

血管生成拟态与肿瘤微循环

曾楷峰, 施瑞华

曾楷峰, 施瑞华, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029
施瑞华, 教授, 主任医师, 主要从事上消化道肿瘤的基础与临床研究.
作者贡献分布: 本文由曾楷峰综述; 施瑞华审校.
通讯作者: 施瑞华, 教授, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化内科, ruihuashi@126.com
电话: 025-83674636
收稿日期: 2009-05-21 修回日期: 2009-07-07
接受日期: 2009-07-13 在线出版日期: 2009-07-18

Vasculogenic mimicry and microcirculation in tumors

Kai-Feng Zeng, Rui-Hua Shi

Kai-Feng Zeng, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Professor Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com
Received: 2009-05-21 Revised: 2009-07-07
Accepted: 2009-07-13 Published online: 2009-07-18

Abstract

Vasculogenic mimicry (VM), a term that describes a novel form of angiogenesis-independent microcirculation pattern recently found in few highly aggressive tumors, is formed by tumor cells, rather than endothelial cells. VM is closely correlated with the invasiveness, metastasis and prognosis of related tumors. The presence of VM is associated with an embryonic like phenotype acquired by tumor cells and the biological effects of many proteins. Furthermore, tumor microenvironment also plays an important role in the development of VM. Here, we will review the advances in research on the characteristic, formative mechanisms and clinical significance of VM.

Key Words: Vasculogenic mimicry; Angiogenesis; Tumor; Microcirculation

Zeng KF, Shi RH. Vasculogenic mimicry and microcirculation in tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2015-2020

摘要

血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是

近几年在少数高度恶性肿瘤中发现的一种独立于血管生成的全新肿瘤内微循环模式,即由恶性肿瘤细胞而非血管内皮细胞围成、细胞外基质界限的血管样结构. VM与肿瘤侵袭、转移及患者预后密切相关,其发生和肿瘤细胞呈现多潜能胚胎样表型及多种蛋白分子的生物学效应有关,肿瘤局部微环境也起着重要作用. 现就VM的特点、发生机制及临床意义等研究进展作一综述.

关键词: 血管生成拟态; 血管生成; 肿瘤; 微循环

曾楷峰, 施瑞华. 血管生成拟态与肿瘤微循环. *世界华人消化杂志* 2009; 17(20): 2015-2020
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2015.asp>

0 引言

肿瘤的生长和转移与新生血管形成密切相关. 既往观点认为内皮细胞依赖性血管是肿瘤循环的唯一形式. Maniotis *et al*^[1]发现在高侵袭性黑色素瘤中,存在一种高碘酸-希夫(periodic acid-schiff, PAS)染色阳性, CD34阴性的管网状结构. Maniotis *et al*将其称为血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM),并推测其参与了肿瘤的微循环. 随后在卵巢癌、炎性乳腺癌、前列腺癌、骨肉瘤、肝细胞癌、胆囊癌、恶性食管间质瘤及肺癌等一些恶性肿瘤中证实了血管生成拟态的存在^[2-9]. 近期,有学者发现急性白血病患者的骨髓间质细胞在体外Matrigel基质胶上培养时亦能形成VM^[10]. VM的发现和提出,改变了人们对肿瘤微循环的观点,是对肿瘤微循环理论的必要补充,也为抗肿瘤治疗带来新的思路,引起研究者的极大兴趣.

1 VM的结构和特点

VM常位于肿瘤内部,是由肿瘤细胞通过自身变形围成,没有血管内皮细胞参与的、由细胞外基质界定的微循环管道. 这些结构可以是实芯也可以是中空. VM管壁PAS染色阳性,而CD34等内皮细胞标志物染色阴性,进一步提示VM中不含内皮细胞^[1]. Shirakawa *et al*^[11]对

■背景资料

血管生成拟态(VM)是Maniotis教授最早在恶性黑色素瘤中发现的一种独立于传统肿瘤血管生成的全新的肿瘤内微循环模式. 他的形成涉及多方面的机制,并与肿瘤的侵袭、转移以及患者的不良预后密切相关,是近年来肿瘤研究领域的热点. 血管生成拟态的提出为肿瘤临床治疗提供了新的思路 and 方向,有望成为肿瘤分子靶向治疗的新靶点.

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院

■研究前沿

目前,关于血管生成拟态的研究主要涉及其发生的分子机制及其作为靶点的肿瘤治疗的研究等方面.近来,不断有新的关于血管生成拟态的调节因子被报道,但其发生机制仍未能完全明确.许多问题有待进一步解决,例如形成血管生成拟态的肿瘤细胞与其他肿瘤细胞有何区别,其与肿瘤干细胞又有何联系?而针对血管生成拟态的治疗目前仍处于实验探索阶段,需寻找最佳的分子靶点以有效拮抗其形成,抗VM治疗与抗血管生成的联合治疗也将是研究的方向之一.

炎性乳腺癌血管和VM的血液动力学研究证实VM和肿瘤微血管相通,其内有血液流动供应细胞生长. Folberg *et al*^[12]也发现黑色素瘤中的PAS阳性VM结构直接与脉络膜血管层中的涡静脉或进入肿瘤的微血管相连接. 随后, Frenkel *et al*^[13]应用共聚焦激光扫描血管造影技术对脉络膜黑色素瘤患者的研究证实, VM不属于内皮细胞形成的脉管系统的一部分,而且血液能在VM结构中循环而不是蓄积下来. 这些都提示VM参与了肿瘤的微循环,这也解释了在恶性黑色素瘤中心普遍没有坏死现象的原因. 但在肿瘤中VM与血管是如何共存的? Zhang *et al*^[14]通过对不同阶段的小鼠黑色素瘤移植瘤的观察,提出肿瘤血供的“三阶段现象”. 即肿瘤早期血供主要来自VM,随着体积的增大,内皮细胞增殖,在VM和内皮细胞依赖性血管之间出现马赛克血管(由肿瘤细胞与内皮细胞共同参与构成),之后内皮细胞依赖性血管逐渐取代前两者成为肿瘤血供的主要方式. 马赛克血管可能是VM和内皮细胞依赖性血管的中间阶段.

2 VM形成的调节机制

2.1 肿瘤细胞的去分化 Seftor *et al*^[15]研究发现,黑色素瘤MUM-2细胞分化成2个克隆MUM-2B和MUM-2C. MUM-2B侵袭性高,可形成VM,而MUM-2C侵袭性低,不能形成VM;两者有210个基因表达不同, MUM-2B分子标志与多能胚胎样基因型相似. 基因表达微阵列分析^[16]显示侵袭性肿瘤细胞同时表达多种基因,包括上皮细胞、肾、神经、肌肉、内皮细胞、成纤维干细胞、周细胞表型特异基因. 同时发现,黑色素瘤细胞特异的分化标记表达显著下调. 提示高侵袭性葡萄膜黑色素瘤呈现多潜能胚胎干细胞的表型. Fujimoto *et al*^[17]将膀胱癌ECV304细胞培养于I型胶原凝胶,发现其能形成管网状结构,并表达数个内皮相关标记因子,表明ECV304细胞具有内皮细胞性特征,使其能模拟并与内皮细胞协作促进肿瘤微循环的形成. 这些结果充分证实了高度恶性肿瘤细胞的可塑性,能去分化逆转多潜能胚胎干细胞表型.

2.2 磷脂酰肌醇-3-激酶和基质金属蛋白酶及层粘连蛋白 磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)信号通路在细胞的增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等方面起重要调节作用,而且与肿瘤细胞的迁移、黏附、肿瘤血管生成以及细胞外基质的降解等相关^[18]. Hess *et al*^[19]

在黑色素瘤研究中,证实磷脂酰肌醇-3-激酶特异性影响膜型-基质金属蛋白酶1(membrane type 1-matrix metalloproteinase, MT1-MMP)和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)活性,在VM形成中起关键作用. 活化的PI3K能激活MT1-MMP的活性; MT1-MMP在金属蛋白酶组织抑制因子-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)协同下激活MMP-2. 激活后的MT1-MMP和MMP-2促进层粘连蛋白(laminin, LN)5 γ 2链裂解为 γ 2'和 γ 2x片段,沉积于肿瘤外环境中,促使肿瘤VM形成. 应用PI3K特异性抑制剂后, MMP-2和MT1-MMP活性下降,进而阻滞LN-5 γ 2链的裂解,导致 γ 2'和 γ 2x片段水平降低,最终延缓黑色素瘤VM的形成. Hendrix *et al*^[16]亦发现,在高侵袭性黑色素瘤细胞中LN-5 γ 2链及MMPs在VM网状结构染色区高表达,应用LN-5 γ 2链反义寡核苷酸、MMP-2或MT1-MMP抗体可抑制VM发生.

2.3 血管上皮钙黏附素与上皮细胞激酶及黏附斑激酶 有研究^[16]认为,血管上皮钙黏附素(VE-cadherin)能在相邻黑色素瘤细胞间同型结合,使上皮细胞激酶(EphA2)局限于细胞膜上,与相邻细胞上的相应膜配体ephrin-A1相结合并发生磷酸化,同时黏附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)在细胞膜上跟EphA2以及可能的整合素相互作用,引起FAK磷酸化和活化,共同促进了VM形成. 另一项研究^[20]发现,黑色素瘤FAK第397和576位酪氨酸残基磷酸化可促进高侵袭性黑色素瘤形成VM;如果黑色素瘤细胞表达FAK相关非激酶蛋白,可阻断细胞外信号调节激酶介导的信号转导通路,从而抑制侵袭表型,使肿瘤细胞侵袭、转移和形成VM的能力降低. Hess *et al*^[21]经体外实验证实,在高侵袭性黑色素瘤细胞中,敲除VE-cadherin或EphA2的表达影响EphA2磷酸化及其信号转导通路下游区,并导致细胞不能形成血管样结构. Margaryan *et al*^[22]的研究也证实了EphA2可明显促进黑色素瘤VM形成. 说明VE-cadherin及EphA2可能在VM形成中起关键作用.

2.4 蛋白酪氨酸激酶与上皮细胞激酶 Hess *et al*^[23]经体外免疫荧光技术研究发现,蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinases, PTKs)表达在高侵袭性黑色素瘤中明显升高,其活性在VM局部有所增加. 而且PTKs的受体EphA2可在高侵袭性黑色素瘤细胞中特异性地表达,参与了血管样通道的形成,抑制PTKs活性或者敲除EphA2

基因可明显抑制VM产生. 提示PTKs引起的信号转导蛋白磷酸化对VM形成也很重要.

2.5 环氧化酶-2 环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)作为前列腺素E2的限速酶, 在多种上皮肿瘤中高表达, 通过多种信号通路参与癌症发生发展^[24]. Basu *et al*^[25]发现COX-2过表达的侵袭性乳腺癌细胞在三维Matrigel培养基培养时能形成VM结构, 而表达低水平COX-2的低侵袭性细胞株并不能形成这种管腔. 当使用塞来考昔或COX-2 siRNA处理肿瘤细胞后, 其管腔结构受到明显抑制. 可见COX-2参与了VM形成的调节.

2.6 组织因子途径抑制物 Ruf *et al*^[26]将低度侵袭性黑色素瘤细胞培养在含有重组组织因子途径抑制物-2(tissue factor pathway inhibitor-2, TFPI-2)的三维基质中, 能够产生一些血管样通道. 阻滞TFPI-2可抑制MMP-2的活性, 提示TFPI-2可能是侵袭性黑色素瘤形成VM的一个必要通路. 肿瘤细胞表达的TFPI-1可阻断TF相关的凝血通路, 发挥抗凝作用, 有利于血液在PAS阳性管道中流动. 这些结果说明肿瘤细胞不仅具有内皮细胞形态, 而且具有内皮细胞抗凝血功能, 以维持VM管道的血流灌注.

2.7 肿瘤局部微环境 缺氧可以促进少数恶性肿瘤VM的形成. Hendrix *et al*^[27]在黑色素瘤裸鼠移植瘤模型中发现, 缺氧环境使高侵袭性黑色素瘤细胞恶性细胞基因表型转化多能胚胎样干细胞, 选择性地表达某些血管内皮细胞基因, 使其能够参与VM形成. Yao *et al*^[28]研究发现, 缺氧是卵巢上皮癌细胞形成VM的重要诱导因素, 西罗莫司可通过抑制缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)表达阻断VM形成. Sun *et al*^[29]也发现黑色素瘤细胞在缺氧微环境中缺氧诱导因子HIF-1 α 表达增加, 并诱导VM管道形成以获得足够的供氧.

有学者^[30]将不能形成VM的低侵袭性黑色素瘤细胞置于曾经培养过高侵袭性黑色素瘤细胞的基质中进行三维培养, 发现低侵袭性细胞的基因表达发生了显著变化, 并产生了VM. 当去除这种基质后, 低侵袭性细胞则失去形成VM的能力. Folberg *et al*^[31]认为高侵袭性黑色素瘤能产生VM增殖所需的细胞外基质微环境: Laminin、IV型胶原、VI型胶原和纤维结合蛋白. 因此高侵袭性黑色素瘤细胞处理过的细胞外基质微环境能诱导VM的产生. 这说明肿瘤细胞外基质重塑也参与VM的形成.

2.8 其他 VM形成的具体机制目前尚不完全清

楚, 除以上调节机制外, 研究者们近来又相继报道了多种与VM相关的调节因子. 有研究^[32]认为, 迁移诱导蛋白-7(migration-inducing protein 7, Mig-7)在促进肿瘤细胞双向分化模拟内皮细胞特征表型过程中起重要作用. Petty *et al*^[33]在三维培养中发现, Mig-7的表达能引起肿瘤细胞侵袭和VM的发生, 且Mig-7只在存在VM的高侵袭性黑色素瘤细胞表达. 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能强有力的诱导内皮细胞增生和管状形成, 是诱导血管生长的强效因子^[34]. 近来研究发现其与VM形成亦存在一定相关性. Mei *et al*^[35]用特异性siRNA抑制VEGF的表达, 证实VEGF水平的降低与骨肉瘤细胞株MG63的VM减少相关. Wang *et al*^[36]在卵巢癌的研究中也发现, VEGF-a(即VEGF)在VM形成中起重要作用, 并推测VEGF-a \rightarrow EphA2 \rightarrow MMPs \rightarrow VM是VM形成的主要途径. Mourad-Zeidan *et al*^[37]使用RNA干扰沉默黑色素瘤细胞半乳糖凝集素-3(Galectin-3, Gal-3)表达后, VE-cadherin蛋白表达显著降低, 并使肿瘤细胞侵袭性及VM形成能力受到显著抑制. 提示Gal-3在VM形成过程中起重要作用. Su *et al*^[38]通过RNA干扰实验证实, 沉默DNA结合抑制因子2(inhibitor of DNA binding 2, Id2)能相应下调VE-cadherin的表达, 同时使恶性黑色素瘤细胞不能形成VM. 推测Id2通过其靶分子VE-cadherin在VM形成中起重要调节作用. Le Mercier *et al*^[39]发现使用siRNA技术下调神经胶质瘤细胞(brain-expressed X-linked gene 2, BEX2)基因能明显抑制VM的形成, 并削弱肿瘤细胞的侵袭性. 推测BEX2可能也参与了VM的形成.

3 VM的临床意义

3.1 VM与肿瘤预后 VM的存在使得肿瘤组织血供丰富, 肿瘤细胞直接构成管壁, 无内皮细胞衬附. 由于缺乏内皮细胞衬附, VM管壁上的肿瘤细胞更容易脱落入其管道中, 进入血管随宿主血循环向远处转移^[40]. Shirakawa *et al*^[41]发现存在VM的病例较无VM者具有更高的血源性转移率和更低的5年存活率. 推测VM的存在与肿瘤预后成反比. Guzman *et al*^[42]证实原发性肝细胞癌患者中VM的存在与原位肝移植后肿瘤的复发相关. Sun *et al*^[43-44]发现存在VM的原发性肝细胞癌患者生存期显著低于无VM组. 而在胃肠道间质瘤的研究中也证实VM阳性肿瘤患者易于发生肝转移, 推测VM的存在是肿瘤预后不良的

■ 相关报道

随着分子生物学及其他基础科学的发展, 近年来关于血管生成拟态的新的调节因子不断被报道, 为以血管生成拟态为靶标的肿瘤治疗研究提供了广阔前景. Su *et al*研究发现DNA结合抑制因子2(Id2)能相应下调VE-cadherin的表达, 进而抑制VM形成, 提示Id2通过其靶分子VE-cadherin在VM形成中起重要调节作用, 为抗VM治疗提供了新的思路.

■创新盘点

本文综述了国内外相关文献,对血管生成拟态的结构特点、发生机制、与肿瘤预后关系及以其为靶点的肿瘤治疗策略等多个方面作了全面、系统地总结,并介绍了近期报道的多种新的血管生成拟态调节因子。

独立预测因素. 这些研究都说明VM不仅是侵袭性肿瘤获取血供的一种方式,而且与恶性肿瘤转移和不良预后密切相关.

3.2 VM与肿瘤治疗 传统的抗肿瘤血管新生治疗主要针对血管内皮细胞,而对恶性肿瘤自身能够形成VM结构未加以考虑,所以对某些肿瘤疗效不佳. van der Schaft *et al*^[45]发现Anginex, TNP-470和内皮抑素(endostatin)3种作用于内皮细胞的血管生成抑制因子对黑色素瘤细胞VM相对无影响. VM在肿瘤中的发现,是对传统的抗肿瘤血管新生治疗的挑战和补充,迫使我们重新思考针对血管形成的治疗方法. 拮抗某些肿瘤细胞黏附分子表达或抑制肿瘤侵袭相关蛋白酶合成及细胞外基质合成与分泌的分子靶向治疗,能有效抑制VM以阻断血液供应,可用于治疗高侵袭性、高血道转移性肿瘤. 且分子靶向治疗具有对正常细胞影响较小、毒性轻微、安全性优于细胞毒性化疗药物等优点^[46]. 所以,以VM作为肿瘤分子靶向治疗靶点具有良好的应用前景. 目前针对VM的治疗仍处于探索阶段. Hess *et al*提出应用PI3K特异性抑制剂能有效延缓黑素瘤VM的形成^[19,23]. 抑制蛋白酪氨酸激酶活性和敲除EphA2可明显抑制VM的产生. Vartanian *et al*^[47]发现抗氧化剂能显著降低VEGF、VEGF受体和活性细胞凋亡蛋白酶(active caspase-3)蛋白水平,进一步抑制VM的形成. Zhang *et al*^[48]通过动物实验发现沙利度胺能抑制MMP-2及MMP-9表达,进而抑制VM形成. 最近一项研究发现,福斯高林(血小板凝集抑制剂)能诱导环磷腺苷(cyclic AMP)表达增多,进而通过多重信号通路抑制VM的形成^[49]. 这些发现将为肿瘤VM的靶向治疗带来新的希望. 同时,肿瘤发生发展往往存在多靶点、多环节调控过程^[50],意味着治疗针对的靶点越多越能取得满意的结果. 如何将抗VM治疗与其他分子靶向治疗相结合以及靶向治疗药物与化疗药物合理组合而达到最佳疗效^[51],也是今后肿瘤治疗研究的方向之一.

4 结论

VM的发现改变了人们对肿瘤血供的传统观念. VM分子机制的研究为恶性肿瘤临床治疗打下了理论基础,从而为阻止其进展、预防复发、抑制血行转移、提高患者的生存率及生活质量创造了重要条件. VM现象解释了抗内皮细胞治疗肿瘤疗效不佳的原因,并为开发针对肿瘤VM新的基因治疗提供了理论依据. 肿瘤VM机制的

研究初步证实了肿瘤细胞可向胚胎样多能干细胞方向转化,也将丰富胚胎学、肿瘤干细胞理论及肿瘤基础理论. 目前,关于VM的研究尚处于初步阶段,还有很多的机制和现象尚需要进一步探索,如发生VM时肿瘤细胞本身有何具体变化? VM的特异性标记物是什么? 肿瘤干细胞和组成VM的肿瘤细胞有何联系? 是否所有的低分化高侵袭性肿瘤都存在VM? 相信随着研究的不断深入,人们对VM的认识将更加客观和系统,并更好的将对VM的研究应用到肿瘤临床治疗中.

5 参考文献

- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752
- Sood AK, Seftor EA, Fletcher MS, Gardner LM, Heidger PM, Buller RE, Seftor RE, Hendrix MJ. Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *Am J Pathol* 2001; 158: 1279-1288
- Kobayashi H, Shirakawa K, Kawamoto S, Saga T, Sato N, Hiraga A, Watanabe I, Heike Y, Togashi K, Konishi J, Brechbiel MW, Wakasugi H. Rapid accumulation and internalization of radiolabeled herceptin in an inflammatory breast cancer xenograft with vasculogenic mimicry predicted by the contrast-enhanced dynamic MRI with the macromolecular contrast agent G6-(1B4M-Gd)(256). *Cancer Res* 2002; 62: 860-866
- Sharma N, Seftor RE, Seftor EA, Gruman LM, Heidger PM Jr, Cohen MB, Lubaroff DM, Hendrix MJ. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *Prostate* 2002; 50: 189-201
- Cai XS, Jia YW, Mei J, Tang RY. Tumor blood vessels formation in osteosarcoma: vasculogenesis mimicry. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 94-98
- Zhao XL, Du J, Zhang SW, Liu YX, Wang X, Sun BC. [A study on vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 41-44
- 范跃祖, 孙伟, 张文忠, 葛春艳. 原发性胆囊癌患者肿瘤血管生成拟态及其临床意义. *中华医学杂志* 2007; 87: 145-149
- Zhao H, Gu XM. Study on vasculogenic mimicry in malignant esophageal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2430-2433
- 韩义明, 王静, 王国平, 敖启林. 肺癌组织中血管生成拟态和HIF-1 α 的表达及意义. *临床与实验病理学杂志* 2008; 24: 269-272
- Mirshahi P, Rafii A, Vincent L, Berthaut A, Varin R, Kalantar G, Marzac C, Calandini OA, Marie JP, Soria C, Soria J, Mirshahi M. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia* 2009; 23: 1039-1048
- Shirakawa K, Kobayashi H, Heike Y, Kawamoto S, Brechbiel MW, Kasumi F, Iwanaga T, Konishi F, Terada M, Wakasugi H. Hemodynamics in vasculogenic mimicry and angiogenesis of

- inflammatory breast cancer xenograft. *Cancer Res* 2002; 62: 560-566
- 12 Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361-381
- 13 Frenkel S, Barzel I, Levy J, Lin AY, Bartsch DU, Majumdar D, Folberg R, Pe'er J. Demonstrating circulation in vasculogenic mimicry patterns of uveal melanoma by confocal indocyanine green angiography. *Eye* 2008; 22: 948-952
- 14 Zhang S, Guo H, Zhang D, Zhang W, Zhao X, Ren Z, Sun B. Microcirculation patterns in different stages of melanoma growth. *Oncol Rep* 2006; 15: 15-20
- 15 Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Pe'er J, Maniotis AJ, Trent JM, Folberg R, Hendrix MJ. Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 233-246
- 16 Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene* 2003; 22: 3070-3075
- 17 Fujimoto A, Onodera H, Mori A, Nagayama S, Yonenaga Y, Tachibana T. Tumour plasticity and extravascular circulation in ECV304 human bladder carcinoma cells. *Anticancer Res* 2006; 26: 59-69
- 18 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt信号通路与肿瘤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 306-311
- 19 Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2003; 63: 4757-4762
- 20 Hess AR, Hendrix MJ. Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype. *Cell Cycle* 2006; 5: 478-480
- 21 Hess AR, Seftor EA, Gruman LM, Kinch MS, Seftor RE, Hendrix MJ. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 228-233
- 22 Margaryan NV, Strizzi L, Abbott DE, Seftor EA, Rao MS, Hendrix MJ, Hess AR. EphA2 as a promoter of melanoma tumorigenicity. *Cancer Biol Ther* 2009 [Epub ahead of print]
- 23 Hess AR, Seftor EA, Gardner LM, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor RE, Kinch MS, Hendrix MJ. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Res* 2001; 61: 3250-3255
- 24 Becker MR, Siegelin MD, Rompel R, Enk AH, Gaiser T. COX-2 expression in malignant melanoma: a novel prognostic marker? *Melanoma Res* 2009; 19: 8-16
- 25 Basu GD, Liang WS, Stephan DA, Wegener LT, Conley CR, Pockaj BA, Mukherjee P. A novel role for cyclooxygenase-2 in regulating vascular channel formation by human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R69
- 26 Ruf W, Seftor EA, Petrovan RJ, Weiss RM, Gruman LM, Margaryan NV, Seftor RE, Miyagi Y, Hendrix MJ. Differential role of tissue factor pathway inhibitors 1 and 2 in melanoma vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2003; 63: 5381-5389
- 27 Hendrix MJ, Seftor RE, Seftor EA, Gruman LM, Lee LM, Nickoloff BJ, Miele L, Sheriff DD, Schattman GC. Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the microenvironment in cell-fate determination. *Cancer Res* 2002; 62: 665-668
- 28 Yao LQ, Feng YJ, Ding JX, Xu CJ, Jin HY, Yin LH. [Primary study of vasculogenic mimicry induced by hypoxia in epithelial ovarian carcinoma] *Zhonghua Fuchanke Zazhi* 2005; 40: 662-665
- 29 Sun B, Zhang D, Zhang S, Zhang W, Guo H, Zhao X. Hypoxia influences vasculogenic mimicry channel formation and tumor invasion-related protein expression in melanoma. *Cancer Lett* 2007; 249: 188-197
- 30 Seftor EA, Meltzer PS, Kirschmann DA, Margaryan NV, Seftor RE, Hendrix MJ. The epigenetic reprogramming of poorly aggressive melanoma cells by a metastatic microenvironment. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 174-196
- 31 Folberg R, Arbieva Z, Moses J, Hayee A, Sandal T, Kadkol S, Lin AY, Valyi-Nagy K, Setty S, Leach L, Chévez-Barrios P, Larsen P, Majumdar D, Pe'er J, Maniotis AJ. Tumor cell plasticity in uveal melanoma: microenvironment directed dampening of the invasive and metastatic genotype and phenotype accompanies the generation of vasculogenic mimicry patterns. *Am J Pathol* 2006; 169: 1376-1389
- 32 Robertson GP. Mig-7 linked to vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 2007; 170: 1454-1456
- 33 Petty AP, Garman KL, Winn VD, Spidel CM, Lindsey JS. Overexpression of carcinoma and embryonic cytotrophoblast cell-specific Mig-7 induces invasion and vessel-like structure formation. *Am J Pathol* 2007; 170: 1763-1780
- 34 Tseng PL, Tai MH, Huang CC, Wang CC, Lin JW, Hung CH, Chen CH, Wang JH, Lu SN, Lee CM, Changchien CS, Hu TH. Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients. *J Surg Oncol* 2008; 98: 349-357
- 35 Mei J, Gao Y, Zhang L, Cai X, Qian Z, Huang H, Huang W. VEGF-siRNA silencing induces apoptosis, inhibits proliferation and suppresses vasculogenic mimicry in osteosarcoma in vitro. *Exp Oncol* 2008; 30: 29-34
- 36 Wang JY, Sun T, Zhao XL, Zhang SW, Zhang DF, Gu Q, Wang XH, Zhao N, Qie S, Sun BC. Functional significance of VEGF-a in human ovarian carcinoma: role in vasculogenic mimicry. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 758-766
- 37 Mourad-Zeidan AA, Melnikova VO, Wang H, Raz A, Bar-Eli M. Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 2008; 173: 1839-1852
- 38 Su F, Li B, Wang J, Xu X, Ren R, Li L, Gao F, Liu X. Molecular regulation of vasculogenic mimicry in human uveal melanoma cells: role of helix-loop-helix Id2 (inhibitor of DNA binding 2). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247: 411-419
- 39 Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, Roland I, Spiegl-Kreinecker S, Haibe-Kains B, Bontempi G, Decaestecker C, Berger W, Lefranc F, Kiss R. Galectin 1 proangiogenic and promigratory effects in the Hs683 oligodendroglioma model are partly mediated through the control of BEX2 expression. *Neoplasia* 2009; 11: 485-496
- 40 Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry.

■应用要点

血管生成拟态的发现引起人们对传统抗肿瘤血管生成治疗的反思,可能成为临床治疗高度恶性肿瘤的全新的分子靶标和方向。对血管生成拟态的深入研究也将更好地在肿瘤临床治疗中起指导作用。

■同行评价

本文就血管生成拟态的特点、发生机制及临床意义等研究进展进行了综述,属综述性文章,有关血管生成拟态与肿瘤微循环相关综述近年有较多报道,本文内容全面,可靠,有一定的可读性。

- APMIS 2004; 112: 508-525
- 41 Shirakawa K, Wakasugi H, Heike Y, Watanabe I, Yamada S, Saito K, Konishi F. Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 99: 821-828
- 42 Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, Maniotis AJ, Folberg R. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1776-1781
- 43 Sun B, Zhang S, Zhang D, Du J, Guo H, Zhao X, Zhang W, Hao X. Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2006; 16: 693-698
- 44 Sun B, Qie S, Zhang S, Sun T, Zhao X, Gao S, Ni C, Wang X, Liu Y, Zhang L. Role and mechanism of vasculogenic mimicry in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2008; 39: 444-451
- 45 van der Schaft DW, Seftor RE, Seftor EA, Hess AR, Gruman LM, Kirschmann DA, Yokoyama Y, Griffioen AW, Hendrix MJ. Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1473-1477
- 46 吴晴, 李兆申. 消化系统肿瘤的分子靶向治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3666-3672
- 47 Vartanian AA, Burova OS, Stepanova EV, Baryshnikov AY, Lichinitser MR. Melanoma vasculogenic mimicry is strongly related to reactive oxygen species level. *Melanoma Res* 2007; 17: 370-379
- 48 Zhang S, Li M, Gu Y, Liu Z, Xu S, Cui Y, Sun B. Thalidomide influences growth and vasculogenic mimicry channel formation in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 60
- 49 Lissitzky JC, Parriaux D, Ristorcelli E, Verine A, Lombardo D, Verrando P. Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells in vitro. *Cancer Res* 2009; 69: 802-809
- 50 Ellis LM, Hicklin DJ. Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6371-6375
- 51 Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J, Gores GJ. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698-711

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$; 第 3 套为 ^f $P < 0.05$, ^g $P < 0.01$ 。 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。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, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5 \text{ cm} \times 4.5 \text{ cm}$, 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 2009-07-18)

TROP2 shRNA真核表达载体转染胃癌BGC-823细胞的沉默作用

戴东方, 陈德玉, 邵世和

戴东方, 陈德玉, 邵世和, 江苏大学附属医院放疗科 江苏大学基础医学与医学技术学院病原生物学研究室 江苏省镇江市 212001

戴东方, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 戴东方与陈德玉对此文所作贡献均等; 本课题由戴东方、陈德玉及邵世和设计; 陈德玉为课题总负责人; 邵世和提供技术指导; 研究过程、数据分析及论文写作由戴东方完成。

通讯作者: 陈德玉, 副教授, 212001, 江苏省镇江市, 江苏大学附属医院放疗科。ddffwlqe@163.com

电话: 0511-85037530

收稿日期: 2009-05-11 修回日期: 2009-06-16

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Short hairpin RNA-mediated silencing of TROP2 gene in gastric cancer BGC-823 cells

Dong-Fang Dai, De-Yu Chen, Shi-He Shao

Dong-Fang Dai, De-Yu Chen, Shi-He Shao, Department of Radiation Oncology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University; Department of Microbiology, School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor De-Yu Chen, Department of Radiation Oncology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. ddffwlqe@163.com

Received: 2009-05-11 Revised: 2009-06-16

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To construct eukaryotic expression vectors of short hairpin RNA (shRNA) specific for TROP2 gene and observe its silencing effect on TROP2 gene in BGC-823 cells.

METHODS: The eukaryotic expression vectors of short hairpin RNA (shRNA) specific for TROP2 were constructed by ligating pGensil1.1 plasmid (containing human U6 shRNA promoter) to TROP2-specific shRNA target sequences. After the resulting recombinant plasmids were transfected into BGC-823 cells, the cells were screened in medium containing G418 (at a concentration of 400 mg/L) for 24 h to obtain stably transfected cell strain. These stably transfected cells were then divided into W group (untransfected), HK group (transfected with random

negative control plasmid), KB group (transfected with empty plasmid), T1 group, T2 group and T3 group. The expression of TROP2 gene in stably transfected cells was determined by real-time PCR and Western blot.

RESULTS: TROP2-specific shRNA target sequences were successfully inserted into eukaryotic expression vector pGensil1.1. The sequences of shRNAs inserted into the recombinant plasmids were identical to those expected. The expression levels of TROP2 mRNA and protein in cells transfected with recombinant plasmids were lower than those in untransfected cells or cells transfected with random negative control plasmid or empty plasmid. Compared with the T1 and T2 groups, TROP2-specific shRNA in the T3 group had the more strong inhibitory effect on the expression of TROP mRNA (8.79 ± 0.23 vs 9.54 ± 0.20 , 9.57 ± 0.23) and protein (3.66 ± 0.11 vs 6.46 ± 0.36 , 9.31 ± 0.11), and the differences were significant (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Eukaryotic expression vectors of shRNA specific for TROP2 gene are constructed successfully. The expression of TROP2 mRNA and protein is down-regulated in cells transfected with recombinant plasmids. Our study provides a new approach to the study of the function of TROP2 gene.

Key Words: Gastric cancer; RNA interference; TROP2; BGC-823 cells

Dai DF, Chen DY, Shao SH. Short hairpin RNA-mediated silencing of TROP2 gene in gastric cancer BGC-823 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2021-2025

摘要

目的: 构建TROP2特异性短发夹环RNA (shRNA)真核表达载体, 抑制人胃癌BGC-823细胞TROP2基因的表达。

方法: 构建TROP2短发夹环RNA, 产生重组质粒转染胃癌BGC-823细胞, 转染24 h后用G418

背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 5年生存率仍在30%左右, 寻找新的治疗方法已成为目前胃癌研究的重要问题。RNA干扰被广泛应用于各种肿瘤研究, 能高效、特异地阻断细胞外源或内源性靶基因的表达, 其在胃癌治疗方面的研究具有重要的现实意义。

同行评议者

王晓艳, 副教授, 湖南长沙中南大学湘雅三医院消化内科

■ 研发前沿

通过抑制TROP2基因表达以达到治疗胃癌的目的是胃癌基因治疗领域的新思路。

(浓度400 mg/L)筛选,待细胞稳定后收集,分别命名为W组(未处理组),HK组(随机阴性对照质粒组),KB组(空质粒组),T1组,T2组,T3组。并运用实时荧光定量PCR和Western blot检测TROP2的表达。

结果: TROP2特异性shRNA片段被成功克隆进pGensil1.1质粒中,重组质粒shRNA编码序列与设计片断的序列完全一致。与未转染细胞组、随机阴性对照组、空质粒组相比,转染shRNA重组质粒的人胃癌BGC-823细胞TROP2表达在mRNA和蛋白水平都受到抑制。与T1、T2组相比,T3组对TROP2 mRNA和蛋白抑制作用最明显,差异具统计学意义(8.79 ± 0.23 vs 9.54 ± 0.20 , 9.57 ± 0.23 ; 3.66 ± 0.11 vs 6.46 ± 0.36 , 9.31 ± 0.11 , 均 $P < 0.05$)。

结论: 成功构建了针对TROP2的特异性shRNA真核表达载体并抑制了TROP2的表达,为进一步研究其基因功能打下了基础。

关键词: 胃癌; RNA干扰; TROP2; BGC-823细胞系

戴东方, 陈德玉, 邵世和. TROP2 shRNA真核表达载体转染胃癌BGC-823细胞的沉默作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2021-2025

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2021.asp>

0 引言

RNA干扰是通过核酸酶将双链RNA切割成21-25 nt的干扰RNA(siRNA),按碱基配对原则特异性识别并切割同源性靶mRNA分子而实现的^[1]。TROP2在人类的角膜、胰腺、前列腺等器官中均有表达,并在正常的滋养层细胞、多层上皮细胞及上皮癌中高度表达^[2-5],他的表达和肿瘤侵袭行为有关^[6-9]。他的生理功能还不清楚,可能为一种钙信号换能器^[10-11]。目前TROP2与胃癌的关系国内尚未见文献报道。本研究拟用RNA干扰技术,构建针对TROP2基因的特异性短发夹环RNA(shRNA)真核表达载体,获得稳定转染该载体的BGC-823细胞,实现对TROP2表达的抑制,为研究TROP2基因功能以及探索基因治疗打下一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌BGC-823细胞,大肠埃希菌DH5 α 株和含绿色荧光蛋白、耐卡那霉素、抗新霉素Rneo基因及人U6启动子的质粒pGensil1.1由江苏大学基础医学与医学技术学院病原生物学实验室保存,DMEM培养基为Gibco公司产

品,新生牛血清为杭州四季青产品,pMD18T-vector和Real Time PCR扩增试剂盒购自TaKaRa公司,T4 DNA连接酶、各种限制性内切酶均为晶美公司产品,质粒提取试剂盒购自Promega公司,LipofectamineTM 2000和TRIzol购自美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒为Toyobo产品,TROP2基因RNAi寡核苷酸,TROP2基因和 β -actin基因PCR引物均由上海生物工程公司合成,鼠抗人TROP2及GAPDHAb和酶标羊抗鼠IgG为Santa Cruze公司产品。

1.2 方法

1.2.1 shRNA设计与合成: 针对TROP2基因设计3条特异性的shRNA。从GenBank中获取TROP2 mRNA的完整序列,基因序列号为NM_002353,从目标基因开放阅读框起始密码(ATG)下游75至100碱基位置开始,寻找“AA”二连序列后的19个碱基序列。设计shRNA时不针对5'和3'端的非编码区,分析获得的序列,选择GC比为40%-55%的靶基因序列作为潜在优选。使用BLAST将选定的序列和相应的人基因组数据库进行比较。pGensil1.1质粒当中在U6启动子后连接针对TROP2基因的干扰片段,反义片段以后接TTTTTT以终止转录。为了便于克隆与鉴定,shRNA 5'端和3'端分别带有Eco31 I酶切位点,终止信号后带有Sac I的酶切位点,形成CACG+Sense+Loop+Antisense+终止信号+Sac I的结构,基因的shRNA序列分别选择TROP2外显子448-466位点、1030-1048位点、1102-1120位点(表1)。同时合成目标基因序列为GACTTCATAAGGCGCATGC的随机阴性对照序列。

1.2.2 载体质粒的构建与鉴定: 将pGensil1.1质粒和合成的shRNA用足量的Eco31 I酶切消化,低熔点10 g/L琼脂糖凝胶电泳后回收大片段;将上述2个回收片段在T4连接酶作用下,22℃连接反应过夜;各取5 μ L连接产物转化DH5 α ,涂布于含Kana抗性的LB平皿上,37℃恒温过夜,从平皿中各挑选3个单克隆菌落于3 mL含Kana抗性的LB培养液中,37℃,250 r/min摇床培养过夜;用质粒纯化试剂盒提取质粒,并做Sac I酶切鉴定;挑选鉴定正确的克隆进行DNA测序分析。

1.2.3 细胞转染: 在预实验中,荧光定量PCR法检测人食管癌EC/CUHK1细胞,肝癌HepG2细胞,胃癌BGC-823细胞3株细胞系TROP2 mRNA的表达情况,发现在这3株消化系肿瘤细胞中均有表达,且以肝癌HepG2细胞表达最低,胃癌BGC-823细胞表达最高。选择胃癌BGC-823细胞

■ 相关报道

国外已有学者对TROP2在结肠癌、食管癌、乳腺癌等恶性肿瘤中的作用进行了研究,但关于其在胃癌发生发展中发挥的作用研究尚少。

表 1 针对TROP2基因设计的3对shRNA序列

| shRNA序列 | 碱基序列 |
|-------------------|--|
| pGensil1.1/TROP21 | 正义 5'-CACCGCCACCAACAAGATGACCGTTTCAA GACGACGGTCATCTTGTGGTGGTTTTTGG-3' |
| | 反义 5'-AGCTCAAAAAACCACCAACAAGATGACCG TCGTCTTGAAACGGTCATCTTGTGGTGGC-3' |
| pGensil1.1/TROP22 | 正义 5'-CACCAGGGCGAGTCTCTATTCCATTCAAG ACGTGGAATAGAGACTCGCCCTTTTTTTG-3' |
| | 反义 5'-AGCTCAAAAAAAGGGCGAGTCTCTATTCC ACGTCTTGAATGGAATAGAGACTCGCCCT-3' |
| pGensil1.1/TROP23 | 正义 5'-CACCGCACGCTCATCTATTACCTTTCAAG ACGAGGTAATAGATGAGCGTGCTTTTTTTG-3' |
| | 反义 5'-AGCTCAAAAAAGCACGCTCATCTATTACCT CGTCTTGAAGGTAATAGATGAGCGTGC-3' |

■创新亮点

本研究利用RNA干扰的方法,通过构建shRNA表达质粒下调BGC-823细胞的TROP2 mRNA和蛋白水平。

作为研究对象,收集同批未转染的胃癌BGC-823细胞作为阴性对照,同时取随机阴性对照质粒,空质粒及pGensil1.1/TROP21, pGensil1.1/TROP22及pGensil1.1/TROP23重组体分别转染对数生长期BGC-823细胞,转染方法参照Lipofectamine™ 2000转染试剂操作说明进行,转染前1 d将 2.5×10^5 个细胞接种于6孔培养板中,次日达到80%汇合,质粒与脂质体按1:4形成DNA与脂质体混合物逐滴加入并混匀,添加无血清、无抗生素DMEM培养基至总体积为2 mL,培养5 h后换DMEM完全培养液继续培养。采用盲法随机计数显微镜下10个视野的阳性细胞数与总细胞数,发绿色荧光的细胞数与总细胞数之比即为转染效率。根据预实验的结果,转染24 h后用G418(浓度400 mg/L)筛选,待细胞稳定后收集,分别命名为W组(未处理组),HK组(随机阴性对照质粒组),KB组(空质粒组),T1组, T2组, T3组。

1.2.4 Real Time PCR分析:利用Primer 5.0软件设计TROP2基因引物,由上海生物工程公司合成。上游引物序列为:5'-CCT CAT CGC CGT CAT CGT-3';下游引物序列为:5'-CGG TTC CTT TCT CAA CTC CC-3',扩增片段长度136 bp。 β -actin上游引物序列为:5'-CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC-3';下游引物序列为:5'-CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC-3',扩增片段长度262 bp。提取1 μ g总RNA逆转录后行PCR反应。将以上2种扩增片段分别与pMD-18T载体连接,筛选后得到重组标准品质粒进行酶切、PCR和测序鉴定,质粒抽提得到的TROP2和 β -actin质粒用作实时PCR标准品。采用双标准曲线法,用Stratagene Mx3000P荧光定量PCR分析仪进行PCR反应,扩增条件为:95℃ 10 s; 95℃ 5 s; 60℃ 20 s, 40个循

环。每个循环后采集荧光生成扩增曲线,并在反应后生成溶解曲线,采用Mx3000P软件进行数据分析,依据TROP2拷贝数/ β -actin拷贝数比值提示mRNA表达水平,进行统计学分析。

1.2.5 Western blot检测TROP2蛋白的表达:培养细胞蛋白质样品的制备:收集各组细胞,用细胞裂解液和蛋白保护液裂解细胞,经涡旋离心后取上清。制备SDS-PAGE凝胶,并做预电泳;每孔加样品24 μ L, Marker加10 μ L,电泳;染色和脱色,切胶,电转;封闭,加一抗孵育, TBST洗后加酶标二抗; TBST洗后,显影,定影;用GAPDH作内参验证蛋白的含量。

统计学处理 实验所得数据使用SPSS13.0统计分析软件进行方差分析,比较各组间的差异, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 酶切鉴定 完成构建的载体质粒经Sac I酶切,在插入的目的基因片段里,我们分别设计了一个Sac I的酶切位点,而质粒pGensil1.1本来就有Sac I的酶切位点,如若插入正确,质粒就能被Sac I酶切出1条约916 bp的DNA小带。经电泳分析,构建质粒均被切出1条916 bp大小的DNA带(图1),说明重组质粒即为克隆正确的质粒。

2.2 重组质粒结果分析 经酶切后,挑取鉴定正确的克隆进行测序分析,结果显示,3个重组质粒shRNA编码序列与设计的片段完全一致,说明重组质粒构建成功。

2.3 Real Time PCR检测结果 对TROP2、 β -actin质粒稀释浓度的对数和相应的拷贝数进行直线回归分析。模板的融解曲线显示为单峰,且峰值单一,说明产物特异。T1组、T2组、T3组较W组、

应用要点

本研究构建并筛选出靶向TROP2基因的shRNA重组质粒,经检测证实对TROP2基因有明显的干扰作用,为进一步观察TROP2基因在胃癌中作用的研究打下基础。

表 2 各组质粒抑制mRNA及TROP2蛋白表达的结果 (mean ± SD, n = 3)

| 分组 | mRNA | 蛋白 |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| W(未处理组) | 12.54 ± 0.35 | 9.62 ± 0.18 |
| HK(随机阴性对照质粒组) | 12.37 ± 0.12 | 9.50 ± 0.07 |
| KB(空质粒组) | 11.99 ± 0.46 | 9.65 ± 0.08 |
| T1(pGensil1.1/TROP21组) | 9.54 ± 0.20 ^a | 6.46 ± 0.36 ^a |
| T2(pGensil1.1/TROP22组) | 9.57 ± 0.23 ^a | 9.31 ± 0.11 |
| T3(pGensil1.1/TROP23组) | 8.79 ± 0.23 ^{bc} | 3.66 ± 0.11 ^{ae} |

^a*P*<0.05 vs W(未处理组); ^b*P*<0.05 vs T1和T2组; ^c*P*<0.05 vs T1组。

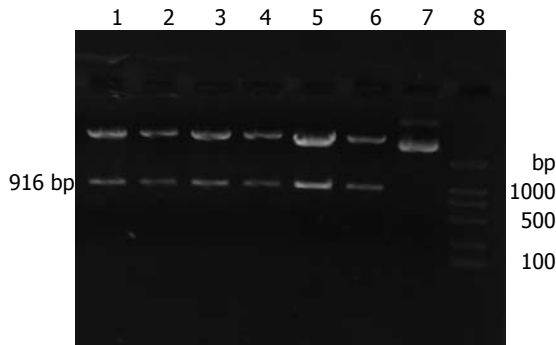


图 1 重组质粒Sac I 酶切鉴定。1-2: HK随机阴性对照质粒; 3: KB空质粒; 4: T1pGensil1.1/TROP21; 5: T2pGensil1.1/TROP22; 6-7: T3pGensil1.1/TROP23; 8: DL2000 Marker。

HK组、KB组都统计学意义(*P*<0.05),但以T3组差异最显著,T1、T2组之间无统计学意义(表2)。

2.4 Western blot检测结果 T1组、T2组和T3组与随机阴性对照组、空质粒组,对照组相比蛋白条带减弱。T1组和T3组与对照组比较有统计学意义(*P*<0.05),以T3组蛋白表达下降最明显(表2)。

2.5 最有效重组干扰质粒筛选 荧光实时定量PCR和Western blot检测显示,T3组干扰质粒对TROP2基因mRNA和蛋白表达水平抑制作用最明显。与未转染细胞对照组相比,T3组mRNA表达抑制率为29.9%,蛋白表达抑制率为62.0%,差异具统计学意义(*P*<0.05,图2)。

3 讨论

TROP2亦称为TACSTD2、MIS1、GA733-1、EGP-1,定位在1号染色体短臂D1S2890和D1S2801之间一个长约2.6 cm的区域上^[12]。他是GA733基因家族的其中一员,是无内含子的基因,所编码的产物为含有323个氨基酸、35.7 kDa的蛋白质,被认为是一种癌症相关抗原。他包含一个上皮生长因子样的重复区,一个甲状腺球蛋白样重复区,其分子羧基端含有丝氨酸和酪氨酸位点及PIP-2结合区域,其丝氨酸残端

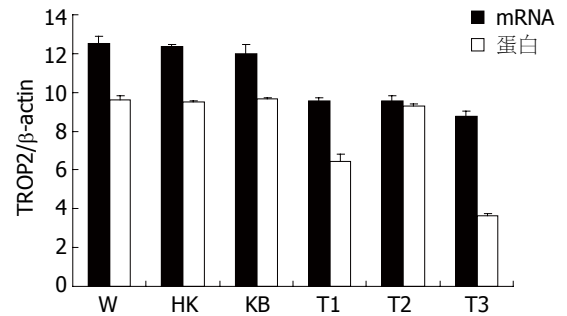


图 2 质粒转染后TROP2 mRNA和蛋白相对表达量。

为激酶C所磷酸化。早期人们发现TROP2基因突变与胶样滴状角膜营养不良(gelatinous drop-like corneal dystrophy, GDL D)有关,GDL D是一种罕见的常染色体隐性遗传病,可导致视力严重障碍甚至失明^[13-15]。2008年Wang *et al*^[16]用RNA干扰技术,向我们展示了TROP2的表达与结肠癌细胞的发生及侵袭密切相关,干扰后这两种特性均受到抑制,同时针对TROP2胞外域的抗体能降低肿瘤细胞的侵袭性。也有研究认为TROP2是独立的肠型胃癌复发预测因子,因为他分布广泛有可能成为新的治疗靶位^[17]。以上提示我们利用抑制TROP2基因表达的方法治疗结肠癌和胃癌可能具有较好的应用前景。

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发生发展是以癌基因的激活与抑癌基因的失活为基础的多步骤、多阶段过程,是遗传和环境因素相互作用的结果。因此寻找阻断癌基因激活的siRNA有可能抑制胃癌的发生。由于RNAi技术可以利用siRNA或shRNA表达载体快速、经济、简便的以序列特异方式剔除目的基因表达,所以现在已经成为探索基因功能的重要研究手段,并在肿瘤基因治疗方面显示出了广阔的应用背景^[18]。siRNA在体内的半衰期短,对基因的抑制作用较短暂^[19],而shRNA表达载体可以在体内持续产生siRNA,并且用含有hU6启动子的载体对靶基因的沉默效果

较好, 沉默时间较久^[20], 同时以9个核苷酸序列环为发夹的shRNA产生的基因干扰效果最明显^[21], 因此我们采用构建shRNA表达质粒来沉默TROP2基因. 将siRNA转入细胞是RNA干扰关键技术之一, 常规方法有: 脂质体转染、电穿孔法、微注射法^[22-24]. 本实验用脂质体Lipfectamine™ 2000转染试剂介导的转染, 操作简单, 不需要复杂的设备, 转染效率较高. 另T3组抑制效果较T1、T2组更为明显, 提示RNA干扰技术抑制基因表达的效果与靶位点的选择密切相关.

总之, 本实验中我们针对TROP2基因分别设计了3条shRNA, 从中筛选出最有效的短链片段, 获得稳定转染该有效片段的BGC-823细胞, 其mRNA和蛋白表达抑制率为29.9%和62.0%, 将为进一步的基础和临床研究提供更多的依据.

4 参考文献

- 1 Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6047-6052
- 2 Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005; 54: 374-384
- 3 Nakashima K, Shimada H, Ochiai T, Kuboshima M, Kuroiwa N, Okazumi S, Matsubara H, Nomura F, Takiguchi M, Hiwasa T. Serological identification of TROP2 by recombinant cDNA expression cloning using sera of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 112: 1029-1035
- 4 Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, Anfossi S, Gokden M, Dunn D, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J Jr, Pecorelli S. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *Int J Cancer* 2004; 112: 14-25
- 5 Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Shen-Ong GL, van Heek T, Ashfaq R, Meyer R, Walter K, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH. Discovery of novel tumor markers of pancreatic cancer using global gene expression technology. *Am J Pathol* 2002; 160: 1239-1249
- 6 Huang E, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF, Bild A, Iversen ES, Liao M, Chen CM, West M, Nevins JR, Huang AT. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003; 361: 1590-1596
- 7 Coldren CD, Helfrich BA, Witta SE, Sugita M, Lapadat R, Zeng C, Barón A, Franklin WA, Hirsch FR, Geraci MW, Bunn PA Jr. Baseline gene expression predicts sensitivity to gefitinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 521-528
- 8 Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 3057-3063
- 9 Shimada A, Kano J, Ishiyama T, Okubo C, Iijima T, Morishita Y, Minami Y, Inadome Y, Shu Y, Sugita S, Takeuchi T, Noguchi M. Establishment of an immortalized cell line from a precancerous lesion of lung adenocarcinoma, and genes highly expressed in the early stages of lung adenocarcinoma development. *Cancer Sci* 2005; 96: 668-675
- 10 Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S. Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. *Int J Cancer* 1998; 76: 671-676
- 11 Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, Okubo K. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20: 639-673
- 12 Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Nishida K, Shimomura Y, Tano Y, Nakamura Y. Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nat Genet* 1999; 21: 420-423
- 13 Zhang B, Yao YF, Zhou P. Two novel mutations identified in two Chinese gelatinous drop-like corneal dystrophy families. *Mol Vis* 2007; 13: 988-992
- 14 Markoff A, Bogdanova N, Uhlig CE, Groppe M, Horst J, Kennerknecht I. A novel TACSTD2 gene mutation in a Turkish family with a gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Mol Vis* 2006; 12: 1473-1476
- 15 Alavi A, Elahi E, Tehrani MH, Amoli FA, Javadi MA, Rafati N, Chiani M, Banihosseini SS, Bayat B, Kalhor R, Amini SS. Four mutations (three novel, one founder) in TACSTD2 among Iranian GDLN patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4490-4497
- 16 Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, Michel L. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 280-285
- 17 Mühlmann G, Spizzo G, Gostner J, Zitt M, Maier H, Moser P, Gastl G, Zitt M, Müller HM, Margreiter R, Ofner D, Fong D. TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 2009; 62: 152-158
- 18 Shankar P, Manjunath N, Lieberman J. The prospect of silencing disease using RNA interference. *JAMA* 2005; 293: 1367-1373
- 19 Holen T, Amarzguoui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1757-1766
- 20 Mäkinen PI, Koponen JK, Kärkkäinen AM, Malm TM, Pulkkinen KH, Koistinaho J, Turunen MP, Ylä-Herttuala S. Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *J Gene Med* 2006; 8: 433-441
- 21 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 22 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188-200
- 23 Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-6888
- 24 Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002; 26: 199-213

■同行评价

本研究选题有一定的科研价值, 实验方法先进, 具有一定的参考价值.

肝切除术后早期应用生长抑素对门静脉血流动力学的影响

叶华, 何波, 王捷

■背景资料

生长抑素(SST)及其类似物已被广泛应用于肝硬化门脉高压食管胃底静脉曲张破裂出血的治疗, 而肝切除术后早期应用SST及其类似物对门静脉血流动力学影响的报道较少, 本研究探讨肝脏大部分切除术后, 早期应用SST类似物恩他宁对门静脉血流动力学的影响及其相关机制。

叶华, 王捷, 中山大学附属第二医院肝胆外科 广东省广州市 510120

何波, 中山大学附属第二医院麻醉科 广东省广州市 510120
叶华, 主治医师, 主要从事肝胆疾病的诊疗研究。

作者贡献分布: 叶华与何波对此文所作贡献均等; 此课题由王捷设计; 研究过程由叶华与何波操作完成; 数据分析由何波完成; 本论文写作由叶华与王捷完成。

通讯作者: 王捷, 教授, 510120, 广东省广州市, 中山大学附属第二医院肝胆外科. sumsjw@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-07 修回日期: 2009-06-18

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Effects of somatostatin on portal vein hemodynamics in the early stage after hepatectomy

Hua Ye, Bo He, Jie Wang

Hua Ye, Jie Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Bo He, Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Correspondence to: Professor Jie Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. sumsjw@yahoo.com.cn

Received: 2009-05-07 Revised: 2009-06-18

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of somatostatin on portal vein hemodynamics in the early stage after hepatectomy and explore the mechanism under such effects.

METHODS: Thirty-two rabbits were randomly divided into three groups: group A ($n = 6$, control group), group B ($n = 13$, normal saline treatment group) and group C ($n = 13$, somatostatin treatment group). Rabbits in all three groups underwent portal vein catheterization, while only those in Groups B and C underwent 50% partial hepatectomy. An intraoperative and postoperative intravenous infusion of normal saline and somatostatin was given. Before and after the treatment (0.5, 1, 2 h), the pressure, flow direction, diameter, hemokinetic velocity, average flow rate and blood flow of the portal vein were

detected and compared.

RESULTS: After hepatectomy, the portal pressure increased. The increase in the portal pressure in group B was significantly higher than that in group C (0.5 h: 436.001 ± 169.654 Pa vs 258.012 ± 167.497 Pa, $P < 0.05$; 1 h: 394.324 ± 163.182 Pa vs 224.767 ± 164.653 Pa, $P < 0.05$; 2 h: 193.092 ± 154.356 Pa vs 351.861 ± 183.579 Pa, $P < 0.05$). There were no significant differences in portal diameter and hemokinetic velocity among all the three groups before and after treatment ($P > 0.05$). However, the average flow rate and blood flow of the portal vein in group C were significant lower than those in groups A and B (both $P < 0.05$). Two hours after hepatectomy, no significant differences in the expression of ALT and AST were noted between groups A and B.

CONCLUSION: Application of somatostatin in the early stage of hepatectomy may reduce elevated portal pressure, which may be associated with somatostatin-induced decrease in flow rate and blood flow of the portal vein.

Key Words: Hepatectomy; Somatostatin; Portal vein pressure

Ye H, He B, Wang J. Effects of somatostatin on portal vein hemodynamics in the early stage after hepatectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2026-2030

摘要

目的: 探讨肝切除术后早期应用生长抑素对门静脉血流动力学的影响及可能机制。

方法: 将32只健康家兔随机分为: A组(正常对照组)、B组(生理盐水治疗组)和C组(生长抑素治疗组)。对A组建立门静脉置管动物模型; B组和C组均建立50%肝切除及门静脉置管动物模型, 并于术中及术后早期分别滴注生理盐水和生长抑素。定期(0.5、1、2 h)检测上述3组动物模型门静脉压力差值, 用超声多普勒检测动物模型门静脉血流方向、血管内径、截面积、平均血流速率及血流量, 同时检测动物模型肝功能变化。

■同行评议者

李胜, 研究员, 山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

结果: 动物模型在肝切除术后门静脉压力升高, 与A组相比, B组门静脉压力升高幅度明显高于C组(0.5 h: 436.001 ± 169.654 Pa vs 258.012 ± 167.497 Pa, $P < 0.05$; 1 h: 394.324 ± 163.182 Pa vs 224.767 ± 164.653 Pa, $P < 0.05$; 2 h: 193.092 ± 154.356 Pa vs 351.861 ± 183.579 Pa, $P < 0.05$). 术中及术后早期检测A、B、C 3组动物门静脉血管内径和截面积无明显差异, 但C组门静脉平均血流速率及血流量显著低于A组和B组(均 $P < 0.001$). 肝切除术后2 h, B组与C组间ALT、AST差异无显著意义。

结论: 肝部分切除术后, 早期应用生长抑素可降低门静脉压力的升高幅度, 这种作用可能与生长抑素降低了门静脉血流速率和血流量相关。

关键词: 肝切除; 生长抑素; 门静脉压力

叶华, 何波, 王捷. 肝切除术后早期应用生长抑素对门静脉血流动力学的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2026-2030 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2026.asp>

0 引言

目前, 生长抑素(somatostatin, SST)及其类似物已被广泛应用于肝硬化门脉高压食管胃底静脉曲张破裂出血的治疗, 而肝切除术后早期应用SST及其类似物对门静脉血流动力学影响的报道较少. 本研究探讨了兔肝脏大部分切除术后, 早期应用SST类似物思他宁对门静脉血流动力学的影响及其相关机制. 旨在为临床肝切除术后应用SST及其类似物降低门静脉压力(portal vein pressure, PVP), 从而减少手术并发症的发生提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康家兔32只, 由中山大学医学院实验动物中心提供, 雌雄不限, 月龄10 mo左右, 体重2.4-3.0 kg, 在无特殊病原菌条件下(SPF)分笼饲养; SST类似物思他宁由瑞士雪兰诺公司提供, 每支3000 μg ; 超声多普勒(型号 Esaote Technos DII6)由ESAOTE公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组及处理: 健康家兔32只随机分为3组. A组: 正常对照组6只, 氯胺酮肌肉注射麻醉, 消毒后上腹肋缘下切口进腹, 经肠系膜上静脉终末分支插管, 导入门静脉主干, 备测PVP; B组: 生理盐水治疗组13只, 按照A组方法常规麻醉开腹后, 建立门静脉置管+50%肝切除术动物模型。

从阻断肝十二指肠韧带肝缺血开始, 至切肝后2 h内, 经耳缘静脉持续滴入生理盐水100 mL(50 mL/h). C组: SST治疗组13只, 采用与B组相同的方法建立门静脉置管+50%肝切除术动物模型. 从阻断肝十二指肠韧带肝缺血开始, 至切肝后2 h内, 经耳缘静脉持续滴入生理盐水100 mL+思他宁(滴速50 mL/h, 思他宁剂量为84 $\mu\text{g}/\text{kg}$). 上述3组动物在实验指标检测完毕后缝合切口。

1.2.2 PVP测定: A组剖腹后建立门静脉置管模型, 测量0、0.5、1、2 h的PVP; B组、C组剖腹后建立门静脉置管+肝切除术动物模型, 分别测量阻断肝门前、切肝后0.5、1、2 h的PVP。

1.2.3 超声多普勒检测: A组剖腹后建立门静脉置管模型, 测量0、0.5、1、2 h的门静脉平均血流速率、血管内径、截面积、门静脉血流量和血流方向; B组、C组剖腹后建立门静脉置管+肝切除术动物模型, 分别测量阻断肝门前、切肝后0.5、1、2 h的门静脉平均血流速率、血管内径、截面积、门静脉血流量和血流方向。

1.2.4 肝功能检测: B组、C组剖腹后建立门静脉置管+肝切除术动物模型, 分别于阻断肝门前、切肝后2 h采血检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST), 了解其动态变化。

统计学处理 所有实验数据以mean \pm SD表示, 不同组间实验数据差异比较采用 t 检验和重复测量方差分析, 统计软件采用SPSS11.0 for Windows, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 PVP A组与B、C组PVP差值分别比较差异均有显著意义($P < 0.05$), 表明肝切除术后其PVP明显升高. B组与C组比较, 两者差异有显著意义($P < 0.05$), 表明SST(思他宁)可明显降低肝切除术后升高的PVP. 同时, C组内不同时间点之间即肝切除术后0.5、1、2 h与术前的PVP差值, 差异无显著意义($F = 2.482$, $P = 0.102$), 表明SST(思他宁)的降压作用是持续而稳定的(图1, 表1)。

2.2 门静脉血流方向 A、B、C组动物肝切除术前及术后0.5、1、2 h均观察到向肝血流, 未见离肝血流。

2.3 门静脉血管内径、截面积、平均血流速率及血流量检测 各组术后0.5、1、2 h的门静脉血管内径及门静脉截面积数值与术前比较, 三组间均无显著性差异($P > 0.05$). 各组术后0.5、1、2 h的门静脉平均血流速率数值与术前比较, A组与B组见无差异($P = 0.895$), A组及B组与C组均

■ 研发前沿
尽管生长抑素降低门静脉压力的作用已得到广泛认可, 然而目前其血液动力学效应仍未完全揭示。

■创新盘点

本研究证明肝切除术后早期应用生长抑素可以降低门静脉压力升高的幅度,并在此基础上对生长抑素降低肝切除术后门静脉压力的血流动力学机制进行了初步探讨。

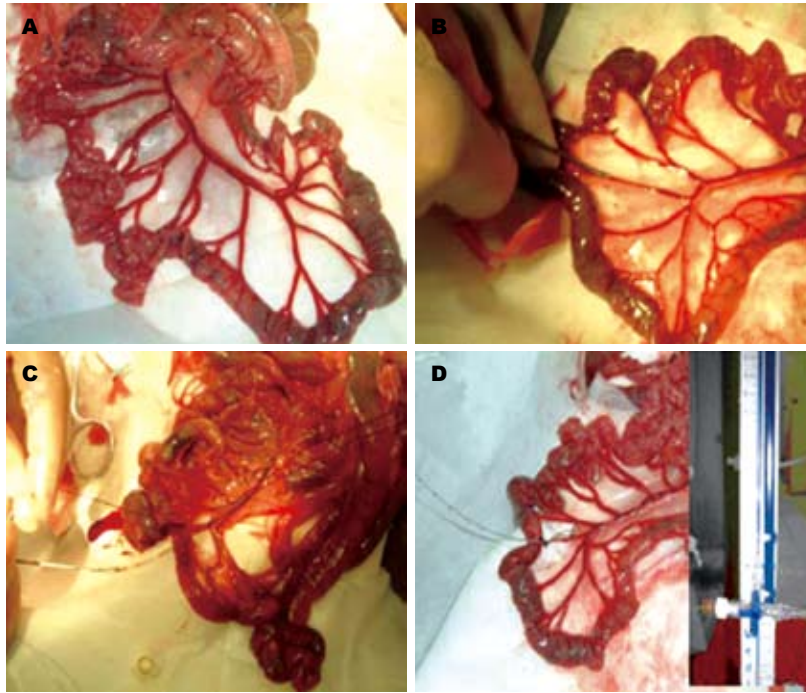


图1 剖腹后建立门静脉置管测定PVP. A: 暴露肠系膜; B: 经肠系膜小静脉穿刺置管至门静脉; C: 妥善固定门静脉置管; D: 通过门静脉置管测定门静脉压力。

表1 3组动物肝切除术前与术后PVP差值的比较 (mean ± SD, Pa)

| 分组 | n | 术后0.5 h | 术后1 h | 术后2 h |
|----|----|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A组 | 6 | 34.323 ± 70.411 | 24.517 ± 11.030 | -62.076 ± 96.791 |
| B组 | 13 | 436.001 ± 169.654 ^a | 394.324 ± 163.182 ^a | 351.861 ± 183.579 ^a |
| C组 | 13 | 258.012 ± 167.497 ^{ab} | 224.767 ± 164.653 ^{ab} | 193.092 ± 154.356 ^{ab} |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.05$ vs A组; ^c $P < 0.05$ vs B.

有显著统计学差异(均 $P < 0.001$),显示使用SST后门静脉平均血流速率明显降低.各组术后0.5、1、2 h的门静脉血流量数值与术前比较的差值,A组与B组和C组间无统计学差异,B组与C组有统计学差异($P = 0.035$),表明SST治疗组较生理盐水治疗组其门静脉血流量明显降低(表2).

2.4 肝功能检测 B组肝切除术后2 h与术前ALT、AST的差值分别为710.15 ± 403.81 U/L、301.46 ± 239.16 U/L; C组肝切除术后2 h与术前ALT、AST的差值分别为513.77 ± 373.44 U/L、171.85 ± 199.04 U/L. 两组差异无显著意义($P = 0.210$, $P = 0.147$).表明SST(思他宁)并不引起AST或ALT的升高(表3).

3 讨论

目前,肝切除术仍是治疗肝脏良恶性肿瘤最常用和最有效的治疗方法.近年来,随着外科技术和围手术期处理经验的不断提高和完善,肝切除术后肝功能衰竭的发生率明显减少,而术中或术后出血、胆瘘、难治性腹水、肝功能不全

等并发症的发生率呈相对升高的趋势.相关资料显示^[1-2],上述并发症的发生与术后PVP升高的幅度呈正相关.尽管SST降低门静脉压力的作用已得到广泛认可,然而直到目前其血液动力学效应仍未完全揭示^[3-6],这在一定程度上限制了SST在临床治疗中的优化用药.在此,本研究证明了肝切除术后早期应用SST可以降低PVP升高的幅度,并在此基础上对SST降低肝切除术后PVP的血流动力学机制进行了初步探讨.

PVP的检测方法有多种,但由于干扰间接测压法的因素较多,如检测部位、门静脉直径大小等,影响数据的准确性和可比性,而且结果的判断带有一定主观性.本研究采用术中经肠系膜上静脉的分支插管,导入门静脉主干,直接测量PVP.并间歇输入小剂量肝素以起抗凝作用,确保导管顺畅,减少操作因素而产生的误差.因此这一检测方法更能直接地、动态地反映肝切除术后PVP的变化.我们的研究发现:肝切除术后PVP明显升高,并且是持续、稳定地增高(术后0.2、1、2 h PVP的变化无显著差异).其机制

表 2 各组实验动物手术前后门静脉血流动力学变化情况

| | A组(n = 6) | B组(n = 13) | C组(n = 13) |
|--------------------------|----------------|------------------|------------------|
| 门静脉血管内径(mm) | | | |
| 0.5 h | -0.900 ± 1.594 | 0.623 ± 0.803 | 0.077 ± 0.894 |
| 1 h | 0.100 ± 0.415 | 0.369 ± 1.259 | 0.069 ± 0.988 |
| 2 h | 0.067 ± 0.476 | 0.139 ± 1.161 | -0.339 ± 0.737 |
| 门静脉截面积(mm ²) | | | |
| 0.5 h | 0.170 ± 1.626 | 2.953 ± 4.995 | 0.781 ± 2.573 |
| 1 h | 0.449 ± 1.841 | 2.946 ± 6.006 | 0.520 ± 2.739 |
| 2 h | 0.653 ± 1.577 | 1.424 ± 4.395 | -1.183 ± 1.069 |
| 门静脉平均血流速率(m/s) | | | |
| 0.5 h | -0.013 ± 0.025 | -0.003 ± 0.026 | -0.090 ± 0.037 |
| 1 h | -0.015 ± 0.031 | -0.014 ± 0.030 | -0.112 ± 0.032 |
| 2 h | -0.000 ± 0.020 | -0.006 ± 0.031 | -0.112 ± 0.047 |
| 门静脉血流量(mL/min) | | | |
| 0.5 h | -4.823 ± 2.363 | -4.000 ± 22.931 | -18.692 ± 29.310 |
| 1 h | -4.833 ± 3.764 | -7.769 ± 30.362 | -33.308 ± 54.879 |
| 2 h | -5.167 ± 1.941 | -13.308 ± 29.293 | -47.385 ± 26.544 |

■应用要点

肝切除术后门静脉压力的升高, 是机体代偿功能的一种表现, 有利于术后肝功能的恢复和肝细胞的再生. 而在肝切除术后早期使用生长抑素可使残肝重量增加减慢, 肝细胞的再生受到抑制.

表 3 B、C组动物肝切除术后2 h与术前ALT、AST差值的比较 (mean ± SD, U/L, n = 13)

| 分组 | ALT | AST |
|----|------------------------------|------------------------------|
| B组 | 710.15 ± 403.81 ^a | 301.46 ± 239.16 ^b |
| C组 | 513.77 ± 373.44 | 171.85 ± 199.04 |

$t = 1.287$, $^aP = 0.210$ vs C组; $t = 1.502$, $^bP = 0.147$ vs C组.

可能为^[7-8]: (1)由于门静脉血流最终汇入肝静脉出肝, 肝切除术后肝静脉的数量减少, 疏导门静脉血流的能力减弱, 造成门静脉淤血、PVP明显升高. (2)阻断肝门和部分肝切除均可引起肝实质的损害, 残留肝脏发生脂肪浸润和组织水肿, 间接导致PVP升高.

我们使用彩色多普勒超声检测了肝切除术前门静脉直径、血管截面积、平均血流速率、血流量和血流方向变化以及SST对其的影响. 本研究显示, SST治疗组和生理盐水治疗组的门静脉血流方向均为向肝性血流, 未见离肝血流. 使用SST后门静脉直径、血管截面积, 与生理盐水治疗组相比差异无显著意义, 即SST不能够直接收缩门静脉. 而门静脉平均血流速率、血流量锐减, 与生理盐水治疗组相比差异有显著意义. 我们推断SST降低PVP的作用可能是通过降低门静脉血流速率, 从而使门静脉血流量减少. 但SST降低门静脉血流量的详细机制尚不完全清楚, 我们也仅作了初步的探讨, SST对肝切除术后全肝血液动力学的影响及其作用

机制还有待进一步研究.

由于麻醉、手术创伤、阻断肝门引起的肝缺血和再灌注损伤, 肝切除术后都会出现肝功能异常, 如谷草转氨酶、谷丙转氨酶、总胆红素的升高. 肝切除术后PVP的升高, 实际上是机体代偿功能的一种表现, 有利于术后肝功能的恢复和肝细胞的再生^[9-12]. 思他宁的作用是降低PVP和减少内脏血流量, 用药后是否会加重肝功能损害, 这是需要慎重考虑的问题. 而之前关于大鼠动物实验的结果提示, 肝切除术后早期使用SST可使残肝质量增加减慢, 肝细胞的再生受到抑制^[13-15]. 因此, 在肝切除术后早期应用SST减少肝断面渗血、胆瘘、术后出血等并发症时, 是否应注意其抑制肝再生的不良反应, 防止诱发肝功能衰竭. 我们初步观察了SST对肝切除术后肝功能的影响, 结果显示, 肝切除术后2 h谷草转氨酶、谷丙转氨酶均显著升高, 但SST治疗组和生理盐水治疗组两组之间升高的程度无明显差异, 表明SST并非如预想般加重肝功能损害.

4 参考文献

- 1 杨文燕, 吴建新, 戴强, 江佛湖. 长效奥曲肽对大鼠肝纤维化门静脉高压形成的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2815-2819
- 2 潘勤, 李定国, 杜学良, 徐芹芳. 生长抑素及奥曲肽的肝细胞保护作用及其机制研究. 中国病理生理杂志 2008; 24: 730-733
- 3 吴志勇, 曹晖, 邱江锋. 门静脉高压症血流动力学研究的意义. 中华肝胆外科杂志 2005; 11: 4-5
- 4 Sakamoto M, Ueno T, Nakamura T, Sakata R, Hasimoto O, Torimura T, Sata M. Improvement of portal hypertension and hepatic blood flow in

■同行评价

本研究选题新颖,方法有一定特色,有一定的学术价值

- 5 cirrhotic rats by oestrogen. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 220-225
- 5 Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007; 46: 242-253
- 6 Yang YP, Ma XM, Wang CP, Han J, Lu YY, Xiang Y, Su SH, Feng YY. Effect of increased hepatic platelet activating factor and its receptor portal hypertension in CCl4-induced liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 709-715
- 7 Patella S, Phillips DJ, Tchongue J, de Kretser DM, Sievert W. Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G137-G144
- 8 Vanheule E, Geerts AM, Reynaert H, Van Vlierberghe H, Geerts A, De Vos M, Colle I. Influence of somatostatin and octreotide on liver microcirculation in an experimental mouse model of cirrhosis studied by intravital fluorescence microscopy. *Liver Int* 2008; 28: 107-116
- 9 Jung Y, Oh SH, Zheng D, Shupe TD, Witek RP, Petersen BE. A potential role of somatostatin and its receptor SS1R4 in the migration of hepatic oval cells. *Lab Invest* 2006; 86: 477-489
- 10 Deli A, Kreidl E, Santifaller S, Trotter B, Seir K, Berger W, Schulte-Hermann R, Rodgarkia-Dara C, Grusch M. Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1699-1709
- 11 Xu H, Shi BM, Lu XF, Liang F, Jin X, Wu TH, Xu J. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2349-2357
- 12 Laviña B, Gracia-Sancho J, Rodríguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, García-Pagán JC. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl4 cirrhotic rats with portal hypertension. *Gut* 2009; 58: 118-125
- 13 Reynaert H, Vaeyens F, Qin H, Hellemans K, Chatterjee N, Winand D, Quartier E, Schuit F, Urbain D, Kumar U, Patel YC, Geerts A. Somatostatin suppresses endothelin-1-induced rat hepatic stellate cell contraction via somatostatin receptor subtype 1. *Gastroenterology* 2001; 121: 915-930
- 14 Song SH, Leng XS, Li T, Qin ZZ, Peng JR, Zhao L, Wei YH, Yu X. Expression of subtypes of somatostatin receptors in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1663-1665
- 15 Vorobioff JD, Ferretti SE, Zangroniz P, Gamen M, Picabea E, Bessone FO, Reggiardo V, Diez AR, Tanno M, Cuesta C, Tanno HE. Octreotide enhances portal pressure reduction induced by propranolol in cirrhosis: a randomized, controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2206-2213

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(科学编辑:李军亮 2009-07-18)

早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤大鼠肠黏膜细胞紧密连接的影响

邓志云, 郭光华, 杨毅

邓志云, 杨毅, 广东省边防武警总队医院一外科 广东省深圳市 518029
郭光华, 南昌大学一附院烧伤中心 江西省南昌市 330006
邓志云, 主治医师, 主要从事创伤营养方面的研究.
江西省自然科学基金项目, No. 0340078
作者贡献分布: 此课题由郭光华与邓志云设计; 研究过程由邓志云与郭光华完成; 数据分析由邓志云完成; 本论文写作由邓志云与郭光华完成.
通讯作者: 邓志云, 博士, 主治医师, 518029, 广东省深圳市, 广东省边防武警总队医院一外科. dennis8710@163.com
电话: 0755-82699765
收稿日期: 2009-05-05 修回日期: 2009-06-12
接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-18

Effects of early enteral glutamine supplementation on tight junctions in intestinal mucosa of scalded rats

Zhi-Yun Deng, Guang-Hua Guo, Yi Yang

Zhi-Yun Deng, Yi Yang, Department of General Surgery, Guangdong Frontier Defence Armed Police General Hospital, Shenzhen 518029, Guangdong Province, China
Guang-hua Guo, Burn Center, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, No. 0340078
Correspondence to: Dr. Zhi-Yun Deng, Department of General Surgery, Guangdong Frontier Defence Armed Police General Hospital, Shenzhen 518029, Guangdong Province, China. dennis8710@163.com
Received: 2009-05-05 Revised: 2009-06-12
Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the protective effects of early enteral glutamine supplementation on the barrier function of intestinal mucosa in scalded rats and explore the mechanism underlying such protective effects.

METHODS: Healthy adult SD rats were subjected to a 30% TBSA third-degree scald injury to develop a rat model of scald injury. Scalded rats were then randomly divided into EN and EN plus Gln group, respectively. Rats in the EN group were fed standard enteral nutrition (Nutrison Multi Fibre) while those in the EN

plus Gln group were fed standard enteral nutrition plus Gln. On days 1, 4, 7 and 10 after scald induction, plasma D-lactic acid levels were analyzed by ultraviolet spectrophotometry, the expression of Occludin protein was detected by Western blot, and the expression of ZO-1 mRNA was determined by RT-PCR.

RESULTS: Serum D-lactic acid level was elevated in response to scald induction. The levels of D-lactic acid in the serum of rats in the EN group did not return to normal within the period of observation of this study, whereas those in the EN plus Gln group returned to normal on day 4 after scald induction (4.5 ± 0.8 mg/L vs 3.8 ± 0.6 mg/L). Semiquantitative Western blot analysis showed that the expression of Occludin protein in intestinal mucosa of rats in the EN plus Gln group showed an initial rise, followed by a decline. On days 4 and 7, the expression level of Occludin protein in intestinal mucosa of rats in the EN plus Gln group were significantly higher than those in the EN group (1.18 ± 0.14 vs 0.79 ± 0.09 and 1.59 ± 0.16 vs 1.12 ± 0.13 , respectively; both $P < 0.05$). In both groups, the expression levels of ZO-1 mRNA on day 1 significantly declined when compared with pre-induction values (0.71 ± 0.19 and 0.76 ± 0.17 vs 1.00, both $P < 0.05$). On day 4, a significant difference was noted in the expression levels of ZO-1 mRNA between the two groups (1.17 ± 0.16 vs 0.76 ± 0.15 ; $P < 0.05$) though no significant differences were found at other time points.

CONCLUSION: Early enteral glutamine supplementation is superior to standard enteral nutrition in promoting the expression of Occludin protein and ZO-1 mRNA in intestinal mucosa and improving the barrier function of intestinal mucosa.

Key Words: Scalding; D-lactic acid; Tight junction; Glutamine

Deng ZY, Guo GH, Yang Y. Effects of early enteral Glutamine supplementation on tight junctions in intestinal mucosa of scalded rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2031-2036

■背景资料

烧(创)伤后肠道应激性变化引起肠黏膜屏障功能损害, 细菌、内毒素移位乃至启动SIRS的发生, 并通过一系列级联反应可最终导致MODS; 烧伤后如何有效地促进肠黏膜修复, 维护肠黏膜屏障功能, 减少肠内细菌、内毒素移位并实行有效的营养支持成为烧伤治疗中的一个重要环节.

■同行评议者

彭曦, 副研究员, 重庆市西南医院烧伤研究所

■ 研究前沿

肠道是烧伤后高代谢反应的中心器官之一,胃肠道的缺血缺氧性损害、营养底物的缺乏是导致黏膜机械屏障损害的主要原因。围绕烧伤后黏膜屏障功能的维护开展了众多的研究;亟待解决的问题是选择何种安全、有效的方法及干预的途径、时机。

摘要

目的: 了解早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤后肠黏膜屏障功能的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

方法: 选取健康SD大鼠随机分为标准肠内营养组(EN组)和谷氨酰胺补给组(EN+Gln组),每组32只,制成烫伤动物模型(30% TBSA III度烫伤),伤后早期分别给予标准肠内营养制剂(能全力)和标准肠内营养制剂+谷氨酰胺,于第1、4、7、10天观察血清D-乳酸,Western blot半定量分析紧密连接结构蛋白Occludin和RT-PCR分析ZO-1 mRNA表达的变化。

结果: 烫伤后血清D-乳酸水平升高,EN组在观察时间内血清D-乳酸水平没有恢复至伤前水平,EN+Gln组在伤后4 d恢复(4.5 ± 0.8 mg/L vs 3.8 ± 0.6 mg/L); Western blot半定量分析显示EN+Gln组伤后Occludin表达先下降后上升,在4、7 d时明显高于EN组(1.18 ± 0.14 vs 0.79 ± 0.09 , 1.59 ± 0.16 vs 1.12 ± 0.13 , 均 $P < 0.05$); 烧伤后1 d时,2组ZO-1 mRNA表达与伤前比较均明显下降(0.71 ± 0.19 , 0.76 ± 0.17 vs 1.00, 均 $P < 0.05$),4 d时EN+Gln组与EN组比较差异有显著的统计学意义(1.17 ± 0.16 vs 0.76 ± 0.15 , $P < 0.05$),其余时间点各组间差异均无统计学意义。

结论: 早期肠内谷氨酰胺补给支持能快速逆转烧伤后TJ结构蛋白Occludin、ZO-1表达的下,从而改善肠黏膜的屏障功能。

关键词: 烫伤; D-乳酸; 紧密连接; 谷氨酰胺

邓志云, 郭光华, 杨毅. 早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤大鼠肠黏膜细胞紧密连接的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2031-2036

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2031.asp>

0 引言

在严重烧伤、感染、休克等应激条件下,因肠道缺血缺氧、炎性因子的瀑式释放、营养底物的缺乏等变化,可引起上皮细胞间紧密连接通道的异常开放,最终导致黏膜屏障功能损害。近年来研究亦证实肠黏膜屏障功能下降和由此所致的肠源性细菌、内毒素移位、全身感染、多器官功能衰竭等并发症密切相关,因此改善烧伤后肠黏膜屏障功能,减少肠源性细菌、内毒素移位对于烧伤患者的临床和预后具有较大的现实意义^[1-5]。紧密连接(tight junction, TJ)是相邻上皮细胞间的连接方式细胞间最重要的连接方

式,控制着离子及小分子可溶性物质通过,排斥毒性大分子及微生物侵入^[6-9]。近来研究发现谷氨酰胺(Gln)等能促进肠黏膜细胞的增生、防止肠黏膜萎缩及有利于维持肠黏膜屏障功能^[10-13]。为此我们设计了本实验,对烫伤大鼠伤后早期肠内补给含谷氨酰胺的肠内营养制剂,观察其对紧密连接主要构成蛋白Occludin和ZO-1的影响并探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康SD大鼠72只,体质量220-250 g,雌雄兼用,由南昌大学医学院医学实验动物科学部提供(动物合格证:医动字021-9602)。雌雄分笼,适应性喂养1 wk,自由摄水饮食。主要试剂Occluding Rabbit mAb购自Santa Cruz公司;以及相应的试剂购自Promega公司,PCR引物由上海生物技术服务公司合成。

1.2 方法

1.2.1 大鼠烫伤模型的制作: SD大鼠随机分为2组,即肠内营养组(EN组)和肠内营养加谷氨酰胺补给组(EN+Gln组),2组所有大鼠均制成烫伤模型,每组32只。另取8只作为伤前对照,制成假烫模型,所得数据作为伤前参考值。大鼠烫伤前禁食12 h,10 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉,电推去毛,称其质量后采用本实验中心自制蒸汽烫伤控制器,设定压力为0.03 mPa,温度108℃,持续8 s,造成总体表面积(TBSA)为30%的III度烫伤。伤后立即ip平衡液50 mL/kg抗休克。将大鼠放入限制笼内饲养,实验过程中室温保持在25℃左右,相对湿度约40%左右,创面外用碘伏消毒,实验室每天紫外线消毒。于伤后1,4,7和10 d检测观察指标,在每个时间点每组大鼠均为8只。

1.2.2 营养液的配制与供给: 2组给予同等热量的肠内营养物。EN组给予整蛋白型肠内营养剂能全力(nutrison multi fibre),EN+Gln组在此基础上添加Gln(重庆药友制药有限公司惠赠)0.3 g/(d·kg); 2组在层流台上将各种营养成分混匀后分装,4℃保存,用时复温到37℃。伤后4 h开始灌喂营养液,按每天731.5 kJ/kg的标准供给^[14],每天计划量分3-5次喂完,不限饮水。

1.2.3 检测指标与方法: (1)血清D-乳酸测定: 门静脉血离心后分离血清,-80℃保存,用酶联紫外分光光度法测定血清D-乳酸水平。(2)Western blot法检测肠黏膜Occludin蛋白量: 载玻片刮取大鼠回肠黏膜层,称质量后加入去污剂裂解缓

表 1 ZO-1的引物序列

| 分组 | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (3'-5') | 大小(bp) |
|---------|---------------------------|--------------------------|--------|
| β-actin | CACCCTGTGCTGCTCACCCGAGGCC | CCACACAGATGACTTGCGCTCAGG | 690 |
| ZO-1 | AATGCTGCTTTATTGGG | AGTGGTTGGTGGTCTTCT | 229 |

表 2 血清D-乳酸的变化 (n = 8, mean ± SD, mg/L)

| 分组 | 伤后时间(d) | | | |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 1 | 4 | 7 | 10 |
| 伤前值 | 3.8±0.6 | 3.8±0.6 | 3.8±0.6 | 3.8±0.6 |
| EN组 | 7.9±1.3 ^b | 6.9±0.7 ^a | 6.3±0.8 ^a | 5.6±1.1 ^a |
| EN+Gln组 | 7.2±1.3 ^b | 4.5±0.8 ^c | 4.3±0.5 ^c | 4.2±0.6 |

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 伤前; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs EN组.

冲液, 匀浆器匀浆, 冰上裂解30 min; 将已裂解的组织转移入1.5 mL EP管中, 4℃, 10000 g离心10 min, 取上清; 取出上清液约100 μL, Folin-酚法进行蛋白质的定量及标化; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 免疫学检测Occludin蛋白条带进行半定量分析; 具体步骤按参考文献[15]. (3) 肠黏膜细胞ZO-1 mRNA检测: 每例标本取回肠黏膜组织约20 mg提取总RNA, Beckman DH7400分光光度计行质量、浓度检测与标化后, RNA样品逆转录、聚合酶链式反应(PCR)扩增. 引物序列见表1; 反应条件为: 94℃预变性3 min, 然后进行PCR反应35次循环: 94℃变性45 s, 47.5℃退火130 s, 72℃延伸60 s, 最后行72℃延伸5 min. 取扩增产物15 μL上样, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色显示后, 在透射紫外光分析仪下摄影, 并用激光光密度图像扫描仪扫描. 定量计算方法为: 待测基因吸光度值/内参照吸光度值, 再除以假烫组相对应样本的此2条带综合灰度之比.

统计学处理 所有数据均用SPSS10.0统计软件进行分析, 用mean±SD进行统计描述, 同种处理不同时间间比较及同一时间内不同处理组间比较均采用单因素方差分析方法. 结果以P<0.05为差异显著, P<0.01为差异非常显著.

2 结果

2.1 不同时间血清D-乳酸浓度的变化 2组烫伤动物在1 d时血清D-乳酸浓度较伤前明显升高(P<0.01), 在4、7及10 d时EN组与伤前比较D-乳酸浓度均显著升高(P<0.05); 在4、7及10 d时EN+Gln组与伤前比较差异无显著性意义(P>0.05). 在4、7 d时EN+Gln组血清D-乳酸浓度

■ 相关报道

Gln是21世纪的“明星营养素”, 众多的研究报道了Gln提高机体免疫力、降低外科手术术后感染并发症发生率、改善危重患者脓毒症及MODS发生率、缩短住院时间等方面的优势, 至于补给Gln对伤后紧密连接结构蛋白的影响目前尚未见报道.

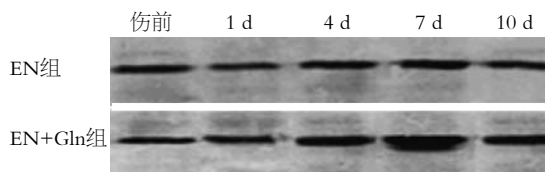


图 1 回肠上皮细胞Occludin表达水平的变化.

与EN组比较明显降低(P<0.05); 在其他时间点各组间比较差异均不明显(P>0.05). 这说明早期肠内谷氨酰胺补给能改善烫伤后肠黏膜屏障功能的损害(表2).

2.2 回肠上皮细胞Occludin表达的变化 Western blot分析显示, 烫伤后1 d时2组动物Occludin的表达水平降低(与伤前比较P<0.05); EN组在伤后4 d回升, 7及10 d时与伤前比较差异无显著性意义(P>0.05); EN+Gln组在7 d时明显高于伤前(P<0.01), 4、10 d时与伤前比较差异无显著性意义(P>0.05, 图1). 组间比较在4、7 d时EN+Gln组与EN组比较差异均显示显著的统计学意义(P<0.01或0.05), 在其余时间点各组间比较差异均不明显(P>0.05); 说明伤后Gln补给能上调Occludin蛋白的表达(表3).

2.3 肠上皮细胞ZO-1 mRNA表达的变化 ZO-1 mRNA的RT-PCR分析显示, 2组动物烫伤后1 d时ZO-1 mRNA表达明显下降(与伤前比较P<0.05); EN组伤后4 d时仍低于伤前(P<0.05), 7、10 d时与伤前比较差异无显著的统计学意义(P>0.05); EN+Gln组在4、10 d时与伤前无差异(P>0.05). 提示烫伤后早期ZO-1 mRNA表达受到抑制, EN支持能逐渐逆转ZO-1 mRNA表达被抑制状态并恢复正常. 组间比较在4、7 d时EN+Gln组明显高于EN组(P<0.05); 说明相对于EN组肠内营养物, 早期Gln补给支持能在更快地促进ZO-1 mRNA表达的恢复, 从而改善TJ的通透性(表4, 图2-3).

3 讨论

紧密连接是肠腔相邻上皮细胞间最重要的连接方式, 他由一些特殊的蛋白组成(Occludin, Claudin, ZO-1、肌动蛋白等), 以上成分的复合

应用要点

肠内Gln补给支持能快速逆转烧伤后TJ结构蛋白Occludin、ZO-1表达下降,从而上调肠黏膜的屏障功能。

表 3 肠上皮细胞Occludin表达的变化 ($n = 8$, mean \pm SD)

| 分组 | 伤后时间(d) | | | |
|---------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| | 1 | 4 | 7 | 10 |
| 伤前 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| EN组 | 0.71 \pm 0.14 ^a | 0.79 \pm 0.09 ^a | 1.12 \pm 0.13 | 1.09 \pm 0.12 |
| EN+Gln组 | 0.76 \pm 0.15 ^a | 1.18 \pm 0.14 ^c | 1.59 \pm 0.16 ^{bd} | 1.16 \pm 0.13 |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 伤前; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs EN组。

表 4 肠黏膜细胞 ZO-1 mRNA 相对表达量的变化 ($n = 8$, mean \pm SD)

| 分组 | 伤后时间(d) | | | |
|---------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| | 1 | 4 | 7 | 10 |
| 伤前 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| EN组 | 0.71 \pm 0.19 ^a | 0.76 \pm 0.15 ^a | 0.87 \pm 0.12 | 1.09 \pm 0.12 |
| EN+Gln组 | 0.76 \pm 0.17 ^a | 1.17 \pm 0.16 ^c | 1.19 \pm 0.11 ^{ac} | 1.13 \pm 0.14 |

^a $P < 0.05$ vs 伤前; ^c $P < 0.05$ vs EN组。

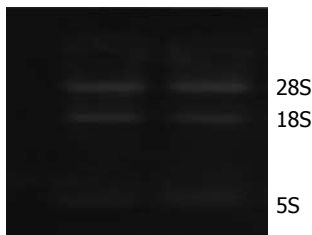


图 2 总RNA琼脂糖凝胶电泳。

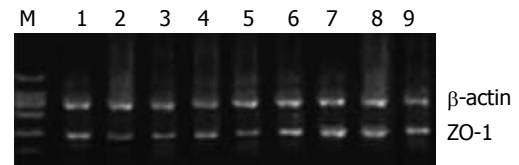


图 3 回肠上皮细胞ZO-1 mRNA表达水平的变化. M: Marker; 1-4: EN组(1, 4, 7, 10 d); 5-8: EN组+Gln组(1, 4, 7, 10 d); 9: 伤前。

结构形成防止微生物、微粒和大分子侵入的机械屏障^[16-17]。许多病理状态如烧伤、感染、休克等情况下,引起细胞间紧密连接功能改变,细胞孔隙(窗孔)明显扩大,导致大分子物质及毒素、细菌移位,导致肠黏膜的通透性增高^[18-21]。在实验中我们利用Western blot分析了Occludin在各组之间的表达,同时检测了ZO-1 mRNA的变化,结果显示1 d时各组Occludin表达明显下降,说明烧伤能引起紧密连接的破坏。Simonovic *et al*^[22]在实验中证实应在应激、感染等情况下,由于钙耗竭等因素能导致上皮细胞间紧密连接的重要成分Occludin去磷酸化而致TJ的破坏。谷氨酰胺补给组在4、7 d时Occludin表达明显高于EN组;这说明Gln补给能有效地促进Occludin的表达,下调上皮细胞间通透性。Occludin为一完整的II型跨膜蛋白,相对分子质量约65 kDa,含4个跨膜结构,位于紧密连接线上,在维持和调节紧密连接屏障功能中具有重要作用^[23-24]。Li *et al*^[25]利用Caco-2细胞观察Gln对其紧密连接蛋白的影响,发现Gln能促进Occludin的表达并呈剂量依赖性。

在CaCo-2细胞的体外培养体系中发现过氧化氢能快速诱导细胞紧密连接蛋白Occludin和ZO-1的Tyr残基磷酸化,从而使紧密连接分解,而EGF能完全阻止Tyr位点的磷酸化^[26-28]。

进一步的研究发现ERK的抑制剂能阻断EGF的效果;在我们以前的研究中发现烧伤后早期肠内补给Gln能促进p-ERK1/2的表达^[29],说明ERK通路的激活能维护细胞间的紧密连接的形成^[30],在他们的实验中发现p-ERK主要集中于上皮细胞的侧膜且与Occludin位置重叠,随着EGF的给予,二者定域也相应扩大,利用GST-Occludin-C和重组ERK配对测定证实p-ERK1/2直接和Occludin的C末端相互作用,阻止Occludin苏氨酸残基的去磷酸化,引起TJ蛋白及其相关信号分子的磷酸化,从而上调上皮细胞间TJ的完整性及其屏障功能。

ZO-1是膜相关鸟苷酸激酶家族成员之一,与细胞质内的Occludin和Claudin相互作用,同时也参与蛋白与蛋白相互作用的信号转导^[31-32]。

ZO-1能够与胞质内的其他蛋白如Occludins蛋白的C末端连接^[33], 而ZO-1的C末端则可结合肌动蛋白和应激纤维, 从而将Occludin和肌动蛋白骨架系统连接在一起构成稳定的连接系统. 在Yang *et al*^[34]的实验中利用发现ERK1/2的活化能促进肠黏膜ZO-1的表达, 用U0126阻断ERK1/2的活化, ZO-1和Occludin表达明显减少, 肠黏膜通透性升高. 在我们的实验中发现肠内Gln补给支持也能促进ZO-1 mRNA的表达. 结合TJ主要结构蛋白Occludin和p-ERK1/2的表达的变化^[29], 可以确定早期肠内Gln补给对细胞间紧密连接起重要的正向调控作用.

为了评价不同营养内容对肠黏膜屏障功能影响的结果, 我们选择D-乳酸作为黏膜屏障通透性的标志物. 在正常情况下, 哺乳动物组织既不产生D-乳酸, 也不代谢D-乳酸. 但在肠道应激缺血、创伤、感染等情况下, 肠道细菌产生的大量D-乳酸可通过受损的肠黏膜, 进入血液循环, 引起血清D-乳酸水平升高. 故检测血清D-乳酸水平可及时反映肠黏膜上皮细胞通透性及肠屏障功能的损害程度^[35]. 本实验中各组烫伤动物在1 d时血清D-乳酸浓度较伤前均明显升高, 说明烫伤能明显引起肠黏膜通透性升高; 肠屏障功能处于损伤状态. 在4、7 d时EN+Gln组D-乳酸浓度明显低于EN组, 说明肠内Gln补给支持能快速、有效地增强肠黏膜屏障功能, 减少血清D-乳酸进入血液循环.

总之, 烫伤能引起TJ结构蛋白Occludin、ZO-1表达的减弱, 从而引起肠黏膜通透性升高, 肠黏膜屏障功能的损害. 肠内Gln补给支持能快速逆转烧伤后TJ结构蛋白Occludin、ZO-1表达下降, 从而上调肠黏膜的屏障功能. 这也是Gln改善烧伤后肠道功能的主要机制之一.

4 参考文献

- 1 Wilmore DW. Nutrition and metabolic support in the 21st century. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2000; 24: 1-4
- 2 Briassoulis G, Filippou O, Hatzi E, Papassotiriou I, Hatzis T. Early enteral administration of immunonutrition in critically ill children: results of a blinded randomized controlled clinical trial. *Nutrition* 2005; 21: 799-807
- 3 张家平, 黄跃生, 杨宗城. 烧伤延迟复苏加重肠黏膜屏障功能损害的机制研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1329-1332
- 4 Wilson MD, Dziewulski P. Severe gastrointestinal haemorrhage and ischaemic necrosis of the small bowel in a child with 70% full-thickness burns: a case report. *Burns* 2001; 27: 763-766
- 5 Xu GF, Lu Z, Gao J, Li ZS, Gong YF. Effect of

ecoimmunonutrition supports on maintenance of integrity of intestinal mucosal barrier in severe acute pancreatitis in dogs. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 656-661

- 6 Cerejido M, Contreras RG, Flores-Bentez D, Flores-Maldonado C, Larre I, Ruiz A, Shoshani L. New diseases derived or associated with the tight junction. *Arch Med Res* 2007; 38: 465-478
- 7 Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81: 1-44
- 8 Matsuda M, Kubo A, Furuse M, Tsukita S. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 1247-1257
- 9 刘冬妍, 崔巍. NO体外对肠上皮细胞表达紧密连接蛋白Occludin的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2295-2299
- 10 Coëffier M, Marion R, Ducrotté P, Déchelotte P. Modulating effect of glutamine on IL-1beta-induced cytokine production by human gut. *Clin Nutr* 2003; 22: 407-413
- 11 崔巍, 闻颖, 董亚玲, 刘沛. 谷氨酰胺对体外培养肠上皮细胞屏障通透性的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3729-3733
- 12 Singleton KD, Beckey VE, Wischmeyer PE. Glutamine prevents activation of NF-kappaB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. *Shock* 2005; 24: 583-589
- 13 张小平, 程爱国, 陈玉红. 谷氨酰胺对饥饿大鼠内毒素移位和肠黏膜免疫功能的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1982-1986
- 14 王凤君, 汪仕良, 赵云, 尤忠义, 王裴. 不同营养支持途径对烧伤大鼠肠黏膜上皮细胞周期的影响. *中华烧伤杂志* 2002; 18: 203-206
- 15 Mazzon E, Sturniolo GC, Puzzolo D, Frisina N, Fries W. Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. *Gut* 2002; 51: 507-513
- 16 Matsuda M, Kubo A, Furuse M, Tsukita S. A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 1247-1257
- 17 Hossain Z, Hirata T. Molecular mechanism of intestinal permeability: interaction at tight junctions. *Mol Biosyst* 2008; 4: 1181-1185
- 18 Farmer DG, Venick RS. Morbidity and mortality associated with chronic intestinal failure. *Transplantation* 2008; 85: 1385-1386
- 19 Vega D, Badami CD, Caputo FJ, Watkins AC, Lu Q, Xu da Z, Berezina TL, Zaets SB, Feketeova E, Deitch EA. The influence of the type of resuscitation fluid on gut injury and distant organ injury in a rat model of trauma/hemorrhagic shock. *J Trauma* 2008; 65: 409-414; discussion 414-415
- 20 Zhang F, Tong L, Qiao H, Dong X, Qiao G, Jiang H, Sun X. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. *J Surg Res* 2008; 149: 101-109
- 21 Beale RJ, Sherry T, Lei K, Campbell-Stephen L, McCook J, Smith J, Venetz W, Altheheld B, Stehle P, Schneider H. Early enteral supplementation with key pharmacutrients improves Sequential Organ Failure Assessment score in critically ill patients with sepsis: outcome of a randomized, controlled,

■同行评价

本研究选题尚可, 设计合理, 结果可靠, 但内容稍显简单.

- double-blind trial. *Crit Care Med* 2008; 36: 131-144
- 22 Simonovic I, Rosenberg J, Koutsouris A, Hecht G. Enteropathogenic Escherichia coli dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cell Microbiol* 2000; 2: 305-315
- 23 Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Ruben LL. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 14): 1603-1613
- 24 Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123: 1777-1788
- 25 Li N, Lewis P, Samuelson D, Liboni K, Neu J. Glutamine regulates Caco-2 cell tight junction proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G726-G733
- 26 Sheth P, Seth A, Thangavel M, Basuroy S, Rao RK. Epidermal growth factor prevents acetaldehyde-induced paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 797-804
- 27 Atkinson KJ, Rao RK. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1280-G1288
- 28 Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK. Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 324-329
- 29 郭光华, 邓志云, 范骏, 张红艳, 李国辉. 早期肠内谷氨酰胺补给对烫伤大鼠回肠p-ERK通路的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 353-358
- 30 Basuroy S, Seth A, Elias B, Naren AP, Rao R. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochem J* 2006; 393: 69-77
- 31 Baltes S, Nau H, Lampen A. All-trans retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions. *Dev Growth Differ* 2004; 46: 503-514
- 32 Weiler F, Marbe T, Scheppach W, Schaubert J. Influence of protein kinase C on transcription of the tight junction elements ZO-1 and occludin. *J Cell Physiol* 2005; 204: 83-86
- 33 Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 1993; 120: 477-483
- 34 Yang R, Harada T, Li J, Uchiyama T, Han Y, Englert JA, Fink MP. Bile modulates intestinal epithelial barrier function via an extracellular signal related kinase 1/2 dependent mechanism. *Intensive Care Med* 2005; 31: 709-717
- 35 胡晓骅, 葛艳玲, 辛动, 李海波, 张会英, 孙永华, 乌司他丁对严重烧伤小型猪肠黏膜损伤的影响. *中华烧伤杂志* 2003; 19: 18-21

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第九次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2009-12-04/06在广州市召开第九次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下:

1 征文内容

与消化系统疾病有关的流行病学、基础及临床研究. (1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性肠病; (7)胃肠激素; (8)消化疾病介入治疗; (9)青年委员会专场(全部用英文交流).

2 征文要求

(1)报送的论文要求800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者姓名、单位及邮编, 论文文责自负. 投青年会专场的论文必须附相应的英文摘要, 第一作者年龄须在45周岁以下(1964-11后出生). (2)凡已在全国性学术会议或全国公开发行的刊物上发表过的论文不予受理. (3)通过本次会议专用网站报送电子文稿及报名注册, 会议不接受书面投稿. 要求作者本人通过会议网站上传稿件并留下联系方式, 会议网址: <http://www.csgd.org.cn>. (4)截稿日期: 2009-09-15.

希望各地委员积极、认真组织所在地区医生踊跃投稿并参会.

DEC205在幽门螺杆菌感染的巨噬细胞中的表达

赵莹, 魏晓晴, 崔颖, 高颖

赵莹, 魏晓晴, 崔颖, 高颖, 大连医科大学中心实验室 辽宁省医学细胞分子生物学重点实验室 辽宁省大连市 116044
赵莹, 博士, 主要从事幽门螺杆菌与胃疾病关系的研究。
辽宁省教育厅2009年度高等学校科研项目计划基金资助项目, No. 2009A195
作者贡献分布: 此课题由赵莹设计并操作完成; 数据分析由魏晓晴与崔颖完成; 本论文写作由赵莹与高颖完成。
通讯作者: 高颖, 教授, 116044, 辽宁省大连市, 大连医科大学中心实验室. gaoying822@hotmail.com
电话: 0411-86110290
收稿日期: 2009-05-05 修回日期: 2009-06-14
接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-18

Expression of DEC205 in *Helicobacter pylori*-infected macrophages

Ying Zhao, Xiao-Qing Wei, Ying Cui, Ying Gao

Ying Zhao, Xiao-Qing Wei, Ying Cui, Ying Gao, Central Laboratory and Liaoning Provincial Key Laboratory of Medical Cellular and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China
Supported by: the Scientific Research Foundation of the Higher Education Institutions of Liaoning Province, No. 2009A195
Correspondence to: Professor Ying Gao, Central Laboratory, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China. gaoying822@hotmail.com
Received: 2009-05-05 Revised: 2009-06-14
Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection and the expression of DEC205.

METHODS: *H pylori*-HSP60 was prepared by a recombinant DNA procedure. After monocytic cells (NOMO1 line) were infected with *H pylori* or stimulated with *H pylori*-HSP60 or *E.coli*-LPS, whole cell protein was extracted and analyzed by Western blot. NOMO1 cells were then treated with PMA to induce their differentiation into macrophages, and infected with *H pylori* or stimulated with *H pylori*-HSP60. The expression of DEC205 mRNA was detected by real-time PCR. The expression of DEC205 protein on the surface of NOMO1 cells was analyzed by flow cytometry.

RESULTS: The expression of DEC205 protein

was markedly increased following *H pylori* infection, whereas the protein expression was only slightly upregulated after stimulation with *H pylori*-HSP60 or *E.coli*-LPS. After treatment of NOMO1 cells with PMA, the expression of DEC205 mRNA was enhanced. Subsequent infection with *H pylori* or stimulation with *H pylori*-HSP60 could induce the expression of DEC205 mRNA in differentiated NOMO1 cells. Flow cytometry analysis indicated that the expression of DEC205 protein was upregulated obviously on the surface of *H pylori*-infected NOMO1 cells (88.10% vs 7.84%, $P < 0.05$). Moreover, *H pylori* infection and *H pylori*-HSP60 stimulation could also increase DEC205 expression in differentiated NOMO1 cells (74.73% and 51.31% vs 43.77%, both $P < 0.05$).

CONCLUSION: *H pylori* infection may be closely related with the expression of DEC205 on the surface of macrophages in gastric mucosa.

Key Words: *Helicobacter pylori*; DEC205; Macrophage

Zhao Y, Wei XQ, Cui Y, Gao Y. Expression of DEC205 in *Helicobacter pylori*-infected macrophages. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2037-2041

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与巨噬细胞表面的胞吞受体DEC205的关系。

方法: 用蛋白纯化法提取得到*H pylori*-HSP60。分别用*H pylori*、*H pylori*-HSP60和*E.coli*-LPS刺激单核细胞(NOMO1)后提取蛋白进行免疫印迹法分析。利用PMA将NOMO1细胞分化成巨噬细胞,再用*H pylori*或*H pylori*-HSP60刺激细胞后提取RNA进行实时PCR分析;细胞表面DEC205抗原的表达通过流式细胞术进行分析。

结果: *H pylori*的刺激能明显引起DEC205蛋白的表达,而*H pylori*-HSP60或*E.coli*-LPS的刺激只引起了少许DEC205蛋白的表达;经PMA分化后的NOMO1细胞表面DEC205 mRNA的表达增强,分化后的NOMO1细胞被*H pylori*或

■背景资料

*H pylori*感染的胃组织可通过淋巴细胞和巨噬细胞的大量浸润进行免疫调节。表达于树突状细胞的DEC205是一种完整的膜糖蛋白,与抗原摄取、处理和提呈相关,能够诱导抗原特异性T细胞免疫。*H pylori*感染与DEC205的关系目前尚不清楚。

■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

Yamasaki *et al* 曾报道 *H pylori*-HSP60 刺激外周血单核细胞后, 胃炎患者的 DEC205 mRNA 表达明显增高。

H pylori-HSP60 刺激后也增强了 DEC205 mRNA 的表达; 流式细胞术结果表明 NOMO1 细胞在 *H pylori* 刺激后, 细胞表面 DEC205 抗原的表达明显增加 (88.10% vs 7.84%, $P < 0.05$), 而且当 NOMO1 细胞被 PMA 分化后, 经 *H pylori* 或 *H pylori*-HSP60 刺激后 DEC205 表达也有所增高 (74.73%, 51.31% vs 43.77%, 均 $P < 0.05$)。

结论: *H pylori* 感染与巨噬细胞表面的胞吞受体 DEC205 有着密切的联系。

关键词: 幽门螺杆菌; DEC205; 巨噬细胞

赵莹, 魏晓晴, 崔颖, 高颖. DEC205 在幽门螺杆菌感染的巨噬细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2037-2041
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2037.asp>

0 引言

通过巨噬细胞引起的细菌局部获得性免疫机制至今还不是十分清楚. 在 *H pylori* 感染中, 巨噬细胞分泌的细胞因子产物明显升高^[1]. *H pylori* 感染的胃组织中会通过淋巴细胞和巨噬细胞的大量浸润来进行免疫调节^[2]. 然而, 胃黏膜中巨噬细胞和 *H pylori* 的关系并不是十分清楚. DEC205 属于甘露糖家族中 C 型凝集素超家族中的一个亚族, 与 B 细胞一样存在于巨噬、胸腺、肺及肠上皮细胞表面^[3]. DEC205 作为树枝状细胞表面的膜糖蛋白, 具有抗原提呈作用, 能够诱导抗原特异性 T 细胞免疫^[4]. 人类的 DEC205 是一个 200 kDa 的糖蛋白, 表达于胸腺、树突状细胞及少量 T 细胞中^[5]. 然而, DEC205 在胃黏膜的分布仍然不清楚. Yamasaki *et al*^[6] 曾报道 *H pylori*-HSP60 刺激外周血单核细胞后, 胃炎患者的 DEC205 的 mRNA 的表达明显增高. HSP60 表达于 *H pylori* 表面, 与此菌表面产生的尿素酶等病原因子突破了胃壁的天然保护屏障, 构成了 *H pylori* 感染的病理变化^[7]. 目前大量报道也指出由于 *H pylori*-HSP60 的功能和位置, 使得这个蛋白对于 *H pylori* 感染的局部和系统免疫产生影响^[8]. 本研究调查了巨噬细胞中 *H pylori* 感染与 DEC205 表达的关系, 即 *H pylori* 或 *H pylori*-HSP60 刺激经 PMA 分化的单核细胞系 NOMO1 细胞后 DEC205 的表达状况。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* (ATCC 43504) 购于美国标准菌库. 细菌培养使用含有 7% 无菌、不含纤维蛋白的马血脑心浸液琼脂培养基, 在含有 100 mL/L

CO₂, 50 mL/L O₂, 和 850 mL/L N₂ 的微需氧培养箱中培养. 经过 3 d 的培养, *H pylori* 以 A₆₀₀ = 1.0 (相当于 1 × 10⁸ 个细菌/mL) 数量移至不含胎牛血清的 RPMI 1640 (Gibco 公司) 培养液中. 单核细胞系 NOMO1 购买于日本科研生物制品公司. 细胞培养在含有 100 mL/L 胎牛血清, 50 kU/L 青霉素, 50 U/L 链霉素和 2.5 mg/L 两性霉素 B 的 RPMI 1640 培养液中, 在 37°C、50 mL/L CO₂ 和 99% 湿度的温箱中. 在每次实验之前, 细胞被不含任何抗体的 RPMI 1640 培养液清洗 3 次, 并将细胞数量维持在 2 × 10⁶ cells/mL. 为了使细胞分化为巨噬细胞, 20 nmol/mL PMA 被加入到培养液中. 大肠杆菌的脂多糖购买于 Sigma 公司. DEC205 和 Actin 抗体购于 BD 公司. CD14 抗体购于 R&D 公司. IgG-PE 购于 Santa Cruz 公司. IgG-FITC 购于 MP Biomedicals 公司. ECL 发光剂购于 Amersham Pharmacia 公司. RNA 抽取试剂盒购于 Qiagen 公司. 逆转录分析使用 SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System 购于 invitrogen. 流式细胞仪 (BD 公司, 美国), 紫外-可见分光光度计 (Beckman 公司, 美国), 实时 PCR 执行于 LightCycler Quick System 350S (Roche 公司, 瑞士), LightCycle software Ver.3.5 软件 (Roche 公司, 瑞士), LAS-1000 mini 图像分析系统 (Fuji 公司, 日本), Image Gauge Ver 4.0 软件 (Fuji 公司, 日本).

1.2 方法

1.2.1 蛋白纯化: 通过 PCR 技术构建 *H pylori*-HSP60 基因重组表达载体 pEGX-5X3, 经大肠杆菌 DH5α 表达得到可溶性 GST 融合蛋白, 采用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 进行分离与纯化, 经氨基酸序列测序确定其蛋白的一源性。

1.2.2 免疫印迹法: 将用 *H pylori*、*H pylori*-HSP60 或 LPS 处理的 NOMO1 细胞收集后离心, 在冰上孵育 20 min, 用超声波破碎细胞, 离心后上清液按 1:1 与 2 × SDS 样品缓冲液混合, 煮沸 5 min. 溶胞产物用 12% SDS-PAGE 进行电泳, 转染至 PVDF 膜. 膜用 TBS 清洗后, 封闭于含有 50 g/L 脱脂奶的 TBS/Tween20 室温下孵育 1 h, 经 TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 用 DEC205 或 actin 抗体室温下孵育 1 h, 此时抗体稀释于含有 50 g/L 脱脂奶的 TBST 溶液中, 再分别用 IgG HRP 标记的二抗室温下孵育 1 h, 然后以 ECL 化学发光剂显色曝光于 LAS-1000 mini 图像分析系统. DEC205 的条带灰度值分析于 Image Gauge Ver 4.0 软件, 并以肌动蛋白作为标准化计算。

1.2.3 实时 PCR 分析: 先将 NOMO1 细胞用 20 μg/L

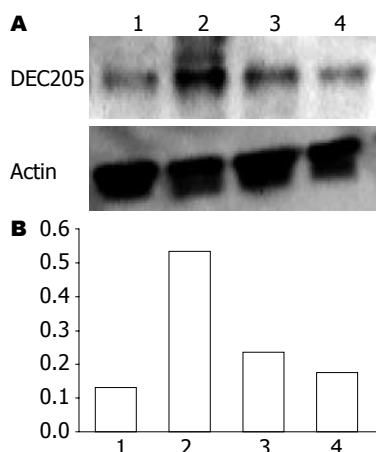


图 1 *H. pylori*感染的单核细胞中DEC205蛋白表达. 1: Cells; 2: *H. pylori*; 3: *H. pylori*-HSP60; 4: *E. coli* LPS.

的PMA预处理5 min, 然后用*H. pylori*或*H. pylori*-HSP60刺激. 全量的RNA从 3×10^6 NOMO1细胞中利用RNeasy Mini kit进行提取. RNA的浓度, 通过 A_{260} 值测定, 根据 A_{260}/A_{280} 比值, 推测RNA纯度. 提取的RNA保存于 -80°C 直至使用. 在确认RNA提取过程中没有DNA的污染后, 利用逆转录酶, 进行逆转录分析. 实时PCR执行于LightCycler Quick System 350S. $2 \mu\text{L}$ cDNA加入到 $20 \mu\text{L}$ 反应体系中, 其中包括 $10 \mu\text{L}$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™]聚合酶混合物, $2 \mu\text{L}$ DEC205引物混合物(5'-CAAATTCCAAAAGGCCGTACTC-3'; 5'-CACCACCTTCTGTCCATCACCA-3')或G3PDH引物混合物(5'-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3'; 5'-CTGGAAGATGGTGATGGGATTT-3'), $7.2 \mu\text{L}$ 超纯水以及 $0.8 \mu\text{L}$ DNATaq聚合酶. 反应条件为先用 95°C 30 s, 1个循环; 95°C 5 s, 55.5°C 10 s, 72°C 15 s, 35个循环; 65°C 15 s, 40°C 30 s, 1个循环. 数据用LightCycle software Ver 3.5分析, 计算IL-8/G3PDH比值.

1.2.4 流式细胞术分析: 用*H. pylori*或*H. pylori*-HSP60处理的NOMO1细胞表面DEC205和CD14的表达通过流式细胞术进行分析. 10^5 细胞首先在室温下用IgG孵育15 min阻滞Fc受体. 细胞再用DEC205或CD14抗体孵育1 h, 然后用IgG-PE或IgG-FITC二抗孵育30 min. 所有的染色过程 4°C 及含有0.02%叠氮钠和0.2% BSA的PBS溶液中进行. 然后将样品固定在2%多聚甲醛/0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.3)中20 min, 然后使用流式细胞仪进行分析.

统计学处理 实验结果以mean \pm SE表示. 数据通过Student's *t*检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

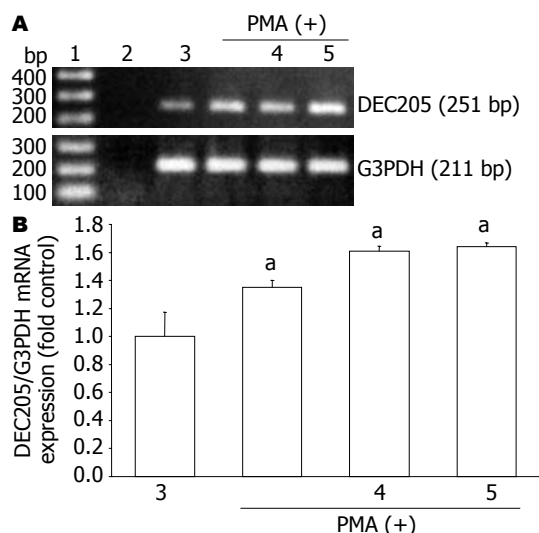


图 2 *H. pylori*感染的巨噬细胞中DEC205 mRNA表达. 1: Marker; 2: RT-PCR; 3: 对照组; 4: *H. pylori*-HSP60; 5: *H. pylori*. * $P < 0.05$ vs 对照组.

2 结果

2.1 DEC205蛋白的表达 $2 \times 10^6/\text{mL}$ NOMO1细胞经 $5 \times 10^7/\text{mL}$ *H. pylori*、 100 mg/L *H. pylori*-HSP60或 10 mg/L *E. coli*-LPS刺激后过夜培养, 细胞溶解物分别用DEC205或actin抗体进行免疫印迹分析(图1A), *H. pylori*的刺激明显引起了DEC205蛋白的表达, 而*H. pylori*-HSP60或*E. coli*-LPS的刺激只引起了少许DEC205蛋白的表达, DEC205与内参actin相对灰度比值使用Image Gauge软件进行分析(图1B).

2.2 DEC205 mRNA的表达 $3 \times 10^6/\text{mL}$ NOMO1细胞首先用 $20 \mu\text{g/L}$ PMA进行6 h的预处理后, 分别用 $5 \times 10^7/\text{mL}$ *H. pylori*或 100 mg/L *H. pylori*-HSP60刺激NOMO1细胞后进行过夜培养, 观察了DEC205 mRNA的表达状况. DEC205 mRNA的表达通过RT-PCR进行分析(图2A). 可以看到经PMA分化后的NOMO1细胞表面DEC205 mRNA的表达增强, 分化后的NOMO1细胞被*H. pylori*或*H. pylori*-HSP60刺激后似乎也增强了DEC205 mRNA的表达. 同时, DEC205 mRNA的表达也通过实时PCR进行定量分析(图2B). 结果显示PMA的分化增强了DEC205 mRNA的表达, 而细菌的额外刺激又增加了这个表达.

2.3 DEC205表达于*H. pylori*感染的单核和巨噬细胞表面 $2 \times 10^6/\text{mL}$ NOMO1细胞用 $20 \mu\text{g/L}$ PMA进行6 h的预处理或不处理后, 分别用 $5 \times 10^7/\text{mL}$ *H. pylori*或 100 mg/L *H. pylori*-HSP60进行过夜培养. 细胞表面DEC205表达通过流式细胞术进行分析(图3). 数据显示没有被PMA分化的NOMO1

■ 创新盘点

本研究利用WB、实时PCR和FACS技术, 分别从蛋白水平、RNA水平及细胞表面抗原表达量来分析*H. pylori*刺激细胞后DEC205的变化, 揭示*H. pylori*的致病机制, 国内外尚未见相关报道.

应用要点

本研究通过探讨胃疾病重要致病因子 *H. pylori* 与甘露糖受体家族成员之一的 DEC205 的关系, 揭示 *H. pylori* 感染所致胃炎中 DEC205 扮演的免疫调节角色, 为临床治疗提供新的靶点。

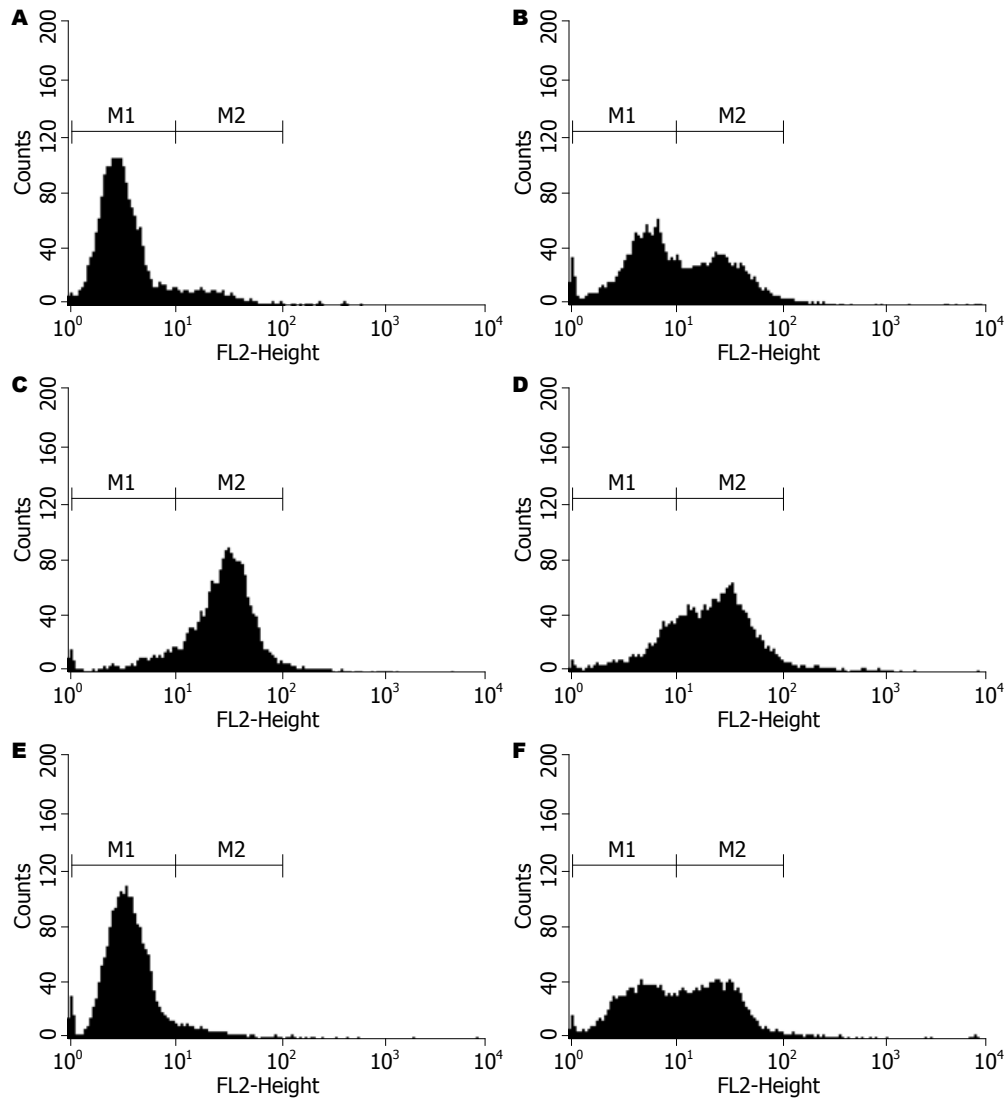


图3 *H. pylori* 感染的单核和巨噬细胞表面 DEC205 的表达。A-B: Cells; C-D: *H. pylori*; E-F: *H. pylori*-HSP60; A、C、E: PMA(-); B、D、F: PMA(+).

细胞在没有任何刺激下, 几乎没有 DEC205 的表达(图3A), 经 *H. pylori* 刺激后, DEC205 的表达由刺激前的 7.84% 增长至刺激后的 88.1% (图3C), 但 *H. pylori*-HSP60 的刺激没有引起 DEC205 表达的变化(图3E), 此结果与图1一致。当 NOMO1 细胞被 PMA 分化后, 经 *H. pylori* 或 *H. pylori*-HSP60 刺激的 DEC205 表达由 43.77% (图3B) 分别增至 74.73% (图3D) 和 51.31% (图3F), 此结果与图2一致。这些结果表明了巨噬样 NOMO1 细胞 DEC205 的表达与细菌刺激有关。

3 讨论

H. pylori 的慢性感染是慢性活动性胃十二指肠炎症、胃十二指肠溃疡、胃 MALT 淋巴瘤以及胃癌发生发展的重要致病因子。其中, MALT 淋巴瘤的患者, 经除菌治疗后, 60%-70% 的患者的淋

巴瘤消失, 考虑是由于 *H. pylori* 感染刺激后引起胃淋巴组织增生。*H. pylori* 作为非细胞侵入性细菌, 却能够引起胃的各种病变, 是因为此菌表面能够产生鞭毛、尿素酶、热休克蛋白、空泡毒素 (VacA) 和细胞毒素 (CagA) 等病原因子, 这些因素突破了胃壁的天然保护屏障, 构成了 *H. pylori* 感染的病理变化。其中热休克蛋白作为受到外界不良刺激时被释放出来的应激蛋白, 已经被报道与原始适应性免疫系统有着紧密地联系, 能够诱导细胞产生炎症因子等物质来帮助宿主抵御外界刺激和损伤^[9-10], 其功能与作用正被国内外学者所认知和密切关注。

甘露糖受体 (MR) 家族广泛地分布于巨噬细胞或树枝状细胞表面。MR 与白色念珠菌、卡氏肺囊虫、结核分枝杆菌、克雷白 (氏) 杆菌属等的各种微生物结合后表达于巨噬细胞^[10-14]。此次

研究, 我们显示了甘露糖受体(MR)家族其中成员之一的DEC205因为*H pylori*的感染使之表达于巨噬细胞表面. 表明DEC205表达阳性的巨噬细胞可能在*H pylori*感染的胃黏膜上也有着重要的免疫作用. DEC205的表达与IL4受体的信号传导相关, 阻断DEC205可以减少IL4从淋巴细胞中的分泌^[15]. Yamasaki *et al*曾报道胃MALT淋巴瘤患者的淋巴细胞中IL4的分泌产物增多, 而胃炎的患者却没有增多, 此外, 胃MALT淋巴瘤中, 外周血单核细胞的DEC205表达明显减少. DEC205可能与胃MALT淋巴瘤中B细胞增殖有关. 另一方面, 在肿瘤的发展中, DEC205与IL4受体紧密相关^[16]. 在一些病例中, DEC205表达缺失与乳腺和直肠浸润性癌有关^[17]. 此次研究我们只调查了*H pylori*与巨噬细胞的关系. 我们将会在今后的工作中进一步调查胃炎患者胃黏膜活检中DEC205的表达. 免疫系统如何认识胃中*H pylori*早期感染以及其对菌体的反应, 目前还不是很清楚. 因为胃MALT淋巴瘤并不真正存在于胃中, 通常肠内淋巴组织免疫反应发生于回肠末端的肠道集合淋巴结内^[18]. 目前的研究表明DEC205表达于单核/巨噬细胞. 因此, DEC205通过胞吞作用引起的抗原提呈效应和T细胞特殊免疫反应也可能占据于胃黏膜. DEC205在免疫反应或癌症的发生发展中具有许多功能. 我们认为目前探讨DEC205在胃炎中的角色只是第一步, 在今后的研究中我们还将继续探讨更进一步的*H pylori*病理过程.

4 参考文献

- Harris PR, Smythies LE, Smith PD, Dubois A. Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *J Infect Dis* 2000; 181: 783-786
- Suzuki T, Kato K, Ohara S, Noguchi K, Sekine H, Nagura H, Shimosegawa T. Localization of antigen-presenting cells in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Pathol Int* 2002; 52: 265-271
- East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 364-386
- Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004; 199: 9-26
- Shimizu K, Fujii S. An adjuvant role of in situ dendritic cells (DCs) in linking innate and adaptive immunity. *Front Biosci* 2008; 13: 6193-6201
- Yamasaki R, Yokota K, Okada H, Hayashi S, Mizuno M, Yoshino T, Hirai Y, Saitou D, Akagi T, Oguma K. Immune response in *Helicobacter pylori*-induced low-grade gastric-mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. *J Med Microbiol* 2004; 53 (Pt 1): 21-29
- Yokota K, Ayada K, Son-NanLin, Oguma K, Takenaka R. [Mechanisms of inflammation induced by *H. pylori*-HSP60] *Nippon Rinsho* 2005; 63 Suppl 11: 75-79
- Yunoki N, Yokota K, Mizuno M, Kawahara Y, Adachi M, Okada H, Hayashi S, Hirai Y, Oguma K, Tsuji T. Antibody to heat shock protein can be used for early serological monitoring of *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 574-577
- Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, Lin SN, Toyokawa T, Okada H, Shiratori Y, Oguma K. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology* 2004; 150 (Pt 12): 3913-3922
- Zhao Y, Yokota K, Ayada K, Yamamoto Y, Okada T, Shen L, Oguma K. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes. *J Med Microbiol* 2007; 56 (Pt 2): 154-164
- van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJ, Cheng SC, Joosten I, van den Berg WB, Williams DL, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* 2009; 5: 329-340
- Swain SD, Lee SJ, Nussenzweig MC, Harmsen AG. Absence of the macrophage mannose receptor in mice does not increase susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection in vivo. *Infect Immun* 2003; 71: 6213-6221
- Torrelles JB, Azad AK, Henning LN, Carlson TK, Schlesinger LS. Role of C-type lectins in mycobacterial infections. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 102-112
- Barton E, Flanagan P, Hill S. Spinal infection caused by ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* treated with temocillin. *J Infect* 2008; 57: 347-349
- McKay PF, Imami N, Johns M, Taylor-Fishwick DA, Sedibane LM, Totty NF, Hsuan JJ, Palmer DB, George AJ, Foxwell BM, Ritter MA. The gp200-MR6 molecule which is functionally associated with the IL-4 receptor modulates B cell phenotype and is a novel member of the human macrophage mannose receptor family. *Eur J Immunol* 1998; 28: 4071-4083
- Al-Tubuly AA, Spijker R, Pignatelli M, Kirkland SC, Ritter MA. Inhibition of growth and enhancement of differentiation of colorectal carcinoma cell lines by MAb MR6 and IL-4. *Int J Cancer* 1997; 71: 605-611
- Tungekar MF, Gatter KC, Ritter MA. Bladder carcinomas and normal urothelium universally express gp200-MR6, a molecule functionally associated with the interleukin 4 receptor (CD 124). *Br J Cancer* 1996; 73: 429-432
- Santacroce L, Cagiano R, Del Prete R, Bottalico L, Sabatini R, Carlaio RG, Prejbeanu R, Vermesan H, Dragulescu SI, Vermesan D, Motoc A, Losacco T. *Helicobacter pylori* infection and gastric MALTomas: an up-to-date and therapy highlight. *Clin Ter* 2008; 159: 457-462

■同行评价

本文观察*H pylori*感染的巨噬细胞中DEC205表达, 对阐明*H pylori*免疫致病机制有重要理论指导意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

肝细胞癌患者血清DcR3水平与临床意义

杨梅松竹, 陈罡, 党裔武, 陈霜, 罗殿中

■背景资料

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 特异性的诊断指标一直是肝癌早期发现的研究重点。DcR3在多种恶性肿瘤中呈高表达, 并可分泌至血清中, 有望成为新的恶性肿瘤的诊断指标应用于临床。

杨梅松竹, 陈罡, 党裔武, 陈霜, 罗殿中, 广西医科大学病理教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

杨梅松竹, 在读硕士, 主要从事肝癌免疫分子生物学研究。广西科学研究与技术开发计划资助项目(桂科能), No. 05112001-4。

广西科学基金资助项目(桂科基), No. 0639040

作者贡献分布: 此课题由杨梅松竹, 陈罡及罗殿中设计; 研究过程由杨梅松竹, 党裔武及陈霜操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由杨梅松竹, 陈罡及罗殿中提供; 数据分析由杨梅松竹与陈罡完成; 本论文写作由杨梅松竹与罗殿中完成。

通讯作者: 罗殿中, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西医科大学病理教研室。

luodianzhong@yahoo.com.cn

电话: 0771-5359206 传真: 0771-5359206

收稿日期: 2009-04-15 修回日期: 2009-06-23

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-07-18

Clinical significance of elevated serum DcR3 in patients with hepatocellular carcinoma

Song-Zhu Yangmei, Gang Chen, Yi-Wu Dang, Shuang Chen, Dian-Zhong Luo

Song-Zhu Yangmei, Gang Chen, Yi-Wu Dang, Shuang Chen, Dian-Zhong Luo, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Scientific Research and Technology Development Program of Guangxi, Gui Ke Neng No. 05112001-4; and the Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Gui Ke Ji No. 0639040

Correspondence to: Professor Dian-Zhong Luo, Department of Pathology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. luodianzhong@yahoo.com.cn

Received: 2009-04-15 Revised: 2009-06-23

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the diagnostic value and clinical significance of elevated serum decoy receptor 3 (DcR3) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Serum DcR3 levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 67 patients with HCC, 8 patients with liver cirrhosis, 17 patients with cholecystitis and 28 healthy individuals. Serum alpha fetoprotein (AFP) levels were measured by chemiluminescence. The expression of DcR3 in HCC tissue

was evaluated by immunohistochemistry (IHC).

RESULTS: The levels of serum DcR3 in both HCC and liver cirrhosis patients were significantly higher than that in healthy individuals ($P < 0.01$). The level of serum DcR3 in HCC patients was correlated with the development of cirrhosis, capsular infiltration and metastasis ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the levels of DcR3 in the serum and HCC tissue ($r = 0.395, P < 0.01$). The positive rate of DcR3 in the serum was significantly higher than that in HCC tissue ($P < 0.05$). The sensitivities of single detection of AFP or DcR3 were 82% and 376%, respectively. In contrast, the sensitivity of combined detection of AFP and DcR3 rose to 93%.

CONCLUSION: Elevated serum DcR3 may play an important role in the pathogenesis, development, invasion and metastasis of HCC. It may be of great significance for the screening, diagnosis and prognosis of HCC to simultaneously monitor the levels of DcR3 and AFP in the serum of high-risk populations and HCC patients.

Key Words: DcR3; Hepatocellular carcinoma; Enzyme linked immunosorbent assay; Immunohistochemistry

Yangmei SZ, Chen G, Dang YW, Chen S, Luo DZ. Clinical significance of elevated serum DcR3 in patients with hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2042-2047

摘要

目的: 探讨血清DcR3水平对HCC的诊断价值及临床意义。

方法: 采用ELISA检测67例HCC、8例肝硬化、17例胆囊炎患者和28例正常人血清DcR3水平; 化学发光法测定血清AFP水平; 免疫组织化学二步法检测HCC癌组织中DcR3蛋白的表达。

结果: HCC组和肝硬化组血清DcR3水平均明显高于正常对照组($P < 0.01$), HCC血清DcR3水平与伴有肝硬化、包膜浸润和复发转移有关

■同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科

($P < 0.05$). DcR3蛋白在HCC癌组织中的表达与血清水平呈正相关($r = 0.395, P < 0.01$), 但DcR3血清阳性率明显高于癌组织IHC($P < 0.05$). AFP与DcR3联合检测对HCC的诊断灵敏度可由单项检测的82%和76%提高到93%.

结论: 血清DcR3升高在HCC的发生发展及浸润转移中起重要作用, 通过监测高危人群以及肝癌患者血清中的DcR3水平, 同时联合检测AFP, 可能对HCC的筛查、诊断和判断预后有一定意义.

关键词: DcR3; 肝细胞癌; 酶联免疫吸附实验; 免疫组织化学

杨梅松竹, 陈罡, 党裔武, 陈霜, 罗殿中. 肝细胞癌患者血清DcR3水平与临床意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2042-2047
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2042.asp

0 引言

诱捕受体3(decoy receptor 3, DcR3)是肿瘤坏死因子受体超家族(tumor necrosis factor receptor, TNFR)的新成员^[1], 可以竞争性抑制配体与死亡受体的结合, 阻断配体诱导产生的细胞凋亡^[2-3], 在多种恶性肿瘤, 特别是胃肠道肿瘤^[4]中表达升高. 本课题组的前期研究^[5-6]显示肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织及细胞系存在DcR3 mRNA和蛋白的过表达, 并且可影响肿瘤细胞凋亡. 由于是一种分泌性蛋白, 可在血清中检测到, 有研究发现多种恶性肿瘤患者血清DcR3升高^[7]. 为了进一步探讨DcR3对HCC的临床诊断价值, 我们采用酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测HCC、肝硬化、胆囊炎患者以及正常人血清DcR3水平, 化学发光法检测血清AFP水平, 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)二步法检测HCC癌组织中DcR3蛋白表达, 探讨血清DcR3水平对HCC筛查、诊断和判断预后的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 血清标本取自2006-09/2007-09在广西医科大学第一附属医院行肝癌手术的HCC患者67例, 其中男58例, 女9例, 年龄29-74(平均47.7±10.2)岁. 患者术后均给予以化疗为主的综合治疗. HCC诊断按照2000年WHO分类标准分为高分化16例, 中分化37例, 低分化14例. HCC临床分期按照2003年国际抗癌联盟(UICC)和美国肿瘤联合会(AJCC)联合制定的TNM分期法分为 I 期

26例, II期11例, III期19例, IV期11例. 肝硬化患者8例, 其中男6例, 女2例, 年龄28岁-60(平均43.6±11.1)岁. 胆囊炎患者17例, 其中男9例, 女8例, 年龄25-79(平均55.3±15.4)岁. 以上患者术后均经病理证实. 正常对照组血清取自健康成年献血者28例. 标本取自患者术前和献血者外周静脉血, 静置后取上层血清, 分装保存于-80℃备用. 组织标本取自广西医科大学第一附属医院病理科上述HCC患者手术切除组织存档蜡块. Human DcR3 ELISA试剂盒购自奥地利Bender MedSystems GmbH公司. 抗DcR3兔多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 工作浓度为1:150. IHC二步法试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 ELISA: 按照试剂盒说明书进行配液, 将标准蛋白和血清样本加入微孔板, 加生物素-结合物(Biotin-conjugate)孵育, 洗板, 加抗生物素蛋白链菌素-辣根过氧化物酶(streptavidin-HRP)孵育, 再洗板, 加四甲基联苯胺(TMB)避光反应, 加终止液终止反应, 酶标仪测量吸光值, 由标准曲线求出各血清样本浓度. 根据正常对照组血清DcR3水平, 按照百分位数法得到 $P_{95} = 122.22$ ng/L, 依此设定阳性界值为122.22 ng/L, 浓度高于此值者, 则认为血清DcR3阳性.

1.2.2 IHC染色: 抗DcR3兔单抗已知阳性组织切片作阳性对照, PBS代替一抗作阴性对照. 4 μm厚连续石蜡切片, 脱蜡, 阻断内源性过氧化物酶, 高压修复抗原, 加一抗孵育, 加标记过氧化物酶的二抗孵育, 冲洗后加二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木精复染, 脱水, 封片后光镜下观察. 凡细胞质呈现明显的棕黄色者为阳性细胞. 由2名病理科医师采用双盲法阅片, 双评分半定量法评分^[8]: 靶细胞阳性率<5%为0分, 6%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分; 显色程度按靶细胞显色有无及深浅记分, 细胞无染色为0分, 浅棕黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; 将两分相乘, 0分为(-), 1-4分为(+), 5-8分为(++), ≥9分为(+++).

1.2.3 化学发光法: AFP化学发光试剂盒购自广州伟之晨公司, 经美国雅培ARCHITECT i2000SR全自动化学发光免疫分析系统检测, 实验步骤严格按照试剂盒说明书进行, 将血清加入相应的样品杯中, 设定程序, 仪器自动进行定量检测. 按试剂盒提供的参考值, 确定阳性界值为10.90 mg/L.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件对计

■ 研发前沿

肿瘤标志物的研究目前备受关注, 也是肝癌的研究重点. 肿瘤标志物的发现, 对肿瘤的早期发现和早期诊断以及改善患者的生活质量将起到积极的推动作用.

■ 相关报道

以往研究发现DcR3在多种恶性肿瘤患者血清中升高, 可作为恶性肿瘤诊断、治疗和判断预后的一个新参数.

■创新盘点

本研究采用ELISA和免疫组织化学方法研究肝癌患者血清和组织中DcR3的表达,并进行相关性分析和检测阳性率的比较,同时分析血清DcR3水平与肝癌各临床病理参数的关系,初步探讨血清DcR3对肝癌的筛查、诊断和判断预后的意义。

表1 各组血清DcR3水平的比较

| 分组 | n | 血清DcR3阳性 | | 血清DcR3水平 中位数(ng/L) |
|-------|----|----------|----|-----------------------|
| | | n | % | |
| HCC组 | 67 | 51 | 76 | 151.13 ^b |
| 肝硬化组 | 8 | 5 | 62 | 135.87 ^b |
| 胆囊炎组 | 17 | 3 | 18 | 100.02 ^d |
| 正常对照组 | 28 | 1 | 4 | 98.24 |

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^d $P < 0.01$ vs HCC组。

量资料采用秩和检验,计数资料采用 χ^2 检验,相关性采用秩相关分析,以 $P < 0.05$ 判为差异有显著性意义。特异度、敏感度、阳性预测值、阴性预测值、Youden指数、粗符合率作为诊断价值的评价指标。

2 结果

2.1 各组血清DcR3水平比较 HCC组67例患者中51例血清DcR3阳性,阳性率为76%。肝硬化组8例患者中5例血清DcR3阳性,阳性率为62%。胆囊炎组17例患者中3例血清DcR3阳性,阳性率为18%。正常对照组28例患者中1例血清DcR3阳性,阳性率为4%。经Kruskal-Wallis秩和检验分析,HCC组血清DcR3水平明显高于正常对照组、胆囊炎组($P < 0.01$),肝硬化组明显高于正常对照组($P < 0.01$),HCC组与肝硬化组、肝硬化组与胆囊炎组、胆囊炎组与正常对照组比较均无统计学差异($P > 0.05$,表1)。

2.2 HCC血清DcR3水平与临床病理参数的关系 HCC伴有肝硬化、无包膜或包膜浸润、复发转移患者血清DcR3阳性率分别明显高于HCC不伴肝硬化、包膜完整或无包膜浸润、无复发转移患者($P < 0.05$),但与分化程度、临床分期、AFP水平、门脉癌栓、肿瘤结节及肿瘤直径无关($P > 0.05$,表2)。

2.3 HCC癌组织中DcR3表达及其与血清水平相关性分析 检测上述ELISA检测的67例HCC患者中的64例患者癌组织DcR3蛋白的表达(图1),其中15例血清DcR3阴性(0-122.22 ng/L)患者中,4例IHC呈低度阳性;16例血清DcR3低水平(122.23-149.99 ng/L)患者中,10例IHC阳性;20例血清DcR3中等水平(150.00-299.99 ng/L)患者中,14例IHC阳性;13例血清DcR3高水平(≥ 300.00 ng/L)患者中,11例IHC阳性。经Kendall's tau_b秩相关分析,癌组织中DcR3的表达与血清DcR3水平呈正相关($r = 0.395$, $P < 0.01$)。IHC与ELISA检测阳性率分别为61%(39/64)和

表2 HCC患者血清DcR3水平与临床病理参数的关系

| 临床病理参数 | n | 血清DcR3水平(n) | | | χ^2 值 | P值 |
|-----------|----|-------------|----|--------|------------|-------|
| | | 阳性 | 阴性 | 阳性率(%) | | |
| 年龄(岁) | | | | | | |
| ≥50 | 30 | 25 | 5 | 83 | 1.555 | 0.212 |
| <50 | 37 | 26 | 11 | 70 | | |
| 性别 | | | | | | |
| 男 | 58 | 47 | 11 | 81 | 3.902 | 0.048 |
| 女 | 9 | 4 | 5 | 44 | | |
| 分化程度 | | | | | | |
| 高 | 16 | 13 | 3 | 81 | 0.405 | 0.817 |
| 中 | 37 | 28 | 9 | 76 | | |
| 低 | 14 | 10 | 4 | 71 | | |
| 临床分期 | | | | | | |
| I II | 37 | 26 | 11 | 70 | 1.555 | 0.212 |
| III IV | 30 | 25 | 5 | 83 | | |
| 伴肝硬化 | | | | | | |
| 有 | 44 | 37 | 7 | 84 | 4.481 | 0.034 |
| 无 | 23 | 14 | 9 | 61 | | |
| AFP(mg/L) | | | | | | |
| ≥400 | 28 | 23 | 5 | 82 | 0.960 | 0.327 |
| <400 | 39 | 28 | 11 | 72 | | |
| 门脉癌栓 | | | | | | |
| 有 | 11 | 9 | 2 | 82 | 0.010 | 0.922 |
| 无 | 56 | 42 | 14 | 75 | | |
| 包膜浸润 | | | | | | |
| 无包膜或包膜浸润 | 37 | 32 | 5 | 86 | 4.886 | 0.027 |
| 包膜完整或无浸润 | 30 | 19 | 11 | 63 | | |
| 复发转移 | | | | | | |
| 有 | 40 | 34 | 6 | 85 | 4.306 | 0.038 |
| 无 | 27 | 17 | 10 | 63 | | |
| 肿瘤结节 | | | | | | |
| 多个 | 25 | 20 | 5 | 80 | 0.330 | 0.565 |
| 单个 | 42 | 31 | 11 | 74 | | |
| 肿瘤直径(cm) | | | | | | |
| ≥5 | 43 | 35 | 8 | 81 | 1.838 | 0.175 |
| <5 | 24 | 16 | 8 | 67 | | |

77%(49/64),经配对设计 χ^2 检验分析,DcR3血清ELISA检测阳性率明显高于癌组织IHC检测($P < 0.05$,表3)。

2.4 AFP与DcR3联合检测对HCC的诊断评价 AFP与DcR3单项检测对HCC的诊断灵敏度分别为82%和76%,联合检测可将灵敏度提高到93%,且阴性预测值、Youden指数、粗符合率均有明显上升,仅特异度与阳性预测值略有下降(表4)。

3 讨论

DcR3又被称作TR6或者M68,是1998年Pitti *et al*^[1]

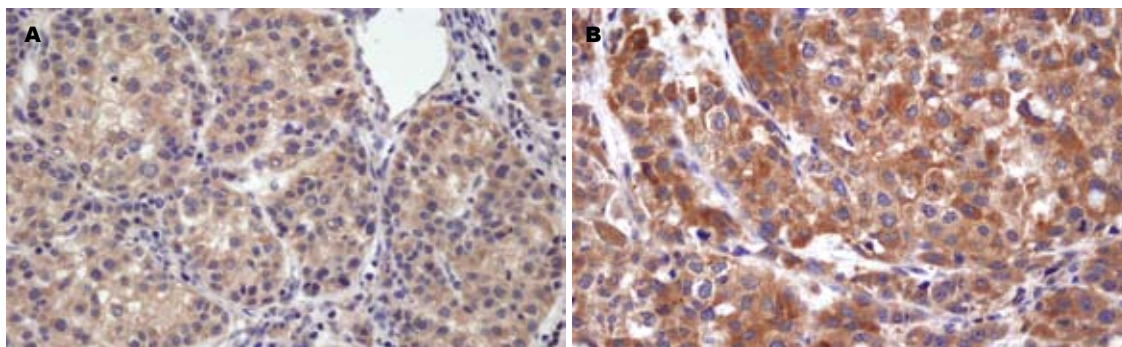


图 1 DcR3蛋白在HCC组织中的表达(×400). HCC组织石蜡包埋切片抗DcR3兔多克隆抗体IHC二步法染色. DcR3蛋白阳性染色定位于癌细胞胞质内, 呈棕黄色颗粒状或斑片状, 阳性细胞的分布呈弥漫性、小巢状或散在分布. A: 阳性; B: 强阳性.

■应用要点
HCC患者血清DcR3水平较正常人明显升高, 且与肿瘤的生长、浸润、复发、转移等代表肿瘤恶性生物学行为的因素有关, 因此通过监测高危人群以及肝癌患者血清中的DcR3水平, 可能有助于肝癌早期诊断和判断预后.

表 3 HCC血清与组织DcR3表达相关性分析

| 血清水平(ng/L) | n | 组织表达 | | | |
|---------------------|----|------|---|----|-----|
| | | - | + | ++ | +++ |
| 阴性(0-122.22) | 15 | 11 | 4 | 0 | 0 |
| 低水平(122.23-149.99) | 16 | 6 | 5 | 4 | 1 |
| 中等水平(150.00-299.99) | 20 | 6 | 8 | 4 | 2 |
| 高水平(≥300.00) | 13 | 2 | 4 | 2 | 5 |

发现的一种无明显跨膜序列的分泌型蛋白, 属TNFR超家族成员, 可以和FasL^[1-2,9], LIGHT^[3], TLIA^[10]等配体特异性结合, 竞争性地抑制配体与死亡受体(death receptor)的结合, 从而阻断该配体诱导产生的凋亡^[2-3,11]. 并且通过降低T细胞与抗原呈递细胞之间的相互作用, 抑制T细胞趋化^[12], 调节树突状细胞的分化和成熟^[13], 诱导树突状细胞凋亡^[14], 调节巨噬细胞的分化和激活, 抑制肿瘤相关巨噬细胞MHC II的表达^[15], 增加单核细胞的黏附能力^[16], 调节免疫细胞之间的相互作用^[17-18]和诱导免疫耐受^[19]等机制, 在肿瘤的发生、发展以及免疫逃逸中发挥重要作用. 已有研究发现在神经系统^[20-21]、泌尿系统^[22]、消化系统^[23-31]等多个系统的恶性肿瘤中存在DcR3的高表达. Shen *et al*^[29-30]研究发现HCC组织中DcR3基因扩增与mRNA表达相一致, 存在DcR3 mRNA和蛋白的高表达. 本课题组的前期研究结果^[5-6]显示HCC组织和HCC细胞系中均存在DcR3 mRNA和蛋白的高表达, 而癌旁组织无或者低表达, DcR3的高表达可抑制肿瘤细胞凋亡.

DcR3是一种分泌型蛋白, 可在血清中检测到. 有研究发现胃癌、肝癌、胆囊癌、结肠癌、甲状腺腺癌、胰腺癌、骨肉瘤、乳腺癌^[7]、肾癌^[22]、卵巢癌^[32]等恶性肿瘤, 以及系统性红斑狼疮^[33-34]、类风湿关节炎^[35]等自身免疫性疾病患者血清DcR3水平有不同程度的升高, 而其中以

肝癌、胃癌和胆囊癌等胃肠道肿瘤升高最显著. Wu *et al*^[7]对多种肿瘤患者血清DcR3水平进行了研究, 包括35例HCC患者, 其中26例血清DcR3阳性, 阳性率74.3%, 血清水平明显高于正常人. 本研究检测了67例HCC患者, 其中51例阳性, 阳性率为76%, HCC血清DcR3水平与正常人和感染性疾病患者比较均显著升高, 与Wu *et al*^[7]的研究结果相似, 证实了HCC患者血清中DcR3的水平明显高于正常人, 有希望成为新的HCC筛选标志物.

我们进一步将HCC患者分为HCC伴有肝硬化和HCC不伴肝硬化两组, HCC伴有肝硬化组血清DcR3阳性率明显高于HCC不伴肝硬化组(84% vs 61%). 另外, 肝硬化患者血清DcR3阳性率为62%(5/8), 血清水平明显高于正常对照组. 以上结果均提示DcR3的表达与肝硬化有密切关系. 在Wu *et al*^[7]的研究中, 5例肝硬化患者血清DcR3平均水平为45 ng/L, 较正常显著升高, 又由于HCC患者中伴有肝硬化的达74%, Wu *et al*^[7]推测血清中的一部分DcR3可能来源于肝硬化组织. 本课题组前期研究^[8]也发现在部分肝硬化组织中存在DcR3 mRNA和蛋白的表达, 但是表达阳性率和表达强度明显低于HCC. 因此, 肝硬化中DcR3表达增高的发生机制, DcR3与肝硬化和HCC的发生发展是否有关等问题还有待于进一步研究.

在DcR3表达与HCC临床病理参数关系的研究中, Shen *et al*^[29-30]和Chen *et al*^[5-6]发现HCC组织中DcR3 mRNA和蛋白的表达与肿瘤大小、临床分期、浸润转移、包膜浸润等有关. 而HCC患者血清DcR3水平与临床病理参数之间的关系尚未见文献报道. 本研究发现, HCC患者中包膜浸润者血清DcR3阳性率明显高于无包膜浸润者、复发转移者明显高于无复发转移者. 提示DcR3与HCC的恶性进展和浸润转移密切相关, 推测血清DcR3高水平患者易发生肿瘤的浸润转移, 预后差, DcR3

■同行评价

血清DcR3升高在HCC的发生发展及浸润转移中可能起重要作用,通过监测高危人群以及肝癌患者血清中的DcR3、AFP水平,可能对HCC的筛查、诊断和判断预后有较大意义。

表 4 血清AFP与DcR3联合测定对HCC的诊断评价 $n(\%)$

| 标志物 | 灵敏度 | 特异度 | 阳性预测值 | 阴性预测值 | Youden指数 | 粗符合率 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|------|
| AFP | 82(55/67) | 89(47/53) | 90(55/61) | 80(47/59) | 71 | 85.0 |
| DcR3 | 76(51/67) | 85(45/53) | 86(51/59) | 74(45/61) | 61 | 80.0 |
| AFP+DcR3 | 93(62/67) | 81(43/53) | 86(62/72) | 90(43/48) | 74 | 87.5 |

可能成为评价HCC预后的重要血清学指标。

为了探讨HCC患者血清中DcR3的水平与癌组织中DcR3蛋白表达的关系,我们用IHC方法检测了67例HCC患者中64例手术切除癌组织DcR3蛋白的表达情况,比较同一患者血清和组织DcR3蛋白表达的差异。国内外尚未见这方面的报道。本研究发现, DcR3蛋白在HCC癌组织中呈高表达,且随着DcR3血清水平的升高,组织中的表达相应增强,即血清水平越高的患者,其组织中DcR3蛋白表达越强。相关分析表明组织中DcR3表达与血清水平呈正相关,证明DcR3在组织中的表达与血清水平一致。但ELISA检测阳性率明显高于IHC(77% vs 61%)。我们推测可能是由于ELISA检测较IHC检测更灵敏所致,由此也提示DcR3血清学ELISA检测更灵敏、更简便、更适合于临床应用。

另一方面, AFP从20世纪70年代应用于临床检测,到目前仍是最常用的HCC诊断标志物,广泛用于HCC的普查、诊断、判断治疗效果、预测复发等。但是由于其特异度不高,约为75%-80%,因此出现了很多肿瘤标志物与AFP联合检测提高对HCC诊断效率的研究^[36]。为了提高HCC诊断效率,弥补DcR3在多种疾病中均有表达,特异性不高的缺点,探讨了AFP与DcR3联合检测对HCC的诊断价值。发现血清AFP、DcR3单项检测的灵敏度分别为82%、76%,与叶茂 *et al*^[36]和Wu *et al*^[7]研究结果相符。但由于二者单项检测的灵敏度不高,部分患者可因假阴性而漏诊。而联合测定AFP与DcR3可将灵敏度提高到93%,明显提高了诊断敏感性,能有效防止漏诊。也说明DcR3对血清AFP水平在正常范围的HCC患者的筛查和诊断有一定的价值。虽然联合检测的特异度和阳性预测值与单项检测相比略有降低,但阴性预测值、Youden指数和粗符合率均有所上升,说明了联合检测的诊断价值高于单项检测,AFP与DcR3联合检测能有效提高HCC的诊断率,为尽早发现、尽早治疗HCC提供了有利条件,以进一步改善患者的生存率和生存质量。

总之, HCC患者血清DcR3水平升高,且与肿瘤的生长、浸润、复发、转移等代表肿瘤恶性生物学行为的因素有关,因此通过监测高危人群以及肝癌患者血清中的DcR3水平,同时联合检测AFP,对HCC的筛查、诊断和判断预后有较大意义。

4 参考文献

- Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 1998; 396: 699-703
- Li W, Zhang C, Chen C, Zhuang G. Correlation between expression of DcR3 on tumor cells and sensitivity to FasL. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 455-460
- Gill RM, Hunt JS. Soluble receptor (DcR3) and cellular inhibitor of apoptosis-2 (cIAP-2) protect human cytotrophoblast cells against LIGHT-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 2004; 165: 309-317
- Bai C, Connolly B, Metzker ML, Hilliard CA, Liu X, Sandig V, Soderman A, Galloway SM, Liu Q, Austin CP, Caskey CT. Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1230-1235
- Chen G, Luo DZ, Wang Y, Liao ZL, Zhang MY. [Relationship between expression of decoy receptor 3 and apoptosis in hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2007; 36: 113-117
- Chen G, Luo DZ. [The relationship between the expression of TR6 mRNA and protein in the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 302-303
- Wu Y, Han B, Sheng H, Lin M, Moore PA, Zhang J, Wu J. Clinical significance of detecting elevated serum DcR3/TR6/M68 in malignant tumor patients. *Int J Cancer* 2003; 105: 724-732
- 陈莉, 李德春, 朱远源. NET-1蛋白表达与HCC临床病理因素相关性探讨. *中华病理学杂志* 2005; 34: 596-597
- Elnemr A, Ohta T, Yachie A, Kayahara M, Kitagawa H, Fujimura T, Ninomiya I, Fushida S, Nishimura GI, Shimizu K, Miwa K. Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *Int J Oncol* 2001; 18: 311-316
- Yang CR, Hsieh SL, Teng CM, Ho FM, Su WL, Lin WW. Soluble decoy receptor 3 induces angiogenesis by neutralization of TL1A, a cytokine belonging to tumor necrosis factor superfamily and exhibiting

- angiostatic action. *Cancer Res* 2004; 64: 1122-1129
- 11 Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 420-430
 - 12 Shi G, Wu Y, Zhang J, Wu J. Death decoy receptor TR6/DcR3 inhibits T cell chemotaxis in vitro and in vivo. *J Immunol* 2003; 171: 3407-3014
 - 13 Hsu TL, Chang YC, Chen SJ, Liu YJ, Chiu AW, Chio CC, Chen L, Hsieh SL. Modulation of dendritic cell differentiation and maturation by decoy receptor 3. *J Immunol* 2002; 168: 4846-4853
 - 14 You RL, Chang YC, Chen PM, Wang WS, Hsu TL, Yang CY, Lee CT, Hsieh SL. Apoptosis of dendritic cells induced by decoy receptor 3 (DcR3). *Blood* 2008; 111: 1480-1488
 - 15 Chang YC, Chen TC, Lee CT, Yang CY, Wang HW, Wang CC, Hsieh SL. Epigenetic control of MHC class II expression in tumor-associated macrophages by decoy receptor 3. *Blood* 2008; 111: 5054-5063
 - 16 Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, Lin WW. Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression. *J Immunol* 2005; 174: 1647-1656
 - 17 Wan X, Shi G, Semenuk M, Zhang J, Wu J. DcR3/TR6 modulates immune cell interactions. *J Cell Biochem* 2003; 89: 603-612
 - 18 Mueller AM, Pedre X, Killian S, David M, Steinbrecher A. The Decoy Receptor 3 (DcR3, TNFRSF6B) suppresses Th17 immune responses and is abundant in human cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 2009; 209: 57-64
 - 19 Chen C, Zhang C, Zhuang G, Luo H, Su J, Yin P, Wang J. Decoy receptor 3 overexpression and immunologic tolerance in hepatocellular carcinoma (HCC) development. *Cancer Invest* 2008; 26: 965-974
 - 20 Arakawa Y, Tachibana O, Hasegawa M, Miyamori T, Yamashita J, Hayashi Y. Frequent gene amplification and overexpression of decoy receptor 3 in glioblastoma. *Acta Neuropathol* 2005; 109: 294-298
 - 21 Chen L, Tian X, Li W, Agarwal A, Zhuang G. Expressions of Fas/DcR3 and RGD-FasL mediated apoptosis in pituitary adenomas. *Neurol India* 2009; 57: 28-30
 - 22 Macher-Goeppinger S, Aulmann S, Wagener N, Funke B, Tagscherer KE, Haferkamp A, Hohenfellner M, Kim S, Autschbach F, Schirmacher P, Roth W. Decoy receptor 3 is a prognostic factor in renal cell cancer. *Neoplasia* 2008; 10: 1049-1056
 - 23 Li H, Zhang L, Lou H, Ding I, Kim S, Wang L, Huang J, Di Sant'Agnese PA, Lei JY. Overexpression of decoy receptor 3 in precancerous lesions and adenocarcinoma of the esophagus. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 282-287
 - 24 Tsuji S, Hosotani R, Yonehara S, Masui T, Tulachan SS, Nakajima S, Kobayashi H, Koizumi M, Toyoda E, Ito D, Kami K, Mori T, Fujimoto K, Doi R, Imamura M. Endogenous decoy receptor 3 blocks the growth inhibition signals mediated by Fas ligand in human pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2003; 106: 17-25
 - 25 Chen PH, Yang CR. Decoy receptor 3 expression in AsPC-1 human pancreatic adenocarcinoma cells via the phosphatidylinositol 3-kinase-, Akt-, and NF-kappa B-dependent pathway. *J Immunol* 2008; 181: 8441-8449
 - 26 Takahama Y, Yamada Y, Emoto K, Fujimoto H, Takayama T, Ueno M, Uchida H, Hirao S, Mizuno T, Nakajima Y. The prognostic significance of overexpression of the decoy receptor for Fas ligand (DcR3) in patients with gastric carcinomas. *Gastric Cancer* 2002; 5: 61-68
 - 27 陈罡, 党裔武, 罗殿中. 应用组织微阵列技术检测胃癌组织肿瘤坏死因子受体6的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1997-2001
 - 28 Chen G, Luo D. Over-expression of decoy receptor 3 in gastric precancerous lesions and carcinoma. *Ups J Med Sci* 2008; 113: 297-304
 - 29 Shen HW, Wu YL, Peng SY. [Overexpression and genomic amplification of decoy receptor 3 in hepatocellular carcinoma and significance thereof] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003; 83: 744-747
 - 30 Shen HW, Gao SL, Wu YL, Peng SY. Overexpression of decoy receptor 3 in hepatocellular carcinoma and its association with resistance to Fas ligand-mediated apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5926-5930
 - 31 Mild G, Bachmann F, Boulay JL, Glatz K, Laffer U, Lowy A, Metzger U, Reuter J, Terracciano L, Herrmann R, Rochlitz C. DCR3 locus is a predictive marker for 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; 102: 254-257
 - 32 Simon I, Liu Y, Krall KL, Urban N, Wolfert RL, Kim NW, McIntosh MW. Evaluation of the novel serum markers B7-H4, Spondin 2, and DcR3 for diagnosis and early detection of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 106: 112-118
 - 33 Lee CS, Hu CY, Tsai HF, Wu CS, Hsieh SL, Liu LC, Hsu PN. Elevated serum decoy receptor 3 with enhanced T cell activation in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 383-390
 - 34 Han B, Bojalil R, Amezcua-Guerra LM, Springall R, Valderrama-Carvajal H, Wu J, Luo H. DcR3 as a diagnostic parameter and risk factor for systemic lupus erythematosus. *Int Immunol* 2008; 20: 1067-1075
 - 35 Bamias G, Siakavellas SI, Stamatelopoulos KS, Chrysoschoou E, Papamichael C, Sfrikakis PP. Circulating levels of TNF-like cytokine 1A (TL1A) and its decoy receptor 3 (DcR3) in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 2008; 129: 249-255
 - 36 叶茂, 黄定德, 李前伟, 张广运, 李惠萍. AFP、HA与CG联合检测在肝硬化和原发性肝癌诊断中的价值. *标记免疫分析与临床* 2006; 13: 176-177

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

Survivin、COX-2及VEGF在大肠癌中的表达及与肿瘤微血管密度的关系

孔令建, 赵晶, 曲波, 樊微微, 高善玲

■背景资料

生存素(Survivin)是近年来发现的一种的凋亡抑制因子, 属于凋亡抑制蛋白(IAP)家族, 广泛表达在多种恶性肿瘤组织中. 当前研究显示, 其不但具有抑制凋亡的作用, 而且与肿瘤血管生成有密切关系.

孔令建, 赵晶, 曲波, 樊微微, 高善玲, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

孔令建, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤诊断与治疗的研究.

哈尔滨医科大学附属第二医院博士科研基金资助项目, No. BS2007-06

作者贡献分布: 孔令建与赵晶对此文所作贡献均等; 此课题由孔令建与赵晶设计; 研究过程由孔令建、赵晶、樊微微、曲波及高善玲操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵晶提供; 数据分析由孔令建、赵晶、曲波、樊微微及高善玲完成; 本论文写作由孔令建、赵晶、曲波、樊微微及高善玲完成.

通讯作者: 赵晶, 主治医师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科. konggewww@sina.com
电话: 0451-86605143

收稿日期: 2009-04-22 修回日期: 2009-05-28

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-18

Expression of Survivin, COX-2 and VEGF in colorectal cancer and its correlation with tumor angiogenesis

Ling-Jian Kong, Jing Zhao, Bo Qu, Wei-Wei Fan, Shan-Ling Gao

Ling-Jian Kong, Jing Zhao, Bo Qu, Wei-Wei Fan, Shan-Ling Gao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Doctoral Research Fund of the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, No. BS2007-06

Correspondence to: Jing Zhao, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. konggewww@sina.com

Received: 2009-04-22 Revised: 2009-05-28

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To simultaneously detect the expression of Survivin, cyclooxygenase-2 (COX-2), vascular endothelial growth factor (VEGF) and CD34 in colorectal cancer and explore its correlation with tumor angiogenesis.

METHODS: All specimens (including 26 colorectal cancer specimens, 10 colorectal polyp specimens and 7 chronic colitis specimens) were collected from September 2007 to May 2008 at the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University. All specimens were pathologically

reevaluated to confirm the initial diagnosis. The expression of Survivin, COX-2, VEGF and CD34 in these specimens was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rates of Survivin, COX-2 and VEGF proteins in colorectal cancer tissue were 76.9%, 80.8% and 69.28% respectively, significantly higher than those in colorectal polyp and chronic colitis tissues ($P < 0.01$ or 0.05). The microvascular density (MVD) revealed by CD-34 immunostaining in colorectal cancer tissue was significantly higher than that in colorectal polyp and chronic colitis tissues (23.69 ± 9.96 vs 13.10 ± 7.05 and 10.43 ± 4.24 , both $P < 0.01$). Furthermore, the expression of Survivin, COX-2 and VEGF proteins in colorectal cancer tissue is positively correlated with tumor microvessel count (all $P < 0.05$). In colorectal cancer tissue, the expression of Survivin was closely correlated with that of COX-2 and VEGF ($\chi^2 = 11.18, 4.72, P < 0.05$).

CONCLUSION: Survivin is probably able to promote tumor angiogenesis through regulating the expression of COX-2 and VEGF in colorectal cancer.

Key Words: Survivin; Cyclooxygenase-2; Vascular endothelial growth factor; CD34; Colorectal cancer

Kong LJ, Zhao J, Qu B, Fan WW, Gao SL. Expression of Survivin, COX-2 and VEGF in colorectal cancer and its correlation with tumor angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2048-2053

摘要

目的: 研究Survivin, COX-2, VEGF和肿瘤微血管密度(MVD)在大肠癌组织中的表达, 探讨其与大肠癌肿瘤血管生成的关系.

方法: 2007-09/2008-05哈尔滨医科大学附属第二临床医学院内镜下取材的大肠癌、肠息肉及肠炎标本. 所有标本均经病理检查证实诊断. 试验对象共分3组, 分别为大肠癌组织26

■同行评议者

余宏宇, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科

例, 大肠息肉组织10例, 大肠黏膜慢性炎症组织7例. 采用免疫组织化学方法检测Survivin, COX-2, VEGF和CD34在大肠组织中的表达.

结果: Survivin, COX-2与VEGF蛋白在大肠癌组织中阳性表达率分别为76.9%, 80.8%和69.28%, 明显高于大肠息肉组与肠炎组的表达($P<0.01$ 或 0.05). 大肠癌组织中MVD(CD34)明显高于大肠息肉组与肠炎组(23.69 ± 9.96 vs 13.10 ± 7.05 , 10.43 ± 4.24 , 均 $P<0.01$). Survivin, COX-2和VEGF蛋白在大肠癌组中的表达与MVD相关(均 $P<0.05$), Survivin和促血管形成因子COX-2, VEGF在大肠癌组织中的表达密切相关($\chi^2 = 11.18, 4.72$, 均 $P<0.005$).

结论: Survivin可能通过COX-2, VEGF促进大肠癌肿瘤血管的形成.

关键词: Survivin; 环氧合酶-2; 血管内皮生长因子; CD34; 大肠癌

孔令建, 赵晶, 曲波, 樊微微, 高善玲. Survivin、COX-2及VEGF在大肠癌中的表达及与肿瘤微血管密度的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2048-2053

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2048.asp>

0 引言

肿瘤血管(tumor angiogenesis)是肿瘤生长、侵袭和转移的基础. 他的形成是一个多因素、级联、整体、动态的过程, 是多种血管调节因子共同作用的结果^[1]. 大肠癌(colorectal cancer)是一种常见的恶性肿瘤, 其发病率近年来呈上升趋势, 但是其病因现在尚未完全清楚, 目前认为主要是环境因素与遗传因素综合作用的结果^[2]. Survivin是近年来发现的一种凋亡抑制因子, 属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族, 广泛表达与多种恶性肿瘤组织中^[3]. 当前研究显示, 不但具有抑制凋亡的作用, 而且与肿瘤血管生成以及肿瘤的耐药性有密切关系^[4-5]. 本实验应用免疫组织化学方法, 测定Survivin、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在大肠癌组织中的表达, 探讨他们在肿瘤血管形成中的作用和相互关系, 从而为大肠癌的早期诊断和治疗提供更为广阔的前景.

1 材料和方法

1.1 材料 2007-09/2008-05哈尔滨医科大学附属第二临床医学院内镜下取材的大肠癌、肠息肉

及肠炎标本. 所有标本均经病理检查证实诊断. 试验对象共分3组, 分别为大肠癌组织26例, 大肠息肉组织10例, 大肠黏膜慢性炎症组织7例. 其中大肠癌标本取材前患者未进行过放、化疗. Survivin兔抗人多克隆抗体、COX-2和VEGF兔抗人mAb、CD34鼠抗人mAb及试剂盒, 均购于北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 指标检测: 采用免疫组织化学二步法检测Survivin, COX-2、VEGF和CD34在大肠癌组织、肠息肉组织和肠炎组织中的表达, 操作严格按照试剂盒说明书操作步骤进行.

1.2.2 结果判定: (1)Survivin: 胞质中染成棕黄色为阳性, 首先按染色强度计分: 无着色为0分, 染色弱1分, 染色清晰2分; 阳性范围 $\leq 10\%$ 为0分, 阳性范围 $\leq 25\%$ 为1分, 阳性范围 $\leq 50\%$ 为2分, 阳性范围 $> 50\%$ 为3分. 根据2项相加数分为: 0-1为(-); 2分为(+); 3-4分为(++); 5-6分为(+++). (2)VEGF: 阳性染色模式为胞质着色, 呈浅黄色至棕黄色颗粒. 按胞质的着色强度分为: (-)细胞质不着色; (+)细胞质呈浅黄色颗粒; (++)细胞质呈棕黄色颗粒. (3)COX-2: 以胞质有棕黄色颗粒为阳性. 选择5个以上视野, 计数不少于500个细胞进行阳性计数及评分. 根据染色程度及染色细胞百分率进行评分: 基本不着色者为0分, 着色淡者为1分, 着色适中者为2分, 着色深者为3分; 着色细胞占计数细胞的百分率 $< 5\%$ 为0分, 5%-为1分, 25%-为2分, 50%-为3分. 将每张切片的染色程度与染色细胞百分率得分相乘, 其乘积为最后得分. 0-1分为阴性(-), 2-3分为弱阳性(+), 4-6分为中等阳性(++), > 6 分为强阳性(+++). (4)CD34: CD34使各种大小血管均呈棕黄色染色, 主要使新生血管内皮细胞染成棕黄色. 肿瘤微血管计数(MVC)值采用Weidner计数法, 即先在低倍镜下寻找微血管密集区, 再在高倍镜($\times 200$)下计数5个不同视野中的微血管数, 单个着色的内皮细胞或细胞丛均按独立的血管分别计数, 取以肿瘤细胞胞质内呈现棕黄色者计算其平均值.

统计学处理 统计学处理应用SPSS13.0软件完成, 计数资料用 χ^2 检验、Fisher确切概率法及相关分析组间差异, 计量资料用 t 检验. $P<0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 Survivin、COX-2和VEGF的表达 在大肠

■ 研发前沿

Survivin是如何促进肿瘤血管生成的呢? 这是当前研究的热点问题. 本文选取了血管生成相关刺激因子COX-2、VEGF作为研究对象, 初步探讨Survivin在大肠癌肿瘤血管形成中的作用. 其具体机制有待进一步研究.

■相关报道

O'Connor *et al* 研究, 发现Survivin在不增殖的血管中很少表达, 然而在肉芽组织中的新近形成的血管中明显表达, 说明Survivin是血管的保护性基因, 在受损伤时升高. Mesri *et al* 研究认为VEGF在肿瘤血管生成过程中发挥的内皮细胞抗凋亡作用依赖于Survivin的表达上调. Tran *et al* 发现Survivin可有效地维持微小血管网的结构, 促进VEGF的内皮细胞保护功能.

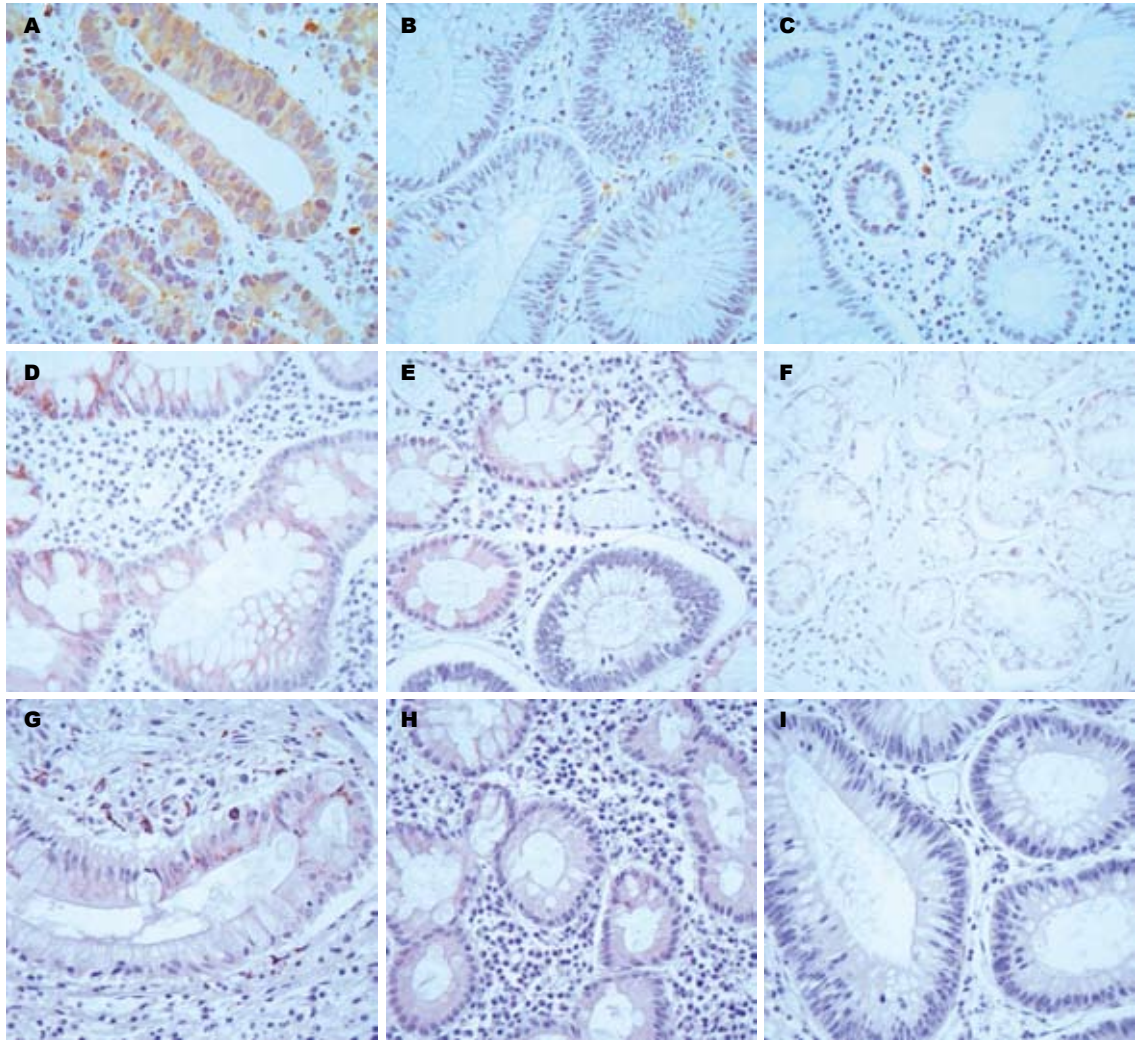


图1 Survivin, COX-2和VEGF在大肠癌组织、肠息肉组织和肠炎组织中的表达(免疫组织化学×100). A-C: Survivin; D-F: COX-2; G-I: VEGF; A、D、G: 大肠癌; B、E、H: 肠息肉; C、F、I: 肠炎.

癌、大肠息肉和大肠炎3组中, Survivin的阳性表达率分别为76.9%、10.0%、14.3%; COX-2的阳性表达率分别为80.0%、20.0%、28.0%; VEGF的阳性表达率分别为69.2%、40.0%、28.6%. 大肠癌组Survivin、COX-2和VEGF阳性表达率明显高于其他2组, 差别有统计学意义($P < 0.05$, 图1, 表1).

2.2 CD34的表达 大肠癌组CD34的表达明显高于其他2组, MVD计数值(以mean±SD表示)差别有统计学意义(23.69 ± 9.96 vs 13.10 ± 7.05 , 10.43 ± 4.24 , 均 $P < 0.01$, 图2).

2.3 Survivin、COX-2、VEGF的表达和MVD计数值的关系 在大肠癌组织中, Survivin、COX-2、VEGF阳性表达的MVD值明显高于阴性表达, 差别有统计学意义(25.80 ± 10.03 vs 16.67 ± 6.69 ; 26.74 ± 9.63 vs 15.43 ± 5.16 ; 28.22 ± 8.42 vs 13.50 ± 3.30 , 均 $P < 0.05$). Survivin与COX-2、VEGF的表达均正相关($\chi^2 = 11.18$,

表1 Survivin、COX-2和VEGF在大肠癌、大肠息肉和肠炎组织中的阳性表达率(%)

| 分组 | n | Survivin | COX-2 | VEGF |
|-------|----|-------------------|-------------------|-------------------|
| 大肠癌组 | 26 | 76.9 ^b | 80.8 ^b | 69.2 ^a |
| 大肠息肉组 | 10 | 10.0 | 20.0 | 40.0 |
| 肠炎组 | 7 | 14.3 ^d | 28.6 ^d | 48.6 ^c |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 大肠息肉组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 大肠癌组.

4.72, 均 $P < 0.005$).

3 讨论

Survivin是近年来发现的一种新的凋亡抑制因子, 属于IAP家族的新成员具有不同于IAP家族其他成员的独特性质和结构^[6]. 研究表明Survivin是迄今发现最强的凋亡抑制因子, 具有较强的抑制细胞的凋亡的功能, 促进肿瘤的发生. 本实验证实, Survivin在大肠癌中的阳性率为

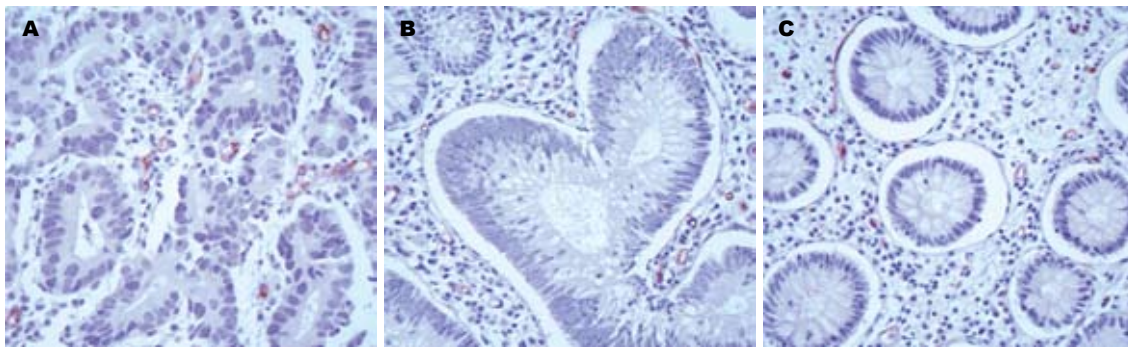


图 2 CD34在大肠癌、大肠息肉和肠炎组织中的表达(免疫组织化学×100)。A: 大肠癌; B: 大肠息肉; C: 大肠炎。

■创新盘点

本实验应用免疫组织化学方法, 联合研究Survivin、COX-2、VEGF在大肠癌组织中的表达, 探讨他们在肿瘤血管形成中的作用和相互关系, 初步探讨Survivin促进肿瘤血管形成作用的机制。

76.9%, 显著高于大肠息肉组和大肠炎症组, 说明Survivin的表达具有特异性, 以此可有助于鉴别肿瘤良恶性和提高恶性肿瘤的诊断率。

肿瘤新生血管的形成不但成为肿瘤生长的基础, 而且构成了肿瘤细胞侵袭转移的首要靶目标, 肿瘤细胞转移及其在转移部位的生长也依赖于肿瘤血管生成^[7]。肿瘤血管生成一方面保证了肿瘤生长所需要的营养供应, 促使肿瘤体积增加, 没有血管, 肿瘤一般只生长到1-3 mm; 另一方面, 肿瘤组织内血管密度的增加、肿瘤边缘部位的瘤细胞与血管接触增多, 也进一步促使肿瘤细胞随细胞数量的增多而脱落进入血管的机会增加。因此, 肿瘤血管生成对肿瘤细胞的转移有直接的和间接的促进作用。肿瘤血管表达的高低可以用肿瘤MVD加以量化, MVD不仅与肿瘤细胞的营养和供氧有关, 而且反映了肿瘤的浸润和转移能力^[8]。

血管形成过程的核心是内皮细胞的分裂增殖, 确切地说取决于血管内皮细胞的生存和凋亡平衡的结果。血管生成时, 内皮细胞受生长因子刺激而分裂、移行、重塑, 形成原始血管和开放的血管网, 此过程依赖内皮细胞的生长和稳定性, 破坏内皮细胞和基质联系及干扰内皮细胞的信号传导足以引起Caspase依赖的内皮细胞的凋亡, 导致血管结构的退化。已有研究表明Survivin在血管形成过程中也起关键作用^[9-11]。其机制可能是通过上调VEGF和COX-2的水平, 以促进肿瘤血管的生成^[12-14]。VEGF是血管内皮生长因子, 又称血管通透因子, 是迄今鉴定出来的最重要的血管生成因子, 可作为肿瘤代谢及转移的标志。VEGF具有促进血管内皮细胞增殖, 增进血管能透性及改变细胞外基质的作用^[15]。COX-2是花生四烯酸转化成前列腺素过程中重要的限速酶。近年研究表明其在多种肿瘤组织中表达增强, 对肿瘤的发生、发展及转移有促进作用,

可能机制为促进细胞增殖、抑制凋亡及促进血管形成^[16-18]。当前研究发现, Survivin在肝癌^[19]、胰腺癌^[20]、直肠癌^[21]、鼻咽癌^[22]、乳腺癌^[23]甲状腺癌^[24]和神经母细胞瘤^[25]中的表达和VEGF密切相关。在肝癌^[26]、子宫内膜癌^[27]、肺癌^[28]、胃癌^[29]、大肠癌^[30]和卵巢癌^[31]中, Survivin和COX-2的表达均密切相关。研究表明, COX-2、VEGF不仅通过旁分泌途径促进血管生成, 从而促进肿瘤的发生, 发展, 而且作为一种自分泌生长调节因子, 直接刺激肿瘤细胞的增殖或迁移^[32-33]。本研究表明Survivin, COX-2, VEGF在大肠癌中的阳性表达与MVD相关, 提示他们在大肠癌的血管生成中占有重要地位。

O'Connor *et al*^[34]研究, Survivin在不增殖的血管中很少表达, 然而在肉芽组织中的新近形成的血管中明显表达, 说明Survivin是血管的保护性基因, 在受损伤时升高。应用VEGF诱导静止期的内皮细胞分裂, 检测Survivin表达水平, 结果提示血管内皮细胞内Survivin含量升高了16倍, 在6-10 h达峰, 24 h开始下降。而炎症因子TNF等未能诱导血管内皮细胞内Survivin的表达, 提示Survivin可能是血管形成中生长因子诱导的保护性基因, 维持血管内皮细胞的正常增殖。Mesri *et al*^[15]研究认为VEGF在肿瘤血管生成过程中发挥的内皮细胞抗凋亡作用依赖于Survivin的表达上调。Tran *et al*^[12]发现Survivin可有效地维持微血管网的结构, 促进VEGF的内皮细胞保护功能, 抵抗化疗药物对血管内皮细胞的致凋亡作用, 从而增强肿瘤的抗药性。Mesri *et al*^[15]还发现, Survivin的反义核苷酸可消除VEGF对抗肿瘤坏死因子或神经酰胺诱导的细胞死亡的抗凋亡作用, 导致内皮细胞凋亡和毛细血管迅速退化。本实验发现, 在大肠癌组织中Survivin和COX-2, VEGF表达存在正相关, 提示促血管生成因子对大肠肿瘤的发生发展特别是

■应用要点

由于Survivin表达的组织特异性及功能的多样性,使其成为一个非常有吸引力的癌症治疗靶点. 本文研究发现, Survivin可能通过上调COX-2, VEGF因子来发挥其促进肿瘤血管生成的作用. 通过更深入的研究, 进一步探明其促进肿瘤血管形成方面的机制, 为肿瘤的临床诊断和治疗提供一个更为广阔的应用前景.

在促进血管形成方面可能有Survivin的参与.

总之, 大肠癌组织中的Survivin, COX-2, VEGF的表达与肿瘤的MVD值成正相关. 提示在肿瘤血管形成方面, Survivin和COX-2, VEGF起着协同作用. 在大肠癌组织中, Survivin的表达和COX-2, VEGF的表达呈明显相关性, 提示Survivin可能通过上调COX-2, VEGF因子来发挥其促进肿瘤血管生成的作用, 其具体作用机制有待进一步研究.

4 参考文献

- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994-1998
- Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol* 2001; 54: 206-214
- Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, Oehmichen A, Schmitz M, Mehlhorn J, Conrad K, Rieber EP. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res* 2000; 60: 1815-1817
- Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 61-70
- Kucukzeybek Y, Gul MK, Cengiz E, Erten C, Karaca B, Gorumlu G, Atmaca H, Uzunoglu S, Karabulut B, Sanli UA, Uslu R. Enhancement of docetaxel-induced cytotoxicity and apoptosis by all-trans retinoic acid (ATRA) through downregulation of survivin (BIRC5), MCL-1 and LTbeta-R in hormone- and drug resistant prostate cancer cell line, DU-145. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 37
- Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40: 1117-1123
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186
- Weidner N, Gasparini G. Determination of epidermal growth factor receptor provides additional prognostic information to measuring tumor angiogenesis in breast carcinoma patients. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29: 97-107
- Hoel AW, Wang GJ, Simosa HF, Conte MS. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by survivin. *Vascular* 2007; 15: 344-349
- Delvaeye M, De Vriese A, Zwerts F, Betz I, Moons M, Autiero M, Conway EM. Role of the 2 zebrafish survivin genes in vasculo-angiogenesis, neurogenesis, cardiogenesis and hematopoiesis. *BMC Dev Biol* 2009; 9: 25
- Conway EM, Zwerts F, Van Eygen V, DeVriese A, Nagai N, Luo W, Collen D. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol* 2003; 163: 935-946
- Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem*

- Biophys Res Commun* 1999; 264: 781-788
- Barnes N, Haywood P, Flint P, Knox WF, Bundred NJ. Survivin expression in in situ and invasive breast cancer relates to COX-2 expression and DCIS recurrence. *Br J Cancer* 2006; 94: 253-258
- Mori F, Piro FR, Della Rocca C, Mesiti G, Giampaoli S, Silvestre G, Lazzaro D. Survivin and Cyclooxygenase-2 are co-expressed in human and mouse colon carcinoma and in terminally differentiated colonocytes. *Histol Histopathol* 2007; 22: 61-77
- Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, Altieri DC. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol* 2001; 158: 1757-1765
- Konturek PC, Rembiesz K, Burnat G, Konturek SJ, Tusinela M, Bielanski W, Rehfeld J, Karcz D, Hahn E. Effects of cyclooxygenase-2 inhibition on serum and tumor gastrins and expression of apoptosis-related proteins in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 779-787
- Cusimano A, Foderà D, D'Alessandro N, Lampiasi N, Azzolina A, Montalto G, Cervello M. Potentiation of the antitumor effects of both selective cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 inhibitors in human hepatic cancer cells by inhibition of the MEK/ERK pathway. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 1461-1468
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60: 1306-1311
- Cui F, Chen B, Chen JZ, Huang YX, Luo RC. [Expressions of Survivin and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and their clinical significance] *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2008; 28: 761-763
- Lang SA, Schachtschneider P, Moser C, Mori A, Hackl C, Gaumann A, Batt D, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O. Dual targeting of Raf and VEGF receptor 2 reduces growth and metastasis of pancreatic cancer through direct effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3509-3518
- Yang D, Schneider S, Azuma M, Iqbal S, El-Khoueiry A, Groshen S, Agafitei D, Danenberg KD, Danenberg PV, Ladner RD, Lenz HJ. Gene expression levels of epidermal growth factor receptor, survivin, and vascular endothelial growth factor as molecular markers of lymph node involvement in patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2006; 6: 305-311
- Li YH, Hu CF, Shao Q, Huang MY, Hou JH, Xie D, Zeng YX, Shao JY. Elevated expressions of survivin and VEGF protein are strong independent predictors of survival in advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med* 2008; 6: 1
- Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, Wang HJ, Untch M, Meng G, Pegram MD, Podratz KC, Crown J, Slamon DJ, Duffy MJ. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Ann Oncol* 2006; 17: 597-604
- Zhang HY, Meng X, Du ZX, Fang CQ, Liu GL, Wang HQ, Deng WW. Significance of survivin, caspase-3, and VEGF expression in thyroid

- carcinoma. *Clin Exp Med* 2009 Feb 10. [Epub ahead of print]
- 25 Beierle EA, Nagaram A, Dai W, Iyengar M, Chen MK. VEGF-mediated survivin expression in neuroblastoma cells. *J Surg Res* 2005; 127: 21-28
- 26 Song IH, Kim DW, Shin KC, Shin HD, Yun SY, Kim SB, Shin JE, Kim HJ, Kim EY. [Down-regulation of survivin in growth inhibition of hepatoma cells induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor] *Korean J Hepatol* 2008; 14: 351-359
- 27 Erkanli S, Bolat F, Kayaselcuk F, Demirhan B, Kuscü E. COX-2 and survivin are overexpressed and positively correlated in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 320-325
- 28 Kryan K, Merchant FH, Zhu L, Dohadwala M, Luo J, Lin Y, Heuze-Vourc'h N, Pöld M, Seligson D, Chia D, Goodglick L, Wang H, Strieter R, Sharma S, Dubinett S. COX-2-dependent stabilization of survivin in non-small cell lung cancer. *FASEB J* 2004; 18: 206-208
- 29 Sun YS, Ye ZY, Zhao ZS, Shi D, Zou SC. [Expression of vascular endothelial growth factor C and survivin in gastric carcinoma and their clinical implications] *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2006; 9: 264-267
- 30 Calviello G, Resci F, Serini S, Piccioni E, Toesca A, Boninsegna A, Monego G, Ranelletti FO, Palozza P. Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of beta-catenin, down-regulation of survivin and apoptosis in human colorectal cancer cells not expressing COX-2. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1202-1209
- 31 Athanassiadou P, Grapsa D, Athanassiades P, Gonidi M, Athanassiadou AM, Tsipis A, Patsouris E. The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer. *Pathol Res Pract* 2008; 204: 241-249
- 32 Kardosh A, Soriano N, Pyrko P, Liu YT, Jabbour M, Hofman FM, Schönthal AH. Reduced survivin expression and tumor cell survival during chronic hypoxia and further cytotoxic enhancement by the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *J Biomed Sci* 2007; 14: 647-662
- 33 Kunze D, Wuttig D, Kausch I, Blietz C, Blumhoff L, Burmeister Y, Kraemer K, Fuessel S, Toma M, Schwenzer B, Meye A, Grimm MO, Hakenberg OW, Jocham D, Wirth MP. Antisense-mediated inhibition of survivin, hTERT and VEGF in bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2008; 32: 1049-1056
- 34 O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 393-398

■同行评价
本文设计尚可, 结果丰富, 统计学方法正确, 具有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5±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 ± 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; $101 \leq$ 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。完整的阿拉伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-18)

门静脉高压性肠病的研究现状

胡美迪, 郭贵海

■背景资料

近20年来, 门静脉高压(PHT)及由PHT导致的机能改变, 已得到越来越多的认识与关注, 20世纪80年代, 门静脉高压性胃病(PHG)已得到学术界认可, 而后的进一步研究表明, 类似的黏膜病变也会发生在PHT状态下的肠道, 称之为门静脉高压性肠病(PHE), 但目前尚无针对PHE的大规模前瞻性研究。

胡美迪, 郭贵海, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 本综述由胡美迪完成, 郭贵海审核。
通讯作者: 郭贵海, 主任医师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科. guoguihai@163.com
电话: 0791-8692505

收稿日期: 2009-05-07 修回日期: 2009-06-16
接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Advances in research on portal hypertensive enteropathy

Mei-Di Hu, Gui-Hai Guo

Mei-Di Hu, Gui-Hai Guo, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Gui-Hai Guo, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. guoguihai@163.com

Received: 2009-05-07 Revised: 2009-06-16
Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

Portal hypertensive enteropathy, whose fundamental pathologic change is a vasculopathy characterized histopathologically by mucosal and submucosal vessel dilatation, oedema and congestion, mainly results from a combination of increased intrahepatic vascular resistance and increased blood flow through the portal venous system. Though portal hypertensive enteropathy usually has non-specific clinical manifestations, it is a major cause of lower gastrointestinal bleeding. Up to now, there has been no standard for the diagnosis and grading of portal hypertensive enteropathy. Unfortunately, the experience of treatment for portal hypertensive enteropathy only comes from some small-sample trials. For these reasons, an in-depth study of portal hypertensive enteropathy is still necessary. In this article, we will review the advances in research on portal hypertensive enteropathy.

Key Words: Portal hypertension; Portal hypertensive enteropathy; Cirrhosis

Hu MD, Guo GH. Advances in research on portal hypertensive enteropathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2054-2057

■同行评议者

李国威, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

摘要

肝硬化门静脉高压性肠病(portal hypertensive enteropathy, PHE)的2大主要发病机制是肝内门脉血流阻力增加和流经门脉血流增多. PHE的基本特征是组织病理学上的特征性血管病变. 临床表现无特异性, 但却是下消化道出血的主要原因. 目前为止, PHE的诊断和分级尚无统一标准, 治疗上也仅限于小样本经验总结, 因此, 关于PHE的进一步研究非常必要. 本文就PHE的研究现状作一综述.

关键词: 门静脉高压; 门静脉高压性肠病; 肝硬化

胡美迪, 郭贵海. 门静脉高压性肠病的研究现状. *世界华人消化杂志* 2009; 17(20): 2054-2057

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2054.asp>

0 引言

门静脉高压性胃肠病(portal hypertensive gastroenteropathy, PHGE)的特征是, 在门静脉高压(portal hypertension, PHT)状态下, 胃肠道黏膜发生特殊病变. 早在1985年, McCormack *et al* 就首先阐述了在PHT患者的胃黏膜中发生的特殊病变, 他们称之为充血性胃病(congestive gastropathy)^[1]. 经过大量研究发现, 类似的黏膜病变也会发生在PHT状态下的肠道, 称之为门静脉高压性肠病(portal hypertensive enteropathy, PHE), 包括门静脉高压性小肠病(包括空肠病、回肠病等)和门静脉高压性结肠病(portal hypertensive colonopathy, PHC). 肠道在PHE时发生的病变是PHT患者发生下消化道出血的重要原因. 现就有关文献对PHE的有关问题综述如下.

1 发病率

目前, 各文献报道的PHE的发病率尚无统一数据, 并且差异较大. 由Misra *et al*^[1]观察发现, PHC的发病率为52.3%, 门脉高压性回肠病(portal hypertensive ileopathy, PHI)的发病率为25%, 而且PHC与PHI可重叠发生. De Palma *et al*^[2]运用胶囊内镜进行研究分析, 发现有67.5%的肝硬化患者有PHE. Nagral *et al*^[3]研究PHT空肠病发生

率, 得出结果仅为16%. 而由Urbain *et al*^[4]进行的类似研究则称, 出现PHE镜下表现的肝硬化患者有50%. 任习芳 *et al*^[5]报道PHC在门静脉高压患者中的发病率是52%. 各数据出现如此差异的可能原因包括: (1)入选病例不同, 有的研究将所有临床诊断为肝硬化的患者包括在内, 而有些则只收录出现了并发症的患者; (2)判断标准不同; (3)肠镜检查范围不尽相同; (4)检查设备不同, 有些研究者使用的是传统推进式内镜, 而有些研究者使用的是新近的设备(如胶囊内镜).

2 发病机制

2.1 PHT PHE通常发生在PHT的情况下. 正常的肝静脉压力梯度(hepatic venous pressure gradient, HVPG) <5 mmHg^[6], 当门脉压力超过11 mmHg时或者门脉系统与右心房的压力梯度超过10 mmHg时即存在门脉高压^[7].

PHT的出现往往是由于门脉血流阻力增加和流经门脉血流增多2大因素造成^[3,6,8-11]. 其中, 门脉血管阻力增加是始动因素, 被认为是“后向血流学说”, 究其原因有2个方面, 即机械性因素和动力性因素. 机械性因素是由于假小叶的形成、肝窦内再生结节等多种因素造成了肝血窦阻力增加, 肝脏微循环障碍. 而动力性因素是指肝脏小静脉收缩激活了肝血窦周围的星状细胞(hepatic stellate cells, HSC), 活化后的HSC能使血管平滑肌收缩^[12]并由此始动纤维化^[6,10].

当门脉高压形成之后, 外周血管扩张, 且血流阻力降低、心输出量增加, 出现高动力循环. 进而使回流入肝脏的血流增多, 并由此进一步加重了PHT^[6,13], 此即“前向血流学说”.

2.2 分子生物学基础 研究发现, 血管活性物质失衡在PHE的形成和发展中起到了重要作用. 一氧化氮(nitric oxide, NO)为一种较强的扩血管物质, 普遍存在于各系统中, 包括肠道. Aller *et al*^[14]通过对大鼠进行肝门静脉结扎实验(portal vein-ligated, PVL)得知, 实验中大鼠的肝脏和肠道均有NO表达, 证明NO在维持门脉高压和PHE典型血管病变和黏膜损伤的形成和发展中起到了重要作用. PHT状态下, NO的主要来源是, 细胞内毒素、脂多糖和炎症因子作用于NO合酶(nitric oxide synthase, NOS)的可诱导单体(inducible nitric oxide synthase, iNOS), 使其过度表达, 合成大量NO^[8], iNOS的长期过度表达与肝硬化高动力循环状态有关^[15].

2.3 相关因素 目前为止, 关于PHE与肝功能、食管静脉曲张的关系, 存在2种截然不同的观

点, 即两者间呈正相关或负相关. 支持前者的学者认为PHE与肝功能Child C级、2度以上食管静脉曲张、门脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy, PHG)强烈相关^[2,16]. 支持后者的学者认为PHE与肝功能Child分级无关, 门脉的大小和侧枝循环的建立均不能很好地预测PHE的发生^[3]. 任习芳 *et al*^[5]的研究进一步认为PHC在行食管静脉曲张扎术或硬化剂治疗前后发病率并无明显差别.

肝硬化患者有3.6%-56%会发生直肠静脉曲张^[17], Misra *et al*^[1]指出在有直肠静脉曲张的肝硬化患者中, PHC的发病率是32%, 在无直肠静脉曲张的患者中该发病率为68%, 造成这种结果的原因, 可能是由于曲张的直肠静脉减少了结肠血管的压力.

3 组织学表现

PHT状态下, 发生在小肠和大肠的病理改变包括血管数增多、出现壁厚扩张的黏膜血管、黏膜固有层水肿、黏膜肌层增厚、纤维肌性增生、腺体萎缩、绒毛/隐窝比率下降以及慢性炎性渗出等. 这些都属于非特异性改变^[3,8].

4 临床表现

PHE亦无特异的临床表现, 主要表现包括下消化道出血、腹痛、排便习惯和粪便性状的改变, 以及由此导致的贫血, 或者无任何症状. 1项针对PHC的研究资料显示, 在行结肠镜检查的1组肝硬化患者中, 有大便潜血阳性者占34%、黑便者23%、缺铁性贫血者10%、腹泻者4%、腹痛者4%、血清CEA水平升高4%, 在这些患者中, PHC发病率是66%^[18]. 基于PHE患者的肠道发生了血管和黏膜病变, 这就为消化系出血埋下了伏笔^[3]. 与PHG所致的消化系出血不同的是, PHG主要导致上消化道出血, 而PHE则以下消化道出血为多见, 其中, 慢性隐匿过程居多, 主要表现为大便隐血阳性及黑便, 大出血发生率仅为4%^[18].

5 内镜下表现

PHE的内镜下表现包括: 肠道黏膜血管扩张、血管发育不良、黏膜血管曲张、黏膜慢性炎性改变、黏膜充血、红斑样损伤和活动性出血等^[1-2,4,9]. 但是, 各种改变的发生概率尚无统一数据. De Palma *et al*^[2]通过应用胶囊内镜对PHE患者的肠道黏膜进行研究, 发现有67.5%的患者出现黏膜损伤, 其中, 毛细血管扩张、血管发育不良(24.3%), 红斑样损伤(62.2%), 黏膜慢性炎性改变(13%)、静脉曲张(8.1%), 且64.9%的研究对象有多种改变混合存在, 存在活动性出血者达

■ 研发前沿

目前, 已有部分学者就PHE的发病率、病理改变、镜下表现、临床表现及治疗方案进行相关研究, 获得了一些宝贵资料. 诊断和治疗作为临床工作的重点, 进一步解决这一问题便成为今后PHE研究的重点.

■ 相关报道

De Palma *et al*^[1]呼吁建立PHE的分级标准使PHE的诊断更规范. 他们也把PHE的镜下表现提供了一个分级标准, 分别把“肠道炎性改变”、“血管损害”设定为PHE镜下表现的1度、2度. 但他们也提到, 该分级标准的临床意义并不显著, 因为“分级标准”只有在对疾病预后才有参考价值时才有意义.

到10.8%. 由Urbain *et al*^[4]所做的相似研究表明: 内镜下, 50%的肝硬化受检者出现了肠道黏膜血管损伤, 其中血管发育不良样损伤占30%, 黏膜血管曲张占15%, 活动性出血10%, 以及红斑样改变占32%.

6 诊断

国外学者Aydede *et al*^[19]把组织病理异常(即黏膜血管扩张、绒毛/隐窝比率下降、黏膜固有层水肿以及纤维肌性增生)作为临床诊断PHE的标准. 国内学者任习芳 *et al*^[5]在做PHE研究时, 在门脉高压患者出现相应内镜下表现(即肠黏膜明显弥漫性充血水肿、蜘蛛痣和血管扩张、斑片状充血、黏膜下自发性出血等)时, 作出PHE的诊断. 由此可见, 关于PHE的诊断, 目前尚无统一标准. 合理的标准应是根据肝硬化PHT病史, 结合相应临床表现、内镜下表现、组织学表现等作出诊断.

正因为还没有统一的诊断标准, 故对于是否把直肠病变归入PHE的范畴, 仍存在争议. De Palma *et al*^[2]呼吁建立PHE的分级标准使PHE的诊断更规范. 他们也把PHE的镜下表现提供了一个分级标准, 分别把“肠道炎性改变”、“血管损害”设定为PHE镜下表现的1度、2度. 但他们也提到, 该分级标准的临床意义并不显著, 因为“分级标准”只有在对疾病预后才有参考价值时才有意义.

De Palma *et al*发出的呼吁, 确实值得引起同行们的注意, 今后应该进行相关研究, 以提出PHE的包括临床表现、镜下表现、病理学、门脉压值等方面的明确诊断标准和分级依据, 另外, PHE与肝硬化PHT状态下的食管病变、胃的病变的关系, 以及出血率、发生率、死亡率也应该得到进一步的阐释^[9].

若以上问题能得到解决, 必然使关于PHE的认识上升到新的高度, 令临床医师和患者对病情的轻重程度和预后都有清晰的概念.

7 治疗

PHE无特异的临床表现, 出现一般症状时, 可予以相应的对症治疗, 肠道静脉曲张导致的小消化道出血是PHE最严重的临床表现, 下面主要就此方面的治疗阐述如下.

7.1 曲张静脉出血的治疗 首先, 要重视一般性治疗, 包括建立静脉通道、必要时输血、短程预防性使用抗生素等; 其次, 尽快使用止血药. 目前, 由PHE引起的下消化道静脉曲张出血的药

物治疗, 与由胃食管静脉曲张出血的药物治 疗基本相同. 生长抑素及其类似物奥曲肽、特利加压素已被广泛用于这方面的治疗. 生长抑素能显著减少门脉血流及门脉压力^[20], 可有效地控制出血, 但是其作用短暂, 因此需要持续静滴, 临床上, 尚不能用以长期降低门脉压力^[21-22], 继出血后第一个24 h持续静滴后, 再予推注, 可有效止血并降低死亡率^[23], 特利加压素有相似的作用^[24]. 奥曲肽与生长抑素相比有更长的半衰期, 使用效果也比较理想, 去年, 有国内学者报道, 使用长效奥曲肽降低门脉压力, 效果较好^[25], 长效奥曲肽还可部分改善PHT的高动力循环状态, 并调整血管的渗透性^[19]. 与普萘洛尔相比, 奥曲肽可更明显减轻黏膜毛细血管扩张和黏膜充血水肿, 还可以改善因PHE引起的组织形态学异常. 在成功止血并停用奥曲肽之前, 应该加用普萘洛尔稳定门脉压力. 虽然, 药物治疗能取得比较理想的效果, 但这些效果是暂时的, 还应尽快行内镜检查, 明确出血灶, 在必要时尽快行内镜下治疗^[26]; 再次, 近年来, 部分文献中报道了内镜下治疗PHE静脉曲张出血的内容. 1991年, Kozarek *et al*报道PHC并直肠静脉曲张出血在内镜下热力探头电凝及注射硬化剂止血的病例. Misra *et al*^[1]指出, 因为回肠静脉曲张靠近回盲部, 可以考虑用内镜下曲张静脉结扎(endoscopic varices ligation, EVL)或者内镜硬化疗法(endoscopic sclerotherapy, EST)止血, 今年, 又有文献提到, 可以用单气囊肠镜作相应的治疗^[27]. 但是, 目前关于这方面的文献报道并不多, 具体的适应证和效果尚不很明确. 另外, 也有少数资料报道了把介入引入PHE出血的治疗, 1998年, Balzer *et al*报道了首例经颈静脉肝内门脉系统分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)治疗PHC所致的下消化道复发性出血. 该术由有经验的医师操作时, 成功实施, 且不出急性并发症的概率在90%以上, 但因TIPS术后会引发缓发的功能不全和并发症(如肝性脑病和肝功能衰竭), 使TIPS的推广受到限制^[28-29]. 如今, 非手术治疗静脉曲张出血的成功率已较高, 但必要时, 传统的外科手术仍可作为一种重要的备用手段^[30].

7.2 出血的初级、次级预防 2008年, 任习芳 *et al*^[5]报道, 在成功止血后, 用普萘洛尔即可有效预防再出血. 但目前, 关于预防静脉曲张出血方面的资料尚不多, 究其原因, 是由于PHE引起的静脉曲张出血研究病例不多, 这方面的治疗仅

限于小规模样本的经验总结, 还有很多未明确之处, 需要进一步研究解决。

8 结论

PHE通常发生在肝硬化PHT的情况下, 其病变部位可在结肠、空肠、回肠等处。当发生PHE时, 肠道血管增多、黏膜水肿、腺体萎缩; 临床表现以下消化道出血最常见、最严重; 内镜下多表现为红斑样损伤、血管发育不良等; PHE的具体诊断标准尚待进一步明确; 目前, PHE的治疗方法以对症治疗为主, 且重在针对预防及控制下消化道出血。关于PHE, 找到明确的发病机制、危险因素, 建立内镜下表现、组织病理表现与诊断、分级的关系, 得出明确的出血率、死亡率等临床转归, 规范治疗方案等等, 都是值得进一步研究的问题。

9 参考文献

- Misra SP, Dwivedi M, Misra V, Gupta M. Ileal varices and portal hypertensive ileopathy in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 778-783
- De Palma GD, Rega M, Masone S, Persico F, Siciliano S, Patrone F, Matantuono L, Persico G. Mucosal abnormalities of the small bowel in patients with cirrhosis and portal hypertension: a capsule endoscopy study. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 529-534
- Nagral AS, Joshi AS, Bhatia SJ, Abraham P, Mistry FP, Vora IM. Congestive jejunopathy in portal hypertension. *Gut* 1993; 34: 694-697
- Urbain D, Vandebosch S, Hindryckx P, Colle I, Reynaert H, Mana F, Vanden Branden S, Van Vlierberghe H, De Vos M, De Looze D. Capsule endoscopy findings in cirrhosis with portal hypertension: a prospective study. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 392-393
- 任习芳, 姚洁华, 郑宗军, 龚发良. 肝硬化并门脉高压性肠病42例. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 4115-4117
- Dib N, Oberti F, Calès P. Current management of the complications of portal hypertension: variceal bleeding and ascites. *CMAJ* 2006; 174: 1433-1443
- Gauthier F. Recent concepts regarding extra-hepatic portal hypertension. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14: 216-225
- Palma MD, Aller MA, Vara E, Nava MP, Garcia C, Arias-Diaz J, Balibrea JL, Arias J. Portal hypertension produces an evolutive hepatointestinal pro- and anti-inflammatory response in the rat. *Cytokine* 2005; 31: 213-226
- Marrero RJ, Barkin JS. Wireless capsule endoscopy and portal hypertensive intestinal vasculopathy. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 535-537
- Stanley AJ, Hayes PC. Portal hypertension and variceal haemorrhage. *Lancet* 1997; 350: 1235-1239
- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model* 2007; 4: 44
- Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 马骁, 刘冰榕. 门静脉高压药物治疗的新进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3775-3781
- Aller MA, Vara E, Garcia C, Palma MD, Arias JL, Nava MP, Arias J. Proinflammatory liver and anti-inflammatory intestinal mediators involved in portal hypertensive rats. *Mediators Inflamm* 2005; 2005: 101-111
- Ferguson JW, Dover AR, Chia S, Cruden NL, Hayes PC, Newby DE. Inducible nitric oxide synthase activity contributes to the regulation of peripheral vascular tone in patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2006; 55: 542-546
- 严正平, 陈俊, 王笑秋, 林长生, 金祖锡. 门静脉高压性结肠病的内镜表现. *中华消化内镜杂志* 2003; 20: 56-57
- Iredale JP, Ridings P, McGinn FP, Arthur MJ. Familial and idiopathic colonic varices: an unusual cause of lower gastrointestinal haemorrhage. *Gut* 1992; 33: 1285-1288
- 孙宇, 王维民. 门静脉高压性结肠病. *中华外科杂志* 2006; 44: 786-788
- Aydede H, Seda Vatansever H, Erhan Y, Ilkgül O. Effects of ocreotide on intestinal mucosa in rats with portal hypertensive enteropathy. *Acta Histochem* 2009; 111: 74-82
- Yan BM, Lee SS. Emergency management of bleeding esophageal varices: drugs, bands or sleep? *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 165-170
- Cheung J, Wong W, Zandieh I, Leung Y, Lee SS, Ramji A, Yoshida EM. Acute management and secondary prophylaxis of esophageal variceal bleeding: a western Canadian survey. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 531-534
- 朱长清, 董胜翔, 茅益民, 曾民德, 蒋义斌, 许建明, 田德安, 刘吉勇, 徐三平, 孙樱, 罗和生, 王炳元. 奥曲肽治疗肝硬化门静脉高压食管胃底静脉曲张急性出血的多中心对照研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2570-2573
- Chatterjee S, Van Marck E. Can somatostatin control acute bleeding from oesophageal varices in *Schistosoma mansoni* patients?[ISRCTN63456799]. *BMC Infect Dis* 2004; 4: 58
- Boyd R, Butler J. Best evidence topic report. Terlipressin or somatostatin for the treatment of bleeding oesophageal varices. *Emerg Med J* 2005; 22: 433-434
- 杨文燕, 吴建新, 戴强, 江佛湖. 长效奥曲肽对大鼠肝纤维化门静脉高压形成的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2815-2819
- Aller MA, Arias JL, Arias J. The mast cell integrates the splanchnic and systemic inflammatory response in portal hypertension. *J Transl Med* 2007; 5: 44
- Traina M, Tarantino I, Barresi L, Mocciaro F. Variceal bleeding from ileum identified and treated by single balloon enteroscopy. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1904-1905
- Patel NH, Chalasani N, Jindal RM. Current status of transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Postgrad Med J* 1998; 74: 716-720
- Bass NM. Role of TIPS in portal hypertension: variceal bleeding and ascites. *Tech Vasc Interv Radiol* 1998; 1: 44-50
- Cello JP, Crass RA, Federle MP. Colonic varices: an unusual source of lower gastrointestinal hemorrhage. *West J Med* 1982; 136: 252-255

■同行评价

本文内容丰富, 参考文献引用合理, 具有较好的可读性。

编辑 李军亮 电编 何基才

克罗恩病肛瘻的诊断与治疗

杨柏霖, 竺平, 孙桂东

■背景资料

肛瘻是克罗恩病最常见、最难处理的肛周病变, 常表现为伴有广泛炎症和疤痕的高位复杂性肛瘻。外科医生在处理克罗恩病肛瘻必须权衡手术带来的潜在风险, 单纯的局部手术治疗常常失败。理想的治疗策略是在保护肛门功能的基础上治愈或减轻局部症状, 药物治疗与外科手术相结合。

杨柏霖, 竺平, 孙桂东, 南京中医药大学附属医院肛肠科 江苏省南京市 210029

作者贡献分布: 本文综述由杨柏霖、竺平及孙桂东共同完成; 由杨柏霖审校。

通讯作者: 杨柏霖, 副主任医师, 210029, 江苏省南京市, 南京中医药大学附属医院肛肠科. blyang1971@163.com

电话: 025-86617141-71108

收稿日期: 2009-04-19 修回日期: 2009-06-17

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn's disease

Bo-Lin Yang, Ping Zhu, Gui-Dong Sun

Bo-Lin Yang, Ping Zhu, Gui-Dong Sun, Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Bo-Lin Yang, Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. blyang1971@163.com

Received: 2009-04-19 Revised: 2009-06-17

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

Perianal fistulas secondary to Crohn's disease may destroy the sphincter musculature after years of development. Meticulous anorectal examination is often needed to identify the location of abscesses and fistulas. Combined medical and surgical therapy is the optimal treatment for perianal fistulas secondary to Crohn's disease. Drug therapy is also necessary for patients with active gastrointestinal inflammation. Patients with complex fistulae must be treated on an individual basis. However, choosing the appropriate surgical and medical interventions is often quite difficult. In this article, we will review the diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn's disease.

Key Words: Perianal fistula; Crohn's disease; Diagnosis; Treatment

Yang BL, Zhu P, Sun GD. Diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2058-2063

■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

摘要

克罗恩病并发肛瘻经过数年的发展会损伤肛门括约肌, 细致的肛管直肠检查能正确评价脓肿和肛瘻。理想的治疗方法是选择合适药物与外科手术相结合。伴有胃肠道炎症的患者必须结合药物治疗。低位单纯性肛瘻可采用瘻管切开术, 复杂性肛瘻患者必须个体化治疗。然而, 选择正确的手术方法和药物治疗比较困难。现就克罗恩肛瘻的诊断与治疗进行阐述。

关键词: 肛瘻; 克罗恩病; 诊断; 治疗

杨柏霖, 竺平, 孙桂东. 克罗恩病肛瘻的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2058-2063

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2058.asp>

0 引言

自1934年Bissell^[1]首先报道小肠局限性肠炎同时伴有肛周肉芽肿病变以来, 克罗恩病(Crohn's disease, CD)的肛周病变越来越受到临床医师的重视。肛瘻是CD最常见的肛周病变, 文献报道的发生率可高达43%^[2]。CD患者肛瘻的诊断评价应包括肛瘻的类型和位置, 病变导致的括约肌功能状况, 是否存在活动性肠道炎症等。由于疾病自身的发展和潜在的病理变化, 合理的治疗方案应当是在外科治疗的基础上联合药物治疗^[3]。

1 肛瘻的发生率与流行病学

肛周丰富的淋巴组织可以解释肛周CD多发的原因。文献报道CD患者肛瘻发病率17%-43%^[2]。Hellers *et al*^[4]报道1955-1974年瑞典斯德哥尔摩市CD患者肛瘻的发病率为23%。Schwartz *et al*^[5]报道1970-1993年美国明尼苏达医院CD患者肛瘻发病率为38%。肠道CD确诊后, 在1、10、20年内肛瘻的发病率分别为12%、21%、26%^[3]。肠道炎症发生的部位明显影响肛瘻的发生, 存在结肠活动性病变的患者肛瘻发病率明显升高, 直肠受累时肛瘻发病率为92%, 只有5%的CD患者首先表现为肛瘻而缺乏肠道炎症的表现^[2-3]。

2 诊断

2.1 临床表现 多种病变同时表现是肛周CD的典型特征. CD肛瘘可以同时伴有肛周皮赘、肛裂、肛门失禁或肛管直肠狭窄, 局部疼痛轻微或无痛. 剧烈的疼痛提示有潜在的感染. 由于CD是一种慢性、透壁性炎症疾病, 疾病自身的进行性发展可导致内外括约肌和会阴体的损害, 直肠炎症导致直肠顺应性降低, 即使是中等程度的括约肌功能下降, 也可能会因为结肠吸收水分障碍、直肠容积及顺应性下降, 最终形成肛门失禁. 然而, 多数肛门失禁是由于过度的外科手术所致.

CD肛瘘的确切病因尚不明确. Armuzzi *et al*^[6] 研究认为5号染色体缺陷使CD患者肛周病变具有明显的遗传倾向. CD肛瘘中低位肛瘘可视为腺源性肛瘘; 具有高位内口或复杂瘘管的高位复杂性肛瘘与腺源性肛瘘不同, 他们有复杂的相互连通的管道. 直肠阴道瘘多见, 发生率约为10%, 以低位瘘多见^[7].

2.2 分类 就肛瘘而言, 目前还未有被一致接受的标准分类. 分类形式繁多, 临床医生经常被这些复杂的分类所混淆. 肛瘘分类应当确定原发瘘管、继发管道, 病变所涉及肛门括约肌及周围相关组织结构的关系, 并提供外科手术所需要的解剖资料. Park's分类是目前临床最为广泛接受的分类方法, 同样适用于CD肛瘘(图1).

2.3 CD肛瘘活动评价 正确评价瘘管的活动程度有助于临床治疗CD肛瘘. 标准的CD活动指数(the Crohn's disease activity index, CDAI)并不适合评价CD肛瘘. 尽管不同的研究者使用不同的评价方法, 但肛周CD活动指数(perianal Crohn's disease activity index, PCDAI)最能反映CD患者肛瘘的进展情况^[8]. PCDAI从5个方面对CD患者肛周病变进行评价: 分泌物、疼痛、性生活困难、肛周病变类型和硬结.

2.4 辅助检查 临床检查结果将直接影响治疗决策, 正确的诊断检查方法是CD肛瘘治疗的重要部分. 目前临床最为常用的局部检查方法有直肠指诊、肛管直肠腔内超声(anorectal ultrasound, AUS)、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)和麻醉状态下探查(examination under anesthesia, EUA).

磁共振成像能从矢状面、冠状面及横截面获得理想的影像图片, 充分显示肛管直肠周围肌肉, 瘘管与疤痕存在不同的影像学信号而能准确分辨, 已逐步成为复杂性肛瘘术前诊断的

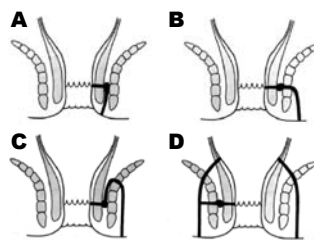


图1 Park'S肛瘘分类. A: 括约肌间肛瘘; B: 经括约肌肛瘘; C: 括约肌上方肛瘘; D: 括约肌外侧肛瘘.

金标准^[9]. 我们的研究结果显示MRI对复杂性肛瘘内口检出率为84%, 原发主管、支管/脓腔检出准确率100%和94.7%^[10]. MRI是CD肛瘘首选检查方法^[3,9]. 肛管直肠腔内超声受到超声波穿透范围、局部脓肿形成导致的疼痛及直肠狭窄等因素的存在, 而在CD肛瘘诊断应用中受到限制^[3]. MRI影像指导, 麻醉状态下探查能正确评价脓肿和肛瘘的情况^[3].

肠道炎症侵犯的范围和程度影响对CD肛瘘的外科处理, 以及对疾病预后的判断, 因此, 患者应当定期进行纤维结肠镜检查来评价肠道炎症的进展. 全消化系造影可以用来评价小肠的侵犯程度.

2.5 CD肛瘘的癌变 CD是否为结直肠癌发生的危险因素尚有争论. Kersting *et al*^[11]报道手术治疗的330例CD患者中, 10例诊断为结直肠癌, 其中3例与肛瘘相关. Ky *et al*^[12]经过14年对1000多例伴有肛周病变的CD患者追踪研究, 7名患者发生肛管或直肠恶性肿瘤, 作者认为癌变与肛瘘有关, 并认为CD肛瘘的癌变率为0.7%. Gaertner *et al*^[13]报道的14例肛瘘癌变中有10例为CD患者. CD肛瘘癌变预后较差, 诊断比较困难, 对于长期存在复杂性肛瘘的CD患者需提防局部癌变. 复杂的肛周病变形成的狭窄、溃疡、炎症等导致局部检查受限. 对临床怀疑的病例, MRI能够提供准确而有效的影像学依据, 继而在麻醉状态下探查、进行活组织病理检查是必需的^[10]. CD肛瘘癌变的治疗与常规肿瘤治疗一致, 鳞状上皮癌需采用放疗, 腺癌需在手术的基础上联合化疗.

3 治疗

CD肛瘘的治疗策略是在保护肛门功能的基础上治愈肛瘘或减轻局部症状, 药物治疗与局部外科手术相结合. 然而, 如何选择正确的手术方法和有效的治疗药物是困难的.

3.1 药物治疗 合并有肠道CD的患者结合内科药物治疗是必须的. 肠道炎症的控制影响CD肛瘘的活动程度和治愈率, 肠道炎症处于相对静

■ 研发前沿

磁共振成像在复杂性肛瘘中的应用, 为手术治疗克罗恩肛瘘提供了理想的解剖学依据. 挂线引流技术、推移皮瓣/黏膜瓣技术和肛瘘栓等手术方法, 以及抗肿瘤坏死因子 α 等生物制剂的相继问世, 为综合治疗克罗恩肛瘘提供了新的治疗选择. 然而, 选择正确的手术方法和药物治疗以获取最佳治疗结果依然困难.

■ 相关报道

Gaertner *et al*报道的14例肛瘘癌变中有10例为CD患者. Caprilli *et al*报道证实Infliximab是第一个由RCT临床试验证实具有促使CD肛瘘闭合并维持症状达1年的药物. Connor *et al*报道应用肛瘘栓治疗CD肛瘘, 20例患者中16例愈合(80%, 随访时间3-24 mo, 平均10 mo). Ky *et al*报道肛瘘栓治疗复杂性肛瘘, 结果显示非CD肛瘘疗效优于CD肛瘘(66.7% vs 26.6%).

■创新盘点

本文从克罗恩病肛瘘的诊断与治疗要点入手,提出了疾病治疗目标,系统阐述、分析了现有检查和治疗研究,对各种手术方法和药物治疗作了介绍和比较,为临床提供了新的治疗策略。

止期时为处理肛周病变提供了良好的条件。目前临床常用的药物包括抗生素(甲硝唑、环丙沙星), 5-氨基水杨酸或其药物前体(如柳氮磺吡啶、偶氮水杨酸等), 免疫抑制剂(6-巯嘌呤、氨甲喋呤、环孢霉素), 抗肿瘤坏死因子- α mAb(英夫利昔单抗, Infliximab)。CD伴有肛瘘时不建议使用皮质类固醇, 类固醇对CD肛瘘无明确的治疗效果, 而且会影响肛瘘的愈合并导致脓肿的形成^[14]。

3.1.1 抗生素: 甲硝唑和环丙沙星是治疗肛周CD的一线用药。CD伴有瘘管或化脓性并发症时, 应及时使用甲硝唑、环丙沙星^[3,15]。尽管没有RCT试验证实甲硝唑治疗CD肛瘘有效, 但多个非随机的临床试验证实甲硝唑治疗CD肛瘘有效。临床应用剂量通常为750-1000 mg/d, 6-8 wk后起效^[3]。甲硝唑为治疗CD肛瘘的一线用药, 80%的患者症状缓解^[16]。Bernstein *et al*^[17]报道了连续的21例患者, 每天接受20 mg/kg甲硝唑治疗, 83%的患者肛瘘闭合。甲硝唑减量或停药会导致病情活动, 一项研究显示停药4 mo后, 78%的患者症状复发, 但重新恢复治疗剂量后病情很快又被控制^[18]。长期服用甲硝唑的不良反应主要有口腔金属味、舌炎、恶心、周围末梢神经炎。Edward *et al*^[16]局部应用10%甲硝唑治疗CD肛瘘, 起效时间为2 wk, 治疗4 wk后PCDAI从 8.8 ± 0.9 下降至 4.1 ± 0.7 , 无明显不良反应。

研究表明环丙沙星通过抑制细菌DNA回旋酶合成治疗肛周CD有明显效果。West *et al*^[19]通过双盲安慰剂对照试验证实环丙沙星配合英夫利昔单抗治疗CD肛瘘的疗效明显优于单独应用英夫利昔单抗。与甲硝唑相同, 目前缺乏随机对照的临床试验, 而且停药后肛瘘可能会复发。

3.1.2 5-氨基水杨酸及其药物前体: 5-氨基水杨酸及其药物前体已广泛应用于溃疡性结肠炎与肠道CD, 但目前尚未见到此类药物治疗CD肛瘘的确切疗效报道^[20]。5-氨基水杨酸局部灌肠或使用栓剂对肛周CD有明显的改善^[21]。根据我们的经验, 在肛瘘伴有活动性肠道炎症时建议使用, 初始剂量3-4 g/d。

3.1.3 免疫抑制剂: 6-巯基嘌呤(6-MP)或其药物前体硫唑嘌呤结合甲硝唑为治疗CD肛瘘的一线药物^[3]。一篇包括5个随机对照临床试验的Meta分析显示, 使用6-MP或硫唑嘌呤治疗的44例CD肛瘘患者中22例(54%)瘘管闭合, 安慰剂为21%(6/29)。美国胃肠病学会推荐使用6-MP 1.0-1.5 mg/(kg·d)或硫唑嘌呤2.0-3.0 mg/(kg·d)治疗CD肛瘘^[14]。不良

反应报道为9%-15%, 主要是白细胞减少、过敏反应、感染、胰腺炎和药物性肝炎^[2]。

临床试验证实静脉应用大剂量的环孢菌素(Cyclosporine)能够有效治疗CD肛瘘, 然而不良反应限制了其临床应用, 口服维持剂量时症状通常会复发^[14]。Present *et al*^[22]报道静脉滴注4 mg/kg, 平均起效时间为7.4 d, 继而6-8 mg/kg *po*维持, 临床有效率90%, 维持剂量时有部分患者复发。

3.1.4 抗肿瘤坏死因子- α mAb: Infliximab是一种嵌合mAb, 是第一个由RCT临床试验证实具有促使CD肛瘘闭合并维持症状达1年的药物^[3]。在美国和欧洲12个中心进行的一项RCT试验中, 94名CD肛瘘患者在0、2、6 wk时接受静脉滴注5 mg/kg或10 mg/kg Infliximab。62%的患者瘘管不需要进一步引流(安慰剂组, 26%); 55%的患者肛瘘症状完全消失(安慰剂组, 13%); 平均起效时间14 d, 5 mg/kg是最佳治疗剂量^[23]。ACCENT II试验证实了上述研究结果, 并进行了长期维持治疗的效果的研究^[24-25]。306例CD肛瘘患者在0、2、6 wk时静脉滴注5 mg/kg Infliximab, 治疗14 wk时, 69%(195例)有效患者再随机分组接受每8 wk 5 mg/kg Infliximab作维持治疗, 54 wk时36%的患者瘘管完全闭合(安慰剂组, 19%), Infliximab维持治疗减少了患者手术次数和住院时间。最近的一项RCT试验证实Infliximab联合环丙沙星治疗CD肛瘘的疗效明显优于单独应用Infliximab^[19]。

应用Infliximab有20%-30%患者发生输液反应, 多数为低热、脸色潮红、心跳加速等轻微反应, 2%左右的患者会出现严重的过敏反应、呼吸困难或血压下降, 少见狼疮样反应, 潜伏结核病的复发, 10%-35%的患者会因为肛瘘外口闭合而继发肛周脓肿, 通过挂线引流往往能够控制^[14]。

3.2 外科治疗 CD肛瘘手术前应评价肛周病变的严重程度、肛门括约肌功能、控便情况、伴随的直肠炎症、瘘管的数目及复杂情况、患者的营养状况及症状对患者生活质量影响的程度^[7]。CD肛瘘手术治疗可参照以下原则: (1)无症状: 不治疗; (2)伴有活动性肠道炎症: 全身治疗和局部外科引流或作长期引流; (3)低位括约肌间瘘或经括约肌瘘: 瘘管切开术; (4)复杂性肛瘘: 引流并考虑在适当时期选择挂线治疗、黏膜瓣/皮瓣推移技术^[26]。

3.2.1 脓肿切开引流: CD患者伴有肛管直肠周

围疼痛提示肛周脓肿形成. 对于初次发生的肛周脓肿应采用单纯切开引流, 在尽可能避免括约肌损伤的同时获得足够而充分的引流. 如果脓腔较大且离肛门较远, 可通过小切口进入脓腔, 放置蘑菇头导尿管持续引流或橡皮筋长期引流挂线, 导管可放置数周或数月, 直至肛瘘形成. 复发性脓肿可采用部分内括约肌切断术, 切除感染的肛腺上皮, 开放括约肌间间隙并切除部分内括约肌使脓腔得到充分引流. Pritchard *et al*^[27] 回顾了38例经手术治疗的CD患者的直肠周围脓肿, 30例低位脓肿, 8例深部脓肿, 53%(20/38)进行单纯切开引流, 26%(10/38)采用松弛挂线引流, 21%(8/38)采用蘑菇头导尿管引流, 术后3组复发率分别为42%、46%和45%.

3.2.2 CD肛瘘的处理: 正确的手术方法是不影响肛门控制功能的基础上治愈肛瘘或减轻局部症状. 皮下肛瘘、低位括约肌间肛瘘或低位经括约肌肛瘘可参照腺源性肛瘘采用瘘管切开术. 高位经括约肌肛瘘、括约肌外肛瘘或括约肌上方瘘宜采用挂线技术、推移皮瓣技术或肛瘘栓治疗. (1)瘘管切开术: 皮下肛瘘、低位括约肌间肛瘘或低位经括约肌肛瘘可采用瘘管切开术. 骶麻或局部麻醉后, 探针穿过外口、管道和内口. 切开瘘管, 切除内口周围组织及部分内括约肌, 修剪创面使引流通畅. (2)肛瘘挂线治疗: 复杂性的CD肛瘘宜采用长期挂线引流. 就CD肛瘘而言, 手术造成的问题可能比原发疾病有更大的危险性, 挂线引流是尝试进一步外科治疗前最行之有效的办法, 能够有效限制和减轻了局部症状, 保护肛门括约肌功能^[28]. 除低位肛瘘能采用瘘管切开术外, 其他CD肛瘘应采用引流挂线结合药物治疗^[7]. Williams *et al*报道了55例CD肛瘘, 33例共41处低位肛瘘采用肛瘘切开术, 93%(38/41)的手术切口在6 mo内愈合, 12%(4/33)的患者轻度肛门失禁; 22例高位复杂性肛瘘采用长期挂线引流, 其中3例需再次挂线, 3例行直肠切除^[29]. 作者认为括约肌间肛瘘和低位经括约肌间肛瘘进行瘘管切开术是安全的, 高位复杂性肛瘘宜采用长期挂线引流以限制症状和保持肛门功能. CD肛瘘采用挂线治疗主要是利用挂线的引流作用, 限制症状进展, 避免直肠切除和永久性造口, 手术时彻底探查原发管道、支管和内口, 置入橡皮筋松弛挂线以避免括约肌功能损伤^[30]. (3)推移黏膜瓣/皮瓣修补术: 推移黏膜瓣/皮瓣修补术治疗CD肛瘘和直肠阴道瘘的结果是令人满意的. 手术避免切断肛门

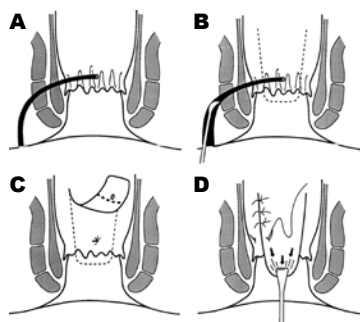


图 2 推移黏膜瓣技术: A: 经括约肌肛瘘; B: 外口扩大并清扫瘘管内坏死肉芽组织; C: 游离黏膜瓣并封闭损伤的内括约肌; D: 黏膜瓣覆盖内口并缝合.

■应用要点

本文不仅给克罗恩病肛瘘的诊断和治疗提供参考, 并对该疾病新兴的研究热点作了阐述, 为临床治疗和研究均提供了重要的指导意义.

括约肌, 因此不会导致肛门失禁. 手术成功的关键包括: 黏膜瓣应包括黏膜层、黏膜下层以及部分内括约肌, 宽度至少达直肠全周的1/4, 以确保足够的血供; 游离皮瓣长度需超过肛瘘内口, 保证在内口切除和清创后无张力缝合; 手术中必须仔细止血; 彻底的瘘管清创或切除; 外口适当扩创保持充分的引流. 手术成功率70%-75%, 对失败的患者可以再次手术治疗^[31-32](图2). 运用推移黏膜瓣/皮瓣修补术治疗复杂性肛瘘是否需同时行肠造口粪便转流手术是一直存在的争论话题, 我们的经验是不同时行粪便转流手术^[33]. 推移黏膜瓣/皮瓣修补术治疗CD肛瘘的成功率与肠道炎症密切相关, 存在活动性的直肠炎症时预后较差. 直肠炎症的存在是手术失败的主要因素, 挂线引流是存在直肠炎症时的首选治疗^[7].

3.2.3 肛瘘栓的应用: 肛瘘栓(anal fistula plug, AFP)是近几年才应用于肛瘘的治疗. AFP是一种从猪小肠黏膜下层(small intestinal submucosa, SIS)提取的生物胶原做成的栓剂. AFP与宿主损伤部位组织具有较好的生物吸收和相容性, 能够为宿主组织细胞和血管生长提供网状支架结构, 促使局部组织修复. 推荐手术方法如下: 瘘管经无菌生理盐水或双氧水冲洗后, AFP自主管内口插入瘘管, 经外口拉出至出现阻力(AFP完全填充内口部位), 剪除多余AFP; 用可吸收缝线将AFP缝合固定于内口; 剪除外口多余AFP, 存在支管可开放引流^[34]. Champagne *et al*^[35]报道应用AFP治疗腺源性肛瘘的长期随访结果(6-24 mo, 平均12 mo), 有效率为83%(38/46). Connor *et al*^[36]应用AFP治疗CD肛瘘, 20例患者中16例愈合(80%, 随访时间3-24 mo, 平均10 mo). 然而, Ky *et al*^[37]用该方法治疗45例患者(其中20例为复杂性肛瘘), 随访8 wk时成功率为84%; 但随时间推移成功率下降, 平均随访至6.5 mo时成功率下降至54.6%, 单纯性肛瘘较复杂性肛瘘有效(70.8% vs 35%), 非CD肛瘘疗效优于CD肛瘘(66.7% vs 26.6%). Christoforidis *et al*^[38]

■名词解释

肛瘘栓:一种从猪小肠黏膜下层提取的生物胶原做成的栓剂,能够与宿主损伤部位组织具有较好的生物吸收和相容性,为宿主组织细胞和血管生长提供网状支架结构,促使局部组织修复。

对照长期随访推移皮瓣和AFP治疗复杂性肛瘘结果,推移皮瓣成功率为63%(平均随访56 mo),AFP为56%(平均随访14 mo)。

3.2.4 严重的进展性肛周病变:有效的手术与药物治疗使CD肛瘘治愈率达到62%-86%,并维持正常的肛门控便功能^[7]。若症状持续存在并严重影响患者的生活质量,或伴有保守治疗无效的进展性直肠炎症需行直肠切除术、永久性造口转流术。手术应在括约肌间入路,切除直肠黏膜、黏膜下层和内括约肌,保留外括约肌,支管予以切开、搔刮,或经清创引流。Mueller *et al*^[39]对一组连续的102例CD患者采用问卷调查,在平均16年的随访期中,54%的患者因复杂性肛瘘或直肠阴道瘘而行永久性造口转流手术。

4 结论

肛瘘是CD最常见的肛周病变,文献报道的发生率可高达43%。术前恰当地评估肛瘘的分型及其与肛门括约肌的关系,以及肠道炎症状况极其重要。药物治疗与外科手术是最理想的治疗策略。甲硝唑和环丙沙星是治疗肛周CD的一线用药。肛周脓肿应及时切开引流;瘘管切开术适合于低位经括约肌肛瘘或括约肌间肛瘘;高位经括约肌间肛瘘、括约肌上方瘘或括约肌外侧瘘可以采用挂线引流、推移皮瓣技术或肛瘘栓治疗,同时应用抗生素、免疫抑制剂或Infliximab。

5 参考文献

- Bissell AD. Localized Chronic Ulcerative Ileitis. *Ann Surg* 1934; 99: 957-966
- Schwartz DA, Pemberton JH, Sandborn WJ. Diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn disease. *Ann Intern Med* 2001; 135: 906-918
- Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, Moser G, Munkholm P, Forbes A, Hommes DW, Lochs H, Angelucci E, Cocco A, Vucelic B, Hildebrand H, Kolacek S, Riis L, Lukas M, de Franchis R, Hamilton M, Jantschek G, Michetti P, O'Morain C, Anwar MM, Freitas JL, Mouzas IA, Baert F, Mitchell R, Hawkey CJ. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut* 2006; 55 Suppl 1: i36-i58
- Hellers G, Bergstrand O, Ewerth S, Holmström B. Occurrence and outcome after primary treatment of anal fistulae in Crohn's disease. *Gut* 1980; 21: 525-527
- Schwartz DA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 2002; 122: 875-880
- Armuzzi A, Ahmad T, Ling KL, de Silva A, Cullen S, van Heel D, Orchard TR, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP. Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on

- chromosome 5q31. *Gut* 2003; 52: 1133-1139
- Fichera A, Michelassi F. Surgical treatment of Crohn's disease. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 791-803
- Irvine EJ. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *J Clin Gastroenterol* 1995; 20: 27-32
- Halligan S, Stoker J. Imaging of fistula in ano. *Radiology* 2006; 239: 18-33
- 杨柏霖,谷云飞,祝新,邵万金,孙桂东,丁曙晴,金黑鹰. 磁共振成像在复杂性肛瘘诊断中的应用. *中华胃肠外科杂志* 2008; 11: 339-342
- Kersting S, Bruerger M, Laukoetter MG, Rijcken EM, Mennigen R, Buerger H, Senninger N, Kriegelstein CF. Intestinal cancer in patients with Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 411-417
- Ky A, Sohn N, Weinstein MA, Korelitz BI. Carcinoma arising in anorectal fistulas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 992-996
- Gaertner WB, Hagerman GF, Finne CO, Alavi K, Jessurun J, Rothenberger DA, Madoff RD. Fistula-associated anal adenocarcinoma: good results with aggressive therapy. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1061-1067
- Lichtenstein GR, Abreu MT, Cohen R, Tremaine W. American Gastroenterological Association Institute medical position statement on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 935-939
- 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华内科杂志* 2001; 40: 138-141
- Stringer EE, Nicholson TJ, Armstrong D. Efficacy of topical metronidazole (10 percent) in the treatment of anorectal Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 970-974
- Bernstein LH, Frank MS, Brandt LJ, Boley SJ. Healing of perineal Crohn's disease with metronidazole. *Gastroenterology* 1980; 79: 357-365
- Brandt LJ, Bernstein LH, Boley SJ, Frank MS. Metronidazole therapy for perineal Crohn's disease: a follow-up study. *Gastroenterology* 1982; 83: 383-387
- West RL, van der Woude CJ, Hansen BE, Felt-Bersma RJ, van Tilburg AJ, Drapers JA, Kuipers EJ. Clinical and endosonographic effect of ciprofloxacin on the treatment of perianal fistulae in Crohn's disease with infliximab: a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1329-1336
- Rutgeerts P. Review article: treatment of perianal fistulizing Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 4: 106-110
- Basu A, Wexner SD. Perianal Crohn's Disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2002; 5: 197-206
- Present DH, Lichtiger S. Efficacy of cyclosporine in treatment of fistula of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 374-380
- Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1398-1405
- Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank

- MA, van Deventer SJ. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 876-885
- 25 Sands BE, Blank MA, Patel K, van Deventer SJ. Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to infliximab in the ACCENT II Study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 912-920
- 26 David EB, Wexner SD. Fundamentals of Anorectal Surgery. 2nd ed. London: W. B. Saunders Company, 1998: 498-507
- 27 Pritchard TJ, Schoetz DJ Jr, Roberts PL, Murray JJ, Collier JA, Veidenheimer MC. Perirectal abscess in Crohn's disease. Drainage and outcome. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 933-937
- 28 Keighley MRB, Williams NS. 肛肠外科学. 第2版. 北京: 科学出版社, 2003: 527-529
- 29 Williams JG, Rothenberger DA, Nemer FD, Goldberg SM. Fistula-in-ano in Crohn's disease. Results of aggressive surgical treatment. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 378-384
- 30 Aronoff JS, Korelitz BI, Sohn N, Ky A, Rajapakse R, Weinstein MA, Cohen FS. Anorectal Crohn's disease: surgical and medical management. *BioDrugs* 2000; 13: 95-105
- 31 Marchesa P, Hull TL, Fazio VW. Advancement sleeve flaps for treatment of severe perianal Crohn's disease. *Br J Surg* 1998; 85: 1695-1698
- 32 Michelassi F, Melis M, Rubin M, Hurst RD. Surgical treatment of anorectal complications in Crohn's disease. *Surgery* 2000; 128: 597-603
- 33 邵万金, 孙桂东, 陈邑歧, 杨柏林, 钱剑秋, 施正华. 推移瓣修补治疗直肠阴道瘻的初步经验. *中华胃肠外科杂志* 2007; 10: 393
- 34 The Surgisis AFP anal fistula plug: report of a consensus conference. *Colorectal Dis* 2008; 10: 17-20
- 35 Champagne BJ, O'Connor LM, Ferguson M, Orangio GR, Schertzer ME, Armstrong DN. Efficacy of anal fistula plug in closure of cryptoglandular fistulas: long-term follow-up. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 1817-1821
- 36 O'Connor L, Champagne BJ, Ferguson MA, Orangio GR, Schertzer ME, Armstrong DN. Efficacy of anal fistula plug in closure of Crohn's anorectal fistulas. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 1569-1573
- 37 Ky AJ, Sylla P, Steinhagen R, Steinhagen E, Khaitov S, Ly EK. Collagen fistula plug for the treatment of anal fistulas. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 838-843
- 38 Christoforidis D, Pieh MC, Madoff RD, Mellgren AF. Treatment of transsphincteric anal fistulas by endorectal advancement flap or collagen fistula plug: a comparative study. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 18-22
- 39 Mueller MH, Geis M, Glatzle J, Kasperek M, Meile T, Jehle EC, Kreis ME, Zittel TT. Risk of fecal diversion in complicated perianal Crohn's disease. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 529-537

■同行评价

本文综述了克罗恩病肛瘻的诊断和治疗进展, 有一定临床实用价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-18)

埃索美拉唑的临床应用新进展

张晖敏, 缪应雷

■背景资料

奥美拉唑的S-旋光异构体, 是全球首个异构体质子泵抑制剂(PPI), 通过特异性抑制胃壁细胞质子泵减少胃酸分泌。经大量临床实验和药物研究证实: 其维持胃内pH>4的时间更长, 抑酸效率更高, 疗效优于前两代PPI。作为一种较新的PPI, 现已广泛应用于临床治疗诸多酸相关疾病。

张晖敏, 缪应雷, 昆明医学院第一附属医院消化内科 云南省昆明市 650032

作者贡献分布: 本文由张晖敏和缪应雷完成; 缪应雷审校。

通讯作者: 缪应雷, 650032, 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院消化内科, myldu@sina.com.cn
电话: 0871-5324888-2532

收稿日期: 2009-05-06 修回日期: 2009-06-12

接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-18

Advances in the clinical applications of esomeprazole

Hui-Min Zhang, Ying-Lei Miao

Hui-Min Zhang, Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Correspondence to: Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. myldu@sina.com.cn

Received: 2009-05-06 Revised: 2009-06-12

Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-18

Abstract

Esomeprazole is the first proton pump inhibitor (PPI) to be developed as a single optical isomer. Ever since its first clinical application seven years ago, esomeprazole has attracted more and more attention due to relatively unique metabolism (compared to other PPIs), efficient and durable acid control, better safety and lower incidence of adverse reactions. In this article, we will review the clinical applications of esomeprazole in the treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD), *Helicobacter pylori* infection, peptic ulcers, NSAID-related gastrointestinal disorders and upper gastrointestinal bleeding.

Key Words: Esomeprazole; Proton pump inhibitor; Digestive system diseases

Zhang HM, Miao YL. Advances in the clinical applications of esomeprazole. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2064-2069

摘要

质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPI)在治疗消化系诸多酸相关疾病方面取得了满意

的效果, 其家族中的第1个单一光学异构体-埃索美拉唑(esomeprazole), 应用于临床的7年间, 以其相对独特的代谢途径(较其他PPI), 高效持久的抑酸效果, 较好的安全性和较低的不良反应发生率, 得到临床的广泛应用和人们越来越多的关注。本文就近几年国内外对该药主要临床应用研究作一综述。

关键词: 埃索美拉唑; 质子泵抑制剂; 消化系疾病

张晖敏, 缪应雷. 埃索美拉唑的临床应用新进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(20): 2064-2069

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2064.asp>

0 引言

自从1988年奥美拉唑(omeprazole)作为世界上第1个应用于临床的质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPI)上市, 此类药物, 如兰索拉唑(lansoprazole)、泮托拉唑(pantoprazole)、雷贝拉唑(rabeprazole)等就陆续推出。大量研究和临床试验表明: PPI在治疗消化系诸多酸相关疾病方面取得了肯定而满意的效果。埃索美拉唑(esomeprazole)是奥美拉唑的S-异构体, 也是PPI家族中第1个单一光学异构体, 作为一种比较新的质子泵抑制剂, 广泛应用于临床, 现就其临床应用疗效作一简要综述。

1 药理、药动与药效

埃索美拉唑与其他PPI一样, 为胃壁细胞质子泵H⁺-K⁺-ATP酶的特异性抑制剂, 在分泌胃酸的壁细胞或近酶区, 被转化为次磺酰胺的活化形式, 然后与壁细胞上的H⁺-K⁺-ATP酶亚单位半胱氨酸残基上的巯基通过二硫键结合, 使酶被氧化失活, 从而使壁细胞的H⁺不能转运到胃腔, 进而发挥抑制胃酸的治疗作用^[1]。埃索美拉唑通过肝脏的2种细胞色素P450(CYP)同工酶进行代谢: 主要是通过CYP3A4代谢, 只有小部分是CYP2C19代谢^[2-3]。埃索美拉唑药动学差异源于肝脏代谢的差异, 在所有PPI中, 埃索美拉唑弱代谢者和强代谢者的AUC之比为2, 变

■同行评议者

马欣, 主任医师, 甘肃省人民医院消化科

异最小, 而其他的PPI均为5左右. 提示埃索美拉唑的个体差异远低于其他PPI^[2]. Schwab *et al*^[4] 一项基于埃索美拉唑治疗205名胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)患者的研究表明: 埃索美拉唑治愈GERD与CYP2C19基因无关, 这可以说明其代谢主要由CYP3A4介导; 国内牛春燕 *et al*^[5]通过对确定CYP2C19基因型的志愿者开放、对照的研究亦未观察到CYP2C19基因多态性对埃索美拉唑的抑酸效应的影响. 然而, 也有新近研究提出: CYP2C19基因的多态性对埃索美拉唑维持胃内pH>4的时间和血药浓度具有显著影响, 但通过调整药物剂量, 使之达到最佳剂量20TD(20 mg, bid)或10Q4D(10 mg, qid)可以将这种影响降到最低^[6]. 作为第1个S-异构体的PPI, 由于其肝脏首过效应较低, 血清清除速率较慢, 血药浓度及生物利用度较高^[2], 因此他的抑制胃酸的作用更为强烈而持久. 临床实验分别表明: 每日口服40 mg埃索美拉唑产生的抑酸作用强于静推同等剂量的泮托拉唑^[7]; 埃索美拉唑提供胃酸抑制的作用强于奥美拉唑^[8]; 埃索美拉唑(40 mg *po*, qd)较雷贝拉唑(10 mg *po*, qd)能更高效快捷的提高胃内pH值, 并且潜在改善了治疗酸相关疾病的效果^[9]; 比起兰索拉唑, 埃索美拉唑更能有效地提高胃内pH值并有效控制胃酸, 减少药物剂量耐受及药物调整^[10]. 以奥美拉唑40 mg qd、兰索拉唑30 mg qd、泮托拉唑40 mg qd、雷贝拉唑20 mg qd和埃索美拉唑40 mg qd口服后第5天相比, 埃索美拉唑维持胃内pH>4的时间显著长于其他PPI. (胃内pH>4的时间, 埃索美拉唑为14 h, 雷贝拉唑为12.1 h, 奥美拉唑为11.8 h, 兰索拉唑为11.5 h, 泮托拉唑为10.1 h, P值均 ≤ 0.001)^[11]. Röhss *et al*^[12]报道: 在健康受试者中给予维持剂量的埃索美拉唑20 mg, 其抑制胃酸作用及保持胃内pH>4的时间显著长于维持剂量的兰索拉15 mg, 雷贝拉唑10 mg, 及泮托拉唑20 mg. 证明埃索美拉唑的抑酸能力强于其他质子泵抑制剂.

2 临床疗效

2.1 治疗GERD GERD是指由胃内容物反流入食管引起, 伴有不适症状和(或)并发症的一种疾病^[13]. 据统计: 北京GERD的患病率为10.19%, 上海为7.76%, 两地总的患病率为5.77^[14-15]近年来GERD成为国内常见慢性疾病, 由于容易反复发作, 对患者生活影响较大. 埃索美拉唑等PPI制剂在治疗GERD方面显示了良好的疗

效, FDA已经批准埃索美拉唑用于1-17岁儿童GERD的治疗. 国外1项随机、单盲、平行对照的研究表明: 口服埃索美拉唑在1-24 mo的婴儿中以0.25 mg/kg和1 mg/kg都能很好地耐受, 并呈现出剂量相关的抑酸效果^[16]. 一项基于8 wk、多中心、随机、双盲的研究显示: 埃索美拉唑(每日剂量5, 10或20 mg)治疗内镜证实的GERD儿童(1-11岁)表现出了良好的耐受性, 在治疗期间GERD相关的严重症状明显减少^[17]; 随机交叉研究发现: 在有症状的GERD患者中, 埃索美拉唑40 mg显示了强大的抑酸作用, 他使更多患者维持胃内pH>4的时间长于兰索拉唑30 mg, 奥美拉唑20 mg, 泮托拉唑40 mg以及雷贝拉唑20 mg^[18]. 另据Edwards *et al*^[19]Meta分析表明: 在治疗GERD 4 wk及8 wk后, 埃索美拉唑40 mg更能有效减轻反流症状, 促进愈合, 治愈率高于其他标准剂量的PPI(兰索拉唑30 mg、奥美拉唑20 mg、泮托拉唑40 mg、雷贝拉唑未予对比). 国内系统评价报道: 埃索美拉唑40 mg与奥美拉唑20 mg比较, 反流性食管炎的治愈率在4 wk(RR = 1.12, 95%CI: 1.09-1.16)和8 wk(RR = 1.14, 95%CI: 1.03-1.27)以及治疗4 wk后烧心症状的缓解率(RR = 1.16, 95%CI: 1.10-1.22)优于奥美拉唑. 埃索美拉唑40 mg对反流性食管炎4 wk的治愈率(RR = 1.10, 95%CI: 0.99-1.23)、8 wk的治愈率(RR = 1.05, 95%CI: 1.03-1.06)以及治疗4 wk后烧心症状的缓解率(RR = 1.06, 95%CI: 1.02-1.10)优于兰索拉唑30 mg. 埃索美拉唑40 mg与泮托拉唑40 mg比较, 对反流性食管炎4 wk治愈率(RR = 1.07, 95%CI: 1.03-1.11)、8 wk治愈率(RR = 1.04, 95%CI: 1.02-1.06)以及治疗4 wk后烧心症状的缓解率(RR = 1.08, 95%CI: 1.03-1.12)优于泮托拉唑^[20]. 研究表明: 对于非糜烂性食管炎, 埃索美拉唑比泮托拉唑疗效好; 对于糜烂性食管炎, 埃索美拉唑疗效优于其他PPI^[21].

2.2 根除H pylori 大量研究表明: 半数以上的消化性溃疡是由H pylori感染引起的, 现已基本确定H pylori是慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤及胃癌等疾病的重要致病因子^[22]. 因此根除H pylori, 控制H pylori感染是治疗这类H pylori相关性疾病的重点所在. PPI通过抑制H pylori ATP酶活性及协同抗生素的作用从而抑制H pylori生长, 目前以质子泵抑制剂为基础加二种抗生素是当今使用最广泛的方案^[23]. 在这些治疗方案中, 基于埃索美拉唑的三

■ 研发前沿

CYP2C19对于埃索美拉唑代谢的影响程度, 国内外研究尚有争议, 国外新近研究表明: 调整埃索美拉唑用药剂量至最优可减少该酶对代谢的影响, 这可为今后临床研究和用药提供思路.

■相关报道

2007-12, FDA宣布审查结果说, 没有证据表明埃索美拉唑会增加心血管事件的风险. 2008年初, 加拿大卫生部完成埃索美拉唑的安全性评估: 目前没有证据证明长期使用该药与心血管风险的增加有关.

联治疗方案比奥美拉唑三联治疗方案对于根除 *H pylori* 感染更为有效, 并表现出良好的耐受性. 对于根除 *H pylori* 的ITT(intention to treat)分析, 埃索美拉唑联合抗生素的根除率为86%(95%CI: 83%-89%), 其他PPI(奥美拉唑或泮托拉唑)的根除率为81%(79%-84%), *OR*值为1.38(95%CI: 1.09-1.75); PP(per-protocol)分析的结果: 埃索美拉唑和其他PPI对于 *H pylori* 的根除率分别为90%(95%CI: 87%-92%)和85.4%(83%-89%), 固定效应模型和随机效应模型的*OR*值分别为1.61(95%CI: 1.21-2.13)及1.83(95%CI: 1.11-3.02)^[24]. 王震华 *et al*^[25]的荟萃分析表明: 埃索美拉唑和奥美拉唑联合抗生素的加权平均 *H pylori* 根除率ITT分析分别为85.6%和81.6% (*OR* = 1.30, 95%CI: 1.02-1.65, *P* = 0.04), 差异有统计学意义. 说明埃索美拉唑联合抗生素较奥美拉唑联合抗生素具有更高的 *H pylori* 根除率. 关于埃索美拉唑不同剂量对 *H pylori* 根除率研究表明: 较低剂量(40 mg, qd)和较高剂量(40 mg, bid)的本品对 *H pylori* 都有很高的根除率, ITT分析(90% vs 92%, *P* > 0.05). PP分析(93% vs 95%), 并且都表现出较好的依从性^[26]. 但也有研究表明: 以埃索美拉唑为基础的 *H pylori* 根除方案与以雷贝拉唑、或奥美拉唑为基础的 *H pylori* 根除方案效率和安全性相当^[27-28].

2.3 治疗消化性溃疡 *H pylori* 感染和长期服用非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID)是诱发消化性溃疡(peptic ulcer)的两大主要因素. 根除 *H pylori* 感染不仅能有效地促进溃疡的愈合, 还可减少其复发. PPI在治疗消化性溃疡方面显示了良好的疗效, 现有的大量研究表明: PPI治疗消化性溃疡疗效优于H₂受体阻断剂或安慰剂. 对PPI治疗溃疡作用机制的理解的现代理念, 是直接针对其抗氧化性损伤和细胞凋亡以及通过细胞增殖促进愈合的可能作用^[29]. 各种PPI制剂对于根除 *H pylori* 的疗效已如上所述: 但张兰 *et al*^[28]成本-效果分析表明: 治疗消化性溃疡及根除 *H pylori* 埃索美拉唑组C/E小于奥美拉唑组, 因此使用埃索美拉唑治疗消化性溃疡更能减轻患者负担, 节约卫生资源. 国内随机对照实验表明: 埃索美拉唑三联疗法治疗 *H pylori* 阳性十二指肠溃疡的疗效优于奥美拉唑三联疗法, 腹痛较快得以缓解, 具有良好的治疗作用和安全性, 值得临床推广应用^[30-31]. 国外1项401人的随机、双盲、对照试验表明: 以埃索

美拉唑为基础的三联疗法能够高效地根除 *H pylori*、治愈溃疡并且防止溃疡复发^[32]. 由NSAID诱发的溃疡将下文一并叙述.

2.4 治疗NSAID相关性消化系疾病 近年来, 随着NSAID广泛用于临床解热镇痛治疗, 由NSAID引起的消化系不良反应: 溃疡、出血、穿孔等也明显增加. 据美国FDA统计, 服用NSAID 3 mo的患者, 胃肠道溃疡、出血和穿孔的发生率为1%-2%, 服用1年的患者发生率在2%-5%. NSAID通过抑制前列腺素的合成破坏黏膜屏障, 使黏膜防御修复功能受损及拮抗血小板凝集作用而引发溃疡、出血、甚至穿孔. 其中, 胃酸在NSAID相关性胃十二指肠溃疡中扮演了重要角色, 因此使用抑酸疗法控制胃内酸度和保护修复黏膜屏障是治疗这类疾病的重点. 国外一项由406名患者参与的多中心、随机、双盲、平行对照研究的结果显示: 对于必须使用NSAID维持治疗的胃溃疡患者, 埃索美拉唑(40 mg或20 mg, qd)的疗效和耐受性优于雷尼替丁(150 mg, bid)^[33]. 另一项多中心, 对照交叉的研究报道: 给予90名接受NSAID治疗的成年患者分别服用埃索美拉唑40 mg、兰索拉唑30 mg、和泮托拉唑40 mg治疗5 d. 在第5天监测胃内24 h pH值, 结果胃内pH>4的百分率埃索美拉唑为(74.2%), 显著长于兰索拉唑(66.5%, *P* < 0.001)和泮托拉唑(60.8%, *P* < 0.001), 说明埃索美拉唑对接受NSAID治疗的患者胃酸抑制效果优于兰索拉唑和泮托拉唑^[34]. 目前已临床证据表明: 对于需要长期接受NSAID药物治疗的老年患者, 埃索美拉唑能够非常有效地预防非甾体类抗炎药引起的肠道损伤和上消化系溃疡, 其疗效优于其他PPI^[35]. 欧洲已于2004-09批准埃索美拉唑用于治疗NSAID引起的胃肠道症状, 以及防止因长期使用NSAID高危人群胃十二指肠溃疡的发生. 在防止因服用NSAID导致的溃疡出血复发方面, 加用埃索美拉唑能明显减低再出血的发生^[36]. 另外, 还有研究表明: 埃索美拉唑能够有效治疗由于服用NSAID导致的烧心和反流等症状^[37].

2.5 治疗上消化道出血 上消化道出血是常见的消化系统疾病, 虽然病因众多, 但迅速有效的抑制胃酸分泌, 提高胃内pH值是治疗消化系出血的关键. 有研究表明当胃内pH值大于4以上, 止血药物才能有效地发挥作用, 而只有在pH>6.0时血小板的聚集作用才能发挥, 抑制胃蛋白酶诱导的凝血块溶解, 从而有利于上消化道出血

的治疗. 大量研究证实: PPI对于上消化道出血的治疗效果比H₂受体阻滞剂或安慰剂好, 不良反应小; 在溃疡出血的患者中, PPI能够减少再出血的发生和减少由于再出血需行的外科或重复内镜止血治疗, 并且能够改善高危患者的死亡率^[38]. 而埃索美拉唑作为PPI中持续控制和维持胃内pH值>4的时间最长的制剂, 也能用于上消化道出血的治疗, 并且其疗效可能不逊色于其他PPI. 目前对埃索美拉唑用于临床治疗上消化系出血的研究不多, 国内孟莹 *et al*^[39]的随机、双盲、双模拟、平行组阳性药物对照的临床研究表明埃索美拉唑组和奥美拉唑组比较, 72 h和120 h的临床无消化系出血的受试者比例以及临床上消化系出血停止时间的中位值均无显著性差异, 证实了静脉给予埃索美拉唑治疗非静脉曲张性上消化系出血患者的疗效不劣于奥美拉唑, 并且具有良好的耐受性. 宋发友^[40]对66例消化性溃疡出血患者的随机对照研究表明: 埃索美拉唑是治疗消化性溃疡出血的有效药物, 且不良反应发生率(6.25%)低于奥美拉唑组(29.41%)($P<0.05$), 值得临床进一步推广应用.

2.6 其他 与其他PPI一样, 埃索美拉唑在临床的诸多应用都是基于其抑制胃酸, 控制胃内pH值而发挥疗效的. 用于治疗卓-艾综合征(胃泌素瘤), 有研究报道: 1年内适当地逐渐增加埃索美拉唑的用药剂量能控制高胃酸分泌患者的胃酸输出量并且耐受性较好^[41], 治疗咽喉反流, 能明显减少后连合肥大、增生^[42]. 还用于治疗功能性消化不良, Barrett溃疡、由GERD引起的哮喘、慢性咽炎等并发症, 以及防止术后恶心、呕吐等. 不良反应: 作为一种安全高效的PPI, 其为数不多的不良反应包括恶心、腹泻、头痛、腹痛、呼吸道感染、鼻窦炎等^[43], 主要发生在用药治疗后的第1月; 少见的不良反应(0.1%-1%)为皮炎、瘙痒、荨麻疹、头昏、口干^[44].

3 结论

在临床治疗过程中埃索美拉唑显示了较好的耐受性和安全性, 据英国一项大样本的研究显示: 埃索美拉唑的安全性符合药品信息及经验文献报道^[45]. FDA曾对该药物进行了安全审查. 2007-12, FDA宣布审查结果说, 没有证据表明埃索美拉唑会增加心血管事件的风险^[46]. 2008年初, 加拿大卫生部完成埃索美拉唑的安全性评估: 目前没有证据证明长期使用该药与心血管风险的增加有关^[47]. 埃索美拉唑上市7年多, 得

到广泛应用, 其疗效和安全性得到临床诸多药物试验和临床研究的证实. 目前, 其剂型有: 片剂、胶囊、混悬液等, 并有研究表明: 混悬液具有与胶囊、片剂相同的生物等效性^[48]. 近年来阿斯利康公司又推出了埃索美拉唑的注射剂型(耐信针剂). 相信, 随着临床用药时间的延长和领域的不断扩大, 埃索美拉唑这个PPI制剂中的新秀必将得到人们越来越广泛的关注.

4 参考文献

- 1 Sachs G, Shin JM, Vagin O, Lambrecht N, Yakubov I, Munson K. The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41 Suppl 2: S226-S242
- 2 杨丽, 严宝霞. 埃索美拉唑的药理学. *中国新药杂志* 2004; 13: 398-400
- 3 Andersson T, Röhss K, Bredberg E, Hassan-Alin M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of esomeprazole, the S-isomer of omeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1563-1569
- 4 Schwab M, Klotz U, Hofmann U, Schaeffeler E, Leodolter A, Malferttheiner P, Treiber G. Esomeprazole-induced healing of gastroesophageal reflux disease is unrelated to the genotype of CYP2C19: evidence from clinical and pharmacokinetic data. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 627-634
- 5 牛春燕, 罗金燕, 王学勤, 朱有玲. CYP2C19基因多态性对埃索美拉唑抑酸效应的影响. *西安交通大学学报(医学版)* 2004; 25: 487-489
- 6 Lou HY, Chang CC, Sheu MT, Chen YC, Ho HO. Optimal dose regimens of esomeprazole for gastric acid suppression with minimal influence of the CYP2C19 polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol* 2009; 65: 55-64
- 7 Armstrong D, Bair D, James C, Tanser L, Escobedo S, Nevin K. Oral esomeprazole vs. intravenous pantoprazole: a comparison of the effect on intragastric pH in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 705-711
- 8 Lind T, Rydberg L, Kylebäck A, Jonsson A, Andersson T, Hasselgren G, Holmberg J, Röhss K. Esomeprazole provides improved acid control vs. omeprazole in patients with symptoms of gastroesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 861-867
- 9 Li ZS, Zhan XB, Xu GM, Cheng NN, Liao Z. Effect of esomeprazole and rabeprazole on intragastric pH in healthy Chinese: an open, randomized crossover trial. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 815-820
- 10 Wilder-Smith C, Lind T, Lundin C, Naclér E, Nilsson-Pieschl C, Röhss K. Acid control with esomeprazole and lansoprazole: a comparative dose-response study. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 157-164
- 11 Miner P Jr, Katz PO, Chen Y, Sostek M. Gastric acid control with esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, pantoprazole, and rabeprazole: a five-way crossover study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2616-2620
- 12 Röhss K, Wilder-Smith C, Naclér E, Jansson L. Esomeprazole 20mg provides more effective

■同行评价

本研究内容比较新颖, 文章层次清楚, 逻辑性强, 有一定的实用性.

- intra-gastric Acid control than maintenance-dose rabeprazole, lansoprazole or pantoprazole in healthy volunteers. *Clin Drug Investig* 2004; 24: 1-7
- 13 Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920; quiz 1943
- 14 唐旭东, 王萍, 卞立群, 张引强. 胃食管反流病的流行病学研究. *现代消化及介入诊疗* 2008; 13: 22-27
- 15 潘国宗, 许国铭, 郭慧平. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查. *中华消化杂志* 1999; 19: 223-226
- 16 Omari T, Davidson G, Bondarov P, Naucler E, Nilsson C, Lundborg P. Pharmacokinetics and acid-suppressive effects of esomeprazole in infants 1-24 months old with symptoms of gastroesophageal reflux disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45: 530-537
- 17 Gilger MA, Tolia V, Vandenplas Y, Youssef NN, Traxler B, Illueca M. Safety and tolerability of esomeprazole in children with gastroesophageal reflux disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 524-533
- 18 Röhss K, Lind T, Wilder-Smith C. Esomeprazole 40 mg provides more effective intra-gastric acid control than lansoprazole 30 mg, omeprazole 20 mg, pantoprazole 40 mg and rabeprazole 20 mg in patients with gastro-oesophageal reflux symptoms. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60: 531-539
- 19 Edwards SJ, Lind T, Lundell L. Systematic review: proton pump inhibitors (PPIs) for the healing of reflux oesophagitis - a comparison of esomeprazole with other PPIs. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 743-750
- 20 孟凡冬, 刘莹, 张澍田, 于中麟, 周巧直, 彭晓霞. 埃索美拉唑治疗反流性食管炎四周和八周的疗效评价. *临床内科杂志* 2007; 24: 183-185
- 21 钟利春, 贾红, 李昌平. 埃索美拉唑治疗胃食管反流病的系统评价. *中国临床药理学与治疗学* 2006; 11: 1154-1159
- 22 孙建, 李雯. 幽门螺旋杆菌感染与功能性消化不良关系的相关研究. *重庆医学* 2009; 38: 178-179
- 23 唐辉. 幽门螺旋杆菌治疗的临床分析. *中华综合临床医学杂志* 2009; 10: 49-50
- 24 Wang X, Fang JY, Lu R, Sun DF. A meta-analysis: comparison of esomeprazole and other proton pump inhibitors in eradicating *Helicobacter pylori*. *Digestion* 2006; 73: 178-186
- 25 王震华, 熊光苏, 吴叔明. 埃索美拉唑和奥美拉唑联合抗生素根除幽门螺旋杆菌疗效对比. *荟萃分析胃肠病学* 2006; 11: 598-601
- 26 Hsu PI, Lai KH, Wu CJ, Tseng HH, Tsay FW, Peng NJ, Chen TA, Chuah SK, Lin WS, Lo GH. High-dose versus low-dose esomeprazole-based triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Clin Invest* 2007; 37: 724-730
- 27 Wu IC, Wu DC, Hsu PI, Lu CY, Yu FJ, Wang TE, Chang WH, Chen JJ, Kuo FC, Wu JY, Wang WM, Bair MJ. Rabeprazole- versus esomeprazole-based eradication regimens for *H. pylori* infection. *Helicobacter* 2007; 12: 633-637
- 28 张兰, 王雷. 3种方案治疗十二指肠球部溃疡的成本-效果分析. *海峡药学* 2008; 20: 113-115
- 29 杨昭徐. 质子泵抑制剂作用机制的新见解. *中国医药导刊* 2008; 10: 165-167
- 30 邓丽清, 吴明东, 劳海忠, 杨华. 质子泵抑制剂埃索美拉唑三联疗法在十二指肠溃疡中的疗效观察. *河北医学* 2009; 15: 186-188
- 31 奚松林. 埃索美拉唑与奥美拉唑治疗十二指肠溃疡的临床观察. *海南医学院学报* 2008; 14: 663-664
- 32 Tulassay Z, Stolte M, Sjölund M, Engstrand L, Butruk E, Malfertheiner P, Dite P, Tchernev K, Wong BC, Gottlow M, Eklund S, Wrangstadh M, Nagy P. Effect of esomeprazole triple therapy on eradication rates of *Helicobacter pylori*, gastric ulcer healing and prevention of relapse in gastric ulcer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 526-536
- 33 Goldstein JL, Johanson JF, Suchower LJ, Brown KA. Healing of gastric ulcers with esomeprazole versus ranitidine in patients who continued to receive NSAID therapy: a randomized trial. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2650-2657
- 34 Goldstein JL, Miner PB Jr, Schlesinger PK, Liu S, Silberg DG. Intra-gastric acid control in non-steroidal anti-inflammatory drug users: comparison of esomeprazole, lansoprazole and pantoprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1189-1196
- 35 Blandizzi C, Tuccori M, Colucci R, Gori G, Fornai M, Antonioli L, Ghisu N, Del Tacca M. Clinical efficacy of esomeprazole in the prevention and healing of gastrointestinal toxicity associated with NSAIDs in elderly patients. *Drugs Aging* 2008; 25: 197-208
- 36 Katz PO. Celecoxib combined with esomeprazole prevented recurrent ulcer bleeding in patients with previous NSAID-induced ulcer bleeding. *ACP J Club* 2007; 147: 38
- 37 Hawkey CJ, Jones RH, Yeomans ND, Scheiman JM, Talley NJ, Goldstein JL, Ahlbom H, Naesdal J. Efficacy of esomeprazole for resolution of symptoms of heartburn and acid regurgitation in continuous users of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 813-821
- 38 Leontiadis GI, Sharma VK, Howden CW. Proton pump inhibitor therapy for peptic ulcer bleeding: Cochrane collaboration meta-analysis of randomized controlled trials. *Mayo Clin Proc* 2007; 82: 286-296
- 39 孟莹, 梁晓梅, 周巧直. 埃索美拉唑静脉滴注治疗非静脉曲张性上消化道出血的疗效观察. *中国医院用药评价与分析* 2008; 8: 851-853
- 40 宋发友. 埃索美拉唑治疗消化性溃疡出血32例疗效观察. *华夏医学* 2008; 21: 239-240
- 41 Metz DC, Sostek MB, Ruszniewski P, Forsmark CE, Monyak J, Pisegna JR. Effects of esomeprazole on acid output in patients with Zollinger-Ellison syndrome or idiopathic gastric acid hypersecretion. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2648-2654
- 42 Reichel O, Dressel H, Wiederanders K, Issing WJ. Double-blind, placebo-controlled trial with esomeprazole for symptoms and signs associated with laryngopharyngeal reflux. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 139: 414-420
- 43 Kale-Pradhan PB, Landry HK, Sypula WT. Esomeprazole for acid peptic disorders. *Ann Pharmacother* 2002; 36: 655-663
- 44 陈华, 王晓蕙, 金伟华. 耐信Nexium. *中国新药杂志* 2003; 12: 478-479
- 45 Davies M, Wilton LV, Shakir SA. Safety profile of esomeprazole: results of a prescription-event monitoring study of 11 595 patients in England. *Drug Saf* 2008; 31: 313-323
- 46 FDA宣布埃索美拉唑和奥美拉唑不会增加心血管事

- 件风险. 世界临床药物 2008; 29: 4
- 47 加拿大卫生部完成奥美拉唑和埃索美拉唑安全性评估. 中国执业药师 2008; 6: 33
- 48 Bladh N, Blychert E, Johansson K, Backlund A, Lundin C, Niazi M, Pettersson G, Fjellman M. A new esomeprazole packet (sachet) formulation for suspension: in vitro characteristics and comparative pharmacokinetics versus intact capsules/tablets in healthy volunteers. *Clin Ther* 2007; 29: 640-649

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

| 代码 | 期刊名称 | 总被引频次 | | | 影响因子 | | |
|-------------|-----------------------------------|-------------|----------|-------------|--------------|-----------|-------------|
| | | 数值 | 学科排名 | 离均差率 | 数值 | 学科排名 | 离均差率 |
| 1170 | JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY | 19 | 44 | -0.98 | 0.059 | 44 | -0.89 |
| G275 | WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY | 4431 | 1 | 3.46 | 0.745 | 10 | 0.38 |
| G803 | 肝脏 | 467 | 28 | -0.53 | 0.537 | 17 | -0.01 |
| G938 | 国际呼吸杂志 | 521 | 25 | -0.48 | 0.386 | 32 | -0.29 |
| G415 | 国际内分泌代谢杂志 | 654 | 20 | -0.34 | 0.520 | 19 | -0.04 |
| G939 | 国际脑血管病杂志 | 662 | 19 | -0.33 | 0.480 | 22 | -0.11 |
| G501 | 临床肝胆病杂志 | 497 | 26 | -0.50 | 0.318 | 36 | -0.41 |
| G291 | 临床骨科杂志 | 689 | 18 | -0.31 | 0.455 | 25 | -0.16 |
| G658 | 临床荟萃 | 1169 | 13 | 0.18 | 0.233 | 40 | -0.57 |
| G257 | 临床内科杂志 | 651 | 21 | -0.35 | 0.367 | 34 | -0.32 |
| G855 | 临床消化病杂志 | 292 | 36 | -0.71 | 0.394 | 30 | -0.27 |
| G261 | 临床心血管病杂志 | 866 | 17 | -0.13 | 0.474 | 24 | -0.12 |
| G293 | 临床血液学杂志 | 341 | 34 | -0.66 | 0.347 | 35 | -0.36 |
| G491 | 岭南心血管病杂志 | 157 | 41 | -0.84 | 0.110 | 43 | -0.79 |
| G662 | 内科急危重症杂志 | 276 | 37 | -0.72 | 0.318 | 36 | -0.41 |
| G746 | 实用肝脏病杂志 | 297 | 35 | -0.70 | 1.100 | 3 | 1.04 |
| G190 | 世界华人消化杂志 | 2353 | 5 | 1.37 | 0.568 | 15 | 0.05 |
| G800 | 胃肠病学 | 376 | 33 | -0.62 | 0.372 | 33 | -0.31 |
| G326 | 胃肠病学和肝病学杂志 | 468 | 27 | -0.53 | 0.399 | 29 | -0.26 |
| G451 | 现代消化及介入诊疗 | 84 | 43 | -0.92 | 0.230 | 41 | -0.58 |
| G083 | 心肺血管病杂志 | 214 | 40 | -0.78 | 0.206 | 42 | -0.62 |
| G419 | 心血管病学进展 | 467 | 28 | -0.53 | 0.419 | 27 | -0.23 |
| G260 | 心脏杂志 | 523 | 24 | -0.47 | 0.392 | 31 | -0.28 |
| G610 | 胰腺病学 | 223 | 38 | -0.78 | 0.282 | 38 | -0.48 |
| G234 | 中国动脉硬化杂志 | 869 | 16 | -0.13 | 0.521 | 18 | -0.04 |
| G422 | 中国脑血管病杂志 | 223 | 38 | -0.78 | 0.503 | 21 | -0.07 |
| G267 | 中国实用内科杂志 | 2121 | 7 | 1.13 | 0.601 | 13 | 0.11 |
| G211 | 中国糖尿病杂志 | 1284 | 11 | 0.29 | 0.931 | 7 | 0.72 |
| G203 | 中国心脏起搏与心电生理杂志 | 616 | 23 | -0.38 | 0.599 | 14 | 0.11 |
| G633 | 中国血液净化 | 449 | 31 | -0.55 | 0.478 | 23 | -0.12 |
| G119 | 中国循环杂志 | 643 | 22 | -0.35 | 0.411 | 28 | -0.24 |
| G231 | 中华肝脏病杂志 | 2746 | 4 | 1.76 | 1.056 | 4 | 0.95 |
| G235 | 中华高血压杂志 | 982 | 15 | -0.01 | 0.757 | 9 | 0.40 |
| G639 | 中华老年多器官疾病杂志 | 143 | 42 | -0.86 | 0.235 | 39 | -0.57 |
| G876 | 中华老年心脑血管病杂志 | 465 | 30 | -0.53 | 0.431 | 26 | -0.20 |
| G150 | 中华老年医学杂志 | 1010 | 14 | 0.02 | 0.510 | 20 | -0.06 |
| G155 | 中华内分泌代谢杂志 | 1548 | 9 | 0.56 | 1.032 | 5 | 0.91 |
| G156 | 中华内科杂志 | 3238 | 3 | 2.26 | 0.847 | 8 | 0.57 |
| G161 | 中华肾脏病杂志 | 1477 | 10 | 0.49 | 1.018 | 6 | 0.88 |
| G285 | 中华消化内镜杂志 | 1271 | 12 | 0.28 | 0.607 | 12 | 0.12 |
| G168 | 中华消化杂志 | 2249 | 6 | 1.26 | 1.123 | 2 | 1.08 |
| G892 | 中华心率先失常学杂志 | 384 | 32 | -0.61 | 0.568 | 15 | 0.05 |
| G170 | 中华心血管病杂志 | 3705 | 2 | 2.73 | 1.217 | 1 | 1.25 |
| G172 | 中华血液学杂志 | 1632 | 8 | 0.64 | 0.633 | 11 | 0.17 |
| | 平均值 | 994 | | | 0.541 | | |

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.

肝细胞生长因子对肝细胞癌细胞系SMMC-7721黏着斑激酶的影响

苏荣健, 李贞, 李宏丹, 宋慧娟, 程留芳

■背景资料

肝癌是一种恶性肿瘤, 他的发病率逐年增高. 肝细胞生长因子是间充质细胞分泌的多效应因子, 其与c-Met结合, 激活下游的信号通路. 已经明确HGF可以促进肝细胞癌的侵袭和转移, 并且发现其对肝细胞癌侵袭和转移的作用与PI3K有关.

苏荣健, 李宏丹, 宋慧娟, 辽宁医学院科学实验中心 辽宁省高校分子细胞生物学和新药开发重点实验室 辽宁省锦州市121001
李贞, 程留芳, 中国人民解放军总医院临床部消化科 北京市100853
辽宁省博士启动基金资助项目, No. 20061074
辽宁省教育厅重点实验室基金资助项目, No. 2008S142
作者贡献分布: 本研究由程留芳提出, 苏荣健设计并分析结果; 李贞、李宏丹及宋慧娟负责具体的实验操作; 论文撰写由李贞完成.
通讯作者: 苏荣健, 副教授, 121001, 辽宁省锦州市, 辽宁医学院科学实验中心, 辽宁省高校分子细胞生物学和新药开发重点实验室. rongjiansu@hotmail.com
电话: 0416-4673183
收稿日期: 2009-04-14 修回日期: 2009-06-15
接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Effects of hepatocyte growth factor on the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase in SMMC-7721 cells

Rong-Jian Su, Zhen Li, Hong-Dan Li, Hui-Juan Song, Liu-Fang Cheng

Rong-Jian Su, Hong-Dan Li, Hui-Juan Song, Key Laboratory of Molecular Cell Biology and New Drug Development of the Education Department of Liaoning Province, Scientific Experimental Center, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Zhen Li, Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of the Chinese PLA, Beijing 100583, China

Supported by: the Doctor Scientific Startup Foundation of Liaoning Province, No. 20061074; and the Key Laboratory Foundation of the Department of Education of Liaoning Province, No. 2008S142

Correspondence to: Professor Rong-Jian Su, Key Lab of Molecular Cell Biology and New Drug Development of the Education Department of Liaoning Province, Scientific Research Center, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. rongjiansu@hotmail.com

Received: 2009-04-14 Revised: 2009-06-15

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of hepatocyte growth factor (HGF) on the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and Src kinase, and explore the role of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in this

process.

METHODS: After hepatocellular carcinoma cells (SMMC-7721) were pretreated with LY294002 and stimulated with HGF, the phosphorylation status of FAK at Y397 and Src at Y416 were analyzed by Western blot, and the distribution of FAK was observed by immunofluorescence.

RESULTS: HGF (50 $\mu\text{g/L}$) was able to promote the phosphorylation of FAK at Y397, but had no effect on the expression of FAK. Pretreatment of cells with LY294002 (an inhibitor of PI3K) significantly decreased the phosphorylation of FAK at Y397. After HGF treatment, FAK was mainly clustered in the periphery of hepatocellular carcinoma cells. In contrast, FAK was diffused throughout the cells after pretreatment with PI3K inhibitor. HGF treatment could significantly raise the phosphorylation levels of Src kinase and Src-Y416 while pretreatment with LY294002 could significantly decrease the phosphorylation levels of Src kinase and Src-Y416.

CONCLUSION: HGF is able to promote the activation of FAK and Src in a PI3K-dependent manner.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Hepatocyte growth factor; Focal adhesion kinase; PI3K

Su RJ, Li Z, Li HD, Song HJ, Cheng LF. Effects of hepatocyte growth factor on the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase in SMMC-7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2070-2073

摘要

目的: 探讨肝细胞生长因子(HGF)对黏着斑激酶(FAK)、Src表达及活性的影响以及PI3K在该过程中的作用.

方法: LY294002预处理阻断PI3K的活性, HGF处理SMMC-7721后检测FAK和Src的表达、磷酸化及在细胞内的分布. 应用免疫印迹技术检测FAK、Src的表达及磷酸化, 免疫荧

■同行评议者

潘兴华, 副主任
医师, 中国人民解放军
成都军区
昆明总医院病理
实验科

光技术检测FAK在SMMC-7721细胞中的分布.

结果: HGF(50 $\mu\text{g/L}$)可以促进FAK Y397位点的磷酸化, 对FAK的表达没有影响. 应用PI3K抑制物LY294002处理后, FAK Y397的磷酸化水平显著降低. HGF处理后, FAK主要位于细胞边缘, 呈簇状分布, 应用PI3K抑制物, FAK在细胞内弥散分布. HGF处理后, Src激酶和Src Y416的磷酸化水平明显增加, 而经LY294002处理后, Src激酶与Src Y416的磷酸化水平明显降低.

结论: 肝细胞癌中, HGF以PI3K依赖性的方式促进FAK和Src的活化.

关键词: 肝细胞癌; 肝细胞生长因子; 黏着斑激酶; PI3K

苏荣健, 李贞, 李宏丹, 宋慧娟, 程留芳. 肝细胞生长因子对肝细胞癌细胞系SMMC-7721黏着斑激酶的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2070-2073

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2070.asp>

0 引言

肝细胞癌是一种常见的恶性肿瘤, 其发病率呈逐年上升的趋势, 居于全球第5位, 死亡率居第3位仅次于肺癌和胃癌^[1]. 肝细胞生长因子(hepatocellular growth factor, HGF)是间质细胞(如成纤维细胞、巨噬细胞等)分泌的一种多效应生长因子, 对细胞增殖、细胞迁移、细胞黏附等多种生物学行为具有调节作用^[2]. 目前已经明确HGF可以与细胞膜表面的c-Met结合, 导致c-Met的自身磷酸化^[3], 激活下游的信号传导过程. 我们以前的研究表明HGF可以促进肝细胞癌的侵袭和转移, 并且明确HGF对肝细胞癌侵袭和转移作用与PI3K有关^[4]. 本文进一步对肝细胞癌细胞系SMMC-7721中HGF对黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的分布及磷酸化水平进行研究, 并进一步探讨PI3K在该过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 肝细胞癌细胞系SMMC-7721为中国医科大学发育生物学教研室惠赠. HGF、LY294002购于Sigma公司. FAK和磷酸化FAK抗体(pY397)购于Biosource公司, Src及SrcY416抗体购于Cellsignal公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及HGF处理: 人肝细胞癌细胞系

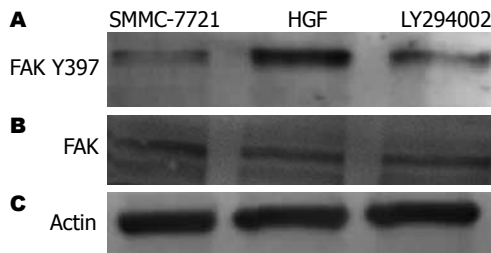


图 1 PI3K对FAK Y397磷酸化的影响. A: HGF能够促进FAK Y397的磷酸化, PI3K抑制物LY294002可以阻断HGF对FAK Y397磷酸化的促进作用; B: HGF不能增加FAK的表达, LY294002对FAK的表达也没有影响; C: Actin的表达一致, 蛋白含量一致.

SMMC-7721培养于含100 mL/L胎牛血清、100 g/L青霉素、100 g/L链霉素的DMEM培养液中; 当细胞生长至培养瓶底面的70%-80%, 血清饥饿3 h, 加入HGF(终浓度50 $\mu\text{g/L}$)处理12 h^[4].

1.2.2 LY294002处理: 细胞培养方法同上, 当细胞生长至培养瓶底面的70%-80%, 血清饥饿3 h, 加入LY294002(终浓度10 $\mu\text{mol/L}$)预处理1 h, PBS漂洗3次, 加入HGF(终浓度50 $\mu\text{g/L}$)处理12 h.

1.2.3 免疫荧光实验: 胰蛋白酶消化细胞, PBS漂洗3次, 用无血清培养液稀释至 2×10^8 个/L, 接种于用10 mg/L的纤粘连蛋白包被的盖玻片上, 继续培养12 h, 取出盖玻片, PBS漂洗, 37 mL/L甲醛固定30 min, 2 mL/L Triton-X-100通透5 min, 100 mL/L BSA封闭30 min, 一抗室温温育1 h, PBS漂洗, 二抗室温温育1 h, PBS漂洗, 甘油封片, 荧光显微镜下观察.

1.2.4 免疫印迹: 用细胞刮刀收集收集细胞, PBS漂洗, RIPA缓冲液冰上裂解30 min, BCA法测定蛋白含量. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 1 g/L BSA封闭, 一抗(FAK, FAK Y397, SRC, SRC Y416)室温温育3 h, 二抗室温温育1 h, BCIP/NBT显色.

2 结果

2.1 PI3K对FAK Y397磷酸化的影响 HGF(50 $\mu\text{g/L}$)可以促进FAK Y397位点的磷酸化, 对FAK的表达没有影响. 应用PI3K抑制物LY294002处理后, FAK Y397的磷酸化水平显著降低(图1). 这些说明在肝细胞癌细胞中PI3K参与FAK活化过程的调节, 抑制PI3K能够抑制FAK的活化.

2.2 PI3K对FAK细胞内分布的影响 HGF处理后, FAK主要位于细胞边缘, 呈簇状分布, 应用PI3K抑制物, FAK在细胞内弥散分布(图2). 这些说明PI3K对FAK在肝细胞癌细胞中的定位具有调节作用.

■ 研发前沿

HGF能够促进很多肿瘤细胞的侵袭和转移, 对于其机制的研究一直受到众多研究者的重视, 其中信号通路的研究更成为本领域研究热点. 然而, 其具体机制的研究一直未果. 故而, 明确HGF促进肝细胞癌侵袭和转移的机制, 抑制肝细胞癌侵袭和转移成为亟待解决的问题.

■ 相关报道

目前研究认为, HGF对于肝细胞癌侵袭和转移的机制是通过多信号通路实现的, PI3K和MAPK信号通路在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥着重要的作用, FAK和Src能够调节肿瘤的侵袭和转移.

■创新盘点

本文以肝细胞癌SMMC-7721为研究对象,用HGF和PI3K抑制剂LY294002处理,观察其对于FAK和Src的影响,并且探讨HGF发挥作用的机制。结果发现HGF通过PI3K信号通路发挥其影响FAK和Src的作用,促进SMMC-7721的侵袭和转移作用。

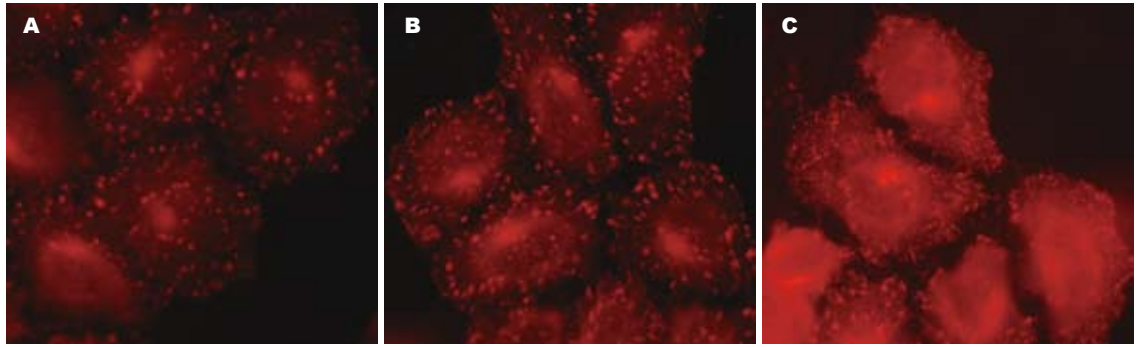


图2 PI3K对FAK细胞内分布的影响. A: 未做处理的SMMC-7721; B: HGF处理后的SMMC-7721; C: 经LY294002预处理后加入HGF的SMMC-7721. 可见HGF能够导致FAK在细胞内的重新分布,主要位于细胞边缘,呈簇状分布;PI3K抑制物处理后FAK弥散分布于细胞内,簇状结构消失。

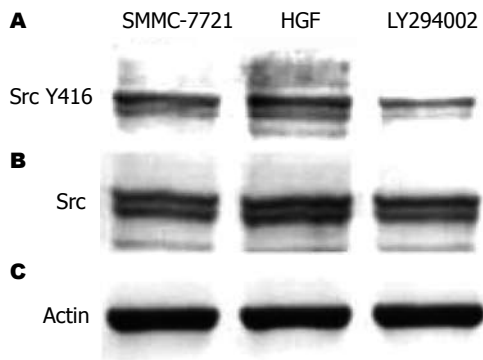


图3 PI3K对Src激酶活化的影响. A-B: 分别显示了Src和Src Y416的表达情况,可见HGF能够促进Src激酶和Src Y416的活化;但经PI3K预处理后,HGF所致的Src激酶和Src Y416的活化明显受到抑制. C: 显示3组细胞的Actin表达相同,表示蛋白含量上样相同。

2.3 PI3K对Src激酶活化的影响 HGF处理后,Src激酶和Src Y416的磷酸化水平明显增加,而经LY294002处理后,Src激酶与Src Y416的磷酸化水平明显降低.这些结果说明HGF可以促进Src激酶的活化(图3)。

3 讨论

FAK是整合素信号传导途径中的关键酪氨酸激酶,对于肿瘤细胞的侵袭和转移具有重要的调节作用^[5-6].大量研究表明FAK分别通过磷酸化Y397和Y576/577位点激活FAK^[7-8].FAK激活后,其磷酸化的Y397与Src激酶结合,形成FAK/SRC复合物而引起Paxillin和cas磷酸化^[9-10],后二者通过接头蛋白Crk和Grb2激活Ras途径的下游激酶MAPK^[11],进而改变细胞行为.HGF通过与c-Met结合后能够激活PI3K^[12],继而引起一系列的细胞内信号传导.本实验基于前文HGF促进细胞的侵袭和转移^[4],进一步研究HGF对FAK,Src激酶的影响及PI3K在其中的作用。

由免疫印迹结果可见,HGF(50 μg/L)处理后

的SMMC-7721细胞FAK的表达不变,而磷酸化FAK Y397的表达增加,说明HGF能够促进FAK活化,但却不增加FAK的表达.应用PI3K抑制物LY294002处理后,FAK Y397的磷酸化水平显著降低.由此,说明HGF引起的FAK Y397磷酸化增加,是通过PI3K激酶起作用的,PI3K激酶对于HGF刺激FAK的磷酸化具有调节作用.免疫荧光结果可见,HGF处理后的SMMC-7721,FAK的表达主要位于细胞边缘,呈簇状分布,细胞内分布很少,而经PI3K抑制物LY294002处理后,FAK主要是在细胞内弥散分布,边缘很少,与对照组的细胞FAK的分布相似.说明在肝细胞癌细胞中PI3K参与FAK活化过程的调节,影响其在细胞内的分布,PI3K对HGF引起的FAK的活化具有抑制作用。

HGF处理后,Src激酶和Src Y416的磷酸化水平均明显增加,而经LY294002处理后,Src激酶与Src Y416的磷酸化水平也均明显降低.这说明HGF可以促进Src激酶的活化,PI3K激酶对于HGF引起的Src磷酸化具有调节作用.由此可见,HGF与细胞膜表面的c-Met结合,导致c-Met的自身磷酸化,激活PI3K,进而导致磷酸化的FAK Y397与Src激酶结合,激活下游的信号通路,导致肝癌细胞的整合素,E-cad,N-cad的表达改变,进而改变细胞的侵袭、转移、黏附等行为。

总之,HGF引起的肝癌细胞侵袭和转移能力增强是一个复杂生物的过程^[12-14].其通过活化PI3K激酶促进FAK Y397的磷酸化,引起肝癌细胞内FAK分布改变.HGF所引起的肝癌细胞的侵袭和转移能力增强,黏附能力降低的机制与PI3K有关。

4 参考文献

- 1 Yau T, Chan P, Epstein R, Poon RT. Evolution

- of systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6437-6441
- 2 You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep* 2008; 41: 833-839
 - 3 Puri N, Salgia R. Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *J Carcinog* 2008; 7: 9
 - 4 王庆军, 孙抒, 李宏丹, 魏嘉, 苏荣健. 肝细胞生长因子对肝细胞癌侵袭和转移的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3152-3156
 - 5 Su JM, Wang LY, Liang YL, Zha XL. Role of cell adhesion signal molecules in hepatocellular carcinoma cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4667-4673
 - 6 von Sengbusch A, Gassmann P, Fisch KM, Enns A, Nicolson GL, Haier J. Focal adhesion kinase regulates metastatic adhesion of carcinoma cells within liver sinusoids. *Am J Pathol* 2005; 166: 585-596
 - 7 Shepard HM, Brdlik CM, Schreiber H. Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family. *J Clin Invest* 2008; 118: 3574-3581
 - 8 Halder J, Lin YG, Merritt WM, Spannuth WA, Nick AM, Honda T, Kamat AA, Han LY, Kim TJ, Lu C, Tari AM, Bornmann W, Fernandez A, Lopez-Berestein G, Sood AK. Therapeutic efficacy of a novel focal adhesion kinase inhibitor TAE226 in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 10976-10983
 - 9 Armulik A, Velling T, Johansson S. The integrin beta1 subunit transmembrane domain regulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 2558-2567
 - 10 Sundberg LJ, Galante LM, Bill HM, Mack CP, Taylor JM. An endogenous inhibitor of focal adhesion kinase blocks Rac1/JNK but not Ras/ERK-dependent signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 29783-29791
 - 11 Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; 19: 5582-5589
 - 12 Watanabe T, Tsuda M, Makino Y, Ichihara S, Sawa H, Minami A, Mochizuki N, Nagashima K, Tanaka S. Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 499-510
 - 13 Luo YQ, Wu MC, Cong WM. Gene expression of hepatocyte growth factor and its receptor in HCC and nontumorous liver tissues. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 119-121
 - 14 Lee KH, Kim SW, Kim JR. Reactive oxygen species regulate urokinase plasminogen activator expression and cell invasion via mitogen-activated protein kinase pathways after treatment with hepatocyte growth factor in stomach cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 73

■同行评价

本研究选题新颖, 设计合理, 结果可靠, 具有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-18)

左金丸及反左金丸对实验性大肠癌不同时期甲基转移酶表达的影响

文彬, 熊旻利, 戴伟怡, 梁齐桁, 刘玲, 陈蔚文

■背景资料

左金丸最早收录于《丹溪心法》, 由黄连、吴茱萸按6:1配比组成, 黄连苦寒, 清心泻肝, 吴茱萸辛热, 引热下行, 二药一主一辅, 一寒一热, 相反相成, 反左金丸是后世受左金丸启发而创制, 由黄连、吴茱萸按1:6组成。现代药理学研究表明, 左金丸对消化系统有广泛的镇痛、抗炎、抑菌、抗溃疡等作用, 在抗肿瘤方面的研究表明黄连素(小檗碱)和吴茱萸碱均可阻断促癌物质对潜在癌变细胞的作用。

文彬, 陈蔚文, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405
熊旻利, 戴伟怡, 梁齐桁, 刘玲, 广州中医药大学第二临床医学院 广东省广州市 510407
国家自然科学基金资助项目, No. 30400602; No. 30672687
作者贡献分布: 本实验由文彬设计; 研究过程由文彬、熊旻利、戴伟怡、梁齐桁及刘玲操作完成, 数据分析由文彬完成, 本文写作由文彬完成, 实验指导和写作指导由陈蔚文完成。
通讯作者: 文彬, 副研究员, 510405, 广东省广州市机场路12号, 广州中医药大学脾胃研究所. wenbin@gzucm.edu.cn
电话: 020-36585077
收稿日期: 2009-04-30 修回日期: 2009-06-15
接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-18

Effects of Zuojin Pill and Fanzuojin Pill on the expression of methyltransferase in rats with experimental colorectal carcinoma at different stages

Bin Wen, Min-Li Xiong, Wei-Yi Dai, Qi-Heng Liang, Ling Liu, Wei-Wen Chen

Bin Wen, Wei-Wen Chen, Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Min-Li Xiong, Wei-Yi Dai, Qi-Heng Liang, Ling Liu, the Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medical, Guangzhou 510407, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30400602, No. 30672687

Correspondence to: Dr. Bin Wen, Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. wenbin@gzucm.edu.cn

Received: 2009-04-30 Revised: 2009-06-15

Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the intervention effect of Zuojin Pill and Fanzuojin Pill on the development and progression of colorectal carcinoma, and examine their effects on the expression of methyltransferase expression in colorectal carcinoma at different stages.

METHODS: Rats were given a subcutaneous injection of DMH (25 mg/kg; once a week for 12 weeks) to establish a rat model of colorectal carcinoma. The rats were then randomly divided

into Zuojin Pill group (i.g., 1.4 g/kg, once a day), Fanzuojin Pill group (i.g., 1.4 g/kg, once a day) and control group (i.g., 0.9% NaCl, once a day). The rats in each group were killed at weeks 11, 21 and 34 after treatment, respectively. The intervention effect of Zuojin Pill and Fanzuojin Pill on the development and progression of colorectal carcinoma was evaluated by pathological examination. The expression of methyltransferase in colorectal carcinoma at different stages was detected by real-time fluorescent quantitative PCR.

RESULTS: Zuojin Pill and Fanzuojin Pill could effectively suppress the early development of rat colorectal carcinoma induced by DMH though they had no obvious suppressing effects against the late progression of colorectal carcinoma. In the control group and two treatment groups, the expression levels of Dnmt1 and Dnmt3a did not change significantly. However, the expression level of Dnmt3b in the positive control group was significantly higher than those in the two treatment groups (4.784 vs 2.613, $P < 0.01$). In addition, the expression level of Dnmt3b was gradually elevated as the carcinoma progressed.

CONCLUSION: Zuojin Pill and Fanzuojin Pill can effectively hinder the early development of rat colorectal carcinoma induced by DMH. Dnmt3b is involved in the process of malignant transformation of and rat colorectal carcinoma, which may explain the intervention effects of Zuojin Pill and Fanzuojin Pill.

Key Words: Zuojin Pill; Fanzuojin Pill; 1, 2-dimethyl hydrazide; Colorectal carcinoma; Methyltransferase

Wen B, Xiong ML, Dai WY, Liang QH, Liu L, Chen WW. Effects of Zuojin Pill and Fanzuojin Pill on the expression of methyltransferase in rats with experimental colorectal carcinoma at different stages. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2074-2078

摘要

目的: 探讨左金丸及反左金丸对大肠癌发

■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; 李勇, 副教授, 上海中医药大学附属市中医院消化科

生、发展的干预作用,及在大肠癌不同时期对甲基转移酶表达的影响。

方法:在180只大鼠左肩胛骨侧皮下注射1, 2-二甲基酰肼(1, 2-DMH)25 mg/kg, 每周1次, 连续注射12 wk. 随机将大鼠分为3组: 左金丸组、反左金丸组和对照组. 从第1次注射DMH的第2天开始, 左金丸组和反左金丸组每天以中药汤剂1.4 g/kg灌胃, 对照组灌服同体积的生理盐水, 每日1次, 连续34 wk. 分别在第11、21、34周, 每组取部分大鼠脱颈处死, 通过病理学观察左金丸和反左金丸对大鼠大肠癌发生发展的干预作用, 实时荧光定量PCR法检测不同肿瘤发展时期Dnmt1、Dnmt3a及Dnmt3b mRNA的表达。

结果:左金丸和反左金丸均能在肿瘤发生的早期显著抑制癌症的进程, 左金丸作用优于反左金丸, 但后期(34 wk), 二者的作用不明显. 对照组和中药组Dnmt1、Dnmt3a表达没有明显变化. 对照组中Dnmt3b的表达明显高于中药组(4.784 vs 2.613, $P < 0.01$), 且随癌变进程的深入, Dnmt3b表达量增高。

结论:左金丸和反左金丸均可以有效阻碍早期大肠癌的发生和发展. Dnmt3b参与了组织恶变的过程, 其表达的调控可能是中药干预肿瘤进程的机制之一。

关键词:左金丸; 反左金丸; 1, 2-二甲基酰肼; 大肠癌; 甲基转移酶

文彬, 熊旻利, 戴伟怡, 梁齐彬, 刘玲, 陈蔚文. 左金丸及反左金丸对实验性大肠癌不同时期甲基转移酶表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2074-2078
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2074.asp>

0 引言

DNA甲基化异常是肿瘤发生的一条重要的机制^[1-3]. DNA甲基化异常易引起细胞功能异常, 这可能是向癌变迈进的第1步. 对癌旁组织的研究发现, 癌基因低甲基化在癌症发生之前就存在, 并且低甲基化状态更易引起肿瘤的浸润和转移. 在哺乳动物细胞中, Dnmts是催化DNA甲基化的主要酶类. 从1991年至今, 人类Dnmt家族中已发现并克隆的成员有: Dnmt1、Dnmt2、Dnmt3(Dnmt3a和Dnmt3b). 迄今, 对Dnmts与肿瘤的关系研究最早且最深入的是其与结肠癌发生、发展的关系^[4]. 我们研究小组对黄连、吴茱萸、青黛为主药的加味左金丸(复方连黛片)及其主要成分盐酸小檗碱、靛玉红和吴茱萸碱

防治胃肠癌的药理作用及临床已进行了10余年的研究, 左金丸最早收录于《丹溪心法》, 由黄连、吴茱萸按6:1配比组成, 黄连苦寒, 清心泻肝, 吴茱萸辛热, 引热下行, 二药一主一辅, 一寒一热, 相反相成, 反左金丸是后世受左金丸启发而创制, 由黄连、吴茱萸按1:6组成. 现代药理学研究表明, 左金丸对消化系统有广泛的镇痛、抗炎、抑菌、抗溃疡等作用, 在抗肿瘤方面的研究表明黄连素(小檗碱)和吴茱萸碱均可阻断促癌物质对潜在癌变细胞的作用^[5-6]. 我们这些年的研究发现, 黄连素(小檗碱)和吴茱萸(吴茱萸碱)能降低MNNG诱发大鼠胃及十二指肠癌的发生, 减轻病理损伤, 明显抑制癌细胞的增殖, 促进细胞分化, 降低肿瘤转移, 抑制一些癌基因的表达^[7-14]等. 本研究采用DMH诱导大鼠大肠癌, 观察中药左金丸和反左金丸对大肠癌发生发展进程的干预作用, 并选择具有甲基转移活性的Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b作为研究对象, 用实时荧光定量RT-PCR技术检测, 在中药左金丸和反左金丸干预下, DMH诱导大鼠大肠癌过程中, 肿瘤发展不同时期甲基转移酶表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 黄连和吴茱萸购自广州中医药大学第一附属医院, 1, 2-二甲基酰肼(1, 2-DMH)购自美国Sigma公司, TRIzol, Invitrogen(Cat. No. 15596-018), First Strand cDNA Synthesis Kit: GeneCopoeia(Cat. No. C0210A), 2×AllinOne™ Q-PCR Mix: GeneCopoeia(Cat. No. D0101A), SPF级健康Wistar大鼠均购于并饲养于广州中医药大学动物中心(动物合格证号分别为: 0014754, 0017087)。

1.2 方法

1.2.1 DMH诱导Wistar大鼠大肠癌实验模型制作: DMH诱导大鼠大肠癌模型主要参考Noguera Aguilar *et al*^[15]2005年的研究报告. 健康雌雄各半Wistar大鼠共180只, 体质量180-220 g, 在每只大鼠左肩胛骨侧皮下注射1, 2-DMH 25 mg/kg, 每周1次, 连续注射12 wk. 随机将其分为3小组: 对照组、左金丸组和反左金丸组. 从第1次注射DMH第2天开始, 左金丸组和反左金丸组每天以中药汤剂1.4 g/kg灌胃, 对照组灌服同体积的生理盐水, 每日1次, 连续34 wk.

1.2.2 标本的采集: 从灌胃11 wk开始, 分批处死大鼠, 开腹分离整段大肠, 剖开, 冰冻生理盐水冲洗干净, 平展于过滤白纸上, 描述并记录肠上

■ 研发前沿

在DMH诱导大鼠大肠癌活体实验中, 左金丸和反左金丸虽然均能在肿瘤发生早期起到阻碍作用, 但效应不同, 这尚需要进一步的研究, 从最简单的对药开始研究中药的配伍或许是一条最为有效的途径。

■ 相关报道

陈蔚文 *et al* 发现黄连与吴茱萸配伍比例及提取方法对主要有效成分有影响。陈艳芬 *et al* 通过寒热胃模型从实验上证实了左金丸与反左金丸在胃黏膜损伤中的选择性。

表 1 基因序列及反应条件

| 基因 | 引物 | 退火温度(°C) | 循环数 | 扩增片段长度(bp) |
|--------|-------------------------------|----------|-----|------------|
| Dnmt1 | 5'-Tgtctgtcctcgcgtaagaa-3' | 59 | 35 | 130 |
| | 5'-ctgatagccgtcctcatcgt-3' | | | |
| Dnmt3a | 5'-Gtgatgatcgcacccaaag-3' | 60 | 35 | 110 |
| | 5'-tccagcttatcattcacagtgg-3' | | | |
| Dnmt3b | 5'-Gatgatcgcacccatcaag-3' | 60 | 35 | 123 |
| | 5'-cgagcttatcattcttgaagcta-3' | | | |

皮形态变化(包括息肉数量、颜色、部位、大小形态), 切取肉眼所见表皮发生变化或病变部位(含周围相当于息肉直径范围肠组织), 用40 g/L的中性甲醛溶液固定后, 常规脱水、浸蜡、透明、包埋, 切片, 做病理学观察, 其余病变部位组织迅速冷冻于液氮中, 后转至-70°C冰箱保存, 留待检测, 结肠组织病理形态学观察: 切片HE染色后以Olympus显微镜观察并拍照。

1.2.3 病理分级: 采用改良的Dukes^[16]大肠癌分期及预后分期标准: A: 肿瘤限于黏膜层(重度上皮内瘤变); B1: 肿瘤侵及肌层, 但未穿透, 无淋巴结转移; B2: 肿瘤穿透肌层, 但无淋巴结转移; C1: 肿瘤未穿透肌层, 但有区域性无血管根部淋巴结转移; C2: 肿瘤穿透肠壁, 并伴有肠系膜淋巴结转移; D: 有远隔脏器转移。

1.2.4 引物的设计及合成: 根据Dnmt1、Dnmt3a和Dnmt3b基因序列(GenBank NM_053354, NM_001003957, NM_001003959), 用Primer Express Software V2.0设计引物。引物序列及拟扩增片段送至NCBI BLAST数据库检测特异性。基因序列及反应条件见表1(引物由广州复能基因公司合成)。

1.2.5 实时荧光定量PCR检测: (1)总RNA的提取: 取大鼠癌肿组织常规TRIzol法提取总RNA。(2)cDNA第一链合成: 每个样品取总RNA 1 μg, 加入Random Primer 10 μmol/L, 加DEPC水至总体积13 μL, 65°C变性10 min后, 加入反转录反应液(含5×RT Reaction Buffer 5 μL, dNTP 1 mmol/L, RNase Inhibitor 1 U/μL, M-MLV RTase 8 U/μL, DEPC水4 μL, 总体积25 μL), 短暂离心后37°C孵育1 h, 反应结束后, 85°C灭活处理5 min, 最后-20°C保存反转录产物。(3)定量PCR实验: 采用染料法(SYBR Green I)进行相对定量分析, 实验设计是按照 $\Delta\Delta Ct$ 解析法来进行设计。将2×AllinOne™ Q-PCR Mix在室温下融解, 轻柔得上下颠倒混匀并进行短暂离心(同时在使用过程中始终保持避光)。PCR Reaction Mix的制备: 2×

AllinOne™ Q-PCR Mix 10 μL, ddH₂O 2 μL, PCR Forward Primer(4 μmol/L)2 μL, PCR Reverse Primer(4 μmol/L)2 μL, cDNA(1:5 diluted), 总体积20 μL。实验以NTC(No Template Control)为阴性对照, 即在反应中用水来代替模板cDNA, 其他试剂不变, 从而来质控是否体系有污染。迅速将PCR Reaction Mix稍混匀, 并加入96孔板中。将96孔板进行短暂离心, 确保所有反应液在反应孔底部。采用了标准的三步法程序进行PCR反应, 反应后进行熔解曲线分析。(4)反应结果: 根据建立的标准曲线对本标本中的Dnmts与管家基因GAPDH进行定量。经条件优化, Ct值与拷贝数的对数值具有密切的相关性($r>0.99$), 并且每个基因的扩增都达到了较高的效率, 其余几个基因的标准曲线的结果均显示一致系数R²接近1.000, 可用于计算表达量。RT-PCR扩增结束后, 将所得未知样品的目的基因扩增曲线图的阈值设定为所得的标准曲线阈值而得到相对应的Ct值, 同时为了把目的基因统一到同一样品数的比较, 减少由于样品数量差异和抽提RNA得率差异所引起的误差, 同样条件下做管家基因的表达, 得到作为内参照的管家基因GAPDH在同一阈值下的Ct值, 通过标准曲线的公式计算在同一条件下的目的基因和管家基因的表达量, 用目的基因表达量/管家基因的表达量得到相对较真实的样品基因的表达量, 然后通过统计画表得到统计用柱状分析图。

统计学处理 数据处理采用SPSS11.5统计软件, 单因素分析用*t*检验。以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 左金丸和反左金丸对DMH诱导大鼠大肠癌发生发展进程的影响 在DMH诱导肿瘤的早期(11 wk), 我们观察到, 左金丸组可以有效地阻断肿瘤的发生, 20只大鼠无1例发生癌变, 反左金丸组有2只大鼠检出处于A期的肿瘤, 发病率为10%, 反左金丸的效应略低于左金丸, 2组癌变率

表 2 DMH诱导大鼠大肠癌变过程中各组肿瘤发生率及病理分级

| 时间(wk) | 分组 | n | 病理分级 | | | | | | 肿瘤发生率(%) |
|--------|------|----|------|----|----|----|----|---|-------------------|
| | | | A | B1 | B2 | C1 | C2 | D | |
| 11 | 对照组 | 20 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20.0 |
| | 左金丸组 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 ^b |
| | 反左金丸 | 20 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10.0 ^b |
| 21 | 对照组 | 16 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 50.0 |
| | 左金丸组 | 14 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14.3 ^b |
| | 反左金丸 | 16 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25.0 ^b |
| 34 | 对照组 | 20 | 2 | 2 | 4 | 4 | 2 | 0 | 70.0 |
| | 左金丸组 | 16 | 2 | 2 | 4 | 2 | 0 | 0 | 62.5 |
| | 反左金丸 | 18 | 4 | 2 | 4 | 0 | 2 | 0 | 66.7 |

应用要点
左金丸和反左金丸均可以有效阻碍早期大肠癌的发生和发展。

^bP<0.01 vs 对照组.

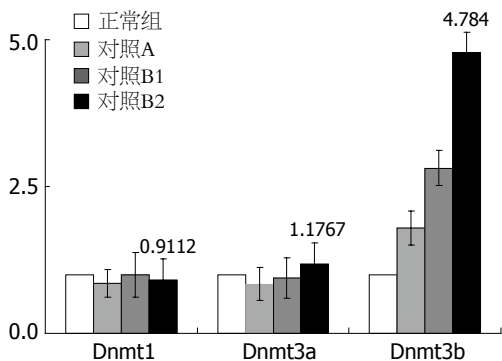


图 1 Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b在DMH诱导大鼠大肠癌实验过程中表达分析.

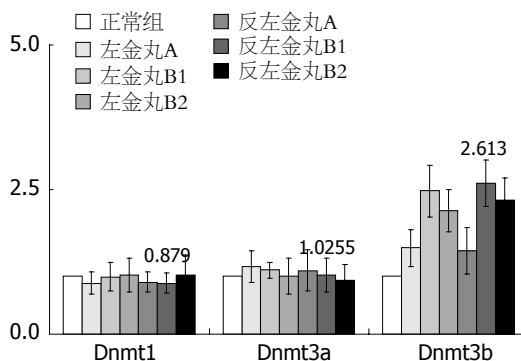


图 2 左金丸组和反左金丸组在大鼠大肠癌诱导发生过程中Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b表达分析.

均显著低于对照组(20%, $P<0.01$). 21 wk时, 左金丸组(14.3%)和反左金丸(25%)组均能有效阻碍肿瘤的进程($P<0.01$), 肿瘤的发生率均明显低于对照组(50%, $P<0.01$), 但到了34 wk, 左金丸组和反左金丸组与对照组的肿瘤发生率无明显差别(依次为70%、62.5%、66.7%, 表2).

2.2 Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b在DMH诱导大鼠大肠癌实验过程中表达分析 从表2病理检测结果可以看出, 直到34 wk, 大多数发生癌变的组织都处于A、B1、B2期, 因此, 我们只取这3个时期的大鼠进行Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b表达分析. 结果表明, 无论在正常组织中, 还是在癌变组织中, Dnmt1和Dnmt3a表达无明显变化, 只有Dnmt3b表达差异较大, 且随着肿瘤的恶化的程度而表达量明显升高, B2期的表达量高于B1期(图1).

2.3 左金丸和反左金丸在DMH诱导大鼠大肠癌变过程中Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b表达分析 从结果(图2)我们可以看到, Dnmt1和Dnmt3a的表达情况与上面对照组的情况类似: 正常组、

中药干预组, Dnmt1和Dnmt3a的表达变化不明显, 而Dnmt3b表达变化较大, 在中药处理组中, B1、B2期的表达量高于A期. 环比中药处理组和对照组, 我们发现, 中药处理组Dnmt3b整体表达量(2.613)低于对照组(4.784)($P<0.01$), 且中药组B1与B2期的Dnmt3b表达量相比略有下降, 统计学上表达差异不明显($P>0.05$).

3 讨论

对药是中药配伍中的最小单位, 为历代医家所重视. 吴茱萸和黄连作为对药配伍的历史非常悠久, 早在北宋《太平圣惠方·治水泻诸方》中就载有茱萸原方, 由黄连和吴茱萸(1:1)组成. 陈蔚文 *et al*^[17]发现黄连与吴茱萸配伍比例及提取方法对主要有效成分有影响. 陈艳芬 *et al*^[18]通过寒热胃模型从实验上证实了左金丸与反左金丸在胃黏膜损伤中的选择性. 在离体实验中, 我们发现小檗碱和吴茱萸碱都表现出同样的抑制HT29细胞增殖、诱导HT29细胞凋亡的效应^[13-14], 但在DMH诱导大鼠大肠癌活体实验中,

■同行评价

本研究目的明确,实验设计较合理,实验结论也较客观、明确,有一定的研究价值。

左金丸和反左金丸虽然均能在肿瘤发生早期起到阻碍作用,但效应不同,这尚需要进一步的研究,从最简单的对药开始研究中药的配伍或许是一条最为有效的途径。

在哺乳动物细胞中, Dnmts是催化DNA甲基化的主要酶类。同时Dnmts也是外源化学物作用的靶点, 外源化学物通过改变Dnmts的表达水平和酶的活力, 影响DNA的甲基化和表观遗传的调节功能。近年来研究发现Dnmts的表达异常与疾病如肿瘤的发生发展密切相关, DNA甲基化作用的发生和甲基化水平的高低主要取决于DNA甲基转移酶及其相关蛋白。一旦甲基转移酶表达异常就会发生基因突变, 细胞分化异常。参与DNA甲基化的DNA甲基转移酶家族分为Dnmt1、Dnmt2、Dnmt3, 其中Dnmt3又分为Dnmt3a、Dnmt3b、Dnmt3L。目前研究发现Dnmt1、Dnmt3a及Dnmt3b在正常组织中普遍呈低表达; 而他们在多种实体肿瘤和造血系统肿瘤中高表达, 尤其是Dnmt3b, 与此同时伴有酶活性的升高, 提示他与肿瘤的关系更为密切, 且3种酶在肿瘤发生、发展过程中具有协同作用^[19-22]。Issa *et al*^[4]研究结果显示: 11例良性多发大肠息肉的Dnmt1活性较对照组高1.4倍, 较15例大肠癌病变附近未受侵袭的肠黏膜高1.6倍, 而较结肠癌病变处则高5.4倍。其中1例患者同时患有大肠癌及良性多发息肉, 对其未受损黏膜、良性息肉的黏膜与癌黏膜进行酶活性测定, 结果与正常对照相比, 依次增高1.7、2.7和5.3倍。在我们的研究中, 我们发现, 无论是对照组还是中药组, 相对于正常组织, Dnmt1和Dnmt3a表达的组间差异不明显, Dnmt3b有较大差异, 且Dnmt3b在对照组中表达量高于中药组。我们还发现, 经中药处理过的组织样本, Dnmt3b表达量在B1、B2期差异不明显, 而对照中B2期Dnmt3b表达量显著高于B1期, 这可能是中药的干预作用的结果, 虽然甲基化在肿瘤的发生发展中起重要作用, 但也不是唯一的途径, 而中药对DMH诱导肿瘤过程中的阻碍作用可能是通过影响了多条肿瘤发生途径而实现。其次, 这也有可能是样本量不足, 这还需要进一步研究。

4 参考文献

- 1 Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428
- 2 Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin

- alterations in human tumours. *J Pathol* 2002; 196: 1-7
- 3 Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003; 4: 351-358
- 4 Issa JP, Vertino PM, Wu J, Sazawal S, Celano P, Nelkin BD, Hamilton SR, Baylin SB. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1235-1240
- 5 谭宇蕙, 吴映雅, 钟富有, 胡岳山, 宁异真, 李杰芬. 吴茱萸碱对小鼠肝癌细胞生长的抑制和诱导凋亡作用. *中药药理与临床* 2006; 22: 33-35
- 6 何菱, 郑保忠, 胥佩菱. 小檗碱类衍生物的全合成及抗癌活性的研究. *华西药理学杂志* 1987; 2: 61-66
- 7 马伟, 王建华, 陈蔚文, 石兴华. 盐酸小檗碱促进胃癌细胞系分化的作用. *中药新药与临床药理* 2001; 12: 90-92
- 8 谭宇蕙, 陈蔚文, 周本杰, 李茹柳. 连黛片对大鼠溃疡性胃癌ras基因点突变的影响. *中药药理与临床* 2001; 17: 27-28
- 9 周本杰, 徐勤, 谭宇蕙, 陈蔚文, 王建华. 连黛片对大鼠溃疡性胃癌相关癌基因蛋白表达的影响. *中药新药与临床药理* 2001; 12: 249-251
- 10 陈蔚文, 李茹柳, 徐勤, 叶富强, 徐颂芬, 潘怀耿, 赵军宁, 王建华. 连黛片抗大鼠胃癌及对p21ras, c-erbB2, Rb和p53基因蛋白表达的影响. *中国中西医结合杂志* 1998; 18: 265-267, 407
- 11 杨传标, 陈蔚文, 王建华, 张礼康. 连黛胶囊对胃肠肿瘤p21~(ras)和突变型p53蛋白表达调节作用的临床研究. *中国中西医结合杂志* 2001; 21: 736-738
- 12 谭宇蕙, 陈冠林, 郭淑杰, 李燕红, 陈蔚文. 小檗碱对胃癌MGC-803细胞生长抑制及诱导凋亡的作用. *中国药理学通报* 2001; 17: 40-43
- 13 常金荣, 文彬, 王汝俊, 陈蔚文, 王建华. 吴茱萸碱和小檗碱对HT29细胞凋亡及端粒酶催化亚基(hTERT)表达的影响. *中药药理与临床* 2008; 24: 6-8
- 14 常金荣, 文彬, 王汝俊, 陈蔚文, 王建华. 吴茱萸碱和盐酸小檗碱对HT29细胞生长抑制及凋亡的影响. *中药新药与临床药理* 2008; 19: 191-195
- 15 Noguera Aguilar JF, Amengual Antich I, Plaza Martínez A, Ibarra de la Rosa J, Tortajada Collado C, Gamundí Gamundí A, Pujol Tugores JJ. Cyclooxygenase-2 inhibition in colon experimental carcinogenesis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 637-647
- 16 郑树. 结直肠癌肿瘤. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 552-556
- 17 陈蔚文, 李茹柳, 徐颂芬, 钟秉文, 谢泳芳. 左金丸配伍和提取方法对化学成分的影响. *中成药* 1993; 15: 2-3
- 18 陈艳芬, 陈蔚文, 李茹柳, 叶富强, 徐颂芬, 潘怀耿. 左金丸和反左金丸对大鼠胃粘膜保护机制的比较研究. *广州中医药大学学报* 2003; 20: 133-135
- 19 Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416: 552-556
- 20 Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bièche I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4415-4422
- 21 Kim GD, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S. Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J* 2002; 21: 4183-4195
- 22 Beaulieu N, Morin S, Chute IC, Robert MF, Nguyen H, MacLeod AR. An essential role for DNA methyltransferase DNMT3B in cancer cell survival. *J Biol Chem* 2002; 277: 28176-28181

电针足三里对脓毒症大鼠小肠促炎症因子、二胺氧化酶活性及组织含水率的影响

胡森, 张立俭, 白慧颖, 包呈梅

胡森, 张立俭, 白慧颖, 包呈梅, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官障碍实验室 北京市 100037
全军医学科研“十一五”专项课题基金资助项目, No. 06Z055
作者贡献分布: 此课题由胡森设计; 研究过程由张立俭、白慧颖及包呈梅操作完成; 研究所用试剂及分析工具由胡森提供; 数据分析由胡森与张立俭完成; 本论文写作由胡森完成。
通讯作者: 胡森, 研究员, 100037, 北京市, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官障碍实验室。
hs82080@yahoo.com.cn
电话: 010-66867397 传真: 010-68429998
收稿日期: 2009-04-22 修回日期: 2009-05-21
接受日期: 2009-05-28 在线出版日期: 2009-07-18

Effects of electro-acupuncture at Zusanli point on the expression of proinflammatory cytokines, the activity of diamine oxidase and the rate of water content in the small intestine in rats with sepsis

Sen Hu, Li-Jian Zhang, Hui-Ying Bai, Cheng-Mei Bao

Sen Hu, Li-Jian Zhang, Hui-Ying Bai, Cheng-Mei Bao, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Affiliated Hospital of the General Hospital of the Chinese PLA, Beijing 100037, China
Supported by: the Medical Science Foundation of the Chinese People's Liberation Army during the 11th Five-Year Plan Period, No. 06Z055
Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Affiliated Hospital of the General Hospital of the Chinese PLA, Beijing 100037, China. hs82080@yahoo.com.cn
Received: 2009-04-22 Revised: 2009-05-21
Accepted: 2009-05-28 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of electro-acupuncture (EA) at Zusanli (ST36) against proinflammatory cytokine-induced intestinal injury in rats with sepsis.

METHODS: Thirty-two male Sprague-Dawley rats were subjected to cecal ligation and puncture (CLP) to develop a rat model of sepsis. The rats were then randomly divided into four groups ($n = 8$ each): CLP plus EA group, CLP

plus sham EA (SEA) group, vagotomy (VA) plus CLP group and VA plus CLP plus EA group. An electroacupuncture at Zusanli point (ST36) was performed at constant voltage (2-100 Hz, 2 mA for 1.5 h) immediately after CLP surgery. Rats in the VA plus CLP group and the VA plus LPS plus EA group were abdominally vagotomized. All animals were sacrificed at 6 h after CLP to collect jejunal specimens. The contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nitric oxide (NO), the activity of myeloperoxidase (MPO) and diamine oxidase (DAO), as well as the rate of water content (ratio of dry weight to wet weight) were determined.

RESULTS: The levels of TNF- α and NO, the activity of MPO and the rates of water content in the jejunum in the CLP plus EA group were significantly lower than those in the other three groups, while the activity of DAO at 6 h after CLP in the CLP plus EA group was significantly higher than that in the other three groups (all $P < 0.05$). The levels of TNF- α and NO and the activity of MPO in the VA plus CLP group and the VA plus CLP plus EA groups were significantly higher (748.80 ± 112.45 pg/g protein and 737.58 ± 100.56 pg/g protein *vs* 560.23 ± 82.25 pg/g protein; 1.32 ± 0.15 $\mu\text{mol/g}$ protein and 1.12 ± 0.24 $\mu\text{mol/g}$ protein *vs* 0.97 ± 0.12 $\mu\text{mol/g}$ protein; 0.57 ± 0.06 U/g and 0.61 ± 0.12 U/g *vs* 0.45 ± 0.07 U/g, all $P < 0.05$) than those in the CLP plus SEA group, while the activity of DAO in the VA plus CLP group and the VA plus CLP plus EA groups was significantly lower than that in the CLP plus SEA group (0.07 ± 0.02 U/L and 0.06 ± 0.04 U/L *vs* 0.12 ± 0.04 U/L, both $P < 0.05$). There were no significant differences in all of the above parameters between the VA plus CLP plus EA group and the VA plus CLP group.

CONCLUSION: Electro-acupuncture at Zusanli point significantly lowers the elevated levels of proinflammatory factors in the small intestine and alleviate tissue edema and mucosal dysfunction in rats undergoing CLP.

Key Words: Sepsis; Electro-acupuncture; Zusanli;

■背景资料

肠道缺血、感染及炎症均能激活肠道局部炎症细胞释放多种炎症因子,造成肠组织过度炎症、肠黏膜水肿及肠屏障损害,进而引起肠道细菌和毒素移位、肠源性脓毒症甚至MODS的发生。因此有效地抑制肠道促炎细胞因子的产生,保护肠组织免受过度的炎症损害对于脓毒症和MODS的防治具有重要意义。针刺治疗已应用于临床数千年,能双向调节神经-内分泌-免疫系统,保护脏器功能,但其作用机制尚不清楚。本研究目的是观察电针足三里能否抑制脓毒症引起的大鼠肠组织TNF- α 和NO等促炎因子释放,减轻肠组织水肿,保护肠屏障功能。

■同行评议者

唐文富, 副主任医师, 四川大学华西医院中西医结合科; 曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 香港伊利沙伯医院临床肿瘤科

■相关报道

对胆碱能抗炎通路的研究表明,电刺激外周迷走神经能抑制内毒素攻击和失血性休克动物血清和组织促炎细胞因子表达,减轻休克的病情,并证明胆碱能神经递质的抗炎作用是通过兴奋胆碱能N受体 $\alpha 7$ 亚单位(NR $\alpha 7$)实现的.在另一项研究中,本课题组预先给内毒素血症大鼠静脉注射NR $\alpha 7$ 拮抗剂 α -银环蛇毒素,电针对肝组织TNF- α 含量和ALT活性的影响亦显著减弱或消失,说明电针足三里的抗炎作用很可能是通过NR $\alpha 7$ 实现的.因此,激活胆碱能抗炎通路是本研究中电针足三里发挥抗炎和肠保护作用的主要机制之一.

Intestine; Tumour necrosis factor- α ; Cholinergic

Hu S, Zhang LJ, Bai HY, Bao CM. Effects of electroacupuncture at Zusanli point on the expression of proinflammatory cytokines, the activity of diamine oxidase and the rate of water content in the small intestine in rats with sepsis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2079-2082

摘要

目的: 探讨电针足三里(ST36)对脓毒症大鼠促炎因子所致小肠损伤的抑制作用.

方法: 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠脓毒症模型,取♂SD大鼠32只,随机分为CLP+电针(EA)足三里组(CLP+EA组)、CLP+假电针(shame EA)(CLP+SEA)组、迷走神经切断(VA)+CLP(VA+CLP)组和迷切后CLP再电针(VA+CLP+EA组)组,每组8只. EA组持续针刺双侧足三里30 min,强度为2 mA, 2-100 Hz. CLP/SEA组采用相同频率和强度刺激非经非穴(足三里外侧旁开0.5 cm)30 min. VA组先手术切断腹腔迷走神经再CLP. 各组大鼠于CLP术后6 h处死取空肠组织,检测TNF- α 和NO含量、髓过氧化物(MPO)和二胺氧化酶活性及肠组织含水率.

结果: 采用盲肠结扎穿孔术后6 h,与其余3组相比,CLP/EA组小肠组织促炎因子TNF- α 、NO、MPO水平和组织含水率均显著降低、DAO活性显著升高(均 $P < 0.05$). VA+CLP组和VA+CLP+EA组TNF- α 、NO和MPO水平显著高于CLP+SEA组(748.80 \pm 112.45 pg/g protein, 737.58 \pm 100.56 pg/g protein vs 560.23 \pm 82.25 pg/g protein; 1.32 \pm 0.15 μ mol/g protein, 1.12 \pm 0.24 μ mol/g protein vs 0.97 \pm 0.12 μ mol/g protein; 0.57 \pm 0.06 U/g, 0.61 \pm 0.12 U/g vs 0.45 \pm 0.07 U/g, 均 $P < 0.05$), DAO活性显著低于CLP+SEA组(0.07 \pm 0.02 U/L, 0.06 \pm 0.04 U/L vs 0.12 \pm 0.04 U/L, 均 $P < 0.05$); VA+CLP+EA组、VA+CLP组、CLP+SEA组上述指标的变化无统计学差别.

结论: 电针足三里显著抑制CLP大鼠小肠促炎因子水平,减轻肠组织水肿和功能损害.

关键词: 脓毒症; 电针; 足三里; 小肠; 肿瘤坏死因子; 胆碱能

胡森, 张立位, 白慧颖, 包呈梅. 电针足三里对脓毒症大鼠小肠促炎因子、二胺氧化酶活性及组织含水率的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(20): 2079-2082

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2079.asp>

0 引言

在全身炎症反应失控诱发多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)发病过程中,肠道既是始动器官,同时又是该病理过程中最易受损的器官之一.研究表明肠道缺血、感染及炎症均能激活肠道局部炎症细胞释放多种炎症因子、氧自由基及胃肠动力抑制性介质,造成肠组织过度炎症、肠黏膜水肿、肠屏障损害和肠麻痹,进而引起肠道细菌和毒素移位、肠源性脓毒症甚至MODS的发生^[1-2].因此有效地抑制肠道促炎细胞因子的产生,保护肠组织免受过度的炎症损害对于脓毒症和MODS的防治具有重要意义.针刺治疗已应用于临床数千年,能双向调节神经-内分泌-免疫系统,保护脏器功能,但其作用机制尚不清楚^[3].本研究目的是观察电针足三里能否抑制脓毒症引起的大鼠肠组织肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)和NO等促炎因子释放,减轻肠组织水肿,保护肠屏障功能.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠, 60-70日龄, 体质量220 \pm 20 g, 中国人民解放军军事医学科学院动物实验中心提供. 实验前适应性饲养1 wk, 术前12 h禁食, 禁饮4 h. TNF- α ELISA试剂盒购自美国Doclone公司; NO、髓过氧化物(myeloperoxidase, MPO)、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)以及组织匀浆蛋白试剂盒均购自南京建成生物工程研究所.

1.2 方法

1.2.1 分组: 按随机数字表法将动物分为CLP+电针(electr-acupanctru, EA)足三里组(CLP+EA组)、CLP+假电针(shame EA, CLP+SEA)组、迷走神经切断(vagotomy, VA)+CLP组(VA+CLP)和迷切后CLP再电针组(VA+CLP+EA), 每组8只.

1.2.2 造模及处理: 按照Chaudry *et al*^[4]报道的方法行CLP, 复制严重腹腔感染致脓毒症模型. 大鼠用盐酸氯胺酮注射液与速眠新II注射液按体积比8:3混合, 0.4 mL/kg肌肉注射麻醉后, 实施无菌手术, 沿腹正中线切口, 暴露盲肠并结扎根部(避免结扎回肠及盲肠根部血管), 用16号针贯通穿刺盲肠3次形成肠瘘, 留置1条2 cm \times 2 mm的橡皮条引流防针孔闭合. 将盲肠还纳腹腔, 逐层缝合腹壁切口. 术毕立即皮下注射50 mL/kg生理盐水抗休克, 自由饮水. 电针时大鼠用自制布袋固定, 于CLP术后20 min在清醒状态下常规

表 1 电针足三里对大鼠CLP后6 h小肠促炎因子水平、DAO活性和组织含水率的影响 (mean ± SD, n = 6)

| 分组 | TNF- α (pg/g protein) | NO(μ mol/g protein) | MPO(U/g) | DAO (U/L) | 组织含水率(%) |
|-----------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| CLP+EA | 360.43 ± 60.87 ^{abc} | 0.72 ± 0.10 ^{abc} | 0.34 ± 0.05 ^{abc} | 0.21 ± 0.05 ^{abc} | 65.3 ± 2.3 ^{abc} |
| CLP+SEA | 560.23 ± 82.25 | 0.97 ± 0.12 | 0.45 ± 0.07 | 0.12 ± 0.04 | 72.2 ± 3.4 |
| VA+CLP | 748.80 ± 112.45 ^a | 1.32 ± 0.15 ^a | 0.57 ± 0.06 ^a | 0.07 ± 0.02 ^a | 75.5 ± 2.9 |
| VA+CLP+EA | 737.58 ± 100.56 ^a | 1.12 ± 0.24 ^a | 0.61 ± 0.12 ^a | 0.06 ± 0.04 ^a | 72.4 ± 3.6 |

^aP<0.05 vs CLP+SEA组; ^bP<0.05 vs VA+CLP+EA组; ^cP<0.05 vs VA+CLP组。

消毒双下肢并备皮。CLP+EA组取双侧足三里穴(膝关节后外侧、腓骨小头下约5 mm处)直刺7 mm^[5], 后接电针仪(国产HANS, LH202H)持续针刺30 min, 强度为2 mA, 2-100 Hz; CLP+SEA组采用相同频率和强度刺激非经非穴(足三里外侧旁开0.5 cm); VA组先手术在胃贲门处沿食管两侧切断腹腔迷走神经后再CLP。

1.2.3 指标检测: 于CLP术后6 h处死动物取空肠组织, 检测TNF- α 和NO含量、MPO和DAO活性及肠组织含水率。肠组织TNF- α 含量采用ELISA法测定; NO含量、MPO和DAO活性以及组织匀浆蛋白含量采用生化试剂盒测定; 肠组织含水率(%)采用干湿重法测定。

统计学处理 检测结果以mean ± SD表示, 采用SPSS12.0统计分析软件处理数据, 单因素方差分析检验各组间差异, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

CLP后6 h, 与其余3组相比, CLP/EA组小肠组织促炎因子TNF- α 、NO、MPO水平和组织含水率均显著降低、DAO活性显著升高(均P<0.05)。VA+CLP组和VA+CLP+EA组TNF- α 、NO和MPO水平显著高于CLP+SEA组, DAO活性显著低于CLP+SEA组; VA+CLP+EA组与VA+CLP组上述指标的变化无统计学差别(P>0.05, 表1)。

3 讨论

肠屏障损害和肠麻痹是脓毒症及脓毒性休克的常见并发症, 其发生机制目前仍未完全阐明。研究显示肠道局部的促炎因子的作用对于脓毒症时肠功能障碍的发生具有重要意义^[6]。肠道局部缺血和感染时, 细菌及其毒素能快速激活原本功能静止的肠道固有巨噬细胞, 产生大量的促炎因子, 而这些促炎因子进一步引起单核细胞和多形核白细胞在肠道微循环聚集和肠组织中浸润、释放更多的炎症因子、氧自由基及胃

肠动力抑制性的介质, 造成肠组织过度的炎症反应、黏膜水肿、肠屏障损害和肠麻痹, 进而引发肠道细菌、毒素移位和肠源性脓毒症甚至MODS的发生^[2]。

在肠道局部炎症导致肠组织细胞损伤过程中, TNF- α 和NO等被认为起关键作用^[7]。TNF- α 作为一种多功能的促炎细胞因子, 可由肠道巨噬细胞和中性粒细胞大量产生, 在炎症介质的级联反应过程中居于始动位置, 能诱发一系列介质生成、形成瀑布效应, 最终导致肠组织细胞损害。而NO作为肠道及血管平滑肌的主要抑制性介质之一, 在肠组织缺血和肠动力障碍过程起重要的作用。本研究结果显示, 电针足三里对CLP模型大鼠小肠促炎因子所致肠组织水肿和肠黏膜损伤具有明显保护作用, 能降低异常升高的小肠组织TNF- α 和NO含量及MPO活性, 降低肠组织含水率, 恢复肠黏膜DAO活性。但若在CLP前预先切断双侧腹腔迷走神经, 能上调肠组织促炎因子水平、加重肠组织损害; 此时电针足三里不能降低肠组织促炎因子水平, 减轻肠组织水肿和炎症损害。说明迷走神经的完整性在EA发挥抗炎和器官保护作用时具有至关重要的作用。可能迷走神经被切断后机体向大脑传递的致炎信号和迷走神经发出的相应的传出信号被阻断, 使电针失去治疗作用, 这与以往的研究认为副交感神经在针刺调节免疫反应过程中主要起促进作用和针刺足三里可使传出迷走神经的兴奋性增高相一致^[8]。

胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway)是2000年后报告的胆碱能神经及其递质调节或对抗全身性炎症反应的通路^[9]。研究证明, 直接给予ACh或烟碱能显著减少内毒素刺激后人血巨噬细胞TNF- α 、IL-1 β 、IL-6及IL-18等促炎细胞因子的产生, 但对抗炎细胞因子IL-10无明显作用。电刺激外周迷走神经能抑制内毒素攻击和失血性休克动物血清和组织促炎细胞因子表达, 减轻休克的病情,

■应用要点

足三里不但是抗炎及免疫调节的要穴, 同时也是足阳明胃经的合穴和治疗胃肠疾病的要穴之一。电针足三里不仅能兴奋胆碱能N受体发挥抗炎作用, 而且可能也兴奋了胆碱能M受体发挥促进胃肠蠕动和排毒作用, 改善缺血和脓毒症引起的肠黏膜水肿、肠屏障损害和肠麻痹, 对于防治肠道细菌和毒素移位、肠源性脓毒症和MODS有积极的作用。

同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值。

并证明ACh的抗炎作用是通过与胆碱能N受体 $\alpha 7$ 亚单位(NR $\alpha 7$)结合实现的^[10]。在另一项研究中, 我们预先给内毒素血症大鼠静脉注射NR $\alpha 7$ 拮抗剂 α -银环蛇毒素, 电针对肝组织TNF- α 含量和ALT活性的影响亦显著减弱或消失, 说明电针足三里的抗炎作用很可能是通过NR $\alpha 7$ 实现的^[11]。因此, 我们认为激活胆碱能抗炎通路是本研究中电针足三里发挥抗炎和肠保护作用的主要机制之一。我们还观察到, 与CLP+SEA组相比, VA+CLP组和VA+CLP+EA组促炎因子水平和肝组织含水率均显著增加, DAO活性降低, 表明促炎/抗炎因子的水平的平衡受交感肾上腺素能神经与副交感胆碱能神经调节。在本实验中, 当副交感胆碱能神经的作用被阻断后, 表现出交感肾上腺素能神经的促炎作用, 导致促炎细胞因子水平升高和组织炎症反应加重。

从中医角度看, 脓毒症属外邪侵袭, 其病机应为邪盛内陷, 内闭外脱, 邪热炽盛, 正邪交争, 阴津耗损。足三里不但是抗炎及免疫调节的要穴, 同时也是足阳明胃经的合穴和治疗胃肠疾病的要穴之一。而通腑攻下以存阴是治疗脓毒症的重要措施之一, 攻下能排毒解毒, 荡涤积滞, 抑制过度发酵, 使大量细菌和毒素随肠内容物排出体外, 减少其吸收^[12-14]。我们在实验中也观察到CLP+EA组大鼠多有腹泻表现, 味多腥臭, 表明电针足三里不仅能兴奋胆碱能N受体发挥抗炎作用, 而且可能也兴奋了胆碱能M受体发挥促进胃肠蠕动和排毒作用, 改善了脓毒症引起的肠黏膜水肿、肠屏障损害和肠麻痹, 对于防治肠道细菌和毒素移位、肠源性脓毒症和MODS有积极的作用^[15]。

4 参考文献

- 1 Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1999; 178: 449-453
- 2 Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG,

- 3 Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15: 1-10
- 4 胡森, 宋琪, 王磊. 电针兴奋胆碱能抗炎通路对内毒素引起的细胞因子释放和脏器功能损害作用研究. *中国中西医结合急救杂志* 2008; 15: 205-208
- 5 Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery* 1979; 85: 205-211
- 6 宋琪, 石现, 胡森, 黎君友, 吕艺, 王磊. 电针治疗全身炎症反应综合征大鼠模型的研究. *感染、炎症、修复* 2006; 7: 222-224
- 7 Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. *Ann Surg* 1999; 229: 478-486
- 8 Burne MJ, Elghandour A, Haq M, Saba SR, Norman J, Condon T, Bennett F, Rabb H. IL-1 and TNF independent pathways mediate ICAM-1/VCAM-1 up-regulation in ischemia reperfusion injury. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 192-198
- 9 Liu JH, Yan J, Yi SX, Chang XR, Lin YP, Hu JM. Effects of electroacupuncture on gastric myoelectric activity and substance P in the dorsal vagal complex of rats. *Neurosci Lett* 2004; 356: 99-102
- 10 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462
- 11 Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384-388
- 12 胡森, 宋琪, 王海滨, 吕艺, 于勇, 王磊, 周国勇, 石现, 盛志勇. 电针足三里对内毒素所致大鼠肝损伤保护机制的研究. *中国中西医结合急救杂志* 2007; 14: 296-298
- 13 胡森, 王海滨, 夏斌, 于勇, 黎君友, 邹晓防, 周国勇, 车晋伟. 通腑颗粒改善犬缺血再灌注状态下实施肠内营养时的小肠功能. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1845-1849
- 14 张立俭, 胡森, 侯经元, 周国勇, 石现, 盛志勇. 电针足三里在40%血容量失血大鼠口服补液时对胃排空率、血浆一氧化氮及胃动素的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 395-398
- 15 胡森, 王磊, 宋琪, 周国勇, 石现, 盛志勇. 电针足三里兴奋胆碱能通路对烫伤大鼠胃肠黏膜血流量和肠动力的影响. *中国中西医结合急救杂志* 2009; 16: 79-81
- 16 胡森. 兴奋胆碱能抗炎通路干预炎症与缺血引起的器官损害. *感染、炎症、修复* 2008; 9: 195-198

编辑 李军亮 电编 何基才

内镜检查对食管胃黏膜异位的诊断意义

谭东毅, 张国梁, 邴玉芝, 鲍文漪

谭东毅, 张国梁, 邴玉芝, 鲍文漪, 天津市第一中心医院消化内科 天津市 300192

作者贡献分布: 此课题由谭东毅与张国梁设计; 临床内镜检查由谭东毅、张国梁及邴玉芝操作完成; 数据分析由谭东毅与鲍文漪完成; 本论文写作由谭东毅完成。

通讯作者: 谭东毅, 副主任医师, 300192, 天津市, 天津市第一中心医院消化内科, tdy058@126.com

电话: 022-23626816

收稿日期: 2009-04-15 修回日期: 2009-06-25

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-07-18

Diagnostic value of endoscopy for heterotopic gastric mucosa in the esophagus

Dong-Yi Tan, Guo-Liang Zhang, Yu-Zhi Bing, Wen-Qi Bao

Dong-Yi Tan, Guo-Liang Zhang, Yu-Zhi Bing, Wen-Qi Bao, Department of Gastroenterology, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

Correspondence to: Dong-Yi Tan, Department of Gastroenterology, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China. tdy058@126.com

Received: 2009-04-15 Revised: 2009-06-25

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To analyze endoscopic features and pathological characteristics of heterotopic gastric mucosa (HGM) in the esophagus and investigate the correlation of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection with the development of heterotopic gastric mucosa.

METHODS: Twenty-seven patients with histopathologically confirmed HGM, who were treated at our hospital from January 2007 to December 2008, were included in the study. An electronic gastroscope was inserted to observe esophageal mucosa and take mucosal biopsy for rapid urease test to diagnose *H pylori* infection.

RESULTS: Gastroscopic examination revealed 34 ectopic foci, of which 77.8% were single lesions that were mostly distributed along the long axis, 18.5% were double lesions mostly in kissing position, and 3.7% were multiple lesions. These lesions were elliptic or round in shape, and orange red or deep red in color, forming a

vivid contrast comparing surrounding normal pearl-grey esophageal mucosa. The diameter of these lesions ranged from 0.5 to 2.5 cm. A round superficial ulcer with a diameter of 0.75 cm was noted in one patient. Pathological examination showed that gastric columnar epithelium, containing parietal cells and chief cells, was visible in the lesions. Inflammatory cell infiltration was found in 51.9% of HCM patients. Additionally, 37% of patients were positive for *H pylori* test, while 35.3% of HCM patients with chronic inflammation and intestinal metaplasia were positive for *H pylori* test.

CONCLUSION: *H pylori* infection is correlated with the development of heterotopic gastric mucosa but reveals no obvious correlation with the severity of pathological changes. Multipoint biopsy and deep biopsy can improve diagnostic accuracy.

Key Words: Heterotopic gastric mucosa; Endoscopy; Diagnosis

Tan DY, Zhang GL, Bing YZ, Bao WQ. Diagnostic value of endoscopy for heterotopic gastric mucosa in the esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2083-2086

摘要

目的: 分析食管胃黏膜异位症(HGM)内镜下表现特征及其病理学特点, 探讨幽门螺杆菌(*H pylori*)与HGM的关系。

方法: 2007-01/2008-12我院门诊HGM患者27例, 均经病理组织学证实, 行电子胃镜检查, 进镜后观察食管黏膜, 行黏膜活检病理检查, 以及快速尿素酶检验, 阳性者诊为*H pylori*感染。

结果: 内镜检查发现异位灶共34处, 其中单病灶占77.8%, 多沿长轴纵行分布; 双病灶占18.5%, 多呈对吻性; 3个病灶占3.7%。病变呈椭圆形或圆形, 橘红色或深红色黏膜区, 与周围的灰白色正常食管黏膜分界清楚, 直径为0.5-2.5 cm。1例伴有0.75 cm大小圆形浅溃疡。病理检查显示可见胃柱状上皮, 含有壁细胞

背景资料

食管胃黏膜异位, 由于部位的特殊性易造成漏诊, 如果不及时诊治可导致食管黏膜糜烂和溃疡, 甚至可致狭窄和穿孔等, 临床易误诊为咽炎或食管炎。本病的治疗原则是密切随访、对症处理、防治并发症及根治性治疗。因此提高该病的检出率, 对治疗及预后起着重要的作用。

同行评议者

冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科

■相关报道

国内外有关研究提示无痛胃镜检查术,可使患者在麻醉状态下无恶心、呕吐的表现,更有利于内镜医师仔细观察,提高该病的检出率。

和主细胞,其中51.9%见炎性细胞浸润,37% *H pylori*检测呈阳性,在HGM伴有慢性炎症及肠上皮化生者中35.3% *H pylori*呈阳性。

结论: HGM存在 *H pylori* 感染,但感染与病变程度无明确相关性,内镜检查技术的完善及活检的充分和准确,对于HGM具有重要的确诊意义。

关键词: 食管胃黏膜异位症; 内镜检查; 诊断

谭东毅, 张国梁, 邢玉芝, 鲍文漪. 内镜检查对食管胃黏膜异位的诊断意义. 世界华人消化杂志, 2009; 17(20): 2083-2086

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2083.asp>

0 引言

食管胃黏膜异位症(heterotopic gastric mucosa, HGM)是一种先天性胚胎残余病变,是指食管上段存在有胃黏膜,而引起临床症状的一种疾病,临床易误诊为咽炎或食管炎。因病变接近食管入口处,部位较特殊,易造成漏诊^[1-2]。本文总结我院27例HGM的内镜、病理特点及幽门螺杆菌(*H pylori*)与HGM的关系,旨在探讨其在HGM上的诊断价值,加深对该病的认识,提高诊断率。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-01/2008-12我院门诊HGM患者共27例,男16例,女11例;年龄35-69(平均年龄47.7)岁。患者均经病理组织学证实为HGM,临床表现咽喉部异物感、吞咽不适、吞咽困难4例,以胸骨后疼痛、烧灼感及反酸症状为主者5例,以上腹部不适为主者12例,体检剑突下压痛3例,体检无症状及体征者3例。

1.2 方法 27例患者行电子胃镜检查,进镜后观察食管黏膜,行黏膜活检病理检查,以及快速尿素酶检验,阳性者诊为 *H pylori* 感染。

2 结果

2.1 病变部位 发现异位灶共34处,11处病变黏膜位于食管距门齿15-17 cm,占32.4%,23处位于距门齿18-20 cm,占67.6%,其中单病灶21例,占77.8%,发生在食管右壁9例,左壁5例,后壁4例,前壁3例,多沿长轴纵行分布;双病灶5例,占18.5%,呈对吻性3例,其中位于食管前后壁2例,左右壁1例;3个病灶1例,占3.7%。

2.2 内镜表现 病变呈椭圆形或圆形,橘红色或深红色黏膜区,表面光滑27处,细颗粒样7处,与周围的灰白色正常食管黏膜分界清楚,直径为



图1 内镜下食管上段胃黏膜。

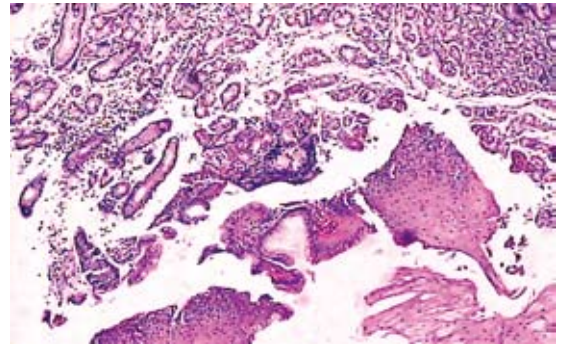


图2 胃黏膜上皮(壁细胞)及鳞状上皮(HE x 40)。

0.5-2.5 cm(图1)。8例伴充血水肿,偶见浅糜烂。1例可见0.75 cm大小圆形浅溃疡,表面覆薄白苔,边缘欠规则,溃疡中央可见充血黏膜岛。

2.3 病理特点 27例活检组织病理检查可见类似胃黏膜的柱状上皮,含有壁细胞和主细胞。其中22例(81.5%)为胃窦底交界腺型,1例(3.7%)幽门腺型,4例(14.8%)胃底腺型。其中炎性细胞浸润14例(51.9%),萎缩性胃炎样改变2例(7.4%),肠化生1例(3.7%)(图2)。(距门齿20 cm黏膜,活检)取材黏膜组织一小块,部分胃黏膜,部分被覆鳞状上皮,黏膜组织水肿及慢性炎症,灶性充血,考虑胃黏膜异位。1例(3.7%)见炎性渗出,伴少量坏死组织、肉芽组织等慢性溃疡改变。

2.4 *H pylori* 检出情况 10例 *H pylori* 检测呈阳性,占37%,在17例HGM伴有慢性炎症及肠上皮化生者中6例 *H pylori* 呈阳性,占35.3%。1例合并食管溃疡者未检出 *H pylori*。

3 讨论

HGM是一种先天性病变,在胚胎初期食管黏膜由柱状上皮覆盖,后由鳞状上皮所取代,当有少数柱状上皮被遗留时,就会发展成岛状异位胃黏膜,他可终生存在,胃黏膜异位可发生在消化系的任何部位^[3]。病变黏膜内含有壁细胞为主的胃上皮细胞,并有泌酸功能。因此,部分患者可出现胸骨后烧灼感或疼痛、吞咽困难或吞咽

■创新盘点

本文总结了食管胃黏膜异位内镜下表现特征及其病理学特点,探讨了 *H pylori* 与HGM的关系,分析漏诊原因,针对退镜至食管上段时拔镜过快,且食管上段的反复收缩影响观察等问题,提出在常规内镜检查中,应将内镜缓慢退至食管上段,嘱患者行连续吞咽动作,同时边少量注气边缓慢后退的方法,注意观察该段食管全周黏膜的颜色改变,如见异常,局部行多块活检,送病理检查以提高检出率。

痛、咽部球状异物感、声音嘶哑、咳嗽等类似胃食管反流病的反流症状。胃酸与胃蛋白酶慢性刺激, 加上长期胃食管反流, 容易形成溃疡, 严重者甚至可并发穿孔、出血、狭窄等症状, 本组中发现1例HGM合并食管溃疡^[4-5]。面积大的HGM所含壁细胞较多, 泌酸量更大, 故面积大的HGM易引起症状, 本组中6例无症状的HGM患者病变黏膜直径均 ≤ 0.75 cm。有报道证实少部分HGM有癌变的趋势, 对于患者出现的食管和咽喉部的一些症状, 都应引起重视, 警惕HGM的可能^[6-7]。

食管胃黏膜异位可见食管各段, 以上段多见, 本组研究中, 67.6% HGM发生在距门齿18-20 cm处, 单病灶77.8%, 66.7%发生在食管侧壁; 亦可见2个及2个以上病灶, 若为双病灶则多形成对吻性。本病内镜下特征性表现为直径小于2.5 cm的椭圆形或圆形斑块, 表面扁平光滑或呈细颗粒状, 色泽呈柱状上皮特有的橘红色, 与周边鳞状上皮所具有的灰白色黏膜分界清楚, 部分患者可见黏膜充血水肿, 伴浅糜烂等食管炎表现, 也可显示坏死假膜、溃疡和狭窄。食管胃黏膜异位伴溃疡与食管癌较易鉴别, 前者可表现为非进行性吞咽困难, 镜下见局部蠕动存在, 溃疡中央可见食管鳞状上皮黏膜岛是其重要特征, 边缘无明显赘生, 多在隆起的溃疡边缘呈小结节状改变。但食管胃黏膜异位黏膜上皮可发生异型增生, 与食管癌的发生有密切的关系, 应引起临床医师广泛重视^[9-10]。本病常易漏诊, 这可能与操作者对该病的认识不足, 退镜至食管上段时拔镜过快有关, 且食管上段括约肌的反复收缩, 内镜检查时退镜至该部位时患者的耐受性差, 影响观察, 一些微小的异位斑片可能被周围鳞状上皮掩盖而不易发现。为提高检出率, 在常规内镜检查中, 将内镜缓慢退至食管上段, 嘱患者行连续吞咽动作, 同时边少量注气边缓慢后退, 注意观察该段食管全周黏膜的颜色改变, 如见异常, 局部行多块活检, 送病理检查以明确诊断; 由于目前无痛胃镜检查术的普遍开展, 患者在麻醉状态下无恶心、呕吐的表现, 有利于内镜医师仔细观察^[11-12]。有报道, 内镜窄带成像技术在诊断上具有一定的鉴别作用^[13-15]。

*H pylori*对胃黏膜具有特殊的侵袭力, HGM中也存在*H pylori*的感染, 但*H pylori*的感染与否与HGM慢性炎症发生及炎症的严重程度无明确相关性, 这可能由于*H pylori*在该部位是定居而非致病, 也可能唾液影响了HGM的微环境, 使

*H pylori*不能完全展现其活性和功能。本组研究中37% HGM伴*H pylori*感染, 其中HGM伴慢性炎症者中*H pylori*检出率为35.3%, 合并食管溃疡者未检出*H pylori*。HGM的病理组织学检查可见胃柱状上皮, 其中含有壁细胞和主细胞。胃底型、胃窦型和两者的过渡型都有报道, 本组研究中81.5%均为交界性胃黏膜。可有中性粒细胞和淋巴细胞的浸润, 周边的鳞状上皮多伴有轻到中度的慢性炎症存在。其他少见的病理表现为肠上皮化生、糜烂(或溃疡)、腺管的囊性扩张、壁细胞胞质水肿, 偶有双核浆细胞、浆细胞的结节样增生。结合症状和病理表现, 国外学者将HGM分型如下: (1)无症状, 无并发的病理形态改变的携带者; (2)有症状, 无并发的病理形态改变; (3)有并发病理形态改变并引起相应的症状; (4)恶化, 形成上皮内肿瘤; (5)进一步发展为上段食管腺瘤。

内镜检查时的经验、技巧和重视程度对HGM的检出率起着重要作用, 随着人们认识的提高, 内镜检查技术的完善, 以及活检的充分和准确, 可以降低误诊率, 并能确定病变的范围、位置及并发症程度, 为有针对性治疗提供了依据。对于该病通常的治疗原则是随访、对症处理、防治并发症及根治性治疗。

4 参考文献

- 唐宇, 马洪升. 食管上段胃黏膜异位症. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2865-2867
- Noguchi T, Takeno S, Takahashi Y, Sato T, Uchida Y, Yokoyama S. Primary adenocarcinoma of the cervical esophagus arising from heterotopic gastric mucosa. *J Gastroenterol* 2001; 36: 704-709
- von Rahden BH, Stein HJ, Becker K, Liebermann-Meffert D, Siewert JR. Heterotopic gastric mucosa of the esophagus: literature-review and proposal of a clinicopathologic classification. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 543-551
- 叶淑芳, 叶秀津. 先天性异位组织并食管溃疡20例内镜分析. 现代实用医学 2004; 16: 278-279
- Akbayir N, Alkim C, Erdem L, Sökmen HM, Sungun A, Başak T, Turgut S, Mungan Z. Heterotopic gastric mucosa in the cervical esophagus (inlet patch): endoscopic prevalence, histological and clinical characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 891-896
- 姜琼, 车筑萍, 后冬梅, 李娟. 食管异位胃黏膜的内镜诊断. 中国内镜杂志 2007; 13: 332-333
- 黄宣, 宋震亚, 钱可大, 孙爱武, 张奕茵, 赵振刚. 食管异位胃黏膜19例分析. 中华消化杂志 2004; 24: 248-249
- 麻树人, 潘汝明, 袁爱娇, 艾美娜. 食管异位胃黏膜23例报告及文献复习. 中华消化内镜杂志 2006; 23: 300-301
- 符宝敏, 谭红文, 库建伟. 食管癌742例的内镜检查及病理分析. 医学论坛杂志 2008; 29: 20-23
- De Angelis P, Trecca A, Francalanci P, Torroni F,

■名词解释

内镜窄带成像技术(NBI): 是一种全新的内镜下成像诊断技术, 更有效地显示黏膜表面的形态结构, 从而更加精确地引导活检, 因其观察到的图像类似染色剂染色的内镜图像, 故又称为“电子染色”内镜。

■同行评价

本文报道了27例食管胃黏膜异位症(HGM)内镜下表现特征及其病理学特点,并探讨了幽门螺杆菌与HGM的关系,有助于提高消化内镜医师对本病的诊断水平和认识。

- Federici Di Abriola G, Papadatou B, Ciofetta GC, Dall'Oglio L. Heterotopic gastric mucosa of the rectum. *Endoscopy* 2004; 36: 927
- 14 刘俊. 内镜窄带成像术在消化道疾病诊断中的作用. *临床消化病杂志* 2007; 19: 76-78
- 11 邵杰. 无痛胃镜诊断食管上段异位胃黏膜的临床分析(附10例报告). *中华临床医学研究杂志* 2008; 14: 163-164
- 15 Uedo N, Ishihara R, Iishi H, Yamamoto S, Yamamoto S, Yamada T, Imanaka K, Takeuchi Y, Higashino K, Ishiguro S, Tatsuta M. A new method of diagnosing gastric intestinal metaplasia: narrow-band imaging with magnifying endoscopy. *Endoscopy* 2006; 38: 819-824
- 12 薛凌, 王岩. 无痛胃镜与普通胃镜检查的对比研究. *中国实用医药* 2008; 3: 35-36
- 16 陈磊, 房殿春. 食管胃黏膜异位症. *中国消化内镜* 2008; 2: 27-29
- 13 Gheorghe C. Narrow-band imaging endoscopy for diagnosis of malignant and premalignant gastrointestinal lesions. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15: 77-82

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第九届全国消化系恶性病变介入诊疗研讨会暨内镜 / 介入新技术论坛征文通知

本刊讯 为满足临床一线医师对消化系病变介入新技术研究、探讨和交流的欲望,进一步提升国内消化系疾病尤其是消化系恶性病变介入诊治的技术水平,上海同仁医院联合河南省人民医院以及河南省新乡医学院第一附属医院,定于2009-11-06/11在河南省新乡市主办第九届全国消化系恶性病变介入诊疗研讨会暨内镜/介入新技术论坛。本次会议由河南省抗癌协会、河南省消化内镜学会、河南省医学会介入治疗专业分会具体承办,《中华放射学杂志》、《中华消化内镜学杂志》、《世界胃肠病学杂志》、《介入放射学杂志》、《微创医学杂志》以及《医学信息内科学杂志》共同参与协办。会议将着重介绍消化系病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法,为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台。本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管、胃肠道等消化系管腔内支架治疗应用技术和发生的问题以及消化系病变、门静脉高压、胆道结石等疾病的消化内镜、介入放射、内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨。会议还将邀请美国、德国和韩国专家介绍相关领域的技术进展并安排内容丰富的手术演示。参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分。

1 征文内容

(1)消化系恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等;(2)消化系良性病变,如:门静脉高压、胆管结石、消化系出血等的内镜及介入新技术应用;(3)消化系疾病诊治边沿交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验、个案报告等各类稿件。

2 投稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿,也可自荐,需全文;(2)论著需1000字以内的标准论文摘要,包括目的、方法、结果与结论四要素。经验交流、短篇报道等全文限1000字以内;(3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确,书写规范,稿件应是未发表过的论文。优秀论文将安排在国家级杂志上发表。(4)所有稿件一律要求电脑打印(Word格式),邮寄者需附软盘,特别鼓励用E-mail投稿(以附件Word格式);(5)截稿日期:2009-09-31。

3 联系方式

杨瑞民, 453100, 河南省卫辉市健康路88号, 新乡医学院第一附属医院介入科. y-rmin@163.com, 电话: 0373-4402942, 手机: 13903805978

梁宝松, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院内镜科. lbaosong@hotmail.com, 电话: 0371-65063502

贵州省安顺地区人群胃食管反流病流行病学调查

朱键, 周力, 王岚, 吕锐, 郑州云

朱键, 周力, 王岚, 吕锐, 郑州云, 贵州省贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550004

作者贡献分布: 此课题由朱键设计, 周力作指导; 资料收集由朱键、王岚、吕锐及郑州云收集; 数据分析与论文写作由朱键完成。

通讯作者: 朱键, 主治医师, 550004, 贵州省贵阳市北京路9号, 贵阳医学院附属医院消化内科, zhujian1972@163.com

收稿日期: 2009-04-27 修回日期: 2009-06-20

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Epidemiologic investigation of gastroesophageal reflux disease in the population of Anshun in Guizhou Province

Jian Zhu, Li Zhou, Lan Wang, Rui Lv, Zhou-Yun Zheng

Jian Zhu, Li Zhou, Lan Wang, Rui Lv, Zhou-Yun Zheng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Jian Zhu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 9 Beijing Road, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. zhujian1972@163.com

Received: 2009-04-27 Revised: 2009-06-20

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the prevalence of gastroesophageal reflux disease (GERD) in the population of Anshun in Guizhou Province.

METHODS: From July 2006 to December 2006, a face-to-face interview was carried out in a randomly sampled population of Anshun in Guizhou Province using a validated Chinese version of Reflux Disease Questionnaire (RDQ) to assess the prevalence of GERD. The SPSS14.0 software package was used to perform the Chi-square test and *t* test.

RESULTS: A total of 1692 residents (836 males and 856 females) were investigated. The response rate was 96.2%. The responders ranged in age from 10 to 87 years, with a mean age of 42.2 ± 15.3 years. The prevalence of GERD in the population of Anshun in Guizhou Province was 6.9% according to the definition (RDQ score ≥ 12). The prevalence of GERD in male was higher than that in female though no significant dif-

ference was found ($P > 0.05$). The prevalence of GERD rose with age ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The prevalence of GERD in the population of Anshun in Guizhou Province was higher than those reported in the populations of Guangdong Province, Beijing and Shanghai.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease, Epidemiological investigation; Anshun district

Zhu J, Zhou L, Wang L, Lv R, Zheng ZY. Epidemiologic investigation of gastroesophageal reflux disease in the population of Anshun in Guizhou Province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2087-2090

摘要

目的: 探讨贵州省安顺地区人群胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)的患病。

方法: 2006-07/2006-12采用中文版反流性疾病问卷(RDQ), 应用随机、整群、分层抽样方法对安顺地区人群进行调查。调查方式为面试, 所得资料均输入电脑, 建立数据库, 用SPSS14.0软件行卡方检验及*t*检验等。

结果: 被调查者共1692例(男836例, 女856例), 应答率96.2%; 年龄10-87(平均年龄 42.2 ± 15.3)岁。按RDQ评分(≥ 12)定义, 安顺地区人群GERD的患病率为6.9%。男性患病率高于女性, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 年龄分布, GERD的患病率随年龄增长而增高($P < 0.05$)。

结论: 贵州省安顺地区人群中GERD患病率明显高于广东省社区人群GERD患病率, 也高于北京、上海两地GERD患病率。

关键词: 胃食管反流病; 流行病学分析; 安顺地区

朱键, 周力, 王岚, 吕锐, 郑州云. 贵州省安顺地区人群胃食管反流病流行病学调查. *世界华人消化杂志* 2009; 17(20): 2087-2090

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2087.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease,

■背景资料

GERD是临床上常见的消化系统疾病, 其在西方国家人群中发病率较高, 据报道人群中约7%-15%可有胃食管反流症状; 北京协和医院1986年对3000例接受胃镜检查患者调查表明, RE占5.8%; 台湾一所医院对2044例患者行胃镜检查, 发现RE患病率为5%。鉴于对GERD诊断目前尚缺乏金标准, 国外提出依据症状作为初诊断, 而我国GERD研究协作组也于2003年建立了符合自己的RDQ诊断标准。

■同行评议者

黄晓东, 副主任医师, 武汉市中心医院消化内科

■ 研发前沿

GERD的诊断缺乏金标准,因此国外提出依据症状作为初诊断,在此基础上提出的RDQ证实对GERD诊断有帮助。

GERD)是指胃十二指肠内容物非生理性逆流食管等处,造成食管及食管以外组织化学性炎症性改变,并引起烧心、反酸、反食、胸骨后疼痛等症状的疾病。GERD又被分为糜烂性和非糜烂性2种:糜烂性GERD是指患者食管黏膜有组织病理学损伤改变者,即反流性食管炎(reflux esophagitis, RE);非糜烂性GERD是指内镜下不能发现食管黏膜破损,但相关检查证实存在病理性胃-食管反流者,又称为非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)^[1]。GERD是临床上常见的消化系疾病,其在西方国家人群中发病率较高,据报道人群中约7%-15%可有胃食管反流症状^[2];北京协和医院1986年对3000例接受胃镜检查患者调查表明,RE占5.8%^[3];台湾一所医院对2044例患者行胃镜检查,发现RE患病率为5%^[4]。鉴于对GERD诊断目前尚缺乏金标准,国外提出依据症状作为初诊断^[5],而我国GERD研究协作组也于2003年建立了符合自己的RDQ诊断标准^[6]。本次研究采用该标准,对我院在安顺地区门诊就诊人群中进行调查,探讨该人群GERD患病情况。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-07/12采用随机整及分层抽样方式,对安顺地区的10岁以上,男女不限,有小学以上文化水平,可独立阅读填写问卷的患者进行调查;被调查者就诊前4 wk内未服用过任何止酸药或胃动力药物。调查结束后,选择部分被调查者的问卷由另人复核,正确率为96.2%。

1.2 方法

1.2.1 调查:采用我国GERD研究协作组2003-11推出的反流性疾病问卷(reflux disease questionnaire, RDQ)为基础,以面试方式,由调查人员详细记录。调查人员由消化内科医师组成。

1.2.2 问卷内容:问卷所涉及内容包括被调查者在过去4 wk中发生烧心、反酸、反食、胸骨后疼痛4种上消化系症状的频率和程度予以评分。其中发生频率计分按无症状为0分,症状出现频率<1、1、2-3、4-5以及6-7 d/wk分别记为1、2、3、4、5分。症状程度计分:症状不明显,在医生提醒下发现为1分;症状明显,影响日常生活,偶尔服药为3分;症状非常明显,影响日常生活,需要长期服药治疗为5分。症状介于1分和3分之间为2分,介于3分和5分之间为4分。症状频率计分加程度计分总分最高可达40分。以RDQ分值12分为GERD流行病学调查的筛选临界值^[6]。

统计学处理 将调查资料输入电脑建立数据库,患病率由百分率表示。统计分析由SPSS14.0软件处理。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RDQ评分分布 在1692例调查者中,烧心、反酸、反食、胸骨后疼痛4种上消化系症状的频率和程度评分分布为1000例(59.1%)为0分,396例(23.4%)为1-5分,180例(10.6%)为6-11分,94例(5.6%)为12-20分,22例(1.3%)为21-40分;以12分作为GERD流行病学调查的筛选临界值^[4],在我院安顺地区人群中GERD患病率为6.9%。各年龄段及性别GERD患病情况:在1692例被调查者中,其中男性836例,GERD患病者为63例;女性856例,GERD患者为53例。具体各年龄段及性别GERD患病分布情况见表1。男性患病率略高于女性,但两者无统计学差异($P>0.05$);GERD患病率随年龄增长而增高($P<0.05$),60岁以上者患病率达12.9%,为相对高发人群。

2.2 各种反流症状患病率 在1692例被调查者中反食症状至少每月、每周、每日出现1次的患病率为10.0%,5.4%,0.7%;反酸至少每月、每周、每日出现1次的患病率为22.5%,7.9%,2.8%(表2);胸骨后疼痛症状至少每月、每周、每日出现1次的患病率为8.7%,3.1%,0.4%;烧心至少每月、每周、每日出现1次的患病率为7.4%,2.8%,0.5%;其中反流症状以反酸最为常见,而胸骨后疼痛,反食症状的患病率高于烧心症状。

3 讨论

GERD是临床上的一种常见病,该病在西方国家人群中发病率较高,据报道人群中约7%-15%可有胃食管反流症状^[2]。在我国,1999年潘国宗 *et al*^[7]对北京和上海两地常住居民的GERD流行病学调查报告显示其人群患病率达5.77%;近年在广东省社区人群中的1项流行病学的调查中显示其患病率为2.5%^[8]。但对于西南地区的GERD的患病情况未见报道。

GERD的诊断缺乏金标准,因此国外提出依据症状作为初诊断^[5];在此基础上提出的RDQ证实对GERD诊断有帮助^[9];我科室应用我国的RDQ诊断标准自2006-07/12应用随机、整群、分层抽样方法,对安顺地区人群进行GERD流行病学调查;调查采用面试方式,由我科室专业医护人员承担调查任务,并选择部分被调查者的

表 1 患者各年龄段及性别GERD症状分布

| 年龄组(岁) | 男 | | | 女 | | |
|--------|-----|------|--------|-----|------|--------|
| | n | GERD | 患病率(%) | n | GERD | 患病率(%) |
| 10-19 | 42 | 1 | 2.4 | 64 | 1 | 1.6 |
| 20-39 | 358 | 20 | 5.6 | 368 | 16 | 4.4 |
| 40-59 | 310 | 26 | 8.4 | 286 | 18 | 6.3 |
| 60- | 126 | 16 | 12.7 | 138 | 18 | 13.0 |

■应用要点

在临床工作中如遇胸骨后疼痛而就诊者, 在排除心源性胸痛的情况下, 应注意对GERD的诊断。

表 2 患者各年龄段反食、反酸、烧心及胸骨后疼痛时间段内至少发生1次的百分比n(%)

| 年龄组(岁) | 反食 | | | 反酸 | | | 烧心 | | | 胸骨后疼痛 | | |
|--------|--------|---------|----------|---------|----------|-----------|--------|---------|----------|--------|---------|---------|
| | 每日 | 每周 | 每月 | 每日 | 每周 | 每月 | 每日 | 每周 | 每月 | 每日 | 每周 | 每月 |
| 10-19 | 0(0.0) | 2(1.9) | 8(7.5) | 2(1.9) | 6(5.7) | 20(18.9) | 0(0.0) | 4(3.8) | 6(5.7) | 0(0.0) | 0(0.0) | 8(7.5) |
| 20-39 | 4(0.6) | 40(5.5) | 68(9.4) | 16(2.2) | 54(7.4) | 154(21.2) | 2(0.3) | 18(2.5) | 38(5.2) | 2(0.3) | 10(1.4) | 60(8.3) |
| 40-59 | 6(1.0) | 36(6.0) | 60(10.1) | 18(3.0) | 46(7.7) | 144(24.2) | 2(0.3) | 18(3.0) | 60(10.1) | 2(0.3) | 26(4.4) | 56(9.4) |
| 60- | 2(0.8) | 14(5.3) | 34(12.9) | 12(4.5) | 28(10.6) | 62(23.5) | 4(1.5) | 8(3.0) | 22(8.3) | 2(0.8) | 16(6.1) | 24(9.1) |

问卷由另人复核, 正确率为96.2%。

本次调查发现, 安顺地区人群GERD的患病率为6.9%, 明显高于广东省社区人群GERD患病率^[8], 也高于北京、上海两地常住人群的GERD患病率(5.77%)^[7], 但明显低于Locke *et al*对美国明尼苏达州Olmsted镇社区居民的GERD患病率(19.8%)^[10], 可能与当地人喜进食辣椒, 过咸食品; 饮食习惯以火锅为主, 这种过辣、过咸、过烫食物无疑对食管上皮是损伤, 削弱了食管防御机制, 引起食管上皮完整性破坏, 有研究表明GERD的发生与食管黏膜细胞间隙增宽有密切关系^[11-12], 导致食管黏膜酸暴露机率增加, 引起GERD的患病机会增多。与另一方面本次调查是针对安顺地区人群所作的一项流行病学调查, 其中一部分患者是有明显反流症状而就诊, 因此, 本次调查结果高于国内其他地区调查结果; 在西方国家因为其脂肪摄入量大于我国人群, 再者西方人最大及基础酸分泌量也大于我国人群, 因此, 西方国家GERD患病率高。本次调查发现, GERD患病率随年龄增加而增加($P<0.05$), 不同于广东省社区人群各年龄段GERD患病率差异无统计学意义($P>0.05$)^[8]; 考虑食管下括约肌张力性收缩随年龄增加而减弱, 导致反流增加; 另一方面, 膈肌肌张力随年龄增加而减弱也是中、老年GERD增加的因素。研究证明, 心理因素与GERD患者的躯体症状相关^[13], 而老年GERD患者的心理健康水平明显低于正常人群^[14]。因此老年人心理因素也是引起老年GERD高患病率的合理的解释之一。调查中的男女

GERD患病率无明显差异($P>0.05$), 与广东省社区人群GERD流行病学调查相同^[8]。本次研究显示, 反流症状以反酸最为多见, 而以胸骨后疼痛为主要反流症状的患者也不少见(每周至少出现1次的患病率为3.1%, 因此在临床工作中如遇胸骨后疼痛而就诊者, 在排除心源性胸痛的情况下, 应注意对GERD的诊断。同时GERD患者还可表现为食管外症状, 尤其是老年人, 有研究表明, 患GERD的老年人食管外症状明显高于其他年龄段患者^[15]。因此对有咽喉痛, 牙龈炎, 夜间呛咳, 不明原因哮喘, 气管炎的老年人患者, 应注意GERD。

4 参考文献

- 1 萧树东. 上海仁济医院消化内科专题讲座. 第1版. 郑州: 郑州大学出版社, 2005: 1-7
- 2 Nebel OT, Fornes MF, Castell DO. Symptomatic gastroesophageal reflux: incidence and precipitating factors. *Am J Dig Dis* 1976; 21: 953-956
- 3 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学(上册). 第1版. 北京: 科学出版社, 1994: 729-739
- 4 Chang CS, Poon SK, Lien HC, Chen GH. The incidence of reflux esophagitis among the Chinese. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 668-671
- 5 Klauser AG, Schindlbeck NE, Müller-Lissner SA. Symptoms in gastro-oesophageal reflux disease. *Lancet* 1990; 335: 205-208
- 6 中国胃食管反流病研究协作组. 反流性疾病问卷在胃食管反流病诊断中的价值. *中华消化杂志* 2003; 23: 651-654
- 7 潘国宗, 许国铭, 郭惠平, 柯美云, 韩少梅, 李兆申, 方秀才, 邹多武, 鲁素彩, 刘婧. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查. *中华消化杂志* 1999; 19: 223-226
- 8 熊理守, 陈旻湖, 陈惠新, 许岸高, 贺龙君, 胡品津. 广东省社区人群胃食管反流病流行病学研究. *中华消化*

■同行评价

本文研究的内容较重要,具有一定的新颖性,学术价值较好.

- 杂志 2006; 26: 239-242
- 9 Shaw MJ, Talley NJ, Beebe TJ, Rockwood T, Carlsson R, Adlis S, Fendrick AM, Jones R, Dent J, Bytzer P. Initial validation of a diagnostic questionnaire for gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 52-57
- 10 Locke GR 3rd, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ 3rd. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997; 112: 1448-1456
- 11 Caviglia R, Ribolsi M, Maggiano N, Gabbrielli AM, Emerenziani S, Guarino MP, Carotti S, Habib FI, Rabitti C, Cicala M. Dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in nonerosive reflux disease patients with physiological esophageal acid exposure. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 543-548
- 12 Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi G, Areni A, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 525-532
- 13 Wright CE, Ebrecht M, Mitchell R, Anggiansah A, Weinman J. The effect of psychological stress on symptom severity and perception in patients with gastro-oesophageal reflux. *J Psychosom Res* 2005; 59: 415-424
- 14 李军, 李严严, 张丽娟, 朱宇欣. 老年胃食管反流病患者心理健康评估和干预157例. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1685-1687
- 15 高彦, 陈绳武, 蓝宇. 老年GERD患者临床表现疗效对比分析. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2045-2047

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-18)

卡巴胆碱治疗创伤和感染后胃肠功能障碍78例

邱方, 李志强, 安媛

邱方, 李志强, 安媛, 华北煤炭医学院附属医院 河北省唐山市 063000

作者贡献分布: 此课题由邱方设计与指导; 研究过程由邱方、李志强及安媛共同完成; 数据分析由李志强完成; 论文写作由邱方与李志强完成。

通讯作者: 李志强, 主治医师, 063000, 河北省唐山市建设南路73号, 华北煤炭医学院附属医院ICU. lzq671@sina.com

电话: 0315-2763043

收稿日期: 2009-04-07 修回日期: 2009-05-18

接受日期: 2009-05-25 在线出版日期: 2009-07-18

Treatment of severe trauma- or infection-induced gastrointestinal dysfunction with carbachol: an analysis of 78 cases

Fang Qiu, Zhi-Qiang Li, Yuan An

Fang Qiu, Zhi-Qiang Li, Yuan An, Department of Intensive Care, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Correspondence to: Dr. Zhi-Qiang Li, Department of Intensive Care, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China. lzq671@sina.com

Received: 2009-04-07 Revised: 2009-05-18

Accepted: 2009-05-25 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of carbachol in the treatment of gastrointestinal dysfunction induced by severe trauma or infection.

METHODS: One hundred and forty intensive care unit (ICU) patients selecting from three hospitals in Tangshan City were randomly divided into two groups: carbachol treatment group ($n = 78$) and mosapride citrate treatment group ($n = 62$). Intestinal pneumatosis and hydrops, gastrointestinal dysfunction scores and overall response rate were observed. The activity of plasma diamine oxidase (DAO) and the content of serum *D*-lactic acid were determined at 0, 24, 48 and 72 hours and on day 7 after treatment, respectively.

RESULTS: Compared to the mosapride citrate treatment group, patients in the carbachol treatment group showed a significant improve-

ment in intestinal pneumatosis and hydrops ($P < 0.05$), a significant decrease in gastrointestinal dysfunction scores ($P < 0.05$), an obvious increase in overall response rate (43.6% vs 62.8%, $P < 0.05$), as well as a significant decline in the activity of DAO and the contents of serum *D*-lactic acid and endotoxin on day 7 after treatment ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Carbachol can decrease the activity of plasma DAO and the levels of serum *D*-lactic acid and endotoxin, and improve intestinal function in patients with severe trauma- or infection-induced gastrointestinal dysfunction.

Key Words: Carbachol; Critical care; Multiple organ dysfunction syndrome; Randomized controlled trial

Qiu F, Li ZQ, An Y. Treatment of severe trauma- or infection-induced gastrointestinal dysfunction with carbachol: an analysis of 78 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2091-2095

摘要

目的: 研究卡巴胆碱治疗创伤和感染后胃肠功能障碍的有效性和安全性。

方法: 选取2007-02/2008-02唐山市3家三级医院ICU重症患者140例, 随机分为卡巴胆碱组($n = 78$)和莫沙比利组($n = 62$)。观察患者治疗前(0 h)、治疗后24, 48, 72 h及7 d的肠管积气、积液、胃肠功能评分、临床总有效率和血清二胺氧化酶(DAO)、*D*-乳酸和内毒素水平变化。

结果: 与莫沙比利组比较, 治疗后卡巴胆碱组患者肠管积气/积液明显改善($P < 0.05$), 第7天胃肠功能评分明显降低($P < 0.05$), 临床总有效率显著提高(62.8% vs 43.6%, $P < 0.05$)。血清DAO、*D*-乳酸和内毒素水平第7天均明显低于莫沙比利组($P < 0.05$)。

结论: 卡巴胆碱可以降低创伤和感染重症患者血清DAO、*D*-乳酸和内毒素水平, 改善肠积气, 降低胃肠功能评分, 具有胃肠功能保护作用。

背景资料

肠道既是“细菌库”, 又是创伤和感染后的“炎症介质库”, 肠黏膜损伤后, 大量细菌、内毒素和炎症因子进入体内, 容易导致MODS的发生。“胆碱能抗炎通路”是近年来发现治疗脓毒症和MODS的新途径。动物实验研究表明, 卡巴胆碱不但能促进胃肠运动, 还具有强大的抗炎和减轻肠道缺血再灌注损伤的作用。本研究拟探讨卡巴胆碱治疗创伤或感染重症患者胃肠功能障碍的有效性和安全性。

同行评议者
彭曦, 副研究员, 重庆市西南医院烧伤研究所

■相关报道

国内外大量动物实验研究报道了卡巴胆碱能够抑制组织和血清细胞因子和炎症介质的释放,减少肠上皮细胞和淋巴细胞的凋亡,增加胃肠血流,促进胃肠蠕动,保护肠屏障功能。但卡巴胆碱在重症患者中的应用尚未见报道。

关键词: 卡巴胆碱; 危重患者医疗; 多器官功能障碍综合征; 随机对照试验

邱方, 李志强, 安媛. 卡巴胆碱治疗创伤和感染后胃肠功能障碍78例. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2091-2095
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2091.asp

0 引言

胃肠功能障碍是严重创伤或感染后常见的并发症,也是导致ICU患者发生多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)和死亡的重要诱因之一,但临床对严重创伤或感染后胃肠功能障碍尚缺乏有效的药物和治疗手段^[1]。卡巴胆碱作为一种强力拟胆碱药,具有促进胃肠动力、扩张血管、增加腺体分泌等功能。近年研究表明,卡巴胆碱能抑制休克及肠缺血动物中TNF- α 产生,减轻肠黏膜炎症反应和病理损害^[2-3]。本研究拟通过随机临床对照试验,探讨卡巴胆碱治疗创伤或感染重症患者胃肠功能障碍的有效性和安全性。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2007-02/2008-02唐山市3家三级医院ICU患者140例。卡巴胆碱注射液由山东博士伦福瑞达制药有限公司生产,规格为0.1 g/L。莫沙比利片,规格每片5 mg。血清DAO、D-乳酸分别采用黎君友 *et al*^[6]和Brandt *et al*^[7]建立的分光度法测定。内毒素采用姚咏明 *et al*^[8]建立的鲎试剂显色法进行定量检测。

1.2 方法

1.2.1 患者纳入及排除标准: (1)纳入标准:有引起胃肠缺血及/或胃肠功能障碍的急性诱因;符合全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的诊断标准^[4];胃肠功能损伤评分^[5]≥1分;年龄18-80岁。(2)排除标准:近1 wk使用过促胃肠动力和抗胆碱药物;胃肠切除术后或胃肠道有原发性损伤;有明确或可疑肠梗阻;胃肠化学毒性损伤;慢性疾病引发的胃肠功能障碍;恶性肿瘤晚期;人类免疫缺陷病毒感染;系统性红斑狼疮; Glasgow评分≤6分;严重心血管疾病包括心律不齐、心动过缓、低血压等;迷走神经兴奋、癫痫、甲亢、帕金森病;支气管哮喘、消化系溃疡或尿路梗阻;孕妇或哺乳期妇女等。

1.2.2 治疗方案:研究对象按统一随机信封分为卡巴胆碱组($n = 78$)和莫沙比利组($n = 62$)。莫沙比利每次5 mg,每日3次,疗程7 d。卡巴胆碱每次

表 1 患者临床特征

| | 卡巴胆碱组 | 莫沙比利组 |
|--------------|-----------|-----------|
| 性别(男/女) | 49/29 | 40/22 |
| 年龄(岁) | 51.2±11.9 | 49.6±12.7 |
| APACHE II 评分 | 19.8±6.7 | 21.2±8.1 |
| Marshall评分 | 13.5±5.1 | 14.1±4.8 |
| 临床诊断(n) | | |
| 严重感染 | 35 | 38 |
| 严重胸腹部创伤 | 6 | 7 |
| 重症胰腺炎 | 4 | 4 |
| 心肺复苏 | 3 | 6 |
| 胸部及心血管大手术 | 4 | 5 |
| 严重单纯颅脑损伤 | 5 | 7 |
| 颅脑创伤合并严重四肢损伤 | 1 | 2 |
| 外伤后合并脓毒性休克 | 3 | 4 |
| 并发症(n) | | |
| MODS | 3 | 4 |
| ARDS | 6 | 4 |
| DIC | 2 | 2 |
| ARF | 3 | 2 |
| 心脏功能损伤 | 3 | 4 |
| 肝损伤 | 8 | 6 |

ARDS: 急性呼吸窘迫综合征; DIC: 弥散性血管内凝血; ARF: 急性肾衰竭。

0.2 mg/kg, 每日2次, 疗程7 d, 经胃管给药; 若用药第3天仍无排气排便, 药物用量加倍。

1.2.3 疗效指标观察:于治疗前(0 h), 治疗后24、48、72 h及7 d或患者死亡前进行疗效判定。临床指标包括治疗前、后患者腹部B超肠管积气、积液, 胃肠功能评分, 临床总有效率(有排便且肠鸣音恢复正常为显效; 有排便但肠鸣音未完全恢复为有效; 无排便为无效)。生化指标包括不同观察时间血清DAO、D-乳酸和内毒素水平变化。不良反应包括严重腹泻、胃肠痉挛或疼痛、呕吐、面色潮红、心律不齐或心动过缓、新出现的哮喘、流涎等。观察期间出现药物不良反应时立即停止用药并将该病例从研究中剔除。

统计学处理 应用SPSS13.0软件进行统计学处理。定量数据以mean±SD表示。患者年龄、APACHE II 评分、Marshall评分和同一时间点血清DAO、D-乳酸、内毒素水平变化采用成组设计定量资料的 t 检验。患者性别、临床诊断及并发症、肠积气和总有效率比较采用 χ^2 检验。胃肠功能评分变化采用单向有序分类变量的Wilcoxon秩和检验。血清DAO、D-乳酸和内毒素水平与治疗前(0 h)的两两比较采用Donnett

表 2 两组患者不同观察时间胃肠功能评分的变化 (*n*)

| 分组 | 0 h(分) | | | | 24 h(分) | | | | 48 h(分) | | | | 72 h(分) | | | | 7 d(分) | | | |
|-------|--------|---|----|----|---------|---|----|----|---------|----|----|----|---------|----|----|----|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 卡巴胆碱组 | 0 | 6 | 18 | 54 | 2 | 3 | 35 | 38 | 3 | 4 | 41 | 30 | 9 | 23 | 33 | 13 | 19 ^a | 34 ^a | 24 ^a | 1 ^a |
| 莫沙比利组 | 1 | 3 | 23 | 35 | 1 | 5 | 21 | 35 | 1 | 11 | 33 | 17 | 9 | 17 | 31 | 5 | 14 | 22 | 23 | 3 |

^a $P < 0.05$ vs 莫沙比利组.

表 3 不同观察时间患者血清DAO活性的变化 (mean \pm SD, kU/L)

| 分组 | <i>n</i> | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 7 d |
|-------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 卡巴胆碱组 | 78 | 5.10 \pm 1.28 | 4.89 \pm 1.13 | 4.37 \pm 1.21 | 3.05 \pm 1.42 ^{ac} | 3.39 \pm 1.37 ^{ac} |
| 莫沙比利组 | 62 | 5.13 \pm 1.20 | 4.86 \pm 1.20 | 4.71 \pm 1.24 | 4.38 \pm 1.33 | 4.59 \pm 1.21 |

^a $P < 0.05$ vs 莫沙比利组; ^c $P < 0.05$ vs 0 h.

表 4 不同观察时间患者血清D-乳酸的变化 (mean \pm SD, mg/L)

| 分组 | <i>n</i> | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 7 d |
|-------|----------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 卡巴胆碱组 | 78 | 17.38 \pm 4.06 | 15.66 \pm 6.80 | 12.67 \pm 3.08 ^c | 11.37 \pm 2.71 ^c | 8.65 \pm 3.10 ^{ac} |
| 莫沙比利组 | 62 | 14.84 \pm 3.12 | 12.88 \pm 4.13 | 12.65 \pm 4.03 | 13.75 \pm 4.27 | 17.09 \pm 4.56 ^c |

^a $P < 0.05$ vs 莫沙比利组; ^c $P < 0.05$ vs 0 h.

*t*检验. $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义. 对剔除或脱落病例, 采用意向性分析(intention-to-treat, ITT).

2 结果

2.1 患者基本特征 2组患者性别、年龄、APACHE II评分、Marshall评分及致伤因素无显著性差异 ($P > 0.05$). 无退出、剔除和脱落病例(表1).

2.2 肠积气变化 卡巴胆碱组治疗后肠积气消失16例, 莫沙比利组5例, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

2.3 胃肠功能评分 胃肠功能评分治疗前2组患者均较高, 差异无统计意义; 治疗72 h后均下降, 但无统计学差异; 第7天卡巴胆碱组较莫沙比利组胃肠功能评分明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表2).

2.4 总有效率 卡巴胆碱组显效19例, 有效30例, 无效29例, 总有效率62.8%; 莫沙比利组显效共10例, 有效17例判定为, 无效35例, 总有效率43.6%. 2组间总有效率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

2.5 不良反应 研究期间无不良反应病例发生.

2.6 血清DAO变化 2组患者治疗前血清DAO水平无差异, 治疗72 h后卡巴胆碱组血清DAO水平下降明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而莫沙比利组血清DAO水平第7天下降仍不明显(表3).

2.7 血清D-乳酸变化 2组患者治疗前血清D-乳酸水平无明显差异, 治疗后莫沙比利组血清D-乳酸水平经过短暂的下降后又升高, 卡巴胆碱组血清D-乳酸水平持续下降(表4).

2.8 血清内毒素变化 治疗前2组患者血清内毒素水平无统计学差异. 治疗后2组患者血清内毒素水平均下降, 但卡巴胆碱组下降较莫沙比利组明显, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05$, 表5).

3 讨论

卡巴胆碱是一种强力拟胆碱药, 能同时兴奋M样和N样受体, 兴奋M样受体具有促进胃肠动力、扩张血管的作用, 以往临床用于胃肠胀气及尿滞留等. 根据“胆碱能抗炎通路理论(cholinergic anti-inflammatory pathway)”^[9], 近年我们对卡巴胆碱兴奋N样受体的作用作了深入研究, 证明卡巴胆碱能结合细胞膜上的胆碱能受体 $\alpha 7$ 亚单位, 发挥着有效的抗炎作用^[10], 抑制肠缺血-再灌注

■ 创新盘点

本文采用前瞻性随机对照的研究设计, 观察了卡巴胆碱治疗创伤或感染后胃肠功能障碍患者的临床有效性和安全性.

应用要点

本研究显示卡巴胆碱胃肠内给药治疗严重创伤和感染后重症患者的胃肠功能障碍安全有效,值得临床推广。进一步的研究应延长观察时间,纳入更多如死亡率、住院时间等客观观察指标。

表 5 不同观察时间患者血清内毒素的变化 (mean ± SD, EU/ml)

| 分组 | n | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 7 d |
|-------|----|---------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 卡巴胆碱组 | 78 | 0.281 ± 0.065 | 0.264 ± 0.087 | 0.229 ± 0.083 ^{ac} | 0.182 ± 0.066 ^{ac} | 0.111 ± 0.059 ^{ac} |
| 莫沙比利组 | 62 | 0.260 ± 0.054 | 0.300 ± 0.073 ^c | 0.279 ± 0.091 | 0.271 ± 0.091 | 0.196 ± 0.055 ^c |

^aP<0.05 vs 莫沙比利组; ^cP<0.05 vs 0 h.

大鼠肠组织和血清TNF- α 含量及IL-6等促炎症因子的释放,减轻休克和肠缺血时肠道局部和全身脏器功能损害^[11-12]。

在严重创伤、休克和感染等疾病危重状态下,胃肠道作为应激反应的中心器官,常处于严重缺血和麻痹状态,患者表现为肠管积气、积液,胃肠功能评分增加。由于肠黏膜屏障受损,DAO、D-乳酸和内毒素等肠道中固有物质大量释放,使血清中DAO、D-乳酸和内毒素含量明显升高。肠内细菌和内毒素等发生移位,进一步激活循环及组织中炎症细胞,放大全身炎症反应,诱发脓毒症和MODS的发生。本研究中ICU重症患者均出现不同程度的肠管积气、积液,胃肠功能评分增加及血清DAO、D-乳酸和内毒素含量明显升高。

本研究结果显示,卡巴胆碱在改善严重创伤和感染重症患者肠管积气、积液,降低胃肠功能评分和提高临床总有效率等方面明显均优于莫沙比利组,卡巴胆碱组血清DAO、D-乳酸和内毒素的含量也显著低于莫沙比利组。卡巴胆碱改善创伤和感染后胃肠功能障碍的机制可能包括以下方面: (1)增加胃肠黏膜血流,改善休克或缺血引起的胃肠功能障碍^[13]; (2)促进胃肠道蠕动,改善肠缺血引起的肠麻痹^[14]; (3)抑制白细胞活化和促炎细胞因子的产生和释放,减轻胃肠道局部及全身失控炎症反应^[15-16]; (4)抑制肠缺血时肠上皮细胞和淋巴细胞的凋亡,保护肠黏膜屏障^[17]; (5)抑制胃肠道局部及全身过氧化反应和氧自由基损伤^[18]。卡巴胆碱的治疗效果可能是以上综合作用的结果。

根据药物使用说明,卡巴胆碱静脉大剂量应用时可对呼吸、心率、血压等产生一定的抑制。而本研究中,肠道给予卡巴胆碱后患者并未出现不良反应现象,提示用该剂量鼻饲安全可靠。

本研究亦存在不足,如观察时间偏短,应延长到肠道屏障功能完全恢复;未将死亡率、住院时间等纳入观察指标;评价胃肠功能恢复状态时可能存在测量偏倚的影响等。

总之,本研究显示卡巴胆碱胃肠内给药对改善严重创伤和感染后重症患者的胃肠功能障碍、保护胃肠黏膜的完整性和减轻炎症损害,具有积极的作用。

致谢:感谢中国人民解放军304医院全军烧伤研究所胡森教授对本研究的悉心指导。

4 参考文献

- Hassoun HT, Kone BC, Mercer DW, Moody FG, Weisbrodt NW, Moore FA. Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 2001; 15: 1-10
- 邹晓防, 周国勇, 胡森, 吕艺, 黎君友, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血再灌注大鼠肠黏膜组织炎症反应和血流量的影响. 第八届全国烧伤外科学年会论文汇编 2007: 99-101
- 吕艺, 姜小国, 曹卫红, 白玉梅, 孙丹, 胡森, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠缺血-再灌流动物脏器功能的保护作用. *中华急诊医学杂志* 2006; 15: 228-231
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874
- 王今达, 王宝恩. 多脏器功能失常综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准(经庐山'95全国危重病急救医学学术会讨论通过). *中国危重病急救医学* 1995; 7: 346-347
- 黎君友, 于燕, 郝军, 晋桦, 许惠君. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性. *氨基酸和生物资源* 1996; 18: 28-30
- Brandt RB, Siegel SA, Waters MG, Bloch MH. Spectrophotometric assay for D-(-)-lactate in plasma. *Anal Biochem* 1980; 102: 39-46
- 姚咏明, 田惠民, 王亚平, 于燕, 施志国, 盛志勇. 过氧酸新法预处理血浆定量检测微量内毒素的鲎试验方法及其应用. *检验医学* 1993; 8: 31-33
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462
- 胡森, 周国勇, 吕艺, 宋琪, 邹晓防, 盛志勇. 卡巴胆碱对脂多糖刺激巨噬细胞释放炎症细胞因子的影响及其受体研究. *中国药理学通报* 2007; 23: 1575-1579
- 白玉梅, 胡森, 刘秀华, 曹卫红, 黎君友, 孙丹, 吕艺. 卡巴胆碱对肠部分缺血-再灌注损伤家兔血浆促炎细胞因子含量的影响及对烧伤后防治的意义. *中国临床康复* 2004; 8: 2684-2685
- 邹晓防, 林凯, 吕艺, 黎君友, 陆江阳, 胡森, 盛志勇. 缺血-再灌注时卡巴胆碱对大鼠肠上皮细胞的保护作用

- 用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 625-628
- 13 周洁平, 刘欣茹, 王海滨, 于勇, 邱方, 吴静, 牛梅梅, 胡森. 卡巴胆碱对烫伤休克大鼠脏器血流量的影响. 创伤外科杂志 2008; 10: 64-66
- 14 胡森, 郝波, 车晋伟, 耿世佳, 吴静, 杜颖, 盛志勇. 卡巴胆碱对大鼠烫伤休克早期口服补液时胃排空和胃血流量的影响. 解放军医学杂志 2007; 32: 1142-1144
- 15 吕艺, 牛梅梅, 周洁萍, 胡森. 卡巴胆碱减轻肠缺血/再灌注大鼠中性粒细胞活化和多器官损伤. 中国药物与临床 2008; 8: 770-773
- 16 胡森, 姜小国, 石德光, 吕艺, 黎君友, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血再灌注损伤时肠道局部炎症反应的影响. 中国危重病急救医学 2003; 15: 748-750
- 17 胡森, 邹晓防, 吕艺, 陆江阳, 盛志勇. 肠缺血/再灌注时卡巴胆碱对肠上皮细胞凋亡的影响. 中国危重病急救医学 2007; 19: 463-466
- 18 邹晓防, 胡森, 吕艺, 孙娜, 石新慧, 李泽峰, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠上皮细胞氧化损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1273-1275

■同行评价

本研究紧密结合临床实际, 课题设计合理, 指标选择较恰当, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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 2009-07-18)

IL-21诱导自身免疫性肝炎患者促炎症细胞因子分泌

王修齐, 刘嫦钦, 刘占举

■背景资料

研究发现IL-21参与了多种自身免疫性疾病的发生, 如炎症性肠病、系统性硬化、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和糖尿病等。本课题重点探讨IL-21R在AIH患者外周血淋巴细胞上的表达及其免疫病理作用。

王修齐, 河南省人民医院消化内科 河南省郑州市 450003
刘嫦钦, 刘占举, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科 上海市 200072
教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NECT-05-0609
作者贡献分布: 此课题由刘占举设计; 实验操作与论文写作由王修齐与刘占举完成。
通讯作者: 刘占举, 教授, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科. zhanjuliu@yahoo.com
电话: 021-66301164
收稿日期: 2009-04-28 修回日期: 2009-06-05
接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-18

IL-21 induces the secretion of proinflammatory cytokines in patients with autoimmune hepatitis

Xiu-Qi Wang, Chang-Qin Liu, Zhan-Ju Liu

Xiu-Qi Wang, Department of Gastroenterology, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Chang-Qin Liu, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Supported by: the New Century Talent Supporting Scheme Projects of the Ministry of Education, No. NECT-05-0609

Correspondence to: Professor Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China. zhanjuliu@yahoo.com
Received: 2009-04-28 Revised: 2009-06-05

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To detect the expression of IL-21 receptor (IL-21R) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with autoimmune hepatitis (AIH) and analyze the secretion of proinflammatory cytokines (e.g., TNF- α , IFN- γ and IL-2) in cultured PBMCs stimulated with IL-21.

METHODS: Peripheral blood samples were collected from 21 AIH patients and 25 healthy controls, respectively. The expression of IL-21R in CD4⁺ and CD8⁺ T cells was examined by flow cytometry. After cultured PBMCs were stimulated with IL-21 and anti-CD3, the secretion of cytokines was examined by ELISA.

RESULTS: IL-21R was significantly upregulated in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (7.66% \pm 2.37%

vs 3.12% \pm 0.76% and 9.42% \pm 2.48% vs 4.02% \pm 0.89%, respectively; both $P < 0.05$). After stimulation with IL-21 and anti-CD3, the levels of secreted TNF- α , IFN- γ and IL-2 in PBMCs from AIH patients were significantly higher than those in PBMCs from healthy controls ($P < 0.05$).

CONCLUSION: IL-21R is highly expressed in T cells from AIH patients, and IL-21 is able to induce the secretion of proinflammatory cytokines, suggesting that IL-21 is involved in the process of tissue injury in AIH.

Key Words: Autoimmune hepatitis; Peripheral blood mononuclear cell; T cell; Interleukin-21; Receptor

Wang XQ, Liu CQ Liu ZJ. IL-21 induces the secretion of proinflammatory cytokines in patients with autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2096-2098

摘要

目的: 探讨IL-21在自身免疫性肝炎(AIH)发生过程中的免疫病理作用。

方法: 采集21例AIH患者和25例健康成人外周血样本, 使用流式细胞仪检测PBMC表面IL-21R的表达。培养外周血单核淋巴细胞(PBMC), 使用IL-21和抗CD3单抗刺激, 使用ELISA检测上清液中TNF- α 、IFN- γ 和IL-2水平。

结果: AIH患者外周血中CD4⁺、CD8⁺ T细胞表达IL-21R水平比健康对照者显著升高(7.66% \pm 2.37% vs 3.12% \pm 0.76%, 9.42% \pm 2.48% vs 4.02% \pm 0.89%, 均 $P < 0.05$)。体外培养PBMC, 发现IL-21可显著诱导AIH患者PBMC分泌高水平的TNF- α 、IFN- γ 和IL-2($P < 0.05$)。

结论: AIH患者外周血T细胞表达IL-21R水平明显升高, 并诱导T细胞分泌高水平的促炎症介质, 提示IL-21参与了肝脏自身免疫损伤过程。

关键词: 自身免疫型肝炎; 外周血单核淋巴细胞; T细胞; 白介素-21; 受体

王修齐, 刘嫦钦, 刘占举. IL-21诱导自身免疫性肝炎患者促炎症

■同行评议者

黄志勇, 教授, 华中科技大学同济医学院普外科

细胞因子分泌. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2096-2098
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2096.asp

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种原因不明的肝脏慢性炎症, 主要表现为小叶内和间隔胆管的进行性炎症性破坏, 伴门静脉周围炎症, 继而纤维化, 最后演变为肝硬化, 最终引起门静脉高压及终末期肝病的其他并发症而导致死亡^[1]. 大量研究发现AIH患者肝脏内有大量激活的淋巴细胞浸润, 并分泌高水平的促炎症细胞因子(如TNF- α), 这些淋巴细胞和炎症介质在肝脏炎症损伤过程中起着重要作用^[1-2]. IL-21是由CD4⁺ T细胞分泌的细胞因子, 并参与了一些免疫病理损伤疾病发生过程^[3]. 本文重点检测AIH患者外周血T细胞IL-21R表达, 并分析IL-21对外周血T细胞的效应应答.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2007-04/2009-04河南省人民医院消化内科门诊或/和病房住院的AIH患者21例, 男3例, 女18例, 年龄19-47(平均为32.4)岁. 其中12例外周血抗核抗体(ANA)阳性, 10例患者抗平滑肌抗体(SMA)阳性, 7例患者ANA和SMA均阳性, 所有患者均未接受任何免疫抑制剂治疗, 并均接受肝脏穿刺病理组织学检查. AIH患者的临床诊断根据临床症状、体征、肝功能检查和肝组织病理学检查等确诊^[4]. 另外, 选择25例健康者作对照研究, 男12例, 女13例, 年龄18-42(平均为30.1)岁. 所有研究对象均征求同意后进行研究, 并取得医院的同意. 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人CD4、CD8单抗、藻红蛋白(PE)标记的羊抗小鼠mAb均为美国BD PharMingen公司原装产品; 小鼠抗人IL-21R mAb为美国R&D公司产品; RPMI 1640培养液、胎牛血清、链霉素、青霉素、谷氨酰胺和庆大霉素均购于美国Gibco公司; 淋巴细胞分离液购于上海试剂二厂.

1.2 方法

1.2.1 外周血单核淋巴细胞采集: 收集所有对象抗凝静脉血5 mL, 采用淋巴细胞分离液分离外周血单核淋巴细胞(PBMC), 使用PBS液将PBMC稀释为 1×10^9 /L浓度待用.

1.2.2 IL-21R表达水平分析: 用PBS液洗涤PBMC细胞2次, 然后使用FITC标记的CD4或CD8单克隆抗体染色, 于4℃避光作用20 min, 然后用PBS液洗涤1次去除未结合的抗体. 所得细胞再

用抗人IL-21R抗体染色, 30 min后, 用PBS液洗涤, 再用PE-标记的羊抗小鼠二抗染色, 30 g/L多聚甲醛溶液固定细胞, 最后使用美国BD公司FACScan流式细胞仪测定CD4⁺、CD8⁺ T细胞IL-21R表达水平. 利用CellQuest软件分析样本中IL-21R阳性细胞表达水平^[5].

1.2.3 IL-21诱导PBMC分泌细胞因子: 首先用小鼠抗人CD3 mAb(克隆UCHT1、5 μ g/L)包被24孔培养板, 4℃过夜待用. 培养PBMC(1×10^9 /L), 使用IL-21(50 μ g/L)和抗CD3抗体刺激. 48 h后, 收集培养上清液, 采用ELISA方法检测TNF- α 、IFN- γ 和IL-2, 具体参照我们近期报道文献^[5].

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 采用t检验进行数据分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 AIH患者外周血T细胞IL-21R表达 流式细胞仪检测发现, AIH患者外周血中CD4⁺、CD8⁺ T细胞表达IL-21R水平比健康对照者明显升高(7.66% \pm 2.37% vs 3.12% \pm 0.76%, 9.42% \pm 2.48% vs 4.02% \pm 0.89%, $P < 0.05$).

2.2 IL-21诱导AIH患者PBMC分泌促炎症细胞因子水平 实验分析发现, IL-21可显著地诱导AIH患者外周血PBMC分泌高水平的TNF- α 、IFN- γ 和IL-2($P < 0.05$, 表1).

3 讨论

IL-21属于 γ c细胞因子家族成员, 与IL-2、IL-4和IL-15具有同源性, 其中与IL-15同源性最高. 人类的IL-21基因位于4q26-q27染色体上, 其蛋白由162个氨基酸组成, 其中前31个氨基酸为信号肽, 成熟蛋白为131个氨基酸, 形成4个螺旋结构^[3]. 研究发现IL-21主要由激活的CD4⁺ T细胞, 包括Th1、Th2和Th17细胞及NKT细胞表达^[3], 而IL-21R在CD4⁺、CD8⁺ T、B、NK细胞以及树突状细胞均有不同程度的表达^[3]. IL-21可以扩大CD4⁺和CD8⁺ T细胞的增值, 通过其增值提高细胞因子的分泌; 同时IL-21还可以诱导B细胞激活为记忆性细胞并最终分化成浆细胞及提高活化的NKT细胞.

研究发现IL-21可显著增强抗CD3单抗诱导的T细胞增殖分化, 并增加CD8⁺ T细胞的活化、增殖和效应功能, 同时可以诱导Th17细胞的分化^[3,6]. IL-21可诱导激活的免疫记忆T细胞表达Th1相关的转录因子T-bet; 然而, IL-21亦可以抑制幼稚T细胞向表达IFN- γ 的Th1细胞转化, 参与

■ 相关报道

已有研究报道发现一些促炎症细胞因子(如TNF- α 、IL-12)参与了AIH的病理生理发生过程, 为AIH患者进行治疗靶向生物免疫治疗开辟新的治疗途径. 本文研究IL-21在AIH中的免疫病理作用, 为临床上开展靶向阻断IL-21生物学活性治疗AIH提供理论依据.

■ 创新盘点

本文使用流式细胞仪检测AIH患者外周血淋巴细胞IL-21R表达. 体外细胞培养发现IL-21可以刺激淋巴细胞激活, 并分泌促炎症细胞因子.

■应用要点

初步发现IL-21R在AIH患者外周血淋巴细胞上表达升高,并诱导淋巴细胞促炎症细胞因子分泌,为将来靶向阻断IL-21生物学活性治疗AIH奠定重要的理论基础。

表 1 IL-21诱导AIH患者PBMC分泌促炎症细胞因子 (pg/L)

| 分组 | n | IFN- γ | TNF- α | IL-2 |
|------|----|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 健康对照 | 25 | 1265 \pm 325 | 118 \pm 31 | 432 \pm 156 |
| UC患者 | 21 | 3468 \pm 528 ^a | 468 \pm 98 ^a | 869 \pm 253 ^a |

^aP<0.05 vs 健康对照。

Th2免疫应答。目前一些研究发现IL-21参与了多种自身免疫性疾病的发生,如系统性硬化、风湿性关节炎(RA)、系统性红斑狼疮、糖尿病等^[3,6]。我们^[7]既往研究报道了IL-21R信号在RA的免疫病理作用,发现IL-21R阳性细胞在RA患者的炎性滑膜中表达增加,流式细胞仪分析证实了IL-21R主要表达在外周血和关节滑液内的CD4⁺、CD8⁺ T、B和NK细胞上。分离RA患者外周血和关节滑液中的T细胞,进行体外培养,使用IL-21刺激,发现IL-21可以显著地刺激T细胞激活,分泌高水平的促炎症细胞因子(如TNF- α 、IFN- γ 、IL-2),这些结果提示IL-21R信号参与了关节滑膜的炎症损伤过程。近期,我们^[5]在炎症性肠病患者中也研究发现IL-21R在外周血T、B和NK细胞表面表达升高,并能诱导外周血T细胞激活,并产生大量促炎症细胞因子。这些研究均提示IL-21参与了一些自身免疫性疾病的发生。

AIH病理生理学改变主要以高球蛋白血症、循环自身抗体和组织学上有界面性肝炎及汇管区浆细胞浸润为特征。已有研究报道^[8],在AIH病变过程中,肝组织内有大量激活的淋巴细胞浸润,并分泌高水平的促炎症介质,这些激活的T细胞可以破坏肝脏细胞以及胆管上皮细胞,造成肝组织炎症损伤^[8-10]。本研究发现AIH

患者外周血的CD4⁺、CD8⁺ T细胞表达IL-21R显著升高;体外实验发现,IL-21可以诱导AIH患者外周血T淋巴细胞激活,分泌高水平的TNF- α 、IFN- γ 和IL-2,进一步放大肝脏组织炎症反应。总之,本研究结果提示在AIH病变过程中,淋巴细胞IL-21R表达增高,IL-21R信号可以诱导淋巴细胞分泌促炎症介质。因此,本结果为将来在临床上实施靶向性阻断IL-21R信号治疗AIH奠定了重要的理论基础。

4 参考文献

- 1 Teufel A, Galle PR, Kanzler S. Update on autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1035-1041
- 2 Vergani D, Mieli-Vergani G. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3306-3312
- 3 Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 688-698
- 4 Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3374-3387
- 5 夏兴洲, 刘占举. IL-21受体自在溃疡性结肠炎中的表达及对促炎症细胞因子分泌的诱导. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 102-105
- 6 Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 57-79
- 7 Li J, Shen W, Kong K, Liu Z. Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2006; 64: 515-522
- 8 Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 298-305
- 9 Eksteen B, Afford SC, Wigmore SJ, Holt AP, Adams DH. Immune-mediated liver injury. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 351-366
- 10 Czaja AJ. Autoimmune hepatitis. Part A: pathogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2007; 1: 113-128

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本研究选题新颖,结果可靠,证据充足,具有较好的学术价值。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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/>在线提交未成功,请通过submission@wjgnet.com,电话: 010-8538 1892,传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 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 2009-07-18)

慢性HBV感染者肝脏病理及临床特征分析128例

耿晓霞, 林健梅, 杨兴祥, 黄仁刚, 江南

耿晓霞, 林健梅, 杨兴祥, 黄仁刚, 江南, 四川省医学科学院·四川省人民医院感染科 四川省成都市 610072
作者贡献分布: 本文病例资料整理、分析与文章撰写由耿晓霞完成; 林健梅、杨兴祥及黄仁刚提供病例资料; 江南对文章进行审阅与修改。
通讯作者: 江南, 博士, 610072, 四川成都市, 四川省医学科学院·四川省人民医院感染科. jiangn-dr@163.com
电话: 028-87394030
收稿日期: 2009-03-28 修回日期: 2009-06-15
接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Liver histopathology and clinical manifestations in patients with chronic HBV infection: an analysis of 128 cases

Xiao-Xia Geng, Jian-Mei Lin, Xing-Xiang Yang, Ren-Gang Huang, Nan Jiang

Xiao-Xia Geng, Jian-Mei Lin, Xing-Xiang Yang, Ren-Gang Huang, Nan Jiang, Department of Infectious Diseases, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China
Correspondence to: Doctor Nan Jiang, Department of Infectious Diseases, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China. jiangn-dr@163.com
Received: 2009-03-28 Revised: 2009-06-15
Accepted: 2009-06-25 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To compare the liver histopathological changes and clinical features between chronic HBV carriers and chronic hepatitis B patients with mildly elevated serum alanine aminotransferase (ALT), and explore factors affecting liver histopathological changes.

METHODS: One hundred and twenty-eight patients were divided into three groups according to serum ALT levels: Group A (ALT level $\leq 0.5 \times$ upper limits of normal (ULN)), Group B ($0.5 \times$ ULN < ALT level $\leq 1 \times$ ULN) and Group C ($1 \times$ ULN < ALT level < $2 \times$ ULN). The age, sex, serum HBV-DNA level, HBeAg status, positive rate of HBcAg, thickness of spleen, width of portal vein, grade of liver inflammation and stage of liver fibrosis in the three groups were compared. The changes in these clinical parameters were

then observed in patients whose liver had different histopathological changes.

RESULTS: Of 128 patients, 44.5% had G1 hepatitis and 55.5% had G2 hepatitis; 56.3% had S1 fibrosis, 23.4% had S2 fibrosis and 20.3% had no liver fibrosis. There were no significant differences in age, sex, serum HBV DNA level, HBeAg status, expression of HBcAg in liver and width of portal vein among Group A, B and C (all $P > 0.05$). And there was a significant difference in thickness of spleen between Group C and A, as well as between Group C and B ($P < 0.01$). The aggravation of liver inflammation was correlated with a significant increase in serum ALT level, thickness of spleen, width of portal vein and positive rate of HBcAg (all $P < 0.05$). Moreover, the aggravation of liver fibrosis was correlated with a significant increase in the thickness of spleen, breadth of portal vein and negative rate of HBeAg (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Patients with chronic HBV infection (ALT < $2 \times$ UNL) often show varying degrees of liver inflammation, with or without liver fibrosis. Close monitoring of serum ALT, thickness of spleen, width of portal vein and positive rate of HBcAg in liver may be able to help understand histopathological changes in the liver.

Key Words: Chronic hepatitis B; Alanine aminotransferase; Histopathology; Clinical manifestations

Geng XX, Lin JM, Yang XX, Huang RG, Jiang N. Liver histopathology and clinical manifestations in patients with chronic HBV infection: an analysis of 128 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2099-2104

摘要

目的: 比较慢性HBV携带者与血清ALT轻度升高慢性乙型肝炎患者肝组织病理学及临床改变的差异, 并寻找与肝组织学改变相关的因素。

方法: 将128例患者按血清ALT水平分为3组: A组: ALT $\leq 0.5 \times$ 正常值上限(upper limits

背景资料

我国是HBV感染高流行区, 一般人群的HBsAg阳性率为9.09%, 约有1.2亿感染HBV。目前已有研究表明在ALT持续正常的慢性HBV感染者中仍有相当一部分患者存在显著的肝脏组织学改变。抗病毒治疗是阻止乙型肝炎进展的关键, 我国已将ALT $\geq 2 \times$ ULN或肝组织炎症 \geq G2和/或纤维化 \geq S2作为抗病毒治疗的重要指征。因此, 探讨慢性HBV携带者与转氨酶轻度升高慢性乙型肝炎患者的肝脏病理学及临床特征, 并进一步寻找与肝组织学改变相关的因素, 对这部分患者抗病毒治疗方案的制定有重要的临床意义。

同行评议者

杨林, 副研究员, 中山大学附属第三医院感染病科

■ 研究前沿

慢性HBV携带者与转氨酶轻度升高(ALT<2×ULN)慢性乙型肝炎患者是否需要抗病毒治疗,及其肝组织病理学与临床改变的相关性是目前国内外学者研究的热点、难点。

of normal, ULN), B组: $0.5 \times ULN < ALT \leq 1 \times ULN$, C组: $1 \times ULN < ALT < 2 \times ULN$. 对比各组年龄、性别、血清HBV DNA定量、HBeAg阳性率、肝内HBcAg的表达、脾脏厚度、门静脉宽度及肝脏炎症活动度、纤维化程度,并进一步分析不同肝脏病理变化时上述临床资料的差异。

结果: 128例患者中肝脏炎症病变达G1者44.5%, G2者55.5%, 无G0期; 纤维化病变达S1者56.3%, S2者23.4%, 无纤维化者20.3%, C组较A组炎症病变显著加重($P < 0.05$); A、B、C组中患者的性别、年龄、血清HBV DNA定量、HBeAg阳性率、肝内HBcAg阳性率、门静脉宽度无明显差异(均 $P > 0.05$), C组的脾脏厚度较A组、B组显著增加(均 $P < 0.01$); 随炎症分级的增加, 血清ALT、脾脏厚度、门静脉宽度、肝内HBcAg阳性率显著增加(均 $P < 0.05$); 脾脏厚度、门静脉宽度、血清HBeAg阴性患者比率随纤维化程度加重显著增加(均 $P < 0.05$).

结论: 慢性HBV感染者(ALT<2×ULN), 肝组织均有不同程度炎症改变, 伴或不伴纤维化改变, 密切随访血清ALT、脾脏厚度、门静脉宽度、肝内HBcAg的表达, 对于协助了解肝脏病变有一定的提示作用。

关键词: 慢性乙型肝炎; 丙氨酸氨基转移酶; 组织病理学; 临床特征

耿晓霞, 林健梅, 杨兴祥, 黄仁刚, 江南. 慢性HBV感染者肝脏病理及临床特征分析128例. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2099-2104
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2099.asp>

0 引言

我国是HBV感染高流行区, 一般人群的HBsAg阳性率为9.09%^[1], 约有1.2亿感染HBV^[2]. 有文献报道在ALT持续正常的慢性HBV感染者中仍有相当一部分患者存在显著的肝脏组织学改变^[3-5]. 目前认为, 抗病毒治疗是阻止乙型肝炎进展的关键, 我国已将ALT $\geq 2 \times ULN$ 或肝组织炎症 $\geq G2$ 和/或纤维化 $\geq S2$ 作为抗病毒治疗的重要指征^[6]. 国外临床实践指南^[7]亦建议ALT持续轻度升高而病毒载量高的患者, 若肝活检显示中或重度炎症或显著纤维化, 应考虑抗病毒治疗. 本文主要对比分析慢性HBV携带者与转氨酶轻度升高慢性乙型肝炎患者肝组织病理学及临床改变的差异, 并进一步探讨这部分患者中年龄、

性别、血清HBV DNA定量、HBeAg阳性率、肝内HBcAg的表达、超声改变与肝组织学改变的关系, 寻找与肝组织学改变相关的因素, 对慢性HBV携带者与转氨酶轻度升高慢性乙型肝炎患者长期抗病毒治疗方案的制定有重要的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2008-01/2009-03四川省人民医院感染科住院经肝穿刺活检的慢性HBV携带者及转氨酶轻度升高的慢性乙型肝炎患者共128例, 男86例, 女42例, 慢性HBV携带者及慢性乙型肝炎患者诊断标准依据2005年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[6], 慢性乙型肝炎患者肝穿前6 mo内血清ALT持续低于 $2 \times ULN$. 患者行肝穿前未曾接受过抗病毒药物[核苷(酸)类似物或干扰素]治疗, 影像学检查无肝硬化及肝癌, 无丙、戊型肝炎及艾滋病病毒合并感染, 无自身免疫性肝病, 无药物性肝炎、脂肪性肝病及长期酗酒史. HAMILTON全自动酶免分析仪2420, 试剂购自北京万泰生物药业有限公司. ABI 7500实时PCR定量检测仪, 试剂购自中山大学达安基因股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组: 将纳入的患者按血清ALT水平分为3组: A组: ALT $\leq 0.5 \times ULN$; B组: $0.5 \times ULN < ALT \leq 1 \times ULN$; C组: $1 \times ULN < ALT < 2 \times ULN$. 每例患者临床及生化、影像学资料均采集自肝穿刺前1 wk之内。

1.2.2 肝脏病理学检查: 全部病例均无肝穿刺禁忌证. 患者首先行B超定位确定穿刺深度, 局部麻醉后用美国巴德活检针MN1816获取肝组织, 长度均在1 cm以上, 包含4个及4个以上可供评价汇管区. 标本置于100 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 行HE、网状纤维染色及HBcAg免疫组织化学染色. 由本院病理科医师读片, 病理学诊断按炎症活动度分级(G0-G4)、纤维化分期(S0-S4), 具体标准参照2000年修订的《病毒性肝炎防治方案》^[8].

1.2.3 实验室检查: (1)血清ALT采用日本Olympus AU2700型全自动生化分析仪检测, 其正常值上限为40 IU/L; (2)乙型肝炎标志物采用ELISA检测; (3)血清HBV DNA采用实时荧光定量PCR检测法。

1.2.4 影像学检查: 全部病例肝活检前采用NEMIO30彩色多普勒超声仪检测脾厚度、门静

表 1 不同ALT水平患者的基本情况比较

| 分组 | n | 男/女 | 年龄(岁) | HBV DNA(Ig) | 脾厚(cm) | 门静脉(cm) | HBeAg表达(+/-) |
|----|----|-------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| A组 | 27 | 18/9 | 26.04 ± 7.25 | 5.96 ± 1.32 | 3.12 ± 0.14 | 1.16 ± 0.14 | 22/5 |
| B组 | 53 | 33/20 | 25.45 ± 7.86 | 6.47 ± 1.09 | 3.17 ± 0.21 | 1.18 ± 0.13 | 47/6 |
| C组 | 48 | 35/13 | 28.15 ± 7.87 | 6.44 ± 1.11 | 3.61 ± 0.37 | 1.21 ± 0.15 | 38/10 |

表 2 不同ALT水平患者的肝组织炎症活动度、纤维化程度及肝内HBcAg表达 n(%)

| 分组 | n | 炎症活动度 | | 纤维化程度 | | | HBcAg表达(+/-) |
|----|----|----------|----------|----------|----------|----------|--------------|
| | | G1 | G2 | S0 | S1 | S2 | |
| A组 | 27 | 17(63.0) | 10(37.0) | 10(37.0) | 14(51.9) | 3(11.1) | 18/9 |
| B组 | 53 | 25(47.2) | 28(52.8) | 8(15.1) | 32(60.4) | 13(24.5) | 35/18 |
| C组 | 48 | 15(31.3) | 33(68.7) | 8(16.7) | 26(54.2) | 14(29.1) | 38/10 |

脉宽度。

统计学处理 采用SPSS15.0软件对研究数据进行统计学分析。计量资料采用mean±SD表示, 正态分布的多组均数比较采用方差分析, 2组均数比较采用t检验; 血清HBV DNA定量转化为其对数值进行比较; 计数资料用例数和百分比表示, 率和构成比的比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同ALT水平的患者基本情况及病理结果比较 不同ALT水平的3组患者中均以男性为主, 3组间性别比例无明显差异($\chi^2 = 1.30, P > 0.05$); 128例患者年龄为16-50(平均26.59 ± 7.78)岁, 3组间年龄分布无明显差异($F = 1.61, P > 0.05$); 3组间血清HBV DNA对数值、HBeAg阳性率无明显差异($F = 1.96, \chi^2 = 1.77, \text{均} P > 0.05$); 3组间总的脾脏厚度比较有显著差异($F = 42.86, P < 0.01$), 其中C组较A组、B组显著增加(均 $P < 0.01$), 但A组与B组比较无明显差异($P > 0.05$); 3组间门静脉值有随ALT升高逐渐增加趋势, 但总的差异无统计学意义($F = 1.26, P > 0.05$, 表1)。

患者肝组织均有不同程度炎症改变, 诊断异常率为100%, A组中以G1为主, 但仍有37.0%的患者达G2; B组及C组均以G2为主, 各组中均无G3和G4改变; 炎症病变随ALT的升高而加重, 3组间总的差异有显著性($\chi^2 = 7.29, P < 0.05$), 其中A组与C组比较差异有统计学意义($\chi^2 = 7.10, P < 0.05$), 而A组与B组、B组与C组比较无明显差异($\chi^2 = 1.79, 2.67, \text{均} P > 0.05$); 患者肝组织伴或不伴纤维化改变, 3组中均以S1为主, 而S2的比例有随ALT

升高而增加趋势, 但3组间纤维化分期总的比较差异无统计学意义($\chi^2 = 7.48, P > 0.05$)。A组、B组、C组患者肝内HBcAg表达的阳性率比较无明显差异($\chi^2 = 2.44, P > 0.05$, 表2)。

2.2 不同肝组织炎症活动度、纤维化程度与患者基本情况的关系

2.2.1 不同肝组织炎症活动度患者的年龄、性别、ALT、HBV DNA比较: 128例患者中肝脏炎症分级以G2为主, 达71例(55.5%), G1、G2组均以男性为主, 年龄分布有随炎症分级增加而增大趋势, 但2组患者性别比例、年龄比较均无明显差异($\chi^2 = 0.24, t = 1.35, \text{均} P > 0.05$), 血清HBV DNA水平的比较差异亦无统计学意义($t = 0.21, P > 0.05$); 而G1、G2组的血清ALT随肝脏炎症程度加重而显著升高, 差异有统计学意义($t = 2.92, P < 0.01$, 表3)。

2.2.2 不同肝组织炎症活动度患者的血清HBeAg表达、超声检测、肝内HBcAg表达的比较: 128例患者不同炎症分级组间血清HBeAg阳性率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.42, P > 0.05$); 而在G1、G2组中随炎症分级的增加, 脾脏厚度、门静脉值、肝内HBcAg的表达显著增加, 差异有统计学意义($t = 4.27, t = 3.95, \chi^2 = 4.70, \text{均} P < 0.05$, 表4)。

2.2.3 不同肝组织纤维化程度患者的年龄、性别、ALT、HBV DNA比较: 128例患者中肝脏纤维化分期以S1为主(56.3%), 但仍有23.4%的患者达S2。各纤维化分期组以男性患者为主, 3组间性别比例、血清HBV DNA对数值差异无统计学意义($\chi^2 = 0.51, F = 0.025, \text{均} P > 0.05$); S1、S2、S3组中患者年龄、血清ALT有随纤维化分期的增加而增加趋势, 但3组间差异无统计学意义(F

■ 相关报道

斯崇文 *et al* 对90例慢性HBV携带者研究发现, 有23.3%的患者肝脏炎症病变达G2, 纤维化病变达S2者亦占23.3%, 且肝纤维化随病程发展有不同程度进展, 同时, 进一步随访研究表明这些携带者中部分在近期内需要抗病毒治疗。

■创新盘点

本文对比分析了慢性HBV携带者与转氨酶轻度升高慢性乙型肝炎患者肝组织病理学及临床改变的差异,并进一步探讨了这部分患者中与肝组织学改变相关的因素,为这部分患者抗病毒治疗方案的制定提供了临床线索及依据。

表 3 不同肝组织炎症分级患者的年龄、性别、ALT、HBV DNA比较

| 炎症分级 | n | 男/女 | 年龄(岁) | ALT(U/L) | HBV DNA(Ig) |
|------|----|-------|--------------|---------------|-------------|
| G1 | 57 | 37/20 | 26.64 ± 7.31 | 34.86 ± 13.29 | 6.50 ± 1.18 |
| G2 | 71 | 49/22 | 28.58 ± 8.61 | 43.01 ± 17.33 | 6.46 ± 1.06 |

表 4 不同肝组织炎症分级患者的血清HBeAg表达、超声检测、肝内HBcAg表达

| 炎症分级 | n | 血清HBeAg表达(+/-) | 脾厚(cm) | 门静脉(cm) | 肝内HBcAg表达(+/-) |
|------|----|----------------|-------------|-------------|----------------|
| G1 | 57 | 49/8 | 3.11 ± 0.23 | 1.10 ± 0.14 | 35/22 |
| G2 | 71 | 58/13 | 3.30 ± 0.28 | 1.21 ± 0.16 | 56/15 |

表 5 不同肝组织纤维化分期患者的年龄、性别、ALT、HBV DNA比较

| 纤维化分期 | n | 男/女 | 年龄(岁) | ALT(U/L) | HBV DNA(Ig) |
|-------|----|-------|--------------|---------------|-------------|
| S0 | 26 | 16/10 | 27.62 ± 8.64 | 38.50 ± 13.80 | 6.50 ± 1.21 |
| S1 | 72 | 49/23 | 28.01 ± 8.84 | 38.06 ± 16.71 | 6.46 ± 1.11 |
| S2 | 30 | 21/9 | 30.30 ± 7.86 | 44.00 ± 13.82 | 6.43 ± 1.04 |

表 6 不同肝组织纤维化分期患者的血清HBeAg表达、超声检测、肝内HBcAg表达

| 纤维化分期 | n | 血清HBeAg表达(+/-) | 脾厚(cm) | 门静脉(cm) | 肝内HBcAg表达(+/-) |
|-------|----|----------------|-------------|-------------|----------------|
| S0 | 26 | 24/2 | 3.16 ± 0.26 | 1.08 ± 0.11 | 19/7 |
| S1 | 72 | 63/9 | 3.24 ± 0.26 | 1.17 ± 0.15 | 50/22 |
| S2 | 30 | 20/10 | 3.67 ± 0.33 | 1.30 ± 0.14 | 22/8 |

= 0.91, $F = 1.63$, 均 $P > 0.05$, 表5).

2.2.4 不同肝组织纤维化程度患者的血清HBeAg表达、超声检测、肝内HBcAg表达的比较: S0、S1、S2组中血清HBeAg阴性患者比率、脾脏厚度、门静脉值均随纤维化程度加重而逐渐增加, 3组间上述各指标总的差异有统计学意义($\chi^2 = 8.51$, $F = 30.89$, $F = 17.66$, 均 $P < 0.05$), 其中S2组与S0、S1组的HBeAg阴性率、脾脏厚度分别比较有明显差异(均 $P < 0.05$), 而S0组与S1组的HBeAg阴性率、脾脏厚度比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 各组间门静脉值分别比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); 3组间肝内HBcAg阳性表达率总的比较无明显差异($\chi^2 = 0.22$, $P > 0.05$, 表6).

3 讨论

ALT水平升高是肝脏存在坏死炎症的标志, 目前现行的慢性乙型肝炎治疗指南都将ALT异常作为抗病毒治疗的重要选择标准^[6-8]. 然而, 目前越来越多的国内^[3-4]、国外^[5,9]研究表明, ALT正常

慢性HBV感染者的肝组织检查仍然可有显著的炎症病变及纤维化改变, 单纯依赖ALT水平来确定慢性HBV感染者是否需要抗病毒治疗存在很大的局限性. 因此, 我国2005年版《慢性乙型肝炎防治指南》已将ALT $\geq 2 \times$ ULN或组织学炎症 \geq G2和/或纤维化 \geq S2作为抗病毒治疗的重要指征.

本研究通过对128例慢性HBV携带者及转氨酶轻度升高的慢性乙型肝炎患者进行肝活检分析发现, 患者肝组织均有不同程度炎症改变, 诊断异常率为100%, 达G2者占55.5%, 其中ALT正常的患者有47.5%肝脏炎症病变达G2, 这与其他学者^[10]研究发现ALT正常的慢性HBV携带者中无G0S0结果一致; 128例患者伴或不伴纤维化改变, 达S2者占23.4%, 其中ALT正常的患者中达S2者占20%. 以上研究结果提示血清ALT水平与肝组织学病变程度并非总有良好的相关性, 仅凭ALT决定是否抗病毒治疗将会遗漏部分已达G2或/和S2的患者. 这种现象可能与乙型肝炎的发病机制之一系免疫反应所致有关, 如果免

疫反应只是引起炎症和纤维化,并不破坏肝细胞,肝细胞质里的各种酶未入血,这样血清转氨酶可不升高,病变可呈隐匿发展而病理损害较临床表现重^[11].

另外,研究结果还表明肝脏炎症病变有随ALT的升高而加重趋势,不同ALT水平的3组中S2的比例有随ALT升高而增加趋势,A组与C组的炎症分级比较差异有统计学意义.以上提示我们对于ALT在1-2×ULN但尚未达抗病毒治疗标准的患者应进行更密切的随访,是否在这部分患者中肝脏病变的进展速度大于ALT≤0.5×ULN组中同病理学类型的患者需在以后的随访研究中进一步了解.

我们同时对比了128例患者其他多项临床资料、实验室及影像学检查,结果显示随着ALT水平的逐渐上升,患者的性别比例、年龄分布、血清HBV DNA定量水平、血清HBeAg阳性率、肝内HBcAg阳性率、门静脉值并无明显变化,仅脾脏厚度随ALT上升显著增加.进一步提示从临床资料看似乎差异不大的不同ALT水平的患者,仍然可能存在肝脏组织学改变的显著差异,而上述临床资料与肝脏病理学改变的关系如何呢?为寻找临床诊断“携带者”及ALT水平未达抗病毒治疗标准的患者中病情隐匿进展的危险信号以及启动抗病毒治疗的依据,我们对比了这部分患者中不同肝脏病理改变时上述临床资料的变化.进一步研究显示,在不同炎症分级组中,ALT随肝脏炎症程度加重而明显升高,提示ALT与炎症病变有一定相关性,但结合之前结果显示ALT正常者仍有47.5%病变达G2以上,说明ALT仅能作为随访抗病毒治疗与否的指标之一而不是主要依据,病理学依据仍然是决定是否抗病毒治疗的有力依据.在128例ALT正常及轻度升高患者中,随肝脏炎症病变、纤维化程度逐渐增加,超声定量测量脾脏厚度及门静脉宽度显著增加,提示对于慢性HBV携带者及轻度慢性乙型病毒性肝炎患者,定期检测脾脏厚度、门静脉宽度对早期发现肝纤维化有重要参考价值^[12-13].

已有研究表明,我国约1/3的HBeAg阴性者HBV DNA仍有高水平复制^[2],肝纤维化程度高者以HBeAg阴性者居多^[14].HBV前C区G1896A或核心区启动子A1762T和G1764A突变是HBeAg阴性慢性乙型肝炎发生的主要机制,也是其肝脏损害程度严重^[15]和易发展至肝硬化或原发性肝癌的主要原因^[16].我们在研究中也发现随肝脏纤维

化程度逐渐加重,血清HBeAg阴性患者比率逐渐增加,提示HBVDNA(+)/HBeAg(-)慢性HBV感染者的预后较差,应动态监测病情演变,必要时行肝穿活检,并及时进行干预性治疗.

本研究结果还发现,ALT正常及轻度升高的患者肝脏炎症病变及纤维化程度与血清HBV DNA定量水平无关,即HBV DNA水平可反映病毒的复制状况,但不能反映肝脏的炎症坏死、纤维化程度,这与罗国庆 *et al*^[17]研究结果一致.这一现象由乙型肝炎的发病机制所致,即慢性乙型肝炎的发病主要是HBV诱导T淋巴细胞与人白细胞抗原(HLA)双识别所致的免疫损伤,而不是HBV对肝细胞的直接细胞毒性作用^[18].而研究结果显示肝细胞内HBcAg的表达在G2组明显多于G1组,即肝内HBcAg的表达与肝组织炎症程度有关,这与骆子义 *et al*^[19]的报道一致.提示在慢性乙型肝炎肝组织免疫损伤的免疫应答中,HBcAg是HBV特异性CTL的主要靶抗原,HBcAg阳性的肝细胞是人体免疫机制主要的攻击目标^[20].以上提示在这部分患者中,血清HBV DNA含量的高低并不能作为评价慢性HBV感染者肝组织损伤的可靠指标,但HBV DNA结合肝细胞内HBcAg的表达似可作为估计患者病情严重程度并指导抗病毒治疗时机选择的有效指标.

有学者研究表明^[21-22]肝组织中HBcAg的表达强度与肝组织炎症程度及纤维化程度呈负相关,考虑系因肝细胞膜上表达的HBcAg诱发细胞免疫反应,破坏了这些表达HBcAg的肝细胞.这与我们的研究结果不一致,不排除前者的研究对象ALT明显升高,系肝功损害较重者,而我们的纳入患者血清ALT<2×ULN,肝脏病变最严重也仅达G2、S2,故肝脏损害尚属早期阶段,肝细胞未大量破坏,因此呈现出HBcAg在肝内的表达与炎症程度呈正相关.另外,在128例患者中,不同炎症分级及纤维化分期组中年龄分布无明显差异,这与部分学者研究结果不一致,不排除与就诊患者的地域差别、样本量有关.

总之,对于慢性HBV携带者及ALT<2×ULN的慢性乙型肝炎患者,肝脏病理学依据仍然是决定是否抗病毒治疗的有力依据,在这部分患者中,密切随访血清ALT、脾脏厚度、门静脉宽度、肝内HBcAg的表达,对于协助了解肝脏病理变化、决定抗病毒治疗时机有一定的提示作用.

4 参考文献

- 1 梁晓峰,陈园生,王晓军,贺雄,陈丽娟,王骏,林长缨,

■应用要点

对于ALT<2×ULN的慢性HBV感染者,病理学依据仍然是决定是否抗病毒治疗的有力依据,在这部分患者中,密切随访血清ALT、脾脏厚度、门静脉宽度、肝内HBcAg的表达,对于协助了解肝脏病理变化有一定的提示作用.

■同行评价

本研究选题较好,设计合理,结果可靠,具有一定的学术价值及临床意义。

- 2 刘萱,贾继东.乙型肝炎病毒感染的自然病程.中华传染病杂志 2006; 24: 210-211
- 3 桂红莲,俞红,谢青,王晖,蔡伟,林之莓,姜山,许蓓,周霞秋,郭清.丙氨酸氨基转移酶持续正常的慢性乙型肝炎病毒感染者的肝脏组织学改变.中华肝脏病杂志 2007; 15: 881-885
- 4 吴赤红,斯崇文,田庚善,于岩岩,徐小元,王泰龄.慢性乙型肝炎病毒携带者的病理与临床及预后分析.中华肝脏病杂志 2007; 15: 577-581
- 5 Kumar M, Sarin SK, Hissar S, Pande C, Sakhuja P, Sharma BC, Chauhan R, Bose S. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently normal ALT. *Gastroenterology* 2008; 134: 1376-1384
- 6 中华医学会肝病学会、感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南.中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
- 7 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539
- 8 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案.中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 9 Wang CC, Lim LY, Deubner H, Tapia K, Lau AW, Manansala J, Krows M, Shuhart MC, Kowdley KV. Factors predictive of significant hepatic fibrosis in adults with chronic hepatitis B and normal serum ALT. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 820-826
- 10 黄俊华,游晶,陈红英,高惠芸,曲俊燕,吴国斌. ALT正常的HBV慢性携带者肝组织病理结果分析.临床肝胆病杂志 2007; 23: 6-8
- 11 杨小云,温帆渊,吴静黎,周华坚.慢性乙型肝炎患者血清病毒标志和丙氨酸转氨酶与肝组织病理的相关性.南方医科大学学报 2006; 26: 892-893
- 12 杜瑞清,马春华,孝奇,吴小霞.乙型肝炎病毒感染者门静脉及脾静脉血流量与肝脏组织学变化的关系.中国介入影像与治疗学 2008; 5: 374-377
- 13 温小凤,蒋忠胜,柯柳,陈念,覃川,李敏基.门静脉和肝中静脉内径与肝纤维化相关性的临床研究.临床超声医学杂志 2008; 10: 673-675
- 14 陈恩强,何伶俐,王丽春,雷秉钧,白浪,刘聪,雷学忠,唐红.丙氨酸氨基转移酶低于2倍正常值的慢性乙型肝炎患者肝组织学的改变.世界华人消化杂志 2008; 16: 2476-2481
- 15 Rezende RE, Fonseca BA, Ramalho LN, Zucoloto S, Pinho JR, Bertolini DA, Martinelli AL. The precore mutation is associated with severity of liver damage in Brazilian patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005; 32: 53-59
- 16 Lin CL, Liao LY, Wang CS, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, Kao JH. Basal core-promoter mutant of hepatitis B virus and progression of liver disease in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Liver Int* 2005; 25: 564-570
- 17 罗国庆,王康敏,蔡亚君,周世龙. HBeAg阴性乙型肝炎病毒携带者血清HBV DNA水平与肝纤维化指标相关性研究.实用肝脏病杂志 2008; 11: 317-318
- 18 张立浩,王泰龄,王欣欣,孟忻,赵景民,宋晨朝,孙琳,张世杰,李俊强,金荣华.慢性HBsAg携带者及非活动性HBV感染状态的病理学研究.临床肝胆病杂志 2007; 23: 337-339
- 19 骆子义,袁静,王昭钦.慢乙肝患者血清HBV DNA与肝细胞内HBsAg和HBcAg表达的相关性研究.中国医师杂志 2005; 7: 352-353
- 20 陶森,邵凤珍,马胜利.国内肝穿活检术在慢性乙型肝炎病毒感染者中的应用.中西医结合肝病杂志 2008; 18: 317-319
- 21 周文红,应豪.慢性乙型肝炎患者肝组织HBsAg、HBcAg表达及临床意义.中西医结合肝病杂志 2006; 16: 266-267
- 22 王功遂,王曼曼,谢秋里,明朗,姜湘宁,陈乐无,刘梅华. HBsAg、HBcAg在慢性乙型肝炎肝细胞内的表达及临床意义.中华肝脏病杂志 2004; 12: 287-289

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评,基础研究,临床研究,焦点论坛,文献综述,研究快报,临床经验,病例报告,会议纪要.文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性,重点突出,文字简练,数据可靠,写作规范,表达准确.(常务副总编辑:张海宁 2009-07-18)

慢性丙型肝炎患者血清IL-18和IL-1 β 水平的变化及意义

张琳, 苗亮, 付海超, 赵桂珍, 冯国和, 窦晓光

张琳, 付海超, 赵桂珍, 冯国和, 窦晓光, 中国医科大学附属盛京医院感染科 辽宁省沈阳市 110004
苗亮, 秦皇岛市第三人民医院肝病科 河北省秦皇岛市 066001
辽宁省高等学校科研项目计划基金资助项目, No. 2008852
十一五国家科技重大专项基金资助项目, No. 2008zx10002-013
作者贡献分布: 张琳和苗亮对此文所作贡献均等; 此课题由张琳、冯国和及赵桂珍设计; 研究过程由苗亮与付海超操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由窦晓光提供; 数据分析由张琳与苗亮完成; 本论文写作由张琳完成。
通讯作者: 窦晓光, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院感染科. liaiminzh@163.com
电话: 024-83955175
收稿日期: 2009-05-13 修回日期: 2009-06-23
接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Significance of changes in serum IL-18 and IL-1 β levels in patients with chronic hepatitis C

Lin Zhang, Liang Miao, Hai-Chao Fu, Gui-Zhen Zhao, Guo-He Feng, Xiao-Guang Dou

Lin Zhang, Hai-Chao Fu, Gui-Zhen Zhao, Guo-He Feng, Xiao-Guang Dou, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Liang Miao, Department of Liver Diseases, the Third People's Hospital of Qinhuangdao City, Qinhuangdao 066001, Hebei Province, China
Supported by: Scientific Research Foundation of the Higher Education Institutions of Liaoning Province, No. 2008852; and the National Key Technologies R & D Program of China during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2008zx10002-013
Correspondence to: Dr. Xiao-Guang Dou, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. liaiminzh@163.com
Received: 2009-05-13 Revised: 2009-06-23
Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the roles of serum IL-18 and IL-1 β in the progression of chronic hepatitis C and explore the correlation between serum IL-18 and IL-1 β levels and the efficacy of interferon (IFN) therapy.

METHODS: The levels of IL-18 and IL-1 β in the serum of 30 chronic hepatitis C patients were determined before and after they received IFN

therapy to observe changes in the serum levels of the two cytokines in different periods after HCV infection. Moreover, the correlations of serum IL-18 and IL-1 β levels with ALT level, HCV genotype, IL-2 and IL-6 levels were analyzed. The differences in the serum levels of the two cytokines were also compared between patients with response and nonresponse to interferon treatment. The levels of serum cytokines were determined by ELISA. HCV genotypes were classified by direct sequencing. HCV RNA loads were determined by fluorescence quantitative PCR.

RESULTS: The level of IL-18 in the serum of chronic hepatitis C patients was higher than that of healthy controls (1077.44 ± 657.58 ng/L vs 259.92 ± 328.47 ng/L, $P < 0.001$). No significant difference in the level of serum IL-1 β was noted between chronic hepatitis C patients and healthy controls though it had an upward trend over time (in contrast to a downward trend for IL-18). Severe patients had higher serum IL-1 β level than mild ones (4.99 ± 1.44 ng/L vs 3.68 ± 0.76 ng/L, $P < 0.05$). The levels of the two cytokines were not significantly different among patients with different genotypes or subtypes of HCV. The level of IL-18 was positively correlated with that of IL-2 ($r = 0.434$, $P < 0.05$) rather than IL-6. The level of IL-1 β was not correlated with those of IL-2 and IL-6. No significant differences were noted in the serum levels of IL-18 and IL-1 β between patients with response and nonresponse to IFN therapy.

CONCLUSION: Serum IL-18 and IL-1 β levels may be correlated with the chronicity and severity of hepatitis C but can not be used for prediction of the efficacy of IFN therapy.

Key Words: Chronic hepatitis C; Interleukin 18; Interleukin 1 β

Zhang L, Miao L, Fu HC, Zhao GZ, Feng GH, Dou XG. Significance of changes in serum IL-18 and IL-1 β levels in patients with chronic hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2105-2111

摘要

目的: 探讨血清IL-18和IL-1 β 水平在慢性丙型

■背景资料

研究表明, Th1/Th2相关细胞因子在丙型肝炎发病机制和干扰素治疗效果中起重要作用. IL-18和IL-1 β 主要由抗原递呈细胞分泌, 能调节Th1/Th2细胞因子之间的平衡, 与Th1/Th2细胞因子共同影响着机体对病毒的清除、组织损伤和慢性化过程. 虽然目前这方面的研究较多, 但所得的结论却不尽相同.

■同行评议者

高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

■ 研发前沿

干扰素治疗应答率低仍是目前慢性丙型肝炎治疗的瓶颈,纠正细胞因子失衡亦即免疫调节治疗能否提高干扰素治疗应答率将是今后慢性丙型肝炎抗病毒治疗的一个新方向。

肝炎患者病程进展中的作用及与临床和干扰素疗效的关系。

方法: 检测30例慢性丙型肝炎患者干扰素治疗前后血清IL-18和IL-1 β 含量,观察HCV感染后不同阶段血清IL-18和IL-1 β 水平的变化,分析血清IL-18和IL-1 β 水平与ALT水平、HCV基因型及Th1/Th2相关细胞因子IL-2和IL-6的关系。比较应答组和无应答组之间2种细胞因子水平的差异。血清细胞因子检测应用ELISA法,HCV基因分型应用直接测序法,HCV RNA载量采用荧光定量PCR法。

结果: 慢性丙型肝炎患者血清IL-18水平明显高于健康对照组(1077.44 ± 657.58 ng/L vs 259.92 ± 328.47 ng/L, $P < 0.001$), IL-1 β 水平与健康对照组无显著差异;随着感染时间的延长,血清IL-1 β 水平有逐渐升高趋势,而IL-18则逐渐下降;慢性肝炎重度患者血清IL-1 β 水平明显高于轻度患者(4.99 ± 1.44 ng/L vs 3.68 ± 0.76 ng/L, $P < 0.05$);不同基因型和亚型之间两种细胞因子水平无显著差异;血清IL-18与IL-2含量呈显著性正相关($r = 0.434$, $P < 0.05$),与IL-6无相关,血清IL-1 β 含量与IL-2和IL-6均无相关;干扰素对应答组和无应答组治疗前、后血清IL-18和IL-1 β 水平均无显著性差异。

结论: 血清IL-18和IL-1 β 水平分别与丙型肝炎的慢性化和病情轻重相关,该两种细胞因子水平与干扰素疗效无关,不能对疗效进行预测。

关键词: 慢性丙型肝炎;白介素18;白介素1 β

张琳, 苗亮, 付海超, 赵桂珍, 冯国和, 窦晓光. 慢性丙型肝炎患者血清IL-18和IL-1 β 水平的变化及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(20): 2105-2111

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2105.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染是慢性肝炎的主要病因之一,急性HCV感染后,慢性化比例高达80%以上^[1-3],部分患者最终将发展成肝硬化和肝细胞癌^[4-6]。由于HCV具有高度变异性,目前还没有有效的疫苗问世,干扰素治疗的持续应答率也仅40%左右^[7-8]。对丙型肝炎慢性化机制的研究以及如何预测及提高干扰素治疗的应答率一直是备受关注的热点。近年的研究表明,细胞因子在丙型肝炎的组织损伤、慢性化以及对干扰素治疗的反应中起重要作用^[9-11],在HCV急性感染阶段,Th1细胞分泌的细胞因子占优势,有利于机体对病毒的清除,而

在慢性阶段则以Th2细胞为主,而且干扰素治疗过程中Th1细胞优势的维持预示着对治疗有较高的应答率^[11-13]。然而也有报道认为治疗前低Th1/Th2比率预示着对干扰素治疗有较高的持续应答率^[14]。IL-1和IL-18主要由抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)如树突状细胞、巨噬细胞等分泌,能调节Th1/Th2细胞因子之间的平衡,与Th1/Th2细胞因子组成细胞因子网络调节系统^[15],共同影响着机体对病毒的清除、组织损伤和慢性化过程。本研究对30例应用干扰素治疗的慢性丙型肝炎患者血清IL-18和IL-1 β 进行检测,探讨慢性丙型肝炎患者血清IL-18和IL-1 β 水平的变化及与临床和干扰素治疗的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-2008年中国医科大学附属盛京医院感染科慢性丙型肝炎住院患者30例,其中男15例,女15例,年龄34-66(平均年龄 48.5 ± 8.11)岁。所有患者均应用干扰素联合利巴韦林治疗,总疗程为48 wk。其中8例患者应用Peg-IFN- α -2b(每次50-80 μ g,每周1次),22例应用IFN- α -2b(每次300万U,每周3次),利巴韦林剂量800-1000 mg/d。疗效判定:持续应答组,治疗结束时ALT正常,HCV RNA阴转,并持续半年以上;无应答组,治疗结束时ALT未恢复正常或HCV RNA持续阳性。分别留取治疗前和治疗结束时血清,-20 $^{\circ}$ C冻存待测。

1.2 方法

1.2.1 细胞因子检测: 血清IL-18、IL-1 β 、IL-2和IL-6检测采用ELISA法。IL-18试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司,IL-1 β 、IL-2和IL-6试剂盒购自生物晶美工程有限公司。按试剂盒说明方法进行检测。

1.2.2 HCV基因分型检测: 采用直接测序法,根据HCV NS5B核苷酸序列进行分型。引物序列: F1(8351-8378): TGG GGA TCC CGT ATG CCC GCT GCT TTG A; R1(8719-8748): GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA; F2(8379-8402): CTC AAC CGT CAC TGA GAG AGA CAT; R2(8694-8718): GCT CTC AGG CTC GCC GCG TCC TC。血清中提取HCV RNA,逆转录成cDNA后,应用Nested-PCR扩增NS5B基因片段,片段大小约为340 bp。PCR产物纯化后由沈阳市传染病院中心实验室进行核苷酸序列测定。HCV RNA提取及PCR产物纯化试剂盒购自天星生物制品有限公司。应用MEGA软件对核

表 1 患者临床及实验室检查特点

| 变量 | 应答组 | 无应答组 | P值 |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| <i>n</i> | 14 | 16 | |
| 年龄(岁) | 51.43 \pm 9.053 | 45.94 \pm 6.403 | 0.063 |
| 男性患者(%) | 50 | 50 | 0.642 |
| 体质量(kg) | 62.96 \pm 11.22 | 61.06 \pm 12.21 | 0.662 |
| 感染时间(年) | 11.96 \pm 9.45 | 15.43 \pm 7.17 | 0.298 |
| ALT(U/L) | 124.86 \pm 99.42 | 65.44 \pm 53.99 | 0.048 |
| HCV RNA载量(Ig ^{cp/mL}) | 6.32 \pm 0.828 | 6.08 \pm 0.892 | 0.460 |
| IFN类型(%) | | | |
| Peg- α -2b | 62.5 | 37.5 | |
| α -2b | 40.9 | 59.1 | 0.417 |
| HCV基因分型(%) | | | |
| 1a型 | 50.0 | 50.0 | |
| 1b型 | 35.7 | 64.3 | 0.336 ^a |
| 1c型 | 0.0 | 100.0 | |
| 2a型 | 66.7 | 33.3 | |
| 2b型 | 33.3 | 66.7 | |
| 3a型 | 100.0 | 0.0 | |

^a: 1b和2a型比较.

苷酸序列进行分析, 确定HCV基因型.

1.2.3 HCV RNA载量检测: 采用特异性荧光探针PCR法, 按试剂盒说明书进行.

1.2.4 血清ALT检测: 由中国医科大学附属盛京医院中心实验室应用美国贝克曼公司生产的8200A全自动生化分析仪常规检测.

统计学处理 应用SPSS15.0软件进行统计学检验, 所用方法包括: 均数的比较、 χ^2 检验和Biraviate相关性检验. $P < 0.05$ 为显著性差异水平.

2 结果

2.1 患者的临床和实验室检查特征 30例患者中, 26例有明确的流行病学史, 其中有输血史者15例(50%)、手术史5例(16.7%)、治牙史3例(10%)、纹刺史3例(10%)及原因不清4例(13.3%). 持续应答率46.7%. 应答组和无应答组相比, 年龄、性别、体质量、感染时间及血清HCV RNA载量均无显著差异, 血清ALT水平明显高于无应答组. 应用Peg干扰素者应答率为62.5%, 普通干扰素为40.9%, 两者无显著差异. 基因型分布以1b型最多, 占46.7%, 其余依次为2a型20%、1a型13.3%、2b型10%、3a型6.7%和1c型3.3%. 1b型应答率为35.7%, 2a型为66.7%, 但统计学比较无显著差异(表1).

2.2 慢性丙型肝炎患者血清IL-1 β 和IL-18水平的变化 比较慢性丙型肝炎组和健康对照组血清

IL-1 β 和IL-18水平, 结果发现: 慢性丙型肝炎患者血清IL-18水平明显高于健康对照组(1077.44 \pm 657.58 ng/L vs 259.92 \pm 328.47 ng/L, $P < 0.001$), IL-1 β 水平(3.88 \pm 0.93 ng/L)与健康对照组(3.44 \pm 1.36 ng/L)无显著差异($P = 0.209$). 根据患者感染时间将其分为0-5年、6-10年、11-20年、21-30年4组, 分别比较4组间细胞因子水平的差异, 结果发现: 血清IL-1 β 在0-5年组、6-10年组和11-20年组均明显低于21-30年组(3.63 \pm 0.42 ng/L, 4.20 \pm 0.27 ng/L, 3.76 \pm 0.89 ng/L vs 6.56 \pm 0.99 ng/L, 均 $P < 0.01$). IL-18在6-10年组明显高于11-20年组(1936.50 \pm 705.83 ng/L vs 872.35 \pm 703.30 ng/L, $P = 0.031$). 两种细胞因子随着感染时间的变化趋势见图1.

2.3 血清IL-1 β 和IL-18水平与肝脏炎症活动及病情轻重的关系 血清IL-1 β 和IL-18含量与血清ALT水平无明显相关($r = 0.106, 0.325$, 均 $P > 0.05$), 由轻度到重度2种细胞因子水平均逐渐升高(图1), 但只有重度患者IL-1 β 含量与轻度相比具有显著性差异(4.99 \pm 1.44 ng/L vs 3.68 \pm 0.76 ng/L, $P < 0.05$, 图2).

2.4 血清IL-1 β 和IL-18水平与HCV基因型的关系 比较不同基因型之间细胞因子水平的差异, 结果发现不同基因型和亚型之间血清IL-1 β 和IL-18含量均无显著性差异(均 $P > 0.05$, 表2).

2.5 血清IL-1 β 和IL-18水平与Th1/Th2细胞因子

■ 相关报道

有研究报道慢性丙型肝炎患者血清IL-18水平明显高于正常对照组, 并与肝脏炎症活动和损伤程度呈正相关, 治疗前血清低水平IL-18与干扰素持续应答呈正相关. 慢性丙型肝炎患者血清IL-1 β 水平明显高于正常对照组, 但与肝脏组织学炎症和纤维化程度不相关. 血清和肝脏中IL-1 β 能降低IFN- α 的信号传导, 是慢性丙型肝炎干扰素治疗抵抗的机制之一.

■创新盘点

本文比较系统地研究了慢性丙型肝炎患者血清IL-18和IL-1 β 水平与丙型肝炎慢性化、病情轻重、肝脏炎症活动以及干扰素疗效的关系,同时分析了二者与Th1细胞因子IL-2和Th2细胞因子IL-6之间的相关性。

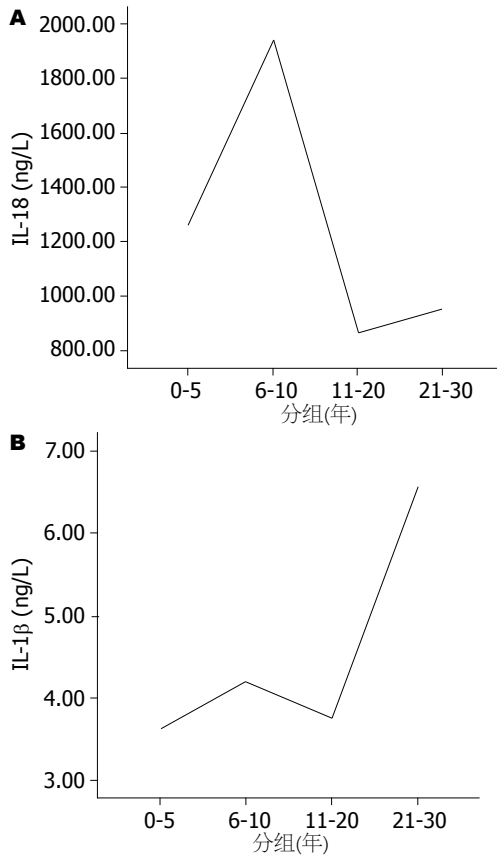


图1 慢性丙型肝炎患者血清IL-1 β 和IL-18水平与感染时间的关系。A: IL-18; B: IL-1 β 。

表2 不同基因型之间血清IL-1 β 和IL-18含量的比较 (ng/L)

| 基因型 | n | IL-1 β | IL-18 |
|------|----|-----------------|----------------------|
| 基因型 | | | |
| 1型 | 19 | 4.03 \pm 1.04 | 1235.34 \pm 751.99 |
| 2型 | 9 | 3.85 \pm 0.96 | 933.94 \pm 610.16 |
| 3型 | 2 | 3.49 \pm 0.09 | 1144.50 \pm 692.96 |
| 基因亚型 | | | |
| 1a | 4 | 3.76 \pm 0.52 | 1242.00 \pm 864.06 |
| 1b | 14 | 4.10 \pm 1.18 | 1284.92 \pm 756.32 |
| 1c | 1 | | |
| 2a | 6 | 3.86 \pm 1.16 | 783.67 \pm 607.67 |
| 2b | 3 | 3.82 \pm 0.53 | 1234.50 \pm 602.31 |

IL-2和IL-6的关系 血清IL-1 β 含量与血清IL-2和IL-6水平均无相关($r = 0.098, 0.333, 均P > 0.05$), IL-18与IL-2呈显著性正相关($r = 0.434, P = 0.017$), 与IL-6无相关($r = 0.243, P = 0.196$)。

2.6 血清IL-1 β 和IL-18水平与干扰素疗效的关系 比较应答组和无应答组治疗前血清IL-1 β 和IL-18水平, 两组之间均无显著性差异(表3)。对30例患者中的12例进行了动态观察, 其中应答组5例, 无应答组7例。治疗结束时应答组和无应答组与治疗前相比, 两种细胞因子水平亦均无显

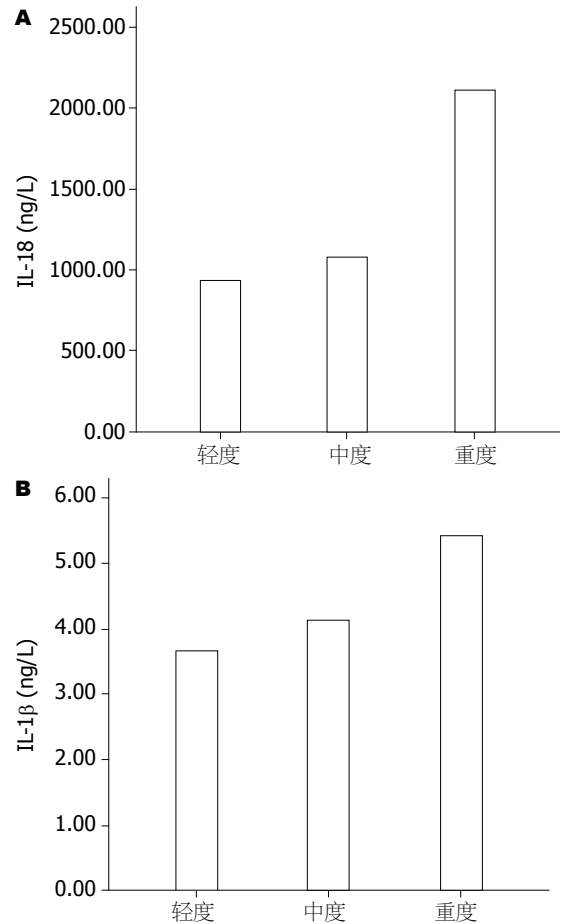


图2 血清IL-1 β 和IL-18水平与病情轻重的关系。A: IL-18; B: IL-1 β 。

表3 应答组和无应答组治疗前血清IL-1 β 和IL-18水平的比较 (ng/L)

| 细胞因子 | 应答组 | 无应答组 | P值 |
|--------------|----------------------|----------------------|-------|
| IL-1 β | 3.81 \pm 0.88 | 4.05 \pm 1.06 | 0.493 |
| IL-18 | 1091.57 \pm 610.16 | 1180.25 \pm 787.13 | 0.736 |

著性差异(表4)。

3 讨论

目前认为细胞免疫应答对丙型肝炎患者病情发展及转归起主要作用^[16-18]。HCV感染后机体最主要的效应细胞是细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL), CTL细胞需在Th细胞辅助下, 才能充分发挥作用, Th细胞通过分泌的细胞因子调节CTL细胞的功能, 并与APC如树突状细胞、巨噬细胞等分泌的IL-1、IL-18等共同组成细胞因子网络调节系统在病毒感染后机体对病毒的清除、组织损伤、病情进展过程中起重要作用。

IL-18主要由激活的单核巨噬细胞产生, 能够

表 4 干扰素治疗前后血清IL-1 β 和IL-18水平的比较 (ng/L)

| 变量 | 治疗前 | 治疗后 | P值 |
|--------------|----------------------|----------------------|-------|
| 应答组 | | | |
| IL-1 β | 3.88 \pm 1.48 | 2.84 \pm 0.64 | 0.186 |
| IL-18 | 1161.50 \pm 578.88 | 1186.10 \pm 625.57 | 0.950 |
| 无应答组 | | | |
| IL-1 β | 3.95 \pm 1.04 | 4.46 \pm 0.98 | 0.364 |
| IL-18 | 1147.36 \pm 738.29 | 740.07 \pm 333.84 | 0.208 |

促进T细胞增殖,并使T细胞前体向Th1细胞分化增殖,在机体的免疫应答反应中起重要作用^[19-23]. Falasca *et al*^[24]和Majda-Stanislawski *et al*^[25]研究发现,慢性丙型肝炎患者血清IL-18水平明显高于正常对照组,并与肝脏炎症活动和损伤程度呈正相关,而Schvoerer *et al*^[26]却报道慢性丙型肝炎患者血清和外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)内IL-18水平明显低于健康对照组,并与肝脏炎症活动程度相关. 本研究结果与Falasca *et al*和Majda-Stanislawski *et al*的一致,慢性丙型肝炎患者血清IL-18含量明显高于健康对照组,且由轻度到重度逐渐升高,尽管没有达到显著相差异水平,但与之不同的是,未发现血清IL-18含量与反映肝脏炎症活动的血清ALT水平有相关性. 进一步比较了HCV感染后0-5年、6-10年、11-20年和21-30年不同感染阶段血清IL-18水平的差异,发现随着感染时间的延长,IL-18有逐渐下降趋势. 上述结果表明:血清IL-18水平与丙型肝炎的慢性化和病情轻重有关. 随着感染时间的延长血清IL-18水平逐渐下降,支持了在HCV感染初期, Th1细胞因子占优势,随着慢性化的进展,则出现由Th1细胞向Th2细胞的优势转化这一观点,因为IL-18是Th1细胞刺激因子,可使体外培养的T细胞产生大量的干扰素 γ 和IL-2^[27-28],本研究对血清IL-18和血清IL-2含量进行相关性分析发现,二者呈显著性正相关. Schvoerer *et al*还发现:感染1b型HCV的慢性丙型肝炎患者血清和PBMC内IL-18水平明显低于其他基因型HCV感染者,而1b型HCV感染者慢性化比例明显高于其他基因型感染者,说明IL-18在丙型肝炎的发病机制中可能起一定作用. 本研究比较了不同基因型和亚型之间血清IL-18和IL-1 β 水平,未发现显著性差异. 1b型HCV感染者慢性化比例明显高于其他基因型感染者是否与此有关,尚需进一步研究.

IL-1 β 是由单核-巨噬细胞和内皮细胞产生,参与免疫反应、炎症、发热、急性期蛋白质合成等宿主防御反应的一种细胞因子. 有报道IL-1 β 能增强Th1细胞的优势反应^[29],在丙型肝炎的发病机制起重要作用. 本文对慢性丙型肝炎组和健康对照组血清IL-1 β 水平比较未发现显著性差异,但HCV感染0-5年组、6-10年组和11-20年组血清IL-1 β 均明显低于21-30组,轻度患者明显低于重度患者,上述结果表明,血清IL-1 β 水平是可以反映慢性丙型肝炎患者病情轻重和慢性化的指标之一. 未发现血清IL-1 β 含量与Th1类细胞因子IL-2和Th2类细胞因子IL-6含量相关,是否与其他Th1/Th2细胞因子有关,有待于进一步研究. 与本研究结果不同, Lapiński *et al*^[30]研究发现,慢性丙型肝炎患者血清IL-1 β 水平明显高于正常对照组,并与肝组织内IL-1 β 水平升高相一致,与肝脏组织学炎症和纤维化程度不相关. 因此,有关IL-1 β 在慢性丙型肝炎发病机制中的作用及与Th1/Th2细胞因子之间的相互关系,尚需进一步研究证实.

所观察的30例患者中,26例有明确的流行病学史,主要感染原因依次为输血、手术、治牙及纹刺,呼吁应加强此方面的宣传及管理,以降低丙型肝炎的发病率. 干扰素治疗的持续应答率为46.7%,应用Peg干扰素者(62.5%)高于普通干扰素(40.9%),但统计学检测无显著性差异. 最近有报道应用Peg干扰素治疗慢性丙型肝炎的持续应答率高达80%以上^[31-32],但治疗费用过高仍是阻碍部分患者选择Peg干扰素的主要原因. 应答组和无应答组相比,年龄、性别、体质量、感染时间及血清HCV RNA载量均无显著差异,血清ALT水平明显高于无应答组,表明肝脏存在炎症活动时进行干扰素抗病毒治疗效果较好,这与以往的研究结论一致. 基因型分布以1b型(46.7%)和2a型(20%)为主,尚有1a、1c、2b和3a型存在. 2a型患者对干扰素治疗的应答率(66.7%)高于1b型(35.7%),但可能由于病例数较少,统计学检测并无显著性差异. 分析血清IL-18和IL-1 β 含量与干扰素疗效的关系发现,应答组和无应答组干扰素治疗前2种细胞因子水平无显著性差异,对其中12例患者进行了动态观察(应答组5例,无应答组7例),治疗结束时应答组和无应答组与治疗前相比,2种细胞因子水平亦均无显著性差异. Tian *et al*^[33]报道血清和肝脏中IL-1 β 能降低IFN- α 的信号传导,是慢性丙型肝炎干扰素治疗抵抗的机制之一,本文的研究结果

■应用要点

血清IL-18和IL-1 β 水平分别与丙型肝炎的慢性化和病情轻重相关,该两种细胞因子水平与干扰素疗效无关,不能对疗效进行预测.

■同行评价

本文选题密切联系临床,参考文献较新颖,值得临床医生阅读。

也发现干扰素治疗无应答组血清IL-1 β 含量高于应答组,干扰素治疗应答组治疗结束时血清IL-1 β 含量有所下降,无应答组则升高,但统计学检测未达到显著差异水平。Mihm *et al*^[34]报道在感染HCV-1型的丙型肝炎患者中,应答者干扰素治疗前血清IL-18水平低于无应答者,提示治疗前血清低水平IL-18与干扰素持续应答呈正相关。

可见,目前对IL-1 β 和IL-8在慢性丙型肝炎发病机制、病情进展及干扰素治疗过程中作用的研究还缺乏系统性,研究结果也不完全相同,仍需要进行进一步的研究。对细胞因子多态性与丙型肝炎发病机制及IFN- α 治疗反应之间的关系的深入研究,将为干扰素治疗无应答者能否联合免疫调节治疗以提高应答率提供理论依据。

4 参考文献

- Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992; 327: 1899-1905
- Di Bisceglie AM, Goodman ZD, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpolder JJ, Alter HJ. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. *Hepatology* 1991; 14: 969-974
- Seeff LB. Natural history of viral hepatitis, type C. *Semin Gastrointest Dis* 1995; 6: 20-27
- Gane EJ. The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl* 2008; 14 Suppl 2: S36-S44
- Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Yoshida H, Sato S, Kato N, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Risk assessment of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients by transient elastography. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 839-843
- Kwon JH, Bae SH. [Current status and clinical course of hepatitis C virus in Korea] *Korean J Gastroenterol* 2008; 51: 360-367
- Trepo C. Genotype and viral load as prognostic indicators in the treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 2000; 7: 250-257
- Kogure T, Ueno Y, Fukushima K, Nagasaki F, Kondo Y, Inoue J, Matsuda Y, Kakazu E, Yamamoto T, Onodera H, Miyazaki Y, Okamoto H, Akahane T, Kobayashi T, Mano Y, Iwasaki T, Ishii M, Shimosegawa T. Pegylated interferon plus ribavirin for genotype 1b chronic hepatitis C in Japan. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7225-7230
- Priimiagi LS, Tefanova VT, Tallo TG, Shmidt EV, Solomonova OV, Tuisk TP. [Immune-regulating Th1- and Th2-cytokines in chronic infections caused by hepatitis B and C viruses] *Vopr Virusol* 2003; 48: 37-40
- Lapiński TW, Dabrowska MM. [Activity of cytokines in chronic HCV-infected patients] *Przegl Epidemiol* 2007; 61: 747-754
- Falasca K, Mancino P, Ucciferri C, Dalessandro M, Zingariello P, Lattanzio FM, Petrarca C, Martinotti S, Pizzigallo E, Conti P, Vecchiet J. Inflammatory cytokines and S-100b protein in patients with hepatitis C infection and cryoglobulinemias. *Clin Invest Med* 2007; 30: E167-E176
- Sobchak DM, Korochkina OV. [Cytokine regulation of immune response in patients with acute HCV-infection] *Ter Arkh* 2005; 77: 23-29
- Trapero M, García-Buey L, Muñoz C, Vitón M, Moreno-Monteagudo JA, Borque MJ, Quintana NE, Moreno-Otero R. Maintenance of T1 response as induced during PEG-IFN α plus ribavirin therapy controls viral replication in genotype-1 patients with chronic hepatitis C. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 481-490
- Masaki N, Fukushima S, Hayashi S. Lower th-1/th-2 ratio before interferon therapy may favor long-term virological responses in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2163-2169
- Fan Z, Huang XL, Kalinski P, Young S, Rinaldo CR Jr. Dendritic cell function during chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1127-1137
- Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1473-1482
- Satake S, Nagaki M, Kimura K, Naiki T, Hayashi H, Sugihara J, Tomita E, Moriwaki H. Significant effect of hepatitis C virus specific CTLs on viral clearance in patients with type C chronic hepatitis treated with antiviral agents. *Hepatol Res* 2008; 38: 491-500
- Abbas Z, Moatter T, Hussainy A, Jafri W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6656-6661
- Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Mühl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 658-664
- Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 59-63
- Sugawara I. Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes Infect* 2000; 2: 1257-1263
- Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, Miller JL, Manns MP, Rehermann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* 2000; 6: 578-582
- Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001; 22: 556-560
- Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M, Zingariello P, Mancino P, Petrarca C, Pizzigallo E, Conti P, Vecchiet J. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci* 2006; 36: 144-150
- Majda-Stanislawski E, Pietrzak A, Brzezińska-Błaszczak E. Serum IL-18 concentration does not depend on the presence of HCV-RNA in serum or in PBMC. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 212-215
- Schwoerer E, Navas MC, Thumann C, Fuchs A,

- Meyer N, Habersetzer F, Stoll-Keller F. Production of interleukin-18 and interleukin-12 in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection before antiviral therapy. *J Med Virol* 2003; 70: 588-593
- 27 Matsumoto S, Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Koide K, Takeuchi M, Ohta T, Kurimoto M. Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 454-457
- 28 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 10702-10707
- 29 McGuinness PH, Painter D, Davies S, McCaughan GW. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. *Gut* 2000; 46: 260-269
- 30 Lapiński TW. The levels of IL-1beta, IL-4 and IL-6 in the serum and the liver tissue of chronic HCV-infected patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001; 49: 311-316
- 31 Jeong S, Kawakami Y, Kitamoto M, Ishihara H, Tsuji K, Aimitsu S, Kawakami H, Uka K, Takaki S, Kodama H, Waki K, Imamura M, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. Prospective study of short-term peginterferon-alpha-2a monotherapy in patients who had a virological response at 2 weeks after initiation of interferon therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 541-545
- 32 Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med* 2004; 140: 346-355
- 33 Tian Z, Shen X, Feng H, Gao B. IL-1 beta attenuates IFN-alpha beta-induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway. *J Immunol* 2000; 165: 3959-3965
- 34 Mihm U, Herrmann E, Sarrazin U, von Wagner M, Kronenberger B, Zeuzem S, Sarrazin C. Association of serum interleukin-8 with virologic response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2004; 40: 845-852

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-07-18)

miRNA在HBV从感染经由肝硬化到肝癌进程中表达谱的变化

马兆龙, 杨炼, 陈立波, 黄金明, 王冬冬, 王国斌

■背景资料

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类约22 nt大小的非编码单链RNA分子,他们通过与靶基因mRNA的结合调控其他基因mRNA和蛋白的表达,参与发育、炎症、肿瘤等多种生理、病理过程。在肝细胞癌(HCC)中,多个miRNA的异常表达已被证明参与了肝癌的恶性生物学行为。由于中国绝大多数肝癌患者与HBV感染密切相关,但HBV感染→肝硬化→肝癌进程中,有关miRNA表达变化的研究较少。

马兆龙, 陈立波, 王冬冬, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430022
马兆龙, 山东省泰安市中心医院 山东省泰安市 271000
杨炼, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 湖北省武汉市 430022
黄金明, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
王国斌, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科治疗中心 湖北省武汉市 430022
国家自然科学基金资助项目, No. 30672067, No. 30700190
教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NCET-07-0318
作者贡献分布: 马兆龙与杨炼对此文所作贡献均等; 此课题由马兆龙、杨炼、陈立波及王国斌设计; 研究过程由马兆龙与黄金明操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由马兆龙与王冬冬提供; 数据分析由马兆龙与黄金明完成; 本论文写作由马兆龙、杨炼及陈立波完成。
通讯作者: 杨炼, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科。
yanglian2003@163.com
电话: 027-85351623
收稿日期: 2009-05-12 修回日期: 2009-06-16
接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-18

Differential expression profile of microRNAs in the different stages of hepatitis B virus infection-related hepatocarcinogenesis

Zhao-Long Ma, Lian Yang, Li-Bo Chen,
Jin-Ming Huang, Dong-Dong Wang, Guo-Bin Wang

Zhao-Long Ma, Li-Bo Chen, Dong-Dong Wang, Hepatobiliary Surgery Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Zhao-Long Ma, Taian Central Hospital, Taian 271000, Shandong Province, China
Lian Yang, Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Jin-Ming Huang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Guo-Bin Wang, Laparoscopic Surgical Treatment Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30672067 and 30700190; the Program for New Century Excellent Talents in University, No. NCET-07-318
Correspondence to: Lian Yang, Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan

■同行评议者

管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验医学教研室; 范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科

430022, Hubei Province, China. libo_chen@hotmail.com
Received: 2009-05-12 Revised: 2009-06-16
Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To investigate the differential expression profile of microRNAs in the different stages of hepatitis B virus (HBV) infection-related hepatocarcinogenesis.

METHODS: MicroRNA microarray was used to detect the differential expression profile of microRNAs in the liver tissue taken from healthy controls as well as patients with HBV-induced cirrhosis or HBV-related hepatocellular carcinoma. Real-time quantitative PCR was performed to verify the differential expression of candidate microRNAs obtained from microarray experiment.

RESULTS: Compared with normal liver tissue, six microRNAs (hsa-miR-602, hsa-miR-129-5p, has-miR-210, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-30b*, and hsa-miR-572) were upregulated more than two-fold, and eight microRNAs (hsa-miR-143, hsa-miR-199a-5p, has-miR-195, hsa-miR-27a, hsa-miR-99a, hsa-miR-519e, has-miR-130a and hsa-miR-597) were downregulated in the liver tissue taken from patients with HBV-induced cirrhosis or HBV-related hepatocellular carcinoma. Though these identified microRNAs showed significant differential expression between normal liver tissue and HBV-related hepatocellular carcinoma tissue and cirrhotic tissue, they exhibited no significant differential expression between HBV-related hepatocellular carcinoma tissue and cirrhotic tissue.

CONCLUSION: HBV-related hepatocarcinogenesis is associated with the change in the expression profile of microRNAs.

Key Words: MicroRNA microarray; MicroRNA; Hepatitis B virus; HBV-related hepatocellular carcinoma

Ma ZL, Yang L, Chen LB, Huang JM, Wang DD, Wang

GB. Differential expression profile of microRNAs in the different stages of hepatitis B virus infection-related hepatocarcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2112-2116

摘要

目的: 分析微小RNA(microRNA, miRNA)在HBV感染到肝硬化再到肝癌进程中表达谱的变化。

方法: 利用miRNA芯片技术检测人正常肝脏、乙型肝炎肝硬化、HBV相关性肝癌组织中miRNA表达谱的差异。实时定量PCR检测上述3种肝脏组织中芯片结果差异性表达的miRNA, 验证芯片结果的可信性。

结果: 与正常肝脏组织相比, 乙型肝炎肝硬化和HBV相关性肝癌组织中表达上调超过2倍的microRNA有6个, 分别为: hsa-miR-602、hsa-miR-129-5p、has-miR-210、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-30b*及hsa-miR-572; 表达下调超过2倍的miRNA有8个: hsa-miR-143、hsa-miR-199a-5p、has-miR-195、hsa-miR-27a、hsa-miR-99a、hsa-miR-519e、has-miR-130a及hsa-miR-597。这些正常肝脏组织相比有差异表达的miRNA, 在乙型肝炎肝硬化和HBV相关性肝癌组织中表达量无明显差别。

结论: 从HBV感染到肝硬化再到肝癌进程中伴有microRNA表达谱的变化, 且变化主要发生在进程早期。

关键词: 微小RNA芯片; 微小RNA; 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒相关性肝癌

马兆龙, 杨炼, 陈立波, 黄金明, 王冬冬, 王国斌. miRNA在HBV从感染经由肝硬化到肝癌进程中表达谱的变化. *世界华人消化杂志* 2009; 17(20): 2112-2116

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2112.asp>

0 引言

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类约22 nt大小的非编码单链RNA分子, 他们通过与靶基因mRNA的结合调控其他基因mRNA和蛋白的表达, 参与发育、炎症、肿瘤等多种生理、病理过程^[1-6]。在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中, 多个miRNA的异常表达已被证明参与了肝癌的恶性生物学行为^[7-11]。由于中国绝大多数肝癌患者与HBV感染密切相关, 但HBV感染→肝硬化→肝癌进程中, 有关miRNA表达变化的研究较少。我们通过应用miRNA芯片技术检

测不同肝脏组织标本中miRNA表达谱的差异, 筛选出在乙型肝炎肝硬化和HBV相关性肝癌中表达明显上调或下调的miRNA, 为进一步阐明miRNA表达变化在HBV感染→肝硬化→肝癌进程中起到的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2007-09/2008-08华中科技大学同济医学院附属协和医院行肝癌切除和门诊肝组织活检病例, 选取其中无其他基础肝病, 30-40岁男性患者的正常肝脏组织、乙型肝炎肝硬化组织和HBV相关性肝癌组织, 所有病例术前均未接受放化疗, 均经病理学确诊。组织标本离体后立即放入液氮冷藏, 后转入-80℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取及质量检测: 按照TRIzol[®]试剂(Invitrogen life technologies)说明书的步骤, 逐步提取出组织标本中的总RNA。应用紫外分光光度计测定总RNA的吸光度 A_{260} 值和 A_{280} 值, 用 A_{260} 值计算其浓度, 并计算 A_{260}/A_{280} 值检测其纯度; 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法进一步检测总RNA质量。

1.2.2 miRNA芯片检测不同肝脏组织miRNA的表达: 为减少性别、年龄和基础疾病的影响, 在所有肝脏组织标本中, 选择年龄为30-40岁, 排除其他基础疾病的男性患者的正常肝脏、乙型肝炎肝硬化和HBV相关性肝癌组织标本各1例, 进行miRNA芯片检测。该实验采用丹麦Exiqon公司生产的LNA[™] miRNA芯片(11.0版), 此芯片使用的是基于锁定核苷酸[™](lock nucleic acids, LNA)专利技术的捕获探针, 该探针可以高灵敏、高特异性与互补的靶RNA结合, 从而准确检测样品中miRNA的表达水平。每张miRNA芯片中包含有至少1807个特异性探针、435个Exiqon特有的miRPlus[™]探针(提供miRBase数据库外的新miRNA信息)、对照探针以及无探针的空白对照, 可以检测Sanger miRBase 11.0数据库中人、小鼠、大鼠全部miRNA(其中人约847条, 小鼠约609条, 大鼠约351条)。为保证结果的可靠性, 上述每个探针在芯片内重复4次, 即每张芯片对同一样本重复检测4次。分别取5 μg上述3个不同类型肝脏组织样本的总RNA, 采用miRCURY[™] Array Labelling kit(Exiqon)标记Hy3[™]荧光, 采用RNeasy Mini Kit(Qiagen)浓缩标记样品, 然后采用miRCURY[™] Array microarray kit(Exiqon)和Hybridization Chamber II(Ambion)

■ 相关报道

大量研究发现, 在多种人类肿瘤都伴有miRNA的表达异常, 如弥漫性大B细胞淋巴瘤中miR-155表达上调、胰腺癌中miR-221表达上调、肺癌中的let-7表达下调、结肠直肠癌中的miR-143和miR-145表达下调、慢性淋巴细胞白血病中的miR-15a和miR-16-1表达下调等, 提示miRNA在肿瘤的发生发展中可能发挥类似癌基因或抑癌基因的作用。

应用要点

miRNA表达的改变可能为HBV感染→肝硬化→肝癌进程的始动因素,相关miRNA表达的改变可能促进了该进程的发生发展.

表 1 miRNA芯片和实时定量PCR检测差异表达miRNA的结果

| | miRNA分子 | 芯片结果 | | | 实时定量PCR结果 | | |
|----------|-----------------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|
| | | B/A | C/A | C/B | B/A | C/A | C/B |
| 上调的miRNA | hsa-miR-602 | 3.234 | 4.134 | 1.278 | 2.703 | 3.486 | 1.290 |
| | hsa-miR-129-5p | 2.246 | 6.322 | 2.815 | 2.852 | 4.347 | 1.524 |
| | has-miR-210 | 5.159 | 4.274 | 0.828 | 3.531 | 2.894 | 0.820 |
| | hsa-miR-671-5p | 4.315 | 4.249 | 0.985 | 2.953 | 3.624 | 1.227 |
| | hsa-miR-30b* | 3.571 | 4.005 | 1.122 | 3.841 | 4.896 | 1.275 |
| | hsa-miR-572 | 3.588 | 3.092 | 0.862 | 4.319 | 4.291 | 0.994 |
| 下调的miRNA | hsa-miR-143 | -3.661 | -5.764 | -1.575 | -2.762 | -3.521 | -1.275 |
| | hsa-miR-199a-5p | -3.288 | -5.139 | -1.563 | -2.482 | -2.730 | -1.100 |
| | has-miR-195 | -3.066 | -3.251 | -1.060 | -2.501 | -2.943 | -1.177 |
| | hsa-miR-27a | -2.193 | -3.147 | -1.435 | -3.492 | -3.246 | 1.076 |
| | hsa-miR-99a | -2.137 | -2.746 | -1.285 | -3.581 | -3.484 | 1.028 |
| | hsa-miR-519e | -2.653 | -2.674 | -1.008 | -2.898 | -3.572 | -1.233 |
| | has-miR-130a | -2.016 | -2.740 | -1.225 | -3.805 | -3.872 | -1.018 |
| | hsa-miR-597 | -2.071 | -2.357 | -1.138 | -3.736 | -4.058 | -1.086 |

进行miRNA芯片杂交,具体步骤按各试剂说明书进行;杂交后芯片用Genepix 4000B(Molecular Devices)635 nm波长进行图像扫描,所得数据用Genepix Pro 6.0(Molecular Devices)分析,通过原始值减去背景值来做修正,并用中值做标准化,分别计算出3种样本中miRNA的标准值及两两之间标准值的比值.

1.2.3 实时定量PCR检测目的miRNA表达量:取2 μ g上述3种不同类型肝脏组织样本的总RNA作为初始模板,总反应体系为20 μ L,应用Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)在Gene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)上进行逆转录合成cDNA,反应条件为:16°C, 30 min; 42°C, 42 min; 85°C, 5 min. 然后取1 μ L上述cDNA为模板,以U6作为内参照,每个检测样本做3个复孔,在Rotor-Gene 3000 Real-time PCR仪(Corbett Research)上进行实时定量PCR,反应条件为:95°C预热5 min; 95°C, 10 s; 58°C, 15 s; 72°C, 20 s, 35个循环; +0.5°C/cycle, 5 s, 54个循环. 实验中所用引物均由Invitrogen公司合成. 为减小因RNA浓度定量误差和RNA逆转录效率误差等的影响,所得数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式校正,用校正后的值判定各样本中目的miRNA的表达量的差异.

2 结果

2.1 总RNA的质量检测 紫外分光光度计检测结果表明,3种不同类型肝脏组织标本总RNA的 A_{260}/A_{280} 值分别为1.88、1.85和1.83;凝胶电泳结果提示各样本的18S和28S条带均较清晰,且密

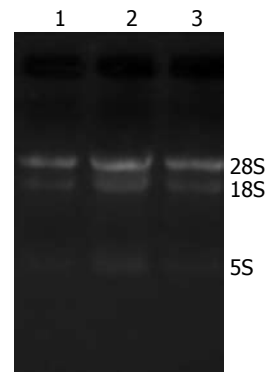


图 1 不同肝脏组织标本中总RNA凝胶电泳图. 1: 正常肝脏组织; 2: 乙型肝炎肝硬化组织; 3: HBV相关性肝癌组织.

度之比约为1:2(图1). 上述实验结果表明来自3种不同类型肝脏组织标本的总RNA均有较好的质量,完全可以满足后续的miRNA芯片检测和实时定量PCR的实验要求.

2.2 miRNA芯片检测结果 杂交后的miRNA芯片经Genepix 4000B扫描,所得结果见图2;再经Genepix Pro 6.0分析及标准化处理后,芯片结果显示与正常肝脏组织相比,乙型肝炎肝硬化和HBV相关性肝癌组织中表达上调超过2倍的miRNA有6个,分别为hsa-miR-602、hsa-miR-129-5p、has-miR-210、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-30b*和hsa-miR-572;表达下调超过2倍的miRNA有8个,分别为hsa-miR-143、hsa-miR-199a-5p、has-miR-195、hsa-miR-27a、hsa-miR-99a、hsa-miR-519e、has-miR-130a和hsa-miR-597,具体结果见表1.

2.3 实时定量PCR检测目的miRNA结果 以用于上述miRNA芯片检测的3种不同类型肝脏组织标本总RNA为模板,实时定量PCR检测在芯片结果中差异性表达的miRNA,结果见表1,提示实时

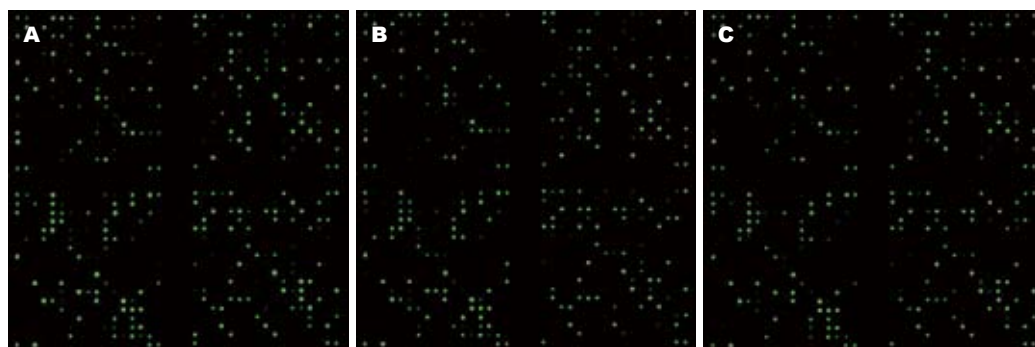


图 2 Hy³™ 荧光标记的总RNA与LNA™ miRNA芯片杂交图(局部放大图). A: 正常肝脏组织; B: 乙型肝炎肝硬化组织; C: HBV相关性肝癌组织.

■同行评价

本文主要应用microRNA芯片技术检测HBV感染到肝癌组织中microRNA表达的差异, 课题思路清晰, 文字表达清楚, 具有很高的学术价值与创新性.

定量PCR结果与miRNA芯片结果趋势一致, 表明miRNA芯片的结果具有可信性.

3 讨论

miRNA作为一类成熟状态下只有22 nt左右的非编码单链小RNA, 广泛存在于从线虫、植物、动物到人类的多种生物中, 由于其在个体生长发育、细胞增殖凋亡、炎症和肿瘤等多种生理病理过程中都起着十分重要的作用, 因而受到广泛关注. 从Du *et al*^[22]在线虫中发现第1个miRNA(lin-4)开始, 截止2009-03, 已经在103个物种中发现miRNA共约9539个, 其中人类约706个(数据来源于Sanger miRBase 13.0, <http://miRNA.sanger.ac.uk/sequences/>), 据估计这些miRNA具有调控人类至少30%基因的潜能^[12].

大量研究发现, 在多种人类肿瘤都伴有miRNA的表达异常, 如弥漫性大B细胞淋巴瘤中miR-155表达上调^[13]、胰腺癌中miR-221表达上调^[14]、肺癌中的let-7表达下调^[15-16]、结肠直肠癌中的miR-143和miR-145表达下调^[17]、慢性淋巴细胞白血病中的miR-15a^[18]和miR-16-1表达下调^[19]等, 提示miRNA在肿瘤的发生发展中可能发挥类似癌基因或抑癌基因的作用. 在正常情况下, 成熟的miRNA通过调控靶基因mRNA的翻译或其稳定性来参与正常细胞稳态的维持, 故而miRNA的异常表达可能导致其相应靶基因转录后水平的表达异常. 目前对miRNA在肿瘤发生发展中的作用机制还不是太明确, 认为其主要作用机制为: miRNA通过RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)与靶基因mRNA的3'端UTR区互补结合^[20-21], 当两者能完全互补配对结合时, 导致靶基因mRNA的降解, 这种现象在植物中多见; 在动物中则多数是通过两者的不完全互补结合, 抑制靶基因mRNA的翻译, 进而影响靶基因蛋白的表达^[22].

在排除年龄、性别和基础肝脏疾病的影响下, 我们通过miRNA芯片和实时定量PCR检测发现: 与正常人类肝脏组织相比, 有些miRNA在乙型肝炎肝硬化和HBV相关性肝癌组织中表达明显上调, 如miR-602、miR-129-5p、miR-210、miR-671-5p、miR-30b*和miR-572; 有些则表达明显下调, 如miR-143、miR-199a-5p、miR-195、miR-27a、miR-99a、miR-519e、miR-130a和miR-597, 其中miR-210^[23-24]、miR-143^[17,25]、miR-195^[26]、miR-27a^[27]、miR-99a^[28]、miR-130a^[29]等已被文献报道过在其他肿瘤组织中也有类似结果, 提示这些在不同类型肝脏组织中差异性表达的miRNA可能在HBV感染→肝硬化→肝癌的发生发展过程中起到重要的类似癌基因或抑癌基因的作用. 但上述与正常肝脏组织相比表达上调或下调的miRNA, 在乙型肝炎肝硬化组织和HBV相关性肝癌组织中的表达却无明显差异, 表明miRNA的表达的变化主要发生在HBV感染→肝硬化→肝癌进程中的早期.

通过上述结果我们可以推测出miRNA表达的改变可能为HBV感染→肝硬化→肝癌进程的始动因素, 相关miRNA表达的改变可能促进了该进程的发生发展.

4 参考文献

- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-7070
- He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 19075-19080
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21

- is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029-6033
- 4 Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 2006; 5: 29
 - 5 Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, Labourier E, Hahn SA. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 4442-4452
 - 6 Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA* 2008; 14: 417-424
 - 7 Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537-2545
 - 8 Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, Schmittgen TD. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 419-427
 - 9 Huang YS, Dai Y, Yu XF, Bao SY, Yin YB, Tang M, Hu CX. Microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues without viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 87-94
 - 10 Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, Zanetti KA, Ye QH, Qin LX, Croce CM, Tang ZY, Wang XW. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 897-907
 - 11 Wang Y, Lee AT, Ma JZ, Wang J, Ren J, Yang Y, Tantoso E, Li KB, Ooi LL, Tan P, Lee CG. Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J Biol Chem* 2008; 283: 13205-13215
 - 12 Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-798
 - 13 Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3627-3632
 - 14 Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1046-1054
 - 15 Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647
 - 16 Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753-3756
 - 17 Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
 - 18 Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11755-11760
 - 19 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2999-3004
 - 20 Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-640
 - 21 Tang F, Hajkova P, O'Carroll D, Lee C, Tarakhovskiy A, Lao K, Surani MA. MicroRNAs are tightly associated with RNA-induced gene silencing complexes in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372: 24-29
 - 22 Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005; 132: 4645-4652
 - 23 Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 1340-1348
 - 24 Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, Li C, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Weber BL, Simon C, Coukos G, Zhang L. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 255-264
 - 25 Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007; 72: 397-402
 - 26 Flavin RJ, Smyth PC, Laios A, O'Toole SA, Barrett C, Finn SP, Russell S, Ring M, Denning KM, Li J, Aherne ST, Sammarae DA, Aziz NA, Alhadi A, Sheppard BL, Lao K, Sheils OM, O'Leary JJ. Potentially important microRNA cluster on chromosome 17p13.1 in primary peritoneal carcinoma. *Mod Pathol* 2009; 22: 197-205
 - 27 Zhu H, Wu H, Liu X, Evans BR, Medina DJ, Liu CG, Yang JM. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 582-588
 - 28 Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2588-2592
 - 29 Sorrentino A, Liu CG, Addario A, Peschle C, Scambia G, Ferlini C. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2008; 111: 478-486

奥曲肽治疗顽固性Mallory-Weiss综合征24例

林海, 林志辉, 陈贻胜, 潘秀珍

林海, 林志辉, 陈贻胜, 潘秀珍, 福建医科大学省立临床医学院消化内科 福建省福州市 350001

作者贡献分布: 林海与林志辉对此文所作贡献均等; 此课题由林海与林志辉设计; 研究过程由林海、林志辉、陈贻胜及潘秀珍操作完成; 数据分析由林海完成; 本论文写作由林海完成。

通讯作者: 林海, 副主任医师, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建医科大学省立临床医学院消化内科. hellolinhai@sohu.com
电话: 0591-87557768-7028

收稿日期: 2009-04-26 修回日期: 2009-05-28

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-18

Treatment of intractable Mallory-Weiss syndrome with octreotide: a report of 24 cases

Hai Lin, Zhi-Hui Lin, Yi-Sheng Chen, Xiu-Zhen Pan

Hai Lin, Zhi-Hui Lin, Yi-Sheng Chen, Xiu-Zhen Pan, Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Clinical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Dr. Hai Lin, Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Clinical College, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. hellolinhai@sohu.com

Received: 2009-04-26 Revised: 2009-05-28

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-18

Abstract

AIM: To observe the efficacy of octreotide in the treatment of intractable Mallory-Weiss syndrome (MWS).

METHODS: Forty-seven MWS patients who did not respond to routine treatment within 24 h were randomly divided into two groups: treatment group ($n = 24$) and control group ($n = 23$). Patients in the control group were given an intravenous infusion of 40 mg omeprazole, once every 12 hours, while those in the treatment group were given the same dose of omeprazole as well as continuous intravenous administration of octreotide via a micro pump at a constant speed of 25 $\mu\text{g}/\text{h}$ for three days.

RESULTS: After treatment with octreotide, hemostasis was achieved in 17 (70.8%) patients. The overall response rate achieved in the treatment group was significantly higher than that in

the control group (91.67% vs 73.91%, $P < 0.01$). Moreover, the hemostasis success rate in the treatment group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Combined use of octreotide and omeprazole is more effective in the treatment of MWS patients who do not respond to routine treatment.

Key Words: Octreotide; Mallory-Weiss syndrome; Bleeding

Lin H, Lin ZH, Chen YS, Pan XZ. Treatment of intractable Mallory-Weiss syndrome with octreotide: a report of 24 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(20): 2117-2119

摘要

目的: 观察奥曲肽对顽固性Mallory-Weiss综合征(MWS)的疗效。

方法: 将经常规治疗24 h仍出血不止的MWS患者47例, 随机分为2组: 治疗组($n = 24$)和对照组($n = 23$)。对照组: 单用静脉注射奥美拉唑40 mg, 每12 h 1次。治疗组: 加用奥曲肽25 $\mu\text{g}/\text{h}$ 微量泵泵入, 连用3 d。

结果: 治疗组加用奥曲肽治疗后, 止血显效17例, 占70.8%。治疗组总有效率(91.67%)明显优于对照组(73.91%), 治疗组止血率明显优于对照组, 差异有显著性($P < 0.01$)。

结论: 对顽固性MWS大出血患者, 常规治疗效果不佳时, 加用奥曲肽治疗效果显著。

关键词: 奥曲肽; Mallory-Weiss综合征; 出血

林海, 林志辉, 陈贻胜, 潘秀珍. 奥曲肽治疗顽固性Mallory-Weiss综合征24例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(20): 2117-2119

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2117.asp>

0 引言

Mallory-Weiss综合征(Mallory-Weiss syndrome, MWS)由Mallory和Weiss于1929年首先描述, 近

■背景资料

MWS近年有增加的趋势, 多为无痛性出血, 出血量大, 甚至可引起失血性休克和死亡, 多采用常规止血及内镜治疗, 但存在再出血率高和转手术率高的问题, 且需要较熟练的内镜技术, 本文采用常规止血加用奥曲肽治疗, 使用方便, 效果显著。

■同行评议者

张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

■应用要点

对顽固性MWS大出血患者,常规治疗效果不佳时,加用奥曲肽治疗,使用方便,尤其适用于基层医院。

年有增加的趋势^[1]。MWS约占上消化道出血的0.1%-14.7%^[2],是急性上消化道大出血的少见原因之一。MWS的特征性临床表现为先剧烈呕吐,开始呕吐物无血而后呕血。多为无痛性出血,出血量大,甚至可引起失血性休克和死亡^[3]。临床上均采用常规抗酸等止血及内镜下治疗,仍出血不止者,一般多采取外科手术治疗。我院采用奥曲肽联用奥美拉唑治疗顽固性MWS大出血,疗效满意,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组47例为我院2005-01/2008-01收治的患者,经胃镜证实为MWS,发病前均有剧烈呕吐,随后出现呕血,估计出血量均>1000 mL,伴失血性休克。本组中出现有胸骨后烧灼感18例,有上腹部轻微疼痛感16例。其中大量饮酒后引起38例,妊娠呕吐引起5例,不明原因呕吐4例。临床表现呕血、黑便、头晕、乏力、心悸等,测血压明显下降,手术风险较高。本组均在24-48 h内行胃镜检查,镜下所见均为食管贲门交界黏膜纵行撕裂伤,诊断为MWS,裂伤有1处38例,有2-3处9例,长度0.5-2.5 cm,皆呈线形,深度至黏膜及黏膜下层,边缘锐利,底部、边缘有活动性出血、血凝块或黄色坏死组织附着,出血量大时可见食管腔和胃腔内大量血液聚集。其中合并食管炎13例,食管裂孔疝7例。

1.2 方法 诊断明确后常规给予输血、止血、补充血容量、抗休克等综合治疗,同时静脉注射奥美拉唑40 mg,每12 h 1次。上述常规治疗24 h出血仍未控制,患者愿意接受奥曲肽治疗者,纳入本研究。随机分2组,治疗组24例,男17例、女7例,年龄45±3岁;对照组23例,男19例、女4例,年龄43±2岁。2组一般资料比较无显著性差异,具有可比性。对照组:继续单用静脉注射奥美拉唑40 mg,每12 h 1次。治疗组:加用奥曲肽(善宁)25 μg/h微量泵泵入,连用3 d。3 d后根据病情逐步减量。出血停止指标:(1)经治疗后呕血和/或黑便停止,血压,心率稳定,血红蛋白无下降;(2)大便隐血转阴;(3)胃管抽吸液变清至少持续6 h;(4)胃镜证实病灶已无出血。患者符合上述任何1项,即判定为出血已止。超过72 h仍有出血迹象者为无效。疗效判定显效:用药后48 h内无活动性出血;有效:用药后48-72 h内无活动性出血;无效:用药72 h后仍有活动性出血。

统计学处理 2组患者疗效比较采用 χ^2 检验。

表1 治疗组与对照组治疗效果比较 n(%)

| 分组 | n | 显效 | 有效 | 无效 | 总有效 |
|-----|----|----------|---------|---------|------------------------|
| 治疗组 | 24 | 17(70.8) | 5(20.8) | 2(8.3) | 22(91.67) ^b |
| 对照组 | 23 | 10(43.5) | 7(30.4) | 6(26.1) | 17(73.91) |

^b $P<0.01$ vs 对照组。

2 结果

治疗组加用奥曲肽治疗后,止血显效17例,占70.8%。治疗组总有效率(91.67%)明显优于对照组(73.91%),治疗组止血率明显优于对照组,差异有显著性($P<0.01$,表1)。治疗组2例治疗无效患者转外科手术后治愈。对照组6例治疗无效患者内镜下钛夹止血或转外科手术后治愈。治疗组2例轻微头晕,对照组3例恶心,余无其他不良反应。

3 讨论

MWS是由于剧烈干呕、呕吐、剧烈咳嗽、搬运重物、用力排便、顽固呃逆等原因引起腹内压力或胃内压力突然急剧增加,导致贲门处、食管下段黏膜及黏膜下层撕裂,内镜下多表现为食管下段局部线状和梭状损伤^[4],临床表现为程度不同的上消化道出血为主的综合征。

Ghosh *et al*^[5]报道MWS占上消化道出血原因的5.0%-11.0%。常见诱因因为各种原因引起的剧烈呕吐,如过量饮酒、饱食、妊娠剧吐等,其中过量饮酒是本病的主要诱因之一^[6],戒酒可降低本病的发病率。本组38例患者有饮酒史占80.9%,说明饮酒在本病发病中的重要作用。Kortas *et al*^[7]提出MWS除饮酒外其他的危险因素包括:非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)摄入、抗凝剂、阵发性的咳嗽、尿毒症、妊娠、食管胃内压急剧升高、用力排便、食管裂孔疝、麻醉期间打呃以及腹部的钝伤。值得注意的是因妊娠呕吐极为普遍,临床上往往忽视本病存在,延误诊断,造成出血加重而危及孕妇安全^[8]。本组5例患者是妊娠呕吐引起占10.6%。

胃镜检查为确诊本病的重要手段,根据病史、体征,临床考虑是MWS者,应尽早行内镜检查,达到及时诊断和治疗的目的,以在发病24 h内急诊胃镜检查或出血时即时检查为最佳时机。MWS治疗包括去除诱因,予止血、抑酸、镇吐等常规药物,内镜治疗包括局部喷洒药物、注射药

■名词解释

Mallory-Weiss综合征(MWS):即食管贲门黏膜撕裂综合征,是引起上消化道出血的重要原因之一,随着胃镜检查的不断完善,此病的诊断率逐渐提高。

物、高频、电凝、氩离子凝固器、钛夹等,常用的内镜止血包括注射法和结扎法^[9]. Peng *et al*^[10]对比内镜下注射肾上腺素生理盐水与常规的药物治疗,均为同样的止血率.而较常用的内镜下注射或钛夹,仍然存在再出血率高和转手术率高的问题,且需要较熟练的内镜技术.多数MWS的出血量不大,常有自限性,经纠正凝血机制障碍和应用血管加压素等非手术疗后一般可控制出血^[11].

奥曲肽是一种人工合成的天然生长抑素的八肽衍生物,其半衰期较长,保留了与生长抑素类似的广泛抑制作用^[12].其主要的药理作用包括:(1)选择性直接作用于血管平滑肌,明显减少内脏血流量,从而减少食管静脉的血流量;(2)抑制胃泌素、胃酸及胃蛋白酶的分泌,从而减轻这些物质对黏膜的攻击,保护黏膜屏障,促进已损伤的黏膜上皮细胞的修复;(3)通过抑制胰高血糖素分泌间接阻断血管扩张,使内脏血流量下降;(4)增加食管下括约肌的张力,减少胃液反流,保护食管黏膜;(5)促进血小板的凝聚和血块收缩^[13].因此,近年来被广泛用于非静脉曲张性出血的治疗.其止血的机制在于能降低供应食管血管内血流压力,强有力地抑制胃肠道的分泌与运动,抑制胃酸、胃蛋白酶和胃泌素的分泌,可能还有细胞保护作用.这能阻止出血部位血凝块的液化,促进病变的愈合.血小板聚集及血浆凝血功能所诱导的止血作用需在pH>6时才能有效发挥,而且新形成的凝血块在pH<5的胃液中会迅速被消化.因此,抑制胃酸分泌,提高胃内pH值具有止血作用.奥美拉唑为质子泵抑制剂,能显著降低胃腔内酸度,提高胃内pH值,有利于血小板聚集和血凝块形成^[14].研究表明,奥美拉唑40 mg静脉注射,每12 h 1次,可使胃内pH迅速提高到6以上,作用持续时间长,且止血效果肯定^[15].因此奥曲肽联用奥美拉唑治疗上消化系大出血显然比常用的单一药物作用更全面,可促进形成稳定的血痂和黏膜修复及再生的作用,以达到永久性止血和降低手术率的目的,而有良好的疗效.本文研究结果显示,奥曲肽联合奥美拉唑止血有效率(91.67%)优于单用奥美拉唑(73.91%).因此,对顽固性MWS大出血患者,常规治疗效果不佳时,加用奥曲肽治疗,使用方

便,效果显著.

4 参考文献

- 1 Enestvedt BK, Gralnek IM, Mattek N, Lieberman DA, Eisen G. An evaluation of endoscopic indications and findings related to nonvariceal upper-GI hemorrhage in a large multicenter consortium. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 422-429
- 2 席智文. Mallory-Weiss综合征26例临床分析. *中国内镜杂志* 2004; 10: 78-79
- 3 刘文天, 王帮茂, 吕宗舜. Mallory-Weiss综合征引起消化道出血的内镜下观察和治疗. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 348-349
- 4 Huang SP, Wang HP, Lee YC, Lin CC, Yang CS, Wu MS, Lin JT. Endoscopic hemoclip placement and epinephrine injection for Mallory-Weiss syndrome with active bleeding. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 842-846
- 5 Ghosh S, Watts D, Kinnear M. Management of gastrointestinal haemorrhage. *Postgrad Med J* 2002; 78: 4-14
- 6 李敏, 魏红霞. Mallory-Weiss综合征36例诊治. *第四军医大学学报* 2005; 26: 封3
- 7 Kortas DY, Haas LS, Simpson WG, Nickl NJ 3rd, Gates LK Jr. Mallory-Weiss tear: predisposing factors and predictors of a complicated course. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2863-2865
- 8 Cho KH, Heo SW, Chung SH, Kim CG, Kim HG, Choe JY. A case of Mallory-Weiss syndrome complicating pregnancy in a patient with scleroderma. *Korean J Intern Med* 2003; 18: 238-240
- 9 Park CH, Min SW, Sohn YH, Lee WS, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ. A prospective, randomized trial of endoscopic band ligation vs. epinephrine injection for actively bleeding Mallory-Weiss syndrome. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 22-27
- 10 Peng YC, Tung CF, Chow WK, Chang CS, Chen GH, Hu WH, Yang DY. Efficacy of endoscopic isotonic saline-epinephrine injection for the management of active Mallory-Weiss tears. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 119-122
- 11 Eyster ME, Asaad SM, Gold BD, Cohn SE, Goedert JJ. Upper gastrointestinal bleeding in haemophiliacs: incidence and relation to use of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Haemophilia* 2007; 13: 279-286
- 12 李雪飞. 食道静脉曲张破裂出血不同治疗方法的对照研究. *中国社区医师(综合版)* 2006; 8: 27-28
- 13 Avgerinos A, Sgouros S, Viazis N, Vlachogiannakos J, Papaxoinis K, Bergele C, Sklavos P, Raptis SA. Somatostatin inhibits gastric acid secretion more effectively than pantoprazole in patients with peptic ulcer bleeding: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 515-522
- 14 Leontiadis GI, Howden CW. Pharmacologic Treatment of Peptic Ulcer Bleeding. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007; 10: 134-142
- 15 黄忠, 赵芝蓉, 邹燕. 善得定与洛赛克治疗非静脉曲张性上消化道大出血疗效分析. *西部医学* 2006; 18: 35-36

■同行评价

本研究证实了临床治疗Mallory-Weiss综合征合并顽固性大出血者又一可靠、安全、方便的治疗方法,值得借鉴.

编辑 李军亮 电编 何基才