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 2 月 18 日　第 22 卷　第 5 期　(Volume 22 Number 5)

5/2014

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录.

ISSN 1009-3079
05>
9 771009 307056

世界华人消化杂志
www.wjgnet.com
二零一四年二月十八日
第二十二卷
第五期

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

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

总顾问

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

名誉主编

潘伯荣教授

主编

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

编委

消化内科学

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

消化外科学

白雪副主任医师
白雪巍副主任医师
白玉作教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈炳官教授
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈凛教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅思源副教授
傅晓辉副教授
傅志仁主任医师
高毅主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何向辉教授
何晓顺教授
何裕隆教授
胡安斌副教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
康春博副主任医师
孔静副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李升平教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔教授
李正荣副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘宏鸣副教授
刘建教授
刘亮副主任医师
刘颖斌主任医师
卢军华教授
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕凌副教授
吕云福教授
麻勇副研究员
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民主任医师
邱伟华主任医师
仇毓东教授
崔清波副教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋新明教授
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙文兵教授
孙星副教授
孙学英教授
邰升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授

世界华人消化杂志®

编辑委员会

田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
王道荣主任医师
王德盛副主任医师
王凤山教授
王刚副研究员
王健生教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王铮副研究员
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
俞继卫副主任医师
于则利教授
禹正杨副教授
喻春钊教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
邹小明教授

消化感染病学

白浪副教授
陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
方今女教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郭永红副主任医师
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
林潮双副教授
刘正稳教授
彭亮副主任医师
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王建明副教授
王凯教授
王怡主任医师
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
姚鹏副教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵秀英副教授
周陶友副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

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

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
侯凤刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李苏宜教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

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

消化中西医结合学

范恒教授
唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
袁建业副研究员
张春虎副教授
朱西杰教授

消化基础研究

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

消化病理学

陈云昭副教授
邓昊副教授
杜祥教授
樊祥山副主任医师
郭炜教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
门秀丽教授
莫发荣副教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2014 年 2 月 18 日　第 22 卷　第 5 期　(总第445期)

述　评

609 Wnt/β-catenin通路与肝星状细胞的活化、增殖
王心蕊, 鲁玉辉

基础研究

615 P162抑制Hedgehog信号转录因子Gli-1增强食管癌Eca109细胞的放射敏感性
陈洁, 吴清明, 龙辉, 张红, 陈建华

624 结肠癌中相关miRNA对NRP2调控的预测及鉴定
李明, 连海峰, 刘成霞, 马锋振, 谢书阳

临床研究

630 肝癌患者血浆中PLAG1的异常表达
付琳, 杨玉秀, 白阳秋, 张立达

文献综述

637 NDRG2与肝纤维化相关性的研究进展
马继征, 刘绍能, 陈兰羽, 姚乃礼

642 质子泵抑制剂防治化疗引起胃肠道黏膜损伤的研究进展
谢一娜, 黄其春

648 胆管癌支架治疗的现状及进展
于泓, 缪林

654 miR-375在消化系肿瘤中的研究进展
颜俊伟, 廖家智, 林菊生, 何星星

研究快报

661 肠癌大鼠与正常大鼠粪便菌群的结构性差异
高仁元, 朱庆超, 伍雯, 秦环龙

668 P38MAPK抑制剂对溃疡性结肠炎大鼠外周血淋巴细胞凋亡及相关调控蛋白的影响
李军华, 周薇

临床经验

674 核素胃排空检查在功能性消化不良患者中的临床应用
张悦, 张遵城, 董萍, 董华, 肖连东, 王国强

679 冰帽参与治愈显著肝性脑病后患者认知功能的评价
张玉波, 刘振坤, 陈立敏, 袁亚松, 纪志伟, 李佳桂

685 超声内镜辅助治疗恶性梗阻性黄疸105例
李明, 郝芳, 秦鸣放

690 应用SELDI-TOF-MS技术筛选肝癌遗传性血清蛋白标志物
邓敬桓, 陈智平, 李山, 秦雪, 黄东萍

695 INPP4B和PTEN蛋白在肝细胞癌中的表达及其意义
张洋洋, 李建生, 贺德志, 蒋冬

700 腹腔镜胆囊切除术对HIV感染者细胞免疫的影响
胡明辉, 魏国, 赵勇, 范合璋, 华欣, 何永, 蔡林

705 导丝超选胆管插入法与乳头直接插入法对ERCP术后并发症的影响比较
毕荣欣, 薛志广, 张伟, 周亮

709 内镜黏膜下剥离术治疗直肠类癌17例
王海波, 吴会超, 彭丹若, 刘 黔, 庹必光

713 机会性结肠镜检查对结直肠肿瘤发现率的影响
兰君, 孙方利, 吴军, 付信娟, 滕春媛, 王燕平

718 LETM1蛋白在结肠癌组织中的表达及临床意义
高爱花, 金永民, 孙红花, 金文彪, 崔海, 崔现, 崔玉珍, 沈雄虎, 张松男, 朴龙镇

724 IGF-Ⅰ、IGF-ⅠR、IGF-Ⅱ在结直肠腺瘤中的表达及意义
谭晓林, 刘祥玉, 米贤军, 谢彩虹, 赵超, 陈冬妹, 肖文, 尹泉, 施为建

730 ESD术治疗上消化道疾病50例
沈睿炜, 孙聪, 郑惠虹, 孙常波, 李江波, 魏冬梅, 朱红梅, 王贤君

735 医用胶经导管行消化系出血血管栓塞的疗效
程斌, 许敏, 蒋天鹏, 宋杰, 安天志, 周石

742 IL-10、TNF-α在不同菌型幽门螺杆菌感染消化性溃疡中的表达
游海梅, 胡团敏

病例报告	747 胰胆管合流异常术后残余胆管复发结石1例 张恺, 路军华, 张宪文
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	641 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 660 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0.873 678 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 689 《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 694 《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) 746 《世界华人消化杂志》栏目设置
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 鲁玉辉, 副教授, 350122, 福建省福州市闽侯上街邱阳西路1号, 福建中医药大学中医学院
本期责任人	编务 车新鑫; 送审编辑 鲁亚静, 闫晋利; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 郭鹏; 形式规范审核编辑部主任 田滢; 最终清样审核总编 马连生

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名

(旬刊)

创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2014-02-18
原刊名 新消化病学杂志

期刊名称
世界华人消化杂志

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

主编
程英升, 教授, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科
党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科
江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科
刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科
刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科
吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科
马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科
王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科
姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心
张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编辑部
田滢, 主任
《世界华人消化杂志》编辑部
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室
电话: 010-59080035
传真: 010-85381893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

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

制作
北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室
电话: 010-85381892
传真: 010-85381893

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

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

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

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

定价
每期90.67元 全年36期3264.00元

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

World Chinese Journal of Digestology

February 2014 Contents in Brief Volume 22 Number 5

EDITORIAL

609 Role of Wnt/β-catenin pathway in activation and proliferation of hepatic stellate cells
Wang XR, Lu YH

BASIC RESEARCH

615 P162 enhances radiosensitivity of esophageal carcinoma Eca109 cells by inhibiting Hedgehog signaling transcription factor Gli-1
Chen J, Wu QM, Long H, Zhang H, Chen JH

624 Prediction and identification of microRNAs involved in regulating neuropilin-2 in colorectal carcinoma
Li M, Lian HF, Liu CX, Ma FZ, Xie SY

CLINICAL RESEARCH

630 Abnormal expression of PLAG1 in plasma of patients with hepatocellular carcinoma
Fu L, Yang YX, Bai YQ, Zhang LD

REVIEW

637 NDRG2 and hepatic fibrosis
Ma JZ, Liu SN, Chen LY, Yao NL

642 Advances in prevention and treatment of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis with proton pump inhibitors
Xie YL, Huang QC

648 Biliary stenting for cholangiocarcinoma: An update
Yu H, Miao L

654 Roles of miR-375 in digestive tumors
Yan JW, Liao JZ, Lin JS, He XX

RAPID COMMUNICATION

661 Compositional differences in fecal microbiota between rats with colorectal cancer and normal rats
Gao RY, Zhu QC, Wu W, Qin HL

668 P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 promotes peripheral blood lymphocyte apoptosis in rats with colitis
Li JH, Zhou W

CLINICAL PRACTICE

674 Radionuclide gastric emptying scintigraphy in patients with functional dyspepsia
Zhang Y, Zhang ZC, Dong P, Dong H, Xiao LD, Wang GQ

679 Assessment of cognitive function of patients after resolution of overt hepatic encephalopathy with ice cap participated treatment
Zhang YB, Liu ZK, Chen LM, Yuan YS, Ji ZW, Li JG

685 Endoscopic ultrasonography for auxiliary treatment of malignant obstructive jaundice: An analysis of 105 cases
Li M, Hao F, Qin MF

690 Detection of hereditary serum markers for liver cancer using SELDI-TOF-MS protein chip technology
Deng JH, Chen ZP, Li S, Qin X, Huang DP

695 Significance of expression of INPP4B and PTEN in hepatocellular carcinoma
Zhang YY, Li JS, He DZ, Jiang D

700 Impact of laparoscopic cholecystectomy on cellular immunity in patients with HIV infection
Hu MH, Wei G, Zhao Y, Fan HZ, Hua X, He Y, Cai L

705 Comparison of post-ERCP complications between patients using guidewire ultra-election duct insertion versus those using direct papillary insertion
Bi RX, Xue ZG, Zhang W, Zhou L

709 Endoscopic submucosal dissection for rectal carcinoid tumors: An analysis of 17 cases
Wang HB, Wu HC, Peng DR, Liu Q, Tuo BG

713 Detection rate of colorectal neoplasms by opportunistic colonoscopy
Lan J, Sun FL, Wu J, Fu XJ, Teng CY, Wang YP

718 Clinical significance of LETM1 protein expression in colonic cancer
Gao AH, Jin YM, Sun HH, Jin WB, Cui H, Cui X, Cui YZ, Shen XH, Zhang SN, Piao LZ

724 Significance of expression of IGF-Ⅰ, IGF-ⅠR and IGF-Ⅱ in colorectal adenoma
Tan XL, Liu XY, Mi XJ, Xie CH, Zhao C, Chen DM, Xiao W, Yin Q, Shi WJ

730 Endoscopic submucosal dissection for upper gastrointestinal lesions: Our experience with 50 cases
Shen RW, Sun C, Zheng HH, Sun CB, Li JB, Wei DM, Zhu HM, Wang XJ

735 Transcatheter arterial embolization with medical adhesive for nonvariceal gastrointestinal bleeding
Chen B, Xu M, Jiang TP, Song J, An TZ, Zhou S

742 Serum levels of IL-10 and TNF-α in patients with peptic ulcer caused by different *Helicobacter pylori* strains
You HM, Hu TM

CASE REPORT	747 Recurrent gallstones in residual bile ducts after surgery for pancreaticobiliary maljunction: A case report and literature review *Zhang K, Lu JH, Zhang XW*
APPENDIX	Ⅰ－Ⅴ Instructions to authors of *World Chinese Journal of Digestology* Ⅰ Meeting events calendar in 2014
ACKNOWLEDGMENT	Ⅰ Acknowledgments to reviewers of *World Chinese Journal of Digestology*
COVER	Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Yu-Hui Lu, Associate Professor, College of TCM, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 1 Qiuyang West Road, Minhoushang Street, Fuzhou 250122, Fujian Province, China
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: *Xin-Xin Che* Review Editor: *Ya-Jing Lu, Jin-Li Yan* Electronic Page Editor: *Ya-Jing Lu* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Peng Guo* Proof Editor: *Ying Tian* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

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

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

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

EDITOR-IN-CHIEF
Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China
Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China
Lian-Xin Liu, Professor, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China
Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hang-zhou 310006, Zhejiang Province, China
Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China
Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

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

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

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

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

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

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

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

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 609-614
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

述评 EDITORIAL

Wnt/β–catenin通路与肝星状细胞的活化、增殖

王心蕊, 鲁玉辉

王心蕊, 鲁玉辉, 福建中医药大学中医学院 福建省福州市 350122
鲁玉辉, 副教授, 主要从事中医湿热病证治规律及肝病中西医防治的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81173180/H2704
福建省自然科学基金资助项目, No. 2011J01216
作者贡献分布: 本文综述由王心蕊与鲁玉辉完成; 王心蕊贡献较多; 鲁玉辉审校.
通讯作者: 鲁玉辉, 副教授, 350122, 福建省福州市闽侯上街邱阳西路1号, 福建中医药大学中医学院. luyuhui2006@163.com
收稿日期: 2013–12–20 修回日期: 2014–01–05
接受日期: 2014–01–10 在线出版日期: 2014–02–18

Role of Wnt/β-catenin pathway in activation and proliferation of hepatic stellate cells

Xin-Rui Wang, Yu-Hui Lu

Xin-Rui Wang, Yu-Hui Lu, College of TCM, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian Province, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81173180/H2704; the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2011J01216
Correspondence to: Yu-Hui Lu, Associate Professor, College of TCM, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, 1 Qiuyang West Road, Minhoushang Street, Fuzhou 350122, Fujian Province, China. luyuhui2006@163.com
Received: 2013-12-20 Revised: 2014-01-05
Accepted: 2014-01-10 Published online: 2014-02-18

Abstract

Liver fibrosis refers to a pathological state in which a variety of pathogenic factors lead to hepatocyte inflammation and necrosis, the imbalance between degradation and deposition of collagen and other extracellular matrix (ECM) molecules, and the abnormal proliferation of liver connective tissue. In the process of the formation of hepatic fibrosis, hepatic stellate cells are the major contributor. Activated hepatic stellate cells secrete extracellular matrix components, and excessive deposition of extracellular matrix is the central event in liver fibrosis. Currently, there have been many articles reporting that the Wnt/β-catenin signaling pathway is involved in organ fibrosis and liver fibrosis, but the underlying mechanism has not been clearly clarified. Some studies have also confirmed that there is a certain relationship between the Wnt/β-catenin pathway and activation of hepatic stellate cells in liver fibrosis.

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

Key Words: Hepatic fibrosis; Hepatic stellate cells; Wnt/β-catenin signaling

Wang XR, Lu YH. Role of Wnt/β-catenin pathway in activation and proliferation of hepatic stellate cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 609-614 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/609.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.609

摘要

肝纤维化是指各种致病因子导致肝细胞炎症、坏死, 肝脏中胶原蛋白等细胞外基质(extracellular matrix)降解与沉积失衡, 进而导致肝脏内结缔组织异常增生的病理状态. 在肝纤维化的形成过程中, 肝星状细胞为主要效应细胞. 肝星状细胞的激活、分泌细胞外基质、过度的细胞外基质的沉积是形成肝纤维化的中心环节. Wnt/β-catenin通路参与器官纤维化的机制并没有被明确, 但已有文献报道Wnt信号通路参与到器官纤维化和肝纤维化的过程中. 国内外也均有研究证实Wnt/β-catenin通路与肝星状细胞的活化增殖、肝纤维化存在着一定的关系.

© 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; 肝星状细胞; Wnt/β–catenin通路

核心提示: 经典的Wnt/β-catenin通路与肝星状细胞的激活存在着一定的关联, 非经典Wnt通路亦参与到肝星状细胞的激活之中. Wnt通路与肝纤维化的形成存在着一定的联系. 且Wnt通路可与细胞内其他的信号通路存在着信号通讯. TGF-β与Wnt通路之间的信号通讯, 参与了肝纤维化的形成.

王心蕊, 鲁玉辉. Wnt/β–catenin通路与肝星状细胞的活化、增殖. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 609–614 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/609.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.609

■背景资料
目前普遍认为, 在肝纤维化的过程中, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)为主要效应细胞. HSCs的激活, 分泌细胞外基质, 过度的细胞外基质的沉积是形成肝纤维化的关键环节. 而活化的HSCs, 也将成为人们抗纤维化的主要治疗靶点. 而HSCs的激活机制并未能清楚阐明, 本文从Wnt/β-catenin信号通路来浅述该通路与HSCs的激活、肝纤维化的形成之间的关联.

■同行评议者
姚登福, 教授, 南通大学附属医院

■研发前沿
HSCs可藉由不同的细胞通路活化，如TGF-β/Smad通路、MAPK通路、PDGF、NF-κB这些信号通路. 新兴研究的Wnt通路亦参与到HSCs的活化中. Wnt通路分为经典通路和非经典通路，越来越多的研究证实了异常的Wnt通路与人类许多疾病有关，如神经系统退行性病变、癌症、器官纤维化、心血管系统疾病等. 干扰异常的Wnt通路的活性的分子机制，是否可成为治疗疾病的策略，有待更深入的研究.

0 引言

肝纤维化是指各种致病因子导致肝细胞炎症、坏死，肝脏中胶原蛋白等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解与沉积失衡，进而导致肝脏内结缔组织异常增生. 肝纤维化是慢性肝病以及各种损肝因素所致的肝脏损伤重要的病理特征. 目前普遍认为，在肝纤维化的过程中，肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)为主要效应细胞. HSCs的激活，分泌细胞外基质，过度的细胞外基质的沉积是形成肝纤维化的关键环节. 而活化的HSCs，也将成为人们抗纤维化的主要治疗靶点[1]. 而新兴研究的Wnt/β-catenin通路，在动物胚胎发育、器官形成、组织再生等生理过程中，具有重要的作用，激活的异常的Wnt/β-catenin通路也参与到癌症的形成、阿兹海默病、器官纤维化等过程中. 本文旨在从Wnt/β-catenin通路来浅述该通路、HSCs与肝纤维化之间的关系.

1 HSCs的活化与肝纤维化

HSCs位于窦周Disse腔内，正常情况下主要起着代谢和储存维生素A的作用，能够合成与分泌少量的细胞外基质，有一定的产生胶原酶的能力. 肝纤维化时，静止状态的星状细胞活化. 而活性氧、脂质过氧化产物，或者其他由邻近细胞如活化的Kupffer细胞、肝窦内皮细胞、损伤的肝细胞分泌的分子，都有可能促进静止态的星状细胞活化[2]. 活化后的星状细胞存在着形态学上的改变，包括分泌α平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α-SMA)、细胞内储存维生素A的丢失、粗面内质网的增加[2,3]. 星状细胞的活化亦伴随一系列基因表达的改变，包括活化的星状细胞细胞膜上增加了对旁分泌刺激产生应答的受体[4]; 以及一系列细胞内信号级联反应，该细胞内信号级联反应有利于维持活化的细胞表型、控制纤维化的发生以及星状细胞增殖状态以及Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白的转录与翻译的增加[3].

肝纤维化是一种可逆的伤口愈合反应，在各种慢性肝损伤中，肝纤维化最具特色的特征是Ⅰ型胶原蛋白过多的沉积[2,3]，主要产自活化的HSCs. 细胞外基质的过度分泌与积累主要责之于活化的HSCs. HSCs激活后，转变为类成肌纤维细胞，具有了收缩能力、增殖、趋药性、纤维形成、基质减少和维生素A的丢失等特性[4]. 已有研究显示活化的HSCs在肝损伤后一段时间，具有了纤维化形成和肝组织再生的能力，且慢性肝损伤伴随着明显的基质减少，而这些最终导致大量的胶原沉积[5]. 已研究的TGF-β/Smad通路、MAPK通路、PDGF、NF-κB这些信号通路，在HSCs活化后，主要控制纤维化反应的基因表达的诱导[3,6]. 与静止期HSC比较，能观察到前胶原α1与α2、纤连蛋白等细胞外基质组成成分基因的表达[3]. HSCs亦对VEGF和血管生成素1作用的应答，表现在增殖、ECM组成成分的沉积增加[7]. 另有文献报道，阻止HSCs的活化或通过细胞凋亡、免疫清除、细胞表型逆转、细胞衰老等减少活化的HSCs，都有利于肝纤维化的逆转[8]. 使用抗氧化剂和抗细胞凋亡的半胱天冬酶，亦可增强大鼠肝纤维化的逆转[9]. 肝纤维化复原过程中HSCs的死亡通过凋亡和衰老两种方式已被证明，其量化的贡献是未知的，理论上来说，活化的HSCs可能分化为另一种表型或恢复为静止态HSCs[10]. Ariane Mallat与Sophie Lotersztajn研究表示，在肝纤维化复原过程中，半数肌成纤维细胞并未凋亡，而是下调了形成纤维化的基因，获得一种类似于静止态HSCs的表型，但与静止态HSCs的表型相比，区别之处在于，在与促进纤维化形成刺激物的反应应答中更迅速再活化为肌成纤维细胞以及更具有形成肝纤维化的能力[11].

2 Wnt/β-catenin通路与器官纤维化

Wnt蛋白是一类富含半胱氨酸的糖蛋白家族，参与调控了器官发育，细胞增殖和迁移，细胞分化以及细胞极性的产生. Wnt蛋白与细胞膜上的卷曲样蛋白结合，诱发一系列信号分子的表达与活化，发挥其生物学效应. Wnt途径分为经典途径和非经典途径. 到目前为止，至少有19种Wnt蛋白被人们鉴别. 一般说来，wnt1、wnt2、wnt3a、wnt8和wnt8a属于经典wnt信号途径蛋白，而wnt4、wnt5a、wnt5b、wnt6、wnt7a和wnt11是非经典wnt信号蛋白[12]. 经典的wnt信号途径是指β-catenin介导的wnt/β-catenin信号通路，Wnt蛋白与细胞膜表面Frizzled和LRP家族受体结合，将信号传给Dishevelled(Dsh)，活化的Dsh抑制Axin、APC、GSK-3β组成的复合物的活性，使胞浆内β-catenin蛋白不能被磷酸化，积累的β-catenin与转录因子TCF/LEF结合，调节靶基因的表达. 在没有Wnt信号时，胞浆内β-catenin被GSK-3β磷酸化，后被泛素化，最终被蛋白酶体降解. Wnt蛋白拮抗剂、核转录因子TCF的显性负

性突变体等, 均可阻断Wnt信号通路[13].

已有大量文献报道, 活化的异常的Wnt/β-catenin通路参与到多种疾病中. 在神经系统中, Wnt信号通路可调节神经元形态发生和突触分化, 异常的Wnt信号通路涉及到多种神经系统疾病, 如慢性疼痛的发病机制[14]以及阿尔兹海默病[15], 在帕金森综合征中, 调节经典和非经典Wnt信号通路来改善细胞治疗颇具前景[16]. Wnt/β-catenin通路能维持干细胞的自我更新与分化的特性, 包括在细胞培养中使用Wnt蛋白或Wnt通路激动剂来维持干细胞的特性, 如在具有多向分化潜能的间充质干细胞和肿瘤干细胞中[17], Wnt信号通路在该两类细胞的自我更新与分化中起到重要作用; 在癌症中, 也能较频繁地观察到Wnt通路的活性与突变, 如*APC*基因的胚系突变导致的家族性腺瘤性息肉病[18], 且与Notch信号通路存在着信号通讯[19]. 另有文献报道, 在乙型肝炎诱导的肝细胞癌中, Wnt3结合于FZD7致肝细胞癌细胞中Wnt/β-catenin通路的活化, 说明在肝细胞癌形成过程中Wnt3可能起到一定作用[20]; 较近的研究亦发现Wnt通路与代谢类疾病[18]、心血管疾病如心肌梗死[21]、气道炎症性疾病[22]亦有关联.

Wnt/β-catenin通路亦参与到器官纤维化中. 虽然参与器官纤维化的机制并没有被明确, 但已有文献报道Wnt信号通路与器官纤维化的形成有一定关系. 有学者研究12例心脏同种异体移植失败并伴有心脏舒张期功能障碍的心外膜纤维化患者, 观察到细胞核内β-catenin的积累与TCF-4阳性, 显示了经典的Wnt/β-catenin通路与心外膜纤维化之间有关联[23]. 在特发性肺间质纤维化, β-catenin蛋白通过siRNA的沉默, 能够阻止TGF-β1处理过的纤维母细胞中α-SMA的表达, 进一步支持GSK-3α/β-catenin通路成为特发性肺间质纤维化发病机制的假设[24]. 有学者在观察特发性肺间质纤维化胶原沉积的动态过程中, 发现新的胶原纤维形成与弹性蛋白、Wnt-1诱导的信号通路蛋白1、Ⅳ型胶原蛋白的基因表达关联紧密[25]. 国内有学者报道, 体外培养正常皮肤的纤维母细胞, 在分化成为肌成纤维细胞的过程中, 使用实时定量聚合酶链反应、Western blot以及免疫组织化学等方法, 可以观察到Wnts mRNA和β-catenin蛋白在TGF-β1诱导的分化过程中出现上调情况, 表示β-catenin可能有参与到肌成纤维细胞的分化中并起到负调节作用[26]. 在使用经典Wnt通路下游抑制剂PKF118-310和ICG-001, 在皮肤纤维化的实验模型上具有抗纤维化作用[27]. 近几年已经有研究证明在纤维化疾病如系统性硬化中存在着异常的Wnt信号通路, 因此Dees等研究证实, 在系统性硬化中, 激活的经典的Wnt信号通路诱导了纤维母细胞的激活以及下一步的分化为肌成纤维细胞和过多的胶原分泌, 最终导致组织纤维化, 而基因的或药理的Wnt信号通路阻滞剂减轻了实验性纤维化[28]. 作为Wnt/β-catenin信号通路负性调节剂Dapper3, 有学者观察到在输尿管阻塞诱导的肾纤维化中, *Dapper3*基因的缺失增强了肾组织中肌成纤维细胞活性与细胞外基质的过度产生[29]. 亦有文献证明, Wnt信号通路活性的改变可能与骨骼肌纤维化的形成有关[30].

■**创新盘点**
本文旨在综述经典的Wnt/β-catenin通路与HSCs的活化, 以及肝纤维化的形成之间的关联, 内容较丰富.

3 Wnt/β-catenin通路参与HSCs活化及肝纤维化过程

Wnt通路属于新兴研究的细胞通路. Wnt/β-catenin通路、HSCs的激活与肝纤维化的具体机制并不明确, 但国内外均有研究证实到Wnt/β-catenin通路与HSCs的活化、肝纤维化的形成存在着一定关系. Tsukamoto等[31]在研究中亦展示了TGF-α与Wnt, 作为抗脂肪生成的调节剂, 可减少过氧化物酶体增殖物激活受体-γ的活性并促进HSCs向肌成纤维细胞的转化. 在体外培养的HSCs中, 瘦素增加β-catenin蛋白数量, 且瘦素诱导的β-catenin通路减少了固醇调节原件结合蛋白-1c的表达和活性, 而该蛋白可阻止HSC的活化, 因此β-catenin参与到瘦素诱导的肝纤维化过程中[32]. β-catenin和TGF-β2为小分子RNA-200a的两类功能性下游靶蛋白, 而小分子RNA-200a可通过Wnt/β-catenin通路和依赖TGF-β的机制部分减轻肝纤维化[33]. Yanagida等[34]报道, HSCs通过丢失Sept4转化为促纤维化细胞, 部分原因, 是因为Dkk2与其同系物的表达减少直接导致经典Wnt通路途径的抑制解除, 而Sept4, 只在静止期HSCs细胞内表达, 在HSC转化为肌成纤维细胞后表达明显被下调. 在体外培养的HSC中, 加入Wnt3a通过减少肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)诱导的HSCs的凋亡, 明显促进了HSC的活化[35]. 腺病毒表达的小发夹RNA(shRNA)引起抑蛋白necdin, 一种黑色素瘤抗原家族蛋白的基因表达沉默, 可通过依赖过氧化物酶体增殖物激活受体-γ和抑制经典Wnt通路的方式, 将活化的HSCs逆转为静止态细胞[36]. 有学者使用大鼠实验性胆汁淤积性肝纤维化的

■应用要点
本文综述经典的Wnt/β-catenin通路与HSCs的活化、肝纤维化的形成之间的关系，对将来清楚阐释经典的Wnt/β-catenin通路参与肝纤维化的分子机制，有一定指导意义. 而经典的Wnt/β-catenin通路预计也可成为肝纤维化治疗的一个重要有效靶点.

HSC，分离并体外培养后，观察到HSC中存在着*Wnt*和*Fz*基因的诱导和表达，而在活化的HSC的培养中使用Wnt蛋白的竞争性拮抗剂Dkk-1，增加了HSC的凋亡，说明Wnt拮抗剂可能成为治疗肝纤维化的一种手段[37]. Arellanes-Robledo等[38]在对离体的人HSCs进行体外培养后发现，累积的β-catenin蛋白定位于细胞核上，上调促进纤维化的基因的表达. 非经典Wnt通路也参与到肝纤维化过程中，如Jiang等[39]研究证实明显上调的Wnt5a与Wnt5a受体Frizzled2的表达，使得Wnt通路参与到静止状态的HSCs分化为肌成纤维细胞，预示了Wnt信号通路在肝纤维化发展过程中起到重要作用. 亦有学者文献报道，观察大鼠肝移植(整块肝移植和小肝移植作比较；正常肝组织移植与40%脂肪样变性的脂肪肝移植作比较)，得出上调Wnt4信号通路可以直接导致HSC的活化和小肝综合征损伤[40]. Fizzled10和钙/钙调素依赖蛋白激酶2α(CAMK2A)的表达上调，也说明了非经典通路Wnt/Ca^{2+}在含有人端粒酶逆转录酶的HSCs (hTERT HSCs)中是活化的状态，可能参与到HSC的活化与增殖[41]. Wnt5a可增加HSCs LX-2细胞系来源的细胞外基质和肝纤维化，通过对静止期和活化的大鼠HSCs基因表达的分析，可发现活化的HSCs Wnt5a mRNA水平上调[42].

而Wnt/β-catenin信号通路与肝纤维化也存在着一定关系. 国内已有学者使用带有商陆抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein, PAP)的质粒(plasmid pXF3H-PAP)，通过尾静脉注射对CCl_4诱导的肝纤维化大鼠进行基因转染，观察到商陆抗病毒蛋白可以通过下调Wnt/β-catenin信号通路来减轻肝纤维化的发生，为肝纤维化的治疗提供了新的对策[43]. 已有学者在研究Wnt/β-catenin信号通路在参与肺纤维化、肝纤维化、皮肤纤维化和肾纤维化等组织纤维化的分子机制过程中，与TGF-β信号通路、microRNAs之间存在着信号通讯[44]. 有实验研究检测到，活化的星状细胞和发展期的纤维化与TGF-β1、TGF-β受体2、Smad3a、Smad3b、β-catenin等表达相关[45]. 有学者通过使用细胞移植，展示了存在于肿瘤微环境的肿瘤MIM-R肝细胞，与有活性的HSCs或由其衍生的肌成纤维细胞一起，会诱导进展的恶性肿瘤发生，且MIM-R肝细胞和肌成纤维细胞的共同移植，伴随着Smad2/3和β-catenin的核定位出现明显的肿瘤形成，通过MIM-R肝细胞的拮抗剂Smad7的累积对TGF信号通路进行基因干扰，在与HSCs或肌成纤维细胞互相作用的过程中减弱了上皮去分化和肿瘤形成，进一步分析显示肿瘤内受到干扰的Smad通路缺乏了β-catenin的积累，该研究结果展示了TGF-β与β-catenin通路之间存在着细胞通讯[46]. 通过分析干扰素-α2b与TGF-β1对Wnt/β-catenin通路的影响、检测Smad蛋白水平、β-catenin/TCF4/Smads的互相作用以及HepG2/C3A和Huh7细胞系的增殖与凋亡，发现干扰素-α2b和TGF-β1可通过减少β-catenin与Frizzled7受体蛋白结合，减少β-catenin与TCF4的互相作用来减弱Wnt/β-catenin通路，证明TGF-β1和干扰素-α2b为Wnt/β-catenin通路的有效调节物[47]. 国内李文庭等在研究肝纤维化分子机制中发现，在肝纤维化的大鼠肝组织中，明显可见β-catenin的表达；活化的HSC-T6细胞株亦可见β-catenin蛋白的表达；β-catenin也参与到TGF-β1/Smad3通路致肝纤维化的过程中，通过1ng/ml TGF-β1刺激2 h后，HSC表达β-catenin mRNA、Smad3 mRNA和α-SMA mRNA量最大，β-catenin mRNA表达与两者均具有明显的相关关系[48]. 国外已有文献报道TGF-β1可以通过β-catenin通路下调过氧化物酶体增殖物激活受体-γ的表达而达到增加体外培养的HSCs α1(1)胶原的水平[49]. 使用TGF-β/Smad通路和Wnt/β-catenin通路的抑制物组氨酸三聚体核苷酸结合蛋白1，可升高*Smad7*的基因表达水平，降低*TGF-β1/Smad3*和*β-catenin/cyclin D1*的基因表达水平，阻止肝脏组织中α-SMA的表达[50].

4 结论

Wnt/β-catenin通路、HSCs活化增殖与肝纤维化存在着一定关系. 通过Wnt/β-catenin通路活化HSCs参与肝纤维化的机制依然未能明确阐明，有待进一步深入研究. 活化的HSCs内该通路的调控亦有希望成为抗肝纤维化治疗的一个重要靶点.

5 参考文献

1 Zhang DW, Zhao YX, Wei D, Li YL, Zhang Y, Wu J, Xu J, Chen C, Tang H, Zhang W, Gong L, Han Y, Chen ZN, Bian H. HAb18G/CD147 promotes activation of hepatic stellate cells and is a target for antibody therapy of liver fibrosis. *J Hepatol* 2012; 57: 1283-1291 [PMID: 22878468 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.07.042]

2 Friedman SL. Hepatic fibrosis - overview. *Toxicology* 2008; 254: 120-129 [PMID: 18662740 DOI: 10.1016/j.tox.2008.06.013]

3 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60 [PMID: 16139830]
4 Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1639-1642 [PMID: 19433304 DOI: 10.1016/j.biocel.2009.03.001]
5 Alatas FS, Masumoto K, Matsuura T, Hayashida M, Saeki I, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T. Synchronized expressions of hepatic stellate cells and their transactivation and liver regeneration during liver injury in an animal model of cholestasis. *J Pediatr Surg* 2011; 46: 2284-2290 [PMID: 22152866 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.016]
6 Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 195-206 [PMID: 21497738 DOI: 10.1016/j.bpg.2011.02.005]
7 Forbes SJ, Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 207-217 [PMID: 21497739 DOI: 10.1016/j.bpg.2011.02.006]
8 Kong D, Zhang F, Zhang Z, Lu Y, Zheng S. Clearance of activated stellate cells for hepatic fibrosis regression: molecular basis and translational potential. *Biomed Pharmacother* 2013; 67: 246-250 [PMID: 23201010 DOI: 10.1016/j.biopha.2012.10.002]
9 Kim do Y, Chung SI, Ro SW, Paik YH, Lee JI, Jung MK, Lee MG, Park YN, Lee KS, Park JG, Park HD, Han KH. Combined effects of an antioxidant and caspase inhibitor on the reversal of hepatic fibrosis in rats. *Apoptosis* 2013; 18: 1481-1491 [PMID: 24045874 DOI: 10.1007/s10495-013-0896-5]
10 Kisseleva T, Brenner DA. Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 305-317 [PMID: 21497747 DOI: 10.1016/j.bpg.2011.02.011]
11 Mallat A, Lotersztajn S. Reversion of hepatic stellate cell to a quiescent phenotype: From myth to reality? *J Hepatol* 2013; 59: 383-386 [PMID: 23567083 DOI: 10.1016/j.jhep.2013.03.031]
12 Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* 2009; 433: 1-7 [PMID: 19135507 DOI: 10.1016/j.gene.2008.12.008]
13 江鸣, 熊伍军, 刘菲. Wnt信号通路与抗纤维化策略. 国际内科学杂志 2009; 36: 230-233
14 Tang SJ. Synaptic Activity-Regulated Wnt Signaling in Synaptic Plasticity, Glial Function and Chronic Pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013 Dec 22. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24365183]
15 De Ferrari G, Avila M, Medina M, Pérez-Palma E, Bustos B, Alarcón M. Wnt/β-Catenin Signaling in Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013 Dec 22. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24365184]
16 Parish CL, Thompson LH. Modulating Wnt signaling to improve cell replacement therapy for Parkinson's disease. *J Mol Cell* Biol 2013 Dec 13. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24334258]
17 Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25: 254-264 [PMID: 23347562 DOI: 10.1016/j.ceb.2013.01.004]
18 Clevers H, Nusse R. Wnt/β-catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149: 1192-1205 [PMID: 22682243 DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.012]
19 赵渊源, 李春艳. Wnt与Notch信号通路的串话与肿瘤发生、发展的关系. 国际病理科学与临床杂志 2010; 30: 255-259
20 Kim M, Lee HC, Tsedensodnom O, Hartley R, Lim YS, Yu E, Merle P, Wands JR. Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. *J Hepatol* 2008; 48: 780-791 [PMID: 18313787 DOI: 10.1016/j.jhep.2007.12.020]
21 郭志雷, 左伋, 金惠铭. Wnt-frizzled信号通路与心血管疾病关系的研究进展. 中国病理生理杂志 2004; 20: 2134-2138
22 申永春, 万春, 文富强. Wnt/β-catenin信号通路在气道炎症性疾病中的研究进展. 临床肺科杂志 2013; 18: 317-318
23 Ye B, Ge Y, Perens G, Hong L, Xu H, Fishbein MC, Li F. Canonical Wnt/β-catenin signaling in epicardial fibrosis of failed pediatric heart allografts with diastolic dysfunction. *Cardiovasc Pathol* 2013; 22: 54-57 [PMID: 22475572 DOI: 10.1016/j.carpath.2012.03.004]
24 Caraci F, Gili E, Calafiore M, Failla M, La Rosa C, Crimi N, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A, Vancheri C. TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacol Res* 2008; 57: 274-282 [PMID: 18346908 DOI: 10.1016/j.phrs.2008.02.001]
25 Blaauboer ME, Emson CL, Verschuren L, van Erk M, Turner SM, Everts V, Hanemaaijer R, Stoop R. Novel combination of collagen dynamics analysis and transcriptional profiling reveals fibrosis-relevant genes and pathways. *Matrix Biol* 2013; 32: 424-431 [PMID: 23648810 DOI: 10.1016/j.matbio.2013.04.005]
26 Liu J, Wang Y, Pan Q, Su Y, Zhang Z, Han J, Zhu X, Tang C, Hu D. Wnt/β-catenin pathway forms a negative feedback loop during TGF-β1 induced human normal skin fibroblast-to-myofibroblast transition. *J Dermatol Sci* 2012; 65: 38-49 [PMID: 22041457 DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.09.012]
27 Beyer C, Reichert H, Akan H, Mallano T, Schramm A, Dees C, Palumbo-Zerr K, Lin NY, Distler A, Gelse K, Varga J, Distler O, Schett G, Distler JH. Blockade of canonical Wnt signalling ameliorates experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1255-1258 [PMID: 23595143 DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202544]
28 Dees C, Distler JH. Canonical Wnt signaling as a key-regulator of fibrogenesis -Implications for targeted therapies? *Exp Dermatol* 2013 Oct 3. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24118232 DOI: 10.1111/exd.12255]
29 Xue H, Xiao Z, Zhang J, Wen J, Wang Y, Chang Z, Zhao J, Gao X, Du J, Chen YG. Disruption of the Dapper3 gene aggravates ureteral obstruction-mediated renal fibrosis by amplifying Wnt/β-catenin signaling. *J Biol Chem* 2013; 288: 15006-15014 [PMID: 23580654 DOI: 10.1074/jbc.M113.458448]
30 Cisternas P, Henriquez JP, Brandan E, Inestrosa NC. Wnt Signaling in Skeletal Muscle Dynamics: Myogenesis, Neuromuscular Synapse and Fibrosis. Mol Neurobiol 2013 Sep 7. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24014138]
31 Tsukamoto H, She H, Hazra S, Cheng J, Miyahara T. Anti-adipogenic regulation underlies hepatic stellate cell transdifferentiation. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S102-S105 [PMID: 16958658]
32 Zhai X, Yan K, Fan J, Niu M, Zhou Q, Zhou Y, Chen

■同行评价

本文能反映我国Wnt/β-catenin通路活化与肝纤维化研究的水平.

H, Zhou Y. The β-catenin pathway contributes to the effects of leptin on SREBP-1c expression in rat hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Br J Pharmacol* 2013; 169: 197-212 [PMID: 23347184 DOI: 10.1111/bph.12114]

33 Sun X, He Y, Ma TT, Huang C, Zhang L, Li J. Participation of miR-200a in TGF-β1-mediated hepatic stellate cell activation. *Mol Cell Biochem* 2013 Nov 16. *[Epub ahead of print]*[PMID: 24242045]

34 Yanagida A, Iwaisako K, Hatano E, Taura K, Sato F, Narita M, Nagata H, Asechi H, Uemoto S, Kinoshita M. Downregulation of the Wnt antagonist Dkk2 links the loss of Sept4 and myofibroblastic transformation of hepatic stellate cells. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 1403-1411 [PMID: 21763422 DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.06.015]

35 Myung SJ, Yoon JH, Gwak GY, Kim W, Lee JH, Kim KM, Shin CS, Jang JJ, Lee SH, Lee SM, Lee HS. Wnt signaling enhances the activation and survival of human hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2007; 581: 2954-2958 [PMID: 17544413]

36 Zhu NL, Wang J, Tsukamoto H. The Necdin-Wnt pathway causes epigenetic peroxisome proliferator-activated receptor gamma repression in hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 30463-30471 [PMID: 20663865 DOI: 10.1074/jbc.M110.156703]

37 Cheng JH, She H, Han YP, Wang J, Xiong S, Asahina K, Tsukamoto H. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G39-G49 [PMID: 18006602]

38 Arellanes-Robledo J, Reyes-Gordillo K, Shah R, Domínguez-Rosales JA, Hernández-Nazara ZH, Ramirez F, Rojkind M, Lakshman MR. Fibrogenic actions of acetaldehyde are β-catenin dependent but Wingless independent: A critical role of nucleoredoxin and reactive oxygen species in human hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 1487-1496 [PMID: 23880292 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.017.Epub]

39 Jiang F, Parsons CJ, Stefanovic B. Gene expression profile of quiescent and activated rat hepatic stellate cells implicates Wnt signaling pathway in activation. *J Hepatol* 2006; 45: 401-409 [PMID: 16780995]

40 Cheng Q, Ng KT, Fan ST, Lim ZX, Guo DY, Liu XB, Liu Y, Poon RT, Lo CM, Man K. Distinct mechanism of small-for-size fatty liver graft injury--Wnt4 signaling activates hepatic stellate cells. *Am J Transplant* 2010; 10: 1178-1188 [PMID: 20420630 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03102.x]

41 Shin HW, Park SY, Lee KB, Shin E, Nam SW, Lee JY, Jang JJ. Transcriptional profiling and Wnt signaling activation in proliferation of human hepatic stellate cells induced by PDGF-BB. *Korean J Hepatol* 2009; 15: 486-495 [PMID: 20037267 DOI: 10.3350/kjhep.2009.15.4.486]

42 Rashid ST, Humphries JD, Byron A, Dhar A, Askari JA, Selley JN, Knight D, Goldin RD, Thursz M, Humphries MJ. Proteomic analysis of extracellular matrix from the hepatic stellate cell line LX-2 identifies CYR61 and Wnt-5a as novel constituents of fibrotic liver. *J Proteome Res* 2012; 11: 4052-4064 [PMID: 22694338 DOI: 10.1021/pr3000927]

43 Li W, Zhu C, Chen X, Li Y, Gao R, Wu Q. Pokeweed antiviral protein down-regulates Wnt/β-catenin signalling to attenuate liver fibrogenesis in vitro and in vivo. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 559-566 [PMID: 21444256 DOI: 10.1016/j.dld.2011.02.016]

44 Guo Y, Xiao L, Sun L, Liu F. Wnt/beta-catenin signaling: a promising new target for fibrosis diseases. *Physiol Res* 2012; 61: 337-346 [PMID: 22670697]

45 Van Wettere AJ, Law JM, Hinton DE, Kullman SW. Anchoring hepatic gene expression with development of fibrosis and neoplasia in a toxicant-induced fish model of liver injury. *Toxicol Pathol* 2013; 41: 744-760 [PMID: 23197195 DOI: 10.1177/0192623312464308]

46 Mikula M, Proell V, Fischer AN, Mikulits W. Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF-beta dependent fashion. *J Cell Physiol* 2006; 209: 560-567 [PMID: 16883581]

47 Ceballos MP, Parody JP, Alvarez Mde L, Ingaramo PI, Carnovale CE, Carrillo MC. Interferon-α2b and transforming growth factor-β1 treatments on HCC cell lines: Are Wnt/β-catenin pathway and Smads signaling connected in hepatocellular carcinoma? *Biochem Pharmacol* 2011; 82: 1682-1691 [PMID: 21843516 DOI: 10.1016/j.bcp.2011.08.001]

48 李文庭, 贺永文, 肖志宏. 转化生长因子β1对大鼠肝星状细胞表达β-连环蛋白的影响. 肝脏 2009; 14: 30-32

49 Qian J, Niu M, Zhai X, Zhou Q, Zhou Y. β-Catenin pathway is required for TGF-β1 inhibition of PPARγ expression in cultured hepatic stellate cells. *Pharmacol Res* 2012; 66: 219-225 [PMID: 22706027 DOI: 10.1016/j.phrs.2012.06.003]

50 Wu F, Huang S, Zhu N, Liu W, Zhang Y, He Y. Recombinant human histidine triad nucleotide-binding protein 1 attenuates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Mol Med Rep* 2013; 8: 1023-1028 [PMID: 23934318 DOI: 10.3892/mmr.2013.1618]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 615-623
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

P162抑制Hedgehog信号转录因子Gli-1增强食管癌Eca109细胞的放射敏感性

陈 洁, 吴清明, 龙 辉, 张 红, 陈建华

陈洁, 张红, 武汉科技大学 湖北省武汉市 430065
吴清明, 龙辉, 武汉科技大学附属天佑医院 湖北省武汉市 430064
陈建华, 武汉凯泰新生物技术有限公司 湖北省武汉市 430074
陈洁, 在读硕士, 主要从事食管癌的基础研究.
作者贡献分布: 课题设计由陈洁、吴清明、龙辉及张红完成; 研究过程由陈洁操作完成; 新药多肽P162由陈建华提供; 论文写作与数据分析由陈洁与吴清明共同完成.
通讯作者: 吴清明, 教授, 430064, 湖北省武汉市丁字桥涂家岭9号, 武汉科技大学附属天佑医院. wuhe9224@sina.com
电话: 027-51164093
收稿日期: 2013-12-02 修回日期: 2013-12-24
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

P162 enhances radiosensitivity of esophageal carcinoma Eca109 cells by inhibiting Hedgehog signaling transcription factor Gli-1

Jie Chen, Qing-Ming Wu, Hui Long, Hong Zhang, Jian-Hua Chen

Jie Chen, Hong Zhang, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China
Qing-Ming Wu, Hui Long, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China
Jian-Hua Chen, Wuhan KatyGen Pharmaceuticals Inc., Wuhan 430074, Hubei Province, China
Correspondence to: Qing-Ming Wu, Professor, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, 9 Tujialing Dingziqiao, Wuhan 430064, Hubei Province, China. wuhe9224@sina.com
Received: 2013-12-02 Revised: 2013-12-24
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To investigate whether P162 enhances radiosensitivity of esophageal carcinoma cell line Eca109 by inhibiting Hedgehog signaling transcription factor Gli-1.

METHODS: Eca109 cells (a total dose of 60 Gy) to induce radioresistant esophageal carcinoma cell line Eca109R. The inhibition of cell proliferation was determined by Cell Counting Kit assay. The expression of Gli-1 was detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. HE staining was employed to observe the changes in cell morphology. Western blot was employed to determine the nuclear expression of Gli-1 and dynamic changes of Gli-1 in irradiated Eca109 cells. Apoptosis was determined by flow cytometry. The following four groups were included in the experiments: untreated cells, P162-treated cells, irradiated cells, and P162-treated irradiated cells. Eca109 and Eca109R cells were included in each group.

RESULTS: Eca109R possessing certain radiation resistance displayed lower ability of growth inhibition than Eca109 cells. Nuclear Gli-1 expression was significantly higher in Eca109R cells than in Eca109 cells (0.45 ± 0.01 *vs* 0.32 ± 0.01, $P < 0.0001$). On days 2 and 14 after irradiation, the nuclear expression of Gli-1 in Eca109 cells was higher than that in control cells (0.0882 ± 0.011, 0.3560 ± 0.015 *vs* 0.2552 ± 0.0103, $P < 0.05$). In both Eca109R and Eca109 cells, the nuclear expression of Gli-1 was reduced after treatment with 20 μmol/L P162 [0.2553 ± 0.011, 0.2578 ± 0.014 (non-irradiation); 0.1324 ± 0.012, 0.0595 ± 0.011(2 d after irradiation); 0.1741 ± 0.013, 0.2397 ± 0.112 (14 d after irradiation), $P < 0.0001$]. P162 combined with radiotherapy facilitated cells apoptosis.

CONCLUSION: Nuclear Gli-1 expression is related to radioresistance of esophageal cancer cells. P162 enhances radiosensitivity of Eca109 cell possibly by inhibiting Gli-1 expression and promoting apoptosis.

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

Key Words: Esophageal carcinoma cell; Hedgehog; Gli-1; P162; Radioresistance

Chen J, Wu QM, Long H, Zhang H, Chen JH. P162 enhances radiosensitivity of esophageal carcinoma Eca109 cells by inhibiting Hedgehog signaling transcription factor Gli-1. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 615-623
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/615.asp
DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.615

■背景资料
食管癌是消化系常见的恶性肿瘤之一, 放疗是其晚期主要治疗手段. 据统计发现临床上放疗后大约有68%的食管癌会复发, 研究证实放射治疗并不能完全杀死肿瘤细胞. 进一步研究发现其与放疗抵抗相关. 目前研究表明食管癌放疗抵抗涉及多种基因、多条信号通路调控细胞的DNA损伤修复、细胞周期重分布、细胞凋亡、细胞再增殖、细胞再氧合等. 因此研究食管癌放疗抵抗主要机制并使用药物增敏放射敏感性具有重要的临床价值.

■同行评议者
张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

■研发前沿
Hedgehog(Hh)是肿瘤干细胞信号通路之一，发现其信号分子在食管鳞癌中异常表达，近年的研究显示肿瘤干细胞在肿瘤放疗抵抗中起极其重要的作用，那么，Hedgehog是否导致食管癌的放疗抵抗？.

摘要

目的：探讨新药多肽P162通过抑制Hedgehog(Hh)信号转录因子Gli-1对人食管癌细胞株Eca109起放射增敏作用.

方法：反复多次X线(剂量累计60 Gy)照射Eca109诱导食管癌细胞Eca109R，采用CCK8法测增殖抑制率，免疫细胞化学法、免疫荧光技术测Gli-1的表达，HE染色观察细胞形态学改变，Western blot测核内Gli-1表达及动态监测Eca109放疗后核内Gli-1变化，流式细胞仪测细胞凋亡率. 实验分以下4组：未照射加药组、照射加药组、未照射不加药组和照射不加药组，每组中含Eca109、Eca109R两种细胞.

结果：Eca109R增殖抑制率明显低于Eca109，具有一定放射抗拒性；Eca109R较Eca109高表达Gli-1(0.45±0.01，0.32±0.01，P<0.0001)；Eca109放疗后Gli-1于2 d，14 d表达与对照相比(0.0882±0.011，0.3560±0.015 *vs* 0.2552±0.0103)，差异有统计学意义(P<0.05)；20 μmol/L P162干预Eca109R、Eca109细胞中，与0 μmol/L P162干预比较Gli-1表达下调，分别为：0.2553±0.011，0.2578±0.014(未照射)，0.1324±0.012，0.0595±0.011(照射2 d)，0.1741±0.013，0.2397±0.112(照射14 d)，差异均有统计学意义(P<0.0001)，P162联合放疗促细胞凋亡.

结论：Hh信号转录因子Gli-1与食管癌放射抗拒相关. P162放射增敏作用可能与抑制转录因子Gli-1、促细胞凋亡相关.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词：食管癌；Hedgehog；Gli-1；P162；放射抗拒

核心提示：Hedgehog(Hh)信号转录因子Gli-1与食管癌放射抗拒相关. P162放射增敏作用可能与抑制转录因子Gli-1、促细胞凋亡相关.

陈洁，吴清明，龙辉，张红，陈建华. P162抑制Hedgehog信号转录因子Gli-1增强食管癌Eca109细胞的放射敏感性. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 615-623 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/615.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.615

0 引言

食管癌是常见的消化系恶性肿瘤，放疗是晚期治疗重要手段，但易形成放疗抵抗而复发[1,2]，靶向G3BP多肽162-P162(中国专利2010101400323，PCT WO2011/124063 A1)，其结构能与G3BP蛋白的NTF2结构域发生特异性结合，干预G3BP蛋白磷酸化. 已证实P162对高表达G3BP的食管癌Eca109细胞有放射增敏作用，但具体增敏机制尚不完全清楚[3]，研究显示Hedgehog(Hh)通路在食管癌异常激活[4-6]，且与放化疗抵抗相关[7,8]. 本实验以食管癌细胞株Eca109及其诱导的具有一定放射抗拒性细胞Eca109R为对象，探讨食管癌放射抗拒及P162的放射增敏作用与Hh信号通路转录因子Gli-1的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌细胞株Eca109(由太和医院馈赠)；多肽P162(武汉凯泰新生物技术有限公司)；Gli-1抗体(Santa Cruz公司)；新生胎牛血清(杭州四季青有限公司)；RPMI 1640培养粉(Gibco公司)；胰蛋白酶粉(Amresco公司)，CCK-8试剂(Sigma公司)；苏木素(Gibco公司)、伊红(Gibco公司)；丙烯酰胺(Amresco)；甲叉双丙烯酰胺(Amresco)；BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)；核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒(凯基生物)；Annexin V-FITC凋亡试剂盒(Roche). CO_2恒温细胞培养箱(Heal Force公司)；酶联免疫检测仪(美国宝特ELX800)；倒置显微镜(Olympus公司)；超速低温离心机(Sigma公司)；流式细胞仪(美国贝克曼公司FC 500 cytometers CXP分析软件)；37 ℃恒温水浴箱(华普达公司)；垂直电泳槽(北京六一仪器厂)；Nikon ECLIPSE 80i荧光显微镜(日本Nikon 公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养：细胞置37 ℃、5%CO_2培养箱中培养，其培养基为含有10%胎牛血清、青霉素100 U/L、链霉素100 U/L的RPMI 1640，细胞处于对数生长期时进行实验.

1.2.2 诱导Eca109R细胞：取亲本细胞Eca109采用Varian2300直线加速器6MV-X线照射8 Gy，表面加1.5 cm标准等效填充物，放射源至标本距离100 cm，照射野10 cm×10 cm，吸收剂量率为1.5 Gy/min，照射后置培养箱继续培养，待细胞接近长满瓶底时，0.25%胰蛋白酶消化后重新接种培养. 细胞处于对数期时，再次X射线照射8 Gy. 重复以上过程，累计照射剂量至60 Gy[9].

1.2.3 CCK-8法测Eca109、Eca109R细胞增殖抑制率：0、2、4、6、8 Gy剂量照射Eca109、Eca109R细胞后，将其消化成悬液，以5000 cells/well接种于96孔板，重复6孔，设空白调零组. 孔中培养24、48、72 h后加10 μL CCK-8，培养箱孵育1 h，选择450 nm处酶标仪测各孔吸光度(A)，

计算增殖抑制率, 抑制率(inhibition rate, IR) =(1-实验组平均A值/对照组平均A值)×100%.

1.2.4 细胞免疫化学: 将对数生长期细胞Eca109、Eca109R消化成悬液, 以5×10^4 cells/mL接种于6孔板中盖玻片上, 每孔2 mL, 孵育4 h后, 4%多聚甲醛固定, 0.5%Triton X-100室温通透, 3%H_2O_2-甲醇除内源性过氧化酶活性, 10%正常山羊血清封闭, 敷Ⅰ抗兔抗人Gli-1(1∶100), 4 ℃湿盒过夜, 加入相应的Ⅱ抗, 显微镜下控制DAB显色, 待显色充分后, 水冲洗终止反应. 苏木素复染, 盐酸乙醇分化, 二甲苯透明, 树胶封片, 镜下观察, 拍照. Gli-1蛋白以胞质或胞核出现浅黄色至深棕色颗粒判断为阳性细胞. 在显微镜下随机计数6个高倍视野的细胞. 综合阳性细胞及染色强度所占百分比2个方面进行半定量分析. 染色强度评分: 0分: 无或染色极淡, 阴性(-); 1分: 浅棕黄色, 弱阳性(+); 2分: 棕黄色, 阳性(++); 3分: 棕褐色, 强阳性(+++). 阳性细胞百分比(A、B、C、D)分别是-、+、++、+++各种染色强度细胞的百分比. 染色强度指数 = A×0+B×1+C×2+D×3.

1.2.5 免疫荧光: 细胞爬片处理同细胞免疫化学, 4%的多聚甲醛固定, 0.5%Triton X-100室温通透20 min, 正常山羊血清封闭, 敷Gli-1Ⅰ抗(1∶150), 4 ℃湿盒过夜; 敷Ⅱ抗荧光(Cy3)标记羊抗兔IgG(1∶100), 湿盒中20 ℃-37 ℃孵育1 h, 复染核DAPI避光孵育5 min, 抗荧光淬灭剂封片液封片, 显微镜下随机计数6个高倍视野的细胞, 计算阳性细胞率.

1.2.6 HE染色观察P162对Eca109、 Eca109R细胞形态学影响: Eca109、 Eca109R细胞加入终浓度为20 μmol/L P162, 同时对照细胞加入等量RPMI 1640培养液, 作用48 h后做爬片处理, 苏木素染色10 min, 盐酸乙醇分化, 伊红染色2 min, 二甲苯透明, 树胶封片, 镜下观察, 拍照.

1.2.7 Western blot测放疗后Eca109核内Gli-1表达变化: 6 Gy X射线照射Eca109细胞后, 分别于1、2、4、24、48、72 h、7、10、14、18 d后提取核蛋白, 未照射Eca109细胞作空白对照. 测蛋白浓度, 取50 μg总蛋白上样电泳, 蛋白分离后停止电泳, 电转移至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶粉封闭2 h, 加入封闭液稀释兔抗Gli-1Ⅰ抗(1∶300), 4 ℃孵育过夜, TBST洗膜, 加入相应Ⅱ抗室温孵育2 h, TBST洗膜, ECL试剂盒暗室曝光显影.

1.2.8 Western blot测处理组细胞核内Gli-1表达: 处理组给予两种干预方法, 先20 μmol/L P162干预48 h, 后6 Gy X线照射, 可分为4组, 即: 未照射不加药组、未照射加药组、照射加药组和照射不加药组, 每组均含Eca109、Eca109R两种细胞. 加药不加药干预48 h后, 不照射细胞立即提取核蛋白-80 ℃保存, 照射处理细胞于照射后48 h、14 d提取核蛋白, 待核蛋白提取完毕统一进行Western blot.

1.2.9 流式细胞术测细胞凋亡率: 上述4组细胞加药及不加干预理48 h后, 未照射及照射处理24 h后用不含EDTA胰酶消化收集5×10^5细胞, PBS洗涤2次(2000 r/min, 离心5 min), 悬浮于500 μL Binding Buffer中, 加入5 μL Annexin V-FITC混匀后, 再加入5 μL Propidium Iodide混匀, 避光孵育15 min, 过滤后上流式细胞仪检测.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行统计分析. 计量资料用mean±SD表示, 组间比较采用配对t检验, P162对Eca109、Eca109R细胞核内Gli-1影响采用2×2析因设计, 正态Shapiro-Wilk检验, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 Eca109、Eca109R细胞增殖抑制率差异 Eca109、Eca109R细胞经X线照射后24、48、72 h行CCK8检测, 发现相同时间各个照射剂量下Eca109R增殖抑制率明显低于Eca109(表1, 图1)(组间两两比较采用配对t检验, P<0.05). 与亲本Eca109细胞相比, Eca109R细胞放射敏感性较低, 具有一定放射抗拒性.

2.2 Gli-1蛋白在Eca109、 Eca109R细胞定位表达 免疫细胞化学法、免疫荧光技术显示Gli-1蛋白表达位于胞核及胞浆, Eca109、Eca109R细胞均有表达, 免疫组织化学染色强度分别为: 1.05629±0.098, 1.703975±0.055(P<0.05)(图2, 3). 免疫荧光阳性细胞率分别为: 39.9567%±0.0097%, 66.4589%±0.0251%(P<0.05)(图4, 5), 差异有统计学意义.

2.3 P162对Eca109、Eca109R细胞形态学影响 HE观察显示: Eca109细胞呈圆形或不规则多边形, 如铺路石排列(图6A). Eca109R细胞呈不规则梭性, 不规则排列(图6B). 20 μmol/L P162处理48 h后, Eca109细胞皱缩聚集, 变为不规则条形, 可见细胞裂解相互融合(图6C). Eca109R细胞亦表现为皱缩聚集, 可见核缩小、多核, 细胞裂解融合(图6D).

2.4 放疗后Eca109细胞核内Gli-1表达变化 Western blot测X线照射后Eca109细胞1、2、4、24、48、72 h、7、10、14 d时间点核内Gli-1表达, 结果显示: 照射后Gli-1逐渐下调, 与未照射细胞

■相关报道
Yoshikaw报道核蛋白Gli-1的表达与食管鳞癌放疗抵抗及复发有显著联系. Zhu等也表明Gli-1表达与食管鳞癌放疗抵抗相关. Chen等研究显示放疗诱使肝癌细胞自分泌Shh配体激活Hh信号通路产生放疗抵抗.

■创新盘点
Hh信号转录因子Gli-1在食管癌Eca109细胞中表达，并与其放射抗拒相关，新药多肽P162能够抑制Gli-1的表达来增加食管癌放射敏感性.

表 1 不同剂量的X线对Eca109、Eca109R细胞的增殖抑制率(CCK8法) (mean ± SD, n = 6, %)

照射剂量(Gy)	IR					
	24 h		48 h		72 h	
	Eca109	Eca109R	Eca109	Eca109R	Eca109	Eca109R
2	10.70 ± 1.08	3.91 ± 1.44	19.35 ± 1.45	6.65 ± 1.19	31.79 ± 1.25	7.51 ± 1.00
4	12.65 ± 1.09	9.53 ± 1.17	36.11 ± 1.47	11.81 ± 1.14	47.94 ± 0.93	13.64 ± 1.17
6	21.23 ± 1.55	13.73 ± 1.41	46.98 ± 1.32	21.73 ± 1.34	51.72 ± 1.32	23.68 ± 1.12
8	43.52 ± 1.07	31.64 ± 1.41	56.93 ± 1.20	32.84 ± 1.52	71.95 ± 1.36	38.35 ± 1.11

IR: 抑制率.

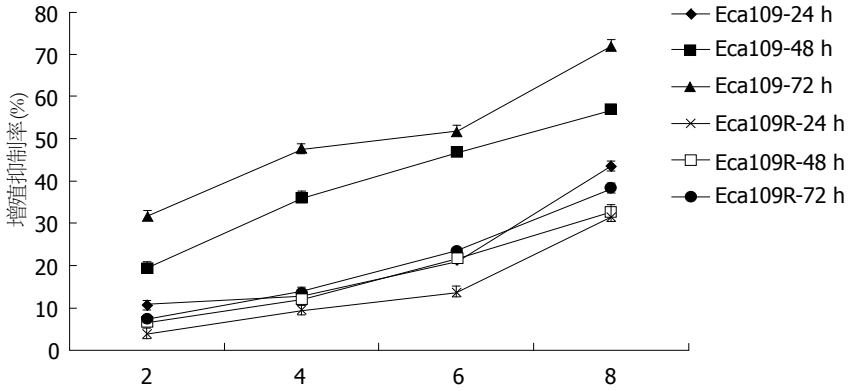

图 1 放疗对Eca109、Eca109R的增殖抑制曲线.

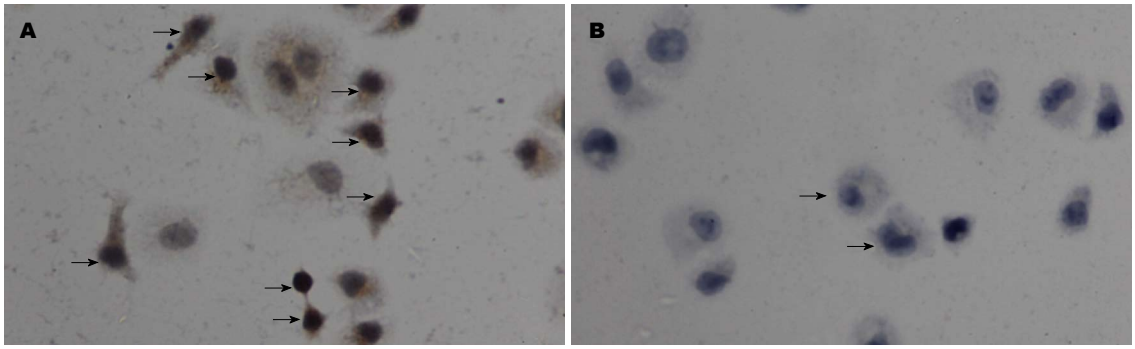

图 2 Gli-1在Eca109R细胞中表达的染色强度(免疫组织化学 × 400). A: Gli-1阳性; B: 阴性对照.

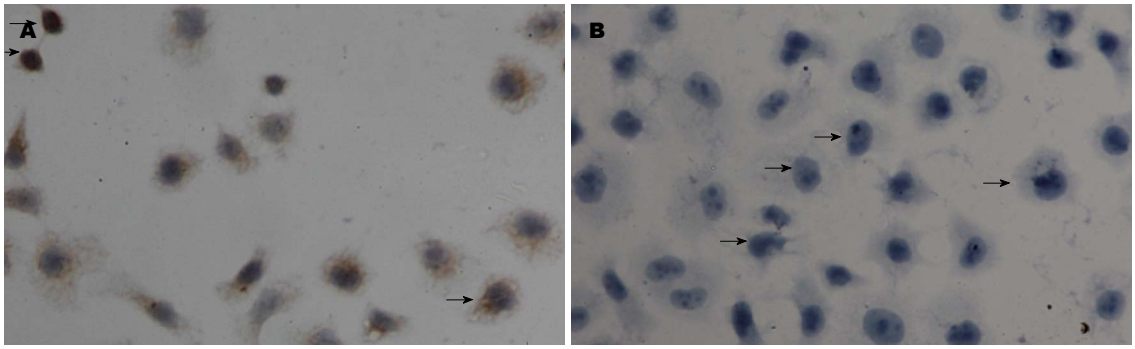

图 3 Gli-1在Eca109细胞中表达染色强度(免疫组织化学 × 400). A: Gli-1阳性; B: 阴性对照.

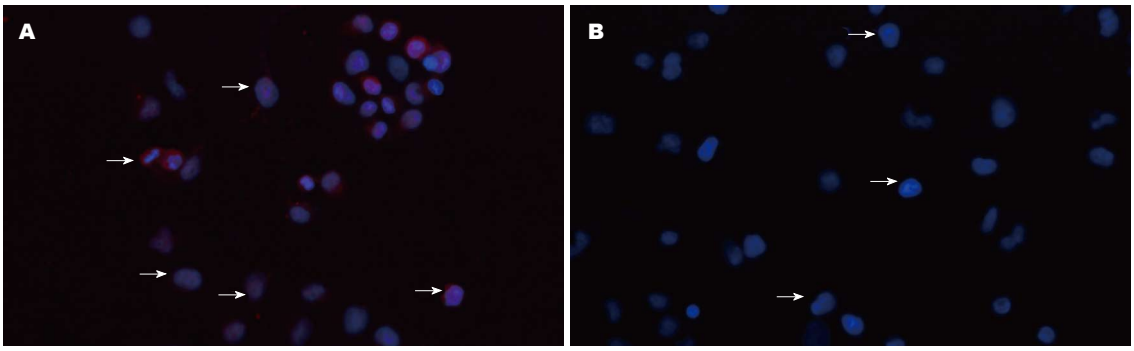

图 4 Gli-1在Eca109R细胞中表达的阳性率(免疫荧光×400). A: Gli-1阳性; B: 阴性对照.

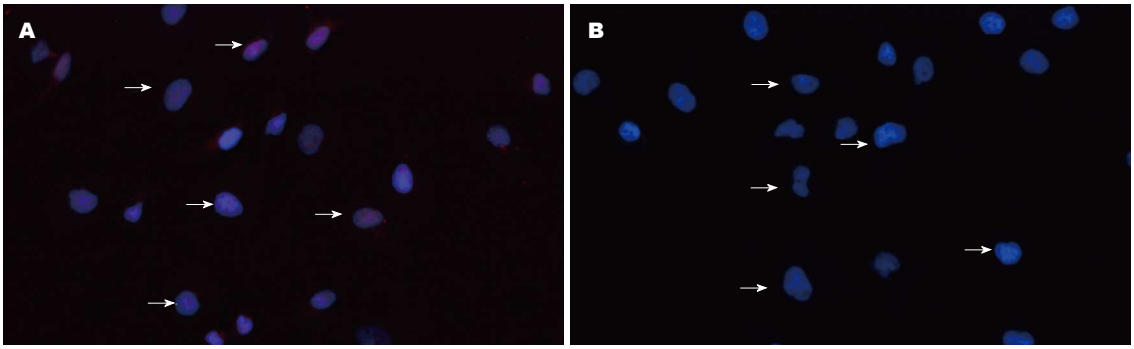

图 5 Gli-1在Eca109细胞中表达的阳性率(免疫荧光×400). A: Gli-1阳性; B: 阴性对照.

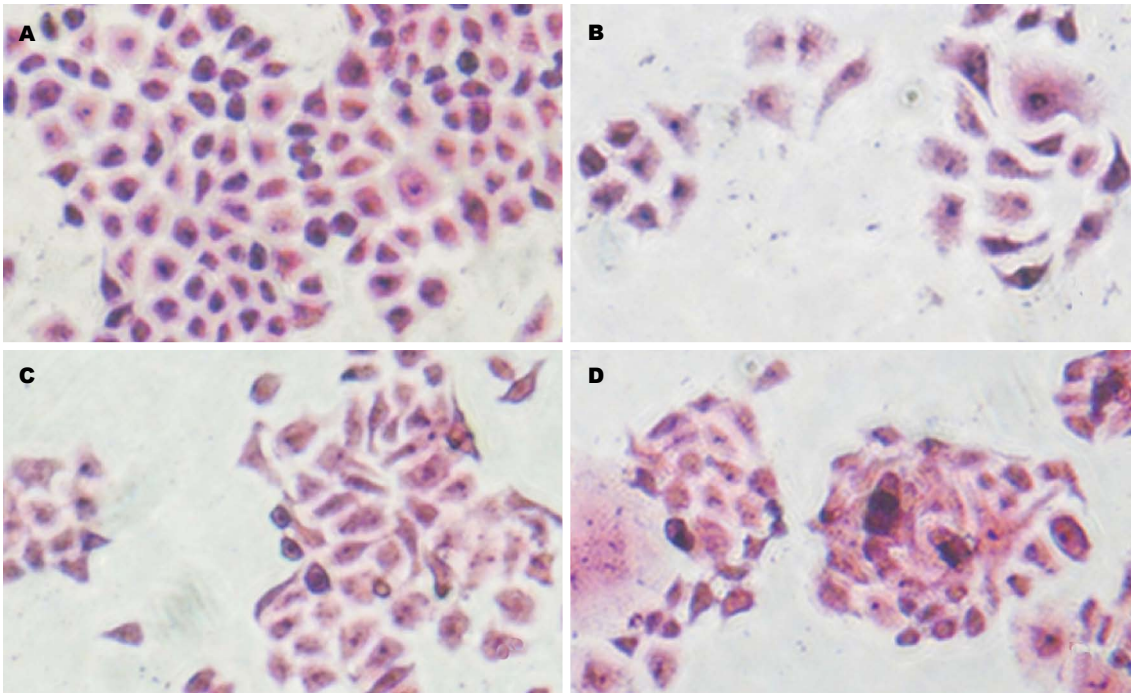

图 6 经20 μmol/L P162作用48 h后Eca109、Eca109R细胞形态(HE×200). A: Eca109; B: Eca109R; C: P162+Eca109; D: P162+Eca109R.

相比于第48小时表达最低($P<0.05$), 此后逐渐上调, 于第14天表达最高($P<0.05$), 18 d趋于下降趋势(图7), 差异有统计学意义.

2.5 P162对Eca109、Eca109R细胞核内Gli-1影响 Western blot测射线照射及P162干预后Eca109、Eca109R细胞核内Gli-1变化, 结果显示: 未照射加药组较未照射不加药组低表达Gli-1, 其中未照射不加药组中, Eca109R较Eca109高表达Gli-

■应用要点
靶向作用于G3BP的新型多肽P162通过抑制Hh信号通路逆转食管癌放射抗拒, 阐明食管癌放疗抗拒和P162增敏放疗的最新机制, 为食管癌防治提供新的理论依据和手段.

■同行评价
本文设计合理可靠，有系统的理论分析和有价值的结论.

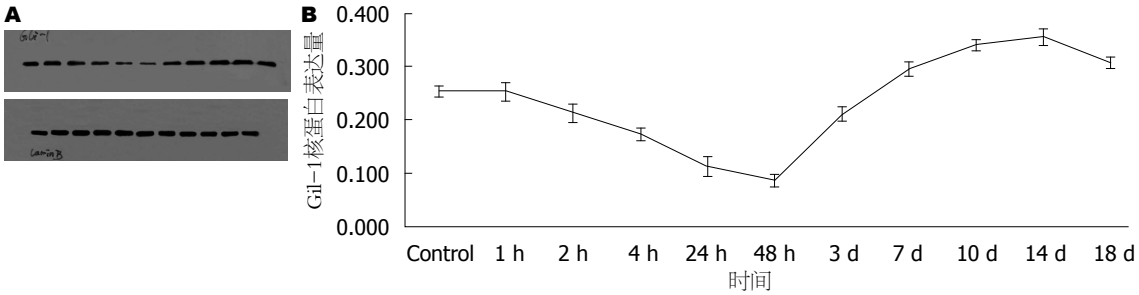

图 7 Eca109细胞放疗后不同时间点核蛋白Gli-1的表达. A: Western blot结果; B: Eca109细胞放疗后不同时间点核蛋白Gli-1表达水平.

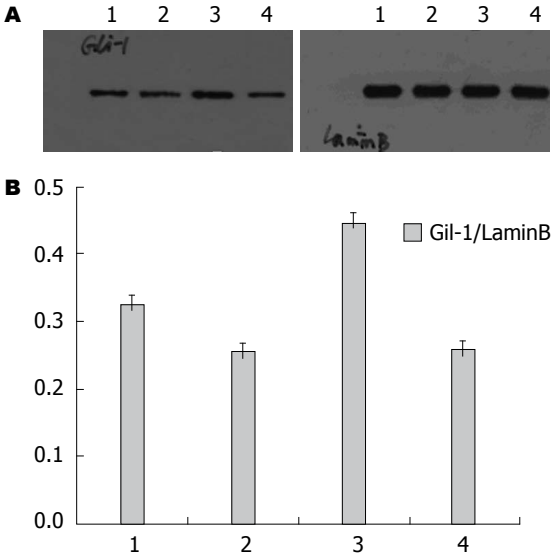

图 8 不照射加药组、未照射不加药组细胞核内蛋白Gli-1的表达. A: Western blot结果, 参照为核蛋白LaminB; B: 未照射加药组、未照射不加药组细胞核内蛋白Gli-1表达水平. 1: Eca109; 2: Eca109+20 μmol/L P162; 3: Eca109R; 4: Eca109R+20 μmol/L P162.

1(F = 135.73, P<0.0001)(图8); 照射加药组较照射不药组(照射后2、14 d)低表达Gli-1, 差异均有统计学意义(P<0.05), 其中照射不加药组(照射后2、14 d)中, Eca109与Eca109R的 Gli-1表达无统计学差异[分别为F = 1.89, P = 0.2064(2 d), F = 0.45, P = 0.5191(4 d)](图9, 10).

2.6 P162联合放疗对Eca109、Eca109R细胞凋亡影响 由表2、图11可知P162联合放疗促进Eca109R、Eca109细胞凋亡.

3 讨论

Hh经典信号通路主要由Hh配体(Dhh、Ihh、Shh)、PTCH和Smo组成的受体复合物以及下游转录因子Gli等组成, 其中Gli-1是Hh下游靶基因的强激活子, 核内Gli-1蛋白水平与Gli-1的转录活性成正比, 核蛋白Gli-1的表达水平是反映Hh信号通路活性[10]. Yoshikaw等[11]报道核蛋白Gli-1

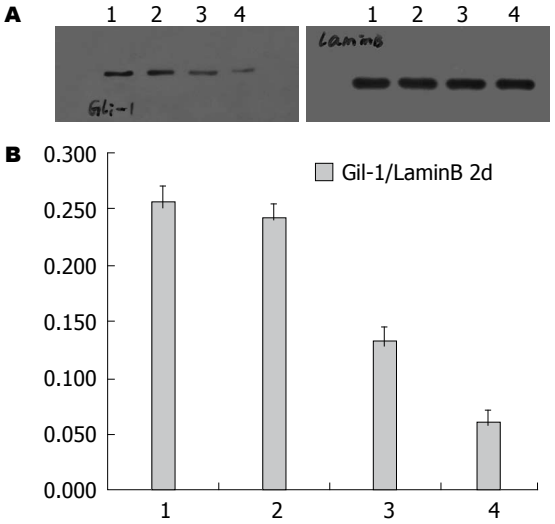

图 9 照射加药组、照射不加药组(照射后2 d)核蛋白Gli-1的表达. A: Western blot结果. 参照为核蛋白LaminB; B: 照射加药组、照射不加药组(照射后2 d)核蛋白Gli-1表达水平. 1: Eca109; 2: Eca109+20 μmol/L P162; 3: Eca109R; 4: Eca109R+20 μmol/L P162.

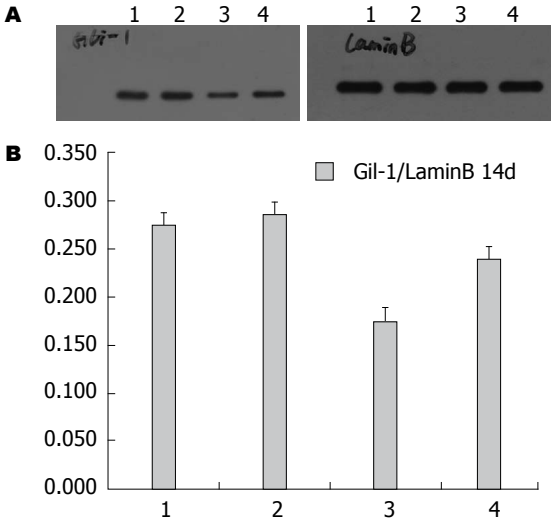

图 10 照射加药组、照射不加药组(照射后14 d)核蛋白Gli-1的表达. A: Western blot结果. 参照为核蛋白LaminB; B: 照射加药组、照射不加药组(照射后14 d)核蛋白Gli-1表达水平. 1: Eca109; 2: Eca109+20 μmol/L P162; 3: Eca109R; 4: Eca109R+20 μmol/L P162.

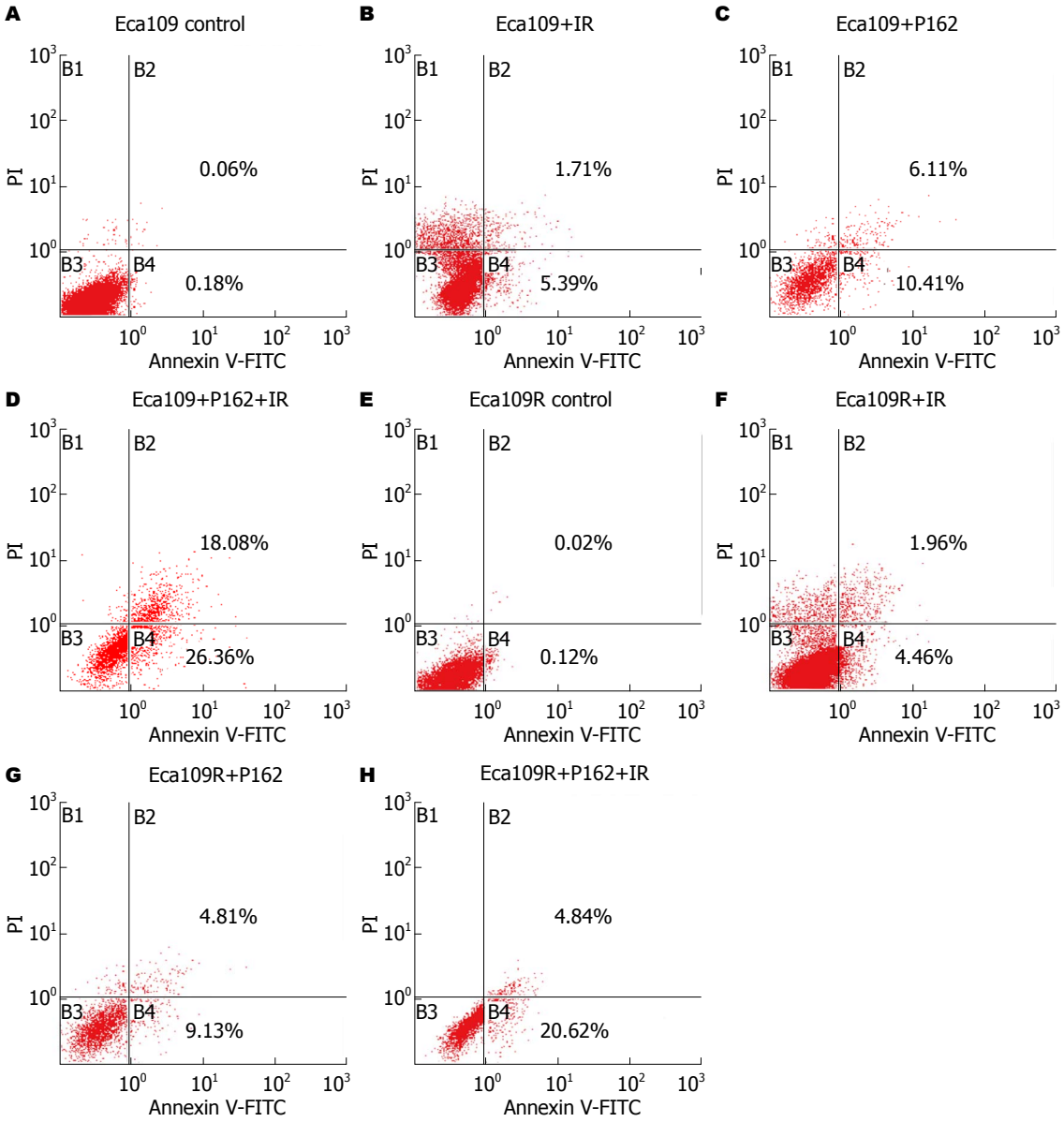

图 11 P162联合放疗对Eca109R、Eca109细胞凋亡影响流式图(20 μmol/L P162, IR照射剂量为6 Gy). A: Eca109; B: Eca109+IR; C: Eca109+P162; D: Eca109+P162+IR; E: Eca109R; F: Eca109R+IR; G: Eca109R+P162; H: Eca109R+P162+IR.

的表达与食管鳞癌放疗抵抗及复发有显著联系. Zhu等[7]也表明Gli-1表达与食管鳞癌放疗抵抗相关. Chen等[12]研究显示放疗诱使肝癌细胞自分泌Shh(sonic hedgehog)配体激活Hh信号通路产生放疗抵抗. 本实验发现亲本食管癌Eca109细胞经放疗后Gli-1下调后上调, 放射抗拒性食管癌细胞较亲本食管癌细胞上调核蛋白Gli-1, 而两种细胞经放疗后2及4 d时Gli-1变化没有差异, 提示Hh信号通路异常激活可能与食管癌放射抗拒相关.

Hh信号诱导放疗抗拒的机制目前尚不清楚, 推测其可能的机制是因Hh为调控肿瘤干细胞的重要通路之一, 在肿瘤干细胞自我更新、细胞持续分化以及肿瘤细胞侵袭转移等方面均扮演重要角色, 维持肿瘤的生存和促进肿瘤细胞的再增殖[13,14], 而肿瘤干细胞是导致肿瘤复发、转移、放疗抵抗的主要根源[15-18].

已证实食管癌放射抗拒细胞富集大量食管癌干细胞, 具有无限增殖、自我更新、细胞球形成力、高致瘤力等干细胞特性[19,20], 前期我们发现食管癌Eca109细胞随着放疗剂量的增加SP细胞、干细胞标志物β-catenin、食管癌干细胞标志物P75NTR的表达逐渐上调, 而P162抑制P75NTR表达[3]、干扰Ras-PI3K-Akt的增殖信号通路、抑制AKT、ERK、NF-κB的表达, 上调凋亡信号通路[21]. 研究发现抑制Hh信号增敏放

表 2 P162联合放疗对Eca109R、Eca109细胞早晚期凋亡率(%)

照射剂量(Gy)	分组	早期	晚期
0	Eca109	0.18	0.06
	Eca109R	0.12	0.02
	Eca109+P162	10.41	6.11
	Eca109R+P162	9.13	4.81
6	Eca109	5.39	1.71
	Eca109R	4.46	1.96
	Eca109+P162	26.36	18.08
	Eca109R+P162	20.62	4.84

疗[22], Gu等[23]表明阻滞Hh通过干扰肿瘤干细胞增敏放疗并阻止远处癌肿转移, Chen等[24]表明抑制Gli-1 mRNA表达可促进肝癌细胞凋亡. 本实验发现单独P162及P162联合放疗下调Eca109、Eca109R核内蛋白Gli-1, 并促使其凋亡. 提示多肽P162抑制Hh信号激活, 联合放疗促进食管癌细胞凋亡.

然而P162具体通过什么信号分子抑制Hh通路亦尚未清楚, 已发现非经典Hh通路是由信号通路RAS、AKT、TGFβ不依赖配体蛋白激活转录因子Gli[25], 其中RAS-MEK信号通路是最主要的非经典Hh信号通路[26,27]. NF-κB靶向激活Shh mRNA及蛋白的表达抵抗TNF诱导凋亡[28], 据此可推测P162可通过NF-κB直接抑制经典Hh通路, 还可经 RAS-MEK、PI3K-Akt抑制非经典Hh通路.

总之, Hh信号通路在人食管癌Eca109细胞系中存在异常激活, 并与放射抗拒相关. P162对食管癌的放疗增敏作用可能涉及促进细胞凋亡, 抑制Hh信号激活及食管癌干细胞表达, 还可能涉及其他影响因素, 如DNA损伤修复机制、细胞周期再分布、肿瘤细胞再增殖等. Hh信号激活导致放射抗拒的机制及其与食管癌干细胞之间的关系、P162增敏放疗的具体机制尚需进一步探讨.

4 参考文献

1 Wong R, Malthaner R. Combined chemotherapy and radiotherapy (without surgery) compared with radiotherapy alone in localized carcinoma of the esophagus. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (1): CD002092 [PMID: 16437440 DOI: 10.1002/14651858]

2 Chen Y, Lu Y, Wang Y, Yang H, Xia Y, Chen M, Song H, Li T, Li D, Wang J, Li S. Comparison of salvage chemoradiation versus salvage surgery for recurrent esophageal squamous cell carcinoma after definitive radiochemotherapy or radiotherapy alone. *Dis Esophagus* 2012 Oct 22. *[Epub ahead of print]* [PMID: 23088212 DOI: 10.1111/j.1442-2050]

3 郑娇娇, 吴清明, 陈建华, 陈彩虹, 程静. P162对食管癌细胞株Eca109R的放射增敏作用及其对P75NTR表达的影响. 中国病理生理杂志 2013; 29: 103-107

4 Wei L, Xu Z. Cross-signaling among phosphinositide-3 kinase, mitogen-activated protein kinase and sonic hedgehog pathways exists in esophageal cancer. *Int J Cancer* 2011; 129: 275-284 [PMID: 20839260 DOI: 10.1002/ijc.25673]

5 Ma X, Sheng T, Zhang Y, Zhang X, He J, Huang S, Chen K, Sultz J, Adegboyega PA, Zhang H, Xie J. Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. *Int J Cancer* 2006; 118: 139-148 [PMID: 16003737]

6 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; 425: 846-851 [PMID: 14520411 DOI: 10.1038/nature01972]

7 Zhu W, You Z, Li T, Yu C, Tao G, Hu M, Chen X. Correlation of hedgehog signal activation with chemoradiotherapy sensitivity and survival in esophageal squamous cell carcinomas. *Jpn J Clin Oncol* 2011; 41: 386-393 [PMID: 21127038 DOI: 10.1093/jjco/hyq217]

8 Sims-Mourtada J, Izzo JG, Apisarnthanarax S, Wu TT, Malhotra U, Luthra R, Liao Z, Komaki R, van der Kogel A, Ajani J, Chao KS. Hedgehog: an attribute to tumor regrowth after chemoradiotherapy and a target to improve radiation response. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6565-6572 [PMID: 17085672 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0176]

9 金曙, 吴清明, 于皆平. NS398对放射抗拒食管鳞癌细胞的放射增敏作用. 医药导报 2006; 25: 613-615

10 Mori Y, Okumura T, Tsunoda S, Sakai Y, Shimada Y. Gli-1 expression is associated with lymph node metastasis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2006; 70: 378-389 [PMID: 17179732]

11 Yoshikawa R, Tsujimura T, Tao L, Kamikonya N, Fujiwara Y. The oncoprotein and stem cell renewal factor BMI1 associates with poor clinical outcome in oesophageal cancer patients undergoing preoperative chemoradiotherapy. *BMC Cancer* 2012; 12: 461 [PMID: 23046527 DOI: 10.1186/1471-2407-12-461]

12 Chen YJ, Lin CP, Hsu ML, Shieh HR, Chao NK, Chao KS. Sonic hedgehog signaling protects human hepatocellular carcinoma cells against ionizing radiation in an autocrine manner. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 80: 851-859 [PMID: 21377281 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2011.01.003]

13 Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3130-3140 [PMID: 20530699 DOI: 10.1158/1078-0432]

14 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 DOI: 10.1371/journal.pone.0017687]

15 Ogawa K, Yoshioka Y, Isohashi F, Seo Y, Yoshida K, Yamazaki H. Radiotherapy targeting cancer stem cells: current views and future perspectives. *Anti-*

cancer Res 2013; 33: 747-754 [PMID: 23482741]
16 Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 2144-2151 [PMID: 22981632 DOI: 10.1016/j.biocel]
17 Bohl SR, Pircher A, Hilbe W. Cancer stem cells: characteristics and their potential role for new therapeutic strategies. *Onkologie* 2011; 34: 269-274 [PMID: 21577035 DOI: 10.1159/000327815]
18 Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, Bertrand G, Chargari C, Alphonse G, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C, Magné N. Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell. *Cancer Lett* 2012; 322: 139-147 [PMID: 22459349 DOI: 10.1016/j.canlet.2012.03.024]
19 Che SM, Zhang XZ, Liu XL, Chen X, Hou L. The radiosensitization effect of NS398 on esophageal cancer stem cell-like radioresistant cells. *Dis Esophagus* 2011; 24: 265-273 [PMID: 21087344 DOI: 10.1111/j.1442-2050.2010.01138.x]
20 Li JC, Liu D, Yang Y, Wang XY, Pan DL, Qiu ZD, Su Y, Pan JJ. Growth, clonability, and radiation resistance of esophageal carcinoma-derived stem-like cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 4891-4896 [PMID: 24083764]
21 Zhang H, Zhang S, He H, Zhao W, Ren K, Chen J, Shao RG. RasGAP-derived peptide 38GAP potentiates the cytotoxicity of cisplatin through inhibitions of Akt, ERK and NF-κB in colon carcinoma HCT116 cells. *Cancer Lett* 2011; 308: 62-70 [PMID: 21570766 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.04.014]
22 Zeng J, Aziz K, Chettiar ST, Aftab BT, Armour M, Gajula R, Gandhi N, Salih T, Herman JM, Wong J, Rudin CM, Tran PT, Hales RK. Hedgehog pathway inhibition radiosensitizes non-small cell lung cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; 86: 143-149 [PMID: 23182391 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2012.10.014]
23 Gu D, Liu H, Su GH, Zhang X, Chin-Sinex H, Hanenberg H, Mendonca MS, Shannon HE, Chiorean EG, Xie J. Combining hedgehog signaling inhibition with focal irradiation on reduction of pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 1038-1048 [PMID: 23468532 DOI: 10.1158/1535-7163]
24 Chen XL, Cao LQ, She MR, Wang Q, Huang XH, Fu XH. Gli-1 siRNA induced apoptosis in Huh7 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 582-589 [PMID: 18203291 DOI: 10.3748/wjg.14.582]
25 Lauth M, Toftgård R. Non-canonical activation of GLI transcription factors: implications for targeted anti-cancer therapy. *Cell Cycle* 2007; 6: 2458-2463 [PMID: 17726373 DOI: 10.4161/cc.6.20.4808]
26 Goel HL, Pursell B, Chang C, Shaw LM, Mao J, Simin K, Kumar P, Vander Kooi CW, Shultz LD, Greiner DL, Norum JH, Toftgard R, Kuperwasser C, Mercurio AM. GLI1 regulates a novel neuropilin-2/α6β1 integrin based autocrine pathway that contributes to breast cancer initiation. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 488-508 [PMID: 23436775 DOI: 10.1002/emmm.201202078]
27 Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz I Altaba A. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5895-5900 [PMID: 17392427 DOI: 10.1073/pnas.0700776104]
28 Kasperczyk H, Baumann B, Debatin KM, Fulda S. Characterization of sonic hedgehog as a novel NF-kappaB target gene that promotes NF-kappaB-mediated apoptosis resistance and tumor growth in vivo. *FASEB J* 2009; 23: 21-33 [PMID: 18772349 DOI: 10.1096/fj.08-111096]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 624-629
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

结肠癌中相关miRNA对NRP2调控的预测及鉴定

李 明, 连海峰, 刘成霞, 马锋振, 谢书阳

■背景资料
结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 在全世界范围内普遍高发, 淋巴结转移是其最常见的转移途径, 也是预示患者肿瘤复发及死亡的强有力指标. 神经纤毛蛋白2(neuropilin-2, NRP2)在结直肠癌淋巴结转移中起着重要作用, 其在结直肠癌中表达上调的机制尚不明确. MiRNA作为内源性、非编码调节RNA在肿瘤相关蛋白的表达中起着重要作用, 研究NRP2调控相关miRNA对于结直肠癌的治疗具有重要的临床意义.

■同行评议者
王鲁平, 主任医师, 北京军区总医院病理科

李明, 连海峰, 刘成霞, 马锋振, 滨州医学院附属医院消化内科 山东省滨州市 256603
谢书阳, 滨州医学院肿瘤分子生物学重点实验室 山东省烟台市 264003
李明, 在读硕士, 主要从事大肠癌淋巴结转移的研究.
山东省自然科学基金资助项目, No. ZR2010HL051
作者贡献分布: 李明与连海峰对此论文所作贡献均等; 此课题由刘成霞与连海峰设计; 研究过程由李明与连海峰操作完成; 数据分析由马锋振与谢书阳完成; 本论文写作由李明与连海峰完成.
通讯作者: 刘成霞, 教授, 256603, 山东省滨州市黄河二路661号, 滨州医学院附属医院消化内科. phdlcx@163.com
电话: 0543-3256764
收稿日期: 2013-11-20 修回日期: 2013-12-08
接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-18

Prediction and identification of microRNAs involved in regulating neuropilin-2 in colorectal carcinoma

Ming Li, Hai-Feng Lian, Cheng-Xia Liu, Feng-Zhen Ma, Shu-Yang Xie

Ming Li, Hai-Feng Lian, Cheng-Xia Liu, Feng-Zhen Ma, Department of Digestive Medicine, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong Province, China
Shu-Yang Xie, Key Laboratory of Tumor Molecular Biology, Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2010HL051
Correspondence to: Cheng-Xia Liu, Professor, Department of Digestive Medicine, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, 661 Huanghe Er Road, Binzhou 256603, Shandong Province, China. phdlcx@163.com
Received: 2013-11-20 Revised: 2013-12-08
Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To predict and identify the possible microRNAs (miRNAs) involved in regulating neuropilin-2 (NRP2) in colorectal carcinoma.

METHODS: Bioinformatic technique was used to predict the possible miRNAs which might participate in regulating NRP2. miR-486-5p, which is most possibly involved in regulating NRP2, was selected for further study. A miR-486-5p over-expressing plasmid was constructed and transfected into the human colorectal carcinoma cell line SW620 using Lipofectamine 2000. The expression of miR-486-5p in transfected cells was measured by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Western blot was conducted to detect the expression of NRP2 protein, and miR-486-5p targeting NRP2 3′UTR was verified by dual luciferase reporter assay.

RESULTS: Twenty-five possible NRP2-regulating miRNAs were predicted using bioinformatic software. By searching the literature, we chose miR-486-5p for further study. The expression of miR-486-5p in SW620 cells transfected with miR-486-5p over-expressing plasmid was obviously up-regulated. Western blot analysis revealed that miR-486-5p reduced the expression level of NRP2. Dual luciferase reporter assay demonstrated that miR-486-5p could directly target the NRP2 3'UTR.

CONCLUSION: miR-486-5p is involved in the post-transcriptional regulation of NRP2 by binding to the NRP2 3′UTR and interfering the normal translation of NRP2.

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

Key Words: Neuropilin-2; miR-486-5p; Transfection; Bioinformatic technique

Li M, Lian HF, Liu CX, Ma FZ, Xie SY. Prediction and identification of microRNAs involved in regulating neuropilin-2 in colorectal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 624-629 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/624.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.624

摘要

目的: 预测可能调控神经纤毛蛋白2(neuropilin-2, NRP2)的微小RNA(microRNA, miRNA), 鉴定其对NRP2的调控作用及可能的调控机制.

方法: 使用生物信息学软件预测可能调控NRP2的miRNA, 选择可能性最大的miRNA-486-5p进一步研究, 构建miRNA-486-5p过表达质粒, 采用脂质体法将质粒转染入人结肠

癌细胞株SW620, 实时定量PCR(qRT-PCR)验证miRNA-486-5p的表达丰度, Western blot检测NRP2的表达, 双荧光素酶实验验证miRNA-486-5p对NRP2的调控机制.

结果: 生物信息学技术预测共有25条miRNA可能调控NRP2的表达, 结合文献选择miR-486-5p进一步研究; miR-486-5p过表达质粒转染SW620细胞后, 表达丰度升高, NRP2蛋白表达明显下调, 双荧光素酶实验证实miRNA-486-5p可与NRP2 mRNA 3'非转录区(3' untranslated region, 3'UTR)直接结合, 从而发挥对NRP2转录后翻译的抑制作用.

结论: miRNA-486-5p可调控的NRP2的表达, 其作用机制是通过结合NRP2 3'UTR而抑制NRP2 mRNA的正常翻译.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: NRP2; miRNA-486-5p; **转染; 生物信息学技术**

核心提示: 本研究应用生物信息学软件预测可能调控神经纤毛蛋白2(neuropilin-2, NRP2)的微小RNA, 选择可能性最大的miRNA-486-5p进一步研究, 上调SW620细胞miRNA-486-5p的表达量后, Western blot表明miR-486-5p可抑制NRP2的表达, 双荧光素酶实验证实miRNA-486-5p可与NRP2 mRNA 3'非转录区直接结合, 从而发挥对NRP2转录后翻译的抑制作用.

李明, 连海峰, 刘成霞, 马锋振, 谢书阳. 结肠癌中相关miRNA对NRP2调控的预测及鉴定. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 624-629 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/624.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.624

0 引言

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)在全世界范围内普遍高发, 其发病率在恶性肿瘤中居第4位, 术后复发和转移是结直肠癌患者的主要死因, 淋巴结转移是其最常见的转移途径, 也是判断患者预后及制定治疗方案的重要指标[1]. 神经纤毛蛋白2(neuropilin-2, NRP2)是一种单链跨膜糖蛋白, 首先作为神经导向因子semaphorins的受体而被发现的[2]. 新近发现NRP2可以与VEGFR3形成受体复合物, 促进淋巴管生成[3]. 多项研究表明NRP2在肿瘤中发生发展中其重要作用: Gray等[4]研究发现NRP2在结直肠癌组织高表达, 周琪等[5]发现结直肠组织中NRP2高表达, 并与肿瘤的淋巴结转移及肿瘤微淋巴管密度(micro-lymphatic density, MLD)呈正相关. 目前关于NRP2在肿瘤中上调机制仍不明确, 研究其作用机制可为针对淋巴结转移的生物靶向治疗、预防结直肠癌的转移和复发及提高肿瘤患者的生存率提供理论依据. miRNA是一类长约22 nt的非编码小RNA, 作为基因转录后调控因子, 可抑制靶蛋白的转录后翻译, 由于miRNA作用于靶基因时只需其种子区域(seed region, 第2个至第8个核苷酸)完全匹配, 而不需要完全配对结合, 故一条miRNA可调控多个靶基因, 一个靶基因受多条miRNA的调控[6]. 研究证明异常表达的miRNA在肿瘤的发生发展过程中起着重要的作用. 我们推测NRP2在结直肠癌中的高表达可能与异常表达的miRNA相关, 故研究NRP2调控相关的miRNA可为结直肠癌的生物靶向治疗提供新的研究方向. 本实验通过生物信息学技术及相关文献筛选高度可能调控NRP2的miRNA, 并验证其对NRP2的作用及机制.

■研发前沿
本研究首先应用生物信息学软件预测可能调控NRP2的微小RNA, 结合文献选择可能性最大的miRNA-486-5p深入研究, 通过转染、Western blot及荧光素酶实验证实了其对NRP2的直接调控作用, 丰富了NRP2调控的理论体系, 为结直肠癌的防治提供新的研究方向.

1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌细胞株SW620购自武汉博士德公司; miRNA-486-5p过表达质粒(GV214-miR)由上海吉凯公司构建、合成: 合成miRNA-486-5p前体序列并在两端设计*BamH* I /*Hind*III酶切位点, 插入GV214多克隆位点, 该载体以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)为报告基因, 同时构建阴性质粒(GV214-NC); 双荧光素酶报告质粒(pmirGLO Vector)由上海吉玛公司构建合成: 全基因合成NRP2 3'UTR, 并在两端设计酶切位点, 插入荧光虫荧光素酶(firefly luciferase)3'UTR的克隆位点, 该质粒同时包含海肾荧光素酶(renilla luciferase)基因, 作为内参验证其转染效率(图1). RPMI 1640培养基、标准胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Hyclone公司); Lipofectamine 2000(Invitrogen公司); 兔抗人NRP2多克隆抗体(英国Abcam公司); BCA蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、GAPHD兔单克隆抗体、硝酸纤维素膜、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(碧云天生物技术研究所); 总RNA提取试剂、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR试剂盒(大连宝生物公司); 荧光实时定量PCR引物: 广州锐博有限公司设计合成.

1.2 方法

1.2.1 TargetScan软件预测NRP2调控相关的miRNA: 利用TargetScan软件预测可能的NRP2

■相关报道
Gray等研究发现NRP2在结直肠癌组织高表达, 并在体外实验证实抑制NRP2的表达可促进细胞凋亡, 抑制其增殖和迁移. MiR-486-5p在胰腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌均表达下调.

表 1 TargetScan预测神经纤毛蛋白2调控相关的miRNA及其相应评分

编号	miRNA	Position of NRP2 3'UTR	Context score
1	has-miR-4433	79-86	99
2	has-miR-876-5p	85-92	99
3	has-miR-3167	85-92	98
4	has-miR-371-5p	107-114	98
5	has-miR-216b	112-119	97
6	has-miR-571	76-82	90
7	has-miR-4298	53-59	88
8	has-miR-1302	53-59	86
9	has-miR-4768-3p	80-86	85
10	has-miR-3913-3p	50-56	84
11	has-miR-3145-3p	100-106	82
12	has-miR-486-5p	30-36	81
13	has-miR-4459	80-86	79
14	has-miR-371b-5p	108-114	78
15	has-miR-452	63-69	75
16	has-miR-1290	86-92	73
17	has-miR-1255a	72-78	69
18	has-miR-4676-3p	32-38	68
19	has-miR-216a	113-119	68
20	has-miR-622	43-49	67
21	has-miR-1255b	72-78	66
22	has-miR-339-5p	32-38	59
23	has-miR-140-3p	26-32	50
24	has-miR-4760-5p	59-65	50
25	has-miR-1267	–	Too close to ORP

调控相关的miRNA, 结果显示共有25条miRNA可能参与了NRP2转录后调控(表1). NRP2在结肠癌中表达上调, miRNA对靶基因的表达是通过结合靶基因3'UTR而抑制基因的表达, 故在癌组织应表达下调的miRNA才有可能对NRP2具有转录后的调控作用. 因此我们首先查阅所有TargetScan预测miRNA的相关文献, 首先排除掉无文献支持、预测评分较低和某些表达上调的miRNA, 然后在剩下的miRNA中选择与肿瘤密切相关的miRNA进一步研究. 结合文献、预测评分, 我们采用miR-486-5p作为目的miRNA作为研究对象. miRNA-486-5p在包括结直肠癌在内的多个肿瘤中表达下调, 并与肿瘤淋巴结转移密切相关. 利用miRanda(v1.9)软件预测miR-486-5p的潜在靶基因, 结果显示*NRP2*为其可能靶基因, 因此本实验选择miRNA-486-5p进一步研究.

1.2.2 细胞培养: SW620细胞以含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37 ℃、5%CO_2的培养箱中常规培养, 每2-3天用0.25%的胰蛋白酶消化、传代, 取对数期细胞用于实验.

1.2.3 miRNA-486-5p过表达质粒瞬时转染SW620细胞: 取对数生长期细胞1×10^6个接种于6孔板, 置于37 ℃、5%CO_2的培养箱中培养至细胞密度70%后, 将细胞分为3组: 单纯RPMI 1640培养组、GV214-NC质粒转染组、GV214-miR过表达质粒转染组, 将培养基换成无血清无双抗的1640培养基(每孔1 mL), 质粒及转染试剂Lipofectamine 2000分别用100 μL 1640培养基稀释后, 以质粒(μg): 脂质体(μL) = 1∶2的比例混匀后静置30 min, 逐滴加入并轻晃混匀, 培养6 h后换为含完全培养基, 48 h后收集细胞进行下一步分析.

1.2.4 实时定量PCR检测miRNA-486-5p丰度: 转染48 h后收集细胞, (1)按照TRIzol试剂说明提取总RNA, 1%的琼脂糖变性凝胶电泳检测RNA的完整性, 紫外可见分光光度计检测RNA的纯度和浓度; (2)按逆转录试剂盒逆转录得到cDNA, 反应条件如下: 70 ℃ 10 min、冰浴2 min、42 ℃ 60 min、70 ℃ 10 min; (3)PCR反应参数设置:

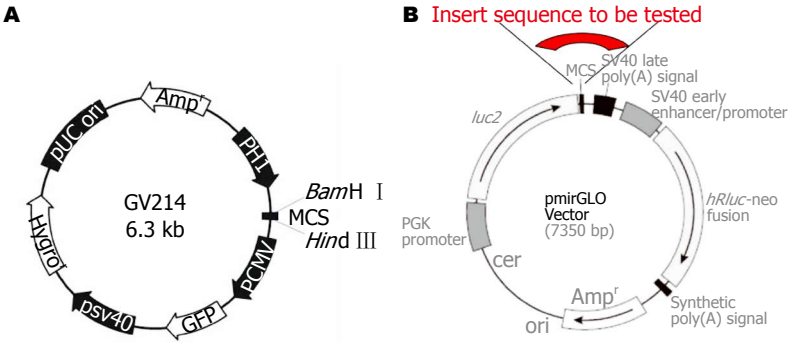

图 1 质粒图谱. A: miRNA-486-5p过表达质粒; B: 双荧光素酶报告质粒.

■创新盘点

本文将生物信息学技术和转染、Western blot、荧光素酶实验结合起来, 首次验证了miR-486-5p与NRP2之间的调控关系, 为结直肠的基因诊断及基因治疗的研究提供了新的理论依据和治疗靶点.

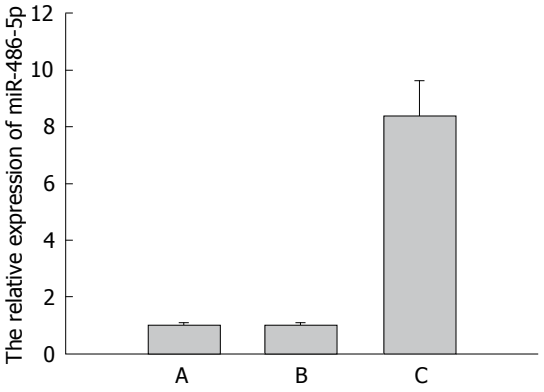

图 2 各组细胞miRNA-486-5p相对表达量. A: 空白对照组; B: GV214-NC质粒组; C: GV214-miR质粒组.

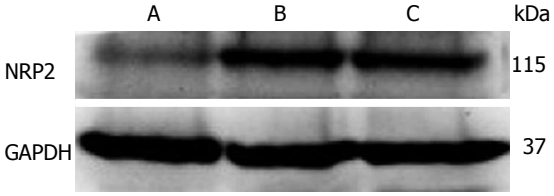

图 3 质粒转染48 h后SW620细胞内NRP2蛋白的表达. A: GV214-miR质粒组; B: GV214-NC质粒组; C: 空白对照组. NRP2: 神经纤毛蛋白2.

95 ℃ 20 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 20 s, 72 ℃ 5 s, 40个循环, 每个样品做3个平行管, 每次实验至少重复3次; (4)数据分析miRNA-486-5p相对表达水平用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算(Ct值是目标扩增产物打到设定阈值所经历的循环数), 内参为*U6*基因.

1.2.5 Western blot检测各组细胞NRP2蛋白的表达: 细胞转染48 h后, 提取总蛋白, BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 取50 μg变性处理的蛋白质加入SDS-聚丙烯酰胺凝胶小孔进行电泳(浓缩胶层80 V, 分离胶层120 V), 电泳后于冰上0.25 mA转膜2 h 10 min, 丽春红染色观察转移效果满意后, TBST缓冲液洗膜后5%脱脂奶粉与摇床上孵育2 h, 加入一抗(1∶500兔抗人NRP2多抗, 1∶5000兔抗人GAPDH单抗)4 ℃封闭过夜, 洗膜后加入羊抗兔IgG/HRP二抗(1∶2000)室温孵育1 h, 增强化学发光法(ECL)显影得到蛋白印记条带, 以Tanon软件分析条带灰度值.

1.2.6 双荧光素酶实验: 取对数生长期细胞接种于96孔板, 置于37 ℃、5%CO_2的培养箱中培养至细胞密度70%后, 将细胞分为3组: 只转染pmirGLO质粒组、共转染GV24-miR质粒和pmirGLO质粒组、共转染GV214-NC和pmirGLO质粒组; 转染方法同前. 转染48 h后吸尽细胞培养液后加入报告基因细胞裂解液, 每孔加入萤火虫荧光素酶检测缓冲液100 μL, 把96孔板放入多功能酶标仪内测定RLU(relative light unit), 检测完成后加入海肾荧光素酶检测工作液, 同样测定RLU. 用萤火虫荧光素酶测定得到的RLU值除以海肾荧光素酶测定得到的RLU值, 作为其荧光素酶活性的相对值.

统计学处理 实验数据以mean±SD表示, 单因素方差分析比较各组间差异, 实验所得数据资料采用SPSS19.0统计分析软件分析, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 qRT-PCR检测转染细胞miRNA-486-5p丰度 miR-486-5p及U6扩增曲线均为典型S型曲线, 溶解曲线呈单峰且溶解温度均一, 表明引物特异性好, qRT-PCR结果可靠. 分析结果显示: GV214-miR质粒转染组中miRNA表达明显上调, 相对定量显示其表达量约为未转染组的8倍($P<0.05$), 转染GV214-NC质粒组则无明显变化($P>0.05$)(图2).

2.2 miRNA-486-5p对NRP2蛋白表达的影响 Western blot分析结果显示, 各组细胞β-actin蛋白杂交条带亮度相似, 但NRP2条带亮度有明显差异. 与空白对照组(0.71±0.04)相比, 转染GV214-miR质粒组(0.36±0.06)NRP2表达明显下调($P<0.05$), 转染GV214-NC质粒组(0.65±0.07)则无明显差异($P>0.05$)(图3).

■应用要点
本文发现miR-486-5p在结直肠癌中参与NRP2的调控，说明其在结直肠癌淋巴结转移中的重要临床意义，提示miR-486-5p可作为NRP2潜在的治疗靶位，并可作为结直肠癌诊断及预后的判断的分子标志，对于结肠癌的早期诊断和治疗具有重要意义.

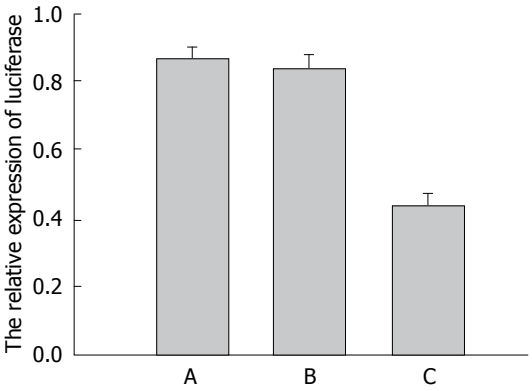

图 4 各组SW620细胞荧光素酶相对表达量. A: 空白对照组; B: GV214−NC质粒组; C: GV214−miR质粒组.

2.3 双荧光素酶实验 为了研究miR-486-5p是否直接调控NRP2的表达，我们构建了双荧光素酶报告基因载体，采用荧光素酶报告基因实验进行检测. 结果显示：和单独转染双荧光素酶质粒pmirGLO的空白对照组相比，共转染GV214-miR和pmirGLO质粒组荧光素酶活性明显降低(P<0.05)，而共转染GV214-NC和pmirGLO质粒组荧光素酶无明显改变(P>0.05)(图4).

3 讨论

CRC是消化系最常见的恶性肿瘤之一，尽管采取手术、放疗、化疗等综合治疗措施，其疗效仍不理想. 浸润和转移是包括结直肠癌在内的多数恶性肿瘤的基本特征，也是其死亡的主要原因，该过程涉及多个信号通路[7]. 早期CRC主要通过淋巴管向局部淋巴结转移，研究证明结直肠癌周围存在许多扩张状的新生淋巴管，为其淋巴结转移提供了条件，目前关于淋巴结转移的具体分子学机制尚不明确[8]. NRP2是近年来被发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族的新型受体，与VEGFR-3形成共受体，促进淋巴管生成，有研究证明NRP2在多种肿瘤中表达上调，并与淋巴结转移密切相关，Caunt等[9]在动物实验中使用针对NRP2上与VEGF-C结合的b1b2结构域的特异性抗体阻断NRP2功能后，出现肿瘤转移至哨淋巴结及远隔器官的减少的现象，证实其在肿瘤淋巴管生成及肿瘤远处转移中起着重要作用. NRP2在结直肠癌中上调的机制尚不明确，研究上调机制对于针对结直肠癌淋巴结转移的靶向治疗有着重大的临床意义. miRNA是一类内源性转录后调控因子，可通过与靶基因mRNA的3'UTR结合抑制其翻译，调控大约30%的蛋白编码基因的表达，从而广泛参与发育时序调控、细胞分化、凋亡等各种过程[10]. miRNA的基因突变或表达异常导致其下游靶蛋白的异常表达，参与包括肿瘤在内的多种疾病发生发展过程. 大量研究表明miRNA在肿瘤中既可作为抑癌基因，下调原癌基因的活性，也可作为癌基因，下调抑癌基因的活性，miRNA在肿瘤转移中的调控作用亦被证实[11]. 本研究旨在预测可能调控NRP2的miRNA，并验证其对NRP2的调控作用和机制.

生物信息学技术是使用不同的预测软件(主要包括TargetScan、PicTar、miRanda、EMBL、EIMM、PITA)，分析miRNA的序列或靶基因mRNA 3'UTR 的序列，这些软件使用不同的参数预测miRNA和靶基因mRNA 3'UTR上互补配对的种子序列. 对于一个给定的miRNA可以预测出其所有的靶基因mRNA，同时也可以根据给定的基因mRNA 3'UTR序列，则可以预测出此基因的可能相关miRNAs以及结合位点的种子序列. 由于不同的预测工具有不同的计算方法，会预测出不同的miRNA或靶mRNA以及互补配对的位点，因此需要使用多个预测工具进行预测，并结合相关文献，选择软件中预测出来的有高度的重叠性miRNA或靶基因，进一步用相关实验进行验证[12]. 本研究首先使用TargetScan软件预测了25条可能调控NRP2的miRNA. 结合相关文献，初步筛选可能性较大的miRNA: Tan等[13]使用微阵列实验检测肺癌及癌旁组织中差异表达的miRNA并qRT-PCR验证其准确性，结果显示miRNA-486-5p表达明显下调，可作为区分肺癌的分子标志物. Navon等[14]使用微阵列方法证实miRNA-486-5p在胰腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌的表达均下调. Oh等[15]发现miRNA-486-5p在胃癌中表达明显下调，且与胃癌淋巴结转移密切相关. miRanda(v1.9)软件显*NRP2*是miRNA-486-5p的潜在靶基因之一，因此我们选择miRNA-486-5p作进一步研究.

我们使用miRNA-486-5p过表达质粒转染结肠癌细胞SW620，使用Western blot验证其对NRP2蛋白表达的影响，证实miRNA-486-5p可抑制SW620细胞NRP2的表达，虽然该方法能确定NRP2与miRNA-486-5p的调控相关性，但不能鉴定miRNA-486-5p的靶位点. 为进一步确定miRNA-486-5p是直接与NRP2 3'UTR直接作用，我们进行了双荧光素酶实验. 目前双荧光素

酶实验是最常用的miRNA靶位点鉴定方法, 其原理是构建荧光素酶表达载体, 将希望鉴定的miRNA靶基因的3'UTR克隆到含荧火虫荧光素酶基因标记的报告质粒中, 然后将构建好的载体与miRNA过表达质粒同时转染细胞, 最后检测荧光素酶的活性以分析转染3'UTR中是否含有miRNA的靶位点. 如果相应基因的3'UTR内含有miRNA的结合位点, 则细胞内上调的miRNA将结合于靶基因3'UTR, 阻碍萤火虫荧光素酶的翻译. miRNA-486-5p过表达质粒与含有NRP2 3'UTR的双荧光素酶载体共转染SW620细胞时, 萤火虫荧光素酶活性明显降低, 证实miRNA-486-5p是通过结合在NRP2 3'UTR而发挥对NRP2的抑制作用.

总之, 本研究使用生物信息学技术预测NRP2调控相关的miRNA, 从中选择miRNA-486-5p进一步研究, 结果表明miRNA-486-5p可抑制NRP2的表达, 双荧光素酶实验证实miRNA-486-5p可直接作用于NRP2 3'UTR, 提示*NRP2*可能为miRNA-486-5p的靶基因, 为结直肠癌的防治提供了新的靶点.

4 参考文献

1 Higa R. [Colorectal cancer: epidemiology and primary profilaxis]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2011; 41: 70-73 [PMID: 21539071]

2 He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 1997; 90: 739-751 [PMID: 9288753]

3 Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1099-1107 [PMID: 16731741]

4 Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, Xia L, Wang X, Yang AD, Somcio RJ, Lin YG, Lim S, Fan F, Mangala LS, Arumugam T, Logsdon CD, Lopez-Berestein G, Sood AK, Ellis LM. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 109-120 [PMID: 18182619 DOI: 10.1093/jnci/djm279]

5 周琪, 梁后杰, 阎晓初, 彭秋平, 周进明, 吴峰, 龙艺, 刘以淑. 结肠癌组织NRP2的表达与淋巴结转移的关系. 临床肿瘤学杂志 2009; 14: 797-802

6 Petri A, Lindow M, Kauppinen S. MicroRNA silencing in primates: towards development of novel therapeutics. *Cancer Res* 2009; 69: 393-395 [PMID: 19147547 DOI: 10.1158/0008-5472]

7 Vather R, Sammour T, Zargar-Shoshtari K, Metcalf P, Connolly A, Hill A. Lymph node examination as a predictor of long-term outcome in Dukes B colon cancer. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 283-288 [PMID: 18716784 DOI: 10.1007/s00384-008-0540-y]

8 Dekker JW, Peeters KC, Putter H, Vahrmeijer AL, van de Velde CJ. Metastatic lymph node ratio in stage III rectal cancer; prognostic significance in addition to the 7th edition of the TNM classification. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 1180-1186 [PMID: 20884164]

9 Caunt M, Mak J, Liang WC, Stawicki S, Pan Q, Tong RK, Kowalski J, Ho C, Reslan HB, Ross J, Berry L, Kasman I, Zlot C, Cheng Z, Le Couter J, Filvaroff EH, Plowman G, Peale F, French D, Carano R, Koch AW, Wu Y, Watts RJ, Tessier-Lavigne M, Bagri A. Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* 2008; 13: 331-342 [PMID: 18394556]

10 Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 2006; 66: 7390-7394 [PMID: 16885332]

11 Kunej T, Godnic I, Horvat S, Zorc M, Calin GA. Cross talk between microRNA and coding cancer genes. *Cancer J* 2012; 18: 223-231 [PMID: 22647358 DOI: 10.1097/PPO.0b013e318258b771]

12 Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-798 [PMID: 14697198]

13 Tan X, Qin W, Zhang L, Hang J, Li B, Zhang C, Wan J, Zhou F, Shao K, Sun Y, Wu J, Zhang X, Qiu B, Li N, Shi S, Feng X, Zhao S, Wang Z, Zhao X, Chen Z, Mitchelson K, Cheng J, Guo Y, He J. A 5-microRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis and hsa-miR-31 for prognosis. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6802-6811 [PMID: 21890451 DOI: 10.1158/1078-0432]

14 Navon R, Wang H, Steinfeld I, Tsalenko A, Ben-Dor A, Yakhini Z. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. *PLoS One* 2009; 4: e8003 [PMID: 19946373 DOI: 10.1371/journal.pone.0008003]

15 Oh HK, Tan AL, Das K, Ooi CH, Deng NT, Tan IB, Beillard E, Lee J, Ramnarayanan K, Rha SY, Palanisamy N, Voorhoeve PM, Tan P. Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2657-2667 [PMID: 21415212]

■同行评价

本文设计合理, 科学性较强, 层次清楚. 为结肠癌基因治疗的研究提供了新的理论依据和治疗靶点.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 630-636
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床研究 CLINICAL RESEARCH

肝癌患者血浆中PLAG1的异常表达

付 琳, 杨玉秀, 白阳秋, 张立达

■背景资料
肝细胞癌是世界范围内临床上最常见的恶性肿瘤之一. 在当前临床实践中, 甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)等血清标志蛋白被广泛应用于肝癌诊断, 但由于其敏感性和特异性往往令人无法满意, 而且他们无法完整的诠释肿瘤疾病复杂的分子进展过程, 所以急需新的分子标志物用于辅助诊断肝癌, 并监测预后. 通过前期实验研究发现多形性腺瘤基因1(pleomorphic adenoma gene 1, *PLAG1*)是原发性肝癌中的一个明显高表达基因, 但研究仅提示在肝癌组织中高表达, 外周血浆中表达情况未见报道.

付琳, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450000
杨玉秀, 白阳秋, 张立达, 河南省人民院消化内科 河南省郑州市 450000
付琳, 在读硕士, 主要从事消化系肿瘤的研究.
河南省重点科技攻关基金资助项目, No. 132102310444
作者贡献分布: 此课题由杨玉秀与付琳设计; 研究过程由付琳、白阳秋及张立达操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由杨玉秀提供; 数据分析由付琳与白阳秋完成; 本论文写作由付琳完成; 杨玉秀审校.
通讯作者: 杨玉秀, 教授, 主任医师, 450000, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院消化内科. yangyuxiu55@126.com
收稿日期: 2013-10-14 修回日期: 2013-12-24
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

Abnormal expression of PLAG1 in plasma of patients with hepatocellular carcinoma

Lin Fu, Yu-Xiu Yang, Yang-Qiu Bai, Li-Da Zhang

Lin Fu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China
Yu-Xiu Yang, Yang-Qiu Bai, Li-Da Zhang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, Henan Province, China
Supported by: A Key Bio-Medical Research Grant from Henan Provincial Government, No. 132102310444
Correspondence to: Yu-Xiu Yang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, 7 Weiwu Road, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. yangyuxiu55@126.com
Received: 2013-10-14 Revised: 2013-12-24
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To investigate the abnormal expression of pleomorphic adenoma gene 1 (PLAG1) in plasma of patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and to analyze its clinical significance.

METHODS: Plasma samples were collected from 42 HCC patients, 34 liver cirrhosis patients and 30 healthy donors. The mRNA expression levels of PLAG1 were quantified by SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR. The correlation between clinicopathologic characteristics of HCC and expression of PLAG1 was evaluated.

RESULTS: The positive rate of PLAG1 mRNA in the HCC group, liver cirrhosis group, and healthy control group were 71.4%, 23.5% and 6.7%, respectively. PLAG1 mRNA expression level in the HCC group was significantly higher than those in other two groups ($P < 0.05$ for both). However, no significant difference was found between the liver cirrhosis group and healthy control group ($P > 0.05$). Significant difference in quantitative data from SYBR Green I real-time fluorescent quantitative PCR was also found among the three groups ($P < 0.05$). PLAG1 mRNA expression level in HCC patients was significantly correlated with pathological grade and tumor metastasis ($P < 0.05$ for both).

CONCLUSION: The expression level of PLAG1 mRNA in plasma of HCC patients may play a significant role in the pathogenesis and development of HCC, and it may serve as a novel tumor marker for diagnosis and metastasis of HCC.

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

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Plasma; Pleomorphic adenoma gene 1; Real-time fluorescent quantitative PCR

Fu L, Yang YX, Bai YQ, Zhang LD. Abnormal expression of PLAG1 in plasma of patients with hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 630-636 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/630.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.630

摘要

目的: 本研究旨在探讨多形性腺瘤基因1(pleomorphic adenoma gene 1, PLAG1)在肝细胞癌患者血浆中的异常表达及其临床意义.

方法: 收集42例肝癌患者、34例肝硬化患者及30例健康人血浆, 应用SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR技术检测PLAG1 mRNA在健康人、肝硬化患者及肝癌患者血浆中的表达情况, 并分析其与肝癌患者临床病理特征之间的关系.

结果: SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR结果显示, PLAG1 mRNA在肝癌组、肝硬化组

■同行评议者
吴道澄, 教授, 西安交通大学生命学院

及健康体检组的血浆中阳性表达率分别为: 71.4%、23.5 %和6.7%. PLAG1 mRNA在肝癌组血浆中的阳性表达率明显高于健康体检组及肝硬化组(P<0.05). 而健康体检组和肝硬化组血浆中PLAG1 mRNA阳性表达率差异无统计学意义(P>0.05).同时对肝癌组、肝硬化组及健康体检组中PLAG1 mRNA的扩增产物进行相对定量的分析比对, 发现三组间比较差异有统计学意义(P<0.05). 肝癌患者血浆中PLAG1 mRNA表达水平与肝癌的病理分化程度及远处转移有显著的关系(P<0.05).

结论: PLAG1 mRNA在肝癌患者血浆中的表达, 提示其可能在肝癌的发生发展过程中发挥重要的作用, 有望成为新的辅助诊断肝癌, 判断转移风险的临床检测指标.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝细胞癌; 血浆; 多形性腺瘤基因1; SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR技术

核心提示: 本研究发现多形性腺瘤基因1(pleomorphic adenoma gene 1, PLAG1) mRNA在肝癌患者血浆中明显高表达, 并与肝癌病理分化程度及远处转移的发生相关. 提示PLAG1与肝癌的发生、发展及侵袭转移有着密切的关系, 有望成为辅助诊断肝癌, 并判断远处转移风险的临床检测指标.

付琳, 杨玉秀, 白阳秋, 张立达. 肝癌患者血浆中PLAG1的异常表达. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 630-636 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/630.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.630

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 简称肝癌, 是世界范围内临床上最常见的恶性肿瘤之一, 位居恶性肿瘤发病率第5位, 其中约55%的病例发生于中国. 肝癌起病隐匿, 进展快, 死亡率高, 严重威胁人类的生命健康, 其发生和发展是一个多因素、多阶段及多基因相互作用的过程. 在前期相关实验中发现, 多形性腺瘤基因1(pleomorphic adenoma gene 1, PLAG1)在肝癌发展过程中呈上调表达, 并与肝癌病理分级、分化程度有着密切的关系[1]. 目前有关研究的结果仅提示PLAG1在肝癌组织中高表达, 而在肝癌患者血浆中的表达情况鲜有报道. 本研究采用SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR技术检测PLAG1在健康人群、肝硬化患者及肝癌患者血浆中的表达水平, 探讨其在肝癌的发生发展过程所发挥的作用及对临床的相关指导意义.

1 材料和方法

1.1 材料 实验组选择2012-06/2012-12河南省人民医院肝胆外科住院的肝癌患者42例, 其中男性34例, 女性8例, 年龄34-78岁, 平均年龄54.2岁±11.1岁. 所有肝癌患者诊断均经过病理证实, 收集标本时均未进行手术治疗、放疗及化疗. 对照组34例为河南省人民医院消化内科住院的肝硬化患者, 并经影像学检查排除肝癌; 另30例为本院同期同年龄段健康体检者. 所有受试者均获得知情同意.

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 抽取清晨空腹静脉血3 mL, 置于EDTA抗凝的无菌试管中, 室温3500 r/min离心15 min, 收集血浆, 置于-80 ℃保存待测定.

1.2.2 SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR检测PLAG1 mRNA: (1)引物设计和合成: 目的引物碱基序列由上海生工生物工程股份有限公司合成，内参基因*GAPDH*由大连宝生物工程有限公司购得(表1); (2)总RNA提取: 取血浆300 μL按TRIzol试剂(Invitrogen公司)说明书提取血浆总RNA, 加20 μL无核酶去离子水溶解, 所得RNA经1%琼脂糖凝胶电泳(150 V, 15 min)检测RNA 28S和18S比例, 估计总RNA的完整性, 并应用紫外分光光度计检测$A_{260/280}$, 测定总RNA吸光度; (3)逆转录合成cDNA: 逆转录试剂盒(TaKaRa)购自大连宝生物工程有限公司, 并按照逆转录试剂盒(Takara code No. DRR047A)说明书步骤进行逆转录聚合酶链反应. 基因组DNA的除去反应体系总体积为10 μL, 包含样本RNA 4 μL, 5×gDNA Eraser Buffer 2 μL, gDNA Eraser 1 μL, RNase Free dH_2O 3 μL, 反应条件42 ℃, 2 min. 逆转录反应在上述反应液中依次加入RNase Free dH_2O 4 μL, 5×PrimeScript Buffer 4 μL, RT Prime Mix 1 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL, 逆转录反应体系总体积为20 μL, 反转录条件依次为37 ℃ , 15 min, 85 ℃, 5 s; (4)SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR反应: 按照RT-PCR试剂盒(TaKaRa)进行操作, PCR反应体系为20 μL, 反应体系中含SYBR Premix Ex Taq Ⅱ 10 μL、正、反PCR引物各0.8 μL, ROX Reference Dye Ⅱ 0.4 μL、cDNA模板2.0 μL、dH_2O 6.0 μL. PCR扩增条件为95 ℃ 30 s, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 31 s; 进行40个PCR循环. 所用扩增仪型号为ABI7300.

1.2.3 结果判断: (1)ΔCt = 样品Ct-内参Ct, ΔΔCt =

■研发前沿
目前关于循环核酸在肿瘤发生发展过程中所起到的作用已逐渐成为国内外研究热点. 同时血浆中PLAG1作为“分子标志物”应用于肝癌的辅助诊断也已成为令人期待的研究重点.

■相关报道
PLAG1在肝母细胞瘤、淋巴细胞型白血病、儿童胃肠道间质瘤、腺样囊性癌中高表达. 并有文献报道显示PLAG1在肝癌组织中明显高表达,与肝癌的发生、发展关系密切.

表 1 荧光定量PCR引物序列

目的基因	序列	产物长度(bp)
PLAG1	上游引物: 5'-ATCCCTCTCACCACCTTTCTTT-3'	125
	下游引物: 5'-GCCACCTTGTAACTCCATCAG-3'	
GAPDH(内参基因)	由大连宝生物工程有限公司提供	138

PLAG1: 多形性腺瘤基因1.

表 2 PLAG1 mRNA在3组样本中表达水平的比较

分组	*n*	PLAG1 mRNA		阳性率(%)	χ^2值	*P*值
		阳性	阴性			
肝癌组	42	30	12	71.4	χ^2_1 = 17.244	< 0.05
肝硬化组	34	8	26	23.5	χ^2_2 = 3.438	> 0.05
健康体检组	30	2	28	6.7	χ^2_3 = 29.726	< 0.05

χ^2_1: 肝癌组与肝硬化组; χ^2_2: 肝硬化组与健康体检组; χ^2_3: 肝癌组与健康体检组. PLAG1: 多形性腺瘤基因1.

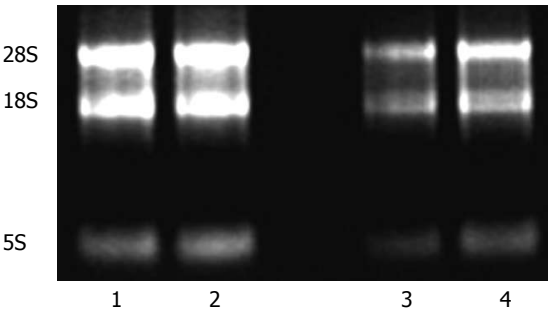

图 1 总RNA琼脂糖凝胶电泳图. 1, 2: 肝癌患者血浆; 3: 肝硬化患者血浆; 4: 健康体检者血浆.

ΔCt-(随机阴性对照样品Ct均值-该样品的内参Ct均值), 以$2^{-\Delta\Delta Ct}$表示样品中目的基因初始cDNA相对表达量[2], 所有步骤均重复3遍取平均值; (2)取扩增产物10 μL, 应用4%琼脂糖凝胶电泳(150 V, 45 min), BIO-RAD Gel Doc XR凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司)进行扫描和分析检测扩增产物的正确性.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行统计分析. PLAG1 mRNA各组阳性表达率差异运用χ^2检验, 当样本量<40时, 运用Fisher确切概率法统计. 多组定量资料运用Kruskal-Wallis秩和检验. *P*<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组总RNA 提取结果良好, 1%琼脂糖电泳结果, 可见28S、18S二条清晰条带和稍欠清晰的5S条带(图1), 证实提取的是高纯度的RNA, 完整性较好, 总RNA吸光度$A_{260/280}$为1.5-1.9, 符合纯度要求(图1).

2.2 SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR 肝癌组与肝硬化组、健康体检组血浆中PLAG1 mRNA表达水平比较: 肝癌组、肝硬化组、健康体检组Ct≤35时PLAG1 mRNA荧光定量扩增曲线呈典型的S型, 熔解曲线分析可见只有单峰值(图2), 熔解温度均一, 排除引物二聚体及非特异性产物的产生. Ct>35时, 则未见或略见起翘, 为一不规则波浪线. 以样品基因CT值≤35表示目的基因阳性表达[3]. 本研究中, 肝癌实验组30例患者PLAG1 mRNA Ct≤35, PLAG1 mRNA阳性表达率为71.4%(30/42), 肝硬化组、健康体检组的阳性表达率分别为23.5%(8/34)、6.7%(2/30). 三组间比较差异有统计学意义(χ^2 = 33.654, *P*<0.05). 两两比较, 肝癌组与肝硬化组、肝癌组与健康体检组差异均有统计学意义(*P*<0.05). 肝硬化组与健康体检组差异无统计学意义(*P* = 0.064)(表2). 运用Kruskal-Wallis秩和检验对三组PLAG1 mRNA扩增产物(Ct≤35)的相对定量进行分析比对, 三组间比较差异有统计学意义(χ^2 = 23.47, *P*<0.05).

2.3 PLAG1 mRNA表达与临床病理的关系 42例原发性肝癌患者中, 高分化、中分化与低分化三组的阳性表达率分别为22.2%(2/9)、66.7%(8/12)、95.2%(20/21). 三组差异有统计学意义(χ^2 = 16.248, *P*<0.05)(表3). 运用Fisher确切

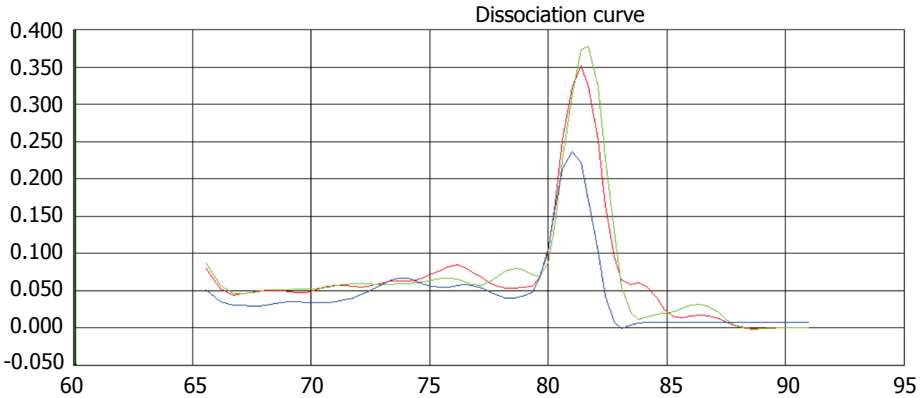

图 2 部分肝癌患者血浆中PLAG1 mRNA荧光定量熔解曲线.

■创新盘点
本文应用SYBR Green I荧光定量PCR技术检测PLAG1肝癌患者血浆中的表达, 并分析其表达水平与肝癌临床病理的关系, 为肝癌诊断及判断远处转移风险提供了进一步研究方向.

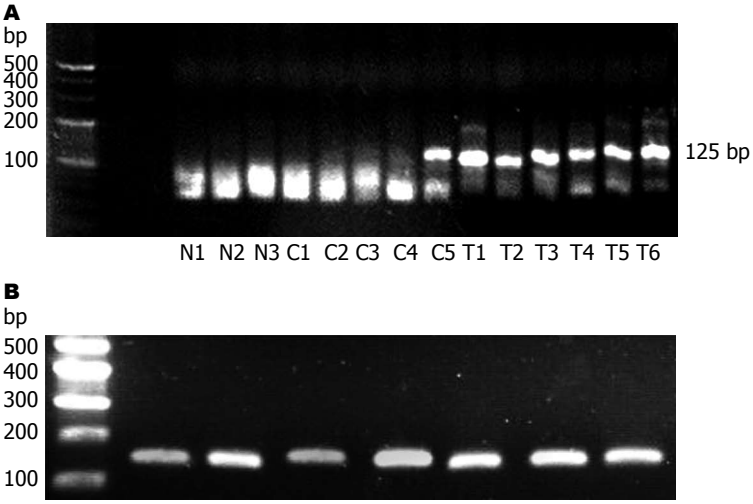

图 3 PLAG1和GAPDH mRNA荧光定量PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果. A: PLAG1, T1−T6: 肝癌患者; C1−C5: 肝硬化患者; N1−N3: 健康体检者; B: GAPDH. PLAG1: 多形性腺瘤基因1.

表 3 不同分化程度的肝癌患者血浆中PLAG1 mRNA表达水平的比较

分组	*n*	PLAG1 mRNA		阳性率(%)	χ^2值	*P*值
		阳性	阴性			
高分化组	9	2	7	22.2	χ^2_4 = 4.073	0.044
中分化组	12	8	4	66.7	χ^2_5 = 4.849	0.028
低分化组	21	20	1	95.2	χ^2_6 = 17.175	<0.05

χ^2_4: 高分化组与低分化组; χ^2_5: 中分化组与低分化组; χ^2_6: 高分化组与低分化组. PLAG1: 多形性腺瘤基因1.

概率法两两比较, 低分化与高、中分化组差异均有统计学意义(P<0.05). 分化程度越低, PLAG1 mRNA表达率越高. 运用Kruskal-Wallis秩和检验对不同分化程度的三组中PLAG1 mRNA扩增产物(Ct≤35)的相对定量进行比对, 三种不同分化程度肝癌患者血浆中PLAG1 mRNA相对定量差异无统计学意义(χ^2 = 4.590, P = 0.101).

2.4 肝癌组PLAG1 mRNA的表达与相关临床参数的关系 运用Fisher确切概率法分析肝癌患者组血浆中PLAG1 mRNA表达与年龄、性别及AFP无关, 与远处转移相关, 发生远处转移肝癌患者PLAG1 mRNA表达率高于未转移者(表4).

2.5 PLAG1 mRNA扩增产物电泳结果 最终扩增产物经4%琼脂糖凝胶电泳, BIO-RAD Gel Doc XR凝胶成像系统进行扫描和分析, 可见PLAG1和GAPDH对应的125、138 bp的电泳条带(图3).

3 讨论

Kas等[4]在1997年从t(3; 8)(p21; q12)染色体易位的多形性腺瘤组织中克隆到了一个高表达基因,

■应用要点
对于患者血浆中PLAG1表达水平的检测有望成为新的分子标志物应用于辅助诊断肝癌、判断远处转移风险.

表 4 PLAG1 mRNA的表达与相关临床参数的关系

	阳性	阴性	总例数	χ^2值	*P*值
年龄(岁)				0.840	0.359
≥55	24	8	32		
<55	6	4	10		
性别				0.386	0.543
男	25	9	34		
女	5	3	8		
AFP				0.187	0.666
阳性	22	8	30		
阴性	8	4	12		
有无远处转移				4.783	0.029
有	21	4	25		
无	9	8	17		

故命名为PLAG1. *PLAG1*是位于人染色体8q12的原癌基因, 包含5个外显子, cDNA全长7313 bp, 基因库编号为U65002, 其中只有第4外显子的最后端和第5外显子的起始端进行编码, 编码框共1503 bp. 正常情况下, PLAG1仅在胎儿的肺、肝、肾等脏器中表达, 但其在多种肿瘤中存在异常表达的现象也被多次报道. 曾有相关文献报道其在肝母细胞瘤[5]、淋巴细胞型白血病[6]、儿童胃肠道间质瘤[7]、腺样囊性癌[8]中被激活表达.

既往研究中, *PLAG1*曾被认为是一个“良性癌基因”, 并一度被证实为肿瘤抑制基因[9], 但Queimado等[10]的研究并不支持这个理论. 在前期实验中, 我们也曾应用含有19378个已知基因的核苷酸芯片筛选出肝炎、肝硬化及原发性肝癌差异基因表达谱, 显示*PLAG1*在原发性肝癌中是一个明显高表达基因[11]. PLAG1的致癌能力考虑与其多种靶基因如胰岛素样生长因子Ⅱ(insulin-like growth factor Ⅱ, IGF-Ⅱ)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、胎盘生长因子(placental growth factor, PGF)的异常表达相关. 其中IGF-Ⅱ的表达受其4个启动子(P1-P4)控制[12]. PLAG1作为调控转录因子及原癌基因曾在相关文献中被报道过, 在体外实验中, 也有证据显示PLAG1与*IGF-Ⅱ*启动子P3的共同结合位点相结合后激活其转录[13]. IGF-Ⅱ是一种促生长因子, 由肝脏分泌和合成, 能够促细胞有丝分裂、刺激细胞增殖以及DNA复制和转录、刺激组织器官的生长和分化、抑制细胞凋亡. 相关研究提示, IGF-Ⅱ在肝细胞癌的早期即开始有过量表达, 并参与发生肝癌早期事件. 而肝细胞癌的快速分裂, 会导致肝供血不足, 局部出现缺氧状态, 也会促使IGF-Ⅱ增加, 作为血管活性因子间接促进VEGF的合成, 从而刺激肝癌新生肿瘤血管的形成[14]. IGF-Ⅱ的过度表达在人类多种类型的肿瘤中均可发现, 他通过自分泌或旁分泌机制强效刺激细胞增殖[15]. 从这些结论及微阵列技术分析也可以得知, PLAG1的致癌能力至少一部分是通过IGF-Ⅱ有丝分裂信号转导通路介导的[16].

引起PLAG1异常表达主要原因与染色体易位相关. 而发生染色体易位的原因主要为PLAG1与其广泛表达的“融合伴侣”基因如位于3p21的*CTNNB1*、*CHCHD7*、*LIFR*(leukemia inhibitory factor receptor)及TCEA1(transcription elongation factor A1)发生了启动子交换所导致[17]. 这一论点曾在关于多形性腺瘤中PLAG1表达的相关实验得到证实[18,19]. 其中CTNNB1负责编码β-catenin[20], 是肝细胞癌中最常发生的突变基因. 其作用机制可能为*CTNNB1*发生基因突变后, 使β-catenin在细胞胞浆内聚集进而入胞核导致Wnt/β-catenin信号通路活化[21], 促进细胞的增殖, 导致肝癌发生; 同时Wnt/β-catenin信号通路还可以通过调节环氧酶2(cyclo-oxygen-ase 2, COX-2)表达, 促进肿瘤血管新生, 并加速肿瘤侵袭转移.

SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR技术具有高特异性、高灵敏度、污染小等优点, 在研究基因表达方面, 不仅可以进行定性检测, 还可进行定量研究, 从而更加准确表达基因相关的差异性[22]. 目前国内外陆续有报道显示应用该法检测肿瘤患者血浆中相关mRNA、miRNA表达情况[23]. 本研究运用SYBR Green Ⅰ实时荧光定量PCR技术, 对肝癌、肝硬化患者及健康体检者血浆中PLAG1 mRNA进行分析, 并在实验过程中采用下列措施避免假阳性: (1)认真操作, 避免污染; (2)所有步骤均重复检测3次在无明显差异情况下取平均值; (3)扩增产物应用4%琼脂糖凝胶电泳, 进行分析验证扩增产物的正确性, 并结合熔解曲线排除假阳性. 结果表明肝癌患者血浆中PLAG1 mRNA表达水平显著高于肝硬化组及健康体检组, 并跟病理分化程度相关, 分化程度越低, PLAG1 mRNA表达率越高. 前期研究中曾发现PLAG1在肝癌组织中异常表达, 通过本组实验发现在肝癌患者血浆中PLAG1同样高表达, 尤其已发生远处转移组中PLAG1表达明显高于未发生转移组, 考虑其有可能来源于转移入血的肝癌细胞, 也不排除来源于血浆中存在的游

离循环核酸内的突变基因. 推测PLAG1可能既通过与“融合伴侣”发生染色体易位引起肝癌的发生, 又与其靶基因发生共同位点结合激活靶基因转录进一步加剧肝癌的发展, 与肝癌的发生、发展及侵袭转移有着密切的关系, 有望成为新的辅助诊断肝癌的肿瘤标志物, 并有可能成为帮助判断肝癌患者是否存在转移风险的有效指标.

循环核酸是指存在于血液(血浆或血清)中的细胞外游离RNA和DNA. 近年来循环核酸在肿瘤的发生发展过程中所起到的作用逐渐引起人们的重视. 特别是在Sorenson等[24]和Vasioukhin等[25]成功检测到循环核酸内的突变原癌基因导致的肿瘤发生后. 目前观点认为导致肿瘤患者体内循环RNA浓度升高的原因, 主要为原发灶肿瘤代谢过程中坏死细胞不断释放核酸入血; 或者在肿瘤转移过程中, 脱落的肿瘤细胞在血液循环中凋亡, 或被机体免疫系统识别后消灭, 释放核酸入血[26]. 虽然血液中存在大量核糖核酸酶(RNase), 但相关研究显示, 外周血中循环RNA可能与包括脂蛋白、核蛋白、P53蛋白、糖蛋白等多种物质形成复合体或包含于合胞体滋养层微粒[27]、凋亡小体[28]从而免受RNase的降解. 而最近的研究也表明, 循环mRNA很可能是来源于机体多种组织及多种类型细胞, 通过包装于外染色体(exosome)或是经转录修饰后释放入血, 从而免受RNase的降解[29]. 在当前的临床实践中, 许多血清标志蛋白如针对肝癌的AFP等作为肿瘤标志物得到广泛的应用[30]. 但是这些蛋白的敏感性和特异性往往令人无法满意, 而且他们无法完整的诠释肿瘤复杂的分子进展过程, 故以血浆中的游离循环核酸作为“分子标志物”逐渐成为临床医学肿瘤诊断的研究重点[31]. 本实验在以血浆为标本的研究基础上, 旨在了解肝癌患者血浆中PLAG1的表达情况, 并通过实验探究PLAG1可能有望作为“分子标志物”, 成为新的诊断肝癌的分子生物学辅助指标.

4 参考文献

1 洪双双, 杨玉秀, 白阳秋, 张立达. 多形性腺瘤基因1与肝细胞癌关系探讨. 中华消化杂志 2011; 31: 486-489

2 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408 [PMID: 11846609 DOI: 10.1006/meth.2001.1262]

3 Tani N, Ichikawa D, Ikoma D, Tomita H, Sai S, Ikoma H, Okamoto K, Ochiai T, Ueda Y, Otsuji E, Yamagishi H, Miura N, Shiota G. Circulating cell-free mRNA in plasma as a tumor marker for patients with primary and recurrent gastric cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 1207-1212 [PMID: 17465264]

4 Kas K, Voz ML, Röijer E, Aström AK, Meyen E, Stenman G, Van de Ven WJ. Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3; 8)(p21; q12) translocations. *Nat Genet* 1997; 15: 170-174 [PMID: 9020842 DOI: 10.1038/ng0297-170]

5 Zatkova A, Rouillard JM, Hartmann W, Lamb BJ, Kuick R, Eckart M, von Schweinitz D, Koch A, Fonatsch C, Pietsch T, Hanash SM, Wimmer K. Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 126-137 [PMID: 14695992 DOI: 10.1002/gcc.10307]

6 Pallasch CP, Patz M, Park YJ, Hagist S, Eggle D, Claus R, Debey-Pascher S, Schulz A, Frenzel LP, Claasen J, Kutsch N, Krause G, Mayr C, Rosenwald A, Plass C, Schultze JL, Hallek M, Wendtner CM. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009; 114: 3255-3264 [PMID: 19692702 DOI: 10.1182/blood-2009-06-229898]

7 Agaram NP, Laquaglia MP, Ustun B, Guo T, Wong GC, Socci ND, Maki RG, DeMatteo RP, Besmer P, Antonescu CR. Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3204-3215 [PMID: 18483389 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1984]

8 Aström AK, Voz ML, Kas K, Röijer E, Wedell B, Mandahl N, Van de Ven W, Mark J, Stenman G. Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. *Cancer Res* 1999; 59: 918-923 [PMID: 10029085]

9 Bilanges B, Varrault A, Basyuk E, Rodriguez C, Mazumdar A, Pantaloni C, Bockaert J, Theillet C, Spengler D, Journot L. Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors. *Oncogene* 1999; 18: 3979-3988 [PMID: 10435621 DOI: 10.1038/sj.onc.1202933]

10 Queimado L, Obeso D, Hatfield MD, Yang Y, Thompson DM, Reis AM. Dysregulation of Wnt pathway components in human salivary gland tumors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134: 94-101 [PMID: 18209144 DOI: 10.1001/archotol.134.1.94]

11 白阳秋, 丁光伟, 杨玉秀. 肝癌发生过程中的差异基因表达. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2537-2541

12 Hartmann W, Waha A, Koch A, Albrecht S, Gray SG, Ekström TJ, von Schweinitz D, Pietsch T. Promoter-specific transcription of the IGF2 gene: a novel rapid, non-radioactive and highly sensitive protocol for mRNA analysis. *Virchows Arch* 2001; 439: 803-807 [PMID: 11787854]

13 Akhtar M, Holmgren C, Göndör A, Vesterlund M, Kanduri C, Larsson C, Ekström TJ. Cell type and context-specific function of PLAG1 for IGF2 P3 promoter activity. *Int J Oncol* 2012; 41: 1959-1966 [PMID: 23023303]

14 Lee YM, Bae MH, Lee OH, Moon EJ, Moon CK, Kim WH, Kim KW. Synergistic induction of in vivo angiogenesis by the combination of insulin-like growth factor-II and epidermal growth factor. *Oncol*

■同行评价

本文提出了一种新的有效指标来表示肝癌患者是否发生转移, 有一定的实际意义和学术价值.

Rep 2004; 12: 843-848 [PMID: 15375510]
15 Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000; 21: 215-244 [PMID: 10857553]
16 Van Dyck F, Declercq J, Braem CV, Van de Ven WJ. PLAG1, the prototype of the PLAG gene family: versatility in tumour development (review). *Int J Oncol* 2007; 30: 765-774 [PMID: 17332914]
17 Matsuyama A, Hisaoka M, Hashimoto H. PLAG1 expression in mesenchymal tumors: an immunohistochemical study with special emphasis on the pathogenetical distinction between soft tissue myoepithelioma and pleomorphic adenoma of the salivary gland. *Pathol Int* 2012; 62: 1-7 [PMID: 22192798 DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02740.x]
18 Asp J, Persson F, Kost-Alimova M, Stenman G. CHCHD7-PLAG1 and TCEA1-PLAG1 gene fusions resulting from cryptic, intrachromosomal 8q rearrangements in pleomorphic salivary gland adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 820-828 [PMID: 16736500 DOI: 10.1002/gcc.20346]
19 Martins C, Fonseca I, Roque L, Pereira T, Ribeiro C, Bullerdiek J, Soares J. PLAG1 gene alterations in salivary gland pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a combined study using chromosome banding, in situ hybridization and immunocytochemistry. *Mod Pathol* 2005; 18: 1048-1055 [PMID: 15920557 DOI: 10.1038/modpathol.3800386]
20 Chan TA, Wang Z, Dang LH, Vogelstein B, Kinzler KW. Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of beta-catenin mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8265-8270 [PMID: 12060769 DOI: 10.1073/pnas.082240999]
21 Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 387-398 [PMID: 18432252 DOI: 10.1038/nrc2389]
22 汪洋, 宫琳琳, 邵淑娟. 实时荧光定量PCR在肿瘤研究中的应用. 肿瘤 2004; 24: 196-197
23 Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, Ozcan C, Tamer L. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 1499-1506 [PMID: 23817697 DOI: 10.1007/s00432-013-1469-2]
24 Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 67-71 [PMID: 8118388]
25 Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 86: 774-779 [PMID: 7918071 DOI: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x]
26 戚鹏, 高春芳. 外周血循环RNA、微小RNA与肿瘤诊断. 中国生物工程杂志 2009; 29: 94-101
27 Gupta AK, Holzgreve W, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Hahn S. Detection of fetal DNA and RNA in placenta-derived syncytiotrophoblast microparticles generated in vitro. *Clin Chem* 2004; 50: 2187-2190 [PMID: 15502097 DOI: 10.1373/clinchem.2004.040196]
28 Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001; 47: 1488-1489 [PMID: 11468248]
29 Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 13-21 [PMID: 18589210 DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033]
30 Ren FY, Piao XX, Jin AL. Efficacy of ultrasonography and alpha-fetoprotein on early detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4656-4659 [PMID: 16937435]
31 Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology* 2007; 39: 197-207 [PMID: 17454749 DOI: 10.1080/00313020701230831]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 637-641
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

NDRG2与肝纤维化相关性的研究进展

马继征, 刘绍能, 陈兰羽, 姚乃礼

马继征, 刘绍能, 陈兰羽, 姚乃礼, 中国中医科学院广安门医院 北京市 100053
马继征, 主治医师, 主要从事中医药防治消化系统疾病的研究.
国家青年自然科学基金资助项目, No. 81292633
作者贡献分布: 马继征负责文献检索与论文撰写; 陈兰羽负责课题设计与论文修改; 刘绍能与姚乃礼负责论文审阅.
通讯作者: 陈兰羽, 副主任医师, 100053, 北京市西城区北线阁5号, 中国中医科学院广安门医院. chenlanyu@163.com
收稿日期: 2013-10-25 修回日期: 2013-11-26
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

NDRG2 and hepatic fibrosis

Ji-Zheng Ma, Shao-Neng Liu, Lan-Yu Chen, Nai-Li Yao

Ji-Zheng Ma, Shao-Neng Liu, Lan-Yu Chen, Nai-Li Yao, Guang'an Men Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China
Supported by: the National Natural Science Foundation for Young, No. 81292633
Correspondence to: Lan-Yu Chen, Associate Chief Physician, Guang'an Men Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Science, 5 Beixiange, Xicheng District, Beijing 100053, China. chenlanyu@163.com
Received: 2013-10-25 Revised: 2013-11-26
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract
N-mycdown stream-regulated gene 2 (NDRG2) is a potential regulator of liver fibrosis. Enhanced NDRG2 expression inhibits hepatic stellate cell activation, promotes the degradation of extracellular matrix, and regulates the regeneration of the liver. In addition, NDRG2 contributes to an enhanced capacity of liver and other tissues to hypoxic stresses. This article reviews the relationship between NDRG2 expression and liver fibrosis.

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

Key Words: N-mycdown stream regulated gene; Hepatic fibrosis; Hepatic stellate cells; Hypoxia inducible factor-1

Ma JZ, Liu SN, Chen LY, Yao NL. NDRG2 and hepatic fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 637-641 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/637.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.637

摘要
NDRG2(N-mycdown stream regulated gene)基因是多种癌症的候选抑癌基因, 并在肝纤维化的发生发展中扮演重要角色, 通过抑制肝星形细胞激活、促进细胞外基质降解、调节肝细胞再生、增强肝细胞缺氧应激能力等多种途径调节肝纤维化进程. 本文就NDRG2与肝纤维化的关系作一综述.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: NDRG2; 肝纤维化; 肝星形细胞; 缺氧诱导因子

核心提示: 本文就*NDRG*(N-mycdown stream regulated gene)基因对肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活、肝细胞外基质降解、肝细胞再生、肝细胞缺氧应激损伤等几方面, 探讨NDRG2基因影响肝纤维化的机制.

马继征, 刘绍能, 陈兰羽, 姚乃礼. NDRG2与肝纤维化相关性的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 637-641 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/637.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.637

0 引言
NDRG(N-mycdown stream regulated gene)是近年来新发现的基因, 因受N-Myc的抑制而得名. NDRG家族在人和鼠之间保持较高的同源性, 人和鼠*NDRG2*基因同源性为92%[1]. 现已克隆的人源*NDRG*基因包括*NDRG1*、*NDRG2*、*NDRG3*和*NDRG4*, *NDRG2*于1999年首次被成功克隆[2-4]. 研究表明, *NDRG2*基因为多种癌症的候选抑癌基因[5-8], 在心、脑、肺、肝、骨骼肌等多种组织器官均有表达[9,10]. NDRG2与肝纤维化[11]及肿瘤的发生、发展与转归[12]、缺氧应激[13]、缺血再灌注损伤[14]、组织胚胎的发育和细胞的分化[15]等密切相关. NDRG2可通过多种途径调控肝脏的生理病理过程, 在肝纤维化的发生发展中, NDRG2亦可能扮演重要角色, 现介绍如下.

■背景资料
*NDRG2*基因是一种抑癌基因, 并与肝纤维化密切相关, 通过多种途径参与肝纤维化进程, 并且该基因的表达水平与肝纤维化的进展存在相关性.

■同行评议者
吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院感染科

■研发前沿
*NDRG2*基因是近年新发现的与肝纤维密切相关的一种基因，其影响肝纤维的机制仍有待深入研究，该基因在慢性肝损伤-肝纤维-肝硬化的发展病程中的表达，是否存在规律性也有待进一步研究.

1 抑制肝星形细胞的活化

肝星形细胞活化是肝纤维化形成的重要环节[16,17]，生理情况下肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)处于静止状态，在各种肝损伤因素刺激下HSC被激活[18]，α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)是肝星形细胞活化标志物，转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)是HSCs激活和胶原生成经典的激动因子[19,20]. TGF-β1/Smad信号转导通路与肝纤维化密切相关，其通过介导HSCs活化、增加细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积、调节肝细胞生长等途径，参与肝纤维化的形成[21-23]. 将洗脱血清后的LX-2细胞(肝星形细胞)，用TGF-β1处理24 h，与对照组相比，处理组α-SMA表达水平升高，NDRG2表达受到抑制，提示TGF-β1能促进LX-2活化. 经腺病毒诱导NDRG2过表达，能够降低基础条件下LX-2细胞活化引起的α-SMA蛋白表达水平，亦能降低经TGF-β1诱导引起的α-SMA蛋白表达水平. α-SMA表达增加时，NDRG2 mRNA和蛋白表达水平均降低. HSCs激活能够诱导NDRG2 mRNA和蛋白表达水平均降低，而增强NDRG2表达则能够减少Smad转录及磷酸化，通过阻断TGF-β1/Smad信号通路，抑制HSCs活化. 同时也发现，NDRG2抑制HSCs活化不受TGF-β1的影响，并且增加HSCs MMP的表达[11].

2 调控肝细胞外基质降解

肝纤维化的发生是细胞外基质沉积过多和/或降解减少的结果[24]，生理情况下，基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)促进细胞外基质的降解，基质金属蛋白酶抑制蛋白(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)抑制细胞外基质的降解，二者之间分泌失衡是导致多种组织纤维化的重要因素之一[25-27]. 在肝纤维化过程中，MMP2/TIMP2比例决定了细胞外基质的沉积与否以及肝纤维化的形成[28,29]. 研究表明，TGF-β1诱导的LX-2细胞活化能增加MMP2、TIMP2的表达水平，与β-半乳糖苷酶组比较，经腺病毒诱导NDRG2过表达通过抑制TGF-β1/Smad信号通路升高MMP2水平，同时降低TIMP2水平，升高MMP2/TIMP2比例，从而减少二甲基亚硝胺(Dimethylnitrosamine, DMN)肝纤维化模型大鼠肝脏细胞外基质的沉积[11]. 上述研究结果与Takahara等[30]在DMN肝纤维化模型中的认识相一致，即“随着纤维化的进展，肝细胞*NDRG2*基因表达下调”. 在肿瘤的发生发展过程中，MMP2通过降解肿瘤细胞外基质，促进肿瘤的转移、侵袭. 有研究表明在肝细胞癌中，NDRG2通过抑制MMP2的表达降低肿瘤细胞对周围组织的侵袭力[31]. 另一项研究认为，NDRG2通过下调MMP2水平影响肝癌细胞株的增殖能力和拮抗TGF-β1介导的肝癌细胞侵袭[32]. 这与NDRG2在肝纤维化发展过程中对MMP2的调节并不一致，但其内在机制尚不清楚.

3 调控肝细胞生长

NDRG2 mRNA和蛋白在不同胚胎发育期的人和大鼠肝组织中的表达水平存在差异，通常在胚胎发育早期较低，后期则明显升高[33,34]. NDRG2参与肝细胞的再生、分化、信号转导等生理过程，当肝脏再生能力达到一定峰值时，NDRG2 mRNA和蛋白表达水平显著降低. 经腺病毒转染诱导肝细胞NDRG2高表达，通过诱导p53和p21调节Bax/Bcl-2升高，同时抑制cyclin E-Cdk2表达，致使细胞周期静止，从而发挥抗增殖作用，与对照组相比细胞凋亡比例由9.4%升高至64.7%[35]. 在DMN肝纤维化模型中，诱导NDRG2高表达能够促进肝细胞再生、改善肝脏功能，并不引起肝细胞凋亡[11]. NDRG2 mRNA和蛋白在鼠和人胚胎肝脏中高表达，且其表达水平随着肝脏的发育而逐渐升高[34]，而在部分肝切除模型肝再生过程中其表达呈现先下降后上升的趋势，即NDRG2蛋白和mRNA水平在肝细胞进入增殖阶段时(48 h内)表达下调，在肝细胞进入分化阶段时(48 h后)表达上调. NDRG2高表达导致肝细胞周期阻滞于G_1/S期，表达下调则促进肝细胞周期G_1/S期转换的顺利进行. NDRG2通过上调p21，抑制cyclin E实现对肝再生时肝细胞周期的调控[36,37].

4 抗缺氧应激损伤

缺氧能够诱发基因和蛋白质组学的改变[38]，导致细胞周期终止、分化、凋亡、坏死[39,40]. 低氧通过影响成纤维胞的活性、胶原的合成与降解及生长因子的分泌，参与病理性瘢痕的形成[41]. 病理性瘢痕组织中HIF-lα mRNA及蛋白质表达水平均明显高于正常皮肤组织[42]. 肝纤维化发生时，肝细胞外基质过度沉积，肝细胞缺血缺氧，缺氧诱导因子在肝纤维发生发展中扮演重要角色[43,44]. *NDRG2*是*HIF-1*的下游目的基因，参与*HFI-1*基因介导的多种缺氧应答反应. 快速生长的肿瘤组织伴随癌细胞微环境的变化，因为

肿瘤细胞的快速分化, 导致局部血管无法提供充分的氧气和营养[45]. 缺氧成为实体瘤的生理病理特征之一[46]. 研究发现, 将人类肺癌细胞株A549细胞暴露在缺氧(2%O_2)或类似的环境中, 能够明显增强NDRG2 mRNA的表达. 用干扰RNA(siRNA)阻断A549细胞内源性HIF-1α表达, 缺氧诱导NDRG2高表达现象便消失. 缺氧通过HIF-α1, 促进*NDRG2*基因表达增加. NDRG2增强A549细胞对缺氧诱导凋亡的敏感性, 促进肿瘤细胞的凋亡. 阻断HIF-1α表达或敲除HRE1只能减少约60%或80%的缺氧应答反应, 表明还有其他因素参与缺氧诱导的NDRG2上调, 如*p53*、核因子κB(nuclear factor kappa B, *NF-κB*)、*SP1*等NDRG2的上游基因[47]. 实体瘤"缺氧"特征与肝纤维化、肝硬化细胞外基质过度沉积、假小叶形成、血管重建等所致的"缺氧"存在相似性, HIF-α1的激活促进*NDRG2*基因的表达, 因此NDRG2在抗肝纤维化缺氧应激损伤方面可能发挥积极作用.

5 讨论

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化、肝癌发展的过渡阶段, 其发展转归可对疾病预后产生重要影响. 目前的观点认为, 慢性肝损伤-肝纤维化-肝硬化-肝癌是慢性肝病由轻到重的一般进展模式. 肝纤维化的基本病理特征为肝细胞外基质的过度沉积, 其病理环节涉及HSCs的激活[18]、MMP/TIMP比例的失衡[25-27]、肝窦毛细血管化[48,49]、肝实质细胞的缺血缺氧[43,44]、肝细胞的再生[30,50]等, 目前已证实的与肝纤维化病理过程相关的基因有数十种之多, NDRG2是其中的一种[30], 其与肝纤维的多个病理过程相关. 目前研究发现, *NDRG2*基因通过阻断TGF-β1/Smad信号通路, 抑制肝星形细胞的活化和促进肝细胞外基质的降解; 通过诱导p53和p21调节Bax/Bcl-2升高, 同时抑制cyclin E-Cdk2表达, 促进肝细胞生长; 作为HIF-1的下游基因, 减轻肝细胞缺氧应激损伤等途径抑制肝纤维化. NDRG2在正常组织、良性肿瘤、恶性肿瘤中的表达水平逐渐降低[30,31,33], 其与组织缺氧程度呈负相关[47], 并且在肝脏再生过程中呈动态变化[33,34]. NDRG2通过阻断ERK1/2信号通路, 抑制MMP2、MMP9表达, 减少对癌细胞细胞外基质的降解, 降低肝细胞癌的侵蚀转移能力[31,51,52], 而在肝纤维化病理过程中, NDRG2能够促进MMP表达、同时抑制TIMP表达, 改变MMP/TIMP比例, 促进肝细胞外基质的降解, 抑制肝纤维化的进展[11,30]. NDRG2对MMP的调节作用, 在不同病理过程中截然相反, 可能与疾病本身的病理特点及通过影响不同的信号通路有关, 目前缺乏针对此现象的研究报道. 肝损伤过程中是否存在NDRG2表达水平的动态演变, 其变化对早期判断疾病预后是否具有指导性, 仍值得进一步探讨. HSC的激活抑制*NDRG2*基因的表达, 慢性肝损伤激活HSC致肝纤维化逐渐加重的过程中, 是否同时存在NDRG2的动态演变有待进一步研究.

■相关报道

长期以来*NDRG2*基因被认为是一种抑癌基因, 近年发现该基因广泛参与肝纤维的病理过程. *NDRG2*基因通过影响肝星形细胞(hepatic stellate cell)激活、调节MMP/TIMP、调节肝细胞生长等, 影响肝纤维化, 并且随着纤维化的进展, 肝细胞*NDRG2*基因表达下调.

6 参考文献

1 张健, 刘新平, 张万会, 药立波. ndrg家族研究进展. 生命科学 2003; 15: 203-206

2 邓艳春, 药力波, 刘新平, 聂晓燕, 王吉树, 张晓光, 苏成芝. 人脑内一含有ACP样结构域新基因的发现. 生物化学与生物物理进展 2001; 28: 72-76

3 Lachat P, Shaw P, Gebhard S, van Belzen N, Chaubert P, Bosman FT. Expression of NDRG1, a differentiation-related gene, in human tissues. *Histochem Cell Biol* 2002; 118: 399-408 [PMID: 12432451]

4 Qu X, Zhai Y, Wei H, Zhang C, Xing G, Yu Y, He F. Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol Cell Biochem* 2002; 229: 35-44 [PMID: 11936845]

5 Shen L, Zhao ZY, Wang YZ, Ji SP, Liu XP, Liu XW, Che HL, Lin W, Li X, Zhang J, Yao LB. Immunohistochemical detection of Ndrg2 in the mouse nervous system. *Neuroreport* 2008; 19: 927-931 [PMID: 18520995 DOI: 10.1097/WNR.0b013e32830163d0]

6 Zheng J, Li Y, Yang J, Liu Q, Shi M, Zhang R, Shi H, Ren Q, Ma J, Guo H, Tao Y, Xue Y, Jiang N, Yao L, Liu W. NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression. *BMC Cancer* 2011; 11: 251: 1-251: 9 [PMID: 21676268 DOI: 10.1186/1471-2407-11-251]

7 Gao L, Wu GJ, Liu XW, Zhang R, Yu L, Zhang G, Liu F, Yu CG, Yuan JL, Wang H, Yao LB. Suppression of invasion and metastasis of prostate cancer cells by overexpression of NDRG2 gene. *Cancer Lett* 2011; 310: 94-100 [PMID: 21741166 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.06.015]

8 Furuta H, Kondo Y, Nakahata S, Hamasaki M, Sakoda S, Morishita K. NDRG2 is a candidate tumor-suppressor for oral squamous-cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1785-1791 [PMID: 20045673 DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.12.156]

9 Okuda T, Kondoh H. Identification of new genes ndr2 and ndr3 which are related to Ndr1/RTP/Drg1 but show distinct tissue specificity and response to N-myc. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 208-215 [PMID: 10581191]

10 Okuda T, Kokame K, Miyata T. Differential expression patterns of NDRG family proteins in the central nervous system. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 175-182 [PMID: 17998568]

11 Yang J, Zheng J, Wu L, Shi M, Zhang H, Wang X, Xia N, Wang D, Liu X, Yao L, Li Y, Dou K. NDRG2 ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting the TGF-β1/Smad pathway and altering the MMP2/

■应用要点

*NDRG2*基因与肝纤维化的多个病理环节密切相关，并与肝纤维化的进展程度存在关联性，为该病的诊断和治疗提供新的视角.

TIMP2 ratio in rats. *PLoS One* 2011; 6: e27710 [PMID: 22110735 DOI: 10.1371/journal.pone.0027710]

12 Deuschle U, Schüler J, Schulz A, Schlüter T, Kinzel O, Abel U, Kremoser C. FXR controls the tumor suppressor NDRG2 and FXR agonists reduce liver tumor growth and metastasis in an orthotopic mouse xenograft model. *PLoS One* 2012; 7: e43044 [PMID: 23056173 DOI: 10.1371/journal.pone.0043044]

13 Liu J, Zhang J, Wang X, Li Y, Chen Y, Li K, Zhang J, Yao L, Guo G. HIF-1 and NDRG2 contribute to hypoxia-induced radioresistance of cervical cancer Hela cells. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1985-1993 [PMID: 20206160 DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.028]

14 Ostadal P, Elmoselhi AB, Zdobnicka I, Lukas A, Chapman D, Dhalla NS. Ischemia-reperfusion alters gene expression of Na+-K+ ATPase isoforms in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 457-462 [PMID: 12804585]

15 胡晓兰, 药立波, 张远强, 邓艳春, 刘新平. NDRG2在人胚胎组织中的表达分布特点. 生理学报 2006; 58: 331-336

16 Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1639-1642 [PMID: 19433304 DOI: 10.1016/j.biocel]

17 Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734 [PMID: 17979495]

18 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250 [PMID: 10644669]

19 Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. *Clin Sci* (Lond) 2007; 112: 265-280 [PMID: 17261089]

20 Ahmad A, Ahmad R. Understanding the mechanism of hepatic fibrosis and potential therapeutic approaches. *Saudi J Gastroenterol* 2012; 18: 155-167 [PMID: 22626794 DOI: 10.4103/1319-3767.96445]

21 Yoshida K, Matsuzaki K. Differential Regulation of TGF-β/Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries. *Front Physiol* 2012; 3: 53 [PMID: 22457652 DOI: 10.3389/fphys]

22 Uemura M, Swenson ES, Gaça MD, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG. Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cell function and alpha-smooth muscle actin organization. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4214-4224 [PMID: 15987742]

23 Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007; 282: 22089-22101 [PMID: 17513865]

24 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245-G249 [PMID: 10915630]

25 Préaux AM, Mallat A, Nhieu JT, D'Ortho MP, Hembry RM, Mavier P. Matrix metalloproteinase-2 activation in human hepatic fibrosis regulation by cell-matrix interactions. *Hepatology* 1999; 30: 944-950 [PMID: 10498646]

26 Wang CH, Lee TH, Lu CN, Chou WY, Hung KS, Concejero AM, Jawan B. Electroporative alpha-MSH gene transfer attenuates thioacetamide-induced murine hepatic fibrosis by MMP and TIMP modulation. *Gene Ther* 2006; 13: 1000-1009 [PMID: 16511523]

27 Peng WH, Tien YC, Huang CY, Huang TH, Liao JC, Kuo CL, Lin YC. Fraxinus rhynchophylla ethanol extract attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats via down-regulating the expressions of uPA, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1. *J Ethnopharmacol* 2010; 127: 606-613 [PMID: 20035854 DOI: 10.1016/j.jep]

28 Okamoto K, Mimura K, Murawaki Y, Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1102-1108 [PMID: 15955221]

29 Sentíes-Gómez MD, Gálvez-Gastélum FJ, Meza-García E, Armendáriz-Borunda J. [Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGFbeta]. *Gac Med Mex* 2005; 141: 315-322 [PMID: 16164129]

30 Takahara Y, Takahashi M, Wagatsuma H, Yokoya F, Zhang QW, Yamaguchi M, Aburatani H, Kawada N. Gene expression profiles of hepatic cell-type specific marker genes in progression of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6473-6499 [PMID: 17072980]

31 邱智泉, 姜小清. AQP5、CCL20、NDRG2在原发性肝细胞癌伴胆管癌栓中的表达意义及功能研究. 第二军医大学, 2012

32 Lee DC, Kang YK, Kim WH, Jang YJ, Kim DJ, Park IY, Sohn BH, Sohn HA, Lee HG, Lim JS, Kim JW, Song EY, Kim DM, Lee MN, Oh GT, Kim SJ, Park KC, Yoo HS, Choi JY, Yeom YI. Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res* 2008; 68: 4210-4220 [PMID: 18519680 DOI: 10.1158/0008-5472]

33 Hu XL, Liu XP, Deng YC, Lin SX, Wu L, Zhang J, Wang LF, Wang XB, Li X, Shen L, Zhang YQ, Yao LB. Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues. *Cell Tissue Res* 2006; 325: 67-76 [PMID: 16520977]

34 Hu XL, Yao LB, Zhang YQ, Deng YC, Liu XP. [Distribution characteristic of NDRG2 expression in human fetal tissues]. *Shengli Xuebao* 2006; 58: 331-336 [PMID: 16906333]

35 Yang J, Li Y, Wu L, Zhang Z, Han T, Guo H, Jiang N, Tao K, Ti Z, Liu X, Yao L, Dou K. NDRG2 in rat liver regeneration: role in proliferation and apoptosis. *Wound Repair Regen* 2005; 18: 524-531 [PMID: 20840522 DOI: 10.1111/j.1524-475X]

36 杨建栋, 郑瑾, 李燕, 王德盛, 曹大勇, 刘新平, 药立波, 窦科峰. NDRG2调控大鼠肝细胞周期的机制. 现代生物医学进展 2010; 10: 4432-4435

37 杨建栋, 李 燕, 陶开山, 逄振宇, 刘新平, 药立波, 窦科峰. NDRG2参与调控大鼠肝再生的机制. 胃肠病学和肝病学杂志 2010; 19: 440-443

38 Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 266-276 [PMID: 11181773]

39 Soengas MS, Alarcón RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 1999; 284: 156-159 [PMID: 10102818]

40 Seta KA, Millhorn DE. Functional genomics approach to hypoxia signaling. *J Appl Physiol* (1985) 2004; 96: 765-773 [PMID: 14715686 DOI: 10.1152/japplphysiol.00836.2003]

41 Kischer CW. Contributions of electron microscopy

to the study of the hypertrophic scar and related lesions. *Scanning Microsc* 1993; 7: 921-930; discussion 930-931 [PMID: 8146619]
42 郑旭东, 高建华. 缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)在病理性瘢痕形成中的作用. 南方医科大学, 2010
43 Haase VH. Hypoxia-inducible factor signaling in the development of kidney fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012; 5 Suppl 1: S16 [PMID: 23259746 DOI: 10.1186/1755-1536-5-S1-S16]
44 Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology* 2012; 55: 622-633 [PMID: 22120903 DOI: 10.1002/hep.25497]
45 Angst E, Sibold S, Tiffon C, Weimann R, Gloor B, Candinas D, Stroka D. Cellular differentiation determines the expression of the hypoxia-inducible protein NDRG1 in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2006; 95: 307-313 [PMID: 16832411]
46 Wang L, Liu N, Yao L, Li F, Zhang J, Deng Y, Liu J, Ji S, Yang A, Han H, Zhang Y, Zhang J, Han W, Liu X. NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells. *Cell Physiol Biochem* 2008; 21: 239-250 [PMID: 18209490 DOI: 10.1159/000113765]
47 Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1010-1021 [PMID: 11981751]
48 Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp Hepatol* 2002; 1: 1 [PMID: 12437787]
49 Sanz S, Pucilowska JB, Liu S, Rodríguez-Ortigosa CM, Lund PK, Brenner DA, Fuller CR, Simmons JG, Pardo A, Martínez-Chantar ML, Fagin JA, Prieto J. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury. *Gut* 2005; 54: 134-141 [PMID: 15591519]
50 Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006; 312: 104-107 [PMID: 16601191]
51 吴国强, 张健, 李开宗, 窦科峰, 刘新平. NDRG2基因在原发性肝细胞肝癌及正常肝组织中的表达研究. 中国普外基础与临床杂志 2012; 19: 266-270
52 Guo Y, Ma J, Wu L, Wang Q, Li X, Li X, Zhang Y, Zhang J, Yao L, Zhang J, Liu W. Hyperthermia-induced NDRG2 upregulation inhibits the invasion of human hepatocellular carcinoma via suppressing ERK1/2 signaling pathway. *PLoS One* 2013; 8: e61079 [PMID: 23630579 DOI: 10.1371/journal.pone.0061079]

■同行评价
*NDRG2*基因与肝纤维化发生相关性研究报道较少, 选题有新颖性.

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》2011年开始不再收取审稿费

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

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 642-647
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

质子泵抑制剂防治化疗引起胃肠道黏膜损伤的研究进展

谢一娜, 黄其春

■背景资料
肿瘤化疗引起的胃肠道黏膜损伤可影响患者的生活质量及化疗效果, 是肿瘤学界普遍关注的问题, 近年来质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)被用于防治化疗引起的胃肠道疾病, 但鲜有文献对此作用机制及临床疗效进行评估.

谢一娜, 黄其春, 广西医科大学附属肿瘤医院临床药学科 广西壮族自治区南宁市 530021
谢一娜, 硕士研究生, 主要从事抗肿瘤中药的研制.
作者贡献分布: 本文综述由谢一娜完成; 黄其春审校.
通讯作者: 黄其春, 副教授, 副主任药师, 530021, 广西壮族自治区南宁市河堤路71号, 广西医科大学附属肿瘤医院临床药学科. hqc28705@sina.com
电话: 0771-5318407
收稿日期: 2013-12-01 修回日期: 2013-12-17
接受日期: 2013-12-19 在线出版日期: 2014-02-18

Advances in prevention and treatment of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis with proton pump inhibitors

Yi-Lang Xie, Qi-Chun Huang

Yi-Lang Xie, Qi-Chun Huang, Department of Pharmacology, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Correspondence to: Qi-Chun Huang, Associate Professor, Associate Chief Pharmacist, Department of Pharmacology, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, 71 Hedi Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. hqc28705@sina.com
Received: 2013-12-01 Revised: 2013-12-17
Accepted: 2013-12-19 Published online: 2014-02-18

Abstract
Proton pump inhibitors (PPIs) are potent acid-suppressive medications commonly used for management of acid-related diseases. Over the past decade, gastrointestinal injury following chemotherapy has attracted wide attention from oncologists. Two international clinical practice guidelines, the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) and the Multinational Association of Supportive Care in Cancer (MASCC) antiemesis guidelines, recommend omeprazole for the treatment of chemotherapy-induced epigastric pain. In recent years, PPIs have been widely used for the prevention and treatment of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. This paper summarizes the mechanisms by which chemotherapy causes damage to the gastrointestinal tract, the mechanisms underlying the protection afforded by PPIs against gastrointestinal injury induced by chemotherapy, and their clinical applications.

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

Key Words: Proton pump inhibitors; Chemotherapy-induced; Gastrointestinal mucositis; Prevention treatment

Xie YL, Huang QC. Advances in prevention and treatment of chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis with proton pump inhibitors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 642-647 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/642.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.642

摘要
质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)具有抑制胃酸分泌和保护胃黏膜作用, 临床常用于治疗酸相关性疾病. 肿瘤化疗引起的胃肠道黏膜损伤, 一直受到肿瘤学界的重视, 在美国国立癌症综合网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)与癌症辅助治疗多国协会(Multinational Association of Supportive Care in Cancer, MASCC)临床止吐指南中, PPIs之一的奥美拉唑被推荐用于治疗肿瘤化疗引起的上腹痛症状. 目前PPIs的适应症有增加趋势, 国内临床上广泛用于防治肿瘤化疗引起的胃肠道黏膜损伤. 本文就化疗引起胃肠道黏膜损伤机制、PPIs保护胃肠道黏膜机制及其防治化疗引起胃黏膜损伤的临床应用作一综述.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 质子泵抑制剂; 化疗引起; 胃肠道黏膜损伤; 防治

核心提示: 质子泵抑制剂(proton pump inhibitors)兼具抑制胃酸及细胞保护作用, 能有效防治化疗引起的胃肠道黏膜损伤, 有助于提高化疗患者生活质量. 临床医师应严格按照用药说明及临床指南应用此类药物.

■同行评议者
袁建业, 副研究员, 上海中医药大学附属龙华医院/脾胃病研究所

的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 642-647 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/642.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.642

0 引言

1980年, 第一个质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)奥美拉唑始应用于临床, 现已成为治疗酸相关性疾病的主要药物[1]. 此后, 兰索拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑和埃索美拉唑等同类药物陆续上市, 其作用各有特点, 为临床用药提供了多种选择. 肿瘤化疗导致的胃肠道黏膜损伤一直是临床上比较关注的问题, Sartori等[2,3]通过两项随机试验证实PPIs可有效预防化疗引起的胃肠道黏膜损伤. 基于此研究结果, 2004年奥美拉唑被癌症辅助治疗多国协会(Multinational Association of Supportive Care in Cancer, MASCC)指南推荐用于治疗化疗引起的上腹痛及烧心症状[4]. 目前PPIs在国内临床上被广泛用于防治化疗引起的胃肠道黏膜损伤, 特别是预防化疗引起的恶心、呕吐等胃肠道反应的发生; 由于临床医师使用PPIs治疗此类胃肠疾病时多以国际指南作为用药参考, 而PPIs使用说明书均未明确提及此类适应征, 因此鲜有文献对其作用机制及治疗效果予以评估. 本文就化疗引起胃肠道黏膜损伤的机制、PPIs保护胃肠道黏膜的机制及其防治化疗引起胃肠道黏膜损伤的临床应用做一综述.

1 化疗引起胃肠道黏膜损伤的机制及PPIs保护胃肠道黏膜的机制

1.1 化疗引起胃肠道黏膜损伤的机制 化疗引起胃肠道黏膜损伤的机制尚未完全清楚, Sultani等和Sonis等[5,6]认为化疗引起胃肠道黏膜损伤大致可分为5个阶段, 首先细胞毒药物直接损伤细胞的DNA, 引起黏膜基底层上皮细胞和黏膜下层细胞凋亡, 广泛的组织损伤导致活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生, ROS可刺激巨噬细胞的生成, 引发包括SP1相关视网膜母细胞瘤控制蛋白、P53、核转录因子(nuclear factor kappa-B, NF-κB)在内的炎症级联通路, 造成细胞凋亡和组织的损伤. 第二个阶段, 一系列信号通路与转录因子被激活, 其中最重要的是NF-κB. NF-κB主要调控各种炎性分子的基因表达与合成, 其中包括白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子(tumour-necrosis factor, TNF)、黏附因子及环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)等促炎细胞因子[7,8]. 第三个阶段, 各类促炎细胞因子与NF-κB相互影响形成一炎症恶性反馈环, 如TNF在反馈环中强化了NF-κB的活性, 导致炎症信号被进一步放大, 放大的炎症恶性反馈环又促进TNF、IL-6及IL-1β的产生, 使细胞凋亡和组织损伤进一步加重[6]. 第四个阶段, 胃肠道黏膜上皮的完整性遭到严重破坏, 溃疡形成. 溃疡处定殖的细菌可激活巨噬细胞渗透物和其他炎性细胞聚集到受损的组织中, 引起继发性感染. 最后一个阶段, 一般出现在停止治疗后的2 wk内, 是胃肠道黏膜上皮细胞自我修复和更新的一个过程, COX-2可能通过促进血管生成在这一“重建”过程中发挥重要作用[6,9,10]. 此外, 化疗引起胃肠道黏膜损伤还可能与其导致胃肠道菌群失衡有关. 化疗可引起胃肠道菌群的易位或过度生长, 破坏正常菌群对胃肠道的保护功能. 这些功能的破坏可导致胃肠道的局部感染或者菌血症的发生[11].

1.2 PPIs保护胃肠道黏膜的机制

1.2.1 提高胃黏膜防御屏障: 正常情况下, 胃肠道黏膜的防御机制包括黏膜结构的完整、上皮细胞的自我更新及其分泌的碳酸氢盐与磷脂黏液、微血管持续的血液流动等多个方面. 其中微血管持续的血液流动对维持胃肠道黏膜的正常结构与功能起着关键作用. 前列腺素(prostaglandin , PG)可维持胃肠道黏膜上皮细胞的自我更新及微血管的血液流动, 在胃肠道黏膜防御机制中发挥重要作用[12,13]. 人体内的PG主要包括PGE2、PGI2、PGD2及PGF2α 4种类型, 其中PGE2含量最多, 并对调节人体各种生理功能起着重要作用, 其中包括调节免疫应答、维持血压稳定、保持胃肠道黏膜完整性等. PG的合成依赖于COX)的活性, 其两个亚型分别为COX-1与COX-2[14]. Tsuji等[15]通过动物实验证实随着剂量的增加, 兰索拉唑可提高大鼠血清胃泌素水平及增加COX-2表达, 促进胃黏膜PGE2合成而发挥胃黏膜保护作用. 尽管胃泌素诱导COX-2表达的具体机制尚不清楚, 但是可以推断兰索拉唑保护胃黏膜的作用机制, 与内源性胃泌素激活胃泌素受体、增加COX-2介导的胃黏膜PGE2合成有关. Kobayashi等[16]研究还发现兰索拉唑可增加大鼠胃黏膜血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达, VEGF可以促进血管内皮细胞生长加速血管再生. 而抑制PG的生成可减少VEGF的表达, 提示兰索拉唑修复胃肠道黏膜溃疡的机制可能与

■研发前沿
近年来研究显示PPIs除抑制胃酸分泌外还具有抗炎、抗氧化等细胞保护作用, 可使胃肠道黏膜免受各种致病因素的危害, 其中包括化疗药物损害.

■相关报道
代兴斌等对127例肿瘤化疗患者进行观察，结果显示兰索拉唑与奥美拉唑对化疗药物引起的消化系反应均具有明显的预防及抑制作用.

增加VEGF的表达及提高PG合成有关；不过也可能存在另一个机制，即促进黏膜下基质内的基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2，MMP-2)表达，一种可重建细胞外基质促进细胞损伤修复的内切酶，而这种机制与刺激内源性PG释放无关[16,17].

1.2.2 抗氧化作用：一些体外研究发现PPIs可以阻止次氯酸引起的β-胡萝卜素的氧化、铁和铜介导的脱氧核糖的氧化以及铜引起的低密度脂蛋白氧化，并可有效清除过渡金属化学反应所产生的羟基自由基(•OH)[18-20]. 在体内试验中，研究者发现小鼠因受束缚及冷应激引起的胃溃疡主要由胃黏膜产生的羟基自由基(•OH)导致. 在冷应激前给予奥美拉唑处理的小鼠，其胃黏膜表现出较低水平的羟基自由基(•OH)、脂质过氧化反应以及蛋白质氧化[21]. 在吲哚美辛引起胃溃疡的小鼠模型中，研究人员发现，小鼠胃溃疡与胃黏膜谷胱甘肽，一种强力的内源性抗氧化因子的消耗有关. 埃索美拉唑可有效防止谷胱甘肽的损耗以保护胃黏膜的损伤，其机制尚不清楚. 研究者估计在胃酸中埃索美拉唑转变成四环的次磺酰胺，为胃黏膜提供硫基化合物以起到抗氧化的作用[22]. 另一个吲哚美辛致小鼠胃溃疡的研究中，Koch等[23]还发现埃索美拉唑可以提高过氧化歧酶水平和总抗氧化能力，不过其机制也尚未清楚.

1.2.3 抗炎作用：血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是血红素分解代谢的限速酶，其亚型HO-1广泛存在于胃肠道黏膜[24-26]. HO-1表达水平上调作为一种自然防御机制可减少炎症的发生及黏膜组织的损伤[27,28]. 在应激及病理状态下，如休克、缺氧、缺血及ROS可刺激HO-1表达水平上调发挥细胞保护作用[29-31]. 研究显示兰索拉唑可诱导大鼠胃黏膜上皮细胞HO-1表达增高，其机制可能为兰索拉唑促使Kelch样ECH联合蛋白1(Keap-1)释放核转录因子Nrf2，并激活Nrf2使其磷酸，从而上调HO-1 mRNA和蛋白表达，最终诱导HO-1的表达[32-34]. PPIs还可通过抑制促炎性细胞因子的释放发挥抗炎作用[35]. 胃黏膜产生IL-8，一种强力的白细胞刺激物，在幽门螺杆菌介导的炎症反应中发挥重要的作用. Handa等[36]观察发现在人胃癌细胞与脐静脉内皮细胞中，奥美拉唑和兰索拉唑可能通过阻碍NF-κB的细胞通路以抑制幽门螺杆菌刺激IL-8的产生. 这种现象也可以在动物实验中观察到[36,37]. 在人工培养的气管上皮细胞中，兰索拉唑可以降低一系列促炎症因子包括IL-6、IL-8及TNF-α的水平. PPI减少上皮和内皮细胞产生的促炎症因子的机制尚不清楚[38].

1.2.4 抑制胃酸分泌作用：胃黏膜壁细胞中主要功能性靶点为H2受体和H^+-K^+-ATP酶. 组胺与H2受体结合导致胞内环磷腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)浓度升高和蛋白激酶(protein kinase A, PKA)激活. PKA激活的效应之一则是细胞骨架蛋白磷酸化，细胞骨架蛋白参与H^+-K^+-ATP酶由细胞质向细胞膜的转运，从而使H^+-K^+-ATP酶可以接触到胞外的KCl，使胞外K^+与胞内H^+进行交换，形成胃酸分泌. 组胺H2受体对于壁细胞泌酸过程的特征性形态学改变至关重要，而H^+-K^+-ATP酶承担着泌酸的最后一项功能[39]. PPIs为苯并咪唑衍生物，以前体药物的形式在胃酸中激活，转化为次磺酰胺类化合物，与H^+-K^+-ATP酶亚单位上的半胱氨酸残基(Cys)中的巯基共价结合形成二硫键，使质子泵不可逆地失去活性，阻断酶的H^+/K^+转运机制，从而抑制胃酸分泌的最后步骤，以保护胃黏膜免遭胃酸侵袭[40].

2 PPIs防治化疗引起胃肠道黏膜损伤的临床应用

2.1 减轻胃肠道反应 化疗引起胃肠道反应以恶心、呕吐最为常见，人体超过95%的5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)由胃肠道黏膜分泌，细胞毒药物造成胃肠道黏膜损伤致使黏膜上的嗜铬细胞释放5-HT，与5-HT3受体结合产生神经冲动经迷走传入神经传入呕吐中枢引起患者呕吐[41,42]. 代兴斌等[43]研究显示兰索拉唑、奥美拉唑联合止吐药在防治呕吐、恶心、食欲不振方面的有效率明显高于单用止吐药(格拉司琼+地塞米松). 提示PPI能提高止吐药物对化疗引起胃肠道反应的控制率，且药物安全性高. 其机制可能与PPIs保护胃肠道黏膜，减少黏膜嗜铬细胞释放5-HT有关.

2.2 预防急性胃溃疡 细胞毒药物对胃肠道黏膜的直接损害加上胃酸侵袭常导致急性胃十二指肠溃疡形成. Sartori等[2,3]通过随机对照实验证实奥美拉唑组患者在化疗过程中急性胃溃疡的发生率、上腹痛及烧心感症状的出现率明显低于安慰剂组，差异有统计学意义. 安慰剂组的患者化疗后内镜评分均高于化疗前，奥美拉唑组并无此表现. 表明奥美拉唑能有效预防化疗引起的上消化系黏膜损伤，减少胃肠道溃疡的发生. 其机制主要与PPIs减少胃酸分泌有关.

2.3 防治化疗性胃食管反流病 化疗引起胃食管返流病的机制不完全清楚, 可能与细胞毒药物抑制黏膜细胞正常增殖分裂、刺激炎性因子分泌、减弱食管下段括约肌功能引起胃容物返流等因素有关, 临床上头颈部及胸部肿瘤患者经常接受化疗及放疗联合治疗, 这更增加了食管黏膜损伤的风险[44,45]. Uwagawa等[46]在其研究中发现, 雷贝拉唑能够明显改善化疗引起的胃食管返流病症状频率评分, 提示化疗引起胃食管返流与胃酸分泌过度有关系, 也表明PPI可以改善化疗引起的胃食管反流病的症状.

2.4 PPIs的安全性 一项长达15年的开放性试验显示, 长期使用泮托拉唑治疗严重酸相关性疾病有良好的安全性及有效性. 研究从1999-09开始至2007-09结束, 研究人员定期记录患者在治疗期间的各项参考指标, 结果显示长期使用泮托拉唑不会导致患者胃部腺体萎缩和肠上皮化生, 虽然可引起胃部腺体可逆性轻至中度扩张, 但不会增加肿瘤发生的风险[47]. 一项Meta分析提示使用PPIs超过180 d并不增加患者患社区获得性肺炎的风险, 但是使用高剂量或者使用时间少于30 d的患者患社区获得性肺炎的风险增加[48]. 另一项Meta分析显示PPIs可轻微提高髋骨及脊柱骨折的风险[49]. 此外PPIs还可导致低镁血症、低钙血症及低钾血症等电解质紊乱的发生[50,51].

3 结论

PPIs因其显著的抑酸效果被广泛用于治疗酸相关性疾病, 如胃食管反流病, 上消化系溃疡及卓-艾氏综合征等[52]. 近十几年来, 因PPIs对胃肠道黏膜的保护作用而应用于治疗化疗引起的胃肠道黏膜损伤. 两项国际指南美国国立癌症综合网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)与MASCC均提示在化疗患者出现上腹痛及烧心症状时可使用PPIs进行治疗. 以上综述表明PPIs可有效防治化疗引起的胃肠道黏膜损伤. 尽管如此, PPIs多种潜在的不良反应值得临床医生注意, 只有正确掌握PPIs的作用机制及适应症, 才能避免药物过度使用, 确保患者得到安全合理的治疗.

4 参考文献

1 Heidelbaugh JJ, Metz DC, Yang YX. Proton pump inhibitors: are they overutilised in clinical practice and do they pose significant risk? *Int J Clin Pract* 2012; 66: 582-591 [PMID: 22607510 DOI: 10.1111/j.1742-1241.2012.02921.x]

2 Sartori S, Trevisani L, Nielsen I, Tassinari D, Abbasciano V. Misoprostol and omeprazole in the prevention of chemotherapy-induced acute gastroduodenal mucosal injury. A randomized, placebo-controlled pilot study. *Cancer* 1996; 78: 1477-1482 [PMID: 8839554]

3 Sartori S, Trevisani L, Nielsen I, Tassinari D, Panzini I, Abbasciano V. Randomized trial of omeprazole or ranitidine versus placebo in the prevention of chemotherapy-induced gastroduodenal injury. *J Clin Oncol* 2000; 18: 463-467 [PMID: 10653861]

4 Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, Elting LS, Fox PC, Cooksley C, Sonis ST. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer* 2004; 100: 2026-2046 [PMID: 15108223 DOI: 10.1002/cncr.20163]

5 Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemother Res Pract* 2012; 2012: 490804 [PMID: 22973511 DOI: 10.1155/2012/490804]

6 Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol* 2007; 5: 3-11 [PMID: 18046993]

7 Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a001651 [PMID: 20457564 DOI: 10.1101/cshperspect.a001651]

8 Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 63: 239-251 [PMID: 18351341 DOI: 10.1007/s00280-008-0732-8]

9 Perfetto B, Donnarumma G, Criscuolo D, Paoletti I, Grimaldi E, Tufano MA, Baroni A. Bacterial components induce cytokine and intercellular adhesion molecules-1 and activate transcription factors in dermal fibroblasts. *Res Microbiol* 2003; 154: 337-344 [PMID: 12837509 DOI: 10.1016/s0923-2508(03)00084-6]

10 Sonis ST, O'Donnell KE, Popat R, Bragdon C, Phelan S, Cocks D, Epstein JB. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. *Oral Oncol* 2004; 40: 170-176 [PMID: 14693241]

11 Stringer AM, Gibson RJ, Bowen JM, Keefe DM. Chemotherapy-induced modifications to gastrointestinal microflora: evidence and implications of change. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 79-83 [PMID: 19149515]

12 Tarnawski AS, Ahluwalia A, Jones MK. The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target. *Curr Med Chem* 2012; 19: 4-15 [PMID: 22300071]

13 Tulassay Z, Herszényi L. Gastric mucosal defense and cytoprotection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 99-108 [PMID: 20227024 DOI: 10.1016/j.bpg.2010.02.006]

14 Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 986-1000 [PMID: 21508345 DOI: 10.1161/atvbaha.110.207449]

15 Tsuji S, Sun WH, Tsujii M, Kawai N, Kimura A,

■创新盘点

关于PPIs药理作用的研究比较多, 但对其防治化疗引起的胃肠道黏膜损伤作用机制的报道较少, 本文对此机制及临床应用等作一综述, 为指导临床合理使用PPIs提供科学依据.

■**应用要点**

目前，国内外临床上广泛存在超出药品说明书标示的适应症使用PPIs的情况，本文有助于临床医师深入了解PPIs的作用机制，正确掌握其适应症，使PPIs得到科学合理的使用.

Kakiuchi Y, Yasumaru S, Komori M, Murata H, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Lansoprazole induces mucosal protection through gastrin receptor-dependent up-regulation of cyclooxygenase-2 in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 1301-1308 [PMID: 12438555 DOI: 10.1124/jpet.102.035204]

16 Kobayashi S, Nakajima N, Ito Y, Moriyama M. Effects of lansoprazole on the expression of VEGF and cellular proliferation in a rat model of acetic acid-induced gastric ulcer. *J Gastroenterol* 2010; 45: 846-858 [PMID: 20333532 DOI: 10.1007/s00535-010-0224-6]

17 Al-Dasooqi N, Gibson RJ, Bowen JM, Logan RM, Stringer AM, Keefe DM. Matrix metalloproteinases are possible mediators for the development of alimentary tract mucositis in the dark agouti rat. *Exp Biol Med* (Maywood) 2010; 235: 1244-1256 [PMID: 20682600 DOI: 10.1258/ebm.2010.010082]

18 Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Festi D, Cuccurullo F. Antioxidant properties of omeprazole. *FEBS Lett* 1996; 382: 189-192 [PMID: 8612750]

19 Blandizzi C, Fornai M, Colucci R, Natale G, Lubrano V, Vassalle C, Antonioli L, Lazzeri G, Del Tacca M. Lansoprazole prevents experimental gastric injury induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs through a reduction of mucosal oxidative damage. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4052-4060 [PMID: 15996031]

20 Simon WA, Sturm E, Hartmann HJ, Weser U. Hydroxyl radical scavenging reactivity of proton pump inhibitors. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1337-1341 [PMID: 16494850 DOI: 10.1016/j.bcp.2006.01.009]

21 Biswas K, Bandyopadhyay U, Chattopadhyay I, Varadaraj A, Ali E, Banerjee RK. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J Biol Chem* 2003; 278: 10993-11001 [PMID: 12529378 DOI: 10.1074/jbc.M210328200]

22 Pastoris O, Verri M, Boschi F, Kastsiuchenka O, Balestra B, Pace F, Tonini M, Natale G. Effects of esomeprazole on glutathione levels and mitochondrial oxidative phosphorylation in the gastric mucosa of rats treated with indomethacin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008; 378: 421-429 [PMID: 18545984 DOI: 10.1007/s00210-008-0314-7]

23 Koch TR, Petro A, Darrabie M, Opara EC. Effect of the H, K-ATPase inhibitor, esomeprazole magnesium, on gut total antioxidant capacity in mice. *J Nutr Biochem* 2004; 15: 522-526 [PMID: 15350983 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2004.03.003]

24 Burger D, Xiang F, Hammoud L, Lu X, Feng Q. Role of heme oxygenase-1 in the cardioprotective effects of erythropoietin during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H84-H93 [PMID: 18996987 DOI: 10.1152/ajpheart.00372.2008]

25 Coëffier M, Le Pessot F, Leplingard A, Marion R, Lerebours E, Ducrotté P, Déchelotte P. Acute enteral glutamine infusion enhances heme oxygenase-1 expression in human duodenal mucosa. *J Nutr* 2002; 132: 2570-2573 [PMID: 12221210]

26 Barton SG, Rampton DS, Winrow VR, Domizio P, Feakins RM. Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8: 329-334 [PMID: 15115285]

27 Vijayan V, Mueller S, Baumgart-Vogt E, Immenschuh S. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3112-3119 [PMID: 20593496]

28 Guo X, Shin VY, Cho CH. Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. *Life Sci* 2001; 69: 3113-3119 [PMID: 11758836]

29 Umeda K, Takahashi T, Inoue K, Shimizu H, Maeda S, Morimatsu H, Omori E, Akagi R, Katayama H, Morita K. Prevention of hemorrhagic shock-induced intestinal tissue injury by glutamine via heme oxygenase-1 induction. *Shock* 2009; 31: 40-49 [PMID: 18497709 DOI: 10.1097/SHK.0b013e318177823a]

30 Chang AY, Chan JY, Cheng HL, Tsai CY, Chan SH. Hypoxia-inducible factor 1/heme oxygenase 1 cascade as upstream signals in the prolife role of heat shock protein 70 at rostral ventrolateral medulla during experimental brain stem death. *Shock* 2009; 32: 651-658 [PMID: 19333137 DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181a71027]

31 Cooper KL, Liu KJ, Hudson LG. Enhanced ROS production and redox signaling with combined arsenite and UVA exposure: contribution of NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 381-388 [PMID: 19414066 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.034]

32 陈汉卿, 吕宾, 陈鸣艳, 张烁. 质子泵抑制剂对NSAIDs相关小肠损伤大鼠HO-1表达的影响. 胃肠病学 2011; 16: 390-394

33 Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T. The expression of heme oxygenase-1 induced by lansoprazole. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 45: 9-13 [PMID: 19590701 DOI: 10.3164/jcbnSR09-28]

34 Takagi T, Naito Y, Okada H, Ishii T, Mizushima K, Akagiri S, Adachi S, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Itoh K, Yamamoto M, Matsui H, Yoshikawa T. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, mediates anti-inflammatory effect in gastric mucosal cells through the induction of heme oxygenase-1 via activation of NF-E2-related factor 2 and oxidation of kelch-like ECH-associating protein 1. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331: 255-264 [PMID: 19628634 DOI: 10.1124/jpet.109.152702]

35 Smith WB, Gamble JR, Clark-Lewis I, Vadas MA. Interleukin-8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 1991; 72: 65-72 [PMID: 1997402]

36 Handa O, Yoshida N, Fujita N, Tanaka Y, Ueda M, Takagi T, Kokura S, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Molecular mechanisms involved in anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors. *Inflamm Res* 2006; 55: 476-480 [PMID: 17122965 DOI: 10.1007/s00011-006-6056-4]

37 Kuroda M, Yoshida N, Ichikawa H, Takagi T, Okuda T, Naito Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Lansoprazole, a proton pump inhibitor, reduces the severity of indomethacin-induced rat enteritis. *Int J Mol Med* 2006; 17: 89-93 [PMID: 16328016]

38 Sasaki T, Yamaya M, Yasuda H, Inoue D, Yamada M, Kubo H, Nishimura H, Sasaki H. The proton pump inhibitor lansoprazole inhibits rhinovirus infection in cultured human tracheal epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 2005; 509: 201-210 [PMID: 15733557 DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.12.042]

39 Shin JM, Kim N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. *J Neurogastroenterol Motil* 2013; 19: 25-35 [PMID: 23350044

DOI: 10.5056/jnm.2013.19.1.25]
40 Ward RM, Kearns GL. Proton pump inhibitors in pediatrics : mechanism of action, pharmacokinetics, pharmacogenetics, and pharmacodynamics. *Paediatr Drugs* 2013; 15: 119-131 [PMID: 23512128 DOI: 10.1007/s40272-013-0012-x]
41 Morita H, Mochiki E, Takahashi N, Kawamura K, Watanabe A, Sutou T, Ogawa A, Yanai M, Ogata K, Fujii T, Ohno T, Tsutsumi S, Asao T, Kuwano H. Effects of 5-HT2B, 5-HT3 and 5-HT4 receptor antagonists on gastrointestinal motor activity in dogs. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 6604-6612 [PMID: 24151388 DOI: 10.3748/wjg.v19.i39.6604]
42 National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: AntiemesisV.1.2012. Available from: URL: http: //www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
43 代兴斌, 蒋楠, 魏学礼, 马兰. 兰索拉唑防治化疗药物所致消化道反应的临床研究. 中国医药 2011; 6: 804-805
44 Shields HM, Recht A, Wang HH. Exposure to both radiation and chemotherapy increases the risk of Barrett's and multilayered epithelium. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2143-2149 [PMID: 19093207 DOI: 10.1007/s10620-008-0619-x]
45 Tutuian R. Adverse effects of drugs on the esophagus. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 91-97 [PMID: 20227023 DOI: 10.1016/j.bpg.2010.02.005]
46 Uwagawa T, Misawa T, Iida T, Sakamoto T, Gocho T, Wakiyama S, Hirohara S, Yanaga K. Proton-pump inhibitor as palliative care for chemotherapy-induced gastroesophageal reflux disease in pancreatic cancer patients. *J Palliat Med* 2010; 13: 815-818 [PMID: 20636150 DOI: 10.1089/jpm.2009.0404]
47 Brunner G, Athmann C, Schneider A. Long-term, open-label trial: safety and efficacy of continuous maintenance treatment with pantoprazole for up to 15 years in severe acid-peptic disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 37-47 [PMID: 22531114 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2012.05106.x]
48 Giuliano C, Wilhelm SM, Kale-Pradhan PB. Are proton pump inhibitors associated with the development of community-acquired pneumonia? A meta-analysis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2012; 5: 337-344 [PMID: 22697595 DOI: 10.1586/ecp.12.20]
49 Yu EW, Bauer SR, Bain PA, Bauer DC. Proton pump inhibitors and risk of fractures: a meta-analysis of 11 international studies. *Am J Med* 2011; 124: 519-526 [PMID: 21605729 DOI: 10.1016/j.amjmed.2011.01.007]
50 刘改芳. 长期应用质子泵抑制剂与低镁血症. 中华消化杂志 2013; 33: 497-499
51 Maeda Y, Kojima N, Araki Y, Uno T, Nishigaki K, Inaba N. Does a proton pump inhibitor cause hypokalemia? *Intern Med* 2011; 50: 1045-1050 [PMID: 21532230]
52 Sugimoto M, Furuta T. Efficacy of esomeprazole in treating acid-related diseases in Japanese populations. *Clin Exp Gastroenterol* 2012; 5: 49-59 [PMID: 22649281 DOI: 10.2147/ceg.s23926]

■同行评价

本文综述PPIs保护胃肠黏膜免受化疗损伤的作用机制及临床应用等对临床更好的应用PPIs有很好的指导作用.

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 648-653
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

胆管癌支架治疗的现状及进展

于 泓, 缪 林

■背景资料
胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是最常见的胆道恶性肿瘤. 因其起病隐匿、早期诊断困难、治疗方法有限, 预后极差. 大多数患者就诊时已失去外科手术机会. 胆道支架治疗是晚期胆管癌重要的姑息治疗手段, 可解除胆道梗阻, 改善患者生活质量, 延长生存期.

于泓, 缪林, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心 南京医科大学消化内镜研究所 江苏省南京市 210011
于泓, 在读硕士, 主要从事消化系肿瘤的基础与临床研究.
江苏省科技厅自然科学基金资助项目, No. BK2012871
作者贡献分布: 本文综述由于泓完成; 缪林审校.
通讯作者: 缪林, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 210011, 江苏省南京市下关区姜家园121号, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 南京医科大学消化内镜研究所. maofrest@yahoo.com.cn
电话: 025-58766446
收稿日期: 2013-11-15 修回日期: 2013-12-11
接受日期: 2013-12-19 在线出版日期: 2014-02-18

Biliary stenting for cholangiocarcinoma: An update

Hong Yu, Lin Miao

Hong Yu, Lin Miao, Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Science and Technology Department of Jiangsu Province, No. BK2012871
Correspondence to: Lin Miao, Associate Professor, Chief Physician, Institute of Digestive Endoscopy and Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 121 Jiangjiayuan, Xiaguan District, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. maofrest@yahoo.com.cn
Received: 2013-11-15 Revised: 2013-12-11
Accepted: 2013-12-19 Published online: 2014-02-18

Abstract
Cholangiocarcinoma (bile duct cancer) is the most common malignant tumor of the biliary tree. This devastating malignancy presents late, and is notoriously difficult to diagnose, thus resulting a high mortality. The majority of cholangiocarcinoma patients present with an unresectable disease, and survive less than 12 mo following diagnosis. Biliary stent placement is an effective palliative therapy for malignant biliary obstruction, which can significantly improve the quality of life, and extend the survival time of patients. Different biliary stent placement methods would closely affect the prognosis of patients. The purpose of this article is to review the treatment efficacy, insertion paths and types of biliary stents. This paper also covers emerging biliary stents including drug stents, and biliary stent combination local therapy.

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

Key Words: Cholangiocarcinoma; Biliary stent; Photodynamic therapy; Endobiliary radiofrequency ablation

Yu H, Miao L. Biliary stenting for cholangiocarcinoma: An update. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 648-653 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/648.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.648

摘要
胆管癌(cholangiocarcinoma)是最常见的胆道恶性肿瘤. 因其起病隐匿、早期诊断困难、治疗方法有限, 预后极差. 大多数患者就诊时已失去外科手术机会. 胆道支架治疗是晚期胆管癌重要的姑息治疗手段, 可解除胆道梗阻, 改善患者生活质量, 延长生存期. 不同支架治疗方法的选择与患者的预后密切相关. 本文结合最近几年有关文献, 就胆管癌支架治疗效果, 支架植入路径选择, 不同材质支架特点及应用, 载药支架等新兴胆道支架的研究进展, 以及支架联合局部治疗的应用等作一综述, 以供临床参考.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胆管癌; 胆道支架; 光动力治疗; 胆道内射频消融

核心提示: 不同支架治疗方法的选择与晚期胆管癌患者的预后密切相关. 本文比较了不同支架植入路径的选择, 不同材质支架的特点及应用. 介绍了近年来研究热点的药物洗脱支架、放射性支架等新兴胆道支架, 以及支架联合光动力治疗或射频消融治疗等局部治疗手段的最新研究进展, 对于临床和研究有重要指导价值.

于泓, 缪林. 胆管癌支架治疗的现状及进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 648-653 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/648.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.648

■同行评议者
陈进宏, 副主任医师, 复旦大学附属华山医院普外科; 陈汝福, 教授, 中山大学第二附属医院肝胆胰外科

0 引言

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)起源于胆管上皮细胞, 是全世界第2大原发性肝胆系肿瘤, 也是最常见的胆道恶性肿瘤[1,2]. 胆管癌起病隐匿、早期诊断困难、治疗方法有限, 预后极差, 中位生存期不足24 mo[1]. 胆道脓毒症、肝衰竭、恶病质和营养不良是胆管癌最主要的死因[3]. 手术切除是唯一有效的治疗手段. 然而大多数患者就诊时已失去手术切除机会, 在12 mo之内因恶病质及功能衰竭而死亡[4]. 根治性手术五年生存率也仅为20%-40%[5].

胆道支架植入术主要用于无法行手术切除的晚期胆管癌患者, 是解除其恶性胆道梗阻的一种有效的姑息性治疗手段. 其目的是解除阻塞性胆汁淤积, 减轻黄疸、皮肤瘙痒、腹痛等相关并发症, 预防胆管炎, 避免渐进性胆道梗阻引起的肝衰竭, 通过微创治疗提高生活质量、降低治疗成本、减少手术相关并发症、缩短住院时间[6-8]. 在晚期胆管癌的姑息性治疗中不同支架的选择及治疗方法至关重要.

1 经内镜胆道支架引流和经皮胆道支架引流

经内镜胆道引流比经皮胆道引流更符合生理特点、患者创伤小且舒适[9]. 相对于经皮肝穿刺胆管造影(percutaneous transhepatic cholangiography, PTC), 内镜下逆行性胰胆管造影术(encoscopic retrograde cholangio-pancreatography, ERCP)有更多的优点: 可直视十二指肠及乳头, 检查肿瘤浸润情况, 可轻松获取细胞及组织样本, 后续放置支架可解除阻塞性胆汁淤积[10], 支架内引流可以恢复胆汁正常生理通道, 维持胆汁生理功能. 一项美国的研究表明, 对无法行手术切除的患者内镜治疗费用明显低于手术治疗, 且可获得更长的生存期, 内镜下支架置入术可作为姑息性胆道引流的首选方法[11].

经皮支架植入术通常用于内镜治疗失败或不能经内镜治疗的患者(例如胃部分切除史、幽门梗阻), 对于肝门部胆管狭窄的患者, 行经皮引流可避免内镜引流的高失败率和并发症发生率, 且经皮支架植入一枚以上金属支架更为容易[9]. 在一项韩国的多中心回顾研究中, 经皮胆道引流成功率高于内镜下胆道引流, 两组中胆道引流成功后中位生存时间、支架通畅时间及并发症发生率均无明显差异, 其中胆道引流成功患者的中位生存时间均高于引流失败者[12]. 经皮引流的主要缺点是经皮管所造成的不适及相关并发症, 如出血、感染、胆汁瘘、导管阻塞和移动, 应根据恶性胆道狭窄的位置(肝门部或胆总管下段)选择合适的姑息性治疗的手段[10].

2 塑料支架和金属支架

塑料支架和金属支架均可用于解除恶性胆道梗阻. 塑料支架的直径为7.0-11.5 F, 长度为5-18 cm[13]. 塑料支架费用较低、操作技术简单、发生阻塞时易于拆除和替换, 然而由于塑料支架直径较小, 更易发生阻塞, 引起胆管炎. 有20%-40%单边或双边支架植入术后发生胆管炎, 其原因是支架直径小及胆道细菌感染继发生物膜形成和胆泥淤积, 多数塑料支架治疗恶性胆道梗阻的患者至少需要更换一次支架[1,2]. 对于极高龄恶性梗阻性黄疸患者Grönroos等[14]认为对于应用塑料支架即可.

与塑料支架相比, 金属支架在近年来的研究中显示出更多的优势, 应用也日益增多. 一方面, 他增大了支架的直径, 从而增加支架通畅时间、减少梗阻复发. 其中自彭式金属支架(self-expanding metal stents, SEMSs)是应用最为广泛的金属支架, 大多数SEMSs的长度在4-10 cm之间, 直径一般为10 mm[15]. 另一方面, 金属支架的网眼可避免堵塞侧支胆管, 使胆汁得到更好的引流[16]. 研究表明金属支架通畅时间明显高于塑料支架, 两者通畅时间分别为10-12 mo和3-4 mo[10]. 对于肝门部胆管癌, SEMSs植入后通畅时间也明显高于塑料支架, 且SEMSs有利于减少再手术的次数, 降低总的治疗费用[17]. 金属支架的主要缺点在于: 支架本身费用高, 植入后不易移除.

一般认为金属支架主要应用于预期生存时间>3 mo、接受化疗或其他姑息性治疗的不可切除的胆管癌患者, 植入金属支架可减少ERCP次数、缩短住院时间、减少并发症的发生[2,18,19]. 欧洲胃肠内镜学会指南推荐: 对于肝门部胆管恶性狭窄的患者, 预期生存期>3 mo或并发胆道感染者首选SEMSs; 对于确诊为恶性胆总管梗阻的患者, 如果预期生存期>4 mo或SEMSs本身的成本小于ERCP费用的50%, 应首选直径10 mm的SEMSs[15].

3 裸支架和覆膜支架

胆道金属支架可以进一步分为裸支架和覆膜支架. 裸支架主要由不锈钢、镍钛合金等制成, 覆膜支架表面由硅橡胶、聚亚安酯、聚四氟乙烯等材质的膜覆盖, 可避免肿瘤向内生长造成支

■研发前沿

普通支架只能机械性阻止肿瘤生长, 并不能杀伤肿瘤, 作为近年来研究热点的药物洗脱支架和放射性支架克服了以上不足, 在机械性解除胆道梗阻的同时具有抑制肿瘤细胞增殖的作用. 另外, 支架联合光动力治疗或射频消融治疗也是新兴的肿瘤局部治疗手段, 通过联合治疗的方法局部抑制肿瘤生长, 可延长支架通畅时间, 提高患者生存率, 具有良好的发展前景, 也是胆管癌姑息性治疗具有良好发展前景的新方向.

■相关报道
《Biliary stents: models and methods for endoscopic stenting》本文献详细介绍了不同胆道支架的分类、材质、规格及特点，胆道支架植入移除的方法技巧，多枚支架植入的应用，以及新型支架的研究等，内容详实具有临床指导意义.

架阻塞，并使支架易于移除. 其中膜覆盖整个支架者称为全覆膜支架，覆盖部分支架而两端不覆盖者称为半覆膜支架[15].

覆膜支架会阻塞侧支胆管，且更易发生支架移位，在肝门部胆管癌中应用甚少[20,21]. 一项多中心实验纳入了400例不可手术切除的胆管远端恶性梗阻患者，应用裸支架和覆膜支架治疗后，患者的生存期、支架通畅时间、并发症发生率均无明显差异，然而应用裸支架者更易发生肿瘤向内生长，应用覆膜支架者更易发生支架移位[22]. 裸SEMS、半覆膜SEMS、全覆膜SEMS支架移位率分别约为1%、5%、20%[15]. 近期一项Meta分析则显示，在胆管远端恶性梗阻的患者，与裸支架相比植入覆膜支架可延长的支架通畅时间及患的者生存期[23].

4 单侧支架和双侧支架

在胆管癌特别是肝门部胆管癌的姑息性治疗中，胆道引流的程度仍存在争议. 单侧支架植入与双侧支架植入相比，操作更简单，费用更低，再介入治疗更容易[24]. De Palma等[25]认为胆管分叉处的肿瘤不应常规应用一个以上的支架治疗，双侧支架比单侧支架植入的成功率更低，且双侧支架植入会导致更高的并发症发生率. Iwano等[26]认为肝脓肿在双侧支架植入术后发病率更高. 内镜下双侧支架植入比单侧支架植入操作难度更大，植入后行再介入手术情况也更复杂[24].

然而随着内镜技术的提高，近期的研究则认为肝门部胆管癌双侧引流较单侧引流更有效，双侧引流可获得更长的支架通畅时间，而支架植入的成功率、引流成功率、并发症发生率无明显差别，双侧支架植入的成功率也达到了90%-93%[27-29]. 双侧支架植入主要有两种方式：并排式和嵌入式. 一项纳入52例肝门部恶性梗阻患者的实验显示：并排式双侧支架植入术后并发症发生率高于嵌入式支架植入，然而并排式支架通畅率也更高[30]. 目前对于两种植入方式比较的研究较少，尚需进一步的研究来阐明两种方法的优劣势.

2013年亚太共识建议：肝门部胆管癌的姑息性胆道支架治疗应引流50%体积以上的肝脏，应根据个人肝脏的解剖特点决定应用单支架、双支架或多支架[31].

5 药物洗脱支架和放射性支架

目前无论普通金属支架或塑料支架、裸支架或腹膜支架都只是机械性的姑息治疗，并无抑制肿瘤细胞增殖的效应.

药物洗脱支架(drug-eluting stents, DESs)，广泛应用于冠状动脉疾病，近年来越来越多的研究将非血管性载药支架(non-vascular DESs)应用于胃肠道、胆道、气管、支气管等恶性梗阻的治疗中. 支架表面的抗肿瘤药物通过单纯扩散至黏膜及黏膜下层，使肿瘤微环境药物浓度达到最大，减小非肿瘤区域的药物毒性. 同时，通过支架表面的抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞增殖、黏膜增生，减少肿瘤向内生长的风险，增加支架通畅率[32,33].

紫杉醇洗脱支架研究最为广泛，已在细胞、动物及临床研究中证明其安全有效[34-36]. 一项前瞻性随机化研究纳入了52例恶性胆道梗阻患者，比较了紫杉醇载药覆膜支架与普通覆膜支架的治疗效果，证实了紫杉醇载药支架安全性，然而该研究中两组中支架通畅时间和患者生存时间均无明显差异[37]. 近期亦有体内、外研究证实索拉非尼洗脱支架亦具有抑制细胞增殖、侵袭及血管生成的作用[38].

放射性支架目前研究尚少，Guijin等[39]和He等[40]已在细胞水平证实(103)Pd放射性支架可抑制胆管癌细胞增殖，诱导凋亡. 随着进一步的实验室及临床研究，药物洗脱支架及放射性支架将有望成为胆管癌安全有效的局部治疗手段.

6 支架联合光动力治疗和胆道内射频消融

光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)是一种新兴的恶性肿瘤的姑息治疗方法，其原理是：静脉注射的光敏药物在肿瘤组织中聚集浓度大大高于周围组织，用特定波长的光照射时，光敏剂发生光化学反应产生氧自由基导致肿瘤细胞坏死，而周围正常组织受损很小或几乎不受损伤. 多项研究证实支架联合PDT治疗晚期胆管癌安全有效，与单独应用支架治疗相比，可更好的引流胆汁，延长患者生存时间，改善生存质量，延长支架通畅时间[41,42]. Lee等[43]认为支架联合光动力治疗较单纯支架治疗可提高患者生存期延长支架通畅时间，并不增加并发症的发生率. 在一些报道中少数病例会出现胆管炎或光毒性的不良反应[44-47].

传统的射频消融术(radiofrequency ablation, RFA)主要用于治疗心律失常，近年来逐渐成为肿瘤微创治疗新技术，多用于肝癌等实体性肿瘤的治疗[48,49]. 在肝内胆管癌的治疗中也有应用[50,51].

胆道内射频消融(endobiliary radiofrequency ablation, RFA)是局部抑制胆管癌生长的又一新方法. 其原理是通过高频电流使肿瘤组织、血管凝固坏死. 近期的研究认为对于肝外胆管癌, 采取胆道支架联合RFA的治疗方法安全有效[52-55]. 患者在植入胆道支架引流之前, 首先应用射频消融电极对肿瘤部位进行灼烧, 减轻胆道狭窄, 也可进行多次射频消融治疗增强抑瘤效果. 胆道支架联合RFA可延长支架通畅时间, 减少阻塞率, 降低治疗成本, 提高生存率[54,55].

支架联合PDT或RFA治疗都是新兴的肿瘤局部治疗手段, 通过联合治疗的方法克服了普通支架只能机械性阻止肿瘤生长的不足, 已于临床证实可增加之间通畅时间, 具有良好的发展前景, 然而尚需大样本长时间的研究来证实其疗效.

7 结论

支架治疗是胆管癌姑息治疗安全有效的手段, 在胆管癌的治疗过程中, 选择不同的支架植入路径、支架材质、支架类型、支架数量、载药支架以及支架联合局部治疗的应用与患者的预后密切相关. 应根据患者的预期生存期、一般情况、并发症、经济状况等具体情况综合考虑, 选择最适治疗方案. 新技术的发展也将提高胆管癌支架治疗的效果. 目前双层支架(double layer stents, DLS)[56,57]、抗返流支架[58,59]期望通过改善支架材料、去除侧孔、增加支架内表面光滑程度、减少十二指肠中食物返流等方法延长支架通畅时间, 也是新型支架发展的有益尝试, 其治疗效果尚待进一步的研究.

8 参考文献

1 Blechacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 512-522 [PMID: 21808282 DOI: 10.1038/nrgastro.2011.131]

2 Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, Rosenberg WM, Tait P, Taylor-Robinson SD, Thillainayagam AV, Thomas HC, Wasan H. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 2012; 61: 1657-1669 [PMID: 22895392 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301748]

3 Oh SW, Yoon YS, Shin SA. Effects of excess weight on cancer incidences depending on cancer sites and histologic findings among men: Korea National Health Insurance Corporation Study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4742-4754 [PMID: 16034050]

4 Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366: 1303-1314 [PMID: 16214602 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67530-7]

5 Blechacz B, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology* 2008; 48: 308-321 [PMID: 18536057 DOI: 10.1002/hep.22310]

6 Chahal P, Baron TH. Endoscopic palliation of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 551-560 [PMID: 16891889 DOI: 10.1097/01.mog.0000239872.12081.a4]

7 Van Laethem JL, De Broux S, Eisendrath P, Cremer M, Le Moine O, Devière J. Clinical impact of biliary drainage and jaundice resolution in patients with obstructive metastases at the hilum. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1271-1277 [PMID: 12818268 DOI: 10.1016/S0002-9270(03)00284-3]

8 Abu-Hamda EM, Baron TH. Endoscopic management of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 165-175 [PMID: 15192789 DOI: 10.1055/s-2004-828893]

9 Cowling MG, Adam AN. Internal stenting in malignant biliary obstruction. *World J Surg* 2001; 25: 355-359; discussion 355-359 [PMID: 11343193]

10 Kim JH. Endoscopic stent placement in the palliation of malignant biliary obstruction. *Clin Endosc* 2011; 44: 76-86 [PMID: 22741117 DOI: 10.5946/ce.2011.44.2.76]

11 Martin RC, Vitale GC, Reed DN, Larson GM, Edwards MJ, McMasters KM. Cost comparison of endoscopic stenting vs surgical treatment for unresectable cholangiocarcinoma. *Surg Endosc* 2002; 16: 667-670 [PMID: 11972211]

12 Paik WH, Park YS, Hwang JH, Lee SH, Yoon CJ, Kang SG, Lee JK, Ryu JK, Kim YT, Yoon YB. Palliative treatment with self-expandable metallic stents in patients with advanced type III or IV hilar cholangiocarcinoma: a percutaneous versus endoscopic approach. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 55-62 [PMID: 18657806 DOI: 10.1016/j.gie.2008.04.005]

13 Webb K, Saunders M. Endoscopic management of malignant bile duct strictures. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2013; 23: 313-331 [PMID: 23540963 DOI: 10.1016/j.giec.2012.12.009]

14 Grönroos JM, Gullichsen R, Laine S, Salminen P. Endoscopic palliation of malignant obstructive jaundice in extremely elderly patients: plastic stent is enough. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2010; 19: 122-124 [PMID: 20151854 DOI: 10.3109/13645701003642941]

15 Dumonceau JM, Heresbach D, Devière J, Costamagna G, Beilenhoff U, Riphaus A. Biliary stents: models and methods for endoscopic stenting. *Endoscopy* 2011; 43: 617-626 [PMID: 21614754 DOI: 10.1055/s-0030-1256315]

16 Geller A. Klatskin tumor--palliative therapy: the jury is still out or may be not yet in... . *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 63-65 [PMID: 19111687 DOI: 10.1016/j.gie.2008.06.025]

17 Mukai T, Yasuda I, Nakashima M, Doi S, Iwashita T, Iwata K, Kato T, Tomita E, Moriwaki H. Metallic stents are more efficacious than plastic stents in unresectable malignant hilar biliary strictures: a randomized controlled trial. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2013; 20: 214-222 [PMID: 22415652 DOI: 10.1007/s00534-012-0508-8]

18 Stern N, Sturgess R. Endoscopic therapy in the management of malignant biliary obstruction. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 313-317 [PMID: 18276101 DOI:

■创新盘点

目前对于系统性比较胆管癌不同支架治疗技术, 尤其是新型胆道支架及胆道支架联合治疗的报道较少. 本文系统性论述了晚期胆管癌支架治疗的目前的研究现状及进展, 介绍了胆管癌支架治疗的效果, 支架植入路径的选择, 不同材质支架的特点及应用, 准确把握了载药支架、放射性支架等新兴胆道支架, 以及支架联合光动力治疗、射频消融术的发展方向, 可为临床和研究提供重要的参考.

■应用要点
本文详细介绍了支架植入路径的选择，不同材质支架的特点及应用，准确把握了载药支架、放射性支架等新兴胆道支架以及支架联合光动力治疗、射频消融术的发展方向. 在临床应用中，为胆管癌患者选择适合治疗方法提供参考依据.

10.1016/j.ejso.2007.07.210]
19 Kaassis M, Boyer J, Dumas R, Ponchon T, Coumaros D, Delcenserie R, Canard JM, Fritsch J, Rey JF, Burtin P. Plastic or metal stents for malignant stricture of the common bile duct? Results of a randomized prospective study. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 178-182 [PMID: 12556780 DOI: 10.1067/mge.2003.66]
20 Lee TH. Technical tips and issues of biliary stenting, focusing on malignant hilar obstruction. *Clin Endosc* 2013; 46: 260-266 [PMID: 23767037 DOI: 10.5946/ce.2013.46.3.260]
21 Sung J. Are covered stents superior to uncovered stents in the management of malignant biliary obstruction? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 20-21 [PMID: 16265038 DOI: 10.1038/ncpgasthep0014]
22 Kullman E, Frozanpor F, Söderlund C, Linder S, Sandström P, Lindhoff-Larsson A, Toth E, Lindell G, Jonas E, Freedman J, Ljungman M, Rudberg C, Ohlin B, Zacharias R, Leijonmarck CE, Teder K, Ringman A, Persson G, Gözen M, Eriksson O. Covered versus uncovered self-expandable nitinol stents in the palliative treatment of malignant distal biliary obstruction: results from a randomized, multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2010; 72: 915-923 [PMID: 21034892 DOI: 10.1016/j.gie.2010.07.036]
23 Saleem A, Leggett CL, Murad MH, Baron TH. Meta-analysis of randomized trials comparing the patency of covered and uncovered self-expandable metal stents for palliation of distal malignant bile duct obstruction. *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 321-327. e1-e3 [PMID: 21683354 DOI: 10.1016/j.gie.2011.03.1249]
24 Yasuda I, Mukai T, Moriwaki H. Unilateral versus bilateral endoscopic biliary stenting for malignant hilar biliary strictures. *Dig Endosc* 2013; 25 Suppl 2: 81-85 [PMID: 23617655 DOI: 10.1111/den.12060]
25 De Palma GD, Galloro G, Siciliano S, Iovino P, Catanzano C. Unilateral versus bilateral endoscopic hepatic duct drainage in patients with malignant hilar biliary obstruction: results of a prospective, randomized, and controlled study. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 547-553 [PMID: 11323577 DOI: 10.1067/mge.2001.113381]
26 Iwano H, Ryozawa S, Ishigaki N, Taba K, Senyo M, Yoshida K, Sakaida I. Unilateral versus bilateral drainage using self-expandable metallic stent for unresectable hilar biliary obstruction. *Dig Endosc* 2011; 23: 43-48 [PMID: 21198916 DOI: 10.1111/j.1443-1661.2010.01036]
27 Naitoh I, Ohara H, Nakazawa T, Ando T, Hayashi K, Okumura F, Okayama Y, Sano H, Kitajima Y, Hirai M, Ban T, Miyabe K, Ueno K, Yamashita H, Joh T. Unilateral versus bilateral endoscopic metal stenting for malignant hilar biliary obstruction. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 552-557 [PMID: 19220678 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05750]
28 Liberato MJ, Canena JM. Endoscopic stenting for hilar cholangiocarcinoma: efficacy of unilateral and bilateral placement of plastic and metal stents in a retrospective review of 480 patients. *BMC Gastroenterol* 2012; 12: 103 [PMID: 22873816 DOI: 10.1186/1471-230X-12-103]
29 Lee TH, Moon JH, Kim JH, Park DH, Lee SS, Choi HJ, Cho YD, Park SH, Kim SJ. Primary and revision efficacy of cross-wired metallic stents for endoscopic bilateral stent-in-stent placement in malignant hilar biliary strictures. *Endoscopy* 2013; 45: 106-113 [PMID: 23212727 DOI: 10.1055/s-0032-1325928]
30 Naitoh I, Hayashi K, Nakazawa T, Okumura F, Miyabe K, Shimizu S, Yoshida M, Yamashita H, Ohara H, Joh T. Side-by-side versus stent-in-stent deployment in bilateral endoscopic metal stenting for malignant hilar biliary obstruction. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 3279-3285 [PMID: 22732832 DOI: 10.1007/s10620-012-2270-9]
31 Rerknimitr R, Angsuwatcharakon P, Ratanachuek T, Khor CJ, Ponnudurai R, Moon JH, Seo DW, Pantongrag-Brown L, Sangchan A, Pisespongsa P, Akaraviputh T, Reddy ND, Maydeo A, Itoi T, Pausawasdi N, Punamiya S, Attasaranya S, Devereaux B, Ramchandani M, Goh KL. Asia-Pacific consensus recommendations for endoscopic and interventional management of hilar cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 593-607 [PMID: 23350673 DOI: 10.1111/jgh.12128]
32 Costamagna G, Boškoski I, Familiari P, Tringali A, Cesaro P, Perri V. Update in biliary endoscopy. *Dig Dis* 2011; 29 Suppl 1: 3-8 [PMID: 22104745 DOI: 10.1159/000331118]
33 Lee DK. Drug-eluting stent in malignant biliary obstruction. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 628-632 [PMID: 19554255 DOI: 10.1007/s00534-009-0135-1]
34 Suk KT, Kim JW, Kim HS, Baik SK, Oh SJ, Lee SJ, Kim HG, Lee DH, Won YH, Lee DK. Human application of a metallic stent covered with a paclitaxel-incorporated membrane for malignant biliary obstruction: multicenter pilot study. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 798-803 [PMID: 17905025 DOI: 10.1016/j.gie.2007.05.037]
35 Lee DK, Kim HS, Kim KS, Lee WJ, Kim HK, Won YH, Byun YR, Kim MY, Baik SK, Kwon SO. The effect on porcine bile duct of a metallic stent covered with a paclitaxel-incorporated membrane. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 296-301 [PMID: 15729251]
36 Kalinowski M, Alfke H, Kleb B, Dürfeld F, Joachim Wagner H. Paclitaxel inhibits proliferation of cell lines responsible for metal stent obstruction: possible topical application in malignant bile duct obstructions. *Invest Radiol* 2002; 37: 399-404 [PMID: 12068162 DOI: 10.1097/00004424-200207000-00007]
37 Song TJ, Lee SS, Yun SC, Park do H, Seo DW, Lee SK, Kim MH. Paclitaxel-eluting covered metal stents versus covered metal stents for distal malignant biliary obstruction: a prospective comparative pilot study. *Gastrointest Endosc* 2011; 73: 727-733 [PMID: 21288514 DOI: 10.1016/j.gie.2010.11.048]
38 Kim do H, Jeong YI, Chung CW, Kim CH, Kwak TW, Lee HM, Kang DH. Preclinical evaluation of sorafenib-eluting stent for suppression of human cholangiocarcinoma cells. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 1697-1711 [PMID: 23658488 DOI: 10.2147/IJN.S43508]
39 Guijin H, QiYong G, XiaoDan Z, DaWei J, Xi G, ChunLai P, Liu W, XianWei D. Effect of 103Pd radioactive stent on caspase-9, cholangiocarcinoma cell growth and its radiosensitivity. *Surg Oncol* 2011; 20: 247-251 [PMID: 20231087 DOI: 10.1016/j.suronc.2010.02.001]
40 He GJ, Sun DD, Ji DW, Sui DM, Yu FQ, Gao QY, Dai XW, Gao H, Jiang T, Dai CL. Induction of biliary cholangiocarcinoma cell apoptosis by 103Pd cholangial radioactive stent gamma-rays. *Chin Med*

J (Engl) 2008; 121: 1020-1024 [PMID: 18706251]
41 Cheon YK, Lee TY, Lee SM, Yoon JY, Shim CS. Longterm outcome of photodynamic therapy compared with biliary stenting alone in patients with advanced hilar cholangiocarcinoma. *HPB* (Oxford) 2012; 14: 185-193 [PMID: 22321037 DOI: 10.1111/j.1477-2574.2011.00424]
42 Ortner ME, Caca K, Berr F, Liebetruth J, Mansmann U, Huster D, Voderholzer W, Schachschal G, Mössner J, Lochs H. Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study. *Gastroenterology* 2003; 125: 1355-1363 [PMID: 14598251 DOI: 10.1016/j.gastro.2003.07.015]
43 Lee TY, Cheon YK, Shim CS, Cho YD. Photodynamic therapy prolongs metal stent patency in patients with unresectable hilar cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 5589-5594 [PMID: 23112552 DOI: 10.3748/wjg.v18.i39.5589]
44 Talreja JP, DeGaetani M, Sauer BG, Kahaleh M. Photodynamic therapy for unresectable cholangiocarcinoma: contribution of single operator cholangioscopy for targeted treatment. *Photochem Photobiol Sci* 2011; 10: 1233-1238 [PMID: 21512706 DOI: 10.1039/c0pp00259c]
45 Kahaleh M, Mishra R, Shami VM, Northup PG, Berg CL, Bashlor P, Jones P, Ellen K, Weiss GR, Brenin CM, Kurth BE, Rich TA, Adams RB, Yeaton P. Unresectable cholangiocarcinoma: comparison of survival in biliary stenting alone versus stenting with photodynamic therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 290-297 [PMID: 18255347 DOI: 10.1016/j.cgh.2007.12.004]
46 Rumalla A, Baron TH, Wang KK, Gores GJ, Stadheim LM, de Groen PC. Endoscopic application of photodynamic therapy for cholangiocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 500-504 [PMID: 11275896 DOI: 10.1067/mge.2001.113386]
47 Zoepf T, Jakobs R, Arnold JC, Apel D, Riemann JF. Palliation of nonresectable bile duct cancer: improved survival after photodynamic therapy. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2426-2430 [PMID: 16279895 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.00318.x]
48 Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; 53: 1020-1022 [PMID: 21374666 DOI: 10.1002/hep.24199]
49 Siperstein AE, Berber E, Ballem N, Parikh RT. Survival after radiofrequency ablation of colorectal liver metastases: 10-year experience. *Ann Surg* 2007; 246: 559-565; discussion 565-567 [PMID: 17893492 DOI: 10.1097/SLA.0b013e318155a7b6]
50 Xu HX, Wang Y, Lu MD, Liu LN. Percutaneous ultrasound-guided thermal ablation for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Radiol* 2012; 85: 1078-1084 [PMID: 22374282 DOI: 10.1259/bjr/24563774]
51 Kim JH, Won HJ, Shin YM, Kim KA, Kim PN. Radiofrequency ablation for the treatment of primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2011; 196: W205-W209 [PMID: 21257864 DOI: 10.2214/AJR.10.4937]
52 Monga A, Gupta R, Ramchandani M, Rao GV, Santosh D, Reddy DN. Endoscopic radiofrequency ablation of cholangiocarcinoma: new palliative treatment modality (with videos). *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 935-937 [PMID: 21168839 DOI: 10.1016/j.gie.2010.10.018]
53 Steel AW, Postgate AJ, Khorsandi S, Nicholls J, Jiao L, Vlavianos P, Habib N, Westaby D. Endoscopically applied radiofrequency ablation appears to be safe in the treatment of malignant biliary obstruction. *Gastrointest Endosc* 2011; 73: 149-153 [PMID: 21184881 DOI: 10.1016/j.gie.2010.09.031]
54 Alis H, Sengoz C, Gonenc M, Kalayci MU, Kocatas A. Endobiliary radiofrequency ablation for malignant biliary obstruction. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2013; 12: 423-427 [PMID: 23924501 DOI: 10.1016/S1499-3872(13)60066-1]
55 Wadsworth CA, Westaby D, Khan SA. Endoscopic radiofrequency ablation for cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2013; 29: 305-311 [PMID: 23449026 DOI: 10.1097/MOG.0b013e32835faacc]
56 Elwir S, Sharzehi K, Veith J, Moyer MT, Dye C, McGarrity T, Mathew A. Biliary stenting in patients with malignant biliary obstruction: comparison of double layer, plastic and metal stents. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 2088-2092 [PMID: 23456505 DOI: 10.1007/s10620-013-2607-z]
57 Tringali A, Mutignani M, Perri V, Zuccalà G, Cipolletta L, Bianco MA, Rotondano G, Philipper M, Schumacher B, Neuhaus H, Schmit A, Devière J, Costamagna G. A prospective, randomized multicenter trial comparing DoubleLayer and polyethylene stents for malignant distal common bile duct strictures. *Endoscopy* 2003; 35: 992-997 [PMID: 14648409]
58 Kim DU, Kwon CI, Kang DH, Ko KH, Hong SP. New antireflux self-expandable metal stent for malignant lower biliary obstruction: in vitro and in vivo preliminary study. *Dig Endosc* 2013; 25: 60-66 [PMID: 23286258 DOI: 10.1111/j.1443-1661.2012.01324.x]
59 Dua KS, Reddy ND, Rao VG, Banerjee R, Medda B, Lang I. Impact of reducing duodenobiliary reflux on biliary stent patency: an in vitro evaluation and a prospective randomized clinical trial that used a biliary stent with an antireflux valve. Gastrointest Endosc 2007; 65: 819-828 [PMID: 17383650 DOI: 10.1016/j.gie.2006.09.011]

■同行评价

本文系统性论述了晚期胆管癌支架治疗的目前的研究现状及进展，介绍了胆管癌支架治疗的效果，比较了不同支架植入路径，不同材质类型支架的特点及应用，准确把握了载药支架、放射性支架等新兴胆道支架，以及支架联合光动力治疗、射频消融术的发展方向. 可为临床和研究提供重要参考.

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 654-660
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

miR-375在消化系肿瘤中的研究进展

颜俊伟, 廖家智, 林菊生, 何星星

■背景资料
肿瘤的早期诊断和治疗均缺乏有效的手段和方法, 所以肿瘤学研究的重心也是难点就是寻找合适生物分子标志物和有效分子治疗靶点. MicroRNA是一类内源性的具有调控基因表达功能的微小RNA分子其异常表达与肿瘤的发生发展密切相关. MicroRNA是较为理想的分子标志物, 其替代或拮抗治疗很可能成为未来肿瘤治疗的新方法.

■同行评议者
莫发荣, 副教授, 广西医科大学组织学与胚胎学教研室

颜俊伟, 廖家智, 林菊生, 何星星, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
颜俊伟, 硕士研究生, 主要从事microRNA与肝癌的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81101824
同济医院首届优秀青年科学基金资助项目, No. YXQN005
作者贡献分布: 本文综述由颜俊伟完成; 何星星指导; 廖家智与林菊生审校.
通讯作者: 何星星, 助理研究员, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. xxhe@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 86-27-83663661
收稿日期: 2013-12-02 修回日期: 2013-12-19
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

Roles of miR-375 in digestive tumors

Jun-Wei Yan, Jia-Zhi Liao, Ju-Sheng Lin, Xing-Xing He

Jun-Wei Yan, Jia-Zhi Liao, Ju-Sheng Lin, Xing-Xing He, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei province, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81101824; and the Outstanding Youth Science Foundation of Tongji Hospital, No. YXQN005
Correspondence to: Xing-Xing He, Research Assistant, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Dadao, Wuhan 430030, Hubei Province, China. xxhe@tjh.tjmu.edu.cn
Received: 2013-12-02 Revised: 2013-12-19
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract
MicroRNAs (miRNAs) are a group of small non-coding RNAs that regulate gene expression post-transcriptionally. A large body of evidence has indicated that dysregulation of miRNAs is an important hallmark of cancer. MiRNAs modulate malignant phenotypes of cancer by repressing many critical oncogenes or tumor suppressors. MiR-375 was firstly identified in pancreatic beta-cells and it can regulate insulin secretion and pancreatic development. Further studies found that miR-375 is significantly downregulated in multiple types of tumors, especially digestive system tumors, such as hepatocellular carcinoma, gastric cancer, esophageal cancer, and pancreatic cancer. Overexpression of miR-375 represses target genes, such as *AEG-1*, *JAK2*, *ATG7*, *IGF1R*, *PDK1*, *14-3-3Z* and *YAP1*, and thereby inhibits malignant properties of cancer. It is also found that miR-375 in tissues or circulation could be used as a biomarker for diagnosis or prognosis prediction in digestive system tumors. Since miR-375 play an important role in the initiation and progression of digestive system tumors, it can become a novel therapeutic target. Monitoring the levels of miR-375 may contribute to the early diagnosis and prognosis prediction.

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

Key Words: MiR-375; Tumor suppressor; Cancer

Yan JW, Liao JZ, Lin JS, He XX. Roles of miR-375 in digestive tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 654-660
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/654.asp
DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.654

摘要
MiRNAs是一类在转录后水平调控基因表达的微小RNA分子. 大量研究表明, MiRNAs的失调表达是肿瘤的重要特征之一. MiRNAs参与调控许多重要的癌基因或抑癌基因的表达, 从而调控肿瘤的恶性生物学表型. MiR-375最早发现在胰岛B细胞表达并调控胰岛素的分泌和胰岛的形成. 进一步的研究发现, miR-375在肿瘤组织中普遍呈现低表达特别是在消化系肿瘤中, 如肝癌、胃癌、食管癌、胰腺癌. 在这些肿瘤中过表达miR-375可抑制靶基因, 如: 星形胶质细胞升高基因1、Janus激酶2、自噬相关蛋白7、胰岛素样生长因子1受体、3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1、YWHAZ以及YES相关蛋白1的表达从而抑制肿瘤的恶性表型. 此外研究还发现组织或血清中的miR-375可作为消化系肿瘤诊断和预后的生物标志物. 因此, miR-375在消化系统肿瘤的发生和发展过程中发挥了重要的作用, 是潜在的肿瘤药物开发的新靶点, 监测miR-375的表达水平可能有助于消化系肿瘤的早期诊断和预后判断.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: MiR-375; 抑癌基因; 肿瘤

核心提示: 目前关于消化系肿瘤发生发展的分子机制仍不十分清楚. DNA高甲基化导致miR-375在众多常见的消化系肿瘤中均呈显著低表达. miR-375通过抑制星形胶质细胞升高基因1(astrocyte elevated gene-1)、Janus激酶2(janus kinase 2)、胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor)、3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1)、14-3-3Z以及YES相关蛋白1(Yes-associated protein 1)等重要癌基因发挥抑癌作用. 因此, 高甲基化导致抑癌基因miR-375低表达引起上述癌基因的异常激活可能是消化系肿瘤发生发展共同机制之一.

颜俊伟, 廖家智, 林菊生, 何星星. miR-375在消化系肿瘤中的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 654-660 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/654.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.654

0 引言

MicroRNA(miRNAs)是长度约为22个碱基的单链非编码RNA分子. MiRNA基因经RNA聚合酶Ⅱ转录后, 经核糖核酸酶Ⅲ(RNase Ⅲ)Drosha和Dicer酶分别在核内和核外剪切加工形成成熟的miRNA分子[1]. MiRNA与诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)在胞浆中结合后, 通过与靶mRNA的3'非翻译区的互补序列结合导致翻译抑制或mRNA的降解, 从而抑制靶基因的表达[2]. 据估计miRNA基因调控多达30%的所有蛋白质编码基因[3]. MiRNA通过调控靶基因参与肿瘤细胞的分化、 增殖、存活、凋亡和转移[4-6]. MiR-375首先在胰腺中被发现并调节胰岛素的分泌以及参与胰岛细胞的发育和生长[7-10]. 随后的全基因组miRNA表达谱的研究显示, miR-375广泛存在于各种组织或器官中并在多种肿瘤特别是消化系统肿瘤如肝癌、食管癌、胃癌、胰腺癌中均显著下调[11-16]. 目前已经清楚地知道miR-375在上述这些肿瘤中发挥了重要的抑癌作用, miR-375很有可能成为未来肿瘤治疗的新型靶点以及作为重要的早期诊断和预后判断的肿瘤标志物. 以下总结了miR-375在消化系肿瘤中的抑癌机制以及其作为肿瘤治疗靶点的潜力和作为诊断和预后标志物的前景.

1 miR-375的分子结构与抑癌机制

遗传学分析表明人*miR-375*基因位于2号染色体长臂2区3带, *Cryba2*基因和*Ccdc108*基因之间, 因此属于基因间型的miRNA[17]. 该染色体区域在人和小鼠之间具有较高的保守性, Avnit-Sagi等[18]通过对miR-375上游启动子中人和小鼠的保守序列分析发现了重要的转录起始和调控元件如: TATA盒和E盒. 前者是DNA聚合酶Ⅱ的结合位点, 后者是转录因子的结合位点. 这些证据表明miR-375拥有独立的启动子并受转录调控信号的调节. 进一步研究证明miR-375表达受转录因子如: PDX/NeuroD1[19]、ASH1[20]、ERα[21], CTCF[21], IL-13[22]以及糖代谢调节信号cAMP[23]的调控. 更重要的是, 研究还发现*miR-375*启动子区域存在高频率的CpG岛证明miR-375表达受甲基化的调控, 而*miR-375*启动子区域的高甲基化是miR-375在消化系肿瘤中低表达的重要原因[21,24-27]. 成熟的miR-375为长22个碱基的单链RNA分子, 碱基序列为UUUGUUCGUUCG-GCUCGCGUGA. miR-375在胞浆内加工成熟后与RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合, 该复合物通过miR-375的碱基序列识别众多mRNA分子导致靶mRNA的降解或抑制翻译过程, 从而调控基因的表达. 研究发现miR-375通过靶向抑制不同的促肿瘤相关基因可抑制众多类型肿瘤特别是消化系肿瘤的生长[11,15,27-30]. 因此, 高甲基化导致的miR-375低表达是消化系肿瘤发生发展的重要原因之一.

2 miR-375与消化系肿瘤的关系

大量证据表明miR-375在消化系肿瘤中显著下调, *miR-375*启动子区域高甲基化是miR-375下调的主要原因[24,25,27,28]. MiR-375通过靶向抑制许多重要的靶基因如: 星形胶质细胞升高基因(astrocyte elevated gene-1, *AEG-1*)、*PDK1*、*YAP1*等抑制消化系肿瘤的恶性表型(图1).

2.1 MiR-375与肝癌

He等[11]应用miRNA芯片和TaqMan qRT-PCR技术发现miR-375在肝癌细胞和肝癌组织中的表达都是显著下调的, 并且在原发性肝癌组织中miR-375和AEG-1的表达水平呈现负相关. *AEG-1*是重要的癌基因在肝癌中表达上调并参与到肿瘤进展的各个方面包括转化, 逃避凋亡、侵袭、转移以及药物的耐药[31]. 研究证实AEG-1是miR-375的一个重要靶基因, 而miR-375表达下调可能是AEG-1在肝癌中表达

■研发前沿

每年都有大量肿瘤相关的microRNA被发现和证实, 研究microRNA调控网络、血清microRNA作为肿瘤分子标志物的应用前景以及microRNA相关药物的开发是microRNA研究的热点. MicroRNA携带载体的开发是microRNA药物走向临床治疗的瓶颈.

■相关报道
Poy等证实*miR-375*基因敲除小鼠导致高血糖和胰岛素抵抗; Biton报道miR-375参与肠道免疫; Wang等发现miR-375参与肺泡上皮分化以及表面活性物质的分泌.

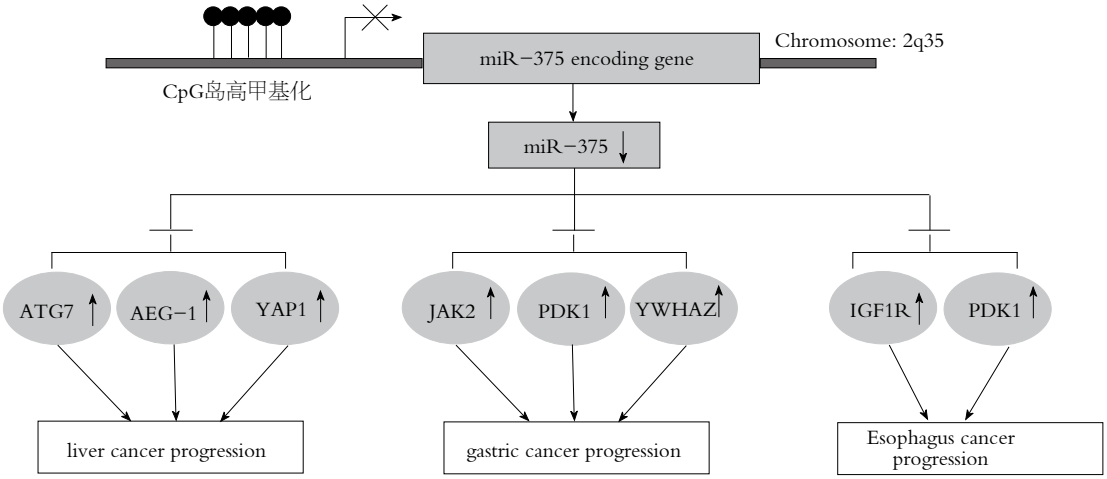

图 1 MiR-375在消化系肿瘤中低表达和抑癌机制. ATG7: 自噬相关蛋白7; YAP1: YES相关蛋白1; IGF1R: 胰岛素样生长因子1受体; PDK1: 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1; AEG-1: 星形胶质细胞升高基因1; JAK2: Janus激酶2.

上调的原因之一[11]. 进一步研究发现MiR-375通过靶向抑制AEG-1抑制了肝癌细胞的生长、侵袭, 诱导肝癌细胞G_1期阻滞和细胞凋亡[11]. 此外, miR-375还可抑制缺氧诱导的细胞自噬从而影响肝癌细胞在缺氧条件下生存[32]. 缺氧发生时细胞激活自噬作为一种保护机制, 使细胞分解细胞器和蛋白质以维持生存所必需的能量和物质供应. MiR-375可抑制LC3I转化为LC3II, 从而抑制自噬体的形成, 后者可与溶酶体融合后被降解和回收利用因此是自噬的关键步骤. 自噬相关蛋白7(autophagy-related protein 7, ATG7)被发现是miR-375的直接靶基因. ATG7介导其他ATGs分子的连接从而促进自噬的激活[33]. 在肝癌细胞中过表达miR-375或者抑制ATG7的表达均可抑制肿瘤细胞在低氧状态下对损伤线粒体的清除, 增加线粒体凋亡相关蛋白如细胞色素C的释放, 从而抑制肝癌细胞的活性[32]. 这些发现阐述了miR-375新的抑癌机制: miR-375通过抑制在缺氧等应激条件下保护性自噬的发生影响肝癌细胞的生存. 研究发现自噬是肿瘤耐药的重要机制之一[34], 而恶性肿瘤特别是肝癌长期处于缺氧的微环境中, 这提示我们miR-375的替代治疗或联合用药可能具有高效的治疗潜能. Liu等[35]的研究还发现miR-375通过靶向YES相关蛋白1(Yes-associated protein 1, YAP1)抑制了肝癌细胞的侵袭和扩散.

2.2 MiR-375与胃癌 MiR-375在胃癌组织中呈低表达并发挥了重要的抑癌作用. Ding等[12]发现miR-375在胃癌中显著下调, 并通过靶向抑制Janus激酶2(janus kinase 2, JAK2)抑制胃癌细胞的增殖. JAK2是Janus非受体酪氨酸激酶家族成员其表达水平与miR-375在胃癌组织中呈负相关. 利用酪氨酸磷酸化抑制剂AG490或RNA干扰抑制JAK2后胃癌细胞的生长受到抑制而过表达JAK2则抵消了miR-375的生长抑制作用. Tsukamoto等[28]进一步证实了miR-375在胃癌中的抑癌作用并发现两个新的靶基因: 一是3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1, *PDK1*或*PDPK1*), 可激活蛋白激酶Akt及其下游的信号通路[36,37]; 另一个是*YWHAZ*(也称14-3-3Z), 属于高度保守的14-3-3家族的结合蛋白参与有丝分裂、细胞周期和细胞凋亡的调控[38]. 干扰YWHAZ和PDK1均可诱导胃癌细胞Caspase的激活, 从而启动凋亡信号[28].

2.3 MiR-375与食管癌 针对食管癌和癌旁组织的miRNA芯片结果发现: 在众多下调的miRNA中miR-375下调最为明显, 特别是在食管鳞状细胞癌中[39]. Kong等[27]发现miR-375靶向胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)抑制食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的细胞的增殖, 克隆形成及转移能力. 胰岛素样生长因子1(Insulin-like growth factor 1, IGF-1)可与IGF1R结合激活PI3K/Akt信号通路. 此外, Li等[25]也证实*PDK1*是miR-375的直接靶基因. 因此, 可以推测miR-375是PI3K/Akt信号通路的一个重要调节因子. 在肿瘤发生过程中miR-375下调导致PI3K/Akt信号通路的异常激活, 从而导致肿瘤的发生发展.

2.4 MiR-375与其他消化系肿瘤 Bloomston等[13]发现miR-375在正常胰腺组织、慢性胰腺炎、胰腺癌中呈逐渐下降的趋势. Bhatti等[40]检测了胰腺导管细胞癌(pancreatic ductal adenocarci-

表 1 miR-375作为消化系肿瘤预后判断生物标志物的总结

肿瘤类型	miRNA	来源	miR-375水平	预后	参考文献
食管鳞状细胞癌	miR-21, miR-375	血浆	下调	差	[51]
食管鳞状细胞癌	miR-375	组织	下调	差	[52]
食管腺癌	miR-21, miR-375	组织	下调	差	[39]
胃癌	miR-375/miR-142-5p	组织	下调	差	[53]

■创新盘点
miR-375与多种肿瘤密切相关但与消化系肿瘤的关系尤为突出, 几乎参与所有常见消化系器官恶性肿瘤的进展并在这些肿瘤中显著低表达. 本文重点概括总结了miR-375与消化系肿瘤的密切联系认为miR-375不管是在消化系肿瘤诊断还是治疗方面都具有很高的潜力.

noma, PDAC)与癌旁组织中miR-375的表达水平发现miR-375在PDAC中明显下调. Zhou等[29]进一步证实上调miR-375可抑制胰腺癌细胞的增殖, 促进癌细胞阻滞在G_0期并诱导细胞凋亡. 此外, Faltejskova等[41]发现结肠癌组织中miR-375的表达明显低于癌旁组织, 上调miR-375可抑制结肠细胞的生长并抑制细胞从G_1期向S期转换. 虽然研究发现miR-375在胰腺癌和结肠癌具有抑癌作用, 但具体的分子机制还需进一步阐明.

3 结论

MiR-375不仅在消化系肿瘤中显著低表达而且是消化系肿瘤的重要抑癌基因之一, 因此进一步探索miR-375在临床方面的应用潜力具有重要的现实意义. MiRNA在肿瘤中的表达谱差异, 使我们可以将miRNA作为诊断肿瘤和预后判断的标志物[42,43]. MiR-375在消化系肿瘤中显著低表达表明miR-375可能作为重要的分子标志物区分消化系肿瘤. Wang等[44]发现联合miR-375、miR-424和miR-92a 3个miRNA可准确的区分大肠标本中的腺瘤和高级别上皮内瘤变. 研究发现血清miRNA可在循环中稳定存在是理想分子标志物[45,46]. Li等[47]发现血清miR-25、miR-375和let-7f可用于区分HBV阳性肝癌和健康对照人群. 许多研究还发现miR-375在消化系肿瘤的预后判断方面也具有很大的潜力(表1). 值得注意的是, miR-375在众多的消化系统肿瘤中表达均下调这可能暗示miR-375的低表达不是某一肿瘤特异性而是一个广谱的分子标志物, 因此联合miR-375与其他的特异性的miRNA分子标志物可能具有更高的特异性和灵敏度.

未来miRNA的替代或拮抗疗法可能成为疾病治疗特别是抗肿瘤治疗重要方法之一[48,49]. 大量的证据表明miR-375在消化系肿瘤中显著下调, 体内和体外实验均证明miR-375可显著抑制肿瘤的生长, 这表明miR-375可作为肿瘤治疗的分子靶点, 具有重要的治疗价值. 实验证明胆固醇修饰的miR-375具有良好的稳定性可不依靠其他载体高效率的进入细胞内发挥作用. 将胆固醇修饰的miR-375注入到裸鼠移植瘤内明显抑制了肿瘤的生长[11]. 此外, 通过慢病毒介导miR-375过表达能抑制肝癌细胞自噬, 影响肝癌细胞的生存从而减缓小鼠肝癌移植瘤的生长[32]. miR-375的过表达真核表达质粒在转染试剂的协助下, 导入胃癌移植瘤内显著抑制了胃癌细胞的生长[12]. 稳定转染miR-375前体食管癌细胞的裸鼠成瘤能力明显低于空白对照组[27]. 这些证据表明miR-375在体内和体外都具有良好的抑癌作用, miR-375替代治疗肿瘤具有广阔的应用前景. 未来针对miR-375的治疗探索, 我们应该着眼于开发出新型的miRNA携带载体. 新型的miRNA携带载体必须保证合成RNA在体内稳定性高, 肿瘤靶向特异性强, 药物作用时间持久, 药物不良反应低. 而纳米技术很可能成为这类新型miRNA携带载体中的一员[50]. 通过纳米材料携带miRNA分子并偶联肝脏组织或肝癌细胞特异性的靶向分子如叶酸或转铁蛋白等可高效的将miRNA分子导向靶器官并被胞吞进入细胞内部发挥抗肿瘤作用.

MiRNAs为癌症研究开辟了一个新的领域. 到目前为止, miR-375已被证实在消化系肿瘤中下调并作为一个重要的抑癌基因. 虽然已经鉴别出许多重要的靶基因但miR-375参与的信号通路仍未完全阐明, 利用生物信息学的方法分析miR-375靶基因的调控网络有助于全面解析miR-375的功能. MiR-375在癌症的诊断和治疗方面具有很大的潜力, 未来我们的研究工作应探索miR-375的临床应用潜力, 更好的实现基础医学向临床医疗的转化.

4 参考文献

1 Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 228-234 [PMID: 19255566 DOI: 10.1038/ncb0309-228]

2 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297 [PMID: 14744438 DOI: S0092867404000455]

■**应用要点**
未来可利用miR-375的类似物与具有靶向功能的新型携带载体偶联后通过局部注射或全身应用的方法治疗消化系肿瘤.

3 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20 [PMID: 15652477 DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035]

4 Baranwal S, Alahari SK. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer* 2010; 126: 1283-1290 [PMID: 19877123 DOI: 10.1002/ijc.25014]

5 Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2009; 84: 55-71 [PMID: 19046400 DOI: 10.1111/j.1469-185X.2008.00061.x]

6 Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12: 580-587 [PMID: 17071139 DOI: 10.1016/j.molmed.2006.10.006]

7 Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432: 226-230 [PMID: 15538371 DOI: 10.1038/nature03076]

8 El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2008; 57: 2708-2717 [PMID: 18591395 DOI: 10.2337/db07-1614]

9 Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, Zavolan M, Stoffel M. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5813-5818 [PMID: 19289822 DOI: 10.1073/pnas.0810550106]

10 Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007; 5: e203 [PMID: 17676975 DOI: 10.1371/journal.pbio.0050203]

11 He XX, Chang Y, Meng FY, Wang MY, Xie QH, Tang F, Li PY, Song YH, Lin JS. MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 2012; 31: 3357-3369 [PMID: 22056881 DOI: 10.1038/onc.2011.500]

12 Ding L, Xu Y, Zhang W, Deng Y, Si M, Du Y, Yao H, Liu X, Ke Y, Si J, Zhou T. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell Res* 2010; 20: 784-793 [PMID: 20548334 DOI: 10.1038/cr.2010.79]

13 Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901-1908 [PMID: 17473300 DOI: 10.1001/jama.297.17.1901]

14 Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordonez B, Jurisica I, O'Sullivan B, Waldron J, Gullane P, Cummings B, Liu FF. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1129-1139 [PMID: 20145181 DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-09-2166]

15 Wang F, Li Y, Zhou J, Xu J, Peng C, Ye F, Shen Y, Lu W, Wan X, Xie X. miR-375 is down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1. *Am J Pathol* 2011; 179: 2580-2588 [PMID: 21945323 DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.07.037]

16 Chang C, Shi H, Wang C, Wang J, Geng N, Jiang X, Wang X. Correlation of microRNA-375 downregulation with unfavorable clinical outcome of patients with glioma. *Neurosci Lett* 2012; 531: 204-208 [PMID: 23103713 DOI: 10.1016/j.neulet.2012.10.021]

17 Baroukh NN, Van Obberghen E. Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain. *FEBS J* 2009; 276: 6509-6521 [PMID: 20102393 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07353.x]

18 Avnit-Sagi T, Kantorovich L, Kredo-Russo S, Hornstein E, Walker MD. The promoter of the pri-miR-375 gene directs expression selectively to the endocrine pancreas. *PLoS One* 2009; 4: e5033 [PMID: 19343226 DOI: 10.1371/journal.pone.0005033]

19 Keller DM, McWeeney S, Arsenlis A, Drouin J, Wright CV, Wang H, Wollheim CB, White P, Kaestner KH, Goodman RH. Characterization of pancreatic transcription factor Pdx-1 binding sites using promoter microarray and serial analysis of chromatin occupancy. *J Biol Chem* 2007; 282: 32084-32092 [PMID: 17761679 DOI: 10.1074/jbc.M700899200]

20 Nishikawa E, Osada H, Okazaki Y, Arima C, Tomida S, Tatematsu Y, Taguchi A, Shimada Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Toyokuni S, Sekido Y, Takahashi T. miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 6165-6173 [PMID: 21856745 DOI: 10.1158/0008-5472.can-11-1020]

21 de Souza Rocha Simonini P, Breiling A, Gupta N, Malekpour M, Youns M, Omranipour R, Malekpour F, Volinia S, Croce CM, Najmabadi H, Diederichs S, Sahin O, Mayer D, Lyko F, Hoheisel JD, Riazalhosseini Y. Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70: 9175-9184 [PMID: 20978187 DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-1318]

22 Lu TX, Lim EJ, Wen T, Plassard AJ, Hogan SP, Martin LJ, Aronow BJ, Rothenberg ME. MiR-375 is downregulated in epithelial cells after IL-13 stimulation and regulates an IL-13-induced epithelial transcriptome. *Mucosal Immunol* 2012; 5: 388-396 [PMID: 22453679 DOI: 10.1038/mi.2012.16]

23 Keller DM, Clark EA, Goodman RH. Regulation of microRNA-375 by cAMP in pancreatic β-cells. *Mol Endocrinol* 2012; 26: 989-999 [PMID: 22539037 DOI: 10.1210/me.2011-1205]

24 Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2010; 31: 766-776 [PMID: 19843643 DOI: 10.1093/carcin/bgp250]

25 Li X, Lin R, Li J. Epigenetic silencing of microRNA-375 regulates PDK1 expression in esophageal cancer. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 2849-2856 [PMID: 21533613 DOI: 10.1007/s10620-011-1711-1]

26 Mazar J, DeBlasio D, Govindarajan SS, Zhang S, Perera RJ. Epigenetic regulation of microRNA-375 and its role in melanoma development in humans. *FEBS Lett* 2011; 585: 2467-2476 [PMID: 21723283 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.06.025]

27 Kong KL, Kwong DL, Chan TH, Law SY, Chen L, Li Y, Qin YR, Guan XY. MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like

growth factor 1 receptor. *Gut* 2012; 61: 33-42 [PMID: 21813472 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300178]
28 Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res* 2010; 70: 2339-2349 [PMID: 20215506 DOI: 10.1158/0008-5472.can-09-2777]
29 Zhou J, Song S, Cen J, Zhu D, Li D, Zhang Z. MicroRNA-375 is downregulated in pancreatic cancer and inhibits cell proliferation in vitro. *Oncol Res* 2012; 20: 197-203 [PMID: 23581226]
30 Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Sakurai D, Fujimura L, Kawakami K, Chiyomaru T, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. Tumor suppressive microRNA-375 regulates oncogene AEG-1/MTDH in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *J Hum Genet* 2011; 56: 595-601 [PMID: 21753766 DOI: 10.1038/jhg.2011.66]
31 Hu G, Wei Y, Kang Y. The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5615-5620 [PMID: 19723648 DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-09-0049]
32 Chang Y, Yan W, He X, Zhang L, Li C, Huang H, Nace G, Geller DA, Lin J, Tsung A. miR-375 inhibits autophagy and reduces viability of hepatocellular carcinoma cells under hypoxic conditions. *Gastroenterology* 2012; 143: 177-187.e8 [PMID: 22504094 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.04.009]
33 Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 2005; 169: 425-434 [PMID: 15866887 DOI: 10.1083/jcb.200412022]
34 Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 726-734 [PMID: 16148885 DOI: 10.1038/nrc1692]
35 Liu AM, Poon RT, Luk JM. MicroRNA-375 targets Hippo-signaling effector YAP in liver cancer and inhibits tumor properties. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394: 623-627 [PMID: 20226166 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.036]
36 Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 1997; 7: 261-269 [PMID: 9094314]
37 Raimondi C, Falasca M. Targeting PDK1 in cancer. *Curr Med Chem* 2011; 18: 2763-2769 [PMID: 21568903]
38 Nishimura Y, Komatsu S, Ichikawa D, Nagata H, Hirajima S, Takeshita H, Kawaguchi T, Arita T, Konishi H, Kashimoto K, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Otsuji E. Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 108: 1324-1331 [PMID: 23422756 DOI: 10.1038/bjc.2013.65]
39 Mathé EA, Nguyen GH, Bowman ED, Zhao Y, Budhu A, Schetter AJ, Braun R, Reimers M, Kumamoto K, Hughes D, Altorki NK, Casson AG, Liu CG, Wang XW, Yanaihara N, Hagiwara N, Dannenberg AJ, Miyashita M, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6192-6200 [PMID: 19789312 DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-09-1467]
40 Bhatti I, Lee A, James V, Hall RI, Lund JN, Tufarelli C, Lobo DN, Larvin M. Knockdown of microRNA-21 inhibits proliferation and increases cell death by targeting programmed cell death 4 (PDCD4) in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2011; 15: 199-208 [PMID: 21088996 DOI: 10.1007/s11605-010-1381-x]
41 Faltejskova P, Svoboda M, Srutova K, Mlcochova J, Besse A, Nekvindova J, Radova L, Fabian P, Slaba K, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 2655-2666 [PMID: 22469014 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01579.x]
42 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866 [PMID: 17060945 DOI: 10.1038/nrc1997]
43 Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1273-1281 [PMID: 20026422 DOI: 10.1016/j.biocel.2009.12.014]
44 Wang S, Wang L, Bayaxi N, Li J, Verhaegh W, Janevski A, Varadan V, Ren Y, Merkle D, Meng X, Gao X, Wang H, Ren J, Kuo WP, Dimitrova N, Wu Y, Zhu H. A microRNA panel to discriminate carcinomas from high-grade intraepithelial neoplasms in colonoscopy biopsy tissue. *Gut* 2013; 62: 280-289 [PMID: 22535378 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301554]
45 Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 7223-7233 [PMID: 21609964 DOI: 10.1093/nar/gkr254]
46 Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 5003-5008 [PMID: 21383194 DOI: 10.1073/pnas.1019055108]
47 Li LM, Hu ZB, Zhou ZX, Chen X, Liu FY, Zhang JF, Shen HB, Zhang CY, Zen K. Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma. *Cancer Res* 2010; 70: 9798-9807 [PMID: 21098710 DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-1001]
48 Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol* 2012; 13: e249-e258 [PMID: 22652233 DOI: 10.1016/s1470-2045(12)70073-6]
49 Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res* 2010; 70: 7027-7030 [PMID: 20807816 DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-2010]
50 Hao L, Patel PC, Alhasan AH, Giljohann DA, Mirkin CA. Nucleic acid-gold nanoparticle conjugates as mimics of microRNA. *Small* 2011; 7: 3158-3162 [PMID: 21922667 DOI: 10.1002/smll.201101018]
51 Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Konishi H, Nagata H, Hirajima S, Kawaguchi T, Arita T, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Prognostic impact of circulating miR-21 and miR-375 in plasma of patients with esophageal squamous cell carcinoma.

■同行评价

本文综述miR-375的抑癌机制以及其作为肿瘤治疗靶点的潜力和作为诊断和预后标志物的前景，具有一定的可读性，可为以后的研究提供思路.

Expert Opin Biol Ther 2012; 12 Suppl 1: S53-S59 [PMID: 22519435 DOI: 10.1517/14712598.2012.681373]

52 Li J, Li X, Li Y, Yang H, Wang L, Qin Y, Liu H, Fu L, Guan XY. Cell-specific detection of miR-375 downregulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization. *PLoS One* 2013; 8: e53582 [PMID: 23301089 DOI: 10.1371/journal.pone.0053582]

53 Zhang X, Yan Z, Zhang J, Gong L, Li W, Cui J, Liu Y, Gao Z, Li J, Shen L, Lu Y. Combination of hsa-miR-375 and hsa-miR-142-5p as a predictor for recurrence risk in gastric cancer patients following surgical resection. *Ann Oncol* 2011; 22: 2257-2266 [PMID: 21343377 DOI: 10.1093/annonc/mdq758]

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.

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 661-667
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

肠癌大鼠与正常大鼠粪便菌群的结构性差异

高仁元, 朱庆超, 伍 雯, 秦环龙

高仁元, 朱庆超, 伍雯, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233
秦环龙, 同济大学附属第十人民医院普外科 上海市 200072
高仁元, 上海交通大学医学院在读硕士研究生, 主要从事胃肠病学的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81230057
上海市科学技术委员会基金资助项目, No. 11140902400
作者贡献分布: 此课题由高仁元与朱庆超设计; 实验操作由朱庆超与伍雯完成; 数据分析及论文撰写由高仁元完成; 秦环龙指导.
通讯作者: 秦环龙, 教授, 博士生导师, 200072, 上海市闸北区延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院普外科.
huanlqin@126.com
电话: 021-64361349
收稿日期: 2013-10-22 修回日期: 2013-12-16
接受日期: 2013-12-19 在线出版日期: 2014-02-18

Compositional differences in fecal microbiota between rats with colorectal cancer and normal rats

Ren-Yuan Gao, Qing-Chao Zhu, Wen Wu, Huan-Long Qin

Ren-Yuan Gao, Qing-Chao Zhu, Wen Wu, Department of General Surgery, Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China
Huan-Long Qin, Department of General Surgery, Tenth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200072, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81230057; and Project from Science and Technology Committee of Shanghai, No. 11140902400
Correspondence to: Huan-Long Qin, Professor, Department of General Surgery, Tenth People's Hospital Affiliated to Tongji University, 301 Yanchang Road, Zhabei District, Shanghai 200072, China. huanlqin@126.com
Received: 2013-10-22 Revised: 2013-12-16
Accepted: 2013-12-19 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To investigate the compositional differences in fecal flora between rats with colorectal cancer and normal rats.

METHODS: A rat model of colorectal cancer was developed by intraperitoneal injection of 1, 2-dimethyl hydrazine (DMH). Fecal samples were collected from rats with colorectal cancer and normal controls, and the microbiota was isolated by PCR-DGGE technique to perform flora similarity analysis (cluster analysis) and polymorphism analysis (richness, uniformity, Shannon-Wiener index, Simpson index) and to compare with the GenBank to identify the genus so as to study the variation.

RESULTS: Compared with normal rats, the abundance of *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Lactobacillus intestinalis*, *Paraprevotella*, *Lactobacillus murinus*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Lactobacillus crispatus* and *Lachnospiracea incertae sedis* was significantly reduced and that of *Coprobacillus* was significantly increased in rats with colorectal cancer. Although the flora diversity between the two groups showed no statistical difference, there was a significant difference in flora composition.

CONCLUSION: The composition of fecal microflora changes in rats with colorectal cancer compared with normal rats, with the number of beneficial bacteria reduced and that of potential pathogens increased.

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

Key Words: Colorectal cancer; PCR; DGGE; Cluster analysis; Microbiota

Gao RY, Zhu QC, Wu W, Qin HL. Compositional differences in fecal microbiota between rats with colorectal cancer and normal rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 661-667 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/661.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.661

摘要

目的: 研究结肠癌大鼠与正常大鼠粪便菌群结构性变化.

方法: 通过1,2-二甲肼(dimethyl hydrazine, DMH)腹腔注射构建大肠癌的动物模型, 造模成功后收集实验组和对照组大鼠肠道粪便, 利用PCR-DGGE(polymerase chain reaction-denaturing gradient electrophoresis)技术分离菌群, 对两组菌群相似性(聚类分析)和多态性(丰富度、均一性、Shannon-Wiener指数、Simpson指数)进行分析, 并对目的菌群与

■背景资料
随着肠癌发生率的逐年增加, 人们对肠道内环境的研究愈加重视. 研究发现, 肠道微生态(microbiota)在肠癌的发生发展中具有重要作用.

■同行评议者
白雪, 副主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院普通外科; 侯凤刚, 副主任医师, 副教授, 上海中医药大学附属市中医医院肿瘤科

■研发前沿
基于PCR-DGGE技术对两种不同肠道微生态环境的大鼠菌群进行比较，可以筛选出在肠癌发生发展过程中特异性的肠道菌群，便于进一步研究其可能促进肠癌的机制.

GenBank进行比对，确定菌群种属，研究其变化规律.

结果：相较于对照组，实验组中毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、*Ruminococcaceae*科菌、肠乳杆菌(*Lactobacillus intestinalis*)、帕拉普氏菌属(*Paraprevotella*)、鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、普氏菌属(*Prevotella*)、卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)和*Lachnospiracea incertae sedis*等菌群丰度显著降低，而粪芽孢菌属(*Coprobacillus*)丰度则明显增加. 尽管两组菌群多样性均较丰富，但菌群结构相似性存在明显差异.

结论：肠癌大鼠与正常对照组相比出现粪便菌群结构的偏移，有益菌减少，潜在致病菌增加.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词：肠癌；PCR；DGGE；聚类分析；菌群

核心提示：与正常大鼠相比，肠癌大鼠粪便中菌群发生明显偏移，有益菌数量及种类明显下降，而致病菌却增加.

高仁元，朱庆超，伍雯，秦环龙. 肠癌大鼠与正常大鼠粪便菌群的结构性差异. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 661-667 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/661.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.661

0 引言

大肠癌的发生发展是伴随着一系列基因突变的多步骤病变过程，其发病率在全球范围内高居第3位，全球每年新发病例数超过120万例[1]. 随着经济的发展，在发展中国家，大肠癌发生率呈现快速升高的趋势. 如在中国上海地区，大肠癌发病率已猛增至56/10万人，达到欧美发达国家发病率水平[2]. 目前，遗传因素和环境因素被认为是大肠癌发生发展的重要原因，而环境因素中的肠道微生态异常改变及其与肠癌相关性的研究近几年称为研究的热点，菌群结构和数量的异常促进肠癌发生的报道也逐渐增多[3]. 在哺乳类动物肠道内也存在着种类繁多和数量庞大的微生物，他们在宿主肠道营养摄取、维生素合成、多酚类物质代谢、保护肠上皮细胞、脂肪贮存、刺激肠道组织血管生成以及肠道免疫功能形成等多方面具有不可或缺的作用[4,5]. 因此，这些微生物构成了维持整个肠道微生态稳定的重要基础. 而在这些微生物中，占据了绝大部分数量的是细菌，他们的基因组大小是宿主的150-160倍[6,7]. 因此，对其肠道菌群结构多样性及种群动态变化进行研究具有至关重要的意义. 传统的微生物检测方法主要依赖从宿主新鲜粪便中分离微生物进行培养，进而明确菌属性质. 但是由于技术条件、培养条件的严苛性，肠道中可以被培养的菌群较少(不超过20%-30%)，且并不能代表全部肠道菌群，更不能明确物种之间的系统发育学关系[7]. 随着微生态学检测技术的迅速发展，特别是应用了PCR-变性梯度凝胶电泳(polymerase chain reaction- denaturing gradient electrophoresis, DGGE)等较先进的技术后，菌群变化和相关疾病之间的关系研究取得了巨大的进步. DGGE技术主要原理是基于DNA碱基配对的基础，将具有相同长度但不同组成的双链PCR产物分离，使具有不同序列的DNA片段停留在凝胶的不同位置，形成相互分开的条带图谱，从而对菌群进行分离[8]. 该技术不依赖于培养技术且最低可检测到只占总群数量1%的菌群[9]. 因此，本研究我们利用DGGE技术来比较大鼠肠癌模型与正常对照组之间粪便中菌群的变化，并阐述肠道菌群在肠癌发生发展中的结构变化及潜在作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂Wistar大鼠共计12只，体质量150-180 g. 购自上海史莱克实验动物有限公司，生产许可证号为SCXK(沪)2007-0005，使用许可证号为SYXK(沪)2006-0010. Taq酶等试剂(生工生物工程股份有限公司)；PCR反应扩增仪(加拿大，BBI公司)；DYY-8型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司)；H6-1微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂)；凝胶成像系统(Gene Genius公司)；U-3010紫外-可见分光光度计(Hitachi公司)；DGGE仪(美国Bio-Rad公司)；DMH(Sigma-aldrich上海贸易有限公司).

1.2 方法

1.2.1 构建动物模型及收集标本：所有大鼠共计12只被随机分为两组，一组为正常饮食组，即对照组($n1 = 6$). 另一组为1,2-二甲肼(1,2-dimethylhydrazine, DMH)诱导肠癌组[10]，即实验组($n2 = 6$). 两组均给予啮齿类动物基础饲料. 所有大鼠自由饮食、水1 wk，以适应周围环境. 随后，对实验组大鼠腹腔注射DMH(剂量为40 mL/kg，1次/wk)，连续注射10 wk. 对照组大鼠腹腔注射生理盐水和乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic

表 1 PCR引物

引物	序列	扩增片段大小
F357-GC	5'-CCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCCCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	230 bp
R518	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	

acid, EDTA). 12 wk肿瘤形成后(肿瘤组织由病理切片证实), 取其肠道内粪便, 无菌操作收集于冻存管中, 置于-80 ℃冰箱中保存(实验组标记为T_1-T_6, 对照组标记为N_1-N_6). 该实验已获得上海市第六人民医院医学伦理委员会批准.

1.2.2 样品DNA的制备: 离心收集菌体, 溶于5 mL提取缓冲液中, 37 ℃振荡45 min. 加入0.75 mL 20%SDS, 65 ℃水浴1 h. 12000 r/min, 离心10 min, 收集上清. 上清用等体积的酚: 氯仿: 异戊醇(25∶24∶1)抽提2次, 加入终浓度0.3 mol/L醋酸钠(pH 5.2)及2倍体积的无水乙醇, 室温沉淀1 h. 4 ℃, 12000 r/min, 离心20 min, 收集沉淀, 并用700 mL/L乙醇漂洗2次, 晾干后溶于50 μL TE中.

1.2.3 16S rRNA gene V3区扩增: 所用引物为细菌16S rRNA V3高变区F357和R518(表1), 反应体系总体积为50 μL, ddH_2O 41.25 μL, 10×Buffer(含2.0 mmol/L $MgCl_2$)5 μL, dNTP(10 mmol/L)1 μL, F357-GC(10 μmol/L)1 μL, R518(10 μmol/L)1 μL, Taq酶(5 U/μL)0.25 μL, 模板DNA 0.5 μL, 设置阴性对照. 反应程序按照以下进行: 94 ℃预变性4 min; 94 ℃ 0.5 min; 56 ℃ 1 min; 72 ℃ 0.5 min; 30个循环, 72 ℃延伸7 min. 取PCR产物各3 μL, 1.5%琼脂糖凝胶加5%Goldview染液, 120 V稳压电泳30 min, 用UVI凝胶成像系统拍照.

1.2.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE): 取样品各400 ng的V3区PCR产物, 采用D-Code突变检测系统对样品进行DGGE分析. 所用的聚丙烯酰胺凝胶浓度为8%(丙稀酰胺: 双丙稀酰胺 = 37.5∶1), 变性剂浓度从30%-60%(100%的变性剂为7 mol/L尿素+40%甲酰胺). 在180 V电压下, 60 ℃恒温, 1×TAE中电泳4.0 h. 电泳完毕后, 用超纯水冲洗胶, 然后将胶放进染液中, 置于摇床上染色后, 在UVI成像系统拍照.

1.2.5 PCR扩增及产物回收及克隆: 选取较有代表性的条带, 用洁净的手术刀片将目标DGGE条带完整的切下并装入1.5 mL离心管中, 按UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒回收. 对目的片段进行克隆测序, 与已知GenBank比对获得菌群的种属名称.

统计学处理 对DGGE凝胶图进行相似性和多样性分析. 相似性分析采用聚类分析, 使用非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)计算系统发育图[11]; 多样性分析采用丰富度和生物多样性分析. 丰富度(S)用DGGE图谱每条泳道的条带数表示; Shannon-Wiener指数(H')的计算方法为$H' = -\sum_{i=1}^{s}(Pi)(\ln Pi)$, Pi为第i条带的吸光度与该泳道所有条带吸光度总和的比值, S为总的条带数目; 均一性(E)表示菌群种属分布的一致性, 计算方法为$E = H'/\ln S$[12]. Simpson多样性指数(D)计算方法为$D = 1-\sum_{i=1}^{s}(Pi)^2$, Pi及S计算方法同上, 该指数意义与Shannon指数相似[13]. 分析所得数据使用SPSS19.0进行Student-*t*检验, 计量资料结果以mean±SD表示. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠体质量 对大鼠体质量按周记录, 结果示两组之间体质量变化均无明显统计学差异(图1). 说明两组大鼠之间饮食水、环境等基本情况较为一致.

2.2 菌群多样性 PCR扩增结果示各组样本目标条带及大小合适(图2). 在DGGE指纹图谱中每一条泳道代表一个样本中的菌群(图3), 不同位置的条带代表不同的优势菌群. PCR-DGGE电泳结果显示对照组大鼠粪便中菌群与罹患肠癌的大鼠粪便中的菌群均有较好的多样性, 且两者的均一性均较好. Shannon-Wiener指数(H')和Simpson指数(D)分析实验组菌群多样性高于对照组, 但二者并无统计学上的差异($P>0.05$)(表2).

2.3 菌群结构差异性 根据DGGE指纹图谱条带的亮度不同, 说明代表该样本中菌群的相对含量也不相同. 由此, 我们筛选了10组处于同一位置但亮度明显有差异(甚至消失)的条带进行菌群鉴定, 这些菌群主要分布在厚壁菌门(*Firmicutes*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)(表3). 其中, 实验组中毛螺菌科(*Lachnospiraceae*)、*Ruminococcaceae*科菌、肠乳杆菌(*Lactobacillus intestinalis*)、帕拉普氏菌属(*Paraprevotella*)、鼠乳杆菌(*Lactobacillus murinus*)、乳杆菌属(*Lac-*

■相关报道
目前已有研究发现肠道菌群与肥胖、糖尿病以及心血管疾病等多种疾病密切相关甚至是起到关键作用, 其可能机制与炎症及肠屏障功能损伤相关. 通过调节肠道菌群, 可以帮助恢复肠道内环境的稳态, 减少疾病的发生.

■创新盘点

本文采用新型检测技术, 对肠道菌群进行分离、鉴定和对比, 初步揭示了大鼠肠癌模型中粪便菌群较正常菌群产生的偏移, 帮助理解肠癌发生发展过程中内环境的改变.

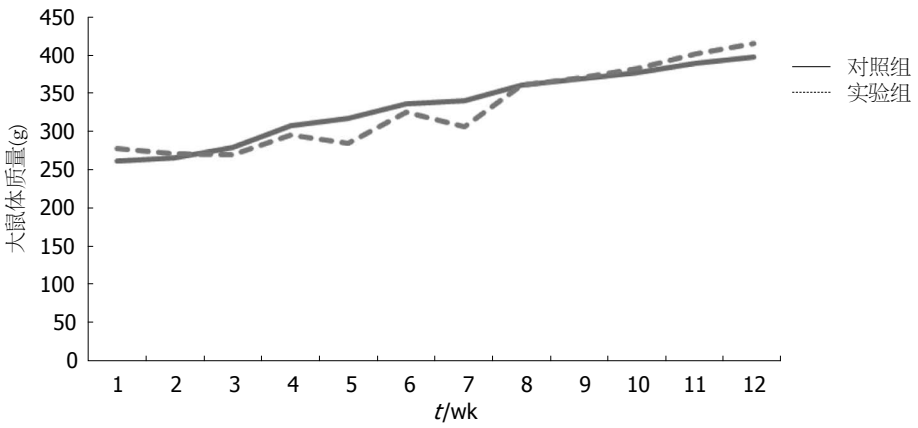

图 1 两组大鼠体质量变化图.

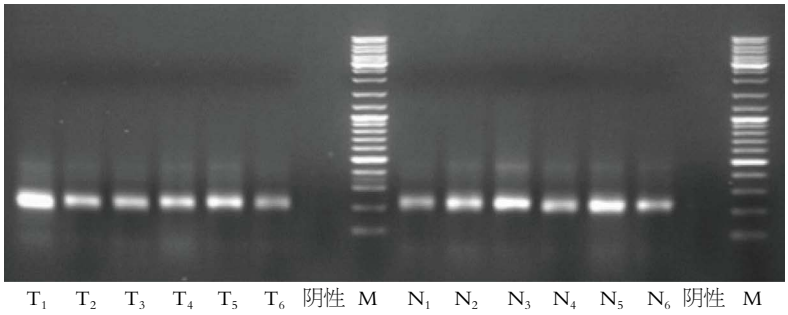

图 2 PCR扩增结果. T_1–T_6: 实验组样本, N_1–N_6: 正常组样本. 每个编号对应不同的样本, 每个不同亮度的条带代表菌群的含量不同. M: Marker条带.

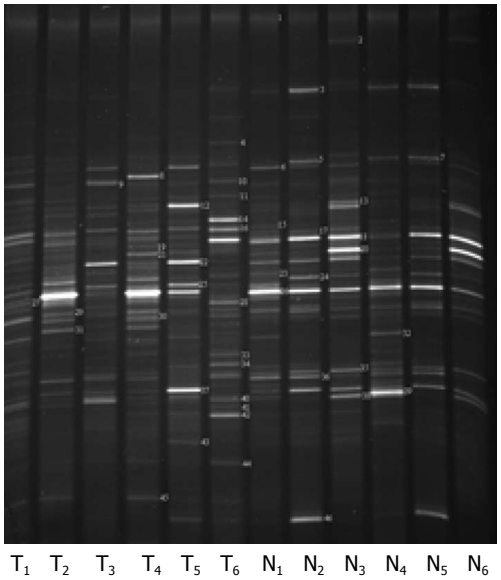

图 3 DGGE图谱. T_1–T_6: 实验组样本, N_1–N_6: 正常组样本. 每个编号对应不同的样本, 每个不同亮度的条带代表菌群的含量不同. 图谱中标记的数字与表3中相对应.

tobacillus)、普氏菌属(*Prevotella*)、卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)等菌群丰度显著降低, 而粪芽孢菌属(*Coprobacillus*)丰度则明显增加. 此外, 对两组大鼠粪便菌群DGGE的图谱进行聚类分析, 结果表明实验组和对照组之间菌群相似度较低(图4).

3 讨论

人体肠道含有复杂的微生态系统, 他是由细菌、古细菌、真菌以及病毒等一系列微生物组成[14,15]. 肠道内微生物可以看作是人体这个“大器官”内的一个“小器官”, 他与人体共同进化, 逐渐形成共栖关系并维持肠道内环境的稳态[16]. 最近的研究揭示, 肠道菌群的确在肠癌的发生发展中具有重要的影响. Boleij等[17]研究显示感染牛链球菌的患者肠道中伴生腺瘤或癌的病例中位数高达60%, 而感染该链球菌Ⅰ型的患者罹患大肠癌的风险非常高(合并OR值为7.26). 检测结果也证实牛链球菌抗原RpL7/L12浓度在早期(Ⅰ/Ⅱ)肠癌患者中明显增高[18]. Kostic等[19]发现梭形杆菌属细菌(*F. nucleatum*、*F. mortiferum*和*F. necrophorum*)在肿瘤组织内数量明显多于正常组织, 且组织学和肿瘤转移灶梭形杆菌属DNA分析也证实了该结果. Tjalsma等[20]提出了一种大肠癌发生过程中细菌动态变化的模式, 其认为肠道内有一部分菌群属于“启动(driver)”菌群, 如肠杆菌科、梭状芽孢杆菌等, 他们能够损害肠上皮细胞DNA, 诱导大肠癌的发生. 还有一部分菌群属于

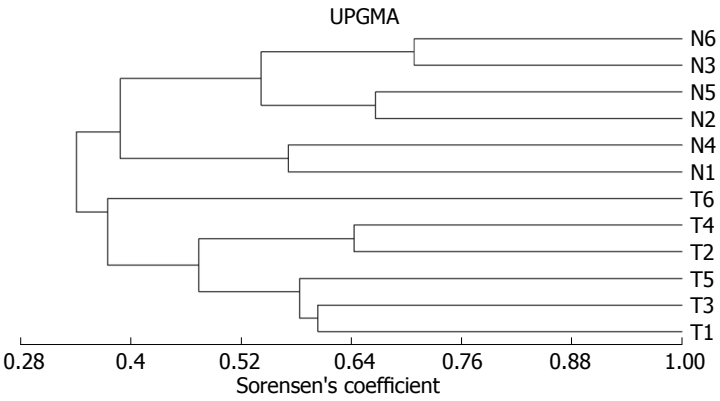

图 4 两组大鼠粪便菌群DGGE聚类分析

图. T_1–T_6: 实验组样本, N_1–N_6: 正常组样本.

■应用要点

随着对肠道微生态及其致病机制的深入研究, 相关研究成果可以为预防和治疗肠癌提供新理论依据.

表 2 两组大鼠粪便菌群丰度及多样性指数结果

多样性指数	实验组	对照组	*P*值
丰富度(S)	25.833 ± 5.845	21.500 ± 2.665	0.142
均一性(E)	1.000	1.000	–
Shannon–Wiener指数(H')	3.231 ± 0.222	3.062 ± 0.122	0.133
Simpson指数(D)	0.960 ± 0.089	0.953 ± 0.060	0.149

表 3 代表性条带菌群鉴定结果

条带编号	菌群(门)	菌群(属)	种属相似性(%)	V3区大小(bp)
3	*Spirochaetes*	*Treponema amylovorum*	82	194
7	*Firmicutes*	*unclassified_Ruminococcaceae*	90	172
12	*Firmicutes*	*Lactobacillus crispatus*	93	193
16	*Firmicutes*	*Coprobacillus*[1]	95	193
18	*Firmicutes*	*Lachnospiracea incertae sedis*	97	168
20	*Bacteroidetes*	*Prevotella*	91	189
22	*Firmicutes*	*Lactobacillus intestinalis*	100	194
26	*Bacteroidetes*	*Paraprevotella*	100	188
27	*Firmicutes*	*Lactobacillus murinus*	100	194
35	*Firmicutes*	*Lactobacillus*	96	194

[1]代表菌群在实验组中比例升高; 未标记代表实验组菌群比例降低.

“过路(passenger)”菌群, 他们能够适应肠道微环境的改变而大量增殖, 成为肠道内优势菌群, 包括梭形杆菌属、链球菌科等. 这些有害菌群通过刺激宿主免疫功能, 引起肠道炎症反应, 并通过诱导树突细胞和辅助性TH17细胞释放白介素(interleukin, IL)如IL-23、IL-17, 引起肠上皮细胞分泌β-防御素(β-defensins)、钙卫蛋白(calprotectin)和脂质运载蛋白-2(lipocalin 2)等抗菌物质, 或提供黏附界面, 帮助某些细菌定植于肿瘤微环境, 促进肿瘤生长.

本研究通过对正常组和实验组大鼠粪便菌群检测, 发现PCR-DGGE技术能够较清晰地分离出肠道内的主要菌群. 本试验两份样本均显示了良好的菌群多样性. 但聚类分析发现, 实验组大鼠粪便的菌群组成结构与正常组有明显的差异性. 分析可见, 两组之间出现最显著差异的为四种菌, 其中毛螺旋菌科、帕拉普氏菌属、乳杆菌属在对照组中均有明显表达, 而在实验组中出现不表达. 毛螺旋菌科主要包括丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)、毛螺菌属(*Lachnospira*)和罗氏菌属(*Roseburia*)[21]. 在炎症性肠病(innammatory bowel diseases, IBD)患者的肠道组织样本中, 毛螺旋菌科含量可降至正常含量的1/300[22]. 研究发现, 该科细菌具有水解多种植物多糖、脱乙酰基作用以降解毒素、拮抗艰难梭菌感染等作用[21,23]. 不过, 也有研究认为, 某些产丁酸

■同行评价
本文内容通过对正常大鼠肠道和结肠癌大鼠肠道内菌群的比较分析来研究结直肠癌肠内微环境的改变，有较好的研究价值及临床指导意义.

盐的细菌(如毛螺菌科)丰度下降，导致丁酸盐诱导凋亡和分化、抑制增生及血管形成等功能下降，也可能间接促进了肿瘤的进展[24]. 帕拉普氏菌属为革兰染色阴性厌氧菌，一般在动物的瘤胃内易分离出该菌[25,26]. 近期研究显示该菌也常存在于人群肠道中. 研究人员对人肠癌组织及癌旁组织对比显示，帕拉普氏菌属在癌旁组织(距离癌组织10-20 cm)中丰度更高[27]. 这种丰度差异提示其在预防肿瘤发生发展方面具有一定作用. 乳杆菌属属于厚壁菌门，是存在于人体内的益生菌. 研究显示乳杆菌属能够上调结肠癌细胞中肿瘤抑制基因，抑制核因子κB抑制蛋白(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, IκB)的降解，降低β-葡萄糖醛酸酶和硝基还原酶的活力，并且还能抵抗诱变剂突变的作用，从而抑制炎症、阻碍病原微生物定植，拮抗肿瘤的发生[28-31]. 而在本实验中，由于这3种有益菌群数量大幅降低，导致菌群明显失调，可见其丰度降低与肿瘤的发生发展密切相关. 另外，实验组还发现粪芽孢菌属在6组样本中均见明显条带，而在对照组中条带消失. 该菌属于厚壁菌门，既往研究发现该细菌常在肠道炎症组织和高脂饮食大鼠体内出现，而这两者均为肠癌的高危因素，因此根据本实验结果，提示该菌其与肠癌的发生的相关性较高[3,32]. 因此，本实验揭示了在正常组织中丰富较高的菌群(特别是乳杆菌属一般可达总数的10%-15%)，在肠癌组织中出现了不同程度的比例降低，这与文献报道结果一致[33-35]. 实验组大鼠肠道内菌群谱明显紊乱，除了受到大鼠个体的遗传性状的影响外，还可能与肿瘤生长的微环境及肿瘤的进展阶段有关.

总之，尽管本次实验样本数量较少，但已基本阐明肠癌模型大鼠肠道内菌群与正常相比，已发生了明显的偏移. 实验结果表明大量有益菌的下降，有害菌的增殖，通过多种途径直接或间接地促进了肿瘤的发生发展. 但是，对肠道内肿瘤组织的侵犯程度与菌群的相关性、肠癌发生不同时期菌群的结构和数量等的动态变化以及微生态致肠癌的最终生物学机制仍需要进一步探索.

4 参考文献

1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917 [PMID: 21351269 DOI: 10.1002/ijc.25516]

2 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29 [PMID: 22237781 DOI: 10.3322/caac.20138]

3 Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, Holt RA. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 299-306 [PMID: 22009989 DOI: 10.1101/gr.126516.111]

4 Hamer HM, De Preter V, Windey K, Verbeke K. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G1-G9 [PMID: 22016433 DOI: 10.1152/ajpgi.00048.2011]

5 Zwielehner J, Lassl C, Hippe B, Pointner A, Switzeny OJ, Remely M, Kitzweger E, Ruckser R, Haslberger AG. Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR, 454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting. *PLoS One* 2011; 6: e28654 [PMID: 22194876 DOI: 10.1371/journal.pone.0028654]

6 Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 2008; 57: 1605-1615 [PMID: 18941009 DOI: 10.1136/gut.2007.133603]

7 Maccaferri S, Biagi E, Brigidi P. Metagenomics: key to human gut microbiota. *Dig Dis* 2011; 29: 525-530 [PMID: 22179207 DOI: 10.1159/000332966]

8 GreenSJ, Leigh MB, Neufeld JD. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) for Microbial Community Analysis. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. 1st ed. Germany: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 4137-4158

9 Dar SA, Kuenen JG, Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 2325-2330 [PMID: 15870318 DOI: 10.1128/AEM.71.5.2325-2330.2005]

10 彭佳远，张清福，秦环龙，结肠癌发生和发展不同阶段的差异蛋白质组学实验研究. 肿瘤 2008; 28: 1023-1028

11 Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* 2002; 4: 634-643 [PMID: 12460271 DOI: 10.1046/j.1462-2920.2002.00358.x]

12 Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 695-700 [PMID: 7683183]

13 Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature* 1949; 163: 688 [DOI: 10.1038/163688a0]

14 Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-1920 [PMID: 15790844 DOI: 10.1126/science.1104816]

15 Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010; 466: 334-338 [PMID: 20631792 DOI: 10.1038/nature09199]

16 Lepage P, Leclerc MC, Joossens M, Mondot S,

Blottière HM, Raes J, Ehrlich D, Doré J. A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 2013; 62: 146-158 [PMID: 22525886 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301805]
17 Boleij A, van Gelder MM, Swinkels DW, Tjalsma H. Clinical Importance of Streptococcus gallolyticus infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 870-878 [PMID: 21960713 DOI: 10.1093/cid/cir609]
18 Boleij A, Roelofs R, Schaeps RM, Schülin T, Glaser P, Swinkels DW, Kato I, Tjalsma H. Increased exposure to bacterial antigen RpL7/L12 in early stage colorectal cancer patients. *Cancer* 2010; 116: 4014-4022 [PMID: 20564125 DOI: 10.1002/cncr.25212]
19 Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Tabernero J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS, Meyerson M. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 292-298 [PMID: 22009990 DOI: 10.1101/gr.126573.111]
20 Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 575-582 [PMID: 22728587 DOI: 10.1038/nrmicro2819]
21 Cotta M, Forster R. The Family Lachnospiraceae, Including the Genera Butyrivibrio, Lachnospira and Roseburia. The prokaryotes. 3th ed. USA: Springer US, 2006: 1002-1021
22 Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13780-13785 [PMID: 17699621]
23 Reeves AE, Koenigsknecht MJ, Bergin IL, Young VB. Suppression of Clostridium difficile in the gastrointestinal tracts of germfree mice inoculated with a murine isolate from the family Lachnospiraceae. *Infect Immun* 2012; 80: 3786-3794 [PMID: 22890996 DOI: 10.1128/IAI.00647-12]
24 Fung KY, Cosgrove L, Lockett T, Head R, Topping DL. A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate. *Br J Nutr* 2012; 108: 820-831 [PMID: 22676885 DOI: 10.1017/S0007114512001948]
25 Sakamoto M, Ohkuma M. Identification and classification of the genus Bacteroides by multilocus sequence analysis. *Microbiology* 2011; 157: 3388-3397 [PMID: 21948050 DOI: 10.1099/mic.0.052332-0]
26 Kim M, Morrison M, Yu Z. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol Ecol* 2011; 76: 49-63 [PMID: 21223325 DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x]
27 Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2012; 7: e39743 [PMID: 22761885 DOI: 10.1371/journal.pone.0039743]
28 Yang T, Owen JL, Lightfoot YL, Kladde MP, Mohamadzadeh M. Microbiota impact on the epigenetic regulation of colorectal cancer. *Trends Mol Med* 2013; 19: 714-725 [PMID: 24051204 DOI: 10.1016/j.molmed.2013.08.005]
29 Candela M, Guidotti M, Fabbri A, Brigidi P, Franceschi C, Fiorentini C. Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Crit Rev Microbiol* 2011; 37: 1-14 [PMID: 20874522 DOI: 10.3109/1040841X.2010.501760]
30 Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol* 2013; 35: 229-244 [PMID: 23161445 DOI: 10.1007/s00281-012-0352-6]
31 Chong ES. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World J Microbiol Biotechnol* 2013 Sep 26. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24068536 DOI: 10.1007/s11274-013-1499-6]
32 Greiner T, Bäckhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 117-123 [PMID: 21353592 DOI: 10.1016/j.tem.2011.01.002]
33 Daniel H, Gholami AM, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, Mondot S, Lepage P, Rothballer M, Walker A, Böhm C, Wenning M, Wagner M, Blaut M, Schmitt-Kopplin P, Kuster B, Haller D, Clavel T. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J* 2013 Sep 12. *[Epub ahead of print]* [PMID: 24030595 DOI: 10.1038/ismej.2013.155]
34 Tomas J, Langella P, Cherbuy C. The intestinal microbiota in the rat model: major breakthroughs from new technologies. *Anim Health Res Rev* 2012; 13: 54-63 [PMID: 22853927 DOI: 10.1017/S1466252312000072]
35 Power SE, O'Toole PW, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF. Intestinal microbiota, diet and health. *Br J Nutr* 2013 Aug 12. *[Epub ahead of print]* [PMID: 23931069]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 668-673
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

P38MAPK抑制剂对溃疡性结肠炎大鼠外周血淋巴细胞凋亡及相关调控蛋白的影响

李军华, 周 薇

■背景资料
细胞凋亡在溃疡性结肠炎发生发展过程中起重要作用, p38丝裂原活化蛋白激酶超家族(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是介导细胞生长, 发育, 分化和凋亡的重要信号通路之一, 该通路的激活与多种疾病发病密切相关, 其对细胞凋亡的调控可能参与了溃疡性结肠炎的发病.

李军华, 周薇, 荆门市第一人民医院消化内科 湖北省荆门市 448000
李军华, 副主任医师, 主要从事炎症性肠病的基础与临床研究.
湖北省荆门市科学技术计划基金资助项目, No. 08S11
作者贡献分布: 李军华与周薇对此文所作贡献均等; 此课题由李军华与周薇设计; 研究过程由李军华与周薇完成; 数据分析由周薇完成; 本论文写作由李军华与周薇完成.
通讯作者: 周薇, 副主任医师, 448000, 湖北省荆门市象山大道67号, 湖北省荆门市第一人民医院消化内科. zwcherry@tom.com
电话: 0724-2305745
收稿日期: 2013-10-21 修回日期: 2013-12-16
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 promotes peripheral blood lymphocyte apoptosis in rats with colitis

Jun-Hua Li, Wei Zhou

Jun-Hua Li, Wei Zhou, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Jingmen, Jingmen 448000, Hubei Province, China
Supported by: the Science and Technology Program of Jingmen, No. 08S11
Correspondence to: Wei Zhou, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Jingmen No. 1 People's Hospital, 67 Xiangshan Road, Jingmen 448000, Hubei Province, China. zwcherry@tom.com
Received: 2013-10-21 Revised: 2013-12-16
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To investigate the influence of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 on peripheral blood lymphocyte (PBL) apoptosis in rats with colitis and the possible mechanisms involved.

METHODS: Forty-five healthy female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: a normal group, a model group and a SB203580 group. Colitis was induced with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats of the latter two groups. The normal group and the model group were treated intrarectally with saline, while the SB203580 group was given SB203580 [1 mg/(kg•d)]. The rats were sacrificed after 2 wk to assess disease activity index (DAI) and macroscopic and histological changes of the colon. PBL apoptosis and Bcl-2 expression were examined by flow cytometry. p-ATF2 protein expression in colon tissue was determined by immunohistochemistry.

RESULTS: In the model group, the percentages of cells expressing p-ATF2 and Bcl-2 were higher than those in the normal group and SB203580 group (43.40% ± 2.67% *vs* 7.45% ± 1.26%, 20.70% ± 2.79%; 38.60% ± 3.53% *vs* 13.70% ± 2.45%, 20.30% ± 2.87%, $P < 0.01$ for all), but the percentage of apoptotic PBLs in the model group was lower than those in the normal group and SB203580 group (27.70% ± 3.02% *vs* 58.70% ± 3.09%, 46.60% ± 4.14%, $P < 0.01$ for both). DAI and macroscopic and histological scores in the model group were significantly higher than those in the normal group and SB203580 group (2.42 ± 0.30 *vs* 0.28 ± 0.29, 1.24 ± 0.17; 5.42 ± 0.30 *vs* 0.30 ± 0.48, 3.30 ± 0.22; 3.29 ± 0.26 *vs* 0.05 ± 0.20, 1.10 ± 0.74, $P < 0.01$ for all).

CONCLUSION: P38MAPK inhibitor SB203580 reduces colonic inflammatory injury in rats with colitis by down-regulating expression of p-ATF2 and Bcl-2 and inducing PBL apoptosis. SB203580 can be considered as a novel therapeutic alternative for the treatment of UC.

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

Key Words: Ulcer colitis; P38MAPK; Bcl-2; Peripheral blood lymphocyte; Apoptosis

Li JH, Zhou W. P38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB203580 promotes peripheral blood lymphocyte apoptosis in rats with colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 668-673 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/668.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.668

摘要

目的: 观察p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-

■同行评议者
刘杰民, 副主任医师, 贵州省人民医院消化内镜科

activated protein kinase, MAPK)特异性抑制剂SB203580对大鼠实验性结肠炎(ulcerative colitis, UC)外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)凋亡及相关调控蛋白的影响, 探讨P38MAPK通路在UC中的可能作用及机制.

方法: 45只健康SD大鼠随机均分为正常对照组、结肠炎模型组、SB203580组. 模型组及SB203580组以三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)制备大鼠溃疡性结肠炎模型, 正常对照组给予等量0.9%生理盐水灌肠, SB203580组于造模完成后给予1 mg/(kg·d) SB203580腹腔注射. 流式细胞仪技术检测PBL凋亡率及Bcl-2表达率, 免疫组织化学方法检测活化转录因子-2(phosphor-activating transcription factor 2, p-ATF2)表达; 同时观察大鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)、肠道大体形态及组织学评分情况; 分析p-ATF2水平与PBL凋亡率及Bcl-2达率的相关关系.

结果: 与正常组相比, 模型组大鼠肠组织磷酸化p-ATF2及PBL中Bcl-2阳性表达显著增高(43.40%±2.67% *vs* 7.45%±1.26%, 38.60%±3.53% *vs* 13.70%±2.45%, $P<0.01$), PBL凋亡率明显降低(27.70%±3.02% *vs* 58.70%±3.09%, $P<0.01$); SB203580组p-ATF2、Bcl-2阳性表达率较模型组明显下降(20.70%±2.79%, 20.30%±2.87%, $P<0.01$), PBL凋亡率较模型组明显上升(46.60%±4.14%, $P<0.01$). 大鼠DAI及肠道大体形态、组织学评分模型组明显高于正常组(2.42±0.30 *vs* 0.28±0.29, 5.42±0.30 *vs* 0.30±0.48, 3.29±0.26 *vs* 0.05±0.20, $P<0.01$), SB203580组较模型组明显下降(1.24±0.17, 3.30±0.22, 1.10±0.74, $P<0.01$).

结论: P38MAPK抑制剂SB203580通过下调p-ATF2活性及Bcl-2表达, 促进PBL的凋亡减轻UC大鼠肠道炎症损伤, 对UC具有保护作用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 溃疡性结肠炎; P38丝裂原活化蛋白激酶; Bcl-2; 外周血淋巴细胞; 凋亡

核心提示: 本文通过观察p38丝裂原活化蛋白激酶超家族(mitogen-activated protein kinase)抑制剂对结肠炎大鼠外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)凋亡及相关调控蛋白的影响, 结果发现其可下调活化转录因子-2 (phosphor-activating transcription factor 2)活性及Bcl-2表达, 促进PBL凋亡, 减轻大鼠肠道炎症损伤, 对溃疡性结肠炎具有保护作用.

李军华, 周薇. P38MAPK抑制剂对溃疡性结肠炎大鼠外周血淋巴细胞凋亡及相关调控蛋白的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 668-673 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/668.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.668

■研发前沿
细胞信号通路是溃疡性结肠炎研究领域中的热点, 阻断导致肠道炎症损伤和免疫异常的信号通路的传导过程是溃疡性结肠炎治疗的又一新策略.

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病的一种, 以肠道持续的慢性炎症为主要病理特征, 目前其病因和发病机制尚不十分清楚. 一些研究表明, 细胞凋亡与UC发病关系密切, 免疫细胞凋亡延迟是UC炎症持续存在的主要原因之一[1-3]. p38蛋白激酶是丝裂原活化蛋白激酶超家族(mitogen-activated protein kinase, MAPK)中的重要成员, 其信号通路在炎症、细胞增殖、分化、凋亡等过程中发挥重要作用[4-7]. 本研究通过观察P38MAPK特异性抑制剂对溃疡性结肠炎大鼠肠道损伤、外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte, PBL)及相关基因的影响, 探讨P38MAPK信号通路在溃疡性结肠炎中的可能作用和机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级健康成年♂大鼠45只, 体质量180±20 g. 由武汉大学医学院实验动物中心提供. 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)(Sigma公司); 兔抗大鼠磷酸化的p-ATF2、Bcl-2单抗(Santa Cruz公司); SB203580(Calbiochem公司); RPMI 1640培养基为Gibco公司产品, SP、DAB试剂盒为晶美公司产品; Ficoll淋巴细胞分离液为天津TBD产品; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品; 其他试剂为进口或国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 动物造模与处理: 实验大鼠适应性喂养1 wk, 随机分为正常对照组、模型组及SB203580干预组共3组, 每组15只. 模型组及SB203580组参照文献[8-10]建立大鼠溃疡性结肠炎模型. 大鼠术前24 h禁食不禁水, 实验时以乙醚吸入麻醉大鼠, 采用橡胶软管由大鼠肛门轻缓插入结肠约8 cm, 每只大鼠以100 mg/kg注入5%(w/v)的2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇(体积比1∶1)混合溶液. 灌肠完成后倒提鼠尾轻摇大鼠半分钟, 防止灌注液倒流, 动物平躺放置自然清醒. 正常对照组给予等量0.9%生理盐水灌

■相关报道
Feng等研究发现在炎症性肠病中存在P38MAPK信号通路的表达异常，其可通过对炎症细胞因子TNF-α等表达的调控参与发病过程；同时也有研究表明在哮喘、急性胰腺炎等疾病中特异性阻断P38通路能够减轻炎症反应及损伤.

表 1 各组大鼠疾病活动指数及结肠大体形态、组织学损伤评分比较 (n = 15, mean ± SD)

分组	DAI	大体评分	组织学评分
正常对照组	0.28 ± 0.29	0.30 ± 0.48	0.05 ± 0.20
模型组	2.42 ± 0.30[b]	5.42 ± 0.30[b]	3.29 ± 0.26[b]
SB203580组	1.24 ± 0.17[bd]	3.30 ± 0.22[bd]	1.10 ± 0.74[bd]
F值	173.049	538.594	137.598

[b]P<0.01 *vs* 正常对照组; [d]P<0.01 *vs* 模型组. DAI: 疾病活动指数.

表 2 各组大鼠肠组织p-ATF2及外周血PBL凋亡率、Bcl-2表达水平比较 (n = 15, mean ± SD)

分组	p-ATF2(%)	PBL凋亡率(%)	Bcl-2表达率(%)
正常对照组	7.45 ± 1.26	58.70 ± 3.09	13.70 ± 2.45
模型组	43.40 ± 2.67[b]	27.70 ± 3.02[b]	38.60 ± 3.53[b]
SB203580组	20.70 ± 2.79[bd]	46.60 ± 4.14[bd]	20.30 ± 2.87[bd]
F值	600.077	204.302	186.744

[b]P<0.01 *vs* 正常对照组; [d]P<0.01 *vs* 模型组. p-ATF2: 活化转录因子-2; PBL: 外周血淋巴细胞.

肠, SB203580组于造模完成后给予1 mg/(kg·d) SB203580腹腔注射. 2 wk后所有动物全麻下取材.

1.2.2 大鼠疾病活动度及肠组织损伤观察: 每日观察大鼠精神、食欲、活动等一般情况及大便、血便等消化系症状, 并计算疾病活动指数(disease activity index, DAI)[11]. 肠组织标本取肛门至盲肠段, 沿肠管纵轴剪开, 冰生理盐水洗净, 参照文献[12]进行肠道大体形态评分. 结肠组织卷起来, 以4.0%多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μm连续切片, HE染色, 根据Fedorak积分标准进行病理组织学损伤评分[13].

1.2.3 大鼠PBL提取及凋亡检测: 肠道取材前全麻下于大鼠尾静脉取血约5 mL, 肝素抗凝, 采用密度梯度离心法分离出PBL[14,15]. 以台盼蓝染色法检测PBL活力>96%. 将提取的PBL悬于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中, 调整细胞浓度为1×10^6/L, 置于37 ℃、体积分数5%的CO_2培养箱内培养保存. 凋亡检测时以pH 7.4的PBS缓冲液洗涤2次后调整细胞浓度为1×10^6/L上流式细胞仪检测, 操作步骤按Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书进行.

1.2.4 大鼠PBL Bcl-2表达检测: 取培养保存的PBL以pH 7.4的PBS缓冲液洗涤2次, 调整细胞浓度为1×10^6/L, 加入FITC标记的Bcl-2单抗, 常温孵育30 min. PBS缓冲液洗涤2次后加入碘化丙啶(propidium iodide, PI), 避光室温孵育30 min, 流式细胞仪检测, 计算Bcl-2阳性细胞表达率.

1.2.5 肠组织p-ATF2表达检测: 采用免疫组织化学SP法, 石蜡切片脱蜡水化, 经微波抗原修复, 3%H_2O_2孵育消除内源性过氧化物酶活性后, 以10%正常血清封闭非特异性抗原; 滴加1∶100稀释的p-ATF2抗体, 4 ℃过夜; 滴加生物素化二抗, 37 ℃孵育10 min后滴加辣根过氧化物酶标记的卵白素工作液, 37 ℃孵育15 min; 滴加抗体步骤之间均需PBS缓冲液洗涤3×5 min; DAB显色, 苏木素复染, 中性树脂封片. 显微镜下计算阳性细胞所占比例.

统计学处理 采用SPSS13.0软件处理实验数据, 计量资料以mean±SD表示, 方差齐性检验采用单因素方差分析处理, 相关分析采取线性相关分析. P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠一般情况及结肠损伤评分 TNBS造模大鼠出现精神倦怠, 活动减退, 食欲、体质量下降, 毛发失去光泽等改变; 可观察到腹泻, 黄色稀便或肛周体毛被稀便沾染, 约30%大鼠出现黏液血便. SB203580组经干预后上述症状逐渐减轻, DAI评分明显下降(表1). 模型组结肠黏膜充血、肿胀、糜烂多见, 可见散在溃疡及出血灶; 光镜下可见结肠上皮细胞坏死、脱落, 黏膜层及黏膜下层有较多炎症细胞浸润, 可见溃疡及隐窝脓肿形成. SB203580组大鼠肉眼及镜下结肠损

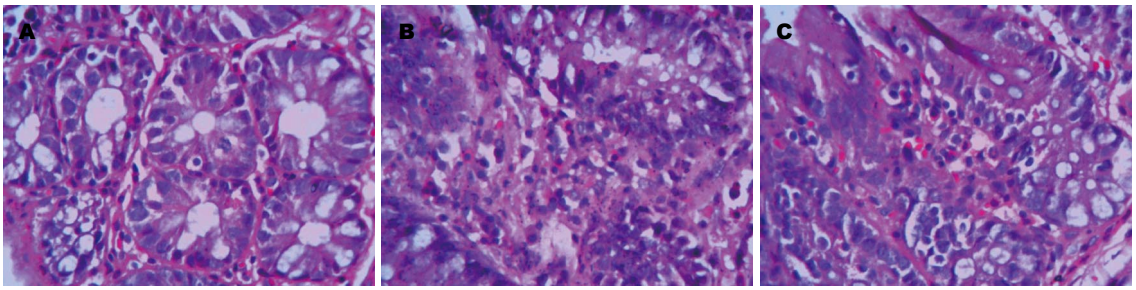

图 1 结肠黏膜HE染色(×400). A: 正常对照组, 上皮细胞完整; B: 模型组, 见较多炎症细胞浸润; C: SB203580组, 腺体破坏较轻, 炎症细胞浸润减少, 但仍可见散在炎症细胞浸润.

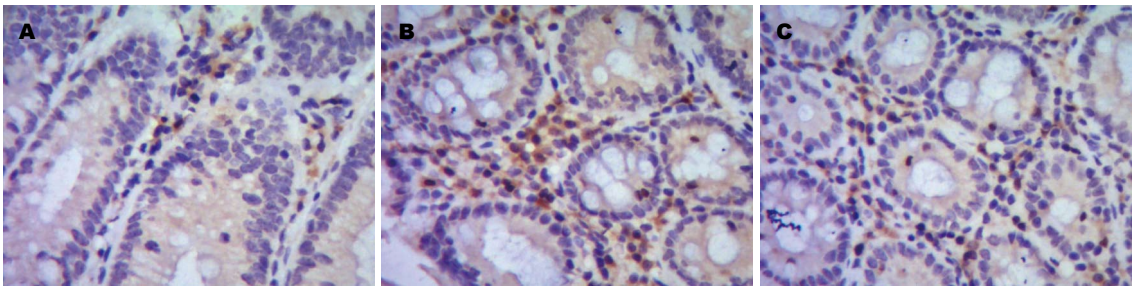

图 2 p-ATF2表达免疫组织化学染色. A: 正常对照组, 见少许阳性细胞表达, 胞浆着色为主; B: 模型组, 阳性细胞表达密集, 胞浆着色为主, 部分见胞核着色; C: SB203580组, 阳性细胞明显减少.

■创新盘点

有关溃疡性结肠炎中P38MAPK信号通路与细胞凋亡的关系目前鲜有研究报道, 本文发现P38MAPK信号通路活化可延迟外周血淋巴细胞凋亡, 导致肠道过度的炎症反应和损伤, 探讨了其对细胞凋亡的调控机制.

伤情况明显减轻, 黏膜充血水肿, 糜烂灶明显减轻或消失, 溃疡愈合, 结肠损伤大体评分及组织学评分均明显下降(P<0.01, 表1, 图1).

2.2 大鼠肠组织p-ATF2表达 p-ATF2阳性表达细胞以胞浆着色为主, 呈棕褐色, 胞核亦有少量着色, 阳性细胞多集中在黏膜固有层内. SB203580组中p-ATF2阳性表达率较模型组明显降低(P<0.01, 表2, 图2).

2.3 大鼠外周血PBL凋亡率及Bcl-2表达 模型组大鼠PBL凋亡率明显低于正常组(P<0.01); SB203580组PBL凋亡率明显高于模型组(P<0.01), 但仍低于正常组(P<0.01). 与正常组相比, 模型组大鼠Bcl-2表达率明显上升(P<0.01), SB203580组干预后, Bcl-2表达明显下降, 但其表达水平仍高于正常组(P<0.01).

2.4 p-ATF2表达水平与PBL凋亡率、Bcl-2表达率相关分析 采用SPSS软件对上述指标进行线性相关分析, 得相关系数分别为r = -0.991, 0.985(P<0.01); p-ATF2表达水平与PBL凋亡率呈显著负相关, 与Bcl-2表达率呈显著正相关.

3 讨论

UC目前病因仍未完全阐明, 可能涉及感染、遗传、免疫及环境等多个因素相互作用. 炎症因子网络失衡、免疫系统紊乱是导致UC肠道炎症损伤持续存在或反复发作的重要因素, 而细胞凋亡与之关系密切; 资料表明, 在UC中, 结肠上皮细胞凋亡明显增多, 而淋巴细胞等免疫细胞凋亡延迟或减弱[16-18]. 本实验结果发现, 在UC大鼠外周血中, 淋巴细胞的凋亡率明显低于正常组大鼠, 提示UC中不仅仅在肠道局部, 外周血中的淋巴细胞液存在凋亡延迟情况.

P38是丝裂原活化蛋白激酶家族的成员之一, 是细胞内信号传递的重要分子, 在机体生理、病理过程如细胞生长、分化、凋亡及炎症、应激反应中起重要调控作用[4-7]. SB203580是一种人工合成的吡啶咪唑类制剂, 可特异性抑制P38MAPK活性, 其可竞争性结合P38MAPK的ATP位点, 抑制p38对下游分子如ATF2的磷酸化, 但并不影响p38的磷酸化过程[19,20]. 因此, 在SB203580干预情况下, 磷酸化的ATF2水平可以反映P38MAPK的酶活性. 近年来, 随着研究的不断深入, P38MAPK信号通路在炎症性肠病发病中的作用日益受到重视[21-24], 研究表明[24], P38MAPK信号通路可通过对UC中炎症细胞因子TNF-α表达的调控参与UC的发病. 但在UC中, P38MAPK信号通路与细胞凋亡的关系目前尚未见报道. 本实验通过TNBS/乙醇灌肠复制溃疡性结肠炎模型, 采用P38MAPK选择性抑制剂SB203580进行干预, 结果发现, 模型组大

■同行评价
本文围绕溃疡性结肠炎防治开展研究，结果可信. 研究结果对丰富溃疡性结肠炎发病机理，寻求溃疡性结肠治疗新靶点方面有一定学术意义.

鼠肠组织p-ATF2表达较正常组明显升高，给予SB230580处理后，p-ATF2表达明显下降，且PBL凋亡率较模型组有明显上升，大鼠一般情况及肠道损伤情况明显改善，提示SB203580确实阻断了P38MAPK信号通路，并促进了UC大鼠外周血淋巴细胞的凋亡，减轻了肠道炎症损伤.

资料表明，P38MAPK可通过增强c-myc、TNF-α表达，激活c-jun、c-fos，磷酸化P53，参与Fas/FasL途径等多种方式实现细胞凋亡调控，在细胞凋亡调控过程中作用关键[25-29]. ATF2在细胞增殖更新中亦发挥重要作用，其可诱导Bcl-2表达，从而引起下游效应[30]. Bcl-2是一个研究最早的细胞凋亡抑制基因，他与其同源蛋白Bax 的比率可以调节细胞凋亡的速率[31,32]. 本实验进一步观察了p38特异性抑制剂对UC大鼠PBL中Bcl-2表达水平的影响，结果发现SB203580干预后，UC大鼠PBL中Bcl-2的表达率明显下降. 同时，相关分析结果显示，ATF2表达水平与Bcl-2的表达率呈显著正相关，而与PBL凋亡率呈显著负相关. 实验结果表明p38/ATF2-Bcl-2途径参与了UC大鼠外周血PBL的凋亡调控过程，其活化可延迟PBL的凋亡，导致肠道过度的炎症反应和损伤，而其特异性抑制剂SB203580可阻断这一过程. 总之，实验结果提示，阻断或调控p38信号通路有望成为溃疡性结肠炎防治的又一途径.

4 参考文献

1 Araki Y, Mukaisyo K, Sugihara H, Fujiyama Y, Hattori T. Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Oncol Rep* 2010; 24: 869-874 [PMID: 20811666]

2 Akcan A, Kucuk C, Sozuer E, Esel D, Akyildiz H, Akgun H, Muhtaroglu S, Aritas Y. Melatonin reduces bacterial translocation and apoptosis in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis of rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 918-924 [PMID: 18240350]

3 Pacheco RG, Esposito CC, Müller LC, Castelo-Branco MT, Quintella LP, Chagas VL, de Souza HS, Schanaider A. Use of butyrate or glutamine in enema solution reduces inflammation and fibrosis in experimental diversion colitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4278-4287 [PMID: 22969190]

4 de la Cruz-Morcillo MA, Valero ML, Callejas-Valera JL, Arias-González L, Melgar-Rojas P, Galán-Moya EM, García-Gil E, García-Cano J, Sánchez-Prieto R. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. *Oncogene* 2012; 31: 1073-1085 [PMID: 21841826 DOI: 10.1038/onc.2011.321]

5 Khan R, Khan AQ, Qamar W, Lateef A, Tahir M, Rehman MU, Ali F, Sultana S. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 258: 315-329 [PMID: 22155348 DOI: 10.1016/j.taap.2011.11.013]

6 Zhang YP, Yao XX, Zhao X. Interleukin-1 beta up-regulates tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA and phosphorylation of c-jun N-terminal kinase and p38 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1392-1396 [PMID: 16552807]

7 Ipaktchi K, Mattar A, Niederbichler AD, Hoesel LM, Hemmila MR, Su GL, Remick DG, Wang SC, Arbabi S. Topical p38MAPK inhibition reduces dermal inflammation and epithelial apoptosis in burn wounds. *Shock* 2006; 26: 201-209 [PMID: 16878030]

8 Peterson TC, Peterson MR, Raoul JM. The effect of pentoxifylline and its metabolite-1 on inflammation and fibrosis in the TNBS model of colitis. *Eur J Pharmacol* 2011; 662: 47-54 [PMID: 21554874 DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.04.030]

9 Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu J, Luo HS. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF-kappaB activation in rats with colitis. *Mediators Inflamm* 2005; 2005: 185-193 [PMID: 16192667]

10 侯丽娟，唐方，王晓红，孙晓萍. 溃疡性结肠炎模型的建立及影响因素. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3242-3245

11 贺文成，李谨，周瑞，唐平飞. 5-ASA对TNBS结肠炎大鼠血中性粒细胞凋亡及血清IL-8水平的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1297-1302

12 Mei Q, Yu JP, Xu JM, Wei W, Xiang L, Yue L. Melatonin reduces colon immunological injury in rats by regulating activity of macrophages. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 882-886 [PMID: 12370092]

13 Fedorak RN, Empey LR, MacArthur C, Jewell LD. Misoprostol provides a colonic mucosal protective effect during acetic acid-induced colitis in rats. *Gastroenterology* 1990; 98: 615-625 [PMID: 2105254]

14 郑雪莲，李园，徐定远，陈珂玲，周总光. AEP大鼠外周血淋巴细胞的分离及其影响因素的探讨. 四川医学 2007; 28: 1195-1196

15 陈肃标，谢素和，曾庆馀. 提高外周血淋巴细胞梯度离心分离率. 汕头大学医学院学报 2001; 14: 135-137

16 Buczyński J, Spychalski M, Ławska-Wierzchniewska A, Dziki A. Higher apoptosis index and proliferation index in colonocytes of patients with ulcerative colitis in remission. *Pol Przegl Chir* 2012; 84: 271-275 [PMID: 22842738 DOI: 10.2478/v10035-012-0046-8]

17 Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, Aydin MS, Yuksel M, Ogunc AV, Alican I. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. *Life Sci* 2011; 89: 402-407 [PMID: 21806998 DOI: 10.1016/j.lfs.2011.07.005]

18 Dirisina R, Katzman RB, Goretsky T, Managlia E, Mittal N, Williams DB, Qiu W, Yu J, Chandel NS, Zhang L, Barrett TA. p53 and PUMA independently regulate apoptosis of intestinal epithelial cells in patients and mice with colitis. *Gastroenterology* 2011; 141: 1036-1045 [PMID: 21699775 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.05.032]

19 Su J, Cui X, Li Y, Mani H, Ferreyra GA, Danner RL, Hsu LL, Fitz Y, Eichacker PQ. SB203580, a p38 inhibitor, improved cardiac function but worsened lung injury and survival during Escherichia coli pneumonia in mice. *J Trauma* 2010;

68: 1317-1327 [PMID: 20068480 DOI: 10.1097/TA.0b013e3181bb9cd3]
20 Henklova P, Vrzal R, Papouskova B, Bednar P, Jancova P, Anzenbacherova E, Ulrichova J, Maurel P, Pavek P, Dvorak Z. SB203580, a pharmacological inhibitor of p38 MAP kinase transduction pathway activates ERK and JNK MAP kinases in primary cultures of human hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2008; 593: 16-23 [PMID: 18655782 DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.07.007]
21 Feng YJ, Li YY. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Dig Dis* 2011; 12: 327-332 [PMID: 21955425 DOI: 10.1111/j.1751-2980.2011.00525.x]
22 Zhao X, Kang B, Lu C, Liu S, Wang H, Yang X, Chen Y, Jiang B, Zhang J, Lu Y, Zhi F. Evaluation of p38 MAPK pathway as a molecular signature in ulcerative colitis. *J Proteome Res* 2011; 10: 2216-2225 [PMID: 21428429 DOI: 10.1021/pr100969w]
23 Mihaescu A, Santen S, Jeppsson B, Thorlacius H. p38 Mitogen-activated protein kinase signalling regulates vascular inflammation and epithelial barrier dysfunction in an experimental model of radiation-induced colitis. *Br J Surg* 2010; 97: 226-234 [PMID: 20034051]
24 易文全, 甘华田, 黄晓丽, 张蒙, 欧阳钦. p38丝裂原活化蛋白激酶抑制剂SB203580对溃疡性结肠炎肠黏膜肿瘤坏死因子α表达的影响. 中华内科杂志 2007; 46: 747-750
25 Stoneley M, Chappell SA, Jopling CL, Dickens M, MacFarlane M, Willis AE. c-Myc protein synthesis is initiated from the internal ribosome entry segment during apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1162-1169 [PMID: 10648601]
26 Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002; 168: 5342-5351 [PMID: 11994493]
27 Matsui Y, Watanabe J, Ding S, Nishizawa K, Kajita Y, Ichioka K, Saito R, Kobayashi T, Ogawa O, Nishiyama H. Dicoumarol enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in p53 wild-type urothelial cancer cells through p38 activation. *BJU Int* 2010; 105: 558-564 [PMID: 19583730 DOI: 10.1111/j.1464-410X]
28 Kornmann M, Ishiwata T, Kleeff J, Beger HG, Korc M. Fas and Fas-ligand expression in human pancreatic cancer. *Ann Surg* 2000; 231: 368-379 [PMID: 10714630]
29 Chen KC, Chiou YL, Chang LS. JNK1/c-Jun and p38 alpha MAPK/ATF-2 pathways are responsible for upregulation of Fas/FasL in human chronic myeloid leukemia K562 cells upon exposure to Taiwan cobra phospholipase A2. *J Cell Biochem* 2009; 108: 612-620 [PMID: 19670268]
30 马秦, 宋红, 程晓兵, 张浚睿, 陈富林, 吴炜, 毛天球. 活化转录调控因子2(ATF2)在下颌骨髁突软骨细胞中调控Bcl-2机制的研究. 实用口腔医学杂志 2009; 25: 459-461
31 Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, Miyagawa J, Kanayama S, Shinomura Y, Ishikawa H, Ohtani T, Nezu R, Nagata S, Matsuzawa Y. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998; 43: 48-55 [PMID: 9771405]
32 Karamanolis DG, Kyrlagkitsis I, Konstantinou K, Papatheodoridis GV, Karameris A, Mallas E, Ladas SD, Raptis S. The Bcl-2/Bax system and apoptosis in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1085-1088 [PMID: 17629044]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 674-678
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

核素胃排空检查在功能性消化不良患者中的临床应用

张 悦, 张遵城, 董 萍, 董 华, 肖连东, 王国强

■背景资料
功能性消化不良患者占胃肠病专科门诊患者的50%, 不仅影响患者的生活质量, 而且构成相当高的医疗费用, 因此已逐渐成为现代社会中一个主要的医疗保健问题. 迄今功能性消化不良的病因及发病机制未完全明了.

张悦, 张遵城, 董萍, 董华, 肖连东, 王国强, 天津医科大学第二医院核医学科 天津市 300211
张悦, 硕士, 主治医师, 主要从事临床核医学影像检查工作.
作者贡献分布: 此课题由张遵城与张悦共同设计; 研究过程由张悦、肖连东及王国强完成; 图像处理与数据分析由董萍与董华完成; 论文书写由张悦完成; 文章审阅由张遵城完成.
通讯作者: 张遵城, 教授, 300211, 天津市河西区平江道23号, 天津医科大学第二医院核医学科. zhangzuncheng@sina.com
电话: 022-88329419
收稿日期: 2013-09-02 修回日期: 2013-12-11
接受日期: 2013-12-19 在线出版日期: 2014-02-18

Radionuclide gastric emptying scintigraphy in patients with functional dyspepsia

Yue Zhang, Zun-Cheng Zhang, Ping Dong, Hua Dong, Lian-Dong Xiao, Guo-Qiang Wang

Yue Zhang, Zun-Cheng Zhang, Ping Dong, Hua Dong, Lian-Dong Xiao, Guo-Qiang Wang, Department of Nuclear Medicine, Tianjin Medical University 2nd Hospital, Tianjin 300211, China
Correspondence to: Zun-Cheng Zhang, Professor, Department of Nuclear Medicine, Tianjin Medical University 2nd Hospital, 23 Pinjiang Road, Hexi District, Tianjin 300210, China. zhangzuncheng@sina.com
Received: 2013-09-02 Revised: 2013-12-11
Accepted: 2013-12-19 Published online: 2014-02-18

Abstract
AIM: To assess the use of gastric emptying scintigraphy with solid test meal in patients with functional dyspepsia (FD) and normal subjects.

METHODS: Forty-two patients with FD and 30 normal subjects underwent gastric emptying scintigraphy with ^{99m}Tc-DTPA labeling egg solid meal. The standard curve of gastric emptying was plotted to figure out the half-time of gastric emptying and emptying rate at 60 and 120 min by three different methods: method 1 with the radioactivity of the anterior view, method 2 with the mean value of and method 3 with the geometric mean of the radioactivity of the anterior and pastier views as the y-axis of the standard curve of gastric emptying, respectively. The differences in half-times and gastric emptying rates at 60 and 120 min figured out by the three different methods were compared between patients with FD and normal subjects.

RESULTS: One-way analysis of variance was performed to compare the differences in half-times. The half-time figured out by method 1 did not differ significantly from that by method 2 (P = 0.808, P = 0.243, P > 0.05), but the half-time figured out by method 3 differed significantly from those by methods 1 and 2 (1 *vs* 3: P = 0.007, P = 0.000; 2 *vs* 3: P = 0.035, P = 0.023; P < 0.05 for all). The half-time and gastric emptying rates at 60 and 120 min differed significantly between FD patients and normal subjects (P = 0.000). Method 1 figured out 80.9%, method 2 figured out 71.4% and method 3 figured out 90.5% of FD patients had longer half-time than normal subjects.

CONCLUSION: Radionuclide ^{99m}Tc-DTPA gastric emptying scintigraphy with solid meal is a simple, accurate, quantitative and physiologic method for measuring gastric motility in FD patients.

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

Key Words: Radionuclide imaging; Gastric emptying; Half-time; Function dyspepsia

Zhang Y, Zhang ZC, Dong P, Dong H, Xiao LD, Wang GQ. Radionuclide gastric emptying scintigraphy in patients with functional dyspepsia. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 674-678 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/674.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.674

摘要
目的: 前瞻性研究评价放射性核素标记固体试餐胃排空检查对功能性消化不良(function dyspepsia, FD)患者及正常对照者胃排空功能的测定.

方法: 应用双探头SPECT对42例FD患者及30例对照者进行放射性核素标记物^{99m}锝-二乙基三胺五乙酸(^{99m}Tc-DTPA)标记鸡蛋固体试餐胃排空检查, 分别以方法1试餐前位放射性、

■同行评议者
陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

方法2试餐前、后位放射性的算术平均数及方法3试餐前、后位放射性的几何平均数为纵坐标, 时间为横坐标绘制每个受试者的胃排空曲线并计算半排时间及60、120 min胃排空率, 比较3种计算半排时间方法的差异及FD患者与对照者半排时间及60、120 min胃排空率的差异.

结果: 3种计算半排时间方法差异的比较采用单因素方差分析, 其中方法1与2计算的半排时间之间差异不具有统计学意义(P = 0.808, P = 0.243, P>0.05), 方法1、2与3计算的半排时间之间差异具有统计学意义(1与3: P = 0.007, P = 0.000; 2与3: P = 0.035, P = 0.023; P<0.05); 3种方法计算FD患者与对照者胃排空的半排时间及60、120 min胃排空率之间差异的比较采用t检验, 且差异均具有统计学意义(P = 0.000); 分别以对照组半排时间为诊断标准, 方法1诊断出80.9%(34/42)FD患者的半排时间延长, 方法2诊断出71.4%(30/42), 方法3诊断出90.5%(38/42).

结论: 核素^{99m}Tc-DTPA固体试餐胃排空检查能够简单、定量反映胃排空的功能状态, 为FD的诊断及研究提供客观、准确的依据.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 核素显像; 胃排空; 半排时间; 功能性消化不良

核心提示: 核素胃排空检查是在生理状态下准确了解胃排空功能的常用方法, 是一种高灵敏、无创性、重复性好、具有定量和符合生理特点的检查手段, 对功能性消化不良(function dyspepsia)的发病机制研究、诊断、临床疗效判断、随访评价等提供准确、客观依据.

张悦, 张遵城, 董萍, 董华, 肖连东, 王国强. 核素胃排空检查在功能性消化不良患者中的临床应用. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 674-678 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/674.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.674

0 引言

胃肠运动功能障碍是功能性消化不良(function dyspepsia, FD)发病的重要病理生理基础[1], 主要表现为胃排空功能下降. 目前, 临床上胃排空功能测定主要有插管法、超声法、X线钡餐法、核素显像、药物吸收试验及^{13}C呼气试验等方法, 其中以核素胃排空检查最优, 被认为是评价胃排空功能的金标准[1,2]. 我们对42例FD患者及30例正常对照者进行核素^{99m}Tc-DTPA固体试餐胃排空检查, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2011-12/2013-02我院消化科门诊, 符合罗马III[3,4]标准的患者42例, 男16例, 女26例, 平均年龄49岁±11.9岁. 正常对照组30例(系本院同期健康查体的志愿者), 均无消化系统疾病症状及体征, 其中男14例, 女16例, 平均年龄42.5岁±10.7岁. 所有受试者在检查前1-2 wk停服影响胃肠动力的药物, 隔夜禁食(至少8 h以上), 签署知情同意书.

1.2 方法

1.2.1 试餐的制备和鉴定: 放射性核素标志物为^{99m}锝-二乙基三胺五乙酸(^{99m}Tc-DTPA), 由中国原子高科核技术有限公司公司提供, 放化纯度>95%. 取37-74 MBq ^{99m}Tc-DTPA, 加入到120 g鸡蛋中搅匀, 油中煎炒至固体状, 加入两片面包中备用. 为了评价放射性核素和鸡蛋结合的稳定性, 计算结合百分率(%). 取已标记的煎炒成固体状的鸡蛋适量, 切碎成约3 mm^{3}大小, 以模拟咀嚼, 并测定其放射性, 然后加入含有胃蛋白酶(400 mg/L)的盐酸(浓度为0.08 nmol/L), 37 ℃保温2 h, 以模拟胃内消化, 最后用两层纱布过滤, 离心滤液, 测定上清液的放射性, 按下式计算结合百分率(%): 结合百分率(%) = (标记鸡蛋放射性-上清夜放射性)/标记鸡蛋放射性×100%.

1.2.2 核素检查: 显像仪器: 美国Picker公司PRISM 2000XP双探头SPECT, 配置低能高分辨平行孔准直器, 能峰140 KeV, 窗宽20%, 图像矩阵128×128. 检查程序: 要求受试者在5 min内吃完试餐, 即刻(记为0 min)仰卧于检查床上, 使胃及大部分小肠位于探头视野中, 同时采集前、后位平面图像, 随后每隔15 min(记为15、30、45、60、75、90、105、120 min)采集一帧图像, 每帧采集60 s, 连续观察120 min, 若120 min时胃内试餐放射性下降未达到0 min时放射性的50%, 可延迟显像直至放射性降至50%以下. 显像间期允许受试者适当走动, 但每次显像的体位及图像采集条件一致. 为了验证核素检查方法的重复性, 采用简单随机化抽样的方法在对照组中选择8例于3 d内进行相同条件下的重复检查.

1.2.3 图像及数据分析: 在每个时间点采集到的前、后位图像上沿胃的最大轮廓划定感兴趣区域, 得到每个时间点试餐前、后位的放射性计数(前位Ct、后位Ct)并进行放射性衰变校正(前

■研发前沿

目前, 临床诊断功能性消化不良主要根据临床症状, 胃排空功能的测定是其最重要的辅助诊断手段, 测定方法主要有插管法、超声法、X线钡餐法、药物吸收试验、^{13}C呼气试验及核素胃排空检查等, 其中以核素胃排空检查最优, 被认为是评价胃排空功能的金标准.

■相关报道
过去进行核素胃排空检查使用的是单探头的γ照相机，仅采集前位图像，即以试餐前位放射性为纵坐标计算半排时间；现在使用双探头SPECT，能够同时采集前、后位图像，目前国内进行核素胃排空检查较少，且以前、后位放射性的算术平均数为纵坐标，但国外研究考虑需要对射线的散射、胃运动及胃在人体内的空间位置造成的探测的几何条件的改变进行校正，以前、后位放射性的几何平均数为纵坐标.

表 1 3种方法计算$T_{1/2}$比较 (min)

分组	n	方法1	方法2	方法3	P值
FD患者	42	142.5±48.1	134.5±55.8	102.0±22.1	1与2: 0.808 1与3: 0.007 2与3: 0.035
对照组	30	79.4±12.4	73.6±7.8	66.7±7.1	1与2: 0.243 1与3: 0.000 2与3: 0.023
P值		0.000	0.000	0.000	
F值		22.898	16.315	39.082	

方法1: 以试餐前位放射性为纵坐标; 方法2: 以试餐前、后位放射性的算术平均数为纵坐标; 方法3: 以试餐前、后位放射性的几何平均数为纵坐标. FD: 功能性消化不良.

位Ct/K、后位Ct/K, K为放射性衰变常数)后得到试餐前、后位的放射性; 以试餐放射性为纵坐标, 时间为横坐标绘制以时间－放射性表示的胃排空曲线. 采用3种方法绘制胃排空曲线, 方法1: 以试餐前位放射性为纵坐标; 方法2: 以试餐前、后位放射性的算术平均数为纵坐标; 方法3: 以试餐前、后位放射性的几何平均数为纵坐标. 分别对3种方法绘制的曲线进行线性拟和得到直线及公式, 根据直线公式计算胃排空的半排时间(half-time, $T_{1/2}$): 即试餐放射性降至0 min时放射性一半的时间; 分别根据60、120 min时胃内试餐的放射性计算60、120 min胃排空率(gastric emptying rate, GER). GER计算公式如下: 某时间GER(%) = (1-某时间试餐放射性/0 min时试餐放射性)×100%.

统计学处理 采用SPSS11.5软件对所得数据进行统计学分析, 胃排空的$T_{1/2}$及60、120 min GER用mean±SD表示. 3种计算$T_{1/2}$方法之间的比较采用单因素方差分析; FD患者与对照者之间$T_{1/2}$及60、120 min GER的比较采用t检验. P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 标记试餐的稳定性 采用简单随机化的方法对^{99m}Tc-DTPA标记的鸡蛋固体试餐抽样9次进行鉴定, 消化2 h后结合百分率均>95%(96.8%-98.5%), 说明标记试餐在检查过程中是稳定的.

2.2 检查方法的重复性 8例对照者于3 d内进行重复检查, 前、后两次检查结果显示: 受试者胃排空的$T_{1/2}$最大差异在6%以内, 排除测定误差及两次检查时生理性差异的影响, 前、后两次检查的差异明显比个体间的差异小, 说明检查重复性良好.

2.3 3种计算$T_{1/2}$方法的比较 方法1与2计算的$T_{1/2}$之间差异不具有统计学意义(P>0.05), 方法1与3、2与3计算的$T_{1/2}$之间差异具有统计学意义(P<0.05, 表1).

2.4 FD患者与对照者$T_{1/2}$及60、120 min GER比较 3种方法计算FD患者及对照者胃排空的$T_{1/2}$分别为: 142.5 min±48.1 min、134.5 min±55.8 min、102.0 min±22.1 min和79.4 min±12.4 min、73.6 min±7.8 min、66.7 min±7.1 min, 其差异均具有统计学意义(P<0.00, 表1). 分别以对照组$T_{1/2}$的(mean±SD)为诊断标准, 方法1诊断出34例FD患者$T_{1/2}$延长, 占80.9%(34/42); 方法2诊断出30例FD患者$T_{1/2}$延长, 占71.4%(30/42); 方法3诊断出38例FD患者$T_{1/2}$延长, 占90.5%(38/42). 3种方法计算FD患者及对照者的60、120 min GER之间差异亦均有统计学意义(P<0.00, 表2).

3 讨论

核素胃排空检查通过连续动态采集受试者胃内放射性核素标记试餐随时间变化的图像, 生成以试餐放射性为纵坐标、时间为横坐标的胃排空曲线, 获得衡量胃排空功能的指标, 如半排时间, 但其测定结果受很多因素影响, 如所用试餐成分、热量及体积, 试餐的核素标记率及稳定性, 检查体位及患者是否应用影响胃肠功能的药物等[5,6]. Américo等[6]通过研究认为同一人用不同体积固体试餐测得的半排时间不同, 试餐体积越大, 测得的半排时间越长; 此外, 站立位时胃排空速率较仰卧位时快. 以往进行核素胃排空检查使用单探头γ照相机, 仅采集试餐的前

表 2 3种方法计算60 min、120 min GER(%)

	方法1		方法2		方法3	
	60 min	120 min	60 min	120 min	60 min	120 min
FD患者	28.5±3.7	50.2±7.9	30.7±3.4	51.8±7.6	33.5±3.6	55.5±7.6
对照者	49.4±8.0	76.6±6.9	54.1±8.0	78.4±7.1	57.4±7.9	81.2±7.0
*t*值	11.113	10.371	12.683	10.669	12.791	10.559
*P*值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

方法1: 以试餐前位放射性为纵坐标; 方法2: 以试餐前、后位放射性的算术平均数为纵坐标; 方法3: 以试餐前、后位放射性的几何平均数为纵坐标. GER: 胃排空率; FD: 功能性消化不良.

■**创新盘点**

(1)采用双探头SPECT同时采集放射性试餐胃排空的前、后位图像, 分别以试餐前位放射性, 前、后位放射性的算术平均数及几何平均数为纵坐标计算半排时间; (2)采用放射性核素标记鸡蛋作为固体试餐, 制备简单, 稳定性高, 且合乎生理条件; 检查过程简单, 方法重复性好; (3)采用多个参数进行定量评价, 且定量准确, 为FD的诊断及病情程度的判断提供客观准确的依据.

位图像, 且粗略认为胃腔与探头是平行的, 而后位图像存在脊柱遮挡, 故仅以试餐前位放射性为纵坐标计算半排时间[6], 如本研究中的方法1; 现在使用双探头SPECT检查仪器能够同时采集试餐的前、后位图像, 国内研究多以试餐前、后位放射性的算术平均数为纵坐标计算半排时间, 如方法2, 而国外研究以试餐前、后位放射性的几何平均数为纵坐标计算半排时间, 如方法3. 为了比较3种计算半排时间方法的差异, 我们将其他影响因素标准化, 包括所用试餐及检查过程, 结果发现方法1与2计算的半排时间之间差异不具统计学意义, 方法1与3、2与3计算的半排时间之间差异具有统计学意义. 国外研究[7-9]认为在计算胃排空的半排时间时需要对射线的散射、胃的运动及胃在人体内空间位置造成的探测的几何条件的改变进行校正, 因为胃腔与人体表面并不是平行的, 胃底位置靠近人体背侧, 而胃窦更接近腹侧; 食物由胃底向胃窦移动, 而胃底与胃窦收缩运动及排空方式亦不同, 这些差异的影响不容忽略, 所以采用计算试餐前、后位放射性几何平均数的方法对这些差异进行校正. 我们的检查结果表明无论对于FD患者还是对于对照者方法1与3、2与3计算的半排时间之间存在差异, 不能等同, 在实践工作中进行结果比较时需要注意.

FD是指具有上腹痛、上腹胀、早饱、嗳气、食欲不振、恶心、呕吐等临床症状, 经检查排除引起这些症状的器质性疾病的一组临床综合征, 症状可持续或反复发作, 是临床上最常见的一种功能性胃肠疾病[10,11]. FD的病因及发病机制未完全明了, 患者多存在胃排空功能障碍, 其诊断主要根据临床症状, 目前尚缺少准确、客观的诊断和评价依据[12]. 核素胃排空检查是在生理状态下准确了解胃排空功能的常用方法, 是一种高灵敏、无创性、重复性好、具有定量和符合生理特点的检查手段. 根据所用试餐成分不同分为液体、固体及液体-固体混合食物试餐3种测定方法, 其中固体试餐胃排空检查灵敏度最高, 能够发现胃排空功能的轻度异常, 是目前应用最多的方法[13,14]. 我们采用放射性核素标记鸡蛋作为固体试餐, 制备简单, 稳定性高, 且合乎生理条件; 通过采集受试者胃内放射性核素标记试餐随时间变化的图像, 绘制胃排空曲线并获得衡量胃排空功能的指标: 半排时间及60、120 min胃排空率, 采用多个参数进行定量评价, 方法重复性好, 且测量准确. 检查结果证实FD患者与对照者的半排时间及60、120 min胃排空率的差异均具有统计学意义, 如以对照者半排时间的(mean±SD)为核素胃排空检查诊断功能性消化不良的标准, 大多数FD患者胃排空的半排时间延长(方法1诊断出80.9%FD患者半排时间延长; 方法2诊断出71.4%; 方法3诊断出90.5%), 与诸多文献报道一致[13-15].

核素胃排空检查可以采用几何平均数的方法对试餐放射性进行校正并计算半排时间及胃排空率, 这些指标能够准确反映疾病状态下胃排空功能的异常变化, 对FD的发病机制研究、诊断、临床疗效判断、随访评价等提供准确、客观依据.

4 参考文献

1 郭文娟, 张艳丽, 姚树坤, 尹立杰, 严珏, 李红磊. 功能性消化不良症状和近端胃功能的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1623-1629

2 林敏, 郁立菲, 徐克勤, 薛乐宁. 胃排空检测方法的研究进展. 国际消化病杂志 2011; 31: 13-15.

3 Ochi M, Tominaga K, Tanaka F, Tanigawa T, Yamagami H, Watanabe K, Watanabe T, Fujiwara Y, Arakawa T. Clinical classification of subgroups according to the Rome III criteria cannot be used to distinguish the associated respective pathophysiology in Japanese patients with functional dyspepsia. *Intern Med* 2013; 52: 1289-1293 [PMID: 23774536 DOI: 10.2169/internalmedicine.52.9205]

4 吴改玲, 蓝宇, 王玘, 闫冰, 张小晋. 胃运动和感觉功能

■同行评价
本文有一定的科学性和可读性.

在符合罗马Ⅲ标准的功能性消化不良患者中的特点. 世界华人消化杂志 2011; 19: 734-738
5 Seok JW. How to interpret gastric emptying scintigraphy. *J Neurogastroenterol Motil* 2011; 17: 189-191 [PMID: 21602998 DOI: 10.5056/jnm.2011.17.2.189]
6 Américo MF, Ietsugu MV, Romeiro FG, Corá LA, Oliveira RB, Miranda JR. Effects of meal size and proximal-distal segmentation on gastric activity. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5861-5868 [PMID: 21155008 DOI: 10.3748/wjg.v16.i46.5861]
7 Donohoe KJ, Maurer AH, Ziessman HA, Urbain JL, Royal HD, Martin-Comin J. Procedure guideline for adult solid-meal gastric-emptying study 3.0. *J Nucl Med Technol* 2009; 37: 196-200 [PMID: 19692450 DOI: 10.2967/jnmt.109.067843]
8 Braghetto I, Davanzo C, Korn O, Csendes A, Valladares H, Herrera E, Gonzalez P, Papapietro K. Scintigraphic evaluation of gastric emptying in obese patients submitted to sleeve gastrectomy compared to normal subjects. *Obes Surg* 2009; 19: 1515-1521 [PMID: 19714384 DOI: 10.1007/s11695-009-9954-z]
9 Maurer AH. Advancing gastric emptying studies: standardization and new parameters to assess gastric motility and function. *Semin Nucl Med* 2012; 42: 101-112 [PMID: 22293165 DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2011.10.001]
10 Koskenpato J, Punkkinen JM, Kairemo K, Färkkilä M. Nizatidine and gastric emptying in functional dyspepsia. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 352-357 [PMID: 17682943 DOI: 10.1007/s10620-007-9898-x]
11 Vanheel H, Vanuytsel T, Van Oudenhove L, Farré R, Verbeke K, Tack J. Postprandial symptoms originating from the stomach in functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25: 911-e703 [PMID: 23992049 DOI: 10.1111/nmo.12227]
12 于方. 功能性消化不良发病机制的研究进展. 中国疗养医学 2013; 22: 515-517.
13 Miwa H, Watari J, Fukui H, Oshima T, Tomita T, Sakurai J, Kondo T, Matsumoto T. Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 3: 53-60 [PMID: 21443711 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06633.x]
14 Misiara GP, Troncon LE, Hara SH, Secaf M. Dynamic antral scintigraphy following solid and liquid meals in healthy human subjects. *Nucl Med Commun* 2007; 28: 479-483 [PMID: 17460539 DOI: 10.1097/MNM.0b013e32815aa5f7]
15 Talley NJ, Locke GR, Lahr BD, Zinsmeister AR, Tougas G, Ligozio G, Rojavin MA, Tack J. Functional dyspepsia, delayed gastric emptying, and impaired quality of life. *Gut* 2006; 55: 933-939 [PMID: 16322108 DOI: 10.1136/gut.2005.078634]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

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

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 679-684
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

冰帽参与治愈显著肝性脑病后患者认知功能的评价

张玉波, 刘振坤, 陈立敏, 袁亚松, 纪志伟, 李佳桂

张玉波, 刘振坤, 纪志伟, 涿州市医院急诊科 河北省涿州市 072750
陈立敏, 涿州市医院消化科 河北省涿州市 072750
袁亚松, 李佳桂, 涿州市医院重症监护室 河北省涿州市 072750
张玉波, 主治医师, 主要从事肝硬化和胰腺炎的研究.
作者贡献分布: 本课题由张玉波设计并撰写论文; 刘振坤与陈立敏进行数据分析; 由张玉波、刘振坤、陈立敏、袁亚松、纪志伟及李佳桂共同收集资料完成.
通讯作者: 张玉波, 主治医师, 072750, 河北省涿州市范阳西路129号, 河北省涿州市医院急诊科. qaz301214@126.com
电话: 0312-5521022
收稿日期: 2013-11-22 修回日期: 2013-12-13
接受日期: 2013-12-19 在线出版日期: 2014-02-18

Assessment of cognitive function of patients after resolution of overt hepatic encephalopathy with ice cap participated treatment

Yu-Bo Zhang, Zhen-Kun Liu, Li-Min Chen, Ya-Song Yuan, Zhi-Wei Ji, Jia-Gui Li

Yu-Bo Zhang, Zhen-Kun Liu, Zhi-Wei Ji, Department of Emergency Medicine, Zhuozhou City Hospital, Zhuozhou 072750, Hebei Province, China
Li-Min Chen, Department of Gastroenterology, Zhuozhou City Hospital, Zhuozhou 072750, Hebei Province, China
Ya-Song Yuan, Jia-Gui Li, Intensive Care Unit, Zhuozhou City Hospital, Zhuozhou 072750, Hebei Province, China
Correspondence to: Yu-Bo Zhang, Attending Physician, Department of Emergency Medicine, Zhuozhou City Hospital, 129 Fanyang West Road, Zhuozhou 072750, Hebei Province, China. qaz301214@126.com
Received: 2013-11-22 Revised: 2013-12-13
Accepted: 2013-12-19 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To assess the cognitive function of patients after resolution of overt hepatic encephalopathy with ice cap participated treatment.

METHODS: Ninety patients diagnosed with grade 4 type C overt hepatic encephalopathy were randomly divided into 3 groups, a control group (n = 30) undergoing conventional treatment + lactulose enema, a trial group (n = 30) undergoing conventional treatment + ice cap, and another trial group (n = 30) undergoing conventional treatment + ice cap + lactulose enema. After the above treatments, 87 patients were back to consciousness, and one week later, these patients (including 28 patients in the control group, 29 patients in the first trial group, and 30 patients in the another trial group) were evaluated for cognitive function by the number connection test-A (NCT-A), number connection test-B (NCT-B), and inhibitory control test (ICT).

RESULTS: The times needed for both NCT-A and NCT-B were shortened in the two trial groups compared with the control group (NCT-A: 42.00 s ± 7.91 s, 39.20 s ± 9.95 s *vs* 46.61 s ± 10.55 s; NCT-B: 114.48 s ± 27.05 s, 100.30 s ± 31.32 s *vs* 120.68 s ± 28.68 s), but a significant difference was observed only between the second trial group and control group (P = 0.004, 0.009). In the inhibitory control test, after 6 similar 2-min runs, the lures were reduced in both trial groups compared with the control group (9.45 ± 3.95, 7.43 ± 4.02 *vs* 11.18 ± 4.39), but a significant difference was observed only between the second trial group and control group (P = 0.001). The correct target response rate was higher in both trial groups than in the control group (92.34% ± 4.90%, 93.24% ± 3.31% *vs* 95.20% ± 3.52%), and a significant difference was observed only between the second trial group and control group (P = 0.007). The reduction for lure response may serve as a measure of learning improvement. In this study, the lure responses during runs 4-6 in the three groups were all less than those during runs 1-3, although the reduction was not statistically significant ($P \geqslant 0.05$).

CONCLUSION: Ice cap can help to treat cognitive impairment in patients with overt hepatic encephalopathy whose consciousness had been recovered.

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

Key Words: Hepatic encephalopathy; Ice cap; Cognitive testing; Inhibitory control test

Zhang YB, Liu ZK, Chen LM, Yuan YS, Ji ZW, Li JG. Assessment of cognitive function of patients after

■背景资料
肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)是肝功能严重障碍和/或门体分流术后患者发生的以代谢紊乱为基础, 神经、精神症状为主要表现的综合征, 表现为认知功能障碍、行为异常、甚至昏迷、死亡, 预后差, 经积极治疗, 患者神志恢复后, 仍有心理智能障碍并逐渐进展恶化, 严重影响患者的生活质量. HE发病机制尚不明确, 普遍认为在高血氨症、炎症反应等因素的共同作用下, 导致脑星状胶质细胞肿胀, 进而引起脑水肿、颅内高压, 目前以降低血氨、抗炎对症治疗为主, 而治疗性低温可直接减轻脑水肿、降低颅内压, 改善机体炎症状态, 综合保护脑功能, 已应用于心肺复苏术后、缺血缺氧性脑病、急性肝衰竭的治疗, 并取得了较好疗效, 本文发现冰帽参与的综合治疗昏迷HE患者神志恢复后, 亦有助于保护患者的认知功能.

■同行评议者
陈积圣, 教授, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

■研发前沿
肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)的发病机制、诊断、改善认知功能的治疗方法是目前研究的热点、难点、重点. 探索简便的诊断轻微型HE的方法以及有效的改善认知功能的治疗手段是亟待解决的问题.

resolution of overt hepatic encephalopathy with ice cap participated treatment. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 679-684 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/679.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.679

摘要

目的: 评估冰帽参与治愈显著肝性脑病后对患者认知功能的影响.

方法: 90例C型显著肝性脑病(依据West Haven标准分级为4级)患者, 随机分为3组接受如下治疗, 对照组(30例): 常规治疗+乳果糖灌肠; 试验1组(30例): 常规治疗+冰帽; 试验2组(30例): 常规治疗+冰帽+乳果糖灌肠, 经治疗, 87例患者神志恢复正常(简易智能量表评分大于25分为诊断标准), 并在神志恢复正常后1 wk, 进入本研究(其中对照组28例; 试验1组29例; 试验2组30例)进行心理智能评估: 数字连接试验A、数字连接试验B、抑制控制试验.

结果: 数字连接试验A评估中, 与对照组(46.61 s±10.55 s)比较, 试验1、2组完成数字连接试验A所需时间均有缩短(42.00 s±7.91 s、39.20 s±9.95 s), 但仅试验2组与对照组的差异有统计学意义(P = 0.004<0.05). 数字连接试验B评估中, 与对照组(120.68 s±28.68 s)比较, 试验1、2组完成数字连接试验B所需时间均有缩短(114.48 s±27.05 s、100.30 s±31.32 s), 但仅试验2组与对照的差异有统计学意义(P = 0.009<0.05). 抑制控制试验6轮整体评估中, 与对照组(11.18次±4.39次)比较, 试验1、2组诱饵应答次数均有减少(9.45次±3.95次、7.43次±4.02次), 但仅试验2组与对照组的差异有统计学意义(P = 0.001<0.05). 而试验1、2组与对照组相比, 靶标应答正确率均有提高(92.34%±4.90%、93.24%±3.31%、95.20%±3.52%), 但仅试验2组与对照组的差异有统计学意义(P = 0.007<0.05). 第4-6轮诱饵应答次数较第1-3轮减少提示学习能力的改善, 在本次研究中, 3组患者第4-6轮的诱饵应答次数均较第1-3轮少, 但P≥0.05, 差异无统计学意义.

结论: 冰帽可有助于改善显著性肝性脑病患者意识恢复后的认知功能缺损.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝性脑病; 冰帽; 认知功能检测; 抑制控制试验

核心提示: 在综合治疗的基础上, 应用冰帽治疗显著肝性脑病(overt hepatic encephalopathy, OHE)有利于缩短患者完成数字连接试验A/B所需的时间, 提高患者抑制控制试验中靶标应答率, 减少诱饵应答次数, 提示冰帽可有助于改善OHE患者意识恢复后的认知功能缺损.

张玉波, 刘振坤, 陈立敏, 袁亚松, 纪志伟, 李佳桂. 冰帽参与治愈显著肝性脑病后患者认知功能的评价. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 679-684 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/679.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.679

0 引言

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)是临床上常见的一种以代谢紊乱为基础的神经精神异常综合征, 是严重肝病常见的并发症及死亡原因之一. 患者可出现不同程度的智力、定向力、情感、行为、精细运动、意识等改变. 根据临床症状的轻重分为轻微HE(minimal hepatic encephalopathy, MHE)和显著HE(overt hepatic encephalopathy, OHE). 因发病机制尚不明确, 目前以综合治疗为主, 目的是缓解病情, 及早恢复患者神志, 改善预后, 现有一线治疗为降低血氨药物乳果糖、利福昔明, 当OHE患者意识恢复后, 仍有认知功能缺损, 表现为心理智能障碍, 即MHE, 且认知功能缺损持续存在, 并随着MHE进展为OHE而进行性加重, 反复发作OHE, 最终导致患者明显智力、意识障碍甚至死亡. 我们先前的研究证实局部治疗性低温即冰帽可通过减少血氨的产生及颅内转运、减少脑代谢、减轻脑水肿, 保护神经细胞, 缩短HE患者的昏迷时间. 冰帽是否有利于改善HE患者的认知功能? 本文通过心理智能测试即传统笔试和计算机心理测试, 评价冰帽治疗OHE患者神志恢复后认知功能状况, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2010-09/2013-09在我院消化内科、感染科、急诊科、重症监护室收治的90例患者, 入选标准: 慢性肝炎肝硬化失代偿期的住院患者, 诊断为HE, 即C型HE[1]. 采用West Haven标准对HE严重程度进行分级, 昏迷的4级患者入选[2]. 排除标准: (1)其他疾病所致昏迷患者如低血糖、高血糖高渗性昏迷、肺性脑病、尿毒症、脑血管疾病等; (2)近4 wk内服用影响神经功能药物(如镇静剂、麻醉剂等)者; (3)酒精依赖尚未戒酒者、药物依赖者; (4)伴随严重心、

肺、肾疾病者及严重糖尿病者; (5)颅脑外伤及颅脑手术史者; (6)肝硬化合并原发性肝癌或合并其他恶性肿瘤者; (7)本次发病前已经使用降氨药物、支链氨基酸等治疗者; (8)孕妇、哺乳期妇女.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 90例患者随机分为3组, 对照组30例, 试验1组30例, 试验2组30例, 均予常规治疗: 去除诱因、限制经胃肠道蛋白摄入、纠正水电解质紊乱、抗感染、输白蛋白、输血浆、保肝(门冬氨酸鸟氨酸). 对照组加用乳果糖灌肠, 试验1组加用冰帽, 试验2组加用冰帽联合乳果糖灌肠. 经治疗, 死亡3例, 神志恢复87例[简易智能量表(the mini-mental status examination, MMSE), 评分>25分为诊断标准][3], 87例患者均愿意参加心理智能评估.

1.2.2 评估项目: (1)数字连接试验A(number connection test-A, NCT-A): 以计时方式测定患者连线1-25个数字点的时间, 评估患者心理运动的速度, 所需时间越长, 成绩越差; (2)数字连接试验B(number connection test-B, NCT-B): 以计时方式测定患者连线数字与对应字母的时间, 评估患者心理运动速度, 注意力的定势转移与分配能力. 同NCT-A, 完成试验时间越长, 成绩越差; (3)抑制控制试验(inhibitory control test, ICT): 是应用计算机软件(下载自http://www.hecme.tv)测试受试对象的注意力及应答抑制能力. 该试验包括练习和测试两部分: 电脑屏幕上每隔500 ms出现一个字母(A-Z任意一个), 其中散在X和Y, 在练习的前半段时间内, 要求受试者每看到X或Y后即按下空格键, 以建立起对X或Y的优先应答, 后半段时间里, 要求受试者仅对X和Y交替出现时按空格键即靶标应答, 而对X后跟X或Y后跟Y时不按任何键即抑制诱饵应答. 练习完毕后进入测试部分, 分为六轮, 每轮持续约2 min, 共约15 min, 各轮中间允许受试者休息1 min, 全部测试共计40个诱饵, 212个靶标, 以1728个随机字母将诱饵(lures)或靶标(targets)分隔开, 测试完毕后, 软件自动计算诱饵应答出现的次数(以mean±SD表示)及靶标应答正确率(以%表示), 主要测试患者的警觉性、持续注意能力、反应能力及工作记忆. 诱饵应答次数越低, 靶标应答率越高, 提示患者心理智能状态越好; (4)ICT前三轮及后三轮诱饵应答次数, 这两部分测试内容是一致的, 而后三轮诱饵应答的次数减少, 即成绩的提高, 提示受试者的学习能力改善, 可有助于评估HE患者的学习能力.

统计学处理 采用SPSSl7.0统计软件进行统计分析, 上述评估项目均可以计量资料(mean±SD)表示, 3组间数据比较行多样本均数比较的方差分析, 组内数据行独立样本t检验, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 患者一般临床资料 经治疗后, OHE发病诱因均有效消除, 不存在消化系出血、感染、电解质紊乱、便秘、腹泻等. 87例患者一般临床资料: 对照组28例, 男22例, 女6例; 年龄47.8岁±8.2岁; 乙型肝炎肝硬化21例, 丙肝肝硬化3例, 酒精性肝硬化4例, 文化程度: 小学12例, 中学16例; 试验1组29例, 男24例, 女5例; 年龄49.3岁±8.2岁; 乙型肝炎肝硬化20例, 丙肝肝硬化5例, 酒精性肝硬化4例, 文化程度: 小学13例, 中学16例; 试验2组30例, 男21例, 女9例; 年龄51.2岁±8.1岁; 乙型肝炎肝硬化23例, 丙肝肝硬化4例, 酒精性肝硬化3例, 文化程度: 小学13例, 中学17例. 各组患者肝功能Child-Pugh分级均为C级.

2.2 数字连接试验A评估 与对照组(46.61 s±10.55 s)比较, 试验1、2组NCT-A所需时间均有缩短(分别为42.00 s±7.91 s, 39.20 s±9.95 s), 但仅试验2组与对照组的差异有统计学意义(P = 0.004<0.05). 试验2组优于试验1组, 但差异无统计学意义(P = 0.262). 提示冰帽+乳果糖可缩短HE患者NCT-A完成时间, 改善患者的心理运动速度(表1).

2.3 数字连接试验B评估 与对照组(120.68 s±28.68 s)比较, 试验1、2组NCT-B所需时间均有缩短(分别为114.48 s±27.05 s、100.30 s±31.32 s), 但仅试验2组与对照组的差异有统计学意义(P = 0.009<0.05). 试验2组优于试验1组, 但差异无统计学意义(P = 0.065). 提示冰帽+乳果糖可缩短患者NCT-B完成时间, 改善患者心理运动速度, 提高注意力的定势转移与分配能力(表1).

2.4 抑制控制试验6轮整体评估 与对照组(11.18次±4.39次)比较, 试验1、2组诱饵应答次数均有减少(分别为9.45次±3.95次, 7.43次±4.02次), 但仅试验2组与对照组的差异有统计学意义(P = 0.001<0.05). 而试验1、2组与对照组相比, 靶标应答正确率均有提高(分别为92.34%±4.90%、93.24%±3.31%、95.20%±3.52%), 但仅试验2组与对照组的差异有统计学意义(P = 0.007<0.05). 提示冰帽+乳果糖有利于改善患者

■相关报道

以往研究认为当显著肝性脑病(overt hepatic encephalopathy, OHE)患者的临床症状和体征消失后, 即表明患者的神经功能异常已完全纠正, 但Bajaj等经过一系列心理智能测验发现这些患者的认知功能缺损不能完全逆转, Chen等应用结构和功能性磁共振扫描亦证实了这个观点. 治疗性低温具有脑保护作用, 已应用于急性肝衰竭、缺血缺氧性脑病的治疗.

■创新盘点
本研究针对肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)主要发病病理脑水肿，脑代谢异常，在原有治疗基础上加用冰帽治疗的方法，首次应用随机对照试验研究冰帽应用于慢性肝病所致的HE，并通过心理智能测试评价患者的认知功能，从而得出治疗性低温有助于改善显著肝性脑病(overt hepatic encephalopathy, OHE)患者意识恢复后的认知功能缺损.

表 1 3组OHE患者经治疗神志恢复后心理智能测试结果

项目	对照组	试验1组	试验2组	试验1组与对照组比较P值	试验2组与对照组比较P值	试验1组与试验2组比较P值
n	28	29	30			
NCT-A(s)	46.61±10.55	42.00±7.91	39.20±9.95	0.072	0.004	0.262
NCT-B(s)	120.68±28.68	114.48±27.05	100.30±31.32	0.424	0.009	0.065
ICT诱饵 应答次数	11.18±4.39	9.45±3.95	7.43±4.02	0.117	0.001	0.064
ICT靶标应答率(%)	92.34±4.90	93.24±3.31	95.20±3.52	0.383	0.007	0.061

表 2 分段评估3组患者在ICT中诱饵应答的次数(次)

项目	对照组	试验1组	试验2组
n	28	29	30
前三轮	8.64±0.78	8.24±0.99	7.97±1.16
后三轮	7.39±0.83	6.55±1.35	5.20±1.56
*F*值	0.278	3.906	4.02
*P*值	0.600	0.053	0.05

反应能力、抑制控制力、注意力及工作记忆力(表1).

2.5 抑制控制试验分段评估 各组后三轮与前三轮诱饵应答次数均有所减少(表2), 但$P \geq 0.05$, 差异无统计学意义. 尚不能认为冰帽+乳果糖有助于改善OHE患者神志恢复后的学习能力.

3 讨论

HE是肝功能严重障碍和/或门体分流术后患者发生的以代谢紊乱为基础，神经、精神症状为主要表现的综合征. 约30%-80%的肝硬化患者会发生不同程度的HE，除非及早行肝移植治疗，否则随着病程延长，出现HE后患者1年存活率42%，3年存活率仅23%[4].

HE发病的确切分子机制还不清楚，普遍认为在高血氨症、炎症反应等因素的共同作用下，导致脑星状胶质细胞肿胀，进而引起脑水肿、颅内高压，神经细胞功能受损. 不论HE严重程度如何，均存在一定程度的脑水肿[5]. 目前治疗HE尚无特效治疗方法，综合的治疗方案主要是: (1)护肝，营养支持; (2)发现并消除其他并存的导致脑病的原因; (3)发现并治疗导致HE的诱发因素; (4)经验性药物治疗，主要包括: 减少肠道内氨及其他毒素的产生与吸收: 如乳果糖、利福昔明; 降氨药物: 如门冬氨酸鸟氨酸; 乳果糖可酸化肠道减少氨的产生和吸收，并有缓泻作用，利于肠道内氨及毒素的排泄，从而改善HE[6]. 但乳果糖有腹胀、腹部痉挛性疼痛等不良反应，部分患者不耐受. 利福昔明为广谱强效的不可吸收性抗生素，对肠道细菌生长具有抑制作用，减轻炎症反应，从而治疗并预防HE的发作[7]，应用前景好，但价格昂贵，国内尚未普及应用. 门冬氨酸鸟氨酸可通过鸟氨酸循环，将血氨转化为尿素经肾代谢从体内排出，价格亦较贵，且疗效尚未肯定，不是一线用药. 上述疗法均未直接改善HE的脑水肿、颅内高压的病理改变，且经内科合理治疗[8]、甚至肝移植后[9]，OHE患者神志虽可基本恢复，但患者的心理智能即认知功能缺损不能完全逆转，Chen等[10]应用结构和功能性磁共振扫描证实尽管在治疗OHE后神志精神明显好转，但脑功能受损确实存在. 部分患者可经神经心理测试发现异常，仍可诊断为MHE，23%-30%MHE发展为OHE[11]，且MHE会逐渐加重发展为OHE，即认知功能障碍会有累积效应. 导致OHE患者认知功能缺损且持续存在的机制目前尚不明确，可能是氨毒性未完全清除，其他毒性物质锰金属、炎症因子、硫醇蓄积颅内[12]，尸检结果及动物实验发现在海马、额皮质中，神经递质如神经类固醇、单胺、阿片样物质的发生一系列改变，均参与OHE的发病经过[13].

治疗性低温(32 ℃-35 ℃)是一种切实有效的脑保护治疗措施，现已应用于急性肝衰竭[14]、缺血缺氧性脑病[15]和严重颅脑外伤[16]等疾病的治疗中，取得了较好效果. 低温起效的机制是多重性的，他能在多个水平抑制导致脑损伤的级联反应，抑制氧化自由基和硝化自由基的产生，减少细胞外谷氨酰胺的生成，减慢蛋白质的代谢和血氨的生成，而起到明确的神经保护作用[17]. 对于急性肝衰竭，治疗性低温可保护血脑屏障，减少血氨的产生及颅内转运、减少颅内乳酸的产生、抑制星状胶质细胞水肿及致炎因子的产生，从而减轻脑水肿，改善神志[18]. 冰帽是最简单的一种选择性脑低温方法，可减缓脑代谢，减轻

脑水肿, 降低颅内压, 利于颅脑损伤及缺血性脑血管患者神智功能的恢复. 研究表明颅内温度降低1 ℃, 可使颅内代谢减少6%, 其机制是限制氧耗和糖的消耗, 减少能量耗竭的风险, 预防钠泵衰竭, 阻止钙离子内流, 从而降低脑细胞死亡的风险. 其亚细胞机制目前认为是减少兴奋性神经递质释放、自由基的生成, 减少持续电除极, 抑制炎症因子和凋亡路径, 从而稳定血脑屏障, 减轻脑水肿, 恢复颅内压[19,20]. 而研究认为延长低温治疗时间, 可有助于改善神经功能[21].

根据HE的发病机制、病理以及冰帽发挥疗效的机制, 我们经随机对照研究证实冰帽可用于治疗4级C型HE, 应用冰帽后试验组患者颅内温度降至34 ℃-35 ℃, 躯体温度降至35 ℃-36 ℃, 并稳定维持在该水平, 而对照组温度在36 ℃-38 ℃之间, 与对照组相比, 试验组患者神志恢复时间缩短2-5 h, 体温降低1 ℃-3 ℃, 治疗前后血氨降低幅度增加, 且体温降低程度越大, 神志恢复越早.

本研究各组患者神志恢复后1 wk, 我们对87例患者进行MMSE评分均高于25分, 提示HE临床治愈. 通过纸笔测试及计算机测试来评价患者的认知功能, 与对照组及试验1组相比, 试验2组患者完成NCT-A/B的时间均明显缩短, 提示冰帽联合乳果糖治疗, 有助于提高患者的心理运动速度, 改善患者注意力的定势转移与分配能力. 试验2组较对照组及试验1组相比, ICT中, 诱饵应答次数减少, 靶标应答正确率提高, 差异有统计学意义, 提示冰帽+乳果糖治疗有利于改善患者反应能力、抑制控制力、注意力及工作记忆力. 上述结果表明在综合治疗的基础上, 冰帽有助于减轻或延缓HE患者的神经认知功能减退. 研究表明ICT中后三轮诱饵应答次数较前三轮减少即提示学习能力及工作记忆改善[22], 但我们进一步分析发现三组患者在ICT时, 后三轮诱饵应答次数较前三轮相比虽有减少, 但差异无统计学意义, 提示发生OHE的患者学习能力受损, 故从单一神经心理测试即ICT结果来看, 可以认为认知能力在患者神志恢复后未完全改善, 与Bajaj的研究结果[22]一致. 但本研究发现试验1及2组后三轮诱饵应答低于前三轮, P值几乎接近0.05, 考虑学习能力是有所提高的, 分析原因: (1)样本量小, 未能完全体现总体数据, 今后可逐渐增加样本量以获得更准确性的结论; (2)评估时间短, 本研究为经治疗神志恢复后1 wk所得数据, 可通过长期随访, 评估患者的心理智能状况; (3)组合冰帽治疗HE确实有促醒、保护脑功能的作用. 既往研究表明乳果糖、利福昔明单用或两者合用未能完全恢复OHE的认知功能[23], 并不能否定还存在其他方法, 冰帽+乳果糖/利福昔明或者冰帽+乳果糖+门冬氨酸鸟氨酸可能是一种选择, 随着对HE发病机制认识的深入, 治疗HE的方法也将逐渐成熟、有效.

■应用要点

本研究以简单易行、便于基层医疗机构或家庭应用的方式即冰帽治疗HE, 并通过笔试联合计算机测试评估患者的心理智能, 提示对发病患者及早施行低温治疗, 有助于缩短病程, 减少认知功能的缺损, 即减少医疗费用、又有助于提高患者生活质量、延长生存周期.

4 参考文献

1 肝性脑病诊断治疗专家委员会, 成军, 段芳龄, 范建高, 范小玲, 郭利民, 郭明洲, 韩涛, 刘景院, 马雄, 沈薇, 施光峰, 王宪波, 乌云, 谢雯, 谢尧, 邢卉春, 袁平戈, 杨永平, 张福奎. 肝性脑病诊断治疗专家共识. 中华实验和临床感染病杂志(电子版) 2009; 3: 449-473

2 Eugene R. Schiff, Willis C. Maddrey, Michael F. Sorrell. Schiff's diseases of the liver. 11th ed. A John Wiley & Sons: Ltd., 2011: 424

3 Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975; 12: 189-198 [PMID: 1202204 DOI: 10.1016/0022-3956(75)90026-6]

4 Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, Rodés J. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1999; 30: 890-895 [PMID: 10365817]

5 Prakash R, Mullen KD. Mechanisms, diagnosis and management of hepatic encephalopathy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 515-525 [PMID: 20703237 DOI: 10.1038/nrgastro.2010.116]

6 Sharma P, Sharma BC, Agrawal A, Sarin SK. Primary prophylaxis of overt hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: an open labeled randomized controlled trial of lactulose versus no lactulose. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1329-1335 [PMID: 22606978 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07186.x]

7 Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, Sigal S, Sheikh MY, Beavers K, Frederick T, Teperman L, Hillebrand D, Huang S, Merchant K, Shaw A, Bortey E, Forbes WP. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 2010; 362: 1071-1081 [PMID: 20335583 DOI: 10.1056/NEJMoa0907893]

8 Mullen KD, Prakash RK. Management of covert hepatic encephalopathy. *Clin Liver Dis* 2012; 16: 91-93 [PMID: 22321467 DOI: 10.1016/j.cld.2011.12.006]

9 Sotil EU, Gottstein J, Ayala E, Randolph C, Blei AT. Impact of preoperative overt hepatic encephalopathy on neurocognitive function after liver transplantation. *Liver Transpl* 2009; 15: 184-192 [PMID: 19177446 DOI: 10.1002/lt.21593]

10 Chen HJ, Zhu XQ, Shu H, Yang M, Zhang Y, Ding J, Wang Y, Teng GJ. Structural and functional cerebral impairments in cirrhotic patients with a history of overt hepatic encephalopathy. *Eur J Radiol* 2012; 81: 2463-2469 [PMID: 22056487 DOI: 10.1016/j.ejrad.2011.10.008]

11 Huang E, Esrailian E, Spiegel BM. The cost-effectiveness and budget impact of competing therapies in hepatic encephalopathy - a decision analysis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1147-1161 [PMID: 17894657]

12 Shawcross DL, Wright G, Olde Damink SW, Jalan

■同行评价
肝性脑病为严重肝病的常见并发症及死因，即使患者意识恢复，但仍有认知功能障碍. 研究者在前期研究局部治疗性低温可治疗肝性脑病基础上进一步研究冰帽能否改善其认知功能，有一定临床治疗指导意义.

R. Role of ammonia and inflammation in minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 125-138 [PMID: 17260161]

13 Ahboucha S, Layrargues GP, Mamer O, Butterworth RF. Increased brain concentrations of a neuroinhibitory steroid in human hepatic encephalopathy. *Ann Neurol* 2005; 58: 169-170 [PMID: 15984019]

14 Vaquero J. Therapeutic hypothermia in the management of acute liver failure. *Neurochem Int* 2012; 60: 723-735 [PMID: 21963992 DOI: 10.1016/j.neuint.2011.09.006]

15 De Georgia MA, Krieger DW, Abou-Chebl A, Devlin TG, Jauss M, Davis SM, Koroshetz WJ, Rordorf G, Warach S. Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology* 2004; 63: 312-317 [PMID: 15277626]

16 Clifton GL, Valadka A, Zygun D, Coffey CS, Drever P, Fourwinds S, Janis LS, Wilde E, Taylor P, Harshman K, Conley A, Puccio A, Levin HS, McCauley SR, Bucholz RD, Smith KR, Schmidt JH, Scott JN, Yonas H, Okonkwo DO. Very early hypothermia induction in patients with severe brain injury (the National Acute Brain Injury Study: Hypothermia II): a randomised trial. *Lancet Neurol* 2011; 10: 131-139 [PMID: 21169065 DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70300-8]

17 González-Ibarra FP, Varon J, López-Meza EG. Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action. *Front Neurol* 2011; 2: 4 [PMID: 21331282 DOI: 10.3389/fneur.2011.00004]

18 Mpabanzi L, Jalan R. Neurological complications of acute liver failure: pathophysiological basis of current management and emerging therapies. *Neurochem Int* 2012; 60: 736-742 [PMID: 22100567 DOI: 10.1016/j.neuint.2011.10.014]

19 Feng JF, Zhang KM, Jiang JY, Gao GY, Fu X, Liang YM. Effect of therapeutic mild hypothermia on the genomics of the hippocampus after moderate traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery* 2010; 67: 730-742 [PMID: 20651628 DOI: 10.1227/01.NEU.0000378023.81727.6E]

20 Truettner JS, Alonso OF, Bramlett HM, Dietrich WD. Therapeutic hypothermia alters microRNA responses to traumatic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31: 1897-1907 [PMID: 21505482 DOI: 10.1038/jcbfm.2011.33]

21 Wang H, Olivero W, Lanzino G, Elkins W, Rose J, Honings D, Rodde M, Burnham J, Wang D. Rapid and selective cerebral hypothermia achieved using a cooling helmet. *J Neurosurg* 2004; 100: 272-277 [PMID: 15086235]

22 Bajaj JS, Schubert CM, Heuman DM, Wade JB, Gibson DP, Topaz A, Saeian K, Hafeezullah M, Bell DE, Sterling RK, Stravitz RT, Luketic V, White MB, Sanyal AJ. Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 2010; 138: 2332-2340 [PMID: 20178797 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.02.015]

23 Neff GW, Frederick RT. Assessing treatment patterns in patients with overt hepatic encephalopahty. *Hepatology* 2012; 56(Suppl S1): 945A

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 685-689
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

超声内镜辅助治疗恶性梗阻性黄疸105例

李 明, 郝 芳, 秦鸣放

李明, 郝芳, 秦鸣放, 天津市南开医院微创外科中心 天津市 300100
李明, 主要从事腹部外科疾病的微创治疗.
作者贡献分布: 李明负责研究设计、实施及数据处理、论文写作; 秦鸣放负责研究设计、实施及论文修改; 郝芳负责数据收集与统计计算.
通讯作者: 李明, 住院医师, 300100, 天津市南开区长江道6号, 南开医院天津市微创外科中心. lm_peasant@hotmail.com
收稿日期: 2013-10-04 修回日期: 2013-12-23
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

Endoscopic ultrasonography for auxiliary treatment of malignant obstructive jaundice: An analysis of 105 cases

Ming Li, Fang Hao, Ming-Fang Qin

Ming Li, Fang Hao, Ming-Fang Qin, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China
Correspondence to: Ming Li, Resident Physician, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital, 6 Changjiang Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. lm_peasant@hotmail.com
Received: 2013-10-04 Revised: 2013-12-23
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To assess the value of endoscopic ultrasonography in the auxiliary treatment of malignant obstructive jaundice.

METHODS: The clinical data for 105 patients with malignant obstructive jaundice who underwent endoscopic ultrasonography were retrospectively analyzed.

RESULTS: One hundred and five patients who were diagnosed with malignant obstructive jaundice by both endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) and endoscopic ultrasonography were included. Based on the clinical condition, endoscopic metal biliary endoprothesis was used in 61 patients, endoscopic retrograde biliary drainage in 39 patients, endoscopic nasobiliary drainage in 3 patients, and percutaneous transhepatic cholangial drainage in 2 patients. In the vast majority of patients, clinical symptoms were relieved and hepatic function was significantly recovered. The success rate of ERCP was 98.1%, and the rate of complications was 7.62%. Three patients had post-ERCP hyperamylasemia, 2 patients had mild cholangitis, and 3 patients had acute pancreatitis. During a follow-up period of 6.8 mo ± 5.3 mo (range, 1-18 mo), the half-year survival rate was 63.8% (67/105).

CONCLUSION: Endoscopic ultrasonography is a safe, effective and mildly invasive method for treating malignant obstructive jaundice.

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

Key Words: Endoscopic ultrasonography; Biliary stents; Malignant obstructive jaundice

Li M, Hao F, Qin MF. Endoscopic ultrasonography for auxiliary treatment of malignant obstructive jaundice: An analysis of 105 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 685-689 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/685.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.685

摘要

目的: 探讨超声内镜在辅助治疗恶性梗阻性黄疸中的临床价值.

方法: 回顾性分析我中心2010-02/2013-08超声内镜在105例恶性梗阻性黄疸患者中的临床效果.

结果: 105例患者行超声内镜检查均考虑恶性梗阻性疾病, 61例置入金属支架, 39例置入塑料支架, 3例患者行放置鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)引流, 2例患者行经皮经肝胆管引流术(percutaneous transhepatic cholangial drainage, PTCD)治疗, 十二指肠镜逆行胆胰管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)操作成功率98.1%(103/105). 治疗后患者临床症状均见明显缓解, 复查肝功能明显改善. 术

■背景资料
恶性胆道梗阻在临床上并不少见, 该病起病隐匿, 很多患者就诊时已发展至晚期,失去手术根治的机会, 如何解除梗阻、消除黄疸, 进行有效的胆道引流, 从而减轻患者的痛苦、提高生存质量成为了治疗此类疾病的重要目标, 随着超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)的不断发展, 该项技术在此类疾病有着越来越多的应用.

■同行评议者
李健丁, 教授, 山西医科大学第一医院放射科CT室

■研发前沿
近年来随着内镜及介入技术的发展与成熟，经内镜下胆道引流术已广泛应用于恶性胆道梗阻，他对解除梗阻、恢复胆汁引流、缓解患者的症状具有确切的疗效，EUS在这方面的辅助作用得到了越来越多的体现.

后高淀粉酶血症3例，轻度胆管炎2例，急性胰腺炎3例，并发症发生率7.62%(8/105)，随访1-18 mo(平均6.8 mo±5.3 mo)，半年生存率63.8%(67/105).

结论：超声内镜辅助治疗恶性梗阻性黄疸微创、有效.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词：超声内镜；胆道支架；恶性梗阻性黄疸

核心提示：超声内镜在恶性梗阻性黄疸的姑息治疗中具有诊断准确性高，并发症少，存活率较高，操作简便，创伤小，患者痛苦少，并且可以根据超声内镜对肿瘤进行分期，提高临床诊断准确性，有助于评估手术可行性，并可辅助制定详细方案，提供新思路.

李明，郝芳，秦鸣放. 超声内镜辅助治疗恶性梗阻性黄疸105例. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 685-689 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/685.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.685

0 引言

恶性梗阻性黄疸(malignant obstructive jaundice, MOJ)是由于恶性肿瘤侵及或压迫肝外胆道出现肝外胆管或肝内胆管阻塞所致的黄疸，临床主要表现为皮肤巩膜黄染、恶心呕吐、瘙痒、浓茶样尿及褪色样便等. 传统主要以外科手术为重要的根治方法，但手术创伤较大，尤其不适应于晚期恶病质患者. 随着内镜下逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangio pancreatography, ERCP)及超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)技术的发展，为临床治疗恶性梗阻性黄疸提供了新思路. 本文主要回顾性分析2010-02/2013-08于天津市南开医院微创外科中心治疗的105例恶性梗阻性黄疸患者，具体分析报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本组105例患者，男62例，女43例，平均年龄62.3岁(43-81岁)，均因不同程度皮肤巩膜黄染、上腹不适、消瘦乏力、恶心呕吐、浓茶样尿及陶土样便就诊. 其中97例患者根据临床表现，血液化验及B超、CT、MRCP或超声内镜(术中检查)等影像学检查定性诊断为恶性梗阻性黄疸，8例有病理学检查结果，均证实为恶性梗阻性黄疸手术治疗效果较差或拒绝行手术治疗的患者. 治疗前患者黄疸病史7-87 d，平均27.5 d. 采用日本FUJINON公司的ED-250电子十二肠镜、标准ERCP造影导管、SP702超声内镜及P2620超声探头，美国COOK公司标准乳头切开刀、针状切开刀、德国ERBE-ICC80高频电发生器、美国BOSTON公司标准及超滑亲水导丝、气囊导管、胆道扩张探条、胆管推送导管、支架释放导管、WALLSTEN和STERCKER可膨式胆道金属支架(直径8-10 mm，长度50-80 mm)、鼻胆引流管(7.0-8.5 Fr)等.

1.2 方法

1.2.1 内镜检查及治疗：常规行十二指肠镜ERCP，插镜过幽门进入十二指肠降段寻找乳头，常规行内镜下乳头括约肌切开术(endoscopic sphincteropapillotomy, EST)，插管成功同时行胆管腔内超声(intraductal ultrasonography, IDUS)检查，将微型超声探头插入胆管内自近端向远端多次扫查梗阻部位，对于部分因肿瘤转移等所致插管困难患者，在EUS指导下插管并扫查梗阻部位，之后选择扩张明显且引流范围最广的胆管，根据胆管狭窄的长度选择合适的胆道金属支架(endoscopic metal biliary endoprothesis, EMBE)或塑料支架(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)进行内引流，或先行放置鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)外引流减轻胆道压力，1 wk后再次放置胆道支架内引流. 对ERCP不成功者改行经皮经肝胆管引流术(percutaneous transhepatic cholangial drainage, PTCD)行体外引流. 所有操作均在患者及家属知情同意后进行.

1.2.2 内镜治疗后处理：术后禁食水24 h，监测血尿淀粉酶情况，观察生命指征和腹部体征的变化，对术后出现寒战发热等胆管炎或胰腺炎患者予对症治疗；对术前腹痛、发热、黄疸等症状改善情况进行评估，记录内镜后2 wk内肝功能变化[血清胆红素、谷氨酰转移酶(glutamyl transferase, ALT)、谷氨酰转移酶(gamma glutamyl transpeptidase, GGT)、碱性磷酸酶(alkline phosphatase, AKP)]，进行统计学分析.

1.2.3 疗效观察：减黄效果按以下标准评判：黄疸迅速消退，1 wk内TBIL下降超过1/3，或2 wk内降至50 μmol/L以下；一般：黄疸有所下降，1 wk内TBIL下降不足1/3，或2 wk内未降至50 μmol/L以下；无效：黄疸下降程度不明显甚至上升[1].

统计学处理 应用SPSS11.0软件进行数据，计量资料用mean±SD表示，两组均数比较用t检

表 1 患者内镜治疗前后血清胆红素、谷氨酰转移酶、谷氨酰转移酶、碱性磷酸酶变化情况 (n = 105)

	术前	术后7 d
总胆红素(μmol/L)	351.2 ± 29.1	101.9 ± 23.4[a]
直接胆红素(μmol/L)	198.6 ± 23.9	57.3 ± 16.2[a]
谷丙转氨酶(U/L)	286.3 ± 45.2	92.7 ± 20.1[a]
谷氨酰转移酶(U/L)	387.2 ± 21.3	144.9 ± 25.5[a]
碱性磷酸酶(U/L)	165.5 ± 37.6	73.3 ± 27.1[a]

[a]P<0.05 *vs* 术前.

验, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

随访时间1-18 mo(平均6.8 mo±5.3 mo), 除15例患者失访, 其余患者均得到门诊随访, 术后每1-2 mo复查肝功能, 若患者血清胆红素指数较支架后上升1-2倍以上, 则入院接受全面检查包括常规生化检查、CT或MRCP检查, 判断胆道支架阻塞者, 根据情况及患者治疗要求给予再次治疗方案. 随访期间观察患者生存时间及支架通畅时间. 半年生存率63.8%(67/105).

本组病例内镜插管成功率98.1%(103/105), 61例置入金属支架, 39例置入塑料支架, 3例患者因导丝未能通过肿瘤狭窄部位仅单纯行ENBD引流. 2例患者因肿瘤晚期恶病质严重未能成功插管改行PTCD治疗. 术后高淀粉酶血症3例, 急性胰腺炎3例, 轻度胆管炎2例, 均经非手术治疗后在24-72 h内恢复正常, 并发症发生率为7.62%(8/105), 其中无出血、穿孔等内镜相关并发症发生, 无死亡报道.

本组患者行超声内镜检查均提示为恶性梗阻性黄疸, 诊断原发性肿瘤包括胆管癌53例(其中肝门部胆管癌27例, 胆管中段癌10例, 远端胆管癌16例), 胰头癌21例, 胆囊癌17例, 其他转移性肿瘤14例. 具体超声表现为: 肿瘤多呈低回声, 少数可成高回声, 形态不规则, 内部回声不均匀, 边界不清晰, 病灶内可见散在的血流信号; 正常胆管壁结构破坏, 层次欠清晰; 可见肿瘤组织侵入周围组织.

105例患者在治疗后1wk, 黄疸明显消退, 其中满意69例(65.71%), 一般31例(29.52%), 无效5例(4.76%), 观察肝功能等指标, 可见血清胆红素、ALT、GGT、AKP(表1), 患者临床症状如皮肤巩膜黄染、腹胀、恶心呕吐、浓茶样尿、陶土样便均见改善.

3 讨论

恶性梗阻性黄疸是一类临床较常见疾病, 指由原发性胆管癌、壶腹癌、胰腺癌或肝癌压迫或其他部位癌肿淋巴结转移压迫胆道致肝内外胆管阻塞继发梗阻性黄疸[2], 主要临床表现为进行性皮肤巩膜黄染、恶心呕吐、乏力纳差、浓茶样尿、陶土样便及消瘦等. 他可引起进行性加重的梗阻性黄疸, 导致肝功能迅速恶化, 并易发生严重的感染、胃肠道出血及肾功能衰竭, 病死率很高[3]. 传统以外科手术治疗为主, 但由于就诊时已出现严重黄疸, 甚至合并严重并发症, 全身状况差, 导致手术切除率较低, 预后较差[4]. 目前随着ERCP及EUS技术的发展, 为姑息性治疗恶性梗阻性疾病提供了一种新方法, 减少患者痛苦, 尽可能延长生存期[5].

文章中涉及的105例患者均因恶性肿瘤局部浸润致胆道梗阻, 按照梗阻部位, 大致可分为高位梗阻和低位梗阻. 其中68例患者术前评估确诊为恶性肿瘤不可切除, 其余37例涉及壶腹周围癌及胰头癌者, 结合CT、EUS相关检查, 考虑肿瘤侵入门-肠系膜上静脉和肠系膜上动脉, 血管受侵犯范围较大, 无法行根治手术[6], 均行超声内镜引导下支架置入姑息性治疗.

超声内镜是在内镜引导下, 在消化系腔内对消化系及消化系周围的脏器进行超声扫描的一种方法. 我中心通常采用7.5或12 MHz的超声内镜, 此频率能清楚显示3-6 cm范围的病灶, 更适用于诊断肿瘤性疾病有无淋巴结转移. 在超声内镜指导下插管成功后, 应用微型超声探头插入胆管内行腔内超声扫查, 其图像分辨力高, 可以更加准确的扫查胆管全长, 有利于发现小的病灶, 早期发现胆管癌, 并可对胆管癌进行分期, 较准确地显示肿瘤病变的侵犯深度[7]. 正常胆管壁呈高、低、高3层回声结构, 恶性胆道梗阻的超声图像[8]为正常胆管壁结构破坏, 管壁可见边缘不规则的低回声肿块, 内部回声不均匀, 浸润至周围组织. 并且超声内镜也有利于诊断其他肿瘤所致周围组织浸润及淋巴结转移. 本组105例患者术中检查均考虑恶性梗阻性病变, 并在超声内镜指导下放置支架. 此外, 鉴于不明原因的消化道疾病, 均可行超声内镜检查, 提高临床诊断的准确性[9], 并有助于早期发现肿瘤及早治疗.

本组3例肝门部胆管癌患者因导丝未能通过肿瘤狭窄部位, 仅在超声内镜引导下单纯放置ENBD外引流. 61例置入金属支架, 39例置入塑

■相关报道

EUS诊断胆管恶性疾病的总体准确性、敏感性、阳性预测值、阴性预测值及特异性分别为86.0%-94.1%、82.3%-84.0%、80.0%-84.2%, 85.0%-93.3%, 90.0%-96.0%. 同时EUS对胆道恶性狭窄患者的T、N、M分期具有很高的准确性, 对于恶性梗阻性黄疸的姑息治疗具有很高的临床辅助价值.

■**创新盘点**
国内通过EUS辅助姑息性治疗恶性胆道梗阻的报道较少，本研究中EUS的辅助作用，为恶性梗阻性黄疸的治疗提供依据，为独到之处，具备诸多优点，为治疗此类疾病的突破与亮点.

料支架，均行内引流，有效地防止胆汁的肝肠循环被阻断. 有学者认为[10]，金属支架对于生存期超过6 mo的患者总花费及住院天数低于使用塑料支架者，而生存期不超过6 mo者则应用塑料支架更为合适. 根据我中心治疗经验，胆道金属支架及塑料支架可适用于无法根治性切除的恶性胆管梗阻患者，预计存活3-6 mo或以上患者. 一般塑料支架使用10-11.5 Fr支架，引流效果好，对于已堵塞的支架可根据情况应用导丝疏通及更换新支架或放置多支架，同时在超声内镜引导下准确放置支架位置，一般支架长度先端需越过梗阻段上缘1 cm，尾端要距乳头外1 cm. 胆道金属支架目前较多采用全覆膜可回收金属支架，根据肿瘤继续生长的可能选择合适的直径及位置，梗阻两端的支架长度应在2 cm以上为宜，若支架阻塞，可再置入一个内径较大或多根塑料支架引流，并根据具体情况决定再次治疗与否及治疗方法[11,12].

文中2例患者因肿瘤晚期恶病质严重未能成功插管改行PTCD治疗，亦不失为一种较好的减黄方法，取得一定的疗效，但穿刺管有滑脱的可能性，且不利于长期置管，这些都使其临床治疗范围相对狭窄[13].

ERCP术后的早期并发症有出血、穿孔、急性胆管炎、急性胰腺炎或高淀粉酶血症等. 出血和穿孔大多与术者的技术水平和临床经验有关，本组患者中无出血和穿孔发生. 本组105例患者，总的并发症发生率为7.62%(8/105)，无死亡报道，内镜术后高淀粉酶血症3例，急性胰腺炎3例，均经非手术治疗后在24-72 h内恢复正常. 轻度胆管炎2例，国内有文献报道，ERCP术后胆管炎或胆管感染的发生率为0.35%-20.40%[14]，这可能与术后早期金属支架膨胀不全，引流较差有关. 晚期并发症主要是支架阻塞.

本组病例半年生存率为63.8%(67/105). 术后患者的生存期与原发肿瘤的情况、恶性胆道梗阻的肝内外转移等密切相关. 造成患者死亡的主要原因是肿瘤自身的生长，支架治疗仅能解除胆道梗阻，而对肿瘤本身并无直接的治疗作用，为延长患者的生存期，还应配合其他治疗，如动脉灌注化疗、定位放疗、生物免疫治疗、射频消融、光动力疗法等[11].

在行内镜操作时应注意以下几点：支架长度的选择要合适，精确测量梗阻或狭窄段上缘到乳头的距离是选择合适支架的关键，在此长度上增加1 cm左右的支架较为合适；进行合理、适当的EST可以使支架的放置更为容易，并且有利于术后胆道的引流；必要时行胆道扩张，在实际操作中常会遇到支架难以越过狭窄段的情况，这时可使用胆道扩张探条或气囊行胆道扩张，多可完成支架的放置；如为高位胆道梗阻，支架末端不必暴露于乳头外，可置于胆管内[15].

超声内镜联合胆道支架治疗恶性梗阻性黄疸患者的技术已日渐成熟，相对于传统手术而言，其诊断准确性高，并发症少，存活率较高，操作简便，创伤小，患者痛苦少，并且可以根据超声内镜对肿瘤进行分期[16]，提高临床诊断准确性，有助于评估手术可行性，并对姑息性治疗恶性梗阻性疾病制定详细方案，提供新思路.

4 参考文献

1 龚彪. 经内镜胆道金属支架引流术治疗恶性胆道梗阻的价值. 实用肿瘤杂志 2007; 22: 911-913

2 Oran NT, Oran I, Memis A. Management of patients with malignant obstructive jaundice. Nursing perspective from the interventional radiology room. *Cancer Nurs* 2000; 23: 128-133 [PMID: 10763284]

3 张景成, 康丽, 王悦友, 田国利, 董来春. 经内镜塑料支架置入治疗恶性胆道梗阻17例. 中国中西医结合消化杂志 2009; 17: 61-62

4 黄志强. 胆道癌外科治疗世纪回眸. 中华普通外科杂志 2001; 16: 69-72

5 Domagk D, Wessling J, Reimer P, Hertel L, Poremba C, Senninger N, Heinecke A, Domschke W, Menzel J. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography, intraductal ultrasonography, and magnetic resonance cholangiopancreatography in bile duct strictures: a prospective comparison of imaging diagnostics with histopathological correlation. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1684-1689 [PMID: 15330902]

6 Varadhachary GR. Preoperative therapies for resectable and borderline resectable pancreatic cancer. *J Gastrointest Oncol* 2011; 2: 136-142 [PMID: 22811843 DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.030]

7 李焕喜, 秦鸣放, 王震宇, 王光霞. 胆管腔内超声对胆管良恶性狭窄的鉴别诊断. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2515-2517

8 Kim HM, Park JY, Kim KS, Park MS, Kim MJ, Park YN, Bang S, Song SY, Chung JB, Park SW. Intraductal ultrasonography combined with percutaneous transhepatic cholangioscopy for the preoperative evaluation of longitudinal tumor extent in hilar cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 286-292 [PMID: 19780880 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.05944.x]

9 Victor DW, Sherman S, Karakan T, Khashab MA. Current endoscopic approach to indeterminate biliary strictures. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 6197-6205 [PMID: 23180939 DOI: 10.3748/wjg.v18.i43.6197]

10 Nguyen K, Sing JT. Review of endoscopic techniques in the diagnosis and management of cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2995-2999 [PMID: 18494049 DOI: 10.3748/wjg.14.2995]

11 Bruha R, Petrtyl J, Kubecova M, Marecek Z, Dufek V, Urbanek P, Kodadova J, Chodounsky Z. Intraluminal brachytherapy and selfexpandable stents in nonresectable biliary malignancies--the question of long-term palliation. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 631-637 [PMID: 11462891]
12 Maluf-Filho F, Retes FA, Neves CZ, Sato CF, Kawaguti FS, Jureidini R, Ribeiro U, Bacchella T. Transduodenal endosonography-guided biliary drainage and duodenal stenting for palliation of malignant obstructive jaundice and duodenal obstruction. *JOP* 2012; 13: 210-214 [PMID: 22406603]
13 夏永辉, 徐克, 苏洪英, 冯博. 晚期恶性梗阻性黄疸经皮介入治疗近期并发症的临床观察及处理. 当代医学 2009; 3: 88-90
14 李兆申, 许国铭, 孙振兴, 邹晓平, 金震东, 邹多武. 诊断性与治疗性ERCP早期并发症与处理. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 77-80
15 吴瑜, 秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁. 内镜金属支架姑息性治疗胆管远端恶性梗阻272例分析. 中国内镜杂志 2011; 17: 383-385
16 Choi JM, Kim JH, Kim SS, Yu JH, Hwang JC, Yoo BM, Park SH, Kim HG, Lee DK, Ko KH, Yoo KS, Park do H. A comparative study on the efficacy of covered metal stent and plastic stent in unresectable malignant biliary obstruction. *Clin Endosc* 2012; 45: 78-83 [PMID: 22741136 DOI: 10.5946/ce.2012.45.1.78]

■同行评价
本文通过分析EUS在辅助治疗恶性梗阻性黄疸中的临床应用, 立题较新颖, 具有一定的指导意义.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》于 2012-12-26 获得 RCCSE 中国权威学术期刊 (A+) 称号

本刊讯 《世界华人消化杂志》在第三届中国学术期刊评价中被武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)评为“RCCSE中国权威学术期刊(A+)”. 本次共有6 448种中文学术期刊参与评价, 计算出各刊的最终得分, 并将期刊最终得分按照从高到低依次排列, 按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围. 其中A+(权威期刊)取前5%; A(核心期刊)取前5%-20%; A-(扩展核心期刊)取前20%-30%; B+(准核心期刊)取前30%-50%; B(一般期刊)取前50%-80%; C(较差期刊)为80%-100%.

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 690-694
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

应用SELDI-TOF-MS技术筛选肝癌遗传性血清蛋白标志物

邓敬桓, 陈智平, 李 山, 秦 雪, 黄东萍

■背景资料
广西是全国乃至全球肝癌高发区之一, 乙型肝炎病毒感染是广西肝癌高发的主要致病因子, 在相同民族、相同生活环境、生活水平、生活习惯和生活条件下, 存在许多肝癌易发家系, 也有大量无癌家系.

邓敬桓, 陈智平, 黄东萍, 广西医科大学公共卫生学院 广西壮族自治区南宁市 530021
李山, 秦雪, 广西医科大学第一附属医院检验科 广西壮族自治区南宁市 530021
邓敬桓, 助理研究员, 硕士, 主要从事肝病蛋白组学的研究.
广西自然科学基金资助项目, No. 2011GXNSFA018271
作者贡献分布: 论文写作与质谱分析由邓敬桓完成; 课题设计由陈智平完成; 试剂由秦雪提供; 数据分析由李山与黄东萍完成.
通讯作者: 陈智平, 教授, 硕士生导师, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学公共卫生学院.
nanyangtang@yahoo.com.cn
电话: 0771-5358877
收稿日期: 2013-12-06 修回日期: 2013-12-30
接受日期: 2014-01-08 在线出版日期: 2014-02-18

Detection of hereditary serum markers for liver cancer using SELDI-TOF-MS protein chip technology

Jing-Huan Deng, Zhi-Ping Chen, Shan Li, Xue Qin, Dong-Ping Huang

Jing-Huan Deng, Zhi-Ping Chen, Dong-Ping Huang, College of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Shan Li, Xue Qin, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: the Guangxi Natural Science Foundation, No. 2011GXNSFA018271
Correspondence to: Zhi-Ping Chen, Professor, College of Public Health, Guangxi Medical University, 22 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. nanyangtang@yahoo.com.cn
Received: 2013-12-06 Revised: 2013-12-30
Accepted: 2014-01-08 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To detect specific serum biomarkers for liver cancer using surface enhanced laser desorption inhibition time-of-flight ionization mass spectrometry (SELDI-TOF-MS), and establish a serum protein pattern for screening liver cancer prone families.

METHODS: Serum samples collected from 30 patients from liver cancer prone families and 30 patients from liver cancer-free families were detected by SELDI-TOF-MS. The data were analyzed was Biomarker Wizard and BPS software to establish a serum protein pattern for screening liver cancer prone families. The pattern was evaluated by a blind test.

RESULTS: A total of 20 peaks showed significant differences between the two groups, among which 4 (9645.48, 3960.65, 7895.66, 5916.07 kDa) were chosen to establish a serum protein pattern for screening liver cancer prone families. The accuracy, sensitivity and specificity of the pattern were 92% (55/60), 93% (28/30) and 90% (27/30), respectively. The blind test showed that the sensitivity and specificity were 92% (23/25) and 90% (18/20), respectively.

CONCLUSION: SELDI-TOF-MS has a high sensitivity and specificity in screening specific hereditary serum biomarkers for liver cancer.

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

Key Words: Liver cancer; Familial pedigree; Surface enhanced laser desorption ionization time of fight mass spectrometry; Serum biomarker

Deng JH, Chen ZP, Li S, Qin X, Huang DP. Detection of hereditary serum markers for liver cancer using SELDI-TOF-MS protein chip technology. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 690-694 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/690.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.690

摘要

目的: 采用表面增强激光解析/电离飞行时间质谱技术(surface enhanced laser desorption inhibition time of flight ionization mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)检测肝癌易发家系患者和无癌家系患者血清蛋白生物标志物, 比较两者间的蛋白差异, 建立筛选血清蛋白质图谱模型并初步验证.

方法: 选择30例肝癌易发家系患者, 30例无癌

■同行评议者
程树群, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

家系患者, 应用SELDI-TOF-MS技术及相应的计算机软件进行比较分析, 检测肝癌易发家系患者血清蛋白质的特异性生物标志, 建立肝癌易发家系患者的筛选模型, 并对其进行了双盲法验证.

结果: 肝癌易发家系组与对照组共有20个蛋白质差异有显著性, 以其中4个蛋白标志物(9645.48、3960.65、7895.66和5916.07 kDa), 建立的筛选模型检测灵敏度为93%(28/30), 特异性为90%(27/30), 准确率为92%(55/60). 盲法验证, 灵敏度为92%(23/25), 特异性为90%(18/20).

结论: SELDI-TOF-MS技术具有高灵敏度和特异性, 在肝癌易发家系的血清蛋白特异性生物标志物的筛选等方面具有较好的应用前景.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝癌; 家系; 表面加强激光解吸电离-飞行时间质谱; 血清蛋白标志物

核心提示: 本研究筛选出的20个有统计学意义的差异性蛋白峰可能就是我们要寻找的遗传性蛋白质峰, 肝癌易发家系组与无癌家系组在血清蛋白组学方面确实存在差异, 再次验证原发性肝癌的发生与遗传具有密切相关性.

邓敬桓, 陈智平, 李山, 秦雪, 黄东萍. 应用SELDI-TOF-MS技术筛选肝癌遗传性血清蛋白标志物. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 690-694 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/690.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.690

0 引言

肝癌易发家系包括肝癌高发家系和肝癌非高发家系, 相关研究表明[1], 肝癌的发生发展是多因素参与的多环节的病理过程, 除了与病毒寄生虫和细菌的感染、黄曲霉毒素的摄入、水源污染以及吸烟喝酒这些外环境致癌因素有关, 自身遗传因素也具有一定的相关性. 本实验采用表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱技术, 以肝癌无癌家系为参照, 筛选出肝癌遗传性的血清蛋白标志物, 为将来建立能够判断肝癌易发家系发生肝癌危险性的预测体系奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌易发家系包含肝癌高发家系和肝癌非高发家系两类. 肝癌高发家系: 直系亲属中发生过2例或2例以上原发性肝癌病例的家系. 肝癌非高发家系: 直系亲属中发生过1例原发性肝癌病例的家系. 无癌家系: 直系亲属中未发生过任何恶性肿瘤病例的家系. 广西医科大学在承担国家"六五"和"七五"攻关课题时, 已在肝癌高发区建立了癌症登记网, 掌握了肝癌高发区中肝癌高发家系、肝癌非高发家系和无癌家系成员名单, 在患者经病理或临床诊断确诊且未经治疗的情况下说明了采血的要求, 给予知情权, 并征得研究对象同意, 在2010-01/2013-03期间, 采集到肝癌高发家系患者30例血清, 肝癌非高发家系患者25例血清, 肝癌无癌家系患者50例血清. 其中以相同的生活环境、生活习惯、相同职业、相同民族、相同性别、年龄±5岁作为配对条件, 选取肝癌高发家系患者15例, 肝癌非高发家系患者15例作为肝癌易发家系组, 对照组肝癌无癌家系患者30例, 用于筛选模型的建立, 剩余样本用于所建模型的双盲法验证. 尿素、3-环乙胺-1-丙磺酸、乙腈、二硫苏糖醇、醋酸钠、三氟乙酸、羟乙基哌嗪乙磺酸、芥子酸、超纯水均购自美国西格玛(Sigma)公司; 蛋白芯片生物系统及CM10芯片购自美国赛弗吉(Ciphergen)公司.

1.2 方法

1.2.1 样品收集与预处理: 所有血样均于清晨空腹采集, 放置4 ℃冰箱2 h后, 1000 r/min离心10 min, 冰浴上分装血清于-80 ℃低温冰箱保存备用. 检测前取出血清样品, 置冰盒上溶解; 以1000 r/min, 4 ℃离心2 min; 取血清10 μL, 加入2倍体积9 mol/L Urea缓冲液(含DTT)稀释, 将样品冰浴震荡30 min; 将30 μL上述变性后样品加入360 μL的50 mmol/L NaAC(pH 4.0)缓冲液, 立即混匀.

1.2.2 芯片预处理、上样和洗脱: 将CM10芯片装入生物芯片处理器, 每孔加入200 μL 50 mmol/L NaAC(pH 4.0)缓冲液, 震荡5 min, 甩掉缓冲液. 重复上述操作一次. 在芯片处理器每孔中加入100 μL处理好的样品, 4 ℃震荡1 h; 弃去未结合样品, 每孔加入200 μL的NaAC缓冲液, 震荡5 min, 甩去孔中液体, 重复操作一次; 每孔加入200 μL 1 mmol/L HEPES, 然后立刻甩出; 取出芯片待干后, 在每个加样孔上加SPA 0.5 μL; 待干后, 重复加SPA一次.

1.2.3 芯片检测、数据采集和参数设置: 采用PBS Ⅱ C型蛋白芯片生物系统读取芯片信息. 用加有标准蛋白质的All-in-one芯片校正仪器. 芯片阅读仪参数设置如下: 激光强度185, 检测灵

■研发前沿
蛋白质的差异表达与肝癌发生发展存在着密切关系, 这些易发家系家庭成员遗传的不同基因所表达的不同蛋白质本身可能就具有发生肝癌的危险性.

■**相关报道**
肖开银等对101例家族聚集性肝癌家族史和临床进行分析分析, 显示肝癌是遗传和环境因素相互作用的结果.

表 1 CM10芯片筛选肝癌易发家系组和肝癌无癌家系组血清差异蛋白的表达

差异蛋白峰的相对分子质量	*P*值	蛋白质平均强度		差异蛋白质的表达变化
		肝癌易发家系组	肝癌无癌家系组	
4700.91	0.00	1.13	3.62	↓
9125.89	0.00	1.89	3.21	↓
5317.22	0.00	4.65	8.04	↓
4856.19	0.00	3.14	2.28	↑
9645.48	0.00	28.1	4.95	↑
8282.61	0.00	4.12	6.16	↓
7679.40	0.00	3.74	4.11	↓
3960.65	0.00	0.27	3.58	↓
9179.55	0.00	8.11	6.96	↑
4760.91	0.00	4.39	2.85	↑
5916.07	0.00	3.35	10.65	↓
7554.67	0.00	1.95	1.15	↑
7895.66	0.00	11.49	3.27	↑
4598.00	0.00	23.47	27.60	↓
6315.22	0.00	10.54	6.96	↑
2742.85	0.00	8.05	5.29	↑
4681.23	0.00	1.18	2.47	↓
7847.62	0.00	3.14	1.57	↑
3565.86	0.00	3.89	1.78	↑
5701.52	0.01	2.71	4.92	↓

敏度8, 优化范围2000-10000, 最高相对分子质量50000, 芯片上的每个点采集130次.

1.2.4 *分析差异蛋白*: 用Proteinehip Software3.2 Software(BPS)对图谱进行标准化后, 筛选出有统计学意义的差异蛋白峰, 然后用Biomarker Wizard软件快速计算出有统计学意义相同相对分子质量的蛋白在肝癌易发家系组与对照组间峰值差异的表达强度, 最后以肝癌无癌家系组的蛋白质平均强度数值为参照进行比对两组差异蛋白质的表达变化.

1.2.5 *诊断模型的建立与验证*: 用Biomarker Pattern软件对两组间相同相对分子质量的差异表达蛋白峰值做线性分类分析, 经过进一步优化实验参数, 确定最佳的分类模型, 即诊断模型并输出原始判别结果, 用BPS进行交叉验证并输出结果, 以交叉验证为最终结果.

1.2.6 *盲筛法验证诊断模型用剩余样本*: 肝癌易发家系25例, 其中肝癌高发家系15例、肝癌非高发家系10例, 肝癌无癌家系组20例, 对上述建立的诊断模型进行盲法验证(masked analysis), 验证该模型的特异性和灵敏度.

统计学处理 数据的统计分析由统计软件包SPSS10.0完成. 两组间比较用*t*检验, $P<0.05$为差异有统计学意义.

表 2 模型中的4个蛋白所占的重要分值

Variable(变量)	Score(分值)	蛋白所占分值具体图示
M9645_48	100.00	
M3960_65	87.62	
M5916_07	67.40	
M7895_66	44.83	

2 结果

2.1 *蛋白质峰的初步筛选和评价* 在相对分子质量2000-50000范围内共检测到45个蛋白质峰, 其中20个在两组间的比较差异有统计学意义($P<0.05$, 表1).

2.2 *诊断模型的建立与验证* 将这些差异峰用BPS软件进行分析, 自动选取其中4个差异峰(9645.48、3960.65、5916.07、7895.66 kDa), 模型中的4个蛋白所占的重要分值(表2), 建立了筛选肝癌易发家系的诊断模型(图1), 此模型的根节点为9645.48 kDa, 首先根据此峰值强度, 28例标本被划分到左侧的枝结点, 32例被划分到右侧的枝结点, 又根据3960.65、5916.07、7895.66 kDa的峰值强度, 将标本进一步划分, 最终将60例标本划分开. 经交叉验证该模型区分肝癌易发家系组和肝癌无癌家系组, 30例肝癌易发家系组有28例被正确划分, 30例肝癌无癌家系组有27例被正确划分, 该模型检测灵敏度为93%(28/30), 特异性为90%(27/30), 准确率为92%(55/60). 用该模型对肝癌易发家系25例(其中肝癌高发家系15例、肝癌非高发家系10例), 肝癌无癌家系组20例进行盲法验证, 23例肝癌易发家系, 18例肝癌无癌家系被区分正确, 盲法验证, 灵敏度为92%(23/25), 特异性为90%(18/20).

3 讨论

蛋白质组是连接基因序列与细胞功能的桥梁. 近年来, 人们认识到仅通过DNA序列来解释生物功能是不可能的, 蛋白质才是生命功能的主要执行者. 而蛋白质组的研究方法现已广泛应用于临床各领域的研究[2]. 特别是对原发性肝癌的发生、发展等方面的相关研究.

原发性肝癌的发生是多因素相互作用, 多途径多步骤长期作用的结果, 有外部的环境因素包

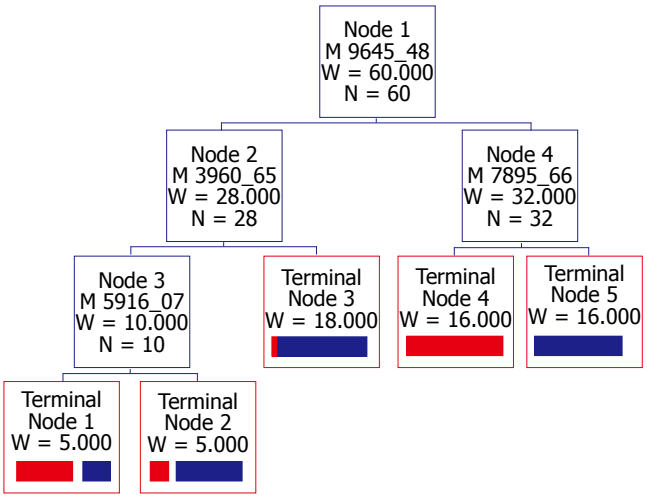

图 1 肝癌易发家系血清诊断筛选模型.

■创新盘点
本研究采用SELDI蛋白芯片技术分析广西肝癌高发区肝癌易发家系和无癌家系肝癌发展过程的血清蛋白质组, 并鉴定出蛋白质谱中差异蛋白, 探寻肝癌遗传性相关的蛋白标志.

括病毒感染, 黄曲霉毒素, 农村饮用水的污染, 饮酒、吸烟, 幽门螺旋杆菌肝吸虫感染等[3-8]; 而内部因素如自身的遗传因素, 在原发性肝癌的发生机制方面也起了非常重要的作用. 广西医科大学在承担国家“六五”和“七五”攻关课题以及进行的一系列研究中发现, HBV感染是广西肝癌高发的主要致病因子在相同民族、相同生活环境、生活水平、生活习惯和生活条件下, 出现癌家族聚集性[9], 为揭示这一流行病学现象. 本实验从蛋白质组水平进行研究, 以30例肝癌易发家系患者、30例无癌家系患者作为研究对象, 采用(SELDI-TOF-MS)及CM10蛋白芯片筛选血清中蛋白质的差异表达, 并找到表达明显改变的标志蛋白, 实验结果发现肝癌易发家系组与无癌家系组在相对分子质量2000-50000范围内共检测到45个蛋白质峰, 其中20个在两组间的比较差异, 有统计学意义(P<0.05), 筛选出的这些有统计学意义的蛋白质峰可能就是我们要寻找的遗传性蛋白质峰. 运用BPS软件筛选出其中的4个蛋白标志物(9645.48、3960.65、7895.66和5916.07 kDa), 建立的血清蛋白质图谱诊断模型, 检测的灵敏度为93%(28/30), 特异性为90%(27/30), 准确率为92%(55/60), 能较好地将两组区分开来, 且经过盲筛将25例肝癌易发家系, 20例肝癌无癌家系组对建立的血清蛋白质图谱诊断模型进行验证, 得到较高灵敏度92%(23/25)与特异性(23/25), 说明模型的合理性和可操作性, 同时这也表明肝癌易发家系组与无癌家系组在血清蛋白组学方面确实存在差异, 原发性肝癌的发生与遗传具有密切相关性. 肝癌易发家系的遗传基因可能在抑癌基因和癌基因上出现失衡或出现遗传易感性[10], 陈圆圆等[11]和肖开银等[12]对广西扶绥县肝癌高发家系遗传基因的相关研究显示谷胱甘肽转硫酶M1(glutathione-S-transferase M1, *GSTM1*)和谷胱甘肽转硫酶T1(glutathione-S-transferase T1, *GSTT1*)基因多态性与肝癌家族聚集性相关; *GSTM1*和*GSTT1*基因联合缺失与肝癌的发生呈显著正相关, 诸如*GST*基因多态性、第10号染色体缺失[13]、*p53*、*p21*基因表达差异[14]、细胞色素*P4501A*基因多态性、乙醛脱氢酶2基因多态性[15]等与肝癌之间存在密切相关, 其表达的相关蛋白质就可能异于无癌家系患者, 增加了原发性肝癌发生的危险性.

为了使筛选的遗传性的血清蛋白标志物更具有代表性, 做者将继续收集标本, 扩大样本例数, 验证其准确性, 并做相关性的生物学功能进行鉴定, 为将来建立能够判断肝癌易发家系发生肝癌危险性的预测体系奠定基础.

4 参考文献

1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90 [PMID: 21296855]
2 牟文凤, 王亚秋, 孙佰秀, 王斌. SELDI蛋白质芯片技术检测膝骨性关节炎患者黏附关节液中蛋白质的差异改变. 中国现代医学杂志 2008; 18: 2097-2099
3 吴江南, 陈裕明, 王翠玲. 丙型、乙型肝炎病毒对原发性肝癌影响的荟粹分析. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 137-140
4 李瑗, 苏建家, 曹骥, 欧超, 仇效坤, 班克臣, 杨春, 覃柳亮, 罗丹, 岳惠芬, 张丽生, 万大方, 顾健人. 用cDNA阵列技术研究黄曲霉毒素B1诱发树鼩肝癌形成过程中的基因变化. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 96-99
5 苏德隆. 饮水中蓝绿藻毒素与肝癌的研究. 医学研究通讯 2001; 30: 19-20
6 汤伯明, 张竹梅, 王其军, 王启敏, 朱鑫, 樊巍巍, 张小燕, 边建超. 饮酒与肝癌的病例对照研究. 实用肿瘤学杂志 2002; 16: 88-91
7 方俊, 刘伯齐, 张庆镐, 蔡英姬. 吸烟与肝癌关系的病例对照研究. 延边大学医学学报 2003; 26: 106-108
8 黎学铭, 谭裕光, 张鸿满, 欧阳颐, 阮廷清, 许洪波. 广西华支睾吸虫病流行及危险因素分析. 应用预防医学

■同行评价
肝癌发生与家属遗传性有相当的关系, 本研究科学性强. 研究方法正确, 数据可靠, 结论可信, 通过采用表面增强激光解析/电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS) 检测肝癌易发家系患者和无癌家系患者血清蛋白生物标志物, 是目前研究的热点, 从蛋白组学方面寻找肝癌发生相关蛋白对临床和基础研究都起重要作用.

2006; 12: 334-337
9 肖开银, 黎乐群, 彭民浩, 梁水庭, 覃晓, 陈希刚, 郭雅, 覃忠, 彭涛, 陈滨, 苏智雄, 尚丽明. 家族聚集性肝癌101例家族史和临床分析. 广西医科大学学报 2005; 22: 224-226
10 靳磊, 袁晟光. 肝癌相关新基因的研究进展. 临床医学工程 2013; 20: 380-382
11 陈圆圆, 丁飞, 谢裕安. 广西扶绥县肝癌高发家系谷胱甘肽转硫酶GSTM1和GSTT1基因多态性的研究. 中国癌症防治杂志 2012; 4: 140-144
12 肖开银, 黎乐群, 彭民浩, 覃晓, 彭涛, 郭雅, 陈滨, 卢景宁, 秦权林, 桂文波. GSTM1、GSTT1基因多态性与家族聚集性肝癌的遗传易感性研究. 中国癌症防治杂志 2011; 3: 287-290
13 颜见, 姚志成, 钟跃思, 李明亮, 陈骋, 许瑞云, 邓美海. 第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因在家族聚集性肝癌组织中的表达及临床意义. 中华实验外科杂志 2012; 29: 1892-1895
14 林源, 莫显伟. 家族聚集性肝癌组织p53、p21、C-erbB-2基因表达分析. 广西医科大学学报 2006; 23: 94-95
15 崔美兰, 朴熙绪, 金永日, 李成浩, 金爱花. 延边地区朝鲜族及汉族男性乙醛脱氢酶2基因多态性与酒精性肝病的关系. 延边大学医报 2011; 34: 51-54

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

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

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 695-699
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

INPP4B和PTEN蛋白在肝细胞癌中的表达及其意义

张洋洋, 李建生, 贺德志, 蒋 冬

张洋洋, 李建生, 贺德志, 蒋冬, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室 河南省郑州市 450052
张洋洋, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究.
河南省教育厅科学技术研究重点基金资助项目, No.14A320040
作者贡献分布: 此课题由李建生、贺德志及张洋洋设计; 研究过程由张洋洋与蒋冬操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由李建生与贺德志提供; 数据分析由张洋洋与蒋冬完成; 本论文写作由张洋洋完成; 李建生审校.
通讯作者: 李建生, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市二七区建设东路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科.
lijiansheng@medmail.com.cn
电话: 0371-66862052
收稿日期: 2013-11-28 修回日期: 2013-12-14
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

Significance of expression of INPP4B and PTEN in hepatocellular carcinoma

Yang-Yang Zhang, Jian-Sheng Li, De-Zhi He, Dong Jiang

Yang-Yang Zhang, Jian-Sheng Li, De-Zhi He, Dong Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: the Scientific Research Key Project Fund of Education Department of Henan Province, No. 14A320040
Correspondence to: Jian-Sheng Li, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Erqi District, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lijiansheng@medmail.com.cn
Received: 2013-11-28 Revised: 2013-12-14
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of INPP4B and PTEN in hepatocellular carcinoma (HCC) and to analyze their correlation with clinicopathological parameters of HCC patients.

METHODS: By immunohistochemistry, the expression of INPP4B and PTEN was detected in 74 HCC tissue, 74 matched tumor-adjacent atypical hyperplasia tissues and 30 normal tissues. Correlations between INPP4B and PTEN expression and clinicopathological parameters were analyzed by statistical analysis.

RESULTS: The levels of INPP4B and PTEN expression in HCC were significantly lower than those in histologically normal hepatic tissues (both $P < 0.05$). INPP4B and PTEN protein expression in HCC was not statistically correlated with age, sex, or cirrhosis background, but was significantly correlated with degree of differentiation and presence of tumor capsule. INPP4B protein expression, not PTEN protein expression, was correlated with tumor size. There was a positive correlation between INPP4B protein expression and PTEN protein expression in HCC ($r = 0.561$, $P = 0.000$).

CONCLUSION: The low expression of INPP4B and PTEN proteins in HCC and their positive correlation suggest that they are possibly involved in the occurrence and development of HCC.

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

Key Words: Hepatocellular carcinoma; INPP4B; PTEN; Immunohistochemistry

Zhang YY, Li JS, He DZ, Jiang D. Significance of expression of INPP4B and PTEN in hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 695-699 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/695.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.695

摘要

目的: 通过检测肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者肝癌、癌旁组织及正常肝组织中Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶(inositol polyphosphate 4-phosphatase type Ⅱ, INPP4B)和磷酸酯酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)的表达情况, 结合HCC的临床病理特征, 探讨其在HCC发生发展中的作用及意义.

方法: 应用免疫组织化学方法分别检测74例肝癌组织、对应癌旁组织及30例正常肝脏组织中INPP4B和PTEN的表达情况.

结果: (1)肝癌组织中INPP4B和PTEN的表达水平显著低于癌旁组织和正常肝脏组织(均

■背景资料
Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶(inositol polyphosphate 4-phosphatase type Ⅱ, INPP4B)是一种新发现的脂质磷酸酶, 作为一个潜在的肿瘤抑制因子, 在前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、白血病等多种恶性肿瘤中表达缺失. 磷酸酯酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)是一种位于10号染色体(10q23)的抑癌基因, 兼具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性参与细胞周期以及多种信号传导途径的负调控, 抑制细胞恶性转化. INPP4B和PTEN的缺失与肿瘤的发生发展密切相关. 目前国内外文献甚少有两者在肝癌中的表达及相关性研究报道.

■同行评议者
李孟森, 教授, 海南医学院/海南省肿瘤发生和干预重点实验室

■研发前沿
通过免疫组织化学法检测INPP4B和PTEN在肝癌组织、对应癌旁组织及正常肝脏组织中的表达，并结合患者临床病理资料进行分析，探讨两者的表达特点及意义.

$P<0.05$); (2)INPP4B和PTEN的表达与HCC患者的性别、年龄、肝硬化病史无关，与分化程度、包膜完整程度相关. INPP4B的表达与肿瘤直径相关，PTEN的表达与肿瘤直径无关; (3)肝癌组织中INPP4B和PTEN的表达呈正相关($r = 0.561$, $P = 0.000$).

结论: INPP4B和PTEN在肝癌组织中的低表达及两者表达呈正相关提示两者可能共同参与了HCC的发生发展.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 肝细胞癌; Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶; 磷酸酯酶; 免疫组织化学

核心提示: Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶(inositol polyphosphate 4-phosphatase type Ⅱ, INPP4B)和磷酸酯酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)在肝癌组织中的表达明显减低，且两者表达呈正相关; INPP4B和PTEN的表达与肿瘤分化程度、包膜完整程度相关; 提示两者可能共同参与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)的发生发展及侵袭转移.

张洋洋, 李建生, 贺德志, 蒋冬. INPP4B和PTEN蛋白在肝细胞癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 695-699
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/695.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.695

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)，简称肝癌，是目前常见的恶性肿瘤之一，在我国HCC年发病率位居第4位，而肿瘤死亡率居第2位[1]. 其恶性程度高，预后普遍较差. 虽然目前有多种治疗方法可供选择，但疗效甚微，即使根治性手术切除术后复发率仍然很高. 因此，寻找新型的、有效的治疗方法十分必要. 然而，HCC的病理生理机制不完全清楚，环境因素和遗传因素都参与其中，各种细胞信号传导通路的失调、DNA修复调节基因的缺失、原癌基因的激活、抑癌基因的失活及细胞周期调控基因的失控等因素促进了HCC的发生发展[2]. Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶(inositol polyphosphate 4-phosphatase type II, INPP4B)是一种新发现的脂质磷酸酶，作为一个潜在的肿瘤抑制因子，在前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、白血病等多种恶性肿瘤中表达缺失[3]. 第10号染色体上缺失的与张力蛋白同源的磷酸酯酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*)，是一种位于10号染色体(10q23)的抑癌基因，兼具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性，参与细胞周期以及多种信号传导途径的负调控，抑制细胞恶性转化[4]. INPP4B和PTEN的缺失与肿瘤的发生发展密切相关. 本研究通过免疫组织化学方法检测肝癌组织、癌旁组织、正常肝脏组织中INPP4B和PTEN的表达，进一步阐明HCC的发病机制，探讨INPP4B和PTEN在HCC发生发展过程中的作用和意义，为日后研发相应的分子靶向治疗药物提供理论支持.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2010-07/2013-03郑州大学第一附属医院肝胆外科及肝移植科手术切除后经病理组织学切片HE染色证实为HCC和对应癌旁组织(距离肿瘤2 cm)74例，其中女18例，男56例; 年龄20-75岁. 患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗，具有完整的临床病理资料. 并收集因肝破裂、外伤后手术切除的肝脏标本30例作为对照组，经病理组织学切片HE染色证实为正常肝脏组织. 所有标本手术切除后经10%甲醛固定石蜡包埋存档备用. 鼠抗人PTEN/MMACl(CT)单克隆抗体(上海瑞齐实业科技有限公司); 鼠抗人INPP4B单克隆抗体(Abcam公司); DAB试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); SP-9000免疫组织化学试剂盒、即用型一步法(非生物素)检测试剂盒(迈新公司).

1.2 方法 标本经10%多聚甲醛固定，制作石蜡切片，抗原修复选择热修复，一抗按1∶200稀释，孵育选择4 ℃过夜(14-16 h)，具体步骤应用SP-9000免疫组织化学试剂盒按照说明书进行，显微镜下观察. 结果判断: 免疫组织化学: 染色的切片由两位有经验的病理医师采用双盲法读片，结果判断兼顾阳性细胞率和染色强度，综合两者计分称为阳性强度，作为判断标准. 随机观察10个高倍镜视野，细胞中出现明显的棕黄色颗粒为阳性细胞. 依据染色强度计分: 着色强者计3分，着色中度计2分，着色弱者计1分. 依据每个高倍镜视野下的阳性细胞率计分: 阳性细胞率>75%计4分，50%-75%计3分，25%-50%计2分，5%-25%计1分，<5%计0分. 两种记分相加即为阳性强度. 阳性强度0-2分为阴性(-)，3-7为阳性(+). 染色结果均经3次重复观察.

统计学处理 运用SPSS17.0统计软件进行数

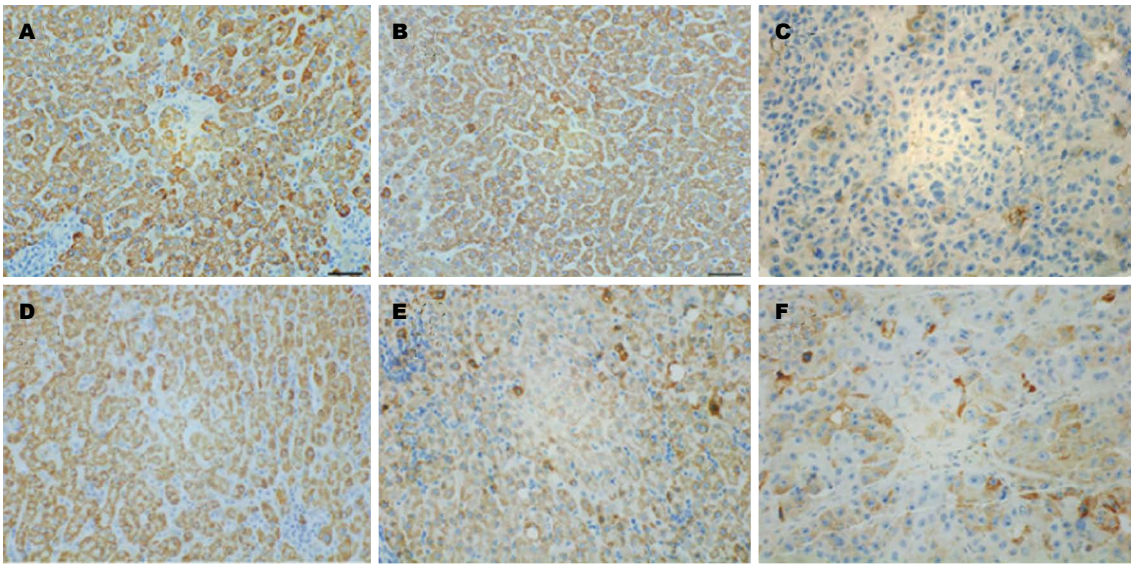

图 1 不同肝脏组织中INPP4B和PTEN的表达结果(SP × 400). A: INPP4B在正常肝脏组织中的表达; B: INPP4B在肝癌癌旁组织中的表达; C: INPP4B在肝癌组织中的表达; D: PTEN在正常肝脏组织中的表达; E: PTEN在肝癌癌旁组织中的表达; F: PTEN在肝癌组织中的表达. INPP4B: Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶; PTEN: 磷酸酯酶.

表 1 INPP4B和PTEN在肝癌组织、癌旁组织、正常组织中的表达 (*n*)

分组	*n*	INPP4B阳性	PTEN阳性
癌组织	74	26	40
癌旁组织	74	57	67
正常组织	20	18	20
χ^2		35.537	34.028
*P*值		0.000	0.000

INPP4B: Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶; PTEN: 磷酸酯酶.

据分析, INPP4B和PTEN在HCC中的相关性采Spearman等级相关分析. INPP4B和PTEN在肝癌组织、癌旁组织、正常组织中的表达差异以及与各临床病理类型的关系采用χ^2检验进行分析. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

INPP4B与PTEN在肝癌组织及癌旁组织中的表达均明显低于正常组织, 差异有统计学意义($P<0.05$)(图1, 表1). INPP4B和PTEN的表达与HCC患者的性别、年龄、肝硬化病史无关, 与分化程度、包膜完整程度相关. INPP4B的表达与肿瘤直径相关, PTEN的表达与肿瘤直径无关(表2). INPP4B与PTEN 在肝癌组织中的表达具有相关性, 两者的表达呈正相关($\chi^2 = 34.07$, $r = 0.561$, $P = 0.000$)(表3).

3 讨论

PI3K/AKT/mROT信号通路参与细胞生长、增殖和分化, 其调节异常在肿瘤的恶性增殖、血管生成和侵袭转移中起着重要作用[5]. PI3K/AKT/mROT信号通路的激活与HCC发生发展呈负相关, 使得其成为重要的分子治疗靶点之一[2]. 在人类恶性肿瘤中, PI3K激活催化形成两个主要的磷脂池: 磷脂酰肌醇-3,4,5三磷酸[PI(3,4,5)P3]和磷脂酰肌醇-3,4二磷酸[PI(3,4,)P2). [PI(3,4,5)P3]和[PI(3,4)P2]都可与AKT和PDK1的PH结构域结合, 促使PDK1催化AKT磷酸化激活, 促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移[6]. INPP4B包含N-末端C2脂质结合结构域, 内部NHR 2和C-末端磷酸酶结构域. INPP4B C2域优先结合磷脂酸和PI(3,4,5)P3, 可水解PI(3,4,)P2的D4位磷酸基团, 使其去磷酸化为3-磷酸磷脂酰肌醇[PI(3)P][3]. PTEN是一种多功能蛋白质, 定位于常染色体10q23.3, 共含8个内含子和9个外显子, 全长约200 kb, 是第1个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因. PTEN水解PI(3,4,5)P3的D3位磷酸基团, 使其去磷酸化形成PI(4,5)P2[7]. PTEN和INPP4B的缺失可能导致各自的底物PI(3,4,5)P3和PI(3,4)P2的堆积, 两底物共同促进Akt活性最大化, 增强细胞活性, 导致肿瘤细胞锚定独立生长[6].

*INPP4B*作为上皮肿瘤的抑癌基因, 参与PI3K信号通路的调节, 在人类乳腺癌中可检测

■相关报道

Gewinner等发现在随机抽取的乳腺癌和卵巢癌患者中, INPP4B低水平表达者往往出现较早的淋巴结转移, 且肿瘤患者的生存时间明显缩短. Hodgson等发现 INPP4B在前列腺癌组织中表达明显下降, INPP4B表达阴性肿瘤更容易复发. Horie等发现敲除PTEN相关基因的小鼠肝脏恶性肿瘤的发生率显著增高, PTEN的缺失可能导致肝脏恶性肿瘤的发生. Zhu等研究发现, PTEN的阳性表达率随着肝癌组织组织学分级的降低及侵袭性的增高而显著下降.

■**创新盘点**
本文通过免疫组织化学方法检测肝癌组织、癌旁组织、正常肝脏组织中INPP4B和PTEN的表达，进一步阐明肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发病机制，为HCC的治疗和预防提供新的方向.

表 2 INPP4B和PTEN在肝癌组织中的表达与临床病理特征的关系

临床特征分类	*n*	INPP4B				PTEN			
		+	−	χ^2	*P*值	+	−	χ^2	*P*值
年龄(岁)				0.350	0.554			3.731	0.053
>35	63	23	40			37	26		
≤35	11	3	8			3	8		
性别				0.565	0.452			0.014	0.906
男	56	21	35			32	24		
女	18	5	13			8	10		
肿瘤直径(cm)				5.071	0.024			0.718	0.397
>5	30	6	24			18	12		
≤5	44	20	24			22	22		
肝硬化病史				0.554	0.457			0.728	0.394
有	53	20	33			27	26		
无	21	6	15			13	8		
分化程度				10.687	0.001			14.255	0.000
高、中	35	19	16			27	8		
低	39	7	32			13	26		
肿块包膜				10.377	0.001			11.622	0.001
有	18	12	6			16	2		
无	56	14	42			24	32		

INPP4B: Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶; PTEN: 磷酸酯酶.

表 3 INPP4B和PTEN在肝癌组织表达的相关性分析

		INPP4B		*P*值	*r*值
		+	−		
PTEN	+	26	14	0.000	0.561
	−	0	34		

INPP4B: Ⅱ型多磷酸肌醇4-磷酸酶; PTEN: 磷酸酯酶.

到INPP4B杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH), 并与肿瘤分级、肿瘤大小、激素受体缺失有关, 在三阴性或基底细胞样乳腺癌亚型中, INPP4B表达下降及LOH较为显著, 随访发现, 这类患者通常预后差, 肿瘤复发率高[8,9]. 在随机抽取的乳腺癌和卵巢癌患者中, INPP4B低水平表达者往往出现较早的淋巴结转移, 且肿瘤患者的生存时间明显缩短[6]. 有研究表明, 在卵泡颗粒细胞中INPP4B表达下降可使PI3K/Akt信号传导通路超活化, 导致卵泡形成时卵巢内环境缺陷, 促使卵巢畸胎瘤形成[10]. Hodgson等[11]通过对正常前列腺上皮和前列腺癌组织的免疫组织化学染色发现, INPP4B在前列腺癌组织中表达明显下降, INPP4B表达阴性肿瘤更容易复发. 以上研究表明, INPP4B的表达水平与多种恶性肿瘤的发生呈负相关, 由此本课题就INPP4B表达与HCC的关系进行研究, 进一步阐明HCC的发病机制.

PTEN具有双特异性磷酸酯酶活性, 不仅可以通过抑制PI3K/Akt信号传导通路, 使细胞周期停滞在G_1期或促进细胞凋亡, 还能通过抑制PTEN/ERK/MARK途径, 使细胞生长分化减慢或停滞, 并促进肿瘤细胞衰老或凋亡, 从而阻碍肿瘤的发生发展[12]. Horie等[13]通过对比正常小鼠和敲除PTEN相关基因的小鼠中肝脏恶性肿瘤的发生率, 发现敲除PTEN相关基因的小鼠肝脏恶性肿瘤的发生率显著增高, 提示了PTEN的缺失可能导致肝脏恶性肿瘤的发生. Zhu等[14]研究发现, PTEN的阳性表达率随着肝癌组织组织学分级的降低及侵袭性的增高而显著下降, 提示了在HCC的发生发展中, PTEN可能与肝癌细胞的转移和浸润密切相关. 以上研究表明, PTEN不仅参与了HCC的发生发展, 也可能作为一个潜在的HCC诊断和预后指标. PTEN的表达水平与HCC的发生发展呈负相关, 其作为HCC治疗的一个重要靶基因, 越来越多地被关注.

在本课题研究中, 我们通过免疫组织化学检测方法, 检测INPP4B和PTEN在肝癌组织、癌旁组织及正常肝组织的表达情况. 通过显微镜下观察可见INPP4B和PTEN在肝癌组织中的表

达较癌旁组织和正常肝组织明显减低. 通过统计学分析发现, 肝癌组织中INPP4B和PTEN的表达呈正相关, 提示INPP4B和PTEN可能共同参与HCC的发生发展, 且已有研究表明在乳腺癌中存在INPP4B和PTEN共同缺失[8]. 能否通过敲除INPP4B和PTEN相关基因预防和治疗HCC还有待研究, 本课题就此进行了前期探索, 为HCC的防治提供新的突破点. 我们推测, INPP4B和PTEN表达缺失的肿瘤将为PI3K传导通路抑制因子治疗提供理想的选择. 目前, 众多Ⅰ期、Ⅱ期临床试验正在进行, 探讨PI3K信号通路抑制因子在治疗人类肿瘤中的作用[8]. mROT抑制剂治疗HCC也已进入临床试验阶段[15], 以*INPP4B*和*PTEN*基因为靶点预防和治疗HCC仍需进行大量基础及临床实验研究.

随着生活水平的提升及生活习惯的改变, HCC的发病率逐年升高, 这严重影响了人们的生活质量. 因此, 对于HCC的研究需要综合各种因素, 本文从免疫组织化学检测层面就INPP4B和PTEN在HCC的表达进行了初步研究, 为HCC的治疗和预防提供了新的方向, 但其在HCC中的作用、意义及两者的相关性仍需要大量的实验进一步证实.

4 参考文献

1 赫捷, 陈万青. 2012年中国肿瘤登记年报. 北京: 军事科学医学出版社, 2012: 22-23

2 Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 2047-2063 [PMID: 19003900 DOI: 10.1002/hep.22580]

3 Agoulnik IU, Hodgson MC, Bowden WA, Ittmann MM. INPP4B: the new kid on the PI3K block. *Oncotarget* 2011; 2: 321-328 [PMID: 21487159]

4 Song MS, Carracedo A, Salmena L, Song SJ, Egia A, Malumbres M, Pandolfi PP. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner. *Cell* 2011; 144: 187-199 [PMID: 21241890 DOI: 10.1016/j.cell.2010.12.020]

5 夏曙, 于世英. PI3K/Akt信号转导通路在恶性肿瘤中的研究进展. 肿瘤 2006; 26: 576-578

6 Gewinner C, Wang ZC, Richardson A, Teruya-Feldstein J, Etemadmoghadam D, Bowtell D, Barretina J, Lin WM, Rameh L, Salmena L, Pandolfi PP, Cantley LC. Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell* 2009; 16: 115-125 [PMID: 19647222 DOI: 10.1016/j.ccr.2009.06.006]

7 Dong-Dong L, Xi-Ran Z, Xiang-Rong C. Expression and significance of new tumor suppressor gene PTEN in primary liver cancer. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 67-71 [PMID: 12767263]

8 Fedele CG, Ooms LM, Ho M, Vieusseux J, O'Toole SA, Millar EK, Lopez-Knowles E, Sriratana A, Gurung R, Baglietto L, Giles GG, Bailey CG, Rasko JE, Shields BJ, Price JT, Majerus PW, Sutherland RL, Tiganis T, McLean CA, Mitchell CA. Inositol polyphosphate 4-phosphatase II regulates PI3K/Akt signaling and is lost in human basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 22231-22236 [PMID: 21127264 DOI: 10.1073/pnas.1015245107]

9 Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10869-10874 [PMID: 11553815]

10 Balakrishnan A, Chaillet JR. Role of the inositol polyphosphate-4-phosphatase type II Inpp4b in the generation of ovarian teratomas. *Dev Biol* 2013; 373: 118-129 [PMID: 23078915 DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.10.011]

11 Hodgson MC, Shao LJ, Frolov A, Li R, Peterson LE, Ayala G, Ittmann MM, Weigel NL, Agoulnik IU. Decreased expression and androgen regulation of the tumor suppressor gene INPP4B in prostate cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 572-582 [PMID: 21224358 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2314]

12 Kotelevets L, van Hengel J, Bruyneel E, Mareel M, van Roy F, Chastre E. Implication of the MAGI-1b/PTEN signalosome in stabilization of adherens junctions and suppression of invasiveness. *FASEB J* 2005; 19: 115-117 [PMID: 15629897]

13 Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, Naito M, Enomoto K, Watanabe S, Mak TW, Nakano T. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 2004; 113: 1774-1783 [PMID: 15199412]

14 Zhu X, Qin X, Fei M, Hou W, Greshock J, Bachman KE, Wooster R, Kang J, Qin CY. Combined Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Loss and Fatty Acid Synthase (FAS) Overexpression Worsens the Prognosis of Chinese Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 9980-9991 [PMID: 22949843 DOI: 10.3390/ijms13089980]

15 Kudo M. mTOR inhibitor for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2011; 29: 310-315 [PMID: 21829022 DOI: 10.1159/000327565]

■同行评价

本文对认识这两种蛋白分子共同参与肝癌发生、发展有一定的指导价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 700-704
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

腹腔镜胆囊切除术对HIV感染者细胞免疫的影响

胡明辉, 魏 国, 赵 勇, 范合璋, 华 欣, 何 永, 蔡 林

■背景资料
人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染已成为全球性重大公共卫生问题！随着HIV感染的传播以及高效抗逆转录病毒治疗的推广, HIV感染者存活者越来越多, 这些伴有免疫缺陷的HIV感染者对医学的诸多领域提出了新的要求和挑战.

胡明辉, 魏国, 赵勇, 范合璋, 华欣, 何永, 蔡林, 成都市公共卫生临床医疗中心外科 四川省成都市 610061
胡明辉, 主治医师, 主要从事普通外科与感染外科的相关研究.
四川省卫生厅科研基金资助项目, No. 20090013
作者贡献分布: 课题设计由胡明辉与魏国完成; 材料收集由赵勇、范合璋、华欣、何永及蔡林完成; 研究过程与数据分析由胡明辉、魏国及赵勇完成; 论文写作由胡明辉与魏国完成.
通讯作者: 胡明辉, 主治医师, 610061, 四川省成都市锦江区净居寺路18号, 成都市公共卫生临床医疗中心普通外科.
hmhdoc@qq.com
收稿日期: 2013-11-28 修回日期: 2013-12-15
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

Impact of laparoscopic cholecystectomy on cellular immunity in patients with HIV infection

Ming-Hui Hu, Guo Wei, Yong Zhao, He-Zhang Fan, Xin Hua, Yong He, Lin Cai

Ming-Hui Hu, Guo Wei, Yong Zhao, He-Zhang Fan, Xin Hua, Yong He, Lin Cai, Department of Surgery, Public Health Clinic Center of Chengdu, Chengdu 610061, Sichuan Province, China
Supported by: the Research Foundation of Health Department of Sichuan Province, No. 20090013
Correspondence to: Ming-Hui Hu, Attending Physician, Department of Surgery, Public Health Clinic Center of Chengdu, 18 Jingjusi Road, Jinjiang District, Chengdu 610061, Sichuan Province, China. hmhdoc@qq.com
Received: 2013-11-28 Revised: 2013-12-15
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To observe the impact of laparoscopic cholecystectomy (LC) on cellular immunity in HIV-infected patients with different levels of immunodeficiency.

METHODS: Ninety-four patients who underwent LC, including 62 HIV-positive (HIV+) patients and 32 randomly selected HIV-negative (HIV-) patients, were included in the study. Peripheral venous blood samples were collected to count the number of $CD4^+$ (cell/μL) and $CD8^+$ (cell/μL) T lymphocyte subsets on preoperative day 1 (D0) and postoperative days 3 (D3) and 7 (D7). The ratios of the number of $CD4^+$ cells on D3 to that on D0 [D3/D0 (%)] and D7 to D0 [D7/D0 (%)] were calculated. Patients were stratified into three groups according to the count of $CD4^+$ cell count on D0: Ⅰ (≥ 500), Ⅱ (≥ 200 but < 500) and Ⅲ (≥ 0 but < 200). The differences in the cell count between preoperation and postoperation in each group and between each group were analyzed by statistical methods.

RESULTS: There were no significant differences in WBC count, neutrophil percentage, lymphocyte percentage and $CD8^+$ cell count between preoperation and postoperation in each group ($P > 0.05$ for all), but significant differences were observed in $CD4^+$ cell count between preoperation and postoperation in each group ($P < 0.001$ for all) as well as between different groups ($F = 203.80$, $P < 0.001$). There was an interactive effect between time and group ($F = 8.08$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: LC has an impact on CD4-based cellular immunity, with a process from suppression to restoration. The more serious the immunodeficiency, the more significant the immunosuppression and the more slow the immune recovery. Attention should be paid to surgical indications and appropriate perioperative management including immune intervention in HIV-infected patients undergoing surgery.

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

Key Words: Human immunodeficiency virus; Laparoscopic cholecystectomy; CD4 T Lymphocyte

Hu MH, Wei G, Zhao Y, Fan HZ, Hua X, He Y, Cai L. Impact of laparoscopic cholecystectomy on cellular immunity in patients with HIV infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 700-704 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/700.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.700

摘要

目的: 观察腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)对不同免疫缺陷程度的人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者细胞免疫功能的影响.

方法: 62例HIV阳性(HIV+)与同期随机32例

■同行评议者
薛东波, 教授, 哈尔滨医科大学附属第一医院

HIV阴性(HIV-)共94例需LC患者, 检测其术前1 d(D0)、术后第3天(D3)、术后第7天(D7)外周静脉血T淋巴细胞亚群CD4和CD8计数(单位cell/μL). 各自计算D3、D7两次CD4计数相对于D0百分比D3/D0(%)、D7/D0(%). 并根据术前1 d(D0)CD4计数分层(组), Ⅰ≥500>Ⅱ≥200>Ⅲ≥0. SPSS19.0软件包分析每组内前后差异以及各层组之间差异.

结果: 在各组内部前后3次检测中, 白细胞计数、中性粒细胞率、淋巴细胞率、CD8计数差异无统计学意义(P>0.05), CD4计数各组内部前后3次检测两两对比差异有统计学意义(P<0.001). 不同组别之间差异有统计学意义(F = 203.80, P<0.001). 时间和组别两个因素之间有交互效应(F = 8.08, P<0.001).

结论: LC手术对以CD4为主的细胞免疫功能有"先抑制后恢复"的影响过程, 其影响过程体现出从HIV-Ⅰ组的"V"型到HIV+Ⅲ组的"L"型的渐变规律. HIV感染者免疫缺陷程度越重, 其免疫抑制越明显, 其免疫恢复也更缓慢. 对HIV感染者施行手术需要正确把握手术适应症、重视免疫干预并且进行有针对性的围术期处理.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 人类免疫缺陷病毒; 腹腔镜胆囊切除术; CD4 T淋巴细胞

核心提示: 本研究基于前瞻性分层对照研究, 观察到腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy)手术对人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者细胞免疫有"先抑制后恢复"影响过程, 其影响过程还体现出从"V"型到"L"型的渐变规律. HIV感染者免疫缺陷越重, 其免疫抑制越明显, 其免疫恢复也更缓慢. 作者强调对HIV感染者施行手术要正确把握手术适应症、重视免疫干预并且有针对性地围术期处理.

胡明辉, 魏国, 赵勇, 范合璋, 华欣, 何永, 蔡林. 腹腔镜胆囊切除术对HIV感染者细胞免疫的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 700-704 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/700.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.700

0 引言

1981年美国首次报道"获得性免疫缺陷综合症"(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)即"艾滋病". 1983年发现了导致AIDS的人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV). HIV通过对CD4 T淋巴细胞(CD4 T lymphocyte, CD4)亚群的破坏导致AIDS[1]. 随着HIV感染的传播以及高效抗逆转录病毒治疗(highly active antiretroviral therapy, HAART)的推广, 生存的HIV感染者越来越多, HIV感染者合并外科疾病并需要手术者也不断增多[2]. 我院2006年开始了对HIV感染者手术安全性及手术适应症的探索. 2009年启动了对合并HIV感染的腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)患者的前瞻性临床分层对照研究, 报告如下.

■研发前沿
HIV感染者施行手术治疗, 亟待解决以下问题: 手术对HIV感染者免疫功能的影响如何? 手术适应症如何把握? 如何规范有效地围手术期处理? 如何保证医患各方的安全?

1 材料和方法

1.1 材料 选择2009-01/2013-12我院收治的所有18-65岁, 具有明确LC手术适应症并且术前2 wk内未使用过糖皮质激素或免疫抑制剂的患者94例, 包括合并HIV感染(HIV+)者62例及同期随机选取的未合并HIV感染(HIV-)者32例, 其中男43例, 女51例; 年龄18-65岁, 平均40.2岁±14.7岁; 结石合并胆囊炎40.43%(37/94), 胆囊结石34.04%(32/94), 急慢性胆囊炎17.02%(16/94), 胆囊息肉及其他9.57%(9/94). 美国麻醉师协会(American Society of Anesthesiology, ASA)麻醉前分级Ⅰ-Ⅲ级. 此94例患者纳入前瞻性临床对照研究, 依据LC术前1 d外周静脉血CD4计数(D0, 单位cell/μL)分层, Ⅰ≥500>Ⅱ≥200>Ⅲ≥0. 结合有无HIV感染分为HIV-Ⅰ、HIV+Ⅰ、HIV+Ⅱ、HIV+Ⅲ共4组.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 手术前后处理参照《临床诊疗指南-外科学分册》[3], 经必要术前准备, 各组均在气管插管全身麻醉下由同一治疗小组施行LC, 各组患者术后1 wk均未使用糖皮质激素或免疫抑制剂. (HIV+)者按照《艾滋病诊疗指南》进行抗病毒治疗和并发症处理[4]. 符合抗病毒治疗标准的24例(HIV+)患者术前抗病毒治疗2 wk, 术后继续HAART抗病毒及治疗AIDS并发症. HIV+Ⅲ组均经过包括营养支持和并发症处理等充分的术前准备.

1.2.2 检测指标: HIV抗体ELISA法初筛实验阴性为(HIV-)组, HIV抗体 ELISA法初筛实验阳性且蛋白印迹法(Western blot)确证阳性为(HIV+)组, 所有研究对象除诊疗指南要求项目外, 于术前1 d(D0)、术后第3天(D3)、术后第7天(D7)分别抽取外周静脉血, 检测血液常规和T淋巴细胞亚群, 包括CD4、CD8计数(cell/μL)及CD4/CD8. 分别

■**创新盘点**
本研究通过较大样本含量的前瞻性分层对照，采用两因素多水平方差分析，总结出手术对不同免疫缺陷程度HIV感染者细胞免疫影响的特征和规律. 为外科HIV感染者围手术期的免疫干预提供了理论依据.

表 1 各组患者LC手术前后外周静脉血主要免疫细胞指标变化 (mean ± SD)

分组	*n*	时间	白细胞(10^9/L)	中性粒细胞率(%)	淋巴细胞率(%)	CD4(cell/μL)	CD8(cell/μL)
HIV− Ⅰ	32	D0	7.5 ± 3.3	62.6 ± 10.8	42.4 ± 8.3	660 ± 169	530 ± 124
		D3	8.8 ± 2.4	72.6 ± 12.3	38.6 ± 12.3	613 ± 97	512 ± 108
		D7	8.1 ± 3.6	67.9 ± 7.7	46.2 ± 4.3	676 ± 104	503 ± 93
HIV+ Ⅰ	14	D0	6.7 ± 3.1	60.5 ± 28.3	40.5 ± 5.8	628 ± 73	620 ± 186
		D3	7.2 ± 2.4	68.7 ± 12.6	35.6 ± 8.4	539 ± 39	668 ± 210
		D7	6.9 ± 4.2	64.2 ± 13.5	38.3 ± 6.5	592 ± 91	647 ± 164
HIV+ Ⅱ	36	D0	5.6 ± 3.6	67.5 ± 8.6	35.9 ± 9.6	377 ± 85	726 ± 241
		D3	6.0 ± 2.9	72.3 ± 10.3	32.4 ± 17.3	302 ± 85	764 ± 186
		D7	5.4 ± 3.5	77.6 ± 8.6	30.8 ± 11.5	305 ± 72	670 ± 104
HIV+ Ⅲ	12	D0	4.7 ± 3.4	71.8 ± 12.6	30.5 ± 16.4	144 ± 37	432 ± 210
		D3	4.4 ± 2.6	78.4 ± 14.9	25.4 ± 8.9	114 ± 38	478 ± 251
		D7	3.9 ± 3.2	76.3 ± 15.1	23.1 ± 12.5	115 ± 33	423 ± 142

LC: 腹腔镜胆囊切除术; HIV: 人免疫缺陷病毒.

表 2 各组患者LC手术前后CD4计数(cell/μL)及其相对百分比 (mean ± SD)

分组	*n*	术前1 d(D0)		术后第3天(D3)		术后第7天(D7)	
		CD4	D0/D0(%)	CD4	D3/D0(%)	CD4	D7/D0 (%)
HIV− Ⅰ	32	660 ± 169	100	613 ± 97	93.20 ± 5.73	676 ± 104	102.90 ± 7.48
HIV+ Ⅰ	14	628 ± 73	100	539 ± 39	86.65 ± 8.81	592 ± 91	95.55 ± 18.39
HIV+ Ⅱ	36	377 ± 85	100	302 ± 85	81.35 ± 21.12	305 ± 72	83.21 ± 20.35
HIV+ Ⅲ	12	144 ± 37	100	114 ± 38	79.83 ± 21.35	115 ± 33	82.43 ± 20.74

LC: 腹腔镜胆囊切除术; HIV: 人免疫缺陷病毒.

计算D3、D7两次CD4计数相对于D0的百分比D3/D0(%)、D7/D0(%). T淋巴细胞亚群检测采用Beckman Coulter Epics XL流式细胞仪.

统计学处理 结果以mean±SD的形式表示，使用SPSS19.0软件包，重复测量数据采用Repeated Measures单因素(组内前后比较)或两因素(组间、组内同时比较)多水平方差分析(ANOVA). 按$\alpha = 0.05$水准，$P<0.05$差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *临床效果* 全部94例患者麻醉及LC手术顺利(其中3例因合并胆总管结石附加了经十二指肠镜胆总管取石术). 所有患者未发生麻醉及手术相关并发症，无围手术期死亡病例，胆道疾病全部一期治愈. 各组手术前后检测指标如表1及表2.

2.2 *统计学结果* 各组内部，手术前后3次检测各项目均数差异中，白细胞计数、中性粒细胞率、淋巴细胞率、CD8计数无统计学意义($P>0.05$); CD4计数有统计学意义($P<0.001$); 进一步两两比较发现，对于CD4计数，D0 *vs* D3、D0 *vs* D7和D3 *vs* D7差异有计学意义($P<0.0001$); 对于CD4计数相对百分比，D0/D0 *vs* D3/D0和D0/D0 *vs* D7/D0差异有统计学意义($P<0.0001$), D3/D0 *vs* D7/D0差异有统计学意义($P<0.05$). 不同分组之间的差异效应有统计学意义($F = 203.80$, $P<0.001$). 时间与分组两个因素之间有交互效应($F = 8.08$, $P<0.001$). 各组CD4计数的变化趋势以及时间与分组两因素的交互作用如图1, 图2.

3 讨论

HIV感染(包括AIDS)是全球共同面临的巨大挑战！HIV感染也已经成为我国当前面临的重大公共卫生问题之一. HIV通过对CD4 T淋巴细胞亚群的破坏导致AIDS. CD4计数、病毒载量和全身营养状况是常用于评估HIV感染者病情、预后及疗效的最常用指标[5]. HIV感染者合并外科疾病并需要手术者也不断增多. 关于HIV感染者外科手术安全性和适应症的研究日益受到重视.

国内外已有一些关于外科手术对HIV感染者免疫功能影响的研究. Jiang等[1]将微芯片技术

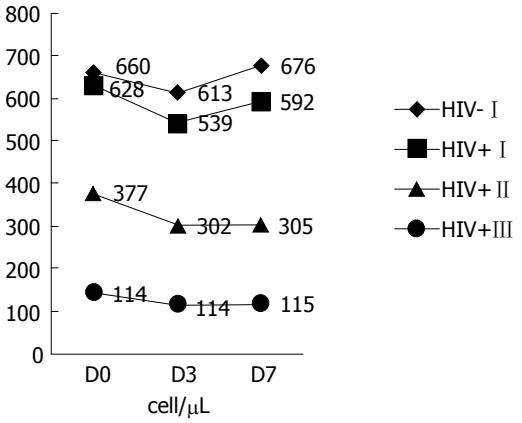

图 1 各组手术前后CD4计数(均值).

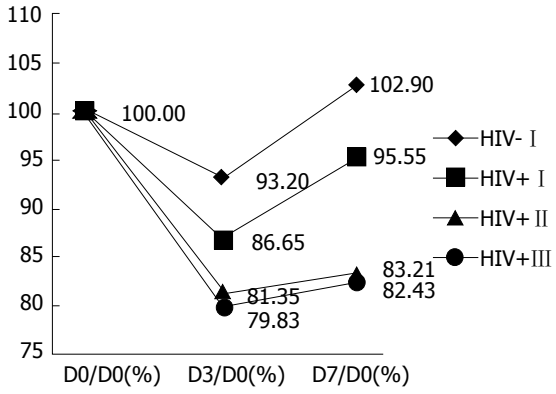

图 2 各组手术前后CD4计数相对比(均值).

■应用要点

本研究发现了腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)手术对HIV感染者细胞免疫影响的特征和规律; 文章强调对HIV感染者施行手术要正确把握手术适应症、重视免疫干预并且进行有针对性的围术期处理.这些规律和观点可用于启发和指导相关的科研和临床工作.

用于HIV感染者的研究, 认为HIV主要攻击人体免疫系统中的CD4 T淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞. 有研究[6-9]通过对HIV感染者腹腔镜手术前后免疫功能的对比观察认为腹腔镜手术可以短暂、轻度抑制细胞免疫, 对体液免疫无明显影响, 并认为术前检查CD4≥200 cell/μL可确保手术安全性. 但这些研究大多样本量较少, 而且缺乏对照, 尤其是缺乏针对不同免疫力缺陷程度患者的分层对比研究.

我们设计了前瞻性分层对比研究. HIV感染按照WHO分级标准[10], 根据术前1天(D0)CD4计数水平(cell/μL)分为3层, Ⅰ≥500>Ⅱ≥200>Ⅲ≥0, 加上阴性对照组(同期随机选择的非HIV感染者)共分为4层(组). 为减少混杂影响, 研究对象年龄控制在18-65岁, 并且剔除术前2 wk内曾使用过糖皮质激素或免疫抑制剂的患者. 由于各层组术前1d(D0)CD4计数基数不同, 为更本质地反映各组变化趋势和幅度, 我们还观察分析了各组手术前后3次CD4计数的“相对比”(与D0的相对百分比)的变化情况.

结果显示, 手术前后3次检测中, 白细胞计数、中性粒细胞率、淋巴细胞率、CD8计数差异无统计学意义, 可能LC手术相对创伤较小、对其的影响不显著. 每组组内手术前后CD4计数差异有统计学意义(P<0.0001). 进一步分析发现, 不同组别之间的差异效应有统计学意义、时间与组别有交互效应(P<0.0001). 而且各组CD4计数都有“先降后升”(先抑制后恢复)的变化过程. 这种趋势在(为矫正CD4计数基数差异的影响)将其转化为相对比后更显著(图1, 2).

本研究显示: 不同层(组)的下降和回升的速度(斜率)及幅度不同. 各组CD4计数D3下降速度及幅度排序: HIV-Ⅰ<HIV+Ⅰ<HIV+Ⅱ<HIV+Ⅲ, CD4计数D7回升速度及幅度排序正好相反: HIV-Ⅰ>HIV+Ⅰ>HIV+Ⅱ>HIV+Ⅲ. 其影响过程还体现出从HIV-Ⅰ组的“V”型到HIV+Ⅲ组的“L”型的渐变规律. 这表明病情越重(CD4破坏越多、计数越低), 手术麻醉对其免疫抑制越明显, 其免疫恢复也更慢. 其中HIV-Ⅰ组D7超过D0 (D7/D0 = 102.9%),可能与其免疫系统受到刺激后产生代偿性反应性增生有关. HIV+Ⅰ组虽然也表现出代偿, 但与术前CD4计数基数相当的HIV-Ⅰ组相比也体现出有统计学意义的差异, 可能与其代偿潜能已经受到一定程度的破坏有关.

创伤和应激可对机体免疫功能产生影响, 轻者可激发和增强免疫, 重者可导致免疫抑制. 其影响程度和持续时间与创伤的大小密切相关[11]. 创伤后机体T淋巴细胞总数可减少, 其中主要是属CD4 T细胞的Th细胞减少. 创伤后免疫细胞恢复速度与创伤严重程度和并发症情况有关, 一般数天至数周[5].

以LC为代表的微创手术近年来逐步用于合并HIV感染(有不同程度免疫缺陷)的外科患者. 卢春燕、张锡贵等证实腹腔镜手术创伤应激小、疼痛轻、恢复快、免疫抑制轻, 并认为HIV感染者CD4 T淋巴细胞≥200 cell/μL可以安全手术[12-16]. 本研究表明LC手术和插管全身麻醉引起了创伤和应激类似免疫抑制和恢复的过程. 本研究还提示手术产生的免疫抑制以及恢复的程度与CD4基数水平具有连续渐变的线性关系. 没有观察到明显的“分界线”, 这表明: 所有HIV感染者的免疫功能都应给予重视, 即使CD4≥500 cell/μL也并非绝对安全.

通过规范、细致的围手术期处理(特别是HIV+Ⅲ组都经过包括营养支持和并发症处理等充分的术前准备; 与刘保池等[17]类似, CD4 T淋巴细胞<200 cell/μL者常规加用预防肺孢子虫

■同行评价
本文设计新颖科学，统计规范明晰，论证有理有据，讨论深入有序. LC手术对HIV感染者细胞免疫影响的“先抑制后恢复”过程及其从“V”型到“L”型的渐变规律等创新性发现对相关科研和临床都具有较大的启发和参考价值.

和真菌感染的药物). 全部94例患者临床效果满意, 胆道疾病全部一期治愈, 无手术及麻醉相关并发症发生. 该研究表明: 通过正确把握手术适应症以及适当的围手术期处理, 对于伴HIV感染的胆道患者, 全麻下施行LC手术可以取得与非HIV感染者相似临床疗效.

总之, LC手术对CD4为主的细胞免疫功能有“先抑制后恢复”的影响过程. 其影响过程还体现出从HIV-Ⅰ组的“V”型到HIV+Ⅲ组的“L”型的渐变规律. HIV感染者免疫缺陷程度越重, 其免疫抑制越明显, 其免疫恢复也更缓慢. 对HIV感染者施行手术要正确把握手术适应症、重视免疫干预并且进行有针对性的围术期处理. 对于不同程度免疫缺陷的外科HIV感染者, 其手术安全性、手术适应症以及针对性的免疫干预等多个方面, 都还需要更多更深入的研究.

4 参考文献

1 Jiang X, Spencer MG. Electrochemical impedance biosensor with electrode pixels for precise counting of CD4+ cells: a microchip for quantitative diagnosis of HIV infection status of AIDS patients. *Biosens Bioelectron* 2010; 25: 1622-1628 [PMID: 20047827 DOI: 10.1016/j.bios.2009]

2 Geocze L, Mucci S, De Marco MA, Nogueira-Martins LA, Citero Vde A. Quality of life and adherence to HAART in HIV-infected patients. *Rev Saude Publica* 2010; 44: 743-749 [PMID: 20676564 DOI: 10.1590/S0034-89102010000400019]

3 中华医学会编著. 临床诊疗指南–外科学分册. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 292-335

4 中华医学会感染病学分会艾滋病学组. 艾滋病诊疗指南. 中华传染病杂志 2006; 24: 133-144

5 Ni Choileain N, MacConmara M, Zang Y, Murphy TJ, Mannick JA, Lederer JA. Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J Immunol* 2006; 176: 225-236 [PMID: 16365414]

6 邓建宁. 腹腔镜手术对HIV感染者免疫功能的影响探讨. 中外医疗 2013; 32: 70- 71

7 张磊, 刘保池. 人类免疫缺陷病毒感染者手术安全问题探讨. 中国全科医学杂志 2012; 15: 62-64

8 卢焱, 沈芳. 腹腔镜手术对HIV感染者免疫功能的影响. 腹腔镜外科杂志 2007; 12: 293-296

9 魏国, 温贤敏, 范合璋, 华欣, 何永, 蔡林, 钟明, 何盛华. 腹腔镜胆囊切除术对HIV/AIDS细胞免疫功能的影响. 中国实用医药杂志 2013; 8: 4-6

10 Bahebeck J, Bedimo R, Eyenga V, Kouamfack C, Kingue T, Nierenet M, Sosso M. The management of musculoskeletal infection in HIV carriers. *Acta Orthop Belg* 2004; 70: 355-360 [PMID: 15481421]

11 Broder S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. *Antiviral Res* 2010; 85: 1-18 [PMID: 20018391 DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.10.002]

12 卢春燕. 腹腔镜胆囊切除术与开腹胆囊切除术同期临床对比. 医药前沿 2013; (30): 109-110

13 张锡贵, 吴才, 倪武, 林育超, 车芳, 赖巧红. 腹腔镜与开腹结直肠癌根治术对患者免疫功能的影响比较. 微创医学 2013; 8: 140-142

14 凡兴卫. 腹腔镜与开腹手术对老年胆囊切除患者免疫功能影响的比较. 中外医疗 2012; 31: 77

15 张庆尧. 腹腔镜胆囊切除术对机体免疫球蛋白、补体及CRP的影响. 腹腔镜外科杂志 2003; 8: 148-150

16 梁永任, 黄燕金, 梁日光, 廖均平. 腹腔镜与开腹胆囊切除术对患者免疫功能的影响机制研究. 中国医药科学 2012; (6): 14-15

17 刘保池, 张磊, 苏锦松. HIV感染者胆囊切除围手术期处理. 上海医药 2013; (4): 36-39

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 705-708
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

导丝超选胆管插入法与乳头直接插入法对ERCP术后并发症的影响比较

毕荣欣, 薛志广, 张 伟, 周 亮

毕荣欣, 薛志广, 张伟, 周亮, 河北省邢台市第三医院普外科 河北省邢台市 054000
毕荣欣, 主治医师, 主要从事微创外科的研究.
作者贡献分布: 课题设计与论文写作由毕荣欣与薛志广完成; 研究过程由张伟完成; 周亮进行数据分析.
通讯作者: 毕荣欣, 主治医师, 054000, 河北省邢台市钢铁北路108号, 河北省邢台市第三医院普外科. blackfoxbrx@163.com
电话: 0319-2123201
收稿日期: 2013-12-07 修回日期: 2013-12-23
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

Comparison of post-ERCP complications between patients using guidewire ultra-election duct insertion versus those using direct papillary insertion

Rong-Xin Bi, Zhi-Guang Xue, Wei Zhang, Liang Zhou

Rong-Xin Bi, Zhi-Guang Xue, Wei Zhang, Liang Zhou, Department of General Surgery, the Third Hospital of Xingtai City, Xingtai 054000, Hebei Province, China
Correspondence to: Rong-Xin Bi, Attending Physician, Department of General Surgery, the Third Hospital of Xingtai City, 108 Gangtie North Road, Xingtai 054000, Hebei Province, China. lackfoxbrx@163.com
Received: 2013-12-07 Revised: 2013-12-23
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To explore the impact of guidewire ultra-election duct insertion versus direct papillary insertion on post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) complications.

METHODS: Ninety-one patients who underwent ERCP at our hospital were involved. According to the way the guide wire was inserted, they were divided into two groups: those using the guidewire ultra-election duct insertion (44 cases) and those using direct papillary insertion (47 cases). The surgical success rate, pancreatic duct visualization rate, post-ERCP pancreatitis (PEP) incidence and postoperative changes in serum amylase were compared between the two groups.

RESULTS: Surgical success rate, pancreatic duct visualization rate and PEP incidence in the direct papillary insertion group were 42.02%, 51.07% and 17.02%, respectively. The corresponding values in the guidewire ultra-election bile duct insertion group were 90.91%, 6.82% and 4.55%. Compared with the guidewire ultra-election insertion group, the direct papillary insertion group had significantly lower surgical success rate and PEP incidence but higher pancreatic duct visualization rate ($P < 0.01$ for all). Serum levels of amylase at 6 and 24 h were significantly increased in all patients compared with preoperative values ($P < 0.05$ for all). Serum amylase levels at 48 h in both groups were significantly lower than those at 24 in all patients with successful surgery ($P < 0.05$). Serum levels of amylase at 48 h in the guidewire ultra-election duct insertion group was significantly lower than that in the direct papillary insertion group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Compared with the traditional direct papillary insertion method, guidewire ultra-election bile duct insertion technique has huge advantages in terms of higher surgical success rate and lower pancreatic duct visualization rate and incidence of PEP.

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

Key Words: Guidewire ultra-election bile duct insertion; Papillary direct insertion; ERCP; Pancreatitis

Bi RX, Xue ZG, Zhang W, Zhou L. Comparison of post-ERCP complications between patients using guidewire ultra-election duct insertion versus those using direct papillary insertion. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 705-708 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/705.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.705

摘要

目的: 比较导丝超选胆管技术与乳头直接插入法对内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)术

■背景资料
内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)是近十几年来新型的胰胆疾病治疗技术, 其具有创伤小、手术时间短等优点, 深受广大患者的欢迎. 插管是手术成功的基础和关键. 乳头直接插入法和导丝超选胆管技术均是插管的重要方法, 前者被人们发现较早, 使用广泛, 但是对于医师的经验要求较高, 其主要并发症-胰腺炎的发病率也较高; 而导丝超选胆管技术属新型的插管技术, 是利用超滑亲水导丝与结肠镜结合插入, 并借助透视镜观测的方法, 正在逐渐被人们接受.

■同行评议者
周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

■相关报道
有研究认为，胰管显影的发生机制可能为胰管内造影剂过度充盈，瞬间压力过大导致胰管细胞损伤所致. 还有研究认为，胰腺炎的发生原因是因为过多的造影剂反流入胰腺，胰腺细胞不能正常代谢而致.

后并发症的影响.

方法：选取我院需要ERCP手术的患者91例，根据导丝插入方法不同分为导丝超选胆管插入法44例和乳头直接插入法47例，对比两组患者的手术成功率、胰管显影率、术后胰腺炎(post-ERCP pancreatitis, PEP)发生率及手术前后血清淀粉酶的变化情况.

结果：乳头直接插入法手术成功率为42.02%，胰管显影率为51.07%，PEP发生率为17.02%；导丝超选技术手术成功率为90.91%，胰管显影率为6.82%，PEP发生率为4.55%. 与导丝超选相比，乳头直接插入法手术成率、PEP发生率明显较低，胰管显影率较高，差异均有统计学意义(P<0.01). 与手术前比较，所有患者术后6、24 h血清淀粉酶均升高，差异有统计学意义(P<0.05). 手术成功的患者中，两种方法48 h血清淀粉酶较术后24 h降低，差异有统计学意义(P<0.05)；导丝超选法术后48 h血清淀粉酶较乳头直接插入法降低，差异有统计学意义(P<0.05).

结论：导丝超选胆管技术插入法手术成功率高，胰管显影率及PEP发生率低，相对于传统的乳头直接插入法具有很大优势，值得推广.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词：导丝超选胆管技术；乳头直接插入法；内镜下逆行胰胆管造影术；胰腺炎

核心提示：本次研究仅从不同插管方法入手，研究其对内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography)术后胰腺炎发生率的影响，希望为临床治疗提供依据.

毕荣欣，薛志广，张伟，周亮. 导丝超选胆管插入法与乳头直接插入法对ERCP术后并发症的影响比较. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 705-708 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/705.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.705

0 引言

内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)是近十几年来新型的胰胆疾病治疗技术，其具有创伤小、手术时间短等优点，深受广大患者的欢迎[1,2]. 但是，随着该项技术的广泛使用，ERCP带来的并发症也不容忽视，尤其是胰腺炎和高淀粉酶血症已经成为新的疾病发病人群[3]. 据统计，ERCP相关胰腺炎的发病率可能已经超过10%，并且药物控制疗效较差. 我们认为可能与导管插入时造成不必要的创伤有关[4,5]，若能将导丝超选技术灵活运用到插管这一步骤中，降低插管伤害及失败导致的胰腺炎发病人数，则对于ERCP的继续发展有重要意义. 本研究比较了导丝超选胆管技术与乳头直接插入法对ERCP术后胰腺炎发生率的影响，现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 随机抽取2012-01-01/2013-05-31我院消化内科需要ERCP手术的患者91例，其中男52例，女39例，最大年龄62岁，最小年龄39岁，平均年龄43.12岁±3.24岁. 诊断性患者41例，胆总管结石23例，胆总管梗阻9例，胆囊切除10例，胆总管狭窄8例. 根据导丝插入方法不同分为导丝超选胆管插入法44例和乳头直接插入法47例，两组患者在年龄、性别、疾病类型、血压、血糖、血脂都无统计学差异(P>0.05).

1.2 方法

乳头直接插入法：根据胆总管十二指肠段走形判断插管的方向，根据乳头的大小、开口方向确定导管的插入部位，通过调整肠镜的弯曲度和抬钳器调整角度，将造影管通过十二指肠乳头插入胆总管. 然后根据医师经验判断是否成功插入，推入造影剂. 导丝超选胆管插入法：将超滑亲水导丝插入切开刀内，用切开刀代替造影管，通过调整肠镜的弯曲度、抬钳器调整角度及刀片的紧张度，试探性插入导丝，利用透视镜确保导丝插入并推入造影剂.

为保证试验结果的准确性，以上所有手术操作均由同一医师进行，并且均签署患者知情同意书.

统计学处理 采用SPSS17.0统计学软件分析，计量资料以mean±SD表示，并采用t检验，计数资料及率的比较采用χ^2检验，P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 两种方法手术成率、胰管显影率、PEP发生率比较 乳头直接插入法手术成功率为42.02%，胰管显影率为51.07%，PEP发生率为17.02%；导丝超选技术手术(图1)成功率为90.91%，胰管显影率为6.82%，PEP发生率为4.55%. 与导丝超选技术相比，乳头直接插入法手术成率、PEP发生率明显较低，胰管显影率较高，差异有统计学意义(P<0.01，表1，图2).

2.2 两种方法术前、后血清淀粉酶比较 与手术

表 1 两种方法手术成率、胰管显影率、术后胰腺炎发生率比较 *n*(%)

分组	*n*	手术成功	胰管显影	术后胰腺炎
乳头直接插入法	47	19(42.02)	24(51.07)	12(25.53)
导丝超选技术	44	40(90.91)	3(6.82)	2(4.55)
χ^2值	–	23.237	19.252	6.161
*P*值	–	0.000	0.000	0.013

表 2 两种方法术前、后血清淀粉酶比较 (IU/L)

	n	手术前6 h	手术后6 h	术后24 h	术后48 h
乳头直接插入法					
成功	19	51.83 ± 2.35	263.53 ± 15.53[a]	216.33 ± 16.35[a]	144.24 ± 5.89[e]
未成功	28	56.24 ± 1.55	247.18 ± 7.29[a]	205.49 ± 34.26	163.85 ± 15.32
导丝超选技术					
成功	40	52.57 ± 2.73	294.75 ± 8.38[a]	222.43 ± 5.73[a]	77.74 ± 24.27[ce]
未成功	4	51.27 ± 4.72	245.74 ± 11.83[a]	217.47 ± 13.73	135.53 ± 13.47

[a]*P*<0.05 *vs* 手术前6 h; [c]*P*<0.05 *vs* 乳头直接插入法成功组; [e]*P*<0.05 *vs* 手术后24 h.

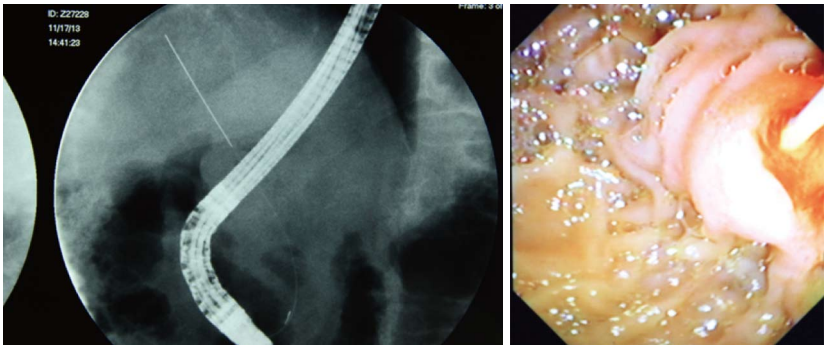

图 1 运用导丝超选胆管插入法的内镜下逆行胰胆管造影术.

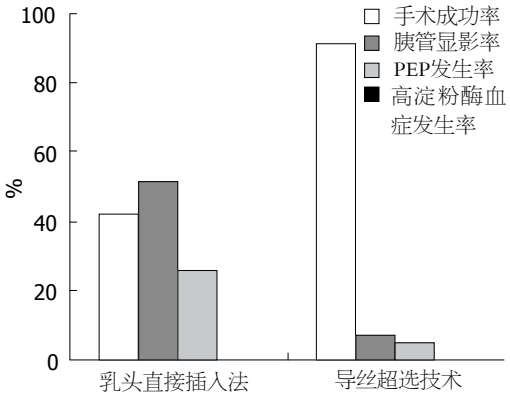

图 2 两种方法手术成率、胰管显影率、PEP发生率、高淀粉酶血症发生率比较.

前比较, 所有患者术后6、24 h血清淀粉酶均升高, 差异有统计学意义(*P*<0.05). 手术成功的患者中, 两种方法48 h血清淀粉酶较术后24 h降低, 差异有统计学意义(*P*<0.05); 导丝超选法术后48 h血清淀粉酶较乳头直接插入法降低, 差异有统计学意义(*P*<0.05)(表2).

3 讨论

ERCP是运用十二指肠肠镜将导管插入十二指肠乳头部, 进而找到胆总管, 将造影剂注入并显影的技术, 主要包括插镜、插管、造影、拍片、治疗等过程[6-8], 其中插管是手术成功的基础和关键. 乳头直接插入法和导丝超选胆管技术均是插管的重要方法, 前者被人们发现较早, 使用广泛, 但是对于医师的经验要求较高, 其主要并发症-胰腺炎的发病率也较高; 而导丝超选胆管技术属新型的插管技术, 是利用超滑亲水导丝与结肠镜结合插入, 并借助透视镜观测的方法, 正在逐渐被人们所接受[9-11]. 本次研究仅从不同插管方法入手, 研究其对ERCP术后胰腺炎发生率的影响, 希望为临床治疗提供依据.

■应用要点

新型导丝超选胆管技术插入法手术成功率高, 胰管显影率及术后胰腺炎(post-ERCP pancreatitis)发生率低, 相对于传统的乳头直接插入法具有很大优势, 也为经内镜逆行性胰胆管造影术成功奠定了基础, 对于胰胆疾病的诊疗有重要意义.

■同行评价
本文设计合理，结果可靠，方法实用，对临床医师有很好的参考价值.

本次试验结果中，乳头直接插入法手术成功率为42.02%，胰管显影率为51.07%，PEP发生率为17.02%；导丝超选技术手术成功率为90.91%，胰管显影率为6.82%，PEP发生率为4.55%. 与导丝超选相比，乳头直接插入法手术成率、PEP发生率明显较低，胰管显影率较高. 表明与传统的乳头直接插入法相比，导丝超选插入技术在提升手术成功率、降低胰管显影率和胰腺炎发病率方面具有更大的优势. 我们认为，导丝超选插入法的手术成功率与显影率密切相关，胰管显影率降低，手术的成功率才能提高. 有研究认为[12]，胰管显影的发生机制可能为胰管内造影剂过度充盈，瞬间压力过大导致胰管细胞损伤所致. 还有研究认为[13]，胰腺炎的发生原因是因为过多的造影剂反流入胰腺，胰腺细胞不能正常代谢而致. 由于导丝超选技术是在透视镜下进行的，对于造影剂剂量控制良好，从而降低了PEP的发生. 此外，我们认为导丝超选技术插入法手术成率高的另一原因可能为新型导丝的运用，减少了机械插入对于胰胆部位的创伤，为进一步的治疗创造了更为优越的手术条件. 研究结果中，与手术前比较，所有患者术后6、24 h血清淀粉酶均升高. 手术成功的患者中，两种方法48 h血清淀粉酶较术后24 h降低；导丝超选法术后48 h血清淀粉酶较乳头直接插入法降低. 说明两种插入方法均会导致血清淀粉酶的升高，之后逐渐下降，但是导丝超选组患者的血清淀粉酶降低所需时间较乳头直接插入法缩短，减少了高淀粉酶血症的发生. 在临床诊断中，血清淀粉酶主要用于急性胰腺炎的判断，急性胰腺炎发病时，淀粉酶溢出胰腺，迅速吸收入血，导致血清中淀粉酶含量增高[14,15]. 实验中患者在短时间内淀粉酶均高于正常值，可能与插入时机械损伤腺泡有关，也可能从侧面提示ERCP术中轻度胰腺炎发生的不可避免. 但是导丝插入法的患者48 h后淀粉酶开始降低，其机制可能与升高是相似，导丝技术的运用减小了创伤，那么胰腺恢复的速度将会提高，更有利于机体的恢复.

总之，新型导丝超选胆管技术插入法手术成功率高，胰管显影率及PEP发生率低，相对于传统的乳头直接插入法具有很大优势，也为经内镜逆行性胰胆管造影术成功奠定了基础，对于胰胆疾病的诊疗具有重要意义.

4 参考文献

1 柴宁莉，令狐恩强，万军，蔡昌豪，徐世平，吴本俨，胡海田，张煜，张智勇. 胆管超选技术降低ERCP术后胰腺炎发生率的对照研究. 中华肝胆外科杂志 2010; 16: 336-340

2 Freeman ML. Post-ERCP pancreatitis: patient and technique-related risk factors. *JOP* 2002; 3: 169-176 [PMID: 12432183]

3 Wang ZK, Yang YS, Cai FC, Wang YH, Shi XL, Ding C, Li W. Is prophylactic somatostatin effective to prevent post-endoscopic retrograde cholangio-pancreatography pancreatitis or hyperamylasemia? A randomized, placebo-controlled pilot trial. *Chin Med J* (Engl) 2013; 126: 2403-2408 [PMID: 23823808 DOI: 10.3760]

4 夏挺松，刘鹏飞. 直肠非甾体类抗炎药对ERCP术后胰腺炎的预防作用. 中华消化内镜杂志 2010; 27: 301-302

5 孙铎，刘永刚，杨俊清，刘山，朱广庆. PTCD与ERCP联合术治疗恶性梗阻性黄疸疗效分析. 中华肝胆外科杂志 2010; 16: 308-309

6 宋丽亚，赵清喜，孔心涓，田字彬，张琪. ENBD预防胆管多发结石ERCP术后急性胰腺炎及高淀粉酶血症65例. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1724-1727

7 Baron TH, Abu Dayyeh BK, Zinsmeister AR. Rectal indomethacin to prevent post-ERCP pancreatitis. N *Engl J Med* 2012; 367: 277-278; author reply 277-278 [PMID: 22808973 DOI: 10.1056/NEJMc1205928]

8 周玉保，黄慧，潘亚敏，王田田，王书智，陆蕊，王淑萍，时之梅，孙志飞，胡冰. 针状刀乳头开窗术在ERCP困难插管中的应用. 中华消化内镜杂志 2010; 27: 454-457

9 王锋，王琦，李昭宇. 导丝引导下选择性胆管插管预防ERCP术后胰腺炎和高淀粉酶血症的作用. 中华肝胆外科杂志 2010; 16: 670-672

10 王蒙，王广义，张平，吕国悦，耿亚军，冯秋实. 急性胆胰疾病的急诊内镜治疗. 中华普通外科杂志 2011; 26: 671-673

11 王淑萍，高道键，陆蕊，时之梅，黄慧，周吉，王书智. 肝门部胆管癌肝内胆管超选困难时的配合技巧探讨. 中华消化内镜杂志 2013; 30: 234-235

12 刘玉杰，江堤，苏剑东，黄友明，李学谦，孙贤久，麦海珠，杨巧玲，廖秀敏，龚飞跃. 急诊ERCP在急性胆源性胰腺炎治疗中的应用. 肝胆胰外科杂志 2012; 24: 278-280, 285

13 刘志兰，胡金定，袁少轩. 优质护理理念对ERCP术患者治疗配合及并发症控制情况的影响研究. 国际护理学杂志 2013; 32: 473-474, 531

14 梁和业，乔秀丽，王晓丰，褚衍六，高若辉，高孝忠. ERCP后即时LC在治疗胆囊结石合并胆总管结石中的应用价值. 胃肠病学和肝病学杂志 2013; 22: 704-705

15 赵娅敏，刘锦涛，余细球，范东俊. ERCP术后并发症临床分析. 胃肠病学和肝病学杂志 2013; 22: 708-710

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 709-712
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

内镜黏膜下剥离术治疗直肠类癌17例

王海波, 吴会超, 彭丹若, 刘 黔, 庹必光

王海波, 吴会超, 彭丹若, 刘黔, 庹必光, 贵州省遵义医学院附属医院消化内科 贵州省消化内镜诊断与治疗工程中心 贵州省遵义市 563003
王海波, 主治医师, 主要从事大肠癌的早期诊断与治疗及消化内镜下的治疗.
作者贡献分布: 王海波、吴会超及庹必光对此文所做贡献均等; 内镜诊断由王海波、吴会超及刘黔操作完成; 手术由王海波与刘黔操作完成; 资料收集及整理由王海波与彭丹若完成; 本论文写作由王海波与庹必光完成.
通讯作者: 庹必光, 教授, 563003, 贵州省遵义市汇川区大连路149号, 遵义医学院附属医院消化内科. tuobiguang@yahoo.com.cn
收稿日期: 2013-07-03 修回日期: 2013-12-23
接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

Endoscopic submucosal dissection for rectal carcinoid tumors: An analysis of 17 cases

Hai-Bo Wang, Hui-Chao Wu, Dan-Ruo Peng, Qian Liu, Bi-Guang Tuo

Hai-Bo Wang, Hui-Chao Wu, Dan-Ruo Peng, Qian Liu, Bi-Guang Tuo, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China
Correspondence to: Bi-Guang Tuo, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 149 Dalian Road, Huichuan District, Zunyi 563003, Guizhou Province, China. tuobiguang@aliyun.com.cn
Received: 2013-07-03 Revised: 2013-12-23
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To assess the clinical efficacy and safety of endoscopic submucosal dissection (ESD) for rectal carcinoid tumors.

METHODS: Seventeen consecutive patients with 17 carcinoid tumors were enrolled. Carcinoid tumors were diagnosed by colonoscopy and endoscopic ultrasonography, and further confirmed by histopathologic examination of resected specimens. There was no endoscopic evidence of muscularis propria invasion or evidence of lymph node or distant metastasis. Tumors were resected by ESD with the Dual Knife and IT-2 Knife. All cases were followed after operation.

RESULTS: Complete resection was achieved in all 17 cases (100%). The size of tumors ranged from 0.4 to 1.2 cm (average 0.72 cm). The operative time was 7-25 min (average 9.4 min). No late hemorrhage or perforation occurred. The capsules of all resected tumors were complete. The bases of tumors and the edges within 0.2 cm from tumors had no lesions. No residual lesion or recurrence occurred during the follow-up period of 3-36 mo.

CONCLUSION: ESD is feasible and effective for patients with a rectal carcinoid tumor smaller than 10, but without muscularis propria invasion.

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

Key Words: Endoscopic submucosal dissection; Rectal carcinoid tumors

Wang HB, Wu HC, Peng DR, Liu Q, Tuo BG. Endoscopic submucosal dissection for rectal carcinoid tumors: An analysis of 17 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 709-712 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/709.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.709

摘要

目的: 探讨内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)治疗直肠类癌的应用价值.

方法: 对内镜发现的直肠黏膜下肿瘤, 通过微超声探头检查, 超声内镜明确诊断17例来源于黏膜下层、没有固有肌层受累和淋巴结或远处转移的直肠类癌, 用Dual Knife和IT-2 Knife进行ESD治疗, 并进行术后随访.

结果: 17例成功完成ESD治疗, 完整切除率达100%. 病变最大直径0.4-1.2 cm(平均0.72 cm), 手术时间7-25 min(平均9.4 min). 无1例出现迟发性出血及穿孔. 所有ESD剥离肿瘤包膜完整, 基底和切缘0.2 cm以内均未见病变累及. 术后随访3-36 mo, 无1例病变残留和复发.

结论: ESD治疗直径≤2.0 cm、未侵犯固有肌层的直肠类癌安全、有效, 可以一次性完整切除病变, 提供完整的病理学诊断资料.

■背景资料
直肠类癌是一种恶性程度低的神经内分泌肿瘤, 但发展缓慢, 其恶性程度的判断主要取决于肿瘤的大小、是否侵入肌层及组织学分化程度. 随着内镜治疗技术的不断提高, 直肠类癌的内镜治疗已成为研究热点.

■同行评议者
许剑民, 教授, 上海市复旦大学附属中山医院普外科; 卢宁, 副主任医师, 中国人民解放军兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 内镜黏膜下剥离术; 直肠类癌

核心提示: 直肠类癌是一种生长缓慢、恶性程度低、病程较长的神经内分泌肿瘤. 目前越来越多的直肠类癌能够在早期通过内镜下一体化诊断及治疗, 而内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection)的应用也使类癌在内镜下治疗的完整切除率和安全性大大提高, 复发率下降.

王海波, 吴会超, 彭丹若, 刘黔, 庹必光. 内镜黏膜下剥离术治疗直肠类癌17例. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 709-712
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/709.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.709

■研发前沿
内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)可以完整地切除病变, 较内镜黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)更能体现微创手术的优越性和有效性, 但是需要较高的内镜治疗技术, 如何掌握ESD操作技巧、减少并发症的发生, 体现该技术的应用价值是研究热点.

0 引言

内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)是由内镜黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)演变出一种新技术. 由于较大较深的消化系病变在EMR治疗时, 容易病变残留或复发, 为了避免EMR的局限性, 一次性能将较大较深的消化系病变完整地切除, 并将整块病变送病理组织学检查, ESD显示出明显的优势, 而且同时具备微创治疗的优越性[1]. 我院消化内镜科自开展ESD新技术治疗方法3年以来, 成功切除17例直肠类癌, 而且术后经病理及免疫组织化学染色检查均证实为类癌, 取得了较好的临床效果. 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2010-04/2013-04我院消化内镜科经肠镜检查发现的直肠黏膜下肿瘤经超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)检查, 有17例符合直肠类癌超声内镜影像学改变[2], 然后患者住院后在全麻下行ESD治疗. 其中男患12例, 女患5例. 年龄31-66岁(平均年龄为45.5岁). 我院消化内镜科采用ERBE公司VIO-200D高频电切装置和APC300氩离子凝固器. Olympus公司CF Q260电子结肠镜; KD-650L型Dual刀和KD-611L型IT-2刀; NM-4L-1注射针, FD-410LR热活检钳, FG-8U-1异物钳, HX-610-90金属止血铗.

1.2 方法

1.2.1 手术: 所有患者在术前均充分告知手术的必要性和风险性, 患者及其委托人签署手术知情同意书, 并经术前常规检查明确无内镜治疗禁忌症, 腹部彩超、X线或CT检查常规排除有无肝、肺等远处转移. 手术步骤: (1)观察病变: 内镜头端附加透明帽后, 充分暴露局部病变, 活检钳触动病变均有黏膜下滑动; (2)标记: 应用Dual刀头端于要切除的病变边缘进行电凝标记; (3)黏膜下注射: 使用0.0005%肾上腺素生理盐水混合溶液, 为了手术中分辨剥离层次, 还混有少量靛胭脂, 用注射针于病变标记点处进行多点黏膜下注射, 观察有无抬举征; (4)预切开: 应用Dual刀沿标记点环形切开黏膜, 这时可观察到一些部分肿瘤表面; (5)剥离: 根据病变大小应用Dual刀或/和IT-2刀进行黏膜下剥离, 剥离过程中可反复进行黏膜下注射, 保持病变与肌层分离, 直至完整剥离肿瘤; (6)创面处理: 切除病变后, 观察创面基底部有无残留, 然后应用APC或热活检钳处理创面预防出血. 对于较大创面可采用金属止血铗夹闭创面.

1.2.2 术后处理: 处理创面后应用异物钳将肿瘤取出, 观察包膜是否完整, 并放入formalin固定液中, 送病理组织学检查.

1.2.3 术后观察: 患者有无腹痛、腹胀症状, 有无肛门滴血表现. 术后常规禁食、卧床休息, 使用止血药和补液治疗, 24 h后如无并发症, 可进流质饮食. 术后第3个月复查内镜, 观察局部愈合情况及病变有无残留; 第6、12、24、36个月分别复查内镜, 了解病变有无复发.

2 结果

2.1 部位、大小及时间 17例中肿瘤位于距肛门约4-12 cm直肠处. 剥离病变时证实均来源于黏膜下层, 固有肌层完整. 本组病例均成功完成ESD治疗, 完整切除率达100%, 切除病变最大直径0.4-1.2 cm, 平均0.72 cm. 病变部位标记至内镜下完整切除病变及处理创面时间7-25 min, 平均9.4 min.

2.2 手术成功率及病理结果 严格按照手术步骤(标记、黏膜下注射、预切开、剥离、处理创面)进行手术. 术中有少量出血, 均采用APC或热活检钳止血成功, 无1例出现迟发性出血及穿孔. 所有ESD切除的肿瘤包膜完整(图1), 病理报告基底和切缘0.2 cm以内均未见病变累及, 且所有病变均得到病理及免疫组织化学染色检查证实为直肠类癌, 超声内镜诊断率达100%.

2.3 术后随访 患者术后第2天均予进食流质, 住院4-6 d, 平均4.4 d. 17例患者目前术后随访了3 mo的1例, 随访了6 mo的2例, 随访了1年的5例, 随访了2年的8例, 随访了3年的1例, 所有患者的创面均愈合良好, 无1例病变残留或复发.

■相关报道
Yamaguchi等指出ESD切除直径≤1 cm的直肠类癌是安全有效的. Park等报道在两组肿瘤大小无统计学差异的患者中, EMR和ESD的完整切除率分别为71.0%、90.3%, 而且并发症较EMR少.

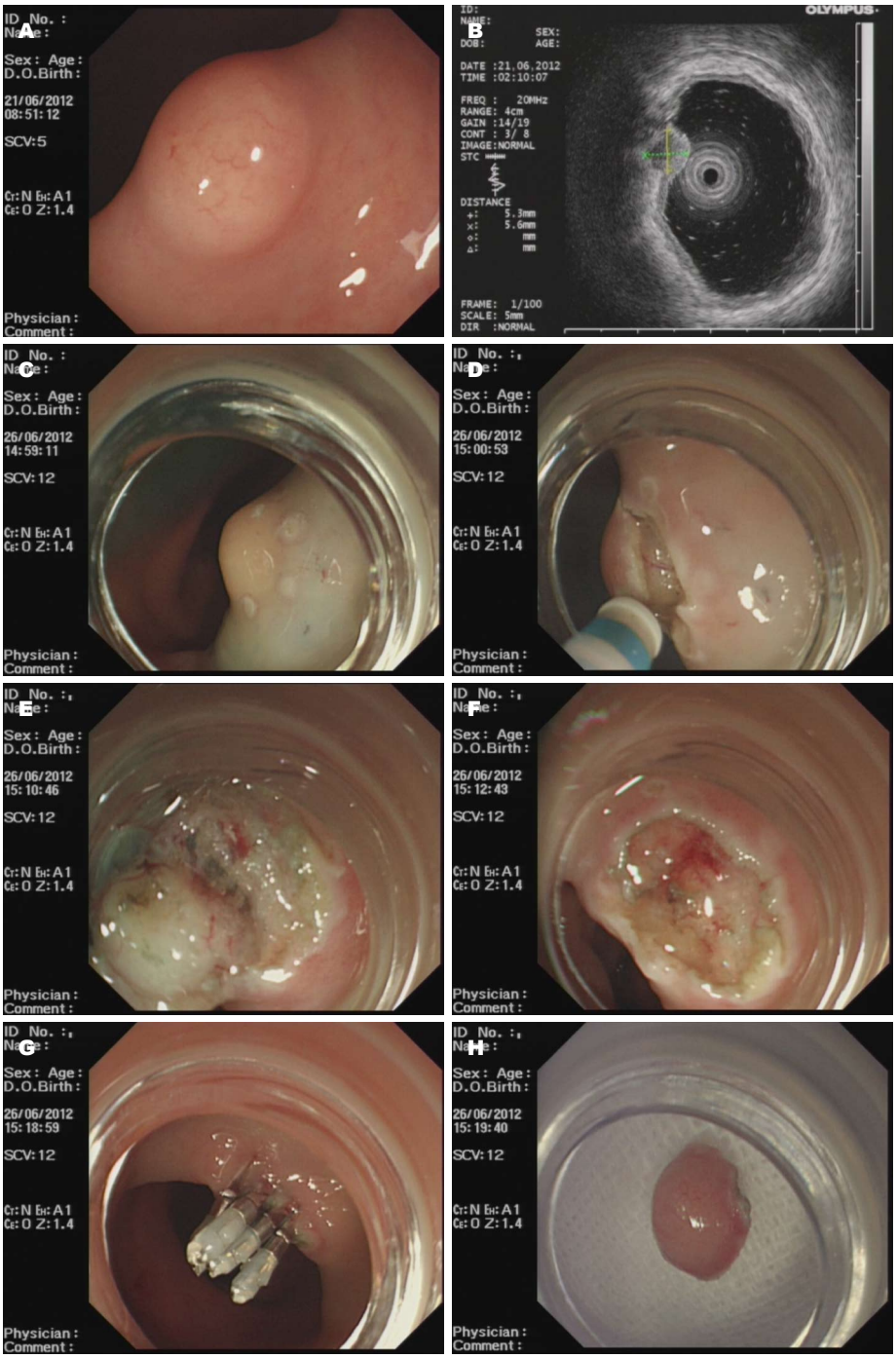

图 1 直肠类癌镜下观. A: 结肠镜检查发现黏膜下肿物; B: 超声内镜证实病变部位; C: ESD术前黏膜下注射; D: ESD术中预切开; E: ESD术中黏膜剥离; F: ESD术后创面; G: ESD术后钛铗封闭创面; H: ESD切除的直肠类癌.

■创新盘点

随着内镜下一体化诊断及治疗技术的不断提高, 对于直径≤2.0 cm、未侵犯固有肌层的直肠类癌, 本文从治疗效果、有无并发症及随访情况, 认为ESD仍是首选治疗方法, 值得推广.

3 讨论

直肠类癌是一种生长缓慢、恶性程度低、病程较长的神经内分泌肿瘤, 其发病率已位居胃肠道类癌的首位[3], 好发于40-60岁的中老年人群, 且男患多于女患, 本组17例病例平均年龄45.5岁, 男患12例, 女患5例, 均符合文献报道[4].

直肠类癌是具有潜在恶性的肿瘤, 判断其良恶性的主要依据在于肿瘤大小及其是否侵入肌层, 目前普遍认为, 直径≤1 cm的直肠类癌肿瘤鲜有肌层侵犯、淋巴结受累及远处转移[5,6], 对于此类肿瘤, 内镜下一体化诊断及治疗已逐渐受到内镜医师的重视.

如今超声内镜技术的应用可对消化系管壁黏膜下生长的肿瘤性质进行更精确的鉴别诊断, 特别是对于较小黏膜下肿瘤的诊断精确度高, 这对于直肠类癌的诊断、良恶性判断及治疗方案的选择有着重大意义. 本组17例病例的术后组织经病理及免疫组织化学染色检查证实均为

■同行评价
本文目标明确, 设计合理, 实验数据可靠, 具有一定的创新性, 研究结果有一定科学意义.

直肠类癌, 超声内镜诊断率达100%, 这与多篇文献[7,8]报道结果一致, 由此可见超声内镜诊断直肠类癌已是术前常规检查项目.

直肠类癌肿瘤直径≤1 cm、未侵犯肌层及肿瘤表面无溃疡或凹陷是目前被大多数学者认为符合内镜下治疗的3条标准[9,10]. 内镜治疗方法既往以标准的EMR为主[11], 但近年来随着ESD新技术的开展, 使病变切除更完整、更彻底. EMR对于消化道较大的平坦病变、早期癌和黏膜下肿瘤, 只能进行分块切除, 不能获得完整的病理学诊断资料, 或者在无法确定解剖层次的情况下切除病变, 大大增加病变残留及复发的风险, 而ESD可以大块、完整地切除病变, 术后可将完整的病变组织进行全面的病理组织学检查, 提供完整的病理诊断依据, 并判断患者是否治愈及是否需要进一步治疗, 可见ESD较EMR更能体现微创手术的优越性和有效性.

而针对此类病变, Lee等[12]在两组肿瘤大小无统计学差异的患者中, EMR和ESD的完整切除率分别为89.3%、100%, 且两组的并发症发生率无统计学差异, 无1例复发. Baek等[13]报道12例直肠类癌患者经由EMR或ESD的完整切除率均达100%, 无1例出现并发症. 阮荣蔚等[14]对直径<1.5 cm的19例直肠类癌肿瘤行ESD治疗, 均完整切除病灶, 1例术中直肠小穿孔, 1例术后2 d出现创面边缘小动脉搏动性出血, 均随即采用金属止血铗夹闭妥善处理, 所有病例随访1-4年, 无1例复发及远处转移. 另有文献[15]报道16例超声内镜诊断的直肠类癌予ESD治疗, 病灶均一次性完整切除, 手术时间25-55 min, 6例术中出血, 予电凝及金属止血铗止血成功, 随访6-24 mo, 均无复发. 本组研究中, 笔者选取3年来我院消化内镜科收治的17例直肠类癌病例, 术前常规行超声内镜检查, 在排除恶性倾向的可能性后均行ESD, 手术完整切除率达100%, 无1例出现迟发性出血及穿孔, 随访3-36 mo, 无1例病变残留及复发. 以上数据提示, ESD在直肠类癌的内镜治疗上取得了较好的疗效, 并随着内镜技术的发展及内镜医师操作水平的提高, ESD将成为治疗良性直肠类癌高效、安全的内镜主要手术方式, 但由于ESD的开展时间较短, 病例数相对较少, 随访时间相对较短, ESD治疗直肠类癌的远期疗效有待进一步观察.

4 参考文献

1 刘云祥, 黄留业. 实用消化内镜治疗学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 4

2 金震东, 李兆申. 消化超声内镜学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2011: 11

3 Kinoshita T, Kanehira E, Omura K, Tomori T, Yamada H. Transanal endoscopic microsurgery in the treatment of rectal carcinoid tumor. *Surg Endosc* 2007; 21: 970-974 [PMID: 17285371 DOI: 10.1007/s00464-006-9155-y]

4 程天明, 秦和平. 消化道类癌的诊治现状. 现代消化及介入诊疗 2010; 15: 184-187

5 Bates HR. Carcinoid tumors of the rectum: a statistical review. *Dis Colon Rectum* 1966; 9: 90 [PMID: 5908773 DOI: 10.1007/BF02617306]

6 Naunheim KS, Zeitels J, Kaplan EL, Sugimoto J, Shen KL, Lee CH, Straus FH. Rectal carcinoid tumors--treatment and prognosis. *Surgery* 1983; 94: 670-676 [PMID: 6623366]

7 Ishii N, Horiki N, Itoh T, Maruyama M, Matsuda M, Setoyama T, Suzuki S, Uchida S, Uemura M, Iizuka Y, Fukuda K, Suzuki K, Fujita Y. Endoscopic submucosal dissection and preoperative assessment with endoscopic ultrasonography for the treatment of rectal carcinoid tumors. *Surg Endosc* 2010; 24: 1413-1419 [PMID: 20033710 DOI: 10.1007/s00464-009-0791-x]

8 周平红, 姚礼庆, 钟芸诗, 徐美东, 高卫东, 何国杰, 张扶群, 陈魏峰, 秦新裕. 直肠类癌的内镜超声诊断和内镜黏膜下切除. 中华消化内镜杂志 2006; 23: 175-178

9 周平红, 姚礼庆, 秦新裕. 直肠类癌的内镜诊断和治疗. 中国临床医学 2005; 12: 756

10 Konishi T, Watanabe T, Kishimoto J, Kotake K, Muto T, Nagawa H. Prognosis and risk factors of metastasis in colorectal carcinoids: results of a nationwide registry over 15 years. *Gut* 2007; 56: 863-868 [PMID: 17213340 DOI: 10.1136/gut.2006.109157]

11 Kim YJ, Lee SK, Cheon JH, Kim TI, Lee YC, Kim WH, Chung JB, Yi SW, Park S. [Efficacy of endoscopic resection for small rectal carcinoid: a retrospective study]. *Korean J Gastroenterol* 2008; 51: 174-180 [PMID: 18451691]

12 Lee DS, Jeon SW, Park SY, Jung MK, Cho CM, Tak WY, Kweon YO, Kim SK. The feasibility of endoscopic submucosal dissection for rectal carcinoid tumors: comparison with endoscopic mucosal resection. *Endoscopy* 2010; 42: 647-651 [PMID: 20669076 DOI: 10.1055/s-0030-1255591]

13 Baek IH. Endoscopic submucosal dissection or conventional endoscopic mucosal resection is an effective and safe treatment for rectal carcinoid tumors: a retrospective study. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2010; 20: 329-331 [PMID: 20438309 DOI: 10.1089/lap.2009.0373]

14 阮荣蔚, 王实, 刘永军, 陶亚利, 俞江平, 朱舒文. 内镜超声和内镜粘膜下剥离诊治直肠类癌31例. 中国微创外科杂志 2012; 12: 1063-1066

15 焦胜, 成宏伟, 陈苏阳, 黄震, 徐丽, 谢志华. 内镜粘膜下剥离术治疗直肠类癌的临床价值. 实用临床医药杂志 2012; 16: 59-60

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 713-717
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

机会性结肠镜检查对结直肠肿瘤发现率的影响

兰 君, 孙方利, 吴 军, 付信娟, 滕春媛, 王燕平

兰君, 青岛大学医学院附属海慈医院 山东省青岛市 266000
孙方利, 吴军, 付信娟, 滕春媛, 王燕平, 青岛市海慈医院消化内科 山东省青岛市 266000
兰君, 主要从事消化系肿瘤的研究.
青岛市医药卫生发展科技基金资助项目, No. 2010-WSZD039
作者贡献分布: 此课题由孙方利设计; 研究过程由孙方利、兰君、滕春媛及王燕平操作完成; 数据分析由兰君完成; 本论文的写作由兰君、孙方利、吴军及付信娟完成.
通讯作者: 孙方利, 主任医师, 266000, 山东省青岛市人民路4号, 青岛市海慈医院消化内科. sunfangli737@sina.com
收稿日期: 2013-11-26 修回日期: 2013-12-11
接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-18

Detection rate of colorectal neoplasms by opportunistic colonoscopy

Jun Lan, Fang-Li Sun, Jun Wu, Xin-Juan Fu, Chun-Yuan Teng, Yan-Ping Wang

Jun Lan, Affiliated Haici Medical Group of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong Province, China
Fang-Li Sun, Jun Wu, Xin-Juan Fu, Chun-Yuan Teng, Yan-Ping Wang, Qingdao Haici Medical Group, Qingdao 266000, Shandong Province, China
Supported by: Municipal Science and Technology Development Funded Projects of Qingdao Medical and Health, No. 2010-WSZD039
Correspondence to: Fang-Li Sun, Chief Physician, Qingdao Haici Medical Group, 4 Renmin Road, Qingdao 266000, Shandong Province, China. sunfangli737@sina.com
Received: 2013-11-26 Revised: 2013-12-11
Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To investigate the detection rate of colorectal neoplasms by opportunistic colonoscopy.

METHODS: In total, 32694 patients who visited Department of Gastroenterology of our hospital from January 2012 to September 2013 were randomly divided into a case group and a control group. The case group was tested by opportunistic colonoscopy, while the control group was tested based on the clinical pattern. The difference in the detection rate of colorectal neoplasms was compared between the two groups.

RESULTS: Of 16298 patients in the trial group, 1167 underwent colonoscopy and the detection rate of colorectal neoplasms was 1.38% (225/16298). Of 16396 patients in the control group, 855 underwent colonoscopy and the detection rate of colonoscopy was 1.07% (176/16396). The detection rate of colorectal neoplasms differed significantly between the two groups ($\chi^2 = 6.209$, $P = 0.014$).

CONCLUSION: The detection rate of colorectal neoplasms by opportunistic colonoscopy is higher than that based on the clinical pattern.

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

Key Words: Colorectal neoplasms; Opportunistic colonoscopy; Fecal occult blood test; Colonoscopy

Lan J, Sun FL, Wu J, Fu XJ, Teng CY, Wang YP. Detection rate of colorectal neoplasms by opportunistic colonoscopy. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 713-717 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/713.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.713

摘要

目的: 研究机会性结肠镜检查对结直肠肿瘤发现率的影响.

方法: 选择2012-01/2013-09于我院消化内科门诊就诊的患者32694例, 随机分为试验组及对照组. 试验组采用机会性结肠镜检查模式, 对照组采用医师的临床经验模式, 通过χ^2检验比较两组结直肠肿瘤发现率有无差异.

结果: 试验组就诊人数共16298例, 1167例接受结肠镜检查, 发现结直肠肿瘤共225例, 结直肠肿瘤发现率为1.38%(225/16298); 对照组就诊人数共16396例, 855例接受结肠镜检查, 发现结直肠肿瘤共176例, 发现率为1.07%(176/16396); 二者差异具有统计学意义($\chi^2 = 6.209$, $P = 0.014<0.05$).

结论: 机会性结肠镜检查对结直肠肿瘤发现率较临床经验模式高, 采用机会性结肠镜检查方法可发现更多结直肠肿瘤.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

■背景资料
结直肠癌的发生率及死亡率居高不下, 通过筛查可以降低结直肠癌的发生率及死亡率. 近期, 国内外对结直肠肿瘤的机会性筛查相关研究备受关注.

■同行评议者
杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院

■研发前沿
结直肠癌的发生率逐年上升，而早期结直肠癌及其癌前疾病-腺瘤性息肉多无特异性临床症状. 通过筛查可将结直肠癌在早期可治愈阶段及癌前疾病阶段切除来预防结直肠癌的发生及死亡，需要结肠镜结合病理组织学这一金标准. 而如何提高结直肠肿瘤检查率是目前被普遍关注的问题.

关键词: 结直肠肿瘤; 机会性结肠镜; 粪便潜血试验; 结肠镜

核心提示: 本研究通过试验组-机会性结肠镜检查组及对照组-医师临床经验组对比，研究表明在同一时期、结肠镜检查依从性及镜检阳性率相似情况下，试验组结直肠肿瘤检出率高，直接原因在于试验组有更多患者接受结肠镜检查.

兰君, 孙方利, 吴军, 付信娟, 滕春媛, 王燕平. 机会性结肠镜检查对结直肠肿瘤发现率的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 713–717 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/713.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.713

0 引言

结直肠肿瘤较为常见，其中结直肠癌给人们的生活质量造成严重下降，其发病率及死亡率都居高不下. 即使被诊断为结直肠癌，早期结直肠癌较晚期术后患者生存率较高. 筛查被认为是早发现、早诊断结直肠癌的最佳方式. 国际上目前的筛查方式有: 自然人群筛查和机会性筛查. 适合我国医疗特点的机会性筛查(opportunistic screening)[1]，也称为个体筛查或个案检查，他是一种以个体为单位的临床筛查方式，可以是受筛查者主动前往医生处进行筛查，也可以由医生根据受筛查者的危险水平决定对其进行筛查. 本文通过单中心前瞻性比较机会性结肠镜检查与既往临床模式检出结直肠肿瘤不同，探讨机会性结肠镜检查对结直肠肿瘤发现率的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2012-01/2013-09于青岛市海慈医疗集团消化内科门诊就诊的患者资料.

1.2 方法

1.2.1 分组: 将就诊患者随机分为试验组跟对照组，各组均由3名固定副主任及主任医师接诊. 试验组符合以下条件建议其行结肠镜检查: 包括: (1)有消化系症状，如便血、黏液便和腹痛者等; (2)不明原因贫血/体质量下降; (3)本人有癌症史; (4)有结直肠癌癌前疾病者(如结直肠腺瘤、溃疡性结肠炎、克罗恩病、血吸虫病等); (5)结直肠癌家族史的直系亲属; (6)结直肠息肉家族史的直系亲属; (7)粪便隐血试验阳性; (8)有盆腔放疗史者; (9)符合下列6项中任意2项者，慢性腹泻、慢性便秘、黏液血便、慢性阑尾炎或阑尾切除史、慢性胆囊炎或胆囊切除史、长期精神压抑[2]. 其中需剔出以下人群: 拒绝接受检查者; 年龄超过85岁者; 严重心肺疾病患者; 患有其他严重疾病不能耐受结肠镜检查者. 对照组中建议结肠镜检查者为医师依据临床经验认为需要接受结肠镜检查以明确结直肠病情或排除结直肠癌而选择的患者，不包括主动要求行结肠镜检查的患者. 所有进入本研究患者检查及治疗前均先签署知情同意书，并获得医院伦理委员会批准.

1.2.2 研究: 试验组: 对筛查对象采取机会性结肠镜检查模式，医师向其进行宣传教育，填写结直肠肿瘤问卷调查表，建议其留取粪便行粪便隐血试验及行结肠镜检查. 粪便隐血试验结果以阳性、阴性计入统计. 对照组建议其留取粪便行粪便隐血试验及行结肠镜检查. 粪便隐血试验采用免疫法检测，结肠镜采用日本OLYMPUS CF240I、OLYMPUS CF260AI. 在结肠镜检查过程中发现病变取活组织检查送病理检验. 其中对于结肠息肉，镜检过程中发现直径<0.5 cm的息肉，用活检钳钳除整个息肉送病理检查; 直径≥0.5 cm的息肉，采用高频电凝切除或灼除，回收息肉送病理检查; 直径>2.0 cm的巨大息肉，不能一次性切除的，采用分块、分次套切送病理检查.

统计学处理 采用SPASS软件19.0对数据进行处理，计数资料以频数及百分数(率)表示，采用χ^2检验. 对结直肠肿瘤影响因素的统计分析采用Logistic回归，计算各因素的OR值、95%的可置信区间及P值. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 研究对象的一般资料 试验组总就诊人数为16298例，其中符合条件并建议其接受结肠镜检查者共1434例; 最终共1167例接受结肠镜检查，其中年龄在17-85岁，中位年龄55岁，男665例，女502例. 对照组就诊人数为16396例，其中依据医师临床经验建议其接受结肠镜检查者共1035例，最终共855例接受结肠镜检查，其中年龄在15-84岁，中位年龄55岁，男443例，女412例(图1).

2.2 结直肠肿瘤的发现率 试验组总就诊人数为16298例，发现结直肠肿瘤225例，其中结直肠癌52例，结直肠腺瘤173例. 对照组就诊人数为16396例，发现结直肠肿瘤176例，其中结直肠癌43例，结直肠腺瘤133例. 两组在同一时期、门诊医师水平无明显差异、各组总门诊量相近情况下，两组结直肠肿瘤发现率的结果如表1. 同一时期，试验组与对照组总就诊人数大致情况

表 1 总就诊人数中发现结直肠肿瘤的情况

分组	研究总人数	结直肠癌数n(%)	χ^2	P值	结直肠腺瘤数n(%)	χ^2	P值	结直肠肿瘤数n(%)	χ^2	P值
试验组	16298	52(0.32)	0.910	0.356	173(1.06)	4.848	0.029	225(1.38)	6.209	0.014
对照组	16396	43(0.26)			133(0.81)			176(1.07)		

本研究中结直肠肿瘤包括结直肠癌及结直肠腺瘤.

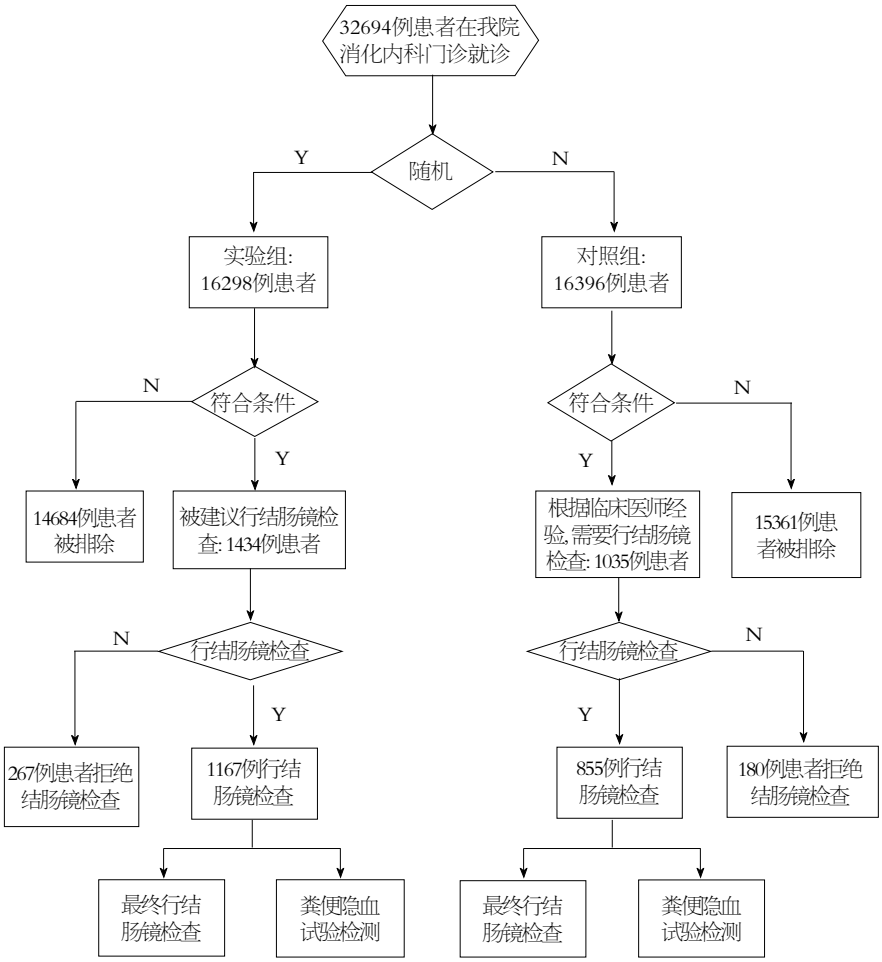

图 1 本研究各阶段试验流程及患者人数. Y: Yes; N: No.

相同, 两组对结直肠肿瘤的发现率差异具有统计学意义, 试验组比对照组可发现更多结直肠肿瘤. 其中, 两组对结直肠癌的发现率无明显差异, 而试验组较对照组对结直肠肿瘤发现率的差异主要表现在结直肠腺瘤的发现率上.

2.3 结直肠肿瘤结肠镜检出结果 试验组共832例完成粪便隐血试验, 其中结果阳性者61例, 阳性率为7.33%(61/832); 试验组被建议结肠镜检查者共1434例, 最终1167例接受结肠镜检查, 结肠镜检查依从性为81.35%(1167/1434), 检出结直肠肿瘤225例, 结直肠肿瘤检出率为19.28%(225/1167)其中结直肠癌52例, 结直肠腺瘤173例, 对照组共624例完成粪便隐血试验, 阳性者46例, 阳性率为7.41%(46/624); 被建议接受结肠镜检查者共1035例, 最终855例接受结肠镜检查, 结肠镜检查依从性为82.60%(855/977), 共检出结直肠肿瘤176例, 结直肠肿瘤检出率为20.58%(176/855), 其中结直肠癌43例, 结直肠腺瘤133例. 两组在同一时期, 门诊医师水平大致相同、各组门诊总量及结肠镜检查依从性大致相同情况下, 两组结直肠肿瘤检出结果如表2. 在同一时期, 两组中行结肠镜检查患者结直肠

■相关报道
韩英通过国内外结直肠癌筛查回顾与现状, 推荐"机会性筛查"模式. Boroff等研究发现远端结肠息肉发生率与腺瘤发生率不相关. 许岸高等研究发现机会性筛查人群依从性高, 可以更多地检出结直肠癌和癌前疾病.

■**创新盘点**
本研究采用了机会性结肠镜检查，侧重于结肠镜及其病理检查，不同于以往序贯性筛查方案，减少了粪便隐血试验阴性相关的结直肠肿瘤的漏诊率，并且通过对比试验来探讨了机会性结肠镜检查对结直肠肿瘤检出率的影响.

表 2 接受结肠镜检查人数中发现结直肠肿瘤的情况

分组	结肠镜检出数	结直肠癌例数	χ^2	*P*值	结直肠腺瘤例数	χ^2	*P*值	结直肠肿瘤例数	χ^2	*P*值
试验组	1167	52	0.362	0.595	173	0.205	0.661	225	0.255	0.651
对照组	855	43			133			176		

表 3 性别、年龄对结直肠肿瘤检出率的关系

性别	年龄	结直肠肿瘤	非结直肠肿瘤	合计
男	50岁之下	29	179	208
	50岁之上	118	309	427
女	50岁之下	9	155	164
	50岁之上	69	299	368

肿瘤(包括结直肠腺瘤、结直肠癌)的检出率无明显差异.

2.4 性别、年龄对结直肠肿瘤检出率的关系 采用Logistic回归研究年龄、性别对于结直肠肿瘤检出率，对于年龄，χ^2 = 28.247，*P* = 0.000<0.5，OR = 2.768，95%CI: 1.902-4.029. 对于性别，χ^2 = 14.350，*P* = 0.000<0.5，OR = 1.809，95%CI: 1.331-2.459. 年龄跟性别对于结直肠肿瘤的检出是有影响的. 结直肠肿瘤随着性别及年龄段变化而发生变化(表3).

3 讨论

结直肠肿瘤是临床常见肿瘤，分为良性、恶性，其中结直肠癌是世界范围内常见的恶性肿瘤之一. 随着国人生活水平的提高和饮食结构的变化，结直肠癌的发生率和死亡率呈上升趋势. 早期诊断结直肠癌，术后5年生存率可高达90%以上，而晚期则不足10%[3]. 目前普遍认为结直肠癌主要由其癌前疾病-结直肠腺瘤性息肉转化而来，该窗口期平均可达10年左右，有文献报道通过发现和切除腺瘤性息肉可预防结直肠癌的发生及患者死亡[4]，故对结直肠肿瘤进行筛查，较早发现结直肠癌及其癌前疾病，通过干预及治疗，可降低其死亡率[5]. 目前国际上对结直肠肿瘤的筛查方式主要有系统性筛查和机会性筛查两种，而在我国目前国情及其卫生医疗条件下开展机会性筛查更为适合. 本研究通过是否采用机会性结肠镜筛查的方法分为试验组跟对照组，通过研究发现在同一时期、两组就诊人数、门诊医师水平、患者依从性相近的情况下，试验组中接受结肠镜检查者对结直肠肿瘤检出率与对照组接受结肠镜检查者结直肠肿瘤检出率无显著差异. 而采用机会性结肠镜检查对所有就诊患者发现结直肠肿瘤比率高于根据医师临床经验模式发现结直肠肿瘤比率，该情况说明了试验组就诊患者中可以发现更多的结直肠肿瘤，直接原因在于试验组的结肠镜推荐率较高，而二者的结肠镜依从性类似，检查的阳性率也类似，因此发现了更多肿瘤的直接原因在于机会筛查组有更多的患者接受了结肠镜检查. 而且试验组减少了结直肠肿瘤的漏诊率，更具有结肠镜检查的临床意义，并从而借助个体机会性筛查的平台和渠道，弥补群体普查不足.

本研究中通过机会性结肠镜检查，结直肠肿瘤检出率为19.28%，较韩英等[6]及钟选芳等[7]得出的结直肠肿瘤检出率低. 其分析原因可能为韩英等的研究中所有研究对象的年龄均在50岁之上，而本研究中研究对象的年龄在17-85岁，研究对象年龄的差异使得两个研究中得出的结直肠肿瘤检出率存在着差异，如本研究中得出年龄对结直肠肿瘤检出率有影响. 钟选芳等[7]的研究中检出的结直肠肿瘤包括了结直肠癌及结直肠息肉，而本文研究的结直肠肿瘤只包括结直肠癌及结直肠腺瘤[2]，前者对于结直肠肿瘤定义范围广，得出的结直肠肿瘤检出率较本研究高. 其他原因可能为本研究并未严格按照机会性结直肠肿瘤筛查模式进行筛查，而只是以机会性结肠镜检查作为重点筛查方法. 在研究初期预试验中，发现在临床筛查工作中存在着患者对粪便隐血试验依从性差，及对结肠镜结合病理学检查作为结直肠肿瘤检出金标准的认识，使得患者更倾向于接受结肠镜检查. 而粪便隐血试验需要排除饮食、药物等因素及其他可使其呈假阳性的原因、患者对粪便隐血试验依从性差及最终无论粪便隐血试验结果如何都要依靠结肠镜检查确诊等因素使得本研究制定了机会性结肠镜检查方案，而没有采取所谓序贯性筛查方案[8].

结直肠肿瘤的发生是由遗传因素与环境因素综合作用的结果. 影响结直肠肿瘤发生的遗传基因较多，如*Bmi1*基因[9]在结直肠癌组织较正常组织中高表达. 遗传因素不易干预，但环境因

素可通过干预来预防结直肠肿瘤的发生. 有研究报道[10], 结直肠癌和结直肠腺瘤组的幽门螺杆菌感染率高于非结直肠肿瘤组, 故可通过根除幽门螺杆菌来降低结直肠肿瘤发生率. Ren等[11]研究表明: 糖尿病患者与结直肠癌的发病呈正相关, 通过控制血糖水平从一定程度上可来降低结肠癌发病率. 而通过结直肠肿瘤的筛查可降低结直肠癌的死亡率, 在发现并切除腺瘤性息肉后, 可通过戒烟、调整饮食结构、控制体质量、加强锻炼、摄入多种维生素及服用非甾体类药物来预防腺瘤性息肉的复发及结直肠癌的发生[12-16].

尽管机会性筛查对于提高肿瘤检出率是肯定的, 但是相应带来的是人力成本和医疗成本的提高. 为此, 陶倩[17]对2012年天津结直肠癌筛查项目进行了成本效益分析得出筛查经济效益大于成本, 具有良好经济效益和社会效益, 值得推广. 本研究中对结直肠肿瘤的筛查采用机会性筛查模式, 在门诊即可进行, 无需特殊经费支持和额外的工作人员, 这是机会性筛查的特点之一, 较自然人群筛查节省人力、财力.

在目前国情下, 结直肠肿瘤普查不能全面覆盖, 结直肠肿瘤机会性筛查成为个体筛查的平台及渠道, 弥补了群体普查的不足. 机会性筛查对结直肠肿瘤检出的价值是肯定的, 结肠镜检查结合病理学检查是目前诊断结直肠肿瘤的金标准. 本研究直接进行机会性结肠镜检查明显提高结直肠癌前疾病-结直肠腺瘤的检出率, 对减少结直肠癌的发生、发展及患者预后具有重要意义.

4 参考文献

1 Harnett SJ, Wong SK, Lackey GW. Opportunistic GP-based bowel cancer screening. *Med J Aust* 2003; 178: 92-93 [PMID: 12526732]

2 房静远. 中国大肠肿瘤筛查、早诊早治和综合预防共识意见. 胃肠病学和肝病学杂志 2011; 20: 979-995

3 O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1420-1425 [PMID: 15467030]

4 Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, Shi W, Bond JH, Schapiro M, Panish JF, Stewart ET, Waye JD. Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med* 2012; 366: 687-696 [PMID: 22356322 DOI: 10.1056/NEJMoa1100370]

5 Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith RA, Thorson A, Winawer SJ. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology* 2008; 134: 1570-1595 [PMID: 18384785 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.02.002]

6 韩英, 武子涛, 李世荣, 盛剑秋. 伺机性筛查2756例大肠肿瘤结果分析. 中国误诊学杂志 2008; 8: 2130-2130

7 钟选芳, 许岸高, 肖丹, 甘爱华, 张晓慧, 钟旭辉, 林燕华. 大肠肿瘤机会性筛查初探. 胃肠病学和肝病学杂志 2013; 22: 404-406

8 郑树, 张苏展, 蔡善荣, 黄彦钦. 大肠癌筛查方案及其实践. 中国肿瘤 2009; 18: 700-704

9 邹艳芳, 田永, 徐峰. Bmi-1和Mel-18基因在大肠癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2013; 21: 397-402

10 何敏, 陈文科, 邹兵, 赖广顺, 余光银, 吕国庆. 幽门螺杆菌感染与大肠癌的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20: 2742-2745

11 Ren X, Zhang X, Zhang X, Gu W, Chen K, Le Y, Lai M, Zhu Y. Type 2 diabetes mellitus associated with increased risk for colorectal cancer: evidence from an international ecological study and population-based risk analysis in China. *Public Health* 2009; 123: 540-544 [PMID: 19664792 DOI: 10.1016/j.puhe.2009.06.019]

12 路明亮, 黄华. 体质量指数与结直肠癌相关性的研究现状. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1957-1960

13 Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Eheman C, Zauber AG, Anderson RN, Jemal A, Schymura MJ, Lansdorp-Vogelaar I, Seeff LC, van Ballegooijen M, Goede SL, Ries LA. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 2010; 116: 544-573 [PMID: 19998273 DOI: 10.1002/cncr.24760]

14 Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Wu K, Fuchs CS. Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men. *Gastroenterology* 2008; 134: 21-28 [PMID: 18005960]

15 Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, Meade TW. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010; 376: 1741-1750 [PMID: 20970847 DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61543-7]

16 Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2011; 377: 31-41 [PMID: 21144578 DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62110-1]

17 陶倩. 大肠癌筛查成本效益分析. 科技致富向导 2013; 20: 207-207

■同行评价

本文设计合理, 样本量较大, 对在我国开展结肠肿瘤的普查普治具有重要意义.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 718-723
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

LETM1蛋白在结肠癌组织中的表达及临床意义

高爱花, 金永民, 孙红花, 金文彪, 崔 海, 崔 现, 崔玉珍, 沈雄虎, 张松男, 朴龙镇

■背景资料
氨酸拉链EF-hand结构域跨膜蛋白1(leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1, LETM1)是最近新发现的线粒体蛋白, 曾经在医学学术界查明了LETM1蛋白是诱发沃尔夫综合症的原因蛋白质. 最近研究表明, LETM1在宫颈癌中高表达, 且可激活PI3K/Akt信号传导通路, 在肿瘤的发生、发展, 且发现在多种肿瘤组织中其表达水平异常升高.

高爱花, 金永民, 孙红花, 金文彪, 崔海, 崔现, 崔玉珍, 沈雄虎, 张松男, 朴龙镇, 延边大学附属医院肿瘤科 吉林省延吉市 133000
高爱花, 在读硕士, 主要从事肿瘤分子生物学的研究.
国家自然科学基金资助项目, Nos. 81060166, 81160270, 81160275
高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20102201120003
作者贡献分布: 高爱花与金永民对此文献贡献均等; 此课题由朴龙镇设计; 研究过程由高爱花与金永民共同完成; 孙红花、金文彪、崔海、崔现、崔玉珍、沈雄虎及张松男同负责临床资料的收集和试验的实施; 论文写作由朴龙镇完成.
通讯作者: 朴龙镇, 副教授, 主治医师, 133000, 吉林省延吉市局子街1327号, 延边大学附属医院肿瘤科. plz1978@126.com
电话: 0433-2660195
收稿日期: 2013-11-11 修回日期: 2013-12-16
接受日期: 2013-12-25 在线出版日期: 2014-02-18

Clinical significance of LETM1 protein expression in colonic cancer

Ai-Hua Gao, Yong-Min Jin, Hong-Hua Sun, Wen-Biao Jin, Hai Cui, Xian Cui, Yu-Zhen Cui, Xiong-Hu Shen, Song-Nan Zhang, Long-Zhen Piao

Ai-Hua Gao, Yong-Min Jin, Hong-Hua Sun, Wen-Biao Jin, Hai Cui, Xian Cui, Yu-Zhen Cui, Xiong-Hu Shen, Song-Nan Zhang, Long-Zhen Piao, Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 81060166, 81160270, and 81160275; and the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China, No. 20102201120003
Correspondence to: Long-Zhen Piao, Associate Professor, Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, 1327 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. plz1978@126.com
Received: 2013-11-11 Revised: 2013-12-16
Accepted: 2013-12-25 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To observe the expression of leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1 (LETM1) protein in colonic cancer and to determine whether LETM1 can be used as a marker for this malignancy.

METHODS: Immunohistochemical method was used to detect the expression of LETM1 and phosphorylated Akt (protein kinase B, PKB/Akt) and glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) in 73 specimens of colonic carcinoma. Disease-free survival time of colonic cancer patients was analyzed by Kaplan-Meier method. Univariate analysis was performed to determine the correlation between LETM1 expression and clinicopathologic parameters of colonic cancer.

RESULTS: The rate of high LTEM1 protein expression was 54.8% in 73 colonic cancer specimens. LETM1 protein expression was significantly correlated with degree of invasion (27.3% *vs* 72.7%, $P < 0.05$), differentiation (38.3% *vs* 61.7%, $P < 0.05$) and lymph node metastasis (22.7% *vs* 77.3%, $P < 0.05$), but not with age, sex or tumor size ($P > 0.05$ for all). High expression of LETM1 protein could activate the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt signal transduction pathway. The disease-free survival time of patients with high expression of LETM1 was significantly lower than that of patients with low expression of LETM1 ($P < 0.05$).

CONCLUSION: High expression of LETM1 may play a role in the pathogenesis, metastasis and recurrence of colon cancer. LETM1 protein may be used as an indicator to determine the prognosis of colon cancer patients.

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

Key Words: Leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1; Colonic cancer; Akt

Gao AH, Jin YM, Sun HH, Jin WB, Cui H, Cui X, Cui YZ, Shen XH, Zhang SN, Piao LZ. Clinical significance of LETM1 protein expression in colonic cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 718-723 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/718.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.718

摘要

目的: 观察亮氨酸拉链EF-hand结构域跨膜蛋白1(leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1, LETM1)在结肠癌中的表达情况, 探讨LETM1蛋白是否能够成为判断结肠癌患者预后的新的生物学指标.

■同行评议者
卢宁, 副主任医师, 兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

方法: 利用免疫组织化学法检测73例结肠癌患者组织中LETM1蛋白的表达水平和蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)/Akt的丝氨酸473(Ser473)、苏氨酸308(Thr308)两个磷酸化位点及葡萄糖合成激酶3β(glycogen synthase kinase 3β, GSK3β)的磷酸化水平, 并根据LETM1蛋白表达水平进行高表达和低表达分组; 采用Kaplan-Meier法分析各组无疾病生存期; 采用χ^2检验进行组间单因素分析.

结果: 在结肠癌患者中LETM1蛋白高表达率为54.8%, LETM1蛋白在结肠癌浸润深度、分化及淋巴结转移中低表达和高表达率分别为27.3%/72.7%、38.3%/61.7%和22.7%/77.3%, 其差异均有统计学意义(P<0.05), 而与年龄、性别、肿瘤大小未见统计学意义(P>0.05). LETM1蛋白在结肠癌组织中可以激活磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase , PI-3K)/Akt信号传导通路. LETM1高表达患者无疾病生存期显著低于LETM1低表达患者(P<0.05).

结论: LETM1蛋白在结肠癌中高表达, 可能参与结肠癌的发生、发展与复发. LETM1蛋白可以作为预测结肠癌患者预后的新的生物学指标.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 亮氨酸拉链EF–hand结构域跨膜蛋白1; 结肠癌; 蛋白激酶B

核心提示: 亮氨酸拉链EF-hand结构域跨膜蛋白1(leucine zipper/EF-hand- containing transmembrane protein 1, LETM1)表达水平的改变, 影响线粒体功能, 导致NADH/NADPH比率改变, 从而抑制人第10号染色体缺失的磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)的活性, 最终激活磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/丝/苏氨酸蛋白酶(serine/threonine kinase, Akt)信号传导通路.

高爱花, 金永民, 孙红花, 金文彪, 崔海, 崔现, 崔玉珍, 沈雄虎, 张松男, 朴龙镇. LETM1蛋白在结肠癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 718–723 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/718.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.718

0 引言

结直肠癌(colorectal cancer)是常见的消化系恶性肿瘤, 发病率为全球第4位的常见恶性肿瘤之一. 国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)最新数据显示, 2009年全球结直肠癌新病例接近120万例, 死亡63万例, 分别比2000年增加27%和28%, 平均年增3.9%和4%[1], 而中国的结直肠癌每年发病递增速度为世界平均数的两倍[2]. 蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)又称丝/苏氨酸蛋白酶(serine/threonine kinase, Akt)是一种60 kDa左右的蛋白激酶[3]. Akt参与的磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)介导的信号传导通路, 与细胞生长、抑制凋亡、增强端粒酶活性、促进肿瘤新生血管形成以及增加肿瘤细胞侵袭力等密切相关[3,4]. 越来越多的研究表明, 在结肠癌中Akt的磷酸化水平不同程度的增多[5-8]. 亮氨酸拉链EF-hand结构域跨膜蛋白1(leucine zipper/EF-hand-containing transmembrane protein 1, LETM1)是最近新发现的线粒体蛋白, 曾经在医学学术界查明了LETM1蛋白质是诱发Wolf-Hirschhorn Syndrome(沃尔夫综合症)的原因蛋白质[9]. 最近研究表明, LETM1在宫颈癌中高表达, 且可激活PI3K-Akt信号传导通路, 从而影响肿瘤的发生发展, 同时在结肠癌组织中发现LETM1蛋白高表达. 为结合临床, 我们采用结肠癌术后存档蜡块标本进行免疫组织化学, 进一步证明在结肠癌组织中LETM1蛋白表达水平及与Akt之间的关系. 本研究通过观察结肠癌组织中LETM1蛋白表达及Akt磷酸化水平, 同时分析两者之间的关系, 为判定结肠癌患者的预后提供一个新的肿瘤生物学标志物.

■研发前沿
肿瘤细胞的代谢与正常细胞不同, 能量来源主要是由胞浆内的糖酵解途径所获得, 而一些线粒体的蛋白的表达异常或基因的突变, 常常在不同肿瘤细胞中发生, 而这种线粒体代谢功能紊乱必然带来细胞的异常增生, 目前有很多线粒体蛋白研究于肿瘤的发生与发展, 且用于早期诊断、疗效评估及判断预后.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-01/2010-12在延边大学附属医院接受手术治疗及正规术后辅助化疗的Ⅱ、Ⅲ期患者. 病例资料完整的73例结肠癌患者, 其中男性46例, 女性27例, 中位年龄为55岁. 截止于2012-12-30随访结束. 鼠抗人LETM1单克隆抗体(1∶500稀释, Abnova公司); 磷酸化Akt(pSer473)和磷酸化Akt(pThr308)抗体(1∶200稀释, Cellsignaling公司); 兔抗人多磷酸化葡萄糖合成激酶3β(glycogen synthase kinase 3β, GSK3β)多克隆抗体(1∶100稀释, Abcam公司). SP试剂盒和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法 采用免疫组织化学SP法检测结肠癌组织中LETM1蛋白的表达情况, 同时测定Akt的Ser473、Thr308两个磷酸化位点及GSK3β磷酸化水平. 切片常规二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化

■相关报道
Piao等研究首次发现，在人宫颈癌细胞株HeLa细胞中过表达LETM1通过抑制线粒体的功能，改变细胞的NADH/NADPH的比率，激活Akt的活性，从而推测LETM1蛋白表达水平的改变可诱导肿瘤的发生.

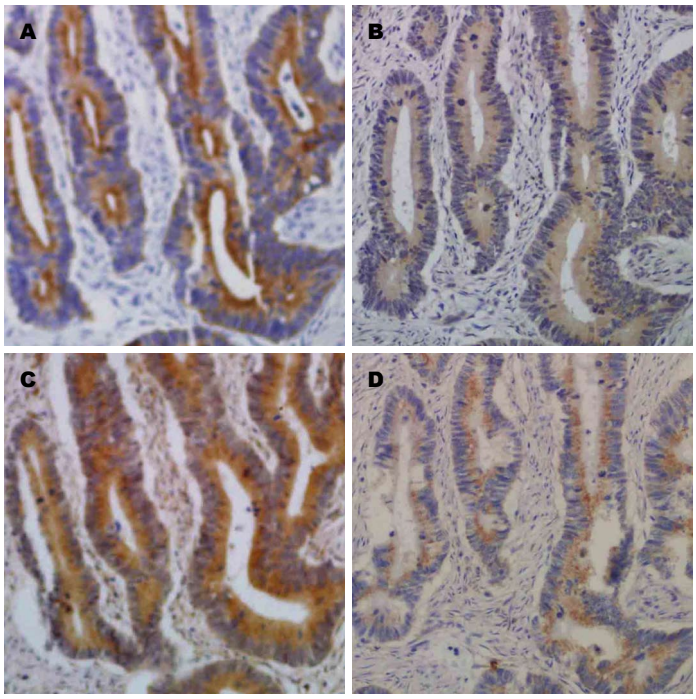

图 1 在同一结肠癌患者肿瘤组织中LETM1蛋白表达、Akt的Ser473和Thr308两个位点及GSK3β磷酸化情况. A: LETM1蛋白在结肠癌组织中高表达水平; B: Akt的Ser473位点磷酸化的阳性表达; C: Akt的Thr308位点的磷酸化阳性表达; D: GSK3β磷酸化阳性表达.

表 1 LETM1蛋白表达水平与73例结肠癌患者临床病理特征之间的关系

临床病理生理特性	n	LEMT1表达				P值
		n	低表达率(%)	n	高表达率(%)	
年龄(岁)						0.711
≤60	47	22	46.8	25	53.2	
>60	26	11	42.3	15	57.7	
性别						0.173
男	46	18	39.1	28	60.9	
女	27	15	55.6	12	44.4	
肿瘤大小(cm)						0.800
≤5	41	18	43.9	23	56.1	
>5	32	15	46.9	17	53.1	
淋巴转移						0.011
阳性	22	5	22.7	17	77.3	
阴性	51	28	54.9	23	45.1	
浸润程度						0.043
T1、T2	51	27	52.9	24	47.1	
T3、T4	22	6	27.3	16	72.7	
分化程度						0.011
高、中分化	60	23	38.3	37	61.7	
低分化	13	10	76.9	3	23.1	

后微波抗原修复，滴加适量H_2O_2阻断内源性过氧化酶，然后滴加一抗，4 ℃冰箱过夜(以PBS作为阴性对照). 结果判定由2名病理医师分别对LETM1蛋白、Akt及GSK3β磷酸化的阳性细胞比例及染色强度进行评价. 评价标准如下：根据Beesley分级法[10]，按阳性细胞所占百分比并参考着色强度确定分级，无明显阳性细胞或着浅黄色为(-)；阳性细胞数<25%，颗粒棕黄色为(+)；阳性细胞数25%-50%，颗粒棕黄色为(++)；阳性细胞数>50%，颗粒深棕色为(+++). LETM1染色--+纳入低表达组，LETM1染色++-+++纳入高表达组.

统计学处理 利用SPSS17.0统计学软件进行数据分析. 采用Kaplan-Meier法分析各组无疾病生存期；采用χ^2检验进行组间单因素分析，$P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 LETM1蛋白在结肠癌组织中表达与临床病理因数的关系 利用免疫组织化学检测LETM1蛋白在结肠癌组织表达情况，其结果LTEM1蛋白主要表达于肿瘤细胞胞浆中，阳性细胞的胞浆呈棕褐色(图1). LETM1蛋白在结肠癌中高表达40例(54.8%)，低表达33例(45.2%)(表1，图1). LETM1蛋白在结肠癌组织中的表达与淋巴结转移、浸润程度及分化程度具有统计学意义，呈正相关($P<0.05$)，与年龄、性别、肿瘤大小无统计学意义($P>0.05$)，(表1).

2.2 结肠癌组织中LETM1蛋白表达水平与Akt之间的相关性 Ser473及Thr308分别是Akt的两个磷酸化位点，而GSK3β作为Akt激酶磷酸化的底物，在此实验中作为了判定Akt激酶活性的参照物. 在同一患者结肠癌组织中随LETM1蛋白表达水平升高，其Akt的两个磷酸化位点的磷酸化，即Ser473和Thr308位点的磷酸化水平继而也增加.

表 2 LETM1蛋白表达与Ser473磷酸化水平之间的相关性

参数	n	Ser473磷酸化		χ^2	P值
		阴性	阳性		
LETM1				0.539	0.000
低表达	33	21	12		
高表达	40	6	34		

LETM1: 亮氨酸拉链EF-hand结构域跨膜蛋白1.

表 3 LETM1蛋白表达与Thr308磷酸化水平之间的相关性

参数	n	Thr308磷酸化		χ^2	P值
		阴性	阳性		
LETM1				0.556	0.000
低表达	33	23	10		
高表达	40	6	34		

LETM1: 亮氨酸拉链EF-hand结构域跨膜蛋白1.

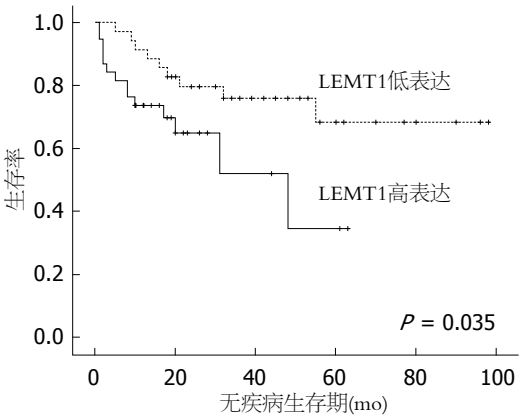

图 2 LETM1表达水平与结肠癌患者的无疾病生存期之间相关性.

表 4 Thr308磷酸化水平与GSK3β磷酸化水平之间的相关性

参数	n	GSK3β磷酸化		χ^2	P值
		阴性	阳性		
Thr308磷酸化				0.542	0.000
阴性	29	21	8		
阳性	44	8	36		

GSK3β: 葡萄糖合成激酶β.

表 5 Ser473磷酸化水平与GSK3β磷酸化水平之间的相关性

参数	n	GSK3β磷酸化		χ^2	P值
		阴性	阳性		
Ser473磷酸化				0.480	0.000
阴性	27	19	8		
阳性	46	10	36		

GSK3β: 葡萄糖合成激酶β.

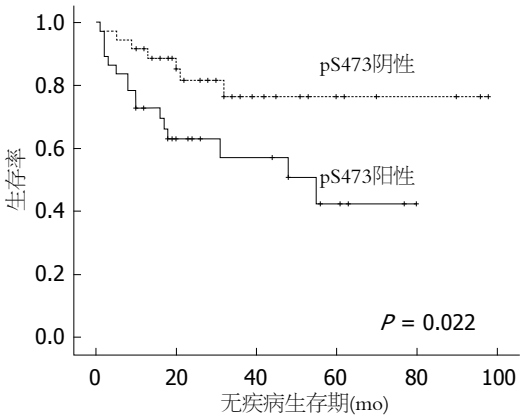

图 3 AktSer473位点的磷酸化水平与结肠癌患者的无疾病生存期之间相关性.

采用χ^2检验统计学方法分析, 结果表明LETM1蛋白表达水平与Ser473、Thr308及GSK3β磷酸化水平呈正相关, $P<0.05$(表2, 3), 进一步Akt的两个磷酸化位点的磷酸化水平与GSK3β的磷酸化也呈正相关, $P<0.05$(表4, 5). 结果提示, 在结肠癌组织中随LETM1蛋白表达的异常可以改变Akt的活性, 继而影响PI3K/Akt信号传导通路的开启, 最终影响着细胞的生长、凋亡及血管的再生等生理学功能.

2.3 在结肠癌患者中LETM1蛋白表达水平和Akt磷酸化水平与其无疾病生存期之间关系 LETM1蛋白高表达组患者无疾病生存率显著低于LETM1蛋白低表达患者($P<0.05$)(图2), Ser473磷酸化阳性患者无疾病生存期显著低于Ser473磷酸化阴性患者($P<0.05$)(图3). Thr308磷酸化阳性患者与阴性患者无疾病生存期未见明显统计学差异($P>0.05$)(图4).

3 讨论

结肠癌的发生, 发展及演进是多步骤, 多基因突变共同作用的结果, 其中涉及多个途径的分子改变, 其确切机制仍不十分明确. PI3K/Akt信号通路是细胞内信号传导的重要环节, 参与细胞代谢、生存、凋亡、分化和增殖等过程. 目前研究认为PI3K/Akt途径参与了结肠组织的恶性转化和演进过程. Piao等[11]研究发现, 在人宫颈癌细胞株HeLa细胞中过表达LETM1蛋白可激活Akt的活性, 推测LETM1蛋白的表达的改变

■创新盘点
LETM1不仅可激活PI3K/Akt信号传导通路的开启, 在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用, 且有希望成为判断结肠癌患者预后的新的肿瘤分子生物学标志物.

■应用要点
LETM1在结肠癌中高表达，可能参与结肠癌的发生、发展与复发. LETM1蛋白可以作为预测结肠癌患者预后的新的生物学指标.

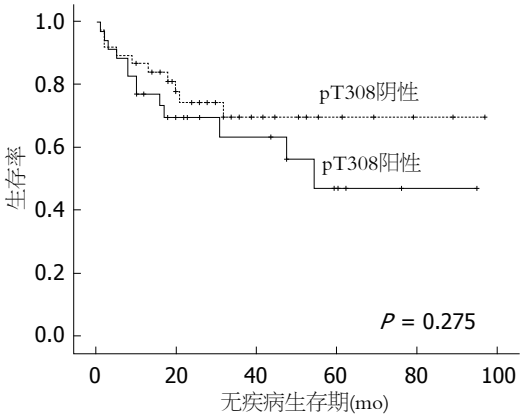

图 4 AktThr308位点的磷酸化水平与结肠癌患者的无疾病生存期之间相关性.

可诱导肿瘤的发生，同时发现在结肠癌组织中LETM1蛋白高表达.

我们实验结果发现，在结肠癌组织中LETM1的高表达率为54.8%(表2)，且与淋巴结转移、分化及浸润程度具有正相关(表2). 这些结果表明，LETM1蛋白表达的增多可能是结肠肿瘤复发及转移的高危因素之一，且与结肠癌的预后有密切的相关性.

为观察在结肠癌组织中Akt的两个磷酸化位点的磷酸化水平，我们免疫组织化学检测了Ser473和Thr308的磷酸化水平. 结果显示，在结肠癌组织中Ser473磷酸化阳性率为63.0%，Thr308磷酸化阳性率为60.3%(表2, 3). 我们的结果表明结肠癌组织中Akt磷酸化程度在高水平状态，这与绝大多数国内外的研究结果相符合. 而且我们的结果提示，Ser473磷酸化水平与浸润程度及分化程度呈正相关，Thr308磷酸化水平与淋巴结转移呈正相关，这些结果基本与文献报道相符. 这些结果提示，在结肠癌中随Akt磷酸化水平的升高，可激活PI3K/Akt信号传导通路，促进肿瘤细胞的生长、抑制细胞凋亡及影响细胞周期，从而成为不良的预后因素之一.

本次研究为GSK3β作为Akt激酶的底物[12]，我们进一步检测了两者之间的关系，发现Akt的Ser473和Thr308磷酸化水平与GSK3β磷酸化呈正相关(P<0.05)(表4, 5)，说明当Akt活性增加时，相应的其底物的磷酸化水平也随之升高. 该结果进一步证明Akt信号转导通路在结肠癌中的重要性.

此次研究结果还发现，LETM1蛋白表达分别与Ser473及Thr308磷酸化水平呈正相关(表2, 3)，证明结肠癌组织中LETM1蛋白的高表达，可激活PI3K/Akt信号传导通路，此结果与既往Piao等[11]研究宫颈癌细胞中LETM1蛋白激活PI3K/Akt信号通路一致. 据此推测，在结肠癌中LETM1蛋白表达也可影响Akt的活性，在肿瘤的发生及发展过程中发挥着重要的角色.

Piao等[11]报道，LETM1蛋白高表达诱导线粒体功能障碍，导致糖酵解的增加，使乳酸分泌增多. 线粒体功能障碍及通过糖酵解增加ATP，都可以调节NADH/NADPH的比值. NADPH是维持硫氧还蛋白酶活性的重要分子，当NADH/NADPH比值上升，使人第10号染色体缺失的磷酸酶(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)保持在氧化/失活状态，进一步激活PI3K/Akt信号转导通路[13]. *PTEN*是一种抑癌基因，PTEN抑癌作用主要是通过催化第3位磷酸发生脱磷酸，使3,4,5三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP3)的磷酸脱磷酸形成4,5二磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol,4,5-bisphosphate, PIP2)，使之丧失信号传导功能，从而间接抑制PI3K/Akt信号传导通路，抑制细胞增殖和细胞凋亡[14,15]. 结合我们研究结果及以往的结果，推测LETM1蛋白在结肠癌中随着表达水平的增加影响线粒体的功能，改变NADH/NADPH的比值，抑制PTEN的活性，使无法灭火Akt的活性，从而使细胞趋向于存活的优势，所有这些变化都可能是导致癌变的原因之一.

另外，为进一步证实LETM1蛋白在结肠癌发展过程中的作用，观察结肠癌患者无疾病生存时间. 结果显示LETM1蛋白高表达组患者无疾病生存率显著低于LETM1低表达组患者(图2)，且Ser473磷酸化阳性组无疾病生存期显著低于Ser473阴性组患者(图3)，然而Thr308阳性组患者与阴性组患者无疾病生存期未见明显统计学差异(图4)，考虑与标本数少有关. 由于LTEM1蛋白可激活PI3K/Akt信号传导通路，我们推测，LETM1蛋白高表达在结肠癌患者发生复发及转移过程中发挥重要作用. 据此判断，LETM1蛋白是一个比Akt更理想的预示结肠癌演进和预后的重要生物学指标.

总之，我们的研究提示，在结肠癌发生、发展过程中，可能由于LETM1高表达导致PI3K/Akt所介导的信号传导通路异常激活，Akt持续活化，使细胞异常增殖进一步恶性转化，并促使肿瘤浸润及转移. 因此，对结肠癌组织中LETM1蛋

白表达表达和Akt信号传导通路的相关作用的研究, 将有助于进一步了解结肠癌的发生及发展, 从而寻找新的、有价值的肿瘤分子标志物, 为肿瘤的临床诊断、治疗以及预后评估提供新的生物学指标.

4 参考文献

1 Picelli S, Von Holst S, Wessendorf P. The continuing search for predisposing colorectal cancer variants. *Cancer Genomics Proteomics* 2009; 6: 305-316 [PMID: 20065317 DOI: 10.1007/s12307-009-0029-4]

2 Sung JJ, Lau JY, Goh KL, Leung WK. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening. *Lancet Oncol* 2005; 6: 871-876 [PMID: 16257795 DOI: 10.1016/S1470-2045(05)70422-8]

3 Zou W, Li ZY, Li CL, Cui ZC. [Protein kinase B and its role in the signal transduction pathway mediated by phosphoinositide 3-kinase]. *Shengli Kexue Jinzhan* 2000; 31: 120-124 [PMID: 12545728]

4 Cheng GZ, Park S, Shu S, He L, Kong W, Zhang W, Yuan Z, Wang LH, Cheng JQ. Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery. *Curr Cancer Drug Targets* 2008; 8: 2-6 [PMID: 18288938 DOI: 10.2174/156800908783497104]

5 Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23: 201-205 [PMID: 11756242]

6 Johnson SM, Gulhati P, Rampy BA, Han Y, Rychahou PG, Doan HQ, Weiss HL, Evers BM. Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 2010; 210: 767-776, 776-778 [PMID: 20421047 DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2009.12.008]

7 Baba Y, Nosho K, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, Chan AT, Giovannucci E, Fuchs CS, Ogino S. Phosphorylated AKT expression is associated with PIK3CA mutation, low stage, and favorable outcome in 717 colorectal cancers. *Cancer* 2011; 117: 1399-1408 [PMID: 21425139 DOI: 10.1002/cncr.25630]

8 Weng D, Song X, Xing H, Ma X, Xia X, Weng Y, Zhou J, Xu G, Meng L, Zhu T, Wang S, Ma D. Implication of the Akt2/survivin pathway as a critical target in paclitaxel treatment in human ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 273: 257-265 [PMID: 18842333 DOI: 10.1016/j.canlet.2008.08.027]

9 Schlickum S, Moghekar A, Simpson JC, Steglich C, O'Brien RJ, Winterpacht A, Endele SU. LETM1, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics* 2004; 83: 254-261 [PMID: 14706454]

10 Beesley MF, McLaren KM. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology* 2002; 41: 236-243 [PMID: 12207785]

11 Piao L, Li Y, Kim SJ, Byun HS, Huang SM, Hwang SK, Yang KJ, Park KA, Won M, Hong J, Hur GM, Seok JH, Shong M, Cho MH, Brazil DP, Hemmings BA, Park J. Association of LETM1 and MRPL36 contributes to the regulation of mitochondrial ATP production and necrotic cell death. *Cancer Res* 2009; 69: 3397-3404 [PMID: 19318571 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3235]

12 Quintavalle C, Incoronato M, Puca L, Acunzo M, Zanca C, Romano G, Garofalo M, Iaboni M, Croce CM, Condorelli G. c-FLIPL enhances anti-apoptotic Akt functions by modulation of Gsk3β activity. *Cell Death Differ* 2010; 17: 1908-1916 [PMID: 20508645 DOI: 10.1038/cdd.2010.65]

13 Pelicano H, Xu RH, Du M, Feng L, Sasaki R, Carew JS, Hu Y, Ramdas L, Hu L, Keating MJ, Zhang W, Plunkett W, Huang P. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. *J Cell Biol* 2006; 175: 913-923 [PMID: 17158952 DOI: 10.1083/jcb.200512100]

14 Depowski PL, Rosenthal SI, Ross JS. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2001; 14: 672-676 [PMID: 11454999 DOI: 10.1038/modpathol.3880371]

15 Koksal IT, Yasar D, Dirice E, Usta MF, Karauzum S, Luleci G, Baykara M, Sanlioglu S. Differential PTEN protein expression profiles in superficial versus invasive bladder cancers. *Urol Int* 2005; 75: 102-106 [PMID: 16123561 DOI: 10.1159/000085933]

■同行评价

本文结果提示LETM1在结肠癌中高表达, 可能参与结肠癌的发生、发展与复发. LETM1蛋白可以作为预测结肠癌患者预后的新的生物学指标物. 本文内容客观, 观点新颖, 具有一定的科学意义.

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

关于论文（稿号 1312694）申请撤销的单位介绍信

世界华人消化杂志

兹有我单位谭晓林同志向贵刊编辑部投稿并发表的文章（稿号：1312694，题目：IGF-I、IGF-IR、IGF-II 在结直肠腺瘤中的表达及意义，作者：谭晓林等，2014 年第 5 期），根据编辑部来函“关于世界华人消化杂志作者申请撤稿的说明”，经领导审批，同意个人和编辑部意见，同意撤销已发表论文。

特此证明。

谭晓林　刘祥飞
米贤举　谢彩虹
赵超　陈冬妹
肖文　施为建
尹泉

中山市博爱医院

2014-10-22

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 730-734
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

ESD术治疗上消化道疾病50例

沈睿炜, 孙 聪, 郑惠虹, 孙常波, 李江波, 魏冬梅, 朱红梅, 王贤君

■背景资料
近年来随着消化内镜技术的发展, 内镜下治疗消化道早期肿瘤的临床应用日益广泛, 消化内镜已从单纯的检查诊断进展到消化系肿瘤的治疗时期. 由剥脱活检术发展而来的内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection)、内镜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)、内镜黏膜下肿瘤挖除术(endoscopic submucosal excavation)已逐步推广, 少数医院还可开展内镜全层切除术(endoscopic full-thickness resection). 这些由内而外的内镜治疗, 提高了肿瘤的切除率, 减少病灶残存, 可达到对早期消化道肿瘤的根治性切除.

■同行评议者
欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

沈睿炜, 孙聪, 郑惠虹, 孙常波, 李江波, 魏冬梅, 朱红梅, 王贤君, 浙江中医药大学附属宁波中医院消化科 浙江省宁波市 315000
沈睿炜, 硕士, 主治医师, 主要从事消化科的临床研究.
作者贡献分布: 手术由沈睿炜、孙聪、郑惠虹、李江波及王贤君操作完成; 数据分析由沈睿炜、魏冬梅及朱红梅完成; 论文写作由沈睿炜与孙常波完成.
通讯作者: 沈睿炜, 主治医师, 315000, 浙江省宁波市丽园北路819号, 浙江中医药大学附属宁波中医院消化科.
shenruiwei@126.com
收稿日期: 2013-12-10 修回日期: 2014-01-05
接受日期: 2014-01-10 在线出版日期: 2014-02-18

Endoscopic submucosal dissection for upper gastrointestinal lesions: Our experience with 50 cases

Rui-Wei Shen, Cong Sun, Hui-Hong Zhen, Chang-Bo Sun, Jiang-Bo Li, Dong-Mei Wei, Hong-Mei Zhu, Xian-Jun Wang

Rui-Wei Shen, Cong Sun, Hui-Hong Zhen, Chang-Bo Sun, Jiang-Bo Li, Dong-Mei Wei, Hong-Mei Zhu, Xian-Jun Wang, Department of Gastroenterology, Ningbo Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Ningbo 315000, Zhejiang Province, China
Correspondence to: Rui-Wei Shen, Attending Physician, Ningbo Traditional Chinese Medicine Hospital, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, 819 Liyuan North Road, Ningbo 315000, Zhejiang Province, China. shenruiwei@126.com
Received: 2013-12-10 **Revised:** 2014-01-05
Accepted: 2014-01-10 **Published online:** 2014-02-18

Abstract
AIM: To discuss the clinical value of endoscopic submucosal dissection (ESD) for treating upper gastrointestinal lesions.

METHODS: A total of 52 patients who underwent ESD between May 2012 and May 2013 were retrospectively analyzed to assess the feasibility, safety and efficacy of ESD for treating upper gastrointestinal lesions.

RESULTS: Among 52 patients, 4 had esophageal lesions, 48 had gastric lesions. Postoperative pathology revealed that 40 were mucosal lesions, including esophageal papilloma (n = 2), cardiac hyperplastic polyps (n = 9), cardiac adenoma (n = 3), early gastric cancer (n = 2), high grade intraepithelial neoplasia (n = 3), low grade intraepithelial neoplasia (n = 5), gastric antral adenomatous polyps (n = 9), hyperplastic polyps (n = 5), and intestinal metaplasia (n = 2); and 12 were submucosal lesions, including esophageal leiomyoma (n = 1), esophageal gastrointestinal stromal tumor (n = 1), gastric heterotopic pancreas (n = 7), gastric body gastrointestinal stromal tumor (n = 2), and lipoma (n = 1). All the lesions were completely resected and were confirmed by pathologic examination. No severe bleeding occurred. Perforation occurred in two cases but was safely managed by conservative treatment.

CONCLUSION: ESD is a safe, effective and recommendable treatment for upper gastrointestinal lesions. It can not only resect the lesions completely, but also provide accurate pathologic information.

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

Key Words: Esophagus; Stomach; Endoscopic submucosal dissection

Shen RW, Sun C, Zheng HH, Sun CB, Li JB, Wei DM, Zhu HM, Wang XJ. Endoscopic submucosal dissection for upper gastrointestinal lesions: Our experience with 50 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 730-734
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/730.asp
DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.730

摘要
目的: 总结内镜下黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)在上消化道病变治疗中的应用体会.

方法: 回顾分析2012-05/2013-05在我院经ESD的52例患者资料, 评价ESD在上消化道病变治疗的安全性、有效性.

结果: 52例患者中食管病变4例、胃部病变48例, 所有病变均经病理检查表明病灶完整切

除, 切缘及基底部无病变残留. 其中黏膜病变40例(术后病理示食管乳头状瘤2例, 贲门增生性息肉9例、腺瘤3例, 胃窦原位癌2例、高级别上皮内瘤变3例、低级别上皮内瘤变5例、腺瘤9例、增生性息肉5例、肠上皮化生2例); 黏膜下肿瘤12例(术后病理示食管平滑肌瘤1例、食管间质瘤1例、胃间质瘤2例、胃脂肪瘤1例, 胃异位胰腺7例). 无并发大出血病例; 术中穿孔2例, 均于保守治疗后治愈.

结论: 以ESD方法治疗上消化道病变, 不仅能完整切除病变, 同时可获得完整、准确的病理资料, 值得推广应用.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胃; 食管; 内镜下黏膜剥离术

核心提示: 本研究回顾分析2012-05/2013-05在我院经内镜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)的52例患者资料, 评价ESD在上消化道病变治疗的安全性、有效性, 结果显示: 对于ESD术中穿孔重在预防, 如已发生穿孔应及时使用金属夹闭合创面, 尽量做到"以镜救镜", 以胃镜技术处理胃镜并发症. 本院自开展ESD以来, 所有患者近期效果均良好, 远期疗效还需进一步随访观察.

沈睿炜, 孙聪, 郑惠虹, 孙常波, 李江波, 魏冬梅, 朱红梅, 王贤君. ESD术治疗上消化道疾病50例. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 730-734 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/730.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.730

0 引言

消化系肿瘤是临床常见病、多发病. 据报道, 我国每年胃癌发病率为男性31.2/10万, 女性15.5/10万; 食管癌的发病率为15.15/10万[1]. 大部分肿瘤患者发现时均已达到中晚期, 即使外科根治术后, 5年生存率也较低, 严重影响人们的生活质量. 提高消化系肿瘤治疗有效性的关键在于早期发现、早期治疗. 近年来随着消化内镜技术的发展, 内镜下治疗消化道早期肿瘤的临床应用日益广泛, 消化内镜已从单纯的检查诊断进展到消化系肿瘤的治疗时期. 由剥脱活检术(strip biopsy)发展而来的内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)、内镜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)、内镜黏膜下肿瘤挖除术(endoscopic submucosal excavation, ESE)已逐步推广, 少数医院还可开展内镜全层切除术(endoscopic full-thickness resection, EFR). 这些由内而外的内镜治疗, 提高了肿瘤的切除率, 减少病灶残存, 可达到对早期消化道肿瘤的根治性切除[2]. 目前ESD治疗技术日益推广. 现将我院经ESD治疗的52例患者资料总结如下, 并讨论ESD的适应症、并发症及操作过程中出现的问题.

■研发前沿
ESD手术操作过程复杂, 手术时间较长, 对操作者的技术要求高, 并且需助手的熟练配合.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2012-05/2013-05在我院就诊, 经胃镜发现的上消化道病变共52例, 其中男20例, 女32例; 年龄35-73岁, 平均50.3岁. 病变组织活检提示为低或高级别上皮内瘤变、早期胃癌, 黏膜下占位, 直径>2 cm的宽基底息肉病变. 对黏膜下占位均进行超声内镜检查. 排除服用抗凝药、凝血功能异常者. 术前告知可能的益处及风险, 并签署知情同意书. 采用富士能EG-250WR5、EG-590WR胃镜. 内镜超声系统为富士能SP702-EUS909型, 超声探头频率酌情采用12、15或20 MHz. Olympus NM-4L-1注射针, Olympus FD-1-1热活检钳, Olympus HX-610-135L、HX-610-135止血夹, ERBE ICC 200高频电切装置和APC 300氩离子凝固器, Olympus钩形电刀(Hook knife)、IT刀(insulation-tipped knife). ESD治疗过程中胃镜前端附加透明帽.

1.2 方法

1.2.1 术前检查: 术前了解病灶的大小、形态, 确定病灶的深度, 排除淋巴结转移. 黏膜病变采用表面喷洒0.4%靛胭脂染色观察. 对黏膜下肿瘤常规行超声内镜, 了解病变所在的层次、深度, 有无浸润特征; 较大者行上腹部CT增强, 排除腔外病变.

1.2.2 ESD手术: (1)标记: 用APC在病灶周围进行电凝标记. 对黏膜病灶标记点离开病灶边缘至少5 mm, 对黏膜下病变紧靠病灶边缘标记; (2)黏膜下注射: 将5 mL 0.2%靛胭脂(南京微创公司)、2 mL 1%肾上腺素和100 mL生理盐水混合配制的混合溶液, 自远端至近端, 于病灶边缘标记点外进行多点黏膜下注射, 每点至少2 mL至黏膜明显隆起; (3)切开病变外侧缘黏膜: 应用Hook刀沿病灶边缘标记点切开黏膜; (4)黏膜剥离、挖除病变: 借助透明帽, 通过反复的黏膜下注射、分离, 根据情况采用钩形电刀或IT刀将病灶从黏膜下层进行剥离, 大块、完整地切除病灶. 术中保持直视下操作, 并注意随时止血; (5)创面处理: 对创面可见的小血管应用氩离子血浆凝固术凝固治疗, 较大血管用热活检钳电凝,

■相关报道
近年来日本确定了上消化道早期肿瘤内镜切除的治疗规范. Gotoda等认为ESD治疗早期胃癌的适应症为: (1)分化型黏膜内癌、无溃疡发生、大小不限定; (2)溃疡、分化型黏膜内癌, 直径<3 cm; (3)sm1浸润分化癌、无溃疡发生、无淋巴及血行转移, 直径<3 cm; (4)低分化型黏膜内癌、无溃疡发生, 直径<2 cm.

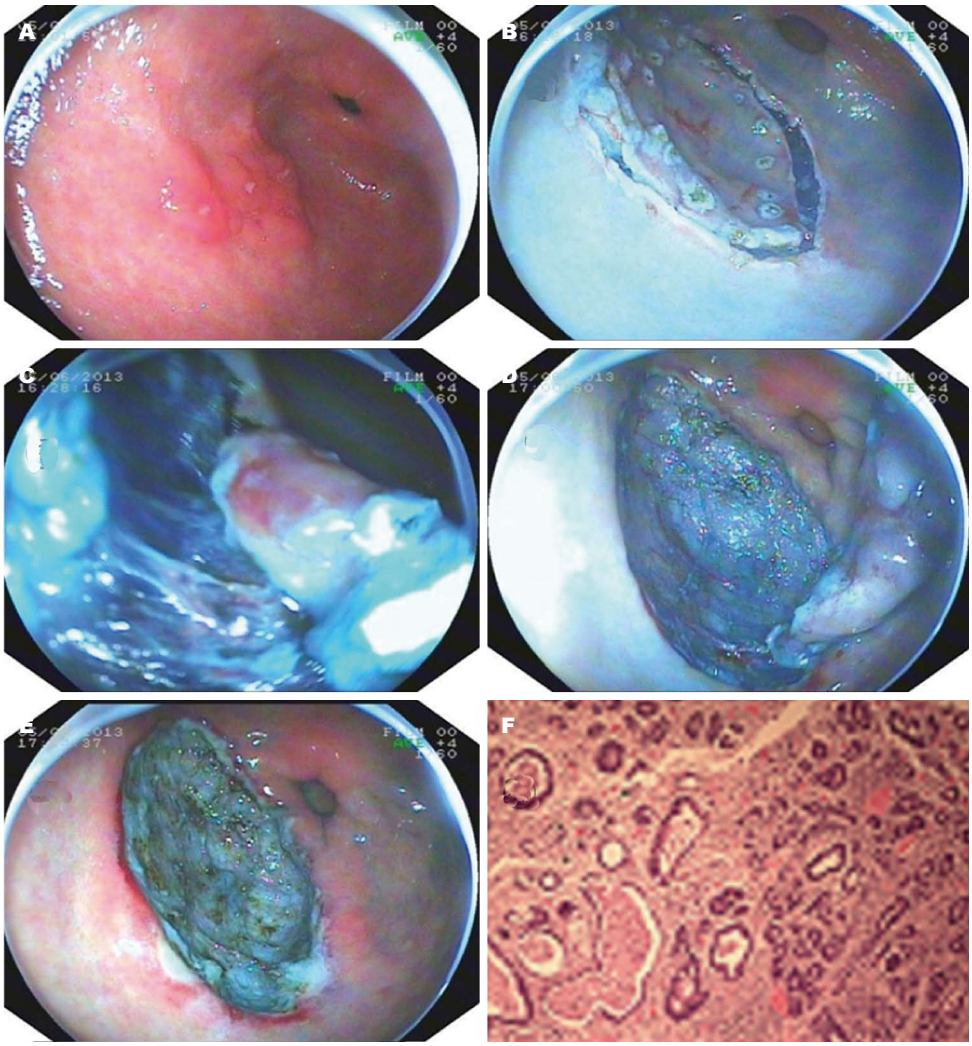

图 1 ESD过程及病理. A: 病灶位于胃窦前壁偏大弯侧, 表面粗糙、糜烂, 部分呈颗粒样改变, 大小约3.0 cm×4.0 cm, 边界不清晰; B: 靛胭脂染色并用APC标记病灶边缘, 然后使用钩刀沿标记外缘0.5 cm左右全周切开; C: 剥离中见黏膜下血管, 随时处理; D: 完整剥离病灶; E: 底部创面处理; F: 病理提示(×40): (胃窦)腺上皮高级别上皮内瘤变, 灶性癌变, 局限在固有层, 水平切缘、垂直切缘阴性.

必要时应用金属夹闭合创面或血管.

1.2.3 *术后处理*: 切除病灶标本应用大头针固定, 甲醛固定后送病理检查, 确定病变性质及切缘和基底部有无侵犯. 患者术后常规禁食1-3 d, 并予质子泵抑制剂、黏膜保护剂等治疗; 观察腹部体征及胃管引出物颜色, 判断有无消化系出血等并发症, 必要时给予抗感染治疗.

1.2.4 *术后随访*: 术后1-3 mo内镜随访, 了解人工溃疡愈合情况, 并在瘢痕处活检, 了解有无复发.

2 结果

本组病例包括食管病变4例、胃部病变48例, 所有病变均经病理检查表明病灶完整切除, 切缘及基底部无病变残留. 4例食管病变中黏膜层病变2例, 术后病理提示为乳头状瘤; 黏膜下层病变2例, 超声内镜提示起源于黏膜肌层1例、黏膜下层1例, 术后病理分别为食管平滑肌瘤、间质瘤(低度恶性). 48例胃部病变中: (1)贲门部病变12例, 内镜下肉眼观察均为隆起性病变, 术后病理为增生性息肉9例、腺瘤3例; (2)胃体病变3例, 均为黏膜下占位, 病变直径2.0-3.0 cm, 超声内镜提示起源于黏膜肌层1例、黏膜下层1例、肌层1例; 术后病理提示间质瘤2例、脂肪瘤1例; (3)胃窦部病变33例, 其中黏膜层病变26例, 病变直径1.5-4.0 cm, 平均3.3 cm, 术后病理提示原位癌2例、高级别上皮内瘤变3例、低级别上皮内瘤变5例、腺瘤9例、增生性息肉5例、肠上皮化生2例; 另有黏膜下病变7例, 术前超声内镜提示起源于黏膜下层4例、肌层3例, 术后病理均为异位胰腺. ESD术中发生穿孔2例, 均经保守治疗后好转. 未有发生大出血转外科手术的病例(图1).

3 讨论

随着内镜设备的改进及技术的提高, 内镜下黏膜剥脱活检术逐步发展为黏膜切除术, 并进一步发展为内镜下黏膜剥离术、内镜黏膜下肿瘤挖除术. 近年来, 随着金属夹闭合技术的发展, 部分经验丰富的内镜医生甚至由治疗过程中的被动穿孔发展为主动穿孔, 可以行内镜全层切除术. 经过金属夹闭合创面及抑酸、抗感染等治疗, 内镜下治疗一般不会产生严重的并发症. 目前应用ESD治疗上消化道早期肿瘤及癌前病变日益增多, ESD属于微创治疗, 患者无需开腹手术, 痛苦小、住院天数少、术后不留体表瘢痕, 尤其是可以一次性完整切除病灶, 不仅利于对所切除标本的病理观察, 而且可以减少局部复发几率. 但ESD手术操作过程复杂, 手术时间较长, 对操作者的技术要求高, 并且需助手的熟练配合.

近年来日本确定了上消化道早期肿瘤内镜切除的治疗规范. Gotoda等[3]认为ESD治疗早期胃癌的适应症为: (1)分化型黏膜内癌、无溃疡发生、大小不限定; (2)溃疡、分化型黏膜内癌, 直径<3 cm; (3)sm1浸润分化癌、无溃疡发生、无淋巴及血行转移, 直径<3 cm; (4)低分化型黏膜内癌、无溃疡发生, 直径<2 cm. 2007年, Fujishiro等[4]提出ESD治疗食管病变的适应症为食管重度异型增生、原位癌、黏膜内癌. 我们体会, 术前必须严格掌握ESD的临床适应症, 这是保证内镜下安全、有效治疗的首要关键.

对于ESD操作, 我们有如下体会. (1)要重视黏膜染色剂靛胭脂的作用, 在部分病例, 只有使用了靛胭脂染色后其病变范围才能充分显现, 才可保证切除范围的充分性; (2)病灶边缘标记要清晰, 做病灶全周切开时要将全部标记点包含在内, 这是保证切除范围充分性的另一个要点; (3)黏膜下注射时要使黏膜层充分隆起, 并于手术过程中反复多次追加注射, 使切割操作易于进行, 并减少电刀对消化道肌层的损害; (4)黏膜下注射后抬举不良的病变, 即黏膜下注射后黏膜层不能充分隆起者, 多由溃疡瘢痕、反复活检后瘢痕黏连甚至肿瘤浸润所导致, 通常不宜进行ESD治疗, 因为此时发生穿孔的可能性较大. 我们体会, 若黏膜层与黏膜下层黏连不严重, 充分利用透明帽的推举作用, 谨慎操作, 胆大心细地循层剥离也可成功进行ESD. 本组有1例EMR术后8 mo局部复发的胃窦黏膜隆起性病变患者, 再次行ESD时抬举不良征阳性, 术中黏连明显, 与患者及家属充分沟通后, 于黏膜下多次、足量注射含肾上腺素、靛胭脂的生理盐水, 使黏膜下层与肌层尽可能分离, 在保证视野、保持直视下操作的前提条件下, 沿肌层上缘谨慎、仔细地进行切割, 最终ESD顺利完成; (5)对于黏膜下占位的剥离, 去除黏膜下占位的顶端黏膜, 充分暴露瘤体, 可沿占位边缘一次性完整大块剥离; 如占位有包膜, 应尽量不破坏包膜的完整性, 这样可减少占位的残存, 防止肿瘤的种植转移, 减少肿瘤的局部复发[5].

出血和穿孔是ESD治疗过程的两种主要并发症. (1)关于出血的预防及处理. Fujishiro[6]报道应用ESD治疗382例胃部肿瘤患者, 术中出血13例(3.4%), 术后再出血8例(2.1%). ESD术中出血一旦发生, 会严重影响内镜视野, 而盲目止血容易发生穿孔, 所以对术中所见血管的预处理极其重要, 对于可能出血的血管要及时电凝, 对于黏膜下层较细小的血管, 可以用Hook刀头端或IT刀直接电凝; 对于较粗的血管, 则使用热活检钳夹闭后电凝血管. 如发生术中出血需及时、准确止血, 不可盲目操作. 术中出血较少时, 可用含去甲肾上腺素的冰盐水进行冲洗, 明确出血位置后选择相应措施止血. 如出血量较大, 术中不能止血, 有时不得不中止手术, 转外科手术治疗. 病灶完整剥离后, 应用APC烧灼创面上所有裸露的小血管, 必要时应用金属夹缝合创面, 可达到预防术后迟发出血的目的. 术中出血较多或术中穿孔者, 术后应常规放置胃管引流, 观察胃管内引流物颜色、数量, 如有数十分钟内引出约100 mL以上血性液体者, 需行急诊胃镜检查, 对动脉出血可金属夹闭合血管, 静脉渗血可用热活检钳电凝止血. 本组术者术中止血充分, 本组未发生因术中出血影响视野而中止ESD转外科手术治疗的病例, 也无术后出血病例; (2)关于穿孔的预防及处理. 临床文献报道ESD穿孔的发生率为0%-8%[7-10]. Fujishiro等[11]认为避免术中发生消化系穿孔最重要的要点是在ESD术中始终保持操作视野清晰. ESD术中穿孔一般较小, 术中基本上都能及时发现. 操作者术中应间断进行腹部触诊检查, 腹胀明显时要及时抽吸出胃腔内气体, 保持胃腔适度充气即可, 若可保持良好视野则应尽量少充气. 发生消化系穿孔时可及时用金属夹缝合, 一般不必终止治疗. 气腹明显时可用20 mL注射器, 在右上腹进行腹腔穿刺排气. 因胃镜治疗前患者处于禁食状态, 术中胃腔内液体较少, 穿孔所致的腹膜炎体征往

■同行评价
本研究设计合理, 结果可靠, 讨论丰富, 有较好的参考价值.

往较轻, 金属夹闭合后气腹往往能得到控制. 若穿孔较大, 可在内镜下将大网膜吸引入胃腔, 应用金属夹固定大网膜封堵穿孔[12]. 对于穿孔病例, 术中夹闭结合术后禁食、胃肠减压、选择合理体位、静脉使用抗生素等, 保守治疗一般能成功[13-15]. 本组出现2例穿孔, 均为黏膜下占位, 超声内镜提示起源于肌层、黏膜下层各1例, 2例均术中黏膜下注射生理盐水、靛胭脂、肾上腺素混合液后抬举不良, 分离瘤体过程中出血较多影响视野, 同时钩刀分离过程中, 钩刀勾端无意中倾向于腔外, 结果造成术中点状穿孔. 穿孔发生后, 我们在穿孔部位使用金属夹闭合创面, 后继续完整切除病灶, 术后观察无严重腹膜炎. 我们体会: ESD术中要充分黏膜下注射, 同时利用胃镜前端透明帽的推举作用, 使瘤体与其下层分离; 使用钩刀时, 要使勾端倾向于腔内, 在直视下完成切割, 可防止勾端造成的穿孔.

总之, 对于ESD术中穿孔重在预防, 如已发生穿孔应及时使用金属夹闭合创面, 尽量做到“以镜救镜”, 以胃镜技术处理胃镜并发症. 本院自开展ESD以来, 所有患者近期效果均良好, 远期疗效还需进一步随访观察.

4 参考文献

1 詹文华. 提高我国胃癌诊治及学术水平之我见. 中华胃肠外科杂志 2006; 1: 5-7

2 Mochizuki Y, Saito Y, Tanaka T, Nitta N, Yamada H, Tsujikawa T, Murata K, Fujiyama Y, Andoh A. Endoscopic submucosal dissection combined with the placement of biodegradable stents for recurrent esophageal cancer after chemoradiotherapy. *J Gastrointest Cancer* 2012; 43: 324-328 [PMID: 21538215 DOI: 10.1007/s12029-011-9283-z]

3 Gotoda T, Iwasaki M, Kusano C, Seewald S, Oda I. Endoscopic resection of early gastric cancer treated by guideline and expanded National Cancer Centre criteria. *Br J Surg* 2010; 97: 868-871 [PMID: 20301163 DOI: 10.1002/bjs.7033]

4 Fujishiro M. Perspective on the practical indications of endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal neoplasms. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4289-4295 [PMID: 18666315 DOI: 10.3748/wjg.14.4289]

5 周平红, 徐美东, 陈巍峰, 钟芸诗, 张轶群, 王萍, 王红美, 姚礼庆, 秦新裕. 内镜粘膜下剥离术治疗直肠病变. 中华消化内镜杂志 2007; 24: 4-7

6 Fujishiro M. Endoscopic submucosal dissection for stomach neoplasms. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5108-5112 [PMID: 16937520 DOI: 10.3748/wjg.v12.i32.5108]

7 Tanaka S, Oka S, Kaneko I, Hirata M, Mouri R, Kanao H, Yoshida S, Chayama K. Endoscopic submucosal dissection for colorectal neoplasia: possibility of standardization. *Gastrointest Endosc* 2007; 66: 100-107 [PMID: 17591481 DOI: 10.1016/j.gie.2007.02.032]

8 Miyamoto S, Muto M, Hamamoto Y, Boku N, Ohtsu A, Baba S, Yoshida M, Ohkuwa M, Hosokawa K, Tajiri H, Yoshida S. A new technique for endoscopic mucosal resection with an insulated-tip electrosurgical knife improves the completeness of resection of intramucosal gastric neoplasms. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 576-581 [PMID: 11923778 DOI: 10.1067/mge.2002.122579]

9 Yamamoto H, Kawata H, Sunada K, Satoh K, Kaneko Y, Ido K, Sugano K. Success rate of curative endoscopic mucosal resection with circumferential mucosal incision assisted by submucosal injection of sodium hyaluronate. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 507-512 [PMID: 12297765 DOI: 10.1067/mge.2002.128108]

10 丁岩冰, 孙建宏, 陈姚生, 邓彬, 眭伟, 陈海燕, 赵烨. 手术室内行内镜粘膜下剥离术治疗胃肠道病变102例. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3267-3270

11 Fujishiro M, Yahagi N, Kakushima N, Kodashima S, Muraki Y, Ono S, Kobayashi K, Hashimoto T, Yamamichi N, Tateishi A, Shimizu Y, Oka M, Ogura K, Kawabe T, Ichinose M, Omata M. Successful nonsurgical management of perforation complicating endoscopic submucosal dissection of gastrointestinal epithelial neoplasms. *Endoscopy* 2006; 38: 1001-1006 [PMID: 17058165 DOI: 10.1055/s-2006-944775]

12 周平红, 姚礼庆, 秦新裕, 徐美东, 钟芸诗, 马丽黎, 张轶群, 陈巍峰, 秦文政, 胡健卫, 蔡明琰, 刘靖正, 王萍. 无腹腔镜辅助的内镜全层切除术治疗胃黏膜下肿瘤. 中华消化内镜杂志 2009; 6: 617-621

13 张春霞, 宫爱霞, 孙颖, 刘艳洁, 夏楠, 冷敬, 葛林梅. 内镜黏膜下剥离术在胃肠黏膜病变治疗中的价值. 世界华人消化杂志 2013; 21: 1866-1870

14 冯倩, 戈之铮. 内镜黏膜下剥离术在早期胃癌治疗中的应用进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2031-2035

15 于衍会, 高善玲. 内镜超声诊断胃肠道黏膜及黏膜下隆起性病变432例. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1745-1748

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 735-741
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

医用胶经导管行消化系出血血管栓塞的疗效

程 斌, 许 敏, 蒋天鹏, 宋 杰, 安天志, 周 石

程斌, 贵州省人民医院介入放射科 贵州省贵阳市 550004
许敏, 蒋天鹏, 宋杰, 安天志, 周石, 贵阳医学院附属医院介入科 贵州省贵阳市 550004
程斌, 住院医师, 临床医学专业硕士, 主要从事外周介入的治疗与临床研究.
作者贡献分布: 程斌与许敏对此文所做贡献均等; 此课题由许敏、程斌及周石设计; 研究过程由程斌、许敏、蒋天鹏、宋杰及安天志操作完成; 数据分析由许敏完成; 本论文写作由程斌与许敏完成.
通讯作者: 周石, 教授, 主任医师, 550004, 贵州省贵阳市云岩区北京路, 贵阳医学院附属医院. huaiqiaogood@126.com
收稿日期: 2013-10-09 修回日期: 2013-11-11
修回日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-18

Transcatheter arterial embolization with medical adhesive for nonvariceal gastrointestinal bleeding

Bin Cheng, Min Xu, Tian-Peng Jiang, Jie Song, Tian-Zhi An, Shi Zhou

Bin Cheng, Department of Radiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Min Xu, Tian-Peng Jiang, Jie Song, Tian-Min Xu, Tian-Peng Jiang, Jie Song, Tian-Zhi An, Shi Zhou, Department of Radiology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China
Correspondence to: Shi Zhou, Professor, Chief Physician, Department of Radiology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Beijing Road, Yunyan District, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. huaiqiaogood@126.com
Received: 2013-10-09 Revised: 2013-11-11
Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To assess the clinical utility and safety of transcatheter arterial embolization with Fuaile medical adhesive (FAL) for control of arterial bleeding in the upper or lower gastrointestinal tract.

METHODS: Thirty-five patients with arterial bleeding of the gastrointestinal tract who underwent therapeutic transcatheter embolization using FAL during the period between October 2010 and June 2013 were retrospectively analyzed. Among the patients with upper gastrointestinal bleeding (n = 26), 5 had gastric ulcer, 7 had duodenal ulcer, 1 had pancreatic cancer, 4 had gastric cancer, 2 previously underwent suturing to stop bleeding gastric ulcer, 1 previously underwent surgery for duodenal ulcer, and 6 previously underwent gastrectomy. Among the patients with lower gastrointestinal bleeding (n = 9), 2 had jejunal cancer, 1 had ileal cancer, 2 had recurrent rectal cancer, 2 had recurrent colon cancer, and 2 had colorectal polyps. Superselective transcatheter arterial embolization with mixtures of FAL and iodized oil (1:1) was performed when the signs of bleeding was observed by radiography. Patient's blood pressure, heart rate, and hemoglobin level were assessed during 24 h before and after embolization. All the patients were followed for 1 year, and clinical effectiveness was evaluated and complications were analyzed.

RESULTS: Of 35 patients included, 33 were treated with FAL solely and 2 by FAL with microcoil. The rate of successful hemostasis was 100% (35/35). Four patients experienced rebleeding, of whom one had multiple ulcers and was retreated with coil and FAL successfully 6 days after the procedure, one who underwent gastrointestinal anastomosis was re-cured with FAL perfectly, and the other two died, one for pancreatic cancer three months after the embolization and one for massive rebleeding caused by pancreatic cancer and failed emergency surgery. Abdominal pain occurred in 5 patients, of whom 4 spontaneously relieved and 1 was referred to surgery for increased abdominal pain. Five patients died for cancer after the embolization during the follow-up and no rebleeding occurred.

CONCLUSION: The results suggest that FAL can be a useful alternative embolic agent for the treatment of gastrointestinal bleeding, with a low rebleeding rate and incidence of complications if used properly.

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

Key Words: Gastrointestinal hemorrhage; Fuaile medical adhesive; Embolization; Therapeutic; Complication

■背景资料
消化系出血是内科常见急症之一, 严重威胁患者生命安全. 当内、外科治疗无效时, 经导管选择性出血动脉栓塞成为可供选择的有效止血方法. 如何选择一种安全、快速、有效、价廉的血管内栓塞材料成为关键点. 本研究拟评估福爱乐医用胶用于血管内栓塞治疗消化系出血的疗效及并发症.

■同行评议者
陈贻胜, 教授, 福建省立医院

■研发前沿
本文研究的主要热点、重点问题是：福爱乐医用胶配合超选择插管栓塞消化系出血的止血效果；如何尽可能降低术后并发症的发生率，尤其是肠坏死．精确计算医用胶的用量及术中注射医用胶速度的控制．亟待解决的问题是：需要大样本的研究及术后长期随访问题．

Chen B, Xu M, Jiang TP, Song J, An TZ, Zhou S. Transcatheter arterial embolization with medical adhesive for nonvariceal gastrointestinal bleeding. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 735-741 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/735.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.735

摘要

目的：探讨使用福爱乐医用胶配合超选择插管行血管内栓塞术治疗消化系出血的临床安全性，有效性．

方法：回顾性分析2010-10/2013-01内科治疗无效，血管造影明确为消化系血管出血并运用福爱乐医用胶栓塞出血血管的35例患者．其中上消化道出血26例：胃溃疡5例，十二指肠溃疡7例，胃癌4例，胰腺癌1例，胃溃疡缝扎止血术后2例，十二指肠溃疡术后1例，胃大部切除、胃肠吻合术后6例．下消化道出血9例：空肠恶性肿瘤2例，回肠恶性肿瘤1例，直肠癌术后复发2例，结肠癌术后复发2例，大肠息肉2例．所有病例均经微导管超选择插管至出血动脉，在透视监视下经微导管向出血动脉内注入福爱乐医用胶+碘化油混合液(比例为1∶1)．比较经导管栓塞治疗前及治疗后24 h患者的血压、心率、血红蛋白．患者术后随访1年，观察栓塞疗效及术后并发症．

结果：35例消化系出血的患者中，33例单用福爱乐医用胶栓塞，2例用福爱乐医用胶+弹簧圈栓塞．35例患者术中均成功止血，止血成功率100%．4例患者栓塞术后再发出血，其中1例为胰腺癌患者，术后第1天再发消化系大出血，急性失血性休克抢救无效死亡；1例为胃癌患者14 d后再发出血转外科手术治疗，3 mo后死于多器官功能衰竭；1例为胃多发溃疡患者6 d后再发出血成功予以福爱乐胶+弹簧圈栓塞；1例为胃肠吻合术后患者于栓塞术后26 d再发出血，再次予以福爱乐胶栓塞成功．术后5例患者出现腹痛症状，4例患者自行缓解，1例腹痛进行性加重，转外科治疗．随访期间另有5例恶性肿瘤患者因原发疾病在随访期内死亡但并无再出血情况发生．

结论：福爱乐医用胶配合超选择插管栓塞消化道出血血管成功率高，术后再出血并并发症发生率低，疗效确切．

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有．

关键词：消化系出血；福爱乐医用胶；栓塞；治疗性；并发症

核心提示：在充分掌握医用胶的基础上，运用医用胶对上消化道出血进行栓塞非常有效并且安全，尤其是在固体栓塞剂很难到达病变出血点或者患者有凝血功能障碍时．福爱乐胶作为国产医用胶，与α-氰基丙烯酸正丁酯(N-butyl 2-cyanoacrylate)胶比较，性能形似，同样安全、有效，性价比更高．

程斌，许敏，蒋天鹏，宋杰，安天志，周石．医用胶经导管行消化系出血血管栓塞的疗效．世界华人消化杂志 2014; 22(5): 735-741 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/735.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.735

0 引言

消化系出血(gastrointestinal hemorrhage, GIH) 是内科常见急症之一，严重威胁患者生命安全，其分为上消化道与下消化道出血．研究显示，上消化道出血的年发病率为40/10-150/10万[1]，年死亡率为10%-35%[2]；临床主要表现为不同程度的黑便、便血甚至呕血，同时可伴有血容量的减少引发的一系列临床症状及体征．内、外科治疗是消化系出血的常见处理方法，但由于大多数消化系出血量较大时，患者生命征往往不稳定，手术风险高，术后并发症多、死亡率较高，尤其是对于手术后的消化系再次出血，病情更加凶险．由于介入的广泛开展及其对血管性疾病诊断的优势[3]，其可通过血管造影精确确定病变部位及供血来源并微导管超选择插管至出血血管进行精确定位栓塞[4]．其以较高的成功率和较低的手术死亡率，近年来已逐渐被内、外科医师所接受．但目前栓塞剂种类繁多：如明胶海绵、弹簧圈、PVA颗粒等．然而在侧枝血管较多，血管非常迂曲，血管痉挛或凝血功能障碍[5]情况下固体栓塞剂止血效果可能欠佳，而使用液体栓塞剂是一种较好的选择[6,7]．福爱乐医用胶属液体栓塞剂，具有固化时间延长，聚合速度适当，在阴离子(体液、血液)作用下扩散性能好、聚合热低、对血管的损伤小且费用低等优点[8]．本课题回顾性分析了从2010-10/2013-01 35例消化系出血经福爱乐医用胶混合适量碘油进行血管内栓塞治疗患者的临床资料，初步探讨福爱乐医用胶用于血管内栓塞治疗消化系出血的疗效及并发症．

1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-10/2013-01我院消化系出血患者的信息(表1)，其中35例行福爱乐医用胶血

表 1 患者医疗信息

序号	性别/年龄	出血原因	栓塞血管	栓塞材料	再出血	随访结果
1	F/74	GU	GDA	FAL	无	10 d后出院
2	F/73	DU	GDA	FAL	无	15 d后出院
3	M/62	胃癌	LGA	FAL	无	8 mo后死亡
4	M/55	胰腺癌	PD–arcade	FAL	1 d后	1 d后死亡
5	M/69	胃肠吻合术后	RGA	FAL	无	28 d后出院
6	M/26	十二指肠缝合术后	GDA	FAL	无	22 d后出院
7	M/62	DU	GDA	FAL+Coil	无	7 d后出院
8	M/77	空肠恶性肿瘤	SMA	FAL	无	6 mo后死亡
9	M/41	GU	GDA	FAL	6 d后	予FAL+Coil栓塞, 4 d后出院
10	M/37	DU	GDA	FAL	无	5 d后出院
11	F/75	直肠癌术后	IMA	FAL	无	25 d后出院
12	M/42	GU	GDA	FAL	无	8 d后出院
13	M/68	胃肠吻合术后	SMA	FAL	无	17 d后出院
14	F/35	DU	GDA	FAL	无	5 d后出院
15	F/78	胃癌	GDA	FAL	无	7 mo后死亡
16	M/59	结肠癌术后	IMA	FAL	无	20 d后出院
17	F/76	胃肠吻合术后	RGA	FAL	无	25 d后出院
18	M/53	DU	GDA	FAL	无	11 d后出院
19	M/69	胃癌	GEA	FAL	14 d后	3 mo后死亡
20	F/58	直肠癌术后	IMA	FAL+Coil	无	12 mo后死亡
21	M/59	胃肠吻合术后	LGA	FAL	无	18 d后出院
22	M/69	空肠恶性肿瘤	SMA	FAL	无	20 d后出院
23	F/73	胃肠吻合术后	RGA	FAL	26 d后	10 d后出院
24	M/34	大肠息肉	IMA	FAL	无	11 d后出院
25	F/50	DU	GDA	FAL	无	6 d后出院
26	M/68	胃癌	LGA	FAL	无	15 d后出院
27	M/45	回肠恶性肿瘤	SMA	FAL	无	8 mo后死亡
28	F/48	DU	GDA	FAL	无	3 d后出院
29	M/58	胃溃疡缝扎术后	GEA	FAL	无	13 d后出院
30	M/26	GU	GDA	FAL	无	4 d后出院
31	F/49	胃肠吻合术后	LGA	FAL	无	7 d后出院
32	M/68	大肠息肉	IMA	FAL	无	3 d后出院
33	M/75	胃溃疡缝扎术后	LGA	FAL	无	12 d后出院
34	F/39	GU	GDA	FAL	无	5 d后出院

GU: 胃溃疡; DU: 十二指肠溃疡; RGA: 胃右动脉; GDA: 胃十二指肠动脉; LGA: 胃左动脉; GEA: 胃网膜动脉; IMA: 肠系膜下动脉; SMA: 肠系膜上动脉; PD arcade: 胰十二指肠动脉分支; FAL: 福爱乐医用胶; F: 女性; M: 男性.

■相关报道

目前国外已有多篇文章对以α-氰基丙烯酸正丁酯(N-butyl 2-cyano-acrylate, NBCA)胶作为栓塞剂治疗消化系出血进行了报道, 其中在NBCA胶行消化系非静脉性出血血管栓塞方面Jae等报道技术成功率100%, 再出血发生率19%, 其32例非静脉曲张上消化道出血的患者栓塞后无肠坏死发生. Lee等报道技术成功率88%, 再出血发生率17%. 可见NBCA止血成功率高, 再出血发生率低.

管内栓塞止血. 其中男性23例, 女性12例, 年龄26-78岁. 中位年龄67岁. 35例中, 上消化道出血26例, 其中胃溃疡5例, 十二指肠溃疡7例, 胃癌4例, 胰腺癌1例, 胃溃疡缝扎止血术后2例, 十二指肠溃疡术后1例, 胃大部切除、胃肠吻合术后6例. 下消化道出血9例, 空肠恶性肿瘤2例, 回肠恶性肿瘤1例, 直肠癌术后复发2例, 结肠癌术后复发2例, 大肠息肉2例. 在造影过程中表现为造影剂外溢25例, 假性动脉瘤10例. 术前失血程度(依据外科学第7版失血性休克诊断标准[9])为: 轻度17例, 中度15例, 重度3例. 胃肠道手术史13例, 恶性肿瘤8例. 纳入标准: (1)因急性消化系大出血无法行内镜诊断或内镜诊断未明确出血部位的患者; (2)各种原因的消化系出血经内科保守治疗无效或内镜难以止血; (3)因急性消化系大出血, 外科手术分险大, 患者不能耐受或家属拒绝手术的患者. 排除标准: (1)门脉高压引起的食管胃底静脉曲张破裂所致出血; (2)出现严重肝肾功能衰竭, 严重凝血功能异常等无法行DSA造影及介入栓塞的患者; (3)患者因各种基础疾病无法配合DSA检查及介入治疗; (4)DSA造影结果阴性. 临床评价指标定义[10]: (1)技术成功

■**创新盘点**
所有病例均经微导管超选择插管至出血动脉, 在透视监视下经微导管向出血动脉内注入福爱乐医用胶+碘化油混合液(比例为1∶1), 比较经导管栓塞治疗前及治疗后24 h患者的血压、心率、血红蛋白变化. 栓塞原理与NBCA近似, 但与NBCA胶相比, 其聚合热更低, 聚合时间约为3 s, 价格仅为其1/5.

表 2 35例消化系出血患者福爱乐胶栓塞前后血压、心率、血红蛋白变化

分组	观察指标			
	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	HR(s)	HGB(g/L)
栓塞前	75 ± 13	62 ± 15	116 ± 12	52 ± 10
栓塞后24 h	108 ± 9	78 ± 6	83 ± 11	70 ± 9
*t*值	12.17	5.78	11.82	7.80
*P*值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

SBP: 收缩压; DBP: 舒张压; HR: 心率; HGB: 血红蛋白.

率: 是指一次介入栓塞术后消化系出血停止, 无介入相关主要并发症发生, 再发出血需要栓塞的患者被排除; (2)临床成功率: 是指介入栓塞术后消化道出血停止, 30 d内无介入相关主要并发症发生; (3)主要并发症: 是指需要有创治疗或单靠介入治疗无法解决的并发症(例如: 肠缺血坏死、血管穿孔和急性肾功能衰竭).

1.2 *方法*

1.2.1 *治疗*: 所有患者以Seldinger法穿刺股动脉成功后均植入5F血管鞘, 由血管鞘引入5F-Yashiro导管, 依次钩挂腹腔干, 肠系膜上动脉, 肠系膜下动脉成功后接高压注射器减影(条件: 非离子造影剂碘佛醇, 总量50-70 mL, 速率6-8 mL/s, 压力300 Pa, 每次减影曝光时间20-30 s), 明确出血部位后, 选用微导管超选择插管至靶血管, 再次造影证实, 后以5%葡萄糖水反复冲洗微导管使导管内充满糖水, 再以适当比例配置(一般是1∶1)的福爱乐医用胶与超液化碘油混合剂在减影条件下以恒定速度经微导管注入, 栓塞速度不宜过快以防栓塞剂返流导致异位栓塞肠坏死. 栓塞结束后立即退出微导管并反复以5%葡萄糖水冲洗微导管. 后以注射器连接5F-Yashiro导管, 负压回抽, 若回血良好, 以盐水冲管后再经导管减影明确栓塞效果, 若回血不良或回抽血液中参杂有絮状物, 考虑为5F导管内存留有福爱乐医用胶聚合物, 此时拔出5F导管并反复以5%葡萄糖水冲洗, 清理干净后再钩挂相应血管进行造影明确栓塞效果. 栓塞成功标准为栓塞后即刻复查造影显示出血动脉闭塞, 无造影剂外溢.

1.2.2 *随访*: 术后1 d动态监测并记录患者血压, 心率, 常规术后1 d复查血常规及凝血功能. 病情稳定, 未再次出现消化系出血患者术后7-10 d复查血常规, 凝血功能, 患者出现消化系出血情况, 及时复查. 对患者进行术后1 mo, 术后6 mo及以后每6 mo一次随访, 明确有无再次消化系出血情况. 本研究的终点为患者死亡或至研究截止时间.

统计学处理 本研究数据使用SPSS13.0统计软件, 患者手术前后的血压, 心率及血红蛋白变化, 采用mean±SD表示, 使用配对*t*检验进行计量资料间的比较, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 栓塞 所有患者术中经微导管超选择插管至出血动脉后均成功栓塞, 技术成功率100%(35/35). 栓塞出血动脉情况如下: 胃十二指肠动脉14例, 胃左动脉5例, 胃右动脉3例, 胃网膜动脉2例, 胰十二指肠动脉分支1例. 肠系膜上动脉分支动脉组: 空肠动脉2例, 回结肠动脉1例, 右结肠动脉1例. 肠系膜下动脉组: 乙状结肠动脉3例, 直肠上动脉2例. 4例患者术后1 mo内再次出现消化系出血, 临床成功率88.57%(31/35). 具体情况为: 1例为胰腺癌(患者4), 术后1 d出现呕血及黑便, 并发失血性休克经抢救无效死亡; 1例为胃多发溃疡(患者9), 术后第6天再发出血, 经再次造影证实为原出血部位侧枝血管形成至再发出血, 予以福爱乐胶+弹簧圈栓塞后出血停止并未再复发出血; 1例为胃癌(患者19), 术后第14天出现呕血及黑便, 但患者及家属拒绝再次介入治疗转胃肠外科手术治疗, 术后未再出血, 但于3 mo后因肿瘤进展死亡. 1例为胃肠吻合术后(患者23), 术后第26天再发消化系出血, 急诊介入造影证实为新发的出血灶, 原出血部位栓塞良好并未见出血征象, 新发出血灶经福爱乐胶栓塞止血成功(图1, 2).

33例患者单用福爱乐胶栓塞, 2例患者使用福爱乐胶+弹簧圈栓塞, 其中1例为直肠癌术后直肠上动脉分支血管破裂出血, 另1例为十二指肠溃疡致胃十二指肠分支动脉破裂出血. 栓塞后24 h患者血压, 心率及血红蛋白情况较栓塞术前明显改善, 经统计学分析($P<0.05$), 差别具有统计学意义(表2). 5例患者术后出现栓塞后栓塞

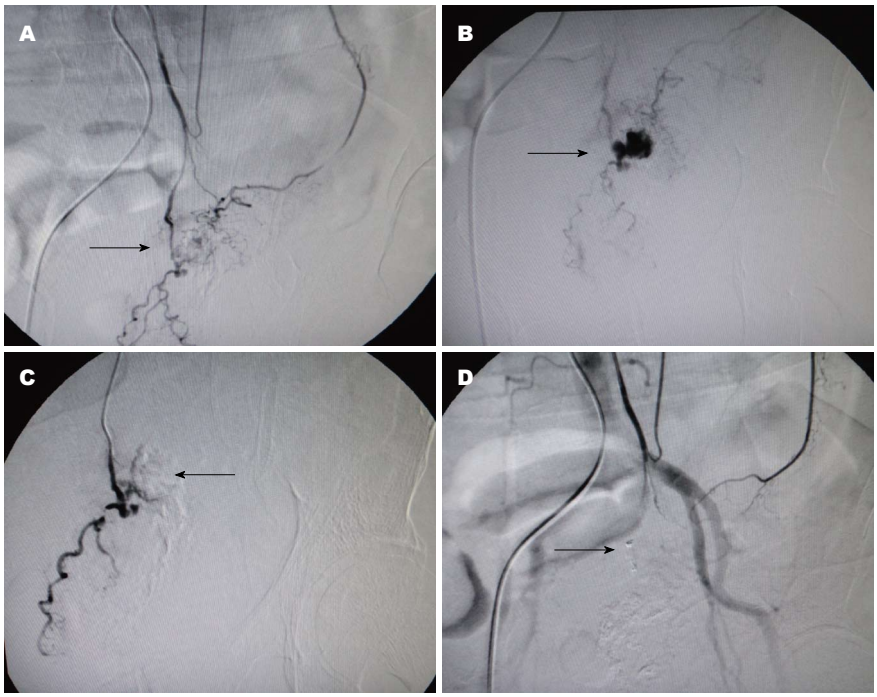

图 1 58岁直肠癌术后便血患者, 行肠系膜下动脉造影. A: 5 F导管插管至肠系膜下动脉开口手推减影示直肠下动脉造影剂外溢(箭头所示); B: 微导管超选择插管至出血部位(箭头所示); C: 福爱乐医用胶栓塞后减影见出血点被胶所填充(箭头所示); D: 予以弹簧圈补充栓塞后再次经5F导管减影未见出血血管显影(箭头所示).

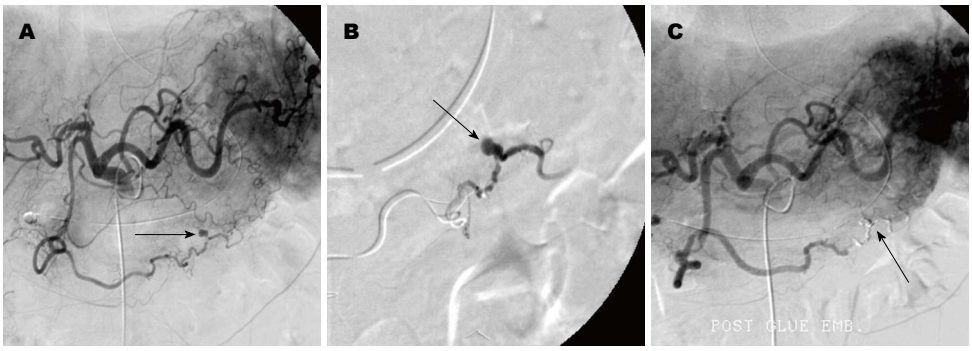

图 2 69岁胃癌出血患者, 行腹腔动脉造影. A: 经5F导管插管至腹腔干动脉高压减影见胃网膜右动脉造影剂外溢(箭头所示); B: 微导管超选择插管造影可见胃网膜右动脉假性动脉瘤形成(箭头所示); C: 福爱乐胶栓塞后减影可见栓塞成功, 远端血管铸型(箭头所示).

出血血管供血区域腹部疼痛情况, 4例患者予以对症处理后症状消失并出院, 1例患者症状持续存在无缓解, 经复查血管造影证实栓塞区域肠道缺血, 后转外科手术治疗. 1例患者术后出血明显减少, 间断有黑便情况, 未再次介入治疗, 予以内科止血治疗后2 wk大便转黄. 2例患者出现腹股沟区血肿, 巩固加压包扎、穿刺肢体绝对制动及改善凝血功能后血肿消散. 随访期内, 6例患者因肿瘤进展死亡.

3 讨论

消化系出血常可造成严重的失血性休克, 如救治不及时可危及患者生命. 对于消化系出血的治疗有3大类, 即: 内科治疗、外科手术及血管内栓塞治疗. 自从1972年Rosch等为了治疗上消化道出血而使用了经导管栓塞(transcatheter arterial embolization, TAE), TAE已经被广泛的接受为内镜治疗无效的非静脉性出血的首选治疗方法, 尤其是在高危患者中, TAE要比外科治疗更有优势[11-14]. 随着微导管技术以及新的栓塞材料的使用, 国内外介入医师成功进行导管选择性出血动脉栓塞的报导逐年增多[15].

目前介入治疗领域, 栓塞材料种类繁多, 不同疾病、不同部位所需的栓塞材料也不尽相同.

■应用要点

福爱乐医用胶配合超选择插管栓塞消化系出血目前国内外尚无报道. 本文通过总结35例使用福爱乐医用胶经血管内栓塞消化系出血疗效及并发症分析, 认为其安全、有效, 性价比更高, 应用前景广阔.

■同行评价
本文通过探讨35例福爱乐医用胶经血管途径治疗消化道出血的临床安全性，有效性，为临床处理消化系出血提供一种较好的选择方法．实验设计合理，数据处理真实、可靠，具有一定的创新性及较好的实用性，本文成果具有一定的社会效益和经济效益．

目前一系列固体栓塞材料，如：明胶海绵颗粒、微弹簧圈、聚乙烯醇颗粒以及自体血凝块已经用于消化系出血的栓塞治疗．有些作者已经报道了运用液体粘合剂栓塞消化系出血[5,16-18]．大多数介入临床医师对于固体栓塞材料运用熟练，性能掌握较佳，习惯用于消化系出血靶血管的栓塞．其中尤其以弹簧圈与明胶海绵颗粒或PVA最为常用．弹簧圈通常为假性动脉瘤栓塞的首选[19]，对于消化系出血血管的栓塞，首先必须进行超选择插管并且在栓塞过程中稳定导管位置，否则弹簧圈即可出现移位，出现靶血管以外血管的栓塞．然而，往往消化系出血血管分支细小，位置较深，有时候超选择插管于远端细小、迂曲的血管非常困难，同时在弹簧圈释放过程中导管位置的稳定亦有一定困难[20]．对于明胶海绵或PVA颗粒，作为消化系出血血管的栓塞剂，面临的主要问题与弹簧圈相似．其一：栓塞血管主要为出血血管的供血血管，有时栓塞后再次造影见侧枝血管形成并导致止血不佳，进一步超选择插管至这些侧枝血管非常耗时并且可能会插管失败或栓塞失败[21]．其二：栓塞效果受凝血功能影响明显．Encarnacion等[12]报道在凝血功能障碍的病例组中，栓塞失败高出2.9倍，栓塞后出血死亡率为9.6倍．Schenker等[22]报道，介入治疗时有凝血功能障碍时栓塞失败高出2.8倍，死亡的可能性要高出3.4倍．与之相比，医用胶栓塞剂具有能进入比较细小的血管，弥散性好、栓塞完整、较少形成侧枝循环、不进入微循环系统以及不受凝血功能影响等优点．但液体粘合剂或者医用胶作为栓塞剂使用已有30年，国内介入临床医师并不太愿意使用液体栓塞剂作为栓塞材料进行消化系出血血管栓塞，原因可能担心栓塞时对液体粘合剂控制不佳而导致缺血性事件的产生．目前国外已有多篇文章对以α-氰基丙烯酸正丁酯(N-butyl 2-cyanoacrylate, NBCA)胶作为栓塞剂治疗消化系出血进行了报道．栓塞能完全止血的成功率文献报道的比例从52%-90%不等，大部分文献报道成功率在70%-80%[23-25]．其中在NBCA胶行消化系非静脉性出血血管栓塞方面Jae等[26]报道技术成功率100%，再出血发生率19%，其32例非静脉曲张上消化道出血的患者栓塞后无肠坏死发生．Lee等[27]报道88%技术成功率，17%再出血发生率．然而，NBCA价格昂贵，严重阻碍了其在国内的推广、应用．对此，我们选用了性价比更优的国产医用胶栓塞剂-福爱乐作为栓塞材料，并累及了约10年的临床应用经验．其主要成分为α-氰基丙烯酸正辛酯(N-octyl-α-Cyanoacrylate, NOCA)、NBCA，其栓塞原理与NBCA近似，但与NBCA胶相比，其聚合热更低，价格仅为其1/5．在本组35例患者中，使用福爱乐胶栓塞技术成功率100%，术中完全止血率为100%，与术前比较术后24 h内患者血压、血红蛋白明显回升，心率稳定回落，差异具有统计学意义(P<0.001)．随访期内复发出血4例，止血有效率85.58%(31/35)，其中2例患者再次行介入补充栓塞治疗后出血停止，与国外文献比较，福爱乐胶栓塞效果并不比NBCA差．在并发症上，35例患者中引起严重并发症的只有1例：因栓塞剂返流导致异位栓塞，最终肠道发生坏死并需外科手术处理．余并发症并没有对手术患者造成严重影响，表明以福爱乐胶行肠道动脉性出血血管栓塞安全、有效．

在福爱乐医用胶栓塞肠道出血血管时，我们总结了以下几点经验可能对降低手术相关并发症有所帮助：(1)精确计算医用胶用量，主要通过导管容积，注射入病灶内的量以及注射器内剩余量估算．具体注射量，可实现通过造影剂对病变反复造影评估；(2)注射速度的控制，应首先了解医用胶的属性，对于运用医用胶经验不足的医师，应手术前进行动物模型试验．医用胶聚合时间的由碘油与医用胶的比例决定，碘油量越多，聚合时间越长．我们运用福爱乐医用胶的经验为1∶1，聚合时间约为3 s．NBCA文献报道多为1∶1至1∶4之间，其中1∶3-1∶4之间居多，聚合时间维持在7.5-11.5 s；(3)栓塞结束后立即、快速退出微导管并反复以5%葡萄糖水冲洗微导管，后退出5 F导管并反复以5%葡萄糖水冲洗，清理干净后再钩挂相应血管进行造影明确栓塞效果．

总之，在充分掌握医用胶的基础上，运用医用胶对上消化道出血进行栓塞非常有效并且安全，尤其是在固体栓塞剂很难到达病变出血点或者患者有凝血功能障碍时．福爱乐胶作为国产医用胶，与NBCA胶比较，性能形似，同样安全、有效，性价比更高．

4 参考文献

1 Langner I, Langner S, Partecke LI, Glitsch A, Kraft M, Bernstorff Wv, Hosten N. Acute upper gastrointestinal hemorrhage: is a radiological interventional approach an alternative to emergency surgery? *Emerg Radiol* 2008; 15: 413-419 [PMID: 18512090 DOI: 10.1007/s10140-008-0736-z]

2 Padia SA, Geisinger MA, Newman JS, Pierce G, Obuchowski NA, Sands MJ. Effectiveness of coil

embolization in angiographically detectable versus non-detectable sources of upper gastrointestinal hemorrhage. *J Vasc Interv Radiol* 2009; 20: 461-466 [PMID: 19328425 DOI: 10.1016/j.jvir.2009.01.006]
3 胡道予. 消化道出血及小肠病变多排CT的临床应用. 放射学实践 2005; 20: 84-86
4 Scheppach W, Wittenberg G, Hahn D, Langenfeld H, Burghardt W, Van Aerssen M, Ott G, Thiede A, Kasper H. [Massive hemorrhage from jejunal varices]. *Z Gastroenterol* 1997; 35: 195-198 [PMID: 9173688]
5 Kish JW, Katz MD, Marx MV, Harrell DS, Hanks SE. N-butyl cyanoacrylate embolization for control of acute arterial hemorrhage. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 689-695 [PMID: 15231881 DOI: 10.1097/01.RVI.0000133505.84588.8C]
6 Frodsham A, Berkmen T, Ananian C, Fung A. Initial experience using N-butyl cyanoacrylate for embolization of lower gastrointestinal hemorrhage. *J Vasc Interv Radiol* 2009; 20: 1312-1319 [PMID: 19800541 DOI: 10.1016/j.jvir.2009.06.031]
7 Huang CC, Lee CW, Hsiao JK, Leung PC, Liu KL, Tsang YM, Liu HM. N-butyl cyanoacrylate embolization as the primary treatment of acute hemodynamically unstable lower gastrointestinal hemorrhage. *J Vasc Interv Radiol* 2011; 22: 1594-1599 [PMID: 21875815 DOI: 10.1016/j.jvir.2011.07.018]
8 田霞, 卢永顺. 福爱乐医用胶及其应用.国际外科学杂志 2006; 33: 74-79
9 陈孝平. 外科学上册. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 85-92
10 Vanninen RL, Manninen I. Onyx, a new liquid embolic material for peripheral interventions: preliminary experience in aneurysm, pseudoaneurysm, and pulmonary arteriovenous malformation embolization. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007; 30: 196-200 [PMID: 17205359 DOI: 10.1007/s00270-006-0071-2]
11 Dempsey DT, Burke DR, Reilly RS, McLean GK, Rosato EF. Angiography in poor-risk patients with massive nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Am J Surg* 1990; 159: 282-286 [PMID: 2305934 DOI: 10.1016/S0002-9610(05)81218-8]
12 Encarnacion CE, Kadir S, Beam CA, Payne CS. Gastrointestinal bleeding: treatment with gastrointestinal arterial embolization. *Radiology* 1992; 183: 505-508 [PMID: 1561358]
13 Lang EV, Picus D, Marx MV, Hicks ME. Massive arterial hemorrhage from the stomach and lower esophagus: impact of embolotherapy on survival. *Radiology* 1990; 177: 249-252 [PMID: 2399325]
14 Lang EK. Transcatheter embolization in management of hemorrhage from duodenal ulcer: long-term results and complications. *Radiology* 1992; 182: 703-707 [PMID: 1535883]
15 Burgess AN, Evans PM. Lower gastrointestinal haemorrhage and superselective angiographic embolization. *ANZ J Surg* 2004; 74: 635-638 [PMID: 15315561 DOI: 10.1111/j.1445-1433.2004.03109.x]
16 Toyoda H, Nakano S, Kumada T, Takeda I, Sugiyama K, Osada T, Kiriyama S. Estimation of usefulness of N-butyl-2-cyanoacrylate-lipiodol mixture in transcatheter arterial embolization for urgent control of life-threatening massive bleeding from gastric or duodenal ulcer. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 252-258 [PMID: 8742922 DOI: 10.1111/j.1440-1746.1996.tb00071.x]
17 Slaba S, Nassar J, El Murr T, Saba M, Ghayad E. [Distal glue embolization in a patient with gastrointestinal hemorrhage]. *J Radiol* 2002; 83: 656-658 [PMID: 12063431]
18 Goldman ML, Freeny PC, Tallman JM, Galambos JT, Bradley EL, Salam A, Oen KT, Gordon IJ, Mennemeyer R. Transcatheter vascular occlusion therapy with isobutyl 2-cyanoacrylate (bucrylate) for control of massive upper-gastrointestinal bleeding. *Radiology* 1978; 129: 41-49 [PMID: 308668]
19 Loffroy RF, Abualsaud BA, Lin MD, Rao PP. Recent advances in endovascular techniques for management of acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *World J Gastrointest Surg* 2011; 3: 89-100 [PMID: 21860697 DOI: 10.4240/wjgs.v3.i7.89]
20 Yamakado K, Nakatsuka A, Tanaka N, Takano K, Matsumura K, Takeda K. Transcatheter arterial embolization of ruptured pseudoaneurysms with coils and n-butyl cyanoacrylate. *J Vasc Interv Radiol* 2000; 11: 66-72 [PMID: 10693716 DOI: 10.1016/S1051-0443(07)61284-6]
21 Pollak JS, White RI. The use of cyanoacrylate adhesives in peripheral embolization. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 907-913 [PMID: 11487670 DOI: 10.1016/S1051-0443(07)61568-1]
22 Schenker MP, Duszak R, Soulen MC, Smith KP, Baum RA, Cope C, Freiman DB, Roberts DA, Shlansky-Goldberg RD. Upper gastrointestinal hemorrhage and transcatheter embolotherapy: clinical and technical factors impacting success and survival. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 1263-1271 [PMID: 11698624 DOI: 10.1016/S1051-0443(07)61549-8]
23 Burke SJ, Golzarian J, Weldon D, Sun S. Nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Eur Radiol* 2007; 17: 1714-1726 [PMID: 17058080 DOI: 10.1007/s00330-006-0477-x]
24 Loffroy R, Guiu B, Mezzetta L, Minello A, Michiels C, Jouve JL, Cheynel N, Rat P, Cercueil JP, Krausé D. Short- and long-term results of transcatheter embolization for massive arterial hemorrhage from gastroduodenal ulcers not controlled by endoscopic hemostasis. *Can J Gastroenterol* 2009; 23: 115-120 [PMID: 19214287]
25 Loffroy R, Rao P, Ota S, De Lin M, Kwak BK, Geschwind JF. Embolization of acute nonvariceal upper gastrointestinal hemorrhage resistant to endoscopic treatment: results and predictors of recurrent bleeding. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010; 33: 1088-1100 [PMID: 20232200 DOI: 10.1007/s00270-010-9829-7]
26 Jae HJ, Chung JW, Jung AY, Lee W, Park JH. Transcatheter arterial embolization of nonvariceal upper gastrointestinal bleeding with N-butyl cyanoacrylate. *Korean J Radiol* 2007; 8: 48-56 [PMID: 17277563 DOI: 10.3348/kjr.2007.8.1.48]
27 Lee CW, Liu KL, Wang HP, Chen SJ, Tsang YM, Liu HM. Transcatheter arterial embolization of acute upper gastrointestinal tract bleeding with N-butyl-2-cyanoacrylate. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18: 209-216 [PMID: 17327553 DOI: 10.1016/j.jvir.2006.12.003]

编辑 田滢 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 742-746
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

IL-10、TNF-α在不同菌型幽门螺杆菌感染消化性溃疡中的表达

游海梅, 胡团敏

■背景资料
幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染一直是消化系统疾病研究的热点, 尤其是对*H. pylori*致病因素的探讨颇多, 其中以损伤胃黏膜、炎症与免疫损伤为主的CagA、VacA等致病因子更受到关注, 因而根据*CagA*、*VacA*基因的存在将*H. pylori*进行分型. 故本文就血清白介素10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)在不同菌型*H. pylori*感染消化性溃疡中的表达进行探讨.

■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

游海梅, 南昌大学医学院消化内科 江西省南昌市 330000
胡团敏, 中国人民解放军第180医院消化内科 福建省泉州市 362000
游海梅, 在读硕士, 主要从事幽门螺杆菌与消化系统疾病关系的研究.
中国人民解放军南京军区科研基金资助项目. No. 12MA075
作者贡献分布: 此课题由胡团敏与游海梅设计; 研究过程由游海梅操作完成; 数据分析及论文写作由胡团敏与游海梅共同完成.
通讯作者: 胡团敏, 教授, 主任医师, 362000, 福建省泉州市清源山下, 中国人民解放军第180医院消化内科. yihu180@163.com
电话: 0595-28919151
收稿日期: 2013-10-17 修回日期: 2013-12-30
接受日期: 2014-01-08 在线出版日期: 2014-02-18

Serum levels of IL-10 and TNF-α in patients with peptic ulcer caused by different *Helicobacter pylori* strains

Hai-Mei You, Tuan-Min Hu

Hai-Mei You, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China
Tuan-Min Hu, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China
Supported by: the Medical Scientific Research Fund of Nanjing Military Command of Chinese PLA, No. 12MA075
Correspondence to: Tuan-Min Hu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Qingyuan Mountain, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. yihu180@163.com
Received: 2013-10-17 Revised: 2013-12-30
Accepted: 2014-01-08 Published online: 2014-02-18

Abstract

AIM: To compare serum levels of interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in patients with peptic ulcer (PU) caused by different strains of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*).

METHODS: Ninety-four patients with gastroscopically diagnosed PU were randomly selected. *H. pylori* infection status was detected by endoscopic gastric mucosa biopsy and rapid urease test. Antibodies against various *H. pylori* proteins (CagA, VacA, UreB, UreA) were detected by immunological method. The contents of serum IL-10 and TNF-α were determined in all subjects.

RESULTS: The *H. pylori* positive rate was 89.4% (84/94) in PU, 66.7% (56/84) in duodenal ulcer (DU) and 33.3% (28/84) in gastric ulcer (GU). Sixty-four cases (44 DU and 20 GU) were infected by type Ⅰ *H. pylori* and 20 cases (12 DU and 8 GU) were infected by type Ⅱ *H. pylori*. There was no significant difference in serum level of IL-10 between type Ⅰ *H. pylori* infection group and type Ⅱ *H. pylori* infection group ($P > 0.05$). Serum level of IL-10 was significantly higher in type Ⅰ *H. pylori* infection group than in *H. pylori* negative group ($P < 0.05$), although there was no significant difference between Type Ⅱ *H. pylori* infection group and *H. pylori* negative group ($P > 0.05$) or between DU and GU group with either type Ⅰ or type Ⅱ *H. pylori* infection. Serum TNF-α was significantly higher in type Ⅰ or Ⅱ *H. pylori* infection group than in *H. pylori* negative group ($P < 0.05$ for both), in type Ⅰ *H. pylori* infection group than in type Ⅱ *H. pylori* infection group, or in DU group than in GU group with type Ⅰ *H. pylori* infection ($P < 0.05$), but showed no significant difference between DU group and GU group with type Ⅱ *H. pylori* infection.

CONCLUSION: Type Ⅰ *H. pylori* infection is a major pathogenic factor of PU. Serum IL-10 in patients with type Ⅰ *H. pylori* infection was increased obviously, but showed no significant correlation with the type of *H. pylori* infection or ulcer location. Serum TNF-α was increased obviously in patients with types Ⅰ and Ⅱ *H. pylori* infection, especially the former, and was obviously higher in DU patients than in GU patients with type Ⅰ *H. pylori* infection.

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

Key Words: Interleukin-10; Tumor necrosis factor-α; *Helicobacter pylori*; Different type; Peptic ulcer

You HM, Hu TM. Serum levels of IL-10 and TNF-α in patients with peptic ulcer caused by different *Helicobacter pylori* strains. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 742-746 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/742.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.742

摘要

目的: 探讨不同菌型幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染消化性溃疡(peptic ulcer, PU)患者血清白介素10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)的表达.

方法: 随机选择经胃镜检查诊断为消化性溃疡的患者94例, 进行内镜下胃黏膜活检快速尿素酶试验检测*H. pylori*感染状况, *H. pylori*阳性者进一步抽血进行分型检测, 采用免疫印迹法检测血清*H. pylori* CagA、VacA、UreB、UreA等4项基因抗体; 所有受检者均予抽血检测血清IL-10、TNF-α的含量.

结果: *H. pylori*感染状况: 94例消化性溃疡中*H. pylori*阳性病例84例, 其中十二指肠球部溃疡56例, 胃溃疡28例, *H. pylori*阴性病例10例; Ⅰ型*H. pylori*感染64例(十二指肠球部溃疡44例, 胃溃疡20例); Ⅱ型*H. pylori*感染20例(十二指肠球部溃疡12例, 胃溃疡8例). 血清IL-10的表达状况: Ⅰ型*H. pylori*感染组检测值(31.51 pg/mL±11.58 pg/mL)略高于Ⅱ型*H. pylori*感染组(22.02 pg/mL±13.50 pg/mL), 统计学比较无明显差异(P>0.05), 但明显高于*H. pylori*阴性组检测值(18.87 pg/mL±6.45 pg/mL), 统计学比较有显著差异(P<0.05); Ⅱ型*H. pylori*感染组检测值与*H. pylori*阴性组比较无明显差异(P>0.05). Ⅰ型*H. pylori*感染及Ⅱ型*H. pylori*感染组中十二指肠球部溃疡组检测值(32.25 pg/mL±19.33 pg/mL及18.57 pg/mL±8.46 pg/mL)与胃溃疡组检测值(29.86 pg/mL±14.80 pg/mL及27.20 pg/mL±8.12 pg/mL)比较无明显差异. 血清TNF-α的表达状况: Ⅰ型*H. pylori*感染组及Ⅱ型感染组的检测值(42.66 pg/mL±11.41 pg/mL及28.67 pg/mL±8.27 pg/mL)与*H. pylori*阴性组(11.24 pg/mL±4.31pg/mL)比较均明显增高(P<0.05); Ⅰ型*H. pylori*感染组与Ⅱ型感染组比较明显升高(P<0.05); Ⅰ型*H. pylori*感染组中十二指肠球部溃疡组检测值(47.13 pg/mL±10.20 pg/mL)明显高于胃溃疡组检测值(32.85 pg/mL±7.28 pg/mL)(P<0.05); Ⅱ型*H. pylori*感染组中十二指肠球部溃疡组检测值(28.83 pg/mL±11.38 pg/mL)与胃溃疡组检测值(28.42 pg/mL±3.79 pg/mL)比较无明显差异.

结论: Ⅰ型*H. pylori*感染是消化性溃疡主要致病因素; 血清IL-10的表达在Ⅰ型*H. pylori*感染明显增高, 但在不同菌型*H. pylori*感染及不同部位的溃疡方面均无明显差异; 血清TNF-α的表达在Ⅰ型及Ⅱ型*H. pylori*感染均明显增高, 尤见于Ⅰ型*H. pylori*感染, 且在Ⅰ型*H. pylori*感染十二指肠球部溃疡明显高于胃溃疡.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 白介素-10; 肿瘤坏死因子因子-α; 幽门螺杆菌; 不同菌型; 消化性溃疡

核心提示: Ⅰ型幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染是消化性溃疡主要致病因素; 血清白介素10(interleukin-10, IL-10)的表达在Ⅰ型*H. pylori*感染明显增高, 血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)的表达在Ⅰ型及Ⅱ型*H. pylori*感染均明显增高, 尤见于Ⅰ型*H. pylori*感染.

游海梅, 胡团敏. IL-10、TNF-α在不同菌型幽门螺杆菌感染消化性溃疡中的表达. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 742-746
URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/742.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.742

■研发前沿
*H. pylori*的致病因素是目前研究的热点之一, 特别是以损伤胃黏膜、炎症及免疫损伤为主的*CagA*、*VacA*基因. *CagA*、*VacA*基因如何通过炎症反应参与消化系统疾病的发生发展令人关注.

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染一直是消化系统疾病研究的热点, 尤其是对*H. pylori*致病因素的探讨颇多, *H. pylori*的致病力在于其致病因子, 主要有与定植有关的、以直接损伤胃黏膜为主的以及与炎症及免疫损伤有关的等多种致病因子, 其中以损伤胃黏膜、炎症与免疫损伤为主的CagA、VacA等致病因子更受到关注[1]. 随着研究深入发现具有*CagA*、*VacA*基因的*H. pylori*致病力更强, 因而根据*CagA*、*VacA*基因的存在将*H. pylori*进行分型, 本文旨在探讨血清白介素10(interleukin-10, IL-10)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)在不同基因型*H. pylori*感染消化性溃疡患者中的表达.

1 材料和方法

1.1 材料 随机选择2012-01/2013-01因上腹部不适就诊于我院消化内科门诊及住院的患者, 经胃镜检查诊断为消化性溃疡(peptic ulcer, PU)94例, 年龄19-63岁, 平均年龄39.26岁±11.88岁, 男60例, 女34例. 经胃黏膜活检快速尿素酶试验检测*H. pylori*阳性的患者84例, 其中十二指肠球部溃疡(duodenal ulcer, DU)56例, 胃溃疡(gastric ulcer, GU)28例, *H. pylori*阴性者10例. 所有入选者均于就诊前2 mo内未接受过任何治疗, 且通过血常规、生化、彩超等检查排除其他炎症性疾病及肿瘤; 根据*H. pylori*感染情况分为Ⅰ型*H. pylori*感染消化性溃疡组、Ⅱ型*H. pylori*感染消化性溃疡组及*H. pylori*阴性消化性溃疡组.

■相关报道
Zalewska-Ziob等研究表明CagA/VacA可引起胃黏膜CD4+ T淋巴细胞升高, IL-10、TNF-α分泌升高. KIDD等研究表明TH1和TH2免疫应答间通过其分泌的细胞因子交互负反馈的调节使TH1细胞和TH2细胞处于相对平衡状态. 袁建芬等研究表明*H. pylori*感染者存在增强的TH2免疫应答和抑制的TH1免疫应答.

1.2 方法

1.2.1 血清*H. pylori CagA*、*VacA*、*UreB*、*UreA*基因抗体检测: 采集*H. pylori*阳性患者静脉血4 mL, 经3000 r/min离心, 用免疫印迹法测定其血清中*H. pylori CagA*、*VacA*、*UreB*、*UreA*基因抗体. 测定药盒由深圳市伯劳特生物科技有限公司生产, 详细操作[将25 mL浓缩洗涤液用蒸馏水稀释至250 mL, 在放有印迹膜的反应槽中加入洗涤应用液1 mL和待检血清10 μL, 置摇床上室温(20 ℃-37 ℃)摇动30 min, 弃去反应槽液体, 在吸水纸上拍干, 加入洗涤应用液1 mL, 反复洗涤3次, 最后在吸水纸上拍干, 在反应槽中加入洗涤应用液0.5 mL和酶联试剂10 μL, 置摇床上摇动30 min, 弃去反应槽液体, 洗涤应用液反复洗涤3次, 在吸水纸上拍干, 在反应槽中加入显色剂0.5 mL, 摇床上摇动5 min, 显色]及结果判定(CagA、VacA区带中任意一种或两种同时出现为Ⅰ型, 仅UreB和UreA区带中任意一种或两种同时出现, 而未见CagA、VacA区带为Ⅱ型)按说明书进行.

1.2.2 血清IL-10、TNF-α含量检测: 抽取所有受检者静脉血4 mL, 经3000 r/min离心, 应用ELISA法检测患者血清中IL-10、TNF-α含量. 试剂盒由上海森雄科技实业有限公司生产, 详细操作[建立标准曲线: 设标准孔8孔, 每孔中加入样品稀释液100 μL, 第一孔加标准品100 μL, 混匀后用加样器吸出100 μL, 移至第二孔, 如此反复做对数稀释至第七孔, 最后从第七孔中吸出100 μL弃去, 第八孔为空白对照; 加样: 待测品孔中每孔各加入待测品100 μL; 将反应板置37 ℃ 120 min, 洗板, 每孔中加入第一抗体工作液50 μL, 将反应板置37 ℃ 60 min, 洗板, 每孔加酶标抗体工作液100 μL, 将反应板置37 ℃ 60 min, 洗板, 每孔加入底物液100 μL, 置37 ℃暗处反应10 min, 每孔加入50 μL终止液混匀, 在450 nm处测吸光值(*A*值)]及结果判定(所有*A*值减去空白值后计算, 以标准品1000、500、250、125、62.5、31.25、15.62、0 pg/mL的*A*值在半对数纸上作图, 浓度为X轴, *A*值为Y轴, 曲线为一光滑曲线, 根据样品A值在该曲线图上查出相应IL-10、TNF-α含量)按说明书进行.

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行数据处理, 数据间比较采用*t*检验, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 *H. pylori*感染状况 94例消化性溃疡中*H. pylori*阳性的病例84例(89.4%), 其中十二指肠球部溃疡54例(66.7%), 胃溃疡28例(33.3%), *H. pylori*阴性病例10例(10.6%); *H. pylori*基因抗体表达分别为CagA 64例(76.2%)、VacA 48例(57.1%)、UreA 72例(85.7%)、UreB 80例(95.2%), 根据*H. pylori*分型标准, *CagA*、*VacA*基因其中一项或两项同时阳性为Ⅰ型, 否则为Ⅱ型; 结果表明Ⅰ型*H. pylori*感染64例(76.2%)(十二指肠球部溃疡44例, 胃溃疡20例); Ⅱ型*H. pylori*感染20例(23.8%)(十二指肠球部溃疡12例, 胃溃疡8例).

表 1 各组血清IL-10、TNF-α水平比较 (mean ± SD, pg/mL)

分组	*n*	IL-10	TNF-α
*H. pylori*阴性	10	18.87 ± 6.45	11.24 ± 4.31
Ⅰ型*H. pylori*	64	31.51 ± 11.58[a]	42.66 ± 11.41[a]
Ⅱ型*H. pylori*	20	22.02 ± 13.50	28.67 ± 8.27[ac]

[a]$P<0.05$ *vs H. pylori*阴性组; [c]$P<0.05$ *vs* Ⅰ型*H. pylori*组. *H. pylori*: 幽门螺杆菌; IL-10: 白介素10; TNF-α: 肿瘤坏死因子α.

2.2 各组血清IL-10及TNF-α的表达状况 IL-10的表达水平在Ⅰ型*H. pylori*感染组检测值略高于Ⅱ型*H. pylori*感染组, 统计学比较无明显差异($P>0.05$), Ⅰ型*H. pylori*感染组明显高于*H. pylori*阴性组, 统计学比较有显著差异($P<0.05$); Ⅱ型*H. pylori*感染组与*H. pylori*阴性组比较无明显差异($P>0.05$). TNF-α的表达水平在Ⅰ型*H. pylori*感染组及Ⅱ型感染组与*H. pylori*阴性组比较均明显升高($P<0.05$); Ⅰ型*H. pylori*感染组与Ⅱ型感染组比较明显升高($P<0.05$)(表1).

2.3 *H. pylori*感染十二指肠球部溃疡组与胃溃疡组血清IL-10、TNF-α的表达状况 IL-10的表达水平在Ⅰ型*H. pylori*感染及Ⅱ型*H. pylori*感染十二指肠球部溃疡组与胃溃疡组比较无明显差异. TNF-α的表达水平在Ⅰ型*H. pylori*感染十二指肠球部溃疡组明显高于胃溃疡组($P<0.05$); Ⅱ型*H. pylori*感染十二指肠球部溃疡组与胃溃疡组比较无明显差异($P>0.05$)(表2).

3 讨论

大量的研究表明炎症免疫反应是*H. pylori*感染黏膜损伤的重要病理生理机制, 其可导致宿主出现细胞免疫应答, 胃黏膜CD4+ T细胞升高, 其亚型TH1、TH2可分泌多种细胞因子, 其中TH1分泌TNF-α等促炎因子, TH2分泌IL-10等抗炎因子[2-5]; 当促炎和抗炎因子释放失衡时可导致胃黏膜炎症损伤, 参与溃疡的发生发展. 研究表明

表 2 *H. pylori*感染十二指肠球部溃疡组与胃溃疡组血清IL-10、TNF-α水平比较 (mean ± SD, pg/mL)

分组	Ⅰ型*H. pylori*感染		Ⅱ型*H. pylori*感染	
	IL-10	TNF-α	IL-10	TNF-α
十二指肠球部溃疡	32.25 ± 19.33	47.13 ± 10.20	18.57 ± 8.46	28.83 ± 11.38
胃溃疡	29.86 ± 14.80	32.85 ± 7.28[a]	27.20 ± 8.12	28.42 ± 3.79

[a]$P<0.05$ *vs* 十二指肠球部溃疡组. *H. pylori*: 幽门螺杆菌; IL-10: 白介素10; TNF-α: 肿瘤坏死因子α.

■**创新盘点**

*H. pylori*感染致炎症因子IL-10、TNF-α升高已得到公认, 但关于IL-10、TNF-α在*H. pylori*不同菌型感染消化性溃疡中的表达尚未见报道, 本文的创新点在于明确了IL-10、TNF-α在不同菌型*H. pylori*感染消化性溃疡中的差异, 以及在不同菌型*H. pylori*感染十二指肠球部溃疡与胃溃疡中的差异.

CagA/VacA可引起胃黏膜$CD4^+$ T淋巴细胞升高, IL-10、TNF-α分泌升高[6-8].

IL-10是一种重要免疫调节细胞因子, 主要由TH2淋巴细胞分泌, 可通过自分泌或旁分泌方式发挥作用, 下调多种免疫细胞的活性, 其可抑制TH1淋巴细胞因子(TNF-α、IFN-γ、IL-8等)的合成及其活性[9-10], 发挥其抗炎作用. 生理情况下, TH1和TH2免疫应答间通过其分泌的细胞因子交互负反馈的调节使TH1细胞和TH2细胞处于相对平衡状态[11], *H. pylori*感染者存在增强的TH2免疫应答和抑制的TH1免疫应答[12]; *H. pylori*感染后可引起TH2免疫增强, 通过低调节免疫/炎症反应来抑制炎症过程, 从而减轻组织损伤, 同时TH1应答减弱, 导致*H. pylori*感染成为慢性感染, 有研究表明CagA蛋白可能参与诱导宿主免疫耐受的形成和慢性感染的迁延不愈[13]; 长期持续的*H. pylori*感染又可加重TH1细胞免疫应答, 使TNF-α等促炎因子分泌增加; TNF-α是一种重要的促炎因子, 可诱导血管内皮细胞表达细胞间黏附分子-1和分泌IL-1、IL-8等炎症因子, 通过上调中性粒细胞及内皮细胞上黏附分子的表达引起中性粒细胞移动, 诱导中性粒细胞黏附及白细胞穿出血管壁, 造成胃黏膜内皮细胞的损伤, 使血流减少; 因胃黏膜血流在胃黏膜屏障的防御机制中至关重要, 从而造成胃黏膜损伤[14], TNF-α亦可提高细胞单核细胞趋化因子1的分泌, 促进免疫炎症反应进展[15].

本研究结果显示*H. pylori*感染消化性溃疡中以Ⅰ型*H. pylori*感染为主, 表明Ⅰ型*H. pylori*感染是消化性溃疡的主要致病因子. 血清IL-10检测值在Ⅰ型与Ⅱ型*H. pylori*感染消化性溃疡之间比较无明显差异, 但在Ⅰ型*H. pylori*感染组明显高于*H. pylori*阴性组, 表明Ⅰ型*H. pylori*感染与Ⅱ型*H. pylori*感染患者机体的防御机制是一样的, 都可引起细胞免疫应答, 但Ⅰ型*H. pylori*感染引起的机体免疫应答反应更强, 表现为抗炎因子IL-10的明显增高, 有利于抑制炎症反应. 血清IL-10水平在Ⅰ型*H. pylori*感染的十二指肠球部溃疡与胃溃疡之间无明显差异, 表明IL-10的表达与Ⅰ型*H. pylori*感染有关, 但与溃疡部位无明显相关性, 后者与王如华等[16]研究一致.

血清TNF-α的表达, 在Ⅰ型及Ⅱ型*H. pylori*感染组的检测值均高于*H. pylori*阴性组; 且Ⅰ型*H. pylori*感染组高于Ⅱ型*H. pylori*感染组; Ⅰ型*H. pylori*感染组中十二指肠球部溃疡者明显高于胃溃疡者($P<0.05$); Ⅱ型感染组无明显差异; 其结果提示*H. pylori*感染时机体的炎症免疫反应增强, 尤其是Ⅰ型*H. pylori*感染, TH1细胞免疫应答增强较Ⅱ型*H. pylori*感染更为显著, 更能促进TNF-α分泌增加, 引起黏膜炎症加重, 破坏了黏膜的防御和修复功能, 导致溃疡的形成. 因而我们认为Ⅰ型*H. pylori*感染是引起十二指肠球部溃疡的重要攻击因子, 由于Ⅰ型*H. pylori*通过促进TNF-α的分泌明显增强了攻击因素, 其直接或间接作用于胃窦D、G细胞促进胃酸分泌, 同时引起十二指肠炎症, 故在十二指肠球部溃疡血清TNF-α的表达水平明显高于胃溃疡, 表明TNF-α的表达水平与*H. pylori*感染, 尤其是Ⅰ型*H. pylori*感染密切相关, 且与溃疡部位有关.

总之, 在消化性溃疡的发生发展过程中, *H. pylori*感染, 血清IL-10、TNF-α的表达, 各自扮演重要角色, *H. pylori*感染, 尤其是Ⅰ型*H. pylori*感染是消化性溃疡发病的重要因素, 机体炎症免疫机制的失调, 抗炎因子IL-10与促炎因子TNF-α的失衡, 是*H. pylori*感染消化性溃疡的重要发病机制, 尤其是Ⅰ型*H. pylori*感染时血清IL-10及TNF-α均明显增高, 后者更为明显, 尤见于十二指肠球部溃疡.

4 参考文献

1 胡伏莲. 幽门螺杆菌的致病因子. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1933-1996

2 Amieva MR, El-Omar EM. Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* 2008; 134: 306-323 [PMID: 18166359]

■同行评价
本文选题好, 课题设计合理, 结果可信, 有一定的临床意义.

3 Stuller KA, Ding H, Redline RW, Czinn SJ, Blanchard TG. CD25+ T cells induce Helicobacter pylori-specific CD25- T-cell anergy but are not required to maintain persistent hyporesponsiveness. *Eur J Immunol* 2008; 38: 3426-3435 [PMID: 19003932 DOI: 10.1002/eji.00838428]

4 Kayhan B, Arasli M, Eren H, Aydemir S, Kayhan B, Aktas E, Tekin I. Analysis of peripheral blood lymphocyte phenotypes and Th1/Th2 cytokines profile in the systemic immune responses of Helicobacter pylori infected individuals. *Microbiol Immunol* 2008; 52: 531-538 [PMID: 19090832 DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00066x]

5 石云, 刘晓斐, 邹全明. 幽门螺杆菌与Th细胞应答的研究进展. 细胞与分子免疫学杂志 2010; 26: 407-409

6 Kido M, Watanabe N, Aoki N, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, Azuma T, Chiba T. Dual roles of CagA protein in Helicobacterpylori-induced chronic gastritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 412: 266-272 [PMID: 21820415]

7 Bodger K, Bromelow K, Wyatt JI, Heatley RV. Interleukin 10 in Helicobacter pylori associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. *J Clin Pathol* 2001; 54: 285-292 [PMID: 11304845 DOI: 10.1136/jcp.54.4.285]

8 Zalewska-Ziob M, Adamek B, Strzelczyk JK, Gawron K, Jarzab B, Gubała E, Kula D, Krakowczyk Ł, Sieroń A, Wiczkowski A. TNF-alpha expression in gastric mucosa of individuals infected with different virulent Helicobacter pylori strains. *Med Sci Monit* 2009; 15: BR166-BR171 [PMID: 19478694]

9 王秀莲, 徐存美. 幽门螺杆菌与相关细胞因子关系的研究进展. 内蒙古医学杂志 2009; 41: 967-969

10 郭佳鹤, 孙瑜, 温晓晔. IL-10与消化性溃疡患者幽门螺杆菌感染的关系. 中国实验诊断学 2008; 12: 1381-1382

11 Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003; 8: 223-246 [PMID: 12946237]

12 袁建芬, 喻海忠, 张小洁, 洪宏, 顾庆华, 何秀萍, 刘小丽. 幽门螺杆菌感染与细胞因子的关系. 现代检验医学杂志 2013; 28: 133-135

13 谢兆兰, 周立云, 王明林. CagA的表达对慢性胃炎Th细胞亚群分化的影响. 天津医药 2013; 41: 752-755

14 Moorchung N, Srivastava AN, Gupta NK, Malaviya AK, Achyut BR, Mittal B. The role of mast cells and eosinophils in chronic gastritis. *Clin Exp Med* 2006; 6: 107-114 [PMID: 17061058 DOI: 10.1007/s10238-006-0104-9]

15 Aukrust P, Sandberg WJ, Otterdal K, Vinge LE, Gullestad L, Yndestad A, Halvorsen B, Ueland T. Tumor necrosis factor superfamily molecules in acute coronary syndromes. *Ann Med* 2011; 43: 90-103 [PMID: 21039303 DOI: 10.3109/07853890.2010.523711]

16 王如华, 朱金水, 邹静, 朱励, 余小虎. 消化性溃疡患者CagA-Hp感染与血清IL-8、IL-10的相关性研究. 中国临床医学 2002; 9: 254-255

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》栏目设置

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): 747-750
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

病例报告 CASE REPORT

胰胆管合流异常术后残余胆管复发结石1例

张 恺, 路军华, 张宪文

张恺, 路军华, 张宪文, 天津中医药大学第一附属医院外二科 天津市 300193
张恺, 主治医师, 主要从事中西医结合外科临床、科研及教学工作.
作者贡献分布: 收集整理资料与论文写作由张恺完成; 完善病例讨论内容由路军华与张宪文完成.
通讯作者: 张恺, 主治医师, 300193, 天津市南开区鞍山西道314号, 天津中医药大学第一附属医院外二科.
k.leo.zhang@gmail.com
电话: 022-27432478
收稿日期: 2013-11-16 修回日期: 2013-12-18
接受日期: 2013-12-25 在线出版日期: 2014-02-18

Recurrent gallstones in residual bile ducts after surgery for pancreaticobiliary maljunction: A case report and literature review

Kai Zhang, Jun-Hua Lu, Xian-Wen Zhang

Kai Zhang, Jun-Hua Lu, Xian-Wen Zhang, Second Department of Surgery, the First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
Correspondence to: Kai Zhang, Attending Surgeon, Second Department of Surgery, the First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 314 Anshanxi Road, Nankai District, Tianjin 300193, China. k.leo.zhang@gmail.com
Received: 2013-11-16 Revised: 2013-12-18
Accepted: 2013-12-25 Published online: 2014-02-18

Abstract
Pancreaticobiliary maljunction (PBM) is a type of congenital anomaly present in pancreatic duct development. Surgery is a reliable treatment for acute pancreatitis and biliary calculi induced by PBM, and can reduce the risk of carcinoma from congenital biliary dilatation. However, there have been few reports on postoperative complications. Here we report a case of recurrent gallstones in residual bile ducts after surgery for PBM. A review of the literature was also performed.

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

Key Words: Pancreaticobiliary maljunction; Residual bile duct; Recurrent gallstones

Zhang K, Lu JH, Zhang XW. Recurrent gallstones in residual bile ducts after surgery for pancreaticobiliary maljunction: A case report and literature review. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(5): 747-750 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/747.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.747

摘要
胰胆合流异常(pancreaticobiliary maljunction, PBM)是胰胆管发育异常的先天性畸形. 手术治疗是可靠的治疗方式, 其既治疗了PBM所并发的急性胰腺炎及胆道结石, 又降低了胆总管扩张症发展为胆管癌的风险, 但对于手术并发症尚未见系统报导. 作者近年诊治了PBM术后残余胆管复发结石1例, 经十二指肠镜治疗后好转, 予以报道并复习文献.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胰胆合流异常; 残余胆管; 复发结石

核心提示: 胰胆合流异常(pancreaticobiliary maljunction, PBM)术后残余胆管复发结石尚未见系统报导, 本文分析了PBM术后残余胆管复发结石的原因, 提出了复发结石的治疗方案.

张恺, 路军华, 张宪文. 胰胆管合流异常术后残余胆管复发结石1例. 世界华人消化杂志 2014; 22(5): 747-750 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/747.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i5.747

0 引言
胰胆合流异常(pancreaticobiliary maljunction, PBM)是指在胚胎时期, 由于某些因素导致胰胆管发育异常的先天性畸形. 随着影像学和内镜技术的进展, 该病诊出率逐渐增多, 对于伴有胆总管扩张症的PBM患者, 手术治疗是较为可靠的治疗方式, 其既治疗了PBM所并发的急性胰腺炎及胆道结石, 又降低了胆总管扩张症发展为胆管癌的风险, 但对于手术并发症尚未见系统报导. 作者近年诊治了PBM术后残余胆管复发结石1例, 经十二指肠镜治疗后好转, 现报道如下.

■背景资料
胰胆合流异常是胰胆管发育异常的先天性畸形, 术后残余胆管复发结石尚未见系统报导.

■同行评议者
白雪巍, 副主任医师,哈尔滨医科大学

■研发前沿
通过对胰胆合流异常术后残余胆管复发结石治疗这1病例及文献复习，希望能提高临床医师对此疾病的认识.

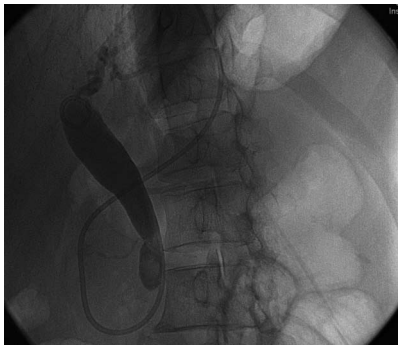

图 1 术前行经内镜逆行性胰胆管造影术、经内镜鼻胆管引流术.

1 病例报告

患者, 女, 39岁, 主因“上腹痛反复发作6 mo, 加重1 d”于2011年住院治疗. 患者入院前6 mo于当地医院诊断为急性胰腺炎, 经对症治疗后好转. 6 mo以来, 急性胰腺炎反复发作3次, 患者体质量下降15 kg, 体质量指数(body mass index, BMI)15.9 kg/m^2. 入院前1 d, 患者腹痛再次发作, 经当地医院转诊至我院. 检查提示: 肝功能损害, 血、尿淀粉酶均明显高于正常; 腹部CT及磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)提示: 胆囊增大并胆囊壁增厚、胆囊炎、肝外胆管及胆总管下段扩张、提示胆总管下端结石不除外. 行经内镜逆行性胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)检查示肝外胆管明显扩张, 胆总管最大直径约2.5 cm, 其内可见一枚巨大结石样透亮负影, 嵌顿于胆总管下端, 直径约2 cm×3 cm, Oddis括约肌炎性狭窄, 胰胆管合流异常(P-B型), 并行内镜下十二指肠乳头括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)、经内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)(图1), 监测胆汁淀粉酶>2000 U/L. 故明确诊断为: 胰胆管异常合流伴胆总管扩张症, 胆总管结石, 急性胰腺炎, 慢性胆囊炎, 经保肝治疗后在全麻下行胆囊切除、胆总管囊肿切除, 肝管空肠Roux-en-Y吻合术. 术后患者恢复良好, 肝功能及血、尿淀粉酶恢复正常, 腹痛消失, 出院后每半年随访一次, 患者均无不适主诉, BMI升至21.2 kg/m^2.

患者术后20 mo再次无明显诱因出现上腹痛并进行性加重, 即入院检查示血淀粉酶升高, MRCP提示: 胆总管中下段多发结石、继发局部胆总管扩张、胆囊术后改变、胰头稍饱满、胰管扩张. ERCP检查提示残余胆管扩张伴结石, 行网篮及气囊导管取石并置胰管支架引流, 术后诊断: 胆总管残端胰性结石. 经对症治疗后好转, 1 mo后经十二指肠镜拔除胰管支架, 现随诊3 mo患者无不适症状, 化验正常, 彩超检查未见复发结石征象.

2 讨论

2.1 PBM PBM的概念, 最早是由日本学者Kozumi于1916年经过尸检发现并首先提出的; 而在1991年, 日本胰胆管合流异常研究会指出PBM是指解剖上胰管与胆管在十二指肠壁外合流的畸形, 功能上由于胰液与胆汁相互混合及逆流入胆管和/或胰管, 由于十二指肠乳头部括约肌(Oddis括约肌)的作用不能影响到合流部, 导致胆道及胰腺出现各种病理变化, 如: 急慢性胰腺炎、胰管结石、胆道结石、胆管炎和胆管癌等[1]. 目前, 日本学者对该疾病研究较为深入, 一般认为, 成人共同通道长度≥15 mm, 小儿≥5 mm, 即可诊断PBM, 但随着对PBM认识的逐渐深刻及检测手段的进步, 临床诊断PBM的共同通道长度, 应该从≥15 mm、≥12 mm、≥8 mm到≥6 mm[2].

日本学者Komi等[3]根据影像学研究, 提出新的PBM分型: Ⅰ型: 胆总管进入胰管后汇合在为胰管型(B-P型); Ⅱ型: 胰管进入胆管后汇合为胆管型(P-B型); Ⅲ型: 复杂型: 依据胆管、胰管以及副胰管的连接分为5种亚型. 根据ERCP结果, 本例PBM即属于Ⅱ型.

2.2 胆总管扩张症 先天性胆管扩张症(congenital biliary dilatation, CBD), 临床上表现为胆道的部分呈囊性或者梭形扩张, 可以发生于肝内外胆管的任何部位, 因其好发于胆总管, 故亦称“先天性胆总管囊肿”(congenital choledochal cyst, CCC)[4]其病因尚未明确, 除遗传因素和先天性胆道发育异常两种病因外, 由美国学者Babbitt[5]提出的PBM为CBD的病因这一论点, 越来越得到了学者们的认可和共识. Babbitt等[6]于1969年和1973年先后报道了PBM和CBD的关系, 提出了因PBM导致胰液逆流进入胆道, 导致胆管炎反复发作, 胆管内膜遭到破坏导致纤维变性、胆管壁变薄弱从而引起胆总管囊性扩张, 这一假说已经由不同学者从影像学、病理学、流体力学、分子生物学等不同角度得到证实[7-10], 是目前CBD病因中最为学者们认同的. CBD的主要病理危险因素在于其是胆管癌的癌前病变之一[11], 研究表明, 大多数胆管癌癌变病例均发生于扩

张的肝外胆道, 而其中的绝大多数则是囊肿本身的癌变[12]. 分析本例病例的胆总管扩张, 即属于梭性扩张的类型, 其主要病因就在于PBM, 并继发胆总管结石及急性胰腺炎, 且存在着发展成为胆管癌的风险.

2.3 *手术方式* 本例病例首先经ERCP明确诊断, 置ENBD引流, 达到了4个主要目的: (1)减低胆道压力促进肝功能恢复; (2)减轻於胆, 改善胆囊炎症状; (3)监测胆汁淀粉酶变化, 既佐证了诊断, 又监测了胰液反流情况; (4)为术中通过造影找到胰管在胆总管开口位置及判断胆总管囊肿切除范围提供了依据.

手术方式选择为胆囊切除、胆总管囊肿切除、肝管空肠Roux-en-Y吻合术, 手术中注意: (1)尽可能全部切除囊肿, 因残存的囊壁仍有癌变机会; (2)合理重建胆肠通道, 既要防止肠内容物反流, 又要避免吻合口狭窄, 以达到吻合口引流通畅, 避免吻合口瘘的出现, 故空肠Y臂应该选择大于30 cm, 对于肝门部胆管扩张的患者可与空肠直接行端-侧或端-端吻合, 如胆总管扩张呈梭形, 肝门部扩张不明显, 则可以劈开左右肝管, 行肝门-空肠盆式吻合术以避免吻合口狭窄及复发结石, 如条件允许, 可以行ENBD引流以保证胆汁和/或胰液引流通畅, 必要时可以置T管引流降低吻合口瘘的几率; (3)胰胆管分流, 阻止胰液进入胆管. 遇胆管感染严重, 不能一期行根治术时, 可先行囊肿外引流, 等感染控制后再行胰胆分流的根治手术. 因本例患者为P-B分流方式, 故胰胆管共同通道不能切除, 这也成为了本例患者残余胆管复发结石的病理基础之一.

2.4 *复发结石* 本例患者术后恢复良好, 但20 mo后出现残余胆管扩张、复发结石并急性胰腺炎, 行十二指肠镜检查并取石, 结石位于原胆总管下端, 胰腺胆管开口远端, 即胰胆管合流共同通道处, 分析该结石成因, 有以下因素: (1)患者首次ERCP检查时已行EST术, 故考虑存在十二指肠食物残渣反流进入胆管, 引发感染, 导致结石复发; (2)患者急性胰腺炎反复发作, 导致胰腺组织呈慢性炎症改变可以起动胰腺结石的形成, 加之胰胆管畸形等多种因素, 导致胰石蛋白(pancreatic stone protein, PSP)分泌减少[13]、活性降低[14]、构型改变[15], 乳铁蛋白[16](lactoferrin, LF)、骨桥蛋白[17](osteopontin)等分泌增加, 引起碳酸钙、蛋白栓及其他有形物质沉积于胰管内, 形成结石, 结石造成胰管梗阻, 从而加重结石, 形恶性循环; (3)患者胰腺炎发作, 导致胰腺肿大并主胰管狭窄[18]或胰管压力增高, 可阻塞胰管, 促进结石形成[19]; (4)患者P-B型PBM, 有胰液汇入共同通道形成湍流, 促进结石形成的可能. 我们选择在患者第二次十二指肠镜检查取石之后放置胰管支架, 这样可以消除近端主胰管的狭窄, 一定程度上改善了胰液的排空, 降低了术后再次发作结石的风险, 但鉴于患者已行EST术, 胰管支架的放置亦有增加十二指肠液通过Oddis括约肌、胰胆管共同通道反流至胰腺、导致急性胰腺炎发生的风险, 故术后1 mo, 待局部水肿消退后取出支架. 其远期效果尚需进一步对患者进行随访和研究, 目前随访3 mo, 无急性胰腺炎发作.

对于该病例, 我们还设计了患者再次发作结石的可能治疗方案: (1)如患者再次出现残余胆管复发结石, 则首选十二指肠镜下取石、ERPD术; (2)如患者反复发作急性胰腺炎, 除外结石因素后, 则有EST术后十二指肠液反流之可能, 故可以在完善消化系造影检查之下行Billorth Ⅱ式胃-空肠吻合术以避免十二指肠液反流; (3)如胰胆管共同通道再次出现扩张, 可选择胰肠吻合术; 如经评估属于癌变高风险状态, 则可选择行保留十二指肠的胰头切除术, 如发生癌变, 则选择胰十二指肠切除术(Whipple手术). 这些方案的设计还请各位专家同仁指正!

此外, 对患者进行合理的健康教育及营养学指导也是对本病的预防有着积极意义的, 如戒烟戒酒、合理膳食、避免高脂饮食、适量运动、定期超声检查及肿瘤标志物监测等.

■创新盘点
胰胆合流异常术后残余胆管复发结石尚未见系统报导, 本文尝试提出相关治疗方案.

3 参考文献

1 Funabiki T, Sugiue K, Matsubara T, Amano H, Ochiai M. Bile acids and biliary carcinoma in pancreaticobiliary maljunction. *Keio J Med* 1991; 40: 118-122 [PMID: 1753553 DOI: 10.2302/kjm.40.118]

2 Kamisawa T, Amemiya K, Tu Y, Egawa N, Sakaki N, Tsuruta K, Okamoto A, Munakata A. Clinical significance of a long common channel. *Pancreatology* 2002; 2: 122-128 [PMID: 12123092 DOI: 10.1159/000055902]

3 Komi N, Takehara H, Kunitomo K, Miyoshi Y, Yagi T. Does the type of anomalous arrangement of pancreaticobiliary ducts influence the surgery and prognosis of choledochal cyst? *J Pediatr Surg* 1992; 27: 728-731 [PMID: 1306647 DOI: 10.1016/s0022-3468(05)80102-2]

4 Edil BH, Cameron JL, Reddy S, Lum Y, Lipsett PA, Nathan H, Pawlik TM, Choti MA, Wolfgang CL, Schulick RD. Choledochal cyst disease in children and adults: a 30-year single-institution experience. *J Am Coll Surg* 2008; 206: 1000-1005; discussion 1000-1005 [PMID: 18471743 DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2007.12.045]

■同行评价
本文病例描述详细，相关资料引用详实，详细描述了此病的治疗过程及治疗方法.

5 Babbitt DP. [Congenital choledochal cysts: new etiological concept based on anomalous relationships of the common bile duct and pancreatic bulb]. *Ann Radiol* (Paris) 1969; 12: 231-240 [PMID: 5401505]

6 Babbitt DP, Starshak RJ, Clemett AR. Choledochal cyst: a concept of etiology. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1973; 119: 57-62 [PMID: 4744730 DOI: 10.2214/ajr.119.1.57]

7 Watanabe Y, Kubota H, Honma T, Hosoya T, Yamaguchi K. [Usefulness of helical DIC-CT in pancreaticobiliary maljunction]. *Nihon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 1997; 57: 249-252 [PMID: 9164113]

8 Noda Y, Fujita N, Kobayashi G, Ito K, Horaguchi J, Takasawa O, Obana T, Ishida K, Senoo S, Yonechi M, Suzuki T, Hirasawa D, Sugawara T, Kobari M, Sawai T, Uzuki M, Watanabe M. Histological study of gallbladder and bile duct epithelia in patients with anomalous arrangement of the pancreaticobiliary ductal system: comparison between those with and without a dilated common bile duct. *J Gastroenterol* 2007; 42: 211-218 [PMID: 17380279 DOI: 10.1007/s00535-006-1991-y]

9 Seki M, Yanagisawa A, Ninomiya E, Ninomiya Y, Ohta H, Saiura A, Yamamoto J, Yamaguchi T, Aruga A, Yamada K, Takano K, Fujita R, Ikeda M, Sasaki K, Kato Y. Clinicopathology of pancreaticobiliary maljunction: relationship between alterations in background biliary epithelium and neoplastic development. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 254-262 [PMID: 15995816 DOI: 10.1007/s00534-004-0966-8]

10 Anderson MC, Hagstrom WJ. A comparison of pancreatic and biliary pressures recorded simultaneously in man. *Can J Surg* 1962; 5: 461-470 [PMID: 14012877]

11 Nagai M, Watanabe M, Iwase T, Yamao K, Isaji S. Clinical and genetic analysis of noncancerous and cancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *World J Surg* 2002; 26: 91-98 [PMID: 11898040 DOI: 10.1007/s00268-001-0187-0]

12 孙昀, 耿小平. 先天性胆管扩张症外科治疗进展. 肝胆外科杂志 2005; 13: 477-480

13 吴孟超, 吴在德. 黄家僩. 外科学. 第七版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1839-1843

14 Schiesser M, Bimmler D, Frick TW, Graf R. Conformational changes of pancreatitis-associated protein (PAP) activated by trypsin lead to insoluble protein aggregates. *Pancreas* 2001; 22: 186-192 [PMID: 11249074 DOI: 10.1097/00006676-200103000-00012]

15 Katsuzaki T, Tatemichi N, Takeichi C, Hayakawa S, Hayakawa T, Shibata T, Harada H, Ochi K. Enzyme immunoassay for specific analysis of pancreatic stone proteins in human pancreatic juice. *J Clin Lab Anal* 1992; 6: 375-378 [PMID: 1432363 DOI: 10.1002/jcla.1860060607]

16 Nakamura M, Oka M, Iizuka N, Kawauchi S, Gondo T, Ueno T, Tangoku A. Osteopontin expression in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 182-187 [PMID: 12142743 DOI: 00006676-200208000-00012]

17 Izzedine H, Caramella C, Ratziu V, Deray G. Chronic calcifying pancreatitis and systemic lupus erythematous. *Pancreas* 2005; 31: 289-290 [PMID: 16163063 DOI: 00006676-200510000-00014]

18 党小红, 赵和平, 黄会芳, 李建红. 慢性胰腺炎中结石形成危险因素的研究. 中国药物与临床 2012; 12: 3-6

19 Khan KJ. Prevalence, diagnosis, and profile of autoimmune pancreatitis presenting with features of acute or chronic pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 639-640; author reply 640-641 [PMID: 20197116 DOI: 10.1016/j.cgh.2010.02.010]

编辑 郭鹏 电编 鲁亚静

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): Ⅰ-Ⅴ
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

《世界华人消化杂志》投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569)》是一份同行评议和开放获取期刊(Open Access Journal, OAJ), 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版. 《世界华人消化杂志》编辑委员会成员, 由483位专家组成, 分布在30个省市、自治区和特别行政区.

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病学, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章. 最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病学实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平.

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group, BPG)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上. OAJ最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊. 论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本. BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑.目前编辑和出版42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平.

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录. 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号. 《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊.

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

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊.

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录.

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H.pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$不能写成tl/2或T , *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、－及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 ℃±1.2 ℃, 45.6岁±24岁, 56.4 d±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56 ng/L±0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用1×10^{12}/L, WBC数用1×10^{9}/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的

相关系数用英文小写r; (5)自由度用希文小写υ; (6)样本数用英文小写n; (7)概率用英文斜体大写P. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用$^aP<0.05$, $^bP<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第三套为$^eP<0.05$, $^fP<0.01$等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名，按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行，每月8、18、28日出版.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写*P*, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. *P*值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, $t = 4.56$ *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用*t*/min, *c*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃表达.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上

角注码号. 如马连生[1]报告……, 潘伯荣等[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部),书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/sp.asp

4.2 研究原著写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/yjyz.asp

4.3 焦点论坛写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/jdlt.asp

4.4 文献综述写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/wxzs.asp

4.5 研究快报写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/yjkb.asp

4.6 临床经验写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/lcjy.asp

4.7 病例报告写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/blbg.asp

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf. 审稿过程平均时间需要14-28天. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审.

6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进.

《世界华人消化杂志》编辑部
北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
http: //www.wjgnet.com

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): I
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

2014年国内国际会议预告

2014-03-12/15
2014年亚太肝病研究协会肝病周(APASL)
会议地点: 澳大利亚
联系方式: http://apasl2014.com/

2014-04-05/09
2014年美国癌症研究协会大会(AACR)
会议地点: 美国
联系方式: http://www.aacr.org/home/scientists/meetings--workshops/meetings--workshops-calendar.aspx

2014-04-09/13
2014年第49届欧洲肝病研究协年会(EASL)
会议地点: 英国
联系方式: http://www.easl.eu/_the-international-liver-congress/general-information

2014-04-18/05-20
2014中国超声医学学术大会
会议地点: 北京市
联系方式: http://www.cuda.org.cn/new/meeting

2014-04-26/27
中华医学会临床药学分会2014年全国学术会议
会议地点: 成都市
联系方式: http://www.cncscp.org/

2014-05-04/06
2014年美国消化疾病周(DDW)
会议地点: 美国
联系方式: http://www.ddw.org/attendees/faqs

2014-05-16/18
2014第七届世界癌症大会
会议地点: 南京市
联系方式: http://www.bitlifesciences.com/cancer2014/cn/meeting.asp

2014-05-23/24
第六届药源性疾病与安全用药中国论坛-消化系统与肝病药物专题研讨会
会议地点: 北京市
联系方式: adrhuiyi@126.com

2014-05-30/06-03
2014年美国临床肿瘤协会年会(ASCO)
会议地点: 美国
联系方式: http://www.asco.org/meetings/calendar-events

2014-06-04/07
2014年第20届国际肝移植协会年会(ILTS)
会议地点: 英国
联系方式: http://www.ilts.org/meetings/

2014-06-09/12
2014年第47届欧洲儿科胃肠病, 肝病和营养学协会大会(ESPGHAN)
会议地点: 以色列
联系方式: http://www.espghan2014.org/

2014-06-18/21
2014年欧洲胃肠与腹部放射学协会肝部成像研讨会(ESGAR)
会议地点: 奥地利
联系方式: http://www.esgar.org/files/File/ESGAR14

2014-06-25/28
2014年世界胃肠癌大会(WGIC)
会议地点: 西班牙
联系方式: http://worldgicancer.com/WCGI

2014-06-25/28
2014年第14届欧洲内窥镜手术协会国际大会(EAES)
会议地点: 法国
联系方式: hdimcs@163.com

2014-06-27/28
2014中华医学会肝病与代谢学术研讨会
会议地点: 上海市
联系方式: lilyjia@163.com

2014-07-26/31
2014年世界移植大会
会议地点: 美国
联系方式: http://www.wtc2014.org/

2014-07-28/30
第3届国际肠胃病学与泌尿学大会
会议地点: 美国
联系方式: http://www.omicsgroup.com/gastroenterology-urology-conference-2014/registration.php

2014-09-05/07
2014年第8届国际肝癌协会大会(ILCA)
会议地点: 日本
联系方式: http://www.ilca2014.org/

2014-09-26/30
2014年欧洲临床肿瘤协会年会(ESMO)
会议地点: 西班牙
联系方式: http://www.esmo.org/

2014-10-18/22
2014年第22届欧洲联合胃肠病学周(UEG)
会议地点: 奥地利
联系方式: http://www.ueg.eu/week/past-future/future-ueg-week/

世界华人消化杂志 2014年2月18日; 22(5): I
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

• 志谢 •

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授
江西省南昌大学第一附属医院消化病研究所

白浪 副教授
四川大学华西医院感染性疾病中心

陈洪 主任医师
东南大学附属中大医院消化科

陈进宏 副主任医师
复旦大学附属华山医院普外科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝胆胰内科

高泽立 副教授
上海交大医学院九院周浦分院

巩鹏 教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

郭晓钟 教授
沈阳军区总医院消化内科

郝丽萍 副教授
华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

何松 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

季国忠 教授
南京医科大学第二附属医院消化科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

刘杰民 副主任医师
贵州省人民医院消化内镜科

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

卢晓梅 教授
新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院

缪应雷 主任医师
昆明医科大学第一附属医院消化内科

宁钧宇 副研究员
北京市疾病预防控制中心卫生毒理所

谭德明 教授
中南大学湘雅医院感染病科

唐文富 副教授
四川大学华西医院中西医结合科

王刚 副研究员
哈尔滨医科大学附属第一医院胰胆外科(普外二科)

王江滨 教授
吉林大学中日联谊医院

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

肖秀英 副主任医师
上海市徐汇区中心医院肿瘤科

杨柏霖 副主任医师
南京中医药大学附属医院

杨江华 副教授
皖南医学院弋矶山医院感染科

俞继卫 副主任医师
上海交通大学医学院附属第三人民医院普外一科(胃肠外科)

喻春钊 教授
南京医科大学第二附属医院普通外科九区

张进祥 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院

张力为 副教授
新疆医科大学第一附属医院胸外科

郑素军 副教授
首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心

周晓武 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普外科

世界华人消化杂志
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

《中文核心期刊要目总览》收录证书

《中文核心期刊要目总览》入编通知

尊敬的主编先生/女士：

我们谨此郑重通知：依据文献计量学的原理和方法，经研究人员对相关文献的检索、统计和分析，以及学科专家评审，贵刊《**世界华人消化杂志**》入编《中文核心期刊要目总览》2011 年版（即第六版）之 **临床医学/特种医学类** 的核心期刊。该书由北京大学出版社出版。书中按《中国图书馆分类法》的学科体系，列出了 73 个学科的核心期刊表，并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括：题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN 号、CN 号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。

评选核心期刊的工作，是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动，研究工作量浩大。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

课题组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究，进一步改进了核心期刊评价方法，使之更趋科学合理，力求使评价结果符合客观实际。对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web 下载量等 9 个评价指标，选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到 60 余种，统计到的文献数量共计 221177 余万篇次，涉及期刊 14400 余种。参加核心期刊评审的学科专家达 8200 多位。经过定量筛选和专家定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出 1982 种核心期刊。

需要特别指出的是，该研究成果只是一种参考工具书，主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考，例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等，不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂

撰安

《中文核心期刊要目总览》2011 年版编委会

代章：

2012 年 1 月

北京大学图书馆

百世登

Baishideng®

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

ISSN 1009-3079

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