jiang KP, Li JH, Hu HT, Ren J, Qiu TY, Huang QH, Mao RJ. FibroScan vs hepatic histopathology for diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis B patients with liver stagnation and spleen deficiency syndrome or damp and heat accumulation syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2768-2773 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2768.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2768>

摘要

目的: 探讨Fibroscan在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化无创诊断中的应用前景。

方法: 按照CHB临床诊断依据及中医证候诊断标准, 选择CHB湿热蕴结证患者180例、肝郁脾虚证患者159例。根据FibroScan硬度值(liver stiffness measurement, LSM)范围, 判定肝纤维化程度; 肝组织纤维化病理学诊断, 采用METAVIR评分系统确定纤维化分期; 统计学分析采用 t 检验、 χ^2 检验。

结果: 在肝组织病理学诊断中, CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者F2以上肝纤维化总发生率分别为65.56%、62.89%, 差异无统计学意义($P>0.05$); CHB湿热蕴结证患者肝组织纤维化F4(肝硬化)发生率为25.56%, 高于CHB肝郁脾虚证患者(16.35%), 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.2748, P<0.05$)。在FibroScan测定中, CHB湿热蕴结证患者肝纤维化F4(肝硬化)发生率为15%, 明显高于CHB肝郁脾虚证患者(5.67%), 差异有统计学意义($\chi^2 = 7.7586, P<0.01$)。以肝组织病理学诊断为“金标准”, 则FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者 $\geq$ F2-F4肝纤维化的总准确率分别为75.42%、66%, 差异无统计学意义($P>0.05$); 诊断CHB

湿热蕴结证患者 $\geq$ F2肝纤维化的准确率(84.85%)高于CHB肝郁脾虚证患者(63.04%), 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.5396, P<0.05$); 诊断 $\geq$ F3、F4(肝硬化)肝纤维化的准确率, 两组患者无显著性差异($P>0.05$)。

结论: CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化发生率较高, 而湿热蕴结证患者更易出现F4(肝硬化), 临床须重点关注。FibroScan可用于CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化的无创诊断, 对湿热蕴结证患者肝纤维化进程启动阶段的监测更具有实效性。

© 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; 湿热蕴结证; 肝郁脾虚证; 肝纤维化; FibroScan; 肝组织病理学

核心提示: 慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化发生率较高, 湿热蕴结证患者更易出现F4(肝硬化)。FibroScan可用于CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化的无创诊断, 对湿热蕴结证患者肝纤维化进程启动阶段的监测更具有实效性。

蒋开平, 李建鸿, 胡洪涛, 任健, 邱腾宇, 黄清华, 毛荣军. 慢性乙型肝炎湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化FibroScan测定与肝组织病理学诊断的比较. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2768-2773 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2768.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2768>

0 引言

慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)是我国常见的慢性传染病之一。我国现有慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者约9300万例, 其中CHB患者约2000万例^[1], 是我国慢性肝病肝纤维化最为常见的病因。肝纤维化是CHB发生发展过程中的重要病理生理环节, 其持续进展最终可发展到肝硬化甚至肝癌, 严重危害人民健康。肝纤维化可以减轻或逆转^[2], 故早期诊断并进行有效治疗将有助于抑制肝纤维化的发展, 甚或在一定程度上逆转肝纤维化、减少肝硬化或肝癌的发生, 从而提高CHB患者的生存率和生活质量, 这对CHB的综合防治具有重要临床意义。肝活检虽仍被认为是诊断肝纤维化的“金标准”, 但这种损伤性检查具有许多不足之处, 限制了临床应用深度和广度。同时, 肝纤维化是一个损伤和修复的动态发展过程, 一次肝活检不能检测出肝纤维化发展过程^[3]。多年来, 国内外在肝纤维化的非创伤性诊断方法和评估方面, 作了大量卓

■ 研发前沿

长期以来, 中医药防治CHB肝纤维化大都聚焦于“益气活血”、“扶正化瘀”等措施。理想疗效率仍待提高。如何从CHB临床最主要、最常见的证型入手, 动态监测肝纤维化的发生、发展及中医论治的干预作用? 以肝组织病理学诊断为基准, 分析FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化的准确度, 是重要起点。

■相关报道

Han等报道, 肝纤维化是一个损伤和修复的动态发展过程, 一次肝活检不能检测出肝纤维化发展过程. 陆伦根撰文, 现阶段瞬时弹性测定还不能完全取代肝组织活检, 但在初次活检后用于随访是肯定合适的. 叶放等认为, 在慢肝肝纤维化阶段, 湿热瘀毒证是共同的基本证型.

有成效的研究工作, 如肝纤维血清学评估指标、影像学检查、多指标联合的无创诊断模型等, 虽最有一定临床实用价值, 但仍有较大局限性^[4,5]. 近年来, 基于肝脏瞬时弹性成像技术(transient elastography, TE)的FibroScan能够通过检测肝脏硬度值(liver stiffness measurement, LSM)来判断肝纤维化, 代表了肝纤维化无创诊断技术的新高度, 在我国已被批准用于临床^[6]. 中医药在CHB的诊疗特别是抗肝纤维化中发挥着重要作用, 而FibroScan新技术在中医肝病领域的应用, 尚属于起步阶段. 如何在CHB中医诊疗中引入FibroScan前沿新技术, 面临着挑战. 湿热蕴结证和肝郁脾虚证是CHB患者临床上最主要、最常见的两个证型^[7,8], 可否应用FibroScan新技术即时、动态监测该两个证型肝纤维化的发生发展及中医药治疗干预的效应, 值得期待. 为此, 我们就CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化FibroScan测定与肝组织病理学诊断进行了比较分析, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2013-01/2013-10我院肝病科符合CHB临床诊断依据及湿热蕴结证和肝郁脾虚证中医证候诊断标准的住院患者. 其中, CHB湿热蕴结证患者180例, CHB肝郁脾虚证患者159例. 湿热蕴结证患者中, 男性133例, 女性47例, 年龄16-57岁、平均年龄33.58岁±9.12岁; 肝郁脾虚患者中, 男性111例, 女性48例, 年龄17-62岁、平均年龄32.12岁±8.76岁. 两组患者性别构成无显著性差异($\chi^2 = 0.6959, P > 0.05$), 年龄结构无显著性差异($t = 1.4969, P > 0.05$), 具有可比性. 所有患者均于肝脏FibroScan检测后, 2 wk内行肝活检, 完成肝组织病理学检查.

1.2 方法

1.2.1 CHB临床诊断: 符合《慢性乙型肝炎防治指南(2010版)》^[1]及2012年《欧洲肝病学会(EASL)临床实践指南: 慢性乙型肝炎病毒感染管理》^[9]中的诊断依据: 既往有乙型肝炎病史或HBsAg阳性超过6 mo; 年龄18-65岁; $2 \times \text{ULN} \leq \text{ALT} \leq 10 \times \text{ULN}$, 且 $\text{TBIL} \leq 51.3 \mu\text{mol/L}$; HBV DNA阳性($\geq 2000 \text{ IU/mL}$); 肝脾超声检查未见明显异常.

1.2.2 CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证中医证候诊断: 符合《慢性乙型肝炎中医诊疗专家共识(2012-01)》证候诊断标准^[10]. (1)湿热蕴结证: 主症: 身目黄染, 黄色鲜明; 小便黄赤; 口干苦或口

臭; 舌苔黄腻. 次症: 脘闷, 或纳呆, 或腹胀; 恶心或呕吐; 大便秘结或黏滞不畅; 胸胁胀; 脉弦滑或滑数. 凡具备主症中2项加次症2项, 可定为本证; (2)肝郁脾虚证: 主症: 胁肋胀痛; 情绪抑郁; 纳差或食后胃脘胀满; 倦怠乏力. 次症: 口淡乏味、便溏不爽、嗝气、乳房胀痛或结块、舌质淡红、苔薄白或薄黄、脉弦缓. 凡具备主症“胁肋胀痛/情绪抑郁”任一项加“纳差或食后胃脘胀满/倦怠乏力”任一项, 加次症2项, 可定为本证.

1.2.3 病例排除: 具有下列情形之一者, 即予以排除: 同时感染艾滋病病毒、丙型肝炎病毒; 合并代谢性或自身免疫性肝病; 滥用酒精或非法药品史, 30 d内参加其他肝炎药物试验; 入选前24 wk有核苷类似物、干扰素、免疫调节剂及抗肝纤维化等用药史; 入选前12 wk有清热利湿、健脾疏肝汤药或中成药服用史; 临床确诊的肝硬化患者; $\text{ALT} \leq 2 \times \text{ULN}$ 或 $\text{ALT} \geq 10 \times \text{ULN}$ 或 $\text{TBIL} \geq 51.3 \mu\text{mol/L}$; 怀孕或哺乳期妇女; 精神病和其他严重脏器疾病者.

1.2.4 肝脏FibroScan检测: 检测仪器FibroScan[®] 502由法国Echosens公司生产, 检测方法参照FibroScan[®]用户手册, 由受过专业培训的操作者独立完成. 检测区域为右侧腋前线至腋中线第7、8、9肋间, 连续成功检测10次, 取中位值(M)为最后测定结果, 并以硬度值(kPa)表示. 有效性判定: 四分位间距(IQR)与中位值比值(IQR/M) < 30%, 操作成功率 $\geq 60\%$. 综合文献资料^[6,11,12], 根据LSM判定肝纤维化程度: F0-F1($\text{LSM} < 7.4 \text{ kPa}$), F2($7.4 \text{ kPa} \leq \text{LSM} < 9.4 \text{ kPa}$), F2-F3($9.4 \text{ kPa} \leq \text{LSM} < 12.4 \text{ kPa}$), F3-F4($12.4 \text{ kPa} \leq \text{LSM} < 17.5 \text{ kPa}$), F4($\geq 17.5 \text{ kPa}$).

1.2.5 肝组织病理学检查: 两组患者排除禁忌症后, 超声超引导下使用16 G穿刺针, 采用1 s负压法于呼气末行经皮肝穿刺活组织检查, 要求所得肝脏组织长度 $\geq 1 \text{ cm}$ 、包含 ≥ 6 个可供评价的汇管区. 肝组织标本块取出后立即用4%甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋、连续切片备用. 肝组织病理切片由本院经验丰富的病理科医师分别进行HE染色、Masson染色、嗜银染色、网状纤维染色及阅片. 肝组织纤维化病理学诊断, 采用METAVIR评分系统确定纤维化分期^[13]: F0(无纤维化)、F1(门静脉区有纤维化但没有纤维间隔形成)、F2(少量纤维间隔形成)、F3(大量纤维间隔但没有肝硬化)、F4(肝硬化).

统计学处理 应用SPSS 16.0统计软件进行分

表 1 CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝组织纤维化病理学诊断比较 $n(\%)$

分组	n	肝组织纤维化病理学诊断			
		F0-F1	F2	F3	F4
湿热蕴结证	180	62(34.44)	33(18.33)	39(21.67)	46(25.56) ^a
肝郁脾虚证	159	59(37.11)	37(23.27)	37(23.27)	26(16.35)
合计	339	82(29.93)	63(22.99)	53(19.34)	76(27.74)

$\chi^2 = 4.2748$, ^a $P < 0.05$ vs 肝郁脾虚证. CHB: 慢性乙型肝炎.

表 2 CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化FibroScan检测比较 $n(\%)$

分组	n	肝纤维化FibroScan检测				
		F0-F1	F2	F2-F3	F3-F4	F4
湿热蕴结证	180	41(22.78)	39(21.67)	51(28.33)	22(12.22)	27(15.00) ^a
肝郁脾虚证	159	48(30.19)	38(23.90)	42(26.42)	22(13.84)	9(5.67)
合计	339	91(33.21)	72(26.28)	54(19.71)	39(14.23)	18(6.57)

$\chi^2 = 7.7586$, ^a $P < 0.05$ vs 肝郁脾虚证. CHB: 慢性乙型肝炎.

表 3 CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者FibroScan诊断 $\geq F2$ 以上肝纤维化准确率分析

分组		肝纤维化分期 $n(\%)$		
		$\geq F2$	$\geq F3$	F4
湿热蕴结证	病理学诊断	33	39	46
	FibroScan检测	28/33(84.85) ^a	32/39(82.05)	29/46(63.04)
肝郁脾虚证	病理学诊断	37	37	26
	FibroScan检测	23/37(62.16)	28/37(75.67)	15/26(57.69)

$\chi^2 = 7.7586$, ^a $P < 0.05$ vs 肝郁脾虚证. CHB: 慢性乙型肝炎.

析. 计量资料以mean $\pm$ 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 CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝组织纤维化病理学诊断比较 肝组织纤维化病理学诊断显示, CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者F2以上肝纤维化总发生率分别为65.56%、62.89%, 差异无统计学意义($P > 0.05$). 其中, CHB湿热蕴结证患者肝组织纤维化F4(肝硬化)的发生率为25.56%, 高于CHB肝郁脾虚证患者(16.35%), 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.2748$, $P < 0.05$); 肝组织纤维化F0、F1、F2、F3的发生率, 在两组患者中均无显著性差异($P > 0.05$)(表1).

2.2 CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化FibroScan检测比较 肝纤维化FibroScan检测显示, CHB湿热蕴结证患者FibroScan检测肝纤

维化F4(肝硬化)发生率为15%, 明显高于CHB肝郁脾虚证患者(5.67%), 差异有统计学意义($\chi^2 = 7.7586$, $P < 0.01$); 肝纤维化F0-F1、F2、F2-F3、F3-F4的出现率, 在两组患者中均无显著性差异($P > 0.05$)(表2).

2.3 CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化FibroScan检测与肝组织病理学诊断比较 以肝组织病理学诊断为标准, FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者 $\geq F2$ 肝纤维化的总准确率分别为75.42%、66%, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 诊断 $\geq F2$ 、F3、F4肝纤维化的准确率分别为84.85%、82.05%、63.04%和62.16%、75.67%、57.69%. 其中, 诊断CHB湿热蕴结证患者 $\geq F2$ 肝纤维化的准确率高于CHB肝郁脾虚证患者, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.5396$, $P < 0.05$); 诊断CHB $\geq F3$ 、F4肝纤维化的准确率, 两组患者无显著性差异($P > 0.05$)(表3).

■创新盘点

以肝组织病理学诊断为基准, 分析FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化的准确度, 重点关注CHB湿热蕴结证患者肝纤维化的发生、发展及肝硬化的形成以及FibroScan的应用价值.

■应用要点

FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化,可使60%以上患者免于肝活检;FibroScan诊断CHB湿热蕴结证患者 $\geq$ F2肝纤维化的准确率高于肝郁脾虚证患者;诊断 $\geq$ F3、F4(肝硬化)患者肝纤维化的准确率,肝郁脾虚证略低于湿热蕴结证。初步显示FibroScan动态监测CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化发生、发展的应用前景。

3 讨论

中医中药防治CHB肝纤维化有特色优势。长期以来,CHB肝纤维化的防治大都聚焦于重度肝纤维化或肝硬化已形成后“益气活血”、“扶正化瘀”、“软坚散结”等措施的跟进干预^[14],虽可在一定程度上减轻或逆转肝纤维化,但治疗难度大、理想疗效率不高等临床困局仍待破解。因此,从CHB临床上最主要、最常见的湿热蕴结证和肝郁脾虚证入手,动态监测肝纤维化的发生、发展,运用中医辨证论治手段及时干预治疗,最大限度减少、延缓甚至阻断重度肝纤维化或肝硬化的形成,具有重要临床意义。FibroScan无创肝纤维化诊断新技术的问世,为中医中药防治CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化动态疗效的可视化带来了曙光,而以肝组织病理学诊断为基准,分析FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化的准确度,则是其中的重要节点。

《肝纤维化中西医结合诊疗指南》指出^[15]:“肝纤维化的基本证候病机为正虚血瘀。但在肝纤维化病变的不同阶段、不同患者,可表现为不同的证候类型,常见有肝胆湿热、肝郁脾虚、肝肾阴虚等主要证型。”针对CHB“湿热疫毒”的致病因素,CHB湿热蕴结证肝纤维化的论治逐步受到临床关注。叶放等^[16]认为,在慢肝肝纤维化阶段,湿热瘀毒证是共同的基本证型,并以此为中心,可以合并肝脾不调、肝肾阴虚、气阴两虚、脾肾阳虚等多种证型。我们的早期研究发现^[17],湿热型CHB患者血清肝纤维化指标TGF- β 1和TIMP-1水平明显升高,预示肝纤维化进程已经启动,中医论治CHB肝纤维化不可忽视湿热为患的影响。本资料肝纤维化病理学诊断显示,虽然CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者F2以上肝纤维化的总发生率基本相同($P>0.05$),但CHB湿热蕴结证患者肝纤维化F4(肝硬化)的发生率(25.56%)高于CHB肝郁脾虚证患者(16.35%)($P<0.05$);FibroScan检测亦显示,CHB湿热蕴结证患者FibroScan检测肝纤维化F4(肝硬化)的发生率(15%)明显高于CHB肝郁脾虚证患者(5.67%)($P<0.01$)。故临床上需重点关注CHB湿热蕴结证患者肝纤维化的发生、发展及肝硬化的形成。至于CHB湿热蕴结证患者FibroScan检测肝纤维化F4(肝硬化)的发生率低于肝组织纤维化病理学诊断率,则可从以下两方面分析说明:(1)FibroScan肝纤维化无创诊断技术尚不能完全替代“金标准”的肝组织病理学诊断;

(2)FibroScan检测肝纤维化F4(肝硬化)的判定值较高(≥ 17.5 kPa),部分肝组织病理学诊断为肝纤维化F4(肝硬化)的患者,因FibroScan检测值位于F3-F4(12.4 kPa $\leq$ LSM <17.5 kPa)区间而划归 $\geq$ F3。因此,对于FibroScan检测值位于F3-F4的CHB湿热蕴结证或肝郁脾虚证患者,必要时可行肝活检以确定有无肝纤维化F4(肝硬化)的形成。

以肝组织病理学诊断为“金标准”,分析FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化的准确度,本资料显示:FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者 $\geq$ F2-F4肝纤维化的总准确率分别为75.42%、66%,两组基本相同($P>0.05$);FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者 $\geq$ F2、 $\geq$ F3、F4(肝硬化)肝纤维化的准确率分别为84.85%、82.05%、63.04%和62.16%、75.67%、57.69%。其中,FibroScan诊断CHB湿热蕴结证患者 $\geq$ F2肝纤维化的准确率高于CHB肝郁脾虚证患者($P<0.05$);而在诊断 $\geq$ F3、F4(肝硬化)肝纤维化的准确率方面,两组则基本相同($P>0.05$)。分析以上资料,FibroScan无创技术诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化,可使60%以上患者免除有创诊断的肝活检,初步显示FibroScan无创肝纤维化诊断新技术动态监测CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化发生、发展的应用前景。其中,FibroScan诊断CHB湿热蕴结证 $\geq$ F2肝纤维化的准确率高于CHB肝郁脾虚证,说明CHB湿热蕴结证患者肝纤维化进程启动阶段应用FibroScan监测的实效性,但必须注意LSM影响因素的甄别:CHB湿热蕴结证患者,ALT、BIL等肝功能指标均较肝郁脾虚证患者显著升高^[18],而LSM会受ALT、BIL水平升高的影响,并可随ALT、BIL水平的下降而降低^[19,20]。在FibroScan诊断 $\geq$ F3、F4(肝硬化)患者肝纤维化的准确率方面,虽然肝郁脾虚证略低于湿热蕴结证,但无统计学意义($P>0.05$),这可从中医病因病机学理论进行解析:中医学认为湿热是CHB的基本病理因素,可贯穿病程的始终,并与肝脏的炎症活动相关^[17],故肝郁脾虚证不仅可部分兼有湿热蕴结证的证候因素,且肝郁脾虚 $\rightarrow$ 脾虚不能运化水湿,郁久化热,亦可向湿热蕴结证转化。当然,对FibroScan诊断CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化准确度的把握,还必须在操作上注重LSM取值可靠性标准(IQR/M)的掌控^[21]。

总之,CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝

纤维化发生率较高, 而湿热蕴结证患者更易出现F4(肝硬化), 临床须重点关注。FibroScan新技术可用于CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证患者肝纤维化的无创诊断, 对湿热蕴结证患者肝纤维化进程启动阶段的监测更具有实效性, 若较好规避LSM影响因素、把握LSM取值可靠性标准(IQR/M), 并在首次联合肝活检后用于CHB患者肝纤维化发生发展的动态随访^[22], 则FibroScan将为中医药防治CHB湿热蕴结证和肝郁脾虚证肝纤维化动态疗效的可视化提供强大支撑, 进而提升中医中药防治肝纤维化的学术水平。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010版). 中华肝脏病杂志 2011; 19: 13
- 2 Pinzani M, Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4: 459-472 [PMID: 20678019 DOI: 10.1586/egh.10.47]
- 3 Han KH, Yoon KT. New diagnostic method for liver fibrosis and cirrhosis. *Intervirol* 2008; 51 Suppl 1: 11-16 [PMID: 18544943 DOI: 10.1159/000122594]
- 4 王一飞, 陆伦根. 非创伤性检查诊断肝纤维化的进展. 胃肠病学 2011; 16: 181-183
- 5 Martínez SM, Crespo G, Navasa M, Forns X. Noninvasive assessment of liver fibrosis. *Hepatology* 2011; 53: 325-335 [PMID: 21254180 DOI: 10.1002/hep.24013]
- 6 肝脏硬度评估小组. 瞬时弹性成像技术诊断肝纤维化专家意见. 中华肝脏病杂志 2013; 21: 420-424
- 7 张国良, 吴其恺, 林巧, 邓欣, 乐晓华, 聂广. 260例慢性乙型肝炎中医证型与肝组织病理改变的相关性研究. 中国中西医结合杂志 2007; 27: 613-615
- 8 李梢, 张宁波, 李志红, 丁皓, 叶永安. 慢性乙型肝炎患者肝胆湿热证和肝郁脾虚证的决策树诊断模型初探. 中国中西医结合杂志 2009; 29: 993-996
- 9 European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57: 167-185 [PMID: 22436845]
- 10 中华中医药学会内科肝胆病学组, 世界中医药联合学会肝病专业委员会, 中国中西医结合学会肝病组. 慢性乙型肝炎中医诊疗专家共识(2012-01). 临床肝胆病杂志 2012; 28: 164-168
- 11 de Lédinghen V, Vergniol J. Transient elastography for the diagnosis of liver fibrosis. *Expert Rev Med Devices* 2010; 7: 811-823 [PMID: 21050091 DOI: 10.1586/erd.10.46]
- 12 Chen YP, Liang XE, Zhang Q, Peng J, Zhu YF, Wen WQ, Hou JL. Larger biopsies evaluation of transient elastography for detecting advanced fibrosis in patients with compensated chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1219-1226 [PMID: 22414330 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07122.x]
- 13 Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825-832 [PMID: 9121257 DOI: 10.1016/S0140-6736(96)07642-8]
- 14 陈俊荣, 陈俊红, 侯振江. 抗肝纤维化中医治则的临床研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 289-291
- 15 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 866-870
- 16 叶放, 薛博瑜, 吴勉华, 周珉, 周中瑛. 重视对慢性肝炎肝纤维化进程中湿热瘀毒证治研究. 中华中医药学刊 2007; 25: 2477-2479
- 17 蒋开平, 陶银, 胡洪涛, 李建鸿, 张玉萍, 何应伟. 湿热型慢性乙型肝炎患者血清TGF- β 1和TIMP-1水平的研究. 中西医结合肝病杂志 2007; 17: 264-265
- 18 张玲, 蒋桦, 潘虹. 慢性乙型肝炎中医证型与临床检验指标相关性研究. 浙江中医药大学学报 2012; 36: 21-22
- 19 Liang XE, Chen YP, Zhang Q, Dai L, Zhu YF, Hou JL. Dynamic evaluation of liver stiffness measurement to improve diagnostic accuracy of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B acute exacerbation. *J Viral Hepat* 2011; 18: 884-891 [PMID: 21062388 DOI: 10.1111/j.1365-2893]
- 20 Wong GL, Wong VW, Choi PC, Chan AW, Chim AM, Yiu KK, Chan FK, Sung JJ, Chan HL. Increased liver stiffness measurement by transient elastography in severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1002-1007 [PMID: 19457152]
- 21 Boursier J, Zarski JP, de Lédinghen V, Rousselet MC, Sturm N, Lebaill B, Fouchard-Hubert I, Gallois Y, Oberti F, Bertrais S, Calès P. Determination of reliability criteria for liver stiffness evaluation by transient elastography. *Hepatology* 2013; 57: 1182-1191 [PMID: 22899556 DOI: 10.1002/hep.25993]
- 22 陆伦根. 瞬时弹性测定在肝纤维化诊断中的意义. 中华肝脏病杂志 2012; 20: 571-572

同行评价

本文基于FibroScan的临床应用研究了湿热蕴结证与肝郁脾虚证肝纤维化的差异, 有一定的临床意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



实时组织弹性成像评价肝纤维化分级的Meta分析

张碧莹, 李晓光, 胥婕

■背景资料

肝硬化是临床常见的慢性进行性肝病。早期由于肝脏代偿功能较强可无明显症状, 后期则以肝功能损害和门脉高压为主要表现, 常合并上消化道出血、肝性脑病、腹水、癌变等并发症。早期肝纤维化有可逆性, 因此预测及早期诊断肝纤维化对整个疾病的进程和预后非常重要。

张碧莹, 李晓光, 胥婕, 北京大学第三医院感染疾病科 北京市 100191

张碧莹, 住院医师, 北京大学医学部临床博士, 主要从事病毒性肝炎的研究。

作者贡献分布: 资料整理、数据分析及文章起草由张碧莹完成; 选题设计与文章修改由李晓光完成; 文章修改与审阅由胥婕完成。

通讯作者: 胥婕, 主任医师, 100191, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院感染疾病科. xujie1998@126.com

电话: 010-82265599 传真: 010-82265592

收稿日期: 2014-03-18 修回日期: 2014-04-09

接受日期: 2014-04-17 在线出版日期: 2014-07-08

Assessment of hepatic fibrosis stage by real-time tissue elastography: A meta-analysis

Bi-Ying Zhang, Xiao-Guang Li, Jie Xu

Bi-Ying Zhang, Xiao-Guang Li, Jie Xu, Department of Infectious Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Correspondence to: Jie Xu, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Peking University Third Hospital, 49 North Garden Road, Haidian District, Beijing 100191, China. xujie1998@126.com

Received: 2014-03-18 Revised: 2014-04-09

Accepted: 2014-04-17 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To assess the value of real-time tissue elastography (RTE) in hepatic fibrosis stage assessment.

METHODS: We searched PubMed, Elsevier, Springer and CNKI databases for the articles in Chinese or English language that evaluated RTE for diagnosis of hepatic fibrosis. Data of enrolled articles were analyzed with Meta-disc 1.4 software.

RESULTS: A total of 10 studies were included. The pooled sensitivity, specificity and the area under the summary receiver operating characteristic curve for significant fibrosis ($\geq F2$) and cirrhosis (F4) were 83.7%, 80.75%, and 0.9017, and 77.7%, 86.5%, and 0.9183, respectively.

CONCLUSION: RTE is a non-invasive detection method for hepatic fibrosis with high accuracy.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Liver cirrhosis; Fibrosis; Real-time elastography

Zhang BY, Li XG, Xu J. Assessment of hepatic fibrosis stage by real-time tissue elastography: A meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2774-2779
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2774.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2774>

摘要

目的: 应用Meta分析评价实时组织弹性成像(real-time elastography, RTE)技术对肝纤维化的诊断价值。

方法: 对Pubmed、Elsevier、Springer以及中国期刊网(China National Knowledge Infrastructure)中有关RTE评价肝纤维化分级的中英文文献进行评价和筛选, 应用Meta-disc 1.4软件对入选文献进行数据分析。

结果: 共纳入10篇文献。RTE对肝纤维化分级 $\geq F2$ 组(明显肝纤维化)和F4(早期肝硬化)组的合并敏感度、特异度、综合受试者工作特征(summary receiver operating characteristics)曲线下面积分别为83.7%、80.75%、0.9017和77.7%、86.5%、0.9183。

结论: RTE技术对肝纤维化分级具有较高诊断价值。

© 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; 肝硬化; 实时组织弹性成像

核心提示: 本研究通过Meta分析方法得出实时组织弹性成像(real-time elastography)对于评估肝脏明显纤维化和早期肝硬化具有较高诊断价值的结论, 病种包括病毒性肝炎、脂肪肝和铁超载等, 临床上具有较高的应用价值。

张碧莹, 李晓光, 胥婕. 实时组织弹性成像评价肝纤维化分级的Meta分析. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2774-2779

■同行评议者

高泽立, 副教授, 周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院

URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2774.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2774>

0 引言

肝纤维化是长期肝损伤过程中细胞外基质过量沉积及异常分布的结果, 最终可导致肝硬化。他由不同病因造成, 包括病毒感染、免疫反应、中毒和代谢损害等。尽管经皮肝脏穿刺活组织检查是临床评价肝纤维化分级的“金标准”^[1], 但有其自身局限性, 包括有创性引起的并发症, 穿刺部位局限而易出现抽样误差等。一系列无创诊断模型和方法应运而生。近年发展的实时组织弹性成像(real-time tissue elastography, RTE)的原理是压迫性弹性成像^[2], 即通过操作者手法施加一定的压力, 比较组织受压前后的变化得到一幅相关的压力图。目前, 广泛应用于临床的为日本HITACHI公司所开发的超声弹性成像设备。该设备以原有的超声彩色成像仪为基础, 在设备内部设置可调的弹性成像感兴趣区(region of interest, ROI), 比较加压过程中ROI内病变组织与周围正常组织之间的弹性系数(应力/应变)不同来估计组织内部不同位置的位移, 从而计算出变形程度, 再以灰阶或彩色编码成像^[3]。弹性系数小的组织受压后位移变化大, 显示为红色; 弹性系数中等的组织显示为绿色; 弹性系数大的组织受压后位移变化小则显示为蓝色, 以绿色表示感兴趣区域的平均硬度。红色到蓝色表示病变区组织从“软”到“硬”的变化程度。许多研究表明, RTE测定的肝纤维化值与肝纤维化病理分级相关, 但对其评价肝纤维化分级的准确性和各期诊断界值尚存在争议。本研究应用Meta分析, 从循证医学角度评价RTE对肝纤维化的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 材料 通过计算机检索2001-01/2013-12相关文献, 数据库包括Pubmed、Elsevier、Springer以及中国期刊网(China National Knowledge Infrastructure, CNKI)检索词为“liver cirrhosis”、“fibrosis”、“Real time elastography”、“肝纤维化”、“肝硬化”、“实时组织弹性成像”。

1.2 方法

1.2.1 文献纳入及排除标准: 纳入标准: (1)以病理活检为金标准, 采用METAVIR分级法^[4]将纤维

化分为F0-F4期(F0: 无纤维化; F1: 汇管区纤维化但无纤维间隔; F2: 汇管区纤维化伴少量间隔; F3: 间隔纤维化; F4: 肝硬化。明显纤维化是F2等级及以上); (2)研究对象包括各种病因导致的肝纤维化患者; (3)通过RTE诊断肝纤维化分级; (4)病例数不少于20例; (5)中、英文原始论著。排除标准: (1)无法提取原始数据获取四格表; (2)重复发表文献。

1.2.2 资料提取: 根据上述标准选取文献, 提取相关临床及统计资料, 包括研究作者、国家或地区、发表期刊、发表时间、研究对象样本量、病因、年龄、性别、RTE检查相关数据及统计分析需要的各项参数(真阳性数、假阳性数、真阴性数、假阴性数等)。

1.2.3 文献质量评价: 依据诊断性试验准确性质量评价工具(quality assessment of diagnostic accuracy studies), 对入选文献的各条目按“是”、“否”、“不清楚”进行评价。如果文献各项条目评价结果均为“是”, 则该文献被评为A级, 即出现偏倚的可能性极低; 若其中任何一条或多条评价结果为“不清楚”, 则该文献被评为B级; 如果其中一条或多条评价结果为“否”, 则文献被评为C级, 即出现偏倚的可能性较高。

统计学处理 采用诊断性试验荟萃分析软件Meta-disc1.4计算纳入文献的合并敏感度、合并特异度、合并诊断比值比(diagnostic odds ratio, DOR)及95%置信区间, 并进行综合受试者工作特性曲线(summary receiver operating characteristic, SROC)拟合分析, 获得曲线下面积(area under curve, AUC)。通过SROC平面散点图的分布形态判断是否存在阈值效应, 如呈现“肩臂形”, 表明存在阈值效应, 敏感度和特异度呈阴性关联。DOR指病例组中试验阳性的比值与对照组中试验阳性的比值, DOR越大, 表明诊断试验判别有无疾病的能力越强。对DOR结果采用卡方检验及Q值评估其异质性, $I^2 \geq 25\%$, Cochran-Q及 $P < 0.05$ 表明存在异质性, 采用随机效应模型, $I^2 < 25\%$, Cochran-Q及 $P \geq 0.05$ 表明异质性小, 采用固定效应模型。

2 结果

2.1 文献筛选 初步检索得到相关中英文文献99篇, 经筛选10篇文献^[5-14]入选, 9篇英文, 1篇中文, 共纳入病例数为1068例。10篇文献中有4篇描述了RTE评价 $\geq F1$ 的诊断价值, 病例数为96例; 9篇

■研究前沿

肝脏活体组织检查(肝活检)目前仍被认为是诊断肝纤维化的“金标准”, 但由于其有创性以及很难全面体现整个肝脏的纤维化程度限制了其应用。因而无创性肝纤维化诊断方法逐渐成为国内外学者关注的热点, 理想的肝纤维化诊断方法应该具备无创、有肝脏特异性、易于执行、可靠和便宜等特性。目前肝纤维化的无创模型主要包括检测相关的血清学标志物水平以及通过超声或磁共振弹性成像方法来评价肝组织硬度。

■相关报道

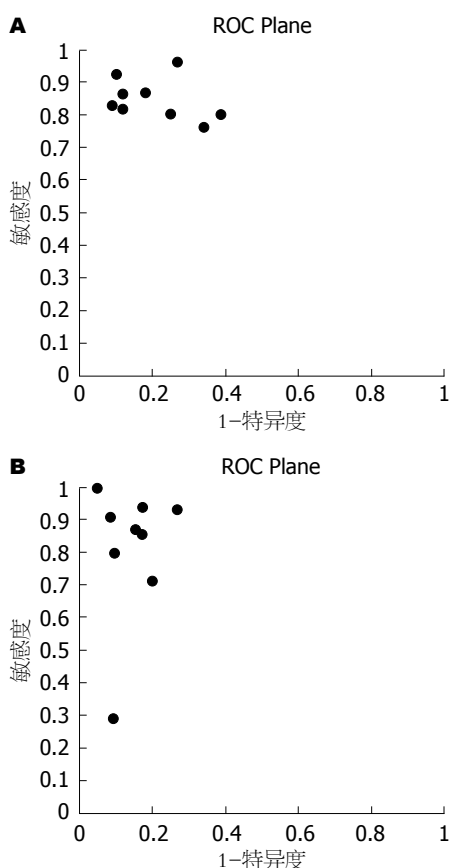
2013年Fruio等发表了关于肝脏超声弹性成像的综述, 文中详细描述了各种超声弹性成像技术的优缺点比较, 包括脉冲成像、静态成像等。Colombo对实时组织弹性成像(real-time elastography, RTE)和瞬时弹性成像(transient elastography)进行的头对头研究表明, 两者与肝纤维化均有较高关联度但对于坏死炎症则无明显相关。

■创新盘点

本文通过meta分析评估RTE诊断肝纤维化的价值,得出RTE对于评估肝脏明显纤维化和早期肝硬化具有较高诊断价值的结论可信度高,解决了部分研究结果不一致性的问题。

表 1 10篇纳入文献基本特征及质量等级

第一作者	国家或地区	年份	病因	n	质量等级
Hu ^[5]	中国	2012	乙型肝炎	96	A
Koizumi ^[6]	日本	2011	丙型肝炎	70	A
Paparo ^[7]	意大利	2013	铁超载	60	B
Wang ^[8]	中国	2012	乙型肝炎	75	B
Kanamoto ^[9]	日本	2009	病毒性肝炎	41	B
Friedrich-Rust ^[10]	德国	2007	丙型肝炎	99	A
Colombo ^[11]	意大利	2012	慢性肝病	91	B
陈曦 ^[12]	中国	2012	病毒性肝炎	70	C
Ochi ^[13]	日本	2012	脂肪肝	75	A
Morikawa ^[14]	日本	2011	丙型肝炎	101	C

图 1 不同组别散点图分布. A: $\geq$ F2组; B: F4组.

描述了RTE评价 $\geq$ F2的诊断价值,病例数为114例;7篇描述了RTE评价 $\geq$ F3的诊断价值,病例数为84例;9篇描述了RTE评价F4的诊断价值,病例数为129例。

2.2 纳入研究特点及质量评价 4篇文献评为A级;4篇文献评级为B级,2篇文献评级为C级。入选文献的基本特征如表1。

2.3 统计分析 因 $\geq$ F1组别文献数或例数较少,不宜进行Meta针对 $\geq$ F2和F4组别进行分析。 $\geq$ F2

和F4组的散点图分布均非典型的“肩臂形”(图1),不存在阈值效应引起的异质性。 $\geq$ F2组 $I^2 = 58.0\%$, Q值19.03($P = 0.0147$); F4组 $I^2 = 58.0\%$, Q值19.06($P = 0.0145$)(图2),表明两组均存在非阈值效应引起的异质性。采用随机效应模型进行分析, $\geq$ F2合并敏感度、特异度、诊断比值比分别0.837(95%CI: 0.799-0.869)、0.807(95%CI: 0.751-0.865)、22.54(95%CI: 11.27-45.07); F4组的合并敏感度、特异度、比值比分别0.777(95%CI: 0.701-0.841)、0.865(95%CI: 0.834-0.892)、29.66(95%CI: 12.26-71.72)。 $\geq$ F2组AUC = 0.9017, $Q^* = 0.8331$; F4组AUC = 0.9183, $Q^* = 0.8514$ (图3)。

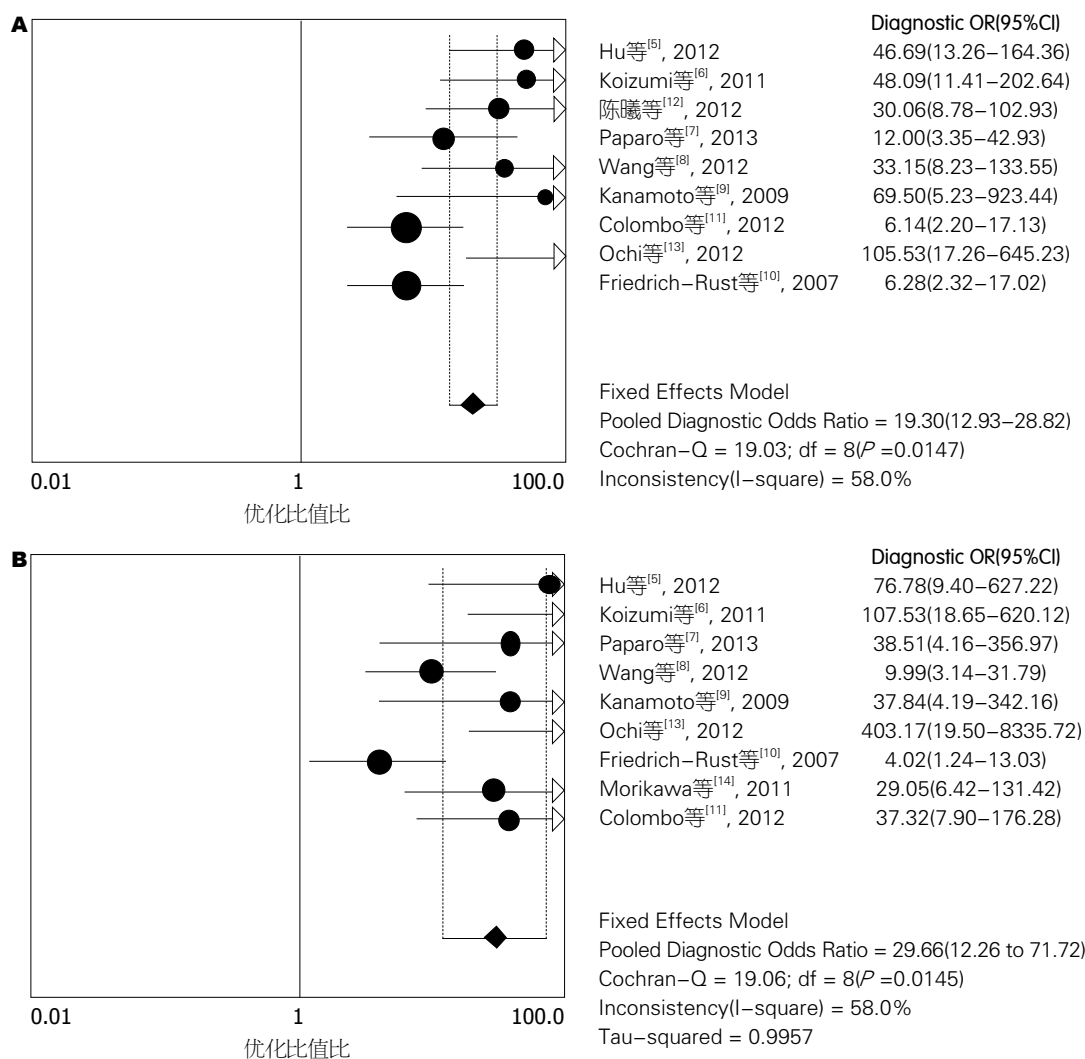
3 讨论

Meta分析是指用统计学方法对收集的多个研究资料进行分析和概括,以提供量化的平均效果来回答研究的问题。其优点是增大样本含量来增加结论的可信度,解决研究结果的不一致性。Meta分析通过AUC判断诊断性试验的诊断价值: AUC $\leq$ 50%表明诊断试验无意义; 50% $<$ AUC $\leq$ 70%表明诊断的准确率较低; 70% $<$ AUC $\leq$ 90%表明诊断的准确率中等; AUC $>$ 90%表明诊断的准确率较高,即越接近于1(曲线越接近左上角)表明诊断准确率越高。本研究结果显示RTE对于评价肝纤维化 $\geq$ F2组和F4组, AUC分别为0.9017、0.9183。表明其有较高的临床实用价值,诊断准确率高。

本研究纳入文献存在较高异质性对于不同病因分析, $\geq$ F2组 $I^2 = 58.0\%$, Q值19.03($P = 0.0147$); F4组 $I^2 = 58.0\%$, Q值19.06($P = 0.0145$),但散点图未呈现“肩臂效应”,故考虑为非阈值效应引起的研究异质性。本研究的异质性主

■应用要点

诊断早期肝纤维化是判断病情、决定治疗及随访疗效的关键环节。RTE技术为无创性方法,临床上应用简便,对肝纤维化分级具有较高诊断价值。



■名词解释

综合受试者工作特性曲线(summary receiver operating characteristic, SROC)是针对同一检测指标的多个不同试验进行Meta分析, 根据他们的比数比的权重, 通过拟合SROC曲线综合评价诊断试验的准确性, 从SROC曲线上可得到每一个研究的灵敏度和特异度。

图 2 不同组别诊断比值比. A: $\geq$ F2组; B: F4组.

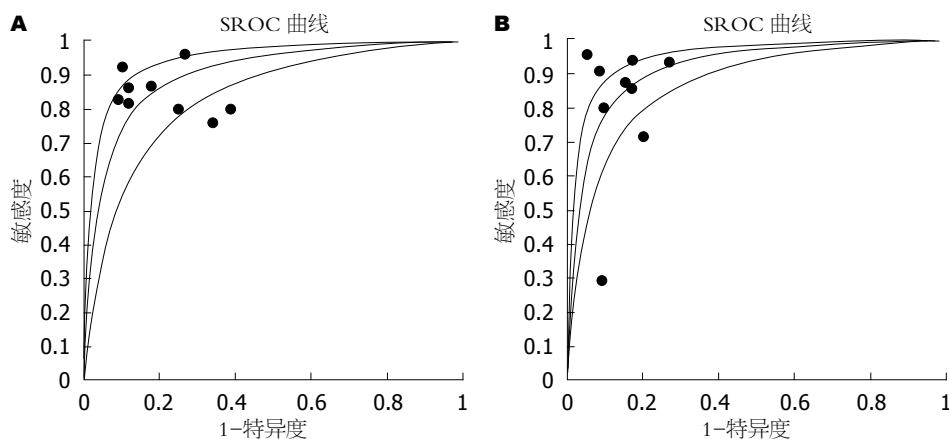


图 3 不同组别SROC曲线. A: $\geq$ F2组; B: F4组.

要原因可能为研究对象的肝纤维化原因不同, 包括有病毒性肝炎, 脂肪肝, 铁超载等; 也可能与操作者本身的经验有关不同. 对于不同病因, 对比本研究纳入所有文献, Ochi^[13]报道的脂肪肝诊断价值高, 其对于F2和F4分组中曲线

下面积、灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值可以达到0.923、92.3%、89.8%、82.8%、95.7%和0.96、100%、95.3%、78.6%、100%, 测量指标方面, ROI与其他组织的比值得到的弹性指数诊断最为常见, 也可以

■同行评价

早期诊断肝硬化对临床指导治疗至关重要,各种无创模型和方法是目前研究的热点。本文通过搜集相关文献综合分析,应用综合受试者工作特性曲线曲线下面积分析得出RTE技术对肝纤维化分级具有较高诊断价值的结论,结论可靠,该方法值得在临床推广应用。

蓝色区域面积或其他均值为参照。而操作者的经验也可能影响灵敏度和特异度。因病因、测量指标、人群的差异,无法定义不同分期的诊断界值。

依据METAVIR分级标准, F2为明显纤维化的分界, 而F4为肝硬化的分界, Meta分析合并诊断F2和F4的AUC均在90%以上, 故对不同分期都有较高的诊断价值。所有纳入研究均以病理诊断结果为金标准, 由于在同一患者肝脏的不同部位取材, 可能会得出不同的病理诊断结果, 因此会造成病理结果的偏差, 故RTE的诊断价值也可能被低估。

与其他无创方法进行对比, 如基于Fibroscan弹性成像仪的瞬时弹性成像(transient elastography, TE)技术。RTE的优点是迅速, 无痛, 腹水不作为限制因素, 测量可视化控制, 局限性在于非定量技术; 而TE的范围局限, 且无法进行常规超声成像, 无法避开肝内大血管系统对测量的影响, 测量可能有15.8%的失败率^[15], 超重或肥胖的患者失败率会增加^[16]。Colombo等^[11]对RTE和TE进行的头对头研究表明, 两者与肝纤维化均有较高关联度但对于坏死炎症则无明显相关。RTE诊断的AUC值略低于TE, 如对于严重肝纤维化, 前者为85.3%, 而后者为90%, 但因肥胖等原因, TE对11个患者操作失败, 而RTE全部成功。RTE检查也有其局限性, 如高度肥胖、严重肝萎缩和肋间隙狭窄等患者肝脏的产生外加震动时, 技术上有一定限制影响其诊断准确率。另外弹性成像评分标准只能定性诊断肝纤维化, 而不能进行定量判断, 主观因素的影响可能会造成误差。

总之, Meta分析结果表明, RTE对于评估肝脏明显纤维化和早期肝硬化具有较高诊断价值。在实际应用中, 需要对不同人群采取相应的诊断值。

4 参考文献

- Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344: 495-500 [PMID: 11172192 DOI: 10.1056/NEJM200102153440706]
- Kallel F, Ophir J. Limits on the contrast of strain concentrations in elastography. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24: 1215-1219 [PMID: 9833591 DOI: 10.1016/S0301-5629(98)00106-9]
- 赵子卓, 罗葆明. 超声弹性成像基本原理及技术. 中国医疗器械信息 2008; 14: 6-8
- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*

- 1996; 24: 289-293 [PMID: 8690394 DOI: 10.1002/hep.510240201]
- Hu Q, Zhu SY, Kang LK, Wang XY, Lun HM, Xu CM. Non-invasive assessment of liver fibrosis using real-time tissue elastography in patients with chronic hepatitis B. *Clin Radiol* 2014; 69: 194-199 [PMID: 24290780 DOI: 10.1016/j.crad.2013.10.003]
- Koizumi Y, Hirooka M, Kisaka Y, Konishi I, Abe M, Murakami H, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: noninvasive diagnosis by means of real-time tissue elastography--establishment of the method for measurement. *Radiology* 2011; 258: 610-617 [PMID: 21273523 DOI: 10.1148/radiol.10100319]
- Paparo F, Cevasco L, Zefiro D, Biscaldi E, Bacigalupo L, Balocco M, Pongiglione M, Banderali S, Forni GL, Rollandi GA. Diagnostic value of real-time elastography in the assessment of hepatic fibrosis in patients with liver iron overload. *Eur J Radiol* 2013; 82: e755-e761 [PMID: 24050879 DOI: 10.1016/j.ejrad.2013.08.038]
- Wang J, Guo L, Shi X, Pan W, Bai Y, Ai H. Real-time elastography with a novel quantitative technology for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B. *Eur J Radiol* 2012; 81: e31-e36 [PMID: 21216123 DOI: 10.1016/j.ejrad.2010.12.013]
- Kanamoto M, Shimada M, Ikegami T, Uchiyama H, Imura S, Morine Y, Kanemura H, Arakawa Y, Nii A. Real time elastography for noninvasive diagnosis of liver fibrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 463-467 [PMID: 19322509 DOI: 10.1007/s00534-009-0075-9]
- Friedrich-Rust M, Ong MF, Herrmann E, Dries V, Samaras P, Zeuzem S, Sarrazin C. Real-time elastography for noninvasive assessment of liver fibrosis in chronic viral hepatitis. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: 758-764 [PMID: 17312065 DOI: 10.2214/AJR.06.0322]
- Colombo S, Buonocore M, Del Poggio A, Jomoletti C, Elia S, Mattiello M, Zabbialini D, Del Poggio P. Head-to-head comparison of transient elastography (TE), real-time tissue elastography (RTE), and acoustic radiation force impulse (ARFI) imaging in the diagnosis of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2012; 47: 461-469 [PMID: 22223175 DOI: 10.1007/s00535-011-0509-4]
- 陈曦, 解丽梅, 董颖慧, 广畅, 张晓雯. 实时超声弹性成像诊断慢性肝病肝纤维化. 中国医学影像技术 2012; 28: 129-132
- Ochi H, Hirooka M, Koizumi Y, Miyake T, Tokumoto Y, Soga Y, Tada F, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Real-time tissue elastography for evaluation of hepatic fibrosis and portal hypertension in nonalcoholic fatty liver diseases. *Hepatology* 2012; 56: 1271-1278 [PMID: 22488593 DOI: 10.1002/hep.25756]
- Morikawa H, Fukuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2011; 46: 350-358 [PMID: 20697747 DOI: 10.1007/s00535-010-0301-x]
- Castéra L, Foucher J, Bernard PH, Carvalho F, Alaix D, Merrouche W, Couzigou P, de Lédinghen V. Pitfalls of liver stiffness measurement: a 5-year

- prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology* 2010; 51: 828-835 [PMID: 20063276 DOI: 10.1002/hep.23425]
- 16 Myers RP, Pomier-Layrargues G, Kirsch R, Pollett A, Duarte-Rojo A, Wong D, Beaton M, Levstik M, Crotty P, Elkashab M. Feasibility and diagnostic performance of the FibroScan XL probe for liver stiffness measurement in overweight and obese patients. *Hepatology* 2012; 55: 199-208 [PMID: 21898479 DOI: 10.1002/hep.24624]

编辑 郭鹏 电编 都珍珍



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)

肝癌切除联合断流术治疗原发性肝癌合并门静脉高压症的疗效

杨科, 杨启

■背景资料

肝癌与门静脉高压症是临床中常见疾病之一, 具有较高发病率, 严重的影响患者的身体健康。临床中常常采取根治性切除手术治疗, 并且取得了较好的应用效果。临床有学者提出对原发性肝癌合并门静脉高压症患者实施肝癌切除与断流术联合治疗, 从而提高整体效果。本研究重点分析联合手术治疗的可行性与优势。

杨科, 杨启, 河南省南阳市中心医院肝脏普外科 河南省南阳市 473000

杨科, 副主任医师, 主要从事普外科的临床研究。

作者贡献分布: 本研究由杨科与杨启共同完成; 杨科撰写文章。

通讯作者: 杨科, 副主任医师, 473000, 河南省南阳市工农路312号, 河南省南阳市中心医院肝脏普外科。370550489@qq.com

收稿日期: 2014-03-26 修回日期: 2014-04-20

接受日期: 2014-04-28 在线出版日期: 2014-07-08

Hepatectomy combined with devascularization for treatment of primary hepatocellular carcinoma with portal hypertension

Ke Yang, Qi Yang

Ke Yang, Qi Yang, Department of Hepatic General Surgery, Nanyang Central Hospital of Liver, Nanyang 473000, Henan Province, China

Correspondence to: Ke Yang, Associate Chief Physician, Department of Hepatic General Surgery, Nanyang Central Hospital of Liver, 312 Gongnong Road, Nanyang 473000, Henan Province, China. 370550489@qq.com

Received: 2014-03-26 Revised: 2014-04-20

Accepted: 2014-04-28 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical efficacy of hepatectomy combined with devascularization in the treatment of primary liver cancer with portal hypertension.

METHODS: Fifty hepatocellular carcinoma patients with portal hypertension treated at our hospital between January 2011 and December 2013-12 were randomly divided into either a study group ($n = 30$) or a control group ($n = 20$). The control group underwent hepatectomy only, and the study group underwent hepatectomy combined with devascularization. Clinical results were compared between the two groups.

RESULTS: There were no significant differences between the treatment group and control group with regard to white blood cell (WBC) count and platelet (PLT) before treatment ($P > 0.05$). The

WBC and PLT were improved after treatment in both groups, and the improvement was better in the treatment group ($P < 0.05$). There were no significant differences between the treatment group and control group before treatment with regard to alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), total bilirubin (TB) and albumin ($P > 0.05$); all these parameters were improved after treatment in both groups, and there were no statistical significances in these parameters between the two groups after treatment ($P > 0.05$). The operative time and treatment costs were significantly higher in the treatment group than in the control group ($P < 0.05$), although there was no significant difference in hospitalization time ($P > 0.05$). The incidence of complications showed no significant difference between the two groups (16.7% vs 15.0%, $P > 0.05$).

CONCLUSION: Hepatectomy combined with devascularization is effective in the management of hepatocellular carcinoma patients with portal hypertension.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Primary liver cancer; Portal hypertension; Liver cancer resection; Revascularization; Clinical efficacy

Yang K, Yang Q. Hepatectomy combined with devascularization for treatment of primary hepatocellular carcinoma with portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2780-2783 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2780.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2780>

摘要

目的: 探讨肝癌切除联合断流术治疗原发性肝癌合并门静脉高压症的临床疗效。

方法: 收集2011-01/2013-12我院收治的原发性肝癌合并门静脉高压症患者50例, 其中, 采取单纯肝癌切除术治疗20例(对照组), 采取肝癌

■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

切除联合断流术治疗30例(观察组). 回顾性分析两组的临床治疗效果.

结果: 治疗前观察组和对照组的白细胞计数(white blood cell count, WBC)、血小板(blood platelet, PLT)比较无明显的差异($P>0.05$), 统计学无意义; 治疗后观察组和对照组的WBC、PLT较治疗前有明显的改善, 观察组改善程度优于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$). 治疗前观察组和对照组谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)和总胆红素(total bilirubin, TB)以及白蛋白(albumin, ALB)比较无明显的差异($P>0.05$), 统计学无意义; 治疗后观察组和对照组ALT、AST和TB以及ALB均较治疗前有明显的改善, 但是术后组间的数据比较差异无统计学意义($P>0.05$). 观察组手术时间和治疗费用均明显地高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 观察组和对照组住院时间比较无明显差异($P>0.05$). 观察组并发症发生率为16.7%; 对照组并发症发生率为15.0%. 两组术后并发症发生率比较无明显的差异($P>0.05$).

结论: 临床中原发性肝癌合并门静脉高压症患者采取肝癌切除联合断流术治疗效果显著, 有效地改善患者血常规指标, 值得临床中应用与推广.

© 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; 门静脉高压症; 肝癌切除术; 断流术; 临床疗效

核心提示: 原发性肝癌合并门静脉高压症患者, 术前肝功能为A级, 采取肝癌切除联合脾切除、贲门周围血管离断术, 能够同时处理肝肿瘤和门静脉高压症, 有效地改善患者血常规指标, 是治疗肝癌合并门静脉高压症的有效方法.

杨科, 杨启. 肝癌切除联合断流术治疗原发性肝癌合并门静脉高压症的疗效. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2780-2783
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2780.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2780>

0 引言

肝癌与门静脉高压症是临床中常见疾病之一, 在临床中具有较高的发病率, 严重的影响患者的身体健康. 临床治疗中也存在着较多的问题, 如何有效地提高该病的临床治疗效果是医师们关注的重点^[1-3]. 临床中常常采取根治性切除手术治疗, 并且取得了较好的应用效果. 随着医疗

水平的不断发展和对疾病的认识, 临床有学者提出对原发性肝癌合并门静脉高压症患者实施肝癌切除与断流术联合治疗, 能够更好的提高整体治疗效果^[4,5]. 因此, 本文重点分析原发性肝癌合并门静脉高压症患者实施肝癌切除与断流术联合治疗的可行性和疗效, 具体的分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2012-01/2013-12我院收治的原发性肝癌合并门静脉高压症患者50例为研究对象, 采取单纯肝癌切除术治疗的20例患者为对照组, 男性患者10例, 女性患者10例, 患者的年龄为20-50岁, 平均年龄为32.8岁 $\pm$ 2.5岁, 手术方法为对肝脏病变部位进行根治切除, 尽可能地保证切除距肿瘤边缘1.0-2.0 cm的位置^[6]. 观察组30例患者采取肝癌切除联合断流术治疗, 主要包括离断贲门周围血管和切除患者脾脏以及横断食道的下段^[7], 男性患者15例, 女性患者15例, 患者的年龄为19-49岁, 平均年龄为33.1岁 $\pm$ 2.2岁. 观察组和对照组的基本资料比较无明显的差异($P>0.05$), 具有可比性.

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: (1)胃镜检查其食道静脉重度曲张; (2)CT检查显示其脾脏大于7个肋单元; (3)胞苷三磷酸(cytidine triphosphate, CTP)评分在8分以下; (4)血常规显示其白细胞计数 $<3.0 \times 10^9/L$, 血小板计数 $<65.0 \times 10^9/L$; (5)肿瘤局限于肝脏一叶或者相邻的几个肝段内, 且能够进行局部的切除; (6)肝功能均为A级; (7)经过科研处批准与患者均知情同意.

1.2.2 排除标准: (1)不符合原发性肝癌合并门静脉高压症的临床诊断标准; (2)胃镜与CT检查未出现上述情况对象; (3)血常规检查其白细胞计数和血小板计数均不在纳入标准范围内对象; (4)不同意此次临床研究的对象.

1.2.3 观察指标: (1)手术前后血常规指标变化白细胞计数(white blood cell count, WBC)、血小板(blood platelet, PLT); (2)手术前后肝功能指标变化谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)和总胆红素(total bilirubin, TB)以及白蛋白(albumin, ALB); (3)手术时间; (4)住院时间; (5)治疗费用; (6)并发症.

统计学处理 采取SPSS19.0的统计学软件进行数据分析与处理, 计量资料采取mean $\pm$ SD进行表示, 独立样本采取 t 进行检验, 计数资料采取 χ^2 进行检验. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

■研究前沿

本研究重点分析原发性肝癌合并门静脉高压症患者实施肝癌切除联合断流术的可行性和临床疗效. 文章中主要是从血常规指标、肝功能指标以及住院时间和治疗费用、并发症等方面进行分析, 从而客观的阐述肝癌切除联合断流术治疗该病的效果.

■相关报道

临床中相关研究显示, 临床中对于腹水和肝性脑病以及肝功能恢复与应激性溃疡患者的治疗方面, 常常采取联合手术和单纯性切除肝脏病灶手术的效果并无明显的差异. 进一步说明肝癌切除联合断流术治疗的可行性. 该研究与本次的临床研究具有相同的结论, 但是本研究中更全面的阐述其效果.

■创新盘点

本次临床研究从血常规指标、肝功能指标的角度分析,客观的分析肝癌切除联合断流术治疗原发性肝癌合并门静脉高压症的临床疗效。传统的研究主要是从患者手术指标进行分析,而本研究主要是从客观指标进行分析,减少了人为因素的干扰,使得结果更加有说服力。

■应用要点

本研究从临床实际出发,采取的是前瞻性研究,从临床各个指标进行分析肝癌切除联合断流术治疗原发性肝癌合并门静脉高压症的可行性。同时,在临床治疗过程中进一步推广了肝癌切除联合断流术的优势和应用场合,提高其推广度。

表 1 观察组和对照组手术前后血常规指标变化比较 (mean $\pm$ SD, $10^9/L$)

分组	n	时间	白细胞	血小板
观察组	30	手术前	2.6 $\pm$ 1.3	44.7 $\pm$ 11.7
		手术后	10.7 $\pm$ 2.1 ^a	145.8 $\pm$ 41.6 ^a
对照组	20	手术前	2.7 $\pm$ 1.1	45.1 $\pm$ 10.9
		手术后	4.7 $\pm$ 1.5 ^{ac}	36.6 $\pm$ 14.2 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 手术前; ^c $P < 0.05$ vs 观察组。

表 2 观察组和对照组手术治疗前后肝功能指标比较 (mean $\pm$ SD)

分组	n	时间	ALT(U/L)	AST(U/L)	TB(μ mol/L)	ALB(g/L)
观察组	30	手术前	42.1 $\pm$ 10.7	52.1 $\pm$ 8.9	26.5 $\pm$ 4.6	40.4 $\pm$ 5.6
		手术后	142.5 $\pm$ 19.5 ^a	40.5 $\pm$ 7.9 ^a	28.5 $\pm$ 5.8 ^a	47.2 $\pm$ 8.6 ^a
对照组	20	手术前	43.5 $\pm$ 9.7	53.5 $\pm$ 8.6	25.9 $\pm$ 5.0	41.7 $\pm$ 4.8
		手术后	139.6 $\pm$ 20.6 ^a	39.5 $\pm$ 7.9 ^a	27.7 $\pm$ 5.9 ^a	46.3 $\pm$ 7.8 ^a

^a $P < 0.05$ vs 手术前。ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; TB: 总胆红素; ALB: 白蛋白。

表 3 观察组和对照组手术时间和住院时间以及治疗费用对比分析 (mean $\pm$ SD)

分组	n	手术时间(min)	住院时间(d)	治疗费用(万元)
观察组	30	177.4 $\pm$ 31.6	23.2 $\pm$ 8.9	4.3 $\pm$ 0.2
对照组	20	116.4 $\pm$ 25.8	24.4 $\pm$ 8.6	2.1 $\pm$ 0.1
t值	—	22.5135	0.1834	6.0251
P值	—	< 0.05	> 0.05	< 0.05

2 结果

2.1 两组手术前后血常规指标变化比较 治疗前后观察组和对照组的WBC、PLT比较无明显差异($P > 0.05$)。治疗后观察组和对照组的WBC、PLT较治疗前有明显的改善,观察组改善程度优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表1)。

2.2 两组患者术前后肝功能指标变化比较 治疗前观察组和对照组ALT、AST和TB以及ALB比较无明显差异($P > 0.05$)。治疗后观察组和对照组ALT、AST和TB以及ALB均较治疗前有明显的改善,但是术后组间的数据比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表2)。

2.3 两组手术时间和住院时间以及治疗费用比较 观察组手术时间和治疗费用均明显地高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。观察组和对照组住院时间比较无明显的差异($P > 0.05$)(表3)。

2.4 术后并发症观察 观察组1例肝性脑病,3例腹水,1例应激性溃疡,并发症发生率为16.7%。对照组1例肝性脑病,1例腹水,1例应激性溃疡,并

发症发生率为15.0%。两组术后并发症发生率比较无明显差异($\chi^2 = 0.31, P > 0.05$)。

3 讨论

原发性肝癌合并门静脉高压症是临床中常见疾病之一,其病情比较复杂,且治疗的过程中尚无确切的治疗方法^[8]。门静脉高压症患者由于食管胃底静脉曲张与慢性胃黏膜充血很容易发生上消化道出血的情况。而肝癌患者死亡的原因除了肿瘤因素之外,多数的患者死于肝功能衰竭与上消化道出血上。临床中常常采取肝癌切除联合脾切除或者脾动脉结扎方法进行治疗,旨在消除门脉高压对患者的影响。

通过本次的临床研究分析,临床中对于原发性肝癌合并门静脉高压症患者实施肝癌切除联合断流术治疗是可行的,能够有效的改善患者的临床症状,提高整体的效果。研究显示,临床中对于腹水和肝性脑病以及肝功能恢复与应激性溃疡患者的治疗方面,常常采取联合手术和

单纯性切除肝脏病灶手术的效果并无明显的差异^[9,10]。但是在手术的过程中,联合手术能够有效地消除患者脾脏功能的亢进,大大地降低消化系统出血的并发症,最大程度地提高手术治疗的安全性^[11-13]。本组的数据也显示,治疗后患者的ALT、AST和TB以及ALB均较治疗前均有一定程度的改善。进一步说明,这种联合手术治疗的优越性,更好的改善患者的肝肾功能。同时,数据还显示,治疗后观察组和对照组的WBC、PLT较治疗前有明显的改善,观察组改善程度优于对照组。由此分析,在血常规的改善方面,联合手术患者术后血功能指标改善效果明显的优于单纯切除术的效果^[14]。但是,在手术的操作过程中,联合手术会增加手术的时间和治疗费用^[15]。因此,临床中应引起重视。整个手术的操作过程中,应重视术后的并发症,及时的给予针对性的措施,从而快速的缓解症状,提高整体治疗效果。本次研究显示,联合手术治疗后1例肝性脑病,3例腹水,1例应激性溃疡,均经过针对性的治疗改善临床症状。

总之,原发性肝癌合并门静脉高压症患者,若术前肝功能为A级,采取肝癌切除联合脾切除、贲门周围血管离断术,能够同时处理肝肿瘤和门静脉高压症,有效地改善患者血常规指标,是治疗肝癌合并门静脉高压症的有效方法,值得临床中应用与推广。

4 参考文献

- 徐威,赵国刚,李敬东,石刚,田云鸿. 合并原发性肝细胞癌的門静脉高压症临床特征及生存分析. 中国普通外科杂志 2012; 21: 17-22
- 赵伟,李一凡,张毅,周丽英,冯文军. 肝癌切除联合断流术治疗原发性肝癌合并重度門静脉高压症临床分析. 中华肝胆外科杂志 2010; 16: 903-905
- 李公明,刘自立. 原发性肝癌合并門静脉高压症的围术期处理和联合手术治疗. 中国实用医刊 2011; 38: 13-17
- Nyilas A, Paszt A, Simonka Z, Abrahám S, Pál T, Lázár G. [Comparison of laparoscopic and open splenectomy]. *Magy Seb* 2013; 66: 14-20 [PMID: 23428723 DOI: 10.1556/MaSeb.66.2013.1.2]
- 姚关兵,周军,陈念平,陈明. 原发性肝癌合并門静脉高压、脾亢的外科治疗. 医学综述 2009; 15: 1514-1517
- 单成祥,杨宁,杨广顺. 联合手术治疗原发性肝癌伴严重門静脉高压症的手术安全性. 肝胆胰外科杂志 2009; 21: 260-262
- Chen P, Wang W, Yan L. Prophylactic anticoagulation following splenectomy in cirrhotic patients. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 2042-2044 [PMID: 22640915 DOI: 10.5754/hge12266]
- 黄新军,李向农. 原发性肝癌合并門静脉高压症的外科治疗. 中国现代医生 2011; 49: 158-160
- 徐国辉,周存才,周峰,何均,魏小勇,徐宗全. 肝癌切除联合全脾切除治疗原发性肝癌合并脾功能亢进的疗效分析. 中国医学创新 2013; 11: 29-31
- 陈建敏,蒋平. 高龄原发性肝癌患者肝癌切除术1例. 中国医疗前沿 2012; 7: 60-61
- 朱志军,王凯,张雅敏,高伟,蒋文涛,淮明生,郑虹,邓永林,潘澄,沈中阳. 肝硬化門静脉高压症患者肝移植术后門静脉血流动力学变化的临床研究. 中华普通外科杂志 2007; 22: 254-257
- 何立,王玉文. 肝硬化門静脉高压症断流术和分、断流联合术的疗效比较. 中国当代医药 2012; 19: 190-191
- Hamlat CA, Arbabi S, Koepsell TD, Maier RV, Jurkovich GJ, Rivara FP. National variation in outcomes and costs for splenic injury and the impact of trauma systems: a population-based cohort study. *Ann Surg* 2012; 255: 165-170 [PMID: 22156925 DOI: 10.1097/SLA.0b013e31823840ca]
- 金洪永,姜洪伟,姜天明,赵德新,于磊,齐德祥. 脾切除联合贲门周围血管离断术与分流术治疗門脉高压症的疗效分析. 中国老年学杂志 2008; 28: 1402-1403
- 申权,薛涣洲,姜青峰,王亚东,张宏伟. 原发性肝癌并門静脉高压症的外科治疗. 实用诊断与治疗杂志 2007; 21: 895-898

■同行评价

本文可行性强,具有一定指导意义。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



肝移植术后早期肠内营养不同途径的对比

李晖, 郑丹, 熊会玲, 吴杰

■背景资料

近年来肝移植已成为肝硬化、肝癌等终末期肝病的有效治疗手段。多数学者认为, 当肠内营养失败或胃肠道消化吸收功能丧失时选用肠外营养, 肝移植术后患者胃肠道尚有消化吸收功能, 且不需要肠道完全休息, 应首选肠内营养。

李晖, 郑丹, 熊会玲, 吴杰, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014

李晖, 主治医师, 主要从事肝脏肿瘤的研究。

作者贡献分布: 李晖负责课题的设计及论文写作; 研究过程与数据分析由郑丹与熊会玲完成; 试剂由吴杰提供。

通讯作者: 李晖, 主治医师, 430014, 武汉市江岸区胜利街26号, 武汉市中心医院消化内科。royli1977@126.com

电话: 027-82211449

收稿日期: 2014-02-25 修回日期: 2014-04-17

接受日期: 2014-04-24 在线出版日期: 2014-07-08

Clinical effects of early enteral nutrition *via* a nasogastric tube vs a gastric-jejunal tube in patients after liver transplantation

Hui Li, Dan Zheng, Hui-Ling Xiong, Jie Wu

Hui Li, Dan Zheng, Hui-Ling Xiong, Jie Wu, Department of Gastroenterology, Wuhan City Central Hospital, Wuhan 430014, Hubei Province, China

Correspondence to: Hui Li, Attending Physician, Wuhan City Central Hospital, 26 Shengli Street, Jiang'an District, Wuhan 430014, Hubei Province, China. royli1977@126.com

Received: 2014-02-25 Revised: 2014-04-17

Accepted: 2014-04-24 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To compare the clinical effects of different ways of early enteral nutrition in patients after liver transplantation.

METHODS: Ninety-eight patients who underwent liver transplantation were selected, and 4 cases were excluded because of postoperative deaths within one week. The remaining patients were divided into two groups according to the way of enteral nutrition: nasogastric tube group ($n = 44$) and gastric-jejunal tube group ($n = 50$). The nasogastric tube group adopted a nasogastric tube, and the gastric-jejunal tube group underwent percutaneous endoscopic gastrostomy/jejunostomy for enteral nutrition. The start time of enteral nutrition, indwelling time, complications caused by feeding tube and liver transplantation, and the average hospitalization time were recorded and compared.

RESULTS: Compared with the nasogastric tube group, the start time of enteral nutrition in the gastric-jejunal tube group ($25.7 \text{ d} \pm 5.2 \text{ d}$ vs $97.3 \text{ d} \pm 9.6 \text{ d}$) was significantly earlier and the indwelling time was significantly longer ($P < 0.01$). The incidence of gastroesophageal reflux and gastric retention in the gastric-jejunal tube group was significantly lower than that in the nasogastric tube group (10.00% vs 27.27% , 14.00% vs 34.09% , $P < 0.05$). When the preoperative Meld score was greater than 15, the average hospitalization time was significantly shorter in the gastric-jejunal tube group than in the nasogastric tube group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The effects of enteral nutrition *via* a gastric-jejunal tube are significantly better than those *via* a nasogastric tube in patients after liver transplantation.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Liver transplantation; Enteral nutrition; Nasogastric tube; Percutaneous endoscopic gastrostomy/jejunostomy

Li H, Zheng D, Xiong HL, Wu J. Clinical effects of early enteral nutrition *via* a nasogastric tube vs a gastric-jejunal tube in patients after liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2784-2788 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2784.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2784>

摘要

目的: 比较肝移植术后不同途径进行早期肠内营养的临床效果。

方法: 选取本院肝移植患者98例, 排除术后1 wk内死亡的患者4例, 根据肠内营养方式的不同分为鼻胃管组鼻胃管组($n = 44$)和胃空肠管组($n = 50$)。鼻胃管组术后采用鼻胃管肠内营养, 胃空肠管组采用术后经皮经胃空肠置管肠内营养。分别记录两组患者的营养管开始使用时间、留置时间, 放置营养管致并发症情况, 肝移植相关并发症及平均住院时间。

■同行评议者

徐洪, 副主任医师, 上海复旦大学附属中山医院

结果:胃空肠管组营养管开始使用时间明显早于鼻胃管组, 且留置时间($97.3 \text{ d} \pm 9.6 \text{ d}$)明显长于鼻胃管组($25.7 \text{ d} \pm 5.2 \text{ d}$), 差异有统计学意义($P < 0.01$), 而且胃食管返流及胃潴留并发症发生率(胃食管返流: 10.00%; 胃潴留: 14.00%)明显低于鼻胃管组(胃食管返流: 27.27%; 胃潴留: 34.09%), 差异有统计学意义($P < 0.05$). 另外, 当患者术前Meld评分 >15 分时, 胃空肠管组平均住院时间($31.8 \text{ d} \pm 6.3 \text{ d}$)明显短于鼻胃管组($36.7 \text{ d} \pm 5.5 \text{ d}$), 差异有统计学意义($P < 0.01$).

结论:肝移植术后采用经皮经胃空肠管肠内营养方式效果明显优于鼻胃管方式, 值得在临床治疗中推广.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝移植; 肠内营养; 鼻胃置管; 经皮经胃空肠置管

核心提示: 本研究对肝移植术后鼻胃置管和经皮经胃空肠管两种肠内营养方式进行比较, 发现鼻胃管组营养管开始使用时间明显长于胃空肠管组, 这说明经皮经胃空肠管可以更早为患者提供营养支持.

李晖, 郑丹, 熊会玲, 吴杰. 肝移植术后早期肠内营养不同途径的对比. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2784–2788 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2784.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2784>

0 引言

肝移植患者术前肝功能不全, 多种营养物质代谢失调, 术后肝脏受再灌注损伤, 消化系出现肿胀及黏膜屏障受损, 因此肝移植术后患者常伴有严重的营养不良及代谢异常, 容易出现移植后并发症^[1-3]. 有研究表明, 术后及早进行肠内营养对患者的恢复及预后有重要的影响^[4,5]. 目前肠内营养的方式包括鼻胃置管、空肠造口置管及经皮经胃空肠置管^[6]. 本研究比较鼻胃置管和经皮经胃空肠置管2种肠内营养方式, 分析其临床效果, 为肝移植术后营养支持治疗提供依据. 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2009-02/2013-02于本院行肝移植手术的患者98例, 排除术后1 wk内死亡的病例4例. 根据所选肠内营养方式的不同分为鼻胃管组($n = 44$)和胃空肠管组($n = 50$). 鼻胃管组术后



图1 经鼻插胃管示意图.

采用鼻胃管方式进行早期肠内营养, 胃空肠管组采用术后经皮经胃空肠置管方式进行早期肠内营养. 两组患者的术前一般资料(年龄、性别、术前Meld评分、术前Child Pugh分级及基础疾病)经统计学分析, 差异无统计学意义(表1), 具有可比性.

1.2 方法

1.2.1 置管: 鼻胃管组患者于术前1 h行常规经鼻插胃管(图1). 胃空肠管组患者行经皮经胃空肠置管, 术前不插胃管, 术中胆道重建后放置营养管, 经十二指肠到达空肠上端, 末端经左侧腹壁开孔穿出并以皮肤固定线固定(图2).

1.2.2 肠内营养: 使用专用输入泵持续匀速输入百普力肠内营养液, 电子加温器控制输入温度在 40°C 左右. 第1天输入速度维持 5 mL/h , 之后根据患者反应情况逐渐加量, 1 wk后可适当添加米汤、牛奶等流质食物.

1.2.3 观察指标: 两组患者术后营养管开始使用时间、留置时间, 放置营养管致并发症情况, 肝移植相关并发症及平均住院时间.

统计学处理 用SPSS17.0软件包进行统计学处理. 计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 的形式表示, 两组间比较应用 t 检验, 计数资料比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 患者术后营养管开始使用时间及留置时间 由表2比较发现两组患者术后鼻胃管组营养管开始使用时间明显晚于胃空肠管组, 且留置时间明显短于胃空肠管组, 差异有统计学意义($P < 0.01$).

2.2 术后营养管放置后并发症发生率 两组患者术后营养管放置后并发症情况结果如表3. 由表中数据可以发现鼻胃管组胃食管返流及胃潴留并发症发生率明显高于胃空肠管组, 差异有统

■ 研发前沿

现如今临床上应用最多的肠内营养方式是鼻胃置管, 具有操作简单、营养液要求低, 缺点包括返流、误吸及胃潴留等发生率较高, 且患者对置管不易耐受, 同时也不利于咳嗽排痰.

■相关报道

有研究表明,术后及早进行肠内营养对患者的恢复及预后有重要的影响。目前肠内营养的方式包括鼻胃置管、空肠造口置管及经皮经胃空肠置管。

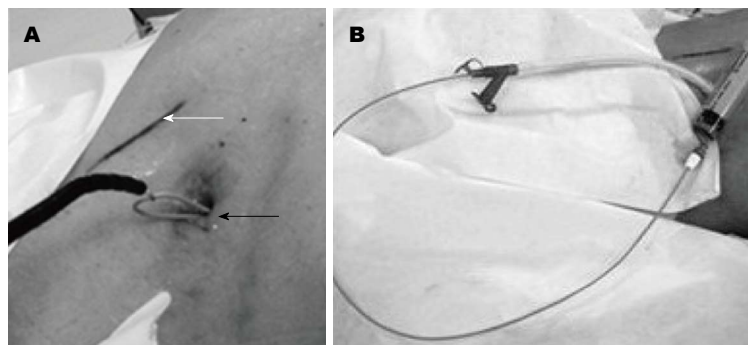


图2 经皮经胃空肠置管示意图。A: 放置营养管,经十二指肠到达空肠上端,末端经左侧腹壁开孔穿出并以皮肤固定线固定。白箭头示肝移植切口,黑箭头示营养管入口;B: 置管后外接注射器输送肠内营养液。

表1 两组患者术前一般资料比较 (n)

分组	n	年龄(岁)	性别		Meld评分		Child-Pugh分级			基础疾病	
			男	女	<15分	>15分	A	B	C	良性	恶性
鼻胃管组	44	42.6 ± 14.7	34	10	11	33	5	14	25	33	11
胃空肠管组	50	43.1 ± 15.3	38	12	15	35	9	18	23	34	16
t/χ^2		0.161		0.021		0.292		1.349			0.560
P值		0.872		0.884		0.589		0.509			0.454

表2 两组患者术后营养管开始使用时间及留置时间比较 (mean ± SD, d)

分组	n	营养管开始使用时间	营养管留置时间
鼻胃管组	44	2.44 ± 0.31	25.7 ± 5.2
胃空肠管组	50	0.73 ± 0.28	97.3 ± 9.6
t值		34.020	44.090
P值		0.000	0.000

计学意义($P < 0.05$)。两组腹泻及管道堵塞并发症发生率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 术后肝移植相关并发症发病率 两组患者术后肝移植相关并发症比较结果如表4。经比较发现两组患者四种术后肝移植相关并发症发生率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 不同术前Meld评分平均住院时间 两组患者当术前Meld评分<15分时,患者平均住院时间差异无统计学意义($22.6 \pm 3.9 \text{ d}$ vs $21.9 \pm 4.2 \text{ d}$, $t = 0.834$, $P = 0.407$),而当Meld评分>15分时,鼻胃管组明显高于胃空肠管组,差异有明显统计学意义($36.7 \pm 5.5 \text{ d}$ vs $31.8 \pm 6.3 \text{ d}$, $t = 3.984$, $P = 0.000$)。

3 讨论

近年来肝移植已成为肝硬化、肝癌等终末期肝病的有效治疗手段^[7]。多数学者认为,当肠内营养失败或胃肠道消化吸收功能丧失时选用肠外

营养,肝移植术后患者胃肠道尚有消化吸收功能,且不需要肠道完全休息,应首选肠内营养^[8-10]。肝移植术后早期进行肠内营养可有效的保护胃肠道功能,明显促进患者预后情况^[11]。

现如今临床上应用最多的肠内营养方式是鼻胃置管,具有操作简单、营养液要求低,缺点包括返流、误吸及胃潴留等发生率较高,且患者对置管不易耐受,同时也不利于咳嗽排痰^[12,13]。另一种肠内营养方式是空肠造口置管,该方法优点在于可长时间放置营养管,不经过鼻咽部,不会出现患者对置管不耐受的情况,同时可以选择更粗的营养管,避免出现堵塞^[14,15]。其营养管固定在腹壁皮肤上,有效防止了肝移植术后出现肝性脑病等精神症状时自己将鼻胃管拔出^[16,17]。然而,肝移植后空肠造口置管容易浸泡于术后产生的大量腹水中,造成肠痿或腹腔感染^[18-20]。本研究中胃空肠管组采用的肠内营养方式为经皮经胃空肠管,有效避免了空肠造口置管时导管隧道位置偏低,浸泡于肝移植形成的大量腹水中。

本研究对肝移植术后鼻胃置管和经皮经胃空肠管两种肠内营养方式进行比较,发现鼻胃管组营养管开始使用时间明显长于胃空肠管组,这说明经皮经胃空肠管可以更早为患者提供营养支持。其原因在于肝移植手术中无肝期时胃肠道淤血,对胃肠道会造成一定程度的损伤,使胃肠道肿胀及黏膜屏障破坏,胃蠕动能力降低,

表 3 两组患者术后营养管放置后并发症发生率的比较 $n(\%)$

分组	n	胃食管返流	胃潴留	腹泻	管道堵塞
鼻胃管组	44	12(27.27)	15(34.09)	9(20.45)	5(11.36)
胃空肠管组	50	5(10.00)	7(14.00)	16(32.00)	5(10.00)
χ^2 值		4.713	5.270	1.598	0.046
P 值		0.030	0.022	0.206	0.831

■同行评价

本研究选题较好,方法合理,结果可靠,有一定的学术价值。

表 4 两组患者术后肝移植相关并发症发病率比较 $n(\%)$

分组	n	肺部感染	腹腔感染	急性肾功能不全	急性排斥反应
鼻胃管组	44	17(38.64)	5(11.36)	10(22.73)	6(13.64)
胃空肠管组	50	15(30.00)	5(10.00)	8(16.00)	8(16.00)
χ^2 值		0.777	0.046	0.684	0.103
P 值		0.378	0.831	0.408	0.748

而经皮经胃空肠管头端位置相对较低,可以直接将营养液送达空肠上端^[21-23],因而经皮经胃空肠管可以提前为患者提供营养支持。

两组营养管留置时间比较发现,经皮经胃空肠管留置时间明显长于鼻胃置管。由此说明经皮经胃空肠管可为患者提供更长久的营养支持。留置时间更长可能是由于经皮经胃空肠管不经过鼻咽部,不存在患者对营养管不耐受的情况,可长期为患者提供营养支持。

两组患者术后营养管放置并发症和肝移植相关并发症发病率经统计学分析发现鼻胃置管胃食管返流和胃潴留发病率高于经皮经胃空肠管,差异有统计学意义。而两组间腹泻、管道堵塞及肝移植相关并发症发病率经比较差异无统计学意义。这说明经皮经胃空肠管可有效降低肝移植术后因置管所致的食管返流和胃潴留并发症的发病率。究其原因可能与营养管使用时间相关,经皮经胃空肠管可在术后第1天内就给予营养支持^[24-27],这可有效促进胃肠道功能的恢复,降低食管返流和胃潴留的发生率。

比较两组患者平均住院时间发现当术前Meld评分<15分时,两种肠内营养方式的平均住院时间差异无统计学意义,当术前Meld评分>15分时,应用经皮经胃空肠管患者平均住院时间明显短于鼻胃置管患者。上述结果表明当术前Meld评分>15分时,经皮经胃空肠管肠内营养方式有助于患者术后机体功能的恢复。因为该方式可减少患者不适,降低胃食管返流及胃潴留发生率^[28-30],更早、更好的起到肠内营养支持的作用。

总之,经皮经胃空肠管肠内营养方式,可以更早的给肝移植患者提供营养支持,且胃食管返流和胃潴留并发症发病率低,当Meld评分>15分时可明显缩短住院时间,促进患者的预后,值得在临床工作中推广。

4 参考文献

- 赵虹. 肝移植术后肠内营养支持及护理进展. 护理实践与研究 2013; 10: 112-113
- 施晓雷, 任昊楠, 吴亚夫, 江春平, 张炜炜, 丁义涛. 肠外联合肠内营养支持在肝功能衰竭病人肝移植术后的应用. 肠外与肠内营养 2013; 20: 324-327
- 史艳敏, 王淼, 曲红岩, 朱雪娟, 井永敏. 肠内、外营养对肝移植术后患者营养支持治疗效果分析. 河北医药 2013; 35: 1467-1468
- 刘诚, 龙桃清, 邓红焰, 阳平华. 手术后早期肠内营养临床价值分析. 中外医疗 2012; 31: 46-46
- 黄静, 武杰. 不同时期肠内营养对消化系统恶性肿瘤术后并发症的影响. 中国现代普通外科进展 2012; 15: 418-420
- 黄海波. 胃肠手术后早期肠内营养支持对患者康复影响分析. 中国医药指南 2012; 10: 211-212
- 王新颖, 牛程麟, 章黎, 金丽, 李宁, 曹伟新, 秦环龙, 杨勇, 童本德, 黎介寿. 肠内营养对肝功能障碍患者腹部手术后肝功能及炎性反应的改善. 中华胃肠外科杂志 2011; 14: 336-339
- 陈长蓉, 张琪韵, 陈先锋, 甘立学. 肝部分切除病人口服肠内营养乳剂的临床效果观察. 护理研究 2013; 27: 3660-3662
- 汤素平, 胡自梅. 早期肠内营养在肝部分切除术后患者中的应用. 现代临床护理 2011; 10: 51-53
- 史长城, 申红, 林东海, 周永刚. 肝移植术后患者早期肠内营养对比肠外营养治疗的疗效的Meta分析. 中国药房 2013; 24: 3405-3408
- 黄伟, 王毅, 谷斌斌. 肝移植术后的营养支持治疗. 上海预防医学 2013; 25: 269-271
- 吴健雄, 王黎明, 荣维淇, 吴凡, 安松林, 冯莉, 刘发强, 毕超. 肝癌合并肝硬化患者术后不同剂型肠内营养的临床效果. 中华临床营养杂志 2013; 21: 345-350
- 卢瑞利, 曹金光, 罗建平, 赵建波, 李亚岭, 殷景远. 肠内营养在肝硬化治疗中的临床研究进展. 临床荟萃

- 2011; 26: 1273-1275
- 14 史长城, 周永刚. 肝移植术后早期肠内营养的临床疗效观察. 中国普通外科杂志 2014; 23: 91-94
- 15 罗文峰, 时军, 周凯, 丁利民, 徐志丹, 王永刚, 李新长, 龙成美, 罗来邦. 肝移植后早期营养支持的评估. 中国组织工程研究与临床康复 2011; 15: 800-805
- 16 余忠山, 江艺, 蔡秋程, 杨芳, 吕立志. 肝移植后的并发症. 中国组织工程研究 2013; 17: 3275-3282
- 17 黄加干, 鲍鹤玫, 褚静茹. 肝移植术后早期空肠造口置管和鼻胃管肠内营养效果的比较. 解放军护理杂志 2012; 29: 38-40
- 18 吕少诚, 史宪杰, 梁雨荣, 顾万清, 何蕾, 纪文斌, 罗英, 徐明月. 肝移植术后的早期肠内营养支持治疗: 附86例报告. 中华肝胆外科杂志 2012; 18: 692-695
- 19 司丕成, 张若曦, 李立涛, 徐建国. 肝外伤术后肠内营养对肝功能的影响. 中华普外科手术学杂志(电子版) 2012; 6: 190-195
- 20 王栩, 阎成美, 谢海英, 赵婷鹭, 江艺. 肝移植受者术后早期肠内营养不同途径的效果比较. 中华现代护理杂志 2011; 17: 2001-2004
- 21 郭志辉, 孔宪炳. 肠内营养在肝胆胰疾病中的应用. 中外健康文摘 2012; 9: 415-416
- 22 叶国强. 早期肠内营养在胃手术后的应用. 中外医学研究 2012; 9: 9-10
- 23 黄升. 早期肠内营养对肝胆外科术后患者胃肠功能恢复的临床研究. 中国民族民间医药杂志 2011; 20: 104-105
- 24 王兵辉. 肝移植患者术后早期肠内营养的应用. 器官移植 2013; 4: 228-229
- 25 Binhas M, Amathieu R, Campillo B, Roudot-Thoraval F, Azoulay D, Plaud B, Dhonneur G, Paugam-Burtz C. [French survey on perioperative nutrition in cirrhotic adult patients waiting for liver transplantation]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2013; 32: 302-306 [PMID: 23562420 DOI: 10.1016/j.annfar.2013.02.017]
- 26 Fukushima K, Ueno Y, Kawagishi N, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Ninomiya M, Wakui Y, Saito N, Satomi S, Shimosegawa T. The nutritional index 'CONUT' is useful for predicting long-term prognosis of patients with end-stage liver diseases. *Tohoku J Exp Med* 2011; 224: 215-219 [PMID: 21701127 DOI: 10.1620/tjem.224.215]
- 27 陈东. 肠内营养支持治疗疗效观察. 黑龙江医药 2012; 25: 312-313
- 28 马云飞, 陈忠勇. 肠内营养支持途径与并发症. 实用医学杂志 2013; 29: 2400-2402
- 29 Kaido T, Ogawa K, Fujimoto Y, Ogura Y, Hata K, Ito T, Tomiyama K, Yagi S, Mori A, Uemoto S. Impact of sarcopenia on survival in patients undergoing living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2013; 13: 1549-1556 [PMID: 23601159 DOI: 10.1111/ajt.12221]
- 30 Safer U, Tasci I, Binay Safer V, Doruk H. Comment on "Impact of sarcopenia on survival in patients undergoing living donor liver transplantation". *Am J Transplant* 2013; 13: 2505 [PMID: 23915024 DOI: 10.1111/ajt.12375]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



新生儿胃肠外营养相关性胆汁淤积的发生及危险因素评估

云翔, 罗彬, 漆光紫, 唐清, 单庆文, 陈秀奇, 陈玉君, 王琳琳

云翔, 唐清, 单庆文, 陈秀奇, 陈玉君, 王琳琳, 广西医科大学一附院儿科 广西壮族自治区南宁市 530021

罗彬, 广西医科大学基础医学院 广西壮族自治区南宁市 530021

漆光紫, 广西医科大学公共卫生学院 广西壮族自治区南宁市 530021

云翔, 主治医师, 主要从事小儿消化病学的临床研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81360374

作者贡献分布: 课题由云翔与王琳琳设计; 资料收集由云翔、唐清、单庆文、陈秀奇及陈玉君完成; 统计分析由云翔、罗彬、漆光紫及王琳琳完成; 本论文写作由云翔与王琳琳完成.

通讯作者: 王琳琳, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学一附院儿科. wll276@163.com

电话: 0771-5356505

收稿日期: 2014-02-08 修回日期: 2014-03-13

接受日期: 2014-03-18 在线出版日期: 2014-07-08

Incidence of and risk factors for parenteral nutrition associated cholestasis in neonates

Xiang Yun, Bin Luo, Guang-Zi Qi, Qing Tang, Qing-Wen Shan, Xiu-Qi Chen, Yu-Jun Chen, Lin-Lin Wang

Xiang Yun, Qing Tang, Qing-Wen Shan, Xiu-Qi Chen, Yu-Jun Chen, Lin-Lin Wang, Department of Paediatrics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Bin Luo, Pre-clinical School, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Guang-Zi Qi, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81360374

Correspondence to: Lin-Lin Wang, Professor, Department of Paediatrics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. wll276@163.com

Received: 2014-02-08 Revised: 2014-03-13

Accepted: 2014-03-18 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To investigate the incidence of and risk factors for parenteral nutrition associated cholestasis (PNAC) in neonates.

METHODS: A retrospective review of 97 neonates who had received parenteral nutrition (PN) for more than 14 d was performed. The

incidence of PNAC and the possible relationship among birth weight, gestational age, duration of PN and PNAC frequency were analyzed. Subjects were divided into either a PNAC group or a non-PNAC group. Statistical analysis was done to compare several parameters relevant to PNAC between the two groups. The risk factors for PNAC were also assessed.

RESULTS: The incidence of PNAC was 18.6% (18/97). The neonates with lower birth weight or longer duration of PN had a higher incidence of PNAC. There were significant differences between the PNAC group and non-PNAC group with respect to birth weight ($1.53 \text{ kg} \pm 0.41 \text{ kg}$ vs $1.79 \text{ kg} \pm 0.55 \text{ kg}$, $P < 0.05$), duration of PN ($32.28 \text{ d} \pm 16.31 \text{ d}$ vs $22.78 \text{ d} \pm 7.60 \text{ d}$, $P < 0.05$), duration of total parenteral nutrition [7 (3.75-9.75) vs 3 (0-7), $P < 0.01$], cumulative amount of amino acids ($67.82 \text{ g/kg} \pm 48.35 \text{ g/kg}$ vs $48.58 \text{ g/kg} \pm 22.17 \text{ g/kg}$, $P < 0.05$), duration of amino acid intake ($32.28 \text{ d} \pm 16.31 \text{ d}$ vs $22.61 \text{ d} \pm 7.57 \text{ d}$, $P < 0.05$), duration of lipid emulsion intake ($28.17 \text{ d} \pm 10.61 \text{ d}$ vs $21.38 \text{ d} \pm 7.42 \text{ d}$, $P < 0.01$), and infection (83.33% vs 34.18%, $P < 0.01$). Logistic regression analysis revealed that infection (OR = 6.818, 95%CI: 1.599-29.07, $P < 0.01$) and duration of amino acid intake (OR = 1.228, 95%CI: 1.057-1.426, $P < 0.01$) were independent risk factors for PNAC.

CONCLUSION: PNAC may be associated with birth weight, duration of PN and TPN, cumulative amount of amino acids, duration of amino acid and lipid emulsion intake, and infection. Infection and duration of amino acid intake are independent risk factors for PNAC.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Parenteral nutrition; Parenteral nutrition associated cholestasis; Risk factors

Yun X, Luo B, Qi GZ, Tang Q, Shan QW, Chen XQ, Chen YJ, Wang LL. Incidence of and risk factors for parenteral nutrition associated cholestasis in neonates. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2789-2794 URL: <http://www.wjgnet.com>

■背景资料

胃肠外营养应用于临床以来, 对于改善不能耐受肠内营养的新生儿生存质量有显著疗效, 是新生儿营养支持治疗不可或缺的一项重要措施, 与之相关的并发症也日益引起了人们的关注.

■同行评议者

薛东波, 教授, 哈尔滨医科大学附属第一医院

■ 研发前沿

胃肠外营养相关性胆汁淤积(parenteral nutrition associated cholestasis, PNAC)是新生儿胃肠外营养最常见的并发症之一,部分严重PNAC的新生儿会发展成为肝功能衰竭而导致死亡。现阶段,影响PNAC的发病原因及机制尚不清楚,仍有待探讨。

www.wjgnet.com/1009-3079/22/2789.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2789

摘要

目的: 研究新生儿胃肠外营养相关性胆汁淤积(parenteral nutrition associated cholestasis, PNAC)的发生及相关危险因素,为临床上PNAC的预防和诊疗奠定基础。

方法: 对接受胃肠外营养(parenteral nutrition, PN)超过14 d的97例新生儿进行回顾分析,研究PNAC的发病率及与出生胎龄、出生体质量和PN持续时间等指标的关系;按是否发生PNAC进行分组,统计比较PNAC组和非PNAC组间各相关影响因素有无差异并寻找危险因素。

结果: PNAC发病率为18.56%(18/97);新生儿出生体质量越低、PN持续时间越长,其PNAC发病率越高。PNAC组与非PNAC组相比,出生体质量($1.53 \text{ kg} \pm 0.41 \text{ kg}$ vs $1.79 \text{ kg} \pm 0.55 \text{ kg}$, $P < 0.05$)、PN持续时间($32.28 \text{ d} \pm 16.31 \text{ d}$ vs $22.78 \text{ d} \pm 7.60 \text{ d}$, $P < 0.05$)、完全肠外营养持续时间[$7(3.75-9.75)$ vs $3(0-7)$, $P < 0.01$]、氨基酸累积用量($67.82 \text{ g/kg} \pm 48.35 \text{ g/kg}$ vs $48.58 \text{ g/kg} \pm 22.17 \text{ g/kg}$, $P < 0.05$)、氨基酸使用时间($32.28 \text{ d} \pm 16.31 \text{ d}$ vs $22.61 \text{ d} \pm 7.57 \text{ d}$, $P < 0.05$)、脂肪乳使用时间($28.17 \text{ d} \pm 10.61 \text{ d}$ vs $21.38 \text{ d} \pm 7.42 \text{ d}$, $P < 0.01$)、有否感染(83.33% vs 34.18% , $P < 0.01$)的差异具有统计学意义; Logistic回归分析显示感染($\text{OR} = 6.818$, $95\% \text{CI}: 1.599-29.07$, $P < 0.01$)和氨基酸使用时间($\text{OR} = 1.228$, $95\% \text{CI}: 1.057-1.426$, $P < 0.01$)是PNAC发生的独立危险因素。

结论: PNAC的发生可能与新生儿出生体质量、PN和完全胃肠外营养持续时间、氨基酸累积用量、氨基酸和脂肪乳使用时间、有否感染有关,其中感染和氨基酸使用时间可能是PNAC发生的独立危险因素。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃肠外营养; 胃肠外营养相关性胆汁淤积; 危险因素

核心提示: 本研究提示胃肠外营养相关性胆汁淤积(parenteral nutrition associated cholestasis, PNAC)的发生可能与新生儿出生体质量、胃肠外营养及完全胃肠外营养持续时间、氨基酸累积用量、氨基酸和脂肪乳使用时间、有否感染

有关,其中感染和氨基酸使用时间可能是PNAC发生的独立危险因素。

云翔, 罗彬, 漆光紫, 唐清, 单庆文, 陈秀奇, 陈玉君, 王琳琳. 新生儿胃肠外营养相关性胆汁淤积的发生及危险因素评估. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2789-2794 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2789.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2789

0 引言

新生儿由于出生时其胃肠消化系统尚未完全发育成熟,因此在抢救或治疗期间给予适当的营养物质支持是必要的。自胃肠外营养(parenteral nutrition, PN)应用于临床以来,对于改善不能耐受肠内营养的新生儿生存质量有显著效果,许多危重患儿的抢救成功率也得以提高。随着PN技术的广泛应用,由PN引发的并发症也日益受到人们的关注。胃肠外营养相关性胆汁淤积(parenteral nutrition associated cholestasis, PNAC)是新生儿PN最常见的并发症之一,部分严重PNAC的新生儿会发展成为肝功能衰竭而导致死亡^[1,2]。现阶段,PNAC的发病原因及机制尚不清楚,仍有待探讨。本研究对97例接受PN治疗超过14 d的新生儿进行回顾性调查,明确PNAC的发病率,探讨PNAC发生的相关影响因素并寻找危险因素,为临床上PNAC的预防和诊疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 选择广西医科大学第一附属医院儿科在2003-01/2008-02收治、接受PN开始时日龄 $< 28 \text{ d}$, PN持续时间超过14 d的97例新生儿作为研究对象,接受PN时间为14-75 d,平均 $24.32 \text{ d} \pm 10.35 \text{ d}$ 。其中包括男63例(64.95%),女34例(35.05%);正常出生体质量儿($\geq 2.5 \text{ kg}$)10例,低出生体质量儿($1.5-2.5 \text{ kg}$)51例,极低出生体质量儿($1-1.5 \text{ kg}$)35例,超低出生体质量儿($< 1 \text{ kg}$)1例,平均体质量 $1.74 \text{ kg} \pm 0.53 \text{ kg}$ 。其中早产儿($< 36 \text{ wk}$)87例,足月儿($\geq 36 \text{ wk}$)10例,平均胎龄 $32.62 \text{ wk} \pm 2.89 \text{ wk}$;原发病第1诊断:新生儿呼吸暂停15例,肺透明膜病15例,多器官功能衰竭10例,胃肠道出血10例,单纯早产儿9例,肺炎8例,坏死性小肠结肠炎7例,喂养困难6例,吸入性肺炎5例,缺血缺氧性脑病5例,新生儿窒息3例,新生儿败血症3例,先天性气管囊肿1例。

1.2 方法

1.2.1 PN方案: PN成分采用“全合一”配方,由3大营养物质(5%-50%葡萄糖注射液、小儿专用

表 1 97例新生儿PNAC发病率及与临床指标的关系

指标	<i>n</i>	PNAC(<i>n</i>)	PNAC发病率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别				0.143	0.705
男	63	11	21.15		
女	34	7	20.59		
出生胎龄(wk)				4.25	0.12
>36	10	0	0		
32-36	50	8	16.00		
<32	37	10	27.03		
出生体质量(kg)				6.50	0.04
>2.5	10	0	0		
1.5-2.5	51	7	13.73		
<1.5	36	11	30.56		
PN持续时间(wk)				9.54	0.008
<3	50	4	8		
3-4	23	5	21.74		
>4	24	9	37.50		

PNAC: 胃肠外营养相关性胆汁淤积; PN: 胃肠外营养.

氨基酸液溶液、20%脂肪乳剂)及电解质、维生素和微量元素组成,由微量输液泵持续20 h以上匀速输入.小儿液体的日需均量为120 mL/kg,根据日龄、使用开放式暖箱、光疗、高温环境、发热、呼吸窘迫、感染、腹泻或用脱水剂等情况酌情增减液体量.定期监测新生儿体质量、肝肾功能、血糖、血脂、电解质等指标,适时调整PN方案.

1.2.2 分组:根据PNAC的诊断标准将97例患儿分为PNAC组和非PNAC组. PNAC诊断标准: (1)PN持续14 d以上; (2)临床出现皮肤黄染、大便颜色变浅或白陶土样大便,且以上症状不能用原发病解释; (3)直接胆红素 $>26 \mu\text{mol/L}$,伴有直接胆红素与总胆红素的比值 $>50\%$; (4)排除其他明确原因导致的胆汁淤积^[1,2].

1.2.3 分析指标:性别、出生体质量、出生胎龄、入院日龄、PN开始时日龄、完全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)持续时间、部分胃肠外营养(partial parenteral nutrition, PPN)持续时间、PN持续时间及PPN/PN、PN液的组成(氨基酸累积用量、氨基酸使用时间及平均用量、脂肪乳累积用量、脂肪乳使用时间及平均用量、静脉热卡平均摄入量、葡萄糖平均浓度比、平均渗透压)、有否感染.

统计学处理 数据采用SPSS13.0软件包进行统计学处理. 正态分布计量资料用 t 检验, 偏态分布计量资料用秩和检验, 计数资料用 χ^2 检验, 相

关危险因素用单因素及多因素Logistic回归分析; 检验水准 $\alpha = 0.05$. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 PNAC发生情况 接受PN 14 d以上的97例新生儿中, PNAC发病率为18.56%. 我们对PNAC组18例患儿根据不同性别、出生胎龄、出生体质量及PN持续时间进一步细分, 分别统计不同组别PNAC发病率(表1), 结果表明新生儿出生体质量越低、PN持续时间越长, PNAC发病率越高, 其差异具有统计学意义($P < 0.05$).

2.2 PNAC组与非PNAC组临床资料比较 统计分析显示, PNAC组与非PNAC组两组间新生儿的出生体质量、PN及TPN持续时间、氨基酸累积用量、氨基酸及脂肪乳使用时间、有无感染的差异均有统计学意义($P < 0.05$), 其他指标尚未见明显差异(表2).

2.3 PNAC的危险因素分析 用非条件Logistic回归模型对表2中的临床指标进行逐个筛选, 其中8项具有统计学意义(表3). 进一步将这8项单因素自变量做多因素分析, 按检验标准 $\alpha = 0.05$, 提示感染和氨基酸使用时间是PNAC发生的独立危险因素(表4). 具体来看, 在控制了其他相关影响因素后, 新生儿若发生感染, 其PNAC发病率是无感染新生儿的6.818倍; 氨基酸使用时间越长, 每增加一个单位, 新生儿患PNAC的可能性是原来的1.228倍.

■ 相关报道

1971年, Peden等首次报道了1例接受胃肠外营养治疗的早产儿出现PNAC. 随后, 国内外PNAC的相关研究逐渐增多, 报道PNAC发病率为7.4%-84%, 存在较大差异.

■创新盘点

本研究按是否发生PNAC进行分组,探讨了PNAC组内新生儿出生胎龄、出生体质量和胃肠外营养持续时间等指标与PNAC发病率的关系;分析比较PNAC组和非PNAC组两组间的相关影响因素有无差异并寻找PNAC发生的危险因素。

表 2 PNAC组和非PNAC组患儿的临床资料比较分析结果

指标	PNAC组	非PNAC组	t/χ^2 值	P值
出生胎龄(wk)	31.72 ± 2.08	32.87 ± 3.04	1.524	0.131
出生体质量(kg)	1.53 ± 0.41	1.79 ± 0.55	1.987	0.023
PN开始时间(d)	3.17 ± 1.76	4.00 ± 3.05	1.112	0.269
PN持续时间(d)	32.28 ± 16.31	22.78 ± 7.60	2.411	0.026
PPN持续时间(d)	24.17 ± 13.51	18.66 ± 7.37	1.674	0.110
PPN/PN	0.74 ± 0.18	0.82 ± 0.18	1.700	0.090
TPN持续时间(d) ¹	7(3.75-9.75)	3(0-7)	2.877	0.004
氨基酸累积用量(g/kg)	67.82 ± 48.35	48.58 ± 22.17	2.569	0.012
氨基酸使用时间(d)	32.28 ± 16.31	22.61 ± 7.57	2.456	0.024
氨基酸平均用量[g/(kg·d)]	2.02 ± 0.59	2.10 ± 0.39	0.600	0.550
脂肪乳累积用量(g/kg)	55.68 ± 35.78	46.29 ± 19.38	1.078	0.294
脂肪乳使用时间(d)	28.17 ± 10.61	21.38 ± 7.42	3.214	0.002
脂肪乳平均用量[g/(kg·d)]	1.91 ± 0.60	2.13 ± 0.40	1.500	0.150
静脉热卡平均摄入量[kcal/(kg·d)]	70.75 ± 10.41	73.20 ± 11.99	0.801	0.425
葡萄糖平均浓度比(%)	9.89 ± 1.39	9.87 ± 1.39	0.057	0.955
平均渗透压(mOsm/L)	754.00 ± 87.67	754.88 ± 78.88	0.042	0.967
感染 ²	15(83.33)	27(34.18)	12.496	0.000

¹TPN持续时间为偏态分布计量资料,用中位数(四分位数间距)表示,采用秩和检验;²感染为计数资料,用 $n(\%)$ 表示,采用 χ^2 检验;其他指标为正态分布计量资料,用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,采用 t 检验。PNAC: 胃肠外营养相关性胆汁淤积; PN: 胃肠外营养; PPN: 部分胃肠外营养; TPN: 完全胃肠外营养。

表 3 PNAC单因素统计分析结果

因素	偏回归系数	标准误	Wald值	P值	OR值
出生体质量	-1.364	0.722	3.57	0.04	0.256
PN持续时间	0.077	0.028	7.674	0.01	1.081
PPN持续时间	0.058	0.027	4.733	0.03	1.06
TPN持续时间	0.141	0.051	7.585	0.01	1.151
氨基酸累积用量	0.018	0.008	4.926	0.03	1.018
氨基酸使用时间	0.079	0.028	7.825	0.01	1.083
脂肪乳使用时间	0.085	0.031	7.446	0.01	1.089
感染	2.265	0.675	11.242	0.00	9.63

PNAC: 胃肠外营养相关性胆汁淤积; PN: 胃肠外营养; PPN: 部分胃肠外营养; TPN: 完全胃肠外营养。

表 4 PNAC多因素统计分析结果

因素	偏回归系数	标准误	Wald值	P值	OR值	95%CI
感染	1.92	0.74	6.73	0.009	6.818	1.599-29.07
氨基酸使用时间	0.205	0.076	7.207	0.007	1.228	1.057-1.426

PNAC: 胃肠外营养相关性胆汁淤积。

3 讨论

1971年, Peden等^[3]首次报道了1例接受PN治疗的早产儿出现PNAC, 随后, PNAC相关性报

道逐渐增多, 其发病率在不同文献中的报道也有较大差异, 可达7.4%-84%^[4]。本研究统计显示我院2003-2008年新生儿PNAC发病率为

18.56%(18/97). 分析PNAC发病率存在差异的原因, 可能与PNAC的诊断标准、纳入研究的患儿年龄及基础疾病、PN治疗方案及持续时间等影响因素不同有关。

国外有研究报道, 患儿的胎龄越小, 出生体质量越低, 其PNAC发病率越高^[5,6]. 本研究中PNAC组患儿的出生体质量($1.53\text{ kg} \pm 0.41\text{ kg}$)明显低于非PNAC组($1.79\text{ kg} \pm 0.55\text{ kg}$); 具体来看, PNAC组内18例患儿中, 正常出生体质量儿($\geq 2.5\text{ kg}$)无1例发生PNAC, 低出生体质量儿($1.5\text{--}2.5\text{ kg}$)和极低出生体质量儿($< 1.5\text{ kg}$)的PNAC发病率则分别为13.7%和30.6%. 已有研究认为小胎龄是PNAC发生的独立危险因素^[7,8], 虽然我们的结果尚未显示PNAC组与非PNAC组患儿的出生胎龄有统计学差异, 但是我们也发现患儿的出生胎龄越小, 其PNAC的发病率越高; 出生胎龄 ≥ 36 、 $32\text{--}36$ 、 $< 32\text{ wk}$ 的3组PNAC患儿发病率分别为0%、16.0%和27.0%. Pereira等^[5]采用了与本研究相同的胎龄分类方法, 结果显示3组PNAC患儿发病率分别为1.4%、5.3%和13.7%, 亦呈递增趋势, 与我们的结果类似. PNAC的发病机制目前仍不明确, 研究发现低出生体质量儿及早产儿的肝脏发育尚未成熟, 胆盐合成能力及肝肠循环较弱, 有毒胆汁酸中间产物不能有效降解, 因此易患PNAC^[9].

本研究中, PNAC组患儿接受PN的持续时间为 $32.28\text{ d} \pm 16.31\text{ d}$, 非PNAC组为 $22.78\text{ d} \pm 7.60\text{ d}$, 两组相比, $P < 0.05$. 我们进一步将PN持续时间按照 ≤ 3 、 $3\text{--}4$ 、 $> 4\text{ wk}$ 进行细分, PNAC发病率依次为8.0%、21.7%和37.5%. 由此可见, PN持续时间越长, PNAC发病率越高. 国外及国内亦有相似的研究报道. Lauriti等^[10]认为PNAC的发生与PN持续时间成正比, 他们对接受PN $\leq 1\text{ mo}$ 和 $\geq 2\text{ mo}$ 的患儿做了统计, 发现前者PNAC发病率(15.7%)显著低于后者(60.9%); 汤庆娅等^[11]对612例接受PN的新生儿进行了大样本研究, 发现PNAC组持续时间($32\text{ d} \pm 30\text{ d}$)显著长于非PNAC组($13\text{ d} \pm 10\text{ d}$). 此外, 我们还对患儿接受TPN、PPN及PPN/PN进行了初步研究, 结果发现PNAC的发生与TPN有关($P < 0.01$). 有研究对206例接受PN $> 1\text{ wk}$ 的新生儿进行回顾调查, 发现PNAC组TPN持续时间($23\text{ d} \pm 8\text{ d}$)明显长于非PNAC组($15\text{ d} \pm 5\text{ d}$), 这一结果与我们的研究相符^[12]. TPN即为禁食时间, 长期PN或禁食一方面会使胃肠道缺乏有效的刺激, 胆囊收缩力下降, 导致胆汁滞留而胆囊排空障碍, 引起胆汁淤积; 另一方面导

致肠腔内细菌过度繁殖并分解、重吸收胆红素, 胆红素钙盐发生沉淀而形成胆汁泥或结石^[2,12].

接受PN治疗的患儿往往不能耐受经口喂养, 因此PN的成分及使用也是本研究的分析指标. PNAC组与非PNAC组相比, 结果显示氨基酸累积用量、氨基酸及脂肪乳使用时间的差异具有统计学意义, 多因素分析提示氨基酸使用时间是PNAC发生的独立危险因素($OR = 1.118$; $95\%CI: 1.057\text{--}1.426$, $P = 0.007$). 根据《中国新生儿营养支持临床应用指南》, 新生儿氨基酸和脂肪乳日均量为 $1\text{--}3.5\text{ g/kg}$ ^[13], 本研究两组患儿的氨基酸和脂肪乳用量均在此范围内. 我们统计了氨基酸和脂肪乳使用时间 $> 4\text{ wk}$ 的患儿, PNAC发病率分别为37.5%和38.9%, 明显高于 $\leq 4\text{ wk}$ 的患儿(12.3%和13.9%), 可见伴随着氨基酸和脂肪乳使用时间的增长, 患儿发生PNAC的概率增高. 目前已有研究证实PN中营养成分与PNAC的发生密切相关: Shin等^[14]发现PNAC组氨基酸累积用量、脂肪乳累积用量和平均用量均高于非PNAC组, 其中脂肪乳累积用量是PNAC的独立危险因素; 国内有研究小组的报道结论相似, 认为氨基酸累积用量是PNAC的独立危险因素^[15]. 由于新生儿体内降解、排泄的功能不完善, 加之接受PN时肠道的代谢较弱, 因此有可能导致毒性氨基酸和脂肪在肝细胞中的堆积而造成肝损, 促使PNAC的发生.

此外, 我们还发现感染与PNAC的发生有关. 18例PNAC患儿中感染发病率(83.33%, 15/18)显著高于非PNAC组(34.18%, 27/79); 感染是PNAC发生的独立危险因素, 有感染的新生儿其PNAC发病率是无感染新生儿的6.818倍. 国内阳勇等^[15]报道了接受PN $> 14\text{ d}$ 的98例新生儿, PNAC组发生感染的比例(75%)明显高于非PNAC组(27.8%); 张晓敏等^[16]也报道了合并败血症、真菌感染是PNAC的高危因素; Robinson等^[7]研究了231例接受PN $\geq 7\text{ d}$ 的早产儿, 发现脓毒血症在PNAC组的发病率(80%)比非PNAC组(20%)更高. 因此, 这些研究说明接受PN的患儿易发生感染. 一些研究提示感染可能是引起PNAC的重要原因之一, 与内毒素对肝胆系统的毒性作用有关^[11,17].

PNAC作为PN常见的并发症之一, 其发生是多因素共同作用的结果. 在临床治疗中, 我们在进行PN的同时应采取多项措施预防PNAC的发生, 如加强围产期的保健, 尽可能避免早产、低出生体质量儿的发生; 早期进行全胃肠内喂养,

■应用要点

了解PNAC的发生情况并探讨其相关危险因素, 为临床上PNAC的预防和诊疗奠定基础, 能指导临床医生采取多项措施降低PNAC发生率, 推动新生儿胃肠外营养支持的有效、安全和合理的应用, 具有重要的现实意义.

■同行评价

依据充分, 逻辑清晰, 有一定的临床意义。

缩短PN持续时间; 在保证营养供给的前提下, 适当调整PN配方和使用方案; 尽量避免和控制感染等。

4 参考文献

- 1 Carter BA, Shulman RJ. Mechanisms of disease: update on the molecular etiology and fundamentals of parenteral nutrition associated cholestasis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 277-287 [PMID: 17476210 DOI: 10.1038/ncpgasthep0796]
- 2 高恒淼, 樊寻梅. 胃肠外营养相关性胆汁淤积的研究进展. *中华儿科杂志* 2001; 39: 508-510
- 3 Peden VH, Witzleben CL, Skelton MA. Total parenteral nutrition. *J Pediatr* 1971; 78: 180-181 [PMID: 4992578 DOI: 10.1016/S0022-3476(71)80289-5]
- 4 Arnold CJ, Miller GG, Zello GA. Parenteral nutrition-associated cholestasis in neonates: the role of aluminum. *Nutr Rev* 2003; 61: 306-310 [PMID: 14552065 DOI: 10.1301/nr.2003.sept.306-310]
- 5 Pereira GR, Sherman MS, DiGiacomo J, Ziegler M, Roth K, Jacobowski D. Hyperalimentation-induced cholestasis. Increased incidence and severity in premature infants. *Am J Dis Child* 1981; 135: 842-845 [PMID: 6792907 DOI: 10.1001/archpedi.1981.02130330052017]
- 6 Hsieh MH, Pai W, Tseng HL, Yang SN, Lu CC, Chen HL. Parenteral nutrition-associated cholestasis in premature babies: risk factors and predictors. *Pediatr Neonatol* 2009; 50: 202-207 [PMID: 19856863 DOI: 10.1016/S1875-9572(09)60064-4]
- 7 Robinson DT, Ehrenkranz RA. Parenteral nutrition-associated cholestasis in small for gestational age infants. *J Pediatr* 2008; 152: 59-62 [PMID: 18154901 DOI: 10.1016/j.jpeds.2007.06.002]
- 8 Champion V, Carbajal R, Lozar J, Girard I, Mitancher D. Risk factors for developing transient neonatal cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55: 592-598 [PMID: 22684346 DOI: 10.1097/MPG.0b013e3182616916]
- 9 Emerick KM, Whittington PF. Molecular basis of neonatal cholestasis. *Pediatr Clin North Am* 2002; 49: 221-235 [PMID: 11826806 DOI: 10.1016/S0031-3955(03)00116-0]
- 10 Lauriti G, Zani A, Aufieri R, Cananzi M, Chiesa PL, Eaton S, Pierro A. Incidence, prevention, and treatment of parenteral nutrition-associated cholestasis and intestinal failure-associated liver disease in infants and children: a systematic review. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2014; 38: 70-85 [PMID: 23894170 DOI: 10.1177/0148607113496280]
- 11 汤庆娅, 王莹, 冯一, 陶晔璇, 吴江, 蔡威. 新生儿肠外营养相关性胆汁淤积因素612例分析. *中华儿科杂志* 2007; 45: 838-842
- 12 Moukartzel AA, Dahlstrom KA, Buchman AL, Ament ME. Carnitine status of children receiving long-term total parenteral nutrition: a longitudinal prospective study. *J Pediatr* 1992; 120: 759-762 [PMID: 1578313 DOI: 10.1016/S0022-3476(05)80243-4]
- 13 中华医学会肠外肠内营养学分会儿科协作组, 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华医学会儿外科学分会新生儿学组. 中国新生儿营养支持临床应用指南. *中国当代儿科杂志* 2006; 8: 352-356
- 14 Shin JI, Namgung R, Park MS, Lee C. Could lipid infusion be a risk for parenteral nutrition-associated cholestasis in low birth weight neonates? *Eur J Pediatr* 2008; 167: 197-202 [PMID: 17436017 DOI: 10.1007/s00431-007-0454-7]
- 15 阳勇, 钱新华, 郭丽珊, 陈佳, 黄为民. 新生儿长期胃肠外营养相关性胆汁淤积的发病率及其影响因素. *实用儿科杂志* 2010; 25: 112-113, 128
- 16 张晓敏, 朱雪萍. 早产低体质量儿长期胃肠外营养相关性胆汁淤积高危因素分析. *苏州大学学报(医学版)* 2012; 32: 145-147
- 17 Kusters A, Karpen SJ. The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 186-194 [PMID: 20422500 DOI: 10.1055/s-0030-1253227]

编辑 郭鹏 电编 都珍珍



能全力行肠内营养支持配合综合性护理干预对出血昏迷患者的疗效

仲桂英, 马丽萍

仲桂英, 马丽萍, 青海大学附属医院神经内科 青海省西宁市 810001

仲桂英, 主管护理师, 主要从事脑血管病营养支持护理的研究。

作者贡献分布: 本文由仲桂英与马丽萍共同完成。

通讯作者: 仲桂英, 主管护师, 810001, 青海省西宁市城西区同仁路29号, 青海大学附属医院神经内科。1679237107@qq.com
电话: 0971-6230866

收稿日期: 2014-04-23 修回日期: 2014-05-20

接受日期: 2014-05-29 在线出版日期: 2014-07-08

Efficacy of enteral nutrition combined with comprehensive nursing in patients with coma due to hypertensive cerebral hemorrhage

Gui-Ying Zhong, Li-Ping Ma

Gui-Ying Zhong, Li-Ping Ma, Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Correspondence to: Gui-Ying Zhong, Charge Nurse, Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Qinghai University, 29 Tongren Road, Chengxi District, Xi'ning 810001, Qinghai Province, China. 1679237107@qq.com

Received: 2014-04-23 Revised: 2014-05-20

Accepted: 2014-05-29 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of enteral nutrition combined with comprehensive nursing in patients with coma due to hypertensive cerebral hemorrhage.

METHODS: One hundred and twenty patients with coma due to hypertensive cerebral hemorrhage treated at our hospital from March 2011 to February 2014 were studied. The patients were randomly divided into either an observation group or a control group. The control group was given nasogastric nutrition therapy and routine care intervention. The observation group was given enteral nutrition and comprehensive care intervention. After 4 wk of nutritional therapy, total protein (TP), albumin (ALB), hemoglobin (Hb), and total lymphocyte count (TLC) in the two groups were monitored and analyzed. The

prognosis and complications were compared between the two groups.

RESULTS: After 4 wk of nutritional therapy, TP, ALB and TLC significantly increased in both groups ($P < 0.05$), but Hb showed no significant change ($P > 0.05$). TP, ALB and TLC were significantly higher in the observation group than in the control group ($64.31 \text{ g/L} \pm 4.33 \text{ g/L}$ vs $63.10 \text{ g/L} \pm 3.65 \text{ g/L}$, $39.24 \text{ g/L} \pm 5.45 \text{ g/L}$ vs $38.37 \text{ g/L} \pm 5.49 \text{ g/L}$, $17.32 \times 10^9/\text{L} \pm 7.01 \times 10^9/\text{L}$ vs $15.12 \times 10^9/\text{L} \pm 6.60 \times 10^9/\text{L}$, $P < 0.05$). The prognosis was significantly better in the observation group than in the control group ($U = -3.0039$, $P = 0.0027$). The rates of gastrointestinal bleeding, nausea and vomiting, constipation, and hyperglycemia were significantly lower in the observation group than in the control group ($P < 0.05$), but the rates of constipation, diarrhea and aspiration showed no significant difference ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The use of enteral nutritional support with comprehensive nursing intervention can significantly improve the efficacy in patients with coma due to hypertensive intracerebral hemorrhage.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hypertensive cerebral hemorrhage; Coma; Enteral nutrition; Care

Zhong GY, Ma LP. Efficacy of enteral nutrition combined with comprehensive nursing in patients with coma due to hypertensive cerebral hemorrhage. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2795-2799 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2795.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2795>

摘要

目的: 探讨高血压脑出血昏迷患者肠内营养支持的护理的疗效。

方法: 选择2011-03/2014-02我院接诊的高血压

■背景资料

高血压脑出血昏迷的患者, 由于机体应激反应的发生, 常处于高代谢的状态。且昏迷的患者长期不能进食, 因此常会由于营养不良而导致患者死亡。由于患者营养需要较大, 因此常规的肠外营养支持不能满足患者的营养需要, 临床中常需对患者进行肠内营养支持治疗。

■同行评议者

杨桦, 教授, 重庆市第三军医大学新桥医院

■研究前沿

有学者研究发现,在对昏迷患者进行肠内营养支持的过程中,患者常会出现各种并发症,严重影响患者的预后。

脑出血昏迷的患者120例进行研究。按照随机数表法,将患者随机均分为观察组和对照组。对照组给予混合流质进行鼻饲营养支持,并给予患者一般的护理干预措施。观察组给予能全力进行鼻饲,并采用综合护理干预措施对患者进行护理干预。营养支持4 wk后,监测分析两组患者的总蛋白(total protein, TP)、清蛋白(albumin, ALB)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)及淋巴细胞总数(total lymphocyte count, TLC)各营养指标的变化情况,并分析两组患者的预后状况及并发症发生情况。

结果:营养支持4 wk后,两组患者的TP、ALB及TLC均明显升高($P<0.05$), Hb均无显著性改变($P>0.05$);观察组患者营养支持后的TP、ALB及TLC均明显高于对照组($64.31\text{ g/L} \pm 4.33\text{ g/L}$ vs $63.10\text{ g/L} \pm 3.65\text{ g/L}$, $39.24\text{ g/L} \pm 5.45\text{ g/L}$ vs $38.37\text{ g/L} \pm 5.49\text{ g/L}$, $17.32 \times 10^9/\text{L} \pm 7.01 \times 10^9/\text{L}$ vs $15.12 \times 10^9/\text{L} \pm 6.60 \times 10^9/\text{L}$, $P<0.05$)。观察组患者的预后效果明显优于对照组,两组患者的预后效果比较有显著性差异($U = -3.0039$, $P = 0.0027$)。观察组患者的消化系出血、恶心呕吐、便秘及高血糖的发生率明显低于对照组($P<0.05$),便秘、腹泻及误吸的发生率无显著性差异($P>0.05$)。

结论:采用能全力进行肠内营养支持,配合综合性护理干预,可显著提高对高血压脑出血昏迷患者的疗效。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 高血压脑出血; 昏迷; 肠内营养; 护理

核心提示: 在本研究中,我院对高血压脑出血昏迷患者治疗过程中,在常规的消毒和预防感染的护理及密切监控的基础上,给予患者综合性的护理干预措施,分别对患者进行呼吸道、鼻饲过程及并发症的护理干预,最终发现患者的总蛋白(total protein)、清蛋白(albumin)及淋巴细胞总数(total lymphocyte count)各项营养指标得到明显的改善,改善效果明显优于进行常规治疗和护理干预的对照组患者。患者的预后状况也明显得到了改善,消化系出血、恶心呕吐、便秘及高血糖的发生率均明显降低。

仲桂英, 马丽萍. 能全力行肠内营养支持配合综合性护理干预对出血昏迷患者的疗效. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2795-2799
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2795.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2795>

0 引言

高血压脑出血昏迷的患者,由于机体应激反应

的发生,常会处于高代谢的状态^[1]。且昏迷的患者长期不能进食,因此常会由于营养不良而导致患者死亡^[2]。由于患者营养需要较大,因此常规的肠外营养支持不能满足患者的营养需要,临床中常需对患者进行肠内营养支持治疗^[3,4]。但是,有学者研究发现,在对昏迷患者进行肠内营养支持的过程中,患者常会出现各种并发症,严重影响患者的预后^[5]。有学者探讨采用完善的护理干预措施对患者进行治疗期间严密的护理干预,在临床试验中取得了良好的效果^[6]。本研究我院在对高血压脑出血昏迷患者肠内营养支持的过程中,给予患者综合性护理干预措施,探讨综合性护理在高血压脑出血昏迷患者治疗中的应用效果。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2011-03/2014-02我院接诊的高血压脑出血昏迷的患者120例进行研究。按照随机数表法,将患者随机均分为观察组和对照组。观察组60例患者,年龄为48-61岁, GCS评分为4-8分。对照组60例患者,年龄为46-63岁, GCS评分为3-9分。两组患者的年龄、性别及GCS评分等一般资料无显著性差异($P>0.05$)(表1),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 所有患者均根据病情状况进行常规的处理。采取手术治疗的患者术后即对患者进行鼻胃管的留置,保守治疗的患者则在患者住院开始即进行鼻胃管的留置。当患者24 h内的胃内潴留量低于300 mL后,即对患者进行肠内营养支持。对照组给予混合流质进行鼻饲营养支持,并给予患者一般的护理干预措施。主要包括有常规的消毒和预防感染的护理,及定期对患者进行病情监护,并定时向上级医生进行病情及护理措施的汇报等。与此同时,确保病室内的安静,严格控制患者家属探视的次数和时间。患者取头高脚低位,严密监控患者的各项生命体征,由相关护士进行24 h的护理(密切观察患者的意识状况及瞳孔的变化情况)。高血压脑出血的患者常需进行导管引流,因此要保证引流导管的通畅,期间密切做好导管的护理,观察引流液的性状,并及时作好记录,向上级医生进行定时的汇报。此外,高血压脑出血昏迷的患者常会出现体温的升高,因此需对患者进行物理降温的治疗,可采用冰帽进行冰敷,并定时进行体温的监测。观察组给予能全力进行鼻饲,在常规护理的基础上,采用综合护理干预措施对患者进

表 1 两组患者的一般资料状况的记录与统计学分析 ($n = 60$)

项目	观察组	对照组	统计值	P 值
年龄(岁)	56.55 ± 1.11	56.23 ± 1.19	1.5232	0.1304
性别比(男/女)	41/19	40/20	0.0380	0.8455
GCS评分	5.33 ± 0.44	5.41 ± 0.51	0.9200	0.3595
脑出血部位 n (%)				
基底节区	35(58.33)	33(55.00)		
脑干区	6(10.00)	8(13.33)		
小脑区	7(11.67)	8(13.33)		
脑叶区	12(20.00)	11(18.33)	0.4547	0.9287
手术治疗 n (%)	40(66.67)	42(70.00)	0.1540	0.6947

■ 相关报道

有学者探讨采用完善的护理干预措施对患者进行治疗期间严密的护理干预, 在临床试验中取得了良好的效果。

行护理干预. 主要包括胃管的严格护理, 鼻饲营养中的护理以及预防并发症发生的详细的护理干预措施. 具体有: (1)对患者呼吸道的护理干预: 高血压脑出血昏迷的患者, 由于长期卧床, 口腔内的分泌物无法排出, 因此, 对患者的呼吸道进行密切的观察护理, 及时将口腔内的分泌物吸出, 确保患者呼吸道的通畅. 在操作中, 要做到严格的无菌操作, 并且对于术后并发症进行注意和避免; (2)患者鼻饲过程中的护理干预: 在患者进行鼻饲的过程中, 对患者进行严密的鼻饲的护理干预. 患者进行鼻饲的操作时, 保证床头抬高30-45度, 并且进行回抽确保胃管在胃中. 在鼻饲结束30 min内, 严禁搬动患者, 采用能全力一次性肠内营养注射管与鼻胃管进行连接, 根据患者的具体反应及意识情况进行速率的调节; (3)对于治疗过程中可能出现的并发症的护理干预: 患者在治疗过程中, 常会出现消化系出血、恶心呕吐、便秘及高血糖等并发症, 因此, 针对这些并发症, 应在护理干预前, 制定好详细的预防措施, 使相关护理人员清除各并发症的防治和处理的原则, 从而降低并发症的发生率. 对于消化道出血的护理干预, 在对患者进行治疗的过程中, 定时进行胃液隐血实验的检查, 如出现阳性, 确诊为消化系出血, 则应立即进行制酸、止血的处理, 并根据患者的具体情况进行鼻饲速率的调节, 如出现严重的消化道出血, 则应进行持续的胃肠减压. 针对恶心、呕吐的防治和治疗, 如患者在治疗过程中出现恶心、呕吐, 则应立即向上级医生进行汇报, 明确原因, 并协助患者进行相应的处理. 其余各类并发症的处理措施均在护理干预前即进行明确.

1.2.2 观察指标: 营养支持4 wk后, 监测分析两组患者的总蛋白(total protein, TP)、清蛋白(albumin, ALB)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)及淋巴细

胞总数(total lymphocyte count, TLC)各营养指标的变化情况. 并分析两组患者的预后状况及并发症发生情况. 预后状况的评价分为良好、中残、重残、生存、死亡5个指标, 结合患者的具体疾病康复状况进行评定分析.

统计学处理 选择SPSS18.0进行数据统计, 数据采用mean±SD来表示, 计量资料的比较采用 t 检验, 计数资料的比较采用 χ^2 检验, 等级资料的比较采用秩和检验(Wilcoxon两样本比较法)进行. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 两组患者的营养支持前后的营养各项指标的分析记录 营养支持4 wk后, 两组患者的TP、ALB及TLC均明显升高($P < 0.05$), Hb均无显著性改变($P > 0.05$); 观察组患者营养支持后的TP、ALB及TLC均明显高于对照组($P < 0.05$)(表2).

2.2 两组患者治疗后的预后效果的分析 治疗后, 发现观察组患者的预后效果明显优于对照组, 两组患者的预后效果比较有显著性差异($U = -3.0039, P = 0.0027$)(表3).

2.3 两组患者随访调查的并发症情况的记录分析 治疗后, 发现观察组患者的消化系出血、恶心呕吐、便秘及高血糖的发生率明显低于对照组($P < 0.05$), 便秘、腹泻及误吸的发生率无显著性差异($P > 0.05$)(表4).

3 讨论

高血压脑出血昏迷的患者的病情较为危重, 治疗也十分棘手. 常规的肠外营养支持不能满足患者的较大的营养需求. 因此, 常会导致患者因营养缺乏而出现多脏器的功能衰竭^[7]. 在对高血压脑出血昏迷患者治疗中, 需给予患者足量的肠内营养支持, 从而补充患者的营养需求, 改善

■应用要点

高血压脑出血昏迷患者肠内营养支持的护理的疗效显著, 有一定临床应用价值。

表 2 两组患者治疗前后的营养各项指标的检测分析 ($n = 60$)

分组	时间	TP(g/L)	ALB(g/L)	Hb(g/L)	TLC(10^9 /L)
观察组	支持前	61.76 ± 3.91	36.44 ± 5.22	13.27 ± 2.81	14.13 ± 7.31
	支持4 wk后	64.31 ± 4.33	39.24 ± 5.45	13.17 ± 2.61	17.32 ± 7.01
	<i>t</i> 值	3.3856	2.8740	0.2020	2.4397
	<i>P</i> 值	0.0010	0.0048	0.8403	0.0162
对照组	支持前	61.78 ± 3.40	36.40 ± 5.32	13.22 ± 2.91	14.21 ± 6.81
	支持4 wk后	63.10 ± 3.65	38.37 ± 5.49	13.82 ± 2.71	15.12 ± 6.60
	<i>t</i> 值	2.0498	1.9961	1.1688	2.0501
	<i>P</i> 值	0.0426	0.0482	0.2449	0.0426

TP: 总蛋白; ALB: 清蛋白; Hb: 血红蛋白; TLC: 淋巴细胞总数。

表 3 两组患者治疗后的预后状况的分析记录 ($n = 60, n(\%)$)

分组	良好	中残	重残	植物生存	死亡
观察组	6(10.00)	40(66.67)	9(15.00)	3(5.00)	2(3.33)
对照组	3(5.00)	27(45.00)	17(28.33)	8(13.33)	5(8.33)
<i>U</i> 值					-3.0039
<i>P</i> 值					0.0027

表 4 两组患者的治疗后的并发症情况的记录分析 ($n(\%)$)

分组	胃肠道出血	恶心呕吐	便秘	腹泻	误吸	高血糖
观察组	3(5.00)	3(5.00)	3(5.00)	4(6.67)	1(1.67)	2(3.33)
对照组	10(16.67)	11(18.33)	10(16.67)	5(8.33)	2(3.33)	9(15.00)
χ^2 值	4.2272	5.1752	4.2272	0.1201	0.3419	4.9041
<i>P</i> 值	0.0398	0.0229	0.0398	0.7289	0.5587	0.0268

患者的预后状况。

多项临床研究也发现高血压脑出血昏迷患者治疗过程中, 肠内营养支持的实施较为重要^[8,9]。通过肠内营养支持措施的实施, 可补充患者治疗过程中的营养需要, 改善各脏器的营养缺乏状况, 从而起到改善患者预后的效果^[10]。本研究中也发现采用肠内营养支持措施对患者进行营养补充, 患者的TP、ALB及TLC均明显升高。但是, 国内外研究发现高血压脑出血昏迷患者肠内营养支持过程中, 常会产生消化系出血、恶心、呕吐等并发症, 严重影响患者的预后状况^[11,12]。本研究中也发现患者的消化系出血、恶心呕吐、便秘及高血糖等并发症的发生率较高。在对改善患者预后状况的相关因素研究中, 有学者发现患者治疗过程中的护理措施尤为重要。常规的护理干预措施, 仅在患者治疗过程中进行消毒和预防感染/温度的控制等, 没有针对性,

对患者的护理干预效果不佳。高血压脑出血昏迷的患者, 由于长期的卧床, 因此会产生较多的口腔内分泌物, 且不易排出, 因此护理过程中应着重强调对患者呼吸道的护理干预^[13]。此外, 鉴于患者治疗过程中可能出现较多的并发症, 因此在治疗前即对相关护理人员进行可能出现的并发症的宣讲, 并针对性进行处理方案和措施的教授^[14]。多项临床也发现密切的护理干预措施的实施与患者的预后状况及并发症的发生率密切相关^[15,16]。因此, 临床中探讨采用综合性的护理干预措施对患者实施护理, 从而改善患者的预后状况。

在本研究中, 我院对高血压脑出血昏迷患者治疗过程中, 在常规的消毒和预防感染的护理及密切监控的基础上, 给予患者综合性的护理干预措施, 分别对患者进行呼吸道、鼻饲过程及并发症的护理干预, 最终发现患者的TP、

ALB及TLC各项营养指标得到明显的改善, 改善效果明显优于进行常规治疗和护理干预的对照组患者。患者的预后状况也明显得到了改善, 消化道出血、恶心呕吐、便秘及高血糖的发生率均明显降低。

本研究显示, 血压脑出血昏迷患者肠内营养支持, 配合综合型护理干预措施, 可显著改善患者的营养状况及预后状况, 降低消化系出血、恶心呕吐、便秘及高血糖的发生率, 效果明显优于常规的营养支持治疗和护理干预措施。

总之, 高血压脑出血昏迷患者肠内营养支持的护理的疗效显著, 有一定临床应用价值。

4 参考文献

- 1 贺传沙, 鲁远君. 高血压脑出血血肿扩大的危险因素. 重庆医科大学学报 2011; 36: 1391-1393
- 2 杜倩, 李淑娥, 王飞, 张华, 陈银玲, 王盈盈. 脑出血患者并发症的预防及护理体会. 山东医药 2011; 51: 53
- 3 孙耀辉, 黄健聪, 黄麟, 周晓庭, 彭宇, 黄凤珠. 高血压脑出血术后血压波动与再出血的关系. 实用医学杂志 2011; 27: 1053-1055
- 4 衣服新, 张建选, 孔令常. 高血压脑出血术后并发症对患者预后的影响. 山东医药 2011; 51: 46-47
- 5 成杰, 李新, 宋云华, 毕金玲, 田华, 刘清军. 鼻饲生大黄预防高血压脑出血昏迷患者胃肠功能紊乱的研究. 护士进修杂志 2011; 26: 394-395
- 6 吴有志, 罗良生, 张健, 陈骅, 吴鸣. 高血压脑出血患者诊疗及预后的影响因素. 中国老年学杂志 2013; 33: 3328-3329
- 7 Kalita J, Goyal G, Kumar P, Misra UK. Intracerebral hemorrhage in young from a tertiary neurology center in North India. *J Neurol Sci* 2014; 336: 42-47 [PMID: 24128695]
- 8 Takeuchi S, Takasato Y, Masaoka H, Hayakawa T, Yatsushige H, Shigeta K, Nagatani K, Otani N, Nawashiro H, Shima K. Decompressive craniectomy with hematoma evacuation for large hemispheric hypertensive intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* 2013; 118: 277-279 [PMID: 23564148]
- 9 范红, 刘旭, 郑仲乾, 李红梅, 廖洪民. 微创术治疗高血压脑出血综合护理干预效果分析. 护士进修杂志 2012; 27: 1681-1682
- 10 Zhang HT, Xue S, Li PJ, Fu YB, Xu RX. Treatment of huge hypertensive putaminal hemorrhage by surgery and cerebrospinal fluid drainage. *Clin Neurol Neurosurg* 2013; 115: 1602-1608 [PMID: 23481903]
- 11 柏慧华, 姚秋近, 祝晓娟, 王卉, 张峰极, 张一. 脑出血患者术后早期吞咽障碍筛查及康复护理. 中华护理杂志 2013; 48: 299-301
- 12 贺春燕, 梁娟, 张娟, 孟瑞丽. 综合护理干预在脑出血患者微创锥颅血肿清除术的应用效果分析. 护士进修杂志 2013; 28: 804-806
- 13 彭岱. 高血压脑出血病人围手术期营养支持的研究进展. 肠外与肠内营养 2013; 20: 181-183
- 14 陈光学, 吴丽君, 林勇. 家属协助心理干预和康复治疗对高血压脑出血肢体偏瘫的疗效观察. 广东医学 2011; 32: 3113-3115
- 15 张亚琴. 脑出血合并肺部感染原因分析及护理. 护士进修杂志 2012; 27: 954
- 16 李红旗, 张玉芝, 臧永强, 赵宇. 高血压脑出血后二次脑损伤相关因素对预后的影响. 中风与神经疾病杂志 2013; 30: 248-250

■同行评价

本研究有一定的参考价值, 值得进一步深入研究。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



耳穴贴压联合系统护理干预预防脑卒中患者便秘的临床效果

黄萍, 廖红梅

■背景资料

便秘是脑卒中患者临床常见并发症之一, 可对脑卒中患者治疗及预后产生较大影响。尤其是过度排便可导致颅内压升高而加重患者病情, 对出血性脑卒中患者可引发再次出血, 同时也降低了脑卒中患者的日常生活能力, 对其生活质量产生较大影响。因此, 采取有效治疗和护理干预措施预防脑卒中后便秘的发生是脑卒中治疗中的重要环节。

黄萍, 廖红梅, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院神经内科 湖北省武汉市 430077

黄萍, 主管护师, 主要从事神经内科护理的研究。

作者贡献分布: 此课题由黄萍设计; 研究过程由黄萍与廖红梅实施完成; 数据分析由廖红梅完成; 本论文写作由许黄萍与廖红梅同完成。

通讯作者: 黄萍, 主管护师, 430077, 湖北省武汉市武昌区东湖生态风景区沿湖大道39号, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院神经内科。lyhp4232@qq.com
电话: 027-86772577

收稿日期: 2014-03-11 修回日期: 2014-04-16

接受日期: 2014-04-24 在线出版日期: 2014-07-08

Clinical effects of auricular application and comprehensive nursing intervention in stroke patients with constipation

Ping Huang, Hong-Mei Liao

Ping Huang, Hong-Mei Liao, Department of Neurology, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei Province, China

Correspondence to: Ping Huang, Charge Nurse, Department of Neurology, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 39 Yanhu Road, Wuchang District, Wuhan 430077, Hubei Province, China. lyhp4232@qq.com

Received: 2014-03-11 Revised: 2014-04-16

Accepted: 2014-04-24 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To assess the clinical effects of auricular application and comprehensive nursing intervention in stroke patients with constipation.

METHODS: One hundred and two stroke patients with constipation were randomly divided into either an experiment group or a control group. All the patients were treated by auricular application. On the basis of this treatment, the control group underwent routine nursing care, and the experiment group was given comprehensive nursing intervention. The scores of modified Rankin scale (MRS), defecation scale and the rate of constipation were compared between the two groups.

RESULTS: In both groups, MRS score was significantly decreased after intervention compared with before intervention (2.93 ± 1.17 vs 3.58 ± 0.86 , 3.20 ± 1.22 vs 3.62 ± 0.69 , $P < 0.05$), and the decrease was more significant in the experiment group (2.93 ± 1.17 vs 3.20 ± 1.22 , $P < 0.05$). In both groups, the score of abdominal distension was significantly increased and the scores of dry mouth and halitosis were significantly decreased after intervention compared with before intervention (0.29 ± 0.60 vs 0.05 ± 0.24 , 1.29 ± 0.68 vs 2.12 ± 0.80 ; 1.18 ± 0.55 vs 2.25 ± 0.80 , 0.35 ± 0.29 vs 0.06 ± 0.17 ; 1.36 ± 0.77 vs 2.09 ± 0.91 , 1.67 ± 0.53 vs 2.26 ± 0.81 ; $P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the changes in the scores of abdominal distension, dry mouth and halitosis were significantly lower in the experiment group than in the control group (0.29 ± 0.60 vs 0.35 ± 0.29 , 1.29 ± 0.68 vs 1.36 ± 0.77 , 1.18 ± 0.55 vs 1.67 ± 0.53 , $P < 0.05$). The rate of constipation in the experiment group was significantly lower than that in the control group (11.76% vs 21.57% , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Auricular application and comprehensive nursing intervention can improve the symptoms of constipation in stroke patients with constipation.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Auricular application; Comprehensive nursing intervention; Stroke; Constipation

Huang P, Liao HM. Clinical effects of auricular application and comprehensive nursing intervention in stroke patients with constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2800-2803 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2800.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2800>

摘要

目的: 探讨耳穴贴压联合系统护理干预在预防脑卒中患者便秘中的临床效果。

方法: 按照随机数字表法将我院收治的102例

■同行评议者

李永翔, 主任医师, 教授, 博士生导师, 普外腔镜外科主任, 安徽医科大学第一附属医院普外科

脑卒中患者均分为观察组和对照组,两组患者均给予耳穴贴压治疗,对照组给予常规护理,观察组在常规护理方法基础上实施系统护理干预模式,比较两组患者干预前后改良Rankin量表(modified Rankin scale, MRS)评分和排便量表评分变化情况以及便秘发生率。

结果: 两组患者干预后MRS评分均显著下降,与干预前比较(2.93 ± 1.17 vs 3.58 ± 0.86 , 3.20 ± 1.22 vs 3.62 ± 0.69),差异具有统计学意义($P < 0.05$);观察组患者干预后MRS评分显著低于干预前(2.93 ± 1.17 vs 3.20 ± 1.22),差异具有统计学意义($P < 0.05$);两组患者干预后腹胀评分显著升高,口干和口臭评分显著降低,与干预前比较(0.29 ± 0.60 vs 0.05 ± 0.24 、 1.29 ± 0.68 vs 2.12 ± 0.80 、 1.18 ± 0.55 vs 2.25 ± 0.80 、 0.35 ± 0.29 vs 0.06 ± 0.17 、 1.36 ± 0.77 vs 2.09 ± 0.91 、 1.67 ± 0.53 vs 2.26 ± 0.81),差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);观察组患者干预后腹胀、口干和口臭评分均显著低于对照组(0.29 ± 0.60 vs 0.35 ± 0.29 、 1.29 ± 0.68 vs 1.36 ± 0.77 、 1.18 ± 0.55 vs 1.67 ± 0.53),差异具有统计学意义($P < 0.05$);观察组患者便秘发生率明显低于对照组(11.76% vs 21.57%),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 耳穴贴压联合系统护理干预能够有效预防脑卒中后便秘的发生,具有较高临床应用和推广价值。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 耳穴贴压; 系统护理干预; 脑卒中; 便秘

核心提示: 本研究结果显示,实时系统护理干预后患者改良Rankin量表(modified Rankin scale)评分和排便量表评分显著改善,便秘的发生率也明显降低,表明该护理模式在改善脑卒中患者临床症状和预防便秘上具有确切效果。

黄萍, 廖红梅. 耳穴贴压联合系统护理干预预防脑卒中患者便秘的临床效果. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2800-2803
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2800.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2800>

0 引言

便秘是脑卒中患者临床常见并发症之一,可对脑卒中患者治疗及预后产生较大影响。尤其是过度排便可导致颅内压升高而加重患者病情,对出血性脑卒中患者可引发再次出血,同时也降低了脑卒中患者的日常生活能力,对其生活

质量产生较大影响^[1]。因此,采取有效治疗和护理干预措施预防脑卒中后便秘的发生是脑卒中治疗中的重要环节。我院采取耳穴贴压和系统护理干预预防脑卒中患者便秘的发生,取得了较为满意的临床效果,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2013-02/2014-02我院收治的102例脑卒中患者作为研究对象。所有患者均符合中华医学会神经病学分会神经康复学组、中华医学会神经病学分会脑血管病学组和卫生部脑卒中筛查与防治工程委员会办公室发布的《中国脑卒中康复治疗指南》^[2]中脑卒中相关诊断标准且经颅脑电子计算机X射线断层扫描技术(electronic computer X-ray tomography technique, CT)或核磁共振成像(nuclear magnetic resonance imaging, MRI)检查确诊。所有患者均为首次发生脑卒中且入院前1 wk排便完全正常,排除合并严重脏器功能障碍、既往有直肠、结肠器质性病变、伴有其他脑部或脊髓疾病、合并耳聋或认知障碍不能配合治疗以及病情急性加重者。按照随机数字表法将102例患者均分为观察组和对照组,两组患者在性别、年龄、病程、脑卒中类型以及是否使用脱水剂等上差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1),具有可比性。所有患者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 耳穴贴压治疗: 两组患者均给予耳穴贴压治疗: 根据国家标准《耳穴名称与定位》^[3]取穴耳廓直肠、大肠、肺、三焦、脾、皮质下和交感诸穴。使用750 mL/L乙醇棉球对患者一侧耳廓进行常规消毒后,一手固定耳廓,另一手使用血管钳将粘有王不留行籽的小胶布[上海泰成科技发展有限公司,粤食药监械(准)字2009第2260684号]贴于耳穴。使用拇指和食指按压时患者出现热、胀、痛感,每日按压4次,隔天贴压另一侧。进行4 d共2次治疗。对照组在此基础上参照中华人民共和国卫生部、中国人民解放军总后勤部卫生部发布的《临床护理实践指南2011版》^[4]中便秘的常规护理方法,包括健康教育、饮食指导、运动指导、腹部和脐周按摩、腹式呼吸指导、定时排便训练以及心理护理。观察组患者在常规护理方法基础上实施系统护理干预模式,每日对患者进行临床症状及体征评估,确定问题后采取针对性干预措施,并对干预措施进行动态式调整和改进。

■ 研究前沿

传统中医学认为脑卒中后便秘是人体痰热阻滞、腑气不通的表现,患者发病的主要病机为气血逆乱、浊邪不降和痰热不去。

■创新盘点

本研究观察组通过对患者进行动态评估,针对患者表现出的问题采取应对措施和实时调整个性化护理策略不仅提高了护理人员的工作效率,也实现了护理干预的系统化和科学化。

表 1 两组患者临床资料比较 ($n = 51$)

分组	性别[n(%)]		平均年龄(岁)	平均病程(h)	脑卒中类型[n(%)]		是否使用脱水剂[n(%)]	
	男性	女性			缺血性	出血性	是	否
观察组	37(72.55)	14(27.45)	61.22 ± 9.13	50.27 ± 9.71	40(78.43)	11(21.57)	21(41.18)	30(58.82)
对照组	40(78.43)	11(21.57)	60.27 ± 9.76	51.06 ± 9.58	39(76.47)	12(23.53)	22(43.14)	29(56.86)

表 2 两组患者干预前后排便量表评分比较 ($n = 51$)

分组	时间	大便干结	腹胀	腹部压痛	口干	口臭
观察组	干预前	0.20 ± 0.24	0.05 ± 0.24	0.09 ± 0.29	2.12 ± 0.80	2.25 ± 0.80
	干预后	0.31 ± 0.28	0.29 ± 0.60 ^{bc}	0.09 ± 0.58	1.29 ± 0.68 ^{bc}	1.18 ± 0.55 ^{bc}
对照组	干预前	0.19 ± 0.47	0.06 ± 0.17	0.09 ± 0.24	2.09 ± 0.91	2.26 ± 0.81
	干预后	0.33 ± 0.58	0.35 ± 0.29 ^a	0.11 ± 0.39	1.36 ± 0.77 ^a	1.67 ± 0.53 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 同组干预前; ^c $P < 0.05$ vs 对照组。

1.2.2 观察指标: 记录两组患者干预前后改良 Rankin量表(modified Rankin scale, MRS)评分及排便量表评分变化情况, 比较两组患者脑卒中后便秘发生率。MRS评分标准: 无症状: 0分; 轻度临床症状, 可进行正常工作和生活: 1分; 轻度残疾, 能够自我照顾: 2分; 中度残疾, 能独立行走, 需要一些照顾: 3分; 中等程度严重残疾, 生活和行走需照顾: 4分; 严重残疾, 长期卧床, 大小便失禁, 需专人照顾: 5分; 死亡: 6分^[5]。排便量表评分标准: 无症状: 0分; 轻度: 1分; 中度: 2分; 重度: 3分; 极重: 4分^[6]。便秘诊断标准: 参照中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组和中华医学会消化病学分会胃肠动力学组发布的《中国慢性便秘诊治指南(2013, 武汉)》^[7]中便秘的诊断标准: 排便时间较正常患者明显延长, 每次排便间隔2 d以上, 大便干燥且坚硬, 症状严重者排便艰难, 大便为块状硬便, 可伴有少腹胀急、神倦乏力及胃纳减退等症状。注意排除肠道器质性疾病。

统计学处理 使用SPSS17.0统计分析, 用mean ± SD表示计量资料, 采用 t 检验, 用百分比表示计数资料, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者干预前后MRS评分比较 观察组和对照组患者干预后MRS评分均显著下降, 与干预前比较(2.93 ± 1.17 vs 3.58 ± 0.86 , 3.20 ± 1.22 vs 3.62 ± 0.69), 差异具有统计学意义($P < 0.05$);

观察组患者干预后MRS评分显著低于干预前, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 两组患者干预前后排便量表评分比较 两组患者干预后腹胀评分显著升高, 口干和口臭评分显著降低, 与干预前比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 观察组患者干预后腹胀、口干和口臭评分均显著低于对照组, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

2.3 两组患者便秘发生率比较 观察组患者便秘发生率明显低于对照组(11.76% vs 21.57%), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

便秘是脑卒中患者常见并发症, 大量研究表明脑卒中后便秘对患者有较大危害, 主要包括: (1) 食物残渣不能排出而在肠内发酵腐败, 产生的 H_2S 、 Cl_2 、 CO_2 、 $C_{15}H_{16}O_2$ 以及 NH_3 等不仅对机体糖和脂肪代谢产生不利影响, 也会被人体吸收并导致内毒素中毒^[8]; (2)便秘后患者粪便在小肠内停留时间延长, 提高了胆固醇吸收率, 导致患者血液胆固醇含量升高, 容易引发动脉粥样硬化^[9]; (3)患者便秘时需用力排便, 易导致心脑血管受损、增加了心脏负荷, 尤其易引发阻塞性出血卒中中发生或诱发急性心肌梗死等靶器官损伤^[10]。因此, 采取有效治疗及护理措施预防脑卒中患者便秘的发生时脑卒中治疗过程中的重要环节。

传统中医学认为脑卒中后便秘是人体痰热阻滞、腑气不通的表现, 患者发病的主要病机

为气血逆乱、浊邪不降和痰热不去^[11]。耳穴贴压作为治疗便秘的常用中医手段,疗效确切,治疗费用低,在临床上应用较为广泛。通过耳穴贴压刺激患者耳廓诸穴,能够达到疏通经络、运行气血、调节脏腑和器官功能的效果^[12]。大量临床研究也证实,耳穴能够通过神经对胃肠电活动产生影响。人体耳廓神经丰富,具有支配和协调全身脏器正常运动的作用^[13]。本研究中选择耳廓直肠、大肠、肺、三焦、脾、皮质下和交感诸穴,目的在于改善患者胃肠功能,预防便秘发生。

有效护理干预是预防脑卒中后便秘发生的关键。本研究中对对照组采取健康教育、饮食指导、运动指导、腹部和脐周按摩、腹式呼吸指导、定时排便训练以及心理护理等综合护理。其中健康教育能够提高患者对便秘危害性的了解程度,提高患者治疗的配合度;饮食指导通过控制患者水和食物纤维的摄入,改善胃肠内食物残渣的形态,不仅利于排出,也有助于激发患者便意和排便反射^[14];运动指导主要目的是避免患者长期卧床而不利胃肠功能改善,也可促进患者进食,增加排便次数;腹部和脐周按摩能够有效刺激胃肠蠕动,有助于患者排便。但按摩过程中要注意按摩手法和力度;腹式呼吸指导能够提高患者肛门对排便的敏感性,培养患者排便意识^[15];定时排便训练可培养患者排便条件反射和排便规律;心理护理则从最大限度上改善患者紧张焦虑等负面情绪,避免不良情绪导致肾上腺素分泌增加和交感神经兴奋所引起的胃肠蠕动减弱^[16]。而观察组则对上述综合护理进行了系统规划,通过对患者进行动态评估,针对患者表现出的问题采取应对措施和实时调整个性化护理策略不仅提高了护理人员的工作效率,也实现了护理干预的系统化和科学化^[17]。本研究结果显示,实时系统护理干预后患者MRS评分和排便量表评分显著改善,便秘的发生率也明显降低,表明该护理模式在改善脑卒中患者临床症状和预防便秘上具有确切效果。

总之,耳穴贴压联合系统护理干预能够有效

预防脑卒中后便秘的发生,具有较高临床应用和推广价值,相信系统护理干预能够在更广阔的领域发挥更大的作用。

4 参考文献

- 1 缪虹,赵杨.卒中后便秘研究进展.辽宁中医药大学学报 2011; 13: 257-259
- 2 中华医学会神经病学分会神经康复学组,中华医学会神经病学分会脑血管病学组,卫生部脑卒中筛查与防治工程委员会办公室.中国脑卒中康复治疗指南(2011完全版).中国康复理论与实践 2012; 18: 301-318
- 3 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.耳穴名称与定位.国家中医药管理局, 2009: 1-65
- 4 中华人民共和国卫生部,中国人民解放军总后勤部卫生部.临床护理实践指南2011版.北京:人民军医出版社, 2011
- 5 周思远,刘婷,覃海知,李瑛.临床常用便秘诊断和疗效评价量表的特征.世界华人消化杂志 2013; 21: 2611-2616
- 6 中华医学会外科学分会肛肠外科学组.便秘症状及疗效评估.中华胃肠外科杂志 2005; 8: 355
- 7 中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组,中华医学会消化病学分会胃肠动力学组.中国慢性便秘诊治指南(2013,武汉).胃肠病学 2013; 18: 605-612
- 8 侯淑敏,陈长香.脑卒中患者便秘的原因分析及护理进展.护理实践与研究 2012; 9: 110-112
- 9 Rentz AM, van Hanswijck de Jonge P, Leyendecker P, Hopp M. Observational, nonintervention, multicenter study for validation of the Bowel Function Index for constipation in European countries. *Curr Med Res Opin* 2011; 27: 35-44 [PMID: 21083515 DOI: 10.1185/03007995.2010.535270]
- 10 潘小丽.脑卒中患者便秘原因分析及对策.护理实践与研究 2013; 10: 73-74
- 11 姜玥,宁文帅,李刚.脑卒中患者便秘的中医护理研究进展.解放军护理杂志 2010; 27: 839-840
- 12 徐清玲.耳穴贴压预防脑卒中急性期患者便秘的效果观察.中医药导报 2010; 16: 121-122
- 13 王俊灵,付晓红.耳穴压豆预防脑卒中急性期便秘的护理.全科护理 2009; 7: 1512-1513
- 14 刘瑞华,王素娟,王尚书,陈长香,侯淑敏.饮食干预治疗脑卒中后便秘的疗效.中国老年学杂志 2013; 33: 2352-2353
- 15 Lim YH, Kim DH, Lee MY, Joo MC. Bowel dysfunction and colon transit time in brain-injured patients. *Ann Rehabil Med* 2012; 36: 371-378 [PMID: 22837973 DOI: 10.5535/arm.2012.36.3.371]
- 16 代怀静,王小静,韩福红.护理干预对脑卒中患者便秘及预后的影响.齐鲁护理杂志 2010; 16: 34-35
- 17 颜国慧,王欣,李钰燕,梁琼珍,黄七林,吕静玉.系统化护理干预在预防脑卒中患者便秘的效果分析.现代临床护理 2009; 8: 11-13

■同行评价

本研究设计简单实用,可操作性强,有一定的参考价值。

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



EMG肌电生物反馈训练系统治疗功能性便秘患者的远期疗效及护理对策

王少萍, 刘欢欢, 许晨耘

■背景资料

生物反馈治疗功能性便秘是利用生物反馈原理进行排便训练, 该方法利用电子技术将患者的生理、生化过程通过仪器内部复杂转化成患者可以接受的光、声、图像等反馈信息, 患者在形象化的视觉和听觉指导下, 练习正确的排便锻炼, 纠正不协调的排便动作。患者通过学习, 可以在某种意义上控制自身的生理、生化过程, 从而达到控制排便的目的。

王少萍, 刘欢欢, 许晨耘, 海南省人民医院心血管内科 海南省海口市 570311

王少萍, 副主任护师, 主要从事内分泌科的临床护理与糖尿病的教育。

海南省重点科技基金资助项目, No. ZDXM20130072

作者贡献分布: 王少萍负责课题的设计与论文写作; 刘欢欢与许晨耘参与研究过程并进行数据分析。

通讯作者: 王少萍, 副主任护师, 570311, 海南省海口市秀英区秀华路19号, 海南省人民医院心血管内科。

wangshaoping8363@163.com

收稿日期: 2014-04-03 修回日期: 2014-05-10

接受日期: 2014-05-19 在线出版日期: 2014-07-08

Biofeedback therapy for functional constipation: Long-term efficacy and nursing measures

Shao-Ping Wang, Huan-Huan Liu, Chen-Yun Xu

Shao-Ping Wang, Huan-Huan Liu, Chen-Yun Xu, Department of Cardiovascular Internal Medicine, Hainan People's Hospital, Haikou 570311, Hainan Province, China
Supported by: Intensive Science and Technology Plan of Hainan Province, No. ZDXM20130072

Correspondence to: Shao-Ping Wang, Associate Chief Nurse, Department of Cardiovascular Internal Medicine, Hainan People's Hospital, 19 Xiuhua Road, Xiuying District, Haikou 570311, Hainan Province, China. wangshaoping8363@163.com

Received: 2014-04-03 Revised: 2014-05-10

Accepted: 2014-05-19 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To assess the long-term efficacy of biofeedback treatment (BF) for functional constipation (FC) and to discuss the nursing measures.

METHODS: One hundred and fifty FC patients who underwent BF were retrospectively analyzed. The clinical symptoms and anorectal manometry results before and after BF were compared. The long-term efficacy of biofeedback treatment and the related nursing measures were assessed.

RESULTS: The numbers of patients with typical clinical symptoms decreased significantly

3 and 6 mo after treatment compared with before treatment ($P < 0.05$). There were no significant differences in the rectal resting pressure and the maximum constriction pressure between before and after treatment. However, the initial defecation perception threshold and the anorectal inhibitory reflex threshold were significantly higher after treatment than before treatment ($41.65 \text{ mL} \pm 6.74 \text{ mL}$ vs $29.41 \text{ mL} \pm 4.97 \text{ mL}$, $67.12 \text{ mL} \pm 9.55 \text{ mL}$ vs $47.25 \text{ mL} \pm 8.34 \text{ mL}$, $P < 0.05$). Univariate and multivariate analyses showed that the long-term efficacy of BF treatment was positively correlated with patient compliance and utilization of social support, and negatively correlated with age, disease course and other diseases.

CONCLUSION: BF therapy can improve clinical symptoms of FC patients and correct physiological dysfunction, having satisfactory long-term efficacy.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Biofeedback treatment; Functional constipation; Long-term efficacy; Nursing measures

Wang SP, Liu HH, Xu CY. Biofeedback therapy for functional constipation: Long-term efficacy and nursing measures. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2804-2808 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2804.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2804>

摘要

目的: 探讨生物反馈治疗功能性便秘的远期疗效及护理对策。

方法: 对150例接受生物反馈治疗治疗的功能性便秘患者进行回顾性随访, 比较患者功能性便秘治疗前和随访时的临床症状和肛门直肠测压结果, 评价功能性便秘治疗的远期疗效及其相关影响因素。

结果: 治疗后3 mo随访和6 mo随访时具有临

■同行评议者

任粉玉, 教授, 延边大学附属医院消化内科

床症状的人数比治疗前明显减少, 差异具有统计学意义($P<0.05$). 治疗后患者的直肠静息压和最大缩窄压与治疗前相差不大, 差异不具有统计学意义($P>0.05$). 而治疗后的初次排便感觉阈值和直肠肛门抑制反射阈值明显比治疗前降低($41.65\text{ mL}\pm 6.74\text{ mL}$ vs $29.41\text{ mL}\pm 4.97\text{ mL}$, $67.12\text{ mL}\pm 9.55\text{ mL}$ vs $47.25\text{ mL}\pm 8.34\text{ mL}$), 差异具有统计学意义($P<0.05$). 多因素分析结果显示, 生物反馈治疗治疗的远期疗效与患者依从性和社会支持利用度正相关, 与年龄、病程和基础性疾病呈负相关.

结论: 生物反馈治疗能改善功能性便秘患者临床症状, 纠正生理功能障碍, 具有较好的远期疗效.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 生物反馈治疗; 功能性便秘; 远期疗效; 护理

核心提示: 本研究中腹胀、腹痛、排便不畅、肛门堵塞和长期无便意均比治疗前显著减少, 表明生物反馈治疗能明显的减轻功能性便秘患者症状. 其原理可能为生物反馈治疗能减弱肛门外括约肌静息电位、加快结肠的有效转运, 改善肛门内、外括约肌矛盾运动、提高排便肌群的肌肉力量和整体肌群的协调性, 从而改善了功能性便秘患者的肛门排便生理功能并能维持远期疗效. 治疗后肠肛门抑制反射域和初次排便感觉阈值与治疗前相比明显降低, 这表明生物反馈能有效的治疗功能性便秘患者从理论数据上得到了验证.

王少萍, 刘欢欢, 许晨耘. EMG肌电生物反馈训练系统治疗功能性便秘患者的远期疗效及护理对策. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2804-2808 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2804.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i19.2804>

0 引言

随着生活水平的提高以及社会压力的增大, 便秘发病率近年来呈高发趋势. 据统计, 慢性长期便秘发病率5%-8%左右, 且发病有低龄化趋势, 慢性长期便秘已经严重影响了人们的生活质量^[1]. 功能性便秘(functional constipation, FC)指的是排除消化系器质性病变外的, 由于胃肠动力障碍或胃肠菌落紊乱而引起的习惯性便秘或单纯性便秘, 患者主要临床症状为排便困难, 排便间隔时间长或粪便坚硬. 目前临床上治疗功能性便秘没有特效药, 治疗方式主要依靠外

用开塞露、甘油栓或内服泻剂等治疗方式, 但是这些治疗手段效果一般, 治疗后病情容易反复, 远期疗效不明显, 甚至能够诱发癌变^[2]. 生物反馈治疗是一种无手术创伤、安全、无不良作用生物行为治疗方法, 逐渐成为国内外的研究热点, 但据各家报道治疗效果不一. 本院自2010-02/2012-08对150例功能性便秘患者使用生物反馈治疗, 对治疗效果进行分析并跟踪随访6-12 mo, 现将研究资料报道如下. 本研究探讨了生物反馈治疗慢性功能性便秘的长期疗效和护理对策, 旨在为功能性便秘的治疗和康复提供可行性指导.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2010-02/2012-08在我院消化内科收治的150例功能性便秘患者. 其中男65例, 女85例, 年龄67-78岁, 平均 $71.3\text{岁}\pm 5.1\text{岁}$, 体质量45-65 kg, 平均体质量 $57.3\text{ kg}\pm 9.3\text{ kg}$. 所有患者治疗前都要排除消化系器质性病变以及其他基础性内科疾病对患者的影响, 按照罗马III诊断标准确诊^[3]. 其中出口梗阻性便秘患者98例, 慢传输型便秘患者31例, 混合便秘患者21例, 平均病程 $10.2\text{年}\pm 2.1\text{年}$. 通过电话或者复诊时随访6-12 mo, 方式采用问卷调查.

1.2 方法

1.2.1 生物反馈治疗: 我院采用进口品牌Orion-PC/12EMG肌电生物反馈训练系统进行功能性便秘的治疗. 首先医生指导患者正确掌握仪器操作方法, 熟悉各种按键; 识别各种生理、生化图像; 训练患者掌握收肛、缩肛、如何增加腹压等动作要领. 一个疗程大约10 d左右, 每天大约50 min. 结束1-2个疗程后为巩固训练阶段, 在此期间每天进行3次治疗, 每次30 min, 巩固训练5 d. 如果家庭条件许可, 可以鼓励患者在家人陪同下治疗.

1.2.2 护理对策: 要特别注重对治疗期间患者的心理护理干预, 给予患者完成自我改造, 重塑新生的信心. 治疗前应掌握患者的具体个人背景、性格、文化程度等方面因素. 遵循“真诚、耐心、细致”的原则, 与患者进行语言交流, 注意运用暗示和赞扬手段, 能使患者感受到自信和满足感, 认识到依从性和意志力是治疗的成败所在, 避免半途而废^[4,5]. 治疗中采用心理激励方法, 不断用语言刺激患者完成每个基本动作, 让患者能成功建立起排便反射的信号传

■研究前沿

目前临床上治疗功能性便秘没有特效药, 治疗方式主要依靠外用开塞露、甘油栓或内服泻剂等治疗方式, 但是这些治疗手段效果一般, 治疗后病情容易反复, 远期疗效不明显, 甚至能够诱发癌变.

■相关报道

据统计, 慢性长期便秘发病率5%-8%, 且发病有低龄化趋势, 慢性长期便秘已经严重影响了人们的生活质量.

■应用要点

生物反馈治疗能改善功能性便秘患者临床症状,获得较好的治疗效果,远期疗效肯定,可以在临床上广泛推广利用,同时在治疗过程中给予科学合理的护理干预对治疗效果有促进作用。

表 1 治疗前后直肠前后压力测定比较 (mean $\pm$ SD)

测定参数	治疗前	治疗后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
直肠静息压(mmHg)	12.72 $\pm$ 5.21	13.42 $\pm$ 7.46	1.264	0.897
最大缩榨压(mmHg)	147.34 $\pm$ 23.52	153.85 $\pm$ 34.12	1.976	0.764
直肠肛门抑制反射阈值(mL)	41.65 $\pm$ 6.74	29.41 $\pm$ 4.97	2.176	0.041
初次排便感觉阈值(mL)	67.12 $\pm$ 9.55	47.25 $\pm$ 8.34	2.976	0.035

表 2 功能性便秘患者生物反馈治疗远期疗效影响因素的多因素回归分析

变量	回归系数	标准误	标准化的回归系数	<i>P</i> 值
年龄	-0.013	0.006	-0.197	0.019
病程	-0.019	0.007	-0.215	0.031
患者依从性	0.053	0.021	0.413	0.010
基础性疾病	-0.023	0.002	-0.219	0.021
社会支持利用度	0.033	0.011	0.313	0.008

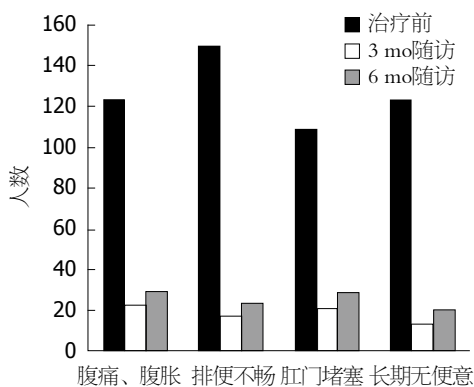


图 1 治疗前后不同时期临床症状比较。

导通路,敦促培养患者定时定点排便的习惯,做好饮食控制,患者食材以高纤维食物为主,注意多喝水,勤加运动^[6,7]。

1.2.3 评价: (1)治疗前后临床效果比较,包括腹胀、排便不畅、肛门堵塞、长期无便意等症状; (2)治疗前后直肠前后压力测定比较,包括直肠静息压、最大缩榨压、初次排便感觉阈值和直肠肛门抑制反射域; (3)功能性便秘患者生物反馈治疗远期疗效影响因素的多因素回归分析。

统计学处理 所有数据结果均采用SPSS16.0统计软件处理,计量资料采用*t*检验或方差分析,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 治疗前后临床症状比较 治疗前后临床症状比较如图1所示。结果证明,治疗后3 mo随访时

患者的临床症状,如腹胀、腹痛23例(15%)、排便不畅17例(12%)、肛门堵塞21例(14%)和长期无便意14例(10%)均比治疗前显著减少,差异具有统计学意义($P<0.05$)。治疗后6 mo随访时患者的临床症状,腹胀、腹痛30例(20%)、排便不畅24例(16%)、肛门堵塞29例(20%)和长期无便意21例(14%)均比治疗前显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 治疗前后直肠前后压力测定比较 治疗前后直肠前后压力测定比较如表1所示。结果证明,经过治疗后功能性便秘患者的直肠静息压和最大缩榨压治疗前的数据相比差异无统计学意义($P<0.05$)。而直肠肛门抑制反射阈值和初次排便感觉阈值与治疗前相比明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 功能性便秘患者生物反馈治疗远期疗效影响因素的多因素回归分析 功能性便秘患者生物反馈治疗远期疗效影响因素的多因素的回归分析如表2所示,结果提示患者依从性和社会支持利用度两个因素与远期治疗效果呈正相关。远期治疗效果与年龄、病程和基础性疾病呈负相关。

3 讨论

功能性便秘发病率高,症状繁多,患者患病时间较长,治疗时应采取因人施治的原则。传统治疗方法有增加食物纤维及水的摄入量、定时排便、服用泻药等^[8]。随着医疗技术的进步,生物反馈治疗功能性便秘越来越受到临床医生关注,

其作为全新的生物行为治疗手段, 无手术创伤, 无不良作用, 具有良好的使用前景, 尤其是在治疗慢性功能性便秘方面更显示出其无与伦比的优点。

本研究中腹胀、腹痛、排便不畅、肛门堵塞和长期无便意均比治疗前显著减少, 表明生物反馈治疗能明显减轻功能性便秘患者症状。其原理可能为生物反馈治疗能减弱肛门括约肌静息电位、加快结肠的有效转运, 改善肛门内、外括约肌矛盾运动、提高排便肌群的肌肉力量和整体肌群的协调性, 从而改善了功能性便秘患者的肛门排便生理功能并能维持远期疗效^[9,10]。治疗后肠肛门抑制反射域和初次排便感觉阈值与治疗前相比明显降低, 这表明生物反馈能有效治疗功能性便秘患者从理论数据上得到了验证。其原因是生物反馈治疗可以明显促进便秘患者的结肠节律性蠕动, 增强排便反射的神经传导途径^[11]。功能性便秘患者生物反馈治疗远期疗效影响因素的多因素回归分析表明, 患者依从性和社会支持利用度两个因素与远期疗效呈正相关, 与患者年龄、病程和基础性疾病呈负相关。其主要原因可能为生物反馈治疗作为生物行为治疗手段, 患者的主观能动性对治疗效果起到关键性作用, 通过社会支持可提高患者的自信心和依从性, 能否获得患者的积极主动的配合治疗是成败关键所在^[12-14]。而年龄、病程、基础性疾病与生物反馈治疗远期疗效呈负相关, 这可能是由于高龄多病患者其依从性差, 不容易坚持完成治疗过程所致, 因此不是独立的有效影响因素。但是不能排除这些影响因素间接性地影响远期疗效^[15]。

总之, 生物反馈治疗能改善功能性便秘患者临床症状, 获得较好的治疗效果, 远期疗效肯定, 可以在临床上广泛推广利用, 同时在治疗过程中给予科学合理的护理干预对治疗效果有促进作用。

4 参考文献

- 1 Lindberg G, Hamid SS, Malfetheriner P, Thomsen OO, Fernandez LB, Garisch J, Thomson A, Goh KL, Tandon R, Fedail S, Wong BC, Khan AG, Krabshuis JH, LeMair A. World Gastroenterology Organisation global guideline: Constipation-a global perspective. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 483-487 [PMID: 21666546 DOI: 10.1097/MCG.0b013e31820fb914]
- 2 Chiarioni G, Whitehead WE, Pezza V, Morelli A, Bassotti G. Biofeedback is superior to laxatives for normal transit constipation due to pelvic floor dys-synergia. *Gastroenterology* 2006; 130: 657-664 [PMID: 16530506 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.11.014]
- 3 Rao SS, Seaton K, Miller M, Brown K, Nygaard I, Stumbo P, Zimmerman B, Schulze K. Randomized controlled trial of biofeedback, sham feedback, and standard therapy for dyssynergic defecation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 331-338 [PMID: 17368232 DOI: 10.1016/j.cgh.2006.12.023]
- 4 Xiong GY, Zhao ZQ. Clinical significance of functional constipation categorized by colonic transit time and pelvic floor electromyography. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 156-159 [PMID: 15612884 DOI: 10.1111/j.1443-9573.2004.00177.x]
- 5 Heymen S, Jones KR, Scarlett Y, Whitehead WE. Biofeedback treatment of constipation: a critical review. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1208-1217 [PMID: 12972965 DOI: 10.1007/s10350-004-6717-8]
- 6 Rao SS, Valestin J, Brown CK, Zimmerman B, Schulze K. Long-term efficacy of biofeedback therapy for dyssynergic defecation: randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 890-896 [PMID: 20179692 DOI: 10.1038/ajg.2010.53]
- 7 Emmanuel AV, Kamm MA. Response to a behavioural treatment, biofeedback, in constipated patients is associated with improved gut transit and autonomic innervation. *Gut* 2001; 49: 214-219 [PMID: 11454797 DOI: 10.1136/gut.49.2.214]
- 8 Lee BH, Kim N, Kang SB, Kim SY, Lee KH, Im BY, Jee JH, Oh JC, Park YS, Lee DH. The Long-term Clinical Efficacy of Biofeedback Therapy for Patients With Constipation or Fecal Incontinence. *J Neurogastroenterol Motil* 2010; 16: 177-185 [PMID: 20535349 DOI: 10.5056/jnm.2010.16.2.177]
- 9 Moran CG, Wenn RT, Sikand M, Taylor AM. Early mortality after hip fracture: is delay before surgery important? *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 483-489 [PMID: 15741611 DOI: 10.2106/JBJS.D.01796]
- 10 Clague JE, Craddock E, Andrew G, Horan MA, Pendleton N. Predictors of outcome following hip fracture. Admission time predicts length of stay and in-hospital mortality. *Injury* 2002; 33: 1-6 [PMID: 11879824 DOI: 10.1016/S0020-1383(01)00142-5]
- 11 Schwartz AV, Nevitt MC, Brown BW, Kelsey JL. Increased falling as a risk factor for fracture among older women: the study of osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol* 2005; 161: 180-185 [PMID: 15632268 DOI: 10.1093/aje/kwi023]
- 12 Praticò C, Quattrone D, Lucanto T, Amato A, Penna O, Roscitano C, Fodale V. Drugs of anesthesia acting on central cholinergic system may cause post-operative cognitive dysfunction and delirium. *Med Hypotheses* 2005; 65: 972-982 [PMID: 16043305 DOI: 10.1016/j.mehy.2005.05.037]
- 13 Insall JN, Ranawat CS, Aglietti P, Shine J. A comparison of four models of total knee-replacement prostheses. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58: 754-765 [PMID: 956219]
- 14 García-de-Lorenzo A, Zarazaga A, García-Luna PP, Gonzalez-Huix F, López-Martínez J, Miján A, Quecedo L, Casimiro C, Usán L, del Llano J. Clinical evidence for enteral nutritional support with glutamine: a systematic review. *Nutrition* 2003; 19: 805-811 [PMID: 12921894 DOI: 10.1016/S0899-9007(03)00103-5]

■同行评价

本研究选题实用, 方法合理, 结果可靠, 对临床有一定的参考价值。

- 15 Davis FM, Woolner DF, Frampton C, Wilkinson A, Grant A, Harrison RT, Roberts MT, Thadaka R. Prospective, multi-centre trial of mortality following general or spinal anaesthesia for hip fracture surgery in the elderly. *Br J Anaesth* 1987; 59: 1080-1088 [PMID: 3311100 DOI: 10.1093/bja/59.9.1080]

编辑 田滢 电编 都珍珍



含左氧氟沙星5日伴同疗法根除幽门螺杆菌感染的疗效

周颖, 许琦华, 周忠杰, 董跃滨

周颖, 许琦华, 周忠杰, 董跃滨, 上海市第七人民医院消化科内镜室 上海市 200137

周颖, 主治医师, 主要从事消化内镜的相关研究.

浦东新区卫生系统青年医学人才培养基金资助项目, No. PWRq2012-29

作者贡献分布: 数据分析、论文写作由周颖完成; 研究过程由周颖、许琦华、周忠杰及董跃滨操作完成.

通讯作者: 周颖, 主治医师, 200137, 上海市浦东新区大同路358号, 上海市第七人民医院消化科内镜室. loverabbi@hotmail.com
电话: 021-50123408

收稿日期: 2014-04-02 修回日期: 2014-04-21

接受日期: 2014-04-30 在线出版日期: 2014-07-08

Efficacy of 5-day levofloxacin-containing concomitant therapy in eradicating *Helicobacter pylori* infection

Ying Zhou, Qi-Hua Xu, Zhong-Jie Zhou, Yue-Bin Dong

Ying Zhou, Qi-Hua Xu, Zhong-Jie Zhou, Yue-Bin Dong, Department of Gastroenterology, Shanghai 7th People's Hospital, Shanghai 200137, China

Supported by: the Foundation for Excellent Young Medical Talents in Health System of Pudong New District, No. PWRq2012-29

Correspondence to: Ying Zhou, Attending Physician, Department of Gastroenterology, Shanghai 7th People's Hospital, 358 Datong Road, Pudong New District, Shanghai 200137, China. loverabbi@hotmail.com

Received: 2014-04-02 Revised: 2014-04-21

Accepted: 2014-04-30 Published online: 2014-07-08

Abstract

AIM: To assess the efficacy and safety of 5-day levofloxacin-containing concomitant therapy in eradicating of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection.

METHODS: One hundred and sixty patients with *H. pylori* infection who did not receive eradication therapy were randomly assigned to two groups to receive 5-day levofloxacin-containing concomitant therapy and 10-day sequential therapy, respectively. The eradication effect was assessed by the ¹⁴C-urea breath test at 4 wk after treatment. Adverse events were recorded.

RESULTS: According to intention-to-treat (ITT) analysis, the eradication rates of *H. pylori* in

the concomitant therapy group and sequential therapy group were 90% and 91.25%, respectively. According to per-protocol (PP) analysis, the eradication rates were 92.31% and 92.41%, respectively. The ITT and PP eradication rates in the concomitant therapy group were not inferior to those in the sequential therapy group ($P < 0.05$). The rates of adverse events were 11.25% and 13.757%, respectively ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The 5-day levofloxacin-containing concomitant therapy is as effective and safe in eradicating *H. pylori* infection as the 10-day levofloxacin-containing sequential therapy.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Levofloxacin; Sequential therapy; Concomitant therapy

Zhou Y, Xu QH, Zhou ZJ, Dong YB. Efficacy of 5-day levofloxacin-containing concomitant therapy in eradicating *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2809-2812 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2809.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2809>

摘要

目的: 观察含左氧氟沙星5日伴同疗法对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)的根除效果和安全性.

方法: 既往未接受过*H. pylori*根除治疗的*H. pylori*阳性感染患者160例, 随机分为含左氧氟沙星5日伴同疗法组(病例组)和10日序贯疗法组(对照组). 疗程结束4 wk后行¹⁴C-尿素呼气试验判断两组的*H. pylori*根除效果, 同时比较两组不良反应.

结果: 按意向性治疗(intention-to-treat, ITT)分析, 病例组根除率为90%, 对照组为91.25%; 按符合方案集(per-protocol, PP)分析, 病例组92.31%, 对照组为92.41%. 病例组的ITT、PP根除率非劣效于对照组, $P < 0.05$. 两组间不良反应发生率分别为11.25%及13.75%, $P > 0.05$.

■背景资料

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关性淋巴瘤、胃癌的发病有着密切的关系, 根除*H. pylori*是防治上述各种疾病发生、发展以及复发的重要途径, 可降低胃癌发生危险性.

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 主任医师, 博士生导师, 副院长, 郑州大学第二附属医院消化科

■研发前沿

根据Mastricht IV/Florence共识,我国作为克拉霉素高耐药率地区,推荐采用铋剂四联疗法、序贯疗法、伴同疗法作为根除*H. pylori*一线方案。目前,序贯疗法和伴同疗法作为一线治疗方案的根除效果,国内外研究结果尚存在争议。

结论:含左氧氟沙星5日伴同疗法能达到与10日序贯疗法相近的根除率,能有效根除*H. pylori*,且安全性良好,有望作为一有效的初治方案。

© 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;左氧氟沙星;序贯疗法;伴同疗法

核心提示:含左氧氟沙星5日伴同疗法能达到与10日序贯疗法相近的根除率,能有效根除幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*),且安全性良好。

周颖, 许琦华, 周忠杰, 董跃滨. 含左氧氟沙星5日伴同疗法根除幽门螺杆菌感染的疗效. 世界华人消化杂志 2014; 22(19): 2809-2812 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2809.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2809>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关性淋巴瘤的发病有着密切的关系,长期的*H. pylori*感染可能是促使胃癌发病的重要原因。而根除*H. pylori*是防治上述各种疾病发生、发展以及复发的重要途径,可降低胃癌发生的危险性^[1]。含左氧氟沙星5日伴同疗法是在10日序贯疗法基础上提出的根除*H. pylori*新方案, Federico等^[2]的研究表明,含左氧氟沙星的5日伴同疗法安全有效,且患者依从性较好,医疗支出减少。本研究观察含左氧氟沙星5日伴同疗法根除*H. pylori*的效果和安全性,评价该根除*H. pylori*方案的临床可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 2012-10/2013-09在上海市第七人民医院消化科就诊,胃镜提示消化性溃疡和/或慢性胃炎伴糜烂,既往未接受过*H. pylori*根除治疗的*H. pylori*阳性感染患者160例。本研究方案通过上海市第七人民医院伦理委员会审批,所有患者受检前签署知情同意书。纳入标准: (1)年龄>18岁及<70岁; (2)*H. pylori*阳性,之前未接受过根除治疗,且本次检查前2 wk未使用抑酸剂、铋剂及相关抗生素。排除标准: (1)对实验药物过敏者; (2)心、肝肾功能异常者; (3)曾行消化系手术者; (4)有恶性肿瘤病史; (5)不能签署知情同意者。埃索美拉唑,规格: 每片20 mg,阿斯利康有限公司生产; 左氧氟沙星,规格: 每片0.5 g,上海中西三维药业有限公司生产; 阿莫西林,规格:

每片0.5 g, 珠海联邦制药有限公司生产; 替硝唑,规格: 每片0.5 g, 山东方明药业股份有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组和治疗: 160例患者随机分为病例组和对照组,每组各80例,两组患者在年龄、性别、病因等一般情况比较无显著性差异(表1)。病例组(含左氧氟沙星5日伴同疗法): 予埃索美拉唑20 mg *bid*+左氧氟沙星0.5 g *bid*+阿莫西林1.0 g *bid*+替硝唑0.5 g *bid*,口服5 d; 对照组(含左氧氟沙星10日序贯疗法): 予埃索美拉唑(20 mg *bid*+阿莫西林1.0 g *bid*)5 d,埃索美拉唑(20 mg *bid*+左氧氟沙星0.5 g *bid*+替硝唑0.5 g *bid*),口服5 d。入组后详细记录患者一般情况及用药后不良反应。于疗程结束4 wk后行¹⁴C-尿素呼气试验检测,检测值≥100为阳性,<100为阴性,阴性者定为根除成功。

1.2.2 观察指标: (1)组间*H. pylori*根除率: 采用按意向治疗分析(intention-to-treat, ITT)和按符合方案集分析(per-protocol, PP)两种方法。ITT分析包括所有至少服用了一次治疗的患者,PP分析包括按规定完成研究方案和随访的患者; (2)不良反应: 腹痛、腹泻、纳差、味觉异常、头痛、皮疹、恶心、呕吐等,记录用药过程中不良反应的发生情况。不良反应分为4级: 无: 无任何不良反应; 轻度: 轻度不适,不影响生活及工作; 中度: 中度不适,在一定程度上影响生活及工作,但仍可以继续工作; 重度: 严重不适,不能从事工作,必须全休及停药。

统计学处理 应用ITT及PP计算*H. pylori*根除率。计数资料用百分率表示,不良反应发生率的比较采用 χ^2 检验,*H. pylori*根除率的比较采用非劣效性检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *H. pylori*根除率比较 研究结束时有3例患者失访,病例组失访2例,对照组失访1例,失访率为1.8%。最后符合方案集分析病例共157例,病例组78例,对照组79例。病例组及对照组ITT根除率分别为90%(72/80)及91.25%(73/80),PP根除率分别为92.31%(72/78)及92.41%(73/79),病例组ITT及PP根除率非劣效于对照组($P<0.05$)。

2.2 不良反应发生率比较 部分患者出现口苦、恶心、纳差等不良反应(表2),病例组9例患者出现一种或多种不良反应,对照组发生不良反应11例,但反应均为轻中度不适,不影响治

■相关报道

由于各地区*H. pylori*毒力基因型及对主要抗生素的耐药情况、治疗方案中质子泵抑制剂及抗生素的选择、用药剂量的不同、治疗时间的不同、入组患者的选择等原因,序贯疗法和伴同疗法的根除效果,国内外研究结果尚存在争议。

表 1 两组患者一般资料 ($n = 80$)

一般资料	含左氧氟沙星 5日伴同疗法	含左氧氟沙星 10日序贯疗法
年龄(岁)	39.88 ± 11.08	43.31 ± 10.89
性别(男/女)	48/32	46/34
病因		
慢性胃炎伴糜烂	53	49
胃溃疡	3	5
十二指肠球部溃疡	24	26

疗, 无需停药及特殊处理, 服药期间或疗程结束停药后自行消失. 两组间不良反应发生率分别为11.25%及13.75%, 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$).

3 讨论

随着 *H. pylori* 根除治疗的普及和推广, 既往作为一线方案的标准三联疗法的根除率已降到80%以下^[3]. 马斯特里赫特IV/佛罗伦萨(Maastricht IV/Florence)共识指出, 克拉霉素耐药是导致标准三联疗法根除失败的最主要原因, 推荐根据克拉霉素地区耐药情况选择根除方案, 在克拉霉素耐药 $\geq 20\%$ 的地区, 摒弃含克拉霉素的三联方案. 我国作为克拉霉素高耐药率地区, 推荐采用铋剂四联疗法、序贯疗法、伴同疗法作为根除 *H. pylori* 一线方案^[4].

目前, 序贯疗法和伴同疗法作为一线治疗方案的根除效果, 国内外研究结果尚存在争议^[5-12], 这与各地区 *H. pylori* 毒力基因型及对主要抗生素的耐药情况、治疗方案中质子泵抑制剂及抗生素的选择、用药剂量的不同、治疗时间的不同、入组患者的选择等有关. 国内外有报道^[2, 12-14]含左氧氟沙星的序贯疗法及伴同疗法 *H. pylori* 根除率可达到90%以上. 其中, 由Federico等^[2]提出的含左氧氟沙星的5日伴同疗法安全有效, 治疗时间短, 患者依从性较好, 医疗支出减少, 且对克拉霉素、替硝唑、左氧氟沙星耐药者的根除效果良好. 在我国, Qian等^[15]研究报道, 含左氧氟沙星的序贯疗法根除效果优于标准序贯疗法和含左氧氟沙星7日三联疗法, 但根除率低于国外报道. 含左氧氟沙星伴同疗法根除效果国内尚不明确.

本研究中含左氧氟沙星5日伴同疗法ITT根除率为90%, PP根除率为91.03%, 含左氧氟沙星序贯疗法ITT根除率为92.31%, PP根除率为

表 2 两组患者不良反应情况 ($n = 80$)

不良反应	含左氧氟沙星 5日伴同疗法	含左氧氟沙星 10日序贯疗法
腹痛	0	0
腹泻	0	0
纳差	1	3
味觉异常	7	6
头痛	0	0
皮疹	0	0
恶心	1	2
呕吐	0	0
总计	9	11

92.41%, 两种疗法均能有效根除 *H. pylori*. 本研究中含左氧氟沙星序贯疗法根除率高于Qian等^[15]报道的82.8%、86.5%, 可能与研究中左氧氟沙星剂量较大, 及不同地区抗生素的耐药情况不同有关. 研究提示含左氧氟沙星5日伴同疗法虽然需要在短期内四联用药, 但用药周期较短, 患者多数能够耐受, 两组不良反应发生率分别为11.25%及13.75%, 无显著性差异.

总之, 含左氧氟沙星5日伴同疗法能达到与10日序贯疗法相近的根除率, 能有效根除 *H. pylori*, 且安全性良好.

志谢: 感谢第二军医大学附属长海医院消化科金震东教授, 作为人才培养项目院外导师对该课题实施及论文撰写过程中的指导和帮助!

4 参考文献

- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. Management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61: 646-664 [PMID: 22491499 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302084]
- Federico A, Nardone G, Gravina AG, Iovene MR, Miranda A, Compare D, Piloni PA, Rocco A, Ricciardiello L, Marmo R, Loguercio C, Romano M. Efficacy of 5-day levofloxacin-containing concomitant therapy in eradication of Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* 2012; 143: 55-61. e1; quiz e13-e14 [PMID: 22484118 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.03.043]
- Graham DY, Fischbach L. Helicobacter pylori treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 2010; 59: 1143-1153 [PMID: 20525969 DOI: 10.1136/gut.2009.192757]
- 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组. 第四届全国幽门螺杆菌感染处理共识报告. *中华内科杂志* 2012; 51: 832-837
- Zullo A, De Francesco V, Hassan C, Morini S, Vaira

■创新盘点

含左氧氟沙星伴同疗法根除效果国内尚不明确. 本研究观察含左氧氟沙星5日伴同疗法对 *H. pylori* 的根除效果和安全性, 评价该根除 *H. pylori* 方案的临床可行性.

■应用要点

左氧氟沙星5日伴同疗法和序贯疗法均能有效根除 *H. pylori*, 伴同疗法虽然需要在短期内四联用药, 但用药周期较短, 患者多数能够耐受, 安全性良好, 有望作为一有效的初治方案.

■同行评价

本文设计合理, 中英文写作规范, 对 *H. pylori* 治疗有一定的临床意义。

- D. The sequential therapy regimen for *Helicobacter pylori* eradication: a pooled-data analysis. *Gut* 2007; 56: 1353-1357 [PMID: 17566020]
- 6 Wu DC, Hsu PL, Wu JY, Opekun AR, Kuo CH, Wu IC, Wang SS, Chen A, Hung WC, Graham DY. Sequential and concomitant therapy with four drugs is equally effective for eradication of *H. pylori* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 36-41.e1 [PMID: 19804842 DOI: 10.1016/j.cgh.2009.09.030]
- 7 Gisbert JP, Calvet X, O'Connor A, Mégraud F, O'Morain CA. Sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a critical review. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 313-325 [PMID: 20054285 DOI: 10.1097/MCG.0b013e3181c8a1a3]
- 8 Gisbert JP, Calvet X. Review article: non-bismuth quadruple (concomitant) therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 604-617 [PMID: 21745241 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04770.x]
- 9 Park HG, Jung MK, Jung JT, Kwon JG, Kim EY, Seo HE, Lee JH, Yang CH, Kim ES, Cho KB, Park KS, Lee SH, Kim KO, Jeon SW. Randomised clinical trial: a comparative study of 10-day sequential therapy with 7-day standard triple therapy for *Helicobacter pylori* infection in naïve patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 56-65 [PMID: 22066530 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04902.x]
- 10 Greenberg ER, Anderson GL, Morgan DR, Torres J, Chey WD, Bravo LE, Domínguez RL, Ferreccio C, Herrero R, Lazcano-Ponce EC, Meza-Montenegro MM, Peña R, Peña EM, Salazar-Martínez E, Correa P, Martínez ME, Valdivieso M, Goodman GE, Crowley JJ, Baker LH. 14-day triple, 5-day concomitant, and 10-day sequential therapies for *Helicobacter pylori* infection in seven Latin American sites: a randomised trial. *Lancet* 2011; 378: 507-514 [PMID: 21777974 DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60825-8]
- 11 Seddik H, Ahid S, El Adioui T, El Hamdi FZ, Hassar M, Abouqal R, Cherrah Y, Benkirane A. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a prospective randomized study. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: 1709-1715 [PMID: 23695545 DOI: 10.1007/s00228-013-1524-6]
- 12 Romano M, Cuomo A, Gravina AG, Miranda A, Iovene MR, Tiso A, Sica M, Rocco A, Salerno R, Marmo R, Federico A, Nardone G. Empirical levofloxacin-containing versus clarithromycin-containing sequential therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomised trial. *Gut* 2010; 59: 1465-1470 [PMID: 20947881 DOI: 10.1136/gut.2010.215350]
- 13 贾道全. 含左氧氟沙星序贯疗法根除幽门螺杆菌感染的方案讨论. *中华消化杂志* 2012; 32: 758
- 14 余艳秋, 王建宁, 翟启智, 朱祖明, 王川. 含左氧氟沙星的四联药物10日序贯疗法根除幽门螺杆菌疗效观察. *山东医药* 2013; 53: 64-65
- 15 Qian J, Ye F, Zhang J, Yang YM, Tu HM, Jiang Q, Shang L, Pan XL, Shi RH, Zhang GX. Levofloxacin-containing triple and sequential therapy or standard sequential therapy as the first line treatment for *Helicobacter pylori* eradication in China. *Helicobacter* 2012; 17: 478-485 [PMID: 23067317 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2012.00993.x]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静



肾移植术后腹痛为首表现的胃肠道功能障碍1例

李益飞, 曾仲, 马超龙, 刘涛

李益飞, 曾仲, 马超龙, 刘涛, 昆明医科大学第一附属医院器官移植科 云南省昆明市 650032

李益飞, 主要从事泌尿外科及器官移植的研究。

作者贡献分布: 本文写作由李益飞与刘涛完成; 曾仲与马超龙指导分析。

通讯作者: 曾仲, 教授, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医科大学第一附属医院器官移植科。

fei0456@126.com

电话: 0871-65324888-2437

收稿日期: 2014-03-06 修回日期: 2014-05-04

接受日期: 2014-05-06 在线出版日期: 2014-07-08

Key Words: Gastrointestinal dysfunction; Renal transplantation

Li YF, Zeng Z, Ma CL, Liu T. Abdominal pain as first clinical manifestation of gastrointestinal dysfunction following renal transplantation: A case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(19): 2813-2816 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2813.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2813>

■背景资料

肾移植术后胃肠道功能障碍表现不一, 临床表现较为隐匿, 多在全身性感染(如肺部感染、胃肠道感染)后出现胃肠道症状, 在临床上罕见, 因而在诊断及鉴别诊断中很容易被忽略。

Abdominal pain as first clinical manifestation of gastrointestinal dysfunction following renal transplantation: A case report

Yi-Fei Li, Zong Zeng, Chao-Long Ma, Tao Liu

Yi-Fei Li, Zong Zeng, Chao-Long Ma, Tao Liu, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Correspondence to: Zong Zeng, Professor, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. fei0456@126.com

Received: 2014-03-06 Revised: 2014-05-04

Accepted: 2014-05-06 Published online: 2014-07-08

Abstract

Gastrointestinal dysfunction with abdominal pain as the first clinical manifestation is a rare complication following renal transplantation, which always shows generalized infection such as pulmonary infection and gastrointestinal infection before the emergence of gastrointestinal symptoms. The symptoms of gastrointestinal dysfunction such as abdominal distention, decreased bowel sounds, stress ulcer, aseptic cholecystitis often results in misdiagnosis. Abdominal pain should be promptly evaluated for life-threatening acute abdominal diseases for each individual patient. Identifying the cause and prompt and effective treatment are key to successful management.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

摘要

肾移植术后腹痛为首表现胃肠道功能障碍较为少见, 在出现胃肠道症状前多有全身性感染如肺部感染、胃肠道感染等, 出现进行性腹部胀气、肠鸣音减弱、应激性溃疡, 无菌性胆囊炎等胃肠道功能障碍症状, 容易误诊, 完善相关检查明确腹痛的病因为外科性、内科性, 同时排除危重急腹症, 明确病因及及时有效治疗方式, 治疗成功率较高。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃肠道功能障碍; 肾移植

核心提示: 本文报告了1例31岁男性肾移植术后胃肠道功能障碍患者, 经完善相关检查后排除外科性腹痛后, 根据病原学培养结果调整抗生素加强抗感染治疗, 保护和恢复胃肠黏膜的屏障功能, 症状逐渐缓解, 为少见病例报告, 并结合国内外文献资料进行讨论, 对提高本病认识具有一定临床意义。

李益飞, 曾仲, 马超龙, 刘涛. 肾移植术后腹痛为首表现的胃肠道功能障碍1例. *世界华人消化杂志* 2014; 22(19): 2813-2816 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/2813.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i19.2813>

0 引言

感染是肾移植术后比较常见的并发症, 是肾移植患者死亡和发病最主要的原因。最常见的部位是肺, 泌尿系感染, 而全身重症感染在胃肠道功能障碍发生过程中发挥重要作用, 而胃肠道功能障碍可造成肠道细菌移位, 从而加重全身

■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

■ 研究前沿

肾移植术后胃肠道功能障碍如能早期发现、早期诊断与治疗预后良好, 因此早期诊断至关重要。

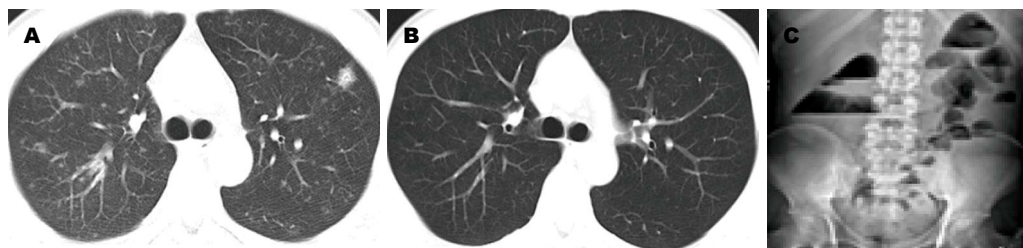


图1 治疗前后影像检查. A: 治疗前, 双肺小结节; B: 治疗后病灶明显吸收; C: 多个大小不等液气平。

表1 辅助检查结果

检查项目	n	mean ± SD	参考值
γ-谷氨酰转氨酶(IU/L)	34	946.89 ± 476.00	11-50
碱性磷酸酶(IU/L)	34	495.34 ± 257.68	40-150
尿素氮(mmol/L)	34	4.75 ± 1.77	2.8-7.2
肌酐(μmol/L)	34	116.33 ± 19.11	59-104
他克莫司(ng/mL)	29	6.92 ± 3.37	5-10
C-反应蛋白(mg/L)	5	25.88 ± 16.01	0-10
降钙素原(ng/mL)	5	2.31 ± 0.64	<0.5
白细胞($\times 10^9/L$)	34	7.54 ± 4.14	4-10
淋巴细胞($\times 10^9/L$)	34	1.01 ± 0.68	0.8-4.0
中性粒细胞($\times 10^9/L$)	34	5.56 ± 3.90	2-7

感染, 因此死亡率较高. 以腹痛为首表现的胃肠道功能障碍例较为罕见。

1 病例报告

患者, 男, 31岁, 因慢性肾小球肾炎、慢性肾功能衰竭(尿毒症期), 2012-10-16于本院行异体肾移植术, 供体为7岁患儿, 因车祸外伤医治无效, 被鉴定为心死亡反复核查各项指标均符合心死亡器官捐献(donation after cardiac death, DCD)国际标准. 供受体血型匹配, 为O, RH(+), HLA交叉配型4/8位点匹配, 群体反应性抗体(panel reaction antibody, PRA)、淋巴细胞毒试验(complement dependent cytotoxicity, CDC)阴性. 术中免疫诱导方案为: 环磷酰胺200 mg+巴利昔单抗20 mg+甲泼尼龙500 mg. 术后第4天肌酐下降至238.1 μmol/L. 予巴利昔单抗20 mg静脉滴注. 口服免疫抑制剂、激素, 方案为他克莫司2 mg, Q12H+吗替麦考酚酯胶囊, 750 mg, Q12H+醋酸泼尼松40 mg(5 mg/d递减至10 mg维持), 术后第6天肌酐下降至正常范围(106.5 μmol/L). 2012-12-06无明显诱因下出现中上腹绞痛不适, 并腹胀、恶心、呕吐, 与体位、进食、活动、呼吸无关, 发热, 体温最高为38.5 °C, 无寒战、黄疸; 无呕血、黑便等; 无血尿、尿频、尿急

等不适. 入院情况, 体温为37.4 °C, 右下腹部见陈旧性手术疤痕, 已经愈合, 肠鸣音3次/min, 中上腹压痛, 无反跳痛及肌紧张, 移植肾不大、质地中等入院时检查提示肌酐正常. 住院过程中尿量维持在1500-300 mL. 治疗后体温平稳, 维持在36 °C-37 °C、肠鸣音恢复正常(5次/min)、腹痛缓解出院. 辅助检查(表1): 动态监测血常规、血生化、淀粉酶、脂肪酶、尿量、体温、血药浓度、感染相关蛋白、G试验、肺部CT、移植肾B超结果. 因免疫抑制药物具有胃肠道不良反应, 予行胃镜(2012-12-12)示慢性浅表性胃炎(胃窦), 十二指肠球炎; 痰培养、咽拭子培养(2012-12-18/19): 热带假丝酵母菌; G试验: 162.1 pg/mL; 肺部CT提示双肺多发小结节, 经抗真菌治疗10 d后, 痰、咽拭子培养阴性; CT示双肺小结节明显吸收(图1), G试验结果明显下降. 肝胆胰脾平扫+增强+MRCP(2012-12-20): 少量腹水及胆囊窝积液, 小肠扩张积气. 立卧位腹部平片(2012-12-21)提示肠梗阻(图1), 禁食、胃肠道碘水造影治疗后腹胀、恶心等症状明显好转. 血CMV-DNA(2012-12-25): 2.7×10^6 拷贝/mL, 血呼吸道九项: 呼吸道合胞病毒、乙型流感病毒、腺病毒(+), 予更昔洛韦抗病毒治疗10 d后拷贝数下降至<5000 拷贝/mL(图2A), 腺病毒转阴; 粪细菌涂片革兰染色检查(2012-12-30)示革兰氏阴性杆菌、阳性杆菌、阴性球菌、阳性球菌分别为10%、5%、5%、75%, 酵母菌为5%, 稳可信、泰能治疗; 肠道益生菌调节肠道菌群2 wk后, 大便菌群分析示球杆/菌比为1:4. 入院后完善淀粉酶、脂肪酶、心肌酶谱、粪常规、TB-DNA、EB-DNA、D-二聚体、24 h动态心电图、肠系膜血管(三维重建)移植肾B超、心脏超声检查均无异常发现. 治疗: 免疫抑制剂方案调整: 停止泼尼松、MMF, 减少他克莫司剂量为0.5 mg, Q12H, 口服. 抗生素剂量使用情况(表2).

腹痛、体温、胆酶谱变化呈现阶段性变化的特点: (1)腹痛主要为绞痛, 症状与体征分离, 腹

表 2 抗生素调整治疗

抗生素	开始时间	停止时间
头孢哌酮他唑巴坦钠(2.25 g <i>bid</i>)	2012-12-11	2012-12-17
甲硝唑氯化钠(0.5 g <i>qd</i>)	2012-12-12	2012-12-17
伏立康唑(90.2 g Q12H)	2012-12-17	2013-01-05
米卡芬(150 mg <i>qd</i>)	2012-12-17	2012-12-25
头孢曲松钠(2 g <i>qd</i>)	2012-12-20	2012-12-25
莫西沙星(0.4 g <i>qd</i>)	2012-12-25	2012-12-30
米卡芬净(200 mg <i>qd</i>)	2012-12-25	2013-01-05
更昔洛韦(300 mg <i>bid</i>)	2012-12-25	2013-01-23
J亚胺培南西司他丁钠(0.5 g Q8H)	2012-12-30	2013-01-12
J盐酸万古霉素(1 Q12H)	2012-12-30	2013-01-12
伏立康唑(0.2 g Q12H)口服	2013-01-06	2013-01-23

■应用要点

本文在临床中对该病的诊断及治疗具有一定参考价值,但病例数较少,未来可增加病例数,能更好提供临床指导作用。

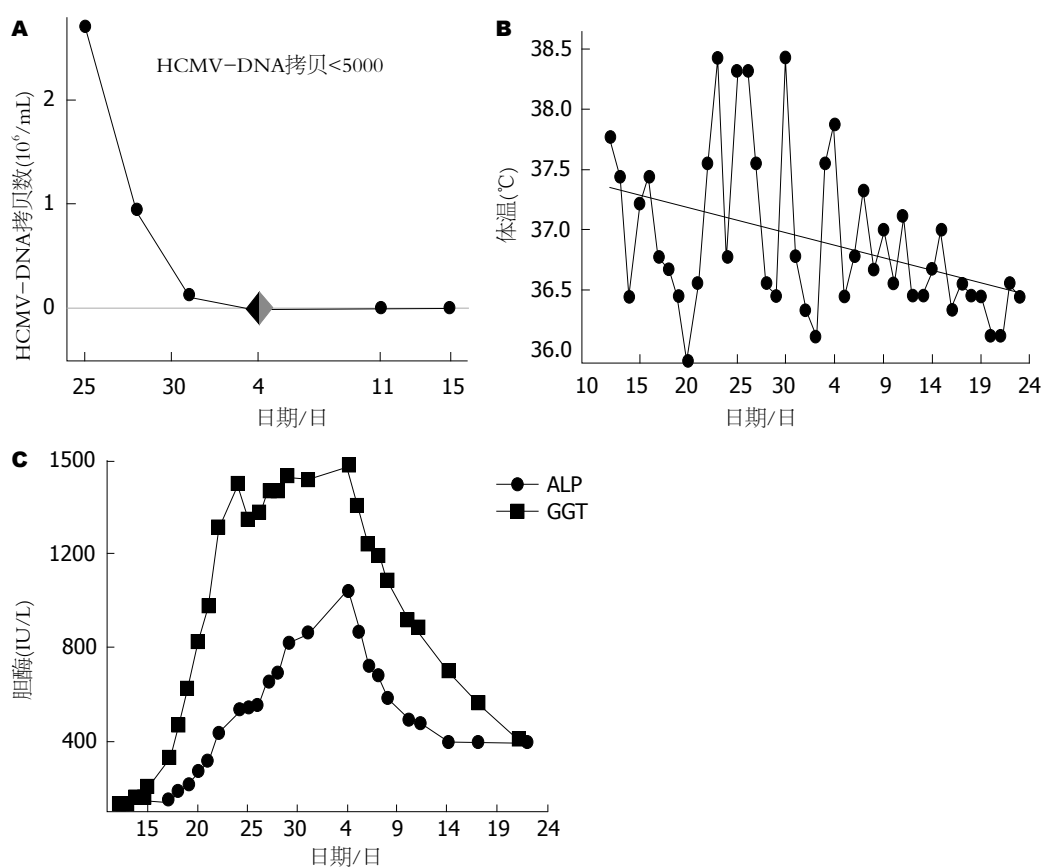


图 2 实验室检查及体温变化. A: 抗病毒治疗后HCMV-DNA拷贝数变化(2013-01-04<5000拷贝/mL); B: 体温变化; C: 胆酶谱变化.

痛剧烈,腹部体征较轻. 2012-12-13/2012-12-25疼痛较为剧烈, 2012-12-16出现胆囊区疼痛不适, Murphy征(+); 2012-12-26/2013-01-06腹痛较前稍有缓解. 2013-01-07后腹痛明显缓解; (2)2012-12-23/2012-12-30体温最高, 热型为弛张热, 高热多发生于夜间和下午, 后体温下降, 住院期间的体温 $37.3^{\circ}\text{C} \pm 0.63^{\circ}\text{C}$ (图2B); (3)2013-12-11/2013-12-24胆酶谱上升较快,

2013-12-24达到最高值; 2013-12-25/2013-01-04维持平稳; 2013-01-05后迅速下降(图2C).

2 讨论

感染是肾移植术后最常见的并发症, 是影响移植术后患者远期存活的重要因素之一. 术后发生感染的时间是关键, 术后1-6 mo是免疫调节病毒感染发生的高峰期, 这些病毒包括巨细胞病

■同行评价

本文通过报道了1例肾移植术后胃肠道功能障碍病例,结合国内外报道进行分析,对临床有一定的指导意义。

毒(cytomegalovirus, CMV)、人类肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、EB病毒,通过级联放大内部复杂联系,增加炎症介质及细胞因子的表达,导致其他病毒感染及机会致病性感染,如肺部真菌感染、其他病毒感染^[3]。免疫调节病毒在肾移植术后混合性感染中发挥着重要的作用。受者整体免疫状态低下是CMV感染的重要危险因素,免疫诱导单克隆抗体使CMV感染风险增高,CMV感染首选治疗方案为更昔洛韦,可明显减少死亡率及发病率^[4]。本例患者为肾移植术后1 mo余,术前巴利昔单抗免疫诱导,术中术后多次输血病史,显著增加了CMV感染风险,通过免疫调节机制导致肺部念珠菌、呼吸道合胞病毒、腺病毒、流感病毒等混合性感染。静脉应用更昔洛韦治疗疗效显著,治疗10 d后病毒拷贝下降至正常水平。

危重患者常合并胃肠功能障碍,多由如严重感染、肠缺血等原因引起胃肠黏膜屏障功能障碍,肠道正常菌群失调,对致病性细菌的防御能力减退,肠道细菌通过肠黏膜进入肠壁淋巴结与肝门静脉系统进而导致全身炎症反应及肠道感染^[5]。结合以上相关症状、体征及辅助检查,根据笔者推断该患者病程的发生、发展过程为:感染(肺部真菌感染、CMV病毒血症)导致患者胃肠道功能障碍,导致胃肠应激性溃疡,引起肠梗阻,出现腹痛、腹胀、恶心等相关症状,进一步导致胃肠道黏膜屏障功能障碍,使肠道菌群失调,使肠道致病性阳性球菌生长,通过门静脉内毒素血症进一步导致患者高热、寒战,肠道菌群移位导致胆道感染、腹腔感染,在MRCP可见胆囊窝积液及腹水,因不同抗生素抗菌谱的差异性,导致体温、腹痛、胆酶谱出现阶段性变化过程,更昔洛韦、伏立康唑、米卡芬净、亚胺培南西司他丁钠、盐酸万古霉素控制感染

后患者体温平稳、腹痛症状好转、胃肠道功能逐渐恢复、胆酶谱下降。

肾移植术后急腹症的诊治国内外报道较少,按学科分类可分为外科急腹症、内科急腹症、妇产科、儿科急腹症,按病变的性质可分为5类:(1)急性炎症;(2)急性穿孔;(3)急性出血;(4)急性管腔梗阻;(5)急性脏器缺血,对于腹痛的患者首先要排除危重急腹症如急性化脓性胆管炎、肝脾破裂出血、肠系膜静脉血栓形成、肠系膜动脉栓塞等进展较快,病死率高的急腹症,进行必要的影像学检查排除,有文献总结了^[6]10例肾移植术后急腹症病因,急性炎症8例,炎症伴穿孔2例,对于外科性腹痛,明确病因及有效外科治疗,成功率较高。该患者因全身性感染导致炎症性腹痛,为内科性,感染以腹痛为首发症状,容易导致误导为外科性急腹症,入院后予完善相关检查排除危重急腹症,明确无手术指征,依据移植术后常见感染部位及不同时间段常见感染的病原菌进行适当经验性治疗,标本培养鉴定明确病因,及时根据培养结果调整治疗方案是治疗成功的关键。

3 参考文献

- 1 中华内科杂志编辑委员会. 侵袭性肺部真菌感染的诊断标准与治疗原则(草案). 中华内科杂志 2006; 45: 697-700
- 2 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874 [PMID: 1597042]
- 3 Danovitch GM. Handbook of kidney transplantation. Lippincott Williams & Wilkins, 2005: 281-282
- 4 中华医学会. 临床诊疗指南-器官移植学分册. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 183-189
- 5 黎介寿. 重视胃肠道功能障碍患者营养问题. 中华胃肠外科杂志 2012; 15: 423-425
- 6 黄颖鹏, 沈贤, 暨玲. 肾移植术后急腹症十例. 中华普通外科杂志 2011; 26: 700-701

编辑 田滢 电编 鲁亚静



《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, 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。

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》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。

《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*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max} , C_{max} , 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 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/mL应改为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L。明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

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χ²; (4)样本的

相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L $\pm$ 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如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 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如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致谢中. 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: wjcd@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: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

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/lcyj.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、补充或删除时, 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》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》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。

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/>

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!

白岚 教授
南方医院惠侨科

陈国凤 主任医师
中国人民解放军第302医院感染七科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

陈云昭 副教授
新疆石河子大学医学院/一附院病理科

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

巩鹏 教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

英卫东 教授
安徽省立院肝脏外科

江建新 副主任医师
贵阳医学院附属医院肝胆外科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

康春博 副主任医师
北京大学航天临床医院普通外科

李刚 教授
北京大学医学部生物化学与分子生物学系

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

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

刘亮明 副教授
上海交通大学附属第一人民医院松江分院肝病科

门秀丽 教授
河北联合大学(原华北煤炭医学院)病理生理学教研室

彭宗根 副研究员
中国医学科学院医药生物技术研究室病毒室

齐清会 教授
大连医科大学附属第一医院

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

田文静 副教授
哈尔滨医科大学

王承党 教授
福建医科大学附属第一医院消化内科

王道荣 主任医师
江苏省苏北人民医院胃肠外科

魏睦新 教授
南京医科大学第一附属医院

吴建兵 教授
南昌大学第二附属医院肿瘤科

吴军 研究员
中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所

吴泰璜 教授
山东省立医院肝胆外科

肖秀英 副主任医师
上海交通大学医学院附属仁济医院

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

阴赅宏 研究员
首都医科大学附属北京友谊医院感染与急救医学

殷正丰 教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

张火俊 副教授
长海医院放射科

张力为 副教授
新疆医科大学第一附属医院胸外科

《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引量、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：





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

