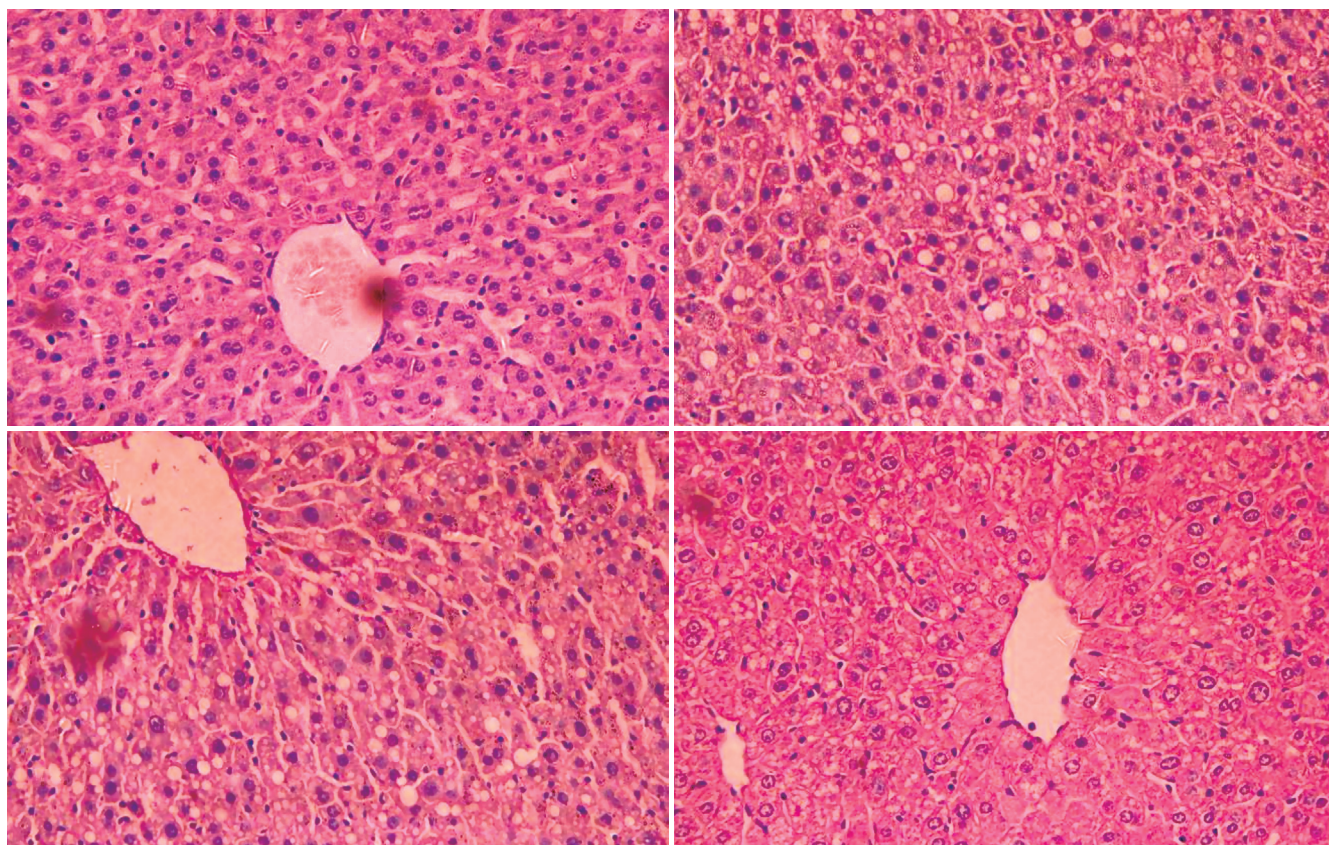


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 12 月 8 日 第 17 卷 第 34 期 (Volume 17 Number 34)



34 / 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 12 月 8 日 第 17 卷 第 34 期 (总第294期)

述 评

3475 胰腺癌早期诊断与治疗的研究进展

刘海林, 王磊

基 础 研 究

3480 TGF- β 1反义寡核苷酸对食管鳞癌细胞EC9706增殖及凋亡的影响

张红燕, 李珊珊, 孙洋, 王新华, 阎爱华, 王小军

3486 Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞胃酸分泌的调节作用

杜改梅, 刘茂军, 陈钟鸣

3491 猕猴桃果仁油对小鼠非酒精性脂肪性肝病的作用

向志钢, 李先辉, 刘锋, 周卫华, 张永康

3497 针对HBV S基因mRNA反义锁核酸设计及其在2.2.15细胞内的抗病毒作用

邓益斌, 王燕菲

3502 胰岛素样生长因子1对大鼠结肠平滑肌细胞中干细胞因子表达的影响

宁月季, 张蔚, 成家飞, 李学良, 王美峰, 林琳

3507 TIM1与TIM4对小鼠食物过敏模型中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞功能的影响

王新亭, 郑鹏远, 罗予, 刘志强, 张利利

临 床 研 究

3514 辣椒素受体基因多态性与肠易激综合征的相关性

张志强, 王沁, 王毕娟

文 献 综 述

3519 原发性食管小细胞癌的研究进展

卢绪菁, 孔颖泽, 王建华

3524 砷在肝脏中的代谢及对其生化指标影响的研究进展

刘洋, 吴君

3530 多药耐药基因与溃疡性结肠炎的研究进展

马铭泽, 杨崇美

研 究 快 报

3534 曲古菌素A对食管癌EC1细胞增殖和细胞周期的影响及其分子机制

马俊芬, 江亚南, 赵继敏, 黄幼田, 赵明耀, 董子明

3538 硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影响

陈晋, 吴清明

临 床 经 验

3543 食管动力在咽喉反流发生中的作用

马进玉, 齐颖, 邱岩, 苗丽

3547 阿德福韦酯联合苦参素胶囊对慢性乙型肝炎患者HBV复制及T淋巴细胞亚群的影响

涂远航, 马勇, 李珊珊

3550 戊型肝炎病毒抗体检测试剂盒临床考核数据分析

李宏峰, 赵红

3553 IZL-2003免疫治疗系统治疗肝癌患者40例

李文东, 王威, 陈京龙

	<div>3558 塞来昔布治疗肝门部胆管癌24例 吴高松, 马小鹏, 汪杰, 黄丽丽, 刘岩岩, 尹玉平, 刘捷</div> <div>3561 乌司他丁预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的系统评价 郭强, 胡伟明</div> <div>3568 彩色超声在胃肠道间质瘤诊断中的应用 杨力, 段洪涛, 宋奕宁, 王功伟, 李建国</div>
致 谢	<div>3572 致谢世界华人消化杂志编委</div>
消 息	<div>3479 《世界华人消化杂志》正文要求</div> <div>3485 《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》</div> <div>3496 《世界华人消化杂志》中文摘要要求</div> <div>3518 《世界华人消化杂志》计量单位标准</div> <div>3523 《世界华人消化杂志》修回稿须知</div> <div>3533 《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》</div> <div>3542 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</div> <div>3546 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</div> <div>3557 汤姆森-路透公布2008年WJG影响因子2.081</div> <div>3571 WJG成功通过评审被PMC收录</div>
封面故事	<div>向志钢, 李先辉, 刘锋, 周卫华, 张永康. 猕猴桃果仁油对小鼠非酒精性脂肪性肝病的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3491-3496 http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3491.asp</div>
本期责任人	<div>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 李瑞敏; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生</div>

<div><div>世界华人消化杂志</div><div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div><div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</div><div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-12-08 原刊名 新消化病学杂志</div></div> <div><div>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</div></div>	<div><div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div><div><div>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div><div><div>印刷 北京科信印刷厂</div><div><div>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</div><div><div>订购 全国各地邮电局</div><div><div>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div></div></div></div></div></div></div>	<div><div>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。</div><div><div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</div><div><div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</div><div>2009年版权归世界华人消化杂志所有</div></div></div></div>
---	--	---

中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262	国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050
------------	--------------------------------	----------------	----------------	----------------------------	--------------------------

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

December 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 34

EDITORIAL	<p>3475 Advances in the early diagnosis and therapy of pancreatic cancer <i>Liu HL, Wang L</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>3480 TGF-β1 antisense oligonucleotide ASODN promotes cell proliferation but inhibits apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706 <i>Zhang HY, Li SS, Sun Y, Wang XH, Yan AH, Wang XJ</i></p> <p>3486 Ghrelin stimulates gastric acid secretion by rat gastric mucosal cells <i>in vitro</i> <i>Du GM, Liu MJ, Chen ZM</i></p> <p>3491 Kiwifruit seed oil has a protective effect against nonalcoholic fatty liver disease in mice <i>Xiang ZG, Li XH, Liu F, Zhou WH, Zhang YK</i></p> <p>3497 Antiviral effects of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting HBV S gene mRNA in HepG2 2.2.15 cells <i>Deng YB, Wang YF</i></p> <p>3502 Insulin-like growth factor-1 upregulates the expression of stem cell factor in rat colonic smooth muscle cells <i>Ning YJ, Zhang W, Cheng JF, Li XL, Wang MF, Lin L</i></p> <p>3507 TIM4 and TIM1 modulate the function of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in mice with food allergy <i>Wang XT, Zheng PY, Luo Y, Liu ZQ, Zhang LL</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3514 Relationship between TRPV1 gene polymorphism and irritable bowel syndrome <i>Zhang ZQ, Wang Q, Wang BJ</i></p>
REVIEW	<p>3519 Advances in research of primary small cell carcinoma of the esophagus <i>Lu XJ, Kong YZ, Wang JH</i></p> <p>3524 Advances in research on the metabolism of arsenic in the liver and its effects on hepatic biochemical parameters <i>Liu Y, Wu J</i></p> <p>3530 Advances in understanding the correlation between multi-drug resistance gene and ulcerative colitis <i>Ma MZ, Yang CM</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3534 Trichostatin A inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in human esophageal carcinoma cell line EC1 <i>Ma JF, Jiang YN, Zhao JM, Huang YT, Zhao MY, Dong ZM</i></p> <p>3538 Selenomethionine increases the chemosensitivity of gastric cancer BGC-803 cells <i>Chen J, Wu QM</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3543 Role of esophageal motility in the development of laryngopharyngeal reflux <i>Ma JY, Qi Y, Di Y, Miao L</i></p> <p>3547 Effects of adefovir dipivoxil in combination with Marine Capsules on HBV replication and T lymphocyte subsets in patients with chronic hepatitis B <i>Tu YH, Ma Y, Li SS</i></p>

	<p>3550 Analysis of clinical assessment data for a hepatitis E virus antibody test kit <i>Li HF, Zhao H</i></p> <p>3553 Efficacy of the IZL-2003 immunotherapeutic system in patients with liver cancer: an analysis of 40 cases <i>Li WD, Wang W, Chen JL</i></p> <p>3558 Efficacy of celecoxib in the treatment of hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 24 cases <i>Wu GS, Ma XP, Wang J, Huang LL, Liu YY, Yin YP, Liu J</i></p> <p>3561 Prophylactic use of ulinastatin against post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis: a systematic review <i>Guo Q, Hu WM</i></p> <p>3568 Clinical value of color Doppler sonography in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor <i>Yang L, Duan HT, Song YN, Wang GW, Li JG</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	3572 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Xiang ZG, Li XH, Liu F, Zhou WH, Zhang YK.</i> Kiwifruit seed oil has a protective effect against nonalcoholic fatty liver disease in mice.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(34): 3491-3496</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3491.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>Rui-Min Li</i> Proof Editor: <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 December 8, 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: 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: 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*

胰腺癌早期诊断与治疗的研究进展

刘海林, 王磊

刘海林, 王磊, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科 上海市 200011

刘海林, 主任医师, 博士生导师, 主要从事消化系统肿瘤的早期诊断和治疗、肝纤维化防治的研究。

作者贡献分布: 本文由刘海林与王磊共同完成。

通讯作者: 刘海林, 主任医师, 200011, 上海市制造局路639号, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科。

liuhailin@medmail.com.cn

电话: 021-23271023

收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-08

Advances in the early diagnosis and therapy of pancreatic cancer

Hai-Lin Liu, Lei Wang

Hai-Lin Liu, Lei Wang, Department of Gastroenterology, Shanghai Ninth People's Hospital, Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Correspondence to: Hai-Lin Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Ninth People's Hospital, Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 639 Zhizaoju Road, Shanghai 200011, China. liuhailin@medmail.com.cn

Received: 2009-10-16 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-08

Abstract

The prevalence of pancreatic cancer has increased dramatically over the past decades. As pancreatic cancer is difficult to detect at an early stage, its prognosis is very poor. Inherited genetic factors and environmental factors are known to be the major causes of pancreatic cancer. Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) lesions have been established as the pre-neoplastic changes during pancreatic carcinogenesis. Detection of tumor markers and imaging examinations (computed tomography, magnetic resonance imaging, endoscopic ultrasonography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography) are effective means for diagnosis of pancreatic cancer. The combination of surgical resection and adjuvant or neoadjuvant chemotherapy shows promise in prolonging the survival time of patient with pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Early diagnosis;

Therapy

Liu HL, Wang L. Advances in the early diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3475-3479

摘要

胰腺癌的发病率不断升高, 早期诊断困难, 临床治疗效果差, 是目前预后最差的恶性肿瘤。遗传因素和环境因素在胰腺癌的发生中具有重要作用, 胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)是胰腺癌的癌前病变。CT、MRI、超声内镜、ERCP和血清标志物检测为胰腺癌诊断提供了有效手段, 手术与辅助化疗、放疗以及分子靶向治疗等综合治疗有望改善胰腺癌患者的预后。建立灵敏高效的预警和早期诊断体系, 加强多学科合作开展综合治疗, 是提高胰腺癌临床诊疗水平的主要途径。

关键词: 胰腺癌; 早期诊断; 治疗

刘海林, 王磊. 胰腺癌早期诊断与治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(34): 3475-3479

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3475.asp>

0 引言

近年来, 胰腺癌的发病率明显上升。以上海为例, 1972-1974年上海城区居民男性和女性胰腺癌的发病率分别为4.0/10万和3.1/10万, 2005年达到6.8/10万和5.2/10万, 增加了约70%。在癌症死亡原因顺位中, 男6-8位, 女9-10位^[1-2]。胰腺癌起病隐匿, 早期发生转移, 治疗效果差, 5年生存率不足5%, 是目前预后最差的恶性肿瘤。建立灵敏高效的预警和早期诊断体系, 加强多学科之间合作, 开展综合治疗, 是有效提高胰腺癌临床诊疗水平的主要途径。

1 高危人群和癌前病变

胰腺癌的病因尚未完全明了, 目前认为遗传因素和环境因素的协同作用是胰腺癌发生的主要原因。多种遗传性家族性肿瘤综合征患者胰

■背景资料

近年来, 胰腺癌的发病率明显上升, 但胰腺癌的病因尚未完全明了, 目前认为遗传因素和环境因素的协同作用是胰腺癌发生的主要原因。其特点是, 早期发生转移, 使胰腺癌的早期诊断与治疗尤为重要。

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■相关报道

Kala *et al*证实, CT在判断胰腺癌分期、预测手术切除率方面具有一定的优越性, 但对直径小于1 cm的胰腺癌、淋巴结浸润转移和肝内小转移灶等的准确性下降, 多排螺旋CT的诊断效率有所提高. Beger *et al*采用5-FU、四氢叶酸、阿霉素和顺铂经腹腔动脉灌注胰十二指肠切除术后胰腺癌患者, 可以显著减少胰腺癌肝转移的风险, 患者中位生存时间为21 mo, 2年生存率为40%, 可以选择作为胰腺癌的二线治疗方法.

腺癌的发病率较高, 包括家族性乳腺癌综合征、遗传性非息肉性结肠癌综合征(hereditary nonpolypo-sis colorectal carcinoma, HNPCC)、Peutz-Jeghers综合征、家族性不典型多发性黑色素瘤(familial atypical multiple mole melanoma, FAMMM)综合征^[3]. 遗传性胰腺炎患者易发生胰腺癌. 在遗传性胰腺癌家系中, BRCA1、BRCA2^[4-5]和Pogue-Geile *et al*^[6]基因具有较高的突变频率. 吸烟、高脂饮食以及经常接触甲醛、有机氯、氯化烃等致癌物可以使胰腺癌的患病风险增加. 一些慢性疾病如酒精性和非酒精性慢性胰腺炎、2型糖尿病、病态性肥胖患者发生胰腺癌的风险增高.

胰腺癌中80%-90%为起源于胰腺导管上皮的胰腺导管腺癌, 一般认为其发生过程经过从正常上皮到上皮过度增生, 再发展到上皮不典型增生直至癌的逐级演变. 胰腺上皮内瘤变(pancreatic intraepithelial neoplasia, PanIN)被认为是胰腺导管腺癌的主要癌前病变之一, 根据胰腺导管上皮增生的病理形态学程度不同, PanIN可以分级为PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2, PanIN-3^[7-8]. 开展对PanIN的深入研究, 有助于了解胰腺癌的发生机制、寻找具有早期诊断价值的肿瘤标志物和采取干预措施.

2 诊断

胰腺癌因缺乏特异性的临床症状, 早期诊断十分困难. 患者可出现向腰背部放射的上腹痛、体质量下降、黄疸等, 少数患者以新近发生糖尿病和原因不明的急性胰腺炎^[9]为首发症状. 单独应用一种检查方法的诊断价值有限, 即使联合应用多种检查方法, 仍有超过1/3的无法切除胰腺癌病例可能被漏诊^[10].

2.1 影像学 and 超声内镜检查

2.1.1 B超: 为无创性、简便易行. 由于胰腺的解剖位置深, 在B超检查时易受胃肠道内气体的干扰以及脊柱的影响, 对直径2 cm以下的胰腺癌检出率较低.

2.1.2 CT和MRI: CT在判断胰腺癌分期、预测手术切除率方面具有一定的优越性, 但对直径小于1 cm的胰腺癌、淋巴结浸润转移和肝内小转移灶等的准确性下降^[11], 多排螺旋CT的诊断效率有所提高. MRI在诊断肝内转移灶方面优于CT, 但对淋巴结浸润诊断效果却比CT差. 磁共振胰胆管造影(MRCP)和磁共振血管造影可以提供胰胆管异常和血管壁浸润等方面的信息^[12-13].

2.1.3 超声内镜: 可以发现较小的胰腺肿瘤, 评估肿瘤大小和淋巴结受累情况比CT更准确. EUS引导下的细针吸引活检(EUS-FNA)可以完成原发肿瘤、淋巴结和远处转移灶的病理学诊断, 用于术前检查的灵敏性为95%, 特异性达92%^[14]. 但为了避免肿瘤播散, 检查结果对治疗策略无影响时不宜采用. EUS引导下细针核心活检(EUS-needle core biopsies)诊断的灵敏性不及EUS-FNA^[15].

2.1.4 ERCP: 可反映主胰管及其分支的病变情况, 并可对胰管进行活检或用细胞刷做细胞学检查, 也可以收集胰液进行细胞学和基因检测^[16].

2.1.5 腹腔镜: 腹腔镜和腹腔镜超声(LUS)可以发现隐藏的腹膜转移灶和其他方法漏诊的肝内转移灶, 目前多推荐用于胰腺癌的术前评估检查^[17].

2.2 肿瘤标志物 以CA19-9最常用, 按照血清CA19-9水平>37 U/mL为标准, 诊断胰腺癌的敏感性和特异性分别为81%、91%^[18]. 其他常用的胰腺癌肿瘤标志物还有CA50、CA242、Span-1、MIC-1、Dupan-2等, 但早期诊断价值有限. 多种肿瘤标志物(如CA19-9、CA242、CEA和CA125)联合检测, 可提高诊断的敏感性和特异性^[19].

2.3 基因分子诊断 80%-90%的胰腺癌存在K-ras基因突变, 可采集外周血、胰液、十二指肠液、粪便以及细针抽吸或胰管刷检标本进行检测. 在PanIN等癌前病变中即可检测到K-ras基因突变, 虽然特异性有所降低, 但为早期诊断提供了可能. 其他开展的基因突变检测还有抑癌基因P53、P16、Smad4等.

2.4 蛋白质组学技术 随着蛋白质组学技术的发展, 为寻找新的肿瘤标志物提供了有效手段. 最近有报道应用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF MS)技术检测胰腺癌患者的血清蛋白质谱, 通过决策树法分析, 选择其中6种差异表达蛋白建立胰腺癌鉴别体系, 经双盲检测验证表明该体系诊断胰腺癌的灵敏性达80%, 特异性为84.6%^[20]. 采用蛋白质芯片和ELISA方法测定胰液和血清HIP/PAP- I (hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I)水平, 胰腺癌患者显著高于胰腺良性疾病患者, 提示HIP/PAP- I 可作为胰腺癌的标志物^[21].

2.5 风险预测模型 针对胰腺癌的高危人群进行

监测, 准确预测高危个体患胰腺癌的风险, 是早期诊断胰腺癌的必要前提. 最近, 美国研究人员建立了一种胰腺癌风险预测模型PancPRO, 用于对有胰腺癌家族史的个体进行风险评估^[22], 为此方面的研究提供了新的思路.

3 治疗

3.1 手术 对可以手术切除的胰腺癌, 首选根治性手术. 不同术式对患者的生存时间并无显著差别^[23-24].

3.2 化疗 最近一项随机、前瞻性、多中心III期临床试验(CONKO-001)结果显示胰腺癌根治性切除术后吉西他滨单药辅助化疗能显著延缓肿瘤的复发^[25]. 对晚期胰腺癌, 吉西他滨单药作为一线治疗方案已有十余年^[26]. 近年来, 针对吉西他滨与其他药物如5-FU^[27]、顺铂^[28]、奥沙利铂^[29]、卡培他滨^[30]等联合化疗进行了临床研究, 结果显示与吉西他滨单药化疗相比, 联合化疗可以显著延长中位生存期, 但很少能延长到9 mo以上. 因此, 今后还需进一步探索新的联合化疗方案.

区域灌注化疗有助于提高进入胰腺癌组织中的化疗药物浓度, 减轻全身不良反应. Beger *et al*^[31]采用5-FU、四氢叶酸、阿霉素和顺铂经腹腔动脉灌注胰十二指肠切除术后胰腺癌患者, 可以显著减少胰腺癌肝脏转移的风险, 患者中位生存时间为21 mo, 2年生存率为40%, 可以选择作为胰腺癌的二线治疗方法^[32].

3.3 放疗 尚存在争议. 有研究认为术后仅需进行辅助化疗, 联合放化疗反而降低患者的生存时间^[33-34]. 但也有临床研究表明术后辅助放化疗可以显著延长患者的生存时间, 术后放化疗患者的平均生存时间达2.9年, 较单纯化疗的1.1年和单纯放疗的2.1年显著延长^[35-36]. 对于无法手术切除的胰腺癌, 有研究显示单纯化疗作为一线治疗的患者平均生存时间为18 mo, 显著高于放化疗的9.5 mo^[37].

3.4 分子靶向治疗 分子靶向治疗是肿瘤治疗研究的新热点. 目前已完成III期临床试验的分子靶向药物包括: 贝伐单抗、西妥昔单抗、厄洛替尼(erlotinib). 其中吉西他滨联合厄洛替尼(HER1/EGFR酪氨酸激酶抑制剂)可以延长胰腺癌患者的生存时间^[38]. 最近1项贝伐单抗联合吉西他滨/厄洛替尼与吉西他滨/厄罗替尼治疗胰腺癌的III期临床对照试验表明, 加入贝伐单抗组无进展生存期明显延长, 总体生存率也有所

提高. 关于分子靶向药物治疗的关键问题是需要治疗前明确胰腺癌患者是否表达相应的分子靶点, 否则会引起对研究结论的质疑.

3.5 其他 中西医结合个体化治疗对延长患者生存时间有一定意义^[39]. 据报道光动力治疗对胰腺癌也有一定效果^[40].

4 结论

提高胰腺癌的早期诊断率和手术切除率是改善患者预后的关键, 确定胰腺癌的易患(高发)人群, 制定合理的筛查方案, 有助于早期发现胰腺癌. 加强肿瘤标志物联合检测的临床研究, 建立优势互补的组合是当前可行的方法. 同时应大力开展胰腺癌的基础研究, 寻找敏感性高、特异性强, 特别是具有早期诊断意义的新的肿瘤标志物. 在循证医学的基础上, 通过综合治疗延长患者的生存时间, 形成规范化的治疗方案是今后临床上需要解决的重要课题. 总之, 胰腺癌的防治是一个系统工程, 需要多学科的紧密协作.

5 参考文献

- 1 Wang L, Yang GH, Lu XH, Huang ZJ, Li H. Pancreatic cancer mortality in China (1991-2000). *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1819-1823
- 2 2005年上海市市区恶性肿瘤发病率. *肿瘤* 2008; 28: 726
- 3 Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 197-209
- 4 Greer JB, Whitcomb DC. Role of BRCA1 and BRCA2 mutations in pancreatic cancer. *Gut* 2007; 56: 601-605
- 5 Couch FJ, Johnson MR, Rabe KG, Brune K, de Andrade M, Goggins M, Rothenmund H, Gallinger S, Klein A, Petersen GM, Hruban RH. The prevalence of BRCA2 mutations in familial pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 342-346
- 6 Pogue-Geile KL, Chen R, Bronner MP, Crnogorac-Jurcovic T, Moyes KW, Downen S, Otey CA, Crispin DA, George RD, Whitcomb DC, Brentnall TA. Palladin mutation causes familial pancreatic cancer and suggests a new cancer mechanism. *PLoS Med* 2006; 3: e516
- 7 Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Offerhaus GJ. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 579-586
- 8 Hruban RH, Takaori K, Klimstra DS, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Biankin SA, Compton C, Fukushima N, Furukawa T, Goggins M, Kato Y, Klöppel G, Longnecker DS, Lüttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Shimizu M, Yonezawa S. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal

■应用要点

本文提示, 提高胰腺癌的早期诊断率和手术切除率是改善患者预后的关键, 确定胰腺癌的易患(高发)人群, 制定合理的筛查方案, 有助于早期发现胰腺癌. 同时应大力开展胰腺癌的基础研究, 寻找敏感性高、特异性强, 特别是具有早期诊断意义的新的肿瘤标志物.

■同行评价

本文较为全面地综述了胰腺癌早期诊断与治疗的研究进展,学术价值好,有一定参考价值。

- 9 Mujica VR, Barkin JS, Go VL. Acute pancreatitis secondary to pancreatic carcinoma. Study Group Participants. *Pancreas* 2000; 21: 329-332
- 10 Germanos S, Gourgiotis S, Stavrothanasopoulou A, Alepas P, Zampitis N, Panteli A. Diagnostic and therapeutic approach to pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15: 257-263
- 11 Kala Z, Válek V, Hlavsa J, Hana K, Vánová A. The role of CT and endoscopic ultrasound in pre-operative staging of pancreatic cancer. *Eur J Radiol* 2007; 62: 166-169
- 12 Soriano A, Castells A, Ayuso C, Ayuso JR, de Caralt MT, Ginès MA, Real MI, Gilabert R, Quintó L, Trilla A, Feu F, Montanyà X, Fernández-Cruz L, Navarro S. Preoperative staging and tumor resectability assessment of pancreatic cancer: prospective study comparing endoscopic ultrasonography, helical computed tomography, magnetic resonance imaging, and angiography. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 492-501
- 13 Schima W. MRI of the pancreas: tumours and tumour-simulating processes. *Cancer Imaging* 2006; 6: 199-203
- 14 Eloubeidi MA, Varadarajulu S, Desai S, Shirley R, Heslin MJ, Mehra M, Arnoletti JP, Eltoum I, Wilcox CM, Vickers SM. A prospective evaluation of an algorithm incorporating routine preoperative endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration in suspected pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 813-819
- 15 Yun SS, Remotti H, Vazquez MF, Crapanzano JP, Saqi A. Endoscopic ultrasound-guided biopsies of pancreatic masses: comparison between fine needle aspirations and needle core biopsies. *Diagn Cytopathol* 2007; 35: 276-282
- 16 Brugge WR. Advances in the endoscopic management of patients with pancreatic and biliary malignancies. *South Med J* 2006; 99: 1358-1366
- 17 Butturini G, Crippa S, Bassi C, Salvia R, Piccoli M, Pederzoli P. The role of laparoscopy in advanced pancreatic cancer diagnosis. *Dig Surg* 2007; 24: 33-37
- 18 Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 350-355
- 19 汤厚阔, 陈炯. 肿瘤标志物CA19-9、CA242、CEA和CA125联合检测在胰腺癌诊断中的意义. *肝胆胰外科杂志* 2009; 21: 95-97
- 20 Yu Y, Chen S, Wang LS, Chen WL, Guo WJ, Yan H, Zhang WH, Peng CH, Zhang SD, Li HW, Chen GQ. Prediction of pancreatic cancer by serum biomarkers using surface-enhanced laser desorption/ionization-based decision tree classification. *Oncology* 2005; 68: 79-86
- 21 Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002; 62: 1868-1875
- 22 Wang W, Chen S, Brune KA, Hruban RH, Parmigiani G, Klein AP. PancPRO: risk assessment for individuals with a family history of pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1417-1422
- 23 Farnell MB, Pearson RK, Sarr MG, DiMagno EP, Burgart LJ, Dahl TR, Foster N, Sargent DJ. A prospective randomized trial comparing standard pancreatoduodenectomy with pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in resectable pancreatic head adenocarcinoma. *Surgery* 2005; 138: 618-628; discussion 628-630
- 24 Riall TS, Cameron JL, Lillemoe KD, Campbell KA, Sauter PK, Coleman J, Abrams RA, Laheru D, Hruban RH, Yeo CJ. Pancreaticoduodenectomy with or without distal gastrectomy and extended retroperitoneal lymphadenectomy for periaampullary adenocarcinoma--part 3: update on 5-year survival. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1191-1204; discussion 1204-1206
- 25 Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gutberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 297: 267-277
- 26 Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403-2413
- 27 Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB 3rd. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3270-3275
- 28 Colucci G, Giuliani F, Gebbia V, Biglietto M, Rabitti P, Uomo G, Cigolari S, Testa A, Maiello E, Lopez M. Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: a prospective, randomized phase III study of the Gruppo Oncologia dell'Italia Meridionale. *Cancer* 2002; 94: 902-910
- 29 Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, André T, Zaniboni A, Ducreux M, Aitini E, Taïeb J, Faroux R, Lepere C, de Gramont A. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3509-3516
- 30 Stathopoulos GP, Syrigos K, Polyzos A, Fountzilas G, Rigatos SK, Ziras N, Potamiannou A, Tsiakopoulos I, Androulakis N, Aravantinos G, Athanasiadis A, Papakotoulas P, Georgoulas V. Front-line treatment of inoperable or metastatic pancreatic cancer with gemcitabine and capecitabine: an intergroup, multicenter, phase II study. *Ann Oncol* 2004; 15: 224-229
- 31 Beger HG, Gansauge F, Büchler MW, Link KH. Intraarterial adjuvant chemotherapy after pancreatoduodenectomy for pancreatic cancer: significant reduction in occurrence of liver metastasis. *World J Surg* 1999; 23: 946-949
- 32 Barletta E, Fiore F, Daniele B, Ottaiano A, D'Angelo

- R, Ferrari E, Formato R, Tortoriello A, Turitto G, Bruni GS, Pignata S, Iaffaioli RV. Second-line intra-arterial chemotherapy in advanced pancreatic adenocarcinoma. *Front Biosci* 2006; 11: 782-787
- 33 Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, Bassi C, Falconi M, Pederzoli P, Dervenis C, Fernandez-Cruz L, Lacaine F, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Friess H, Büchler MW. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001; 358: 1576-1585
- 34 Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1200-1210
- 35 Greco JA, Castaldo ET, Feurer ID, Pinson CW, Chakravarthy AB, Merchant NB, Parikh AA. Survival benefit with adjuvant radiation therapy in surgically resected pancreatic cancer. 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium; Abstract No: 109
- 36 Corsini MM, Miller RC, Haddock MG, Donohue JH, Nagorney DM, Jatoi A, Bhatia S, Gunderson LL. Adjuvant radiation and chemotherapy for pancreatic adenocarcinoma: The Mayo Clinic experience. 2007 Gastrointestinal Cancers Symposium; Abstract No: 110
- 37 Bachet JB, Mitry E, Lepère C, Decléty G, Vaillant JN, Parlier H, Otmezguine Y, Julie C, Penna C, Housset M, Nordlinger B, Rougier P. Chemotherapy as initial treatment of locally advanced unresectable pancreatic cancer: a valid option? *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 151-156
- 38 Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-1966
- 39 曹志成. 中西医与分子靶向综合治疗胰腺癌的进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2049-2054
- 40 Fan BG, Andrén-Sandberg A. Photodynamic therapy for pancreatic cancer. *Pancreas* 2007; 34: 385-389

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按 ●、○、■、□、▲、△ 顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则 ^a $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 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 2009-12-08)

TGF- β 1反义寡核苷酸对食管鳞癌细胞EC9706增殖及凋亡的影响

张红燕, 李珊珊, 孙洋, 王新华, 阎爱华, 王小军

■背景资料

食管癌是世界范围内, 特别是中国河南省死亡率较高的恶性肿瘤之一, 严重危害人们的生命健康。因此研究食管癌发病机制对于降低肿瘤患者的死亡率尤为重要。

张红燕, 李珊珊, 孙洋, 王新华, 王小军, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市450052

阎爱华, 郑州大学基础医学院癌前研究室 河南省郑州市450052

张红燕, 主治医师, 主要从事食管癌的基础与临床研究。

河南省重点科技攻关基金资助项目, No. 072102310042

作者贡献分布: 此课题由李珊珊设计主持; 张红燕与孙洋操作完成并撰写论文; 王新华、阎爱华及王小军进行数据处理。

通讯作者: 李珊珊, 教授, 450052, 河南省郑州市二七区建设东路1号, 郑州大学第一附属医院病理科。lsspath@yahoo.com.cn
电话: 0371-65032580

收稿日期: 2009-10-21 修回日期: 2009-11-15

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-08

TGF- β 1 antisense oligonucleotide ASODN promotes cell proliferation but inhibits apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706

Hong-Yan Zhang, Shan-Shan Li, Yang Sun, Xin-Hua Wang, Ai-Hua Yan, Xiao-Jun Wang

Hong-Yan Zhang, Shan-Shan Li, Yang Sun, Xin-Hua Wang, Xiao-Jun Wang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Ai-Hua Yan, Department of Precancerous Diseases, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of Henan Province, No. 072102310042

Correspondence to: Professor Shan-Shan Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, 27 District, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lsspath@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-21 Revised: 2009-11-15

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of transforming growth factor-beta 1 antisense oligonucleotide ASODN (TGF- β 1-ASODN) on cell proliferation and apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706.

METHODS: EC9706 cells were transfected with chemically synthesized TGF- β 1-ASODN. The

expression of TGF- β 1 mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and flow cytometry, respectively. Cell morphological changes were observed. The proliferation and apoptosis of EC9706 cells were measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and flow cytometry, respectively.

RESULTS: After TGF- β 1-ASODN transfection, the expression levels of TGF- β 1 mRNA and protein in EC9706 cells were significantly lower than those in untransfected EC9706 cells (0.25 ± 0.07 vs 0.43 ± 0.09 and 35.35% vs 41.38% , respectively; both $P < 0.05$). TGF- β 1-ASODN transfection could stimulate proliferation and inhibit apoptosis of EC9706 cells. After transfection, EC9706 cells lost their normal morphology. Compared with untransfected cells, the survival rate increased (109.4% vs 100.0% , $P < 0.05$), the percentages of cells in G₁ and S phases decreased (62.9% vs 66.5% and 21.3% vs 23.7% , respectively; both $P < 0.05$), the percentage of cells in G₂ phase rose (14.8% vs 9.8% , $P < 0.05$), and the apoptosis rate declined in cells transfected with TGF- β 1-ASODN (0.69% vs 0.96% , $P < 0.05$).

CONCLUSION: TGF- β 1-ASODN can silence the expression of the TGF- β 1 gene efficiently and specially, and antagonize TGF- β 1-mediated proliferation inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in EC9706 cells.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Transforming growth factor-beta 1; Proliferation; Apoptosis

Zhang HY, Li SS, Sun Y, Wang XH, Yan AH, Wang XJ. TGF- β 1 antisense oligonucleotide ASODN promotes cell proliferation but inhibits apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3480-3485

摘要

目的: 探讨转染TGF- β 1反义寡核苷酸(TGF- β 1-ASODN)对食管鳞癌细胞EC9706增殖及凋

■同行评议者

李玉明, 教授, 江苏省南通市第一人民医院消化内科

亡的影响.

方法: 将化学合成的TGF- β 1-ASODN转染食管鳞癌细胞EC9706, 采用RT-PCR和流式细胞术检测转染效率; 观察TGF- β 1-ASODN转染后细胞形态学的改变; 采用MTT和流式细胞术检测TGF- β 1-ASODN转染后对细胞增殖及凋亡的影响.

结果: 转染TGF- β 1-ASODN可有效抑制EC9706细胞中TGF- β 1的活性, 其mRNA及蛋白的表达均明显低于转染前的水平(0.25 ± 0.07 vs 0.43 ± 0.09 ; 35.35% vs 41.38% , 均 $P < 0.05$); TGF- β 1-ASODN可明显促进细胞增殖、抑制细胞凋亡, 转染后细胞生长拥挤失去正常形态, 细胞存活率高于转染前(109.4% vs 100.0% , $P < 0.05$), G_1 期、S期细胞百分比低于转染前, G_2 期细胞百分比则高于转染前, 细胞凋亡率低于转染前(62.9% vs 66.5% ; 21.3% vs 23.7% ; 14.8% vs 9.8% ; 0.69% vs 0.96% , 均 $P < 0.05$).

结论: TGF- β 1-ASODN可高效特异地将TGF- β 1基因沉默, 并解除其抑制细胞增殖、阻滞细胞周期、促进细胞凋亡的作用.

关键词: 食管鳞癌; 转化生长因子 β 1; 增殖; 凋亡

张红燕, 李珊珊, 孙洋, 王新华, 阎爱华, 王小军. TGF- β 1反义寡核苷酸对食管鳞癌细胞EC9706增殖及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3480-3485
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3480.asp>

0 引言

转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)是一类多功能的多肽类细胞因子, 首先由Assoian *et al*^[1]于1983年自人血小板中成功提取, 已被证实对细胞增殖分化、细胞外基质产生、血管生成以及细胞凋亡等起重要的调控作用^[2]. 近年来发现, TGF- β 对肿瘤的作用极其复杂且可能相互矛盾, 在肿瘤早期可抑制细胞增殖、启动细胞分化诱导凋亡; 但在肿瘤的进展期则可通过多种机制促进肿瘤的侵袭和转移^[3-5]. 为探讨TGF- β 1对食管鳞癌细胞的作用, 本研究运用反义寡核苷酸技术观察了TGF- β 1-ASODN对食管鳞癌细胞EC9706增殖及凋亡的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 食管鳞癌细胞系EC9706由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点

实验室惠赠.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: EC9706细胞在含有100 mL/L的胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基中生长, 并置于37℃, 50 mL/L CO₂的条件下培养, 实验细胞均处于对数生长期.

1.2.2 TGF- β 1-ASODN转染EC9706细胞: 根据文献设计合成针对TGF- β 1第一启动子的反义寡核苷酸片段^[6], 启动子序列: GGC GCC GCC TCC CCC ATG CCG CCC TCC GGG, TGF- β 1-ASODN: CCC GGA GGG CGG CAT GGG GG, 由北京赛百盛生物技术有限公司合成, 硫代磷酸化修饰, PAGE纯化, 纯度99.9%. 将细胞分为3组, 转染反义寡核苷酸组(ASODN); 转染试剂组(不加反义寡核苷酸仅仅加入转染试剂); 未转染组(不进行任何操作的EC9706细胞). 按KeyGen公司转染试剂说明书将TGF- β 1-ASODN(0.2 g/L)转入EC9706细胞中.

1.2.3 观察转染后EC9706细胞形态学改变: 在细胞培养状态下, 用倒置显微镜分别观察各组细胞的生长状态及形态学改变.

1.2.4 RT-PCR检测EC9706细胞TGF- β 1 mRNA表达: TGF- β 1引物序列^[7]: 上游: 5'-CACATCAGAGCTCCGAGAAG-3', 下游: 5'-GGTCTTGCGGAAGTCAATG-3', 片段大小: 492 bp, 由北京赛百盛生物技术有限公司合成; 内参 β -actin引物序列: 上游: 5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3', 下游: 5'-TCATAGTCCGCCTAGAAGC-3', 片段大小: 281 bp, 由北京奥科生物技术有限公司合成. 按照TRIzol总RNA抽提纯化试剂盒说明(Invitrogen公司)抽提总RNA. 取1 μ L总RNA加入50 μ L的反应体系中, 根据OneStep RT-PCR Kit(宝生物工程公司)的说明, 在同一反应体系中同时扩增内参和目的基因. 取5 μ L PCR产物, 2 g/L琼脂糖电泳, 对凝胶进行灰度扫描并对灰度值进行统计学处理.

1.2.5 流式细胞术检测EC9706细胞TGF- β 1蛋白表达: 将细胞用胰酶消化, 1000 r/min离心5 min, 弃去上清; 用PBS洗2遍, 离心后弃去, 加入70%冰乙醇固定, 过夜; 取单细胞悬液 1×10^6 /mL, 加入鼠抗人TGF- β 1 mAb(北京中山金桥生物公司)工作液100 μ L, 室温孵育30 min; 加入PBS 10 mL洗涤1次, 弃上清; 加入羊抗鼠FITC-IgG二抗工作液100 μ L, 避光室温孵育30 min; 加入PBS 10 mL洗涤1次, 加入PBS 0.1 mL经500目铜网过滤后流式细胞仪检测TGF- β 1蛋白.

■ 相关报道

Gong *et al*的研究结果显示, TGF- β 1可导致大肠癌细胞细胞周期受阻, 细胞生长受抑. Patel *et al*的研究结果表明, TGF- β 1对肝癌细胞凋亡具有诱导作用.

■创新盘点

TGF- β 对肿瘤的作用极其复杂且可能相互矛盾,本研究运用反义寡核苷酸技术观察TGF- β 1-ASODN对食管鳞癌细胞增殖及凋亡的影响,可明确TGF- β 1对食管癌细胞的作用,并为阐明食管癌发病机制奠定基础。

表 1 TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞TGF- β 1表达的影响

分组	TGF- β 1 mRNA	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	TGF- β 1蛋白		χ^2 值	<i>P</i> 值
				细胞数	阳性率(%)		
TGF- β 1-ASODN组	0.25 \pm 0.07			5741	35.35		
转染试剂组	0.44 \pm 0.09	17.085	0.002	5628	45.32	157.108	0.000
未转染组	0.43 \pm 0.09	13.847	0.000	2061	41.38	23.513	0.000

表 2 TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞细胞周期的影响

分组	细胞数	G ₁ (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	G ₂ (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	S(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
TGF- β 1-ASODN组	24 332	62.9			14.8			21.3		
转染试剂组	7325	65.1	11.653	0.001	10.7	79.171	0.000	24.2	27.686	0.000
未转染组	8873	66.5	15.204	0.004	9.8	93.521	0.000	23.7	1293.858	0.000

χ^2 值与*P*值分别为TGF- β 1-ASODN组与各对照组之间的比值。

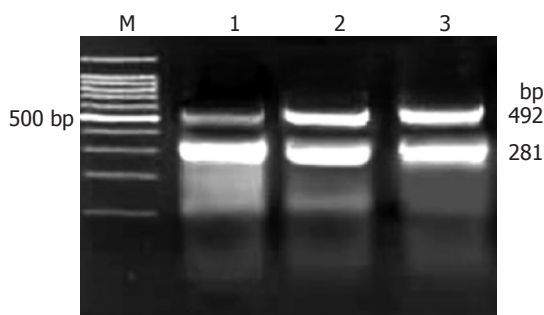


图 1 TGF- β 1-ASODN转染后72 h TGF- β 1 mRNA在EC9706细胞中的表达(492 bp)。M: Marker(100 bp); 1: TGF- β 1-ASODN组; 2: 转染试剂组; 3: 未转染组。

1.2.6 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测EC9706细胞增殖活性:将细胞按每孔 5×10^3 铺入96孔板,培养24 h后进行转染,在72 h时按常规方法加入MTT、二甲基亚砜,用酶标仪测定各孔的 A_{492} ,并计算细胞存活率(细胞存活率 = 实验组 A 均值/对照组 A 均值 $\times 100\%$)。

1.2.7 流式细胞术检测EC9706细胞凋亡及细胞周期:细胞准备同1.2.5,取单细胞悬液 $1 \times 10^6/L$,加1 mL PI(100 mg/L),避光30 min,流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期。

统计学处理 所有数据均经SPSS13.0软件进行统计分析。计数资料采用阳性率表示,阳性率之间的比较采用 χ^2 检验;计量资料采用mean \pm SD表示,2组均数的比较用*t*检验。显著性水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞TGF- β 1的抑

制作用 RT-PCR结果显示, TGF- β 1片段大小为492 bp(图1)。经TGF- β 1/ β -actin mRNA半定量分析显示,转染TGF- β 1-ASODN后72 h, EC9706细胞TGF- β 1 mRNA的表达水平明显低于对照组($P < 0.01$, 表1, 图1)。流式细胞术结果显示,转染TGF- β 1-ASODN后72 h, EC9706细胞TGF- β 1蛋白阳性表达率明显低于对照组($P < 0.01$, 表1, 图2)。以上结果表明, TGF- β 1-ASODN可有效抑制TGF- β 1基因的表达。

2.2 TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞形态的影响 倒置显微镜下观察发现,未转染组部分细胞呈多边形,部分细胞呈梭形、菱形或泪滴形,边缘锐利,癌细胞呈散在分布或呈片状、放射状、条索状排列,细胞轮廓清楚,贴壁生长,生长旺盛。转染TGF- β 1-ASODN组,24 h,癌细胞折光性减弱,形态基本正常;48 h,细胞体积变小,细胞形态变圆滑,呈圆形、椭圆形或方形,细胞间隙变宽,细胞胞质减少、颗粒增多,折光性差;72 h,细胞生长拥挤失去正常形态,部分细胞死亡脱落而悬浮于培养液中(图3)。

2.3 TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞增殖的影响 流式细胞术检测细胞周期,结果显示转染TGF- β 1-ASODN组G₁期、S期细胞较对照组减少($P < 0.01$),而G₂期细胞较对照组增多($P < 0.01$, 表2, 图4); MTT法检测结果显示转染TGF- β 1-ASODN组细胞的存活率较对照组高($P < 0.05$, 表3)。表明TGF- β 1-ASODN可使EC9706细胞增殖加快。

2.4 TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞凋亡的影响 流式细胞术检测细胞凋亡,结果显示,转染

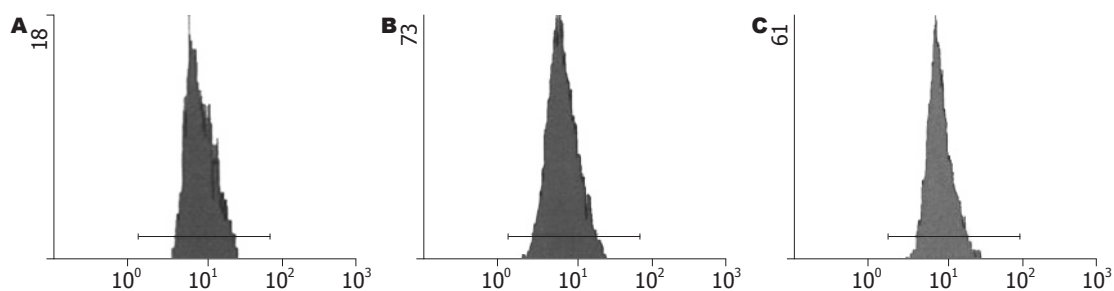


图 2 TGF- β 1-ASODN转染后72 h TGF- β 1蛋白在EC9706细胞中的表达. A: TGF- β 1-ASODN组; B: 转染试剂组; C: 未转染组.

应用要点

本研究提示, TGF- β 1-ASODN可以高效特异地将TGF- β 1基因沉默, 解除其促进细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制细胞增殖的作用. 这有助于进一步探讨TGF- β 1在食管癌发生发展中的作用.

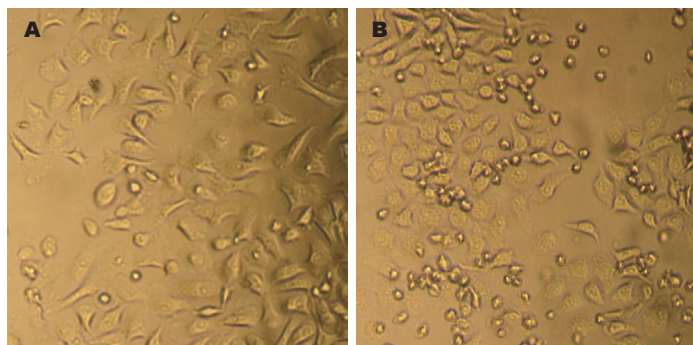


图 3 TGF- β 1-ASODN转染后EC9706细胞形态. A: 未转染组; B: TGF- β 1-ASODN组.

表 3 TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞增殖的影响

分组	A值	存活率(%)	t值	P值
TGF- β 1-ASODN组	0.58 ± 0.11	109.4		
转染试剂组	0.53 ± 0.09	96.2	4.272	0.043
未转染组	0.53 ± 0.09	100.0	4.445	0.039

表 4 TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞凋亡的影响

分组	细胞数	凋亡百分率(%)	χ^2 值	P值
TGF- β 1-ASODN组	24 332	0.69		
转染试剂组	7325	0.95	5.306	0.021
未转染组	8873	0.96	6.154	0.013

χ^2 值与P值分别为TGF- β 1-ASODN组与各对照组之间的比值.

χ^2 值与P值分别为TGF- β 1-ASODN组与各对照组之间的比值.

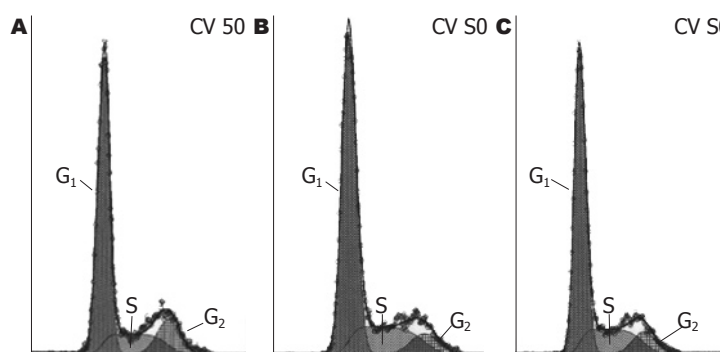


图 4 流式细胞术检测各组EC9706细胞周期. A: TGF- β 1-ASODN组; B: 转染试剂组; C: 未转染组.

TGF- β 1-ASODN组细胞凋亡率较对照组降低 ($P < 0.05$), 表明TGF- β 1-ASODN可抑制EC9706细胞凋亡(表4, 图5).

3 讨论

TGF- β 在机体的胚胎发育、创伤修复、免疫调节、细胞外基质的合成和储存等方面发挥重要作用, 同时也对许多细胞的生长具有调节作用. TGF- β 对细胞的作用可表现为刺激或抑制, 这主

要取决于细胞的类型、来源、分化状态和实验条件的不同. 体外研究表明, TGF- β 家族成员可抑制上皮细胞的增殖, 促进细胞凋亡, 但对不同的肿瘤细胞其作用还有待进一步探讨.

本研究根据文献[6]合成针对TGF- β 1第一启动子的反义寡核苷酸(TGF- β 1-ASODN), 并进行硫代磷酸化修饰, 运用阳离子聚合物瞬时转染食管鳞癌细胞EC9706, 观察TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞增殖及凋亡的影响. RT-PCR结

同行评价

本研究科学地观察并分析了TGF- β 1反义寡核苷酸对食管鳞癌细胞EC9706增殖及凋亡的影响,有一定先进性和可读性。

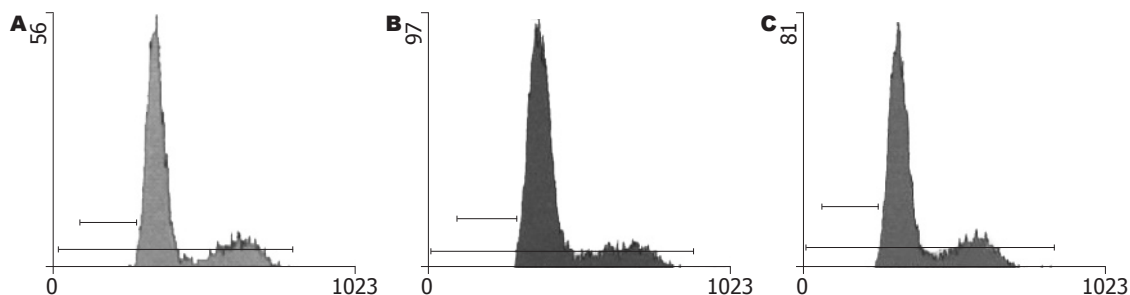


图5 流式细胞术检测各组EC9706细胞的凋亡. A: TGF- β 1-ASODN组; B: 转染试剂组; C: 未转染组.

果显示, 转染TGF- β 1-ASODN后24 h TGF- β 1 mRNA的表达水平即有所下降, 72 h(0.25 ± 0.07)明显低于转染前(0.43 ± 0.09 , $P < 0.01$), 而同一样本中TGF- β 1-ASODN非靶向基因 β -actin的表达未见明显变化. 流式细胞术结果也显示, 转染后TGF- β 1蛋白的表达(35.35%)明显低于转染前(41.38%, $P < 0.01$). 以上结果表明, TGF- β 1-ASODN可以高效特异地将TGF- β 1基因沉默, 这为进一步研究TGF- β 1-ASODN对食管鳞癌细胞的增殖及凋亡的影响奠定了基础.

正常的TGF- β 功能取决于正常的TGF- β 信号通路, TGF- β 具有抑制细胞增殖及促进凋亡的作用. TGF- β 抑制细胞增殖主要是对细胞周期的阻滞作用^[8-10]. G_1 期向S期转化是细胞周期调控的关卡, 细胞一旦通过此控制点, 将通过整个细胞周期. 本研究结果显示, TGF- β 1-ASODN转染EC9706细胞后, G_2 期细胞明显增多, 其百分比(14.8%)明显高于转染前(9.8%), 而 G_1 期的细胞减少, 其百分比(62.9%)低于转染前(66.5%), S期细胞百分比(21.3%)也明显低于转染前(23.7%). 由此可见, TGF- β 1-ASODN对食管鳞癌细胞EC9706中TGF- β 1的特异性抑制, 可能解除了TGF- β 1对细胞的生长抑制, 使得细胞通过 G_1 期及S期, 进入 G_2 期, 导致有更多的细胞进行细胞分裂. 本研究MTT检测结果也证实转染TGF- β 1-ASODN后72 h, 细胞存活率(109.4%)明显高于转染前(100%, $P < 0.05$), 细胞增殖加快, 提示转染TGF- β 1-ASODN后, 细胞增殖活性增强. 转染之后细胞形态学的改变也提示TGF- β 1-ASODN对TGF- β 1基因的抑制, 导致EC9706细胞增长速度加快. 72 h时, 细胞生长明显拥挤并失去正常形态, 使得部分细胞死亡脱落而悬浮于培养液中.

TGF- β 1不仅可抑制上皮细胞的增殖并对细胞凋亡具有诱导作用. Patel *et al*^[11]的研究结果表明, TGF- β 1对肝癌细胞凋亡具有诱导作用. 本研究转染TGF- β 1-ASODN对EC9706细胞凋亡的影

响也是显而易见的, 在转染TGF- β 1-ASODN后, 细胞凋亡率降低(转染前: 0.96%, 转染后: 0.69%, $P < 0.05$), 表明以TGF- β 1-ASODN沉默TGF- β 1基因, 可阻断TGF- β 1对食管鳞癌细胞EC9706的凋亡促进作用.

对大多数上皮细胞TGF- β 1发挥着生长抑制作用, 本研究结果提示TGF- β 1对食管鳞癌细胞EC9706也具有生长抑制及诱导凋亡的作用. TGF- β 抑制细胞增殖的机制主要是对细胞周期的阻滞作用. TGF- β 在 G_1 期发挥调节细胞周期的作用, 这些作用主要通过对细胞周期素(cyclin)、细胞周期素依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)、细胞周期素依赖激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)以及c-Myc^[12-13]的表达水平及功能状态进行调控, 最终使pRB去磷酸化而活化, 活化的pRB结合并抑制大量生长因子, 导致细胞停滞在 G_1 期. 此外, TGF- β 1对细胞凋亡的诱导可能通过以下途径: (1)提高细胞内组织型转谷氨酰胺酶的含量; (2)与c-Myc基因相互作用; (3)抑制RB蛋白的表达及磷酸化或与其他凋亡相关基因相互作用. 这些调节过程始终离不开TGF- β 1/Smads信号的正常转导, 信号通路中任何分子的异常都可能干扰细胞周期的正常运转, 从而成为肿瘤发生的诱因. TGF- β 1-ASODN可以高效特异地将TGF- β 1基因沉默, 解除其促进细胞凋亡、阻滞细胞周期、抑制细胞增殖的作用. 本研究结果显示的TGF- β 1对食管癌细胞增殖及凋亡的影响有助于进一步探讨TGF- β 1在食管癌发生发展中的作用.

参考文献

- 1 Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258: 7155-7160
- 2 李珊珊. 信号转导通路与食管癌. 中华病理学杂志

- 2007; 36: 366-369
- 3 Pasche B. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J Cell Physiol* 2001; 186: 153-168
- 4 Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8621-8623
- 5 Wong SF, Lai LC. The role of TGFbeta in human cancers. *Pathology* 2001; 33: 85-92
- 6 Romeo D, Allison RS, Kondaiah P, Wakefield LM. Recharacterization of the start sites for the major human transforming growth factor-beta 1 mRNA. *Gene* 1997; 189: 289-295
- 7 王医术, 李玉林, 李一雷, 王心蕊, 张丽红. TGF β 1在乳腺癌间质新生血管周细胞中的表达. *吉林大学学报(医学版)* 2004; 30: 684-686
- 8 Alexandrow MG, Moses HL. Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. *Cancer Res* 1995; 55: 1452-1457
- 9 Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 2000; 14: 627-644
- 10 Gong J, Ammanamanchi S, Ko TC, Brattain MG. Transforming growth factor beta 1 increases the stability of p21/WAF1/CIP1 protein and inhibits CDK2 kinase activity in human colon carcinoma FET cells. *Cancer Res* 2003; 63: 3340-3346
- 11 Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21: 1725-1741
- 12 Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massagué J. Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5913-5922
- 13 Hu X, Cress WD, Zhong Q, Zuckerman KS. Transforming growth factor beta inhibits the phosphorylation of pRB at multiple serine/threonine sites and differentially regulates the formation of pRB family-E2F complexes in human myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 930-939

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 2009-12-08)

Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞胃酸分泌的调节作用

杜改梅, 刘茂军, 陈钟鸣

■背景资料

生长素(Ghrelin)是一种主要由胃内分泌细胞分泌的一种新的脑肽, 他与其受体结合可以发挥许多生物学功能, 其中发现Ghrelin对胃肠道的结构和功能具有重要的调节作用。许多研究证明Ghrelin可以促进胃肠运动, 而其对胃功能发育的作用尚不清楚。目前虽然有许多有关Ghrelin对胃酸分泌的研究报道, 但结果仍然存在争议。

杜改梅, 陈钟鸣, 金陵科技学院动物科学与技术学院 江苏省南京市 210038

刘茂军, 江苏省农业科学院兽医研究所 农业部畜禽疫病诊断重点开放实验室 江苏省南京市 210014

杜改梅, 2006年金陵科技学院动物医学基础兽医学博士, 副教授, 主要从事营养和消化生理研究。

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2007536

南京市科技发展计划基金资助项目, No. 20081b311085

2008年江苏省“青蓝工程”基金资助项目

作者贡献分布: 此课题杜改梅与刘茂军贡献均等; 由杜改梅与刘茂军设计; 研究过程由杜改梅与刘茂军操作完成; 数据分析由杜改梅完成; 本论文写作由杜改梅与刘茂军完成、陈钟鸣审核。

通讯作者: 刘茂军, 助理研究员, 210014, 江苏省南京市, 江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部畜禽疫病诊断重点开放实验室。

maojunliu@163.com

电话: 025-83066851

收稿日期: 2009-09-03 修回日期: 2009-09-29

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-12-08

Ghrelin stimulates gastric acid secretion by rat gastric mucosal cells *in vitro*

Gai-Mei Du, Mao-Jun Liu, Zhong-Ming Chen

Gai-Mei Du, Zhong-Ming Chen, Department of Animal Science and Technology, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, Jiangsu Province, China

Mao-Jun Liu, Key Laboratory of Animal & Poultry Disease Diagnosis of the Ministry of Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2007536; the Science and Technology Development Program of Nanjing, No. 20081b311085; and the 2008 Qing Lan Project

Correspondence to: Mao-Jun Liu, Key Laboratory of Animal & Poultry Disease Diagnosis of the Ministry of Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China. maojunliu@163.com

Received: 2009-09-03 Revised: 2009-09-29

Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of ghrelin on gastric exocrine secretion.

METHODS: Gastric mucosa was obtained from weaned rats. Gastric mucosal cells were dispersed from freshly obtained gastric mucosa and divided into two groups: treatment group and control group. The treatment group was incubated with fresh culture medium containing different concentrations of ghrelin (1×10^{-4} , $1 \times$

10^{-3} , 1×10^{-2} and 1×10^{-1} $\mu\text{mol/L}$), while the control group was incubated with fresh culture medium without ghrelin. Four hours after incubation, culture supernatants were collected, and cells were harvested. Cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Pepsin activity and H^+ - K^+ -ATPase mRNA expression and activity were evaluated.

RESULTS: No significant difference was noted in cell viability between the control group and treatment group. Ghrelin at a concentration of 1×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ significantly augmented pepsin activity and H^+ - K^+ -ATPase mRNA expression (both $P < 0.05$). Ghrelin at a concentration of 1×10^{-4} and 1×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ significantly increased H^+ - K^+ -ATPase activity in gastric mucosal cells (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Ghrelin can significantly stimulate the secretion of both pepsin and gastric acid by gastric mucosal cells *in vitro*.

Key Words: Ghrelin; Gastric mucosal cell; Rat; Pepsin; H^+ - K^+ -ATPase

Du GM, Liu MJ, Chen ZM. Ghrelin stimulates gastric acid secretion by rat gastric mucosal cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3486-3490

摘要

目的: 探讨Ghrelin对胃外分泌功能的作用。

方法: 从断奶大鼠中获得新鲜胃黏膜组织。分离培养胃黏膜上皮细胞, 培养30 h后, 实验组换为分别含有 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} 和 1×10^{-1} $\mu\text{mol/L}$ Ghrelin的新鲜培养液, 对照组换为不含Ghrelin的正常新鲜培养液。继续培养4 h, 收集培养液和细胞, 分别测定细胞的相对活性(MTT法)、培养液中胃蛋白酶活性、细胞中 H^+ - K^+ -ATPase mRNA表达和活性。

结果: 实验组中细胞的相对活性与对照组相比没有发生明显的变化; 1×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ Ghrelin可显著提高胃蛋白酶的活性($P < 0.05$)。 1×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ Ghrelin可显著增加细胞中 H^+ -

■同行评议者

白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

K^+ -ATPase mRNA的表达($P<0.05$), 1×10^{-4} 和 1×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ Ghrelin明显增加了胃黏膜上皮细胞中 H^+ - K^+ -ATPase的活性(均 $P<0.05$).

结论: Ghrelin体外作用于胃黏膜上皮细胞可刺激胃蛋白酶和胃酸的分泌.

关键词: Ghrelin; 胃黏膜上皮细胞; 大鼠; 胃蛋白酶; H^+ - K^+ -ATPase

杜改梅, 刘茂军, 陈钟鸣. Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞胃酸分泌的调节作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3486-3490
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3486.asp>

0 引言

胃功能发育缓慢, 胃酸和胃蛋白酶分泌不足是导致新生动物腹泻、生长缓慢的主要原因之一^[1]. 曾有研究发现, 在新生动物日粮中添加有机酸的方法来降低腹泻率, 取得了较好的效果, 但存在较多弊端. 一方面添加的剂量较难掌握, 剂量太高, 影响饲料适口性和动物采食量; 另一方面添加酸性物质可通过负反馈作用抑制胃泌素的分泌, 从而抑制动物自身的胃酸分泌能力^[1-2]. 因此, 如何激发动物内源性的胃酸分泌能力, 促进胃功能的发育成为研究人员和养殖业最关注的问题.

Ghrelin是1999年由日本发现的一种由A-like细胞分泌的一种28个氨基酸残基组成的新脑肠肽, 又名生长素^[3]. Ghrelin具有许多生物学功能, 如促进垂体生长激素的释放, 促进动物采食, 增加体质量, 调节能量平衡, 促进胃排空和胃酸分泌等^[4-6]. Sibilia *et al*和Trudel *et al*研究证明, Ghrelin在消化系中具有许多功能性作用, 如调节胃肠运动, 保护胃黏膜免受乙醇和应激等引起的损伤, 促进胃酸分泌, 肠上皮细胞的更新等^[7-8]. Ariyasu *et al*研究发现, 切除胃中产酸区域, 血清Ghrelin浓度显著下降, 提示Ghrelin与胃酸分泌有密切的关系^[4]. 近年来, 虽然大多研究均已证明Ghrelin可以促进胃肠道运动和排空^[9-10], 但关于Ghrelin对胃酸分泌的作用目前仍然存在争议, 尚待作进一步的研究. 研究发现, 给小鼠脑室内注射Ghrelin, 引起小鼠剂量依赖性的胃酸分泌, 迷走神经切断或给予阿托品后, 能阻断Ghrelin引起的胃酸分泌增多, 提示Ghrelin对胃酸分泌的促进作用主要是通过中枢神经系统来调节^[11], 然而, Ghrelin的外周作用并不能被忽视. Ghrelin对体外培养的胃黏膜上皮细胞功能的影响尚未见报道.

胃蛋白酶原主要由胃底主细胞分泌, 然后经胃酸刺激成为有活性的胃蛋白酶, 才能参与胃肠道的消化功能. 胃蛋白酶作用的适宜环境约为pH2, 在pH值大于6时, 酶活性消失^[12]. 质子泵, 又名 H^+ - K^+ -ATP酶(H^+ - K^+ -ATPase), 专一性地存在于壁细胞中, 是胃酸分泌的分子基础, 也是调控壁细胞泌酸的最后通道. H^+ - K^+ -ATPase表达和活性的增高, 标志着胃酸分泌能力的增强^[13]. 因此, H^+ - K^+ -ATPase的活性可以作为评价壁细胞泌酸能力的一个重要指标. 本研究主要采用大鼠为动物模型, 探索Ghrelin对断奶大鼠胃蛋白酶和胃酸分泌的体外作用.

1 材料和方法

1.1 材料 Ghrelin购自美国Peptide公司. H^+ - K^+ -ATPase Kit购自南京建成生物有限公司. Trypsin、MTT、DMEM/F-12和HEPES分别购自Sigma、Gibco和Hyclone. 胎牛血清购自杭州四季青公司. 反转录酶(MMLV)、DNA聚合酶(Taq)和RNA酶抑制剂(RNase inhibitor)购自Promega公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理: 断颈处死断奶SD大鼠(体质量48 g), 迅速取出胃, 用4℃含有双抗(青霉素500 kU/L和链霉素500 kU/L)的D-Hanks液洗去胃内容物, 分离胃黏膜, 按照Terano *et al*^[14]的方法, 略加改进, 进行胃黏膜上皮细胞的培养. 用含有双抗(100 kU/L青霉素和100 kU/L链霉素)的D-Hank's液反复冲洗胃黏膜, 直到洗液不再混浊为止. 将胃黏膜剪成1 mm³左右的小块, 在37℃, 用0.15%的胰蛋白酶消化20-30 min, 铜网过滤后离心5 min(1000 r/min). 然后将离心的沉淀用D-Hank's液冲洗1次, 再离心5 min(1000 r/min), 重复2次后将沉淀用DEME/F-12(含有10%的胎牛血清和双抗)悬浮, 制成细胞悬液, 用0.1%台盼蓝染色检测细胞存活率在95%以上. 将细胞密度调整至 2×10^6 个/mL, 接种到12孔培养板上, 然后将细胞放入CO₂培养箱中进行培养(37℃, 5% CO₂). 培养细胞分为6组, 每组6个样本, 每个样本4孔. 细胞培养30 h后, 实验组换为分别含有 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} 和 1×10^{-1} $\mu\text{mol/L}$ Ghrelin的新鲜培养液, 对照组换为不含Ghrelin的正常新鲜培养液. 继续培养4 h, 收集培养液和细胞, 分别测定培养液中胃蛋白酶和细胞中 H^+ - K^+ -ATPase mRNA表达和活性.

1.2.2 MTT法测定细胞活力: 将大鼠胃黏膜上皮

■ 研发前沿

Ghrelin作为一种重要的胃肠道激素, 是否对胃功能发育具有一定的调节作用? Ghrelin是否可以通过外周途径来调节胃的结构和功能发育都成为研究人员最关注的问题.

■相关报道

Sibilia *et al* 研究证明大鼠脑室内注射Ghrelin对胃酸分泌有抑制作用。而Dornonville *et al* 给大鼠皮下注射Ghrelin, 结果胃排空促进, 而胃酸分泌未受到任何促进或抑制作用。

细胞培养于96孔板中, 培养30 h后, 实验组换为分别含有 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} 和 1×10^{-1} $\mu\text{mol/L}$ Ghrelin的新鲜培养液, 继续培养4 h, 然后在每孔培养液中均加入20 μL MTT液, 再继续培养3-4 h. 然后从每个培养孔中均吸去100 μL 培养液, 再加入等量的20% SDS(sodium dodecyl sulfate)-50% DMF(dimethylformamide), 在微型振荡器上振荡5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h, 在酶标仪上测光吸光度值(A值)(波长490 nm, 参考波长560 nm).

1.2.3 胃蛋白酶活性: 采用常规生物化学方法进行测定, 主要步骤如下: 培养结束后收集细胞培养液, 用DAB9^[15]法测培养液中总胃蛋白酶活性, 同时用考马斯亮蓝法测培养液中总蛋白质浓度, 计算方法为: 胃黏膜上皮细胞培养液中总胃蛋白酶比活(U/g) = 胃黏膜上皮细胞培养液中总胃蛋白酶活性(U/mL)/胃黏膜上皮细胞培养液中总蛋白质浓度(g/mL).

1.2.4 相对定量RT-PCR: (1)总RNA提取: 采用总RNA提取试剂盒(TRIzol法)提取胃组织样的总RNA. 用紫外分光光度计测定总RNA浓度(260 nm), 并通过1.4%的琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳检验总RNA的质量. (2)反转录(RT): 用随机引物对样品的RNA进行RT, 获得RNA的cDNA(RT产物). RT反应总体积25 μL , 包括2 μg 总RNA, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物, 0.4 mmol/L dNTP, 加ddH₂O至10 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min, 立即放冰上冷却, 再加8 U RNA酶抑制剂, 100 U M-MLV反转录酶, 5 μL 5 \times RT Buffer(含250 mmol/L pH8.3 Tris-HCl, 15 mmol/L MgCl₂, 375 mmol/L KCl, 50 mmol/L DTT), 补充DEPC处理水至25 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应5 min. 同时用不加反转录酶的反转录体系作为阴性对照(C1), 用于检测总RNA样品中是否有基因组DNA污染. 反转录产物(RT产物)-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用. (3)引物设计及PCR扩增条件: H⁺-K⁺-ATPase引物根据GenBank(M22724)提供的全序列设计. 上游引物序列为: 5'-GAG AACCACCACCTACAAG-3', 下游引物序列为: 5'-CAACAGCGAACTCCAAG-3', 由大连宝生物工程公司合成, 预期PCR产物长度为362 bp. PCR反应体积25 μL , 含模板(RT产物)2 μL , 0.5 U Taq DNA聚合酶, 2.5 μL 10 \times PCR Buffer(含50 mmol/L Tris-HCl pH9.0, 100 mmol/L NaCl, 1.0 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, 500 mL/L glycerol, 10 g/L Triton X-100), 0.2 mmol/L dNTP, 1.0-2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ H⁺-K⁺-ATPase

引物, 0.02-0.03 $\mu\text{mol/L}$ 18S rRNA内标. PCR扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 复性30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s, 共26个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸10 min. H⁺-K⁺-ATPase, PCR反应分别在26个循环时, 18S rRNA和目的基因的PCR产物均在线性扩增范围. 每个样品至少作3次重复, 同时用ddH₂O和RNA样品分别取代RT产物作对照, 以检验是否有外源和基因组DNA污染. (4)电泳及灰度分析: 取20 μL PCR产物在含EB的2.0%琼脂糖凝胶上电泳. 图像处理及灰度分析, 根据H⁺-K⁺-ATPase和18S PCR产物的灰度比, 确定样品中H⁺-K⁺-ATPase mRNA表达的相对含量.

1.2.5 H⁺-K⁺-ATPase活性测定: 细胞培养结束后, 吸去培养液, 每孔加入1 mL 0.2%的TritonX-100, 反复吹吸数次使细胞破碎, 然后收集细胞破碎液, 按试剂盒说明进行测定. 同时用考马斯亮蓝法测定细胞中总蛋白含量, 结果以反应1 h内H⁺-K⁺-ATPase磷酸化释放磷量和细胞中总蛋白含量比值来表示H⁺-K⁺-ATPase活性, 单位为 $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg prot}\cdot\text{h})$. 也可以将细胞破碎液保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待测酶活性.

统计学处理 所有数据用mean \pm SD表示. 采用SPSS11.0统计软件统计, 差异显著性检验采用单因子方差分析(One-way ANOVA, LSD).

2 结果

2.1 Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞相对活性的影响 用MTT法检测大鼠胃黏膜上皮细胞的增殖, 结果发现细胞的相对活性与对照组相比没有发生明显的变化(图1A).

2.2 Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞中胃蛋白酶活性的影响 用不同剂量的Ghrelin处理培养的大鼠胃黏膜上皮细胞, 1×10^{-3} $\mu\text{mol/L}$ Ghrelin可显著提高培养液中胃蛋白酶活性(图1B). 因为在pH1.6的酸性条件下测定的培养液中胃蛋白酶活性, 反映的是总胃蛋白酶活性(包括被盐酸激活的胃蛋白酶原和有活性的胃蛋白酶), 所以该结果暗示Ghrelin对主细胞分泌胃蛋白酶原具有明显的促进作用.

2.3 Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞中H⁺-K⁺-ATPase活性的影响 从图1C中我们可以得知, 用 1×10^{-4} 和 1×10^{-3} Ghrelin处理细胞后, 胃黏膜上皮细胞中H⁺-K⁺-ATPase的活性与对照组相比明显增加(均 $P < 0.05$).

2.4 Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞中H⁺-K⁺-ATPase mRNA表达的影响 用不同剂量的Ghrelin

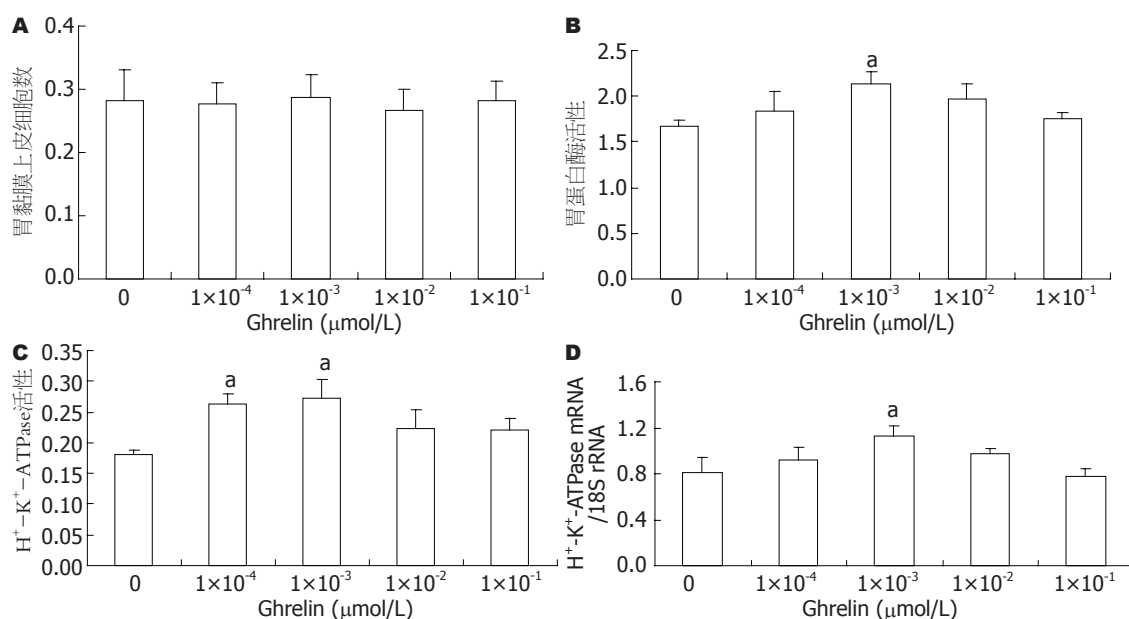


图1 Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞的体外影响. A: 相对活力; B: 胃蛋白酶活性; C: $H^+-K^+-ATPase$ 活性; D: $H^+-K^+-ATPase$ mRNA的表达. ^a $P < 0.05$ vs 对照组.

■创新盘点

本研究为了排除体内多种因素的影响,首次通过体外培养胃黏膜上皮细胞来研究Ghrelin对胃功能发育的外周作用.以往研究多以胃液pH值来衡量其胃酸分泌能力,而胃液pH值不能精确反映动物自身胃酸分泌的能力.为了避免采食、饮水等食糜的影响,本研究则主要以胃酸分泌过程中的关键酶- $H^+-K^+-ATPase$ 作为指标,更能准确衡量胃酸的分泌能力.

处理培养的大鼠胃黏膜上皮细胞, 1×10^{-3} μmol/L Ghrelin可显著提高胃黏膜上皮细胞中 $H^+-K^+-ATPase$ mRNA的表达(图1D).

3 讨论

Ghrelin主要由位于胃泌酸区域的A-like分泌,提示Ghrelin与胃酸分泌具有密切的关系^[16].研究表明,人和大鼠Ghrelin免疫活性细胞密集分布于胃的泌酸腺黏膜,约占胃泌酸腺区内分泌细胞总数的20%,在胃窦、十二指肠和空肠也发现Ghrelin免疫活性细胞^[17].血清Ghrelin浓度会随着胃中产酸区域的切除而显著下降^[4],这表明Ghrelin与胃酸分泌有密切的关系.有研究发现外源性Ghrelin能通过肠壁内在神经丛的胆碱能神经元促进大鼠在体和离体小肠运动^[18].我们曾研究发现,断奶前后仔猪胃黏膜Ghrelin mRNA的表达变化规律与胃黏膜 $H^+-K^+-ATPase$ 的表达呈显著的正相关,暗示Ghrelin可能参与胃酸分泌的调节^[19].目前,许多研究均已证明Ghrelin对胃排空确实具有明显的促进作用^[8],而他对胃酸分泌的作用仍然存在分歧^[9,20-21], Date *et al*和 Trudel *et al*分别给小鼠脑室内和大鼠静脉内注射Ghrelin,发现均可引起剂量依赖性的胃酸分泌增多,胃收缩增强^[8,11]. Sibilica *et al*研究证明大鼠脑室内注射Ghrelin对胃酸分泌有抑制作用^[20]. Dornonville *et al*给大鼠皮下注射Ghrelin,结果胃排空促进,而胃酸分泌未受到任何促进或抑制作用^[9].这种分歧可能与Ghrelin的处理途径、剂

量、动物状态以及评估胃酸分泌能力的指标不同等有关.

$H^+-K^+-ATPase$ 通过自身的磷酸化和去磷酸化,将细胞外液中的 K^+ 转运入细胞内,同时逆浓度梯度将细胞内的 H^+ 泵出细胞外,完成 H^+/K^+ 电中性跨膜离子转运和胃酸分泌功能^[22].研究发现 $H^+-K^+-ATPase$ 的表达和活性变化趋势与胃酸分泌能力相一致^[23].因此通过测定 $H^+-K^+-ATPase$ 的表达和活性可精确反映胃酸分泌能力.以往的报道是以胃液pH值来衡量其胃酸分泌能力,而胃液pH值反映的是动物自身分泌的盐酸、食糜和乳汁所形成的总酸度,并且容易受到采食、饮水的影响^[2],因此胃液pH值并不能精确反映动物自身胃酸分泌的能力.而本实验以胃酸分泌过程中的关键酶($H^+-K^+-ATPase$)作为指标,则更能准确衡量大鼠的胃酸分泌能力.此外, Ghrelin主要通过存在于胃肠道和胰腺中的受体结合来调节胃肠运动和胃酸分泌,提示Ghrelin对胃功能的作用主要是通过中枢神经系统来调节的^[11],然而, Ghrelin的外周作用并不能被排除.本研究通过培养胃黏膜上皮细胞进行了体外实验,结果证明用一定剂量的Ghrelin处理体外培养的大鼠胃黏膜上皮细胞,能明显促进胃黏膜上皮细胞中 $H^+-K^+-ATPase$ 活性,这首次研究表明Ghrelin可能不通过迷走神经和中枢神经系统也能促进胃酸的分泌.胃蛋白酶原主要由胃黏膜主细胞分泌,分泌后在胃酸的刺激下,转变为具有活性的胃蛋白酶^[12].本实验是在pH1.6的

■同行评价

本研究探讨了Ghrelin对大鼠胃黏膜上皮细胞胃酸分泌的调节作用,有一定学术价值和可读性。

酸性条件下测定的培养液中胃蛋白酶活性,反映的是总胃蛋白酶活性(包括被盐酸激活的胃蛋白酶原和有活性的胃蛋白酶),所以本研究结果Ghrelin可明显促进胃蛋白酶的活性,表明Ghrelin对主细胞分泌胃蛋白酶原具有明显的促进作用。然而Ghrelin是直接作用于壁细胞和主细胞还是间接作用于胃黏膜其他细胞来调节胃酸和胃蛋白酶原的分泌,还需要进行进一步的研究。然而,用Ghrelin处理培养的大鼠胃黏膜上皮细胞,细胞的相对活性没有发生显著的变化,这可能与MTT检测方法的敏感性和特异性有关。

本研究证明Ghrelin可以作用于体外培养的胃黏膜上皮细胞,促进胃蛋白酶活性和 H^+-K^+-ATP 酶活性,但其作用机制还需要进行进一步研究。

4 参考文献

- 1 沈国顺, 刘丽霞, 刘春秀. 早期断奶仔猪腹泻发生的原因及预防措施. 畜牧与兽医 2001; 33: 32-34
- 2 饶辉. 影响断奶仔猪胃肠道pH值及胃蛋白酶活性的因素. 江西饲料 2008; (03): 1-4
- 3 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660
- 4 Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-4758
- 5 Okimura Y, Ukai K, Hosoda H, Murata M, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K. The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely moving male rats. *Life Sci* 2003; 72: 2517-2524
- 6 Rubino F, Zizzari P, Tomasetto C, Bluett-Pajot MT, Forgione A, Vix M, Grouselle D, Marescaux J. The role of the small bowel in the regulation of circulating ghrelin levels and food intake in the obese Zucker rat. *Endocrinology* 2005; 146: 1745-1751
- 7 Sibilias V, Rindi G, Pagani F, Rapetti D, Locatelli V, Torsello A, Campanini N, Deghenghi R, Netti C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology* 2003; 144: 353-359
- 8 Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, Poitras P. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G948-G952
- 9 Dornonville de la Cour C, Lindström E, Norlén P, Håkanson R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 2004; 120: 23-32
- 10 Peeters TL. Central and peripheral mechanisms by which ghrelin regulates gut motility. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 Suppl 4: 95-103
- 11 Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 904-907
- 12 陈杰. 家畜生理学. 第4版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 151-157
- 13 Wallmark B, Larsson H, Humble L. The relationship between gastric acid secretion and gastric H^+-K^+-ATP ase activity. *J Biol Chem* 1985; 260: 13681-13684
- 14 Terano A, Ivey KJ, Stachura J, Sekhon S, Hosojima H, McKenzie WN Jr, Krause WJ, Wyche JH. Cell culture of rat gastric fundic mucosa. *Gastroenterology* 1982; 83: 1280-1291
- 15 Stellmach Bruno, 钱嘉渊. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 256-260
- 16 Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2002; 23: 531-536
- 17 Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141: 4255-4261
- 18 Edholm T, Levin F, Hellström PM, Schmidt PT. Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons. *Regul Pept* 2004; 121: 25-30
- 19 Du GM, Shi ZM, Wei XH, Liu MJ, Zhang L, Zhao RQ. Expression of gastric ghrelin and $H(+)-K(+)-ATP$ ase mRNA in weanling piglets and effect of ghrelin on $H(+)-K(+)-ATP$ ase expression and activity in gastric mucosal cells in vitro. *Res Vet Sci* 2007; 82: 99-104
- 20 Sibilias V, Pagani F, Guidobono F, Locatelli V, Torsello A, Deghenghi R, Netti C. Evidence for a central inhibitory role of growth hormone secretagogues and ghrelin on gastric acid secretion in conscious rats. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 92-97
- 21 Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-908
- 22 Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 103-131
- 23 Hervatin F, Benkouka F, Robert JC, Péranski G, Soumarmon A. The ontogeny of rat gastric H^+/K^+-ATP ase. *Biochim Biophys Acta* 1989; 985: 320-324

编辑 李军亮 电编 何基才

猕猴桃果仁油对小鼠非酒精性脂肪性肝病的作用

向志钢, 李先辉, 刘锋, 周卫华, 张永康

向志钢, 李先辉, 刘锋, 周卫华, 吉首大学医学院 吉首大学医学研究所 湖南省吉首市 416000

张永康, 吉首大学食品科学研究所 湖南省吉首市 416000
向志钢, 硕士, 副教授, 主要从事临床肝胆胰疾病研究.

湖南省自然科学基金项目, No. 07JJ6029

作者贡献分布: 此课题由向志钢、李先辉及刘锋与张永康共同设计; 研究过程由向志钢、李先辉、刘锋及周卫华操作完成; 研究所用相关试剂及分析工具由张永康、李先辉及刘锋提供; 数据分析由向志钢、李先辉及刘锋共同完成; 本论文写作主要由向志钢与李先辉完成.

通讯作者: 向志钢, 副教授, 416000, 湖南省吉首市, 吉首大学医学院, 吉首大学医学研究所. xiangzhigang@126.com
电话: 0743-8759168

收稿日期: 2009-10-22 修回日期: 2009-11-10

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-08

Kiwifruit seed oil has a protective effect against nonalcoholic fatty liver disease in mice

Zhi-Gang Xiang, Xian-Hui Li, Feng Liu, Wei-Hua Zhou, Yong-Kang Zhang

Zhi-Gang Xiang, Xian-Hui Li, Feng Liu, Wei-Hua Zhou, School of Medicine, Institute for Medical Research, JiShou University, Jishou 41600, Hunan Province, China

Yong-Kang Zhang, Institute of Food Science, JiShou University, Jishou 41600, Hunan Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 07JJ6029

Correspondence to: Professor Zhi-Gang Xiang, School of Medicine, Institute for Medical Research, JiShou University, Jishou 41600, Hunan Province, China. xiangzhigang@126.com

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

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate whether Kiwifruit seed oil has a protective effect against nonalcoholic fatty liver disease in mice.

METHODS: Fifty adult male mice were randomly divided into five groups: normal control group, model control group, and three Kiwifruit seed oil treatment groups (low-, medium- and high-dose). Mice in the normal control group were fed a normal diet, while those in other groups were fed a high-fat diet. Mice in the three Kiwifruit seed oil treatment groups were also given low-, medium- and high-dose Kiwifruit seed oil, respectively. Six weeks later, the body

weight, liver index, serum TG, TC, ALT and AST levels, and hepatic TG, TC, MDA, SOD and GSH-Px levels were measured. The histological changes in the liver were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining and oil red staining.

RESULTS: Compared with the normal control group, the liver index, serum TG, TC, ALT and AST levels, and hepatic MDA level markedly increased (all $P < 0.01$); and hepatic SOD and GSH-Px significantly decreased (both $P < 0.01$) in the model control group. Compared with the model control group, the liver index, serum TG, TC, ALT and AST, and hepatic MDA markedly decreased (TC: 3.05 ± 0.32 mmol/L, 2.55 ± 0.43 mmol/L vs 4.55 ± 0.23 mmol/L; TG: 1.62 ± 0.68 mmol/L, 1.56 ± 0.57 mmol/L vs 1.90 ± 0.55 mmol/L; ALT: 76.91 ± 16.32 U/L, 64.54 ± 11.32 U/L vs 170.34 ± 9.32 U/L; AST: 128.26 ± 20.15 U/L, 112.74 ± 21.37 U/L vs 158.86 ± 18.45 U/L; MDA: 5.16 ± 0.97 U/mg, 5.01 ± 1.14 U/mg vs 5.88 ± 1.07 U/mg; all $P < 0.05$ or 0.01); and hepatic SOD and GSH-Px significantly increased (both $P < 0.01$) in the medium- and high-dose Kiwifruit seed oil treatment groups. Mice in the model control group showed serious fatty degeneration, inflammatory cell infiltration and necrosis in the liver. However, these pathological changes were milder in the medium- and high-dose Kiwifruit seed oil treatment groups than in the model control group.

CONCLUSION: Kiwifruit seed oil has a protective effect against nonalcoholic fatty liver disease in mice.

Key Words: Kiwifruit seed oil; α -linolenic acid; Mouse; Nonalcoholic fatty liver disease

Xiang ZG, Li XH, Liu F, Zhou WH, Zhang YK. Kiwifruit seed oil has a protective effect against nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3491-3496

摘要

目的: 观察猕猴桃果仁油对小鼠非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的保护作用, 并初步探讨其作用机制.

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是慢性肝病最常见的原因之一, 发病率逐年上升, 除可导致终末期肝病外, NAFLD还会引起患者心血管疾病发生率和病死率增加, 对健康威胁极大, 如何有效防治NAFLD已成为全球普遍关注的医学问题和社会问题.

■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市公共卫生中心

■ 研发前沿

氧化应激与脂质过氧化在NAFLD发病机制中的作用正日益受到重视,积极寻找和筛选有效途径和方法阻止脂质在肝脏的沉积,阻断氧化应激和脂质过氧化对NAFLD的进一步损伤是当前面临的严峻挑战,已是当今NAFLD防治研究的焦点和热点。

方法: 健康, ♂ 小鼠50只, 随机分为: 对照组、模型组和果仁油低、中、高剂量组[90、180、270 mg/(kg·d)]5组。除对照组用普通饲料喂养外, 其余各组均给予高脂饲料喂养。实验6 wk后处死全部小鼠, 比较各组之间血清和肝脏生化以及肝脏组织病理学特征。

结果: 与对照组相比, 模型组小鼠血清TG、TC、ALT、AST和肝组织MDA显著升高(均 $P < 0.01$), 肝组织SOD和GSH-Px显著降低(均 $P < 0.01$); 果仁油中、高剂量组小鼠血清TC、TG、ALT、AST及肝组织MDA显著低于模型组(TC: 3.05 ± 0.32 mmol/L, 2.55 ± 0.43 mmol/L vs 4.55 ± 0.23 mmol/L; TG: 1.62 ± 0.68 mmol/L, 1.56 ± 0.57 mmol/L vs 1.90 ± 0.55 mmol/L; ALT: 76.91 ± 16.32 U/L, 64.54 ± 11.32 U/L vs 170.34 ± 9.32 U/L; AST: 128.26 ± 20.15 U/L, 112.74 ± 21.37 U/L vs 158.86 ± 18.45 U/L; MDA: 5.16 ± 0.97 U/mg, 5.01 ± 1.14 U/mg vs 5.88 ± 1.07 U/mg, $P < 0.05$ 或 0.01), 肝组织SOD和GSH-Px的显著高于对照组(均 $P < 0.05$); 模型组小鼠肝脏脂肪变性严重, 并伴有炎细胞浸润及坏死, 而果仁油中、高剂量组小鼠肝脏脂肪变性程度轻, 无明显炎细胞浸润及坏死。

结论: 猕猴桃果仁油对高脂饲料诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病有明显的保护作用。

关键词: 猕猴桃果仁油; α -亚麻酸; 小鼠; 非酒精性脂肪性肝病

向志钢, 李先辉, 刘锋, 周卫华, 张永康. 猕猴桃果仁油对小鼠非酒精性脂肪性肝病的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3491-3496
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3491.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞脂肪变为主要特征的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)以及由其演变的非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)和肝硬化, 是许多国家的第一大慢性肝病, 也是我国常见的慢性肝病之一^[1-2]。猕猴桃果仁油是以猕猴桃果籽为原料, 通过CO₂超临界萃取而得到的天然植物油, 富含 α -亚麻酸、亚油酸等不饱和脂肪酸, 研究证实其能有效降低血清中的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及低密度脂蛋白(LDL-C), 还具有清除氧自

由基, 抑制氧化应激等作用^[3-5]。但猕猴桃果仁油对血脂的调节作用能否减少肝脏的脂质沉积和降低肝脏脂质过氧化水平, 以及猕猴桃果仁油对NAFLD的保护作用及机制研究尚未见文献报道。本研究以高脂饲料诱导建立小鼠的脂肪肝模型, 观察猕猴桃果仁油对小鼠NAFLD的保护作用并探讨其机制, 旨在利用猕猴桃果仁油具有的调节血脂和抗氧化应激能力为NAFLD探索新的防治途径, 也为猕猴桃的进一步开发利用提供理论指导和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康昆明小鼠50只, ♂, 周龄4-5 wk, 20 ± 1.6 g, 清洁级, 湖南省长沙市开福区东创实验动物服务部提供, 批准号: 001847。猕猴桃果仁油由吉首大学食品科学研究所提供, 为黄色油性液体, 浓度60%。胆固醇(天津光复精细化工研究所生产, 批号: 20051010), 甲基硫氧嘧啶(常州康普药业有限公司, 批号: 0707029), 胆酸钠(武汉凯通精细化工有限公司), TG、TC试剂盒(温州东瓯津玛生物科技有限公司生产, 批号: 20080022); SOD、MDA、GSH-Px、AST、ALT试剂盒(南京建成生物工程研究所生产, 批号: 20090311), BCA蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司生产, 批号: 02/2010), 猪油自制。UV-3系列紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司), 医学图像分析系统[BX51奥林巴斯(Olympus)销售服务有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 高脂饲料的配制: 高脂饲料由猪油(15%自制)、胆固醇(2.8%)、甲基硫氧嘧啶(0.2%)、胆酸钠(0.7%)、普通饲料(81.3%)组成, 将以上各成分人工充分混匀搅拌, 压成圆条状, 经紫外光辐照消毒、烘干, 包装备用。

1.2.2 分组及造模: 50只小鼠给予普通饲料喂养5 d后, 随机分为5组, 即对照组、模型组和果仁油低、中、高剂量组, 每组各10只。对照组继续普通饲料喂养, 模型组和果仁油低、中、高剂量组均给予高脂饲料喂养。另外, 果仁油低、中、高剂量组小鼠分别给予猕猴桃果仁油90, 180, 270 mg/(kg·d)灌胃, 对照组及模型组均给予等量生理盐水灌胃, 均饮自来水, 实验期间小鼠自由进食和饮水。6 wk后, 隔夜禁食, 不禁水, 眼眶取血, 颈椎脱臼处死, 取相同部位肝脏0.4 g加生理盐水制成10%匀浆液备用; 剖取相同部位肝脏, 分别浸泡于100 g/L甲醛溶液中固定, 石蜡包埋

表 1 各组小鼠体质量、肝指数的变化 (mean ± SD)

分组	n	体质量(g)		肝湿质量(g)	肝指数(%)
		第1天	第6周		
对照组	10	20.2 ± 1.2	35.8 ± 4.65	1.59 ± 0.06	4.2 ± 0.24
模型组	8	20.5 ± 1.8	30.2 ± 3.14 ^a	1.88 ± 0.05 ^a	5.9 ± 0.19 ^a
果仁油低剂量组	8	20.9 ± 1.3	31.2 ± 4.17	1.82 ± 0.07	5.8 ± 0.26
果仁油中剂量组	9	21.1 ± 1.5	34.5 ± 5.24 ^c	1.69 ± 0.05 ^c	4.9 ± 0.29 ^c
果仁油高剂量组	9	20.7 ± 1.4	33.7 ± 5.36 ^c	1.65 ± 0.04 ^c	4.8 ± 0.26 ^c

^a*P*<0.05 vs 对照组; ^c*P*<0.05 vs 模型组.

表 2 猕猴桃果仁油对小鼠血清TG, TC, ALT, AST的影响 (mean ± SD)

分组	n	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
对照组	10	1.43 ± 0.65	2.40 ± 0.40	29.40 ± 8.45	103.45 ± 16.73
模型组	8	1.90 ± 0.55 ^d	4.55 ± 0.23 ^d	170.34 ± 9.32 ^d	158.86 ± 18.45 ^d
果仁油低剂量组	8	1.92 ± 0.63	4.35 ± 0.31	143.56 ± 19.54	125.86 ± 17.75
果仁油中剂量组	9	1.62 ± 0.68 ^b	3.05 ± 0.32 ^b	76.91 ± 16.32 ^b	128.26 ± 20.15 ^b
果仁油高剂量组	9	1.56 ± 0.57 ^b	2.55 ± 0.43 ^b	64.54 ± 11.32 ^b	112.74 ± 21.37 ^b

^b*P*<0.01 vs 模型组; ^d*P*<0.01 vs 对照组.

切片, 常规HE染色, 光镜下观察肝脏病理变化.

1.2.3 小鼠体质量和肝指数的测定: 实验开始前, 称小鼠体质量, 处死前再称小鼠体质量. 剖取肝脏后, 称量肝湿质量, 计算肝指数(肝指数 = 肝湿质量/体质量 × 100%).

1.2.4 血清及肝脏生化指标检测: 检测血清TG, TC, ALT, AST; 将制备的10%肝组织匀浆液, 3500 r/min 4℃离心10 min, 取上清液再离心10 min, 检测TC, TG, SOD, MDA, GSH-Px. 所有操作均严格按照试剂盒说明书进行.

1.2.5 肝脏病理组织检测: 常规HE染色, 光学显微镜下观察肝组织的脂肪变程度, 每张切片随机拍摄2个视野的低倍镜(10×10)和高倍镜(10×400)图像, 观察肝细胞变性情况; 根据非酒精性脂肪性肝病诊疗指南^[1]的肝细胞脂肪变性程度F0-F4分级标准判断脂肪变性程度.

统计学处理 所有资料采用SPSS11.5软件进行统计分析, 计量资料采用mean ± SD表达, 2组间采用两独立样本的*t*检验; 等级资料采用秩和检验. *P*<0.05差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 猕猴桃果仁油对小鼠一般情况、体质量及肝指数的影响 对照组小鼠状态保持良好, 模型组基础状态变差, 食欲减低, 体质量下降, 果仁

油各剂量组小鼠体质量也有所下降, 但与模型组比较, 差异有显著性意义(*P*<0.05). 模型组小鼠肝指数显著升高, 果仁油中、高剂量组小鼠则较模型组显著降低(*P*<0.05, 表1). 实验过程中, 模型组小鼠在第3周死亡2只, 果仁油中剂量组小鼠在给药第1周死亡1只, 低剂量组小鼠在第1周和第3周分别意外死亡1只, 高剂量组小鼠在第5周死亡1只.

2.2 猕猴桃果仁油对小鼠血清TG, TC, ALT, AST的影响 模型组小鼠血清TG, TC, ALT, AST显著高于对照组(均*P*<0.01), 果仁油中、高剂量组小鼠血清TG, TC, ALT, AST显著低于模型组(均*P*<0.01, 表2).

2.3 猕猴桃果仁油对小鼠肝组织TG, TC, SOD, MDA, GSH-Px的影响 模型组小鼠肝组织中TG, TC的含量显著高于对照组(均*P*<0.05), 果仁油中、高剂量组小鼠肝组织中TG, TC的含量显著低于模型组(均*P*<0.05); 模型组小鼠肝组织中SOD, GSH-Px活性显著低于对照组(均*P*<0.01), MDA活性则显著高于对照组(均*P*<0.01); 果仁油中、高剂量组小鼠肝组织中SOD, GSH-Px活性显著高于模型组(均*P*<0.05), MDA活性则显著低于模型组(均*P*<0.05, 表3).

2.4 猕猴桃果仁油对小鼠肝组织病理变化的影响 对照组小鼠肝脏组织结构正常, 肝小叶轮廓

■ 相关报道

谭小进 *et al* 报道猕猴桃果王素有较强的抗氧化作用, 可提高心肌内抗氧化酶的表达与活性, 增加抗氧化酶清除氧自由基和抑制氧化应激等作用, 能有效减轻阿霉素引起的心肌自由基损伤.

■创新盘点

猕猴桃果仁油富含 α -亚麻酸、亚油酸等多种营养成分,主要用于调节血脂和延缓衰老。本实验通过研究发现其能有效减少肝脏的脂质沉积和降低肝脏脂质过氧化水平,对由高脂饲料诱导的小鼠NAFLD有明显的保护作用。

表 3 猕猴桃果仁油对小鼠肝组织TG, TC, SOD, MDA, GSH-Px的影响 (mean \pm SD)

分组	n	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	SOD(U/mg)	MDA(U/mg)	GSH-Px(U/mg)
对照组	10	1.38 \pm 0.45	1.66 \pm 0.28	86.96 \pm 8.87	4.78 \pm 0.69	61.35 \pm 12.52
模型组	8	1.88 \pm 0.35 ^a	2.15 \pm 0.23 ^a	68.87 \pm 7.89 ^b	5.88 \pm 1.07 ^b	45.41 \pm 9.87 ^b
果仁油低剂量组	8	1.81 \pm 0.72	2.03 \pm 0.71	62.76 \pm 11.16	5.43 \pm 1.11	47.33 \pm 12.21
果仁油中剂量组	9	1.52 \pm 0.78 ^c	1.85 \pm 0.62 ^c	75.53 \pm 9.42 ^c	5.16 \pm 0.97 ^c	55.61 \pm 11.87 ^c
果仁油高剂量组	9	1.46 \pm 0.57 ^c	1.72 \pm 0.59 ^c	80.97 \pm 10.29 ^c	5.01 \pm 1.14 ^c	59.89 \pm 13.24 ^c

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 对照组; ^c P <0.05 vs 模型组。

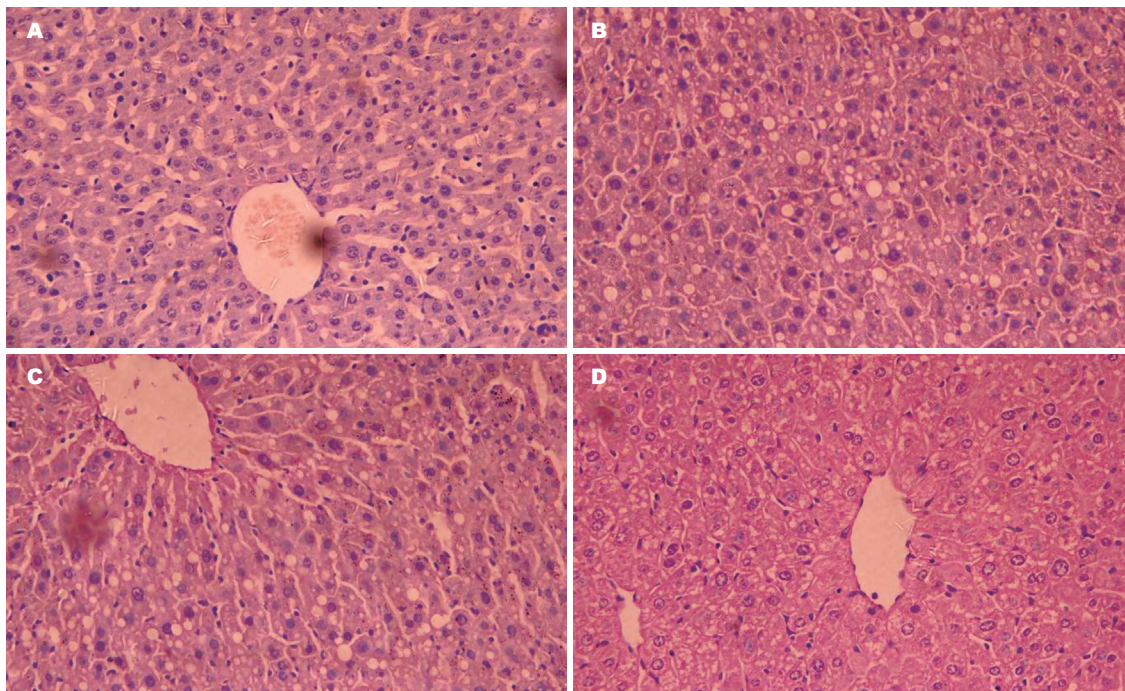
图 1 小鼠肝组织病理(HE \times 400). A: 对照组; B: 模型组; C: 果仁油中剂量组; D: 果仁油高剂量组。

表 4 各组小鼠肝组织脂肪变性程度

分组	n	脂肪变性程度分级				
		F0	F1	F2	F3	F4
对照组	10	9	1	0	0	0
模型组	8	0	1	2	4	1
果仁油低剂量组	8	0	1	3	3	1
果仁油中剂量组	9	0	2	4	3	0
果仁油高剂量组	9	0	3	5	1	0

注: F0代表肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数比值<5%; F1: 5%–30%; F2: 31%–50%; F3: 51%–75%; F4: >75%。

清晰,肝索排列规则且以中心静脉放射排列,汇管区未见炎细胞浸润,脂肪变性程度显著低于模型组小鼠(P <0.01);模型组小鼠肝索排列紊乱,出现不同程度的弥漫性肝细胞脂肪变性,大量炎性细胞浸润,提示已经进入NASH阶段;果仁

油中、高剂量组小鼠肝板排列完好,肝组织内可见散在大小不等的圆形脂肪空泡,汇管区血管扩张充血,无明显炎细胞浸润及坏死,肝组织脂肪变性程度较模型组明显减轻(P <0.05, 0.01, 图1)。各组小鼠肝组织脂肪变性程度见表4。

3 讨论

NAFLD除可导致终末期肝病外,还会引起患者心血管疾病发生率和病死率增加,对健康危害严重,其相关病因很多,如药物、肥胖、胰岛素抵抗和高脂血症等^[6-7],发病具体机制尚未完全明确,一般认为与脂肪代谢异常、遗传因素、氧化应激及脂质过氧化损伤等有关^[8]。随着“二次打击”学说的提出,氧化应激与脂质过氧化在NAFLD发病机制中的作用日益受到重视^[9]。氧化应激可增加脂质过氧化产物的释放,介导NAFLD的发生发展^[10];由氧化应激产生的氧自

由基(reactive oxygen species, ROS)可启动细胞内脂质过氧化反应,加重TG在肝脏内的积聚;脂质过氧化反应可诱导中性粒细胞的趋化作用,导致脂质产生炎性浸润,使肝脏发生炎症、坏死,还可激活Kupffer细胞和星状细胞,促进肝纤维化^[11-13]。MDA是强毒力的脂质过氧化产物,有研究^[14-15]证实NAFLD患者MDA水平增高,而且与肝组织炎症、坏死及纤维化呈显著正相关。因此,氧化应激、脂质过氧化在NAFLD发病机制中的作用不容忽视。

为建立与人类NAFLD发病相近的动物模型,本研究模拟人类摄食方式,通过对常规高脂饲料配方进行改良,在饲料中加入胆酸钠和甲基硫氧嘧啶两种物质,成功建立了小鼠NAFLD动物模型。高胆固醇和高脂饮食可增加胆固醇的吸收,在饲料中加入少量胆酸盐后可增加外源性胆固醇的吸收,加入少量甲状腺功能抑制药甲基硫氧嘧啶可抑制胆固醇在肝内转变为胆汁酸,加速胆固醇在肝内的堆积,加快脂肪肝形成过程^[16-17]。

本研究显示,果仁油中、高剂量组小鼠血清和肝组织中TG、TC含量均显著低于模型组,低剂量组无显著性变化,提示猕猴桃果仁油可调节脂肪代谢,减少脂质在肝内沉积,阻止由高脂饲料诱导的小鼠NAFLD形成。同时,肝组织病理变化结果显示果仁油中、高剂量组小鼠肝组织脂肪变性程度较模型组明显减轻,表明猕猴桃果仁油对高脂饲料诱导的小鼠NAFLD具有显著的保护作用。此外,果仁油中、高剂量组小鼠血清ALT、AST活性显著降低,也表现出了猕猴桃果仁油较强的抗肝损伤效应。尽管果仁油3个剂量组在减轻小鼠肝脏脂质沉积上的量效梯度关系不是很明显,但从高剂量组小鼠血清ALT活性下降幅度强于中、低剂量组看,猕猴桃果仁油抗肝损伤方面还是体现了一定的量效关系。

猕猴桃果仁油含有多种营养成分,其不饱和脂肪酸的含量高达85.2%,其中 α -亚麻酸占不饱和脂肪酸的64%以上,并含有一定量的维生素E和微量元素硒等物质^[3,5]。 α -亚麻酸是体内各种组织生物膜的结构材料,也是人体合成前列腺素(prostaglandins, PGs)等重要生理活性物质的前体^[18],研究发现其具有显著的调节血脂和降低血压作用^[19-21],可以减少TG在大鼠肝脏中的沉积和降低血清及肝脏的脂质水平^[22-23]。GSH-Px的活性中心是硒半胱氨酸,硒是GSH-Px的必需部分,而猕猴桃果仁油则可以作为GSH-Px的

合成原料而促进GSH-Px合成,增加其活力^[5];维生素E具有抗脂质过氧化作用,可以抑制单核细胞及Kupffer细胞表达炎性因子,抑制肝胶原蛋白 $\alpha 1$ 基因的表达,有利于减轻氧化应激和肝损伤^[24-25]。本研究发现模型组小鼠肝组织中SOD、GSH-Px活性明显低于对照组,MDA活性显著高于对照组,表明肝组织中产生了大量的ROS,消耗了SOD、GSH-Px等抗氧化酶,导致其在组织中含量减少,活力减低,这又会导致ROS在肝组织中大量蓄积,形成恶性循环,从而导致肝脏损伤。本研究发现,与模型组比较,果仁油低剂量组小鼠肝组织中SOD、GSH-Px和MDA活性无显著变化,说明此剂量猕猴桃果仁油保护作用不明显,而果仁油中、高剂量组小鼠肝组织中以上指标均有显著性差异,因此我们推测通过调节SOD等抗氧化酶的活性是猕猴桃果仁油发挥保护作用的机制之一。

总之,猕猴桃果仁油具有显著的调脂作用和很强的抗过氧化作用及抑制氧化应激等能力,可减轻肝脏脂质代谢障碍引起的肝损伤,从而保护肝脏,其保护作用呈剂量依赖性。目前已知ROS参与了多种肝损伤的病理过程,因此,我们推论猕猴桃果仁油不但能减轻NAFLD导致的肝损伤,对其他原因导致的肝损伤可能也有一定的保护作用,有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
- 2 Portincasa P, Grattagliano I, Palmieri VO, Palasciano G. Current pharmacological treatment of nonalcoholic fatty liver. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2889-2900
- 3 欧阳辉, 张永康. 猕猴桃果仁油主要成分及其药理生理作用. 吉首大学学报(自然科学版) 2004; 25: 80-82
- 4 朱黎明, 张永康, 孟祥胜. 猕猴桃果仁素降血脂作用的临床研究. 中医药学报 2002; 30: 12-13
- 5 谭小进, 陶辉宇, 李丽, 陈杰彬, 李双杰. 果仁素对大鼠阿霉素心肌损伤的保护作用及抗氧化机制. 中国动脉硬化杂志 2006; 14: 25-28
- 6 Misra VL, Khashab M, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Curr Gastroenterol Rep* 2009; 11: 50-55
- 7 Assy N, Nassar F, Nasser G, Grosovski M. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1809-1815
- 8 卢明芳, 王雯. 软脉灵对大鼠非酒精性脂肪肝的预防作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1213-1218
- 9 杨丽丽, 柳涛, 王淼, 邢练军, 季光, 郑培永. 氧化应激与非酒精性脂肪性肝病研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 896-900
- 10 Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S20-S27
- 11 Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis

■应用要点

本研究提示,猕猴桃果仁油对高脂饲料诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病有明显的保护作用。对于临床研发安全有效的防治NAFLD的药物有着重要的参考意义,同时也将拓展猕猴桃的综合开发利用价值。

■同行评价

本文对猕猴桃果仁油对小鼠NAFLD的作用进行了研究,结果有一定的参考意义。

- and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19
- 12 Haufröid V, Ligocka D, Buysschaert M, Horsmans Y, Lison D. Cytochrome P4502E1 (CYP2E1) expression in peripheral blood lymphocytes: evaluation in hepatitis C and diabetes. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 29-33
- 13 Begrich K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 2006; 6: 1-28
- 14 Niemelä O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pasanen M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000; 33: 893-901
- 15 Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, Ozcan A, Uygun A, Cakir E, Sanisoglu SY, Erdil A, Ates Y, Aslan M, Musabak U, Erbil MK, Karaeren N, Dagalp K. Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 850-855
- 16 张智, 闪增郁, 向丽华, 陈燕萍, 李爽姿, 张雪亮. 大鼠实验性高脂血症两种造模方法的比较. *中国中医基础医学杂志* 2004; 10: 33-34
- 17 秦红波, 曹浩强, 华志元, 李相成, 倪全法. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪肝模型的建立. *南京医科大学学报* (自然科学版) 2008; 28: 973-976
- 18 Simopoulos AP. n-3 fatty acids and human health: defining strategies for public policy. *Lipids* 2001; 36 Suppl: S83-S89
- 19 Nordøy A, Marchioli R, Arnesen H, Videbaek J. n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Lipids* 2001; 36 Suppl: S127-S129
- 20 Buang Y, Cha JY, Nagao K, Wang YM, Inoue N, Yanagita T. Alleviation of fatty liver by alpha-linolenic acid. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2004; 50: 272-276
- 21 陈榕, 郭清, 朱文静, 谢青, 王晖, 蔡伟. ω-3多不饱和脂肪酸胶丸对非酒精性脂肪肝患者的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2002-2006
- 22 Vijaimohan K, Jainu M, Sabitha KE, Subramaniyam S, Anandhan C, Shyamala Devi CS. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. *Life Sci* 2006; 79: 448-454
- 23 王晔, 程庆民, 曹伟新, 胡雪华, 蒋咏梅. 苜蓿和紫苏提取液对降低血脂保护肝及主动脉壁的作用. *肠外与肠内营养* 2005; 12: 219-222
- 24 Younossi ZM. Review article: current management of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 2-12
- 25 Bayard M, Holt J, Boroughs E. Nonalcoholic fatty liver disease. *Am Fam Physician* 2006; 73: 1961-1968

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》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 2009-12-08)

针对HBV S基因mRNA反义锁核酸设计及其在2.2.15细胞内的抗病毒作用

邓益斌, 王燕菲

邓益斌, 右江民族医学院附属医院医学检验中心 广西壮族自治区百色市 533000

王燕菲, 广州医学院生物化学与分子生物学教研室 广东省广州市 510182

邓益斌, 2009年广东省广州医学院硕士, 主要从事基因诊断与基因治疗的研究。

广州市科技攻关计划基金资助项目, No. 2002Z3-E4081

作者贡献分布: 该实验由邓益斌设计; 实验过程由邓益斌操作完成; 实验研究所需经费由王燕菲提供; 数据分析由邓益斌完成; 论文写作由邓益斌完成, 王燕菲提出修改意见。

通讯作者: 王燕菲, 教授, 510182, 广东省广州市东风西路195号, 广州医学院生物化学与分子生物学教研室。

yanfeiw@hotmail.com

电话: 020-81340212

收稿日期: 2009-08-18 修回日期: 2009-10-20

接受日期: 2009-10-26 在线出版日期: 2009-12-08

Antiviral effects of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting HBV S gene mRNA in HepG2 2.2.15 cells

Yi-Bin Deng, Yan-Fei Wang

Yi-Bin Deng, Center for Medical Laboratory Science, the Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan-Fei Wang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Foundation of Guangzhou Municipality, No. 2002Z3-E4081

Correspondence to: Professor Yan-Fei Wang, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangzhou Medical College, 195 Dongfeng Western Road, Guangzhou 510182, Guangdong Province, China. yanfeiw@hotmail.com

Received: 2009-08-18 Revised: 2009-10-20

Accepted: 2009-10-26 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides targeting hepatitis B virus (HBV) S gene in HepG2 2.2.15 cells, and screen effective LNA antisense oligonucleotides.

METHODS: Four LNA antisense oligonucleotides of different lengths that are complementary to the translation initiation region of

HBV S gene were designed, synthesized, and introduced into HepG2 2.2.15 cells by cationic liposome-mediated transfection. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and HBV DNA levels in cell supernatant were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and fluorescent quantitative-polymerase chain reaction (FQ-PCR) 24, 48 and 72 hours after transfection. The cell toxicity of LNA antisense oligonucleotides was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay.

RESULTS: All four LNA antisense oligonucleotides (10, 15, 20 and 25 base, respectively) could inhibit the expression of HBsAg and the replication of HBV DNA. Seventy-two hours after transfection, the reduced rates of HBsAg and HBV DNA levels were 46.58%, 54.38%, 72.43% and 69.92% as well as 27.09%, 28.77%, 34.71% and 32.68%, respectively. No obvious cell toxicity of LNA antisense oligonucleotides was noted.

CONCLUSION: LNA antisense oligonucleotides targeting HBV S gene show strong inhibitory effects on HBV replication *in vitro*. The optimal length of LNA antisense oligonucleotides ranges from 15 to 25 base. LNA antisense oligonucleotides targeting HBV S gene have a therapeutic potential in patients infected with HBV.

Key Words: Hepatitis B virus; Locked nucleic acid; HepG2 2.2.15 cell; Gene therapy; Cationic liposomes

Deng YB, Wang YF. Antiviral effects of locked nucleic acid antisense oligonucleotides targeting HBV S gene mRNA in HepG2 2.2.15 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3497-3501

摘要

目的: 探讨针对乙型肝炎病毒(HBV)S基因翻译起始区反义锁核酸(LNA)片段在HepG2.2.15细胞内抗病毒效果及有效LNA序列筛选。

方法: 设计合成互补于HBV S基因mRNA翻译起始区同一位点的4条不同序列长度LNA片

■背景资料

近年来, 锁核酸(LNA)的出现给反义核酸技术带来了新的希望与机遇。LNA是新发现的一种在2'-O与4'-C发生缩水作用而形成带环状结构的核苷酸衍生物, 具有稳定性好、分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力强、脂溶性好和低细胞毒性等特点, 因而具有广阔的研究与应用前景。

■同行评议者

李增山, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室

■ 研发前沿

在反义核酸技术基础上发展起来的反基因技术,即三螺旋构象寡核苷酸技术(TFO)是目前研究的热点。日前亟待解决的问题是寻找一种满意的肝靶向性核酸药物载体以及特异性抗HBV药物。

段及无关对照序列,以阳离子脂质体介导,作用于HepG2.2.15细胞,采用ELISA法和FQ-PCR法分别监测24、48和72 h细胞培养上清液中HBsAg和HBV DNA的含量;MTT法检测LNA对细胞代谢的影响。

结果: 4条不同序列长度(10、15、20及25个碱基)的反义LNA对HBsAg的表达和HBV DNA的复制均有显著性抑制作用,72 h后的抑制率分别为46.58%、54.38%、72.43%、69.92%及27.09%、28.77%、34.71%、32.68%,且抑制率随时间呈增高趋势。LNA对细胞代谢无明显影响。

结论: 针对HBV S基因mRNA翻译起始区的反义LNA短序列体外能显著抑制HBV基因的表达,且抑制作用最强的序列长度应在15-25个碱基之间。

关键词: 乙型肝炎病毒; 锁核酸; 2.2.15细胞; 基因治疗; 脂质体

邓益斌, 王燕菲. 针对HBV S基因mRNA反义锁核酸设计及其在2.2.15细胞内的抗病毒作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3497-3501

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3497.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的一种死亡率较高的慢性传染性疾病,易发展为肝硬化和肝细胞癌,已成为一个全球性健康问题。全球约有3.5亿HBV携带者,而我国约有1.3亿,占全球患者的37.14%^[1-5]。目前临床治疗药物主要是干扰素^[6-9]和核苷类似物(如拉米夫定)^[10-12],干扰素的远期疗效不理想,而长期使用拉米夫定则易引起基因变异,导致耐药。因此,探索廉价、高效、不良反应小、稳定且专一性强的抗HBV新型药物具有重要的意义。反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotide, ASODN)是近几年来研究较广泛的一种基因疗法,其抗HBV机制是通过导入外源寡核苷酸片段与细胞内特定的mRNA结合形成杂交分子,从而达到阻断特定基因表达的目的^[13-15]。但是,由于反义寡核苷酸稳定性差、亲和力不强、抗核酸酶降解能力弱等因素,故一直未取得满意效果。锁核酸(locked nucleic acid, LNA),是新发现的一种带环状结构的核苷酸衍生物,因其核糖的2'-O和4'-C通过缩水作用形成氧亚甲基桥,形似锁状,故得名。LNA与

传统寡核苷酸相比,具有更高的热稳定性、更好的分子杂交能力和更强的抗核酸酶降解能力^[16-24],因而具有广阔的应用前景。S基因是HBV的关键基因,其编码产物是乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)的主要组成部分。封闭S基因的表达有可能影响病毒颗粒的装配和成熟,达到抑制HBV复制的作用。我们前期研究结果表明,反义LNA抗HBV基因复制与表达的能力比传统全硫代修饰的ASODN强^[25-27]。为了进一步筛选出针对S基因靶位的最佳LNA片段,我们在前期研究的基础上,针对HBV S基因mRNA翻译起始区同一靶位设计合成4条不同序列长度的反义LNA片段,观察其在HepG2.2.15细胞内的抗病毒效果,旨在筛选出针对S基因靶位的最佳LNA序列。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2.2.15细胞由中国人民解放军广州军区空军医院刘光泽博士惠赠,该细胞株为HBV DNA全基因转染肝癌细胞系HepG2,能稳定分泌HBsAg,本室常规培养于含G418(380 ITI1)、100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中,37℃、50 mL/L CO₂条件下5-6 d传代1次;DMEM培养基、G418为Gibco产品;胎牛血清购自杭州四季青公司;LipofectamineTM2000购自Invitrogen公司;HBsAg检测试剂盒为深圳丽珠生物技术有限公司产品;HBV DNA定量检测试剂盒为深圳匹基生物有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 反义LNA片段合成与修饰: 根据国内外报道选择抑制作用较强、互补于HBV S基因翻译起始区同一位点为研究对象,分别合成以下几段锁核酸序列: (1)序列I: 互补HBV S基因区151-160 nt处,共10个碱基(5'-CcATgTTCaG-3',其中7个大写字母代表LNA,3个小写字母代表DNA); (2)序列II: 互补于HBV S基因区151-165 nt处,共15个碱基(5'-GtTcTccAtGtTcaG-3',其中7个大写字母代表LNA,8个小写字母代表DNA); (3)序列III: 互补于HBV S基因区151-170 nt处,共20个碱基(5'-GtGaTgTtCtccaTgtcaG-3',其中7个大写字母代表LNA,13个小写字母代表DNA); (4)序列IV: 互补于HBV S基因区151-175 nt处,共25个碱基(5'-CtgAtGtgaTgTtCtccaTgtcag-3',其中7个大写字母代表LNA,18个小写字母代表DNA); (5)与HBV S基因无关序列,共20个碱基

■创新盘点

锁核酸(LNA)是一种新兴环状核苷酸衍生物,具有分子杂交能力强、抗核酸酶降解能力等特性,本研究在前期工作基础上,进一步探讨了反义LNA片段的设计与筛选,为下一步的实验提供理论基础。

表 1 各LNA序列对HepG22.2.15细胞HBsAg表达的影响 ($n = 6$, P/N, mean \pm SD)

分组	0 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	1.238 \pm 0.025	1.241 \pm 0.032	1.268 \pm 0.026	1.270 \pm 0.049
无关序列	1.248 \pm 0.037	1.252 \pm 0.027	1.265 \pm 0.019	1.271 \pm 0.023
序列 I	1.245 \pm 0.041 ^d	0.928 \pm 0.111 ^d	0.769 \pm 0.155 ^d	0.665 \pm 0.133 ^d
序列 II	1.245 \pm 0.028 ^f	0.865 \pm 0.031 ^f	0.675 \pm 0.073 ^f	0.568 \pm 0.602 ^f
序列 III	1.233 \pm 0.033 ^h	0.762 \pm 0.048 ^h	0.496 \pm 0.045 ^h	0.340 \pm 0.039 ^h
序列 IV	1.237 \pm 0.032 ⁱ	0.792 \pm 0.744 ⁱ	0.545 \pm 0.054 ⁱ	0.372 \pm 0.031 ⁱ

^d $P < 0.01$ vs 空白对照组与无关序列组; ^f $P < 0.01$ vs 序列 I; ^h $P < 0.01$ vs 序列 II; ⁱ $P < 0.01$ vs 序列 III。

表 2 各LNA序列对HepG22.2.15细胞HBV DNA复制的影响 ($n = 6$, $\times 10^6$ copies/mL, mean \pm SD)

分组	0 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	6.121 \pm 0.425	6.137 \pm 0.481	6.110 \pm 0.527	6.108 \pm 0.529
无关序列	6.108 \pm 0.476	6.023 \pm 0.584	6.183 \pm 0.273	6.047 \pm 0.706
序列 I	6.182 \pm 0.602 ^d	5.708 \pm 0.576 ^d	5.128 \pm 0.527 ^d	4.507 \pm 0.358 ^d
序列 II	6.201 \pm 0.618 ^f	5.615 \pm 0.452 ^f	4.793 \pm 0.409 ^f	4.417 \pm 0.388 ^f
序列 III	6.123 \pm 0.405 ^h	5.373 \pm 0.423 ^h	4.373 \pm 0.369 ^h	3.987 \pm 0.249 ^h
序列 IV	6.116 \pm 0.501 ⁱ	5.475 \pm 0.293 ⁱ	4.583 \pm 0.324 ⁱ	4.117 \pm 0.435 ⁱ

^d $P < 0.01$ vs 空白对照组与无关序列组; ^f $P < 0.01$ vs 序列 I; ^h $P < 0.01$ vs 序列 II; ⁱ $P < 0.01$ vs 序列 III。

(5'-TtCaAgAtTgtgaGtgtgaC-3', 其中7个大写字母代表LNA, 13个小写字母代表DNA), 以上片段均由美国Genelink公司合成修饰并纯化。

1.2.2 脂质体包裹反义LNA的制备: 脂质体与反义LNA按1:10比例充分混匀(1 μ g反义LNA+10 μ L脂质体), 室温下静置1 h后, 此即为稳定的脂质体-LNA混合物。

1.2.3 HepG22.2.15细胞培养与转染: 将HepG22.2.15细胞按 1×10^5 细胞/mL接种于96孔培养板, 每孔100 μ L, 设定6个组(即序列 I 组、序列 II 组、序列 III 组、序列 IV 组、无关序列组和不加药的空白对照组), 每组各设6个复孔, 待细胞贴壁后吸取培养上清液(-20 $^{\circ}$ C保存), 分别在各组每孔中一次性加入含LNA量为10 μ mol/L的LNA-Lipo-DMEM混合液1 mL, 分别于24、48和72 h收集各孔培养上清液保存于-20 $^{\circ}$ C待测。

1.2.4 培养上清液HBsAg含量测定: 采用ELISA法, 每个样品重复3次, 取均值, 严格按试剂盒说明书操作。

1.2.5 培养上清液HBV DNA含量测定: 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法检测。取培养上清液50 μ L, 加等量体积DNA提取液, 充分混匀, 100 $^{\circ}$ C恒温处理10 min, 1200 r/min离心5 min, 取2 μ L上清于PCR反应管中并加入反应

液, 总体积共25 μ L, 各反应管放入荧光定量PCR仪, 扩增条件: 37 $^{\circ}$ C保温2 min, 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 共35个循环。由计算机软件自动分析所收集的荧光信号并计算出定量结果, 采用计算对数平均值的方法计算HBV DNA平均拷贝数。

1.2.6 LNA对细胞的毒性检测: 采用MTT比色法检测LNA对细胞代谢活性的影响。

统计学处理 所有数用mean \pm SD表示, 应用SPSS12.0统计软件处理, 各组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。抑制率(%) = (用药前P/N-用药后P/N)/(用药前P/N-2.1) $\times 100\%$ 。其中: P/N表示阳性孔A值/阴性孔A值。

2 结果

2.1 LNA对HepG22.2.15细胞HBsAg表达的影响 LNA加入24 h后, HBsAg的分泌量即开始下降, 且下降率随时间呈增高趋势, 72 h后下降率最高可达72.43%。各组间比较均有显著性差异(均 $P < 0.01$), 与对照组比较, HBsAg的分泌量均明显下降(均 $P < 0.01$), 且在序列 II-IV组间(即15-25个碱基)下降最为明显(表1, 图1)。

2.2 LNA对HepG22.2.15细胞HBV DNA复制的影

■同行评价

本文将LNA应用于HBV的研究,并发现具有抑制mRNA翻译和DNA复制的功能,具有一定的实际应用价值和参考性。

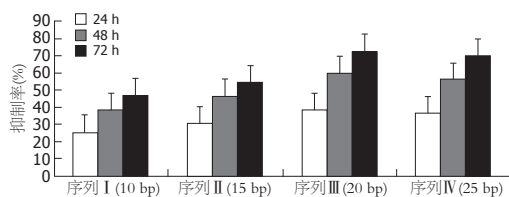


图1 不同时间内各序列LNA对HBsAg表达的抑制率(%)。

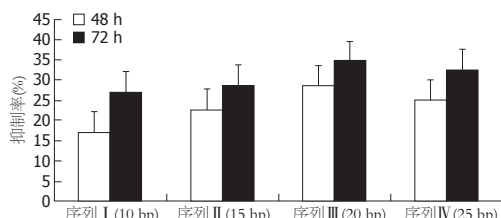


图2 不同时间内各序列LNA对HBV DNA复制的抑制率(%)。

响 LNA加入48 h后,对HBV DNA的复制开始出现抑制作用,且抑制率随时间呈增高趋势,72 h后抑制率最高可达34.71%。各组间比较均有显著性差异(均 $P<0.01$),与对照组比较,HBV DNA的拷贝数均下降明显(均 $P<0.01$),且在序列II-IV组间(即15-25个碱基)下降最为明显(表2,图2)。

2.3 LNA-Lipo混合物对HepG22.15细胞活性的影响 用药3 d后,采用MTT比色法测定各实验组的A值,序列I、II、III、IV的A值分别为 1.173 ± 0.049 、 1.161 ± 0.042 、 1.156 ± 0.042 、 1.147 ± 0.046 ,与对照组(A值为 1.203 ± 0.043)比较均无差异性($P>0.05$),表明实验范围内LNA对细胞基本无毒性。

3 讨论

自20世纪90年代初,Patil *et al*^[13]首次报道利用反义核酸技术抗HBV的实验研究以来,反义核酸技术抗病毒研究已取得了很大的进展。但由于传统ASODN易被降解、杂交结合能力不强以及对机体存在不良反应等因素,其抗病毒感染的基因治疗一直未取得满意的效果。1994年,Rodriguez *et al*首次发现LNA,它是一种特殊的双环核酸衍生物,由核糖的2位氧与4位碳通过缩水作用形成氧亚甲基桥、硫亚甲基桥或胺亚甲基桥等,作为一种新型反义核酸,具有比传统ASODN更强的优势^[16-24]: (1)更高的热稳定性; (2)更强的分子杂交能力; (3)更强的抗核酸酶降解能力; (4)更好的脂溶性,可自由穿入细胞膜; (5)对细胞的毒性较低。

HBV基因组至少有7个重要的基因靶位,其中,S基因是关键基因靶位之一^[28-29]。S基因编码

产物是HBsAg的主要组成部分,不仅参与完整HBV Dane颗粒的装配,而且还组装成直径为22 nm的球形颗粒以及管型颗粒,大量存在于HBV携带者血液中,并随血液、唾液、精液、分泌物等在易感人群中传播。封闭S基因的表达有可能抑制HBsAg的分泌,从而干扰HBV Dane颗粒的装配和HBV颗粒的成熟,发挥抗HBV的作用。

研究表明,由阳离子脂质体介导的反义LNA,能有效进入肝细胞内,发挥抗HBV基因表达的作用,对HBsAg的抑制率最高可达72.43%,且随反义LNA作用时间的延长呈逐渐增高趋势。这比文献[30]报道的抑制作用时间要长,原因可能是反义LNA的亲合力及抗核酸降解能力均较传统ASODN强,这将为反义LNA用于抗HBV的基因治疗研究提供了参考价值。但其抑制率是否持续性增高,还有待于进一步的研究。我们的研究结果也表明,LNA抗HBV效果与LNA序列长度之间存在相关性,但并不随LNA序列长度无限增高,而是存在一个最适序列长度,约在15-25个碱基之间。

此外,反义LNA对HBV DNA的复制也有比较显著的抑制作用,原因可能是LNA的高亲和力、强抗核酸酶降解能力和良好的脂溶性,促使部分LNA通过核孔进入细胞核内,结合到与HBV S基因mRNA翻译起始位点相对应的基因组cccDNA的编码链上,形成三链杂交分子,从复制和转录水平发挥抑制作用,其作用机制还有待于进一步的研究。

总之,互补于S基因的反义LNA片段体外能显著抑制HBV的复制与表达,且抑制作用最强的序列长度在15-25个碱基之间,因此,LNA有望成为抗HBV基因治疗的新型分子药物,同时也为其他疾病的基因研究带来新的应用前景。

致谢: 研究过程中,得到中国人民解放军广州军区空军医院的刘光泽博士及广州医学院组织胚胎学教研室的马宁芳教授的帮助,在此深表感谢。

4 参考文献

- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *J Hepatol* 2003; 39 Suppl 1: S64-S69
- Fleming J. Current treatments for hepatitis. *J Infect Nurs* 2002; 25: 379-382
- elSaadany S, Tepper M, Mao Y, Semenciw R, Giulivi A. An epidemiologic study of hepatocellular carcinoma in Canada. *Can J Public Health* 2002; 93: 443-446
- Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of

- alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002; 36: 1206-1213
- 5 Kannangai R, Molmenti E, Arrazola L, Klein A, Choti M, Thomas DL, Torbenson M. Occult hepatitis B viral DNA in liver carcinomas from a region with a low prevalence of chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 297-301
- 6 Hino O, Kajino K, Umeda T, Arakawa Y. Understanding the hypercarcinogenic state in chronic hepatitis: a clue to the prevention of human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2002; 37: 883-887
- 7 Buti M, Esteban R. Drugs in development for hepatitis B. *Drugs* 2005; 65: 1451-1460
- 8 Wai CT, Chu CJ, Hussain M, Lok AS. HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology* 2002; 36: 1425-1430
- 9 Manns MP. Current state of interferon therapy in the treatment of chronic hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2002; 22 Suppl 1: 7-13
- 10 Liaw YF. Therapy of chronic hepatitis B: current challenges and opportunities. *J Viral Hepat* 2002; 9: 393-399
- 11 Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, de Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine, lamivudine-famciclovir or lamivudine-ganciclovir. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 1007-1011
- 12 Song JW, Zhang G, Lin JG, Tang WX, Lin JS. [Clinical study of lamivudine and interferon combinate administration to inhibit hepatitis B virus replication] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 593-596
- 13 Patil SD, Rhodes DG, Burgess DJ. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *AAPS J* 2005; 7: E61-E77
- 14 Gruegelsiepe H, Brandt O, Hartmann RK. Antisense inhibition of RNase P: mechanistic aspects and application to live bacteria. *J Biol Chem* 2006; 281: 30613-30620
- 15 Wo JE, Wu XL, Zhou LF, Yao HP, Chen LW, Dennin RH. Effective inhibition of expression of hepatitis B virus genes by DNazymes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3504-3507
- 16 Wengel J, Petersen M, Frieden M, Koch T. Chemistry of locked nucleic acids (LNA): Design, synthesis, and bio-physical properties. *Lett Pept Sci* 2003; 10: 237-253
- 17 Inohara H, Obika S, Imanishi T. 2',4'-BNA derivatives bearing an unnatural nucleobase: synthesis and application to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004; 63-64
- 18 Braasch DA, Liu Y, Corey DR. Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 5160-5167
- 19 Rapozzi V, Cogoi S, Xodo LE. Antisense locked nucleic acids efficiently suppress BCR/ABL and induce cell growth decline and apoptosis in leukemic cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1683-1692
- 20 Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, Monia BP, Bennett CF. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 687-700
- 21 Elmén J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Ørum H, Koch T, Wahlestedt C. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 439-447
- 22 Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M, Kulozik AE, Hentze MW, Muckenthaler MU. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006; 12: 913-920
- 23 Vester B, Hansen LH, Lundberg LB, Babu BR, Sørensen MD, Wengel J, Douthwaite S. Locked nucleoside analogues expand the potential of DNazymes to cleave structured RNA targets. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 19
- 24 Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001; 8: 1-7
- 25 唐盈, 王燕菲. 针对HBV S基因的反义锁核酸抗乙肝病毒表达的初探. *江西医药* 2006; 41: 205-208
- 26 邓益斌, 王燕菲. 阳离子脂质体介导双靶区反义锁核酸抗病毒疗效研究. *国际流行病学传染病学杂志* 2008; 35: 149-153
- 27 邓益斌, 农乐根, 王燕菲. HBVS基因的反义锁核酸对乙型肝炎转基因小鼠HBV复制和表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2338-2345
- 28 Funk A, Mhamdi M, Will H, Sirma H. Avian hepatitis B viruses: molecular and cellular biology, phylogenesis, and host tropism. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 91-103
- 29 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein acts as a tumor promoter in development of diethylnitrosamine-induced preneoplastic lesions. *J Virol* 2001; 75: 3851-3858
- 30 刘素侠, 孙汶生, 郭春, 张向红, 张艳, 姜昱竹. 互补于hTERT关键区段的反义RNA抑制肝癌细胞. *基础医学与临床* 2006; 26: 381-385

编辑 李军亮 电编 何基才

胰岛素样生长因子1对大鼠结肠平滑肌细胞中干细胞因子表达的影响

宁月季, 张蔚, 成家飞, 李学良, 王美峰, 林琳

■背景资料

胃肠动力障碍性疾病的发病机制目前仍不清楚, 临床缺乏有效的治疗手段。随着对ICC间质细胞功能的研究日益增多, 发现IGF-1是ICC间质细胞的保护因子。IGF-1有望成为治疗该病新的突破口。

宁月季, 张蔚, 成家飞, 李学良, 王美峰, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

宁月季, 硕士在读, 主要从事胃肠动力性疾病的研究。

国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目, No. 2006CB503908

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2008466

作者贡献分布: 该课题由宁月季与林琳共同设计; 研究过程由宁月季与张蔚操作完成; 研究所用试剂及分析工具由宁月季提供; 数据分析由宁月季与成家飞合作完成; 论文撰写由宁月季完成; 李学良与王美峰协助课题设计并修改论文。

通讯作者: 林琳, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科。lin9100@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-10-26 修回日期: 2009-11-22

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-08

Insulin-like growth factor-1 upregulates the expression of stem cell factor in rat colonic smooth muscle cells

Yue-Ji Ning, Wei Zhang, Jia-Fei Cheng, Xue-Liang Li, Mei-Feng Wang, Lin Lin

Yue-Ji Ning, Wei Zhang, Jia-Fei Cheng, Xue-Liang Li, Mei-Feng Wang, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the National Program on Key Basic Research Project (973 Program), No. 2006CB503908; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2008466

Correspondence to: Professor Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-26 Revised: 2009-11-22

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on the expression of stem cell factor (SCF) in rat colonic smooth muscle cells (SMCs).

METHODS: Rat colonic SMCs were separated, cultured, and identified by immunofluorescence staining of α -actin. Cultured colonic SMCs were divided into IGF-1 treatment group and IGF-1 receptor antibody intervention group. Cells in the IGF-1 treatment group incubated with different concentrations (0, 5, 10, 50, 100 and 150 μ g/L) of IGF-1 for different durations (0, 8, 16,

24 and 48 hours), while those in the IGF-1 receptor antibody intervention group were treated with IGF-1 and different concentrations of IGF-1 receptor monoclonal antibody (0, 50, 100 and 150 μ g/L). The expression of SCF in colonic SMCs was examined by Western blot and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

RESULTS: Although IGF-1 at low concentrations (5 and 10 μ g/L) had no significant impact on the expression of SCF mRNA and protein in SMCs (all $P > 0.05$), IGF-1 at moderate or high concentrations (50, 100 and 150 μ g/L) significantly upregulated the expression of SCF mRNA and protein (all $P < 0.05$). The optimum concentration of IGF-1 to upregulate SCF expression *in vitro* was 100 μ g/L (0.820 ± 0.061 vs 0.167 ± 0.015 and 1.269 ± 0.219 vs 0.560 ± 0.023 , respectively; both $P < 0.05$), and the peak expression of SCF occurred 16 hours after incubation with IGF-1 (0.420 ± 0.034 vs 0.209 ± 0.001 and 1.407 ± 0.133 vs 0.477 ± 0.041 , respectively; both $P < 0.05$). IGF-1 receptor monoclonal antibody could inhibit the expression of SCF in SMCs in a dose-dependent manner (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: IGF-1 can upregulate the expression of SCF in colonic SMCs perhaps in an IGF-1 receptor-dependent manner.

Key Words: Insulin-like growth factor-1; Smooth muscle cell; Stem cell factor; Receptor; Antibody

Ning YJ, Zhang W, Cheng JF, Li XL, Wang MF, Lin L. Insulin-like growth factor-1 upregulates the expression of stem cell factor in rat colonic smooth muscle cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3502-3506

摘要

目的: 探讨胰岛素样生长因子1(IGF-1)对大鼠结肠平滑肌细胞(SMC)表达干细胞因子(SCF)的影响。

方法: 酶解法分离培养SD大鼠结肠SMC、 α -actin免疫荧光鉴定, 然后将大鼠结肠SMC随机分为IGF-1不同浓度(0、5、10、50、

■同行评议者

宛新建, 副教授, 上海市第一人民医院消化内科

100、150 $\mu\text{g/L}$)、时间(0、8、16、24、48 h)及IGF-1 α 受体(IGF-1R α)抗体(0、50、100、150 $\mu\text{g/L}$)干预组; Western blot、RT-PCR法检测SMC合成SCF的变化。

结果: 低剂量IGF-1(5、10 $\mu\text{g/L}$)对SCF蛋白和mRNA表达无影响($P>0.05$), 中高剂量IGF-1(50、100、150 $\mu\text{g/L}$)诱导其表达增加(均 $P<0.05$), 100 $\mu\text{g/L}$ 可能为体外最大有效浓度(0.820 ± 0.061 vs 0.167 ± 0.015 ; 1.269 ± 0.219 vs 0.560 ± 0.023 , 均 $P<0.05$), 且其促SCF蛋白和mRNA合成的最高峰在第16小时(0.420 ± 0.034 vs 0.209 ± 0.001 ; 1.407 ± 0.133 vs 0.477 ± 0.041 , 均 $P<0.05$), IGF-1R α 抗体可抑制SCF蛋白和mRNA合成, 抑制作用呈浓度依赖性($P<0.05$)。

结论: IGF-1能通过作用于SMC上的IGF-1受体刺激大鼠结肠SMC内SCF的表达。

关键词: 胰岛素样生长因子1; 平滑肌细胞; 干细胞因子; 受体; 抗体

宁月季, 张蔚, 成家飞, 李学良, 王美峰, 林琳. 胰岛素样生长因子1对大鼠结肠平滑肌细胞中干细胞因子表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3502-3506
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3502.asp>

0 引言

Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)是胃肠动力的起搏细胞, 且调节电活动的扩布和参与神经冲动的传导^[1-2]; 许多胃肠动力障碍性疾病与胃肠道ICC的缺失或病变有关^[3-7]。干细胞因子(stem cell factor, SCF)是一种多功能细胞因子, 是胃肠道ICC生长、功能及表型维持的主要调控因子, 胃肠动力性疾病中SCF下降可能是ICC数量减少和超微结构改变的直接原因^[8-10]。研究发现^[11], 胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)可能通过胃平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)调控SCF的合成, 进而对胃ICC具有保护作用。我们前期实验发现, IGF-1能促进体外培养的胃SMC合成SCF, 其对结肠SMC的作用不清楚, 本研究从细胞水平探讨IGF-1对大鼠结肠SMC表达SCF的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠, 雌雄不拘, 体质量150-200 g, 由南京医科大学医学实验动物中心提供。DMEM培养液、胎牛血清、II型胶原酶、大

豆胰蛋白酶抑制剂(Gibco, USA), 重组大鼠IGF-1(R&D, UK), IGF-1R α 抗体(Abcam, UK), SCF抗体(Santa Cruz, USA), α -actin抗体(北京博奥森公司), SCF引物(南京博尔迪生物科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 结肠SMC的分离和培养: SD大鼠断椎处死, 快速自肛门上2 cm取结肠10 cm左右, 用含抗生素的Hepes-Ringer缓冲液反复冲洗, 去除黏膜层和浆膜层。将平滑肌组织剪碎匀浆, 置入消化液(0.1%的II型胶原酶和0.01%的大豆胰蛋白酶抑制剂)中, 30℃孵育20 min、离心、弃消化液, 反复2次, 加含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中中止消化、离心, DMEM培养液重悬细胞, 过筛; 台盼蓝染色确认细胞活力 $>90\%$, 于37℃ 950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂条件下培养, SMC长至致密单层时, 传代培养。采用第3-5代SMC进行实验。

1.2.2 结肠SMC的鉴定: 取对数生长的SMC, 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液; 将SMC接种到放置载玻片的培养皿中, 置CO₂孵箱中培养1-3 d, 待SMC长至单层时, 取出载玻片。PBS冲洗、丙酮固定, 3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶; 滴加 α -actin一抗(1:100), 4℃过夜, PBS冲洗, 滴加罗丹明标记的羊抗兔IgG二抗, 室温避光湿盒中孵育1 h, PBS冲洗, 滴加Hoechst染核, PBS冲洗、封片, 观察特异性荧光。

1.2.3 分组与处理: 将 $2.5\times10^8/\text{L}$ 的SMC接种于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中培养至融和后, PBS洗涤, 加入无胎牛血清的培养基饥饿24 h。分组: IGF-1不同时间组、IGF-1不同浓度组、IGF-1+不同浓度IGF-1R α 抗体组。IGF-1不同时间组: SMC+IGF-1(100 $\mu\text{g/L}$), 分别培养0, 8, 16, 24和48 h。IGF-1不同浓度组: SMC+IGF-1(0, 5, 10, 50, 100, 150 $\mu\text{g/L}$)培养16 h。IGF-1+IGF-1R抗体组: SMC+IGF-1(100 $\mu\text{g/L}$)与不同浓度的IGF-1R抗体(0, 50, 100, 150 $\mu\text{g/L}$)培养16 h。以上实验重复3次。

1.2.4 Western blot法检测SMC中SCF蛋白: 蛋白裂解液提取各组细胞蛋白, BCA法测定蛋白浓度。60 μg 蛋白/泳道加样恒流30 mA电泳, 恒压100 V转膜55 min, 封闭2 h。加入SCF一抗(1:100), 4℃过夜; 二抗1:5000, 37℃孵育, 曝光、显影。

1.2.5 RT-PCR法检测SMC中SCF mRNA: 按TRIzol试剂说明提取各组细胞总mRNA, 逆转录为cDNA, 以此cDNA为模板行PCR扩增。PCR反应条件: 94℃预变性5 min、94℃变性

■相关报道

Horvath *et al* 离体培养糖尿病小鼠胃窦和胃体组织, 给予IGF-1, 可完全阻止ICC间质细胞的减少。该研究提示IGF-1可能刺激平滑肌细胞表达干细胞因子, 进而对ICC间质细胞起调控作用。

■创新盘点

本研究首次在体外培养结肠平滑肌细胞,应用外源性IGF-1对结肠平滑肌细胞进行干预,结果验证了其对于结肠平滑肌细胞产生干细胞因子的显著影响。

表 1 不同浓度IGF-1对结肠SMC的SCF蛋白和mRNA的影响 (mean ± SD)

分组	蛋白	mRNA
IGF-1(μg/L)		
0	0.167 ± 0.015	0.560 ± 0.023
5	0.163 ± 0.021	0.624 ± 0.026
10	0.183 ± 0.051	0.683 ± 0.049
50	0.480 ± 0.036 ^a	0.926 ± 0.025 ^a
100	0.820 ± 0.061 ^c	1.269 ± 0.219 ^c
150	0.807 ± 0.090	1.212 ± 0.299

^a $P < 0.05$ vs 其他各组; ^c $P < 0.05$ vs IGF-1(0, 5, 10, 50 μg/L)。

15 s、55℃退火30 s、72℃延伸15 s、共循环30次,最后于72℃延伸8 min,PCR产物经3%琼脂糖凝胶电泳,观测、拍照。SCF上游引物:5'-TTC GCT TGT AAT TGG CTT TGC-3';下游引物5'-CAA CTG CCC TTG TAA GAC TTG A-3'(76 bp, NM_021843); GAPDH上游引物:5'-CCC CCA ATG TAT CCG TTG TG-3';下游引物5'-TAG CCC AGG ATG CCC TTT AGT-3'(118 bp, BC059110)。

统计学处理 所有数据录入SPSS10.0软件包分析,以mean±SD表示,采用方差分析和成组 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 结肠SMC培养和鉴定 结肠SMC培养24 h后,可见细胞贴壁,呈三角形或梭形,有少量突起;3-5 d开始增殖(图1A);14 d后细胞密集,呈峰谷样生长(图1B)。α-actin免疫荧光阳性反应:大部分多角形细胞胞质内见红色荧光,细胞核Hoechst染色呈蓝色(图1C)。

2.2 不同浓度IGF-1对结肠SMC中SCF蛋白和mRNA的影响 低浓度IGF-1(5, 10 μg/L)对SMC中SCF蛋白和mRNA表达无影响($P > 0.05$,表1,图2),IGF-1在50 μg/L时,SCF表达增加($P < 0.05$,表1,图2),在100 μg/L时表达最多($P < 0.05$,表1,图2),150 μg/L时仍显著促进SCF蛋白和mRNA的表达(类似100 μg/L时, $P < 0.05$,表1,图2)。

2.3 IGF-1作用时间对结肠SMC中SCF蛋白和mRNA的影响 IGF-1在100 μg/L时,促进SMC内SCF蛋白和mRNA的表达呈时间依赖性地升高,16 h达最高($P < 0.05$,表2,图3),此后逐渐下降;48 h与0 h对SCF作用无统计学差异($P > 0.05$,表2,图3)。

2.4 不同浓度的IGF-1R抗体对IGF-1诱导SCF蛋白和mRNA的影响 加入IGF-1(100 μg/L)与不同

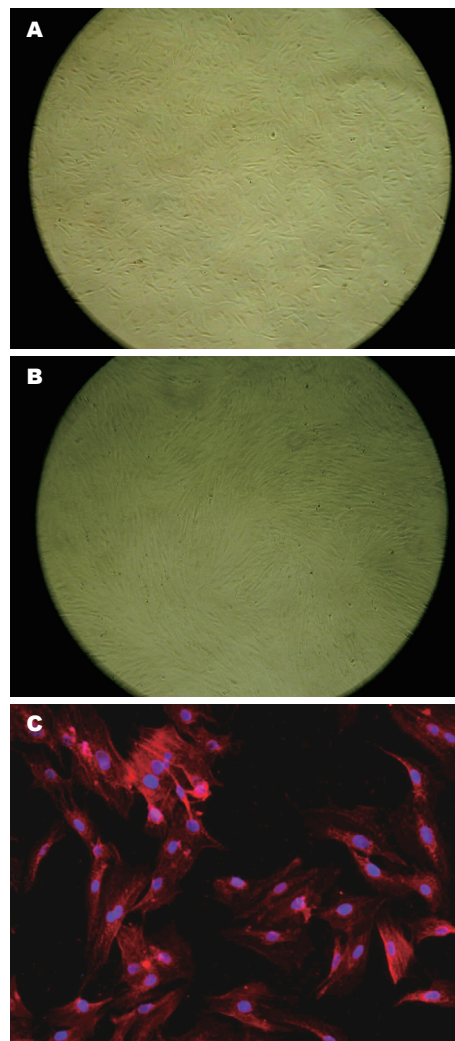


图 1 结肠SMC的培养与鉴定: A: 结肠SMC培养3-5 d,开始增殖(×100); B: 结肠SMC培养14 d,细胞密集,峰谷样生长(×100); C: 结肠SMC免疫荧光鉴定(×400)。

浓度的IGF-1R(IGF-1Rα)抗体后,随抗体浓度的增高,SCF蛋白和mRNA的表达愈加减少,各浓度组之间有统计学差异($P < 0.05$,表3,图4)。

3 讨论

ICC以网络状分布于胃肠神经末梢及平滑肌之间,ICC、肠神经细胞和SMC构成“功能元件”,共同调控胃肠道的各种生理功能。研究已证实ICC的缺失或病变是胃肠动力障碍重要原因之一,包括糖尿病胃肠病变时,均存在ICC破坏^[3-7]。

SCF是c-kit的天然配体,SCF与kit结合后形成SCF-kit信号系统,在造血细胞、肥大细胞、生殖细胞以及黑色素细胞的发育中起关键作用,研究证实^[9-10,12],SCF在胃肠道ICC的发育、增殖和表型维持过程中起关键作用,SCF减少与胃肠动力相关的ICC异常有关。人体SCF可由成纤维细胞、角蛋白细胞、内皮细胞、骨髓、小细胞

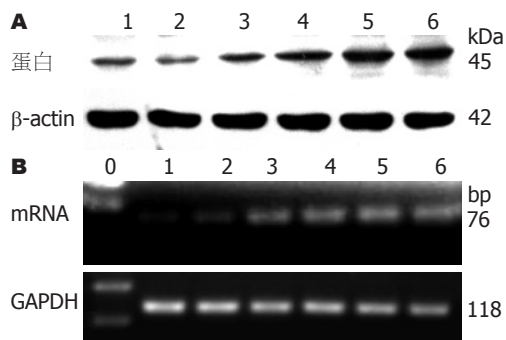


图 2 不同浓度IGF-1对结肠SMC内SCF蛋白和mRNA表达的影响。A: 蛋白; B: mRNA; 0: 50 bp DNA Marker; 1: IGF-1 0 μg/L; 2: IGF-1 5 μg/L; 3: IGF-1 10 μg/L; 4: IGF-1 50 μg/L; 5: IGF-1 100 μg/L; 6: IGF-1 150 μg/L。

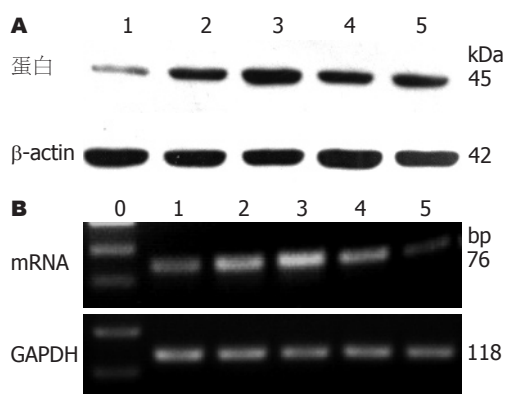


图 3 IGF-1刺激时间对结肠SMC内SCF蛋白和mRNA表达的影响。A: 蛋白; B: mRNA; 0: 50 bp DNA Marker; 1: IGF-1刺激0 h; 2: IGF-1刺激8 h; 3: IGF-1刺激16 h; 4: IGF-1刺激24 h; 5: IGF-1刺激48 h。

肺癌细胞等产生, 胃肠道SCF可来自SMC、肠神经元细胞, 研究发现^[11], 维持胃肠ICC所需的SCF可能来源于胃肠SMC。大量研究表明^[3,13-16], IGF-1、一氧化氮(NO)、5-HT、血红素氧化酶-1(HO-1)及IL-9等因素均与ICC的生存和表型维持有关。但IGF-1保护胃肠ICC的分子机制不清? Horváth *et al*^[11]离体培养DM小鼠胃窦和胃体组织, 给予胰岛素或IGF-1, 可完全阻止ICC的减少, 认为DM病程中, 胃SMC萎缩、合成SCF减少, 导致ICC病变, 因此推测IGF-1刺激胃SMC表达SCF, 进而对ICC起调控作用。我们前期实验提示, 体外培养胃SMC, 给予IGF-1可促进SCF表达增加。由于胃肠道不同部位ICC的分布不同, 且胃肠道不同部位及不同亚型的ICC对SCF的需求量亦不同^[17-19], 因此, 结肠SMC在IGF-1作用下是否表达SCF增加, 还不清楚。本实验培养结肠SMC显示, 中高剂量的IGF-1可明显促进结肠SMC合成SCF, 且体外IGF-1在100 μg/L、作用16 h, 促进结肠SMC合成SCF的作用最强, 提示

表 2 100 μg/L IGF-1不同时间刺激对结肠SMC中SCF蛋白及mRNA影响 (mean ± SD)

分组	蛋白	mRNA
0 h	0.209 ± 0.001	0.477 ± 0.041
8 h	0.344 ± 0.007 ^a	0.963 ± 0.083 ^a
16 h	0.420 ± 0.034 ^c	1.407 ± 0.133 ^c
24 h	0.328 ± 0.023	0.977 ± 0.084
48 h	0.182 ± 0.058	0.575 ± 0.075

^a*P* < 0.05 vs 100 μg/L IGF-1(0, 16, 48 h); ^c*P* < 0.05 vs 其他各组。

表 3 不同浓度IGF-1R抗体对结肠SMC中SCF蛋白及mRNA影响 (mean ± SD)

分组	蛋白	mRNA
0 μg/L	1.690 ± 0.056	0.180 ± 0.010
50 μg/L	1.277 ± 0.072 ^a	0.130 ± 0.000 ^a
100 μg/L	1.077 ± 0.055 ^a	0.077 ± 0.005 ^a
150 μg/L	0.787 ± 0.055 ^a	0.033 ± 0.058 ^a

^a*P* < 0.05 vs 其他各组。

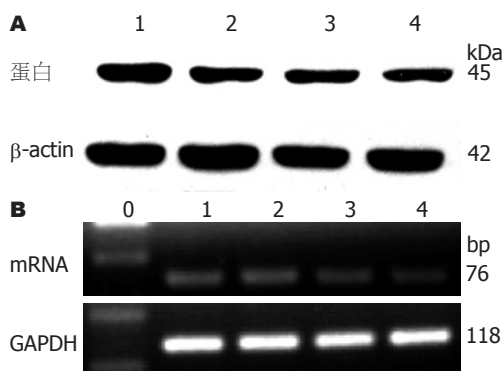


图 4 不同浓度IGF-1R抗体对结肠SMC内SCF蛋白和mRNA表达的影响。A: 蛋白; B: mRNA; 0: 50 bp DNA Marker; 1: IGF-1R抗体0 μg/L; 2: IGF-1R抗体50 μg/L; 3: IGF-1R抗体100 μg/L; 4: IGF-1R抗体150 μg/L。

IGF-1以浓度和时间依赖性方式诱导结肠SMC表达SCF。

IGF-1是胰岛素样生长因子家族中的一种, 含70个氨基酸, 相对分子质量为7649 Da, 主要由肝脏分泌, 以内分泌、自分泌、旁分泌的方式, 与靶细胞表面的IGF-1R结合, 对外周组织、细胞起生理和病理调节作用^[20]。IGF-1R是一种具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白质, 包括两个α亚基和两个β亚基, α亚基位于细胞膜外侧, β亚基位于细胞膜内侧, IGF-1首先与α亚基结合, 激活β亚基上的酪氨酸激酶, 使之磷酸化, 引起胞质内一系列的信号级联反应和基因转录, 从而产

应用要点

本研究证实了, IGF-1能通过作用于SMC上的IGF-1受体刺激大鼠结肠SMC内SCF的表达, 为临床治疗胃肠动力障碍性疾病提供新的理论依据。

■同行评价

本研究的内容具有重要的价值和新颖性,客观地反映了IGF-1对结肠SMC表达SCF的影响,有较好的可读性。

生IGF-1的生物学效应。本实验中,IGF-1R α 抗体以浓度依赖性的方式抑制结肠SMC合成SCF,提示IGF-1可与结肠SMC胞膜上IGF-1R α 结合,促进SCF的合成。

总之,本实验初步证实了体外IGF-1可诱导结肠SMC产生SCF,且可能通过SMC上的IGF-1受体。IGF-1使SMC表面的IGF-1R磷酸化后,引起的细胞内机制尚待进一步研究。为进一步探讨SCF的调控、相应的干预方法、促使SCF的合成以及为ICC的保护、治疗胃肠动力障碍提供了实验依据。

4 参考文献

- 1 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
- 2 Kito Y, Ward SM, Sanders KM. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C710-C720
- 3 Horváth VJ, Vittal H, Ordög T. Reduced insulin and IGF-I signaling, not hyperglycemia, underlies the diabetes-associated depletion of interstitial cells of Cajal in the murine stomach. *Diabetes* 2005; 54: 1528-1533
- 4 Forster J, Damjanov I, Lin Z, Sarosiek I, Wetzel P, McCallum RW. Absence of the interstitial cells of Cajal in patients with gastroparesis and correlation with clinical findings. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 102-108
- 5 Battaglia E, Bassotti G, Bellone G, Dughera L, Serra AM, Chiusa L, Repici A, Mioli P, Emanuelli G. Loss of interstitial cells of Cajal network in severe idiopathic gastroparesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6172-6177
- 6 Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, Kanaoka S, Furuta T, Ikuma M, Hishida A. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2006; 41: 1076-1087
- 7 Wang XY, Huizinga JD, Diamond J, Liu LW. Loss of intramuscular and submuscular interstitial cells of Cajal and associated enteric nerves is related to decreased gastric emptying in streptozotocin-induced diabetes. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: e1095-e1092
- 8 龙庆林, 房殿春, 史洪涛, 向国春, 罗元辉. 糖尿病大鼠胃窦SCF-Kit信号改变及其对Cajal间质细胞的影响. 第三军医大学学报 2007; 29: 141-143
- 9 徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良. 干细胞因子对糖尿病结肠Cajal间质细胞的影响. 中华消化杂志 2008; 28: 388-391
- 10 徐丽明, 林琳, 汤玉蓉, 张红杰, 李学良. 干细胞因子对糖尿病小鼠结肠Cajal间质细胞的干预效应. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1294-1298
- 11 Horváth VJ, Vittal H, Lörincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, Ordög T. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 759-770
- 12 Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006; 576: 721-726
- 13 Choi KM, Gibbons SJ, Roeder JL, Lurken MS, Zhu J, Wouters MM, Miller SM, Szurszewski JH, Farrugia G. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 585-595
- 14 Wouters MM, Gibbons SJ, Roeder JL, Distad M, Ou Y, Strege PR, Szurszewski JH, Farrugia G. Exogenous serotonin regulates proliferation of interstitial cells of Cajal in mouse jejunum through 5-HT2B receptors. *Gastroenterology* 2007; 133: 897-906
- 15 Choi KM, Gibbons SJ, Nguyen TV, Stoltz GJ, Lurken MS, Ordög T, Szurszewski JH, Farrugia G. Heme oxygenase-1 protects interstitial cells of Cajal from oxidative stress and reverses diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2008; 135: 2055-2064, 2064.e1-2064.e2
- 16 Ye J, Zhu Y, Khan WI, Van Snick J, Huizinga JD. IL-9 enhances growth of ICC, maintains network structure and strengthens rhythmicity of contraction in culture. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 687-694
- 17 Ordög T, Baldo M, Danko R, Sanders KM. Plasticity of electrical pacemaking by interstitial cells of Cajal and gastric dysrhythmias in W/W mutant mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 2028-2040
- 18 Fox EA, Phillips RJ, Byerly MS, Baronowsky EA, Chi MM, Powley TL. Selective loss of vagal intramuscular mechanoreceptors in mice mutant for steel factor, the c-Kit receptor ligand. *Anat Embryol (Berl)* 2002; 205: 325-342
- 19 Seki K, Komuro T. Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx 43 in the stomach of wild-type and W/Wv mutant mice. *Anat Embryol (Berl)* 2002; 206: 57-65
- 20 Lim HJ, Park HY, Ko YG, Lee SH, Cho SY, Lee EJ, Jameson JL, Jang Y. Dominant negative insulin-like growth factor-1 receptor inhibits neointimal formation through suppression of vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1106-1114

编辑 李军亮 电编 何基才

TIM1与TIM4对小鼠食物过敏模型中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞功能的影响

王新亭, 郑鹏远, 罗 予, 刘志强, 张利利

王新亭, 郑鹏远, 刘志强, 张利利, 郑州大学第二附属医院消化内科 郑州大学医学微生物学研究所 河南省郑州市 450014

罗予, 河南省医药科学研究所 河南省郑州市 450052

王新亭, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30772028

作者贡献分布: 王新亭与郑鹏远对此文贡献均等; 此课题由王新亭、郑鹏远及罗予设计; 研究过程由王新亭、张利利及刘志强完成; 研究所用新试剂和分析工具由郑鹏远与罗予提供; 数据分析由王新亭完成; 本论文写作由王新亭、郑鹏远及刘志强完成.

通讯作者: 郑鹏远, 教授, 主任医师, 博士生导师, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科, 郑州大学医学微生物学研究所. medp7123@126.com

电话: 0371-65261035 传真: 0371-63934118

收稿日期: 2009-09-14 修回日期: 2009-11-13

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-08

TIM4 and TIM1 modulate the function of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in mice with food allergy

Xin-Ting Wang, Peng-Yuan Zheng, Yu Luo, Zhi-Qiang Liu, Li-Li Zhang

Xin-Ting Wang, Peng-Yuan Zheng, Zhi-Qiang Liu, Li-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Institute of Medical Microecology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Yu Luo, Henan Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772028

Correspondence to: Professor Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Institute of Medical Microecology, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@126.com

Received: 2009-09-14 Revised: 2009-11-13

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the function of T regulatory (Treg) cells and determine the role of T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 4 (TIM4) and TIM1 in modulating the function of Treg cells in mice with food allergy.

METHODS: Thirty-two BALB/c mice fed an ovalbumin (OVA)-free diet were randomly and equally divided into four groups: normal saline

(NS) group, *staphylococcal enterotoxin B* (SEB) plus OVA group, anti-TIM1 antibody plus SEB and OVA group, and anti-TIM4 antibody plus SEB and OVA group. Mice in the four groups were sensitized by intraperitoneal injections of NS, SEB/OVA, anti-TIM1/SEB/OVA, and anti-TIM4/SEB/OVA on days 0, 3 and 9, respectively. All mice (except the NS group) were challenged by intraperitoneal injections of SEB/OVA on days 7 and 14, respectively. The expression of forkhead box P3 (FOXP3) mRNA in the jejunum and spleen and TIM4 mRNA in the jejunum was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The levels of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and interleukin-10 (IL-10) in the serum were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of TGF- β 1 and IL-10 proteins in the jejunum was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with the NS group, the expression levels of FOXP3 mRNA in the jejunum and spleen significantly decreased (0.401 ± 0.145 vs 0.732 ± 0.162 and 0.407 ± 0.082 vs 0.691 ± 0.145 , respectively; both $P < 0.05$), the expression level of TIM4 mRNA increased significantly ($P < 0.05$), and the levels of TGF- β 1 in the serum and jejunum decreased significantly (7859.853 ± 126.704 ng/L vs 8342.814 ± 488.461 ng/L and 108.834 ± 9.634 ng/L vs 156.298 ± 12.002 ng/L, respectively; both $P < 0.05$) in the SEB/OVA group. In contrast, the expression levels of FOXP3 mRNA in the jejunum and spleen and TGF- β 1 in the serum and jejunum were significantly higher in the anti-TIM1/SEB/OVA and anti-TIM4/SEB/OVA groups than in the SEB/OVA group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treg cells in SEB/OVA-sensitized mice are dysfunctional. Pretreatment with anti-TIM1 or anti-TIM4 can restore the function of Treg cells, suggesting that the TIM4-TIM1 pathway may play a key role in the development of food allergy.

Key Words: Food allergy; CD4⁺CD25⁺ T regulatory

■背景资料

FA在世界上广泛存在, 最近几十年其发病率在全球范围内大大提高. 然而FA的发病机制尚不清楚, 最近几年有关FA领域研究发展迅速. 口服耐受受损是致FA的重要因素之一, 维持口服耐受的复杂免疫调节网络成为研究热点.

■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

■研究前沿

目前对FA的研究多集中在Th1/Th2细胞失衡与卫生假说、细菌毒素及食物蛋白的共同作用、口服耐受受损等方面。TIMS家族的发现及其在免疫调节中的作用逐渐受到重视,尤其TIMS蛋白在过敏性疾病中的重要作用引起研究者关注。

cells; Oral tolerance; TIM protein

Wang XT, Zheng PY, Luo Y, Liu ZQ, Zhang LL. TIM4 and TIM1 modulate the function of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in mice with food allergy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3507-3513

摘要

目的:探讨在食物过敏小鼠模型中CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的功能状态及TIM4与TIM1对其的影响,分析食物过敏的发生机制。

方法:无受试蛋白喂养BALB/c小鼠32只,随机分为4组:空白对照组、金黄色葡萄球菌肠毒素B(SEB)+卵清蛋白(OVA)共同作用组、TIM1抗体干预组及TIM4抗体干预组,分别于0、3、9 d ip生理盐水, SEB和OVA, TIM1抗体+SEB+OVA, TIM4抗体+SEB+OVA, 并于第7、14天给予SEB+OVA(空白对照组以生理盐水ig)ig. RT-PCR检测空肠及脾脏Foxp3 mRNA表达、空肠TIM4 mRNA表达, ELISA法测定血清TGF-β1与IL-10的表达. 免疫组织化学法检测空肠黏膜TGF-β1与IL-10表达。

结果:与空白对照组相比, SEB+OVA共同作用组小鼠空肠及脾脏Foxp3 mRNA表达明显下降(0.401 ± 0.145 vs 0.732 ± 0.162 ; 0.407 ± 0.082 vs 0.691 ± 0.145 , 均 $P < 0.05$), TIM4 mRNA表达明显增高($P < 0.05$), 血清和空肠黏膜TGF-β1表达显著降低(7859.853 ± 126.704 ng/L vs 8342.814 ± 488.461 ng/L; 108.834 ± 9.634 ng/L vs 156.298 ± 12.002 ng/L, 均 $P < 0.05$); 与SEB+OVA组相比, TIM1和TIM4抗体干预组小鼠空肠及脾脏Foxp3 mRNA及血清和空肠黏膜TGF-β1表达显著增高(均 $P < 0.05$)。

结论: TIM4与TIM1抗体干预可恢复SEB+OVA致敏小鼠Treg细胞功能, 维持耐受平衡, 减轻过敏症状, 提示TIM4-TIM1通路可能在食物过敏的发生中起重要作用。

关键词: 食物过敏; CD4⁺CD25⁺调节性T细胞; 口服耐受; TIM蛋白

王新亭, 郑鹏远, 罗予, 刘志强, 张利利. TIM1与TIM4对小鼠食物过敏模型中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞功能的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17(34): 3507-3513

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3507.asp>

0 引言

近年来, 过敏性疾病的发病率在全球内迅速增

加^[1], 目前2%-6%的人有食物过敏(food allergy, FA)及相关症状^[2]. FA的症状轻则表现为呕吐、腹泻、呼吸困难、皮疹等不适, 重则发生威胁生命的过敏性休克^[3]. 而FA的病因和免疫机制仍不清楚, 当前普遍认为FA是肠道免疫系统与食物抗原之间的耐受平衡打破, 产生的以Th2细胞反应为主的免疫反应. 正常情况下, 肠道免疫系统对食物抗原和肠道共生菌耐受, 肠道上皮完整性、树突状细胞(dendritic cell, DC)和调节性T细胞等对维持这种平衡至关重要^[4]. 调节性T细胞尤其是CD4⁺CD25⁺调节性T(CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, Treg)细胞在机体免疫系统中发挥负向调节作用, 在口服耐受中发挥关键作用, 其功能紊乱或数目下降将打破肠道耐受平衡^[5]. 鼠和人中Treg能选择性表达叉头翼螺旋转录因子(Foxp3), 表达Foxp3的Treg细胞在维持免疫耐受的作用已被证实, Foxp3的基因突变或表达下降, 可导致Treg细胞的功能不全^[6-9]. T细胞免疫球蛋白与黏蛋白域(T cell immunoglobulin and mucin domains, TIMS)蛋白最近在小鼠中发现, 包括TIM1-TIM8, 在人和猴子基因组中也发现有同源类似分子^[10]. TIMS家族的基因多态性与自身免疫性疾病、过敏性疾病及Th1-Th2细胞间的平衡作用受到人们重视^[11-12]. 小鼠空肠CD4⁺ T细胞表达TIM1, TIM4是他的配体^[11], 表达于抗原递呈细胞, 特别是成熟的DC, 高表达的TIM4与TIM1结合能够打破Th1-Th2细胞平衡, 促进Th2细胞炎症因子释放, 并产生相应炎症反应^[13-14]. TIM1在调节Treg细胞的功能中也显示出重要作用, 在体外实验中已证实, TIM1的激活能够降低Treg细胞Foxp3、糖皮质激素诱导型肿瘤坏死因子受体(glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR)和其他Treg细胞表面分子的mRNA及其功能, 并能减少相应细胞向Treg细胞转化^[15]. 目前对FA中的Treg的功能状态及TIM1对其影响尚未见报道, 我们推测FA中也存在Treg细胞功能不全, TIM4与TIM1的相互作用可能降低Treg细胞的功能及状态, 破坏免疫耐受平衡, 是造成FA的重要机制之一. 本研究通过构建过敏模型, 检测过敏状态下Treg的功能, 并用TIM1和TIM4抗体干预, 对TIM1对Treg的影响和FA的发病机制做进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 卵清蛋白(OVA, Sigma公司), SEB由郑州大学生物工程系提供, TIM1(美国RD公司),

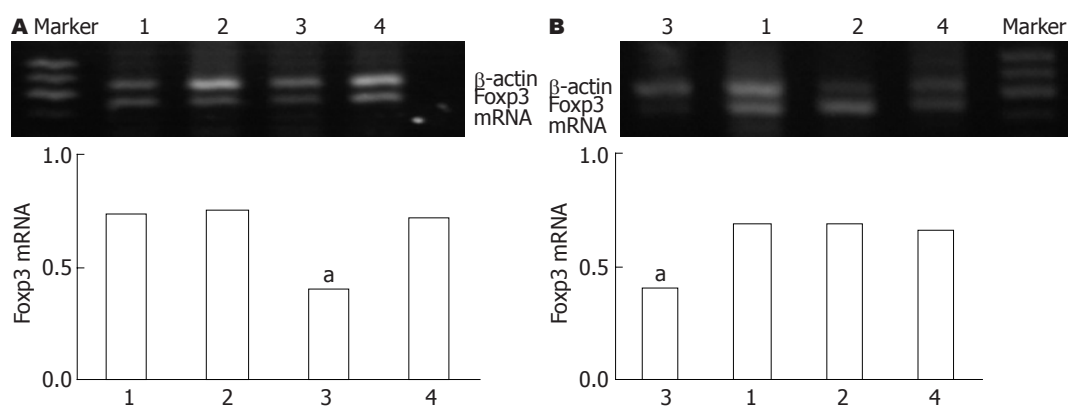


图1 TIM1及TIM4抗体干预组小鼠空肠及脾脏组织Fcγ3 mRNA表达。A: 空肠; B: 脾脏; 1: 空白对照组; 2: TIM1干预组; 3: SEB+OVA共同作用组; 4: TIM4干预组; ^a $P < 0.05$ vs 空白对照组。

TIM4(美国BioLegend公司), 小鼠IL-10、TGF-β1 ELISA定量试剂盒(上海西唐生物科技有限公司), BALB/c小鼠购于河南省实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 动物模型实验: 无受试蛋白喂养BALB/c小鼠32只, 6-8 wk, ♂, 随机分为4组: 空白对照组(A)、SEB+OVA共同作用组(B)、TIM1干预组(C)、TIM4干预组(D), 每组8只。按照文献[14]方法进行造模, B组小鼠的致敏和激发过程如下: 取BALB/c小鼠8只, 第0、3、9天使用10 μg SEB及20 μg OVA无菌生理盐水(NS)溶液0.2 mL ip进行基础致敏, 第7、14天使用10 μg SEB及20 μg OVA无菌生理盐水(NS)溶液0.2 mL对B组小鼠进行ig激发。另设小剂量TIM1特殊对照组(E)($n = 8$), A组以等体积的生理盐水, C、D、E组抗体分别于SEB+OVA ip和ig前30 min ip, 总剂量分别为每只50 μg、50 μg、10 μg。以腹泻为造模成功标志, 如果被致敏小鼠未出现明显腹泻, 可观察处死后小鼠的空肠内容物, 相对于正常小鼠结肠中的球样大便, 水样粪便亦可被视为腹泻。第15天处死小鼠, 留取血清标本。

1.2.2 RT-PCR检测Fcγ3和TIM4 mRNA表达: 无菌取空肠和脾脏, 生理盐水冲洗, 以TRIzol法提取总RNA, 按试剂盒说明进行cDNA合成和PCR扩增, Fcγ3引物(上游: 5'-AGGAGAAAGCGGATACCA-3', 下游: 5'-GAAGGACATACCAGAAGC-3', 55℃, 扩增产物349 bp)、TIM4引物(上游: 5'-AGGGTCCGCCTCACTAC-3', 下游: 5'-TCCCGTCTTCATCATCCC-3', 55℃, 扩增产物404 bp)、β-actin(上游: 5'-GAGACCTTCAACACCCCGC-3', 下游: 5'-CCACAGGATTCCATCCCAA-3', 59℃, 扩增产物446 bp), PCR产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳, 以DNA Marker标记确

定条带大小。凝胶扫描成像分析系统进行摄像后并对凝胶条带灰度信号强度半定量分析, 以Fcγ3/β-actin及TIM4/β-actin的比值作为Fcγ3和TIM4 mRNA表达的相对表达强度。

1.2.3 空肠黏膜TGF-β1、IL-10免疫组织化学测定: 无菌取空肠, 生理盐水冲洗, 40 g/L多聚甲醛固定24-48 h, 以SP方法检测空肠黏膜TGF-β1、IL-10表达。

统计学处理 实验结果采用SPSS13.0统计软件包分析。组间均数比较选用单因素方差分析。采用 $\alpha = 0.05$ 为假设检验标准。

2 结果

2.1 空肠及脾脏组织Fcγ3 mRNA表达 与空白对照组小鼠相比, SEB+OVA过敏小鼠空肠及脾脏Fcγ3 mRNA表达明显减少(0.401 ± 0.145 vs 0.732 ± 0.162 ; 0.407 ± 0.082 vs 0.691 ± 0.145 , 均 $P = 0.000$), TIM1和TIM4抗体干预组空肠及脾脏Fcγ3表达较过敏组小鼠明显恢复(均 $P = 0.000$), 与空白对照组接近(图1)。我们以较小剂量TIM1干预做特别对照, 结果提示TIM1的干预对SEB+OVA过敏小鼠Fcγ3的恢复具有剂量依从性(图2)。

空肠TIM4 mRNA表达: 与空白对照组小鼠相比, SEB+OVA、TIM1和TIM4抗体干预组小鼠TIM4表达较高($P = 0.004$ 、 0.007 和 0.033 , 图3), 抗体干预组之间表达无明显差异。

2.2 血清抑制性细胞因子测定 SEB+OVA实验组小鼠的平均TGF-β1与空白对照组、anti-TIM1组和anti-TIM4组比较明显减少, 差异具有统计学意义($P = 0.012$, 0.010 和 0.000), 小剂量TIM1抗体干预组TGF-β1与实验组相比明显增高($P = 0.020$), 大剂量TIM1抗体干预组与小剂量TIM1

■ 相关报道

Yang *et al*研究表明TIM4与TIM1的作用能促进Th2细胞分化, 在FA中发挥重要作用, 用相应抗体干预则能改善症状。Degauque *et al*研究认为在移植反应中TIM1的激活能够降低CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的功能和数目, 破坏免疫耐受。已有研究表明在FA模型中, 小鼠脾脏的CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的数目下降显著。

■创新盘点

肠道是人体最大的免疫器官,检测肠道及血清Treg细胞因子表达,可以明确其功能状态。本研究通过构建过敏模型,检测过敏状态下Treg的功能,并用TIM1和TIM4抗体干预,对TIM1对Treg的影响和FA的发病机制做进一步探讨。

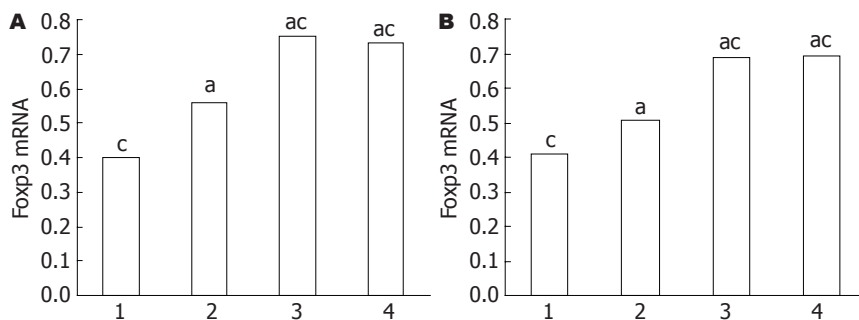


图 2 不同剂量TIM1抗体干预小鼠空肠及脾脏组织Foxp3 mRNA表达. A: 空肠; B: 脾脏; 1: SEB+OVA共同作用组; 2: 特殊对照组; 3: TIM1干预组; 4: 空白对照组; ^a $P<0.05$ vs SEB+OVA共同作用组; ^c $P<0.05$ vs 特殊对照组。

表 1 血清TGF- β 1、IL-10的表达 ($n=8$, mean \pm SD)

分组	TGF- β 1(ng/L)	IL-10(ng/L)
空白对照组	8342.814 \pm 488.461 ^{ae}	40.395 \pm 6.319
实验组	7859.853 \pm 126.704 ^e	46.013 \pm 5.661 ^c
TIM1(小剂量)	8058.045 \pm 97.158 ^a	42.663 \pm 2.990
TIM1(大剂量)	8356.972 \pm 222.288 ^{ae}	43.570 \pm 5.069
TIM4(每只50 μ g)	8628.364 \pm 455.372 ^{ae}	43.327 \pm 3.249

^a $P<0.05$ vs 实验组; ^e $P<0.05$ vs 空白对照组; ^{ae} $P<0.05$ vs TIM1(小剂量)组。

表 2 空肠黏膜TGF- β 1、IL-10的表达 (平均积分吸光度)

分组	TGF- β 1(ng/L)	IL-10(ng/L)
空白对照组	156.298 \pm 12.002 ^{ae}	97.054 \pm 10.495
实验组	108.834 \pm 9.634 ^e	148.204 \pm 10.009 ^c
TIM1(小剂量)	120.150 \pm 19.646 ^a	143.911 \pm 13.405 ^c
TIM1(大剂量)	142.888 \pm 6.343 ^{ae}	108.218 \pm 10.964 ^c
TIM4(每只50 μ g)	151.151 \pm 6.037 ^{ae}	117.525 \pm 9.280 ^c

^a $P<0.05$ vs 实验组; ^e $P<0.05$ vs 空白对照组; ^{ae} $P<0.05$ vs TIM1(小剂量)组。

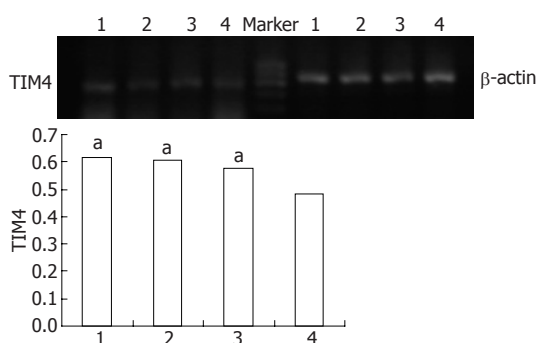


图 3 TIM1及TIM4抗体干预小鼠空肠TIM4 mRNA表达. 1: SEB+OVA共同作用组; 2: TIM1干预组; 3: TIM4干预组; 4: 空白对照组; ^a $P<0.05$ vs 空白对照组。

干预组相比TGF- β 1仍高($P=0.001$); 空白对照组血清IL-10水平为40.395 \pm 6.319 ng/L, SEB+OVA实验组IL-10明显升高($P<0.05$), 其余干预组IL-10略有升高, 但无统计学意义(表1)。

2.3 空肠黏膜TGF- β 1、IL-10表达 实验组小鼠TGF- β 1表达明显减少, 低于空白对照组和各干预组(均 $P<0.05$), 与血清TGF- β 1表达相似, TIM1干预具有剂量依从性(图4); 与实验组相比, 大小剂量TIM1干预后, TGF- β 1明显升高(均 $P<0.05$), 大小剂量TIM1干预比较差异仍具有统计学意义(均 $P<0.05$); 与空白对照组相比, 实验组及干预组IL-10明显升高(均 $P<0.05$, 表2)。

3 讨论

近年来有关FA领域的研究进展迅速, 而其发生机制仍不清楚, 目前研究多集中在Th1/Th2细胞失衡与卫生假说、细菌毒素及食物蛋白的共同作用、口服耐受受损等方面^[16-18]。TIMS家族的发现及其在免疫调节中的作用带来新的研究思路。TIM蛋白是TIM基因编码的一类具有共同基序的跨膜糖蛋白, 其基本结构包括一个信号

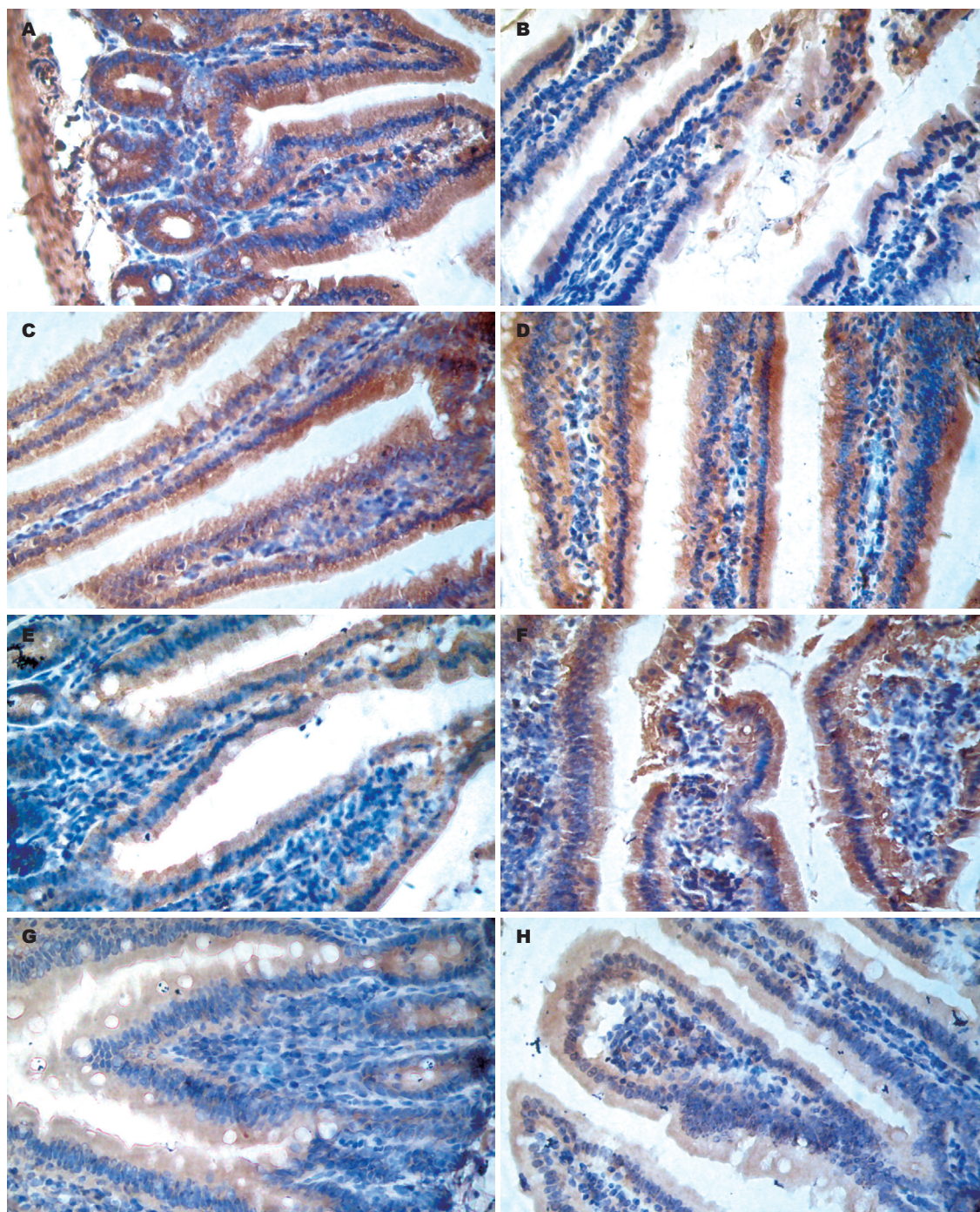


图4 空白对照组、实验组、TIM1及TIM4抗体干预组小鼠空肠黏膜TGF-β1、IL-10表达。A-D: TGF-β1; E-H: IL-10; A、E: 空白对照组; B、F: 实验组; C、G: TIM1干预组; D、H: TIM4干预组。

■应用要点

本研究结果显示, TIM4与TIM1的作用不仅能促进Th2细胞分化, 而且能降低Treg功能, TIM1的激活对FA的发生至关重要。应用TIM4与TIM1抗体, 可以防止FA的发生, 维持免疫耐受。

肽、免疫球蛋白(IgV)样区、黏蛋白样区、跨膜区和有磷酸位点的胞内尾巴区^[19], TIM蛋白在自身免疫性疾病、超敏反应性疾病及移植耐受中均发挥重要作用, CD4⁺ T细胞表达TIM1, TIM4是其内源性配体, 二者相互作用促进CD4⁺ T细胞的分化, 调节Th1-Th2平衡^[20], 然而二者对Treg细胞的影响尚不清楚, 而Treg细胞在维持口服耐受过程中发挥重要作用, 口服耐受受损可以促进FA发生^[21]。因此在FA中, 了解Treg细胞的功能

及TIM1对其影响, 对于了解发生FA的病因和免疫机制有重要意义。

Foxp3是Treg细胞的重要标记分子, 同时也是控制Treg发育及其功能效应的关键基因^[22-23], Foxp3决定了Treg细胞的抑制功能^[24], Foxp3的表达高低可以有效判断Treg细胞的功能状态。本研究显示FA小鼠空肠组织和脾脏Foxp3 mRNA表达明显减少, 提示存在Treg细胞的功能不全。通过释放抑制性细胞因子TGF-β1和IL-10是Treg细

■同行评价

本文探讨了TIM1与TIM4对小鼠食物过敏模型中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞功能的影响,内容新颖,可读性好。

胞发挥抑制功能的重要方面^[25-26],而TGF- β 1与IL-10共同作用可以有效发挥抑制作用。空肠是FA累及的重要靶器官,我们检测了血清和空肠组织局部的TGF- β 1和IL-10,发现FA小鼠血清和空肠组织TGF- β 1明显下降,这与Foxp3下降是一致的,进一步证实FA中存在Treg细胞功能不全,可导致口服耐受受损,从而发生FA。尽管过敏组小鼠血清和空肠组织IL-10比正常组略高,其原因可能是IL-10也是Th2分泌的重要因子,在FA中存在Th2极化,能够释放大量的IL-10,除此外,DC和Th3等细胞也能分泌部分IL-10,最终影响IL-10水平,提示IL-10作用十分广泛和复杂,值得进一步探讨。

Degauque *et al*通过体外实验证实TIM1的激活能够降低CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的功能和数目,是破坏移植耐受的重要原因^[15]。我们推测FA中Treg细胞的功能不全也存在类似机制,SEB与OVA共刺激可以促进DC的TIM4高表达^[14],本实验也证实了这一点,而高表达的TIM4可以激活TIM1,导致Treg细胞功能不全。我们采用SEB+OVA过敏小鼠模型,分别用TIM1和TIM4抗体干预,检测干预后CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的功能,发现TIM1和TIM4抗体干预后,过敏小鼠的Foxp3与TGF- β 1均明显恢复,同时我们用不同剂量TIM1抗体干预,发现Foxp3与TGF- β 1的恢复与TIM1抗体干预具有剂量依从性,提示在FA中,TIM1的激活可以导致Treg细胞功能下降,而高表达的TIM4与TIM1作用导致Treg细胞功能下降可能是导致FA的重要原因之一。病理诊断是诊断FA病情的有效指标,我们证实在过敏小鼠空肠组织存在大量的M细胞和嗜酸性粒细胞等炎症细胞(数据未显示),抗体干预组小鼠炎症细胞明显减少,和正常对照组小鼠类似,说明抗体干预是有效的,而破坏TIM4-TIM1通路有希望成为治疗FA的理想靶点。

大量临床证据提示致病性细菌感染参与过敏性疾病的发生,我们前期研究发现SEB在FA反应中发挥重要作用^[17],SEB能够通过促进DC的TIM4表达增高,且具有剂量依从性,而TLR2、NOD1参与促进DC TIM4表达增高,高表达TIM4的DC能够促进Th2细胞分化及因子释放,干扰TIM1-TIM4作用则能消除该作用^[21]。Yang *et al*发现,SEB与OVA共刺激不仅能显著促进DC的TIM4表达,而且能显著促进MHC II分子的表达,而只有SEB和OVA共同作用可促进FA的发生,他们同时检测其他肠道细菌产物如

葡萄糖肽多糖和百日咳毒素也能促进DC TIM4表达^[14]。另有研究表明,霍乱毒素(cholera toxin, CT)也能够促进DC TIM4表达,在花生过敏模型中,只有CT与花生提取物共同作用可促进FA的发生^[27],这些结果提示体内微生物毒素和食物抗原的共同作用对过敏的发生至关重要。结合本研究,我们认为FA的发生机制可能如下:正常情况下肠道免疫系统不会对食物抗原和肠道固有细菌发生免疫反应,为口服耐受状态,这种耐受状态与肠上皮细胞的各组成部分的完整性、DC的提呈作用、CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的作用等因素密切相关^[4];在炎症及各种理化因子的刺激下,肠道黏膜完整性受到破坏,DC与大量食物抗原和致病性细菌及产物相遇,DC通过TLR受体、NOD受体及吞噬作用处理细菌产物,促进TIM4及共刺激分子表达增多,同时通过吞噬作用处理食物抗原,二者的共同作用导致大量TIM4表达及DC的成熟及活化,该DC与CD4⁺ T细胞通过TIM4与TIM1的相互作用作用,一方面促其向Th2细胞分化,另一方面,抑制Treg Foxp3表达及抑制因子释放,最终打破口服耐受,导致Th2细胞的高度极化,释放大量的IL-4、IL-5、IL-10及IL-13等因子,促使M细胞和嗜酸性粒细胞增多和活化,释放大量的炎症因子,造成细胞水肿及组织损伤,产生过敏症状。我们认为成熟DC的形成可能是导致FA最为关键的因素,致病微生物的感染是促进DC成熟的重要环节,而阻止该DC的形成和破坏其重要信号传导可能成为有效控制FA的方法,然而,FA发生机制十分复杂,尚需大量的基础研究证实。

最近的研究发现TIM1和TIM4分子还可以表达磷脂酰丝氨酸(PS)的受体^[28],表达在APC上TIM4分子胞外的IgV区可与表达在凋亡细胞的PS结合,在清除凋亡细胞及预防自身免疫发挥重要作用,提示TIM1和TIM4的作用复杂,值得进一步探讨。我们在实验中证实,在动物过敏模型中,存在口服耐受受损及调节性T细胞功能不全,而TIM4-TIM1通路可能导致Treg细胞的功能下降,用相应抗体破坏其相互作用,则能改善Treg细胞的功能。实验结果表明在FA中,TIM1的激活对CD4⁺ T细胞的功能和分化起着关键性作用,不仅能促进Th2细胞极化,并且降低Treg功能,破坏TIM1信号传导,可以有效维持耐受平衡,改善相应过敏症状。

4 参考文献

- 1 Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin

- disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2008. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 319-327
- 2 Vierk KA, Koehler KM, Fein SB, Street DA. Prevalence of self-reported food allergy in American adults and use of food labels. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1504-1510
- 3 Bahna SL. Diagnosis of food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003; 90: 77-80
- 4 Strobel S, Mowat AM. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6: 207-213
- 5 Almeida AR, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J Immunol* 2002; 169: 4850-4860
- 6 Powrie F, Read S, Mottet C, Uhlig H, Maloy K. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Novartis Found Symp* 2003; 252: 92-98; discussion 98-105, 106-114
- 7 Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2005; 204: 184-194
- 8 Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF. Transforming growth factor beta induced FoxP3⁺ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 2006; 55: 671-680
- 9 Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y, Jessberger R, Trinchieri G, Lira SA, Randolph GJ, Bromberg JS. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006; 7: 652-662
- 10 Umetsu DT, McIntire JJ, DeKruyff RH. TIM-1, hepatitis A virus and the hygiene theory of atopy: association of TIM-1 with atopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40 Suppl 1: S43
- 11 Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, Berry GJ, Nagumo H, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2005; 6: 447-454
- 12 Vincentz JW, McWhirter JR, Murre C, Baldini A, Furuta Y. Fgf15 is required for proper morphogenesis of the mouse cardiac outflow tract. *Genesis* 2005; 41: 192-201
- 13 Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, Kenny J, Zheng XX, Umetsu DT, DeKruyff RH, Strom TB, Kuchroo VK. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol* 2005; 6: 455-464
- 14 Yang PC, Xing Z, Berin CM, Soderholm JD, Feng BS, Wu L, Yeh C. TIM-4 expressed by mucosal dendritic cells plays a critical role in food antigen-specific Th2 differentiation and intestinal allergy. *Gastroenterology* 2007; 133: 1522-1533
- 15 Degauque N, Mariat C, Kenny J, Zhang D, Gao W, Vu MD, Alexopoulos S, Oukka M, Umetsu DT, DeKruyff RH, Kuchroo V, Zheng XX, Strom TB. Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 735-741
- 16 Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002; 296: 490-494
- 17 Liu T, Wang BQ, Zheng PY, He SH, Yang PC. Rhinosinusitis derived Staphylococcal enterotoxin B plays a possible role in pathogenesis of food allergy. *BMC Gastroenterol* 2006; 6: 24
- 18 Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005; 206: 232-259
- 19 McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2001; 2: 1109-1116
- 20 Liu T, He SH, Zheng PY, Zhang TY, Wang BQ, Yang PC. Staphylococcal enterotoxin B increases TIM4 expression in human dendritic cells that drives naïve CD4 T cells to differentiate into Th2 cells. *Mol Immunol* 2007; 44: 3580-3587
- 21 Ganeshan K, Neilsen CV, Hadsaitong A, Schleimer RP, Luo X, Bryce PJ. Impairing oral tolerance promotes allergy and anaphylaxis: a new murine food allergy model. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 231-238.e4
- 22 Fehérvári Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 203-208
- 23 Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004; 16: 1643-1656
- 24 Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 337-342
- 25 Annacker O, Pimenta-Araujo R, Buren-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 2001; 166: 3008-3018
- 26 Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1061-1067
- 27 Feng BS, Chen X, He SH, Zheng PY, Foster J, Xing Z, Bienenstock J, Yang PC. Disruption of T-cell immunoglobulin and mucin domain molecule (TIM)-1/TIM4 interaction as a therapeutic strategy in a dendritic cell-induced peanut allergy model. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 55-61, 61.e1-e7
- 28 Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 2007; 450: 435-439

编辑 李军亮 电编 何基才

辣椒素受体基因多态性与肠易激综合征的相关性

张志强, 王沁, 王毕娟

■背景资料

由于生活节奏的加快, 以及社会环境因素的改变等诸多因素的影响, IBS的发病率有逐渐上升的趋势, 因严重影响人们的生活质量而日益受到重视, 但其发病原因及发病机制目前还不清楚。

张志强, 王沁, 王毕娟, 兰州大学第一医院消化科 甘肃省兰州市 73000

张志强, 兰州大学硕士在读, 主要从事肠易激综合征的分子机制研究。

作者贡献分布: 张志强与王沁对此文所作贡献均等; 此课题由张志强及王沁共同设计; 研究过程由张志强、王沁及王毕娟操作完成; 研究所用试剂、实验室由王沁提供; 数据分析由张志强与王沁共同完成; 本文写作由张志强、王沁及王毕娟共同完成。

通讯作者: 王沁, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院消化科. chencp@lzu.edu.cn

电话: 0931-8625200-6205

收稿日期: 2009-10-19 修回日期: 2009-11-07

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-12-08

Relationship between TRPV1 gene polymorphism and irritable bowel syndrome

Zhi-Qiang Zhang, Qin Wang, Bi-Juan Wang

Zhi-Qiang Zhang, Qin Wang, Bi-Juan Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Professor Qin Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. chencp@lzu.edu.cn

Received: 2009-10-19 Revised: 2009-11-07

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) gene polymorphism and irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and direct sequence analysis were used to comparatively analyze the polymorphism of the TRPV1 gene in patients with IBS ($n = 73$) fulfilling the Rome III criteria and healthy controls ($n = 65$).

RESULTS: A total of three genotypes were detected in IBS patients and healthy controls: CC, CT and TT. The frequencies of CC genotype and C allele in IBS patients were significantly higher than those in healthy controls (genotype: $\chi^2 = 6.858$, $P = 0.032$; allele: $\chi^2 = 4.174$, $P = 0.041$). A significant difference was found in TRPV1 gene polymorphism between IBS and healthy controls

($P < 0.05$).

CONCLUSION: The TRPV1 gene polymorphism is associated with the development of IBS. The presence of CC genotype and C allele probably increases the susceptibility of individuals to IBS. TRPV1 may be a novel therapeutic target for IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Transient receptor potential vanilloid 1; Restriction fragment length polymorphism

Zhang ZQ, Wang Q, Wang BJ. Relationship between TRPV1 gene polymorphism and irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3514-3518

摘要

目的: 探讨辣椒素受体(transient receptor potential vanilloid-1, TRPV1)基因多态性与肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的相关性。

方法: 以罗马Ⅲ诊断标准纳入病例73例, 正常对照65例, 采用聚合酶链反应限制性酶切片段多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法对研究对象进行TRPV1的基因型和等位基因分析, 并对突变的纯合基因型进行直接测序。

结果: 测出3种TRPV1基因型: CC型、CT型、TT型。IBS组CC基因型的频率明显高于对照组(25 vs 10, $\chi^2 = 6.858$, $P = 0.032$), 等位基因C的频率IBS组明显高于正常对照组(93 vs 67, $\chi^2 = 4.174$, $P = 0.041$), IBS组与对照组之间有统计学差异($P < 0.05$), TT基因型的测序结果与预期相符合。

结论: TRPV1基因多态性可能影响个体对IBS的遗传易感性以及IBS患者的内脏高敏感性, 表现为CC基因型及等位基因C的个体对IBS易感, 他有望成为IBS治疗的一个靶点。

关键词: 肠易激综合征; 辣椒素受体; 限制性酶切片断多态性

张志强, 王沁, 王毕娟. 辣椒素受体基因多态性与肠易激综合征

■同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科

的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3514-3518
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3514.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是最常见的功能性胃肠道疾病,人群中发病率为5%-20%。腹痛及腹部不适为其主要症状,严重影响患者的生活质量^[1-2]。由于受到遗传、炎症、心理等多方面因素共同作用的影响,导致胃肠道功能的易激性改变,表现为引起内脏性疼痛或不适的伤害性刺激的阈值降低,即内脏高敏感性(visceral hyperalgesia, VHL),但确切发病机制目前还不太清楚。辣椒素受体(transient receptor potential vanilloid-1, TRPV1)广泛分布于中枢、外周神经和胃肠道,可以感受热、化学、炎症、机械等伤害性刺激,当TRPV1被激活后,可引起细胞Ca²⁺内流、细胞去极化、钙离子基因相关肽及P物质的释放增加,P物质是重要的神经递质,可以介导VHL的形成。有研究表明TRPV1在VHL的发生中起着重要作用^[3],并且在IBS的肠道黏膜表达明显高于正常患者^[4]。但也有研究表明辣椒素及其类似物姜辣素对5-HT₃和P物质激动剂等在水貂呕吐模型和大鼠异嗜模型的止吐作用,作用机制可能与NK1受体(P物质的受体之一)、5-HT₃受体及信号转导系统调节有关。Abdel *et al*在豚鼠回肠平滑肌的体外试验证明,姜辣素对5-HT₃受体有抑制作用^[5];国内、外多项研究表明,遗传学因素在IBS发病中起着重要作用,对遗传起着决定性因素的基因(如:基因多态性)是研究的热点之一:5-HT及其转运体基因、胆囊收缩素、IL-10等基因多态性与IBS存在相关性^[6-12]。TRPV1基因位于人类17p13染色体,第12外显子有多态性位点(rs_8065080),可以发生C-T错义突变或变异,表现为编码氨基酸的不同。但此位点的多态性是否与IBS有关的报道目前还不多。因此,探索TRPV1基因多态性与IBS的相关性有重要临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2008-09/2009-05到兰州大学第一医院就诊的IBS患者73例,其中男32例,女41例,平均年龄30.1±2.07岁,全部患者均符合罗马III诊断标准^[13-14]。详细询问患者病史,进行全面体格检查,电子结肠镜、X线气钡双重对比造影、超声以及血、尿、粪、血生化等相关检

查排除肠道肿瘤、炎症性肠病、慢性胰腺炎、肠道感染、结肠憩室等因素引起的器质性疾病;吸收不良综合征、甲状腺疾病、糖尿病、药物不良反应引起的便秘或腹泻症状、功能性腹痛、功能性便秘、功能性腹泻等疾病的患者不被纳入。以兰州大学第一医院体检中心经全面体检结果为正常的健康志愿者65例为正常对照,其中男30例,女35例,平均年龄30.2±1.29岁。全部受试者均停用可影响胃肠功能的药物1 wk以上;人淋巴细胞分离液(分离密度为1.077 kg/L)购于天津灏洋生物公司;蛋白酶K购于BBI公司;PCR(Taq)扩增试剂盒(SK2502-N)购于上海生工生物工程公司;限制性内切酶*Tai* I 购于MBI公司(ER-1141);琼脂糖购于BBI公司;DNA Marker(TaKaRa DL500 bp)购于宝生物(大连)有限公司;国产分析纯和实验耗材由兰州大学第一医院中心实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及血液基因组DNA的抽提: 采空腹静脉血2 mL, EDTA抗凝,用人淋巴细胞分离液分离单个核细胞于1.5 mL的离心管中,用苯酚-氯仿法提取血液基因组DNA。

1.2.2 引物设计: 参考SNP数据库信息(rs_8065080),用Primer Premier 5.0软件设计引物, Oligo 6.90软件对引物进行评价,引物序列为:上游引物: 5'-TGT CCT CTG TCC ACC CTC-3';下游引物: 5'-GTT CTC AAG ACG CAT CCC-3',由上海生工生物工程公司合成,引物用缓冲液配成100 μmol/L贮存液, -20℃低温保存,使用前稀释成10 μmol/L。

1.2.3 PCR扩增目的基因: 用PCR扩增试剂盒按如下方法配制反应体系: ddH₂O 14 μL、5× Buffer 5 μL、dNTP 2.5 μL、MgCl₂ 1.5 μL、Taq 酶0.3 μL、模板DNA 1 μL,上、下游引物各1 μL,总反应体系25 μL,按下列程序进行PCR扩增: 94℃预变性5 min、94℃变性30 s、57℃退火30 s、72℃延伸45 s、35个循环,72℃再延伸5 min;取5 μL PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,以DNA Marker(DL500 bp)为参照,在凝胶成像系统下观察扩增的目的基因,片段长度为305 bp。

1.2.4 限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP): 配制酶切反应体系: 灭菌双蒸水18 μL, 10× Buffer R 2 μL, PCR产物10 μL, 限制性内切酶*Tai* I 2 μL, 反应总体系为32 μL, 65℃水浴16 h(酶切过夜), 3%琼脂

■研究前沿

基因多态性与IBS的关系是当前研究的热点,亟待解决的问题是遗传易感性是否与其他相关因素共同在肠易激综合征的发病中发挥作用。

■ 相关报道

Akar *et al* 研究发现 TRPV1 在 IBS 患者肠道的表达明显高于正常对照者, Caterina *et al* 发现体外培养的 TRPV1 基因敲除小鼠对各种有害刺激的反应都明显削弱。

表 1 TRPV1 基因型及等位基因分布 $n(\%)$

分组	基因型			等位基因	
	CC	CT	TT	C	T
IBS 组	25(34.2) ^a	43(58.9)	5(6.9)	93(63.7) ^c	53(36.3)
对照组	10(15.4)	47(72.3)	8(12.3)	67(51.5)	63(48.5)
合计	35(25.4)	90(65.2)	13(9.4)	160(58.0)	116(42.0)

$\chi^2 = 6.858$, ^a $P = 0.032$ vs 对照组基因型; $\chi^2 = 4.174$, ^c $P = 0.041$ vs 对照组等位基因。

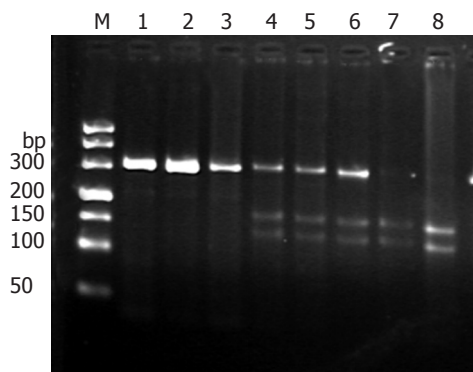


图 1 PCR 结果及限制性酶切电泳图。M: Marker; 1-2: PCR 产物, 大小为 305 bp; 3: TT 基因型; 4-6: CT 基因型; 7-8: CC 基因型。

糖凝胶电泳, 凝胶成像系统下观察, 判断基因型。

1.2.5 DNA 测序分析: 取突变型的 PCR 产物每个样本 50 μ L, 送交上海美季生物公司, PCR 产物经纯化后, 在 ABI-3730XL 测序仪上用双脱氧法进行双向测序分析, 测序结果在 NCBI 网站进行 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 比对分析^[15]。

统计学处理 基因型及等位基因用频数及百分率(%)表示, 运用 SPSS11.0 统计学软件采用 $R \times C$ 表 χ^2 检验对数据进行统计学处理。以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 产物酶切基因分型的琼脂糖凝胶电泳结果 检测出 3 种 TRPV1 基因型, 2 条 DNA 链均存在酶切位点为 CC 型(169 bp、136 bp), 只有一条链存在酶切位点为 CT 型(305 bp、169 bp、136 bp), 酶切位点消失则为 TT 型(305 bp)(图 1)。各基因型以及等位基因的频率及百分率分布见表 1。

2.2 PCR 产物直接测序及其 BLAST 比对结果 测序结果(图 2)与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对结果 TT 基因型的测序结果与 NCBI 比对发现在 -116 位为 T, 与预期的结果相符合。

2.3 基因分型的相关数据统计 与对照组相比, 基

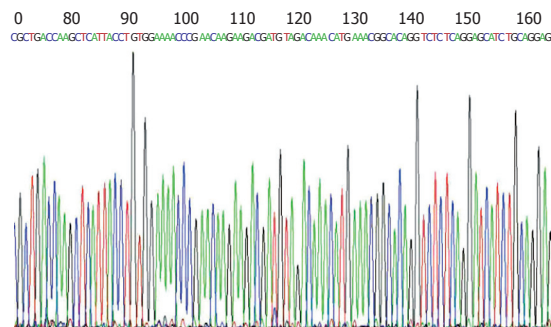


图 2 PCR 产物测序结果图。116 位等位基因为 T。

因型及等位基因差异有统计学意义($\chi^2 = 6.858$, 4.174 , $P = 0.032$, 0.041), 表现为 CC 基因型及 C 等位基因的个体更易患 IBS。

3 讨论

IBS 是最常见的功能性胃肠病, 随着人们生活水平的提高、饮食结构改变以及心理、社会、遗传等因素的影响, IBS 发病率呈上升趋势, 已成为近年来导致消化系统疾病谱变化的主要因素^[16]。

VHL 是 IBS 的重要发病机制, 表现为引起内脏性疼痛或不适的伤害性刺激的阈值降低, 严重影响人们的生活质量, 腹痛成为患者来医院求诊的重要原因之一。但 VHL 的机制目前还不清楚, 可能是由于: (1) 内脏机械性感受器的敏感性改变, VHL 的初级反应部位可能在肠壁的机械性受体, 由肠壁初级传入神经将内脏感觉信息传入中枢; (2) 感觉神经传入异常, 脊髓背角神经元兴奋性升高, 导致伤害性刺激在传入过程中被放大, 脊髓水平的异常改变对 VHL 形成和维持有重要的作用; (3) 中枢对疼痛的阈值降低^[17]。

TRPV1 是 TRP 家族的一类糖蛋白, 由 6 个跨膜蛋白组成的非选择性阳离子通道, 在人体由 839 个氨基酸组成, 相对分子质量为 95 kDa, 广泛分布于脊髓背根及迷走神经的中、小神经元上以及一些非神经组织中如膀胱上皮、肝、胃肠道、肥大细胞等^[3,16]。TRPV1 可以感受瞬时感受

器电位. 当被辣椒素类物质等伤害性刺激激活后, 可引降钙素基因相关肽及P物质的释放, 后者是重要的神经递质, 参与内脏高敏感性的形成. Akar *et al*用免疫组织化学方法对23例IBS患者及22例正常对照的肠黏膜细胞进行研究, 结果发现IBS患者的肠道内TRPV1感觉神经元平均值是正常人的3.5倍, TRPV1高表达与IBS具有相关性, TRPV1是IBS发生的病理生理学机制之一^[4]. 用基因敲除技术在VHL动物模型中也得出相似的结论^[18]. Caterina *et al*成功地培育出敲除VR1基因的小鼠, 体外培养的TRPV1阴性小鼠的初级感觉神经细胞对各种有害刺激的反应都严重削弱^[19], 因此, TRPV1对伤害性刺激的传递起关键作用, 对VHL的发生是必不可少的. 但也有研究表明辣椒素及其类似物姜辣素对5-HT3和P物质激动剂等在水貂呕吐模型和大鼠异嗜模型的止吐作用, 作用机制可能与NK1受体(P物质的受体之一)、5-HT3受体及信号转导系统调节有关; Abdel *et al*在豚鼠回肠平滑肌的体外试验证明, 姜辣素对5-HT3受体有抑制作用^[5], 辣椒素类物质可能存在剂量-效应关系的双向调节作用.

IBS患者存在家族聚集现象以及对双生子的研究说明这遗传因素在IBS发病机制中可能起着重要的作用^[4-6]. 国内外多项研究表明, 5-HT及其转运体基因、胆囊收缩素、IL-10等基因的多态性与IBS有关^[8-12]. TRPV1基因位于17P13染色体^[3]. TRPV1基因第12外显子存在多态性位点, 可以发生C-T变异或突变(rs_8065080), 在蛋白水平上表现为编码的氨基酸不同, 使其编码的氨基酸由异亮氨酸(Ile)变成缬氨酸(Val)^[20], 影响TRPV1的一级结构及空间构型, 使其表现的性质发生改变, 但该位点多态性是否与IBS的发病有关的报道目前还不多见.

当TRPV1等位基因表现为C时, DNA链存在*Tai* I 限制性酶切位点, 当发生突变时则该酶切位点消失, 不能被限制性内切酶切开, 因此, 本试验通过PCR-RFLP方法对该位点进行观察, 结果发现CC基因型的个体对IBS更易感($\chi^2 = 6.858$, $P = 0.032$), C等位基因是IBS发病的一个危险因素($\chi^2 = 4.174$, $P = 0.041$), 而表现为CT, TT基因型的个体2组未见有明显差别. 限制性内切酶可以特异性的识别酶切序列, 同时通过基因测序的方法也印证了试验的可行性和可靠性, 在研究对象入选标准上我们采用了最新的罗马III诊断标准, 保证了试验结果的同质性, 有利于

试验的可重复性. 因此, 我们可以得出结论, 当个体的基因型表现为纯合的CC型, 或等位基因表现为C时, TRPV1基因所表达受体蛋白可能与IBS的VHL有关, TRPV1有望成为治疗IBS的一个作用靶点.

总之, TRPV1基因多态性可能影响个体对IBS的易感性以及IBS患者的VHL. 但由于本试验研究的样本量还不够大, 患者年龄分布偏小, 有待于进行大样本, 广范围的研究, 为探索IBS的分子生物学机制提供试验依据.

4 参考文献

- 1 Maxion-Bergemann S, Thielecke F, Abel F, Bergemann R. Costs of irritable bowel syndrome in the UK and US. *Pharmacoeconomics* 2006; 24: 21-37
- 2 姚健敏, 陈淑洁, 孙蕾民. 浙江省肠易激综合征的流行病学和患者生活质量研究. *中华内科学杂志* 2003; 42: 34-37
- 3 陈敏, 张陆勇, 严明. 辣椒素受体研究进展. *中国临床药理学与治疗学* 2006; 11: 126-130
- 4 Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Walters JR, Anand P, Ghosh S. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* 2008; 57: 923-929
- 5 赵德雪, 杨志宏, 李明, 薛敏, 岳旺. 生姜对呕吐模型水貂止吐作用的研究. *中国药事* 2006; 20: 601-604
- 6 Levy RL, Jones KR, Whitehead WE, Feld SI, Talley NJ, Corey LA. Irritable bowel syndrome in twins: heredity and social learning both contribute to etiology. *Gastroenterology* 2001; 121: 799-804
- 7 Saito YA, Zimmerman JM, Harmsen WS, De Andrade M, Locke GR 3rd, Petersen GM, Talley NJ. Irritable bowel syndrome aggregates strongly in families: a family-based case-control study. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 790-797
- 8 Wang BM, Jiang XZ, Yang YL, Liu WT, Cao XC, Zhao XZ. [A study of interleukin-10 gene polymorphism in irritable bowel syndrome] *Zhonghua Neike Zazhi* 2006; 45: 289-292
- 9 Yeo A, Boyd P, Lumsden S, Saunders T, Handley A, Stubbs M, Knaggs A, Asquith S, Taylor I, Bahari B, Crocker N, Rallan R, Varsani S, Montgomery D, Alpers DH, Dukes GE, Purvis I, Hicks GA. Association between a functional polymorphism in the serotonin transporter gene and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome in women. *Gut* 2004; 53: 1452-1458
- 10 Saito YA, Locke GR 3rd, Zimmerman JM, Holtmann G, Slusser JP, de Andrade M, Petersen GM, Talley NJ. A genetic association study of 5-HTT LPR and GNBeta3 C825T polymorphisms with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 465-470
- 11 Li Y, Nie Y, Xie J, Tang W, Liang P, Sha W, Yang H, Zhou Y. The association of serotonin transporter genetic polymorphisms and irritable bowel syndrome and its influence on tegaserod treatment in Chinese patients. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 2942-2949
- 12 Cremonini F, Camilleri M, McKinzie S, Carlson P, Camilleri CE, Burton D, Thomforde G, Urrutia R, Zinsmeister AR. Effect of CCK-1 antagonist, dexloxiglumide, in female patients with irritable

■应用要点

本文进一步明确了IBS发病的分子学机制, 对IBS的基因诊断、个体化治疗以及临床新药的筛选等有一定意义.

■同行评价

本文探索TRPV1基因多态性与IBS的相关性有重要临床意义,对研究低毒、广谱、多靶点治疗IBS天然新药,促进中医药的科技进步有理论与应用价值。

- bowel syndrome: a pharmacodynamic and pharmacogenomic study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 652-663
- 13 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 肠易激综合征诊断和治疗的共识意见(2007, 长沙). *中华消化杂志* 2008; 28: 38-41
- 14 Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480-1491
- 15 丁六松, 张宇伟. BLAST序列比对与生物医学文献检索. *情报杂志* 2003; 22: 74-75
- 16 张琴, 谭婷婷, 彭燕. 辣椒素对内脏痛觉过敏的影响及其机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3884-3889
- 17 虞阳, 邹多武. 5-羟色胺4受体激动剂(替加色罗)临床应用进展. *中华消化杂志* 2006; 26: 215-216
- 18 Jones RC 3rd, Xu L, Gebhart GF. The mechanosensitivity of mouse colon afferent fibers and their sensitization by inflammatory mediators require transient receptor potential vanilloid 1 and acid-sensing ion channel 3. *J Neurosci* 2005; 25: 10981-10989
- 19 Ro JY, Lee JS, Zhang Y. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. *Pain* 2009; 144: 270-277
- 20 Kim H, Neubert JK, San Miguel A, Xu K, Krishnaraju RK, Iadarola MJ, Goldman D, Dionne RA. Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain* 2004; 109: 488-496

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字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \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 2009-12-08)

原发性食管小细胞癌的研究进展

卢绪菁, 孔颖泽, 王建华

卢绪菁, 孔颖泽, 王建华, 苏州大学附属常州肿瘤医院放疗科 江苏省常州市 213001

作者贡献分布: 本文由卢绪菁与孔颖泽综述; 王建华审核。

通讯作者: 卢绪菁, 主任医师, 213001, 江苏省常州市怀德北路1号, 苏州大学附属常州肿瘤医院放疗科。

luxujing68@yahoo.com.cn

电话: 0519-86868236

收稿日期: 2009-09-21 修回日期: 2009-11-13

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-08

Advances in research of primary small cell carcinoma of the esophagus

Xu-Jing Lu, Ying-Ze Kong, Jian-Hua Wang

Xu-Jing Lu, Ying-Ze Kong, Jian-Hua Wang, Department of Radiotherapy, Changzhou Cancer Hospital, Affiliated to Soochow University, Changzhou 213001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xu-Jing Lu, Department of Radiotherapy, Changzhou Cancer Hospital, Affiliated to Soochow University, 1 Huaide North Road, Changzhou 213001, Jiangsu Province, China. luxujing68@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-21 Revised: 2009-11-13

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-08

Abstract

Primary small cell carcinoma of the esophagus is a rare disease, characterized by aggressive progression. It has a high incidence of metastatic disease at presentation and a poor overall prognosis. Treatment protocols are not well established because of the paucity of cases and a lack of large studies. In this article, we will review the recent advances in the clinical and therapeutic aspects of primary small cell carcinoma of the esophagus.

Key Words: Esophageal cancer; Small cell carcinoma; Surgery; Radiotherapy; Chemotherapy

Lu XJ, Kong YZ, Wang JH. Advances in research of primary small cell carcinoma of the esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3519-3523

摘要

原发性食管小细胞癌是非常少见的食管恶性肿瘤, 近年来食管小细胞癌的发病率似有上升趋势。食管小细胞癌的生物行为、治疗模

式及预后均不同于鳞状细胞癌, 其恶性程度高、预后差, 目前尚无统一的治疗规范。本文就近几年来有关食管小细胞癌的研究进展作一综述。

关键词: 食管癌; 小细胞癌; 手术; 放疗; 化疗

卢绪菁, 孔颖泽, 王建华. 原发性食管小细胞癌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(34): 3519-3523

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3519.asp>

0 引言

食管癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其组织学类型以鳞状细胞癌最为多见, 国内统计多在90%以上, 其他类型少见, 而原发性食管小细胞癌(primary small cell carcinoma of the esophagus, PESC)是非常少见的类型之一, 近年来文献报道PESC的发病率似有上升趋势。至2009年国外所报道的仅300余例^[1], 而国内报道则明显多于国外, 尤其近几年明显增多。PESC的生物学行为、治疗模式、预后均不同于鳞状细胞癌, 其恶性程度高, 预后差, 目前尚无统一的治疗规范。本文就其近几年来有关PESC的研究进展作一综述。

1 流行病学

PESC自1952年McKeown *et al*^[1]首次报道以来, 国外报道已超过300例^[2], 占同期食管癌的0.8%-2.4%, 占同期小细胞癌的2%-5%^[3], 美国估计每年新发病例130-395例^[2]。患者以中老年多见, 男性多于女性, 与鳞癌相当, 为最常见的肺外小细胞癌。Wong *et al*^[4]报道泰晤士癌症登记中心1970-2004年共有1618例肺外小细胞癌, 其中食管小细胞癌最多, 有293例(18%)。我国是食管癌高发国家, PESC的报道例数也远高于国外, 其中报道较多的有中国医科院肿瘤医院宋岩 *et al*^[5]报道了151例, 男114例, 女37例, 年龄32-82(中位年龄59)岁, 占同期食管恶性肿瘤的1.5%。河南省王卫杰 *et al*^[6]报道了105例, 其中男54例, 女51例, 年龄33-75(平均年龄55)岁。河北省郭杨 *et al*^[7]报道89例, 男54例, 女35例, 年龄

■背景资料

PESC的与鳞癌相比有更大的侵袭性, 预后明显比鳞癌差, 患者常死于远处转移或局部复发, 临床分期、体能状况、治疗方式和治疗模式是影响PESC患者预后的独立因素。因此及早发现是提高生存率的关键。食管癌切除再结合化疗或放疗的综合治疗可能会延长患者生存期。

■同行评议者

李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

■研究前沿

PESC发病率低,国内外文献多是病例报告,缺乏大样本的随机对照研究结果,对于治疗规范尚未达成共识。

34-74(中位年龄56)岁,占同期食管恶性肿瘤的2.8%。

2 病理学

2.1 组织学来源 目前国内外较多采用“食管小细胞癌”和“食管小细胞未分化癌”,以前者更为广泛。既往国外使用较多的有燕麦细胞癌、间变性癌、类癌、神经内分泌癌、未分化鳞癌等。

PESC的组织来源目前尚无最终定论,文献报道也众说不一。目前多数学者倾向于认为PESC被神经内分泌标志物所标记,来源于食管黏膜上皮的APUD细胞,属神经外胚叶源性肿瘤;近几年来国内外许多学者认为,PESC与食管鳞、腺癌一样,都来源于食管黏膜的多潜能原始干细胞,为多功能干细胞在致癌因素的作用下恶变后向不同方向分化的结果,多能干细胞大多分化为鳞癌,少数分化为腺癌或PESC^[8-9],这可解释PESC常伴有鳞癌和(或)腺癌成分这一现象。Brenner *et al*^[10]报道62例胃肠道小细胞癌中,其中小细胞癌伴有鳞癌和(或)腺癌成分者为23例,比例高达37.1%,为“小细胞癌可能来自能引起鳞状细胞癌(或)腺癌的同一种多潜能原始干细胞”这一观点提供了有力证据。赵尔增 *et al*^[11]采用光镜观察和免疫组织化学技术对6例PESC肿瘤组织进行了研究也表明PESC具有向上皮和神经内分泌肿瘤双向分化的特性,提示PESC可能来源于食管黏膜的多潜能干细胞。

PESC与小细胞未分化癌的大体类型近似于食管鳞状细胞癌,而PESC与小细胞未分化癌两者的组织形态极为相似,细胞形态多样性,如淋巴瘤细胞样、燕麦细胞样甚或混有大细胞以及灶性鳞癌或腺癌区。因此根据细胞学表现可分为小圆细胞型、燕麦细胞型、基底细胞样型、混合细胞型4个类型^[12]。

2.2 免疫组织化学特征 根据国内外有关PESC或小细胞未分化癌各种抗原表达情况的报道^[13],目前多认为神经元特异性烯醇化酶(NSE)、突触素(Syn)、嗜铬粒-A(CHr-A)和CD56是神经内分泌分化的特异性抗体,但因选用方法以及病例数量所限,而得出的结果也不太一致。王小玲 *et al*^[14]对63例PESC肿瘤组织进行了CK、NSE、CHr-A、Syn和CD56的检测,结果显示CK、NSE、CHr-A、Syn和CD56的阳性率分别为41.3%、36.5%、90.5%、60.3%和50.8%。其中11例只有上皮表达,37例只有神经内分泌表

达,15例既有上皮表达又有神经内分泌表达,其结果表明PESC来源于上皮细胞还是来源于神经外胚叶细胞很难区分,可能的分析是PESC的组织来源于多潜能的干细胞。Lu *et al*^[15]对15例PESC肿瘤组织进行免疫组织化学检测,结果阳性率分别为NSE 100%、Syn 100%、高分子量角蛋白抗体(AE1/AE3)100%、CD56 93.3%、甲状腺转录因子(TTF-1)60%、CgA53.3%、细胞角蛋白单克隆抗体(CK34 β E12)6.7%和细胞角蛋白(CK10/13)0%。Yun *et al*^[16]对21例PESC肿瘤组织进行免疫组织化学检测,结果阳性率分别为Syn 95.2%、CD56 76.2%、TTF-1 71.4%、NSE 61.9%、CgA 61.9%、CK 57.1%、上皮细胞膜抗原(EMA)61.9%和S-100 19.0%。

3 临床表现与诊断

PESC的发病年龄与鳞癌类似,以中老年患者为主,但近年来发病有年轻化趋势。总结国内食管癌高发区近5年发表的病例共671例PESC^[5-7,17-22],其中男467例,女204例,男女比例为2.3:1,年龄32-84(中位年龄55-59)岁;病变位于胸上段(包括颈段)59例,胸中段400例,胸下段212例;X线影像分型为蕈伞型96例(96/354, 27.1%),髓质型141例(39.8%),溃疡型63例(17.8%),斑块型15例(4.2%),腔内型29例(8.2%),缩窄型10例(2.8%)。Ku *et al*^[23]报道斯隆-凯特琳癌症中心22例PESC,其中男18例,女4例,年龄51-73(中位年龄60)岁,病变位于胸上段2例,胸中段1例,胸下段19例。

PESC的临床表现缺乏特异性,以吞咽困难常见,异位神经内分泌症状罕见,病程短。宋岩 *et al*^[15]报道151例患者初发症状有吞咽不顺者占86.1%,胸背疼痛者占32.5%,咽喉疼痛者占23.2%,胸骨后不适者占14.6%,声音嘶哑者占2.6%。李辉 *et al*^[22]报道47例PESC从出现首发症状到初诊时间在0.5-15.5 mo, 70%在1-3 mo。Yun *et al*^[16]报道21例原发食管小细胞癌从出现首发症状到初诊时间在10 d-9 mo,平均时间为2 mo。

PESC的临床症状、X线的影像表现和内窥镜所见与食管鳞癌、腺癌相似,所以只能依靠病理组织学来确诊。但由于术前食管镜取材组织较少,尤其是依赖食管拉网和纤维食管镜毛刷细胞学检查的诊断难度较大,术前食管镜取材普通病理检查误诊率较高。李辉 *et al*^[22]报道术前行食管拉网或纤维食管镜毛刷细胞学检查的36例患者中,仅有4例(11.1%)找到小细胞未分化癌细胞。王卫杰 *et al*^[6]对105例PESC中的65例进

术前检查, 活检确诊为小细胞癌的也仅14例, 活检确诊率仅为21.9%。

有时低分化鳞癌与小细胞癌在光学显微镜下难以区别, 或者为混合型, 因此活检标本的普通病理学检查确诊率也很低, 由于术前得不到准确的病理诊断, 可能会给术前综合治疗带来一定的影响。因此提高PESC术前确诊率需依靠多点活检取材以提高阳性率, 或利用免疫组织化学染色和电镜观察有助于明确诊断。对于确诊为PESC者还应行纤维支气管镜和胸部CT检查以除外小细胞肺癌, 同时胸腹部CT及内镜超声对于术前分期及选择合适治疗方案是必要的, 必要时应行核素扫描以除外远处转移。PESC的恶性程度高, 易发生淋巴结转移和血源性转移, 约40%-60%的患者在就诊时已属广泛期, 应将PESC视为全身性疾病^[23-24]。

因为其高度的恶性和侵袭性, 诊断时大部分患者已有远处转移, 转移脏器以肝脏和肺脏及锁骨上淋巴结转移多见^[10,18-20,23]。也有文献报道就诊时远处转移率并不高, 国内较大数目的病例报告结果表明其远处转移率并不高^[6-7,22], 可能与所报道病例均为手术病例, 有一定选择性有关。

PESC尚无标准分期系统, 可参照2002年美国抗癌协会(AJCC)标准进行TNM临床分期, 或参照VALSG分期分为局限期和广泛期。局限期(LD期): 肿瘤局限在食管或食管周围, 无淋巴结转移或有区域淋巴结转移(相当于T1-4N0-1M0); 广泛期(ED期): 肿瘤局限期范围以外(如肝、骨、远处淋巴结转移, 相当于任何T、任何N、M1)。国内报道^[5-7,18-19]361例可手术的PESC分期为I期36例, IIa期70例, IIb期72例, III期159例, IV期30例; 其中151例同时进行VALSG分期为局限期(LD)138例, 广泛期(ED)13例。Ku *et al*^[23]报道美国MSKCC中心22例PESC, 其中LD期18例, ED期4例, TNM分期则为I期1例, II/III期10例, IVa期3例, IVb期8例, 其中8例IVb期分别发生肝脏、远处淋巴结、肺、肾上腺、骨及骨髓转移; Casas *et al*^[25]报道199例PESC, 其中局限期93例, 广泛期95例, 另11例未能分期。

4 治疗及预后

由于PESC发病率低, 国内外文献多是病例报告, 缺乏大样本的随机对照研究结果, 对于治疗规范尚未达成共识。考虑到PESC的组织学表现, 基

因改变和高度侵袭性的生物学特点与肺的小细胞癌相似, 对他的治疗多借鉴小细胞肺癌的治疗模式, 强调了化疗在PESC治疗中的地位。

近年来, 对局限期PESC的治疗倾向于采用手术治疗并辅助化疗, 而且辅助化疗的作用尤为重要。众多文献多认为包括手术治疗在内的综合治疗, 疗效明显好于单纯放疗或化疗, 或放化疗结合。国内曾报道以手术为主的综合治疗者的最长生存期为300 mo, 远远超出了国外1例综合治疗后106 mo的生存期。Lieberman *et al*^[26]报道术后化疗PESC患者的中位生存时间为28 mo。Ku *et al*^[23]报道美国MSKCC中心对于LD期PESC采用EP方案诱导化疗和同期放化疗DT 50.4 Gy/28 fx, 食管切除术仅作为挽救性治疗方案, 取得中位生存期22.3 mo(6 mo-11.2年)的疗效, 其中1例最初诊断为低分化腺癌的IVa期食管癌伴有腹腔多处淋巴结转移在紫杉醇新辅助化疗3周期后出现进展, 行姑息性食管切除术, 术后病理证实为PESC, 术后进行了6周期DDP+VP-16化疗, 52 mo后出现腹腔转移, 活检病理为小细胞癌, 采用DDP+irinotecan化疗1周期后仍然进展, 改用DDP+VP-16化疗结合同期放疗DT 45 Gy/25 fx后达到完全缓解(CR), 生存期达11.2年及复发后5.5年。Aoyama *et al*^[27]则报道1例胸中段PESC采用5-FU+DDP诱导化疗后进行食管切除术, 术后74 mo随访无复发。宋岩 *et al*^[5]报道46例局限期患者根治性切除术后未行辅助治疗者中位生存期9 mo, 52例行辅助治疗者(辅助化疗42例, 辅助放疗3例, 辅助化疗加放疗7例)中位生存期13.4 mo, 有辅助治疗者生存期比无辅助治疗者明显延长($P = 0.029$)。另有学者^[28]则认为对于无脏器转移的原发食管小细胞癌, 应采用已成为局限期小细胞肺癌标准治疗模式的化疗、放疗(同步或先化疗)综合治疗方案, 手术应限于对放、化疗不敏感者。放疗靶区应包括食管肿瘤和区域淋巴引流区照射, 根治剂量 ≥ 60 Gy, 预防剂量为40-50 Gy。化疗方案则参照小细胞肺癌的化疗方案, 多采用含铂类药物的化疗方案如EP方案, 但是标准方案、化疗的时限尚无定论。Yamashita *et al*^[29]报道日本9例局限期PESC采用EP方案化疗4周期并放疗50 Gy, 5例治疗后完全缓解, 3年OS为55.6%, 取得与SCLC相同的效果。

对于广泛期患者, 多数采用单一化疗, 但是缓解期短, 未能提高生存率, 而采用综合治疗可

■ 相关报道

宋岩 *et al*报道46例局限期患者根治性切除术后未行辅助治疗者中位生存期9 mo, 52例行辅助治疗者(辅助化疗42例, 辅助放疗3例, 辅助化疗加放疗7例)中位生存期13.4 mo, 有辅助治疗者生存期比无辅助治疗者明显延长($P = 0.029$)。Yamashita *et al*报道日本9例局限期PESC采用EP方案化疗4周期并放疗50 Gy, 5例治疗后完全缓解, 3年OS为55.6%, 取得与SCLC相同的效果。

■应用要点

本文对PESC的流行病学特点、病理学特点、临床表现和治疗进行了较全面的综述,对今后的研究方向提出新的见解。

能改善生存期。Ku *et al*^[23]认为最常用的化疗方案为EP方案,其他较为常用的药物为紫杉醇及依立替康,8例广泛期PESC的中位生存期为8.5 mo(1.5 mo-2.2年)。Mizui *et al*^[30]报道1例59岁的PESC并纵隔淋巴结转移、胰腺及肝脏多发转移患者采用CDDP+CPT-11化疗5周期化疗后出现胰腺周围淋巴结转移,改用卡铂和足叶乙甙二线治疗,生存期13 mo。Brenner *et al*^[31]建议同期或序贯放化疗时放疗的剂量为DT 45-50 Gy,分割剂量为1.8-2.0 Gy/d或超分割照射45 Gy,分割剂量为1.5 Gy,每日2次。单纯放疗国外很少使用,国内也是如此。与肺小细胞癌不同的是,PESC发生脑转移的几率较低,仅为1%^[23],是否需要预防性全脑放疗还需进一步研究。

PESC的与鳞癌相比有更大的侵袭性,预后明显比鳞癌差,患者常死于远处转移或局部复发,临床分期、体能状况、治疗方式和治疗模式是影响PESC患者预后的独立因素。因此及早发现是提高生存率的关键。食管癌切除再结合化疗或放疗的综合治疗可能会延长生存期。

5 结论

PESC是非常罕见的食管恶性肿瘤,近年来发病率似有上升趋势,其生物学行为,治疗模式,预后均不同于鳞状细胞癌,他的恶性程度高,预后差,患者常死于远处转移或局部复发,及早发现是提高生存率的关键,治疗多采用以手术为主的综合治疗。

6 参考文献

- McKeown F. Oat-cell carcinoma of the oesophagus. *J Pathol Bacteriol* 1952; 64: 889-891
- Walenkamp AM, Sonke GS, Sleijfer DT. Clinical and therapeutic aspects of extrapulmonary small cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 228-236
- van der Heijden HF, Heijdra YF. Extrapulmonary small cell carcinoma. *South Med J* 2005; 98: 345-349
- Wong YN, Jack RH, Mak V, Henrik M, Davies EA. The epidemiology and survival of extrapulmonary small cell carcinoma in South East England, 1970-2004. *BMC Cancer* 2009; 9: 209
- 宋岩, 王绿化, 赫捷, 王金万. 151例食管小细胞癌的治疗与预后分析. *癌症* 2009; 28: 303-307
- 王卫杰, 周福有, 宋清荣, 苏文中, 耿明飞, 崔东海. 原发性食管小细胞未分化癌105例外科治疗. *临床外科杂志* 2004; 12: 650
- 郭杨, 王瑞, 姚计方, 张择峰, 高峰, 王增林. 原发性食管小细胞癌89例临床分析. *中国综合临床* 2005; 21: 905-907
- Walenkamp AM, Sonke GS, Sleijfer DT. Clinical and therapeutic aspects of extrapulmonary small cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 228-236
- Frazier SR, Kaplan PA, Loy TS. The pathology of extrapulmonary small cell carcinoma. *Semin Oncol* 2007; 34: 30-38
- Brenner B, Shah MA, Gonen M, Klimstra DS, Shia J, Kelsen DP. Small-cell carcinoma of the gastrointestinal tract: a retrospective study of 64 cases. *Br J Cancer* 2004; 90: 1720-1726
- 赵尔增, 张建中, 张铭, 景青苹, 郑燕华. 食管小细胞癌的临床病理及免疫组织化学研究. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1183-1185
- 王士杰, 王其彰. 食管癌与贲门癌. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 46
- Johnson PW, Joel SP, Love S, Butcher M, Pandian MR, Squires L, Wrigley PF, Slevin ML. Tumour markers for prediction of survival and monitoring of remission in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1993; 67: 760-766
- 王小玲, 刘爽, 吴国祥, 孟宪利, 郭明, 杨会钗. 食管小细胞癌的临床病理分析. *中国肿瘤临床* 2004; 31: 65-68
- Lu J, Xue LY, Lu N, Zou SM, Liu XY, Wen P. Superficial primary small cell carcinoma of the esophagus: clinicopathological and immunohistochemical analysis of 15 cases. *Dis Esophagus* 2009 Jun 9. [Epub ahead of print]
- Yun JP, Zhang MF, Hou JH, Tian QH, Fu J, Liang XM, Wu QL, Rong TH. Primary small cell carcinoma of the esophagus: clinicopathological and immunohistochemical features of 21 cases. *BMC Cancer* 2007; 7: 38
- 赵献军, 刘志才, 赵献云, 杨增周, 管福顺, 郭建庄, 侯建国. 45例食管小细胞癌治疗及预后分析. *中国肿瘤* 2007; 16: 81-82
- 邹明雷, 左凤霞, 徐静. 50例原发性食管小细胞癌的临床分析. *中国医药导刊* 2008; 10: 1167-1168
- 朱江, 何金涛, 李强. 50例原发性食管小细胞癌的临床特点和综合治疗. *中国肿瘤临床* 2007; 34: 444-446
- 封巍, 王准, 郑晓, 刘冠, 徐裕金. 67例食管小细胞癌临床分析. *浙江医学* 2007; 29: 488-489
- 赵华锋, 赵锡江, 唐鹏, 马明全, 王世江. 原发性食管小细胞癌的诊疗及预后(附67例报道). *天津医科大学学报* 2007; 13: 387-389
- 李辉, 刘曙光, 刘希斌, 张百江, 张为迪. 原发性食管小细胞癌47例预后分析. *肿瘤* 2009; 29: 180-183
- Ku GY, Minsky BD, Rusch VW, Bains M, Kelsen DP, Ilson DH. Small-cell carcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction: review of the Memorial Sloan-Kettering experience. *Ann Oncol* 2008; 19: 533-537
- Brenner B, Tang LH, Shia J, Klimstra DS, Kelsen DP. Small cell carcinomas of the gastrointestinal tract: clinicopathological features and treatment approach. *Semin Oncol* 2007; 34: 43-50
- Casas F, Ferrer F, Farrús B, Casals J, Biete A. Primary small cell carcinoma of the esophagus: a review of the literature with emphasis on therapy and prognosis. *Cancer* 1997; 80: 1366-1372
- Lieberman MD, Franceschi D, Marsan B, Burt M. Esophageal carcinoma. The unusual variants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108: 1138-1146
- Aoyama T, Saeki H, Fujisawa J, Matsukawa H, Rino Y, Masuda M. [A long-term recurrence-free survivor after chemotherapy with 5-FU plus CDDP and surgery for small cell carcinoma of the esophagus] *Gan To Kagaku Ryoho* 2009; 36: 637-640
- Lü JM, Liang J, Wang JW, He J, Xiao ZF, Zhang HX, Chen DF, Feng QF, Wang LH. [Clinical analysis of

- 126 patients with primary small cell carcinoma of the esophagus] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2009; 31: 121-125
- 29 Yamashita H, Nakagawa K, Asari T, Murakami N, Igaki H, Okuma K, Ohtomo K. Concurrent chemoradiation alone with curative intent for limited-disease small-cell esophageal cancer in nine Japanese patients. *Dis Esophagus* 2009; 22: 113-118
- 30 Mizuiri H, Hihara J, Okada M. [CDDP+CPT-11 therapy is useful for stage IVb esophageal small cell carcinoma] *Gan To Kagaku Ryoho* 2009; 36: 831-834
- 31 Brenner B, Tang LH, Klimstra DS, Kelsen DP. Small-cell carcinomas of the gastrointestinal tract: a review. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2730-2739

■同行评价

本综述内容新颖, 全面详实地反映了原发性食管小细胞癌的研究进展, 可提高读者对PESC的认识。

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 2009-12-08)

砷在肝脏中的代谢及其生化指标影响的研究进展

刘洋, 吴君

■背景资料

慢性砷中毒对肝脏的影响是多方面的, 临床上暴露相同浓度无机砷但症状却不同的患者可能与砷代谢物种类、比例及量有关, 而涉及氧化还原和甲基化的因素一定影响砷在体内的代谢过程, 进而影响砷的毒性表达. 对于砷代谢的分子生物学方面的深入研究, 仍然有很多工作值得去做.

刘洋, 吴君, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

国家自然科学基金资助项目, No. 30471592

中国肝炎防治基金会“王宝恩肝纤维化研究基金”资助项目, No. 20070013

作者贡献分布: 此课题的总设计与指导由吴君提供; 论文写作由刘洋完成.

通讯作者: 吴君, 教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院感染科. wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6774146 传真: 0851-6774146

收稿日期: 2009-09-18 修回日期: 2009-11-09

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-08

Advances in research on the metabolism of arsenic in the liver and its effects on hepatic biochemical parameters

Yang Liu, Jun Wu

Yang Liu, Jun Wu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471592; and the “Wang Bao-En Liver Fibrosis Research Foundation” from China Foundation for Hepatitis Prevention and Control, No. 20070013

Correspondence to: Professor Jun Wu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wuwuj@21cn.com

Received: 2009-09-18 Revised: 2009-11-09

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-08

Abstract

Arsenic exposure may induce different types of hepatic injury, such as liver fibrosis, cirrhosis and even liver cancer. The pathogenesis of arsenic exposure-induced remains unclear. Until now, there is no well-established theory to explain it. In this article, we summarize the changes in biochemical parameters in the liver injured by arsenic exposure and reviews the advances in research on the pathogenesis of arsenic toxicity.

Key Words: Arsenic; Metabolism; Liver; Biochemical parameters

Liu Y, Wu J. Advances in research on the metabolism of arsenic in the liver and its effects on hepatic biochemical parameters. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3524-3529

■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

摘要

砷暴露可致多种形式的肝损伤, 如肝纤维化、肝硬化, 进一步发展成肝癌, 其致病机制仍在研究探讨中, 迄今尚无完善成熟的理论解释. 本文综述了砷致肝损伤后相关生化指标的变化, 旨在对砷中毒机制的研究和进展作进一步探讨.

关键词: 砷; 代谢; 肝脏; 生化指标

刘洋, 吴君. 砷在肝脏中的代谢及其生化指标影响的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(34): 3524-3529
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3524.asp>

0 引言

砷暴露可引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌, 严重危害人体健康. 本文从生物化学角度全面综述了砷在肝脏中的代谢过程及影响, 对砷致肝损伤的临床诊断、防治监测等有积极作用.

1 砷蓄积

肝脏是砷的蓄积器官, 动物研究表明, 慢性砷暴露大鼠肝组织的砷含量且与暴露浓度呈正相关. 随着染毒程度及染毒时间的延长, 各亚细胞器中砷浓度不断增加, 其中尤以微粒体和线粒体中砷浓度增加最快, 到染毒后期砷浓度最高. 因为经超速离心后得到的微粒体含有丰富的血红素铁蛋白及其他蛋白质和酶类, 而砷对血红素生物合成中各种巯基酶具有高度的亲和力, 能生成稳定的络合物, 从而导致微粒体中出现高浓度砷. 肝细胞中微粒体是外来化学物的代谢场所, 微粒体中砷含量的大量增加, 应与砷在微粒体中的代谢有关^[1]. 杨瑞瑛 *et al*^[2]用亚砷酸钠(NaAsO_2)诱导出大鼠亚急性砷中毒模型, 显示中毒组大鼠肝脏中各亚细胞组分中砷的含量均显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), 在中毒组肝脏亚细胞中的浓度遵循: 微粒体 > 细胞液 > 线粒体 > 细胞核.

2 砷在肝内的代谢

砷通过饮用高砷水、职业性接触和燃高砷煤污

染等途径经呼吸道、皮肤、胃肠道吸收进入体内后, 主要在肝脏中进行甲基化代谢, 可从多方面影响肝细胞. 目前, 对无机砷(iAs)进入体内在肝脏发生生物转化的基本过程已基本清楚. iAs进入机体后, 在红细胞内被砷酸盐还原酶从 iAs^{5+} 还原 iAs^{3+} , 然后被肝细胞摄取, 在甲基转移酶的催化下生成单甲基砷酸(MMA^{5+}). 生成的 MMA^{5+} 又能被 MMA^{5+} 还原酶还原成为单甲基亚砷酸(MMA^{3+}), 然后 MMA^{3+} 进一步被甲基化成为二甲基砷酸(DMA^{5+}), 两步甲基化反应均是以S-苜甲硫氨酸(S-Adenosyl-l-methionine)为甲基供体. 进入体内的砷及其代谢产物主要经过胆汁和尿液排出体外. 其外排机制中, 多药耐药相关蛋白(MRP)起着重要的作用^[3-4], MMA 还原酶是砷代谢整个过程中的限速酶. 用Chang人肝细胞检测了各种形态砷的相对毒性, 发现毒性大小顺序为 $MMAIII > iAsIII > iAsV > MMAV = DMAV$ ^[5].

3 砷对肝脏的生化指标的影响

3.1 非特异性指标改变

3.1.1 含巯基酶: 巯基(-SH)是许多酶特别是氧化还原酶和转移酶类的活性中心和必须基团, 是构成酶蛋白的辅基, 是辅酶之一, 参与体内多种代谢活动, 具有重要生物学作用. 研究已证实, 砷与-SH有很强的亲和力, 砷与砷化物首先与酶中的-SH结合, 使酶活性受到抑制, 严重干扰酶的生理功能、结构与代谢. 受影响的重要酶系统有丙酮酸氧化酶、丙酮酸脱氢酶、磷酸酯酶、细胞色素氧化酶、脱氧核糖核酸聚合酶等, 直接影响细胞的代谢、氧化过程、染色体结构的改变和核分裂等, 导致肝细胞损伤, 造成肝脏组织的损害, 从而导致机体的一系列代谢紊乱^[6]. 丙酮酸是糖代谢的中间产物, 糖原或葡萄糖需经过一系列磷酸化的步骤首先形成丙酮酸, 才能进一步氧化分解. 丙酮酸氧化酶是含双巯基的酶, 作用是催化丙酮酸氧化脱羧生成乙酰CoA, 进入三羧酸循环. 刘起展 *et al*^[7]研究显示, 砷染毒和氟砷联合染毒在6和12 mo均引起全血丙酮酸含量显著升高. 已有报道, 接触As(III)的各组织中反映三羧酸循环强度的琥珀酸脱氢酶活性受到抑制^[6], 且砷中毒病区人群的血ATP含量下降, 提示在慢性砷中毒患者体内三大物质代谢的共同通路-三羧酸循环是处于抑制状态, 可能与丙酮酸氧化酶受到抑制, 丙酮酸不能进一步氧化使血液中丙酮酸增加, 影响细胞正常

代谢有关^[8]. 乳酸脱氢酶(LDH): LDH被公认是细胞膜损伤的敏感且特异指标, 其分子半胱氨酸残基上的-SH表现其活性. 氧自由基大量产生时, 可与酶类结合影响酶的活性. 尤其是自由基与-SH的亲合性较高, 故含有-SH的酶受影响较大^[9]. 砷对LDH活性的影响报道不一, 有人认为砷进入体内后, 可通过LDH上的巯基结合而直接抑制LDH的活性, 从而干扰细胞能量代谢^[10]; 也有体外实验中, 随心脏灌注液中砷浓度的增加, LDH活性逐渐增加^[11]. 陆春伟 *et al*^[12]研究发现砷病区非地砷病患者血清中的LDH活性显著升高, 病区的地砷病患者LDH活性显著降低. 有报道称染毒动物细胞质中砷含量与肝组织LDH同工酶LDH5之间存在明显正相关^[11]. 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px): GSH-Px是体内广泛存在的一种催化过氧化物分解的含-SH抗氧化酶, 他以还原型谷胱甘肽(GSH)作为受氢体, 清除体内有害的过氧化物, 阻断脂质过氧化链反应^[12]. 研究发现, 砷中毒病区非患者组全血中的GSH-Px活性显著降低, 且随着中毒程度的加重而下降; GSH-Px mRNA在 iAs^{3+} 组和 iAs^{5+} 组中均呈低水平表达; GSH-Px与尿砷呈负相关. 表明GSH-Px也是反映砷对人体作用的敏感指标^[13-15]. 其机制推测可能是砷及其代谢产物与该酶活性中心的巯基大量结合, 或与其底物GSH结合而使其大量消耗, 使其抗氧化活性降低.

3.1.2 脂质过氧化影响: 砷及其甲基化代谢产物均可诱发脂质过氧化反应(lipid peroxidation reaction, LPR), 产生多种自由基和非自由基产物, 引起细胞功能紊乱; 或直接攻击细胞造成损伤并产生大量活性氧自由基引发脂质过氧化(lipid peroxidation, LPO)反应, 同时机体动员体内的抗氧化物质清除自由基, SOD、GSH-Px等抗氧化物数量或活力逐渐消耗, 导致机体氧化与抗氧化系统平衡紊乱. SOD: SOD是能够有效清除超氧化物阴离子自由基的一类极重要的抗氧化酶. 研究显示, 砷可导致小鼠肝、肾组织中SOD活性下降; 砷对家兔、小鼠全血中SOD活力的影响, 不论急性实验还是亚慢性实验, 均表现为抑制作用; 砷也可明显抑制人体中SOD活力^[16-17]. -S-S-是构成SOD空间构象的主要结构, 砷对S及含S的化合物具有高度的亲和力^[18], 因此其活力的降低可能与砷破坏了SOD的-S-S-, 导致其分子构象发生改变有关. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 为SOD的主要辅基, 其含量的多少直接影响SOD活力的发挥, 因此砷也可能通过干预SOD的酶蛋白部分

■研发前沿

目前对与砷中毒引起的基因方向的研究仍处在初级阶段, 实验室检验及临床诊断都还需不断研究和完善, 许多理论和推测都仅在体外实验获得成功, 但是在体内研究方面, 尚缺乏报道.

■相关报道

刘起展 *et al* 研究显示, 砷染毒和氟砷联合染毒在6和12 mo均引起全血丙酮酸含量显著升高. 陆春伟 *et al* 研究发现砷病区非地砷病患者血清中的LDH活性显著升高, 病区的地砷病患者LDH活性显著降低.

与金属离子(Cu^{2+} 、 Zn^{2+})的结合而抑制其活性的发挥^[19]. GSH: GSH是体内一种重要的抗氧化剂, 是GSH-Px和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的特有底物, GSH的解毒功能主要是通过这两种酶来完成的, 从而保护细胞免受自由基的毒性作用. 另一方面, GSH也可以直接与高活性的自由基反应, 不需要酶的催化. 多次体外研究和人群调查发现砷暴露后全血中GSH结果并不一致, 提示砷对GSH含量的影响较为复杂, 可能与砷接触剂量、接触时间及动物种属等有关^[20]. GSH还参与 As^{5+} 、 MMA^{5+} 等还原为 As^{3+} 和 MMA^{3+} , 能与 iAs^{3+} 及其中间代谢产物形成各种砷-GSH复合物, 并加速砷的甲基化反应, 因而GSH对于无机砷及其中间代谢产物的氧化还原和甲基化过程具有十分重要的作用^[21]. 丙二醛(MDA): MDA为砷的代谢产物之一. 已有研究, 砷中毒病区人群肝组织中LPO及代谢产物MDA水平增加, 血GSH-Px活力比对照区显著降低; 血清MDA显著升高, 且砷接触时间长短与人体内MDA的含量呈正向量-效关系^[14,22-24]. 许多资料表明, 细胞内GSH含量的降低会进一步加重体内、外实验中砷的细胞毒性, 从而造成一种因果恶性循环^[21]. 因此推测MMA可能通过影响GSH的正常代谢而改变整个砷的代谢过程.

3.2 肝损指标的变化 血清总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)是反映肝脏功能的重要的指标, 均在肝脏中合成. 砷中毒患者的血清中两者含量较正常对照组明显降低, 提示长期砷接触可使肝脏的合成功能障碍^[24].

丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)是反映肝细胞的炎症损伤的重要指标. 染砷鼠肝损伤模型研究显示, 鼠血清ALT和AST水平升高可反映肝细胞的炎症损伤程度^[25-26]. 砷致肝损伤人群的肝功能调查研究显示, ALT和AST活性高于临床正常参考值, 提示砷对肝脏造成损害, 其损害程度还可能随着砷作业工龄的延长而不断加重^[27].

胆碱酯酶(CHE)是慢性肝损伤时的敏感指标, 当肝细胞暴露于砷后, 多种机制引起肝细胞受损(砷直接毒性、甲基化代谢产物引起损伤、脂质过氧化机制等), 均可影响CHE的合成, 导致血清CHE活性的降低^[28].

γ -谷氨酰转氨酶(GGT)主要来源于肝脏, 分布于肝细胞胞质和肝内胆管上皮细胞, 是反映肝细胞损害的血清酶类, 对肝内胆管阻塞性肝病有较高灵敏度和特异性. 当肝内合成亢进或

胆汁排出受阻时, 血清中GGT升高^[29-30]. 在对砷中毒肝损伤患者的研究中, 血清GGT有不同程度的升高. 杨大平 *et al*^[27]应用生化放射免疫法检测燃煤型砷中毒患者肝损伤的早期检测指标时中、重度砷中毒患者血清GGT、血管内皮素(ET)水平随病情加重呈逐渐升高的趋势.

血管内皮细胞可以分泌多种舒缩血管因子, 一氧化氮(NO)和血管内皮素(ET)就是其中一对最为重要的舒缩因子. 他们相互作用保持动态平衡, 维护血管基础张力并减少白细胞和血小板黏附和聚集. 一旦平衡失调, 将引起血管内皮细胞损伤. 在燃煤性砷中毒患者血清ET/NO的检测及血流变学等指标的观察实验中, 轻、中、重度组ET均呈上升趋势, 差异有统计学意义, 同时伴有脱落的内皮细胞数量增加^[9,27], 提示慢性砷中毒过程中存在血管内皮细胞损伤. 许多研究表明, ET可能是介导肝损伤的重要介质之一, 肝硬化(LC)伴腹水患者血清ET水平明显升高^[30]. 既往研究显示不同于饮水型和贵州燃煤型砷中毒使NO含量下降, 推测砷通过损伤人类血管内皮细胞、抑制谷胱甘肽等抗氧化酶的活性以减少NO生成.

胆汁酸(SBA)对检查各类肝硬化的灵敏度很高, 可反映肝损伤、肝脏排泄功能和门腔分流3方面的综合情况. 健康正常人空腹SBA含量很低, 一般在 $5 \mu\text{mol/L}$ 以下, 在肝胆疾病时则含量明显上升. 燃煤型砷中毒患者血清研究发现^[27], 轻中重度中毒组SBA和中、重度中毒组GGT、ET水平均显著高于对照组, 差异有显著性, 提示SBA对检查燃煤型砷中毒肝损有较高的敏感性.

3.3 砷致肝纤维化的指标改变

3.3.1 肝组织病理改变: 大量染砷动物模型及砷暴露肝损伤患者的肝组织病理结果均显示, 肝细胞有不同程度的变性、坏死、再生, 汇管区少许纤维增生, 纤维条索形成^[31-32]肝组织电镜观察结果示, 肝细胞内细胞器有所减少, 可见大量微丝和细胞内胶原纤维, 肝细胞间胆小管增多, 管腔明显扩张, 管壁增厚并有较多微丝环绕, 胆小管周围及肝细胞间桥粒连接增多, 肝血窦扩张, 狄氏间隙增宽, 并出现假狄氏间隙, 巨噬细胞内溶酶体增多, 肝细胞间可见较多胶原纤维, 并可见淋巴细胞攻击肝细胞现象. 肝损伤程度与砷的价态及蓄积量有关, iAs^{3+} 损伤作用强于 iAs^{5+} ^[33].

3.3.2 反映肝纤维化的指标: 透明质酸(HA)是评

价肝细胞损害和肝纤维化相对最敏感的生物标志物。张爱华 *et al*^[34]研究发现, 砷中毒患者血清HA在各病例组均明显高于对照组。机制可能是由于染砷致肝细胞发生坏死及炎症刺激, 肝星状细胞对其合成增加; 另一方面可能是由于肝血窦毛细血管化、肝血窦内皮细胞受损伤导致肝脏对血清中的HA摄取和降解减少所致。

纤维连接蛋白(FN)和IV型胶原等共同组成基底膜的成分。肝纤维化时, 肝组织中细胞型FN水平明显增加, 而血清FN水平明显下降。张碧霞 *et al*^[35]对146名砷中毒患者血清中FN进行检测, 发现中、重度组FN水平较对照组低, 差异有显著意义。

层黏蛋白(LN)是细胞外间质中的一种非胶原性结构糖蛋白, 主要存在于基底膜。目前证实血清LN含量对及时判断慢性肝病的纤维化形成情况有重要意义。张碧霞 *et al*^[35]实验发现中、重度组砷中毒患者血清的LN水平明显高于对照组, 差异有显著意义。

III型前胶原氨基端前肽(PIIIP)升高反映的是肝脏增生活跃, 对肝纤维化程度的判定主要在于动态观察PIIIP水平、IV型胶原(CIV)的含量升高反映了肝血窦基底膜的更新率加快。PC-III、CIV在有明显肝损害的砷中毒病例组中明显高于对照组, 且与尿砷、发砷的含量存在明显剂量-效应关系^[34]。说明慢性砷中毒所致的肝纤维化是机体对于持续肝实质损伤的一种代偿修复反应, PIIIP和CIV可作为砷中毒致明显肝损伤后检测指标和肝纤维化疗效判断的评估指标, 在病程中、后期诊断中有较确切价值。有助于动态了解砷致肝损害的发生发展, 对临床上的早期诊断和预后判断具有实用价值。

I型胶原(Col I)和III型胶原(Col III)是构成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要成分, 两者是常用于评估ECM沉积的重要指标。砷模型研究中发现, Col I mRNA、Col III mRNA在砷暴露小鼠肝组织中高表达^[33,36-37]。说明肝脏受到砷所致的慢性损伤时, 肝脏ECM分泌和降解失衡, 使ECM在肝脏中过多沉积, 最终导致肝纤维化和肝硬化。

肝脏ECM的代谢主要由基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及基质金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)共同调节。MMP促进ECM的降解, 其血清水平可估计肝内纤维降解情况。MMP-8主要作用是分解I型胶原, 有研究^[33]显

示MMP-8 mRNA在砷中毒小鼠肝组织中表达降低, 表明ECM降解减少, 长期暴露于砷环境可导致ECM在肝脏中过度沉积, 最终形成肝纤维化。TIMPs通过抑制MMP活性阻止ECM的降解, 慢性肝病患者血清MMP-1活性随肝病进展逐渐降低, 与肝组织纤维化程度呈负相关; 而血中TIMP-1水平升高, 并与肝纤维化程度密切相关。

3.4 细胞因子(cytokines, CK)类 CK是一类有免疫活性的小分子多肽。能调节多种细胞产生生理效应, 在异常情况下也可导致病理反应。

TNF- α 、IL-6、IL-1 α 、 β 等均属促炎性细胞因子, 与各种病因所致肝损伤、肝纤维化、LC的发生机制相关。多项研究表明TNF- α 、IL-6在砷中毒患者或模型肝组织和血清中的表达随病情的加重而升高^[33,38]。机制可能是砷作为一种原浆性毒物进入人体后, 刺激肝脏Kupffer细胞过度分泌TNF- α 、IL-6等因子, 使血清中TNF- α 、IL-6增高。TNF- α 大量产生加速了肝细胞的崩解, 并诱导IL-6等细胞因子的产生, 从而促进肝内炎症反应, 造成细胞因子TNF- α 、IL-6急剧增多的恶性循环。另一方面, TNF- α 还能激活I、II、III型胶原, 刺激ECM的合成与分泌增多。同时, 肝细胞损伤后对细胞因子清除率低, 造成IL-6增高。IL-6还可抑制胶原酶活性, 减少胶原的降解, 导致肝胶原沉淀, 促进肝纤维化的形成, 最终导致肝硬化的发生^[39]。

细胞因子如TNF- α 、IL-1等是促进细胞凋亡的诱导因素, 但这些因素并不直接引起细胞凋亡, 而是通过一定的信号传递方式激活生存与死亡的相关基因***bcl***、***bax***、***p53***、***Fas***、***c-fos***等, 然后将信号传递到核内切酶, 执行死亡功能^[40]。研究发现, 砷可通过促发LPO、TNF介导及激发的caspase途径引起细胞凋亡。采用免疫组织化学法对燃煤型砷中毒病区25例砷中毒肝损伤患者肝组织凋亡相关基因的研究发现, 砷可能通过上调凋亡基因蛋白***Fas***/***FasL***和***bcl-2***家族中促凋亡蛋白***Bax***的表达而启动肝细胞的胞内凋亡信号传导途径, 导致肝细胞凋亡增加^[41]。

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)能够强烈刺激肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的增殖和迁移, 促使其胶原的产生和沉积, 并诱导HSC合成转化生长因子(transforming growth factor, TGF)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)等细胞因子, 在肝纤维化的发生和发展中作用非常重要。欧兵 *et al*^[42]砷致肝纤维化发生机制的研

■应用要点

本文从生物化学角度全面综述了砷在肝脏中的代谢过程及影响, 对砷致肝损伤的临床诊断、防治监测等有积极作用。

■同行评价

本文较详细地阐述了砷对肝细胞损伤的机制,有较好的理论价值和参考意义。

究课题组,用高砷水自由饮用的方式,在小鼠10 mo小鼠肝组织中发现肝纤维化形成相关因子PDGF在肝组织中高表达。推测砷致肝脏受损时,巨噬细胞、血小板、浸润的炎症细胞、肝窦内皮细胞、肝Kupffer细胞及活化的HSC均可分泌PDGF,使其在肝脏中表达升高。

血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是一生物活性很强的脂质递质,参与了缺血再灌注肝损伤和内毒素性肝损伤,且有中心放大作用^[43]。正常情况下,肝脏单核-吞噬细胞能阻止肠源性内毒素进入人体循环。但当肝Kupffer细胞受到抑制和损伤时,内毒素可进入人体循环内毒素是PAF强有力的激动剂,可刺激单核-吞噬细胞释放PAF。何云 *et al*^[44]研究发现随着砷中毒程度的加重,患者血中PAF、TNF及ET的含量也逐渐地增加,可见由内毒素诱导的一系列细胞因子在砷中毒肝损害中的作用。TNF也可刺激多种细胞释放PAF,参与肝损害的发生。在肝功能受损所致肠源性内毒素血症时及低氧血症等因素可损伤血管内皮细胞释放ET,而使门静脉收缩,肝脏水肿,细胞脂质过氧化和溶酶体的漏出,形成恶性循环,进一步加重肝损伤^[45]。PAF在增加肝脏血管阻力及糖原分解的同时,还可促进多形核白细胞(polymorphonuclear leucocyte, PMN)黏附于内皮细胞,诱导PMN呼吸“爆炸”和继发性脱颗粒,释放氧自由基及花生四烯酸代谢产物等。

血红素氧化酶同工酶(heme oxygenase-1, HO-1)能够被多种刺激或应激因素所诱导,如重金属、内毒素、细胞因子等,该诱导作用被认为是机体对各种氧化应激刺激的一种适应性保护反应^[46-47]。罗天永 *et al*^[37]研究表明HO-1 mRNA在iAs组肝组织中表达明显升高,说明砷暴露对肝细胞HO-1 mRNA诱导的一种特异性细胞应激反应。该应激反应在慢性砷暴露中的是否也是应激保护作用,有待进一步探索。

激活素A(activin A, ACTA)和转化生长因子- β 1(transforming growth factor, TGF- β 1)属于一类结构相关的多肽类调控蛋白大家族。研究表明,随着TGF- β 1的分泌增加, TGF- β 1促进ACTA合成及ACTA自身正反馈调节作用而使其表达显著增高,这说明TGF- β 1和ACTA都具有致肝细胞损伤、凋亡及促肝纤维化的作用,并且二者具有一定的协同效应^[48-49]。刘芙蓉 *et al*^[50]在砷暴露大鼠模型中测定肝组织中TGF- β 1 mRNA和ACTA mRNA水平,发现表达均高于对照组,且

随着暴露时间的延长,其表达也逐渐增高,说明ACTA及TGF- β 1在砷暴露致肝损伤、肝纤维化的形成过程中有着重要作用,其具体机制有待于进一步研究。

MIP-2、MCP-1均属于趋化因子CC亚家族,与组织损伤、肝细胞癌的发生有相关性,在砷导致肝损伤模型中均表达升高^[51-52]。推测其作用机制与砷的毒性其诱发活性氧自由基(ROS)的产生以及抑制抗氧化物的活力从而导致氧化损伤关系密切。活性氧等可刺激与肝损伤有关的基因表达,从而释放多种促炎症因子。

这些细胞因子间存在着复杂的网络联系,它们的产生和释放过程既可以相互激发又具有协同作用,共同参与肝细胞损害。还有一些重要的细胞因子与肝纤维化密切相关,虽然在砷中毒相关方面鲜有报道,但对今后的砷致肝纤维化有积极的启示作用。

4 结论

慢性砷中毒对肝脏的影响是多方面的,临床上暴露相同浓度无机砷但症状却不同的患者可能与砷代谢物种类、比例及量有关,而涉及氧化还原和甲基化的因素一定影响砷在体内的代谢过程,进而影响砷的毒性表达。目前对与砷中毒引起的基因方向的研究仍处在初级阶段,实验室检验及临床诊断都还需不断研究和完善,许多理论和推测都仅在体外实验获得成功,但是在体内研究方面,尚缺乏这方面的报道。对于砷代谢的分子生物学方面的深入研究,仍然有很多工作值得去做。

5 参考文献

- 1 朱建华,王翔朴. 砷在砷中毒性肝脏内的亚细胞水平分布. 中国现代医学杂志 1997; 7: 40-41, 43
- 2 杨瑞瑛,李子洁,林勤,王生玲,张玲,马品江,朱殿志,王连方. 砷中毒大鼠体内各脏器、组织中砷的分布. 中国地方病防治杂志 2003; 20: 260-262
- 3 仙玲玲,杨磊. 生物体抗砷机制的研究进展. 中国地方病学杂志 2004; 23: 92-93
- 4 秦秀军,裴秋玲. 几种砷代谢相关酶和转运蛋白及其遗传多态性的研究进展. 中国地方病学杂志 2005; 24: 232-233
- 5 孙贵范. 深入研究慢性砷中毒的分子作用机制. 中国地方病学杂志 2004; 23: 1-2
- 6 Reichl FX, Kreppel H, Forth W. Pyruvate and lactate metabolism in livers of guinea pigs perfused with chelating agents after repeated treatment with As₂O₃. Arch Toxicol 1991; 65: 235-238
- 7 刘起展,黄厚今,董国宾,周远忠,王建华,胡斌丽,李红,赵曼平. 慢性氟砷染毒对小鼠某些生化指标的影响. 环境与职业医学 2003; 20: 103-105
- 8 戴江红,吴继尧. 砷氟对血中巯基、丙酮酸和尿羟脯氨酸影响的实验研究. 地方病通报 1998; 18: 9-12
- 9 张碧霞,张爱华,蒋天祥,胡昭宇,武静,张彤. 燃煤性

- 砷中毒患者血清NO、ET的检测及血流变学等指标的
观察. 中国微循环 2004; 8: 46-47
- 10 刘汉名, 王恩炎, 蒋有仁. 砷作业工人心电图的观察.
职业医学 1986; 13: 27
- 11 张玉林. 氧自由基去除剂对离体兔心砷损害的保护作
用的实验观察. 新疆医学院学报 1989; 4: 168
- 12 陆春伟, 李富君, 孙贵范, 田超云, 吉田贵彦. 地砷病
患者部分生化指标的测定. 中国公共卫生 1999; 15:
741-742
- 13 刘开泰, 肖碧玉, 姜平, 张晨, 王国荃, 冯东明. 氟砷对
大鼠肾脂质过氧化和抗氧化能力的影响. 卫生毒理学
杂志 1995; 9: 136
- 14 李建学, 张研, 曹静祥. 地方性砷中毒患者血中氧自由
基代谢的变化. 第三届全国地方病学术会议论文集.
哈尔滨: 中国地方病学杂志 1996; 205
- 15 黄晓欣, 张爱华, 杨大平, 洪峰, 张碧霞, 罗鹏, 董学新,
郭渝成. 燃煤型砷中毒患者临床特征、多系统损害及
其意义. 中国地方病学杂志 2002; 21: 490-493
- 16 吴庆, 王茜, 贾汉, 吴静. 砷对砷中毒小鼠肝肾脂质过
氧化影响的实验研究. 新疆医科大学学报 2008; 31:
801-803
- 17 刘开泰, 王国荃. 砷对家兔脂质过氧化和抗氧化能力
的影响. 卫生研究 1991; 20: 6-8
- 18 孙贵范, 李富君, 皮静波. 砷对心肌细胞生物膜损伤
机制的探讨. 中华劳动卫生与职业病杂志 1997; 15:
335-337
- 19 李富君, 孙贵范, 梁刚, 山内博, 吉田贵彦, 刘淑兰, 李
革新. 砷对小鼠及人体SOD活力影响的研究. 中国医
科大学学报 1999; 28: 269-270, 275
- 20 仇玉兰, 祝寿芬, 韩光. 砷对机体抗氧化能力的影响及
硒多糖的拮抗作用. 卫生毒理学杂志 2001; 15: 86-87
- 21 蒋玲, 陆爽, 吴君. 砷对肝脏的毒性及氧化损伤. 世界
华人消化杂志 2007; 15: 2334-2336
- 22 Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Chakaborty SK,
Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic
arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol
Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- 23 Xie Y, Liu J, Liu Y, Klaassen CD, Waalkes MP.
Toxicokinetic and genomic analysis of chronic
arsenic exposure in multidrug-resistance *mdr1a/*
1b(-/-) double knockout mice. *Mol Cell Biochem*
2004; 255: 11-18
- 24 李富君, 孙贵范, 皮静波. 地方性砷中毒患者生物膜损
伤机制的探讨. 中国地方病学杂志 1998; 17: 9-11
- 25 闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎. 水砷暴露大鼠肝损伤和
肝纤维化模型的建立. 世界华人消化杂志 2009; 17:
862-866
- 26 吴君, 程明亮, 李玲, 李诚秀, 蒋玲, 张韵, 欧兵. 砷致
小鼠肝纤维化模型的建立. 中华医学杂志 2009; 89:
1455-1459
- 27 杨大平, 王松, 谢政军. SBA, γ -GT、ET、ALT在燃煤
型砷中毒患者肝损伤中的表达及其临床意义. 贵州医
药 2002; 26: 300-301
- 28 杨光红, 张爱华, 何江, 黄晓欣, 任渝江, 董学新, 何云,
赵转地. 银杏叶片对地方性砷中毒患者七项肝功能指
标的影响. 癌变. 畸变. 突变 2006; 18: 227-229
- 29 Xie Y, Liu J, Liu Y, Klaassen CD, Waalkes MP.
Toxicokinetic and genomic analysis of chronic
arsenic exposure in multidrug-resistance *mdr1a/*
1b(-/-) double knockout mice. *Mol Cell Biochem*
2004; 255: 11-18
- 30 杨树平, 孙宏训. 内皮素与肝脏疾病. 国外医学•消化
疾病分册 1996; 16: 138-141
- 31 何云, 张爱华, 杨大平, 王建宾, 韦小瑜, 黄晓欣. 银杏
叶片治疗燃煤型砷中毒肝纤维化的临床研究. 西南军
医 2005; 7: 1-3
- 32 吴君, 陆彤, 程明亮. 汉丹肝乐胶囊对贵州地区20例
砷暴露肝损伤患者的治疗作用. 中国地方病学杂志
2006; 25: 86-89
- 33 李玲, 吴君, 蒋玲, 欧兵, 张韵, 李诚秀, 程明亮, 杨勤.
不同价态饮水砷暴露对小鼠肝脏的损伤作用. 第二军
医大学学报 2008; 29: 499-503
- 34 张爱华, 李军, 杨大平, 蒋宪瑶, 洪峰, 黄晓欣, 任渝江.
燃煤型砷中毒肝损害生物标志物筛选及其临床意义.
毒理学杂志 2005; 19: 293-294
- 35 张碧霞, 黄晓欣, 张爱华, 罗鹏, 张彤, 任渝江. 燃煤型
砷中毒患者血清中细胞外基质成分测定的临床意义.
中国地方病学杂志 2004; 23: 373-374
- 36 张韵, 欧兵, 吴君. 砷致肝细胞的炎症反应及凋亡. 世
界华人消化杂志 2007; 15: 2332-2333
- 37 罗天永, 吴君, 张韵, 欧兵, 程明亮, 杨勤. HO-1 mRNA
在砷暴露肝损伤小鼠肝组织中的表达. 世界华人消化
杂志 2008; 16: 2161-2165
- 38 张彤, 张碧霞, 胡昭宇, 叶萍, 鲁力. 血浆u-PA、
u-PAR与血清IL-6、TNF- α 在慢性燃煤型砷中毒肝
损伤中的表达及意义. 中国医学检验杂志 2006; 7:
247-248
- 39 孙颖, 辛绍杰, 雷厉, 侯俊, 貌盼勇. 乙肝病毒外膜大蛋
白检测对于判定HBV DNA复制的意义. 世界华人消
化杂志 2006; 14: 354-357
- 40 陈文慧, 刘平, 徐光福, 陆雄, 熊卫国, 李风华, 刘成海.
脂质过氧化在二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成过程
中的作用. 世界华人消化杂志 2001; 9: 645-648
- 41 周晓倩, 何云, 吴君. 砷中毒所致氧化应激与肝脏损伤.
中国地方病学杂志 2008; 26: 114-116
- 42 欧兵, 张韵, 吴君. 砷与肝纤维化. 世界华人消化杂志
2007; 15: 2330-2331
- 43 何云, 袁凤仪, 任渝江, 袁红波, 李凌, 程忠良. 银杏内
酯对小鼠急性肝坏死的保护作用. 中华传染病杂志
2001; 19: 368-370
- 44 何云, 张爱华, 杨大平, 王建宾, 韦小瑜, 黄晓欣. 燃煤
型砷中毒患者血清细胞因子改变及意义. 世界华人消
化杂志 2004; 12: 2210-2211
- 45 陈隆典, 张维. 肝肺综合征的回顾与进展. 中华肝病病
杂志 2003; 11: 318-319
- 46 李瑶, 王小明, 吴其夏. 缺氧与血红素氧化酶-1的表
达. 国外医学•生理、病理科学与临床分册 2005; 25:
238-241
- 47 宋靖. 血红素氧化酶-1在氧化应激状态下的作用. 中国
航天医药杂志 2003; 5: 77-78
- 48 杨清, 王永香, 张红军. ACTA、TGF- β 1、SOD、
MDA与肝纤维化的相关性研究. 中国现代实用医学
杂志 2006; 5: 11-12
- 49 黄新, 李定国, 陆汉明, 魏红山, 王志荣, 程计林, 周欣,
徐芹芳. 激活素A、TGF- β 1在实验性肝纤维化中的表
达比较. 中华肝病病杂志 2001; 9: 368
- 50 刘芙蓉, 吴君, 闫超, 张莉莎. 砷暴露与小鼠肝损伤
及激活素A、转化生长因子- β 1的相关性. 世界华人消
化杂志 2009; 17: 747-752
- 51 陈骏, 孙喜太, 丁义涛, 孟凡青, 吴鸿雁. 肝细胞性肝癌
中MCP-1的表达与血管新生的关系. 南京医科大学学
报 2007; 27: 133-136, 141
- 52 Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes
MP. Metallothionein-I/II null mice are more
sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and
nephrotoxic effects of chronic oral or injected
inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2000; 55: 460-467

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

多药耐药基因与溃疡性结肠炎的研究进展

马铭泽, 杨崇美

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)是一种常见的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 发病率有上升趋势. 近年来有研究表明多药耐药基因(MDR)的基因多态性与UC发病有关. 研究MDR基因的多态性有助于揭示UC的病因和发病机制, 为UC的预防和治疗找到新的途径和药物作用靶点.

马铭泽, 杨崇美, 山东大学附属省立医院消化内科 山东省济南市 250021

山东省自然科学基金项目, No. Y2006C135

作者贡献分布: 本综述由马铭泽完成; 杨崇美审核.

通讯作者: 杨崇美, 主任医师, 250021, 山东省济南市, 山东大学附属省立医院消化内科. yangchongmei@medmail.com.cn
电话: 0531-85186355

收稿日期: 2009-09-06 修回日期: 2009-11-07

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-12-08

Advances in understanding the correlation between multi-drug resistance gene and ulcerative colitis

Ming-Ze Ma, Chong-Mei Yang

Ming-Ze Ma, Chong-Mei Yang, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital, Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. Y2006C135

Correspondence to: Chong-Mei Yang, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital, Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. yangchongmei@medmail.com.cn

Received: 2009-09-06 Revised: 2009-11-07

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-12-08

Abstract

The etiology and pathogenesis of ulcerative colitis remain unclear. It has been reported that multiple drug resistant 1a (MDR 1a) knockout mice are susceptible to developing a spontaneous ulcerative colitis (UC). The incidence of C3435T gene mutation in the MDR1 gene in UC patients is significantly higher than that in healthy controls. The C3435T gene mutation can lead to decreased expression of P-glycoprotein (P-gp). The expression of P-gp in the peripheral blood lymphocytes and intestinal mucosal epithelial cells is higher in hormone-resistant UC patients than in hormone-sensitive UC patients and healthy controls. Thus, a hypothesis was proposed that the MDR1 gene polymorphism may correlate with the occurrence and progression of UC and the sensitivity to hormone therapy in UC patients. However, this hypothesis is still controversial.

Key Words: Ulcerative colitis; MDR gene; P-glyco-

protein; Hormone resistance

Ma MZ, Yang CM. Advances in understanding the correlation between multi-drug resistance gene and ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3530-3533

摘要

溃疡性结肠炎(UC)的病因和发病机制尚不明确. 针对MDR1基因敲除小鼠易发UC; MDR1发生C3435T基因变异在UC患者的发生率显著高于正常人; C3435T基因变异可导致P糖蛋白(P-gp)表达下降; 而在激素耐药的UC患者其外周血淋巴细胞及肠黏膜上皮细胞P-gp的表达量较药物敏感者及正常对照组高等现象, 提出MDR1基因多态性可能和UC的发生、发展以及激素的治疗反应有关的假说, 但也有不同的结论.

关键词: 溃疡性结肠炎; MDR基因; P糖蛋白; 激素耐药

马铭泽, 杨崇美. 多药耐药基因与溃疡性结肠炎的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(34): 3530-3533

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3530.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种常见的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 发病率有上升趋势. 流行病学研究指出UC患者比一般人群发生结直肠癌的危险性高20-30倍, 文献报道UC相关的肠癌发病率在0.6%-17%, 但目前UC的病因和发病机制尚不明确. 普遍认为UC是免疫、遗传、环境及肠道细菌等多因素共同作用的结果, 可能是肠道细菌及其代谢产物作用于基因易感宿主, 使之产生免疫应答, 三者炎症的开始和持续发展中起了重要协同作用. 近年来有研究表明多药耐药(multi-drug resistance, MDR)基因的多态性与UC发病有关. MDR基因的表达产物P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)与UC患者产生激素耐药密切相关. 本文对有关多药耐药基因(MDR1)与UC发病及激素耐药机制的研究进

■同行评议者

戈之铮, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

行综述如下。

1 MDR1的多态性

MDR是转运蛋白超家族成员之一P-gp的编码基因。人类MDR基因有: MDR1和MDR3(又称MDR2)基因, 其中以MDR1起主导作用; 小鼠MDR1基因又分为MDR1a(MDR3)和MDR1b(MDR1)2种亚型。人类MDR1基因、小鼠MDR1a和MDR1b基因表达产物与多药耐药有关, 是目前研究最多的基因型。人与鼠MDR1基因序列有高度同源性, 此外人MDR1基因与细菌转运蛋白基因也非常相似。人类MDR1基因位于第7号染色体q21.1段, MDR1 mRNA大小4.7 ku, 包含28个内含子, 编码1280个氨基酸, 编码区不到整个基因组的5%, 编码的蛋白产物为P-gp。他有2个同源结构, 各含有6个跨膜结构域和1个ATP结合位点, 是ATP结合盒(ABC)运输系统的重要一员, 属于ABCB1家族^[1]。

目前研究认为MDR1基因具有高度多态性, 不同个体中MDR1基因多态性与P-gp表达和功能的改变密切相关。人类的多药耐药基因(MDR1)已被发现有28个SNP(单核苷酸多态性)位点, SNP是指在基因组DNA某个位置处存在单个碱基的差异。他在人群中的发生频率超过1%, 人类基因组DNA序列90%多态性是由SNP造成的, 对基因组DNA序列进行多态性研究, 可以最终弄清生物体生物学性状差异及疾病发生的遗传基础。MDR1基因有7个SNP发生在内含子, 11个SNP导致了氨基酸的变化, 目前已知的MDR1基因的多态现象中, 第26外显子C3435T和第21外显子G2677T/A具有重要的功能意义。C3435T和G2677T/A SNPs可能与P-gp活性的关系较为密切。其中对C3435T多态性研究最多, 结论也较明确。C3435T变异是指MDR1基因的26外显子的3435位点的C被T代替, 氨基酸的组成没有发生改变, C3435T虽然是第26外显子上的一个同义突变但其显著影响P-gp的表达。梁剑宁 *et al*^[2]应用PCR技术对正常人MDR1C3435T基因进行扩增以Mbo I 进行限制性酶切图谱分析结果示汉族人MDR1C3435T基因中, 表现型T/T频率14.42%, 表现型T/C40.54%, 表现型C/C45.04%。MDR1C3435T基因T频率0.3469, 基因C频率是0.6531; 有学者证实TT3435基因型人群中, TT3435基因型患者表达的P-gp比纯合子低。在不同种族中, SNP发生率相差较大: 在非洲C3435C发生率高于高加索人和亚洲人, 这说明

干旱的地区C3435C基因型可起到很好的保护作用, 因为P-gp表达高使人们免受细菌的侵害。发生C3435T变异后的MDR1基因表达P-gp下降伴有P-gp的功能下降(Farnood^[3]), 由此可以改变一些药物的代谢。而对于G2677T/A单核苷酸多态性的研究较少, 对于G2677T/A单核苷酸多态性与P-gp表达及活性的关系尚不明确。C3435T及G2677T/A位点间有连锁关系。目前, 研究热点为寻找新的SNP位点、启动子和编码区SNP的功能研究, 以及SNP与基因表达关系的研究等。

2 P-gp的表达与功能

P-gp是相对分子质量为170 kDa的糖蛋白, 是MDR基因的表达产物, 于1976年在中国仓鼠的卵巢细胞秋水仙碱耐药株中首次被发现。约10年后, 从多药耐药的KB癌细胞中分离出了编码P-gp的MDR基因。P-gp是ATP依赖性的跨膜泵, 能够在底物或药物到达细胞质时识别并将其从脂质双层中泵出细胞外, 因此被认为是一个疏水的真空清洗机。其生理作用是保护细胞免受毒物或代谢废物的损害, 以保持内环境的稳定。P-gp有广泛的作用底物, 这些物质多是疏水分子或两性分子, 例如糖皮质激素和免疫抑制剂等。MDR1最初于研究肿瘤细胞耐药时提出, 表达的P-gp能够导致肿瘤细胞对多种药物产生耐药。然而P-gp不仅存在于肿瘤细胞, 而且也存在于正常组织中。Farnood *et al*研究发现健康人的结肠和小肠上皮细胞中有P-gp高浓度富集, P-gp有阻止肠腔内药物及毒素吸收的作用^[3,22], 缺乏P-gp, 肠黏膜上皮细胞的屏障功能受损, 肠腔内食物及细菌代谢废物在肠黏膜细胞内聚集, 可能与UC的发病有关。

3 MDR1多态性与UC

许冬梅 *et al*^[4]的研究提示MDR1基因敲除的小鼠有21%自发UC, 而对照组无1例小鼠发生UC, 这种发生在MDR1a基因敲除小鼠的结肠炎与人类UC的发病很相似, 提示UC的易感性与MDR1基因的功能及基因型有关。Panwala *et al*实验证实MDR1是小鼠肠道上皮细胞和外周T淋巴细胞唯一的P-gp表达基因^[5,21], 并建立了MDR1a^{-/-}小鼠炎症性肠病的动物模型。在药物诱导的UC小鼠模型中发现, MDR1在结肠黏膜上皮细胞的表达及活性下调。C3435T基因变异在UC患者的发生率显著高于正常($P = 0.001$), 由此证明C3435T与UC的发病可能相关^[3,6]。Cortada *et al*的研究

■研究前沿

目前针对UC的研究热点集中于胃肠道炎症成分的研究。研究最多的是局部分泌的调节黏膜微环境免疫反应的物质。这些物质包括免疫调节性细胞因子、免疫抑制性细胞因子、促炎症性细胞因子。中和这些因子可有效阻断炎症和诱导缓解。

■应用要点

本文总结了目前MDR基因多态性与UC相关性的研究成果,有助于揭示UC的病因和发病机制,为UC的预防和临床治疗找到新的途径和药物作用靶点。

表明MDR1-C3435T变异型通过减少表达P-gp并降低其功能导致对UC的易感以及患病后的表现^[7,20]。有关G2677T/A单核苷酸多态性与P-gp表达及活性的关系研究相对较少, G2677T/A单核苷酸多态性是指21号外显子的2677位点的丙氨酸被丝氨酸或苏氨酸替代,改变了氨基酸的组成,可能进而影响P-gp的表达与功能。不同位置的SNP有很多连锁关系,对MDR1基因的G2677T/A多态性的研究有助于进一步揭示UC发病。

4 P-gp的表达与激素疗效的关系

糖皮质激素是治疗UC的最基本的药物之一,肾上腺皮质激素治疗能使病情获得缓解。UC的预后在很大程度上取决于患者对糖皮质激素的反应。临床上部分患者足量应用后激素仍对无反应,称耐药,导致病情迁延不愈。

Huebner *et al*研究发现MDR1基因的SNP变异不仅导致对UC的易感^[8,19],还决定患者对激素的反应。Sapmaz *et al*^[9]研究表明激素治疗失败的UC患者外周血淋巴细胞的MDR1表达显著升高,而MDR1基因是外周血淋巴细胞和肠黏膜细胞中唯一的P-gp170表达基因,因而外周血淋巴细胞和肠黏膜细胞的MDR1基因表达在UC患者对激素治疗的反应情况中起重要作用,难治性UC可能归咎于MDR1过表达P-gp170。越来越多的研究表明, P-gp170可通过多重途径介导激素耐药。P-gp170可通过发挥药物转运泵及保护细胞凋亡而导致激素耐药。最新的研究表明, P-gp170也能通过在总体细胞免疫系统中发挥作用而介导激素耐药,如作用于免疫细胞和细胞因子发挥效应的某些环节。Juyal *et al*用植物血凝素刺激10名健康人外周血单个核细胞,并用P-gp170单克隆抗体阻断P-gp170的功能^[10,18],以流式细胞仪检测培养的上清液中IL-2、4、6、10、 γ 干扰素、肿瘤坏死因子- α 的水平,发现P-gp170 mAb抑制了IL-2、4、干扰素 γ 、肿瘤坏死因子- α 等细胞因子的释放。

P-gp170的表达水平虽与许多疾病激素耐药、激素的临床疗效及预后等有关,但就不同疾病而言,具体报道不一。某些疾病的激素耐药患者在应用激素治疗前即有较高的P-gp170表达水平,而在另外一些疾病患者P-gp170的表达水平与是否应用激素及其应用的剂量、疗程有关。Sapmaz *et al*和Sambuelli *et al*研究表明P-gp170在激素耐药的UC患者其外周血淋巴细胞及肠

黏膜上皮细胞P-gp170的表达量较药物敏感者及正常对照组高,MDR1的产物P-gp170过表达是导致UC患者激素治疗失败的原因之一^[9,11,14,17]。Yacyshyn *et al*用RT-PCR及罗丹明123释放试验分析证明未接受激素治疗的UC患者外周血、肠黏膜固有层及肠上皮内的淋巴细胞P-gp170的表达及活性低于正常对照组^[12,15]。然而Fiedler *et al*用RT-PCR技术对25例没用过激素的患者和25例用过激素的患者的外周血单核细胞中的MDR1 mRNA表达量进行测定,发现健康者与未用激素UC患者P-gp170的表达无显著差异,而外周血单核细胞MDR1 mRNA含量在接受过激素治疗的UC患者一组明显高于未使用过激素治疗的患者组($P = 0.0375$);接受过激素的UC患者的外周血单核细胞MDR1 mRNA表达量与激素的总用量显著正相关($P = 0.0175$);说明UC患者MDR1 mRNA的高表达不是自发的,而是应用大剂量激素治疗后诱发的反应^[13,16]。将上述矛盾的实验结果对比,可以说明MDR1基因及表达产物P-gp170与UC之间的关系尚不确定,有待进一步研究。

5 结论

UC患者MDR1基因多态性,以及P-gp表达异常或功能活性的改变和UC的发生、发展以及与激素的治疗反应的关系有待更多更深入的研究。研究MDR基因的多态性有助于揭示UC的病因和发病机制,为UC的预防和治疗找到新的途径和药物作用靶点。研究激素耐药的机制,有助于正确指导临床糖皮质激素的应用,具有重大的临床意义;进而通过干预其中某一个或几个环节而逆转激素耐药,必将对临床炎症、免疫性疾病的激素治疗产生深远影响。

6 参考文献

- 1 林莉,刘晓晴,王升启.多药耐药基因的单核苷酸多态性研究进展.国外医学·药学分册 2006; 33: 28-30
- 2 梁剑宁,李耀明,张惠文,陈盛强.MDR1 C3435T基因多态性的检测.现代临床医学生物工程学杂志 2003; 9: 221-236
- 3 Farnood A, Naderi N, Moghaddam SJ, Noorinayer B, Firouzi F, Aghazadeh R, daryani NE, Zali MR. The frequency of C3435T MDR1 gene polymorphism in Iranian patients with ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 999-1003
- 4 许冬梅,张源潮,杨清锐.多药耐药基因敲除小鼠结肠炎的免疫病理改变.中华消化杂志 2005; 25: 71-74
- 5 Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 1998; 161:

- 5733-5744
- 6 Li YH, Wang YH, Li Y, Yang L. MDR1 gene polymorphisms and clinical relevance. *Yichuan Xuebao* 2006; 33: 93-104
- 7 Cortada CM, Gil A, Goncalves S, Sambuelli A, Rubio MC, Carballo MA. [P-glycoprotein functional activity in peripheral blood lymphocytes in ulcerative colitis] *Medicina (B Aires)* 2009; 69: 437-441
- 8 Huebner C, Browning BL, Petermann I, Yeo Han D, Philpott M, Barclay M, Gearry R, McCulloch A, Demmers P, Ferguson LR. Genetic analysis of MDR1 and inflammatory bowel disease reveals protective effect of heterozygous variants for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1784-1793
- 9 Sapmaz A, Ozen Karatayli SC, Dagli U, Kiliç ZM, Törüner M, Celik Y, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Effects of polymorphism in G2677T/A triallelic region of MDR1 gene in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *Turk J Gastroenterol* 2008; 19: 168-173
- 10 Juyal G, Midha V, Amre D, Sood A, Seidman E, Thelma BK. Associations between common variants in the MDR1 (ABCB1) gene and ulcerative colitis among North Indians. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19: 77-85
- 11 Sambuelli AM, Negreira SM, Gil AH, Huernos SP, Goncalves S, Toro MA, Kogan Z, Cabanne A, Camarero S, Bai JC, Lazarowski AJ. Multidrug resistance gene (MDR-1) expression in the colonic mucosa of patients with refractory ulcerative colitis. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2006; 36: 23-32
- 12 Yacyshyn B, Maksymowych W, Bowen-Yacyshyn MB. Differences in P-glycoprotein-170 expression and activity between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol* 1999; 60: 677-687
- 13 Fiedler T, Büning C, Reuter W, Pitre G, Gentz E, Schmidt HH, Büttner J, Ockenga J, Gerloff T, Meisel C, Lochs H, Roots I, Köpke K, John A. Possible role of MDR1 two-locus genotypes for young-age onset ulcerative colitis but not Crohn's disease. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 917-925
- 14 Mir A, Minguez M, Tatay J, Pascual I, Peña A, Sanchiz V, Almela P, Mora F, Benages A. Elevated serum eotaxin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1452-1457
- 15 Ardizzone S, Maconi G, Bianchi V, Russo A, Colombo E, Cassinotti A, Penati C, Tenchini ML, Bianchi Porro G. Multidrug resistance 1 gene polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 516-523
- 16 Daniel F, Lorient MA, Seksik P, Cosnes J, Gornet JM, Lémann M, Fein F, Vernier-Massouille G, De Vos M, Boureille A, Treton X, Flourie B, Roblin X, Louis E, Zerbib F, Beaune P, Marteau P. Multidrug resistance gene-1 polymorphisms and resistance to cyclosporine A in patients with steroid resistant ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 19-23
- 17 Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3636-3644
- 18 Onnie CM, Fisher SA, Pattni R, Sanderson J, Forbes A, Lewis CM, Mathew CG. Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 263-271
- 19 Osuga T, Sakaeda T, Nakamura T, Yamada T, Koyama T, Tamura T, Aoyama N, Okamura N, Kasuga M, Okumura K. MDR1 C3435T polymorphism is predictive of later onset of ulcerative colitis in Japanese. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 324-329
- 20 Wilk JN, Bilsborough J, Viney JL. The *mdr1a* -/- mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease. *Immunol Res* 2005; 31: 151-159
- 21 Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, Dean M. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes Immun* 2004; 5: 530-539
- 22 Glas J, Török HP, Schiemann U, Folwaczny C. MDR1 gene polymorphism in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 367

同行评价

本文对有关多药耐药基因(MDR1)与UC发病及激素耐药机制的研究进行了综述,为UC的预防和治疗找到新的途径和药物作用靶点提供理论依据。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

· 消息 ·

《世界华人消化杂志》入选《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 2009-12-08)

曲古菌素A对食管癌EC1细胞增殖和细胞周期的影响及其分子机制

马俊芬, 江亚南, 赵继敏, 黄幼田, 赵明耀, 董子明

■背景资料

曲古菌素A(TSA)既是一种抗真菌药物,同时也是强大的组蛋白去乙酰酶(HDAC)抑制剂,其生物学效应主要包括诱导细胞凋亡,阻滞细胞周期和诱导肿瘤细胞分化。不同结构的HDAC抑制剂对不同的细胞系的作用及机制不同,本实验探讨TSA对食管癌EC1细胞增殖和细胞周期的影响。

马俊芬, 江亚南, 赵继敏, 黄幼田, 赵明耀, 董子明, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 此课题由董子明、马俊芬及赵继敏设计; 研究过程由马俊芬、江亚南、赵继敏及黄幼田操作完成; 数据分析由马俊芬、赵继敏、赵明耀及董子明完成; 本论文写作由马俊芬、赵继敏、赵明耀及董子明完成。

通讯作者: 董子明, 教授, 450001, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室, dongzm@zzu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-29 修回日期: 2009-11-14

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-08

Trichostatin A inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in human esophageal carcinoma cell line EC1

Jun-Fen Ma, Ya-Nan Jiang, Ji-Min Zhao, You-Tian Huang, Ming-Yao Zhao, Zi-Ming Dong

Jun-Fen Ma, Ya-Nan Jiang, Ji-Min Zhao, You-Tian Huang, Ming-Yao Zhao, Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Correspondence to: Professor Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, 100 Kexue Avenue, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. dongziming@zzu.edu.cn
Received: 2009-09-29 Revised: 2009-11-14
Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of trichostatin A (TSA) on cell proliferation and cell cycle progression in esophageal carcinoma cell line EC1, and explore potential mechanisms involved.

METHODS: EC1 cells in logarithmic growth phase were incubated with TSA at concentrations of 0.3, 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ for 24 and 48 hours, respectively. The proliferation of EC1 cells was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The effects of TSA on cell cycle distribution was detected by flow cytometry (FCM). The expression of $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ was investigated by Western blot.

RESULTS: TSA at concentrations of 0.5 and 1.0

$\mu\text{mol/L}$ inhibited the growth of EC1 cells. In comparison with the control group, the percentage of cells in G_0/G_1 phase increased, while the percentage of cells in S phase decreased ($74.56\% \pm 1.34\%$ vs 62.12 ± 0.52 and $14.52\% \pm 1.81\%$ vs 27.50 ± 0.66 , respectively; both $P < 0.05$) in EC1 cells treated with TSA at a concentration of 0.5 $\mu\text{mol/L}$. TSA induced G_0/G_1 phase arrest in a dose-dependent manner. Western blot analysis indicated that the expression of $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ was upregulated in EC1 cells treated with TSA at concentrations of 0.5 or 1.0 $\mu\text{mol/L}$ TSA for 24 hours (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: TSA is able to inhibit cell proliferation and induce G_0/G_1 arrest in human esophageal carcinoma cell line EC1 partly through upregulation of the $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$.

Key Words: Trichostatin A; Cell cycle; Esophageal carcinoma; $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$

Ma JF, Jiang YN, Zhao JM, Huang YT, Zhao MY, Dong ZM. Trichostatin A inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in human esophageal carcinoma cell line EC1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3534-3537

摘要

目的: 探讨不同浓度曲古菌素A对食管癌细胞系EC1细胞增殖、细胞周期的影响及其对细胞周期调控基因 $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ 表达的影响。

方法: 用0.3, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的TSA处理EC1细胞, MTT检测TSA作用24、48 h对EC1细胞的抑制作用, 流式细胞仪检测0.3, 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的TSA作用24 h后EC1细胞周期的改变, Western blot法检测 $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ 变化。

结果: TSA在0.5 $\mu\text{mol/L}$ 以上时对EC1细胞有抑制作用; 0.3 $\mu\text{mol/L}$ TSA处理细胞后细胞周期与对照组相比, 无明显变化; 0.5 $\mu\text{mol/L}$ TSA处理EC1细胞后, G_0/G_1 期细胞较对照组明显增加, S期细胞较对照组明显减少($74.56\% \pm 1.34\%$ vs $62.12\% \pm 0.52\%$; $14.52\% \pm 1.81\%$ vs $27.50\% \pm 0.66\%$, 均 $P < 0.05$); 0.5, 1.0 $\mu\text{mol/L}$

■同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科

TSA处理细胞后 $p21^{WAF1/CIP1}$ 表达明显增加(均 $P<0.05$).

结论:一定浓度的TSA对人食管癌细胞EC1具有的增殖抑制作用,引起EC1细胞发生 G_0/G_1 期阻滞,其部分机制与 $p21^{WAF1/CIP1}$ 上调有关.

关键词:曲古菌素A; 细胞周期; 食管癌; $p21^{WAF1/CIP1}$

马俊芬, 江亚南, 赵继敏, 黄幼田, 赵明耀, 董子明. 曲古菌素A对食管癌EC1细胞增殖和细胞周期的影响及其分子机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3534–3537

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3534.asp>

0 引言

食管癌是一种常见的消化系恶性肿瘤,发病分布具有鲜明的地理区域特点,高发地区为包括我国北部、中部在内的“亚洲食管癌高发带”.近年来,以外科手术为主,辅以术前或术后放、化疗的综合治疗模式已成为是食管癌治疗的标准模式.然而,目前食管癌诊疗的整体形势仍不容乐观,我国食管癌术后5年生存率仅30%.因此,探索和开发新型的更为有效的诊疗技术和手段也成为医学工作者和药物企业共同的重要目标.曲古菌素A(trichostatin A, TSA)源自链霉菌代谢产物,是一种抗真菌药物使用,同时也是强大的组蛋白去乙酰酶(histone deacetylase inhibitor, HDAC)抑制剂,是目前广泛使用的HDAC之一,其生物学效应主要包括诱导细胞凋亡,阻滞细胞周期,和诱导肿瘤细胞分化^[1].但是,不同结构的HDAC抑制剂对不同的细胞系的作用机制不同,即使同一种细胞对不同的HDAC抑制剂的反应也不相同^[2-4].人食管癌细胞系EC1为低分化鳞癌,目前,在国内外TSA对EC1细胞研究甚少,TSA对EC1细胞增殖、细胞周期的影响尚未见报道.本文主要探讨TSA对食管癌EC1细胞增殖和细胞周期的影响以及对细胞周期调控基因 $p21^{WAF1/CIP1}$ 的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640(美国Gibco公司),胎牛血清(天津TBD生物有限公司),Trichostatin A(美国Sigma公司)溶解于二甲基亚砜,配成2.5 mmol/L的贮存液.二甲基亚砜DMSO(美国Sigma公司),细胞周期试剂盒(美国BD公司),碘化吡啶PI(美国Sigma公司), $p21^{WAF1/CIP1}$ 鼠抗人单抗(美国Santa Cruz),RPMI 1640培养液(美国Gibco公司产品),食管鳞癌EC1细胞由本室保存.

1.2 方法

1.2.1 MTT检测TSA对EC1的抑制率:食管鳞癌细胞EC1在含100 mL/L的胎牛血清1640完全培养基培养至对数生长期,消化接种于96孔板,接种细胞数每孔约 5×10^3 个,将96孔板放于37℃、50 mL/L CO₂培养箱中培养24 h,随机分成TSA处理组和空白对照组.TSA处理组分为含0.3, 0.5, 1.0 μmol/L TSA,对照组换为等浓度的DMSO,同时设仅加培养基的阴性对照组和空白组,每组设5个复孔,在培养24和48 h后,加入20 μL 5 g/L的MTT溶液,继续培养4 h准备收集细胞,吸去上清,加入200 μL DMSO,室温下振荡10 min使紫色结晶全部溶解,在96孔酶标仪上以空白对照孔调零、570 nm处读取吸光度值 A_{570} .并按下面公式计算不同浓度的TSA对EC1细胞的增殖活力的抑制,细胞存活率 = (实验孔平均 A 值/对照孔平均 A 值) × 100%.

1.2.2 流式细胞仪检测周期:将各组细胞用0.05%胰蛋白酶消化,2000 r/min离心8 min,弃去上清;用PBS洗2遍,离心后弃上清,加入700 mL/L冰乙醇固定,4℃过夜;上机前,2000 r/min离心8 min,弃去乙醇,PBS洗2遍;加入1 mL PBS制成细胞悬液,加RNaseA(终浓度50 mg/L),室温放置1 h;调整细胞浓度为 1×10^6 /管,加1 mL PI(50 mg/L),避光30 min,上机检测细胞周期,每个样本检测10 000个细胞.

1.2.3 Western blot法检测 $p21^{WAF1/CIP1}$ 蛋白的表达:按照细胞总蛋白试剂盒提取总蛋白,Bradford法检测蛋白质的含量,50 μg上样量分别用12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳分离,转移至PVDF膜上,用含50 g/L牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭3 h,加入 $p21^{WAF1/CIP1}$ 一抗,4℃过夜.将膜放于TBST稀释的二抗中,室温轻摇2 h,用TBST洗涤3次,使用辣根过氧化物酶HRP-ECL发光法进行显影,结果用以Gel-Doc图像分析软件进行分析.

统计学处理 统计学多样本均数采用单因素方差分析,SPSS10.0统计软件处理.以 $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 不同浓度TSA对EC1细胞增殖的影响 EC1细胞经不同浓度的TSA处理24和48 h后,MTT法检测细胞增殖变化,各处理组细胞在TSA的作用下细胞的 A 值较对照组下降,EC1细胞的存活率降低,增殖受到抑制,其中0.3 μmol/L TSA组作用24

■ 研发前沿

核小体中心组蛋白的乙酰化(acetylation)和去乙酰化(deacetylation)是调节染色体结构和基因转录的重要修饰.细胞及有机体内组蛋白的乙酰化和去乙酰化之间存在动态平衡,从而控制染色质的结构和调节基因的表达.诸多研究表明,当HDAC过度表达时,既可导致某些特定基因的非正常抑制,引起肿瘤的发生,因此HDAC抑制剂成为肿瘤治疗的新热点.

■应用要点

本研究发现,一定浓度的TSA可通过引起细胞周期抑制基因 $p21^{WAF1/CIP1}$ 的表达增强导致食管癌EC1细胞发生细胞增殖抑制和细胞周期 G_0/G_1 阻滞,为进一步探索HDAC抑制剂对食管癌治疗奠定了理论基础。

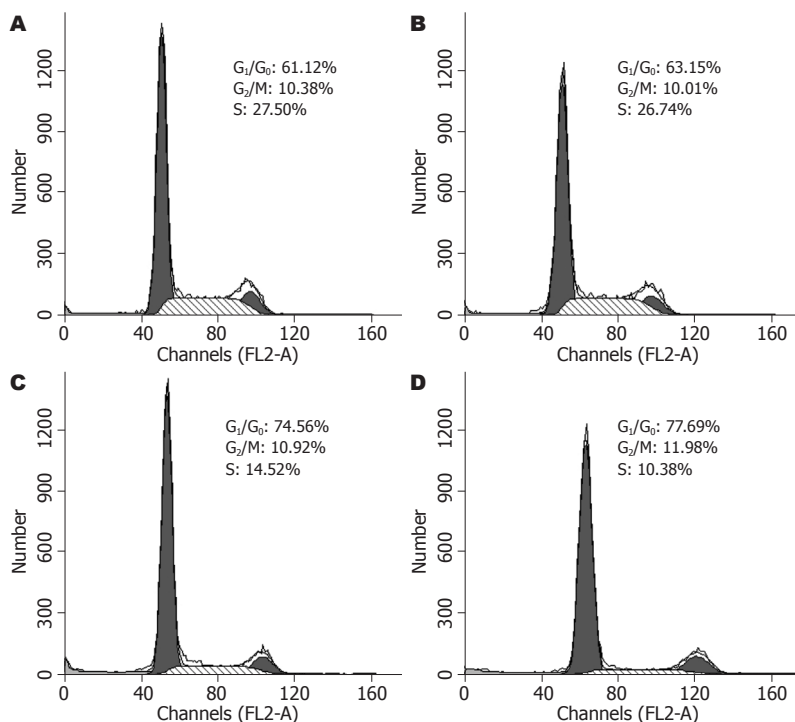


图1 不同浓度TSA处理EC1细胞的周期. A: 对照组; B-D分别为TSA 0.3, 0.5及1.0 $\mu\text{mol/L}$.

表1 不同浓度TSA处理EC1 24和48 h细胞的增殖 (mean \pm SD)

分组	24 h		48 h	
	A值	存活率(%)	A值	存活率(%)
对照组	1.289 \pm 0.01	100.00	1.489 \pm 0.04	100.00
TSA($\mu\text{mol/L}$)				
0.3	1.267 \pm 1.22	98.29	1.460 \pm 0.06	98.05
0.5	1.107 \pm 0.98 ^a	85.88	1.115 \pm 0.06	74.88
1.0	0.878 \pm 0.44 ^a	68.11	0.784 \pm 0.03	52.65

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

表2 不同浓度TSA处理EC1细胞的周期 (% , mean \pm SD)

分组	G_0/G_1	G_2/M	S
对照组	62.12 \pm 0.52	10.38 \pm 0.93	27.50 \pm 0.66
TSA($\mu\text{mol/L}$)			
0.3	62.13 \pm 1.33	10.01 \pm 1.25	27.86 \pm 1.40
0.5	74.56 \pm 1.34 ^a	10.92 \pm 1.17	14.52 \pm 1.81 ^a
1.0	77.69 \pm 1.87 ^a	11.93 \pm 1.85	10.38 \pm 2.12 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

和48 h A值与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$), 0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$ TSA组和对照组24和48 h A值与对照组均有统计学差异(均 $P < 0.05$, 表1).

2.2 TSA对EC1细胞周期的影响 0.3 $\mu\text{mol/L}$ TSA处理细胞后细胞周期与对照组相比, 无明显变化. 随TSA浓度增加, G_0/G_1 期细胞百分比逐渐

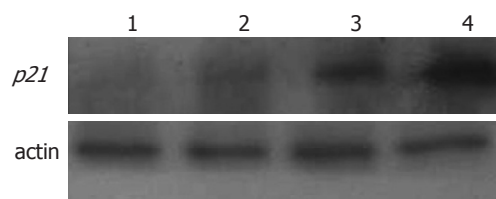


图2 不同浓度的TSA作用于EC1细胞 $p21^{WAF1/CIP1}$ 表达. 1: 对照组; 2-4分别为TSA 0.3, 0.5及1.0 $\mu\text{mol/L}$. $P < 0.05$ vs 对照组.

增大, 而S期细胞百分比降低, 且呈浓度依赖关系, 与溶剂对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$), 表明细胞被阻滞于 G_0/G_1 期(表2, 图1).

2.3 Western blot法检测TSA EC1细胞 $p21^{WAF1/CIP1}$ 表达 为了探讨TSA对EC1细胞周期阻滞的分子机制, 我们检测了细胞周期蛋白 $p21^{WAF1/CIP1}$, TSA处理EC1细胞, Western blot检测0.3 $\mu\text{mol/L}$ TSA引起的 $p21^{WAF1/CIP1}$ 的改变和对照组相比无统计学

差异, 0.5、1.0 $\mu\text{mol/L}$ TSA组较对照组 $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ 明显增加(均 $P<0.05$, 图2), 提示TSA对细胞周期的抑制至少部分是由于 $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ 上调引起的。

3 讨论

核小体是最基本的染色体结构。核小体中心组蛋白的乙酰化(acetylation)和去乙酰化(deacetylation)是调节染色体结构和基因转录的重要修饰。组蛋白乙酰转移酶(histone acetylase, HAT)和HDAC是调节染色体结构和基因表达的关键激酶。通过翻译后修饰改变染色体结构, 尤其是对位于核心组蛋白N-端的赖氨酸的乙酰化修饰可以改变染色体结构和功能。一般情况下, 细胞及有机体内组蛋白的乙酰化和去乙酰化之间存在动态平衡, 从而控制染色质的结构和调节基因的表达。研究表明肿瘤的发病与组蛋白的乙酰化和去乙酰化这对平衡的紊乱有着密切关系。HAT可以增加组蛋白的乙酰化中和组蛋白电荷, 使RNA合成酶、转录因子、调节因子复合物接近DNA, 使基因更容易表达。与之相反, HDAC的去乙酰化作用则由于恢复了组蛋白正电荷, 从而增加DNA与组蛋白之间的引力, 使松弛的核小体变得十分紧密, 不利于特定基因的表达, 包括一些肿瘤抑制基因。曲古菌素A作为HDAC抑制剂, 通过改变核小体组蛋白乙酰化水平来改变染色体的结构, 从而调控了基因的表达^[5-7]。诸多研究表明, 当HDAC过度表达时, 既可导致某些特定基因的非正常抑制, 引起肿瘤的发生, 因此HDAC抑制剂成为肿瘤治疗的新热点。

本研究发现0.3 $\mu\text{mol/L}$ TSA处理细胞后细胞周期与对照组相比, 无明显变化。随TSA浓度增加, G_0/G_1 期细胞百分比逐渐增大, 而S期细胞百分比降低。TSA可以使食管癌细胞EC1发生 G_0/G_1 期阻滞从而抑制肿瘤细胞的增殖。我们又探讨了TSA引起细胞EC1发生 G_0/G_1 期阻滞的机制。利用Western blot分析当TSA作用于EC1细胞时细胞周期抑制基因 $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ 的表达增强且随着药物浓度增加而增加。

细胞周期是指细胞从一次分裂结束到下一次分裂终止的过程, 细胞周期分为 G_1 期, S期, G_2 期和M期, 其中最关键的是S期, 此期细胞进行DNA倍增和染色体复制, 是增殖的关键时期。若发生 G_1 期阻滞, 则细胞无法增殖。细胞周期的进程受到一系列周期素依赖激酶(CDK), 周期素依

赖激酶抑制剂(CDKI), 周期素(cyclin)精密的调控^[8-9]。其中, $p21$ 可以和所有的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK2、4、6)复合物相结合, 是一种通用的细胞周期依赖性激酶抑制剂, 控制细胞周期 G_1/S 调控点, 抑制细胞增殖, 在肿瘤的发生发展发挥重要作用TSA作用于EC1细胞时细胞周期抑制基因 $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ 的表达增强, 从而抑制细胞增殖^[10-11]。由此我们可以看出TSA抑制EC1增殖的机制之一是由于引起细胞周期抑制基因 $p21$ 的表达上调而引起的 G_1 期阻滞。

4 参考文献

- 1 Mariadason JM. HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics* 2008; 3: 28-37
- 2 Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiol* 2005; 34: 405-412
- 3 Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 344-351
- 4 Suzuki T, Yokozaki H, Kuniyasu H, Hayashi K, Naka K, Ono S, Ishikawa T, Tahara E, Yasui W. Effect of trichostatin A on cell growth and expression of cell cycle- and apoptosis-related molecules in human gastric and oral carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2000; 88: 992-997
- 5 Malinen M, Saramäki A, Ropponen A, Degenhardt T, Väisänen S, Carlberg C. Distinct HDACs regulate the transcriptional response of human cyclin-dependent kinase inhibitor genes to Trichostatin A and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 121-132
- 6 徐周敏, 梅琪, 陈坚, 杜佳, 魏燕, 徐迎春. 曲古抑菌素A抑制肿瘤细胞增殖及提高p21基因表达. 军事医学科学院院刊 2007; 31: 420-422
- 7 Kang MR, Kang JS, Han SB, Kim JH, Kim DM, Lee K, Lee CW, Lee KH, Lee CH, Han G, Kang JS, Kim HM, Park SK. A novel delta-lactam-based histone deacetylase inhibitor, KBH-A42, induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 486-494
- 8 Qu W, Kang YD, Zhou MS, Fu LL, Hua ZH, Wang LM. Experimental study on inhibitory effects of histone deacetylase inhibitor MS-275 and TSA on bladder cancer cells. *Urol Oncol* 2009 Jan 30. [Epub ahead of print]
- 9 Roy S, Packman K, Jeffrey R, Tenniswood M. Histone deacetylase inhibitors differentially stabilize acetylated p53 and induce cell cycle arrest or apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 2005; 12: 482-491
- 10 Habold C, Poehlmann A, Bajbouj K, Hartig R, Korkmaz KS, Roessner A, Schneider-Stock R. Trichostatin A causes p53 to switch oxidative-damaged colorectal cancer cells from cell cycle arrest into apoptosis. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 607-621
- 11 张波, 黄韬, 刘科, 王国斌. 曲古菌素A抑制乳腺癌细胞增殖的分子机制. 中华实验外科杂志 2007; 24: 1192-1194

■同行评价

本研究探讨了曲古菌素A对食管癌EC1细胞增殖和细胞周期的影响及其分子机制, 有一定新颖性, 结论有一定参考价值。

硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影响

陈晋, 吴清明

■背景资料

胃癌的发病率和死亡率都非常高, 单纯的手术治疗效果不佳, 而化疗的不良反应又太大。如何选择效率高, 不良反应小的方案一直是肿瘤医生不断追求的目标。硒是人体所必需的营养元素, 同时也是一种广泛的抗癌因子, 目前人们对硒的研究, 主要侧重于他的癌症化疗辅助剂作用。

陈晋, 武汉大学医学院 湖北省武汉市 430065
吴清明, 武汉大学附属天佑医院 湖北省武汉市 430064
作者贡献分布: 课题设计实施由吴清明与陈晋共同完成; 数据分析及论文写作由陈晋完成; 审校由吴清明完成。
通讯作者: 吴清明, 教授, 430064, 湖北省武汉市, 武汉大学附属天佑医院. wuhe9224@sina.com
电话: 027-87301829
收稿日期: 2009-09-18 修回日期: 2009-11-20
接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-08

Selenomethionine increases the chemosensitivity of gastric cancer BGC-803 cells

Jin Chen, Qing-Ming Wu

Jin Chen, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei Province, China

Qing-Ming Wu, TianYou Hospital, Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Qing-Ming Wu, TianYou Hospital, Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China. wuhe9224@sina.com

Received: 2009-09-18 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of selenomethionine on the chemosensitivity of gastric cancer BGC-803 cells.

METHODS: BGC-803 cells were incubated with cisplatin alone or in combination with selenomethionine of different concentrations. Cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The expression of selenoprotein P in BGC-803 cells was detected by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method.

RESULTS: The proliferation of cells incubated with cisplatin in combination with selenomethionine was more significantly inhibited when compared with cells incubated with cisplatin alone or blank controls (all $P < 0.05$), and the inhibitory actions were concentration- and time-dependent. The most marked inhibitory effect appeared 72 hours after incubation with cisplatin

(40 mg/L) and selenomethionine (20 mmol/L). Selenium addition during cisplatin treatment could increase the expression of selenoprotein P in BGC-803 cells.

CONCLUSION: Selenomethionine can increase the inhibitory action of cisplatin on the proliferation of BGC-803 cells, which provides a theoretical basis for use of selenomethionine in adjuvant chemotherapy of gastric cancer. Selenoprotein P expression level may be used as a parameter for measuring chemosensitivity of gastric cancer cells.

Key Words: Selenomethionine; Gastric cancer; Cisplatin; Selenoprotein P

Chen J, Wu QM. Selenomethionine increases the chemosensitivity of gastric cancer BGC-803 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3538-3542

摘要

目的: 探讨硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影响。

方法: 用MTT法检测不同浓度的硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影响; 免疫组织化学SP法检测化疗时补硒对胃癌细胞BGC-803中硒蛋白P表达的影响。

结果: 各浓度顺铂加硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803的增殖均有明显抑制作用, 与单用同浓度顺铂组及空白对照组比较有差异性(均 $P < 0.05$), 且呈一定的浓度、时间依赖性, 当顺铂加硒蛋氨酸浓度为40 mg/L+20 mmol/L作用72 h对胃癌细胞BGC-803的增殖抑制作用最强; 同时, 化疗时补充硒蛋氨酸能增强胃癌细胞BGC-803中硒蛋白P的表达。

结论: 硒蛋氨酸可增强顺铂对胃癌细胞BGC-803增殖的抑制作用, 为其作为胃癌化疗的辅助剂提供了理论依据; 硒蛋白P可能成为衡量胃癌化疗敏感性的指标之一。

关键词: 硒蛋氨酸; 胃癌; 顺铂; 硒蛋白P

陈晋, 吴清明. 硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影

■同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科

响. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3538-3542
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3538.asp>

0 引言

胃癌因在我国各类恶性肿瘤中的高发病率及高死亡率而倍受关注, 由于胃癌单纯的手术治愈率不高, 且易出现复发或转移, 因此, 化疗已成为其主要的治疗手段之一, 但其不良反应太大, 很多患者不能完成治疗^[1-2]. 如何选择效率高, 不良反应小的方案一直是肿瘤医生不断追求的目标. 硒是人体所必需的营养元素, 同时也是一种广泛的抗癌因子, 目前人们对硒的研究, 主要侧重于作为癌症化疗辅助剂的作用. 硒能明显降低化疗药物的不良反应, 并且在协同化疗药物抗肿瘤方面发挥着重要的作用^[3-5]. 本实验的目的在于观察硒蛋氨酸对体外培养胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影响, 为探讨其作为胃癌化疗的辅助剂提供理论依据; 同时, 观察了化疗时补充硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803中硒蛋白P的表达的影响, 也为硒蛋白P可能成为衡量胃癌化疗敏感性的指标之一提供了一定的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基、MTT购自Gibco公司; 胎牛血清购自杭州四季青; 胰蛋白酶购自Biosharp公司; 硒蛋氨酸(selenomethionine)、DMSO购自Sigma公司; 兔抗硒蛋白P抗体购自Santa公司; 顺铂购自齐鲁制药有限公司; 免疫组织化学试剂盒及DAB显色液均购于福州迈新生物技术有限公司; 人胃癌细胞BGC-803由武汉科技大学分子生物学实验室提供. 超净工作台(苏州苏净集团安泰空气技术有限公司SW-CJ-2FD型), 恒温CO₂培养箱(SANYO Mco-15AC), 倒置显微镜(Olympus), 酶标仪(metertech E960), 离心机(LD5-2A).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 胃癌细胞BGC-803常规培养于RPMI 1640(含100 mL/L胎牛血清)中, 置37℃、50 mL/L CO₂培养箱内培养, 注明细胞名称及日期.

1.2.2 MTT法检测不同浓度的硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影响: 取对数生长期的胃癌BGC-803细胞, 按每孔 1×10^4 个/mL细胞的密度接种于96孔板中, 24 h后换液, 加入顺铂10 mg/L+硒蛋氨酸5 mmol/L, 顺铂20 mg/L+硒蛋氨酸10 mmol/L, 顺铂30 mg/L+硒蛋氨酸15 mmol/L, 顺铂40 mg/L+硒蛋氨酸20 mmol/L, 顺铂50 mg/L+硒

蛋氨酸25 mmol/L, 设单用同样浓度的顺铂为阴性对照组, 只接种细胞未加试剂为空白对照组, 每组每个浓度每个时间点6个复孔, 置37℃、50 mL/L CO₂培养箱内培养, 注明细胞名称及同期, 明确每个孔所加入的试剂, 以免混淆. 于24、48、72、96 h后吸去上清, 并用PBS清洗1遍后加入RPMI 1640培养液, 再将MTT溶液(5 g/L)10 μ L加入至每孔, 继续在37℃、50 mL/L CO₂培养箱内孵育4 h后弃上清, 每孔加入100 μ L DMSO, 放入摇床轻轻振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 在590 nm波长酶标仪上测定吸光度(A值)^[6].

1.2.3 细胞爬片免疫组织化学SP法观察补硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803中硒蛋白P表达的影响:

(1)细胞爬片: 将灭菌后的盖玻片放入无菌6孔板的影响内, 取对数生长期的胃癌BGC-803细胞, 按 1×10^4 个/mL细胞的密度接种于6孔板内盖玻片的中央, 每孔90 μ L, 置37℃、50 mL/L CO₂培养箱内孵育2 h后, 加入含RPMI 1640培养液(含100 mL/L胎牛血清)继续培养, 24 h后吸去培养液, 按照MTT法测出的最佳顺铂+硒蛋氨酸浓度处理实验组细胞, 单用同样浓度的顺铂为阴性对照组, 只接种细胞未加试剂为空白对照组, 每组6个复孔, 继续在37℃、50 mL/L CO₂培养箱内培养后取出进行免疫组织化学实验. (2)SP免疫组织化学: 将细胞爬片在六孔板里用PBS浸洗, 然后40 g/L多聚甲醛固定1-2 h后, 依次加3% H₂O₂-甲醇封闭、一抗和二抗, 以DAB为显色剂SP免疫组织化学法检测胃癌细胞BGC-803中硒蛋白P的表达. (3)胃癌细胞BGC-803染色阳性率计算方法: 以细胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性表达判断依据, 每张细胞爬片随即选取5个高倍($\times 400$)视野, 并计数5个视野中的细胞总数及阳性表达的细胞数, 计算出每张爬片上阳性细胞百分率作为标记指数(阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$)^[7-8].

统计学处理 SPSS11.5统计软件进行分析, 所有计数资料以mean \pm SD表示, 均数间差异采用方差分析, 两两比较采用t检验, 显著性水准为0.05.

2 结果

2.1 胃癌细胞BGC-803的增殖 各组浓度顺铂加硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803的增殖均有明显抑制作用, 与单用同浓度顺铂组及空白组比较有统计学差异(均 $P < 0.05$), 且呈一定的浓度、时间依赖性, 用顺铂加硒蛋氨酸浓度为40 mg/L+20 mmol/L处理胃癌细胞BGC-803 72 h后, 对该细

■相关报道

大量的流行病学表明, 硒水平的各种参数与胃癌、食管癌、结直肠癌及膀胱癌等呈负关联. 但因为硒与其他的必需元素一样, 他的生物学效应具有双向性, 一方面缺硒会引起异常反应, 另一方面高浓度的硒又可引起中毒反应, 所以目前硒在肿瘤化疗中仅作为辅助剂使用.

■创新盘点

本研究观察了硒蛋氨酸对体外培养胃癌细胞BGC-803化疗敏感性的影响和化疗时补充硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803中硒蛋白P的表达的影响,为硒蛋白P可能成为衡量胃癌化疗敏感性的指标之一提供了一定的理论依据。

表 1 硒蛋氨酸、顺铂对胃癌细胞BGC-803敏感性检测 (mean \pm SD, $n = 6$)

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
空白组	0.617 \pm 0.073	0.673 \pm 0.071	0.735 \pm 0.053	0.781 \pm 0.044
顺铂组(mg/L)				
10	0.532 \pm 0.055 ^d	0.495 \pm 0.073 ^d	0.475 \pm 0.135 ^d	0.444 \pm 0.105 ^d
20	0.502 \pm 0.053 ^d	0.445 \pm 0.086 ^d	0.423 \pm 0.050 ^d	0.393 \pm 0.010 ^d
30	0.464 \pm 0.008 ^d	0.377 \pm 0.010 ^d	0.371 \pm 0.010 ^d	0.341 \pm 0.020 ^d
40	0.413 \pm 0.017 ^d	0.352 \pm 0.019 ^d	0.261 \pm 0.014 ^d	0.253 \pm 0.014 ^d
50	0.389 \pm 0.016 ^d	0.324 \pm 0.013 ^d	0.251 \pm 0.018 ^d	0.247 \pm 0.013 ^d
硒蛋氨酸+顺铂组				
5 mmol/L+10 mg/L	0.487 \pm 0.027 ^b	0.387 \pm 0.024 ^b	0.231 \pm 0.010 ^b	0.206 \pm 0.026 ^a
10 mmol/L+20 mg/L	0.412 \pm 0.016 ^b	0.296 \pm 0.023 ^b	0.197 \pm 0.013 ^a	0.195 \pm 0.026 ^a
15 mmol/L+30 mg/L	0.376 \pm 0.014 ^b	0.168 \pm 0.016 ^a	0.163 \pm 0.011 ^a	0.169 \pm 0.027 ^a
20 mmol/L+40 mg/L	0.309 \pm 0.017 ^b	0.160 \pm 0.018 ^a	0.158 \pm 0.007 ^a	0.157 \pm 0.015 ^a
25 mmol/L+50 mg/L	0.245 \pm 0.024 ^b	0.156 \pm 0.012 ^a	0.154 \pm 0.014 ^a	0.151 \pm 0.006 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白组; ^d $P < 0.01$ vs 硒蛋氨酸+顺铂组。

细胞的增殖抑制作用最明显。但考虑该浓度处理胃癌细胞BGC-803 48 h及以后,细胞状态不好,故用该浓度处理24 h进行后面的实验(表1)。

2.2 硒蛋白P的表达 顺铂加硒蛋氨酸浓度为40 mg/L+20 mmol/L和单用同样浓度顺铂处理胃癌细胞BGC-803 24 h后,以及未经药物处理的胃癌细胞BGC-803培养24 h后,通过SP免疫组织化学观察,阳性反应的胃癌细胞BGC-803胞质或胞膜出现棕黄色、黄色或浅黄色小均匀颗粒。顺铂加硒蛋氨酸处理的细胞呈现最强的阳性反应;仅经顺铂处理的细胞阳性反应次之;而未经任何试剂处理的细胞则阳性反应最弱(图1)。进一步在40 \times 显微镜下随机选取5个视野进行阳性细胞计数并计算阳性细胞率,空白组阳性细胞表达率为37.5% \pm 2.345%,顺铂组阳性细胞表达率为42.5% \pm 1.643%,顺铂加硒蛋氨酸组阳性细胞表达率为46.167% \pm 1.471%。空白组与顺铂组间($t = -4.277$, $P = 0.002$)、顺铂组与顺铂加硒蛋氨酸组间($t = 4.071$, $P = 0.002$)、空白组与顺铂加硒蛋氨酸组间($t = 7.667$, $P = 0.000$)阳性细胞表达率不同,差异均有统计学意义。

3 讨论

微量元素在人体内的含量虽然很少,但对人体健康却起着重要的作用。他们作为酶、激素、核酸的成分,参与生命的代谢过程。从某种意义上说,微量元素比维生素对机体更重要。硒之所以对肿瘤的预防与治疗起着重要作用,主要原因是其能改善免疫功能,提高机体抵抗力

和抗氧化能力,能阻断肿瘤血管形成,防止肿瘤复发、转移。由于硒所具备的生物学功能,因而吸引了大批专家学者就硒与癌症的关系进行了大量包括在动物和人体的实验研究。大量的流行病学表明,硒水平的各种参数与胃癌、食管癌、结直肠癌及膀胱癌等呈负关联^[1,9-11]。但因为硒与其他的必需元素一样,他的生物学效应具有双向性,一方面缺硒会引起异常反应,另一方面高浓度的硒又可引起中毒反应,所以目前硒在肿瘤化疗中是作为辅助剂使用。硒作为一种必需的微量元素,其重要的生理功能主要由已知的约12种硒蛋白发挥,而硒蛋白P是主要的血浆硒蛋白,所以硒蛋白P被作为反应人体内硒水平的一个很好的指标进一步探讨硒与肿瘤的关系^[12-14]。

本研究显示,各组浓度顺铂加硒蛋氨酸对胃癌细胞BGC-803的增殖均有明显抑制作用,与单用同浓度顺铂组及空白对照组比较有统计学意义($P < 0.05$),且呈一定的浓度、时间依赖性;随着浓度的增加,时间的延长,对胃癌细胞BGC-803的增殖抑制作用更明显。MTT结果显示,在顺铂加硒蛋氨酸浓度为40 mg/L+20 mmol/L处理胃癌细胞BGC-803 72 h后,对该细胞的增殖抑制作用最明显,与单用同浓度的顺铂组及未经任何处理的该细胞组有统计学差异。用该浓度处理胃癌细胞BGC-803和单用同样浓度顺铂处理胃癌细胞BGC-803 24 h,以及未经药物处理的胃癌细胞BGC-803培养24 h后,免疫组织化学结果显示,阳性反应的胃癌细胞BGC-803胞质或胞

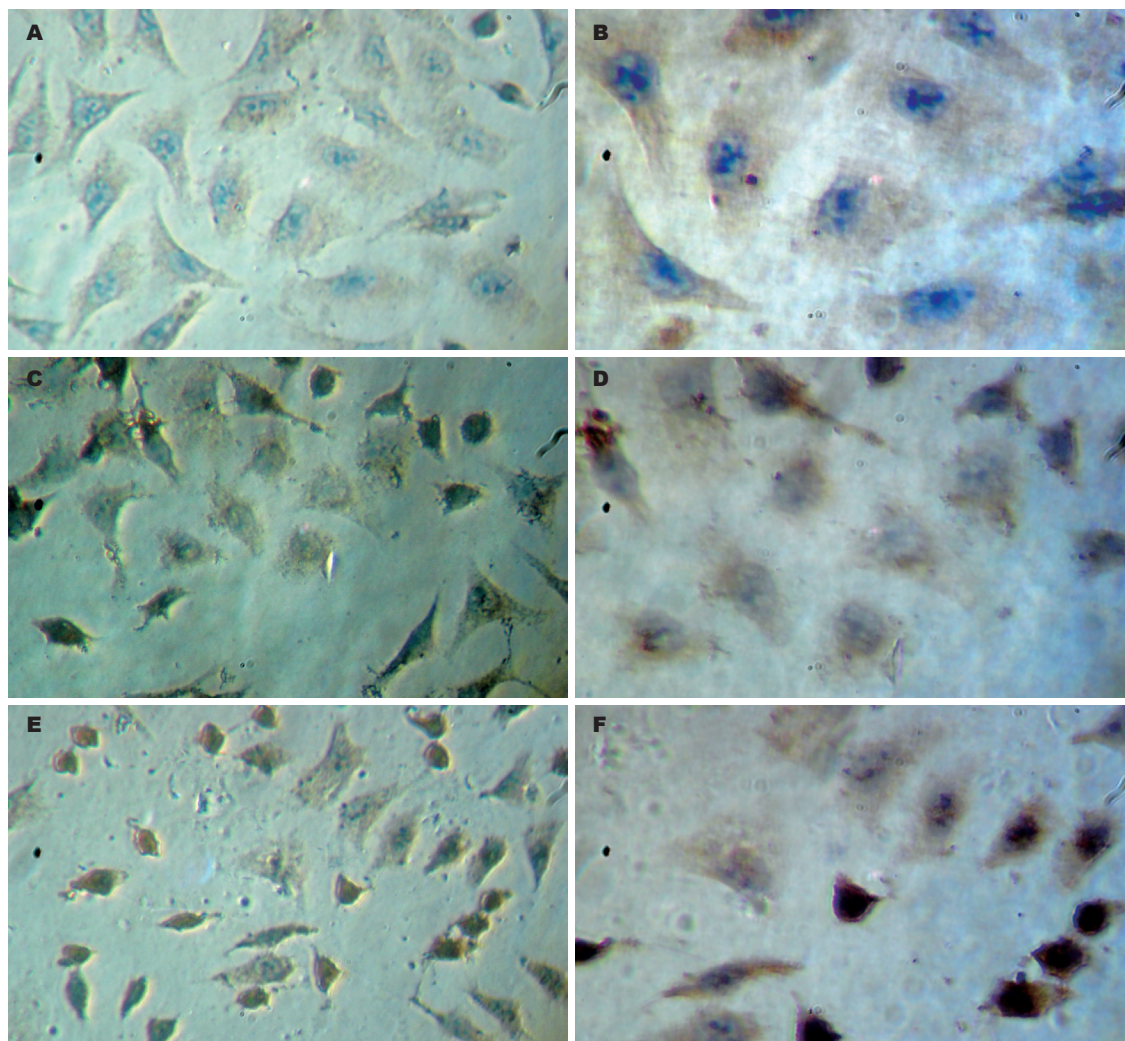


图 1 胃癌细胞BGC-803中硒蛋白P的表达(免疫组织化学染色). A: 空白对照组低倍镜($\times 200$); B: 空白对照组高倍镜($\times 400$); C: 顺铂组低倍镜($\times 200$); D: 顺铂组高倍镜($\times 400$); E: 硒蛋氨酸加顺铂组低倍镜($\times 200$); F: 硒蛋氨酸加顺铂组高倍镜($\times 400$).

■应用要点

本研究提示, 硒蛋氨酸可增强顺铂对胃癌细胞BGC-803增殖的抑制作用; 而硒蛋白P的表达与胃癌细胞增殖呈负相关, 这为硒蛋白P能否成为胃癌化疗敏感性的指标之一提供了一定的理论依据.

膜出现棕黄色、黄色或浅黄色小均匀颗粒. 顺铂加硒蛋氨酸处理的细胞呈现最强的阳性反应; 仅经顺铂处理的细胞阳性反应次之; 而未经任何试剂处理的细胞则阳性反应最弱. 进一步在每张细胞爬片上随即选取5个高倍($\times 400$)视野, 并计数5个视野中的细胞总数及阳性表达的细胞数, 得出阳性细胞百分率顺铂加硒蛋氨酸处理的阳性细胞表达率最高, 仅经顺铂处理的阳性细胞表达率次之; 而未经任何试剂处理的阳性细胞表达率最低, 有统计学意义.

因此, 我们认为硒蛋氨酸可增强顺铂对胃癌细胞BGC-803增殖的抑制作用; 而硒蛋白P的表达与胃癌细胞增殖呈负相关, 这为硒蛋白P能否成为胃癌化疗敏感性的指标之一提供了一定的理论依据.

4 参考文献

- 1 王竟, 王金万. 胃癌治疗进展. 癌症进展 2004; 2: 88-93
- 2 Ajani JA. Evolving chemotherapy for advanced

- gastric cancer. *Oncologist* 2005; 10 Suppl 3: 49-58
- 3 赵洪进, 刘佩红, 孙泉云, 唐文红, 刘家国, 刘艳娟, 王小龙. 硒在肿瘤防治中的作用研究进展. 动物医学进展 2007; 28: 96-99
- 4 吴建民, 陈婉容. 硒在癌症治疗中的作用. 广东微量元素科学 2000; 7: 1-4
- 5 吴英德, 吴开国. 硒对癌症的预防和临床问题的研究现状. 广东微量元素科学 2002; 9: 18-24
- 6 吴清明, 陈滋华, 童强, 李胜保, 王小虎. 硒蛋氨酸对耐顺铂食管癌细胞P-170的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1179-1182
- 7 周乾毅, 袁新初, 张端莲, 程桂荣, 张伟, 杨逢春. 重组人促红细胞生成素对体外培养内皮细胞增殖的影响. 解剖学杂志 2008; 31: 626-628
- 8 王青, 吕宁, 窦科峰, 薛丽艳, 钱海利, 房青, 谢永强, 刘秀云, 杨建国, 马庆久, 鲁建国, 詹启敏, 林晨. 利用组织芯片技术检测硒蛋白P在胃癌组织中的表达. 肿瘤防治杂志 2005; 12: 721-724
- 9 别同玉, 许加生. 硒与肿瘤. 微量元素与健康研究 2002; 19: 61-65
- 10 孙毅, 卢贤瑜. 硒抗肿瘤机制的研究进展. 国际检验医学杂志 2006; 27: 1042-1047
- 11 Raich PC, Lü J, Thompson HJ, Combs GF Jr. Selenium in cancer prevention: clinical issues and implications. *Cancer Invest* 2001; 19: 540-553
- 12 Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins

■同行评价

本文研究了硒蛋
氨酸对胃癌BGC-
803化疗敏感性,
结论有一定参考
价值。

- and human health: a review. *Public Health Nutr* 2001; 4: 593-599
- 13 Gladyshev VN, Jeang KT, Wootton JC, Hatfield DL. A new human selenium-containing protein.

- Purification, characterization, and cDNA sequence. *J Biol Chem* 1998; 273: 8910-8915
- 14 张宝弟, 郭雄. 硒蛋白. 国外医学·医学地理分册 2004; 25: 115-119

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 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病学杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.

食管动力在咽喉反流发生中的作用

马进玉, 齐颖, 邸岩, 苗丽

马进玉, 齐颖, 邸岩, 苗丽, 北京世纪坛医院干部医疗科干一病区 北京市 100038

作者贡献分布: 此研究由马进玉设计; 临床操作、病例采集由马进玉、齐颖、邸岩及苗丽完成; 数据分析与论文撰写由马进玉完成。

通讯作者: 马进玉, 副主任医师, 100038, 北京市海淀区羊坊店路, 北京世纪坛医院干部医疗科干一病区。

majinyu@yahoo.com.cn

电话: 010-63926700

收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2009-11-14

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-08

Role of esophageal motility in the development of laryngopharyngeal reflux

Jin-Yu Ma, Ying Qi, Yan Di, Li Miao

Jin-Yu Ma, Ying Qi, Yan Di, Li Miao, the First Department of Cadre Medical Treatment, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Correspondence to: Jin-Yu Ma, the First Department of Cadre Medical Treatment, Beijing Shijitan Hospital, Yangfangdian Road, Haidian District, Beijing 100038, China. majinyu@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-16 Revised: 2009-11-14

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the role of esophageal motility in the development of laryngopharyngeal reflux.

METHODS: Esophageal manometry and 24-hour esophageal pH monitoring were performed in 22 patients suffering from reflux laryngitis (LPR group) caused by gastroesophageal reflux and 23 patients with typical gastroesophageal reflux symptoms (acid regurgitation and heartburn) but without laryngitis-related symptoms (GERD group).

RESULTS: The upper esophageal sphincter (UES) pressure and the contractile force of esophageal segment 8 cm above the lower esophageal sphincter (LES) in the LPR group were significantly lower than those in the GERD group (41.23 ± 19.61 mmHg vs 55.82 ± 20.51 mmHg, $P = 0.009$; 58.77 ± 30.84 mmHg vs 77.40 ± 36.12 mmHg, $P = 0.035$). No significant differences were noted in UES length, LES length,

LES pressure and the contractile force of the remaining segments of the esophagus (3, 13, and 18 cm above LES) between the two groups. The incidence of pathological acid reflux in the LPR group was significantly lower than that in the GERD group ($\chi^2 = 3.979$, $P = 0.046$).

CONCLUSION: UESP and the contractile force of the lower esophagus play an important role in preventing the development of laryngopharyngeal reflux.

Key Words: Gastroesophageal reflux; Laryngopharyngeal reflux; Esophageal manometry; 24-hour esophageal pH monitoring

Ma JY, Qi Y, Di Y, Miao L. Role of esophageal motility in the development of laryngopharyngeal reflux. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3543-3546

摘要

目的: 探讨食管动力在咽喉反流发生过程中的作用。

方法: 对怀疑由胃食管反流引起的22例反流性咽喉炎患者(LPR组)和存在典型食管反流症状(反酸烧心)却没有咽喉炎症状的23例胃食管反流病患者(GERD组)进行食管压力测定和24 h食管pH监测。

结果: LPR组的食管上括约肌压力(UESP)和距食管下括约肌(LES)8 cm处的食管收缩力明显低于GERD组(41.23 ± 19.61 mmHg vs 55.82 ± 20.51 mmHg; 58.77 ± 30.84 mmHg vs 77.40 ± 36.12 mmHg, $P = 0.009$, 0.035)。2组的食管上括约肌长度(UESL)、食管下括约肌长度(LESL)、食管下括约肌压力(LESP)和食管其余各段(距LES 3、13、18 cm)的收缩力无明显差异。LPR组病理性酸反流的发生率明显低于GERD组($\chi^2 = 3.979$, $P = 0.046$)。差异有统计学意义。

结论: UESP和食管下段的收缩力在阻止咽喉反流的发生中起重要作用。

关键词: 胃食管反流; 咽喉反流; 食管测压; 24-小

■背景资料

胃食管反流导致反流性咽喉炎的发生机制十分复杂,并不是所有胃食管反流都引起咽喉反流。国内针对食管动力在咽喉反流发生中的作用研究较少。

■同行评议者

施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科; 迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院消化内科

■研究前沿

目前治疗反流性咽喉炎主要应用抑酸促胃动力等治疗胃食管反流的方法,多数研究集中在抑酸药的应用疗程及疗效方面,尚无根本性阻断反流物从食管进入咽喉部的措施。

时食管pH监测

马进玉, 齐颖, 邱岩, 苗丽. 食管动力在咽喉反流发生中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3543-3546
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3543.asp>

0 引言

胃食管反流(gastroesophageal reflux, GER)是指胃内容物通过食管下括约肌反流入食管. 咽喉反流(laryngopharyngeal reflux, LPR)是指胃内容物反流至食管上括约肌(upper esophageal sphincter, UES)以上的咽喉部. GER有复杂的病理特点,可引起多种临床症状. 食管症状(典型表现)主要为反酸和胸骨后烧灼感等. 食管外症状(非典型表现)主要累及呼吸系统,表现为咽部异物感、慢性咳嗽、哮喘等. 食管症状感知和食管外症状感知的机制主要有胃酸和胃蛋白酶对食管和呼吸道黏膜的直接刺激及迷走神经反射等. 目前,食管动力在防止LPR的发生中所起的作用研究甚少. 本研究对这一问题做出分析,以探讨食管动力在LPR发生中所起的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2006-05/2009-05在我院胃肠动力检查室接受食管动力检查疑似GERD导致食管外症状的患者22例为LPR组,其中男11例,女11例,年龄27-83岁. 症状表现为咽部异物感11例,慢性咳嗽10例,阵发哮喘1例,均经耳鼻喉科专科医师确诊慢性咽喉炎症,经传统清热抗炎等治疗无明显效果,怀疑GERD引起. 另随机选取在我院胃肠动力检查室接受检查的症状表现为反酸烧心但无食管外症状的患者23例作为GERD组,男14例,女9例,年龄39-83岁. 2组在性别年龄无统计学差异. 这些患者均除外了糖尿病、结缔组织疾病、甲亢甲减等全身性疾病,无消化系手术史.

1.2 方法

1.2.1 食管测压: 检查前1 wk停用抑酸药、胃肠促动力药,检查前至少禁食8 h,应用高分辨四通道毛细灌注测压系统(Polygraf ID, 瑞典Medtronic公司生产),采用定点牵拉法分别测定受检者食管上括约肌压力(upper esophageal sphincter pressure, UESP),食管下括约肌压力(lower esophageal sphincter pressure, LESP),食管上括约肌长度(upper esophageal sphincter length, UESL),食管下括约肌长度(lower esophageal sphincter length, LESL). 湿咽5-10次(每次咽水5

mL, 间隔30 s),测量食管体部各段(分别距LES上缘3、8、13、18 cm)的收缩幅度,取其平均值.

1.2.2 食管pH监测: 测压结束后应用便携式动态pH监测记录仪(Digitrapper pH 400, 瑞典Medtronic公司生产)行24 h食管pH监测,电极选用单通道铈电极,电极置于LES上缘5 cm处(据食管测压结果配合牵拉法定位),记录24 h,记录仪自动计算出Demeester积分. pH<4时间百分比>4%或Demeester积分 ≥ 14.72 为病理性酸反流.

统计学处理 应用SPSS11.0统计分析软件,采用组间比较 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

与GERD组相比, LPR组的UESP和距LES上8 cm处食管收缩力明显降低,差异有统计学意义($P=0.009, 0.035$). 2组UESL、LESL、LESP和距LES 3、13、18 cm处食管体部的收缩压力无明显差异($P>0.05$, 表1). LPR组有18例接受了食管pH监测,其中7例存在病理性酸反流,占38.9%. GERD组有22例接受pH监测,14例存在病理性酸反流,占63.6%. 两组相比具有统计学意义($\chi^2=3.979, P=0.046$).

3 讨论

GERD是国内外常见的消化系疾病之一,其典型症状为反酸和烧心,有的患者也出现反食和胸痛. 近年来研究表明,相当一部分咽喉部疾病(如咽喉炎)是有GERD引起,症状表现为咽部异物感、咽喉痛、慢性咳嗽、声音嘶哑等^[1-2]. 据研究估计,来耳鼻喉科门诊就诊的患者中约有10%存在LPR的症状和体征^[3]. GER也是消化系和呼吸道柱状细胞癌的重要致病因素^[4].

目前,GERD出现食管外症状的确切发生机制尚未阐明,推断其发生可能由于胃内容物“冲破”LES与UES,胃内的酸性物质或胃蛋白酶与咽喉部黏膜直接接触并引起组织损伤所致^[5];食管远端酸反流刺激通过迷走反射可引起清嗓动作或咳嗽,最终也可导致咽喉部病变和症状^[6]. 咽喉部症状与反酸、烧心等食管内症状并不是同时出现. 龚齐 *et al*^[7]统计发现持续不愈的慢性咽喉炎患者中,GERD占34.6%,而同时具有反酸、上腹部烧灼感等消化系症状者仅占9.2%,由此可见反流性咽喉炎患者中绝大多数无典型的食管症状,胃内容物是否反流入咽喉部与反流入食管内的量并无相关性. 常规食管

表 1 两组食管测压结果 ($n = 45$, mean \pm SD)

分组	UESP(mmHg)	UESL(cm)	LESP(mmHg)	LESL(cm)	P18cm(mmHg)	P13cm(mmHg)	P8cm(mmHg)	P3cm(mmHg)
LPR组	41.23 \pm 19.61 ^b	3.22 \pm 0.99	20.50 \pm 8.63	2.74 \pm 0.76	50.82 \pm 27.27	42.09 \pm 21.81	58.77 \pm 30.82 ^a	65.08 \pm 28.95
GERD组	55.82 \pm 20.51	3.68 \pm 1.06	16.87 \pm 6.83	2.93 \pm 0.88	49.90 \pm 25.02	46.33 \pm 29.67	77.40 \pm 36.12	73.51 \pm 36.56
<i>t</i> 值	2.440	1.517	1.563	0.795	0.118	0.548	1.863	0.888
<i>P</i> 值	0.009	0.068	0.063	0.216	0.453	0.293	0.035	0.190

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs GERD组.

下段pH监测对GERD食管外表现的阳性预测值不高^[8]. 我们也得出一致结论: LPR组病理性酸反流的出现率明显低于GERD组, 但却出现了反流性咽喉炎. 与食管相比, 喉部黏膜本身对胃酸的损伤更为敏感, 缺乏对胃酸的抵抗机制. 在这方面已经有许多动物模型被证实^[9]. 以上研究均提示: 对反流性咽喉炎的诊断不应参照GERD的一些诊断标准如问卷调查、食管下段pH监测等.

目前双通道24 h pH监测被认为是诊断LPR的金标准. 远端电极(pH1)位置在LES上缘5 cm, 近端电极(pH2)在UES上缘, 但距UES的距离目前尚未形成定论. 国外有学者认为, 24 h内近端食管pH<4时间百分比大于1%可视为近端食管pH异常^[10]. Jacob *et al*^[11]发现反流性咽喉炎患者食管近端酸暴露时间显著长于正常对照组. 发生LPR的先决条件是发生了GER, 而并不是所有的GER都会进一步导致LPR, 那么阻挡进入食管的胃内容物进入咽喉部的屏障有哪些呢? 抵抗胃酸反流入咽喉部的机制有横膈脚、下食管括约肌、食管体部的蠕动、食管上括约肌和上食管反射等. 目前国内外在针对食管动力在LPR的发生中所起的作用方面研究甚少. 陈军 *et al*发现咽异感症患者存在UES高压^[12]. 亦有报道促动力药物联合H₂受体拮抗剂在治疗GERD相关咽喉部症状取得了较好疗效^[13], 全消化系动力药替加色罗也能明显改善病理性酸反流阳性咽喉炎患者的临床症状^[14]. Fouad *et al*^[15]回顾了98例有呼吸道症状的GERD患者, 并与66例有烧心但无食管外表现的GERD患者进行对照, 发现两组患者中均存在无效食管运动, 但有呼吸道症状患者发生无效食管运动的数量明显高于单纯烧心的患者. 我们分析了有典型食管症状而无咽喉炎的GERD组和LPR组的食管动力, 发现食管上括约肌的压力和食管下段(距LES 8 cm处)的收缩力在LPR组明显下降, 而LES及其余食管各处的

收缩压力2组无明显差异. 2组病理性酸反流的出现率为38.9%和63.6%, LPR组明显低于GERD组, 说明阻止胃内容物反流入咽喉部的关键因素是食管上括约肌的屏障作用和食管下段的清除力. 如果UESP下降, 则反流物冲破UES进入咽喉部的几率增大, 进一步导致反流性咽喉炎. 食管下段收缩力在防止反流物继续反流入咽喉部也起重要作用. 因此, 积极寻找提高UESP和提高食管下段收缩力的治疗方法将可能对防止LPR的发生起到重要作用.

4 参考文献

- 1 Wong RK, Hanson DG, Waring PJ, Shaw G. ENT manifestations of gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: S15-S22
- 2 Powitzky ES, Khaitan L, Garrett CG, Richards WO, Courey M. Symptoms, quality of life, videolaryngoscopy, and twenty-four-hour triple-probe pH monitoring in patients with typical and extraesophageal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2003; 112: 859-865
- 3 Vaezi MF. Therapy Insight: gastroesophageal reflux disease and laryngopharyngeal reflux. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 595-603
- 4 Qadeer MA, Colabianchi N, Vaezi MF. Is GERD a risk factor for laryngeal cancer? *Laryngoscope* 2005; 115: 486-491
- 5 Ylitalo R, Lindestad PA, Ramel S. Symptoms, laryngeal findings, and 24-hour pH monitoring in patients with suspected gastroesophago-pharyngeal reflux. *Laryngoscope* 2001; 111: 1735-1741
- 6 Farrokhi F, Vaezi MF. Extra-esophageal manifestations of gastroesophageal reflux. *Oral Dis* 2007; 13: 349-359
- 7 龚齐, 周康年. 反流性咽喉炎与胃食管反流病的关系研究. *临床耳鼻咽喉科杂志* 2001; 15: 548-549
- 8 李兆申, 徐晓蓉, 邹多武, 谢渭芬, 于晓峰, 陈锡美, 林勇, 夏俊, 朱风尚, 温武, 苏瞰. 胃食管反流病食管外表现的临床研究. *中华内科杂志* 2006; 45: 13-16
- 9 Ludemann JP, Manoukian J, Shaw K, Bernard C, Davis M, al-Jubab A. Effects of simulated gastroesophageal reflux on the untraumatized rabbit larynx. *J Otolaryngol* 1998; 27: 127-131
- 10 Wo JM, Hunter JG, Waring JP. Dual-channel ambulatory esophageal pH monitoring. A useful

■应用要点

本研究发现食管上括约肌压力和食管下段的收缩力对阻止反流物从食管进入咽喉部起重要作用, 为寻找进一步治疗咽喉反流的方法提供理论依据.

■同行评价

本文科学性、创新性和可读性能较好地反映我国该领域研究的先进水平,有较好的参考价值.

- 11 Jacob P, Kahrilas PJ, Herzon G. Proximal esophageal pH-metry in patients with 'reflux laryngitis'. *Gastroenterology* 1991; 100: 305-310
- 12 陈军, 徐洁洁, 陈曦, 王美峰, 陆美萍, 张红杰. 咽异感症的喉镜观察和食管上括约肌压力检测. *江苏医药* 2006; 32: 727-728
- 13 Toohill RJ, Kuhn JC. Role of refluxed acid in pathogenesis of laryngeal disorders. *Am J Med* 1997; 103: 100S-106S
- 14 汪菁峰, 袁耀宗, 许斌, 孙菁. 胃食管反流病食管外症状-咽喉炎的临床研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 6-9
- 15 Fouad YM, Katz PO, Hatlebakk JG, Castell DO. Ineffective esophageal motility: the most common motility abnormality in patients with GERD-associated respiratory symptoms. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1464-1467

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位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (科学编辑: 李军亮 2009-12-08)

阿德福韦酯联合苦参素胶囊对慢性乙型肝炎患者HBV复制及T淋巴细胞亚群的影响

涂远航, 马勇, 李珊珊

涂远航, 蚌埠医学院医学检验系 安徽省蚌埠市 233030
马勇, 李珊珊, 中国人民解放军第123医院肝病中心 安徽省蚌埠市 233015

作者贡献分布: 涂远航对此文作出主要贡献; 此课题由涂远航设计并操作完成主要研究过程; 李珊珊协助完成部分过程; 研究所用标本及部分试剂由马勇提供; 数据分析由涂远航完成; 本论文写作由涂远航完成。

通讯作者: 马勇, 主任医师, 教授, 233015, 安徽省蚌埠市, 中国人民解放军第123医院肝病中心. my4973766@163.com
电话: 0552-4973716

收稿日期: 2009-08-26 修回日期: 2009-11-02
接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-12-08

Effects of adefovir dipivoxil in combination with Marine Capsules on HBV replication and T lymphocyte subsets in patients with chronic hepatitis B

Yuan-Hang Tu, Yong Ma, Shan-Shan Li

Yuan-Hang Tu, Department of Laboratory Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, Anhui Province, China

Yong Ma, Shan-Shan Li, Center for Liver Diseases, the 123rd Hospital of Chinese PLA, Bengbu 233015, Anhui Province, China

Correspondence to: Professor Yong Ma, Center for Liver Diseases, the 123rd Hospital of Chinese PLA, Bengbu 233015, Anhui Province, China. my4973766@163.com

Received: 2009-08-26 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To observe the effects of adefovir dipivoxil in combination with Marine Capsules on hepatitis B virus (HBV) replication and T lymphocyte subsets in patients with hepatitis B surface antigen (HBeAg)-positive chronic hepatitis B (CHB).

METHODS: One hundred and six patients with CHB were randomly divided into control group ($n = 46$) and treatment group ($n = 60$). Patients in the control group received adefovir dipivoxil alone, while those in the treatment group received both adefovir dipivoxil and Marine Capsules. The period of treatment was 48 weeks.

RESULTS: At the end of treatment, the negative

conversion rates of HBV DNA and HBeAg and HBeAg/anti-HBe seroconversion rate were significantly higher in the treatment group than in the control group (71.67% vs 32.61%, 53.33% vs 15.22%, and 45.00% vs 13.04%, respectively; all $P < 0.05$). The percentages of CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes were significantly higher in the treatment group than in the control group ($38.61\% \pm 5.28\%$ vs $30.16\% \pm 5.11\%$, and $1.52\% \pm 0.32\%$ vs $0.73\% \pm 0.30\%$, respectively; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Adefovir dipivoxil in combination with Marine Capsules can significantly improve efficacy and increase the percentages of CD4⁺ and CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes in patients with CHB.

Key Words: Adefovir dipivoxil; Marine; Chronic hepatitis B; T lymphocyte subset

Tu YH, Ma Y, Li SS. Effects of adefovir dipivoxil in combination with Marine Capsules on HBV replication and T lymphocyte subsets in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3547-3549

摘要

目的: 探讨阿德福韦酯联合苦参素抗病毒治疗对HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者病毒复制指标及T淋巴细胞亚群的影响。

方法: 将106例慢性乙型肝炎患者随机分为治疗组和对照组。治疗组60例, 给予阿德福韦酯联合苦参素胶囊治疗; 对照组46例, 单用阿德福韦酯治疗; 2组疗程均为48 wk。

结果: 疗程结束后, 组HBV DNA、HBeAg阴转率以及HBeAg/抗HBe转换率显著高于对照组, 差异有统计学意义(71.67% vs 32.61%; 53.33% vs 15.22%; 45.00% vs 13.04%, 均 $P < 0.05$); 治疗组CD4⁺以及CD4⁺/CD8⁺也较对照组明显升高, 差异有统计学意义($38.61\% \pm 5.28\%$ vs $30.16\% \pm 5.11\%$; $1.52\% \pm 0.32\%$ vs $0.73\% \pm 0.30\%$, 均 $P < 0.05$)。

■背景资料

乙型肝炎的治疗, 抗病毒是关键。目前公认有效的抗病毒药物有干扰素类和核苷类似物类, 但干扰素副作用大, 价格昂贵, 拉米夫定变异率较高, 恩替卡韦、替比夫定价格较贵, 均限制了这些药物的广泛应用。阿德福韦酯因其安全、有效、廉价的特点, 目前在临床已经逐渐替代拉米夫定成为一线抗病毒药物。但临床发现, 阿德福韦酯亦有其不足之处, 其抗病毒作用在不同个体中差异较大, 尤其在病毒载量较高时, 其HBV DNA阴转率及HBeAg/抗HBe转换率均较低, 探讨通过联合用药提高阿德福韦酯抗病毒疗效对广大乙型肝炎患者具有重要意义。

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

■研究前沿

慢性乙型肝炎患者普遍存在着细胞免疫功能的紊乱,通过T淋巴细胞亚群的检测,评价患者细胞免疫状况,提高现有药物抗病毒的效果,是目前研究的热点,也是目前临床上亟待研究的问题。

结论: 阿德福韦酯与苦参素联合应用可显著提高疗效,并能显著改善慢性乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞亚群状态。

关键词: 阿德福韦酯; 苦参素; 慢性乙型肝炎; T淋巴细胞亚群

涂远航, 马勇, 李珊珊. 阿德福韦酯联合苦参素胶囊对慢性乙型肝炎患者HBV复制及T淋巴细胞亚群的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3547-3549

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3547.asp>

0 引言

乙型肝炎的发病机制主要是机体免疫系统清除HBV而引发的免疫病理改变。对慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的自然史研究表明,慢性HBV感染者病情进展和预后与HBV复制密切相关。T淋巴细胞亚群的平衡在机体清除HBV过程中起决定作用^[1-2]。阿德福韦酯可明显抑制HBV DNA复制,耐药率低,已成为一线抗HBV药物之一,但其抑制作用在不同个体中差异较大,尤其在病毒载量(HBV DNA $\geq 1 \times 10^7$ copies/mL)患者中,HBV DNA阴转率及HBeAg/抗HBe转换率均较低。本研究中采用阿德福韦酯联合苦参素治疗HBV DNA阳性CHB患者60例,观察治疗前后HBV DNA及外周血T细胞亚群的变化,并与对照组比较,探讨通过联合用药提高阿德福韦酯抗病毒疗效的可行性及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 中国人民解放军第123医院肝病中心门诊及住院的CHB患者106例,其中男78例,女28例,年龄18-52(平均33.5)岁。所有病例均符合2000年西安修订《病毒性肝炎防治方案》的诊断分型标准^[3],同时HBV DNA $\geq 10^5$ copies/mL(荧光定量PCR),且排除甲、丙、丁、戊和庚型肝炎病毒的感染,入选前未使用过干扰素、胸腺肽等免疫调节剂。入选病例随机分为2组。2组患者在年龄、性别、病程及实验室检查方面具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 对照组给予阿德福韦酯胶囊(江苏正大天晴药业股份有限公司)10 mg,口服,每天1次,疗程48 wk。治疗组给予阿德福韦酯胶囊和苦参素胶囊(江苏正大天晴药业股份有限公司),其中阿德福韦酯胶囊10 mg,口服,每天1次,疗程48 wk,苦参素胶囊0.2 g,口服,每天3次,疗程48 wk。

1.2.2 HBV DNA的检测: 采用荧光定量PCR法,

表 1 2组HBV DNA、HBeAg转阴及HBeAg/抗HBe转换的比较 $n(\%)$

分组	<i>n</i>	HBV DNA转阴	HBeAg转阴	HBeAg/ 抗HBe转换
治疗组	60	43(71.67)	32(53.33)	27(45.00)
对照组	46	15(32.61)	7(15.22)	6(13.04)
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

由专人按照仪器操作规程和试剂盒说明书操作。

1.2.3 HBeAg及抗HBe的检测: 采用荧光放射免疫法,由专人按照仪器操作规程和试剂盒说明书操作。

1.2.4 T细胞亚群的检测: 采用FACScalibur流式细胞仪(美国BD公司生产)检测外周血T细胞亚群。采取患者外周血2 mL,肝素钠抗凝;分别加入三色标记的单克隆抗体(CD3/FITC, CD4/APC, CD8/PE)10 μ L及60 μ L全血;充分混匀,4℃下避光30 min后加含2.5% FBS的PBS 2.5 mL离心洗去多余抗体;破红,再次离心洗涤,弃上清,细胞以10 g/L多聚甲醛重悬,流式细胞仪检测。

统计学处理 所有试验数据采用应用mean \pm SD表示,SPSS统计软件进行统计学处理,率的比较采用 χ^2 检验,均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 治疗后HBV DNA及HBeAg/抗HBe的变化 治疗组的HBV DNA、HBeAg转阴率以及HBeAg/抗HBe血清转换率明显高于对照组(表1)。

2.2 治疗前后外周血T淋巴细胞亚群的变化 治疗组在疗程结束后CD4⁺ T淋巴细胞百分率以及CD4⁺/CD8⁺比例明显回升,CD8⁺ T淋巴细胞百分率水平下降,同治疗前比较,差异有显著性;而对对照组CD4⁺ T淋巴细胞百分率以及CD4⁺/CD8⁺比例也有所升高,但同治疗前比较,差异无显著性(表2)。

3 讨论

慢性HBV感染者病情进展和预后与HBV复制密切相关。高病毒血症、HBeAg持续阳性、ALT水平高或反复波动是发生肝硬化、肝癌的主要高危因素。抗病毒治疗是CHB治疗的关键所在。但CHB患者存在明显的细胞免疫功能缺陷,国内外多数研究均已证实,CHB患者外周血CD4⁺ T淋巴细胞减少,CD8⁺ T淋巴细胞增加,CD4⁺/CD8⁺比值降低,且不同临床类型的肝炎患者T淋巴细胞亚群绝对数明显不

表 2 治疗前后外周血T淋巴细胞亚群的变化 (mean ± SD)

分组	CD4 ⁺ (%)		CD8 ⁺ (%)		CD4 ⁺ /CD8 ⁺	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	27.62 ± 4.36	38.61 ± 5.28 ^a	35.27 ± 5.02	27.35 ± 5.11 ^a	0.86 ± 0.31	1.52 ± 0.32 ^a
对照组	27.86 ± 4.48	30.16 ± 5.11	32.16 ± 5.56	30.26 ± 4.78	0.71 ± 0.27	0.73 ± 0.30

^aP<0.05 vs 治疗前。

同^[4-8]。如何最大程度改善患者免疫状态, 恢复T淋巴细胞亚群的平衡, 彻底清除HBV, 是目前大家研究的热点。

阿德福韦酯是一种单磷酸腺苷的无环核苷类似物, 在体内被磷酸化为具有活性的二磷酸阿德福韦, 并通过竞争脱氧腺苷三磷酸底物, 终止病毒DNA链延长而发挥抑制HBV DNA作用, 经大规模临床验证, 可使患者获得病毒学、肝脏生化功能和组织学的改善。但其抗病毒作用在不同个体中差异较大, 尤其在病毒载量较高时, HBV DNA阴转率及HBeAg/抗HBe转换率均较低, 董莉 *et al*^[9]比较了不同病毒载量患者的外周血T淋巴细胞亚群, 结果显示高病毒载量患者CD8⁺ T淋巴细胞增加, CD4⁺/CD8⁺比值降低, 和低病毒载量组比较, 差异有显著性, 提示高病毒载量患者存在着更严重的免疫失衡。苦参素是由中药苦豆子中提取的有效成分, 内含氧化苦参碱及少量氧化槐果碱, 具有改善慢性乙型肝炎患者肝功能和抗乙型肝炎病毒作用。国内学者^[10]研究发现苦参素可以使CHB患者外周血CD4⁺ T淋巴细胞增加, CD8⁺ T淋巴细胞减少, 提高CD4⁺/CD8⁺比值, 并能调节Th1和Th2细胞因子比例平衡, 从而提高细胞免疫反应。

本研究采用阿德福韦酯联合苦参素胶囊治疗CHB患者60例, 结果提示: 阿德福韦酯与苦参素有一定的协同作用, 显著提高了HBV DNA、HBeAg转阴率及HBeAg/抗HBe的血清转换率, 并能调节外周血T淋巴细胞亚群的平衡, 提高了CHB抗病毒疗效。但本研究病例及治疗时间有

限, 能否达到最大限度的长期抑制或清除病毒, 尚待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
- 2 田瑛, 邱志峰, 李太生. 慢性乙型肝炎患者和乙型肝炎病毒携带者外周血T细胞亚群的变化和意义. *中华医学杂志* 2005; 85: 3354-3359
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- 4 Urbani S, Boni C, Amadei B, Fisicaro P, Cerioni S, Valli MA, Missale G, Ferrari C. Acute phase HBV-specific T cell responses associated with HBV persistence after HBV/HCV coinfection. *Hepatology* 2005; 41: 826-831
- 5 Shibolet O, Alper R, Zlotogarov L, Thalenfeld B, Engelhardt D, Rabbani E, Ilan Y. Suppression of hepatocellular carcinoma growth via oral immune regulation towards tumor-associated antigens is associated with increased NKT and CD8+ lymphocytes. *Oncology* 2004; 66: 323-330
- 6 黄玉波, 李保顺, 董庆鸣, 谢尧, 魏红山. 慢性HBV感染患者T细胞亚群变化规律及可能的意义. *胃肠病学和肝病学杂志* 2005; 14: 5490-5492
- 7 刘源, 韩亚萍, 李军, 黄祖瑚. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群的测定分析. *南通医学院学报* 2004; 24: 140-141
- 8 刘明, 沈馥, 陆颖, 项明洁. 慢性乙型肝炎病毒感染患者外周血T细胞亚群变化与其血清HBV DNA的水平分析. *中国实验诊断学* 2008; 12: 232-235
- 9 董莉, 李军, 韩亚萍, 刘源, 宋培新, 郭小英. 阿德福韦酯对HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者外周血T细胞亚群的影响. *苏州大学学报(医学版)* 2008; 28: 962-965
- 10 廖光法. 苦参素对慢性乙型肝炎患者外周血T细胞亚群和Th1/Th2平衡的调节作用. *实用医学杂志* 2009; 25: 274-276

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本研究证实, 阿德福韦酯联合苦参素胶囊能够提高疗效, 并能显著改善外周血T淋巴细胞亚群状态, 对CHB的临床治疗及其机制研究均有一定的意义。

戊型肝炎病毒抗体检测试剂盒临床考核数据分析

李宏峰, 赵红

■背景资料

近年来, 散发的戊型肝炎病例呈增多趋势, 临床上 HEV IgM、IgG 的检测有助于疾病的诊断, 国内尚无批准上市检测 HEV 总抗体 (IgM+IgG) 的产品。

李宏峰, 赵红, 天津市传染病医院检验科 天津市 300192
作者贡献分布: 李宏峰与赵红对此文所作贡献均等; 此课题由李宏峰与赵红设计; 研究过程由李宏峰与赵红操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵红提供; 数据分析由李宏峰完成; 本文写作由李宏峰与赵红完成。

通讯作者: 李宏峰, 300192, 天津市传染病医院检验科。
lhfh001@163.com

电话: 022-27468190

收稿日期: 2009-10-10 修回日期: 2009-11-04

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-12-08

Analysis of clinical assessment data for a hepatitis E virus antibody test kit

Hong-Feng Li, Hong Zhao

Hong-Feng Li, Hong Zhao, Clinical Laboratory, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin 300192, China
Correspondence to: Hong-Feng Li, Clinical Laboratory, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin 300192, China. lhfh001@163.com

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

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the quality and possible uses of a hepatitis E virus (HEV) antibody test kit.

METHODS: The kit evaluated (HEV antibody test kit; Dia.Pro Diagnostic Bioprobes Srl, Italy), reference kit (HEV antibody test kit; Wantai Biological Pharmacy, Beijing, China) and a third-party kit were used to detect 450 serum samples taken from individuals undergoing routine physical examination and those potentially infected with HEV. Statistical analysis was then performed to evaluate the test data obtained.

RESULTS: The coincidence rates of positive and negative results and the total coincidence rate between the evaluated kit and the reference kit were 98.35%, 99.70% and 99.33%, respectively. A sample that showed inconsistent results between the evaluated kit and the reference kit was subjected to confirmation test using the third-party kit. The results demonstrated that the evaluated kit had a sensitivity of 99.17% and a specificity of 100%.

■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

CONCLUSION: Combined detection of HEV antibody (IgG+IgM) in the serum of patients can improve the detection rate of HEV.

Key Words: Hepatitis E virus antibody; ELISA; Clinical assessment

Li HF, Zhao H. Analysis of clinical assessment data for a hepatitis E virus antibody test kit. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3550-3552

摘要

目的: 探讨国外戊型肝炎病毒(HEV)抗体检测试剂盒的质量及可能的用途。

方法: 用考核试剂(意大利Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l., HEV抗体检测试剂盒)、参比试剂(北京万泰生物药业有限公司, HEV抗体诊断试剂盒)及第三方试剂对本院常规体检标本及戊型肝炎可疑感染者血样共450份血清进行检测, 并对检测数据进行统计分析。

结果: 考核试剂和参比试剂的阳性符合率98.35%, 阴性符合率99.70%, 总符合率99.33%。对考核试剂和参比试剂检测结果不一致的1例样本进行第三方试剂检测, 表明, 考核试剂的敏感性为99.17%, 特异性为100%。

结论: 采用对患者血清中的HEV抗体(IgG+IgM)的联合检测, 可以提高戊型肝炎的临床检出率, 有助于疾病的诊断与预防。

关键词: 戊型肝炎病毒抗体; 酶联免疫吸附试验; 临床考核

李宏峰, 赵红. 戊型肝炎病毒抗体检测试剂盒临床考核数据分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3550-3552
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3550.asp>

0 引言

戊型肝炎(hepatitis E, HE)是由戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)引起的病毒性肝炎, 主要经粪-口途径传播, 多呈散发性流行, 也可引起暴发性流行^[1]. 在我国, 散发性HE病例约占急性

散发性病毒性肝炎的8.6%^[2-8], 成为不可忽视的公共卫生问题. 在HE早中期, 患者粪便和血清中常可检出病毒RNA, 是HE确诊的可靠指标. 但在疾病中后期, 体内病毒已基本被清除, 此时血清中HEV IgM、HEV IgG通常也已转阳. 在临床上HEV IgM、IgG的检测有助于疾病的诊断. 国内尚无批准上市检测HEV总抗体(IgM+IgG)的产品, 目前应用范围比较广的由北京万泰生物药业有限公司生产的HEV抗体酶联免疫诊断试剂盒(双抗原夹心法). 国内批准上市的相关产品为北京现代高达生物技术有限责任公司生产的HEV IgM抗体诊断试剂盒(酶联免疫法)和HEV IgG抗体酶免检测试剂盒; 国外批准上市的公司有DIA.PRO、DiaSorin等.

1 材料和方法

1.1 材料 采用本院常规体检标本及HEV可疑感染者血样共450份血清, 样本通过静脉穿刺术无菌采集血样, 采用制备临床实验室分析用样品的标准制备血清, 丢弃溶血(红色)样品或明显高脂(乳状)样品, 每份样品分管保存于-70℃. 考核试剂为意大利DIA.PRO Diagnostic Bioprobes Srl生产的HEV抗体检测试剂盒(酶联免疫法)(以下简称考核试剂), 批号为0907, 效期为2008-12; 参比试剂为北京万泰生物药业有限公司生产的HEV抗体酶联免疫诊断试剂盒(双抗原夹心法)(以下简称参比试剂), 批号为ES20080402, 效期为2008-10; 第三方试剂为北京现代高达生物技术有限责任公司生产的HEV IgM抗体诊断试剂盒(酶联免疫法), 批号为200711005, 效期为2008-11, 注册证号为国药准字S20063144; 北京现代高达生物技术有限责任公司生产的HEV IgG抗体酶免检测试剂盒, 批号为200709004, 效期为2008-09, 注册证号为国药准字S20000034. Ortho系统酶标仪.

1.2 方法 所有检测严格按使用说明书操作. 所有判断结果由Ortho-Clinical Diagnostics系统软件完成. 检测结果均根据S/Co值来判断, 意大利DIA.PRO Diagnostic Bioprobes Srl HEV抗体检测试剂盒当待测样品信号/临界阈值(S/CO)<0.9, 样品为阴性, 当待测样品信号/临界阈值(S/CO)≥1.1, 报告显示样品为阳性. 北京万泰生物药业有限公司生产的HEV抗体酶联免疫诊断试剂盒及北京现代高达生物技术有限责任公司生产的HEV IgM抗体诊断试剂盒(酶联免疫法)和HEV IgG抗体酶免检测试剂盒, 当待测样品信号/临界

阈值(S/CO)<1, 样品为阴性. 当待测样品信号/临界阈值(S/CO)≥1, 报告显示样品为阳性.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件, 对结果进行Kappa和ROC曲线分析.

2 结果

2.1 临床研究及分析 本院检测的总样本量为450例. 经检测, 共有119份样本考核试剂与参比试剂检测结果完全一致, 均为阳性; 共有328份样本考核试剂与参比试剂检测结果完全一致, 均为阴性. 有1份样本, 考核试剂检测为阳性, 参比试剂检测为阴性. 有2份样本, 考核试剂检测为阴性, 参比试剂检测为阳性. 结果显示: 考核试剂与参比试剂的阳性符合率为98.35%, 阴性符合率为99.70%, 总符合率为99.33%. 用SPSS13.0对实验结果进行Kappa分析, 结果显示Kappa值为0.983($P<0.001$), 反映考核试剂和参比试剂之间有很好的 consistency(表1).

2.2 诊断敏感性和诊断特异性分析 对考核试剂和参比试剂检测结果不一致的样本, 应用第三方试剂进行检测, 结果显示有1份为假阴性, 1份为真阳性, 1份为真阴性. 所以考核试剂的敏感性为99.17%, 特异性为100%. ROC曲线下面积达0.990, 说明考核试剂盒的检测性能优越, 有较高的准确性(图1).

3 讨论

戊型病毒性肝炎的流行特点似甲型肝炎, 经粪-口途径传播, 具有明显季节性, 多见于雨季或洪水之后, 无慢性化, 预后良好.

HEV根据易感宿主的差别可以分为2大类: 一类只分离自人的H(human)类, 包括HEV-1和HEV-2; 一类为人畜共患的Z(zoonosis)类, 包括HEV3和HEV-4. HEV分部具有一定的地区性, 但尽管不同地区分离、克隆的HEV病毒株的核苷酸序列变异较大, 但其基因结构基本相似, 基因组全长7.6 kb, 编码ORF1, ORF2, ORF3 3种病毒蛋白. ORF1被编码蛋白与RNA复制有关的非结构蛋白. ORF2具有典型的病毒衣壳蛋白的特征, 带有明显的信号肽序列, ORF2有2个主要抗原位点, 一个位点在感染性病毒的表面是不可接近的, 而另一个位点可以接触到抗体, 被特异性中和抗体所识别. ORF3蛋白的25氨基酸区为ORF3和ORF2相互作用所必需, ORF3在HEV结构组装中可能具有很好的调控作用. 意大利DIA.PRO Diagnostic Bioprobes Srl生产的戊型肝炎病毒抗

■应用要点

本文提示, 意大利DIA.PRO Diagnostic Bioprobes Srl生产的HEV抗体检测试剂盒由于采用对患者血清中HEV抗体(IgG+IgM)的联合检测, 可以提高HEV的临床检出率, 有助于疾病的诊断与预防.

■同行评价

本研究对HEV抗体检测试剂盒临床考核数据进行了分析,是一篇有临床实际应用价值的文章。

表 1 考核试剂与参比试剂测定结果 (n)

		万泰试剂		合计
		阳性	阴性	
Dia.Pro	阳性	119	1	120
	阴性	2	328	330
合 计		121	329	450

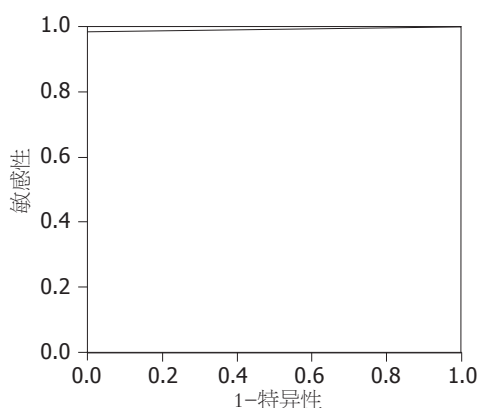


图 1 考核试剂检测HEV IgG+IgM的ROC曲线。

体检测试剂盒的微孔板上包被了HEV 1, 2, 3, 4型的ORF2和ORF3的抗原保守片段, 所以大大地降低了假阴性结果的产生, 提高了检测的准确性。

一种新的体外诊断试剂盒的灵敏性、重复性、准确性、精密性、特异性和可靠性等参数是首先必须考核的指标^[9]。同时通过对临床标本的检测, 并将结果与同类产品(或方法)比较和分析, 也是考核试剂盒临床实际性能的重要内容, 是综合评价新研发产品灵敏度和特异性的重要资料^[10]。由于目前国内尚无批准上市的同类产品, 参比试剂选用北京万泰生物药业有限公司生产的HEV抗体酶联免疫诊断试剂盒。

根据对以上450例标本的临床试验结果表明, 通过对考核试剂与参比试剂进行对比研究,

考核试剂和参比试剂的阳性符合率98.35%, 阴性符合率99.70%, 总符合率99.33%。对考核试剂和参比试剂检测结果不一致的3例样本进行第三方试剂检测, 有1份为假阴性, 1份为真阳性, 1份为真阴性, 结果表明, 考核试剂的敏感性为99.17%, 特异性为100%。经过Kappa分析和ROC分析, 可见该考核试剂检测性能优越, 有较高的准确性, 与国内应用范围比较广的HEV抗体酶联免疫诊断试剂盒相比无明显差别, 有很好的-致性; 且方法简单, 易于操作, 可同时处理大量样品, 可用于高通量检测。该试剂由于采用对患者血清中的戊型肝炎病毒抗体(IgG+IgM)的联合检测, 还可以提高HEV的临床检出率, 有助于疾病的诊断与预防。

4 参考文献

- 1 Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol Res* 2006; 34: 137-140
- 2 庄辉. 重视戊型肝炎的研究. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 5-6
- 3 曲勇刚, 朱光泽, 孙中锋, 王铁峰. 戊型肝炎流行病学研究进展. *传染病信息* 2007; 20: 86-89
- 4 Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 1990; 247: 1335-1339
- 5 陈紫榕. 病毒性肝炎. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 126-127
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学会和肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-326
- 7 康来仪, 孙永德, 郝连杰, 曹学义, 潘启超. 我国丙型和戊型肝炎人群流行病学调查及流行因素的研究. *中华传染病杂志* 1997; 15: 712-715
- 8 程岩, 许家璋, 高蕾, 谢琴秀, 张馨, 孟运运. 164例散发性戊型肝炎临床分析. *江苏医药* 2005; 31: 337
- 9 张庆生. 分析方法的验证. *中国新药与临床药理* 1999; 10: 376
- 10 王瑞莲. 新药临床研究实用手册2设计、执行和分析. 北京: 化学工业出版社, 2003: 38-44

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

IZL-2003免疫治疗系统治疗肝癌患者40例

李文东, 王威, 陈京龙

李文东, 王威, 陈京龙, 北京地坛医院肿瘤科 北京市 100015
北京市优秀人才培养基金资助项目, No. 20081D0301500097
作者贡献分布: 陈京龙与李文东对此文所作贡献均等; 此课题由陈京龙与李文东设计; 病例收集由陈京龙、李文东及王威完成; 研究过程及数据分析由陈京龙与李文东完成; 本论文写作由陈京龙与李文东共同完成。

通讯作者: 陈京龙, 主任医师, 100015, 北京市朝阳区京顺东街8号, 北京地坛医院肿瘤科。chejl6412@yahoo.com.cn

电话: 010-84322470

收稿日期: 2009-08-04 修回日期: 2009-11-04

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-12-08

Efficacy of the IZL-2003 immunotherapeutic system in patients with liver cancer: an analysis of 40 cases

Wen-Dong Li, Wei Wang, Jing-Long Chen

Wen-Dong Li, Wei Wang, Jing-Long Chen, Department of Oncology, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100015, China
Supported by: the Talent Training Foundation of Beijing, No. 20081D0301500097

Correspondence to: Jing-Long Chen, Beijing Ditan Hospital, 8 Jingshun Dongjie, Chaoyang District, Beijing 100015, China. chejl6412@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-04 Revised: 2009-11-04

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the curative effect of the IZL-2003 immunotherapeutic system in patients with liver cancer.

METHODS: Sixty-one patients with liver cancer were divided into treatment group ($n = 40$) and control group ($n = 21$). The patients in the treatment group were treated with liver-protecting drugs in combination with 35-42.8-GHz millimeter wave. The patients in the control group were treated only with liver-protecting drugs. Routine blood tests and liver function tests were performed within two weeks before treatment. T-cell subgroup detection, B-mode ultrasonic scan or computed tomography (CT) were performed within one month before treatment. Routine blood tests were performed again within two weeks after treatment, and T-cell subgroups were retested within three months after treatment.

RESULTS: Millimeter-wave radiation significantly increased white cell count and hemoglobin level in patients with decreased white cell count ($P = 0.028$ and 0.017 , respectively), but had no significant impact on blood platelet count. The counts of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in patients with liver cancer were less than normal level (486.45 ± 255.35 and 350.05 ± 246.26 cells/ μ L, respectively). Millimeter-wave radiation significantly increased the counts of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. In patients with $CD4^+$ cell count less than 400 cells/ μ L, both the counts of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells significantly increased after millimeter-wave radiation ($P = 0.03$ and 0.067 , respectively). Millimeter-wave radiation could effectively improve the symptoms in patients with liver cancer, and the effective rate was above 80% ($P < 0.05$). Millimeter-wave radiation could also improve Karnofsky performance scale (KPS) score and life quality in liver cancer patients.

CONCLUSION: Millimeter-wave radiation used in the IZL-2003 immunotherapeutic system can enhance immunity, increase white cell count and hemoglobin level, improve life quality, and prevent tumor recurrence and metastasis in patients with liver cancer.

Key Words: Millimeter wave; Liver cancer; T-cell subgroups

Li WD, Wang W, Chen JL. Efficacy of the IZL-2003 immunotherapeutic system in patients with liver cancer: an analysis of 40 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3553-3557

摘要

目的: 探讨IZL-2003免疫治疗系统对肝癌患者的疗效。

方法: 入选的61例均为肝癌患者, 其中治疗组40例, 给予毫米波照射联合一般保肝治疗, 复合毫米波包括等幅极高频、脉冲极高频、聚能极高频3种, 治疗头频率为35-42.8 GHz; 对照组21例, 仅给予一般保肝治疗。治疗前2 wk内查血常规、肝功能, 1 mo内查T细胞亚群、B超或CT等, 治疗后2 wk内复查血常规, 3 mo

■背景资料

在肿瘤进展及治疗过程中, 骨髓抑制, 白细胞降低, 免疫功能低下所引起的感染是肿瘤相关的主要死亡原因之一。提高免疫功能及白细胞水平, 改善生活质量是抗肿瘤成败的关键。本研究利用免疫治疗系统通过毫米波照射肝癌患者的骨髓富集点或相关经穴, 增强骨髓造血, 提升人体白细胞, 增强抗肿瘤免疫功能, 提高患者生活质量。

■同行评议者

刘彬彬, 副研究员, 复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所

■相关报道

俄罗斯及我国学者对毫米波照射进行了较深入的研究,证实其可增加NK细胞及CD4⁺细胞的功能,增加TNF- α 水平,减少化疗后肿瘤的转移。已应用于放疗、化疗或其他原因引起的白细胞降低及免疫功能下降的治疗,并可很好的改善肿瘤患者的生活质量。

内复查T细胞亚群。

结果:肝癌患者白细胞降低组,经免疫治疗系统毫米波照射后可升高白细胞及血色素($P = 0.028, 0.017$),血小板无显著变化。肝癌患者T细胞亚群CD4⁺细胞(486.45 ± 255.35 cells/ μ L)及CD8⁺细胞(350.05 ± 246.26 cells/ μ L),均低于正常值,毫米波照射治疗后CD4⁺及CD8⁺水平升高;CD4⁺小于400 cells/ μ L的患者,治疗后CD4⁺及CD8⁺均升高($P = 0.03, 0.067$)。毫米波照射可有效改善肝癌患者症状,有效率可达80%以上($P < 0.05$),可有效提高KPS评分,改善生活质量($P < 0.01$)。

结论:IZL-2003免疫治疗系统毫米波可增加肝癌患者免疫功能,升高白细胞、血色素,改善生活质量,预防肿瘤复发及转移。

关键词:毫米波;肝癌;T细胞亚群

李文东, 王威, 陈京龙. IZL-2003免疫治疗系统治疗肝癌患者40例. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3553-3557
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3553.asp>

0 引言

我院引进的IZL-2003免疫治疗系统采用毫米波照射骨髓富集点或相关经穴,增强骨髓细胞再生和造血功能,使人体白细胞增殖,调节免疫,增加CD4⁺细胞或NK细胞水平,从而提高抗肿瘤疗效。极高频还能够明显改善肿瘤患者的症状,提高生活质量。于1997年中国卫生部将极高频循经治疗肿瘤技术列为十年百项计划推广。俄罗斯及我国等学者对毫米波照射进行了较深入的研究,既往实验证实其可增加NK细胞^[1]及CD4⁺细胞的功能,增加TNF- α 水平^[2],减少化疗后肿瘤的转移^[3],联合环磷酰胺可使实验小鼠的黑色素瘤缩小^[4]。已应用于放疗、化疗或其他原因引起的白细胞降低及免疫功能下降的治疗,并可很好的改善肿瘤患者的生活质量。

1 材料和方法

1.1 材料 入选61例均为肝癌患者,其中治疗组40例,对照组21例。根据志愿随机分组,治疗组均为2007-2008年北京地坛医院门诊或病房患者,40例患者中,39例诊断为原发性肝癌,其中合并乙型肝炎后肝硬化患者31例,合并丙型肝炎后肝硬化患者3例,合并胆汁性肝硬化5例,另1例为晚期乳腺癌肝转移患者。肝癌的诊断及分期标准,按照2001-09广州第八届全国肝癌学

术会议修订的标准,其中男29例,女11例,年龄39-77(平均年龄60)岁,IIa期6例,IIb期14例,IIIa期5例,IIIb期15例,治疗过程中有3例发生腹腔感染退出治疗组。对照组21例,均为北京地坛医院住院的肝癌患者,合并乙型肝炎后肝硬化患者19例,合并丙型肝炎后肝硬化患者2例,男15例,女6例,年龄43岁到81岁,平均年龄60岁,Ia期3例,IIa期2例,IIb期6例,IIIa期6例,IIIb期4例,其中1例患者因感染退出对照组。两组临床资料对比分析,性别、年龄、病种、临床分期、血象及CD4⁺水平无显著差异,Karnofsky评分(KPS) ≥ 60 分,治疗过程中无不良反应发生。免疫治疗系统为极高频辐射,属复合毫米波,包括等幅极高频、脉冲极高频、聚能极高频3种,等幅极高频电磁波治疗头频率为35-37 GHz;脉冲极高频电磁波治疗头频率为35-37 GHz;聚能极高频电磁波治疗头频率为41.2-42.8 GHz,等幅极高频电磁波治疗头出口平均功率密度为3-10 mW/cm²;治疗头工作在脉冲状态下,治疗头出口平均功率密度为2-8 mW/cm²;治疗头工作在等幅状态下,治疗头出口平均功率密度为12-40 mW/cm²;聚能极高频电磁波治疗头出口平均功率密度为3-10 mW/cm²。

1.2 方法 治疗组患者采用IZL-2003免疫治疗系统毫米波照射,每天照射1次,分别照射膈俞穴或血海穴,每次40 min,连用5-15次。或每次30 min,每天2次,上、下午各1次,上午照膈俞穴,下午照血海穴,连用5-15次,其他治疗采用一般保肝或抗病毒治疗,未给予特殊升白细胞药物如升白能等治疗。对照组未采用IZL-2003免疫治疗系统照射,其他治疗与治疗组相同,以上治疗组与对照组全部完成一个疗程以上,治疗前2 wk内查血常规、肝功能,1 mo内查T细胞亚群、B超或CT等,治疗后2 wk内复查血常规,3 mo内复查T细胞亚群,采血为晨起静脉血,T细胞亚群正常范围CD4⁺为706-1125 cells/ μ L,CD8⁺为323-836 cells/ μ L,CD4⁺/CD8⁺为1-2。血常规检查采用cell-DYN 1700全自动血球分析仪,T细胞亚群采用DB FACSCalibur流式法检测,治疗前后密切观察临床症状以评估疗效。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件对数据进行处理及分析,用 χ^2 检验对2组结果进行比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生活质量 免疫治疗系统可有效改善肝癌患

表 1 治疗组及对照组患者生活质量

	治疗组n(%)	对照组n(%)	χ^2 值	P值
食欲改善	30/37(81.08)	11/21(57.14)	5.326	0.021
疼痛缓解	7/8(87.50)	1/4(25.00)	4.688	0.030
乏力减轻	31/37(83.78)	10/21(47.62)	8.456	0.004
夜尿减少	12/15(80.00)	2/10(20.00)	8.766	0.003
KPS评分提高	32/37(86.49)	8/21(38.10)	14.657	0.000

■创新盘点

本研究结合中医经络理论,研究了毫米波对肝癌患者的生活质量、血常规、T细胞亚群的影响,结果显示能改善肝癌患者症状,提升白细胞,增强免疫,改善贫血。

表 2 37例肝癌患者免疫治疗系统治疗前后血常规

	白细胞数($10^9/L$)	血色素(g/L)	血小板($10^9/L$)
白细胞低下($n=23$)			
治疗前	3.11 ± 0.74	104.39 ± 23.98	72.82 ± 39.97
治疗后	3.51 ± 1.02	111.39 ± 30.29	75.41 ± 37.15
P值	0.028	0.017	0.489
白细胞正常($n=14$)			
治疗前	5.33 ± 0.81	119.86 ± 21.73	123.07 ± 52.98
治疗后	5.45 ± 1.26	119.36 ± 27.37	127.86 ± 39.21
P值	0.754	0.908	0.396

者症状,主要表现在乏力减轻,食欲改善,夜尿增多者可减少夜尿,对疼痛患者可缓解症状,治疗组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01),可有效提高KPS评分,改善生活质量($P<0.001$,表1)。

2.2 血常规 IZL-2003免疫治疗系统对白细胞降低的肝癌患者升高白细胞作用显著,同时有升高血色素作用,治疗前后血小板无显著差异。对于白细胞正常的肝癌患者无显著升高白细胞、血色素及血小板的作用(表2)。对照组仅常规予保肝等治疗,未给免疫治疗系统治疗,观察前后血常规指标无显著差异(表3)。

2.3 T细胞亚群观察 治疗前结果提示肝癌患者免疫水平低下,表现为 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ 水平均下降, $CD4^+/CD8^+$ 较高,超过正常值上限。免疫治疗系统治疗可提高 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ 水平, $CD4^+/CD8^+$ 比值有所下降,但治疗前后数据统计无显著差异。对照组未给予免疫治疗系统治疗, $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 均下降, $CD4^+$ 下降最显著($P=0.000$)。2组结果比较,免疫治疗系统可提高 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ 水平,尤其 $CD4^+<400$ cells/ μL 者,可显著提高 $CD4^+$ 水平,提示免疫治疗系统可有效提高或保护免疫功能(表4)。

$CD4^+$ 水平小于400 cells/ μL 的患者,经免疫系统治疗后, $CD4^+$ 及 $CD8^+$ 均升高, P 值分别为0.03及0.067,但需进一步扩大例数确定其有无

表 3 对照组20例肝癌患者观察前后血常规

	白细胞数($10^9/L$)	血色素(g/L)	血小板($10^9/L$)
对照前	3.31 ± 0.97	116.29 ± 31.06	63.05 ± 25.40
对照后	3.50 ± 1.95	117.45 ± 23.73	71.05 ± 29.31
P值	0.670	0.873	0.085

显著差异, $CD4^+/CD8^+$ 比值有所下降,统计学无显著差异(表5)。

3 讨论

在肿瘤进展及治疗过程中,骨髓抑制,白细胞降低,细胞免疫功能低下所引起的感染是肿瘤相关的主要死亡原因之一^[5]。而外科手术或介入治疗后肿瘤的复发及转移亦与免疫功能低下等关系密切。故提高免疫功能及白细胞水平,改善生活质量是抗肿瘤成败的关键。研究显示肝癌患者白细胞水平为 $(3.92 \pm 1.28) \times 10^9/L$,T细胞亚群 $CD4^+$ 细胞 486.45 ± 255.35 cells/ μL 及 $CD8^+$ 细胞 350.05 ± 246.26 cells/ μL 均低于正常值, $CD4^+/CD8^+$ 为 2.00 ± 1.65 ,处于正常值高限^[6-7]。肝癌肝硬化的骨髓抑制,脾功能亢进,抗肿瘤的相关治疗及病情进展均可进一步降低患者的白细胞及免疫功能。

我们采用的IZL-2003免疫治疗系统是利用特定频率的极高频辐射,属复合毫米波,包括等

■应用要点

本研究提示, IZL-2003免疫治疗系统毫米波治疗可有效提高肝癌患者的免疫功能, 改善其生活质量, 有抗肿瘤、预防肿瘤复发及转移等作用。该设备疗效可靠, 无创伤, 无不良反应, 可广泛应用于临床。

表 4 肝癌患者免疫治疗系统治疗或未治疗前后T细胞亚群

	CD4 ⁺ (cells/ μ L)	CD8 ⁺ (cells/ μ L)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
治疗组(n = 20)			
治疗前	486.45 \pm 255.35	350.05 \pm 246.26	2.00 \pm 1.65
治疗后	507.05 \pm 278.03	378.90 \pm 203.16	1.86 \pm 1.53
P值	0.674	0.477	0.224
对照组(n = 21)			
对照前	528.14 \pm 265.176	332.00 \pm 212.33	1.94 \pm 0.74
对照后	387.24 \pm 192.11	275.33 \pm 165.13	1.73 \pm 0.88
P值	0.000	0.153	0.148

表 5 治疗组8例CD4⁺细胞小于400 cells/ μ L者, 治疗前后T细胞亚群

检测项目	CD4 ⁺ (cells/ μ L)	CD8 ⁺ (cells/ μ L)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
治疗前	235.75 \pm 97.05	160.63 \pm 125.57	2.65 \pm 2.47
治疗后	308.88 \pm 133.49	229.00 \pm 163.57	2.53 \pm 2.28
P值	0.030	0.067	0.422

幅极高频、脉冲极高频、聚能极高频3种, 治疗头频率在35-42.8 GHz范围内, 用其近距离照射骨髓富集点或相关经穴, 回升白细胞和进行肿瘤缓解治疗, 从而改善造血功能, 促进白细胞增殖, 调节免疫, 提高生活质量。其相应的治疗穴位多对应于骨髓组织或胸腺部位, 这些均为免疫器官和造血重要场所, 结合中医的经络理论, 从而达到疗效。

有研究提示, 毫米波照射可保护造血组织, 防止放化疗等引起的白细胞降低^[8], 另报道, 毫米波对乙肝肝硬化伴白细胞及血小板减少有明显的提高作用^[9]。治疗结果显示, IZL-2003免疫治疗系统可升高白细胞, 与既往研究相一致。治疗前后血色素比较有差异, 但 $P = 0.061$, 无明显升高血小板作用。37例治疗组患者依据白细胞高低分为白细胞降低及白细胞正常2组分析, 治疗前后, 白细胞降低的肝癌患者可升高白细胞及血色素。对于白细胞正常的肝癌患者治疗前后血常规无显著变化。对照组观察前后血常规指标无显著变化。

目前, 已有大量的临床研究结果表明, 一定条件下的毫米波辐射可以提高机体免疫系统的功能^[10]。治疗组的20例患者, 治疗后CD4⁺及CD8⁺水平升高, CD4⁺/CD8⁺比值有所下降, 但数据统计无显著差异。其中CD4⁺小于400 cells/ μ L的8例患者, 治疗后CD4⁺及CD8⁺均升高, P 值分别为0.03及0.067, CD4⁺升高显著, 提示对免疫功能低

下者疗效显著。而对照组CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺均下降, CD4⁺下降显著。

毫米波结合中医经络理论, 可达到缓解局部疼痛, 恢复肢体功能, 抑制、杀伤肿瘤细胞, 减轻毒副作用^[10]; 毫米波也有用于治疗皮肤损伤及慢性炎症的报道^[11]。观察显示, 免疫治疗系统可有效改善肝癌患者症状, 主要表现在乏力减轻, 食欲改善, 夜尿增多者可减少夜尿, 对疼痛患者可缓解症状^[12], 有效率可达80%以上, 治疗组与对照组比较差异有统计学意义, 可有效提高KPS评分, 改善生活质量。本研究发现毫米波治疗虽然有改善肝癌患者症状、提升白细胞、改善贫血的作用, 但从B超或CT结果看对肝癌的发展进程没有产生有意义的影响, 可能与治疗时间短有关。此外, 由于病例数不够多, 未对各种肿瘤分期的影响进行分析, 目前已在结合其他免疫细胞(NK细胞、Treg细胞等)或免疫分子(IL-2、IL-12等)扩大样本量进一步研究。

总之, IZL-2003免疫治疗系统毫米波治疗可有效提高肝癌患者白细胞及血色素, 适合于白细胞降低及贫血患者, 提高肝癌患者的CD4⁺及CD8⁺水平, 对肝癌患者的免疫功能有保护作用, CD4⁺升高显著, 尤其对CD4⁺小于400 cells/ μ L的患者疗效好。可改善肝癌患者生活质量, 有效提高KPS评分, 该设备疗效可靠, 无创伤, 无不良反应, 针对肝癌患者, 兼有增加免疫功能, 升高白细胞、血色素, 改善生活质量, 抗肿瘤, 预防肿瘤复发及转移等作用^[1-3], 可广泛应用于临床。

4 参考文献

- 1 Makar VR, Logani MK, Bhanushali A, Kataoka M, Ziskin MC. Effect of millimeter waves on natural killer cell activation. *Bioelectromagnetics* 2005; 26: 10-19
- 2 Makar V, Logani M, Szabo I, Ziskin M. Effect of millimeter waves on cyclophosphamide induced suppression of T cell functions. *Bioelectromagnetics*

- 2003; 24: 356-365
- 3 Logani MK, Szabo I, Makar V, Bhanushali A, Alekseev S, Ziskin MC. Effect of millimeter wave irradiation on tumor metastasis. *Bioelectromagnetics* 2006; 27: 258-264
- 4 Logani MK, Bhanushali A, Anga A, Majmundar A, Szabo I, Ziskin MC. Combined millimeter wave and cyclophosphamide therapy of an experimental murine melanoma. *Bioelectromagnetics* 2004; 25: 516-523
- 5 Repetto L, Accettura C. The importance of prophylactic management of chemotherapy-induced neutropenia. *Anticancer Drugs* 2003; 14: 725-730
- 6 王玉亮, 张珩, 李光, 唐志琴, 江雁, 彭林. 肝癌患者外周血淋巴细胞亚群、白细胞介素2和自然杀伤细胞活性的研究. *中华检验医学杂志* 2004; 27: 844-845
- 7 Kong L, Yao SK, Liu JX, Wang N. [The prognostic value of cellular immunity function in patients with hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 194-197
- 8 李国光, 邱书明, 林崇文, 张富鑫. EHF毫米波辐射对受化疗处理期小鼠造血系统的保护作用. *中华物理医学杂志* 1995; 17: 175-177
- 9 张导文, 刘惠敏. 毫米波辅助治疗乙型肝炎硬化合并白细胞及血小板减少疗效观察. *临床医学* 2006; 26: 1-2
- 10 李翔, 胡向军, 彭瑞云. 毫米波辐射的生物效应研究概况. *解放军预防医学杂志* 2007; 25: 379-382
- 11 Liu Z, Sun C, Zhang W, Mao J, Yan Y, Fu C. [Research of magnetism light compound therapy in clinical application] *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2003; 20: 305-307
- 12 Yip YB, Tse HM, Wu KK. An experimental study comparing the effects of combined transcutaneous acupoint electrical stimulation and electromagnetic millimeter waves for spinal pain in Hong Kong. *Complement Ther Clin Pract* 2007; 13: 4-14

■同行评价

本研究观察到 IZL-2003免疫治疗系统对肝癌患者有增加白细胞, 改善贫血和免疫功能等效果, 有一定的学术价值和参考性。

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 •

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 2009-12-08)

塞来昔布治疗肝门部胆管癌24例

吴高松, 马小鹏, 汪杰, 黄丽丽, 刘岩岩, 尹玉平, 刘捷

■背景资料

目前, 肝门部胆管癌的常规手术切除可能已达到一定限度, 需要在治疗观念上有所突破, 才可能获得更好的效果。寻找一种高效低毒的药物辅助治疗晚期肿瘤是许多学者研究的方向。

吴高松, 马小鹏, 汪杰, 黄丽丽, 刘岩岩, 尹玉平, 刘捷, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030

湖北省自然科学基金资助项目, No. 2004ABA246

作者贡献分布: 此课题由吴高松、马小鹏及汪杰设计; 研究过程由刘岩岩、汪杰、黄丽丽、刘捷及尹玉平完成; 研究数据分析由刘捷与尹玉平完成; 本论文写作由马小鹏、汪杰及黄丽丽完成。

通讯作者: 马小鹏, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科. doc_mxp@126.com

收稿日期: 2009-08-26 修回日期: 2009-11-04

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-12-08

Efficacy of celecoxib in the treatment of hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 24 cases

Gao Song Wu, Xiao-Peng Ma, Jie Wang, Li-Li Huang, Yan Yan Liu, Yu-Ping Yin, Jie Liu

Gao Song Wu, Xiao-Peng Ma, Jie Wang, Li-Li Huang, Yan Yan Liu, Yu-Ping Yin, Jie Liu, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2004ABA246

Correspondence to: Xiao-Peng Ma, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. doc_mxp@126.com

Received: 2009-08-26 Revised: 2009-11-04

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical efficacy of celecoxib, a cyclooxygenase-2 (COX-2) selective inhibitor, in the treatment of hilar cholangiocarcinoma.

METHODS: Forty-one patients with hilar cholangiocarcinoma were randomly divided into two groups: 24 consecutive patients undergoing treatment with celecoxib (200 mg PO qd; treatment group), and 17 consecutive patients not undergoing celecoxib treatment (control group). The survival time of patients in the two groups was compared. The analgesic effect and safety of the drug were also analyzed.

RESULTS: The survival time of patients in the treatment group was significantly higher than

that in the control group (11.5 mo vs 9.6 mo, $P < 0.05$). No obvious complications were observed in patients treated with celecoxib. Pain relief was noted in 83.3% of patients in the treatment group.

CONCLUSION: Celecoxib is safe and effective in improving the survival time of patients with advanced hilar cholangiocarcinoma.

Key Words: Celecoxib; Hilar cholangiocarcinoma; Survival rate

Wu GS, Ma XP, Wang J, Huang LL, Liu YY, Yin YP, Liu J. Efficacy of celecoxib in the treatment of hilar cholangiocarcinoma: an analysis of 24 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3558-3560

摘要

目的: 探讨环氧化酶-2(COX-2)特异性抑制剂塞来昔布(celecoxib)治疗肝门部胆管癌的临床疗效。

方法: 对24例不可切除的肝门部胆管癌患者, 采用塞来昔布治疗, 并与同期随机的17例患者(对照组)进行前瞻性比较, 分析2组生存期、塞来昔布治疗的安全性及其镇痛效果。

结果: 塞来昔布组的生存期高于未服用组, 2组生存时间有显著性差异(11.5 mo vs 9.6 mo, $P < 0.05$); 塞来昔布组患者未发生明显的不良反应, 他对疼痛缓解的总有效率为83.3%。

结论: 塞来昔布可能是治疗肝门部胆管癌安全、有效的新方法。

关键词: 塞来昔布; 肝门部胆管癌; 生存率

吴高松, 马小鹏, 汪杰, 黄丽丽, 刘岩岩, 尹玉平, 刘捷. 塞来昔布治疗肝门部胆管癌24例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(34): 3558-3560

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3558.asp>

0 引言

肝门部胆管癌起病隐匿, 目前总体疗效欠佳, 复发率高, 预后较差^[1]。寻找一种高效低毒的药

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外科

物辅助治疗晚期肿瘤是许多学者研究的方向。COX-2是前列腺素生物合成过程中的一个重要限速酶。近年来研究表明, COX-2不仅是炎症反应的中心环节, COX-2基因表达的蛋白更被认为是一种原癌蛋白, 其对多种人类肿瘤的发生与发展中起着重要的促进作用。已有体外实验证实COX-2选择性抑制剂能诱导多种肿瘤细胞凋亡、抑制其生长。我们将塞来昔布用于肝门部胆管癌伴轻度癌痛需服用镇痛药物的患者, 在观察期镇痛效果的同时, 经前瞻性对比研究发现, 塞来昔布治疗肝门部胆管癌有效, 治疗期间未发现明显不良反应。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-06/2007-06华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科、肿瘤科、消化内科以及作者在外院会诊治疗的肝门部胆管癌41例患者, 其中男26例, 女15例。中位年龄56(38-76)岁。塞来昔布组24例, 男15例, 女9例, 中位年龄57.7岁; 对照组17例, 男11例, 女6例, 中位年龄54.7岁。患者均成功行ERCP胆道支架置入治疗, 患者伴有轻度癌痛的症状。13例伴肝脏转移, 12例有中度黄疸, 2例伴骨转移, 2例伴少量腹水, 1例伴肺转移。根据Bismuth-Corlette分类法: I型5例(12.2%)、II型13例(31.7%)、IIIa型8例(19.5%)、IIIb型7例(17.1%)及IV型8例(19.5%)。2组患者病期、年龄等无统计学差异。

1.2 方法 41例患者随机入组分为塞来昔布组和对照组。塞来昔布组: 口服塞来昔布(商品名-西乐葆)200 mg, ERCP术后2 wk开始, 每天1次, 1-6 mo。对照组不服塞来昔布。入组标准: 影像学检查以及病理活检证实为肝门部胆管癌; 并且均成功行ERCP胆道支架置入治疗; 且无磺胺过敏史(塞来昔布禁忌证)。剔除标准: 无完整随访资料者, 因外伤以及ERCP术后并发症等原因意外死亡者不入组, 服用中药抗肿瘤治疗以及采用其他方法治疗者。经患者知情同意, 告知患者服用塞来昔布主要目的为镇痛, 对其是否能抑制肿瘤目前没有结论。

镇痛效果的评定标准: 参考WHO疼痛分级标准。完全缓解: 疼痛基本消失或疼痛明显减轻, 对日常生活无影响; 部分缓解: 疼痛有所减轻, 但对日常生活及饮食、睡眠仍有影响; 无效: 疼痛无变化或加重, 需服用其他镇痛药。

统计学处理 以放置支架完成为起点, 死亡时间为终点; 中位生存时间采用Kaplan-Meier

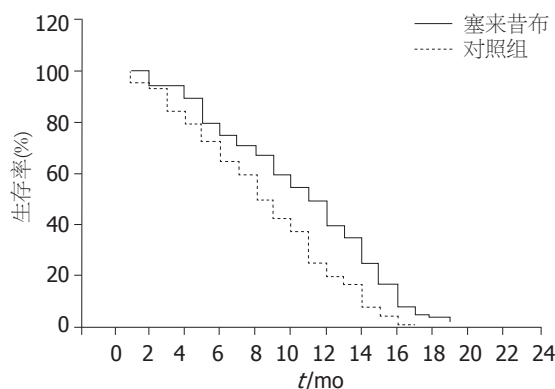


图1 2组生存时间比较。

表1 2组严重不良事件比较

严重不良事件	塞来昔布组(n = 24)		对照组(n = 17)	
	n	发生率(%)	n	发生率(%)
胃肠道出血	3	12.5	2	11.8
肝功能损害	5	20.8	4	23.5
肾功能损害	1	4.2	0	0.0
心脑血管意外	1	4.2	1	5.9

做生存分析。不良反应比较采用 χ^2 检验。应用SPSS13.0统计软件, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

塞来昔布组中位生存时间比对照组延长。塞来昔布组全组中位生存期11.5 mo(95%CI: 4.5-18.9); 对照组: 全组中位生存期9.6 mo(95%CI: 3.6-17.8); 2组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。2组服药期间严重不良事件比较, 消化系出血、肝功能损害、肾功能损害、心脑血管意外的发生率均无显著差异(图1, 表1)。

塞来昔布组24例患者服药2-3 wk时腹痛情况: 完全缓解者4例(16.7%), 部分缓解者16例(66.7%), 无效者4例(16.7%)。总有效率83.3%。

3 讨论

目前, 肝门部胆管癌的常规手术切除可能已达到一定限度, 需要在治疗观念上有所突破, 才可能获得更好的效果^[2]。寻找一种高效低毒的药物辅助治疗晚期肿瘤是许多学者研究的方向。COX参与维持机体各种生理和病理过程, COX-1是一种结构酶, 他催化产生的PG参与机体正常生理过程和保护功能, COX-2被认为是诱导型酶, 只在病理情况下才表达, 包括炎症、缺氧、损伤、修复及肿瘤的生长和转移^[3]。许多癌前病变和恶性肿瘤均有COX-2基因扩增和蛋白

■应用要点

本研究证实, 口服塞来昔布的胆管癌患者, 生存时间延长, 服药期间未发现严重的不良反应。塞来昔布除了传统的镇痛作用还有抗肿瘤的效应, 具有一定得临床应用价值。

■同行评价

本研究为肝门部胆管癌的治疗提供了有力的证据和借鉴,具有重要的临床价值。

的高表达, COX-2基因表达的蛋白被认为是一种原癌蛋白; COX-2在多种人类肿瘤的发生与发展中起着重要的作用^[4-5]; 其主要机制包括: 刺激肿瘤细胞的增殖及抑制细胞凋亡^[6]、参与前致癌物的代谢、抑制机体免疫^[7]、刺激肿瘤新生血管形成、影响肿瘤细胞周期^[8]等; Patti *et al*^[9]认为COX-2在肿瘤组织中过表达所产生的PGE₂, 实际上是大部分肿瘤细胞形成和存活的基础; COX-2抑制剂降低COX-2的表达, 能够减少PGE₂的合成, 从而能抑制肿瘤细胞增生、诱导其凋亡。有效抑制COX-2的表达可能对肿瘤发生、发展具有重要意义^[10-11]。

塞来昔布是已在我国上市的COX-2选择性抑制剂, 可通过抑制COX-2阻止炎症前列腺素类物质的产生, 达到抗炎、镇痛及退热作用; 作为非甾体类抗炎镇痛药用于临床。近年来有研究发现: 塞来昔布对胰腺癌的生长有抑制作用, 同时还可增强多种化疗药物对肿瘤的杀伤作用^[12-13]; 塞来昔布可使偶氮甲烷所致的大肠癌的发生率和数量分别减少93%和97%, 并抑制结肠异常腺管灶的形成^[14]。

我们在前期的实验中已证实^[4-5,15-17]: COX-2在胆管细胞癌中高表达; COX-2反义基因转染能通过改变细胞周期的机制, 抑制胆管癌细胞(QBC939细胞)的增生; 塞来昔布通过COX-2和PGE₂途径能抑制人胆囊癌细胞生长和诱导凋亡。本文通过前瞻性体内研究发现, 口服塞来昔布的胆管癌患者, 与对照组比较, 生存时间延长, 服药期间未发现严重的不良反应。作者初步认为塞来昔布对治疗肝门部胆管癌有效, 除了传统的镇痛作用还有抗肿瘤的效应, 具有一定得临床应用价值。

4 参考文献

- 1 孙学军, 石景森, 何平. 影响胆管癌切除术后的预后因素分析. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 85-88
- 2 黄志强. 肝门部胆管癌外科治疗观念能否有所转变. 临床外科杂志 2008; 16: 3-4
- 3 刘小旭, 康华峰, 王西京, 代志军, 薛锋杰, 薛兴欢. 环氧合酶-2抑制剂预防大鼠化学性乳腺癌. 第四军医大学学报 2007; 28: 27-29
- 4 Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Wang DY. Bile from a patient with anomalous pancreaticobiliary ductal union promotes the proliferation of human

cholangiocarcinoma cells via COX-2 pathway. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1094-1097

- 5 Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Tang ZH, Wang JH. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E₂ pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1302-1306
- 6 Michael MS, Badr MZ, Badawi AF. Inhibition of cyclooxygenase-2 and activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma synergistically induces apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cells. *Int J Mol Med* 2003; 11: 733-736
- 7 Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, Gray RJ, Hernandez JL, Gendler SJ, Mukherjee P. Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E₂ secretion in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 328-339
- 8 Shishodia S, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaB kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9. *Cancer Res* 2004; 64: 5004-5012
- 9 Patti R, Gumired K, Reddanna P, Sutton LN, Phillips PC, Reddy CD. Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human primitive neuroectodermal tumors: effect of celecoxib and rofecoxib. *Cancer Lett* 2002; 180: 13-21
- 10 康华峰, 王西京, 刘小旭, 代志军, 薛锋杰, 薛兴欢. 塞来昔布预防大鼠乳腺癌发生及其机制. 南方医科大学学报 2006; 26: 1599-1602
- 11 刘利珍, 简捷, 吴建兵, 黄龙璋, 史芳. Nimesulide联合奥沙利铂对人肝癌细胞增殖与凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 4041-4045
- 12 徐刚, 吴恺, 王兴鹏, 赵崧. 塞来昔布与吉西他滨合用对胰腺癌的抑制作用及其机制. 中华医学杂志 2005; 85: 986-991
- 13 吴高松, 邹声泉. Celecoxib通过环氧合酶2和前列腺素E₂途径抑制胰腺癌JF-305细胞增殖. 肿瘤防治研究 2003; 30: 480-482
- 14 Jacoby RF, Cole CE, Tutsch K, Newton MA, Kelloff G, Hawk ET, Lubet RA. Chemopreventive efficacy of combined piroxicam and difluoromethylornithine treatment of Apc mutant Min mouse adenomas, and selective toxicity against Apc mutant embryos. *Cancer Res* 2000; 60: 1864-1870
- 15 Wu GS, Wang JH, Liu ZR, Zou SQ. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in extra-hepatic cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 429-433
- 16 Wu GS, Zou SQ, Wu XY, Qiu FZ. Effects of cyclooxygenase-2 antisense vector on proliferation of human cholangiocarcinoma cells. *Chin Med Sci J* 2004; 19: 89-92
- 17 吴高松, 武小勇, 邹声泉, 裘法祖. 环氧合酶-2反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 733-736

编辑 李军亮 电编 何基才

乌司他丁预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的系统评价

郭强, 胡伟明

郭强, 胡伟明, 四川大学华西医院肝胆胰外科 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 此课题由郭强设计; 文献检索由郭强与胡伟明完成; 数据采集由郭强与胡伟明完成; 数据分析由郭强与胡伟明完成; 论文写作由郭强与胡伟明完成。

通讯作者: 胡伟明, 教授, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院肝胆胰外科. guoqiang31415926@163.com

电话: 028-85422496

收稿日期: 2009-10-08 修回日期: 2009-11-17

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-08

Prophylactic use of ulinastatin against post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis: a systematic review

Qiang Guo, Wei-Ming Hu

Qiang Guo, Wei-Ming Hu, Department of Hepato-Bilio-Pancreatic Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Wei-Ming Hu, Department of Hepato-Bilio-Pancreatic Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. guoqiang31415926@163.com

Received: 2009-10-08 Revised: 2009-11-17

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of ulinastatin in the prophylaxis of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) pancreatitis.

METHODS: A method recommended by the Cochrane Collaboration was used to perform a meta-analysis of randomized controlled trials (RCTs) of ulinastatin in the prevention of post-ERCP pancreatitis (PEP). A total of four RCTs were included.

RESULTS: Two RCTs that focus on the comparison of ulinastatin and placebo for 446 patients undergoing ERCP and two RCTs that focus on the comparison of ulinastatin and gabexate for 207 patients were included. Analysis of these RCTs revealed the presence of statistical homogeneity among them. In ulinastatin versus placebo trials, the odds ratio associated with treat-

ment with ulinastatin for PEP was 0.35 (95%CI: 0.14-0.88). In ulinastatin versus gabexate trials, the odds ratio associated with treatment with ulinastatin for PEP was 1.57 (95%CI: 0.39-6.24). A comparison of low-dose ulinastatin and gabexate was also performed, and the odds ratio associated with treatment with ulinastatin for PEP was 1.69 (95%CI: 0.39-7.32).

CONCLUSION: Current best evidence demonstrates that ulinastatin can prevent post-ERCP pancreatitis, and ulinastatin has very similar efficacy to gabexate in the prevention of post-ERCP pancreatitis.

Key Words: Ulinastatin; Gabexate; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Pancreatitis; Systematic review

Guo Q, Hu WM. Prophylactic use of ulinastatin against post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis: a systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3561-3567

摘要

目的: 评价乌司他丁预防内镜逆行胰胆管造影(ERCP)术后胰腺炎的有效性。

方法: 通过使用由Cochrane协作网推荐的方法, 对在世界范围内搜索出的4篇关于乌司他丁在预防ERCP术后胰腺炎(PEP)的随机对照试验进行Meta分析。

结果: 分别对2篇乌司他丁和安慰剂比较的随机对照试验共446例, 以及2篇乌司他丁与加贝酯比较的随机对照试验共207例患者进行了分析, 这些试验均存在统计同质性。在乌司他丁与安慰剂、加贝酯对照的试验以及小剂量乌司他丁和加贝酯对照的试验中, 乌司他丁组PEP的OR值分别为: 0.35(95%CI: 0.14-0.88)、1.57(95%CI: 0.39-6.24)及1.69(95%CI: 0.39-7.32)。

结论: 据目前的最佳证据, 乌司他丁可以防止PEP, 他与加贝酯有相近的疗效。

关键词: 乌司他丁; 加贝酯; 内镜逆行胰胆管造影;

■背景资料

随着ERCP在临床上的广泛引用, 其并发症越来越受到临床医生的关注, 其中最常见的是胰腺炎。如何有效地预防PEP已成为研究的热点, 然而目前大量的随机对照试验并未统一地证实何种方法或药物能有效地预防PEP的发生。

■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

■研发前沿

乌司他丁, 糖皮质激素, 别嘌醇, 奥曲肽, 生长抑素及加贝酯等都被用于预防PEP. 但后三者在一系统评价后已被证实对PEP无效, 而乌司他丁是否有效仍有争议, 目前仍无系统评价对其有效性进行评估.

胰腺炎: 系统评价

郭强, 胡伟明. 乌司他丁预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的系统评价. 世界华人消化杂志 2009; 17(34): 3561-3567
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3561.asp>

0 引言

自1974年首次应用于临床, 内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)已发展成一种诊断和治疗多种胆道和胰腺疾病的重要手段. 随着ERCP在临床上的广泛引应用, 其并发症越来越受到临床医生的关注, 其中最常见的是胰腺炎^[1], 在已报道的大样本的前瞻性研究中, 其发生率为1.4%-7.2%^[1-4]. 因此如何有效地预防ERCP术后胰腺炎(post-ERCP pancreatitis, PEP)已成为研究的热点, 然而目前大量的随机对照试验并未统一地证实何种方法或药物能有效地预防PEP. 在很多系统评价中, 糖皮质激素, 别嘌醇, 奥曲肽等已被证实对预防PEP无效^[5-7]. 生长抑素及加贝酯的有效性在各试验中有出入^[8-9]. 因此能有效地应用于PEP预防, 不良反应少且经济的药物是目前需要证实的.

乌司他丁是从人尿中提取的一种蛋白酶抑制剂, 在动物实验模型中已证实能通过抑制胰酶活性治疗胰腺炎. 乌司他丁在日本和中国被广泛应用于胰腺炎的治疗, 且较早的被用于PEP的预防^[10-11], 然而其是否有效仍有争议, 目前仍无系统评价对其有效性进行评估. 因此我们希望通过Meta分析的方法来提供乌司他丁对于PEP预防效果的有效信息.

1 材料和方法

1.1 材料 以“ERCP-related pancreatitis”、“post-ERCP pancreatitis”、“post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis”、“Endoscopic retrograde cholangiopancreatography”、“pancreatitis”、“ercp”、“ulinastatin”为检索词, 检索MEDLINE(1950/2009-09), EMBASE(1966-2009), PubMed(1966-2009), The Cochrane Library(2009年第2期); 并以检索词“乌司他丁、胰腺炎、内镜逆行胰胆管造影、ERCP等”检索CBMdisc(1978/2009-09), CNKI(1979/2009-09)数据库, 初检出的文献51篇, 其中英文49篇, 中文2篇.

1.2 方法

1.2.1 材料纳入与排除标准: (1)研究设计: 纳入随

机对照试验(RCT), 语种为英文和中文; (2)研究对象: 患者年龄>18岁且接受ERCP检查或治疗; (3)干预措施: 试验组予乌司他丁治疗, 对照组予安慰剂或加贝酯治疗; (4)结局指标: 主要结局指标: 高淀粉酶血症发生率, 急性胰腺炎发生率. 次要结局指标: 重症急性胰腺炎发生率, PEP死亡率.

1.2.2 文献筛选与质量评价: 文献筛选由两名评价员独立操作, 首先阅读文章题目, 在排除明显不符合纳入标准的试验后, 如内容相关再阅读全文摘要, 若为随机对照试验, 则阅读全文, 以确定是否真正符合纳入标准, 然后进行交叉核对, 如意见不统一则通过讨论或第三者裁定解决分歧. 纳入研究的方法学质量采用Cochrane Reviewer's Handbook质量评价标准进行. 两位研究者根据以上的评价标准对每1篇符合纳入标准的文献进行方法学的质量评价.

1.2.3 资料提取: 按照预先设计好的资料提取表, 由两名评价者独立提取和录入资料, 如有分歧则通过讨论或由第三者判定解决. 提取的主要资料内容包括: 文章题目、作者、研究对象、研究方法、干预措施、结局测量与评价、是否采用分配隐藏、有无退出、结局推导等.

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的RevMan 4.2软件进行Meta分析. 因纳入文献的结果测量指标均为计数资料, 故采用优势比(OR)及其95%CI. 各研究间的异质性检验采用 χ^2 检验, $P>0.10$, 可认为多个同类研究具有同质性, 采用固定效应模型分析结果; $P<0.10$, 则认为多个研究结果有异质性, 则寻找异质性原因, 并采用亚组分析和敏感性分析进行处理; 若未找到异质性原因, 则采用随机效应模型进行Meta分析, 反之, 采用固定效应模型分析. 如研究间异质性太大, 无法进行Meta分析时, 则进行描述性分析.

2 结果

2.1 一般情况 阅读文章题目和摘要后, 因题目或摘要明显不符合要求和非随机对照试验而排除文章36篇, 其中英文35篇, 中文1篇. 排除相同的文章或同一研究不同阶段文章, 保留5篇, 其中英文4篇, 中文1篇. 在阅读全文后, 按照纳入标准, 排除不符合纳入标准的文章1篇. 最终纳入4个RCT, 其中3篇英文, 1篇中文.

2.2 研究描述及质量评价 在纳入的4个RCT中, 有2个对照组为安慰剂, 另2个对照组为加贝酯.

表 1 安慰剂为对照组的2个RCT

项目分类	Tsujino <i>et al</i> ^[12]	宋爱琳 <i>et al</i> ^[13]
研究类型	RCT	RCT
随机方法	信封随机分配	随机, 但未提及方法
研究对象	患者年龄大于18岁且接受ERCP检查	患者年龄大于18岁且接受ERCP检查
干预措施	乌司他丁组(15×10^4 U溶于100 mL生理盐水中, 于ERCP术前10 min开始静滴) vs 安慰剂组(100 mL生理盐水)	乌司他丁组(20×10^4 U溶于250 mL生理盐水中, 于ERCP术前1 h开始静滴) vs 安慰剂组(250 mL生理盐水)
观察指标	胰腺炎和高淀粉酶血症的发生率为主要观察指标. 重症急性胰腺炎发生率, ERCP术后胰腺炎死亡率等为次要观察指标	胰腺炎和高淀粉酶血症的发生率为观察指标
分配隐藏	是	不清楚
盲法	双盲	不清楚
随访	描述充分	不清楚
退出	描述充分	不清楚
意向性分析	描述充分	描述充分
基线比较	男女性别比113/91 vs 131/71, 平均年龄65岁 vs 65岁, 体质质量指数22 vs 22, 疾病分布无明显差异	男女性别比9/11 vs 8/12, 平均年龄48岁 vs 47岁; 疾病分布无明显差异
质量评级	A级	B级

■创新盘点

本文通过对在世界范围内搜索出的4篇关于乌司他丁在预防PEP的随机对照试验进行Meta分析, 分别对乌司他丁与安慰剂, 乌司他丁与加贝酯, 低剂量乌司他丁与加贝酯就胰腺炎、高淀粉酶血症的发生率进行了对比. 通过Meta分析的方法评价了乌司他丁的疗效及乌司他丁对比加贝酯的疗效, 为乌司他丁应用于PEP的临床治疗提供了一定参考.

安慰剂为对照组的RCT中共有446例患者参与试验(Tsujino *et al*^[12]研究406例; 宋爱琳 *et al*^[13]研究40例), Tsujino *et al*共有4个研究中心, 均在日本. 宋爱琳 *et al*为单中心研究, 在中国. 加贝酯为对照组的RCT中共有207例患者参与试验(Fujishiro *et al*^[14]研究139例; Ueki *et al*^[15]研究68例), Fujishiro *et al*共有3个研究中心, 均在日本, Ueki *et al*为单中心研究, 在日本. 详细结果见表1和表2.

2.3 纳入文献结果分析

2.3.1 乌司他丁对比安慰剂的胰腺炎发生率: 2个RCT, 共包括446例患者, 均比较了胰腺炎发生率, 且将此指标作为最主要的观察指标. 异质性检验显示2个研究不存在显著的异质性($P = 0.66$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析. 结果表明乌司他丁对于PEP的预防有效($OR = 0.35$, 95%CI: 0.14-0.88, 表3).

2.3.2 乌司他丁对比安慰剂的高淀粉酶血症发生率: 2个RCT均比较了高淀粉酶血症发生率, 异质性检验显示2个研究不存在显著的异质性($P = 0.18$, $I^2 = 44.5\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析. 结果表明乌司他丁对于减少ERCP术后高淀粉酶血症的发生有效($OR = 0.47$, 95%CI: 0.29-0.75, 表4).

2.3.3 乌司他丁对比加贝酯的胰腺炎发生率: 2个RCT, 共包括207例患者, 均比较了胰腺炎发生率, 且将此指标作为最主要的观察指标. 异质

性检验显示2个研究不存在显著的异质性($P = 0.72$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析. 结果表明乌司他丁对比加贝酯对于PEP的预防效果无明显差异($OR = 1.57$, 95%CI: 0.39-6.24, 表5).

2.3.4 乌司他丁对比加贝酯的高淀粉酶血症发生率: 2个RCT均比较了高淀粉酶血症发生率. 异质性检验显示2个研究不存在显著的异质性($P = 0.99$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析. 结果表明乌司他丁对比加贝酯对于减少ERCP术后高淀粉酶血症的发生无明显差异($OR = 1.85$, 95%CI: 0.83-4.13, 表6).

2.3.5 低剂量乌司他丁对比加贝酯的胰腺炎发生率: 2个RCT, 共包括161例患者. 异质性检验显示2个研究不存在显著的异质性($P = 0.67$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析. 结果表明低剂量乌司他丁对比加贝酯对于PEP的预防效果无明显差异($OR = 1.69$, 95%CI: 0.39-7.32, 表7).

2.3.6 低剂量乌司他丁对比加贝酯的高淀粉酶血症发生率: 2个RCT异质性检验显示2个研究不存在显著的异质性($P = 1.00$, $I^2 = 0\%$), 故采用固定效应模型进行Meta分析. 结果表明低剂量乌司他丁对比加贝酯对于减少ERCP术后高淀粉酶血症的发生无明显差异($OR = 1.84$, 95%CI: 0.80-4.27, 表8).

2.3.7 重症急性胰腺炎发生率、PEP死亡率: 4篇


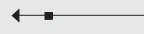

■应用要点

本文提示, 乌司他丁对于PEP的预防有效, 且效果与加贝酯无明显差异. 为乌司他丁对PEP的预防效果提供了有效信息.

表 2 加贝酯为对照组的2个RCT

项目分类	Fujishiro <i>et al</i> ^[14]	Ueki <i>et al</i> ^[15]
研究类型	RCT	RCT
随机方法	电脑随机分配	电脑随机分配
研究对象	患者年龄大于18岁且接受ERCP检查	接受ERCP检查的患者
干预措施	大剂量乌司他丁组(45×10^4 U溶于300 mL盐水中, 每100 mL分别于术前1 h, 术中, 术后11 h快速静滴, 其他时间1500 mL液体持续静滴) vs 小剂量乌司他丁组(15×10^4 U溶于300 mL盐水中, 每100 mL分别于术前1 h, 术中, 术后11 h快速滴入, 其他时间1500 mL液体持续静滴) vs 加贝酯组(900 mg溶于1500 mL液体中, 持续静滴)	乌司他丁组(15×10^4 U溶于2500 mL糖盐水中, 于术前60–90 min开始静滴, 持续至术后22 h) vs 加贝酯组(600 mg溶于2500 mL糖盐水中, 于术前60–90 min开始静滴, 持续至术后22 h)
观察指标	胰腺炎和高淀粉酶血症的发生率为主要观察指标. 重症急性胰腺炎发生率, ERCP术后胰腺炎死亡率等为次要观察指标	胰腺炎和高淀粉酶血症的发生率为主要观察指标, 腹痛, 重症急性胰腺炎发生率, 高脂肪酶血症等为次要观察指标.
分配隐藏	是	是
盲法	不清楚	不清楚
随访	描述充分	描述充分
退出	描述充分	描述充分
意向性分析	描述充分	描述充分
基线比较	男女性别比27/19 vs 22/24 vs 26/21, 平均年龄 63.9 ± 14.8 vs 65.3 ± 13.3 vs 65.4 ± 12.1 岁, 疾病分布无明显差异	男女性别比25/9 vs 22/12, 平均年龄66 vs 61岁, 体质量指数23 vs 22, 疾病分布无明显差异
质量评级	B级	B级

表 3 乌司他丁对PEP的作用

Study or sub-category	乌司他丁组 <i>n/n</i>	安慰剂组 <i>n/n</i>	OR(fixed) 95%CI	Weight (%)	OR(fixed) 95%CI
Tsujino <i>et al</i>	6/204	15/202		85.70	0.38 [0.14, 0.99]
宋爱琳 <i>et al</i>	0/20	2/20		14.30	0.18 [0.01, 4.01]
Total (95%CI)	224	222		100.00	0.35 [0.14, 0.88]
Total events: 6(乌司他丁组); 17(安慰剂组)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 0.20$, $df = 1$ ($P = 0.66$), $I^2 = 0\%$					
Test for overall effect: $Z = 2.24$ ($P = 0.03$)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			Favours乌司他丁组 Favours安慰剂组		

RCT重症急性胰腺炎发生率, PEP死亡率均为0.

2.4 敏感度分析 改用随机效应模型对数据进行分析, 均未见Meta分析结果逆转. 说明本研究结论具有一定的可靠性.

2.5 偏倚分析 由于本研究收录的仅仅是发表的文献, 可能存在发表偏倚. 因此, 我们引用了失效安全数对合并相对危险度有显著性差异的指标

进行检验. 乌司他丁对比安慰剂的胰腺炎发生率的失安全系数为17; 乌司他丁对比加贝酯的胰腺炎发生率的失安全系数为13, 高于纳入的文献数, 因此本研究的结论具有一定的可靠性.

3 讨论

本系统评价纳入的研究质量较齐. 所有研究按

表 4 乌司他丁对ERCP术后高淀粉酶血症的作用

Study or sub-category	乌司他丁组 <i>n</i> / <i>n</i>	安慰剂组 <i>n</i> / <i>n</i>	<i>OR</i> (fixed) 95%CI	Weight (%)	<i>OR</i> (fixed) 95%CI
Tsujino <i>et al</i>	30/204	50/202		83.45	0.52 [0.32, 0.87]
宋爱琳 <i>et al</i>	3/20	10/20		16.55	0.18 [0.04, 0.80]
Total (95%CI)	224	222		100.00	0.47 [0.29, 0.75]
Total events: 33(乌司他丁组); 60(安慰剂组)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 1.80$, <i>df</i> = 1 (<i>P</i> = 0.18), <i>I</i> ² = 44.5%					
Test for overall effect: <i>Z</i> = 3.16 (<i>P</i> = 0.002)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			乌司他丁组 安慰剂组		

同行评价
本研究对国内外有关乌司他丁在预防PEP的临床应用研究结果进行Meta分析,系统评价乌司他丁预防PEP的有效性,为临床应用乌司他丁预防PEP提供了科学的理论依据。

表 5 乌司他丁对比加贝酯对于PEP的作用

Study or sub-category	乌司他丁组 <i>n</i> / <i>n</i>	加贝酯组 <i>n</i> / <i>n</i>	<i>OR</i> (fixed) 95%CI	Weight (%)	<i>OR</i> (fixed) 95%CI
Fujishiro <i>et al</i>	7/93	2/46		71.83	1.79 [0.36, 8.98]
Ueki <i>et al</i>	1/34	1/34		28.17	1.00 [0.06, 16.67]
Total (95%CI)	127	80		100.00	1.57 [0.39, 6.24]
Total events: 8(乌司他丁组); 3(加贝酯组)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 0.12$, <i>df</i> = 1 (<i>P</i> = 0.72), <i>I</i> ² = 0%					
Test for overall effect: <i>Z</i> = 0.64 (<i>P</i> = 0.52)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			乌司他丁组 加贝酯组		

表 6 乌司他丁对比加贝酯对于ERCP术后高淀粉酶血症的作用

Study or sub-category	乌司他丁组 <i>n</i> / <i>n</i>	加贝酯组 <i>n</i> / <i>n</i>	<i>OR</i> (fixed) 95%CI	Weight (%)	<i>OR</i> (fixed) 95%CI
Fujishiro <i>et al</i>	14/93	4/46		48.98	1.86 [0.58, 6.01]
Ueki <i>et al</i>	11/34	7/34		51.02	1.84 [0.61, 5.54]
Total (95%CI)	127	80		100.00	1.85 [0.83, 4.13]
Total events: 25(乌司他丁组); 11(加贝酯组)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 0.00$, <i>df</i> = 1 (<i>P</i> = 0.99), <i>I</i> ² = 0%					
Test for overall effect: <i>Z</i> = 1.51 (<i>P</i> = 0.13)					
			0.1 0.2 0.5 1 2 5 10		
			乌司他丁组 加贝酯组		

明确的纳入和排除标准,均为随机、对照研究方法。对失访者均有描述,但有些未提及具体的随机方法,分组隐藏未有描述。有些文章未提及评价者是否应用盲法。通过计算失安全系数进行偏倚分析,本研究的结论具有一定可靠性。

目前,胰腺炎仍然是ERCP术后最常见也是最有可能致命的并发症。PEP的病理基础仍不清

楚,但有研究表明低龄,女性,既往有胰腺炎病史,接受EST治疗患者是PEP发病的高危人群^[2]。胰酶的激活,氧自由基活化引起的毛细血管损伤及全身炎症反应综合征,被认为在胰腺炎的病理过程中起到重要作用。这也是胰酶活性抑制剂,胰酶分泌抑制剂,氧自由基抑制剂,抗炎因子等用于胰腺炎治疗的药物的药理基础。在

表 7 低剂量乌司他丁对比加贝酯对与PEP的作用

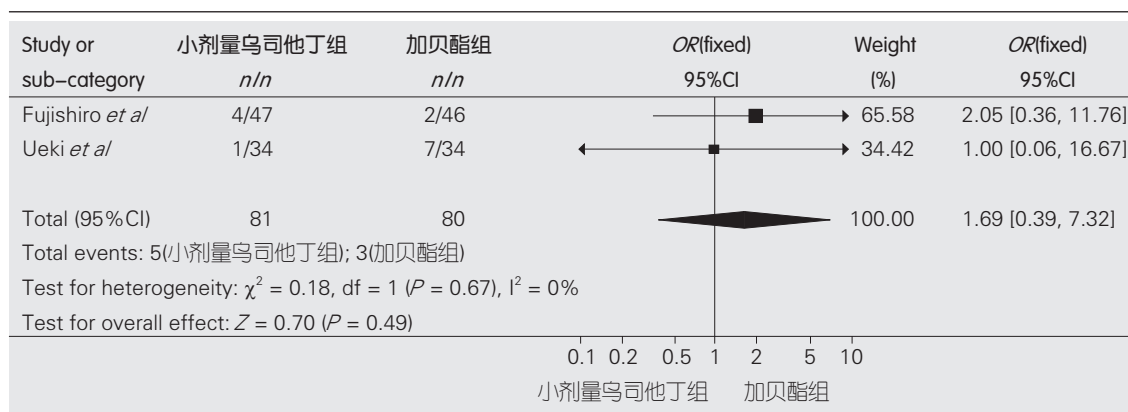
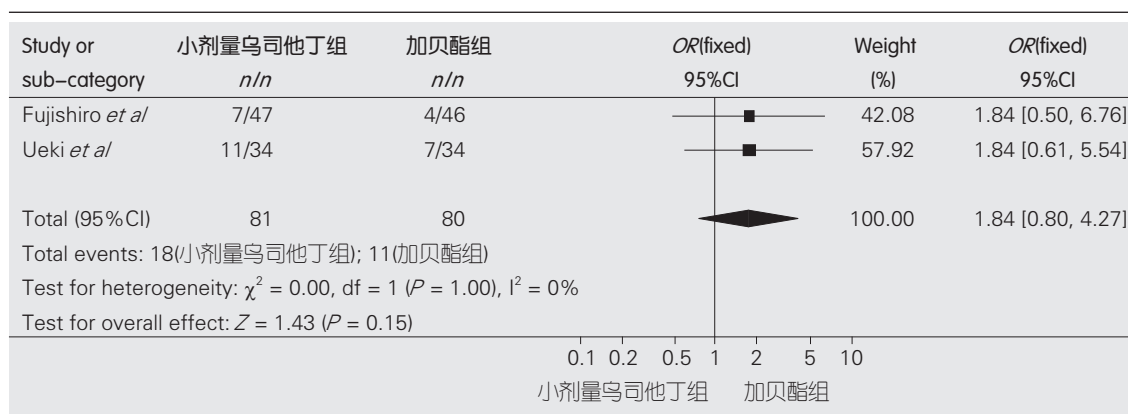


表 8 低剂量乌司他丁对比加贝酯对于ERCP术后高淀粉酶血症的作用



一些已发表的RCT试验中, 胰酶活性抑制剂加贝酯和乌司他丁被证明对于预防PEP有一定效果, 胰酶分泌抑制剂生长抑素也有效, 但其昂贵的费用限制了其在临床上的应用. 另一种胰酶分泌抑制剂奥曲肽在1项系统评价中被证实没有效果. 其他如别嘌醇, 糖皮质激素等在一系列系统评价中也被证实没有效果.

在本研究中, 我们收集了4篇发表在国内及国际期刊上的RCT试验. 并分别对乌司他丁与安慰剂, 乌司他丁与加贝酯, 低剂量乌司他丁与加贝酯就胰腺炎、高淀粉酶血症的发生率进行对比. 试图通过Meta分析的方法来评价乌司他丁的疗效及乌司他丁对比加贝酯的疗效. 由于纳入的2篇对比乌司他丁与加贝酯的RCT还进行了小剂量乌司他丁与加贝酯的对比, 我们还对比评价了小剂量乌司他丁的疗效. 结果表明: 乌司他丁对于PEP的预防, 减少高淀粉酶的发生有效($OR = 0.35$, 95%CI: 0.14-0.88; $OR = 0.47$, 95%CI: 0.29-0.75). 乌司他丁对比加贝酯对于减少PEP及高淀粉酶血症的发生无明显差异($OR = 1.57$, 95%CI: 0.39-6.24; $OR = 1.85$, 95%CI:

0.83-4.13). 小剂量乌司他丁对比加贝酯对于减少PEP及高淀粉酶血症的发生无明显差异($OR = 1.69$, 95%CI: 0.39-7.32; $OR = 1.84$, 95%CI: 0.80-4.27).

乌司他丁与加贝酯相比, 后者还具有松弛Oddi括约肌的功能^[16], 其对Oddi括约肌的保护是其优于乌司他丁的一个方面. 然而乌司他丁具有抑酶作用强大、费用较低以及半衰期较长等特点^[17]. 在安全性方面, 以往进行的加贝酯试验的1220例患者中, 没有1例发生由于加贝酯引起的严重不良反应^[18-20]. 而在Tsuji *et al*的研究涉及的204例患者中, 没有1例发生由于乌司他丁引起的严重不良反应. 此外, 在Fujishiro *et al*与Ueki *et al*的RCT中, 还评估了IL-6等炎症因子的浓度, 结果显示IL-6、IL-8、血清中性粒细胞弹性蛋白酶及C-反应蛋白在乌司他丁组和加贝酯组中无明显差异.

由于乌司他丁使用范围的局限性和医学伦理的限制, 并没有很多的大样本量随机对照试验来评估, 且目前的试验质量参差不齐, 可能对本研究的结论有一定的影响. 目前需要多

中心, 大样本量, 高质量的随机对照试验来证实乌司他丁预防PEP的有效性. 此外, 由于大部分PEP都属于轻型胰腺炎, 且随着PEP高危因素的研究, 越来越多的人认为常规使用药物预防没有太大必要, 因此专门针对高危人群的随机对照试验需要开展.

目前的研究表明, 乌司他丁对于PEP的预防有效, 且效果与加贝酯无明显差异.

4 参考文献

- Masci E, Toti G, Mariani A, Curioni S, Lomazzi A, Dinelli M, Minoli G, Crosta C, Comin U, Fertitta A, Prada A, Passoni GR, Testoni PA. Complications of diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 417-423
- Tsujino T, Isayama H, Komatsu Y, Ito Y, Tada M, Minagawa N, Nakata R, Kawabe T, Omata M. Risk factors for pancreatitis in patients with common bile duct stones managed by endoscopic papillary balloon dilation. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 38-42
- Loperfido S, Angelini G, Benedetti G, Chilovi F, Costan F, De Berardinis F, De Bernardin M, Ederle A, Fina P, Fratton A. Major early complications from diagnostic and therapeutic ERCP: a prospective multicenter study. *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 1-10
- Cheng CL, Sherman S, Watkins JL, Barnett J, Freeman M, Geenen J, Ryan M, Parker H, Frakes JT, Fogel EL, Silverman WB, Dua KS, Aliperti G, Yakshe P, Uzer M, Jones W, Goff J, Lazzell-Pannell L, Rashdan A, Temkit M, Lehman GA. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 139-147
- Zheng M, Chen Y, Bai J, Xin Y, Pan X, Zhao L. Meta-analysis of prophylactic allopurinol use in post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis. *Pancreas* 2008; 37: 247-253
- Bai Y, Gao J, Zou DW, Li ZS. Prophylactic octreotide administration does not prevent post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Pancreas* 2008; 37: 241-246
- Bai Y, Gao J, Shi X, Zou D, Li Z. Prophylactic corticosteroids do not prevent post-ERCP pancreatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Pancreatology* 2008; 8: 504-509
- Arvanitidis D, Anagnostopoulos GK, Giannopoulos D, Pantes A, Agaritsi R, Margantinis G, Tsiakos S, Sakorafas G, Kostopoulos P. Can somatostatin prevent post-ERCP pancreatitis? Results of a randomized controlled trial. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 278-282
- Andriulli A, Solmi L, Loperfido S, Leo P, Festa V, Belmonte A, Spirito F, Silla M, Forte G, Terruzzi V, Marengo G, Ciliberto E, Sabatino A, Monica F, Magnolia MR, Perri F. Prophylaxis of ERCP-related pancreatitis: a randomized, controlled trial of somatostatin and gabexate mesylate. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 713-718
- Jönsson-Berling BM, Ohlsson K. Distribution and elimination of intravenously injected urinary trypsin inhibitor. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51: 549-557
- Ohnishi H, Kosuzume H, Ashida Y, Kato K, Honjo I. Effects of urinary trypsin inhibitor on pancreatic enzymes and experimental acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1984; 29: 26-32
- Tsujino T, Komatsu Y, Isayama H, Hirano K, Sasahira N, Yamamoto N, Toda N, Ito Y, Nakai Y, Tada M, Matsumura M, Yoshida H, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. Ulinastatin for pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a randomized, controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 376-383
- 宋爱琳, 尹兰宁, 寇治民. 乌司他丁对内镜逆行胰胆管造影术后高淀粉酶血症及急性胰腺炎的预防作用. *兰州大学学报(医学版)* 2005; 31: 24-25, 40
- Fujishiro H, Adachi K, Imaoka T, Hashimoto T, Kohge N, Moriyama N, Suetsugu H, Kawashima K, Komazawa Y, Ishimura N, Ishihara S, Amano Y, Kinoshita Y. Ulinastatin shows preventive effect on post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis in a multicenter prospective randomized study. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1065-1069
- Ueki T, Otani K, Kawamoto K, Shimizu A, Fujimura N, Sakaguchi S, Matsui T. Comparison between ulinastatin and gabexate mesylate for the prevention of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis: a prospective, randomized trial. *J Gastroenterol* 2007; 42: 161-167
- Kong J, Wu SD, Zhang XB, Li ZS, Shi G, Wang W, Chen JZ. Choledochoscope manometry about different drugs on the Sphincter of Oddi. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5907-5912
- Sugiura Y, Nakajima K, Kawase H, Tsubota K, Fujibayashi T, Goto Y. Evaluation of a large dose intravenous administration of urinastatin. *Jpn J Acute Med* 1988; 12: 1153-1156
- Cavallini G, Tittobello A, Frulloni L, Masci E, Mariana A, Di Francesco V. Gabexate for the prevention of pancreatic damage related to endoscopic retrograde cholangiopancreatography. Gabexate in digestive endoscopy--Italian Group. *N Engl J Med* 1996; 335: 919-923
- Andriulli A, Clemente R, Solmi L, Terruzzi V, Suriani R, Sigillito A, Leandro G, Leo P, De Maio G, Perri F. Gabexate or somatostatin administration before ERCP in patients at high risk for post-ERCP pancreatitis: a multicenter, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 488-495
- Masci E, Cavallini G, Mariani A, Frulloni L, Testoni PA, Curioni S, Tittobello A, Uomo G, Costamagna G, Zambelli S, Macarri G, Innocenti P, Dragonetti C. Comparison of two dosing regimens of gabexate in the prophylaxis of post-ERCP pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2182-2186

编辑 李瑞敏 电编 何基才

彩色超声在胃肠道间质瘤诊断中的应用

杨力, 段洪涛, 宋奕宁, 王功伟, 李建国

■背景资料

GIST是近年研究的热点, 在病理及治疗上取得了很大进步. 但由于其临床症状缺乏特异性, 早期诊断是GIST临床工作中的难点.

杨力, 宋奕宁, 李建国, 北京大学人民医院超声科 北京市100044

段洪涛, 呼伦贝尔市人民医院超声科 内蒙古自治区呼伦贝尔市021008

王功伟, 北京大学人民医院病理科 北京市100044

作者贡献分布: 此课题立题由杨力完成; 设计由杨力完成; 研究过程由杨力、段洪涛、宋奕宁及王功伟操作完成; 数据分析及论文撰写由杨力完成; 实验指导与论文修改由李建国完成.

通讯作者: 杨力, 主治医师, 100044, 北京市西城区西直门南大街11号, 北京大学人民医院超声科. yanglit@yahoo.com.cn

电话: 010-88325380

收稿日期: 2009-09-26 修回日期: 2009-11-19

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-08

Clinical value of color Doppler sonography in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor

Li Yang, Hong-Tao Duan, Yi-Ning Song,
Gong-Wei Wang, Jian-Guo Li

Li Yang, Yi-Ning Song, Jian-Guo Li, Department of Ultrasound, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Hong-Tao Duan, Department of Ultrasound, Hulunbeier People's Hospital, Hulunbeier 021008, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Gong-Wei Wang, Department of Pathology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Correspondence to: Li Yang, Department of Ultrasound, Peking University People's Hospital, 11 Xizhimen South Street, Xicheng District, Beijing 100044, China. yanglit@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-26 Revised: 2009-11-19

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-08

Abstract

AIM: To analyze the value of color Doppler sonography in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor (GIST).

METHODS: The color Doppler sonographic images obtained in 45 patients with pathologically confirmed GIST were analyzed retrospectively. The sonographic findings were compared with pathological results.

RESULTS: There was no statistical difference in diagnostic accuracy of tumor size assessment between color Doppler sonography and pathological examination ($t = 1.328$, $P > 0.05$). Tumor size, internal echo and morphology were critical

factors for differentiation of low- and high-risk GIST. Color Doppler sonography has a higher accuracy in the diagnosis of GIST in the stomach than in the intestinal tract.

CONCLUSION: Color Doppler sonography is an effective method for diagnosis of GIST. Color Doppler sonography in combination with other examinations may improve diagnostic accuracy in patients with GIST.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumor; Sonography; Color

Yang L, Duan HT, Song YN, Wang GW, Li JG. Clinical value of color Doppler sonography in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(34): 3568-3571

摘要

目的: 探讨彩色超声在胃肠道间质瘤(GIST)诊断中的应用价值.

方法: 回顾性分析经病理证实的45例GIST的超声声像图特征, 将超声与手术病理结果进行对比分析.

结果: 超声测量肿瘤的最大径线数值病理测量方法差异无统计学意义($t = 1.328$, $P > 0.05$). 肿瘤的形态及内部回声与其危险性高低有关: 危险性低、形态规则、内部回声均; 危险性高, 形态不规则, 内呈现混杂回声. 彩色血流分布与肿瘤危险性高低无明显相关. 超声在胃GIST的诊断准确率高于肠道GIST.

结论: 彩色超声检查在GIST诊断中具有实用价值, 结合其他检查可提高GIST诊断准确性.

关键词: 胃肠道间质瘤; 超声; 彩色

杨力, 段洪涛, 宋奕宁, 王功伟, 李建国. 彩色超声在胃肠道间质瘤诊断中的应用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(34): 3568-3571
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3568.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor,

■同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

GIST)是最常见的胃肠道间叶源性肿瘤,以往多归入平滑肌瘤范畴,近年来的研究已证实,他是一类具有自身形态学特征、特定的免疫表型的肿瘤。GIST早期无任何症状,随着肿瘤的不断生长,临床上出现多种非特异性症状。超声检查作为腹部疾病的最常规检查手段之一,在GIST的诊断中有其优势。本文回顾性分析我院经手术病理证实的45例GIST的超声检查资料,以探讨超声在GIST诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2006-02/2009-04在我院行超声检查,住院手术确诊为GIST的患者45例,其中男22例,女23例,年龄36-83(平均 54.5 ± 24.5)岁。患者临床症状:腹部不适、腹胀痛19例;胃肠道出血(呕血、便血、黑便、大便潜血试验阳性)16例;腹部包块3例;食管癌根治手术中发现2例,体检时发现5例。

1.2 方法 使用GE logiq9、Aloka 4000、Aloka α 10型彩色超声诊断仪,腹部探头频率3.5-5.0 MHz。患者空腹,平卧位,常规探查腹、盆腔实质性脏器及周围大血管,同时扫查胃肠走行区,发现肿块,记录肿块部位、大小、形态、回声类型、有无液化坏死区,以及肿块的活动度。启动彩色多普勒,观察肿块的血流特点及肿块与周围血管结构的关系。若怀疑来源胃部,嘱患者饮水500-600 mL,并变换体位对胃部进行多切面观察。用计算机影像工作站和仪器内置存储设备记录图像。病理危险性分级标准参照文献[1],本文将极低度危险性病例列入低度危险性病理诊断中。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件将超声检查结果与手术病理结果对比分析。

2 结果

2.1 病理 肿瘤危险性分级:高度危险性15例,中度危险性13例,低度危险性17例。单发44例,多发1例(图1)。肿瘤发生部位:胃部25例(55.55%),十二指肠5例,空回肠9例,结肠3例,腹腔1例,食管下段2例。

2.2 超声声像表现

2.2.1 肿瘤的大小: 超声测量肿瘤最小 $2.5 \text{ cm} \times 2.2 \text{ cm} \times 2.0 \text{ cm}$,最大 $37 \text{ cm} \times 19 \text{ cm} \times 7 \text{ cm}$ 。45例患者中,30例病理有完整的标本大小记录。将超声测量肿瘤的最大径线数值与病理测量的最大径线数值进行配对样本的 t 检验,2种测量方法差

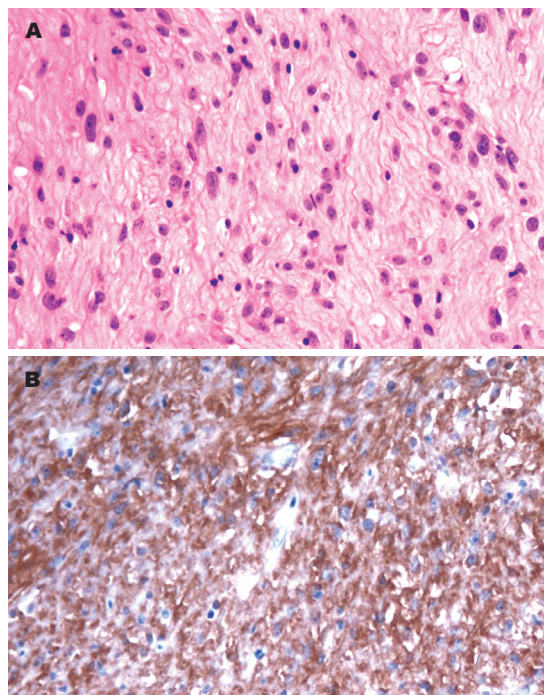


图1 GIST病理组织改变($\times 200$)。A: 多量梭形细胞; B: 免疫组织化学CD117+。

异无统计学意义($t = 1.328, P > 0.05$)。

2.2.2 形态与内部回声: 肿瘤的形态及内部回声与肿瘤的大小有关,即与其危险性高低相关: 肿瘤较小,即直径为 $2.0\text{--}5.0 \text{ cm}$,病理为低至中度危险性,形态规则,圆形或椭圆形,均匀的等低回声(图2A); 肿瘤的直径大于 5 cm 以上时,病理为高危险性,形态不规则,部分呈分叶状,内部呈现不均匀的混杂回声,可呈囊实性,内有液性无回声区(图2B)。应用彩色多普勒超声检查,肿瘤内部及边缘见少量点条状血流信号(图3),可取到低速动静脉血流频谱。彩色血流分布与肿瘤危险性高低未见明显相关。

2.2.3 肿瘤来源: 25例胃部GIST, 超声提示21例(84%),4例超声误判断为胰尾部肿瘤1例(图4),左肝肿瘤2例,腹腔淋巴结1例。5例十二指肠GIST, 超声提示2例(40%),余3例超声提示十二指肠占位。9例空、回肠病例中,5例(55.55%)超声诊断为小肠GIST,4例提示腹、盆腔占位;3例结肠病例,1例提示GIST,1例提示结肠占位未定性,1例提示腹膜后占位。1例腹腔间质瘤为腹腔多发肿物,为小肠GIST复发,超声正确提示。

3 讨论

GIST被定义为组织学上由梭形、上皮样、偶或多形性细胞排列成束状或弥漫状图像,免疫表型上表达c-kit基因蛋白产物KIT(CD117),由突

■创新盘点

本文总结了GIST的超声表现,有助于超声医师认识此病,使更多的GIST能得到早期诊断与早期治疗。

应用要点

本文提示,彩色超声结合其他检查科提高GIST诊断准确性,对于超声应用于GIST的诊断有良好的推动作用。

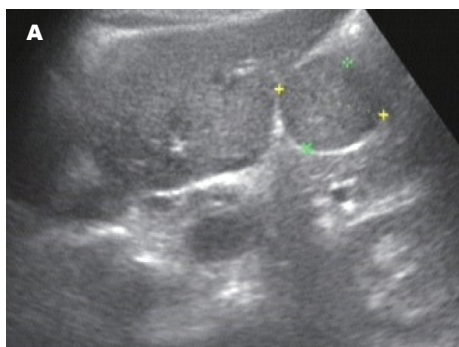


图2 肿瘤形态。
A: 胃小弯侧间质瘤(低风险性)。圆形,回声均; B: 小肠间质瘤(高风险性)。分叶状,回声不均,内有液性无回声。



图3 胃间质瘤内部边缘少量彩色血流信号。

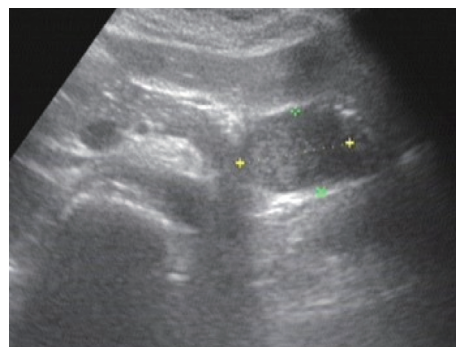


图4 误诊为胰尾肿瘤的胃间质瘤。

变的c-kit或血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor, PDGFR) α 基因驱动的间叶源性肿瘤,可以发生在从食管到直肠整个消化系,在胃部最多见^[1-2]。GIST生物学行为不稳定,从良性到恶性往往缺乏明确的分界,因此目前较一致的病理分级是根据肿瘤的大小和核分裂象分为:极低度危险性,低度危险性,中度危险性,高度危险性^[3-4]。

随着超声诊断仪的不断改进,超声技术的提高,超声除了在腹部实质性脏器的诊断中有其不可替代的作用外,在胃肠道疾病诊断中也起到越来越重要的作用。本组45例中除2例食管下段GIST是在食管癌手术中发现,超声无法观察外,其中43例确诊病例超声均有阳性发现。通过对超声测量的肿瘤最大径线数值与病理有完整的标本大小记录的30例进行统计检验发现,两种方法差异无统计学意义。证明超声测量GIST的大小是可信的,即通过超声测量的肿瘤大小来推断其危险性同样是可信的。已知肿瘤大小与其危险性高低高度相关,肿瘤的大小不同,其在超声图像中的形态及内部回声亦有不同:偏良性肿瘤,形态规则,内部回声均匀;偏恶性肿瘤,其形态不规则,内部显示混杂回声及液性无回声。这些特征与一般的良恶性肿瘤的超声鉴别特点也相一致^[5]。但在彩色多普勒超声中,彩色血流分布与肿瘤危险性高低未见明显相关,

这与既往相关报道一致^[6]。

本组结果显示,超声对胃部GIST定位准确度为84%,明显高于十二指肠及小肠病例,主要因为胃的解剖位置相对固定,通过饮水可使胃腔充盈,清晰的显示胃壁的各层结构及肿块与胃壁的关系,肿瘤发生于黏膜下、肌层或浆膜下,可向腔内、腔外或腔内外生长^[7]。在胃部误诊为来源肝左叶肿瘤的病例肿瘤较大,为胃小弯侧浆膜层外生性肿物,饮水后检查仍然无法与肝左叶分界。4例超声提示为腹盆腔占位的小肠GIST中,2例也因为肿瘤巨大,与周围脏器关系不明而无法判定其来源。1例结肠占位的诊断中,在结肠走行区域见肿物回声,周围肠管轻度扩张,超声诊断为结肠癌可能性大,实为黏膜下GIST向腔内生长引起轻度肠梗阻。1例因患者体胖,腹部胀气明显,反复加压及变换体位后,肿瘤位置显示不佳,误诊为腹膜后占位。目前,胃肠道疾病的重要检查手段是胃镜,肠镜及消化道造影。由于GIST长于胃肠道间质,其生长方式有腔内生长,腔内/外生长,腔外生长。胃镜肠镜多局限于消化系壁内形态及黏膜的显示^[8],而超声对于胃肠道外生性肿瘤有很高的显示率^[9-10],但对于胃肠道向腔内生长的病例,尤其是在肠道,较大病例,超声定性困难,这也是超声的局限性。

2例典型病例。病例1: 50岁男性患者间断性便血6 mo,胃镜、肠镜检查都未发现有明显异

常, 便血时断时续, 一度中止检查, 最后行超声检查发现右中下腹部 $5.2\text{ cm}\times 3.4\text{ cm}\times 3.0\text{ cm}$ 低回声肿物, 略呈分叶状, 提示肠管外生性肿物, 考虑小肠GIST, 进一步行腹部CT也证实. 最后手术病理诊断为中度危险性回肠GIST. 消化系出血是GIST的症状之一, 胃肠道内为碱性环境, 当出血量不大时, 出血有时可自行停止, 便血间断出现, 影响了进一步的检查和治疗. 病例2: 35岁男性, 无任何不适, 在超声体检时发现, 左中下腹部见圆形低回声肿物, 大小 $2.5\text{ cm}\times 2.2\text{ cm}\times 2.0\text{ cm}$, 内部未见明显血流信号, 与肠管活动性一致, 未见肠管扩张, 超声提示小肠外生性肿瘤, 考虑GIST, 后经手术病理证实为低度危险性空肠GIST. GIST早期无任何症状, 据统计约12%是由于其他原因就诊时偶然检查发现的^[1].

总之, 超声在GIST诊断中有其优势, 但肿瘤较大时往往不能全面性观察其相对解剖位置, 同时超声检查结果易受肠道气体和腹部脂肪干扰, 也与操作者经验和手法直接相关. 因此, 超声诊断GIST还应积极联合应用其他检查方法, 以提高诊断正确率.

4 参考文献

- 1 中国胃肠道间质瘤病理专家组. 中国胃肠道间质瘤病理共识意见. 中华病理学杂志 2007; 36: 704-707
- 2 Tornillo L, Terracciano LM. An update on molecular genetics of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2006; 59: 557-563
- 3 Rutkowski P, Symonides M, Zdzienicki M, Siedlecki JA. Developments in targeted therapy of advanced gastrointestinal stromal tumors. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2008; 3: 88-99
- 4 Nakajima T, Miwa S, Ando T, Fujinami H, Kajiura S, Hosokawa A, Takano Y, Sugiyama T. Interstitial cells of Cajal do not harbor c-kit or PDGFRA gene mutations in patients with sporadic gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol* 2009; 44: 426-431
- 5 胡兵, 周进祝. 胃肠道肿瘤超声诊断. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1408-1410
- 6 李洪林, 郝玉芝, 陈宇, 朱利, 牛丽娟, 黄苏里, 王勇. 胃肠道间质瘤的超声诊断. 中国超声医学杂志 2005; 21: 921-924
- 7 顾国利, 王石林, 任力, 魏学明, 李德昌, 周晓武, 黄蓉蓉. 胃肠道间质瘤的临床病理分析和免疫组化特点. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2241-2246
- 8 Tateishi U, Hasegawa T, Satake M, Moriyama N. Gastrointestinal stromal tumor. Correlation of computed tomography findings with tumor grade and mortality. *J Comput Assist Tomogr* 2003; 27: 792-798
- 9 Burkill GJ, Badran M, Al-Muderis O, Meirion Thomas J, Judson IR, Fisher C, Moskovic EC. Malignant gastrointestinal stromal tumor: distribution, imaging features, and pattern of metastatic spread. *Radiology* 2003; 226: 527-532
- 10 Dietrich C, Hartung E, Ignee A. The use of contrast-enhanced ultrasound in patients with GIST metastases that are negative in CT and PET. *Ultraschall Med* 2008; 29 Suppl 5: 276-277
- 11 Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 52-68

■同行评价

本文探讨了彩色超声在GIST诊断中的应用价值, 为GIST的临床诊断提供借鉴及指导, 具有一定的临床应用价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

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 2009-12-08)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈光 教授
吉林大学第一医院消化器官外科

陈红松 研究员
北京大学人民医院肝病研究所

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

迟宝荣 教授
吉林大学第一医院消化内科

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

樊晓明 主任医师
复旦大学附属金山医院消化科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

李华 副教授
中山大学附属第三医院肝脏外科

林志辉 教授
福建省立医院消化内科

马欣 主任医师
甘肃省人民医院消化科

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化内科

彭吉润 主任医师
北京大学人民医院肝胆外科中心

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

孙明军 教授
中国医科大学附属第一医院内镜中心

唐世刚 教授
中南大学湘雅三医院内科

王承党 副教授
福建医科大学附属第一医院消化内科

王蒙 副教授
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

王学美 研究员
北京大学第一医院中西医结合研究室

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

熊斌 教授
武汉大学中南医院肿瘤科

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

阴赅宏 研究员
首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科

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

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科