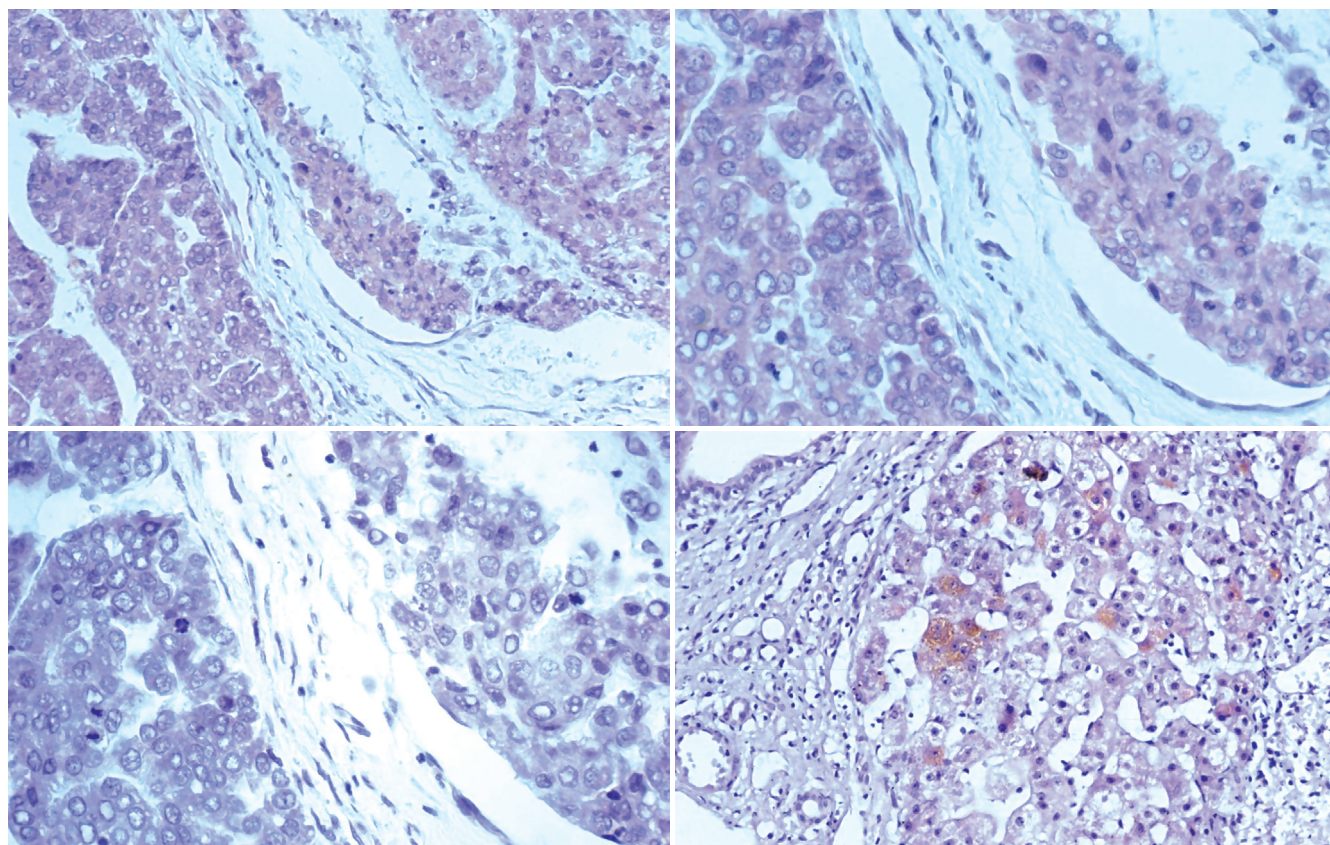


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 11 月 18 日 第 17 卷 第 32 期 (Volume 17 Number 32)



32 / 2009

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
苒新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
马欣主任医师

倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田宇彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
周国雄主任医师
周晓东副教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学

蔡开琳副教授
蔡三军主任医师

曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗副教授

李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
汤恢焕教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授

高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璠教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授

钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 11 月 18 日 第 17 卷 第 32 期 (总第292期)

述 评

3279 谷胱甘肽过氧化物酶与肝脏疾病

蔡晓波, 陆伦根

基 础 研 究

3283 骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞RhoA、P27的表达

苏思标, 姜海行, 王东旭, 覃山羽, 梁梓宇

3292 VEGF促进肝癌SMMC-7721细胞侵袭性的自分泌机制

顾宇, 陆枫林

3296 Syndecan-1在急性结肠炎及慢性化小鼠模型中的表达及其意义

王显飞, 陈予, 戴俊臣, 陈村龙, 王霞, 陈烨

3302 皮层蛋白氨基端同源多肽分子对大肠癌细胞迁移、内吞能力及侵袭性的抑制

朱建伟, 陆毅祥, 黄宝玉, 赵任, 秦婧

临 床 研 究

3307 OY-TES-1在肝细胞癌中的表达及抗体血清学分析

范蓉, 黄巍, 肖绍文, 罗彬, 何少健, 罗国容, 谢小薰

文 献 综 述

3313 肝门胆管癌的治疗进展

詹茜, 沈柏用

3318 肠易激综合征发病机制的研究进展

银新, 宁守斌

3324 ¹²⁵I粒子近距离植入治疗结直肠癌肝转移的研究进展

陈亿, 罗开元, 李滢旭

研 究 快 报

3328 急性疼痛应激对SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达的影响

卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 时姗姗, 柳海燕, 陶晓倩, 姚兵

3332 斑蝥酸钠维生素B6联合X射线诱导肝癌细胞HepG2凋亡

赵航宇, 梁健

3337 Tiam1与大肠癌细胞EMT的关系

王雅娟, 胡洁, 赵海燕, 韩慧霞

3342 新肿瘤睾丸抗原Ropporin重组蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备

尹燕华, 李占飞, 邹声泉

临 床 经 验

3346 GOLFIG-1在化疗耐药转移性结肠癌中的疗效

林榕波, 范南峰, 陈玲, 刘捷

3351 II、III期直肠癌根治术后放疗同步希罗达化疗的疗效

陆忠华, 王建华, 许锡元, 周健

3355 阑尾术后肠粘连气腹造影的CT影像特征及其临床价值

段亮, 蔡晓军, 韩承新, 张新国, 严建宇, 曹策, 郭晓博, 刘勇, 李晗

3360 替代空肠营养管在上消化道手术中的应用分析41例

杜强, 范梅香, 张福庆, 纪刚, 于阜杰

	<p>3365 中国序贯疗法与三联疗法治疗幽门螺杆菌感染荟萃分析 陈羽, 吴礼浩, 何兴祥</p> <p>3370 2008年全国其他感染性腹泻报告病例信息分析 张昕, 高永军, 冯子健, 王子军, 冉陆</p>
致 谢	3376 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>3291 《世界华人消化杂志》中文摘要要求</p> <p>3295 《世界华人消化杂志》投稿方式</p> <p>3301 《世界华人消化杂志》正文要求</p> <p>3317 世界华人消化杂志修回稿须知</p> <p>3323 《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》</p> <p>3327 《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》</p> <p>3336 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>3341 WJG成功通过评审被PMC收录</p> <p>3350 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.729</p> <p>3354 《世界华人消化杂志》参考文献要求</p> <p>3364 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>3369 《世界华人消化杂志》计量单位标准</p> <p>3375 汤姆森-路透公布2008年WJG影响因子2.081</p>
封面故事	<p>范蓉, 黄巍, 肖绍文, 罗彬, 何少健, 罗国容, 谢小薰. OY-TES-1在肝细胞癌中的表达及抗体血清学分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3307-3312 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3307.asp</p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮</p> <p>形式规范 马连生</p>

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-11-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>		<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2009年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p>		<p>邮发代号 82-262</p> <p>国外代号 M 4481</p> <p>国内定价 每期24.00元 全年864.00元</p>	<p>广告经营许可证 1401004000050</p>

World Chinese Journal of Digestology

November 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 32

EDITORIAL	3279 Glutathione peroxidase and liver diseases <i>Cai XB, Lu LG</i>
BASIC RESEARCH	<p>3283 Bone marrow mesenchymal stem cells modulate the expression of RhoA and P27 in hepatic stellate cells <i>Su SB, Jiang HX, Wang DX, Qin SY, Liang ZY</i></p> <p>3292 Vascular endothelial growth factor promotes the invasion of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via an autocrine mechanism <i>Gu Y, Lu FL</i></p> <p>3296 Significance of syndecan-1 expression in dextran sulfate sodium-induced colitis that progresses to chronicity in mice <i>Wang XF, Chen Y, Dai JC, Chen CL, Wang X, Chen Y</i></p> <p>3302 A peptide homologous with the amino-terminus of cortactin inhibits the migrative, endocytic and invasive capacity of colon cancer cells <i>Zhu JW, Lu YX, Huang BY, Zhao R, Qin J</i></p>
CLINICAL RESEARCH	3307 OY-TES-1 expression and serum immunoreactivity in hepatocellular carcinoma <i>Fan R, Huang W, Xiao SW, Luo B, He SJ, Luo GR, Xie XX</i>
REVIEW	<p>3313 Current management of hilar cholangiocarcinoma <i>Zhan Q, Shen BY</i></p> <p>3318 Advances in understanding the pathogenesis of irritable bowel syndrome <i>Yin X, Ning SB</i></p> <p>3324 Advances in permanent ¹²⁵I seed implantation for colorectal liver metastases <i>Chen Y, Luo KY, Li YX</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3328 Formalin-induced acute pain upregulates the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of rats <i>Lu KG, Han XF, Zhang YM, Shi SS, Liu HY, Tao XQ, Yao B</i></p> <p>3332 Disodium Cantharidinate and Vitamin B6 Injection in combination with radiotherapy induces apoptosis and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 <i>Zhao HY, Liang J</i></p> <p>3337 Correlation between Tiam1 expression and epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer cell lines <i>Wang YJ, Hu J, Zhao HY, Han HX</i></p> <p>3342 Prokaryotic expression of ropporin and generation of its rabbit polyclonal antisera <i>Yin YH, Li ZF, Zou SQ</i></p>
CLINICAL PRACTICE	3346 Chemoimmunotherapy of chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer with gemcitabine plus FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 <i>Lin RB, Fan NF, Chen L, Liu J</i>

	<p>3351 Efficacy of postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy with Xeloda for stage II/III rectal cancer <i>Lu ZH, Wang JH, Xu XY, Zhou J</i></p> <p>3355 Diagnostic value of pneumoperitoneum contrast helical computed tomography imaging for peritoneal adhesions after appendectomy <i>Duan L, Cai XJ, Han CX, Zhang XG, Yan JY, Cao C, Guo XB, Liu Y, Li H</i></p> <p>3360 Application of self-made jejunal feeding tubes after upper gastrointestinal surgery: an analysis of 41 cases <i>Du Q, Fan MX, Zhang FQ, Ji G, Yu FJ</i></p> <p>3365 Sequential therapy versus standard triple therapy for <i>Helicobacter pylori</i> eradication in Chinese patients: a meta-analysis <i>Chen Y, Wu LH, He XX</i></p> <p>3370 Analysis of the pathogens in infectious diarrhea (other than cholera, dysentery, typhoid and paratyphoid) cases reported in China in 2008 <i>Zhang X, Gao YJ, Feng ZJ, Wang ZJ, Ran L</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	3376 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Fan R, Huang W, Xiao SW, Luo B, He SJ, Luo GR, Xie XX.</i> OY-TES-1 expression and serum immunoreactivity in hepatocellular carcinoma.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(32): 3307-3312</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3307.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i></p> <p>Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date November 18, 2009

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
 Department of Science and Technology
 of Shanxi Province

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

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

PRINTING
 Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
 Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
 Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
 Director: Hai-Ning Zhang

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2009 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

谷胱甘肽过氧化物酶与肝脏疾病

蔡晓波, 陆伦根

蔡晓波, 陆伦根, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科
上海市 200080

陆伦根, 教授, 博士生导师, 主要从事肝脏疾病的基础和临床研究.
通讯作者: 陆伦根, 教授, 博士生导师, 200080, 上海市虹口区海
宁路100号, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科.
lungenlu1965@yahoo.com

收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2009-11-04

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-11-18

Glutathione peroxidase and liver diseases

Xiao-Bo Cai, Lun-Gen Lu

Xiao-Bo Cai, Lun-Gen Lu, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Professor Lun-Gen Lu, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China. lungenlu1965@yahoo.com

Received: 2009-10-16 Revised: 2009-11-04

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-11-18

Abstract

Glutathione peroxidase is one of the most important components of anti-peroxidation system of the body and has been implicated in some diseases. Liver is an important organ where oxidative stress is generated. A close relationship between glutathione peroxidase and liver diseases has been reported in many studies. In this article, we will review the recent advances in understanding the relationship between liver diseases and selenium-dependent glutathione peroxidase.

Key Words: Liver diseases; Glutathione peroxidase; Selenium

Cai XB, Lu LG. Glutathione peroxidase and liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3279-3282

摘要

谷胱甘肽过氧化物酶是机体抗过氧化屏障的组分之一. 他与多种疾病发病的关系得到了广泛的研究. 肝脏是氧应激产生的重要脏器. 多项研究对谷胱甘肽过氧化物酶与肝脏疾病的关系进行报道. 本文对近年来关于肝脏疾病与

谷胱甘肽过氧化物酶及其相关硒之间的关系进行综述.

关键词: 肝脏疾病; 谷胱甘肽过氧化物酶; 硒

蔡晓波, 陆伦根. 谷胱甘肽过氧化物酶与肝脏疾病. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3279-3282

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3279.asp>

0 引言

谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)于1957年由Mills从牛红细胞中发现, 由于分子结构中含硒, 故又名硒谷胱甘肽过氧化物酶. 生物体在正常的生理活动中产生活性氧如 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} 和单线态氧, 除满足机体代谢需要外, 不可避免会作用于其他生物分子, 从而引起机体病变. GSH-Px以GSH为底物和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)一起, 共同清除机体活性氧, 减轻和阻止活性氧的过氧化作用. 目前发现GSH-Px至少有4种同工酶. 第1种为细胞GSH-Px, 主要分布在组织细胞的细胞区、线粒体和红细胞中. 第2种为磷脂过氧化氢GSH-Px, 主要分布在各种组织细胞外的细胞液内, 部分分布在细胞膜上, 是必需的生物膜组成成分. 第3种为血清GSH-Px, 主要分布在血液中. 第4种为消化系GSH-Px, 高表达于胃肠道黏膜上皮细胞. 由于硒是GSH-Px的构成成分, 机体硒含量和GSH-Px活力密切相关. 用低硒低碘饲料喂养SD大鼠, 其后代肝脏GSH-Px含量明显降低^[1]. 硒缺乏动物血液、肝脏GSH-Px活力下降, 而补硒可升高GSH-Px. 这表明机体硒的水平与GSH-Px相关, 而硒的生物学作用也与GSH-Px密切相关. 脂质过氧化被认为在多种肝病的发病机制中起了十分重要的作用, 而作为机体抗氧化防御重要组分的GSH-Px在肝脏具有丰富的分布. 因此, GSH-Px与各种肝病的关系也得到了许多的研究.

1 慢性乙型和丙型病毒性肝炎

Chrobot *et al*^[2]对100例慢性乙型肝炎病毒

■背景资料

随着氧应激和脂质过氧化在各种疾病发病机制中的重要性越来越被认识, 机体各种抗氧化屏障也得到越来越多的研究. 肝脏是合成多种抗氧化酶的主要器官, 机体氧应激的存在损伤肝脏, 而肝细胞受损后, 合成抗氧化酶减少, 进一步加重机体的氧应激. 因此, 肝脏疾病和氧应激关系密切, 互为因果. 作为抗氧化屏障的重要组分的GSH-Px与肝脏疾病之间的关系也得到了众多研究.

■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

■ 研发前沿

GSH-Px在肝脏疾病发病和治疗中的地位、不同类型的GSH-Px在肝病及其并发症中的各自作用以及以GSH-Px为靶向结合其他抗氧化剂治疗对肝病的疗效等仍然需要进一步的研究。

(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染儿童的研究显示其CAT、SOD活性降低而GSH-Px活性升高,从而认为慢性肝炎的儿童可能存在不充分抗氧化剂屏障。Czuczejko *et al*^[3]的研究显示乙型肝炎和丙型肝炎患者中ALT正常者红细胞GSH-Px活性与健康对照无明显差异,但在ALT升高者则轻度降低,但不显著。而血清GSH-Px在ALT正常者则轻度降低,在ALT升高者则升高。这种矛盾的结果可能由于肝细胞损伤时细胞内异质体的释放。

肝炎病毒在基因水平与GSH-Px相互影响。张健 *et al*^[4]采用酵母双杂交技术对HCV E2蛋白合蛋白进行研究,在人肝细胞文库中筛选出人类硒结合蛋白,表明HCV E2与硒结合蛋白有相互作用,从而推测HCV E2可能存在编码硒蛋白的读码区。通过比较GSH-Px和HCV基因序列,发现GSH-Px同源区与HCV NS4基因区重叠,并且是在HCV非常保守的基因区。HCV能编码硒依赖的GSH-Px基因。因此推测GSH-Px基因的存在及表达有助于解释过氧化应激作用加速HCV疾病进展为肝细胞癌^[5]。

体外试验显示GSH-Px在HCV感染的人肝细胞系明显下调(将近20倍)。与此同时,细胞总的GSH-Px活性明显降低,这使得人肝细胞对氧化打击更加易感。干扰素 α 治疗下调HCV复制伴随着胃肠道GSH-Px表达恢复至正常水平。另外,通过基因转导使复制系细胞表达胃肠道GSH-Px能使HCV-RNA下调,且这种下调与剂量相关。通过维甲酸激活细胞GSH-Px基因(编码胃肠道GSH-Px)的启动子,能以时间和剂量依赖的方式下调HCV的表达,而且这种效应可以逆转。维甲酸的这种效应依赖于硒,且可以被GSH-Px siRNA取消。因此胃肠道GSH-Px可能起到抗HCV的作用^[6]。

硒被发现能增强免疫,能延缓HIV阳性的AIDS患者的病情进展,而在病毒性肝炎中的免疫调节作用也得到研究。研究显示乙型肝炎、丙型肝炎患者血硒含量明显降低。慢性乙型肝炎患者外周血单核细胞膜流动性、白介素-2产生和白介素-2受体表达明显降低,这与体外培养中用过氧化物刺激外周血单核细胞产生的反应一致,而补充硒能够逆转这种情况,这说明硒能够改善慢性肝炎时的免疫功能,而硒的这一作用可能是通过含硒蛋白质的抗氧化功能介导^[7]。

2 非酒精性脂肪性肝病

脂质过氧化在非酒精性脂肪肝型肝病(non-

alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病机制中起了关键的作用。NAFLD时增强的氧应激状态促进脂质的过氧化反应形成脂质过氧化物。脂质过氧化物又可直接损伤肝细胞膜导致其死亡,与库普弗细胞及肝细胞释放的细胞因子一起介导肝内炎症及诱导纤维化的发生。作为抗脂质过氧化屏障的重要组成部分, GSH-Px在NAFLD中的作用也得到研究。

红细胞是过氧化损伤的一个潜在靶细胞。红细胞脂质对过氧化的易感性反应包括肝脏器官和组织的类似异常。Das *et al*^[8]研究显示NAFLD患者红细胞谷胱甘肽、过氧化氢酶活性、GSH还原酶活性、GSH-Px活性分别降低10.7%、18.5%、8.1%和16.8%。GSH-Px的减少可能与其过度消耗和活性氧引起GSH-Px失活有关。

Perlemuter *et al*^[9]研究显示NAFLD患者肝脏GSH-Px活性较正常对照升高,而红细胞GSH-Px活性则无明显改变。这表明NAFLD患者肝组织内抗氧化酶活性较对照组明显升高,而红细胞的抗氧化状态并不反应肝脏的氧化状态。该研究中肝活检证实的NAFLD患者肝脏只有轻中度的炎症而无纤维化。而Sreekumar *et al*^[10]研究显示继发于NAFLD的肝硬化患者肝脏编码包括GSH-Px在内的多种抗氧化酶基因明显下调。这可能是在NAFLD的早期阶段,受到氧化打击的影响,肝脏GSH-Px活性代偿性增加,而随着肝脏炎症纤维化的进展, GSH-Px的活性和合成受到抑制,而此又进一步加重了肝脏的过氧化损伤。

NAFLD患者血清硒浓度明显降低,肝组织硒水平也降低。Loguerio *et al*^[11]研究了50例NAFLD患者(11例为脂肪性肝炎, 39例为肝硬化),结果显示肝硬化者血清硒和GSH水平明显降低,而红细胞的硒和GSH水平也明显降低。GSH的水平与肝脏损伤程度相关。血清及红细胞硒和GSH水平直接相关。

3 酒精性肝病

酒精在体内主要通过肝脏代谢为乙酸。在乙醇的代谢过程中特别过量时形成了大量的自由基,损伤肝细胞,引起肝脏炎症坏死和纤维化。氧应激和脂质过氧化在酒精性肝病的发病中起了关键的作用。

Das *et al*^[8]研究显示酒精性肝病者红细胞GSH-Px活性降低45.3%。Girre *et al*研究^[12]也显示红细胞和血清GSH-Px在重度饮酒的慢性酒精性肝病而无肝硬化者中明显降低。但也有

研究报道酒精性肝病患者红细胞GSH-Px与健康对照相比只有轻度、无统计学意义的改变^[3]. Guemouri *et al*^[13]研究也显示无肝硬化的长期酗酒者血清GSH-Px轻度升高, 但无明显统计学意义. Czuczejko *et al*^[3]研究显示以酒精性肝病为主体的慢性肝病患者(50例酒精性肝病, 3例自身免疫性肝病、11例隐源性肝病)ALT正常者红细胞GSH-Px活性轻度降低, 而ALT升高者则无明显差异. 动物研究显示酒精诱导的肝脏GSH-Px活性改变与病理学损伤严重程度呈负相关. 当肝脏没有明显炎症坏死时, 酒精不能诱导GSH-Px活性的改变^[14].

酒精性肝病患者全血和血清及肝组织硒含量降低, 24 h尿硒排泄无明显差异^[15]. 酗酒者血清、全血、红细胞硒含量明显降低. 酒精性肝硬化患者全血和血清硒含量明显降低. 而男性酗酒者在戒酒1 mo后复查血清硒水平与对照者无明显差异^[3]. 对于酒精性肝病, 硒降低可能与营养不良、吸收功能降低、酒精诱导硒代谢改变、尿和粪便的异常丢失等. 多个研究显示饮酒者血硒浓度主要和其营养状态相关^[3,15].

4 肝硬化

Burk *et al*研究^[16]显示Child A级肝硬化患者血清GSH-Px活性与健康对照相似, 但随着疾病的严重程度增加而增加. 这可能由于肝细胞损伤时细胞内异质体的释放. 而肝硬化时肝组织GSH-Px较正常降低^[17]. 也有报道肝硬化者红细胞GSH-Px与健康对照相比只有轻度、无统计学意义的改变^[3]. Seckin *et al*^[18]研究显示肝硬化者胃组织GSH-Px降低, 且与门脉直径、脾长径成负相关, 表明GSH-Px与肝硬化门脉高压有关.

对不同原因肝硬化患者的研究显示其血清硒和硒蛋白含量降低, 且与肝硬化的严重程度相关. 这表明肝脏损伤影响肝脏对含硒蛋白质的合成. 同时肝硬化也影响了转硫途径, 而这进一步影响将硒合成为硒蛋白^[16]. 对因肝硬化死亡的患者的尸解显示其肝脏硒的含量明显低于健康对照^[3]. 硒补充能减少四氯化碳诱导的肝星状细胞活化和增殖, 并增加急性损伤期活化肝星状细胞的凋亡. 因此硒能够有效地降低肝脏纤维化的程度并加快恢复^[19]. 硒也能通过增强免疫和抑制NF- κ B和TGF- β 表达来起到抗纤维化的效应^[20]. 富含硒的乳酸菌能使CCl₄诱导的肝组织GSH-Px和SOD降低的活性明显升高, 且与正常对照接近. 富含硒的乳酸菌也能增强巨噬细胞

活性, 抑制TNF- α 的过度释放, 抑制肝细胞钙离子的急剧释放, 从而保护了肝损伤^[21].

5 肝癌

GSH-Px在肝癌组织表达明显降低, Northern blot分析显示GSH-Px mRNA在肝癌组织比正常肝细胞降低2/3. 这表明在致癌物诱导的肝细胞肝癌中, GSH-Px表达受到的影响在mRNA水平已发生^[22]. 肿瘤组织GSH-Px活性较正常降低, 而肿瘤邻近组织的GSH-Px活性也较正常组织降低, 这表明肝细胞肝癌可能在GSH-Px不足的环境下发生^[23].

硒被认为有抗肝脏肿瘤的效果. 硒的抗肿瘤机制包括降低致癌原的致突变性, 抑制细胞增殖及通过硒依赖的GSH-Px起到抗氧化损伤. Yu *et al*^[24]流行病学研究显示肝癌患者的血清硒水平明显较乙型肝炎表面抗原阳性的对照者降低. 将血清硒水平五分, 随着五分值的增加, 其对肝癌调整后的比值比分别为1、0.52、0.32、0.19和0.62. Lee *et al*^[25]对大鼠的体内试验显示低剂量的硒能够减少N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine诱导的肝脏肿瘤数量和大小. Irmak *et al*的体外试验^[26]显示缺乏硒的环境能对部分肝癌细胞系产生氧化打击和促进其释放细胞色素C, 从而引起凋亡, 这种效应可以通过维生素C的抗氧化效应而逆转. 而大多数肝癌细胞系能耐受缺乏硒的环境, 从而避免凋亡. 其中大多数为整合HBV DNA的肝癌细胞系.

4年的鸭动物实验显示饮食中补充硒能够减少同样暴露在自然环境的致病因素中77.2%的HBV感染和75.7%的肝脏癌前病变. 对人群的8年随访研究显示食用硒化盐的人群原发性肝癌的发病率减少35.1%. 而当对治疗组撤去硒补充后, 肝癌的发病率又开始升高. 然而在停止治疗后的3年内对HCV的抑制效应仍然存在^[27].

6 结论

随着氧应激和脂质过氧化在各种疾病发病机制中的重要性越来越被认识, 机体各种抗氧化屏障也得到越来越多的研究. 肝脏是合成多种抗氧化酶的主要器官, 机体氧应激的存在损伤肝脏, 而肝细胞受损后, 合成抗氧化酶减少, 进一步加重机体的氧应激. 因此, 肝脏疾病和氧应激关系密切, 互为因果. 作为抗氧化屏障的重要组成部分的GSH-Px与肝脏疾病之间的关系也得到了众多研究. 多个研究证实硒有抗肝炎病毒、抗

■ 相关报道

4年的鸭动物实验显示饮食中补充硒能够减少同样暴露在自然环境的致病因素中77.2%的HBV感染和75.7%的肝脏癌前病变. 对人群的8年随访研究显示食用硒化盐的人群原发性肝癌的发病率减少35.1%. 而当对治疗组撤去硒补充后, 肝癌的发病率又开始升高. 然而在停止治疗后的3年内对HCV的抑制效应仍然存在.

■同行评价

肝脏疾病与谷胱甘肽过氧化物酶及其相关的硒之间关系的研究是预防和治疗慢性肝病的重要课题,相关内容有重要的参考价值。

肝脏恶性肿瘤的效果,这主要通过与其相关的GSH-Px的抗氧化作用有关。而GSH-Px在肝脏疾病发病和治疗中的地位、不同类型的GSH-Px在肝病及其并发症中的各自作用以及以GSH-Px为靶向结合其他抗氧化剂治疗对肝病的疗效等仍然需要进一步的研究。

7 参考文献

- 张舸, 田东萍, 苏敏, 高玉霞, 沈秀娜. 长期低硒、低碘对发育期大鼠肝脏和全血GSH-Px活性的影响. *环境与职业医学* 2005; 22: 309-311
- Chrobot AM, Szaflarska-Szczepanik A, Drewa G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C. *Med Sci Monit* 2000; 6: 713-718
- Czuczajko J, Zachara BA, Staubach-Topczewska E, Halota W, Kedziora J. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1147-1154
- 张健, 成这国, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒E2蛋白结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. *解放军医学杂志* 2003; 28: 766-767
- Zhang W, Cox AG, Taylor EW. Hepatitis C virus encodes a selenium-dependent glutathione peroxidase gene. Implications for oxidative stress as a risk factor in progression to hepatocellular carcinoma. *Med Klin (Munich)* 1999; 94 Suppl 3: 2-6
- Morbitzer M, Herget T. Expression of gastrointestinal glutathione peroxidase is inversely correlated to the presence of hepatitis C virus subgenomic RNA in human liver cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 8831-8841
- He SX, Wu B, Chang XM, Li HX, Qiao W. Effects of selenium on peripheral blood mononuclear cell membrane fluidity, interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in patients with chronic hepatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3531-3533
- Das KS, Balakrishnan V, Mukherjee S, Vasudevan DM. Evaluation of blood oxidative stress-related parameters in alcoholic liver disease and non-alcoholic fatty liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 323-334
- Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, Conti M, Bigorgne A, Paradis V, Corre MP, Prat L, Kuoch V, Basdevant A, Pelletier G, Oppert JM, Buffet C. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005; 25: 946-953
- Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38: 244-251
- Loguercio C, De Girolamo V, Federico A, Feng SL, Crafa E, Cataldi V, Gialanella G, Moro R, Del Vecchio Blanco C. Relationship of blood trace elements to liver damage, nutritional status, and oxidative stress in chronic nonalcoholic liver disease. *Biol Trace Elem Res* 2001; 81: 245-254
- Girre C, Hispard E, Therond P, Guedj S, Bourdon R, Dally S. Effect of abstinence from alcohol on the depression of glutathione peroxidase activity and selenium and vitamin E levels in chronic alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14: 909-912
- Guemouri L, Lecomte E, Herbeth B, Pirollet P, Paille F, Siest G, Artur Y. Blood activities of antioxidant enzymes in alcoholics before and after withdrawal. *J Stud Alcohol* 1993; 54: 626-629
- Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A, Nanji AA. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology* 1998; 27: 1317-1323
- Thuluvath PJ, Triger DR. Selenium in chronic liver disease. *J Hepatol* 1992; 14: 176-182
- Burk RF, Early DS, Hill KE, Palmer IS, Boeglin ME. Plasma selenium in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1998; 27: 794-798
- Czczot H, Scibior D, Skrzycki M, Podsiad M. Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Acta Biochim Pol* 2006; 53: 237-242
- Seckin Y, Harputluoglu MM, Batcioglu K, Karıncaoglu M, Yildirim B, Oner RI, Uyumlu B, Aydogdu N, Hilmioglu F. Gastric tissue oxidative changes in portal hypertension and cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1154-1158
- Shen XH, Cheng WF, Li XH, Sun JQ, Li F, Ma L, Xie LM. Effects of dietary supplementation with vitamin E and selenium on rat hepatic stellate cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4957-4961
- He YT, Liu DW, Ding LY, Li Q, Xiao YH. Therapeutic effects and molecular mechanisms of anti-fibrosis herbs and selenium on rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 703-706
- Chen L, Pan DD, Zhou J, Jiang YZ. Protective effect of selenium-enriched *Lactobacillus* on CCl₄-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5795-5800
- Lertprasertsuke N, Shinoda M, Takekoshi S, Yoshimura S, Watanabe K. Suppression of messenger ribonucleic acid for glutathione peroxidase in chemically induced rat hepatocellular carcinoma and its biological significance. *Tokai J Exp Clin Med* 1990; 15: 285-292
- Casari M, Gabrielli GB, Dusi S, Nicoli N, Bellisola G, Corrocher R. Decreased activity of liver glutathione peroxidase in human hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1985; 21: 941-944
- Yu MW, Horng IS, Hsu KH, Chiang YC, Liaw YF, Chen CJ. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 367-374
- Lee CY, Hsu YC, Wang JY, Chen CC, Chiu JH. Chemopreventive effect of selenium and Chinese medicinal herbs on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced hepatocellular carcinoma in Syrian hamsters. *Liver Int* 2008; 28: 841-855
- Irmak MB, Ince G, Ozturk M, Cetin-Atalay R. Acquired tolerance of hepatocellular carcinoma cells to selenium deficiency: a selective survival mechanism? *Cancer Res* 2003; 63: 6707-6715
- Yu SY, Zhu YJ, Li WG. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biol Trace Elem Res* 1997; 56: 117-124

骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞RhoA、P27的表达

苏思标, 姜海行, 王东旭, 覃山羽, 梁梓宇

苏思标, 姜海行, 王东旭, 覃山羽, 梁梓宇, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

苏思标, 广西医科大学硕士研究生, 主要从事干细胞及肝损伤修复机制研究。

广西自然科学基金资助项目, No. 0640133, No. 0897008

作者贡献分布: 此课题姜海行、苏思标及王东旭设计; 研究过程由苏思标、王东旭、覃山羽及梁梓宇操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由姜海行提供; 数据分析由苏思标完成; 本文写作由苏思标完成。

通讯作者: 姜海行, 教授, 博士生导师, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院消化内科. jihaxi@263.net

电话: 0771-5356501 传真: 0771-5353668

收稿日期: 2009-08-04 修回日期: 2009-09-22

接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-11-18

Bone marrow mesenchymal stem cells modulate the expression of RhoA and P27 in hepatic stellate cells

Si-Biao Su, Hai-Xing Jiang, Dong-Xu Wang, Shan-Yu Qin, Zi-Yu Liang

Si-Biao Su, Hai-Xing Jiang, Dong-Xu Wang, Shan-Yu Qin, Zi-Yu Liang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi, Nos. 0640133 and 0897008

Correspondence to: Professor Hai-Xing Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. jihaxi@263.net

Received: 2009-08-04 Revised: 2009-09-22

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on the mRNA and protein expression of RhoA (Ras homolog gene family member A) and P27 in hepatic stellate cells (HSCs) and explore the mechanisms how MSCs regulate cell cycle progression of HSCs.

METHODS: MSCs were isolated from rat bone marrow and propagated in culture flasks. Meanwhile, HSCs and fibroblasts were thawed and passaged. An indirect co-culture system between MSCs/fibroblasts and HSCs was established using a Transwell membrane system (diameter:

24 mm; pore size: 0.4 μ m). HSCs were randomly divided into three groups: blank control group (HSCs alone), negative control group (HSCs plus fibroblasts), and experimental group (HSCs plus MSCs). Cell proliferation was tested by WST-8 assay. Cell-cycle phases were determined by flow cytometry. The mRNA and protein expression of RhoA and P27 in HSCs was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: After 24 hours of co-culture, the reduced rate of cell proliferation in the experimental group was significantly higher than those in the blank control group and negative control group co-culture (both $P < 0.01$). Flow cytometry analysis showed that, after 12 hours of co-culture, the percentage of HSCs in the G_0/G_1 phase in the experimental group was significantly higher than those in the two control groups (both $P < 0.01$), while the percentage of HSCs in the S phase in the experimental group was significantly lower than those in the two control groups (both $P < 0.01$). After 12 hours of co-culture, the expression level of RhoA mRNA in the experimental group was significantly lower than those in the two control groups (both $P < 0.01$), whereas the expression level of P27 mRNA showed no significant differences between the experimental group and the two control groups (both $P > 0.05$). The expression level of RhoA protein in the experimental group was significantly lower than those in the two control groups (both $P < 0.01$), whereas the expression level of P27 in the experimental group was significantly higher than those in the two control groups (both $P < 0.01$). No correlation was noted between the expression of RhoA and P27 mRNAs ($r = 0.105$). However, a negative correlation was noted between the expression of RhoA and P27 proteins ($r = -0.943$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: MSCs inhibit the proliferation of HSCs possibly by modulating the RhoA-P27 pathway to alter cell cycle progression of HSCs. The upregulation of P27 protein may be due to the downregulation of RhoA activity.

■背景资料

MSCs是一类具有自我增殖和分化潜能的多能干细胞, MSCs移植治疗肝纤维化的效果已得到初步肯定, 但其治疗机制尚不明确. 研究体外MSCs与HSCs相互干预的作用机制具有重要的意义.

■同行评议者

张凤春, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

■ 研发前沿

近年来,国内外异体或自体MSCs移植治疗肝病的研究越发增多,但采用构建MSCs和HSCs共培养的微环境来研究其相互作用机制的研究却极少。

Key Words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Hepatic stellate cells; RhoA; P27; Cell cycle

Su SB, Jiang HX, Wang DX, Qin SY, Liang ZY. Bone marrow mesenchymal stem cells modulate the expression of RhoA and P27 in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3283-3291

摘要

目的: 观察体外大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)对肝星状细胞(HSCs)RhoA信号因子及其细胞周期调控因子P27表达的影响,探讨MSCs调控HSCs细胞周期G₁/S转换机制。

方法: 贴壁筛选法培养、纯化SD大鼠MSCs,传代至第4代使用;大鼠肝星状细胞(HSC-T6)系及纤维原细胞系冻融后传代使用。应用6孔塑料细胞培养盒,每孔使用半透膜(transwell insert)建立上下双层细胞共培养体系,常规培养。实验分3组:空白对照组、阴性对照组、MSCs实验组。用WST-8法对HSCs增殖率进行测定;流式细胞仪检测细胞周期;RT-PCR、Western blot检测MSCs与HSCs共培养后HSCs内RhoA, P27 mRNA和蛋白的表达。

结果: (1)HSCs与MSCs共培养24 h后, HSCs表现明显增殖抑制($P < 0.01$), 且呈现时间依赖性。MSCs实验组与空白对照组、阴性对照组比较均有显著性差异(均 $P < 0.01$)。 (2)共培养12 h后, MSCs可阻滞HSCs由G₀/G₁期向S期转换,使G₀/G₁期细胞增多, S期细胞减少, 与空白对照组、阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。 (3)共培养12 h后, MSCs实验组RhoA mRNA表达与空白对照组、阴性对照组比较均有统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 随时间的延长呈递减趋势;共培养后, MSCs实验组P27 mRNA表达与空白对照组、阴性对照组比较均无统计学差异。 (4)共培养12 h后, MSCs实验组RhoA蛋白表达与空白对照组、阴性对照组比较均有统计学差异(均 $P < 0.01$), 随时间的延长呈递减趋势;共培养12 h后, MSCs实验组P27蛋白与空白对照组、阴性对照组比较均有统计学差异(均 $P < 0.01$), 随时间的延长呈递增趋势。 (5)相关性分析显示: RhoA与P27 mRNA的表达无明显相关($r = -0.105$); RhoA与P27蛋白的表达呈显著负相关($r = -0.943$, $P < 0.01$)。

结论: MSCs抑制HSCs增殖的机制可能是通过RhoA-P27通路调控HSCs细胞周期改变; RhoA活性的下调可能是引起HSCs内P27蛋白表达增加的原因。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 肝星状细胞; RhoA; P27; 细胞周期

苏忠标, 姜海行, 王东旭, 覃山羽, 梁梓宇. 骨髓间充质干细胞调控肝星状细胞RhoA、P27的表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17(32): 3283-3291

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3283.asp>

0 引言

在真核细胞中, 细胞周期调控的物质基础是细胞周期蛋白(cyclins), 细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclins-dependent kinases, CDKs), 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclins-dependent kinases inhibitors, CKIs)以及其他中间因子。P27作为CKIs群体中的一员, 在细胞增殖过程中起着关键的调控作用^[1-2], 能对细胞周期G₁/S期转换起关键的调控作用^[3]。RhoA是RhoGTP酶家族的成员之一, 具有调节细胞骨架动力学、基因转录、细胞周期进程及细胞转化的功能。RhoA与P27是紧密联系的, RhoA的活化可下调P27的水平。RhoA可通过调控cyclinE/CDK2的活性而调控P27蛋白的降解并影响细胞周期G₁/S期进程^[4-5]。Tammy *et al*^[6]研究发现, RhoA可通过激活PI3K通路而减少P27蛋白的表达, 并能引起其自身DNA合成发生改变, 从而调控细胞的增殖与迁移。Rho通路阻断剂、洛伐他丁或者胞外酶体C3均可增强P27 mRNA的翻译效率^[7]。此外, RhoA还可以通过调控Skp2-P27通路而促进细胞周期G₁/S期转换^[8]。P27调节细胞迁移是通过调控RhoA的活性而起作用的^[9]。可见, RhoA活性的改变可以影响P27蛋白的表达与降解, 从而影响细胞周期G₁/S期转换的进程。近期研究发现, 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, MSCs)可下调RhoA-ROCK信号转导通路活性, 并能抑制肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化、增殖与迁移, 促进HSCs凋亡^[10-11]。然而, MSCs抑制HSCs增殖的机制尚不十分明确。我们通过建立MSCs与HSCs共培养体系, 检测共培养后HSCs内RhoA、P27蛋白和mRNA表达水平的改变, 初步探讨MSCs通过RhoA-P27通路调控HSCs细胞周期改变的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠6只, 周龄6-8 wk, 由广西医科大学实验动物中心提供。肝星状细胞系(HSC-T6)及纤维原细胞系(由中山大学附属肿

瘤医院细胞库提供); DMEM-LG培养液(购于美国Gibco公司); 特级胎牛血清(购于美国Hyclone公司); 小鼠抗 RhoA、P27 mAb(购于美国Santa Cruz公司); TRIzol(购于美国Invitrogen公司); 逆转录试剂盒(购于美国MBI公司); Transwell insert 半透膜(购于美国Millipore公司); Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(购于碧云天生物技术研究所); 凯基细胞周期检测试剂盒(购于凯基生物公司); 小鼠重组肝细胞生长因子(HGF)(购于美国Peprotech公司).

1.2 方法

1.2.1 MSCs的分离、培养与功能鉴定: 按文献[12]方法在无菌条件下分离SD大鼠股骨骨髓细胞, 于37℃、饱和湿度、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 利用MSCs与其他贴壁细胞的贴壁差异性严格控制传代时胰酶的量和消化时间, 传代纯化MSCs, 显微镜下观察细胞形态. 取第4代细胞(Passage 4, P4), 2.5 g/L胰酶消化, 调整细胞浓度 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种于50 mL一次性培养瓶中, 备试验用. 取第4代细胞, 用特级胎牛血清内添加20 μg/L(终浓度)HGF诱导MSCs, 置于37℃、饱和湿度、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 每3天换液1次, 连续培养14 d, 倒置相差显微镜下观察细胞形态.

1.2.2 HSC-T6的培养、传代与活化鉴定: 大鼠HSC-T6系冻融后传代使用. 于L-DMEM培养液(含100 mL/L胎牛血清)、37℃、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 8 h即可贴壁生长, 2-3 d后细胞80%-90%铺满瓶底即可再次传代, 传至3-4代细胞生长活跃, 增殖明显可用于实验. 采用免疫组织化学法检测α-SMA表达. 倒置相差显微镜下观察活体细胞形态学改变.

1.2.3 纤维原细胞的培养、传代: 纤维原细胞系冻融后传代使用方法同上.

1.2.4 细胞共培养: 参照文献[13-14]方法应用6孔塑料细胞培养盒, 在半透膜(transwell insert) 上层接种MSCs或纤维原细胞(2×10^5 cells/well), 在下层接种HSC-T6细胞(2×10^5 cells/well), 建立上下双层细胞共培养体系, 常规培养. 实验分组: (1)空白对照组: HSCs单独培养(其上层只含培养基); (2)阴性对照组: HSCs与纤维原细胞共培养; (3)MSCs实验组: MSCs与HSCs共培养. 以上体系培养观察0、6、12、24、48、72 h. 各时间段于倒置相差显微镜下动态观察活体细胞形态学改变.

1.2.5 WST-8法检测HSCs增殖率: 共培养各时段

后用2.5 g/L胰酶消化贴壁细胞, 用细胞计数板计数细胞, 各时段细胞配成细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 吹打, 混匀, 取96孔板, 每孔加入100 μL, 每时段设3个复孔, 每孔加入10 μL CCK-8溶液. 设立空白孔, 加入100 μL无细胞的PBS溶液和10 μL的CCK-8溶液. 在细胞培养箱内继续孵育1 h, 再用酶标仪检测. 选择吸光度为450 nm进行检查. 取各时段4值均数进行比较.

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期: MSCs与HSCs各以 2×10^5 cells/well的量共培养, 取各时间段的细胞, 胰酶消化贴壁细胞, PBS清洗, 70%预冷酒精悬浮固定细胞, 4℃过夜, 加入等量PBS再洗2遍, 加100 μL RNaseA 37℃水浴30 min, Propidium Iodide(PI)4℃避光显色30 min, 流式细胞仪检测, MCYCLE软件分析细胞周期.

1.2.7 HSCs总RNA提取和RT-PCR: 收集各时段HSCs, 计数, 每 5×10^6 个细胞加1 mL的TRIzol, 振荡机振荡混匀. TRIzol一步抽提法提取总RNA. 按逆转录试剂盒说明进行逆转录, 并根据以下条件进行目的基因的扩增: 95℃预变性5 min进入循环, 95℃变性45 s, 55℃退火45 s, 72℃ 1 min, 共35个循环后, 72℃延伸5 min, 以GAPDH为内参照. 扩增引物由上海生工生物工程公司合成. RhoA的上游引物5'-TGGTGATG GAGCTTGTGTAAG-3', 下游引物 5'-AACAT CAGTGTCTGGGTAGGAG-3'; P27的上游引物 5'-TGCAACCGACGATTCTTCTACTCAA-3', 下游引物5'-CAAGCAGTGATGTATCTGATAAAC AAGGA-3'; GAPDH上游引物: 5'-GCCAGTAGA CTCCACGACAT-3', 下游引物5'-GCAAGTTCA ACGGCACAG-3'. 取6 μL PCR产物及6 μL DNA Marker进行1.7%琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶图像分析仪进行吸光度扫描, 观察条带的灰度强弱, 以目的基因/GAPDH的灰度比值表示相对目的基因 mRNA水平.

1.2.8 HSCs总蛋白提取和Western blot检测: 用细胞裂解液提取各时段HSCs总蛋白, 考马斯亮蓝比色法测定蛋白含量, 上样量为80 μg, 蛋白进行15% SDS-PAGE凝胶电泳, PVDF转膜, 非特异性封闭; 加入一抗小鼠抗RhoA、P27 mAb(1:500稀释), 4℃过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗进行杂交. ECL发光剂1-5 min, 曝光、显影、定影. 数码成像分析系统软件对结果进行分析, 以目的蛋白/GAPDH的灰度比值表示相对目的蛋白水平.

统计学处理 数据资料以mean±SD表示并

■相关报道

Arnaud *et al*报道, P27调节细胞迁移是通过调控RhoA的活性而起作用的; 而Shiotani *et al*研究发现, MSCs可下调RhoA-ROCK信号转导通路活性, 并能抑制HSCs活化、增殖与迁移, 促进HSCs凋亡.

■创新盘点

本文首次构建MSCs和HSCs共培养的微环境,研究MSCs抑制HSCs RhoA活化,并导致细胞周期的关键调控因子P27胞内表达增加,阻滞HSCs的增殖、分化.这可能是MSCs逆转肝纤维化的作用机制之一.

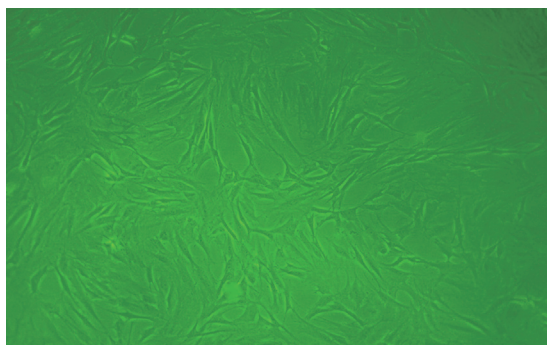


图1 MSCs原代培养至P4的形态.

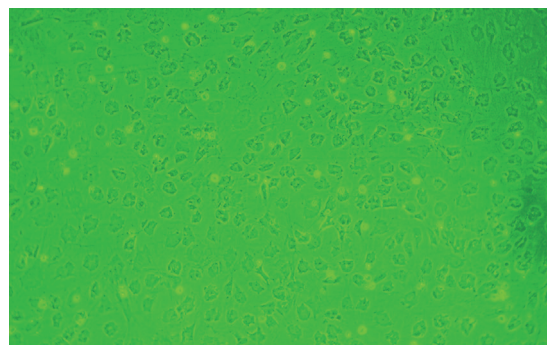


图2 HGF诱导MSCs 14 d的形态.

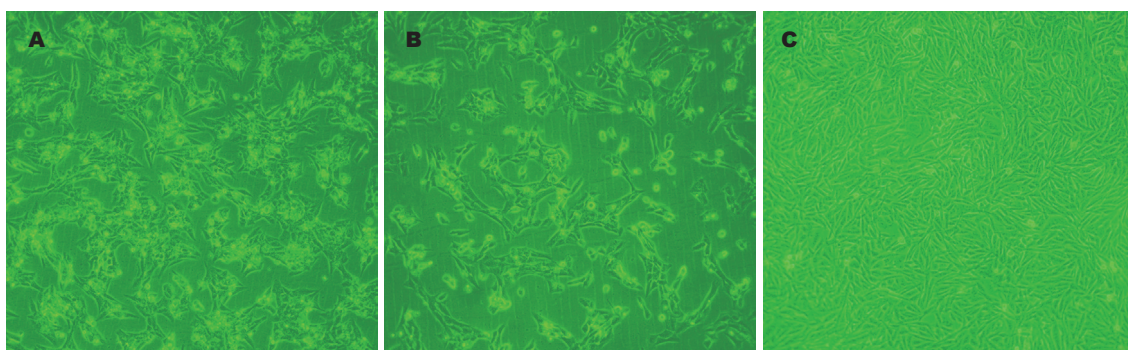


图3 HSC-T6复苏后培养、传代的形态学变化. A: 培养12 h; B: 培养48 h; C: 传代后48 h.

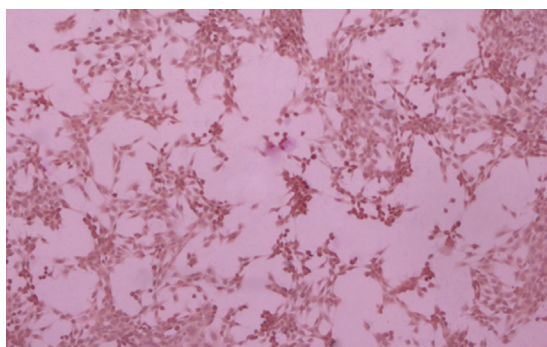


图4 HSCs活性鉴定.

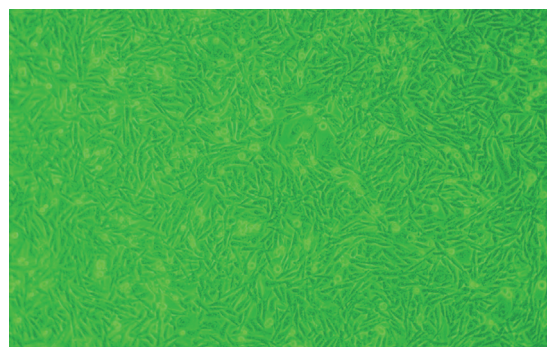


图5 纤维原细胞培养12 h后细胞形态.

应用统计软件SPSS13.0进行分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 MSCs形态学特点与功能鉴定 接种24 h后首次换液,可见少量类圆形细胞贴壁生长.原代培养3 d后,镜下可见单个或少量成集落生长贴壁细胞,形态大多呈短梭形;7-10 d后,细胞集落不断扩大并形成融合单层,细胞形态大多呈长梭形或多角形;传至P4, MSCs逐渐纯化,类似成纤维细胞,呈旋涡状生长(图1);经HGF诱导的细胞在最初2-3 d形态无明显变化,约7-10 d由梭形向三角形、椭圆形或多角形变化,14 d时,分化细胞基本

为椭圆形,细胞体积增大,高倍镜下细胞折光性强,核大而圆,偶见双核,类似肝细胞形态(图2).

2.2 HSC-T6的形态学特点与活性鉴定 HSCs 12 h在培养瓶中完全贴壁生长,呈圆形或椭圆形,胞质内含折光颗粒(图3A),48 h后发生细胞间融合现象,细胞变长且分裂增殖,呈纤维样细胞形状,胞质内折光颗粒减少(图3B).消化传代后的HSCs生长速度加快,48 h成典型的成纤维原细胞形态(图3C). α -SMA是HSCs活化的标志:免疫组织化学染色显示,HSCs培养48 h后 α -SMA表达呈阳性,胞质被染成棕黄色,呈细条索状.HSCs呈星形,胞体大,膜状伸展. α -SMA阳性率达95%以上(图4).

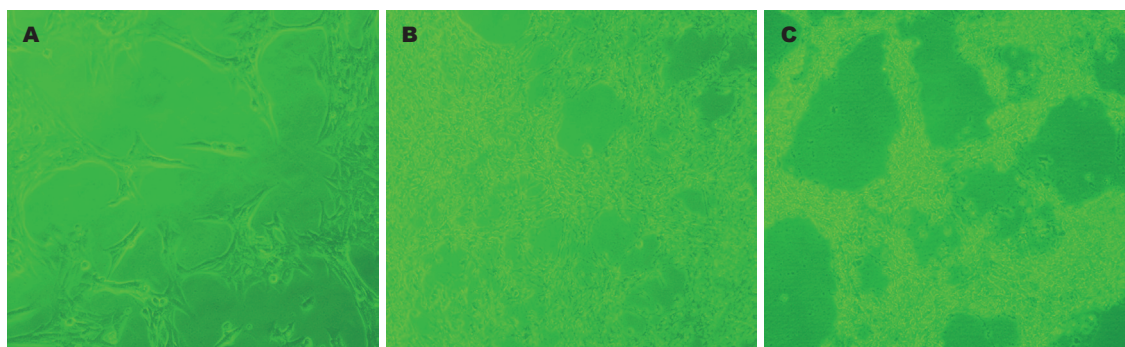


图 6 共培养后HSCs形态学变化. A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h.

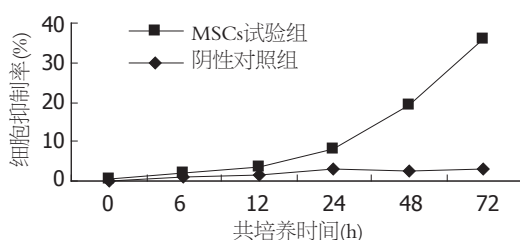


图 7 HSCs细胞增殖抑制曲线.

2.3 纤维原细胞形态学特点 纤维原细胞培养12 h, 在培养瓶中可见完全贴壁生长各组与成纤维细胞形态上基本相似, 呈梭形或不规则三角形, 放射状或旋涡状走行(图5).

2.4 共培养后HSCs形态学变化 MSCs实验组共培养0至24 h时段, HSCs形态学无明显改变(图6A); 48 h HSCs多呈椭圆形, 膜状伸展减弱, 包体变小, 折光颗粒增多, 细胞贴壁减弱, 细胞数减少(图6B); 72 h HSCs呈圆形或椭圆形, 无膜状伸展, 折光颗粒密集, 贴壁差, 细胞数明显减少(图6C). 共培养后, 空白对照组与阴性对照组HSCs形态学均无明显改变, 呈星形, 胞体大, 膜状伸展, 折光颗粒较少.

2.5 HSCs增殖率检测 以空白对照组的细胞数作为参照值. 共培养24 h, MSCs实验组HSCs表现轻度的增殖抑制, 其抑制率为 $5.15\% \pm 2.1\%$, 此后细胞增殖抑制明显增强, 48、72 h各为 $16.23\% \pm 2.35\%$ 、 $32.91\% \pm 1.8\%$, 出现时间依赖性(图7). 24 h后, MSCs实验组与阴性对照组($2.85\% \pm 0.12\%$ 、 $2.77\% \pm 0.25\%$ 、 $2.89\% \pm 0.11\%$)比较具有显著性差异($P < 0.01$). 共培养全过程中, 阴性对照组与空白对照组比较无差异.

2.6 HSCs细胞周期的变化 共培养12 h后, MSCs实验组与空白对照组、阴性对照组比较, HSCs停滞在 G_0/G_1 期的细胞数明显增多($P < 0.01$), S期细胞数显著减少($P < 0.01$); 24、48、72 h, G_0/G_1 期的细胞数分别为 $49.45\% \pm 0.95\%$ 、 54.28%

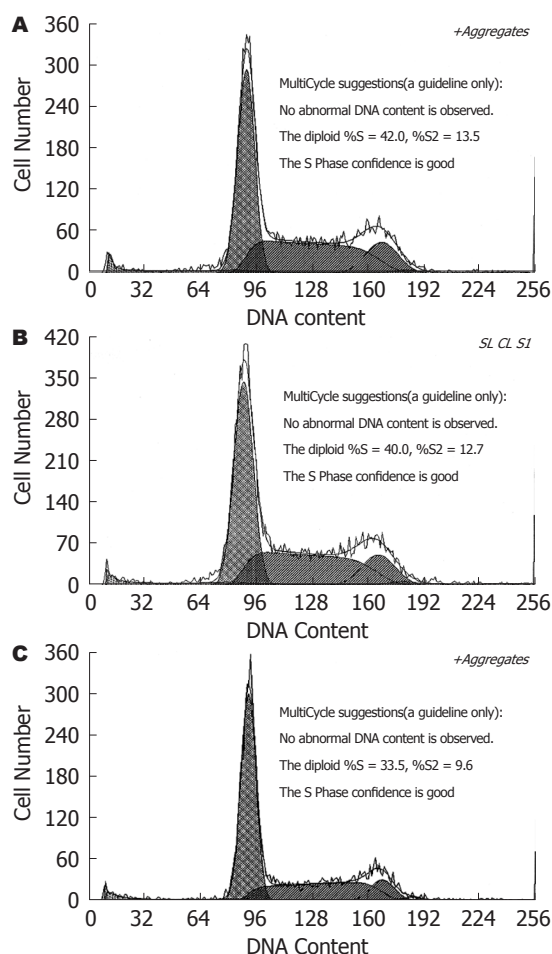


图 8 HSCs细胞周期流式细胞图. A: MSCs实验组, 共培养0 h; B: 阴性对照组, 共培养72 h; C: MSCs实验组, 共培养72 h.

$\pm 0.99\%$ 、 $58.64\% \pm 1.10\%$, S期细胞数分别为 $38.86\% \pm 1.17\%$ 、 $35.42\% \pm 0.94\%$ 、 $33.5\% \pm 0.78\%$. 共培养全过程中, 空白对照组与阴性对照组比较无差异(图8).

2.7 RhoA、P27 mRNA的表达 共培养12 h, MSCs实验组RhoA mRNA表达(0.89 ± 0.02)较空白对照组(1.06 ± 0.02)显著下调($P < 0.01$), 此后迅速下调, 72 h达到最低水平(0.37 ± 0.05); 共培养各时间段中, RhoA mRNA表达, 阴性对照组($1.07 \pm$

应用要点

本实验研究MSCs与HSCs共培养后HSCs内RhoA、P27表达的变化, 说明MSCs可能通过RhoA-P27通路调控HSCs的增殖、分化, 为MSCs移植治疗肝纤维化提供新的理论依据.

同行评价

本文统计学方法正确, 研究内容有一定的创新性.

表 1 共培养后HSCs RhoA蛋白/GAPDH灰度比值 ($n = 3$, mean \pm SD)

分组	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	1.17 \pm 0.04	1.14 \pm 0.09	1.11 \pm 0.12	1.09 \pm 0.08	1.09 \pm 0.05	1.07 \pm 0.05
阴性对照组	1.07 \pm 0.16	1.03 \pm 0.25	1.06 \pm 0.16	1.06 \pm 0.17	1.05 \pm 0.28	0.99 \pm 0.27
MSCs实验组	1.18 \pm 0.10	1.03 \pm 0.15	0.86 \pm 0.07 ^b	0.60 \pm 0.11 ^b	0.46 \pm 0.03 ^b	0.18 \pm 0.03 ^b

^b $P < 0.01$ vs 空白对照组.

表 2 共培养后HSCs P27蛋白/GAPDH灰度比值 ($n = 3$, mean \pm SD)

分组	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.19 \pm 0.02	0.19 \pm 0.03	0.20 \pm 0.04	0.20 \pm 0.04	0.21 \pm 0.04	0.22 \pm 0.04
阴性对照组	0.22 \pm 0.03	0.22 \pm 0.05	0.21 \pm 0.04	0.20 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	0.22 \pm 0.03
MSCs实验组	0.13 \pm 0.03	0.14 \pm 0.03	0.39 \pm 0.03 ^a	0.73 \pm 0.07 ^b	1.07 \pm 0.02 ^b	0.96 \pm 0.06 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白对照组.

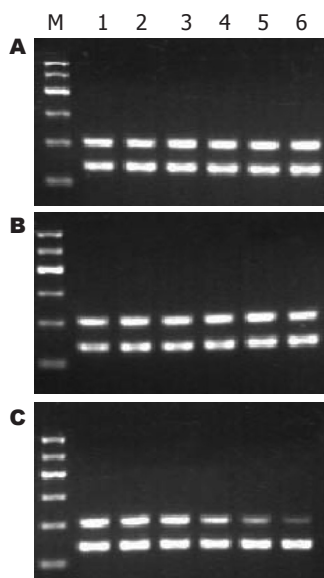


图 9 HSCs RhoA mRNA的表达. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: MSCs实验组. 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: 48 h; 6: 72 h; M: Marker.

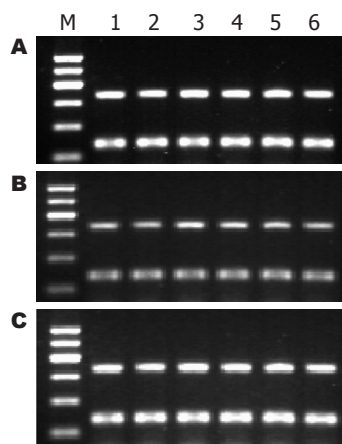


图 10 HSCs P27 mRNA的表达. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: MSCs实验组. 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: 48 h; 6: 72 h; M: Marker.

0.03, 1.03 \pm 0.05, 1.06 \pm 0.03, 1.04 \pm 0.07, 1.01 \pm 0.06, 0.96 \pm 0.10)与空白对照组(1.08 \pm 0.02, 1.04 \pm 0.03, 1.06 \pm 0.02, 0.96 \pm 0.08, 1.00 \pm 0.06, 0.92 \pm 0.07)比较均无差异(图9); 共培养全过程中, 各组P27 mRNA表达的比较均无差异(图10). RhoA与P27 mRNA表达无明显相关($r = -0.105$).

2.8 RhoA、P27蛋白的表达 共培养后12 h, MSCs实验组RhoA蛋白表达(0.86 \pm 0.07)较空白对照组(1.11 \pm 0.12)显著下调($P < 0.01$), 此后缓慢下降, 72 h达到最低水平(表1, 图11); 共培养后12 h, MSCs实验组P27蛋白表达(0.39 \pm 0.03)较空白对照组(0.20 \pm 0.04)上调($P < 0.05$), 至24 h MSCs实验组P27蛋白(0.73 \pm 0.07)表达较空白对照组(0.20 \pm 0.04)显著上调($P < 0.01$), 此后持续维持高

表达状态(表2, 图12). 阴性对照组与空白对照组RhoA、P27蛋白表达在共培养的各个时间点比较均无差异. RhoA与P27蛋白表达呈显著负相关($r = -0.943$, $P < 0.01$).

3 讨论

HSCs是肝纤维化的中心环节, 其活化后可向肌成纤维细胞转型. 活化型星状细胞有较大的胶原合成能力^[15], 大量合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 导致肝内ECM过量积聚, 最终导致肝纤维化和肝硬化形成. MSCs是骨髓来源干细胞^[16-17], 具有多向分化潜能. 在体内外研究中, MSCs可成功分化为肝样细胞^[18-19]. MSCs通过外周静脉移植可有效逆转肝纤维化或肝硬化, 阻止肝组织病理学变化^[20-22]. MSCs定植入肝脏之后, 通过与肝细胞及星状细胞之间的旁分泌及其信号通路传导发挥重要作用^[23]. Shiotani *et al*^[11]研究发现抑制Rho-ROCK信号通

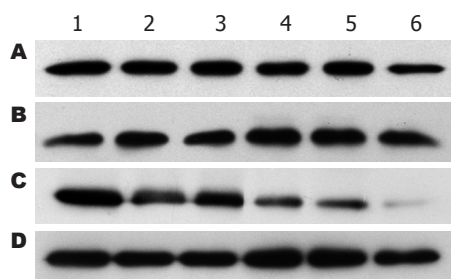


图 11 HSCs RhoA蛋白的表达. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: MSCs实验组. 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: 48 h; 6: 72 h.

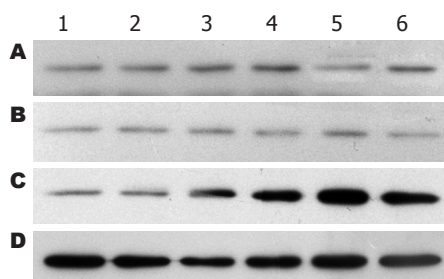


图 12 HSCs P27蛋白的表达. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: MSCs实验组. 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: 48 h; 6: 72 h.

路活化可以阻断HSCs增殖、收缩和迁移, 促进HSCs凋亡. 同时, 我们前期研究^[10]发现, Rho家族蛋白在治疗大鼠急性慢性肝损伤中发挥重要作用. MSCs可下调RhoA-ROCK信号转导通路活性加速肝脏修复. 在体外MSCs与HSCs共培养研究中, MSCs可抑制HSCs的活性、增殖及其RhoA蛋白的表达. 可以推断, RhoA活性下调可能在MSCs对HSCs增殖抑制过程中起着重要作用.

本研究发现, MSCs与HSCs共培养后, 随着时间的延长, HSCs细胞形态逐渐改变, 由0 h呈星形, 胞体大, 膜状伸展, 折光颗粒较少, 至48 h呈椭圆形, 膜状伸展减弱, 包体变小, 折光颗粒增多, 细胞贴壁减弱, 细胞数减少, 至72 h呈圆形或椭圆形, 无膜状伸展, 折光颗粒密集, 贴壁差, 细胞数明显减少; HSCs细胞增殖率亦下降明显, 这种增殖抑制作用在共培养24 h后更明显; 在对HSCs细胞周期分析时, 我们发现, 共培养12 h后, HSCs停滞在G₀/G₁期的细胞数增加开始明显, 而S期的细胞数亦开始显著减少, 至72 h时, 这种离散的变化趋势更加显著; 在蛋白水平上, 共培养12 h后, HSCs内RhoA蛋白表达显著减少, 而P27蛋白表达明显增加, P27蛋白与RhoA蛋白表达的变化存在显著的负相关关系. 不难发现, 这些变化表现出明显的时间依赖性, 他们各自的变化存在紧密的联系. 研究证实, RhoA可通过调控cyclinE/CDK2^[5]、PI3K通路^[6]、Skp2^[8]的活性而调控P27蛋白的表达与降解, 最终改变细胞周期的G₁/S期进程; RhoA还可调控CIP/KIP家族肿瘤抑制因子(P21、P27、P57)或选择性抑制RhoA或其效应因子mammalian Diaphanous 1和Rho激酶(ROCK), 有效地抑制细胞增殖和细胞周期G₁/S期转化^[24]. 此外, 在正常细胞中, P27蛋白量在细胞周期G₀期是较高的, 而在有丝分裂原诱导细胞进入G₁期时P27蛋白量会迅速地减少^[25-26]. P27蛋白高表达可使细胞停滞在G₁期时

段, 抑制P27表达可以增加S期细胞的比率^[27]. 可见, MSCs抑制HSCs RhoA的高表达, 而RhoA活性的下调导致P27蛋白降解的减少, P27蛋白在胞内大量聚积, 致使大量HSCs停滞在细胞周期的G₀/G₁期, 即停滞在细胞周期的DNA合成前期, 最终导致HSCs细胞分裂、增殖减少, 活性减低, 并促进细胞凋亡.

然而, 本研究各组在共培养全过程中, P27 mRNA表达没有明显变化; 在MSCs实验组中, P27蛋白水平却能随着RhoA活性下调而呈增多趋势. 有学者认为, P27在转录水平不受调控^[28-29], P27蛋白上调可能与胞质内P27蛋白降解受阻有关. P27蛋白表达的调节方式主要发生在翻译后水平, 即泛素蛋白酶体途径介导的P27蛋白降解^[30-31], 该途径的激活需要Skp2蛋白的活化. 当Skp2-P27复合物形成, 即可致使P27蛋白泛素化及降解^[32-37], 而RhoA可以通过调控Skp2-P27通路而促进细胞周期G₁/S期转换^[8].

在共培养模型中, HSCs在0, 6, 12 h各时段内细胞形态、活性、增殖抑制率及其RhoA、P27蛋白和mRNA表达水平均无明显变化, 这可能与两细胞各自通过旁分泌或自分泌某些细胞因子和生长因子有关, 如IL-10、TNF- α 、GM-CSF^[38]、HGF^[19]和NGF^[39]等, 这些活性因子可能相互影响, 并导致微环境的改变.

总之, MSCs可能通过RhoA-P27通路调控HSCs的细胞周期G₁/S期转换, 抑制HSCs的增殖并促进其凋亡. RhoA活性的下调可能是引起HSCs P27蛋白表达增加的原因. 然而本研究应用的共培养体系所涉及的微环境极为复杂, 深入研究该体系内各种信号因子的改变, 对于阐明MSCs与HSCs作用机制具有深远意义.

4 参考文献

- 1 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of

- p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66
- 2 Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74
- 3 Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 2000; 183: 10-17
- 4 Weber JD, Hu W, Jefcoat SC Jr, Raben DM, Baldassare JJ. Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27. *J Biol Chem* 1997; 272: 32966-32971
- 5 Hu W, Bellone CJ, Baldassare JJ. RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *J Biol Chem* 1999; 274: 3396-3401
- 6 Seasholtz TM, Zhang T, Morissette MR, Howes AL, Yang AH, Brown JH. Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27(Kip1) expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circ Res* 2001; 89: 488-495
- 7 Vidal A, Millard SS, Miller JP, Koff A. Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced transformation in a manner dependent on p27 status. *J Biol Chem* 2002; 277: 16433-16440
- 8 Mammoto A, Huang S, Moore K, Oh P, Ingber DE. Role of RhoA, mDia, and ROCK in cell shape-dependent control of the Skp2-p27kip1 pathway and the G1/S transition. *J Biol Chem* 2004; 279: 26323-26330
- 9 Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* 2004; 18: 862-876
- 10 梁昌宇, 覃山羽, 姜海行, 王东旭, 苏思标, 梁梓宇. 骨髓间充质干细胞对大鼠急性肝损伤修复的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1178-1184
- 11 Shiotani S, Shimada M, Suehiro T, Soejima Y, Yosizumi T, Shimokawa H, Maehara Y. Involvement of Rho-kinase in cold ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transplantation* 2004; 78: 375-382
- 12 穆丽雅, 韩明子, 祁金锋. 门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1408-1411
- 13 Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 247-252
- 14 Shi L, Li G, Wang J, Sun B, Yang L, Wang G, Wang D, Mu L, Chen H, Jin L, Kostulas N, Li H. Bone marrow stromal cells control the growth of hepatic stellate cells in vitro. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2969-2974
- 15 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 16 Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; 30: 896-904
- 17 Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-3493
- 18 Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, Petersen BE. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007; 132: 1077-1087
- 19 Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl₄-injured rats. *J Hepatol* 2006; 44: 742-748
- 20 Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40: 1304-1311
- 21 Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3431-3440
- 22 Ueno T, Nakamura T, Torimura T, Sata M. Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Med Mol Morphol* 2006; 39: 16-21
- 23 Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, Fujisaki H, Tokimasa S, Osugi Y, Ozono K, Matsumoto K, Nakamura T, Hara J. Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor. *Exp Hematol* 2004; 32: 955-961
- 24 Zhang S, Tang Q, Xu F, Xue Y, Zhen Z, Deng Y, Liu M, Chen J, Liu S, Qiu M, Liao Z, Li Z, Luo D, Shi F, Zheng Y, Bi F. RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 570-580
- 25 Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994; 372: 570-573
- 26 Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 1995; 9: 1831-1845
- 27 Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 1996; 272: 877-880
- 28 Singh SP, Lipman J, Goldman H, Ellis FH Jr, Aizenman L, Cangi MG, Signoretti S, Chiaur DS, Pagano M, Loda M. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 1730-1735
- 29 王小中, 冯文莉, 刘兴, 曹唯希, 黄宗干. SKP2反义寡核苷酸对K562细胞生长和增殖的影响. *癌症* 2003; 22: 948-952
- 30 Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; 269: 682-685
- 31 Nakayama KI, Hatakeyama S, Nakayama K. Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 853-860
- 32 Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of

- the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 193-199
- 33 Montagnoli A, Fiore F, Eytan E, Carrano AC, Draetta GF, Herskho A, Pagano M. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 1999; 13: 1181-1189
- 34 Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, Krek W. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 207-214
- 35 Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* 2000; 19: 2069-2081
- 36 Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, Herskho A. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 321-324
- 37 Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith AP, Ryan A, Krek TW, Reed SI. A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* 2001; 7: 639-650
- 38 Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyannidis P, Proya E, Anagnostopoulos A, Fassas A. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005; 33: 108-119
- 39 Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 2002; 59: 514-523

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》中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

VEGF促进肝癌SMMC-7721细胞侵袭性的自分泌机制

顾宇, 陆枫林

■背景资料

目前, 对肝癌的侵袭转移机制研究虽取得了一定的进展, 但具体分子机制仍不十分清楚, 对其潜在分子机制的阐明可以为肝癌侵袭转移分子靶向治疗奠定基础. 以往的研究认为肿瘤的转移为旁分泌机制, 本研究拟探讨肝癌细胞侵袭的自分泌机制.

顾宇, 陆枫林, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009

顾宇, 主治医师, 主要从事消化系疾病研究.

通讯作者: 陆枫林, 副教授, 主任医师, 210009, 江苏省南京市, 东南大学附属中大医院消化科. guyu123456789@126.com

收稿日期: 2009-07-18 修回日期: 2009-09-12

接受日期: 2009-09-15 在线出版日期: 2009-11-18

Vascular endothelial growth factor promotes the invasion of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via an autocrine mechanism

Yu Gu, Feng-Lin Lu

Yu Gu, Feng-Lin Lu, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Feng-Lin Lu, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. guyu123456789@126.com

Received: 2009-07-18 Revised: 2009-09-12

Accepted: 2009-09-15 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To evaluate the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on cell invasion and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721.

METHODS: SMMC-7721 cells were incubated with different concentrations of VEGF. The invasive capacity of cells was determined using cell invasion assay. The expression of MMP-9 mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: Compared with normal control cells, cells treated with VEGF had significantly increased invasive capacity ($P < 0.01$). The expression levels of MMP-9 mRNA and protein in VEGF-treated cells were significantly higher than those in normal control cells (0.479 ± 0.025 , 0.665 ± 0.024 vs 0.315 ± 0.022 ; 0.521 ± 0.026 , 0.662 ± 0.026 vs 0.366 ± 0.025 , both $P < 0.01$). The ex-

pression levels of MMP-9 mRNA and protein in cells incubated with high-concentration VEGF ($30 \mu\text{g/L}$) were significantly higher than those in cells incubated with low-concentration VEGF ($10 \mu\text{g/L}$) ($P < 0.01$).

CONCLUSION: VEGF can upregulate MMP-9 expression and promote cell invasion in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via an autocrine mechanism.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Vascular endothelial growth factor; Matrix metalloproteinase-9; Invasion

Gu Y, Lu FL. Vascular endothelial growth factor promotes the invasion of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via an autocrine mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3292-3295

摘要

目的: 探讨促血管内皮生长因子(VEGF)对肝癌细胞SMMC-7721侵袭力以及对该细胞中基质金属蛋白酶9(MMP-9)的影响, 初步研究VEGF对肿瘤侵袭和转移的影响及可能的作用机制.

方法: 使用VEGF体外培养人肝癌SMMC-7721细胞, 通过细胞体外侵袭实验检测细胞侵袭能力的改变, 再分别使用 $30 \mu\text{g/L}$ 、 $10 \mu\text{g/L}$ VEGF培养人肝癌SMMC-7721细胞, 以正常培养人肝癌SMMC-7721细胞为空白对照组. 使用半定量RT-PCR和Western blot法对3组细胞中MMP-9的mRNA和蛋白表达水平进行分析.

结果: 细胞体外侵袭实验显示, 外加VEGF培养后, 细胞侵袭力明显增强($P < 0.01$); MMP-9 mRNA和蛋白的表达在外加VEGF组中要明显高于空白对照组(0.479 ± 0.025 , 0.665 ± 0.024 vs 0.315 ± 0.022 ; 0.521 ± 0.026 , 0.662 ± 0.026 vs 0.366 ± 0.025 , 均 $P < 0.01$), 且高浓度和低浓度组之间也有明显差别.

结论: 肝癌SMMC-7721细胞系中存在有自分泌机制, VEGF可通过自分泌机制上调肝癌细胞的MMP-9表达, 进而促进肿瘤的浸润转移.

■同行评议者

于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

关键词: 肝癌; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶-9; 侵袭

顾宇, 陆枫林. VEGF促进肝癌SMMC-7721细胞侵袭性的自分泌机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3292-3295

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3292.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上常见的恶性肿瘤之一, HCC有高致死率, 特别是肝硬化基础上发展为肝癌的患者^[1], 容易发生早期肝内外转移, 预后较差. 因此, 对于肝癌的侵袭转移机制的研究是一个重要课题. 目前, 对肝癌的侵袭转移机制研究虽取得了一定的进展, 但具体分子机制仍不十分清楚, 对其潜在分子机制的阐明可以为肝癌侵袭转移分子靶向治疗奠定基础. 以往的研究认为肿瘤的转移为旁分泌机制, 本研究拟探讨肝癌细胞侵袭的自分泌机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株SMMC-7721由本校分子生物中心实验室提供; DMEM高糖细胞培养基购自美国Gibco公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物公司; 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)购自美国-9 Santa Cruz公司; 单克隆抗人基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinases 9, MMP-9)抗体购自美国Santa Cruz生物公司; 免疫组织化学试剂盒购自北京奥伯森生物公司; TRIzol裂解液购自美国Invitrogen公司; RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司; Matrigel胶购自美国Becton-dickinson公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝癌细胞株SMMC-7721用含100 mL/L胎牛血清的DMEM高糖培养基, 在37℃、50 mL/L CO₂培养箱里常规培养, 细胞长至80%培养皿面积时, 以2.5 g/L胰酶37℃消化1 min, 倒去胰酶, 加入新鲜培养基, 吹打至单细胞悬液, 分装传代.

1.2.2 侵袭性实验: 加Matrigel胶至24孔板上的Transwell小室上室, 每孔100 μL, 37℃放置4-5 h; 使用无血清培养基轻柔的清洗凝胶后的Matrigel, 吸出培养板上多余液体; 下室放置600 μL含有5 mg/L fibronectin、200 μg/L的VEGF培养基, 作为黏附底物; 对照组下室加不含VEGF的无血清培养基; 2组上室均加入含有10⁵个细胞

的悬液, 37℃、50 mL/L CO₂培养箱孵育24 h. 取出上室; 棉签擦去Matrigel胶以及膜上层细胞, 无水酒精固定膜下层细胞, 苏木素染色; 显微镜下随机选取10个高倍视野计数.

1.2.3 RT-PCR分析: 分3组进行细胞培养: 空白对照组、VEGF 10 μg/L组、VEGF 30 μg/L浓度组. 细胞培养至细胞融合达90%以上时, 按TRIzol试剂盒说明提取空白对照组、VEGF 10 μg/L组、30 μg/L组的细胞总RNA, 琼脂糖凝胶电泳初步评价RNA的质量, 分光光度仪测定总RNA纯度. 根据RNA纯度将每组的RNA调至每个反应体系中含1 μg. MMP-9引物上游序列为5'-CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC-3', 下游序列为5'-GCC ACT TGT CGG CGA TAA GG-3', 扩增产物为263 bp; 内参GAPDH引物上游序列为5'-CAT CTT CCA GGA GCG AGA-3', 下游序列为5'-TGT TCT CAT ACT TCT CAT-3', 扩增产物为203 bp. 对RT-PCR产物进行琼脂糖电泳, 数字成像系统进行拍照分析.

1.2.4 Western blot检测MMP-9蛋白的表达: 将融合达90%以上的3组细胞用细胞裂解液裂解, 分别提取各自的细胞总蛋白, 在11%聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 将蛋白电转膜至硝酸纤维素膜上, 50 g/L脱脂奶粉封闭后分别与抗MMP-9单克隆抗体杂交, 再与相应的酶标记二抗反应, 阳性条带用化学发光法检测, 放置Kodak活体成像仪直接数码显色.

统计学处理 实验的定量检测结果以mean±SD表示, 2组均数间比较使用 t 检验; 多组均数间比较采用单因素方差分析, 两两组间比较采用 q 检验. 采用SAS11.5软件进行统计分析, $P \leq 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结果

2.1 外加VEGF后, 人肝癌细胞株SMMC-7721侵袭力明显增强 通过显微镜下高倍视野计数, 与空白对照组相比, 外加VEGF的人肝癌细胞株SMMC-7721细胞的侵袭力明显增加(侵袭细胞数量: 441.7 ± 29.8256 vs 151.0 ± 29.18904 , $P < 0.01$, 图1).

2.2 MMP-9 mRNA的表达 与空白对照组相比, 外加VEGF组的MMP-9 mRNA表达明显增高, 并且和浓度之间存在量的关系(表1, 图2).

2.3 MMP-9蛋白的表达 本实验检测人肝癌SMMC-7721细胞在加入VEGF不同浓度后MMP-9蛋白水平的表达. 结果显示, 外加VEGF

■ 研发前沿
肿瘤细胞是否存在促进侵袭的自分泌机制还不明了.

■相关报道

Kamel *et al* 在比较肝癌、肝纤维化患者治疗前与健康者血清VEGF水平时发现, 有门静脉侵犯和转移的肝癌患者其血清VEGF和MMP-9水平较无门静脉侵犯和转移的明显升高, 并且发现血清VEGF水平在肿瘤>5 cm和<5 cm的患者之间存在明显差异, 显示了VEGF可以导致肿瘤侵袭和转移能力增加。

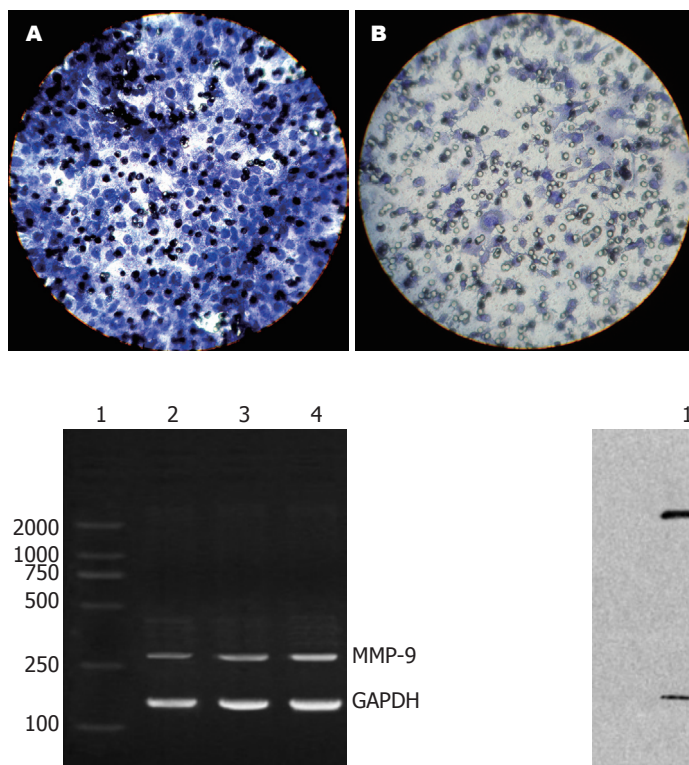


图2 人肝癌SMMC-7721细胞中MMP-9 mRNA的表达. 1: DNA Marker; 2: 空白对照组; 3: VEGF 10 µg/L组; 4: VEGF 30 µg/L组.

后, MMP-9蛋白的表达水平与空白对照组相比明显增高, 并且和浓度之间存在量的关系(表1, 图3).

3 讨论

肿瘤的侵袭、转移级联反应涉及到多个步骤, 包括肿瘤在局部生长到一定大小后, 肿瘤细胞从原发灶脱落, 降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜, 进入血液循环系统后逃逸宿主的免疫监控而存活下来, 到达远处组织器官后黏附并形成微小转移灶, 继而新生血管形成, 最后继发形成肿瘤. VEGF和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在此过程中起着非常重要的作用.

MMPs是一族Zn²⁺依赖的蛋白水解酶, 主要负责组织重塑与ECM的降解, 现已至少发现该家族的26个成员^[2], 他们大多于人体或其他哺乳动物中表达. MMPs对肿瘤作用为^[3]: (1)刺激肿瘤进展; (2)诱导血管生成; (3)促进肿瘤侵袭; (4)促进肿瘤细胞从原发位置逃逸; (4)促使肿瘤细胞在继发转移位点定居等.

MMPs在恶性肿瘤发生和进展中的作用主要是降解ECM、促进肿瘤生长、浸润和转移. ECM是宿主细胞赖以生存的微环境, 细胞发生

图1 人肝癌细胞株SMMC-7721细胞体外侵袭图. A: VEGF 200 µg/L组; B: 空白对照组.

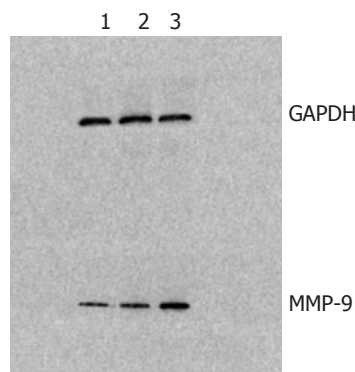


图3 Western blot检测MMP-9蛋白的表达. 1: 空白对照组; 2: VEGF 10 µg/L组; 3: VEGF 30 µg/L组.

表1 人肝癌SMMC-7721细胞中MMP-9蛋白及mRNA的表达

	蛋白	mRNA
空白对照组	0.366 ± 0.025	0.315 ± 0.022
VEGF 10 µg/L组	0.521 ± 0.026 ^b	0.479 ± 0.025 ^b
VEGF 30 µg/L组	0.662 ± 0.026 ^b	0.665 ± 0.024 ^b

^bP<0.01 vs 空白对照组.

恶性转化后, 必须降解细胞外的基质为自己的生长提供空间, 并将其改建为适合自己生长的微环境. MMP-9是MMPs家族中相对分子质量最大的酶, 他可以降解所有ECM. MMP-9是水解ECM的重要蛋白水解酶, 在肿瘤的侵袭、转移过程中发挥重要作用. 主要降解基底膜的主要成分IV型胶原、VII型、X型胶原和明胶.

VEGF是1989年由Ferrara *et al* 发现的, 是最重要的血管生成调节因子. VEGF对肿瘤的影响机制可能有^[4]: (1)促进肿瘤血管形成, 这与VEGF能增加血管通透性、促进血管内皮细胞增殖、促进血管支持物生长有关; (2)促进肿瘤淋巴管生长; (3)对肿瘤细胞的细胞动力影响; (4)增强肿瘤细胞对放疗的耐受性及影响免疫功能. VEGF在许多肿瘤组织中均有较高水平的表达, 如在脑肿瘤、卵巢肿瘤、黑色素瘤、肺癌、大肠癌中与肿瘤生长密切相关. Kamel *et al*^[5]在比较肝癌、肝纤维化患者治疗前与健康者血清VEGF

水平时发现, 有门静脉侵犯和转移的肝癌患者其血清VEGF和MMP-9水平较无门静脉侵犯和转移的明显升高, 并且发现血清VEGF水平在肿瘤>5 cm和<5 cm的患者之间存在明显差异, 显示了VEGF可以导致肿瘤侵袭和转移能力增加。

MMPs的表达和活性受酶原合成、活化和抑制剂抑制3个水平调控。在正常生理条件下, MMP-9的表达受到严格的调控目前已明确的上调因素有IL-1、TNF- α 、EGF、VEGF等。Hiratsuka *et al*就报道了可以通过肺内皮细胞的VEGFR-1产生MMP-9从而促进在肿瘤在肺的转移^[6]。

目前大多数研究显示VEGF作用于肿瘤细胞周围的间质细胞, 促进MMP-9分泌, 为旁分泌机制, 肿瘤细胞是否存在促进侵袭的自分泌机制还不明了, 因此探讨肿瘤细胞的侵袭的自分泌机制有助于了解肿瘤细胞特性, 丰富肿瘤转移的理论基础。

本实验通过对使用VEGF培养的肝癌细胞和正常培养的肝癌细胞侵袭力的比较, 得出VEGF可以促进人肝癌SMMC-7721细胞株侵袭力增加, 证明了VEGF可以促进肿瘤细胞的侵袭, 和以往的研究一致。MMP-9是肿瘤侵袭转移中最重要的酶分子之一, 因此我们假设VEGF促进肿瘤细胞侵袭力增加可能为上调了MMP-9的表达所致, 在随后的实验中通过检测各组人肝癌SMMC-7721细胞中MMP-9的表达, 证实了该假设, 因此可以说VEGF上调肿瘤细胞的MMP-9表达是增加肿瘤细胞的侵袭力的作用机制之一。

通过本实验, 证实了肿瘤细胞亦可在外在的细胞因子作用下自分泌降解基质的酶分子, 从而促进肿瘤细胞的侵袭, 促进肿瘤细胞的恶性化。

总之, VEGF在促进肿瘤转移中, 除了旁分泌机制调节新生血管形成外, 还经自分泌机制直接作用于肿瘤细胞, 其中包括上调肿瘤细胞的MMP-9的表达来增加肿瘤细胞的侵袭性。目前, 运用分子生物学的手段在基因或蛋白水平上对一些癌基因或促肿瘤生长的因素进行干预已成为新的治疗肿瘤的方向。本研究为肝癌的基因治疗提供了一定的实验依据。

4 参考文献

- 1 Benzoni E, Lorenzin D, Favero A, Adani G, Baccarani U, Molaro R, Zompicchiatti A, Saccomano E, Avellini C, Bresadola F, Uzzau A. Liver resection for hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of factors associated with improved prognosis. The role of clinical, pathological and surgical related factors. *Tumori* 2007; 93: 264-268
- 2 Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 2223-2268
- 3 Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 9-34
- 4 陈孝, 王孟薇, 吴本俨. 血管内皮生长因子对肿瘤的影响及临床应用. *四川医学* 2005; 26: 1032-1034
- 5 Kamel L, Nessim I, Abd-el-Hady A, Ghali A, Ismail A. Assessment of the clinical significance of serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in patients with hepatocellular carcinoma. *J Egypt Soc Parasitol* 2005; 35: 875-890
- 6 Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2: 289-300

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本实验设计合理, 选择方法得当, 学术价值较好。

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)。(科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

Syndecan-1在急性结肠炎及慢性化小鼠模型中的表达及其意义

王显飞, 陈予, 戴俊臣, 陈村龙, 王霞, 陈烨

■背景资料

Syndecan-1(Sdc-1)属于黏附分子整合素跨膜粘蛋白聚糖家族成员,生理状态下主要表达于上皮细胞表面,是肠上皮细胞紧密连接的重要组成部分,在炎症过程中,Sdc-1通过其胞外段硫酸乙酰肝素链(属于GAGs)共价结合多种胞外配体,结合各种生物分子及调节各种结合蛋白的生物学功能,参与炎症反应的多个环节。

王显飞, 陈予, 川北医学院附属医院消化内科 四川省南充市 637000

戴俊臣, 四川省眉山市人民医院 四川省眉山市 620010
陈村龙, 王霞, 陈烨, 南方医科大学南方医院消化病研究所 广东省广州市 510515

王显飞, 助教, 主要从事炎症性肠病与肠道微生态。

作者贡献分布: 此课题由王显飞、陈村龙、王霞与陈烨设计; 研究过程由王显飞、王霞与陈烨操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈烨提供; 数据分析由王显飞、陈村龙、王霞与陈烨完成; 本论文写作由王显飞、陈村龙、陈予、戴俊臣与陈烨完成。

通讯作者: 陈烨, 副教授, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院消化病研究所. yechen@fimmu.com

电话: 020-61641545

收稿日期: 2009-09-08 修回日期: 2009-10-09

接受日期: 2009-10-19 在线出版日期: 2009-11-18

Significance of syndecan-1 expression in dextran sulfate sodium-induced colitis that progresses to chronicity in mice

Xian-Fei Wang, Yu Chen, Jun-Chen Dai,
Cun-Long Chen, Xia Wang, Ye Chen

Xian-Fei Wang, Yu Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Jun-Chen Dai, Meishan City People's Hospital, Meishan 620010, Sichuan Province, China

Cun-Long Chen, Xia Wang, Ye Chen, Institute of Digestive Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yu Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China. yechen@fimmu.com

Received: 2009-09-08 Revised: 2009-10-09

Accepted: 2009-10-19 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of syndecan-1 (SDC-1) in dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis that progresses to chronicity in mice and explore the role of SDC-1 in the progression of colitis.

METHODS: Fifty-four C57BL/6 mice were equally divided into control group and model group. The model group was fed 3% DSS ad libitum for 5 days, followed by administration of

distilled water for 2 weeks to induce acute colitis that progressed to chronic inflammation. The control group was only fed distilled water. Mice were killed on days 5, 12 and 19, respectively. The histological changes in the colon were observed and scored under light microscopy. The expression of SDC-1 and interleukin-8 (IL-8) mRNAs as well as SDC-1 protein in colonic tissue was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: The histological scores on days 5, 12 and 19 were significantly higher in the model group than in the control group (2.17 ± 1.03 , 2.60 ± 1.73 and 1.18 ± 0.75 vs 0.04 ± 0.13 , respectively; all $P < 0.05$). The expression levels of SDC-1 mRNA and protein in the colon at all time points were significantly lower in the model group than in the control group (mRNA: 1.58 ± 0.13 , 1.39 ± 0.17 and 1.78 ± 0.08 vs 2.12 ± 0.03 , respectively; all $P < 0.05$; protein: 1.59 ± 0.12 , 1.43 ± 0.12 and 1.81 ± 0.10 vs 2.20 ± 0.04 , respectively; all $P < 0.01$). The expression levels of IL-8 mRNA in the colon at all time points were significantly higher in the model group than in the control group (1.20 ± 0.15 , 1.53 ± 0.05 and 1.65 ± 0.04 vs 1.02 ± 0.08 , respectively; all $P < 0.01$).

CONCLUSION: The reduced severity of colitis is associated with downregulated SDC-1 mRNA and protein expression in the colon of mice. The down-regulation of SDC-1 mRNA and protein may be associated with increased IL-8 mRNA level.

Key Words: Syndecan-1; Dextran sulfate sodium; Mice; Colitis

Wang XF, Chen Y, Dai JC, Chen CL, Wang X, Chen Y. Significance of syndecan-1 expression in dextran sulfate sodium-induced colitis that progresses to chronicity in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3296-3301

摘要

目的: 探讨Syndecan-1在葡聚糖硫酸钠(DSS)

■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

诱导的小鼠结肠炎中的表达及其在肠道炎症中的作用。

方法: 54只C57BL/6小鼠随机分为正常对照组和模型组, 每组27只。模型组自由饮用3% DSS溶液, 5 d后改饮用蒸馏水2 wk, 建立急性结肠炎慢性化模型。正常对照组饮用蒸馏水19 d。于实验第5、12、19天分别处死2组各9只小鼠。HE染色评价小鼠结肠组织学改变; RT-PCR检测小鼠肠黏膜Sdc-1 mRNA及IL-8 mRNA表达; 免疫组织化学检测小鼠肠黏膜Sdc-1蛋白的表达。

结果: 第5、12、19天模型组小鼠结肠组织学评分均高于对照组(2.17 ± 1.03 、 2.60 ± 1.73 、 1.18 ± 0.75 vs 0.04 ± 0.13 , 均 $P < 0.05$); 模型组小鼠肠黏膜Sdc-1 mRNA表达水平明显低于对照组(1.58 ± 0.13 、 1.39 ± 0.17 、 1.78 ± 0.08 vs 2.12 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$); 模型组小鼠肠黏膜细胞表面Sdc-1蛋白水平明显低于对照组(1.59 ± 0.12 、 1.43 ± 0.12 、 1.81 ± 0.10 vs 2.20 ± 0.04 , 均 $P < 0.01$); 模型组小鼠结肠黏膜IL-8 mRNA表达评分均高于对照组(1.20 ± 0.15 、 1.53 ± 0.05 、 1.65 ± 0.04 vs 1.02 ± 0.08 , 均 $P < 0.01$)。

结论: 小鼠结肠炎症的严重程度可能与肠黏膜Sdc-1 mRNA及蛋白表达水平减低均有关, 而肠黏膜Sdc-1 mRNA及蛋白表达水平减低可能与肠黏膜IL-8水平增高有关。

关键词: Sdc-1; 葡聚糖硫酸钠; 小鼠; 结肠炎

王显飞, 陈予, 戴俊臣, 陈村龙, 王霞, 陈桦. Syndecan-1在急性结肠炎及慢性化小鼠模型中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3296-3301
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3296.asp>

0 引言

Syndecan-1(Sdc-1)属于黏附分子整合素跨膜粘结蛋白聚糖家族成员, 生理状态下主要表达于上皮细胞表面, 是肠上皮细胞紧密连接的重要组成部分, 在炎症过程中, Sdc-1通过其胞外段硫酸乙酰肝素链(属于GAGs)共价结合多种胞外配体, 结合各种生物分子及调节各种结合蛋白的生物学功能, 参与炎症反应的多个环节^[1]。本研究通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的急性结肠炎慢性化小鼠模型监测Sdc-1在结肠炎中的变化, 探讨Sdc-1在肠道炎症中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 选用健康♀C57BL/6小鼠54只, 鼠龄6-8

wk, 体质量16-20 g, 无特殊病原体(SPF)级; DSS为美国MPBiomedicals公司产品, 相对分子质量36 000-44 000 Da; TRIzol反应剂(美国Invitrogen); TaKaRa RNA PCR试剂盒(AMV)Ver.3.0及标本保存液(日本TaKaRa); 大鼠抗小鼠Sdc-1胞外段mAb(clone 281-2)(美国休斯顿医学中心提供); 即用型非生物素免疫组织化学试剂盒与DAB显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 54只C57BL/6小鼠随机分为正常对照组和模型组, 每组27只。模型组小鼠造模按Melgar *et al*^[2]和Cooper *et al*^[3]的方法建立急性结肠炎慢性化模型: 给小鼠自由饮用3% DSS溶液5 d后饮用蒸馏水14 d。对照组小鼠饮用蒸馏水19 d。两组于实验第5、12、19天分别处死9只。所有小鼠均以皮下注射10%水合氯醛的方法处死。

1.2.2 标本取材: 每只小鼠留取2份结肠标本: 一份以100 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 用于HE染色及免疫组织化学染色, 观察病理组织形态学变化以及Sdc-1蛋白表达。另一份用标本保存液保存, 用于RT-PCR检测。

1.2.3 小鼠结肠HE染色及组织学评分: 参照Cooper *et al*^[3]的研究观察组织学改变并评分, 平均观察15个放大100倍的视野, 取其平均值。评分标准: 0分为正常结肠黏膜; 1分为隐窝腺体丢失1/3; 2分为隐窝腺体丢失2/3; 3分为隐窝腺体全部丢失, 黏膜上皮完整, 伴有轻度炎性细胞浸润; 4分为黏膜上皮糜烂、破坏, 伴有明显炎性细胞浸润。

1.2.4 RT-PCR检测肠黏膜Sdc-1 mRNA表达: 提取总RNA后, 逆转录为cDNA, 行PCR扩增: 94℃、10 min, 94℃、45 s, 57.5℃、1 min, 72℃、1 min, 35个循环, 终末延伸72℃、10 min。引物GAPDH上游: 5'-TGG CAA AGT GGA GAT TGTT-3'; GAPDH下游: 3'-TAG TGA CGG TGG GTC TTC-5'(484 bp)。Sdc-1上游: 5'-CAG CAG CAA CAC CGA GAC-3'; Sdc-1下游: 3'-CTC CTA CCT TGA CGG TTA G-5'(359 bp)。IL-8上游: 5'-AGA AGC ATG GCC CAG AAA TCA-3'; IL-8下游: 3'-GGC CTT GTA GAC ACC TTG GT-5'(产物: 176 bp)。扩增产物经琼脂糖电泳后, 进行成像及分析。用Image-Pro Plus 6.0软件对RT-PCR条带进行半定量, 目的条带灰度值/内参条带灰度值 = IA比值, 以此来表示Sdc-1及IL-8 mRNA的表达水平。

■相关报道

国外文献认为IBD模型建立成功与否与动物种系、DSS浓度、DSS相对分子质量、DSS溶液饮用时间4种因素相关, 其中关键因素是DSS浓度和相对分子质量。

■创新盘点

小鼠结肠炎症的严重程度可能与肠黏膜Sdc-1 mRNA及Sdc-1蛋白表达水平减低均有关,而肠黏膜Sdc-1 mRNA及Sdc-1蛋白表达水平减低可能与肠黏膜IL-8水平增高有关。本实验结论与王霞 *et al* 以三硝基苯磺酸(TNBS)-乙醇溶液灌肠诱导的小鼠结肠炎模型中肠黏膜Sdc-1蛋白水平减低而Sdc-1 mRNA表达水平无明显变化不一致,可能与动物模型及动物种系不同有关。

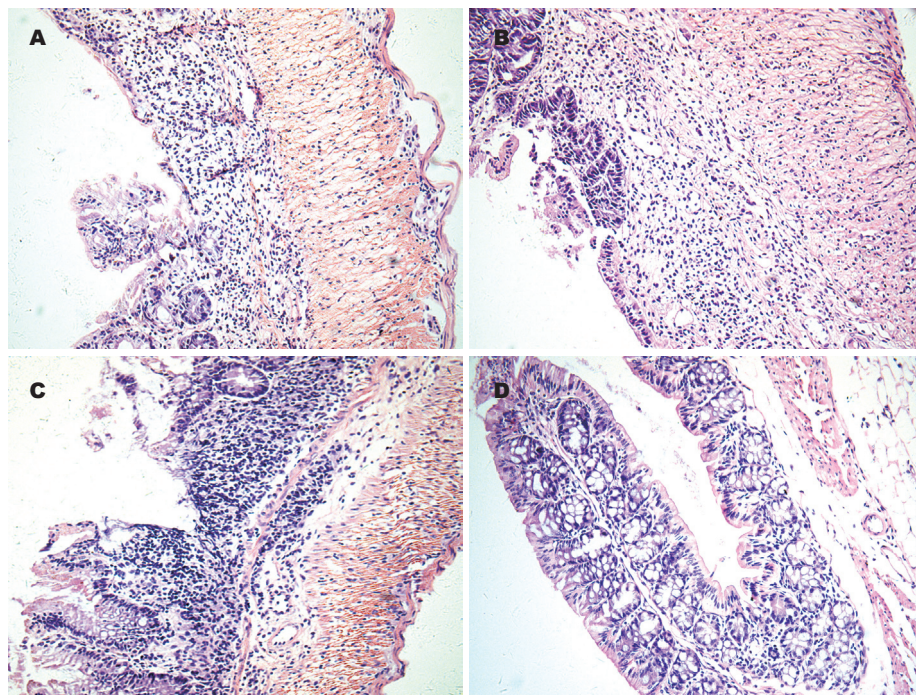


图1 小鼠远段结肠的组织学改变(HE × 200). A: 模型组饮用DSS第5天; B: 模型组第12天; C: 模型组第20天; D: 正常对照组.

表1 小鼠组织学评分 (mean ± SD)

分组	第5天	第12天	第19天
模型组	2.17 ± 1.03 ^a	2.60 ± 1.73 ^{ac}	1.18 ± 0.75 ^{af}
正常对照组	0.04 ± 0.13	0.04 ± 0.13	0.04 ± 0.13

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 同组第5天; ^f $P < 0.01$ vs 同组第12天.

1.2.5 免疫组织化学检测肠黏膜Sdc-1蛋白表达: 免疫组织化学结果判断参照文献[4]: 凡肠黏膜上皮细胞膜和腺体细胞膜着色者为阳性, 根据染色强度和显色细胞的比例进行综合评分. 每张切片随机选取8个高倍视野(400倍)进行评分. (1)按组织显色深浅评分: 无显色者为0分, 呈浅黄色或黄色者为1分, 呈棕黄色者为2分, 呈棕褐色者为3分, 求出8个视野的平均分. (2)以细胞着色比例分级为: <25%的细胞着色, 计0.1分; 26%-50%的细胞着色, 计0.4分; 51%-75%的细胞着色, 计0.6分; 76%-100%的细胞着色, 计0.9分; 求出8个视野的平均分. (3)每张切片的积分为(1)×(2).

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件, 数据以mean ± SD表示, 组内比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间比较采用单向方差分析(One-way ANOVA)或独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 小鼠结肠组织学评分 正常对照组小鼠结肠

黏膜完整, 黏膜上皮完整、连续, 腺体排列规则、结构清楚, 几乎没有炎细胞浸润及溃疡. 模型组小鼠在第5、12、19天结肠组织学评分均高于对照组($P < 0.05$). 模型组小鼠第5天结肠黏膜不完整, 可见多灶性浅溃疡, 全部隐窝被破坏, 大部分腺体被破坏, 腺体正常结构丧失, 排列紊乱, 腺腔消失, 黏膜固有层大量中性粒细胞浸润; 第12天隐窝部分或全部被破坏, 杯状细胞显著丢失, 较大溃疡出现, 黏膜固有层仍有大量炎细胞浸润, 组织学评分较对照组及模型组第5天显著升高($P < 0.01$); 第19天可见局限性灶性小溃疡, 边缘见隐窝及杯状细胞再生、修复及腺体再生, 炎症主要累及黏膜及黏膜下层, 以淋巴细胞浸润为主, 组织学评分较模型组第5、12天显著降低($P < 0.05$, 图1, 表1).

2.2 小鼠结肠黏膜Sdc-1蛋白水平 正常对照组小鼠免疫组织化学积分最高. 模型组小鼠在第5、12、19天结肠黏膜Sdc-1蛋白水平均明显低于对照组($P < 0.01$), 且第5天时积分明显低于对照组($P < 0.01$), 第12天时积分最低($P < 0.05$), 第19天时积分较第5、12天有所回升, 但仍低于正常对照组($P < 0.05$, 图2, 表2).

2.3 小鼠结肠黏膜Sdc-1 mRNA表达 正常对照组小鼠Sdc-1 mRNA表达最高. 模型组小鼠在第5、12、19天结肠黏膜Sdc-1 mRNA表达均低于对照组($P < 0.05$), 第12天最低(1.39 ± 0.17), 第5天次之(1.58 ± 0.13), 第19天有所回升(1.78 ± 0.08)但仍低于正常对照组; 且第12天Sdc-1 mRNA表达显著低于第5、19天($P < 0.05$, 图3A, 表2).

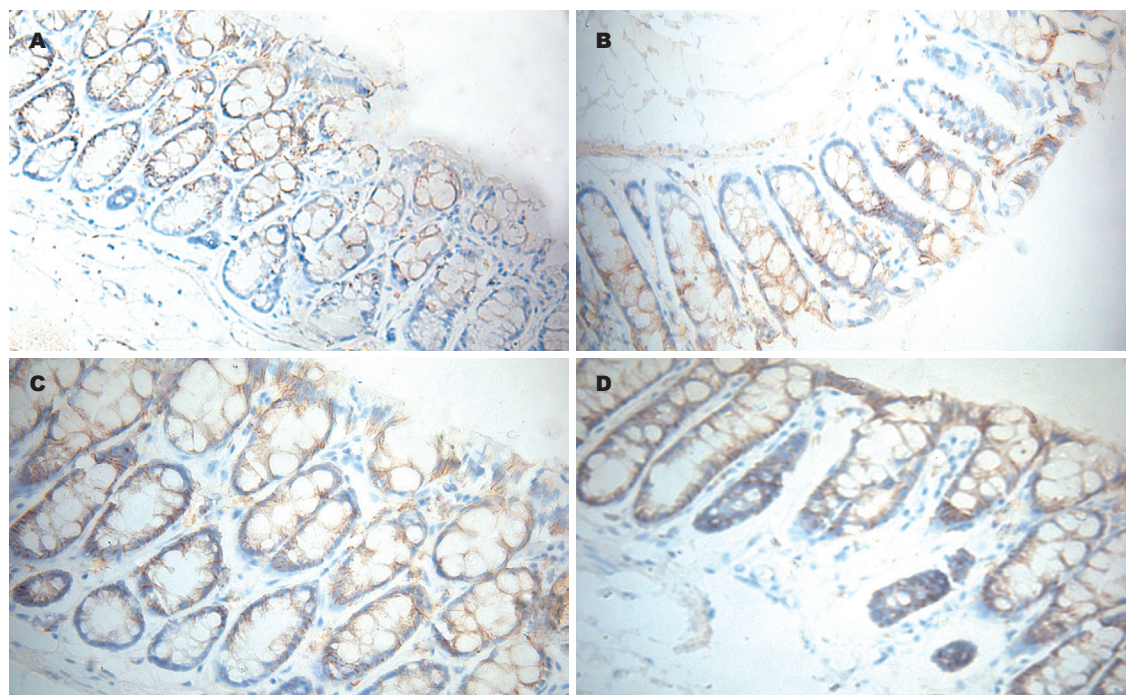


图 2 免疫组织化学检测小鼠结肠黏膜中Sdc-1蛋白的表达($\times 400$)。A: 模型组饮用DSS第5天; B: 模型组第12天; C: 模型组第19天; D: 正常对照组。

■名词解释

Syndecan-1(Sdc-1): 属于黏附分子整合素跨膜粘蛋白聚糖家族成员, 生理状态下主要表达于上皮细胞表面, 是肠上皮细胞紧密连接的重要组成部分。

表 2 模型组、对照组结肠黏膜Sdc-1 mRNA及蛋白表达评分 (mean \pm SD)

分组	Sdc-1 mRNA			Sdc-1蛋白		
	第5天	第12天	第19天	第5天	第12天	第19天
模型组	1.58 \pm 0.13 ^a	1.39 \pm 0.17 ^{bc}	1.78 \pm 0.08 ^a	1.59 \pm 0.12 ^a	1.43 \pm 0.12 ^{bc}	1.81 \pm 0.10 ^a
对照组	2.15 \pm 0.02	2.12 \pm 0.03	2.11 \pm 0.05	2.20 \pm 0.04	2.20 \pm 0.04	2.20 \pm 0.04

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 同组第5、19天。

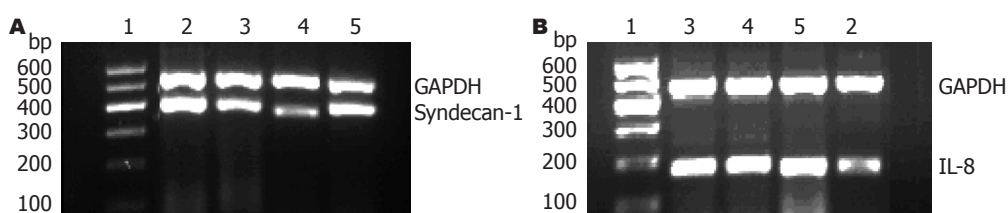


图 3 RT-PCR检测Syndecan-1和IL-8 mRNA的表达。A: Syndecan-1; B: IL-8; 1: MARK1; 2: 对照组; 3: 模型组第5天; 4: 模型组第12天; 5: 模型组第19天。

2.4 小鼠结肠黏膜IL-8 mRNA表达 定量方法同Sdc-1 mRNA。在第5、12、19天, 模型组小鼠结肠黏膜IL-8 mRNA表达水平均明显高于对照组($P < 0.05$), 且随着造模时间的延长表达水平逐渐升高, 在第19天时积分最高, 明显高于对照组($P < 0.01$, 图3B, 表3)。

3 讨论

Sdc-1来自于希腊文syndein, 其意是指将细胞微

环境成分与细胞骨架结合起来。他属于黏附分子整合素跨膜粘蛋白聚糖家族成员, 通过其分子表面的硫酸肝素侧链(heparan sulfate, HS), 可结合一系列配基如细胞黏附分子、基质成分、生长因子、酶和酶抑制物等, 以共受体(as cell-surface co-receptors)方式调节细胞与微环境之间的相互作用, 参与组织器官分化发育、血管形成、组织再生等一系列生理过程的调节^[5]。生理状态下, 大部分Sdc-1结合于细胞膜上, 仅有

■同行评价

本文实验及造模方法可靠, 统计分析合理, 参考文献较新, 选题密切注意基础联系临床, 值得临床医生阅读。

表 3 结肠黏膜IL-8 mRNA表达评分 (mean \pm SD)

分组	第5天	第12天	第19天
模型组	1.20 \pm 0.15 ^b	1.53 \pm 0.05 ^b	1.65 \pm 0.04 ^{bc}
正常对照组	1.02 \pm 0.08	1.02 \pm 0.08	1.02 \pm 0.08

^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 同组第5、12天。

少量Sdc-1在某些切割酶类(基质金属蛋白酶等)的作用下被切割而脱落, 成为游离的Sdc-1胞外功能区。同时, 细胞内又合成新的Sdc-1以补充细胞膜表面缺失的Sdc-1。游离的Sdc-1包含有完整的HS链, 即Sdc-1发挥作用的主要部分^[6]。

本实验中, 模型组小鼠结肠组织学评分逐渐升高, 在第12天时最高, 其后逐渐减低。模型组小鼠肠黏膜Sdc-1 mRNA表达及Sdc-1蛋白水平在各时间点均明显低于对照组, 且均表现为先逐渐下降, 在第12天时Sdc-1 mRNA表达及Sdc-1蛋白水平均出现最低值, 后随着炎症反应的逐步减轻而逐渐回升。模型组小鼠结肠黏膜Sdc-1 mRNA表达、Sdc-1蛋白水平与组织学改变是一致的, 且Sdc-1 mRNA表达的变化与蛋白水平的变化是一致的, 这与国外学者在研究其他炎症时得出的结论相一致: 炎症时上皮细胞表面Sdc-1脱落增加^[7-9], 提示Sdc-1 mRNA及Sdc-1蛋白水平表达水平与结肠炎病变严重程度有关。

本实验结论与王霞 *et al*^[10]以三硝基苯磺酸(TNBS)-乙醇溶液灌肠诱导的小鼠结肠炎模型中肠黏膜Sdc-1蛋白水平减低而Sdc-1 mRNA表达水平无明显变化不一致, 可能与动物模型及动物种系不同有关。小鼠DSS模型是目前应用极其广泛的结肠炎模型^[11]。国外文献认为IBD模型建立成功与否与动物种系、DSS浓度、DSS相对分子质量、DSS溶液饮用时间4种因素相关, 其中关键因素是DSS浓度和相对分子质量^[12]。本试验中选用对DSS敏感的C57BL/6小鼠, 饮用诱导结肠黏膜病变典型的分子质量为40 000的DSS制备的3% DSS溶液5 d后, 饮用蒸馏水3 wk诱发的急、慢性结肠炎, 无论是在症状还是病理变化均类似于人类结肠炎急性期和缓解期的变化^[13], 具有良好的重复性。

国外文献报道中性粒细胞跨内皮的募集反应由趋化因子IL-8的浓度梯度介导, 是内皮组织对炎症信号比如TNF- α 及IL-1的反应^[14]。内皮是炎症反应中白细胞募集反应的主要屏障。中性粒细胞募集反应由跨内皮的IL-8的浓度梯

度所调控, 而在活体内, 其被限制在内皮细胞表面。在白细胞跨内皮迁移的一个体外模型中, 研究结合位点的同一性及功能表明: 在内皮组织培养的上清液中, IL-8被检测到通过结合到Syndecan-1的外功能区固定在内皮细胞的表面, 与HS及Syndecan-1形成一个三分子的复合物; IL-8/HS/Sdc-1复合物脱落增加时, 中性粒细胞跨膜迁移被抑制^[14]。在本实验中IL-8 mRNA表达水平随着造模时间的延长逐渐升高, 在19 d时最高, 而Sdc-1 mRNA及Sdc-1蛋白水平表达水平在急性期逐渐下降, 在慢性期随着炎症反应的逐步减轻逐渐回升。提示Sdc-1 mRNA及Sdc-1蛋白水平表达水平的变化可能与IL-8 mRNA表达水平增高有关, 有待进一步研究加以证实。

鉴于近年来炎症性肠病在我国的发生率逐渐升高, 且病因及发病机制尚未完全阐明^[15-16], 上述发现为临床工作中炎症性肠病的检查和病变监测提供了新的思路, 但其具体机制和意义仍有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Alexopoulou AN, Mulhaupt HA, Couchman JR. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 505-528
- 2 Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1328-G1338
- 3 Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69: 238-249
- 4 Maitra A, Ashfaq R, Gunn CR, Rahman A, Yeo CJ, Sohn TA, Cameron JL, Hruban RH, Wilentz RE. Cyclooxygenase 2 expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasia: an immunohistochemical analysis with automated cellular imaging. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 194-201
- 5 Attonen A, Kajanti M, Heikkilä P, Jalkanen M, Joensuu H. Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 79: 558-564
- 6 Dhodapkar MV, Kelly T, Theus A, Athota AB, Barlogie B, Sanderson RD. Elevated levels of shed syndecan-1 correlate with tumour mass and decreased matrix metalloproteinase-9 activity in the serum of patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 1997; 99: 368-371
- 7 Xu J, Park PW, Kheradmand F, Corry DB. Endogenous attenuation of allergic lung inflammation by syndecan-1. *J Immunol* 2005; 174: 5758-5765
- 8 Hayashida A, Bartlett AH, Foster TJ, Park PW. *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung

- injury through syndecan-1. *Am J Pathol* 2009; 174: 509-518
- 9 Chen Y, Hayashida A, Bennett AE, Hollingshead SK, Park PW. Streptococcus pneumoniae sheds syndecan-1 ectodomains through ZmpC, a metalloproteinase virulence factor. *J Biol Chem* 2007; 282: 159-167
- 10 王霞, 陈烨, 王显飞, 何雅婧, 朱疆依. Syndecan-1在小鼠结肠炎模型中的表达和意义. *胃肠病学* 2008; 13: 336-340
- 11 Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y, Asaka M. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 256-270
- 12 Vowinkel T, Kalogeris TJ, Mori M, Kriegstein CF, Granger DN. Impact of dextran sulfate sodium load on the severity of inflammation in experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 556-564
- 13 王显飞, 陈烨, 陈村龙, 陈楚弟, 李静. 急性结肠炎慢性化小鼠模型的建立. *胃肠病学* 2008; 13: 167-170
- 14 Marshall LJ, Ramdin LS, Brooks T, DPhil PC, Shute JK. Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes. *J Immunol* 2003; 171: 2057-2065
- 15 Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 79-94
- 16 江学良, 崔慧斐. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见的解析. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1141-1143

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》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 ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; 第 3 套为 ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 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. (科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

皮层蛋白氨基端同源性多肽分子对大肠癌细胞迁移、内吞能力及侵袭性的抑制

朱建伟, 陆毅祥, 黄宝玉, 赵任, 秦婧

■背景资料

皮层蛋白 (Cortactin) 是 Arp2/3 重要的激活因子, 由 CTTN 基因编码, 位于染色体 11q13。皮层蛋白主要由氨基端 (A)、重复区域 (Repeat)、SH3 结构域等构成, 其中氨基端是激活 Arp2/3 的功能区。皮层蛋白通过 A 区域结合并激活 Arp2/3, 促进 Arp2/3 介导的肌动蛋白聚合, 带来细胞的运动实现, 包括迁移、内吞及侵袭活动等。

朱建伟, 黄宝玉, 南通大学附属医院普外科 江苏省南通市 226001
陆毅祥, 南通百奥-迈科生物技术公司 江苏省南通市 226016
赵任, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科 上海市 200025
秦婧, 南通大学医学院病理教研室 江苏省南通市 226001
朱建伟, 副主任医师, 硕士研究生导师, 从事于消化系统肿瘤的基础和临床研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30771126; No. 30772106
教育部出国留学人员启动基金资助项目, No. 2008-890
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2006058
作者贡献分布: 本课题由朱建伟设计; 陆毅祥、黄宝玉、赵任及秦婧完成实验; 朱建伟收集资料及论文撰写。
通讯作者: 朱建伟, 副教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院普外科. usazhujianwei@yahoo.com.cn
电话: 0513-81161221
收稿日期: 2009-09-10 修回日期: 2009-10-27
接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

A peptide homologous with the amino-terminus of cortactin inhibits the migrative, endocytic and invasive capacity of colon cancer cells

Jian-Wei Zhu, Yi-Xiang Lu, Bao-Yu Huang, Ren Zhao, Jing Qin

Jian-Wei Zhu, Bao-Yu Huang, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Yi-Xiang Lu, Biomix Biotechnologies, Nantong 226016, Jiangsu Province, China
Ren Zhao, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
Jing Qin, Department of Pathology, School of Medicine, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30771126 and 30772106; the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, No. 2008-890; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2006058
Correspondence to: Professor Jian-Wei Zhu, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. usazhujianwei@yahoo.com.cn
Received: 2009-09-10 Revised: 2009-10-27
Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To examine the effects of a peptide homologous with the amino-terminus of cortactin (encoded by the CTTN gene) on the

migrative, endocytic and invasive capacity of colon cancer cells.

METHODS: A peptide homologous with the amino-terminus of cortactin was designed, prepared and designated as A-peptide (35 kDa). The peptide was then labeled with Cy5 and transfected into colon cancer HCT-8 cells. Cell migration was examined by scratch wound assay. Cell endocytosis was detected by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cell invasive capacity was evaluated by Transwell assay.

RESULTS: The A-peptide was successfully purified, labeled and transfected into HCT-8 cells. Compared to mock-transfected cells, cell migration, endocytosis and invasion were significantly attenuated in cells transfected with the A-peptide. The number of A-peptide-transfected cells migrating into the area of wound was reduced compared with mock-transfected cells. In transferrin internalization assay, the absorbance value was significantly lower in A-peptide-transfected cells than in mock-transfected cells (0.3 vs 1.2 , $P < 0.05$). Moreover, the number of invasive cells counted by Transwell assay was significantly lower in A-peptide-transfected cells than in mock-transfected cells (56 ± 1.3 vs 148 ± 2.5 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The A-peptide has the potential to inhibit invasion and metastasis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; Cortactin; Peptide

Zhu JW, Lu YX, Huang BY, Zhao R, Qin J. A peptide homologous with the amino-terminus of cortactin inhibits the migrative, endocytic and invasive capacity of colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3302-3306

摘要

目的: 研究针对CTTN编码蛋白Cortactin功能的多肽分子对大肠癌细胞运动性的抑制作用。

方法: 设计和制备与Cortactin蛋白氨基端同源

■同行评议者

王晓艳, 副教授,
中南大学湘雅三
医院消化内科

性的多肽分子, 用荧光物Cy5标记并导入到大肠癌细胞HCT-8中. 采用细胞划痕法检测癌细胞的迁移、Capture-ELISA法检测癌细胞内吞作用, 并采用Boyden培养小室检测癌细胞的侵袭性的改变.

结果: 成功制备和纯化35 kDa多肽分子A, 并以Cy5标记, 有效导入到大肠癌细胞中. 与对照组比较, 导入多肽的大肠癌细胞迁移能力下降, 填充划痕的癌细胞数量减少; 以癌细胞摄取转铁蛋白数量反映的内吞作用同时下降, 摄取值多肽导入组为0.3, 对照组为1.2, 两组比较有统计学差异($P<0.05$); Transwell侵袭实验结果表明, 导入多肽的癌细胞迁移数目为 56 ± 1.3 个, 对照为 148 ± 2.5 个, 侵袭能力明显下降($P<0.05$).

结论: Cortactin氨基端同源性多肽可能对抑制大肠癌的侵袭转移具有潜在应用价值.

关键词: 大肠癌; 皮层蛋白; 多肽

朱建伟, 陆毅祥, 黄宝玉, 赵任, 秦婧. 皮层蛋白氨基端同源性多肽分子对大肠癌细胞迁移、内吞能力及侵袭性的抑制. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3302–3306
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3302.asp>

0 引言

大肠癌等恶性肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤的复杂过程, 一般包括癌细胞的局部增殖和扩展、分离和脱落、肿瘤组织新生血管形成、癌细胞进入循环、癌细胞降解脉管基膜逸出循环及随后的定位生长等. 然而, 这一系列复杂步骤都离不开癌细胞自身的运动能力. 癌细胞的运动, 包括细胞膜的伪足样伸展、膜流动性及细胞极性的变化等, 是癌细胞侵袭转移各步骤基本的共同的特征, 必须依赖于细胞膜下的肌动蛋白的装配过程^[1-4]. 这个过程需要Arp2/3复合物的激活^[5]. 皮层蛋白(Cortactin)是Arp2/3重要的激活因子^[6], 由CTTN基因编码, 位于染色体11q13. 皮层蛋白主要由氨基端(A)、重复区域(Repeat)、SH3结构域等构成, 其中氨基端是激活Arp2/3的功能区. 皮层蛋白通过A区域结合并激活Arp2/3, 促进Arp2/3介导的肌动蛋白聚合, 带来细胞的运动实现, 包括迁移、内吞及侵袭活动等^[7]. 本研究设计和制备与皮层蛋白氨基端同源性的多肽分子片段, 不依赖核酸载体, 将多肽导入到大肠癌细胞中, 观察对癌细胞运动性的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠癌细胞株HCT-8购自上海中科

院细胞库. 质粒pGEX-4T-2及皮层蛋白编码基因CTTN的cDNA克隆, 由美国马里兰大学癌症中心惠赠. 主要试剂包括Pfu DNA聚合酶、dNTP、T4连接酶、限制性内切酶等购自NEB公司. 谷胱甘肽、考马斯亮蓝G250、小牛血清(BSA)、SDS、琼脂糖等购自上海生物工程技术服务有限公司; 亲和层析柱(GST)填料购自GE公司; ELISA试剂盒来自Sigma公司; Phalloidin, 标记蛋白的荧光染料Cy5, 蛋白导入细胞用试剂ProteoJuice Protein Transfection Reagent购自美国Novagen公司.

1.2 方法

1.2.1 皮层蛋白氨基端同源性片段(A蛋白)的制备、荧光标记及细胞导入: 以CTTN基因cDNA克隆为模板扩增获得母的DNA片段, 引物序列: 5'-CCG GAA TTC CCA TGT GGA AAG CTT C-3'及5'-CCG CTC GAG TTA AGC TTT TGG TCC-3', PCR反应程序: 94℃, 5 min; 94℃, 1 min; 58℃, 30 s; 72℃, 30 s; 72℃, 7 min, 30个循环. 琼脂糖凝胶回收酶切、连接、转化、表达、蛋白粗提, 最后用高效液相色谱(HPLC)纯化, -80℃保存备用. 该蛋白片段共80个氨基酸残基. 作蛋白标记时, 取5 mg蛋白溶液冻干成粉状, 将干粉状的蛋白加入1 mL的PBS溶液稀释成5 g/L, 加入1/10体积的Cy5标记试剂, 缓慢混匀, 4℃避光反应过夜, 反应后的溶液, 在4℃避光条件下, 用PBS透析至透析液无色, 蛋白保存于4℃备用. 作蛋白导入时, 5×10^4 /mL细胞接种于24孔板中, 次日细胞密度达到70%左右, 蛋白导入按照ProteoJuice说明书步骤进行.

1.2.2 癌细胞迁移能力的划痕实验: 细胞以 1×10^5 /mL密度接种6孔培养板中, 每孔2 mL(保证在蛋白导入前细胞融合70%左右), 次日用干净的吸头在培养板中间划一直线, 并换新鲜培养基. 每日观察划痕处细胞数目.

1.2.3 癌细胞内吞作用分析(capture-ELISA): 将细胞以1% BSA的无血清1640培养基, 在37℃ 50 mL/L CO₂培养箱中培养30 min, 然后加入生物素标记的转铁蛋白(Bio-Tfn)置于冰上30 min. 然后将细胞置于37℃ 5 min, 然后置于冰上终止细胞内吞活动. 用封闭缓冲液(1% BSA, 1% TritonX-100, 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.1% SDS, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl)将细胞裂解, 再将细胞裂解物加到包被有抗-Tfn抗体的96孔ELISA板上, 在4℃孵育12 h, 于每孔中加入HRP标记二抗作用1 h, 加入显色剂, 最后检测A₄₅₀值.

1.2.4 癌细胞侵袭能力分析: 癌细胞以单细胞悬

■**研发前沿**
防治大肠癌转移的研究长久以来一直是医学界的热点和难点.

■相关报道

研究表明,在癌细胞的运动过程中,肌动蛋白的聚合(装配)是癌细胞运动性的力量来源。

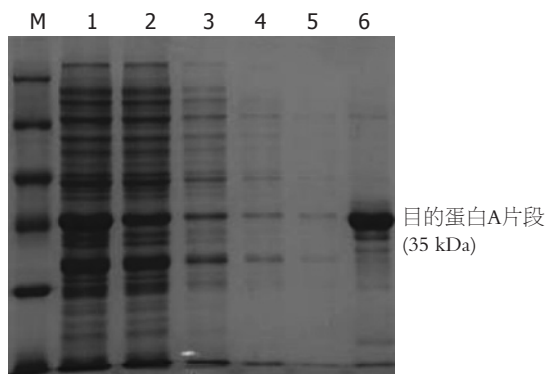


图1 目的蛋白纯化后电泳图。M: 蛋白分子量标记; 1: 粗蛋白; 2: 结合后流出液; 3-5: 洗涤液; 6: 纯化后的蛋白。

液接种在底膜涂有基质胶的带有8 μm 小孔的培养小室, 接种密度 0.5×10^5 , 加入含有10%小牛血清的DMEM培养液, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 100 mL/L CO_2 条件下培养6 h, 将膜上细胞用棉签拭去, 底膜剪下并在750 mL/L乙醇中固定30 min, 作苏木素染色并计数。

2 结果

2.1 皮层蛋白氨基端同源性多肽片段的制备 制备的用于细胞导入的目的多肽片段共有80个氨基酸残基, 我们将其命名为A肽, 其基本序列如下: MWKASAGHAV SITQDDGGAD DWETDP-DFVN DVSEKEQRWG AKTVQSGHQ EHINIH-KLRE NVFQEHQTLK EKELETGPKA。将HPLC纯化的多肽片段用10% PAGE胶电泳, 并用考马斯亮蓝做染色(图1)。蛋白的完整性和纯度良好。

2.2 多肽分子荧光染料标记和导入结肠癌细胞 为观察蛋白导入细胞的效果, 必须先将蛋白做荧光染料标记。所用Cy5染料为红色荧光染料小分子, 对蛋白的功能无实质性的影响。Cy5标记成功的目的蛋白片段顺利导入大肠癌细胞, 图2中可见, 癌细胞经过多肽分子导入后, 细胞未出现毒性反应, 无坏死等表现。

2.3 癌细胞多肽导入后的肌动蛋白骨架的改变 癌细胞伪足减少, 细胞边缘的皮层肌动蛋白(cortical actin)稀疏、松散; 而对照组癌细胞具有典型的细胞伪足, 数目较多, 皮层肌动蛋白致密(图3)。

2.4 癌细胞迁移能力检测 为了观察癌细胞迁移能力, 我们采用细胞划痕试验, 即在培养的癌细胞单层上划出空白区域, 并继续培养, 观察空白区域细胞填充情况。实验分2组细胞, 一组用转导试剂将A肽导入癌细胞, 另一组仅用转导试剂空转细胞, 作为对照。划痕后培养24 h, 比较两组的细胞层空白区域细胞填充情况, 发现转导A肽的癌细胞划痕区域填充数目明显少于对照组(图4), 结果提示A肽转导的癌细胞迁移能力下降。

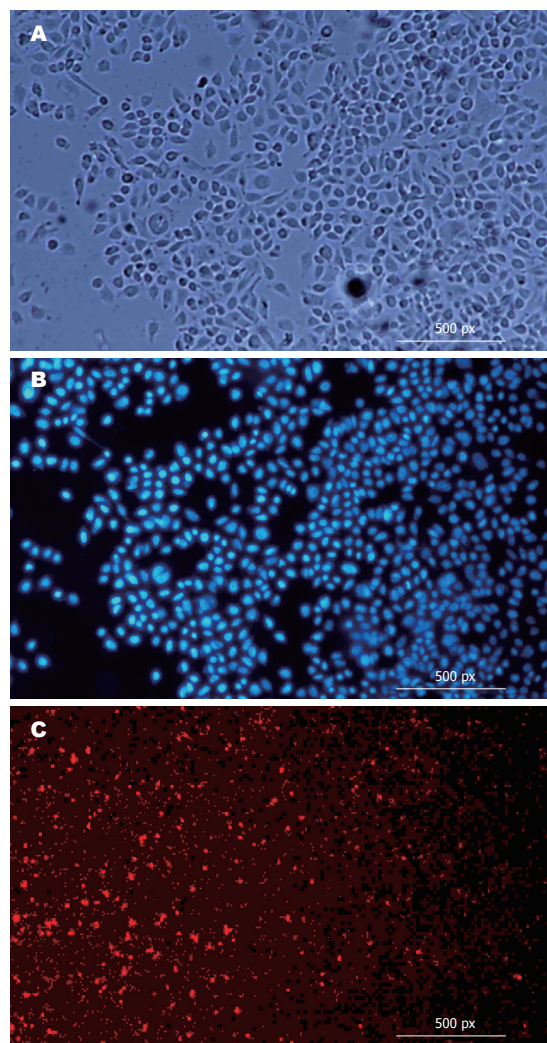


图2 Cy5-A多肽导入大肠癌细胞。A: 相差显微镜下癌细胞外观; B: 癌细胞核染色; C: 导入癌细胞的多肽分子, 发出红色荧光。

2.5 癌细胞内吞能力检测 细胞的内吞作用与癌细胞的侵袭转移能力有关。我们采用Capture-ELISA法检测癌细胞摄取转铁蛋白的能力变化, 以此标志癌细胞内吞作用的变化。结果显示, 转导A肽的癌细胞摄取转铁蛋白的能力明显下降(图5), 采用 t 检验比较两组摄取Tfn的绝对值的变化, 差异具有统计学意义($t = 3.84, P < 0.05$)。

2.6 癌细胞侵袭性检测 采用底膜带孔并涂胶的培养小室接种癌细胞, 观察迁移到底膜另一面的癌细胞数目, 以此来观察癌细胞的侵袭力的变化。结果发现, 转导多肽A的大肠癌细胞的穿膜平均数为 56 ± 1.3 个, 对照空转组癌细胞的穿膜平均数为 148 ± 2.5 个, 采用 t 检验做比较, 差异具有统计学意义($t = 4.17, P < 0.05$, 图6)。

3 讨论

侵袭、转移是大肠癌患者的主要死亡原因。迄今为止, 人们还缺乏有效的控制大肠癌转移的

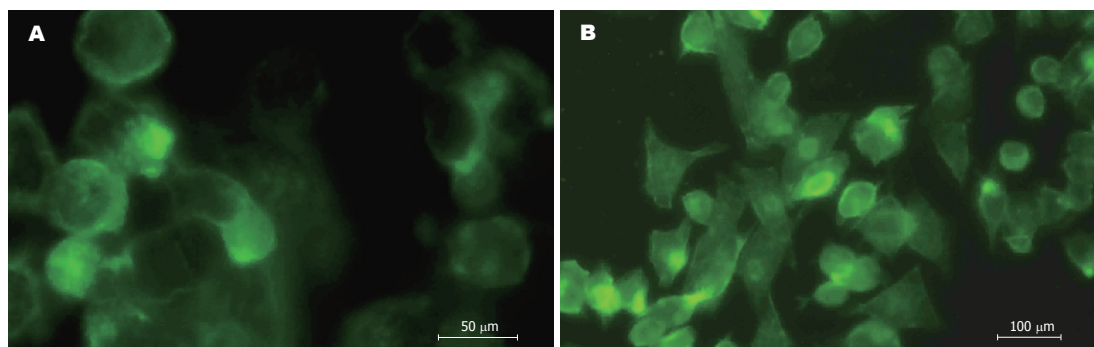


图 3 大肠癌细胞导入外源性多肽前后细胞肌动蛋白骨架的改变. A: 多肽导入后; B: 多肽导入前.

同行评价

本研究内容及方法较新颖, 设计基本合理, 是一篇比较好的论文.

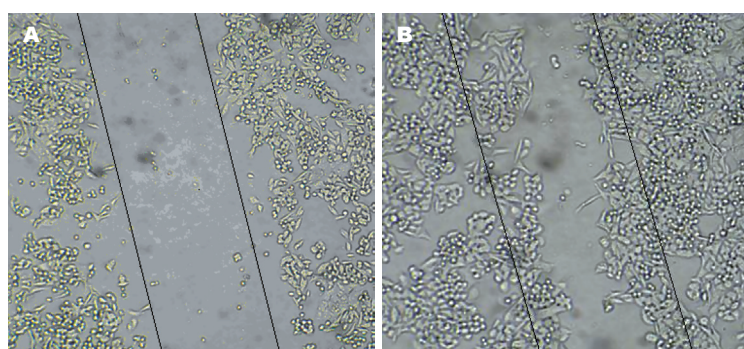


图 4 单层细胞划痕试验. 图中画线区域内细胞数量用于比较迁移能力. A: 导入多肽的癌细胞; B: 对照组癌细胞迁移情况.

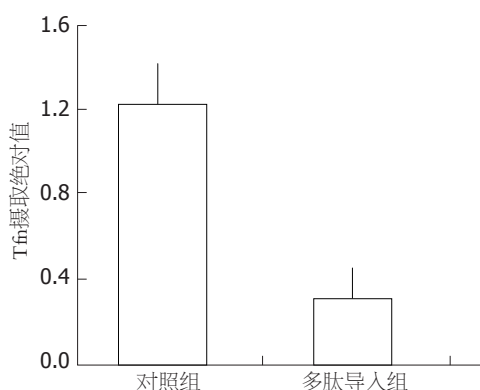


图 5 Capture-ELISA法检测癌细胞内吞作用情况, 摄取转铁蛋白TfR作为内吞能力标志.

方法. 防治大肠癌转移的研究长久以来一直是医学界的热点和难点. 大量的研究表明, 大肠癌等恶性肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤的复杂过程, 然而, 这一系列复杂步骤都离不开癌细胞自身的运动能力. 癌细胞的运动性(motility)是癌细胞侵袭转移各步骤基本的共同的特征. 针对细胞运动性的对抗措施, 理论上可以避开癌细胞侵袭转移过程中纷繁复杂的诸多因素.

研究表明, 在癌细胞的运动过程中, 肌动蛋白的聚合(装配)是癌细胞运动性的力量来源^[1]. 研究表明, 肌动蛋白聚合依赖于Arp2/3复合物的催化作用, 而Arp2/3复合物需要CTTN编码产物Cortactin等分子的激活作用. 一般情况下, Arp2/3

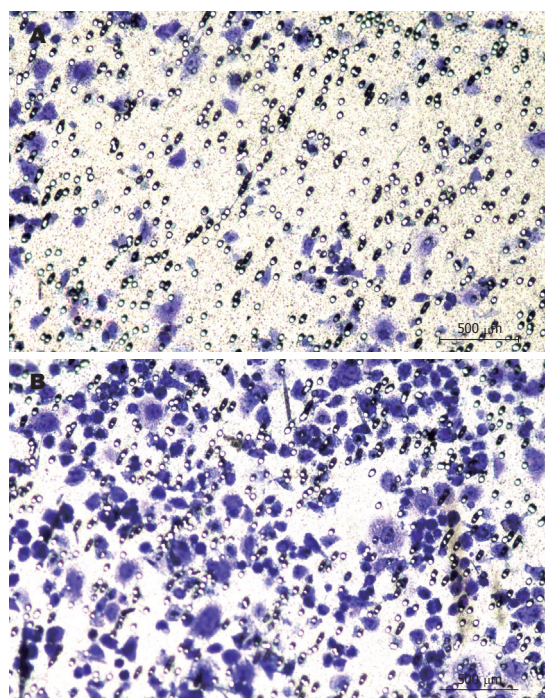


图 6 大肠癌细胞侵袭能力的改变; 迁移到底膜的癌细胞以苏木素染色并计数. 图中小点为底膜开孔, 癌细胞染成蓝色. A: 多肽A转导的癌细胞; B: 对照组.

复合物处于抑制或低活性状态, 需要Cortactin等因子的激活. Cortactin等蛋白结构域具有与其他信号分子相互作用传递细胞外信号的能力, 例如, Src癌基因蛋白可以磷酸化Cortactin, 并依赖Cortactin传递上游信号, 最终通过Cortactin将信

号传递到Arp2/3依赖的肌动蛋白骨架。

人们通过生化试验表明, Cortactin的氨基端是激活Arp2/3的主要结构域, 去除氨基端的Cortactin突变蛋白, 其激活Arp2/3的能力丧失。将Cortactin的突变体导入癌细胞, 细胞迁移能力受到影响^[5-8]。我们先前所作的体内研究表明, 采用RNAi在大肠癌细胞内抑制Cortactin的表达, 可以抑制癌细胞的运动性^[9]。将Cortactin的氨基端编码DNA克隆并通过质粒导入到大肠癌细胞中, 癌细胞的迁移能力受到抑制^[10]。

细胞迁移的实现, 需要细胞形成伪足、与基膜黏附等过程, Arp2/3介导的肌动蛋白聚合使得细胞膜形成突出(protrusion)以及黏附体等, 是迁移实现的必须要素。癌细胞的内吞作用是癌细胞摄取胞外营养及传递信号分子的重要过程。内吞的实现需要细胞膜的凹陷形成以及胞质内的运输, 肌动蛋白的聚合同样起到关键作用。肿瘤细胞的侵袭过程, 一种侵袭性伪足invadopodia形成使得基质破坏, 为肿瘤细胞的穿越提供条件。所用上述过程, Cortactin等Arp2/3激活因子起到重要调节作用^[11-17]。

研究表明, 大肠癌组织高表达Cortactin蛋白^[18], 我们的预实验也发现大肠癌细胞株HCT-8有丰富的胞质Cortactin表达。先前的工作表明, 采用Cortactin的小干扰RNA作用于大肠癌细胞, 结果发现癌细胞的运动性, 包括内吞作用、迁移、细胞贴壁伸展能力等下降。进一步采用Cortactin的结构域相应的DNA构建表达质粒, 导入大肠癌细胞, 发现癌细胞的迁移能力下降^[9-10]。本研究基于我们先前的工作, 体外合成Cortactin氨基端同源性多肽分子, 并导入癌细胞内, 观察癌细胞的运动性的变化。结果发现, 该小分子肽能抑制大肠癌细胞的迁移、内吞及侵袭能力。由于之前干扰Cortactin功能的方法都依赖核酸载体(DNA或RNA), 为将来临床应用的最终目的, 本研究开发出Cortactin的抑制性小分子多肽, 避开核酸载体可能存在的风险, 初步试验证明了该小分子肽在抑制大肠癌细胞运动性方面的有效性。综合先前的研究, 可以看到, Cortactin的氨基端可能是一个有效的药物靶点。我们将进一步做动物体内实验, 观察此多肽分子作为药物在对抗大肠癌侵袭、转移方面的可能作用。

4 参考文献

- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000; 29: 545-576

- 周燕红, 何小飞, 高卉, 王瑶芬. JNK信号通路在大肠癌侵袭和转移中的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2142-2146
- 李占霞, 张国锋. 大肠癌发展与肝转移的差异蛋白质组研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 508-512
- 魏学明, 顾国利, 任力, 熊梅, 王石林, 李德昌. 大肠癌EGFR、HER-2、VEGF表达特点及其对分子靶向治疗的指导意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1836-1841
- Higgs HN, Pollard TD. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 649-676
- Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan Yx, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 259-266
- Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, Currie JD, Webb DJ, Weaver AM. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol* 2005; 15: 1276-1285
- Weaver AM, Karginov AV, Kinley AW, Weed SA, Li Y, Parsons JT, Cooper JA. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* 2001; 11: 370-374
- 朱建伟, 赵任. 沉默Cortactin表达对大肠癌细胞伸展、迁移和侵袭的抑制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1197-1201
- 丛刚, 徐美荣, 朱建伟, 周绍荣. 靶向抑制皮层肌动蛋白装配对大肠癌细胞侵袭作用的影响. *中华实验外科杂志* 2009; 26: 156-158
- Zhu J, Yu D, Zeng XC, Zhou K, Zhan X. Receptor-mediated endocytosis involves tyrosine phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem* 2007; 282: 16086-16094
- Li Y, Tondravi M, Liu J, Smith E, Haudenschild CC, Kaczmarek M, Zhan X. Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61: 6906-6911
- Ammer AG, Weed SA. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008; 65: 687-707
- Luo ML, Shen XM, Zhang Y, Wei F, Xu X, Cai Y, Zhang X, Sun YT, Zhan QM, Wu M, Wang MR. Amplification and overexpression of CTTN (Ems1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. *Cancer Res* 2006; 66: 11690-11699
- Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moisewitsch F, Yamada KM, Mueller SC. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* 2006; 66: 3034-3043
- Huang C, Liu J, Haudenschild CC, Zhan X. The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 25770-25776
- Craig AW, Zirnigbl R, Williams K, Cole LA, Greer PA. Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 603-613
- Lee YY, Yu CP, Lin CK, Nieh S, Hsu KF, Chiang H, Jin JS. Expression of survivin and cortactin in colorectal adenocarcinoma: association with clinicopathological parameters. *Dis Markers* 2009; 26: 9-18

OY-TES-1在肝细胞癌中的表达及抗体血清学分析

范蓉, 黄巍, 肖绍文, 罗彬, 何少健, 罗国容, 谢小薰

范蓉, 黄巍, 广西中医学院组织学与胚胎学教研室 广西壮族自治区南宁市 530001

肖绍文, 罗彬, 何少健, 罗国容, 谢小薰, 广西医科大学组织学与胚胎学教研室 广西壮族自治区南宁市 530021

范蓉, 博士, 副教授, 主要研究方向为癌-睾丸抗原与肿瘤、生殖的相关性研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30760055

广西高发疾病研究创新性团队基金资助项目, No. 桂教人[2007-59]号

作者贡献分布: 范蓉与谢小薰对此文所作贡献均等; 此课题由范蓉与谢小薰设计; 研究过程由范蓉、黄巍、肖绍文、罗彬及何少健完成; 研究所用新试剂和分析工具由罗彬与何少健提供; 数据分析由范蓉、黄巍、肖绍文、罗彬及罗国容完成; 本论文写作由范蓉与谢小薰完成。

通讯作者: 谢小薰, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学组织学与胚胎学教研室, xiexiaoxun@yahoo.com
电话: 0771-5358577

收稿日期: 2009-09-11 修回日期: 2009-10-31

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

OY-TES-1 expression and serum immunoreactivity in hepatocellular carcinoma

Rong Fan, Wei Huang, Shao-Wen Xiao, Bin Luo, Shao-Jian He, Guo-Rong Luo, Xiao-Xun Xie

Rong Fan, Wei Huang, Department of Histology & Embryology, Guangxi Traditional Chinese Medical College, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Shao-Wen Xiao, Bin Luo, Shao-Jian He, Guo-Rong Luo, Xiao-Xun Xie, Department of Histology & Embryology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760055; and the Innovative Team Foundation for Research on Highly Occurring Diseases in Guangxi, Gui Jiao Ren No. 2007-59

Correspondence to: Professor Xiao-Xun Xie, Department of Histology & Embryology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. xiexiaoxun@yahoo.com

Received: 2009-09-11 Revised: 2009-10-31

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To investigate OY-TES-1 expression and serum immunoreactivity in human hepatocellular carcinoma (HCC) and explore the possibility of using OY-TES-1 as a target for immunotherapy and auxiliary diagnosis of HCC.

METHODS: The expression of OY-TES-1 mRNA

and protein was detected by real-time PCR and immunohistochemistry, respectively. The presence of serum OY-TES-1 antibody in normal individuals and patients with HCC or hepatocirrhosis was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using purified OY-TES-1 as the antigen. The clinical significance of OY-TES-1 expression and serum immunoreactivity in HCC was then analyzed.

RESULTS: The positive rates of OY-TES-1 mRNA expression in HCC and tumor-adjacent tissue were 73.21% (41/56) and 64.86% (24/37), respectively, showing no significant difference ($P > 0.05$). The expression level of OY-TES-1 mRNA in HCC tissue was significantly higher than that in tumor-adjacent tissue ($P < 0.05$). The expression level of OY-TES-1 mRNA was correlated with histological grade of HCC. The positive rate of OY-TES-1 protein expression in HCC tissue was 40% (4/10). The positive rate of serum OY-TES-1 antibody was 20% in HCC patients, while no serum reactivity to OY-TES-1 was detected in 76 normal individuals and 17 patients with hepatocirrhosis. No correlation was found between the presence of OY-TES-1 antibody and clinical and pathological parameters in HCC.

CONCLUSION: OY-TES-1 shows high-level expression and high serum immunoreactivity in HCC and is therefore a potential target for antigen-specific immunotherapy and auxiliary diagnosis of HCC.

Key Words: Cancer-testis antigen; OY-TES-1 gene; Gene expression; Serum

Fan R, Huang W, Xiao SW, Luo B, He SJ, Luo GR, Xie XX. OY-TES-1 expression and serum immunoreactivity in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3307-3312

摘要

目的: 了解OY-TES-1在肝细胞癌(HCC)中的表达及其抗体出现情况, 探讨将OY-TES-1用于肿瘤免疫诊疗的可能性。

方法: 利用实时定量PCR和免疫组织化学

■背景资料

OY-TES-1是一种限制性表达于正常组织、选择性高表达于肿瘤组织的癌-睾丸抗原, 目前国外研究小组已将研制的CTA肿瘤疫苗(如NY-ESO-1抗原肽等)试用于临床治疗并取得较好的效果, 因此, 有必要了解OY-TES-1在广西高发肿瘤肝细胞癌(HCC)中的表达及其抗体出现情况, 探讨将OY-TES-1用于肿瘤免疫诊疗的可能性。

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

■研发前沿

在癌-睾丸抗原研究领域,一方面不断地利用各种新技术寻找和鉴定更多的癌-睾丸抗原,另一方面则是对已报道的癌-睾丸抗原进行深入地研究,了解其表达特征,评价这些新发现的癌-睾丸抗原用于肿瘤免疫治疗的可能性。

技术,从mRNA和蛋白质两个水平研究OY-TES-1在HCC中的表达特点;采用酶联免疫吸附实验检测HCC患者及正常人血清中相应的抗体,并对其临床意义做初步的分析。

结果:经实时定量PCR检测, HCC中OY-TES-1 mRNA阳性率为73.21%(41/56), 癌旁阳性率为64.86%(24/37), 有17对HCC及配对癌旁组织均表达阳性, OY-TES-1 mRNA在HCC及癌旁组织两者的表达阳性率无差异($P>0.05$); 在37对HCC及配对癌旁组织中, HCC中OY-TES-1 mRNA水平明显高于对应的癌旁组织, 其差异与病理分级有关($P<0.05$)。HCC中OY-TES-1蛋白阳性率为40%(4/10)。血清学检测未发现76例正常人和17例肝硬化患者血清中有相应抗体, HCC患者血清抗体阳性率为20%(12/58), OY-TES-1血清抗体的出现与HCC患者的年龄、性别等临床资料无相关。

结论:OY-TES-1在HCC中有较高的表达频率及表达水平, 该蛋白具有较强的免疫原性, 他有望作为用于HCC辅助诊断及免疫治疗的肿瘤抗原。

关键词:癌-睾丸抗原; OY-TES-1基因; 基因表达; 血清

范蓉, 黄巍, 肖绍文, 罗彬, 何少健, 罗国容, 谢小薰. OY-TES-1在肝细胞癌中的表达及抗体血清学分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3307-3312

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3307.asp>

0 引言

2001年, Ono *et al*^[1]通过基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)技术鉴定出OY-TES-1基因, 由于该基因的mRNA存在于多种肿瘤组织中, 而正常组织仅限于睾丸, 因此, 认为OY-TES-1是一种癌-睾丸抗原(cancer testis antigen, CTA)。随后, 虽然一些研究发现OY-TES-1 mRNA并非仅存于睾丸组织, 在许多正常组织也可检测到OY-TES-1 mRNA^[2-4]。然而, 这些研究只是对OY-TES-1 mRNA做定性的研究, 未能反映其mRNA量的差异, 为此, 本课题组进一步对OY-TES-1 mRNA进行定量研究, 我们发现在多数正常组织中OY-TES-1 mRNA的量远低于睾丸组织, 此外, 我们还发现多数正常组织并不表达OY-TES-1蛋白^[5]。同样, Tammela *et al*也发现在许多正常组织不表达OY-TES-1蛋白^[6], 可见在正常组织中OY-TES-1蛋白的表达是限制性的。而在肿瘤组织中, 现有的研究均一致认同

OY-TES-1 mRNA广泛存在多种肿瘤组织, 并在一些类型的肿瘤具有较高的阳性率, 但蛋白水平的研究仅见于卵巢癌^[1-3,6]。虽已有研究提示肝癌可较高频率地表达OY-TES-1 mRNA^[1], 但其mRNA量和蛋白的表达目前尚不清楚。因此, 本研究将利用实时定量聚合酶链反应(qPCR)和免疫组织化学技术, 检测OY-TES-1在广西高发肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达, 并结合抗体血清学分析, 探讨OY-TES-1作为一种CTA用于HCC免疫治疗和辅助诊断的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 用于实时定量RT-PCR检测的组织标本包括56例HCC组织, 其中37例HCC组织存在配对的癌旁组织(距癌灶边缘 ≥ 5 cm); 用于免疫组织化学检测的组织标本包括10例HCC组织、4例配对HCC癌旁组织和7例正常肝组织。用于抗体检测的血清标本包括76例正常人血清、58例HCC、17例肝硬化及4例HCC术后患者血清。正常人血清来自广西医科大学本科学生的健康体检者, 肿瘤组织及血清标本来自广西医科大学第一附属医院肝胆外科2005-11/2006-06的住院患者, 均经病理学确认。

1.2 方法

1.2.1 实时定量RT-PCR检测:提取组织总RNA, 逆转录成cDNA。设计定量PCR引物及探针, 上游引物: 5'-GCGACACCTCCCACAAGAC-3'; 下游引物: 5'-GCCCCACCGTACAAATCCAG-3'; 探针: 5'-FAM-CAACCAGGTAGGGTCC-TAMRA-3'。制备OY-TES-1标准品, 定量PCR检测在iCycler iQTMPCR仪(Bio-Rad)上进行^[5]。以去离子水为阴性对照, 标准品及待测样品均设三个复管, 同一批次进行检测。根据标准曲线计算每个待测样本基因的拷贝数取其平均数, 以目的基因相对于管家基因的量(OY-TES-1/HPRT)进行待测样品的标准化处理, 确定组织中OY-TES-1 mRNA的相对表达量。

1.2.2 免疫组织化学染色:常规组织固定, 石蜡包埋, 切片厚5 μ m, 切片经脱蜡水化后, 高压修复5 min, 以SP试剂盒染色, 苏木精复染。步骤按试剂盒说明书操作, 其中sp32/OY-TES-1多克隆抗体(1:2000稀释, 本室制备^[7])37℃孵育1 h。

1.2.3 ELISA检测:用碳酸缓冲液(0.05 mmol/L, pH9.6)稀释MBP/OY-TES-1融合蛋白至浓度为1.0 mg/L^[8]。将稀释好的MBP/OY-TES-1融合蛋

表 1 HCC中OY-TES-1 mRNA表达水平与临床资料的关系

	HCC组织			癌与配对癌旁组织的差值		
	<i>n</i>	OY表达量 ¹	T值	<i>n</i>	OY表达量	T值
性别						
男	51	27.6471	186	33	18.8636	80
女	5	37.2000		4	20.1250	
年龄(岁)						
≤45	29	29.5517	739	19	19.7105	328
>45	27	27.3704		18	18.2500	
HBV						
阳性	48	28.5417	226	33	19.9545	44
阴性	8	28.2500		4	11.1250	
肿瘤大小(cm)						
<5	9	27.6667	249	5	23.1000	115
≥5	47	28.6596		32	18.3594	
病理分级						
I + II	33	25.8939	741	22	15.0909	371 ^a
III + IV	23	32.2391		15	24.7333	
AFP(μg/L)						
<400	30	26.1833	810	21	17.7619	330
≥400	26	31.1731		16	20.6250	
癌栓						
无	38	26.3158	596	25	18.3800	243
有	18	33.1111		12	20.2917	
肝硬化						
无	16	27.6875	443	7	19.5000	136
有	40	28.8250		30	18.8833	
TNM分期						
I + II	15	24.9333	374	11	16.1818	178
III + IV	41	29.8049		26	20.1923	

¹平均秩和; ^a*P*<0.05.

白加入酶标板(每孔100 μL), 4℃包被过夜. 用PBST(PBS中含0.05% Tween-20), 在室温下洗板3次, 50 g/L脱脂奶于37℃封闭1 h, 上待检血清(1:64)于37℃孵育1 h, 随后用Biotin-绵羊抗人IgG单克隆抗体(1:10 000)于37℃孵育1 h, 洗板后加入Avidin-HRP(1:200)37℃孵育30 min, 再次洗板加TMB避光显色15 min, 用1 mol/L硫酸终止反应. 酶标仪(南京DJ5032型)测定 A_{450} 与 A_{630} 值. 以包被麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)为阴性对照.

统计学处理 应用SPSS13.0统计分析软件进行数据分析, 样本率的比较用 χ^2 检验, 样本均数的比较参数法用 t 检验、非参数法用秩和检验, *P*<0.05有统计学意义.

2 结果

2.1 OY-TES-1 mRNA在组织中的表达 HCC中

OY-TES-1 mRNA阳性率为73.21%(41/56), 其癌旁组织的阳性率为64.86%(24/37); 在37例HCC组织及配对的癌旁组织中, HCC及其癌旁组织均为阳性占45.95%(17/37), 均为阴性占8.11%(3/37), HCC为阳性而其癌旁组织为阴性的占27.03%(10/37), OY-TES-1 mRNA在HCC和癌旁组织的阳性率无差异.

从mRNA表达量来看, HCC表达量的中位数为0.7511, 其癌旁组织为0.0929, 两者比较具有统计学差异(*P*<0.05). 经临床资料分析, OY-TES-1 mRNA表达量与HCC患者的性别、年龄、肿瘤大小、病理分级等HCC临床资料无相关; 癌与癌旁组织的表达量差异与病理分级有关, 肿瘤恶性程度越高, 其表达差异越明显(表1).

2.2 OY-TES-1蛋白组织中的表达 正常肝组织中OY-TES-1蛋白的免疫反应均为阴性. HCC组织中目的蛋白的免疫反应阳性率为40%(4/10). OY-

■相关报道

Ono *et al*研究小组在验证OY-TES-1为CTA时应用普通PCR发现肝癌中该基因mRNA的阳性率为40%(2/5), 检测肝癌患者血清中该抗体的阳性率为11%(10/95).

■创新盘点

目前尚无OY-TES-1在HCC中表达的报道,本研究从mRNA和蛋白水平进行定性、定量和定位的研究,了解该基因在HCC中的表达特点,检测HCC患者及正常人血清中相应的抗体,并对其临床意义做初步的分析。

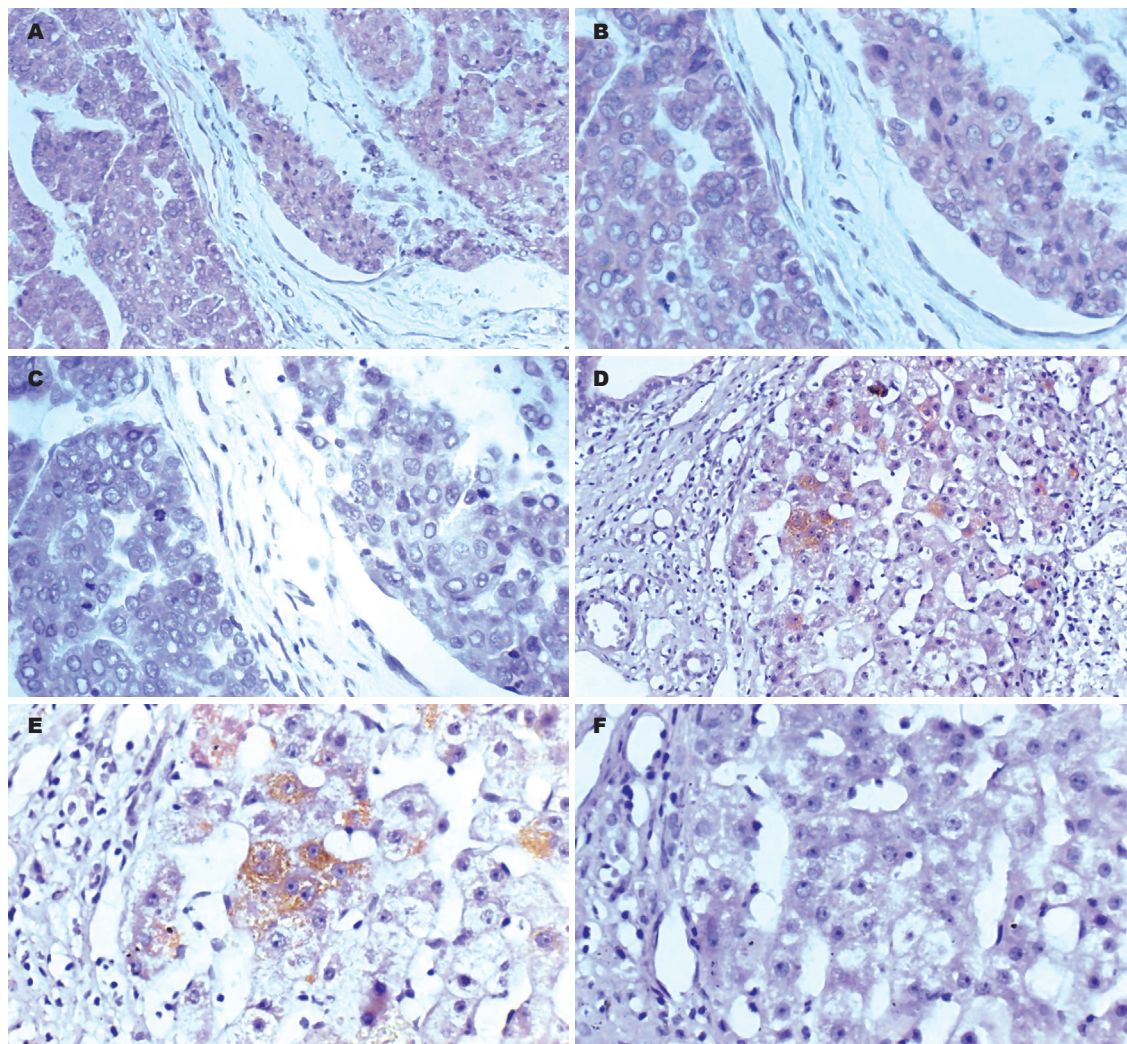


图1 OY-TES-1蛋白在HCC及癌旁的肝硬化组织中的表达。A: HCC组织($\times 20$); B: HCC组织($\times 40$); C、F: 阴性对照(免疫前血清, $\times 40$); D: HCC癌旁的肝硬化组织($\times 20$); E: HCC癌旁的肝硬化组织($\times 40$)。

TES-1蛋白主要分布于癌细胞胞质,部分分布于细胞核;癌细胞胞质内OY-TES-1蛋白呈均质状,而细胞间质为阴性。4例HCC癌旁的肝硬化组织中,有1例呈蛋白免疫反应阳性,OY-TES-1蛋白仅在一些肝细胞的胞质中,蛋白呈颗粒状分布,而胞核和间质为阴性(图1)。

2.3 血清抗体筛选 正常人OY-TES-1抗体平均 A 值为 0.131 ± 0.060 ,用MBP/OY-TES-1检测了76例正常人血清,同时以MBP为阴性对照,所得数据经统计学分析显示两者无差异,说明检测的正常人血清中无OY-TES-1抗体。以大于正常人平均吸光度值3个标准差者判为阳性(临界点 A_{450} 为0.311),17例肝硬化与4例HCC术后患者血清中均未测到相应抗体,HCC中该抗体的阳性率为20.69%(12/58)(图2)。血清OY-TES-1抗体阳性率与HCC患者的性别、肿瘤大小、AFP含量等临床资料无关。

3 讨论

HCC是广西地区最常见且死亡率最高的恶性肿瘤,其免疫治疗的前提是鉴定出特异性表达的肿瘤抗原。由于血-睾屏障的存在及生精细胞不表达人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) I类分子,因此睾丸是免疫豁免器官,具有限制性表达特征的CTA成为近期肿瘤抗原研究领域的一大热点,国外研究小组已将研制的CTA肿瘤疫苗(如NY-ESO-1抗原肽等)试用于临床治疗并取得较好的效果^[9-17]。迄今已发现140多个CTA成员,由70多个CTA基因家族或基因编码,并揭示CTA在肿瘤组织中的表达具有以下特点:(1)同一CTA在不同类型肿瘤组织的表达频率不同;(2)不同CTA在同一类型肿瘤组织的表达频率不同;(3)CTA的表达具有“群集性”,即多种CTA可同时在同一类型肿瘤组织中表达。因此,在该研究领域中,一方面不断地利用各种新技

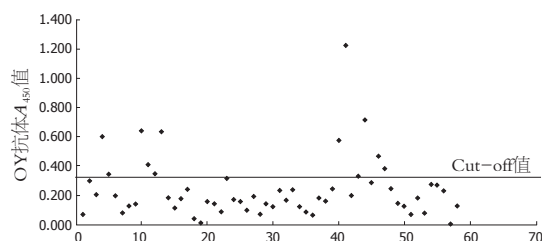


图2 58例HCC患者血清OY-TES-1抗体检测结果。

术寻找和鉴定更多的CTA, 另一方面则是对已报道的CTA进行深入地研究, 了解其表达特征, 评价这些新发现的CTA用于肿瘤免疫治疗的可能性^[18-20]。目前本研究小组与国内外其他研究小组已先后报道多种CTA(如MAGE、NY-ESO-1、LAGE、GAGE、NY-SAR-35、CT9、CT10和SSX等基因)在HCC中的表达, 其表达阳性率为8.2%-75.2%^[21-32]。

21世纪初, Ono *et al*^[1]利用SAGE技术, 鉴定出人OY-TES-1基因, 该基因定位在人12号染色体短臂上, 全长9339 bp, 包含10个外显子, 转录单位全长1895 bp, 其开放阅读框编码543个氨基酸, OY-TES-1蛋白经翻译后修饰, 形成sp32(sperm protein 32)。sp32主要是位于精子顶体内, 与精子前顶体蛋白的包装及顶体酶原的浓缩有关, 还参与精子获能和协助单精入卵^[33-35]。

Ono *et al*^[1]在验证OY-TES-1为CTA时就发现肝癌中该基因mRNA的阳性率为40%(2/5)。本研究结果显示其在HCC的阳性率为73.21%(41/56)。两者结果的差异除了地区、人种与标本例数差别以外, 一方面考虑肿瘤组织类型的不同, 前者肿瘤标本是泛指肝癌, 本研究所用的标本为特定的一种肝癌-HCC, 提示该基因在HCC的表达率可能较其他类型肝癌组织高; 另一方面, Ono *et al*^[1]采用的是普通逆转录PCR, 本研究所采用的检测技术为qPCR, 后者具有更高的灵敏度。本研究首次研究了HCC中OY-TES-1 mRNA的表达量, 发现HCC组织中的OY-TES-1 mRNA表达量明显高于癌旁组织, 肿瘤恶性程度越高, 其表达差异越明显, 提示OY-TES-1的表达可能与肿瘤的发生、发展有关。

本研究亦首次报道OY-TES-1蛋白在HCC中的阳性表达率为40%(4/10), 低于本研究所检测mRNA表达率。一方面由于两个水平检测的标本并不是取自同一患者, 尚不能真实地反映HCC中目的基因的核酸与蛋白表达水平之间的差异; 另一方面, mRNA与蛋白表达并不严格相关, 在检测过程中也易受取材标本的大小与位置等限

制而出现差异。本研究发现OY-TES-1蛋白均匀地分布在HCC肿瘤细胞的胞质中, 在肿瘤组织中无明显的异质性。Tammela *et al*^[6]则发现OY-TES-1蛋白在卵巢癌组织中呈明显的异质性, 推测该蛋白分布特点可能与肿瘤类型有关。由于正常肝组织不表达OY-TES-1蛋白, 因此对于那些表达该蛋白的HCC, 无疑具备了开展HCC肿瘤免疫治疗的前提。此外, 本研究还发现在1例HCC癌旁的肝硬化组织中, 一些肝细胞胞质可见目的蛋白呈颗粒状, 这些目的蛋白反应阳性的肝细胞是否预示已有癌变尚需进一步明确。

Ono *et al*^[1]曾用重组的OY-TES-1全蛋白进行了抗体血清学检查, 在20例正常人血清中均为阴性反应, 而肝癌患者血清中该抗体的阳性率为11%(10/95)。本研究再次证实OY-TES-1具有免疫原性, 在HCC患者血清中该抗体的阳性率为20.69%(12/58), 正常人及肝硬化患者血清中为阴性, 这可能与肿瘤细胞高表达OY-TES-1蛋白并将其呈递到细胞膜外、或(和)肿瘤细胞坏死暴露胞质蛋白, 从而引起相应的免疫反应有关。值得注意的是本研究检测了4例HCC术后患者血清, 也未发现OY-TES-1抗体, 因此OY-TES-1抗体与HCC治疗疗效及预后的关系, 尚需作进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Ono T, Kurashige T, Harada N, Noguchi Y, Saika T, Niikawa N, Aoe M, Nakamura S, Higashi T, Hiraki A, Wada H, Kumon H, Old LJ, Nakayama E. Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 3282-3287
- 2 Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004; 4: 1
- 3 Kubuschok B, Xie X, Jesnowski R, Preuss KD, Romeike BF, Neumann F, Regitz E, Pistorius G, Schilling M, Scheunemann P, Izbicki JR, Lohr JM, Pfreundschuh M. Expression of cancer testis antigens in pancreatic carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int J Cancer* 2004; 109: 568-575
- 4 范蓉, 肖绍文, 何少健, 张小静, 罗昱, 罗国容, 谢小薰. 精子蛋白sp32/OY-TES-1基因mRNA表达的探讨. *解剖学报* 2006; 37: 102-105
- 5 范蓉, 余良, 肖绍文, 何少健, 罗彬, 黄绍明, 罗国容, 谢小薰. 精子蛋白sp32/OY-TES-1 mRNA及其蛋白在正常组织表达的探讨. *解剖学报* 2007; 38: 675-680
- 6 Tammela J, Uenaka A, Ono T, Noguchi Y, Jungbluth AA, Mhawech-Fauceglia P, Qian F, Schneider S, Sharma S, Driscoll D, Lele S, Old LJ, Nakayama E, Odunsi K. OY-TES-1 expression and serum immunoreactivity in epithelial ovarian cancer. *Int J Oncol* 2006; 29: 903-910
- 7 范蓉, 肖绍文, 黄巍, 罗彬, 李硕, 徐丽湘, 谢小薰. 癌-睾丸抗原OY-TES-1多克隆抗体的制备及鉴定. *中国生*

■应用要点

OY-TES-1在HCC中有较高的表达频率及表达水平, 该蛋白具有较强的免疫原性, 他有望作为用于HCC辅助诊断及免疫治疗的肿瘤抗原。

■同行评价

本研究方法可靠, 数据处理正确, 结果可信, 为其他学者在该方面的研究提供一定的警示作用。

- 8 王峰, 范蓉, 莫发荣, 罗彬, 余良, 肖绍文, 谢小薰. 癌睾丸抗原OY-TES-1基因的克隆、表达及纯化. *中国免疫学杂志* 2006; 22: 16-19
- 9 Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2002; 188: 22-32
- 10 Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 2009; 100: 2014-2021
- 11 Dave DS, Leppert JT, Rajfer J. Is the testis a chemoprivileged site? Is there a blood-testis barrier? *Rev Urol* 2007; 9: 28-32
- 12 Jäger E, Gnjatich S, Nagata Y, Stockert E, Jäger D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12198-12203
- 13 Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Dimopoulos N, Luke T, Murphy R, Scott AM, Maraskovsky E, McArthur G, MacGregor D, Sturrock S, Tai TY, Green S, Cuthbertson A, Maher D, Miloradovic L, Mitchell SV, Ritter G, Jungbluth AA, Chen YT, Gnjatich S, Hoffman EW, Old LJ, Cebon JS. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10697-10702
- 14 Vantomme V, Dantinne C, Amrani N, Permanne P, Gheysen D, Bruck C, Stoter G, Britten CM, Keilholz U, Lamers CH, Marchand M, Delire M, Guéguen M. Immunologic analysis of a phase I/II study of vaccination with MAGE-3 protein combined with the AS02B adjuvant in patients with MAGE-3-positive tumors. *J Immunother* 2004; 27: 124-135
- 15 Kawabata R, Wada H, Isobe M, Saika T, Sato S, Uenaka A, Miyata H, Yasuda T, Doki Y, Noguchi Y, Kumon H, Tsuji K, Iwatsuki K, Shiku H, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Monden M, Nakayama E. Antibody response against NY-ESO-1 in CHP-NY-ESO-1 vaccinated patients. *Int J Cancer* 2007; 120: 2178-2184
- 16 Atanackovic D, Altorki NK, Cao Y, Ritter E, Ferrara CA, Ritter G, Hoffman EW, Bokemeyer C, Old LJ, Gnjatich S. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 1650-1655
- 17 Kono K, Mizukami Y, Daigo Y, Takano A, Masuda K, Yoshida K, Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H. Vaccination with multiple peptides derived from novel cancer-testis antigens can induce specific T-cell responses and clinical responses in advanced esophageal cancer. *Cancer Sci* 2009; 100: 1502-1509
- 18 范蓉, 罗昱, 肖绍文. 肿瘤-睾丸抗原的特性及临床应用. *国外医学·肿瘤学分册* 2005; 32: 166-169
- 19 Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* 2007; 25: 707-711
- 20 Ghafouri-Fard S, Modarressi MH. Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy. *Arch Iran Med* 2009; 12: 395-404
- 21 谢小薰, 蓝玲, 黎鹏, 范蓉, 赵飞兰, 莫发荣, 肖绍文, 罗国容. 多种癌-睾丸抗原基因在广西肝细胞癌中的表达. *中华消化杂志* 2004; 24: 174-175
- 22 谢小薰, 何少健, 肖绍文, 范蓉, 莫发荣, 罗国容. 三种 MAGE基因在广西肝细胞癌中的表达. *肿瘤* 2005; 25: 585-588
- 23 许涛, 张小静, 王峰, 范蓉, 罗彬, 何少健, 谢小薰. 肝细胞癌中NY-SAR-35 NY-TLU-57和NY-ESO-1基因的表达及意义. *中国肿瘤临床* 2006; 33: 545-548
- 24 赵飞兰, 何少健, 黎鹏, 莫发荣, 范蓉, 罗国容, 谢小薰. 癌-睾丸抗原GAGE基因mRNA在肝细胞癌的表达及临床意义. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 605-606
- 25 张小静, 范蓉, 何少健, 罗彬, 李硕, 罗国容, 谢小薰. 癌-睾丸抗原SSX基因在肝细胞癌中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2000-2004
- 26 张文敏, 肖刚, 张萌, 郭爱林, 董瑜, 文剑明. NY-ESO-1和LAGE-1癌症-睾丸抗原在肝细胞癌的表达. *中华病理学杂志* 2005; 34: 202-205
- 27 吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛. 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1667-1672
- 28 王万祥, 欧阳晓辉, 孟兴凯, 彭吉润, 冷希圣. CT9和CT10基因在肝细胞癌中的表达及临床意义. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 838-840
- 29 Howes L, Jones R. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 181-192
- 30 Dong XY, Su YR, Qian XP, Yang XA, Pang XW, Wu HY, Chen WF. Identification of two novel CT antigens and their capacity to elicit antibody response in hepatocellular carcinoma patients. *Br J Cancer* 2003; 89: 291-297
- 31 Yin YH, Li YY, Qiao H, Wang HC, Yang XA, Zhang HG, Pang XW, Zhang Y, Chen WF. TSPY is a cancer testis antigen expressed in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 93: 458-463
- 32 Wang XY, Chen HS, Luo S, Zhang HH, Fei R, Cai J. Comparisons for detecting NY-ESO-1 mRNA expression levels in hepatocellular carcinoma tissues. *Oncol Rep* 2009; 21: 713-719
- 33 Riener MO, Wild PJ, Soll C, Knuth A, Jin B, Jungbluth A, Hellerbrand C, Clavien PA, Moch H, Jochum W. Frequent expression of the novel cancer testis antigen MAGE-C2/CT-10 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 124: 352-357
- 34 Dubé C, Leclerc P, Baba T, Reyes-Moreno C, Bailey JL. The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J Androl* 2005; 26: 519-528
- 35 Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol* 2008; 52: 463-472

编辑 李军亮 电编 何基才

肝门胆管癌的治疗进展

詹茜, 沈柏用

詹茜, 沈柏用, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科 上海市 200025

通讯作者: 沈柏用, 主任医师, 教授, 200025, 上海市卢湾区瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科.

shenbaiyong@hotmail.com

电话: 021-64370045-360502

收稿日期: 2009-08-24 修回日期: 2009-10-31

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

Current management of hilar cholangiocarcinoma

Qian Zhan, Bai-Yong Shen

Qian Zhan, Bai-Yong Shen, Department of Hepato-Bilio-Pancreatic Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Professor Bai-Yong Shen, Department of Hepato-Bilio-Pancreatic Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China. shenbaiyong@hotmail.com

Received: 2009-08-24 Revised: 2009-10-31

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

Hilar cholangiocarcinoma is a rare tumor with poor prognosis. Surgical resection provides the only possibility for cure. Due to the central anatomic localization within the liver hilum, established guidelines of oncologic surgery are difficult to apply. Advances in hepatobiliary imaging and surgical strategies to treat this disease have resulted in improved postoperative outcomes. However, selection of extended hepatectomy or vascular resection or not as well as the efficacy of chemotherapy remain great challenges to hepatobiliary surgeons. Here, we will review the recent advances in the management of hilar cholangiocarcinoma.

Key Words: Hilar cholangiocarcinoma; Tumor; Surgical treatment

Zhan Q, Shen BY. Current management of hilar cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3313-3317

摘要

肝门部胆管癌因其发生部位特殊、呈浸润性

生长及与肝门部血管关系密切等特点给手术切除造成极大的困难. 长期以来, 肝门部胆管癌被认为是无法手术根治性切除的癌肿. 近20年来, 随着影像学 and 手术技术的进步, 使肝门部胆管癌的诊断和治疗取得重大进步, 手术切除率逐步提高, 生存率得到明显改善. 但是对于是否应行扩大根治术、血管切除重建, 以及放化疗等的疗效问题, 依然是肝胆外科及肿瘤科医生所面临的严峻挑战. 本文就肝门部胆管癌的治疗进展作一综述.

关键词: 肝门胆管癌; 肿瘤; 治疗

詹茜, 沈柏用. 肝门胆管癌的治疗进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(32): 3313-3317

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3313.asp>

0 引言

肝门部胆管癌因其发生部位特殊、呈浸润性生长及与肝门部血管关系密切等特点给手术切除造成极大的困难. 长期以来, 肝门部胆管癌被认为是无法手术根治性切除的癌肿. 自20世纪90年代以来, 由于影像学 and 手术技术的进步, 使肝门部胆管癌的诊断和治疗取得重大进步, 肝门部胆管癌外科治疗在提高手术切除率、规范手术步骤、减少手术后并发症和降低死亡率方面有了很大的进步, 但是对于是否应行扩大根治术、血管切除重建, 以及放化疗等的疗效问题, 依然是肝胆外科及肿瘤科医生所面临的严峻挑战.

1 可切除性评估及根治性手术

肝门部胆管癌多呈浸润性生长, 肿瘤的切除率低, 预后较差. 术前行内镜逆行胰胆管造影、CT和MRI, 能清楚显示肿瘤位置、肿瘤与周围组织的关系、肝叶改变及胆道全部情况, 并可精确定位. 术前影像学的Bismuth-Corlette^[1]分型与术中探查结果及术后分型差异较大, 常需对其分型进行调整, 对有可能手术的肝门部胆管癌作细致的术中探查, 才能有望提高肝门部胆管癌的切除率^[2]. 不同类型的肝门部胆管癌其生物学行为不同, 应根据肿瘤的病理生物学特征选择

■背景资料

长期以来, 肝门部胆管癌被认为是无法手术根治性切除的癌肿. 肝门部胆管癌患者预后相对较差. 国内外文献报道高位胆管癌的5年生存率为9%-18%, 肝门部受累的患者中位生存期为12-24 mo.

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■相关报道

最近Chahal *et al*对65例移植术后肿瘤复发患者进行分析,发现与肿瘤复发有关的因素包括年龄、肿块大小、胆囊切除史和CA19-9增高。

外科治疗方式^[3].对乳头型、结节型的病例,应注意检测胆管切缘,扩大胆道切除范围,积极地行外科手术切除治疗,预后较好;对硬化型胆管癌,若无淋巴结转移,表现局部浸润为主,可适当扩大清扫切除范围和肝切除,以避免肿瘤残留.而对浸润型及部分硬化型的肝门部胆管癌,若伴有广泛神经纤维束、血管侵犯及淋巴途径转移,则往往是恶性程度高的低分化癌或黏液腺癌.常难以达到根治,预后多不好,不要过分强调扩大根治,此时应注重考虑患者生活质量的改善和综合治疗的开展.准确判断肝门部胆管癌的临床分型、分期根据术前CT、MRCP、B超等影像学检查,了解肿瘤病变范围及胆道变异,准确判断肝门部胆管癌临床分型,制定外科治疗计划.

肝门部胆管癌外科治疗方法的选择原则:若无手术禁忌证,力争根治切除,胆肠吻合.无法根治手术者,则通畅胆道引流.预防胆管炎和肝功能衰竭发生.肝门部胆管癌根治性切除方法基本成型,包括:(1)整块肝外胆道切除及肝十二指肠、肝门部血管“骨骼化”,广泛切除十二指肠韧带上脂肪纤维组织、神经、淋巴,以增加手术切除的彻底性;(2)附加肝叶切除,必要时切除一侧肝(包括尾状叶),以达到R0切除;(3)区域性淋巴结清扫^[4].

2 术前处理及扩大切除术

肝门部胆管癌患者术前多伴有重度黄疸,术后并发症和病死率较高,对于是否术前减黄、门静脉栓塞存在争议^[5-6].目前多数学者认为当总胆红素 $\geq 400 \mu\text{mol/L}$ 时,手术前应先行PTCD减黄,2-3 wk后再手术,可明显降低术后严重并发症的发生率^[7].术前门静脉栓塞由Makuuchi *et al*^[8]提出,可使广泛肝叶切除患者从中获益,解决了广泛肝叶切除所致残肝体积过小或因胆汁淤积所致术后剩余肝组织增生不足、功能储备不够问题.单侧门静脉支栓塞,其目的是让残留的肝脏在术前就能代偿性增生,以防止术后肝功能衰竭.而德国学者认为:门静脉栓塞与肝动脉栓塞相比较,在安全性和对侧肝组织增生方面,两者效果相似.国内黄志强教授认为,当肝切除量大于肝实质总量的60%时,便须行术前一侧门静脉栓塞术^[7].

肝门胆管癌手术治疗的趋势是扩大根治术,切除范围包括肿瘤及其上缘1 cm,低位肝外胆管切除,肝门部血管“骨骼化”,扩大淋巴结

清扫.对于Bismuth-Corlette I, II型肝门部胆管癌采用锐性分离的方法,一般可以根治性切除,而对III, IV型肝门部胆管癌,联合肝叶切除是提高切除彻底性的关键步骤.不同程度的肝叶切除、门静脉及肝动脉切除重建,无论是局部还是附加肝的切除,能够将肿瘤及侵犯的组织包括肝实质、门静脉、肝动脉、胰腺、肝十二指肠韧带内转移的淋巴结一并完全切除,并使各断端切缘无癌细胞残留才达到了根治性切除.肝胰十二指肠切除术(pancreatoduodenectomy, HPD)的主要适应证为肿瘤侵犯十二指肠或肿瘤由肝门向胆管末端弥漫性生长侵犯胰头,需同时清扫十二指肠后方和胰脏上缘的淋巴结.且实施HPD后估计可达根治者. Kawasaki *et al*^[9]、Bismuth *et al*^[10]分别总结了自己的病例,提出对肠系膜上动脉旁或腹主动脉旁淋巴结已有转移者,HPD不能提高患者的生存期和生存质量. HPD手术风险非常大,在肝门部胆管癌手术治疗中不占主导地位,应严格掌握指征,谨慎应用.扩大肝叶切除提高了根治性切除率,可取得较好疗效,但须防止术后出现肝功能衰竭,因此,术前减黄、门静脉栓塞拟切除侧肝脏往往是必须的^[11-12].

3 血管切除重建在肝门部胆管癌治疗中的作用

Chamberlain *et al*^[13]认为对所有的患者都应该持积极的手术态度,虽然根治性手术切除可获得较长期生存,但因肿瘤位于肝门部位,早期易侵犯两侧门静脉、肝动脉和二级胆管,手术切除率低,更很难做到R0切除.

肿瘤对门静脉侵犯范围较小时,采用局部切除修补法,如果门静脉侵犯范围较大,可行门静脉切除后血管重建.在部分门静脉的切除过程中,当有足够的长度可以从肝脏中解剖出来没有遇到肿瘤的时候,门静脉重建可以在切肝前,如有困难则在肝切除后,留有适量的长度,在门静脉的切除过程中尽量不要碰触切除的肿瘤以及邻近的组织,无瘤技术对预后相当重要.当完成了左三叶切除,需要对门静脉分叉处的右支进行切除,由于血管相对较短,可进行人造血管搭桥.所有门静脉的重建都是用5.0-6.0 prolene线端端吻合^[14-15].

在静脉重建期间,动脉的供血要保持通畅.假如动脉受侵犯,联合切除肝固有动脉更有利于胆管癌的根治性切除.国内外学者对肝动脉切除后是否重建观点不一, Gerhards *et al*^[16]报道

扩大肝切除和血管切除者, 病死率达50%。马幼平 *et al* 报道肝右动脉或肝固有动脉切除6例, 均没有重建肝动脉血供, 无1例发生术后肝功能衰竭, 并认为, 肝动脉切除后不必重建, 但肝动脉切除前需先明确保留侧肝叶的门静脉血供, 即门静脉无侵犯或可完成修复并能保证门静脉血供^[17]。

4 肝移植术

肝移植术可提高根治切除率, 同时治疗了潜在或相关病变(如硬化性胆管炎), 预防了新发和复发(10.0%胆管癌患者为多中心病灶), 改善了生活质量, 延长了生存期。Robles *et al*^[18]在1990-2003年对36例无法切除的肝门部胆管癌患者实施了全肝切除和肝移植术, 术后1、3、5年生存率分别为82.0%、53.0%和30.0%, 疗效与根治性切除相似, 长期生存率虽有提高, 但并不令人满意, 肿瘤复发依然是影响肝移植疗效主要因素之一^[19]。而最近报道显示, 只要合理选择受者, 肝移植治疗胆管癌的疗效与传统扩大根治术相当, 远期效果甚至优于后者。Heimbach *et al*^[20]对65例胆管癌患者实施了肝移植, 1、5年的生存率可分别达到91%、76%。Lillemoe *et al*^[21]报道肝移植+部分胰十二指肠切除术(liver transplantation and partial pancreatoduodenectomy, LTPP)可使手术根治率达93%(14/15)。但对于不能切除的肝门胆管癌, 或是切缘有肿瘤残留的患者是否采用同种异体原位肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)目前是有争议的: 供肝资源缺乏, 术后长期服用免疫抑制剂下肿瘤的复发等^[22]。

5 胆道引流减压或姑息性肿瘤切除

有资料显示手术非切除组与介入引流组两者平均生存时间无明显差别, 但手术引流创伤大, 恢复慢, 并发症高, 因此术前应充分分析影像学检查结果, 尤其是对III、IV型患者尤应慎重, 估计切除可能性不大者应尽量减少手术探查, 而采用介入治疗^[23]。PTCD或胆道内支架放置能够减轻黄疸, 改善肝功能, 延长生存期, 而且成功率高, 并发症少。术前充分评估影像学资料, 认为不能根治性切除者首选介入引流, 从而使手术切除率明显提高。

对开腹手术中发现肿瘤已有腹腔内转移, 一般不作切除手术。虽有中心倾向术后内镜下或经皮胆道支架置入, 但一般多考虑即行转流

手术或置管外引流, 可获较长的胆道通畅时间。一般采用左外叶下段胆管(m段胆管)或V段肝管与空肠作Roux-en-Y吻合术, 只是手术成功机会很少。术中肝内胆管内放置合金支架也是一种选择^[2]。肿瘤的姑息性切除多发生于下列情况: 原拟行根治性切除, 然而病理显示标本边缘或胆管切端阳性(R1切除), 患者的情况又不宜行广泛的肝叶切除及联合脏器切除。对术前明确肿瘤无法根治性的患者, 我们一般不主张剖腹行姑息性肿瘤切除。

6 放化疗手段

辅助治疗目前仍以放疗或放化疗为主, 根治切除术后的静脉化疗、放疗并不能明显提高生存率, 但对于手术后有癌肿残留者放疗或化疗有一定疗效^[24]。5-FU和吉西他滨可用于胆管癌的静脉化疗。其中吉西他滨是最有效的单用药物。最常见的放疗形式是外放射治疗, 但外放疗的效果值得探讨。胆道置入支架后, 采用放射治疗, 可以延长平均生存期、减少支架阻塞和提高生活质量。有回顾性分析表明, 姑息切除的患者5年生存率可因接受术后体外放疗而增加^[25]。放化疗的联合使用对于不能切除的胆管癌治疗还没有前瞻性研究结果。

7 其他治疗

光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)对胆管癌的局部控制有一定作用。有研究表明支架胆道引流结合PDT效果明显。可使肿瘤缩小、重新恢复胆汁引流、改善生活质量、延长生存期^[26]。然而, 他在治疗中的确切作用还有待进一步研究。据报道靶向抑制表皮生长因子受体在将来有望成为具有潜力的治疗。最新研究表明, c-Met/HGF诱导级联反应可用于胆管癌的靶向治疗^[27]。

8 肝门胆管癌的预后因素

肝门部胆管癌患者预后相对较差。国内外文献报道高位胆管癌的5年生存率为9%-18%, 肝门部受累的患者中位生存期为12-24 mo。Farhat *et al*^[28]回顾性分析了55例肝门胆管癌, 认为初始胆红素水平及术后辅助化疗也是影响预后的重要因素之一。Johns Hopkins大学回顾性分析了564例胆管癌患者(肝门部胆管癌占50%), 报道影响预后的因素包括手术时期(1995年后)、阴性切缘、高分化肿瘤和淋巴结阴性^[29]。

■应用要点

据报道靶向抑制表皮生长因子受体在将来有望成为具有潜力的治疗。最新研究表明, c-Met/HGF诱导级联反应可用于胆管癌的靶向治疗。

■同行评价

本文可读性较强,能较好地反映我国和国际胃肠病学临床研究的先进水平,对肝胆外科、消化科和肿瘤科的医生会有很大的帮助。

最近Chahal *et al*^[23]对65例移植术后肿瘤复发患者进行分析,发现与肿瘤复发有关的因素包括年龄、肿块大小、胆囊切除史和CA19-9增高。Becker *et al*^[30]对280例肝移植治疗肝门部胆管癌患者回顾性分析。1994-2005年间5年生存率为68%,报道通过多因素分析认为年龄>50岁、性别、原发性硬化性胆管炎的疾病背景与预后显著相关。认为肝移植对不能手术切除、有原发性硬化性胆管炎病史的早期肝门胆管癌有较好预后。

9 结论

对于肝门胆管癌,需要早期诊断,早期治疗,术前积极降低血清总胆红素水平。判断肿瘤能否切除尚无统一标准,对确诊病例在无明显手术禁忌证情况下,应积极手术探查,争取根治性切除。期望提高病患的生存率与改善生存质量,这一观点不应改变,不可为了提高手术切除率而盲目地放宽适应证,扩大手术范围。

10 参考文献

- Bismuth H, Nakache R, Diamond T. Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1992; 215: 31-38
- Singhal D, van Gulik TM, Gouma DJ. Palliative management of hilar cholangiocarcinoma. *Surg Oncol* 2005; 14: 59-74
- 彭承宏. 肝门部胆管癌外科治疗策略. 外科理论与实践 2009; 14: 140-143
- Jarnagin WR, Fong Y, DeMatteo RP, Gonen M, Burke EC, Bodniewicz BS J, Youssef BA M, Klimstra D, Blumgart LH. Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2001; 234: 507-517; discussion 517-519
- 梁力建, 赖佳明, 李绍强, 彭宝岗, 殷晓煜, 汤地, 吕明德, 黄洁夫. 103例肝门部胆管癌的外科手术切除治疗. 中华外科杂志 2006; 44: 882-884
- Palavecino M, Abdalla EK, Madoff DC, Vauthey JN. Portal vein embolization in hilar cholangiocarcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2009; 18: 257-267, viii
- 黄志强. 肝门部胆管癌外科治疗面临的问题与出路. 中华实验外科杂志 2004; 21: 773-775
- Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunvén P, Yamazaki S, Hasegawa H, Ozaki H. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 1990; 107: 521-527
- Kawasaki S, Imamura H, Kobayashi A, Noike T, Miwa S, Miyagawa S. Results of surgical resection for patients with hilar bile duct cancer: application of extended hepatectomy after biliary drainage and hemihepatic portal vein embolization. *Ann Surg* 2003; 238: 84-92
- Bismuth H, Majno PE. Hepatobiliary surgery. *J Hepatol* 2000; 32: 208-224
- Seyama Y, Kubota K, Sano K, Noie T, Takayama T, Kosuge T, Makuuchi M. Long-term outcome of extended hemihepatectomy for hilar bile duct cancer with no mortality and high survival rate. *Ann Surg* 2003; 238: 73-83
- Neuhaus P, Jonas S, Bechstein WO, Lohmann R, Radke C, Kling N, Wex C, Lobeck H, Hintze R. Extended resections for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1999; 230: 808-818; discussion 819
- Chamberlain RS, Blumgart LH. Hilar cholangiocarcinoma: a review and commentary. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 55-66
- Hemming AW, Kim RD, Mekeel KL, Fujita S, Reed AI, Foley DP, Howard RJ. Portal vein resection for hilar cholangiocarcinoma. *Am Surg* 2006; 72: 599-604; discussion 604-605
- Ebata T, Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, Nagasaka T, Nimura Y. Hepatectomy with portal vein resection for hilar cholangiocarcinoma: audit of 52 consecutive cases. *Ann Surg* 2003; 238: 720-727
- Gerhards MF, van Gulik TM, de Wit LT, Obertop H, Gouma DJ. Evaluation of morbidity and mortality after resection for hilar cholangiocarcinoma--a single center experience. *Surgery* 2000; 127: 395-404
- 马幼平, 李恩山, 陈孝平, 朱立东, 王庆东, 孙延雷. 肝门部胆管癌的诊治: 附96例报告. 中国普通外科杂志 2008; 17: 798-800
- Robles R, Figueras J, Turrión VS, Margarit C, Moya A, Varo E, Calleja J, Valdivieso A, Valdecasas JC, López P, Gómez M, de Vicente E, Loinaz C, Santoyo J, Fleitas M, Bernardos A, Lladó L, Ramírez P, Bueno FS, Jaurieta E, Parrilla P. Spanish experience in liver transplantation for hilar and peripheral cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2004; 239: 265-271
- Goldstein RM, Stone M, Tillery GW, Senzer N, Levy M, Husberg BS, Gonwa T, Klintmalm G. Is liver transplantation indicated for cholangiocarcinoma? *Am J Surg* 1993; 166: 768-771; discussion 771-772
- Heimbach JK, Gores GJ, Haddock MG, Alberts SR, Pedersen R, Kremers W, Nyberg SL, Ishitani MB, Rosen CB. Predictors of disease recurrence following neoadjuvant chemoradiotherapy and liver transplantation for unresectable perihilar cholangiocarcinoma. *Transplantation* 2006; 82: 1703-1707
- Lillemoe KD, Cameron JL. Surgery for hilar cholangiocarcinoma: the Johns Hopkins approach. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 115-121
- Becker T, Lehner F, Bektas H, Meyer A, Lück R, Nashan B, Klempnauer J. [Surgical treatment for hilar cholangiocarcinoma (Klatskin's tumor)] *Zentralbl Chir* 2003; 128: 928-935
- Chahal P, Baron TH. Endoscopic palliation of cholangiocarcinoma. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 551-560
- Nakeeb A, Tran KQ, Black MJ, Erickson BA, Ritch PS, Quebbeman EJ, Wilson SD, Demeure MJ, Rilling WS, Dua KS, Pitt HA. Improved survival in resected biliary malignancies. *Surgery* 2002; 132: 555-563; discussion 563-564
- Kubicka S, Rudolph KL, Tietze MK, Lorenz M, Manns M. Phase II study of systemic gemcitabine chemotherapy for advanced unresectable hepatobiliary carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 783-789
- Ortner ME, Caca K, Berr F, Liebetruht J, Mansmann U, Huster D, Voderholzer W, Schachschal G, Mössner J, Lochs H. Successful photodynamic

- therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study. *Gastroenterology* 2003; 125: 1355-1363
- 27 Socoteanu MP, Mott F, Alpini G, Frankel AE. c-Met targeted therapy of cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2990-2994
- 28 Farhat MH, Shamseddine AI, Tawil AN, Berjawi G, Sidani C, Shamseddeen W, Barada KA. Prognostic factors in patients with advanced cholangiocarcinoma: role of surgery, chemotherapy and body mass index. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3224-3230
- 29 DeOliveira ML, Cunningham SC, Cameron JL, Kamangar F, Winter JM, Lillemoe KD, Choti MA, Yeo CJ, Schulick RD. Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg* 2007; 245: 755-762
- 30 Becker NS, Rodriguez JA, Barshes NR, O'Mahony CA, Goss JA, Aloia TA. Outcomes analysis for 280 patients with cholangiocarcinoma treated with liver transplantation over an 18-year period. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 117-122

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章代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

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

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

肠易激综合征发病机制的研究进展

银新, 宁守斌

■背景资料

肠易激综合征曾被认为是人一种人群发病率很高的胃肠功能性疾病, 但最新的研究表明, 该综合征的发生可能有其特殊的病理生理学基础。深入研究和了解肠易激综合征的病因和病理生理学基础, 对临床防治具有重要指导意义。

银新, 宁守斌, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100036

贡献分布作者: 本文综述由银新完成; 宁守斌审校。

通讯作者: 宁守斌, 副主任医师, 硕士生导师, 100036, 北京市阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院消化内科。

ning-shoubin@163.com

电话: 010-66928046

收稿日期: 2009-07-25 修回日期: 2009-10-09

接受日期: 2009-10-19 在线出版日期: 2009-11-18

Advances in understanding the pathogenesis of irritable bowel syndrome

Xin Yin, Shou-Bin Ning

Xin Yin, Shou-Bin Ning, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100036, China

Correspondence to: Shou-Bin Ning, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, 30 Fucheng Road, Beijing 100036, China. ning-shoubin@163.com

Received: 2009-07-25 Revised: 2009-10-09

Accepted: 2009-10-19 Published online: 2009-11-18

Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is a highly prevalent gastrointestinal motility disorder characterized by abdominal discomfort/pain associated with altered bowel habits. At present, the pathophysiology of IBS is still unknown. Genetic factors, psychosocial factors, and changes in gastrointestinal motility and visceral hypersensitivity are traditionally thought to play a crucial role in symptom generation in IBS. Recent studies have identified new additional factors (such as dysregulation of the brain-gut axis, gastrointestinal infection, and activation of mast cells in the intestinal mucosa with consequent release of bioactive substances) that are correlated with the pathogenesis of IBS. In this article, we will review the recent advances in the research on the pathogenesis of IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Pathophysiology; Etiology

Yin X, Ning SB. Advances in understanding the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3318-3323

摘要

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹部不适和排便习惯改变为特征的胃肠功能性疾病。IBS的发病机制仍不清楚, 传统观点认为基因、心理社会因素、胃肠动力障碍和内脏高敏感性等是引起IBS的关键因素。近年来, 人们陆续发现了一些与IBS发病相关的新病理生理学改变依据, 如脑肠轴调节失常、肠道感染、肥大细胞的激活并释放活性物质等。本文总结与IBS发病机制相关的一些最新研究进展。

关键词: 肠易激综合征; 病理生理学; 病因学

银新, 宁守斌. 肠易激综合征发病机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(32): 3318-3323

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3318.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一组以腹痛或腹部不适并同时伴有排便习惯及大便性状改变为主要特征的肠道功能性疾病^[1]。随着对IBS认识的不断深入, 其定义和诊断标准不断发展和完善^[2]。在西方发达国家, 普通人群中约10%-20%符合罗马标准IBS的诊断^[3]。最近, 日本一个流行病学调查表明, 医院门诊人群中IBS患病率高达31%^[4]。我国IBS发病率虽然低于西方发达国家, 但也高达5%左右^[5]。总之, IBS是世界性的常见病, 人群平均患病率在5%-20%之间^[6]。本文主要针对近年来关于IBS病因及发病机制方面取得的最新研究进展作一简述。

1 IBS与肠黏膜异常分子

目前的研究已发现, IBS患者的肠道黏膜存在多种异常分子, 其中多数为胃肠道激素类。以下为近几年来取得研究进展的一些肠黏膜异常分子。

1.1 5-HT和5-HT转运体 5-HT是一种重要的神经递质和信号分子, 人体5-HT 95%来源于肠道, 主要是黏膜层的肠嗜铬细胞(enterochromaffin, EC), 当肠腔内压力增高或受到化学刺激时, 肠道嗜铬细胞释放5-HT, 5-HT释放后被其转运体

■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

(serotonin transporter, SERT)快速重新摄取, 限制其扩散和持续作用. Coates *et al*^[7]研究发现, IBS便秘型和腹泻型患者结肠黏膜SERT mRNA和SERT的表达均下降, 5-HT作用增强, 与受体结合引起肠道神经反射, 启动肠道分泌及推进运动, IBS腹泻型患者出现腹泻和腹部不适症状. 有研究得出^[8]: 5-HT₃受体拮抗剂通过抑制肠神经系统(enteric nervous system, ENS)非选择性离子通道5-HT₃受体, 抑制内脏感觉反射, 从而改善IBS患者的粪便性状, 并缓解腹痛或腹部不适. 便秘型IBS患者可能是由于5-HT作用导致受体脱敏, 出现短期的便秘症状. 而脱敏最快的是5-HT₃受体^[9-10]. 对于便秘型IBS, 5-HT₄受体激动剂可加速胃、小肠和结肠运输, 增加肠道分泌, 为治疗提供依据^[11]. 最近的研究^[12]提示: SERT和钙结合蛋白1轻链影响着5-HT和5-HT受体的功能, 这2种蛋白均被认为与IBS患者常伴随的抑郁状态有关.

1.2 水通道蛋白8(aquaporin 8, AQP8) 水通道蛋白是一族跨膜蛋白质, 主要介导自由水跨生物膜转运, 对保持细胞内外环境的稳态起重要作用, 同时也参与了泌尿、呼吸、消化、神经系统的重要生理功能^[13]. AQP8是近年来发现的一种新型蛋白, 其与IBS的发病机制密切相关. 研究发现AQP8为含有261个氨基酸的蛋白质, 其基因有5个内含子、6个外显子. 近年来国外研究^[14]显示: AQP8存在于十二指肠、近端空肠、近端结肠及直肠的吸收上皮内. 在小肠主要表达于上皮细胞的胞质内膜内, 可能对水的再吸收不起主要作用. 在结肠主要表达于上皮细胞的囊泡内, 所以不能排除结肠AQP8对水的再吸收有重要作用. 腹泻型IBS患者升结肠和降结肠AQP8 mRNA表达显著下降, 且其在结肠的表达水平与患者年龄及始发病年龄均无相关性, 但与病程长度、排便频率和性状密切相关. 病程越长, 排便频率越高, 大便含水量越多, 结肠AQP8 mRNA表达量就越低.

1.3 一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(NOS) NO是一种在胃肠道广泛分布的重要神经递质, 对胃肠道运动及感觉起重要调节作用. 大量研究已证实, NO对胃肠运动起抑制作用, 并且与内脏感觉神经敏感性呈负相关. 当其含量减少时, 胃肠运动加快, 内脏感觉神经高敏感. 穆标 *et al*^[15]经实验对照研究发现: BS-D患者结肠黏膜NO含量明显降低, NOS mRNA的表达明显低于正常人(主要为神经型NOS), 加快胃肠运动, 导致腹泻

伴有腹痛症状. Kuiken *et al*^[16]也选定了正常人与直肠敏感性扩张的IBS患者, 随机、双盲应用安慰剂和NO合成酶抑制剂L-甲基精氨酸进行干预治疗, 发现L-甲基精氨酸明显提高了IBS患者腹部不适, 疼痛阈值, 但对正常人无影响, 由此证明了NO在IBS患者内脏高敏感中的作用.

2 IBS与肠黏膜异常细胞

肠道黏膜是机体接触外环境最大的部位, 拥有丰富的神经、免疫、内分泌等感觉细胞, 从细胞水平来研究IBS肠黏膜的发病机制具有重要意义. 以下为近年来肠黏膜异常细胞的主要研究进展.

2.1 肥大细胞 肠道中的肥大细胞(mast cells, MC)是一种既具有免疫活性, 又能分泌多种介质的重要的免疫细胞, 位于黏膜血管、淋巴和神经附近, 参与肠黏膜的免疫调节. IBS患者结肠黏膜MC的增多已得到公认^[17-20]. 某些刺激如神经肽能激活MC活化^[17], 并释放介质(组胺、前列腺素等), MC介质与神经纤维作用导致肠生理改变^[21]. 有关报道认为^[22]: IBS患者肠黏膜MC的数量和/或MC活化程度增加, 且活化的MC释放其储存的生物活性介质, 并启动新介质合成, 是IBS症状发作的重要因素. 而且, IBS患者腹痛的严重程度和频率与结肠黏膜神经末梢MC的活化程度有关^[23]. 激活后的MC分泌多种介质(如CK等)作用于神经末梢和组织中的内分泌细胞, 多环节地参与肠黏膜的免疫调节. 也有作者^[24]用电镜对IBS患者的肠黏膜超微结构进行观察, 发现MC及肠黏膜杯状细胞、浆细胞、神经内分泌细胞都有超微结构的改变. 另有研究^[25-26]表明: 结肠MC浸润和介质释放与IBS患者内脏高敏感密切相关.

2.2 EC EC是肠道最主要的内分泌细胞, 其主要功能是合成和储存5-HT, 主要作用是引起肠蠕动反射和传导异常^[27]. 生理情况下, EC向肠黏膜固有层及肠腔释放一定量的5-HT, 以维持肠道正常的运动和分泌功能. IBS患者结肠黏膜内EC含量增多, 同时因肠道高敏感性以及动力紊乱等因素, EC接受的刺激增加, 释放过量的5-HT, 造成肠道功能紊乱, 分泌增加, 运动加快, 导致患者出现腹泻症状.

2.3 T淋巴细胞 近年来, 有研究显示^[28]: IBS患者外周血CD4⁺ T细胞水平较正常对照组降低, 腹泻型及腹泻、便秘交替型患者CD8⁺ T均值较正常组增高, 便秘型下降. CD8⁺ T细胞激活后, Ts可

■ 研发前沿

基因、心理社会因素、胃肠动力障碍和内脏高敏感性等是引起IBS的关键因素. 近年来, 发现了一些与IBS发病相关的新的病理生理学改变依据, 如IBS患者肠黏膜出现一些异常的生物活性分子及异常细胞, IBS发生与脑肠轴调节失常、肠黏膜屏障完整性的破坏、肠道感染等可能相关.

■创新盘点

本文对IBS病理生理学改变的最新研究结果进行了系统的总结与介绍,有助于了解IBS的发病机制研究现状,并为进行深入研究奠定了基础。

抑制自身T细胞对抗原的增值反应和抑制活化B细胞产生免疫球蛋白,而Tc抗原微生物免疫和异物排斥反应增强,提示部分BS患者肠道内细菌过度生长可能与CD8⁺ T细胞的优势活化程度有关。另外, O'Mahony *et al*^[29]观察到BS患者肠黏膜IL-10/IL-12比例异常,表明是促炎作用的I型辅助性T细胞(helper T cell 1, Th1)处于活动状态。

最近, Lee *et al*^[19]对42名符合罗马III诊断标准的IBS患者和12名无症状的健康志愿者行直肠组织活检,对MC、EC以及黏膜固有层的T淋巴细胞行免疫染色检查,结果提示:在5名感染后IBS患者中,EC、MC以及黏膜固有层的T淋巴细胞均明显增多。MC在非感染后IBS腹泻型中明显增多,但在便秘型或者混合型者中并不增多。EC在非感染后IBS患者中没有明显变化,作者进一步做了心理因素与这些组织病理学变化之间的相关性研究,结果表明两者之间并没有相关性。

3 脑-肠轴异常与IBS

很早就被研究者们认同:情绪的改变常常会引起腹泻、腹痛和便秘等消化系统症状,进而推测出脑与消化系之间存在某种功能的联系。神经胃肠病学研究表明,肠道经肠神经系统(enteric nervous system, ENS)与中枢神经系统(central nervous system, CNS)相联系,肠道的活动受CNS的调控。这种相互作用被称为脑肠互动^[29-30]。两者间神经传递活动通过多种神经递质完成,包括5-HT、P物质(substance P, SP)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)、胆囊收缩素(cholecystikinin, CCK)、NO、促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin releasing factor, CRF)等、脑啡肽等,从而构成了脑-肠轴。陈晓敏 *et al*^[31]设立对照研究,并取回盲部、乙状结肠黏膜行SP、VIP免疫组化染色和MC计数,结果发现:IBS患者回盲部、乙状结肠黏膜SP、VIP免疫阳性纤维较正常组增多、增粗,阳性加强,IBS患者回盲部黏膜MC计数较正常对照组显著增高。另有研究^[32]证实IBS患者结肠黏膜SP含量明显升高,且SP阳性的神经末梢与MC紧密相邻,并认为肠黏膜内的MC和SP在IBS肠道高敏感性发病中起关键作用。Lee *et al*^[19]经实验发现:与对照组相比,IBS患者末端回肠黏膜内的MC数量都显著增多,而且末端回肠及直-乙状结肠黏膜内神经元特异性烯醇化酶(neurone specific

enolase, NSE)、SP以及5-HT免疫组织化学染色阳性的神经纤维增多,并被数量增多的MC包围。也有研究表明,与正常对照组相比,IBS患者降结肠PPY水平降低,但升结肠与对照组无差别,无论在降结肠还是升结肠,腹泻型IBS患者NPY水平均低于便秘型IBS,IBS患者VIP水平普遍降低,但平均水平与对照组相比无统计学差异,SP水平各组间无差别。VIP、SP、NPY水平在升结肠高于降结肠,但PYY水平正好相反。Mayer *et al*^[33]通过直肠扩张试验中的局部脑血流量测定显示,BS组与溃疡性结肠炎组和对对照组相比,前扣带回、扁桃体和背侧额叶有更多的活动。这些神经递质的改变影响到了脑-肠轴正常的精细调节,可能是引起IBS临床症状的重要因素。

4 肠黏膜屏障完整性的破坏与IBS

Spiller *et al*^[34]应用乳果糖/甘露醇比率法测定了21例急性弯曲菌肠炎患者患病后即12 wk后肠黏膜通透性,发现感染后肠炎患者肠黏膜通透性明显增高。并应用同样方法测定了非感染患者肠黏膜通透性,发现比正常人也明显增高。Dunlop *et al*^[35]进一步研究了不同BS亚型患者与正常人肠黏膜通透性的差别,BS-D、BS-C患者和正常人口服51Cr标记的EDTA,之后收集24 h尿,通过测定不同时间EDTA排泄率反应近端小肠、远端小肠和结肠黏膜通透性,发现BS-D、BS-C患者小肠和结肠黏膜通透性比正常人增高。最新报道^[36]也表明,IBS患者结肠黏膜不仅通透性明显升高,而且与ZO-1 mRNA明显的低表达相关(ZO是一种重要的紧密连接蛋白,是组成细胞紧密连接的重要连接蛋白),将IBS患者结肠黏膜细胞体外培养,取其培养液上清孵育Caco-2细胞(一种来源于人类结肠癌细胞株,常作为小肠功能细胞模型用于实验),可引起Caco-2细胞ZO-1 mRNA表达明显降低,并且可引起Caco-2细胞跨上皮抵抗(transepithelial resistance, TER)的减低和细胞通透性的增加。他们的研究还表明,上清液引起的细胞通透性增加与IBS患者腹痛严重程度相关。由此证明:IBS患者结肠黏膜细胞培养液能够再现IBS患者功能上(通透性)及分子基础上(ZO-1 mRNA)的改变。

5 IBS与肠道感染

越来越多的证据表明,肠道感染是IBS的一个危险因素。流行病学显示:约有4%-26%的患者在急性胃肠炎后可出现IBS^[37]。Wang *et al*^[17]对北京

地区一组患病前无胃肠功能紊乱的痢疾患者进行了追踪研究, 结果表明, 1-2年内22.4%有肠道功能紊乱(functional bowel disorder, FBD), 8.1%进展为IBS. 该研究还表明, 持续腹泻大于 ≥ 7 d是进展为FBE的高危因素. 另有资料证明, 肠道感染后IBS(post-infectious, PI-IBS)和非感染后IBS(nonPI-IBS)患者黏膜固有层T细胞较对照组增加, 非感染后IBS患者MC增加, 如根据传统组织学标准, 则这些活检组织均属正常^[18]. 因此, 过去可能忽略了炎性肠疾病与IBS的关系. 近年来, 为分析感染因素是否影响外周血炎性细胞因子失衡, 梁海清 *et al*^[38]比较了PI-IBS组、非PI-IBS组及对照组3种炎性细胞因子IL-6、IL-18、IL-13的血清表达, 结果显示: PI-IBS组血清IL-6、IL-18水平均显著高于对照组, 非PI-IBS组与对照组相比无显著差异, PI-IBS组与非PI-IBS组相比亦无显著差异. 提示感染因素影响了腹泻型IBS患者全身细胞因子的分泌代谢, 促炎因子分泌增加, 造成PI-IBS患者促炎和抗炎细胞因子失衡. 持续增多的促炎细胞因子可促进PGE2等炎性介质的释放, 作用于肠道初级神经元和平滑肌细胞, 引起肠道感觉、运动功能改变.

6 其他与IBS发病机制相关的研究进展

最近, 有人提出小肠和结肠微生态系统失调和肠道气体平衡的改变与部分IBS的发病相关^[39], IBS患者存在小肠细菌过度生长的问题^[40]. 有学者^[41]研究了IBS患者透壁电位差(主要反映电位相关的氯离子分泌)的变化情况, 结果表明, IBS与对照组之间III相移行运动复合波的波幅及持续时间上无差别, 但其传播速度快于对照组, IBS患者在III相移行运动复合波期间最大透壁电位差, 无论在十二指肠还是空肠都增高. 在III相移行运动复合波之后, 空肠的透壁电位差衰减期明显延长, 腹泻型IBS无论十二指肠还是空肠都存在PD增高, 但在便秘型IBS, PD增高只存在于空肠. 作者认为肠道分泌的增强可能反映了IBS患者肠网络系统功能发生了紊乱.

国内有学者^[42]对5例腹泻型IBS患者与对照组结肠黏膜组织中差异表达蛋白进行了筛选与鉴定, 证明有差异性表达蛋白, 其中21个表达上调, 3个表达下调, 对其中4个差异表达最显著者进行了鉴定, 证明这些蛋白可能在腹泻型IBS发病机制中起一定作用.

最新的1篇临床报道^[43]显示: 抗神经核抗体anti-Hu阳性的小细胞肺癌或其他肿瘤患者易合

并胃肠道功能紊乱, 表现为假性肠梗阻. 其基础研究依据为: 重症IBS患近端空肠全层活检可见肌间神经节内淋巴细胞增多和神经元退行性变. 抗神经核抗体anti-Hu能与肠神经元发生免疫反应, 引起细胞凋亡和神经细胞死亡.

近年来, 精神、心理因素作为IBS重要的发病诱因被研究者们所重视. Kovács *et al*^[44]进行了调查研究, 证明其在IBS患者发病过程的重要性. 国外一项荟萃分析显示^[45]: 在评价IBS时, 心理症状和社会影响跟胃肠道症状同样重要. 国外研究者^[46-47]采用多元回归分析的方法, 发现感觉紧张、无助、睡眠障碍、易疲劳等是影响IBS患者生活质量的独立因素, 而病程、性别、年龄等因素是潜在的诱导因素. Cruz Ruiz *et al*^[48]对100例IBS患者进行研究, 发现58%的患者合并焦虑, 62%合并抑郁, 其中半数以上为女性. Chang *et al*^[49]经研究显示: 女性是IBS发病的一个危险因素, 尤其是便秘为主型的IBS患者.

7 结论

胃肠动力障碍、内脏高敏感性、基因、心理社会因素等是引起IBS的关键因素. 近年来研究证明, 脑-肠轴异常、肠道感染、5-羟色胺(5-HT)及转运体异常以及MC、EC、黏膜固有层的T淋巴细胞和水通道蛋白肠黏膜通透性改变等与IBS的发生有关, 这些病理生理改变对IBS是否属于“功能性”疾病提出了强烈质疑, 但由于没有普遍性和特征性, 还不能作为诊断IBS的客观依据, IBS确切的发病机制仍然不清楚. IBS的罗马III诊断标准依然是基于特征性的临床症状进行诊断.

8 参考文献

- 1 Hammer J, Eslick GD, Howell SC, Altiparmak E, Talley NJ. Diagnostic yield of alarm features in irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Gut* 2004; 53: 666-672
- 2 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 3 Boyce PM, Talley NJ, Burke C, Koloski NA. Epidemiology of the functional gastrointestinal disorders diagnosed according to Rome II criteria: an Australian population-based study. *Intern Med J* 2006; 36: 28-36
- 4 Shinozaki M, Fukudo S, Hongo M, Shimosegawa T, Sasaki D, Matsueda K, Harasawa S, Miura S, Mine T, Kaneko H, Arakawa T, Haruma K, Torii A, Azuma T, Miwa H, Fukunaga M, Handa M, Kitamori S, Miwa T. High prevalence of irritable bowel syndrome in medical outpatients in Japan. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 1010-1016
- 5 马红英, 谌颖琦, 刘玉成, 樊龙忠, 隋杰, 张明华, 蒋国

■同行评价

本文较全面综述了近年来对IBS发病机制的认识, 具有一定的可读性.

- 顺. 湛江市肠易激综合征危险因素的病例对照研究. 中华流行病学杂志 2001; 22: 452-454
- 6 Kanazawa M, Fukudo S. [Epidemiological studies in irritable bowel syndrome] *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1420-1424
- 7 Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 1657-1664
- 8 方秀才. 肠神经系统在功能性胃肠病发病中的作用. 胃肠病学 2009; 14: 65-69
- 9 Liu MT, Rayport S, Jiang Y, Murphy DL, Gershon MD. Expression and function of 5-HT₃ receptors in the enteric neurons of mice lacking the serotonin transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1398-G1411
- 10 代子艳, 王巧民. 5-羟色胺转运体基因多态性与肠易激综合征. 国际消化病杂志 2008; 28: 364-367
- 11 Foxx-Orenstein AE, Camilleri M, Szarka LA, McKinzie S, Burton D, Thomforde G, Baxter K, Zinsmeister AR. Does co-administration of a non-selective opiate antagonist enhance acceleration of transit by a 5-HT₄ agonist in constipation-predominant irritable bowel syndrome? A randomized controlled trial. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 821-830
- 12 Camilleri M, Andrews CN, Bharucha AE, Carlson PJ, Ferber I, Stephens D, Smyrk TC, Urrutia R, Aerssens J, Thielemans L, Göhlmann H, van den Wyngaert I, Coulie B. Alterations in expression of p11 and SERT in mucosal biopsy specimens of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 132: 17-25
- 13 Cruz Ruiz MA, Ortiz Herrera RB, Muñoz Jurado D, Padierna Luna JL. [Association of depression and anxiety in patients with irritable bowel syndrome] *Rev Gastroenterol Mex* 2007; 72: 29-33
- 14 Wellner RB, Cotrim AP, Hong S, Swaim WD, Baum BJ. Localization of AQP5/AQP8 chimeras in MDCK-II cells: exchange of the N- and C-termini. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 172-177
- 15 穆标, 王茂林, 刘之武, 黄乃霞, 刘文天. 一氧化氮能神经调节异常在腹泻型肠易激综合征患者中的作用. 中华消化杂志 2002; 22: 88-91
- 16 Kuiken SD, Klooker TK, Tytgat GN, Lei A, Boeckstaens GE. Possible role of nitric oxide in visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 115-122
- 17 Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 2004; 53: 1096-1101
- 18 Dunlop SP, Jenkins D, Spiller RC. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1578-1583
- 19 Lee KJ, Kim YB, Kim JH, Kwon HC, Kim DK, Cho SW. The alteration of enterochromaffin cell, mast cell, and lamina propria T lymphocyte numbers in irritable bowel syndrome and its relationship with psychological factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1689-1694
- 20 Guilarte M, Santos J, de Torres I, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Martínez C, Casellas F, Saperas E, Malagelada JR. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 2007; 56: 203-209
- 21 Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Corinaldesi R. Functional gastrointestinal disorders and mast cells: implications for therapy. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 6-17
- 22 姚欣, 杨云生. 肠易激综合征与肠黏膜异常. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 79-82
- 23 Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 693-702
- 24 孔武明, 龚均, 陈明霞, 董蕾, 秦斌. 肠易激综合征患者肠黏膜超微结构改变的电镜观察. 西安交通大学学报(医学版) 2008; 29: 318-320
- 25 Park JH, Rhee PL, Kim HS, Lee JH, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 71-78
- 26 Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 132: 26-37
- 27 Talley NJ. Serotonergic neuroenteric modulators. *Lancet* 2001; 358: 2061-2068
- 28 Witowski J, Ksiazek K, Warnecke C, Kuźlan M, Korybalska K, Tayama H, Wiśniewska-Elnur J, Pawlaczyk K, Trómińska J, Breborowicz A, Jörres A. Role of mesothelial cell-derived granulocyte colony-stimulating factor in interleukin-17-induced neutrophil accumulation in the peritoneum. *Kidney Int* 2007; 71: 514-525
- 29 O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Hurley G, Luo F, Chen K, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F, Quigley EM. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005; 128: 541-551
- 30 Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2698-2709
- 31 陈晓敏, 张燕华. 肠易激综合征患者结肠黏膜P物质、血管活性肠肽和肥大细胞的变化. 胃肠病学 2008; 13: 228-230
- 32 Dong WZ, Li ZS, Zou DW, Xu GM, Zou XP, Zhu AY, Yin N, Gong YF. [The changes of mucosal mast cells and substance P in patients with irritable bowel syndrome] *Zhonghua Neike Zazhi* 2003; 42: 611-614
- 33 Mayer EA, Berman S, Suyenobu B, Labus J, Mandelkern MA, Naliboff BD, Chang L. Differences in brain responses to visceral pain between patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Pain* 2005; 115: 398-409
- 34 Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; 47: 804-811
- 35 Dunlop SP, Hebden J, Campbell E, Naesdal J, Olbe L, Perkins AC, Spiller RC. Abnormal intestinal

- permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1288-1294
- 36 Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galmiche JP, Neunlist M. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009; 58: 196-201
- 37 Parry S, Forgacs I. Intestinal infection and irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 5-9
- 38 梁海清, 王世和, 李延青, 王福胜. 肠易激综合征患者外周血炎症细胞因子表达失衡的分析. *胃肠病学* 2008; 13: 111-113
- 39 Gasbarrini A, Lauritano EC, Garcovich M, Sparano L, Gasbarrini G. New insights into the pathophysiology of IBS: intestinal microflora, gas production and gut motility. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12 Suppl 1: 111-117
- 40 Posserud I, Stotzer PO, Björnsson ES, Abrahamsson H, Simrén M. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2007; 56: 802-808
- 41 Larsson MH, Simrén M, Thomas EA, Bornstein JC, Lindström E, Sjövall H. Elevated motility-related transmucosal potential difference in the upper small intestine in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 812-820
- 42 郭旭, 杨云生, 罗莹. 腹泻型肠易激综合征患者结肠黏膜组织异常表达蛋白质的筛选与鉴定. *解放军医学杂志* 2007; 32: 1257-1259
- 43 Drukker CA, Heij HA, Wijnaendts LC, Verbeke JL, Kaspers GJ. Paraneoplastic gastro-intestinal anti-Hu syndrome in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52: 396-398
- 44 Kovács Z, Kovács F. [Depressive and anxiety symptoms, coping strategies in patients with irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease] *Psychiatr Hung* 2007; 22: 212-221
- 45 Schönrich S, Brockow T, Franke T, Dembski R, Resch KL, Cieza A. Analyzing the content of outcome measures in clinical trials on irritable bowel syndrome using the international classification of functioning, disability and health as a reference. *Rehabilitation (Stuttg)* 2006; 45: 172-180
- 46 Spiegel BM, Gralnek IM, Bolus R, Chang L, Dulai GS, Mayer EA, Naliboff B. Clinical determinants of health-related quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Arch Intern Med* 2004; 164: 1773-1780
- 47 Faresjö A, Grodzinsky E, Johansson S, Wallander MA, Timpka T, Akerlind I. Psychosocial factors at work and in every day life are associated with irritable bowel syndrome. *Eur J Epidemiol* 2007; 22: 473-480
- 48 Cruz Ruiz MA, Ortiz Herrera RB, Muñoz Jurado D, Padierna Luna JL. [Association of depression and anxiety in patients with irritable bowel syndrome] *Rev Gastroenterol Mex* 2007; 72: 29-33
- 49 Chang FY, Lu CL. Irritable bowel syndrome in the 21st century: perspectives from Asia or South-east Asia. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 4-12

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12 400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)。(科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

¹²⁵I粒子近距离植入治疗结直肠癌肝转移的研究进展

陈 亿, 罗开元, 李滢旭

■背景资料

放射性粒子组织间植入近距离治疗恶性肿瘤,是指将放射性粒子直接永久植入肿瘤组织内或是插植于手术切除的肿瘤床、残存癌及淋巴转移的途径,利用其释放低能量光子产生的 γ 、X射线持续照射肿瘤细胞并将其杀伤的一种新的技术方法。可以减轻手术创伤、缩短手术时间、减少术后并发症;粒子植入与手术和化疗配合,有望提高肿瘤治疗的彻底性,解决在恶性肿瘤治疗中起关键作用的肿瘤局部复发与再生长问题;能够有效延长患者生存期和提高患者的生存质量。

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

陈亿, 罗开元, 李滢旭, 昆明医学院第四附属医院普外科 云南省昆明市 650021

云南省科技计划项目联合专项基金资助项目, No. 2007C0039R

云南省昆明医学院硕士研究生创新基金资助项目, No. KM2008L04

作者贡献分布: 本文综述由陈亿与李滢旭完成; 罗开元审校。

通讯作者: 罗开元, 教授, 博士生导师, 650021, 云南省昆明市, 昆明医学院第四附属医院普外科. ynluky@yahoo.com.cn
电话: 0871-5156650-2952

收稿日期: 2009-09-25 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

Advances in permanent ¹²⁵I seed implantation for colorectal liver metastases

Yi Chen, Kai-Yuan Luo, Ying-Xu Li

Yi Chen, Kai-Yuan Luo, Ying-Xu Li, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650021, Yunnan Province, China

Supported by: the Yunnan Provincial Science and Technology Joint Special Projects Fund, No. 2007C0039R; and the Innovation Fund for Graduate Students in Kunming Medical University, No. KM2008L04

Correspondence to: Professor Kai-Yuan Luo, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650021, Yunnan Province, China. ynluky@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-25 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

Colorectal cancer is one of the most common cancers worldwide and the second most common type of cancer in the Western world. Colorectal cancer is the most common source of metastatic liver cancer, and liver metastasis is an important prognostic factor for colorectal cancer. Hepatic resection is the treatment of choice for colorectal liver metastases. The postoperative 5-year survival rate for patients with colorectal liver metastase now exceeds 50%. However, hepatic resection is indicated for only 10%-25% of patients with colorectal liver metastases. Therefore, non-surgical methods have attracted increasing attention. Permanent ¹²⁵I seed implantation is now becoming a hotspot for treatment of colorectal liver metastases. This review will focus on the recent advances in permanent ¹²⁵I seed implantation for colorectal

liver metastases.

Key Words: Colorectal cancer; Liver metastasis; ¹²⁵I seed; Brachytherapy

Chen Y, Luo KY, Li YX. Advances in permanent ¹²⁵I seed implantation for colorectal liver metastases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3324-3327

摘要

结直肠癌是世界范围内最常见的癌症之一,在西方社会其发病率排在肿瘤的第2位,其肝转移是影响结直肠癌预后的重要因素,也是最常见的转移性肝癌。手术是目前唯一有效的治愈手段,5年存活率超过50%,但仅有10%-20%结直肠癌肝转移患者确诊时适合于手术切除,因此各种非手术治疗的作用正日益受到关注。随着科学技术的发展,¹²⁵I粒子永久性组织间植入内放射已成为结直肠癌肝转移治疗的新热点,本文拟就其在结直肠癌肝转移方面的治疗进展作一简要综述。

关键词: 结直肠癌; 肝转移; ¹²⁵I粒子; 组织间内放疗

陈亿, 罗开元, 李滢旭. ¹²⁵I粒子近距离植入治疗结直肠癌肝转移的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3324-3327
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3324.asp>

0 引言

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,影响结直肠癌预后的因素有很多,癌灶的转移就是其中的重要原因之一。肝脏是结直肠癌转移的最常见器官,约30%-60%,结直肠癌肝转移(colorectal liver metastases, CRLM)是最常见的转移性肝癌。接近25%的结直肠癌患者在确立诊断时即已存在肝转移,另有30%的患者在结直肠癌原发肿瘤切除术后2年内发生肝转移。转移性肝癌患者的预后大多不佳,如果未经治疗,中位生存期约为12-15 mo,5年生存率不足5%^[1-3]。尽管治疗方法在不断进步,CRLM患者的预后仍不理想,CRLM IV期的患者即使使用当前最好的化疗药平均生存时间约为25 mo^[4]。¹²⁵I粒子永久性组织间植入内放射治疗的出现及其技术的不断改进

为此类患者提供了一种新的治疗手段。

1 ^{125}I 粒子永久性组织间植入内放射治疗CRLM的基本原理

^{125}I 是一种人工合成同位素, 由 ^{124}Xe 吸收1个中子并以电子俘获方式变为 ^{125}I , 释放能量为27-31 keV的X线和35 keV的 γ 射线。 ^{125}I 粒子是由内含吸附有活性 ^{125}I 的钼丝, 外壳为钛合金管并经激光焊接而成的微小颗粒。与其他放射源相比, ^{125}I 粒子具有的优势主要有: 剂量率较低, 治疗比增加, 相对生物效应高(约1.0-1.5或1.2-2.0), 半衰期长(60.1 d), 同时衰变产生的 γ 射线穿透力弱, 在组织和铅中的半价层分别为20 mm和0.025 mm, 组织穿透能力17 mm, 有效的杀伤半径大约是10-15 mm。 γ 射线能够直接损伤大肠癌细胞的DNA, 破坏癌细胞DNA合成, 使双链断裂, 诱导癌细胞凋亡, 使核酸内切酶活化, DNA被打断、裂解, 抑制某些与癌细胞代谢、增殖等相关蛋白分子的合成。同时 ^{125}I 粒子释放的低线性能量传递(linear energy transfer, LET)射线电离癌细胞内的水分子, 产生自由基(H^+ 、 H_2O_2 、 OH^\cdot 、 O^{2-}), 与细胞核酸、蛋白等分子相互作用, 引起组织细胞损伤, 而致组织中的肿瘤细胞失去繁殖能力而凋亡^[5-6]。肝脏肿瘤组织在射线的作用下, 处于照射敏感时相($\text{G}_2\text{-M}$ 期)和非敏感时相细胞的比例存在再分配, 这样就可能增加后续照射的杀伤机会, 效果优于外照射。参照1995年美国医学物理学会43号工作组对胃肠道肿瘤推荐的近距离治疗剂量140 Gy^[7], 据计算, 采用0.7 mCi-0.8 mCi活度的 ^{125}I 粒子作相隔1.0-1.5 cm间距的平面植入经5个半衰期, 可以达到推荐的 ^{125}I 治疗剂量140 Gy。

2 ^{125}I 粒子永久性组织间植入内放射治疗CRLM的方式及疗效

对于CRLM的患者, 手术治疗是目前对于结直肠癌肝转移的根治性治疗公认的唯一方法, 是能使结直肠癌肝转移患者获得长期生存的治疗手段, 但结直肠癌肝转移患者中只有10%-20%适合手术治疗, 手术的时机相当的重要^[8-9]。对于不可切除的原发和转移性肝癌病例的治疗, ^{125}I 粒子永久性组织间植入内放疗的应用越来越广泛。

2.1 单用 ^{125}I 粒子永久性组织间植入内放射治疗

对于不可手术切除的CRLM患者, 放射治疗历来扮演了一个重要的角色^[10], 这主要是因为肝脏对射线的低耐受度。由于肝癌必须有超过40 Gy

的吸收剂量才能得到较好的局部控制, 而肝脏的耐受剂量仅30 Gy, 超过30 Gy会产生严重的放射性肝损伤, 因此, 常规的放射治疗在肝癌的应用受到限制^[11]。1999年Martinez-Monge *et al*^[12]报道了56例 ^{125}I 粒子治疗不可切除CRLM的结果, 1年生存率和3年生存率分别是71%和25%, 中位生存期为20 mo。单发转移灶的5年控制率(39%)高于多发转移灶的5年控制率(9%)。2006年, Nag *et al*^[13]报道 ^{125}I 粒子内放疗治疗不可手术切除的CRLM患者1年生存率和3年生存率分别是73%, 23%, 中位生存期20 mo, 最长生存时间7.5年。单发的转移灶的5年肝内控制率(38%)高于多发的转移灶的5年肝内控制率(6%)。多因素分析表明, 转移灶的数目、大小与患者预后显著相关, 单发病灶者生存期明显长于病灶数多于4处者。虽然缺乏长期的随访资料, 但本研究显示出 ^{125}I 粒子植入内放射具有较高的安全性, 为其在临床的进一步应用提供了基础。

2.2 ^{125}I 粒子永久性组织间植入内放射治疗联合手术

手术切除肝脏转移灶仍然是治疗结直肠癌并肝脏转移的最佳方法^[14]。其主要方式为手术切除主要转移灶, 而后植入 ^{125}I 粒子内放射治疗潜在的残余病灶、切除困难者以及可能发生的转移灶。1994年, Armstrong *et al*^[15]首先报道了从1979年到1990年的一组手术切除同时植入 ^{125}I 粒子治疗转移性肝癌病例的治疗结果。作者在术中对于不能切除或者部分切除的, 采用 ^{125}I 粒子永久性组织间植入内放射治疗CRLM, 结果显示本组患者手术死亡率为0, 无严重的术后并发症, 随访的中位生存期为18 mo, 42%的患者存活了2年以上。这与国外学者^[16-18]相关的CRLM研究报道一致。研究显示 ^{125}I 粒子永久植入内放疗可有效降低局部复发率并显著提高生存率, 具有较高的安全性及可行性, 能在手术切除病灶后有效的控制残余病灶。切缘阳性是局部复发的主要原因, 手术的原则是要求切缘距肿瘤大于1 cm。但也有学者^[19]认为手术中切缘距肿瘤的距离不会影响术后肿瘤复发率。

2.3 ^{125}I 粒子永久性组织间植入内放射治疗联合化疗

CRLM的化疗方式包括: 口服化疗、周围静脉化疗、门静脉化疗以及肝动脉化疗。新的化疗药物的应用增加了疗效, 化疗已不仅仅作为姑息治疗, 化疗更有价值在于部分不能根治切除的病例经化疗肿瘤缩小后从而可根治手术切除, 使更多的患者可能获得长期生存。现在普遍主张在手术后采用辅助化疗措施, 术中先行

■**研发前沿**
肿瘤术后或放疗后局部复发和再生成为临床外科医生面临的相当棘手的问题, 癌复发的外科治疗也已成为当今研究的重要课题。

■应用要点

手术切除肝脏转移灶仍然是治疗结直肠癌并肝脏转移的最佳方法. 临床实践证明¹²⁵I粒子联合手术或化疗治疗中晚期实体肿瘤能够延长患者的生存时间. 随着这一技术的不断完善, 对治疗恶性肿瘤具有良好的应用前景.

¹²⁵I粒子内放疗优于先行化疗, 以化疗来巩固手术治疗的效果. 2005年, 国内罗开元 *et al*^[20]通过对84例肝癌患者随机分组分别给予术后化疗和术中永久插植¹²⁵I粒子组织间放射治疗, 研究结果显示: 前组3年局部复发率为59.5%, 3年生存率47.6%; 后组3年局部复发率为11.9%, 3年生存率为68.7%, 明显优于前组的疗效. 虽然CRLM的化疗结果仍不让人满意, 但最近20年, 以奥沙利铂为代表的第3代铂类及以伊立替康为代表的拓扑异构酶抑制剂的出现, 已将CRLM的化疗反应率提高至一个较高的水平(约50%)^[21]. Wieners *et al*^[22]报道, 对不可切除的只有肝转移的CRLM患者同时行内放疗和肝动脉灌注化疗, 平均随访28 mo, 第1次治疗后的中位生存期为12.3 mo, 所有的患者均未发现肝功能衰竭. 这2种最小侵入性治疗方法的联用是可行的, 而且并发症少, 为治疗不可切除的CRLM患者带来希望.

3 适应证和禁忌证

3.1 适应证 目前认为, 对于各种肝脏恶性肿瘤, 手术切除仍是唯一的根治方法. 因此, 文献推荐不适于手术切除的CRLM是¹²⁵I粒子永久性组织间植入内放射治疗唯一适应证^[23]. 对于原发性肝癌手术治术中残留或切缘距肿瘤太近者、增强根治效果的预防性植入、不能手术治疗的中晚期原发性肝癌患者、术后复发、其他方法治疗后复发、外照射不佳或剂量不足的原发性肝癌患者以及肝转移癌患者均是一种理想的治疗方法. 对于手术残留病灶, 外放疗后癌灶局部残留, 尤其是手术不能切除或切除后仍有残留病灶的患者也同样适用.

3.2 禁忌证 (1)身体情况差, 不能接受手术的; (2)病变性质不明确或侵犯大血管; (3)合并严重的内科疾病不能耐受放疗的^[24]. 在临床实际工作中, 可对适应证和禁忌证做相应的扩展.

4 并发症

文献报道, ¹²⁵I粒子永久性组织间植入内放疗CRLM后的并发症较少见, 国内外对放射性粒子植入治疗的并发症均有报道. 常见的并发症是: (1)穿刺误入血管引起栓塞, 穿破空腔脏器肠管; (2)皮肤溃疡, 粒子迁移引起血管栓塞甚至急性心肌梗塞^[25]; (3)少数患者(0.5%)可造成放射性肠炎, 肝脓肿等^[11]. 合适的粒子剂量、及时有效地预测粒子的迁移^[26], 可以明显减少并发症, 降低死亡率.

5 结论

手术切除仍是可切除CRLM的首选治疗手段, 对于不适合切除的患者可考虑行¹²⁵I粒子永久性组织间植入内放射治疗. CRLM的¹²⁵I粒子植入治疗尚有待于进一步完善, 通过合理设计植入计划、熟练操作流程等有望将¹²⁵I粒子的治疗效果提高. ¹²⁵I粒子联合手术或化疗能够延长患者的生存时间, 而新辅助化疗在CRLM的治疗中具有重要意义, 通过减小肿瘤体积, 增加了手术切除的机会^[27]. 放射性粒子植入的理论指导和实验依据也尚待进一步完善, 如: 不同类型肝脏肿瘤的耐受剂量是多少? 化疗和外放疗如何同¹²⁵I粒子更好的结合, 多病灶的CRLM的耐受剂量以及粒子的放置等等. 为解决上述问题而进行的各种研究, 如内、外放疗相结合以减少放射剂量, 减轻放射毒性^[28]等, 尚需进一步研究探索.

6 参考文献

- 1 Grundmann RT, Hermanek P, Merkel S, Germer CT, Grundmann RT, Hauss J, Henne-Bruns D, Herfarth K, Hermanek P, Hopt UT, Junginger T, Klar E, Klempnauer J, Knapp WH, Kraus M, Lang H, Link KH, Löhle F, Merkel S, Oldhafer KJ, Raab HR, Rau HG, Reinacher-Schick A, Rieke J, Roder J, Schäfer AO, Schlitt HJ, Schön MR, Stippel D, Tannapfel A, Tatsch K, Vogl TJ. [Diagnosis and treatment of colorectal liver metastases - workflow] *Zentralbl Chir* 2008; 133: 267-284
- 2 Donadon M, Torzilli G. [Surgical treatment of liver metastases from colorectal carcinoma] *Minerva Chir* 2007; 62: 257-267
- 3 Donadon M, Ribero D, Morris-Stiff G, Abdalla EK, Vauthey JN. New paradigm in the management of liver-only metastases from colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2007; 1: 20-27
- 4 Venook A. Critical evaluation of current treatments in metastatic colorectal cancer. *Oncologist* 2005; 10: 250-261
- 5 罗开元. 实用组织间植入内放射治疗恶性肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 39-45
- 6 Jakobs TF, Hoffmann RT, Tatsch K, Trumm C, Reiser MF. [Therapy response of liver tumors after selective internal radiation therapy] *Radiologe* 2008; 48: 839-849
- 7 Nath R, Anderson LL, Luxton G, Weaver KA, Williamson JF, Meigooni AS. Dosimetry of interstitial brachytherapy sources: recommendations of the AAPM Radiation Therapy Committee Task Group No. 43. American Association of Physicists in Medicine. *Med Phys* 1995; 22: 209-234
- 8 Moldovan B, Copotioiu C, Bud V, Nemes I, Serac G, Molnar C, Florea S, Cornăteanu S, Milutin D, Coșovanu A, Pocreață D. [The importance of the I-colic time in colorectal cancer with synchronous hepatic metastases. Specifics of surgical strategy] *Chirurgia (Bucur)* 2008; 103: 539-546
- 9 Curley SA. Outcomes after surgical treatment of colorectal cancer liver metastases. *Semin Oncol* 2005;

- 32: S109-S111
- 10 Dawson LA, Lawrence TS. The role of radiotherapy in the treatment of liver metastases. *Cancer J* 2004; 10: 139-144
- 11 Gasent Blesa JM, Dawson LA. Options for radiotherapy in the treatment of liver metastases. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 638-645
- 12 Martinez-Monge R, Nag S, Nieroda CA, Martin EW. Iodine-125 brachytherapy in the treatment of colorectal adenocarcinoma metastatic to the liver. *Cancer* 1999; 85: 1218-1225
- 13 Nag S, DeHaan M, Scruggs G, Mayr N, Martin EW. Long-term follow-up of patients of intrahepatic malignancies treated with iodine-125 brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64: 736-744
- 14 Treska V, Kober J, Hasman D, Racek J, Trefil L, Reischig T, Hes O, Kuntscher V, Moláček J, Tresková I. [Ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation from non-heart beating donor--do antioxidants or antiinflammatory drugs play any role?] *Rozhl Chir* 2009; 88: 65-68
- 15 Armstrong JG, Anderson LL, Harrison LB. Treatment of liver metastases from colorectal cancer with radioactive implants. *Cancer* 1994; 73: 1800-1804
- 16 Brachet D, Lermite E, Rouquette A, Lorimier G, Hamy A, Arnaud JP. Prognostic factors of survival in repeat liver resection for recurrent colorectal metastases: review of sixty-two cases treated at a single institution. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 475-483
- 17 Pessaux P, Lermite E, Brehant O, Tuech JJ, Lorimier G, Arnaud JP. Repeat hepatectomy for recurrent colorectal liver metastases. *J Surg Oncol* 2006; 93: 1-7
- 18 Adam R, Wicherts DA, de Haas RJ, Ciacio O, Lévi F, Paule B, Ducreux M, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D. Patients with initially unresectable colorectal liver metastases: is there a possibility of cure? *J Clin Oncol* 2009; 27: 1829-1835
- 19 Hamady ZZ, Cameron IC, Wyatt J, Prasad RK, Toogood GJ, Lodge JP. Resection margin in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastasis: a critical appraisal of the 1cm rule. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32: 557-563
- 20 罗开元, 郑江华, 李波, 邵庆华, 杨国凯, 赵泉, 杨嵘. ^{125}I 粒子永久性植入组织间放射治疗肝癌. 肝胆胰外科杂志 2004; 16: 29-31
- 21 Masi G, Loupakis F, Pollina L, Vasile E, Cupini S, Ricci S, Brunetti IM, Ferraldeschi R, Naso G, Filipponi F, Pietrabissa A, Goletti O, Baldi G, Fornaro L, Andreuccetti M, Falcone A. Long-term outcome of initially unresectable metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil/leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) followed by radical surgery of metastases. *Ann Surg* 2009; 249: 420-425
- 22 Wieners G, Pech M, Hildebrandt B, Peters N, Nicolaou A, Mohnike K, Seidensticker M, Sawicki M, Wust P, Rieke J. Phase II feasibility study on the combination of two different regional treatment approaches in patients with colorectal "liver-only" metastases: hepatic interstitial brachytherapy plus regional chemotherapy. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2009; 32: 937-945
- 23 Ducreux M, Lartigau E, Eschwege F, Etienne JP. [Radiotherapy of malignant tumors of the liver] *Gastroenterol Clin Biol* 1995; 19: 350-360
- 24 Casaril A, Abu Hilal M, Harb A, Campagnaro T, Mansueto G, Nicoli N. The safety of radiofrequency thermal ablation in the treatment of liver malignancies. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 668-672
- 25 Zhu AX, Wallner KE, Frivold GP, Ferry D, Jutzy KR, Foster GP. Prostate brachytherapy seed migration to the right coronary artery associated with an acute myocardial infarction. *Brachytherapy* 2006; 5: 262-265
- 26 Sugawara A, Nakashima J, Shigematsu N, Kunieda E, Kubo A. Prediction of seed migration after transperineal interstitial prostate brachytherapy with I-125 free seeds. *Brachytherapy* 2009; 8: 52-56
- 27 Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crinò L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini C, Andreuccetti M, Masi G. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1670-1676
- 28 Hurwitz MD. Technology Insight: Combined external-beam radiation therapy and brachytherapy in the management of prostate cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5: 668-676

■同行评价

本文选题实用, 内容全面, 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

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 2009-11-18)

急性疼痛应激对SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达的影响

卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 时姗姗, 柳海燕, 陶晓倩, 姚兵

■背景资料

机体遭受严重的创伤应激后,常出现与胃肠道功能紊乱有关的许多症状。消化系统疾病一直是历次战争中的高发疾病,军事应激导致的损伤是部队非战斗减员的主要原因之一。疼痛是战争创伤引起的常见症状,特别是慢性疼痛,也是近年来影响人们身心健康的主要因素之一,但其对消化系统功能的影响仍没有系统的研究。

卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 时姗姗, 柳海燕, 陶晓倩, 姚兵, 中国人民解放军南京军区南京总医院解放军临床检验医学研究所 江苏省南京市 210002

国家自然科学基金资助项目, No. 30770801

全军“十一五”医药卫生科研基金资助项目, No. 06H011

作者贡献分布: 课题设计由姚兵与卢坤刚完成; 研究操作由卢坤刚、韩雪峰及时姗姗完成; 数据分析由卢坤刚、张艳梅、柳海燕及陶晓倩完成; 研究所用试剂及仪器设备由姚兵提供。

通讯作者: 姚兵, 教授, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 中国人民解放军南京军区南京总医院解放军临床检验医学研究所. yaobingliang@yahoo.com.cn

电话: 025-80860174

收稿日期: 2009-08-28 修回日期: 2009-10-29

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

Formalin-induced acute pain upregulates the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of rats

Kun-Gang Lu, Xue-Feng Han, Yan-Mei Zhang, Shan-Shan Shi, Hai-Yan Liu, Xiao-Qian Tao, Bing Yao

Kun-Gang Lu, Xue-Feng Han, Yan-Mei Zhang, Shan-Shan Shi, Hai-Yan Liu, Xiao-Qian Tao, Bing Yao, Institute of Clinical Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770801; and the Military Medical and Health Research Program during the Eleventh Five-Year Plan Period, No. 06H011

Correspondence to: Professor Bing Yao, Institute of Clinical Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese, 305 Zhongshan East Road, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. yaobingliang@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-28 Revised: 2009-10-29

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of formalin-induced acute pain on the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of Sprague-Dawley (SD) rats.

METHODS: Acute pain was induced in SD rats by subcutaneous injection of 2 mL of 50 g/L formalin into the plantar surface of the left hind-paw. Control rats were injected with equal vol-

ume of normal saline solution. The samples of the stomach and submandibular gland were collected under terminal anaesthesia with ketamine (40 mg/kg) at 1, 6, 24 and 72 h after formalin injection. The expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland was analyzed by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR).

RESULTS: Fluorescent quantitative PCR showed that the expression of annexin 5 mRNA in the stomach significantly increased at 1 h after formalin injection compared to that in control mice (7.43 ± 2.67 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$), and then decreased to basic level at 6 h ($P > 0.05$). In the submandibular gland, the expression of annexin 5 mRNA also increased at 1 h after formalin injection (4.33 ± 1.50 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$), and returned to normal level at 72 h ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Formalin injection-induced acute pain upregulates the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of rats. Annexin 5 may be an acute stress response protein in the digestive system.

Key Words: Pain induction; Stomach; Submandibular gland; Annexin 5; Fluorescent quantitative PCR

Lu KG, Han XF, Zhang YM, Shi SS, Liu HY, Tao XQ, Yao B. Formalin-induced acute pain upregulates the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3328-3331

摘要

目的: 研究在甲醛(formalin)致炎的急性疼痛应激状态下SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达水平的变化。

方法: 单侧后足底皮下注射0.2 mL, 甲醛溶液(50 g/L), 建立SD大鼠的急性疼痛应激模型, 对照组注射等量的生理盐水。实验组与其相应的对照组大鼠分别在注射后1、6、24和72 h用氯胺酮(50 mg/kg)麻醉处死。通过荧光定量

■同行评议者

季国忠, 教授, 南京医科大学第二附属医院消化科; 周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

PCR分析急性疼痛应激对大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达水平的影响。

结果: 荧光定量PCR结果表明, 在甲醛注射后1 h胃中annexin 5 mRNA水平与对照组相比显著升高(7.43 ± 2.67 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$), 至6 h恢复到正常水平($P > 0.05$); 注射后1 h, 颌下腺中annexin 5 mRNA水平也显著升高(4.33 ± 1.50 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$), 并持续到24 h, 至72 h恢复到正常水平。

结论: annexin 5可能是消化系统应激反应蛋白, 急性疼痛可能通过annexin 5影响胃及颌下腺的功能。

关键词: 疼痛应激; 甲醛; 胃; 颌下腺; annexin 5; 荧光定量PCR

卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 时姗姗, 柳海燕, 陶晓倩, 姚兵. 急性疼痛应激对SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3328-3331
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3328.asp>

0 引言

应激状态下机体的消化和免疫系统将受到很大的影响, 应激性肠胃病是部队非战斗减员一个重要原因, 且以功能性胃肠病为主。研究表明身心应激能引起胃肠道即刻早期基因mRNA水平显著升高^[1], 这些基因的迅速表达可能启动应激诱导的黏膜损伤的修复机制, 也可能使胃肠道对应激源产生适应。因此, 研究这些基因在应激状态下表达变化将有助于探讨应激对消化功能影响的具体机制。疼痛是由伤害性刺激引起的一种应激反应, 也是战争创伤引起的常见症状。因此, 我们建立急性疼痛模型模拟战争创伤并研究SD大鼠胃及颌下腺中潜在相关基因表达变化, 为研究功能性胃肠病提供新的线索。annexin 5是一种Ca²⁺依赖的磷脂酰丝氨酸结合蛋白, 并参与形成磷脂膜及Ca²⁺通道, 有研究表明annexin 5具有抗炎和抗凝血作用, 能抑制PKC的活性。我们之前的研究表明, 甲醛注射能诱导SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5蛋白水平的升高, 因此, annexin 5可能参与了胃及颌下腺对急性疼痛应激的反应。本研究在此基础上进一步探讨annexin 5 mRNA水平在急性疼痛应激状态下的变化, 有助于了解急性疼痛应激影响消化系统annexin 5表达的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD ♂ 大鼠60只, 由中国人民解放军

放军南京军区南京总医院动物比较医学科提供, 体质量310-350 g, 随机分为5组, 每组各12只。动物实验房实验前清洁、消毒。温度22℃±2℃; 光控为07:00-19:00光照, 19:00-次日07:00黑暗。TRIzol试剂(Invitrogen公司), 焦炭酸二乙酯(AmrSCO公司), 反转录试剂盒(Promega公司), 即用型Taq酶PCR试剂盒(上海GeneRay Biotech公司), 引物及Taqman探针(上海英骏生物公司合成), 异丙醇、氯仿、无水乙醇均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物及Taqman探针的设计与合成: 参照Barlow *et al*^[2]的研究, 在GenBank上查找大鼠annexin 5及Rpl19的mRNA序列, 取其保守区, 使用Premier Primer 5.0设计引物及Taqman探针(5'FAM、3'TAMRA双标记), 由上海英俊生物技术有限公司合成。annexin 5(产物长度94 bp): 上游引物: 5'-GAGACCCTGACACTGCAATTG-3', 下游引物: 5'-TCATCCGTCCCCCACTTC-3', Taqman探针: 5'-CTCAGGCATTGTTCCAGGCTGGAGA-3'; Rpl19(产物长度96 bp): 上游引物: 5'-CATGAGTATGCTTAGGCTACAGAAG-3', 下游引物: 5'-GCGATTTTCGTTGGTTTCATT-3', Taqman探针: 5'-CGCTGTGGTAAAAAGAAGGTGTGGTTG-3'。

1.2.2 甲醛致炎的急性疼痛模型制备: 按照Dubuisson *et al*^[3]的方法建立疼痛模型并进行评分, 动物实验前先进行30 min适应, 然后, 在大鼠左侧后足底皮下注射50 g/L甲醛0.2 mL, 对照组注射等量的生理盐水。实验动物被放入30 cm×30 cm×30 cm的聚丙烯透明容器内, 并在下面放一面镜子成45度角用于观察大鼠疼痛行为, 并进行评分。评分在注射完毕后立即开始, 持续50 min, 每5 min计算1次。评分方法: 注射足仍能正常支撑体质量, 记为0分; 注射足能支撑一点体质量或不支持, 运动时跛行, 记为1分; 注射足抬起, 悬在空中, 不接触容器, 记为2分; 舔、咬注射足或注射足颤抖, 记为3分。对以上各级评分以5 min为单元作一加权平均, 作为大鼠对注射甲醛的疼痛计分。加权平均(pain score) = $\sum pt/5$ (即5 min为单元, pt数值相加除5), p为大鼠特定疼痛反应的指数(如上0, 1, 2, 3), t为此行为反应所持续的时间。

1.2.3 取材: 实验组、对照组在相应时间段按50 mg/kg体质量注射盐酸氯胺酮麻醉后, 心脏取血处死。分别取胃及颌下腺组织放入预冷的0.01 mol/L PBS(pH7.4)中冲洗干净后放入液氮内保存。

■ 研发前沿

现已证明annexin 5蛋白在消化系统中广泛存在, 且应激状态下其表达水平显著变化, 因此, 研究应激状态下annexin 5表达变化可能有助于解释应激性消化系统疾病发生的机制。

■ 相关报道

刘婧 *et al*通过水浸束缚应激模型的研究表明细胞凋亡是急性胃黏膜损伤过程中细胞死亡的重要形式。Veenstra *et al*报道应激引发的胃肠道损伤可能是其引发胃肠道局部缺血所致。许多annexin蛋白家族的成员都参与了机体的应激反应。Wen *et al*报道annexin 5可通过与血管内皮生长因子受体(VEGFR)结合调节信号的传递, 并具有抗凝血作用。

■创新盘点

本研究首次在甲醛致炎的急性疼痛模型基础上研究annexin 5在消化器官中的表达,将有助于探讨应激对消化功能影响的具体机制,为研究功能性胃肠病提供新的线索。

表 1 急性疼痛应激后大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA相对表达量 ($n = 5$, mean \pm SD)

组织	对照组	实验组			
		1 h	6 h	24 h	72 h
胃	1.00	7.43 \pm 2.67 ^b	1.16 \pm 0.17	1.05 \pm 0.24	0.66 \pm 0.20
颌下腺	1.00	4.33 \pm 1.50 ^d	5.78 \pm 3.00 ^d	9.38 \pm 4.24 ^d	1.75 \pm 1.27

^b $P < 0.01$ vs 胃对照组; ^d $P < 0.01$ vs 颌下腺对照组。

1.2.4 总RNA的提取: 将胃或颌下腺组织在液氮中磨碎,按每50-100 mg组织加入0.5 mL TRIzol匀浆,最后补加0.5 mL TRIzol,样品的体积不应超过TRIzol体积的10%。然后,于4℃、12 000 g 离心15 min。取上清液置另一EP管中,每管加入0.2 mL氯仿,剧烈震荡15 s混匀。将匀浆的样品在室温下(15℃-30℃)放置3-5 min,使核酸蛋白质复合物完全分离。然后,于4℃、12 000 g 离心15 min,样品分为3层,底层为黄色的有机相,上层为无色的水相和一个中间相。RNA主要存在于水相中,将水相转移到新的EP管中,用异丙醇沉淀水相中的RNA,每用1 mL TRIzol加入0.5 mL的异丙醇,于室温放置10 min。然后于4℃、12 000 g 离心10 min,离心管底部会出现胶状RNA沉淀。移去上清,每管加入1 mL、750 mL/L的乙醇洗涤沉淀并于4℃、12 000 g 离心5 min。移去上清,沉淀在室温下干燥5-10 min,用适量的DEPC水溶解RNA沉淀,用分光光度计测其浓度及纯度。

1.2.5 反转录: 使用Promega A3500反转录试剂盒按照操作说明进行反转录反应。反应体系为: 5×AMV Buffer 5.0 μ L、10 mmol/L dNTP 2.5 μ L、Olig dT 1.0 μ L、焦磷酸钠2.5 μ L、AMV反转录酶1 μ L(10 U/ μ L), RNA模板3 μ g,加无核酶水至25 μ L。42℃反应60 min, 94℃ 5 min灭活反转录酶,反应产物于-20℃保存待用。

1.2.6 实时荧光定量PCR: 使用ABI Prism 7000 PCR仪按照以下条件进行荧光定量PCR反应。反应体系为: 2×Taq酶PCR反应混合液12.5 μ L、ddH₂O 6.5 μ L、引物1(10 pmol/L)1.5 μ L、引物2(10 pmol/L)1.5 μ L、Taqman探针(10 pmol/L)1.0 μ L、cDNA模板2.0 μ L。反应条件为: 94℃预变性2 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40个循环。反应结束后以Rpl19基因为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值法计算annexin 5 mRNA的相对含量。

统计学处理 全部数据均用SPSS15.0统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用LSD法, P 值反映各组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异有

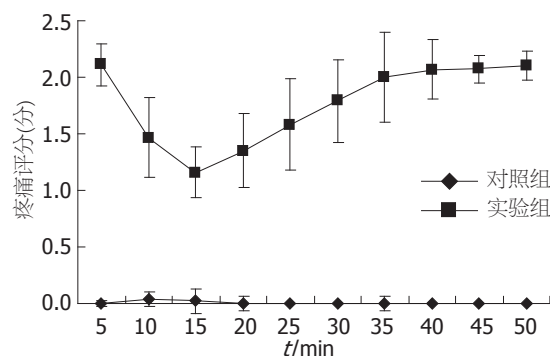


图 1 甲醛注射后对照组与实验组大鼠疼痛评分。

统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型制备情况 SD大鼠左后肢足底皮下注射甲醛后,均出现完全抬起,肢体颤抖、跛行,并舔、咬注射足等行为反应。这些行为呈明显的两期性反应。注射足在注射30 min后开始出现红肿,并且持续到第3天红肿仍不退去。对照组注射生理盐水后,无上述明显的疼痛行为反应。实验组大鼠疼痛评分显著高于对照组($P < 0.05$, 图1)。

2.2 实时荧光定量PCR结果 甲醛注射后1 h,胃组织中annexin 5 mRNA水平显著升高($P < 0.01$),至6 h恢复到正常水平($P > 0.05$)。甲醛注射后1 h,颌下腺中annexin 5 mRNA水平也显著升高($P < 0.01$),并持续到24 h,至72 h恢复到正常水平(表1)。

3 讨论

甲醛是一种常用的炎性介质,注射甲醛是诱导损伤疼痛及评价镇痛药效的一种常用的方法^[4-5]。本研究中,甲醛注射后大鼠的疼痛行为呈明显的两相期反应,与前人报道的一致,且实验组大鼠疼痛评分显著高于对照组,表明我们成功建立了甲醛致炎的急性疼痛模型。一般认为I期反应是由于注射器针头刺入皮下后初级传入神经纤维激活所致,II期反应可能是由于局部的一些活性物质,如局部5-HT的释放,导致初

级传入神经纤维敏化及脊髓背角神经元的激活引起的^[6]。急性应激状态下, HPA轴的激活是应激反应的主要特征, 甲醛注射能引起血清泌乳素(prolactin, PRL)和糖皮质激素(glucocorticoid, GC)短暂而迅速的升高^[7]。研究表明烧伤应激初期, CCK-8分泌增加^[8], CCK-8能增强甲醛诱导的疼痛反应, 并可导致胃动力紊乱^[9]。因此, 甲醛注射引起的急性疼痛应激可能对消化系统的功能造成一定的影响。

我们先前的研究表明, 甲醛注射引起的急性疼痛能诱导大鼠胃和颌下腺中annexin 5蛋白表达水平升高^[10]。本研究表明, annexin 5的这种变化起始于转录水平, 甲醛注射引起的疼痛应激可能通过迷走神经影响胃肠道的功能^[11]。甲醛注射1 h后胃和颌下腺中annexin 5 mRNA水平都显著升高, 但高水平的mRNA在胃中只维持1 h, 而在颌下腺中却能持续到24 h, 因此, 颌下腺对甲醛注射引起的急性疼痛较为敏感。这种不同的表达时相表明, 除了参与对疼痛应激的反应, annexin 5在胃及颌下腺中可能具有其他不同的生理功能。颌下腺不仅参与了消化功能, 其合成的生物活性物质, 如脑源性神经生长因子, 表皮生长因子等, 在应激状态下维持机体内环境的稳定及受损组织的修复方面起到重要的作用。

有研究表明去颌下腺大鼠睾丸中annexin 5表达水平升高^[12], 甲醛注射后annexin 5 mRNA水平的迅速变化也表明机体对伤害性刺激反应非常迅速, annexin 5可能是消化系统内的应激反应蛋白。胃中annexin 5 mRNA水平在6 h就恢复到正常水平, 72 h略低于对照组, 但统计分析表明其与对照组相比没有显著差异。而蛋白翻译水平6 h后显著增高, 并持续到24 h, 可能与胃消化功能的紊乱有关^[10]。颈交感干可能是甲醛注射影响颌下腺的分泌功能的途径之一。颌下腺在应激反应中具有独特的作用, 其annexin 5 mRNA水平一直持续到24 h, 这可能与颌下腺维持机体内稳态的功能有关。本研究进一步证明了annexin 5参与了大鼠胃及颌下腺对急性疼痛应激的反应, 且应激状态下annexin 5在mRNA水

平上的迅速反应表明其可能是消化系统的一种急性应激反应蛋白。但疼痛应激影响消化系统内annexin 5表达变化的体液和神经通路及具体的信号通路仍需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Ueyama T, Saika M, Koreeda C, Senba E. Water immersion-restraint stress induces expression of immediate-early genes in gastrointestinal tract of rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G287-G295
- 2 Barlow NJ, Phillips SL, Wallace DG, Sar M, Gaido KW, Foster PM. Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2003; 73: 431-441
- 3 Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174
- 4 Sakiyama Y, Sujaku T, Furuta A. A novel automated method for measuring the effect of analgesics on formalin-evoked licking behavior in rats. *J Neurosci Methods* 2008; 167: 167-175
- 5 McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13525-13530
- 6 Dickenson AH, Sullivan AF. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci Lett* 1987; 83: 207-211
- 7 Mravec B, Bodnár I, Tillinger A, Uhreczky G, Kvetnansky R, Palkovits M, Nagy GM. Prolactin response to formalin is related to the acute nociceptive response and it is attenuated by combined application of different stressors. *Neuroendocrinology* 2007; 86: 69-76
- 8 刘婧, 李兆申. 烧伤应激对胃动力的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 134-139
- 9 Torres-López JE, Juárez-Rojop IE, Granados-Soto V, Diaz-Zagoya JC, Flores-Murrieta FJ, Ortiz-López JU, Cruz-Vera J. Peripheral participation of cholecystokinin in the morphine-induced peripheral antinociceptive effect in non-diabetic and diabetic rats. *Neuropharmacology* 2007; 52: 788-795
- 10 卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 姚兵. 急性疼痛应激对SD大鼠胃及颌下腺组织annexin 5表达的影响. *临床检验杂志* 2009; 27: 212-215
- 11 Khasar SG, Reichling DB, Green PG, Isenberg WM, Levine JD. Fasting is a physiological stimulus of vagus-mediated enhancement of nociception in the female rat. *Neuroscience* 2003; 119: 215-221
- 12 王晨阳, 侯林, 徐会茹, 蒋超, 黄祝, 崔英霞, 戈一峰, 黄宇烽, 恽时锋, 姚兵. 去颌下腺对大鼠睾丸膜联蛋白5表达的影响. *医学研究生学报* 2007; 20: 700-703

■同行评价

本实验设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

斑蝥酸钠维生素B6联合X射线诱导肝癌细胞HepG2凋亡

赵航宇, 梁 健

■背景资料

斑蝥酸钠维生素B6是中药斑蝥的有效成分之一, 近年研究发现, 斑蝥酸钠维生素B6对肝癌等多种肿瘤细胞具有显著的杀伤作用, 已成为肿瘤治疗的一个新靶点。本课题组在体外实验研究中发现斑蝥酸钠维生素B6与X射线联合能够显著抑制肝癌细胞HepG2生长, 其抗癌主要机制是诱导细胞凋亡。

赵航宇, 梁健, 中国医科大学附属第四医院肝胆胰外科 辽宁省沈阳市 110032

辽宁省教育厅高校科研基金资助项目, No. 2009A729

作者贡献分布: 赵航宇与梁健对此文所作贡献均等; 此研究由赵航宇与梁健设计; 实验及数据分析由赵航宇完成; 本论文写作由赵航宇与梁健完成。

通讯作者: 梁健, 教授, 博士生导师, 110032, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第四医院肝胆胰外科. liangj63110@vip.sina.com

收稿日期: 2009-10-22 修回日期: 2009-11-14

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-11-18

Disodium Cantharidinate and Vitamin B6 Injection in combination with radiotherapy induces apoptosis and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma cell line HepG2

Hang-Yu Zhao, Jian Liang

Hang-Yu Zhao, Jian Liang, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation for Higher Education Institutions in Liaoning Province, No. 2009A729

Correspondence to: Professor Jian Liang, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. liangj63110@vip.sina.com

Received: 2009-10-22 Revised: 2009-11-14

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To explore the effects of Disodium Cantharidinate and Vitamin B6 Injection (Aiyishu) in combination with radiotherapy on cell proliferation and apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line HepG2.

METHODS: After HepG2 cells were incubated with different concentrations of Aiyishu injection, cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Twenty-four hours after incubation, cell radiosensitivity was evaluated by clonogenic assay. Early apoptosis was detected by annexin-V-FITC/propidium iodide double staining assay. Apoptotic cells were observed under a fluorescence microscope.

RESULTS: After 72 hours of incubation, Aiyishu injection (5.0 mg/L) significantly inhibited the growth of HepG2 cells, and the reduced rate of cell growth was 68%. Aiyishu injection in combination with radiotherapy showed stronger inhibitory effects on HepG2 cell growth than either Aiyishu injection or radiotherapy alone, suggesting that Aiyishu injection and radiotherapy have a synergistic effect on HepG2 cell proliferation. Flow cytometry analysis demonstrated that the apoptosis rates of HepG2 cells incubated with Aiyishu injection (2.5 mg/L) for 24 h or irradiated with X-ray (4 Gy) for 24 h were 11.15% and 10.10%, respectively. In contrast, HepG2 cells treated with Aiyishu injection (2.5 mg/L) for 24 h and then irradiated with X-ray (4 Gy) for 24 hours had an apoptosis rate of 23.75%. Clonogenic assay showed that Aiyishu injection could enhance the sensitivity of HepG2 cells to radiotherapy.

CONCLUSION: Aiyishu injection can significantly inhibit proliferation, induce apoptosis, and increase radiosensitivity of human hepatocellular carcinoma cells.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Cantharidin; Disodium cantharidinate; Vitamin B6; Apoptosis; X-ray

Zhao HY, Liang J. Disodium Cantharidinate and Vitamin B6 Injection in combination with radiotherapy induces apoptosis and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3332-3336

摘要

目的: 探讨斑蝥酸钠维生素B6(艾易舒)注射液联合放射疗法对人肝癌细胞HepG2的抑制作用。

方法: 采用MTT法观察不同浓度的斑蝥酸钠维生素B6注射液, 对HepG2生长的影响; 斑蝥酸钠维生素B6作用于HepG2细胞24 h后接受不同剂量的X射线照射, 克隆形成法检测放射增敏比, Annexin-V FITC/PI双染法检测HepG2的早期凋亡。倒置荧光显微镜观察肝癌细胞凋亡的形态学变化。

■同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

结果:斑蝥酸钠维生素B6组、放疗处理组及斑蝥酸钠维生素B6联合放疗组均对HepG2增殖产生抑制作用,与空白对照相比,斑蝥酸钠维生素B6对HepG2有明显抑制作用,并呈现浓度依赖性特点,斑蝥酸钠维生素B6浓度为5.0 mg/L、作用时间为72 h,斑蝥酸钠维生素B6对HepG2细胞的抑制率最大.斑蝥酸钠维生素B6与放疗联合处理组对HepG2的抑制率明显高于单纯斑蝥酸钠维生素B6组和单纯放疗组.提示斑蝥酸钠维生素B6与X射线对HepG2的抑制效果具有协同作用.流式细胞分析显示:2.5 mg/L斑蝥酸钠维生素B6作用于HepG2细胞24 h后,11.15%的肝癌细胞发生凋亡.4 Gy的X射线作用HepG2细胞24 h,10.10%的肝癌细胞发生凋亡.5.0 mg/L斑蝥酸钠维生素B6作用于HepG2细胞24 h后对其行X射线照射,23.75%的细胞发生凋亡.克隆形成实验结果显示,斑蝥酸钠维生素B6可以增强肝癌细胞的放射敏感性.

结论:斑蝥酸钠维生素B6能够显著抑制HepG2增殖,诱导HepG2凋亡,增强HepG2对X射线照射的敏感性,具有临床意义.

关键词:斑蝥素;肝细胞癌;斑蝥酸钠;维生素B6;凋亡;X射线

赵航宇, 梁健. 斑蝥酸钠维生素B6联合X射线诱导肝癌细胞HepG2凋亡. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3332-3336
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3332.asp>

0 引言

肝癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一,全世界每年约有55万新增肝癌患者,其中54%发生在我国^[1]. 外科手术治疗目前仍是肝癌治疗的首选措施和最有效的手段. 由于肝癌早期缺乏特异的症状,大多数患者就诊时已属中晚期,通常只有10%-30%的患者能接受根治性切除手术,导致肝癌患者的整体预后很差,平均存活时间3 mo左右^[2]. 目前普遍认为,只有通过综合性治疗才能真正提高肝癌患者生存期. 近年的研究发现,放射治疗对肝癌有效,但是其遇到棘手的问题,如果采用正常肝组织能够耐受的照射剂量进行放疗,肿瘤治愈率很低,否则将严重损伤正常肝组织. 中医药在肝癌的治疗中发挥着不可替代的作用,中西医结合治疗已成为肝癌治疗的一种重要手段^[3]. 斑蝥素(cantharidin, CTD)为我国传统中药斑蝥的活性成分,临床上对多种肿瘤治疗有一定疗效,并且具有升高白细胞而无骨髓抑制等优点^[4-5]. 斑蝥素的抗肿瘤

作用机制目前尚不十分清楚,有研究提示可能与其抑制蛋白磷酸酶有关^[6]. 斑蝥酸钠(sodium cantharidate, SCA)系斑蝥素的半合成药物,具有提高机体的免疫力,升高白细胞等疗效,多用于中晚期恶性肿瘤的治疗^[7]. 斑蝥酸钠维生素B6注射液(商品名:艾易舒)是由斑蝥酸钠和维生素B6配制的注射液,临床上应用于多种肿瘤的治疗. 本研究旨在通过动态观察不同剂量的斑蝥酸钠维生素B6对肝癌细胞HepG2生长的影响,探讨斑蝥酸钠维生素B6与放疗结合治疗肝癌是否具有协同性,为临床肝癌的综合治疗提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝细胞癌细胞株HepG2(下称HepG2)由中国医科大学细胞学教研室惠赠. 斑蝥酸钠维生素B6注射液(贵州柏强制药有限公司). DMEM培养基(美国Gibco公司),胎牛血清(天津瀚洋生物制品有限公司),Annexin-V FITC/PI双染试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: HepG2培养于100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基内,置于37℃、饱和湿度,50 mL/L CO₂孵育箱中常规培养. 取指数生长期细胞进行细胞实验.

1.2.2 X线照射条件: 6 mV的德国西门子PRIMUS医用电子直线加速器,剂量率200 cGy/min,靶距50 cm,照射时上下分别覆盖1.5 cm厚的补偿胶.

1.2.3 细胞增殖实验(MTT): 取指数生长期的HepG2,制成 1×10^7 /L单细胞悬液,接种于96孔板中,每孔200 μ L,弃上清(培养液). 根据斑蝥酸钠维生素B6的浓度分为:对照组、5.0 mg/L组、2.5 mg/L组、1.0 mg/L组,每组3孔,在细胞孵育3、6、12、24、48、72 h后每孔分别加入5 g/L浓度的MTT 20 μ L,孵育4 h,弃上清,加200 μ L二甲基亚砜(DMSO),置于微量振荡器振荡5 min混匀,用酶联免疫检测仪测波长570 nm的吸光度值. 每组实验重复3次取均值. 抑制率 = [(对照组A值-空白组A值)-(给药组A值-空白组A值)]/(对照组A值-空白组A值) \times 100%.

1.2.4 Annexin-V FITC/PI法检测凋亡: 取指数生长期的HepG2,制成 1×10^8 /L单细胞悬液,当细胞生长至80%汇合时,各组分别给予以下处理因素,实验分4组: (1)对照组; (2)X射线照射组; 2、4、8 Gy单剂量X射线照射,分别于照射后24、48和72 h收集HepG2细胞; (3)斑蝥酸钠维生素B6处理组: 以5.0 mg/L, 2.5 mg/L, 1.0 mg/L浓度的斑蝥酸钠维生素B6处理HepG2细胞,处理后

■ 研发前沿

近来研究认为肝癌是放疗敏感肿瘤,肝癌的放射治疗越来越受到人们的重视,如何减少放射剂量,达到相同的治疗效果,减少放疗造成的全身免疫反应是目前研究的热点,如果能从细胞凋亡及细胞周期角度进一步研究二者联合作用的机制,将会为肝癌治疗提供新的途径.

■相关报道

国内外有关报道提示斑蝥酸钠维生素B6对多种肿瘤细胞有显著抑制作用,诱导肿瘤细胞凋亡,但对于斑蝥酸钠维生素B6的放射增敏作用尚鲜有报道。

表 1 MTT法检测不同浓度的斑蝥酸钠维生素B6作用不同时间对HepG2的抑制率 (%)

	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
斑蝥酸钠维生素B6浓度(mg/L)						
5.0	0.11 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.03 ^a	0.58 ± 0.03 ^a	0.65 ± 0.04 ^a
2.5	0.08 ± 0.02 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.46 ± 0.01 ^a	0.55 ± 0.02 ^a
1.0	0.06 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.03 ^a	0.28 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.02 ^a
对照组	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.12 ± 0.03

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表 2 不同处理因素作用HepG2后2 wk的集落形成数 (mean ± SD)

斑蝥酸钠维生素B6	0 Gy	2 Gy	4 Gy
无	101.7 ± 6.7	81.0 ± 4.6	30.6 ± 4.5
有	59.0 ± 4.6 ^b	31.0 ± 3.0 ^b	6.0 ± 1.0 ^b

^b $P < 0.01$ vs 无斑蝥酸钠维生素B6组。

24、48和72 h收集HepG2细胞; (4)X线照射+斑蝥酸钠维生素B6组: 在4 Gy的X射线照射前24 h加入2.5 mg/L的斑蝥酸钠维生素B6, 处理后24、48和72 h收集HepG2细胞。采用1000 g离心5 min, 弃上清, 收集细胞, 用PBS重悬细胞并计数。取5-10(万)重悬的细胞, 1000 g离心5 min, 弃上清, 加入195 μL Annexin-V FITC结合液重悬细胞, 加入5 μL Annexin-V FITC, 轻摇混匀。20℃-25℃避光孵育10 min, 加入10 μL碘化吡啶染色液, 轻摇混匀, 冰浴避光保存。随即进行流式细胞仪检测, 每组实验重复3次取平均值。

1.2.5 荧光显微镜检测: 按照Annexin-V FITC试剂盒说明, 对24孔板中HepG2进行Annexin-V FITC/PI染色, 在Olympus IX-70型倒置荧光显微镜下观察细胞形态学变化。

1.2.6 克隆形成实验: 当HepG2细胞生长至80%汇合时, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化, 制备单细胞悬液, 分为实验组、阴性对照组和空白对照组, 将每组细胞再分为3个小组, 接种于6孔板, 每小组3个复孔, 10 000个细胞/孔。培养48 h后分别进行0、2、4 Gy剂量的X射照射, 照射处理后细胞再培养2 wk, 计数大于50个细胞的集落数。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件, 数据以mean ± SD表示, 进行各组间 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT法检测斑蝥酸钠维生素B6对HepG2生

长的抑制率 统计比较了不同浓度的斑蝥酸钠维生素B6、在不同作用时间点对HepG2的抑制率。实验结果发现, 与对照组相比, 斑蝥酸钠维生素B6对HepG2生长有明显抑制作用, 随着斑蝥酸钠维生素B6浓度的增加, 以及作用时间的延长, 斑蝥酸钠维生素B6对HepG2细胞的抑制作用逐渐增强。当斑蝥酸钠维生素B6浓度为5.0 mg/L, 作用时间为72 h, 对HepG2细胞的抑制率最大。实验结果提示斑蝥酸钠维生素B6对HepG2生长具有明显的抑制效应, 且呈浓度依赖性。不同浓度之间有显著性差异, 3个不同浓度组与对照组之间比较差异均有显著性差异($P < 0.05$, 表1)。

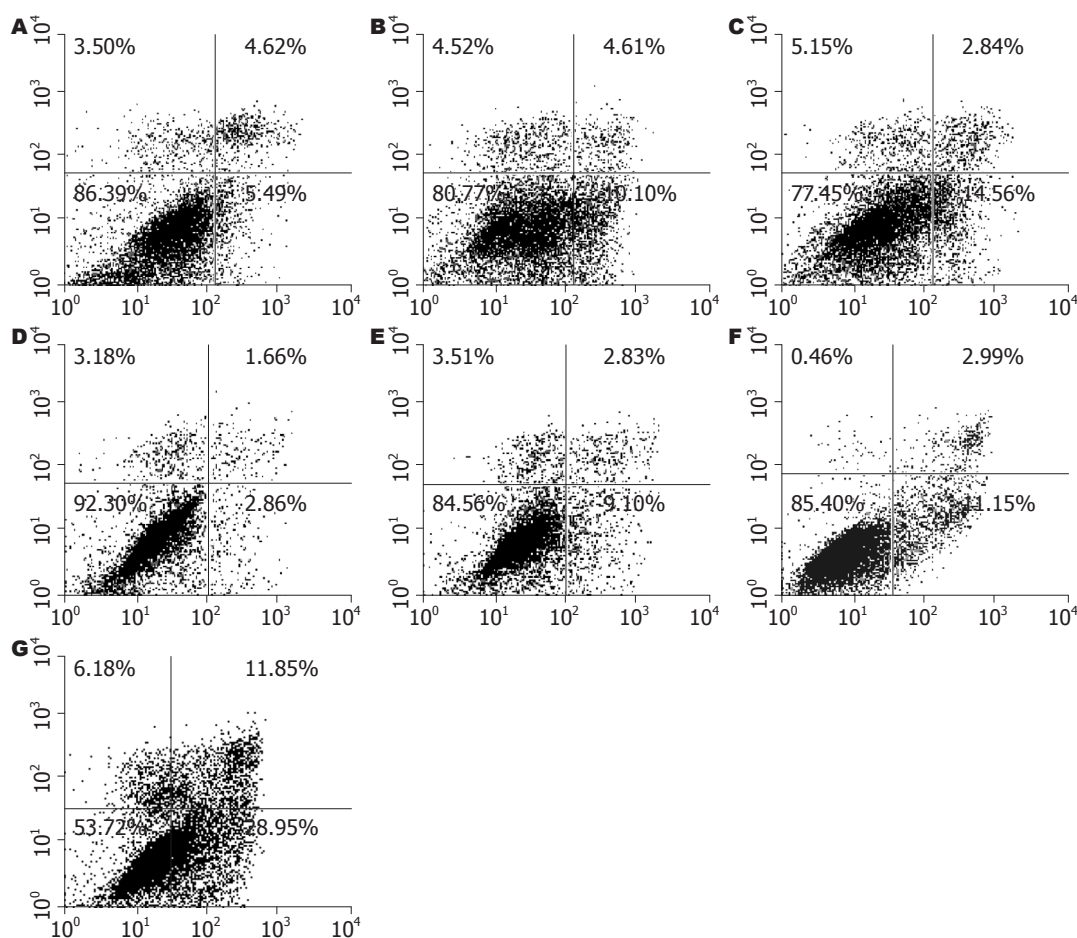
2.2 斑蝥酸钠维生素B6与放疗联合作用对HepG2细胞集落形成的影响 经2 Gy或4 Gy剂量X射线照射后, 经2.5 mg/L斑蝥酸钠维生素B6处理的各组HepG2细胞集落形成数量明显低于无艾易舒处理的各组, 具有统计学差异($P < 0.01$), 提示斑蝥酸钠维生素B6具有提高放射线对HepG2细胞生长的抑制作用(表2)。

2.3 斑蝥酸钠维生素B6及X射线处理HepG2细胞(24 h)各组的凋亡率(%) 实验结果提示, 右上象限为坏死率, 右下象限为凋亡率, 左下象限为正常细胞所占比例。左上象限为可以允许的细胞机械损伤率(图1)。

2.4 倒置荧光显微镜观察细胞凋亡的形态学改变 通过倒置荧光显微镜观察Annexin-V FITC/PI染色的HepG2细胞形态学变化。未破坏的细胞不被Annexin-V FITC/PI染色, 凋亡细胞被染成绿色, 坏死细胞核被染成红色。实验结果发现: 除对照组外, 各组HepG2细胞以不同程度的凋亡改变为主(细胞被染成绿色), 凋亡率高的HepG2细胞间常可见核被染成红色的坏死细胞(图2)。

3 讨论

放射治疗是恶性肿瘤综合治疗的主要方法之一, 肝脏曾一度被看做是放射抗拒器官, 认为肝癌



应用要点

本文研究了斑蝥酸钠维生素B6联合放疗治疗人肝癌细胞凋亡的有效浓度和剂量关系, 初步探讨了其治疗作用的机制, 为斑蝥酸钠维生素B6联合放疗治疗肝癌提供了理论依据, 为进一步研究分子机制奠定基础。

图 1 各组均为处理后24 h, HepG2细胞凋亡率。A-C: 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy的X射线处理组; D: 对照组; E-F: 2.5 mg/L, 5.0 mg/L浓度斑蝥酸钠维生素B6处理组; G: 2.5 mg/L浓度斑蝥酸钠维生素B6加4 Gy的X射线作用组。

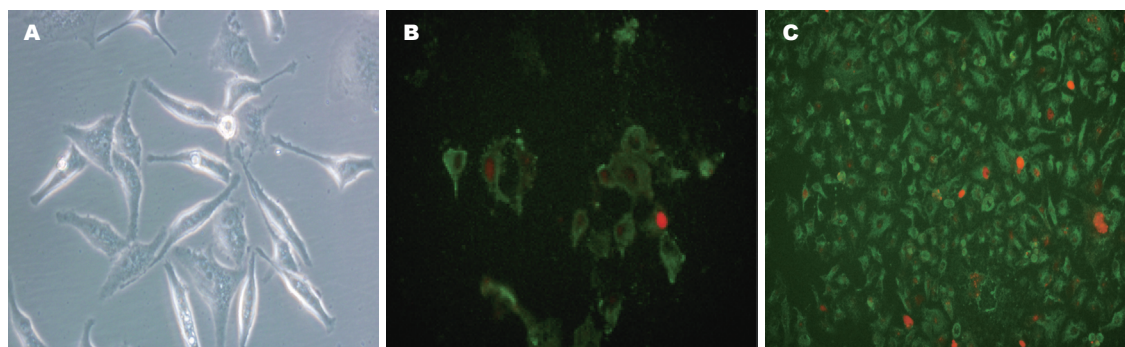


图 2 倒置荧光显微镜观察的Annexin-V FITC/PI染色的HepG2细胞形态学变化。A: 未破坏的HepG2细胞($\times 400$); B: 凋亡及坏死HepG2细胞($\times 400$); C: 凋亡及坏死HepG2细胞($\times 200$)。

不适用于放射治疗。20世纪90年代以来, 随着放疗设备的发展、肿瘤综合治疗理念的增强, 以及放射生物学研究证实肝细胞癌属于放射敏感肿瘤, 肝癌的放疗效果重新得到肯定^[8]。辐射作为一种基因毒剂(genotoxic agents), 可诱导正常组织细胞和肿瘤细胞凋亡^[9]。放射治疗是治疗恶性肿瘤的重要手段之一, 诱发细胞凋亡是导致肿瘤细胞死亡的主要形式。有研究表明, 斑蝥酸钠可以诱导肝癌细胞凋亡^[10], 斑蝥酸钠维生素

B6注射液是斑蝥酸钠和维生素B6的螯合物, 其诱导肝癌细胞凋亡的研究目前少有报道。

斑蝥酸钠维生素B6与放射治疗作为肝癌综合治疗的手段, 两者之间是否有协同作用, 主要作用机制如何, 目前未见报道。我们的前期研究表明, 斑蝥酸钠维生素B6对肝癌细胞HepG2具有抑制作用, 通过诱导肿瘤细胞凋亡, 达到治疗肝癌的效果。本研究采用MTT法及流式细胞分析结果提示: 斑蝥酸钠维生素B6处理肝癌细胞

■同行评价

本研究为肝癌的斑蝥酸钠维生素B6联合放疗方案提供了一定的实验依据,有一定的临床价值,希望今后在研究的深度上进一步完善。

HepG2后,对细胞生长产生了明显的抑制作用,克隆形成实验结果显示斑蝥酸钠维生素B6联合放疗组的细胞集落明显少于单纯放疗组,有统计学差异。

随着X射线剂量的增大,对于肝癌细胞的抑制作用也愈大,但是对正常肝细胞的损伤也愈大,同时也增加了放疗造成的全身免疫抑制作用,我们选用中等剂量(2.5 mg/L)的斑蝥酸钠维生素B6联合X射线,共同作用于肝癌细胞,这样就减少了放疗剂量,在使用较小X射线照射剂量的前提下提高了对肝癌细胞的抑制率,如流式细胞仪分析所示:2.5 mg/L的斑蝥酸钠维生素B6联合4 Gy的X射线作用于肝癌细胞24 h,凋亡率为28.95%,明显高于4 Gy的X射线作用于肝癌细胞24 h的凋亡率(10.10%),在降低放射线剂量的同时,既达到了放疗效果,同时也减轻了对正常肝细胞的损伤。

桂尤胜 *et al*^[11]报道斑蝥酸钠在体外作用于人肝癌细胞系Bel-7402可诱导肝癌细胞的凋亡,抑制肝癌细胞的生长增殖。其作用机制可能是诱导肝癌细胞发生了G₂期阻滞。房德芳 *et al*^[12]的研究表明:斑蝥酸钠对于肝癌细胞HepG2有较强的抑制作用。陈昱明 *et al*^[13]报道,斑蝥酸钠注射液配合放疗治疗中晚期恶性肿瘤(肺癌、鼻咽癌、乳腺癌、食管癌等),能提高治疗效果,降低放疗不良反应,改善患者生活质量,具有抗肿瘤和免疫调节双重作用。

本实验的结果表明,斑蝥酸钠维生素B6与X射线联合作用的效果明显优于斑蝥酸钠维生素B6或X射线单独应用对于肝细胞癌细胞HepG2

效果,其机制可能与二者之间具有协同作用,进一步上调了诱导肝癌细胞凋亡的程度,协同作用的分子生物学和细胞生物学机制还有待于进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8: S4-S66
- 2 刘允怡, 赖俊雄. 肝癌治疗新进展. *临床外科杂志* 2007; 15: 2-7
- 3 骆丹, 叶丽红. 中药治疗肝癌在实验研究领域的发展现状及趋势. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2964-2968
- 4 Wang CC, Wu CH, Hsieh KJ, Yen KY, Yang LL. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells. *Toxicology* 2000; 147: 77-87
- 5 Wang GS. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J Ethnopharmacol* 1989; 26: 147-162
- 6 Sakoff JA, Ackland SP, Baldwin ML, Keane MA, McCluskey A. Anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition of a new generation of cantharidin analogues. *Invest New Drugs* 2002; 20: 1-11
- 7 孙伟芬, 黄伟贤, 王惠杰, 李毅俊. 斑蝥酸钠注射液治疗晚期癌症的临床观察. *中国医院药学杂志* 2001; 21: 427
- 8 曾昭冲. 肝细胞癌的放射治疗. *实用肿瘤杂志* 2007; 22: 380-384
- 9 Maity A, Kao GD, Muschel RJ, McKenna WG. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37: 639-653
- 10 高伟, 郑军. 斑蝥酸钠抑制人肝癌HepG₂细胞增殖及其机制的研究. *重庆医科大学学报* 2008; 33: 1356-1358
- 11 桂尤胜, 曹献英, 陈筠. 斑蝥酸钠体外诱导肝癌细胞凋亡的实验研究. *武汉大学学报(医学版)* 2004; 25: 493
- 12 房德芳, 王明艳. 斑蝥酸钠抑制肝癌细胞生长的实验研究. *辽宁中医杂志* 2007; 34: 845-847
- 13 陈昱明, 刘树佳, 贾筠. 斑蝥酸钠注射液配合放疗治疗中晚期恶性肿瘤23例. *中国药业* 2001; 10: 33

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》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。(科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

Tiam1与大肠癌细胞EMT的关系

王雅娟, 胡洁, 赵海燕, 韩慧霞

王雅娟, 胡洁, 赵海燕, 韩慧霞, 南方医科大学病理学系 广东省广州市 510515

作者贡献分布: 此课题由韩慧霞设计主持; 由王雅娟、胡洁及赵海燕操作完成; 由王雅娟撰写论文。

通讯作者: 韩慧霞, 教授, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学病理学系. hhxia@fimmu.com

电话: 020-62789370

收稿日期: 2009-09-20 修回日期: 2009-10-26

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

Correlation between Tiam1 expression and epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer cell lines

Ya-Juan Wang, Jie Hu, Hai-Yan Zhao, Hui-Xia Han

Ya-Juan Wang, Jie Hu, Hai-Yan Zhao, Hui-Xia Han, Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Professor Hui-Xia Han, Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. hhxia@fimmu.com

Received: 2009-09-20 Revised: 2009-10-26

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To explore the correlation between Tiam1 (T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1) expression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in six colorectal cancer cell lines with different metastatic potential.

METHODS: The expression of Tiam1, E-cadherin and vimentin mRNAs in six human colorectal cancer cell lines was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of Tiam1, E-cadherin and vimentin proteins in LoVo and HT29 cells was detected by immunohistochemistry. The cytoskeleton of LoVo and HT29 cells was observed by Coomassie brilliant blue staining.

RESULTS: The expression levels of Tiam1, E-cadherin and vimentin mRNAs in SW620, SW480/M5, HT29, LoVo and LS174T cells were significantly different from those in SW480 cells (Tiam1: 0.51, 7.67, 0.00, 0.36 and 0.06 vs 1.00;

E-cadherin: 3.18, 2.27, 5.92, 0.00 and 0.61 vs 1.00; vimentin: 6.08, 0.02, 0.35, 11.72 and 0.00 vs 1.00; all $P < 0.05$). E-cadherin protein was moderately expressed in the cytoplasm of HT29 cells, while Tiam1 and vimentin proteins were not detectable in HT29 cells. Tiam1 and vimentin proteins were moderately and strongly expressed in the nuclei of LoVo cells, respectively, while E-cadherin protein was undetectable in LoVo cells. HT29 cells had more surface projections, and less cytoskeletal structures and spot-like actin bodies than LoVo cells.

CONCLUSION: Tiam1 promotes the metastasis of colorectal carcinoma possibly by inducing EMT.

Key Words: Tiam1; Epithelial-mesenchymal transition; Colorectal carcinoma

Wang YJ, Hu J, Zhao HY, Han HX. Correlation between Tiam1 expression and epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3337-3341

摘要

目的: 探讨Tiam1和EMT在不同转移能力的大肠癌细胞中的关系。

方法: 用Real time-RT PCR法分析Tiam1 mRNA, Ecadherin mRNA和Vimentin mRNA在6种大肠癌细胞系中的表达; 通过免疫组织化学检测Tiam1, Ecadherin和Vimentin在LoVo和HT29中的表达。通过考马斯亮蓝染色观察LoVo和HT29的细胞骨架。

结果: 在SW620, SW480/M5, HT29, LoVo和LS174T中, Tiam1 mRNA的表达水平分别是SW480的0.51, 7.67, 0.00, 0.36, 0.06倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); Ecadherin mRNA的表达水平分别是SW480的3.18, 2.27, 5.92, 0.00, 0.61倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); Vimentin mRNA的表达水平分别是SW480的6.08, 0.02, 0.35, 11.72, 0.00倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。细胞免疫组织化学显示LoVo细胞的Tiam1表达呈阳性(++), Vimentin表达呈

■背景资料

大肠癌是发病率非常高的恶性肿瘤, 其侵袭和转移是一个复杂过程。近年研究Tiam1与肿瘤的侵袭转移有关, 而EMT被看成导致肿瘤进展的病理过程, 特别是他与侵袭和转移有关系。本文探讨了Tiam1和EMT在不同转移能力的大肠癌细胞中的关系。

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研究前沿

在大肠癌侵袭研究领域, Tiam1基因和上皮细胞间质转化(EMT)成为近年研究热点. 大肠癌中高表达Tiam1的细胞也高表达Vimentin, 具有更多的转移表型, 同时Ecadherin的表达减少, 发生了EMT.

强阳性(+++), Ecadherin表达阴性(-); HT29细胞的Ecadherin表达呈阳性(++), Tiam1和Vimentin表达阴性(-). LoVo细胞质中丝网状的骨架蛋白结构及点状肌动蛋白小体比HT29多.

结论: Tiam1促进大肠癌转移的机制可能与EMT发生有关.

关键词: Tiam1基因; 上皮-间质转化; 大肠癌

王雅娟, 胡洁, 赵海燕, 韩慧霞. Tiam1与大肠癌细胞EMT的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3337-3341

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3337.asp>

0 引言

Tiam1基因(T lymphoma invasion and metastasis)是从鼠T淋巴瘤中克隆出来的基因, 全称T淋巴瘤侵袭转移诱导因子1^[1]. 近年有研究显示其在多种恶性肿瘤组织中呈阳性表达并与肿瘤侵袭转移密切相关, 结肠癌中高表达Tiam1的细胞也高表达Vimentin, 具有更多的转移表型, 同时Ecadherin的表达减少^[2]. Ecadherin的表达减少时可破坏细胞间的黏附作用, 使细胞获得易于侵袭和转移的特性, 其表达的丢失已被认为是上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)最显著的特征^[3]. 通过前期实验, 我们得出Tiam1与大肠癌的分化和转移有关, 其促进大肠癌转移的机制可能与EMT发生有关^[4]. 在本研究中, 我们通过观察Tiam1, Ecadherin和间充质细胞标志Vimentin^[5]在不同转移能力的大肠癌细胞系中的表达, 探讨Tiam1和EMT在不同转移能力的大肠癌细胞中的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基购自莱德尔生物公司; 新生牛血清购自吉泰公司; TRIzol试剂购自南京凯基公司; Reverse Transcription System试剂盒、SYBR Premix ExTaqTM试剂盒购自TaKaRa公司; Tiam1、Ecadherin、Vimentin和GAPDH引物由上海英骏公司合成; 浓缩型兔抗人Tiam1多克隆抗体购自Santa Cruz公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人大肠癌细胞系SW480、SW620、SW480/M5、LoVo、HT29、LS174T为本室冷冻保存, 其中SW480/M5为本科室前期筛选的具有高选择性肝脏转移特性的SW480亚系^[6]; 采用含20%新生牛血清的RPMI 1640培养基, 至37℃、50 mL/L CO₂培养箱内培养.

1.2.2 Real-time RT-PCR检测大肠癌细胞系中Tiam1, Ecadherin, Vimentin表达: 参照说明书, 用TRIzol试剂常规提取细胞总RNA. 按照逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应. 反应总体积为20 μL, 其中样品总RNA 2 μL, 5×Prime Script 4 μL, PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 1 μL, Random 6 mers 1 μL, Oligo dT Primer 1 μL, DEPC水11 μL. 37℃反应15 min, 85℃灭活5 s. 看家基因GAPDH为内对照. 通过相对荧光定量PCR方法, 同时对Tiam1, Ecadherin, Vimentin和GAPDH进行检测, 计算出不同样本的Tiam1, Ecadherin, Vimentin的相对表达量. 采用Primer 5.0设计引物, Tiam1的上游引物为5'-AAGACGTACTCAGGCCATGTCC-3', 下游引物为5'-GACCCAAATGTCGCAGTCAG-3', 产物长度为252 bp; Ecadherin的上游引物为5'-CGGTGGTCAAAGAGCCCTTA-3', 下游引物为5'-TGAGGGTTGGTGCAACGTCGTTA-3', 产物长度为170 bp; Vimentin的上游引物为5'-TGAGTACCGGAGACAGGTCGAG-3', 下游引物为5'-TAGCAGCTTCAACGCAAAGTTC-3', 产物长度为119 bp; GAPDH上游引物为5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3', 下游引物为5'-GA CAAGCTTCCCGTTCTCAG-3', 产物长度为259 bp. 应用Mx3000P定量PCR仪(Stratagene)进行Real-time PCR实验, 反应条件为95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 72℃ 10 s, 40个循环. 以Folds = 2^{-ΔΔCt}表示实验组与对照组目的基因表达的倍数比关系, 公式如下ΔΔCt = [Ct(target gene)-Ct(GAPDH)]实验组-[Ct(target gene)-Ct(GAPDH)]对照组^[7]. 重复3次实验, 计算平均值. 我们发现SW480的各项指标表达量居中, 考虑到统计结果的直观性, 选择SW480为对照组, SW620, SW480/M5, LoVo, HT29, LS174T为实验组.

1.2.3 免疫组织化学方法检测大肠癌细胞Tiam1, Ecadherin, Vimentin的表达: 制作细胞爬片, 950 mL/L乙醇固定10 min, 余按试剂盒说明书操作. Tiam1, Ecadherin, Vimentin抗体工作浓度均为1:100, DAB显色, 苏木素复染, 中性树脂封固. 以PBS液取代一抗作阴性对照. 以棕黄色为阳性信号, 按照染色深浅, 分为阴性(-)、弱阳性(+), 阳性(++)和与强阳性(+++), 棕黄色越深代表阳性越强.

1.2.4 考马斯亮蓝染色观察大肠癌细胞骨架: 培养细胞爬片, PBS洗涤3次, 每次5 min, 950 mL/L乙醇固定10 min后PBS洗涤3次, 4 min/次, 1.5% Triton振荡洗涤3次, 每次8 min, PBS洗涤3次, 每

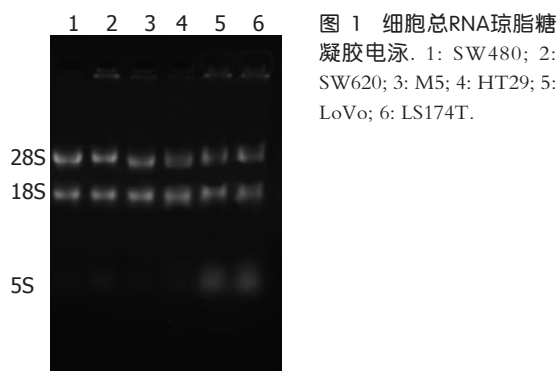


图1 细胞总RNA琼脂糖凝胶电泳. 1: SW480; 2: SW620; 3: M5; 4: HT29; 5: LoVo; 6: LS174T.

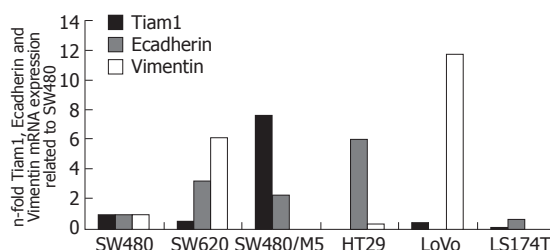


图2 荧光定量PCR检测大肠癌细胞系中Tiam1, Ecadherin和Vimentin的表达.

■ 相关报道

Tiam1和EMT与肿瘤的侵袭转移有关已被广泛认识, 以往的研究显示侵袭能力强的人大肠癌细胞株, 其Tiam1的表达高于侵袭能力弱的人大肠癌细胞株, 发生EMT时, 肿瘤细胞侵袭转移能力更强.

次5 min, 考马斯亮蓝染液染色40 min, PBS洗去多余的染液, 空气干燥, 二甲苯透明, 中性树脂封片.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件包进行处理, Real-time RT-PCR的结果采用非参数Kruskal-Wallis H检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 6种大肠癌细胞总RNA的提取 细胞总RNA琼脂糖凝胶电泳可见清晰的28S、18S条带(图1).

2.2 Tiam1, Ecadherin, Vimentin在各细胞系中的表达 细胞总mRNA经逆转录成cDNA后, 进行Real-time PCR检测. 通过对获得的样本Ct值进行相对定量计算分析, 结果发现SW620, SW480/M5, HT29, LoVo和LS174T中Tiam1 mRNA的表达水平分别是SW480的0.51, 7.67, 0.00, 0.36, 0.06倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$). SW620, SW480/M5, HT29, LoVo和LS174T中Ecadherin mRNA的表达水平分别是SW480的3.18, 2.27, 5.92, 0.00, 0.61倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$). SW620, SW480/M5, HT29, LoVo和LS174T中Vimentin mRNA的表达水平分别是SW480的6.08, 0.02, 0.35, 11.72, 0.00倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图2).

2.3 细胞免疫组织化学结果 LoVo细胞的Tiam1表达呈阳性(++), Vimentin表达呈强阳性(+++), 都定位于胞质, Ecadherin表达呈阴性(-); HT29细胞的Ecadherin表达呈阳性(++), 定位于胞膜上, Tiam1和Vimentin表达阴性(-)(图3).

2.4 考马斯亮蓝染色观察细胞骨架蛋白 LoVo细胞为长梭形或星芒状, 两端有较长较细的突起, 细胞质内可见骨架蛋白成蓝色丝网状结构, 胞核周围可见点状肌动蛋白小体, HT29细胞大多呈椭圆形, 细胞质少, 丝网状的骨架蛋白结构及点状肌动蛋白小体少(图4).

3 讨论

近年研究显示Tiam1对于控制细胞形态、黏附

和运动以及信号传导都有重要作用, 并能够诱导肿瘤细胞的侵袭转移. 其在肺癌、乳腺癌、卵巢癌、喉癌、结肠癌等多种恶性肿瘤组织中呈阳性表达并与侵袭转移密切相关. 侵袭能力强的人大肠癌细胞株, 其Tiam1的表达高于侵袭能力弱的人大肠癌细胞株, Tiam1基因沉默的人大肠癌细胞株, 其体外生长及侵袭能力均被抑制, 肿瘤转移率明显降低, 大肠癌细胞向肺及肝转移的能力均被抑制^[8-9].

EMT是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间充质细胞转分化的现象, 2003年的第一届关于EMT的Boden国际会议提出形态学和侵袭运动方面的4个标准来判断细胞是否发生了EMT: (1)细胞极性的丧失; (2)伸长的细胞形态; (3)出现丝状伪足; (4)侵袭运动性^[10]. EMT被看成导致癌症进展的病理过程, 特别是他与侵袭和转移有关系. 发生EMT时, 上皮细胞极性丧失, 与周围细胞和基质的接触减少, 细胞间的黏附和相互作用减少, 而细胞迁移和运动的能力增强, 同时细胞表型发生改变, 丧失了上皮表型, 如Cytokeratin, Ecadherin的逐渐丧失, 而获得间质表型, 如Vimentin, Fibronectin, α -SMA的表达等. 其中Ecadherin表达的丢失已被认为是EMT最显著的特征.

本研究通过Real-time RT-PCR检测6种大肠癌细胞Tiam1, Ecadherin, Vimentin的表达. 一般来源于肿瘤转移灶的细胞系, 其侵袭转移能力在体外高于原发灶来源的细胞系. 其中SW480, HT29和LS174T来源于肿瘤原发病灶, 其侵袭转移能力较弱; SW620和LoVo来源于大肠癌患者的淋巴结转移灶, 侵袭转移能力强; SW480/M5是本实验室前期利用裸鼠体内连续传代的方法从SW480细胞系中筛选出具有肝转移倾向的亚克隆细胞系SW480/M5, 也具有较强的侵袭转移能力.

结果发现LoVo细胞在高表达Vimentin的同时, Ecadherin的表达量是SW480的0.00倍, 表

■创新盘点

本研究中首次报道Tiam1, Ecadherin和Vimentin在不同转移能力的大肠癌细胞中的表达, 探讨关于Tiam1和EMT在大肠癌侵袭转移中的共同作用。

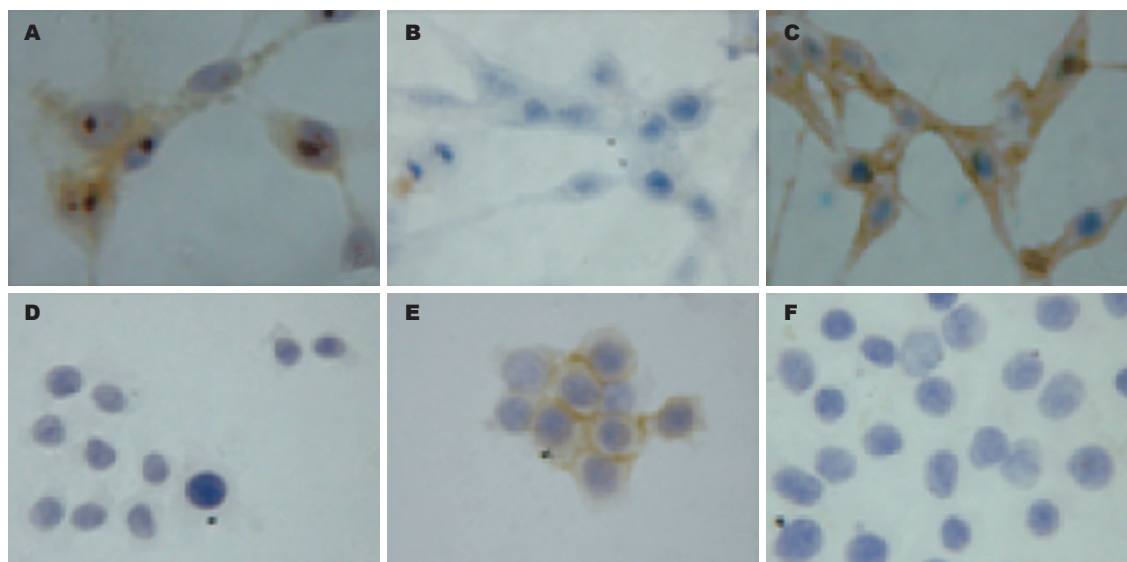


图3 免疫组织化学检测Tiam1, Ecadherin和Vimentin在大肠癌细胞中的表达, 棕色为阳性信号. A: LoVo/Tiam1; B: LoVo/Ecadherin; C: LoVo/Vimentin; D: HT29/Tiam1; E: HT29/Ecadherin; F: HT29/Vimentin.

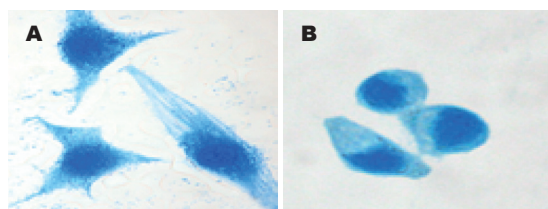


图4 考马斯亮蓝染色观察细胞骨架蛋白. A: LoVo细胞; B: HT29细胞.

示几乎不表达, 符合细胞发生EMT时的特征. 在HT29和SW480/M5中, Vimentin表达很低, Ecadherin表达高, 与EMT的特征相反. 但是另3种细胞并不属于以上两种情况. EMT能促进肿瘤的侵袭转移, 我们推测LoVo细胞较强的侵袭转移能力可能与EMT有关, 虽然SW480/M5也具有较弱的侵袭转移能力, 但是其表现出了与EMT相反的特征, Vimentin表达很低, 有文献报道Vimentin基因的甲基化有利于结肠癌细胞通过腹腔播散或是发生肝脏转移^[11], SW480/M5出现这种情况可能与Vimentin甲基化有关, 其侵袭转移能力可能与EMT无关. HT29表现出了与EMT相反的特征, 符合非EMT细胞其侵袭转移能力较弱的观点. 那么, Tiam1与大肠癌细胞EMT有无关联呢? 我们发现LoVo高表达Tiam1, 而HT29几乎不表达Tiam1, 这与我们推测的Tiam1可能通过使肿瘤细胞发生EMT增强其运动能力, 促进其转移的观点相符合. 但是在另外的4种细胞中我们并没有发现这种现象. 因此, 我们推测Tiam1通过EMT促进LoVo和HT29这两种细胞的侵袭转移. 我们选择这两种细胞进一

步免疫组织化学检测, 结果与PCR检测结果一致. 同时我们通过考马斯染色观察这两种细胞的骨架蛋白, 发现LoVo细胞很符合细胞发生EMT时的形态特征, HT29正相反. 进一步证实LoVo的细胞形态利于其侵袭转移, HT29的细胞形态不利于其侵袭转移.

我们认为在LoVo和HT29中Tiam1促进大肠癌转移的机制可能与EMT发生有关. 但是, 在SW480, SW620, SW480/M5和LS174T这几种细胞中, 我们却没有发现这样的趋势, 我们推测, 只有一部分大肠癌细胞的侵袭转移是Tiam1通过EMT促进的, 还有一部分与此并没有关联. 文献报道Tiam1是Rac1的特异性鸟苷酸转换因子(GEF), 被活化后通过促进GDP释放而促进GTP结合到Rho家族成员中^[12-13], Rac1被激活, Rho样小GTP酶通过改变肌动蛋白细胞骨架的组成而参与大量的细胞活动. 例如促进细胞运动和迁移, 参与基因表达调控、细胞增殖与凋亡等^[14-15]. 至于Tiam1是不是通过Rho通路促进肿瘤细胞EMT的发生, 这尚需要进一步的研究. 然而近年有研究指出, Tiam1通过调节Rac的活性维持AJ, 癌蛋白Src可诱导AJ分解进而发生EMT, 导致细胞运动, 但这个过程需要Rac活化剂Tiam1的局部磷酸化及分解^[16]. 本实验只发现在LoVo和HT29这2种大肠癌细胞中Tiam1可能是通过EMT促进肿瘤侵袭转移, 其余的大肠癌细胞会不会是Tiam1的局部磷酸化及分解后, Src诱导的AJ分解进而发生EMT也需要进一步研究.

4 参考文献

- 1 Habets GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, Collard JG. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 1994; 77: 537-549
- 2 Minard ME, Ellis LM, Gallick GE. Tiam1 regulates cell adhesion, migration and apoptosis in colon tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 2006; 23: 301-313
- 3 Wu Y, Zhou BP. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008; 40: 643-650
- 4 胡洁, 王亚东, 李余发, 王雅娟, 韩慧霞. T淋巴瘤侵袭转移诱导因子与大肠癌上皮间质转化的关系. *南方医科大学学报* 2009; 29: 232-235
- 5 Fraga CH, True LD, Kirk D. Enhanced expression of the mesenchymal marker, vimentin, in hyperplastic versus normal human prostatic epithelium. *J Urol* 1998; 159: 270-274
- 6 张艳飞, 刘莉, 丁彦青. 具有肝转移倾向的结肠癌细胞亚系的筛选与鉴定. *南方医科大学学报* 2007; 27: 126-130
- 7 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- 8 Liu L, Wu DH, Ding YQ. Tiam1 gene expression and its significance in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 705-707
- 9 Liu L, Zhang Q, Zhang Y, Wang S, Ding Y. Lentivirus-mediated silencing of Tiam1 gene influences multiple functions of a human colorectal cancer cell line. *Neoplasia* 2006; 8: 917-924
- 10 Ahmed S, Nawshad A. Complexity in interpretation of embryonic epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor-beta signaling. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 131-145
- 11 Shirahata A, Sakata M, Sakuraba K, Goto T, Mizukami H, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y, Hibi K. Vimentin methylation as a marker for advanced colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2009; 29: 279-281
- 12 Habets GG, van der Kammen RA, Stam JC, Michiels F, Collard JG. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin. *Oncogene* 1995; 10: 1371-1376
- 13 Hoshino M, Sone M, Fukata M, Kuroda S, Kaibuchi K, Nabeshima Y, Hama C. Identification of the stef gene that encodes a novel guanine nucleotide exchange factor specific for Rac1. *J Biol Chem* 1999; 274: 17837-17844
- 14 Mertens AE, Roovers RC, Collard JG. Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett* 2003; 546: 11-16
- 15 Minard ME, Kim LS, Price JE, Gallick GE. The role of the guanine nucleotide exchange factor Tiam1 in cellular migration, invasion, adhesion and tumor progression. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 84: 21-32
- 16 Woodcock SA, Rooney C, Lontos M, Connolly Y, Zoumpourlis V, Whetton AD, Gorgoulis VG, Malliri A. SRC-induced disassembly of adherens junctions requires localized phosphorylation and degradation of the rac activator tiam1. *Mol Cell* 2009; 33: 639-653

■同行评价

Tiam1与大肠癌细胞EMT的关系目前相关研究不多见, 本文有一定的研究价值, 具有一定的科学性和可读性。

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 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-11-18)

新肿瘤睾丸抗原Ropporin重组蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备

尹燕华, 李占飞, 邹声泉

■背景资料

肿瘤细胞可通过各种机制逃逸机体的免疫监控, 其中重要机制之一是肿瘤抗原表达具有极强的异质性: 多数肿瘤抗原仅表达于一个肿瘤内的部分肿瘤细胞, 导致大部分肿瘤疫苗仅能激发机体仅针对部分肿瘤细胞的免疫反应, 难以有效抑制整个肿瘤。因此, 寻找更多的肿瘤抗原有助于根据肿瘤抗原表达情况制备特异性肿瘤疫苗或多价疫苗进行免疫治疗, 以进一步提高免疫治疗效果。

尹燕华, 华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系
湖北省武汉市 430030

李占飞, 邹声泉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院外科
湖北省武汉市 430030

教育部留学回国人员科研启动基金资助项目, No. 2009-08

作者贡献分布: 此课题由李占飞与邹声泉设计; 实验、数据分析和论文写作均由尹燕华和李占飞共同完成; 邹声泉对文稿进行修改和审核。

通讯作者: 李占飞, 主治医师, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院外科。

lezhfei@hotmail.com

电话: 027-83663813

收稿日期: 2009-06-08 修回日期: 2009-09-29

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-11-18

Prokaryotic expression of ropporin and generation of its rabbit polyclonal antisera

Yan-Hua Yin, Zhan-Fei Li, Sheng-Quan Zou

Yan-Hua Yin, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Zhan-Fei Li, Sheng-Quan Zou, Department of Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, No. 2009-08

Correspondence to: Zhan-Fei Li, Department of Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. lezhfei@hotmail.com

Received: 2009-06-08 Revised: 2009-09-29

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To prepare human ropporin (a novel cancer/testis antigen) recombinant protein using a prokaryotic expression system and generate its rabbit polyclonal antisera.

METHODS: The full-length cDNA of the human ropporin gene was subcloned into the pQE30 vector and transformed into competent *Escherichia coli* (*E.coli*) JM109 cells. After transformed *E.coli* was induced using IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), human recombinant

ropporin protein was extracted, purified by Nickel sepharose affinity chromatography, and verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Rabbits were immunized with the purified protein to prepare antisera. The specificity of antisera was determined by Western blot.

RESULTS: SDS-PAGE analysis showed that a protein with similar molecular weight to mouse popporin protein was purified from transformed *E.coli*. Western blot using anti-His tag monoclonal antibody showed that the prepared protein contained a His-tag. Polyclonal antisera were successfully generated by immunization of rabbits with human recombinant ropporin protein. The titers of antisera were more than 1 : 512 000. Western blot analysis confirmed the specificity of the antisera obtained.

CONCLUSION: Human recombinant ropporin protein was successfully prepared using a prokaryotic expression system, and its rabbit polyclonal antisera were also successfully generated. The antisera obtained can be used to detect the expression of ropporin protein in various types of tumors and investigate its role in malignant processes.

Key Words: Ropporin; Cancer/testis antigen; Prokaryotic expression

Yin YH, Li ZF, Zou SQ. Prokaryotic expression of ropporin and generation of its rabbit polyclonal antisera. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3342-3345

摘要

目的: 构建新肿瘤睾丸抗原Ropporin原核表达载体, 表达和纯化人Ropporin重组蛋白, 并制备其兔抗血清。

方法: 人Ropporin全长cDNA克隆入pQE30载体, 在大肠杆菌中利用IPTG诱导表达并纯化人Ropporin重组蛋白。利用人Ropporin重组蛋白免疫兔, 制备人Ropporin多克隆抗体。

■同行评议者

刘行林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科; 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

结果: 以构建的pQE30-Ropporin质粒转化大肠杆菌后, 在IPTG诱导下表达和纯化得到相对分子质量与鼠Ropporin蛋白一致的蛋白质, 利用其免疫动物后, Western blot检测显示该蛋白具有良好的免疫原性, 制备的兔抗血清效价 $>1:512\,000$, 对该蛋白具有高度特异性。

结论: 利用大肠杆菌原核表达系统表达和纯化了人Ropporin重组蛋白, 并成功制备了人Ropporin多克隆抗体。

关键词: Ropporin; 肿瘤睾丸抗原; 原核表达; 多克隆抗体

尹燕华, 李占飞, 邹声泉. 新肿瘤睾丸抗原Ropporin重组蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3342-3345
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3342.asp>

0 引言

肿瘤免疫治疗是一种极有潜力的治疗方法, 近年来在肿瘤研究领域受到广泛关注。肿瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigen, CTA)是一类仅表达于生殖细胞和肿瘤组织而不表达于其他正常组织的蛋白。由于他们具有高度免疫原性和特异性, 被认为是肿瘤免疫治疗的理想靶点^[1-2]。Ropporin是一种特异性表达于精子鞭毛鞘的蛋白, 不表达于其他正常成人组织中^[3-4]。我们前期研究发现Ropporin在血液系统恶性肿瘤中是一种新CTA^[5]。但他是否表达于其他类型恶性肿瘤, 以及他与肿瘤恶性生物学特征之间的关系, 目前国内外尚未见报道。本研究利用大肠杆菌系统原核表达Ropporin重组蛋白, 并用其免疫兔制备抗血清, 以利于进一步研究Ropporin在各种肿瘤中蛋白质水平表达和他在肿瘤细胞恶性生物学行为中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 pGADT7-Ropporin质粒、pQE30载体、JM109为本室保存。凝胶回收和DNA连接试剂盒均购自美国Qiagen公司, 工具酶BamH I和Hind III购自美国Promega公司。PCR引物由美国Sigma公司合成。鼠Ropporin重组蛋白为日本Kyoto大学药理学系Shuh Narumiya惠赠。

1.2 方法

1.2.1 pQE30-Ropporin重组质粒的构建: 以PCR自pGADT7-Ropporin质粒中扩增Ropporin全长cDNA片段, 两端分别加上BamH I和Hind III酶切位点。Ropporin 5'引物: 5'-GCG AAT TCA TGG

CTC AGA CAG ATA AGC-3'; 3'引物: 5'-ATG GAT CCG TTA CTC CAG CCA AAC CCT G-3'。10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 回收Ropporin目的片段和酶切的pQE30线性载体。回收产物在T4 DNA连接酶的作用下连接, 产物转化感受态*E.coli* JM109菌株(CaCl₂法制备), 涂布于含氨苄青霉素100 mg/L的LB培养皿中, 于37℃培养过夜。挑取单菌落抽提质粒, 用BamH I和Hind III双酶切鉴定。鉴定阳性质粒送测序证实。

1.2.2 人Ropporin重组蛋白的诱导表达: 将经鉴定正确含pQE30-Ropporin原核表达载体的JM109菌接种于含氨苄霉素的LB液体培养基内, 转化pQE30的细菌为对照。培养至 $A_{600} = 0.6$ 。分别加IPTG使其终浓度达到0、0.5、1 mmol/L, 在37℃诱导培养。将诱导菌液置于冰上5 min, 10 000 g离心30 s, 收集沉淀, 以0.1 mol/L Tris-CL(pH6.8)悬浮, 再加入等体积2×SDS上样缓冲液, 煮沸3 min后离心取上清。样品以12% SDS-PAGE电泳, 考马斯亮蓝染色观察。同样处理另一块胶电泳完毕转移至PVDF膜, 3% BSA封闭, 以兔抗鼠His单克隆抗体为一抗, 鼠抗兔IgG为二抗, Western blot检测人Ropporin重组蛋白。

1.2.3 人Ropporin重组蛋白的大量制备: 用2 L的LB培养基于37℃培养, 在菌液浓度 A_{600} 值约0.5时, 加入IPTG至终浓度为1 mmol/L, 37℃继续培养4 h收获菌体。将菌体反复冻融3次后, 以0.1 mol/L的Tris-CL缓冲(pH7.6)重悬菌体, 超声破碎菌体, 离心。分别收集沉淀和上清, SDS-PAGE胶分析, 发现融合蛋白在沉淀中。沉淀重悬于含6 mol/L尿素的Tris-HCL缓冲液中, 镍柱亲和层析纯化重组蛋白, 蛋白分析试剂盒测定纯化蛋白浓度, SDS-PAGE分析蛋白纯度。

1.2.4 抗人Ropporin兔血清的制备和纯化: 取体质量4 kg的♂新西兰兔2只, 免疫前3 d耳缘静脉取血分离血清作为阴性对照。初次免疫时, 每只新西兰兔背部皮下多点注射2 mL经完全弗氏佐剂乳化的纯化融合蛋白(0.5 g/L)。2 wk后以1 mL不完全弗氏佐剂乳化的融合蛋白纯品进行第2次免疫, 方法同前。以后每隔2 wk重复免疫1次, 剂量、方法均与第2次免疫相同。免疫3次后, 耳缘静脉采血做多克隆抗体ELISA法效价分析。效价符合要求(要求至少大于1:128 000)后, 再加强免疫1次。加强免疫后3 d, 颈总动脉插管法取血, 离心收集血清并纯化, 常规ELISA方法检测兔抗血清效价。-80℃保存备用。

1.2.5 多克隆抗体特异性鉴定: 人和鼠Ropporin

■研发前沿

Ropporin是近年新发现的一种肿瘤睾丸抗原。本研究制备其多克隆抗体, 以便于进一步研究其在肿瘤生物学行为中的作用。

■应用要点

本研究制备的Ropporin抗体有助于进一步研究Ropporin在各种肿瘤中的表达情况, 以及他在肿瘤恶性生物学行为中的作用。

■名词解释

肿瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigen, CTA): 是一类仅表达于生殖细胞和肿瘤组织而不表达于其他正常组织的蛋白。由于他们具有高度免疫原性和特异性, 被认为是肿瘤免疫治疗的理想靶点。

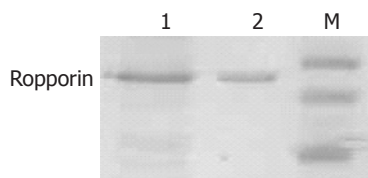


图1 SDS-PAGE电泳检测人Ropporin重组蛋白。M: 蛋白质分子量Marker; 1: 人Ropporin重组蛋白; 2: 鼠Ropporin重组蛋白。

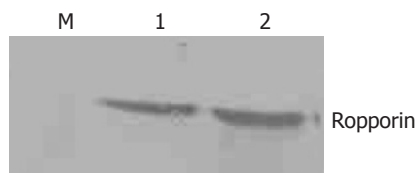


图2 Western blot鉴定人Ropporin重组蛋白。M: 蛋白质分子量Marker; 1: 鼠Ropporin重组蛋白; 2: 人Ropporin重组蛋白。

蛋白行SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜, 3% BSA封闭, 以兔抗血清为一抗(1:5000稀释于封闭液), 鼠抗兔IgG为二抗, Western blot检测兔抗血清的特异性。

2 结果

2.1 成功制备人Ropporin重组蛋白 SDS-PAGE电泳显示制备得到与鼠Ropporin重组蛋白相对分子质量一致的蛋白(图1)。以His抗体进行Western blot检测显示, 制备的蛋白与鼠Ropporin重组蛋白均携带His标签(图2)。以上结果提示成功制备得到人Ropporin重组蛋白。

2.2 成功制备人Ropporin多克隆抗体 利用人Ropporin重组蛋白免疫兔, 我们成功地制备了人Ropporin多克隆抗体。ELISA检测显示抗体效价 $>1:512\ 000$ 。Western blot显示制备的抗体对人Ropporin重组蛋白具有特异性, 与鼠Ropporin重组蛋白也具有交叉反应(图3)。

3 讨论

由于CTA具有很强的免疫原性, 其表达又具有高度特异性(仅表达于肿瘤和生殖细胞, 由于生殖系统的免疫豁免, 不会引起针对其他正常组织的免疫反应), 他被认为是肿瘤免疫治疗的理想靶点。目前已在多种肿瘤中发现40余种CTA, 包括MAGE1、NY-ESO-1和SP17等^[1-2,6-9]。在美国, 已有多项利用肿瘤-睾丸抗原进行肿瘤免疫治疗的研究得到FDA批准进入临床研究阶段, 但这些研究均未能取得令人满意的效果。究其原因, 在于肿瘤细胞可通过各种机制逃逸机体的免疫

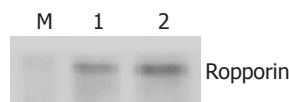


图3 Western blot鉴定人Ropporin多克隆抗体。M: 蛋白质分子量Marker, 同时可作为阴性对照; 1: 鼠Ropporin重组蛋白; 2: 人Ropporin重组蛋白。

监控, 其中重要机制之一是肿瘤抗原表达具有极强的异质性: 不仅不同患者的肿瘤抗原表达谱各不相同, 同一患者肿瘤细胞的抗原表达也存在差异, 多数肿瘤抗原仅表达于一个肿瘤内的部分肿瘤细胞。这就导致大部分肿瘤疫苗仅能激发机体仅针对部分肿瘤细胞的免疫反应, 难以有效抑制整个肿瘤。因此, 寻找更多的肿瘤抗原, 并深入研究肿瘤抗原与恶性肿瘤生物学特征之间的关系, 有助于根据肿瘤抗原表达情况, 选择既高表达又与肿瘤恶性生物学行为密切相关的抗原, 制备特异性肿瘤疫苗或多价疫苗进行免疫治疗^[2], 以进一步提高免疫治疗效果。

人Ropporin是一个由212个氨基酸组成的蛋白, 属于Rho家族, 与Rophilin结合而参与G蛋白信号传导^[3-4]。在人类, 其编码基因定位于3q21.1。人与鼠Ropporin蛋白具有高度同源性(94%), 两者相对分子量基本一致。最初的研究发现他主要存在于精子鞭毛的纤维鞘中, 在精子运动中起重要作用。他主要表达于生殖系统和胚胎组织中而不表达于成人正常组织。

我们前期研究发现, Ropporin表达于多种血液系统肿瘤细胞, 并且在血液系统肿瘤患者的血清中可检测到Ropporin特异性IgG抗体, 说明Ropporin能诱发机体特异性免疫反应。他特异性表达于睾丸组织和肿瘤组织而不表达于其他正常组织, 因此被认为是一种新的肿瘤-睾丸抗原^[5]。进一步研究发现, 他在人原发性肝细胞癌组织中也存在mRNA水平的表达(前期研究, 结果未发表), 提示他在肝癌中可能是一种新的CTA。

目前, 关于Ropporin生物学功能的研究主要集中于他在精子运动和精子发生中的作用^[10-11], 尚未见他在肿瘤细胞恶性生物学行为中的作用的报道。肿瘤细胞在其发生、分化等方面与生殖细胞具有高度相似性, 肿瘤细胞中常出现精子发生和胚胎发育中特异表达基因(不表达于正常成人组织)的异常表达, 这些基因可能在肿瘤细胞的恶性生物学行为中起重要作用^[1,12]。

Ropporin氨基端40个氨基酸序列与cAMP依赖性蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase,

PKA) II型调节亚单位(R II)有高度同源性. 在精子中, Ropporin与AKAP110结合, 在精子运动中起重要作用. 用合成肽竞争性拮抗其结合后可导致实验动物不育^[3-4]. Ropporin的羧基端可以与Rhophilin羧基末端的PDZ域结合而与RhoA相互作用, 提示Ropporin可能与RhoA结合而参与Rho介导的信号通路^[4].

Rho是癌基因Ras同源体(ras homogenous, Rho), 属于Ras超家族成员. Rho家族成员绝大部分是具有GTP酶活性的小分子蛋白, 在细胞迁移、细胞骨架重组、细胞黏附、基因表达调控等多种重要的生物学活动中发挥重要作用. 已有研究提示Rho在多种肿瘤(包括肝癌、乳腺癌和结肠癌等)的侵袭和转移中发挥重要作用^[13-15].

目前关于Ropporin的研究刚刚起步, 国际上已有一些实验室制备了针对鼠Ropporin蛋白的多克隆抗体, Western blot显示其与人Ropporin蛋白存在交叉反应. 但尚无商品化Ropporin抗体问世, 限制了对他的表达谱和在肿瘤恶性生物学行为中的作用的进一步研究. 本研究利用PQE30大肠杆菌原核表达系统成功制备和纯化了Ropporin重组蛋白, 并免疫兔成功制备多抗血清. Western blot检测显示, 目的蛋白准确, 制备的抗体具有很强的特异性. 这将有助于深入研究Ropporin在各种肿瘤组织中蛋白质水平的表达和生物学功能, 为研究其应用于恶性肿瘤的免疫治疗奠定实验基础.

4 参考文献

- 1 Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 615-625
- 2 Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, Old LJ, Chen YT. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2002; 188: 22-32
- 3 Fujita A, Nakamura K, Kato T, Watanabe N, Ishizaki T, Kimura K, Mizoguchi A, Narumiya S. Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 1): 103-112
- 4 Carr DW, Fujita A, Stentz CL, Liberty GA, Olson GE, Narumiya S. Identification of sperm-specific proteins that interact with A-kinase anchoring proteins in a manner similar to the type II regulatory subunit of PKA. *J Biol Chem* 2001; 276: 17332-17338
- 5 Li Z, Li W, Meklat F, Wang Z, Zhang J, Zhang Y, Lim SH. A yeast two-hybrid system using Sp17 identified Ropporin as a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies. *Int J Cancer* 2007; 121: 1507-1511
- 6 李佳, 潘林娜, 张志燕, 李曼. MAGE-A1在食管癌中的表达及其与肿瘤细胞增殖的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 706-711
- 7 Zhang Y, Wang Z, Robinson WR, Lim SH. Combined real time PCR and immunohistochemical evaluation of sperm protein 17 as a cancer-testis antigen. *Eur J Haematol* 2004; 73: 280-284
- 8 吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金铺. 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1667-1672
- 9 吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金铺. 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1 mRNA的表达意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1673-1678
- 10 Newell AE, Fiedler SE, Ruan JM, Pan J, Wang PJ, Deininger J, Corless CL, Carr DW. Protein kinase A RII-like (R2D2) proteins exhibit differential localization and AKAP interaction. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008; 65: 539-552
- 11 Fiedler SE, Bajpai M, Carr DW. Identification and characterization of RHOA-interacting proteins in bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2008; 78: 184-192
- 12 Xiao J, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1849-1853
- 13 Croft DR, Olson MF. Regulating the conversion between rounded and elongated modes of cancer cell movement. *Cancer Cell* 2008; 14: 349-351
- 14 Joshi B, Strugnell SS, Goetz JG, Kojic LD, Cox ME, Griffith OL, Chan SK, Jones SJ, Leung SP, Masoudi H, Leung S, Wiseman SM, Nabi IR. Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res* 2008; 68: 8210-8220
- 15 Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Palmer HG, Valero RA, Barbáchano A, Duñach M, de Herreros AG, Villalobos C, Berciano MT, Lafarga M, Muñoz A. RhoA-ROCK and p38MAPK-MSK1 mediate vitamin D effects on gene expression, phenotype, and Wnt pathway in colon cancer cells. *J Cell Biol* 2008; 183: 697-710

■同行评价

本文构建Ropporin重组蛋白的原核表达载体, 纯化人Ropporin重组蛋白, 及其制备兔抗血清, 有重要临床指导意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

GOLFIG-1在化疗耐药转移性结肠癌中的疗效

林榕波, 范南峰, 陈玲, 刘捷

■背景资料

在我国人群中结直肠癌的死亡率是17.4/10万, 是癌症死亡原因的第5位。晚期结直肠癌的治疗是以期达到延长生存期, 提高生活质量的姑息治疗为目的, 化疗较最佳支持治疗无论是延长生存时间还是提高生活质量都有显著优势。

林榕波, 范南峰, 陈玲, 刘捷, 福建省肿瘤医院内科 福建省福州市 350014

福建省卫生厅青年科研基金资助项目, No. 2007-1-34

作者贡献分布: 林榕波与范南峰对此文所作贡献均等; 此课题由林榕波与范南峰设计; 研究过程由林榕波、范南峰、陈玲及刘捷完成; 研究所用病例由林榕波、范南峰、陈玲及刘捷提供; 数据分析与论文写作由林榕波完成。

通讯作者: 范南峰, 副主任医师, 350014, 福建省福州市, 福建省肿瘤医院内科. fannanfeng8256@sina.com.cn

收稿日期: 2009-09-06 修回日期: 2009-09-29

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-11-18

Chemoimmunotherapy of chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer with gemcitabine plus FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2

Rong-Bo Lin, Nan-Feng Fan, Ling Chen, Jie Liu

Rong-Bo Lin, Nan-Feng Fan, Ling Chen, Jie Liu, Department of Medical Oncology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation for Young Scholars in Fujian, No. 2007-1-34

Correspondence to: Nan-Feng Fan, Department of Medical Oncology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian Province, China. fannanfeng8256@sina.com.cn

Received: 2009-09-06 Revised: 2009-09-29

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of gemcitabine plus FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 (GOLFIG-1 regimen) in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer.

METHODS: The patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer were given gemcitabine, oxaliplatin, levofolonic acid, and 5-fluorouracil, followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. Each cycle lasted for 14 days. The primary endpoint was survival.

RESULTS: A total of 9 patients were enrolled,

of which 2 could not be evaluated because of early death or refusal of treatment. No complete response was observed. Partial response was observed in 1 patient, stable diseases in 4, and progressive disease in 2. The median survival was 91 days (range: 23-325 days). Two patients with interstitial pneumonitis (considered as clinical signs of autoimmunity) had longer survival (325 and 250 days, respectively) than other patients.

CONCLUSION: GOLFIG-1 regimen is effective in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer, especially in those suffering from autoimmune disorders.

Key Words: Advanced colorectal cancer; Gemcitabine; Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; Interleukin-2; Chemoimmunotherapy

Lin RB, Fan NF, Chen L, Liu J. Chemoimmunotherapy of chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer with gemcitabine plus FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3346-3350

摘要

目的: 评估GOLFIG-1在化疗耐药晚期结直肠癌患者中的疗效和不良反应。

方法: 选择化疗耐药的晚期结直肠癌患者, 先予吉西他滨、奥沙利铂、亚叶酸和氟尿嘧啶化疗, 随后予粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和IL-2治疗, 每14 d为1周期。研究的主要终点是生存时间。

结果: 9例患者入组, 早期出组和早期死亡各1例, 无完全缓解病例, 1例部分缓解, 4例稳定, 2例进展。中位生存时间为91 d(23-325 d)。2例出现间质性肺炎(考虑为自身免疫的临床症状)患者的生存时间(325 d和250 d)明显优于其他患者。

结论: GOLFIG-1方案在化疗耐药患者中是有效的, 特别在那些出现自身免疫的患者中。

关键词: 晚期结肠癌; 吉西他滨; 粒细胞巨噬细胞集

■同行评议者

何超, 教授, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

落刺激因子; 白介素-2; 化学免疫治疗

林榕波, 范南峰, 陈玲, 刘捷. GOLFIG-1在化疗耐药转移性结肠癌中的疗效. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3346-3350
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3346.asp>

0 引言

在我国人群中结直肠癌的死亡率是17.4/10万, 是癌症死亡原因的第5位^[1]. 目前, 氟尿嘧啶、亚叶酸联合伊立替康或奥沙利铂, 或再联合抗血管内皮生长因子单抗(贝伐单抗)或抗表皮生长因子受体单抗(西妥昔单抗、帕尼单抗)是晚期结直肠癌的最佳治疗方式^[2-7], 这使得晚期结直肠癌患者的中位生存期延长到18 mo以上. 但大多数患者仍将最终死于对化疗的耐药. 因此, 需要有更多新的有效方案来治疗化疗耐药的晚期结直肠癌. 传统的观念认为化疗导致的细胞死亡是一种凋亡过程, 没有免疫原性. 但近来资料提示, 某些化疗方案可以激活免疫系统, 从而搭起一个全新的癌症治疗平台^[8]. 由吉西他滨、奥沙利铂、氟尿嘧啶和亚叶酸组成的GOLF方案在离体人结肠癌细胞株研究中发现, 他们不仅有协同的细胞毒作用和促进凋亡作用, 还能导致肿瘤细胞分子和抗原的改变^[9-10], 这就使化学免疫治疗成为可能. 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子和IL-2组成的IG-1方案可以增加外周血树突状细胞和抗原特异性细胞毒T淋巴细胞的数量和活性^[11], 使经GOLF改造过的抗原可以通过外周血树突状细胞递呈给特异性细胞毒T淋巴细胞, 从而杀伤对化疗耐药的肿瘤细胞, 此即为GOLFIG-1方案^[12-13]. 本研究评估这个全新的治疗模式在多药耐药晚期结直肠癌患者中的疗效和毒性.

1 材料和方法

1.1 材料 患者年龄在18岁以上; 组织学证实为结肠或直肠癌; 接受过氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康化疗后进展者(肠梗阻患者允许没有使用过伊立替康); 有不能手术切除的转移灶, 并且转移灶至少有单个病灶最大单径测量 ≥ 20 mm(若螺旋CT ≥ 10 mm); 东部肿瘤合作组织行为状态评分(ECOG PS) ≤ 3 ; 有充分的肝肾功能和血液学功能. 排除标准是有第二肿瘤者、有神经病变者、有脑或脑膜侵犯者、有自身免疫性疾病者(如红斑狼疮、类风湿性关节炎、硬皮病等)、正在接受免疫抑制剂治疗者(如器官移植使用环孢菌素者). 所有患者必须签署知情同意书.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 先给予吉西他滨 1000 mg/m^2 , 静脉滴注30 min, 第1天, 然后依次给予亚叶酸 200 mg/m^2 , 静脉推注30 min, 第1、2天, 氟尿嘧啶 400 mg/m^2 , 静脉推注, 第1、2天, 氟尿嘧啶 800 mg/m^2 , 持续静脉滴注22 h, 第1、2天, 奥沙利铂 85 mg/m^2 , 在亚叶酸和氟尿嘧啶前静脉滴注4-6 h, 第2天, 14 d为1周期. 在单数周期中, 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 $150\text{ }\mu\text{g}$, 皮下注射, 第3-6天, IL-2 100万单位, 静脉滴注, 第7-14天. 在偶数周期中, 仅接受IL-2 100万单位, 静脉滴注第3-14天. 每2周期进行1次疗效评价, 疗效有效或稳定者继续使用原方案, 直至疾病进展或出现不能耐受不良反应或患者拒绝再使用.

1.2.2 疗效和不良反应评价: 疗效评价按WHO疗效评价标准执行, 但是考虑到患者为化疗耐药的晚期患者, 生存时间短, 且多为行动不便患者, 故没有要求进行疗效确认. 同时也将观察的主要终点定为生存时间. 疾病无进展时间被定义为从入组之日开始至在肿瘤评估中首次证实疾病进展之日之间的时间, 生存时间被定义为从入组之日开始至任何原因导致死亡之日之间的时间. 不良反应评估按NCI-CTCAE v3.0分级标准执行.

统计学处理 采用Kaplan-Meier方法进行生存分析, 有效率的置信区间计算使用精确二项置信区间. 统计分析利用SPSS16.0统计软件包进行处理.

2 结果

2.1 患者特征 2008-01/2009-02共有结肠癌患者9例进入本研究. 患者特征详见表1. 患者年龄32-65(中位年龄45)岁, 其中男5例(55.6%), 女4例(44.4%). 大多数患者组织学分化程度较差(77.8%为G3/4). 5例(55.6%)患者累及脏器数为1个, 其余4例(44.4%)至少有3个以上的累及脏器. 最常见的累及部位为淋巴结(共5例, 占总患者的55.5%), 其次为腹膜和肝脏(各4例, 各占总患者的44.4%). 7例患者接受过结肠癌手术. 3例患者接受过氟尿嘧啶、亚叶酸和奥沙利铂(FOLFOX)治疗, 因肠梗阻和经济原因无法接受含伊立替康方案或含抗表皮生长因子受体单抗方案, 而直接进入此研究.

2.2 不良反应 9例患者共接受了25个治疗周期, 中位周期数为2个(1-6个). 治疗期间的主要不良反应详见表2. 最常见的不良反应是1、2度发

■研究前沿

对于氟尿嘧啶、伊立替康和奥沙利铂均耐药的晚期结直肠癌的治疗还相当困难. 目前多数指南推荐的标准治疗是抗表皮生长因子受体单抗(西妥昔单抗或帕尼单抗)单药或联合化疗, 但其疗效并不理想. 因此, 需要有更多新的有效方案来治疗化疗耐药的晚期结直肠癌.

■相关报道

抗表皮生长因子受体单抗单药或联合化疗治疗氟尿嘧啶、伊立替康和奥沙利铂均耐药的晚期结直肠癌疗效并不理想. Correale *et al* 用本方案治疗晚期结直肠癌疗效好. 特别是在出现自身免疫临床症状(皮损和关节炎)患者中.

■创新盘点

本研究的病例均为接受过氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康化疗,并在化疗中进展. GOLFIG-1方案在此类化疗耐药患者中仍有效,特别在出现自身免疫临床症状(间质性肺炎)的患者中.

表 1 患者特征和治疗结果

患者编号	性别	年龄(岁)	PS	既往接受过的化疗药物	现为第几线化疗	疗效	生存时间(d)
1	男	65	1	FU ¹ 、OXA、IRI	3	SD	250
2	女	33	3	FU ¹ 、OXA、IRI、CET	4	SD	125
3	男	47	1	FU ¹ 、OXA、IRI、CET	4	PD	42
4	男	51	3	FU、OXA、IRI	2	早期死亡	23
5	女	45	2	FU、OXA、IRI、CET	3	PR	325
6	女	42	3	FU、OXA	2	SD	157
7	女	32	2	FU、OXA、IRI	2	早期出组	59
8	男	35	2	FU ¹ 、IRI	3	PD	49
9	男	63	3	FU、OXA	2	SD	91

FU: 氟尿嘧啶; OXA: 奥沙利铂; IRI: 伊立替康; CET: 西妥昔单抗; ¹接受过卡培他滨治疗

表 2 患者不良反应

	1、2度		3、4度	
	n	%	n	%
白细胞下降	3	33.3	3	33.3
中性粒细胞下降	3	33.3	3	33.3
贫血	7	77.8	1	11.1
血小板下降	4	44.4	3	33.3
恶心	1	11.1	0	0.00
呕吐	1	11.1	0	0.00
腹泻	1	11.1	1	11.1
口腔炎	1	11.1	1	11.1
感觉神经毒性	1	11.1	0	0.00
过敏	2	22.2	0	0.00
发热	7	77.8	0	0.00
转氨酶增高	5	55.6	0	0.00

热、流感样症状、1、2度血液学毒性(贫血、中性粒细胞下降和血小板下降)和1、2度谷丙转氨酶增高. 3、4度不良反应最常见的是血液学毒性(主要为中性粒细胞下降和血小板下降). 2例患者出现奥沙利铂过敏反应(表现为低血压、皮疹、呼吸困难和发热). 患者5在第5周期末出现咳嗽、气促,经胸部摄片证实为间质性肺炎,在第6周期逐渐加重,而停用GOLFIG-1方案. 患者1在化疗第3周期出现咳嗽、气促,经胸部CT证实为间质性肺炎,而停止化疗.

2.3 疗效 所有病例随访截至2009-05-06均已死亡. 治疗结果详见表1. 除1例因早期出组和1例因肿瘤进展早期死亡患者未能进行评价疗效之外,其余7例患者均进行了疗效评价. 无完全缓解病例,1例患者部分缓解,有效率为11.1%(95%CI: 0.3%-48.3%),4例稳定,疾病控制率为55.6%(95%CI: 21.2%-86.3%),2例进展. 9

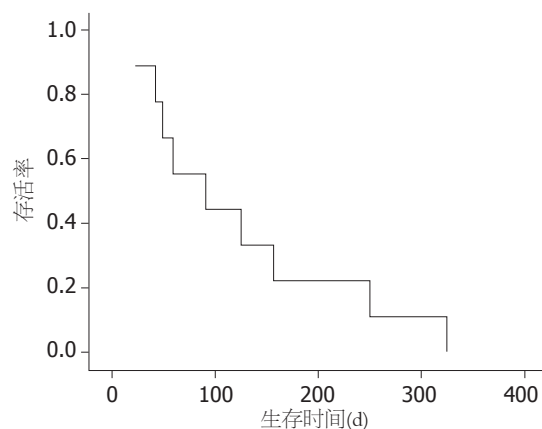


图 1 患者总生存时间的Kaplan-Meier曲线.

例患者的中位生存时间为91(23-325) d, Kaplan-Meier方法进行的生存分析见图1. 在2例间质性肺炎患者中,编号5为曾使用过FOLFOX和伊立替康联合西妥昔单抗治疗的腹膜转移患者,接受了6个周期GOLFIG-1,疗效达到部分缓解,疾病无进展时间为165 d,生存时间为325 d. 编号1为曾使用过卡培他滨联合奥沙利铂和FOLFIRI化疗的肺转移患者,接受了3个周期GOLFIG-1,疗效评价稳定,疾病无进展时间为151 d,生存时间为250 d.

3 讨论

对于氟尿嘧啶、伊立替康和奥沙利铂均耐药的晚期结直肠癌的治疗还相当困难. 目前多数指南推荐的标准治疗是抗表皮生长因子受体单抗(西妥昔单抗或帕尼单抗)单药或联合化疗,但其疗效并不理想. 在Jonker *et al*^[5]的III期临床研究中,西妥昔单抗对比最佳支持治疗治疗氟尿嘧啶、伊立替康和奥沙利铂均耐药的晚期结直肠癌,西妥昔单抗和最佳支持治疗的中位生存时

间分别为6.1和4.6 mo, 有效率分别为8%和0%。Van Cutsem *et al*^[6]报道帕尼单抗对比最佳支持治疗治疗氟尿嘧啶、伊立替康和奥沙利铂均耐药的晚期结直肠癌III期临床研究中, 帕尼单抗和最佳支持治疗的疾病无进展时间分别为8 wk和7.3 wk, 生存时间均为6.2 mo, 有效率分别为10%和0%。在这2个III期临床研究中, 最佳支持治疗的总生存时间并不相同(4.3 mo和6.2 mo), 我们认为主要是在Jonker *et al*^[5]研究中有7%的最佳支持治疗患者最终接受了西妥昔单抗治疗。而在Van Cutsem *et al*^[6]研究中有76%的患者接受了帕尼单抗治疗。因此, 4.3 mo更能反应氟尿嘧啶、伊立替康和奥沙利铂均耐药后的晚期结直肠癌最佳治疗的中位生存时间。

Correale *et al*^[12]用GOLFIG-1治疗了46例晚期结直肠癌患者, 24例接受过一线化疗, 10例接受过FOLFOX或FOLFIRI二线化疗。一线化疗方案9例为氟尿嘧啶/亚叶酸或卡培他滨, 4例为FOLFIRI, 11例为FOLFOX。在接受过化疗的患者中6例联合了西妥昔单抗, 3例联合了贝伐单抗。结果10例患者达到完全缓解, 16例部分缓解, 16例稳定, 有效率为56.5%, 疾病控制率为91.3%。中位疾病无进展时间为12.26 mo, 总生存时间为18.76 mo。Correale *et al*发现在出现皮损(考虑为系统性红斑狼疮)和关节炎这些自身免疫临床症状的患者中, 疾病无进展时间和生存时间均明显高于其他患者^[12-14]。多变量分析证实自体免疫的发生是疾病无进展时间和总生存时间最主要的预测变量。

在本研究中, 使用GOLFIG-1治疗氟尿嘧啶、伊立替康和奥沙利铂均耐药的晚期结直肠癌, 有1例部分缓解, 4例稳定, 中位生存时间为91 d。而在Jonker *et al*^[5]和Van Cutsem *et al*^[6]的研究中最佳支持治疗的有效率为0%。虽然本研究的中位生存时间还不如他们的最佳支持治疗结果, 但我们认为这主要源于本研究中患者的行为状况差。本研究中ECOG PS 3分患者为4例(44.4%), 2分3例(33.3%)。而在Jonker *et al*^[5]的研究中2分患者占23.5%, 没有3分病例。在Van Cutsem *et al*^[6]的研究中2分患者占15%, 3分只占1%。

Correale *et al*^[12]的研究的有效率、疾病控制率和生存时间也明显的优于本研究。我们分析认为除了EGOC PS的因素之外, 还有可能在Correale *et al*^[12]的研究中有近半数患者(47.8%)未接受过化疗。一线中有19.5%的患者只接受过氟尿嘧啶(或其衍生物)化疗。文中并未提到对氟

尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康均耐药患者的比例, 也未提到更改化疗方案是否是因为在既往化疗中肿瘤进展。在实际工作中, 多数化疗患者在接受一定周期数的化疗后, 会休息一段时间。这些休息中出现进展患者多数再接受原治疗方案仍然有效。而本研究的病例均为接受过氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康化疗(除外3例肠梗阻患者未接受伊立替康), 并在化疗中进展。这点可能是影响本研究疗效的最主要原因。

本研究的2例出现间质性肺炎患者有着明显优于其他患者的疗效, 我们考虑间质性肺炎是否与Correale *et al*研究中的皮损和关节炎一样属于自身免疫的临床症状^[12-14]。在某些恶性肿瘤中, 自体免疫和生存时间之间有着密切的关系^[15-16]。这种现象被解释为: 激活免疫系统所靶向的自体抗原是抗肿瘤免疫效应的关键, 在肿瘤和靶组织免疫过程中的抗原表达和构型的特有改变在抗原选择和继发损害中起了一定作用^[16]。在Correale *et al*^[12]的研究中发现, 在外周血的淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和被活性的中心记忆T淋巴细胞数目的增加的同时, 外周血调节T细胞亚群(Treg)也进行性下降。Treg是一种有强烈免疫抑制功能的淋巴细胞亚群, 他能够预防自身免疫的发生, 并且通常在癌症患者中过度增高。Treg的下降不但和自身免疫疾病的发生有关, 还可能与抗肿瘤免疫效应有关^[17-18]。

总之, GOLFIG-1方案在氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康均耐药的的患者中是有效的, 特别是在那些出现自身免疫的患者中。我们希望通过进一步的研究来证实他的疗效以及与自身免疫的关系。

4 参考文献

- 1 He J, Gu D, Wu X, Reynolds K, Duan X, Yao C, Wang J, Chen CS, Chen J, Wildman RP, Klag MJ, Whelton PK. Major causes of death among men and women in China. *N Engl J Med* 2005; 353: 1124-1134
- 2 林榕波, 郭增清, 陈奕贵, 范南峰, 王晓杰, 陈帆, 刘捷, 林锦源. 西妥昔单抗联合伊立替康治疗化疗耐药晚期结直肠癌. *中国癌症杂志* 2008; 18: 79-80
- 3 步召德, 季加孚. 2008年版NCCN结肠癌临床实践指南解读. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 343-346
- 4 Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-237
- 5 Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer

■应用要点

经过氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康治疗失败的晚期结直肠癌患者具有体能状况较差、耐受性差等特点, 而本方案不良反应小, 治疗费用低, 有一定疗效, 值得临床推广使用。

同行评价

本研究结果为晚期结肠癌患者,特别是化疗耐药的患者提供了新延长生命的选择,具有一定的临床应用价值。

- 6 Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlitz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1658-1664
- 7 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342
- 8 Lake RA, van der Most RG. A better way for a cancer cell to die. *N Engl J Med* 2006; 354: 2503-2504
- 9 Caraglia M, Marra M, Budillon A, Meo G, Ricciardiello F, Bismuto E, Brachelente G, Francini G, Giordano A, Correale P, Abbruzzese A. Chemotherapy regimen GOLF induces apoptosis in colon cancer cells through multi-chaperone complex inactivation and increased Raf-1 ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 1159-1167
- 10 Correale P, Cusi MG, Del Vecchio MT, Aquino A, Prete SP, Tsang KY, Micheli L, Nencini C, La Placa M, Montagnani F, Terrosi C, Caraglia M, Formica V, Giorgi G, Bonmassar E, Francini G. Dendritic cell-mediated cross-presentation of antigens derived from colon carcinoma cells exposed to a highly cytotoxic multidrug regimen with gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin, elicits a powerful human antigen-specific CTL response with antitumor activity in vitro. *J Immunol* 2005; 175: 820-828
- 11 Correale P, Campoccia G, Tsang KY, Micheli L, Cusi MG, Sabatino M, Bruni G, Sestini S, Petrioli R, Pozzessere D, Marsili S, Fanetti G, Giorgi G, Francini G. Recruitment of dendritic cells and enhanced antigen-specific immune reactivity in cancer patients treated with hr-GM-CSF (Molgramostim) and hr-IL-2. results from a phase Ib clinical trial. *Eur J Cancer* 2001; 37: 892-902
- 12 Correale P, Tagliaferri P, Fioravanti A, Del Vecchio MT, Remondo C, Montagnani F, Rotundo MS, Ginanneschi C, Martellucci I, Francini E, Cusi MG, Tassone P, Francini G. Immunity feedback and clinical outcome in colon cancer patients undergoing chemoimmunotherapy with gemcitabine + FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and aldesleukin (GOLFIG-1 Trial). *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4192-4199
- 13 Correale P, Cusi MG, Tsang KY, Del Vecchio MT, Marsili S, Placa ML, Intrivici C, Aquino A, Micheli L, Nencini C, Ferrari F, Giorgi G, Bonmassar E, Francini G. Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8950-8958
- 14 Correale P, Fioravanti A, Bertoldi I, Montagnani F, Miracco C, Francini G. Occurrence of autoimmunity in a long-term survivor with metastatic colon carcinoma treated with a new chemo-immunotherapy regimen. *J Chemother* 2008; 20: 278-281
- 15 Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, Panagiotou P, Polyzos A, Papadopoulos O, Stratigos A, Markopoulos C, Bafaloukos D, Pectasides D, Fountzilas G, Kirkwood JM. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med* 2006; 354: 709-718
- 16 Rodriguez-Lecompte JC, Kruth S, Gyorffy S, Wan YH, Gaudie J. Cell-based cancer gene therapy: breaking tolerance or inducing autoimmunity? *Anim Health Res Rev* 2004; 5: 227-234
- 17 Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; 108: 804-811
- 18 Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 2004; 16: 89-98

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 •

《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子 0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统,在“万方数据-数字化期刊群”基础上,结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据,严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后,进行规范化处理和有效链接,经统计分析,编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次,影响因子0.729,即年指标0.142,引用期刊数732,学科扩散指标0.533,被引半衰期4.303,H指数8。(科学编辑:李军亮 2009-11-18)

II、III期直肠癌根治术后放疗同步希罗达化疗的疗效

陆忠华, 王建华, 许锡元, 周 健

陆忠华, 王建华, 许锡元, 周健, 苏州大学附属常州肿瘤医院放疗科 江苏省常州市 213002

作者贡献分布: 陆忠华与王建华对此文所作贡献均等; 此课题由陆忠华与王建华设计; 研究过程由陆忠华、王建华、许锡元及周健操作完成; 数据分析和论文写作由陆忠华完成。

通讯作者: 陆忠华, 副主任医师, 213002, 江苏省常州市, 苏州大学附属常州肿瘤医院放疗科. luzhonghua8687@163.com

收稿日期: 2009-08-17 修回日期: 2009-09-23

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-11-18

Efficacy of postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy with Xeloda for stage II/III rectal cancer

Zhong-Hua Lu, Jian-Hua Wang, Xi-Yuan Xu, Jian Zhou

Zhong-Hua Lu, Jian-Hua Wang, Xi-Yuan Xu, Jian Zhou, Department of Radiation Oncology, Changzhou Tumor Hospital, Soochow University, Changzhou 213002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhong-Hua Lu, Department of Radiation Oncology, Changzhou Tumor Hospital, Soochow University, Changzhou 213002, Jiangsu Province, China. luzhonghua8687@163.com

Received: 2009-08-17 Revised: 2009-09-23

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To retrospectively analyze the efficacy of postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy with Xeloda for stage II/III rectal cancer.

METHODS: A total of 103 rectal cancer patients who underwent radical surgery from January 2001 to December 2004 at our hospital were included in the study. These patients were divided into three groups: patients undergoing radical resection alone (surgical treatment group, ST; $n = 23$), those undergoing concurrent radiochemotherapy after radical resection (postoperative concurrent radiochemotherapy group, PCR; $n = 32$), and those undergoing sequential radiochemotherapy after radical resection (postoperative sequential radiochemotherapy group, PSR; $n = 48$). Two weeks after surgery, patients in the PCR group received radiotherapy consisting of DT 46-50 Gy in 23-25 fractionations over 4.6-5 weeks, concurrent with 4-6 cycles of chemother-

apy [each cycle consisting of 14 days of Xeloda (800 mg/m^2 , bid) followed by seven days off], while those in the PSR group received the same radiotherapy as the PCR group, followed by 4-6 cycles of chemotherapy [each cycle consisting of 14 days of oxaliplatin (130 mg/m^2 , qd) and capecitabine (500 mg/m^2 , bid) followed by seven days off].

RESULTS: The 5-year survival rate in the PCR group was significantly higher than that in the ST group ($62.5\% \text{ vs } 22.5\%$; $P = 0.024$), but comparable with that in the PSR group ($62.5\% \text{ vs } 54.2\%$; $P = 0.077$). The local recurrence rate was significantly lower in the PCR group than in the PSR group and ST group ($6.25\% \text{ vs } 31.25\% \text{ and } 39.13\%$; $P = 0.007 \text{ and } 0.008$, respectively). No significant difference was noted in the local recurrence rate between the PSR group and ST group ($P = 0.511$). No significant difference was also noted in the incidence of grade 3/4 side effects between the PCR group and PSR group.

CONCLUSION: Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy with Xeloda is superior to radical resection alone in decreasing the local recurrence rate and improving the 5-year survival rate in stage II/III rectal cancer patients, and does not increase the incidence of side effects compared with sequential radiochemotherapy.

Key Words: Rectal cancer; Radiotherapy; Xeloda; Concurrent treatment

Lu ZH, Wang JH, Xu XY, Zhou J. Efficacy of postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy with Xeloda for stage II/III rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3351-3354

摘要

目的: 回顾性分析 II、III 期直肠癌患者术后放疗同步联合希罗达化疗的疗效。

方法: 2000-01/2004-12 收治直肠癌根治患者 103 例。按治疗方法分为 3 组。(1) 单纯手术组 ($n = 23$), 行 Mile's 或 Dixon 式根治术; (2) 术后同

■背景资料

近年来放疗化疗的综合治疗越来越多运用到直肠癌的术后辅助治疗中, 术后的综合治疗有可能降低肿瘤局部复发率和提高生存率。

■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

■应用要点

本研究显示放疗联合希罗达同步治疗Ⅱ、Ⅲ期直肠癌术后患者可显著降低肿瘤局部复发率, 优于序贯放化疗和单纯手术, 且不良反应与序贯放化疗相比并未增加, 值得推广应用。

步放化疗组($n = 32$), 患者先行Mile's或Dixon式根治术, 术后2 wk开始放疗, 每4.6-5 wk DT 46-50 Gy/23-25次; 放疗第1天起同时行化疗, 希罗达1600 mg/($m^2 \cdot d$), 每天2次, 第1-14天, 每3 wk重复1个疗程, 共4-6个疗程; (3)术后序贯放化疗组($n = 48$), 手术及放疗方法同上, 化疗结束后给予放疗。奥沙利铂130 mg/($m^2 \cdot d$), 每天1次, 第1-14天; 希罗达1000 mg/($m^2 \cdot d$), 每天2次, 第1-14天, 每3 wk重复1个疗程, 共4-6个疗程。

结果: 术后同步放化疗组5年生存率为62.5%, 高于单纯手术组的52.2%($P = 0.024$), 但与序贯放化疗组(54.2%)相似($P = 0.077$); 同步放化疗组局部复发率为6.25%, 明显低于序贯放化疗组的31.25%($P = 0.007$)及单纯手术组(39.13%, $P = 0.008$); 序贯放化疗组的局部复发率低于单纯手术组, 但无明显差异($P = 0.511$)。同步放化疗组的3/4度不良反应与序贯放化疗组相比无差异。

结论: 放疗联合希罗达同步治疗Ⅱ、Ⅲ期直肠癌术后患者可显著降低肿瘤局部复发率, 5年生存率高于单纯手术, 不良反应与序贯放化疗相比并未增加。

关键词: 直肠癌; 放射治疗; 希罗达; 同步治疗

陆忠华, 王建华, 许锡元, 周健. Ⅱ、Ⅲ期直肠癌根治术后放疗同步希罗达化疗的疗效. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3351-3354

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3351.asp>

0 引言

直肠癌是消化系最常见的恶性肿瘤之一, 占大肠癌的60%-80%。手术是直肠癌的首要治愈手段, 而Ⅱ、Ⅲ期直肠癌患者手术治疗失败的原因主要为局部复发, 对此类病例行术后放化疗可以减少局部复发, 现已成为标准治疗方法。本研究对2000-01/2004-12收治的接受术后希罗达同步放化疗Ⅱ、Ⅲ期直肠癌患者的疗效进行回顾性分析。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-01/2004-12我院收治直肠癌患者103例, 均有病理证实, 按治疗方法分为3组。同步放化疗组、序贯放化疗组和单纯手术组。同步放化疗组32例, 其中男24例, 女8例, 中位年龄62岁。病理类型: 腺癌6例, 黏液腺癌18例, 印戒细胞癌8例; 分化程度: 高分化6例, 中分化15例,

低分化11例; 临床分期: Ⅱ期11例, Ⅲ期21例; 手术方式: Mile's术15例, Dixon术17例。序贯放化疗组48例, 其中男33例, 女15例, 中位年龄66岁。病理类型: 腺癌16例, 黏液腺癌18例, 印戒细胞癌14例; 分化程度: 高分化11例, 中分化23例, 低分化14例; 临床分期: Ⅱ期20例, Ⅲ期28例; 手术方式: Mile's术25例, Dixon术23例。单纯手术组23例, 其中男17例, 女6例, 中位年龄67岁。病理类型: 腺癌3例, 黏液腺癌13例, 印戒细胞癌7例; 分化程度: 高分化5例, 中分化10例, 低分化8例; 临床分期: Ⅱ期10例, Ⅲ期13例; 手术方式: Mile's术12例, Dixon术11例。三组临床资料相比无差异($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 放疗: 常规采用三野等中心放疗。患者体模固定俯卧于模拟机上, 双手置于额下, 在模拟机透视下定位, 上界在第5腰椎椎体下缘水平, 下界依肿瘤的下界水平而定。如为Dixon保肛手术后则下界在闭孔下缘, 如为Mile's术后则下界在原肛门口水平, 二侧界为直骨盆缘外1 cm, 二侧野上、下界同上, 后界包括髂骨外侧皮质, 前界根据术后盆腔CT片, 包括膀胱后1/3处, 侧野用30度楔形板。以上三野均常规挡铅。三个野的剂量比为2:1:1, 放疗剂量每4.6-5 wk DT 46-50 Gy/23-25次。

1.2.2 化疗方案: (1)同步放化疗组: 希罗达1600 mg/($m^2 \cdot d$), 第1-14天, 每天2次, 每3 wk重复1个疗程。化疗在放疗第1天即开始, 放疗完成后继续按原方案化疗, 共4-6个疗程。(2)序贯放化疗组: 奥沙利铂130 mg/($m^2 \cdot d$), 第1-14天, 每天1次; 希罗达1000 mg/($m^2 \cdot d$), 第1-14天, 每天2次, 每3 wk重复1个疗程, 共4-6个疗程, 化疗结束后给予放疗。

1.2.3 评价标准: (1)观察希罗达联合放化疗方案总生存率(OS)、局部复发率、远处转移率, 总生存率计算从同步放化疗开始一直到死亡或末次随访; (2)希罗达联合放化疗方案治疗期间急性不良反应, 按照RTOG/EORTC急性放射不良反应评价标准进行评价。

统计学处理 患者随访截至2009-03, 随访率100%。数据采用SPSS12.0统计软件分析。Kaplan-Meier法计算生存率, Log-Rank检验差异性, 其余数据为 χ^2 检验。

2 结果

2.1 3种治疗方法疗效比较 同步放化疗组、序贯放化疗组和单纯手术组的局部复发分别为2

表 1 3种治疗方法疗效比较

	<i>n</i>	复发 <i>n</i> (%)	远处转移 <i>n</i> (%)	5年总 生存率(%)
同步放化疗组	32	2(6.25)	8(25)	62.5
序贯放化疗组	48	15(31.25)	10(20.83)	54.2
单纯手术组	23	9(39.13)	8(34.78)	52.2
χ^2 值	—	9.386	1.605	5.120
<i>P</i> 值	—	0.009	0.448	0.024

表 2 术后2种方式放化疗3/4级不良反应比较

	同步放 化疗组 <i>n</i> (%)	序贯放 化疗组 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
粒细胞减少	2(6.25)	5(10.42)	0.059	0.809
腹泻	6(18.75)	6(12.5)	0.200	0.655
恶心、呕吐	4(12.5)	6(12.5)	0.000	1.000
手足综合征	1(3.13)	3(6.25)	0.011	0.917
感觉神经病变	4(12.5)	7(14.58)	0.000	1.000

■同行评价

本文回顾性分析了II、III期直肠癌术后患者的同步放化疗资料,对优化晚期直肠癌的治疗方案及预后评估有临床参考价值。

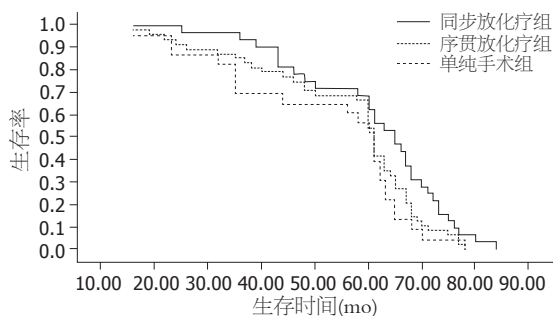


图 1 三种疗法生存曲线。

例、15例和9例;远处转移分别8例、10例和8例。详见表1。

术后同步放化疗组5年生存率为62.5%,高于单纯手术组的52.2%($P = 0.024$),但与序贯放化疗组(54.2%)相似($P = 0.077$);同步放化疗组局部复发率为6.25%,明显低于序贯放化疗组的31.25%($P = 0.007$)及单纯手术组(39.13%, $P = 0.008$);序贯放化疗组的局部复发率低于单纯手术组,但无明显差异($P = 0.511$, 图1)。

2.2 放化疗不良反应 主要不良反应有粒细胞减少、腹泻、恶心、呕吐、手足综合征、感觉神经病变,同步放化疗组的3/4度不良反应与序贯放化疗组相比无差异详见表2。

3 讨论

手术治疗是目前直肠癌首选治疗方法,但是单纯手术后复发率高,尤其于Dukes B2和C期的患者,复发率高达45%-65%^[1]。钱立庭 *et al*^[2]对243例II期和III期直肠癌根治术后放疗治疗的疗效分析中,其术后放疗治疗使局部复发率明显降低,其与单纯手术组的5年累积复发率分别为15.8%和26.8%($P = 0.043$),但术后放疗治疗并不能降低远处转移率,不能延长生存率。Gunderson *et al*^[3]报道III期患者单纯手术的局部复发率为45%-65%,术后放疗组降为9%-12%;对淋巴结阴性的II期患者单纯手术的局部复发率为

25%-30%,术后放疗组为5%-6%,T分期或T/N分期均可作为独立的预后因素,术后放疗开始得早的患者,其效果将更好,术后放射治疗优点是分期明确,避免了T1-2N0M0及术中探查已有肝转移患者的不必要照射。同时在手术中可以放置银夹,靶区定位较准确且不延长手术时间。但由于手术对血管的破坏,造成亚临床病灶缺氧,降低放射敏感性,影响疗效。

近年来放化疗的综合治疗也越来越多地运用到直肠癌的术后辅助治疗中,术后的综合治疗有可能提高生存率。氟尿嘧啶不仅作为标准的大肠癌的化疗药物具有放射增敏作用,与放疗同期使用能降低远处转移率,进而提高生存率^[4]。NSABPR-2研究^[5]初步结果显示同步放化疗可提高生存率和局控率。本组资料显示术后同步放化疗组5年生存率为62.5%,高于单纯手术组的52.2%($P = 0.024$),但与序贯放化疗组(54.2%)相似($P = 0.077$);同步放化疗组局部复发率为6.25%,明显低于序贯放化疗组的31.25%($P = 0.007$)及单纯手术组(39.13%, $P = 0.008$);序贯放化疗组的局部复发率低于单纯手术组,但无明显差异($P = 0.511$),这与序贯放化疗组开始放疗的时间与手术时间间隔较长有关,手术区域周围形成疤痕,造成亚临床病灶缺氧,降低放射敏感性,而使局部复发率下降不明显。因此,术后放疗时间应尽可能早。已有数个前瞻性随机对照研究的结果证实,II期和或III期直肠癌术后同步放化疗的疗效优于单纯手术、术后化疗或术后放疗,显著提高了局部控制率和5年总生存率^[1]。

希罗达是一种口服氟嘧啶类药物,本身无细胞毒性,但是在肿瘤组织中通过胸腺嘧啶磷酸酶(TP)转化成5-FU^[6]。5-FU能够插入肿瘤组织DNA链中,干扰其复制或修复,从而高度靶向治疗肿瘤。放疗治疗可上调实验性肿瘤中TP活性,而不上调正常组织中的TP活性。肿瘤组织TP水

平和活性高于正常组织,较5-FU靶向作用好,因此,希罗达+放疗能够协同增敏治疗肿瘤。同时,希罗达还能防治放疗期间肿瘤转移,已经有多家临床试验^[7-8]证明,希罗达与放射治疗同步治疗的安全性和可行性,希罗达最常见的不良反应为腹泻、手足综合征和轻微的骨髓抑制。本组资料显示同步放化疗组的3/4度不良反应:最常见的不良反应亦为腹泻(18.75%)、恶心、呕吐(12.5%)、粒细胞减少(6.25%),但手足综合征少见(3.13%),与序贯放化疗组相比无差异。且与5-FU持续静脉滴注或静脉推注相比,希罗达口服用药更方便,并可以避免静脉用药所造成的并发症,如感染、静脉血栓以及疼痛。大规模III期临床试验^[7]已经说明,将希罗达与氟尿嘧啶方案对比治疗大肠癌,希罗达方案耐受性良好,可以在门诊进行。

总之,放疗联合希罗达同步治疗II、III期直肠癌术后患者,既可提高生存率,又可降低局部复发率。不良反应大多经对症处理可耐受,所有病例无治疗相关性死亡。

4 参考文献

- 1 殷蔚伯,谷铣之. 肿瘤放射治疗学. 第3版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002: 764-774
- 2 钱立庭,宋永文,刘新帆,余子豪,钱图南,李晔雄. II和III期直肠癌根治术后放射治疗的疗效观察. 中华放射肿瘤学杂志 2003; 12: 101-105
- 3 Gunderson LL, Sargent DJ, Tepper JE, O'Connell MJ, Allmer C, Smalley SR, Martenson JA, Haller DG, Mayer RJ, Rich TA, Ajani JA, Macdonald JS, Goldberg RM. Impact of T and N substage on survival and disease relapse in adjuvant rectal cancer: a pooled analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 386-396
- 4 Benson AB 3rd. Therapy for advanced colorectal cancer. *Semin Oncol* 1998; 25: 2-11
- 5 Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM, Colangelo L, Dimitrov NV, Romond EH, Wexler M, Prager D, Cruz AB Jr, Gordon PH, Petrelli NJ, Deutsch M, Mamounas E, Wickerham DL, Fisher ER, Rockette H, Fisher B. Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol R-02. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 388-396
- 6 Ebi H, Sigeoka Y, Saeki T, Kawada K, Igarashi T, Usubuchi N, Ueda R, Sasaki Y, Minami H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of fluoropyrimidine derivatives, capecitabine and 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR). *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 205-211
- 7 Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731-1740
- 8 Souglakos J, Androulakis N, Mavroudis D, Kourousis C, Kakolyris S, Vardakis N, Kalbakis K, Pallis A, Ardavanis A, Varveris C, Georgoulas V. Multicenter dose-finding study of concurrent capecitabine and radiotherapy as adjuvant treatment for operable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 1284-1287

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。(科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

替代空肠营养管在上消化道手术中的应用分析41例

杜强, 范梅香, 张福庆, 纪刚, 于阜杰

■背景资料

国内绝大部分医师采用的都是复尔凯经鼻空肠管进行术后肠内营养, 该鼻肠管为一次性, 虽使用方便、安全可靠, 但价格较贵, 特别是配套使用的软导引钢丝, 使用一次便丢弃实在浪费, 完全可以消毒后再利用。于是本课题组思考用输液延长管作一小改进与消毒后软导引钢丝配套, 替代营养管使用, 经不断探索, 已经获得了与复尔凯经鼻空肠管相同的临床疗效。

杜强, 范梅香, 张福庆, 纪刚, 于阜杰, 景德镇市第一医院外科 江西省景德镇市 333000
江西省景德镇市科技局计划基金资助项目, No. 景科鉴字[2009]第14号

作者贡献分布: 杜强、范梅香及张福庆对此文所作贡献均等; 此课题由杜强设计; 研究过程由杜强、范梅香、张福庆、纪刚及于阜杰操作完成; 研究资料的收集由范梅香与张福庆完成; 数据统计学处理由张福庆完成; 本论文由杜强与范梅香完成。

通讯作者: 杜强, 副主任医师, 333000, 江西省景德镇市, 景德镇市第一人民医院外科。jdzduqiang@163.com

电话: 0798-8560128

收稿日期: 2009-08-30 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

Application of self-made jejunal feeding tubes after upper gastrointestinal surgery: an analysis of 41 cases

Qiang Du, Mei-Xiang Fan, Fu-Qing Zhang, Gang Ji, Fu-Jie Yu

Qiang Du, Mei-Xiang Fan, Fu-Qing Zhang, Gang Ji, Fu-Jie Yu, Department of Surgery, Jingdezhen First People's Hospital, Jingdezhen 333000, Jiangxi Province, China

Supported by: the Foundation of Science and Technology Bureau of Jingdezhen, Jiangxi Province, Jing Ke Jian Zi [2009] No. 14

Correspondence to: Qiang Du, Department of Surgery, Jingdezhen First People's Hospital, Jingdezhen 333000, Jiangxi Province, China. jdzduqiang@163.com

Received: 2009-08-30 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To explore the feasibility, safety and efficacy of using self-made nasal feeding jejunal tubes for early enteral nutrition in patients after upper gastrointestinal surgery.

METHODS: Forty-one patients receiving enteral nutrition using self-made nasal jejunal feeding tubes after upper gastrointestinal surgery at our hospital from August 2006 to April 2009 and 39 patients receiving parenteral nutrition after upper gastrointestinal surgery from January 2006 to December 2008 were analyzed and compared. The patient's age and sex as well as diagnostic and surgical procedures were comparable between the two groups. The time to the first passage of gas by anus, antibiotic use, length of stay, postoperative recovery, complications, and

medical expenses were compared between the two groups.

RESULTS: No patients receiving enteral nutrition using self-made nasal jejunal feeding tubes developed serious complications such as anastomotic leakage and pulmonary and intra-abdominal infections. The cure rate achieved in patients receiving enteral nutrition was significantly higher than that in patients receiving parenteral nutrition ($P < 0.05$). Enteral nutrition using self-made nasal jejunal feeding tubes had a satisfactory efficacy and a distinct advantage over parenteral nutrition.

CONCLUSION: Application of self-made nasal jejunal feeding tubes for early enteral nutrition is safe, reliable, economical, practical and effective, and shows advantages over parenteral nutrition in improving nutritional status, enhancing immune function and preventing complications in patients after upper gastrointestinal surgery.

Key Words: Self-made nasal jejunal feeding tube; Upper gastrointestinal surgery; Enteral nutrition

Du Q, Fan MX, Zhang FQ, Ji G, Yu FJ. Application of self-made jejunal feeding tubes after upper gastrointestinal surgery: an analysis of 41 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3360-3364

摘要

目的: 探讨上消化道手术后患者应用自制鼻空肠营养管早期肠内营养的可行性、安全性及治疗价值。

方法: 对我院2006-08/2009-04应用自制鼻空肠管对41例上消化道手术后患者行肠内营养, 与2006-01/2008-12上消化道手术后行肠外营养的39例, 在年龄、性别、诊断和接受手术术式等基本一致的患者, 从术后肛门排气、抗生素使用、住院时间、术后恢复、并发症、医疗费用等进行对比分析。

结果: 采用自制鼻空肠管行早期肠内营养组41例病例均无吻合口瘘、胸腹腔及肺部感染等严重并发症, 临床治愈率为100%; 与肠外营

■同行评议者

秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院外科

养组比较有明显统计学意义($P<0.05$), 显示自制鼻空肠管肠内营养组具有满意的疗效和明显的优势。

结论: 上消化道手术后应用自制鼻空肠管肠内营养, 安全、可靠、经济实用、疗效确切, 对患者术后营养状态的改善、免疫功能的提高、并发症的防治等方面均有较好的疗效。

关键词: 自制鼻空肠管; 上消化道手术; 肠内营养

杜强, 范梅香, 张福庆, 纪刚, 于阜杰. 替代空肠营养管在上消化道手术中的应用分析41例. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3360-3364
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3360.asp>

0 引言

食管、贲门、胃、胰十二指肠等上消化道手术患者, 围手术期营养状态的好坏, 将直接影响到术后吻合口的愈合、手术创伤的修复、患者失血的耐受性和免疫应答能力。我国20世纪90年代后期, 对上消化道手术后早期使用空肠营养就重视起来, 进入21世纪以来已经成为外科临床营养支持的首选途径^[1]。我院本科2006-08/2008-04, 应用改进后的输液延长管替代鼻空肠管, 对收治的41例上消化道手术的患者, 术后进行肠内营养(enteral nutrition, EN), 本研究对其临床效果观察和分析, 同时随机筛选了39例上消化道手术后, 采用肠外营养(parenteral nutrition, PN)的设为对照组进行统计学对比分析, 进一步探讨EN在上消化道手术后应用的优势。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2006-08/2009-04应用改进后的输液延长管替代鼻空肠管对41例上消化道手术的患者术后进行EN。随机选择我院2006-01/2008-12相同时间段, 病例年龄、性别、所患疾病等基本一致的上消化道手术术后应用PN的患者39例为对照组。

1.2 方法

1.2.1 术式的选择: 2组患者治疗方面均行上消化道切除及重建术, 手术方法和术式的选择大致相同。

1.2.2 EN组置管方法: 术前30 min, 管床医师带一名护士, 将备好的换药包一个、输液延长管一根、1号丝线一卷、手套2双、5 mL一次性空针、消毒石蜡油、消毒软导引钢丝(复尔凯鼻肠管配套钢丝)用治疗车推至患者病床前, 打开换

药包, 术者戴好手套, 助手将延长管、空针、丝线、软导引钢丝递给术者, 将5 mL石蜡油倒入换药碗内后, 即戴好消毒手套与术者配合。术者先用空针将石蜡油注入输液延长管内作润滑剂, 将软导引钢丝自输液延长管一端徐徐全部插入, 较钢丝头端长出4-6 cm处剪断延长管即为“自制”鼻空肠管。再将自制的鼻空肠管头端, 经胃管的第二个侧孔向头端插入约5-7 cm用细丝线将两管绑扎在一起, 常规方法经鼻插入胃管, 使空肠营养管与胃管同时插入胃腔内, 胶布将两管固定于鼻周即可。手术中需巡回护士配合, 在重建消化系缝合前壁(或吻合器置入口缝闭)之前, 将胃管和营养管拖出并用碘伏消毒2遍后分开, 胃管置于胃腔内作胃肠减压用, 将自制鼻肠管再脱出适当长度, 头端长出之软管部分反折4-6 cm, 使管头端呈长卵圆形并用卵圆钳夹住, 术者右手持卵圆钳, 左手固定幽门部, 触摸下将营养管下送通过幽门后, 术者左手捏住营养管头端, 右手松开卵圆钳后退出, 在用右手将带钢丝的营养管向下徐徐插入, 左手触摸下送至超过屈氏韧带8 cm的空肠内。如重建消化系为胃空肠吻合的, 自制的鼻空肠管就可免插导引钢丝, 术中直接用卵圆钳夹住营养管下送并超过吻合口20 cm的空肠内即可。置管到位后, 术者于吻合口处捏住固定营养管, 嘱巡回护士轻轻外拉营养管受阻后, 将导引钢丝徐徐自营养管内拔出, 重新用胶布分别固定好胃管和经鼻空肠营养管, 空肠管外端接头用一次性5 mL空针连接。

1.2.3 术后EN方法: 本组上消化道手术的患者41例, 术后24-36 h开始通过自制的经鼻空肠置管, 滴注或灌注营养液。开始滴入能全力500 mL, 40 mL/h(可使用输液泵或加热器), 后再由护士指导下用葡萄糖粉150 g+食盐5 g+10%氯化钾20 mL+温开水至500 mL, 配好后倒入能全力空瓶内接着滴入, 100 mL/h。如无异常, 次日剂量和速度可翻倍, 以后直至2000-2500 mL/d, 滴速120-150 mL/h。患者肛门排气后可选择滴注或灌注鲜牛奶、豆浆、米汤、肉汤、鱼汤、果汁、菜汤等。每日的灌注量完成后, 常规用生理盐水或温开水20 mL注入营养管内再封管, 避免沉积物堵管。为避免冷刺激引起的肠管蠕动过速或痉挛, 可使用电辅助加热器保持营养液温度25℃-30℃。部分消化功能不全的患者, 在初次使用能全力肠内滴注时, 可能会出现腹部不适、腹胀、腹泻甚至腹痛的, 用百普力肠内滴注症状可明显缓解。根据监测患者电解质的平衡情

■应用要点

上消化道手术后应用自制鼻空肠管肠内营养, 安全、可靠、经济实用、疗效确切, 对患者术后营养状态的改善、免疫功能的提高、并发症的防治等方面均有较好的疗效。

■同行评价

本文科学性和创新性一般,但实用性较强,对临床医师有一定的参考价值。

表 1 2组患者术前基线资料

指标	EN组	PN组
年龄(岁)	58.9 ± 17	59.5 ± 18
男/女	24/17	21/18
食管中、下段癌	7	8
贲门胃底癌	4	3
胃体癌	7	8
胃窦癌	10	8
胃溃疡出血或癌变	5	7
胃息肉	1	0
胃出口梗阻	4	3
胆总管癌	1	0
胰体尾血肿胃壁穿透	1	0
胰头癌	1	2

表 2 2组患者治疗术式 (n)

术式	EN组	PN组
经左胸食管癌根治术	7	8
联合切口贲门癌切除术	2	1
经腹贲门癌切除术	2	2
全胃切除术	7	8
胃窦癌根治术	12	8
毕罗 I 式胃切除术	2	2
毕罗 II 式胃切除术	6	7
胃空肠吻合术	1	1
胰十二指肠切除术	1	2
胰体尾、胃、脾切除术	1	0

况,加或减钾、钠盐的用量。有时患者感觉口渴时可注入适量温开水或调慢灌注高浓度液的速度。本组静脉滴注主要是抗生素和多种维生素等治疗及辅助用药。

1.2.4 术后PN方法: 对照组于术后常规深静脉输液,补充静脉营养液如脂肪乳剂、氨基酸、高浓度葡萄糖、电解质、多种维生素和微量元素等治疗,待肠蠕动恢复后开始进食,从流质开始,使用肠内营养患者不足的营养成分由静脉营养补充,并且逐步过渡至全肠内营养。

统计学处理 应用软件SPSS10.0进行统计学分析。计量资料以mean ± SD表示,非连续性数据采用 χ^2 检验。连续性数据采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EN组对患者的影响 EN组鼻空肠管留置时间常规为7-9 d,经过临床观察患者均都能接受和耐受,未增加患者的痛苦和不适感。术中置管时间上也仅仅多占用了5-10 min,对患者的影响甚微。

2.2 EN组的并发症 EN组术后给予灌注营养液,营养支持治疗,无1例出现因自制鼻空肠管本身因素所致的并发症。其他原因所致的并发症也为数不多。其中1例行毕罗 II 式胃切除患者行空肠营养的第2天出现恶心呕吐并发症,经分析原因证实为灌注高渗配方液的速度过快,减慢灌注速度,或降低营养液浓度后症状得到缓解;另有2例出现腹胀、1例出现腹泻的上消化道手术患者,均在灌注能全力后出现,将能全力改用百普力滴注,或再度放慢滴注速度后患者症状好转。误吸所导致的肺炎或肺部感染,鼻空肠管的

堵塞,营养制剂和器具的污染,代谢异常等并发症,在本组病例中均未发生。

2.3 EN组与PN组的比较 两组患者一般情况、性别和年龄及发病情况及接受手术情况均无差异(表1-2),2组一经确诊即限期手术,术前均未行放化疗。但2组病例手术后因EN与PN的方法不同(表3)。EN组在肛门排气时间、营养液费用、并发症的发生、术后住院时间和总费用等项目与对照组比较,有明显统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

国内绝大部分医师采用的都是复尔凯经鼻空肠管进行术后肠内营养,我们认为该鼻肠管为一次性,虽使用方便、安全可靠,但价格较贵,特别是配套使用的软导引钢丝,使用一次便丢弃实在浪费,完全可以消毒后再利用。于是我们思考用输液延长管作一小改进与消毒后软导引钢丝配套,替代营养管使用,经不断摸索,已经获得了与复尔凯经鼻空肠管相同的临床疗效。通过41例患者的临床应用,我们体会到,在自制及应用过程中必须注意以下要点: (1)选择管径、长度能与导引钢丝相匹配的输液延长管; (2)将导引钢丝插入输液延长管之前必须注入消毒石蜡油以润滑; (3)自制营养管长度须超出钢丝4-6 cm处减去另一端,术中要将输液管长出部分反折呈长卵圆形,下送时可避免损伤肠黏膜; (4)食管与远段胃重建时,用卵圆钳夹住带导引钢丝的营养管头端必须下送超过幽门,否则将难以继续下送至空肠; (5)食管或胃与空肠吻合重建者,自制鼻空肠管可不用导引钢丝,术中直接用卵圆钳夹住营养管头端下送距吻合口20 cm空肠内即可; (6)经自制营养管滴注或灌注的速度必须遵循先慢渐快、营养液先浓后稀、量逐日增

表 3 2组围手术期情况比较 (mean \pm SD)

项目	EN组	PN组	检验值	P值
手术平均时间(min)	142 \pm 43	138 \pm 48	$t = 1.757$	>0.050
术中出血量(mL/n)	458 \pm 287	455 \pm 284	$t = 0.664$	>0.500
术中输血(n)	28	27	$\chi^2 = 0.008$	>0.500
肛门排气时间(h)	32.6 \pm 4.8	49.7 \pm 5.6	$t = 14.690$	<0.001
抗生素使用时间(d)	4.7 \pm 0.9	6.8 \pm 1.2	$t = 8.860$	<0.001
营养液费用(d/元)	56.8 \pm 12.5	98.4 \pm 19.2	$t = 11.549$	<0.001
置管费用(元)	12.6 \pm 3.1	334 \pm 28.8	$t = 71.070$	<0.001
体质量减轻(kg)	4 \pm 2.4	6.4 \pm 2.9	$t = 4.040$	<0.001
吻合口瘘n(%)	0(0)	2(5)	$\chi^2 = 4.149$	<0.050
肝功能损害n(%)	1(2)	5(12.8)	$\chi^2 = 5.852$	<0.025
切口感染n(%)	1(2)	3(7.7)	$\chi^2 = 1.159$	>0.050
腹腔感染n(%)	0(0)	3(7.7)	$\chi^2 = 2.670$	>0.050
术后住院时间(d)	8.7 \pm 1.4	12.5 \pm 2.6	$t = 8.210$	<0.001
住院费用(元)	10 200 \pm 2400	12 300 \pm 2800	$t = 4.157$	<0.001

多、品种按需或适应性灵活选择等原则; (7)肛门排气后即可先拔除胃管, 鼻空肠管最好保留7-9 d.

严格掌握EN的适应证和禁忌证. 结合本组41例患者应用及观察, 我们认为自制鼻空肠管的临床应用除需掌握上述制作使用要点外, 还应掌握其应用的适应证、禁忌证, 避免可能发生的并发症. 对具备胃肠道功能而出现下列情况: (1)上消化道手术患者; (2)经口摄食不能或不足者; (3)禁忌经口摄食者; (4)出现胃肠道瘘或吻合口瘘者; (5)术后出现胃动力异常者^[2]; (6)上消化道非梗阻性吞咽困难者. 均应视为空肠营养的适应证. 下列情况均应视为禁忌证, 如: (1)不能耐受高糖负荷的糖尿病患者; (2)上消化道大出血患者; (3)下消化系手术后或各种原因所致的肠梗阻患者; (4)严重腹膜炎患者; (5)严重肠道吸收不良者. 我们的经验是严格把握上述适应证和禁忌证, 是临床应用能获得最佳疗效的基础. 避免和防治患者出现的: 恶心呕吐、腹胀腹泻、误吸、吸入性肺炎、喂养管堵塞、营养制剂的器械污染、代谢异常、精神心理障碍等并发症是该技术得以成功开展的基本保障.

经鼻空肠管作为上消化道围手术期首选的营养方式, 已被越来越多的外科医师应用于临床^[3]. 本组41例上消化道手术病例选择了EN, 尤其是本组患者中恶性肿瘤约占88%(41/5), 因恶性肿瘤患者术前多伴有营养消耗过多和免疫抑制, 患者所接受的又是大手术, 术后机体必然处于高分解代谢状态, 加之消化系重建和修复, 术后对营养的需要更显重要. 以往上消化道手术后一般在肛门排气后(需禁食3-5 d)才能逐渐进

流质饮食, 术后的营养主要依赖静脉补给. 实验研究表明, 腹部手术后数小时就有肠蠕动功能恢复, 胃肠道麻痹仅限于胃和结肠, 术后6-8 h小肠就有消化和吸收功能^[4]. 术后禁食会使胃和小肠的蠕动处于缓慢、不规律的收缩波, 而早期进食状态则可促使小肠的蠕动变得有力频繁和有规律的收缩^[5]. 另外静脉输注葡萄糖、氨基酸、脂肪乳剂等高营养液对胃肠动力也有明显抑制作用, 其机制可能与抑制迷走神经兴奋性及刺激胆囊收缩素分泌有关^[6]. 由此可见, 早期肠内营养完全是可行、实用、必要和安全有效的. 本组病例的临床观察证实, 早期EN能刺激肠蠕动, 促进肠功能的恢复和肠黏膜细胞生长, 可促进胃肠激素分泌, 有利于维持肠黏膜细胞结构与功能的完整性, 维护肠黏膜屏障, 明显减少肠道细菌移位的发生^[6]. 另外, 由于肠道功能的恢复早, 胃管留置时间缩短, 可减少因鼻胃管引起的一系列肺部并发症, 迅速缓解患者鼻咽部产生的不舒适感, 有利于患者的休息和睡眠的改善, 食欲的恢复^[7-8], 从而加快患者的康复.

EN组虽在术中需下送空肠管需多花费8-10 min, 但与PN对照组通过对比可见, 无论在手术时间、术中平均出血量和术中输血情况, 均无显著差异. 相反所有患者均能耐受术后24 h开始的肠内营养灌注, 无论是在肛门排气(拔胃管的时间)、抗生素的使用及住院时间方面; 或是在术后恢复、并发症的发生方面; 以及在置管费用和住院总医药费用上两组间差异有显著性($P < 0.05$), 均显示了上消化道手术后应用了自制鼻空肠管EN具有明显的优势. 术后虽有个别患

者出现腹胀、恶心、腹泻等不适,减慢滴速或更换适合的营养液后均可缓解,而且无吻合口漏、胸腹腔感染、肺部感染等严重并发症发生,临床治愈率100%,进一步证实早期应用自制的鼻空肠管EN是安全、可靠和有效的。

总之,本组41例上消化道手术的患者早期应用自制鼻空肠管行EN,对患者术后早期恢复和改善患者的营养状态及免疫功能,防止严重并发症大有裨益,符合快速康复外科理念。自制的鼻空肠管使用方便、对设备的要求不高、操作简单、对患者无任何不良反应和毒副作用,手术者熟练掌握置管的方法和要领,完全能替代复尔凯鼻空肠管,成为上消化道手术后EN的最佳首选途径。

4 参考文献

- 1 黎介寿. 肠内营养—外科临床营养支持的首选途径. 中

国实用外科杂志 2003; 23: 67

- 2 张克俭, 王远新, 王小娣, 施光美, 李广仁. 经胃镜快速放置空肠营养管. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 53
- 3 宋洪江, 魏玉哲, 王铁, 薛英威. 输入袢空肠两点造口双向置管在胃癌毕Ⅱ式吻合术后早期及化疗期间肠内营养中的应用. 中国实用外科杂志 2009; 29: 337-339
- 4 赖佳明, 梁力建, 华赞鹏, 方仕, 黄力, 王恕同, 彭宝岗. 早期肠内肠外营养支持对肝硬化肝切除术后影响的研究. 中国实用外科杂志 2009; 29: 578-580
- 5 江志伟, 李宁, 黎介寿. 术后肠麻痹临床表现及病理生理机制. 中国实用外科杂志 2007; 27: 682-683
- 6 侯玲, 时吉庆, 王蕤兰, 菅留建, 邓丽娟. 胃镜下放置鼻空肠营养管72例. 中国微创外科杂志 2007; 7: 586
- 7 Schuchert MJ, Pettiford BL, Landreneau JP, Waxman J, Kilic A, Santos RS, Kent MS, El-Sherif A, Abbas G, Luketich JD, Landreneau RJ. Transcervical gastric tube drainage facilitates patient mobility and reduces the risk of pulmonary complications after esophagectomy. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 1479-1484
- 8 Thorat JD, Wang E. Gastric acid burns because of a disconnected nasogastric tube. *CMAJ* 2008; 178: 680

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、中医中药学、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。(科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

中国序贯疗法与三联疗法治疗幽门螺杆菌感染荟萃分析

陈羽, 吴礼浩, 何兴祥

陈羽, 吴礼浩, 何兴祥, 广东药学院附属第一医院消化内科
广东省广州市 510080

作者贡献分布: 本研究由陈羽设计、分析、撰写完成; 吴礼浩协助数据收集; 何兴祥总体指导。

通讯作者: 何兴祥, 教授, 主任医师, 510080, 广东省广州市, 广东药学院附属第一医院消化内科. xingxianghe@medmail.com.cn
电话: 020-61321457

收稿日期: 2009-09-07 修回日期: 2009-10-25

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

Sequential therapy versus standard triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Chinese patients: a meta-analysis

Yu Chen, Li-Hao Wu, Xing-Xiang He

Yu Chen, Li-Hao Wu, Xing-Xiang He, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Professor Xing-Xiang He, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. xingxianghe@medmail.com.cn

Received: 2009-09-07 Revised: 2009-10-25

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To systematically review the differences in efficacy and incidence of adverse reactions between sequential therapy and standard triple therapy for the eradication of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection in Chinese patients.

METHODS: A search of Chinese databases was conducted by two independent reviewers to identify randomized controlled trials (RCT) comparing sequential therapy with standard 7-day and 10-day triple therapies in the treatment of *H pylori* infection. The patients' clinical data, study quality, *H pylori* eradication rate and the incidence rate of adverse reactions were compared between sequential therapy and standard 7-day and 10-day standard triple therapies in the treatment of *H pylori* infection. The relative risk ratio (RR) with 95% confidence intervals (CI) was calculated. The funnel plots was used to estimate publication bias.

RESULTS: A total of 9 studies involving 835 subjects were identified. The eradication rates of sequential therapy and standard 7-day and 10-day triple therapies were 92.0%, 73.7% and 84.5%, respectively. Pooled estimates showed superiority of sequential therapy over 7-day triple regimen with RR of 1.23 (95%CI: 1.14-1.33), and over 10-day triple regimen with RR of 1.12 (95%CI: 1.02-1.23). The incidence rate of adverse reactions was comparable between the two therapies.

CONCLUSION: Sequential therapy appears superior to standard triple therapy for eradication of *H pylori* infection in Chinese patients. No significant difference is noted in the incidence rate of adverse reactions between the two therapies.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Sequential therapy; Triple therapy; Eradication rate; Meta-analysis

Chen Y, Wu LH, He XX. Sequential therapy versus standard triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in Chinese patients: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3365-3369

摘要

目的: 系统评价中国序贯疗法与三联疗法治疗幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的疗效及不良反应的差异。

方法: 利用中文数据库, 根据纳入标准入选中国序贯疗法与三联疗法根除*H pylori*的随机对照临床试验。提取患者的基本资料、研究质量、*H pylori*根除率和不良反应发生率等相关数据。比较序贯疗法和7日或10日三联疗法的*H pylori*根除率和不良反应发生率, 计算相对危险度(Relative risk, RR)和95%CI。运用漏斗图评价出版偏倚。

结果: 纳入了9项随机对照研究, 共835例患者。序贯疗法、7日及10日三联疗法的总*H pylori*根除率分别为92.0%、73.7%和84.5%($P = 0.002$)。序贯疗法分别与7日或10日三联疗法比较, RR分别为1.23(95%CI: 1.14-1.33)和1.12(95%CI: 1.02-1.23)。不良反应

■背景资料

随着近年抗菌素耐药率的升高, 根除*H pylori*的经典三联疗法的根除率也在逐年下降。由于*H pylori*已明确与胃炎、消化性溃疡、胃癌等疾病存在密切关系, 因此如何提高*H pylori*的根除率成为世界关注的热点之一。序贯疗法为意大利学者提出的根除*H pylori*新方案, 已得到国外研究的肯定, 并被列入2007年美国胃肠病学会*H pylori*感染治疗指南的一线方案。目前国内有多个研究关注本问题, 但是仍无多中心大样本的临床研究, 缺乏统一的指导原则。本研究旨在通过荟萃分析的方法, 为序贯疗法是否适用于国内人群提供依据。

■同行评议者

张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

■研发前沿

随着*H pylori*耐药率的上升,如何选择有效的根除*H pylori*的药物及方法成为目前医学界研究热点之一。序贯疗法为新颖的根除*H pylori*方法之一,而序贯疗法的临床疗效研究有待进一步证明。

发生率无明显差异。

结论: 中国根除*H pylori*使用序贯疗法明显优于7日和10日三联疗法,不良反应发生率无差异。

关键词: 幽门螺杆菌; 序贯疗法; 三联疗法; 根除率; 荟萃分析

陈羽, 吴礼浩, 何兴祥. 中国序贯疗法与三联疗法治疗幽门螺杆菌感染荟萃分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3365-3369

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3365.asp>

0 引言

我国幽门螺杆菌共识意见(2003, 安徽桐城)^[1]指出, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是消化性溃疡、胃癌、胃黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤等疾病的重要致病因子, 对消化性溃疡、早期胃癌术后、胃MALT淋巴瘤和有明显异常的慢性胃炎患者必须根除*H pylori*。*H pylori*根除的一线方案, 即标准三联疗法(质子泵抑制剂、阿莫西林、甲硝唑、克拉霉素等), 随着细菌耐药率的逐年升高, 其*H pylori*根除率也在下降, 已有文献报道标准三联疗法*H pylori*根除率已下降至66.6%^[2]。同时, 临床研究还表明复治者比初治者*H pylori*根除率明显降低。因此, 需要寻找一种更理想的*H pylori*根除的一线方案。由意大利De Francesco *et al*^[3]发现的根除*H pylori*的新方案-序贯疗法, 可以取得更高的*H pylori*根除率。但由于目前已证实, *H pylori*的重要毒力基因CagA存在东亚及西方两种亚型, 不同亚型对临床结局存在相当大的影响^[4]; 不同国家或地区*H pylori*对主要抗菌素的耐药状况有明显差异^[5], 因此国外序贯疗法的经验和资料并不一定适合中国。在国内, 虽然有多个临床试验提示序贯疗法具有比三联疗法更高的*H pylori*根除率, 并在“第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识意见会议”上推荐为B级或C级新疗法^[6], 但目前尚缺乏多中心大样本的临床研究以证实确切疗效。因此, 本研究对国内相关的随机对照临床试验的数据进行荟萃分析, 旨在提供更准确可信的循证医学证据。

1 材料和方法

1.1 材料 以检索词“幽门螺杆菌”、“序贯”检索中国期刊全文数据库(1994-2008年)、万方数字化期刊全文数据库(1984-2009年)、中国生

物医学文献库(1978-2008年)、维普中文期刊数据库(1989-2008年), 同时联系相关文献的通讯作者和该领域的专家获得文献资料。检索结果由两名评价者独立评阅, 意见不一致时咨询第三方。

1.2 方法 纳入比较序贯疗法与7日或10日三联疗法的*H pylori*根除率的随机对照临床试验。纳入标准: (1)*H pylori*感染需经以下任一方法证实: 快速尿素酶试验、组织染色或C¹³/C¹⁴尿素呼气试验; (2)需含意愿性(intention-to-treat, ITT)分析数据; (3)研究需包括10日序贯疗法和三联疗法的疗效比较。10日序贯疗法方案包括前5 d应用质子泵抑制剂(PPI)常规剂量, bid, 联合一种抗菌素(阿莫西林1000 mg, bid或克拉霉素500 mg, bid)的二联治疗; 后5 d应用PPI常规剂量, bid, 联合两种抗菌素(替硝唑500 mg, bid和/或克拉霉素500 mg, bid和/或红霉素500 mg, qid和/或阿奇霉素500 mg, qd和/或左氧氟沙星200 mg, bid等)的三联治疗; 三联疗法方案为PPI联合两种抗生素。剔除标准: (1)以前接受过抗*H pylori*治疗; (2)前4 wk服用过PPI、H₂受体阻断剂、铋剂、抗生素和益生菌。

统计学处理 按照预制的标准表格提取纳入文献的相关数据。提取信息包括: (1)研究者, 出版年限, 受试者例数, 平均年龄, 性别比; (2)实验设计细节, 是否随机, 随机方法, 失访者例数, 随访时间; (3)治疗方案, 治疗前后*H pylori*诊断方法, *H pylori*根除例数和不良反应发生例数。运用Jadad评分系统评价各研究的质量: 随机化、双盲、随访。由两名评价者独立评分, 当意见不一致时咨询第三方。系统分析软件为Cochrane协作网提供的Revman(版本4.2.2)以及SPSS13.0。Breslow-Day检验评价各研究之间的异质性。运用固定效应模型计算危险度; 当存在异质性时, 运用随机效应模型计算危险度。主要评价结果为: (1)比较10日序贯疗法与7日或10日标准三联疗法的*H pylori*根除率; (2)*H pylori*根除过程中不良反应的发生率。使用漏斗图评价出版偏倚。

2 结果

2.1 检索结果 在18个可能相关的文献中, 阅读全文后排除了9篇文献(其中有综述、非临床试验、国外资料的荟萃分析、不同的干预措施等)。最终纳入了9项研究^[7-15]进行评价。需要强调其中一项来自赵太云 *et al*^[16]的研究, 由于其序贯疗法中前5 d使用了2种抗菌素而被剔除。9项研

表 1 序贯疗法与7日三联疗法的 *H. pylori* 根除率比较

Study or sub-category	序贯疗法组 <i>n/n</i>	三联疗法组(7日) <i>n/n</i>	RR(fixed) 95%CI	Weight %	RR(fixed) 95%CI
赵大国 <i>et al</i> 2006	39/43	30/42		13.32	1.27 [1.03, 1.57]
王靖飞 <i>et al</i> 2007	47/49	41/48		18.17	1.12 [0.99, 1.28]
李曜 <i>et al</i> 2008	37/41	30/41		13.16	1.23 [1.00, 1.52]
马晨曦 <i>et al</i> 2008	56/67	41/63		18.54	1.28 [1.04, 1.58]
钱韶红 <i>et al</i> 2008	38/42	28/38		12.90	1.23 [0.99, 1.52]
王军毅 <i>et al</i> 2008	46/49	33/43		15.42	1.22 [1.02, 1.46]
吴礼浩 <i>et al</i> 2008	26/28	19/27		8.49	1.32 [1.01, 1.72]
Total (95%CI)	319	302		100.00	1.23 [1.14, 1.33]
Total events: 289(序贯疗法组), 222(三联疗法组(7日))					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 2.45$, $df = 6$ ($P = 0.87$), $I^2 = 0\%$					
Test for overall effect: $Z = 5.40$ ($P < 0.00001$)					
			0.5 0.7 1 1.5 2		
			Favours三联疗法 Favours序贯疗法		

■ 相关报道

意大利 Francesco *et al* 于 2001 年首先提出了根除 *H. pylori* 的序贯疗法, Jafri *et al* 和童锦禄等分别发表了关于序贯疗法国外文献的荟萃分析, 均得出序贯疗法优于经典三联疗法的结论。

表 2 序贯疗法与10日三联疗法的 *H. pylori* 根除率比较

Study or sub-category	序贯疗法组 <i>n/n</i>	三联疗法组(10日) <i>n/n</i>	RR(fixed) 95%CI	Weight %	RR(fixed) 95%CI
陈文提 <i>et al</i> 2008	64/67	58/67		63.74	1.10 [0.99, 1.23]
文静 <i>et al</i> 2008	38/40	33/40		36.26	1.15 [0.98, 1.35]
Total (95%CI)	107	107		100.00	1.12 [1.02, 1.23]
Total events: 102(序贯疗法组), 91(三联疗法组(10日))					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 0.19$, $df = 1$ ($P = 0.66$), $I^2 = 0\%$					
Test for overall effect: $Z = 2.49$ ($P = 0.01$)					
			0.5 0.7 1 1.5 2		
			Favours三联疗法 Favours序贯疗法		

究共纳入835例患者。各组患者的年龄、男女构成比及病程均无统计学差异。

2.2 *H. pylori* 根除率的荟萃分析结果 10日序贯疗法分别与7日或10日三联疗法比较, 总的 *H. pylori* 根除率分别为92.0%、73.7%和84.5%, 多组秩和检验提示三者存在显著差异 ($P = 0.002$)。进一步分析将9项研究数据分为2组, 第1组为序贯疗法与7日三联疗法的比较, 第2组为序贯疗法与10日三联疗法的比较。第1组7项研究, 共纳入621例患者^[8-12,14,15]。根据ITT分析显示, 序贯疗法 *H. pylori* 根除率为91.1%(95%CI: 87.5%-94.7%), 而7日三联疗法 *H. pylori* 根除率为73.7%(95%CI: 67.9%-79.5%), 相对危险度(relative risk, RR)为1.23(95%CI: 1.14-1.33, $P < 0.001$, 表1); 根据方案数据(perprotocol population, PP)分析显示, 序贯疗法 *H. pylori* 根除率为

92.9%(95%CI: 91.0%-94.9%), 而7日三联疗法 *H. pylori* 根除率为74.9%(95%CI: 69.8%-80.0%), RR为1.24(95%CI: 1.15-1.33, $P < 0.001$)。第2组2项研究, 共纳入214例患者^[7,13]。序贯疗法的 *H. pylori* 根除率为95.3%, 10日三联疗法的 *H. pylori* 根除率为84.5%, RR为1.12(95%CI: 1.02-1.23, $P = 0.01$, 表2)。以上结果均表明序贯疗法明显优于7日或10日三联疗法。

2.3 不良反应发生率 8项研究提供了不良反应的例数^[7-12,14-15]。常见的不良反应有腹泻、纳差、恶心、呕吐、腹痛、味觉异常等。序贯疗法不良反应的平均发生率为18.8%, 7日三联疗法不良反应的平均发生率为16.7%, RR为1.15(95%CI: 0.77-1.73); 序贯疗法与10日三联疗法不良反应的发生率分别为11.9%和6%, RR为2.14(95%CI: 0.61-7.47)。以上结果均说明两种方案在不良反

■应用要点

本研究证明了中国人群中序贯疗法均明显优于7日及10日三联疗法,为序贯疗法在中国人群应用提供可靠的循证医学证据,可成为根除*H pylori*的一线治疗方案。

应发生率上无差异。

2.4 敏感性分析和出版偏倚 敏感性分析过程中排除了1项低质量试验。出版偏倚使用漏斗图分析未见明显不对称,说明无出版偏倚。

3 讨论

*H pylori*是胃炎、消化性溃疡、胃癌、胃MALT淋巴瘤等疾病的重要致病因子,目前学者建议新的*H pylori*根除指征包括:(1)必须根除:消化性溃疡、低度恶性胃MALT淋巴瘤、早期胃癌术后;(2)支持根除:胃黏膜萎缩、糜烂性慢性胃炎、非溃疡性消化不良、计划长期使用NSAIDs、有胃癌家族史、个人要求治疗者^[6]。一种理想的治疗方案需要包括:(1)*H pylori*根除率 $\geq 90\%$;(2)溃疡愈合迅速,症状消失快;(3)患者依从性好;(4)不产生耐药性;(5)疗程短,治疗简便;(6)价格便宜^[17]。而随着目前*H pylori*耐药率上升,患者依从性下降等情况的存在,经典三联疗法的*H pylori*根除率在逐渐下降,甚至有报道降至66.6%^[2]。因此,亟待寻找一种理想的根除方案。

序贯疗法是意大利De Francesco *et al*^[3]发现的根除*H pylori*的新方案。De Francesco *et al*发现14日二联药物治疗和随后的7日三联药物治疗的*H pylori*根除率显著高于给药顺序相反的方案,这提示给予抗生素的顺序影响了*H pylori*的根除率。基于这一研究结果,进一步简化了方案,提出了10日序贯疗法:在前5 d的诱导期中应用PPI联合阿莫西林,在后5 d中应用PPI、替硝唑和克拉霉素的三联治疗。多个国外的研究表明^[3,18-19],序贯疗法均取得了超过90%的较高根除率。亦有国外的荟萃分析^[20]证明序贯疗法优于三联疗法,但存在一定的出版偏倚。另一方面,由于*H pylori*的重要毒力基因CagA存在东亚及西方两种亚型,而不同亚型对临床结局存在相当大的影响^[4];从耐药方面考虑,国外患者对克拉霉素的耐药率高,而我国患者对咪唑类的耐药率高,国外的资料并不能完全适用于我国。我国发表了多篇临床随机对照试验^[7-16],但由于缺乏多中心大样本的试验而缺乏一定的说服力。

本研究荟萃分析国内关于序贯疗法的研究,以提供更可靠更准确的循证医学证据。结果表明,序贯疗法比7日及10日三联疗法*H pylori*根除率明显升高,ITT分析超过90%,多组秩和检验提示三者存在显著差异($P = 0.002$)。序贯疗法与7日三联疗法比较RR为1.24(95%CI: 1.15-1.33),序

贯疗法与10日三联疗法比较RR为1.12(95%CI: 1.02-1.23),均提示序贯疗法优于三联疗法。同时,不良反应的发生率无差异;由于序贯疗法前5 d只使用一种抗菌素,对比10日三联疗法具有经济上的优势。本研究数据与童锦禄 *et al*^[21]的国外文献荟萃分析结果相接近。本研究证明了序贯疗法明显提高*H pylori*根除率,能成为*H pylori*根除的一线治疗方案。

序贯疗法优于三联疗法的原因目前尚不清楚,可能与抗菌素依次使用加强杀菌效果,患者依从性好等有关,但具体原因有待进一步研究。本研究尚存在以下不足:(1)尚缺乏对序贯疗法的确切定义,多个研究使用的抗菌素稍有差别;(2)本研究的数据存在无双盲、样本量小等缺陷,特别是与10日三联疗法的对比有待进一步扩大样本量;另外,由于同时研究消化不良或消化性溃疡的文献少,因此缺乏亚组的比较分析,有待试验设计方案的改善。

4 参考文献

- 1 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民. 幽门螺杆菌共识意见(2003·安徽桐城). 中华消化杂志 2004; 24: 126-127
- 2 Ojetti V, Migneco A, Zocco MA, Nista EC, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Beta-lactamase inhibitor enhances *Helicobacter pylori* eradication rate. *J Intern Med* 2004; 255: 125-129
- 3 De Francesco V, Zullo A, Hassan C, Faleo D, Ierardi E, Panella C, Morini S. Two new treatment regimens for *Helicobacter pylori* eradication: a randomised study. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 676-679
- 4 萧树东, 郑青. 幽门螺杆菌cagA基因多态性对临床结局的影响: 东亚菌株和西方菌株. 医学与哲学(临床决策论坛版) 2007; 28: 28-31
- 5 潘秀珍, 彭孝纬, 彭如洁. 幽门螺杆菌对抗生素耐药研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 806-813
- 6 成虹, 胡伏莲. “第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识意见会议”纪要. 临床药物治疗杂志 2007; 5: 58-59
- 7 陈文提. 10天序贯方案治疗幽门螺杆菌阳性消化性溃疡的疗效观察. 医学理论与实践 2008; 21: 1299-1300
- 8 李曜, 郝巧枝, 于丽丽. 序贯疗法与常规疗法根除幽门螺旋杆菌疗效分析. 中国实用医药 2008; 3: 114-115
- 9 马春曦, 彭国林, 赵勇凯, 张晓云, 詹丽英. 序贯疗法与标准三联疗法治疗幽门螺杆菌阳性功能性消化不良患者的疗效比较. 第二军医大学学报 2008; 29: 908-911
- 10 钱韶红, 孙立新, 张翠云, 李德清, 肖红. 序贯疗法根除幽门螺杆菌的临床观察. 中国误诊学杂志 2008; 8: 2849
- 11 王靖飞, 姚建设. 含左氧氟沙星序贯疗法根除幽门螺旋杆菌的疗效观察. 中国全科医学 2007; 10: 1814-1815
- 12 王军毅, 郑拓. 序贯疗法治疗幽门螺杆菌阳性的十二指肠球部溃疡患者的临床分析. 浙江临床医学 2008; 10: 1216-1217
- 13 文静, 陈义华. 10天序贯疗法与传统三联疗法根治HP疗效观察. 赣南医学院学报 2008; 28: 427
- 14 吴礼浩, 邓芝禾. 序贯疗法与传统三联疗法根除幽门

- 螺杆菌的疗效比较. 河北医学 2008; 14: 523-525
- 15 赵大国, 孙玉平, 潘建军. 10日序贯疗法根除幽门螺杆菌的疗效观察. 中国医师进修杂志 2006; 29: 24-25
 - 16 赵太云, 陆兴俊, 嘉海燕. 四联抗生素序贯疗法根除幽门螺杆菌疗效对照分析. 中国医药导报 2008; 5: 49-50
 - 17 胡伏莲. 《幽门螺杆菌感染若干问题共识意见》解读. 中国医刊 2007; 42: 4-6
 - 18 Zullo A, Vaira D, Vakil N, Hassan C, Gatta L, Ricci C, De Francesco V, Menegatti M, Tampieri A, Perna F, Rinaldi V, Perri F, Papadia C, Fornari F, Pilati S, Mete LS, Merla A, Poti R, Marinone G, Savioli A, Campo SM, Faleo D, Ierardi E, Miglioli M, Morini S. High eradication rates of *Helicobacter pylori* with a new sequential treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 719-726
 - 19 Francavilla R, Lionetti E, Castellaneta SP, Magistà AM, Boscarelli G, Piscitelli D, Amoroso A, Di Leo A, Miniello VL, Francavilla A, Cavallo L, Ierardi E. Improved efficacy of 10-Day sequential treatment for *Helicobacter pylori* eradication in children: a randomized trial. *Gastroenterology* 2005; 129: 1414-1419
 - 20 Jafri NS, Hornung CA, Howden CW. Meta-analysis: sequential therapy appears superior to standard therapy for *Helicobacter pylori* infection in patients naive to treatment. *Ann Intern Med* 2008; 148: 923-931
 - 21 童锦禄, 冉志华, 沈骏, 黄美兰, 陈翔, 萧树东. 10天序贯疗法与标准三联疗法治疗幽门螺杆菌感染荟萃分析. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 106-109

■同行评价

本文选题较好, 入选标准和剔除标准也掌握的较严, 对指导临床工作意义较大, 如能有不同抗生素序贯以及应用顺序对结果影响的资料分析, 将使文章更具指导意义。

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》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (科学编辑: 李军亮 2009-11-18)

2008年全国其他感染性腹泻报告病例信息分析

张昕, 高永军, 冯子健, 王子军, 冉陆

■背景资料

腹泻病是全球性的公共卫生问题之一, 据WHO资料表明, 2002年腹泻病在全球死因顺位中列第7位, 在中国其发病率仅次于上呼吸道感染。

张昕, 北京协和医学院公共卫生学院 北京市 100050
高永军, 冯子健, 王子军, 冉陆, 中国疾病预防控制中心疾病控制和应急处理办公室 北京市 100050
中美新发和再发传染病基金项目资助, No. 5U2GGH000018-02
作者贡献分布: 本文由张昕与高永军进行数据分析; 冉陆对数据分析给予指导并对数据结果进行总结和讨论; 冯子健与王子军进行指导。
通讯作者: 冉陆, 研究员, 100050, 北京市宣武区南纬路27号, 中国疾病预防控制中心疾病控制和应急处理办公室。
ranlu66@yahoo.com
电话: 010-63025413 传真: 010-63025413
收稿日期: 2009-08-05 修回日期: 2009-09-16
接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-11-18

Analysis of the pathogens in infectious diarrhea (other than cholera, dysentery, typhoid and paratyphoid) cases reported in China in 2008

Xin Zhang, Yong-Jun Gao, Zi-Jian Feng, Zi-Jun Wang, Lu Ran

Xin Zhang, School of Public Health, Peking Union Medical College, Beijing 100050, China
Yong-Jun Gao, Zi-Jian Feng, Zi-Jun Wang, Lu Ran, Office for Disease Control and Emergency Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

Supported by: the China-US Collaborative Program on Emerging and Re-emerging Infectious Disease, No. 5U2GGH000018-02

Correspondence to: Lu Ran, Office for Disease Control and Emergency Response, Chinese Center for Disease Control and Prevention, 27 Nanwei Road, Beijing 100050, China. ranlu66@yahoo.com

Received: 2009-08-05 Revised: 2009-09-16

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-11-18

Abstract

AIM: To analyze the etiological and epidemiological characteristics of infectious diarrhea (other than cholera, dysentery, typhoid and paratyphoid) cases reported in China in 2008.

METHODS: The data of infectious diarrhea (other than cholera, dysentery, typhoid and paratyphoid) cases reported in China in 2008 were retrieved from Chinese Information System for Diseases Control and Prevention and analyzed.

RESULTS: Of more than 70 million cases of in-

fectious diarrhea (other than cholera, dysentery, typhoid and paratyphoid) reported, 50.98% of the cases and 69.64% of the deaths occurred in children aged ≤ 5 years. In nearly 30 000 cases with pathogen information, viruses (90.65%) and bacteria (8.97%) were found to be major pathogens. In bacterial diarrhea, *Vibrio parahaemolyticus* (65.26%) and *Salmonella* (20.70%) are major pathogens, accounting for 85.96%. In viral diarrhea, rotavirus (92.75%) and adenovirus (4.34%) are major pathogens, accounting for 97.09%.

CONCLUSION: Infectious diarrhea (other than cholera, dysentery, typhoid and paratyphoid) mainly affects children aged less than 5 years. The diagnostic information concerning the pathogens of infectious diarrhea has important implications for public health. However, the quality and timeliness of the reported information need to be improved, and the data need to be enriched.

Key Words: Infectious diarrhea; Etiology; Surveillance; Data analysis

Zhang X, Gao YJ, Feng ZJ, Wang ZJ, Ran L. Analysis of the pathogens in infectious diarrhea (other than cholera, dysentery, typhoid and paratyphoid) cases reported in China in 2008. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3370-3375

摘要

目的: 了解2008年我国其他感染性腹泻的流行概况和病原学。

方法: 对中国疾病控制信息系统“疾病监测信息报告管理系统”2008年收到的全国其他感染性腹泻的病例报告的病原信息进行统计分析。

结果: 在报告的70余万病例中, 5岁及以下儿童占病例总数的50.98%, 死亡总数的69.64%。4.03%的病例报告了病原学诊断结果, 其中90.65%为病毒性, 8.97%为细菌性。在报告的病毒性感染性腹泻中, 以轮状病毒(92.75%)和腺病毒(4.34%)感染为主。在报告的细菌性感

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

染性腹泻中,以副溶血弧菌(65.26%)和沙门菌(20.70%)感染为主。

结论: 感染性腹泻主要危害5岁以下儿童。腹泻病病原诊断信息具有公共卫生学意义,感染性腹泻病病原诊断信息报告率和报告质量亟待提高。

关键词: 感染性腹泻; 病原学; 监测; 数据分析

张昕, 高永军, 冯子健, 王子军, 由陆. 2008年全国其他感染性腹泻报告病例信息分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3370-3375

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3370.asp>

0 引言

在我国其他感染性腹泻是丙类传染病,对感染性腹泻诊断和报告的依据为《感染性腹泻诊断标准(WS271-2007)》,其中对感染性腹泻的定义为“由病原微生物及其产物或寄生虫所引起的、以腹泻为主要临床特征的一组传染病,本标准则仅指除霍乱、痢疾、伤寒、副伤寒以外的感染性腹泻”。当今,感染性腹泻普遍流行于世界各地,是全球性重要的公共卫生问题之一^[1]。在我国,2008年其他感染性腹泻在38种法定传染病中发患者数居前3位^[2]。其他感染性腹泻病例可以按照临床诊断的标准进行诊断和报告,目前没有特别要求提供病原学检测结果。在“全国疾病监测信息报告管理系统”上报告的其他感染性腹泻的病例中,有病原学诊断结果的病例比例很低。实际上,许多医院的临床实验室进行了大量的病原学检测,但只有少部分通过网络进行了报告。病原学检测结果对于感染性腹泻的预防和控制有重要的公共卫生的意义,可以帮助我们了解和掌握腹泻病原谱的构成及变化情况,为采取防控措施提供依据^[3]。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-01-01/12-31中国疾病控制信息系统“疾病监测信息报告管理系统”收到的其他感染性腹泻的病例报告。

1.2 方法 对中国疾病控制信息系统“疾病监测信息报告管理系统”中收集到的数据进行数据清理,并对流行病学信息进行统计学描述。通过数据整理,对报告病原学信息的病例进行重点分析,同时对各类病原的病例分布情况进行描述,对重要病原进行详细的数据描述和数据分析。对收集到的全国其他感染性腹泻的病例报

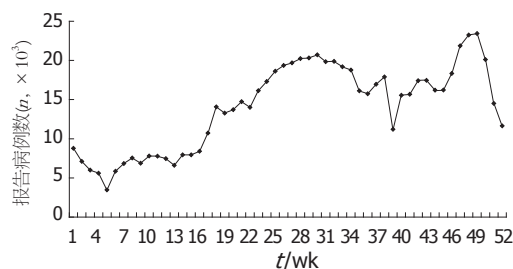


图1 2008年其他感染性腹泻周分布。

告的病原信息进行描述性统计分析。

2 结果

2.1 流行病学概况 2008年全国31个省(自治区、直辖市)共报告其他感染性腹泻病例733 796例,报告发病率为55.54/10万,报告死亡56例。

2.1.1 地区分布: 报告病例数居前5位的地区为浙江(111 904)、广东(111 304)、河北(49 089)、北京(48 647)和天津(44 161),占全国报告病例总数的49.76%。报告发病率居前5位的地区为天津(396.06/10万)、北京(297.90/10万)、浙江(221.15/10万)、宁夏(147.61/10万)和广东(117.79/10万)。

2.1.2 时间分布: 其他感染性腹泻报告病例数在夏季和冬季出现了2个高峰,第1个高峰在第23-34周,第二个高峰在第45-50周(图1)。

2.1.3 人群分布: 报告病例中,男性436 597例,女性297 199例,男女性别比为1.47:1; 0-1岁组发患者数为201 464例,占总数的27.46%,报告发病率为1174.04/10万,死亡25例,占死亡总数的44.64%; 3岁及3岁以下病例357 112例,占病例总数的48.67%,死亡38例,占死亡总数的67.86%; 5岁及5岁以下病例374 098,占病例总数的50.98%,死亡39例,占死亡总数的69.64%。在报告病例和死亡患者中,均以散居儿童为主,报告病例354 034例(48.25%),死亡38例(67.86%)。

2.2 病原学概况 在网络报告的个案表备注栏里提供了病原学诊断的病例共29 587例,占全部报告病例总数的4.03%,其中病毒性感染26 825例,细菌性感染26 55例,真菌感染97例,细菌/真菌与病毒混合感染14例(表1)。

2.3 病毒性感染性腹泻实验室诊断病例分析 全国共报告26 825例病毒性感染性腹泻,其中轮状病毒引起的感染24 881例,占总数的92.75%,报告病例数最少的为杯状病毒2例(表2)。病毒性腹泻的发病高峰主要集中在秋冬季(图2)。

2.4 轮状病毒实验室诊断病例 轮状病毒报告病

■ 研发前沿

腹泻病是在全世界范围内广泛流行,WHO将食源性疾病负担作为当今的研究重点,并组织相关领域的专家进行疾病负担的研究。

■ 相关报道

WHO发布2009年卫生统计报告中指出,在全球5岁以下儿童死亡构成原因中,腹泻病占16.8%,在中国造成5岁以下儿童死亡构成原因的10.5%。

表 1 其他感染性腹泻实验室诊断病例各类病原分类统计

病原	报告地区数	报告机构数	n	构成比(%)
病毒	28	322	26825	90.66
细菌	26	243	2655	8.97
真菌	15	54	93	0.31
混合感染	4	5	14	0.05
合计	29	525	29587	100.00

表 2 病毒性病原分类统计

分型	报告地区数	报告机构数	n	构成比(%)
轮状病毒	28	294	24881	92.75
腺病毒	4	8	1164	4.34
轮状/腺病毒	2	4	646	2.41
诺如病毒	5	12	53	0.20
杯状病毒	1	2	2	0.01
未分型	15	31	79	0.29
合计	28	323	26825	100.00

例数最多的地区为广东(12 705例, 51.06%), 其次为浙江(6748例, 27.12%)和北京(1164例, 4.68%)。其中, 广东省深圳市宝安区报告病例4722例, 浙江省杭州市下城区报告病例2591例, 居区县报告病例数的前2位。此外, 有4家医院报告的病例数超过了1000例, 分别为浙江大学医学院附属儿童医院(2560例)、珠海市妇幼保健院(1798例)、深圳市儿童医院(1314例)、宝安区观澜人民医院(1108例)。轮状病毒感染性腹泻病例从10月份起出现升高趋势, 到12月份达到最高峰(图2)。在24 881例实验室确诊轮状病毒病例中, 15 599例为男性, 9282例为女性, 男女比为1.68:1。其中, 年龄小于1岁的有14 189例, 占总数的57.03%; 1-2岁年龄组为7523例, 占总数的30.24%, 5岁及5岁以下儿童共报告病例23 916例, 占总数的96.12%。报告病例中, 以散居儿童居多, 为23 285例, 占总数的93.59%。

2.5 其他病毒性病原 病毒性腹泻中报告病例数据第2位的为腺病毒腹泻(1164例, 4.34%), 主要集中在广东省(1093例, 93.90%)。珠海市妇幼保健院报告病例996例, 报告病例数占腺病毒报告总数的85.57%。腺病毒腹泻7-11月份为高发月份, 8月份达到发病高峰(180例), 报告病例的男女性别比为1.77:1, 发病年龄小于1岁的有765例, 占总数的65.72%。报告轮状/腺病毒腹泻病例最多的地区为广东(596例, 92.26%), 报告诺如病毒腹泻病例最多的地区也为广东(34例, 64.15%)。53例诺如病毒病例中, 男女性别比为0.71:1, 感染者主要为儿童和青少年, 小于9岁

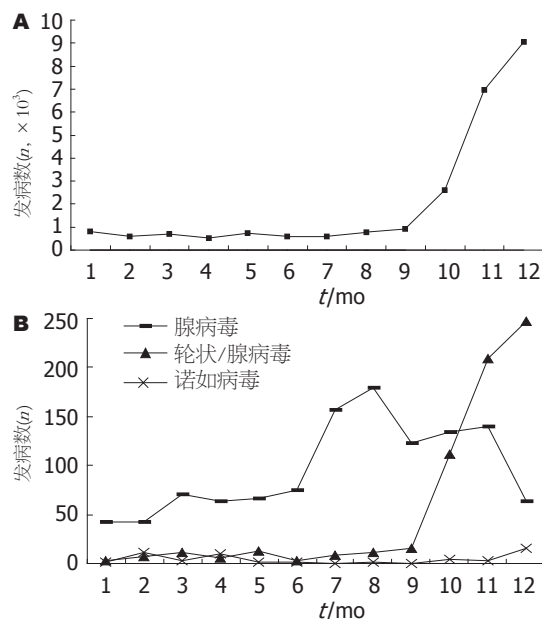


图 2 2008年病毒性其他感染性腹泻病例数月分布。A: 轮状病毒; B: 腺病毒、轮状病毒/腺病毒及诺如病毒。

及9岁组有22例, 占总数的41.51%, 小于19岁及19岁组有32例, 占总数的60.38%, 其报告的发病高峰在2月(11例)和4月(10例)。杯状病毒仅有2例, 均来自于广西桂林市龙胜各族自治县。

2.6 细菌性感染实验室诊断病例分析 在2655例细菌性感染性腹泻中有病原学检测信息共1831例。报告单位(包括各级医院和疾控中心)共200家, 分布在26个省市自治区。共报告病原20大类, 居报告病例数前两位的是副溶血弧菌(1195例)和沙门菌(379例), 分别占病例总数的65.26%和20.70%。沙门菌病例报告省份和报告机构数最多(表3)。

2.7 副溶血弧菌实验室诊断病例 副溶血弧菌病例均为沿海地区报告, 主要集中在上海(1051)和广东(117), 2地区病例占报告病例总数的97.74%。上海市宝山区报告了338例病例, 其中265例为宝山区市一宝山分院报告; 广东省深圳市宝安区报告了116例病例, 其中116例为宝安区西乡人民医院报告。此外, 浙江(24例)、福建(2例)和江苏(1例)也有病例报告。副溶血弧菌发病的季节性特征明显, 在1-3月份病例报告较少, 4月份起开始逐渐增多, 在7-9三个月到达高峰(图3)。在报告的1195例副溶血弧菌病例中, 男女比为0.96:1, 以青壮年报告发病数居多, 18-60岁各年龄组均匀分布, 24-27岁4个年龄组别的发病数最多, 均大于40例。

2.8 沙门菌实验室诊断病例 23个省份的126家机构报告了沙门菌实验室诊断病例, 主要集中在

表 3 其他感染性腹泻实验室诊断病例中细菌类病原分类统计

病原	报告地	报告机	n	构成比 (%)
	区数	构数		
弧菌	6	44	1206	65.87
副溶血弧菌	5	43	1195	65.26
河弧菌	3	4	5	0.27
拟态弧菌	1	1	2	0.11
创伤弧菌	1	1	1	0.05
麦氏弧菌	1	1	1	0.05
非O-1霍乱弧菌	2	2	2	0.11
沙门菌	23	126	379	20.70
大肠杆菌	12	28	65	3.55
克雷伯菌	5	9	53	2.89
弯曲菌	2	6	51	2.79
肠球菌	3	3	9	0.49
变形杆菌	4	5	8	0.44
铜绿假单胞菌	3	6	6	0.33
枸橼酸杆菌	2	4	6	0.33
肠杆菌	2	2	5	0.27
阴沟肠杆菌	2	2	4	0.22
产气肠杆菌	1	1	1	0.05
气单胞菌	3	3	3	0.16
温和气单胞菌	1	1	1	0.05
嗜水气单胞菌	1	1	1	0.05
豚鼠气单胞菌	1	1	1	0.05
链球菌	3	3	3	0.16
牛链球菌	1	1	1	0.05
粪链球菌	1	1	1	0.05
链球菌	1	1	1	0.05
葡萄球菌	3	3	3	0.16
金黄色葡萄球菌	2	2	2	0.11
人葡萄球菌	1	1	1	0.05
耶尔森菌	3	3	3	0.16
嗜麦芽假单胞菌	1	1	1	0.05
类志贺邻单胞菌	1	1	1	0.05
鲍曼氏不动杆菌	1	1	1	0.05
粪产碱杆菌	1	1	1	0.05
志贺菌*	12	21	26	1.42
宋内	3	4	7	0.38
福氏	4	6	6	0.33
菌痢	6	8	9	0.49
未分型	2	3	4	0.22
沙雷菌	1	1	1	0.05
总计	26	200	1831	100.00

志贺菌引起的痢疾属国家乙类传染病, 但其中一些病例未更新为痢疾, 此表根据报告的实际数据统计。

上海、广东、北京和浙江(共289例), 4省病例占病例总数的76.25%。报告病例数最多的为上海(135例, 35.62%), 报告沙门菌病例的机构数最多的也为上海, 共有36家医院和疾控中心报告病

表 4 实验室诊断病例沙门菌血清分型统计

血清型	报告省份	报告病例	
		n	构成比(%)
鼠伤寒	14	103	27.18
肠炎	4	14	3.69
猪霍乱	8	11	2.90
伦敦	2	9	2.37
斯坦利	2	6	1.58
德比	3	5	1.32
都柏林	2	4	1.06
伤寒	2	4	1.06
科特布斯	1	3	0.79
奥兰宁堡	1	2	0.53
鸡	2	2	0.53
山夫登堡	1	2	0.53
圣保罗	1	2	0.53
汤卜逊	1	2	0.53
仙台	1	2	0.53
亚利桑那	1	2	0.53
猪伤寒	1	2	0.53
阿拉伯	1	1	0.26
病牛	1	1	0.26
基桑加尼	1	1	0.26
韦太夫雷登	1	1	0.26
迪凯氏	1	1	0.26
B群	4	17	4.49
C群	2	11	2.90
D群	1	12	3.17
E群	1	3	0.79
非A-F群	1	2	0.53
未分型	16	154	40.63
总计	23	379	100.00

例。沙门菌实验室诊断病例全年均有报告, 从4月份起开始出现增多的趋势, 6-10月份发病水平平均维持在相对较高水平, 其中9月份病例数最多(图3)。180例沙门菌病例有血清分型结果, 共有22个血清型; 43例仅标明了血清群(表4)。鼠伤寒沙门菌的报告省份(14个)和报告病例数(103例)最多, 占沙门菌病例总数的27.18%, 占有血清分型病例总数的57.22%。报告病例主要集中在上海、浙江、新疆、广东和北京。

379例沙门菌实验室诊断病例中, 男女比为1.22:1。其中, 年龄小于1岁的有71例, 占总数的18.73%, 5岁及5岁以下儿童共128例, 占总数的33.77%。报告病例中, 以散居儿童居多为115例, 占总数的30.34%。

2.9 其他细菌性病原 除沙门菌和副溶血弧菌外, 大肠杆菌、克雷伯菌、弯曲菌和志贺菌也是引起病例数较多的细菌性病原。全国共有12个省

■创新盘点
本文将我国其他感染性腹泻的病原学信息与流行病学信息相结合, 进行数据分析。

■应用要点

病原学信息促进临床对其他感染性腹泻的防治,并有利于公共卫生部门发现暴发。

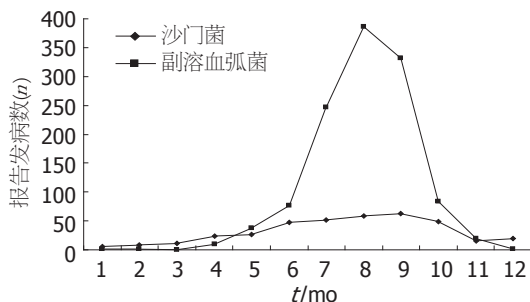


图3 2008年副溶血弧菌与沙门菌病例数月分布图。

市自治区28家机构报告大肠杆菌65例, 占总数的4.72%, 其中包括1起发生在广西桂林某小学的16人的暴发, 患者均为学生, 在学生学校饮用水中检出肠道侵袭性大肠艾希氏菌(O144: K)。全国共报告克雷伯菌病例53例, 占细菌性病例总数的3.85%, 其中广东省深圳市宝安区人民医院报告了其中的36例, 占总数的67.92%。全国共报告弯曲菌病例51例, 占细菌性病例总数的3.70%, 其中浙江大学医学院附属儿童医院报告了41例, 占弯曲菌病例报告总数的80.39%。空肠弯曲菌在世界各地的发病率明显升高, 已成细菌性腹泻中最常见的致病菌^[4]。

2.10 真菌性感染实验室诊断病例分析 全国15个省份52家机构共报告93例真菌、酵母菌引起的感染性腹泻, 男女性别比为1.68:1, 发病年龄段人数最多的为小于1岁年龄组(8例)和1-2岁年龄组(8例)。

2.11 菌/真菌病毒混合感染实验室诊断病例分析 全国共报告14例细菌/真菌和病毒引起的混合感染, 其中以轮状病毒和空肠弯曲菌引起的混合感染最多(8例), 均为浙江大学医学院附属儿童医院报告, 见表5。

3 讨论

感染性腹泻全年均有病例报道, 报道发病率为55.54/10万。全年有2个流行高峰, 第一个高峰在第6-8月, 多为细菌性病原感染; 第二个高峰在第11-12月, 多为病毒性感染。感染性腹泻主要危害5岁以下儿童。在2008年全国感染性腹泻的报告病例中, 5岁以下儿童病例数超过50%, 占死亡病例的69.64%、轮状病毒实验室诊断病例的96.12%、沙门菌实验室诊断病例的33.77%。

病例的病原学检测信息, 经过收集和分析后反映出病原学的流行规律和变化趋势, 是制定预防控制策略的重要科学依据之一。医疗机构内大量的病原学检测信息, 如果不加以收集

表5 其他感染性腹泻实验室诊断病例中细菌病毒混合病原分类统计

分类	报告省份数	报告机构数	n	构成比(%)
轮状病毒/ 空肠弯曲菌	1	1	8	57.14
轮状病毒/ 真菌类	3	4	5	35.71
轮状病毒/ 细菌性感染	1	1	1	7.14
合计	4	6	14	100.00

和利用, 发挥其公共卫生价值, 是信息资源的一种浪费。“全国疾病监测信息报告管理系统”为腹泻病病原检测信息的报道提供了平台, 部分地区的医疗机构在进行感染性腹泻病例报道的同时报告病原检测结果, 使病例个案信息经过汇总分析后, 发挥了更大的公共卫生作用。有病原信息报告的医疗结构数量和已经报告的数据量, 相对于有病原检测能力的医疗机构数量及已经形成的病原检测数据量, 仅仅是“冰山一角”^[5], 因此本文分析的病原学诊断数据有其局限性。及时发现聚集病例是暴发监测的主要内容。网络报告的感染性腹泻病例的病原检测信息, 为发现聚集病例提供了可能。网络报道的病原信息的增加, 将有利于及时发现暴发。通过2008年的数据分析, 也确实发现了聚集性病例。

目前网络报告的腹泻病原信息中无病原检测方法的信息, 无法判断是分离培养到菌毒株还是应用免疫学方法、分子生物学的方法。即使是同样的方法, 不同试剂的灵敏性、准确性也可能存在差异, 因此, 无法评估不同地区和不同医院的数据的可比性。此外, 部分病原的报道地区和报道机构相对比较集中, 如报告的腺病毒腹泻病例中85.57%的病例报道来自珠海市妇幼保健院, 80.39%的弯曲菌病例由浙江大学附属儿童医院报告的, 67.92%的克雷伯菌病例来自广东省深圳市宝安区人民医院。这种情况的出现与这些医院实验室开展的检验项目、检验水平、医院对病例诊断结果的报告意识等多种因素有关。

2008年报告的感染性腹泻病原中包括肠球菌、变形杆菌、铜绿假单胞菌、枸橼酸杆菌、肠杆菌、鲍曼氏不动杆菌、粪产碱杆菌、沙雷菌等条件致病菌。其中一些正常肠道菌群中的条件致病菌的致病性如何确认、正常人经常带菌的条件致病菌的病理性如何确认, 目前并没

个案诊断标准或报告标准.

广谱抗生素的使用对肠道正常菌群的破坏常常导致抗生素性腹泻, 抗生素性腹泻是感染性腹泻中重要的一类^[1]. 其中艰难梭菌腹泻占有重要地位, 在我国已有大量临床报告, 但在2008年网络报告感染性腹泻病例中病原信息未见有艰难梭菌感染的报告.

诊断和报告标准是基础性的技术文件, 《感染性腹泻诊断标准(WS271-2007)》需要修订和完善, 增加对抗生素性腹泻、条件致病菌腹泻的诊断和报告的技术内容. 由于感染性腹泻病原的多样和复杂性, 需要制定感染性腹泻的报告细则来提高报告的质量. 疾控部门应指导和培训医疗机构做好感染性腹泻病原诊断信息的报告, 以提高报告质量. 为提高数据的可比性, 医疗机构需要逐步规范检验方法, 提高实验室质量管理水平. 医疗机构在完成病原的基

本检验和诊断后, 菌毒株和病例信息如能传送到疾控机构, 继续完成有公共卫生意义的检验项目, 并及时反馈给医疗机构, 将会大大提高我国感染性腹泻的监测水平, 同时也有益于对腹泻病例的诊疗.

4 参考文献

- 1 聂青和. 感染性腹泻病原及诊断程序. 世界华人消化杂志 2001; 9: 925-926
- 2 卫生部. 卫生部公布2009年1月及2008年度全国法定报告传染病疫情. 卫生部公报 2009; 3: 65-68
- 3 刘元, 李国华, 张秋香, 郝瑞娥, 杨红霞, 赵嵘. 感染性腹泻151例病原监测分析. 中国药物与临床 2008; 8: 410-412
- 4 聂青和. 感染性腹泻研究现状. 中国实用内科杂志 2003; 23: 631-633
- 5 WHO International Food Safety Authorities Network (INFOSAN). Codex Alimentarius the International Food Standards. INFOSAN Information Note No. 4/2008. cited 2009-08-05. Available from: URL: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_04_Codex_Jun08_en.pdf

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本研究立意有依据, 诊断规范, 统计正确, 讨论简洁, 论点明确, 技术难度一般, 结果对其他感染性腹泻的临床防治和进一步研究有一定的价值和参考意义.

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 2009-11-18)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈光 教授
吉林大学第一医院消化器官外科

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈亚军 主任医师
首都医科大学附属北京儿童医院普外科

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

杜祥 教授
复旦大学附属肿瘤医院病理科

樊晓明 主任医师
复旦大学附属金山医院消化科

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

黄晓东 副主任医师
武汉市中心医院消化内科

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李定国 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医院消化科

刘改芳 主任医师
河北医科大学第三医院消化内科

刘占举 教授
同济大学附属第十人民医院胃肠内科

邱伟华 副主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

邵升 副教授
哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

唐世刚 教授
中南大学湘雅三医院内科

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院普通外科

汪波 副主任医师
北京大学第一医院急诊科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

魏经国 教授
中国人民解放军第四军医大学唐都医院放射科

许玲 副教授
中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

姚鹏 副教授
中国人民解放军北京军区总医院全军肝病中心

姚希贤 教授
河北医科大学附属第二医院消化内科

殷正丰 教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

张小晋 主任医师
北京积水潭医院消化内科