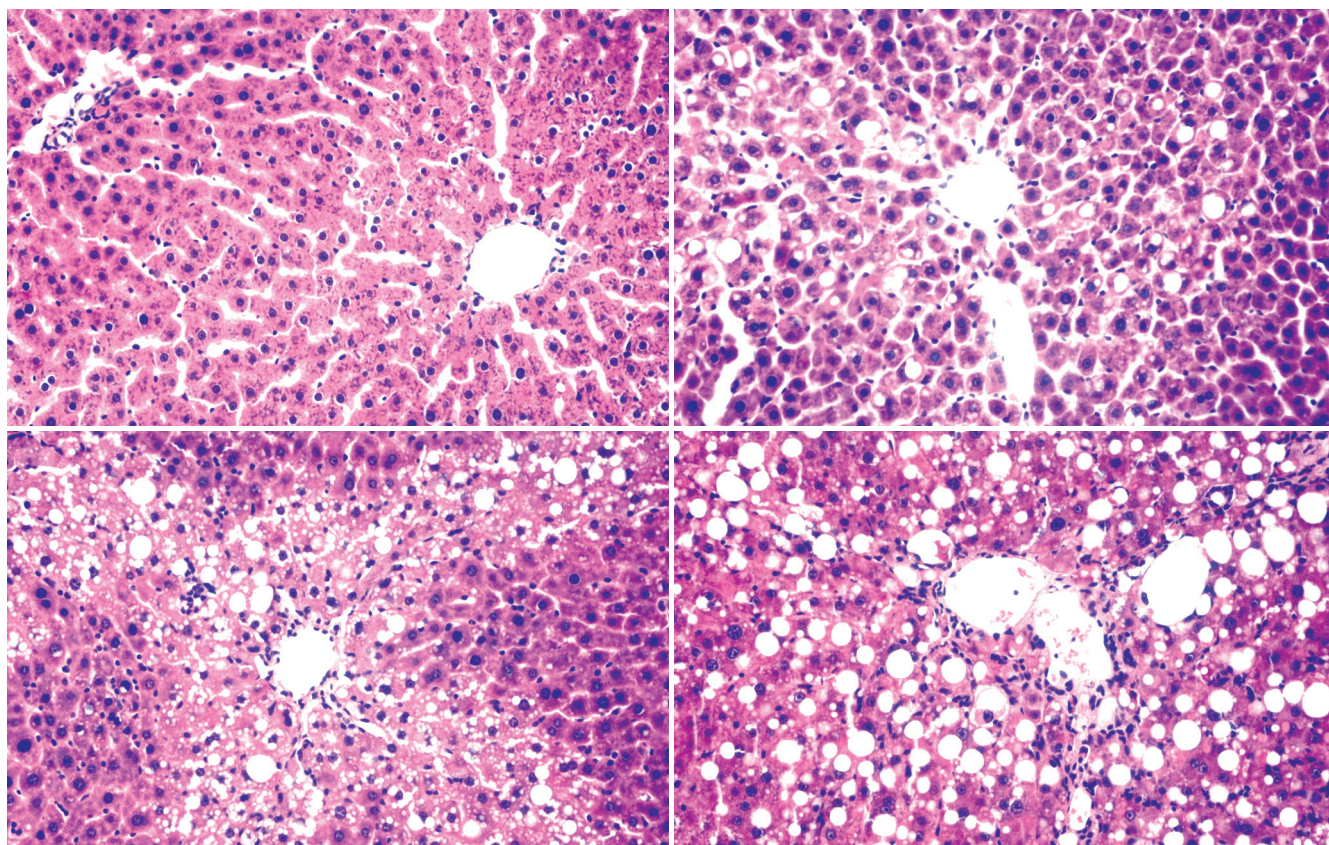


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 12 月 8 日 第 16 卷 第 34 期 (Volume 16 Number 34)



34 / 2008

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升主任医师
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
苒新明教授
陈洪副教授
陈军贤主任医师
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授

陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师

毛高平主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
孙自勤教授
唐采白副教授
唐芙爱教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
夏时海副教授
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授
展玉涛副主任医师
张春清教授

张方信主任医师
张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅廷亮教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授

龚建平教授
巩鹏教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
季加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗副教授
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

裴正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强教授
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王要军教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰瑞教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐智教授

许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郝宝铭教授
郝正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师

秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
唐霓副研究员
唐世刚教授
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
刘海峰主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
倪才方教授
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授

刘鲁明教授
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赧宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学

杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
阎晓初副教授
易永芬教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2008 年 12 月 8 日

第 16 卷

第 34 期

(总第258期)

述 评

3819 努力推进胰腺癌规范治疗

张群华, 陈宗祐

基础 研究

3822 p38MAPK在大鼠实验性肝纤维化发生中的表达及其意义

吴文娟, 杨妙芳, 许小兵, 张晓华, 季洪赞, 袁柏思, 朱人敏

3828 EGCG对肝纤维化大鼠TGF- β 1和CTGF表达的影响

甄茂川, 王效民, 尹震宇, 汪谦, 刘平果, 吴国洋, 俞可克, 李岗山

3835 雷公藤内酯醇对5-LOX代谢通路和胰腺癌细胞凋亡的影响

丁晓凌, 周国雄, 周晓荣, 汪晓莺

临床 研究

3840 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证胃黏膜G、D细胞变化及胃泌素、生长抑素的表达

吴娟, 田德禄

3844 Dukes D期直肠癌的预后分析及治疗策略

王轶慧, 刘彦龙, 赵旭海, 姜世雄, 孙喜文, 王锡山

3849 p53、malat1、ki-67和 β -catenin基因mRNA检测在大肠癌分子诊断中的意义

常建兰, 李祖国, 王晓燕, 杨敏慧

文 献 综 述

3855 食管替代物的研究进展

陈刚, 石文君

3859 HBV的小鼠模型研究进展

刘大斌, 童贻刚

3865 肝癌复发转移与中医药防治

代小平, 管冬元

3870 炎症性肠病基因型动物模型的研究进展

陈迟, 刘菲

3877 代谢组学及其在肿瘤生物学研究中的应用进展

马廷磊, 秦环龙

3884 辣椒素对内脏痛觉过敏的影响及其机制

张琴, 谭婷婷, 彭燕

研究 快报

3890 非酒精性脂肪性肝病患者的血浆Ghrelin水平与颈动脉粥样硬化的相关性

陈宁, 杨明, 黄锦平

3894 N-乙酰半胱氨酸对重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用

邹忠东, 张再重, 宋香全, 王烈, 涂小煌, 陈少全, 王瑜

临 床 经 验

3900 HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达及临床意义


魏房, 孙威, 王强, 刘丽, 任庆华

3904 应用蛋白质组学技术对脂肪肝患者血清标志物的筛选

颜怀军, 陈兆军, 曾强, 陈春, 张腊红, 李宁, 许洋

3910 非酒精性脂肪性肝病患者血清TNF- α 、TGF- β 1及hs-CRP的检测及意义

朱庆曦, 邓长生

	3913 内镜、腹腔镜治疗胰腺假性囊肿38例 李强, 秦鸣放 3919 急性下消化系动脉出血的介入诊疗价值和影响因素 王永利, 程英升, 张家兴, 汝复明, 曹传武, 徐霁充 3925 十二指肠囊肿的内镜诊断及治疗 张锦华, 庄剑波, 缪连生, 袁菊霞, 陈丽 3928 中医挂线治疗直肠狭窄12例 李华山, 马树梅, 王晓锋
致 谢	3932 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	3827 世界华人消化杂作者贡献及同行评议公开政策 3839 世界华人消化杂志投稿方式 3854 世界华人消化杂志被收录情况 3864 世界华人消化杂志正文要求 3869 世界华人消化杂志计量单位标准 3876 世界华人消化杂志作者署名要求 3893 世界华人消化杂志修回稿须知 3899 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标 3918 世界华人消化杂志外文字符标准 3924 世界华人消化杂志数字用法标准 3931 世界华人消化杂志标点符号用法
封面故事	吴文娟, 杨妙芳, 许小兵, 张晓华, 季洪赞, 袁柏思, 朱人敏. p38MAPK在大鼠实验性肝纤维化发生中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3822-3827 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3822.asp
本期责任人	编务 李慧; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 责任编辑 史景红; 英文编辑 张海宁; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生
<div><div><div><div><div></div><div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div><div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</div><div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-12-08 原刊名 新消化病学杂志</div></div></div><div><div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div><div>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div><div>印刷 北京科信印刷厂</div><div>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</div><div>订购 全国各地邮电局</div><div>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div></div><div><div>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</div><div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 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.</div><div><div>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.</div><div>2008年版权归世界华人消化杂志所有</div></div></div></div></div>	
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 邮发代号 82-262 国外代号 M 4481 国内定价 每期24.00元 全年864.00元 广告经营许可证 1401004000050	

World Chinese Journal of Digestology

December 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 34

EDITORIAL	3819 Emphasis on the standardization of therapy for pancreatic cancer <i>Zhang QH, Chen ZY</i>
BASIC RESEARCH	3822 Expression and its location of p38MAPK in CCl ₄ -induced hepatic fibrosis in rats <i>Wu WJ, Yang MF, Xu XB, Zhang XH, Ji HZ, Yuan BS, Zhu RM</i> 3828 Effect of EGCG on expression of TGF- β 1 and CTGF in rats with liver fibrosis <i>Zhen MC, Wang XM, Yin ZY, Wang Q, Liu PG, Wu GY, Yu KK, Li GS</i> 3835 Triptolide suppresses 5-lipoxygenase metabolic pathway and induces apoptosis in pancreatic tumor cell lines <i>Ding XL, Zhou GX, Zhou XR, Wang XY</i>
CLINICAL RESEARCH	3840 Changes of G and D cells and expression of gastrin and somatostatin in gastric mucosa of chronic superficial gastritis with spleen-stomach dampness-heat syndrome <i>Wu J, Tian DL</i> 3844 Prognosis analysis and treatment strategy for patients with Dukes D stage rectal cancer <i>Wang YH, Liu YL, Zhao XH, Jiang SX, Sun XW, Wang XS</i> 3849 Detection of <i>p53</i> , <i>malat1</i> , <i>ki-67</i> and β - <i>catenin</i> mRNA expression and its significance in molecular diagnosis of colorectal carcinoma <i>Chang JL, Li ZG, Wang XY, Yang MH</i>
REVIEW	3855 Advance in esophagus substitute <i>Chen G, Shi WJ</i> 3859 Advance in the mouse model of hepatitis B virus infection <i>Liu DB, Tong YG</i> 3865 Prevention and treatment of hepatoma metastasis and recurrence with Chinese medicine <i>Dai XP, Guan DY</i> 3870 Research progress in genetic animal models of inflammatory bowel disease <i>Chen C, Liu F</i> 3877 Metabonomics and its application in oncobiology research <i>Ma YL, Qin HL</i> 3884 Influence of capsaicin on visceral hyperalgesia and its mechanism <i>Zhang Q, Tan TT, Peng Y</i>
RAPID COMMUNICATION	3890 Correlation analysis of ghrelin level and carotid atherosclerosis in non-alcoholic fatty liver disease <i>Chen N, Yang M, Huang JP</i> 3894 Protective effects of N-acetylcysteine against liver injury in rats with severe acute pancreatitis <i>Zou ZD, Zhang ZZ, Song XQ, Wang L, Tu XH, Chen SQ, Wang Y</i>
CLINICAL PRACTICE	3900 Expression of HIF-1 α , iNOS and COX-2 and its significance in gastric cancer <i>Wei F, Sun W, Wang Q, Liu L, Ren QH</i> 3904 Screening serum biomarkers of fatty liver disease using proteomic technology <i>Yan HJ, Chen ZJ, Zeng Q, Chen C, Zhang LH, Li N, Xu Y</i>

	<p>3910 Detection of TNF-α, TGF-β1 and hs-CRP and its clinical significance in non-alcoholic fatty liver disease <i>Zhu QX, Deng CS</i></p> <p>3913 Endoscopy and laparoscopy co-therapies for pancreatic pseudocyst: an analysis of 38 cases <i>Li Q, Qin MF</i></p> <p>3919 Angiography and transcatheter embolizaion for acute lower gastrointestinal hemorrhage: clinical value and influencing factors of diagnosis and treatment <i>Wang YL, Cheng YS, Zhang JX, Ru FM, Cao CW, Xu JC</i></p> <p>3925 Endoscopic diagnosis and therapy for cystic tumors in duodenum <i>Zhang JH, Zhuang JB, Miao LS, Yuan JX, Chen L</i></p> <p>3928 Treatment of rectal stenosis with TCM thread-drawing method: analysis of 12 cases <i>Li HS, Ma SM, Wang XF</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	3932 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Wu WJ, Yang MF, Xu XB, Zhang XH, Ji HZ, Yuan BS, Zhu RM.</i> Expression and its location of p38MAPK in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(34): 3822-3827 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3822.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Hui Li</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> Editor-in-Charge: <i>Jing-Hong Shi</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date December 8, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2008 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2008 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

努力推进胰腺癌规范治疗

张群华, 陈宗祐

张群华, 陈宗祐, 复旦大学附属华山医院普外科 上海市 200040

张群华, 教授, 擅长肝(肝移植), 胰、胆道疾病, 胃肠道肿瘤, 甲状腺及乳腺疾病等普外科疾病的诊治。

通讯作者: 张群华, 200040, 上海市, 复旦大学附属华山医院普外科, qunhuazh@sh163.net

电话: 021-62489999-1710

收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2008-11-20

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2008-12-08

Emphasis on the standardization of therapy for pancreatic cancer

Qun-Hua Zhang, Zong-You Chen

Qun-Hua Zhang, Zong-You Chen, Department of General Surgery, Huashan Hospital Affiliated to Fuda University, Shanghai 200040, China

Correspondence to: Qun-Hua Zhang, Department of General Surgery, Huashan Hospital Affiliated to Fuda University, Shanghai 200040, China. qunhuazh@sh163.net

Received: 2007-05-14 Revised: 2008-11-20

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2008-12-08

Abstract

Early pancreatic cancer is rarely discovered, and most patients are diagnosed at the middle or advanced stage. A number of clinical doctors treat operation indications differently, so many patients with resectable pancreatic cancer do not obtain a curable therapy due to this unstandardized process. This review aims to provide references for clinicians and press forward the unstandardized therapy of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Diagnosis; Standardized therapy; Operation indication

Zhang QH, Chen ZY. Emphasis on the standardization of therapy for pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3819-3821

摘要

早期胰腺癌极少被发现, 大多数临床胰腺癌患者已属中晚期。部分临床医生对患者的手术指征宽严度的把握不一, 相当多可切除胰腺癌患者未获得合理的治愈性治疗。本文旨在推进胰

腺癌的规范治疗, 为临床医生治疗该疾病提供参考。

关键词: 胰腺癌; 诊断; 规范治疗; 手术指征

张群华, 陈宗祐. 努力推进胰腺癌规范治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3819-3821

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3819.asp>

0 引言

临床研究发现, 早期胰腺癌屈指可数, 大量的临床患者是中晚期胰腺癌患者。部分临床医生对这些患者的手术指征宽严度的把握出现了偏差。在中小城市胰腺癌手术切除率低于5%, 而大城市胰腺癌手术切除率可高达36%。由此推测相当多可切除胰腺癌的患者未获得合理的治愈性治疗。那么胰腺癌根治术作为高难度手术是否应该向中小城市普及。众多专家持质疑态度。问题的焦点是胰十二指肠切除术不仅手术难度大, 更重要的是术后围手术期的处理和并发症的处理十分棘手^[1-4]。临床资料表明胰腺外科专业组施行胰十二指肠切除术的死亡率和并发症明显低于非专业组^[5]。因此, 中小城市外科医生应及时将胰腺癌患者转诊到大城市胰腺癌诊治中心治疗应该形成共识。

1 胰腺癌治疗

在胰腺癌规范治疗中, 引起外科医生重视和困惑的是淋巴结清扫的有效性和神经丛清除的精确性^[6]。我们曾报道了2340例胰腺癌临床流行病学调查, 发现胰腺癌根治术后5年生存率仅为8%^[7]。淋巴结转移情况是影响预后的主要原因之一。因此, 提高临床外科医生廓清淋巴结转移癌灶技术对提高胰腺癌患者的预后是至关重要的。

我们时常碰到手术中按血管骨骼化清扫淋巴结, 但病理报告只有几个淋巴结受到浸润。华山医院曾用显微镜法找淋巴结, 70例胰腺癌标本中每例平均可找到30多枚淋巴结, 最多可高达60多枚淋巴结。我们主张胰头癌根治术中应清扫肠系膜上静脉周围或腹主动脉旁淋巴结。这一区域是胰腺癌转移的好发部位。其根据是

■背景资料

早期胰腺癌屈指可数, 大量的临床患者是中晚期胰腺癌患者。部分临床医生对这些患者的手术指征宽严度的把握出现了偏差。相当多可切除胰腺癌的患者未获得合理的治愈性治疗。临床资料表明胰腺外科专业组施行胰十二指肠切除术的死亡率和并发症明显低于非专业组。因此, 中小城市外科医生应及时将胰腺癌患者转诊到大城市胰腺癌诊治中心治疗应该形成共识。

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

■研发前沿

胰腺癌的早期诊断, 早期治疗仍是关注的焦点, 有待于去认真思考和拓展。

华山医院胰腺癌诊疗中心对近70例胰腺癌术后标本进行显微镜法分离寻找定位检查, 发现肠系膜上动脉旁和腹主动脉旁淋巴结转移率高达50%^[8]。甚有学者提出应该重视胰腺癌前哨淋巴结的清扫问题, 认为胰腺癌扩大根治术过度淋巴结清扫会影响患者阻遏癌转移的免疫自然屏障, 因此适度掌握胰腺癌淋巴结清扫范围已成为胰腺外科专家争议的热点。

有研究报道直径小于2 cm的胰腺癌术后5年生存率为19%-41%。而直径小于1 cm的微小胰腺癌术后5年生存率可达67%。早期胰腺癌特指肿瘤直径小于2 cm, 且仅局限于胰腺实质内, 无胰腺外浸润及淋巴结转移。肿瘤可切除标准很大程度依赖医生的临床技能。门静脉系统累及和淋巴结转移不再是手术切除的禁忌, 但肿瘤侵犯门静脉并有癌栓形成, 浸润肝动脉和肠系膜上动脉是否是手术切除禁忌还需论证。薄层增强螺旋CT对反映胰腺癌浸润周围血管的精确性更高。现已公认螺旋CT的双相扫描对判断可切除正确率达90%。因此对于胰腺癌患者的影像学检查应首选薄层螺旋CT的胰腺检查。国外临床医生热衷于磁共振扫描成像(MRI)、数字减影血管造影(DSA)、正电子发射扫描(PET)。我们对临床判断胰腺癌可切除的参数主要是CT、MRI。较少采用腹腔镜探查。

对早期胰腺癌应该采用经典的胰十二指肠切除术(whipple), 对2、3期的胰腺癌进行扩大范围的切除, 包括易被累及的淋巴结和神经组织的清扫。由于对多数局部进展期肿瘤已侵犯门静脉, 肠系膜上静脉或肠系膜上动脉患者施行了扩大的胰腺癌根治术, 手术切除率达47%, 5年生存率23%, 较传统胰十二指肠切除术有所提高。区域性全胰切除术和胰腺癌联合脏器切除术, 手术风险高, 能否有效提高生存期有待于观察, 需严格掌握手术指征。单纯手术切除者疗效差, 局部复发率高达86%, 腹膜后种植率40%, 肝转移率达60%-90%, 切缘阳性者术后生存期不到1年。由此而提出胰腺癌综合治疗的观念, 包括术前的放化疗、胰腺癌术中放疗和术后放化疗。由于肿瘤的异质性和个体差异, 目前如何确定先放化疗还是后放化疗对患者个体而论, 需要进行仔细分析肿瘤的临床分期、体质、与邻近血管浸润程度。尤其要注意介入治疗对于肿瘤大于5 cm、经CT证实肿瘤与固围血管界限不清或有侵犯者是适用的。因为介入化疗后可以在血管和胰腺癌中间产生炎性水帘有利于手术分离。对于小胰癌, 通常采用扩大的胰十二指肠切除术, 术后常规静脉化疗或区域性介入化疗, 巩固疗效。局部进展期胰腺癌包括临床II期(T3N0M0)

和III期肿瘤(T1-3N1M0)。局部进展期肿瘤由于肿瘤大小不一, 对周围脏器血管侵犯程度不同, 淋巴结转移情况也不同, 因此术式选择不同。即使II期胰头癌侵犯门静脉, 肠系膜上静脉少于3/4 wk, 长度少于2 cm, 无血管内癌栓, 无周围静脉海绵样改变者, 无侧支循环及门脉高压者。胰体尾癌仅单纯侵犯脾脏或横结肠或脾加横结肠, 或侵犯脾动脉根部以远脾静脉远心端部分胃壁, 而无腹腔动脉根部侵犯者均应作胰腺癌根治术。II期患者中的T1N1M0和T2N1M0的胰头部或体尾部肿瘤, 均需作根治术。对于肿瘤>5 cm, 无明显血管侵犯者仍应取积极态度予以手术切除, 包括术前区域性介入化疗产生炎性间隙有利于手术解剖分离, 抑制肿瘤生长。胰腺癌已侵犯肠系膜上动脉者应放弃扩大根治术。代表欧美国家胰腺癌诊治水平的德国Piger教授和美国Whish教授几度来中国交流。在他们的论文报告中, 对于手术范围还是对经典的whipple手术情有独钟。而日本学者则主张扩大根治术。即使胰腺癌侵及的静脉也进行胰腺癌区域性根治术。钟守先、赵玉沛教授根据胰头癌的生物学特性, 建议胰头癌治疗规范化而特称为胰头癌根治术, 已引起共鸣。尤其是提出胰头周围的淋巴结与软组织一并切除并重点强调廓清肝门处及后腹膜血管周围神经丛的淋巴结是解决术后肿瘤残留的关键。这一观点日益得到我国胰腺癌外科专家的认可和重视。众多专家认为门静脉被侵及部分只要不长于2 cm均可切除后行静脉端端吻合, 因此胰头癌切除率有大幅度提高, 尤其是对有血管外科技术或能做肝移植的外科医生, 门静脉的处理更是得心应手。所以近期大量的胰腺癌手术病例报告表明其难度或复杂性均可顺利解决。

胰腺癌外科治疗已从一般的胰十二指肠切除术进入以清除淋巴结为目的的根治术。扩大腹膜后淋巴结清扫不会增加围手术期手术死亡率, 但患者长期存活时间没有明显延长。根据目前意大利、日本和美国临床资料不足够支持进行扩大腹膜后淋巴结扫除的胰十二指肠切除。腹腔镜胰十二指肠切除术在技术上已经成熟, 但是能否达到淋巴结清扫干净有待于腹腔镜医生的经验积累、操作技术的熟练及对胰腺癌生物学特性的进一步认识。保留幽门胰十一十二指肠切除术, 其十二指肠切缘肠壁内神经束膜和固有肌层神经节内有癌肿播散及幽门黏膜下淋巴结转移, 所以彭淑楠教授认为幽门胰十二指肠切除术(pylorus-preserving-pancreaticoduodenectomy, PPPD)不能作为胰头癌的常规。此时我们就更应重视根治术时淋巴结清扫的范围和彻底性。应该承认血管骨骼

化标志着淋巴结清扫的干净程度。然而, 胰腺癌的淋巴转移途径十分复杂, 影响转移的因素很多。肿瘤的部位, 大小, 深度, 向四周浸润的范围, 均可影响淋巴结的转移。因此肿瘤的淋巴流注及淋巴结转移具有不确定性。因此人们还在探究采取某种淋巴流注跟踪检查的方法帮助临床医生从直觉上客观判断淋巴结转移状况。华山医院外科采用活性炭跟踪剂进行胰腺癌淋巴结转移方面的研究提示淋巴结癌转移与胰腺癌肿瘤大小不成正比。即使胰腺癌病灶小于2 cm仍可能胰周淋巴结有转移, 甚至有跳跃式转移。所以我们提出采用纳米技术使活性炭与肿瘤药物偶连, 使其与淋巴结有高度的趋附性, 通过淋巴流注途径使杀伤淋巴结转移癌灶更为有效。这些有益的探索既可标明胰腺癌转移的途径又能起到淋巴结癌灶的杀灭, 有十分重要的临床研究价值。

诚然胰体尾癌手术切除率有大幅度上升, 从理论上讲胰体尾切除对缓解患者疼痛是十分有效, 从技术层面上讲胰体尾切除较Whipple术容易些。然而胰体尾癌根治术后患者的术后比胰头癌更差。5年生存率不超过5%。多数学者认为其预后差的主要原因是胰体尾更易侵及神经丛, 而目前手术范围更少清扫神经丛。其实不然, 胰体尾癌的淋巴清扫是否彻底才是影响预后的重要原因。已知胰体尾的淋巴汇集方式按胰长轴分体尾上下两部分。胰体尾上半部的淋巴从局部淋巴结经脾动脉淋巴结到腹腔动脉周围淋巴结, 再进入腹主动脉周围淋巴结, 或经肝总动脉干淋巴结再达腹腔动脉周围淋巴结; 胰体尾下半部的淋巴或经胰下淋巴结达肠系膜根部淋巴结或直达肠系膜根部淋巴结。另外, 胰体尾淋巴可逆行到胃左动脉干淋巴结, 肝门部淋巴结及胰头前后淋巴结。胰尾部癌第一站的淋巴结(第8, 9, 10, 11, 14及18组, 共6组)必须切除。脾门, 脾动脉和胰下缘的3组淋巴结(第9组), 肝总动脉干周围(第8组)和肠系膜根部的淋巴结(第14组)要仔细逐个清除。胰体部癌接近重要血管区, 因此血管很易受到侵犯, 特别是腹腔动脉与肝总和脾动脉的分叉部位, 当侵及后, 癌细胞继而向腹腔动脉干蔓延, 将其包裹并向深浸润到腹主动脉前鞘, 造成切除困难。胰体癌向后浸润可直接达腹主动脉右侧壁, 也可侵及肠系膜上动脉。肿瘤向下浸润可涉及屈氏韧带部位, 晚期时造成十二指肠梗阻。因此, 当胰体癌已侵及腹腔动脉干, 腹主动脉或屈氏韧带等时往往已不宜手术, 即使切除亦是姑息性治疗。当肿瘤尚属二期或探查无明确的血管侵及时, 则可行根治性切除。

新近临床病理研究表明胰腺癌对胰周神经丛浸润与淋巴结转移的机率相同, 手术中仅仅重视淋巴清扫而忽略胰周神经丛的处理也不是胰腺癌的规范治疗。既然手术对胰腺癌淋巴结清扫和胰周神经的处理难以奏效。术后介入化疗是否可以杀伤淋巴结转移癌灶和抑制神经丛癌浸润的程度值得探讨。目前有些医院采用了术后化疗或介入治疗, 患者无瘤生存期有了适当延长, 我们还需大宗病例的临床流行病学调查来论证这个治疗方案。

我们在临床上更多的是面对不能切除的胰腺癌并伴有转移的患者。通过各种治疗方法力求获得解除消化系梗阻, 恢复自主饮食。用化学疗法, 放疗、热疗等稳定或减缓肿瘤发展速度, 减轻患者疼痛和营养支持以期提高患者生活质量和延长生命。生物治疗已成为胰腺癌综合治疗中重要的组成部分, 特别是靶向治疗、基因治疗、抗血管生成治疗、免疫治疗等多种手段相互融合, 逐渐展现出了诱人前景。目前, C225+健择作为进展期与转移性胰腺癌化疗的一线方案已在III期临床实验中取得了较好的初步结果。

2 结论

胰腺癌的规范化治疗随着医生的医技快速提高, 手术切除率的上升, 各地胰腺癌病例的积累, 不难发现胰腺癌的早期诊断, 早期治疗仍是我们关注的焦点, 有待于去认真思考和拓展。

3 参考文献

- 1 Peng S, Mou Y, Cai X, Peng C. Binding pancreaticojejunostomy is a new technique to minimize leakage. *Am J Surg* 2002; 183: 283-285
- 2 Tezel E, Kaneko T, Sugimoto H, Takeda S, Inoue S, Nagasaka T, Nakao A. Clinical significance of intraportal endovascular ultrasonography for the diagnosis of extrapancreatic nerve plexus invasion by pancreatic carcinoma. *Pancreatol* 2004; 4: 76-81
- 3 Nakao A, Takeda S, Sakai M, Kaneko T, Inoue S, Sugimoto H, Kanazumi N. Extended radical resection versus standard resection for pancreatic cancer: the rationale for extended radical resection. *Pancreas* 2004; 28: 289-292
- 4 Aramaki M, Matsumoto T, Etoh T, Ishio T, Himeno Y, Sasaki A, Yada K, Kawano K, Kitano S. Clinical significance of combined pancreas and portal vein resection in surgery for pancreatic adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 263-266
- 5 张群华, 倪泉兴, 张延龄. 应加大胰腺癌诊治研究的力度. *中华医学杂志* 2002; 82: 361-362
- 6 张群华, 倪全兴, 曹国海, 付德良, 姚琪远, 金忱, 虞先俊, 张姐, 张延龄. 老年胰腺癌患者外科治疗的临床分析. *中华医学杂志* 2001; 81: 1054-1056
- 7 张群华, 倪全兴. 胰腺癌2340例临床病例分析. *中华医学杂志* 2004; 84: 214-218
- 8 张怡杰, 唐岩, 胡先贵, 胡志浩, 刘瑞, 金钢, 邵成浩. 区域淋巴结廓清在胰头癌根治术中的应用. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 463-465

■同行评价

该文章具有很强的临床指导意义, 具有较高的科学性及创新性, 同时对胰腺癌治疗的有关进展进行了较为系统、实际的评价。

p38MAPK在大鼠实验性肝纤维化发生中的表达及其意义

吴文娟, 杨妙芳, 许小兵, 张晓华, 季洪赞, 袁柏思, 朱人敏

■背景资料

肝纤维化(HF)已成为一个危害人类生命健康的世界性问题,如果能阻止其发生,肝硬化及其并发症就能得到有效控制。随着分子生物学的发展,许多研究进一步阐明了HF发病的分子机制,对HF的信号转导通路的研究结果显示有多条通路参与了HF的发生发展。p38MAPK是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族中重要的一员,他在HF发生、发展的过程中起着重要的作用。

吴文娟, 杨妙芳, 许小兵, 张晓华, 季洪赞, 袁柏思, 朱人敏, 南京大学医学院临床学院 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科 江苏省南京市 210002
吴文娟, 南京大学在读硕士研究生, 从事消化内科专业。

南京军区南京总医院科研基金重点资助项目, No. 2005029
作者贡献分布: 吴文娟与朱人敏对此文所作贡献均等; 此课题由朱人敏与杨妙芳设计; 研究过程由吴文娟, 许小兵及袁柏思操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张晓华提供; 数据分析由吴文娟, 杨妙芳及季洪赞完成; 本论文写作由吴文娟与朱人敏完成。
通讯作者: 朱人敏, 博士生导师, 210002, 南京市中山东路305号, 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科。jsrmz@163.com
电话: 025-80860027

收稿日期: 2008-09-29 修回日期: 2008-10-28

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-08

Expression and its location of p38MAPK in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats

Wen-Juan Wu, Miao-Fang Yang, Xiao-Bing Xu, Xiao-Hua Zhang, Hong-Zan Ji, Bo-Si Yuan, Ren-Min Zhu

Wen-Juan Wu, Miao-Fang Yang, Xiao-Bing Xu, Xiao-Hua Zhang, Hong-Zan Ji, Bo-Si Yuan, Ren-Min Zhu, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Chinese PLA; School of Medicine of Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Nanjing General Hospital of Chinese PLA, No. 2005029

Correspondence to: Dr. Ren-Min Zhu, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Chinese PLA, School of Medicine of Nanjing University, 305 East Zhongshan Road, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. jsrmz@163.com

Received: 2008-09-29 Revised: 2008-10-28

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To investigate the expression and its location of p38MAPK in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats and hence to reveal the relationship between hepatic fibrosis and the p38 MAPK signal transduction.

METHODS: A rat model of hepatic fibrosis was established by subcutaneous injection of carbonte trachloride (CCl₄). Thirty-six male SD rats (weight 180-220 g) were randomly divided into two groups: normal control group ($n = 12$) and model group ($n = 24$). They were randomly scarified at 3, 6 and 9 weeks after injection of CCl₄ respectively. Their liver tissues were ana-

lyzed for histopathological changes. Gene expression of p38MAPK was measured by reverse transcription-PCR and immunohistochemistry was used to detect the protein expression and localization.

RESULTS: The level of fibrosis was markedly aggravated at different time spots in the process of CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. With the aggravation of hepatic fibrosis, the expression of p38MAPK mRNA and p38MAPK protein increased gradually, mainly in the mesenchymal cells.

CONCLUSION: Up-regulated p38MAPK is involved in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats, and p38MAPK signal transduction may promote CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats.

Key Words: p38MAPK; Hepatic fibrosis; Hepatic stellate cell

Wu WJ, Yang MF, Xu XB, Zhang XH, Ji HZ, Yuan BS, Zhu RM. Expression and its location of p38MAPK in CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3822-3827

摘要

目的: 观察p38MAPK在实验性大鼠肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)发生过程中表达量的变化及其定位, 从而揭示p38MAPK信号传导通路与HF形成之间的关系。

方法: 采用CCl₄ sc诱导大鼠HF模型, 36只♂SD大鼠(体质量在180-220 g)随机分为正常对照组(12只)和CCl₄造模组(24只), 造模3、6、9 wk结束时分别随机处死各组大鼠。取其肝脏观察HF形成过程中不同时间段各组大鼠肝组织病理变化, 用RT-PCR技术检测p38MAPK mRNA在造模过程中肝组织中的表达变化, 免疫组化方法检测p38MAPK在造模过程中肝组织中蛋白表达量的变化, 及其在肝组织中的表达分布情况。

结果: 与正常对照组比较, CCl₄诱导的实验性大鼠HF不同时间段纤维化程度明显加重, 随

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科; 刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

着HF的形成, p38MAPK在mRNA水平和蛋白水平都表现出增加的趋势, 并且主要表达于肝脏的间质细胞, 肝细胞未见染色。

结论: p38MAPK在HF的形成中持续上调, 参与HF形成的病理过程, p38MAPK信号传导通路活化可能促进CCl₄诱导的HF的形成。

关键词: p38MAPK; 肝纤维化; 肝星状细胞

吴文娟, 杨妙芳, 许小兵, 张晓华, 季洪赞, 袁柏思, 朱人敏. p38MAPK在大鼠实验性肝纤维化发生中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3822-3827
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3822.asp>

0 引言

p38MAPK信号传导通路是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)家族的重要组成成员, 在炎症反应、细胞应激反应、细胞迁移、细胞凋亡以及细胞表型转分化等方面起着重要作用^[1]. 最近的研究发现, p38MAPK特异性抑制剂SB203580干扰博莱霉素诱导的肺纤维化动物模型后纤维化程度明显减轻^[2]. Chin *et al*^[3]报道, 转化生长因子β1(TGF-β1)通过活化p38MAPK诱导肾小球系膜细胞的前胶原 I 的合成, 提示p38MAPK在TGF-β1诱导的细胞外基质(ECM)合成中起重要作用. 到目前为止, p38与肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)发生的关系研究较少, 本实验拟通过CCl₄诱导HF的发生, 观察p38MAPK在HF发生中的表达情况, 从而进一步探讨p38MAPK信号传导通路活化与HF发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级♂SD大鼠, 体质量180-220 g, 购自中国人民解放军南京军区南京总医院实验动物中心. CCl₄(天津市永记商贸有限公司), 兔抗大鼠mAb α-SMA, 大鼠抗小鼠mAb p-p38购自Cell Signal公司. 二抗购自Dako公司. TRIzol RNA提取试剂盒是Gibco公司的产品. RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司. 根据GenBank序列设计引物, 由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 大鼠HF模型的建立: 给大鼠sc 400 mL/L CCl₄/橄榄油溶液, 每次剂量为6 mL/kg, 首剂量加倍, 2次/wk, 持续9 wk, 造模期间大鼠自由饮水、摄食。

1.2.2 实验动物分组及处理: 将36只清洁级♂SD大鼠随机分为正常对照组(12只)和CCl₄造模组

(24只), 正常对照组sc生理盐水, CCl₄造模组建立HF模型. 整个实验过程共9 wk. 造模3、6、9 wk结束时分别处死(末次sc CCl₄ 72 h). 正常对照组大鼠4只和造模组大鼠8只, 取5 mm×5 mm×5 mm肝右叶放入冻存管, -70℃冰箱冻存. 取其肝左叶经40 g/L的甲醛固定, 石蜡包埋, 2-3 μm厚度连续切片, 做HE和Masson染色确定其病理变化, 并进一步做免疫组化观察α-SMA, 磷酸化p38MAPK(p-p38MAPK)在肝脏组织中的表达变化。

1.2.3 病理组织观察: 取各组大鼠新鲜肝左叶, 用40 g/L甲醛溶液固定, 制作病理石蜡切片, 分别作HE和Masson染色, 显微镜下观察肝组织结构、肝细胞炎症反应及纤维组织增生情况. Masson染色光镜下胶原呈绿色, 采用Image Pro Plus(IPP)Version 5.0图像分析软件, 每张切片随机取5个视野, 图像放大200倍, 测量阳性染色面积, 取平均值, 计算其占视野面积的百分数。

1.2.4 免疫组化: 采用免疫组化EnVision法检测α-SMA、p-p38MAPK蛋白表达. 高温、高压抗原修复, 修复液为1 mmol/L EDTA(pH8.0), 常规DAB显色, 苏木素复染及中性树脂封固. 显色结果采用IPP5.0图像分析软件, 每张切片随机取5个视野, 图像放大200倍, 测量阳性染色面积, 取平均值, 计算其占视野面积的百分数。

1.2.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR): (1)引物合成: 具体序列如下: p38: Forward Primer 5'-tccaaggctacacaaatc-3', Reverse Primer 5'-tgttccaggtagggtgagc-3', 引物长度: 341 bp, β-actin大鼠β-actin: Forward Primer 5'-gagagggaatcgtgcgtgac-3', Reverse Primer 5'-catctgctggaaggtggaca-3'. (2)提取总RNA及RT-PCR过程: 各取约50-100 mg组织, 采用TRIzol试剂盒提取总RNA, 在使用分光光度计在260/280 nm处检测总RNA的质量和纯度之后, 使用cDNA合成试剂盒将mRNA反转录为cDNA. cDNA采用相应特异性引物进行PCR扩增. 25 μL的反应体积包括1 μL上、下游特异性引物(各0.5 μL)、0.124 μL的Taq聚合酶、5 μL cDNA、13.876 μL灭菌蒸馏水和5 μL 5×PCR Buffer. PCR反应过程: 在起始2 min 94℃热启动之后, 反应进入35个循环, 其中94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延长2 min. (3)取PCR反应产物10 μL, 在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳30 min, 图像分析仪采集图像, 以内参β-actin为基准, 作半定量分析。

统计学处理 实验数据以mean±SD表示,

■ 研发前沿

p38MAPK信号传导通路是参与HF的重要信号传导通路, 肝组织p38MAPK表达的上调是导致细胞外基质过度合成、沉积的重要原因. 通过干预p38MAPK分子表达有望成为抗HF的有效途径。

■创新盘点

本文用免疫组化和RT-PCR的方法直接检测HF进展过程中肝组织中p38MAPK表达量的变化,分析其与HF发生的可能关系。

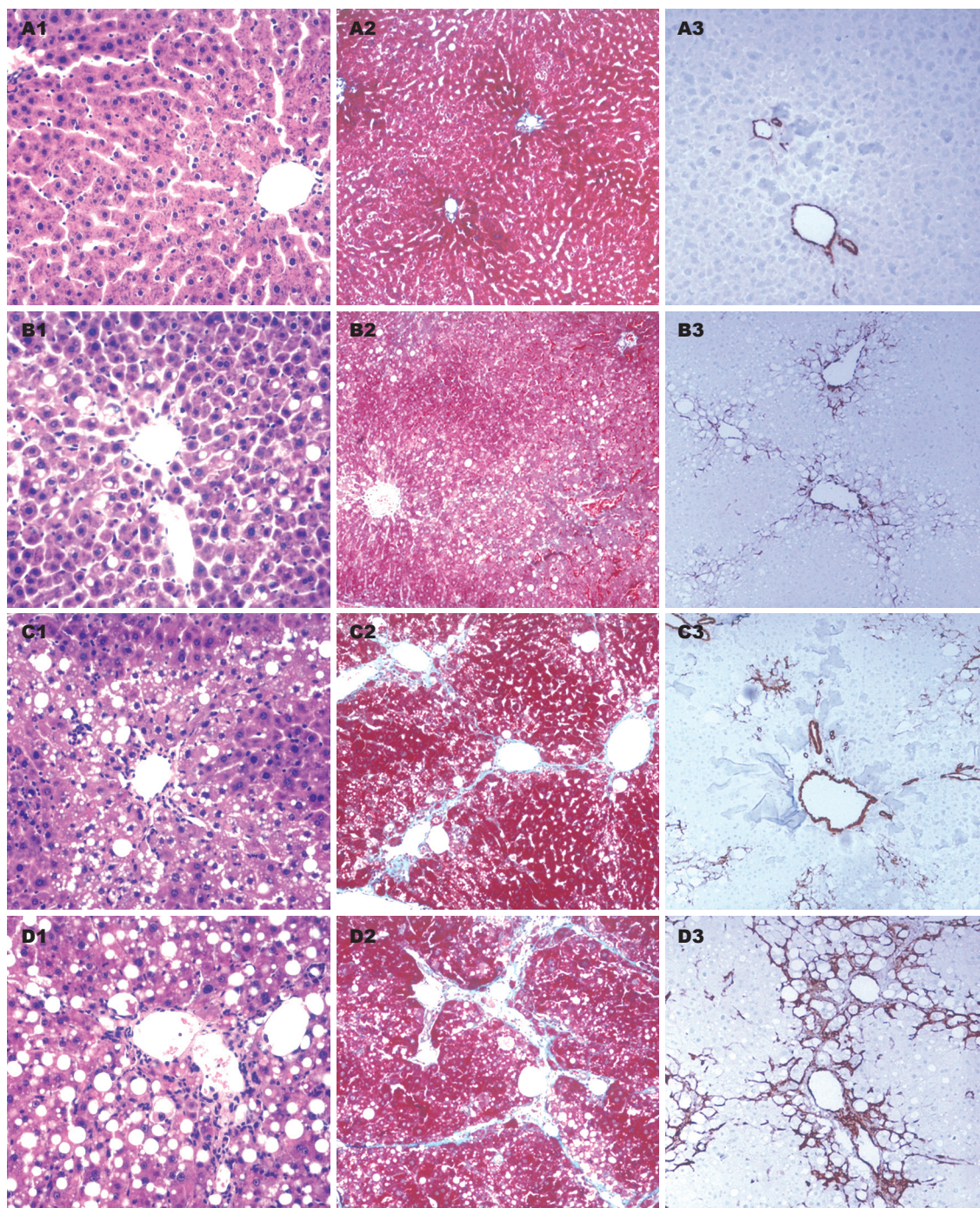


图1 实验进程中肝组织的病理学变化及 α -SMA的表达变化. A: 正常对照组; B: 模型组3 wk; C: 模型组6 wk; D: 模型组9 wk. 1: HE染色; 2: Masson染色; 3: α -SMA免疫组化.

应用SPSS11.0统计软件对数据进行方差分析, $P < 0.05$ 具有显著性意义.

2 结果

2.1 肝组织的病理学变化

2.1.1 肝脏HE染色病理学显示: 正常对照组在各个时间点肝小叶结构完整, 肝细胞排列整齐, 无炎细胞浸润, 无纤维间隔形成. 3 wk时模型组肝小叶结构不甚完整, 多数肝细胞气球样变性, 汇

管区部分炎性细胞浸润. 6 wk时模型组肝细胞气球样变明显, 见有灶性坏死, 肝小叶及汇管区内大量淋巴, 单核细胞浸润, 纤维间隔开始形成. 9 wk时模型组肝小叶结构破坏, 多数肝细胞气球样变, 肝细胞灶性坏死, 大量淋巴细胞, 单核细胞浸润, 纤维组织间隔形成明显(图1).

2.1.2 肝脏Masson染色结果显示: Masson染色光镜下可见绿色为胶原纤维, 正常对照组少量绿色的胶原纤维分布于汇管区和中央静脉管壁,

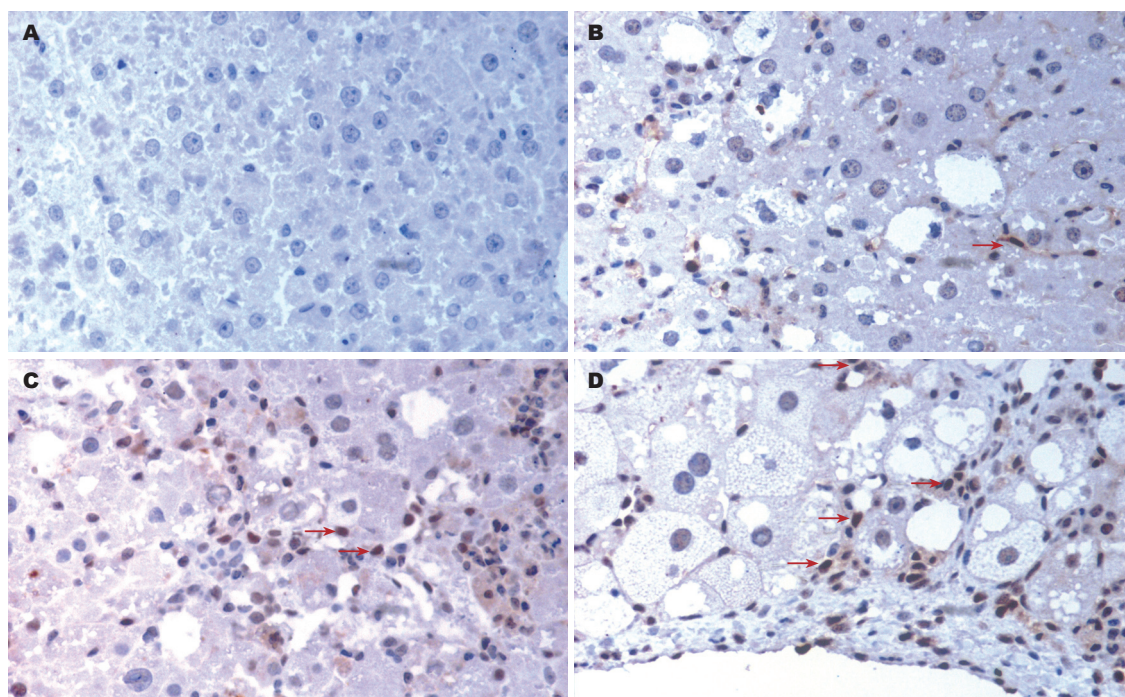


图2 p38MAPK蛋白的表达及定位. A: 正常对照组; B: 模型组3 wk; C: 模型组6 wk; D: 模型组9 wk.

■应用要点

本文主要研究在肝组织MAPK信号传导通路中重要成员p38MAPK在HF进展中的表达变化, 可为HF的防治提供新的思路.

表1 各组胶原面积、 α -SMA以及p38MAPK表达变化 (mean \pm SD, $n = 8$, %)

分组	胶原面积	α -SMA阳性表达面积	p38MAPK表达面积
正常对照组	0.16 \pm 0.10	0.20 \pm 0.09	0.01 \pm 0.01
模型组3 wk	0.20 \pm 0.30 ^a	0.50 \pm 0.35 ^a	0.05 \pm 0.02 ^a
模型组6 wk	0.67 \pm 0.25 ^a	1.55 \pm 0.50 ^a	0.10 \pm 0.05 ^a
模型组9 wk	3.08 \pm 0.60 ^a	5.48 \pm 1.52 ^a	0.50 \pm 0.10 ^a

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组.

模型组3、6、9 wk可见粗大的绿色的胶原纤维大量分布于汇管区和中央静脉管壁以及不完全纤维间隔中, 且随造模时间的延长, 其分布越来越多. 模型组9 wk纤维组织大量增生, 并向内延伸形成纤维隔, 部分已包绕肝组织团块, 形成假小叶, 与正常对照组有显著性意义($P < 0.05$, 图1, 表1).

2.2 肝组织中 α -SMA的表达情况 正常对照组汇管区动脉和中央静脉壁有少量 α -SMA阳性细胞, 肝窦壁阴性; 模型组肝组织中 α -SMA阳性表达明显增加, 胞质呈棕黄色, 大量表达于纤维增生的汇管区、中央静脉周围纤维间隔及靠近纤维间隔的肝窦周围, 且随造模时间的延长, 其表达分布越来越多, 与正常对照组相比有显著性意义($P < 0.05$, 图1, 表1).

2.3 肝组织中p38MAPK的表达情况

2.3.1 免疫组化结果显示: 正常对照组3、6、9

wk实验大鼠肝组织中p-p38MAPK几乎无阳性表达, 模型组肝组织中可见p-p38MAPK阳性表达, 低倍镜下可见小叶中央静脉周围、汇管区及肝小叶内均有条索状、星芒状p-p38MAPK阳性表达. 高倍镜下, p-p38MAPK阳性表达主要分布于肝脏间质细胞中. 且随造模时间的延长, p-p38MAPK的阳性表达明显增多、增强, 与正常对照组相比具有显著性意义($P < 0.05$, 表1, 图2).

2.3.2 RT-PCR检测结果显示: 与正常对照组比较, 各组大鼠肝组织中p38MAPK mRNA均表达增加(均 $P < 0.01$), 且随造模时间的延长, p38MAPK mRNA表达亦呈显著递增趋势(图3).

3 讨论

HF是肝脏对各种病因所致的慢性肝损伤的一种修复反应, 其实质是以胶原分泌为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积^[4]. 活化的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝内ECM的主要来源^[5-6]. 在各种致纤维化的损伤下, HSCs表型从富含维生素A的静息细胞表型转变为具有增殖性、分化性的肌成纤维表型^[7]. 伴随着HSCs的激活, 大量的细胞因子及其信号传导通路被激活, 不仅可以维持HSCs的活化表型还可以维持HSCs的增殖活性和分泌活性^[8]. 近年来细胞因子及其信号传导通路在HF形成中的作用得到越来越多的研究. 其中MAPK可以易位至胞核并激活转录因子的蛋白激酶, 成为多

同行评价

本研究设计较合理,结果可靠,具有一定的科学性、创新性和可读性。

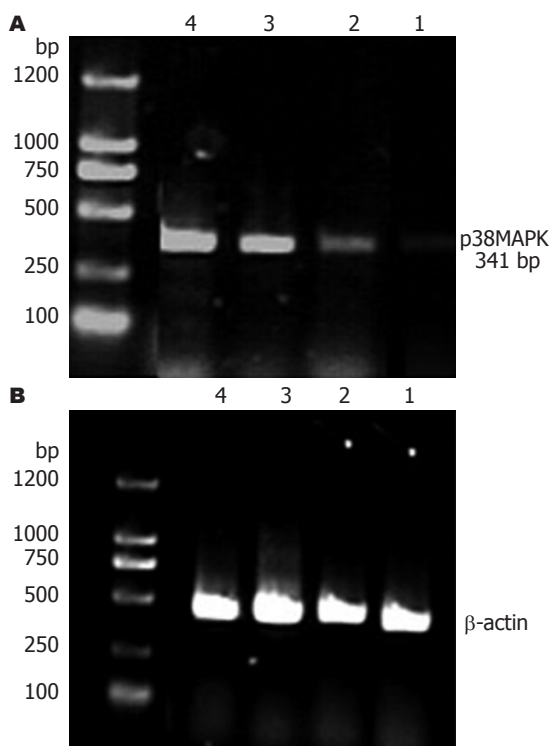


图3 p38MAPK mRNA的表达. A: 正常对照组; 2: 模型组3 wk; 3: 模型组6 wk; 4: 模型组9 wk.

种信号途径的汇集点,因此对于MAPK的研究受到更多的关注. MAPK属于Ser/Thr蛋白激酶家族,主要成员有3个: ERK(细胞外信号调节激酶), JNK(c-Jun氨基末端激酶)和p38MAPK. 其中对于ERK信号传导通路在HF形成中的作用研究较多,大量研究发现各种肝损伤可导致PDGF受体的上调和PDGF分泌的增加,活化的PDGF受体进一步引起信号分子Ras的聚集,从而进一步活化ERK,活化的ERK调节核内转录因子的转录;并能介导细胞周期蛋白(Cyclin)D, E表达,促使HSC从G₁期进入S期并增殖^[9]. 我科研组有研究观察ERK及其下游核糖体S6蛋白激酶随着纤维化的进展其表达量均进行性增加^[10]. 然而对于p38MAPK在HF形成中的作用目前研究较少.

p38MAPK信号传导通路是MAP家族的重要组成成员,经外界刺激而激活,故又称为MAPK应激信号通路. 在各种细胞外刺激包括紫外线、热休克、渗透压休克、内毒素、细胞因子如白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)和G蛋白偶联受体等的激活作用下,相继磷酸化激活TAK/ASK/NLK, MKK3/MKK6,进而p38MAPK三肽基区的Thr、Tyr被双磷酸化而被激活^[11],激活的p38可磷酸化转录因子ATF-2、Elk-1^[12-14],导致他们的转录活性的升高,从而进一步调节最终的生物应答反应. TGF-β是HF

形成中最主要的促纤维化细胞因子,其可通过TGF-β/SMAD通路促进HF的形成. 近年的研究发现TGF-β也可以诱导p38MAPK信号传导通路的活化^[15].

本实验免疫组化及RT-PCR结果显示, p-p38MAPK在正常对照组中未见阳性表达,而p38MAPK mRNA仅有极少量表达,说明在正常生理状态下肝组织中p38MAPK是以无活性的非磷酸化形式存在. 在模型组中,随着造模时间的延长和HF程度的加重, p-p38MAPK及p38MAPK mRNA表达均逐渐增多、增强, p38MAPK表达水平与HF程度呈显著正相关. 说明在HF形成中, p38MAPK被激活,活化的p38MAPK转移入核内,磷酸化下游转录因子,调节目的基因的表达,从而可能由此参与了大鼠HF形成. 另外免疫组化结果显示p-p38MAPK主要表达于肝间质细胞的胞核中,肝细胞中未见表达,可见p38MAPK信号传导通路主要作用于肝间质细胞. HSC和Kupffer细胞是肝间质细胞的主要成分, HSC被认为在HF形成的起着决定性的作用,多种细胞因子及其信号传导通路通过促进HSC的活化、增殖,进一步促进HF的发生. 本实验中HSC的活化标准物α-SMA的表达随造模时间的延长逐渐增加,增强,且主要表达于纤维增生的汇管区、中央静脉周围纤维间隔及靠近纤维间隔的肝窦周围,与胶原的表达呈显著正相关,而p38MAPK的表达与α-SMA及胶原的表达均呈显著正相关,因此可以推测p38MAPK信号传导通路可能通过诱导HSC的活化、增殖促进HF的形成.

肝损伤早期Kupffer细胞可以释放多种细胞因子作用于HSC促进HSC的活化、增殖. 近年来, Kupffer细胞在HF形成中的作用也在逐渐被认为所重视, Kupffer是肝脏内活性氧(ROS)的主要来源, ROS诱导氧化反应,加重HF. Imamura *et al*^[16]研究发现,抑制Kupffer的浸润,可抑制HSCs的激活,从而抑制HF的形成. Nieto^[17]研究发现, HSC和Kupffer细胞共同培养后,比HSC单独培养时,一方面有更多的转化表型,另一方面增殖性也明显增加, α1(I)和α2(I)前胶原基因的表达明显增加,此研究另一个重要的发现是H₂O₂和IL-6可能是通过活化p38MAPK信号传导通路增加HSC的增殖和胶原的表达. 因此我们仍需要继续研究p38MAPK信号传导通路通过何种方式促进HF的形成,其是否可将HSC和Kupffer相联系,这为我们研究及治疗HF提出了新的思路.

4 参考文献

- 1 Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000; 12: 1-13
- 2 Matsuoka H, Arai T, Mori M, Goya S, Kida H, Morishita H, Fujiwara H, Tachibana I, Osaki T, Hayashi S. A p38 MAPK inhibitor, FR-167653, ameliorates murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L103-L112
- 3 Chin BY, Mohsenin A, Li SX, Choi AM, Choi ME. Stimulation of pro-alpha(1)(I) collagen by TGF-beta(1) in mesangial cells: role of the p38 MAPK pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F495-F504
- 4 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 5 Goddard CJ, Smith A, Hoyland JA, Baird P, McMahon RF, Freemont AJ, Shomaf M, Haboubi NY, Warnes TW. Localisation and semiquantitative assessment of hepatic procollagen mRNA in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1998; 43: 433-440
- 6 Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 163-173
- 7 Eng FJ, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G7-G11
- 8 Gong W, Roth S, Michel K, Gressner AM. Isoforms and splice variant of transforming growth factor beta-binding protein in rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1998; 114: 352-363
- 9 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 33-36
- 10 杨妙芳, 谢渭芬, 张新, 强晖, 孙田美, 朱樑. 核糖体S6蛋白激酶在大鼠肝纤维化组织中的表达. *第二军医大学学报* 2004; 25: 153-156
- 11 Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 1995; 270: 7420-7426
- 12 Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Dérjard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 1247-1255
- 13 Dérjard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 1995; 267: 682-685
- 14 Janknecht R, Hunter T. Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a. *EMBO J* 1997; 16: 1620-1627
- 15 Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 10055-10064
- 16 Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005; 128: 138-146
- 17 Nieto N. Oxidative-stress and IL-6 mediate the fibrogenic effects of [corrected] Kupffer cells on stellate cells. *Hepatology* 2006; 44: 1487-1501

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 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. (2)同行评议者: 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; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

EGCG对肝纤维化大鼠TGF- β 1和CTGF表达的影响

甄茂川, 王效民, 尹震宇, 汪谦, 刘平果, 吴国洋, 俞可克, 李岗山

■背景资料

肝纤维化是一种常见的病症, 是慢性肝病共有的病理改变, 不同病因引起的慢性肝损伤造成以胶原为主的细胞外基质各成分合成增多、降解相对不足, 过份在肝内沉积引起肝纤维化。肝星状细胞(HSC)被认为是慢性肝损伤时细胞外基质的主要来源, 因此其在肝纤维化的发生发展中发挥着关键作用。

甄茂川, 王效民, 尹震宇, 刘平果, 吴国洋, 俞可克, 李岗山, 厦门大学附属中山医院肝胆外科 福建省厦门市 361004
汪谦, 中山大学附属第一医院肝胆外科 广东省广州市 510080

甄茂川, 博士, 主要从事肝纤维化、肝癌发病机制及治疗方面的研究。

作者贡献分布: 研究过程由甄茂川, 王效民, 尹震宇, 汪谦, 刘平果及吴国洋操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由汪谦提供; 数据分析由吴国洋, 俞可克及刘平果完成; 本论文写作由甄茂川与尹震宇完成。

通讯作者: 甄茂川, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院肝胆外科。zhenmc@sohu.com

电话: 0592-2993142

收稿日期: 2008-09-22 修回日期: 2008-11-01

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-08

Effect of EGCG on expression of TGF- β 1 and CTGF in rats with liver fibrosis

Mao-Chuan Zhen, Xiao-Min Wang, Zhen-Yu Yin, Qian Wang, Ping-Guo Liu, Guo-Yang Wu, Ke-Ke Yu, Gang-Shan Li

Mao-Chuan Zhen, Xiao-Min Wang, Zhen-Yu Yin, Ping-Guo Liu, Guo-Yang Wu, Ke-Ke Yu, Gang-Shan Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Qian Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Mao-Chuan Zhen, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. zhenmc@sohu.com

Received: 2008-09-22 Revised: 2008-11-01

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To examine the protective effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on CCl₄-induced hepatic fibrosis.

METHODS: A rat model of CCl₄-induced hepatic fibrosis was established to assess the effect of EGCG on the treatment for fibrosis. Liver fibrosis of the rats was evaluated by two histological methods: HE staining and Masson's trichrome staining. Activities of serum ALT and AST were checked with automated biochemistry analyzer. The levels of liver tissue hydroxyproline, glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive

substances (TBARS) were also determined. The expression of α -SMA in hepatic tissue was detected by immunohistochemistry. The mRNA and protein levels of TGF- β 1 and CTGF expression were detected by RT-PCR and Western blot analysis.

RESULTS: Histological and hepatic hydroxyproline examination revealed that EGCG significantly arrested progression of hepatic fibrosis. EGCG caused significant amelioration of liver injury, and reduced activities of serum ALT and AST (138.4 ± 45.8 vs 234.6 ± 63.2 , 96.4 ± 20.5 vs 186.2 ± 36.6 , both $P < 0.05$). Redox state was improved in CCl₄-induced hepatic fibrosis through treatment with EGCG, by suppressing the TBARS formation and increasing the level of GSH. Moreover, EGCG markedly reduced both mRNA and protein expression of TGF- β 1 and CTGF in the liver tissue ($P < 0.05$).

CONCLUSION: EGCG significantly arrested progression of hepatic fibrosis. The underlying mechanism was associated with changes in the redox state and markedly decreased expression of TGF and CTGF in liver tissue.

Key Words: Epigallocatechin-3-gallate; Liver fibrosis; Transforming growth factor- β 1; Connective tissue growth factor

Zhen MC, Wang XM, Yin ZY, Wang Q, Liu PG, Wu GY, Yu KK, Li GS. Effect of EGCG on expression of TGF- β 1 and CTGF in rats with liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3828-3834

摘要

目的: 研究表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG)的抗肝纤维化作用及其机制。

方法: 运用腹腔注射CCl₄构建大鼠肝纤维化模型, 观察EGCG对大鼠肝纤维化的影响。运用HE染色、Masson三色染色检测肝纤维化的变化; 生化检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)及天冬氨酸转氨酶(AST); 同时检测肝组织的羟脯氨酸、还原型谷胱甘肽(GSH)和硫代巴比妥酸反应底物(TBARS)含量。免疫组织

■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

化学法观察 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达;分别运用RT-PCR和Western blot法检测转化生长因子 β 1(TGF- β 1)及结缔组织生长因子(CTGF)mRNA和蛋白质表达。

结果: EGCG对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化程度具有显著的抑制作用。EGCG对肝细胞具有显著的保护作用,与纤维化模型组比较,EGCG干预组血清ALT、AST水平降低(138.4 ± 45.8 vs 234.6 ± 63.2 , 96.4 ± 20.5 vs 186.2 ± 36.6 , 均 $P < 0.05$)。EGCG显著抑制肝组织 α -SMA的表达。EGCG通过抑制TBARS的形成和提高GSH含量,显著改善CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝脏的氧化状态。同时EGCG显著抑制肝组织TGF- β 1及CTGF的mRNA和蛋白质的表达(均 $P < 0.05$)。

结论: EGCG能够显著抑制肝纤维化的进展,其机制与EGCG改善大鼠肝脏的氧化状态及抑制TGF- β 1和CTGF的表达有关。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯;肝纤维化;转化生长因子 β 1;结缔组织生长因子

甄茂川, 王效民, 尹震宇, 汪谦, 刘平果, 吴国洋, 俞可克, 李岗山. EGCG对肝纤维化大鼠TGF- β 1和CTGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3828-3834

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3828.asp>

0 引言

表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶多酚的主要单体及活性成分。EGCG作为一种强的抗氧化剂在治疗氧化应激相关疾病方面引起众多的关注,如肿瘤、心血管疾病和纤维化。最近Chen *et al*^[1]报道,运用EGCG预处理可以减轻CCl₄诱导的急性肝损伤。体外的研究已证明EGCG能够通过抑制HSC I型胶原的合成,抑制增殖和诱导凋亡而发挥抗肝纤维化的作用^[2-3]。EGCG能否成为有效的治疗肝纤维化药物,尚需进一步研究。因此,我们运用CCl₄诱导的大鼠肝纤维化模型,探讨EGCG对CCl₄诱导的肝纤维化的抑制作用以及相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级 δ 健康SD大鼠,体质量180-200 g,由中山大学动物实验中心提供,动物合格证号: SCXK(粤)2004A084。动物房室温20-22 $^{\circ}$ C,光照周期12 h。实验前大鼠适应环境1 wk,自由饮水,无不良反应,进食、饮水和活动正常者纳入实验。羊抗 α -SMA,购自Santa Cruz Biotechnology

公司。二抗为偶联HRP的抗羊IgGMcAb,购自武汉博士德公司。EGCG纯度95%,Sigma公司产品,为粉末状,临用前溶于生理盐水中,过滤除菌;明胶、Triton-X100, Sigma公司产品。CCl₄、橄榄油,广州威佳公司产品。考马斯亮蓝R-250,广州鼎国公司产品。Massion三色试剂盒,广州佰科公司产品。GSH检测试剂盒,Calbiochem公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分组及方法: 健康 δ SD大鼠,随机分成4组: (1)正常对照组,大鼠给与ip橄榄油1 mL/kg,每周2次; (2)EGCG对照组,大鼠给予ip橄榄油1 mL/kg,每周2次,同时每天ip EGCG(25 mg/kg); (3)纤维化模型组,大鼠给予ip 500 mL/L CCl₄橄榄油溶液1 mL/kg,每周2次。 (4)EGCG治疗组,大鼠给予ip 500 mL/L CCl₄橄榄油溶液1 mL/kg,每周2次,同时每日给予EGCG(25 mg/kg)ip。实验期间所有大鼠食用标准饲料。各组均于7 wk后处死。处死前禁食24 h。处死时,大鼠用水合氯醛麻醉,迅速从心脏穿刺取血,分离血清, -80 $^{\circ}$ C保存。平卧状态下剖腹,去除肝脏筋膜,取右叶相同的部分置于冰生理盐水中充分洗涤后,一部分用100 g/L中性甲醛固定,3 d内石蜡包埋备组织病理检测;其余肝组织迅速置于液氮中保存。

1.2.2 肝脏组织病理学检测: 肝脏石蜡切片作HE染色, Massion三色染色法及 α -SMA免疫组化染色。由同一位病理学专家光镜下观察肝组织病理学改变,对肝损伤程度采用Knodell指数进行盲法比较和评分^[4], 0级: 无纤维化; 1级: 汇管区纤维化; 2级: 汇管区纤维化扩大; 3级: 桥接样纤维化; 4级: 肝硬化。免疫组化采用SP法,操作按说明书进行,结果运用HIPS-2000型计算机图像分析系统,通过显微摄像系统摄取图像并输入图像分析系统进行灰度变换,使胶原纤维着色区域与背景分开,自动记录着色面积和总面积。于100倍镜下测定胶原纤维面积百分比,计算方法为: 胶原纤维面积/肝组织面积 $\times 100\%$,取平均值。

1.2.3 肝组织羟脯氨酸含量测定: 采用氯仿-T法测定。取肝组织500 mg,加950 mL/L乙醇脱脂0.5 d,于脱脂器中用丙酮脱脂2 d,取出置10 $^{\circ}$ C烤箱烘干,研磨成粉。再精确称取肝粉40 mg,放入加带塞试管内,加入6 mol/L盐酸3 mL,放在125 $^{\circ}$ C烤箱水解5 h。自然冷却后,移入50 mL容量瓶加6 mol/L氢氧化钠调pH至6.0。用蒸馏水稀释至50 mL刻度。过滤后取1.0 mL测定。各管加1.0 mL T溶液摇匀,室温下放置20 min继续加入1.0 mL过

■ 研发前沿

目前对肝纤维化的治疗尚缺乏理想的药物,寻找新的有效的抗肝纤维化的药物成为当前国内外研究的热点。

■相关报道

EGCG作为茶多酚的主要单体及活性成分,以其强大的抗氧化作用在治疗氧化应激相关疾病方面引起众多的关注,如肿瘤、心血管病和纤维化。最近Chen *et al*报道,运用EGCG预处理可以减轻单次剂量CCl₄诱导的急性肝损伤。体外的研究已证明EGCG能够通过抑制肝星状细胞I型胶原的合成,抑制增殖和诱导凋亡而发挥抗肝纤维化的作用。

表 1 EGCG对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化血清ALT和AST的影响 (U/L)

	正常对照组	EGCG 对照组	纤维化模型组	EGCG干预组
AST	65.3 ± 28.5	66.6 ± 30.6	234.6 ± 63.2 ^a	138.4 ± 45.8 ^c
ALT	36.2 ± 6.1	35.7 ± 7.8	186.2 ± 36.6 ^a	96.4 ± 20.5 ^c

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 纤维化模型组。

氯酸, 5 min后加入1.0 mL 100 mL/L对二甲氨基苯甲醛溶液。65℃水浴保温20 min, 取出后冷却。20 min后在550 nm波长处比色。通过运用已知浓度的羟脯氨酸绘制的标准曲线, 来确定肝组织的羟脯氨酸的浓度。

1.2.4 肝组织GSH及TBARS含量的测定: GSH检测试剂盒, Calbiochem公司产品。脂质过氧化物的主要降解产物是丙二醛(malondialdehyde, MDA), 可与硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)发生反应, 生成紫红色的物质; 该物质在532 nm处有最大吸收峰。因此, 可利用于测定样品中脂质过氧化物的含量。

1.2.5 血清学肝功能测定: 取大鼠血液约3 mL, 置干燥玻璃管内, 37℃温浴30 min, 4℃冰箱静置2 h, 3000 g 10 min, 取血清, -80℃保存。自动生化分析仪检测肝功能指标ALT和AST。

1.2.6 半定量RT-PCR检测: 取大约300 mg肝组织, 加入3 mL TRIzol(Invitrogen)提取总RNA, 在紫外分光仪下测定RNA含量, 根据RNA在A_{260nm}/A_{280nm}≥1.8及10 g/L琼脂糖凝胶电泳28S和18S RNA条带比值≥1.5鉴定RNA纯度和完整性。取2 μg总RNA为模板, 参照TaKaRa公司的RNA PCR Kit(AMV)Ver 3.0试剂盒说明书进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。大鼠CTGF寡核苷酸引物参考Murphy *et al*^[5]序列由上海生工合成, 上游5'-CTA AGA CCT GTG GGA TGG GC-3', 下游5'-CTC AAA GAT GTC ATT GTC CCC-3'(383 bp); 大鼠TGF-β1寡核苷酸引物参考Ding *et al*^[6]上游5'-TGA GTG GCT GTC TTT TGA CG-3', 下游5'-ACT TCC AAC CCA GGT CCT TC-3'(350 bp); 内参照β-actin引物序列如下: 上游5'-TGG GAC GAT ATG GAG AAG AT-3', 下游5'-ATT GCC GAT AGT GAT GAC CT-3'(452 bp)。PCR反应条件为: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 10 min。取PCR扩增产物10 mL在15 g/L琼脂糖凝胶(含0.5 g/L溴化乙锭)电泳, 用美国Pharmacia Master Image紫外凝胶成像系统进行基因表达水平的半定量分析。

1.2.7 Western blot分析: 将肝组织置于冰冷的裂

解液(含150 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl [pH7.6]、0.1% SDS、1% NP-40和蛋白酶抑制剂复合物)中摇床放置10 min, 13 000 g 10 min收集裂解物总蛋白, 取40 μg组织蛋白行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并原位电转印至PVDF膜; 膜经封闭液(含20 mmol/L Tris-HCl[pH7.6]、150 mmol/L NaCl、0.1% Tween-20和5%脱脂奶粉)处理后, 与羊抗TGF-β1、CTGF或β-actin的多克隆抗体分别孵育, 膜经漂洗后再与辣根过氧化物酶耦联的兔抗羊二抗反应, Western blot增强化学发光法(ECL)发光试剂显影, 灰度成像软件(UVP, UK)测定主带的吸光度值以计算β-actin、CTGF和TGF-β1蛋白表达水平。

统计学处理 实验所得数据用mean±SD表示, 采用完全随机设计的单因素方差分析, 多个样本均数间的两两比较采用Student-Newman-Keuls *q*检验, 以P<0.05为差异有显著性, 所有操作均以SPSS11.0统计软件完成。

2 结果

2.1 EGCG对大鼠肝功能的影响 血清AST和ALT是评价肝脏损伤常用的生化指标。同正常对照组相比, 肝纤维化模型组的血清AST和ALT显著增高; 给予EGCG治疗后血清AST和ALT较模型组显著降低。而EGCG对照组同正常对照组无明显差别(表1)。

2.2 EGCG对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝脏病理组织学的影响 正常对照组和EGCG对照组为正常肝脏表现, 颜色深红, 表面光滑, 边缘锐利, 质地较软。纤维化模型组肝脏增大, 颜色浅, 边缘钝, 质地硬, 表面有粗颗粒状表现。EGCG治疗组肝脏颜色较红, 略增大, 表面尚光滑, 肝脏表面可见细小颗粒。运用HE和Massion染色二种组织病理学方法对肝纤维化程度进行分析。组织病理学分析结果显示正常对照组和EGCG对照组的肝组织肝索结构清晰, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状, 肝组织内无脂肪空泡(图1A-B), 仅汇管区和中央静脉有少许胶原纤维存在(图

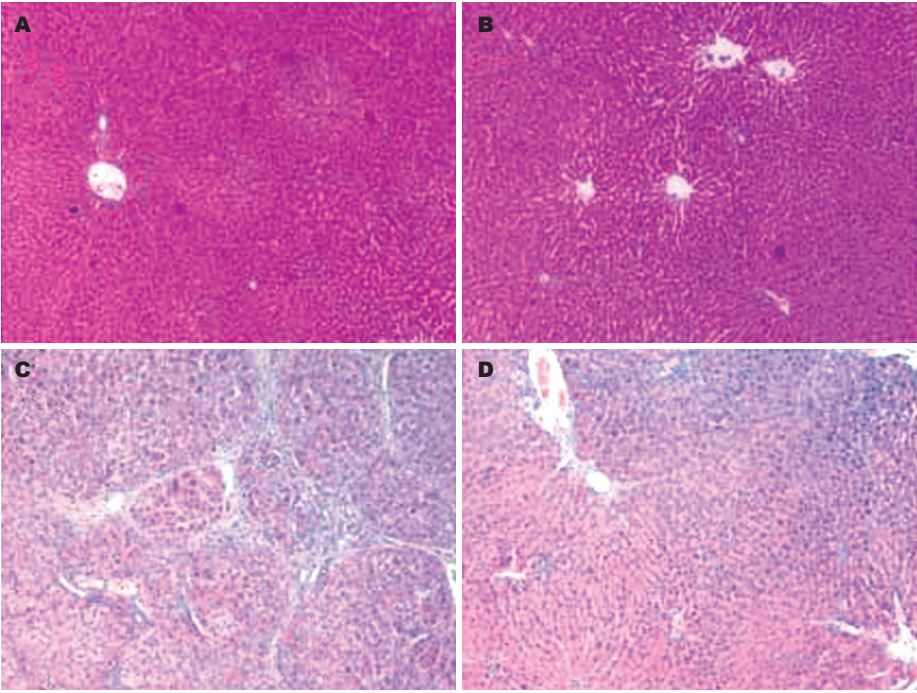


图 1 肝组织切片HE染色(×100). A: 正常对照组; B: EGCG对照组; C: 肝纤维化模型组; D: EGCG干预组.

■创新盘点
本课题基于肝纤维化研究的最新进展,运用CCl₄腹腔注射的大鼠肝纤维化模型,观察EGCG对CCl₄诱导的肝纤维化的保护作用及其相关机制.

表 2 EGCG对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化病理分级的影响

分组	n	0级	1级	2级	3级	4级	mean ± SD
正常对照组	8	8	0	0	0	0	0.00 ± 0.00
EGCG对照组	8	8	0	0	0	0	0.00 ± 0.00
肝纤维化模型组	12	0	0	1	3	8	3.58 ± 0.19 ^a
EGCG干预组	14	0	8	5	1	0	1.50 ± 0.17 ^c

^a*P*<0.05 vs 正常组; ^c*P*<0.05 vs 纤维化模型组.

表 3 EGCG对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝组织CTGF和TGF-β1 mRNA及蛋白质表达的影响

分组	TGF-β1 mRNA	TGF-β1蛋白质	CTGF mRNA	CTGF蛋白质
正常对照组	0.39 ± 0.15	0.36 ± 0.15	0.15 ± 0.06	0.17 ± 0.08
EGCG对照组	0.38 ± 0.14	0.32 ± 0.12	0.14 ± 0.05	0.18 ± 0.09
肝纤维化模型组	1.19 ± 0.26 ^a	0.98 ± 0.24 ^a	0.32 ± 0.19 ^a	0.78 ± 0.24 ^a
EGCG干预组	0.46 ± 0.22 ^c	0.45 ± 0.18 ^b	0.22 ± 0.10 ^b	0.36 ± 0.15 ^c

^a*P*<0.05 vs 正常组; ^c*P*<0.05 vs 纤维化模型组.

2A-B). 模型组肝小叶结构破坏, 纤维组织增生明显, 将肝小叶分隔成大小不等的肝细胞团, 肝细胞广泛变性坏死, 汇管区扩大、胶原沉积(图1C, 2C). 同纤维化模型组比较, 治疗组肝细胞的变性坏死程度及肝小叶结构破坏程度降低, 肝脏胶原纤维增生亦明显减轻, 纤维条索疏松变窄(图1D, 2D). 运用Knodell指数对肝纤维化程度进行评分分析, 结果显示, EGCG治疗组同模型组比较有显著差异(表2, *P*<0.05). 模型组的纤维

化面积为20.5%, EGCG治疗组减低至13.2%(表3, *P*<0.05). 而EGCG对照组和正常对照组之间的组织病理学变化没有明显的差别.
2.3 EGCG对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化肝组织羟脯氨酸含量的影响 在检测肝脏组织病理学改变的同时, 通过检测肝组织中羟脯氨酸水平, 对纤维化程度进行定量分析. 同正常对照组相比较, 肝脏的羟脯氨酸水平在模型组显著增高(*P*<0.05); EGCG治疗后羟脯氨酸水平显著下降

■应用要点

本文为EGCG能够成为有效治疗肝纤维化的药物提供重要的理论依据。

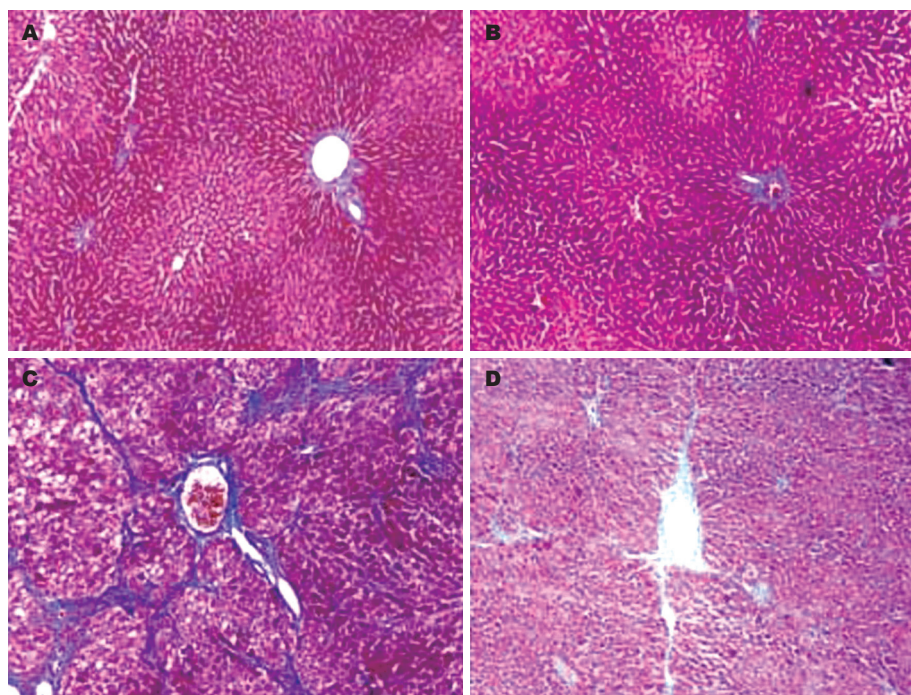


图2 肝组织切片Masson染色($\times 100$)。A: 正常对照组; B: EGCG对照组; C: 肝纤维化模型组; D: EGCG干预组。

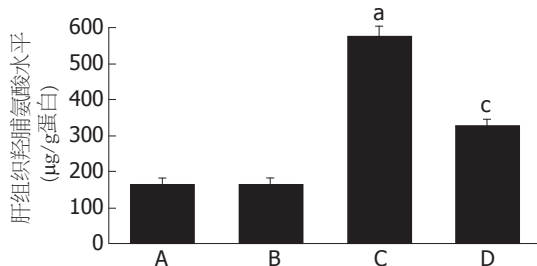


图3 EGCG对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化肝组织羟脯氨酸含量的影响。A: 正常对照组; B: EGCG对照组; C: 肝纤维化模型组; D: EGCG干预组。* $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 纤维化模型组。

($P < 0.05$, 图3)。

2.4 EGCG对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝组织 α -SMA表达的影响 活化的HSC是肝纤维化时基质蛋白的主要来源。而 α -SMA是HSC活化的重要指标。因此,我们运用免疫组化法检测 α -SMA在肝脏中的表达。结果显示,在正常对照组肝脏, α -SMA阳性细胞主要存在于门静脉和肝动脉周围。给予ip CCl₄ 7 wk后, α -SMA阳性细胞占据了大部分的纤维组织。但同时给予EGCG治疗后纤维化区域的 α -SMA阳性细胞的数量显著减低(图4)。

2.5 EGCG对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化肝脏氧化还原状态的影响 通过检测大鼠肝组织匀浆中的GSH和TBARS浓度,探讨EGCG治疗对肝组织氧化状态的影响。GSH构成了拮抗自由基的第一道防线。如图5A所示,同正常对照组比较($5.9 \pm 0.2 \mu\text{mol/g}$),肝纤维化组肝组织GSH含量显著下降($3.5 \pm 0.1 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$)。同正常对照组比

较,肝纤维化组TBARS含量增加约3.2倍(图5B);EGCG治疗组肝脏TBARS含量降至($0.78 \pm 0.10 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$, 图5B)。

2.6 EGCG对大鼠肝脏CTGF和TGF- β 1表达的影响 RT-PCR结果分析显示肝纤维化模型组肝脏CTGF和TGF- β 1 mRNA的表达显著高于正常对照组,而EGCG干预组显著下降,二者之间的差异均有统计学意义(图6,表3, $P < 0.05$)。运用Western blot法检测肝脏CTGF和TGF- β 1蛋白表达,结果显示肝纤维化模型组肝脏CTGF和TGF- β 1蛋白的表达显著高于正常对照组;而EGCG干预后,CTGF和TGF- β 1蛋白的表达均显著下降,二者之间的差异均有统计学意义(图6,表3, $P < 0.05$)。

3 讨论

氧化应激被认为是CCl₄诱导的肝损伤的主要原因。CCl₄由肝细胞的细胞色素P450代谢生成三氯甲基自由基。这些自由基致脂质过氧化,脂质过氧化产物引起肝细胞损伤和促进纤维组织的生成。本研究结果显示EGCG干预后血清转氨酶AST和ALT显著下降,表明EGCG对CCl₄引起的大鼠肝脏毒性具有保护作用。同先前的研究结果相同,经CCl₄处理后,大鼠肝组织中脂质过氧化标志物TBARS显著增高。而EGCG能够显著CCl₄所致的大鼠TBARS的形成。GSH作为一种抗氧化剂在细胞内和细胞外通过结合多种酶反应步骤扩大其细胞内的功能,包括活性氧中间产物的解毒作用及减少蛋白质的硫化、硫氢化

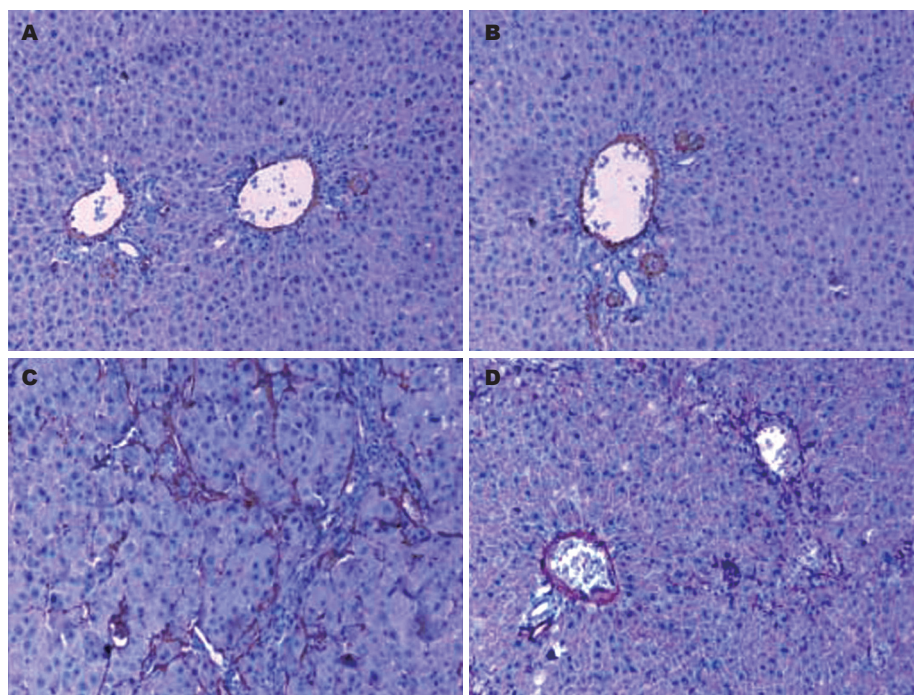


图 4 EGCG对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化组织 α -SMA表达的影响($\times 200$). A: 正常对照组; B: EGCG对照组; C: 肝纤维化模型组; D: EGCG干预组. EGCG干预后, 纤维化区域的 α -SMA阳性细胞显著减少.

■名词解释

桥接样纤维化: 主要由桥接坏死发展而来, 桥接样纤维化虽有纤维间隔形成, 但小叶结构大部仍保留.

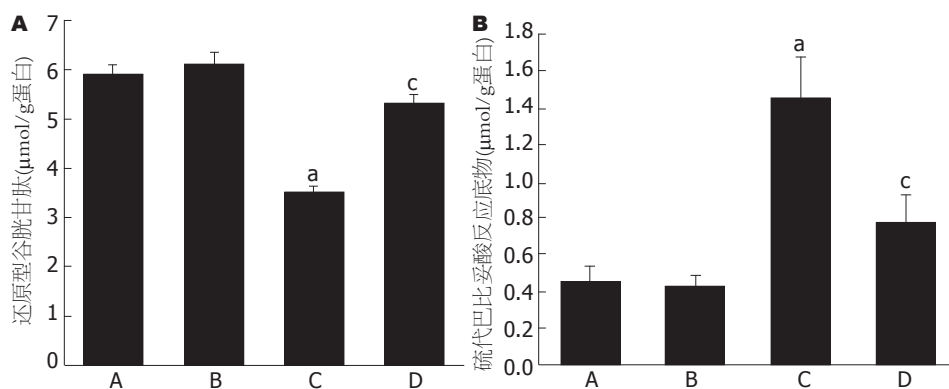


图 5 EGCG对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝组织匀浆中GSH和TBARS的影响. A: 正常对照组; B: EGCG对照组; C: 肝纤维化模型组; D: EGCG干预组. ^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 纤维化模型组.

和二硫化物的形成. 有研究表明GSH通过谷胱甘肽过氧化物酶消除脂质过氧化物的产生. 本实验发现, CCl₄处理的大鼠肝脏GSH水平显著下降, 而EGCG干预后肝脏GSH水平显著增高. 我们的研究结果同既往的报道相一致, EGCG能够通过升高GSH水平抑制体外培养的HSCs的氧化反应^[7]. 体外研究还表明, EGCG对肝细胞的保护作用主要归结于其抗氧化作用^[8-9]. 最近, Chen *et al*证实运用EGCG预处理可以通过抑制脂质过氧化和减少促炎症反应物NO的产生来减轻CCl₄诱导的急性肝损伤^[1]. 总之, 这些结果表明EGCG可能通过其抗氧化能力发挥抗CCl₄诱导的大鼠肝纤维化作用.

HSCs被认为是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)产生的主要来源, 因此其在肝纤维

化的发生和发展中发挥着关键作用^[10]. 在正常肝脏, HSCs处于静止状态. 肝损伤时, HSCs被激活, 表达 α -SMA是HSCs活化的一个重要标志. 我们的研究发现EGCG抑制肝纤维化进展伴随着 α -SMA表达阳性细胞数量的下降, 表明EGCG可抑制HSCs的活化. 先前的研究表明氧化应激通过直接或间接旁分泌刺激受损的肝细胞来促进肝纤维化发展和HSC活化. 因此, EGCG可能通过抑制氧化反应依赖的HSCs活化来防止肝纤维化的形成.

TGF- β 1是目前已知最强的促肝纤维化细胞因子. 近年研究发现, TGF- β 1在体外实验中可特异性诱导成纤维细胞产生CTGF, 并由后者作为下游效应介质作用于结缔组织, 刺激成纤维细胞增殖和细胞外基质合成, 经CTGF介导的

同行评价

本研究有一定科学性、创新性和可读性,较好地反映出我国或国际胃肠病学基础研究的先进水平。

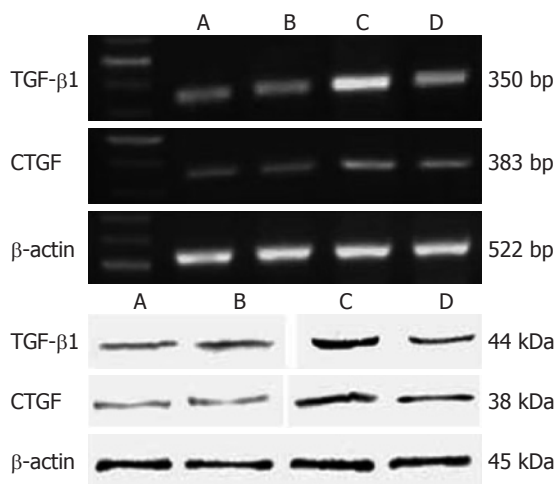


图6 EGCG对CCl₄诱导的肝纤维化大鼠肝脏CTGF和TGF-β1 mRNA及蛋白质表达的影响。A: 正常对照组; B: EGCG对照组; C: 肝纤维化模型组; D: EGCG干预组。

TGF-β1信号途径与肝纤维化的关系更具有特异性。越来越多的体内外研究结果表明CTGF为TGF-β1下游的纤维化活性效应分子; TGF-β1引起的CTGF表达上调在肝纤维化形成的过程中可能发挥着关键作用^[11-12]。肝脏过表达TGF-β1的转基因小鼠导致肝纤维化快速进展, 运用TGF-β1反义寡核苷酸能够显著抑制CCl₄诱导的大鼠肝纤维化^[13]。因此, 通过抑制TGF-β1的合成和(或)其信号传导是治疗纤维化的重要策略。CTGF是一种富含半胱氨酸的蛋白质具有广泛的细胞生物学作用。有研究表明, 在肝纤维化形成过程中, CTGF主要来源于HSC, 具有诱导HSC迁移、增殖、黏附和促进I型胶原的表达; 且CTGF mRNA和蛋白表达水平与肝纤维化的程度成正相关, 而与疾病的类型无关; 运用siRNA使CTGF的表达沉默可具有防治肝纤维化的作用, 阻断CTGF的表达或抑制其生物活性可能成为特异而有效的治疗肝纤维化的手段^[14]。我们的结果显示, 同正常大鼠相比, CCl₄诱导的肝纤维化大鼠在出现组织学异常的同时伴有TGF-β1和CTGF表达增高, 这进一步支持了二者在肝纤维化发病机制中的作用。而EGCG治疗能明显抑制TGF-β1、CTGF表达的增高及改善组织形态上的损害。体外研究结果亦证明EGCG能够通过促进HSC的GSH合成而抑制TGF-β受体的表达而阻断TGF-β信号传导, 最终抑制CTGF的表达^[7]。

本研究结果证明EGCG干预能显著抑制CCl₄诱导的大鼠肝纤维化的进展, 这一效应同EGCG抑制肝脏氧化状态和TGF-β1的表达及其信号传导密切相关。

参考文献

- Chen JH, Tipoe GL, Liong EC, So HS, Leung KM, Tom WM, Fung PC, Nanji AA. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 742-751
- Nakamuta M, Higashi N, Kohjima M, Fukushima M, Ohta S, Kotoh K, Kobayashi N, Enjoji M. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea, suppresses both collagen production and collagenase activity in hepatic stellate cells. *Int J Mol Med* 2005; 16: 677-681
- Higashi N, Kohjima M, Fukushima M, Ohta S, Kotoh K, Enjoji M, Kobayashi N, Nakamuta M. Epigallocatechin-3-gallate, a green-tea polyphenol, suppresses Rho signaling in TWNT-4 human hepatic stellate cells. *J Lab Clin Med* 2005; 145: 316-322
- Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000; 31: 241-246
- Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, Brady HR. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 5830-5834
- Ding J, Yu J, Wang C, Hu W, Li D, Luo Y, Luo H, Yu H. Ginkgo biloba extract alleviates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *Liver Int* 2005; 25: 1224-1232
- Yumei F, Zhou Y, Zheng S, Chen A. The antifibrogenic effect of (-)-epigallocatechin gallate results from the induction of de novo synthesis of glutathione in passaged rat hepatic stellate cells. *Lab Invest* 2006; 86: 697-709
- Kagaya N, Tagawa Y, Nagashima H, Saijo R, Kawase M, Yagi K. Suppression of cytotoxin-induced cell death in isolated hepatocytes by tea catechins. *Eur J Pharmacol* 2002; 450: 231-236
- Ramírez-Mares MV, de Mejía EG. Comparative study of the antioxidant effect of ardisin and epigallocatechin gallate in rat hepatocytes exposed to benomyl and 1-nitropyrene. *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 1527-1535
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669
- 丁宁, 李岩. 转化生长因子β1和结缔组织生长因子在肝纤维化中的表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2521-2526
- Sun K, Wang Q, Huang XH. PPAR gamma inhibits growth of rat hepatic stellate cells and TGF beta-induced connective tissue growth factor expression. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 715-723
- Doh KO, Jung HK, Moon IJ, Kang HG, Park JH, Park JG. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by ribon antisense to transforming growth factor-beta1. *Int J Mol Med* 2008; 21: 33-39
- Li G, Xie Q, Shi Y, Li D, Zhang M, Jiang S, Zhou H, Lu H, Jin Y. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats. *J*

雷公藤内酯醇对5-LOX代谢通路和胰腺癌细胞凋亡的影响

丁晓凌, 周国雄, 周晓荣, 汪晓莺

丁晓凌, 周国雄, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

周晓荣, 汪晓莺, 南通大学医学院免疫研究室 江苏省南通市 226001

丁晓凌, 2004级南通大学附属医院消化内科硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事胰腺癌研究。

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2004049

作者贡献分布: 此课题由周国雄与丁晓凌设计; 研究过程由丁晓凌操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由周晓荣与汪晓莺提供; 数据分析由丁晓凌与周晓荣完成; 本论文写作由丁晓凌, 周国雄及周晓荣完成。

通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科. guoxiong_zhou@163.com

电话: 0513-85112816

收稿日期: 2008-09-27 修回日期: 2008-10-21

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-08

Triptolide suppresses 5-lipoxygenase metabolic pathway and induces apoptosis in pancreatic tumor cell lines

Xiao-Ling Ding, Guo-Xiong Zhou, Xiao-Rong Zhou, Xiao-Ying Wang

Xiao-Ling Ding, Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Xiao-Rong Zhou, Xiao-Ying Wang, Department of Immunology, Medical College of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2004049

Correspondence to: Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. guoxiong_zhou@163.com

Received: 2008-09-27 Revised: 2008-10-21

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effects and the mechanism of triptolide (TL) on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer *in vitro*.

METHODS: Pancreatic tumor cell lines PANC-1, ASPC-1 and SW1990 were treated with different concentrations of TL for 24 h and then, cell death was determined by Typan Blue Staining. Annexin V/PI double staining was performed to evaluate TL-induced apoptosis using flow cytometry. The expression of 5-lipoxygenase (5-LOX) and concentration of its downstream product LTB₄

were determined by real time PCR, Western blot and ELISA. 5-LOX cDNA stable transfected SW1990 cells were established successfully. After treatment with TL, it was examined for over-expression of 5-LOX on TL-induced apoptosis.

RESULTS: TL induced prominent growth inhibition and apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. After treatment at 50 µg/L, the cell viability was 70.5% ± 6.8%, 61.2% ± 5.6% and 52.8% ± 5.3% of PANC-1, ASPC-1 and SW1990, respectively, which were significantly decreased compared with control group ($P < 0.05$). The apoptosis at 12 h evaluated by AnnexinV positive cells increased in TL-treated group compared with control group (24.2 ± 3.23 vs 9.5 ± 2.18 , $P < 0.05$). TL significantly down-regulated 5-LOX expression in these cell lines and decreased LTB₄ concentration in supernatant ($P < 0.01$, compared with control group). Furthermore, overexpression of 5-LOX in SW1990 cells made them more resistant to TL induced apoptosis, significantly inhibited the TL mediated cell death and apoptosis ($P < 0.01$ or 0.05 , compared with control group).

CONCLUSION: Inhibition of 5-LOX pathway of arachidonic acid metabolism is associated with TL's anti-proliferation and pro-apoptotic activity. It also provides evidence that TL has clinic therapeutic value for patients with pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Triptolide; 5-lipoxygenase

Ding XL, Zhou GX, Zhou XR, Wang XY. Triptolide suppresses 5-lipoxygenase metabolic pathway and induces apoptosis in pancreatic tumor cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3835-3839

摘要

目的: 探讨雷公藤内酯醇(triptolide, TL)通过抑制5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)代谢通路对胰腺癌细胞生长增殖及凋亡的影响。

方法: 台盼蓝染色检测TL对胰腺癌细胞

■背景资料

胰腺癌恶性度高, 预后差, 目前研究热点包括阐明胰腺癌发病的分子机制, 寻找早期诊断方法和开发新的治疗途径。

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■相关报道

近年来研究发现, TL可抑制多种肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡, 但分子机制仍不清楚。在胰腺癌发病机制方面, 发现胰腺癌细胞高表达5-LOX, 而抑制5-LOX代谢通路能诱导胰腺癌细胞凋亡。

PANC-1、ASPC-1和SW1990的杀伤作用; 流式细胞术分析凋亡率; Real-time PCR和Western blot检测TL对5-LOX表达的影响; ELISA检测5-LOX下游产物LTB₄的含量。构建5-LOX表达质粒, 筛选稳定转染的SW1990细胞株(SW1990/5-LOX), Western blot检测野生型、转染空质粒、转染5-LOX基因的SW1990细胞5-LOX蛋白表达水平, 并检测胰腺癌细胞高表达5-LOX对TL诱导凋亡的影响。

结果: TL能诱导胰腺癌细胞凋亡, TL 50 μg/L作用24 h后活细胞比例为PANC-1 70.5%±6.8%, ASPC-1 61.2%±5.6%, SW1990 52.8%±5.3%, 比对照组显著减少($P<0.05$); 凋亡细胞数12 h组与对照组相比, 有差异(24.2 ± 3.23 vs 9.5 ± 2.18 , $P<0.05$)。TL能显著抑制5-LOX表达及LTB₄生成。稳定转染后, 细胞内5-LOX蛋白表达量是Wt组的4倍左右, 培养上清中LTB₄表达水平也显著高于Wt组($P<0.01$)。过表达5-LOX使SW1990细胞增强了对TL诱导凋亡的抵抗作用, 细胞死亡和凋亡率均明显低于对照组($P<0.01$ 或 0.05)。

结论: TL可以在体外诱导胰腺癌细胞增殖抑制和细胞凋亡, 该效应与TL抑制5-LOX代谢通路的活性可能有直接关系, 提示TL可能开发成临床治疗胰腺癌的有效药物。

关键词: 胰腺癌; 雷公藤内酯醇; 5-脂氧合酶

丁晓凌, 周国雄, 周晓荣, 汪晓莺. 雷公藤内酯醇对5-LOX代谢通路和胰腺癌细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3835-3839
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3835.asp>

0 引言

胰腺癌是常见的恶性肿瘤之一, 5年生存率小于2%^[1-2], 确诊时多已属晚期, 丧失了根治性手术的机会。因此, 深入探讨发病机制, 寻找新的诊治手段是当前胰腺癌研究的热点。流行病学资料 and 动物研究表明高脂饮食, 特别是花生四烯酸(arachidonic acid, AA)和亚油酸等多不饱和脂肪酸的摄入增加与胰腺癌关系密切^[3-4]。5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)是催化AA转化为白三烯(leukotriene, LT)和5-羟基二十碳四烯酸(5-HETE)的关键酶。近年来有文献报道在胰腺癌组织中有5-LOX上调, 而且5-LOX阻断剂能够在体外抑制肿瘤细胞增殖, 并诱导细胞凋亡^[5], 提示干预5-LOX途径可能具有潜在的临床治疗胰腺癌的价值。雷公藤内酯醇(triptolide, TL)是

从卫矛科植物雷公藤中抽提到的三氧二萜内酯化合物单体, 具有显著的抗炎、免疫抑制作用^[6]。有资料表明, TL可抑制乳腺癌、前列腺癌、肺癌等多种肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡^[7-9]。我们研究了TL在体外对胰腺癌细胞增殖及凋亡的影响, 并探讨其抗肿瘤效应与抑制5-LOX代谢途径的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 TL购自福建医学科学研究所, 人胰腺癌细胞株SW1990细胞由上海交通大学附属第一人民医院消化内科王兴鹏教授惠赠。人胰腺癌细胞株ASPC-1购自上海中科院细胞库。人胰腺癌细胞株PANC-1由上海市免疫学研究所周芸惠赠。细胞在含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液常规培养, 于对数生长期时加入含TL的培养液作为处理组, 对照组加入含0.01% DMSO培养液。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖与凋亡检测: 台盼蓝染色检测TL对细胞增殖抑制作用。细胞培养对数期加入50 μg/L TL处理细胞, 收集细胞, 凋亡检测采用BD公司提供的ApoAlert Annexin-V kit, 2×10^5 细胞用PBS洗1次, 加入200 μL结合溶液并悬浮细胞, 再加5 μL Annexin V和5 μL PI置于室温避光15 min, 上流式细胞仪检测, Annexin V阳性代表凋亡细胞。

1.2.2 Real-time PCR: TRIzol提取总RNA, 逆转录定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司, $\Delta\Delta C_t$ 法对结果进行分析^[10]。引物序列如下: 5-LOX上游引物5'-ACCACGGAGATGGTAGAGTGCAG-3', 下游引物5'-GCAGCTCAAAGTCCACGATGAA-3'; β -actin上游引物5'-ATTGCCGACAGGATGCAG A-3', 下游引物5'-GAGTACTTGCGCTCAGGA GGA-3'。

1.2.3 质粒构建和转染: 从SW1990细胞克隆5-LOX的cDNA, 合成上游引物5'-CGCCATGCC CTCCTACACGGTCAC-3'和下游引物5'-CTGCT CGAGTGCTCAGATGGCCACACTGTT-3', 下游引物含Xho I 内切酶识别位点, PCR条件: 94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 4 min, 28个循环后72℃ 10 min中止。将5-LOX基因克隆到pGEMT-easy(Promega)载体中, 测序确认, 用EcoR和Xho I 双酶切, 将5-LOX cDNA插入表达质粒pcDNA3.1中(pcDNA3.1/5-LOX), 细胞转染用FuGENE 6转染试剂(Roche), 同时设pcDNA3.1空质粒转染组。用1 g/L G418(Calbiochem)筛选稳定

转染的细胞株,并以500 mg/L G418维持培养。

1.2.4 ELISA检测LTB₄含量: 检测试剂盒购自R&D公司,按说明书操作。

1.2.5 Western blot检测: 提取总蛋白,100 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳,转PVDF膜,含50 g/L脱脂奶粉的TBS封闭,1:1000加入抗5-LOX一抗(Cayman),4℃过夜,1:5000加入HRP标记二抗,作用2 h,ECL显色,曝光洗片。

统计学处理 采用STATA 7.0统计软件分析,数据以mean±SD表示,两组计量资料用 t 检验;多组计量资料用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为显著性判断水准。

2 结果

2.1 TL抑制胰腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡 用10、50、100 μg/L的TL处理PANC-1、ASPC-1和SW1990细胞,台盼兰试验可以检测到显著的细胞死亡。如图1所示,50 μg/L TL可以导致明显的细胞死亡,24 h后活细胞比例为PANC-1 70.5%±6.8%,ASPC-1 61.2%±5.6%,SW1990 52.8%±5.3%,比对照组(>95%)及10 μg/L组显著减少($P<0.05$)。

为了检测TL是否能诱导胰腺癌细胞凋亡,我们用50 μg/L TL作用SW1990细胞0-24 h,Annexin V/PI双染法流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果发现50 μg/L TL可使大量SW1990细胞凋亡,表现为Annexin V阳性细胞数明显增加,12 h组与对照组相比(24.2 ± 3.23 vs 9.5 ± 2.18 , $P<0.05$)。图2为其中一次实验结果。可见,TL对胰腺癌细胞株的杀伤作用与其诱导凋亡有关。

2.2 TL抑制胰腺癌细胞5-LOX表达以及LTB₄的产生 Western blot检测到在PANC-1、ASPC-1和SW1990细胞株中均有5-LOX蛋白的表达(图3A)。用50 μg/L TL处理细胞,Real time PCR检测5-LOX基因的表达。结果发现,TL可以显著抑制PANC-1、ASPC-1和SW1990细胞5-LOX mRNA表达(图3B),图中倍率变化(fold)表示TL处理后与处理前5-LOX mRNA比值(以β-actin为内参校准)。这种抑制作用在TL处理后2 h就可以观察到,12 h后更加明显,提示5-LOX可能是TL的靶基因。

进一步,我们用50 μg/L TL处理SW1990细胞,Western blot检测细胞中5-LOX蛋白表达情况。结果发现,TL可以显著抑制SW1990细胞5-LOX蛋白表达(图4A)。ELISA检测证实不同浓度的TL作用SW1990细胞6 h后,上清中5-LOX的

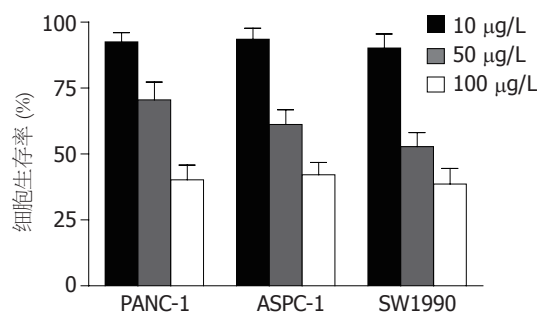


图1 TL对胰腺癌细胞PANC-1、ASPC-1和SW1990的杀伤作用。

主要产物LTB₄的浓度明显下降,这与TL抑制肿瘤细胞表达5-LOX是一致的(图4B)。

2.3 过表达5-LOX增强SW1990抵抗TL诱导的凋亡 为探讨抑制5-LOX表达是否直接参与TL诱导的细胞凋亡,构建了5-LOX表达质粒,并筛选到稳定转染的SW1990细胞株(SW1990/5-LOX)。Western blot检测野生型(Wt组)、转染空质粒(Pc3组)、转染5-LOX基因(5-LOX组)的SW1990细胞5-LOX蛋白表达水平,结果显示(图5A),在稳定转染的细胞株中,5-LOX表达量是野生型SW1990的4倍左右。此外,ELISA结果证实,5-LOX组细胞培养上清中LTB₄表达水平显著高于Wt组($P<0.01$,图5B)。

虽然细胞增殖结果表明,5-LOX转染没有改变细胞正常的生长状态(数据未列出)。但我们发现,50 μg/L TL处理以上三组细胞后,SW1990/5-LOX细胞死亡明显少于空质粒转染对照组和野生组($P<0.05$,图6A)。而且,50 μg/L TL处理24 h后凋亡细胞(以Annexin V阳性细胞计)也明显低于空质粒转染对照组(图6B, $P<0.01$)。这些结果显示:过表达5-LOX可以显著抑制TL诱导的SW1990细胞凋亡。

3 讨论

20世纪70年代以来,我国医学工作者发现TL能够治疗多种白血病,甚至使患者痊愈。近几年对TL的抗肿瘤研究方兴未艾,引起国内外医药界的广泛重视。本研究发现,TL可以诱导人胰腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,提示TL可能开发成临床治疗胰腺癌的有效药物。深入研究发现,TL可以抑制肿瘤细胞5-LOX基因的表达,我们还证明,下调5-LOX表达与TL促凋亡的作用密切相关。

研究表明^[1],在胰腺癌及癌早期病变中均检测到5-LOX表达上调。在人胰腺癌组织中,免疫组化研究也证实5-LOX蛋白表达增加,但在正常胰导管细胞中不表达5-LOX。此外,5-LOX下游

■应用要点

本研究结果显示TL通过抑制细胞5-LOX代谢诱导胰腺癌细胞凋亡,加深了对TL抗肿瘤分子机制的理解,提示TL具有潜在的用于临床治疗胰腺癌的价值。

同行评价

该文章研究方法先进, 讨论客观, 行文流畅, 对探索临床治疗胰腺癌新的药物, 有重要指导意义。

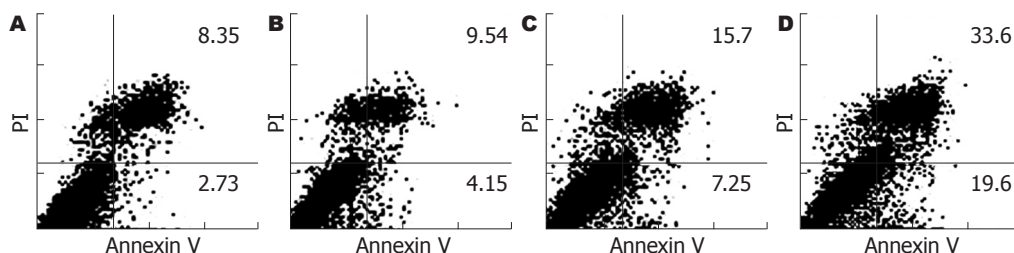


图 2 TL(50 μ g/L)诱导SW1990细胞凋亡。A: 0 h; B: 6 h; C: 12 h; D: 24 h。

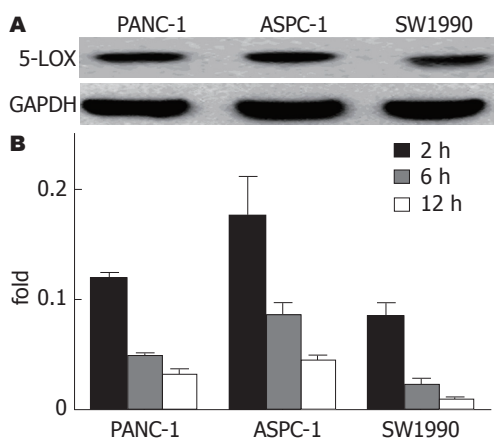


图 3 胰腺癌细胞株5-LOX表达。A: 胰腺癌细胞株5-LOX蛋白; B: 胰腺癌细胞5-LOX mRNA。

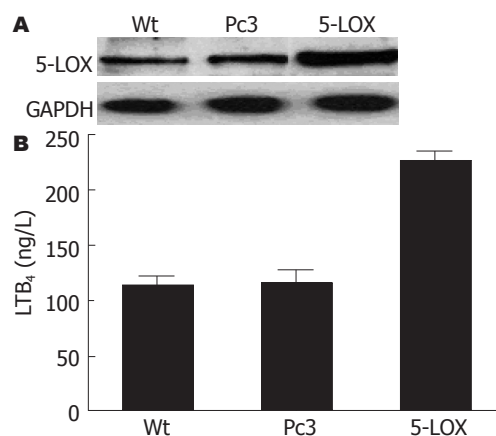


图 5 稳定转染的SW1990细胞表达5-LOX蛋白和上清LTB₄含量情况。A: 5-LOX; B: LTB₄。

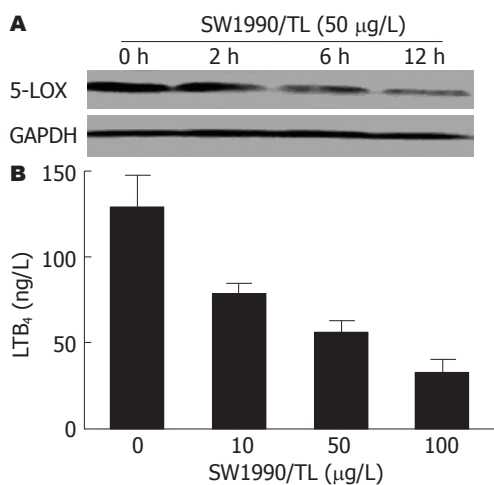


图 4 TL对SW1990细胞5-LOX和LTB₄表达的影响。A: 5-LOX; B: LTB₄。

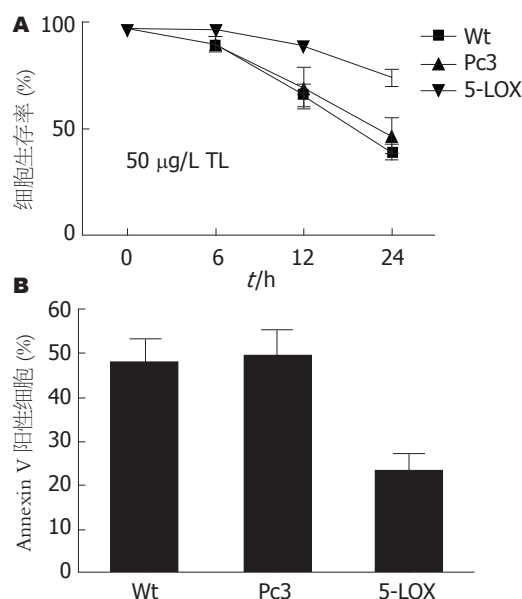


图 6 过表达5-LOX对TL诱导的SW1990细胞凋亡的影响。

主要产物LTB₄也在胰腺癌组织, 而不是正常导管细胞中有高水平表达, 这些结果提示, 5-LOX在胰腺癌高表达可能与肿瘤细胞发生发展有关。已有研究发现, 5-LOX抑制剂通过抑制其酶活性可以抑制胰腺癌移植瘤的生长^[12-13]。在本研究中, TL被证明不仅能抑制5-LOX基因的表达, 而且可以抑制LTB₄的生成。这一方面加深了我们对TL作用机制的了解; 另一方面, 既然TL能抑制胰腺癌细胞中5-LOX代谢途径, 协同使用TL和特

异性酶抑制剂, 比如齐留通等, 能否进一步增强抗肿瘤效应是值得尝试的课题。

我们还观察到, 高表达5-LOX的胰腺癌细胞在一定程度上抵抗TL诱导的凋亡作用。这表明, 抑制5-LOX代谢途径与TL促凋亡的活性可能有直接的关系。另外, 在临床治疗中, 常规化疗药物往往对胰腺癌患者没有明显效果^[14], 我

们推测, 胰腺癌细胞高表达5-LOX的特征可能与这种低反应性有关. 到目前为止, TL抑制胰腺癌细胞5-LOX表达的机制还不清楚, 早期研究提示, TL通过阻断NF- κ B反式激活来发挥免疫抑制作用^[15]. 在5-LOX基因启动子中, 存在数个与NF- κ B相互作用的保守区^[16]. TL是否通过NF- κ B来抑制5-LOX表达还有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Germanos S, Gourgiotis S, Stavrothanasopoulou A, Alepas P, Zampitis N, Panteli A. Diagnostic and therapeutic approach to pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15: 257-263
- 2 郭晓钟. 重视我国胰腺癌的研究现状及发展趋势. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3161-3162
- 3 Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 10
- 4 周国雄, 丁晓凌. 花生四烯酸代谢通路与胰腺癌. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1483-1486
- 5 Hennig R, Ding XZ, Tong WG, Schneider MB, Standop J, Friess H, Büchler MW, Pour PM, Adrian TE. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am J Pathol* 2002; 161: 421-428
- 6 Chen BJ. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 253-265
- 7 丁晓凌, 周国雄. 雷公藤内酯醇诱导肿瘤细胞凋亡的机制. 国际肿瘤学杂志 2006; 33: 259-261
- 8 Carter BZ, Mak DH, Schober WD, McQueen T, Harris D, Estrov Z, Evans RL, Andreeff M. Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemic cells. *Blood* 2006; 108: 630-637
- 9 Miyata Y, Sato T, Ito A. Triptolide, a diterpenoid triepoxide, induces antitumor proliferation via activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1 by decreasing phosphatidylinositol 3-kinase activity in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 1081-1086
- 10 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
- 11 Hennig R, Grippo P, Ding XZ, Rao SM, Buchler MW, Friess H, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE. 5-Lipoxygenase, a marker for early pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Cancer Res* 2005; 65: 6011-6016
- 12 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 929-935
- 13 周国雄, 吴深宝, 黄介飞, 张弘, 魏群, 鄂群. 5-脂氧合酶特异性抑制剂对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响. 中华消化杂志 2005; 25: 689-691
- 14 Shi X, Liu S, Kleeff J, Friess H, Büchler MW. Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes. *Oncology* 2002; 62: 354-362
- 15 Qiu D, Zhao G, Aoki Y, Shi L, Uyei A, Nazarian S, Ng JC, Kao PN. Immunosuppressant PG490 (triptolide) inhibits T-cell interleukin-2 expression at the level of purine-box/nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcriptional activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 13443-13450
- 16 Silverman ES, Le L, Baron RM, Hallock A, Hjoberg J, Shikanai T, Storm van's Gravesande K, Auron PE, Lu W. Cloning and functional analysis of the mouse 5-lipoxygenase promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 475-483

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/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/tgxx.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

慢性浅表性胃炎脾胃湿热证胃黏膜G、D细胞变化及胃泌素、生长抑素的表达

吴娟, 田德禄

■背景资料

运用现代研究方法, 从胃黏膜内分泌细胞(G、D细胞)和胃肠激素(GAS、SS)方面, 探讨脾胃湿热证的病理基础, 为揭示中医证本质提供理论依据。

吴娟, 北京电力医院消化科 北京市 100073
田德禄, 北京中医药大学东直门医院消化科 北京市 100700
吴娟, 博士, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的临床研究。
作者贡献分布: 病例资料的收集、整理、分析和本文撰写由吴娟完成; 文章思路由田德禄提出并对文章进行审阅, 提出修改意见。
通讯作者: 吴娟, 100073, 北京市丰台区太平桥西里甲1号, 北京电力医院消化科. wujuanzi@yahoo.com.cn
电话: 010-63467631-8602
收稿日期: 2008-08-17 修回日期: 2008-09-24
接受日期: 2008-10-07 在线出版日期: 2008-12-08

Changes of G and D cells and expression of gastrin and somatostatin in gastric mucosa of chronic superficial gastritis with spleen-stomach dampness-heat syndrome

Juan Wu, De-Lu Tian

Juan Wu, Department of Gastroenterology, Beijing Hospital of Electronic Power, Beijing 100073, China
De-Lu Tian, Department of Gastroenterology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Correspondence to: Dr. Juan Wu, Department of Gastroenterology, Beijing Hospital of Electronic Power, 1 Taipingqiao Xilijia, Fengtai District, Beijing 100073, China. wujuanzi@yahoo.com.cn

Received: 2008-08-17 Revised: 2008-09-24

Accepted: 2008-10-07 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To explore the changes of G and D cells, and expression of gastrin and somatostatin in gastric mucosa of chronic superficial gastritis with spleen-stomach dampness-heat syndrome.

METHODS: Seventy patients were divided into two groups: spleen-stomach dampness-heat syndrome group ($n = 38$) and spleen-stomach weakness syndrome group ($n = 32$). Immunohistochemical methods were used to detect the amounts of G and D cells, expression of gastrin and somatostatin in gastric mucosa.

RESULTS: Compared with the spleen-stomach weakness syndrome group, spleen-stomach dampness-heat syndrome group showed sig-

nificant difference in amounts of G and D cells, G/D, expression of gastrin and somatostatin in gastric mucosa (130.54 ± 35.62 vs 111.13 ± 23.79 , 54.98 ± 19.63 vs 67.01 ± 21.56 , 2.74 ± 1.36 vs 1.87 ± 1.36 , 34.72 ± 17.24 vs 27.72 ± 14.23 , 13.90 ± 7.22 vs 19.23 ± 7.96 , $P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: Elevated G cell level leads to raised gastrin expression, decreased D cell level leads to lower somatostatin expression, which may be pathological basis for spleen-stomach dampness-heat syndrome. Elevated D cell level leads to lower somatostatin expression, decreased G cell level leads to lower gastrin expression, which may be the pathological basis for spleen-stomach weakness syndrome.

Key Words: Chronic superficial gastritis; Splenogastric hydropyrexia syndrome; G cells; D cells; Gastrin; Somatostatin

Wu J, Tian DL. Changes of G and D cells and expression of gastrin and somatostatin in gastric mucosa of chronic superficial gastritis with spleen-stomach dampness-heat syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3840-3843

摘要

目的: 探讨慢性浅表性胃炎脾胃湿热证患者胃黏膜G、D细胞的变化及胃泌素和生长抑素表达的意义。

方法: 2004-05/2005-03北京市东直门医院消化科门诊或住院的慢性浅表性胃炎患者70例, 其中脾胃湿热证38例, 脾胃虚弱证32例。用免疫组化的方法检测患者胃黏膜中G、D细胞的数目和胃泌素和生长抑素表达的量值。

结果: 与脾虚组比较, 湿热组胃黏膜G细胞数目, D细胞数目, G、D细胞比值, G细胞总面积即Gas表达量, D细胞总面积即SS的表达量有显著性差异(130.54 ± 35.62 vs 111.13 ± 23.79 , 54.98 ± 19.63 vs 67.01 ± 21.56 , 2.74 ± 1.36 vs 1.87 ± 1.36 , 34.72 ± 17.24 vs 27.72 ± 14.23 , 13.90 ± 7.22 vs 19.23 ± 7.96 , $P < 0.05$ 或 0.01)。

■同行评议者

高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

结论: G细胞增多,胃黏膜Gas增多,D细胞减少,胃黏膜SS减少,可能是湿热证的病理基础;而D细胞增多,胃黏膜SS分泌亢进,G细胞减少,胃黏膜Gas水平低下,可能是脾虚证的病理基础。

关键词: 慢性浅表性胃炎;脾胃湿热证;G细胞;D细胞;胃泌素;生长抑素

吴娟,田德禄.慢性浅表性胃炎脾胃湿热证胃黏膜G、D细胞变化及胃泌素、生长抑素的表达.世界华人消化杂志 2008;16(34):3840-3843
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3840.asp>

0 引言

胃黏膜的G细胞和D细胞是消化道重要的分泌细胞,其分泌的胃泌素(gastrin, Gas)和生长抑素(somatostatin, SS)对保持胃酸分泌平衡和维持正常胃肠功能有着重要的意义。脾胃湿热证和脾虚证是脾胃病的常见证型。本研究以慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)患者为对象,探讨脾胃湿热证和脾虚证患者胃黏膜G、D细胞的变化及意义,以揭示中医证的本质,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-05/2005-03北京东直门医院消化科门诊或住院患者共70例,经胃镜、病理组织学检查,确诊为CSG的患者,年龄18-60岁。中医辨证参照《中药新药临床研究指导原则》^[1]“中药新药治疗CSG临床研究指导原则”的诊断标准。其中脾胃湿热证38例,男25例,女13例,平均年龄 36.4 ± 7.2 岁,病程 1.78 ± 0.56 年;脾胃虚弱证32例,男15例,女17例,平均年龄 41.6 ± 8.9 岁,病程 2.98 ± 0.63 年。均除外合并有溃疡病,胃黏膜有中、重度萎缩和/或异型增生,或病理诊断疑有恶变者;有严重的心肝肺肾等脏器疾病者。两组性别、年龄、病程,经 χ^2 检验,无统计学意义。兔抗人Gas多克隆抗体、兔抗人SS多克隆抗体、PV二步法检测试剂盒(Non-Biotin HRP Detectin Systnm. HRP)、DAB显色试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。美国Diagnostic公司真彩色SPOT II图像分析系统,配套分析软件为美国letamorph公司的Meta Morph图像分析软件。

1.2 方法 胃镜直视下在胃窦部距幽门2-3 cm的大、小弯取2块组织,迅速放入浓度100 g/L的甲醛固定,常规石蜡包埋。用免疫组化二步法染色。抗人Gas多克隆抗体及抗人SS抗体为工作液,对照片用PBS代替第一抗体,其余步骤与实验片相同。染色方法:将组织蜡块4 μm 连续切片,黏于

防脱磨砂玻片上,58℃烤片3 h。切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2 室温封闭20 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,加一抗,放入37℃温箱,反应1 h,加PV-HRP,放入37℃温箱,反应30 min, DAB显色5-10 min,显微镜下观察染色结果,用苏木素轻度复染,脱水透明,中性树胶封片。组化染色的阳性切片为细胞质内出现棕黄色颗粒,对照片不显色。用SPOT II分析系统,在电视监视器显示下由主计算机系统进行处理,按照黄色色调的一定阈值分割阳性细胞,随机选取5个视野的图像,取其均数作为每张切片阳性细胞数目、面积和胞体灰度值。视野大小为 20×10 。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件,进行数据统计。计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,采用两独立样本的 t 检验。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 免疫组化染色后,深棕黄色阳性物质主要分布在G、D细胞的细胞质内,细胞核不着色。对照片为阴性。G、D细胞主要分布于胃窦黏膜中部的腺颈部附近,偶见于黏膜上部及下部。在低倍镜黏膜纵切面上见G、D细胞呈点状,分布成条带样,与胃黏膜表面平行,G细胞数目明显多于D细胞,排列较密集,D细胞分布较弥散。在高倍镜下,G细胞呈巢状分布,其形态呈梭形、三角形、圆形、椭圆形或不规则形,有的G细胞发出细长突起,末端呈棒状,伸向邻近细胞。D细胞形态与G细胞相似,似乎更不规则,突起更多见,细且长(图1-2)。

2.2 两组胃黏膜G、D细胞免疫组化图象分析 湿热组与脾虚组比较胃黏G细胞数目增多,D细胞数目减少,两组有明显差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。湿热组G/D细胞比值为 2.74 ± 1.36 ,脾虚组G/D细胞比值 1.87 ± 1.36 ,两组有明显差异($P < 0.05$)。湿热组与脾虚组比较G细胞总面积即Gas表达的量增多,D细胞总面积和D细胞总灰度即SS的表达量减少,两组均有明显的差异($P < 0.05$, $P < 0.01$,表1-2)。

3 讨论

胃黏膜的G细胞和D细胞分别合成与分泌Gas、SS, Gas刺激壁细胞分泌胃酸和营养黏膜的生长,SS以旁分泌方式调节G细胞Gas的分泌,并对胃肠道的分泌、吸收、运动功能有普遍的抑制作用,对胃黏膜有直接的保护作用。Gas和SS的平衡对保持胃黏膜胃酸分泌和维持正常胃肠道功能有着重要作用,而他们的分泌失调可以导致疾病,病理状态下又可导致其分泌失调。在胃黏

■研究前沿

目前研究认为慢性胃炎G、D细胞和GAS和SS的变化主要与*H. pylori*的感染有关,并逐渐形成一致结论。中医证型与胃黏膜内分泌细胞和胃肠激素的关系研究报道较少。

■应用要点

本文探讨不同中医证型存在相应的胃黏膜内分泌细胞和胃肠激素的变化, 这为中医证的研究和治疗提供了新的理论依据。

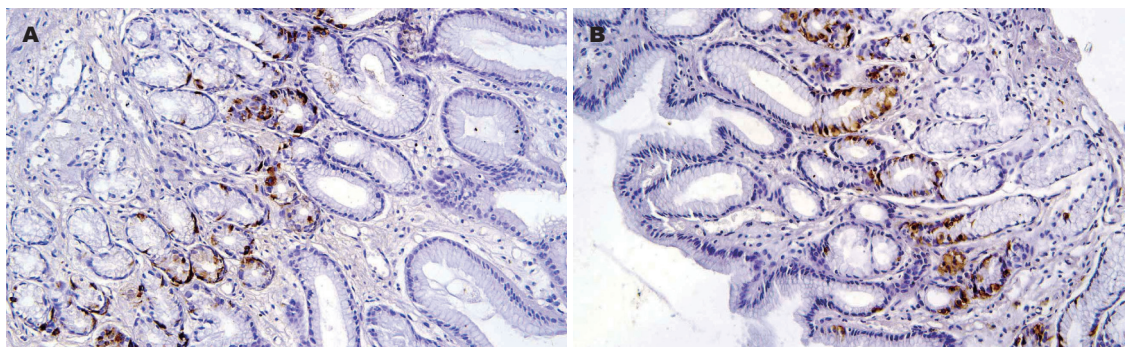


图1 G细胞形态和GAS的表达(组化染色20×10). A: 湿热组; B: 脾虚组.

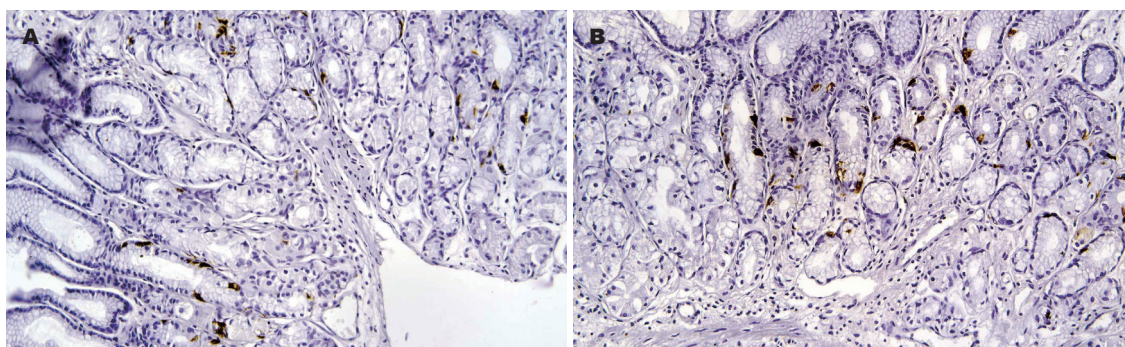


图2 D细胞形态和SS的表达(组化染色20×10). A: 湿热组; B: 脾虚组.

表1 CSG湿热组和脾虚组胃黏膜G、D细胞数目的比较 (mean ± SD)

分组	n	G细胞	D细胞	G/D
湿热组	38	130.54 ± 35.62 ^a	54.98 ± 19.63 ^b	2.74 ± 1.36 ^a
脾虚组	32	111.13 ± 23.79	67.01 ± 21.56	1.87 ± 1.36

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 脾虚组.

膜G细胞主要分布在胃窦部, D细胞在胃窦、胃体和胃底均有分布, 而以胃窦部较多. 胃黏膜内G、D细胞的比值相对恒定, 这有利于维持正常的胃肠功能^[2]. 有关正常人胃黏膜内G、D细胞数目及比值目前尚不清楚, 现有资料发现不论正常人或不同类型的胃炎患者, G细胞的数目均多于D细胞. 本研究显示, G、D细胞主要分布于胃窦黏膜中部的腺颈部附近, 偶见于黏膜上部及下部. G细胞数目明显多于D细胞, 排列较密集, D细胞分布较弥散. G细胞形态呈梭形、三角形、圆形、椭圆形或不规则形, 有的G细胞发出细长突起, 末端呈棒状, 伸向邻近细胞. D细胞形态与G细胞相似, 似乎更不规则, 突起更多见, 细且长. 与报道基本一致^[3-4].

慢性胃炎时Gas、SS的变化不尽一致, 多数学者研究表明: *H. pylori*感染者CSG与*H. pylori*阴性CSG比较, 血清和胃黏膜中Gas水平明显升高,

胃黏膜组织中SS水平明显降低, 而血清SS无变化^[5-7]; 胃窦黏膜内G细胞数目与正常组或*H. pylori*阴性组相比无明显变化, 但D细胞数目则显著性下降, 导致G/D细胞比值增大^[8]. 周凡 *et al*^[9]研究显示G、D细胞密度在CSG组与正常组比较无显著变化, 随着胃窦部黏膜萎缩程度的加重而G、D细胞数明显减少. 其中正常人G/D细胞比值为: 1.89±0.27; CSG和轻度CAG者为: 2.05±0.34和2.24±0.60, 略高于正常人; 中、重度CAG为: 1.78±0.30和1.53±0.24. G/D细胞比值, 正常组与重度萎缩组有显著性差异, 但与浅表组、轻度萎缩组、中度萎缩组无差异. 有关慢性胃炎中医证型和Gas、SS及G、D细胞的关系, 国内学者也有报道. 金敬善 *et al*^[10]首先报道了脾虚患者血清Gas含量降低, 认为脾虚证表现出的一系列消化道功能失调的症状和体征, 与Gas含量降低, 消化道功能处于低下或紊乱的病态有关. 宋于刚 *et al*^[11]发现, D细胞合成分泌功能亢进, 而G细胞合成分泌功能减弱, 可能是导致脾虚证胃肠功能障碍的重要病理机制. 武一曼 *et al*^[12]研究发现脾胃湿热型CSG胃窦黏膜G细胞数目显著高于脾虚组, D细胞数目显著低于脾虚组和正常组. 提示脾胃湿热证与G细胞数目增多, Gas水平的升高有关. 由于研究者的研究对象、方法等不同, 各组结果的量值明显不同, 但*H. pylori*感染、黏膜的

表 2 CSG湿热组和脾虚组胃黏膜Gas、SS表达的比较 (mean ± SD)

分组	n	G细胞总面积	G细胞总灰度	D细胞总面积	D细胞总灰度
湿热组	38	34.72 ± 17.24 ^b	31.87 ± 16.56	13.90 ± 7.22 ^b	20.34 ± 11.10 ^a
脾虚组	32	27.72 ± 14.23	31.34 ± 16.44	19.23 ± 7.96	24.63 ± 17.68

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 脾虚组.

炎症程度和病理改变, 甚至中医证型可能是影响Gas、SS水平的重要因素。

本研究显示: 湿热组与脾虚组比较胃黏膜G细胞数目增多, D细胞数目减少($P<0.05$, $P<0.01$); G细胞总面积即Gas表达的量增多, D细胞总面积和D细胞总灰度即SS的表达量减少($P<0.05$, $P<0.01$), G/D比值湿热组明显高于脾虚组($P<0.05$)。目前研究认为脾胃湿热证是急性、亚急性炎症的临床证候形式, 且“湿热”既是 *H. pylori* 感染的内在因素, 又是他赖以生长繁殖的环境^[13], 以致湿热证 *H. pylori* 感染率高, 代谢呈亢进特征, 免疫功能亢进、抗氧化功能减低^[14-16], 局部炎症反应强烈, 胃黏膜有相对严重的病理变化, 导致G、D细胞的数量和功能的改变, 引起Gas、SS分泌失调, 另一方面, 炎症所诱导产生的一系列的炎症介质和细胞因子, 可进一步影响Gas、SS的分泌, 加重两者的平衡失调。可以说湿热证存在更严重的Gas和SS平衡失调, 这不仅是引起湿热证一系列临床症状的一个重要原因, 也是湿热证炎症反应较重的一个反应。湿热组G细胞数、Gas表达的量增多, 可以使胃酸分泌增多, 胃黏膜生长增强; D细胞数和SS的表达量减少, 不仅减弱了对G细胞的抑制, 使胃酸分泌增多, 且对胃肠道抑制作用减弱, 使胃肠道运动等其他功能增强, 表现为一系列功能亢奋的状态。和湿热组比较脾虚组, 则表现出胃酸分泌减少, 消化功能减弱, 胃肠道运动等功能降低的状态。而湿热组以Gas作用增强为主, 脾虚组以SS的作用相对增强为主。这正好可以解释湿热证的主症, 是由于胃肠运动的过快, 不协调, 使正常的胃肠推进性的蠕动减弱, 胃排空减慢; 胃酸分泌过度, 加之胃排空减弱, 使胃酸胃内作用时间延长, 胃黏膜损害因子增加, 黏膜受损, 出现胃脘痞满、胃脘灼热、胃脘疼痛等“正盛邪实”的症状。而脾虚组由于胃肠道运动减弱、胃酸分泌减少、消化吸收功能等低下, 可出现食欲减退, 食后腹痛或腹胀, 肢体倦怠或神疲懒言和大便不正常(稀溏、先硬后溏或时溏时硬)等脾虚主症。

总之, 本研究提示G细胞增多, 胃黏膜Gas增多, D细胞减少, 胃黏膜SS减少, 可能是湿热证的病理基

础; 而D细胞增多, 胃黏膜SS分泌亢进, G细胞减少, 胃黏膜Gas水平低下, 可能是脾虚证的病理基础。

致谢: 感谢北京东直门医院消化科王玉芬、胃镜室刘常一、病理科鲁凤香和方杰等对本研究的大力支持。

4 参考文献

- 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行). 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 114-117
- Riepl RL, Lehnert P. The mediators of bile action on the exocrine pancreas. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 369-374
- 葛振华, 周凡, 武一曼, 唐福康, 王若愚, 周维湛. 人胃窦部胃泌素和生长抑素及其相关mRNA表达和定位的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2002; 11: 370-374
- 宋于刚, 何燕萍, 刘晓霞, 赖卓胜. 幽门螺杆菌感染后胃窦部G、D细胞变化的研究. *解放军医学杂志* 2002; 27: 688
- 胡文华, 徐采朴. 幽门螺杆菌相关性胃炎、溃疡病与胃泌素、生长抑素关系的研究. *第三军医大学学报* 1996; 18: 102-104
- Kim JH, Park HJ, Cho JS, Lee KS, Lee SI, Park IS, Kim CK. Relationship of CagA to serum gastrin concentrations and antral G, D cell densities in *Helicobacter pylori* infection. *Yonsei Med J* 1999; 40: 301-306
- 丁化, 纪徐准, 许国铭, 杜奕奇, 张洪富, 许爱芳. 幽门螺杆菌感染时血清胃泌素、生长抑素的表达. *第二军医大学学报* 1998; 19: 479-480
- 武一曼, 葛振华, 周凡, 唐福康, 王若愚, 任彦. 幽门螺旋杆菌对慢性胃炎患者胃窦黏膜内G、D细胞的影响. *解剖学报* 2004; 35: 220-223
- 周凡, 唐福康, 武一曼, 周维湛, 王若愚, 葛振华. 慢性胃炎与神经内分泌G、D细胞关系的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 2000; 9: 161-164
- 金敬善, 王广才, 张绳祖, 李伍善, 何俊仁, 王丽华, 危北海. 血清中胃泌素水平与脾虚证的关系. *中国中西医结合杂志* 1982; 2: 25-26
- 宋于刚, 姚永莉, 刘利民, 张万岱. 慢性胃病脾虚患者胃窦黏膜胃泌素细胞和分泌生长抑素细胞的变化及其意义. *中国中西医结合消化杂志* 2003; 11: 138-140
- 武一曼, 葛振华, 周凡, 任彦, 王若愚, 姚欣. 胃泌素、生长抑素与脾胃湿热证慢性浅表性胃炎的相关性研究. *中医杂志* 2004; 45: 215-216
- 杨春波, 柯晓, 李秀娟, 傅肖岩, 祁建生, 杨永昇. 脾胃湿热证的临床研究. *福建中医学院学报* 1999; 9: 31-36
- 祁建生, 杨春波, 汪碧萍. 慢性胃炎湿热证红细胞膜Na⁺、K⁺、ATPase与血清DBHase关系探讨. *新中医* 2001; 33: 30-31
- 杨春波, 傅肖岩, 柯晓, 黄守雄, 王启国, 葛振华, 胡洁. 慢性胃炎中医脾胃湿热证与免疫组织化学关系探讨. *中国中西医结合脾胃杂志* 1998; 6: 68-72
- 陈江华. 湿热证病人体液免疫状态观察. *中国中医急症* 1998; 8: 6-7

■同行评价

本文从中医辨证角度探讨慢性浅表性胃炎患者胃黏膜G、D细胞数量变化及免疫组化灰度代表胃泌素、生长抑素表达, 为进一步研究提供了一定的理论基础。

Dukes D期直肠癌的预后分析及治疗策略

王轶慧, 刘彦龙, 赵旭海, 姜世雄, 孙喜文, 王锡山

■背景资料

在我国, 结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 大约有20%的病例同时并发远处转移。在过去的10年间, 直肠癌的治疗已取得长足的进步, 比如TME的推广、放疗的精确性不断的提高以及术前放化疗的使用, 明显的改善了直肠癌根治术后复发率及生存率。但是, 直肠癌术后5年生存率未得到长足改善的原因, 除了局部复发和远处转移导致的治疗失败外, 主要是Dukes D期直肠癌治疗手段的缺乏。

王轶慧, 刘彦龙, 赵旭海, 姜世雄, 孙喜文, 王锡山, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科 黑龙江省哈尔滨市 150040
孙喜文, 黑龙江省肿瘤医院 黑龙江省哈尔滨市 150040
王轶慧, 主治医师, 主要从事腹部肿瘤的基础研究和外科治疗。

作者贡献分布: 王锡山负责文章的规划及设计; 王轶慧负责论文写作; 刘彦龙负责资料汇总; 赵旭海与姜世雄负责资料收集; 孙喜文负责数据分析。

通讯作者: 王锡山, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院腹外科。

wxshan1208@yahoo.com.cn

电话: 0451-86298898

收稿日期: 2008-09-26 修回日期: 2008-10-30

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-08

Prognosis analysis and treatment strategy for patients with Dukes D stage rectal cancer

Yi-Hui Wang, Yan-Long Liu, Xu-Hai Zhao, Shi-Xiong Jiang, Xi-Wen Sun, Xi-Shan Wang

Yi-Hui Wang, Yan-Long Liu, Xu-Hai Zhao, Shi-Xiong Jiang, Xi-Wen Sun, Xi-Shan Wang, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Xi-Wen Sun, Cancer Research Institute of Heilongjiang, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Xi-Shan Wang, Department of Abdominal Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. wxshan1208@yahoo.com.cn

Received: 2008-09-26 Revised: 2008-10-30

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the metastasis distribution, prognosis and treatment strategy for patients with Dukes D stage rectal cancer.

METHODS: Clinical data, type distribution and prognosis of 301 cases with Dukes D stage rectal cancer who underwent surgery from May 1991 to August 2003 were retrospectively analyzed using Log-rank and Kapla-Meier test.

RESULTS: The patients with Dukes D stage were associated with a mean OS (overall survival) of 32.50 ± 3.22 months, and OS rate were 64.61% (1 year), 26.40% (3 years) and 15.15% (5 years), respectively. The prognosis was related to factors such as gross type, tumor differentia-

tion, T stage and surgery type. 32.56% patients underwent side-side anastomosis and no primary-cancer-directed surgery, and 67.44% patients underwent primary-cancer-directed surgery. Patients had significantly benefited from palliative resection in terms of overall survival ($P = 0.0158$). The patients with Dukes D stage were 10.29% with peritoneal carcinomatosis, 32.55% with local infiltration, 40.53% with distant metastasis, and 16.61% with complex metastasis. The prognosis among metastasis type was not significantly different ($P = 0.4122$). Patients with synchronous liver metastases accounted for 51.4% of all cases, and 84.23% for distant metastasis, which had a mean OS of 32.50 ± 3.22 months and had relatively longer life expectancy.

CONCLUSION: Patients of Dukes D stage rectal cancer show no significant difference regardless of metastasis type, and primary-cancer-directed surgery should be actively performed and the postoperative OS rate and quality of life can be improved.

Key Words: Rectal cancer; Dukes D; Prognosis

Wang YH, Liu YL, Zhao XH, Jiang SX, Sun XW, Wang XS. Prognosis analysis and treatment strategy for patients with Dukes D stage rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3844-3848

摘要

目的: 探讨Dukes D期直肠癌的转移分布、预后及治疗策略。

方法: 收集1979-05/2003-08我院诊断为Dukes D直肠癌并行手术干预治疗的患者301例, 运用Log-rank和Kapla-Meier检测方法回顾性分析患者临床病理资料, 直肠癌的类型分布及预后。

结果: Dukes D期直肠癌患者平均生存 32.50 ± 3.22 mo, 1、3、5年整体生存率为64.61%、26.40%和15.15%; 肿瘤的大体类型、组织类型、浸润深度和手术方式影响患者的预后; 行单纯造瘘的病例占32.56%, 姑息性手术的病例占67.44%, 且行姑息性手术者生存显著获益($P = 0.0158$); 伴有腹膜种植的病例占

■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科

10.29%, 伴有局部浸润的病例占32.55%, 伴有远处转移的病例占40.53%, 术中伴有复合转移(合并两种或两种以上转移类型)的病例占16.61%, 其预后无差异($P = 0.4122$); 发生肝转移的病例占有所有病例的51.4%, 占有远处转移患者的84.23%, 平均生存时间为 32.50 ± 3.22 mo, 行根治术者的生存时间相对较长。

结论: Dukes D期直肠癌中, 各种转移类型的病例预后无差异, 手术切除原发灶可助患者生存获益。

关键词: 直肠癌; Dukes D期; 预后

王轶慧, 刘彦龙, 赵旭海, 姜世雄, 孙喜文, 王锡山. Dukes D期直肠癌的预后分析及治疗策略. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3844-3848

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3844.asp>

0 引言

大肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 起病隐匿, 出现临床症状已属晚期, 部分患者已发生远处转移。有资料显示在所有的结直肠癌患者中, Dukes D期患者大约占20%, 其中仅有大约15%-30%的患者可行根治性切除^[1]。当前, 如何合理处理Dukes D期直肠癌一直是学术界讨论的热点和难点^[2]。本文总结分析我院24年收治的Dukes D直肠癌患者, 旨在了解Dukes D期直肠癌的临床病理资料特点及预后差异, 为制定合理的治疗方案和预后进行指导。

1 材料和方法

1.1 材料 收集1979-05/2003-08在我院住院诊断为Dukes D直肠癌, 并且行手术干预治疗的患者301例。其中男187例, 女114例; 年龄16-83(平均50.6)岁, 其中 ≤ 60 岁者214例, > 60 岁者87例; 病灶位于腹膜返折以上的病例180例, 腹膜返折以下者121例; 手术行Miles者107例, Dixon者63例, Hartmann者33例, 单纯造瘘者98例; 术后病理报告是高中分化腺癌者222例, 黏液腺癌者67例, 印戒细胞癌者12例; 大体类型为增殖型者55例, 溃疡型者84例, 浸润型者63例, 资料缺失者99例; 浸润深度T中包括T₁者1例, T₂者38例, T₃者48例, T₄者214例。每位患者均有完整的随访纪录。

统计学处理 汇总Dukes D期直肠癌患者的临床病理资料, 分析Dukes D期直肠癌的类型分布及预后特点, 其中单因素生存率计算用Kaplan-Meier法, 组间的生存率比较用Log-rank检验。所有处理均采用SPSS11.5统计软件包。

2 结果

2.1 Dukes D期直肠癌患者预后影响因素的分析 在所有的临床病理资料中, 肿瘤的大体类型、组织类型、浸润深度和手术方式影响患者的预后。其中, 肿瘤大体类型为浸润型、肿瘤侵犯浆膜层、组织类型为低分化和黏液腺癌以及行单纯造瘘术的患者的预后最差。行单纯造瘘的病例占32.56%(98/301), 姑息性手术的病例占67.44%(203/301), 且行姑息性手术者生存显著获益($P = 0.0158$)。Dukes D期直肠癌患者平均生存 32.50 ± 3.22 mo, 1、3、5年生存率为64.61%、26.40%和15.15%(表1)。

2.2 Dukes D期直肠癌的类型分布及预后 在301例病例中, 术中发现伴有单纯腹膜种植的病例占10.29%(31/301), 平均生存期为 43.76 ± 12.17 mo; 术中伴有单纯局部浸润的病例占32.55%(98/301), 平均生存期为 28.49 ± 4.68 mo; 伴有单纯远处转移的病例占40.53%(122/301), 平均生存期为 34.04 ± 3.61 mo; 术中伴有复合转移(合并两种或两种以上转移类型)的病例占16.61%(50/301), 平均生存 42.02 ± 13.71 ; 这四种转移类型的病例平均生存时间无差异($P = 0.4122$, 图1, 表2)。

2.3 Dukes D期直肠癌中发生远处脏器转移的预后 在301例病例中, 发生肝转移的病例占51.4%(155/301), 平均生存时间为 32.50 ± 3.22 个月。发生肺脏转移的病例占2.6%(8/301), 平均生存时间为 25.63 ± 6.14 mo。骨转移的病例占1.3%(4/301), 平均生存时间为 31.00 ± 13.69 (表3)。

3 讨论

直肠癌播散途径一般有直接浸润、种植播散、淋巴道转移和血道转移四种类型。在本组总结的所有Dukes D期的直肠癌病例中, 伴有腹膜种植的病例占10.29%, 伴有局部浸润的病例占32.55%, 伴有远处转移的病例占40.53%, 术中伴有复合转移(合并两种或两种以上转移类型)的病例占16.61%, 以局部浸润和远处转移的病例居多。经统计学分析, 这四种转移类型的病例平均生存时间无差异。但是, 伴有局部浸润的患者生存期相对最短, 这主要是因为这类患者大多数无法切除原发肿瘤, 只能行单纯造瘘术, Joffe *et al*^[3]报道单纯造瘘术是不能延长患者的生存期。在Dukes D期患者中, 发生肝转移的病例占51.4%(155/301), 占有远处转移患者的84.23%, 发生肺脏、骨等处转移的病例较少。Welch *et al*曾提出“转移级联学说”即原发灶首先转移到

■ 研发前沿

国内外学者, 尤其是国外学者研究Dukes D期直肠癌的重心在于手术干预时机的选择, 比如直肠癌同时性伴发肝转移的处理及无症状的不可根治的Dukes D直肠癌的处理, 这些都缺乏前瞻性研究。

■相关报道

目前为止,对于并发不可切除的肝转移且无症状Dukes D期直肠癌原发灶的处理有两种观点:一种是积极切除原发灶;另一种是先行放化疗,延迟手术干预。特别是由于化疗新药的不断出现以及腔内支架的使用,部分患者由不可根治变为根治,所以Dukes D期早期手术的价值应重新评估。

表 1 Dukes D期直肠癌患者的整体生存率及平均生存时间的对比

分组	n	1年整体生存率	3年整体生存率	5年整体生存率	平均生存时间(mo)	时序检验值	P值
年龄						0.58	0.4475
≤60	214	0.6253 ± 0.0340	0.226 ± 0.0322	0.108 ± 0.0265	31.0 ± 3.24		
>60	87	0.667 ± 0.0514	0.302 ± 0.0534	0.240 ± 0.0532	34.4 ± 4.50		
性别						0.49	0.4845
男	187	0.596 ± 0.0369	0.231 ± 0.0344	0.146 ± 0.0316	30.6 ± 3.12		
女	114	0.703 ± 0.0434	0.280 ± 0.0462	0.148 ± 0.0406	34.1 ± 4.67		
原发灶部位						0.01	0.9145
腹膜返折上	180	0.583 ± 0.0374	0.271 ± 0.0355	0.167 ± 0.0325	33.9 ± 3.84		
腹膜返折下	121	0.722 ± 0.0419	0.209 ± 0.0434	0.106 ± 0.0374	28.3 ± 2.76		
大体类型						9.93	0.0191
增殖型	55	0.652 ± 0.0645	0.380 ± 0.0693	0.256 ± 0.0700	40.9 ± 6.70		
溃疡型	84	0.779 ± 0.0459	0.289 ± 0.0541	0.144 ± 0.0451	36.2 ± 4.78		
浸润型	63	0.571 ± 0.0641	0.191 ± 0.0583	0.152 ± 0.0579	26.4 ± 4.39		
缺失组	99	0.546 ± 0.0521	0.174 ± 0.0430	0.095 ± 0.0357	27.2 ± 5.20		
组织类型						5.57	0.0618
高-中分化腺癌	222	0.682 ± 0.0320	0.271 ± 0.0334	0.169 ± 0.0307	34.0 ± 2.98		
低分化腺癌	67	0.522 ± 0.0622	0.182 ± 0.0506	0.075 ± 0.0382	25.8 ± 5.58		
黏液腺癌	12	0.420 ± 0.1763	0	0	17.7 ± 5.27		
浸润深度						25.37	0.0000
T ₁	1	0	0	0	5.00 ± 0.00		
T ₂	38	0.789 ± 0.0661	0.445 ± 0.0838	0.287 ± 0.0837	43.9 ± 7.23		
T ₃	48	0.787 ± 0.0596	0.364 ± 0.0720	0.253 ± 0.0682	51.3 ± 9.16		
T ₄	214	0.593 ± 0.0348	0.179 ± 0.0312	0.084 ± 0.0258	24.3 ± 2.31		
手术方式						11.74	0.0194
Miles	107	0.625 ± 0.0489	0.348 ± 0.0506	0.266 ± 0.0504	42.3 ± 6.16		
Dixon	63	0.739 ± 0.0578	0.244 ± 0.0624	0.104 ± 0.0529	31.0 ± 4.18		
Hartmann	33	0.776 ± 0.0806	0.252 ± 0.0954	0.126 ± 0.0791	34.5 ± 7.15		
单纯造瘘	98	0.541 ± 0.0525	0.164 ± 0.0425	0.082 ± 0.0343	22.9 ± 3.47		
手术性质						1.21	0.2720
R0	7	0.714 ± 0.1707	0.476 ± 0.2253	0.238 ± 0.2026	56.3 ± 28.0		
R1	294	0.636 ± 0.0287	0.244 ± 0.0278	0.143 ± 0.0250	31.3 ± 2.62		

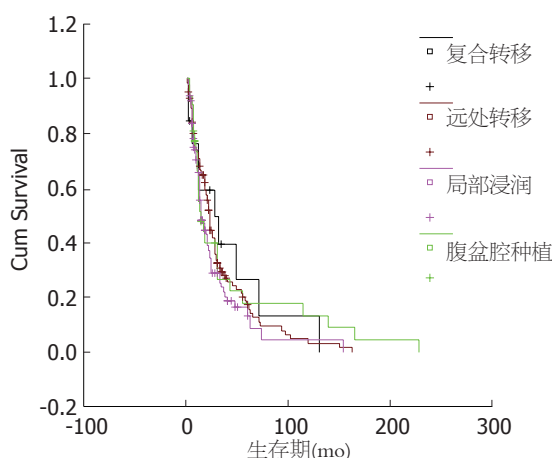


图 1 Dukes D期中各种转移类型直肠癌的预后。

肝脏,再通过肝动脉转移到肺、骨和其他部位^[4]。

在本组资料中,在伴有肝脏转移的病例中,同时肺转移病例有3例,同时伴有骨转移的病例有2例,同时伴有其他脏器转移的病例有4例,由于病例数较少,尚不能支持此理论。但是我们发现,在所有伴有局部浸润的病例中,同时伴有肝转移的病例占24.85%,同时伴有腹膜种植的病例占28.24%,这就提示我们当直肠癌患者处于局部晚期的时候,除了注重原发灶的清除^[5-6]之外,更要注重全身系统评估,以制定合理的治疗方案。

在Dukes D期结直肠癌患者中,原发灶切除的作用一直受到争议,其主要焦点集中于当患者并发不可切除的肝转移且无症状时如何处理原发灶。目前为止,有两种观点。传统观点认为应切除原发灶,其原因在于:(1)防止局部肿瘤的并发症,如疼痛、出血、梗阻和穿孔;(2)降低肿

表 2 Dukes D期直肠癌的类型分布及预后情况

转移类型	<i>n</i>	1年整体生存率	3年整体生存率	5年整体生存率	平均生存时间(mo)	时序检验值	<i>P</i> 值
腹膜种植	31	0.552 ± 0.0934	0.2658 ± 0.0886	0.1772 ± 0.0781	43.76 ± 12.17	2.87	0.4122
局部浸润	98	0.658 ± 0.0492	0.2362 ± 0.0500	0.1299 ± 0.0472	28.49 ± 4.68		
远处转移	122	0.706 ± 0.417	0.2933 ± 0.0444	0.1725 ± 0.0406	34.04 ± 3.61		
复合转移	50	0.592 ± 0.141	0.3949 ± 0.1478	0.2632 ± 0.1458	42.02 ± 13.71		

■应用要点

本文重点探讨不同类型的Dukes D期直肠癌的分布、预后及其相关因素, 并指出切除原发灶可使患者受益。

表 3 并发远处脏器转移的直肠癌患者预后情况

远处转移	<i>n</i>	1年整体生存率	3年整体生存率	5年整体生存率	平均生存时间(mo)
肝脏	155	0.659 ± 0.0388	0.274 ± 0.0392	0.176 ± 0.0365	32.50 ± 3.22
肺脏	8	0.750 ± 0.1531	0.125 ± 0.1169	0	25.63 ± 6.14
骨	4	0.500 ± 0.2500	0.250 ± 0.2165	0	31.00 ± 13.69
其他	17	0.756 ± 0.1063	0.544 ± 0.1548	0.272 ± 0.2075	40.45 ± 6.39

瘤负荷, 为进一步治疗创造条件; (3)相比较于未切除者, 生存和生活质量可获益^[7-9]。而另一种观点认为, 切除原发灶的目的在于防止急性肠梗阻, 因为伴发肠梗阻的患者术后具有较高的死亡率^[10], 所以针对这样的患者应首先立即进行系统化疗^[11-12], 手术切除原发灶可能导致延迟或者妨碍系统化疗。Tebbutt *et al*^[13]通过对伴有远处转移的患者进行随机化疗后, 发现相对于切除原发灶的患者, 未切除原发灶的患者并发肠痿、肠梗阻及腹膜炎的发生率没有区别, 从而说明无症状的Dukes D结直肠癌患者能够耐受化疗而不影响原发灶的切除。Goldberg *et al*^[14]和Tournigand *et al*^[15]的研究认为早期化疗效果较好, 其反应率超过50%, 中位生存期为20 mo。同样, Simmonds的结论也证实了晚期直肠癌进行化疗能够减轻症状, 并能使生存受益^[16], 部分患者化疗后手术可提高整体生存^[17]。当前, 由于化疗新药^[18-20]的不断出现以及腔内支架的使用, 部分患者由不可根治变为根治。对于无症状的不可根治的Dukes D直肠癌患者是否进行即刻手术还是延迟手术干预的前瞻性研究还未见报道, 所以Dukes D期早期手术的价值应重新评估。

但是在我国, 大肠癌一旦诊断多为中晚期, 常常伴有明显的症状, 所以上述关于无症状型Dukes D期大肠癌的治疗方案尚缺乏指导价值。夏振龙 *et al*报导Dukes D期大肠癌自然生存期仅数月-1年, 尤其是有肝转移者, 平均生存期为5-10 mo, 也有报道半年生存率为零^[21]。在本组资料中, Dukes D期直肠癌患者平均生存33 mo, 1、3、5

年生存率为64.6%、26.4%和17.4%, 而伴肝转移者, 平均生存期为32.50 ± 3.22 mo, 这些患者多数是在有明显症状的情况下发现并进行手术干预。肿瘤的大体类型、组织类型、浸润深度和手术方式影响患者的预后。其中, 肿瘤大体类型为浸润型、肿瘤侵犯浆膜层、组织类型为低分化和黏液腺癌以及行单纯造瘘术的患者的预后最差。以往的资料^[22-24]显示, Dukes D期结直肠癌的手术效果与肝转移程度、腹膜种植、原发肿瘤切除、肿瘤的分化程度、年龄是否大于75岁以及心血管疾病有关。由于伴发肝转移与腹膜种植的直肠癌患者预后无差别, 我们没有分析其对手术效果的影响。同时, 相对于单纯造瘘术者, 其余三种术式的效果均具有显著差异, 这是因为单纯造瘘的患者其共性为浸润型、分化差以及“冰冻骨盆”状态; 同时也说明原发灶的切除可以使患者的生存获益; Dukes D期伴肝转移的直肠癌经根治术后生存期高于姑息性切除, 但由于资料偏少未显示出统计学差异。这个结论与一些报道相吻合^[25-30]。所以, 对于有症状的Dukes D期大肠癌患者, 积极手术治疗无论对患者生存期还是生活质量均有较明显改善。在娴熟的手术技巧基础上, 凡术中探查能切除者应尽可能切除, 由于切除了肿瘤负荷, 患者的全身状况在一段时间内将会有明显好转。

总之, Dukes D期患者中, 不同转移类型的病例术后平均生存时间无差异; 肿瘤的大体类型、组织类型、浸润深度和手术方式影响患者的预后; 相比较于原发灶未切除者, 原发灶的切

■同行评价

该文章回顾了301例Dukes D直肠癌病例,从肿瘤的大体类型、组织类型、浸润深度和手术方式等方面进行了总结,对临床有一定指导意义。

除可助患者生存受益。

4 参考文献

- 1 Faivre J, Manfredi S, Bouvier AM. [Epidemiology of colorectal cancer liver metastases] *Bull Acad Natl Med* 2003; 187: 815-822; discussion 822-823
- 2 Rosen SA, Buell JF, Yoshida A, Kazsuba S, Hurst R, Michelassi F, Millis JM, Posner MC. Initial presentation with stage IV colorectal cancer: how aggressive should we be? *Arch Surg* 2000; 135: 530-534; discussion 534-535
- 3 Joffe J, Gordon PH. Palliative resection for colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1981; 24: 355-360
- 4 Welch JP, Donaldson GA. The clinical correlation of an autopsy study of recurrent colorectal cancer. *Ann Surg* 1979; 189: 496-502
- 5 董新舒. 晚期大肠癌的手术治疗. 中国实用外科杂志 2000; 20: 592-593
- 6 郁宝铭. 当前直肠癌治疗的策略. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2371-2376
- 7 Al-Sanea N, Isbister WH. Is palliative resection of the primary tumour, in the presence of advanced rectal cancer, a safe and useful technique for symptom control? *ANZ J Surg* 2004; 74: 229-232
- 8 Ruo L, Gougoutas C, Paty PB, Guillem JG, Cohen AM, Wong WD. Elective bowel resection for incurable stage IV colorectal cancer: prognostic variables for asymptomatic patients. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 722-728
- 9 Kuo LJ, Leu SY, Liu MC, Jian JJ, Hongiun Cheng S, Chen CM. How aggressive should we be in patients with stage IV colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1646-1652
- 10 Scoggins CR, Meszoely IM, Blanke CD, Beauchamp RD, Leach SD. Nonoperative management of primary colorectal cancer in patients with stage IV disease. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 651-657
- 11 Aloia T, Sebahg M, Plasse M, Karam V, Lévi F, Giacchetti S, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D, Adam R. Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4983-4990
- 12 Benoist S, Pautrat K, Mitry E, Rougier P, Penna C, Nordlinger B. Treatment strategy for patients with colorectal cancer and synchronous irresectable liver metastases. *Br J Surg* 2005; 92: 1155-1160
- 13 Tebbutt NC, Norman AR, Cunningham D, Hill ME, Tait D, Oates J, Livingston S, Andreyev J. Intestinal complications after chemotherapy for patients with unresected primary colorectal cancer and synchronous metastases. *Gut* 2003; 52: 568-573
- 14 Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Alberts SR. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 23-30
- 15 Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized

GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-237

- 16 Simmonds PC. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Colorectal Cancer Collaborative Group. *BMJ* 2000; 321: 531-535
- 17 Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB 3rd. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1539-1544
- 18 Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirotta N, Elfring GL, Miller LL. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 905-914
- 19 Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-1208
- 20 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342
- 21 夏振龙. 大肠癌肝转移的发生率及临床特点. 中国实用外科杂志 1999; 19: 579
- 22 Liu SK, Church JM, Lavery IC, Fazio VW. Operation in patients with incurable colon cancer--is it worthwhile? *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 11-14
- 23 Makela J, Haukipuro K, Haukipuro K, Laitinen S, Kairaluoma MI. Palliative operations for colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 846-850
- 24 Stelzner S, Hellmich G, Koch R, Ludwig K. Factors predicting survival in stage IV colorectal carcinoma patients after palliative treatment: a multivariate analysis. *J Surg Oncol* 2005; 89: 211-217
- 25 Beham A, Rentsch M, Püllmann K, Mantouvalou L, Spatz H, Schlitt HJ, Obed A. Survival benefit in patients after palliative resection vs non-resection colon cancer surgery. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6634-6638
- 26 Cook AD, Single R, McCahill LE. Surgical resection of primary tumors in patients who present with stage IV colorectal cancer: an analysis of surveillance, epidemiology, and end results data, 1988 to 2000. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 637-645
- 27 Law WL, Chan WF, Lee YM, Chu KW. Non-curative surgery for colorectal cancer: critical appraisal of outcomes. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 197-202
- 28 Konyalian VR, Rosing DK, Haukoos JS, Dixon MR, Sinow R, Bhaheetharan S, Stamos MJ, Kumar RR. The role of primary tumour resection in patients with stage IV colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 430-437
- 29 Cummins ER, Vick KD, Poole GV. Incurable colorectal carcinoma: the role of surgical palliation. *Am Surg* 2004; 70: 433-437
- 30 Sarela A, O'Riordain DS. Rectal adenocarcinoma with liver metastases: management of the primary tumour. *Br J Surg* 2001; 88: 163-164

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

p53、*malat1*、*ki-67*和 β -*catenin*基因mRNA检测在大肠癌分子诊断中的意义

常建兰, 李祖国, 王晓燕, 杨敏慧

常建兰, 李祖国, 王晓燕, 杨敏慧, 南方医科大学病理系 南方医院病理科 广东省肿瘤分子病理学重点实验室 广东省广州市 510515

常建兰, 南方医科大学硕士, 主要从事大肠癌方面的病理研究。

广东省医学科学技术研究项目, No. A2005371

作者贡献分布: 该课题由李祖国设计; 实验操作, 论文写作由常建兰完成; 论文修改李祖国完成; 王晓燕与杨敏慧协助实验。

通讯作者: 李祖国, 510515, 广东省广州市同和区, 南方医科大学病理学系, 南方医院病理科. lizg@fimmu.com

电话: 020-61648223

收稿日期: 2008-10-09 修回日期: 2008-11-07

接受日期: 2008-11-10 在线出版日期: 2008-12-08

Detection of *p53*, *malat1*, *ki-67* and β -*catenin* mRNA expression and its significance in molecular diagnosis of colorectal carcinoma

Jian-Lan Chang, Zu-Guo Li, Xiao-Yan Wang, Min-Hui Yang

Jian-Lan Chang, Zu-Guo Li, Xiao-Yan Wang, Min-Hui Yang, Department of Pathology, Nanfang Hospital; Southern Medical University; the Key Laboratory of Guangdong Provincial Molecular Pathology, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: the Medical Science and Technology Project of Guangdong Province, No. A2005371

Correspondence to: Zu-Guo Li, Associated Professor, Department of Pathology, Nanfang Hospital; Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. lizg@fimmu.com

Received: 2008-10-09 Revised: 2008-11-07

Accepted: 2008-11-10 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To detect *p53*, *malat1*, *ki-67* and β -*catenin* mRNA expression in colorectal carcinoma and to evaluate its significance in molecular diagnosis of colorectal carcinoma.

METHODS: Real-time RT-PCR was used to detect *p53*, *malat1*, *ki-67* and β -*catenin* mRNA expression in samples from 47 colorectal carcinomas, 13 colorectal adenomas and 53 normal colorectal tissues.

RESULTS: The expression levels of *p53* and *malat1* were significantly different between

colorectal carcinoma, colorectal adenoma and normal colorectal tissue ($P < 0.05$). *p53* expression levels showed an average 1.61-fold ($P = 0.000$) and 2.62-fold ($P = 0.000$) increase in colorectal adenoma and colorectal carcinoma tissues when compared with normal colorectal tissues respectively, and 1.77-fold ($P = 0.026$) increase in colorectal carcinoma compared with colorectal adenoma. Similarly, *malat1* expression levels were 0.55-fold ($P = 0.001$), 1.48-fold ($P = 0.002$) and 1.78-fold ($P = 0.034$) respectively. However, there were no significant differences among colorectal carcinoma, colorectal adenoma and normal colorectal tissues in *ki-67* and β -*catenin*. The expression levels of *p53*, *malat1*, *ki-67* and β -*catenin* mRNA were not associated with the staging of colorectal carcinoma. The AUC (area under curve) of *p53* and *malat1* were 0.755 and 0.748, respectively. The cut-off value for *p53* in colorectal adenoma and colorectal carcinoma was 2.582 and 3.215 respectively; for *malat1*, 0.925, 1.395 respectively. Logistic regression analysis showed that *p53* and *malat1* entered the regression equation ($P < 0.05$). The combined determination showed, the AUC were 0.785, the cut-off values in colorectal adenoma and colorectal carcinoma were 0.750, 0.790 respectively. Thus, the AUC of combined determination was larger than that of single detection for *p53* and *malat1*.

CONCLUSION: The present study demonstrates that *p53* and *malat1* have certain application value in molecular diagnosis of colorectal carcinoma to identify colorectal carcinoma and colorectal adenoma. Furthermore, the accuracy in diagnosis of colorectal cancer is improved by combined assaying of *p53* and *malat1*.

Key Words: Colorectal carcinoma; Molecular diagnosis; *p53*; *malat1*; *ki-67*; β -*catenin*; Real-time RT-PCR

Chang JL, Li ZG, Wang XY, Yang MH. Detection of *p53*, *malat1*, *ki-67* and β -*catenin* mRNA expression and its significance in molecular diagnosis of colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3849-3854

■背景资料

大肠癌是一种常见恶性肿瘤, 发病率和死亡率有逐年增高的趋势, 早期诊断、准确的诊断对大肠癌的治疗和预后判断都有重要的指导意义。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科; 蔡开琳, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

■ 研发前沿

目前尚未见关于大肠癌多个标志基因mRNA表达在腺瘤与癌病理早期鉴别诊断中的研究,如果制定正常大肠黏膜、大肠腺瘤与大肠癌的基因分子诊断标准,将有助于病理医师做出准确的诊断,有助于临床医生选择合理的治疗方案。

摘要

目的: 初步研究多个大肠癌相关基因*p53*、*malat1*、*ki-67*和*β-catenin*在大肠癌分子诊断中的意义。

方法: 收集手术切除的新鲜大肠癌组织标本47例、大肠腺瘤组织标本13例,以及分别和大肠癌、大肠腺瘤对应的正常大肠黏膜组织标本53例,用实时荧光定量RT-PCR方法检测各基因的Ct值。

结果: *p53*、*malat1*在大肠癌组表达量均高于大肠腺瘤组($P = 0.026$, $P = 0.034$),但是*p53*在正常大肠黏膜组、大肠腺瘤组和大肠癌组中表达依次增高,而*malat1*在大肠腺瘤组、正常大肠黏膜组和大肠癌组中表达量依次增高,大肠腺瘤组mRNA表达最低。*ki-67*在大肠癌组的表达量是正常黏膜组表达量的1.42倍($P = 0.007$)。 *β-catenin*基因在三组间的表达差异无统计学意义。各基因的表达量均和大肠癌的分期无关。经ROC曲线分析,*p53*的曲线下面积是0.755($P < 0.05$),在大肠腺瘤组和大肠癌组的最佳Cut-off值分别是2.585、3.215, *malat1*的曲线下面积是0.748($P < 0.05$),在大肠腺瘤组和大肠癌组的最佳Cut-off值分别是0.925、1.395;二元Logistic回归分析, *p53*和*malat1*进入回归模型($P < 0.05$)。联合检测*p53*和*malat1*在大肠腺瘤组和大肠癌组的ROC曲线下面积为0.785($P = 0.01$),在大肠腺瘤组的和大肠癌组的最佳Cut-off值分别是0.750、0.790。 *p53*和*malat1*联合检测的ROC曲线下面积均高于单独检测的ROC曲线下面积。

结论: *p53*和*malat1*在大肠癌的分子诊断中有一定的应用价值,可为鉴别大肠腺瘤和大肠癌提供有效的参考;和单独检测相比,二者联合检测的准确性高于单独检测的准确性。

关键词: 大肠癌; 分子诊断; *p53*; *malat1*; *ki-67*; *β-catenin*; 实时荧光定量PCR

常建兰, 李祖国, 王晓燕, 杨敏慧. *p53*、*malat1*、*ki-67*和*β-catenin*基因mRNA检测在大肠癌分子诊断中的意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3849-3854
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3849.asp>

0 引言

大肠癌是一种常见恶性肿瘤,随着生活水平的提高,生活习惯的改变,大肠癌的发病有逐年增高的趋势,大肠癌的病死率在美国上升到恶性肿瘤死亡率的第三位,在中国上升到恶性肿瘤死亡率的第五位^[1]。尽管近些年临床对大肠癌的诊治水平有明显提高,但手术仍旧是主要的治

疗方法,若早期发现并进行手术治疗,可以大大提高肿瘤患者的生存率^[2],因此治疗癌症的关键是早期诊断。

目前已证实有许多癌基因和抑癌基因如*p53*、*malat1*、*ki-67*和*β-catenin*等在大肠癌发病过程中表达量发生显著的变化,对这些相关基因表达量进行定量分析,分析其在大肠癌变过程中基因表达量的变化,有可能揭示大肠癌相关基因量变和癌变发生的规律,从而可以确立大肠癌分子诊断的标志物及分子诊断标准。本研究运用实时荧光定量RT-PCR技术,对大肠癌相关基因*p53*、*malat1*、*ki-67*和*β-catenin*分别在正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌mRNA的表达量进行了检测,进而分析他们在大肠癌分子诊断中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集: 收集正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌的手术后新鲜组织标本,每个标本收集相同的2份,其中1份切成5 mm³的小块,立即保存在液氮中备用,1份做常规的病理诊断(经3位资深的专家确诊);选择其中诊断为大肠癌,大肠腺瘤及正常大肠黏膜的标本作为本实验的研究对象。收集2007-06/2007-12南方医院普外科手术切除的新鲜大肠癌组织标本47例为大肠癌组,男31例,女16例,平均年龄 57.0 ± 14.2 岁,大肠腺瘤组织标本13例为大肠腺瘤组,男9例,女4例,平均年龄 55.8 ± 18.7 岁,分别取和大肠癌以及大肠腺瘤对应的正常大肠黏膜组织53例为正常黏膜组,男32例,女21例,平均年龄 56.2 ± 15.3 岁;其中47例大肠癌患者中早期和中晚期患者^[3]分别占17.0%(8/47)、83.0%(39/47)。手术前均未接收化疗。

1.1.2 主要试剂与仪器: TRIzol(购自Invitrogen公司), SYBR PrimeScript Real Time RT-PCR kit(购自大连TaKaRa生物工程公司), MX3000p定量PCR仪(购自Stratagene公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成: 登陆GenBank获得各个基因的mRNA序列,利用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物,并使上下游引物跨越2个内含子,以避免基因组DNA的污染,引物均由上海英俊生物有限公司合成(引物序列见表1)。

1.2.2 RNA提取及cDNA合成: 提取每份组织标本的总RNA,所有标本通过光密度分析结果260

表 1 内参基因 β -*actin*及目的基因*p53*、*malat1*、*ki-67*和 β -*catenin*的引物序列

基因	GenBank索取号	上、下游链	引物序列 (5'-3')	产物长度(bp)
β - <i>actin</i>	NM_001101	上游	ACTCGTCATACTCCTGCT	255
		下游	GAAACTACCTTCAACTCC	
β - <i>catenin</i>	NM_001098209	上游	ATGGCTTGGAATGAGAC	189
		下游	AACTGGATAGTCAGCACC	
<i>p53</i>	NM_000546	上游	CCACCATCCACTACAACATACAT	146
		下游	AGGACAGGCACAAACACG	
<i>ki-67</i>	NM_002417	上游	GGGTACCTGGTCTTAGTT	244
		下游	ATGGTTGAGGCTGTTCC	
<i>malat1</i>	NR_002819	上游	GAAGATAGGCATTTGAGTGGCT	136
		下游	CTGAAGAGCATTGGAGATCAGC	

■ 相关报道

Dominique Desvaux *et al*用 Real-time PCR方法证明肾脏急性排斥反应中几个基因在分子诊断中的意义。

表 2 *p53*、*malat1*、*ki-67*和 β -*catenin*在3组中的Kruskal-Wallis检验结果

基因	正常黏膜组 (平均秩)	大肠腺瘤组 (平均秩)	大肠癌组 (平均秩)	P值
β - <i>catenin</i>	38.50	36.39	41.44	0.766
<i>p53</i>	20.50	38.89	55.29	0.000
<i>ki-67</i>	32.50	37.00	45.90	0.031
<i>malat1</i>	32.50	20.75	47.07	0.001

nm/280 nm的比值在1.9-2.1之间, RNA电泳出现28S、18S与5S三条带, 取RNA 2 μ L, 逆转录成cDNA 20 μ L, 反应体系包括: 5 \times PrimeScriptTM Buffer 4 μ L, PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 1 μ L, Oligo dT Primer(50 μ mol/L) 1 μ L, Random 6 mers(100 μ mol/L) 1 μ L, Total RNA 2 μ L, RNase Free dH₂O 11 μ L. 反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s.

1.2.3 实时荧光定量PCR: 反应体系包括: SYBR[®] Premix Ex TaqTM(2 \times) 10.0 μ L, PCR Forward Primer(10 μ mol/L) 0.8 μ L, PCR Reverse Primer(10 μ mol/L) 0.8 μ L, cDNA 2 μ L, dH₂O 6.4 μ L. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min 变性, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s, 40个循环. 扩增完毕后, 进行溶解曲线分析.

1.2.4 基因mRNA表达水平相对定量分析: 应用MX3000p定量PCR仪, 以 β -*actin*为内参, 进行Real-time RT-PCR扩增, 检测各模板的Ct值. 通过Ct值进行相对定量, 实验组和对照组的基因表达相对定量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, 即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示实验组(大肠癌组、大肠腺瘤组)和正常对照组(正常黏膜组)目的基因表达的倍数关系. 其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (实验组)- ΔCt (对照组), $\Delta Ct = Ct$ (目的基因)- Ct (内参基因).

统计学处理 对*p53*、*malat1*、*ki-67*和 β -*catenin*在正常黏膜组、大肠腺瘤组和大肠癌组3组间及组间的两两比较进行Kruskal-Wallis检验; 用ROC曲线分析评价各基因在大肠腺瘤和大肠癌诊断中的价值, 找出适宜的临界点值; 对大肠腺瘤组和大肠癌组进行Logistic回归分析; 以上统计均使用统计软件SPSS13.0. 用Excel分别绘制有意义基因*p53*、*malat1*及二者联合检测在大肠腺瘤组和大肠癌组的ROC曲线.

2 结果

2.1 *p53*、*malat1*、*ki-67*和 β -*catenin*在正常黏膜组、大肠腺瘤组和大肠癌组表达情况的Kruskal-Wallis检验结果 *p53*、*ki-67*和*malat1*基因在正常黏膜组、大肠腺瘤组和大肠癌组的表达均具有统计学意义($P < 0.05$); β -*catenin*基因在3组间的表达无统计学意义. *p53*和*ki-67*在大肠腺瘤组和大肠癌组表达均上调, *malat1*在大肠腺瘤组表达下调而在大肠癌组表达上调(表2). *p53*在大肠腺瘤组的表达量是正常黏膜组表达量的1.61倍($P = 0.000$), 在大肠癌组的表达量是正常黏膜组表达量的2.62倍($P = 0.000$), 在大肠癌组的表达量是大肠腺瘤组表达量的1.77倍($P = 0.026$); *malat1*在大肠腺瘤组的表达量是正常黏膜组表达量的0.55倍($P = 0.001$), 在大肠癌组的表达量是正常黏膜组表达量的1.48倍($P = 0.002$), 在大肠癌组的表达量是大肠腺瘤组表达量的1.78倍($P = 0.034$); *ki-67*在大肠癌组的表达量是正常黏膜组表达量的1.42倍($P = 0.007$), 在正常黏膜组和大肠腺瘤组及大肠腺瘤组和大肠癌组差异无统计学意义(表3). *p53*、*malat1*、*ki-67*和 β -*catenin*中有意义基因*p53*、*malat1*在大肠癌组的表达量均和大肠癌的分期无关($P > 0.05$, 表4).

■应用要点

本文初步制定适合临床应用的正常大肠黏膜、大肠腺瘤与大肠癌的分分子诊断标准,减少大肠癌诊断中的主观性误差,增加客观指标,更好地为临床医生治疗肿瘤提供指导。

表 3 组间两两比较的Kruskal-Wallis检验结果

分组	正常黏膜组 (平均秩)	大肠腺瘤组 (平均秩)	<i>P</i> 值	正常黏膜组 (平均秩)	大肠癌组 (平均秩)	<i>P</i> 值	大肠腺瘤组 (平均秩)	大肠癌组 (平均秩)	<i>P</i> 值
<i>p53</i>	20.50	33.00	0.000	18.50	48.50	0.000	10.89	19.29	0.026
<i>ki-67</i>	22.50	25.00	0.465	28.50	40.39	0.007	16.94	21.53	0.300
<i>malat1</i>	24.50	13.50	0.001	26.50	39.33	0.002	11.81	20.98	0.034

表 4 有意义基因*p53*、*malat1*在大肠癌组不同分期的Kruskal-Wallis检验结果

基因	早期大肠癌组 (平均秩)	中晚期大肠癌组 (平均秩)	<i>P</i> 值
<i>p53</i>	9.13	14.19	0.098
<i>malat1</i>	9.75	15.79	0.071

表 5 *p53*、*malat1*和*ki-67*的ROC曲线下面积(AUC)

基因	AUC	SE	95% CI	<i>P</i> 值
<i>p53</i>	0.755	0.087	0.585-0.924	0.026
<i>malat1</i>	0.748	0.083	0.586-0.910	0.034
<i>ki-67</i>	0.615	0.093	0.433-0.796	0.300

2.2 ROC曲线和二元Logistic回归 对于鉴别大肠腺瘤和大肠癌, *p53*、*malat1*和*ki-67*的ROC曲线下面积(AUC)见表5。 *p53*的ROC曲线下面积为0.755, *p53*在大肠腺瘤组的最佳Cut-off值取2.585, 敏感性为70.8%, 特异性为66.7%, *p53*在大肠癌组的最佳Cut-off值取3.215, 敏感性为88.9%, 特异性为54.2%(图1A); *malat1*的ROC曲线下面积为0.748, 在大肠腺瘤组的最佳Cut-off值取0.925, 敏感性为72.4%, 特异性为75.0%, *malat1*在大肠癌组的最佳Cut-off值取1.395, 敏感性为87.5%, 特异性为65.5%(图1B)。 *ki-67*的ROC曲线下面积无统计学意义。二元Logistic回归分析, *p53*和*malat1*进入回归模型($P<0.05$)。联合检测*p53*和*malat1*在大肠腺瘤组和大肠癌组的ROC曲线下面积为0.785($P=0.01$), 在大肠腺瘤组的最佳Cut-off值取0.750, 敏感性为66.7%, 特异性为75.8%, 在大肠癌组的最佳Cut-off值取0.790, 敏感性为66.7%, 特异性为88.9%(图1C)。

3 讨论

大肠癌发生是涉及多步骤, 多基因改变的过程。几乎所有大肠癌都是由正常肠上皮细胞发展成息肉样腺瘤, 然后在腺瘤的基础上发展而来的, 符合大肠腺瘤-不典型增生-癌的发展规律^[4]。大肠癌发病过程的不同阶段, 同时涉及多个基因表达量的变化。研究表明, 89%的高分化腺瘤在其侵袭前的肿瘤细胞中核内 β -catenin表达增加, 同时伴有一定程度的胞内 β -catenin弥漫表达^[5], β -catenin蛋白表达异常可能是大肠腺瘤癌变的重要环节^[6]。野生型*p53*可以诱导细胞凋亡, 目前的研究已充分证实*p53*在大肠癌发生发展中的

重要作用^[7], 他在大肠从腺瘤到癌变的过程中发生突变^[8], 在大多数腺瘤中过表达^[4]。 *ki-67*在正常肠黏膜组织中, 表达弱而有规律, 多集中在肠腺基底部的增殖区细胞核内; 在癌旁黏膜组织中, 表达增强, 黏膜上皮增殖活性升高, 并出现增殖带上移现象; 而在大肠癌细胞中, *ki-67*表达明显增多^[9]。 *malat1*是新发现的高度保守的非编码RNA, 在结肠组织中表达, 目前的研究证明他和癌的转移高度相关^[10], 可以作为肿瘤诊断的分子标记物^[11]。

本研究通过检测*p53*、*malat1*、*ki-67*和 β -catenin分别在正常黏膜组、大肠腺瘤组和大肠癌组mRNA的表达, 统计分析结果表明: *p53*在大肠腺瘤组的表达量是正常黏膜组表达量的1.61倍, 在大肠癌组的表达量是正常黏膜组表达量的2.62倍, 在大肠癌组的表达量是大肠腺瘤组表达量的1.77倍; *malat1*在大肠腺瘤组的表达量是正常黏膜组表达量的0.55倍, 在大肠癌组的表达量是正常黏膜组表达量的1.48倍, 在大肠癌组的表达量是大肠腺瘤组表达量的1.78倍; *ki-67*在大肠癌组的表达量是正常黏膜组表达量的1.42倍, 在正常黏膜组和大肠腺瘤组及大肠腺瘤组和大肠癌组的表达差异无统计学意义; β -catenin在3组中的表达差异无统计学意义。4个基因*p53*、*malat1*、*ki-67*和 β -catenin中, 其中有意义基因*p53*、*malat1*在大肠癌组的表达量均和大肠癌的分期无关。 *p53*和*malat1*在正常黏膜组、大肠腺瘤组和大肠癌组mRNA的表达量均不同($P<0.05$), 二者可能作为大肠癌的分分子标志物。

ROC曲线是肿瘤标志物临床应用中一种全

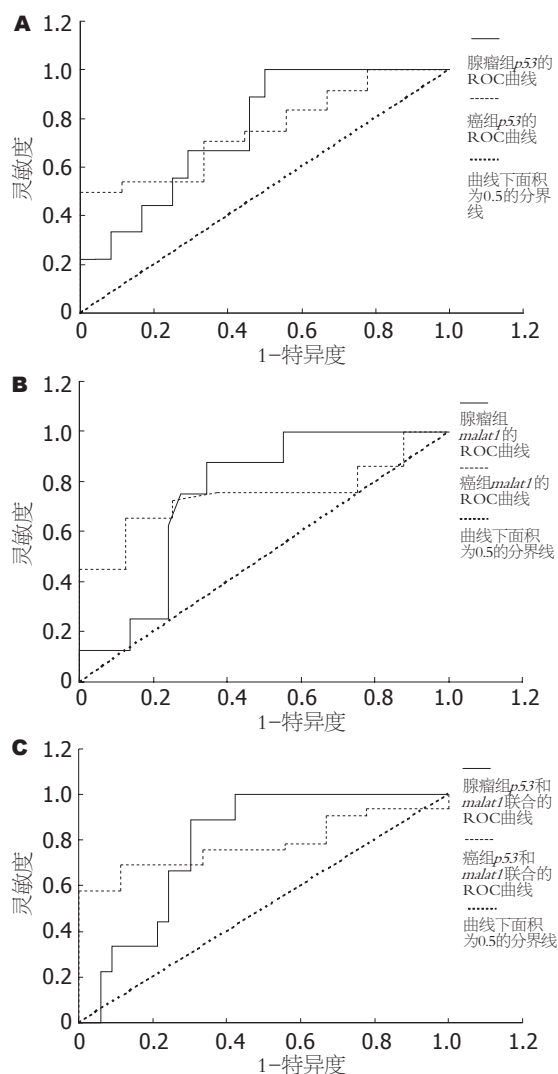


图1 大肠癌组和大肠腺瘤组的ROC曲线. A: *p53*; B: *malat1*; C: *p53*和*malat1*联合检测.

面、准确评价诊断试验非常有效的方法. ROC曲线以良、恶性疾病为研究对象, 是敏感性和特异性的综合反映, 曲线下面积能较好反映一个诊断试验的诊断能力, 并能确定最佳临界值^[12-15]. 根据Swets报道, 面积在0.5以下时无诊断价值; 面积在(0.5-0.7)时有较低的准确性; 面积在(0.7-0.9)时有较高的准确性; 面积在0.9以上时准确性最高^[16]. Logistic回归分析可用来衡量联合分析的价值大小^[14,17-19], 因此本文采用回归分析方法对有意义的*p53*和*malat1*基因进行了联合分析.

本文通过SPSS13.0统计软件分析, 利用Excel绘制ROC曲线, 并比较不同基因曲线下面积大小, 同时按照曲线下面积最大原则提供最佳临界值, 以区别良、恶性疾病^[20]. 对于鉴别大肠腺瘤和大肠癌, *p53*的曲线下面积是0.755($P < 0.05$), 在大肠腺瘤组的最佳Cut-off值取2.585, 敏感性为70.8%, 特异性为66.7%, 在

大肠癌组的最佳Cut-off值取3.215, 敏感性为88.9%, 特异性为54.2%; *malat1*的曲线下面积是0.748($P < 0.05$), 在大肠腺瘤组的最佳Cut-off值取0.925, 敏感性为72.4%, 特异性为75.0%, 在大肠癌组的最佳Cut-off值取1.395, 敏感性为87.5%, 特异性为65.5%. *ki-67*和 β -*catenin*的ROC曲线下面积无统计学意义. *p53*和*malat1*的曲线下面积均大于0.7, 对大肠腺瘤和大肠癌的鉴别诊断中. 而且*p53*的曲线下面积大于*malat1*的曲线下面积, 所以就单一肿瘤标志物鉴别大肠腺瘤和大肠癌的能力而言, *p53*要优于*malat1*.

联合检测*p53*和*malat1*在大肠腺瘤组和大肠癌组的ROC曲线下面积为0.785($P = 0.01$), 在大肠腺瘤组的最佳Cut-off值取0.750, 敏感性为66.7%, 特异性为75.8%, 在大肠癌组的最佳Cut-off值取0.790, 敏感性为66.7%, 特异性为88.9%. 和单独检测相比, *p53*和*malat1*联合检测的曲线下面积大于单独检测的曲线下面积, 表明*p53*和*malat1*联合检测的效果优于单独检测.

大肠癌是严重威胁着人类健康的疾病之一. 肿瘤治疗方案的确定依赖于对患者病情的准确诊断. 病理组织活检和免疫组化是常用的肿瘤诊断方法, 免疫组化法检测的对象是与肿瘤相关的蛋白, 而样本处理方式对蛋白的稳定性影响很大, 因此免疫组化的检测结果的稳定性受到一定的影响. 检测组织特异标志物的mRNA比病理学、免疫组化等方法有几个优点: (1)RNA在细胞外环境中是很不稳定的, 因此检测到标志物mRNA应当表示所检测的组织或体液中有肿瘤细胞; PCR检测法已达到检测单个分子的能力, 而其它方法还达不到; (2)在免疫组化等方法结果为阴性时, 仍可用组织特异性标志物的mRNA检测来表明肿瘤细胞的存在^[21]. 分子诊断灵敏度高, 特异性强, 需要的组织标本少.

分子诊断技术是具有划时代意义的检测手段, 分子病理诊断是将来病理诊断不可缺少重要指标, 分子病理诊断研究拓宽了医学研究的范围^[22], 但本研究设计属于诊断试验准确度评价的初步“探索”阶段^[12], 用于临床之前尚需要大量的后续研究来进行证实和完善.

4 参考文献

- 李祖国, 刘腾飞, 谢卫兵, 周军, 余力, 丁彦青. 环氧化酶2基因异常表达与大肠癌转移的关系. 南方医科大学学报 2006; 26: 1408-1411
- Wilkinson N, Scott-Conner CE. Surgical therapy for

■同行评价

该文证实了大肠癌相关基因*p53*、*malat1*在大肠癌分子诊断的应用价值, 为大肠癌与大肠腺瘤的鉴别诊断提供一定的实验依据, 对临床工作有一定参考价值.

- colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2008; 37: 253-267, ix
- 3 陈杰, 李甘地. 病理学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 274
- 4 Rubio CA, Rodensjö M. p53 overexpression in flat serrated adenomas and flat tubular adenomas of the colorectal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995; 121: 571-576
- 5 Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10356-10361
- 6 何渝军, 刘宝华, 向德兵. β -catenin蛋白表达与大肠腺瘤癌变的关系. 第三军医大学学报 2004; 26: 78-80
- 7 杨兵, 武希润, 谭朝晖, 郭文栋. 大肠癌组织中survivin表达及其与bcl-2和p53的相关性研究. 山西医科大学学报 2006; 37: 240-241
- 8 Sheikh RA, Min BH, Yasmeen S, Teplitz R, Tesluk H, Ruebner BH, Tobi M, Hatfield J, Fligel S, Lawson MJ. Correlation of Ki-67, p53, and Adnab-9 immunohistochemical staining and ploidy with clinical and histopathologic features of severely dysplastic colorectal adenomas. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 223-229
- 9 侯滨, 单吉贤, 辛彦, 侯晓魁. Ki-67抗原表达与大肠癌转移及预后的关系. 中国医科大学学报 2000; 29: 29-30
- 10 Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2003; 22: 8031-8041
- 11 Lin R, Maeda S, Liu C, Karin M, Edgington TS. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. *Oncogene* 2007; 26: 851-858
- 12 Zhou XH, Obuchowshi NA, McClish DK, 宇传华. 诊断医学统计学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 31
- 13 武建国. 血清肿瘤标志物检测中值得注意的问题. 中华医学检验杂志 1997; 20: 7-8
- 14 Rai AJ, Zhang Z, Rosenzweig J, Shih IeM, Pham T, Fung ET, Sokoll LJ, Chan DW. Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 1518-1526
- 15 Rasouli M, Okhovatian A, Enderami A. Serum proteins profile as an indicator of malignancy: multivariate logistic regression and ROC analyses. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 913-918
- 16 陈卫中, 倪宗瓚, 潘晓平, 刘元元, 夏彦. 用ROC曲线确定最佳临界点和可疑值范围. 现代预防医学 2005; 32: 729-731
- 17 李招云, 戴岳楚, 张黎明, 吴晓宇. 荧光定量PCR检测大肠癌患者外周血CK19mRNA、CK20mRNA和CEAmRNA的意义. 中国实验诊断学 2006; 10: 1179-1181
- 18 Schutter EM, Davelaar EM, van Kamp GJ, Verstraeten RA, Kenemans P, Verheijen RH. The differential diagnostic potential of a panel of tumor markers (CA 125, CA 15-3, and CA 72-4 antigens) in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 385-392
- 19 Carpelan-Holmström M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Järvinen H, Haglund C. Estimating the probability of cancer with several tumor markers in patients with colorectal disease. *Oncology* 2004; 66: 296-302
- 20 高云朝, 陆汉魁, 杨亚东. 多种肿瘤标志物在肝脏疾病中的对比研究. 放射免疫学杂志 2006; 19: 146-148
- 21 丁勇, 田嘉禾, 杨武威, 张书文, 尹大一, 姚树林. PET、RT2PCR、IHC方法检测肿瘤转移灶的比较. 中国医学影像学杂志 2002; 10: 405-407
- 22 朱明华. 肿瘤的分子病理诊断. 西北国防医学杂志 2000; 21: 163-165

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EMBase/Excerpta Medica, EM)和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ)收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录.(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

食管替代物的研究进展

陈刚, 石文君

陈刚, 石文君, 中国医科大学第二医院暨盛京医院胸外科 辽宁省沈阳市 110004

国家卫生部资助项目, No. wjz2000-1-17

作者贡献分布: 本综述由陈刚整理完成; 由石文君审核。

通讯作者: 石文君, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第二医院暨盛京医院胸外科, xy7224@sina.com

收稿日期: 2008-02-28 修回日期: 2008-09-28

接受日期: 2008-10-14 在线出版日期: 2008-12-08

Advance in esophagus substitute

Gang Chen, Wen-Jun Shi

Gang Chen, Wen-Jun Shi, Department of Thoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of Chinese Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Science Speciality Fund from Health Department of China, No. wjz2000-1-17

Correspondence to: Wen-Jun Shi, Department of Thoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital (Shengjing Hospital) of Chinese Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. xy7224@sina.com

Received: 2008-02-28 Revised: 2008-09-28

Accepted: 2008-10-14 Published online: 2008-12-08

Abstract

Esophageal replacement is needed to treat many esophageal diseases. Based on domestic and overseas literatures, this review analyzes and summarizes the progress in esophagus prosthesis during the last fifty years, including artificial synthetic material, biologic material, biologic composite material, biological tissue-engineering and self-pulmonary tissue flap, and explains their characters and exploratory development. The best substitute, which can be easily acquired, avirulent, with no rejection, no carcinogenicity and absorbable, has not been found yet.

Key Words: Esophagus; Substitute; Esophagus reconstruction

Chen G, Shi WJ. Advance in esophagus substitute. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3855-3858

摘要

很多食管疾病需行食管替代术。本文通过查阅

国内外文献, 分析总结近50年食管替代物研究及临床应用的发展状况。从人工合成材料、生物材料、生物复合材料以及生物组织工程、自体肺组织瓣的应用与研究, 综述特性及应用, 但尚未找到完全理想的替代物。理想的替代物应是易获取、无毒性、无排斥反应、无致癌性以及可吸收等特点。

关键词: 食管; 替代物; 食管重建

陈刚, 石文君. 食管替代物的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3855-3858

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3855.asp>

0 引言

许多先天性或后天性食管疾病都需要行食管病变部分切除, 食管替代重建术。自50年前人工食管的首次应用以来, 先后出现自体组织、人工合成材料、生物材料、生物复合材料以及生物组织工程等^[1-2]的应用, 但至今未找到一种理想的食管替代物。食管替代物种类繁多, 但大致可分为两大类: 一类是自身的其他组织或器官, 另一类是人工的食管替代物。他们在临床中各有优缺点。其共同的特点是手术打击大, 往往需要开胸, 开腹同时进行, 术后并发症多, 如吻合口瘘、狭窄、坏死、反流、心肺功能紊乱等。并且牺牲部分消化系, 造成消化系功能紊乱和营养吸收障碍。此类手术在婴幼儿中也有一定局限性。另一类实体组织作为替代物, 如: 肌皮瓣^[3]、颈阔肌皮瓣^[4-6]和骨膜肋间肌瓣^[7-8], 主要应用于颈段食管, 对胸段食管不适合应用。最近报道的肺组织瓣等, 都在动物实验中有一定的报道, 目前尚未进行临床大规模应用。

早在1951年Berman^[9]率先采用特制的聚乙烯管替代食管缺损, 1953年用塑料管替代食管缺损并应用于人体, 而我国的医疗工作者在1983年开始, 先后用各种人工材料进行人工食管的研究^[10-12], 因高分子材料与组织的相溶性差, 血管, 组织无法长入, 食管不能完全上皮化, 肉芽组织增生及炎症反应严重而出现严重的并

■背景资料

许多先天性或后天性食管疾病都需要行食管病变部分切除, 食管替代重建术。自50年前人工食管的首次应用以来, 先后出现自体组织、人工合成材料、生物材料、生物复合材料以及生物组织工程等的研究, 但至今未找到一种理想的食管替代物。

■同行评议者

谭群友, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院全军胸外科中心

■研发前沿

早在1951年Berman率先采用特制的聚乙烯管替代食管缺损,1953年用塑料管替代食管缺损并应用于人体,而我国的医疗工作者在1983年开始,先后用各种人工材料进行人工食管的研究,但最后都没有得到理想的效果。

发症如感染、吻合口瘘、狭窄,人工食管不能达到长期固定而脱落,后来又采用膨体聚四氟乙烯及碳素纤维、硅橡胶等^[13-15],都没有得到理想的效果。因而人工合成材料作为食管替代物在临床上没有得到广泛的应用,人们进入了新的替代材料的研究-生物类替代物。

1 生物类替代物

生物型人工食管比普通人工食管有一定的进步,但直到目前也一直处于实验阶段,没有进入一期临床。智发朝 *et al*^[16]报道,应用由猪主动脉经理化处理后制成生物型人工食管,无生物活性,符合国家药监局的可植入人体标准,对30只实验犬进行食管替代,结果发现组织相容性好,质地柔软、有弹性、脱落不构成危险,围手术期有效率为93.3%,有良好的研究及开发应用前景。张兰军 *et al*^[17]应用30只中国杂种犬经右侧开胸切除胸段食管,并以8 cm长生物型人工食管进行重建,观察愈合过程,结果发现:30只犬存活率为81.5%,围手术期存活率93%,吻合口瘘发生率为6.7%,低于一般报告的10%-50%,术后平均28 d人工食管脱落,术后2 mo出现狭窄,需行扩张而缓解13例,需放置支架5例。生物型人工食管作为新的食管重建方法,并发症少,对心肺影响小,不干扰生理。生物型人工食管植入后仅起短暂的替代和支撑作用。术后1 wk即在其外周形成一个血液及结缔组织渗出胶原纤维的管腔道,术后1 mo左右,由于食物刺激及食物中细菌作用,吻合口出现剥脱而被排出。术后狭窄主要是由于人工食管脱落后新生食管的瘢痕增生所致,也与新生食管环形收缩及纵向缩短有关,但上皮完全爬覆有助于狭窄的发生和缓解,支架脱落的时间长短,也对狭窄有一定的影响。还有吻合口瘘以及植入长度的增加,仍需进一步的深入和研究。

2 生物型复合材料

在总结生物型食管替代物的基础上,根据理想化食管替代物的要求,有人设计出生物型复合材料人工食管,即采用生物可降解材料与非降解材料复合制成人工食管,既对自身食管组织爬行再生有一定的诱导作用,同时生物材料降解速度与之相匹配,非降解材料起到支架作用,延长了单纯生物材料的支撑时间,最终再生食管完全替代人工食管。秦雄 *et al*^[18]用医用聚氨脂内管表面覆盖海绵状胶原蛋白壳糖膜,体外制成人工食管,通过手术替换食管缺损,通过组织学及电镜等检测,观察新生食管上皮化过程,通

过与植入橡胶管的对照发现,实验组织术后人工食管假体能迅速被宿主周围组织包绕达到生物学固定;内腔可见规则黏膜上皮生长,1 mo后覆盖内腔生成,吻合口肉芽组织生长不明显,动物存活良好,未发生吻合口瘘,无明显狭窄发生,而对照组出现严重的狭窄而死亡,而且观察到4 wk后新生食管完全上皮化,12 wk时黏膜全层结构完整再生;24 wk时食管肌层部分再生,提示海绵状胶原蛋白壳聚糖膜促进并诱导了自身食管上皮的爬行再生。分析其机制有:(1)海绵状胶原蛋白壳聚糖提供的三维多孔支架对细胞起到锚定和支持作用,不仅能为细胞的黏附、增殖提供空间,而且有利于细胞沿着支架的构造爬行再生以及营养成分的渗透和血管化形成。胶原蛋白壳聚糖可以改变组织的生长、分化、增殖和移动。(2)海绵状胶原蛋白壳聚糖膜具有亲水性,吸附血液及体液营养因子,对食管组织的再生起促进作用。如何改进聚氨酯内管的降解性能使之手术后无需取出,如何延长胶原蛋白壳聚糖海绵降解吸收作用,并引入具有调解细胞生长代谢作用的生长因子和黏附蛋白来促进自身细胞爬行与再生,预防狭窄是人工食管完善应用的重要内容,虽然在动物实验中取得了较满意的结果,但该方法仍有较多的缺陷:如不可降解高分子材料术后一段时间经胃镜取出,此类实验方法仅适用于食管缺损较短者,而不能充分反映食管重建的全貌,再生的食管组织与自身的食管组织结构和功能上有较大的差距。另有文献^[19]报道:壳聚糖为无副作用的天然高分子材料,其化学性质和生物性质与体组织相近,生物相容性好,无毒、无副作用,与人体不排斥,无免疫原性,易于与胶原蛋白交联,并且具有一定的抗感染作用,对创面愈合有一定作用,已被应用于临床烧伤整形外科,也有通过对壳聚糖进行冷冻干燥或真空干燥处理制成壳聚糖三维支架,已经被口腔外科创面修复所应用;也有被制成周围神经支架来修复神经。由此可见,壳聚糖是一种生物材料,适用于生物支架的应用^[20-22],应进一步研究他在食管替代中作为一种支架的尝试。

3 组织工程人工食管

最早是由美国麻省理工学院化学工程师Langer与波士顿麻省大学医院Vacanti^[1]提出Tissue Engineering概念,即应用组织工程学和生命科学的原理和方法来解释正常和病理的哺乳动物组织

器官的结构功能关系, 并且发展具有生物活性的人工替代物来恢复、维持或提高组织器官的功能. 食管组织工程细胞来源: 食管上皮细胞增殖较快, 获得的上皮细胞置于培养皿中, 仅需7 d 上皮细胞就可融合并覆盖整个培养皿表面. 这使得临床应用成为可能, 这样组织工程的方法, 再造组织与器官所用的各类细胞统称为种子细胞, 是组织工程的基本要素. 组织工程食管的种子细胞主要来源于自体. 同种异体及异种组织的细胞等, 只有获得足够数量并保持特定生物活性的种子细胞, 才能保证组织构建的成功, 相关研究表明, 上皮细胞间以及与无细胞支架间的相互作用是维持上皮细胞生长分化的重要因素. 其中整合素(integrin)表皮生长因子(EGF)、软化生长因子(TGF)等多种因子也对之有影响. Sato *et al*^[23]将人食管上皮细胞在胶原基质上培养, 然后一起植入无胸腺大鼠的背阔肌内, 16 d后可见有上皮细胞层生长, 并有新生血管形成, 之后他们又将人食管上皮细胞在PGA胶原复合体上培养8-12 d, 再制成管状物植入无胸腺大鼠背阔肌内, 28 d后形成与正常食管相类似的管状结构, 天狭窄腔内上皮细胞生长良好, 分层达15层, 具有基底膜形.

食管组织工程支架的选择: 目前多选用可降解材料, 分两类, 即天然高分子材料(即生物支架)和合成高分子材料^[24-26]. 组织工程食管天然生物支架方面的研究不多, 主要是借鉴了其他器官组织工程研究方法, 壳聚糖和胶原蛋白都是可以被机体降解吸收的天然生物活性材料, 具有良好的生物相容性和促进细胞再生性. 秦雄 *et al*^[27]把胶原蛋白和壳聚糖共混后经低温冷冻干燥形成海绵状膜, 既保持了胶原蛋白原有的多孔结构, 又克服了胶原蛋白的强度低, 吸收快的特点, 采用海绵状胶原蛋白壳聚糖膜作为支架材料, 接种食管上皮细胞后植入动物体内, 发现食管上皮细胞进一步分化为10层, 术后4 wk 胶原蛋白壳聚糖膜已被降解吸收, 进一步证明了海绵状胶原蛋白壳聚糖膜是组织工程构建可降解人工食管的优良基质材料, 另外, Badylak *et al*^[28]用猪小肠黏膜下组织(SIS)和膀胱黏膜下组织(UBS)两种细胞外基质(ECM)作为组织支架修补狗食管缺损. 但狭窄仍是一个主要问题. 另外组织工程用高分子材料支架主要应用聚乳酸(PGA), 聚乙醇酸(PLA), 二者共聚物(PLGA)等, 目前仍处于实验研究过程中. 组织工程化食管

目前尚未应用于临床, 进一步研究包括上皮细胞与肌细胞的同时种植及生成; 腺体及神经丛的再生问题; 减少瘢痕加快组织结构的修复与重塑等.

4 自体肺组织瓣

石文君 *et al*^[29]首创应用肺组织瓣替代气管缺损经过数年研究获得成功, 又提出肺组织瓣替代食管部分缺损的设想, 并进行了一系列的动物实验, 使得肺组织瓣应用于食管的缺损修补成为可能, 为进一步临床应用打下坚实的基础.

肺组织瓣的提出是一种大胆的设想, 是对传统手术的一种挑战, 使未来复杂的手术变得简单化了. 肺组织瓣制作简单, 采用游离所取肺叶, 就近原则, 结扎切断肺叶、段支气管, 勿损伤肺动、静脉, 注意保护支气管血管, 制成血运丰富的肺组织瓣. 在手术中观察肺组织瓣无缺血改变, 术后病理及电镜均证实这一点, 具有一定的抗感染能力, 术后8-10 wk, 食管缺损处实现了完全再上皮化. 根据胸内食管缺损部位, 可就近取材, 避免了开腹手术, 同时也避免了人工食管的排斥反映. 另外, 肺组织瓣有一定的延展性, 选取了不同的肺叶可制成长度不同的肺组织瓣. 总之, 肺组织瓣取材方便, 组织相容性好, 血运丰富, 抗感染能力强, 愈合能力好, 能够提供食管再生上皮化的良好环境, 减化手术的复杂性, 是一种可深入研究的食管替代组织.

赵俊刚 *et al*^[30]在实验中应用12只犬行肺组织瓣修补食管壁部分缺损长度40 mm, 环1/2-2/3 管腔, 已取得成功. 食管缺损处有新生的黏膜上皮形成, 存活犬均能经口进食, 未见严重狭窄导致进食障碍, 进一步的研究^[31], 将肺组织内衬自扩性记忆合金支架, 发现金属支架对食管壁和肺组织瓣产生严重的损伤, 局部炎症是阻止食管黏膜爬行的主要原因, 导致了过多的疤痕和慢性溃疡, 不利于食管的替代. 刘军 *et al*^[32]在动物实验中再一次证实了肺组织瓣能为食管上皮细胞提供良好再生环境, 用以重建犬胸段食管具有可行性. 但金属支架对组织有损伤, 另有杨伟 *et al*^[33]报道, 利用肺组织瓣代替切除食管60 mm, 内衬硅胶管外包绕肺组织瓣, 上、下端食管进行吻合, 将肺组织瓣缝合成管状, 在犬的实验中获得成功, 但硅胶管支架仍然不是理想支架, 尚需排除或取出, 如能制成一种生物支架, 他能与食管组织有很好的生物相容性, 能适应正常食管的生理收缩和扩张; 同时具有一定的

■相关报道

智发朝 *et al*报道, 应用由猪主动脉经理化处理后制成生物型人工食管, 无生物活性, 符合国家药监局的可植入人体标准, 对30只实验犬进行食管替代, 结果发现组织相容性好, 质地柔软、有弹性、脱落不构成危险, 围手术期有效率为93.3%, 有良好的研究及开发应用前景. 石文君 *et al*首创应用肺组织瓣替代气管缺损经过数年研究获得成功, 又提出肺组织瓣替代食管部分缺损的设想.

■同行评价

本文内容有一定的临床与科研意义,为进一步研究提供了理论依据。

硬度能抵抗周围疤痕组织的收缩保持管腔的通畅,可被机体组织降解吸收,无需取出,相信效果会更加理想。

总之,在食管替代的研究中如何减轻疤痕增生、预防狭窄的发生仍是关键问题。目前,食管替代物能满足于食管上皮的再生,进一步地研究包括平滑肌及神经丛、腺体的再生^[34],蠕动功能的恢复,长段食管的重建等。相信随着研究地深入,最终一定能找到理想的食管替代物。

5 参考文献

- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926
- Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009-1014
- Chen HC, Kuo YR, Hwang TL, Chen HH, Chang CH, Tang YB. Microvascular prefabricated free skin flaps for esophageal reconstruction in difficult patients. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 911-916
- 赵云平, 王如文, 蒋耀光, 龚太乾, 周景海, 谭群友. 颈阔肌皮瓣修复或重建颈部食管缺损术后并发症探讨. *中国胸心血管外科临床杂志* 2001; 8: 169-171
- 王如文, 蒋耀光, 龚太乾, 周景海, 赵云平, 马铮. 颈阔肌皮瓣修复颈部食管狭窄的研究. *第三军医大学学报* 2007; 29: 7-9
- 路学美, 张素华, 张世红, 沈玲. 颈阔肌皮瓣在颈段食管狭窄重建中的应用. *临床耳鼻咽喉科杂志* 2004; 18: 16-17
- 张旭, 王笑茹, 李汝泓, 胡建功, 侯继申, 周士杰. 应用骨膜肋间肌瓣行食管成形术. *中华胸心血管外科杂志* 2000; 16: 163-164
- 张旭, 王笑茹, 张朝满, 李汝弘, 侯继申, 薛景凤. 犬肋骨膜肌瓣食管成型术的应用解剖及实验研究. *中国临床解剖学杂志* 2000; 18: 254-256
- Berman EF. The experimental replacement of portions of the esophagus by a plastic tube. *Ann Surg* 1952; 135: 337-343
- 杨华, 郗家驹, 赵雅娟, 薛世泉. 狗食管重建的病理观察. *吉林大学学报(医学版)* 1985; 11: 42-43
- 天津生物医学工程人工食管研制协作组. 人工食管制造及动物实验的研究. *中国生物医学工程学报* 1985; 4: 37-42
- 许迺文, 陈梦光, 郭继堂. 人工食管的实验研究. *中国生物医学工程学报* 1984; 3: 68-69
- 陈耀辉, 张大为, 黄国俊. 人工食管的实验研究. *中华胸心血管外科杂志* 1992; 8: 115-117
- 陆明, 肖音, 钱锋, 王振英, 李京城. 碳纤维人工食管用于牛羊的实验研究. *中国兽医学报* 1987; 7: 155-160
- 崔英子, 陈世霞. 硅橡胶人工食管研制. *中国生物医学工程学报* 1984; 3: 66-67
- 智发朝, 张兰军, 彭秀凡, 吴湘惠, 潘德寿, 万田莫, 刘思德, 张振书, 周殿元. 用生物型人工食管进行食管重

- 建的实验研究. *中华消化杂志* 2003; 23: 137-141
- 张兰军, 智发朝, 戎铁华, 彭秀凡, 温东东, 颜世强. 生物型人工食管的实验研究. *中华胃肠外科杂志* 2001; 4: 157-160
- 秦雄, 徐志飞, 史宏灿, 赵学维, 孙康, 高向阳. 生物材料复合人工食管的设计、制备与动物实验研究. *中华外科杂志* 2003; 41: 541-544
- 唐慧安, 芦小林, 王成兵, 安建平. 壳聚糖在医药学方面的研究进展. *天水师范学院学报* 2005; 25: 55-59
- 叶春婷, 黄耀熊, 邹海燕, 陈鸿辉, 彭燕豪. 聚乙烯醇-胶原凝胶研制及作为组织替代材料的生物相容性. *中国组织工程研究与临床康复* 2008; 12: 153-155
- Huang YC, Huang YY, Huang CC, Liu HC. Manufacture of porous polymer nerve conduits through a lyophilizing and wire-heating process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 74: 659-664
- Freier T, Montenegro R, Shan Koh H, Shochet MS. Chitin-based tubes for tissue engineering in the nervous system. *Biomaterials* 2005; 26: 4624-4632
- Sato M, Ando N, Ozawa S, Nagashima A, Kitajima M. A hybrid artificial esophagus using cultured human esophageal epithelial cells. *ASAIO J* 1993; 39: M554-M557
- Sato M, Ando N, Ozawa S, Miki H, Kitajima M. An artificial esophagus consisting of cultured human esophageal epithelial cells, polyglycolic acid mesh, and collagen. *ASAIO J* 1994; 40: M389-M392
- Hori Y, Nakamura T, Kimura D, Kaino K, Kurokawa Y, Satomi S, Shimizu Y. Effect of basic fibroblast growth factor on vascularization in esophagus tissue engineering. *Int J Artif Organs* 2003; 26: 241-244
- 史宏灿, 徐志飞, 秦雄, 赵学维, 王文祖, 李毅. 生物材料人工气管的设计与动物实验研究. *第二军医大学学报* 2002; 23: 1142-1145
- 秦雄, 徐志飞, 史宏灿, 赵学维, 孙康, 高向阳. 组织工程构建人工食管的初步实验研究. *第二军医大学学报* 2002; 23: 1134-1137
- Badyrak S, Meurling S, Chen M, Spievack A, Simmons-Byrd A. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 1097-1103
- 石文君, 张苏宁, 杨伟, 赵俊刚, 赵洋, 刘军. 用肺组织瓣重建胸段气管的动物实验与临床应用. *中华外科杂志* 2003; 41: 218-221
- 赵俊刚, 石文君, 张苏宁, 韩云, 赵洋, 刘军. 自体肺组织瓣修补食管壁部分缺损的实验研究. *中华胸心血管外科杂志* 2003; 19: 166-168
- 赵俊刚, 张苏宁, 石文君, 韩云, 邓成飞. 犬自体肺组织瓣修补食管壁部分缺损的可行性. *中国组织工程研究与临床康复* 2007; 11: 15-17
- 刘军, 石文君, 张苏宁, 韩云, 赵俊刚. 犬自体肺组织瓣替代胸段食管部分缺损的实验研究. *中国修复重建外科杂志* 2006; 20: 507-510
- 杨伟, 石文君, 张苏宁, 韩云. 肺组织瓣替代食管的动物实验研究. *中国医科大学学报* 2002; 31: 7-9
- 秦雄, 徐志飞, 赵学维, 史宏灿, 周建华, 孙康, 高向阳. 可降解复合人工食管重建犬颈段食管的实验研究. *中国修复重建外科杂志* 2003; 17: 374-377

编辑 李军亮 电编 何基才

HBV的小鼠模型研究进展

刘大斌, 童贻刚

刘大斌, 童贻刚, 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物国家重点实验室 北京市 100071

通讯作者: 童贻刚, 100071, 北京市, 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物国家重点实验室.

tong.yigang@gmail.com

电话: 010-66948407

收稿日期: 2008-09-19 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-08

Advance in the mouse model of hepatitis B virus infection

Da-Bin Liu, Yi-Gang Tong

Da-Bin Liu, Yi-Gang Tong, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Department of Pathogenic Molecular Biology, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100071, China

Correspondence to: Yi-Gang Tong, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Department of Pathogenic Molecular Biology, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100071, China. tong.yigang@gmail.com

Received: 2008-09-19 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-08

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major worldwide healthy problem and now the virus and the virus-caused diseases have been known deeply. However, due to lack of a practical and convenient animal model, the study of HBV biology and the therapeutic development of HBV infection are still at a low level. As a common species used in laboratory, mice are studied most and the genetic and immune system are clearly understood. In this paper, we briefly describes the mouse models currently available in HBV.

Key Words: Hepatitis B virus; Animal model; Mouse model

Liu DB, Tong YG. Advance in the mouse model of hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3859-3864

摘要

乙型肝炎病毒感染是全球范围内影响人类健康

的重要问题, 目前人们对HBV及其所致疾病有了相当深入的认识. 但由于缺乏合适的动物模型, 乙型肝炎病毒的生物学研究和治疗进展缓慢. 小鼠作为一种实验室常用的动物, 遗传免疫背景清楚明确, 已经成为人们研究乙肝的重要工具. 本文简要综述了小鼠模型在乙型肝炎研究中的进展.

关键词: 乙型肝炎病毒; 动物模型; 小鼠模型

刘大斌, 童贻刚. HBV的小鼠模型研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3859-3864

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3859.asp>

0 引言

人类乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)属于嗜肝DNA病毒科, 含有约3.2 kb的部分双链DNA基因组, 其复制需要经过转录和逆转录过程同时具有高度的宿主种属和组织特异性. 人们对HBV及其所致疾病有了相当深入的认识, 但是仍然有大量疑难问题有待解决, 如HBV感染肝细胞的受体, HBV进入细胞的机制及相关的蛋白因子, HBV非结构蛋白x和e抗原在病毒复制和致病机制中所扮演的角色^[1-2], HBV分泌大量不含基因组的空心颗粒的原因^[3]等. 上述这些问题没能获得很好解决的一个重要原因就是由于合适的HBV动物模型太少. 迄今为止, HBV的体外模型(细胞模型)已经取得了较大的进展, 已有多种支持HBV基因表达和病毒复制的稳定的肝癌细胞系被成功建立^[4], HBV的体外感染模型也可用原代培养人肝细胞或者树鼯肝细胞以及肝癌细胞系HepaRG^[5], 然而感染效率很低. 由于体外系统既没有肝脏组织结构, 也没有体内环境如免疫分子、细胞因子等的影响, 因此在体外实验中获得的结果还需要有体内实验进行验证. 体内模型, 黑猩猩是迄今为止唯一能够感染HBV并发生急性肝炎的动物, 他可以产生与人类极其相似的细胞免疫^[6]. 然而由于他属于较高级的灵长类动物, 各国的使用限制很多, 不适用于作为常规的实验动物. 另一种可以感

■背景资料

动物模型是研究乙肝的一种重要工具, 小鼠是一种实验室常用的动物, 目前已经被广泛应用于模型研究. 各种小鼠模型在乙肝治疗、分子生物学等研究中发挥了很大作用, 但每种模型都存在一些缺陷, 需要努力去研究一种更理想的小鼠模型.

■同行评议者

曹洁, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

■研发前沿

乙型肝炎严重威胁我国人民的健康, 据统计我国平均每年大约有30万人死于乙肝, 因此乙型肝炎相关研究非常紧迫。

染HBV的动物是同属灵长类的小河树鼩(*tupaia belangeri*), 但其感染仅仅是一过性的, 产生的病毒滴度也很低, 感染效率也不高^[7]. HBV相关病毒如土拨鼠HBV(WHV)和鸭HBV(DHBV)也可以用来做HBV的相关研究^[8-9], 但是上述这些动物都不是理想的HBV动物模型. 由于人HBV的替代动物模型具有各种缺点, 因而十分有必要研制遗传和免疫背景清楚、易于饲养的常规小动物模型, 经过基因修饰的小鼠模型因此成为近年研究人HBV的重要工具. 本文就有关支持HBV复制和感染的小鼠模型进行综述.

1 HBV转基因动物模型

1.1 HBV全基因组转基因小鼠 小鼠没有人HBV入侵的受体或者其他相关的因子, 因而无法感染人HBV, 但是可以通过转基因的方法将人HBV基因组转入小鼠胚胎干细胞, 使HBV基因组进入小鼠体内. 用这种模型研究发现, 小鼠虽然不能感染人HBV, 但是小鼠的肝脏和肾脏却可以有效的复制人HBV, 能分泌HBV病毒, 该病毒颗粒在形态学上与人血清HBV颗粒没有区别, 并且可以像人HBV一样感染黑猩猩. 然而尽管转基因小鼠可以产生高滴度的病毒, 却没有表现出任何细胞病理迹象, 这是由于转基因小鼠在胚胎发育阶段就耐受了HBV的各种组分. 这些现象说明, HBV感染具有严格的种属特异性, 但是复制并无种属特异性, 而具有组织特异性, 同时证明HBV的致病机制为宿主的免疫致病. 因转基因小鼠对HBV抗原处于免疫耐受状态, 还可用于研究感染慢性化的形成机制, 熊一力 *et al*^[10]在研究树突状细胞的抗原提呈功能时, 发现转基因小鼠对HBV的抗原提呈能力低下, 同时观察到小鼠的T淋巴细胞免疫活化受到抑制, 鼠肝细胞应答能力下降, 由此推测树突状细胞的抗原提呈能力下降, 是宿主对HBV产生免疫耐受的关键. Zheng *et al*^[11]研究HBV全基因组转基因小鼠模型时发现HBV虽然是肝细胞癌产生的一个重要原因, 但病毒本身并不是有效的致癌物, 其致癌作用可以被致癌物二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)所激发.

HBV基因组转基因小鼠模型为抗HBV药物的评价做出了重要的贡献, 不仅用于核苷类似物以及细胞因子的抗HBV效果评价, 而且被用来评价siRNA对HBV的治疗效果. 研究发现, siRNA作为一种新的潜在的治疗HBV感染的手段, 具有良好的抗HBV的效果, 在转基因小鼠中可以将

HBV的复制水平抑制到不能检测的水平^[12-13]. 虽然HBV基因组转基因小鼠将HBV组分当作自身组分, 不会发生肝炎, 但是, 如果在这种小鼠体内注入针对HBsAg的CTL细胞, 则可以建立急性肝炎小鼠模型^[14], 利用这种模型获得了大量的HBV相关的免疫学信息, 证明HBV特异性CTL细胞通过分泌细胞因子强烈抑制病毒复制, 从而大大降低血液中HBV浓度, 但是这些CTL并不直接杀伤受HBV感染的细胞^[15], 而是引起非HBV特异性的炎症细胞进入肝脏, 这可能是宿主细胞免疫导致肝脏损伤的原因所在^[16], 而且如果在HBV CTL诱导的肝炎模型中去除Gr-1(+)细胞, 则可以避免对肝组织的损伤, 并且不影响CTL的抗病毒活性. 将HBV基因组转入严重免疫缺陷小鼠(SCID小鼠), 该转基因小鼠也可以终身分泌HBV, 但不表现出任何肝炎症状, 但是给该小鼠注入脾细胞则可以消除血液中的病毒并产生慢性肝炎, 如果注入更多的脾细胞, 则可以导致急性肝炎^[17].

1.2 HBV亚基因组转基因小鼠 除了上述HBV全基因组转基因小鼠之外, 也有人用HBV的某一个或多个基因建立转基因小鼠. 这种HBV亚基因组转基因小鼠主要用于研究单个HBV基因对宿主的影响, 尤其是对HBV相关肝硬化及肝癌发生机制的影响, 以及对宿主免疫系统的影响. 屠亚军 *et al*^[18]建立一种可用于研究慢性乙型肝炎患者诱发肝癌的机制及HBX反式激活机制的人的HBV X基因转基因小鼠模型. 相关研究进一步证实HBV X基因是有一定的致癌作用, 但并不单独直接致癌, 而是与其他致癌基因和环境致癌物共同致癌^[19-20], 其致癌机制与抑癌基因p53相关^[21]. 应用转X基因小鼠的其他研究也陆续证明, X蛋白可以调节细胞转录因子的活性、激活Ras2Raf、NF2kB通路、影响p53基因修复DNA等而引起细胞癌变^[22-25]. 此外, 有学者用该模型对其在HBV复制周期中的作用进行研究, 发现X蛋白不是HBV复制所必需的, 但能增强病毒的复制^[26]. Yamazaki *et al*^[27]通过在转X基因小鼠上的研究发现β-干扰素(IFN-beta)在小鼠体内可以抑制DNA的合成继而有效的预防HCC的发生. 同样利用转X基因小鼠, 台湾学者证实了水飞蓟素(silymarin)可以有效的预防或者延迟肝癌的发生^[28]. 转大S基因小鼠研究发现, 大S基因的表达导致大量S蛋白堆积于肝细胞内, 导致肝细胞毒性及代偿性增生, 直至引发肝癌. 另有实验证实全长的preS/S基因产物不具有反式激活作用, 而pres1、pres2区突变的preS/S基因的表

达产物诱导DNA的氧化损伤,可能与HBV相关性HCC的发生有关^[29]. 转HBc/HBeAg基因小鼠研究发现,分泌型抗原e比抗胞内蛋白c更能诱导机体产生T细胞免疫耐受. 刘红 *et al*^[30]用受CMV启动子调控的HBV C基因建立了能够稳定传代的转基因小鼠,并用作评价HBV核酸疫苗的效果和观察针对HBcAg的免疫反应在肝脏损伤中的作用.

总之,转基因小鼠在研究HBV的复制及其与宿主的相互作用方面发挥了重要的作用,然而相关研究具有多种缺陷:首先,转基因小鼠并非被HBV感染,因此无法用来研究病毒进入和在体内的散布;第二,转基因小鼠中的病毒RNA均来自于整合的HBV基因组,在转基因小鼠肝细胞中未发现HBV正常复制所需要的cccDNA(原因不明),因此这些模型不太适合于用来研究抗病毒药物对cccDNA生成的抑制作用.

2 HBV转染小鼠模型

2.1 以病毒载体转导小鼠 用HBV基因组转染体外培养原代细胞或肝癌细胞系,可以建立基因cccDNA的HBV复制细胞模型. 利用杆状病毒载体或者腺病毒载体包装HBV基因组,也可有效的转染小鼠体内肝脏细胞. Rauschhuber *et al*^[31]用一种缺失了全部病毒编码序列的腺病毒载体GD-Adv(gene-deleted adenoviral vector)建立一种转基因小鼠模型. 这样建立的动物模型由于HBV非天生就有,因此可以引起宿主的免疫反应,产生针对HBV的细胞免疫和体液免疫^[32],然而由于载体以及HBV自身的抗体性,以及HBV不能感染小鼠肝细胞,因此HBV只能短暂分泌.

2.2 HBV裸DNA直接注射小鼠 直接将HBV裸DNA注射到裸鼠肝脏内,可以打破种间屏障,使裸鼠产生类似HBV携带者的状况,但这种方法只能是小鼠肝脏中一小部分细胞携带HBV. Yang *et al*^[33]创造了尾静脉大体积(1.6 mL)注射质粒DNA的方法,可以使小鼠产生高滴度(10^7 copy/mL血液)的病毒,但是1 wk以后随着血中抗体和CTL细胞的出现,病毒很快被清除. 而用同样的方法再NOD/SCID小鼠中,病毒可以持续81 d以上. 利用这种小鼠模型研究发现,注射DNA siRNA可以阻断HBV复制^[34];大大降低血中HBV含量. 有中国学者,采用水动力尾静脉注射法,将含有1.3倍HBV基因组的pHBV4.1注入BALB/C小鼠,建立了一种快速简便并且病毒可高水平复制的HBV动物模型,可以用来研究

多聚肌苷酸对HBV复制的抑制作用^[35]. 2006年, Ketzinzel-Gilad *et al*^[36]将HBV adw亚型通过酶切位点连接到载体上,用水动力转染法尾静脉分别注射到BALB/c和SCID小鼠体内. 在BALB/c小鼠体内HBeAg和HBsAg在第3天打到高峰,10 d后随着抗体的出现而开始下降;在SCID小鼠血清中30 d后仍可以检测到HBeAg和HBsAg,利用Real-time PCR检测到HBV-DNA的复制水平可以达到 10^6 - 10^7 . 同年Takehara *et al*^[37]利用水动力转染技术注射1.5倍HBV基因到Balb/c裸鼠体内,HBV相关抗原表达超过1年,而且检测到了cccDNA,说明该模型更接近于自然感染.

尽管在NOD/SCID小鼠中HBV存在时间较长,但是仍然是一过性的HBV复制模型,病毒会以为不能感染和复制而自引清除. 此外该系统不仅需要使用特殊的小鼠NOD/SCID,而且由于注射剂量太大(相当于小鼠全身体液的总量),对小鼠肝脏和其他器官造成的损伤也不能忽视.

3 人-鼠嵌合肝模型

近年来人们用人的肝细胞移植到免疫缺陷小鼠体内,得了一些嵌合肝动物模型,在这些动物模型中,人的肝细胞可以存在并感染HBV.

3.1 Trimer小鼠模型 该模型是用正常Balb/c小鼠经致死剂量的辐射处理后,静脉注射严重联合免疫缺陷(severe combined immunodeficient, SCID)小鼠的骨髓细胞. 这种小鼠用HBV感染过的人肝活检细胞植入其体内,大约80%的移植小鼠可产生病毒血症,组织化学分析和人血清白蛋白mRNA检测结果显示,人肝细胞移植可以在小鼠体内存活. 这种小鼠模型中HBV病毒滴度不高,仅为 10^5 HBV copy/mL血液,而且病毒血症持续时间也只有20 d,仅适合于短时间的药物抗病毒活性分析^[38].

3.2 NOD/SCID小鼠模型 该模型使用NOD/SCID小鼠作为人肝细胞的受体动物,给小鼠注射肝细胞生长因子c-Met的受体酪氨酸激酶拮抗剂(抗体)可以大大促进人肝细胞的存活时间,这种动物模型可以支持HBV的感染和复制,HBV抗原和DNA可在血中存在5 mo,但是HBV DNA的浓度也不太高,只能达到 2×10^5 copy/mL血清. 该模型还可以进行HDV的超感染^[39]. 一旦停止注射抗c-Met抗体,小鼠体内人肝细胞就会缓慢的减少. 有人将HBV基因组转染永生化的肝细胞后植入RAG-2缺陷小鼠(该小鼠与SCID小鼠类似,因为recombination activation gene-2

■应用要点

虽然普通小鼠无法感染HBV,但是通过多种多样的分子生物学的手段,却可以建立适合于各种研究目的HBV小鼠模型,这为HBV的研究提供了非常有用的工具

■同行评价

本文就HBV的小鼠模型研究情况进行综述,为进一步开展实验研究提供了较为系统的理论与实践经验。

的失活而不能形成成熟的T、B细胞),结果获得了5 mo以上的高滴度病毒(达 1×10^8 copy/mL血清)^[40]。

3.3 uPA/SCID小鼠模型 该模型使用的是uPA/SCID小鼠,这种小鼠因为被转入具有肝脏毒性的uPA基因(urokinase plasminogen activator),自身的肝细胞生长受到抑制,而植入的肝细胞具有生长优势,加之该小鼠无免疫排斥能力,适合于移植肝细胞的生长^[41]。移植肝细胞可以生长到小鼠出生之后8 wk,这个年龄正是小鼠肝脏长势正常的时期。在这种小鼠中,移植人肝细胞可以有机的整合到整个鼠肝脏中,在有些模型中,人的肝细胞可以占到整个肝脏的绝大部分,该肝脏近乎完全人源化^[42-43]。给这种小鼠注射乙肝患者血清,小鼠可产生 10^{10} copy/mL血清,并且可以持续5 mo^[43],用体外HepG2细胞产生的病毒上清也可以感染这样的动物模型。Petersen *et al*^[44]用这种模型研究发现从HBV大外膜蛋白分离的酰化肽可以抑制HBV的感染。这种模型还被用来研究HBV突变株(HBeAg阴性)的生物学特性,该模型将非常适合于抗病毒药物的评价,无论这些药物是抑制病毒复制,还是影响病毒进入细胞和体内传播。

尽管该模型可以说是目前最好的HBV感染复制模型,但是由于该小鼠没有免疫机能,对于研究HBV的致病机制以及HBV与宿主免疫系统的相互关系仍然是一个难以克服的问题,一种间接的解决方法就是使用人抗HBV免疫细胞对小鼠进行处理,实施过继免疫(adoptive immune)由于uPA/SCID小鼠在生长过程中,转基因uPA可能会丢失,失去uPA基因的小鼠肝脏重新获得生长优势,结果会导致小鼠肝细胞比例增加,实验发现人肝细胞所占总肝细胞的比例直接影响了血清HBV的含量。uPA/SCID小鼠的饲养和繁殖也是一个问题,由于没有细胞免疫和体液免疫,加上肝脏不能正常发育,因此出生死亡率很高。

与其类似的另一种嵌合肝模型使用uPA转基因小鼠和RAG2小鼠(该小鼠因为recombination activation gene-2的失活而不能形成成熟的T、B细胞)杂交获得杂合子小鼠,其特征与uPA/SCID纯合子小鼠类似,但是由于是杂合子,移植肝细胞占肝脏总细胞数比例较低(可达15%)。这种模型与uPA/SCID模型一样,也可以进行HBV的感染和复制研究。所有嵌合肝模型的主要特点就是允许人肝细胞生长,但是这类模型的构建必须每次都使用新鲜的人肝细胞,而这种人

鲜活肝细胞来源很有限,不易获得。折衷的解决方案是使用树鼯肝细胞,但是从某种角度讲,如果用树鼯肝细胞移植到小鼠体内,还不如直接以树鼯作为模型更好。

4 结论

小鼠作为实验室最常使用的动物,其易于饲养,遗传背景清楚,基因组全序已完全确定,其免疫系统研究深入透彻,这些特点决定了小鼠是最理想的动物模型。虽然普通小鼠无法感染HBV,但是通过多种多样的分子生物学的手段,却可以建立适合于各种研究目的HBV小鼠模型,这为HBV的研究提供了非常有用的工具,如Zhang *et al*^[45]利用小鼠模型研究发现LIGHT基因(TNF家族成员)可以增强细胞和体液免疫反应。目前国内研究的HBV小鼠模型各有特点和不足,转基因小鼠和基因转染小鼠最大的缺点是HBV病毒不能进入细胞发生正常感染和在体内传播,转基因小鼠的优点是可以稳定的分泌必须HBV病毒及抗原,无需每次进行转染或移植,但是机体不能产生对HBV的免疫反应,可以通过过继免疫的方法进行部分补救。而基因转染小鼠的优点是可以产生对HBV的免疫反应,并且可以方便的研究HBV不同突变对HBV本身以及对免疫系统的影响,可以进行免疫致病机制研究。嵌合肝小鼠模型的最大特点是允许HBV复制,但是由于免疫缺陷,他们与转基因小鼠一样不能产生对HBV的免疫,同时动物饲养比较困难,而且必须提供来源稀少的新鲜活跃的人肝细胞。因此,有必要进一步研究更为理想的动物模型。

5 参考文献

- 1 Bréchet C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology* 2004; 127: S56-S61
- 2 Chen M, Sällberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV, Billaud JN, Milich DR. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 2005; 79: 3016-3027
- 3 Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 72: 1462-1468
- 4 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1005-1009
- 5 Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaize D, Canine I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15655-15660
- 6 Bertoni R, Sette A, Sidney J, Guidotti LG, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Human class I supertypes

- and CTL repertoires extend to chimpanzees. *J Immunol* 1998; 161: 4447-4455
- 7 von Weizsäcker F, Köck J, MacNelly S, Ren S, Blum HE, Nassal M. The tupaia model for the study of hepatitis B virus: direct infection and HBV genome transduction of primary tupaia hepatocytes. *Methods Mol Med* 2004; 96: 153-161
- 8 Lin E, Luscombe C, Colledge D, Wang YY, Locarnini S. Long-term therapy with the guanine nucleoside analog penciclovir controls chronic duck hepatitis B virus infection in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2132-2137
- 9 Korba BE, Cote PJ, Menne S, Toshkov I, Baldwin BH, Wells FV, Tennant BC, Gerin JL. Clevudine therapy with vaccine inhibits progression of chronic hepatitis and delays onset of hepatocellular carcinoma in chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Antivir Ther* 2004; 9: 937-952
- 10 能一力, 刘光泽, 贾彦征. HBV转基因小鼠免疫耐受机制的实验研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 642-645
- 11 Zheng Y, Chen WL, Louie SG, Yen TS, Ou JH. Hepatitis B virus promotes hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 2007; 45: 16-21
- 12 Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology* 2003; 37: 764-770
- 13 Shlomai A, Shaul Y. RNA interference--small RNAs effectively fight viral hepatitis. *Liver Int* 2004; 24: 526-531
- 14 Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, Moss B, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL, Kanagawa O, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 1990; 248: 361-364
- 15 Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 25-36
- 16 Sitia G, Isogawa M, Iannaccone M, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs. *J Clin Invest* 2004; 113: 1158-1167
- 17 Larkin J, Clayton M, Sun B, Perchonock CE, Morgan JL, Siracusa LD, Michaels FH, Feitelson MA. Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease. *Nat Med* 1999; 5: 907-912
- 18 屠亚军, 琦祖和, 杨鹏, 潘燕, 于树玉, 杜森, 李光三. 人乙型肝炎病毒X基因转基因小鼠模型的建立. *中国医学科学院学报* 2000; 22: 263-265
- 19 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin b1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus x protein. *J Virol* 2002; 76: 11770-11774
- 20 Zhu H, Wang Y, Chen J, Cheng G, Xue J. Transgenic mice expressing hepatitis B virus X protein are more susceptible to carcinogen induced hepatocarcinogenesis. *Exp Mol Pathol* 2004; 76: 44-50
- 21 Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD, Kappel CA, Ngo L, Feitelson MA, Jay G. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet* 1995; 9: 41-47
- 22 Lin Y, Nomura T, Cheong J, Dorjsuren D, Iida K, Murakami S. Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5. *J Biol Chem* 1997; 272: 7132-7139
- 23 Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10350-10354
- 24 Lucito R, Schneider RJ. Hepatitis B virus X protein activates transcription factor NF-kappa B without a requirement for protein kinase C. *J Virol* 1992; 66: 983-991
- 25 Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998; 72: 266-272
- 26 Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 2579-2584
- 27 Yamazaki K, Suzuki K, Ohkoshi S, Yano M, Kurita S, Aoki YH, Toba K, Takamura MA, Yamagiwa S, Matsuda Y, Aoyagi Y. Temporal treatment with interferon-beta prevents hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus X gene transgenic mice. *J Hepatol* 2008; 48: 255-265
- 28 Wu YF, Fu SL, Kao CH, Yang CW, Lin CH, Hsu MT, Tsai TF. Chemopreventive effect of silymarin on liver pathology in HBV X protein transgenic mice. *Cancer Res* 2008; 68: 2033-2042
- 29 Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, Chang WW, Lei HY, Lai MD, Chang WT, Huang W. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2023-2032
- 30 刘红, 姚玉成, 何金, 李文林, 李建秀, 苏小平, 张钦宪, 胡以平. 乙型肝炎病毒核心抗原转基因小鼠的建立. *第二军医大学学报* 2003; 24: 172-1741
- 31 Rauschhuber C, Xu H, Salazar FH, Marion PL, Ehrhardt A. Exploring gene-deleted adenoviral vectors for delivery of short hairpin RNAs and reduction of hepatitis B virus infection in mice. *J Gene Med* 2008; 10: 878-889
- 32 Isogawa M, Kakimi K, Kamamoto H, Protzer U, Chisari FV. Differential dynamics of the peripheral and intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis B surface antigen. *Virology* 2005; 333: 293-300
- 33 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13825-13830
- 34 Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, Hartsough K, Machemer L, Radka S, Jadhav V, Vaish N, Zinnen S, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Jeffs LB, Judge A, MacLachlan I, Polisky B. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1002-1007
- 35 Liu FJ, Liu L, He F, Wang S, Zhou TY, Liu C, Deng LY, Tang H. Establishment and primary application of a mouse model with hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5324-5330
- 36 Ketzinil-Gilad M, Zauberman A, Nussbaum O, Shoshany Y, Ben-Moshe O, Pappo O, Felig Y, Ilan E, Wald H, Dagan S, Galun E. The use of the hydrodynamic HBV animal model to study HBV biology and anti-viral therapy. *Hepatol Res* 2006; 34: 228-237
- 37 Takehara T, Suzuki T, Ohkawa K, Hosui A, Jinushi M, Miyagi T, Tatsumi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B

- virus replication. *J Hepatol* 2006; 44: 267-274
- 38 Ilan E, Burakova T, Dagan S, Nussbaum O, Lubin I, Eren R, Ben-Moshe O, Arazi J, Berr S, Neville L, Yuen L, Mansour TS, Gillard J, Eid A, Jurim O, Shouval D, Reisner Y, Galun E. The hepatitis B virus-trimera mouse: a model for human HBV infection and evaluation of anti-HBV therapeutic agents. *Hepatology* 1999; 29: 553-562
- 39 Ohashi K, Marion PL, Nakai H, Meuse L, Cullen JM, Bordier BB, Schwall R, Greenberg HB, Glenn JS, Kay MA. Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses. *Nat Med* 2000; 6: 327-331
- 40 Brown JJ, Parashar B, Moshage H, Tanaka KE, Engelhardt D, Rabbani E, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice. *Hepatology* 2000; 31: 173-181
- 41 Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 1991; 66: 245-256
- 42 Tatenno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, Yoshizato K. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 2004; 165: 901-912
- 43 Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, Noguchi C, Oga H, Imamura M, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Ochi H, Chayama K, Tatenno C, Yoshizato K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 2005; 42: 1046-1054
- 44 Petersen J, Dandri M, Mier W, Lütgehetmann M, Volz T, von Weizsäcker F, Haberkorn U, Fischer L, Pollok JM, Erbes B, Seitz S, Urban S. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 335-341
- 45 Zhang Y, Jiang W, Fan Y, Wen J, Hao W, Qian M. Engineering enhancement of the immune response to HBV DNA vaccine in mice by the use of LIGHT gene adjuvant. *J Virol Methods* 2008; 153: 142-148

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

肝癌复发转移与中医药防治

代小平, 管冬元

代小平, 管冬元, 上海中医药大学基础医学院 上海市 201203
国家自然科学基金资助项目, No. 30400582
作者贡献分布: 文献检索、资料分析与论文撰写由代小平完成;
选题与审校由管冬元完成。
通讯作者: 管冬元, 201203, 上海市蔡伦路1200号, 上海中医药大学实验中医教研室. guandongyuan@hotmail.com
电话: 021-51322116
收稿日期: 2008-10-13 修回日期: 2008-11-09
接受日期: 2008-11-10 在线出版日期: 2008-12-08

Prevention and treatment of hepatoma metastasis and recurrence with Chinese medicine

Xiao-Ping Dai, Dong-Yuan Guan

Xiao-Ping Dai, Dong-Yuan Guan, Preclinical Medicine Institute in Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203
Supported by: National Natural Scientific Foundation of China, No. 30400582
Correspondence to: Dong-Yuan Guan, Experimental Chinese Medicine Office of Preclinical Medical Institute in Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 1200 Cailun Road, Shanghai 201203, China. guandongyuan@hotmail.com
Received: 2008-10-13 Revised: 2008-11-09
Accepted: 2008-11-10 Published online: 2008-12-08

Abstract

Based on the clinical data and fundamental investigation, this article overviews the current situation in preventing and treating the recurrence and metastasis of hepatoma with traditional Chinese medicine, holding the opinion that researchers ought to perform multi-center, large-sample and random clinical trials to find out an effective therapeutic method or prescription of traditional Chinese medicine; thus promote the research on the mechanism of prevention and treatment with Chinese medicine via multiple approaches.

Key Words: Hepatoma; Recurrence; Metastasis; Traditional Chinese medicine

Dai XP, Guan DY. Prevention and treatment of hepatoma metastasis and recurrence with Chinese medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3865-3869

摘要

本文在简述肝癌复发转移的临床资料与基础研究的基础上, 综述我国中医药防治肝癌复发转移的研究现状, 认为应大力从临床上开展多中心、大样本、随机观察的方法来筛选有效的中医药治法与方药, 进一步多途径、多方法地深入推进中医药防治的机制研究。

关键词: 肝癌; 复发; 转移; 中医药

代小平, 管冬元. 肝癌复发转移与中医药防治. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3865-3869

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3865.asp>

0 引言

我国原发性肝癌的发病率高居世界之首, 肝癌已成为我国第2位癌症杀手. 当前肝癌临床治疗十分活跃, 除传统治疗的四大疗法(手术、放疗、化疗、生物治疗, 尤以手术为第一选择)外, 又出现了局部治疗、肝移植、靶向治疗等新方法^[1]. 但所有的疗法, 几乎无一例外, 均面临治疗后转移复发这个瓶颈问题, 使疗效难以进一步提高^[2]. 而在我国的肝癌防治研究中, 中医药发挥了重要而又独特的作用, 也开展了广泛的临床与机制研究^[3-4]. 其中, 随着现代医学对肿瘤治疗理念的深入与改变, 中医药对防治肝癌复发转移的作用与机制, 已越来越受到临床与学术界的重视. 现将有关方面作一简要综述.

1 肝癌复发转移的研究

1.1 肝癌复发转移的临床资料 复发与转移是大多数原发性肝癌(以下简称肝癌)术后的死亡原因. 大量的研究资料表明^[5-6], 大肝癌切除术后5年复发与转移率高于60%, 小肝癌也在40%以上. 最早的在术后2 mo复发, 复发高峰在1-2年, 5年后复发少见. 因此, 在术后5年内应定期检查与采取抗复发转移措施, 其中, 根治切除术后, AFP不转阴、肝血管造影和碘化油CT是早期发现残癌和复发的最敏感的检测手段^[7].

■背景资料

在现代医学防治肝癌的所有方法中, 均面临治疗后转移复发这个瓶颈问题, 使疗效难以进一步提高. 而在我国的肝癌防治研究中, 中医药发挥了重要而又独特的作用, 也开展了广泛的临床与机制研究. 其中, 随着现代医学对肿瘤治疗理念的深入与改变, 中医药对防治肝癌复发转移的作用与机制, 已越来越受到临床与学术界的重视.

■同行评议者

徐列明, 教授, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

■研发前沿

中医药在防治肝癌中的应用,已成为我国在肝癌防治研究领域的最大特色和优势。但目前缺乏大样本、多中心、随机对照的临床资料,其机制研究也有待深入,这是亟待加强的问题。

目前,临床上抗肝癌复发与转移的治疗措施主要有放射介入治疗(TACE)、全身化疗、区域性化疗、生物免疫治疗与中医药治疗等几方面^[8]。其中,全身化疗在肝癌抗复发与转移治疗中的价值尚存较大争议,主要是合并肝硬化的患者往往难于耐受足够疗程的治疗。而生物免疫治疗由于副作用较小而易于被患者接受,常用的药物有干扰素 α 和胸腺素 α 。

我国复旦大学肝癌研究所根据肿瘤转移复发规律设计一系列术后介入综合治疗的方案^[9]。该方案认为,术后2 wk肝功能基本恢复,即予全身化疗(如静脉缓滴5-FU),以杀灭循环中的癌细胞;术后2 wk起给予生物免疫治疗(如干扰素、拉米夫定、胸腺肽等),以提高机体免疫功能,可起清扫残癌的作用;术后2 mo内考虑循环癌细胞向血管壁侵犯,开始向组织浸润定位着床,必先有肿瘤血管生成形成显微镜下转移浸润,这时进行肝动脉预防量的化疗栓塞治疗,以起阻断肿瘤血供,杀灭肿瘤细胞,预防肿瘤复发与转移的效果。

1.2 肝癌复发转移的基础研究 在我国肝癌复发与转移研究中,复旦大学肝癌研究所用组织块肝原位移植成功建立在肺、肝和淋巴结高转移的人肝癌裸鼠模型LCI-D20,并用该模型建立高转移潜能人肝癌细胞系MHCC97-H,以及在此细胞系基础上通过“自发性逐级肺转移筛选”建立起自发肺转移人肝癌细胞系HCCML6^[10]。这些肝癌高转移动物模型与高转移潜能人肝癌细胞系的建立,对于我国深入研究肝癌复发转移的分子机制,以及寻找抗复发转移的药物等方面的研究,提供了一个极好的技术平台。

肝癌的复发和转移有一系列基因参与调控,它涉及到细胞基因改变,表面结构、抗原性、侵袭力、黏附能力、产生局部血凝因子或血管生成的能力、分泌代谢功能以及肿瘤细胞与宿主、肿瘤细胞与间质之间相互关系的多步骤、多因素参与的过程。主要与(1)基因的调控,(2)黏附分子,(3)细胞外基质降解,(4)血管生成等四个方面有关^[11-12]。近几年来,高通量技术大量地应用于肝癌复发转移相关的基因组学与蛋白质组学研究中,筛选出部分在有或无复发转移的差异表达基因,并成功建立肝癌转移分子预测模型。例如,我国复旦大学肝癌研究所与美国国立癌症研究所合作,基于与肝细胞癌转移和患者预后等相关的基因表达谱,成功建立了由153个

基因组成的肝癌转移分子预测模型,其预测准确率达90%以上^[13]。国际上,Iizuka *et al*^[14]在基因芯片技术分析的基础上,也建立了一个高效的、由12个差异表达基因组成的预测系统。

1.3 抗肝癌复发转移的问题与反思 临床上肝癌根除手术时,为了预防复发与转移常常要面对两大难题。其一是血管或胆管内癌栓,大多数癌栓即使在手术中予以清除或吸除,仍极易复发,难以控制。其二是腹腔淋巴结转移,这在胆管细胞癌中极为常见,以往尚未引起足够的重视,预后极差。同时,对仅局限于肝十二指肠韧带内的转移淋巴结清扫较易,但转移往往涉及胰头、肝总动脉及腹腔动脉周围淋巴结等部位,术中处理较为棘手。

尽管许多研究者报道了影响肝癌复发转移的基因或蛋白,这些研究进展可能会为肝癌增加血清学或基因诊断的方法,并对复发转移的危险性进行预测,但尚不足以据此建立相应特异的干预手段。同时,由于与肿瘤复发转移相关的分子水平变化是动态变化的,为此单一指标的检测难以达到要求,因此,需要寻找一组有预测价值又符合临床检测要求的指标。另外,除寻找癌细胞相关的指标外,还应寻找机体免疫功能相关的指标。

肝癌是一种高复发转移率的恶性肿瘤,顾健人 *et al*^[15]认为肿瘤是一种以局部组织细胞异常生长为特征的全身系统性疾病,机体神经、内分泌、免疫等系统的失调或调控异常是肿瘤形成的系统性条件,也与肿瘤复发转移密切相关。因此,对于肿瘤治疗,除了现有的手段,应该加强对修复与重建机体对细胞调控的平衡态,包括神经、内分泌、免疫等系统标志的检测,以及相应的新的治疗研究,这可能是今后研究的重要方向。这些新观念的提出与中医防治肿瘤及其复发转移的许多治疗理念不谋而合。

2 中医药对肝癌复发转移的防治研究

2.1 中医药对防治肝癌复发转移的临床意义 在肝癌治疗方面,尽管中医药对缩小肿块作用不十分理想,但大量的临床实践证明,中医药能协助手术、放化疗等现代治疗方法取得更好的疗效,确有其独特之处。这已是我国在肝癌防治研究领域的最大特色和优势^[16]。

由于肝癌复发转移率高,以及患者大多有慢性肝病背景,而任何一种放、化疗方案又都

伴有明显的毒副反应,许多患者正是由于无法忍受这些毒副反应而中途放弃治疗。因此,在我国肝癌综合治疗方案里,中医药的积极参与已经是一个不可缺少的重要组成部分。据不完全统计,临床80%以上的肝癌患者都在不同时间段不同程度地接受中医药治疗,尤其是根治手术后的抗复发转移治疗。苏小康 *et al*^[17]探讨了健脾化痰法抗肝癌术后复发转移的临床疗效,对比观察健脾化痰组(治疗组)和单纯手术组(对照组)1、2、3、5年生存率,复发率,肝功能Child分级及肿瘤相关指标的变化。结果表明健脾化痰法中药能提高肝癌患者的生存率、降低复发率。在肝癌转移复发的防治中,动物药物是经常使用的中药材,金龙胶囊是从守宫、金钱白花蛇等动物提取制备的鲜动物药。李辉 *et al*^[18]评价了金龙胶囊对临床可切除肝癌手术后复发和转移的预防作用。结果表明,与对照组相比,金龙胶囊能明显降低肝癌手术后1-3年的转移与复发率。也有人探讨了中医药分阶段防治恶性肿瘤术后复发转移优化方案^[19],认为在肝癌术后的不同时期,可以采用不同的中医药治法来达到防治肝癌复发转移的目的。第一阶段为术后1 wk至西医放化疗前,主要进行中医药扶正治疗,以提高机体的免疫能力。同时,在此期间,不主张使用“以毒攻毒”之法或由祛邪药物组成的中药,以避免术后机体的免疫能力与抗癌能力愈发降低。第二阶段为西医的放化疗期间,中医药主要通过辨证论治,结合患者不同的毒副反应使用扶正或调理中药,以减轻西医治疗所带来的毒副作用,使患者能顺利接受与完成整个西医治疗方案。第三阶段为中医药抗复发转移的主要阶段,西医通过手术与放化疗治疗后,一般认为已完成了整个治疗方案,而此时机体的免疫功能与骨髓造血功能并没有达到较好的状态,同时,体内的癌细胞也并没有完全清除干净,或者这些癌细胞只是潜伏了下来,随时都有可能“东山再起”。因此,在第三阶段的抗复发与转移的防治中,要强调扶正祛邪并重,并坚持长期用药。当然,有相当一部分肝癌患者在手术后,由于自身体质与肝功能低下等原因,不能接受西医的放化疗等进一步治疗方案。对于这部分患者一般经第一阶段治疗后,直接进入第三阶段的长期的扶正祛邪治疗,只是在患者耐受的情况下,加大祛邪中药的比重。

2.2 中医药防治肝癌复发转移的机制研究 肝癌

复发转移的机制是十分复杂的,既包括肿瘤细胞遗传特性的差异,也与机体神经、内分泌、免疫等系统的功能状态密切相关。而中医药主要通过扶正祛邪的方法来达到其防治复发转移的目的。孟静岩 *et al*^[20]综述了我国中医药防治肿瘤复发转移的作用,认为主要包括:抑制细胞增殖、诱导细胞分化、诱导细胞凋亡、增强免疫、抗多药耐药性等方面。

肝癌细胞的侵袭黏附能力常常被认为与复发转移密切相关,因此,常用来观察中医药的抗复发转移能力。余桂芳 *et al*^[21]探讨了“以毒攻毒”中药制剂三氧化二砷与扶正中药人参皂甙对人肝癌SMMC 7721细胞黏附侵袭转移能力的影响,结果发现,三氧化二砷与人参皂甙单独与联合应用均能显著抑制人肝癌SMMC7721细胞的黏附能力,抑制细胞游走与穿透基底膜的能力,其联合抑制作用优于单独运用。孙婧璟 *et al*^[22]观察了活血化瘀中药丹参对SMMC7721肝癌细胞株侵袭黏附能力和对裸鼠人肝癌切除术后转移复发的影响。结果表明,丹参处理的SMMC7721细胞表面细胞间黏附分子1(ICAM1)表达明显低于对照组,丹参可抑制肝癌细胞的侵袭能力,促进已黏附细胞的脱落,可抑制SMMC7721与SMMC7721细胞、淋巴细胞、内皮细胞的黏附,并对早期和晚期裸鼠人肝癌切除术后肝内和远处转移复发有防治作用。其他,如郭昱 *et al*^[23]观察了清热解毒中药黄芩的有效成分黄芩甙对肝癌细胞BEL-7402的抗黏附作用。当然,临床上抗肝癌复发转移的治疗更多的是中药复方汤药或制剂的应用,因此,如何有效地观察其机制研究,将更显其应用价值。郭昱 *et al*^[24]利用中药药物血清,观察了肝瘤口服液含药血清对人肝癌BEL-7402细胞系侵袭和转移的影响,结果表明肝瘤口服液含药血清能明显抑制肝癌细胞侵袭力、黏附力及运动能力。黄修燕 *et al*^[25]对扶正类中药复方“松友饮”抗肝癌转移复发的作用进行了系统的研究,结果表明,“松友饮”对高转移人肝癌MHCC97H细胞侵袭性具有明显的抑制作用,其机制可能是通过抑制MMP2活性来抑制肝癌侵袭性。

2.3 中医药防治肝癌复发转移的反思 大量的研究表明,肝癌的复发与转移是机体(包括神经、免疫、内分泌等系统的功能状态)、微环境(含血管生成等因素)和癌细胞三者互动的结果^[26]。因此,对于肝癌术后复发与转移的防治,不能单

■ 相关报道

徐振晔认为在肝癌术后的不同时期,可以采用不同的中医药治法来达到防治肝癌复发转移的目的。第一阶段为术后1 wk至西医放化疗前,主要进行中医药扶正治疗,以提高机体的免疫能力。第二阶段为西医的放化疗期间,中医药主要通过辨证论治,结合患者不同的毒副反应使用扶正或调理中药,以减轻西医治疗所带来的毒副作用,使患者能顺利接受与完成整个西医治疗方案。第三阶段为中医药抗复发转移的主要阶段,在西医通过手术与放化疗治疗后,要强调扶正祛邪并重,并坚持长期用药。

■应用要点

本文综述了我国中医药防治肝癌复发转移的研究现状,认为在临床上,应遵循循证医学的原则,广泛利用我国肝癌患者众多,普遍接受中医药防治的医疗资源,着力推进多中心、大样本、随机对照观察的方法来筛选有效的中医药治法与方药;在机制研究方面,也应充分利用当代生命科学的有关知识与原理,进行深入的、多途径、多方法的探讨。

从过去局部的解剖学与微观的病理学角度来看,而应更多地从系统生物学与整体的机体状态来加以研究。现代医学对于肝癌复发与转移防治观念的转变,与中医药的整体观念及辨证论治思想极其相似。正是这种防治观念的转变,以及中医药在肝癌临床中的确切疗效,使得现代医学界对中医药在肝癌复发与转移的防治中作用与地位给予了越来越多的肯定与期待。这也为中医药的发展提供了一个良好的契机。

然而,中医药防治肝癌复发转移的研究现状表明,广大中西医肿瘤工作者仍然需要面对诸多的问题与挑战。其一,在中医或中西医结合领域中,研究中医药防治肝癌复发转移的报道极为有限,且大多为临床方药的疗效观察,极少涉及其机制研究。因此,如何进一步从临床上开展多中心、大样本、随机观察的方法来筛选有效的中医药治法与方药,已成当务之急。其二,在小量的机制研究报道中,也仅采用了传统的观察肝癌细胞侵袭能力等方面的研究,较难与中医多途径、多靶点的作用特点相结合。因此,进一步多途径、多方法的深入推进中医药防治的机制研究,已是中医药发展与现代化的迫切需要。其三,在进行机制研究过程中,我们经常要碰到中药的剂型与给药途径的问题。无论是临床疗效的重复,还是实验结果的验证,如果仍然停留在过去传统的剂型与给药方式上,将极大地制约中医药疗效的提高与推广。所幸的是,在长期的抗肿瘤复发与转移工作中,已开发出一些常用的中药制剂,如康莱特注射液、参芪注射液等。随着这些制剂在临床上的广泛应用与作用机制的深入研究,将进一步拓展中医药防治肝癌复发转移的研究范围。

3 结论

随着现代医学对肿瘤系统生物学行为认识的深入,以及肝癌高转移动物与细胞模型的广泛应用,将极为有力地推进中医药防治肝癌复发转移的研究工作^[27-28]。在临床上,应遵循循证医学的原则,广泛利用我国肝癌患者众多,普遍接受中医药防治的医疗资源,着力推进多中心、大样本、随机对照观察的方法来筛选有效的中医药治法与方药。在机制研究方面,也应充分利用当代生命科学的有关知识与原理,进行深入的、多途径、多方法的探讨。总之,中医药在防治肝癌复发与转移的研究工作,既面临诸多的现实困难,也迎来良好的发展机遇。

参考文献

- 1 郭武华, 张吉翔. 肝癌综合治疗的现状. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2199-2203
- 2 汤钊猷. 从生物学角度看肝癌. 医学研究杂志 2008; 37: 1-3
- 3 刘宁宁, 李琦. 中药经肝动脉介入治疗原发性肝癌的回顾与展望. 上海中医药杂志 2008; 42: 79-82
- 4 林谋清, 苏小康, 赖振添. 肝癌转移复发的中西医研究进展. 辽宁中医杂志 2006; 33: 1369-1372
- 5 Wakai T, Shirai Y, Yokoyama N, Nagakura S, Hatakeyama K. Hepatitis viral status affects the pattern of intrahepatic recurrence after resection for hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 266-271
- 6 周信达. 肝细胞癌转移复发研究现状和展望. 肝胆外科杂志 2003; 11: 241-243
- 7 马曾辰, 黄力文, 汤钊猷, 周信达, 林芷英, 钦伦秀, 叶青海, 孙惠川, 任正刚, 夏景林. 原发性肝癌的三级根治切除标准. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 33-35
- 8 沈锋, 吴孟超. 肝癌切除术后抗复发治疗. 中华医学杂志 2005; 85: 2886-2888
- 9 林芷英, 任正刚, 夏景林, 陈漪, 吴晓凤, 马曾辰, 叶青海, 钦伦秀, 孙惠川, 汤钊猷. 原发性肝癌根治切除后介入治疗对复发防治的疗效评价. 中华肿瘤杂志 2000; 22: 315-317
- 10 汤钊猷, 钦伦秀, 孙惠川, 周俭, 王鲁, 林芷英, 马曾辰, 叶胜龙, 吴志全. 肝癌复发转移的研究. 中华普通外科杂志 2000; 15: 517-520
- 11 周伟平, 单云峰, 王红阳, 吴孟超. 肝癌复发和转移的分子生物学研究. 肝胆外科杂志 2004; 12: 6-8
- 12 李立祥, 熊奇如. 肝癌术后复发转移的相关影响因素研究进展. 现代肿瘤医学 2007; 15: 1869-1873
- 13 Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, Simon R, Li Y, Robles AI, Chen Y, Ma ZC, Wu ZQ, Ye SL, Liu YK, Tang ZY, Wang XW. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2003; 9: 416-423
- 14 Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Nishida M, Maeda Y, Mori N, Takao T, Tamesa T, Tangoku A, Tabuchi H, Hamada K, Nakayama H, Ishitsuka H, Miyamoto T, Hirabayashi A, Uchimura S, Hamamoto Y. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 2003; 361: 923-929
- 15 顾健人, 杨胜利. 要用系统性疾病观念重新认识癌症. 中华医学杂志 2005; 85: 505-507
- 16 吴孟超. 中医药在肝癌防治中的作用、地位和存在的问题. 中西医结合学报 2003; 1: 163-164
- 17 苏小康, 叶小卫, 林谋清, 郑泽棠, 池建安, 郭亚雄, 郑东翔. 健脾化痰法抗肝癌术后复发82例临床研究. 中医杂志 2006; 47: 673-675
- 18 李辉, 张波, 于国泳. 金龙胶囊对可切除肝癌手术后复发和转移的预防作用. 首都医药 2007; 12: 35-36
- 19 徐振晔, 郑展. 中医药分阶段防治恶性肿瘤术后复发转移优化方案探讨. 中西医结合学报 2007; 5: 5-10
- 20 孟静岩, 应森林. 中医药抗癌转移作用和机制的研究进展. 天津中医药 2004; 21: 84-86
- 21 余桂芳, 曾文铤, 朱科伦, 马佩球. 三氧化二砷与人参皂甙Rg3联合对人肝癌SMMC7721细胞侵袭转移能力的影响. 疑难病杂志 2007; 6: 23-26
- 22 孙靖璟, 周信达, 刘银坤. 丹参对肝癌转移复发防治作用的研究. 中国中西医结合杂志 1999; 19: 292-295
- 23 郭昱, 郭霞, 姚金锋, 崔东来, 姚树坤. 黄芩甙对肝癌细

- 胞BEL-7402抗黏附作用中细胞凋亡和细胞周期的改变. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3390-3394
- 24 郭昱, 郭霞, 韩俊岭, 姚树坤. 肝瘤口服液含药血清对人肝癌BEL-7402细胞系侵袭和转移的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2709-2713
- 25 黄修燕, 黄白丽, 晁愚, 王鲁, 周俭, 叶胜龙, 汤钊猷. 中药“松友饮”对高转移人肝癌侵袭性及小鼠免疫功能的影响. 肿瘤 2008; 28: 498-502
- 26 汤钊猷. 开展肝癌转移复发研究的意义与途径. 中华普通外科杂志 2006; 21: 761
- 27 叶翩, 张淑玲, 揭盛华, 董继华. 人肝癌裸鼠移植模型的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3500-3503
- 28 彭艳, 张霞, 王葵, 蒋平, 焦炳华, 倪健. 不同转移潜能肝癌细胞株的差异蛋白质组的二维液相色谱分析. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1482-1487

■同行评价

本文综述了我国中医药防治肝癌复发转移的研究现状, 内容条理清晰, 原创内容不多, 有作者自己的观点.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志计量单位标准

本刊讯 本刊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+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 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 \times 6 cm \times 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 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot 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酒精; 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

炎症性肠病基因型动物模型的研究进展

陈迟, 刘菲

■背景资料

炎症性肠病其病因和发病机制尚不明确, 近年来发病率逐渐增高, 已成为临床研究的重点之一。由于人体实验研究受到一定的限制, 因此建立理想的IBD动物模型对于研究其病因、发病机制、疾病发展规律, 确定诊断和治疗手段以及新药开发与研究均有重要意义。IBD动物模型研究已有100多年历史, 迄今还没有一种模型能与人类IBD完全相同或能阐明其全部的发病机制。

陈迟, 刘菲, 同济大学附属东方医院消化内科 上海市 200120
作者贡献分布: 陈迟与刘菲对此文所作贡献均等; 此文由陈迟与刘菲搜集, 分析资料; 论文写作由陈迟完成; 校对刘菲完成。

通讯作者: 刘菲, 200120, 上海市即墨路150号, 同济大学附属东方医院消化内科. liufeiguo2010@163.com
电话: 021-38804518-7221

收稿日期: 2008-10-06 修回日期: 2008-10-23

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-08

Research progress in genetic animal models of inflammatory bowel disease

Chi Chen, Fei Liu

Chi Chen, Fei Liu, Department of Gastroenterology, Dongfang Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China

Correspondence to: Fei Liu, Department of Gastroenterology, Dongfang Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China. liufeiguo2010@163.com

Received: 2008-10-06 Revised: 2008-10-23

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-08

Abstract

In inflammatory bowel disease (IBD), experimental models, especially genetic animal models, are known as important tools for detecting potential therapeutic agents and investigating the mechanisms of pathogenesis. This review is intended to cover recent advances in genetic IBD model applications. The models have been classified into two main categories based on the methods of induction: gene knockout (KO) and transgenic.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Crohn's disease; Genetic animal model

Chen C, Liu F. Research progress in genetic animal models of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3870-3876

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)动物模型研究已有100多年历史, 近年来新兴的基因型动物模型致病机制具有极强的针对性, 对于研究其病因、发病机制、疾病发展规律, 确定诊断和治疗手段以及新药开发均有重

要意义。本文就IBD的基因型动物模型的研究及进展作一综述。

关键词: 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 基因型动物模型

陈迟, 刘菲. 炎症性肠病基因型动物模型的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3870-3876

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3870.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和Crohn病(Crohn's disease, CD)均属于炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 近年来发病率逐渐增高, 已成为临床研究的重点之一。对于IBD动物模型研究已有100多年历史, 从最早的化学药物诱导方法到近年来新兴的基因型动物模型, 可谓层出不穷。其中基因型动物模型致病机制具有极强的针对性, 对于研究其病因、发病机制、疾病发展规律, 确定诊断和治疗手段以及新药开发均有重要意义, 因而倍受关注。本文就IBD的基因型动物模型的研究及进展作一综述。

1 基因敲除型模型

采用基因敲除技术得到特殊的针对某一因子的基因缺陷模型, 用以明确细胞因子、细胞因子受体、淋巴细胞、抗原递呈细胞(APC)、肠上皮细胞和信号转导蛋白等在IBD免疫发病机制中的作用。

1.1 IL-2基因或IL-2 α 受体敲除 白介素-2(IL-2)是免疫系统中一个具有多重调节功能的细胞因子。IL-2由激活的T淋巴细胞产生, 有放大免疫效应、促进B淋巴细胞分化以及活化巨噬细胞、NK细胞和淋巴因子激活杀伤细胞(LAK细胞)的作用^[1]。IL-2 $^{-/-}$ 以及IL-2 α $^{-/-}$ 基因缺陷小鼠的调节性T细胞(Tr)不能抑制Th1型T细胞产生TNF- α 和IFN- γ , 从而自发诱发Th1增强的免疫反应, 其病变通常位于结肠, 但需在细菌诱导下发生^[2]。

Sadlack *et al*^[3]最早于1993年报道大约有

■同行评议者

房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

50%敲除IL-2基因的小鼠会在4-9周龄时死于巨脾、淋巴结病、自身免疫性溶血性贫血。剩余的动物将在6-15周龄时发生慢性结肠炎。这些小鼠的小肠基本完整, 而结肠(从直肠到盲肠)出现严重的溃疡及肠壁增厚。18周龄后有明显腹泻和血便, 溃疡主要位于远端结肠, 28-32 wk, 小鼠死于严重结肠炎。病理可见与人类IBD类似的表现如隐窝脓肿、黏液腺减少、上皮细胞不典型增生等^[4]。该模型小鼠存在免疫学指标异常, 如肠道固有层中巨噬细胞和树突状细胞增多, IL-1、IL-6、IFN- γ 和TNF- α mRNA水平增高。血清淀粉样蛋白A、P水平常在发病前明显增高, 并与病情严重程度有关^[5-6]。该模型常伴有门静脉炎、贫血、肝脾淀粉样变等肠外表现。

通过对IL-2基因敲除的UC模型的研究发现CD28分子对于肠道淋巴细胞的凋亡有削弱作用^[7]。CD28分子是T细胞表达的潜在共刺激分子, 他能结合APC上的B7-1或B7-2从而刺激T细胞的增殖, 并通过增加抗凋亡蛋白Bcl-xL表达而延长淋巴细胞的寿命^[8]。凋亡缺陷使得病理性T细胞得以生存并发展为IBD中慢性活化的细胞群。Boone *et al*^[9]报道了CD28^{-/-}的小鼠比起野生型小鼠肠道中活性T细胞数减少, 这提示了正常情况下CD28分子向消化系淋巴细胞提供了功能性共刺激信号, 由此为人类IBD的免疫治疗的潜在有效性提供了切入点。

IL-2基因缺陷的鼠模具有肿瘤遗传易感性, 由此展开了一系列对于结肠腺癌APC和p53基因突变及微卫星不稳定性的研究^[10]。其结果发现, 除了APC基因突变谱以外, 其临床表现及分子遗传性均与UC相关的类似。因此, 这类模型对于研究化学干预因素十分有用, 例如叶酸、短链脂肪酸、5-氨基水杨酸等已知对于预防UC相关的人类结肠癌可能有效的药物^[11]。

随着对IBD发病机制的进一步深入研究, IL-2基因缺陷的鼠模为我们提供了发现更多病因和病生机制的途径, 如瘦素在引起患者消瘦和营养不良的重要作用以及运用药物对其进行阻断^[12]。Toll样蛋白调控在IBD发病中的关键地位^[13]。

1.2 IL-10敲除 IL-10由T细胞、B细胞、巨噬细胞、胸腺细胞以及角质形成细胞产生, 可下调Th1细胞、NK细胞和巨噬细胞的功能, 在维持肠道正常免疫、抑制Th1型免疫反应和单核巨噬细胞的抗原递呈中起关键作用^[14]。IL-10^{-/-}小鼠也可自发性发生Th1型结肠炎, 产生以Th1型为

主的细胞因子, 如IFN- γ 、IL-12, 很少甚至不产生IL-4、IL-5^[15]。在无特异病原体的环境中, 4周龄小鼠可产生不同程度的结肠炎症、结肠黏膜溃疡、单核细胞浸润、肉芽肿形成。病变以直肠和远端结肠为主, 也可累及回肠, 但病变较结肠为轻, 病理改变类似人类CD^[16]。在无菌环境中, 小鼠不出现类似病变。抗生素可减少细菌黏附, 起预防和治疗UC的作用, 而非甾体抗炎药可使病情恶化^[17]。

Kühn *et al*^[18]最早于1993年报道IL-10^{-/-}小鼠的炎症可发生在全小肠, 而病变主要位于十二指肠、近段空肠和升结肠。病理发现十二指肠以及空肠肠壁由于增生而致的增厚表现。结肠中可发现杯状细胞减少、上皮细胞变性、分泌IgA的浆细胞浸润和主要组织相容性复合体-II (major histocompatibility complex, MHC-II) 类抗原类抗原表达增加^[19]。

通过对IL-10基因缺陷小鼠的研究, 进一步阐明了IBD的许多重要发病环节, 如Jijon *et al*^[20]在发现了由ADP核糖多聚聚合酶(PARP)诱导的上皮细胞渗透性增加, 而该机制与自发的慢性难治性结肠炎有关。同时证实了用PARP抑制剂氨基苯酰胺治疗IL-10基因缺陷的小鼠可有效逆转典型的CD特征。Mikami *et al*^[21]在其最新的研究中探讨了趋化因子受体CXCR4/CXCL12信号转导通路在IBD中作用, 发现其表达在外周T细胞以及病变肠组织中均有显著上调, 并与疾病活动度一致, 应用CXCR4抑制剂(合成14肽TF14016)可以明显下调CXCR4表达, 改善疾病程度。

IL-10^{-/-}模型为我们寻找各种食物源性治疗方法提供了一个很好的平台。Cantorna *et al*^[22]发现补充活性维生素D 2 wk即可阻断疾病的发展并显著缓解鼠模自发性的IBD临床表现。Menassa *et al*^[23]对IL-10基因缺陷的鼠模进行口服转基因低生物碱烟叶治疗, 发现能改善症状和病情, 其机制考虑为下调TNF- α 的表达所致。Carroll *et al*^[24]应用可表达二氧化锰超氧化物歧化酶的加氏乳杆菌对IL-10^{-/-}鼠模进行干预, 收到良好效果, 为进一步阐明微生态制剂治疗IBD的机制及选择有特别治疗作用的菌属提供依据。

Gratz *et al*^[25]在IL-10基因敲除的IBD小鼠中应用TNF- α 鼠mAb进行腹膜下注射治疗, 经治疗后随着腹泻、便血的症状改善组织学上也有明显的好转, 这证实了TNF- α 在IBD的发病机制中所起的重要作用, 也进一步强调了该模型的重

■ 研发前沿

到目前为止, 还没有任何一个动物模型能够完全模拟人类疾病或能阐明其全部的发病机制, 对于IBD基因型动物模型的研究还值得研究者们进一步深入和探讨。

■应用要点

基因型实验动物的遗传背景定义清晰, 免疫特点突出, 便于制定确认造模成功或干预有效的标准。

要地位^[26]。

Watanabe *et al*^[27]用含有二氯亚甲基二膦酸的D, L多聚乳酸微体每日1次直肠给药, 使巨噬细胞作用削弱。研究发现减少定居在小肠淋巴滤泡中的巨噬细胞数量可阻止慢性结肠炎的进展。这个重要发现使今后研究如何削弱肠道巨噬细胞成为IBD治疗的关键途径^[28]。

IL-10基因敲除模型的重要意义在2003年被Lindsay *et al*^[29]进一步验证, 他们在IL-10基因缺陷的小鼠中成功的诱导产生了IL-10。对该模型的患病小鼠进行IL-10注射治疗并不能缓解病情, 但经直肠注入带有编码IL-10基因的载体腺病毒(AdvmuIL-10)可诱导肝脏IL-10的产生与释放, 通过系统复杂的免疫调节机制使疾病获得长期的缓解。这种局部的基因治疗方法可避免静脉注射AdvmuIL-10而带来的全身性副作用。

人类IBD尤其是UC已知有较高的癌变风险, 研究促癌因子及进行相应阻断有重要意义^[30]。IL-10基因缺陷模型已成为研究IBD癌变的有力工具。Sato *et al*^[31]通过研究发现IL-10基因敲除模型的体细胞具有较高的突变率, 例如G:C或A:T转换为对照组的4.1倍, 某些小的缺失或插入突变为对照组的10倍。Beatty *et al*^[32]将人MUC1基因转入IL-10基因缺陷的鼠模后发现IBD并发结肠癌的进程加速, 这为研究IBD癌变的遗传学机制提供了新思路 and 视角。Zhang *et al*^[33]在该鼠模基础上进一步建立IL-10和可诱导一氧化氮合成酶(IL-10^{-/-}/iNOS^{-/-})双基因缺陷模型, 发现导入iNOS可预防慢性结肠炎癌变, 其机制可能为抑制异常的P53和β层黏连蛋白的表达。

1.3 T细胞受体(TCR)基因敲除 TCR在T细胞介导的体液免疫反应中至关重要, 参与抗原的识别和呈递^[34], 因此, TCR基因缺陷小鼠常用于研究T淋巴细胞和肠道细菌或抗原在IBD病因和发病机制中的作用^[35]。通过基因打靶法可改变小鼠胚胎干细胞TCR-α基因的第二个外显子, 产生TCR-α^{-/-}小鼠, 研究发现, 该小鼠的CD4⁺ TCR-γδ细胞是介导结肠炎形成的主要效应T细胞^[36]。1993年, Mombaerts *et al*^[37]报道了TCR基因改变的小鼠可产生结肠炎。小鼠在16周龄时出现腹泻、持续性炎症、全结肠肥厚, 但小肠仍保持正常。病理表现为结肠黏膜上皮细胞增生、隐窝缺失及隐窝脓肿、杯状细胞减少及炎性细胞浸润。B细胞多克隆激活造成的免疫失调引起大量的自身抗体产生。该模型的病变分布、组织学和免疫学特征均类似人类UC, 其特性倾向于

Th2型结肠炎, 主要产生IL-4, 易对肠道抗原(包括正常细菌和食物)抗原产生免疫反应^[38]。IL-4抗体治疗可抑制TCR^{-/-}小鼠结肠炎活动度, 对于人类UC患者的也有一定的治疗效果^[39]。

1.4 TNF-α基因3'端非翻译区敲除 TNF-α是IBD的重要介质, 尤其与CD密切相关^[40]。TNF-α抗体在CD的临床治疗中取得了较好疗效是其有力的佐证^[41]。美国及欧洲的大宗对照研究已证实抗TNF-α抗体(CA2)是一个有效的治疗药物^[42-43]。一种可过度表达人类TNF-α的转基因鼠可以作为类风湿的动物模型, 但在这种模型中不会出现结肠炎^[44]。在TNF-α基因3'端存在一个非翻译区, 其中富含腺嘌呤和尿嘧啶(adenine/uracil-rich element, ARE), 通过基因敲除TNF-α基因上的ARE后, 则TNF-α的降解减少, 可自发性发生类似人类CD的回肠炎^[45]。因此, 该模型对研究TNF-α引起CD的作用机制具有重要价值。

1.5 G蛋白αi2基因敲除 G蛋白参与多种细胞内信号传导通路, 具有调节细胞的分化、增殖等功能。Gαi2蛋白是G蛋白的一个亚基, 在信号转导过程中起抑制腺苷酸环化酶、激活磷酸肌醇3(PI-3)α和活化钙通道的作用^[46]。Gαi2信号肽突变会引起类似慢性CD的病变^[47-48]。Gαi2^{-/-}小鼠在25周龄时出现CD症状, 淋巴细胞浸润固有层, 肠腺结构异常, 肠上皮增生, 集合淋巴结中T、B淋巴细胞Bcl-2蛋白显著减少, 淋巴细胞凋亡增加, 肠道屏障受损, IFN-γ、IL-2水平增高。炎症出现之前, 记忆性CD4⁺ T细胞和Th1型细胞因子水平增高, 结肠中出现细菌特异性抗体, 这些在诱发CD时均起重要作用^[49]。研究认为, Gαi2缺陷小鼠结肠炎的发生可能与Peyer's淋巴结功能障碍及肠上皮细胞和淋巴细胞凋亡增加有关^[50]。

1.6 三叶因子基因敲除 肠道三叶因子(intestinal trefoil factors, ITFs)是三叶肽家族成员之一, 生理状况下主要分布于小肠及结肠的杯状细胞中, 在黏膜保护、溃疡修复中起重要作用^[51]。病变时三叶因子(trefoil factor, TFF3)表达上调, 诱导细胞迁移, 为炎症之后肠道分泌的保护性多肽, 参与受损黏膜的修复过程^[52]。ITF基因敲除的小鼠在黏膜修复及上皮细胞更新方面能力严重受损, 在DSS诱导结肠炎之后死亡。对于以三硝基苯磺酸(TNBS)或乙酸诱导的大鼠模型中, ITF显示了良好的治疗作用。因此, ITF基因敲除模型对于研究肠道损伤的修复过程十分重要^[53]。

1.7 MDR因子基因敲除模型 多药耐药(multiple drug resistance, MDR)基因由人16p13.1基因编

码, 人类MDR基因有MDR1和MDR3, 啮齿类动物有MDR1、MDR2和MDR3. 小鼠的MDR1基因又分为MDR1a和MDR1b^[54]. 人类MDR1、小鼠MDR1a和MDR1b基因的表达产物为170 kDa的膜转导蛋白, 与多药耐药有关, 同时在防御肠内细菌方面也起重要作用, MDR1缺陷的小鼠可自发产生结肠炎, 与人类IBD相似^[55]. Panwala *et al*^[56]建立MDR1a^{-/-}小鼠炎症性肠病的动物模型在21 wk时出现类似人类UC症状, 表现为全结肠松弛、苍白、无结肠袋, 镜下表现为黏膜层肥厚、大量淋巴细胞浸润、黏膜上皮细胞糜烂、溃疡形成. 在结肠黏膜固有层有CD4⁺ T淋巴细胞及成簇的B淋巴细胞浸润, 抗生素可起到预防及治疗作用. 经过进一步研究发现MDR1a^{-/-}小鼠其发病机制与全身免疫反应无关, 可能与肠黏膜上皮细胞局部的屏障功能紊乱有关. 由于MDR1a作为外排泵, 把毒性物质由细胞内排到肠腔, 缺乏该基因产物, 肠黏膜上皮细胞功能受损, 肠腔内抗原物质在肠黏膜细胞内聚集, 可能是结肠炎发病的主要原因^[57].

2 转基因型模型

2.1 IL-7转基因模型 上皮细胞产生的IL-7对于上皮细胞、上皮层淋巴细胞、黏膜层淋巴细胞的增殖及功能调节来说是至关重要的细胞因子^[58-59]. UC患者血清的IL-7可影响胸腺T细胞分化增殖^[60]. IL-7转基因小鼠可过度表达IL-7 mRNA, 大约在1-3周龄时可出现急性结肠炎发作, 同时在其小肠中也可发现中性粒细胞、CD4⁺ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞浸润, 炎症部位可出现IL-7蛋白的高水平表达, 8-12周龄时出现脱肛和便血. 病理检查发现大量弥漫的单核细胞浸润、杯状细胞减少、隐窝脓肿. 这种模型与人类UC十分相似. 与急性结肠炎相比, 这种慢性结肠炎中IL-7蛋白表达量较少, 其原因可能与富含IL-7的杯状细胞减少有关^[60]. 由此可以假设, 急性期由于IL-7过度表达而使黏膜淋巴细胞大量激活从而导致急性炎症, 而在慢性期, 由于缺乏IL-7而导致的淋巴细胞大量凋亡可能是慢性炎症的主要原因. 2003年, Watanabe *et al*^[27]揭示了黏膜IL-7/IL-7R依赖的信号系统在慢性结肠炎中所起的重要作用. 其研究结果显示了黏膜IL-7/IL-7R依赖的信号转导系统同时参与了鼠模和人类肠黏膜疾病的慢性发生发展过程. Totsuka *et al*^[61]亦验证了IL-7转基因模型为肠道CD4⁺效应记忆T细胞提供了永生化的刺激因子, 使肠道炎症得以发展和持续. 该模型因能阐明IBD的一个

重要发病机制并为治疗提供了一个可能的途径而受到越来越多的重视.

2.2 STAT-4转基因模型 近年来陆续报道了7种对于许多细胞因子信号转导十分重要的信号转导与转录活化因子(signal transducer and activating transcription, STAT)分子家族^[62]. 每个STAT家族的成员服务于几种细胞因子, 这也许是细胞因子极大丰富的原因之一^[63]. STAT-4基因是一种编码转录调节因子, 与IL-12受体信号转导有关, 而IL-12是一种促炎性细胞因子^[64]. STAT-4转基因鼠的肠道炎症组织学特点是黏膜固有层有大量CD4⁺ T细胞浸润, 这种细胞在体内或体外通过 α CD3/ α CD28刺激后, STAT-4表达增加, 产生大量的促炎性细胞因子TNF- α 和IFN- γ , 而不是IL-4, 这与Th1细胞免疫反应一致^[65]. 这种模型的致病机制可能是异常的IL-12参与激活驱动Th1途径, 破坏肠黏膜免疫系统平衡, 引起免疫紊乱而产生免疫病理反应导致肠组织炎症反应, 可自发产生类似CD的结肠炎^[66].

2.3 HLA-B27转基因模型 HLA-B27分子与人类强直性脊柱炎有关^[67], HLA-B27转基因鼠模可自发肠病, 病变涉及胃、回肠、全结肠等部位, 组织学特征是隐窝过度增生形成脓肿, 黏膜组织大量单核细胞浸润^[68]. 其发病机制认为是Th1细胞介导的免疫反应. 这种转基因鼠在无菌环境下饲养并不发生肠道炎症, 给转基因鼠进行以不同的肠道菌群重建, 发现转基因鼠发生的肠道炎症严重程度不同, 且炎症部位也不同, 提示肠道菌群与发病有关^[69]. 目前这种模型广泛应用于肠道菌群在IBD发病机制中作用的研究, 这些研究证明了不同的菌株可以诱导不同类型的病理状态, 例如结肠炎和胃炎. Rath *et al*^[70]在鼠模中研究了抗生素干预的效果, 将环丙沙星、甲硝唑、万古霉素/亚胺培南加入HLA-B27转基因鼠饮水中, 发现如下: (1)预防性应用甲硝唑可显著缓解结肠炎严重程度, 但对于已出现的结肠炎甲硝唑并无治疗作用. (2)万古霉素/亚胺培南对于结肠炎的预防及治疗均有作用, 但不能完全缓解炎症. (3)环丙沙星与甲硝唑有相似的组织学改善. 从治疗所用抗生素的种类角度来看, 结肠炎症的启动可能是由某一特定种群的细菌引起, 但一旦黏膜通透性改变, 肠道内大量而广泛共生的菌群将会为炎症提供持续的抗原刺激.

3 结论

总之, IBD基因型动物模型可用多种方法制备而

■同行评价

本文综述了IBD的基因型动物模型的研究进展情况, 内容较详实, 有一定的理论价值, 对于实验室工作有一定帮助.

成, 某些模型与人类甚为相似, 为人类IBD的研究提供的良好的工具和载体。但是, 由于IBD是一种多因素疾病, 并不是某一单一因素或特定因素所致, 因此, 到目前为止, 还没有任何一个动物模型能够完全模拟人类疾病或能阐明其全部的发病机制, 对于IBD基因型动物模型的研究还值得我们进一步深入和探讨。

4 参考文献

- 1 Fina D, Sarra M, Fantini MC, Rizzo A, Caruso R, Caprioli F, Stolfi C, Cardolini I, Dottori M, Boirivant M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. Regulation of gut inflammation and th17 cell response by interleukin-21. *Gastroenterology* 2008; 134: 1038-1048
- 2 Bohn E, Bechtold O, Zahir N, Frick JS, Reimann J, Jilge B, Autenrieth IB. Host gene expression in the colon of gnotobiotic interleukin-2-deficient mice colonized with commensal colitogenic or noncolitogenic bacterial strains: common patterns and bacteria strain specific signatures. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 853-862
- 3 Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 1993; 75: 253-261
- 4 Cuadrado E, Alonso M, de Juan MD, Echaniz P, Arenas JJ. Regulatory T cells in patients with inflammatory bowel diseases treated with adacolumn granulocytapheresis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1521-1527
- 5 Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, Glickman JN, Glimcher LH. Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system. *Cell* 2007; 131: 33-45
- 6 Moriconi F, Raddatz D, Ho NA, Yeruva S, Dudas J, Ramadori G. Quantitative gene expression of cytokines in peripheral blood leukocytes stimulated in vitro: modulation by the anti-tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab and comparison with the mucosal cytokine expression in patients with ulcerative colitis. *Transl Res* 2007; 150: 223-232
- 7 Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Chinen H, Kamada N, Imai T, Goto H, Hibi T. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 837-846
- 8 Ménager-Marcq I, Pomié C, Romagnoli P, van Meerwijk JP. CD8+CD28- regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 2006; 131: 1775-1785
- 9 Boone DL, Dassopoulos T, Lodolce JP, Chai S, Chien M, Ma A. Interleukin-2-deficient mice develop colitis in the absence of CD28 costimulation. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 35-42
- 10 Sohn KJ, Shah SA, Reid S, Choi M, Carrier J, Comiskey M, Terhorst C, Kim YI. Molecular genetics of ulcerative colitis-associated colon cancer in the interleukin 2- and beta(2)-microglobulin-deficient mouse. *Cancer Res* 2001; 61: 6912-6917
- 11 Hausmann M, Obermeier F, Paper DH, Balan K, Dunger N, Menzel K, Falk W, Schoelmerich J, Herfarth H, Rogler G. In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 373-381
- 12 Gaetke LM, Oz HS, Frederich RC, McClain CJ. Anti-TNF-alpha antibody normalizes serum leptin in IL-2 deficient mice. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 415-420
- 13 Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006; 25: 319-329
- 14 Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, Mathew CG, Schreiber S. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 2008; 40: 1319-1323
- 15 Ebert EC, Mehta V, Das KM. Activation antigens on colonic T cells in inflammatory bowel disease: effects of IL-10. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 157-165
- 16 Nikoopour E, Schwartz JA, Singh B. Therapeutic benefits of regulating inflammation in autoimmunity. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008; 7: 203-210
- 17 Blum AM, Metwali A, Elliott DE, Berg DJ, Weinstock JV. CD4+ T cells from IL-10-deficient mice transfer susceptibility to NSAID-induced Rag colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G320-G325
- 18 Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-274
- 19 Wiethe C, Schiemann M, Busch D, Haeberle L, Kopf M, Schuler G, Lutz MB. Interdependency of MHC class II/self-peptide and CD1d/self-glycolipid presentation by TNF-matured dendritic cells for protection from autoimmunity. *J Immunol* 2007; 178: 4908-4916
- 20 Jijon HB, Churchill T, Malfair D, Wessler A, Jewell LD, Parsons HG, Madsen KL. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G641-G651
- 21 Mikami S, Nakase H, Yamamoto S, Takeda Y, Yoshino T, Kasahara K, Ueno S, Uza N, Oishi S, Fujii N, Nagasawa T, Chiba T. Blockade of CXCL12/CXCR4 axis ameliorates murine experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327: 383-392
- 22 Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. 1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease. *J Nutr* 2000; 130: 2648-2652
- 23 Menassa R, Du C, Yin ZQ, Ma S, Poussier P, Brandle J, Jevnikar AM. Therapeutic effectiveness of orally administered transgenic low-alkaloid tobacco expressing human interleukin-10 in a mouse model of colitis. *Plant Biotechnol J* 2007; 5: 50-59
- 24 Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Bárcena JM, Klaenhammer TR, Hassan HM, Threadgill DS. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293:

- G729-G738
- 25 Gratz R, Becker S, Sokolowski N, Schumann M, Bass D, Malnick SD. Murine monoclonal anti-TNF antibody administration has a beneficial effect on inflammatory bowel disease that develops in IL-10 knockout mice. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1723-1727
 - 26 Hu S, Ciano MJ, Lahav M, Fujiya M, Lichtenstein L, Anant S, Musch MW, Chang EB. Translational inhibition of colonic epithelial heat shock proteins by IFN-gamma and TNF-alpha in intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2007; 133: 1893-1904
 - 27 Watanabe M, Yamazaki M, Kanai T. Mucosal T cells as a target for treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2003; 38 Suppl 15: 48-50
 - 28 Singh UP, Singh S, Singh R, Karls RK, Quinn FD, Potter ME, Lillard JW Jr. Influence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on colitis development and specific immune responses during disease. *Infect Immun* 2007; 75: 3722-3728
 - 29 Lindsay JO, Ciesielski CJ, Scheinin T, Brennan FM, Hodgson HJ. Local delivery of adenoviral vectors encoding murine interleukin 10 induces colonic interleukin 10 production and is therapeutic for murine colitis. *Gut* 2003; 52: 981-987
 - 30 Waldner MJ, Neurath MF. Cytokines in colitis associated cancer: potential drug targets? *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008; 7: 187-194
 - 31 Sato Y, Takahashi S, Kinouchi Y, Shiraki M, Endo K, Matsumura Y, Kakuta Y, Tosa M, Motida A, Abe H, Imai G, Yokoyama H, Nomura E, Negoro K, Takagi S, Aihara H, Masumura K, Nohmi T, Shimosegawa T. IL-10 deficiency leads to somatic mutations in a model of IBD. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1068-1073
 - 32 Beatty PL, Plevy SE, Sepulveda AR, Finn OJ. Cutting edge: transgenic expression of human MUC1 in IL-10^{-/-} mice accelerates inflammatory bowel disease and progression to colon cancer. *J Immunol* 2007; 179: 735-739
 - 33 Zhang R, Ma A, Urbanski SJ, McCafferty DM. Induction of inducible nitric oxide synthase: a protective mechanism in colitis-induced adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1122-1130
 - 34 Haile LA, von Wasielowski R, Gamrekashvili J, Krüger C, Bachmann O, Westendorf AM, Buer J, Liblau R, Manns MP, Korangy F, Greten TF. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 2008; 135: 871-881, 881.e1-e5
 - 35 Shiobara N, Suzuki Y, Aoki H, Gotoh A, Fujii Y, Hamada Y, Suzuki S, Fukui N, Kurane I, Itoh T, Suzuki R. Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 13-21
 - 36 Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Hoffmann JC. Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 168-175
 - 37 Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993; 75: 274-282
 - 38 Probert CS, Saubermann LJ, Balk S, Blumberg RS. Repertoire of the alpha beta T-cell receptor in the intestine. *Immunol Rev* 2007; 215: 215-225
 - 39 Shiobara N, Suzuki Y, Aoki H, Gotoh A, Fujii Y, Hamada Y, Suzuki S, Fukui N, Kurane I, Itoh T, Suzuki R. Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 13-21
 - 40 Andoh A, Yagi Y, Shioya M, Nishida A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5154-5161
 - 41 Caviglia R, Boskoski I, Cicala M. Long-term treatment with infliximab in inflammatory bowel disease: safety and tolerability issues. *Expert Opin Drug Saf* 2008; 7: 617-632
 - 42 D'haens G, Van Deventer S, Van Hogezaand R, Chalmers D, Kothe C, Baert F, Braakman T, Schaible T, Geboes K, Rutgeerts P. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology* 1999; 116: 1029-1034
 - 43 Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2002; 37: 409-417
 - 44 Barrie A, Regueiro M. Biologic therapy in the management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1424-1429
 - 45 Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999; 10: 387-398
 - 46 Ohman L, Aström RG, Hultgren Hörnquist E. Impaired B cell responses to orally administered antigens in lamina propria but not Peyer's patches of Galphai2-deficient mice prior to colitis. *Immunology* 2005; 115: 271-278
 - 47 Elgbratt K, Bjursten M, Willén R, Bland PW, Hörnquist EH. Aberrant T-cell ontogeny and defective thymocyte and colonic T-cell chemotactic migration in colitis-prone Galphai2-deficient mice. *Immunology* 2007; 122: 199-209
 - 48 Hultgren OH, Berglund M, Bjursten M, Hultgren Hörnquist E. Serum interleukin-1 receptor antagonist is an early indicator of colitis onset in Galphai2-deficient mice. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 621-624
 - 49 Dalwadi H, Wei B, Schrage M, Spicher K, Su TT, Birnbaumer L, Rawlings DJ, Braun J. B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J Immunol* 2003; 170: 1707-1715
 - 50 Wu JY, Jin Y, Edwards RA, Zhang Y, Finegold MJ, Wu MX. Impaired TGF-beta responses in peripheral T cells of G alpha i2^{-/-} mice. *J Immunol* 2005; 174: 6122-6128
 - 51 Ido A, Numata M, Kodama M, Tsubouchi H. Mucosal repair and growth factors: recombinant human hepatocyte growth factor as an innovative therapy for inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2005; 40: 925-931
 - 52 Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; 274: 262-265
 - 53 Dehlawi MS, Mahida YR, Hughes K, Wakelin D. Effects of *Trichinella spiralis* infection on intestinal pathology in mice lacking interleukin-4 (IL-4) or intestinal trefoil factor (ITF/TFF3). *Parasitol Int*

- 2006; 55: 207-211
- 54 Dai CL, Tiwari AK, Wu CP, Su XD, Wang SR, Liu DG, Ashby CR Jr, Huang Y, Robey RW, Liang YJ, Chen LM, Shi CJ, Ambudkar SV, Chen ZS, Fu LW. Lapatinib (Tykerb, GW572016) reverses multidrug resistance in cancer cells by inhibiting the activity of ATP-binding cassette subfamily B member 1 and G member 2. *Cancer Res* 2008; 68: 7905-7914
- 55 O'Neill AJ. New antibacterial agents for treating infections caused by multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 297-302
- 56 Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 1998; 161: 5733-5744
- 57 Masunaga Y, Noto T, Suzuki K, Takahashi K, Shimizu Y, Morokata T. Expression profiles of cytokines and chemokines in murine MDR1a-/- colitis. *Inflamm Res* 2007; 56: 439-446
- 58 Kader HA, Tchernev VT, Satyaraj E, Lejnine S, Kotler G, Kingsmore SF, Patel DD. Protein microarray analysis of disease activity in pediatric inflammatory bowel disease demonstrates elevated serum PLGF, IL-7, TGF-beta1, and IL-12p40 levels in Crohn's disease and ulcerative colitis patients in remission versus active disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 414-423
- 59 Peffault de Latour R, Dujardin HC, Mishellany F, Burlen-Defranoux O, Zuber J, Marques R, Di Santo J, Cumano A, Vieira P, Bandeira A. Ontogeny, function, and peripheral homeostasis of regulatory T cells in the absence of interleukin-7. *Blood* 2006; 108: 2300-2306
- 60 Krawczenko A, Kieda C, Duś D. The biological role and potential therapeutic application of interleukin 7. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53: 518-525
- 61 Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Makita S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M. IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J Immunol* 2007; 178: 4737-4748
- 62 Atreya R, Neurath MF. Signaling molecules: the pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 369-374
- 63 Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J, Neurath MF. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 64-72
- 64 Matsukawa A. STAT proteins in innate immunity during sepsis: lessons from gene knockout mice. *Acta Med Okayama* 2007; 61: 239-245
- 65 Berenson LS, Ota N, Murphy KM. Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved. *Immunol Rev* 2004; 202: 157-174
- 66 Wirtz S, Finotto S, Kanzler S, Lohse AW, Blessing M, Lehr HA, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: chronic intestinal inflammation in STAT-4 transgenic mice: characterization of disease and adoptive transfer by TNF- plus IFN-gamma-producing CD4+ T cells that respond to bacterial antigens. *J Immunol* 1999; 162: 1884-1888
- 67 Jacques P, Mielants H, Coppieters K, De Vos M, Elewaut D. The intimate relationship between gut and joint in spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19: 353-357
- 68 Lories RJ. Animal models of spondyloarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 342-346
- 69 Milia AF, Manetti M, Generini S, Polidori L, Benelli G, Cinelli M, Messerini L, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. TNFalpha blockade prevents the development of inflammatory bowel disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Cell Mol Med* 2008 Mar 19. [Epub ahead of print]
- 70 Rath HC. Role of commensal bacteria in chronic experimental colitis: lessons from the HLA-B27 transgenic rat. *Pathobiology* 2002; 70: 131-138

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验; (2) 采集数据; (3) 分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章; (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析; (2) 获取研究经费; (3) 行政、技术或材料支持; (4) 指导; (5) 支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

代谢组学及其在肿瘤生物学研究中的应用进展

马延磊, 秦环龙

马延磊, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233

上海市科委基金资助项目, No. 07DZ19505

作者贡献分布: 本论文由马延磊综述; 秦环龙审核。

通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. hlqin@sjtu.edu.cn

电话: 021-64361349 传真: 021-64368920

收稿日期: 2008-10-07 修回日期: 2008-10-28

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-08

Metabonomics and its application in oncobiology research

Yan-Lei Ma, Huan-Long Qin

Yan-Lei Ma, Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200233, China

Supported by: the Science and Technology Program of Shanghai City, No. 07DZ19505

Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of Surgery, the Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200233, China. hlqin@sjtu.edu.cn

Received: 2008-10-07 Revised: 2008-10-28

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-08

Abstract

The primary aim of this review is to introduce the research status of metabonomics/metabolomics and the application of metabonomics in oncobiology research. At first, the concept of metabonomics and the relationship between metabonomics and tumors are elucidated in detail. Then the research technologies of metabonomics in oncobiology are introduced. Finally, the latest advances in the application of metabonomics in early diagnosis, treatment and prognosis of tumors are summarized.

Key Words: Metabonomics/Metabolomics; Oncobiology; Biomarker

Ma YL, Qin HL. Metabonomics and its application in oncobiology research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3877-3883

摘要

本文主要阐明了代谢组学的概念, 代谢与肿瘤

的关系, 介绍代谢组学的研究状况及研究技术, 着重讲述了其在肿瘤生物学领域研究中的应用, 归纳了代谢组学在肿瘤的早期诊断、治疗和预后评估中的最新应用进展。

关键词: 代谢组学/代谢物组学; 肿瘤生物学; 生物标志物

马延磊, 秦环龙. 代谢组学及其在肿瘤生物学研究中的应用进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3877-3883

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3877.asp>

0 引言

随着人类基因组测序的完成, 生命科学的主要任务已经转为功能基因组分析, 到目前为止, 功能基因组的主要目标是基因产物以及可能的治疗靶标的确定, 研究的策略主要集中在转录组学和蛋白质组学。这些“组学”(-omics)方法在肿瘤生物学领域中的应用也取得了一些成功, 例如: 新的肿瘤亚型的鉴定, 相应基因水平和蛋白水平特定类型肿瘤标志物的鉴定等。但是他们并不能提供对于疾病生化改变所反映的终点诊断标志物及最终的诊断信息。于是出现了代谢组学(metabolomics/metabonomics), 他处于基因组和蛋白质组的下游, 是基因组和蛋白质组的补充, 能够更为灵敏地鉴定出基因改变、疾病和环境因素作用所产生的特定代谢型(metabotype)^[1-2](图1)。因此与其他“组学”相比, 代谢组学在环境变化对机体产生作用的研究中更具优势。目前, 代谢组学被广泛应用于各种研究领域, 尤其是在肿瘤生物学领域逐渐成为近年来研究的热点。

1 代谢组学概况

代谢组学是采用高通量化学分析技术, 如质谱(mass spectrometry, MS)技术和核磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)并结合化学计量学方法对生物体系(细胞、组织或生物体)在给定时间和条件下所有小分子代谢物质的定量分析, 关注的对象是分子质量1000以下的小分子化合物, 从而定量描述生物体内源性代谢物整

■背景资料

随着人类基因组测序的完成, 生命科学的主要任务已经转变为功能基因组分析, 研究的策略主要集中在转录组学和蛋白质组学, 然而他们并不能提供对于疾病生化改变所反映的终点诊断标志物和最终的诊断信息。因此出现了代谢组学, 他处于基因组和蛋白质组的下游, 是二者的补充, 能够更为敏感地鉴定出基因改变、疾病和环境因素作用所产生的特定代谢型。目前代谢组学被应用于各种研究领域, 尤其是在肿瘤生物学研究领域中的应用成为近年来研究的热点。

■同行评议者

刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

■ 研发前沿

通过代谢组学的各种分析技术,检测肿瘤患者体液中的各种代谢小分子,确定肿瘤患者的特征性代谢模式,将有助于实现肿瘤的早期诊断,并能够鉴定出肿瘤的类型及其分化程度,从而对肿瘤的诊断、治疗和预后有着重大的影响,对传统肿瘤标志物提出了挑战。

表 1 不同光谱学方法在代谢组学研究中的应用比较

分析技术	概述	优点	缺点
气质联用质谱(GC-MS ^[8])	用GC分离代谢物,后MS鉴定,可查库搜索,植物代谢组研究的优选方法	高灵敏度、高重复性,费用较低	样品的准备较为耗时,并不适合所有化合物分离
液质联用质谱(LC-MS (Lipid chromatography-mass spectrometry) ^[9])	除了在分离上用LC分离,其他与GC-MS相似	越来越多地用于替代GC-MS作为样品分离的手段,耗时很少,高灵敏度	费用较高,较难操作,且非极性物质难以分离
核磁共振(NMR ^[10])	广泛应用于药学和疾病中血和尿样分析	非破坏性的技术,完全自动化,可重复性好,从简单的一维图谱中较易鉴定代谢物	与MS相比灵敏度较低,共振波谱的代谢物难以鉴定
傅里叶变换红外光谱测定法(FT-IR (Fourier-transform infrared spectrometry) ^[11])	用代谢物的震动频率产生代谢指纹图谱	高通量的首选筛选方法,费用较低,较为准确	难以鉴定引起变化的代谢物,对同类化合物的代谢产物分辨率低
拉曼光谱测定法(Raman spectroscopy ^[12])	FT-IR和红外光谱技术的拓展,依赖于激光照射后分散的光点筛选	由于水有微弱的拉曼光谱,因此可以观测到许多的官能团	分辨率低,较难分辨同类化合物的代谢产物
代谢物微阵列 (Metabolite arrays ^[13])	用96-孔板监测系统进行分析性和筛选	在既定的条件下是很好筛选工具	难以对未知的和异源性代谢产物进行筛选
薄层色谱测定法(TLC Thin-layer chromatography ^[14])	用来追踪在不同培养条件下大肠杆菌中 ¹⁴ C的糖代谢产物	便宜,便捷	存在内在测定的变异,限于特定条件下代谢物的定量测定

体代谢变化情况及其对内因和外因应答变化规律的一门新兴科学^[1,3]。其中“metabonomics”主要是对处于不同发育阶段或不同生长环境的生物系统进行整体及其动态变化规律的研究^[4];而“metabolomics”主要是研究细胞层次上的所有小分子代谢物,强调静态代谢物的分析^[5]。Fiehn *et al*^[6]认为metabolomics是metabonomics的一部分。

代谢组学的分析技术强调整体分析过程,要求测定生物体系中所有代谢产物的信息,然而要实现这一目的,目前的技术仍然面临着极大的挑战^[7]。如:利用NMR为基础的方法,在组织的提取液中可以检测到20-40个代谢物,尿样中可检测到100-200个代谢物,而应用灵敏度更高的气质联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS),在这些样品中大约1000个代谢物可被检测到。目前各种不同的分离及分析手段已应用于代谢组学的研究中,这些代谢组学分析技术的比较见表1。

Fiehn *et al*^[15]将代谢组学的研究目的和策略分为4个层次,即:(1)代谢物靶标分析(metabolite target analysis)^[8]:针对生物样品中的一个或数个

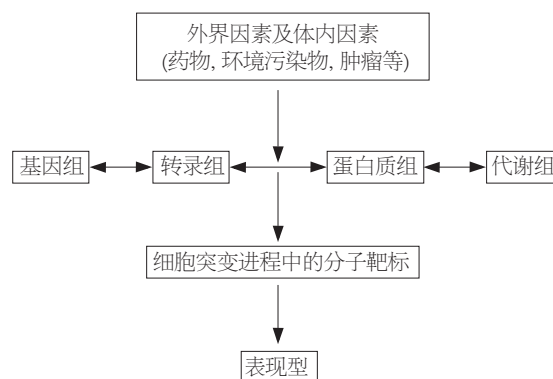


图 1 基因组学、转录组学、蛋白质组学与代谢组学关系示意图。

特定代谢物进行有选择性的定性和定量分析。(2)代谢谱分析(metabolite profiling analysis)^[16-17]:针对预设代谢物,采用特定的分析技术对其代谢过程中的变化进行定量和定性分析。(3)代谢物组(metabonomics)^[1-2,10,18]:生物系统对体系内外因素做出动态应答的所有代谢物小分子。(4)代谢指纹分析(metabolic fingerprinting)^[19]:对样品进行整体定性分析,比较谱图差异,并对样品中的差异代谢物进行快速鉴别和分类,但并不分析或测量具体组分。

2 代谢与肿瘤的关系

70年前经典的生物化学研究已表明: 相对于正常细胞, 肿瘤细胞出现了代谢谱的改变以及葡萄糖吸收率增高和糖酵解过程的增强, 尽管这些代谢方面的改变并非是引起肿瘤发生的本源, 但是他们却赋予不同类型肿瘤细胞一个共同的特点-能够使肿瘤细胞逃避死亡和免疫侵袭。

目前认为肿瘤是环境与宿主内外因素交互作用的结果, 据估计80%以上的恶性肿瘤与环境因素相关。而这些环境因素所导致的肿瘤相关基因和蛋白的变化, 最终会反映在肿瘤的代谢组变化上。因为代谢组反映了基因组和蛋白质组变化所引起的共同“终点”代谢型小分子的变化^[5]。近来研究表明: 大量遗传改变引起的肿瘤也直接影响了肿瘤细胞的糖酵解过程^[20]。肿瘤发生和进展过程中各种因素间平衡的变化与其代谢组的变化密切相关(图2)。

与正常组织相比, 恶性肿瘤组织的代谢状态较旺盛。由于体内外各种因素的影响, 其合成DNA和RNA酶的活性增高, 蛋白质的合成代谢及分解代谢均增强, 且合成代谢超过了分解代谢, 甚至利用正常组织蛋白质的分解产物用于合成肿瘤本身所需的营养物质, 从而导致机体呈现出严重的恶病质状态。肿瘤细胞不仅仅在能量的代谢率上大幅度提高, 而且当他们受损时所导致的“自杀”(commit suicide)行为也会大大减少。其中肿瘤细胞的死亡和代谢相关的分子机制研究近来成为肿瘤生物学领域研究的热点^[21]。Danial *et al*^[22]指出在肿瘤细胞死亡相关的代谢调节过程中, 主要是通过一杀伤性蛋白(Bcl-xl/Bcl-2-associated death, BAD)来调节。BAD蛋白对肿瘤细胞的代谢存在重要的影响, 最主要的是其刺激了细胞内葡萄糖的转换, 己糖激酶和线粒体的重组以及糖酵解过程的加速。

肿瘤细胞不仅仅表现出旺盛的代谢状态, 而且肿瘤的发生和发展也离不开其周围的微环境。肿瘤生长赖以生存的周围微环境主要是一些关键代谢物(critical metabolites)^[23-26], 如氧分、葡萄糖和其他的一些营养性生长因子, 其周围的微环境呈现出明显的酸性环境, 构成这种酸性环境的物质主要是乳酸盐(lactate)等一些小分子。大量的肿瘤细胞有很强的增殖性, 实体瘤细胞也呈现出明显的缺氧现象, 然而肿瘤细胞在增殖过程中却能适应这种状态, 这主要是由于肿瘤细胞在缺氧或低氧状态能够通过糖酵

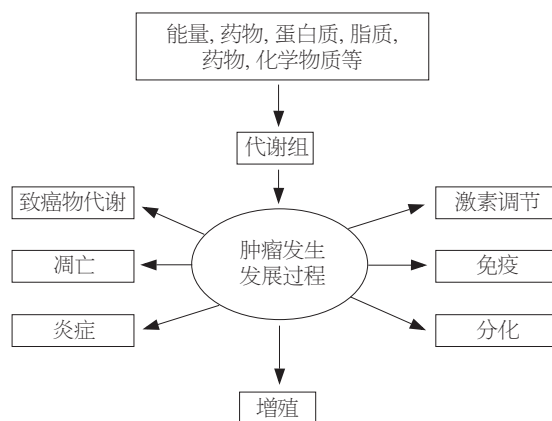


图2 肿瘤发生和进展过程中的各种影响因素与其代谢组关系示意图。

解代谢的增加把葡萄糖作为提供滋生能量的源泉^[27-28]。小分子代谢组分在肿瘤形成过程中发挥了重要的作用, 大量研究已经发现了这些变化的小分子代谢物, 例如: 大量研究发现肿瘤细胞周围的低氧或缺氧以及低血糖环境激发了肿瘤血管的发生, 诱导了血管源性生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的大量表达, VEGF诱发了新的微血管形成, 从而为肿瘤带来了更多的营养物质, 促进了肿瘤体积的增长^[21,29-30]。

3 代谢组学在肿瘤研究中的应用

3.1 肿瘤相关的代谢标志物 在肿瘤发生的早期阶段利用代谢组学技术将可能监测特定代谢过程中代谢物的变化或波动情况, 预测肿瘤的进展, 或是监测肿瘤对于干预的反应^[31-33]。代谢组学技术的定量分析联合先进的统计分析方法, 能够得出特定器官早期变化的特征性代谢谱^[34-35]。通过特定代谢物的变化来评估既定肿瘤的分子病因, 鉴定在生物学效应下的代谢物变化, 并且辅助鉴定肿瘤易感性的特征。生物标志物的发现将可能找出肿瘤细胞特异性损伤的特征性变化情况, 从而将可能用于制定对易感人群的特征性干预策略。理解代谢物变化情况与肿瘤的生长、停滞、凋亡和分化间的关系将有助于发现肿瘤相关的代谢标志物, 从而提高肿瘤的早期诊断。例如脂质和胆固醇变化谱是细胞膜破坏的标志, 这些变化往往表明细胞正在经受各种因素刺激而导致凋亡的过程。同样, 抗癌剂对肿瘤细胞生长的抑制作用也在糖类和氨基酸类代谢途径的变化中得以体现。目前随着代谢组学方法的不断进展, 越来越多的肿瘤相关代谢标志物在肿瘤疾病中被鉴定(表2), 以此用于肿瘤

■ 相关报道

目前代谢组学在各种肿瘤方面的研究越来越多, 同时也越来越深入。国内外的研究主要集中在代谢组学在肿瘤诊断、治疗和预后中的应用方面。同时代谢组学在生命科学的其他领域(如: 药物毒理学、环境科学、检验医学、食品学等)方面也有较多的研究。

■创新盘点

本文主要阐明了代谢组学的概念, 代谢与肿瘤的关系, 介绍代谢组学的研究状况, 同时对目前代谢组学的各种研究技术进行了对比, 着重讲述了代谢组学在肿瘤生物学领域研究中的应用, 归纳了代谢组学在肿瘤的早期诊断、治疗和预后评估中的最新应用进展, 内容较新颖。

表 2 肿瘤代谢产物中的相关代谢生物标志物

代谢标志物	相关代谢功能	相关肿瘤特征
缬氨酸(Alanine)	与乳酸盐相结合, 在缺氧状态下组织中显著增高; 通过丙酮酸盐的转氨基反应产生以致于阻止乳酸盐的显著升高 ^[36]	肝癌和脑肿瘤, 包括星形胶质瘤, 神经胶质瘤, 脑膜瘤及神经上皮的肿瘤
饱和脂质 (Saturated lipids) CCMs	细胞膜的重要组成成分, 由NMR的脂质峰可以确定其是在细胞膜的功能区还是在胞质囊泡内 包括胆碱、磷酸胆碱、磷酸卵磷脂等, 均是细胞膜的关键构成组分	其含量的变化水平与增殖、炎症恶性肿瘤、坏死和凋亡紧密相关 ^[37-41] 在凋亡和坏死期间其水平发生变化, 目前在各种类型肿瘤中已发现其水平的改变. 如: 脑肿瘤、肉瘤、前列腺癌和肝癌 ^[42-45]
甘氨酸(Glycine)	形成嘌呤所必须的前体	随着HIF-1信号通路的破坏其水平显著下降 ^[46]
乳酸盐(Lactate)	糖酵解的终产物	在缺血和低氧期间其水平显著增高; 随其增高在弱血管化的肿瘤出现细胞内pH值显著降低; 其增加率与肿瘤的范围即特定肿瘤的类型有关 ^[47]
肌醇(Myoinositol)	包含在渗透调节和容积调控的过程中	其水平在结肠腺癌、神经胶质瘤、神经鞘瘤、卵巢癌、星形胶质瘤和子宫内膜癌增高; 而在乳腺癌中降低 ^[48-50]
核苷酸 (Nucleotides)	产生DNA和RNA; 在脂肪酸和糖代谢中是一个关键的中间代谢物; 在ATP浓聚物中的改变是肿瘤活力状态的重要指示物	在神经胶质瘤细胞凋亡过程中其水平增高 ^[51] ; CDP-胆碱在凋亡期间水平也增高 ^[52-53]
多不饱和脂肪酸 (PUFAs)	细胞膜尤其是线粒体的组分	凋亡期间, 在胶质瘤、去分化的多形态脂肪瘤中增加 ^[38, 54-55]
牛磺酸(Taurine)	与渗透和容量调节相关; 是抗氧化剂, 阻止细胞受自由基损伤	在鳞状细胞癌、前列腺癌和肝脏次生肿瘤中增加 ^[56-57]

的分型、诊断、治疗和预后评估。

3.2 代谢组学与肿瘤诊断 由于肿瘤会导致机体病理生理的变化, 同时机体的代谢产物也会相应地变化, 对这些变化的代谢产物进行相应的代谢组学分析, 将能够更好地理解病变过程及机体内物质的代谢途径, 从而发现肿瘤相关的生物标志物, 并辅助临床诊断. 代谢组学也将从机体的动态代谢途径中寻找出具有特异性诊断价值的肿瘤生物标志物. 其在肿瘤诊断方面具有独特优势: 其一, 只需采集机体体液, 易于临床取材和获得动态观察结果; 其二, 癌细胞的产生与肿瘤宿主微环境密切相关, 调控癌细胞生长所必须的各种氨基酸、肽类、脂肪酸、小分子代谢物及细胞分裂产物在组织液中的浓度远大于细胞内。

Odunsi *et al*^[58]应用H-NMR和PCA及SIMCA技术对38例卵巢上皮性癌, 12例卵巢良性囊肿, 53例正常妇女的血清的代谢物分析, 并且用受试者工作特征(ROC)曲线对灵敏度和特异度权衡, 此方法对正常绝经前妇女、卵巢良性肿瘤和卵巢上皮性癌的识别率达100%, 对绝经后妇

女和卵巢癌的识别率分别为97.4%和97%, 并且成功诊断出2例 I 期卵巢癌患者. Yang *et al*^[59]采用最新技术魔角自转核磁共振分光检定法(magic-angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, HPMAS)并结合主成份分析(PCA)来研究人肝癌的特征性代谢模式, 结果发现了在肝癌中乳酸盐、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、亮氨酸、丙氨酸和磷酸乙醇胺(PE)等代谢产物相对于邻近正常组织明显升高, 而甘油三酯、葡萄糖和糖原呈现出明显的下降, 得出的结果再利用PCA进行分析, 从而可以成功区分肝癌和正常组织, 表明这些代谢小分子簇可作为肝癌早期诊断和预后的生物标志物. 最近Fang *et al*^[60]应用¹H-NMR(核磁共振技术)研究SD大鼠慢性胰腺炎和胰腺癌完整胰腺组织的代谢谱差异, 结果显示: 与胰腺炎相比, 在胰腺癌中磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱显著降低, 而亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、乳酸盐和丙氨酸呈现出明显升高, 同时结合主成份分析(PCA)方法成功区分出了胰腺癌和慢性胰腺炎SD大鼠。

代谢组学分析亦广泛应用到鉴别诊断中。

Xu *et al*^[61]采用毛细管电泳方法(CE), 通过代谢靶标分析, 以尿中13-15种核苷浓度为数据矢量, 用PCA法处理数据, 对分别患有10多种癌症的68位癌症患者和54位正常人进行分类研究, 识别率达72%。对用HPLC法测定206位正常人和296位肿瘤患者尿中15种核苷排放水平进行研究, 也得到类似的结果。采用人工神经元网络软件对数据进行处理, 对肿瘤患者的识别率可达83%。最近国外学者Kim *et al*^[62]在综述了大量代谢组学应用于肿瘤的研究后, 指出利用代谢组学技术方法可以预测早期肿瘤细胞表型的改变, 从而使得在肿瘤细胞表型改变前, 即在肿瘤的代谢组发生微小的改变时做出了诊断, 从而在很大程度上可发现新的早期诊断特征性代谢小分子, 作为肿瘤早期诊断的生物标志物。

3.3 代谢组学与肿瘤治疗、预后评估 代谢组学的出现打破了传统的以手术、放疗和化疗为主的肿瘤治疗方法, 通过对药物代谢动力学及对药物所引起的内源性代谢物变化方面的研究, 使得人们系统的、整体的来认识机体代谢谱的变化以为他能够更直接地以此来针对肿瘤的异质性和患者的个体差异实现个体化治疗, 同时指导抗肿瘤药物的用量以及评价治疗效果和安全性。

Sasano *et al*^[63]在乳腺癌内分泌治疗的相关研究中, 指出瘤内代谢与雌激素合成在雌激素依赖性乳腺癌的发生、发展中发挥着关键的作用, 尤其是绝经后乳腺癌的发生。瘤内芳香化酶作为雌激素来源的重要转化动力, 而其他酶类如: 17 β -羟基类固醇脱氢酶同工酶(17 β -HSD isozymes)、雌激素硫酸酯酶(STS)和雌激素磺基转移酶(EST)也在雌激素生成过程中起到了重要作用。最后得出结论, 通过使用芳香化酶(尤其是17 β -HSD isozymes)抑制剂并监测瘤内其他酶系(尤其是STS)和相关微环境的变化情况, 可以指导个体化的治疗。Ippolito *et al*^[64]在利用MRS研究前列腺神经内分泌癌所衍生的前列腺神经内分泌癌细胞(prostate neuroendocrine cell, PNEC)中, 发现了与能量代谢密切相关的小分子代谢标志物丙二醇(propylene glycol, PG)和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA), 两者在癌细胞中的含量均明显增高, 与细胞间通讯、能量利用和细胞增殖密切相关, 当GABA、谷氨酰胺(glutamine, Gln)/甘氨酸(glycine, Gly)的受体受刺激被激活时, PNEC的增殖速度将显著加快, 试验中将三种抑制GABA通路的抑制药物

(amiloride、carbidopa和flumazenil)注射入PNEC肿瘤嫁接的裸鼠, 结果出现了肿瘤生长的显著抑制, 利用471例神经内分泌肿瘤的瘤组织进行基因芯片分析, 结果也显示了GABA代谢通路重要组分包括ABP-1在神经内分泌瘤中显著升高, 该项代谢组学研究对于神经内分泌型肿瘤的治疗有着重要的临床指导意义。

Ichikawa^[65]在讨论了遗传因素对氟尿嘧啶治疗效果的影响后, 指出5-FU相关代谢途径中某些酶活性的差异能显著影响其代谢范围和化疗效果, 这些酶主要包括: 胸核苷酸合酶、胸苷磷酸化酶、二氢嘧啶脱氢酶和乳酸磷酸核糖苷转移酶, 他们的基因表达阳性与5-FU在转移性胃癌的化疗效果密切相关, 因此利用代谢组学技术监测这些酶的变化水平将有可能准确判断和预测其化疗患者的预后, 在胃癌化疗患者的预后评估中具有重要的临床指导意义。

4 结论

代谢组学是基因组学、转录组学和蛋白质组学有力的补充, 是系统生物学不可缺少的一部分, 虽是一门新兴科学, 但其发展迅速, 研究技术方法也越来越得以完善, 应用领域也越来越广, 尤其在肿瘤生物学领域中的研究日益升温。基于肿瘤中血、尿相关特征性小分子代谢标志物的异常来诊断特定肿瘤的方法也正向着临床实用性方向发展。随着研究的逐步深入, 代谢组学将在功能基因组学中发挥更大的作用, 同时也提供了一个了解肿瘤相关基因表型的独特途径, 在肿瘤代谢相关的生物学领域中必将发挥更大的作用。

5 参考文献

- 1 Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999; 29: 1181-1189
- 2 Nicholson JK, Connolly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 153-161
- 3 Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K, Oliver SG. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 45-50
- 4 Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 2003; 62:

■同行评价

本文介绍代谢组学在肿瘤生物学研究中的进展, 内容较新, 具有一定的新颖性。

- 817-836
- 5 Fiehn O. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002; 48: 155-171
 - 6 Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1157-1161
 - 7 Griffin JL, Shockcor JP. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 551-561
 - 8 Seger C, Sturm S. Analytical aspects of plant metabolite profiling platforms: current standings and future aims. *J Proteome Res* 2007; 6: 480-497
 - 9 Plumb RS, Stumpf CL, Granger JH, Castro-Perez J, Haselden JN, Dear GJ. Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17: 2632-2638
 - 10 Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabonomics? *Anal Chem* 2003; 75: 384A-391A
 - 11 Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 1998; 16: 373-378
 - 12 Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, Shafer KE, Motz JT, Fitzmaurice M, Kramer JR, Itzkan I, Dasari RR, Feld MS. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Phys Med Biol* 2000; 45: R1-R59
 - 13 Bochner BR, Gadzinski P, Panomitos E. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res* 2001; 11: 1246-1255
 - 14 Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J Bacteriol* 1998; 180: 5109-5116
 - 15 Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001; 2: 155-168
 - 16 Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 763-769
 - 17 Niwa T. Metabolic profiling with gas chromatography-mass spectrometry and its application to clinical medicine. *J Chromatogr* 1986; 379: 313-345
 - 18 Nicholson JK, Wilson ID. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 668-676
 - 19 Ellis DI, Goodacre R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst* 2006; 131: 875-885
 - 20 Costello LC, Franklin RB. 'Why do tumour cells glycolyse?': from glycolysis through citrate to lipogenesis. *Mol Cell Biochem* 2005; 280: 1-8
 - 21 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
 - 22 Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 2003; 424: 952-956
 - 23 Cairns R, Papandreou I, Denko N. Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 61-70
 - 24 Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 1988; 240: 177-184
 - 25 Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-379
 - 26 Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 1997; 3: 177-182
 - 27 Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309-314
 - 28 Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 598-608
 - 29 Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732
 - 30 Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994; 269: 23757-23763
 - 31 Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 189-199
 - 32 Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 245-252
 - 33 Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005; 23: 7350-7360
 - 34 Florian CL, Preece NE, Bhakoo KK, Williams SR, Noble M. Characteristic metabolic profiles revealed by 1H NMR spectroscopy for three types of human brain and nervous system tumours. *NMR Biomed* 1995; 8: 253-264
 - 35 Florian CL, Preece NE, Bhakoo KK, Williams SR, Noble MD. Cell type-specific fingerprinting of meningioma and meningeal cells by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res* 1995; 55: 420-427
 - 36 Ben-Yoseph O, Badar-Goffer RS, Morris PG, Bachelard HS. Glycerol 3-phosphate and lactate as indicators of the cerebral cytoplasmic redox state in severe and mild hypoxia respectively: a 13C- and 31P-n.m.r. study. *Biochem J* 1993; 291 (Pt 3): 915-919
 - 37 Hakumäki JM, Poptani H, Puumalainen AM, Loimas S, Paljärvi LA, Ylä-Herttua S, Kauppinen RA. Quantitative 1H nuclear magnetic resonance diffusion spectroscopy of BT4C rat glioma during thymidine kinase-mediated gene therapy in vivo: identification of apoptotic response. *Cancer Res* 1998; 58: 3791-3799
 - 38 Tate AR, Crabb S, Griffiths JR, Howells SL, Mazucco RA, Rodrigues LM, Watson D. Lipid metabolite peaks in pattern recognition analysis of tumour in vivo MR spectra. *Anticancer Res* 1996; 16: 1575-1579
 - 39 Millis K, Weybright P, Campbell N, Fletcher JA, Fletcher CD, Cory DG, Singer S. Classification of human liposarcoma and lipoma using ex vivo proton NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 1999; 41: 257-267
 - 40 Mountford CE, Wright LC. Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and

- stimulated cells: a new model. *Trends Biochem Sci* 1988; 13: 172-177
- 41 Callies R, Sri-Pathmanathan RM, Ferguson DY, Brindle KM. The appearance of neutral lipid signals in the ¹H NMR spectra of a myeloma cell line correlates with the induced formation of cytoplasmic lipid droplets. *Magn Reson Med* 1993; 29: 546-550
- 42 Cheng LL, Lean CL, Bogdanova A, Wright SC Jr, Ackerman JL, Brady TJ, Garrido L. Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning. *Magn Reson Med* 1996; 36: 653-658
- 43 Chen JH, Enloe BM, Fletcher CD, Cory DG, Singer S. Biochemical analysis using high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy distinguishes lipoma-like well-differentiated liposarcoma from normal fat. *J Am Chem Soc* 2001; 123: 9200-9201
- 44 Millis K, Weybright P, Campbell N, Fletcher JA, Fletcher CD, Cory DG, Singer S. Classification of human liposarcoma and lipoma using ex vivo proton NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* 1999; 41: 257-267
- 45 Tomlins AM, Foxall PJD, Lindon JC, Lynch MJ, Spraul M, Everett JR, Nicholson JK. High resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance analysis of intact prostatic hyperplastic and tumour tissues. *Anal Comm* 1998; 35: 113-115
- 46 Griffiths JR, Stubbs M. Opportunities for studying cancer by metabolomics: preliminary observations on tumors deficient in hypoxia-inducible factor 1. *Adv Enzyme Regul* 2003; 43: 67-76
- 47 Preul MC, Caramanos Z, Collins DL, Villemure JG, Leblanc R, Olivier A, Pokrupa R, Arnold DL. Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nat Med* 1996; 2: 323-325
- 48 Howells SL, Maxwell RJ, Peet AC, Griffiths JR. An investigation of tumor ¹H nuclear magnetic resonance spectra by the application of chemometric techniques. *Magn Reson Med* 1992; 28: 214-236
- 49 Carmichael PL. Mechanisms of action of antiestrogens: relevance to clinical benefits and risks. *Cancer Invest* 1998; 16: 604-611
- 50 Beckonert O, Monnerjahn J, Bonk U, Leibfritz D. Visualizing metabolic changes in breast-cancer tissue using ¹H-NMR spectroscopy and self-organizing maps. *NMR Biomed* 2003; 16: 1-11
- 51 Lehtimäki KK, Valonen PK, Griffin JL, Väisänen TH, Gröhn OH, Kettunen MI, Vepsäläinen J, Ylä-Herttua S, Nicholson J, Kauppinen RA. Metabolite changes in BT4C rat gliomas undergoing ganciclovir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death as studied by ¹H NMR spectroscopy in vivo, ex vivo, and in vitro. *J Biol Chem* 2003; 278: 45915-45923
- 52 Williams SN, Anthony ML, Brindle KM. Induction of apoptosis in two mammalian cell lines results in increased levels of fructose-1,6-bisphosphate and CDP-choline as determined by ³¹P MRS. *Magn Reson Med* 1998; 40: 411-420
- 53 Anthony ML, Zhao M, Brindle KM. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 19686-19692
- 54 Griffin JL, Lehtimäki KK, Valonen PK, Gröhn OH, Kettunen MI, Ylä-Herttua S, Pitkänen A, Nicholson JK, Kauppinen RA. Assignment of ¹H nuclear magnetic resonance visible polyunsaturated fatty acids in BT4C gliomas undergoing ganciclovir-thymidine kinase gene therapy-induced programmed cell death. *Cancer Res* 2003; 63: 3195-3201
- 55 Singer S, Millis K, Souza K, Fletcher C. Correlation of lipid content and composition with liposarcoma histology and grade. *Ann Surg Oncol* 1997; 4: 557-563
- 56 El-Sayed S, Bezabeh T, Odlum O, Patel R, Ahing S, MacDonald K, Somorjai RL, Smith IC. An ex vivo study exploring the diagnostic potential of ¹H magnetic resonance spectroscopy in squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Head Neck* 2002; 24: 766-772
- 57 Moreno A, López LA, Fabra A, Arús C. ¹H MRS markers of tumour growth in intrasplenic tumours and liver metastasis induced by injection of HT-29 cells in nude mice spleen. *NMR Biomed* 1998; 11: 93-106
- 58 Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, Tammela J, Geisler JP, Miller G, Sellers T, Cliby W, Qian F, Keitz B, Intengan M, Lele S, Alderfer JL. Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabolomics. *Int J Cancer* 2005; 113: 782-788
- 59 Yang Y, Li C, Nie X, Feng X, Chen W, Yue Y, Tang H, Deng F. Metabonomic studies of human hepatocellular carcinoma using high-resolution magic-angle spinning ¹H NMR spectroscopy in conjunction with multivariate data analysis. *J Proteome Res* 2007; 6: 2605-2614
- 60 Fang F, He X, Deng H, Chen Q, Lu J, Spraul M, Yu Y. Discrimination of metabolic profiles of pancreatic cancer from chronic pancreatitis by high-resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance and principal components analysis. *Cancer Sci* 2007; 98: 1678-1682
- 61 Xu G, Liebich HM, Lehmann R, Müller-Hagedorn S. Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients. *Methods Mol Biol* 2001; 162: 459-474
- 62 Kim YS, Maruvada P, Milner JA. Metabolomics in biomarker discovery: future uses for cancer prevention. *Future Oncol* 2008; 4: 93-102
- 63 Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer* 2006; 13: 129-136
- 64 Ippolito JE, Merritt ME, Bäckhed F, Moulder KL, Mennerick S, Manchester JK, Gammon ST, Piwnica-Worms D, Gordon JI. Linkage between cellular communications, energy utilization, and proliferation in metastatic neuroendocrine cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12505-12510
- 65 Ichikawa W. Prediction of clinical outcome of fluoropyrimidine-based chemotherapy for gastric cancer patients, in terms of the 5-fluorouracil metabolic pathway. *Gastric Cancer* 2006; 9: 145-155

编辑 史景红 电编 何基才

辣椒素对内脏痛觉过敏的影响及其机制

张琴, 谭婷婷, 彭燕

■背景资料

随着生活水平的提高、饮食结构的改变, 功能性胃肠病发病率呈逐年上升趋势, 很多患者表现为内脏痛觉过敏。辣椒素药理学作用广泛, 近年来研究发现, 辣椒素具有镇痛作用, 对其进行深入研究具有重要的临床意义。

张琴, 谭婷婷, 彭燕, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

作者贡献分布: 论文的文献检索分析及撰写由张琴与谭婷婷完成; 选题和审校由彭燕完成。

通讯作者: 张琴, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院消化内科. ziqing0020@sina.com
电话: 0830-3165331

收稿日期: 2008-09-21 修回日期: 2008-11-03

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-08

Influence of capsaicin on visceral hyperalgesia and its mechanism

Qin Zhang, Ting-Ting Tan, Yan Peng

Qin Zhang, Ting-Ting Tan, Yan Peng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Qin Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. ziqing0020@sina.com

Received: 2008-09-21 Revised: 2008-11-03

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-08

Abstract

Capsaicin (CAP) has multiple pharmacological actions, and researches have been centered on its effect on visceral hyperalgesia (VHL). Relevant studies have shown that low doses of CAP may cause VHL, while high doses can inhibit VHL. This kind of mechanism may be associated with vanilloid receptor subtype 1 (VR1) phosphorylation and dephosphorylation, substance P (SP), calcitonin-gene-related peptide (CGRP) and protease-activated receptor 2 (PAR2). CAP may be promising as a new drug for VHL treatment.

Key Words: Capsaicin; Visceral hyperalgesia; Mechanism

Zhang Q, Tan TT, Peng Y. Influence of capsaicin on visceral hyperalgesia and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3884-3889

摘要

辣椒素(capsaicin, CAP)药理作用广泛, 其对内脏痛觉过敏(visceral hyperalgesia, VHL)的影

响已引起广大学者的关注。研究显示小剂量CAP可能诱发VHL, 而大剂量的CAP可能对VHL有抑制作用。CAP对VHL的作用机制可能与CAP受体(vanilloid receptor subtype 1, VR1)及其VR1的磷酸化和去磷酸化、P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)、蛋白水解酶激活型受体2(protease-activated receptor 2, PAR2)等有关。CAP可能成为一种有前景的治疗VHL的新药。

关键词: 辣椒素; 内脏痛觉过敏; 机制

张琴, 谭婷婷, 彭燕. 辣椒素对内脏痛觉过敏的影响及其机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3884-3889

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3884.asp>

0 引言

功能性胃肠疾病是近年来导致消化病谱变化的主要因素, 此类疾病发病机制仍不清楚, 患者及实验动物表现出内脏痛觉过敏(visceral hyperalgesia, VHL)^[1-6]。然而目前改善VHL的药物较少, 且作用不理想, 随着对CAP的深入研究及VR1的克隆表达, VR1基因敲出小鼠模型的建立, CAP及VR1对VHL的作用已受到越来越多的关注。本文就CAP对VHL的研究进展作一综述。

1 CAP、CAP受体及其作用

CAP是辣椒中的主要辛辣成分, 其药理作用广泛, 具有镇痛、止痒、抗氧化等作用。大量研究显示CAP对带状疱疹后遗神经痛、三叉神经痛、糖尿病神经痛等有显著疗效。20世纪50年代, Jancso提出CAP参与了激活感知痛觉的神经元的活动。此后, 有关CAP在疼痛中的研究愈来愈多。

CAP是通过初级传人神经元末梢和胞膜上特殊的分子受体介导而产生作用的, 这一受体称为VR1^[7-10], 他是一类表达在感觉神经末梢上的受体, 同时也是一个配体门控的非选择性阳离子通道, 属于瞬时感受器电位通道(transient receptor potential channel, TRP channel)家族, 又称TRPV1^[11]。VR1广泛分布在脊髓背根神经节、

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

三叉神经节和迷走神经节的中、小神经元上,因此被认为是一种神经系统特异的受体^[12-13]。近年来发现,一些非神经组织也有VR1的分布,如膀胱上皮、肝、肺、胃肠道、肥大细胞、巨噬细胞等^[14-17]。VR1除了可被辣椒素类物质激活外,在体内还可被伤害性热刺激(>43℃)和酸性环境(pH<6)激活,在炎症产生和痛觉传递过程中发挥重要作用。有研究显示该受体参与机体对刺激的感知、疼痛和镇痛机制^[18]。已有诸多证据表明其可探测和整合诱发痛觉的化学和热刺激信号,基因敲除小鼠的研究分析有力证明了该离子通道参与了疼痛及组织损伤后痛觉过敏的产生,而且是热诱发疼痛发生过程的关键分子^[19]。随着对VR1不断深入的研究,越来越多的证据表明VR1参与了疼痛的发生机制。

2 VHL的机制

向内脏器官施予一些化学物质(如松脂油,乙酸)以诱发实验性炎症时,通常可以使支配脏器的神经纤维的感受性发生变化,本来对机械性刺激不敏感的沉默纤维变得对该刺激敏感,即使是脏器的正常生理性刺激也能使其兴奋,因为这种变化呈现一种对刺激过度敏感的特性,因而称之为内脏痛觉过敏。VHL产生机制非常复杂,研究认为主要是外周敏感化和中枢敏感化共同作用的结果。

2.1 外周敏感化

2.1.1 伤害性感受器的激活:感受器上特异的受体和离子通道被激活以后自身特性发生改变,开放阈值降低,使伤害性感受器对后续刺激的敏感性升高。研究发现VR1在受到热或CAP刺激以后通道的开放阈值降低,相同程度的刺激引起受体放电幅度增加,但放电频率未发生明显变化,VR1的这种变化同伤害性感受器对热刺激过敏的变化时相一致^[20-21]。

2.1.2 伤害性感受器的调制:调制是指受损的组织细胞以及浸润到损伤组织的炎细胞等释放的炎症介质如前列腺素(PG)、5-羟色胺、ATP、神经生长因子(NGF)等通过细胞内信号转导的级联机制使伤害性感受器的受体/离子通道磷酸化,进一步使伤害性感受器的感受阈值降低,细胞膜的兴奋性增强。(1)PG:研究发现PGE2可增强VR1的反应,提前使用PGE2受体拮抗剂可减少PGE2对VR1的异化作用^[22-23]。(2)ATP:Tomimaga *et al*^[24]研究显示显示组织损伤后大量释放的ATP可以通过VR1的作用(主要是VR1磷酸化)

引起痛觉外周敏感化。(3)NGF:Shu *et al*研究显示sc NGF 20 min后VR1对温度的敏感性降低2℃^[25-26],说明NGF可以直接作用于伤害性感受器上的特异性受体,使其对刺激的敏感性降低。

2.1.3 伤害性感受器的改造:炎症情况下伤害性感受器上的特殊受体和通道如VR1、酸敏感性离子通道(ASICs)的表达上调,增加感觉神经末梢对炎症介质和伤害性刺激的敏感性。

2.2 中枢敏感化

2.2.1 兴奋性氨基酸和NMDA(N-甲基-D-天门冬氨酸)受体:兴奋性氨基酸通过激活不同的受体亚型介导外周伤害性信息向中枢的传递,其中NMDA受体在与学习记忆有关的长时程增强、外周感受阈的扩大、中枢过度兴奋以及热敏过程中发挥重大作用。

2.2.2 P物质(SP):SP是一种公认的传递伤害性信息的神经肽。SP可以通过作用于神经激肽(NK)1受体引起突触后膜的缓慢去极化以消除Mg²⁺对NMDA受体的电压依赖性阻断,从而促进后者的激活;此现象提示SP参与了痛觉过敏的形成。

2.2.3 细胞外信号调节蛋白激酶(ERK1/2):ERK1/2是MAPK家族的一种。Galan *et al*采用Western blot检测技术,发现在灌注CAP引起的直肠痛和痛觉过敏的大鼠腰段脊髓的ERK1/2被激活^[27-28],他们还发现iv ERK1/2的抑制剂-UOI26不影响原发痛的产生和直肠的炎症反应,却呈剂量依赖性抑制痛觉过敏。所以他们认为ERK1/2在辣椒素引起的内脏痛觉过敏的维持中起了一定的作用。从而可知ERK1/2信号转导通路在辣椒素引起的内脏痛觉过敏的痛信号传递中起到一定的作用。

2.2.4 CGRP: CGRP大量存在于内脏的传入纤维上,从传入神经的外周末梢释放的CGRP曾被认为在内脏痛觉过敏的外周机制中发挥了重要作用^[29]。Gschossmann *et al*发现,在鞘内注射CGRP受体拮抗剂可呈剂量依赖性的减少反复扩张结肠导致的内脏痛觉过敏引起的腹部肌肉收缩的次数^[30-31]。因此他们推测反复扩张结肠导致的内脏痛觉过敏与脊髓中CGRP的释放有一定的关系。

此外,Laird *et al*采用神经激肽(NK)1受体基因敲除大鼠研究VHL,发现敲除NK1基因的大鼠原发性痛觉过敏的行为学反应减轻^[32-35]。

3 CAP在VHL中的作用

CAP药理作用复杂,不同剂量的CAP或CAP给

■相关报道

大量研究显示辣椒素药理作用广泛,具有镇痛、抗炎抗氧化等作用,甚至认为辣椒素受体对痛觉是必不可少的,但是辣椒素及其受体对内脏痛觉过敏的作用目前尚不清楚,国内这方面研究较少。

■应用要点

本文着重对辣椒素对内脏痛觉过敏的作用及其机制进行阐述,综述了辣椒素及其受体在内脏痛觉过敏的形成和维持中起了一定作用,而一定剂量的辣椒素有减轻内脏痛的作用,这对于临床研究具有重要的意义。

药的不同时期对机体产生的作用效果是不同的。CAP初次施用于外周神经末梢,可引起患者烧灼样的刺激感,施用区产生疼痛,局部血管扩张,微循环量增加,形成一个痛觉过敏区。CAP引起神经肽释放与疼痛有关。继续使用CAP,神经元变得迟钝。对CAP及其他伤害性致痛刺激无反应性,产生镇痛效果,即产生“脱敏”作用。大剂量使用CAP是有毒性的,这可引起传入神经中的C纤维变性、减少,导致CAP敏感传入神经元长期受到损害,失去信息传入功能,即CAP的化学“去神经”作用。多数学者报道在大鼠身上CAP用量 ≥ 50 mg/kg是饱和剂量,可引起化学“去神经”作用^[36],在新生动物身上大剂量使用CAP,可使某部分体积较小的神经元细胞死亡,进而造成动物永久性痛觉丧失。患者在手术后或者组织损伤后,切口周围对于伤害性和非伤害性刺激的敏感性会增强,出现痛觉过敏或者触诱发痛。Pospisilova *et al*^[37]采用大鼠足底切伤模型进行实验,给动物足底切口sc高浓度CAP,引起CAP敏感的伤害性感受器失活。大鼠分别在切伤前6 d或者24 h以及在切伤后2 h应用CAP,然后测试动物对机械刺和辐射热刺激的缩爪反应时间。结果显示,切伤前6 d使用CAP组大鼠,在切伤前引起热痛觉减退,但是不能完全抑制切伤后引起的热痛觉过敏,同时对机械刺激的敏感性减弱。切伤后2 h使用CAP组大鼠,在注射后2 h起作用,在注射后24 h其作用与切伤前6 d使用的作用相当。这些结果提示VR1敏感性伤害性感受器在术后痛敏发生过程中发挥重要的作用,同时表明局部,高浓度使用CAP可以缓解术后痛的发生。CAP对人体皮肤痛阈也有明显影响,在志愿者上臂涂1% CAP乙醇溶液,并测定热刺激痛阈,结果0-10 h痛阈下降3.5℃(变态反应),从第2-10 h平均痛阈值上升1.9℃(镇痛反应)^[38]。蛛网膜下隙注入CAP 0.4 mg可使脊髓后角胶质中的C类纤维末梢大突触囊泡选择性变性。这些可能都是导致CAP产生长时间无痛的原因。可以预测,CAP能引起痛觉过敏,但一定剂量、一定时间可能减轻甚至治疗痛觉过敏。

CAP选择性作用于无髓鞘的C纤维和有髓鞘的A δ 纤维的初级感觉神经元,与感觉神经末梢膜成分进行相互作用产生感觉丧失而不引起感觉神经主要物质的减少。CAP这种选择性作用和相当严格的结构,表明CAP通过激活位于伤害性感受器上的受体,即VR1产生生物学活性。CAP激活VR1后,Ca²⁺通道开放,大量Ca²⁺内流,

细胞去极化,神经元兴奋,引起神经元及其纤维释放神经肽,如P物质、神经激肽A、CGRP、血管活性肠肽及兴奋性氨基酸,如:谷氨酸、天冬氨酸^[21]而发挥作用。一定剂量CAP具有脱敏作用,可使感觉神经元持续兴奋,CGRP、SP等释放耗竭排空,对外界的刺激不敏感从而产生镇痛的效果。Caterina *et al*^[19]成功地培育出敲除VR1基因的小鼠,无VR1的小鼠可以存活,VR1阴性小鼠对sc CAP,喝辣椒水无疼痛抗拒行为,但对伤害性机械刺激反应正常。体外培养的VR1阴性小鼠的初级感觉神经细胞则对各种有害刺激的反应都严重削弱。可见VR1在多型伤害性刺激的传递中起关键作用,甚至认为VR1对痛觉是必不可少的^[39]。VR1在内脏痛中起重要作用,洪迅 *et al*^[40]研究发现内皮素-1腹腔内注射能引起内脏痛,但在VR1基因敲除小鼠引起的内脏痛明显减轻^[19]。所以,VR1是一个镇痛药物开发的靶点。

Chan *et al*^[42]报道在腹部不适伴便秘或腹泻等症状的IBS患者的直肠肌层黏膜下层及黏膜层VR1阳性细胞增加,患者直肠对热刺激及直肠扩张刺激敏感性增强,说明VR1在IBS的发病过程及内脏痛觉过敏的产生中可能起作用。我国学者梁杰贤 *et al*^[41-42]研究显示大鼠去除VR1神经元后,对CAP的刺激不敏感,在直结肠扩张刺激下也不产生内脏痛觉过敏。也说明VR1参与了IBS的VHL的形成。

Winston *et al*在大鼠初生时期给予短暂的伤害性刺激导致大鼠永久的内脏感觉障碍^[43-44],并证实在使用伤害性刺激之前使用VR1拮抗剂的大鼠对内脏扩张刺激敏感性降低,说明了VR1在VHL的形成和维持中都起着十分重要的作用。

4 CAP在VHL中的作用机制

CAP在内脏痛觉过敏形成中的作用机制非常复杂,至今尚不完全清楚。大量研究显示,VR1虽然广泛分布于背根神经节、三叉神经节和迷走神经节中的神经元上,但在腹腔内脏传入神经中的分布多于躯体传入神经,在倡导黏膜下神经丛和肌间神经丛均有VR1阳性神经元分布,从而对内脏痛产生一定作用,其机制主要与下列因素有关。

4.1 SP 大多数实验表明,CAP的镇痛作用是通过与含SP的一级感觉神经终端膜上的某些化合物牢固结合,使SP释放增多、合成中断而衰竭导致;此过程亦有CGRP和NO参加。大剂量的CAP(≥ 50 mg/kg)可产生神经毒性作用,使细胞

内的组织失去统一性开始分解,破坏了感觉神经的微管系统致使顺行性和逆行性轴索运输缺如,因此微管系统的生化过程被破坏,使末梢或中枢合成SP的神经肽蓄积减少或补充受到抑制.另外还干扰传入神经的营养因子的逆向转运.该因子有使SP减少的作用,随着SP合成的不断减少,数天或数小时后SP逐渐耗竭,随之,产生CAP易感种属动物不可修复的感觉丧失.

4.2 CGRP CGRP是一种致炎、致痛的初级传入痛觉递质,富含于CAP敏感性传入神经纤维中.章菲菲 *et al*^[45]在大鼠胃内置入气囊,诱发大鼠内脏痛觉过敏,观察伤害性扩张或静注CGRP对大鼠疼痛阈值的影响及给予CGRP受体拮抗剂hCGRP8-37后疼痛阈值的变化,结果显示CGRP能使大鼠疼痛阈值降低,hCGRP8-37能逆转伤害性扩张和CGRP引起的内脏敏感性增高.有研究显示全身应用CAP可使CGRP耗竭^[46],佟世义 *et al*^[47]通过行为学、免疫组化观察正常大鼠硬膜外间隙注射CAP的镇痛效果,发现注射0.1% CAP组由于浓度较低,神经刺激作用较小,使初级痛觉传入纤维释放的CGRP较少,且痛阈升高可能仅由其阻断作用引起;而注射0.2% CAP组可引起CGRP大量释放,而CAP的短期镇痛效应可能是由初级痛觉递质耗竭和转运障碍双重因素引起的.这些均说明了CGRP在CAP所致的痛觉过敏中起着非常重要的作用.

4.3 VR1的磷酸化和去磷酸化 VR1的磷酸化和去磷酸化调节着其对刺激物的敏感性,Mandadi *et al*实验结果证明,去磷酸化的VR1产生急性脱敏,重新磷酸化后可以恢复对CAP的敏感性^[48-49],这对于痛觉过敏和镇痛有重要意义.炎症时可以产生许多细胞因子,如PGE₂、缓激肽等,同时局部的温度和H⁺浓度较高.大多数细胞因子可以激活PKA而使感觉神经末梢的VR1对温度和H⁺高度敏感^[50-51],这可能与炎症时疼痛和热痛觉过敏有关.VR1的功能受很多因素影响,如细胞因子和蛋白激酶等,而蛋白激酶又是通过其对VR1的磷酸化和去磷酸化调节而发挥作用.Lee *et al*^[52]用CAP处理转染VR1的HEK(人胚肾)293细胞后,发现VR1对CAP的反应增强,同时伴有VR1的磷酸化显著增加,Mohapatra *et al*^[53]的实验进一步说明FSK通过激活PKA而使VR1对CAP的敏感性增强,并且PKA磷酸化Thr 370在VR1敏感性增强中起着关键作用.Wang *et al*研究证实,蛋白激酶C直接磷酸化VR1的ser 116而增强CAP对温度及酸的反应性^[54-57].可以预测,

抑制PKA和PKC的激活,或者抑制TRPV1的某些关键部位的磷酸化,将产生良好的镇痛效应,这或许是将来镇痛药开发研究的方向.

4.4 PAR₂ 研究显示,多种物质可通过易化VR1的作用引起VHL,PAR₂被激活时可以激活蛋白激酶C(protein kinase c, PKC),从而增强VR1对CAP的敏感性^[58-61],大鼠结肠内给药,可引起内脏痛觉过敏^[62-66],梁杰贤 *et al*^[41]的研究显示,通过PKC途径激活VR1从而引起实验大鼠VHL是可能的原因之一.Amadesi *et al*^[59-60]报道注射PAR₂拮抗剂可导致实验大鼠持久的热痛觉过敏,而这种情况却可以被使用VR1拮抗剂或缺乏VR1者所抑制,且CAP诱导的VHL也可以被缺失VR1或使用PKC拮抗剂后抑制.同时还发现PAR₂能同时激活PKC ϵ 和PKA,后者磷酸化VR1,而增强其敏感性,这可能与炎症时的痛觉过敏有关.

5 结论

总之,CAP及其受体仍是目前研究的热点,其对VHL的形成和维持有重要作用,可能通过SP、CGRP、VR1的磷酸化与去磷酸化及PAR₂产生作用,然而这仅仅是一个粗略的了解,参与其中的分子及其相互间的作用等仍有许多不够明确之处,进一步探讨CAP与VHL的关系,对认识CAP新用途和对VHL的治疗具有重要意义,同时也对功能性胃肠病的治疗开辟了一条新的途径.

6 参考文献

- 1 Drossman DA. Rome III: the new criteria. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 181-185
- 2 Delvaux M. Role of visceral sensitivity in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i67-i71
- 3 Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganière M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002; 122: 1771-1777
- 4 Saruc M, Ozden N, Turkel N, Ayhan S, Demir MA, Tuzcuoglu I, Akarca US, Yuceyar H. Functional dyspepsia: relationship between clinical subgroups and Helicobacter pylori status in Western Turkey. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 747-751
- 5 Wood JD. Neuropathophysiology of irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S11-S22
- 6 Wood JD. Neuropathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1313-1332
- 7 Benham CD, Davis JB, Randall AD. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* 2002; 42: 873-888
- 8 郭峰, 姜晓钟, 赵云富. 辣椒素的作用机制及其镇痛应用. *第二军医大学学报* 2002; 23: 96-98
- 9 衡立君, 高国栋, 陈军. 辣椒素受体VR1在局部炎症状

■名词解释

1 辣椒素: 是一种常用的香料,是辣椒中的主要辛辣成分,气化学名称为反-8-甲基-N-香草基-6-壬烯基酰胺.

2 辣椒素受体: 辣椒素通过刺激初级传入神经元末梢和细胞膜上的特殊受体而产生作用,此受体称为辣椒素受体,又称香草醛受体亚型1,同时它也是一个配体门控的非选择性阳离子通道,属于瞬时感受器电位通道,又称TRPV1.

同行评价

本文选题很好,是当前研究的热点和难点问题,为进一步研究奠定了理论依据和实践基础。

- 10 态下的敏化机制. 神经解剖学杂志 2004; 20: 315-318
- 11 陈敏, 张陆勇, 严明. 辣椒素受体研究进展. 中国临床药理学与治疗学 2006; 11: 126-130
- 12 Zimov S, Yazulla S. Vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1) co-localizes with fatty acid amide hydrolase (FAAH) in retinal amacrine cells. *Vis Neurosci* 2007; 24: 581-591
- 13 Chan CL, Facer P, Davis JB, Smith GD, Egerton J, Bountra C, Williams NS, Anand P. Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency. *Lancet* 2003; 361: 385-391
- 14 Brady CM, Apostolidis AN, Harper M, Yiangou Y, Beckett A, Jacques TS, Freeman A, Scaravilli F, Fowler CJ, Anand P. Parallel changes in bladder suburothelial vanilloid receptor TRPV1 and pan-neuronal marker PGP9.5 immunoreactivity in patients with neurogenic detrusor overactivity after intravesical resiniferatoxin treatment. *BJU Int* 2004; 93: 770-776
- 15 Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13396-13401
- 16 Kato S, Aihara E, Nakamura A, Xin H, Matsui H, Kohama K, Takeuchi K. Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1115-1121
- 17 B  r   T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Acs G, Acs P, Paus R, Blumberg PM. Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood* 1998; 91: 1332-1340
- 18 Turner H, del Carmen KA, Stokes A. Link between TRPV channels and mast cell function. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 457-471
- 19 Nielsen GD. Mechanisms of activation of the sensory irritant receptor by airborne chemicals. *Crit Rev Toxicol* 1991; 21: 183-208
- 20 Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288: 306-313
- 21 Zimov S, Yazulla S. Vanilloid receptor 1 (TRPV1/VR1) co-localizes with fatty acid amide hydrolase (FAAH) in retinal amacrine cells. *Vis Neurosci* 2007; 24: 581-591
- 22 Andrew D, Greenspan JD. Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat. *J Neurophysiol* 1999; 82: 2649-2656
- 23 Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* 2001; 87: 3-11
- 24 Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 2005; 72: 359-371
- 25 Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 6951-6956
- 26 Shu XQ, Mendell LM. Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7693-7696
- 27 Malin SA, Molliver DC, Koerber HR, Cornuet P, Frye R, Albers KM, Davis BM. Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. *J Neurosci* 2006; 26: 8588-8599
- 28 Galan A, Cervero F, Laird JM. Extracellular signaling-regulated kinase-1 and -2 (ERK 1/2) mediate referred hyperalgesia in a murine model of visceral pain. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 116: 126-134
- 29 Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K. Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in the dorsal root ganglion following inflammation near the nerve cell body. *Neuroscience* 2004; 126: 1011-1021
- 30 Di Sebastiano P, Friess H, Di Mola FF, Innocenti P, Büchler MW. Mechanisms of pain in chronic pancreatitis. *Ann Ital Chir* 2000; 71: 11-16
- 31 Gschossmann JM, Coutinho SV, Miller JC, Huebel K, Naliboff B, Wong HC, Walsh JH, Mayer EA. Involvement of spinal calcitonin gene-related peptide in the development of acute visceral hyperalgesia in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 229-236
- 32 Li N, Lundberg T, Yu LC. Involvement of CGRP and CGRP1 receptor in nociception in the nucleus accumbens of rats. *Brain Res* 2001; 901: 161-166
- 33 Laird JM, Oliver T, Roza C, De Felipe C, Hunt SP, Cervero F. Deficits in visceral pain and hyperalgesia of mice with a disruption of the tachykinin NK1 receptor gene. *Neuroscience* 2000; 98: 345-352
- 34 Laird JM, Souslova V, Wood JN, Cervero F. Deficits in visceral pain and referred hyperalgesia in Nav1.8 (SNS/PN3)-null mice. *J Neurosci* 2002; 22: 8352-8356
- 35 Laird JM, Martinez-Caro L, Garcia-Nicas E, Cervero F. A new model of visceral pain and referred hyperalgesia in the mouse. *Pain* 2001; 92: 335-342
- 36 Negri L, Lattanzi R, Giannini E, Colucci M, Margheriti F, Melchiorri P, Vellani V, Tian H, De Felice M, Porreca F. Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior. *J Neurosci* 2006; 26: 6716-6727
- 37 Dedov VN, Roufogalis BD. Mitochondrial calcium accumulation following activation of vanilloid (VR1) receptors by capsaicin in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 2000; 95: 183-188
- 38 Pospisilova E, Palecek J. Post-operative pain behavior in rats is reduced after single high-concentration capsaicin application. *Pain* 2006; 125: 233-243
- 39 张军. 辣椒素的药理与临床研究进展. 国外医学·中医中药分册 1996; 18: 8-11
- 40 Vogel G. Hot pepper receptor could help manage pain. *Science* 2000; 288: 241-242
- 41 洪迅, 梁杰贤, 季文进, 郭中敏. 腹腔内注射内皮素-1对硫酸镁引起腹痛的影响. 热带医学杂志 2006; 6: 455-456
- 42 梁杰贤, 季文进, 洪迅, 吉锦泉, 梅莉. 辣椒素受体在肠易激综合症内脏痛觉过敏中的作用. 热带医学杂志 2007; 7: 342-344
- 43 梁杰贤, 洪迅, 季文进, 郭中敏, 刘培庆. 辣椒素受体在腹腔注射内皮素-1引起内脏痛中的作用. 中国疼痛医学杂志 2006; 12: 167-169
- 44 Winston J, Shenoy M, Medley D, Naniwadekar A, Pasricha PJ. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats. *Gastroenterology*

- 2007; 132: 615-627
- 44 Xu GY, Winston JH, Shenoy M, Yin H, Pendyala S, Pasricha PJ. Transient receptor potential vanilloid 1 mediates hyperalgesia and is up-regulated in rats with chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 2007; 133: 1282-1292
- 45 章菲菲, 莫剑忠, 吕有灵, 陈胜良, 吕鸣, 张珏莹, 杨龙. CGRP在大鼠胃痛觉过敏形成机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2484-2487
- 46 Hanesch U, Heppelmann B, Schmidt RF. Substance P- and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in primary afferent neurons of the cat's knee joint. *Neuroscience* 1991; 45: 185-193
- 47 佟世义, 焦岩然, 廖旭, 薛富善. 大鼠硬膜外间隙应用辣椒素镇痛的研究. *中国疼痛医学杂志* 2004; 10: 37-41
- 48 Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 2004; 35: 471-478
- 49 Tominaga M, Tominaga T. Structure and function of TRPV1. *Pflügers Arch* 2005; 451: 143-150
- 50 Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, Kress M. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 2002; 22: 4740-4745
- 51 Varga A, Bölcskei K, Szöke E, Almási R, Czéh G, Szolcsányi J, Pethő G. Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience* 2006; 140: 645-657
- 52 Lee SY, Lee JH, Kang KK, Hwang SY, Choi KD, Oh U. Sensitization of vanilloid receptor involves an increase in the phosphorylated form of the channel. *Arch Pharm Res* 2005; 28: 405-412
- 53 Mohapatra DP, Nau C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2005; 280: 13424-13432
- 54 Wang Y, Kedei N, Wang M, Wang QJ, Huppler AR, Toth A, Tran R, Blumberg PM. Interaction between protein kinase C and the vanilloid receptor type 1. *J Biol Chem* 2004; 279: 53674-53682
- 55 Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 2002; 277: 13375-13378
- 56 Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC, Treanor JJ. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* 2004; 279: 20283-20295
- 57 Wang Y, Szabo T, Welter JD, Toth A, Tran R, Lee J, Kang SU, Suh YG, Blumberg PM, Lee J. High affinity antagonists of the vanilloid receptor. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 947-956
- 58 Dai Y, Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Kobayashi K, Yamanaka H, Tominaga M, Noguchi K. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci* 2004; 24: 4293-4299
- 59 Amadesi S, Nie J, Vergnolle N, Cottrell GS, Grady EF, Trevisani M, Manni C, Geppetti P, McRoberts JA, Ennes H, Davis JB, Mayer EA, Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci* 2004; 24: 4300-4312
- 60 Amadesi S, Cottrell GS, Divino L, Chapman K, Grady EF, Bautista F, Karanjia R, Barajas-Lopez C, Vanner S, Vergnolle N, Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C and A-dependent mechanisms in rats and mice. *J Physiol* 2006; 575: 555-571
- 61 Gatti R, Andre E, Amadesi S, Dinh TQ, Fischer A, Bunnett NW, Harrison S, Geppetti P, Trevisani M. Protease-activated receptor-2 activation exaggerates TRPV1-mediated cough in guinea pigs. *J Appl Physiol* 2006; 101: 506-511
- 62 Kawabata A, Kawao N, Kitano T, Matsunami M, Satoh R, Ishiki T, Masuko T, Kanke T, Saito N. Colonic hyperalgesia triggered by proteinase-activated receptor-2 in mice: involvement of endogenous bradykinin. *Neurosci Lett* 2006; 402: 167-172
- 63 Kawao N, Ikeda H, Kitano T, Kuroda R, Sekiguchi F, Kataoka K, Kamanaka Y, Kawabata A. Modulation of capsaicin-evoked visceral pain and referred hyperalgesia by protease-activated receptors 1 and 2. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 277-285
- 64 Dale CS, Cenac N, Britto LR, Juliano MA, Juliano L, Vergnolle N, Giorgi R. The C-terminus of murine S100A9 protein inhibits hyperalgesia induced by the agonist peptide of protease-activated receptor 2 (PAR2). *Br J Pharmacol* 2006; 149: 374-384
- 65 Grant AD, Cottrell GS, Amadesi S, Trevisani M, Nicoletti P, Materazzi S, Altier C, Cenac N, Zamponi GW, Bautista-Cruz F, Lopez CB, Joseph EK, Levine JD, Liedtke W, Vanner S, Vergnolle N, Geppetti P, Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. *J Physiol* 2007; 578: 715-733
- 66 Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, Liang LL, Zhang YQ, Ji RR, Zhao ZQ. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J Neurosci* 2007; 27: 12067-12077

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

非酒精性脂肪性肝病患者的血浆Ghrelin水平与颈动脉粥样硬化的相关性

陈宁, 杨明, 黄锦平

■背景资料

随着人民生活水平的提高, 饮食结构的变化, 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的发病率日渐升高, NAFLD对于肝脏本身的危害性已经得到认同, 许多消化科医师以及心血管医师日益重视NAFLD与心血管疾病之间的相关性. NAFLD患者容易发生动脉粥样硬化已经有报道, 而与那些因素相关尚无结论.

陈宁, 江苏淮安市第三人民医院老年内科 江苏省淮安市 223001

杨明, 海军总医院检验科 北京市 100037

黄锦平, 江苏省淮安市第三人民医院功能科 江苏省淮安市 223001

通讯作者: 陈宁, 223001, 江苏省淮安市淮海西路272号, 淮安市第三人民医院老年内科. chenning6163@yahoo.com.cn
电话: 0517-83297995

收稿日期: 2008-10-06 修回日期: 2008-11-06

接受日期: 2008-11-17 在线出版日期: 2008-12-08

Correlation analysis of ghrelin level and carotid atherosclerosis in non-alcoholic fatty liver disease

Ning Chen, Ming Yang, Jin-Ping Huang

Ning Chen, Department of Geriatric Internal Medicine, the Third People's Hospital of Jiangsu, Huai'an 223001, Jiangsu Province, China

Ming Yang, Clinical laboratory, Navy General Hospital, Beijing 100037, China

Jin Ping Huang, Department of Function, the Third People's Hospital of Jiangsu, Huai'an 223001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Ning Chen, Department of Geriatric Internal Medicine, the Third People's Hospital of Jiangsu, Huai'an 223001, Jiangsu Province, China. chenning6163@yahoo.com.cn

Received: 2008-10-06 Revised: 2008-11-06

Accepted: 2008-11-17 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To determine whether serum ghrelin level is an independent factor associated with carotid atherosclerosis in non-alcoholic fatty liver disease.

METHODS: One hundred and one patients with non-alcoholic fatty liver disease were divided into 2 groups based on presence of carotid atherosclerosis. Ghrelin level and other non-alcoholic fatty liver disease risk factors including age, course of disease, percentage of fat (Fat%), body-mass index (BMI), free blood glucose (FBG), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), serum cholesterol (TC), triglyceride (TG), and liver function, high density

lipoprotein (HDL-C), low-density lipoprotein (LDL-C), leptin and ghrelin level after multivariate analysis.

RESULTS: Significant differences in age (60.1 ± 10.7 vs 41.9 ± 11.6 , $t = 8.13$, $P < 0.01$), DBP (11.5 ± 2.4 vs 10.1 ± 3.5 , $t = 2.39$, $P < 0.05$), percentage of fat (30.8 ± 8.4 vs 26.7 ± 7.1 , $t = 2.58$, $P < 0.05$) and course of disease (96.2 ± 61.3 vs 69.4 ± 58.9 , $t = 2.20$, $P < 0.05$) were observed between the two groups. Remarkable differences between two groups were also observed in TC (7.4 ± 0.8 vs 5.1 ± 0.7 , $t = 2.61$, $P < 0.05$), LDL-C (3.3 ± 0.6 vs 2.8 ± 0.5 , $t = 4.41$, $P < 0.001$), LEP (7.1 ± 2.2 vs 5.8 ± 2.5 , $t = 2.76$, $P < 0.01$) and ghrelin level (5.97 ± 1.26 vs 6.59 ± 1.16 , $t = 2.54$, $P < 0.05$). Multivariate analysis showed that carotid atherosclerosis was associated with decreased ghrelin level ($r = -0.565$; $P < 0.05$), DBP ($r = -0.615$; $P < 0.01$) and LDL-C ($r = -0.571$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Decreased ghrelin level may be an important risk factor in pathogenesis of carotid atherosclerosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.

Key Words: Ghrelin type; Non-alcoholic fatty liver disease; Carotid; Atherosclerosis

Chen N, Yang M, Huang JP. Correlation analysis of ghrelin level and carotid atherosclerosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3890-3893

摘要

目的: 探讨非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)患者血浆Ghrelin水平与颈动脉粥样硬化是否有关.

方法: NAFLD患者(101例), 按是否有颈动脉粥样硬化分为2组, 对患者年龄、病程、体质量指数(BMI)、体脂肪含量(Fat%)、血压(SBP、DBP)、空腹血糖(FBG)、血清胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、瘦素(LEP)、Ghrelin水平等

■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心; 吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院医院感染科

动脉粥样硬化危险因素进行多变量分析。

结果: 两组在年龄(60.1 ± 10.7 vs 41.9 ± 11.6 , $t = 8.13$, $P < 0.01$)、DBP(11.5 ± 2.4 vs 10.1 ± 3.5 , $t = 2.39$, $P < 0.05$)、Fat%(30.8 ± 8.4 vs 26.7 ± 7.1 , $t = 2.58$, $P < 0.05$)、病程(96.2 ± 61.3 vs 69.4 ± 58.9 , $t = 2.20$, $P < 0.05$)方面经统计学处理有显著性差异。血清生化指标两组在TC(7.4 ± 0.8 vs 5.1 ± 0.7 , $t = 2.61$, $P < 0.05$)、LDL-C(3.3 ± 0.6 vs 2.8 ± 0.5 , $t = 4.41$, $P < 0.001$)、LEP(7.1 ± 2.2 vs 5.8 ± 2.5 , $t = 2.76$, $P < 0.01$)、Ghrelin水平(5.97 ± 1.26 vs 6.59 ± 1.16 , $t = 2.54$, $P < 0.05$)方面比较有显著性差异。NAFLD患者发生颈动脉粥样硬化危险因素多变量分析: 与Ghrelin水平下降($r = -0.565$, $P < 0.05$)、舒张压($r = -0.615$, $P < 0.01$)和LDL-C($r = -0.571$, $P < 0.05$)独立相关。

结论: 血浆Ghrelin水平下降可能是NAFLD患者颈动脉粥样硬化发生的重要因素。

关键词: Ghrelin; 非酒精性脂肪性肝病; 颈动脉; 粥样硬化

陈宁, 杨明, 黄锦平. 非酒精性脂肪性肝病患者的血浆Ghrelin水平与颈动脉粥样硬化的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3890-3893
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3890.asp>

0 引言

随着人民生活水平的提高, 饮食结构的变化, 非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率日渐升高, 成人平均为10%-20%, 近年有报道达到32%^[1]。NAFLD对于肝脏本身的危害性已经得到认同, 而与心血管疾病之间的相关性正日益被重视。如何预防以及阻止NAFLD患者发生动脉硬化, 是提高患者生存质量的关键。而动脉粥样硬化的发生与那些因素相关尚无结论。我们对NAFLD患者血浆Ghrelin水平、血清瘦素、血压、血脂、体质指数(BMI)等多因素进行分析, 以期了解那些变化与NAFLD患者动脉粥样硬化相关。

1 材料和方法

1.1 材料 淮安市第三人民医院2007-01/12门诊体检以及老年内科住院NAFLD患者101例, 年龄37-69(平均 53.9 ± 11.4)岁。根据彩色多普勒超声对颈动脉以及肝脏检查结果, 101例NAFLD患者分为两组: 颈动脉粥样硬化组(A组, 59例, 男41例, 女18例)、无颈动脉粥样硬化组(B组, 42例,

男26例, 女16例)。NAFLD的诊断参照中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组2002年修订的酒精性肝病和NAFLD诊断标准^[2]。NAFLD排除标准: (1)排除过量饮酒, 男性每日饮用乙醇 <20 g(<140 g/wk); (2)除外存在可导致脂肪肝的全身性疾病以及正在服用或近期内曾经服用可致谷丙转氨酶(ALT)和 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)升高的药物(包括中药)的患者; (3)排除所有常见的(乙型肝炎、丙型肝炎)和少见的(自身免疫性肝病、Wilson病、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症)肝病, 以及肝脏恶性肿瘤、感染和胆道疾病; 除外肢端肥大症、骨质疏松、侏儒症、糖尿病以及合并严重感染等影响激素代谢的疾病。记录所有患者的一般情况(性别、年龄、身高、体质量、病程), 收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP), 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、空腹血糖(FBG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、ALT、谷草转氨酶(AST)、瘦素(LEP), Ghrelin。并计算体质指数BMI = 体质量(kg)/身高(m²)。体脂肪含量: 男性体脂肪含量(Fat%) = $1.2 \times \text{BMI} + 0.23 \times \text{年龄} - 16.2$, 女性(Fat%) = $1.2 \times \text{BMI} + 0.23 \times \text{年龄} - 5.4$ ^[3]。
1.2 方法 患者检查前一晚19:30起禁食。次日晨6:30-7:30测量血压后, 空腹抽取肘静脉血。14℃离心, 离心半径15 cm, 3000 r/min分离得到血清, -70℃保存待测; 8:00-9:30采用日本东芝SSA-660A/Sario彩色多普勒超声空腹检查肝脏。具备以下3项腹部超声异常发现中的两项以上者可诊断为脂肪肝: (1)肝脏近场回声弥漫性增强(明亮肝), 回声强于肾脏; (2)肝内管道结构显示不清; (3)肝脏远场回声逐渐衰减。用奥林巴斯800全自动生化分析仪测定ALT、AST、TC、TG、HDL、LDL、FBG。采用时间分辨免疫荧光法测定LEP。采用酶标免疫分析法测定Ghrelin, 试剂由美国ADL公司提供。

颈动脉彩色多普勒超声检查: 所有三组成员停药有可能引起血管扩张的药物3 d, 在安静状态下进行检查: 使用5-10 MHz探头检查颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、椎动脉(VA), 重复频率调至2500 Hz, 彩色血流显示速度调至20-40 cm/s, 彩色多普勒超声诊断仪自动测算出在稳定血流状态及频谱形态下数据: 收缩期峰值流速(Vs)、舒张期峰值流速(Vd)及平均峰值流速(Vm)。根据阻力指数公式 $RI = (Vs - Vd) / Vs$, 计算RI值, $RI \geq 0.75$ 为动脉硬化^[4-5]。

统计学处理 计量资料结果均以mean \pm SD

■ 相关报道

有报道认为NAFLD患者容易发生颈动脉粥样硬化, 但NAFLD的动脉硬化与哪些因素密切相关无明确定论。

■创新盘点

本课题研究发现两组在年龄、DBP、Fat%、病程、TC、LDL-C、LEP、Ghrelin水平比较有显著性差异;NAFLD患者颈动脉粥样硬化发生与Ghrelin水平下降、舒张压和LDL-C相关。

表 1 两组患者一般特征比较 (mean ± SD)

分组	n	年龄(岁)	病程(mo)	SBP(kPa)	DBP(kPa)	Fat%	BMI(kg/m ²)
A组	59	60.1 ± 10.7	96.2 ± 61.3	17.9 ± 3.6	11.5 ± 2.4	30.8 ± 8.4	28.6 ± 3.1
B组	42	41.9 ± 11.6	69.4 ± 58.9	18.2 ± 4.1	10.1 ± 3.5	26.7 ± 7.1	27.9 ± 2.0
t值		8.13	2.20	0.39	2.39	2.58	1.28
P		<0.01	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05

表 2 NAFLD患者血液生化指标 (mean ± SD)

分组	ALT (μ/L)	AST (μ/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	FBG (mmol/L)	LEP (μg/L)	Ghrelin (μg/L)
A组	41.2 ± 29.3	43.9 ± 34.6	7.4 ± 0.8	5.1 ± 0.9	1.8 ± 0.5	3.3 ± 0.6	4.9 ± 2.1	7.1 ± 2.2	5.97 ± 1.26
B组	40.9 ± 26.4	39.8 ± 29.7	5.1 ± 0.7	4.9 ± 0.6	1.7 ± 0.7	2.8 ± 0.5	4.3 ± 1.9	5.8 ± 2.5	6.59 ± 1.16
t值	0.05	0.62	2.61	1.25	1.84	4.41	1.47	2.76	2.54
P	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	<0.001	>0.05	<0.01	<0.05

表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料采用例数和率(n , %)表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 两因素相关用相关分析. 均以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 一般特征比较 男性A组41例, B组26例, $\chi^2 = 0.63$, $P > 0.05$. 年龄、DBP、Fat%、病程经统计学处理有显著性差异(表1).

2.2 血清生化指标 A组TC、LDL-C、LEP、Ghrelin水平与B组比较有显著性差异(表2).

2.3 颈动脉粥样硬化危险因素相关性分析 NAFLD患者颈动脉粥样硬化发生与Ghrelin水平下降($r = -0.565$, $P < 0.05$)、舒张压($r = -0.615$, $P < 0.01$)和LDL-C($r = -0.571$, $P < 0.05$)相关, 其他指标无相关性。

3 讨论

有报道认为NAFLD患者容易发生颈动脉粥样硬化, 但NAFLD的动脉硬化与哪些因素密切相关无明确定论. 本组研究发现老年NAFLD患者更容易发生颈动脉粥样硬化. DBP、Fat%、病程经统计学处理有显著性差异. 体脂肪含量Fat%是指聚积在人体内的脂肪. 除皮下脂肪和内脏脂肪以外, 还包括血液中含有的脂肪和构成细胞膜的脂肪物质. A、B二组Fat%比较有显著性差异 $P < 0.05$, 但BMI比较无显著性差异 $P > 0.05$, 说明对于已经发生动脉硬化的NAFLD患者而言, 血脂以及构成细胞膜的脂肪物质比皮下、内脏脂肪更重要. 二组TC、LEP、血浆Ghrelin水平比较均存在显著性差异: A组LEP高于B组, 而

Ghrelin水平低于B组。

众所周知, 较高水平的DBP、LDL-C是发生动脉硬化的重要因素, 对于NAFLD患者也是同样. 本研究结果显示: NAFLD患者的血浆Ghrelin水平、DBP、LDL-C与颈动脉粥样硬化发生呈独立相关, 提醒NAFLD患者应该高度关注相关指标. Ghrelin是一个胃肠道分泌的小分子脑肠肽, 影响生长激素的分泌和参与调节能量代谢. 是迄今发现的体内唯一的生长激素促成分泌受体的内源性配体, 由28个氨基酸组成, 他在体内通过中枢食欲调节网络, 尤其是神经肽Y, 促进摄食, 并与瘦素、胰岛素等相互作用, 在血脂代谢的病理过程中发挥重要作用^[6]. Ghrelin对心血管系统发挥多种生理功能, 包括对心力衰竭的保护. 给健康人静脉注射Ghrelin, 显著降低平均动脉血压, 增加心输出量, 并不影响心率, 且对患慢性心衰患者也有同样的生理效应. Ghrelin对心血管系统的调节作用与他促生长激素分泌作用无关. Ghrelin可影响血液动力学指标, 给人静脉内注射Ghrelin, 血清生长激素浓度明显增加, 平均动脉压明显下降, 心脏指数增加16%, 每搏输出量增加22%^[7]. 因此, 当NAFLD患者血浆Ghrelin水平降低时, 可通过以下3个方面影响动脉硬化的发生: (1)抑制交感神经活性的能力受到限制, 血压升高, 心率增快; (2)通过直接对血管壁张力以及血液动力学指标影响; (3)通过与脂联素、LEP、胰岛素等相互影响, 使血脂代谢紊乱等途径, 最终促进NAFLD患者发生动脉硬化。

老年NAFLD患者应积极改良生活习惯, 如调整膳食结构、保持均衡营养、防止热量过剩、纠正不良的饮食习惯及戒酒、保持适量的体育锻炼, 同时严格控制血压、以及LDL-C水平等措施, 有效预防发生动脉硬化。也可通过早期血浆Ghrelin、LEP水平测定, 筛选高危人群, 做到有的放矢。

4 参考文献

- 1 谢霞, 梁圣彬, 李世存, 邱力军. 脂肪肝超声诊断与血脂、血糖和肥胖的相关性分析. 第四军医大学学报

- 2007; 28: 331-332
- 2 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 71
- 3 徐青. 非酒精性脂肪肝患者脂肪因子与Ghrelin血清学检测及临床意义. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 582-584
- 4 周永昌, 郭万学. 超声医学. 第3版. 北京: 科学技术文献出版社, 2000: 721
- 5 张青萍. 超声诊断临床指南. 第1版. 北京: 科学出版社, 1999: 449
- 6 戈敏鹃, 马向华, 陈家伟. Ghrelin与肥胖的研究进展. 国外医学·内科学分册 2005; 32: 83-86
- 7 唐胜球, 江青艳, 张永亮, 朱晓彤, 束刚, 高萍. 脑肠肽Obestalin与Ghrelin的研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3324-3332

■同行评价

该文通过病例对照研究探讨NAFLD患者血浆Ghrelin水平与颈动脉粥样硬化的关系, 研究结果对指导临床诊疗有一定的帮助。

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下。

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

N-乙酰半胱氨酸对重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用

邹忠东, 张再重, 宋香全, 王烈, 涂小煌, 陈少全, 王瑜

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)常并发全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征。肝脏是主要受累的胰外器官之一, 肝损伤与SAP病情发展和预后密切相关。有效防护SAP肝损伤对降低胰外器官损伤, 减轻SAP复杂化具有重要意义。

邹忠东, 张再重, 王烈, 涂小煌, 陈少全, 王瑜, 中国人民解放军南京军区福州总医院普通外科 中国人民解放军南京军区普通外科研究所 福建省福州市 350025 宋香全, 邢台医学高等专科学校外科学教研室 河北省邢台市 054000 福建省自然科学基金资助项目, No. 2006J0372

作者贡献分布: 此课题由邹忠东, 张再重, 王瑜, 涂小煌及王烈设计; 研究过程由邹忠东, 张再重, 宋香全及陈少全操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由宋香全, 王瑜及王烈提供; 数据分析由张再重, 陈少全, 涂小煌及王烈完成; 本论文写作由邹忠东与张再重完成。

通讯作者: 王瑜, 350025, 福建省福州市, 中国人民解放军南京军区福州总医院普通外科. fzptwk@21cn.com 电话: 0591-24937077 传真: 0591-83796855 收稿日期: 2008-09-08 修回日期: 2008-10-14 接受日期: 2008-10-21 在线出版日期: 2008-12-08

Protective effects of N-acetylcysteine against liver injury in rats with severe acute pancreatitis

Zhong-Dong Zou, Zai-Zhong Zhang, Xiang-Quan Song, Lie Wang, Xiao-Huang Tu, Shao-Quan Chen, Yu Wang

Zhong-Dong Zou, Zai-Zhong Zhang, Lie Wang, Xiao-Huang Tu, Shao-Quan Chen, Yu Wang, Department of Surgery, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command; Research Institute of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China Xiang-Quan Song, Department of Surgery, Xingtai Medical College, Xingtai 054000, Hebei Province, China Supported by: the Natural Science Foundation of Fuzhou Province, No. 2006J0372

Correspondence to: Dr. Yu Wang, Research Institute of General Surgery, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. fzptwk@21cn.com

Received: 2008-09-08 Revised: 2008-10-14

Accepted: 2008-10-21 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To investigate the role of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) activation in liver injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP), and to explore the protective effect of N-acetylcysteine (NAC) against SAP-associated liver injury in rats.

METHODS: Forty-two Wistar male rats were divided into sham operation group (SO, $n = 6$), SAP group ($n = 18$), and SAP + NAC group

(NAC, 300 mg/kg body wt, $n = 18$). SO group underwent laparotomy only. SAP model was established by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate into the bili-pancreatic duct in Wistar rats. SAP + NAC group were given NAC 300 mg/kg body weight intraperitoneally 2 h before SAP model was established. Rats were sacrificed at 3, 6 and 12 h after operation. The liver and pancreas tissues were obtained to observe their pathological changes with light microscopy. The levels of serum ALT and AST were determined at three time points (8 rats for each time point). The expression of TNF- α mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The activity of NF- κ B in liver was examined by immuno-histochemical methods.

RESULTS: The levels of serum ALT and AST increased significantly in SAP group as compared with those in SO group at 3, 6 and 12 h (ALT: 186.67 ± 27.28 , 321.17 ± 56.14 , 492.50 ± 69.77 vs 36.83 ± 7.02 ; AST: 255.50 ± 44.15 , 343.17 ± 43.70 , 425.33 ± 58.37 vs 41.67 ± 5.35 ; $P < 0.05$ or 0.01). The level of TNF- α mRNA in SAP group was significantly higher than that in SO group at 3, 6 and 12 h (0.37 ± 0.03 , 0.77 ± 0.04 , 0.54 ± 0.04 vs 0.24 ± 0.03 ; $P < 0.05$ or 0.01). The activity of NF- κ B was also higher in SAP group than that in SO group at 3 or 6 h (51.95 ± 4.76 , 24.67 ± 4.93 vs 9.33 ± 2.05 ; $P < 0.01$ or 0.05). Liver and pancreas pathological damages were more severe in SAP group than those in SO group under light microscope. In SAP + NAC group, the levels of serum ALT and AST (143.67 ± 16.62 , 203.33 ± 25.41 , 301.17 ± 26.82 ; 136.33 ± 26.27 , 221.50 ± 38.31 , 310.50 ± 38.17) decreased significantly in comparison with those in SAP group ($P < 0.05$ or 0.01), and the expression of TNF- α mRNA was significantly lower than that in SAP group at the three time points (0.25 ± 0.03 , 0.50 ± 0.05 , 0.43 ± 0.03 , $P < 0.05$ or 0.01). The activity of NF- κ B in SAP + NAC group was lower than that in SAP group at 3 or 6 h (37.60 ± 6.37 , 12.88 ± 2.66 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: NF- κ B activation and TNF- α mRNA up-regulation involve in the pathogen-

■同行评议者

孙诚谊, 教授, 贵阳医学院附属医院院长办; 王春友, 教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心

esis of liver injury in SAP rats. NAC at a dose of 300 mg/kg can alleviate the pathological damage to liver, and its mechanism might relate to inhibition of NF- κ B activation and reduction of cytokines such as TNF- α .

Key Words: N-acetylcysteine; Severe acute pancreatitis; Liver injury; Nuclear factor-kappaB; Cytokine; Immunohistochemistry; Reverse transcription polymerase chain reaction

Zou ZD, Zhang ZZ, Song XQ, Wang L, Tu XH, Chen SQ, Wang Y. Protective effects of N-acetylcysteine against liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3894-3899

摘要

目的: 探讨N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠肝损伤的保护作用及作用机制。

方法: Wistar大鼠42只随机分为3组, SAP组(SAP, $n = 18$), 采用逆行十二指肠胰胆管注射50 g/L牛黄胆酸钠溶液制备SAP模型; SAP+NAC组(SAP+NAC, $n = 18$), 建模前2 h给予NAC 300 mg/kg体质量预处理; 假手术组(SO, $n = 6$). 建模成功后3、6和12 h, 分别取下腔静脉血液、胰腺和肝脏组织。光镜下观察胰腺和肝脏组织病理改变, 全自动生化分析仪检测各时段血液ALT和AST水平, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝脏组织中TNF- α mRNA表达, SP免疫组化法检测肝脏组织中NF- κ B活化。

结果: SO组血液ALT、AST以及肝胰组织病理无显著性变化。SAP组各时间点肝胰病理改变较SO组严重, 术后3、6和12 h时间点ALT及AST均较SO组显著升高(186.67 ± 27.28 , 321.17 ± 56.14 , 492.50 ± 69.77 vs 36.83 ± 7.02 ; 255.50 ± 44.15 , 343.17 ± 43.70 , 425.33 ± 58.37 vs 41.67 ± 5.35 , $P < 0.05$ 或 0.01); TNF- α mRNA表达均显著高于SO组(0.37 ± 0.03 , 0.77 ± 0.04 , 0.54 ± 0.04 vs 0.24 ± 0.03 , $P < 0.05$ 或 0.01); NF- κ B活性术后3、6 h均显著高于SO组(51.95 ± 4.76 , 24.67 ± 4.93 vs 9.33 ± 2.05 , $P < 0.05$ 或 0.01), 12 h与SO组相比差异无显著性意义。SAP+NAC组各时间点肝胰组织病理改变均较SAP组减轻, 术后3-12 h血液ALT及AST水平(143.67 ± 16.62 , 203.33 ± 25.41 , 301.17 ± 26.82 ; 136.33 ± 26.27 , 221.50 ± 38.31 , 310.50 ± 38.17)均显著低于SAP组($P < 0.05$ 或 0.01); 各时间点肝脏TNF- α mRNA表达(0.25

± 0.03 , 0.50 ± 0.05 , 0.43 ± 0.03)显著低于SAP组($P < 0.05$ 或 0.01); 术后3-6 h NF- κ B活性(37.60 ± 6.37 , 12.88 ± 2.66)均较SAP组显著降低($P < 0.05$)。

结论: NF- κ B活化与TNF- α mRNA表达上调参与了SAP大鼠肝损伤过程, NAC 300 mg/kg预处理能够有效减轻SAP大鼠肝损伤, 其作用机制可能与抑制NF- κ B活化进而下调炎症细胞因子TNF- α mRNA表达水平相关。

关键词: N-乙酰半胱氨酸; 重症急性胰腺炎; 肝损伤; 核转录因子- κ B; 细胞因子; 免疫组化; 逆转录-聚合酶链反应

邹忠东, 张再重, 宋香全, 王烈, 涂小煌, 陈少全, 王瑜. N-乙酰半胱氨酸对重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3894-3899

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3894.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 是SAP病情危重、发展迅速、并发症和死亡率较高的主要原因, 肝脏是这一病变过程中最常见的受累胰外器官之一^[1]。NF- κ B可调控包括炎症细胞因子在内的多种基因表达, 在SAP及其相关SIRS和MODS的发生与发展中扮演着重要角色^[2-3]。有研究表明, 一定剂量的N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)预处理对实验性SAP具有一定防护作用, 并可减轻SAP相关肝损伤严重程度, 但其作用机制仍未阐明^[4]。本研究旨在探讨SAP大鼠肝组织NF- κ B活化与肝损伤的关系, 以及NAC防护SAP大鼠肝损伤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康♂清洁级Wistar大鼠42只, 体质量220-250 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供(符合国标GB14922-94 SPF级质量标准), 在SPF条件下适应性饲养1 wk。乙酰半胱氨酸注射液(NAC)(国药准字H20051788)购自杭州民生药业集团有限公司, 牛黄胆酸钠购自Sigma公司(用生理盐水配制成浓度为50 g/L的溶液), TRIzol试剂(美国Invitrogen公司), Taq DNA聚合酶、PCR缓冲液和dNTPs(美国Promega公司), NF- κ B p65

■ 研发前沿

近年研究发现, NF- κ B和炎症细胞因子TNF- α 在SAP肝损伤发生与发展中发挥关键作用, 逐渐成为国内外学者研究的最新热点之一。

■创新盘点

本文通过检测TNF- α mRNA表达和NF- κ B活化情况,从基因调控的角度探讨SAP肝损伤的发病机制,并进一步揭示了NAC防治SAP肝损伤的可能作用机制。

mAb购自Santa Cruz公司, SP免疫组化和DAB显色试剂盒(福建福州迈新生物技术开发有限公司), AU 2700型全自动生化分析仪(日本Olympus公司), PCR扩增仪为德国Eppendorf公司产品, PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 分组: 42只成年健康♂ Wistar大鼠按随机数字表法分为3组, SAP组(SAP, $n = 18$)采用胆胰管逆行注入50 g/L牛黄胆酸钠溶液建立SAP模型; SAP+NAC组(SAP+NAC, $n = 18$)建模前2 h先给予腹腔注射NAC 300 mg/kg体重预处理; 假手术组(SO, $n = 6$)开腹后仅翻动十二指肠和胰腺。前两组根据不同时间点再分为建模后3、6和12 h共3个亚组。

1.2.2 SAP模型制备: 参考文献[5]制备SAP模型, 实验前大鼠禁食12 h, 自由饮水。以戊巴比妥钠(40 mg/kg体重)ip麻醉大鼠后, 严格无菌条件下, 上腹正中切口进腹, 找到胆胰管汇入十二指肠乳头处, 4号头皮静脉针于十二指肠乳头附近穿刺十二指肠壁, 进入胆胰管, 并逆行刺入胆胰管约0.5 cm深度, 同时动脉夹夹闭肝门处胆总管, 匀速注入50 g/L牛黄胆酸钠溶液1 mL/kg, 滞留2 min后去除动脉夹和针头, 保持管内压力10 min, 关腹。术后10 min尾静脉注射生理盐水5 mL/kg体重, 以补充术中丢失的液体。

1.2.3 标本采集及指标检测: 各组大鼠在规定的时间点注射致死剂量的戊巴比妥钠(200 mg/kg体重)安乐处死, 严格无菌条件下采取肝胰组织和血液标本。检测指标及方法如下: (1)肝胰组织形态学观察: 取肝胰相同部位标本2 cm左右, 40 g/L甲醛溶液固定, 修剪、脱脂、石蜡包埋和切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 光镜下观察肝胰病理改变。(2)肝功能指标测定: 取下腔静脉血液2 mL, 3000 r/min离心10 min, 取上层血清-20℃保存, 借助AU 2700型自动生化分析仪测定肝功能指标ALT和AST。(3)肝组织TNF- α mRNA表达: 用半定量RT-PCR检测TNF- α mRNA表达。取液氮冻存肝组织, 用TRIzol试剂一步法抽提肝样品总RNA, 通过读取其在分光光度计260 nm和280 nm处的吸收值, 测定RNA浓度和纯度。随机引物法将RNA逆转录为cDNA, 再以TNF- α 引物进行PCR扩增, β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照。TNF- α 引物上游序列为: 5'-GCC AAT GGC ATG GAT CTC AAA G-3', 下游序列为: 5'-CAG

AGC AAT GAC TCC AAA GT-3', 扩增片段357 bp; β -actin上游序列为: 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3', 下游序列为: 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGF-3', 引物扩增片段241 bp。PCR条件为: 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共35次循环后, 72℃延伸8 min。取5 μ L PCR扩增反应产物在20 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 采集图像后测定目的基因TNF- α 和 β -actin基因的电泳条带灰度值, 以两者比值表示待测基因mRNA相对含量。(4)肝脏NF- κ B活性检测: 参考文献[1]方法, 用常规免疫组化方法检测肝脏NF- κ B活性。肝组织迅速用中性甲醛溶液固定, 常规脱水、石蜡包埋, 制备4 μ m厚连续切片。采用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(SP法), 进行免疫组化染色。操作按照SP免疫组化试剂盒说明进行。一抗工作浓度为1:100。用磷酸缓冲液(PBS)代替一抗作为空白对照。结果判定: 阳性细胞为细胞或(和)细胞质呈棕黄色染色。在10个高倍视野(10 \times 40)下观察阳性肝细胞数N1和总细胞数N, 阳性率 = $N1/N \times 100\%$ 。

统计学处理 应用SPSS13.0软件包, 计量数据用mean \pm SD描述, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 胰腺病理形态改变 大体观察: SO组胰腺未见明显改变; SAP组各时间点均可见腹腔内血性腹水, 胰腺充血水肿、出血坏死, 胰腺颜色逐渐变深, 呈渐进性病理改变; SAP+NAC组各时间点上上述变化均较SAP组明显减轻。光镜下: SO组胰腺形态结构未见异常, 偶可见腺叶间隙增宽; SAP组各时间点可见不同程度的腺叶间灶性水肿、无结构坏死区和组织间隙红细胞分布, 并可见大量炎性细胞浸润, 坏死腺泡细胞呈点状、片状分布, 其中以12 h病理改变最为明显; SAP+NAC组各时间点胰腺水肿、出血、坏死, 炎性细胞浸润程度均较SAP组同时间点明显减轻。

2.2 肝脏病理形态改变 大体观察: SO组肝脏呈鲜红色, 表面光滑, 无渗出, 无充血, 未见明显改变; SAP组各时间点均可见不同程度充血、肿胀, 颜色变深, 12 h可见散在性浅黄色坏死灶; SAP+NAC组各时间点上上述变化均较SAP组明显减轻。光镜下: SO组肝脏形态结构未见明显异常, 偶可见肝窦扩张; SAP组各时间点可见不同

表 1 各组TNF- α mRNA表达及NF- κ B活性的变化 (mean \pm SD)

分组	TNF- α mRNA表达			NF- κ B活性(%)		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
SO组	0.24 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	0.24 \pm 0.03	9.33 \pm 2.05	9.33 \pm 2.05	9.33 \pm 2.05
SAP组	0.37 \pm 0.03 ^a	0.77 \pm 0.04 ^b	0.54 \pm 0.04 ^b	51.95 \pm 4.76 ^b	24.67 \pm 4.93 ^a	14.60 \pm 3.46
SAP+NAC组	0.25 \pm 0.03 ^c	0.50 \pm 0.05 ^d	0.43 \pm 0.03 ^d	37.60 \pm 6.37 ^c	12.88 \pm 2.66 ^c	10.32 \pm 1.68

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs SO组; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs SAP组。

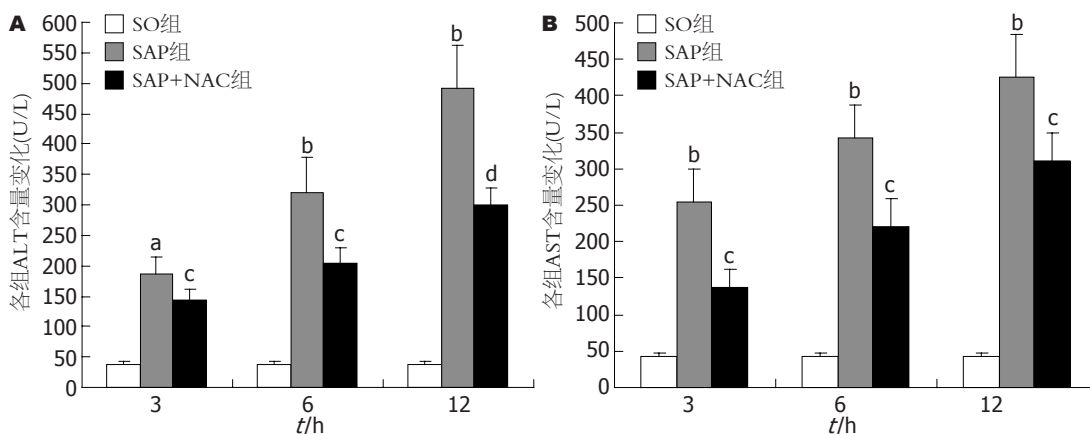


图 1 各组血清ALT和AST含量比较. A: ALT; B: AST. ^a P <0.05, ^b P <0.01 vs SO组; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs SAP组

程度的肝窦扩张, 肝细胞肿胀变性, 肝实质内点状或斑块状出血坏死, 可见明显炎性细胞浸润, 主要集中在汇管区和坏死区域, 并以12 h病理改变最为严重; SAP+NAC组各时间点肝脏病理改变均较SAP组明显减轻。

2.3 肝功能ALT和AST指标变化 SO组ALT和AST水平分别为36.83 \pm 7.02 U/L和41.67 \pm 5.35 U/L, 均在正常范围; SAP组3-12 h ALT和AST水平呈逐渐上升趋势, ALT各时间点均较SO组明显升高(186.67 \pm 27.28 vs 36.83 \pm 7.02, 321.17 \pm 56.14 vs 36.83 \pm 7.02, 492.50 \pm 69.77 vs 36.83 \pm 7.02, P <0.05或 P <0.01), AST各时间点均较SO组显著升高(255.50 \pm 44.15 vs 41.67 \pm 5.35, 343.17 \pm 43.70 vs 41.67 \pm 5.35, 425.33 \pm 58.37 vs 41.67 \pm 5.35, P <0.01); SAP+NAC组各时间点血液ALT水平均显著低于SAP组(143.67 \pm 16.62 vs 186.67 \pm 27.28, 203.33 \pm 25.41 vs 321.17 \pm 56.14, 301.17 \pm 26.82 vs 492.50 \pm 69.77, P <0.05或 P <0.01), 各时间点血液AST水平均显著低于SAP组(136.33 \pm 26.27 vs 255.50 \pm 44.15, 221.50 \pm 38.31 vs 343.17 \pm 43.70, 310.50 \pm 38.17 vs 425.33 \pm 58.37, P <0.05, 图1)。

2.4 肝组织TNF- α mRNA表达 SAP组肝组织

TNF- α mRNA术后3-6 h呈上升趋势, 术后6 h达高峰, 6 h后开始缓慢下降, 但3-12 h均显著高于SO组(0.37 \pm 0.03 vs 0.24 \pm 0.03, 0.77 \pm 0.04 vs 0.24 \pm 0.03, 0.54 \pm 0.04 vs 0.24 \pm 0.03, P <0.05或 P <0.01); SAP+NAC组各时间点肝脏TNF- α mRNA表达较SAP组显著降低, 差异有显著性意义(0.25 \pm 0.03 vs 0.37 \pm 0.03, 0.50 \pm 0.05 vs 0.77 \pm 0.04, 0.43 \pm 0.03 vs 0.54 \pm 0.04, P <0.05或 P <0.01)(表1)。

2.5 肝组织NF- κ B活性变化 NF- κ B在SO组仅有少量表达; SAP组NF- κ B活性在3 h为高峰, 3-12 h呈下降趋势, 但3-6 h均显著高于SO组(51.95 \pm 4.76 vs 9.33 \pm 2.05, 24.67 \pm 4.93 vs 9.33 \pm 2.05, P <0.05或 P <0.01), 12 h与SO组相比差异无显著性意义; SAP+NAC组NF- κ B活性3-6 h均较SAP组显著降低(37.60 \pm 6.37 vs 51.95 \pm 4.76, 12.88 \pm 2.66 vs 24.67 \pm 4.93, P <0.05), 12 h与SAP组和SO组相比差异无显著性意义(表1)。

3 讨论

SAP是外科常见的急腹症, 发病迅速, 病情凶险, 并发症较高, 临床死亡率常高达10%-20%, 甚至超过30%^[1]。目前认为, 胰腺腺泡细胞早期产生和释放的过多炎性细胞因子, 出现失控的炎

■应用要点

该研究课题阐述了TNF- α 和NF- κ B在SAP肝损伤的发病中的作用, 并探讨了可能的防治策略, 为防治SAP肝损伤提供了实验和理论依据, 对SAP肝损伤新型治疗药物的开发具有一定指导意义。

■名词解释

N-乙酰半胱氨酸: 为左旋精氨酸的天然衍生物, 分子式为 $C_5H_9NO_3S$, 分子质量163.20, 是一种抗氧化剂和体内活性氧自由基清除剂, 可抑制炎症介质和促炎细胞因子的生成, 同时具有保护肝脏的作用。

症级联反应, 诱发或加重SIRS, 并产生MODS, 是导致SAP发生及其复杂化的主要原因^[6-7]。肝脏作为胰腺血液回流心脏的必经器官, 肝枯否(Kupffer)细胞占整个机体单核巨噬细胞的50%, 固定巨噬细胞群的80%-90%, 是产生炎症细胞因子的主要效应细胞^[8], 在临床上肝脏也是SAP最常累及得到胰外器官之一^[9]。肝损伤与SAP病情发展及预后密切相关, 研究SAP肝损伤的作用机制, 对于防护胰外器官损伤, 降低MODS的发生有着重要意义。

TNF- α 被认为是在急性胰腺炎中最早升高并起着重要作用的细胞因子, 是与SAP的严重性相关并可作为SAP预后的指标之一^[10-11]。较高浓度的TNF- α 不但具有直接损伤机体细胞的作用, 还能够诱发和调控多种炎症细胞因子如IL-1, IL-6, IL-8等的释放, 直接和间接参与引起了机体内两次高水平细胞因子血症, 引起炎症瀑布样级联反应, 进而导致SIRS并继发MODS^[12]。近来研究也表明, NF- κ B可以调控下游信号分子TNF- α 等众多炎症细胞因子的基因表达, 在SAP发病及其相关SIRS和MODS发生发展过程中扮演关键角色^[2,13-14]。Gukovsky *et al*^[15]研究显示, 用NAC阻滞NF- κ B活性, 能显著减少胰腺炎症细胞浸润, 降低TNF- α 、IL-6等细胞因子基因表达, 有效改善胰腺局部炎症反应, 这也说明NF- κ B在SAP发生与发展中发挥关键作用。Zhang *et al*^[16]研究发现, SAP大鼠肝脏中同样存在NF- κ B大量激活。这些研究提示我们, NF- κ B表达可能参与了SAP大鼠肝损伤的发生, 通过抑制NF- κ B活化进而下调TNF- α mRNA表达是有效防护肝损伤的一个重要途径。

我们研究发现, SAP组大鼠术后3-12 h, 血清ALT和AST显著高于SO组, 胰腺和肝脏病理改变较SO组严重; 肝脏TNF- α mRNA表达3-6 h呈上升趋势, 3-12 h均显著高于同时间点SO组; SAP建模后3 h出现肝脏NF- κ B活化高峰, 3-12 h呈持续降低趋势; 这些结果表明NF- κ B活化与TNF- α 表达上调参与介导了SAP大鼠肝损伤的发生与发展。我们应用抗氧化剂NAC预处理, 可以显著抑制SAP大鼠肝脏NF- κ B活化和TNF- α mRNA表达, 降低血中ALT和AST水平, 有效减轻肝脏病理改变程度, 提示NAC可能通过抑制NF- κ B活化并下调细胞因子TNF- α mRNA表达, 来发挥保护肝脏的作用, 减轻SAP大鼠肝损伤严重程度。

因此, 我们认为NF- κ B活化和TNF- α mRNA表达参与了SAP肝损伤, NF- κ B活化并上调TNF- α 等细胞因子基因表达在SAP肝损伤发生与发展中起着关键作用; 适当抑制NF- κ B活化能够下调TNF- α 等细胞因子基因表达, 并减轻SAP相关肝损伤的严重程度。NAC具有保护肝脏、减轻SAP肝损伤的作用, 值得进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 Zhao YF, Zhai WL, Zhang SJ, Chen XP. Protection effect of triptolide to liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 604-608
- 2 Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2008; 57: 259-267
- 3 Xia SH, Fang DC, Hu CX, Bi HY, Yang YZ, Di Y. Effect of BN52021 on NFkappa-Bp65 expression in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 882-888
- 4 Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Legros F, Louis H, Le Moine O, Devière J. N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice. *Pancreas* 2000; 20: 161-169
- 5 Wang G, Sun B, Gao Y, Meng QH, Jiang HC. The effect of emodin-assisted early enteral nutrition on severe acute pancreatitis and secondary hepatic injury. *Mediators Inflamm* 2007; 2007: 29638
- 6 Almeida JL, Sampietre SN, Mendonça Coelho AM, Trindade Molan NA, Machado MC, Monteiro da Cunha JE, Jukemura J. Statin pretreatment in experimental acute pancreatitis. *JOP* 2008; 9: 431-439
- 7 Zhang Q, Ni Q, Cai D, Zhang Y, Zhang N, Hou L. Mechanisms of multiple organ damages in acute necrotizing pancreatitis. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 738-742
- 8 胡玉川, 徐峰, 徐发良, 龚建平. Kupffer细胞在内毒素诱导肝损伤发病机制中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2751-2755
- 9 Zhang XP, Zhang L, Wang Y, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. Study of the protective effects of dexamethasone on multiple organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *JOP* 2007; 8: 400-412
- 10 Malleo G, Mazzone E, Siriwardena AK, Cuzzocrea S. TNF-alpha as a therapeutic target in acute pancreatitis--lessons from experimental models. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 431-448
- 11 于洪海, 冯志杰. 急性胰腺炎肝损伤的发病机制和治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 385-391
- 12 Zyromski N, Murr MM. Evolving concepts in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Surgery* 2003; 133: 235-237
- 13 Rakonczay Z Jr, Jármyay K, Kaszaki J, Mándi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takács T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709
- 14 Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon

- CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002; 122: 448-457
- 15 Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998; 275: G1402-G1414
- 16 Zhang XP, Zhang L, Chen LJ, Cheng QH, Wang JM, Cai W, Shen HP, Cai J. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF-kappaB expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 548-556

■同行评价
本文具有一定新颖性、科学性和先进性。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人員提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达及临床意义

魏 房, 孙 威, 王 强, 刘 丽, 任庆华

■背景资料

由近期的研究指出转录因子HIF-1通过与靶基因上的缺氧反应元件(HRE)结合,可诱导下游靶基因(VEGF)的转录,从而产生一系列代偿反应,此外,他还可以上调多种基因的表达,如一氧化氮合酶(iNOS),最终影响肿瘤细胞的生长,VEGF和iNOS都是促进血管生成的重要因子,而HIF-1 α 是缺氧状态下血管生成的核心调控因子。诱导型iNOS、环氧合酶2(COX-2)为两种可诱导型酶,报道显示二者皆具有促进VEGF表达、诱导肿瘤血管生成作用。

魏房, 孙威, 王强, 任庆华, 中国医科大学附属盛京医院胃肠外科 辽宁省沈阳市 110003

刘丽, 中国医科大学附属盛京医院手术室 辽宁省沈阳市 110003

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20072109

沈阳市自然科学基金资助项目, No. 1071200-1-00

作者贡献分布: 魏房与孙威对此文所作贡献均等; 此课题由魏房, 孙威, 王强及刘丽设计; 研究过程由魏房与任庆华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孙威提供; 数据分析由刘丽完成; 本论文写作由魏房完成。

通讯作者: 孙威, 110003, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院胃肠外科. sunw@cmu2h.com

电话: 024-83955063 传真: 024-83955092

收稿日期: 2008-10-13 修回日期: 2008-12-03

接受日期: 2008-12-04 在线出版日期: 2008-12-08

Expression of HIF-1 α , iNOS and COX-2 and its significance in gastric cancer

Fang Wei, Wei Sun, Qiang Wang, Li Liu, Qing-Hua Ren

Fang Wei, Wei Sun, Qiang Wang, Qing-Hua Ren, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Li Liu, Department of Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Supported by: Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20072109; and Natural Science Foundation of Shenyang, No. 1071200-1-00

Correspondence to: Dr. Wei Sun, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China. sunw@cmu2h.com

Received: 2008-10-13 Revised: 2008-12-03

Accepted: 2008-12-04 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To examine association of HIF-1 α with iNOS, COX-2 in gastric cancer and their relationship with tumor angiogenesis, clinicopathological feature and prognosis.

METHODS: Immunohistochemical technique was used to detect expressions of HIF-1 α and iNOS, COX-2 in 54 cases with gastric cancer. The association between HIF-1 α expression with iNOS, COX-2 in tumor angiogenesis was analyzed, and clinicopathological features and prognosis of patients were investigated.

RESULTS: The percentage of HIF-1 α , iNOS and COX-2 protein positive expression was 74.07%, 66.67% and 62.9% in gastric cancer, respectively.

The expressions of HIF-1 α , iNOS and COX-2 were significantly higher in gastric cancer than in normal gastric tissue ($P < 0.05$). The expressions of HIF-1 α , iNOS and COX-2 in gastric cancer were significantly associated with TNM stage, invasive depth and lymph node metastasis ($P < 0.05$) except for tumor grading. There were positive correlation among HIF-1 α expression with iNOS, COX-2 ($r = 0.596$, $r = 0.875$, $r = 0.502$; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: HIF-1 α and iNOS, COX-2 play very important roles in the development of gastric cancer. The over expression of HIF-1 α induces tumor angiogenesis and invasion by activating the transcription of iNOS gene and COX-2 gene, thus joint detection is recommended for diagnosis of gastric cancer and estimation of prognosis.

Key Words: Hypoxia-inducible factor-1 α ; Inducible nitric oxide synthase; Cyclooxygenase 2; Gastric cancer; Immunohistochemistry

Wei F, Sun W, Wang Q, Liu L, Ren QH. Expression of HIF-1 α , iNOS and COX-2 and its significance in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3900-3903

摘要

目的: 研究HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达、相互关系及他们在胃癌发生发展、浸润和转移中的作用。

方法: 应用免疫组化SP法检测54例胃癌中HIF-1 α 与iNOS、COX-2的表达, 分析HIF-1 α 与iNOS、COX-2的表达关系及临床意义。

结果: 54例胃癌组织中HIF-1 α 与iNOS、COX-2的阳性表达率分别是74.07%、66.67%和62.9%, HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌组织中的表达水平明显高于正常胃组织中的表达水平($P < 0.05$)。HIF-1 α 与iNOS、COX-2的表达与胃癌的临床TNM分期、浸润程度和淋巴结转移有关($P < 0.05$); 与组织学分级无关。HIF-1 α 、iNOS和COX-2间存在显著相关性($r = 0.596$, 0.875 , 0.502 , 均 $P < 0.05$)。

■同行评议者

刘冰熔, 教授, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科; 樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

结论: HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌的发生发展中起重要作用, HIF-1 α 可能通过上调iNOS和COX-2的表达促进肿瘤血管生成而促进胃癌的转移, 联合检测可作为判断胃癌恶性程度和预后的指标。

关键词: 缺氧诱导因子1 α ; 诱导型一氧化氮合酶; 环氧化酶-2; 胃癌; 免疫组织化学

魏房, 孙威, 王强, 刘丽, 任庆华. HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3900-3903

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3900.asp>

0 引言

胃癌是消化系统发病率很高的恶性肿瘤之一, 胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 虽然综合治疗使得胃癌的5年生存率有所改善, 但其预后仍不理想, 5年生存率总体来说仍徘徊在20%-30%之间, 肿瘤侵袭转移是肿瘤治疗失败的主要原因^[1]. 由近期的研究指出转录因子HIF-1通过与靶基因上的缺氧反应元件(hypoxia resp-onde element, HRE)结合, 可诱导下游靶基因(VEGF)的转录, 从而产生一系列代偿反应, 此外, 他还可以上调多种基因的表达, 如iNOS, 最终影响肿瘤细胞的生长, VEGF和iNOS都是促进血管生成的重要因子, 而HIF-1 α 是缺氧状态下血管生成的核心调控因子^[1]. 诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧化酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)为两种可诱导型酶, 报道显示二者皆具有促进VEGF表达、诱导肿瘤血管生成作用^[2]. 本研究采用免疫组织化学法, 检测HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达, 探讨他们与胃癌肿瘤生物学行为的关系及HIF-1 α 与iNOS、COX-2之间的相关性, 为临床上进一步了解胃癌的生物学行为、判断预后提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2002-03手术切除, 病理证实为腺癌, 临床病理及随访资料齐全的胃癌蜡块标本54例, 术前均未行化疗或放疗. 其中男37例, 女17例; 年龄38-78岁; 肿瘤的原发灶大小、深度(T)、淋巴结转移(N)由病理确定, 远处转移(M)由病理学和临床确定. 其中肿瘤直径<5 cm 37例, \geq 5 cm 17例; 浆膜下者15例, 浸透浆膜者39例; 高分化19例, 中分化17例, 低分化18例; 无转移29例, 有转移25例; 远隔无转移42例, 有转移12例. 根据1997年国际抗癌联盟(IUCC)制定的TNM分期标准进行临床分期, I期12例, II期14例, III期16例, IV

12例. 另取自胃溃疡或十二指肠溃疡手术标本中正常的且排除重度不典型增生的胃组织15例作对照, 其中男10例, 女5例, 年龄44-77岁。

1.2 方法

1.2.1 操作步骤: 常规HE染色, 确定标本的组织分化程度. 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)免疫组织化学方法检测HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌及正常胃组织中的表达. 具体操作步骤按常规进行, 其一抗工作稀释度分别为1:75、1:50、1:50. 用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照, PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。

1.2.2 结果判断: 以细胞质内出现明显棕黄色颗粒为阳性细胞. 先于低倍镜下观察, 排除肿瘤坏死出血区及边缘反应区, 于肿瘤内染色相对密集区选取5个视野分别进行细胞记数, 高倍镜下进行观察, 以阳性细胞数占同类记数细胞的百分比为阳性细胞率. (1)HIF-1 α 阴性(-): 阳性细胞率<5%; 弱阳性(+): 阳性细胞率为5%-25%; 阳性(++): 阳性细胞率为25%-50%; 强阳性(+++): 阳性细胞率>50%. (2)iNOS阳性细胞率<10%为阴性(-), 阳性细胞率 \geq 10%为阳性(+). (3)COX-2阴性(-): 阳性细胞率<5%; 阳性(+): 阳性细胞率 \geq 5%。

统计学处理 采用SPSS12.0软件包进行统计分析. HIF-1 α 及iNOS、COX-2各指标间的相关性研究采用相关分析. 各检验方法皆以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达与胃癌临床病理参数的关系 在不同年龄、性别、肿瘤大小、组织学分级组别中, 三者蛋白表达水平均无显著差别. 三者在胃癌不同的TNM分期、不同的浸润深度和有无淋巴结转移组的表达差异具有显著性($P<0.05$, 表1)。

2.2 HIF-1 α 与iNOS、COX-2表达之间的相互关系 统计资料分析表明HIF-1 α 、iNOS与COX-2表达均呈正相关($r_1=0.596$, $r_2=0.875$, $r_3=0.502$; $P<0.05$)。

3 讨论

胃癌的早期诊断率低、总体预后差, 长期以来严重地威胁着人民的生命健康. 多年来许多学者在胃癌的预后方面进行了多项研究, 如ECG、HER-2、IL-8、VEGF、P27、MMP-1、CDH17等^[3]的联合检查可能对预测胃癌患者预后及进行个体化治疗具有意义, 但是就单个因素来说, 几乎没有哪个因素能很好地预测患者的预后. 因此非常有必要进一步寻找能有效预

■应用要点

通过本研究发现HIF-1 α 、iNOS与COX-2在胃癌的发生发展中起重要作用,联合检测可作为判断胃癌恶性程度和预后的指标。

表 1 HIF-1 α 及iNOS、COX-2在胃癌中的表达与临床病理因素的关系 $n(\%)$

临床病理因素	<i>n</i>	HIF-1 α	iNOS	COX-2
年龄(岁)				
≤60	41	31(75.6)	28(68.3)	26(63.4)
>60	13	9(69.2)	8(61.5)	8(63.4)
性别				
男	37	28(75.7)	26(64.9)	23(62.1)
女	17	12(70.6)	10(58.8)	11(64.7)
肿瘤大小(cm)				
≤5	37	27(73.0)	24(64.9)	24(64.9)
>5	17	13(76.5)	12(70.6)	10(58.8)
组织学分型				
高分化	19	12(63.2)	14(73.7)	10(52.6)
中分化	17	13(76.5)	10(58.8)	11(64.7)
低分化	18	13(72.2)	12(66.7)	13(72.2)
浸润深度				
浆膜下	15	7(46.7)	5(33.3)	6(40.0)
浆膜外	39	33(84.6) ^a	31(79.5) ^a	28(71.8) ^b
淋巴结转移				
无	29	17(58.6)	15(51.7)	11(27.9)
有	25	23(92.0) ^b	21(84.0) ^b	23(92.0) ^a
远隔转移				
无	42	30(71.4)	32(76.2)	24(57.1)
有	12	10(83.3)	4(33.3)	10(83.3)
TNM分期				
I、II期	26	16(61.5)	12(46.2)	8(30.7)
III、IV期	28	24(85.7) ^b	24(85.7) ^a	26(92.9) ^a

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 同组。

测患者预后的指标。缺氧是实体肿瘤生长微环境的一个共同特征^[4], HIF-1则处于肿瘤缺氧的中枢位置。他是由HIF-1 α 及HIF-1 β 组成的异源性二聚体, HIF-1 α 是其活性调节亚单位; HIF-1 β 在常氧和缺氧条件下均可表达, 而HIF-1 α 在氧浓度正常时, 其表达量维持在较低水平, 当氧浓度降低时, HIF-1 α 的转录、翻译水平则呈指数增加。HIF-1作为转录因子, 可调控40余种基因的表达^[5], 如VEGF、EPO、糖酵解酶类及MDR等, 而这些基因的激活解决了缺氧条件下肿瘤组织的血供、氧供及能量代谢, 并且使得肿瘤细胞产生抗药性。

本组实验中, 采用免疫组化的方法对HIF-1 α 进行标记, 结果证实HIF-1 α 主要表达于细胞核, 胞质也有表达, 肿瘤坏死明显的区域和肿瘤浸润的边缘HIF-1 α 表达明显增多, 周围正常组织及肿瘤间质无HIF-1 α 的表达。HIF-1 α 是近年来发现的与机体细胞适应低氧关系密切的一种重要的转录因子, 他受细胞内氧分压的精细调节, 对于低氧环境中机体的生存和肿瘤组织的生长

具有重要意义。肿瘤细胞存在对缺血缺氧的自身调节和适应, 其主要机制为: (1)葡萄糖转运; (2)糖酵解; (3)肿瘤新生血管生成。HIF-1 α 在以上环节中起到重要作用。目前已知HIF-1 α 的靶基因包括: (1)葡萄糖转运蛋白1(GLUT-1)编码基因; (2)糖酵解酶编码基因; (3)VEGF编码基因等。HIF-1 α 可能通过诱导上述因子和酶的表达, 增加肿瘤组织的供血、供氧, 改善肿瘤组织的能量代谢, 促进肿瘤生长^[6]。

NO是由NOS催化L-精氨酸生成的, NOS是体内产生NO的限速酶。NO与肿瘤发生、发展关系较为复杂, 具体机制目前还不清楚。Moochhala *et al*^[7]认为NO可在肿瘤早期通过介导DNA损伤参与复杂的肿瘤形成过程, 还可通过刺激肿瘤细胞, 诱导血管生成和调节免疫系统来促进肿瘤的生长、侵袭和转移。Thomsen *et al*^[8]在研究iNOS表达与人乳腺癌、胃癌标本关系时指出, iNOS催化生成的肿瘤微环境中持续低水平的NO(比引起瘤细胞凋亡的浓度低1-2数量级)有利于肿瘤的发展。肿瘤诱导血管形成是其生长的基础, 足够的肿瘤血流是维持供氧和营养, 维持适度pH值所需要的。大量研究显示, NO在促进肿瘤新生血管的形成中也起到重要作用。Jenkins *et al*将iNOS基因转染的人结肠腺癌细胞株移植到裸鼠体内, 与未转染iNOS基因的亲代野生型瘤株进行比较, 前者肿瘤的生长速度较快且出现较多新生血管, 肿瘤的侵袭性也更强, 易侵入邻近组织。NO促进血管形成的机制目前还不清楚, 一般认为NO是通过参与血管内皮细胞生长因子(VEGF)的生血管机制实现对肿瘤血管的调节。本实验结果显示: iNOS在胃癌中亦呈高表达状态, 与正常胃黏膜组织相比, 差异有显著性($P<0.05$), 且其表达与胃癌组织学分型无关($P>0.05$), 而与胃癌浸润深度、淋巴结转移及临床分期有关($P<0.05$)。结果提示, iNOS可能参与了胃黏膜癌变形成的整个过程, 是胃癌发生发展转移中的危险因素之一。

COX-2是炎症过程中一个重要诱导酶, 炎症过程前列腺素的产生主要由他来催化合成, 近几年国外研究表明, COX-2参与了肿瘤的发生。Uefuji *et al*^[9]用RT-PCR的方法检测37例胃腺癌组织中COX-2 mRNA的表达, 结果表明, 有淋巴结转移胃癌患者肿瘤组织中COX-2 mRNA的表达明显高于无淋巴结转移者, 且COX-2高表达与胃癌病灶直径大小正相关。COX-2可通过促进血管内皮细胞的移动和增强血管生成因子的表达, 而促进血管生成, 且COX-2抑制剂可抑制其这种

作用. Tomazawa *et al*^[10]认为由COX-2产生的前列腺素、血栓素是新血管形成所必需, 他们可以诱导VEGF的产生, 增加血管通透性, 增加已形成血管的血流量, 抑制内皮细胞凋亡, 直接或间接促进血管生成. COX-2是Bcl-2的上游调节者^[11], 通过促进Bcl-2的表达而抑制胃癌细胞凋亡, 促进其发生发展. COX-2调节细胞增殖、凋亡相关基因表达的机制可能通过其下游的各种前列腺素和血栓素结合于相应的膜受体和核受体如PPAR等完成的.

我们发现, COX-2在正常胃组织中的阳性表达率显著低于在胃癌中的阳性表达率. COX-2在胃癌中的表达随淋巴转移的产生、浸润深度的增加、临床分期的提高而明显升高. 与文献报道相符, 提示COX-2表达的升高与胃癌的发生发展密切相关.

关于HIF-1 α 与iNOS、COX-2的相互诱导关系目前研究较少, 具体机制不清. 本试验结果证明了HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达成正相关. 研究表明, 氧诱导的羟化酶的作用是调节HIF-1 α 的最主要途径. 体外试验证明, NO是羟化酶的抑制剂, NO供体对HIF-1 α 的羟化途径能产生抑制作用, 原因是NO与氧竞争性结合PHD上的铁激活位点, 抑制了氧与PHD的结合^[12]. Metzen *et al*也报道了在常氧条件下NO可使HIF-1 α 增多, 原因是NO抑制了PHD的活性. 在缺氧条件下, HIF-1 α 可诱导iNOS合成, 产生NO, 从而舒张血管, 增加血流量, 增加组织供氧. 此外, HIF-1 α 和iNOS均可通过刺激VEGF来促进肿瘤新生血管的生成, 两者在这一机制中可能也存在协同效应. 我们的试验初步证明HIF-1 α 与iNOS在胃癌中的发生、发展中可能起到重要作用.

HIF-1 α 和COX-2共同的靶基因为VEGF, 两者可能通过这一下游路径促进肿瘤的生长和血管形成. 有研究表明COX-2可通过其催化产物PGE2激活HIF-1 α 活性, 通过COX-2/PGE2/HIF-1 α /VEGF途径以促进肿瘤血管生成^[13]. Garayoa *et al*^[14]发现, COX-2选择性抑制剂NS398可以减少HIF-1 α mRNA的表达, 并通过COX-2/PGE2途径减少HIF-1 α 的合成, 从而抑制缺氧诱导的血管生成. 可以认为, 两者可能的联系为缺氧诱导HIF-1 α 的表达, HIF-1 α 通过与COX-2启动子中的缺氧反应元件结合, 激活COX-2的转录, 而COX-2可以通过其代谢产物PGE2等反作用于HIF-1 α , 使HIF-1 α 活性增加, 在核内的积聚增加, 翻译转录加速, 从而形成一个正反馈网络, 共同促进肿瘤的血管形成, 维持肿瘤的生长.

目前关于在胃癌中相互关系的研究报道较

少, 我们发现在胃癌中HIF-1 α 与iNOS、COX-2表达均呈正相关, 并且均与肿瘤的TNM分期、浸润深度和淋巴结转移程度有关. 因此, 我们认为在胃癌发生发展的过程中HIF-1 α 可能通过上调iNOS和COX-2的表达促进肿瘤血管生成而促进胃癌的转移. 总之, HIF-1 α 与iNOS、COX-2均在胃癌的发生发展和浸润转移过程中起重要作用, 其作用途径和形式复杂且相互关联, 需要进一步研究其作用机制, 及其对胃癌的预防、诊断、治疗和预后判断的意义.

4 参考文献

- 1 桑海泉, 王强. 胃癌组织中MTA1, PTEN, E-cadherin的表达及其相互关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1096-1102
- 2 刘莹, 朱祖安, 费素娟. COX-2 iNOS及VEGF在胃不典型增生胃癌中的表达及其意义. 中国肿瘤临床 2005; 32: 428-430
- 3 Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8: 86-94
- 4 Sutherland RM. Tumor hypoxia and gene expression--implications for malignant progression and therapy. *Acta Oncol* 1998; 37: 567-574
- 5 Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; 8: S62-S67
- 6 茅文斌, 邵增务. iNOS与HIF-1 α 在骨肉瘤中的表达及其与血管生成的关系. 中国骨肿瘤骨病 2006; 5: 210-213
- 7 Mochhala S, Rajnakova A. Role of nitric oxide in cancer biology. *Free Radic Res* 1999; 31: 671-679
- 8 Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev* 1998; 17: 107-118
- 9 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001; 76: 26-30
- 10 Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83: 324-328
- 11 Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4245-4249
- 12 饶娅敏, 陈同钰. HIF-1 α 、COX-2、VEGF与胶质瘤. 中国肿瘤临床 2006; 14: 145-147
- 13 Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, Yao S, Dosoretz A, Holland JF, Levine AC. Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1 α stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem* 2002; 277: 50081-50086
- 14 Garayoa M, Martínez A, Lee S, Pío R, An WG, Neckers L, Trepel J, Montuenga LM, Ryan H, Johnson R, Gassmann M, Cuttitta F. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 848-862

■同行评价

该文章就HIF-1 α 与iNOS、COX-2在胃癌中的表达及意义进行研究, 具有一定的学术价值, 为进一步研究提供一定的实践经验.

应用蛋白质组学技术对脂肪肝患者血清标志物的筛选

颜怀军, 陈兆军, 曾强, 陈春, 张腊红, 李宁, 许洋

■背景资料

脂肪肝是指各种原因引起的肝细胞脂肪堆积, 是一个常见的临床现象。脂肪肝的诊断主要依靠病史、临床表现和实验室检查; 特别是B超和CT, 但确切的诊断还是有赖于有创伤性的肝活检。蛋白指纹图谱技术是近年来的热点技术, 已经在临床疾病的研究中得到广泛的应用并展示出较好的应用前景。其检查的无创性和相对更高的敏感性和特异性, 不失为诊断脂肪肝的另一种辅助方法。

颜怀军, 李宁, 中国人民解放军南京军区杭州疗养院空勤区浙江省杭州市 310013

陈兆军, 张腊红, 杭州市第二人民医院 浙江省杭州市 310022
曾强, 中国人民解放军总医院健康体检中心 北京市 100853

陈春, 天津医科大学总医院 天津市 300052

许洋, 中国医学科学院检验医学研发中心 北京市 100730

国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目, No. 2006AA02Z437

作者贡献分布: 颜怀军与陈兆军对此论文做贡献均等; 此课题设计由颜怀军, 陈兆军及许洋完成; 质谱仪检测由李宁与陈春操作完成; 数据分析由张腊红与李宁完成; 本论文写作由颜怀军, 陈春, 曾强及许洋完成。

通讯作者: 许洋, 100730, 北京市, 中国医学科学院检验医学研发中心, yxu1617@126.com

电话: 010-67016717 传真: 010-67016735

收稿日期: 2008-08-20 修回日期: 2008-10-26

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-08

Screening serum biomarkers of fatty liver disease using proteomic technology

Huai-Jun Yan, Zhao-Jun Chen, Qiang Zeng, Chun Chen, La-Hong Zhang, Ning Li, Yang Xu

Huai-Jun Yan, Ning Li, the Hangzhou Sanatorium of Chinese PLA Nanjing District, Hangzhou 310013, Zhejiang Province, China

Zhao-Jun Chen, La-Hong Zhang, the Second People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China

Qiang Zeng, Physical Examination Center, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100835, China

Chun Chen, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Yang Xu, Center for Clinical Laboratory Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Supported by: the National High-tech Research & Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02Z437

Correspondence to: Dr. Yang Xu, Director of Clinical Proteomics, Center for Clinical Laboratory Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China. yxu1617@126.com

Received: 2008-08-20 Revised: 2008-10-26

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To analyze the serum proteomic pattern of the fatty liver disease (FLD) patients, to build a diagnostic model and to evaluate its clinic significance using magnetic bead and MALDI-TOF-MS.

METHODS: WCX magnetic bead and MALDI-TOF-MS were used to detect the serum proteomic patterns of 95 modest FLD patients, 76

mild FLD patients and 99 healthy persons (HP). Biomarker Wizard software was used to analyze protein peaks for significant difference. The model was then built by Biomarker Patterns Software and was further evaluated in blind test for reliability.

RESULTS: A diagnostic pattern for modest FLD from HP using m/z 7626.2, 24147.7, 6118.2 was established with 90.2% sensitivity and 93.9% specificity. A sensitivity of 90.9% and a specificity of 92.0% in blind test were obtained. One diagnostic pattern using m/z 7626.2, 3286.0, 2760.7, 2543.1, 2746.1 was established to differentiate mild from modest FLD; the other diagnostic pattern using m/z 7626.2, 11721.0, 24141.7, 8529.1, 9042.7 was established to differentiate mild FLD from HP.

CONCLUSION: Proteomic technology can significantly identify novel significant biomarkers in the serum. The diagnostic pattern consisting of three differential protein peaks can discriminate the modest FLD from HP. The diagnostic pattern consisting of five specific differential protein peaks can differentiate mild from modest FLD as well as mild FLD from HP.

Key Words: Fatty liver disease; MALDI-TOF-MS; Magnetic beads

Yan HJ, Chen ZJ, Zeng Q, Chen C, Zhang LH, Li N, Xu Y. Screening serum biomarkers of fatty liver disease using proteomic technology. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3904-3909

摘要

目的: 用纳米磁珠与基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术检测脂肪肝患者血清蛋白质组, 筛选候选标志物并建立诊断模型, 初步探讨所建立的诊断模型在脂肪肝早期诊断中的临床意义。

方法: 95例中度和76例轻度脂肪肝患者均经B超证实, 99名健康人血清。用WCX(弱阳离子交换型)纳米磁珠检测各血清标本获得血清蛋白指纹图谱。用Biomarker Wizard软件

■同行评议者

刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科; 曹志成, 院士, 香港伊利莎伯医院临床肿瘤科、肿瘤研究部

分析所获得的蛋白图谱找出差异蛋白, 再用 Biomarker Patterns 建立诊断模型. 扩大样本量, 通过盲法分析进一步验证诊断模型的可靠性.

结果: 初始建模时, 建立了由 m/z 为 7626.2、24147.7、6118.2 这3个差异蛋白峰组成的中度脂肪肝诊断模型, 其敏感性为 90.2%, 特异性为 93.9%. 扩大样本盲法验证的敏感性为 90.9%, 特异性为 92.0%. 另选取了 m/z 为 7626.2、3286.0、2760.7、2543.1、2746.1 这5个差异蛋白峰组成的模型, 能把轻度从中度脂肪肝患者中区分出来; 选取 m/z 为 7626.2、11721.0、24141.7、8529.1、9042.7 这5个差异蛋白峰组成的模型, 能将轻度脂肪肝患者从健康对照中区分出来.

结论: 蛋白质组学技术可筛选出有意义的血清生物标志差异蛋白. 由三个差异表达蛋白及其特定组合构成的诊断模型可以区分中度脂肪肝患者与健康人, 由五个特定组合构成的差异表达蛋白的模型能区分轻度、中度脂肪肝患者及区分轻度脂肪肝患者与健康对照.

关键词: 脂肪肝; 基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱; 纳米磁珠

颜怀军, 陈兆军, 曾强, 陈春, 张腊红, 李宁, 许洋. 应用蛋白质组学技术对脂肪肝患者血清标志物的筛选. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3904-3909
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3904.asp>

0 引言

脂肪性肝病(fatty liver disease, FLD), 简称脂肪肝, 是遗传-环境-代谢应激相关性疾病, 疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎以及脂肪性肝硬化, 而根据病因则分为酒精性肝病(alcoholic liver disease)和非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease)两大类. 随着饮食结构的改变, 我国脂肪肝的发病率呈逐年升高趋势. 脂肪肝是最常见的弥漫性肝病, 常缺乏特异的临床表现, 其发病机制至今不明, 极少数可发展成肝硬化. 如果早期诊断、早期治疗, 可以阻止脂肪肝的进一步发展, 甚至使其逆转. 脂肪肝是指由于各种原因引起的肝细胞内脂肪堆积过多的病变. 正常肝内脂肪占肝质量的3%-4%, 如果脂肪含量超过肝质量的5%即为脂肪肝, 严重者脂肪量可达40%-50%, 脂肪肝的脂类主要是甘油三酯. 传统的血液生化检查, 影像学检查, 肝活检等方法可以对大部分的脂肪肝做出诊断, 但是都各有其局限性. 血生化检查

对脂肪肝的诊断没有特异性. 影像学检查中的B超作为脂肪肝的首选诊断方法, 但是因脂肪变肝细胞达30%时B超才可发现脂肪肝, 其灵敏度和特异性亦有待提高; 超声引导下肝穿刺活检组织细胞学检查可以确诊脂肪肝, 但是因肝活检有创伤性, 患者难以接受, 应用范围也受限. 脂肪肝的早期诊断目前仍旧没有发现理想的标志物^[1-4].

本研究应用纳米磁珠结合基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术, 分析脂肪肝患者与正常健康对照的血清在蛋白质组上的差异. 建立了由7626.2, 24147.7, 6118.2质荷比(蛋白质质量和电荷比值, 简称质荷比, m/z)等3个差异蛋白峰组成的脂肪肝诊断模型, 初步探讨蛋白指纹图谱技术在脂肪肝早期诊断中的应用价值. 此诊断模型的敏感性为 90.2%, 特异性为 93.9%. 扩大样本盲法验证的敏感性为 90.9%, 特异性为 92.0%; 且可以区分轻、中度脂肪肝患者及区分轻度患者与健康对照. 此诊断模型可以作为另一种辅助脂肪肝诊断的好方法.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究共纳入2006-08/2008-05在中国人民解放军南京军区杭州疗养院空勤区和杭州市第二人民医院的体检者并接受腹部超声检查患者的血清样本共计270例. 本研究设计通过我院临床研究伦理委员会的批准, 符合伦理学标准要求. 所有受试对象均为在入选前由专业人员详细告知研究详细内容后自愿加入本研究, 并签署知情同意书. 乙腈、三氟乙酸、SPA、尿素、DTT、CHAPS、Tris-HCL、 dH_2O 等购自Sigma公司. MALDI-TOF-MS(PBS II c)为Ciphergen公司产品. 弱阳离子交换型(WCX)纳米磁珠, 结合缓冲液, 洗脱液等为北京赛尔迪生物医药科技有限公司产品^[5].

1.2 方法

1.2.1 样品收集与预处理: 质谱的标准化质控血清制备定义符合如下标准, 供血者男女各半, 血型为O型; 年龄为18-30岁^[5]. 患者外周血采集后立即放入4℃冰箱静置. 1-2 h内, 4℃ 4000 r/min离心5 min, 分离血清后, 4℃ 14 000 r/min再离心5 min, 去除所有残留细胞碎片. 在冰上将血清转移到新的离心管中, 放入-80℃冰箱分装保存, 限冻融一次. 使用前取出血清样品, 冰上融化. 在标记好的1.5 mL离心管中依次加入20 μ L 9 mol/L 缓冲液(9 mol/L Urea, 2% CHAPS, 50 mmol/L

■ 研发前沿

蛋白指纹图谱技术出现的同时也提出一种全新的多标志物谱或个性化标志物的诊断模式. 采用该技术筛选脂肪肝患者血清中的特异性标志物, 可以发现一些传统方法不能发现的小分子物质, 对这些小分子物质的鉴定有助于脂肪肝的诊断和对发病机制的探讨. 但目前鉴定低丰度小分子难度较大.

■创新盘点

血清蛋白指纹图谱的检测一般采用SELDI技术。本文采用纳米磁性微球技术捕获血清蛋白,再采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪进行蛋白指纹图谱检测,首次为读者提供了新的实验依据。

Tris-HCl, 1% DTT, pH9.0), 和10 μ L血清样品, 并将样品混匀。稀释好的样品室温静置10 min, 然后再加入360 μ L结合缓冲液混匀^[5]。

1.2.2 纳米磁珠预处理、上样和洗脱: 将WCX纳米磁珠分装到PCR管, 置于磁性处理器上, 吸取液体。再依次加入100 μ L结合缓冲液, 混匀后放置5 min, 然后把PCR管置于磁性处理器上, 吸取液体, 重复上述操作一次。向每个装有纳米磁珠的PCR管中加入100 μ L稀释好的血清样品, 混匀后室温放置15 min。将PCR管置于磁性处理器上, 吸去未结合样品。每管加入100 μ L结合缓冲液, 混匀后放置5 min, 然后把PCR管置于磁性处理器上, 吸取液体, 重复上述操作一次。然后, 每管加入10 μ L洗脱液混匀, 放置5 min后置于磁性处理器上。取5 μ L上清液移到另一个PCR管中, 加入5 μ L SPA(Sinapinic acid)饱和溶液充分混匀, 吸取1 μ L点样到Au芯片上, 待干后放入仪器读取^[5]。

1.2.3 芯片检测、数据采集和参数设置: 采用PBS II c质谱仪读取芯片信息, 用加有All-in-one标准蛋白质的NP20芯片校正仪器, 使分子质量的误差范围至0.1%内。用血清中的内标峰4091.1或6634.0 m/z校正原始数据中的蛋白指纹图谱, 使分子量误差<0.01%, 从而获得的精确的蛋白指纹图谱。将标准化质控血清中用于定量的标准峰, m/z为4091.1或6634.0, 强度调至40%-50%信号强度的最大值时, 芯片阅读仪参数设置如下: 激光强度175, 检测灵敏度8, 优化范围为m/z为1000-15 000, 最高50 000, 芯片上的每个点采集90次。用CIPHERGEN ProteinChip 3.2.1软件收集数据。

1.2.4 数据处理: 首先随机挑取51份中度脂肪肝患者血清和49份年龄匹配的对照血清用于建立脂肪肝诊断模型。建模的主要过程包括: (1) 图谱标准化。用血清中m/z为6634.0峰进行了校正, 而后又进行了“减少基线”, 以减少不同芯片、仪器状态波动等因素引起的试验误差。(2) 用Biomarker Wizard 3.1软件快速计算相同m/z的蛋白在脂肪肝组与对照组间峰值差异的P值。选择信/噪比(S/N)>5和在所有图谱中出现频率>90%的峰作为有效蛋白峰。为避免遗漏小的蛋白峰, 将S/N>2和分子质量偏差<0.1%的峰也标记为有效蛋白峰。然后, 根据方差分析的原理计算总图谱内脂肪肝组与对照组相同m/z蛋白表达差异的P值(以Excel表输出差异蛋白的分子量和相对强度)。(3) 诊断模型的建立和验证。用Biomarker Patterns Software 5.0分析软件对脂肪肝组与对照组间相同m/z的差异表达蛋白峰

值做线性分类分析, 经过进一步优化试验参数(包括Gini、Testing、Advance、Costs等), 确定最佳分类模型, 即诊断模型。然后, 扩大样本量, 用此诊断模型盲法分析另外44份脂肪肝中度患者, 26份脂肪肝轻度患者和50名健康人血清中的质谱数据, 并根据盲法分析结果的敏感性和特异性。

1.2.5 B超: 所用仪器为日本Aloka SD256型超声诊断仪, 探头频率3.5 MHz。常规扫查肝、胆、脾、肾。脂肪肝的患者均按照“中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学会”在2006年制定的诊断标准进行诊断^[1]。B超诊断脂肪肝依据为^[1]: (1) 肝脏弥漫性肿大, 形态饱满, 表面光滑, 肝边缘膨胀圆钝。(2) 肝实质回声增强, 明显高于脾脏及肾皮质回声, 呈云雾状, 肝脏深部回声减弱。轻度脂肪肝表现为肝脏后半部光点回声稍减弱, 深面肝包膜回声仍可显示。中度脂肪肝表现为肝深层1/3部分光点回声明显减低, 肝包膜回声不能显示, 提高增益可以显示。(3) 肝细胞脂肪变性: 脂肪变以大泡为主, 偶见脂肪性肉芽肿。轻度: 脂肪变肝细胞达30%-50%者; 中度: 脂肪变肝细胞达50%-75%者。(4) 肝内血管不清晰, 彩色多普勒血流显像肝内血管彩色血流不易显示。轻度病变, 可显示门静脉主干及一级分支中血流, 肝静脉间断显示; 中度病变, 仅模糊隐显门静脉主干内彩色血流, 肝静脉中无彩色显示。(5) 正常管道结构回声改变: 轻度, 肝内管道结构回声多无明显改变。排除标准: 各种类型的肝炎, 如病毒性肝炎(乙肝、丙肝等); 各重要脏器的器质性病变; Wilson病、全胃肠外营养; 自身免疫性疾病、糖尿病; 妊娠或哺乳期妇女。

统计学处理 采用CIPHERGEN ProteinChip软件和Biomarker Wizard软件对质谱检测得到的蛋白指纹图谱进行统计学处理。脂肪肝组与对照组、轻度与中度脂肪肝组之间蛋白质峰的比较采用Mann-Whitney U检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。在此基础上采用Biomarker Patterns软件识别诊断脂肪肝的最佳标志物, 并建立脂肪肝诊断模型。

2 结果

2.1 建模组数据分析 270例血清样本中, 有95例中度脂肪肝病例, 其中61例三酰甘油(TG)偏高, 34例TG正常; 76例轻度脂肪肝病例中, 43例TG偏高, 33例TG正常; 另有99例健康对照。脂肪肝及健康对照的血清样本随后被分成两组: 训练

表 1 49例脂肪肝与51例年龄匹配的健康人群的差异峰结果 (mean \pm SD)

m/z	脂肪肝组	健康对照组	P
7626.2	0.69 \pm 0.24	7.12 \pm 3.75	1.8E-08
2543.1	1.73 \pm 1.96	5.77 \pm 3.39	4.95E-05
2746.1	15.61 \pm 7.45	9.20 \pm 4.64	8.86E-05
2760.7	1.16 \pm 1.19	3.79 \pm 2.22	0.00035
24 141.7	0.69 \pm 0.30	1.02 \pm 0.54	0.00088
6118.2	6.48 \pm 3.64	4.25 \pm 2.70	0.00090

表 2 中度与轻度脂肪肝患者差异峰结果 (mean \pm SD)

m/z	中度脂肪肝	轻度脂肪肝	P
7626.2	0.69 \pm 0.24	5.09 \pm 2.03	1.19E-06
3286.0	0.54 \pm 1.08	2.13 \pm 2.34	0.000192
2760.7	1.16 \pm 1.19	4.22 \pm 2.02	0.000258
2543.1	1.73 \pm 1.96	5.63 \pm 3.43	0.000718
2746.1	15.61 \pm 7.45	10.35 \pm 5.40	0.000917

组, 健康人49例, 脂肪肝-轻、中度分别为50、51例; 另一组为盲测组, 健康人50例, 脂肪肝-轻、中度分别为26、44例。

51份中度脂肪肝患者和49份正常对照血清的原始指纹图谱标准化后, 用Biomarker Wizard软件分析, 在m/z为2000-50 000范围内共检测到163个蛋白峰, 其中6个在脂肪肝组与对照组的差异有极显著意义($P < 0.001$, 表1)。对这些血清差异表达蛋白质用Biomarker Patterns软件做进一步分析, 建立由7626.2、24 147.7、6118.2 m/z等3个差异蛋白峰组成的诊断模型(建模组, 图1)。用此分类法分析51份脂肪肝样本, 其中46份区分正确, 5份区分错误, 敏感性为90.2%; 分析49份正常健康对照样本, 46份区分正确, 3份区分错误, 特异性为93.9%。根据差异蛋白及其特定组合, 可以区分脂肪肝和健康人。

2.2 诊断模型的盲法验证结果 进一步扩大样本量, 用由7626.2、24 147.7、6118.2 m/z 3个差异蛋白峰组成的诊断模型盲法分析44份中度脂肪肝和50份正常健康对照样本的蛋白指纹图谱。44份中度脂肪肝患者样本中40份划分正确, 4份划分错误, 敏感性为90.9%; 50份正常健康对照样本, 46份划分正确, 4份划分错误, 特异性为92.0%。盲法验证的ROC曲线值为0.951(图2), 进一步的分析验证了所建立模型的准确性。

2.3 脂肪肝中度与轻度患者蛋白指纹图谱比较 51份中度脂肪肝与50份轻度脂肪肝蛋白指纹图谱标准化后, 用Biomarker Wizard软件分析, 在

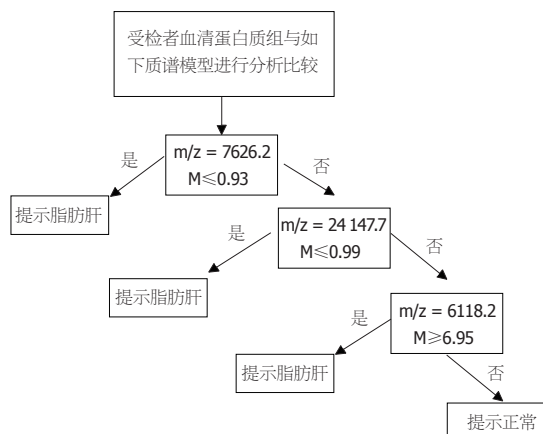


图 1 7626.2、24 147.7和6118.2 m/z 3个差异峰组成的诊断模型。当m/z 7626.2, $M \leq 0.93$ 、m/z 24 147.7, $M \leq 0.99$ 或m/z 6118.2, $M \geq 6.95$ 时为脂肪肝患者, 否则为健康人。M: 质谱峰相对强度。

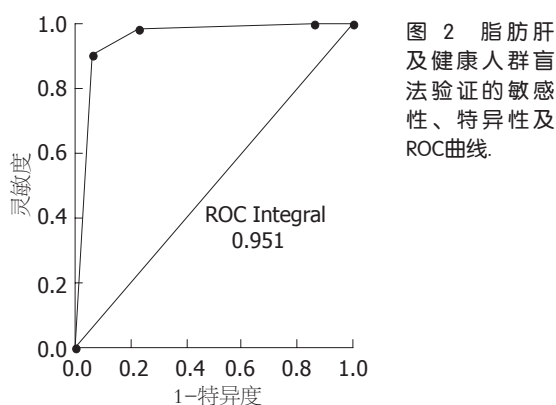


图 2 脂肪肝及健康人群盲法验证的敏感性、特异性及ROC曲线。

m/z为2000-50 000范围内共检测到163个蛋白峰, 其中5个蛋白峰的差异有显著意义($P < 0.001$)。选取了m/z为7626.2、3286.0、2760.7、2543.1、2746.1这5个差异蛋白峰组成的模型, 能把轻度从中度脂肪肝患者中区分出来(表2)。

2.4 轻度脂肪肝患者与正常健康对照图谱比较 50份轻度脂肪肝与49份正常健康对照蛋白指纹图谱标准化后, 用Biomarker Wizard软件分析, 在m/z为2000-50 000范围内共检测到162个蛋白峰, 其中5个蛋白峰在轻度脂肪肝与正常健康对照组的差异有显著意义($P < 0.05$)。选取m/z为7626.2、11 721.0、24 141.7、8529.1、9042.7等5个差异蛋白峰组成的模型, 能将轻度脂肪肝患者从健康对照中区分出来(表3)。

3 讨论

脂肪肝不是一种独立的疾病, 是由诸多原因造成的后果。长期酗酒, 营养过剩, 营养不良, 糖尿病、肝炎、甲亢、重度贫血等慢性疾病, 药物性肝损害等等都是导致脂肪肝的原因。而提高其疾病发生发展逆转率的关键在于提高早期诊断率。

■应用要点

由于蛋白指纹图谱仪(PBS II c)已获国家食品药品监督管理局(SFDA)批准进入国内医院进行蛋白指纹图谱的检测, 故差异蛋白峰(蛋白指纹)可作为脂肪肝辅助诊断的一种新方法。

■名词解释

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS): 是利用激光脉冲辐射使芯池中的分析物解析形成荷电离子, 根据不同 m/z , 这些离子在仪器场中飞行的时间长短不一, 由此绘制出一张质谱图案。

表 3 轻度脂肪肝与正常健康对照组差异峰结果 (mean \pm SD)

m/z	轻度脂肪肝	正常健康对照	P
7626.2	5.09 \pm 2.03	7.12 \pm 3.75	0.001
11 721.0	1.07 \pm 0.59	1.29 \pm 0.46	0.010
24 141.7	0.80 \pm 0.42	1.02 \pm 0.54	0.020
8529.1	0.65 \pm 0.96	1.22 \pm 1.72	0.020
9042.7	0.42 \pm 0.82	0.61 \pm 0.69	0.030

目前临床诊断主要依靠病史, 临床表现, 血液学检测, 影像学诊断等. 在影像学诊断中, B超现已作为脂肪肝的首选诊断方法, 并广泛用于人群脂肪肝发病率的流行病学调查. 近来国外报道B超诊断脂肪肝的阳性预测值为67%. 超声引导下肝穿刺活检组织细胞学检查是确诊脂肪肝, 特别是局灶性脂肪肝的主要方法, 在形态学检查时作必要的特殊染色、免疫组化、组织生化测定及特殊细胞学检查等, 可提高诊断的目的性. 但是因肝活检有创伤性, 患者难以接受.

近年来, 国内外在血清蛋白组方面的研究日益受到关注, 继SELDI-TOF-MS技术后又发展了纳米磁珠结合MALDI-TOF-MS技术^[6-15]. 这一技术的出现为筛选高敏感性和特异性的肿瘤及其他疾病的诊断标志物提供了又一个崭新的研究思路和技术平台, 他比SELDI-TOF-MS更灵敏, 因为球形磁珠比芯片表面具有更多的表面积, 另外也方便后续对未知峰的鉴定. 因此近年来被广泛用于各种疾病和肿瘤标志物的筛选和鉴定^[16-22]. 在乳腺癌, 大肠癌, 口腔癌等肿瘤标志物的研究中, 利用该技术建立的诊断模型均具有较高的敏感性和特异性^[23-25]. 在脂肪肝的蛋白质组学方面的研究中, Younossi *et al*就于2005年应用SELDI-TOF-MS等实验手段, 对98例肥胖的外科患者进行基因组/蛋白质组分析, 结果显示, 在非酒精性脂肪肝的不同类型中, 有好几个基因差异表达和差异蛋白峰, 但该研究没有建立血清质控标准及脂肪肝诊断模型^[26].

在进行血清蛋白质质谱分析时发现血液样本离体后如不及时分离血清, 对实验的稳定性影响很大. 及时分离血清、血清样本的保存和质量稳定性问题对研究及送检显得尤其重要^[5]. 由于既往的样本不完全符合质谱血清学分析的标准, 故对实验分析带来了困惑; 并且大量收集新鲜的血清样本有困难, 研究人员不得不采用反复冻溶几次的样本, 这会影响实验诊断和医学研究的重复性^[5]. 本实验在4℃下处理血液标

本, 2 h内尽快分离血清及细胞, 血清分装、储存在-80℃, 限冻溶1次. 本实验的血清蛋白质质谱分析的重复性(即同一标本同时在WCX磁珠上做8点重复试验, 所有峰值的CV值<10%)与以前我们的报道一致^[5].

本研究应用纳米磁珠结合MALDI-TOF-MS技术分析脂肪肝患者与正常人血清在蛋白质水平上的差异, 建立了由7626.2、24 147.7、6118.2 m/z 3个差异蛋白峰组成的脂肪肝模型, 其敏感性为90.2%, 特异性为93.9%. 扩大样本盲法验证的敏感性为90.9%, 特异性为92.0%. 这是国内外首次报道用WCX纳米磁珠与MALDI-TOF-MS技术检测脂肪肝的结果. 由于蛋白指纹图谱仪(PBS II c)已经国家食品药品监督管理局(SFDA)批准进入国内医院进行蛋白指纹图谱的检测^[5], 故差异蛋白峰(蛋白指纹)将来可作为脂肪肝辅助诊断的一种新方法. 本研究进一步选取了 m/z 为7626.2、3286.0、2760.7、2543.1、2746.1这5个差异蛋白峰组成的模型, 能将轻度脂肪肝从中度脂肪肝患者中区分出来; 选取了 m/z 为7626.2、11 721.0、24 141.7、8529.1、9042.7这5个差异蛋白峰组成的模型, 能将轻度脂肪肝患者从健康对照中区分出来. 该模型能区分轻度、中度脂肪肝患者及区分轻度脂肪肝患者与健康对照, 其检查的无创性及其较之B超检查相对更高的敏感性和特异性, 具有脂肪肝早期诊断的临床意义, 不失为诊断脂肪肝的另一种新的辅助方法, 并且有助于阐明脂肪肝的发病机制和进一步鉴定出干预性治疗的潜在靶点.

因此, WCX纳米磁珠结合质谱技术筛选出的生物标志物可用于脂肪肝的早期诊断及随访检测, 对其在脂肪肝生物标志物的蛋白鉴定和治疗监测相关方面的意义有待进一步研究^[27-32].

4 参考文献

- 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
- 曾民德. 脂肪肝-肝病领域的新挑战. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 69
- Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 185-192
- Tarantino G. Should nonalcoholic fatty liver disease be regarded as a hepatic illness only? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4669-4672
- 刘建栋, 李永哲, 李宁, 郇卫星, 许洋. 血液蛋白质组与质谱仪检测流程标准化初探. 基础医学与临床 2007; 27: 193-197
- Grizzle WE, Semmes OJ, Basler J, Izbicka E, Feng Z, Kagan J, Adam BL, Troyer D, Srivastava S,

- Thornquist M, Zhang Z, Thompson IM. The early detection research network surface-enhanced laser desorption and ionization prostate cancer detection study: A study in biomarker validation in genitourinary oncology. *Urol Oncol* 2004; 22: 337-343
- 7 Zhu XD, Zhang WH, Li CL, Xu Y, Liang WJ, Tien P. New serum biomarkers for detection of HBV-induced liver cirrhosis using SELDI protein chip technology. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2327-2329
- 8 Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, Thar TT, Barget N, Wei W, Billingham LJ, Martin A, Beaugrand M, Johnson PJ. Changes in the serum proteome associated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *Br J Cancer* 2006; 94: 287-292
- 9 Mathelin C, Cromer A, Wendling C, Tomasetto C, Rio MC. Serum biomarkers for detection of breast cancers: A prospective study. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 96: 83-90
- 10 Kang X, Xu Y, Wu X, Liang Y, Wang C, Guo J, Wang Y, Chen M, Wu D, Wang Y, Bi S, Qiu Y, Lu P, Cheng J, Xiao B, Hu L, Gao X, Liu J, Wang Y, Song Y, Zhang L, Suo F, Chen T, Huang Z, Zhao Y, Lu H, Pan C, Tang H. Proteomic fingerprints for potential application to early diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem* 2005; 51: 56-64
- 11 Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, Rosenzweig JM, Cameron B, Wang YY, Meng XY, Berchuck A, Van Haaften-Day C, Hacker NF, de Bruijn HW, van der Zee AG, Jacobs IJ, Fung ET, Chan DW. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5882-5890
- 12 Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 24-30
- 13 Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer* 2007; 6: 25
- 14 Cho WC, Cheng CH. Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 401-410
- 15 许洋. 蛋白质指纹图谱技术在实验诊断与临床医学中的研究进展. *基础医学与临床* 2007; 27: 134-142
- 16 Villanueva J, Philip J, Entenberg D, Chaparro CA, Tanwar MK, Holland EC, Tempst P. Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* 2004; 76: 1560-1570
- 17 Villanueva J, Philip J, DeNoyer L, Tempst P. Data analysis of assorted serum peptidome profiles. *Nat Protoc* 2007; 2: 588-602
- 18 Mengel-Jorgensen J, Sanchez JJ, Borsting C, Kirpekar F, Morling N. MALDI-TOF mass spectrometric detection of multiplex single base extended primers. A study of 17 y-chromosome single-nucleotide polymorphisms. *Anal Chem* 2004; 76: 6039-6045
- 19 Lopez MF, Mikulskis A, Kuzdzal S, Bennett DA, Kelly J, Golenko E, DiCesare J, Denoyer E, Patton WF, Ediger R, Sapp L, Ziegert T, Lynch C, Kramer S, Whiteley GR, Wall MR, Mannion DP, Della Cioppa G, Rakitan JS, Wolfe GM. High-resolution serum proteomic profiling of Alzheimer disease samples reveals disease-specific, carrier-protein-bound mass signatures. *Clin Chem* 2005; 51: 1946-1954
- 20 Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem* 2006; 52: 1223-1237
- 21 Baumann S, Ceglarek U, Fiedler GM, Lembcke J, Leichtle A, Thiery J. Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem* 2005; 51: 973-980
- 22 Gold B, Deng H, Bryk R, Vargas D, Eliezer D, Roberts J, Jiang X, Nathan C. Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria. *Nat Chem Biol* 2008; 4: 609-616
- 23 de Noo ME, Deelder A, van der Werff M, Ozalp A, Mertens B, Tollenaar R. MALDI-TOF serum protein profiling for the detection of breast cancer. *Onkologie* 2006; 29: 501-506
- 24 屠世良, 颜怀军, 郇卫星, 李永哲, 陈盈, 李宁, 许洋. 癌胚抗原阴性的结直肠癌检测和结直肠癌预后相关生物标记. *基础医学与临床* 2007; 27: 926-931
- 25 Cheng AJ, Chen LC, Chien KY, Chen YJ, Chang JT, Wang HM, Liao CT, Chen IH. Oral cancer plasma tumor marker identified with bead-based affinity-fractionated proteomic technology. *Clin Chem* 2005; 51: 2236-2244
- 26 Younossi ZM, Baranova A, Ziegler K, Del Gaudio L, Schlauch K, Born TL, Elariny H, Gorreta F, VanMeter A, Younoszai A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 665-674
- 27 Nedelkov D, Kiernan UA, Niederkofer EE, Tubbs KA, Nelson RW. Investigating diversity in human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10852-10857
- 28 Zhu Y, Valdes R Jr, Jortani SA. Application of bioaffinity mass spectrometry for analysis of ligands. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 694-699
- 29 Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 845-867
- 30 Woong-Shick A, Sung-Pil P, Su-Mi B, Joon-Mo L, Sung-Eun N, Gye-Hyun N, Young-Lae C, Ho-Sun C, Heung-Jae J, Chong-Kook K, Young-Wan K, Byoung-Don H, Hyun-Sun J. Identification of hemoglobin-alpha and -beta subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Sci* 2005; 96: 197-201
- 31 Villanueva J, Shaffer DR, Philip J, Chaparro CA, Erdjument-Bromage H, Olshen AB, Fleisher M, Lilja H, Brogi E, Boyd J, Sanchez-Carbayo M, Holland EC, Cordon-Cardo C, Scher HI, Tempst P. Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 2006; 116: 271-284
- 32 Liotta LA, Petricoin EF. Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *J Clin Invest* 2006; 116: 26-30

■同行评价

本文应用蛋白质组学技术筛选脂肪肝患者血清标志物, 研究结果对临床工作具有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 郭海丽

非酒精性脂肪性肝病患者血清TNF- α 、TGF- β 1及hs-CRP的检测及意义

朱庆曦, 邓长生

■背景资料

炎症因子在NAFLD发病中起着重要的作用。已有研究表明, NAFLD患者血清中hs-CRP、TNF- α 、TGF- β 1水平明显升高, 但在NAFLD病程发展中的意义少见报道。

朱庆曦, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市430071

作者贡献分布: 此课题由朱庆曦与邓长生设计; 研究过程由朱庆曦操作完成; 研究所用试剂及分析工具由朱庆曦提供; 数据分析及论文写作由朱庆曦完成; 邓长生审核。

通讯作者: 邓长生, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科。dengcs06@yahoo.com.cn

电话: 027-67813079

收稿日期: 2008-09-19 修回日期: 2008-10-22

接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-08

Detection of TNF- α , TGF- β 1 and hs-CRP and its clinical significance in non-alcoholic fatty liver disease

Qing-Xi Zhu, Chang-Sheng Deng

Qing-Xi Zhu, Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. dengcs06@yahoo.com.cn

Received: 2008-09-19 Revised: 2008-10-22

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To examine expression and clinical significance of serum TNF- α , TGF- β 1 and hs-CRP in non-alcoholic fatty liver disease.

METHODS: A total of 51 cases with simple steatosis, 48 cases with non-alcoholic steatohepatitis and 32 controls were enrolled from department of gastroenterology in the third hospital of Wuhan. Serum level of hs-CRP was determined and serum TNF- α and TGF- β 1 levels were detected using ELISA method.

RESULTS: Results showed that TNF- α , TGF- β 1 and hs-CRP were independent risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. The levels of serum hs-CRP and TNF- α were significantly higher in non-alcoholic steatohepatitis patients than in simple steatosis patients (3.92 ± 1.41 vs 2.01 ± 0.39 , 8.13 ± 4.21 vs 3.97 ± 0.94 , both $P < 0.05$).

However, no significant difference was observed in serum level of TGF- β 1 between simple steatosis and non-alcoholic steatohepatitis groups.

CONCLUSION: TNF- α and hs-CRP could be used to differentiate patients with non-alcoholic steatohepatitis from simple steatosis.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Tumor necrosis factor- α ; Transforming growth factor- β 1; High-sensitivity C-reactive protein

Zhu QX, Deng CS. Detection of TNF- α , TGF- β 1 and hs-CRP and its clinical significance in non-alcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3910-3912

摘要

目的: 探讨TNF- α 、TGF- β 1、hs-CRP在非酒精性脂肪性肝病患者中的表达及临床意义。

方法: 选择武汉市第三医院消化内科单纯性脂肪肝51例, 非酒精性脂肪性肝炎48例及健康对照者32例, 测定血清hs-CRP水平, 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定血清中TNF- α 、TGF- β 1水平。

结果: TNF- α 、TGF- β 1及hs-CRP是非酒精性脂肪性肝病的独立危险因素。脂肪性肝炎血清hs-CRP、TNF- α 水平显著高于单纯性脂肪肝(3.92 ± 1.41 vs 2.01 ± 0.39 , 8.13 ± 4.21 vs 3.97 ± 0.94 , 均 $P < 0.05$); 而脂肪性肝炎和单纯性脂肪肝两组TGF- β 1水平差异无显著性。

结论: TNF- α 和hs-CRP可作为判断非酒精性脂肪性肝病病程发展的指标。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 肿瘤坏死因子- α ; 转化生长因子- β 1; 超敏C反应蛋白

朱庆曦, 邓长生. 非酒精性脂肪性肝病患者血清TNF- α 、TGF- β 1及hs-CRP的检测及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3910-3912

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3910.asp>

■同行评议者

陈国凤, 主任医师, 中国人民解放军第302医院感染七科; 宣世英, 教授, 山东省青岛市市立医院肝病内科

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的肝病。其临床分型包括单纯性脂肪肝,非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)和肝硬化。近年来研究表明,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)及超敏C反应蛋白(high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)等炎症因子,在NAFLD发病中起着很重要的作用。本研究通过检测NAFLD患者血清TNF- α 、TGF- β 1及hs-CRP水平,探讨其在单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎的表达差异及临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选用武汉市第三医院消化内科2006-05/2008-05门诊及病房患者。非酒精性脂肪性肝病患者共99例,其中单纯性脂肪肝51例,男28例,女23例,年龄28-57岁;脂肪性肝炎48例,男26例,女22例,年龄27-54岁。健康对照者32例,男18例,女14例,年龄25-50岁。根据2006年中华医学会肝脏病学分会非酒精性脂肪肝诊疗指南^[1],确定纳入标准:(1)无饮酒史或饮酒折合乙醇量男<140 g/wk,女<70 g/wk;(2)除外病毒性肝炎、药物性肝病、全胃肠外营养、肝豆状核变性等可导致脂肪肝的特定疾病;(3)除原发病临床表现外,可有乏力、消化不良、肝区隐痛、肝脾肿大等非特异性症状及体征;此外,非酒精性单纯性脂肪肝还必须满足:(1)肝生物化学检查基本正常;(2)影像学表现符合脂肪肝诊断标准。非酒精性脂肪性肝炎还必须满足:(1)存在代谢综合征或不明原因性血清ALT水平升高持续4 wk以上;(2)影像学表现符合弥漫性脂肪肝诊断标准。

1.2 方法 所有研究对象均录入身高、体质量等一般资料,并行肝脏B超检查。抽取清晨空腹血,测定血糖、血脂、肝功能、hs-CRP等。采用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定血清中TNF- α 、TGF- β 1水平。

统计学处理 采用SPSS11.5软件进行统计分析,数据以mean \pm SD表示。多因素分析采用Logistic回归,多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 非酒精性脂肪肝危险因素分析 将所有非酒精性脂肪肝(99例)作为因变量,以体质量指数、

表 1 非酒精性脂肪肝危险因素的Logistic回归分析结果

变量	回归系数	P值	比值比(OR)	95% CI
体质量指数	0.654	0.012	1.763	1.324-2.241
hs-CRP	0.832	0.009	2.132	1.435-3.147
TNF- α	2.921	0.004	18.368	1.798-185.230
TGF- β 1	0.754	0.029	1.921	1.137-2.549

表 2 单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎和对照组hs-CRP、TNF- α 、TGF- β 之间的差异

分组	hs-CRP (mg/L)	TNF- α (ng/L)	TGF- β 1 (mg/L)
对照组(32)	1.16 \pm 0.31	1.91 \pm 0.32	41.45 \pm 10.23
单纯性 脂肪肝组(51)	2.01 \pm 0.39 ^a	3.97 \pm 0.94 ^a	75.21 \pm 15.67 ^a
脂肪性 肝炎组(48)	3.92 \pm 1.41 ^{bc}	8.13 \pm 4.21 ^{bc}	77.65 \pm 18.32 ^a

^aP<0.05 vs 对照组; ^bP<0.05 vs 单纯性脂肪肝。

ALT、甘油三脂、总胆固醇、空腹血糖、平均血压、hs-CRP、TNF- α 、TGF- β 1为自变量,行多因素Logistic回归分析,结果显示体质量指数、hs-CRP、TNF- α 、TGF- β 1为脂肪肝形成的独立危险因素(表1)。

2.2 单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎和对照组hs-CRP、TNF- α 、TGF- β 1之间的差异 单纯性脂肪肝和脂肪性肝炎血清hs-CRP、TNF- α 、TGF- β 1水平均显著高于对照组(P<0.05);脂肪性肝炎血清hs-CRP、TNF- α 水平显著高于单纯性脂肪肝(P<0.05);而脂肪性肝炎和单纯性脂肪肝两组TGF- β 1水平差异无显著性(表2)。

3 讨论

炎症因子在NAFLD发病中起着重要的作用^[2-5]。肝枯否细胞是炎症细胞产生的一个主要来源,游离脂肪酸在肝细胞的聚集能刺激NF- κ B依赖的TNF- α 等炎症因子的表达。TNF- α 可引起全身和肝脏胰岛素抵抗,后者被认为是NAFLD重要的致病因素。研究表明,NASH的动物模型和患者中,可见肝脏组织和血清TNF- α 表达含量增加^[6-7]。TGF- β 1与肝纤维化的形成关系密切。在NASH的大鼠模型中,TGF- β 1表达明显增高^[8]。Hs-CRP是一种急性期反应蛋白及全身炎症的标志物,与C反应蛋白相比,hs-CRP更有助于低级别炎症的诊断。Yoneda *et al*研究显示,血清hs-CRP表达含量的增高与NAFLD患者的发病相

■研发前沿

炎症因子在NAFLD发病中的作用及机制是当前的研究热点。而炎症因子在NAFLD病程发生发展中的作用是本研究关注的问题。

■相关报道

张炜 *et al*研究非酒精性脂肪肝糖代谢异常与超敏C反应蛋白的关系。林克荣 *et al*研究了非酒精性脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 、脂联素水平与胰岛素抵抗的相关性。

■应用要点

TNF- α 和hs-CRP在临床上可作为区别NASH和单纯性脂肪肝非侵入性的辅助指标,有助于评估NAFLD的发病过程。

关^[9]。我们的研究进一步证实了TNF- α 、TGF- β 1、hs-CRP在NAFLD患者中血清表达含量增高,是NAFLD的独立危险因素。

NAFLD的临床分型包括单纯性脂肪肝、NASH和肝硬化。由于临床上治疗单纯性脂肪肝和NASH的策略有很大不同,因此采用有效的方法鉴别单纯性脂肪肝和NASH非常重要。寻找相关的生化指标并明确其在两者之间的表达差异,对临床上判断NAFLD病程发展具有重要的意义。我们的研究结果显示,脂肪性肝炎血清TNF- α 、hs-CRP水平显著高于单纯性脂肪肝。表明TNF- α 、hs-CRP可能是NASH发生的重要因素。TNF- α 可引起全身和肝脏胰岛素抵抗,肝细胞损害和凋亡,中性粒细胞趋化和肝星状细胞活化;TNF- α 还能激活凝血系统,导致血栓形成,影响肝脏血液循环,增强脂质过氧化,以及促进细胞外基质合成,从而促进NASH的发生发展^[10-12]。且TNF- α 的抗体治疗能减少NAFLD动物模型中的组织炎症和纤维化过程^[13]。近年研究表明,血清hs-CRP升高是预测未来心血管事件的一个非常有用的指标^[14]。胰岛素抵抗综合征可能与血清hs-CRP升高和内脏肥胖相关。Hs-CRP可能与IL-6共同作用促进NASH的发生^[9]。Hs-CRP还可作为NASH治疗效果的一个预测指标。有研究显示,通过减轻体重、锻炼及应用罗格列酮等药物治疗可降低血清hs-CRP的水平^[15]。尽管TGF- β 1在NAFLD患者中血清表达含量增高,但在单纯性脂肪肝和NASH间两者表达无差异性。

总之,TNF- α 和hs-CRP在临床上可作为区别NASH和单纯性脂肪肝非侵入性的辅助指标,有助于评估NAFLD的发病过程,并有可能为临床治疗NASH提供新思路。

4 参考文献

- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
- Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 412-421
- 张炜, 范钰, 朱丽群, 程兆明. 非酒精性脂肪肝糖代谢异常与超敏C反应蛋白的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16: 319-3213
- 林克荣, 杨慧莹, 张志坚, 王雯, 乐乔良, 朱金照, 李达

■同行评价

本研究证明TNF- α 、hs-CRP在脂肪性肝炎患者血清中含量高于单纯性脂肪肝及健康人群,提示TNF- α 、hs-CRP可以作为鉴别脂肪性肝炎与单纯性脂肪肝的实验指标,有一定的临床意义。

周, 刘建强, 柳刚. 非酒精性脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 、脂联素水平与胰岛素抵抗的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2613-2618

- 陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞. 非酒精性脂肪肝大鼠肝脏硬脂酰CoA去饱和酶-1表达与ATP浓度之间的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3450-3456
- Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163
- Solis-Herruzo JA, Solís-Muñoz P. [Genetic factors in non-alcoholic fatty liver disease] *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100: 195-201
- Stärkel P, Sempoux C, Leclercq I, Herin M, Deby C, Desager JP, Horsmans Y. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J Hepatol* 2003; 39: 538-546
- Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007; 42: 573-582
- Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005; 11: 191-198
- Nagai H, Matsumaru K, Feng G, Kaplowitz N. Reduced glutathione depletion causes necrosis and sensitization to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 55-64
- Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic Jukić L, Velagic V. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4539-4550
- Koca SS, Bahcecioglu IH, Poyrazoglu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. *Inflammation* 2008; 31: 91-98
- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347: 1557-1565
- Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2004; 39: 188-196

编辑 李军亮 电编 何基才

内镜、腹腔镜治疗胰腺假性囊肿38例

李强, 秦鸣放

李强, 天津医科大学研究生院 天津市 300070

秦鸣放, 天津市南开医院天津市微创外科中心 天津市 300100

作者贡献分布: 李强对本文作出主要贡献; 本课题由李强与秦鸣放共同设计和操作完成; 数据分析与论文写作由李强完成。

通讯作者: 李强, 300070, 天津市, 天津医科大学研究生院。

suifeng6223024@126.com

电话: 022-27435262

收稿日期: 2008-09-29 修回日期: 2008-11-06

接受日期: 2008-11-10 在线出版日期: 2008-12-08

Endoscopy and laparoscopy co-therapies for pancreatic pseudocyst: an analysis of 38 cases

Qiang Li, Ming-Fang Qin

Qiang Li, Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Ming-Fang Qin, Center of Minimally Invasive Surgery, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

Correspondence to: Qiang Li, Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China. suifeng6223024@126.com

Received: 2008-09-29 Revised: 2008-11-06

Accepted: 2008-11-10 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To investigate essentiality of laparoscopy and endoscopy co-therapies for pancreatic pseudocyst and to propose a reasonable algorithm.

METHODS: The clinical data of patients with pancreatic pseudocyst who underwent endoscopy and laparoscopy treatment in department of Tianjin Mini-invasive Surgery, from March 2000 to April 2008, were analyzed retrospectively, including general information, success rate, recurrence rate and incidence of complication, etc.

RESULTS: Compared with abdominal surgery group, no significant difference was observed in success rate, incidence of complications either in laparoscopy therapy or endoscopy therapy group, but shorter treatment sessions, less bleeding during operation and shorter hospital stay were noted. (110 ± 30 , 47.1 ± 15 vs 150 ± 24 ; 100 ± 30 , 20 ± 8 vs 380 ± 40 ; 10 ± 3 , 6.7 ± 3 vs 16 ± 4 ,

all $P < 0.05$). Success rates for the three treatment groups were $< 90\%$. However, 3 cases who received endoscopy and laparoscopy co-therapies had minimal invasive injury, and 2 cases whom open abdominal surgery failed obtained desired results following endoscopy therapy.

CONCLUSION: The endoscopy and laparoscopy co-therapies are safe, effective and minimally invasive for pancreatic pseudocyst.

Key Words: Pancreatic pseudocyst; Endoscopy; Laparoscopy

Li Q, Qin MF. Endoscopy and laparoscopy co-therapies for pancreatic pseudocyst: an analysis of 38 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3913-3918

摘要

目的: 在内镜、腹腔镜阶梯治疗胰腺假性囊肿的基础上, 探讨内镜、腹腔镜联合治疗的必要性, 以制定出其合理的治疗方案。

方法: 回顾性分析2000-03/2008-04天津市微创外科中心使用内镜、腹腔镜及开腹手术治疗胰腺假性囊肿38例患者的临床资料, 包括一般资料、成功率、复发率、并发症等。

结果: 腹腔镜、内镜治疗的成功率及并发症的发生率与开腹手术相比均无明显差别, 但其治疗时间、术中出血及治疗后住院时间上均短于开腹手术(110 ± 30 , 47.1 ± 15 vs 150 ± 24 ; 100 ± 30 , 20 ± 8 vs 380 ± 40 ; 10 ± 3 , 6.7 ± 3 vs 16 ± 4 , 均 $P < 0.05$)。三种治疗方法成功率均不到90%, 但3例行内镜腹腔镜联合治疗可达到微创治疗的目的, 开腹手术失败2例采用内镜治疗取得较好效果。

结论: 内镜、腹腔镜联合应用可以使胰腺假性囊肿的治疗方案更加合理化, 以达到微创治疗目的, 提高治疗的成功率。

关键词: 胰腺假性囊肿; 腹腔镜; 内镜

李强, 秦鸣放. 内镜、腹腔镜治疗胰腺假性囊肿38例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3913-3918

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3913.asp>

■背景资料

早在20世纪80年代和90年代, 国外就有内镜和腹腔镜治疗腹腔假性囊肿(PPs)的相关报道, 但综合国内外文献来看都是内镜或腹腔镜单独治疗PPs的, 内容包括: 治疗方法(如具体方法、具体术式的比较等)、并发症、治疗成功的相关因素报道, 个案报道更是常见。但内镜、腹腔镜治疗的成功率还不是很, 都存在一定的局限性。因此, 联合应用内镜、腹腔镜技术, 以制定出最合理的治疗方案, 使患者得到最合理的治疗。

■同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心; 樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

■ 研发前沿

分析腹腔镜、内镜治疗的成功率及治疗的适应症和局限性,研究腹腔镜内镜联合治疗必要性,制定合理的治疗方案。PPs少见,加之囊肿特点不一,无法进行随机性的实验研究,为增加说服力应行多中心研究。

0 引言

胰腺假性囊肿(pancreatic pseudocyst, PPs)是继发于急慢性胰腺炎和胰腺损伤,存在出血、感染及梗阻等并发症。简单的抽吸复发率为70%,外引流术也有较高的复发率及并发症,复发率可达41%^[1]。目前PPs的治疗主要是有效的内引流术。随着微创技术的发展,内镜、腹腔镜成为治疗PPs的主要方法,内镜治疗PPs及腹腔镜治疗PPs都有相关报道,其成功率分别为70%-90%^[2-4]和95%^[5],单一的内镜或腹腔镜方法无法解决所有问题及治疗后的并发症。本文主要论述内镜、腹腔镜及二者联合、阶梯治疗PPs方法,制定合理的治疗方案,以提高治疗成功率及减少复发率。选择天津市微创外科中心2000-03/2008-04 38例PPs患者治疗情况报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 收集天津市微创外科中心2000-03/2008-04内镜治疗组14例,腹腔镜治疗组7例,同时在53例开腹治疗患者中选择与21例基础情况相似囊肿位置及大小相同的病例作为对照组进行研究,共38例。其中男29例,年龄22-68(平均47±9)岁。34例患者均有不同程度的腹痛腹胀,17例患者体质量减轻,14例患者有恶心、呕吐症状,发热患者6例,19例患者查体均可触及上腹肿物或触之饱满。其中急性胰腺炎20例(52.6%),慢性胰腺炎13例(34.2%),创伤性胰腺炎5例(13.2%),其中胆源性胰腺炎引起PPs者30例(79%)。病程平均9(4-28) mo。术前均行腹部彩超、CT及ERCP检查,囊肿单发者34例,多发4例;囊肿直径6-15(8.7±4) cm; 24例患者囊肿均位于胰体尾部,14例位于胰头部,与胰管相同者10例。以上38例患者均经影像学及血液化验检查除外胰腺囊腺瘤及囊腺癌^[6]。

1.2 方法

1.2.1 术前准备: 术前评价治疗适应症; 术前心肺等重要脏器准备, 注意控制血压血糖, 调整全身情况; 术前行腹部彩超、腹部CT及逆行胰胆管逆行性造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)检查, 明确囊肿数目、大小、位置及与胰管关系, 必要时行磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)及上消化系造影检查(明确消化系有无梗阻及有无静脉曲张等), 根据病史查体及

上述检查决定治疗方法。

1.2.2 治疗方法: (1)内镜治疗: PPs的患者入院后常规行ERCP检查以明确囊肿与主胰管的关系。患者主胰管与囊肿相通且无明显胃十二指肠梗阻者行内镜下经乳头PPs引流术(endoscopic transpapillary cyst drainage, ETCD)治疗: 患者左侧卧位, 基础麻醉下, 十二指肠镜(ED-250XL5/XL8, 富士能)下ERCP常规应用乳头括约肌切开(EST)及胰管括约肌切开(EPS), 选择性应用胰管取石术、球囊导管扩张等治疗手段, 循导丝置放鼻胰管引流(ENPD)或胰管支架置入术(ERPD), 远端置于假性囊肿深处或超越囊肿与胰管相通处。PPs囊壁与胃壁粘连或胃壁本身即为囊壁的一部分并经CT提示囊肿对胃有明显的压迫, 行胃镜下电针开窗囊肿引流及支架置入术: 患者左侧卧位, 在胃镜直视下用针状切开刀在胃肠道压迫最明显处开一小口, 造影管插入假性囊肿后造影确认囊肿无误, 置入导丝至囊肿腔内, 行柱状水囊扩张, 沿导丝置入7Fr或10Fr的双猪尾支架。若囊肿胃内压迹不明显则应用EUS引导下胃囊肿穿刺支架置入术: 采用线阵扫描形EUS(EG-250US, 富士能), 入胃内后, 利用超声内镜的胃镜视野大致观察胃壁情况, 利用超声明确囊肿的大小、位置及囊肿与胃壁的距离及有无较大的血管, 以选择合适的穿刺点, EUS引导下穿刺针穿刺胃壁, 穿刺成功后行造影检查确认囊肿无误, 置入导丝, 行柱状水囊扩张, 扩张后经导丝置入鼻囊肿管引流或置入“双猪尾形”塑料支架。(2)腹腔镜治疗: 内镜治疗失败或不具备内镜治疗指征, 应用腹腔镜囊肿胃吻合或囊肿空肠Roux-en-Y术。(3)手术治疗: 假性囊肿的治疗采用囊肿空肠Roux-en-Y吻合术、囊肿切除、胰腺囊肿空肠袢式吻合、空肠空肠侧侧吻合术及外引流术。

2 结果

38例患者治疗情况如表1, 内镜治疗患者中经乳头引流8例, 4例患者接受2次或2次以上的内镜经乳头治疗, 其中3例行胰管取石并行ENPD术(图1), 2例引流失败, 1例胰管扩张伴狭窄, 引流效果不良, 行经乳头联合EUS引导下经十二指肠囊肿内引流术, 另1例胰管扩张伴胰管结石, 囊肿位于胰体尾部, 引流1 wk囊肿缩小不明显, 遂行腹腔镜下囊肿空肠吻合+空肠空肠侧侧吻合术; 2例行胃镜治疗, 引流效果良好, 1例术中

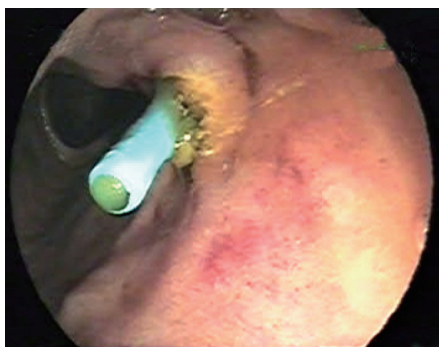


图 1 十二指肠镜下置入胰管支架, 经支架可见清亮囊液流出。



图 3 腹腔镜下使用Endo-GIA行囊肿胃吻合术。

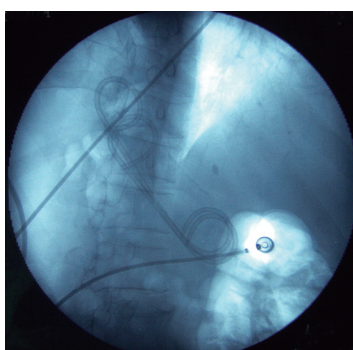


图 2 超声内镜引导下假性囊肿内经胃壁置入双猪尾支架。

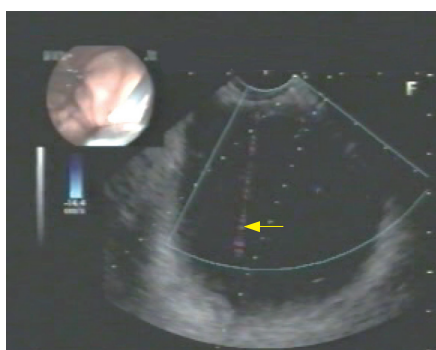


图 4 超声内镜引导下行经胃壁囊肿穿刺术, 箭头指向为穿刺针B超下影像。

出血, 出血约100 mL, 术中止血时间约30 min; 4例患者行EUS引导下囊肿胃十二指肠内引流术, 1例囊肿感染放置鼻囊肿引流管进行持续冲洗5 d, 后改换双猪尾支架(图2), 术后1例出现支架脱落, 经超声内镜重新置入2个双猪尾支架, 引流效果良好。7例患者行腹腔镜手术治疗, 6例行腹腔镜囊肿胃吻合术(图3), 1例行囊肿空肠 Roux-en-Y吻合术, 其中1例行腹腔镜囊肿胃吻合术的患者术后持续低热, 囊肿缩小不明显, 给予内镜下经胃囊肿吻合口置入引流管冲洗, 患者发热消失, 1 wk后置入双猪尾支架以通畅引流。术后无胰漏、出血等严重并发症出现。开腹术后17例行开腹手术治疗, 2例行开腹放置外引流术, 术后1例复发行超声内镜引导下内引流术; 3例行囊肿切除术, 其中1例行胆囊切除+囊肿切除术; 1例行囊肿十二指肠吻合术, 术后淀粉酶升高, 保守治疗治愈; 6例行囊肿胃吻合术, 1例囊肿半年后复发, 拒绝行再次手术治疗行EUS引导下内引流术(图4); 3例行囊肿空肠 Roux-en-Y吻合术; 2例患者行胰腺囊肿空肠袢式吻合、空肠空肠侧侧吻合术, 引流效果良好。

上述患者的术后3 mo后门诊复查, 随访6-28 mo。对内镜、腹腔镜的治疗情况进行分析(表2), 经统计分析, 内镜、腹腔镜治疗的成功

■相关报道

Cahen *et al*指出了一些影响操作成功的因素及内镜治疗并发症的分析; Marc Barthet *et al*报道了他们有效的内镜治疗法则, 50个患者按该法则的治疗操作成功率为90%, 较为系统的指出根据适应证行内镜治疗。

率及并发症的发生率与开腹手术相比均无明显差别, 在治疗时间、术中出血及治疗后住院时间上均短于开腹手术, 具有统计学意义, 说明腹腔镜及内镜治疗具有可行、安全、有效及微创的特点, 但内镜腹腔镜治疗成功率都不到90%, 所以仍有3例行内镜腹腔镜联合治疗才达到微创治疗的目的, 开腹手术失败2例患者通过内镜方式解决。

3 讨论

胰腺假性囊是继发于急慢性胰腺炎和胰腺损伤由血液、胰液、渗出液及坏死组织形成囊性结构, 囊壁由肉芽组织或纤维组织组成。假性囊肿可引起感染、出血、梗阻及囊肿破裂等并发症。在充分引流的原则下, 其治疗方法也不断发展。在1921年Jedlica首创了PPs胃吻合内引流术, 在以后的半个多世纪里外科手术一直是治疗PPs首选和确切的方法。随着内镜及腹腔镜技术的发展和提高, 腔腔、管腔及囊腔内引流术得以成功实施, 内引流的思想逐渐建立, 使得内镜及腹腔镜囊肿内引流术得到发展, 内引流术也体现出自身优势, 具有创伤小、恢复快, 消化液引入消化系起到一定生理作用, 引流时间较

■应用要点

本研究提出内镜腹腔镜联合治疗的思路为其他内引流术的发展提供技术支持,最大程度实现疾病治疗的微创化及合理化。

表 1 内镜治疗组、腹腔镜治疗组和开腹手术组患者的一般情况 $n(\%)$

项目	内镜治疗组			腹腔镜治疗组	开腹手术组
	胰管支架($n=8$)	胃镜($n=2$)	超声内镜($n=4$)	($n=7$)	($n=17$)
治疗时间(min)	49±14	45±11	47±21	110±30	150±24
术中出血量(mL)	10±5	30±5	9±5	100±30	280±40
治疗后住院时间(d)	7±3	6±2	6.5±2	10±3	16±4
成功率	6(75)	2(100)	4(100)	6(85.7)	15(88.2)
复发率	2(25)	0(0)	0(0)	1(14.3)	2(11.8)
并发症	胰腺炎1例	出血1例	支架脱落1例	囊肿感染1例	胰腺炎1例, 切口感染1例

表 2 腹腔镜、内镜治疗组与开腹治疗组治疗相关项目比较

项目	腹腔镜治疗组	内镜治疗组	开腹手术组
治疗时间(min)	110±30 ^a	47.1±15 ^a	150±24
术中出血量(mL)	100±30 ^a	20±8 ^a	380±40
治疗后住院时间(d)	10±3 ^a	6.7±3 ^a	16±4
成功率(%)	85.7	85.7	88.2
复发率(%)	14.3	14.3	11.8
并发症发生率(%)	14.3	21.4	11.8

^a $P<0.05$ vs 开腹手术组。

长等优势。

PPs的治疗有其指征^[3],当PPs的直径大于6 cm,持续超过6 wk时,伴有临床症状;合并慢性胰腺炎伴胰管狭窄;保守治疗囊肿增大;出现并发症(如囊肿感染、出血、破裂和胆道、胃肠道梗阻等);可疑恶性病变均为治疗指征。经皮外引流术仅适于一般情况较差手术风险极大,急性PPs囊壁尚未成熟及囊肿快速增大有可能破裂者,该方法胰液丢失较多,外带引流活动不便及容易复发,可造成经久不愈的胰外漏,还可引起肠漏出血感染等并发症^[7]。1983年Khawajat报道了第一个内镜下经壁引流治疗PPs的病例,以后这种方法在国外得到了较广泛的开展,但有其适应症:PPs必须和胃或十二指肠享有同一个壁;囊肿和胃壁之间的距离不能超过1 cm;内镜下胃和十二指肠壁必须清楚可见;无静脉曲张;抽吸囊液行细胞学及肿瘤标记物检查,除外肿瘤性囊肿及假性动脉瘤;此外,经乳头囊肿引流术者须要主胰管和囊肿相通。Way和Gagner于1994年先后报道了应用腹腔镜治疗PPs的经验。腹腔镜下治疗PPs和开腹手术一样,可分为囊肿-胃、囊肿-十二指肠、囊肿-空肠吻合内引流术和囊肿切除术。

本研究的内镜治疗中,胰管支架置入术对于胰管明显扩张伴狭窄及囊位于胰体尾者效果较差,需采用手术治疗或联合内镜治疗;文献报道对于囊肿合并感染者先行鼻胰管引流,在天津市微创中心常选择性放置鼻胰管引流,观察3-5 d胰液引流情况,然后置入胰管支架。对于胰头部囊肿且与主胰管相通且主胰管无狭窄者应用胰管支架治疗成功率高。但通过乳头引流较经胃或经十二指肠引流更安全。经内镜治疗同时置入多个支架,采用双猪尾型支架均能减少并发症的发生^[2]。引流时间大于6 wk,支架脱落应及时重新置入以保证引流使囊肿完全闭合。在有超声内镜条件时应尽量使用超声内镜以避免大出血及穿孔等严重并发症,同时增加成功率^[4]。

腹腔镜治疗假性囊肿方法与开腹手术方式基本相同^[8],有囊肿-胃^[9]、囊肿-十二指肠^[10]、囊肿-空肠吻合内引流术^[11]和囊肿切除术,都以消除分隔、就近引流、低位吻合口及通畅引流为主要原则,但腹腔镜手术治疗较开腹手术创伤小恢复快^[12]。腹腔镜治疗PPs较内镜下治疗有更高的成功率及更低的死亡率和复发率^[5]。在手术操作过程中,我们更常用囊肿胃吻合术,对

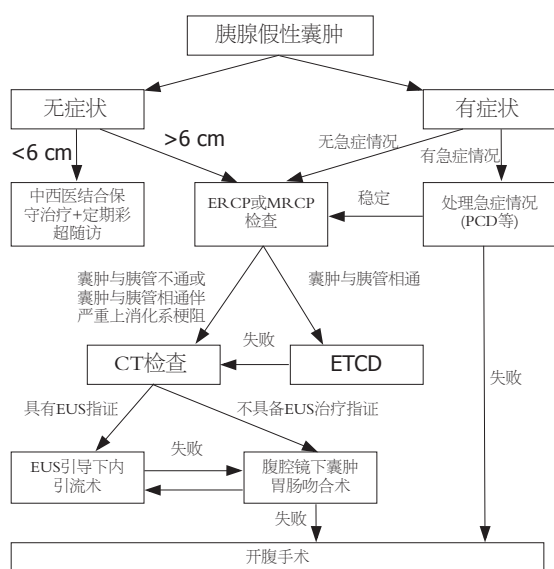


图5 PPs内镜腹腔镜阶梯治疗方案。

于腹腔镜下假性囊肿胃吻合术, 我们认为采用经小网膜囊途径在胃后壁和囊肿前壁选择合适的部位各作一小切口, 然后应用Endo-GIA完成囊肿-胃吻合术, 吻合口前壁在腹腔镜直视下缝合, 这种方法的优点是避免了胃前壁多个Trocar戳孔或切开胃前壁, 吻合口钉合可靠、大小易于掌握, 更能够减少并发症的出现。手术时必须注意囊肿与胃吻合位置, 保证吻合口长径>4 cm。本研究中1例患者术后早期出现发热, 考虑与吻合口引流不畅囊内感染有关, 联合内镜治疗, 置入鼻囊肿管冲洗^[14]及支架治疗治愈。开腹手术治疗的成功率较高, 可成为内镜及腹腔镜治疗的有效补充。

通过上述分析可见, 内镜腹腔镜在PPs的治疗的适应症及并发症的处理上具有互补性, 而且治疗成功率还不是很, 都有自己的局限性, 在治疗过程中部分患者需要联合十二指肠镜、超声内镜及腹腔镜联合治疗以达到微创治疗目的, 尤其是多发或巨大假性囊肿的治疗^[14], 治疗可能要多过程和多方法结合, 制定适合患者的最佳方案, 以提高微创治疗成功率, 同时减少患者的痛苦。Barthet *et al*报道了他们有效的的内镜治疗法则, 50个患者按该法则的治疗操作成功率为90%, 较为系统的指出根据适应症行内镜治疗方式选择, 但仍没有提及内镜之间及内镜与腹腔镜之间的联合应用的问题。天津市微创外科中心在个体化治疗的原则下确立了如图5所示的内镜腹腔镜联合治疗PPs方案。在此方案中掌握内镜、腹腔镜治疗

指证是必要的。

内镜、腹腔镜治疗PPs具有可行、安全、有效、微创^[15]等特点, 但各自有其适应症, 内镜腹腔镜具有互补的特点, 因此二者治疗上应该联合应用, 制定适合患者的最佳方案, 以提高微创治疗成功率, 同时减少患者的痛苦。同时内镜腹腔镜联合治疗的思路可以应用到胆胰胃肠及其他疾病的治疗过程中(如内镜、腹腔镜联合治疗肝内外胆管结石), 内镜、腹腔镜联合治疗PPs也为其他内引流术的发展提供技术支持, 最大程度实现疾病治疗的微创化及合理化。由于PPs的各自特点及治疗方法的适应症不同, 不能进行前瞻性随机实验研究, 其治疗效果仍待多中心、大样本的临床试验进一步研究。

4 参考文献

- Ng B, Murray B, Hingston G, Windsor JA. An audit of pancreatic pseudocyst management and the role of endoscopic pancreatography. *Aust N Z J Surg* 1998; 68: 847-851
- Will U, Wegener C, Graf KI, Wanzar I, Manger T, Meyer F. Differential treatment and early outcome in the interventional endoscopic management of pancreatic pseudocysts in 27 patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4175-4178
- Cahen D, Rauws E, Fockens P, Weverling G, Huibregtse K, Bruno M. Endoscopic drainage of pancreatic pseudocysts: long-term outcome and procedural factors associated with safe and successful treatment. *Endoscopy* 2005; 37: 977-983
- Barthet M, Lamblin G, Gasmi M, Vitton V, Desjeux A, Grimaud JC. Clinical usefulness of a treatment algorithm for pancreatic pseudocysts. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 245-252
- Aljarabah M, Ammori BJ. Laparoscopic and endoscopic approaches for drainage of pancreatic pseudocysts: a systematic review of published series. *Surg Endosc* 2007; 21: 1936-1944
- Singhal D, Kakodkar R, Sud R, Chaudhary A. Issues in management of pancreatic pseudocysts. *JOP* 2006; 7: 502-507
- Sheng QS, Chen DZ, Lang R, Jin ZK, Han DD, Li LX, Yang YJ, Li P, Pan F, Zhang D, Qu ZW, He Q. Laparoscopic cystogastrostomy for the treatment of pancreatic pseudocysts: a case report. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4841-4843
- Edino ST, Yakubu AA. Experience with surgical internal drainage of pancreatic pseudocyst. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 1945-1948
- 罗建强, 梁中晓, 黄顺荣. 腹腔镜手术治疗胰腺假性囊肿六例的体会. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 199
- 梁中晓, 黄顺荣, 罗建强. 腹腔镜外科手术治疗胰腺假性囊肿. *中国内镜杂志* 2003; 9: 38-40
- 刘荣, 胡明根, 周宁新. 治疗性腹腔镜胰腺手术的临床应用. *肝胆外科杂志* 2006; 14: 180-183
- 范莹, 吴硕东, 孔静, 于浩. 腹腔镜下胰体尾切除术及胰腺假性囊肿内引流术治疗经验. *中国内镜杂志* 2008; 14: 67-69
- 胡益群, 叶震世, 司丽娟. 胰腺假性囊肿、胰腺脓肿的超声内镜下治疗进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15:

同行评价

本文选题符合该领域的研究热点, 临床资料齐全, 结论可靠, 对临床具有一定的参考价值。

- 3237-3240
- 14 汪建初, 浦润, 李良波, 韦建宝, 韦忠恒, 马日海, 韦邦宁. 巨大胰腺假性囊肿的处理方法及时机选择. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2142-2145
- 15 Seewald S, Thonke F, Ang TL, Omar S, Seitz U,

Groth S, Zhong Y, Yekebas E, Izbicki J, Soehendra N. One-step, simultaneous double-wire technique facilitates pancreatic pseudocyst and abscess drainage (with videos). *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 805-808

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写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, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

急性下消化道动脉出血的介入诊疗价值和影响因素

王永利, 程英升, 张家兴, 汝复明, 曹传武, 徐霁充

王永利, 张家兴, 汝复明, 曹传武, 徐霁充, 同济大学附属上海第十人民医院介入科 上海市 200072

程英升, 上海交通大学附属第六人民医院介入影像科 上海市 200233

作者贡献分布: 王永利与程英升对本文贡献均等, 王永利收集资料, 分析病例并写作, 程英升修改、润色; 文章涉及的病例手术操作分别由王永利, 程英升, 张家兴, 汝复明, 曹传武及徐霁充完成, 对手术的权重和对文章的贡献按姓名出现的次序分布。

通讯作者: 程英升, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院介入影像科. cjr.chengysh@vip.163.com

电话: 021-64823392

收稿日期: 2008-08-26 修回日期: 2008-11-03

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-08

Angiography and transcatheter embolization for acute lower gastrointestinal hemorrhage: clinical value and influencing factors of diagnosis and treatment

Yong-Li Wang, Ying-Sheng Cheng, Jia-Xing Zhang, Fu-Ming Ru, Chuan-Wu Cao, Ji-Chong Xu

Yong-Li Wang, Jia-Xing Zhang, Fu-Ming Ru, Chuan-Wu Cao, Ji-Chong Xu, Department of Interventional Radiology, Affiliated 10th People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Ying-Sheng Cheng, Department of Interventional Radiology, Affiliated 6th People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Ying-Sheng Cheng, Department of Interventional Radiology, Affiliated 6th People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, 600 Yi Shan Road, Shanghai 200233, China. cjr.chengysh@vip.163.com

Received: 2008-08-26 Revised: 2008-11-03

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the clinical value of angiography and transcatheter embolotherapy in patients with acute massive lower gastrointestinal (GI) hemorrhage, and to analyze the influencing factors.

METHODS: We retrospectively analyzed data of 39 cases with acute massive arterial hemorrhage of lower gastrointestinal tract, including such data as transfusion amount, blood pressure and hemoglobin (Hb) before and after embolization. Baseline, procedural, and outcome parameters were recorded in accordance with current Soci-

ety of Interventional Radiology guidelines. Follow-up time was three to six months. Outcomes included technical success (Immediate disappearance of bleeding signs or obstruction of leaking-blood artery after embolotherapy), clinical success (without rebleeding within 30 days), delayed rebleeding (more than 30 days), and major or minor complication rates.

RESULTS: Twenty-six patients of the 39 with acute massive lower GI hemorrhage received blood transfusion before embolization, and only 4 patients with HB below 40 g/L before embolization, received the transfusion post-embolization. The positive diagnostic rates of lower GI hemorrhage of angiograms were 31% with catheter-tips located at 2nd-grade-blood vessels (superior mesenteric arteries, inferior mesenteric arteries), and 69% at 3rd-grade-blood vessels (jejunal artery, iliac artery, iliac-cecal artery, cecal artery, and marginal artery), respectively. The total positive diagnostic rate of angiography about lower GI bleeding reached 100%. Embolization was performed with injection of gelatin sponge particles or thin strips via catheter following angiogram with angiographical catheter (5French size) or with microcatheter (3French size). Immediate cessation bleeding post-embolization was 92%. The technical success rates and clinical success rates reached 100% and 89.7%, respectively. Transient epigastric pains occurred to 4 patients because of superior mesenteric artery spasm, 2 cases were managed with medications, and the others were relieved spontaneously. Three days after transcatheter embolization, endoscopy examination of four patients showed the areas of mucosal erythema, swelling and pallor. None of major complications was found such as necrosis or serious ischemia of lower GI.

CONCLUSION: Angiography and transcatheter embolization are effective and safe methods to locate the bleeding spot and stop bleeding immediately, which can be considered as alternatives to diagnosis and treatment of acute massive lower GI hemorrhage. The positive-bleeding-diagnostic rates of angiograms in lower GI hemorrhage and the efficacy of embolization are

■背景资料

动脉性下消化道出血, 涉及的病种较多, 急诊入院诊断、救治时, 定位诊断较困难, 急诊内镜检查因肠道准备不足, 难以实施, 尤其大出血患者, 或对于老年体弱、多脏器衰竭的患者难以实施, 有时甚至出血的急性期对有些年轻的患者而言, 其家属或监护人也拒绝接受内镜检查。因定位困难, 给后续的手术治疗带来的不确定影响。

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

■ 研发前沿

经导管造影、栓塞是近年来发展起来的有效诊疗手段之一,但其实施受诸多因素影响。

influenced by varied factors.

Key Words: Lower gastrointestinal hemorrhage; Angiography; Transcatheter embolization

Wang YL, Cheng YS, Zhang JX, Ru FM, Cao CW, Xu JC. Angiography and transcatheter embolization for acute lower gastrointestinal hemorrhage: clinical value and influencing factors of diagnosis and treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3919-3924

摘要

目的: 探讨血管造影、经导管栓塞术在急性下消化道动脉出血中的诊疗价值及影响出血诊断和栓塞疗效的因素。

方法: 回顾性分析血管造影和经导管栓塞术治疗39例急性下消化道动脉大出血病例。记录术前、后输血量、血压变化和血红蛋白改变。随访3-6 mo, 评价技术成功、临床成功、迟发性出血和并发症。

结果: 栓塞术前, 39例患者中26例输注红细胞悬液, 术后仅4例患者(术前Hb均 <40 g/L)输注红细胞悬液。肠系膜上、下动脉(2级血管)开口造影, 出血阳性诊断率31%; 空肠、回肠、回结肠、结肠动脉和边缘动脉等(3级)分支血管开口造影, 出血阳性诊断率69%(27/39)。总血管造影出血阳性率100%。即刻有效栓塞率达92%, 栓塞的技术成功率和临床成功率分别为100%和89.7%。手术操作和栓塞所致动脉痉挛, 一过性腹部隐痛4例, 2例对症处理后缓解, 2例自行缓解。3 d后的肠镜检查, 4例患者显示出栓塞区肠黏膜红斑, 周围水肿、苍白, 但无1例患者出现严重并发症。

结论: 血管造影、经导管栓塞术是急性动脉性下消化道出血定位诊断和安全、有效的急诊治疗手段。血管造影出血的阳性诊断率和栓塞治疗的疗效受多种因素影响。

关键词: 下消化道动脉出血; 血管造影; 经导管栓塞术

王永利, 程英升, 张家兴, 汝复明, 曹传武, 徐霁充. 急性下消化道动脉出血的介入诊疗价值和影响因素. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3919-3924
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3919.asp>

0 引言

急性下消化道动脉大出血是急诊常见病, 内科保守治疗常难于奏效。由于出血量大, 患者一般状况差不能进行充分的肠道准备, 往往无法进

行急诊肠镜检查, 因此不能明确出血部位, 这给肠道部份切除术带来了困难^[1], 且围手术期的死亡率约30%(9%-47%), 有时甚至高达100%, 手术死亡率介于10%-53%^[2-5]。本文回顾性分析1997-01/2007-12本院采用血管造影和经导管栓塞术诊疗急性下消化道动脉性出血的病例资料, 对此诊疗方法的临床应用价值、安全性和影响因素进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 1997-01/2007-12本院收治的下消化道动脉性大出血患者39例, 经血管造影明确诊断并接受经导管动脉内栓塞术(transcatheter artery embolization, TAE)治疗。患者均以急性大量便血入院, 其中30例从急诊室收治, 7例消化科患者, 2例介入科收治患者。男29例, 女10例, 年龄17-83(平均年龄51.5)岁。介入诊疗术前, 便血量约700-2000 mL, 平均 1200 ± 15 mL。鲜红色血便27例, 黯红色血便混合血凝块12例; 血红蛋白3.5-8.8 g/L, 平均 5.3 ± 1.25 g/L; 术前输血量4-8 U。住院时间7-29 d, 平均住院天数 13.5 ± 2 d。

1.2 方法

1.2.1 动脉造影和TAE: 在数字减影血管造影机(DSA)下, 以改良Seldinger's穿刺技术穿刺右或左股动脉, 送入6F动脉导管鞘(Japan Terumo), 股动脉显著迂曲的高龄患者, 改用6F抗折导管鞘打开迂曲血管, 便于导管超选择插管。5F Rosch或Simmons-2型造影导管先行腹腔动脉干造影, 排除上消化系或合并上消化系大出血。再按照肠系膜上动脉、肠系膜下动脉等2级血管近端, 依次造影。如疑有某一支动脉出血时, 以0.035 inch超滑黑导丝引导, 将造影导管尽量超选至空肠动脉、回肠动脉、回结肠动脉、直肠上、下动脉, 或边缘动脉等3级分支动脉的近端造影; 患者血管迂曲明显, 采用同轴导管技术, 在造影导管支撑下, 将3F SP微导管(Japan Terumo)超选择插管至相应3级以下分支动脉, 再行血管造影。明确出血部位后, 将微导管放置在出血动脉的近端, 经微导管注入 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 海绵颗粒或 $8-10 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 海棉条。以术中对比剂不再外逸, 对比剂缓慢或不再前向流动为度, 或出血血管不再显影为度。

1.2.2 技术成功和临床成功标准以及随访: 急性下消化道动脉性大出血急诊介入治疗的效果, 技术成功和临床成功等定义和判断标准, 严格参照美国介入放射协会(society of interventional

表 1 血管造影、TAE后肠镜检查结果与出血病变类型

造影部位 ¹	出血阳性 ⁿ	出血的表现形态	术后肠镜检查	病变类型
2级血管开口处	12/39			
肠系膜上动脉	8	分支动脉末端对比剂外渗		
肠系膜下动脉	4	呈斑点状3例, 小片状7例	黏膜良性溃疡性改变7例,	溃疡性动脉破裂
3级血管开口处	36/39		黏膜红斑3例, 黏膜白苔3例,	出血11例, 憩室7例,
空、回肠动脉	9	对比剂外逸聚集呈湖状28例,	黏膜恶性溃疡糜烂1例	血管畸形9例,
右中结肠动脉	6	对比剂逸出勾画肠道黏膜或		降结肠克罗恩氏
(边缘动脉)		轮廓8例		病1例, 肠道恶性
回结肠动脉	15			肿瘤1例, 病变类型
左中结肠动脉	4			不确定11例
(边缘动脉)				
直肠上动脉	1			
直肠下动脉	1			

¹造影部位所指为导管头端位置。

■应用要点

本文通过对既往病例回顾性研究和分析, 结合近期文献进行讨论分析得出初步结论, 本方法是急诊诊断和治疗下消化道动脉出血的一种安全、有效手段, 其影响因素如文中讨论所述。

radiology, SIR)指南规定. 技术成功是指栓塞结束, 血管造影不再有对比剂外逸征象; 临床成功定义为介入栓塞后30 d内, 血流动力学稳定, 出血不再复发. 临床成功再分为完全成功(出血征候群或症状消失); 部分成功(出血征候群或症状改善), 病情暂时稳定, 为临床其他治疗或再次介入治疗赢得机会或时间. 随访分为院内和院外随访. 院内随访在栓塞达到技术成功后的5-7 d直至出院, TAE出血停止后3-5 d, 内窥镜检查, 验证出血部位, 明确出血原发病因; 出院后随访, 在TAE后3-6 mo, 采用门诊复查和电话随访, 随访时间至出院后6 mo.

1.2.3 安全性评价: TAE严重并发症为肠梗阻或缺血坏死、穿孔, 临床症状及体征表现为持续性腹部剧烈疼痛, 或腹膜刺激征、肌卫征. 轻微并发症: 肠道分支动脉长时间痉挛, 或异位栓塞非靶血管, 造成持续性腹痛.

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件对导管在2级、3级血管造影的出血阳性率的比较, 采用Monte Carlo计算确切概率.

2 结果

介入栓塞后24 h, 血常规显示: 在介入治疗达到技术成功的患者中, Hb数值不再进行性下降. 术前39例患者中26例输注红细胞悬液4-8 U. 术后, 仅4例患者, 因术前Hb均<4 g/L, 为改善患者的贫血状态, 术后输注红细胞悬液2 U.

2.1 血管造影 39例急诊患者均在出血活动期接受血管造影. 出血的阳性诊断率达到100%, 只是造影导管所处的分级血管不同, 获得的出血

阳性率不同(表1), 导管在3级以上血管造影出血的阳性率(69%)显著高于2级血管开口处造影出血的阳性率(31%). 但有3例例外, 导管在2级血管开口造影时, 有阳性出血表现, 在3级血管开口造影, 出血征象消失. 这与术中导管导丝损伤血管内膜或诱发动脉痉挛有关. 出血的直接征象为: 导管在2级血管造影, 出血表现为对比剂聚集呈斑点状, 微导管接近出血动脉, 出血表现为对比剂大量外逸, 肠道黏膜涂抹, 集聚呈“湖状”(图1), 并勾画出病变处肠道的黏膜形态. 间接出血征象为: 血管畸形(弓动脉和直小动脉异常增多, 伴有异常增粗、扩张和迂曲), 造影的动脉早期或中期, 静脉早显, 或见粗大回流静脉.

2.2 疗效和随访结果 39例下消化道动脉出血栓塞后, 血管造影显示: 即刻对比剂不再外逸有29例; 7例血管畸形, 病变不再显示. 即刻有效栓塞率达92%(36/39). 3例患者因为血管迂曲, 操作过程中导丝、导管多次刺激空回肠动脉, 导致其分支动脉长时间痉挛. 因担心栓塞范围过大或造成异位血管栓塞, 出现肠缺血、坏死等严重并发症, 遂留置导管鞘, 送返病房. 这3例患者再次大出血后采用微导管进行了二次造影栓塞术, 术毕出血停止. 总的技术成功率仍旧达到100%. 所有患者在达到栓塞的技术成功后, 解血便或黑便的频次均在2-3次以内, 为肠道存留的积血. 多数在术后3-5 d, 或肠道准备以后的大便常规检查中大便潜血试验为阴性. 术后随访3-6 mo, 37例患者未再出血, 临床成功率: 完全成功率达89.7%(35/39). 部分成功率为10%(4/39). 1例高龄患者, 肠镜提示结肠脾曲肠癌伴溃疡, 在介入栓

■同行评价

本文回顾性分析血管造影和经导管栓塞术治疗39例急性下消化道动脉大出血病例的价值及影响出血诊断和栓塞疗效的因素,内容实用,结论可信,具有较好的临床参考价值。

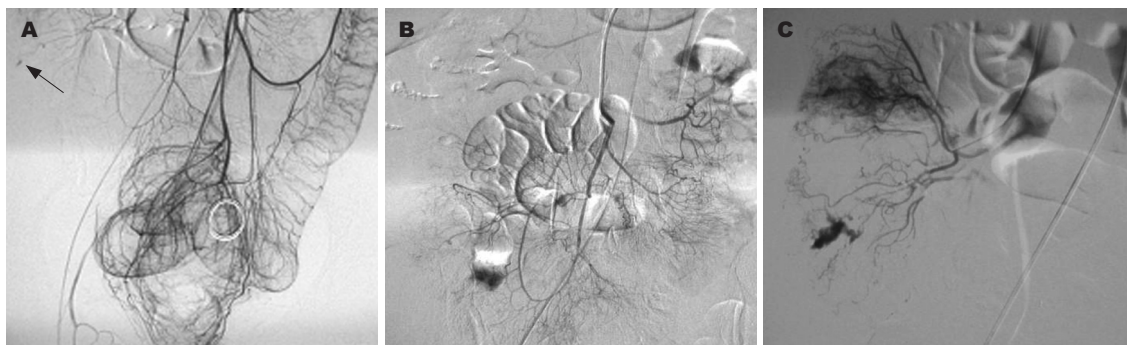


图1 导管头端在不同等级血管造影的出血影像表现. A: 肠系膜下(2级)动脉造影, 通过侧枝循环显示回结肠区出血, 呈斑点状(箭头); B: 回结肠(3级)动脉造影, 导丝、导管致血管痉挛, 原出血征象消失; C: 微导管超选至出血动脉近端造影, 对比剂外逸、集聚成“湖状”。

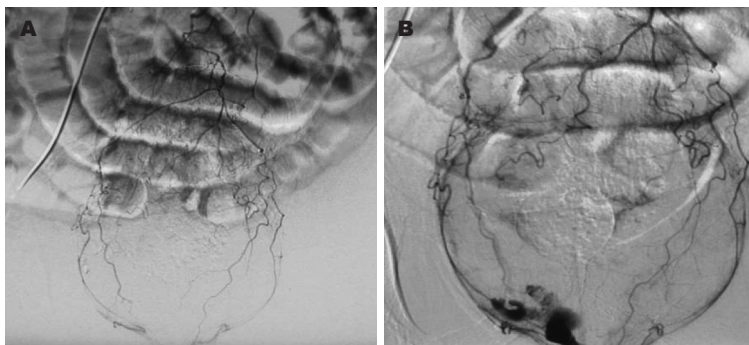


图2 导管在不同等级血管造影的出血阳性诊断差别. A: 导管头端在肠系膜下动脉(2级血管)造影未显示出血征象; B: 导管头端在直肠上动脉(3级血管)造影, 显示直肠上端对比剂外逸集聚呈“湖状”。

塞后血压稳定后, 选择结肠癌根治术. 另1例患者肠镜提示降结肠克罗恩氏病(Crohn's disease), 再出血仍采用介入栓塞治疗达到即刻止血效果后, 择期手术切除病变肠道. 2例升结肠血管畸形患者在栓塞止血后, 接受了升结肠部分切除术, 手术大体标本和病理报告验证了血管造影的诊断结果.

2.3 血管造影或TAE相关的并发症 所有病例栓塞后均未出现腹部绞痛或持续性腹痛, 仅2例患者因操作过程中血管痉挛出现短暂性腹部隐痛, 采用2%利多卡因3 mL生理盐水稀释至10 mL缓慢注入10 min后, 解除血管痉挛, 疼痛缓解. 另有2例患者栓塞后腹部隐痛, 未作处理, 疼痛自行缓解. 出现疼痛的患者, 血管造影发现均有不同程度的血管痉挛. 肠镜检查仅有4例患者表现出栓塞区肠黏膜红斑, 周围水肿、苍白, 但无一例患者出现严重的肠黏膜缺血、坏死, 或肠道穿孔. 随访期间没有发生与明胶海绵栓塞相关的肠道并发症.

3 讨论

急性动脉性下消化系出血是急诊中常见的消化系出血病变. 介入放射学的出现和发展为下消化系动脉性大出血的诊断和治疗提供了有效的

手段^[6-7].

下消化系动脉性大出血活动状态下, 多数患者难于接受肠道准备, 不仅如此, 肠镜检查往往还受限患者的配合程度以及不稳定的生命指征. 此外, 肠镜也不能对空、回肠的出血作出诊断. 相反, 作为急诊诊疗手段, 介入放射学的动脉造影能够在出血的活动期及时发现出血部位, 为后续的栓塞治疗或手术治疗作出明确的定位诊断^[8]. 作为急诊病例, 本组39例患者, 通过血管造影均明确了出血部位; 更重要的是: 介入放射学的TAE治疗, 在有效扩容的基础上, 有助于在较短的时间内, 稳定血压, 纠正紊乱的血流动力学. 血管造影和TAE首先借助导管鞘建立动脉与体外的通道, 这就为快速输血建立了一个有效途径. 本组病例有2例急诊抢救患者, 在血管造影和TAE前, 通过导管鞘和造影导管快速注入4 U红细胞悬液, 血压平稳后, 才顺利完成了整个造影和栓塞治疗; 此外, 栓塞后的即刻止血效应是消除血流动力学紊乱根本原因. 本组病例中, 由于恶性肿瘤($n=1$)、血管畸形($n=2$)和克罗恩氏病($n=1$)随访期间再出血, 最终采取了手术治疗. 尽管如此, 血管造影及经导管栓塞治疗的临床价值仍得到充分体现: (1)及时有效的止血, 快速消除了出血的直接原因, 为进一步纠正

低血容量,改善血流动力学紊乱创造了条件;(2)对出血快速作出定位诊断,为手术切除病变明确了部位,有效的TAE止血也为术前准备赢得了充分的时间;(3)有效的止血和生命指征的改善为出血的病因诊断如:肠道钡剂透视或肠镜检查创造了有利条件。

在血管造影明确诊断出血部位后,常采用经导管肠道动脉内持续灌注垂体后叶素(血管加压素)达到止血的目的。经导管灌注药物治疗出血,将小肠和大肠出血疾病混合统计,止血的成功率59%-90%;单纯统计结肠憩室病变引起的出血,其止血成功率更高达92%-100%^[4]。然而,再出血率也高达40%。经导管动脉栓塞术与药物灌注术同期出现于临床,但是,早期前者的疗效远不及后者,而且栓塞治疗容易造成肠壁缺血、坏死。究其原因,主要与早期使用大直径造影导管有关。造影导管超选择出血靶动脉和到位置困难,容易损伤肠道动脉。随着3F或更细导管以及与其匹配的栓塞剂的应用,超选择性插管和栓塞得以实现,介入栓塞术疗效明显增加。Khanna *et al*^[2]报道12例病例,同时荟萃25篇已发表的文献,发现憩室性下消化道动脉出血栓塞治疗的成功率为85%,非憩室性下消化道动脉出血栓塞后再出血超过40%,因此认为栓塞治疗对于前者有效。本组资料中尽管有3例患者血管迂曲,首次栓塞失败,但二次栓塞仍达到技术成功,因此总的技术成功率仍为100%,这与文献综述的结果相同^[9]。将病理为恶性肿瘤、血管畸形和克罗恩氏病这类必然再出血的病例预算在内,本组病例部分成功率为10%(4/39),这是由4例出血患者的基础疾病所决定,但完全临床成功率仍达89.7%。

文献报道,栓塞后再出血的发生率差异较大,介于14%-40%之间。近年来微导管超选择栓塞的再出血率介于9%-14%。将文献[10]和本组资料结合起来分析,可发现再出血率的差异来自下列几种原因:(1)各家报道的病例其出血的病因和病理构成比不同。动脉粥样硬化、憩室病的栓塞疗效明显优于克罗恩氏病、肠道恶性溃疡等出血;(2)血管造影的阳性诊断率差异决定了TAE疗效不同。造影出血阳性率又与导管头端所分血管的位置相关^[11]。本组资料显示导管头端位于3级动脉开口较之2级血管开口造影的阳性率要高;(3)出血动脉所处部位、血管条件等存在差异。如出血位于结肠脾曲,由边缘动脉的远端分支破裂所致,或血管极度迂曲等,

即使采用微导管超选择技术,也难以到达出血分支动脉。肠系膜上动脉的边缘动脉栓塞后,肠系膜下动脉仍有分支或其他大的侧支与其吻合;(4)选择不同的导管、导丝和微导管等介入器械,或术者的操作技术也可造成疗效差异。选择不同预塑形的造影导管,其头端在动脉内如与血管走行方向成角,或导丝、微导管多次进出分支动脉,必然引起血管痉挛,或损伤分支动脉内膜,导致其不完全闭塞;(5)选择栓塞剂的不同可能造成栓塞结果的差异。作为永久性栓塞剂弹簧圈,被输送出微导管后,不可能再向血管远端运行,只有微导管头端到达分支动脉后,他才能起到长期止血的目的。相反,明胶海绵颗粒或条,在加压状态下,发生变形,仍然能够沿着靶动脉向前运行,更接近出血动脉末端。弹簧圈和明胶海绵颗粒这一微小差别,极有可能对大的侧支循环建立产生不同的效果,这可以解释d'Othée *et al*微弹簧圈栓塞的病例中,有27%的迟发性再出血率^[12]。

TAE的安全性主要在于能否避免严重的肠道缺血并发症^[13]。早期动脉灌注或栓塞囿于导管直径的限制,出现并发症的几率较高^[14]。微导管超选择技术使得栓塞的血管范围越来越局限于出血靶区,缺血造成的损伤可显著下降。动物实验显示:微弹簧圈在猪的空肠($n=14$)、回肠($n=26$)和结肠($n=14$)动脉栓塞,病理检查并没有缺血表现。弹簧圈栓塞的144病例中,10年随访,小的缺血发生率仅7%,出现肠梗阻的几率为零。本组病例使用的明胶海绵颗粒和条没有出现肠道长时间、明显的缺血或坏死征兆。这表明下消化道动脉出血的TAE中,明胶海绵颗粒或条,是一种安全性栓塞剂。这两种栓塞剂只可能到达肠道的弓动脉,不会造成直小动脉的栓塞。肠道黏膜下的微血管网在TAE止血后,仍然能够建立微小的侧支循环,不至于造成肠黏膜的严重缺血和坏死。

血管造影和经导管栓塞术是急诊动脉性下消化道出血的安全、有效的诊断和治疗手段,对出血部位能够快速作出定位、定性诊断,能够迅速纠正患者的血流动力学紊乱,为后续病因诊断和治疗创造条件。造影诊断阳性率和栓塞的疗效受导管头端在不同分级血管、出血病理类型、出血部位、血管条件、介入器械选择和栓塞剂类型等因素影响。

4 参考文献

- 1 van Delden OM, Rauws EA, Gouma DJ, Laméris JS. [Increasing role for angiographic embolisation in

- the treatment of gastrointestinal haemorrhage] *Ned Tijdschr Geneesk* 2006; 150: 956-961
- 2 Khanna A, Ognibene SJ, Koniaris LG. Embolization as first-line therapy for diverticulosis-related massive lower gastrointestinal bleeding: evidence from a meta-analysis. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 343-352
- 3 Udd M, Leppäniemi AK, Bidel S, Keto P, Roth WD, Haapiainen RK. Treatment of bleeding pseudoaneurysms in patients with chronic pancreatitis. *World J Surg* 2007; 31: 504-510
- 4 Lipof T, Sardella WV, Bartus CM, Johnson KH, Vignati PV, Cohen JL. The efficacy and durability of super-selective embolization in the treatment of lower gastrointestinal bleeding. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 301-305
- 5 Sheth R, Someshwar V, Warawdekar G. Treatment of acute lower gastrointestinal hemorrhage by superselective transcatheter embolization. *Indian J Gastroenterol* 2006; 25: 290-294
- 6 Weldon DT, Burke SJ, Sun S, Mimura H, Golzarian J. Interventional management of lower gastrointestinal bleeding. *Eur Radiol* 2008; 18: 857-867
- 7 Yip VS, Downey M, Teo NB, Anderson JR. Management of ischemic proctitis with severe rectal haemorrhage: a case report. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3776-3778
- 8 Abbas SM, Bissett IP, Holden A, Woodfield JC, Parry BR, Duncan D. Clinical variables associated with positive angiographic localization of lower gastrointestinal bleeding. *ANZ J Surg* 2005; 75: 953-957
- 9 Saperas E. [Lower gastrointestinal bleeding: the great unknown] *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 93-100
- 10 Syed MI, Chaudhry N, Shaikh A, Morar K, Mukerjee K, Damallie E. Catheter-directed middle hemorrhoidal artery embolization for life-threatening rectal bleeding. *Can J Gastroenterol* 2007; 21: 117-123
- 11 Charbonnet P, Toman J, Bühler L, Vermeulen B, Morel P, Becker CD, Terrier F. Treatment of gastrointestinal hemorrhage. *Abdom Imaging* 2005; 30: 719-726
- 12 d'Othée BJ, Surapaneni P, Rabkin D, Nasser I, Clouse M. Microcoil embolization for acute lower gastrointestinal bleeding. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2006; 29: 49-58
- 13 Nawawi O, Young N, So S. Superselective coil embolization in gastrointestinal haemorrhage: early experience. *Australas Radiol* 2006; 50: 21-26
- 14 Miller M Jr, Smith TP. Angiographic diagnosis and endovascular management of nonvariceal gastrointestinal hemorrhage. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 735-752

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字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1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密密度。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 \pm 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 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 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。完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

十二指肠囊肿的内镜诊断及治疗

张锦华, 庄剑波, 缪连生, 袁菊霞, 陈丽

张锦华, 庄剑波, 缪连生, 袁菊霞, 陈丽, 甘肃省第二人民医院消化科 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 本课题主要完成者为张锦华; 超声内镜诊断与内镜下治疗均由张锦华完成; 内镜及超声内镜诊断由庄剑波完成; 内镜诊断及复查由缪连生完成; 内镜治疗配合由袁菊霞与陈丽完成; 本论文写作由张锦华完成。

通讯作者: 张锦华, 730000, 甘肃省兰州市城关区和政西街1号, 甘肃省第二人民医院消化科. zjh51272@163.com
电话: 0931-4921417 传真: 0931-4923222
收稿日期: 2008-09-09 修回日期: 2008-10-09
接受日期: 2008-10-27 在线出版日期: 2008-12-08

Endoscopic diagnosis and therapy for cystic tumors in duodenum

Jin-Hua Zhang, Jian-Bo Zhuang, Lian-Sheng Miao, Ju-Xia Yuan, Li Chen

Jin-Hua Zhang, Jian-Bo Zhuang, Lian-Sheng Miao, Ju-Xia Yuan, Li Chen, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Jin-Hua Zhang, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. zjh51272@163.com

Received: 2008-09-09 Revised: 2008-10-09

Accepted: 2008-10-27 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To investigate the endoscopic diagnosis and therapy for cystic tumors in duodenum.

METHODS: Three cases of cystic tumors in duodenum were diagnosed through routine gastroscopy and endoscopic ultrasonography. Cystic tumors were treated with cystoscopy therapy.

RESULTS: Three cases of cystic tumors confirmed by endoscopic ultrasonography were endoscopically treated with rat-like teeth biopsy forceps. One month later, endoscopy review showed that cystic tumors completely disappeared. The desired therapeutic effect was achieved.

CONCLUSION: The endoscopic ultrasonography is of important value to the diagnosis of cystic tumors in the duodenum. The treatment method with rat-like teeth biopsy forceps is a

simple, safe and effective therapy for the cystic tumors in the duodenum.

Key Words: Cystic tumor; Endoscopic ultrasound; Endoscopic therapy

Zhang JH, Zhuang JB, Miao LS, Yuan JX, Chen L. Endoscopic diagnosis and therapy for cystic tumors in duodenum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3925-3927

摘要

目的: 探讨十二指肠囊肿的内镜诊断及治疗方法。

方法: 对3例十二指肠黏膜下囊肿进行常规胃镜及超声内镜(EUS)检查, 并行囊肿内镜下治疗。

结果: 经EUS确诊的3例十二指肠囊肿, 用鼠齿钳夹破囊壁的方法治疗, 并取得较好效果。1 mo后内镜复查, 2例局部未见囊肿及治疗创面, 完全愈合; 1例囊肿消失, 仅见鼠齿钳夹破的创面未完全愈合。

结论: EUS对十二指肠囊肿的诊断和治疗具有重要意义; 鼠齿钳夹破囊壁的治疗方法相对操作简单、易行、安全, 值得进一步探讨及推广应用。

关键词: 十二指肠囊肿; 超声内镜; 内镜治疗

张锦华, 庄剑波, 缪连生, 袁菊霞, 陈丽. 十二指肠囊肿的内镜诊断及治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16(34): 3925-3927
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3925.asp>

0 引言

十二指肠黏膜下囊肿临床少见, 在没有超声内镜(endoscopic ultrasound, EUS)条件下难以确诊。有关该病的内镜、EUS诊断及内镜下治疗的报道很少。本文总结了3例十二指肠囊肿的常规胃镜检查、EUS检查及囊肿内镜下治疗资料, 旨在进一步探讨十二指肠囊肿的内镜诊断及治疗方法, 以提高内镜医生对该病的认识。

■背景资料

十二指肠囊肿少见, 普通内镜下不能确切与其他隆起病变鉴别, 超声内镜对囊肿的诊断和鉴别诊断具有重要价值。近年国内外对于囊肿的治疗常采用内镜下针切开窗术、圈套电凝切除等技术, 但仍有较高风险, 普通内镜医生难以熟练掌握。

■同行评议者

张筱茵, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所; 张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

■应用要点

本文采用鼠齿夹破囊的方法治疗十二指肠囊肿,与针切开窗术、圈套电凝切除方法相比,具有操作简便、易行,安全的特点,仅为深大活检而已,易于基层及内镜操作技术尚不纯熟的医生开展。由于例数较少,其疗效及安全性还有待进一步观察。

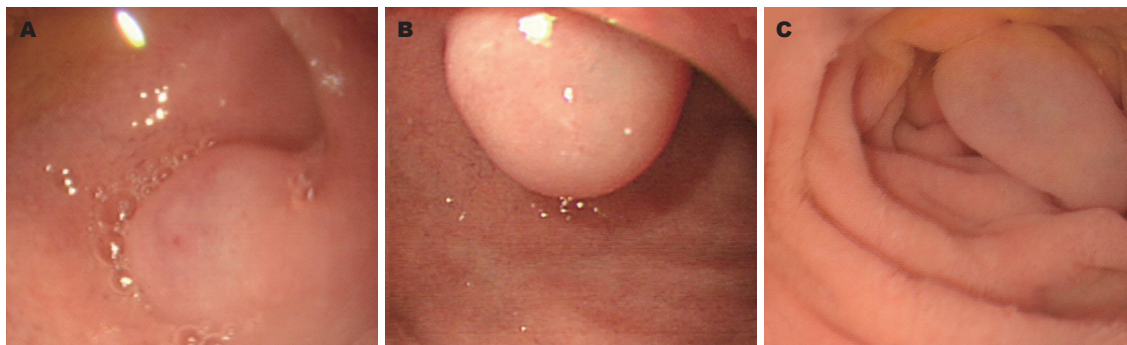


图1 十二指肠囊肿内镜图像。A: 球部; B: 角; C: 降段(肠腔注水后)。

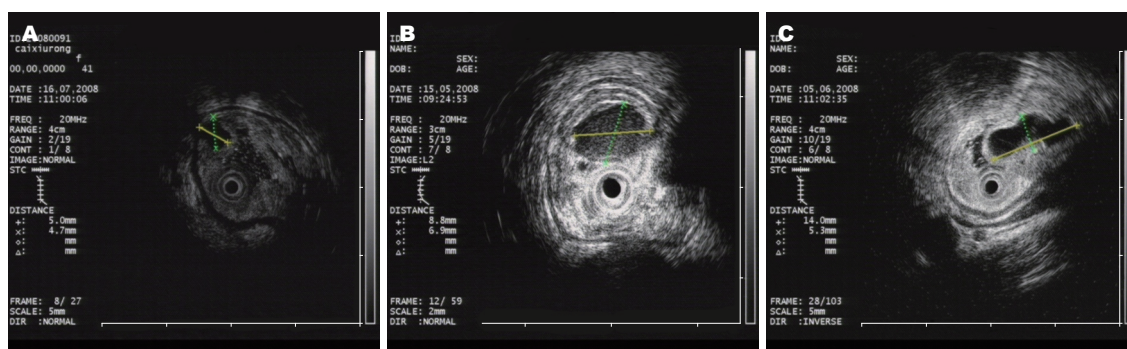


图2 十二指肠囊肿超声内镜。A: 球部, 呈无回声; B: 角, 呈低回声; C: 降段, 呈无回声。

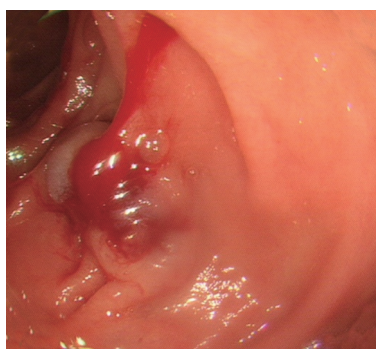


图3 鼠齿钳夹破囊壁后见少量渗血。

2 结果

十二指肠囊肿病例1位于球部, 病例2位于十二指肠角, 病例3位于十二指肠降段。肿物直径5-14 mm, 病例1呈扁平圆形, 无蒂(图1A); 病例2、3呈葫芦形, 顶端大, 根部窄, 亚蒂(图1B-C)。3例均表面光滑, 黏膜表面色泽稍白, 有透明感, 用活检钳触之囊肿质地软、形态改变。超声扫描见囊肿呈无回声或低回声病灶向肠腔内突起, 起源于黏膜或黏膜下, 边界清楚, 包膜连续完整, 其他各层结构清晰(图2)。在超声检查确诊囊性病后, 吸净肠腔内灌注的水, 给气膨胀肠腔, 看清囊肿的根部和顶端, 用鼠齿钳于囊肿不同部位和方向夹破囊肿壁, 3例患者经治疗后均见清亮囊液流出, 囊腔完全塌陷, 创面有少量渗血(图3), 用肾上腺素盐水局部冲洗出血停止。1 mo后复查内镜, 2例局部未见囊肿及治疗创面, 完全愈合(图4A); 1例囊肿消失, 仅见鼠齿钳夹破的创面未完全愈合(图4B), 嘱继续服药治疗, 定期复查内镜。

3 讨论

胃肠道黏膜下囊肿临床较少见。胡伟 *et al*^[1]报道的93例上消化系黏膜下肿瘤中仅有2例为囊肿。本组病例囊肿占同期十二指肠黏膜下病变的

1 材料和方法

1.1 材料 2007-09/2008-08, 我院消化内镜中心对3例十二指肠囊肿患者进行了常规胃镜检查、EUS检查及囊肿内镜下治疗。3例患者中男1例, 女2例; 年龄43-56(52.5±4.95)岁。所用器械主要有Olympus240、H260电子内镜, 超声微探头(UM-DP20-25R, 20 MHz, Olympus FG-44-NR-1型鼠齿钳。

1.2 方法 术前按0.05 mg/kg体重iv咪达唑仑。对胃镜检查疑为十二指肠黏膜下肿物的患者, 行EUS检查, 采用浸泡法于病灶部位进行超声扫描。超声检查确诊囊性病后, 用鼠齿钳于囊肿不同部位和方向夹破囊肿壁后治疗结束, 1 mo后复查内镜。

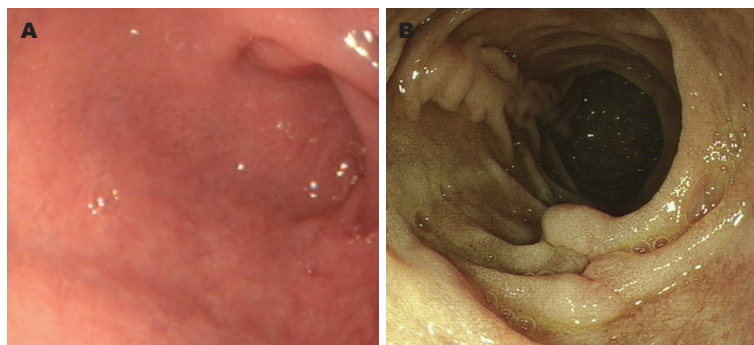


图 4 治疗1 mo后复查内镜. A: 完全愈合; B: 未完全愈合.

■同行评价

本文就十二指肠囊肿疾病的诊断和治疗进行报道, 描述清楚, 文笔流畅, 有一定的临床指导意义.

18.75%(3/16), 可能与本省超声内镜较少有关. 3例十二指肠囊肿内镜下表现为半球形及葫芦形隆起病灶, 内镜下与其他十二指肠黏膜下隆起性病变如息肉、脂肪瘤、平滑肌瘤及恶性淋巴瘤等隆起病变镜下鉴别有一定困难, 但其黏膜透明感, 用活检钳触之囊肿质地软、形态易改变的特点有助于普通胃镜对囊肿的诊断. EUS检查能明确囊肿的大小、数量、回声强弱、边界是否清晰、包膜的完整性、连续性、囊肿位于肠壁的层次和可能的起源以及肠管其余各层结构等特征, 对于囊肿的诊断和鉴别诊断具有重要价值. 对于十二指肠的其他疾病经超声内镜检查由于回声不同较容易鉴别, 而起源于黏膜肌层的平滑肌瘤, 超声扫描都可为低回声, 也起源于同一部位, 应加以进一步鉴别, 囊肿的回声更低、甚至无回声, 在超声检查中用探头触及囊肿, 其形态易改变, 触之二者的质地也不同, 这些都有助于鉴别. 在没有超声内镜条件下, 用活检钳或鼠齿钳夹破囊壁, 见清亮液体流出, 囊壁塌陷有助于囊肿的确诊, 且安全性也较好.

十二指肠黏膜下囊肿的病理类型大多数为Brunner腺增生, 表现为黏膜下囊性肿物, 属于良性的十二指肠囊性病变, 一般不会恶变^[2]. 既往由于治疗手段的限制, 常选择临床观察, 不行内镜下治疗. 随着内镜技术的不断提高, 对于囊肿的治疗常采用内镜下针切开窗术、去顶技术(unroofing technique)^[3]、圈套电凝切除以及尼龙绳结扎后的切除等技术, 但其出血、穿孔等并发症的发生率仍高达5%-11%^[4]. 由于十二指肠肠壁较薄, 易穿孔; 血供丰富, 易出血; 球部和十二指肠角保持良好视野困难、且操作过程中

的肠管蠕动、肠液胆汁等因素都对囊肿治疗的安全性带来不利影响. 如发生十二指肠降段穿孔, 其手术治疗困难, 风险高于其他部位的穿孔. 因而, 许多内镜医生对十二指肠的黏膜、黏膜下病变的治疗多采取谨慎态度. 如何减少并发症的发生, 仍需临床实践中不断探讨. 本组3例十二指肠囊肿, 经EUS确诊后, 用鼠齿钳夹破囊壁的方法治疗囊肿, 内镜复查囊肿完全消失, 取得了预期的治疗效果. 与针切刀、圈套器电凝去顶切除和黏膜下注射切除等方法相比, 避免了针切刀方向、深度掌握要求高; 圈套器去顶操作困难; 黏膜下注射切除对于囊肿可能治疗过度等带来的出血、穿孔并发症发生. 具有操作简便、易行, 安全的特点, 仅有活检后的渗血, 而无并发症发生. 对于不具备超声内镜条件的医院的内镜医生, 只要疑似囊肿, 囊壁有透明感, 肿物质地软, 触之形态改变, 不妨采用此治疗方法, 也仅为深大活检的风险而已. 由于病例较少, 其疗效及安全性还有待进一步观察.

4 参考文献

- 1 胡伟, 于皆平, 吴杰, 贾业贵. 上消化道黏膜下病变的超声内镜诊断价值. 中国内镜杂志 2003; 9: 67-68
- 2 Hizawa K, Iwai K, Esaki M, Suekane H, Inuzuka S, Matsumoto T, Yao T, Iida M. Endosonographic features of Brunner's gland hamartomas which were subsequently resected endoscopically. *Endoscopy* 2002; 34: 956-958
- 3 Mimura T, Kuramoto S, Hashimoto M, Yamasaki K, Kobayashi K, Kobayashi M, Oohara T. Unroofing for lymphangioma of the large intestine: a new approach to endoscopic treatment. *Gastrointest Endosc* 1997; 46: 259-263
- 4 文卓夫, 陈小良, 田虹, 李建忠, 郑丰平. 十二指肠黏膜下囊肿的内镜诊断及切除. 中国内镜杂志 2005; 11: 925-926

编辑 史景红 电编 何基才

中医挂线治疗直肠狭窄12例

李华山, 马树梅, 王晓锋

■背景资料

直肠狭窄是由于各种原因引起的直肠肠腔变窄, 从而出现排便困难, 大便变细等一系列临床症状的疾病, 为肛门直肠手术后一种严重的并发症, 本病多为医源性损伤, 近年来发病率呈上升趋势。

李华山, 马树梅, 王晓锋, 中国中医科学院广安门医院肛肠科北京市100053

作者贡献分布: 本文选题与临床研究由李华山完成; 临床资料搜集整理由马树梅与王晓锋共同完成; 本文写作由马树梅完成。

通讯作者: 李华山, 100053, 北京市宣武区北线阁5号, 中国中医科学院广安门医院肛肠科. lihuashan@263.net

电话: 010-88001025 传真: 010-88001025

收稿日期: 2008-09-04 修回日期: 2008-10-30

接受日期: 2008-11-03 在线出版日期: 2008-12-08

Treatment of rectal stenosis with TCM thread-drawing method: analysis of 12 cases

Hua-Shan Li, Shu-Mei Ma, Xiao-Feng Wang

Hua-Shan Li, Shu-Mei Ma, Xiao-Feng Wang, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Correspondence to: Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital Affiliated to China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China. lihuashan@263.net

Received: 2008-09-04 Revised: 2008-10-30

Accepted: 2008-11-03 Published online: 2008-12-08

Abstract

AIM: To search for a better treatment method for rectal stenosis.

METHODS: From Jul. 2004 to Oct. 2008, 12 cases with rectal stenosis were referred to the department of proctology in Guang'anmen hospital. All the patients were subjected to traditional Chinese medicine thread-drawing treatment to observe the curative effect.

RESULTS: All the patients were cured clinically. The outcome after thread-drawing treatment was classified in three categories: cured: $n = 9$; improved: $n = 3$; failure: $n = 0$. The total effective rate was 100%. The mean disease course was 21d (ranging from 7d to 33 d). No complications like major bleeding occurred and no recurrent stenosis occurred during a follow-up period of 1 month to 4 years.

CONCLUSION: Thread-drawing method is a safe, effective, convenient and inexpensive treatment method for rectal stenosis.

Key Words: Thread-drawing method; Rectal stenosis; Traditional Chinese Medicine

Li HS, Ma SM, Wang XF. Treatment of rectal stenosis with TCM thread-drawing method: analysis of 12 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(34): 3928-3931

摘要

目的: 探索直肠狭窄的治疗方法。

方法: 收集2004-07/2008-10广安门医院肛肠科住院患者12例, 均采取中医挂线进行治疗, 观察其疗效。

结果: 12例患者均获得临床治愈, 其中痊愈9例, 有效3例, 无效0例, 总有效率100%。疗程7-33 d, 平均21 d。治疗期间未出现大出血等严重并发症。术后随访1mo-4年, 无狭窄发生。

结论: 中医挂线治疗直肠狭窄是一种安全、有效、简便、价廉的治疗方法。

关键词: 挂线; 直肠狭窄; 中医

李华山, 马树梅, 王晓锋. 中医挂线治疗直肠狭窄12例. 世界华人消化杂志 2008; 16(34): 3928-3931

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3928.asp>

0 引言

直肠狭窄(rectal stenosis)是指各种原因引起的直肠肠腔狭小缩窄, 轻则大便困难坠胀疼痛, 严重者可出现低位肠梗阻症状。我们收集了2004-07/2008-10我院肛肠科直肠狭窄患者12例, 均实施中医挂线治疗, 取得了较好的疗效, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 广安门医院肛肠科2004-07/2008-10直肠狭窄患者12例。其中男8例, 女4例, 年龄36-76(平均 54.2 ± 0.6)岁, 病程最短2 mo, 最长6年。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: 参考《中医病证诊疗标准与方

■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

剂选用^[1]、李雨农《中华肛肠病学》^[2]的标准制定。有典型的症状和体征:大便排出困难,排便时间延长,便条变细,或稀便时便次频繁,每次排出粪量少,有排便未净感或会阴填塞下坠感,严重时有腹胀,下腹部阵发性绞痛,里急后重等。指诊可触及直肠腔内环状或半环状狭窄,质硬,不可移动,食指通过困难,狭窄部以上肠腔有粪便淤积不能通过,并有明显触痛。(1)狭窄形态:管状狭窄:直肠腔内狭窄环的上下长度超过2.5 cm;环状狭窄:狭窄环的上下长度不超过2.5 cm;镰状狭窄:狭窄呈半环形。(2)狭窄分度:轻度:狭窄环直径<2 cm,食指可通过,但麻醉下不能过2指,便次增多及便不尽感。中度:狭窄环直径<1.5 cm,食指通过困难,小指可过,有明显的排便不畅,或便次增加,会阴下坠填塞感,大便变细,指诊狭窄部阻力和固定感。重度:狭窄环直径<1.0 cm,小指不能通过,重者伴低位不全梗阻症状。

1.2.2 术前准备: (1)进行心电图、胸部透视、肝肾功能、血常规、凝血试验等常规检查,了解患者的一般状态及是否存在其他合并症。(2)肠道准备,术前3 d予少渣饮食,术前1 d,口服肠道消炎药,并给予开塞露灌肠,排空狭窄环近侧粪便,术晨给予清洁灌肠,至粪便排出干净为止。

1.2.3 挂线方法: 采取腰麻或局麻,麻醉满意后,患者侧卧位,碘伏常规消毒肛周皮肤,铺无菌巾单,碘伏消毒肛管及直肠下段。充分扩肛后,以肛门拉钩牵开肛门,充分暴露狭窄环,对于中重度直肠狭窄,先以食指扩张该环,或以电刀切开至食指能够通过,再根据狭窄的高度选择适宜的器械和方法。(1)弯钳挂线:狭窄高度距肛缘3-4.5 cm者,以7号丝线一端系橡皮筋,另一端缠于术者食指上。术者该食指扪及狭窄环近端,了解狭窄部位。另一手以小弯钳或蚊式血管钳经狭窄环远侧端下方沿直肠纵轴穿越,在带线食指的引导下,从近侧端基底部穿出,钳夹食指上的丝线,牵引橡皮筋从弯钳通道内双股拉出,向狭窄环挂紧橡皮筋,止血钳于基底部钳夹橡皮筋,钳下7号丝线双重结扎,于结扎根部0.5 cm处剪除多余橡皮筋,留单根丝线于肛外观察。狭窄位置较低者,橡皮筋可在直视下直接送入钳尖之间者,可不用丝线协助。(2)探针挂线:狭窄高度距肛缘4.5-6 cm者,如血管钳穿刺困难,可用尖头探针系以丝线再系橡皮筋,探针穿刺走行同弯钳,沿垂直于狭窄环的方向穿出后,直肠内术者食指勾住探针,并向外弯曲,钳夹或拉出,引

出橡皮筋,然后紧线。(3)锁穿针挂线:用于管状狭窄或狭窄高度距肛缘6 cm以上的环状、半环状狭窄。对于一些直肠癌术后吻合口狭窄者,因狭窄位置较高,狭窄区域与周围组织粘连较著,瘢痕化明显,弯钳难以穿越狭窄区域,而且手指不便于灵活操作,就可选锁穿针在术者食指的引导下,沿垂直于狭窄环的方向锐性穿透该环,注意勿穿破医者手指,撤出针心,以导丝穿入针体,从狭窄环上方穿出后,先退出针体,再以食指勾出导丝,系以橡皮筋,牵拉导丝引橡皮筋穿过狭窄部位,同前紧线。

总之,挂线方式的选择,需依据狭窄的形态、程度选择挂线部位,决定是采取单处挂线还是多处挂线或者切开挂线。如环状狭窄,可分别于截石位3、7、11点三处挂线;管状狭窄可以部分切开狭窄环再挂线。同时,还要考虑术者手指的长度,选择挂线治疗的方法,具体情况具体分析。

1.2.4 术后处置: 常规抗炎治疗,大便后每日温水坐浴。第4天起医者以食指扩肛,逐后酌情使用两指扩肛,以食指纳入无明显不适感为度。术后一周若挂线未脱落应作紧线处理,通常在1-2 wk内橡皮筋脱落后再用肛镜扩肛1 wk,每日1-2次。扩肛要进行至狭窄完全解除,以防止伤口愈合后收缩。

1.2.5 疗效评价标准: 参考《中医病证诊疗标准与方剂选用》^[1]制定:痊愈:排便通畅,无肛门疼痛,直肠指诊食指能顺利通过;有效:排便较术前通畅,排便时肛门轻度疼痛,食指通过较术前顺利;无效:排便无好转,不通畅,指诊与术前无变化。

统计学处理 应用SAS8.2进行统计学处理,计量资料用mean±SD表示,治疗前后排便情况采用t检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况 本组12例患者均有肛直肠手术史,其中痔切除术后2例,消痔灵注射术后5例,直肠癌低位前切除术后5例,均为医源性损伤。主要症状:11例患者主诉排便困难,需开塞露协助排便;1例主诉大便频数,里急后重;腹胀者4例;肛门坠胀2例。从狭窄形态看,1例镰状狭窄,余11例均为环状狭窄。从分度论,轻度狭窄4例,中度狭窄5例,重度狭窄3例。从狭窄高度而言,本组12例狭窄高度范围距肛缘3-7 cm。

2.2 疗效观察 本组12例患者,痊愈9例,有效3例,

■研究前沿

随着研究的不断深入,直肠狭窄的诊断、预防等方面已经形成诸多共识,但是是一些有关本病的治疗方案仍有争议。

■应用要点

本文根据狭窄环的高度选择了三种挂线法,分别是应用弯钳、探针、锁穿针挂线,特别是第三种以锁穿针辅助挂线十分巧妙新颖,给同行以启示,有一定的代表性,对临床实践有一定的借鉴意义。

■名词解释

挂线疗法: 原为肛瘻治法。《古今医统》云: “……指用芫根煮线, 挂破大肠, 药线日下, 肠肌日长”。是用药线(或普通丝线)或橡皮筋等挂断肛门瘻管的方法。其原理是利用线的张力, 促使局部气血阻断, 肌肉坏死, 以达到切开瘻管的目的。

表 1 治疗前后排便情况对比观察

	排便平均时间(min/次) ^a	排便平均频次(d/次) ^b
治疗前	21.7 ± 9.1	3.8 ± 1.2
治疗后	10.1 ± 3.4	1.4 ± 0.5

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 治疗前。

无效0例, 总有效率100%。疗程7-33 d, 平均21 d。一般术后7-14 d所挂之橡皮筋脱落, 未脱落者予以再次紧线。本组病例中, 一次紧线者8例, 需要二次乃至多次紧线者4例。

2.3 排便情况 治疗前后排便情况对比观察见表1, 所有患者术后排便均较术前通畅, 排便时间明显缩短($P < 0.05$)。其中有4例伴有腹痛腹胀患者, 术后腹痛腹胀症状消失。所有患者治疗期间未出现大出血等严重并发症。

2.4 狭窄口径 治疗前后狭窄口径通过指节的变化情况见表2, 术前轻中度狭窄的9例患者术后直肠指诊均可顺利通过1-2指, 余3例重度狭窄患者指诊亦可通过食指末端指节, 且疼痛不甚, 挂线断端无异常出血、糜烂。术后随访1 mo-4年, 无狭窄发生。

3 讨论

众所周知, 直肠狭窄有良恶性之别, 中医挂线主要针对直肠良性狭窄。本组12例直肠狭窄患者, 均有肛直肠手术病史。其中痔手术引起的狭窄主要是结扎了过多的直肠下段黏膜, 创面瘢痕挛缩而致。消痔灵注射引起的狭窄, 往往是技术操作不当所致, 如无菌操作不严格, 注射部位过深过于集中、或范围过广、注药量过多、浓度过高等, 导致直肠壁肌层坏死、内纤维组织增生、肥厚、失去弹性, 管腔狭小^[3-4]。而对于直肠癌术后的吻合口狭窄, 则主要是由于吻合口缺血、吻合口处夹杂过多的脂肪组织、吻合口瘘二期愈合、吻合口处钛钉脱落不全或感染等^[5-9], 此时宜排除吻合口复发的情况。对于直肠狭窄的治疗, 临床报道有扩肛(食指、扩肛器^[6]、球囊^[10])、狭窄环切开、内镜下激光^[11]或电烙切除狭窄环、经肛门吻合器环切狭窄环^[12-14], 以及皮质类固醇注射^[15]等。但是, 单纯扩肛, 适应范围窄, 作用有限, 且疗程过长。狭窄环切开, 患者要面临出血的危险, 电刀虽可减少出血, 但对于一些基层医院, 甚至未必具备, 况且对于位置较高的直肠狭窄, 难以暴露狭窄部位, 手术操作困难。术后创面新鲜, 亦容易重新粘连形成狭窄环或感染。激

表 2 治疗前后狭窄口径变化情况

狭窄口径	术前病例数(n)	术后病例数(n)
可顺利通过1-2指	0	9
食指末节可通过	4	3
食指末节通过较困难, 伴疼痛	5	0
食指指尖亦难通过, 疼痛甚	3	0

光或电烙切除狭窄环临床可操作性差。经肛门吻合器环切狭窄环, 费用较高, 手术风险较大。注射激素类应用范围较窄, 疗效有限。我们采用单纯挂线法使狭窄环缓慢切开, 避免了直接切开造成的出血, 患者基本无痛苦, 可于出院后紧线, 缩短了住院时间, 实施方便, 无论从患者的心理上还是经济上都比较容易接受, 疗效上也得到肯定, 值得临床推广应用。

挂线是中国医药学宝库的珍贵遗产, 早在汉朝长沙马王堆出土文物已有记载, 最早是用于肛瘻的治疗。中医挂线治疗肛瘻主要是通过线(橡皮筋)的缓慢勒割作用, 压迫肌肉, 引起缺血坏死而缓慢分离, 断端肌肉由于线的异物刺激作用, 与周围产生粘连固定, 离断时不会导致断端肌肉快速回缩而形成肛门失禁。我们采用挂线治疗直肠狭窄, 取其以线代刀, 缓慢切开瘢痕组织, 达到松解狭窄环的目的, 可有效防止直接切开导致出血的并发症。在缓慢切分开离过程中, 黏膜不断向切开端生长, 防止断端组织粘连, 从而达到扩大肠腔、消除狭窄梗阻症状的目的。特别是对于狭窄环位置较高的病例, 在直肠内直接切开手术暴露非常困难, 挂线就更加显示了其优越性。

挂线治疗过程中及术后注意事项: (1)依据狭窄程度选择是否多处挂线, 手术时挂线可挂1-3处, 保证充分切断狭窄环: 对轻度狭窄者只在狭窄最明显处作单根挂线, 对中度狭窄则在截石位3、9点作双根挂线, 对重度狭窄需在3、7、11点处挂线三根。当然, 在实际临床操作中, 还应根据狭窄的形态、部位与程度进行选择, 不必拘泥于右前、右后及左中。(2)一般直肠前壁不予挂线, 因女性可能损伤阴道后壁, 男性可能损伤前列腺、精囊腺或尿道。(3)术后早期扩肛, 并尽早恢复饮食, 促进胃肠功能的恢复, 恢复排便对狭窄处的机械性扩张作用, 对于提高挂线疗效, 防止狭窄复发均具有积极意义。

4 参考文献

- 戴慎, 薛建国, 岳沛平. 中医病证诊疗标准与方剂选用.

- 北京: 人民卫生出版社, 2001: 790-793
- 2 李雨农. 中华肛肠病学. 第1版. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1990: 452-457
- 3 吴冰. 挂线治疗肛管直肠狭窄8例. 安徽中医学院学报 1993; 12: 29
- 4 陈凯, 王素贞, 裴锡玉. 医源性肛管直肠狭窄19例分析. 实用外科杂志 1990; 10: 604
- 5 叶一泉, 贾平, 肖坚, 黄崇民. 吻合器与直肠吻合口狭窄. 大肠肛门病外科杂志 1997; 3: 30-31
- 6 陈贤贵, 李德川, 陈万源. 直肠癌保肛手术吻合口狭窄的预防和治疗. 大肠肛门病外科杂志 1997; 3: 22-24
- 7 任东林, 罗湛滨, 范小华. 直肠癌超低位双吻合器吻合口狭窄原因分析及预防. 外科理论与实践 1998; 3: 153-155
- 8 王夫景, 杨茂鹏, 于洪亮, 杨维良. 低位直肠癌Dixon术后吻合口狭窄的原因. 中国普通外科杂志 2007; 16: 370-372
- 9 郁宝铭, 李东华, 郑民华, 王灏. 双吻合器低位前切除术治疗低位直肠癌. 现代手术学杂志 1997; 2: 79-81
- 10 Kan H, Furukawa K, Suzuki H, Tsuruta H, Matsumoto S, Akiya Y, Teranishi N, Sasaki J, Tajiri T. An improvement in the quality of life after performing endoscopic balloon dilation for postoperative anastomotic stricture of the rectum. *J Nippon Med Sch* 2007; 74: 418-423
- 11 Kato K, Saito T, Matsuda M, Imai M, Kasai S, Mito M. Successful treatment of a rectal anastomotic stenosis by transanal endoscopic microsurgery (TEM) using the contact Nd:YAG laser. *Surg Endosc* 1997; 11: 485-487
- 12 Pabst M, Giger U, Senn M, Gauer JM, Boldog B, Schweizer W. Transanal treatment of strictured rectal anastomosis with a circular stapler device: simple and safe. *Dig Surg* 2007; 24: 12-14
- 13 Shimada S, Matsuda M, Uno K, Matsuzaki H, Murakami S, Ogawa M. A new device for the treatment of coloproctostomic stricture after double stapling anastomoses. *Ann Surg* 1996; 224: 603-608
- 14 Schlegel RD, Dehni N, Parc R, Caplin S, Tiet E. Results of reoperations in colorectal anastomotic strictures. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 1464-1468
- 15 Lucha PA Jr, Fticasar JE, Francis MJ. The strictured anastomosis: successful treatment by corticosteroid injections--report of three cases and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 862-865

■同行评价

本文就医源性损伤造成直肠狭窄这一难题进行探讨, 具有较广泛的应用价值。

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-12-08)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

曹洁 副教授

中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

曹志成 院士

香港伊丽莎白伯医院临床肿瘤部、肿瘤科研部

陈国凤 主任医师

中国人民解放军第302医院感染七科

戴朝六 教授

中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

樊晓明 主任医师

复旦大学附属金山医院消化科

范建高 教授

上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所

房林 副教授

同济大学附属上海市第十人民医院普外科

高泽立 副教授

上海交通大学医学院附属第三人民医院感染科

郭晓钟 教授

中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

李淑德 主任医师

中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

刘海林 主任医师

上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘绍能 主任医师

中国中医科学院广安门医院消化科

任建林 教授

厦门大学附属中山医院消化内科

沈柏用 副教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院院长办

谭群友 副教授

中国人民解放军第三军医大学大坪医院全军胸外科中心

王春友 教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心

吴君 主任医师

贵阳医学院附属医院感染科

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

许玲 副教授

中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

宣世英 教授

山东省青岛市市立医院肝病内科

张小晋 主任医师

北京积水潭医院消化内科

张晓岚 教授

河北医科大学第二医院消化内科

张筱茵 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科