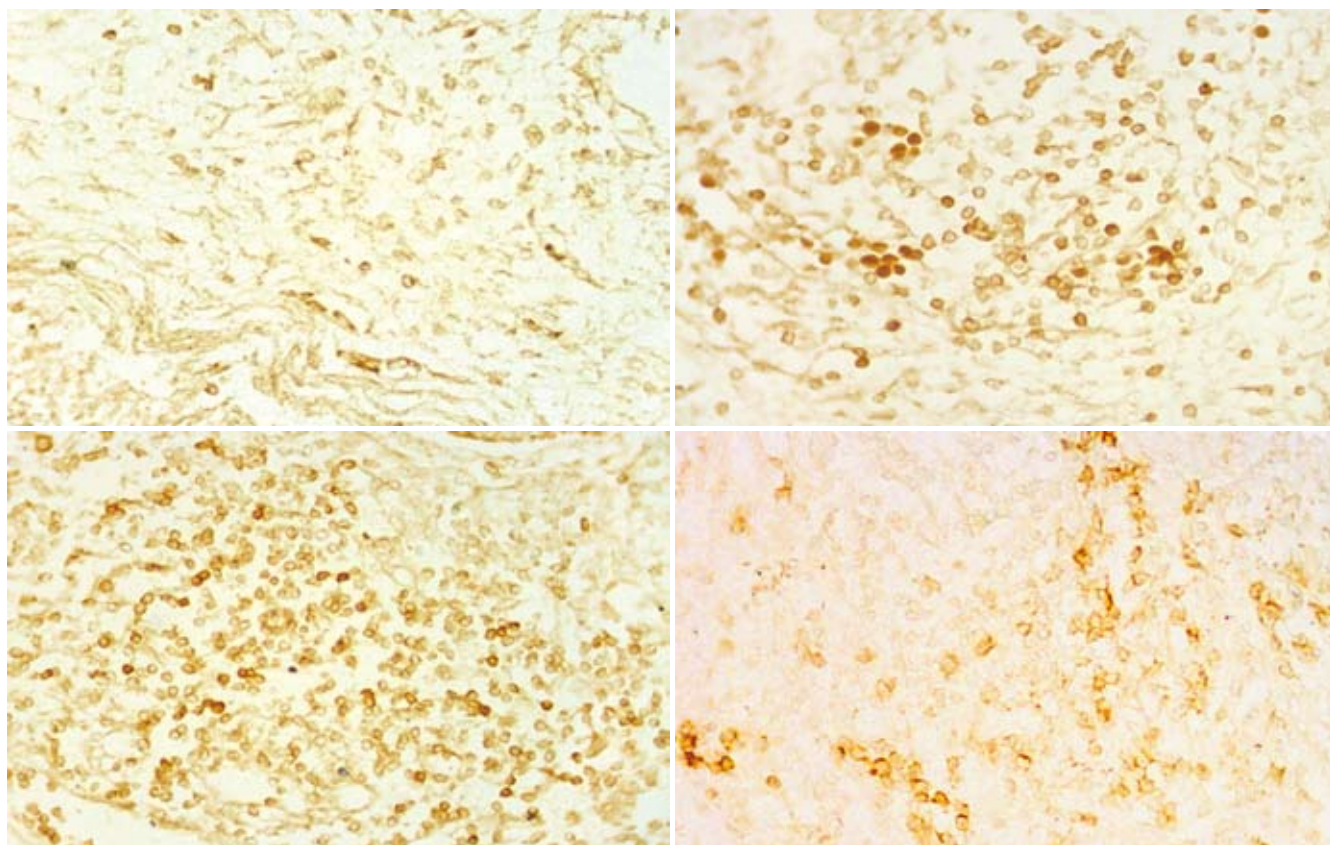


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年12月18日 第17卷 第35期 (Volume 17 Number 35)



35 / 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
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

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
聂新明教授
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
崔云南教授
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
李璦教授
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
扬业发教授
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 18 日 第 17 卷 第 35 期 (总第295期)

述 评

- 3573 脂肪性肝病防治的研究进展
栾新明, 俞建蔚
- 3579 胆囊结石合并胆总管结石的现代外科治疗模式
王广义, 王英超, 吕国悦

基 础 研 究

- 3583 塞来昔布对不表达环氧化酶-2的胃癌细胞生长的影响
王云峰, 李健, 葛成华, 王世伟, 张建军, 夏强, 郭克建
- 3590 幽门螺杆菌致胃上皮细胞株GES-1和胃癌细胞株SGC-7901的氧化性损伤
王艳丽, 宫月华, 徐莹, 陈铁军, 柳云恩, 袁媛
- 3595 NADPH氧化酶对门静脉海绵样变大鼠体内氧化应激的影响
王建尧, 刘磊, 姚君, 王斌, 陈芳, 毛建雄, 缪小平, 林飞飞
- 3601 溃疡性结肠炎与肠应激综合征间差异基因表达
陈玉龙, 苗艳艳, 吕翠田
- 3606 CD3和CD8免疫反应阳性细胞在人胎回肠的发育
苏敏, 胡蓉, 李红, 黄悦, 许庭良, 姜俸蓉

临 床 研 究

- 3611 曲古抑菌素A对胃癌细胞生长的抑制作用
乔文, 杨晓丹, 王丹

文 献 综 述

- 3615 miRNA在结肠癌早期诊断和筛选中的作用
曹锴, 狄建彬, 魏文祥, 庞智
- 3620 结直肠癌旁肿瘤沉积的研究进展
梁冀望, 王振宁, 宋永喜, 徐惠绵
- 3623 噬菌体用于治疗幽门螺杆菌感染的研究进展
万学勤, 李宏鸣, 白杨

研 究 快 报

- 3627 CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用
孙利兵, 杨光
- 3630 干扰素对肝癌细胞胸苷磷酸化酶表达和凋亡的双重影响
肖永胜, 周俭, 樊嘉, 孙绮蛮, 赵燕, 薛琼, 沈早卓, 汤钊猷

临 床 经 验

- 3635 EphA2、hMLH1、hMSH2 mRNA在新疆维吾尔及汉族食管鳞癌中的表达及意义
叶翥飞, 李惠武, 庞作良, 李卉, 田勃, 陈艳, 郭文佳, 李秀梅, 王洪江
- 3640 TFF3在贲门肠化组织中的蛋白表达及其与癌变的相关性
冯笑山, 郝曙光, 王立东, 高社干, 王公平, 侯建峰, 茹艺, 陈强
- 3644 延安地区胃角溃疡内镜分析208例
王恬, 冯义朝, 马东瑞, 杨宁
- 3649 胃脂肪瘤的诊断与治疗66例
李世正, 张俊华, 李锦成, 董哲
- 3653 全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的意义
王春玲, 姜相君
- 3657 序贯结肠透析联合人工肝治疗慢性重型肝炎25例
冯洪玲, 李谦, 唐克诚, 杨积明, 王邦茂

	<p>3661 中国汉族炎症性肠病幽门螺杆菌感染状况分析 庞智, 李美芬, 皇甫照, 周春立, 沈必武</p> <p>3666 含替硝唑序贯疗法根除幽门螺杆菌62例 赵清喜, 黄德瑜</p>
致 谢	3670 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>3578 《世界华人消化杂志》正文要求</p> <p>3582 《世界华人消化杂志》英文摘要要求</p> <p>3589 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>3605 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>3610 《世界华人消化杂志》标点符号用法</p> <p>3614 《世界华人消化杂志》参考文献要求</p> <p>3619 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》</p> <p>3622 《世界华人消化杂志》外文字符标准</p> <p>3626 《世界华人消化杂志》数字用法标准</p> <p>3629 <i>WJG</i>成功通过评审被PMC收录</p> <p>3634 《世界华人消化杂志》修回稿须知</p> <p>3639 《世界华人消化杂志》中文摘要要求</p> <p>3648 汤姆森-路透公布2008年<i>WJG</i>影响因子2.081</p> <p>3652 《世界华人消化杂志》计量单位标准</p> <p>3656 《世界华人消化杂志》名词术语标准</p> <p>3665 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>3669 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729</p>
封面故事	<p>苏敏, 胡蓉, 李红, 黄悦, 许庭良, 姜俸蓉. CD3和CD8免疫反应阳性细胞在人胎回肠的发育.</p> <p>世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3606-3610</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3606.asp</p>
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<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) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-12-18 原刊名 新消化病学杂志</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>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div> <div>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div> <div>印刷 北京科信印刷厂</div> <div>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</div> <div>订购 全国各地邮电局</div> <div>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div>	<div>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</div> <div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</div> <div>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>		
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262	国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

December 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 35

EDITORIAL	<p>3573 Advances in the prevention and treatment of fatty liver disease <i>Chang XM, Yun JW</i></p> <p>3579 Modern surgical treatment of cholecystolithiasis with choledocholithiasis <i>Wang GY, Wang YC, Lv GY</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>3583 Celecoxib inhibits the growth of gastric cancer cells not expressing COX-2 <i>in vitro</i> <i>Wang YF, Li J, Ge CH, Wang SW, Zhang JJ, Xia Q, Guo KJ</i></p> <p>3590 <i>Helicobacter pylori</i> infection induces oxidative DNA damage in human gastric epithelial cell line GES-1 and human gastric cancer cell line SGC-7901 <i>Wang YL, Gong YH, Xu Y, Chen TJ, Liu YE, Yuan Y</i></p> <p>3595 Role of NADPH oxidase in oxidative stress involved in cavernous transformation of the portal vein in rats <i>Wang JY, Liu L, Yao J, Wang B, Chen F, Mao JX, Miao XP, Lin FF</i></p> <p>3601 Identification of differentially expressed genes between ulcerative colitis and irritable bowel syndrome <i>Chen YL, Miao YY, Lv CT</i></p> <p>3606 Development of CD3- and CD8-positive cells in human fetal ileum <i>Su M, Hu R, Li H, Huang Y, Xu TL, Jiang FR</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3611 Trichostatin A inhibits the growth of human gastric cancer SGC-7901 cells <i>Qiao W, Yang XD, Wang D</i></p>
REVIEW	<p>3615 Use of microRNAs in early detection and screening for colorectal cancer <i>Cao K, Di JB, Wei WX, Pang Z</i></p> <p>3620 Advances in research on pericolic tumor deposits in colorectal cancer <i>Liang JW, Wang ZN, Song YX, Xu HM</i></p> <p>3623 Advances in phage therapy of <i>Helicobacter pylori</i> infection <i>Wan XQ, Li HM, Bai Y</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3627 Inhibitory effects of cytokine-induced killer cells on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice <i>Sun LB, Yang G</i></p> <p>3630 Effects of interferon-alpha on thymidine phosphorylase expression and apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells <i>Xiao YS, Zhou J, Fan J, Sun QM, Zhao Y, Xue Q, Shen ZZ, Tang ZY</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3635 Significance of EphA2, hMLH1 and hMSH2 mRNA expression in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Uygur and Han patients in Xinjiang <i>Ye BF, Li HW, Pang ZL, Li H, Tian Q, Chen Y, Guo WJ, Li XM, Wang HJ</i></p> <p>3640 Relationship between TFF3 expression and gastric cardiac carcinogenesis <i>Feng XS, Hao SG, Wang LD, Gao SG, Wang GP, Hou JF, Ru Y, Chen Q</i></p> <p>3644 Endoscopic analysis of ulcer at the gastric angle in Yan'an area: a report of 208 cases</p>

	<p><i>Wang T, Feng YC, Ma DR, Yang N</i></p> <p>3649 Diagnosis and treatment of gastric lipoma: an analysis of 66 cases</p> <p><i>Li SZ, Zhang JH, Li JC, Dong Z</i></p> <p>3653 Significance of RUNX3 promoter methylation in DNA prepared from whole blood for early diagnosis of gastric carcinoma</p> <p><i>Wang CL, Jiang XJ</i></p> <p>3657 Efficacy of sequential colon dialysis in combination with artificial liver support system in treating chronic severe hepatitis: a report of 25 cases</p> <p><i>Feng HL, Li Q, Tang KC, Yang JM, Wang BM</i></p> <p>3661 Low prevalence of <i>Helicobacter pylori</i> infection in Chinese Han patients with inflammatory bowel disease</p> <p><i>Pang Z, Li MF, Huangfu Z, Zhou CL, Shen BW</i></p> <p>3666 Efficacy of tinidazole-containing sequential therapy in the eradication of <i>Helicobacter pylori</i> infection</p> <p><i>Zhao QX, Huang DY</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	3670 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Su M, Hu R, Li H, Huang Y, Xu TL, Jiang FR.</i> Development of CD3- and CD8-positive cells in human fetal ileum. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2009; 17(35): 3606-3610</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3606.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>Peng-Zhen Wu</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

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

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
 Department of Science and Technology
 of Shanxi Province

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

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

PRINTING
 Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF
 Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF
 Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS
 Director: Hai-Ning Zhang

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

脂肪性肝病防治的研究进展

栾新明, 负建蔚

栾新明, 负建蔚, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科 陕西省西安市 710061

栾新明, 教授, 主任医师, 主要从事慢性肝病的防治研究.

通讯作者: 栾新明, 教授, 主任医师, 710061, 陕西省西安市雁塔西路277号, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科.
cxm218@163.com

电话: 029-85323924

收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2009-11-10

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-18

Advances in the prevention and treatment of fatty liver disease

Xin-Ming Chang, Jian-Wei Yun

Xin-Ming Chang, Jian-Wei Yun, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Professor Xin-Ming Chang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, 227 Yanta West Road, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. cxm218@163.com

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

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-18

Abstract

In recent years, lifestyle changes have resulted in a rising prevalence rate of fatty liver disease (FLD). Even worse, there are some misunderstandings concerning the prevention and treatment of FLD. Therefore, it is necessary to improve our understanding of FLD and explore and summarize effective countermeasures for prevention and treatment of FLD. In this article, we will review the recent advances in research of FLD from five aspects: epidemiology, pathogenesis, relationship with metabolic syndrome, misunderstandings concerning prevention and treatment and countermeasures, and highlight the necessity and urgency for prevention and treatment of FLD.

Key Words: Fatty liver disease; Prevention and treatment; Misunderstandings; Countermeasures

Chang XM, Yun JW. Advances in the prevention and treatment of fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3573-3578

摘要

近年来, 随着人们生活水平的提高, 脂肪肝的患病率呈上升趋势, 同时其防治也存在不少误区, 因此有必要提高对脂肪肝的认识, 并在实践中探索总结一套行之有效的防治策略. 本文从脂肪肝的流行病学、发病机制、与代谢综合征的关系、防治误区和防治策略等五个方面进行了探讨, 指出防治脂肪肝的必要性和迫切性.

关键词: 脂肪肝; 防治; 误区; 策略

栾新明, 负建蔚. 脂肪性肝病防治的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(35): 3573-3578

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3573.asp>

0 引言

脂肪性肝病(fatty liver disease, FLD), 简称脂肪肝, 是指多种因素导致的肝脏脂肪代谢障碍, 脂类物质的动态平衡失调, 致使肝细胞内脂肪蓄积过多, 肝脏发生弥漫性脂肪浸润(脂肪变性)及一系列病理生理变化的一种临床病理综合征. 按病理变化的进展程度分为单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化、脂肪性肝硬化四个阶段. 就其病因而言, 按有无饮酒分为酒精性脂肪性肝病(alcoholic fatty liver, AFL)和非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), 后者又分为原发性和继发性两类, 原发性NAFLD主要与代谢综合征(metabolic syndrome, MS)有关^[1], 继发性NAFLD又按不同病因分为药物相关性脂肪肝、病毒相关性脂肪肝和代谢相关性脂肪肝等类型.

1 脂肪肝的流行病学

近年来, FLD患病率有逐渐上升趋势. 在欧美和日本等发达国家, 其患病率逐年上升, 并呈现低龄化趋势, 已成为发达国家慢性肝病的首要原因^[2]. 20世纪80年代欧美及日本成人FLD经B超普查的患病率约为10%, 其中合并肥胖和糖尿病等MS的患者为50%; 目前欧美成人FLD的患病率约为20%, 日本儿童FLD的患病率约

背景资料

脂肪性肝病(FLD), 简称脂肪肝, 是指多种因素导致的肝脏脂肪代谢障碍, 脂类物质的动态平衡失调, 致使肝细胞内脂肪蓄积过多, 肝脏发生弥漫性脂肪浸润(脂肪变性)及一系列病理生理变化的一种临床病理综合征. FLD的研究在我国尚处于起步阶段, 准确的发病机制和完备的治疗手段尚未确立, 因此, 防治FLD还有很多工作要做.

同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

研究前沿
FLD的形成是多种途径之间相互交错形成复杂的网络化、协同化作用的结果, 相关研究涉及多个方面并达到分子水平, 但其发病机制尚未系统阐明。

为2.6%, 低龄化趋势明显^[3]。也有文献报道目前发达国家成人FLD患病率约为17%-33%, 其中1/3-1/2为NAFLD。脂肪性肝炎约有15%-25%于10-15年左右进展为脂肪性肝硬化, 后者则有30%-40%于10年左右死于肝癌、肝衰竭和肝移植术后复发^[4-5]。国内关于FLD流行病学方面的报道较少且差异较大, 北京、上海和杭州报道的FLD患病率分别为11.0%(116/1050)、12.8%(513/4 009)和5.2%(157/3015)^[6]。但国内外流行病学研究均显示其患病率呈不断上升趋势。可以预测, 未来十年或二十年以后, FLD将成为我国肝病防治的主要对象, 充分说明了对FLD防治的迫切性和必要性。

2 脂肪肝的发病机制

FLD的形成是多种途径之间相互交错形成复杂的网络化、协同化作用的结果, 相关研究涉及多个方面并达到分子水平, 但其发病机制尚未系统阐明。目前为多数学者所接受的理论为Day *et al*提出并在其他学者后续研究中不断完善的“二次打击”学说^[7-8]。“一次打击”是FLD发病的基础, 为胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)等因素引起的肝内脂质大量沉积导致单纯性脂肪肝的发生; “二次打击”指脂肪沉积导致氧化应激和脂质过氧化、免疫和炎症损伤等一系列分子、细胞水平乃至病理生理学方面的变化, 最终随着病变的阶段性的进展而表现为脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和脂肪性肝硬化。下面就肝内脂质异常沉积的原因及其导致的异常变化作一简述。

2.1 肝内脂质异常沉积的原因 当各种原因导致肝细胞内脂质[主要为甘油三酯(triglyceride, TG)、游离胆固醇、总多不饱和脂肪酸等]^[9]异常沉积时便形成FLD。目前认为, 肝细胞内脂肪酸(fatty acid, FA)增多、TG合成增加、输出障碍导致脂质大量沉积主要与以下3方面因素有关^[10]:(1) FA的摄入或合成增加: IR、高胰岛素血症、碳水化合物摄入过多、瘦素(leptin)缺乏或抵抗、肥胖等因素导致过多FA在肝脏积聚, 合成脂肪增多, 超过肝脏将其氧化利用和合成脂蛋白输出的能力;(2)蛋白合成障碍: IR、毒物或药物及遗传因素导致极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的合成和分泌减少, 肝细胞脂肪不能运输, 导致脂肪沉积;(3)脂肪酸氧化减少: 致病因素引起FA氧化障碍, 肝细胞通过加速合成TG以防细胞内FA蓄积中毒, 从而促进脂肪沉积。

2.2 肝内脂质沉积引起的异常变化

2.2.1 氧化应激与脂质过氧化作用: 氧化应激是机体在遭受各种有害刺激时, 体内活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)等高活性分子产生过多, 超出抗氧化物的清除能力, 是氧化系统和抗氧化系统的动态失衡。脂质过氧化是指ROS与多不饱和脂肪酸起脂质过氧化反应生成过氧化脂质(lipid peroxides, LPO)。正常肝内存在具有保护性抗氧化物质, 如还原型谷胱甘肽(GSH)和维生素A、C及E等。乙醇、缺血再灌注、胆淤、铁、铜及许多伴有ROS产生的药物等, 均可通过氧应激作为重要的致病因子。该过程生成的自由基可引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白及酶变性、DNA氧化修饰等一系列毒性作用, 最终导致肝细胞坏死或凋亡。其中LPO不仅使内源性ROS增加、毒性增强, 同时还抑制抗氧化系统, 增加细胞和机体对外源性ROS(如过氧化物)毒性的敏感性^[9]。目前多数学者认为氧化应激和脂质过氧化反应可能是单纯性脂肪肝进展为脂肪性肝炎和肝纤维化的重要机制之一。^[7,10-12]

2.2.2 免疫和炎症机制: 该机制主要通过内毒素介导的Kupffer细胞活化, 进而大量释放细胞因子和炎症介质等一系列生物活性物质引起肝脏损害^[7]。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)等部分细胞因子和炎症介质也可来源于脂肪细胞^[13]。Kupffer细胞是肝脏炎症和纤维化细胞因子产生的主要场所。酒精等多种致病因素可以通过内毒素或肠道内细菌产生内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)而导致内毒素血症, 可以直接损伤肝细胞。内毒素还通过激活Kupffer细胞, 进而激活参与许多细胞因子和炎症介质调控的重要基因的转录因子, 如核转录因子kappa B(NF- κ B)等, 从而释放大量细胞因子和炎症介质, 如TNF、IL、转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)、一氧化氮(NO)、急性期反应蛋白(CRP)等, 他们可加重肝细胞炎症、坏死、凋亡和肝纤维化形成。以TNF- α 为例, 该因子被认为是单纯性脂肪肝进展为脂肪性肝炎的主要细胞因子, 其产生伴随着FA合成的增加和IR的出现。Koteish *et al*^[14]对大鼠肝炎模型的研究表明抑制TNF- α 有望成为防治人类早期NAFLD的新途径之一。

2.2.3 脂肪因子的释放和调节: 近10年来, 随着脂肪因子的发现, 人们逐渐认识到脂肪组织(主要

是白色脂肪组织, WAT)除了储能外, 同时也具有内分泌功能. 脂肪因子是脂肪细胞根据肥胖或其他相关代谢信号分泌的可发挥多种生物学活性的蛋白质. 目前认为他们在FLD发病机制中的作用主要与调节IR有关, 但具体机制有待进一步研究. 脂联素(adiponectin)是研究较多的脂肪因子^[13,15], 具有提高胰岛素敏感性、增加肌肉中的FA氧化并降低血清FA水平、抗炎、抗动脉粥样硬化等多种生物学活性. 其血清水平与体质量指数(BMI)成反比. 血清脂联素水平在高胰岛素血症、肥胖、IR和FLD患者明显下降, Nahum *et al*分别认为低脂联素水平是FLD^[16]、2型糖尿病(T₂DM)和心血管疾病^[17]的独立危险因子. 抵抗素(resistin)是在研究噻唑烷二酮衍生物(TZDs)的作用位点时发现的, 又称为脂肪组织特有的分泌因子, 具有增加肝糖产生、调节IR等作用. 在肥胖人群及IR动物模型血清中抵抗素水平增加. Yagmur *et al*^[18]研究表明, 肝硬化患者血循环中抵抗素水平升高, 可能是肝硬化中IR的主要调节因子. 瘦素(leptin)由肥胖基因(ob基因)编码、具有减少摄食和增加能量消耗等功能, 可能参与对脂肪合成和分解代谢动态平衡的调节^[13]. Oral *et al*^[19]研究表明补充瘦素可使NAFLD患者肝脏脂肪沉积减轻、症状缓解, 提示瘦素缺乏是发病机制之一. 也有学者认为瘦素抵抗与FLD的发病关系更为密切, 依据是血清瘦素水平与患者BMI成比例增长.

3 脂肪肝与MS的关系

目前研究表明, FLD与MS具有明显的相关性. FLD患者多有肥胖、高血压病、高脂血症、糖尿病等其他代谢异常性疾病. FLD与MS可能是局部与整体的关系, FLD有可能是MS的一部分. 因为二者有共同的发病基础和协同的相互作用, 提示二者具有密切的内在联系^[8,15,20]. Roland *et al*分别认为FLD是早期IR和MS的标志^[21-22].

IR是FLD(尤其是NAFLD)和MS最为主要的共同发病基础, 胰岛素在脂肪代谢、糖代谢、肾素-血管紧张素系统等多种途径中发挥重要的生物学作用. 一方面各种致病因素所致的肝细胞脂肪沉积可诱发和加剧IR, IR又进一步促进肝细胞脂肪变性, 从而形成“一次打击”, 导致单纯性脂肪肝的发生; 另一方面, 各种原因引起的IR是MS发生、发展的核心环节, IR超过机体增加胰岛素分泌的代偿功能时便形成T₂DM; IR可通过脂肪动员, 使血游离FA升高, 从而促进

TG合成最终形成高甘油三酯血症; IR可使血管紧张素原、血管紧张素转换酶和肾素结合蛋白等基因的表达升高, 导致高血压病. FLD(尤其是NAFLD)和MS中IR的共同调节主要是通过脂肪因子实现的.

FLD(尤其是NAFLD)和MS协同性的相互作用主要体现在: 一方面, NAFLD人群中MS的发病率和患病率非常高; 另一方面, MS患者中NAFLD的发病率高于无MS人群, 且这种NAFLD患者更易发生肝硬化等严重的病理学变化. Cali *et al*^[23]对118例肥胖、糖代谢障碍的青少年FLD患者的研究表明MS可加重FLD的病情进展.

国内陈国生 *et al*^[24]对老年人群进行的一项回顾性分析显示, MS和饮酒等众多危险因素与FLD的相关性顺序如下: 肥胖>饮酒>高甘油三酯血症>高胆固醇血症>糖尿病>高血压. 可见肥胖和饮酒与FLD的相关性最强. 肥胖者有60%属于内脏型肥胖(又称中心性肥胖、代谢性肥胖, visceral obesity, VO), 是MS的始动因素之一, 是与FLD关系最密切的独立性危险因素. 饮酒也是FLD的独立危险因素, 是酒精性肝病(ALD)的直接病因, 肝损害程度与饮酒量直接相关, 是肝病患者死亡的主要原因之一, 英国2005年死于慢性肝病的患者有2/3死于ALD^[25].

4 脂肪肝防治的误区

4.1 不需治疗, 或无药可治 这是目前FLD防治过程中的两个极端. 尽管近年来对FLD的发病机制、病理变化及与MS等疾病的相关性等方面的研究日渐深入, 但仍有人认为FLD不是真正的疾病, 只是一种亚健康状态, 根本无需治疗. 还有人认为FLD不可治愈. 因此, 首先对FLD要有正确的认识, 分不同病因、病变的不同阶段采取不同的治疗措施, 而且贵在坚持. 例如单纯性脂肪肝是肝损害的早期阶段, 根据不同病因进行减肥、戒酒、脱离毒物药物、补充营养等病因治疗后可完全恢复, 而当病变进展到脂肪性肝炎时积极治疗可能需要半年甚至数年时间才可康复, 若发展为肝硬化则难以逆转.

4.2 过度依赖药物, 忽视基础治疗 主要表现为保肝药物、减肥药物或降脂药物的依赖或滥用, 而忽视饮食、运动等基础治疗. 应当指出, 药物不是治疗FLD的唯一措施, 也非首选措施, 应采取因病、因人而异, 充分重视基础治疗、结合必要的药物辅助或强化治疗的综合方案. 例如

相关报道
国内关于FLD流行病学方面的报道较少且差异较大, 北京、上海和杭州报道的FLD患病率分别为11.0%(116/1050)、12.8%(513/4009)和5.2%(157/3015). 但国内外流行病学研究均显示其患病率呈不断上升趋势.

同行评价
有关脂肪性肝病(FLD)的研究和综述国内外已发表很多文章,该综述包括了最近的研究进展,并对FLD的防治提出自己的一些观点和建议,有一定的参考价值。

对单纯性肥胖患者坚持饮食控制和运动锻炼减肥比任何保肝药物和减肥药物更为有效,但应该注意减肥速度不宜过快,体质量下降超过5 kg/m²可导致肝病恶化。关于降脂药物,因应用不当容易导致药物性肝损伤,故主要用于有高脂血症的FLD患者。

4.3 瘦人不患脂肪肝,多食水果肯定有益 前者笼统的认为只有肥胖者才会患FLD,后者习惯性的认为像保健一样多吃水果对FLD具有防治作用。事实上,35%的NAFLD患者并不肥胖,5%的患者没有肥胖、IR、高脂血症等危险因素,正因其如此复杂,FLD的发病机制目前尚未系统阐明。至于长期摄食富含糖类的水果,则有可能导致血糖血脂升高,体质量增加。因此,合并糖尿病、高脂血症和肥胖的FLD患者应尽可能摄食含糖量低的水果,且量不宜过多。新鲜蔬菜含糖量低,富含各种维生素,应是脂肪肝患者理想的选择。

4.4 只见脂肪肝,不见MS 这是长期以来、截至目前FLD防治过程中易被忽视的一个误区。为此本文第三部分专门讨论FLD与MS的关系。目前微观的分子生物学乃至宏观的流行病学研究均表明,FLD与MS可能是局部与整体的关系,FLD可能是MS的一部分。因此对有MS表现的FLD的防治,要充分重视对MS的干预。

5 脂肪肝的防治策略

5.1 基础治疗 应该充分重视并长期坚持基础治疗,主要包括以下4个方面: (1)饮食治疗: 合理控制热量摄入是饮食治疗的首要原则,对于肥胖者,蛋白质、脂肪和碳水化合物分别可按摄入总热量的15%-20%、20%-25%、50%-60%调整饮食结构,坚持高蛋白、低脂肪、低糖饮食^[26];其次尽可能多食新鲜蔬菜以提高膳食纤维的摄入量;再次应该合理分配三餐,对合并糖尿病患者可按1/5、2/5、2/5的比例分配; (2)运动治疗: 运动减肥比节食更为有效,中度以上的有氧运动每日60 min左右、每周至少5次,如每天散步20-40 min或骑自行车、游泳45-60 min,可减少热量1673.6 KJ,从而促进减肥。St George *et al*^[27]对141例NAFLD的研究表明保持或增加体育运动是FLD不依赖于体质量变化的独立受益因素; (3)行为治疗: 主要通过行为干预纠正诱发肥胖的心理和生活方式偏差来建立正常的思维、饮食和运动习惯。该疗法可提高饮食、运动和药物的治疗效果,但需以医患双方的互信合作

为保障; (4)戒酒疗法: 戒酒是治疗ALD的最主要措施,是其他治疗措施起效的前提。因此及时并长期坚持戒酒是治疗ALD的关键。对于AFL而言,戒酒是唯一有效的治疗方法,病变甚至可在数周或数月后完全逆转。

5.2 药物治疗 目前用于FLD治疗的药物有很多种。但由于FLD的病因复杂、发病机制尚未完全阐明,目前尚没有美国食品药品监督管理局(FDA)批准的用于FLD治疗的特效药物^[28]。可试用的药物有: (1)减肥药物: 适用于BMI>30 kg/m²或者BMI>27 kg/m²伴肥胖相关并发症或基础治疗失败者。慎用于妊娠妇女和青少年,用药过程中警惕减肥过快或药物引起肝损害。常用药物有: 以奥利司他(Orlistat)为代表的胃肠道脂酶抑制剂和以西布曲明(sibutramine)为代表的中枢性食欲抑制剂; (2)改善胰岛素抵抗药物: 适用于NAFLD合并T₂DM、空腹血糖调节受损(IFG)、糖耐量减低(IGT)或VO的患者。常用药物有二甲双胍^[29]为代表的双胍类药物和以罗格列酮(发生心衰风险性增高)^[30]、吡格列酮为代表的噻唑烷二酮类(TZDs)胰岛素增敏剂; (3)调脂、降压及控制血糖药物: 合并高脂血症、高血压病或T₂DM应分别给与相关治疗。调脂药物常用的有以阿托伐他汀(atorvastatin)为代表的他汀类药物和以氯贝特为代表的贝特类药物。降压药物以血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素II受体拮抗剂(ARB)应用较多; 胰岛素等降糖药剂种类较多不再赘述; (4)以抗炎为主的药物: 是主要针对免疫和炎症的治疗,主用于重症脂肪性肝炎,常用药物有糖皮质激素、己酮可可碱(pentoxifyllin, PTX)和抗TNF- α 抗体(infliximab),但疗效尚有争议,且缺乏大规模的临床随机对照试验,安全性仍待评估; (5)以抗氧化为主的药物: 是主要针对氧化应激和脂质过氧化的治疗。许多抗氧化剂在动物实验中对FLD的治疗取得了良好的效果,但目前抗氧化剂有效防治人类FLD的临床报道依然较少。常用的药物有多烯磷脂酰胆碱(PPC)、还原型谷胱甘肽(GSH)、水飞蓟素(Silymarin)、S-腺苷-L-蛋氨酸(SAME)、丙硫氧嘧啶(PTU)、甜菜碱(betaine)、锌、硒、维生素E等。

5.3 手术治疗 对药物治疗无效、BMI>40 kg/m²或BMI>35 kg/m²伴肥胖相关并发症的重症病态性肥胖可考虑胃成形手术、肠道旁路术、去脂术^[31]等减肥手术; 对急性肝衰竭和终末期肝病者则可考虑肝移植术。目前关于脂肪肝作为供体的研究争议较多,最近国内一项以中度脂肪

肝(脂肪含量30%-60%)和轻度脂肪肝(脂肪含量小于30%)作为供体的对照研究认为, 行肝移植后1 wk内二者在肝衰竭和肾损害等严重并发症方面并无明显差异^[32]。

6 结论

FLD的研究在我国尚处于起步阶段, 准确的发病机制和完备的治疗手段尚未确立, 因此, 防治FLD还有很多工作要做: (1)提高医务工作者和患者对FLD的正确认识, 藉此消除防治过程中的误区; (2)强化和深入对FLD发病机制及与MS关系等方面的研究, 以期用明确的发病机制有效地指导治疗; (3)鼓励并开展药物治疗的临床研究, 筛选对FLD疗效确切的药物, 最终提高疗效。

7 参考文献

- 1 Tarantino G, Saldalamacchia G, Conca P, Arena A. Non-alcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 293-303
- 2 Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: current concepts and management strategies. *Clin Med* 2006; 6: 19-25
- 3 Falck-Ytter Y, Younossi ZM, Marchesini G, McCullough AJ. Clinical features and natural history of nonalcoholic steatosis syndromes. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 17-26
- 4 Shneider BL, González-Peralta R, Roberts EA. Controversies in the management of pediatric liver disease: Hepatitis B, C and NAFLD: Summary of a single topic conference. *Hepatology* 2006; 44: 1344-1354
- 5 Dasarathy S, Dasarathy J, Thirupathi S, Howard R, Dodig M, Campbell J, McCullough AJ. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: a prospective study. *Gastroenterology* 2005; 128: 543-543
- 6 范建高. 非酒精性脂肪肝的临床流行病学研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 106-107
- 7 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 8 Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 2009; 13: 9-19
- 9 Kapoor A, Puri P, Cheung O, Contos MJ, Luketic VA, Shiffman ML, Sterling R, Stravitz RT, Sanyal AJ. Patterns of fat distribution and its relationship to liver histology in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Gastroenterology* 2007; 132: 813-814
- 10 Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009; 19: 291-302
- 11 Tsukamoto H, Rippe R, Niemelä O, Lin M. Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10 Suppl 1: S50-S53
- 12 Yan M, Zhu P, Liu HM, Zhang HT, Liu L. Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2352-2356
- 13 刘金波, 邓华聪. 脂肪细胞因子及其研究进展. *重庆医学* 2005; 34: 607-609
- 14 Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 679-690
- 15 Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009; 9: 299-314
- 16 Méndez-Sánchez N, Chávez-Tapia NC, Medina-Santillán R, Villa AR, Sánchez-Lara K, Ponciano-Rodríguez G, Ramos MH, Uribe M. The efficacy of adipokines and indices of metabolic syndrome as predictors of severe obesity-related hepatic steatosis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1716-1722
- 17 Zietz B, Herfarth H, Paul G, Ehling A, Müller-Ladner U, Schölmerich J, Schäffler A. Adiponectin represents an independent cardiovascular risk factor predicting serum HDL-cholesterol levels in type 2 diabetes. *FEBS Lett* 2003; 545: 103-104
- 18 Yagmur E, Trautwein C, Gressner AM, Tacke F. Resistin serum levels are associated with insulin resistance, disease severity, clinical complications, and prognosis in patients with chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1244-1252
- 19 Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, Gordon P, Garg A. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 2002; 346: 570-578
- 20 Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116: 539-564
- 21 Roland M, Fairbank J. The Roland-Morris Disability Questionnaire and the Oswestry Disability Questionnaire. *Spine (Phila Pa 1976)* 2000; 25: 3115-3124
- 22 Kim NH, Lee JW. Anterior interbody fusion versus posterolateral fusion with transpedicular fixation for isthmic spondylolisthesis in adults. A comparison of clinical results. *Spine (Phila Pa 1976)* 1999; 24: 812-816; discussion 817
- 23 Cali AM, De Oliveira AM, Kim H, Chen S, Reyes-Mugica M, Escalera S, Dziura J, Taksali SE, Kursawe R, Shaw M, Savoye M, Pierpont B, Constable RT, Caprio S. Glucose dysregulation and hepatic steatosis in obese adolescents: is there a link? *Hepatology* 2009; 49: 1896-1903
- 24 陈国生, 丁宏建, 许震宁. 老年人脂肪肝与代谢综合征的相关性分析. *浙江预防医学* 2009; 21: 27-28
- 25 Welch C, Harrison D, Short A, Rowan K. The increasing burden of alcoholic liver disease on United Kingdom critical care units: secondary analysis of a high quality clinical database. *J Health Serv Res Policy* 2008; 13 Suppl 2: 40-44
- 26 York LW, Puthalapattu S, Wu GY. Nonalcoholic fatty liver disease and low-carbohydrate diets. *Annu Rev Nutr* 2009; 29: 365-379
- 27 St George A, Bauman A, Johnston A, Farrell G, Chey T, George J. Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 50: 68-76
- 28 Rafiq N, Younossi ZM. Nonalcoholic fatty liver disease: a practical approach to evaluation and management. *Clin Liver Dis* 2009; 13: 249-266
- 29 Nadeau KJ, Ehlers LB, Zeitler PS, Love-Osborne K.

- Treatment of non-alcoholic fatty liver disease with metformin versus lifestyle intervention in insulin-resistant adolescents. *Pediatr Diabetes* 2009; 10: 5-13
- 30 Henriksen JH, Ring-Larsen H. Rosiglitazone: possible complications and treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *J Hepatol* 2008; 48: 174-176
- 31 Sanal MG. Adipose tissue transplantation may be a potential treatment for diabetes, atherosclerosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Med Hypotheses* 2009; 72: 247-249
- 32 Gao F, Xu X, Ling Q, Wu J, Zhou L, Xie HY, Wang HP, Zheng SS. Efficacy and safety of moderately steatotic donor liver in transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 29-33

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 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 2009-12-18)

胆囊结石合并胆总管结石的现代外科治疗模式

王广义, 王英超, 吕国悦

王广义, 王英超, 吕国悦, 吉林大学第一医院肝胆胰外科 吉林省长春市 130021

王广义, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事肝脏恶性肿瘤、胆结石成因及治疗方法的基础研究。

作者贡献分布: 王广义对此文作主要贡献; 此课题由王广义与王英超共同设计; 研究过程由王广义、王英超及吕国悦操作完成; 王广义审校。

通讯作者: 王英超, 主治医师, 130021, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林大学第一医院肝胆胰外科。

yingchao111@yahoo.com.cn

电话: 0431-88783376

收稿日期: 2009-09-14 修回日期: 2009-11-17

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-18

Modern surgical treatment of cholecystolithiasis with choledocholithiasis

Guang-Yi Wang, Ying-Chao Wang, Guo-Yue Lv

Guang-Yi Wang, Ying-Chao Wang, Guo-Yue Lv, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Ying-Chao Wang, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, the First Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Avenue, 130021 Changchun, Jilin Province, China. yingchao111@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-14 Revised: 2009-11-17

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-18

Abstract

Nowadays, minimally invasive surgery has been widely accepted, and a variety of endoscopic devices have been devised. The use of various endoscopic devices has resulted in a more rapid convalescence and a shorter hospital stay for many patients. Treatments for choledocholithiasis have been changed greatly from traditional exploratory choledochotomy and T-tube drainage to laparoscopic common bile duct exploration and primary duct closure, transcystic laparoscopic common bile duct exploration, or endoscopic extraction of common bile duct stones before and after laparoscopic cholecystectomy. Combined use of laparoscopy, duodenoscopy and choledochoscopy will be the trend of choledocholithiasis treatment in the future.

Key Words: Minimal invasiveness; Choledocholithiasis; Surgical treatment

Wang GY, Wang YC, Lv GY. Modern surgical treatment of cholecystolithiasis with choledocholithiasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3579-3582

摘要

微创化理念的迅速普及, 微创设备的高速发展, 外科医师可以熟练的运用各种微创化器械使患者在短期内迅速康复。胆总管结石的治疗方式也发生了巨大变化, 由传统的开腹胆总管切开取石、T管引流, 转变为腹腔镜下胆总管切开取石一期缝合或腹腔镜下胆总管切开取石、T管引流, 腹腔镜下经胆囊管胆道镜取石, 或胆囊切除, 术前或术后应用十二指肠镜取出胆总管结石。腹腔镜、十二指肠镜、胆道镜的三镜联合应用将会是今后治疗胆囊结石合并胆总管结石的现代外科治疗模式。

关键词: 微创化; 胆囊结石合并胆总管结石; 外科治疗

王广义, 王英超, 吕国悦. 胆囊结石合并胆总管结石现代外科治疗模式. *世界华人消化杂志* 2009; 17(35): 3579-3582

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3579.asp>

0 引言

自从1991年Stoker *et al*^[1]成功完成首例腹腔镜胆囊切除, 胆总管探查手术后, 胆囊结石合并胆总管结石治疗模式已发生了质的转变, 从以往开腹手术逐渐向微创化治疗模式发展^[2]。国内开展的相对较晚, 在一些省市级的三级甲等医院逐渐开展此类手术。目前在国内针对胆囊结石合并胆总管内结石主要有两种微创化治疗模式^[3]。应用腹腔镜加胆道镜(laparoscopic cholecystectomy plus laparoscopic common bile duct exploration, LC+LCDE)、腹腔镜加十二指肠镜(laparoscopic cholecystectomy plus endoscopic retrograde cholangiopancreatography, LC+ERCP)。针对两种治疗模式的选择有很多的争议^[4-5]。术后近远期并发症少, 死亡率低, 临床费用低的方法, 将成为最佳的选择^[6]。我们科从2000年开展三镜联合治疗胆囊结石合并胆总管内结石, 目前已完成此类手术接

背景资料

胆总管结石是肝胆外科的常见病和多发病。传统的治疗模式为开腹手术。切口长度一般在20 cm左右, 需要15 d左右的住院时间, 3 mo内不能从事剧烈运动。现在由于腔镜技术的迅猛发展, 器械的快速进步, 胆总管结石的治疗模式已经发生了根本的转变, 从以往的开腹手术转向微创化手术。

同行评议者

韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

应用要点
目前针对胆总管结石的微创化治疗主要有两种方法:一为腹腔镜胆囊切除,胆道探查;二为腹腔镜胆囊切除,术前或术后应用ERCP取石。两种治疗模式都有各自的适应证和优缺点,应根据胆道结石患者的特点选择最佳的治疗模式,使患者短期内迅速康复。

近400例,现评述如下。

1 两种治疗模式选择的适应证及手术方法

1.1 LC+LCDE适应证 胆囊结石合并胆总管内结石,胆总管直径在0.8 cm以上;反复应用十二指肠镜取石失败。

胆道探查有两种方法:一种经过胆囊管探查;一种直接经过胆道探查。经过胆囊管探查的优点:可以不打开胆道,取石后直接应用可吸收夹关闭胆囊管,不易造成胆道狭窄,手术简单。缺点:由于胆囊管的直径和角度,在取石时容易损伤胆道镜,由于胆囊管的角度,肝内结石通过胆囊管很难取出。胆道探查后,针对胆道处理也有两种治疗方法:第一,在胆囊切除,胆道探查后置入T管;第二,在胆囊切除,胆道探查后一期缝合。一期缝合要求胆道下端通畅,炎症较轻,无残留结石;有熟练的镜下缝合技术,缝线要求应用可吸收缝合线。手术技术要点一般胆囊最好先不切除,将胆囊先从胆囊床上分离下来,结扎胆囊动脉,将胆囊三角充分游离,在胆囊管用可吸收夹夹闭。将肝十二指肠韧带的浆膜层打开,用电刀纯切切开胆总管1.5 cm左右,不要过大,过大胆道镜水溢出,不利于胆道探查,不能太小,太小结石不易取出。助手牵拉胆囊,将胆道牵直,将胆道镜置入胆道,探查取出。如切除胆囊,可以取1块三角巾,助手钳夹三角纱布顶起肝脏,暴露胆总管。

1.2 LC+ERCP适应证 胆囊结石合并胆总管内结石,胆道内结石直径小于1.2 cm。

腹腔镜结合十二指肠镜也有两种治疗模式。先行LC后行ERCP或先行ERCP再行LC。我们针对这两种模式的选择主要根据患者的状态,或者术前其他方法无法对胆总管内结石确诊的病例。多数情况我们采用先行ERCP再行LC。这样可以最大限度上避免术后残留结石的发生率;而且还可以在术前发现一些特殊的胆道变异;针对感染较重的患者,也可以先通过(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)行胆道减压,改善患者状态,再择期手术。但术前ERCP不列为常规检查范围,主要是费用太贵,可以通过EUS、MRCP、CT等检测手段发现胆道结石。术后ERCP,主要针对胆道直径小于0.8 cm,或LCDE术后残留结石的病例。

2 两种治疗模式住院时间及费用

将目前我们科完成的这两种手术进行总费用及住院时间进行对比。其中LC+LCDE共230例,总住院费用为1.5-2.0万元,住院平均时间10 d,但

拔出T管时间需要在40 d以后。胆道一期缝合的30例,平均住院费用1.3万元左右,平均时间5 d。LC+ERCP患者共168例,住院总费用为2.5-3.0万元,平均住院时间8 d。

3 两种治疗模式近远期并发症对比

全部病例住院期间死亡率为零。LC+LCDE术后各种并发症总比例为15%。其中主要包括:胆漏,胆道内出血,胰腺炎,反流性胃炎,腹泻,腹痛。近期最严重并发症为胆道出血,230例患者共发生8例,7例患者通过应用止血药物,出血自行停止。1例患者通过DSA行肝动脉选择性栓塞,出血停止。LC+ERCP术后各种并发症总比例占25%左右。其中包括乳头出血、胰腺炎、反流性胃炎、腹泻、腹痛。近期最严重并发症主要为胰腺炎,其中168例患者50例患者出现高淀粉酶血症,20例患者术后出现腹痛、恶心、呕吐等胰腺炎表现,其中18例患者通过抑酸,抑酶对症治疗缓解,3 d后治愈。2例患者较重,治疗达10 d后治愈。术后近期并发症LC+LCDE低于LC+ERCP。

我们对目前完成的398例患者进行随访,20%患者随访失败。其中LC+LCDE患者5%术后出现胆道内残余结石,均在术后通过窦道取石成功。13%患者术后出现反流性胃炎,通过口服奥美拉唑,胃炎治愈。10%患者术后出现腹泻,腹部疼痛,口服颠茄片后缓解。LC+ERCP术后出现胆道内残余结石发生率15%,均再次通过ERCP取出。反流性胃炎发生率25%,术后腹泻,腹痛发生率在20%均可以通过药物治疗痊愈。3例患者术后出现反复发热,可以通过抗生素治愈。考虑Oddi括约肌切开后,逆行感染所致。

4 讨论

现代外科外展日新月异,自从腹腔镜胆囊切除成为外科手术的金标准^[7-8]。越来越多的外科手术可以通过微创的方法完成,患者可以在短期内迅速康复。胆囊结石合并胆道结石,在20世纪90年代以前,必须通过开腹才能完成,而且手术切口要达到15 cm以上,患者要在7 d以上拆线,3 mo左右不能作剧烈运动,而现在针对胆囊结石合并胆总管内结石有两种微创的治疗模式,恢复最快的如胆囊切除,胆道探查一期缝合,患者可以在3 d出院,1 mo左右从事任何运动。

回顾我院开展的近400例应用微创方法治疗的胆囊结石合并胆总管结石。在院无死亡病例,其中LC+LCDE术后并发症远低于

LC+ERCP^[9-10]. 但LC+LCDE最大的缺点术后要留置T管达40 d以上, 由于腔镜手术T管周围形成窦道较慢, 早期拔出T管会形成胆漏^[11]. 针对术后是否留置T管在传统的开腹手术中就存在很大的争议^[12]. 在微创手术中面临着同样问题, 如果T管留置时间过长从某种程度上失去了微创的意义^[13]. 但我们对术后是否留置T管是这样要求的: 第一, 胆道的直径要大于0.8 cm, 否则术后会造成胆道狭窄; 第二, 胆道下端通畅, 无残余结石; 第三, 胆道下端无狭窄; 第四, 娴熟的镜下缝合技术^[14-15]. 开展的腹腔镜下胆道一期缝合, 从某种程度上解决了长期留置T管的缺点. 我们采用可吸收线连续缝合, 针距在1.2 mm左右. 30例患者5例术后发生胆漏, 4例在5 d内自行愈合. 1例胆漏, 术后漏出较多, 而且出现明显的腹膜刺激症状, 行ENBD后10 d胆漏愈合. 在取石时如果结石较大, 或者嵌顿在胆总管壶腹内, 可拔出腹壁戳卡, 接应用大的S形蛇牌取石钳从腹壁戳卡留下的腹壁缺损处伸进胆道内取出结石, 效果满意. 如果结石较大, 硬度较高, 而且结石嵌顿在胆总管壶腹内, 应用液电碎石机碎石. 技术上的熟练操作, 并拥有完备的胆道设备, 我们科LC+LCDE残余结石率仅为5%. 转开腹率1.3%. 这要低于多数文献报道残余结石的发生率^[16].

LC+ERCP手术由我科独立完成. LC+ERCP比LC+LCDE最大的优点是患者不需留置T型管, 住院时间短^[17-19]. 如果患者非常危重, 凝血机制严重障碍, 可以先行ENBD, 不进行较大的操作, 起到了胆道减压作用, 挽救患者生命^[20-21]. 这是其他方法无法比拟的. 最大的缺点是临床需要2次麻醉, 临床花费远高于LC+LCDE^[22], 而且术后易发生高淀粉酶血症^[23-25], 由于切开了Oddi括约肌, 患者术后易发生逆行感染, 长期效果不肯定^[26-28]. 在技术要求上也较高, 对乳头的切开要宁浅勿深, 宁小勿大. 十二指肠如果有憩室存在易发生十二指肠穿孔. 结石较大可能需要反复多次取石^[29-30].

LC+LCDE及LC+ERCP都有各自的优缺点, 但却都能在微创意上造福患者^[31]. 由于在多数医院内这两种方法都由不同的科室独立操作. 人为地造成不能客观公正的选择针对患者的最好方法^[31]. 而在我院针对胆囊结石合并胆总管结石的两种微创方法都是由我科独立完成, 客观的避免了人为因素, 可以真正意义上把两种微创办法有效的结合, 采用个体化治疗.

5 参考文献

- 1 Stoker ME, Leveillee RJ, McCann JC Jr, Maini BS. Laparoscopic common bile duct exploration. *J Laparoendosc Surg* 1991; 1: 287-293
- 2 蔡秀军. 腹腔镜在腹部外科应用的现状及发展方向. *中华医学杂志* 2005; 85: 145-148
- 3 刘俊, 裴正军, 黄克俭, 江弢, 曹俊, 朱麟, 张放. 三镜联合在胆囊结石合并胆总管结石治疗中的应用. *肝胆胰外科杂志* 2009; 21: 43-45
- 4 Bingener J, Schwesinger WH. Management of common bile duct stones in a rural area of the United States: results of a survey. *Surg Endosc* 2006; 20: 577-579
- 5 Patel AP, Lokey JS, Harris JB, Sticca RP, McGill ES, Arrillaga A, Miller RS, Kopelman TR. Current management of common bile duct stones in a teaching community hospital. *Am Surg* 2003; 69: 555-560
- 6 Martin DJ, Vernon DR, Toouli J. Surgical versus endoscopic treatment of bile duct stones. *Cochrane Database Syst Rev* 2006: CD003327
- 7 张宗明. 胆道外科疾病的诊治现状与进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1200-1204
- 8 Frazee RC, Roberts J, Symmonds R, Hendricks JC, Snyder S, Smith R, Custer MD, Stoltenberg P, Avots A. Combined laparoscopic and endoscopic management of cholelithiasis and choledocholithiasis. *Am J Surg* 1993; 166: 702-705; discussion 705-706
- 9 Williams EJ, Taylor S, Fairclough P, Hamlyn A, Logan RF, Martin D, Riley SA, Veitch P, Wilkinson ML, Williamson PR, Lombard M. Risk factors for complication following ERCP; results of a large-scale, prospective multicenter study. *Endoscopy* 2007; 39: 793-801
- 10 Tranter SE, Thompson MH. Comparison of endoscopic sphincterotomy and laparoscopic exploration of the common bile duct. *Br J Surg* 2002; 89: 1495-1504
- 11 秦明放, 张晓东, 李文, 邹富胜, 鲁焕章. 腹腔镜联合内镜胆总管探查术. *中华消化内科杂志* 2000; 17: 71-73
- 12 蔡珍福, 王坚, 周玉坤, 焦成文. 胆总管切开纤维胆道镜探查一期缝合695例分析. *肝胆胰外科杂志* 2004; 16: 110-111
- 13 Martin IJ, Bailey IS, Rhodes M, O'Rourke N, Nathanson L, Fielding G. Towards T-tube free laparoscopic bile duct exploration: a methodologic evolution during 300 consecutive procedures. *Ann Surg* 1998; 228: 29-34
- 14 Wani MA, Chowdri NA, Naqash SH, Wani NA. Primary closure of the common duct over endonasobiliary drainage tubes. *World J Surg* 2005; 29: 865-868
- 15 Ha JP, Tang CN, Siu WT, Chau CH, Li MK. Primary closure versus T-tube drainage after laparoscopic choledochotomy for common bile duct stones. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1605-1608
- 16 Anwar S, Rahim R, Agwunobi A, Bancewicz J. The role of ERCP in management of retained bile duct stones after laparoscopic cholecystectomy. *N Z Med J* 2004; 117: U1102
- 17 张成, 安东均, 马富平, 董浩, 晁延军. 十二指肠镜、腹腔镜联合治疗胆囊结石合并胆总管结石. *中华微创外科杂志* 2008; 8: 151-152
- 18 Collins C, Maguire D, Ireland A, Fitzgerald E, O'Sullivan GC. A prospective study of common bile duct calculi in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy: natural history of

同行评价

本文具有作者自己的大宗病例, 且临床观察结果较好, 对临床医师有较好的参考价值.

- choledocholithiasis revisited. *Ann Surg* 2004; 239: 28-33
- 19 Kondo S, Isayama H, Akahane M, Toda N, Sasahira N, Nakai Y, Yamamoto N, Hirano K, Komatsu Y, Tada M, Yoshida H, Kawabe T, Ohtomo K, Omata M. Detection of common bile duct stones: comparison between endoscopic ultrasonography, magnetic resonance cholangiography, and helical-computed-tomographic cholangiography. *Eur J Radiol* 2005; 54: 271-275
 - 20 García-Cano Lizcano J, González Martín JA, Taberna Arana L, Díaz Ruiz J, Morillas Ariño MJ, Pérez Sola A. [Therapeutic biliary endoscopy in patients over 90 years of age] *An Med Interna* 2002; 19: 409-411
 - 21 Mitchell RM, O'Connor F, Dickey W. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography is safe and effective in patients 90 years of age and older. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 72-74
 - 22 Drake BB, Arguedas MR, Kilgore ML, Hawn MT, Wilcox CM. Economical and clinical outcomes of alternative treatment strategies in the management of common bile duct stones in the elderly: wait and see or surgery? *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 746-752
 - 23 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
 - 24 Christensen M, Matzen P, Schulze S, Rosenberg J. Complications of ERCP: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 721-731
 - 25 Stefanidis G, Karamanolis G, Viazis N, Sgouros S, Papadopoulou E, Ntatsakis K, Mantides A, Nastos H. A comparative study of postendoscopic sphincterotomy complications with various types of electrosurgical current in patients with choledocholithiasis. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 192-197
 - 26 Schreurs WH, Vles WJ, Stuijbergen WH, Oostvogel HJ. Endoscopic management of common bile duct stones leaving the gallbladder in situ. A cohort study with long-term follow-up. *Dig Surg* 2004; 21: 60-64; discussion 65
 - 27 Disario JA, Freeman ML, Bjorkman DJ, Macmathuna P, Petersen BT, Jaffe PE, Morales TG, Hixson LJ, Sherman S, Lehman GA, Jamal MM, Al-Kawas FH, Khandelwal M, Moore JP, Derfus GA, Jamidar PA, Ramirez FC, Ryan ME, Woods KL, Carr-Locke DL, Alder SC. Endoscopic balloon dilation compared with sphincterotomy for extraction of bile duct stones. *Gastroenterology* 2004; 127: 1291-1299
 - 28 Park SH, Kim HJ, Park DH, Kim JH, Lee JH, Lee SH, Chung IK, Kim HS, Kim SJ. Pre-cut papillotomy with a new papillotome. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 588-591
 - 29 Vandervoort J, Soetikno RM, Tham TC, Wong RC, Ferrari AP Jr, Montes H, Roston AD, Slivka A, Lichtenstein DR, Ruymann FW, Van Dam J, Hughes M, Carr-Locke DL. Risk factors for complications after performance of ERCP. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 652-656
 - 30 吴成军, 刘志苏, 汪望月, 张扬. EST治疗LC术后胆总管结石体会. *肝胆胰外科杂志* 2006; 18: 301-302
 - 31 Clayton ES, Connor S, Alexakis N, Leandros E. Meta-analysis of endoscopy and surgery versus surgery alone for common bile duct stones with the gallbladder in situ. *Br J Surg* 2006; 93: 1185-1191

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》英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

塞来昔布对不表达环氧合酶-2的胃癌细胞生长的影响

王云峰, 李健, 葛成华, 王世伟, 张建军, 夏强, 郭克建

王云峰, 李健, 葛成华, 王世伟, 上海交通大学医学院附属新华医院分院(上海市杨浦区中心医院)普通外科 上海市 200090

张建军, 夏强, 上海交通大学医学院附属仁济医院肝移植科 上海市 200127

郭克建, 中国医科大学第一附属医院胃肠胰腺外科 辽宁省沈阳市 110001

王云峰, 2004年中国医科大学外科学硕士毕业, 主要从事普外科肝胆胰胃等疾病的基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题由王云峰与葛成华设计; 研究过程由王云峰与李健操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王世伟提供; 数据分析由王云峰完成; 本论文写作由王云峰完成。

通讯作者: 王云峰, 主治医师, 200090, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院分院(上海市杨浦区中心医院)普通外科。wangyunfeng197911@hotmail.com

电话: 021-65690520 传真: 021-65690520

收稿日期: 2009-10-07 修回日期: 2009-11-04

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-12-18

Celecoxib inhibits the growth of gastric cancer cells not expressing COX-2 *in vitro*

Yun-Feng Wang, Jiang Li, Cheng-Hua Ge, Shi-Wei Wang, Jian-Jun Zhang, Qiang Xia, Ke-Jian Guo

Yun-Feng Wang, Jiang Li, Cheng-Hua Ge, Shi-Wei Wang, Department of General Surgery, the Central Hospital of Yangpu District (Branch Hospital of Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University), Shanghai 200127, China

Jian-Jun Zhang, Qiang Xia, Center for Liver Transplantation, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China

Ke-Jian Guo, Department of Gastro-Entero-Pancreatic Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shengyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yun-Feng Wang, Department of General Surgery, the Central Hospital of Yangpu District (Branch Hospital of Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University), Shanghai 200090, China. wangyunfeng197911@hotmail.com

Received: 2009-10-07 Revised: 2009-11-04

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate whether celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, can induce the apoptosis of human gastric cancer MGC-803 cells not expressing COX-2 and explore potential mechanisms involved.

METHODS: Cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Cell cycle distribution was measured by flow cytometry.

The expression of Bax and Bcl-2 proteins was detected by immunohistochemistry. The secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of COX-2 and nuclear factor- κ B (NF- κ B) proteins was examined by Western blot.

RESULTS: The expression of COX-2 protein was not detected in MGC-803 cells. Celecoxib could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of MGC-803 cells in a dose- and time-dependent manner. The reduced rates of growth in cells treated with celecoxib at concentrations of 25, 50, 75 and 100 μ mol/L for 24 h were 48.4%, 54.9%, 58.69% and 63.80%, respectively. Flow cytometry analysis showed that the apoptotic rate of MGC-803 cells treated with celecoxib was 4%, and a sub-G1 cell peak was present. Celecoxib inhibited the secretion of VEGF protein in MGC-803 cells. With the prolongation of the duration of incubation with celecoxib, the level of secreted VEGF decreased. Celecoxib could also inhibit the secretion of NF- κ B protein by inhibiting its expression in a time-dependent manner.

CONCLUSION: Celecoxib inhibits growth and induces apoptosis of MGC-803 cells in a COX-2-independent manner. Celecoxib exerts its anti-tumor effects possibly by inhibiting the expression of NF- κ B protein.

Key Words: MGC-803 cells; Cyclooxygenase-2; Celecoxib; Bcl-2; Bax; Western blot; Nuclear factor- κ B

Wang YF, Li J, Ge CH, Wang SW, Zhang JJ, Xia Q, Guo KJ. Celecoxib inhibits the growth of gastric cancer cells not expressing COX-2 *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3583-3589

摘要

目的: 探讨选择性COX-2抑制剂celecoxib抑制不表达COX-2的胃癌细胞MGC-803生长的机制。

方法: 采用MTT法研究celecoxib对细胞存活

背景资料

COX-2在恶性肿瘤的发生发展过程中起重要作用, COX-2可能成为化学预防和化学辅助治疗恶性肿瘤的新靶点。塞来昔布(celecoxib)是一种选择性COX-2抑制剂, 可抑制多种肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡, 他的上述作用机制尚未完全阐明, 可能存在不依赖COX-2的机制。

同行评议者
傅春彬, 主任医师, 吉化集团公司总医院一院消化内科

研发前沿
塞来昔布作为选择性COX-2抑制剂抗肿瘤药,已成为近年恶性肿瘤化学预防和治疗的研究热点。

率的影响;流式细胞术检测celecoxib处理后细胞DNA含量的变化,免疫组织化学方法检测Bax及Bcl-2的表达, Elisa法检测VEGF蛋白表达水平, Western blot法检测COX-2及NF- κ B蛋白的表达。

结果: MGC-803中未检测到COX-2的表达;选择性COX-2抑制剂celecoxib呈浓度和时间依赖性抑制MGC-803细胞生长($r = 0.985$, $P < 0.05$), 流式细胞仪检测DNA图谱上表现为G₀/G₁期前出现一个代表凋亡细胞的亚G₁峰。Bax及Bcl-2无表达, celecoxib对细胞分泌VEGF($r = 0.928$, $P < 0.01$)及NF- κ B蛋白均有抑制作用, 并且NF- κ B蛋白的表达和celecoxib呈浓度和时间依赖性($r = 1$)。

结论: celecoxib可诱导不表达COX-2的胃癌细胞MGC-803凋亡, 可能通过抑制IKK β -NF- κ B信号通路影响MGC-803细胞的凋亡, 而不依赖COX-2途径。

关键词: MGC-803细胞; 环氧化酶-2; 塞来昔布; Bcl-2; Bax; 蛋白免疫印迹法; 核因子- κ B

王云峰, 李健, 葛成华, 王世伟, 张建军, 夏强, 郭克建. 塞来昔布对不表达环氧化酶-2的胃癌细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3583-3589
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3583.asp>

0 引言

大量研究表明, 环氧化酶-2(cyclooxygenase 2, COX-2)抑制剂能有效预防肿瘤发生。其机制主要是诱导细胞凋亡、调控细胞周期、影响肿瘤新生血管生成等。这种作用与非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)作用的靶点-前列腺素(PG)合成限速酶COX-2有关^[2]。我们的研究发现, 选择性COX-2抑制剂celecoxib(塞来昔布)可诱导不表达COX-2的胃癌细胞MGC-803凋亡。进一步的研究发现癌细胞与正常组织的COX-2表达并无显著差异, 我们推测celecoxib诱导不表达COX-2的胃癌细胞MGC-803凋亡的作用不是通过COX-2起作用, 可能存在其他作用途径。因此, 本研究拟通过体外的细胞株研究celecoxib是否诱导不表达COX-2的胃癌细胞的凋亡, 试图从另一侧面探讨celecoxib诱导胃癌细胞凋亡的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基, 小牛血清购自美国Invitrogen公司; MTT, DMSO购自Sigma公司;

celecoxib由辉瑞制药有限公司提供; BCA蛋白定量试剂盒购自北京博奥森生物技术公司; 人的VEGF ELISA试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 抗COX-2一抗及抗兔二抗购自美国Santa Cruz公司; 核转录因子- κ B(NF- κ B)mAb购自美国Santa Cruz公司; 胰蛋白酶、NF- κ B二抗、增强化学发光试剂盒(ECL)购自北京中山公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂; 人胃癌细胞系MGC-803购自中科院上海细胞所。

1.2 方法

1.2.1 COX-2在胃癌细胞株中表达的检测: 采用免疫印迹实验(Western blot)检测COX-2在胃癌细胞株中的表达。取对数生长期细胞(约 10^9 - 10^{10} cells/L), 用冰PBS液洗涤2次, 加入裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L NaN₃, 1 g/L SDS, 1.0 mmol/L PMSF, 0.2 g/L aprotinin, 1.0 g/L NP40, 5.0 g/L脱氧胆酸钠, pH8.0)混匀, 冰浴30 min。收集细胞裂解液4℃, 12000 g离心5 min, 吸取上清, BCA法蛋白定量后, 调整蛋白量进行SDS-PAGE电泳并将蛋白转移到PVDF膜上。用PBST洗膜3次, 每次5 min。室温下用含50 g/L脱脂奶粉(PBST溶解)封闭PVDF膜1 h或过夜。随后加入适当稀释的一抗(抗COX-2抗体, 美国Santa Cruz公司; β -actin抗体, NewMarker公司)室温温育1 h。用PBST洗脱3次后加入相应的适当稀释的二抗(抗兔二抗, 美国Santa Cruz公司), 温育1 h。PBST洗脱3次后曝光、显影, 凝胶成像系统扫描分析结果。

1.2.2 celecoxib对胃癌细胞生长的影响: (1)细胞存活率测定(MTT法): 收集对数期生长的MGC-803细胞, 调整细胞悬液浓度, 分于96孔板, 每孔100 μ L, 5000-6000个/孔。置37℃、50 mL/L CO₂温箱培养使细胞贴壁, 培养24 h。加入两种不同浓度药物样品各200 μ L(50和100 μ mol/L, 溶剂为含175 mL/L乙醇的RPMI 1640), 分别继续培养至12、24、48、72 h。小心吸去上清, 加入80 μ L新鲜RPMI 1640培养液, 于结束前4 h加入20 μ L MTT溶液(5 g/L)。然后吸掉上清, 每孔加入150 μ L二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的吸光值。同时设置空白孔(含175 mL/L乙醇的RPMI 1640、MTT、二甲基亚砜), 对照孔(细胞、含175 mL/L乙醇的RPMI 1640、MTT、二甲基亚砜), 每组设定3复孔。计算抑制率 = [(对照-空白)-(给药-空白)]/(对照-空白) × 100%。(2)流式细胞仪分析: 取50 μ mol/L celecoxib

表 1 celecoxib作用MGC-803细胞的4值 (mean \pm SD)

分组	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	1.033 \pm 0.079	1.032 \pm 0.079	1.086 \pm 0.159	1.086 \pm 0.159
空白组	0.220 \pm 0.003	0.202 \pm 0.008	0.165 \pm 0.008	0.161 \pm 0.004
celecoxib(μ mol/L)				
25	0.707 \pm 0.009	0.631 \pm 0.007	0.526 \pm 0.006	0.419 \pm 0.013
50	0.689 \pm 0.011	0.577 \pm 0.009	0.449 \pm 0.001	0.327 \pm 0.003
75	0.669 \pm 0.003	0.546 \pm 0.007	0.393 \pm 0.002	0.257 \pm 0.009
100	0.639 \pm 0.009	0.503 \pm 0.009	0.342 \pm 0.007	0.206 \pm 0.006

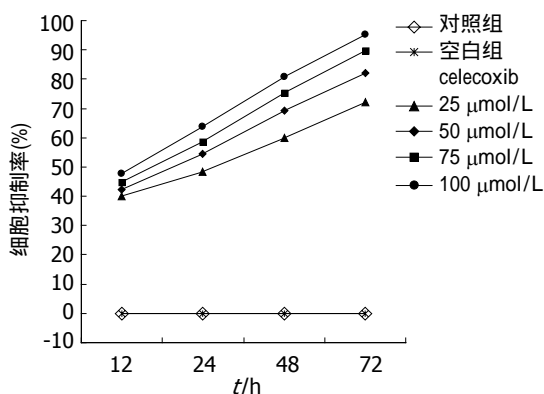


图 1 不同实验组细胞生长抑制率与作用时间的关系。

与胃癌细胞作用24 h后的细胞(1×10^9 cells/L), 用PBS洗涤2次, 离心后以4℃的700 mL/L乙醇固定过夜. 测定前离心洗去乙醇, 加碘化丙啶染液(含50 mg/L PI, 10 mg/L RNase A)避光染色30 min. 以流式细胞仪进样测定。

1.2.3 Bax、Bcl-2免疫组织化学染色: 取50 μ mol/L celecoxib作用48 h后的对数生长期细胞进行免疫组织化学染色, 同时用PBS代替一抗作为阴性对照, 用已知的阳性反应组织作阳性对照. 结果判定标准: 凡细胞质中出现明显的棕黄色颗粒为Bcl-2、Bax蛋白阳性细胞. 每片观察5个高倍视野, 不少于500个细胞, 肿瘤细胞染色阳性率在0%记0分, 1%-5%记1分, 5%-30%记2分, 30%-60%记分, >60%记为4分。

1.2.4 NF- κ B蛋白在胃癌细胞株中表达的检测: 取celecoxib(50及100 μ mol/L)作用24及48 h的对数生长期的细胞用PBS洗涤2次, 加入裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L aprotinin, 1.0 g/L NP40, 5.0 g/L脱氧胆酸钠)混匀, 冰浴30 min. 收集细胞裂解液4℃, 离心5 min, 吸取上清, BCA法蛋白定量后, 调整蛋白量为35 μ g进行SDS-PAGE电泳. 并将蛋白转移到PVDF膜上. 用PBST洗膜3次, 每次5 min. 室温下用含50 g/L脱脂奶粉(PBST溶解)封闭PVDF膜1 h或过

夜. 随后加入适当稀释的一抗(抗NF- κ B抗体, 碧云天生物技术有限公司; β -actin抗体, New Marker公司)室温温育1 h. 用PBST洗脱3次后加入相应的适当稀释的二抗(抗兔二抗, 碧云天生物技术有限公司), 温育1 h. PBST洗脱3次后曝光、显影, 凝胶成像系统扫描分析结果。

1.2.5 VEGF蛋白表达的检测: 按Elisa试剂盒建立VEGF蛋白标准曲线, 取对数生长期的细胞, 按 1×10^9 cells/L的浓度, 每孔500 μ L培养基分别加入到48孔板中, 24 h细胞贴壁后分别加药(50 μ mol/L celecoxib): 细胞对照组、celecoxib(50 μ mol/L)处理组, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h后收集上层培养基, 每个时间设3个, 离心后上清转入tube管中备用, 将备好的培养基加入已平衡至室温板条的相应孔中(每孔100 μ L). 37℃孵箱孵育120 min, 取出板充分洗涤5次, 向滤纸上印干后每孔加入一抗工作液50 μ L, 充分混匀, 37℃孵箱孵育60 min, 洗板5次, 干后每孔加入酶标抗体工作液100 μ L, 37℃孵箱孵育60 min, 洗板5次, 加入底物工作液每孔100 μ L, 37℃孵箱暗处反应10 min, 每孔加入终止液1滴, 混匀后即刻测量 A_{492} nm值, 减去空白孔 A 值, 得各标本的 A 值。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 采用组间 t 检验进行统计学处理, 及应用SPSS13统计软件进行方差分析及直线回归与相关性的分析。

2 结果

2.1 胃癌细胞MGC-803中COX-2的表达 免疫印迹实验(Western blot)结果显示, 在MGC-803胃癌细胞中未检测到COX-2表达。

2.2 celecoxib对胃癌细胞株MGC-803生长的影响 采用MTT法检测发现不同浓度celecoxib处理MGC-803细胞不同时间后, MGC-803细胞的存活率随celecoxib剂量增加和时间延长而降低(图1). 在药物与细胞孵育12 h时, 已有大量细胞发生凋亡现象. 对照组的不同时间的 A 值之间

相关报道

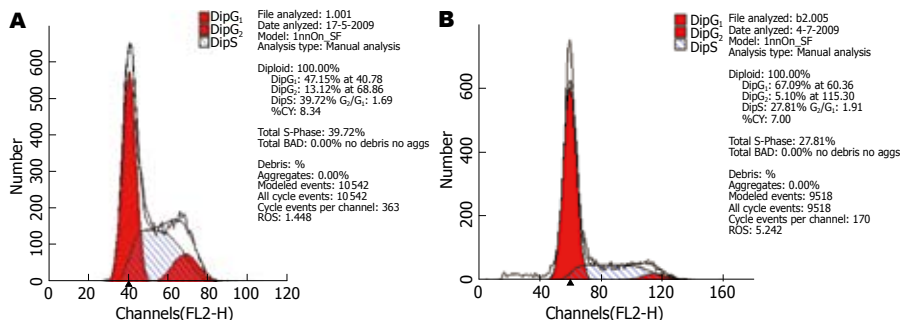
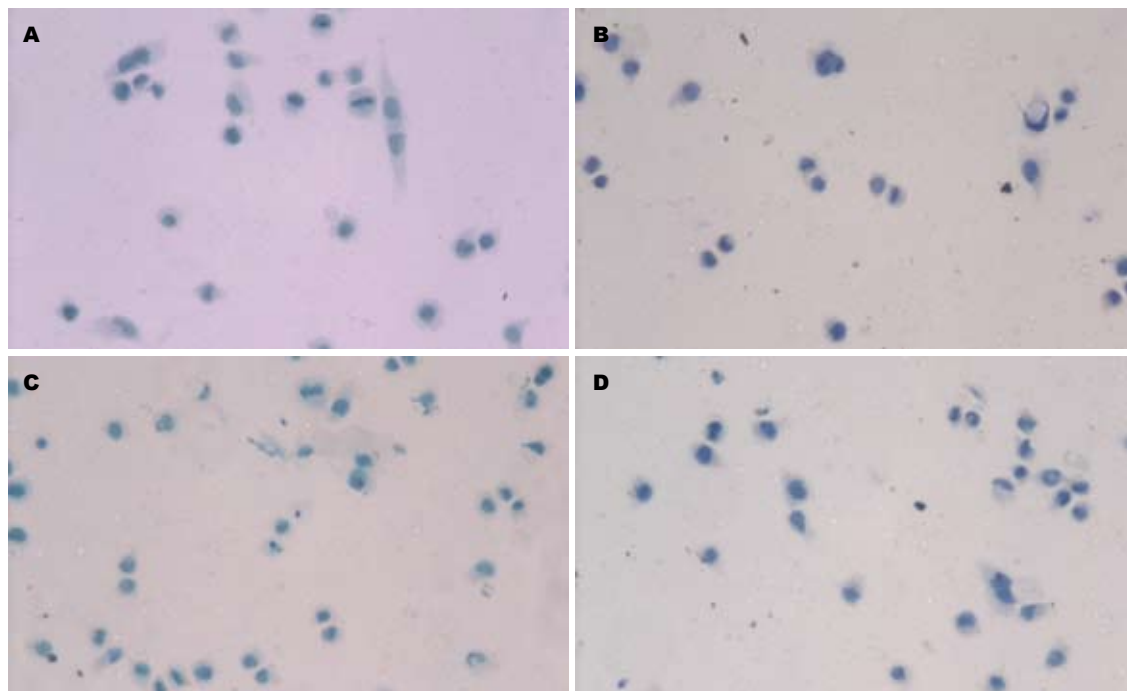
Yu *et al*报道 celecoxib诱导不表达环氧合酶-2的胃癌MGC-803细胞凋亡发生可能与Bcl-2及Bax无关. Ghosh *et al*报道可能存在COX-2非依赖性机制. Narayanan *et al*发现celecoxib能抑制模型动物肿瘤生长, 其作用机制是通过抑制NF- κ B和COX-2活性表达而实现。

同行评价

本文具有科学性、创新性和可读性,能较好地反映我国胃癌基础研究的先进水平。

表 2 celecoxib作用后MGC-803细胞的抑制率(%, mean \pm SD)

	12 h	24 h	48 h	72 h
25 μ mol/L	40.25 \pm 1.04	48.40 \pm 1.09	60.87 \pm 1.07	72.12 \pm 1.12
50 μ mol/L	42.42 \pm 1.12	54.90 \pm 1.10	69.20 \pm 1.11	82.10 \pm 1.62
75 μ mol/L	44.84 \pm 1.08	58.69 \pm 1.03	75.26 \pm 1.06	89.74 \pm 2.08
100 μ mol/L	47.79 \pm 1.18	63.80 \pm 1.11	80.80 \pm 1.15	95.20 \pm 2.41

图 2 流式细胞结果. A: 对照组; B: 50 μ mol/L celecoxib作用24 h组.图 3 Bax和Bcl-2免疫组织化学染色. A - B: Bax; C - D: Bcl-2. A, C: 50 μ mol/L celecoxib作用48 h; B, D: 对照48 h.

无差异($P>0.05$), 说明细胞正常生长无影响. 不同剂量组之间的A值有差异($P<0.05$), 不同时间A值之间也有差异($P<0.05$, 表1). 抑制率和celecoxib的作用时间及剂量有直线相关关系, 呈正相关关系($r=0.985$, $P<0.05$, 表2).

2.3 流式细胞检测结果 celecoxib能够诱导MGC-803细胞发生凋亡, DNA图谱上表现为 G_0/G_1 期前出现一个代表凋亡细胞的亚 G_1 峰. 同正常细胞对比可见 G_0/G_1 期细胞比例逐渐增加, S期和 G_2/M 期细胞比例降低(图2).

2.4 Bax、Bcl-2免疫组织化学染色 Bcl-2阳性染色主要弥漫性分布于胃癌组织细胞质中, 癌旁组织中也可见少量的表达. Bcl-2蛋白免疫组织化学染色评分为: 48 h对照组0分, 50 μ mol/L celecoxib作用48 h组0分, 与对照组比较无统计学意义, Bax阳性反应物位于胞质和胞膜, 呈棕黄色颗粒, Bax蛋白免疫组织化学染色评分为: 48 h对照组0分, 50 μ mol/L celecoxib作用48 h组0分, 与对照组比较无统计学意义(图3).

2.5 NF- κ B蛋白表达 celecoxib对MGC-803细胞

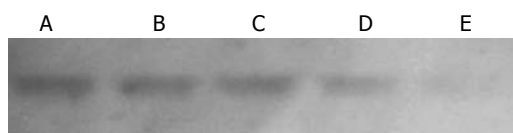


图 4 NF- κ B蛋白表达. A: 对照组; B: 50 μ mol/L(24 h); C: 50 μ mol/L(48 h); D: 100 μ mol/L(24 h); E: 100 μ mol/L(48 h).

分泌NF- κ B蛋白有抑制作用, 并且和celecoxib呈浓度和时间相关性($r = 1$, 图4).

2.6 VEGF蛋白表达 celecoxib对MGC-803细胞分泌VEGF蛋白有抑制作用, 并且和celecoxib呈时间相关性($r = 0.928$, $P < 0.01$, 图5).

3 讨论

NSAIDs对消化系肿瘤具有防治作用已有大量的事实, 但其抗癌作用的机制仍不明确, 有研究认为可能与抑制COX这一前列腺素类物质合成的酶, 使前列腺素类物质生成减少有关, 即COX依赖性途径^[1-2]. 近来人们发现, NSAIDs也可以在完全缺乏COX活性的细胞发挥抗增殖作用, 故推测可能通过其他途径也可诱导细胞凋亡. 本实验应用MTT方法检测了celecoxib对胃癌MGC-803细胞的生长抑制作用. 结果表明, 随着药物浓度的增加和时间的延长, 细胞存活率逐渐降低, DNA图谱上表现为在G₀/G₁期前出现一个代表凋亡细胞的亚G₁峰. 同正常细胞对比可见G₀/G₁期细胞比例逐渐增加, S期和G₂/M期细胞比例降低. 但是, COX-2蛋白的含量在MGC-803细胞未检测到. Yu *et al*^[3]的研究报道与我们的研究一致, 进一步说明celecoxib抑制细胞生长存在其他途径. 可能是通过COX-2非依赖性途径起作用. 有人报道COX-2非依赖性机制可能与如下途径有关: (1)抑制PPAR δ , 诱导肿瘤细胞的凋亡^[4], 或激活PPAR γ 抑制肿瘤细胞的生长^[5]; (2)抑制IKK β -NF- κ B信号通路^[6-7]; (3)抑制Akt信号通路^[8].

本研究中我们通过免疫组织化学方法定性检测Bax及Bcl-2均未见表达, Bcl-2家族的表达和调控是影响细胞凋亡的关键因素. Bcl-2和Bax分别是Bcl-2家族中最有代表性的抑亡和促进凋亡基因, 并且Bax是Bcl-2活性的主要调节子^[9]. 近年来研究表明Bcl-2和Bax调节细胞凋亡, 取决于自身表达的高低, 还与Bax/Bcl-2的比率有关^[10-11]. Bcl-2水平高于Bax时, Bcl-2和Bcl-2形成同源二聚体, 细胞凋亡受抑制; Bax表达高于Bcl-2时, 则形成Bax和Bax同源二聚体, 细胞凋亡增强; 而Bcl-2和Bax水平相当时, 形成Bcl-2Bax二聚体,

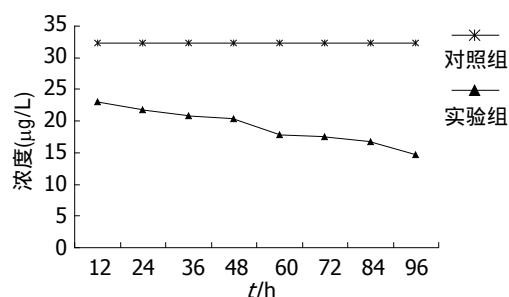


图 5 VEGF蛋白浓度标准曲线.

细胞凋亡终止. 我们的研究表明, celecoxib诱导不表达COX-2的胃癌MGC-803细胞凋亡发生可能与Bcl-2及Bax无关. 唐保东 *et al*^[12]的研究与我们的研究结果一致.

本组实验中, 我们研究发现celecoxib对细胞分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及NF- κ B蛋白均有抑制作用, 并且和celecoxib呈浓度和时间依赖性. VEGF家族有较强的促进新生血管和淋巴管形成作用, 参与病理性、生理性淋巴管和血管新生. 许多因素可调节VEGF的表达, 缺氧及HIF、细胞因子(包括PDGF、bFGF、胰岛素样生长因子、角化细胞生长因子、表皮生长因子、TNF- α 、TGF、IL-1、IL-6)、细胞内介质(包括AP-1转录因子、Ras蛋白和酪氨酸蛋白激酶、VHL、COX-2等)、类固醇激素等均对VEGF的调控产生影响^[13-15]. 在某些消化道肿瘤中COX-2表达与VEGF呈正相关, 提示COX-2可能通过诱导VEGF表达上调促进肿瘤生长, UefujiK *et al*^[16]认为COX-2可能产生前列腺素E₂, 通过EP受体/cAMP途径来调节肿瘤中VEGF基因转录表达^[17]. 本实验中检测celecoxib可抑制MGC-803细胞分泌VEGF, 机制可能通过COX-2非依赖性途径起作用, 具体机制需要进一步深入研究.

NF- κ B是一种重要的转录因子蛋白, 研究表明NF- κ B除了具有调节炎症、免疫反应相关基因转录作用外, 还可以调节细胞增殖, NF- κ B几乎存在于所有细胞, 与p50/p65结合形成二聚体^[18-19]. 静息状态时, p65与 κ B抑制蛋白(inhibitory kappaB, I κ B)结合, 以非活性状态存在于细胞质中, 不具有调节基因转录的能力. 当细胞受到内毒素、病毒蛋白、致癌物等细胞外信号刺激时, 蛋白激酶被激活, I κ B磷酸化并降解, 从而释放NF- κ B二聚体, 使其得以转位进入细胞核中, 与靶基因启动子区域中特定的DNA

序列结合, 诱导抗凋亡基因和促生长基因等靶基因的转录^[20-21]. 我们的研究发现MGC-803细胞株表达NF- κ B活性. 用不同药物浓度的celecoxib处理MGC-803细胞后, Western blot检测结果显示NF- κ B蛋白表达较处理前明显降低, 并且和celecoxib呈浓度和时间依赖性. 表明celecoxib可抑制MGC-803细胞NF- κ B蛋白的表达, 提示celecoxib可通过抑制NF- κ B蛋白的表达, 进而抑制IKK β -NF- κ B信号通路而发挥抗肿瘤作用. Dai *et al*^[21]研究指出胃癌组织中NF- κ B蛋白表达与VEGF蛋白表达之间存在正相关关系, 提示在胃癌组织中NF- κ B的活化对VEGF的表达具有正向的调节作用. Choi *et al*^[22]实验发现, 用NF- κ B反义核苷酸抑制TNF- α 诱导的血管生成的同时, 能下调TNF- α 介导的bFGF和VEGF的表达, 从而提示NF- κ B对VEGF的活性确有潜在的正向调节作用. 这或许是肿瘤细胞中VEGF分泌异常增加的启动机制之一, 也为NF- κ B对胃癌发生发展的多向调节作用提供了有力佐证. Starenki *et al*^[23]研究认为NF- κ B可通过诱导和上调Bcl-2家族蛋白发挥抑制凋亡作用. Bcl-2启动子上存在NF- κ B的特异性结合位点, NF- κ B可通过转录途径直接上调Bcl-2表达, 同时还可通过TNF- α 、p21WAF1^[24]等其他途径促进Bcl-2表达. 在肿瘤细胞中由于NF- κ B的活化可以激活含有 κ B的Bcl-2及Bcl-XL编码基因的转录表达, 而对无 κ B位点的Bax和Bad基因则无此作用, 这就可能使得两类不同功能的蛋白表达量失衡, 从而增强肿瘤细胞的抗凋亡性. 抑制NF- κ B活性可抑制Bcl-2的表达, 进而诱导肿瘤细胞凋亡^[25].

我们的研究结果提示celecoxib可抑制MGC-803细胞的生长, 并可抑制NF- κ B及VEGF蛋白的表达, 此可能为celecoxib抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡, 抑制肿瘤新生血管形成以及预防肿瘤发生等抗肿瘤作用的一种机制.

4 参考文献

- Liu Z, Wang X, Lu Y, Han S, Zhang F, Zhai H, Lei T, Liang J, Wang J, Wu K, Fan D. Expression of 15-PGDH is downregulated by COX-2 in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1219-1227
- Bastos-Pereira AL, Lugarini D, de Oliveira-Christoff A, Avila TV, Teixeira S, Pires AD, Muscará MN, Cadena SM, Donatti L, da Silva de Assis HC, Acco A. Celecoxib prevents tumor growth in an animal model by a COX-2 independent mechanism. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009 Jun 9. [Epub ahead of print]
- Yu J, Tang BD, Leung WK, To KF, Bai AH, Zeng ZR, Ma PK, Go MY, Hu PJ, Sung JJ. Different cell kinetic changes in rat stomach cancer after treatment with celecoxib or indomethacin: implications on chemoprevention. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 41-45
- Ghosh M, Ai Y, Narko K, Wang Z, Peters JM, Hla T. PPARdelta is pro-tumorigenic in a mouse model of COX-2-induced mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009; 88: 97-100
- Hazra S, Peebles KA, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM. The Role of PPARgamma in the Cyclooxygenase Pathway in Lung Cancer. *PPAR Res* 2008; 2008: 790568
- Ding J, Wu K, Zhang D, Luo W, Li J, Ouyang W, Song L, Huang C. Activation of both nuclear factor of activated T cells and inhibitor of nuclear factor-kappa B kinase beta-subunit-/nuclear factor-kappa B is critical for cyclooxygenase-2 induction by benzo[a]pyrene in human bronchial epithelial cells. *Cancer Sci* 2007; 98: 1323-1329
- Ouyang W, Ma Q, Li J, Zhang D, Ding J, Huang Y, Xing MM, Huang C. Benzo[a]pyrene diol-epoxide (B[a]PDE) upregulates COX-2 expression through MAPKs/AP-1 and IKKbeta/NF-kappaB in mouse epidermal Cl41 cells. *Mol Carcinog* 2007; 46: 32-41
- Fu Y, Zhang Q, Kang C, Zhang K, Zhang J, Pu P, Wang G, Wang T. Inhibitory effects of adenovirus mediated COX-2, Akt1 and PIK3R1 shRNA on the growth of malignant tumor cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2009; 35: 583-591
- Panasiuk A, Dzieciol J, Panasiuk B, Prokopowicz D. Expression of p53, Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6198-6202
- Zaldivar V, Magri ML, Zárate S, Jaita G, Eijo G, Radl D, Ferraris J, Pisera D, Seilicovich A. Estradiol increases the Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 2009; 90: 292-300
- Mao JD, Wu P, Xia XH, Hu JQ, Huang WB, Xu GQ. Correlation between expression of gastrin, somatostatin and cell apoptosis regulation gene bcl-2/bax in large intestine carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 721-725
- 唐保东, 曾志荣, 胡品津. 塞来昔布对MNNG诱导的大鼠胃腺癌组织Bax、Bcl-2、Fas表达的影响. *中山大学学报(医学科学版)* 2007; 28: 16-19
- Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: Anticarcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2009; 486: 95-102
- Chen HX, Cleck JN. Adverse effects of anticancer agents that target the VEGF pathway. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 465-477
- Toomey DP, Murphy JF, Conlon KC. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *Surgeon* 2009; 7: 174-180
- Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Increased expression of interleukin-1alpha and cyclooxygenase-2 in human gastric cancer: a possible role in tumor progression. *Anticancer Res* 2005; 25: 3225-3230
- Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007; 29: 19-35
- Qiu J, Wang X, Guo X, Zhao C, Wu X, Zhang Y. Toll-like receptor 9 agonist inhibits ERalpha-mediated transactivation by activating NF-kappaB in breast cancer cell lines. *Oncol Rep* 2009; 22: 935-941
- Piva R, Penolazzi L, Borgatti M, Lampronti I, Lambertini E, Torreggiani E, Gambari R. Apoptosis

- of human primary osteoclasts treated with molecules targeting nuclear factor-kappaB. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171: 448-456
- 20 Tsang TY, Tang WY, Tsang WP, Co NN, Kong SK, Kwok TT. Mechanistic study on growth suppression and apoptosis induction by targeting hepatoma-derived growth factor in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem* 2009; 24: 253-262
- 21 Dai L, Gu L, Ding C, Qiu L, Di W. TWEAK promotes ovarian cancer cell metastasis via NF-kappaB pathway activation and VEGF expression. *Cancer Lett* 2009; 283: 159-167
- 22 Choi IK, Shin HJ, Lee HS, Kwon HJ. Streptochlorin, a marine natural product, inhibits NF-kappaB activation and suppresses angiogenesis in vitro. *J Microbiol Biotechnol* 2007; 17: 1338-1343
- 23 Starenki DV, Namba H, Saenko VA, Ohtsuru A, Maeda S, Umezawa K, Yamashita S. Induction of thyroid cancer cell apoptosis by a novel nuclear factor kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6821-6829
- 24 Akita K, Kawata S, Shimotohno K. p21WAF1 modulates NF-kappaB signaling and induces anti-apoptotic protein Bcl-2 in Tax-expressing rat fibroblast. *Virology* 2005; 332: 249-257
- 25 Fahy BN, Schlieman MG, Mortenson MM, Virudachalam S, Bold RJ. Targeting BCL-2 overexpression in various human malignancies through NF-kappaB inhibition by the proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 46-54

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》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 2009-12-18)

幽门螺杆菌致胃上皮细胞株GES-1和胃癌细胞株SGC-7901的氧化性损伤

王艳丽, 宫月华, 徐莹, 陈铁军, 柳云恩, 袁媛

背景资料
幽门螺杆菌是引起慢性胃炎及消化性溃疡的重要致病因子, 且与胃癌的发生密切相关。关于*H. pylori*引起胃黏膜病变的确切机制, 目前尚未完全明了。研究表明, 氧化性DNA损伤的产生和累积与各种胃黏膜病变的发生发展密切相关。

王艳丽, 宫月华, 徐莹, 陈铁军, 柳云恩, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所暨普通外科研究所第三研究室 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室 辽宁省沈阳市 110001
王艳丽, 辽宁医学院附属第一医院肿瘤科 辽宁省锦州市 121001
王艳丽, 2004年中国医科大学硕士, 主要从事消化系统肿瘤的病因研究。

辽宁省科技攻关基金资助项目, No. 2007225001-1
辽宁省高校重点实验室基金资助项目, No. 2009S106
作者贡献分布: 王艳丽与袁媛对此文所作贡献均等; 此课题由王艳丽、宫月华及袁媛设计; 实验操作由王艳丽、宫月华、徐莹、陈铁军及柳云恩完成; 研究所用试剂及分析工具由袁媛提供; 数据分析及论文写作由王艳丽、宫月华及袁媛完成。
通讯作者: 袁媛, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所暨普通外科研究所第三研究室, 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室。yyuan@mail.cmu.edu.cn
电话: 024-83282153 传真: 024-83282292
收稿日期: 2009-11-09 修回日期: 2009-11-20
接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-18

Helicobacter pylori infection induces oxidative DNA damage in human gastric epithelial cell line GES-1 and human gastric cancer cell line SGC-7901

Yan-Li Wang, Yue-Hua Gong, Ying Xu, Tie-Jun Chen, Yun-En Liu, Yuan Yuan

Yan-Li Wang, Yue-Hua Gong, Ying Xu, Tie-Jun Chen, Yun-En Liu, Yuan Yuan, Key Laboratory of Tumor Etiology and Prevention in Liaoning Province, Institute of Oncology & Department of General Surgery (Division III), the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Yan-Li Wang, Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of Liaoning Province, No. 2007225001-1; and the Fund of the Key Laboratory of Cancer Etiology and Prevention in Liaoning Province, No. 2009S106

Correspondence to: Professor Yuan Yuan, Key Laboratory of Tumor Etiology and Prevention in Liaoning Province, Institute of Oncology & Department of General Surgery (Division III), the First Hospital of China Medical University, Heping District, 155 North Nanjing Street, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan@mail.cmu.edu.cn

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

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-18

(*H. pylori*) infection can induce oxidative DNA damage in human gastric epithelial cell line GES-1 and human gastric cancer cell line SGC-7901.

METHODS: *H. pylori* was co-cultured with GES-1 and SGC-7901 cells, respectively. The morphological changes of GES-1 and SGC-7901 cells between before and after co-culture were observed. The 8-OHdG expression in the two types of cells was detected by laser scanning confocal microscopy.

RESULTS: *H. pylori* infection induced oxidative DNA damage in both GES-1 and SGC-7901 cells. The expression levels of 8-OHdG in GES-1 and SGC-7901 cells co-cultured with *H. pylori* were significantly higher than those in control cells (64.9396 ± 17.8142 vs 32.3010 ± 7.3620 and 102.8344 ± 30.2632 vs 77.1336 ± 32.3223 , respectively; both $P = 0.000$). The extent of 8-OHdG upregulation in GES-1 cells co-cultured with *H. pylori* was significantly higher than that in SGC-7901 cells co-cultured with *H. pylori*.

CONCLUSION: *H. pylori* infection induces oxidative DNA damage in both GES-1 and SGC-7901 cells. This result supports the hypothesis that *H. pylori* induced-oxidative DNA damage plays a pivotal role in the development of gastric carcinoma in patients with chronic gastritis. GES-1 cell line is superior to SGC-7901 cell line in the study of oxidative damage induced by *H. pylori*.

Key Words: *Helicobacter pylori*; GES-1; SGC-7901; Oxidative DNA damage; 8-OHdG; Co-culture

Wang YL, Gong YH, Xu Y, Chen TJ, Liu YE, Yuan Y. *Helicobacter pylori* infection induces oxidative DNA damage in human gastric epithelial cell line GES-1 and human gastric cancer cell line SGC-7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3590-3594

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

Abstract

AIM: To investigate whether *Helicobacter pylori*

摘要

目的: 探讨*H. pylori*对人正常胃黏膜上皮细胞永生细胞株GES-1和人淋巴结转移胃腺癌细

细胞株SGC-7901的氧化性DNA损伤作用.

方法: 采用细菌-细胞共培养的方法, 比较 *H pylori* 作用前后GES-1和SGC-7901细胞株的形态学变化; 采用激光扫描共聚焦显微镜方法, 比较 *H pylori* 作用前后GES-1和SGC-7901细胞株8-羟基脱氧鸟苷(8-OhdG)的表达.

结果: *H pylori* 对GES-1和SGC-7901细胞株均具有损伤作用; 8-OHdG表达升高, 加菌组与对照组相比差别具有统计学意义(64.9396 ± 17.8142 vs 32.3010 ± 7.3620 ; 102.8344 ± 30.2632 vs 77.1336 ± 32.3223 , 均 $P = 0.000$); 而且8-OHdG表达的变化程度GES-1细胞显著高于SGC-7901细胞.

结论: *H pylori* 能够诱导GES-1和SGC-7901细胞DNA氧化性损伤显著增加; 在 *H pylori* 氧化损伤的相关研究中, 更适宜选择对损伤作用敏感的GES-1细胞株作为研究对象.

关键词: 幽门螺杆菌; GES-1; SGC-7901; 氧化性DNA损伤; 8-OHdG; 共培养

王艳丽, 宫月华, 徐莹, 陈铁军, 柳云恩, 袁媛. 幽门螺杆菌致胃上皮细胞株GES-1和胃癌细胞株SGC-7901的氧化性损伤. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3590-3594
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3590.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是引起慢性胃炎的病因, 是消化性溃疡的重要致病因子, 且与胃癌的发生密切相关^[1]. 关于 *H pylori* 引起胃黏膜病变的确切机制, 目前尚未完全明了. 研究表明, 氧化性DNA损伤的产生和累积与各种胃黏膜病变的发生发展密切相关. 8-羟基脱氧鸟苷(8-OhdG)是检测DNA氧化性损伤的敏感标志物^[2], 8-OHdG含量与细胞内DNA氧化损伤程度呈正相关. 目前相关研究多局限于采用免疫组织化学法针对各类 *H pylori* 相关胃黏膜病变的病理资料进行研究, 难以直接反映 *H pylori* 对胃黏膜上皮细胞DNA的氧化性损伤作用. 胃上皮细胞株GES-1为一基本正常的胃黏膜细胞株, 基本保留了正常的细胞骨架结构, 是了解正常胃黏膜细胞离体特征以及胃癌致病机制的良好细胞株^[3]. 胃癌细胞株SGC-7901为淋巴结转移胃腺癌细胞株^[4], 是目前较为常用的胃癌研究细胞模型. 本研究利用 *H pylori* 悬液直接作用于体外培养的人胃上皮细胞株GES-1和人胃腺癌细胞株SGC-7901, 观

察比较 *H pylori* 对正常胃黏膜细胞和胃癌细胞的损伤作用; 应用激光共聚焦扫描显微镜检测共培养后GES-1和SGC-7901细胞株DNA氧化性损伤情况, 旨在探讨 *H pylori* 诱导的胃黏膜细胞DNA氧化性损伤在 *H pylori* 相关疾病中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃上皮细胞株GES-1来自北京市肿瘤防治研究所细胞遗传室. 人胃腺癌细胞株SGC-7901和 *H pylori* 菌株来自中国医科大学附属第一医院普通外科研究所暨肿瘤研究所第三研究室, 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室.

1.2 方法

1.2.1 *H pylori* 活菌悬液的制备: 在无菌条件下, 以划线培养方式将 *H pylori* 接种于含5%羊血的脑心浸液琼脂培养基(BD), 置于37℃微需氧环境中(50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂)培养, 3-5 d后收集针尖样透明菌落, 用含10% FBS的RPMI 1640培养液(无抗生素)作稀释液, 将两种细菌的浓度均调节至 8×10^8 CFU/L. PCR反应证实 *H pylori* 菌株毒力基因型为 cagA(+)vacAs1(+)m1b(+).

1.2.2 *H pylori* 与GES-1和SGC-7901细胞共培养: (1)GES-1和SGC-7901细胞均采用含10% FBS的RPMI 1640培养液, 于37℃、50 mL/L CO₂的培养箱中培养, 每周换液3次, 选取对数生长期的细胞进行实验. (2)2种细胞均以 5×10^4 每孔接种在含洁净小盖玻片的24孔培养板中, 过夜. (3)将稀释好的 *H pylori* 活菌悬液加入过夜后的GES-1和SGC-7901中, 对照组加稀释用培养液. 每种细胞重复3孔. (4)24 h后, 终止共培养. 应用倒置相差显微镜进行数码图像采集, 观察细胞形态学变化. (5)取出小盖玻片, 冷丙酮固定, -20℃保存备用.

1.2.3 8-OHdG荧光染色及激光扫描共聚焦显微镜观察: (1)取上述保存玻片, 经PBS洗涤后用0.1% Triton-100 PBS液室温孵育30 min. (2)10 g/L BSA封闭10 min后, 将鼠抗人8-OHdG一抗(日本老化研究所)加到玻片上, 4℃孵育过夜, 以PBS替代一抗作为阴性对照. (3)经PBS洗涤后加入FITC标记羊抗鼠IgG二抗(北京中杉), 37℃水浴孵育60 min. (4)PBS洗涤, 用无荧光缓冲液甘油封固后, 直接在激光扫描共聚焦显微镜(德国Leica公司TCS SP2型LSCM)下观察并拍照. (5)以绿色荧光通道扫描观察, 每张玻片选择细胞较为密集的区域, 每高倍视野随机选取20个细

参考文献

8-羟基脱氧鸟苷是检测DNA氧化性损伤的敏感标志物. 本研究利用 *H pylori* 悬液直接作用于体外培养的人胃上皮细胞株GES-1和人胃腺癌细胞株SGC-7901, 观察比较 *H pylori* 对正常胃黏膜细胞和胃癌细胞的损伤, 旨在探讨 *H pylori* 诱导的胃黏膜细胞DNA氧化性损伤在 *H pylori* 相关疾病中的作用.

相关报道

目前相关研究多局限于采用免疫组织化学法针对各类 *H pylori* 相关胃黏膜病变的病理资料进行研究, 难以直接反映 *H pylori* 对胃黏膜上皮细胞DNA的氧化性损伤作用.

创新盘点

本研究体外观察了两种来源及属性不同的细胞株在*H. pylori*悬液作用下8-OHdG表达的差异。结果发现,*H. pylori*能够诱导GES-1和SGC-7901细胞DNA氧化性损伤显著增加。在*H. pylori*氧化损伤的相关研究中,更适宜选择对损伤作用敏感的GES-1细胞株作为研究对象。

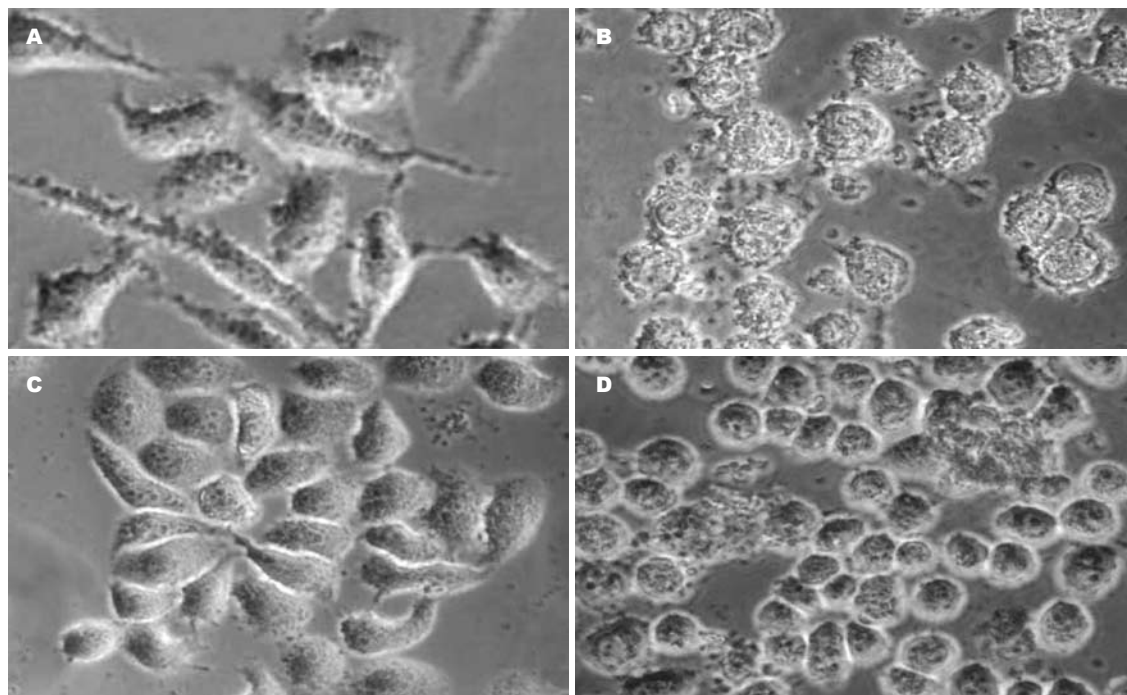


图1 与*H. pylori*共培养后GES-1和SGC-7901细胞的形态学观察($\times 400$)。A: 未经*H. pylori*作用的生长良好的GES-1细胞; B: 与*H. pylori*共培养24 h后的GES-1细胞变圆, 破碎; C: 未经*H. pylori*作用的生长良好的SGC-7901细胞; D: 与*H. pylori*共培养24 h后SGC-7901细胞变圆, 破碎, 部分细胞形态仍然完整。

表1 与*H. pylori*共培养前后GES-1和SGC-7901的8-OHdG荧光强度变化率比较

细胞株	测定值		差值	变化率(%)
	对照组	加菌组		
GES-1	32.30	64.94	32.64	50.26
SGC-7901	77.13	102.83	25.70	25.00

胞, 利用Leica confocal software软件分析荧光强度。实验重复进行3次, 以平均荧光强度作为8-OHdG的相对表达量。

统计学处理 采用统计软件SPSS11.5分析, 组间比较采用*t*检验, 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 GES-1和SGC-7901细胞与*H. pylori*共培养前后的形态学观察 正常情况下, 倒置相差显微镜下观察GES-1细胞(图1A)为扁平多角形, 或近于梭形, 有伪足, 呈小岛状生长, 逐渐扩大成片。SGC-7901细胞(图1C)呈多角形或不规则形; 均贴壁生长, 偶见漂浮细胞; 细胞之间连接紧密。以不加菌的GES-1和SGC-7901细胞为对照, 加入*H. pylori*后, GES-1和SGC-7901细胞均变圆; 贴壁细胞减少, 悬浮细胞增多, 并且细胞周围出现碎片; 细胞之间连接减少甚至消失; 细胞核和细胞质分界模糊, 呈现核质融合状态(图1B, 1D)。

2.2 与*H. pylori*共培养前后GES-1和SGC-7901细胞8-OHdG原位表达 采用激光扫描共聚焦显微镜观察发现, 对照组GES-1呈菱形或多边形等不规则形状, 8-OHdG很少表达, 荧光较弱(图2A); SGC-7901细胞8-OHdG荧光较强(图2C)。与*H. pylori*共培养24 h后, GES-1变圆, 几乎所有细胞胞质内都有8-OHdG表达, 荧光增强(图2B); SGC-7901细胞亦变圆, 荧光显著增强(图2D)。荧光表达强度见表1。

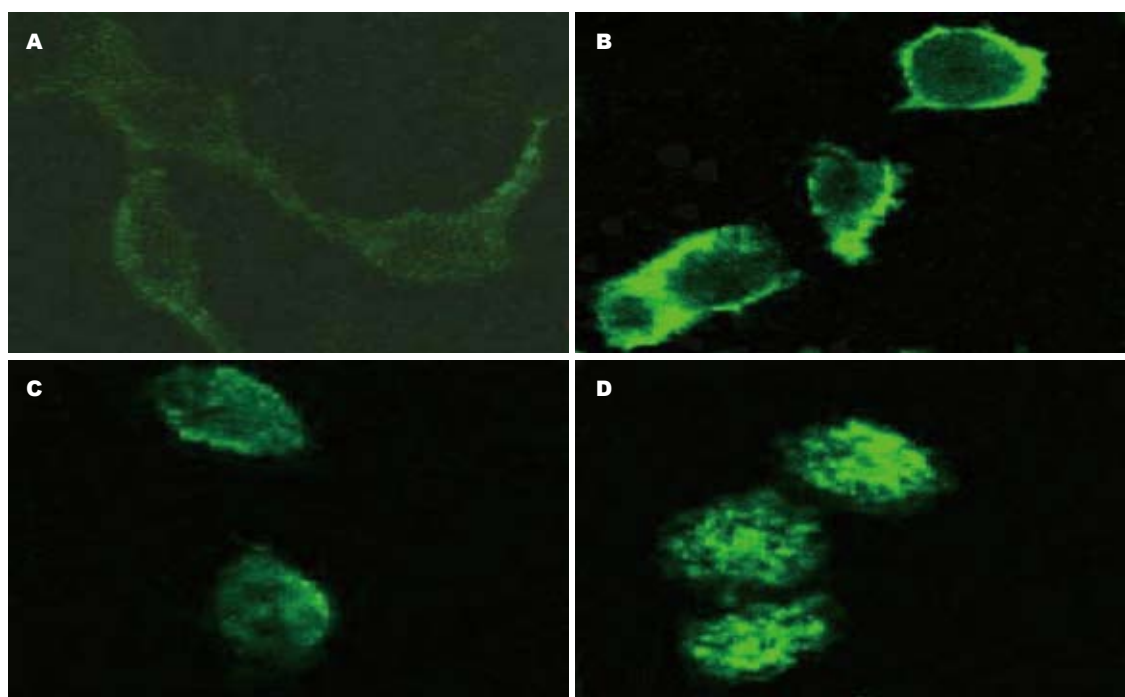
2.3 与*H. pylori*共培养前后GES-1和SGC-7901细胞8-OHdG表达的定量比较 以平均荧光强度作为与*H. pylori*共培养前后GES-1和SGC-7901细胞8-OHdG的相对表达量, 应用SPSS11.5进行统计学分析发现, GES-1或SGC-7901细胞8-OHdG表达量, 加菌组与对照组相比均具有统计学意义(64.9396 ± 17.8142 vs 32.3010 ± 7.3620 , $P = 0.000$ 和 102.8344 ± 30.2632 vs 77.1336 ± 32.3223 , $P = 0.000$, 图3), 而且8-OHdG表达的变化程度GES-1细胞显著高于SGC-7901细胞。

3 讨论

氧化性DNA损伤普遍存在于有氧代谢细胞中。正常情况下, 细胞中氧化性DNA损伤的产生和修复处于一种动态平衡。在有氧代谢过程中, 氧分子接受电子传递链传递的电子, 产生超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$), $O_2^{\cdot -}$ 通过链式反应产生活性氧(reactive

应用要点

本研究为进一步探讨*H. pylori*诱导的DNA氧化性损伤在*H. pylori*相关疾病发病机制中的作用提供了实验依据。



名词解释
8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG): 在有氧代谢过程中, 氧分子接受电子传递链传递的电子, 产生超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$), $O_2^{\cdot-}$ 通过链式反应产生活性氧(ROS). ROS可自由透过细胞膜损伤DNA, 8-OHdG是ROS导致的最主要的DNA损伤, 因此可作为反映DNA碱基序列受损程度的敏感指标.

图2 与*H. pylori*共培养前后GES-1和SGC-7901细胞8-OHdG的表达($\times 400$). A: 未经*H. pylori*作用的生长良好的GES-1细胞呈菱形或多边形等不规则形状, 8-OHdG很少表达, 荧光较弱; B: 与*H. pylori*共培养24 h后的GES-1细胞变圆, 几乎所有细胞胞质内都有8-OHdG表达; C: 未经*H. pylori*作用的生长良好的SGC-7901细胞荧光较强; D: 与*H. pylori*共培养24 h后SGC-7901细胞荧光显著增强.

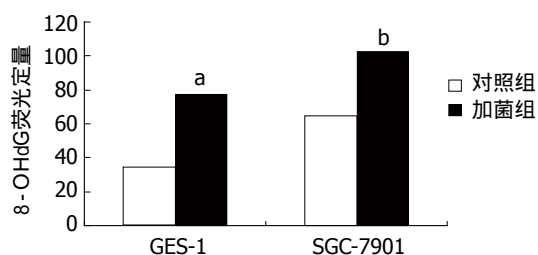


图3 *H. pylori*对GES-1或SGC-7901细胞作用前后8-OHdG表达的定量比较. ^a $P = 0.000$, $t = 7.63$ vs GES-1对照组; ^b $P = 0.000$, $t = 4.104$ vs SGC-7901对照组.

oxygen species, ROS). 通常细胞能够通过激活自身的DNA损伤修复机制^[5-7]及时地清除细胞中氧化性DNA损伤. 但当氧化性DNA损伤显著增加超过了细胞的修复能力或者细胞的DNA修复机制异常时, 这种损伤将会在细胞中累积^[8], 导致抑癌基因p53基因和ras原癌基因等基因发生难以修复的DNA G→T或A→C碱基的错误配对及编码, 导致基因突变. 已有研究发现, 氧化性DNA损伤的产生和累积与各种胃黏膜病变的发生发展密切相关. *H. pylori*感染可通过诱导炎症细胞(如多形核中性粒细胞等)在胃黏膜局部的聚集, 导致胃黏膜内ROS的显著增加^[9]. ROS可自由透过细胞膜, 损伤DNA^[10]. 其中8-OHdG是ROS导致的最主要的DNA损伤标志物, 可作为反映DNA碱基序列受损程度的敏感指标.

本研究利用*H. pylori*悬液与人正常胃黏膜上皮细胞永生细胞株GES-1和人淋巴结转移胃癌细胞株SGC-7901共培养, 观察两种细胞株在*H. pylori*悬液作用下形态学变化及8-OHdG表达情况, 旨在了解*H. pylori*致胃上皮细胞和胃癌细胞DNA氧化性损伤作用. 结果发现与*H. pylori*悬液共培养24 h后, GES-1和SGC-7901细胞由多角形或不规则形变为圆形; 贴壁细胞减少, 悬浮细胞增多; 细胞之间连接减少甚至消失. 8-OHdG免疫荧光染色, 激光扫描共聚焦显微镜观察发现: 未加菌组GES-1细胞8-OHdG很少表达, 荧光较弱; SGC-7901细胞8-OHdG荧光较强. 与*H. pylori*共培养24 h后, GES-1细胞和SGC-7901细胞8-OHdG表达荧光均增强. GES-1或SGC-7901细胞8-OHdG表达量, 加菌组与各自不加菌的对照组相比均具有统计学意义($P < 0.01$). 结果提示*H. pylori*能够诱导GES-1和SGC-7901细胞DNA氧化性损伤显著增加. *H. pylori*感染导致的氧化性DNA损伤可以出现在慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型增生→胃癌这一癌变模式的各个阶段^[11-13]. DNA氧化性损伤的产生和累积在各种*H. pylori*相关疾病乃至胃癌的发病机制中具有重要意义. Xu et al^[14]报道, *H. pylori*感染后, 氧自由基释放导致的氧化损伤

同行评价
本文选题较好, 设计合理, 结果可信, 具有很好的学术价值。

可以诱导巨噬细胞凋亡, 进而引起宿主免疫耐受。此外, 由于氧化损伤诱导的细胞凋亡还可以导致胃黏膜损伤, 以及代偿性高增殖, 提示 *H pylori* 感染介导的氧化性DNA损伤可能是胃黏膜从慢性炎症到癌变的驱动力。

GES-1和SGC-7901是目前较为常用的研究 *H pylori* 致病机制的细胞模型。本研究观察了上述来源及属性不同的两种细胞株在 *H pylori* 悬液作用下8-OhdG表达的差异。结果发现, 无论是否与 *H pylori* 共培养, SGC-7901细胞株8-OhdG表达量均显著高于GES-1细胞株。这与人体组织学研究结果相一致。有研究表明^[15], 胃癌患者癌组织及癌旁组织中的8-OhdG均显著高于正常胃黏膜组织($P<0.001$)。值得注意的是, 与 *H pylori* 共培养后, GES-1细胞株8-OhdG表达量的增加程度显著高于SGC-7901细胞株。提示 *H pylori* 对人正常胃黏膜上皮细胞株的损伤强于对胃癌细胞株的损伤。GES-1为人正常胃黏膜上皮细胞永生细胞株^[3], SGC-7901为从1例胃癌患者外科手术切除标本中获得的转移淋巴结, 在离体条件下应用静置培养自行建立的胃腺癌细胞株^[4]。因此, 与GES-1细胞相比, 来自于胃癌的SGC-7901细胞已经发生了某些DNA损伤性改变, 因此其未加菌处理组中即有高水平8-OhdG表达, 加菌后8-OhdG表达量的增加程度不明显。而GES-1细胞因其来源于正常胃黏膜细胞, 因此DNA损伤性改变较轻, 加菌后8-OhdG表达量的增加程度明显提高。结果提示, 在 *H pylori* 氧化损伤的相关研究中, 更适宜选择对损伤作用敏感的GES-1细胞株作为研究对象。

总之, 本研究结果显示 *H pylori* 能够直接诱导正常胃黏膜上皮细胞株GES-1和人胃腺癌细胞株SGC-7901的DNA氧化性损伤显著增加, 这为进一步探讨 *H pylori* 诱导的DNA氧化性损伤在 *H pylori* 相关疾病发病机制中的作用提供了实验依据。

致谢 感谢北京市肿瘤防治研究所细胞遗传室柯杨教授赠送GES-1细胞株。

4 参考文献

- 1 Peek RM Jr, Blaser MJ. Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 28-37
- 2 Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OhdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics.

Clin Chim Acta 2004; 339: 1-9

- 3 柯杨, 宁涛, 王冰, 路桂荣, 冯雅莉, 李吉友, 吕有勇, 鄂征. 人胃粘膜上皮细胞GES-1的建立及其生物学特性. *中华肿瘤杂志* 1994; 16: 7-10
- 4 富志民, 刘亚伦, 唐国基. 人体胃癌细胞株SGC7901培养及其特性. *肿瘤临床* 1984; 11: 57-60
- 5 Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov VN, Fuchs SY, Henderson S, Fried VA, Minamoto T, Alarcon-Vargas D, Pincus MR, Gaarde WA, Holbrook NJ, Shiloh Y, Ronai Z. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2743-2754
- 6 Izumi T, Hazra TK, Boldogh I, Tomkinson AE, Park MS, Ikeda S, Mitra S. Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1329-1334
- 7 Ding SZ, O'Hara AM, Denning TL, Dirden-Kramer B, Mifflin RC, Reyes VE, Ryan KA, Elliott SN, Izumi T, Boldogh I, Mitra S, Ernst PB, Crowe SE. Helicobacter pylori and H2O2 increase AP endonuclease-1/redox factor-1 expression in human gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2004; 127: 845-858
- 8 Choi J, Yoon SH, Kim JE, Rhee KH, Youn HS, Chung MH. Gene-specific oxidative DNA damage in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *Int J Cancer* 2002; 99: 485-490
- 9 Bréhard S, Bueb JL, Tschirhart EJ. Interleukin-8 primes oxidative burst in neutrophil-like HL-60 through changes in cytosolic calcium. *Cell Calcium* 2005; 37: 531-540
- 10 Termini J. Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations. *Mutat Res* 2000; 450: 107-124
- 11 Nishibayashi H, Kanayama S, Kiyohara T, Yamamoto K, Miyazaki Y, Yasunaga Y, Shinomura Y, Takeshita T, Takeuchi T, Morimoto K, Matsuzawa Y. Helicobacter pylori-induced enlarged-fold gastritis is associated with increased mutagenicity of gastric juice, increased oxidative DNA damage, and an increased risk of gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1384-1391
- 12 Normark S, Nilsson C, Normark BH, Hornef MW. Persistent infection with Helicobacter pylori and the development of gastric cancer. *Adv Cancer Res* 2003; 90: 63-89
- 13 Farinati F, Cardin R, Degan P, Rugge M, Mario FD, Bonvicini P, Naccarato R. Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut* 1998; 42: 351-356
- 14 Xu H, Chaturvedi R, Cheng Y, Bussiere FI, Asim M, Yao MD, Potosky D, Meltzer SJ, Rhee JG, Kim SS, Moss SF, Hacker A, Wang Y, Casero RA Jr, Wilson KT. Spermine oxidation induced by Helicobacter pylori results in apoptosis and DNA damage: implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 8521-8525
- 15 Chang CS, Chen WN, Lin HH, Wu CC, Wang CJ. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor kappaB expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in Helicobacter pylori-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2232-2240

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

NADPH氧化酶对门静脉海绵样变大鼠体内氧化应激的影响

王建尧, 刘磊, 姚君, 王斌, 陈芳, 毛建雄, 缪小平, 林飞飞

王建尧, 刘磊, 王斌, 陈芳, 毛建雄, 缪小平, 林飞飞, 深圳市儿童医院 广东省深圳市 518026

姚君, 暨南大学第二临床学院 广东省深圳市 518026

王建尧, 在读硕士研究生, 住院医师, 研究方向为门静脉海绵样变性的基础与临床研究.

深圳市卫生局科技局基金资助项目, No. 200650

作者贡献分布: 刘磊与王建尧对此文所作贡献均等; 此课题由刘磊与王建尧设计; 研究过程由王建尧与姚君操作完成; 研究用新试剂及分析工具由刘磊提供; 数据分析由王建尧、王斌、陈芳、毛建雄、缪小平及林飞飞完成; 本论文写作由王建尧完成; 刘磊进行指导.

通讯作者: 刘磊, 教授, 518026, 广东省深圳市福田区益田路7019号, 广东深圳市儿童医院普外科. liulei3322@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-08-18 修回日期: 2009-09-29

接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-12-18

Role of NADPH oxidase in oxidative stress involved in cavernous transformation of the portal vein in rats

Jian-Yao Wang, Lei Liu, Jun Yao, Bin Wang, Fang Chen, Jian-Xiong Mao, Xiao-Ping Miao, Fei-Fei Lin

Jian-Yao Wang, Lei Liu, Bin Wang, Fang Chen, Jian-Xiong Mao, Xiao-Ping Miao, Fei-Fei Lin, Department of General Surgery, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China

Jun Yao, Shenzhen People's Hospital, Jinan University, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China

Supported by: the Foundation of Shenzhen Health Bureau, No. 200650

Correspondence to: Professor Lei Liu, Department of General Surgery, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China. liulei3322@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-18 Revised: 2009-09-29

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

Abstract

AIM: To investigate the role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase in oxidative stress that is involved in cavernous transformation of the portal vein (CTPV) in rats.

METHODS: CTPV was induced in rats by partial portal vein ligation. Antioxidant capacity was evaluated by assaying the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the portal vein blood. The content of malonaldehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation, was assayed to assess oxidative

stress level in the portal vein blood. The changes in endothelial function were evaluated by assaying nitric oxide (NO) and endothelial NO synthase in the portal vein. The mRNA expression of NADPH oxidase subunits gp91phox and p22phox was measured by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Compared with sham-operated rats, the activities of SOD and GSH-Px significantly decreased ($93.79 \pm 8.87 \mu\text{U/L}$ vs $103.05 \pm 8.07 \mu\text{U/L}$ and 157.44 ± 26.46 vs 709.09 ± 83.21 , respectively; both $P < 0.05$), the content of MDA increased ($5.33 \pm 0.35 \mu\text{mol/L}$ vs $3.59 \pm 0.44 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$), the expression of NADPH oxidase subunits gp91phox and p22phox was significantly upregulated (16.77 ± 3.27 vs 1.31 ± 0.95 and 11.64 ± 7.34 vs 1.93 ± 0.86 , respectively; both $P < 0.01$), and the endothelial NO content and endothelial NO synthase activity in the portal vein were significantly reduced in CTPV rats ($2.33 \pm 0.82 \mu\text{mol/L}$ vs $85.00 \pm 3.16 \mu\text{mol/L}$ and $0.24 \pm 0.11 \text{ U/mg prot}$ vs $1.76 \pm 0.78 \text{ U/mg prot}$, respectively; both $P < 0.01$).

CONCLUSION: The upregulation of NADPH oxidase subunits gp91phox and p22phox genes is correlated with the oxidative stress status in CTPV rats. NADPH oxidase-dependent oxidative stress may contribute to endothelial dysfunction in CTPV rats.

Key Words: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; Cavernous transformation of the portal vein; Oxidative stress; Nitric oxide

Wang JY, Liu L, Yao J, Wang B, Chen F, Mao JX, Miao XP, Lin FF. Role of NADPH oxidase in oxidative stress involved in cavernous transformation of the portal vein in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3595-3600

摘要

目的: 考察NADPH氧化酶对门静脉海绵样变(cavernous transformation of portal vein, CTPV)大鼠体内氧化应激的影响.

方法: 将大鼠按随机抓取的方式分为假手术

背景资料

近年研究表明, 氧化应激(OS)在血管病变中起着关键作用. NADPH氧化酶(Nox)是心血管组织中活性氧簇的主要来源之一. 然而对于门静脉海绵样变性大鼠体内的氧化应激状态、NADPH氧化酶的作用以及氧化应激对门静脉内皮功能的影响, 未见相关报道.

同行评议者

孙诚谊, 教授, 贵阳医学院附属医院普外科; 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

研究背景

在血管平滑肌细胞、内皮细胞及外膜成纤维细胞中的NADPH氧化酶产生的ROS在高血压、动脉粥样硬化的发生及发展中起着关键作用。NO分泌量是内皮细胞功能的标志,ROS在一些血管疾病中增多并且可以与NO相结合发生相应的反应,使得NO的生物利用度进一步降低。

组、CTPV(门静脉海绵样变性)模型组。采用门脉部分结扎法复制CTPV大鼠动物模型;测定门静脉内血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力及丙二醛(MDA)、门静脉组织一氧化氮(NO)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的含量;采用实时荧光定量RT-PCR法测定门静脉组织NADPH氧化酶p22phox以及gp91phox亚基的mRNA表达。

结果:与Sham组大鼠相比,CTPV组大鼠SOD、GSH-Px活性(酶活力单位)降低($93.79 \pm 8.87 \mu\text{U/L}$ vs $103.05 \pm 8.07 \mu\text{U/L}$, 157.44 ± 26.46 vs 709.09 ± 83.21 , 均 $P < 0.05$),而MDA含量增加($5.33 \pm 0.35 \mu\text{mol/L}$ vs $3.59 \pm 0.44 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$);实时荧光定量RT-PCR显示门静脉NADPH氧化酶亚基gp91phox以及p22phox的mRNA表达增强(16.77 ± 3.27 vs 1.31 ± 0.95 , 11.64 ± 7.34 vs 1.93 ± 0.86 , 均 $P < 0.01$);门静脉组织NO含量及eNOS活性均降低($2.33 \pm 0.82 \mu\text{mol/L}$ vs $85.00 \pm 3.16 \mu\text{mol/L}$, $0.24 \pm 0.11 \text{ U/mg prot}$ vs $1.76 \pm 0.78 \text{ U/mg prot}$, 均 $P < 0.01$)。

结论:CTPV大鼠体内氧化应激状态与NADPH氧化酶亚基gp91phox以及p22phox mRNA过表达有关;NADPH氧化酶依赖的氧化应激可能与CTPV大鼠门静脉内皮功能障碍的发生发展密切相关。

关键词: NADPH氧化酶; 门静脉海绵样变性; 氧化应激; 一氧化氮

王建尧, 刘磊, 姚君, 王斌, 陈芳, 毛建雄, 缪小平, 林飞飞. NADPH氧化酶对门静脉海绵样变大鼠体内氧化应激的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3595-3600
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3595.asp>

相关报道

Fukui *et al*在血管紧张素诱导高血压模型中,发现源于NADPH氧化酶(NADPH oxidase)的超氧阴离子增加,其亚单位p22phox mRNA表达升高,这种变化可被超氧化物歧化酶(SOD)所逆转; Kuzkaya *et al*研究表明ROS对血管紧张度的调节,也可能通过氧化应激介导的血管舒张受损与体内的主要舒血管活性物质NO释放减少而实现的,这可能是继发于NO合成降低的结果。

成纤维细胞中的NADPH氧化酶产生的ROS在高血压、动脉粥样硬化的发生及发展发病机制中起着关键作用。NADPH氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, Nox)是心血管组织中活性氧簇的主要来源之一^[3-5]。然而对于门静脉海绵样变性大鼠体内的氧化应激状态及NADPH氧化酶的作用,未见相关报道。本研究主要考察NADPH氧化酶对CTPV模型大鼠体内的氧化应激状态的影响以及氧化应激与门静脉内皮功能障碍的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠40只, SPF级, 体质量 $150 \pm 10 \text{ g}$, 广东省医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2008-0002, 粤监证字2008A020, 标准饲料, 自由饮水。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、微量丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)、一氧化氮(nitric oxide, NO)以及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。高纯总RNA快速提取试剂盒(北京百泰克生物技术公司); PrimeScript™ RT reagent Kit试剂盒(TaKaRa宝生物有限公司); SYBR Premix Ex Taq™ PCR试剂盒(TaKaRa宝生物有限公司)。BS210S电子天平; 756PC紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司); Hema tol-18R台式冷冻离心机(广州广一科学仪器有限公司); BCD-215KAND2冰箱(青岛海尔集团有限公司); Mx3005P QPCR Systems定量PCR仪(Stratagene Products)。3%戊巴比妥钠(广东汕头新宁化工厂产品); 4-0丝线(上海浦东金环医疗用品公司产品); 三通管; Pclab-US生物医学信号采集系统等。

1.2 方法

1.2.1 分组: 将大鼠按随机抓取的方式随机分为Sham(假手术)组、CTPV(门静脉海绵样变性)模型组。

1.2.2 造模: 采用文献[6]介绍的“门脉部分缩窄”的方法制备CTPV动物模型。(1)CTPV模型组大鼠麻醉后, 逐层切开肌肉及腹膜, 进入腹腔。开腹后沿右侧肝肾隐窝, 暴露肝门区。探查十二指肠后部的门静脉、肝动脉及肝总管。辨认肝门静脉后, 距肝门1 cm处用弯头玻璃分针轻柔地分离周围组织, 避免损伤十二指肠和胰腺。玻璃分针勾挂4号丝线, 丝线从门静脉后方穿过, 21G钝针头平行门静脉放置, 用丝线将门静脉与钝

0 引言

门静脉海绵样变性(cavernous transformation of portal vein, CTPV)是指门静脉主干和(或)其分支完全或部分阻塞后, 肝门区和十二指肠韧带及其周围形成许多向肝性扩张迂曲的静脉血管瘤样侧支循环或阻塞后再通, 是机体为保证肝血流量和肝功能正常的一种代偿性病变, 是一种肝外性门静脉高压症^[1]。近年研究表明: 氧化应激(oxidative stress, OS)在血管病变中起着关键作用。氧化应激是指机体活性氧产生过多或/和机体抗氧化能力降低, 活性氧的清除不足, 导致活性氧在体内增多并引起细胞氧化损伤的病理过程^[2]。在血管平滑肌细胞、内皮细胞及外膜

针头一同结扎。结扎后快速旋转抽出针头, 留线头约2 mm, 剪线。观察周围组织有无活动性出血, 大鼠基本生命体征稳定后, 逐层关闭腹膜、肌层和皮肤。(2)Sham组手术同上述CTPV动物模型制作, 只是开腹后探查十二指肠后部的门静脉、肝动脉及肝总管。不予结扎门静脉, 辨认肝门静脉后, 逐层关闭腹膜、肌层和皮肤。

1.2.3 门静脉造影: 术后6 wk, 动物麻醉后开腹, 开腹后沿右侧肝肾隐窝, 用拉钩牵引肠管, 暴露肝门区。探查十二指肠后部的门静脉、肝动脉及肝总管。辨认肝门静脉, 肉眼观察门静脉及其周围组织静脉海绵样变情况。于肠系膜上静脉插入0.4 mm口径静脉输液针末端连有10 mL注射器, 针尖位于门静脉内接近脾静脉入口处, 以0.4 mL/s的速度注入60%泛影葡胺, 使肝外及肝内门静脉系统显影。

1.2.4 门静脉压测定: 术后6 wk, 大鼠麻醉后, 取腹正中切口, 上至剑突下方, 下至耻骨联合上方, 逐层切开皮肤肌肉。开腹后顺着小肠系膜根部探查肠系膜上静脉, 并且用玻璃分针钝性分离肠系膜上静脉。用静脉夹将远端肠系膜上静脉夹闭。于脾静脉与门静脉汇合处以下, 在肠系膜上静脉底部穿入一根4-0丝线。于脾静脉与门静脉汇合处迅速插入末端接有含100 kU/L肝素的三通管的22G套管针, 缓慢拔出套管针尾部, 见有血液顺着套管针后部流出, 穿刺点近端用4-0丝线固定套管针头, 避免其滑脱。三通管末端接压力传感器与生物机能信号系统, 松开静脉夹, 待压力信号稳定后测压。

1.2.5 门静脉血清GSH-PX、SOD活力和MDA含量测定: 各组大鼠开腹, 门静脉取血, 离心(3000 r/min, 10 min), 分离血清置4℃备用; 分离入肝分叉处以下, 脾静脉汇合处以上门静脉, 称质量, 加入9倍冰冷无菌的生理盐水手动制成10%门静脉匀浆, 离心(2500 r/min, 10 min), 取上清液置4℃备用。采用黄嘌呤氧化酶法测定血清SOD水平; 采用还原型谷胱甘肽法测定GSH-PX活性; 采用硫代巴比妥酸比色法测定MDA水平。各指标测定均严格按照试剂盒说明书进行, 以上试剂均由南京建成生物研究所提供。

1.2.6 门静脉组织NO浓度及eNOS活性测定: 各组大鼠开腹, 取入肝分叉处以下, 胃冠状静脉分叉处以上门静脉, 称质量, 加入质量×9倍体积的预冷无菌的生理盐水手动制成10%门静脉组织匀浆, 离心(2500 r/min, 10 min), 取上清液置4℃备用。应用自动生化分析仪和紫外分光光度

计测量门静脉组织NO浓度以及eNOS活性, 按照试剂盒说明书进行。

1.2.7 实时荧光定量RT-PCR测定: (1)总RNA提取: 取各组大鼠门静脉(上至入肝分叉处, 下至脾静脉汇合处), 生理盐水冲洗干净表面血液, 滤纸吸干后放于电子天平称质量。150±10 mg, 放入盛有液氮的研钵体中研磨成粉末状, 直接加1 mL裂解液RL后匀浆, 按高纯总RNA快速提取试剂盒提取组织总RNA。取制备好的RNA, 加入TE Buffer溶解后, 用紫外分光光度计, 进行吸光度的测量, A_{260}/A_{280} 为1.8-2.0。(2)逆转录反应(RT): 取总质量500 ng的总RNA, 逆转录反应体系50 μL, 按逆转录试剂盒(大连宝生物公司)说明步骤进行。5×PrimeScript™ Buffer 10 μL, PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 2.5 μL, Oligo dT Primer(50 μmol/L)2.5 μL, Random 6 mers(100 μmol/L)2.5 μL, Total RNA(0.5 g/L)15 μL, RNase Free dH₂O 17.5 μL。反应条件为: 37℃反应30 min(反转录), 85℃反应5 s(变性)。(3)聚合酶链反应(PCR): 目的基因及内参基因的引物序列: GenBank中查出引物mRNA序列号, primer5软件设计PCR引物, 以GAPDH为内参。引物序列如下: GAPDH: M17701, sense: 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'; antisense: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT A-3'; gp91-phox: NM023965, sense: 5'-ACAAG GTTTATGACGATGAGCCTA-3'; antisense: 5'-CACTGGCAGCAAGATCAGCA-3'; p22-phox: NM024160, sense: 5'-ACCGTCTGCTTGCCAT TG-3'; antisense: 5'-TCAATGGGAGTCCACTG CTCAC-3'。目的基因扩增的条件: 均为50 μL反应体系, 应用GAPDH mRNA作为参照。变性条件: 95℃预变性5 min, 95℃变性5 s, 60℃退火20 s, 72℃延伸20 s, 45个循环。定量方法参照文献[7], 所有试验数据重复3次, 取均数。阴性对照不加模板。使用双标准曲线法, 初始模板量行均一化处理后, 得出目的基因的相对含量。

统计学处理 各组结果以mean±SD表示, 各组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 术后6 wk大鼠行门静脉系统造影 Sham组显示, 造影剂沿门静脉顺利进入肝脏, 肝脏内各级门静脉属支显影良好, 呈树枝状分布, 门静脉及其属支通畅, 无曲张与扩张, 此时造影未显示门腔静脉侧支循环形成(图1A)。CTPV模型组显示,

创新盘点
目前门静脉海绵样变性的研究多集中于有关诊断、治疗的临床病例报道。本文将与氧化应激有关的NADPH氧化酶与门静脉海绵样变性结合起来进行研究, 进一步探讨了氧化应激可能对门静脉海绵样变性的门静脉内皮功能的影响。

应用要点

CTPV大鼠体内氧化应激状态增强和门静脉内皮功能的降低,可能参与了CTPV的发生、发展过程,并为其发病机制之一。为揭示门静脉海绵样变性、氧化应激的关系以及NADPH氧化酶在其中的作用提供了理论基础。

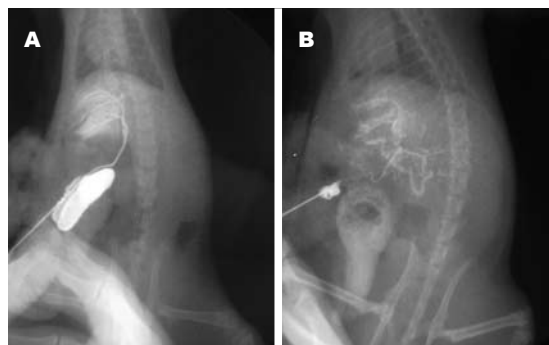


图1 大鼠行门静脉系统造影。A: Sham组门静脉通畅,无曲张与扩张;B: CTPV模型组门静脉周围侧支循环形成。

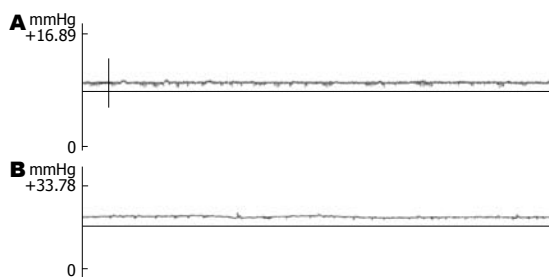


图2 大鼠门静脉压力测定。A: Sham组大鼠门静脉压力变化;B: CTPV模型组大鼠门静脉压力变化。

开始门静脉远侧端显影良好,随后部分造影剂仍沿门静脉顺利进入肝脏,入肝门处门静脉狭窄,肝脏内各级门静脉属支随后缓慢显影,呈树枝状分布,但进入肝脏的造影剂较假手术组大鼠造影时明显减少,在肝脏内各级门静脉属支显影的同时肠系膜上、下静脉及脾静脉各级属支开始显影,可见其一二级属支有曲张现象,左肾上腺静脉显影明显,较正常时增粗。另外造影可显示肝门区和十二指肠韧带及其周围静脉血管瘤样血管丛包绕门静脉进入肝门。部分造影剂沿门腔静脉间侧支循环血管由门静脉系统进入腔静脉系统。说明此时肝门区和十二指肠韧带及其周围侧支循环、门腔间侧支循环已经形成(图1B)。

2.2 门静脉压力测定 术后6 wk,通过给各组大鼠门静脉测压,Sham组大鼠门静脉压力 9.21 ± 0.20 mmHg(图2A);CTPV模型组大鼠门静脉压力 16.29 ± 0.11 mmHg(图2B),与Sham组大鼠比较CTPV模型组大鼠门静脉压力明显升高,两组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。

2.3 门静脉血清氧化应激相关指标 CTPV模型组大鼠静脉血清GSH-PX和SOD活性低于Sham组,两组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。CTPV模型组大鼠血清的MDA含量较Sham组显著性升

表1 各组大鼠门静脉血清SOD、MDA水平及GSH-PX活性比较结果($n = 20$, mean \pm SD)

分组	SOD(μ U/L)	MDA(μ mol/L)	GSH-PX酶活力单位
Sham组	103.05 ± 8.07	3.59 ± 0.44	709.09 ± 83.21
CTPV组	93.79 ± 8.87^a	5.33 ± 0.35^b	157.44 ± 26.46^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs Sham组。

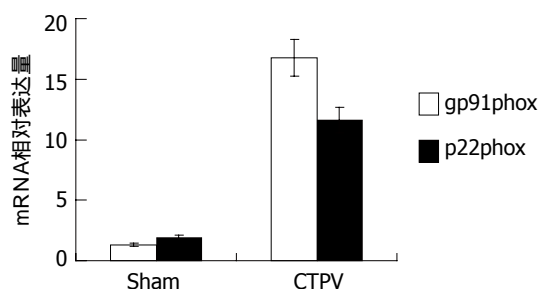


图3 实时荧光定量RT-PCR检测门静脉中NADPH氧化酶的亚基gp91phox以及p22phox的mRNA相对表达量。

高,两组比较差异有显著性意义($P < 0.01$,表1)。

2.4 门静脉内皮功能相关指标 CTPV模型组门静脉组织NO浓度明显低于Sham组门静脉组织NO浓度的水平(2.33 ± 0.82 μ mol/L vs 85.00 ± 3.16 μ mol/L, $P < 0.01$);CTPV模型组门静脉eNOS活力明显低于Sham组门静脉eNOS活力(0.24 ± 0.11 U/mg prot vs 1.76 ± 0.78 U/mg prot, $P < 0.01$)。

2.5 NADPH氧化酶的gp91phox与p22phox亚基mRNA的表达 根据目的基因的原始定量结果,经过管家基因校正后得到gp91phox以及p22phox亚基的相对定量结果。从图3可见,Sham组门静脉gp91phox荧光定量结果为 1.31 ± 0.95 ,明显低于CTPV模型组 16.77 ± 3.27 ,两组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。Sham组p22phox荧光定量结果为 1.93 ± 0.86 ,明显低于CTPV模型组 11.64 ± 7.34 ,两组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。

3 讨论

ROS是指具有高度化学活性的氧依赖性分子,他包括超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢、脂氢过氧化物及其代谢产物。体内抗氧化系统主要由酶促反应和非酶促反应两部分活性物质组成。体内酶促反应抗氧化的酶系SOD、CAT、GSH-Px可使活性氧转变为过氧化氢,最终转变为水和分子氧,从而发挥清除氧自由基的作用;SOD及GSH-Px是体内非常重要的氧自由基清除剂,能保护细胞免受损伤,其活力的高低间接反映

了机体清除自由基的能力^[8]。自由基损伤的主要病理机制是引起脂质过氧化, MDA是脂质过氧化的代谢产物, 其水平可反映机体脂质过氧化损害程度。

本实验研究发现, CTPV模型组大鼠门静脉血清抗氧化能力指标SOD及GSH-PX较Sham组比较显著降低, 两组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。而反映机体氧化应激损伤的指标MDA较Sham组比较显著增加, 两组比较差异有显著性意义($P<0.01$)。确证了CTPV模型大鼠门静脉氧化应激状态的存在。由此可以认为, 大鼠门静脉海绵样变性的发生、发展过程可能与氧化应激有关。本项研究的结果对此见解提供了新的、直接的证据。

人们在研究高血压、动脉粥样硬化等血管疾病中发现, 源于NADPH氧化酶的ROS增加, ROS是调节血管结构和功能状态的重要信号分子, 血管内皮细胞、平滑肌细胞和动脉外膜细胞等均可产生ROS, ROS过多与炎症反应、动脉粥样硬化、糖尿病、高血压和肿瘤的发生密切相关^[9-10]。NADPH氧化酶是由gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox和小GTP酶Rac 6种亚单位组成的复合体, gp91phox和p22phox亚单位位于膜上, 当与胞质中的另外几种亚单位结合时可形成有活性的Nox复合体, 其中gp91phox是其主要的功能亚单位, p22phox的C末端有一富含脯氨酸的尾巴, 可能用来结合Nox的胞质激活因子, 从而发挥在胞内调节作用^[11-12]。本研究的另一个目的, 就是了解NADPH氧化酶在门静脉氧化应激损伤中的作用。结果显示在CTPV模型组中NADPH氧化酶的gp91phox与p22phox亚基的mRNA表达明显升高, 促进了体内及门静脉的氧化应激反应; 同时, 检测到门静脉组织MDA增多。这些结果有力说明, 氧化应激是门静脉海绵样变性疾病的发生、发展机制之一。

由此推测NADPH氧化酶活性增强, 可能导致了门静脉组织的氧化应激的发生, 并且对门静脉组织MDA检查的结果也发现, CTPV模型组中MDA增多, 证实了我们的推测。

NO是内皮细胞分泌的活性物质, 是一种强力的血管舒张因子, 具有调节血管张力, 保持内皮层的完整性等作用, 从而发挥舒张血管的作用。研究显示: 在心血管病理过程中内皮源性NO生物利用度降低, 这可能是内皮细胞损伤的主要表现^[13]。NO主要由血管内皮细胞合成, 源自底

物左旋精氨酸(*L*-arginine, *L*-Arg)在内皮型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, eNOS)的作用下产生, 四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH₄)则是NOS作用的重要辅助因子^[14]。

氧化应激是机体ROS产生增多, 超过机体抗氧化防御能力的病理过程, 氧化应激不仅可以引起血管炎症、促进血管脂质过氧化损伤, 参与血管重构, 而且可以调节血管紧张度。ROS通过促进脂质过氧化、促炎基因的表达和内皮NO的氧化失活而损伤内皮功能, 并且促进中性粒细胞黏附于内皮细胞引起内皮氧化应激损伤。此外, ROS可直接与NO结合, 导致内皮NO的生物利用度降低, 进而引起内皮功能障碍。

此外BH₄与血管内皮功能也密切相关。当BH₄水平下降或生物利用度降低时, eNOS的作用不是产生NO, 而是产生超氧阴离子, 同时造成NO减少与氧自由基增加, 并且, BH₄缺乏还引起eNOS活性降低等效应, 最终导致血管内皮功能异常^[15]。BH₄在调节NO生成和氧自由基产生两方面均起着重要作用。目前研究证实, 在缺乏*L*-精氨酸和BH₄时, 纯化的eNOS产生O₂⁻, 而且已证实O₂⁻的产生主要发生于eNOS氧化酶的血红素中心^[16-17]。BH₄是所有NOS同工酶的辅因子, 具有稳定NOS结构、稳定NOS活性二聚体、增加*L*-精氨酸和NOS结合力等作用, 更为突出的是, BH₄直接影响NO和超氧阴离子的产生^[18]。当BH₄含量充足时, eNOS接受并储存来自NADPH的电子, 在底物*L*-精氨酸和O₂存在时, eNOS将电子转运给*L*-精氨酸而使后者被氧化成*L*-胍氨酸, 同时伴随NO产生, 此过程即为正常的*L*-精氨酸/NO通路; 当BH₄水平不足或生物利用度下降时, 激活的eNOS不能催化*L*-精氨酸氧化而生成*L*-胍氨酸和NO, 但是eNOS仍然能够接受来自NADPH的电子并将电子储存在与其相结合的四羟酮醇中, 然后再将电子传递给另一底物O₂, 导致主要的终产物是O₂⁻, 而不是NO, 此过程被称为eNOS脱偶联(uncoupling)^[19]。并且eNOS脱偶联所产生的超氧阴离子能迅速与NO结合, 消耗NO并生成毒性更强的过氧化亚硝基(ONOO⁻), 后者又能迅速将BH₄氧化, 导致BH₄进一步减少, 从而形成恶性循环。简言之, BH₄缺乏时eNOS脱偶联, NO产生减少, 而主要产生超氧阴离子, 从而导致血管内皮功能异常^[20-21]。

本实验显示CTPV模型组大鼠门静脉内皮NO含量与Sham组比较明显降低, 两组比较差异有显著性意义($P<0.01$), 并且CTPV模型组大鼠

名词解释

1 门静脉海绵样变性(CTPV): 是指门静脉主干和(或)其分支完全或部分阻塞后, 肝门区和十二指肠韧带及其周围形成许多向肝性扩张迂曲的静脉曲张, 是机体为保证肝血流量和肝功正常的一种代偿性病变, 是一种肝外性门静脉高压症。

2 NADPH氧化酶: 由gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox和小GTP酶Rac 6种亚单位组成的复合体, gp91phox和p22phox亚单位位于膜上, 当与胞质中的另外几种亚单位结合时可形成有活性的Nox复合体, 其中gp91phox是其主要的功能亚单位, p22phox的C末端有一富含脯氨酸的尾巴, 可能用来结合Nox的胞质激活因子, 从而发挥在胞内调节作用。

同行评价
本研究设计合理,
方法可靠,结论
合理,有一定理
论价值。

门静脉中NADPH氧化酶的功能亚基的mRNA表达增多,可以推断源于NADPH氧化酶产生的活性氧也增多,并与NO反应,使NO生物利用度下降,导致门静脉内皮功能下降。此外,在本实验研究结果中,CTPV模型组大鼠门静脉组织eNOS活性与Sham组比较显著下降,两组比较差异有显著性意义($P<0.01$)。由这些结果可以认为,门静脉血管内皮细胞在受到持续性门脉高压等危险因子刺激时,NADPH氧化酶的活性增强,源自NADPH氧化酶的活性氧产生增多,包括超氧阴离子、过氧化亚硝基等产生增加,可改变细胞内的氧化-还原状态,使 BH_2 被氧化成 BH_2 甚至 B ,且难以实现再回收($\text{BH}_2 \rightarrow \text{BH}_4$),从而导致 BH_4 含量下降、活性降低,进而引起一系列的eNOS脱偶联与活性氧产生增多的恶性循环,最终结果导致NO生物利用度进一步降低^[22],门静脉内皮功能下降。

4 参考文献

- 1 蒋小云,陈述枚. 门静脉海绵样变性的诊疗进展. 国外医学·儿科学分册 1999; 26: 128-131
- 2 de Champlain J, Wu R, Girouard H, Karas M, EL Midaoui A, Laplante MA, Wu L. Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2004; 26: 593-601
- 3 Fearheller DL, Brown MD, Park JY, Brinkley TE, Basu S, Hagberg JM, Ferrell RE, Fenty-Stewart NM. Exercise training, NADPH oxidase p22phox gene polymorphisms, and hypertension. *Med Sci Sports Exerc* 2009; 41: 1421-1428
- 4 Guzik TJ, Sadowski J, Kapelak B, Jopek A, Rudzinski P, Pillai R, Korbut R, Channon KM. Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1614-1620
- 5 Matsuo J, Oku H, Kanbara Y, Kobayashi T, Sugiyama T, Ikeda T. Involvement of NADPH oxidase and protein kinase C in endothelin-1-induced superoxide production in retinal microvessels. *Exp Eye Res* 2009; 89: 693-699
- 6 Omokawa S, Arai Y, Saito H, Furuya T, Sato T, Shirayama K, Ito M, Asanuma Y, Koyama K. A simple experimental model of total hepatectomy, hepatic ischemia and extrahepatic portal obstruction in rats using splenic transposition. *Jpn J Surg* 1991; 21: 50-56
- 7 唐永凯, 贾永义. 荧光定量PCR数据处理方法的探讨. 生物技术 2008; 18: 89-91
- 8 Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-186
- 9 Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW, Parmer RJ. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension* 2000; 36: 878-884
- 10 Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Curr Diab Rep* 2007; 7: 257-264
- 11 Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 16-27
- 12 Ambasta RK, Schreiber JG, Janiszewski M, Busse R, Brandes RP. Nox1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 193-201
- 13 Forgione MA, Loscalzo J. Oxidant stress as a critical determinant of endothelial function. *Drug News Perspect* 2000; 13: 523-529
- 14 Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012
- 15 Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111: 1201-1209
- 16 Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 1998; 273: 25804-25808
- 17 Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 9220-9225
- 18 Crabtree MJ, Tatham AL, Hale AB, Alp NJ, Channon KM. Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. *J Biol Chem* 2009; 284: 28128-28136
- 19 Sindler AL, Delp MD, Reyes R, Wu G, Muller-Delp JM. Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *J Physiol* 2009; 587: 3885-3897
- 20 Moens AL, Takimoto E, Tocchetti CG, Chakir K, Bedja D, Cormaci G, Ketner EA, Majmudar M, Gabrielson K, Halushka MK, Mitchell JB, Biswal S, Channon KM, Wolin MS, Alp NJ, Paolocci N, Champion HC, Kass DA. Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation* 2008; 117: 2626-2636
- 21 Oelze M, Daiber A, Brandes RP, Hortmann M, Wenzel P, Hink U, Schulz E, Mollnau H, von Sandersleben A, Kleschyov AL, Mülsch A, Li H, Förstermann U, Münzel T. Nebivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats. *Hypertension* 2006; 48: 677-684
- 22 Chalupsky K, Cai H. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9056-9061

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

溃疡性结肠炎与肠应激综合征间差异基因表达

陈玉龙, 苗艳艳, 吕翠田

陈玉龙, 吕翠田, 河南中医学院 河南省郑州市 450008
苗艳艳, 广州中医药大学 广东省广州市 510405
陈玉龙, 副教授, 主要从事中医药分子生物学研究。
作者贡献分布: 本文相关研究有陈玉龙主持设计; 陈玉龙、苗艳艳及吕翠田共同进行了相关生物信息学研究, 本论文写作由陈玉龙与苗艳艳共同完成。
通讯作者: 陈玉龙, 副教授, 博士, 450008, 河南省郑州市金水路1号, 河南中医学院基础医学院. cyl72621@163.com
电话: 0371-65680049
收稿日期: 2009-07-07 修回日期: 2009-09-24
接受日期: 2009-10-12 在线出版日期: 2009-12-18

Identification of differentially expressed genes between ulcerative colitis and irritable bowel syndrome

Yu-Long Chen, Yan-Yan Miao, Cui-Tian Lv

Yu-Long Chen, Cui-Tian Lv, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China
Yan-Yan Miao, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Correspondence to: Professor Yu-Long Chen, School of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China. cyl72621@163.com
Received: 2009-07-07 Revised: 2009-09-24
Accepted: 2009-10-12 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To identify differentially expressed genes between ulcerative colitis (UC) and irritable bowel syndrome (IBS) and analyze the difference in the pathogenesis between UC and IBS at the genetic level.

METHODS: The microarray data for UC and IBS were downloaded from the Gene Express Omnibus (GEO) and mined using the BRB-Array Tools software package to obtain a set of differential genes. Differentially expressed genes were then analyzed using bioinformatic tools.

RESULTS: A total of 131 differential genes were identified between UC and IBS. These genes are involved in inflammatory response, immunity, signal transduction, cell secretion, transcriptional regulation, cell structure, cell death, etc. Compared to IBS, 124 genes were up-regulated and 7 down-regulated in UC. Cluster analysis showed

that the two kinds of samples could be distinguished by specific gene expression profiles.

CONCLUSION: Compared to IBS, many genes involved in inflammatory response, and cell growth, proliferation and secretion are upregulated in UC. Microarray analysis can successfully distinguish UC and IBS samples.

Key Words: Ulcerative colitis; Irritable bowel syndrome; Microarray; Data mining

Chen YL, Miao YY, Lv CT. Identification of differentially expressed genes between ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3601-3605

摘要

目的: 观察溃疡性结肠炎(UC)和肠易激综合征(IBS)之间基因表达上的差异, 从基因水平探讨UC的病理机制及其与IBS的区别。

方法: 从GEO下载UC和IBS基因芯片资料, 用BRB-ArrayTools 3.6软件对该数据进行挖掘, 并对差异表达基因进行生物信息学分析。

结果: 两者具有131条差异基因, 涉及炎症反应、免疫、信号传导、细胞外分泌、基因转录调节、细胞结构、细胞死亡等。与IBS相比, UC上调基因124条, 下调基因7条。聚类分析发现, 两类样品可根据基因表达进行区分。

结论: 与IBS相比, UC肠黏膜在炎症、分泌、细胞生长和增殖等的相关基因表达增高; 利用基因芯片能够对两种疾病进行区别。

关键词: 溃疡性结肠炎; 肠易激综合征; 基因芯片; 数据挖掘

陈玉龙, 苗艳艳, 吕翠田. 溃疡性结肠炎与肠应激综合征间差异基因表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17(35): 3601-3605
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3601.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性

背景资料
基因芯片技术已广泛应用于疾病的诊断和分型, 并从差异表达基因角度研究不同疾病的发病机制及其异同, 包括UC和其他炎性肠病间比较。但是, 应用该技术研究UC和IBS关系的报道尚少。

同行评议者
杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

研究前沿

UC和IBS在症状和发病机制上有一定重叠,特别是UC缓解期与IBS急性期,两者有时相互误诊,有必要深入研究两者的差异.基因芯片技术是研究疾病之间分子差异的有力工具,本文利用该技术资料探讨两者在基因表达上的差异.

非特异性肠道炎症性疾病,主要表现为腹痛、腹泻、黏液便或便血等症状,该病与遗传易感性、免疫应答、环境等多种因素有关^[1].已有很多利用基因芯片技术研究该病与克隆恩氏病及其他炎性肠病间差异基因、UC相关肿瘤(UC-associated colorectal cancer, UC-CRC)基因、不同造模方法基因表达差异等的报道^[2-3],从分子生物学角度探讨了该病的发病机制及与其他疾病的区别.肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)为功能性肠功能紊乱,主要以排便伴有腹部不适或腹痛,或有不规则排便习惯的改变为症状^[4].其发病机制与遗传、心理、胃肠运动失常、腹部高敏、感染和炎症等多种因素有关^[5].该病与溃疡性结肠在症状上有一定重叠^[6],两者有时相互误诊,目前应用基因芯片研究UC和IBS区别的报道尚少.本研究从基因表达资料库(gene express omnibus, GEO)下载两者相互比较的基因芯片资料,进行数据挖掘,探讨两者在基因表达上的差异.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 GSE2461数据集:从GEO下载GSE2461数据集(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE2461>),进行归类整理.该数据集是基于GPL96芯片平台,GSE2461是由丹麦学者Jorgen Olsen于2005-04公布在GEO,是关于IBS和UC基因芯片数据集,集中有8例样品数据由GPL96平台得来,他们为:GSM46539,男性IBS;GSM 46541,女性IBS;GSM 46542,女性IBS;GSM 46543,女性IBS;GSM 46544,女性IBS;GSM 46540,男性UC;GSM46545,男性UC;GSM46546,女性UC.

1.1.2 GPL96芯片平台:GPL96(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL96>)又称人类基因组HG-U133A芯片集(affymetrix),包含1 000 000寡核苷酸片断,覆盖39 000个转录变体,代表33 000条人全长基因.实际研究中应用的GPL96平台,涉及18 400个转录本和400条表达序列标签共22 000条已明确注释的基因.在公开发表的报道中,目前已有15 914份样品是用该平台进行研究的.

1.2 方法 采用数据挖掘软件BRB-ArrayTools 3.6版(BRB)对该数据库进行挖掘,筛选差异表达基因,然后对差异表达基因进行生物信息学分析.资料缺失50%,或少于20%的表达资料大于或等于1.5倍单方向基因中位数值被过滤,重复基因

点取平均值,应用HG-U133第7张芯片中的看家基因中位数进行均一化.应用随机变量模型双样品T检验筛选差异基因,对样品和基因进行层级聚类.

2 结果

2.1 差异表达基因的数量及上下调趋势 22 283条基因片段中1 633条通过过滤条件.对两组进行随机变量模型双样品T检验,UC/IBS比率(ratio)ratio<1为UC下调基因, ratio>1为UC上调基因.设定两个统计差异基因条件: (1) $P<0.01$; (2) $P<0.01$, ratio<0.5或ratio>2.0.结果发现1 633条中,符合条件(1)的差异基因片段141条(Gb),涉及基因131条(Hs).UC基因下调7条,其余124条都是上调.符合条件(2)的差异基因片段33条,涉及基因28条,下调3条,为免疫球蛋白 κ 链(IGKC///IGKV1-5///IGKV2-24)和免疫球蛋白重链 $\alpha 1$ (IGHA1///IGHA2),肿瘤坏死因子受体脱氨基肽酶调节因子1(tumor necrosis factor-receptor kinase regulator de-aminopeptidase1, ARTS-1);上调基因25条,主要为一氧化氮合酶2、黏液蛋白MUC3B、囊泡关联膜蛋白2、jun D原癌基因、蛋白磷酸激酶调节亚基15等(表1).

2.2 基因本体功能分析(GO Comparison) 141条基因片段通过过滤标准,检验了250个GO分类.显著水平设定为默认值 $P<0.005$.有51条基因片段经过LS或KS参数检验,归为结构分子活性7条,调节RNA polymerase II启动子转录12条、细胞死亡16条.

2.3 差异基因的信息通路分析

2.3.1 KEGG通路: 131条基因中具有KEGG通路的30条,有两条下调基因,分别为钙连接蛋白和免疫球蛋白 κ ,主要参与了抗原呈递过程.其余为上调基因,参与了MAPK信号通路5条基因;精氨酸和脯氨酸代谢2条基因;钙离子信号通路3条基因;细胞通讯2条基因;胰岛素信号通路2条基因, SANRE与囊泡相互作用1条基因、细胞因子相互作用1条基因等(表2).

2.3.2 BioCarta通路: 131条基因中具有BioCarta通路信息的18条基因,3条下调基因,分别为多聚腺苷酸聚合酶 α 、高迁移率组框和钙连接蛋白,主要参与了mRNA多腺苷化和凋亡Apoptotic DNA片断组织稳定、ER降解通路.其余为上调基因,主要参与的细胞的生存、由PPAR α (alpha)产生的基因调控、MAPK信号通路、IL-2受体Beta链对T细胞的激活过程、磷酸肌醇及下游通

相关报道

Wu *et al*应用基因芯片技术比较了UC和Crohn's基因表达差异,探讨了两者之间病理机制的不同; Watanabe *et al*应用该技术对UC和UC相关结肠癌进行了比较研究,探讨了UC相关结肠癌发生机制及基因表达标志.

表 1 $P<0.01$, UC/IBS ratio <0.5 或ratio >2.0 的部分差异基因

检验参数 P -value值	IBS组基因密度值 几何均数	UC组基因密度值 几何均数	基因均数ratio值	探针号	基因名称
0.000244	205.9285517	417.7994053	0.4928886	214676_x_at	MUC3B
0.0019582	90.8868736	184.8229232	0.4917511	202014_at	PPP1R15A
5.43E - 05	72.2036604	149.7764105	0.4820763	214792_x_at	VAMP2
0.0062763	133.4356297	296.1121829	0.4506253	214326_x_at	JUND
0.0006259	53.8173706	120.5370706	0.4464798	34478_at	RAB11B
0.009928	41.9325934	94.7902392	0.4423725	210037_s_at	NOS2A
5.55E - 05	119.2627791	294.06674	0.4055636	204907_s_at	BCL3
0.0044962	2736.27977	831.7465272	3.2898001	217022_s_at	IGHA1/IGHA2
0.0001021	228.8090336	98.3600146	2.3262403	209788_s_at	ARTS - 1
0.009715	3350.126035	1527.193161	2.1936492	221651_x_at	IGKC/IGKV1 - 5/2 - 24

创新盘点
本文应用GEO资源,从差异基因、本体功能、信号通路、聚类分析等方面进行了数据挖掘,从差异基因角度比较了UC和IBS病理机制异同,其中两者之间免疫球蛋白IgA的差异,是本研究的重要发现。

表 2 具有KEGG通路和BioCarta通路的部分差异基因

Kegg通路	基因名称	Biocarta通路	基因名称
SANRE与囊泡相互作用	VAMP2	磷酸肌醇及下游通路	GSK3A RD
细胞通讯	NES	IL - 2受体Beta链对T细胞激活	CISH
钙离子信号通路	TNFRSF6B	MAPK信号通路	DUSP8
精氨酸和脯氨酸代谢	NOS1	细胞的生存	JUND
MAPK信号通路	JUND	MAPK信号通路	MAP2K2
胰岛素信号通路	IRS2	由PPAR α (alpha)产生的基因调控	NOS2A
精氨酸和脯氨酸代谢	NOS2A	ER降解通路	CANX
抗原呈递	CANX	凋亡Apoptotic DNA片段组织稳定	HMGB1
抗原呈递	IGKC/IGKV1 - 5	mRNA多腺苷化	PAPOLA

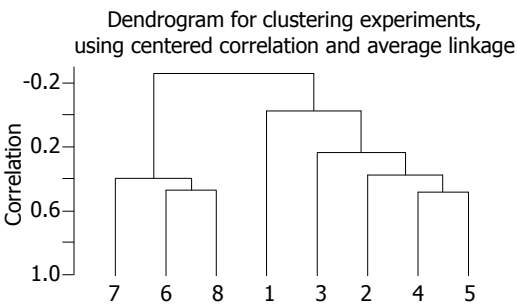


图 1 样品层级聚类图.

路等(表2).

2.4 样品聚类和基因聚类

2.4.1 样品聚类: 根据各样品基因表达情况, 判别样品之间的差距离, 差距最近的样品聚为一类, 然后不断层积, 8个样品可聚为两大类, 溃疡性结肠炎样品为一类, 其中6号样品和8号样品差距最小; IBS样品为一类. 4号样品和5号样品差距最小(图1).

2.4.2 基因聚类: 根据差异基因在各样品表达情况, 判别基因之间的差距离, 差距最近的基因聚

为一类, 然后不断层积, 基因也可聚为两大类, 一类为UC/IBS ratio >1.0 , 一类为UC/IBS ratio <1 , 每个大类包含差距离不断缩小的不同类别.图2所示为UC/IBS ratio <1 的一类. 图中两个免疫球蛋白基因之间差距离最小, 聚为一类, 然后和热休克蛋白差距离较近; 肿瘤坏死因子脱氨基肽激酶调节因子1(ARTS-1)和poly(A)多聚酶(PAPOLA)差距离最小, 聚为一类; 如此不断层积, UC/IBSratio <1 的基因聚为1大类. 由此结果看出, 差距离最小的1类基因在功能上或其转录调节可能非常相近, 如结果中2个免疫球蛋白分子; 两者为1类, 也可能就目前知识水平两者的功能或转录调节关系不明, 但提示在所检测的疾病中两者关系密切, 需要进一步研究, 如结果中的ARTS-1和PAPOLA.

3 讨论

UC和IBS是两种常见的胃肠道疾病, 都会出现腹痛、腹泻、黏液便等症状, 虽然结肠镜下两者能很好地进行鉴别, 但由于IBS急性期时也常

应用要点

本研究比较了UC和IBS间基因表达的差异,为两者之间的鉴别提供了参考,特别是两者之间免疫球蛋白IgA的差异,有望成为便捷地鉴别两种疾病的标志。

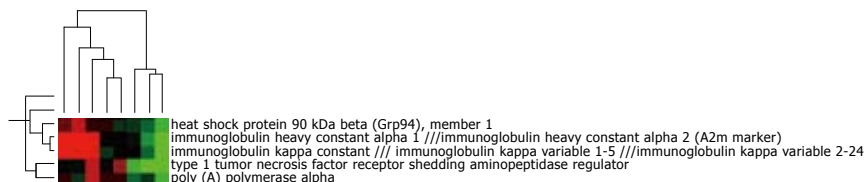


图2 基因层级聚类图(部分)。

常有轻微炎症改变,因此也常常相互误诊。同时,他们的发病机制都和环境、遗传、炎症等因素密切相关,在具体环节上有很多重叠,但两者肯定又有很多不同。基因芯片技术能够高通量、敏感、便捷地比较不同疾病状态下上万个基因差异,是研究疾病之间分子差异的有力工具^[7]。近年来已有可观的利用基因芯片研究疾病病理机制和进行疾病分类比较的数据积累,为了方便进行交流和资源共享,已建立了一批网络数据库, GEO就是其中之一。鉴于利用基因芯片研究UC和IBS之间基因表达差异的报道尚少,而他们病理机制及其之间的异同未明,我们利用GEO资源,下载两者相互比较的基因芯片数据资料,进行比较分析。

本研究发现了131条差异基因,涉及炎症反应、免疫、信号传导、细胞分泌、基因转录调节、细胞结构、细胞死亡等。与IBS相比,UC上调基因124条,下调基因7条。基于UC在机体病理状态表现比IBS更为严重的缘故,很多介导细胞生存和死亡、炎症和抗炎等相互对立的相关基因表达升高,这与慢性UC相对亢进的损伤和修复机制的病理状态一致,从结果来看,UC表现7条下调基因中,有2条是免疫球蛋白,而且UC/IBS ratio<0.5,免疫球蛋白κ链是所有免疫球蛋白轻链,免疫球蛋白重链α1/α2是组成IgA1/IgA2的重链,两者在芯片中表达一致,层级聚类显示为差距离最小的一类,说明两者实质上是代表免疫球蛋白IgA。IgA主要由黏膜相关淋巴样组织产生,其中大部分是由胃肠淋巴样组织所合成,是黏膜局部免疫的最重要因素。结肠黏膜中IgA合成和分泌减少,说明黏膜屏障功能降低。由此可知,UC与IBS相比其黏膜免疫屏障功能降低更为严重。IgA以分泌性为主,在UC与IBS之间表达有如此大差异,可以通过粪便进行检测,有望成为便捷地鉴别两种疾病的指标。

肿瘤坏死因子是重要的炎症因子,与UC发生和发展关系密切。研究发现,UC患者结肠黏膜中TNF高表达,且其基因多态性与UC易感性明显相关。TNF-α抗体infliximab已成为临床治疗UC药物,具有较好的治疗效果^[8-10]。本研究发

现肿瘤因子受体超家族6(tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, RTN1//TNFRSF6B)在UC中高表达,而对肿瘤坏死因子受体介导的信号传导具有负调节作用的ARTS-1^[11]低表达,也说明与IBS相比,TNF受体介导的信号导致的炎症反应在UC中起更重要作用。

差异基因中调节炎症反应的基因除TNF相关的两条基因外,还有一氧化氮合酶(nitric oxide synthase2A/1, NOS2A/NOS1)、B-cell CLL/lymphoma 3(BCL3)、基质金属蛋白酶15(metalloproteinase15, MMP15)、磷脂酶A2(phospholipase A2 G4C, PLA2G4C)、过氧化物同系物(oxidase homolog (Drosophila), PXDN)、干扰素(alpha, beta and omega)受体2(interferon receptor, IFNAR2)、细胞因子诱导的SH2包含蛋白(cytokine inducible SH2-containing protein, CISH)、S100钙离子结合蛋白A8(S100 calcium-binding protein A8, S100A8)等。这些基因在结肠黏膜表达UC比IBS高,说明UC炎症严重程度和黏膜损伤要比IBS高。

本研究发现,在UC中很多与细胞生长和增殖相关基因高表达,如jun D原癌基因、丝裂活性蛋白激酶、Amphiregulin、RAS原癌基因家族RAB11B等。其中有6条基因参与了MAPK信号通路,该通路主要调节细胞的生长、增殖和炎症反应。推测这些基因高表达原因:(1)促进炎症细胞的增殖分裂,在UC结肠黏膜中具有更多炎症细胞聚集和更重的炎症表现;(2)肠黏膜损伤修复机制的启动,严重的UC结肠黏膜损伤促使应激修复和抗损伤机制表现得也更为强烈,黏膜细胞增殖也越明显。

黏蛋白(mucin, MUC)是肠黏膜化学屏障的重要组成部分,对损伤的结肠黏膜具有重要保护和修复功能。有研究表明,UC结肠黏膜上MUC-2、MUC12表达下调,MUC-3、MUC-4表达没有差异,MUC-5、MUC-6没有检出,而MUC-1表达上调,特别是肠隐窝脓肿位置^[12]。另外,用基因芯片研究发现,与正常人相比UC肠黏膜中MUC1、MUC2、MUC4、MUC5B、MUC12、

MUC13、MUC17、MUC20表达降低^[13]。本研究发现与IBS相比, MUC5AC、MUC3B在UC结肠黏膜上高表达, 这可能是因为所比较的对象不同。与正常人相比, 在IBS黏膜中他们的表达也许更低。

胞吐是细胞进行分泌的形式, 包括酶、激素、细胞因子的分泌, 其中有很多细胞器和多种分子参与^[14]。在本研究中发现多种胞吐相关的分子基因在UC-结肠黏膜中高表达, 包括vesicle-associated membrane protein 2(VAMP2)、solute carrier family 22 member 14(SLC15A1)、solute carrier organic anion transporter family, member 2A1(SLCO2A1)、WW domain binding protein 2(WBP2)等。说明UC结肠黏膜中有许多细胞分泌旺盛, 也可能是因为炎症细胞聚集分泌各种炎症因子的缘故。

总之, 我们利用GEO基因芯片资源对IBS和UC进行了比较分析, 发现了许多差异基因, 部分差异基因的表达与他人的研究相一致。与IBS相比, UC肠黏膜炎症相关基因表达增强, 说明其黏膜炎症较重, 基本上反映了两种疾病的病理差异。免疫球蛋白IgA在两者之间的差异, 是本研究的重要发现, 由于其以分泌型为主, 有望成为无创伤鉴别两者的分子标志物, 但需要进一步研究证实。对于其他差异基因, 我们将深入研究分析。

4 参考文献

- 1 Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12 Suppl 1: S3-S9
- 2 Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, Bayless TM, Parmigiani G, Chakravarti S. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive

- 3 pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 807-821
- 4 Watanabe T, Kobunai T, Toda E, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, Tanaka T, Yamamoto Y, Hata K, Kojima T, Yokoyama T, Konishi T, Okayama Y, Sugimoto Y, Oka T, Sasaki S, Ajioka Y, Muto T, Nagawa H. Gene expression signature and the prediction of ulcerative colitis-associated colorectal cancer by DNA microarray. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 415-420
- 4 Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480-1491
- 5 Ohman L, Simrén M. New insights into the pathogenesis and pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 201-215
- 6 Quigley EM. Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: interrelated diseases? *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 122-132
- 7 Lee NH, Saeed AI. Microarrays: an overview. *Methods Mol Biol* 2007; 353: 265-300
- 8 Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; 214: 149-160
- 9 Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, Weeks DE, Jewell DP, Duerr RH. The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1605-1610
- 10 Wilhelm SM, McKenney KA, Rivait KN, Kale-Pradhan PB. A review of infliximab use in ulcerative colitis. *Clin Ther* 2008; 30: 223-230
- 11 Cui X, Hawari F, Alsaaty S, Lawrence M, Combs CA, Geng W, Rouhani FN, Miskinis D, Levine SJ. Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *J Clin Invest* 2002; 110: 515-526
- 12 Longman RJ, Poulosom R, Corfield AP, Warren BF, Wright NA, Thomas MG. Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 1335-1348
- 13 Moehle C, Ackermann N, Langmann T, Aslanidis C, Kel A, Kel-Margoulis O, Schmitz-Madry A, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J Mol Med* 2006; 84: 1055-1066
- 14 Stow JL, Manderson AP, Murray RZ. SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 919-929

同行评价
本研究选题尚可, 方法新颖, 结果可靠, 具有一定的科学意义。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。(科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

CD3和CD8免疫反应阳性细胞在人胎回肠的发育

苏敏, 胡蓉, 李红, 黄悦, 许庭良, 姜俸蓉

背景资料
有关人胎肠相关淋巴组织的研究较多, 针对肠道不同部位T淋巴细胞的发育均有报道, 但是对回肠内淋巴组织T细胞的发育报道较少。CD3是所有T细胞的共同标志, CD8⁺T淋巴细胞是免疫反应的效应细胞, 因而本文对CD3和CD8阳性T细胞的发育、分布和定位情况进行探讨。

苏敏, 胡蓉, 李红, 黄悦, 许庭良, 姜俸蓉, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室 贵州省贵阳市 550004
苏敏, 硕士, 副教授, 主要从事实验组织学和人体胚胎发生的研究。
贵州省教育厅基金资助项目, No. 2002116
作者贡献分布: 苏敏课题设计, 实验结果观察和总结, 起草文章, 提供研究经费; 胡蓉和李红收集标本, 直接参与实验, 统计分析; 黄悦对实验提供技术支持; 许庭良和姜俸蓉对文章内容作批评性审阅。
通讯作者: 苏敏, 副教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室. summ30@163.com
电话: 0851-6908567
收稿日期: 2009-09-25 修回日期: 2009-11-14
接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-18

Development of CD3- and CD8-positive cells in human fetal ileum

Min Su, Rong Hu, Hong Li, Yue Huang, Ting-Liang Xu, Feng-Rong Jiang

Min Su, Rong Hu, Hong Li, Yue Huang, Ting-Liang Xu, Feng-Rong Jiang, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Foundation of the Department of Education of Guizhou Province, No. 2002116

Correspondence to: Min Su, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. summ30@163.com

Received: 2009-09-25 Revised: 2009-11-14

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the distribution, location and growth of CD3- and CD8-positive cells in developing lymphoid tissue of human fetal ileum.

METHODS: Thirty samples of human fetal ileum between gestational weeks 9 and 32 were collected. CD3- and CD8-positive cells were identified by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method. The positive cells were counted using BioMias image analysis software, and the data were analyzed using the SPSS11.5 software package.

RESULTS: At gestational week 9, there were few CD3- and CD8-positive cells scattered in the connective tissue of the ileal wall. At week

11, these positive cells were distributed in small clusters. At week 17, CD3- and CD8-positive cells gathered together. The majority of positive cells were distributed in the connective tissue of mucosa, while few positive cells infiltrated into the ileal epithelium. At week 18, CD3- and CD8-positive cells were seen in the lymphoid nodules and participated in the organization of lymphoid nodules. After week 24, the number of the two types of positive cells gradually increased with fetal age, reaching the peak at week 28. The distribution of these positive cells were particularly prominent in aggregated lymphoid nodules. A significant positive correlation was noted between the number of CD3- and CD8-positive cells ($r = 0.831, P < 0.01$). The number of CD3-positive cells exceeded that of CD8-positive cells at all time points.

CONCLUSION: CD3- and CD8-positive T cells begin to appear at gestational week 9 when gut-associated lymphoid tissue is forming in human fetus. The development of CD3- and CD8-positive T cells is basically synchronous in human fetal ileum.

Key Words: CD3; CD8; Ileum; Human fetus

Su M, Hu R, Li H, Huang Y, Xu TL, Jiang FR. Development of CD3- and CD8-positive cells in human fetal ileum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3606-3610

摘要

目的: 探讨CD3和CD8免疫反应阳性细胞在人胎回肠淋巴组织发生过程中的分布、定位及发育。

方法: 收集因故终止妊娠人胎回肠30例, 采用免疫组织化学SP法染色显示CD3和CD8免疫反应阳性细胞, 用BioMiaspro图象分析软件对免疫反应阳性细胞进行计数, 有关数据作统计学分析。

结果: 9 wk, 回肠内可见CD3和CD8阳性反应细胞, 主要定位于肠壁的结缔组织内, 数量较少, 散在分布; 11 wk可见CD3和CD8阳性细胞

同行评议者
许文燮, 教授, 上海交通大学医学院生理学教研室

三五成群分布; 17 wk, CD3和CD8阳性细胞聚集成群, 主要分布于绒毛中轴以及小肠腺之间固有结缔组织, 回肠黏膜上皮偶见阳性细胞浸润; 18 wk, CD3和CD8阳性反应细胞出现在淋巴小结处参与构成淋巴小结; 24 wk后, CD3和CD8阳性反应细胞数量增多, 尤以典型的集合淋巴小结处有较多分布, 其中, 在28 wk数量增加最为明显($P < 0.05$). CD8和CD3阳性细胞数量之间有较强的正相关关系($r = 0.831$, $P < 0.01$), CD3阳性细胞在整个发育过程中数量上均较CD8阳性细胞多.

结论: 人胎肠相关淋巴组织的形成过程中, 第9周即有T细胞发育. CD8和CD3阳性T细胞的发育时序基本同步.

关键词: CD3; CD8; 人胎; 回肠

苏敏, 胡蓉, 李红, 黄悦, 许庭良, 姜俸蓉. CD3和CD8免疫反应阳性细胞在人胎回肠的发育. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3606-3610

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3606.asp>

0 引言

回肠壁淋巴组织是肠相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)的重要组成部分, 参与构成机体抵抗外界入侵的第一道防线, 在肠道免疫功能的调节过程中起重要作用^[1-3]. CD3是所有T细胞的共同标志, CD3作为T细胞抗原受体, 为信号转导亚单位, 能将TCR接受的抗原刺激信号转导至细胞内, 使T细胞活化, 在T细胞免疫中起着必不可少的作用^[4-5]. CD8⁺ T淋巴细胞是免疫反应的效应细胞, 其数量的增多或减少可间接反映人体的免疫功能^[6-7]. 在人胎发育过程中, 肠道淋巴组织内T细胞逐渐表达CD3和CD8分子, 其发育过程也在一定程度上反映了胎儿免疫功能建立情况. 肠相关淋巴组织内T细胞的发育已经越来越受到学者们的关注, 如: 李红 *et al*^[8]报道人胎肠系膜淋巴结内11 wk出现T细胞; harr *et al*^[9]认为, 人胎13 wk时即有一些分散的淋巴细胞存在阑尾的固有层中; Noussios *et al*^[10]报道的人胎扁桃体14 wk观察到T细胞; Spencer *et al*^[11]认为, 人胎回肠11 wk出现T细胞; 朱清仙 *et al*^[12]认为, 人胎小肠10 wk出现T细胞, 但是对回肠内淋巴组织T细胞的发育报道较少. 因此, 为进一步了解人胎肠相关淋巴组织尤其是回肠内T细胞的发育情况, 本实验收集人胎回肠标本, 对CD3和CD8阳性T细胞的发育、分布和定位情况进行探讨, 以期提供更多的形态学

资料, 并为消化系免疫防御功能的研究提供形态学基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人胎标本来源于贵阳市各医院因故中止妊娠的人胎30例(每例标本均征得孕妇本人同意). 兔抗人CD3 mAb(rabbit monoclonal antibody anti-human CD3)、鼠抗人CD8 mAb(mouse monoclonal antibody anti-human CD8)来源于福州迈新生物技术开发公司, SP免疫组织化学染色试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供. SP免疫组织化学染色试剂盒内容: 内源性过氧化物酶阻断剂(endogenous peroxidase blocking solution), 正常非免疫动物血清(normal nonimmunone serum), 生物素标记的第二抗体(biotin-conjugated second antibody), 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase).

1.2 方法

1.2.1 人胎胎龄计算: 所有人胎标本均测量顶臀长(crown-rump length, CRL), 按Patten标准确定胎龄: 9-12 wk 5例, CRL为39.0-79.0 mm; 13-16 wk 7例, CRL为91.0-137.0 mm; 17-20 wk 6例, CRL为147.0-185.0 mm; 21-24 wk 6例, CRL为197.0-230.0 mm; 25-28 wk 6例, CRL为240.0-270.0 mm.

1.2.2 取材, 制片和染色: 各例均取回肠, 用40 g/L甲醛固定, 经乙醇梯度脱水, 透明, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片、贴片, 邻片单染法每例观察切片两张以上, 切片间隔36 μ m.

免疫组织化学SP法染色显示CD3阳性和CD8阳性T细胞. 免疫组织化学SP法主要步骤: 切片脱蜡下行入水, 微波抗原修复15-20 min, 试剂A室温下10 min, PBS洗3 min \times 3次, 试剂B室温下10 min, 一抗(兔抗CD3 1:50, 鼠抗CD8 1:25)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗3 min \times 3次, 试剂C 37 $^{\circ}$ C孵育20 min, PBS洗3 min \times 3次, 试剂D 37 $^{\circ}$ C孵育20 min, PBS洗5 min \times 4次, DAB-H₂O₂液显色, 中性树胶封片. 阴性对照: 用PBS缓冲液代替一抗, 余步骤同前.

每胎龄段标本随机取非连续切片5张, 应用Biomias 29图像分析系统进行检测, 在高倍镜下(物镜40倍)每张切片随机取3个视野, 分别计数每个视野内的CD3阳性细胞及CD8阳性细胞数.

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 并采用统计软件SPSS11.5进行单因素的方差分析, 组间两两比较用 q 检验, 两变量间的关系用直线相关分析.

研究前沿
有关人胎肠相关淋巴组织的研究主要集中在各种淋巴细胞的发生时间、分布部位、亚型的发育分布、数量变化、淋巴小结各结构的形成以及淋巴细胞的迁移途径等.

相关报道
李红 *et al*报道人胎肠系膜淋巴结内11 wk出现T细胞, 15 wk形成早期髓质; 23 wk可辨认皮质和髓质; 至28 wk时, 小结仍为初级淋巴小结. 并将淋巴结的发生进行了详细研究. 朱清仙 *et al*对大小肠上皮内淋巴细胞的发生、亚型分布和数量变化等进行了比较. 认为大小肠上皮内淋巴细胞有基本相同的发育规律, 但发生时间和数量上有较大差异.

创新盘点

在人胎发育的第9周,回肠内可见少量CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞,主要定位于肠壁的结缔组织内。17 wk, CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞聚集成群,主要分布于绒毛中轴以及固有层结缔组织内。18 wk, CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞出现在淋巴小结处参与构成淋巴小结,尤以CD3⁺淋巴细胞数量最多。24 wk后, CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞在典型的集合淋巴小结处有较多分布。

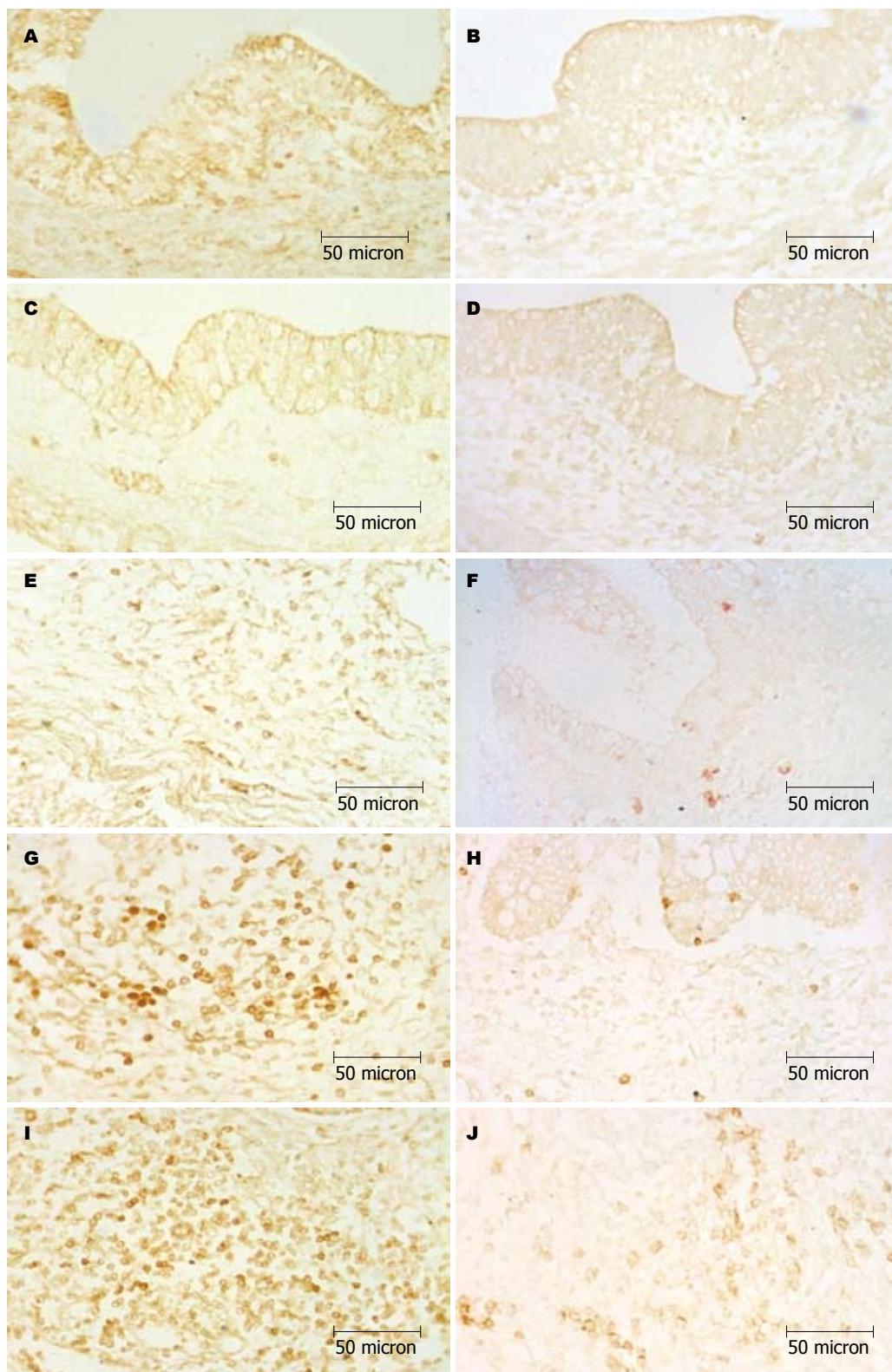


图1 人胎发育不同时期回肠CD3和CD8阳性细胞的发育(免疫组织化学染色, $\times 400$)。A: 9 wk CD3阳性表达; B: 9 wk CD8阳性表达; C: 11 wk CD3阳性表达; D: 11 wk CD8阳性表达; E: 17 wk CD3阳性细胞数量增多, 散在分布; F: 17 wk CD8阳性表达; G: 18 wk CD3阳性表达; H: 18 wk CD8阳性表达, 上皮内阳性细胞浸润明显; I: 24 wk集合淋巴小结处CD3阳性细胞; J: 24 wk CD8阳性细胞, 数量明显增多。

2 结果

2.1 CD3和CD8阳性细胞的分布和定位 9 wk, 回肠内可见少量CD3阳性反应细胞和CD8阳性反

应细胞, 棕褐色的阳性反应产物表达在胞膜上, 反应弱, 染色较浅, 主要定位于肠壁的结缔组织内, 散在分布(图1A-B)。11 wk可见CD3阳性和

表 1 不同胎龄CD3阳性细胞和CD8阳性细胞计数 (mean \pm SD)

细胞类型	9-12 wk	13-16 wk	17-20 wk	21-24 wk	25-28 wk
CD3阳性细胞	6.80 \pm 5.26	17.00 \pm 8.06	46.60 \pm 19.35 ^a	93.00 \pm 40.78 ^a	144.60 \pm 15.52 ^a
CD8阳性细胞	4.80 \pm 1.79	9.20 \pm 1.92	29.20 \pm 8.90 ^a	49.60 \pm 19.00 ^a	75.40 \pm 24.05 ^a

^a $P < 0.05$ vs 同类细胞13-16 wk.

CD8阳性细胞三五成群分布(图1C-D). 17 wk, CD3和CD8阳性细胞数量略增多, 反应明显增强, 细胞聚集成群, 主要分布于绒毛中轴以及固有层结缔组织内, 回肠黏膜上皮偶见阳性细胞浸润(图1E-F). 18 wk, CD3和CD8阳性反应细胞出现在淋巴小结处参与构成淋巴小结, 尤以CD3阳性反应细胞数量最多, 上皮内阳性细胞浸润明显(图1G-H). 24 wk后, CD3和CD8阳性反应细胞数量显著增多, 尤以典型的集合淋巴小结处有较多分布(图1I-J).

2.2 细胞计数 随胎龄增长, CD3阳性反应细胞和CD8阳性反应细胞数量逐渐增加, 尤以25-28 wk数量最多, 与21-24 wk相比, 差异有显著统计学意义($P = 0.001 < 0.01$), 且CD3阳性反应细胞较CD8阳性反应细胞多. 直线相关分析发现, 在人胎发育过程中, CD3和CD8阳性细胞的数量变化呈较强的正相关关系($r = 0.831$, 表1).

3 讨论

肠道不仅是消化、吸收营养物质的场所, 而且具有重要的免疫屏障功能^[1-3]. 肠道的免疫学屏障主要由肠相关淋巴组织和肠道黏膜免疫相关细胞构成, 回肠肠壁内淋巴细胞作为肠道相关淋巴组织中的一个特殊组分, 是机体免疫系统与外来抗原以及微生物较早接触的免疫细胞, 同时也是较早发生免疫反应的细胞^[13-19], 其通过分泌IL-2、IL-5、IFN- α 和IFN- γ 等淋巴因子, 诱导肠上皮细胞参与黏膜免疫应答. 因此, 回肠内淋巴细胞的类型、数量以及分布可以反映小肠局部黏膜免疫屏障的建立情况及其免疫防御功能的完善程度.

本研究发现, 在人胎肠相关淋巴组织的形成过程中, 9 wk回肠内即有CD3阳性反应T细胞和CD8阳性反应T细胞发育, 这一结论较Spencer *et al*^[11]、朱清仙 *et al*^[12]报道T淋巴细胞出现的时间早. CD3是成熟T细胞的标志, CD8亚群T细胞是免疫反应的效应细胞, 提示在胚胎发育的较早的时期, 即有发育成熟的T淋巴细胞迁移进入消化管壁, 并分化出CD8阳性T细胞亚群, 参与

肠相关淋巴组织的形成. 已有的研究表明早在妊娠7.5 wk, 在胎儿肝脏就可检测到胎儿肝细胞发生混合淋巴细胞反应, 在胸腺则为妊娠11 wk, 脾为妊娠13 wk, 外周血为妊娠14.5 wk. 提示9 wk回肠T淋巴细胞在抗原的刺激下, 胎儿可能发生特异性免疫应答, 消化系的免疫功能也开始建立. 本实验还观察到11 wk可见CD3和CD8阳性细胞成群分布, 17 wk聚集成群并浸润上皮, 18 wk形成淋巴小结, 24 wk后, 在典型的集合淋巴小结处有较多分布, 阳性细胞的分布也从固有层散在的淋巴细胞到形成淋巴组织并且逐渐浸润到上皮内, 说明随着胎龄的增加, T淋巴细胞的数量逐渐增多, 回肠黏膜免疫屏障逐渐完善, 胎儿免疫防御功能逐渐增强. 本研究发现在人胎回肠发育过程中, CD3和CD8阳性细胞的数量变化呈较强的正相关关系($r = 0.831$)且二者的发育时序基本同步, 随着CD3阳性细胞的出现, 数量的增多, CD8也同步开始表达, 可以认为, CD3阳性细胞的发育在一定程度上也反映了CD8阳性细胞的变化.

CD8阳性反应细胞是整个肠黏膜免疫系统与肠腔抗原最接近的免疫细胞, 对细菌、病毒感染有免疫监视作用, 能特异性直接杀伤靶细胞^[20-23]. 同时CD8阳性反应细胞和上皮细胞毗邻, 与肠上皮细胞间存在着双向的免疫生理调节. 由于CD8阳性反应细胞与外周T淋巴细胞在表型和回归方面存在很大差异^[24], 因此对CD8阳性反应细胞的来源仍然不明确. 多数研究者所公认CD8阳性反应细胞前体细胞在小肠中发育成熟, 不受胸腺因子的影响, 是一条独立的胸腺外途径^[1]. 一般认为在一个黏膜部位致敏的免疫细胞, 经胸导管入血液循环, 逐步分化成熟, 在特异回归受体介导下, 多数免疫细胞归巢到致敏部位黏膜固有层^[25]. 本实验观察到在基底膜上有CD3和CD8阳性反应细胞, 可能其游走于固有层和上皮之间, 我们至少可以认为黏膜固有层的淋巴细胞可以通过基底膜迁至上皮, 但其具体过程及上皮内淋巴细胞来源仍需进一步探讨.

应用要点

本文为一基础研究, 明确了CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞出现的时间点、分布部位、数量变化, 参与构成淋巴小结的时间等, 为消化系统免疫防御功能的研究提供形态学基础.

同行评价

本研究从发育学的角度去了解人胚胎发育过程中免疫系统的发育情况,具有一定的理论和潜在的临床意义。

4 参考文献

- 1 吴翰桂, 朱诚, 丁仁瑞. 肠道粘膜免疫研究进展. 免疫学杂志 2000; 16: 235-237
- 2 储昭新, 秦环龙. 炎症性肠病肠道淋巴细胞归巢研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 687-693
- 3 任宏宇, 邹开芳. 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3178-3180
- 4 张有聪, 刘淑英. T淋巴细胞和B淋巴细胞的研究进展. 畜牧与饲料科学 2006; 27: 75-78
- 5 李付广, 李沛, 靳静, 董子明. 外周血T淋巴细胞的培养、纯化及鉴定. 郑州大学学报(医学版) 2006; 41: 605-607
- 6 张卫国, 童强, 王强, 王小虎, 李胜保. T淋巴细胞亚群和DNA倍体检测在腹水鉴别诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1972-1975
- 7 戴建宜, 梁晓萍, 文锦丽, 李彩银. T淋巴细胞亚群及炎症细胞因子与慢性浅表性胃炎合并十二指肠球部溃疡的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1254-1256
- 8 李红, 苏敏, 胡蓉, 姜俸蓉, 许庭良. 人胎肠系膜淋巴组织发生及相关T、B细胞的发育. 解剖学杂志 2009; 32: 183-186
- 9 Haar JL. Epithelium and associated lymphocytes of developing human fetal appendix. Electron microscopic study. *Biol Neonate* 1977; 31: 94-102
- 10 Noussios G, Xanthopoulos J, Zaraboukas T, Vital V, Konstantinidis I. Morphological study of development and functional activity of palatine tonsils in embryonic age. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2003; 23: 98-101
- 11 Spencer J, Dillon SB, Isaacson PG, MacDonald TT. T cell subclasses in fetal human ileum. *Clin Exp Immunol* 1986; 65: 553-558
- 12 朱清仙, 邓锋, 江鹏飞, 曾慧红, 邹江洪. 人胎大肠和小肠上皮内淋巴细胞的比较分析. 中国体视学与图像分析 2004; 9: 84-87
- 13 Willems F, Vollstedt S, Suter M. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur J Immunol* 2009; 39: 26-35
- 14 王茜, 杨琨, 白海, 吴涛, 路继红. 人脐血间充质干细胞抑制异体T淋巴细胞反应的实验及临床意义. 第四军医大学学报 2007; 28: 1649-1651
- 15 邓峰, 朱清仙, 黎静, 高摄渊. 人胎儿小肠上皮内淋巴细胞分布及其计数. 江西医药 2003; 38: 320-322
- 16 Law HK, Tu W, Liu E, Lau YL. Insulin-like growth factor I promotes cord blood T cell maturation through monocytes and inhibits their apoptosis in part through interleukin-6. *BMC Immunol* 2008; 9: 74
- 17 李洁, 李扬秋, 杨力建, 陈少华, 余卫. 接触苯及苯中毒工人外周血T细胞中CD3 ζ 基因的表达与分析. 细胞与分子免疫学杂志 2007; 23: 447-449
- 18 陈少华, 李扬秋, 杨力建, 陈思, 林锦绒. CD3 ζ 链基因在脐带血T细胞及其CD4+和CD8+T细胞亚群中的表达特点. 免疫学杂志 2008; 24: 452-455
- 19 孙少川, 郑春宁, 刘国勤, 谭伟, 姜永胜. 重组人生长激素对大鼠肠道缺血再灌注后肠壁组织T淋巴细胞亚群和浆细胞凋亡的影响. 中华实验外科杂志 2006; 23: 605-606
- 20 Mansoor N, Abel B, Scriba TJ, Hughes J, de Kock M, Tameris M, Mlenjeni S, Denation L, Little F, Gelderbloem S, Hawkridge A, Boom WH, Kaplan G, Hussey GD, Hanekom WA. Significantly skewed memory CD8+ T cell subsets in HIV-1 infected infants during the first year of life. *Clin Immunol* 2009; 130: 280-289
- 21 金波, 张纪元, 张政, 王慧芬, 王福生. PD-1表达对急性乙型肝炎患者HBV特异性CD8+ T细胞功能的影响. 肝脏 2008; 13: 310-314
- 22 金波, 王慧芬, 王福生, 李捍卫. 慢性丙型肝炎患者型树突状细胞、淋巴细胞亚群的特点及临床意义. 传染病信息 2008; 21: 115-118
- 23 高娟, 李芳兰, 周一珺, 杨花梅, 陈同辛, 何振娟. 不同发育时期大鼠小肠粘膜及派氏结T淋巴细胞发育活化的研究. 中国免疫学杂志 2009; 25: 678-683
- 24 杨辉, 唐承薇. 肠血管活性多肽或生长抑素抑制大鼠肠CD8 $^{+}$ 淋巴细胞归巢. 上海免疫学杂志 2002; 22: 182-185
- 25 熊建美, 李贞, 李务荣, 李敏, 高慧英. 人小肠各段粘膜上皮及固有层淋巴细胞分布规律的研究. 泰山医学院学报 2006; 27: 532-533

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》标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体. (科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

曲古抑菌素A对胃癌细胞生长的抑制作用

乔文, 杨晓丹, 王丹

乔文, 杨晓丹, 王丹, 西安交通大学医学院第一附属医院消化科 陕西省西安市 710061

作者贡献分布: 乔文、杨晓丹及王丹对此文所作的贡献均等; 此课题由乔文设计并提供实验经费; 研究过程及数据分析由杨晓丹与王丹完成; 本论文书写由乔文、杨晓丹及王丹完成。

通讯作者: 乔文, 副教授, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第一附属医院消化科. qiaowen1202@126.com

电话: 029-85323927

收稿日期: 2009-09-23 修回日期: 2009-11-14

接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-18

Trichostatin A inhibits the growth of human gastric cancer SGC-7901 cells

Wen Qiao, Xiao-Dan Yang, Dan Wang

Wen Qiao, Xiao-Dan Yang, Dan Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Professor Qiao Wen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. qiaowen1202@126.com

Received: 2009-09-23 Revised: 2009-11-14

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of trichostatin A (TSA) on the growth of human gastric cancer SGC-7901 cells and explore potential mechanisms involved.

METHODS: SGC-7901 cells were treated with different concentrations (0.2, 0.4 and 0.8 mg/L) of TSA for different durations (24, 48 and 72 h). Cell proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Cell cycle distribution and apoptotic rate were detected by flow cytometry. Cell ultrastructure was observed using transmission electron microscopy (TEM).

RESULTS: SGC-7901 cells were very sensitive to TSA. TSA inhibited the growth of SGC-7901 cells in a concentration- and time-dependent manner. The reduced rates of growth in cells treated with TSA at concentrations of 0.4 and 0.8 mg/L for 72 h were significantly higher than that in cells treated with TSA at a concentration of 0.2 mg/L

for the same duration ($45\% \pm 1.4\%$ and $73\% \pm 1.7\%$ vs $25\% \pm 1.2\%$, respectively; both $P < 0.05$). The reduced rates of growth in cell treated with TSA at concentrations of 0.8 mg/L for 48 and 72 h were significantly higher than that in cells treated with TSA at the same concentration for 24 hours ($37\% \pm 2.0\%$ and $73\% \pm 1.7\%$ vs $21\% \pm 1.1\%$, respectively; both $P < 0.05$). TSA could induce apoptosis of SGC-7901 cells. The ultrastructure changes in SGC-7901 cells treated with TSA included nuclear fragmentation, nuclear membrane rupture, membrane and organelle dissolution, and formation of vacuoles and apoptotic bodies.

CONCLUSION: TSA can inhibit cell growth and induce apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901 in a concentration- and time-dependent manner.

Key Words: Trichostatin A; SGC-7901 cell; Cell cycle; Apoptosis

Qiao W, Yang XD, Wang D. Trichostatin A inhibits the growth of human gastric cancer SGC-7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3611-3614

摘要

目的: 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂-曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)对胃癌细胞系SGC-7901的生长抑制作用, 证实该作用是通过促使细胞凋亡而实现的。

方法: 用不同浓度(0.2、0.4和0.8 mg/L)和不同作用时间(24、48和72 h)的TSA作用于SGC-7901细胞, 采用MTT法观察TSA对SGC-7901细胞增殖的抑制作用; 通过流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率的变化; 通过透射电镜观察细胞超微结构的变化。

结果: TSA可抑制胃癌SGC-7901细胞的生长, 且这种作用呈时间和剂量依赖关系。当TSA作用浓度分别为0.2、0.4和0.8 mg/L时, 与SGC-7901细胞均作用72 h, TSA对SGC-7901细胞生长的抑制率分别为 $25\% \pm 1.2\%$, $45\% \pm 1.4\%$ 和 $73\% \pm 1.7\%$, 各组均与TSA 0.2 mg/L组

背景资料

组蛋白去乙酰化酶导致核染色质结构更紧密, 转录因子及RNA多聚酶不容易结合靶基因, 从而抑制基因表达。因过度表达或组蛋白去乙酰化酶异常活化而导致的组蛋白乙酰化程度降低与肿瘤的发生、发展密切相关。

同行评议者

刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

研究前沿
组蛋白去乙酰化酶抑制剂可抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞分化和凋亡, 并可发挥免疫调节作用, 是近年来研究的热点, 有望成为新一代具有广泛应用前景的抗肿瘤药。

比较, 差异显著($P < 0.05$)。当0.8 mg/L TSA分别与SGC-7901细胞作用24、48和72 h, TSA对SGC-7901细胞生长的抑制率分别为 $21\% \pm 1.1\%$, $37\% \pm 2.0\%$ 和 $73\% \pm 1.7\%$, 各组均与TSA作用24 h组比较, 差异显著($P < 0.05$)。TSA可延缓细胞周期, 具有明显的诱导细胞凋亡作用。电镜下见细胞染色质凝聚成段片状, 细胞核固缩断裂, 核膜破裂, 细胞器及胞膜自溶, 凋亡小体形成。

结论: TSA通过诱导细胞周期阻止和凋亡来抑制胃癌细胞系SGC-7901的生长, 且这种作用呈时间和剂量依赖性, 为TSA用于胃癌的治疗提供理论依据。

关键词: 曲古抑菌素A; 胃癌SGC-7901细胞; 细胞周期; 凋亡

乔文, 杨晓丹, 王丹. 曲古抑菌素A对胃癌细胞生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3611-3614
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3611.asp>

0 引言

组蛋白乙酰化和去乙酰化在基因的转录调控中发挥着重要作用, 蛋白乙酰化水平由组蛋白乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶的动态平衡调节^[1]。研究发现, 组蛋白乙酰化酶和组蛋白去乙酰化酶的异常与肿瘤的发生密切相关。组蛋白去乙酰基酶抑制剂是一种新型的抗癌药物, 可抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞分化和凋亡, 并可发挥免疫调节作用^[2-4]。曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)是链霉素代谢产物, 可特异性抑制组蛋白去乙酰基酶, 对多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用^[5]。本研究主要了解TSA对胃癌细胞SGC-7901细胞的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 TSA购自Sigma公司, 溶解于二甲基亚砜(购自Sigma公司)溶液(DMSO)中, 制成浓度为3 mmol/L的TSA溶液, 保存于-80℃中备用。噻唑蓝(MTT)购自Sigma公司。RPMI-1640培养液购自美国Gibco公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃癌细胞株SGC-7901购自西安交通大学医学院细胞库。将冻存细胞解冻处理后, 加入含100 mL/L胎牛血清的RPMI-1640培养液, 在37℃, 含50 mL/L CO₂, 950 mL/L空气的饱和湿度培养箱中连续传代培养。取3-4代的细胞实验用。

1.2.2 人胃癌细胞株SGC-7901的给药处理: 将对数生长期细胞, 弃去原培养液, 加入新培养液, 用不同浓度(0.2、0.4和0.8 mg/L)的TSA, 对照组加入同等体积的DMSO, 在培养箱中继续培养不同的作用时间(24、48和72 h), 收集细胞待测。

1.2.3 SGC-7901细胞增殖抑制的测定: 按MTT法, 靶细胞 1×10^3 /孔, 接种于96孔培养皿中, 令其贴壁24 h后, 更换培养液, 同时加入TSA。分为A、B两组: A组(剂量依赖组)不同浓度(0.2、0.4和0.8 mg/L)的TSA, 均培养72 h, 对照组加入同等体积的DMSO; B组(时间依赖组), TSA 0.8 mg/L培养24、48和72 h。每孔加入MTT 100 μg, 继续孵育4 h, 弃上清, 各孔加入150 μL DMSO, 振荡20 min后, 测每孔 A_{560nm} , 按下列公式计算抑制率。抑制率 = $(1 - \text{实验孔}A_{560nm} / \text{对照孔}A_{560nm}) \times 100\%$ 。

1.2.4 细胞周期DNA检测: 采用流式细胞术。取对数生长期的SGC-7901细胞按 1×10^6 /L, 接种于6孔细胞培养板中, 实验组分别加入不同浓度的TSA, 对照组加入等量的培养液, 作用24 h后, 无菌收集细胞数目约为 5×10^9 个/L, 1200 r/min离心, 弃去培养液, PBS洗涤2次, 加入700 mL/L冷乙醇固定细胞, 4℃过夜, 吹散细胞, 再用PBS洗掉固定液, 加入碘化丙啶综合染液0.5 mL, 4℃避光, 上机检测。

1.2.5 透射电镜标本制备及观察: 收集细胞, 3%戊二醛、4℃固定2 h以上。常规脱水、浸透、包埋、超薄切片和铅-铀双重染色, JEM-2000EX透射电镜观察和照相^[6]。

统计学处理 采用SPSS11.5软件包进行配对 t 检验, 所有数据均采用mean \pm SD表示。

2 结果

2.1 SGC-7901细胞增殖抑制的测定 通过MTT检测, 结果表明TSA能够抑制胃癌细胞SGC-7901的生长, 呈明显的时间和剂量依赖性。当TSA作用浓度分别为0.2、0.4和0.8 mg/L时, 与SGC-7901细胞均作用72 h, TSA对SGC-7901细胞生长的抑制率分别为 $25\% \pm 1.2\%$, $45\% \pm 1.4\%$ 和 $73\% \pm 1.7\%$, 各组均与TSA 0.2 mg/L组比较, 差异显著($P < 0.05$)。当0.8 mg/L TSA分别与SGC-7901细胞作用24、48和72 h, TSA对SGC-7901细胞生长的抑制率分别为 $21\% \pm 1.1\%$, $37\% \pm 2.0\%$ 和 $73\% \pm 1.7\%$, 各组均与TSA作用24 h组比较, 差异显著($P < 0.05$)。

2.2 细胞周期DNA检测 发现TSA对胃癌SGC-7901细胞凋亡的诱导呈时间和剂量依赖性。凋亡细

表 1 不同条件下各实验组DNA周期分布

TSA(mg/L)	作用时间(h)	DNA周期(%)			
		G ₁	S	G ₂	AP
0.2	24	48.3	32.0	19.7	1.5
0.8	24	60.8	26.6	12.6	2.3
0.8	48	67.8	28.1	4.1	5.6
0.8	72	83.2	10.0	6.8	14.4
0	72	71.8	21.9	6.3	0.0

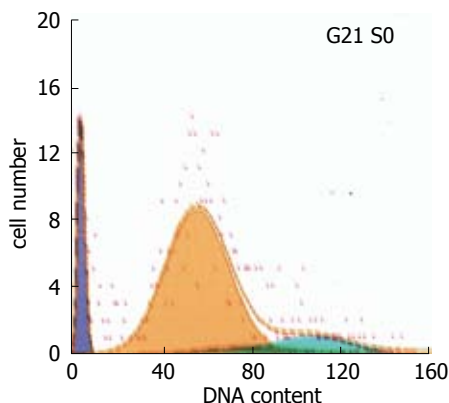


图 1 0.8 mg/L TSA作用SGC-7901 72 h细胞周期改变.

胞所形成的亚二倍体峰位于DNA周期峰群的前端. 用凋亡程序软件分析确认为凋亡峰(AP)(图1). 不同条件下个实验组DNA周期分布见表1.

2.3.2.3 TSA诱导胃癌SGC-7901细胞凋亡的超微结构改变 电镜下见核染色质降解和聚集, 形成均匀一致的细小颗粒状团块聚集于核膜处, 胞质浓缩, 凋亡小体形成, 且具有相对完整的包膜及少数结构完好的细胞器(图2).

3 讨论

肿瘤的发生发展受到许多因素的影响, 如细胞的过度增殖、分化受阻等. 近年来, 染色质结构改变与肿瘤的相关研究越来越受到人们的关注. 染色体重塑是调节基因表达和蛋白质功能的重要机制, 染色体重塑主要有两种方式: 组蛋白去乙酰化和DNA甲基化^[1]. 组蛋白乙酰化和去乙酰化在基因的转录调控中发挥着重要作用, 组蛋白乙酰化水平由组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的动态平衡调节. 组蛋白去乙酰化酶导致核染色质结构更紧密, 转录因子及RNA多聚酶不容易结合靶基因, 从而抑制基因表达. 因过度表达或组蛋白去乙酰化酶异常活化而导致的组蛋白乙酰化程度降低与

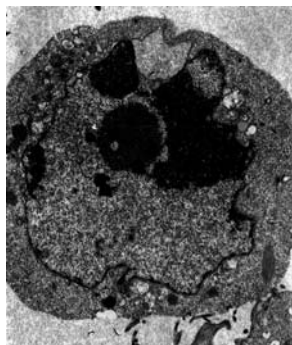


图 2 胃癌SGC-7901细胞的超微结构改变(TEM × 7500).

创新盘点
本研究观察曲古抑菌素A对于胃癌细胞系SGC7901的抑制作用和可能的作用机制, 并且从凋亡的角度解释其可能的作用机制.

肿瘤的发生、发展密切相关. 近年来研究表明, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACI)可抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞分化和凋亡, 并可发挥免疫调节作用, 是新一代具有广泛应用前景的抗肿瘤药^[2].

TSA源自链霉菌代谢产物, 最先作为抗真菌药物使用, 目前研究发现它是组蛋白去乙酰化酶的强效抑制剂, 以纳摩尔的浓度特异抑制组蛋白去乙酰化酶的活性, 对肝癌、甲状腺癌、宫颈癌、口腔癌、前列腺癌及神经母细胞瘤等肿瘤细胞具有明显的细胞毒作用, 可抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导分化或促进凋亡的作用^[3,7].

本实验研究证实TSA可以明显抑制SGC-7901细胞的生长, 具有时间和剂量依赖性. 形态学证实TSA可使细胞卷曲变圆, 细胞质浓缩, 核染色质凝聚, 边集于核膜周围, 随后出现细胞核裂解, 包含有高密度染色质的细胞核以芽生的方式从细胞膜脱落而形成多个有膜包裹、内含物不外溢的凋亡小体. 流式细胞仪分析发现TSA可使细胞的生长主要停止在G₁期, 阻止细胞由G₁期进入S期, 从而抑制细胞的生长. 同时可见在整个细胞周期的前端由于DNA断裂产生特殊的寡核苷酸片段而形成一个凋亡峰, 且成时间和剂量依赖性, 这与多项研究结果相一致^[8-11]. TSA抑制肿瘤生长和促进凋亡的机制目前尚不清楚, Zou *et al*^[12]的研究表明TSA可促进乙酰化组蛋白在肿瘤组织中的聚集, 同时, 乙酰化组蛋白H3的高表达与胃癌SGC-7901和BGC-832的凋亡有关. Lee *et al*^[13]报道肿瘤抑制因子RUNX3参与胃癌细胞的组蛋白修复. Shen *et al*^[14]研究显示组蛋白去乙酰化酶抑制剂可逆转ASSF1A基因的甲基化状态, 并可诱导它的再表达. Wu *et al*^[15]证实TSA诱导胃癌细胞凋亡是通过caspase非依赖途径.

Zhang *et al*^[16]的研究表明TSA可增加抗癌药物的敏感性. 总之, TSA有望成为胃癌治疗的一

同行评价
本文总体设计合理, 思路清楚, 实验方法成熟可靠, 实验结论可信, 讨论紧密结合所研究的内容进行, 有一定的说服力。

种新型药物。但今后还需在其作用机制上做进一步的深入研究。

4 参考文献

- 1 孟春风, 戴冬秋, 郭科军. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷和曲古抑菌素A对卵巢癌顺铂耐药细胞中hMLH1表达及DNA甲基化的影响. 癌症 2008; 27: 1251-1255
- 2 谢静, 王锋, 梅浙川. TSA对不同肝癌细胞株增殖和凋亡的作用及其对HBV复制的影响. 重庆医科大学学报 2008; 33: 1025-1028
- 3 孟春风, 戴冬秋. 组蛋白修饰与胃肠道恶性肿瘤的关系. 中国普外基础与临床杂志 2007; 14: 608-611
- 4 朱新江, 孟春风, 彭过, 戴冬秋. 5-Aza-dC和TSA对胃癌细胞系p16和hMLH-1基因甲基化水平及表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1837-1841
- 5 杨力, 徐瑞容, 宋国齐. 地西他滨联合曲古抑菌素A对MDS细胞株SKM21作用的体外研究. 中国实验血液学杂志 2008; 16: 819-882
- 6 曾林, 孙岩松, 杨晓. 透射电镜观察p21HBHBsAg/HBsAg转基因小鼠肝癌细胞凋亡. 中国实验动物学报 2008; 4: 273-275
- 7 闻晓辉, 沈美萍, 刘翠萍. 曲古抑菌素A对甲状腺未分化癌DRO细胞株生长及其端粒酶逆转录酶mRNA表达影响的研究. 南京医科大学学报 2008; 28: 1565-1568
- 8 Hauswald S, Duque-Afonso J, Wagner MM, Schertl FM, Lübbert M, Peschel C, Keller U, Licht T. Histone deacetylase inhibitors induce a very broad, pleiotropic anticancer drug resistance phenotype in acute myeloid leukemia cells by modulation of multiple ABC transporter genes. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3705-3715
- 9 Park SJ, Kim MJ, Kim HB, Sohn HY, Bae JH, Kang CD, Kim SH. Trichostatin A sensitizes human

- ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis by down-regulation of c-FLIPL via inhibition of EGFR pathway. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 1328-1336
- 10 Noro R, Miyana A, Shimokawa T, Kuribayashi H, Mizutani H, Minegishi Y, Okano T, Seike M, Soeno C, Kataoka K, Matsuda K, Yoshimura A, Gemma A. The anticancer effect of histone deacetylase inhibitors and combination with the cytotoxic agents in lung cancer cells: biological analyses for future clinical application. *J Nippon Med Sch* 2009; 76: 44-46
 - 11 郑向欣, 王建. 5-氮-2-脱氧胞苷联合曲古抑菌素A对胃癌细胞系MGC-803生物学行为的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1655-1659
 - 12 Zou XM, Li YL, Wang H, Cui W, Li XL, Fu SB, Jiang HC. Gastric cancer cell lines induced by trichostatin A. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4810-4815
 - 13 Lee SH, Kim J, Kim WH, Lee YM. Hypoxic silencing of tumor suppressor RUNX3 by histone modification in gastric cancer cells. *Oncogene* 2009; 28: 184-194
 - 14 Shen WJ, Dai DQ, Teng Y, Liu HB. Regulation of demethylation and re-expression of RASSF1A gene in gastric cancer cell lines by combined treatment of 5-Aza-CdR and NaB. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 595-600
 - 15 Wu ZQ, Zhang R, Chao C, Zhang JF, Zhang YQ. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induced caspase-independent apoptosis in human gastric cancer cell. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 2112-2118
 - 16 Zhang X, Yashiro M, Ren J, Hirakawa K. Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, increases the chemosensitivity of anticancer drugs in gastric cancer cell lines. *Oncol Rep* 2006; 16: 563-568

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》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括《世界华人消化杂志》(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. (科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

miRNA在结肠癌早期诊断和筛选中的作用

曹 锴, 狄建彬, 魏文祥, 庞 智

曹锴, 魏文祥, 苏州大学医学部细胞生物学系 江苏省苏州市 215123

狄建彬, 苏州大学苏州中药研究所 江苏省苏州市 215007

庞智, 苏州市立医院北区消化内科 江苏省苏州市 215008

作者贡献分布: 此课题由庞智选题; 资料收集由庞智与魏文祥完成; 写作过程由曹锴与狄建彬操作完成; 审校由魏文祥与庞智完成.

通讯作者: 庞智, 主任医师, 215008, 江苏省苏州市广济路242号, 江苏省苏州市立医院北区消化内科.

pangzhi0273@sina.com

电话: 0512-62363122 传真: 0512-65332028

收稿日期: 2009-10-19 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-12-18

Use of microRNAs in early detection and screening for colorectal cancer

Kai Cao, Jian-Bin Di, Wen-Xiang Wei, Zhi Pang

Kai Cao, Wen-Xiang Wei, Department of Cellular & Molecular Biology, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu Province, China

Jian-Bin Di, Suzhou Institute of Chinese Medicine, Soochow University, Suzhou 215007, Jiangsu Province, China
Zhi Pang, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (North Campus), Suzhou 215008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhi Pang, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (North Campus), 242 Guangji Road, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China. pangzhi0273@sina.com

Received: 2009-10-19 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-12-18

Abstract

Recent studies have identified unique small RNAs, called microRNAs (miRNAs), in colorectal cancer. They can be used to accurately diagnose the presence of colorectal cancer and help predict disease recurrence. Upregulation or downregulation of specific miRNAs are associated with the progression of colorectal cancer. MiRNAs are implicated in tumor metastasis and cytotoxic drug resistance in colorectal cancer. Differential expression of specific miRNAs in tissues and blood offers the prospect of their use in early detection and screening for colorectal cancer. MiRNAs may be important targets for cancer gene therapies, and their manipulation has potential in both prevention of recurrence and palliation. In this article, we will review the

potential use of these biomarkers in early detection and screening for colorectal cancer.

Key Words: MicroRNA; Colorectal cancer; Biomarker

Cao K, Di JB, Wei WX, Pang Z. Use of microRNAs in early detection and screening for colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3615-3619

摘要

miRNA(microRNA)是近年研究发现的存在于血液和结肠癌组织中的一类独特的小RNA, 他们作为生物标志可准确地诊断结肠癌, 并且能辅助预测结肠癌的复发. 特异性miRNA过表达或沉默与结肠癌的发展和演进有关, 肿瘤细胞的转移和耐药性涉及miRNA. 组织和血液中的特异性miRNA差异表达为结肠癌早期诊断和筛选提供了应用前景. miRNA在肿瘤生成中的作用表明: miRNA在缓解和防止肿瘤复发中有着潜在的重要作用, 他们可能成为肿瘤基因治疗的重要靶点. 本文主要综述了特异性miRNA在结肠癌早期诊断和筛选中的作用.

关键词: miRNA; 结肠癌; 生物标志

曹锴, 狄建彬, 魏文祥, 庞智. miRNA在结肠癌早期诊断和筛选中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(35): 3615-3619

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3615.asp>

0 引言

结肠癌是消化系主要的恶性肿瘤之一, 在发达国家高居癌症发病率第1位、死亡率第2位. 近年来, 随着我国人民生活水平的提高、饮食结构的改变、人口老龄化以及结肠癌普查的开展, 结肠癌在我国的发病率呈逐年上升的趋势, 严重威胁着人们的健康^[1]. 结肠癌患者的生存和预后取决于肿瘤的检出时间, 然而超过57%的患者确诊时癌细胞已转移. 近20年来, 对癌症研究的大量投入推动了诊治的可喜进步, 早期结肠癌患者5年生存率约为90%, 但晚期的和转移性患者的总生存率仍无明显提高, 仅为15%. 为了提

背景资料
小分子RNA(miRNA)除了在细胞中干扰靶基因的表达外, 肿瘤患者的结肠组织和血清中的也有特异性miRNA的存在, 特异性miRNA表达谱除了能够区分肿瘤和正常组织, 还能鉴别肿瘤类型, 分期和其他临床变化的特点.

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

国内外已有用RNA干扰/基因敲除技术研究某一基因功能的报道,也有用基因芯片技术研究某些基因表达谱的改变的现象,而特异性miRNA表达谱的研究开拓了新的研究途径。

高结肠癌患者的生存率,临床医生着手制定早期结肠癌的诊断标准,以粪便隐血试验(FOBT)作为主要的检查手段,检查结果与结肠镜检查阳性患者作比较。事实证明:FOBT尽管减少了结肠癌相关的死亡率^[2],却缺乏相应的便捷性、敏感性和特异性。

miRNA是一类进化保守、短小的(一般17-25 nt)单链非编码RNA^[3]。在miRNA数据库中有全面的收录,数据库记录着miRNA的命名、靶点、功能以及对不同的疾病影响;每种miRNA都有唯一的标准通用标识符,如miRNA21被命名为miR-21。miRNA在细胞中从初级miRNA转录子由核糖核酸酶Drosha及Dicer加工而成^[4],这些小分子RNA通过结合靶mRNA在翻译水平调节靶基因的表达。miRNA最早在蠕虫中被发现^[5],根据人类基因组生物信息学研究预测约有1000种miRNA的存在,迄今人类已有533种miRNA被确认^[6]。以前用基因芯片或柱杂交分析miRNA,近年来,茎-环定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)技术已成为miRNA分析的首选方法,该方法在miRNA的定性和定量分析方面具有低成本、高通量和便于检测低含量miRNA的优点。

miRNA在细胞代谢、增殖、分化和凋亡等生物学过程中发挥着重要的调节作用^[7],他们涉及病毒感染、心血管疾病、神经和肌肉失调等疾病的发生、诊断和治疗的诸多方面。miRNA在肿瘤生物学中也发挥重要的作用,包括肿瘤发生、演进、侵袭、转移和血管生成^[8]。

1 miRNA在肿瘤生物学中的作用

miRNA作为负调节因子,通过裂解或抑制靶mRNA的翻译而行使抑制功能。如果miRNA的靶mRNA被抑癌基因或原癌基因编码,那么miRNA的失调可影响到肿瘤的发生。特异性miRNA的过表达和沉默在结肠癌的发生中已有报道^[9]。成熟miRNA的过表达可能是由于编码miRNA的基因扩增造成的,而miRNA沉默/表达降低可能是其生物合成缺陷的结果。对miRNA总的影响可能牵涉所有Hanahan和Weinberg界定的癌症演进的主要标志。miR-20, miR-21, miR-17-5p, miR-15b, miR-181b, miR-191和miR-200c的过表达均涉及到结肠癌组织^[10-12]。这些肿瘤启动子miRNA通过不同的靶点抑制抑癌基因,如:E2F转录因子1(E2F transcription factor 1)、原肌球蛋白1(tropomyosin 1)^[13]、磷酸酶和张力同源基因(phosphatase and tension homologue

gene, PTEN)^[14]以及程序性细胞死亡基因4(programmed cell death gene 4, Pcd4)。结肠癌中成熟的miRNA,如miR-34a, miR-126, miR-143, miR-145和miR-342的表达量很低,表明他们或许是抑癌miRNA^[15]。抑癌miRNA的缺失可能导致癌基因过度活跃。除了确定不同的癌相关miRNA外,研究者致力于鉴别其靶基因、mRNA及受体,这种鉴别将促使miRNA在癌症治疗中的作用做更深入的研究。假定miR-145的靶点是转化生长因子受体II(transforming growth factor receptor II)和胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS-1)^[16], IRS-1作为转换有丝分裂、抗细胞凋亡和分化的信号,对他的抑制将抑制肿瘤活性。癌症演进的另一重要机制是抑癌基因的表现遗传沉默。结肠癌多种低表达miRNA存在着表现遗传变化,提示该机制可以改变抑癌miRNA的表达。

腺瘤是大部分结肠癌的前兆,从腺瘤到结肠癌的演进是一个多步骤过程,涉及不同DNA序列的畸变和基因表达的改变。相对于毗邻的正常结肠组织,腺瘤和癌内的miR-21过表达代表了早期结肠癌发生的细胞事件。有报道指出,侵袭和迁移的肿瘤细胞miRNA的表达量整体降低。PTEN抑制细胞侵袭,阻止细胞外基质金属蛋白酶(matrix metalloproteases, MMP)的表达,而miR-21通过与靶PTEN基因的结合促进了细胞侵袭和迁移^[17]。最近报道了另一条转移途径:在结肠癌中,miR-21通过下调Pcd4的表达而促进癌细胞内渗、侵袭和转移^[18]。对其他癌症的研究还证实:肿瘤转移促使miRNA在肿瘤迁移和侵袭中发挥作用^[19]。血管生成是肿瘤转移和生长的重要环节,Dews *et al*评估了miRNA在血管生成中的作用,发现不同miRNA的表达与*K-ras*和*c-myc*基因改变有关,这些基因有潜在的促血管生成的作用,而血管生成是VEGF表达增加的结果。

2 结肠组织miRNA诊断结肠癌的价值

近来研究miRNA在肿瘤诊断中的作用,是基于对miRNA表达标记,亦即miRNA表达谱的研究。miRNA表达谱是在多个肿瘤样本中不同miRNA的表达所组成的图谱。研究证明:miRNA表达谱除了能够区分肿瘤和正常组织,还能鉴别肿瘤类型,分期和其他临床变化的特点。通过系统地分析各种肿瘤和正常组织标本,根据特异性miRNA表达谱诊断为肿瘤的准确率达70%^[20]。

Cummins *et al*^[11]证实: 与正常结肠组织相比, 结肠癌有18种miRNA表达上调(其中6种miRNA表达升高10倍), 32种miRNA表达降低/沉默. 在另一研究中, 与对应的正常组织相比, I 期和II 期结肠癌分别有28种和64种的miRNA表达有差异^[21]. 近来人们认识到miR-21过表达与结肠癌分期密切相关, 通过比较miR-21在结肠癌早期患者与中期患者的表达量, 显示中期结肠癌患者的miR-21表达量比早期患者高.

不同的研究结果表明: miRNA在结肠癌及其侧翼正常组织的表达有差异, 根据与肿瘤类型及分期相关的个体miRNA的表达差异, 用一套miRNA联合检测结肠癌或许将成为有效的方法. 目前对结肠癌的诊断和分期依赖于组织学检验和放射成像. 前者取决于组织病理学家的判断, 该方法初步诊断不仅耗时, 而且对淋巴结组织学检查很容易错过微小转移, 导致切除的肿瘤不能准确分期. 后者的安全性和检查成本亦值得考虑. 基于miRNA的诊断技术, 从另一方面提供了更快速的活检初步诊断和更精确的分期, 亦不会对患者造成创伤, 能加快对结肠癌的检测, 对常规组织学检验提供有益的参考.

3 血液miRNA诊断结肠癌的价值

血液miRNA在临床上是有潜在应用价值的生物标识. 研究表明^[22]: 源于肿瘤的miRNA在血液中避开了内源性核糖核酸酶的活性, 具有相当稳定的存在形式, 这些肿瘤miRNA在血液中有足够的含量, 可以作为肿瘤的检测标志来检测. 健康人血液中的100多种miRNA已得到确认, 表达谱与结肠癌患者的几种肿瘤特异性miRNA表达谱有明显的差异. Chen *et al*^[23]证实: 相对于健康人, 结肠癌患者血清中有69种特异性miRNA的存在. 此外, 他们还证实了一组由14种血清miRNA组成的独特表达谱在结肠癌中表达, 却不在肺癌中表达. 在不同的病理生理条件下, miRNA可作为潜在的生物标记检查健康状况. 然而, miRNA却具有根据肿瘤特征重叠表达和变化的特点, 提示单一miRNA不能作为诊断标记, 但如果能基于血液建立起与健康人年龄匹配的miRNA表达谱(指纹), 不同时期的结肠癌或许能得到准确的判断. 根据miRNAs表达量与病情严重程度的相关模型, 血液miRNA的表达量或许可以预测结肠癌的时期. 此外, 根据血液检测的独特miRNA表达谱可对具有中等或高风险的肠息肉患者进行监视, 这将减少患者息肉切

除后结肠镜检查的负担.

4 miRNA监测和筛选结肠癌

通过对FOBT和结肠镜两种检查方案对晚期腺瘤的筛选灵敏度的比较: 前者仅有20%的检出率, 后者的检出率可达到100%; 结肠镜检查尽管有很高的筛选灵敏度, 却仅限于检查高危人群或FOBT阳性的疑似患者. Nnoaham *et al*分析了检查方案(FOBT加结肠镜检查)和成本预测^[24]: 假设仅用FOBT初步筛选英国中南部50万名年龄60-74岁的个体, 检出34例结肠癌要花费394 157英镑, 显然这种筛选方式不够经济, 并且筛选费用和结肠镜复查的费用还将逐年增加.

与乳腺癌检查方案(乳房X光造影法)和宫颈癌检查方案(宫颈涂片试验)相比, 结肠癌检查方案(FOBT)的一个明显的缺点就是灵敏度低^[25]. 一种普遍适用的、简单、低成本、灵敏的PCR技术检测和定量血液miRNA可能对结肠癌等癌症的筛选更为有效可靠. 基于血液miRNA检测标准一旦建立起来, 将根据成本评估和人们的接受程度用于普查需求. 随着qRT-PCR试剂盒带有RNA的提取和修饰的试剂, qRT-PCR将适用于miRNA的研究; 一般地一次qRT-PCR只需4-6 h, 多个样品能够一起处理, 结果可在24-48 h内获得; 一个血清RNA qRT-PCR分析模型显示: 当用于一样本容量为84例标本时, 每个标本的成本不到1英镑^[26]; 目前约有一半的FOBT阳性疑似患者用结肠镜复查为阴性, 更敏感的miRNA检测取代FOBT能减少结肠镜检查的阴性率. 所有这些提示了miRNA用于筛查结肠癌时优于FOBT方案. miRNA可以用于肠癌检查的各个方面, 最佳选择是在健康年检中检查血液miRNA, 阳性结果再用结肠镜鉴别.

5 miRNA预测结肠癌复发及化疗反应

手术切除对大多癌症患者(I 期和II 期)十分有效, 但是还有25%-30%患者复发. 一些患者得益于辅助性治疗, 面临的挑战是难以确定高风险II 期的肿瘤. 目前结肠癌的预后是通过切除肿瘤标本的肿瘤分期和病理检查的表型特征来决定, 然而准确地区分高风险II 期肿瘤预后的好坏不太可能; 另一方面对miRNA的研究显示: 不同miRNA, 如miR-21, miR-320, miR-498, miR-106a和miR-200c的表达量与复发相关, 可作为预后参考指标. miRNA的应用价值是作为癌症的预后和预测生物标记在Schetter *et al*的研究中

创新盘点
miRNA作为生物标记可准确地诊断结肠癌, 并且能辅助预测结肠癌的复发.

同行评价
本文选题尚可, 内容充实, 具有一定的可读性.

突显出来^[27], 他们比较了两组 II 期结肠癌及毗邻正常组织的 miRNA 表达谱, 在其中的一组: 与正常组织相比, 肿瘤组织 miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b 和 miR-203 高表达的患者存活率低. 对两组共 175 例患者分别随访 68 和 84 mo 生存分析显示: 对治疗和辅助性化疗反应性差的 II 期和 III 期的结肠癌患者, miR-21 表达量高的生存预期低. 其他研究也发现类似结果: miR-125b 和 miR-137 高表达的直肠癌患者放化疗反应较差. Schepeler *et al*^[28] 研究表明: 37 例 II 期结肠癌患者中(随访 13-148 mo), miR-320 或 miR-498 表达高的患者与表达低的相比, 存活率有着明显的差异. 当对年龄、性别、肿瘤分期、分化和组织学划分时, miRNA 可作为复发单一的预测指标. 当联合使用 17 种 miRNA 的表达谱来检测 31 例患者复发率时: 精确度为 81%, 特异性为 83%, 灵敏度为 77%. 对 110 例结肠癌患者 5 年生存分析表明: miR-106a 较低的表达水平与肿瘤分期、无瘤生存率和总生存期有关. 术后血清癌胚抗原(serum carcinoembryonic antigen, CEA) 是一种临床上广泛接受使用的预后和监测指标. 术前血清 CEA 含量在预测肿瘤化疗反应的期间无特异性, 不能作为预测指标. 基于血液的结肠癌特异性 miRNA 的发现和量化提供了一个基于血液的可变的生物标记, 当联合使用血清 CEA 时, 可准确地预测无瘤生存率和化疗反应.

6 结论

miRNA 的合成、加工和活性可以被各种与成熟 miRNA 互补的编码序列的寡核苷酸所调节^[29]. 合成的 miRNA 类似物或化学修饰的寡核苷酸能诱导 miRNA 过表达^[30]. 反之, 反义寡核苷酸和 miRNA 类似物能够使 miRNA 沉默^[31]. miRNA 治疗时可能会与内源 miRNA 存在交叉敏感性, 以及靶 miRNA 缺乏特异性, 从而产生不良反应. 建立有效的给药途径和合成毒性较低的抗-miRNA 寡核苷酸可减少这种不良反应. miRNA 在癌症中的作用是让他们成为干预治疗的重要靶点. 基因疗法可通过调节抑癌 miRNA 或启动子 miRNA 的表达, 阻止癌前病变的进程来治疗结肠癌. 这种调节可以控制肿瘤的生长率, 有作为早期和晚期癌症新疗法的潜力. 研究表明: 抑制 miR-21 和 miR-17-92 的活性与降低肿瘤的生长、侵袭、转移和血管生成相关^[18]. 针对这类 miRNA 的调节可能有助于防止高风险肿瘤的复发, 并且可以控制晚期转移性肿瘤的生长.

生长. miR-21 过表达与化疗敏感性差、疗效不佳有关^[32], 对他的抑制可以改善对化疗的反应. 一些药物能够使 miRNA 的表达改变^[33], 这证明一些因子可以逆转 miRNA 的表达, 使癌组织转为正常组织是可行的. miRNA 可能在化学预防癌症中起作用, 他们可能促使能够减少肿瘤大小和转移的新的治疗药物的发现. 尽管实验中 miRNA 的疗效看来很有希望, 他们还必须对不同患者加以验证, 才能用于临床实践.

7 参考文献

- Shike M, Winawer SJ, Greenwald PH, Bloch A, Hill MJ, Swaroop SV. Primary prevention of colorectal cancer. The WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. *Bull World Health Organ* 1990; 68: 377-385
- Hewitson P, Glasziou P, Irwig L, Towler B, Watson E. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (1): CD001216
- Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6: 60
- Birchler JA, Kavi HH. Molecular biology. Slicing and dicing for small RNAs. *Science* 2008; 320: 1023-1024
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; 75: 843-854
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D154-D158
- Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006; 11: 441-450
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866
- Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol* 2007; 171: 728-738
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-2261
- Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA Jr, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3687-3692
- Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Kornmann M, Ju J. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights* 2006; 2: 113-121
- Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282: 14328-14336
- Li L, Ross AH. Why is PTEN an important tumor suppressor? *J Cell Biochem* 2007; 102: 1368-1374
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation

- of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
- 16 Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, Linsley P, deAngelis T, Baserga R. Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 32582-32590
- 17 Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 673-677
- 18 Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008; 27: 4373-4379
- 19 Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 202-210
- 20 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838
- 21 Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, Ibeas R, Moreno J, Martinez F, Diaz T, Martinez A, Balagué O, Garcia-Foncillas J. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res* 2008; 18: 823-833
- 22 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-10518
- 23 Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006
- 24 Nnoaham KE, Lines C. Modelling future capacity needs and spending on colonoscopy in the English bowel cancer screening programme. *Gut* 2008; 57: 1238-1245
- 25 NHS. Cancer screening programmes. cited 2009-10-09; 1(1): 24 screens. Available from: URL: <http://www.cancerscreening.nhs.uk>.
- 26 Rouet F, Rouzioux C. HIV-1 viral load testing cost in developing countries: what's new? *Expert Rev Mol Diagn* 2007; 7: 703-707
- 27 Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436
- 28 Schepler T, Reinert JT, Ostenfeld MS, Christensen LL, Silahtaroglu AN, Dyrskjot L, Wiuf C, Sorensen FJ, Kruhoffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Ørntoft TF, Andersen CL. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6416-6424
- 29 Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007; 5: e203
- 30 Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-2060
- 31 Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-689
- 32 Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther* 2006; 13: 496-502
- 33 Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 2006; 66: 1277-1281

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 2009-12-18)

结直肠癌旁肿瘤沉积的研究进展

梁冀望, 王振宁, 宋永喜, 徐惠绵

背景资料
PTDs在外观上类似于转移淋巴结, 存在于结肠周围和结肠系膜脂肪组织中, 过去一些研究常将PTDs与转移淋巴结混淆在一起, 将两者等同对待。但近来对于PTDs的研究不断深入, 人们发现PTDs与淋巴结是两个不同的概念, 应区别对待, 独立研究。

梁冀望, 王振宁, 宋永喜, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001
教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NCET-06-0296
高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 200801590006
作者贡献分布: 梁冀望与王振宁对此文的贡献均等; 王振宁、宋永喜及徐惠绵共同参与本文立题。
通讯作者: 王振宁, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室胃肠肿瘤外科。
josieon826@yahoo.com.cn
电话: 024-83283555
收稿日期: 2009-09-23 修回日期: 2009-11-28
接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-18

Advances in research on pericolic tumor deposits in colorectal cancer

Ji-Wang Liang, Zhen-Ning Wang, Yong-Xi Song, Hui-Mian Xu

Ji-Wang Liang, Zhen-Ning Wang, Yong-Xi Song, Hui-Mian Xu, Department of Surgical Oncology & Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: the Program for New Century Excellent Talents in University, No. NCET-06-0296; and the Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 200801590006
Correspondence to: Professor Zhen-Ning Wang, Department of Surgical Oncology & Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. josieon826@yahoo.com.cn
Received: 2009-09-23 Revised: 2009-11-28
Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-18

Abstract

Clinical studies have shown that pericolic tumor deposits (PTDs) may develop in some patients with colorectal cancer. PTDs are different from lymph node metastases and are usually located along the perivascular, perineural or intravascular spaces. The characteristics of PTDs and their relationship with colorectal cancer prognosis have attracted wide attention. In this article, we will review the recent advances in research on PTDs in colorectal cancer with regard to their location and structural characteristics and their value in TNM staging. Moreover, we will highlight their important value in prediction of

the biological behavior and pathology of colorectal cancer, and their potential use as a parameter for evaluation of prognosis and development of individualized treatment.

Key Words: Pericolic tumor deposits; Colorectal carcinoma; Lymph node metastasis; Prognosis

Liang JW, Wang ZN, Song YX, Xu HM. Advances in research on pericolic tumor deposits in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3620-3622

摘要

结直肠癌的临床研究发现一些患者常存在结肠旁肿瘤沉积(PTDs), 他有别于淋巴结转移癌, 通常沿着血管周围, 神经周围或者血管内生长。PTDs的特性及其与预后的相关性引起了学者们的广泛关注。本文综述了PTDs的生长与组织结构特点, 在TNM分期中价值, 提示其在结直肠癌病理及生物学行为方面的重要价值, 并可能成为评估预后, 制定个体化治疗方案的指标。

关键词: 结肠旁肿瘤沉积; 结肠癌; 淋巴结转移; 预后意义

梁冀望, 王振宁, 宋永喜, 徐惠绵. 结直肠癌旁肿瘤沉积的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(35): 3620-3622
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3620.asp>

0 引言

结直肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 发病率有逐年上升的趋势^[1]。尽管近年来其早期诊断和综合治疗领域有所突破, 但死亡率仍然很高, 转移复发是其预后不良的首要原因。主要的转移形式有淋巴结和血行转移。研究发现, 转移淋巴结周围的静脉常易受到癌组织侵犯, 有时在血管周围, 神经周围或者血管内等部位癌组织会形成孤立性的肿瘤结节, 被称为结肠旁肿瘤沉积(pericolic tumor deposits, PTDs)^[2]。PTDs在外观上类似于转移淋巴结, 存在于结肠周围和结肠系膜脂肪组织中, 过去一些研究常将PTDs与

同行评议者
陈凛, 教授, 中国人民解放军总医院普通外科

转移淋巴结混淆在一起, 将两者等同对待。但近来对于PTDs的研究不断深入, 人们发现PTDs与淋巴结是两个不同的概念, 应区别对待, 独立研究。

1 PTDs的生长部位与组织结构特点

1946年, Glover和Waugh研究直肠癌淋巴引流模式时, 在一些病例中发现距离癌组织约1-2 cm的单发小结节, 起初认为是淋巴结, 但显微镜下观察发现, 他们是含有相邻血管特定区域的癌细胞。研究者认为这可能是一个完全被肿瘤组织取代的淋巴结, 或者是一个罕见的癌组织破坏血管后的产物, 但倾向于淋巴结转移。随着研究的深入, 发现这种结节的分布具有一定特殊性, 如大血管, 神经周围, 血管组织内等, 偶尔也会出现在肿瘤边缘的深层组织中。Goldstein *et al*^[3]通过连续切片方法研究了418例T3N+M0结直肠癌患者, 其中30例存在PTDs现象, 显微镜下发现PTDs作为一种存在于脂肪和纤维组织中的腺癌, 与淋巴结无关, 其特点是纤维脂肪组织中不连续的腺癌, 有些小的PTDs具有环绕恶性腺体的肉芽组织轮廓。病变的组织学生长方式均为浸润性, 多在大血管和神经周围生长。

研究普遍认为PTDs分布具有特殊性, 如原发肿瘤附近的大血管周围, 神经周围或者血管内。这从某种角度可能帮助解释PTDs与患者生存期短, 易发生腹腔内转移的相关性^[3]。具体的机制有待进一步的研究。肿瘤PTDs结节周围有时会混杂诸如淋巴结转移^[4-5]、神经浸润^[3-7]以及内脏周围脂肪的非特殊浸润等^[5-7], 显微镜下区分存在一定困难, 可能影响对观察结果的准确分析。Puppa *et al*^[8]首先报道了含有淋巴细胞的PTDs与患者生存时间缩短有关, 并认为这种情况属于一种特殊类型的淋巴结转移, 而没有淋巴细胞的PTDs则与血行转移有关, 且没有淋巴细胞的PTDs随着肿瘤的进展而增多, 其表现类似于静脉浸润。

2 PTDs的TNM分期

PTDs的来源至今仍不清楚, 如何将他们与淋巴结区分并进行恰当的分期争议颇多。有学者认为PTDs属于血管转移, 因为是沿血管壁生长并进入到周围组织中。但在病理学中归类于血管侵袭, 腺癌的直接扩散, 抑或淋巴结转移, 仍无定论^[9-10]。

第5版的TNM分期^[8,11]建议大于3.0 cm的PTDs归类于区域淋巴结转移, 小于或等于3.0 cm

的PTDs归类于不连续的T3期腺癌。这仅仅以大小为分类标准, 并非建立在大样本患者的生存数据分析基础之上^[3,12]。而新版的TNM^[11,14]分期标准对其进行了修改, 规定“若存在于原肿瘤淋巴引流区域结缔组织中的结节, 没有残余淋巴组织学证据, 形状规则平滑者作为区域淋巴结转移归于pN, 形状不规则者, 则归于pT, 或归类于V1(微观静脉侵袭)或者V2(肉眼可见), 视为静脉侵袭^[12,14]”。

Puppa *et al*采用了更多的PTDs特点作为参数进行分期, 如结节的形状, 厚度, 结节周围胶原纤维的特点, 结节内坏死或者纤维隔的发生, 并且参考了肿瘤是否浸润血管/神经相关结构等。他们认为PTDs的分期应根据结节的外形, 相关结构, 如果在血管中则归于T, 如果没有发现残存血管结构则归于N, 而不规则病变则归于M。在TNM的分期标准中充分考虑和评估PTDs的价值, 可能更好地估测预后, 制定个体化的治疗方案。

结直肠癌中有2种类型的血管受侵^[15-16]: 充填或漂浮型(filling or floating)和阻塞或浸润型(occlusive or infiltrating), 前者血管壁完整, 后者血管壁受到破坏。Sternberg *et al*认为PTDs应归类于浸润型。而Puppa *et al*在对228例III、IV期结直肠癌患者的研究中推测PTDs可能反映的是一种更具破坏性的血管壁外侵袭类型。

3 结论

PTDs是一种在结肠旁脂肪组织中存在的侵袭性腺癌, 沿着神经, 大血管周围或者血管内部生长。深入研究其形成的机制开展大样本多中心的研究探索PTDs在预后评估, TMN分期中价值和意义重大^[17]。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 郑树. 结直肠癌肿瘤基础研究与临床实践. 人民卫生出版社, 2006: 3, 327
- 3 Goldstein NS, Turner JR. Pericolonic tumor deposits in patients with T3N+MO colon adenocarcinomas: markers of reduced disease free survival and intra-abdominal metastases and their implications for TNM classification. *Cancer* 2000; 88: 2228-2238
- 4 Ono C, Yoshinaga K, Enomoto M, Sugihara K. Discontinuous rectal cancer spread in the mesorectum and the optimal distal clearance margin in situ. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 744-749; discussion 742-743
- 5 Ratto C, Ricci R, Rossi C, Morelli U, Vecchio FM, Doglietto GB. Mesorectal microfoci adversely affect the prognosis of patients with rectal cancer. *Dis*

研发前沿
PTDs的来源至今仍不清楚, 如何将他们与淋巴结区分并进行恰当的分期争议颇多。

相关报道
Goldstein *et al*通过连续切片方法研究了418例T3N+M0结直肠癌患者, 其中30例存在PTDs现象, 显微镜下发现PTDs作为一种存在于脂肪和纤维组织中的腺癌, 与淋巴结无关, 其特点是纤维脂肪组织中不连续的腺癌。有些小的PTDs具有环绕恶性腺体的肉芽组织轮廓。

同行评价

本文叙述了PTDs现象, 目前对PTDs还存在很多争议, 本文提出了结直肠癌病理分期的研究方向, 具有一定价值.

- 6 Tateishi S, Arima S, Futami K, Kawahara K, Tachikawa D, Naritomi K, Iwashita A. A clinicopathological investigation of "tumor nodules" in colorectal cancer. *Surg Today* 2005; 35: 377-384
- 7 Ueno H, Mochizuki H. Clinical significance of extrabowel skipped cancer infiltration in rectal cancer. *Surg Today* 1997; 27: 617-622
- 8 Puppa G, Colombari R, Pelosi G, Ueno H. Pericolonic tumour deposits in colorectal cancer patients: the challenge is on-going. *Histopathology* 2008; 52: 767-768; author reply 768-769
- 9 Quirke P, Williams GT, Ectors N, Ensari A, Piard F, Nagtegaal I. The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate? *Lancet Oncol* 2007; 8: 651-657
- 10 Puppa G, Perin T, Canzonieri V. Comment on: a clinicopathological investigation of "tumor nodules" in colorectal cancer. *Surg Today* 2006; 36: 944-945
- 11 Sobin LH. TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin Surg Oncol* 2003; 21: 19-22
- 12 Nagtegaal ID, Quirke P. Colorectal tumour deposits in the mesorectum and pericolon; a critical review. *Histopathology* 2007; 51: 141-149
- 13 American Joint Committee on Cancer. AJCC Comparison Guide: Cancer Staging Manual(fifth versus sixth edition) 2002: 8
- 14 Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC Cancer Staging Manual(sixth edition) 2002
- 15 Sternberg A, Amar M, Alfici R, Groisman G. Conclusions from a study of venous invasion in stage IV colorectal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2002; 55: 17-21
- 16 Ouchi K, Sugawara T, Ono H, Fujiya T, Kamiyama Y, Kakugawa Y, Mikuni J, Tatenos H. Histologic features and clinical significance of venous invasion in colorectal carcinoma with hepatic metastasis. *Cancer* 1996; 78: 2313-2317
- 17 Puppa G, Maisonneuve P, Sonzogni A, Masullo M, Capelli P, Chilos M, Menestrina F, Viale G, Pelosi G. Pathological assessment of pericolonic tumor deposits in advanced colonic carcinoma: relevance to prognosis and tumor staging. *Mod Pathol* 2007; 20: 843-855

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》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*, *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *Vd*, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

噬菌体用于治疗幽门螺杆菌感染的研究进展

万学勤, 李宏鸣, 白杨

万学勤, 李宏鸣, 佛山科学技术学院医学院 广东省佛山市 528000

白杨, 南方医科大学南方医院 广东省广州市 510515

广东省自然科学基金资助项目, No. 9152800001000022

作者贡献分布: 本文由万学勤综述; 白杨整理; 李宏鸣审校。

通讯作者: 李宏鸣, 主任医师, 528000, 广东省佛山市河滨路5号, 佛山科学技术学院医学院. l2000627@126.com

电话: 0757-82816607

收稿日期: 2009-10-31 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-18

Advances in phage therapy of *Helicobacter pylori* infection

Xue-Qin Wan, Hong-Ming Li, Yang Bai

Xue-Qin Wan, Hong-Ming Li, School of Medicine, Foshan University, Foshan 528000, Guangdong Province, China

Yang Bai, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 9152800001000022

Corresponding to: Hong-Ming Li, School of Medicine, Foshan University, 5 Hebin Road, Foshan 528000, Guangdong Province, China. l2000627@126.com

Received: 2009-10-31 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-18

Abstract

Long-term *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection is associated with a high risk of gastric cancer and peptic ulcer disease. Biological therapy is one of the most promising methods for control of *H. pylori* infection. Borrowing ideas from phage therapy of refractory bacterial infections, phages have been used to treat *H. pylori* infection. In this article, we will review the advances in phage therapy of *H. pylori* infection.

Key Words: Phage; *Helicobacter pylori*; Phage therapy

Wan XQ, Li HM, Bai Y. Advances in phage therapy of *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3623-3626

摘要

长期感染幽门螺杆菌, 潜伏着罹患胃癌及消化性溃疡等疾病的高度危险性。生物治疗是控制

幽门螺杆菌感染最有前景的方法之一。借鉴噬菌体治疗难治性细菌感染的研究, 本文综述和展望了利用噬菌体进行幽门螺杆菌治疗的相关研究。

关键词: 噬菌体; 幽门螺杆菌; 噬菌体疗法

万学勤, 李宏鸣, 白杨. 噬菌体用于治疗幽门螺杆菌感染的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3623-3626

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3623.asp>

0 引言

噬菌体是感染细菌、真菌、放线菌、螺旋体等微生物的病毒。其中毒性噬菌体能在特异性宿主菌细胞内复制增殖, 产生许多子代噬菌体, 并裂解细菌。子代噬菌体再度侵染新的宿主菌, 循环往复, 进一步杀灭宿主菌。由于噬菌体具有自然裂菌和追踪杀菌的天然性能, 且对动植物没有毒性, 很早就有噬菌体治疗的相关研究。近年来, 由于耐药菌等难治性细菌感染的问题, 噬菌体的抗菌作用再度引起关注。幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是一种重要且难治的病原菌, 如何有效地根治 *H. pylori* 感染是困扰国际医学界的难题, 噬菌体作为 *H. pylori* 治疗制剂具有良好的研发前景。

1 *H. pylori* 的危害

1.1 *H. pylori* 是胃癌的重要致病因素 *H. pylori* 是引起慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡的主要病原菌, 与胃癌、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤密切相关, 世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)已将该菌列为第 I 类致癌因子^[1]。胃癌是世界上第二大癌症死因, 是威胁人类健康最常见的恶性肿瘤, 每年新发胃癌患者达40万, 有30万人被其夺取生命^[2]。根除 *H. pylori* 可减少人群37%胃癌的发生及防止无癌前病变人群胃癌的发生, *H. pylori* 已成为胃癌一级预防的靶点^[2]。总之, *H. pylori* 作为胃癌的重要危险因素已被世人公认, 早期根除 *H. pylori* 可预防胃癌的发生。

1.2 *H. pylori* 的人群感染率高 *H. pylori* 感染率很

背景资料

H. pylori 感染率高, 早期根除 *H. pylori* 可预防胃癌的发生。目前 *H. pylori* 根除治疗方案众多, 但存在的问题也多, 寻找新的无不良反应的治疗方法, 是 *H. pylori* 根除治疗中需要解决的重要问题。

同行评议者

李振华, 教授, 中国中医科学院西苑医院消化科

研发前沿

噬菌体具有优良的抗菌性能,随着日趋严峻的抗生素耐药问题而再度引起关注。研究的热点和重点是解决制约噬菌体应用的瓶颈,比如噬菌体抗菌谱狭窄,自身具有免疫原性。噬菌体治疗人类*H pylori*面临着突破胃酸、胃蛋白酶及黏液屏障等亟待研究的问题。

高,世界上有近半数人口感染*H pylori*,在发达国家*H pylori*感染率成人30%-50%;而在发展中国家,成人感染率高达80%,10岁以下儿童感染率为50%,我国*H pylori*感染率为40%-90%,平均59%^[3]。*H pylori*感染与社会经济状况呈负相关,人群感染率,随着年龄增长而增加^[4]。而且*H pylori*感染有家庭内聚集现象,儿童普遍感染*H pylori*,炎症伴随终生^[5]。我国属于*H pylori*高感染国家,感染者超过6亿^[6]。

目前*H pylori*根除治疗方案众多,但存在的问题也多,耐药菌的形成^[7]、治疗和防止复发效果不理想等^[8-10],致使*H pylori*感染的治疗需要相应的临床指征,导致许多*H pylori*感染者得不到治疗,而长期的*H pylori*感染潜伏着罹患慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌等严重疾病的高度危险性^[11]。因此,寻找新的无不良反应的治疗方法,成为*H pylori*根除治疗中迫切需要解决的问题,生物治疗被认为是最有前景的治疗方法^[12]。在众多的生物治疗方法中,噬菌体以其独特的优势引起了关注^[13-14]。

2 噬菌体疗法的研究

2.1 噬菌体可治疗多种细菌感染 用噬菌体治疗细菌感染的方法,称为噬菌体疗法(phage-therapy)。早在20世纪30年代,就有噬菌体治疗霍乱成功的报道^[15]。时至今日,运用噬菌体治疗细菌感染研究从来没有停止过^[16-19],噬菌体人体治疗的临床病例已累计达数千例^[20]。涉及的细菌主要有^[20-21]:假单胞菌、葡萄球菌、克雷伯菌、大肠埃希菌、变形杆菌、沙门菌、志贺菌、链球菌、肠球菌、艰难梭杆菌、分枝杆菌等;应用的疾病包括^[22]:皮肤黏膜感染、肠道感染、败血症、脑膜炎、关节炎、膈下脓肿、肺部感染等;采用的方法主要为^[22]:单用噬菌体治疗,包括局部用药、口服、滴入、注射;联用双歧杆菌等益生菌口服等。

2.2 噬菌体疗法面临的挑战 噬菌体疗法的优点在于用量少,疗效好,基本没有不良反应;缺点主要是噬菌体抗菌谱狭窄,以及噬菌体作为病毒,其自身具有免疫原性。因此,虽然噬菌体具有良好的抗菌性能,但是噬菌体真正成为临床治疗细菌感染的药物,依然面临许多挑战,尚需进行大量的研究工作^[22]。

由于噬菌体大多抗菌谱狭窄,所以噬菌体在医学领域中,经典的用于细菌的分型和鉴定。但是随着宽噬菌体噬菌体的发现,以及分子水平

改造噬菌体技术的运用,噬菌体的抗菌谱狭窄问题正趋于解决。如,徐敏超^[19]从医院污水中分离、筛选获得的产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌噬菌体宽噬株 ϕ 9882,裂解谱宽,吸收率高,潜伏期短,裂解细菌能力强,能有效地治疗小鼠产ESBLs大肠埃希菌感染,无不良反应。有人分离到的沙门氏菌噬菌体,在测定其裂解谱时发现,这种噬菌体不仅可以裂解沙门氏菌,还可以裂解大肠杆菌^[20]。用宽噬性噬菌体可以治疗细菌混合感染,具有极好的临床价值,通过基因工程技术,将多种噬菌体有关裂解的关键基因片段转化入同一噬菌体中并使之表达,产生一种可以对多种细菌同时具有裂解作用的新噬菌体,具有广阔的应用前景^[21-22]。

由于噬菌体自身具有免疫原性,最安全的噬菌体治疗方法是用于皮肤和黏膜表面的细菌感染,但是,也可见噬菌体治疗动物全身性细菌感染的报道,比如,Barrow *et al*^[23]利用大肠杆菌噬菌体R对因大肠杆菌引起的鸡和牛败血症和脑膜炎进行治疗,取得成功,并没有不良反应发生;黄新 *et al*^[24]将噬菌体制成脂质体包被液的方法,对感染耐药结核菌的小鼠进行雾化吸入治疗,效果良好;李宏鸣 *et al*^[25]用分枝杆菌噬菌体辅助治疗结核性口腔溃疡取得初步疗效。

2.3 噬菌体疗法的研究方向 近年来,噬菌体疗法在国内外引起了新的关注,传染性疾病的权威及诺贝尔奖获得者Lederberg博士在PVAS的评论中指出:因耐药性细菌的出现,抗生素治疗不再像以前那样有效,应该重视噬菌体作为抗菌治疗生物制剂的研究。Everygreen噬菌体国际会议主办人指出:对于噬菌体治疗,人们存在根深蒂固的偏见,然而现有大量证据证明噬菌体确实是一个有效的治疗方法^[20]。

目前,针对传统抗生素治疗动物细菌感染时易产生药物残留,以及普遍存在的细菌耐药性等问题,噬菌体治疗更表现出许多突出的优越性。因此,目前抗菌噬菌体的研究大多针对的是耐药性细菌^[17-18],主要采用局部治疗的方式,研究对象多为动物^[26]。

噬菌体疗法研究的发展趋势:(1)筛选强裂解性的噬菌体^[20],通过采集污水、粪便等样本,分离针对某种致病菌的具有强裂解效果的噬菌体,并反复实验确定噬菌体的稳定性,再纯化以提高噬菌体的效价,确定给药方式,动物实验观察疗效等,最后制成商品化的制剂应用于临床。(2)探索拓宽噬菌体噬菌谱的方法^[27]和降低噬菌

创新盘点

有关噬菌体治疗细菌感染的相关研究国内外多见报道,但有关*H pylori*噬菌体的研究报道不多,该文从治疗*H pylori*角度综述噬菌体的治疗前景立意新颖。

体的免疫原性. 如分离、筛选野生型宽噬株, 采用人工改造噬菌体的特异性识别分子扩展宿主谱, 使用脂质体技术弱化免疫原性等^[24,28-29].

总之, 噬菌体治疗处于取得突破性进展的前夜, 有着潜在的巨大应用前景, 噬菌体可能会成为抵御难治性病菌感染的一个有力武器. 当然, 噬菌体治疗也必然存在相应的问题, 但存在问题并不排斥噬菌体治疗临床应用的可能性.

2.4 *H pylori*噬菌体的研究 Heintschel von Heinegg *et al*^[30]自行分离的*H pylori*噬菌体phage *H pylori* 1能够感染2株*H pylori*(IMMi 290/89), 经过1个溶菌周期之后可以释放出新的phage *H pylori* 1. 该phage *H pylori* 1空头直径55-60 nm, 成熟头直径50 nm, 内含长22000 bp的双股DNA, 尾长170 nm, 尾宽9.5 nm. Cao *et al*^[21]报道使用针对*H pylori*抗原的鼠源性单克隆抗体单链(ScFv)与一种丝状噬菌体(M13)的重组噬菌体, 能与*H pylori*表面抗原中的30 kDa蛋白亚基特异性结合, 在小鼠体内显示该重组噬菌体对6株*H pylori*均有杀菌作用. Matsuzaki *et al*^[31]提示噬菌体展示技术为*H pylori*感染的噬菌体疗法带来希望.

2.5 噬菌体疗法治疗*H pylori*的前景 众多的*H pylori*治疗方案均存在患者对药物的依从性差、抗生素耐药菌株不断出现、再感染的发生及药物的不良反应等问题, 因此是否治疗无症状带菌者, 成为一个两难选择. 一方面, 为了预防可能出现的不良后果, 应该对每个*H pylori*感染者进行根除治疗; 另一方面, 治疗常常难于坚持, 治愈后又面临复发, 且广泛持久的药物治疗会加速耐药菌株的产生和传播^[7]. 以至于目前国内外抗*H pylori*和根除*H pylori*治疗, 均要具备相对应的临床指征. 换句话说, 绝大多数*H pylori*感染者因为没有临床指征而得不到治疗, 而他们同样面临着罹患胃癌的高风险.

*H pylori*噬菌体为根除*H pylori*感染带来新希望. 毒性噬菌体能在宿主菌细胞内复制增殖, 产生许多子代噬菌体, 并最终裂解细菌, 而对动植物没有毒性. 由于野生型毒性噬菌体具有在宿主菌中自然扩增并破坏宿主菌, 然后随排泄物经粪-口途径自然感染他人的属性, 若采用*H pylori*毒性噬菌体治疗患者, 不仅患者自身感染的*H pylori*被噬菌体破坏得到治愈, 而且患者周围人群也可以自然感染*H pylori*噬菌体, 达到根除体内*H pylori*感染的目的. 从而, 一人使用, 多人受益. 因此, 治疗性*H pylori*噬菌体, 有望治疗大量的*H pylori*感染者. 为*H pylori*感染性疾病

患者提供一种有效、方便、实用的治疗新选择; 为数目庞大的*H pylori*无症状感染者, 提供一种不良反应的治疗新方法和治疗机会, 最终减少人群胃癌发生率.

3 结论

*H pylori*是胃癌的病因素, 根除*H pylori*感染可有效的预防胃癌. 但是*H pylori*的治疗方法虽多, 却都存在一些问题. 由于噬菌体具备追踪裂菌的抗菌性能, 在*H pylori*等难治性细菌感染的治疗和诊断中具有良好的研发前景.

4 参考文献

- 1 张红欣, 宋文刚, 郑成超. 幽门螺杆菌基因工程疫苗的研究进展. 细胞与分子免疫学杂志 2007; 23: 1099-1101
- 2 岳峰, 李艳玲, 李伟伟. 永远向前走 否定到最后 - 访中国工程院院士、第四军医大学校长、西安市科协主席樊代明. 大众科技报 2009.2.17
- 3 薛军. 抗幽门螺杆菌感染治疗进展. 中国现代医生 2008; 46: 39-40
- 4 张天哲, 张铁民, 赵丹丹, 唐桂钰. 中国人群幽门螺杆菌感染相关因素的Meta分析. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1582-1589
- 5 潘孝彰. 新发传染病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 134-136
- 6 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 47-49
- 7 潘秀珍, 彭孝纬, 彭如洁. 幽门螺杆菌对抗生素耐药研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 806-813
- 8 胡水清, 张玫. 10日序贯疗法治疗幽门螺杆菌感染39例. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1693-1695
- 9 张喜梅, 张振玉. 含左氧氟沙星、雷贝拉唑的三联方案治疗幽门螺杆菌94例. 世界华人消化杂志 2008; 16: 443-445
- 10 周俊, 张玫, 孙立东. 两种莫西沙星三联疗法对幽门螺杆菌的根除率的比较. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2887-2890
- 11 苏爱平, 许翠萍, 房晓芬, 王建春, 张太新. 幽门螺杆菌感染在慢性胃炎患者中的危险因素. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3810-3813
- 12 陈云华, 汪春莲, 申月明, 谢云, 蔡宇, 刘东. 乳酸杆菌对蒙古沙土鼠幽门螺杆菌感染性胃炎的疗效及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2922-2928
- 13 Górski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Lobočka M, Fortuna W, Letkiewicz S, Zimecki M, Filby G. Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 766-774
- 14 Housby JN, Mann NH. Phage therapy. *Drug Discov Today* 2009; 14: 536-540
- 15 孙伟, 朱春宝. 噬菌体治疗细菌感染的研究. 国外医药·抗生素分册 2005; 26: 54-69
- 16 von Bodman SB, Willey JM, Diggle SP. Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *J Bacteriol* 2008; 190: 4377-4391
- 17 Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 2765-2773
- 18 McVay CS, Velásquez M, Fralick JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse

名词解释

噬菌体: 是感染细菌、真菌、放线菌、螺旋体等微生物的病毒. 对宿主菌具有高度的专一性, 根据其侵染宿主菌后的状态和结果, 噬菌体分为两种类型: 一种能在宿主菌细胞内复制增殖, 产生许多子代噬菌体, 并最终裂解细菌, 称为毒性噬菌体; 另一种是温和噬菌体或溶原性噬菌体, 其基因组整合于宿主菌染色体中, 成为前噬菌体.

同行评价

本文选题很好, 采用噬菌体治疗幽门螺杆菌是一个不错的选择, 具有一定的可读性.

- burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1934-1938
- 26 Heo YJ, Lee YR, Jung HH, Lee J, Ko G, Cho YH. Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice and *Drosophila melanogaster*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2469-2474
- 27 Short CM, Suttle CA. Nearly identical bacteriophage structural gene sequences are widely distributed in both marine and freshwater environments. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 480-486
- 28 Verma V, Harjai K, Chhibber S. Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent. *Curr Microbiol* 2009; 59: 274-281
- 29 Abedon ST. Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne Pathog Dis* 2009; 6: 807-815
- 30 Heintschel von Heinegg E, Nalik HP, Schmid EN. Characterisation of a *Helicobacter pylori* phage (HP1). *J Med Microbiol* 1993; 38: 245-249
- 31 Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, Wakiguchi H, Imai S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* 2005; 11: 211-219
- 20 蔺红苹. 利用噬菌体进行生物防治的研究进展. 湛江师范学院学报 2007; 28: 91-94
- 21 Cao J, Sun Y, Berglindh T, Mellgård B, Li Z, Mårdh B, Mårdh S. *Helicobacter pylori*-antigen-binding fragments expressed on the filamentous M13 phage prevent bacterial growth. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1474: 107-113
- 22 万学勤, 李万可兰, 崔志新, 段穗芳, 唐冬生. 抗菌微生物及其拮抗性代谢产物的种类和应用. 中国医药生物技术 2009; 4: 137-139
- 23 Barrow P, Lovell M, Berchieri A Jr. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 294-298
- 24 黄新, 高飞絮, 常胜合. 噬菌体脂质体包被液治疗小鼠耐药结核的初步研究. 中国新药杂志 2008; 17: 482-485
- 25 李宏鸣, 万学勤, 李伟忠. 噬菌体辅助治疗结核性口腔

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》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行! (科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用

孙利兵, 杨光

孙利兵, 杨光, 南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科 江苏省苏州市 215001

苏州科技局基金资助项目, No. SS0524

作者贡献分布: 此课题由杨光设计; 研究过程由孙利兵操作完成; 本论文写作由孙利兵与杨光共同完成。

通讯作者: 杨光, 主任医师, 215001, 江苏省苏州市白塔西路16号, 南京医科大学附属苏州医院肿瘤内科。

libingmoma@gmail.com

电话: 0512-62364381

收稿日期: 2009-11-09 修回日期: 2009-11-30

接受日期: 2009-12-07 在线出版日期: 2009-12-18

Inhibitory effects of cytokine-induced killer cells on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice

Li-Bing Sun, Guang Yang

Li-Bing Sun, Guang Yang, Department of Oncology, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of Suzhou Science and Technology Bureau, No. SS0524

Correspondence to: Guang Yang, Department of Oncology, the Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, 16 Baita West Road, Suzhou 215001, Jiangsu Province, China. libingmoma@gmail.com

Received: 2009-11-09 Revised: 2009-11-30

Accepted: 2009-12-07 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of human cytokine-induced killer (CIK) cells on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice.

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from healthy volunteers by Ficoll gradient centrifugation. CIK cells were induced by culturing PBMCs in complete medium containing recombinant human interferon- γ (rhIFN- γ), anti-CD3 monoclonal antibody (CD3 mcAb), recombinant human interleukin-2 (rhIL-2), and rhIL-1. Balb/c nude mice were subcutaneously inoculated with human gastric cancer SGC-7901 cells in the logarithmic growth phase. Ten days after inoculation, 40 model mice were randomly divided into two groups: those injected with CIK cells for five days (experimen-

tal group) and those injected with NaCl solution for the same duration (control group).

RESULTS: Significant differences were noted in the weight of tumor and the survival time of mice between the experimental group and the control group (1.21 ± 0.34 g vs 2.73 ± 0.45 g, and 65.8 ± 6.2 d vs 44.3 ± 4.8 d, respectively; both $P < 0.01$). The reduced rate of tumor growth was significantly higher in the experimental group (47.6%) than in the control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: CIK cells have a strong inhibitory effect on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice and can prolong the survival time of tumor-bearing nude mice.

Key Words: Cytokine-induced killer cells; Gastric cancer; Nude Mice

Sun LB, Yang G. Inhibitory effects of cytokine-induced killer cells on the growth of human gastric cancer xenografts in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3627-3629

摘要

目的: 探讨CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用。

方法: 用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞, 给予多种细胞因子(rhIFN- γ 、CD3 mcAb、rhIL-2、rhIL-1), 诱导生成CIK细胞。培养人胃癌细胞株SGC-7901, 接种至40只裸鼠右腋下, 10 d后随机分2组, 每组20只, 分别为CIK组和对照组。连续5 d在接种肿瘤细胞部位处给予CIK细胞和生理盐水注射治疗, 观察CIK细胞对胃癌移植瘤模型的抗肿瘤疗效。

结果: CIK组胃癌肿块质量和生存期与对照组相比, 均具有显著性差异(1.21 ± 0.34 g vs 2.73 ± 0.45 g, 65.8 ± 6.2 d vs 44.3 ± 4.8 d, 均 $P < 0.01$)。裸鼠体内实验表明, CIK细胞能够显著抑制胃癌细胞的生长, 其抑瘤率可达47.6%, 明显高于对照组($P < 0.01$)。

结论: CIK细胞在裸鼠体内对人胃癌移植瘤有

背景资料

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 传统手术根治及化疗对进展期胃癌的疗效仍不理想。CIK其杀伤肿瘤细胞效应是非MHC限制性的, 具有强大的抗肿瘤活性, 而成为临床应用的一种理想效应细胞。本文应用裸鼠人胃癌模型研究CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用, 旨在为胃癌的生物治疗提供实验依据。

同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

创新盘点
虽然CIK细胞治疗恶性肿瘤具有广阔的前景,但疗效并没有达到预期的效果,改善肿瘤治疗的免疫微环境如抑制或调节共刺激信号的水平,可能是提高CIK治疗恶性肿瘤疗效的一个新策略。

应用要点
文章重点对CIK对胃癌动物模型的抗癌作用进行研究,可以为临床开展CIK生物治疗提供更多实验依据。

特异性抑瘤作用,并可以延长裸鼠生存时间。

关键词: 细胞因子杀伤细胞; 胃癌; 裸鼠

孙利兵, 杨光. CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3627-3629
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3627.asp>

0 引言

胃癌是威胁人类健康和生命的主要恶性肿瘤之一,在东亚、南美及中欧胃癌的发病率极高^[1]. 最新调查报告显示,我国目前胃癌的死亡率位列所有恶性肿瘤之首^[2]. 临床早期发现胃癌的比例不足15%,85%为进展期胃癌,此时癌组织已经浸润达到肌层或浆膜层,5年生存率仅为20%左右. 尽管治疗手段水平不断提高,但治疗效果尚不理想^[3]. 研究发现细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细胞对肾癌、乳腺癌、胃癌、大肠癌、卵巢癌等有明显的杀伤效应^[4-5]. 本研究观察了CIK细胞体外扩增过程中表型特征的变化,应用裸鼠人胃癌模型研究CIK细胞对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用,旨在为胃癌的生物治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c裸鼠40只,♀,周龄6-8 wk,体重15-20 g,由苏州大学动物实验中心提供,于无菌恒温、恒湿屏障系统内饲养,饮水均经灭菌处理. 人胃癌细胞株SGC-7901购于中国科学院细胞库. CD3McAb、rhINF- γ 、rhIL-1购于美国PeproTech公司, rhIL-2购于北京四环药业有限公司,无血清培养基AIM-V购于北京天润善达公司, Ficoll淋巴细胞分离液购于瑞典Amersham Biosciences公司,鼠抗人CD3/CD56购于美国Coulter公司.

1.2 方法

1.2.1 CIK细胞的分离、培养和鉴定: 将健康献血者抗凝外周血(苏州市中心血站提供)经Ficoll淋巴分离液梯度离心取界面层单个核细胞, PBS洗涤3次后,将细胞置于无血清培养基中,调整细胞浓度为 $1 \times 10^7/L$,加入rhINF- γ 1000 kU/L,置于37℃、50 mL/L CO₂中培养. 24 h后加入CD3McAb 100 $\mu g/L$, rhIL-2 500 kU/L, rhIL-1 100 kU/L,以后每3 d半量换液1次,补加rhIL-2 500 kU/L. 参照卫生部2003-03颁布的“人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则”. 细胞培养到第10天,取部分细胞进行细菌、霉菌的

检测. 培养14 d后,台盼蓝计数,收集培养的CIK细胞,通过流式细胞仪检测其表面标志物.

1.2.2 动物实验: 将40只Balb/c裸鼠右腋皮下接种0.2 mL $1 \times 10^9/L$ SGC-7901胃癌细胞后,再随机分成2组: CIK组和对照组. 10 d后CIK组的每只裸鼠在接种肿瘤细胞部位处注射0.2 mL $1 \times 10^{10}/L$ 的CIK细胞,对照组裸鼠注射0.2 mL生理盐水,连续注射5 d. 14 d后每组随机取12只裸鼠颈椎脱臼处死,剥离肿瘤块并称质量,计算抑瘤率,公式为: 抑瘤率 = (对照组瘤质量-实验组瘤质量)/对照组瘤质量 $\times 100\%$. 各组剩余8只动物观察生存期.

统计学处理 所有数据均使用SPSS11.0软件包进行统计学分析. 计量资料用mean \pm SD表示. 各组间采用单因素方差分析.

2 结果

2.1 CIK表型的鉴定 体外将PBMC经rhINF- γ 、CD3McAb、rhIL-2、rhIL-1诱导培养14 d后,可见细胞成团簇状生长,经流式细胞仪检测CIK细胞中CD3⁺、CD56⁺双阳性细胞(CD3⁺/CD56⁺)数量随培养时间的延长而增加. 第0天表达CD3⁺/CD56⁺的细胞占0.6% \pm 0.1%,而经细胞因子刺激的T淋巴细胞第6、10、14天表达CD3⁺/CD56⁺的细胞分别占19.4% \pm 3.1%、33.8% \pm 1.7%、40.1% \pm 2.3%($P < 0.01$).

2.2 干预后14 d各组肿瘤生长情况及抑瘤率 全部实验裸鼠在接种第7天时在接种部位均有肿瘤形成,直径为0.5-1 cm. 在CIK组,裸鼠在干预后14 d内肿瘤有所缩小,对照组所有裸鼠的肿块均增大. 解剖时发现与对照组相比,CIK组的肿瘤块较小且局限,对照组的肿瘤块大,且有肿瘤局部浸现象. CIK组和对照组裸鼠胃癌组织湿质量分别为1.21 \pm 0.34 g和2.73 \pm 0.45 g,差异具有统计学意义($P < 0.01$). CIK细胞对胃癌移植瘤生长的抑制作用明显,抑瘤率可达47.6%($P < 0.01$).

2.3 裸鼠生存期比较 CIK组动物在接种肿瘤后第60天开始有死亡,至75 d全部死亡;对照组动物从接种肿瘤后第41天开始有死亡,至52 d全部死亡. CIK组和对照组裸鼠生存期分别为65.8 \pm 6.2 d和44.3 \pm 4.8 d,差异具有统计学意义($P < 0.01$).

3 讨论

CIK细胞是人外周血单个核细胞在多种细胞因子的诱导下产生的,兼有T淋巴细胞强大的抗癌活性和自然杀伤(natural killer, NK)细胞的非

MHC限制性杀瘤优点,被认为是新一代抗肿瘤过继细胞免疫治疗的首选方案,而成为临床应用的一种理想效应细胞^[6]. CIK细胞的效应细胞是CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ T细胞为主的异质细胞群,其功能特点:选择性地杀伤肿瘤细胞、体外增殖快、杀伤活性高、抗瘤谱广、不良反应小^[7-9]. CIK细胞对靶细胞的杀伤原理可能有如下几种:(1)对肿瘤细胞的直接杀伤,主要通过两条途径发挥作用:(经淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)识别结构激活导致胞质毒颗粒依赖性的溶细胞作用;通过CIK细胞表面的CD3受体激活产生胞质毒性颗粒介导的溶细胞作用).(2)活化后产生的大量炎性细胞因子的抑瘤杀瘤作用.大量实验证明,培养的CIK细胞可以分泌多种细胞因子,能对肿瘤细胞有直接抑制作用,还可通过调节机体免疫系统反应性间接杀伤肿瘤细胞.

本实验研究发现在细胞培养过程中,随着培养时间的延长,细胞体积变大,CD3⁺/CD56⁺细胞的百分含量也明显增加,第14天表达CD3⁺/CD56⁺的细胞占40.1%±2.3%,与第0天相比差异具有统计学意义($P<0.01$). CD3⁺/CD56⁺为CIK细胞的主要表型,CIK细胞的细胞毒作用主要存在于CD3⁺/CD56⁺细胞中. CD3⁺/CD56⁺这种自身CIK细胞对自身及异基因肿瘤细胞均有杀伤作用,因此有潜在的临床研究与应用价值.我们的研究表明,CIK细胞可有效抑制胃癌细胞的生长,延长裸鼠的生存期,这表明CIK细胞适用于胃癌的过继免

疫治疗,对胃癌的临床治疗具有重要意义.在当前对肿瘤特异性抗原了解相对较少的情况下,应用CIK细胞作为胃癌手术、放疗、化疗后的辅助治疗,可能有一定的临床应用意义.

4 参考文献

- 1 Varadhachary G, Ajani JA. Gastric cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005; 3: 118-124
- 2 Archie V, Kauh J, Jones DV Jr, Cruz V, Karpeh MS Jr, Thomas CR Jr. Gastric cancer: standards for the 21st century. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57: 123-131
- 3 陈凇,李涛.胃癌综合治疗现状与进展.世界华人消化杂志 2008; 16: 571-574
- 4 束永前,张锦英,黄普文,卢凯华,朱陵君,刘平,殷咏梅,穆庆霞.细胞因子诱导的杀伤细胞与树突细胞联合治疗晚期实体肿瘤40例临床分析.南京医科大学学报 2005; 25: 747-749
- 5 蒋敬庭,吴昌平, Peter Nilsson-Ehle,邓海峰,陆明洋,李敏. CIK细胞治疗老年人中晚期胃癌的副反应分析.肿瘤 2006; 26: 950-952
- 6 Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3⁺CD56⁺ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol* 1994; 153: 1687-1696
- 7 Hongeng S, Petvises S, Worapongpaiboon S, Rerkamnuaychoke B, Pakakasama S, Jootar S. Generation of CD3⁺ CD56⁺ cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells. *Int J Hematol* 2003; 77: 175-179
- 8 Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, Edinger M, Negrin RS. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 181-187
- 9 秦斌,张筱茵.胃癌分子免疫学研究进展.世界华人消化杂志 2009; 17: 115-119

同行评价
CIK细胞在肿瘤中的作用,近年有大量的文献报道,其抑制肿瘤细胞生长的作用将可能成为免疫治疗的重要方法,是肿瘤免疫研究的热点之一.因此,该文的选题有重要的意义.

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 •

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 2009-12-18)

干扰素对肝癌细胞胸苷磷酸化酶表达和凋亡的双重影响

肖永胜, 周俭, 樊嘉, 孙绮雯, 赵燕, 薛琼, 沈卓卓, 汤钊猷

背景资料
肝细胞癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 每年有50余万新发病例, 其中50%在中国。目前化疗在肝细胞癌的综合治疗中仍有很大需求, 尤其是出现肺、骨等脏器的转移。全身应用5-氟尿嘧啶对肝癌的有效率仅约15%。

肖永胜, 周俭, 樊嘉, 孙绮雯, 赵燕, 薛琼, 沈卓卓, 汤钊猷, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所 上海市 200032
国家教育部博士点基金资助项目, No. 20030246052
上海市教委基金资助项目, No. 02JG05035
作者贡献分布: 本课题由肖永胜、周俭、樊嘉及汤钊猷设计; 研究过程由肖永胜、孙绮雯、赵燕、薛琼、沈卓卓及周俭操作完成; 数据分析由周俭及肖永胜完成; 论文写作由周俭、肖永胜及樊嘉完成。
通讯作者: 周俭, 教授, 200032, 上海市徐汇区枫林路180号, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所. zhou.jian@zs-hospital.sh.cn
电话: 021-64041990-2916
收稿日期: 2009-10-26 修回日期: 2009-12-12
接受日期: 2009-12-14 在线出版日期: 2009-12-18

Effects of interferon-alpha on thymidine phosphorylase expression and apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells

Yong-Sheng Xiao, Jian Zhou, Jia Fan, Qi-Man Sun, Yan Zhao, Qiong Xue, Zao-Zhuo Shen, Zhao-You Tang

Yong-Sheng Xiao, Jian Zhou, Jia Fan, Qi-Man Sun, Yan Zhao, Qiong Xue, Zao-Zhuo Shen, Zhao-You Tang, Liver Cancer Institute & Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, 200032, China
Supported by: the Doctoral Fund of Ministry of Education of China, No. 20030246052; and the Foundation of Shanghai Municipal Education Commission, No. 02JG05035
Correspondence to: Professor Jian Zhou, Liver Cancer Institute & Zhongshan Hospital, Fudan University, 180 Fenglin Road, Shanghai 200032, China. zhou.jian@zs-hospital.sh.cn
Received: 2009-10-26 Revised: 2009-12-12
Accepted: 2009-12-14 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of interferon-alpha (IFN- α) on thymidine phosphorylase (TP) expression and apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells.

METHODS: The expression of TP mRNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of TP protein was evaluated by immunocytochemistry. The percentage of apoptotic cells was measured by flow cytometry.

RESULTS: IFN- α upregulated the expression of TP mRNA in a dose-dependent manner in SMMC-7721 cells. IFN- α at a dose of 5000 or

10000 kU/L induced a 3-fold upregulation of TP mRNA compared to non-treated cells ($P < 0.05$). Compared with non-treated cells, the intensity of TP staining and the number of TP-positive cells significantly increased in IFN- α treated cells (5000 or 10000 kU/L). However, no significant difference was found in the percentage of apoptotic cells between IFN- α (10000 kU/L)-treated cells and non-treated cells ($6.42\% \pm 3.66\%$ vs $7.19\% \pm 2.76\%$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: IFN- α at appropriate doses may upregulate the expression of TP mRNA and protein and antagonize TP-induced inhibition of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells.

Key Words: Thymidine phosphorylase; Interferon-alpha; Apoptosis; Hepatocellular carcinoma

Xiao YS, Zhou J, Fan J, Sun QM, Zhao Y, Xue Q, Shen ZZ, Tang ZY. Effects of interferon-alpha on thymidine phosphorylase expression and apoptosis in hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3630-3634

摘要

目的: 进一步研究干扰素- α (IFN- α)对人肝癌细胞胸苷磷酸化酶(TP)表达及凋亡的双重影响。

方法: 体外分别用0、10、100、1000、5000、10000 kU/L IFN- α 处理人肝癌细胞SMMC-7721, RT-PCR检测细胞TP mRNA表达水平, 免疫细胞化学方法检测细胞TP蛋白表达变化, 流式细胞仪检测凋亡细胞百分比。

结果: IFN- α 上调SMMC-7721细胞TP mRNA表达水平, 呈现剂量依赖性。与未处理组相比, 浓度为5000、10000 kU/L的IFN- α 处理的细胞TP mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$), 而且细胞质内TP蛋白染色强度及阳性染色细胞数均较未处理组的细胞差别明显, 但不同浓度的IFN- α 对凋亡细胞百分比的影响不明显, 对照组和浓度10000 kU/L IFN- α 组的凋亡细胞百分比分别为 $7.19\% \pm 2.76\%$ 和 $6.42\% \pm 3.66\%$, 差别无统计学意义。

同行评议者
郝纯毅, 主任医师, 北京肿瘤医院
肿瘤外科

结论:一定剂量的IFN- α 既能上调肝癌细胞TP表达水平, 又能抵消TP表达上调后抑制细胞凋亡的作用。

关键词: 胸苷磷酸化酶; 干扰素- α ; 细胞凋亡; 肝癌细胞

肖永胜, 周俭, 樊嘉, 孙绮雯, 赵燕, 薛琼, 沈早卓, 汤钊猷. 干扰素对肝癌细胞胸苷磷酸化酶表达和凋亡的双重影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3630-3634
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3630.asp>

0 引言

胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP)在肿瘤组织内部催化卡培他滨等5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)的前体药物转化为有细胞毒作用的5-FU, 是5-FU前体化疗药物发挥作用的关键酶^[1]. 但TP同时能抵抗缺氧^[2]、细胞毒性化疗药物^[3]诱导的细胞凋亡. 有报道干扰素(interferon, IFN)能够上调肿瘤细胞内TP酶的表达^[4-6], 同时一定剂量的IFN又能够诱导肝癌细胞的凋亡^[7-9]. 本课题拟进一步研究干扰素- α (IFN- α)对肝癌细胞TP表达及凋亡的双重影响, 为临床联合应用IFN- α 与卡培他滨防治肝癌提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系SMMC-7721引自第二军医大学, 用含10%小牛血清的RPMI 1640培养液, 在37℃、50 mL/L CO₂的培养箱中培养和传代. 干扰素- α (IFN- α): 由罗氏公司上海分公司惠赠.

1.2 方法

1.2.1 不同浓度IFN- α 对SMMC-7721细胞TP mRNA表达水平的影响: 将对数生长期的细胞铺于6孔板, 培养24 h, 弃去原培养液, 分别加入含IFN- α 的新鲜培养液, IFN- α 的浓度分别为0、10、100、1000、5000、10000 kU/L, 继续培养24 h, 每个浓度2个孔. 利用半定量RT-PCR方法^[10]检测细胞TP mRNA表达水平, TP引物5'-ACAAGGTCAGCCTGGTCCTC-3'(forward)和5'-TCCGAACCTTAACGTCCACCAC-3'(reverse), 产生344 bp PCR产物. 内参照 β -actin引物5'-TGGGCATGGGTCAGAAGGAT-3'(forward)和5'-AAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'(reverse), 产生991 bp PCR产物. PCR反应参数: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s、60℃退火1 min、72℃延伸2 min, 35个循环后72℃再延伸10 min. PCR产物于1.7%琼脂糖凝胶电泳, 用Imagemaster

VDS system给凝胶照相, 并分析凝胶中的PCR产物. 重复上述实验3次.

1.2.2 不同浓度IFN- α 对SMMC-7721细胞TP蛋白表达水平的影响: 胰酶消化、收集IFN- α 处理的肝癌细胞, 室温, 400 g离心4 min, 弃上清. 加入1 mL PBS, 重悬细胞, 室温, 400 g离心4 min, 弃去大部分上清, 保留约50-100 μ L, 重悬细胞, 涂于载玻片上, 滴入鼠抗人TP/PD-ECGF抗体, 置于湿盒中室温孵育60 min, TBS缓冲液冲洗载玻片3次, 滴入EnVisionTM液, 置于湿盒室温孵育30 min. 涂片置新鲜配置的0.04% DAB显色液(40 mg DAB溶于TBS液70 mL中, 滴加1% H₂O₂ 30 mL)显色2-10 min. 水洗终止反应, 苏木素复染, 盐酸酒精分化, 65℃恒温烤片30 min, 二甲苯透明中性树胶封片, NIKON MICROPHOT EPI-FL显微镜观片.

1.2.3 不同浓度IFN- α 对SMMC-7721细胞凋亡水平的影响: 将上述不同浓度IFN- α 处理的肝癌细胞制成 1×10^9 个/L单细胞悬液, 离心, 弃上清, 加入2 mL预冷的柠檬酸固定30 min. 再离心, 弃上清, 加入RNase A, 37℃孵育10 min后放入冰浴中, 加入0.5 mL碘化丙锭(50 mg/L)行DNA染色. 流式细胞仪检测IFN- α 对细胞凋亡的影响^[10]. 重复上述实验3次.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件进行统计分析, $P < 0.05$ 为差别具有统计学意义.

2 结果

2.1 IFN- α 对SMMC-7721细胞TP mRNA表达水平的影响 SMMC-7721细胞应用IFN- α 处理后, TP mRNA表达水平逐渐升高, 具有剂量依赖性. 用浓度5000与10000 kU/L IFN- α 处理细胞, TP mRNA表达水平显著升高, 与未用IFN- α 处理组相比, 差别具有统计学意义($P < 0.05$, 图1).

2.2 IFN- α 对SMMC-7721细胞TP蛋白水平的影响 应用IFN- α 后, SMMC-7721细胞TP染色强度逐渐增加, TP阳性染色主要集中在细胞质中, 阳性染色细胞数目逐渐增多, 当IFN- α 浓度为5000、10000 kU/L时, TP染色强度及阳性染色细胞数均较未用IFN的细胞差别明显. IFN- α 浓度达10000 kU/L时, TP染色强度及阳性染色细胞数均达最高水平(图2).

2.3 IFN- α 对SMMC-7721细胞凋亡的影响 应用不同浓度的IFN- α 处理SMMC-7721细胞, 随着IFN- α 浓度的增加, 细胞的凋亡百分比并未发生明显变化, 浓度0和10000 kU/L IFN- α 的凋

研发前沿
对肿瘤细胞而言, 胸苷磷酸化酶(TP)是一把“双刃剑”. 肿瘤细胞TP表达水平上调, 对5-氟尿嘧啶类前体化疗药物敏感性增加, 但TP表达上调后同时具有促进血管生成、抑制细胞凋亡的不良作用. 多种细胞因子能够上调肿瘤细胞TP表达.

应用要点

深入研究IFN- α 对TP“双刃剑”作用的影响,为临床联合应用IFN- α 与卡培他滨等5-氟尿嘧啶的前体药物治疗肝细胞癌提供更多的实验依据。

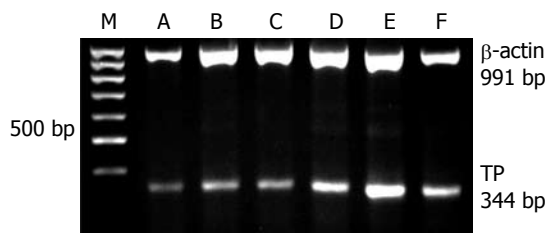


图1 不同浓度IFN- α 对SMMC-7721细胞TP mRNA表达水平的影响. M: 100 bp Marker; A: 0 kU/L; B: 10 kU/L; C: 100 kU/L; D: 1000 kU/L; E: 5000 kU/L; F: 10000 kU/L.

表1 不同浓度IFN- α 对SMMC-7721细胞凋亡的影响

IFN- α 浓度(kU/L)	凋亡细胞百分比(%)
0	7.19 \pm 2.76
10	8.51 \pm 4.04
100	7.65 \pm 1.99
1000	10.16 \pm 4.56
5000	7.70 \pm 0.09
10000	6.42 \pm 3.66

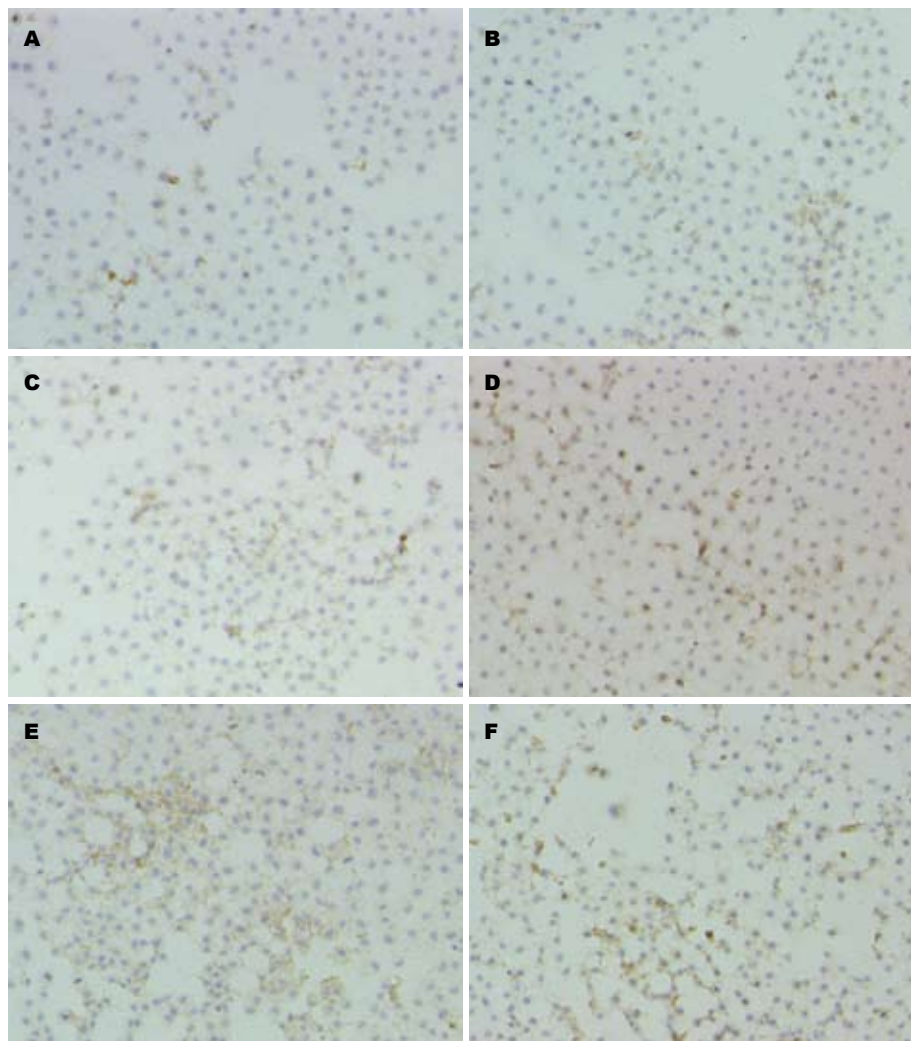


图2 不同浓度IFN- α 对SMMC-7721细胞TP蛋白表达水平的影响($\times 100$). A: 0 kU/L; B: 10 kU/L; C: 100 kU/L; D: 1000 kU/L; E: 5000 kU/L; F: 10000 kU/L.

亡细胞百分比分别为7.19% \pm 2.76%和6.42% \pm 3.66%, 差别无统计学意义(表1).

3 讨论

5-FU作为多种恶性肿瘤特别是消化系肿瘤(包括肝癌)的主要化疗药物已有40多年历史,但有效率仅15%. 卡培他滨是一个新型的氟尿嘧啶前体药,已被美国FDA批准用于紫杉醇抵抗的乳腺癌的临床治疗^[11], TP是其发挥作用的关键酶. 由于肿瘤具有异质性,如何提高TP低表达或无表

达的肿瘤对氟尿嘧啶前体药物的敏感性,是进一步提高其疗效的关键.

目前提高肿瘤组织中TP表达水平的方法包括转染TP cDNA^[12], 以提高肿瘤细胞的TP mRNA表达水平,但受转染效率、表达载体及给药途径等的限制尚不能广泛应用于临床. 另外,多种细胞因子如IL-1 α 、TNF- α 、IFN- γ 、IFN- α 都能上调TP的表达或活性^[4-6,13].

IFN- α 作用于细胞表面I型干扰素受体后,通过细胞内JAK-STAT信号通路^[4],活化TP基

因转录起始位点存在的IFN- α 激活反应元件(TP/ISRE)^[14],从而加速TP基因的转录. 本研究结果亦显示,较高浓度IFN- α 作用24 h能使SMMC-7721细胞TP mRNA表达水平升高3倍,TP染色强度及阳性染色细胞的数量在高浓度IFN- α 作用的显著增加. 同时IFN- α 还具有稳定TP mRNA的作用. TP mRNA分析表明,在其mRNA转录末端第40个核苷酸处存在与稳定mRNA的顺式反应元件^[15]同源的富含嘧啶核苷酸的序列(92%), IFN- α 可能通过影响该嘧啶核苷酸富集序列而稳定TP mRNA.

有报道指出,TP能抑制缺氧^[2]和顺铂^[3]诱导的细胞凋亡. TP通过抑制Fas蛋白介导的途径抑制细胞凋亡的发生,且TP的这一功能不受其催化活性的影响^[16]. TP抵抗细胞损伤因素诱导的凋亡至少部分受PI3K/Akt信号途径调控^[17]. 我们以前的研究表明,与未转染的细胞相比,转染TP cDNA后肝癌细胞凋亡被抑制近50%^[10]. 本实验却观察到,随着培养液中IFN- α 浓度增加,SMMC-7721细胞TP mRNA表达水平显著增加,但细胞凋亡百分比并未出现显著下降,即IFN- α 可能通过促进细胞凋亡的作用,恰好抵消了TP mRNA表达上调后对细胞凋亡的抑制作用. 结合文献分析,IFN- α 促进细胞凋亡的机制可能包括:(1)通过Fas/FasL途径起作用. IFN- α 通过上调细胞Fas和/或Fas L的表达^[18],增强细胞对Fas诱导凋亡信号敏感性^[19]. (2)自分泌TNF- α ,促进细胞凋亡^[20].

卡培他滨等5-FU的前体药物依赖肿瘤组织中的TP酶发挥选择性抗肿瘤作用,本研究结果表明,应用一定剂量的IFN- α 既能实现上调肝癌细胞TP的表达水平,又通过其自身所具有的促进细胞凋亡的作用而抵消了TP表达上调后所致的抑制细胞凋亡的作用,为IFN- α 与5-FU前体药联合应用于临床治疗肝细胞癌提供了实验依据.

4 参考文献

- 1 Bronckaers A, Gago F, Balzarini J, Liekens S. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy. *Med Res Rev* 2009; 29: 903-953
- 2 Kitazono M, Takebayashi Y, Ishitsuka K, Takao S, Tani A, Furukawa T, Miyadera K, Yamada Y, Aikou T, Akiyama S. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 797-803
- 3 Ikeda R, Furukawa T, Mitsuo R, Noguchi T, Kitazono M, Okumura H, Sumizawa T, Haraguchi M, Che XF, Uchimiya H, Nakajima Y, Ren XQ, Oiso S, Inoue I, Yamada K, Akiyama S. Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 358-363
- 4 Yao Y, Kubota T, Sato K, Takeuchi H, Kitai R, Matsukawa S. Interferons upregulate thymidine phosphorylase expression via JAK-STAT-dependent transcriptional activation and mRNA stabilization in human glioblastoma cells. *J Neurooncol* 2005; 72: 217-223
- 5 de Bruin M, Smid K, van der Ent MA, Fukushima M, Pinedo HM, Peters GJ. Upregulation of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase by interferon alpha. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004; 23: 1367-1370
- 6 Xiao YS, Tang ZY, Fan J, Zhou J, Wu ZQ, Sun QM, Xue Q, Zhao Y, Liu YK, Ye SL. Interferon-alpha 2a up-regulated thymidine phosphorylase and enhanced antitumor effect of capecitabine on hepatocellular carcinoma in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 546-550
- 7 Herzer K, Hofmann TG, Teufel A, Schimanski CC, Moehler M, Kanzler S, Schulze-Bergkamen H, Galle PR. IFN-alpha-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves promyelocytic leukemia protein and TRAIL independently of p53. *Cancer Res* 2009; 69: 855-862
- 8 Murata M, Nabeshima S, Kikuchi K, Yamaji K, Furusyo N, Hayashi J. A comparison of the antitumor effects of interferon-alpha and beta on human hepatocellular carcinoma cell lines. *Cytokine* 2006; 33: 121-128
- 9 Yano H, Ogasawara S, Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Ishizaki H, Kojiro M. Expression and activation of apoptosis-related molecules involved in interferon-alpha-mediated apoptosis in human liver cancer cells. *Int J Oncol* 2005; 26: 1645-1652
- 10 肖永胜, 汤钊猷, 樊嘉, 周俭, 刘银坤, 吴志全, 邱双健, 赵燕, 陈军. 转染胸苷磷酸化酶基因对肝癌细胞的双重影响. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 1053-1055
- 11 Blum JL, Jones SE, Buzdar AU, LoRusso PM, Kuter I, Vogel C, Osterwalder B, Burger HU, Brown CS, Griffin T. Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 485-493
- 12 Evrard A, Cuq P, Ciccolini J, Vian L, Cano JP. Increased cytotoxicity and bystander effect of 5-fluorouracil and 5-deoxy-5-fluorouridine in human colorectal cancer cells transfected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer* 1999; 80: 1726-1733
- 13 Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, Ura M, Hino A, Tanaka Y, Wada K, Ishitsuka H. Cytokines induce thymidine phosphorylase expression in tumor cells and make them more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993; 32: 333-338
- 14 Schwartz EL, Wan E, Wang FS, Baptiste N. Regulation of expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 1551-1557
- 15 Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954
- 16 Mori S, Takao S, Ikeda R, Noma H, Mataka Y, Wang

同行评价
本研究选题较好,
设计合理,具有一
定的学术价值.

- X, Akiyama S, Aikou T. Thymidine phosphorylase suppresses Fas-induced apoptotic signal transduction independent of its enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295: 300-305
- 17 Jeung HC, Che XF, Haraguchi M, Zhao HY, Furukawa T, Gotanda T, Zheng CL, Tsuneyoshi K, Sumizawa T, Roh JK, Akiyama S. Protection against DNA damage-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *FEBS Lett* 2006; 580: 1294-1302
- 18 Kaser A, Nagata S, Tilg H. Interferon alpha augments activation-induced T cell death by upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression. *Cytokine* 1999; 11: 736-743
- 19 Lee RK, Cai JP, Deyev V, Gill PS, Cabral L, Wood C, Agarwal RP, Xia W, Boise LH, Podack E, Harrington WJ Jr. Azidothymidine and interferon-alpha induce apoptosis in herpesvirus-associated lymphomas. *Cancer Res* 1999; 59: 5514-5520
- 20 Baker PK, Pettitt AR, Slupsky JR, Chen HJ, Glenn MA, Zuzel M, Cawley JC. Response of hairy cells to IFN-alpha involves induction of apoptosis through autocrine TNF-alpha and protection by adhesion. *Blood* 2002; 100: 647-653

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》修回稿须知

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

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函.内容包括:(1)保证无重复发表或一稿多投;(2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突;(3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负;(4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件;通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核核稿;(5)列出作者贡献分布;(6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信;(7)愿将印刷版和电子版出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、补充或删节时,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,须经得《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 2009-12-18)

EphA2、hMLH1、hMSH2 mRNA在新疆维吾尔及汉族食管鳞癌中的表达及意义

叶翥飞, 李惠武, 庞作良, 李卉, 田勃, 陈艳, 郭文佳, 李秀梅, 王洪江

叶翥飞, 庞作良, 田勃, 王洪江, 新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

李惠武, 李卉, 陈艳, 郭文佳, 李秀梅, 新疆医科大学基础医学院科研中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

新疆维吾尔自治区卫生厅青年科技人才专项基金资助项目, No. 2008Y02

作者贡献分布: 此课题由王洪江、李惠武及叶翥飞共同设计; 研究过程由叶翥飞操作完成; 研究过程中的指导以及设备器材由李卉、郭文佳、田勃、陈艳及李秀梅提供; 数据统计分析及论文的撰写由叶翥飞完成。

通讯作者: 王洪江, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市苏州路789号, 新疆医科大学附属肿瘤医院胸外科。

whj71210@sina.com

电话: 0991-7819910

收稿日期: 2009-08-27 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-18

Significance of EphA2, hMLH1 and hMSH2 mRNA expression in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Uygur and Han patients in Xinjiang

Biao-Fei Ye, Hui-Wu Li, Zuo-Liang Pang, Hui Li, Qing Tian, Yan Chen, Wen-Jia Guo, Xiu-Mei Li, Hong-Jiang Wang

Biao-Fei Ye, Zuo-Liang Pang, Qing Tian, Hong-Jiang Wang, Department of Thoracic Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Hui-Wu Li, Hui Li, Yan Chen, Wen-Jia Guo, Xiu-Mei Li, Scientific Research Center, School of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: the Special Fund for Young Scientists by the Health Department of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2008Y02

Correspondence to: Hong-Jiang Wang, Department of Thoracic Surgery, the Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, 789 Suzhou Road, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. whj71210@sina.com

Received: 2009-08-27 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the significance of Ephrin A2 (EphA2), human mutl homolog 1 (hMLH1) and hMSH2 mRNA expression and explore their relationship with clinicopathological parameters in esophageal carcinoma in Chinese Uygur and

Han patients in Xinjiang.

METHODS: The expression of EphA2, hMLH1 and hMSH2 mRNAs was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in esophageal carcinoma and distant non-carcinoma tissues from 30 Chinese Uygur patients and 30 Chinese Han patients.

RESULTS: The positive rate of EphA2 expression was significantly higher in esophageal carcinoma than in distant non-carcinoma tissue (71.7% vs 46.7%; $\chi^2 = 7.761$, $P = 0.005$). The differential expression rate of EphA2 was 56.7% between esophageal carcinoma and distant non-carcinoma tissue. The expression of EphA2 was correlated with the depth of invasion, lymph node metastasis and patients' nationality in esophageal carcinoma ($P < 0.05$). The positive rate of hMLH1 expression was significantly lower in esophageal carcinoma than in distant non-carcinoma tissue (63.3% vs 88.3%, $\chi^2 = 10.231$, $P = 0.001$). The differential expression rate of hMLH1 was 75.0% between esophageal carcinoma and distant non-carcinoma tissue. There was significant difference in the positive rate of hMSH2 expression between carcinoma and non-carcinoma tissue (83.3% vs 86.7%, $\chi^2 = 0.261$, $P = 0.609$). The differential expression rate of hMSH2 was 81.7% between esophageal carcinoma and distant non-carcinoma tissue. Significant correlations were noted between the expression of hMLH1 and hMSH2 and tumor stage (both $P < 0.05$). The expression of EphA2 was negatively correlated with hMLH1 and hMSH2 expression.

CONCLUSION: EphA2, hMLH1 and hMSH2 play important roles in the carcinogenesis and metastasis of esophageal cancer. Combined detection of EphA2, hMLH1 and hMSH2 expression may be used to screen for esophageal carcinoma in a high-risk population.

Key Words: Esophageal neoplasm; Squamous cell carcinoma; Mismatch repair gene; EphA2; hMLH1; hMSH2

背景资料

近年来研究显示, EphA2在多种肿瘤组织中高表达, 包括乳腺癌、肺癌、胃癌等, 进一步的研究证实 EphA2过表达促进肿瘤向恶性转化及肿瘤的浸润和转移的作用, 但 EphA2在食管癌中的研究少见报道。

同行评议者

张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

研究前沿

目前,食管癌发病机制尚不清楚.近年来随着分子生物学的快速发展,DNA损伤修复基因和信号转导通路成为研究的热点.

Ye BF, Li HW, Pang ZL, Li H, Tian Q, Chen Y, Guo WJ, Li XM, Wang HJ. Significance of EphA2, hMLH1 and hMSH2 mRNA expression in esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Uygur and Han patients in Xinjiang. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3635-3639

摘要

目的: 探讨食管鳞状细胞癌中基因EphA2与hMLH1、hMSH2 mRNA在新疆维吾尔族和汉族中的表达以及与临床病理特征之间的关系.

方法: 利用RT-PCR技术检测30例维吾尔族和30例汉族食管鳞癌组织与食管远隔无癌组织中EphA2与hMLH1、hMSH2 mRNA的表达.

结果: EphA2在癌组织和远隔无癌组织中的阳性表达率分别为71.7%和46.7%,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.761, P = 0.005$), EphA2的差异表达率为56.7%(癌组织大于远隔无癌组织), EphA2表达与浸润深度、淋巴结转移和民族有关($P < 0.05$); hMLH1在癌组织中的阳性表达率(63.3%)低于远隔无癌组织(88.3%),差异有统计学意义($\chi^2 = 9.130, P = 0.003$), hMLH1的差异表达率为75.0%(远隔无癌组织大于癌组织), hMSH2在癌组织和远隔无癌组织中的阳性表达率分别为: 83.3%和86.7%,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.261, P = 0.609$), hMSH2的差异表达率为81.7%(远隔无癌组织大于癌组织), hMLH1和hMSH2阳性表达率与临床分期有关($P < 0.05$); EphA2的表达与hMLH1、hMSH2两者之间成负相关.

结论: 基因EphA2、hMLH1、hMSH2通过不同的途径和机制共同促进食管癌的发生、发展,联合检测有望成为食管癌高发人群普查和筛查的标志物.

关键词: 食管肿瘤; 鳞状细胞癌; 错配修复基因; EphA2; hMLH1; hMSH2

叶翥飞, 李惠武, 庞作良, 李卉, 田勃, 陈艳, 郭文佳, 李秀梅, 王洪江. EphA2、hMLH1、hMSH2 mRNA在新疆维吾尔及汉族食管鳞癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17(35): 3635-3639

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3635.asp>

0 引言

食管癌是常见的消化系恶性肿瘤之一,我国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家.全世界每年新增患者约有30万人,其中一半以上来自我国^[1].流行病学调查显示,新疆是我国食

管癌的高发区之一.目前,食管癌的发病机制尚不清楚.近年来随着分子生物学的快速发展,DNA损伤修复基因和信号转导通路成为研究的热点.本研究通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对30例新疆维吾尔族和30例汉族食管鳞癌组织及其对应的远隔无癌组织中EphA2和hMLH1、hMSH2的mRNA表达情况进行检测并分析其意义.

1 材料和方法

1.1 材料 60例食管鳞癌组织标本取自2008-01/2009-05新疆医科大学附属肿瘤医院手术切除标本,维吾尔族和汉族各30例,男43例,女17例,年龄36-75(中位62)岁.60例全部为鳞癌,所有病例术前均未行放疗、化疗.所有标本在离体后30 min内迅速取材,每例标本均取癌组织及远端6 cm以上的远隔无癌组织两部分置于液氮罐中,然后放于-70℃冰箱中保存.

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA的提取: 取约0.1 g组织,加入1 mL预冷的TRIzol提取液,在玻璃匀浆器充分匀浆,其余步骤严格按TRIzol RNA提取试剂盒说明书进行,再用紫外分光光度计检测RNA的含量及纯度,所得RNA溶解于50 μ L DRPC处理水中.

1.2.2 RT-PCR检测: 经过逆转录后再以cDNA为模板扩增. PCR操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,主要引物序列见表1,主要扩增片段大小分别为: EphA2为204 bp, hMLH1为400 bp, hMSH2为279 bp, GAPDH: 300 bp. 总体系为20 μ L, 其中Taq酶缓冲液10 μ L, 上下游引物各1 μ L, Mg^{2+} 0.4 μ L, 模板cDNA 2 μ L, 剩余用水补至20 μ L, 混合离心后30 s, 取出混匀后的反应体系置于PCR仪中进行扩增,循环次数为35次,扩增产物取6 μ L在20 g/L琼脂糖进行凝胶电泳,在凝胶成像仪上照相和测定分析.

统计学处理 所有数据均经SPSS13.0统计软件进行统计学处理,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 RT-PCR 与标准Marker相比, 在204、279和400 bp处可见明显亮带,与预期目的片段大小一致(图1).

2.2 食管鳞癌中EphA2、hMLH1、hMSH2 mRNA表达 在60例食管鳞癌患者的癌组织和远隔无癌组织中, EphA2在两组织中表达差异有统

表 1 实验引物序列				
基因	上游引物		下游引物	退火温度(℃) 循环次数
EphA2	5'-ATCCTCGTCAACAGCAAC-3'		5'-GGTCATCACCTCCCACAT-3'	60 35
hMLH1	5'-GCTTGCCTTAGATAGTCCAG-3'		5'-GACAATGTGTTCCACAGTCC-3'	57 35
hMSH2	5'-ACGATGGATTTGGGTTAG-3'		5'-CCAGGGCTTTCTGTTTAG-3'	56 35
GAPDH	5'-CGCGGGCTCTCCAGAACATCAT-3'		5'-CCAGCCCCAGCGTCAAAGGTG-3'	59 35

表 2 食管鳞癌中EphA2、hMLH1、hMSH2 mRNA表达情况与病理特征之间的关系										
项目	n	EphA2 n(%)	χ^2 值	P值	hMLH1 n(%)	χ^2 值	P值	hMSH2 n(%)	χ^2 值	P值
正常组织	60	28(46.7)	7.761	0.005	53(88.3)	9.130	0.003	52(86.7)	0.261	0.609
癌组织	60	43(71.7)			39(65.0)			50(83.3)		
民族										
汉族	30	17(56.7)	6.648	0.010	23(76.7)	3.590	0.058	26(86.7)	0.480	0.488
维族	30	26(86.7)			16(53.3)			24(80.0)		
浸润深度										
T1+T2	11	5(45.5)	4.558	0.033	8(72.7)	0.354	0.552	8(72.7)	1.091	0.296
T3+T4	49	38(77.6)			31(63.3)			42(85.7)		
分期										
+ a	20	15(75.0)	0.164	0.685	18(90.0)	8.242	0.009	20(100.0)	6.000	0.014
b+	40	28(70.0)			21(52.5)			30(75.0)		
分化程度										
高分化	16	11(68.8)	0.091	0.762	8(50.0)	2.158	0.142	12(75.0)	1.091	0.296
中-低分化	44	32(72.7)			31(70.5)			38(86.4)		
淋巴结转移										
是	35	31(88.6)	11.822	0.001	22(62.9)	0.170	0.681	27(77.1)	2.318	0.128
否	25	12(48.0)			17(68.0)			23(92.0)		

表 3 基因EphA2与hMLH1、hMSH2之间的关系					
基因	EphA2		χ^2 值	P值	
	+	-			
HMLH1	+	23	8.840	0.003	
	-	20			
hMSH2	+	39	5.926	0.015	
	-	4			

计学意义($\chi^2 = 7.761, P = 0.005$), 其差异表达率为56.7%(癌组织大于远隔无癌组织); hMLH1在两组织中表达差异有统计学意义($\chi^2 = 10.231, P = 0.001$), 其差异表达率为75.0%(远隔无癌组织大于癌组织); hMSH2在两组织中的表达差异无统计学意义($\chi^2 = 0.261, P = 0.609$), 其差异表达率为81.7%(远隔无癌组织大于癌组织); EphA2表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移和民族有关, 而与分期、分化程度无关; hMLH1、hMSH2的表达均与食管癌的临床分期有关, 而与浸润深度、分化程度、淋巴结转移及民族无关(表2).

相关报道
徐峰 *et al* 研究结果显示, 19例正常食管上皮中, EphA2蛋白的阳性表达6例(31.6%), 173例食管鳞癌中EphA2蛋白的阳性表达140例(80.9%), 两者具有显著性差异.

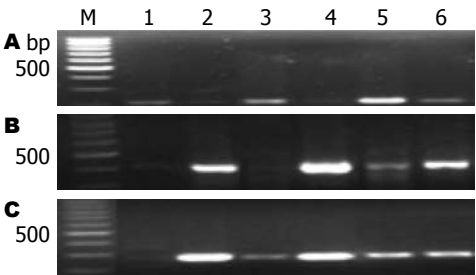


图 1 肿瘤组织与食管远隔组织表达. A: EphA2; B: hMLH1; C: hMSH2; 1、3、5表示肿瘤组织标本, 2、4、6表示与1、3、5对照的远隔无癌组织标本.

食管鳞癌中EphA2、hMLH1、hMSH2 mRNA三者表达之间的关系(表3).

3 讨论

在外界的刺激信息传递给细胞核并转化成细胞效应的信号转导通路过程中, 具有酪氨酸激酶活性的受体(RTKs)起着重要作用. Eph(erythropoietin producing hepatomacellular)是RTKs家族成员之一, EphA2是EphA亚家族受体14个成员

同行评价
本研究选题较好,
设计合理,结果可
靠,学术价值较好.

中的第2个,也是Eph亚家族成员中被发现的具有酪氨酸酶活性的第1个基因编码产物,其广泛表达于人的多种组织或细胞系中,包括皮肤、肺脏、肠道上皮细胞和卵巢组织等.正常上皮细胞EphA2与配体结合,导致自身及下游大量底物酪氨酸磷酸化,从而调节细胞增殖及分化,促进胚胎发育.在癌细胞中,主要以非磷酸化状态存在.近年来研究显示,EphA2在多种肿瘤组织中高表达,包括乳腺癌、肺癌、胃癌等,进一步的研究证实EphA2过表达促进肿瘤向恶性转化及肿瘤的浸润和转移的作用^[2-4],但EphA2在食管癌中的研究少见报道.

本研究应用RT-PCR方法对食管癌组织和食管远隔无癌组织中EphA2 mRNA的表达进行检测,结果显示,EphA2在食管癌组织和远隔无癌组织中均有表达,但EphA2 mRNA在癌组织中的表达明显高于远隔无癌组织($P = 0.002$),而且癌组织大于远隔无癌组织的差异表达率为56.7%,提示EphA2有双重调节作用,一方面参与了正常食管细胞的生长发育,另一方面作为一种重要的致癌基因促进了食管癌的发生和发展.在肿瘤组织中,过表达的EphA2不能与配体很好的结合,丧失了对肿瘤细胞生长和迁移的负调节作用,削弱了肿瘤细胞之间的黏附,并增强细胞与细胞外基质的黏附,破坏细胞骨架的稳定性,导致细胞失控性生长而形成肿瘤,以及运动无规则导致肿瘤细胞的侵袭、浸润、甚至转移的发生.有关食管癌中EphA2表达的国内研究也有报道,徐峰 *et al*^[5]研究结果显示,19例正常食管上皮中,EphA2蛋白的阳性表达6例(31.6%),173例食管鳞癌中EphA2蛋白的阳性表达140例(80.9%),两者具有显著性差异($P < 0.05$).研究发现EphA2 mRNA的表达在食管癌组织和其正常黏膜中未见显著性差异,但其蛋白在食管癌组织中的表达明显高于其正常黏膜,EphA2的mRNA水平和蛋白表达水平不完全一致^[6],这可能与转录后的不协调有关.本研究中食管鳞癌EphA2的表达与民族、临床分期和淋巴结转移有关,临床分期越晚,EphA2的阳性表达率越高;淋巴结转移阳性者明显高表达于淋巴结转移阴性者($P = 0.020$),表明EphA2与食管鳞癌的侵袭转移有关,其过表达提示恶性程度高,分期晚,易发生远处转移.维吾尔族EphA2高表达于汉族,提示EphA2在两民族中的表达可能具有差异性,希望通过以后的大样本研究使其成为高发区食管癌普查和筛查的生物学标志物.

DNA损伤在细胞增殖的过程中是一种比较普遍的现象,但是遗传信息得以能够完整稳定的代代相传,依赖于生物进化过程中形成的一套十分有效的DNA损伤修复系统.hMLH1和hMSH2是错配修复(mismatch repair, MMR)基因系统中的重要成员^[7],之所以说重要是因为二者在错配修复过程中起主要作用.hMSH2在一开始就参与了错配碱基位点的识别,hMLH1则是在中间过程中特定的结合到前者识别的错配位点,整个过程两者既联系又独立,任一基因出现问题,均会导致错配修复的失败.DNA修复能力低下与癌症风险增高相关.在散发性大肠癌、胃癌、肝癌、肺癌、乳癌、卵巢癌及子宫内膜癌等肿瘤中,均存在错配修复系统的异常^[11],常常表现为hMLH1和(或)hMSH2基因表达上调或下调.如在食管癌中,常常由于错配修复基因的突变、缺失引起蛋白表达的水平降低^[8],研究在口腔鳞癌^[9]、大肠癌^[10]等恶性肿瘤中亦有相同结果.而另一些研究表明,肺癌、膀胱癌及胃癌等hMLH1和hMSH2基因表达出现增多的现象^[11-12].目前的研究多集中于蛋白水平,本研究采用RT-PCR方法,在食管鳞癌组织和食管远隔无癌组织中对这2个基因的mRNA水平进行检测,结果显示,癌组织中hMLH1的表达水平低于远隔组织,而hMSH2在两组织中的表达无差异,但是在研究远隔无癌组织较癌组织的差异表达率时发现,两者均有很高的比率,并且早期(I+II a)患者明显高表达于中晚期(II b+III),提示hMLH1在食管癌的发生过程中起主导作用,同时hMLH1和hMSH2基因的突变在早期即参与了食管鳞癌的发生和发展.究竟是什么引起该基因的突变呢?已有不少研究证实^[13-14],启动子甲基化是重要原因.

通过分析,EphA2与hMLH1、hMSH2两者之间成负相关,他们通过不同的途径和机制共同促进食管癌的发生以及浸润和转移.在临床工作中通过联合检测EphA2和hMLH1、hMSH2三者的表达情况,尤其是在食管癌的高发人群,如新疆哈萨克族和维吾尔族人群,希望能成为普查和筛查的生物学标志物,同时联合检测有望成为食管癌早期诊断、判断预后及预测远处转移的分子标志物之一.

4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543
- 2 Abraham S, Knapp DW, Cheng L, Snyder PW,

- Mittal SK, Bangari DS, Kinch M, Wu L, Dhariwal J, Mohammed SI. Expression of EphA2 and Ephrin A-1 in carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 353-360
- 3 Wu D, Suo Z, Kristensen GB, Li S, Troen G, Holm R, Nesland JM. Prognostic value of EphA2 and EphrinA-1 in squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 312-319
- 4 Nasreen N, Mohammed KA, Antony VB. Silencing the receptor EphA2 suppresses the growth and haptotaxis of malignant mesothelioma cells. *Cancer* 2006; 107: 2425-2435
- 5 徐峰, 李娅, 袁丽, 李继昌, 索振河, Jahn M. Nesland. 食管鳞状细胞癌组织中EphA2和EphrinA1的表达. 郑州大学学报(医学版) 2008; 43: 422-425
- 6 郝宝岚, 李珊珊, 张红燕, 闫爱华, 任秀花. EphA2基因在食管癌组织中的表达及其意义. 中国肿瘤临床 2006; 33: 555-558
- 7 Ellison AR, Lofing J, Bitter GA. Human MutL homolog (MLH1) function in DNA mismatch repair: a prospective screen for missense mutations in the ATPase domain. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 5321-5338
- 8 Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Kurokawa T, Murakami S, Fukunaga A, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H, Murakami Y, Shichinohe T, Kawarada Y, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. Deficiency of hMLH1 and hMSH2 expression is a poor prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 92: 109-115
- 9 谷建琦, 张英怀, 董青, 贾志宇. hMLH1、hMSH2蛋白在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义. 北京口腔医学 2007; 15: 87-90
- 10 Chialina SG, Fornes C, Landi C, de la Vega Elena CD, Nicolorich MV, Dourisboure RJ, Solano A, Solis EA. Microsatellite instability analysis in hereditary non-polyposis colon cancer using the Bethesda consensus panel of microsatellite markers in the absence of proband normal tissue. *BMC Med Genet* 2006; 7: 5
- 11 Srivastava T, Chattopadhyay P, Mahapatra AK, Sarkar C, Sinha S. Increased hMSH2 protein expression in glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2004; 66: 51-57
- 12 李梅, 刘丽娜, 王朝晖, 王丽宏, 刘志敏, 许国旺, 吕申. 错配修复蛋白hMSH2、hMLH1表达在胃癌发生中的作用及临床意义. 中国肿瘤临床 2007; 34: 1396-1399
- 13 Tzao C, Hsu HS, Sun GH, Lai HL, Wang YC, Tung HJ, Yu CP, Cheng YL, Lee SC. Promoter methylation of the hMLH1 gene and protein expression of human mutL homolog 1 and human mutS homolog 2 in resected esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1371
- 14 吴安城, 刘希双, 杨堃. 错配修复基因hMLH1甲基化与胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1407-1411

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

TFF3在贲门肠化组织中的蛋白表达及其与癌变的相关性

冯笑山, 郝曙光, 王立东, 高社干, 王公平, 侯建峰, 茹艺, 陈强

背景资料
贲门癌因其独立的流行病学特征近年来作为独立性疾病而研究, 贲门肠化与癌变的相关性至今仍是研究热点。三叶因子是一群主要由胃肠道黏膜细胞分泌的小分子多肽, 在黏膜修复与重建及肿瘤的发生、发展过程中发挥了重要的作用。因此, 对贲门肠化组织中TFF3蛋白的监测有助于阐明贲门肠化与癌变的相关性, 还能为进一步开展贲门癌的诊断和治疗提供重要的理论依据。

冯笑山, 郝曙光, 高社干, 王公平, 侯建峰, 茹艺, 陈强, 河南科技大学第一附属医院肿瘤科 河南科技大学肿瘤研究所 河南省洛阳市 471003
王立东, 河南省食管癌重点开放实验室 河南省郑州市 450052
河南省医学科技攻关基金资助项目, No. 20090110
作者贡献分布: 冯笑山和郝曙光对此文所作贡献均等; 此课题由冯笑山、高社干及郝曙光设计; 研究过程有郝曙光、王公平、侯建峰、茹艺及陈强操作完成; 数据分析有郝曙光及王公平完成; 本论文写作有郝曙光、冯笑山及王立东完成。
通讯作者: 冯笑山, 教授, 471003, 河南省洛阳市, 河南科技大学第一附属医院肿瘤科, 河南科技大学肿瘤研究所。
samfeng137@hotmail.com
电话: 0379-64830548
收稿日期: 2009-09-27 修回日期: 2009-11-14
接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-12-18

Relationship between TFF3 expression and gastric cardiac carcinogenesis

Xiao-Shan Feng, Shu-Guang Hao, Li-Dong Wang, She-Gan Gao, Gong-Ping Wang, Jian-Feng Hou, Yi Ru, Qiang Chen

Xiao-Shan Feng, Shu-Guang Hao, She-Gan Gao, Gong-Ping Wang, Jian-Feng Hou, Yi Ru, Qiang Chen, Department of Oncology, Cancer Research Institute, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China
Li-Dong Wang, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: the Key Medical Science and Technology Program of Henan Province, No. 20090110
Correspondence to: Professor Xiao-Shan Feng, Department of Oncology, Cancer Research Institute, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China. samfeng137@hotmail.com
Received: 2009-09-27 Revised: 2009-11-14
Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To explore the relationship between the expression of trefoil factor 3 (TFF3) protein and the evolution of gastric cardiac adenocarcinoma.

METHODS: The streptavidin-peroxidase immunohistochemistry method was used to detect TFF3 protein expression in 24 cardiac gastritis specimens, 52 intestinal metaplasia specimens, 65 specimens of intestinal metaplasia with dysplasia and 35 gastric cardiac adenocarcinoma specimens from a high incidence area of gastric

cardiac adenocarcinoma in Henan.

RESULTS: TFF3 protein is predominantly expressed in the striated border of the columnar cells in cardiac gastritis and intestinal metaplasia tissues, and in the cytoplasm in dysplasia and carcinoma tissues. The positive rates of TFF3 protein in cardiac gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia, and carcinoma tissues were 20.8%, 44.2%, 46.2% and 54.3%, respectively. The expression of TFF3 was correlated well with the pathological grade of the lesions ($r = 0.232$, $P < 0.05$). The location of TFF3 expression was correlated with the pathological types of the lesions ($Kappa = 0.490$).

CONCLUSION: Overexpression of TFF3 protein in the cytoplasm is involved in gastric cardiac carcinogenesis and might be one of important risk factors for gastric cardiac adenocarcinoma.

Key Words: Gastric cardia; Intestinal metaplasia; Immunohistochemistry; Trefoil factor 3

Feng XS, Hao SG, Wang LD, Gao SG, Wang GP, Hou JF, Ru Y, Chen Q. Relationship between TFF3 expression of T and gastric cardiac carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3640-3643

摘要

目的: 探讨TFF3蛋白在贲门肠化及肠化伴不典型增生组织中的表达与贲门癌变的相关性。

方法: 采用免疫组织化学SP法, 检测河南贲门癌高发区贲门炎组织24例、肠化组织52例、肠化伴不典型增生组织65例及贲门癌组织35例中TFF3蛋白的表达变化。

结果: 在贲门炎及肠化组织中, TFF3蛋白主要表达在柱状细胞的纹状缘, 肠化伴不典型增生及癌变组织中, 主要表达在细胞质中。TFF3蛋白在贲门炎、肠化组织、肠化伴不典型增生及癌变组织中的阳性表达率分别为20.8%、44.2%、46.2%和54.3%, 贲门黏膜组织从正常至不典型增生再至癌变这一过程与TFF3表达阳性率呈正相关($r = 0.232$, $P < 0.05$)。

同行评议者
王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

TFF3蛋白表达的位点与病理类型相关(Kappa = 0.490).

结论: TFF3蛋白在细胞质中的过表达参与了贲门癌变过程, 有可能成为贲门组织早期癌变的预警分子.

关键词: 贲门; 肠上皮化生; 免疫组织化学; 三叶因子

冯笑山, 郝曙光, 王立东, 高社干, 王公平, 侯建峰, 茹艺, 陈强. TFF3在贲门肠化组织中的蛋白表达及其与癌变的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3640-3643
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3640.asp>

0 引言

在贲门癌发生之前贲门黏膜发生的不同病理变化称之为贲门黏膜的癌前期病变, 肠化是其中重要的一个病变环节, 深入对贲门肠化的研究有助于明确贲门肠化和癌变发生的关系, 发现癌变的预警分子, 为贲门癌的早期预防诊断提供理论依据, 并为进一步研究贲门癌的演进过程中的具体机制提供线索. TFF3蛋白是三叶因子家族(trefoil factors, TFFs)中的一员, 正常情况下仅在大肠上皮黏膜中高表达^[1-2], 然而以往的研究表明TFF3蛋白对胃黏膜的肠化组织也具有偏爱性^[3-4]. 本试验利用兔多克隆TFF3蛋白抗体对贲门各级病变组织进行检测, 初步探讨TFF3蛋白在贲门肠化及其癌变中的作用及意义.

1 材料和方法

1.1 材料 入组标本均来自河南贲门癌高发区林州地区, 共计176例组织. 其中贲门炎组织24例, 男16例, 女8例, 平均年龄 47.5 ± 12.3 岁; 贲门肠化组织52例, 男38例, 女14例, 平均年龄 55.2 ± 11.1 岁; 贲门肠化伴不典型增生组织65例, 男47例, 女18例, 平均年龄 60.4 ± 7.7 岁; 贲门癌组织35例, 男26例, 女9例, 平均年龄 59.4 ± 9.3 岁. 患者术前均未接受放疗和化疗. 所有组织均经850 mL/L乙醇固定, 常规石蜡包埋. 一抗TFF3蛋白购自北京博奥森生物技术有限公司(兔源多克隆抗体, bs-0535R, 工作浓度1:150); SP试剂盒, DAB显色剂均购自福州迈新公司.

1.2 方法

1.2.1 组织制作: 每个石蜡包埋的组织标本连续切4张(4 μ m厚), 每个组织的第1张及最后1张常规HE染色, 以重新核实病理诊断并确保病变存在. 第2张做TFF3蛋白组织化学染色, 另一张备用.

1.2.2 免疫组织化学: 严格按照SP试剂盒标准步骤进行. 操作流程均在室温中进行, 同时为排除实验中的假阳性和假阴性, 每次组织化学染色均包含已知阳性片为阳性对照和PBS液代替一抗设为阴性对照.

1.2.3 结果判定: 采用双盲法, 有两名病理学专家独立观察, 计数相差10%以上重新计数, 染色结果采用半定量积分的方法, 先在低倍镜下观察, 然后在400倍高倍镜下随机计数5个视野, 染色面积分为0(0%), 1(0%-25%), 2(25%-50%), 3(50%-75%), 4(75%-100%)5个级别; 同时将染色强度分为0(蓝色), 1(淡黄色), 2(棕色), 3(深棕色)4个级别. 根据染色面积和强度的乘积, 得出以下结论: 阴性(0), +(<4), ++(4-8), +++(8-12).

统计学处理 采用SPSS15.0软件包数据分析, 定性变量分析采用 χ^2 检验或者Fisher确切概率检验法; 两个病理专家对结果的判读采用Kappa一致性检验; 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 TFF3蛋白在贲门各级病变组织中表达的形态学特点 在贲门炎组织中, TFF3蛋白主要表达在柱状细胞的胞质腔缘侧(纹状缘), 染色强度以淡黄色为主(图1A); 贲门肠化组织中, TFF3蛋白主要表达在杯状细胞和柱状细胞的纹状缘, 也见于杯状细胞的细胞质中, 染色以淡黄色和棕色为主(图1B); 不典型增生组织中, TFF3蛋白主要表达在杯状细胞和柱状细胞的细胞质中, 染色以棕色和深棕色为主(图1C); 贲门癌组织中, TFF3蛋白主要表达在癌细胞的细胞质中, 染色以棕色为主(图1D).

2.2 TFF3蛋白在贲门各级病变组织中的表达 TFF3蛋白在贲门炎、肠化、肠化伴不典型增生及贲门癌组织中表达呈上升趋势, 等级相关分析结果显示, 贲门黏膜组织从正常至不典型增生再至癌变这一过程与TFF3表达阳性率呈正相关($r = 0.232, P < 0.05$, 表1). 贲门炎、肠化及贲门癌组间比较具有统计学意义(均 $P < 0.05$). 肠化组与肠化伴不典型增生组阳性率比较无统计学意义($P > 0.05$), 但其染色面积及其强度显著增加.

2.3 TFF3蛋白表达位点与病理类型的相关性 不同组织类型中TFF3蛋白表达的位点不同, 经统计学分析, 其表达的位点与病理类型相关(Kappa = 0.490, 表2).

3 讨论

TFF蛋白家族是一类主要由胃肠道黏液细胞分

研发前沿
随着分子生物学技术的飞速发展, TFF3蛋白对黏膜的保护作用及其对肿瘤的发生、增殖、浸润和转移的作用逐渐被人们所重视, 但作用机制尚不清楚. 有关TFF3蛋白在癌前期病变中所呈现出的双重作用将会成为当今肿瘤研究领域中的新热点.

相关报道
以往研究表明, TFF3蛋白是胃肠黏膜中一个重要的黏膜保护因子, 与胃肠黏膜的损伤、修复有着重要的关系; 也有研究表明TFF3蛋白与肿瘤的发生、发展、预后有一定的关系, 但TFF3蛋白所呈现出的双重作用的具体机制尚不明.

创新盘点

本文首次报道了TFF3蛋白随着组织学分级的逐步改变,其表达位置出现空间和时间上的转变,可能是该蛋白出现不同作用的结构基础。

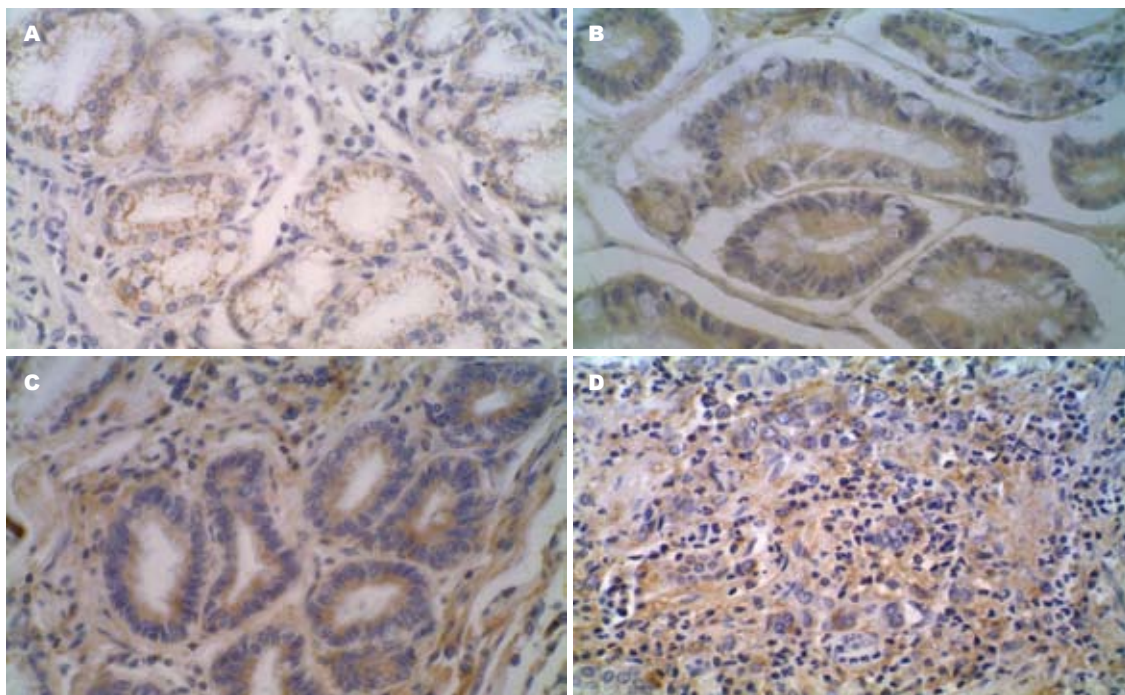


图1 TFF3蛋白在贲门各级病变组织中的表达(SP×200)。A: 炎组织; B: 肠化组织; C: 不典型增生组织; D: 贲门癌组织。

表1 TFF3蛋白在贲门各级病变组织中的表达

分组	n	TFF3蛋白 n(%)			
		-	+	++	+++
贲门炎	24	19(79.2)	5(20.8)	0(0.0)	0(0.0)
贲门肠化	52	29(55.8)	5(17.2)	16(30.8)	2(3.8)
肠化伴不典型增生	65	34(52.3)	2(3.1)	9(13.8)	19(29.2)
贲门癌	35	16(45.7)	0(0.0)	11(31.4)	8(22.9)

表2 TFF3蛋白表达位点与病理类型的相关性 (%)

TFF3蛋白表达位点	贲门组织病理类型	
	炎症+肠化	不典型增生+癌变
纹状缘	71.4	22.4
细胞质	28.6	77.6

泌的小分子多肽,具有特征性三叶状结构,并因其形状而得名,其结构较为稳定,能抗酸、耐热及抗蛋白酶,对黏膜具有保护作用。正常生理情况下,TFFs的分布具有组织、细胞特异性。TFF3主要有大肠的杯状细胞分泌到黏膜的纹状缘,在维持胃肠道黏膜的完整性及修复损伤中起重要作用^[5]。近年来研究发现该蛋白在消化道肿瘤中也高表达,与肿瘤细胞的凋亡及血管生成有关^[6-7]。

本研究的重要发现是在贲门癌变过程中,TFF3蛋白的表达位置出现空间和时间上的转变,即随着组织学分级的逐步改变,该蛋白表达的位点及强度发生改变,这可能是该蛋白出现不同作用的结构基础。以往的研究^[5]表明TFF3蛋白是胃肠黏膜中一个重要的黏膜保护因子,在胃肠黏膜的损伤、修复中起重要作用。本试验贲门炎组织中,该蛋白主要表达于柱状细胞的

纹状缘,表达强度也弱,在该部位其作用可能是通过与黏液糖蛋白相互作用或交联,形成黏弹性的黏液凝胶层,以及募集炎症因子到黏膜上皮协同保护各种损害因素对胃肠道上皮细胞的损伤,从而增强胃肠道黏膜防御屏障,促进黏膜的愈合修复。而在贲门肠化组织中,TFF3蛋白主要表达在杯状细胞和柱状细胞的纹状缘,也见于杯状细胞的细胞质中,表达强度进一步增强,呈淡黄色和棕色为主。这种改变可能是因为贲门黏膜发生肠上皮化生后该蛋白的分泌得到进一步加强,从而呈现上述的改变。Furuta *et al*^[8]证实结肠上皮细胞系Caco-2中缺氧环境可诱导TFF3 mRNA及其蛋白的表达。提示在贲门肠化组织中可能通过缺氧依赖途径促进TFF3的表达,导致该蛋白在肠化细胞质中的累积。然而,表达在不同位置可能所起的作用也发生了改变,从不典型增生组织到癌组织这一阶段中,TFF3蛋白主要表达在杯状细胞、柱状细胞及癌细胞的细胞质,染色以棕色和深棕色为主,出现过表达,推测该蛋白在细胞质中的累积可能参与了细胞

应用要点

本课题采用免疫组织化学技术对TFF3贲门不同病变中的表达进行了检测分析,结果提示TFF3贲门黏膜癌变演进过程中起重要作用,有可能作为贲门癌早期诊断的重要参考指标之一。

癌变的过程. 以往学者^[9-11]的研究也显示该蛋白在胞质中可通过调节MAPK、EGF-R、 β -粘连素、PI-3、COX及TXA2-R等途径使细胞免于凋亡以及促进肿瘤血管的生成, 从而加快了肿瘤的发生. 本研究中TFF3蛋白的表达在肠化伴不典型增生到贲门癌的发生过程中逐渐高表达, 表明该蛋白与贲门癌变有关. Taupin *et al*^[12]研究表明TFF3蛋白在正常肠黏膜中、结肠腺瘤及结肠腺癌中均有表达, 且其RNA及其蛋白的表达与结肠腺癌的Duke分期呈负相关, 而与肿瘤细胞分化状态呈正相关, 也表明该蛋白可能参与了癌变过程.

在71.4%的贲门炎及肠化组织中, TFF3蛋白表达在细胞的纹状缘; 77.6%的不典型增生及癌组织表达在细胞质, 其表达的位点与病理类型相关($Kappa = 0.490$), 提示该蛋白的作用可能与其表达的位点相关. Madsen *et al*^[13]在大肠组织中的研究也发现了随着组织形态学的演变, TFFs表达的位点及强度都有不同程度的变化, 这与本实验的研究一致.

总之, 本试验初步表明当TFF3蛋白表达在贲门柱状细胞的纹状缘时, 其作用可能主要与黏膜防御、保护及修复作用有关, 这种作用可能阻碍了致癌因素对细胞的影响, 总体表现为抑癌作用. 当TFF3蛋白过表达在贲门不典型增生及癌细胞胞质时, 与组织形态学变化呈正相关, 其作用可能参与了组织癌变过程. 这说明该蛋白在不同的位点、不同的强度表达对组织所产生的影响也不同. 可能对正常或癌前病变细胞起促分化作用, 而对肿瘤细胞促生长作用. 但其具体的作用机制还须大量基础研究, 为肿瘤防治提供新的思路.

4 参考文献

1 Wong WM, Poulsom R, Wright NA. Trefoil

- peptides. *Gut* 1999; 44: 890-895
- 2 杨天, 邹开芳. 重组肠三叶因子对实验性结肠炎大鼠NO表达、MDA和SOD活性的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 403-405
- 3 Gutiérrez-González L, Wright NA. Biology of intestinal metaplasia in 2008: more than a simple phenotypic alteration. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 510-522
- 4 Nam KT, Lee HJ, Mok H, Romero-Gallo J, Crowe JE Jr, Peek RM Jr, Goldenring JR. Amphiregulin-deficient mice develop spasmodic polypeptide expressing metaplasia and intestinal metaplasia. *Gastroenterology* 2009; 136: 1288-1296
- 5 Paulsen FP, Woon CW, Varoga D, Jansen A, Garreis F, Jäger K, Amm M, Podolsky DK, Steven P, Barker NP, Sel S. Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal wounds. *J Biol Chem* 2008; 283: 13418-13427
- 6 Dürer U, Hartig R, Bang S, Thim L, Hoffmann W. TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 329-346
- 7 唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 蔡韶滨, 苏海燕, 沈洪武, 吴文乔, 林莉, 王元亨. TFF3和CD147在不同胃黏膜病变中的表达及其与血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3631-3636
- 8 Furuta GT, Turner JR, Taylor CT, Hershberg RM, Comerford K, Narravula S, Podolsky DK, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J Exp Med* 2001; 193: 1027-1034
- 9 Storesund T, Hayashi K, Kolltveit KM, Bryne M, Schenck K. Salivary trefoil factor 3 enhances migration of oral keratinocytes. *Eur J Oral Sci* 2008; 116: 135-140
- 10 Babyatsky M, Lin J, Yio X, Chen A, Zhang JY, Zheng Y, Twyman C, Bao X, Schwartz M, Thung S, Lawrence Werther J, Itzkowitz S. Trefoil factor-3 expression in human colon cancer liver metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 143-151
- 11 张秋宁, 马力. 三叶因子3在胃癌组织中的表达及与血管形成的关系. *现代肿瘤医学* 2005; 13: 42-44
- 12 Taupin D, Ooi K, Yeomans N, Giraud A. Conserved expression of intestinal trefoil factor in the human colonic adenoma-carcinoma sequence. *Lab Invest* 1996; 75: 25-32
- 13 Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 505-513

同行评价

本研究应用常规方法检测了贲门癌高发地区贲门炎、肠化组织、肠化伴不典型增生以及癌中TFF3的表达、定位情况, 探讨了TFF3在表达量及位点与肠化过程的相关性, 对于认识TFF3在贲门癌发生过程中的作用具有重要意义.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

延安地区胃角溃疡内镜分析208例

王恬, 冯义朝, 马东瑞, 杨宁

背景资料
国内有学者研究表明胃角溃疡在胃溃疡中的发生率最高, 延安地区系陕北胃癌高发区, 延安大学附属医院消化内科每年约收集7000例胃镜资料。故本文以延安地区为研究对象, 进行流行病学调查。

王恬, 冯义朝, 马东瑞, 杨宁, 延安大学附属医院消化内科 陕西省延安市 716000
作者贡献分布: 此课题由王恬设计; 研究过程由冯义朝、马东瑞及杨宁参与操作完成; 数据分析由王恬完成; 本论文写作由王恬完成。
通讯作者: 冯义朝, 主任医师, 716000, 陕西省延安市, 延安大学附属医院消化内科。fyc.2881001@163.com
电话: 0911-2881358 传真: 0911-2881358
收稿日期: 2009-09-25 修回日期: 2009-11-15
接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-18

Endoscopic analysis of ulcer at the gastric angle in Yan'an area: a report of 208 cases

Tian Wang, Yi-Chao Feng, Dong-Rui Ma, Ning Yang

Tian Wang, Yi-Chao Feng, Dong-Rui Ma, Ning Yang, Department of Gastroenterology, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Yi-Chao Feng, Yan'an University Affiliated Hospital, Yan'an 716000, Shaanxi Province, China. fyc.2881001@163.com
Received: 2009-09-25 Revised: 2009-11-15
Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the endoscopic manifestations, clinicopathologic characteristics and clinical significance of ulcer at the gastric angle.

METHODS: A total of 208 patients with an ulcer at the gastric angle were analyzed. The initial symptoms, endoscopic manifestations, pathologic types and the detection rate of *H pylori* in these patients were analyzed.

RESULTS: Approximately 90.38% (188/208) of all cases of ulcer at the gastric angle proved to be benign disease, whereas 9.62% (20/208) of cases proved to be malignant tumor. Of all malignant cases, 65% (13/20) were tubular adenocarcinoma, 20% (4/20) were poorly differentiated adenocarcinoma, 10% (2/20) were Krudenberg tumor, and 5% (1/20) were signet-ring cell carcinoma.

CONCLUSION: The majority of cases of ulcer at the gastric angle are found in middle-aged

males (52.88%). The malignancy rate is 9.62%. Of all malignant cases, the majority are tubular carcinoma (65%) and lowly differentiated carcinoma (20%). The rate of *H pylori* infection in all malignant cases is 25%.

Key Words: Gastric carcinoma; Ulcer at the gastric; *Helicobacter pylori*

Wang T, Feng YC, Ma DR, Yang N. Endoscopic analysis of ulcer at the gastric angle in Yan'an area: a report of 208 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3644-3648

摘要

目的: 观察和研究胃角溃疡的临床内镜特征、病理学特点及其临床意义。

方法: 应用临床流行病学方法, 对208例局限于胃角切迹的溃疡患者的首发症状、内镜表现、病理类型及幽门螺杆菌(*H pylori*)检出情况进行研究和分析。

结果: 良性溃疡(188例, 占90.38%), 恶性溃疡(20例, 占9.62%)。其中恶性溃疡中(管状)腺癌13例(65%), 低分化腺癌4例(20%), 黏液细胞癌2例(10%), 印戒细胞癌1例(5%)。

结论: 胃角溃疡多发于中年男性, 多为管状腺癌, 其次为低分化腺癌, 恶性溃疡*H pylori*的感染率为25%。

关键词: 胃癌; 胃角溃疡; 幽门螺杆菌

王恬, 冯义朝, 马东瑞, 杨宁. 延安地区胃角溃疡内镜分析208例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(35): 3644-3648
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3644.asp>

0 引言

胃小弯垂直部与水平部转角处称胃角或角切迹。当胃壁蠕动和收缩时, 会引起胃角部位的血供减少, 黏膜坏死脱落, 形成溃疡; 另一方面, 胃角及胃窦处酸度最高, 加上胃角黏膜保护功能较差, 更容易形成溃疡, 胃角溃疡在胃溃疡中的发

同行评议者
张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科; 程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

生率最高, 据统计胃角溃疡占胃溃疡的40%左右^[1], 而胃角与胃内其他部位相比, 发生恶性肿瘤的比例却比较低, 恶变率只有5%左右, 且良恶性溃疡在形态学上的差别相对于其他部位较小; 大量的临床资料也提示发生在局限于胃角的恶性肿瘤, 较少出现早期转移, 手术后长期生存率相对较高, 故在内镜下对胃角部位的仔细观察和对胃角溃疡的准确活检及病理检查是非常重要的。本文分析了我科208例胃角溃疡的临床内镜特征, 以期为该部位的病变诊断提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-07/2008-12在延安大学医院消化内科内窥镜室行胃镜检查出的延安地区胃角溃疡208例为研究对象, 占同期胃溃疡29.34%(208/719); 选择的标准为病变主要累及胃角切迹范围内2 cm, 累及胃体、胃窦等部位超过此范围的病变不在本观察范围内。均行 *H pylori* 检测和病理切片检查, 男187例, 女26例, 男:女为7.1:1, 年龄19-82(平均49.62)岁。其中小于20岁2例, 21-40岁60例, 41-60岁127例, 61-80岁17例, 81岁以上2例。奥林巴斯GIF TYPE H260 2533102/2532997; YH04 *H pylori* 检测仪。

1.2 方法 胃镜及活检常规术前准备, 术前4 h禁食, 术前口服二甲基硅油胶装去泡, 插镜至十二指肠球部, 部分患者至十二指肠降部, 退镜观察, 所有患者均进行 *H pylori* 检测和病变部位的黏膜活检(在溃疡隆起边缘上及溃疡边缘内侧交界处取活检)。胃镜活检标本均由病理科常规固定, 包埋, 切片, HE染色, 分析。 *H pylori* 以病检和呼气试验共同阳性结果为标准。

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行四格表及行×列表 χ^2 检验、对有理论频数<4的采用Fisher确切概率法。

2 结果

2.1 良恶性胃角溃疡患者年龄分布 良性溃疡188例中, 男171例, 女22例, 男女比为7.77:1, 恶性溃疡20例, 其中男16例, 女4例, 男女比为4:1。全组平均年龄为49.62岁, 以41-60岁居多, 占61.05%, 其次是20-40岁, 为28.85%, 61-80岁为8.17%, 小于20岁及大于80岁为0.96%, 见表1。

2.2 主要症状 上腹饱胀108例, 中上腹痛98例, 体质量减轻49例, 黑便7例。后确诊为胃角恶性溃疡20例患者中主诉中上腹痛者12例(60%), 上腹饱胀10例(10%), 体质量减轻8例(40%), 黑便2例(10%)。良恶性溃疡在症状上差异无统计学意

义(表2)。可见良恶性溃疡在症状上无明显区别($P>0.05$)。

2.3 病变类型及表现 溃疡形状圆型164例, 直径0.2-3.0 cm, 线型20例, 不规则16例。溃疡底部高低不平34例, 边界不清7例, 伴有新鲜出血9例, 陈旧性出血13例。胃角良性溃疡形态上多为圆形, 线性, 表面可覆有程度不同的黄白苔、血痂, 溃疡中央均糜烂, 部分病例因为溃疡反复发生, 质地会比较硬、脆, 周围黏膜隆起不明显, 溃疡边缘清晰, 黏膜充血、水肿。恶性溃疡边缘呈粗糙微隆或境界不清, 黏膜皱襞似中断, 时有虫蛀状改变, 质较脆, 易出血等。在其形态上, 良恶性溃疡差异有统计学意义(表2)。可见在一定程度上可以从溃疡的类型来区别溃疡的良恶性, 但溃疡一旦恶变后果严重, 所以, 还须高度重视活检, 多次活检, 深部活检。

2.4 活检 活检块数最少2块, 最多8块, 平均3.9块。

2.5 伴发疾病 单纯胃多发溃疡36例(17.31%), 复合型溃疡72例(34.62%), 反流性食管炎16例, 十二指肠球炎14例, 食管溃疡2例, 贲门炎1例, 胃息肉1例。我们可以发现, 胃多发溃疡组比胃单发溃疡组容易伴发十二指肠溃疡($\chi^2 = 47.668$, $P = 0.000$, 表3)。同时, 我们也可以发现复合性溃疡的 *H pylori* 感染率比单纯胃溃疡组感染率要高($\chi^2 = 8.981$, $P = 0.003$, 表4)。

2.6 内镜下形态分型 进展期癌20例, 根据Borrmann分型标准, 其中II型3例, III型17例。病理类型良性胃角溃疡病理检查结果为炎性坏死灶及上皮增生, 胃角恶性肿瘤20例, (管状)腺癌13例(65%), 低分化腺癌4例(20%), 黏液细胞癌2例(10%), 印戒细胞癌1例(5%)。我们比较发现各组进展期癌的 *H pylori* 感染差异无统计学意义($P = 0.613$, 表5)。

2.7 呼气试验 *H pylori* 以病检和呼气试验共同阳性结果为本实验 *H pylori* 标准。 *H pylori* (+)110例, *H pylori* (-)98例, 胃角溃疡的 *H pylori* 检出率为52.88%。在20例恶性胃角溃疡中, *H pylori* 阳性率为25%。我们对208例患者行病检同时还进行¹⁴C呼气实验, 并对2组结果进行比较。发现其结果差异有统计学意义($P = 0.000$), 呼气试验结果阳性率要比病检结果阳性率要高(表6)。

2.8 溃疡周边病理学改变情况 角溃疡边缘组织, 慢性萎缩性胃炎、肠腺化生及非典型增生多见, 甚至可出现癌变, 分别为26.92%存在慢性浅表性胃炎(56例), 42.40%存在萎缩性胃炎(109例), 28.37%有肠上皮化生(59例), 10.58%有非典型增生(22例), 0.96%发生癌变(2例)。

研究前沿
本文主要研究胃角溃疡与 *H pylori* 的关系、良恶性溃疡的区别, 及对溃疡周边的病变情况能否提示病程发展规律。

相关报道
有学者通过对胃角溃疡边缘组织进行免疫组织化学染色发现 *H pylori* 与胃角溃疡边缘细胞增殖有关, 其作为始动因子, 导致溃疡周边细胞增殖不断上调, 而超常导致癌变的发生。另有学者研究发现在癌前病变附近组织可能已存在癌变, 故活检时一定要多点取材。

创新盘点

本组材料来源于胃癌高发区, 本文想通过胃癌高发区与普通地区胃角溃疡的区别, 来体现延安地区胃角溃疡的特点, 为胃角溃疡的诊断提供理论依据。

表 1 良恶性胃角溃疡患者的年龄分布 $n(\%)$

分组	年龄(岁)					合计
	< 20	20-40	41-60	61-80	> 80	
胃角良性溃疡	2(1.06)	59(31.38)	113(60.11)	12(6.38)	2(1.06)	188
胃角恶性溃疡	0(0.00)	1(0.05)	14(0.70)	5(0.25)	0(0.00)	20
合计	2	60	127	17	2	208

表 2 胃角良恶性溃疡的临床及内镜下表现 $n(\%)$

	良性胃角溃疡 $(n=188)$	胃角恶性溃疡 $(n=20)$	P 值
临床表现			
腹痛	86(45.75)	12(60.00)	0.225
腹胀	98(52.12)	10(50.00)	0.856
体质量减轻	41(21.80)	8(40.00)	0.059
呕血或黑便	5(2.66)	2(10.00)	0.084
内镜表现			
直径>25 mm	30(15.96)	19(95.00)	0.000
边界不清	0(0.00)	7(35.00)	0.000
底不平	20(10.64)	14(70.00)	0.000

表 3 胃溃疡单发组及多发组与十二指肠溃疡的关系

分组	n	是否伴发十二指肠溃疡	
		伴发 $n(\%)$	不伴发 $n(\%)$
单纯胃溃疡组	117	17(14.53)	100(85.47)
复合性溃疡组	91	55(60.44)	36(39.56)

$\chi^2=47.668, P<0.05$.

3 讨论

本研究中全组患者平均年龄49.62岁, 本文资料显示, 不管是良性还是恶性胃角溃疡, 男性发病率明显高于女性, 男女之比为7.1:1, 显著差异($P=0.000<0.05$)发病年龄相对集中于中老年患者, 41-60岁患者127例(61.06%), 此年龄段与20-40岁患者相比差异有显著性($P<0.05$), 同时与61-80岁患者相比差异有显著性($P<0.05$). 虽然本资料病例统计结果不具有流行病学意义, 但结果与公认的胃溃疡、胃癌的男女患病比例3.6-4.7:1^[2]要高一些, 考虑可能是因为不管是胃溃疡还是胃癌, 虽然是人类的常见病, 呈世界性分布, 但不同地区, 不同种族, 不同年龄间, 甚至同一地区不同时期的发病率都有较大差异. 另一方面, 胃角溃疡和胃角部位的恶性肿瘤在一定程度上多发生于中老年男性患者, 可能也和其他例如吸烟, 饮食习惯, 等多方面的情况有

表 4 两种溃疡的 *H. pylori* 感染率的比较

分组	n	<i>H. pylori</i> (+)		<i>H. pylori</i> (-)	
		n	%	n	%
单纯胃溃疡组	136	61	44.85	75	55.15
复合性溃疡组	72	48	66.66	24	33.34

$\chi^2=8.981, P<0.05$.

表 5 *H. pylori* 感染与恶性胃角溃疡组织学类型的比较

组织学类型	n	<i>H. pylori</i> (+)		<i>H. pylori</i> (-)	
		n	%	n	%
高分化	13	4	30.77	9	69.23
低分化	7	1	14.29	6	85.71
合计	20	5	25.00	15	75.00

$P=0.613>0.05$.

表 6 ^{14}C 呼气实验与病检结果的比较 n

^{14}C 呼气实验	病检		合计
	+	-	
+	110	52	162
-	4	42	46
合计	114	94	208

$\chi^2=50.702, P=0.000<0.05$.

关系. 有报道吸烟和幽门螺杆菌感染是导致胃癌的重要致病因素, 影响胃黏膜细胞的增殖和分化^[3]. 需引起重视, 提倡戒烟.

本组患者以上腹胀(51.92%)为主, 其次上腹痛(47.12%)>体质量减轻(23.56%)>呕血或黑便(3.37%), 良恶性溃疡在症状上无明显区别($P>0.05$), 这与国外报道结果相同^[4-5]. 近年来随着人们健康意识的提高, 前来就诊时间提前, 但由于病变早期的症状不很明显, 加之胃癌处于我国各种恶性肿瘤死亡率的首位, 其预后主要取决于“早期发现, 早期诊断, 早期治疗”^[6], 而

“早期诊断”为重中之重, 所以, 对于有中上腹不适等症状的中老年患者, 应积极给予胃镜及病理检查。

从本文资料看出, 胃角良性溃疡形态上多为圆形, 线性, 周围黏膜隆起不明显, 溃疡边缘清晰, 表面可覆有黄白苔、血痂, 部分病例因为溃疡反复发生, 质地会比较硬、脆。胃溃疡的直径一般为0.5-3.0 cm, 对于溃疡直径达2.5 cm以上者, 恶变可能性更大。该组病例中20例恶性肿瘤有7例表现边界不清, 而良性溃疡中有30例(5.96%)为巨大溃疡, 说明在形态学上来区分良恶性肿瘤的差异是有统计学意义的($P<0.05$)。恶性溃疡多为巨大溃疡且边缘不规则, 患者年龄较大, 对内镜下这类溃疡时应多点取材活检, 以明确是否癌变^[7], 以免漏诊。对于平坦型病变, 应钳取病灶中心; 隆起性病变, 应钳取病灶顶部; 凹陷型病变, 应钳取凹陷内侧壁。第1处活检尤为关键, 应于黏膜粗糙与触之易出血处活检, 该处活检阳性率高^[8]。如有可能应多点活检, 每例患者取4-6块病理组织, 1块正确诊断率为70%, 6块则几乎达100%^[9]。

本组胃角癌20例, 经内镜活检病理证实。一般文献报道溃疡恶变率为3%-4%^[10], 而本组癌检出率达9.62%(20/208), 主要考虑胃角部位特殊, 溃疡边缘的黏膜经过反复的退化及再生, 产生病理性增生, 再生上皮细胞分化障碍和不典型增生导致癌变; 其次, 延安地区是溃疡高发地区, 人们的生活方式与经济状况限制了人们的生活环境。我们在实验过程中对胃内黏膜糜烂灶也进行了取材, 因此早期发现胃角局限性的恶性病变5年存活率很高。同时, 也提醒我们医务工作者在日常工作中要多对患者进行健康宣教。

本组试验显示¹⁴C呼气试验与组织学检查相比, 二者结果差异有统计学意义($P<0.05$)。呼气试验无创、便捷, 能克服胃内 $H pylori$ 灶性分布的局限性及取材局限的缺点, 避免了活检标本 $H pylori$ 分布不均造成的假阴性结果。如近期应用抗菌药物, 铋剂和质子泵抑制剂等可抑制 $H pylori$ 释放的尿素酶, 使呼气试验结果呈阴性, 但通过活检仍可检测出 $H pylori$ 的存在, 即病检结果为阳性, 而呼气试验结果为假阴性。或者当伴有胆汁反流的时候胃内酸度下降, 不适于 $H pylori$ 的生长, 也可造成呼气试验的假阴性结果。同时呼气试验不能反映 $H pylori$ 引起的病变, 如溃疡、炎症等, 故不能代替内镜检查, 不能区分 $H pylori$ 的细胞毒株和非细胞毒株, 其测定有

赖于尿素酶存在。所以, 我们对于呼气试验阴性结果的患者还应进行病检, 而对于病检阴性的患者还应进行呼气试验, 这样才能更准确提高 $H pylori$ 的检出率。

在本组资料中, 胃角的恶性肿瘤的 $H pylori$ 感染率比良性的还要低, 且各组 $H pylori$ 感染差异无统计学意义($P>0.05$), 一方面是因为病例数局限性的影响, 且由于取材在胃癌组织周边坏死区域, 其环境不利于 $H pylori$ 的生长; 其次, 也和患者的治疗经历相关。本组部分病例经正规抗溃疡治疗后, 癌变溃疡缩小甚至假性愈合。甘涛 *et al*^[11]认为可能与癌组织本身的恶性程度、坏死的严重程度以及与破坏正常胃黏膜保护屏障的程度有关。

在本组实验中溃疡边缘42.40%存在萎缩性胃炎, 28.37%有肠上皮化生, 10.58%有非典型增生, 0.96%发生癌变, 而所有肠化、非典型增生及癌变均发生在萎缩性胃炎基础之上, 而 $H pylori$ 不仅与胃溃疡有关且与胃溃疡边缘组织的病理改变也有关。

溃疡病在镜下比较直观, 基本上一目了然, 病理诊断检出率却明显低于镜下诊断, 有的学者报道慢性溃疡的胃镜诊断与病理诊断符合率只有23.55%^[12]。近几年, 国内外开始对GU周边伴随病变(背景病变)引起注意, 并开始深入研究。不典型增生或肠上皮化往往发生于溃疡边缘或隆起、糜烂病变处, 对此类病变应重视, 特别是重度不典型增生。目前, 多数学者认为 $H pylori$ 感染主要通过非萎缩性胃炎→萎缩性胃炎→肠化生→异型增生、胃癌的模式导致胃癌发生。在这一过程中, $H pylori$ 感染者发生胃癌的危险性随病变加深而逐步增加, 其危害比(HR)分别为7.13、14.85和61.85^[13]。还有学者通过对胃角溃疡边缘组织进行免疫组织化学染色发现^[14] $H pylori$ 与胃角溃疡边缘细胞增殖有关, 其作为始动因子, 导致溃疡周边细胞增殖不断上调, 而超常导致癌变的发生。另外有学者^[15]研究发现在癌前病变附近组织可能已存在癌变。故活检时一定要多点取材, 并强调患者与短期内随诊复查胃镜, 在复查时, 应于前次活检部位附近再次取活组织检查。

本文结果提示, 由于胃角的特殊组织学结构, 对胃角溃疡应重视溃疡的形态、大小以及正规抗溃疡治疗后的愈合情况, 尤其对50岁左右, 溃疡直径大于1.5 cm, 形态不规则及正规抗溃疡后效果不佳者, 更应提高警惕。要坚持随访,

应用要点
本文提示, 尤其对50岁左右, 溃疡直径大于1.5 cm, 形态不规则及正规抗溃疡后效果不佳者, 更应提高警惕, 坚持随访。镜下活检应多点、多次取材及必要时行外科手术探查, 是及早发现胃角溃疡癌变的重要环节, 为了延安地区溃疡患者提供更多益处。

同行评价
本文立意较好,对
临床进行总结,对
临床工作有一定的
帮助.

镜下活检应多点、多次取材或剥脱性深层活检(溃疡内侧缘取材活检阳性率较高),必要时行外科手术探查,不可过度强调胃镜活检病理诊断,是及早发现胃角溃疡癌变的重要环节.另外,联合使用色素内镜、超声内镜等检查也可提高胃角溃疡癌变的检出率.

4 参考文献

- 1 彭孝伟,何利平,吴芳,林棱,潘秀珍.消化性溃疡与胃癌患病年龄及部位比较.中华消化内镜杂志 1998; 15: 139-141
- 2 陈灏珠.实用内科学.第11版.北京:人民卫生出版社, 2003: 1741
- 3 张友才,邓长生,朱尤庆,陈金霞.幽门螺旋杆菌感染和吸烟对胃癌患者胃蛋白酶原水平的影响.中国实用内科杂志 2003; 23: 590-591
- 4 Boldys H, Marek TA, Wanczura P, Matusik P, Nowak A. Even young patients with no alarm symptoms should undergo endoscopy for earlier diagnosis of gastric cancer. *Endoscopy* 2003; 35: 61-67
- 5 Allum WH, Griffin SM, Watson A, Colin-Jones D. Guidelines for the management of oesophageal and

- gastric cancer. *Gut* 2002; 50 Suppl 5: v1-v23
- 6 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 7 朴风顺,蔡豪逢,金海燕,耿敏,梁辉.延边地区消化性溃疡4348例胃镜分析.中华消化内镜杂志 2001; 18: 25-26
- 8 张桂英,王娟,张晓梅,李新华.55例早期胃癌的临床与病理分析.中国内镜杂志 2005; 11: 1269-1276
- 9 张维国,王思露,田晓生.38例早期胃癌的胃镜诊断与临床分析.中华消化内镜杂志 2002; 19: 183
- 10 汪恩定.胃癌前期病变566例随访观察.临床内科杂志 1997; 14: 38-39
- 11 甘涛,王一平,杨锦林.胃癌性溃疡假性愈合原因分析.中华消化内镜杂志 2002; 19: 298-299
- 12 邹晓平,沈世明.3644例胃部疾病的胃镜与病理诊断符合率分析.临床消化病杂志 2004; 16: 36-37
- 13 Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, Yoshikawa A, Yanaoka K, Arii K, Tamai H, Shimizu Y, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 2004; 109: 138-143
- 14 王淑英,吴玉娥.幽门螺杆菌与胃角溃疡边缘细胞增殖的关系.中国现代医学杂志 2003; 13: 20-22
- 15 李荣宽,生杰,姜春萌.早期胃癌的胃镜及病理分析.中国内镜杂志 2005; 11: 714-718

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 •

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 2009-12-18)

胃脂肪瘤的诊断与治疗66例

李世正, 张俊华, 李锦成, 董哲

李世正, 张俊华, 李锦成, 董哲, 辽宁医学院附属第一医院普外科 辽宁省锦州市 121001

作者贡献分布: 此课题由李世正设计; 研究过程由张俊华、李锦成及董哲完成; 数据分析由李世正完成; 本论文写作由李世正完成。

通讯作者: 李世正, 121000, 辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院普外科. ychzon@yahoo.com.cn

电话: 0416-4197392

收稿日期: 2009-10-11 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-18

Diagnosis and treatment of gastric lipoma: an analysis of 66 cases

Shi-Zheng Li, Jun-Hua Zhang, Jin-Cheng Li, Zhe Dong

Shi-Zheng Li, Jun-Hua Zhang, Jin-Cheng Li, Zhe Dong, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Shi-Zheng Li, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. ychzon@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-11 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the epidemiology, diagnosis, treatment and misdiagnosis of gastric lipoma to provide references for clinicians.

METHODS: Two patients with gastric lipoma who were treated at our hospital from 2003 to 2008 were reported. In addition, we performed a retrospective analysis of 64 patients who were surgically and pathologically diagnosed as gastric lipoma in the past ten years by searching databases.

RESULTS: Gastric lipoma exhibits no specific clinical manifestations. Computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) are the first choice for preoperative diagnosis of gastric lipoma. Surgery is the main way to cure gastric lipoma, and postoperative prognosis is good.

CONCLUSION: Great progress has been made

in the diagnosis and treatment of gastric lipoma in the past ten years. However, significant weaknesses still exists and needs to be overcome.

Key Words: Gastric lipoma; Diagnosis; Treatment; Retrospective analysis

Li SZ, Zhang JH, Li JC, Dong Z. Diagnosis and treatment of gastric lipoma: an analysis of 66 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3649-3652

摘要

目的: 探讨胃脂肪瘤的流行病学、诊断、治疗及误诊情况, 为临床医生提供借鉴。

方法: 2003-2008年辽宁医学院附属第一医院普外科收治胃脂肪瘤患者2例, 并检索1998-2008年底国内公开发表的胃脂肪瘤相关文献, 分析患者临床资料。

结果: 国内近10年术后病理确诊为胃脂肪瘤的患者64例。胃脂肪瘤在临床上十分少见, 临床表现缺乏特异性, 术前诊断首选CT和MRI, 主要采用手术治疗, 预后较好。

结论: 国内近10年在胃脂肪瘤的诊断与治疗方面有较大进展, 但是对于胃脂肪瘤的相关文献报道仍存在许多不足的地方。

关键词: 胃脂肪瘤; 诊断; 治疗; 回顾分析

李世正, 张俊华, 李锦成, 董哲. 胃脂肪瘤的诊断与治疗66例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(35): 3649-3652

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3649.asp>

0 引言

胃脂肪瘤在临床上十分少见, 由于临床表现缺乏特异性, 术前诊断困难, 而国内对胃脂肪瘤的诊治情况尚无完整的调查资料, 不少患者因此延误诊治。本文结合我院2例胃脂肪瘤的诊治情况, 并检索1998-2008年底国内公开发表的胃脂肪瘤相关文献, 其中被确诊为胃脂肪瘤的患者64例, 进行回顾分析, 以期提高对该病的认识及诊治。

背景资料

胃脂肪瘤在临床上十分少见, 临床表现缺乏特异性, 术前诊断困难。虽然国内有关胃脂肪瘤的报道逐渐增多, 但多局限个案分析, 不少患者因此延误诊治。本文结合本院2例胃脂肪瘤的诊治情况, 同时并1998-2008年底国内公开发表的胃脂肪瘤相关文献, 进行回顾分析, 以期提高对该病的认识及诊治。

同行评议者

葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科

研发前沿
胃脂肪瘤的临床
表现缺乏特异性,
术前诊断困难,如
何采取有效方法
进行胃脂肪瘤的
诊治成为研究的
热点.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-2008年收治胃脂肪瘤患者2例. 其中病例1, 男, 50岁, 上腹部隐痛2年, 纳差, 常于进食后恶心, 黑便7 d. 病例2, 女, 35岁, 上腹隐痛3 mo, 伴反酸、嗝气, 以饱餐后明显. 以“胃脂肪瘤”为主题词检索中国期刊网全文期刊数据库(CNKI)、万方数据资源系统、维普中文科技期刊数据库. 去除无关文献, 去除内部刊物文献, 去除综述性文献, 去除综合总结文献, 共得到文献34篇^[1-34], 全部得到原文.

1.2 方法 病例1, 体检: 上腹轻压痛, 似可触及质软包块, 血红蛋白55 g/L. 上消化道造影考虑为胃平滑肌瘤; 胃镜检查见胃体大弯侧肿块, 呈分叶状, 表面有溃疡. 病例2, 入院查体无明显阳性体征. 胃镜检查示胃窦部有2.5 cm×1.5 cm大小的椭圆形隆起, 表面光滑, 边界清, 中央有0.5 cm×0.4 cm大溃疡, 取该部位组织行病理检查, 提示慢性胃炎, 与胃镜下所见不符, 转外科治疗.

将文献数据全部统计出来后, 首先去除病例未在报道者医院手术的文献及同一病例的文献; 其次是同一医院不同时期的病例报道, 无重叠病例者全部选用; 重叠病例选用时间跨度最长、病例数最多的文献. 最后共得到有效统计文献33篇^[1-33], 其中论著3篇^[31-33], 病例报告30篇^[1-30]. 病例数最多的是武汉大学中南医院和湖北省荆州市第一人民医院共13例. 所有数据均以实际报道例数计算.

2 结果

2.1 本院收治的2例患者临床资料 本院2例患者均行胃大部分切除术, 病例1病理诊断为胃体浆膜下脂肪瘤, 病例2病理诊断为胃窦部脂肪瘤、胃溃疡, 2例患者术后恢复良好.

2.2 回顾性资料

2.2.1 一般临床资料: 33篇文献共报道胃脂肪瘤64例. (1)有明确性别报道的63例, 男26例, 女37例, 男女比0.7:1; (2)发病年龄最小者23岁, 最大者77岁, 平均年龄为59.1岁; (3)肿瘤单发者61例, 占95.3%, 同时伴发胃癌1例, 食管癌1例, 胃平滑肌瘤1例; (4)肿瘤发生在胃窦部50例(78.1%), 胃体部8例(12.5%), 幽门部5例(7.8%), 贲门部1例(1.6%); (5)有肿瘤大小报道的32例病例中, 小于5 cm者21例(65.6%), 5-10 cm者10例(31.3%), 10-15 cm者1例(3.1%). 肿瘤最大者为10 cm×10 cm, 最小者为1.5 cm×2 cm; (6)与胃壁关系: 有明确报道的36例中, 位于黏膜下30例(83.3%), 浆膜下3

例(5.6%), 浸润肌层4例(11.1%).

2.2.2 诊断: 胃脂肪瘤的诊断主要依靠临床表现, 胃肠钡餐造影、CT、胃镜, 术后病理.

2.2.3 临床表现: 64例胃脂肪瘤患者中, 明确报道临床症状61例, 以上腹部胀痛不适者就诊者49例(80.3%), 其中, 上腹部胀痛不适者伴呕血和/或柏油样便者21例(32.8%), 上腹部胀痛不适者伴进食后呕者10例(15.6%), 伴贫血症状者24例(39.3%).

2.2.4 辅助检查: 在64名患者中除有3例因上消化道大出血急诊手术外, 其余均描述了所用检查方法. 行胃肠钡餐造影者28例, 拟诊断为胃占位性病变22例(78.6%). 内镜检查者39例, 拟诊断为胃占位性病变者26例(66.7%); 诊断为胃炎者6例(15.4%); 诊断为胃溃疡性病变者4例(10.2%); 诊断为胃平滑肌瘤者3例(7.7%). 行CT检查者30例, 确诊21例, 诊断阳性率为70%. 超声检查者5例, 其中2例发现胃占位性病变. MRI检查者2例, 均确诊.

2.2.5 误诊: 64例病例中, 术前未明确诊断者占30例(46.9%), 有13例误诊, 误诊率达20.3%. 在15例有明确误诊说明的病例中, 误诊为胃炎6例、胃溃疡4例、胃平滑肌瘤3例.

2.2.6 治疗: 64例病例均进行了手术治疗. 其中61例胃脂肪瘤单发患者全部治愈, 术后均顺利出院, 3例胃脂肪瘤并发其他肿瘤患者, 术后也顺利出院, 无严重并发症出现.

3 讨论

胃脂肪瘤是一种来源于胃间质细胞的罕见肿瘤, 病因不明, 可能是胚胎发育中异位的脂肪组织, 也可能是一种获得性疾病, 发病高峰年龄在50-60岁, 女性患者略多于男性患者, 好发于胃窦部, 约占胃间质肿瘤的6.3%, 占胃良性肿瘤3%, 90%-95%位于黏膜下层, 5%-10%位于浆膜下层, 通常为单发, 偶见多发^[35-36]. 本文统计的胃脂肪瘤平均发病年龄59.1岁, 男女发病率比为0.7:1; 位于黏膜下30例(83.3%), 浆膜下3例(5.6%), 浸润肌层4例(11.1%); 发生在胃窦部者发生在胃窦部50例(78.1%), 这与胃癌的发病部位一致, 其具体原因有待于进一步探讨.

胃脂肪瘤的临床表现无特异性, 常与瘤体大小、部位及并发症有关. 初起肿瘤较小, 无并发症, 常无症状, 病情进展可出现上腹部钝痛, 有并发症时可出现反酸、恶心、呕吐及消化道出血等症状. 由于胃脂肪瘤的临床表现无特

异性, 常会延误患者的病情, 因此, 必须建立胃脂肪瘤有效的检查方法. 本文回顾性分析的64例患者中除有3例因上消化道大出血急诊手术外, 其余均描述了所用检查方法. 行胃肠钡餐造影者28例, 诊断为拟胃占位性病变22例(78.6%); 内镜检查者39例, 拟诊断为胃占位性病变26例(66.7%); 诊断为胃炎者6例(15.4%); 诊断为胃溃疡性病变者4例(10.2%); 诊断为平滑肌瘤3例(7.7%); 行CT检查者30例, 确诊21例, 诊断阳性率为70%; 超声检查者5例, 其中2例发现胃占位性病变; MRI检查者2例, 均确诊. 因此, 诊断胃脂肪瘤首选的检查方法是CT和MRI. CT和MRI不仅在胃脂肪瘤的定性诊断中起了决定性作用, 同时二者能显示病变部位与周围脏器的毗邻关系以及侵犯与否, 对鉴别诊断和手术方案的选择均有帮助. 值得说明的是, 虽然MRI对本病有较高的诊断价值, 但因价格较昂贵, 故检查时应慎重考虑, 并应争得患者或其家属同意. 虽然在胃的腔内病变的检查方法中钡餐及胃镜为首选方法, 尤其是胃镜的定性诊断被视为“金标准”, 但胃脂肪瘤多发生在黏膜下, 由于胃黏膜较厚, 且胃镜活检取点不固定, 很难取到肿瘤组织, 故难以定性. 因此, 钡餐及胃镜两种检查方法仅能提示胃内有无占位性病变以及良恶性, 但对肿瘤类型的确诊则有困难.

胃脂肪瘤在临床上十分少见, 临床表现缺乏特异性, 术前诊断困难, 因此较易误诊, 在描述的64例病例中, 术前未明确诊断者占30例(46.9%), 有13例误诊, 误诊率达20.3%. 在15例有明确误诊说明的病例中, 误诊为胃炎6例、胃溃疡4例、胃平滑肌瘤3例. 误诊原因分析: (1)应用辅助检查缺乏逻辑性: 胃肠钡餐造影应该是排查上消化道肿瘤的首选, 如果能提示为黏膜下肿瘤或黏膜下肿瘤伴有溃疡改变, 下一步应用CT检查, 必要时使用胃镜检查, 以免不必要的应用胃镜给患者带来痛苦; (2)一味强调病理活检这一“金标准”进行诊断: 因为胃脂肪瘤大部分位于黏膜下, 胃镜病理很难取到, 即使有溃疡形成, 也只能取到黏膜层, 难以与良/恶性溃疡相鉴别. (3)该病为罕见病, 而在诊断思维中固然先考虑常见病、多发病, 一些缺乏经验的医生就会盲目下诊断, 成为造成临床误诊的又一因素.

胃脂肪瘤治疗的选择仍存在着争论. 多数学者认为, 如果肿瘤偶尔发现, 无症状或症状较轻、肿块小于1 cm者可以不必进行手术治疗, 此时应用CT扫描进行定期随访. 而对症状

严重、出血或肿瘤难于与其他恶性肿瘤鉴别者应及时行手术治疗, 手术方法以局部切除肿瘤或胃部分切除为主, 必要时可术中冰冻切片以排除胃癌可能. 另外, 如果肿瘤的良恶性鉴别困难, 或伴有反复的出血或梗阻, 则需手术切除. Nakamura *et al*^[37]认为, 胃脂肪瘤的治疗方式可以由内镜超声来决定, 因为内镜超声能对胃壁进行精确评价, 内镜超声如果发现肿瘤位于黏膜下而不侵及固有肌层或位于浆膜下则可行内镜切除术, 反之则需行开腹手术.

另外, 本文总结中还发现国内文献报道有许多不足和缺憾的地方, 归纳起来有以下几点: (1)对该病的认识和重视不够. (2)对临床资料的介绍不完整, 过于简单. (3)对检查方法仅有阳性率报道, 缺少假阳性、假阴性、敏感性、特异性等统计. (4)多数病例报告中缺乏物理学、病理学及切除之肿物的图片, 缺乏可信性. (5)很多文献缺少治疗结果及随访的结果.

4 参考文献

- 1 洪舒, 拉李明. 4例少见部位脂肪瘤的B超诊断分析. 包头医学院学报 1998; 15: 73-74
- 2 华春雷. CT确诊胃脂肪瘤1例报告. 齐齐哈尔医学院报 2002; 23: 461
- 3 王基海, 张英建, 金艳玲, 周德洁. CT诊断胃脂肪瘤1例. 宁夏医学杂志 2004; 26: 309
- 4 李宏伟, 鲁英姬, 矫铁文, 李辉. Turcot综合征伴胃脂肪瘤一例报告. 中华消化内镜杂志 1999; 16: 123
- 5 陈明会, 袁明金, 杨友德. 贲门部黏膜下脂肪瘤1例. 临床肿瘤学杂志 1998; 3: 15
- 6 赵柯湘, 曾繁荣. 老年人胃脂肪瘤合并溃疡出血一例. 中华老年医学杂志 2001; 20: 400
- 7 杨恒明, 王宪军, 吕辉军. 腔外胃脂肪瘤1例. 中国现代实用医学杂志 2007; 6: 36
- 8 温涛, 段磊. 腔外胃脂肪瘤一例. 中华放射学杂志 2002; 36: 173
- 9 张德臣, 倪晓峰. 食管腺鳞癌伴胃脂肪瘤一例报告. 实用医技杂志 2004; 11: 314
- 10 夏瑞明. 胃癌合并胃脂肪瘤一例. 临床放射学杂志 2007; 26: 999
- 11 石林平, 冯勇, 黎雪琴, 魏从全. 胃窦后壁脂肪瘤一例. 放射学实践 2007; 22: 477
- 12 朱承雁, 李滨. 胃巨大脂肪瘤1例. 中国肿瘤临床 1998; 25: 600
- 13 柯美金. 胃黏膜下脂肪瘤1例. 临床消化病杂志 1998; 10: 12
- 14 赵华善, 呼焕风, 牛海苏, 贾爱增. 胃黏膜下脂肪瘤的诊断与治疗: 附5例报告. 山西医药杂志 1998; 27: 557-558
- 15 邱乾德. 胃脂肪瘤1例. 医学影像学杂志 2008; 18: 1281
- 16 梁翠华. 胃脂肪瘤1例. 华北煤炭医学院学报 2003; 5: 491
- 17 濮孟辉. 胃脂肪瘤1例. 邯郸医学高等专科学校学报 2000; 13: 406
- 18 周宝林, 许卫农. 胃脂肪瘤1例报告. 中国医学杂志 2006; 4: 219
- 19 杨忠义, 关志宇, 王玉保. 胃脂肪瘤3例. 中华综合医学杂志 2003; 5: 77
- 20 张玉华, 陈萍, 林卫国, 谢立光. 胃脂肪瘤伴胃肠道多

应用要点
诊断胃脂肪瘤首选的检查方法是CT和MRI. CT和MRI不仅在胃脂肪瘤的定性诊断中起了决定性作用, 同时二者能显示病变部位与周围脏器的毗邻关系以及侵犯与否, 对鉴别诊断和手术方案的选择均有帮助.

同行评价

本文报道2例胃脂肪瘤,并对国内公开报道的64例进行了文献复习和综合分析,提出了CT、MRI对诊断胃脂肪瘤具有较大帮助的观点,对临床上提高术前诊断率有一定的参考价值。

- 21 发性息肉病1例. 中国普通外科杂志 1999; 7: 7
- 22 朱明莉, 王繁荣, 王飞. 胃脂肪瘤并出血1例. 临床消化病杂志 2005; 17: 205
- 23 张彤. 胃脂肪瘤并发大出血1例报告. 中国肿瘤临床与康复 1999; 6: 39
- 24 王全, 陈家科. 胃脂肪瘤出血并幽门梗阻1例. 现代临床普通外科 2000; 5: 51
- 25 张琳鑫, 施维锦. 胃脂肪瘤的诊断与治疗. 中国医刊 2006; 36: 51
- 26 马李军, 赵国金. 胃脂肪瘤二例报告. 腹部外科 2001; 14: 33
- 27 朱方兴, 柳茜汝. 胃脂肪瘤合并溃疡出血1例. 中国普通外科杂志 1999; 7: 97
- 28 刘晓红, 马翠芝. 胃脂肪瘤一例. 临床放射学杂志, 2007; 26: 129
- 29 曲路. 胃脂肪瘤一例. 中华胃肠外科杂志 2004; 7: 362
- 30 钦建平, 孙祥玉, 刘海, 王洪. 胃脂肪瘤一例. 中华放射学杂志 1999; 33: 328
- 31 祝晓涛, 孙鑫, 郑江涛, 曹广东. 胃脂肪瘤1例. 吉林医学信息 1998; 15: 22
- 32 吴光耀, 田志雄, 鄢龙, 张在鹏, 黄雄, 胡浩. 胃脂肪瘤影像学特征分析. 实用放射学杂志 2008; 21: 55-57
- 33 周连高, 李方坤, 汪志杰. 胃脂肪瘤的X线诊断(附7例报告). 实用放射学杂志 2000; 16: 490-492
- 34 宋振龙, 李洪福, 巩曰红, 刘玉元, 柴新, 李文元, 余献曾, 赵文龙, 万洪强, 赵香. 胃脂肪瘤的影像学综合诊断(附5例报告). 中国医学影像技术 1998; 14: 358-359
- 35 张琳鑫, 施维锦. 胃脂肪瘤诊治2例报告. 外科理论与实践 2000; 5: 90
- 36 Taylor AJ, Stewart ET, Dodds WJ. Gastrointestinal lipomas: a radiologic and pathologic review. *AJR Am J Roentgenol* 1990; 155: 1205-1210
- 37 Thompson WM, Kende AI, Levy AD. Imaging characteristics of gastric lipomas in 16 adult and pediatric patients. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 981-985
- 38 Nakamura S, Iida M, Suekane H, Matsui T, Yao T, Fujishima M. Endoscopic removal of gastric lipoma: diagnostic value of endoscopic ultrasonography. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 619-621

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》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 $10\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$. 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·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 2009-12-18)

全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的意义

王春玲, 姜相君

王春玲, 姜相君, 青岛市市立医院消化科 山东省青岛市 266011

作者贡献分布: 王春玲与姜相君对此文所作贡献均等; 此课题由姜相君与王春玲设计; 研究过程由姜相君与王春玲操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由姜相君提供; 数据分析由王春玲完成; 本论文写作由王春玲与姜相君完成。

通讯作者: 姜相君, 主任医师, 266011, 山东省青岛市, 青岛市市立医院消化科. drxj@163.com

电话: 0532-82789581

收稿日期: 2009-10-18 修回日期: 2009-11-17

接受日期: 2009-11-30 在线出版日期: 2009-12-18

Significance of RUNX3 promoter methylation in DNA prepared from whole blood for early diagnosis of gastric carcinoma

Chun-Ling Wang, Xiang-Jun Jiang

Chun-Ling Wang, Xiang-Jun Jiang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Correspondence to: Xiang-Jun Jiang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China. drxj@163.com

Received: 2009-10-18 Revised: 2009-11-17

Accepted: 2009-11-30 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the significance of human runt-related transcription factor 3 (RUNX3) promoter methylation in DNA prepared from whole blood for early diagnosis of gastric carcinoma.

METHODS: Methylation-specific PCR (MSP) was used to detect the methylation status of RUNX3 promoter in DNA prepared from carcinoma tissue, adjacent tissue and whole blood samples taken from 80 gastric cancer patients.

RESULTS: The detection rates of RUNX3 promoter methylation in DNA prepared from gastric carcinoma tissue, adjacent tissue and whole blood samples were 45%, 0% and 40%, respectively. No significant difference was noted in the detection rate of RUNX3 promoter methylation between gastric carcinoma tissue and whole blood samples ($P > 0.05$). The RUNX3 promoter

methylation status in gastric carcinoma was correlated with tumor differentiation and lymph node metastasis, but not with age, gender and tumor site.

CONCLUSION: RUNX3 promoter methylation status in DNA prepared from whole blood is closely associated with the oncogenesis and metastasis of gastric carcinoma and has important significance for early diagnosis of gastric carcinoma.

Key Words: Whole blood; Gastric carcinoma; RUNX3 gene; DNA methylation; Methylation-specific PCR

Wang CL, Jiang XJ. Significance of RUNX3 promoter methylation in DNA prepared from whole blood for early diagnosis of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3653-3656

摘要

目的: 探讨全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的意义。

方法: 采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)法, 检测80例胃癌患者的癌组织及其对应的癌旁组织及全血中RUNX3启动子甲基化情况。

结果: 胃癌组织标本中RUNX3基因启动子甲基化率为45%, 癌旁组织中甲基化率为0%, 全血中甲基化率为40%。胃癌组织、全血中RUNX3基因启动子甲基化, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。全血标本中RUNX3启动子甲基化表达情况与分化程度、是否有淋巴结转移密切相关, 与年龄、性别、肿瘤部位浸润深度无关。

结论: 全血RUNX3启动子区甲基化对胃癌早期诊断有重要指导意义, 与胃癌的发生、发展密切相关。

关键词: 全血; 胃癌; RUNX3; DNA甲基化; 甲基化特异性聚合酶链反应

王春玲, 姜相君. 全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的

背景资料

Runx基因是近年来发现的一种新型抑癌基因, 与人类多种肿瘤的发生、发展有着极密切的关系。2002年日本学者Li *et al* 首例发现RUNX3还有调节胃上皮细胞的增生与凋亡平衡的作用, 说明RUNX3的失活与胃癌的发生发展密切相关, 可能是胃癌发生发展的关键性抑癌基因。

同行评议者

王晓艳, 副教授, 中南大学湘雅三医院消化内科

研究前沿
在多种肿瘤中
RUNX3甲基化成
为最近几年研究
的热点,采取简单
易行的检测手段
检测其甲基化成
为进一步研究需
要解决的问题。

意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3653-3656
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3653.asp>

0 引言

胃癌约占胃恶性肿瘤的95%以上,在癌症死亡率中居第2位^[1],严重威胁人类健康. 众多研究发现,在胃癌发生的分子机制中,遗传和表遗传机制均起着重要的作用. DNA甲基化是研究最多也最深入的一种表遗传学表达机制. RUNX3作为一个新发现的抑癌基因,作为转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)信号作用的靶点对胃癌细胞的生长有明显的抑制作用^[2],而DNA异常甲基化则是RUNX3基因在胃癌中失活的重要途径. 我们采用甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific PCR, MSP)方法检测胃癌患者癌组织、其对应癌旁组织及全血RUNX3启动子甲基化的情况,探讨全血RUNX3启动子甲基化对胃癌早期诊断的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2008-11/2009-08青岛市立医院普外科胃癌手术切除标本80例,包括胃癌组织及其对应的癌旁组织. 患者年龄为35-79(中位年龄56)岁,男44例,女36例. 术前取患者外周血5 mL,经EDTA抗凝. 胃癌组织取自肿块中央非坏死部分,癌旁组织取自距离肿块5 cm以上的正常胃黏膜组织. 患者术前未经辅助放疗、化疗及免疫治疗. 所有标本均经病理证实. 正常对照标本取自无消化系统疾病及任意肿瘤的正常青年人外周血,EDTA抗凝. 所有标本于-70℃冰箱保存. EZ DNA Methylation-Gold kitTM试剂盒购自北京天漠技术开发有限公司,甲基化转移酶Sss I为美国New England公司产品,引物委托大连宝生物公司合成. PCR Taq Mix酶及Marker购自东盛生物科技有限公司.

1.2 方法 采用酚-氯仿抽提,冰乙醇沉淀方法回收提纯DNA, -20℃保存. 紫外分光光度计测其纯度. 按照EZ DNA Methylation-Gold kitTM试剂盒说明进行DNA甲基化修饰. DNA甲基化、非甲基化引物参照文献^[2]合成,扩增片段212 bp. 5M: 5'-TTACGAGGGGCGGTCTGTCGCGGG-3', 3M: 5'-AAAACGACCGACGCGAACGCC-TCC-3'; 非5U: 5'-TTATGAGGGGTGGTTGTATGTGGG-3', 3U: 5'-AAAACAACCAACACAAACA CCTCC-3'. PCR反应体系为25 μ L,包括Taq Mix酶12.5 μ L,上、下游引物各1 μ L,模板(以上修

饰的DNA)2 μ L,双蒸水8.5 μ L. 循环参数为:甲基化反应条件: 95℃预变性3 min, 95℃变性30 s, 64.5℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共35个循环,最后延伸5 min; 非甲基化反应条件: 95℃预变性3 min, 95℃变性30 s, 63℃退火30 s, 72℃延伸30 s,共35个循环,最后延伸5 min. 2%的琼脂糖凝胶电泳,EB染色,紫外光灯检测结果(M为甲基化引物, U为非甲基化引物). 每批标本均同时扩增甲基化酶Sss I修饰和未修饰的提取的正常青年人外周血DNA作为甲基化阳性和非甲基化阳性对照. 阴性对照为双蒸水. 分别只有M引物和U引物得到预期大小的扩增片段,阴性对照未得到任何产物,提示实验技术及所用引物和试剂正确,实验结果可信.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件对数据进行统计学处理,两样本率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 RUNX3启动子甲基化在胃癌、其对应癌旁组织及全血中的表达 RUNX3在胃癌组织中的甲基化率为45%(36/80),对应癌旁组织中的甲基化率为0%(0/80),全血中的甲基化率为40%. 胃癌组织及全血中的甲基化表达,两者差异无统计学意义($P > 0.05$,表1).

2.2 胃癌组织、全血RUNX3启动子甲基化表达与临床及病理特征的关系 胃癌组织、全血中RUNX3启动子甲基化表达与患者性别、年龄、肿瘤部位之间差异无统计学意义($P > 0.05$,表2). 有淋巴转移组的RUNX3启动子甲基化表达高于无转移组($P < 0.05$,表2). 分化程度高的实验组RUNX3启动子甲基化表达低于分化程度低的实验组($P < 0.05$,表2).

2.3 RUNX3甲基化在胃癌组织及其对应癌旁组织、全血中的表达MSP检测结果 在电泳图中,同一标本胃癌组织检测到甲基化和非甲基化两种结果,可能与取材有关;对应癌旁组织未检测到甲基化,全血中检测到甲基化(图1).

3 讨论

DNA甲基化是指在DNA甲基转移酶DNMTs(DNA methyltransferases)的介导下,二核苷酸中胞嘧啶(C)的第5位C原子上的H被S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基取代,使之变成5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m5C)的化学修饰过程. DNA基因组异常甲基化在肿瘤发生、发展中起重要作用.

表 1 RUNX3启动子甲基化在胃癌组织及其对应全血中的表达

组织	甲基化表达	非甲基化表达	χ^2 值	P值
癌组织	36	44	14.48	>0.05
全血	32	48		

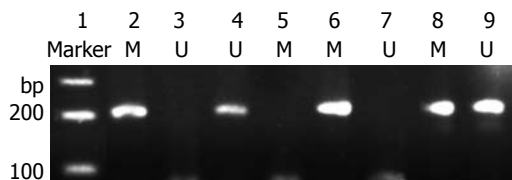


图 1 RUNX3甲基化在胃癌组织及其对应癌旁组织、全血中的表达MSP检测结果. 1: Marker; 2: 甲基化阳性对照; 3: 非甲基化阳性对照; 4-5: 癌旁组织; 6-7: 全血; 8-9: 癌组织.

RUNX3基因是Levanon *et al*于1994年发现的,最初被命名为急性髓性白血病2基因^[3],以后又被称作多瘤病毒强化因子结合蛋白2基因、核心结合因子 α 3基因^[4-5]. RUNX3基因家族是一类具有RUNX保守域的转录因子家族,在哺乳动物中该家族包括基因runx1、runx2和runx3^[6]. runx1是人类白血病常见的突变基因,是闭锁颅骨发育异常的有关基因^[6-7]. 已发现RUNX3在神经发生过程中发挥关键性作用. 2002年日本学者Li *et al*首例发现RUNX3有调节胃上皮细胞的增生与凋亡平衡的作用. 人类RUNX3位于染色体1p36.1,是runx家族中最小也是迄今对其研究最少的基因,全长67 kb,含有6个外显子和p1和p2 2个启动子,2个启动子富含GC, p2启动子GC含量达到64%,易发生甲基化变化.

Li *et al*^[2]采用PCR-SSCP方法检测119例胃癌组织中RUNX3的基因编码区域,结果发现仅1例(1/119)胃癌组织存在RUNX3突变. Li *et al*发现联合应用DNA甲基化转移酶抑制剂5-氮唑2-脱氧胞苷、组蛋白去乙酰酶抑制剂曲古抑菌素可以使RUNX3失表达的胃癌细胞系恢复表达活性,进一步证实了是RUNX3基因启动子区甲基化导致了RUNX3基因的失表达,而不是基因本身的突变和基因杂合性缺失所致. 表明RUNX3基因在胃癌中很少发生突变, RUNX3基因启动子区异常甲基化是主要失活机制.

Lee *et al*^[8]检测胃癌患者肿瘤和血液中基因(DAP2Kinase、E2cadherin、GSTP1、p15、p16)启动子甲基化情况,发现血液中细胞异常甲基化能如实反映肿瘤中基因异常甲基化情况. 由此可见,基因启动子甲基化对于胃癌的早期诊

表 2 胃癌组织及其对应全血RUNX3启动子甲基化表达与临床及病理特征的关系

临床因素	n	癌组织			全血		
		甲基化(n)	χ^2 值	P值	甲基化(n)	χ^2 值	P值
性别							
男	44	24	3.60	>0.05	22	0.57	>0.05
女	36	12			10		
年龄(岁)							
>50	58	24	1.10	>0.05	24	0.09	>0.05
50	22	12			8		
淋巴结转移							
有	54	26	10.20	<0.05	27	6.92	<0.05
无	26	10			5		
浸润深度							
T1-T2	31	11	1.85	>0.05	8	4.25	>0.05
T3-T4	49	25			24		
肿瘤部位							
胃窦	48	24	1.24	>0.05	23	3.24	>0.05
胃体	16	6			5		
贲门	16	6			4		
分化程度							
高中	38	10	10.10	<0.05	7	6.40	<0.05
低	42	26			25		

断、高危人群的检测、肿瘤风险的评估具有重要指导意义. 本研究胃癌组织中有36例发生甲基化,甲基化率为45%,对应全血中有32例,甲基化率为40%,癌旁组织中未检测到发生甲基化. 全血中甲基化的检出率为88.9%. 胃癌组织中与全血中甲基化率差异,可能是肿瘤细胞尚未脱落入血或是末梢血液肿瘤细胞数量太少,未达到实验检测水平. 但在癌组织中未检测出甲基化的在全血中也未检测出,说明全血中甲基化特异性为100%. 因甲基化发生在胃癌的早期,为提高检出率,对于高危人群可采取同一患者同时检测多份血样或是短时间内复查血样.

同时,分析胃癌组织及全血中甲基化情况与临床及病理特征的关系,显示甲基化率与年龄、性别、肿瘤发生部位及肿瘤浸润深度无关,与肿瘤的分化程度、有无淋巴结转移相关. 提示RUNX3基因启动子甲基化情况可用于判断肿瘤的转移情况,预测胃癌的手术、放化疗疗效等.

胃癌的早期诊断对于改善预后至关重要,胃癌相关基因启动子异常甲基化是细胞癌变过程中的一个早期事件、频发事件,且经研究RUNX3对胃癌的特异性高于其他胃癌相关基因,所以RUNX3有可能成为胃癌早期诊断的特异性基因.

名词解释

DNA甲基化:指在DNA甲基转移酶(DNMTs)的介导下,二核苷酸中胞嘧啶(C)的第5位C原子上的H被S-腺苷甲硫氨酸提供的甲基取代,使之变成5-甲基胞嘧啶(m5C)的化学修饰过程. 人类RUNX3位于染色体1p36.1,是runx家族中最小也是迄今对其研究最少的基因,全长67 kb,含有6个外显子和p1、p2两个启动子,两个启动子富含GC, p2启动子GC含量达到64%,易发生甲基化变化.

同行评价
本研究选题较好,
设计合理, 结果可
信, 有较好的参考
价值.

由于DNA甲基化异常不仅可在手术标本中检测到, 还能从各种体液中检测到, 如外周血清/血浆及唾液、痰等, 给检测带来极大便利. 基因的异常甲基化是可逆的过程, 通过甲基化酶抑制剂使沉默的基因重新表达, 成为肿瘤治疗的一种新手段.

4 参考文献

- 1 陆再英, 钟南山. 内科学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 396-401
- 2 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 3 Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y,

Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene--sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001; 279: 221-232

- 4 Bae SC, Choi JK. Tumor suppressor activity of RUNX3. *Oncogene* 2004; 23: 4336-4340
- 5 Ito Y. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells* 1999; 4: 685-696
- 6 Nam S, Jin YH, Li QL, Lee KY, Jeong GB, Ito Y, Lee J, Bae SC. Expression pattern, regulation, and biological role of runt domain transcription factor, run, in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 547-554
- 7 Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 43-47
- 8 Lee TL, Leung WK, Chan MW, Ng EK, Tong JH, Lo KW, Chung SC, Sung JJ, To KF. Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1761-1766

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》名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写. (科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

序贯结肠透析联合人工肝治疗慢性重型肝炎25例

冯洪玲, 李 谦, 唐克诚, 杨积明, 王邦茂

冯洪玲, 李谦, 唐克诚, 杨积明, 天津市传染病医院 天津肝病研究所 天津市 300192

王邦茂, 天津医科大学总医院消化内科 天津市 300052

作者贡献分布: 冯洪玲与李谦对此文所作贡献均等; 此课题由王邦茂设计; 研究过程由冯洪玲操作完成; 研究所用工具由唐克诚提供; 数据分析由冯洪玲完成; 本论文写作由杨积明与冯洪玲完成。

通讯作者: 冯洪玲, 300192, 天津市南开区苏堤路75号, 天津市传染病医院, 天津肝病研究所, fenghongling1116@sohu.com
电话: 022-27468241

收稿日期: 2009-08-22 修回日期: 2009-11-02

接受日期: 2009-12-07 在线出版日期: 2009-12-18

Efficacy of sequential colon dialysis in combination with artificial liver support system in treating chronic severe hepatitis: a report of 25 cases

Hong-Ling Feng, Qian Li, Ke-Cheng Tang,
Ji-Ming Yang, Bang-Mao Wang

Hong-Ling Feng, Qian Li, Ke-Cheng Tang, Ji-Ming Yang, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin Institute of Hepatology, Tianjin 300192, China

Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Hong-Ling Feng, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin Institute of Hepatology, Tianjin 300192, China. fenghongling1116@sohu.com

Received: 2009-08-22 Revised: 2009-11-02

Accepted: 2009-12-07 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of sequential colon dialysis in combination with artificial liver support system in treating patients with chronic severe hepatitis.

METHODS: Fifty patients with chronic severe hepatitis were randomly and equally divided into two groups: treatment group and control group. Patients in the control group underwent comprehensive management of severe hepatitis and artificial liver treatment, while those in the treatment group underwent comprehensive management of severe hepatitis, artificial liver treatment and sequential colon dialysis. The therapeutic efficacy and the incidence of complications were compared between the two groups.

RESULTS: The incidences of debilitation, abdominal distention, constipation and endotoxemia in pretreated patients were 62.86%, 65.71%, 51.43% and 100%, respectively. After treatment, these symptoms were improved and the levels of bilirubin, prothrombin activity (PTA), endotoxin (ET) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) decreased in all patients. The efficacy achieved in the treatment group was superior to that in the control group (all $P < 0.05$ or 0.01). The incidences of infection, hepatorenal syndrome, hepatic encephalopathy and alimentary tract hemorrhage in the treatment group were significantly lower than those in the control group (22.22% vs 58.82%, 5.56% vs 41.18%, 11.11% vs 58.82%, and 22.22% vs 58.82%, respectively; $\chi^2 = 4.880, 6.291, 8.834$, and 4.880 , respectively; all $P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: Sequential colon dialysis can improve the symptoms, decrease the levels of serum endotoxin, TNF- α and bilirubin, shorten prothrombin time, and reduce the incidence of complications in patients with chronic severe hepatitis.

Key Words: Sequential colon dialysis; Chronic severe hepatitis; Artificial liver support system; Endotoxin

Feng HL, Li Q, Tang KC, Yang JM, Wang BM. Efficacy of sequential colon dialysis in combination with artificial liver support system in treating chronic severe hepatitis: a report of 25 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3657-3660

摘要

目的: 观察序贯结肠透析联合人工肝支持系统对慢性重型肝炎的治疗效果。

方法: 将50例患者随机分为治疗组和对照组。两组均给予重型肝炎综合治疗及人工肝治疗, 治疗组在对照组的基础上, 先予序贯结肠透析, 第2天再给予人工肝治疗。分别于治疗前及治疗后4 wk观察患者症状、肝功能(总胆红素, TBIL)、凝血酶原活动度、血氨、血清内毒素、细胞因子(TNF- α)及并发症变化。

背景资料

近年来血液净化技术飞速发展, 已形成一套完整的人工肝支持系统, 有效降低了重型肝炎的病死率, 但当前的血液净化治疗方法尚存在共同缺点, 即不能阻止或减少肠源性的有害物质(如内毒素、氨等)以及由其激发的体内多种炎症因子的继续产生和吸收, 造成对肝脏及其他脏器的持续打击, 致使病情恶化。因此寻找有效的治疗方法, 对有害物质的来源、产生途径和吸收环节进行干预, 显得尤为重要。

同行评议者

范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科

相关报道

随着血液净化技术的飞速进展,逐渐形成了一套完整的人工肝支持系统,使重型肝炎的病死率有所下降,为了弥补血液净化治疗的不足,“体内血液净化”理论为更多的人所重视。张振纲 *et al*报道应用高位结肠灌洗治疗肝性脑病取得了较好疗效。

结果:治疗前慢性重型肝炎乏力、腹胀的发生率分别为62.86%、65.71%,有51.43%的患者需采用灌肠或应用开塞露治疗,内毒素血症发生率为100%。经治疗,两组乏力、腹胀症状均有所好转,胆红素、血氨、内毒素、细胞因子下降,凝血酶原活动度回升。与对照组比较,治疗组在腹胀、大便次数、胆红素下降、血氨下降、凝血酶原活动度回升、内毒素下降及细胞因子下降等方面均优于对照组($P<0.05$ 或 0.01)。治疗后,治疗组感染、肝肾综合征、肝性脑病、胃肠道出血并发症的发生率(22.22%、5.56%、11.11%、22.22%)较对照组(58.82%、41.18%、58.82%、58.82%)低($\chi^2=4.880$ 、 6.291 、 8.834 、 4.880 ; $P<0.05$ 或 0.01)。

结论:序贯结肠透析治疗慢性重型肝炎疗效显著,可缓解患者症状、有效降低血清内毒素及细胞因子水平,促进胆红素、血氨下降,提高凝血酶原活动度,减少并发症的发生率。

关键词:序贯结肠透析;慢性重型肝炎;人工肝支持系统;内毒素

冯洪玲,李谦,唐克诚,杨积明,王邦茂.序贯结肠透析联合人工肝治疗慢性重型肝炎25例.世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3657-3660
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3657.asp>

0 引言

重型肝炎病情进展迅速,病死率极高,目前人工肝已成为治疗重型肝炎的重要措施,但人工肝治疗仅能清除血清中已存在的内毒素和炎症因子,采取有效措施减少肠源性内毒素的产生与吸收或直接拮抗内毒素活性,可从根本上减轻内毒素导致的肝细胞损伤,与人工肝联合应用可望取得更好疗效。为探索治疗重型肝炎的新途径和新方法,我院采用中西医结合序贯结肠透析治疗慢性重型肝炎,取得了较好疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 所有病例均为本院2003-08/2008-01住院患者50例,其中男30例、女20例;年龄19-65(平均 41.78 ± 9.95)岁。诊断为慢性重型肝炎,其中乙型肝炎33例、乙型合并戊型肝炎6例、丙型肝炎5例、酒精性肝病4例、原发性硬化性胆管炎2例,均为早、中期患者,早期9例、中期41例,除外心脑血管、肺、肾、内分泌和造血系统原发性疾病。诊断符合2000年全国第十次病毒性肝炎及肝病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》^[1]。

将患者随机分为治疗组与对照组均为25例。

1.2 方法

1.2.1 治疗:对照组予以重型肝炎基础治疗方案:均卧床休息,供应足够能量基础治疗;给予促肝细胞生长素、还原型谷胱甘肽、前列地尔等药物保肝、促进肝细胞生长、改善肝脏微循环等治疗;人工肝治疗采用冰冻新鲜血浆行血浆置换治疗,视病情变化每周2-3次,每次2600-3000 mL。

治疗组在对照组的基础上先进行序贯结肠透析,第2天进行血浆置换治疗。采用北京智立医学仪器有限公司生产的IMS-100A型结肠途径治疗机治疗,机器自行控制液体温度 36.5°C - 37.5°C 。治疗前,肛门指诊阴性后,用医用凡士林润滑专用插肛器(含外套管及内探条,外套管有进液口和排液口),缓慢送入肠腔,遇阻稍作方向调整,插入深度约40-50 cm,取出内探条,将一次性管路分别连接于透析机的进液口及排液口,废液自排液管流出。治疗过程分三部分进行。结肠灌洗:予生理盐水清结灌洗,根据患者舒适度调节液体流速,直到无粪便排出为止,约进行20-30 min;结肠乳果糖灌洗:予乳果糖灌肠液400 mL灌洗,约进行15 min;中药保留灌肠:通过进液管注入中药400 mL保留灌肠。乳果糖(拉韦,100 mL含乳果糖67 g)灌肠液由200 mL乳果糖及200 mL生理盐水配置浓度达33%,乳果糖由奥地利费森尤斯卡比公司生产;中药灌肠液基础方为大承气汤:按照大黄、厚朴、枳实、芒硝为4:5:4:3比例,大黄后下,芒硝兑入,由我院中药房按质量/体积(W/V)为1:1煎治。每周2-3次,共观察4 wk。

1.2.2 观察指标: (1)临床症状:乏力、腹胀、大便次数。(2)化验检查:分别于治疗前及治疗后4 wk空腹采血化验肝功能:总胆红素(total bilirubin, TBIL)、凝血酶原活动度(prothrombin activity, PTA)、血氨(blood ammonia, NH_3);另同时留血离心后放至 -20°C 冰箱待测内毒素(endotoxin, ET)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)。采用鲎试剂合成基质偶氮显色检测ET,试剂购自上海伊华临床医学科技公司。采用双抗体夹心ELISA法测定TNF- α ,试剂购自深圳晶美生物工程公司。(3)不良反应:大便超过4次/日且呈稀水样便者记入不良反应。

统计学处理 所得数据采用SPSS11.5软件进行统计学分析,死亡及脱落病例未计入统计学分析。计量资料采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验

表 1 两组治疗前后乏力及腹胀变化 $n(\%)$

分组	n	乏力		腹胀	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	18	11(61.11)	2(11.11) ^b	11(61.11)	1(5.56) ^b
对照组	17	11(64.71)	4(23.53) ^a	12(70.59)	6(35.29) ^a
χ^2 值		0.048	0.949	0.349	4.833 ^c
P 值		0.826	0.330	0.555	0.028

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 治疗前; ^c $P<0.05$ vs 对照组.

或秩和检验(Mann-Whitney U法), $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 基本资料 在4 wk观察期内治疗组6例、对照组8例因病情加重而死亡, 治疗组1例因经济困难, 自动出院而脱落, 其观察指标未进行统计学分析. 治疗组共行结肠透析204次、人均11.33次, 行血浆置换204次, 人均11.33次; 对照组进行血浆置换196次, 平均11.53次.

2.2 症状的变化 乏力、腹胀为重型肝炎的常见症状. 两组治疗前, 乏力的发生率分别为治疗组61.11%、对照组64.71%, 腹胀为61.11%、70.59%, 治疗前两组无显著差异. 经4 wk治疗后, 两组症状均有好转, 差别有统计学意义; 治疗组与对照组比较腹胀的发生率差别有统计学意义($\chi^2 = 4.833$, $P<0.05$, 表1). 慢性重型肝炎常伴有便秘次数减少, 治疗前有51.43%的患者需采用灌肠或应用开塞露治疗, 进行结肠透析后可使患者自然排便且大便次数增多, 呈软便或稀软便, 而对照组无明显改变, 治疗组疗效优于对照组($Z = 3.291$, $P<0.01$, 表2).

2.3 临床生化指标及内毒素、细胞因子的变化 血清TBIL、PTA、 NH_3 治疗前两组无显著差异, 治疗后两组TBIL、 NH_3 均有下降, PTA升高, 治疗组疗效优于对照组; 内毒素血症发生率达100%, 两组治疗前血清ET、TNF- α 水平无明显差异, 治疗后均较前下降, 治疗组疗效优于对照组(表3).

2.4 治疗后主要并发症的比较 经4 wk治疗后, 治疗组中感染、肝肾综合征、III-IV度肝性脑病、消化道出血发生率明显低于对照组, 差别有统计学意义(表4).

2.5 不良反应 治疗组中有2例患者出现大便次数增多(5-7次/日), 通过治疗过程中调节灌洗液温度及降低液体流速而缓解; 有11例患者出现下

表 2 两组治疗前后大便次数改变

大便次数	乏力		腹胀	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
0(需灌肠或射肛)	9	0	9	5
1	8	1	7	10
2	1	13	1	2
3-4	0	2	0	0
Z 值		4.836 ^b		1.382
P 值		0.000		0.218

^b $P<0.01$ vs 治疗前.

腹部不适感, 大便后均可缓解.

3 讨论

近年来, 由内毒素诱导的TNF为核心的炎症反应在重型肝炎中的作用受到高度重视. 研究显示, 有效抑制内毒素血症可以促进重型肝炎恢复、减少并发症、提高其存活率^[2-3]. 西医对内毒素血症的治疗目前除应用人工肝治疗以清除血液中内毒素外, 也采取措施减少肠道内毒素的产生与吸收, 乳果糖是一种人工合成的双糖, 可有效降低血清内毒素水平, 已广泛用于重型肝炎的治疗^[4]. 慢性重型肝炎属于中医黄疸病范畴, 为湿热致病, 正虚邪实, 湿热留连不去. 大承气汤是祖国医学具有泻下作用的经典名方, 可有效的防治内毒素血症的发生^[5], 针对结肠黏膜具有天然吸收生物膜特性, 采用中西医结合结肠透析治疗慢性重型肝炎, 有望取得较好疗效.

血浆置换作为人工肝支持系统的主要手段之一, 可清除体内的内毒素、有毒代谢产物和炎性因子, 发挥了“体外血液净化”作用. 同时, 我们将结肠透析进行改良, 采用结肠途径治疗机予结肠灌洗、结肠透析及药物保留灌肠进行序贯结肠透析, 治疗中可到达高位结肠, 充分扩大结肠黏膜的可滤过面积, 达到全结肠灌洗的效果; 同时利用结肠黏膜选择性吸收药物和营养物质、并通过其丰富的循环网络系统运送至组织和器官的特性, 应用减少肠道内毒素产生与吸收的药物作为灌洗液, 拮抗内毒素的生成及活性, 可达到“体内血液净化”作用, 体内外血液净化协同作用, 可使血清内毒素及细胞因子水平明显下降, 阻断瀑布效应, 促进肝脏功能的恢复. 本组资料显示, 慢性重型肝炎内毒素血症发生率达100%, 应用结肠透析及血浆置换治疗后患者血清内毒素水平、细胞因子明显下降、腹胀症状缓解, 但联合治疗组疗效优于对

创新亮点

本文提出了“体内外血液净化”的思路, 即在血液净化的基础上, 将结肠透析技术进行改良, 针对有害物质的来源、产生途径和吸收环节进行干预(即: 体内血液净化), 以减少和阻止有害物质的继续产生和吸收, 阻止对肝脏的持续打击, 达到抑制病情进展的目的.

同行评价

本研究选题有一定的临床指导意义,统计方法应用合理,结果可靠,讨论分析透彻,具有较强的临床实用价值。

表 3 两组临床生化指标、内毒素及细胞因子的变化(mean ± SD)

分组	n	TBIL(μmol/L)		PTA(%)		NH ₃ (μmol/L)		ET(EU/mL)		TNF-α(ng/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
治疗组	18	396.00 ± 39.21	190.08 ± 30.13 ^b	30.70 ± 4.64	42.98 ± 5.18 ^b	88.29 ± 15.71	62.38 ± 20.82 ^b	0.89 ± 0.19	0.26 ± 0.11 ^b	381.83 ± 60.69	114.02 ± 30.90 ^b
对照组	17	395.96 ± 43.54	204.55 ± 28.71 ^b	30.36 ± 4.72	39.91 ± 5.86 ^b	87.70 ± 14.08	78.27 ± 20.81 ^b	0.88 ± 0.17	0.43 ± 0.11 ^b	381.86 ± 61.28	131.52 ± 36.45 ^b
t值		0.056	11.898 ^d	1.183	10.488 ^d	1.080	17.865 ^d	0.095	2.514 ^c	0.021	16.164 ^d
P值		0.956	0.000	0.237	0.000	0.280	0.000	0.925	0.034	0.983	0.000

^bP<0.01 vs 治疗前; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 对照组。

表 4 两组治疗后主要并发症的发生率 n(%)

分组	n	感染	肝肾综合征	Ⅲ-Ⅳ度肝性脑病	消化道出血
治疗组	18	4(22.22)	1(5.56)	2(11.11)	4(22.22)
对照组	17	10(58.82)	7(41.18)	10(58.82)	10(58.82)
χ ² 值		4.880 ^a	6.291 ^a	8.834 ^b	4.880 ^a
P值		0.027	0.012	0.003	0.027

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组。

照组,其可能的机制除结肠透析发挥“体内血液净化”作用外;尚包括:结肠透析发挥渗透性导泻和肠动力性导泻作用使患者排便量增多;经结肠途径吸收的乳果糖作为一种益生元对肠道菌群的调节作用,间接刺激机体免疫系统分泌sIgA、增加肠道局部免疫力^[6-7]等;大承气汤具保护肠道屏障功能、改善肠黏膜通透性、上调单核-巨噬细胞功能,抑制内毒素的吸收并使其灭活等,其机制尚待于进一步研究。

本组资料显示结肠透析及血浆置换治疗后,胆红素水平降低、PTA升高,联合治疗组疗效高于对照组,与李文勇 *et al*^[8]报道一致,考虑与结肠透析后,内毒素所致的继发性肝细胞损伤相对较轻有关。此外,两组治疗后,联合治疗组较对照组血氨下降明显,肝性脑病的发生率低,与张振纲 *et al*^[9]报道一致,考虑一方面乳果糖能降低肠道pH值,减少氨的产生和吸收;亦与结肠透析应用高渗性透析液,利用透析超滤的方式

排除体内多余的水分,在一定程度上减轻了患者的脑水肿有关。本组资料还显示,结肠透析可以降低重型肝炎患者感染、消化道出血、肝肾综合征等的发生率,提示结肠透析有助于减少并发症,改善患者预后。

结肠透析治疗过程中,患者耐受良好,不良反应轻微,有少数患者出现腹泻、下腹部不适感,考虑亦与重型肝炎患者本身存在不同程度胃肠功能不全有关,通过调试灌洗液温度及液体流量,可以缓解。

4 参考文献

- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订.病毒性肝炎防治方案.中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- 郭利民.急性肝衰竭、MODS与人工肝治疗.透析与人工器官 2005; 16: 40-46
- 王嘉川.内毒素血症在重症肝炎发病中的作用.寄生虫病与感染性疾病 2006; 4: 40-42
- 张顺财,戴茜,王吉耀,贺伯明.口服乳果糖对肝病肠源性内毒素血症及细胞因子的影响.中华肝脏病杂志 2000; 8: 185
- 崔克亮,曹书华,王今达.大承气汤对多器官功能障碍综合征防治作用的临床研究.中国中西医结合急救杂志 2003; 10: 12-15
- Harish K, Varghese T. Probiotics in humans-evidence based review. *Calicut Med J* 2006; 4: e3
- 项明洁,刘明,李云珠,王耀莉,倪语星,俞善昌.乳果糖对肠道菌群及SIgA含量的影响.江西医学检验 2002; 20: 72-73
- 李文勇,张振纲,钱宜丹,邱绍勤,田德英.结肠灌洗联合血浆置换序贯治疗慢性重型肝炎内毒素血症的临床研究.中西医结合肝病杂志 2008; 18: 25-26, 31
- 张振纲,田德英,黄元成,许东,李正莲,严先英,魏艳芳.高位结肠灌洗加中药治疗肝性脑病的临床评价.中华传染病杂志 2007; 25: 558-561

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

中国汉族炎症性肠病幽门螺杆菌感染状况分析

庞智, 李美芬, 皇甫照, 周春立, 沈必武

庞智, 周春立, 沈必武, 江苏省苏州市立医院北区消化内科
江苏省苏州市 215008

庞智, 皇甫照, 苏州市消化系疾病与营养研究中心 江苏省苏州市 215008

李美芬, 苏州市立医院北区检验科 江苏省苏州市 215008

作者贡献分布: 此课题由庞智设计; 病例收集由庞智、周春立及沈必武完成; 研究所用试剂与分析工具由李美芬提供; 研究过程由庞智与皇甫照操作完成; 本论文写作由庞智完成。

通讯作者: 庞智, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 215008, 江苏省苏州市广济路242号, 江苏省苏州市立医院北区消化内科。
pangzhi0273@sina.com

电话: 0512-62363122 传真: 0512-65332028

收稿日期: 2009-10-08 修回日期: 2009-11-04

接受日期: 2009-11-09 在线出版日期: 2009-12-18

Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Chinese Han patients with inflammatory bowel disease

Zhi Pang, Mei-Fen Li, Zhao Huangfu, Chun-Li Zhou, Bi-Wu Shen

Zhi Pang, Chun-Li Zhou, Bi-Wu Shen, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (North Campus), Suzhou 215008, Jiangsu Province, China

Zhi Pang, Zhao Huangfu, Research Center on Digestive Diseases and Nutrition of Suzhou, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China

Mei-Fen Li, Department of Laboratory Medicine, Suzhou Municipal Hospital (North Campus), Suzhou 215008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhi Pang, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (North Campus), 242 Guangji Road, Jinchang District, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China. pangzhi0273@sina.com

Received: 2009-10-08 Revised: 2009-11-04

Accepted: 2009-11-09 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the prevalence of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection in Chinese Han patients with inflammatory bowel disease (IBD) and analyze possible associations between *H. pylori* infection and drug therapy for IBD as well as between *H. pylori* infection and the phenotypes of Crohn's disease (CD).

METHODS: One hundred and six unselected patients with IBD, including 54 ulcerative colitis (UC) patients and 52 CD patients, and 106 age- and gender-matched healthy individuals who received a comprehensive medical examination

for a regular checkup purpose were included in the study. The rates of *H. pylori* infection as detected by the gold immunochromatographic assay (GICA) for serum anti-*H. pylori* IgG antibody were compared between IBD patients and controls.

RESULTS: A statistically significant difference was noted in *H. pylori* infection rate between IBD patients (31.1%) and controls (61.3%), and between UC patients (37.0%) and CD patients (25.0%). IBD patients with a history of taking metronidazole (22.3%) or quinolones (19.1%) were found to have a meaningfully lower infection rate, but those who did not take antibiotics still had a significantly lower *H. pylori* infection rate than controls ($P < 0.01$). No significant correlation was noted between the phenotypic characteristics and *H. pylori* infection rate in CD patients.

CONCLUSION: Chinese Han patients with IBD, particularly CD, have a significantly lower *H. pylori* infection rate than healthy controls, suggesting that *H. pylori* infection may predict a low risk of IBD in adults.

Key Words: *Helicobacter pylori* infection; Ulcerative colitis; Crohn's disease

Pang Z, Li MF, Huangfu Z, Zhou CL, Shen BW. Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Chinese Han patients with inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3661-3665

摘要

目的: 调查中国汉族IBD患者*H. pylori*感染情况和IBD治疗药物及克罗恩病(CD)表型与*H. pylori*感染的可能关系。

方法: 收集106例IBD患者, 其中包括54例溃疡性结肠炎(UC)和52例CD, 对照组包括106例年龄和性别及社会经济状况与之匹配且接受了常规的体格检查的健康人。采用*H. pylori* IgG抗体胶体金免疫层析快速诊断试验比较了IBD患者和健康对照者*H. pylori*的感染率。

背景资料
据报道, IBD患者的*H. pylori*感染率明显低于一般人群, 但是*H. pylori*在IBD的发生中是否起作用以及发挥作用的方式并不十分清楚。

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

研究前沿

*H pylori*感染率在我国已经下降,而IBD的发病率明显增加,这表明环境变化与社会经济发展,特别是工业化可能是影响疾病的致病因素。以往研究分析了*H pylori*感染率和IBD既往治疗史的关系特性,但是这种联系仍然存在分歧。

结果:IBD患者和对照组以及UC和CD患者之间*H pylori*感染率,均具有显著性差异(31.1% vs 61.3%, $P<0.01$; 37.0% vs 25.0%, $P<0.05$)。在IBD患者中,曾服用甲硝唑(22.3%)或喹诺酮类抗菌药(19.1%)的患者比对照组*H pylori*感染率显著降低,而没有服用抗生素的患者也表明*H pylori*感染率显著低于对照组。IBD患者的表型特征与*H pylori*感染率没有显著的关系($P>0.05$)。

结论:中国汉族IBD患者,特别是CD患者的*H pylori*感染率显著的低于正常对照者,认为*H pylori*感染在IBD患者中可能是一种低危险因素。

关键词:幽门螺杆菌;溃疡性结肠炎;克罗恩病

庞智,李美芬,皇甫照,周春立,沈必武. 中国汉族炎症性肠病幽门螺杆菌感染状况分析. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3661-3665
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3661.asp>

0 引言

据报道,炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)患者的幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染率明显低于一般人群^[1-3]。然而,尽管对许多潜在的原因,即以往抗生素治疗史,长期使用类似柳氮磺胺吡啶史已进行了研究调查,但是其IBD患者*H pylori*感染率较低的原因仍不清楚^[1-5]。流行病学资料显示,环境因素,如年龄和国籍,与IBD发病率和*H pylori*感染率显著相关^[1-2,6-7]。*H pylori*感染率与年龄正相关,而IBD患者的发病年龄呈双峰分布。过去的几十年,IBD的发病率在一些国家逐渐增加,而*H pylori*和其他类似的传染性疾病的感染率明显下降。此外,*H pylori*的感染率在不同国家有所差异,亚洲国家比西方发达国家高;但IBD在亚洲国家比较少见,在西方发达国家却更加常见。*H pylori*感染率在我国已经下降,而IBD的发病率明显增加,这表明环境变化与社会经济发展,特别是工业化可能是影响疾病的致病因素。我们以往研究分析了*H pylori*感染率和IBD既往治疗史的关系特性^[1-3,8-9],但是这种联系仍然存在分歧。鉴于克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种病因尚不十分清楚的胃肠道慢性炎症性肉芽肿性疾病,临床表现呈多样性,临床过程相对不可预测,故我们分析*H pylori*感染率与CD表型(通过维也纳分类法进行分类)之间的关系^[10-11]。本文研究我国IBD患者的*H pylori*感染率,并试图找出在IBD

的治疗史和CD表型及*H pylori*感染率之间可能的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2007-01/2009-08我院消化中心门诊IBD患者106例,其中CD患者52例,UC患者54例。对照组为106名年龄和性别及社会经济状况匹配的健康体检正常者。近期接受质子泵抑制剂,抗生素和/或铋化合物治疗者被排除在外。

1.2 方法 *H pylori*的测定采用*H pylori* IgG抗体胶体金免疫层析快速诊断试验。IBD患者的临床资料和治疗情况通过问卷形式进行收集。以往应用5-氨基水杨酸,柳氮磺胺吡啶,皮质类固醇激素,抗生素和免疫抑制剂(如硫唑嘌呤)的详细治疗情况由医疗记录和个人面谈核实而获得。抗生素使用史阳性被定义为积累治疗时间超过7 d者。其他药物的使用情况被分类为“未使用”或“连续使用”。吸烟习惯被归类为“从来没有”,“以前吸烟”和“目前吸烟”。社会经济状况基于受到的教育水平进行确定^[12]。(1)“教育程度较低的群体”为受教育达初中水平(<9年)者;(2)“接受更多的教育群体”为高中或以上程度(≥9年)者。根据CD维也纳分类:患者40岁之前被诊断为A1;≥40岁被诊断为A2。病变部位指首次手术前最大范围病变的部位:L1定为疾病限于末端回肠(小肠下1/3,可包括累及盲肠的病变);L2为结肠(盲肠至直肠间病变,无小肠或上消化道病变);L3为回结肠(末端回肠以及升至直肠间病变,盲肠可有或无病变)和L4为上消化道(末端回肠以上,不包括口腔,但不论伴有或不伴有末端回肠或结肠病变)。疾病行为:B1为非狭窄及非穿透型,病程中从无并发症发生;B2为狭窄型(持久性,有狭窄前扩张或梗阻症状,无穿透性病变);B3为穿透型,腹腔内及(或)肛周瘘管或溃疡、炎性包块及(或)脓肿,不包括术后腹腔内并发症及肛周皮赘^[10-11]。

统计学处理 收集资料和数据,采用SPSS13.0统计软件进行分析。*H pylori*感染状况,IBD治疗和CD表型之间的关系使用卡方或 t 检验。进行双侧检验, $P<0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 患者特征 IBD患者的平均年龄为41.6(12-75)岁。CD患者平均年龄为36.7±15.4岁,UC患者42.3±16.1岁和对照组40.9±15.8岁。男性分别占CD患者的57.7%,UC患者的55.5%和正常对

表 1 IBD患者和对照者的临床特征

分组	CD(<i>n</i> = 52)	UC(<i>n</i> = 54)	对照组	<i>P</i> 值
平均年龄(岁)	36.7 ± 15.4	42.3 ± 16.1	40.9 ± 15.8	
男/女	30/22	30/24	60/46	
受教育(%)				
<9年	38.5 ^a	44.4 ^a	30.1	
9年	61.5 ^a	55.6 ^a	69.9	<0.05
<i>H. pylori</i> +(%)	25.0 ^a	37.0 ^a	61.3	<0.05

^a*P*<0.05 vs 对照组.表 2 IBD患者的治疗史与*H. pylori*感染的相关性

药物种类	<i>H. pylori</i> 感染率(%)	
	治疗者	非治疗者
柳氮磺胺吡啶	29.1	37.0
5-氨基水杨酸	29.5	33.3
类固醇	30.3	33.3
硫唑嘌呤	29.6	31.6
甲硝唑	22.3	46.2 ^b
喹诺酮类	19.1	39.1 ^b

^b*P*<0.01 vs 治疗者.

照者的56.6%。我们确定接受教育水平作为社会经济状况指标,在对照者中较高(*P*<0.05,表1)。

2.2 IBD患者的*H. pylori*感染率 25.0%的CD患者,37.0%的UC患者和61.3%的健康对照者感染了*H. pylori*(*P*<0.05,表1)。IBD患者*H. pylori*感染率明显低于对照组(31.1% vs 61.3%, *P*<0.01,经检测CD患者*H. pylori*感染率显著低于UC患者(25.0% vs 37.0%, *P*<0.05,表1)。

2.3 IBD患者的治疗史与*H. pylori*感染的相关性 使用和未使用抗生素的IBD患者之间, *H. pylori*感染率显著不同(表2)。使用了甲硝唑(22.3%)或喹诺酮类(19.1%)1 wk或更长时间的IBD患者, *H. pylori*感染率比未使用者明显降低(*P*<0.01),而没有服用抗生素的患者也表明*H. pylori*感染率也显著低于对照组。在IBD患者中,发现使用抗生素以外的其他4种药物对*H. pylori*感染率无明显影响(表2)。

2.4 按维也纳分类的CD患者*H. pylori*感染率 当病例按首次诊断时的年龄进行分类时, A1的*H. pylori*感染率为23.7%(<40岁)和A2组为28.6%(≥40岁)(*P*<0.05)。CD的病变部位与*H. pylori*感染率无显著相关,即L1(末端回肠)为28.5%, L2(结肠)为21.1%, L3(回结肠)为29.2%和L4(上消化道)为

表 3 CD患者的表型与*H. pylori*感染率的关系

亚类	<i>n</i>	<i>H. pylori</i> 感染率(%)
年龄		
A1(<40岁)	38	23.7
A2(≥40岁)	14	28.6
病变部位		
L1(末端回肠)	7	28.5
L2(结肠)	19	21.1
L3(回结肠)	24	29.2
L4(上消化道)	2	0.0
疾病的行为		
B1(非狭窄和非穿孔)	35	22.9
B2(狭窄)	11	27.2
B3(穿孔)	6	33.3

0%。当根据疾病的行为进行分类时, *H. pylori*感染率在B1(非狭窄和非穿孔)为28.5%, 在B2(狭窄)为21.1%和在B3为29.2%(穿孔), 但这不具有统计学意义(表3), CD患者*H. pylori*感染率与其疾病的表型特征之间无显著相关(*P*>0.05)。

3 讨论

我们的研究结果证实, IBD患者*H. pylori*感染率较低,特别是在CD患者,其感染率只有正常对照者的三分之一。此外,与UC患者相比,CD患者的*H. pylori*感染明显降低。虽然在本研究中没有对IBD发病年龄进行分组,在年龄较轻的群体发现*H. pylori*感染率和IBD的发病率之间是一个重要反比关系,这表明,在成年早期*H. pylori*感染可能影响IBD的发病率。从这个结果,我们推断在成年人中*H. pylori*感染可能防止IBD的发生,这一研究结果与Luther *et al*^[1]最近发表的一份荟萃分析结果一致,认为IBD患者*H. pylori*感染率较低, *H. pylori*感染可能对罹患IBD具有保护作用。

IBD患者*H. pylori*感染率较低的机制仍不明。然而, *H. pylori*感染被认为是与环境因素(例如,在童年和青春期的卫生条件)有关的^[13-15]。有人建议,IBD发展也可能受环境因素的影响,如家庭卫生,喂养方式和围产期感染情况^[1-2,16]。因此,IBD患者*H. pylori*感染率较低可能是由于在童年和青少年时期具有较好的个人卫生和环境卫生,这可能使他们易患IBD^[1-2,17-18]。这一主张是与以往的研究表明,改善个人卫生可能增加IBD的风险的结论是一致的。正如前面已被提到的过敏和自身免疫性疾病中,“卫生假说”也许可以解释*H. pylori*感染和IBD之间的因果关系。改善其生活水准,包括更好地营养,食品安全,清洁

相关报道

本研究结果与Luther *et al*最近发表的一份荟萃分析结果一致,认为IBD患者*H. pylori*感染率较低, *H. pylori*感染可能对罹患IBD具有保护作用。

应用要点
*H pylori*感染与IBD的发病率之间呈反比关系,表明*H pylori*感染可能对成年IBD患者疾病的发展有非特异性保护作用。

用水,改善卫生设施,导致逐步减少了传染性疾病的发生率。由于对自身抗原,过敏原,和/或抗原不恰当的免疫病理应答,以及减少与传染性病菌和寄生虫的接触增加了免疫系统紊乱^[19]。虽然临床与实验研究微生物因素与随后的IBD风险之间的关系产生了相互矛盾的结果^[1-2,20-22],我们研究表明,*H pylori*感染可能对IBD的发展有一个非特异性预防作用。两份报道的3个病例支持这个可能性。Tursi *et al*^[22]和Jovanovic *et al*^[23]报道的病例,在根治*H pylori*后CD迅速发展,但他们无法解释为什么发生了。虽然他们认为,这可能一直是纯属巧合,或在抗菌治疗前CD就已经存在,他们还指出,根除*H pylori*引起的免疫反应对罹患CD具有明显影响的可能性。他们还建议长期*H pylori*感染可能造成Th(T-辅助性)1和Th2表型之间的不稳定平衡,并根除*H pylori*可能通过减少Th2型(一种抗炎细胞因子)诱导Th1细胞模式,并随后增加促炎症细胞因子。因此,优势的Th1细胞模式可能有利于Th1细胞有关的慢性炎症疾病,如CD的发病。

早期的研究报道说,通过柳氮磺胺吡啶治疗CD后*H pylori*阳性率可减少。但是,几个体外研究不能表明,柳氮磺胺吡啶对*H pylori*有任何杀菌或抑菌作用^[1-2,24]。另一方面,一些研究报道说,抗生素减少*H pylori*阳性率。因此,我们研究了IBD治疗药物(柳氮磺胺吡啶,5-氨基水杨酸,类固醇,硫唑嘌呤,甲硝唑和喹诺酮类)对*H pylori*感染率的影响。本研究表明,目前或过去使用抗生素(甲硝唑和喹诺酮类)超过1 wk可以降低*H pylori*感染率,但观察到使用其他药物的研究无显著影响。然而,这并不意味着使用抗生素已完全造成IBD患者较低的*H pylori*感染率,因为没有使用任何抗生素的IBD患者比对照组也有显著降低*H pylori*感染率。

本研究还表明,CD患者比UC患者*H pylori*感染率显著降低。我们认为,CD患者这种低感染率的可能是由于患者的经常和长期使用抗生素治疗脓肿或肛瘘,或在其围手术期间进行治疗,这支持我们的调查结果:IBD治疗影响*H pylori*感染率。本研究中,我们分析了*H pylori*感染率和CD表型(使用维也纳分类年龄,病变部位和行为)之间的关系。据我们的调查结果,年龄是唯一的与*H pylori*感染率显著相关的特点。但是,在解释这一结果时应考虑到几个因素,因为IBD的发生往往是渐进的,缓解和复发在不同时期的相互交错,这使得发病时的年龄难以确定。此外,在病程期间疾病行为不断变化。

总之,在中国患者中能发现*H pylori*感染与IBD的发病率之间呈反比关系,表明*H pylori*感染可能对成年IBD患者疾病的发展有非特异性保护作用。此外,临床治疗(除使用抗生素外)和表型特征(除年龄)被发现对*H pylori*感染率无显著影响。需要进一步研究,以确定是否*H pylori*感染会影响IBD的发生,是否可作为一种保护因子。

4 参考文献

- 1 Luther J, Dave M, Higgins PD, Kao JY. Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: A meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflamm Bowel Dis* 2009 Sep 16. [Epub ahead of print]
- 2 Song MJ, Park DI, Hwang SJ, Kim ER, Kim YH, Jang BI, Lee SH, Ji JS, Shin SJ. [The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korean patients with inflammatory bowel disease, a multicenter study] *Korean J Gastroenterol* 2009; 53: 341-347
- 3 Halme L, Rautelin H, Leidenius M, Kosunen TU. Inverse correlation between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 1996; 49: 65-67
- 4 Matsumura M, Matsui T, Hatakeyama S, Mataka H, Uno H, Sakurai T, Yao T, Oishi T, Iwashita A, Fujioka T. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and correlation between severity of upper gastrointestinal lesions and *H. pylori* infection in Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol* 2001; 36: 740-747
- 5 Pearce CB, Duncan HD, Timmis L, Green JR. Assessment of the prevalence of infection with *Helicobacter pylori* in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 439-443
- 6 Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-1517
- 7 Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2006; 130: 65-72; quiz 211
- 8 Püspök A, Dejaco C, Oberhuber G, Waldhör T, Hirschl AM, Vogelsang H, Gasche C. Influence of *Helicobacter pylori* infection on the phenotype of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3239-3244
- 9 Prónai L, Schandl L, Orosz Z, Magyar P, Tulassay Z. Lower prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with inflammatory bowel disease but not with chronic obstructive pulmonary disease - antibiotic use in the history does not play a significant role. *Helicobacter* 2004; 9: 278-283
- 10 Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8-15
- 11 赵凝, 郑家驹, 庞智, 吴艳, 吴士良. 克罗恩病基因型与表现型及其临床联系. *中华消化杂志* 2006; 26: 643-645
- 12 Kim MH, Kim MK, Choi BY, Shin YJ. Educational

- disparities in the metabolic syndrome in a rapidly changing society--the case of South Korea. *Int J Epidemiol* 2005; 34: 1266-1273
- 13 Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9 Suppl 1: 1-6
- 14 Nishise Y, Fukao A, Takahashi T. Risk factors for *Helicobacter pylori* infection among a rural population in Japan: relation to living environment and medical history. *J Epidemiol* 2003; 13: 266-273
- 15 Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Northfield TC. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* 1992; 339: 896-897
- 16 Duggan AE, Usmani I, Neal KR, Logan RF. Appendicectomy, childhood hygiene, *Helicobacter pylori* status, and risk of inflammatory bowel disease: a case control study. *Gut* 1998; 43: 494-498
- 17 Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994; 343: 766-767
- 18 Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-920
- 19 Basset C, Holton J, Bazeos A, Vaira D, Bloom S. Are *Helicobacter* species and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* involved in inflammatory bowel disease? *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1425-1432
- 20 Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4807-4812
- 21 Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519
- 22 Tursi A. Onset of Crohn's disease after *Helicobacter pylori* eradication. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1008-1009
- 23 Jovanovic IR, Milosavjevic TN, Jankovic GP, Micev MM, Dugalic PD, Saranovic D, Ugljesic MM, Popovic DV, Bulajic MM. Clinical onset of the Crohn's disease after eradication therapy of *Helicobacter pylori* infection. Does *Helicobacter pylori* infection interact with natural history of inflammatory bowel diseases? *Med Sci Monit* 2001; 7: 137-141
- 24 el-Omar E, Penman I, Cruikshank G, Dover S, Banerjee S, Williams C, McColl KE. Low prevalence of *Helicobacter pylori* in inflammatory bowel disease: association with sulphasalazine. *Gut* 1994; 35: 1385-1388

同行评价
本文是我国首例探讨炎症性肠病发病与幽门螺杆菌感染相关性的文章, 选题准确, 设计合理, 结果可靠, 学术价值很好.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (科学编辑: 李军亮 2009-12-18)

含替硝唑序贯疗法根除幽门螺杆菌62例

赵清喜, 黄德瑜

背景资料
我国 *H. pylori* 共识意见(2007·庐山)指出, 对消化性溃疡、早期胃癌术后、胃 MALT 淋巴瘤、有胃黏膜萎缩、糜烂或有消化不良症状的慢性胃炎的患者, 必须根除 *H. pylori*, 然而随着 *H. pylori* 对抗生素耐药菌株的增加, 一些以往 *H. pylori* 根除率高的方案疗效也随着下降。

赵清喜, 黄德瑜, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003
作者贡献分布: 赵清喜对此文作主要贡献; 此课题有赵清喜设计; 研究过程、数据分析及论文撰写由赵清喜与黄德瑜完成。
通讯作者: 赵清喜, 副主任医师, 硕士生导师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科。
qxzhao007@sina.com
电话: 0532-82911304 传真: 0532-82911840
收稿日期: 2009-11-05 修回日期: 2009-12-03
接受日期: 2009-12-07 在线出版日期: 2009-12-18

Efficacy of tinidazole-containing sequential therapy in the eradication of *Helicobacter pylori* infection

Qing-Xi Zhao, De-Yu Huang

Qing-Xi Zhao, De-Yu Huang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Correspondence to: Qing-Xi Zhao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. qxzhao007@sina.com
Received: 2009-11-05 Revised: 2009-12-03
Accepted: 2009-12-07 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To compare the efficacy of tinidazole-containing sequential therapy versus the standard triple therapy in the eradication of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection.

METHODS: A total of 120 *H. pylori*-infected patients with endoscopically diagnosed peptic ulcer or chronic gastritis were enrolled. The patients were randomly divided into trial group ($n = 62$) and control group ($n = 58$). The trial group received pantoprazole 40 mg plus amoxicillin 1.0 g for 5 days, and pantoprazole 40 mg plus clarithromycin 500 mg and tinidazole 500 mg for another 5 days, while the control group received the standard 7-day triple therapy (pantoprazole 40 mg plus clarithromycin 500 mg and amoxicillin 1 g for 7 days). All drugs were given twice daily. *H. pylori* infection status was compared between the two groups after completion of treatment.

RESULTS: The eradication rates achieved in the

trial group were significantly greater than those in the control group in the intention-to-treat analysis (83.87% vs 67.24%, $P < 0.05$) and the per-protocol analysis (89.66% vs 72.22%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The 10-day tinidazole-containing sequential therapy can achieve a higher eradication rate of *H. pylori* infection than the standard 7-day triple therapy.

Key Words: Tinidazole; *Helicobacter pylori*; Sequential therapy

Zhao QX, Huang DY. Efficacy of tinidazole-containing sequential therapy in the eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3666-3669

摘要

目的: 观察由泮托拉唑、替硝唑、阿莫西林、克拉霉素组成的10日序贯疗法根除幽门螺杆菌(*H. pylori*)的疗效。

方法: 将经胃镜检查确诊为慢性胃炎和消化性溃疡且 *H. pylori* 阳性的患者120例随机分为两组, 治疗组(62例)方案为前5 d给予泮托拉唑+阿莫西林, 后5 d给予泮托拉唑+克拉霉素+替硝唑; 对照组(58例)三联疗法为泮托拉唑+阿莫西林+克拉霉素, 疗程7 d。比较治疗后两组患者 *H. pylori* 根除率。

结果: 治疗组和对照组 *H. pylori* ITT根除率分别为83.87%和67.24%, PP根除率分别为89.66%和72.22%, 两组分别有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 含替硝唑的10日序贯疗法治疗 *H. pylori* 感染具有较高的根除率。

关键词: 替硝唑; 幽门螺杆菌; 序贯疗法

赵清喜, 黄德瑜. 含替硝唑序贯疗法根除幽门螺杆菌62例. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3666-3669
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3666.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染

同行评议者
蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

是胃炎和其他相关性疾病(胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤)的主要病因^[1]. 我国*H pylori*共识意见(2007•庐山)^[2]指出, 对消化性溃疡、早期胃癌术后、胃MALT淋巴瘤、有胃黏膜萎缩、糜烂或有消化不良症状的慢性胃炎的患者, 必须根除*H pylori*, 然而随着*H pylori*对抗生素耐药菌株的增加, 一些以往*H pylori*根除率高的方案疗效也随着下降^[3]. 我科2008-04/2008-08应用10日序贯疗法对62例*H pylori*阳性慢性胃炎、胃十二指肠溃疡患者进行根除治疗, 短期疗效满意, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 收集患者120例, 均符合以下条件: (1)胃镜检查确诊*H pylori*阳性胃或十二指肠溃疡, 及*H pylori*阳性的有胃黏膜萎缩、糜烂或有消化不良症状的慢性胃炎; (2)4 wk内未使用质子泵抑制剂(PPI)、H₂受体拮抗剂、铋剂、胃黏膜保护剂、抗生素、益生菌; (3)治疗期间禁止服用其他药物; (4)无药物过敏史; (5)无消化系大出血和幽门梗阻、穿孔等并发症; (6)无消化系手术史; (7)无严重心、肺、肝、肾功能不全; (8)排除癌性溃疡、复合性溃疡. 随机分为2组: 治疗组62例, 男35例, 女27例, 包括慢性胃炎28例, 消化性溃疡34例(其中胃溃疡14例, 十二指肠溃疡20例), 年龄18-69(平均35)岁; 对照组58例, 男33例, 女25, 包括慢性胃炎26例, 消化性溃疡32例(其中胃溃疡11例, 十二指肠溃疡21例), 年龄19-68(平均37)岁. 治疗组失访4例, 对照组失访4例, 最后有效病例112例. 两组的性别、年龄比较, 差异无显著性($P>0.05$), 具有可比性.

1.2 方法

1.2.1 治疗: 试验组患者前5 d泮托拉唑钠肠溶胶囊40 mg(杭州中美华东制药有限公司), 阿莫西林1000 mg(山东鲁抗医药股份有限公司), 每日2次, 口服. 后5 d泮托拉唑钠肠溶胶囊40 mg, 克拉霉素500 mg(江苏恒瑞医药股份有限公司), 替硝唑500 mg(湖北广济药业股份有限公司), 每日2次, 口服. 对照组患者泮托拉唑钠肠溶胶囊40 mg, 阿莫西林1000 mg, 克拉霉素500 mg, 每日2次, 口服, 共7 d.

1.2.2 上腹痛、腹胀、反酸、嗝气、纳差、恶心和呕吐7项症状的严重程度评分标准: 0分: 无症状; 1分: 偶有症状或症状较轻; 2分: 经常发生, 部分影响日常工作及生活, 药物能缓解; 3分: 症状严重, 影响日常工作及生活, 药物难以缓解.

表1 停药4 wk后两组临床症状缓解率比较

分组	n	临床症状缓解 n(%)			
		显效	有效	无效	总有效率(%)
治疗组	58	41(70.69)	13(22.41)	4(6.90)	54(93.10)
对照组	54	37(68.52)	12(22.22)	5(9.26)	49(90.74)

根据积分变化率进行三级疗效评估标准: 显效: 临床症状消失或基本消失; 有效: 临床症状有所改善或明显减轻. 积分减少50%以上; 无效: 临床症状无改善或加重. 积分减少不足50%; 总有效率 = 显效率 + 有效率.

1.2.3 *H pylori*检测方法和根除判断标准: 治疗前1 wk行胃镜检查, 于胃窦、胃体各取2块黏膜行Warthin Starry银染色, 诊断分级标准: (-)未见到细菌; (+)细菌数很少, 稀疏散在分布; (++)细菌数较多, 密集分布; (+++)细菌数很多, 密集成堆^[4]. 停药4 wk后, 胃溃疡行胃镜检查, 球部溃疡及慢性胃炎者行¹³C-尿素呼气试验, 阴性者, 确定为*H pylori*根除.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示, 采用方差分析. 对*H pylori*的根除率采用意向治疗分析(ITT)和按方案分析(PP), 用 χ^2 检验及查四格表的统计意义检验便查表法, 以 $P<0.05$ (双侧)认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 患者症状缓解程度比较 用 χ^2 检验比较两组停药4 wk后主要临床症状缓解率, 其显效率及有效率均无统计学差异($P>0.05$, 表1).

2.2 *H pylori* PP根除率 治疗组和对照组*H pylori* PP根除率分别为89.66%和72.22%, ITT根除率分别为83.87%和67.24%, 具有统计学意义(表2).

2.3 不良反应 治疗组出现1例恶心, 1例味觉障碍, 1例舌炎, 1例头晕, 1例轻微腹泻, 不良反应发生率8.62%(5/58); 对照组出现2例乏力, 2例腹泻, 皮疹1例, 头晕1例, 不良反应发生率11.11%(6/54). 两组不良反应均为轻中度不适, 不影响治疗, 无需停药及特殊处理, 服药期间或疗程结束停药后自行消失. 两组比较差异无显著性($P>0.05$).

2.4 药费及期望成本 要达到根除疗效, 每例所需药费: 治疗组、对照组各为358.40元、337.00元. 但是期望成本(每疗程费用/根除率)治疗组、对照组分别为399.73元、466.63元, 对照组比治疗组高66.90元.

研发前沿
10日序贯疗法对于根除*H pylori*感染无疑是一个很好的选择, 但尚待多中心、大样本的临床研究来进一步证实其高效性和安全性.

相关报道

Zullo *et al* 研究表明10日序贯疗法能够获得比7日或10日三联疗法更高的 *H pylori* 根除率。Francavilla *et al* 报道在儿童中序贯疗法比传统三联疗法具有更高的 *H pylori* 根除率。

表 2 患者 *H pylori* 根除率的比较

分组	根除(n)	未根除(n)	失访(n)	合计(n)	根除率(PP, %)	根除率(ITT, %)
试验组	52	6	4	62	89.66 ^a	83.87 ^c
对照组	39	15	4	58	72.22	67.24
合计	91	21	8	120	81.25	75.83

$\chi^2 = 5.6$, ^a $P < 0.05$ vs 对照组; $\chi^2 = 6.2$, ^c $P < 0.05$ vs 对照组。

表 3 不同的 *H pylori* 组织染色结果时试验组和对照组根除率的比较

组织染色	试验组(b/m)	对照组(d/n)	在表中查c	统计学意义
+	29/30	27/29	未查到c	无
++	13/14	9/13	未查到c	无
+++	10/14	3/12	查到c	有

按查四格表的统计意义检验便查表法。注: b: 试验组中 *H pylori* 已根除的患者; a: 试验组中 *H pylori* 未根除的患者, 即 $a = m - b$; d: 对照组中 *H pylori* 已根除的患者; c: 对照组中 *H pylori* 未根除的患者, 即 $c = n - d$ 。

2.5 组织染色+、++、+++的患者 *H pylori* 根除率比较 组织染色+++的患者, 试验组 *H pylori* 根除率明显高于对照组患者, 但对于组织染色+、++的患者, 尽管试验组患者的 *H pylori* 根除率高于对照组的患者, 但差异并无统计学意义(表3)。

3 讨论

我国是一个 *H pylori* 感染的高发区, 目前以7 d PPI加阿莫西林及克拉霉素的一线三联方案是公认的根除 *H pylori* 治疗方案。但是能够获得 *H pylori* 根除率越来越低, 甚至降到了80%。究其原因主要是因为抗生素耐药、依从性差、疗程偏短、药物相关性不良反应、胃内细菌负荷量、cag A基因以及吸烟史等因素^[5]。最新欧洲指南建议当克拉霉素耐药流行超过15%-20%时, 应用14 d疗程的三联方案或者10-14 d四联方案^[6]。Zullo *et al* 研究表明10日序贯疗法能够获得比7日或10日三联疗法更高的 *H pylori* 根除率^[7-9]。Francavilla *et al*^[10] 报道在儿童中序贯疗法比传统的三联疗法具有更高的 *H pylori* 根除率。根据最新意大利 *H pylori* 指南, 10日序贯疗法被给予了标准7-14 d三联疗法同等地位, 作为了一线治疗方案。我国第三次全国幽门螺杆菌共识会推荐的可能成为B级或C级的新疗法中包括序贯疗法^[11]。

我国对阿莫西林耐药并不常见, 其平均耐药率为0%-2.7%^[12]。然而具体机制不甚明了, 单

用阿莫西林能够获得50%的 *H pylori* 根除率, 并能减少患者胃内细菌的负荷量。胃内细菌的负荷量减少在某种程度上提高了细菌对后续药物的敏感性^[13]。另一方面, 阿莫西林能够破坏细菌细胞壁, 增加大环内酯类药物的进入, 从而增加药物的疗效。克拉霉素是一种新型的大环内酯类抗菌素, 作用机制是通过阻止DNA依赖蛋白质合成而达到杀菌目的, 而且对酸较稳定, 能达到较高的血药浓度和较长的半衰期。替硝唑的作用机制尚未完全阐明, 其硝基可被还原成一种细胞毒, 从而作用于细菌的DNA代谢过程, 促使细菌死亡。替硝唑作用比甲硝唑强2-4倍, 且具有更长的作用时间。谢国艳 *et al* 报道在上海崇文地区 *H pylori* 对替硝唑的耐药率明显低于对甲硝唑的耐药率, 其耐药率分别为20%和40%^[14]。本研究结果显示, 10日序贯疗法疗效优于传统的三联7日疗法, 而且虽然按疗程序贯疗法的费用比标准三联疗法的费用略高一些, 但按成本-效果比比较, 序贯疗法明显低于标准三联疗法。王军毅 *et al*^[15] 报道序贯疗法用于 *H pylori* 阳性十二指肠球部患者根除率达95.92%。本研究对组织 *H pylori* 染色结果+、++及+++的患者的 *H pylori* 根除率进行了比较, 发现对于 *H pylori* 染色为+++的患者, 含替硝唑的序贯疗法较标准三联具有明显的优势。可能与序贯疗法增加了替硝唑, 而且疗程也延长了有关。10日序贯疗法对于根除 *H pylori* 感染无疑是一个很好的选择, 但尚待多中心、大样本的临床研究来进一步证实其高效性和安全性。

4 参考文献

- Shallcross TM, Rathbone BJ, Wyatt JL, Heatley RV. Helicobacter pylori associated chronic gastritis and peptic ulceration in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 1990; 4: 515-522
- 中华医学会消化病分会, 幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科研协作组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告(2007.10庐山). *胃肠病学* 2008; 13: 42-46
- 胡品津. 规范幽门螺杆菌感染的诊断和治疗. *中华内*

- 科杂志 2004; 43: 243
- 4 王玉兰, 吴燕川, 沙中芬. 幽门螺杆菌临床常用检测方法的比较. 首都医科大学学报 2006; 27: 408-409
- 5 Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY. Helicobacter pylori diagnosis and management. *Gastroenterol Clin North Am* 2006; 35: 229-247
- 6 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007; 56: 772-781
- 7 Zullo A, Vaira D, Vakil N, Hassan C, Gatta L, Ricci C, De Francesco V, Menegatti M, Tampieri A, Perna F, Rinaldi V, Perri F, Papadia C, Fornari F, Pilati S, Mete LS, Merla A, Poti R, Marinone G, Savioli A, Campo SM, Faleo D, Ierardi E, Miglioli M, Morini S. High eradication rates of Helicobacter pylori with a new sequential treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 719-726
- 8 De Francesco V, Zullo A, Hassan C, Della Valle N, Pietrini L, Minenna MF, Winn S, Monno R, Stoppino V, Morini S, Panella C, Ierardi E. The prolongation of triple therapy for Helicobacter pylori does not allow reaching therapeutic outcome of sequential scheme: a prospective, randomised study. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 322-326
- 9 Vaira D, Zullo A, Vakil N, Gatta L, Ricci C, Perna F, Hassan C, Bernabucci V, Tampieri A, Morini S. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for Helicobacter pylori eradication: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 556-563
- 10 Francavilla R, Lionetti E, Castellaneta SP, Magistà AM, Boscarelli G, Piscitelli D, Amoroso A, Di Leo A, Miniello VL, Francavilla A, Cavallo L, Ierardi E. Improved efficacy of 10-Day sequential treatment for Helicobacter pylori eradication in children: a randomized trial. *Gastroenterology* 2005; 129: 1414-1419
- 11 成虹, 胡伏莲. 第三次全国幽门螺杆菌共识会在江西庐山召开. 中华医学杂志 2007; 87: 2736
- 12 中华医学会消化病分会幽门螺杆菌学组/全国幽门螺杆菌科研协作组. 中国幽门螺杆菌耐药状况以及耐药对治疗的影响-全国多中心临床研究. 胃肠病学 2007; 12: 525-553
- 13 Murakami K, Fujioka T, Okimoto T, Sato R, Kodama M, Nasu M. Drug combinations with amoxycillin reduce selection of clarithromycin resistance during Helicobacter pylori eradication therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 67-70
- 14 谢国艳, 高志生, 周建华, 黄敏, 胡嘉波. 上海市崇明地区幽门螺杆菌耐药性分析及cagA基因检测. 中国感染与化疗杂志 2008; 8: 463-465
- 15 王军毅, 郑拓. 序贯疗法治疗幽门螺杆菌阳性的十二指肠球部溃疡患者的临床分析. 浙江临床医学 2008; 10: 1216-1217

同行评价
序贯疗法根除
*H pylori*在国内尚
未普及, 本研究设
计合理, 结果可
靠, 疗效观察有一
定临床参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统,在“万方数据-数字化期刊群”基础上,结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),以我国正式出版的各项6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据,严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后,进行规范化处理和有效链接,经统计分析,编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次,影响因子0.729,即年指标0.142,引用期刊数732,学科扩散指标0.533,被引半衰期4.303,H指数8。(科学编辑:李军亮 2009-12-18)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白爱平 副教授

南昌大学第一附属医院消化内科

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈凇 教授

中国人民解放军总医院普通外科

程英升 教授

同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

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

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

范小玲 主任医师

北京地坛医院综合科

傅春彬 主任医师

吉化集团公司总医院一院消化内科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普通外科

巩鹏 教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

韩天权 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

郝纯毅 主任医师

北京肿瘤医院肿瘤外科

江学良 主任医师

中国人民解放军济南军区总医院消化科

蓝宇 教授

北京积水潭医院消化科

李定国 教授

上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李增山 副教授

中国人民解放军第四军医大学病理教研室

李振华 教授

第四军医大学病理教研室

刘丽江 教授

江汉大学医学院病理学

刘连新 教授

哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

龙学颖 副主任医师

中南大学湘雅医院放射科

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

秦环龙 教授

上海交通大学附属第六人民医院外科

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院普外科

王健生 教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王晓艳 副教授

中南大学湘雅三医院消化内科

许文燮 教授

上海交大大学生命科学院生物医学工程系

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肝胆外科

张继明 教授

复旦大学附属华山医院肝炎研究室

张锦生 教授

复旦大学上海医学院病理学系

张军 教授

西安交通大学医学院第二附属医院消化内科