

宿主遗传基因多态性与丙型肝炎病毒感染转归的关系

崔倩, 丁克琴, 喻荣彬

崔倩, 丁克琴, 喻荣彬, 南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系 江苏省南京市 210029

喻荣彬, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事传染病流行病学、分子流行病学和行为流行病学方面的研究。

国家科技重大专项课题基金资助项目, No. 2009ZX1004-904

作者贡献分布: 本综述由崔倩、丁克琴及喻荣彬共同完成; 喻荣彬审校。

通讯作者: 喻荣彬, 教授, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系. rongbinyu@njmu.edu.cn
电话: 025-86862815

收稿日期: 2010-07-07 修回日期: 2010-07-28

接受日期: 2010-08-03 在线出版日期: 2010-09-18

Relationship between host genetic polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection

Qian Cui, Ke-Qin Ding, Rong-Bin Yu

Qian Cui, Ke-Qin Ding, Rong-Bin Yu, Department of Epidemiology and Biostatistics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the National Mega-project of Science Research Foundation, No. 2009ZX1004-904

Correspondence to: Professor Rong-Bin Yu, Department of Epidemiology and Biostatistics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. rongbinyu@njmu.edu.cn

Received: 2010-07-07 Revised: 2010-07-28

Accepted: 2010-08-03 Published online: 2010-09-18

Abstract

Acute hepatitis C virus (HCV) infection can induce host innate and adaptive immune responses. Approximately 15%-25% of HCV-infected patients successfully eliminated the virus whereas the majority of these patients developed chronic liver disease, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Numerous studies have demonstrated that host genetic polymorphisms may lead to differences in host immune function and therefore influence the clinical outcome of HCV infection. This review briefly summarizes the relationship between host genetic polymorphisms and the outcome of HCV infection.

Key Words: Hepatitis C virus; Infection; Gene; Polymorphism; Outcome

Cui Q, Ding KQ, Yu RB. Relationship between host genetic polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2731-2738

摘要

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)急性感染后可引起机体一系列固有及适应性免疫反应。约有15%-25%的HCV感染可被宿主免疫反应所自限清除,而大多数则呈慢性持续性感染,发展为慢性活动性肝炎、肝硬化及肝细胞癌。大量研究证实宿主遗传基因的多态性可能会导致机体免疫功能状态的差异,进而影响到HCV感染的不同临床结局。本文主要对相关的潜在基因多态性与HCV感染转归的关系进行综述。

关键词: 丙型肝炎病毒; 感染; 基因; 多态性; 转归

崔倩, 丁克琴, 喻荣彬. 宿主遗传基因多态性与丙型肝炎病毒感染转归的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18(26): 2731-2738

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2731.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)在中国和世界范围内已成为慢性肝炎(chronic hepatitis)、肝硬化(cirrhosis)和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的主要病因之一^[1,2]。HCV感染的主要危险因素是静脉注射吸毒和输血。HCV的高度变异性、泛嗜性、免疫耐受、免疫损伤等因素是导致HCV感染慢性化的重要原因。虽然目前聚乙二醇干扰素和利巴韦林的联合应用使慢性丙型肝炎患者的治疗效果有了明显改善,但是仍有近50%的患者有持续病毒反应。推测除了与病毒本身的因素有关外,更重要的是与不同个体的遗传学差异有关,这种差异导致机体针对HCV感染所发生的免疫反应不同。近年来国内外有关宿主遗传基因多态性与疾病关系的研究成果不断涌现,现将其中有关的一些宿主基因多态性与HCV感染转归关系的研究进展作简要介绍。

■背景资料

丙型肝炎病毒是慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的主要病因之一,但其感染转归机制尚不明确,除与病毒本身和环境因素有关外,宿主的遗传基因多态性可能是影响丙型肝炎发生、发展和预后的重要因素之一。因此对于HCV感染转归机制的研究具有重要的科学意义。

■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

■ 研究前沿

目前在研究与HCV感染转归密切相关的宿主遗传基因领域中已取得了一些成果,但大多数研究得出的结论不一,故仍需广泛深入研究遗传基因对其感染转归的影响,这是阐明HCV感染转归机制的有效途径。

1 人类白细胞抗原基因多态性与HCV感染转归的关系

人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)是人类的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC),编码HLA的基因为位于人类第6对染色体的短臂上紧密连锁的基因群。传统上,分为3个基因区:HLA-I类、II类和III类基因,分别编码HLA-I、HLA-II和HLA-III抗原。宿主对HCV的细胞免疫反应在很大程度上取决于人类HLA基因系统所编码的HLA分子对病毒表位的加工和递呈,推测HLA基因多态性可影响HCV的感染和转归。

1.1 HLA-I类基因多态性与HCV感染转归的关系 HLA-I类分子分布于所有有核细胞表面,是CD8⁺ T淋巴细胞识别标志之一,诱导CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)对病毒感染细胞的杀伤和溶解,其基因包括HLA-A、B、C及E-L位点的等位基因。一项针对女性HCV感染者的单因素研究发现,HLA-A*03, B*27, Cw*01在自限清除者中出现的频率明显高于持续感染者,且HLA-B*27与病毒的自限清除显著相关^[3]。而Thio等^[4]研究急性HCV感染与HLA的关系,发现HLA-A*1101、B*57及Cw*010与病毒清除具有相关性, A*2301、Cw*04与病毒持续状态相关。来自一项针对非洲人群的研究同样证实HLA-B*57与病毒清除密切相关^[5]。推测可能是由于种族差异、性别以及病毒基因型不同所致。

1.2 HLA-II类基因多态性与HCV感染转归的关系 HLA-II类基因区包括HLA-DR, DQ, DP 3个亚区; DR亚区有10个基因座: DRA, DRB1-B9; DQ亚区有5个基因座: DQA1-2及DQB1-3; DP亚区有4个基因座DPA1, DPB1, DPA2, DPB2,其中以研究DR、DQ与疾病的相关性最为重要。HLA-II类区域内与免疫反应有关的基因尚有抗原处理相关转运体(transporter-associated antigen processing, TAP)基因和低分子量蛋白酶体(low molecular weight protein, LMP)基因,他们均参与免疫反应过程。

近年来,国内外对HLA-II类基因多态性和HCV感染转归的关系进行了许多研究,发现存在明显的地域差异。HLA-DQB1*0301是唯一一个已为不同研究者在多个种族的研究中所证实的慢性丙型肝炎患者中有利于HCV清除的保护性基因位点。可能的机制是DQB1*0301基因能有效地将HCV递呈给T淋巴效应细胞,激活或介

导细胞免疫反应,从而发挥对HCV感染的保护作用。Asti等^[6]对意大利人的研究发现,慢性肝病患者DRB1*1101出现的频率明显升高,并与疾病严重性正相关。日本学者Kuzushita等^[7]对肝功能及肝组织学正常的HCV携带者和慢性丙型肝炎/肝硬化的患者进行研究,发现DRB1*1101、DRB1*1302、DQB1*0604多见于HCV携带者,可能对机体具有保护作用;而DRB1*0405、DQB1*0401在慢性肝病中更常见,与丙型肝炎的慢性化有关。同样, Aikawa等^[8]报道HLA-DRB1*0405和DQB1*0401等位基因在HCV相关性肝硬化或肝癌人群中的检出率分别为27.6%和24.6%,显著高于其在慢性丙型肝炎患者中的检出率(14.0%和12.0%),提示HLA-DRB1*0405和DQB1*0401等位基因的存在易使HCV感染进展成肝硬化或肝癌。Barrett等^[9]还发现爱尔兰女性丙型肝炎患者HLA-DRB1*01位点与HCV的自然清除有关。Minton等^[10]还发现,英国人DRB1*1101与DRB1*0301存在严重的连锁不平衡, DRB1*1101-DRB1*0301单倍体的存在与病毒的自然清除有关。上述研究提示,在考虑单一基因位点对慢性丙型肝炎感染转归影响的同时,还应注意具有种族差异的基因连锁不平衡的重要作用。

TAP基因位于HLA-II类DP与DQ之间,由TAP1和TAP2两个亚单位组成,在机体抗肿瘤、抗病毒的细胞免疫中起着转运抗原肽的作用。LMP包括LMP2和LMP7两个活性单位,参与HLA-II类分子呈递抗原的加工过程。Kuzushita等^[7]研究发现丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)水平正常的HCV携带者中TAP2*0103出现的频率显著高于慢性肝炎患者。Akuta等^[11]对HCV抗体阳性的肝硬化及慢性丙型肝炎的TAP基因多态性比较分析中发现,肝硬化组TAP2*0201的频率显著高于慢性丙型肝炎组。而Sugimoto等^[12]在研究慢性丙型肝炎患者接受干扰素治疗的应答效果中发现, TAP1、TAP2、LMP2基因在产生持续应答者中与无应答者相比没有差异。而LMP7-K基因在持续应答者中出现的频率比无应答者高2.3倍,提示LMP7是影响慢性丙型肝炎患者干扰素治疗效果的一个重要因素。

1.3 HLA-III类基因多态性与HCV感染转归的关系 HLA-III类基因区位于I类和II类基因区之间,其中与免疫系统有关的基因包括补体基因C2、Bf、C4a、C4b及肿瘤坏死因子(tumor

necrosis factor, TNF)A、B和热休克蛋白70(heat shock protein, HSP70). HLA-III类基因具有明显的多态性, 但是关于补体基因能否影响HCV疾病进展、转归的报道极少, 意大利学者Pasta等^[13]通过调查家族聚集性肝硬化患者与HLA-III类基因的相关性, 得出C4QO是家族聚集性丙型肝炎相关性肝硬化的独立危险因素($OR = 2.7$, $95\%CI = 1.83-3.96$), 而Bf基因与家族聚集性肝硬化无关. HSP70基因家族有3个基因, HSP70-1、HSP70-2和HSP70-HOM, 其产物参与炎症和应激反应, 并作为分子伴侣在内源性抗原加工提呈中起作用. 研究报道HSP与受体的结合可激活细胞信号传导通路, 诱导抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)分泌细胞因子及趋化因子, 增加抗肿瘤效应^[14]. Chuma等^[15]分析了对HSP70进行检测作为HCC早期诊断的可靠性, 可将敏感地区分癌前病变、正常肝脏及早期HCC的不同变化. 但是未见HSP70基因多态性与HCV感染转归关系的报道.

2 Th细胞主要细胞因子基因多态性与HCV感染转归的关系

辅助T(helper T, Th)淋巴细胞是免疫调节的核心细胞, 其核心作用主要通过细胞因子调节网络实现. Th1是其主要的一种, 主要产生IFN- γ 和IL-2, 通过介导细胞免疫, 用于宿主的抗病毒, 刺激CTL的分化增殖发挥细胞毒效应, 刺激自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的杀伤作用等. Th2类细胞因子主要分泌IL-4、IL-10等, 主要刺激B淋巴细胞分化增殖, 产生抗体. Th1和Th2细胞因子的功能互相拮抗, 两者功能的平衡和消长是免疫调节的核心环节. Th细胞亚群失衡将严重扰乱体液免疫和细胞免疫, 在HCV感染者慢性化及不同临床转归中起着十分重要的作用.

IFN- γ 作为一种新型细胞活性因子, 具有抗病毒、抗细胞增殖、免疫调节等生物学活性, 且对一些慢性肝炎患者治疗有一定疗效, 其含量的减少易使细胞免疫反应减弱, 机体不能有效清除病毒, 以致病毒感染持续存在, 甚至使病情发展为肝硬化、HCC. IL-2则对T淋巴细胞、B淋巴细胞和NK的增殖分化具有较强的免疫调节作用. Huang等^[16]研究发现IFN- γ 启动子区-764位G突变与HCV的清除及治疗的持续反应有关, 分析原因可能是由于-764位G突变与NF- κ B基序有较高的亲和力, 以致IFN- γ 启动子区活性升高. 高秋菊^[17]研究显示携带IFN- γ +874位AA

基因型的个体感染HCV的相对危险度是TA基因型的3.23倍, AA基因型与宿主体内IFN- γ 含量的减少密切相关, 且其研究发现不同临床转归者IL-2-330位TT基因型频率明显高于对照组, 提示其可能机制是IL-2-330 TT基因型和T等位基因分布明显增多, 使体内表达IL-2产量减低, 导致细胞免疫功能低下, 影响了机体清除病毒.

在HCV感染引起的肝脏损害中, IL-10、IL-4作为一种重要的抗炎因子, 对肝脏可能有一定的保护作用, 但同时也能降低其血清TNF- α 和IFN- γ 的水平. 有报道认为, 高水平的IL-10能强烈抑制Th1细胞功能, 因而不利于机体免疫系统清除病毒, 致使HCV感染持续存在^[18]. 而IL-10产生的多少, 与其基因多态性有密切关系. Turner等^[19]报道IL-10-1082位G-A的突变可以使IL-10的产生减少. Vidigal等^[18]研究显示慢性HCV感染者IL-10-1082位GG基因型检出率为34.6%, 显著高于正常人(16.7%), 提示-1082位GG基因型与HCV感染慢性化形成密切相关, 但也有学者认为IL-10-1082位GG基因型频率在HCV自发清除者中明显高于持续HCV携带者^[20]. 另有研究认为IL-10启动子-592位点AA基因型可能与IL-10的低水平分泌有关^[21]. 而Knapp等^[22]调查研究IL-10启动子基因多态性与HCV感染的结局、对治疗的反应及纤维化发展的相关性中发现, HCV的感染清除与IL-10-592位AA基因型有关($OR = 2.05$, $P = 0.028$), 持续感染与IL-10-1082GG基因型有关($OR = 0.48$, $P = 0.018$). Rosenwasser等^[21]报道IL-4启动子区-589位T等位基因较C等位基因能增强IL-4启动子的启动, 使IL-4表达增加, IL-4通过下调前炎症介质而调节炎症反应, 从而发挥其在肝脏炎症损伤作用中的保护作用. 但未发现IL-4-589位点基因多态性与慢性HCV感染及其临床转归和病毒复制之间有统计学关系.

3 TNF基因多态性与HCV感染转归的关系

TNF是体内具有多种生物活性的重要细胞因子, 有抗肿瘤、抗病毒感染及免疫调节作用. 其基因与MHC基因紧密连锁, 位于MHC-III类基因区内, 临近MHC-II-HLA DRB1和DQB1, 此两区与HCV的自限清除有关, 故TNF- α 可能与HCV的清除也有关联. TNF基因的多态性与TNF的分泌水平密切相关, 在TNF基因启动子区域G对A的突变在308位^[23]和238位^[24]均影响着TNF- α 的表达. TNF- α 分泌不足可以阻碍病毒清除导致慢性

■相关报道

David等研究显示, IL-28B基因附近rs12979860位点的CC基因与HCV感染自限清除有关联. 同时, Ge等研究发现IL-28B基因附近的基因变异(T/T变异为C/C)是影响丙型肝炎治疗的关键因素.

■创新盘点

本文从宏观角度简要概述了可能会影响HCV感染转归的一些潜在的宿主遗传基因,有助于今后HCV感染转归机制的深入研究及疾病防治工作的开展。

感染。

Höhler等^[25]研究报道慢性丙型肝炎患者TNF- α 启动子区-238位等位基因A的检出率为18.7%,显著高于健康对照组,提示TNF- α 启动子区-238位核苷酸变异(G \rightarrow A变异)与HCV感染慢性化形成有关。Rosen等^[26]研究显示TNF- α 启动子区-238位核苷酸为A者的血清病毒水平显著高于-238位为G者,提示TNF- α 启动子区基因多态性即使与机体对HCV的易感性无关,也可能与HCV感染慢性化的形成有一定关系。同样,Dai等^[27]研究发现TNF- α 启动子区-308位A等位基因是影响干扰素联合治疗后HCV持续免疫应答的独立危险因素,这在HCV I b型感染者中尤为显著。而毛小荣等^[28]在调查我国甘肃地区HCV感染者与TNF- α 基因启动子-308位基因多态性的关系中发现HCV感染者A与G等位基因与HCV感染均无相关性,但根据患者ALT水平不同进行分组,分析发现A等位基因与ALT水平升高有一定的相关性。但Yee等^[29]报道TNF- α 启动子-238A和-308A变异分别使肝硬化的危险性增加了3.2倍和5.1倍。提示启动子区基因多态性与慢性感染者肝损害程度及肝硬化的发生密切相关。

4 TGF- β 1基因多态性与HCV感染转归的关系

转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是一种强效的促纤维化的细胞因子,可以通过刺激细胞外基质的合成并抑制其降解而促进纤维化的形成。此外还通过抑制NKC的活性及抑制外周血单个核细胞中IFN- γ 和TNF- α 的产生来抑制免疫反应。很多文献报道, TGF- β 1分子的含量主要受遗传控制,与其基因多态性存在密切的关系。TGF- β 1基因有8个位点存在多态性,其中3个位于启动子区,即-509C>T、-800G>A、-988C>A; 3个位于编码区,即codon10、codon25、codon263。而高春芳^[30]认为在TGF- β 1基因的8个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点中,中国人在-800、-988位点及codon25、codon263基本不存在基因多态性,常见的变异主要存在于-509C>T和codon10。

TGF- β 1调节障碍可能会导致HCV感染发展为肝硬化甚至肝癌。Grainger等^[31]认为TGF- β 1基因启动子区-509位T等位基因与血浆中分泌较高水平的TGF- β 1有关联。Kimura等^[32]认为低水平的TGF- β 1会缓解对NKC的抑制效应,有利于HCV

的清除,其研究认为TGF- β 1基因启动子区-509位C SNP与产生较高的HCV清除率关系密切。同样,Barrett等^[33]通过研究TGF- β 1的两个非编码区基因得出与分泌低水平TGF- β 1有关的单倍体基因型与HCV的清除有关联。日本学者Kimura等^[32]研究证实了启动子区-509位C等位基因与TGF- β 1启动子区活性降低有关,从而影响了TGF- β 1的表达,而低水平含量的TGF- β 1有助于HCV的清除。

杨再兴等^[34]研究报道TGF- β 1基因codon25在所研究的样本中并不存在基因多态性。而房婕等^[35]研究发现codon25的基因多态性与HCV的感染及与HCV相关肝硬化的发生均无相关性,但codon25 G等位基因频率在ALT升高组显著高于ALT正常组。密码子25 G等位基因是高分泌型等位基因, G等位基因预示血清中TGF- β 1水平较高,而较高水平的TGF- β 1能抑制多种免疫细胞功能,推测可能是影响HCV感染结局的重要因素之一。Pereira等^[36]研究也认为TGF- β 1密码子25 C等位基因是HCV感染及肝纤维化的保护基因。日本学者Suzuki等^[37]报道密码子10基因多态性与肝纤维化的进展没有相关性。Gewaltig等^[38]研究显示TGF- β 1基因多态性与HCV感染所致肝纤维化进展速度相关,密码子10位点亮氨酸(Leu)/脯氨酸(Pro)和Pro/Pro基因型者发生纤维化的速度比Leu/Leu基因型者快3倍。Kim等^[39]研究发现密码子10位点Pro/Pro或Leu/Pro基因型者发生肝癌的风险低于Leu/Leu基因型者。然而对于密码子10基因型是否影响丙型肝炎感染转归尚需进一步证实。

5 干扰素诱导的抗病毒蛋白基因多态性与HCV感染转归的关系

机体抗病毒状态建立后,能产生大量抗病毒蛋白,包括双链RNA活化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(double-stranded-RNA-activated serine/threonine protein kinase, PKR), 2'-5'寡腺苷酸合成酶(oligoadenylate synthetase, OAS)基因家族和抗黏病毒(myxovirus resistance, Mx)蛋白。PKR有控制基因转录、翻译等功能,对细胞的生长和凋亡也具有深刻的影响。OAS系统可以导致单链RNA的分裂。Mx蛋白通过削弱胞内病毒运输而阻碍病毒的复制。这些蛋白的编码基因多态性与HCV的感染转归及对治疗的反应有着密切的关系^[40]。

Knapp等^[40]研究发现OAS-1的3'非编码区的

GG基因型与HCV持续感染有关, 但与干扰素治疗反应无关, 而PKR基因-168位点的TT基因型有助于HCV的自限清除. Suzuki等^[41]研究显示MxA基因-88位点的G/T多态性与HCV的感染以及IFN的治疗效果有关. 该位点T等位基因阳性患者比阴性患者更易于产生对IFN治疗的持久反应, 提示T等位基因可能是一个有利于病毒清除的保护性因素, 其机制可能在于MxA基因-88位点T等位基因的改变提高了该基因序列与干扰素刺激反应元件(interferon stimulated response element, ISRE)的同源性, 与此前日本学者Hijikata等^[42]报道的MxA基因-88位点的GG纯合子与IFN治疗无效有关的结果相一致.

6 IFN- λ 基因多态性与HCV感染转归的关系

IFN- λ (包括IL-29、IL-28A和IL-28B)是一组由病毒或双链RNA诱导的多种细胞如外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PMBC)、树突状细胞(dendritic cell, DC)和HeLa细胞产生的新型白细胞介素. IFN- λ 基因位于19号染色体上, 其中IL-29基因有5个外显子, IL-28A和IL-28B基因含6个外显子, 他们均是通过诱导其独特的II型细胞因子受体IL-28R α 和IL-10R β 异二聚体化, 活化Jak-STAT信号通路来干扰病毒复制、上调MHC-I表达, 进而调节固有免疫和获得性免疫系统来抵抗病毒的入侵, 在抗病毒免疫中发挥着重要作用.

美国学者Thomas等^[43]通过在388例HCV自限清除者与620例HCV持续感染者的分组比较中发现, IL28B基因附近基因的rs12979860位点的CC基因型与HCV的自限清除有关联. 同时Ge等^[44]在一项抗HCV治疗研究中用全基因组关联分析了1 600多例患者的基因型, 发现编码IFN- λ 3的IL28B基因附近基因的变异(T/T变异为C/C)是影响丙型肝炎治疗的关键因素, 无论是对欧洲系($P = 1.06 \times 10^{-25}$)还是对非洲系患者($P = 2.06 \times 10^{-3}$), 该突变会使治疗效果翻倍. 提示该基因多态性与HCV感染者聚乙二醇化干扰素与利巴韦林联合用药后的治疗效果有关. 日本学者Tanaka等^[45]也证实IL-28B基因与HCV的IFN治疗效果有关, 可能是一种能够预测丙型肝炎治疗预后的生物学标记.

7 低密度脂蛋白受体基因多态性与HCV感染转归的关系

低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein recep-

tor, LDLR)是一种细胞膜表面的糖蛋白, 他通过介导血浆胆固醇的主要载体LDL进入细胞, 在脂类的转运过程和维持体内胆固醇平衡中起重要作用. 研究表明, LDLR是HCV的主要细胞膜受体^[46], 能促进HCV及黄病毒属其他病毒的入胞. LDLR基因位于第19号染色体短臂末端, 由18个外显子和17个内含子组成, 编码860个氨基酸的受体前体蛋白. LDLR基因异常突变可引起LDLR的功能变化, 导致血浆脂蛋白代谢障碍.

Hennig等^[47]研究发现在LDLR基因外显子10的13 397位点多态性(G \rightarrow A变异)与HCV的自限清除有关联; 3'非编码区的31 125位点多态性(G \rightarrow A变异)与HCV治疗后病毒的持续应答有关. 这与德国学者Mas Marques等^[48]得出的结果一致, 但他们发现这些关联仅存在于HCV-1型感染者. 这些结果提示LDLR基因突变改变了mRNA的稳定性, 影响了LDLR水平的表达, 以致患者感染HCV或治疗后产生了不同的临床结局. 而李晗等^[49]则认为LDLR基因外显子12 Hinc II位点多态性(第16 730位核苷酸T \rightarrow C变异)对HCV的感染及感染后的结局可能不起主要作用. 这可能是由于不同种群之间在LDLR基因多态性位点的存在与频率的差异性所致.

8 血色病基因多态性与HCV感染转归的关系

血色病(hemochromatosis, HFE)基因是一种与铁代谢有关的基因, 铁离子可以促进HCV复制, 增加氧化作用, 耗竭肝保护因子, 损害宿主免疫. 血清铁负荷的指标在慢性丙型肝炎患者中常升高, 铁负荷过度会导致或促进肝脏损伤和纤维化. HFE基因是类MHC-I型基因, 他位于第6对染色体的短臂上, HFE基因突变可通过增加铁存储或调节免疫应答而影响慢性肝病的发生发展. 目前已确定有两种突变, 一个是HFE蛋白的第282位的Cys残基被Tyr取代(C282Y); 二是第63位的His残基被Asp取代(H63D).

Smith等^[50]报道C282Y突变频率在丙型肝炎患者和健康对照两组间无明显差异, C282Y突变者血清铁水平和转铁蛋白饱和度较无突变者明显增高, 肝纤维化积分及坏死性炎症活动度也增高, 且有突变者40%发生肝硬化, 而无突变者仅8.7%发生, 提示C282Y突变在慢性丙型肝炎患者中与肝纤维化相关. 但Kazemi-Shirazi等^[51]报道HFE基因突变与肝纤维化及炎症活动度无明显相关, 肝硬化和无肝硬化患者相比肝脏铁含量缺乏差异. 这些结果显示C282Y突变与丙型

■应用要点

本文通过对宿主遗传基因多态性与HCV感染转归关系的研究, 以期阐明HCV相关疾病的进展及预后提供一些分子生物学依据.

■同行评价

本文可读性好, 有重要的参考价值.

肝炎患者铁沉积有关, 但不能完全解释丙型肝炎患者铁负荷增加的原因, 其在肝纤维化中的作用尚难定论. 但Cauza等^[52]研究发现HFE基因突变C282Y纯合子与原发性肝癌关系密切. 意大利学者Fracanzani等^[53]研究显示在女性人群中H63D杂合子突变与HCV感染有关联, 携带HFE-H63D基因突变的女性丙型肝炎患者发展为肝癌的危险性较无突变者明显升高. 可能是由于HFE基因突变导致过量的铁质在肝内沉积, 促进氧自由基的产生, 导致肝细胞亚细胞膜磷脂过氧化损伤, 最终导致肝细胞损伤, 促成疾病进展, 而女性抵抗自由基的能力明显要低^[54]. 总之, HFE基因突变与HCV感染转归的关系有待进一步阐明.

9 结论

本文简要概述了可能与HCV感染转归存在关联的一些潜在的重要宿主遗传基因, 同时发现性别、年龄、种族、病毒本身因素(病毒载量、基因型、准种出现的频度)以及其他作用于病毒和宿主的外在因素如吸烟、环境污染、合并其他病毒感染等, 也可能是影响以往各研究中得出宿主遗传基因变异与HCV感染转归结论不一的重要原因. 此外, 由于许多研究的样本量太少, 不足以证实基因多态性与HCV感染转归的关联性, 因此还需要进一步考虑其他混杂因素的影响, 采用更大样本量进行更加全面、深入的研究, 从而为HCV感染转归机制提供线索, 为丙型肝炎患者的预后判断提供依据.

10 参考文献

- 1 Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, Nolt K, Nelson KE, Strathdee SA, Johnson L, Laeyendecker O, Boitnott J, Wilson LE, Vlahov D. The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA* 2000; 284: 450-456
- 2 Di Bisceglie AM. Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology* 2000; 31: 1014-1018
- 3 McKiernan SM, Hagan R, Curry M, McDonald GS, Kelly A, Nolan N, Walsh A, Hegarty J, Lawlor E, Kelleher D. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 2004; 40: 108-114
- 4 Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Astemborski J, Carrington M, Thomas DL. HLA-Cw*04 and hepatitis C virus persistence. *J Virol* 2002; 76: 4792-4797
- 5 Chuang WC, Sarkodie F, Brown CJ, Owusu-Ofori S, Brown J, Li C, Navarrete C, Klenerman P, Allain JP. Protective effect of HLA-B57 on HCV genotype 2 infection in a West African population. *J Med Virol* 2007; 79: 724-733
- 6 Asti M, Martinetti M, Zavaglia C, Cuccia MC, Gusberti L, Tinelli C, Cividini A, Bruno S, Salvaneschi L, Ideo G, Mondelli MU, Silini EM. Human leukocyte antigen class II and III alleles and severity of hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Hepatology* 1999; 29: 1272-1279
- 7 Kuzushita N, Hayashi N, Moribe T, Katayama K, Kanto T, Nakatani S, Kaneshige T, Tatsumi T, Ito A, Mochizuki K, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 1998; 27: 240-244
- 8 Aikawa T, Kojima M, Onishi H, Tamura R, Fukuda S, Suzuki T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. HLA DRB1 and DQB1 alleles and haplotypes influencing the progression of hepatitis C. *J Med Virol* 1996; 49: 274-278
- 9 Barrett S, Goh J, Coughlan B, Ryan E, Stewart S, Cockram A, O'Keane JC, Crowe J. The natural course of hepatitis C virus infection after 22 years in a unique homogenous cohort: spontaneous viral clearance and chronic HCV infection. *Gut* 2001; 49: 423-430
- 10 Minton EJ, Smillie D, Neal KR, Irving WL, Underwood JC, James V. Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. Members of the Trent Hepatitis C Virus Study Group. *J Infect Dis* 1998; 178: 39-44
- 11 Akuta N, Chayama K, Suzuki F, Someya T, Kobayashi M, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Risk factors of hepatitis C virus-related liver cirrhosis in young adults: positive family history of liver disease and transporter associated with antigen processing 2(TAP2)*0201 Allele. *J Med Virol* 2001; 64: 109-116
- 12 Sugimoto Y, Kuzushita N, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Miyagi T, Jinushi M, Ohkawa K, Horimoto M, Kasahara A, Hori M, Sasaki Y, Hayashi N. A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2002; 9: 377-384
- 13 Pasta L, Pietrosi G, Marrone C, D'Amico G, D'Amico M, Licata A, Misiano G, Madonia S, Mercadante F, Pagliaro L. C4BQ0: a genetic marker of familial HCV-related liver cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 471-477
- 14 魏红梅, 郭坤元. 热休克蛋白与肿瘤免疫. *实用医学杂志* 2006; 22: 1092-1093
- 15 Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, Ohta T, Ohki M, Asaka M, Hirohashi S. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003; 37: 198-207
- 16 Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, Tong X, Tang G, Howell CD, Rosen HR, Thio CL, Thomas DL, Alter HJ, Sapp RK, Liang TJ. A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 985-990
- 17 高秋菊. 慢性HCV和/或HBV感染者Th1、Th2主要细胞因子基因多态性研究. 河北医科大学, 2007: 1-118
- 18 Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and

- ribavirin. *J Hepatol* 2002; 36: 271-277
- 19 Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8
- 20 Lio D, Caruso C, Di Stefano R, Colonna Romano G, Ferraro D, Scola L, Crivello A, Licata A, Valenza LM, Candore G, Craxi A, Almasio PL. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from HCV infection. *Hum Immunol* 2003; 64: 674-680
- 21 Rosenwasser LJ, Borish L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: S152-S155
- 22 Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, Goldin R, Hill AV, Thomas HC, Thursz MR. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics* 2003; 55: 362-369
- 23 Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177: 557-560
- 24 D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39: 150-154
- 25 Höhler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Löhr HF, Schneider PM, Meyer zum Büschenfelde KH, Rittner C. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997; 26: 503-507
- 26 Rosen HR, McHutchison JG, Conrad AJ, Lentz JJ, Marousek G, Rose SL, Zaman A, Taylor K, Chou S. Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 714-720
- 27 Dai CY, Chuang WL, Chang WY, Chen SC, Lee LP, Hsieh MY, Hou NJ, Lin ZY, Huang JF, Hsieh MY, Wang LY, Yu ML. Tumor necrosis factor- alpha promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2006; 193: 98-101
- 28 毛小荣, 袁宏. 肿瘤坏死因子 α 基因多态性与丙型肝炎病毒感染的相关性研究. 临床荟萃 2007; 22: 389-392
- 29 Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2000; 1: 386-390
- 30 高春芳. TGF β 1基因变异与疾病相关性研究展望. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2959-2965
- 31 Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 93-97
- 32 Kimura T, Saito T, Yoshimura M, Yixuan S, Baba M, Ji G, Muramatsu M, Kawata S. Association of transforming growth factor-beta 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2006; 193: 1371-1374
- 33 Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2003; 71: 212-218
- 34 杨再兴, 王皓, 高春芳, 徐玲玲, 赵文静. 转化生长因子 β 1基因多态性对乙型肝炎肝硬化的影响. 中华医学杂志 2005; 85: 1021-1026
- 35 房婕, 刘正稳, 韩群英, 楼赛, 陈静宏. 转化生长因子 β 1信号肽区单核苷酸多态性与慢性丙型肝炎的相关性. 中华肝脏病杂志 2008; 16: 586-589
- 36 Pereira FA, Pinheiro da Silva NN, Rodart IF, Carmo TM, Lemaire DC, Reis MG. Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2008; 80: 58-64
- 37 Suzuki S, Tanaka Y, Orito E, Sugauchi F, Hasegawa I, Sakurai M, Fujiwara K, Ohno T, Ueda R, Mizokami M. Transforming growth factor-beta-1 genetic polymorphism in Japanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1139-1143
- 38 Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2002; 316: 83-94
- 39 Kim YJ, Lee HS, Im JP, Min BH, Kim HD, Jeong JB, Yoon JH, Kim CY, Kim MS, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Exp Mol Med* 2003; 35: 196-202
- 40 Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, Wright M, Chiaramonte M, Graves M, Thomas HC, Hill AV, Thursz MR. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. *Genes Immun* 2003; 4: 411-419
- 41 Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Takagi K, Satoh J, Kumada H. Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 271-276
- 42 Hijikata M, Mishiro S, Miyamoto C, Furuichi Y, Hashimoto M, Ohta Y. Genetic polymorphism of the MxA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients: revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro. *Intervirology* 2001; 44: 379-382
- 43 Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801
- 44 Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401
- 45 Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga

- K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105-1109
- 46 Monazahian M, Böhm I, Bonk S, Koch A, Scholz C, Grethe S, Thomssen R. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999; 57: 223-229
- 47 Hennig BJ, Hellier S, Frodsham AJ, Zhang L, Klennerman P, Knapp S, Wright M, Thomas HC, Thursz M, Hill AV. Association of low-density lipoprotein receptor polymorphisms and outcome of hepatitis C infection. *Genes Immun* 2002; 3: 359-367
- 48 Mas Marques A, Mueller T, Welke J, Taube S, Sarrazin C, Wiese M, Halangk J, Witt H, Ahlenstiel G, Spengler U, Goebel U, Schott E, Weich V, Schlosser B, Wasmuth HE, Lammert F, Berg T, Schreier E. Low-density lipoprotein receptor variants are associated with spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection. *Infect Genet Evol* 2009; 9: 847-852
- 49 李晗, 刘正稳, 韩群英, 李雁. 低密度脂蛋白受体基因多态性及其与慢性丙型肝炎的相关性. *中国药物与临床* 2006; 6: 88-91
- 50 Smith BC, Gorge J, Guzail MA, Day CP, Daly AK, Burt AD, Bassendine MF. Heterozygosity for hereditary hemochromatosis is associated with more fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 27: 1695-1699
- 51 Kazemi-Shirazi L, Datz C, Maier-Dobersberger T, Kaserer K, Hackl F, Polli C, Steindl PE, Penner E, Ferenci P. The relation of iron status and hemochromatosis gene mutations in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1999; 116: 127-134
- 52 Cauza E, Peck-Radosavljevic M, Ulrich-Pur H, Datz C, Gschwantler M, Schöniger-Hekele M, Hackl F, Polli C, Rasoul-Rockenschaub S, Müller C, Wrba F, Gangl A, Ferenci P. Mutations of the HFE gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 442-447
- 53 Fracanzani AL, Fargion S, Stazi MA, Valenti L, Amoroso P, Cariani E, Sangiovanni A, Tommasini M, Rossini A, Bertelli C, Fatta E, Patriarca V, Brescianini S, Stroppolini T. Association between heterozygosity for HFE gene mutations and hepatitis viruses in hepatocellular carcinoma. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 27-32
- 54 Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1362: 116-127

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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等”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……,潘伯荣等^[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。

藏药柳茶提取物对非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏脂肪代谢的影响

马晓燕, 王晶宇, 卢岩松, 田青山, 夏苗, 刘昕

马晓燕, 王晶宇, 夏苗, 刘昕, 兰州大学基础医学院病理生理学研究所 甘肃省兰州市 730000

卢岩松, 田青山, 青海省人民医院外科 青海省西宁市 810000
马晓燕, 兰州大学基础医学院病理生理学在读硕士, 主要从事临床病理生理学研究。

国家首届大学生创新计划基金资助项目, No. 860014

甘肃省中药管理局科技攻关基金资助项目, No. GZK-2008-20
作者贡献分布: 本研究由马晓燕、王晶宇、夏苗及刘昕共同设计; 实验流程操作由马晓燕、王晶宇及夏苗完成; 数据分析由卢岩松与田青山完成; 本论文写作由马晓燕、夏苗、卢岩松及刘昕完成。

通讯作者: 刘昕, 教授, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学基础医学院病理生理学研究所。liux@lzu.cn

电话: 0931-4585593

收稿日期: 2010-07-07 修回日期: 2010-08-09

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-18

Effects of Liucha extract on liver lipid metabolism in rats with nonalcoholic fatty liver disease

Xiao-Yan Ma, Jing-Yu Wang, Yan-Song Lu,
Qing-Shan Tian, Miao Xia, Xin Liu

Xiao-Yan Ma, Jing-Yu Wang, Miao Xia, Xin Liu, Department of Pathophysiology, Preclinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China
Yan-Song Lu, Qing-Shan Tian, Department of Surgery, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, Qinghai Province, China

Supported by: the National University Student Innovative Program of China, No. 860014; and the Key Science and Technology Program of Gansu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. GZK-2008-20

Correspondence to: Professor Xin Liu, Department of Pathophysiology, Preclinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. liux@lzu.cn

Received: 2010-07-07 Revised: 2010-08-13

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of Liucha extract on liver lipid metabolism in rats with nonalcoholic fatty liver disease.

METHODS: A rat model of nonalcoholic fatty liver disease was established by feeding rats a high-fat diet for 6 wk. The model rats were divided randomly into four groups: model group and low-, medium- and high-dosage treatment

groups. The treatment groups were intragastrically given different doses of Liucha extract for 8 wk. A normal control group was also run. All rats were killed at week 8. Liver function parameters (ALT, AST) and the contents of fat (CHOL, TG) in liver homogenate were examined. Hepatic morphological changes were observed under a light microscope. The expression of PPAR α and ACO mRNAs and PPAR α protein was measured by RT-PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: Compared with the model group, liver function was improved in the treatment groups. The levels of ALT and AST were significant lower in the low- and medium-dosage treatment groups than in the model group (29.83 mmol/L \pm 2.78 mmol/L and 25.78 mmol/L \pm 2.63 mmol/L vs 31.90 mmol/L \pm 2.52 mmol/L; 110.53 mmol/L \pm 12.33 mmol/L and 100.45 mmol/L \pm 12.57 mmol/L vs 128.61 mmol/L \pm 16.01 mmol/L; all $P < 0.05$ or 0.01). The contents of CHOL and TG in liver homogenate were significantly lower in the medium-dosage treatment group than in the model group (0.30 mmol/L \pm 0.02 mmol/L vs 0.47 mmol/L \pm 0.04 mmol/L, 0.75 mmol/L \pm 0.06 mmol/L vs 0.85 mmol/L \pm 0.04 mmol/L, both $P < 0.01$ or 0.05). Hepatic morphological changes were improved in the treatment groups, particularly prominent in the medium-dosage treatment group. Compared with the model group, the expression of PPAR α and ACO mRNAs was up-regulated in the medium- and high-dosage treatment groups (both $P < 0.01$). In addition, Liucha extract up-regulated the expression of PPAR α protein in a dosage-dependent manner.

CONCLUSION: Liucha extract could up-regulate the mRNA expression of PPAR α and ACO, enhance the synthesis of PPAR α protein, promote liver lipid oxidation, and improve liver function in rats with nonalcoholic fatty liver disease.

Key Words: Liucha extract; Rat; Nonalcoholic fatty liver disease

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病是一种与脂肪代谢紊乱相关的常见病, 亚太地区发病率高达20%-30%, 从早期单纯性脂肪肝最终可形成肝硬化甚至肝癌, 严重影响着人们的生活质量和社会经济发展。

■同行评议者

李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

■ 研发前沿

非酒精性脂肪性肝病的治疗关系到生活方式、饮食结构,他以药物治疗改善症状及防治并发症为重点,但生活方式及饮食结构的改变与整个社会的工业化有很大关系,因此,现在治疗NAFLD仍主要依靠药物治疗.中药因其多靶点、不良反应小、肝脏负担轻的优点备受青睐.

Ma XY, Wang JY, Lu YS, Tian QS, Xia M, Liu X. Effects of Liucha extract on liver lipid metabolism in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2739-2744

摘要

目的: 研究柳茶提取物对非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏脂肪代谢的影响.

方法: 高脂饲料饲养SD大鼠, 6 wk后建立非酒精性脂肪肝病模型. 随机分为4组: 模型组、柳茶提取物低、中、高剂量组, 另设正常对照组. 分别给相应干预8 wk后处死, 测血丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)水平及肝匀浆脂肪含量; 制作肝组织切片在光镜下观察形态变化; 实时荧光定量RT-PCR法测肝脏脂肪代谢关键酶PPAR α 、ACO mRNA表达量, Western blot检测PPAR α 蛋白表达水平.

结果: 与模型组相比, 柳茶提取物各剂量组肝功能有不同程度好转, 与模型组比较, 柳茶提取物低、中剂量组ALT、AST水平均明显降低, 有统计学差异($29.83 \text{ mmol/L} \pm 2.78 \text{ mmol/L}$, $25.78 \text{ mmol/L} \pm 2.63 \text{ mmol/L}$ vs $31.90 \text{ mmol/L} \pm 2.52 \text{ mmol/L}$; $110.53 \text{ mmol/L} \pm 12.33 \text{ mmol/L}$, $100.45 \text{ mmol/L} \pm 12.57 \text{ mmol/L}$ vs $128.61 \text{ mmol/L} \pm 16.01 \text{ mmol/L}$, $P < 0.05$ 或 0.01); 肝匀浆中柳茶提取物中剂量组胆固醇(CHOL)及三酰甘油(TG)含量均较模型组明显下降, 差异具有统计学意义($0.30 \text{ mmol/L} \pm 0.02 \text{ mmol/L}$ vs $0.47 \text{ mmol/L} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$, $0.75 \text{ mmol/L} \pm 0.06 \text{ mmol/L}$ vs $0.85 \text{ mmol/L} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$, $P < 0.01$ 或 0.05). 肝细胞形态学改善以柳茶提取物中剂量组表现最为显著, 肝细胞内脂滴消失, 无炎性细胞浸润及细胞坏死, 胞质疏松, 肝窦增宽; 与模型组相比, 柳茶提取物中、高剂量组PPAR α 、ACO mRNA表达量增加(均 $P < 0.01$); 柳茶组PPAR α 蛋白与模型组相比有不同程度的增加, 且与柳茶剂量呈正相关, 剂量越大, PPAR α 蛋白的表达量也越大.

结论: 柳茶提取物可上调脂肪代谢关键酶PPAR α 、ACO mRNA水平, 促进PPAR α 蛋白合成, 增强非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏脂肪酸氧化, 改善肝功能.

关键词: 柳茶提取物; 大鼠; 非酒精性脂肪肝病

马晓燕, 王晶宇, 卢岩松, 田青山, 夏苗, 刘昕. 藏药柳茶提取物对非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏脂肪代谢的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(26): 2739-2744

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2739.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)以肝细胞大泡性脂肪变为特征, 是一个从单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎到肝硬化乃至肝癌的病理过程^[1-4], 超质量或肥胖可成为其诱因^[5,6]. 许多研究结果显示NAFLD患者存在明显的脂代谢紊乱和胰岛素抵抗^[7-9]及内脏脂肪的相对增高, 细胞凋亡在其发病中有正负双向调节作用^[10-12]. 肝脏脂质代谢是一个复杂的过程, 肝细胞中脂肪合成和排出不平衡是形成脂肪肝的主要原因. 高山植物柳茶分布于青海、四川、云南、甘肃等省, 以蔷薇科植物窄叶鲜卑花[Sibiraea. angustata (Rchd.) Hand-Mazz]的嫩枝及叶入药, 民间用于治疗消化不良、胃脘胀痛等病症. 研究证明该药具有调节机体脂肪代谢的功效^[13,14]. 本实验观察了柳茶干预后NAFLD大鼠肝功能、肝细胞形态及脂质成分的变化, 以验证柳茶的治疗作用, 同时检测肝脏脂肪代谢关键酶过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α)、酰基辅酶A氧化酶(Acyl-CoA oxidase, ACO)mRNA水平及PPAR α 蛋白的表达, 以探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD幼鼠60只, 体重80-90 g, 雌雄各半, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供. 优质藏药柳茶, 采自甘肃省甘南地区, 醇沉水法提取后制成浸膏. 临用时以生理盐水配成水溶液. Olympus AU5400全自动生化分析仪; Biophotometer生物分光光度计(德国Eppendorf); S•HH•W₂₁ 600三用电热恒温水浴箱(上海跃进); BP 121 S电子天平; GeneAmp PCR System 2400(美国PE公司); Rotor gene 3000荧光定量PCR仪(澳洲Corbett); DYY-8C电泳仪(北京六一); DHG-9070A电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏); TGL-16G冷冻离心机(上海安亭); Forma-86C ULT Freezer(美国Thermo); DY89-I型电动玻璃匀浆机(宁波新芝); XW-80型旋涡混合器(上海); 153 BR65516蛋白转膜仪; 552BR034248蛋白电泳仪(美国Bio-Rad); BCD-181D美菱无氟冰箱; UV Transilluminator FL310生物机能实验系统(索尼); X-I型暗盒(河南蔚光). TRIzol总RNA提取试剂及TIANScript cDNA合成试剂盒购自北京天根生化科技公司; TaKaRa Ex Taq HS购自大连宝生物工程有限公司; Hot Start Fluorescent

PCR Core Kit购自BBI公司产品; RIPA蛋白裂解液及BCA蛋白定量试剂盒购自武汉博士德公司; PPAR α 兔抗大鼠多克隆抗体为美国Abcam产品; β -actin兔抗大鼠多克隆抗体及羊抗兔IgG抗体为北京博奥康公司产品. PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 动物造模和分组: 所有大鼠分笼饲养于温度20℃ \pm 2℃, 湿度36%-43%的动物房内, 每笼2只, 自由饮水. 随机取10只大鼠作为正常对照组, 以普通饲料(兰州大学实验动物中心提供)饲养, 其余以高脂饲料(含普通饲料70%, 蛋黄粉12%, 猪油10%, 酪蛋白7%, 胆盐0.3%, 食盐0.2%, 酵母粉0.5%)不限量饲养. 6 wk后高脂大鼠平均体重360 g, 高于正常组20%, 随机取其中3只做肝脏病理切片, 镜下均见轻度脂肪变, 证明造模成功. 遂以随机数字表法将剩余动物分为非酒精性脂肪肝病模型组、柳茶提取物低、中、高剂量组, 分别以生理盐水4 mL/d, 柳茶提取物1.05 g/(kg \cdot d), 柳茶提取物2.1 g/(kg \cdot d)和柳茶提取物4.2 g/(kg \cdot d)灌胃(柳茶提取物于4 mL生理盐水中充分搅拌溶解), 正常对照组以生理盐水4 mL/d灌胃, 持续8 wk.

1.2.2 柳茶提取物制备: 柳茶经兰州大学药学院药用植物研究所鉴定, 依次用石油醚、乙醚除去脂溶性杂质; 加10倍量的水100℃提取3次; 合并水提液, 过滤; 70℃水浴减压浓缩至适量, 加入5倍量95%的乙醇纯析, 静置过夜, 离心过滤, 置真空冷冻干燥得柳茶粗提物^[15,16].

1.2.3 样本制备及检测: (1)肝功能检测: 取大鼠股动脉血5 mL, 3 000 r/min离心3 min, 测上清液丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平. (2)肝匀浆脂肪含量测定: 取肝组织0.15 g, 加1.5 mL生理盐水, 冰浴下制成10%肝匀浆, 3 000 r/min离心15 min, 取上清液测胆固醇(cholesterol, CHOL)、三酰甘油(triacylglycerol, TG)含量. (3)肝组织形态学检测: 取肝右叶中部组织以40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 制成4 μ m切片, HE染色, 光镜下观察肝组织形态学变化. (4)PPAR α 、ACO mRNA表达的检测: 取肝右叶中部组织约0.1 g, 以TRIzol提取总RNA, 0.1%无RNase水100 μ L溶解. 取1 μ L RNA样品, 加99 μ L无RNase水, 生物分光光度计测 A_{260} 、 A_{280} , 计算RNA浓度. 按TIANScript cDNA合成试剂盒说明取1 μ L(4 μ g)RNA样品, 逆转录为cDNA, -20℃

保存. 按TaKaRa Ex Taq HS试剂说明, 取cDNA 0.5 μ L, 上下游引物各0.4 μ mol/L, Taq酶12.5 μ L, 补ddH₂O至总体积25 μ L, 以普通PCR测各组大鼠PPAR α 、ACO引物特异性, 其反应参数为94℃预变性3 min, 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 30个循环取PCR反应产物电泳, 测各目的基因引物特异性. 电泳条件: TBE电泳缓冲液, 1.9%琼脂糖凝胶, 恒压110 V, 30 min. 然后采用SYBR Green实时荧光定量PCR法, 按试剂盒说明设置反应参数: 94℃预变性4 min, 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 40个循环, 测各基因mRNA的表达. 每个样本设3个平行. 熔解曲线程序: 95℃ 45 s, 55℃ 5 s, 从67℃-95℃自动绘制熔解曲线图. (5)PPAR α 蛋白表达水平检测: 按BCA蛋白定量试剂盒说明配制BCA定量工作液, 稀释标准品, 分光光度计测 A_{562} , 绘制标准曲线. 取肝组织0.3 g加入3 mL RIPE裂解液及1 mmol/L PMSE, 冰浴下以电动匀浆器充分裂解, 12 000 r/min离心5 min; 取上清液加BCA工作液, 37℃ 30 min后测 A_{562} , 计算蛋白浓度; 余以溴酚蓝上样缓冲液稀释5倍, 94℃变性5 min, -80℃冻存. 取各组蛋白各60 μ g于SDS-PAGE电泳缓冲液中电泳(5%浓缩胶80 V, 12%分离胶100 V)3 h, 100 V恒压转膜1 h, 5% TBST脱脂奶粉封闭1 h后稀释一抗, 4℃摇床杂交过夜, 0.05% TBST洗涤2次, 每次5 min; TBS洗涤5 min, 同法杂交二抗2 h后洗涤, ECL发光液室温孵育3 min后X片曝光显影, 扫描图片.

统计学处理 实验结果以SPSS11.0软件处理, 数据用mean \pm SD表示. 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA). $P<0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肝功能检测 脂肪肝模型组ALT、AST较正常对照组均有显著升高($P<0.05$); 给予柳茶干预后, 与模型组比较, 柳茶提取物低、中剂量组ALT、AST水平均明显降低, 有统计学差异($P<0.05$ 或0.01), 柳茶提取物高剂量组则无明显差异(表1).

2.2 肝脂检测 脂肪肝模型组肝匀浆CHOL、TG较正常对照组均有显著上升($P<0.05$); 经柳茶干预后, 肝匀浆中柳茶提取物中剂量组CHOL及TG含量均较模型组明显下降, 差异具有统计学意义($P<0.01$ 或0.05, 表1).

2.3 肝脏病理改变 切片光镜下可见正常对照组肝细胞形态大小均匀一致, 中央静脉周围无炎

■创新盘点

本文以过氧化物酶体脂肪酸氧化相关基因的表达与肝脏形态功能的变化为重点研究对象, 同时讨论了疾病过程中氧化与抗氧化之间的动态平衡.

■应用要点

非酒精性脂肪性肝病在发展中国家发病率颇高,而藏药柳茶在西北地区资源丰富,提取加工方法已成熟,有望在这一多发病的早期治疗中发挥独到的作用。

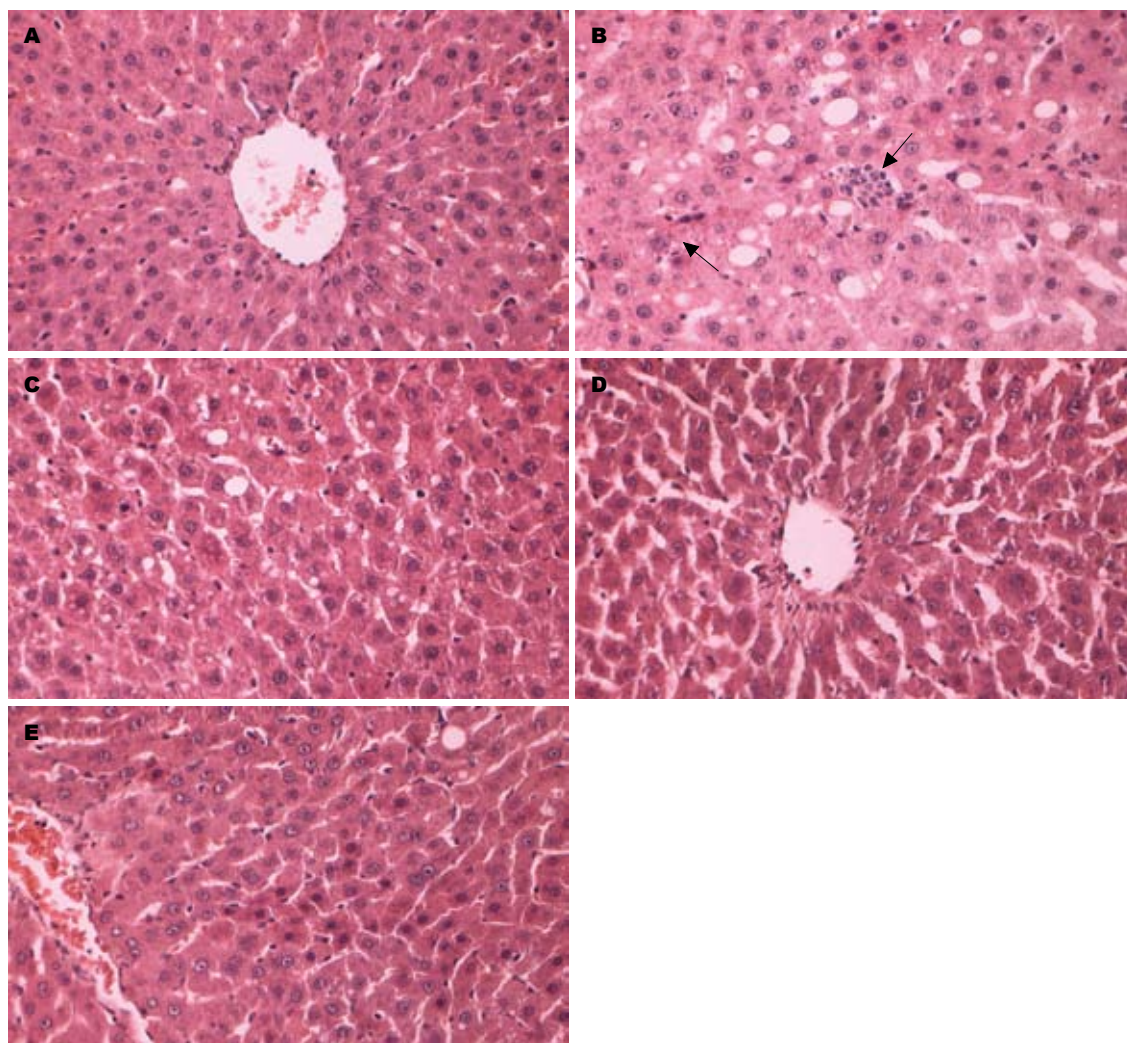


图1 肝组织形态学的变化(×400). A: 正常对照组; B: 模型组; C: 柳茶提取物低剂量组; D: 柳茶提取物中剂量组; E: 柳茶提取物高剂量组.

表1 各组大鼠血清中ALT、AST水平和肝组织匀浆中CHOL和TG水平的变化 (mean ± SD, mmol/L)

分组	ALT	AST	CHOL	TG
正常对照组	25.16 ± 2.32	109.72 ± 15.83	0.35 ± 0.05	0.69 ± 0.03
模型组	31.90 ± 2.52 ^a	128.61 ± 16.01 ^a	0.47 ± 0.04 ^a	0.85 ± 0.04 ^a
柳茶提取物低剂量组	29.83 ± 2.78 ^c	110.53 ± 12.33 ^c	0.35 ± 0.02 ^c	0.77 ± 0.02
柳茶提取物中剂量组	25.78 ± 2.63 ^d	100.45 ± 12.57 ^d	0.30 ± 0.02 ^d	0.75 ± 0.06 ^c
柳茶提取物高剂量组	30.62 ± 7.69	121.72 ± 26.67	0.33 ± 0.02 ^c	0.77 ± 0.10

^aP<0.05 vs 正常对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 模型组.

性细胞浸润(图1A). 非酒精性脂肪肝模型组肝细胞发生脂肪变, 胞质内见大量脂滴, 以大泡性为主, 肝细胞浊肿, 染色较淡, 可见点状坏死, 周围炎性细胞浸润, 肝窦狭窄(图1B). 柳茶提取物低剂量组肝细胞内脂滴减少, 以大、小泡性混杂为主, 炎性细胞浸润减轻, 肝细胞仍有点状坏死(图1C). 柳茶提取物中剂量组肝细胞内脂滴消

失, 无炎性细胞浸润及细胞坏死, 胞质疏松, 肝窦增宽(图1D). 柳茶提取物高剂量组肝细胞脂肪变减轻, 无炎性细胞浸润, 但肝细胞发生广泛嗜酸性变(图1E).

2.4 PPARα、ACO mRNA表达的检测 琼脂糖凝胶电泳示各基因扩增为单一条带, 大小与预计相符, PPARα、ACO、β-actin分别为350、

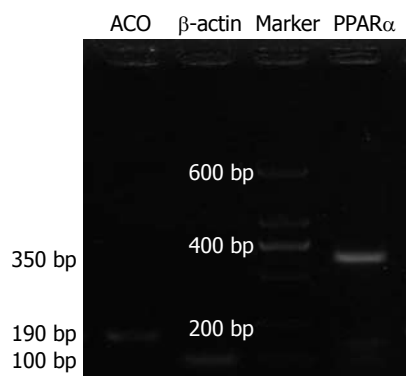


图2 RT-PCR示PPAR α 、ACO、 β -actin扩增产物。

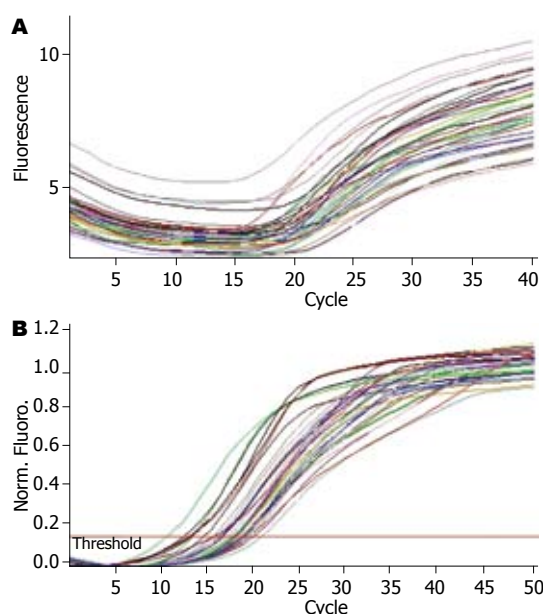


图3 SYBR Green实时荧光定量PCR扩增曲线。

190、100 bp(图2); SYBR Green实时荧光定量PCR扩增曲线平滑, 各基因均有明显的指数扩增期(图3)。设正常对照组各基因mRNA表达量为1, 模型组PPAR α mRNA表达量为其 1.64 ± 0.61 倍, ACO mRNA表达量为其 1.10 ± 0.17 倍。柳茶提取物低、中、高剂量组PPAR α mRNA表达量分别为正常对照组的 3.05 ± 0.94 倍、 16.97 ± 0.21 倍、 19.91 ± 3.70 倍, 与模型组相比, 中、高剂量组差异显著($P < 0.01$), 低剂量组差异无统计学意义。ACO mRNA的表达量分别为正常对照组的 5.12 ± 0.50 倍、 6.83 ± 1.37 倍、 16.67 ± 1.86 倍, 与模型组相比, 中、高剂量组差异显著($P < 0.01$), 低剂量组差异无统计学意义(图4)。

2.5 Western blot检测PPAR α 蛋白表达 柳茶组PPAR α 蛋白表达量与模型组相比有不同程度的增加, 且与柳茶剂量呈正相关, 剂量越大, PPAR α 蛋白的表达量也越大(图5)。

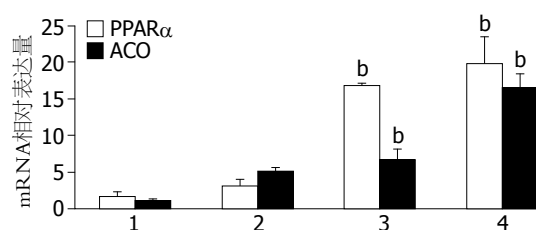


图4 PPAR α 、ACO mRNA相对表达量。1: 模型组; 2: 柳茶低剂量组; 3: 柳茶中剂量组; 4: 柳茶高剂量组。^b $P < 0.01$ vs 模型组。

同行评价
本文实验设计合理, 对于中医藏医用药有一定的临床参考价值。

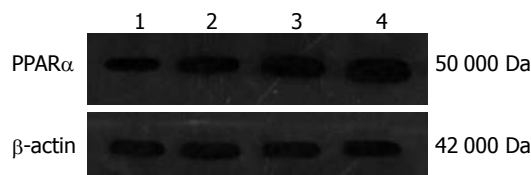


图5 Western blot示PPAR α 蛋白的表达。1: 模型组; 2: 柳茶低剂量组; 3: 柳茶中剂量组; 4: 柳茶高剂量组。

3 讨论

近年来, 随着生活水平的提高, NAFLD逐渐成为一种常见病、多发病, 仅亚太地区其发病率即高达20%-30%, 严重影响着人们的生活质量。在临床上他表现为一个渐进性发展过程, 从早期单纯性脂肪肝发展至脂肪性肝炎, 最终可形成肝硬化甚至肝癌, 治疗需兼顾改变生活方式、饮食结构、药物治疗改善症状及防治并发症^[17-19], 早期诊断和早期治疗尤为重要。实验通过摄食高脂饲料构建了NAFLD动物模型, 循环中大量增多的游离脂肪酸经门静脉入肝, 使肝脏脂代谢负担加重而氧化不足, 同时由于饮食结构的不平衡使载脂蛋白合成减少, 脂肪输出障碍而沉积于肝脏, 镜下可见肝细胞脂肪变, 肝组织匀浆脂肪含量增加。脂肪的蓄积, 尤其是线粒体内的脂肪蓄积可通过TNF- α 导致肝细胞损伤, ALT、AST等释放入血, 肝功能下降。实验以藏药柳茶作为干预措施, 观察了柳茶提取物干预后动物血中ALT、AST的含量、肝细胞形态结构及肝组织脂质水平的变化, 论证了该药对NAFLD早期病变的影响。

PPAR α 在脂肪酸的氧化过程中处于中心地位, 主要表达于肝脏, 能够被其配体如脂肪酸或氯贝特类降脂药活化, 活化后的PPAR α 与X受体形成二聚体, 结合到具有PPAR α 反应元件的下游基因的启动区诱导其表达。这些下游基因范围很广, 其中包括过氧化物酶体脂肪酸氧化限速酶ACO和微粒体脂肪酸- ω 羟基化关键酶CYP4A1^[20,21]。实验检测了大鼠肝脏脂肪酸氧化关

键酶PPAR α 、ACO mRNA及PPAR α 蛋白表达的变化,发现经柳茶作用后NAFLD动物PPAR α 、ACO表达增强,加强了过氧化物酶体 β 氧化作用,使用于TG、CHOL合成的底物减少,因而肝匀浆脂质含量下降,细胞内脂滴变小或消失.随着细胞损害减轻,肝功能改善,血ALT、AST含量降低.脂质沉积的减少与肝功能的改善可互为因果形成良性循环^[22].同时,PPAR α 活化引起的ACO、CYP4A1表达上调又可成为活性氧簇ROS的重要来源,使肝细胞遭到氧化损害,这也许可以解释柳茶提取物高剂量组PPAR α 表达增强的同时,肝细胞脂肪化减轻而又出现嗜酸性变,肝功能改善不如低、中剂量组明显.但由于PPAR α 所介导的信号转导是多途径的,他又可通过增加抗氧化酶如触酶、谷氨酸S转移酶等的活性,抑制脂质过氧化以及使其次级生物效应,从另一方面缓解肝脂质沉积和肝细胞损害^[23-27].在人体内,PPAR α 的表达远低于啮齿类,脂质过氧化造成的肝功能受损是可以在很大程度上得以避免的^[28].

柳茶在西北地区资源丰富,其免疫调节作用和降脂作用已被证实^[29].如能在增强机体免疫功能的基础上发挥降脂护肝的功效,将在NAFLD的早期治疗、减轻肝脏脂肪代谢紊乱和肝细胞损害、阻止病程进展上具有一定的应用前景.

4 参考文献

- 1 裴新明, 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: 3573-3578
- 2 Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3540-3553
- 3 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
- 4 钱林, 胡小宣. 非酒精性脂肪肝分子发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2848-2852
- 5 亚太地区非酒精性脂肪性肝病工作组. 非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗推荐意见(2006年11月修订). 中华全科医师杂志 2007; 6: 229-230
- 6 范建高. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 临床肝胆病杂志 2010; 26: 120-124
- 7 蔡葵, 何玉怡. 非酒精性脂肪肝与脂代谢紊乱及胰岛素抵抗的关系. 江西医学检验 2006; 24: 335-336
- 8 刘迎利, 闫自强. 脂代谢异常与脂肪肝相关性分析. 实用医技杂志 2004; 11: 496-497
- 9 Choi SS, Diehl AM. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 295-300
- 10 陈少东, 胡义扬. 非酒精性脂肪性肝病与肝细胞凋亡调控机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1327-1331
- 11 李鹏, 李昌平. 细胞凋亡在非酒精性脂肪性肝病中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2253-2258
- 12 Zanone MM, Burchio S, Quadri R, Pietropaolo M, Sacchetti C, Rabbone I, Chiandussi L, Cerutti F, Peakman M. Autonomic function and autoantibodies to autonomic nervous structures, glutamic acid decarboxylase and islet tyrosine phosphatase in adolescent patients with IDDM. *J Neuroimmunol* 1998; 87: 1-10
- 13 汪晓立, 郭继明, 杨兵勋. 柳茶调节脂类代谢作用的研究. 中草药 1995; 26: 473-475, 504
- 14 王佳冰, 柴成奎, 陈平, 李兴梅, 夏苗, 马小燕, 刘昕. 藏药柳茶提取物对单纯性肥胖大鼠脂质代谢的影响. 中药新药与临床药理 2010; 21: 148-149, 176
- 15 段博文, 李运, 刘昕, 杨永建. 柳茶多糖对小鼠免疫功能的影响. 中国中药杂志 2010; 35: 1466-1469
- 16 石磊, 张冬梅, 齐洁, 李建银, 杨永建. 柳茶多糖的分离纯化及气相色谱-质谱分析. 时珍国医国药 2009; 20: 2191-2192
- 17 范建高. 脂肪性肝病的治疗现状及展望. 药品评价 2007; 4: 65-67
- 18 范建高. 非酒精性脂肪性肝病的自然史及其诊治对策. 中国实用内科杂志 2009; 29: 393-395
- 19 范建高, 蔡晓波. 亚太地区非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗共识简介. 药品评价 2007; 4: 80-81
- 20 Ng VY, Huang Y, Reddy LM, Falck JR, Lin ET, Kroetz DL. Cytochrome P450 eicosanoids are activators of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 1126-1134
- 21 Yeon JE, Choi KM, Baik SH, Kim KO, Lim HJ, Park KH, Kim JY, Park JJ, Kim JS, Bak YT, Byun KS, Lee CH. Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha may have an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 799-804
- 22 田艳, 范竹萍, 邱德凯, 丁佳, 刘俊平, 高艳敏. 脂肪变性对肝细胞胆固醇代谢的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1031-1036
- 23 尹蓉, 王沁, 富翠芹. 姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1383-1387
- 24 Duplus E, Forest C. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 893-901
- 25 Gonzalez FJ, Shah YM. PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology* 2008; 246: 2-8
- 26 徐磊, 厉有名. 过氧化物酶体增殖物激活受体 α 在脂肪性肝病发病机制中的作用. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 715-717
- 27 Nishimura J, Dewa Y, Okamura T, Murguruma M, Jin M, Saegusa Y, Umemura T, Mitsumori K. Possible involvement of oxidative stress in fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Arch Toxicol* 2008; 82: 641-654
- 28 Kane CD, Francone OL, Stevens KA. Differential regulation of the cynomolgus, human, and rat acyl-CoA oxidase promoters by PPARalpha. *Gene* 2006; 380: 84-94
- 29 雒戛, 刘昕. 柳茶对荷瘤小鼠脾淋巴细胞产生IL-2和TNF- α 的影响. 中药药理与临床 2007; 23: 42-43

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

灌流流速决定慢性肝损伤大鼠的离体门脉压力

徐雪雁, 张涛, 周航, 赵欣, 张滔滔, 银河, 李婷, 李澎涛, 蔡大勇

徐雪雁, 张涛, 周航, 赵欣, 张滔滔, 银河, 李婷, 蔡大勇, 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所 北京市 100193
徐雪雁, 张涛, 周航, 张滔滔, 银河, 李婷, 李澎涛, 蔡大勇, 北京中医药大学 北京市 100029

徐雪雁, 硕士研究生, 研究方向为门脉高压症的发病机制与复方药理机制。

重大新药创制科技重大专项基金资助项目, No. 2009ZX09502-017

国家重大基础研究基金资助项目, No. G2000056905

国家自然科学基金资助项目, No. 30873464

教育部重点研究基金资助项目, No. 108019

通讯作者: 蔡大勇, 100193, 北京市, 中国医学科学院, 中国协和医科大学药用植物研究所. dycal@implad.ac.cn

电话: 010-62899771 传真: 010-62899715

收稿日期: 2010-06-10 修回日期: 2010-08-01

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-18

Portal pressure determined by perfusion velocity in isolated chronically injured rat liver *in vitro*

Xue-Yan Xu, Tao Zhang, Hang Zhou, Xin Zhao, Tao-Tao Zhang, He Yin, Ting Li, Peng-Tao Li, Da-Yong Cai

Xue-Yan Xu, Tao Zhang, Hang Zhou, Xin Zhao, Tao-Tao Zhang, He Yin, Ting Li, Da-Yong Cai, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
Xue-Yan Xu, Tao Zhang, Hang Zhou, Tao-Tao Zhang, He Yin, Ting Li, Peng-Tao Li, Da-Yong Cai, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Supported by: the Major State Creative New Drug Project, No. 2009ZX09502-017; the Major State Basic Research Development Program of China, No. G2000056905; National Natural Science Foundation of China, No. 30873464; and the Science Foundation of the Ministry of Education of the People's Republic of China, No. 108019

Correspondence to: Da-Yong Cai, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China. dycal@implad.ac.cn

Received: 2010-06-10 Revised: 2010-08-01

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To establish equations to define portal pressure based upon perfusion velocity in isolated chronically injured rat liver.

METHODS: Chronic liver injury was induced in Wistar rats using carbon tetrachloride. The liver index and pathological changes were re-

corded. On days 0, 28, 56 and 84 after induction of chronic liver injury, the hepatic artery, portal vein and hepatic vein were cannulated. The residual blood in the isolated liver was eliminated with Krebs-Henseleit solution through the hepatic artery. Portal vein perfusion velocities were precisely controlled between 2 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ to 15 630 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a pump. The pressure (mmHg) was monitored using the BL-420S physiological experiment system. The equations for estimating portal pressure were developed using Prism-4 software, and median velocities and their 95% confidence intervals were calculated.

RESULTS: On days 0, 28, 56 and 84, the equations for estimating portal pressure (mmHg) based on the logarithmic velocity ($\mu\text{L}/\text{min}$) in isolated rat liver were $y = -0.1428 + 1.1423/[1 + 10^{(13.805-3.84x)}]$ ($r^2 = 0.9996$), $y = -0.1570 + 1.419/[1 + 10^{(4.666-1.27x)}]$ ($r^2 = 0.9958$), $y = 0.05106 + 0.96594/[1 + 10^{(10.877-2.958x)}]$ ($r^2 = 0.9987$), and $y = -0.09893 + 1.406/[1 + 10^{(4.3-1.158x)}]$ ($r^2 = 0.9989$), respectively. The median velocities (95% confidence intervals) were 3.595 (3.561-3.628), 3.674 (3.285-4.064), 3.677 (3.614-3.740) and 3.713 (3.449-3.977), respectively.

CONCLUSION: The equations for estimating portal pressure based on the logarithmic velocity in isolated rat liver are similar at different time points during the progression of carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. A dry model of systems biology for portal pharmacodynamics could be derived from the increased median perfusion velocities.

Key Words: Chronic liver injury; Isolated perfusion; Portal pressure equation; Rat; Systems biology

Xu XY, Zhang T, Zhou H, Zhao X, Zhang TT, Yin H, Li T, Li PT, Cai DY. Portal pressure determined by perfusion velocity in isolated chronically injured rat liver *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2745-2749

摘要

目的: 建立灌流流速所决定的慢性各阶段肝损伤大鼠离体门脉压力方程。

■背景资料

慢性肝病患者具有最终死亡和阶段性进展的临床特征。其中, 门脉高压是最主要的致死性并发症。既往肝脏离体灌流, 只能分析正常猪或大鼠肝动脉灌入的肝脏弹性。

■同行评议者

宣世英, 教授, 山东省青岛市立医院肝病内科

■相关报道

许永乐等在前期实验中认识到门脉高压病机的可逆转特征,刘树锋等发现降低模型大鼠CCl₄性、免疫性或胆管阻塞性肝纤维化门脉高压复方单体间的联合作用。

方法: 常规观察CCl₄慢性肝损伤第0、28、56、84天的肝脏系数与肝脏病,大鼠肝动脉、门脉和肝静脉插管,经肝动脉冲净残血,门脉灌流状态下游离肝脏;定量蠕动泵调节门脉灌流流速($\mu\text{L}/\text{min}$),生物机能实验系统监测压力(mmHg),采用Prism-4非线性可变斜率回归由对数流速所决定的压力效能方程式,计算半效对数流速及其95%的可信区间。

结果: 在连续CCl₄慢性肝损伤0、28、56、84天,由灌流数值流速($\mu\text{L}/\text{min}$)决定的离体大鼠门脉灌流压力(mmHg)效能方程分别为 $y = -0.1428 + 1.1423/[1 + 10^{(13.805 - 3.84x)}]$ ($r^2 = 0.9996$)、 $y = -0.1570 + 1.419/[1 + 10^{(4.666 - 1.27x)}]$ ($r^2 = 0.9958$)、 $y = 0.05106 + 0.96594/[1 + 10^{(10.877 - 2.958x)}]$ ($r^2 = 0.9987$)和 $y = -0.09893 + 1.406/[1 + 10^{(4.3 - 1.158x)}]$ ($r^2 = 0.9989$);半效对数流速(95%CI)分别为3.595(3.561-3.628)、3.674(3.285-4.064)、3.677(3.614-3.740)和3.713(3.449-3.977)。

结论: 随着慢性肝损伤进展,离体门脉灌流流速所决定的压力方程具有不同系数和相同形式的特征,增高半效灌流流速可建立门脉舒张潜能低下的系统生物学门脉药效干模式。

关键词: 慢性肝损伤;离体灌流;门脉压力方程;大鼠;系统生物学

徐雪雁,张涛,周航,赵欣,张滔滔,银河,李婷,李澎涛,蔡大勇.灌流流速决定慢性肝损伤大鼠的离体门脉压力.世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2745-2749

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2745.asp>

0 引言

慢性肝病具有死亡率高^[1]和临床阶段性特征^[2]。最主要的门脉高压致死机制^[3]未能得到猪^[4]或大鼠^[5]离体灌流验证。我们在前期实验中认识到门脉高压病机的可逆转特征^[6],发现降低模型大鼠CCl₄性^[7]、免疫性^[8]或胆管阻塞性^[9]肝纤维化门脉高压复方单体间的联合作用;肝外门脉主干离体张力和在体门脉压力不能解释单体联合药理^[10];我们提出肝内门脉局部压力调控主导慢性肝损伤门脉高压发病机制的设想。本实验在CCl₄慢性肝损伤门脉高压症大鼠造模前及第28、56、84天,观察定量灌流流速对离体门脉压力的决定作用;发现随慢性肝损伤进展,离体灌流速度决定的门脉压力方程的形式类似而系数不同;逐步增高的半效对数压力奠定了门脉药效中医复方评价的系统生物学基础^[11]。

1 材料和方法

1.1 材料 体质量 $200 \text{ g} \pm 13 \text{ g}$, δ , Wistar大鼠16只,购于北京华阜康生物科技有限公司。标准饲料购自北京科澳饲料有限公司。每日光照与黑暗各12 h,温度 $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 $45\% \pm 2\%$,自由饮食。HX-1050恒温循环器为成都泰盟科技有限公司产品。BTO1蠕动泵为北京信康亿达科技有限公司产品。950 mL/L O₂, 50 mL/L CO₂混合气体为北氧特种气体研究所有限公司产品。BL-420S生物机能实验系统及压力传感器为成都泰盟科技有限公司产品。瑞士Mettler公司AE160型电子分析天平。德国LETIZ公司FS/FAS5030石蜡切片机。日本滨松Nano Zoomer Digital Pathology数字病理扫描系统等病理科常规设备。灌流液为Krebs-Henseleit溶液(KCl 4.7 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, NaCl 118 mmol/L, 葡萄糖11.0 mmol/L, pH值7.35-7.45)。肝素钠由江苏常州市光明生物化学研究所提供。CCl₄为国药集团化学试剂公司产品。橄榄油为汕头市西陇化工有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分组: 普通级动物房内大鼠适应性饲养3 d,禁食12 h后称量大鼠体质量;体质量均衡随机分为CCl₄造模慢性肝损伤0、28、56、84 d共4组;每组4只,分别在第84、56、28、0天开始慢性肝损伤造模处理。造模大鼠每3.5 d皮下注射40% CCl₄橄榄油3 mL/kg 1次,未开始造模的大鼠每3.5 d同步皮下注射橄榄油3 mL/kg 1次。大鼠标准饲料饲养,自由饮水;每周禁食12 h称量体质量1次;总时程到达84 d进行离体肝门脉灌流。以肝脏系数和肝脏病变为模型指标,以灌流压力为探索性指标,分析慢性肝损伤的门脉灌流流速压力方程。

1.2.2 指标观察: (1)肝脏系数:动物灌流前禁食12 h,称量体质量(W, g);灌流完成撤出插管后称量肝脏质量(L, g);按 $[(L/W) \times 100]$ 计算每100 g体质量的肝脏系数。(2)肝脏病变:切取灌流左叶肝脏,中性甲醛溶液固定24 h,常规石蜡包埋,3 μm 切片,HE染色。数字病理扫描系统扫描分析组织切片,10倍物镜下照片描述组织病变特征。(3)灌流压力:参考Kerdok等^[4]猪肝离体灌流思路,建立灌流系统装置和离体肝脏门脉灌流操作流程。BL-420S生物机能实验系统及其压力传感器进行调零和定标。肝内门脉灌流流速递增,每个灌流流速连续观察5 min平均压力数据。

统计学处理 以mean \pm SD表示各流速状态

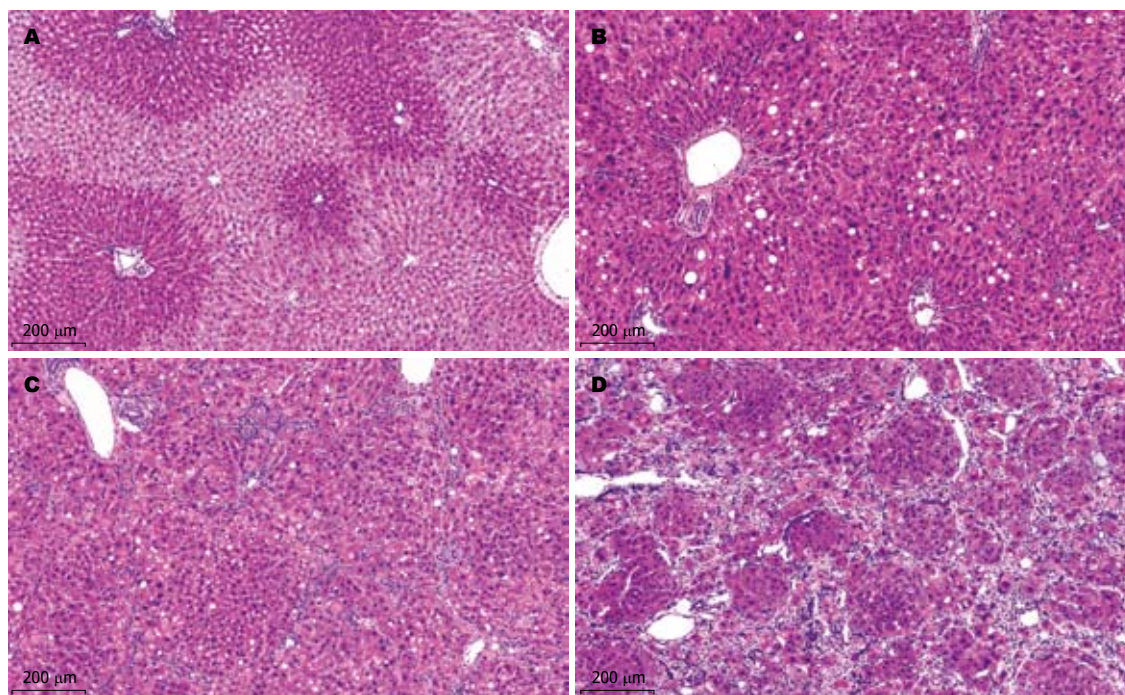


图1 不同时间大鼠慢性肝损伤的肝组织病变(HE × 10). A: 造模前; B: 造模28 d; C: 造模56 d; D: 造模84 d.

■创新盘点

本课题组提出肝内门脉局部压力调控主导CCl₄慢性肝损伤门脉高压发病机制的设想. 本实验在CCl₄慢性肝损伤门脉高压症大鼠造模的第0、28、56、84天, 肝动脉、门脉和肝静脉插管, 经肝动脉冲净残血, 门脉灌流状态下游离肝脏, 观察定量灌流流速对离体门脉压力的决定作用, 为建立中医复方药效系统生物学干模式奠定实验基础.

下压力原始统计数据. 以最大流速(V_{\max})对应压力(P_{\max})为基准, 按公式($E_p = P_i/P_{\max}$)计算压力变化的效能; 以Prism-4统计软件从对数流速[X轴, $\text{Log}(\mu\text{L}/\text{min})$]非线性可变斜率回归离体门脉灌流压力效能曲线方程, 并计算半效流速及95%可信限.

2 结果

2.1 肝脏系数 与造模前比较, 造模28、56、84 d 肝脏系数分别增加65.56%、77.74%和28.54%(均 $P<0.05$); 与造模28 d比较, 造模56、84 d分别增加7.3%和-22.36%(均 $P<0.05$); 与造模56 d比较, 造模84 d降低27.68%($P<0.01$, 表1).

2.2 肝脏病变性质 造模前肝脏结构正常. 肝小叶和汇管区结构清楚, 肝窦和肝索排列规则, 肝细胞或胆管细胞无明显病变(图1A). 造模28 d以肝细胞水肿和脂肪变性为主, 广泛肝细胞变性和肝血窦瘀血等肝脏损伤性改变为特征; 肝细胞发生细胞水肿和脂肪变性, 溶解坏死肝细胞在肝小叶内呈碎屑状坏死和少数桥接坏死, 很少见到肝细胞嗜酸性变和嗜酸性小体形成; 肝血窦瘀血明显. 汇管区出现轻度水肿、充血和纤维组织增生(图1B). 造模56 d以肝纤维化为主. 汇管区纤维增生形成的纤维条索向肝小叶内延伸(肝纤维化), 但未能完全分割肝小叶, 无假小叶形成. 肝细胞变性坏死和肝窦充血显著减轻, 双核肝细胞少见; 汇管区有少量淋巴细胞或浆

表1 造模期间大鼠肝脏系数 (mean ± SD, $n = 4$)

时间(d)	体质量(g)	肝质量(g)	肝脏系数(%)
0	206.85 ± 4.96	10.18 ± 1.03	3.30 ± 0.01
28	195.13 ± 15.84	13.93 ± 2.28	5.48 ± 0.01 ^a
56	204.85 ± 8.60	21.13 ± 3.51	5.88 ± 0.01 ^a
84	192.23 ± 18.92	13.13 ± 1.56	4.25 ± 0.01 ^{bcd}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 造模0 d; ^c $P<0.05$ vs 造模28 d; ^d $P<0.01$ vs 造模56 d.

细胞浸润, 胆管增生不明显(图1C). 造模84 d出现以典型假小叶形成为特征的肝硬化. 肝小叶被广泛增生的纤维组织分割包绕成大小不等、圆形或椭圆形的肝细胞结节(假小叶); 假小叶内肝细胞索排列紊乱, 肝细胞较大、核大而深染, 出现双核肝细胞. 假小叶之间纤维增生, 出现炎性细胞浸润和小胆管增生(图1D).

2.3 慢性肝损伤大鼠离体门脉灌流的流速压力方程

2.3.1 造模前门脉灌流的流速压力曲线: 造模前慢性肝损伤大鼠门脉对数流速决定压力效能方程为 $y = -0.1428 + 1.1423/[1 + 10^{(13.805 - 3.84x)}]$ ($r^2 = 0.9996$), 呈现S型曲线. 其半效对数流速(95%CI)为3.595(3.561-3.628)(表2, 图2A).

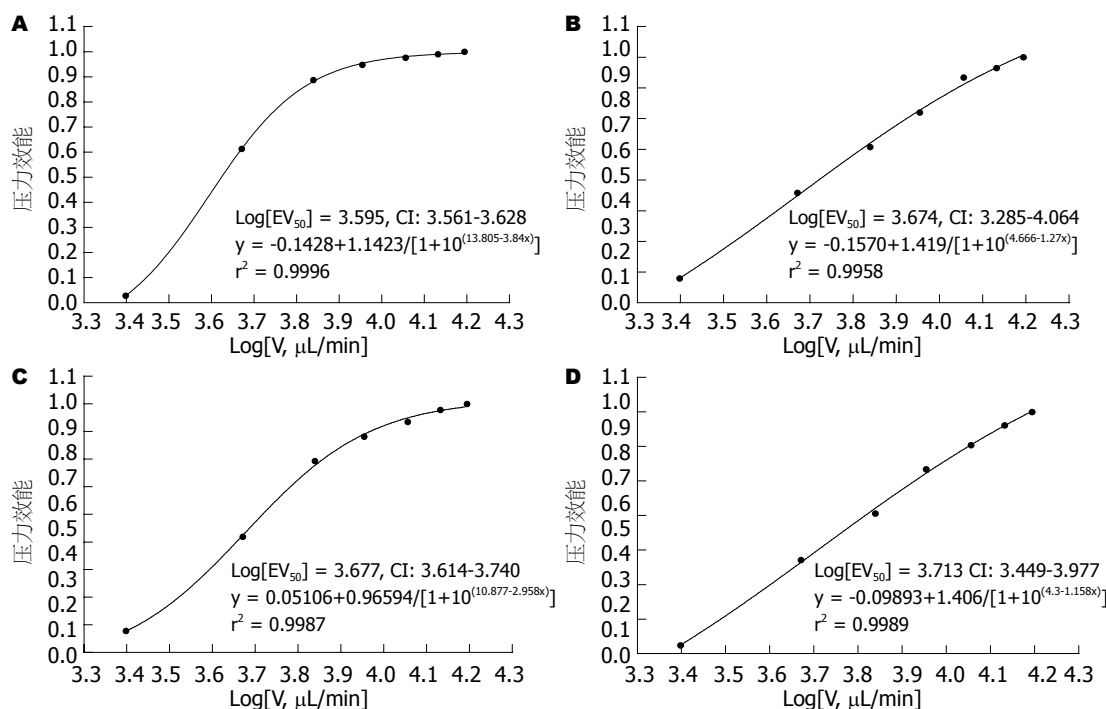
2.3.2 造模28 d门脉灌流的流速压力曲线: 慢性肝损伤造模28 d大鼠门脉对数流速决定压力效

■应用要点

本研究建立了肝硬化门脉高压离体门脉灌流的恒流测压模式,为中药复方药理学和临床处方配伍提供了研究方法,可确定复方单体之间的联合作用机制。

表 2 大鼠造模前后门脉灌流流速和压力的关系 ($n = 4$)

流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Log[V]	第0天		第28天		第56天		第84天	
		压力	效能	压力	效能	压力	效能	压力	效能
2 500	3.398	0.56 ± 0.44	0.077	19.25 ± 0.75	0.279	13.65 ± 1.37	0.178	17.77 ± 2.47	0.324
4 690	3.671	1.35 ± 0.61	0.153	26.69 ± 1.94	0.558	20.71 ± 5.44	0.519	23.59 ± 4.29	0.571
6 900	3.839	3.98 ± 1.18	0.798	33.63 ± 4.82	0.707	35.42 ± 13.20	0.793	28.74 ± 6.39	0.706
9 000	3.954	6.89 ± 1.63	0.906	41.97 ± 7.67	0.820	45.96 ± 17.30	0.881	36.26 ± 10.81	0.834
11 370	4.056	10.85 ± 2.83	0.948	55.71 ± 15.79	0.934	56.28 ± 22.19	0.935	42.30 ± 12.69	0.904
13 550	4.132	14.90 ± 3.35	0.981	61.37 ± 9.80	0.965	68.19 ± 20.94	0.978	48.96 ± 14.90	0.961
15 630	4.194	19.66 ± 4.07	1.000	68.98 ± 4.04	1.000	76.63 ± 19.07	1.000	54.77 ± 15.74	1.000

图 2 大鼠造模前后门脉灌流流速压力曲线方程($n = 4$)。A: 造模前; B: 造模28 d; C: 造模56 d; D: 造模84 d。

能方程为 $y = -0.1570 + 1.419/[1 + 10^{(4.666 - 1.27x)}]$ ($r^2 = 0.9958$), 呈现较直挺的类S型曲线, 其半效对数流速(95% CI)为3.674(3.285-4.064)(表2, 图2B)。

2.3.3 造模56 d门脉灌流的流速压力曲线: 慢性肝损伤造模56 d大鼠门脉对数流速决定压力效能方程为 $y = 0.05106 + 0.96594/[1 + 10^{(10.877 - 2.958x)}]$ ($r^2 = 0.9987$), 呈现S型方程曲线, 其半效对数流速(95%CI)为3.677(3.614-3.740)(表2, 图2C)。

2.3.4 造模84 d门脉灌流的流速压力曲线: 慢性肝损伤造模84 d大鼠门脉对数流速决定压力效能方程为 $y = -0.09893 + 1.406/[1 + 10^{(4.3 - 1.158x)}]$ ($r^2 = 0.9989$), 呈现较直挺的类S型曲线, 其半效对数流速(95%CI)为3.713(3.449-3.977)(表2, 图2D)。

3 讨论

慢性肝病患者具有最终死亡^[1]和阶段性进展^[2]的

临床特征。其中, 门脉高压是最主要的致死性并发症^[3]。既往肝脏离体灌流, 只能分析正常猪^[4]或大鼠^[5]肝动脉灌入的肝脏弹性。本课题组已明确大鼠 CCl_4 慢性肝损伤门脉高压发病机制及其可逆转特征^[6], 随后发现降低模型大鼠门脉高压有效中医复方所含多种单体之间具有最适剂量比^[7]; 该复方单体联合药效在免疫性^[8]和胆管阻塞性^[9]肝纤维化模型大鼠上得到验证。肝外门脉主干离体张力(数据未发表)和在体门脉压力不能解释门脉高压病理和复方单体联合作用药理^[10]; 本课题组由此提出肝内门脉局部压力调控主导 CCl_4 慢性肝损伤门脉高压发病机制的设想。本实验在 CCl_4 慢性肝损伤门脉高压症大鼠造模的第0、28、56、84天, 肝动脉、门脉和肝静脉插管, 经肝动脉冲净残血, 门脉灌流状态下游离肝脏, 观察定量灌流流速对离体门脉压力

的决定作用, 为建立中医复方药效系统生物学干模式^[1]奠定实验基础。

结果发现CCl₄慢性肝损伤大鼠造模的第0、28、56、84天4个进展阶段上, 肝脏系数出现先增加后回降的变化趋势, 与临床患者肝脏大小变化^[1-3]和前期实验数据^[4-6]基本一致; 4个造模进展阶段上, 分别观察到肝脏结构正常、肝细胞变性、肝纤维化和肝硬化病变。提示造模处理大鼠发生了慢性肝损伤的阶段性病变。在慢性肝损伤4个进展阶段上, 离体灌流速度决定的门脉压力方程形式类似; 方程自变量系数不同, 如与第0天比较, 后3阶段方程曲线的基点出现下移-回升-回降的变化趋势。4个造模进展阶段方程曲线均呈S型; 结合病变, 第28天的肝细胞急性损伤和第84天的血流通路改建, 使S型曲线中段僵硬直挺。慢性肝损伤4个进展阶段上, 半效对数流速具有逐步增加趋势, 提示肝小叶细胞损伤-血流改建-毛细血管动脉化的器质性病变影响功能性门脉压调节。

氧化机制参与临床慢性肝损伤^[1-3]。混合功能氧化酶催化CCl₄代谢时释放大量自由基, 发生生物分子损害, 导致肝脏变质-肝纤维化-肝硬化-门脉高压的阶段性机制逐步清楚^[4-6]。但门脉高压主导性局部调控信号通路还有待研究^[1-6]。

本研究建立了肝硬化门脉高压离体门脉灌流的恒流测压模式, 为中药复方药理学和临床处方配伍提供了研究方法, 可确定复方单体之间的联合作用机制。后续研究将确定技术平台的最适条件和临床疗效评价的适应范围, 探索

性建立门脉调控的系统生物学干模式。

4 参考文献

- 1 Roberts SE, Goldacre MJ, Yeates D. Trends in mortality after hospital admission for liver cirrhosis in an English population from 1968 to 1999. *Gut* 2005; 54: 1615-1621
- 2 Planas R, Montoliu S, Ballesté B, Rivera M, Miquel M, Masnou H, Galeras JA, Giménez MD, Santos J, Cirera I, Morillas RM, Coll S, Solà R. Natural history of patients hospitalized for management of cirrhotic ascites. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1385-1394
- 3 Herath CB, Lubel JS, Jia Z, Velkoska E, Casley D, Brown L, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Portal pressure responses and angiotensin peptide production in rat liver are determined by relative activity of ACE and ACE2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G98-G106
- 4 Kerdok AE, Ottensmeyer MP, Howe RD. Effects of perfusion on the viscoelastic characteristics of liver. *J Biomech* 2006; 39: 2221-2231
- 5 Bessems M, 't Hart NA, Tolba R, Doorschodt BM, Leuvenink HG, Ploeg RJ, Minor T, van Gulik TM. The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 2006; 40: 236-246
- 6 许永乐, 蔡大勇, 唐朝枢. CCl₄导致肝硬化和门脉高压的机制. *世界华人消化志* 2005; 13: 235-238
- 7 刘树峰, 蔡大勇, 李澎涛, 相萍茹. 优化甘参复方抗肝纤维化组分配伍的研究. *中华中医药杂志* 2005; 20: 373-375
- 8 邓秀兰, 王青青, 张晓晶, 刘燕南, 曾郁敏, 贾翎, 李澎涛, 蔡大勇. 甘草次酸配伍丹参酮防治大鼠免疫性肝纤维化的作用机制. *中国药师* 2007; 10: 741-744
- 9 杜庆红, 李澎涛. 内皮素系统与门静脉高压症的病理生理和临床治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1092-1097
- 10 任丽薇, 张晓晶, 邓秀兰, 刘树峰, 刘燕南, 蔡大勇. 门脉高压波形特征的观察方法及其影响因素. *北京中医药大学学报* 2006; 29: 840-843
- 11 Hood L, Rowen L, Galas DJ, Aitchison JD. Systems biology at the Institute for Systems Biology. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2008; 7: 239-248

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本文设计新颖, 思路清晰, 数据可靠, 具有比较重要的学术价值。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定*WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6本期刊被PMC收录。PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的。(常务副总编辑: 张海宁 2010-08-17)

肝癌细胞系SMMC-7721中边缘群细胞在低氧诱导的上皮间质转化调控下的表达

王波, 夏羽佳, 晏维, 夏丽敏, 田德安

■背景资料

肿瘤干细胞学说认为, 肿瘤细胞在成瘤性方面具有不均一性, 只有极少数肿瘤干细胞具有自我更新和分化的潜能, 这是肿瘤增殖、抗药和复发的根源. 肿瘤干细胞的比例与肿瘤的恶性程度成正比相关. 上皮间质转化是具有极性的上皮细胞转变成具有移行功能的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的过程. 发生间质转化的上皮细胞与肿瘤的侵袭转移密切相关.

王波, 夏羽佳, 晏维, 夏丽敏, 田德安, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

王波, 主治医师, 主要从事消化系统疾病方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30873038; No. 30800968

作者贡献分布: 此课题由王波、夏羽佳及晏维设计; 研究过程由夏羽佳、晏维及夏丽敏完成; 数据分析由王波与夏羽佳完成; 论文书写由王波与田德安完成.

通讯作者: 田德安, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科.

tiandeanwh@medmail.com.cn

电话: 027-83663611

收稿日期: 2010-05-14 修回日期: 2010-08-05

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-18

Influence of hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition on side population cells in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Bo Wang, Yu-Jia Xia, Wei Yan, Li-Min Xia, De-An Tian

Bo Wang, Yu-Jia Xia, Wei Yan, Li-Min Xia, De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30873038 and 30800968

Correspondence to: De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tiandeanwh@medmail.com.cn

Received: 2010-05-14 Revised: 2010-08-05

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To evaluate the influence of hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) on side population cells in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721.

METHODS: After SMMC-7721 cells were cultured under hypoxic conditions for 72 h, cell morphological changes were observed, E-cadherin expression was detected by Western blot and immunofluorescence, and the percentage of side population cells was analyzed by flow cytometry.

RESULTS: SMMC-7721 cells changed from a polygonal shape to a fibro-like fusiform shape after exposure to hypoxia for 72 h. Compared with control SMMC-7721 cells, E-cadherin expression was significantly down-regulated (0.41 ± 0.23 vs 2.03 ± 0.43 , $P < 0.01$), and the percentage of SP cells were significantly reduced (4.3% vs 0.0% , $P < 0.01$) in SMMC-7721 cells cultured under hypoxic conditions for 72 h.

CONCLUSION: Hypoxia can activate EMT and reduce the percentage of side population cells in hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells, suggesting that EMT might promote the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma cells by suppressing the proliferation of cancer stem cells.

Key Words: Hypoxia; Epithelial-mesenchymal transition; Cancer stem cell; Hepatocellular carcinoma

Wang B, Xia YJ, Yan W, Xia LM, Tian DA. Influence of hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition on side population cells in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2750-2755

摘要

目的: 探讨低氧状态下上皮间质转化对SMMC-7721中边缘群细胞的影响.

方法: 低氧培养SMMC-7721细胞, 动态观察细胞形态学变化, Western blot和免疫荧光检测上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)相关指标钙粘连蛋白(E-cadherin)的表达, 通过流式细胞仪分析诱导前后边缘群(side population, SP)细胞含量的变化.

结果: 低氧诱导72 h后SMMC-7721细胞逐渐由原来的多角形变成类似于成纤维样的长梭形, 排列松散, E-cadherin的表达下调, 其相对定量值与正常培养相比, 差异具有显著意义(0.41 ± 0.23 vs 2.03 ± 0.43 , $P < 0.01$), SP细胞含量也明显降低(4.3% vs 0.0% , $P < 0.01$).

■同行评议者

姚鹏, 副教授, 中国人民解放军北京军区总医院全军肝病中心; 王钦红, 副教授, 美国杜克大学医学院肿瘤生物学

结论:低氧能够诱导肿瘤细胞SMMC-7721发生EMT,同时SP细胞的含量下降. EMT可能抑制了肿瘤干细胞的增殖,促进肿瘤细胞向侵袭和转移的方向发展.

关键词:低氧;上皮间质转化;肿瘤干细胞;肝癌

王波,夏羽佳,晏维,夏丽敏,田德安.肝癌细胞系SMMC-7721中边缘群细胞在低氧诱导的上皮间质转化调控下的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2750-2755
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2750.asp>

0 引言

缺氧是实体瘤微环境的基本特征之一,多数体积 $>1\text{ mm}^3$ 的实体瘤均含有相当数量的缺氧肿瘤细胞. 研究发现,恶性肿瘤细胞在缺氧环境下会产生一系列生物学行为变化,包括增殖、侵袭转移、对放疗和化疗的效果不佳等. 其分子机制一直是肿瘤学研究的热点之一^[1].

上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)最早被发育生物学家用来描述胚胎发育过程中某些特定部位的上皮细胞所发生的形态学改变,发生EMT的上皮细胞在经历了短暂的结构改变后,细胞的迁徙和运动能力增强. 目前认为EMT是一种重要的肿瘤侵袭和转移机制. 我们既往的研究发现转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)能够促使肝癌细胞SMMC-7721发生EMT. 缺氧对此细胞系是否也具备同样的诱导功能,目前国内报道较少.

新的肿瘤干细胞学说认为,肿瘤组织中并非所有的肿瘤细胞都具有恶性特征,只有肿瘤干细胞具有自我更新和分化潜能,成为肿瘤增殖生长、转移和复发的根源^[2-4]. 边缘群(side population, SP)细胞就代表的是这样一族肿瘤干细胞,这些细胞对化疗药物有内在的高抵抗性,即使大部分肿瘤细胞被常规化疗杀死,只要残存SP细胞,都可能引起肿瘤复发和转移^[5].

原发性肝癌是我国最常见的消化系恶性肿瘤之一,临床上病情常迅速进展,预后极差. 因此针对肝癌的侵袭转移一直是该领域的研究热点. 本文试图探讨低氧是否诱导SMMC-7721发生EMT,以及对SP细胞的影响,以期为进一步研究肝癌复发转移提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系SMMC-7721由华中科技

大学附属同济医院肝病研究所保存. DMEM培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自Clark公司;Hoechst 33342、碘化丙啶(propidium iodide, PI)和维拉帕米均购自Sigma公司;人TGF- β 购自英国Protech公司;钙粘连蛋白(E-cadherin)兔抗人多克隆抗体购自Santa Cruz公司. FACS Aria流式细胞仪及其分析软件为美国BD公司产品.

1.2 方法

1.2.1 常规细胞培养: SMMC-7721细胞用含青链霉素及100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液在37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养,0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞用于实验.

1.2.2 低氧细胞培养: SMMC-7721细胞设实验组和对照组. 实验组置低氧培养箱中培养,其培养条件为10 mL/L O₂, 50 mL/L CO₂, 940 mL/L N₂, 37℃. 对照组细胞培养方法同常规细胞培养,以加入TGF- $\beta 1$ 培养细胞为阳性对照,培养72 h后, Olympus倒置显微镜观察细胞形态,高倍镜下随机计数5个视野中多角形和长梭形细胞的数量,计算其百分比.

1.2.3 Western blot检测E-cadherin蛋白的表达: RIPA裂解液提取总蛋白, Bradford法检测其浓度. 取50 μ g总蛋白进行电泳. 10% SDS-PAGE电泳后将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5%的封闭液封闭2 h,加入一抗(兔抗人多克隆抗体, 1:100),4℃过夜;洗膜,再加入二抗(羊抗兔IgG-HRP, 1:10 000)孵育1 h,洗膜后进行ECL显色. 利用相关图像分析软件扫描分析条带的灰度值. 目的蛋白表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/ β -actin条带的灰度值.

1.2.4 免疫荧光法检测细胞E-cadherin蛋白的表达: 待上述各组SMMC-7721细胞在盖玻片上生长融合到90%-95%时,取出以40 g/L的甲醛室温固定30 min; 0.2% Triton X-100透化5 min; 5%的封闭液室温封闭30 min; 加入一抗4℃过夜后,加入二抗避光孵育30 min,激光共聚焦显微镜观察蛋白定位表达情况.

1.2.5 SP细胞分析: 调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,加入Hoechst 33342至终浓度为10 mL/L. 37℃恒温避光水浴90 min,每15 min摇匀1次. 最后500 g于4℃离心5 min弃上清,以4℃预冷的汉克平衡盐溶液重悬细胞. 在反应体系中加入PI使其终浓度为0.5 mg/L时上流式细胞仪检测. 仪器参数如下, 355 UV激发光源, 610 nm双色短通反射滤镜, 450 nm和675 nm边缘长通滤片分别散射蓝光和红光部分. 测量前向散射和侧向散射二维参

■研究前沿

肿瘤干细胞学说和细胞上皮间质转化学说是肿瘤学领域新近研究的重点和热点. SP细胞具有肿瘤干细胞的基本特征,被视为一种肿瘤干细胞筛选和分离纯化的标志. 缺氧是诱发细胞发生上皮间质转化的机制之一. 肿瘤细胞在失控的增殖状态下往往具有缺氧的特征性微环境. 深入探讨缺氧状态下SP细胞的调控机制将成为此领域研究的重点.

■相关报道

1996年, Goodell等采用流式细胞术研究造血干细胞在体内的增殖情况时发现有一小群细胞呈彗星状分布在细胞主群的一侧, 他们将这群细胞称为SP细胞。

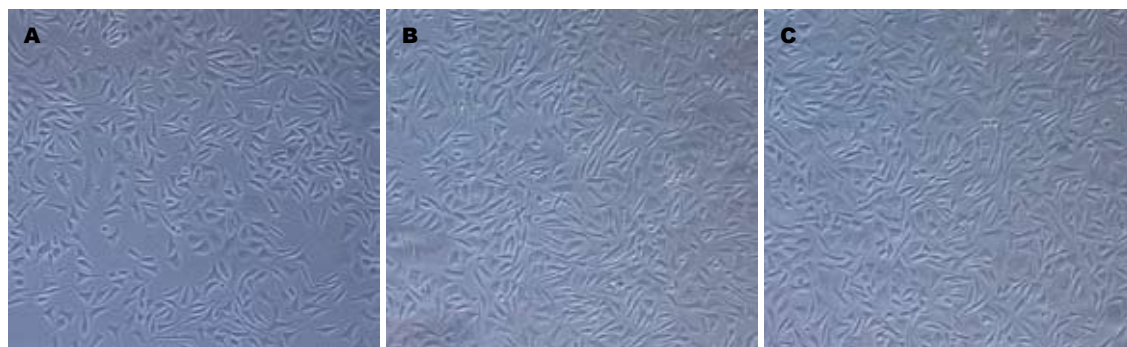


图1 缺氧诱导72 h后SMMC-7721细胞形态学变化($\times 200$)。A: 正常培养组; B: 阳性对照组; C: 低氧培养组。

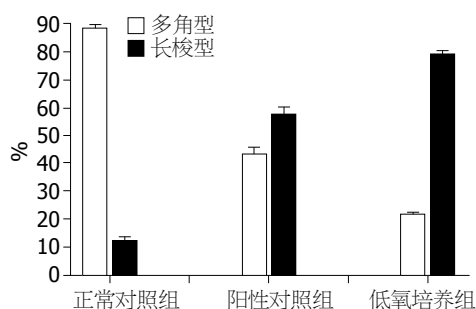


图2 低氧诱导后SMMC-7721不同形态的细胞。

数图, 检测细胞均一性, 将低蓝光低红光且维拉帕米组缺失区域设定为SP细胞的门(gate), 分析SMMC-7721细胞发生EMT时SP细胞的含量变化。

统计学处理 应用SPSS11.0软件进行统计分析, 实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 各组间比较均采用 t 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧诱导SMMC-7721发生的EMT 正常情况下, SMMC-7721细胞生长迅速, 保持为上皮样多角形态且体积较小。以加入TGF- β 1所培养的细胞形态为阳性对照, 我们观察到在低氧条件下细胞逐渐由原来的多角形变成类似于成纤维样的长梭形, 排列松散, 提示细胞间黏附减弱(图1, 2)。

2.2 低氧诱导后E-cadherin的表达变化 低氧培养后, Western blot显示E-cadherin的表达明显下降, 正常对照组相对灰度比值为 2.03 ± 0.43 , 阳性对照组为 0.55 ± 0.17 , 低氧培养组为 0.41 ± 0.23 , 其与正常对照组相比差异显著($P < 0.01$, 图3, 4)。免疫荧光显示对照组细胞膜E-cadherin强表达呈耀眼的绿色荧光, 低氧培养后表达明显减弱(图5)。

2.3 低氧诱导后SP细胞含量的分析 SMMC-7721经Hoechst 33342及PI双标记后经流式细胞仪分析, SP细胞位于左下角两种荧光均阴性或很弱的区域, 正常对照组SP细胞含量为4.3%, 经低氧



图3 Western blot示SMMC-7721细胞中E-cadherin蛋白的表达。

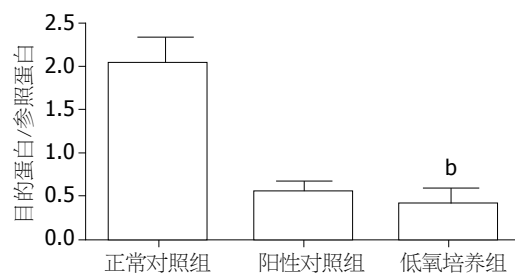


图4 SMMC-7721细胞中E-cadherin的相对定量表达。
^b $P < 0.01$ vs 正常对照组。

培养后, SP细胞含量明显下降至0.0%(图6)。

3 讨论

生长迅速的实体肿瘤组织内常存在缺氧微环境。肿瘤缺氧往往由多种因素所致。由于肿瘤细胞的指数性增殖与肿瘤供血密切相关, 如果没有血管的形成, 肿瘤细胞的生长将受限; 而组织中氧的有效弥散距离仅为1-2 mm, 因此当肿瘤生长到一定阶段, 氧的需求超过血液供给, 或肿瘤内未成熟血管因间质压力而塌陷时, 局部微环境就处于缺氧状态。同时, 肿瘤局部淋巴循环不足导致的组织间压力增高, 以及新生血管不成熟导致的血流短路, 将使缺氧更加严重^[6]。研究发现, 缺氧是肿瘤发生恶性转化甚至转移的启动因子, 也是实体瘤对放化疗耐受性增加的原因之一^[7,8]。

EMT是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下向间质细胞转化的现象。正常上皮细胞

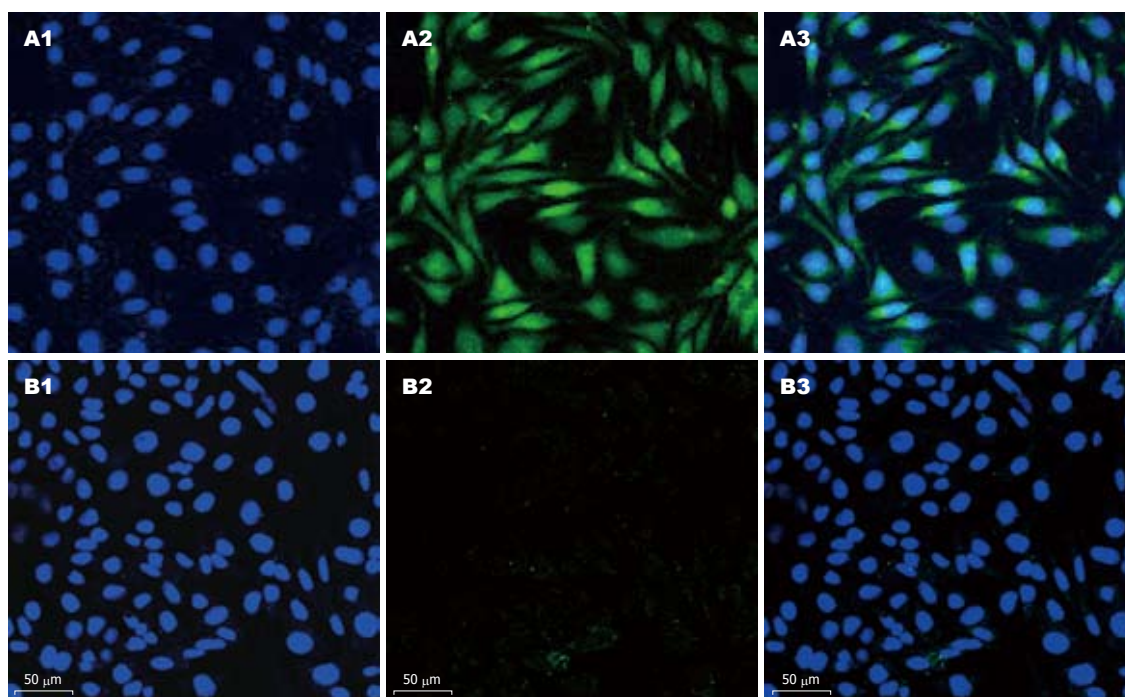


图 5 免疫荧光法示SMMC-7721细胞中E-cadherin蛋白的表达. A: 正常对照组; B: 低氧培养组. 绿色荧光: E-cadherin; 蓝色荧光: Hoechst 33258核.

■创新盘点

本研究采用缺氧培养诱导肝癌细胞系发生上皮间质转化,在此基础上初步探讨缺氧对SP细胞含量的影响及其机制,旨在为将来在组织水平研究肝癌转移、抗药及复发机制提供理论基础.此研究思路和技术路线国内外报道不多.

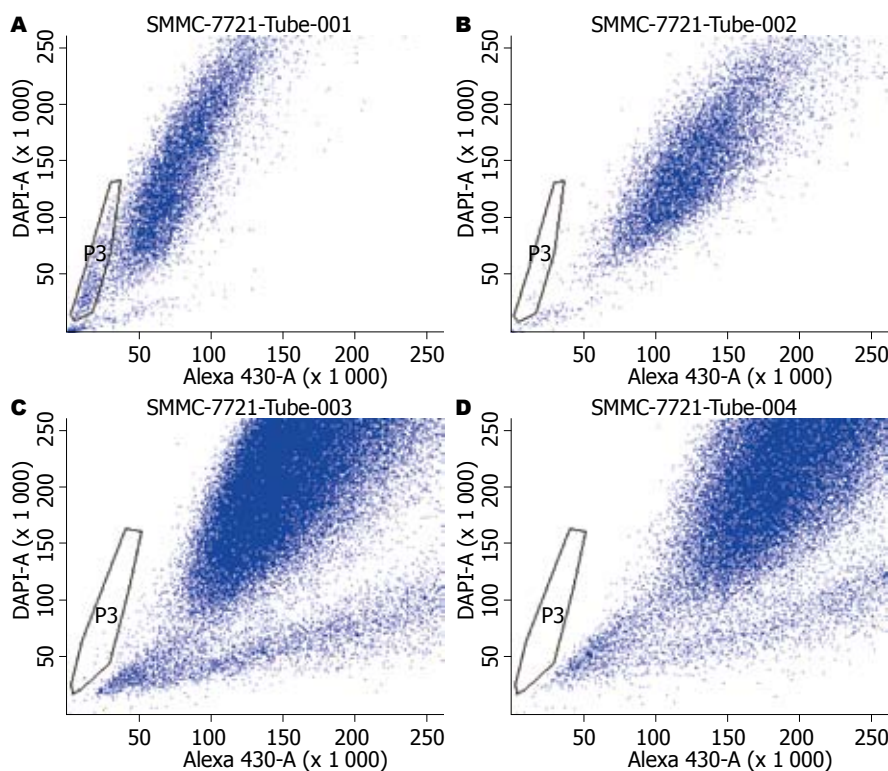


图 6 低氧对SMMC-7721中SP细胞的影响.

A: 正常培养, 无维拉帕米; B: 正常培养, 加入维拉帕米; C: 低氧培养, 无维拉帕米; D: 低氧培养, 加入维拉帕米.

富于细胞间黏附从而形成稳定的细胞间接触. EMT时上皮组织基本结构消失, 失去细胞极性和紧密连接, 细胞内骨架成分重排并获得移行能力等间质细胞的特性. EMT与胚胎发育过程和特定类型的伤口愈合中细胞及组织的重塑有关^[9]. 肝癌组织的中央细胞往往是上皮表型, 当

经历EMT后肿瘤细胞摆脱细胞之间的连接, 从而获得突破基底膜、侵袭周围组织的能力^[10,11]. E-cadherin是上皮组织中的一种依赖 Ca^{2+} 的细胞间跨膜粘连糖蛋白分子, 主要参与细胞间的连接. E-cadherin同时也是EMT的关键分子标志之一^[12]. 本研究结果显示, 低氧培养后SMMC-7721

■应用要点

已有研究报道缺氧在肝癌的侵袭转移中起着重要的作用。深入研究缺氧对肝癌细胞系中SP细胞的调控机制,将有助于从不同的侧面了解肿瘤干细胞在肝癌发生发展中的作用,从而为后续治疗提供理论基础。

细胞的形态发生改变。免疫印迹提示其蛋白表达明显下调,免疫荧光提示定位于胞浆的表达阳性细胞明显减少。这些都说明低氧能够诱导肿瘤细胞发生EMT,从而在肝癌转移过程中起到重要的作用。

1996年,Goode11等采用流式细胞术研究造血干细胞在体内的增殖情况时发现有一小群细胞呈彗星状分布在细胞主群的一侧,他们将这群细胞称为SP细胞^[13]。SP细胞特异性的将荧光染料Hoechst 33342排出到胞外,从而具有Hoechst 33342拒染或淡染性,这是流式细胞仪进行检测分选的基本原理^[14]。最初的研究表明:来源于骨髓的SP细胞具有很强的造血干细胞活性,能重建致死放射量照射小鼠的髓系和淋巴系血细胞;随后人们相继在多种正常组织(骨髓、骨骼肌、肺、肝、心脏、睾丸、肾、皮肤、脑和乳腺等)、肿瘤组织和细胞系中分离出功能类似的SP细胞^[15-17]。由于SP细胞符合肿瘤干细胞学说的特点,因此他被视为肿瘤干细胞的标志,随即成为新的研究热点^[18]。

既然肿瘤干细胞和缺氧都与肿瘤的发生及转移有关,那么两者之间的关系如何呢?研究发现,缺氧可以通过诱导基因组不稳定、抑制细胞凋亡来促进肿瘤干细胞的发生^[19],异常的低氧状态可能导致干细胞失去正常调控而发生恶性转化^[20];肿瘤干细胞自我更新的信号传导通路如Notch、Wnt、c-Myc等多是缺氧诱导因子在转录水平上的调节靶点;缺氧通过EMT及其他因素可能促进了肿瘤干细胞的转移^[21]。上述现象表明,缺氧和肿瘤干细胞的关系复杂,缺氧对于肿瘤干细胞的调控机制仍有待进一步阐明。

对于肝癌细胞来说,缺氧和干细胞关系又如何呢?既往我们已经成功地建立了肝癌细胞中SP细胞分离纯化体系。现我们选择SP细胞为代表,以低氧诱导肝癌细胞发生EMT为切入点,对两者的关系进行研究。本研究进一步发现,低氧诱导SMMC-7721细胞发生EMT后,SP细胞比例从未诱导前的4.3%降低到诱导后的0.0%。分析其可能的机制,我们推测低氧状态下EMT状态的诱导和维持在一定程度上抑制了肿瘤干细胞的增殖,促进了肿瘤细胞向侵袭和转移方向发展。

总之,本研究初步探讨了缺氧时肝癌细胞EMT和SP细胞之间的关系,为将来研究肿瘤干细胞在肝癌发生中的作用和调控机制,乃至成为新的治疗靶点提供了理论依据。

参考文献

- 1 Rademakers SE, Span PN, Kaanders JH, Sweep FC, van der Kogel AJ, Bussink J. Molecular aspects of tumour hypoxia. *Mol Oncol* 2008; 2: 41-53
- 2 Mueller MT, Hermann PC, Heeschen C. Cancer stem cells as new therapeutic target to prevent tumour progression and metastasis. *Front Biosci* (Elite Ed) 2010; 2: 602-613
- 3 Sottoriva A, Verhoeff JJ, Borovski T, McWeeney SK, Naumov L, Medema JP, Sloot PM, Vermeulen L. Cancer stem cell tumor model reveals invasive morphology and increased phenotypical heterogeneity. *Cancer Res* 2010; 70: 46-56
- 4 Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 2010; 120: 41-50
- 5 Wu C, Wei Q, Utomo V, Nadesan P, Whetstone H, Kandel R, Wunder JS, Alman BA. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res* 2007; 67: 8216-8222
- 6 Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem* 2009; 107: 1053-1062
- 7 DeClerck K, Elble RC. The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. *Front Biosci* 2010; 15: 213-225
- 8 Rapisarda A, Melillo G. Role of the hypoxic tumor microenvironment in the resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist Updat* 2009; 12: 74-80
- 9 Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 2009; 174: 1588-1593
- 10 Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 15-33
- 11 Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 2010; 101: 293-299
- 12 Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med* 2008; 14: 199-209
- 13 Chan RK, Garfein E, Gigante PR, Liu P, Agha RA, Mulligan R, Orgill DP. Side population hematopoietic stem cells promote wound healing in diabetic mice. *Plast Reconstr Surg* 2007; 120: 407-411; discussion 412-413
- 14 Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res* 2007; 67: 3716-3724
- 15 Kayo H, Yamazaki H, Nishida H, Dang NH, Morimoto C. Stem cell properties and the side population cells as a target for interferon-alpha in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364: 808-814
- 16 Komuro H, Saihara R, Shinya M, Takita J, Kaneko S, Kaneko M, Hayashi Y. Identification of side population cells (stem-like cell population) in pediatric solid tumor cell lines. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 2040-2045
- 17 Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett* 2008; 268: 1-9
- 18 Milas L, Hittelman WN. Cancer stem cells and tumor response to therapy: current problems and fu-

- ture prospects. *Semin Radiat Oncol* 2009; 19: 96-105
- 19 Chan N, Koch CJ, Bristow RG. Tumor hypoxia as a modifier of DNA strand break and cross-link repair. *Curr Mol Med* 2009; 9: 401-410
- 20 Kim Y, Lin Q, Glazer PM, Yun Z. Hypoxic tumor microenvironment and cancer cell differentiation. *Curr Mol Med* 2009; 9: 425-434
- 21 Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 789-795

■同行评价

本文选题新颖, 结果可信, 具有较强的实用临床意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

●消息●

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

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

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

PD98059对胰腺癌Panc-1细胞株及裸鼠荷瘤增殖、凋亡的影响

胡益群, 司丽娟, 叶震世, 林振和, 柯细松

■背景资料

胰腺癌恶性程度高, 预后差, 症状隐匿, 近些年来全球范围胰腺癌发病率、死亡率均在上升。胰腺癌发病机制仍然不明确, 这给早期诊断以及进一步治疗带来很大的困难。只有真正揭示胰腺癌发病的内在机制, 才能寻找到有效的早期诊断及治疗方法。

胡益群, 司丽娟, 叶震世, 林振和, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门大学消化疾病研究所 厦门市消化疾病中心 福建省厦门市 361004

柯细松, 挪威卑尔根大学Gade学院 挪威卑尔根市 5020

胡益群, 主治医师, 医学博士, 主要从事胰腺癌及胰腺内分泌肿瘤发病机制的研究。

厦门市卫生局重点基金资助项目, No. 3502z20077038

作者贡献分布: 胡益群负责课题申请、实验设计以及具体操作; 司丽娟与叶震世负责标本取材及技术指导; 林振和负责动物实验; 柯细松负责理论指导。

通讯作者: 胡益群, 博士, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201-209号, 厦门大学附属中山医院消化内科。

huyiqun0826@yahoo.com.cn

电话: 0592-2993171

收稿日期: 2010-07-14 修回日期: 2010-08-10

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-18

Effect of PD98059 on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer Panc-1 cells and tumor growth in Panc-1-xenografted nude mice

Yi-Qun Hu, Li-Juan Si, Zhen-Shi Ye, Zhen-He Lin, Xi-Song Ke

Yi-Qun Hu, Li-Juan Si, Zhen-Shi Ye, Zhen-He Lin, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Xiamen University; Gastroenterology Institute of Xiamen University; Gastroenterology Center of Xiamen, Xiamen 361004, Fujian Province, China

Xi-Song Ke, Gade Institute, Bergen University, 5020 Bergen, Norway

Supported by: the Major Foundation of Xiamen Municipal Health Bureau, No. 3502z20077038

Correspondence to: Yi-Qun Hu, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Xiamen University, 201-209 Hubin South Road, Xiamen 361004, Fujian Province, China. huyiqun0826@yahoo.com.cn

Received: 2010-07-14 Revised: 2010-08-10

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of PD98059, a specific inhibitor of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling pathway, on the apoptosis and proliferation of pancreatic cancer Panc-1 cells and tumor growth in Panc-1-xenografted nude mice.

METHODS: After Panc-1 cells were treated

with different doses of PD98059, cell proliferation was measured by MTT assay, cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry, and apoptotic cells were examined by Hoechst 33258 staining. The expression of phosphorylated ERK1/2 in tumors in Panc-1-xenografted nude mice was detected by Western blot.

RESULTS: PD98059 suppressed the proliferation of pancreatic cancer Panc-1 cells in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with control cells, the absorbance at 490 nm (A_{490}) was significantly lower (0.391 ± 0.029 vs 0.994 ± 0.057 , $P < 0.05$) and the apoptosis rate was significantly higher ($11.77\% \pm 1.33\%$ vs $1.13\% \pm 0.19\%$, $P < 0.05$) in Panc-1 cells treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 for 96 h. However, no significant difference was noted in the apoptosis rate between Panc-1 cells treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 and control cells. PD98059 could restrain the expression of P-ERK1/2 proteins in tumors in Panc-1-xenografted nude mice, and the maximum inhibition was achieved with 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059.

CONCLUSION: The MAPK/ERK1/2 signaling pathway may play an important role in regulating the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells.

Key Words: PD98059; Pancreatic cancer; MAPK/ERK1/2 signaling pathway; Proliferation; Apoptosis; Nude mouse

Hu YQ, Si LJ, Ye ZS, Lin ZH, Ke XS. Effect of PD98059 on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer Panc-1 cells and tumor growth in Panc-1-xenografted nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2756-2761

摘要

目的: 探讨MAPK/ERK1/2细胞信号通路在胰腺癌演化中的作用和机制。

方法: 用不同浓度PD98059处理Panc-1细胞及裸鼠, 采用MTT法观察其对胰腺癌细胞增殖

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

的影响, 利用流式细胞仪检测胰腺癌细胞周期以及细胞凋亡的变化, 使用Hoechst33258染色观察凋亡细胞的形态, 应用Western blot检测裸鼠荷瘤MAPK/ERK1/2通路P-ERK1/2蛋白的表达变化。

结果: 不同浓度的PD98059均可显著抑制胰腺癌Panc-1细胞的增殖(均 $P<0.05$), 且随着处理时间的延长, PD98059浓度的增加, 其抑制能力逐渐增强。96 h 50 $\mu\text{mol/L}$ 的PD98059抑制Panc-1细胞增殖的能力最强, 其 A_{490} 与对照相比具有统计学差异(0.391 ± 0.029 vs 0.994 ± 0.057 , $P<0.05$)。此时Panc-1细胞的凋亡率较对照组明显增加($11.77\% \pm 1.33\%$ vs $1.13\% \pm 0.19\%$, $P<0.05$), 而20 $\mu\text{mol/L}$ 的PD98059处理后, 细胞凋亡率与对照组无明显增加。PD98059同时可以降低裸鼠荷瘤P-ERK1/2蛋白的表达, 其完全抑制浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)具有最强的抑制能力。

结论: MAPK/ERK1/2信号通路是调控胰腺癌细胞重要的因素之一, 其作用机制与磷酸化的ERK1/2蛋白有关。

关键词: PD98059; 胰腺癌; MAPK/ERK1/2细胞信号通路; 增殖; 凋亡; 裸鼠

胡益群, 司丽娟, 叶震世, 林振和, 柯细松. PD98059对胰腺癌Panc-1细胞株及裸鼠荷瘤增殖、凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2756–2761

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2756.asp>

0 引言

流行病学调查资料显示近年来全球范围胰腺癌发病率、死亡率均在上升, 西方国家高于发展中国家^[1]。胰腺癌恶性程度高, 病程隐匿, 早期诊断对治疗、预后极为重要, 目前胰腺癌发病机制仍然不明确, 这给其早期的诊断以及治疗带来很大的困难。

许多学者认为肿瘤发生进展归根到底是由细胞调控机制紊乱造成的^[2]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路介导细胞生长、发育、分裂、分化、死亡等过程, 细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase 1 and 2, ERK1/2)信号通路是MAPK通路的重要组成部分, 调控其转录活性^[3]。一些研究发现肿瘤演化中存在ERK1/2信号通路的活化及过度表达, 但其在胰腺癌中表达及其作用方面的研究甚少, PD98059是MAPK/ERK1/2信号通路特异性抑制剂, 我们通过不同

浓度PD98059处理胰腺癌细胞, 探讨胰腺癌细胞中MAPK/ERK1/2信号通路的作用机制, 并为肿瘤早期诊断治疗寻找新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 PD98059、MTT、抑肽酶(aprotinin)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、Hoechst33258均购自美国Sigma公司。P-ERK1/2、ERK1/2及相应二抗均为Santa Cruz公司产品, 预染Marker、Super ECL Plus Western blot超敏发光液购自北京普利莱基因技术有限公司。PD98059(50 mmol/L储液): 将PD98059黄色粉末5 mg溶于373 μL DMSO, 分装, 避光, -20°C 冰箱保存。MTT(5 g/L): 称取250 mg MTT, 加50 mL PBS缓冲液, 搅拌30 min, 0.22 μm 滤膜过滤, 分装, 4°C 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胰腺癌Panc-1细胞株由北京协和医院消化内科实验室提供, 细胞培养于10% FBS RPMI 1640培养基, 含两种抗生素: 青霉素和链霉素(浓度均为100 $\mu\text{g/mL}$), 放置于 37°C 、50 mL/L CO_2 饱和湿度环境, 每2-3 d换用新鲜培养液, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 分组: 对照组为空白对照, 实验组分为PD98059 20 $\mu\text{mol/L}$ 组(ERK1/2蛋白半数抑制浓度 IC_{50}), PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$ 组(ERK1/2蛋白完全抑制浓度)。

1.2.3 细胞增殖检测: (1)细胞准备: 取对数生长期细胞, 胰酶消化后用完全培养基配成单细胞悬液, 接种于96孔板, 接种细胞密度 $5 \times 10^3/\text{孔}$, 每孔接种体积为200 μL 。每组设4个平行孔。(2)增殖检测(MTT法): 无血清预处理细胞12 h后置 CO_2 细胞培养箱, 继续培养24 h, 实验时每天更换RPMI 1640完全培养基, 分别加入浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059, 结束前4 h加入20 μL MTT(5 mg/mL), 37°C 继续孵育4 h, 终止培养, 吸弃培养液, 每孔加入150 μL DMSO, 振荡10 min, 待甲臜完全溶解后, 在ELISA仪上于490 nm波长读取吸光度。实验重复3次, 以平均值做剂量时间曲线。(3)凋亡细胞形态: Hoechst 33258染色法观察细胞凋亡。Panc-1细胞爬片, 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059处理细胞, 参照细胞增殖检测结果, 以120 h时段为观察窗, 加入40 g/L多聚甲醛2 mL固定20 min, PBS洗1遍, 加入Hoechst 33258, 室温染色30 min, 将抗荧光衰减封片剂滴到载玻片上, 取出盖玻片倒扣在载玻片上, 封片。荧光

■ 研发前沿

近年来, 尽管随着外科技术水平的提高、化疗药物的推陈出新以及治疗理念、方式的转变, 胰腺癌治疗较前已有了长足的进步, 但胰腺癌治疗的远期效果仍不令人满意, 基于细胞信号转导通路特定靶点的靶向治疗成为研究热点, 目前正在从基础研究转向临床研究, 并取得了一定的治疗效果, 而MAPK/ERK1/2信号通路是其中最为重要的研究对象和治疗方向。

■相关报道

最近一项研究表明, 索拉非尼联合维生素K可通过调控磷酸化ERK1/2及Bcl-2基因表达水平来促进胰腺癌细胞凋亡。一些胰腺癌细胞体外研究也显示, 单一细胞信号通路靶点的阻滞对胰腺癌细胞并不能达到最佳治疗效果。这都证明MAPK/ERK1/2细胞信号通路紊乱是胰腺癌发生进展的特定表现。

表 1 不同浓度PD98059对Panc-1细胞增殖作用的影响 (mean \pm SD, $n = 3$, A_{490})

时间	对照组	20 μ mol/L组	50 μ mol/L组
24 h	0.220 \pm 0.038	0.243 \pm 0.009	0.199 \pm 0.005
48 h	0.517 \pm 0.047	0.244 \pm 0.032 ^a	0.218 \pm 0.021 ^a
72 h	0.697 \pm 0.042	0.441 \pm 0.033 ^a	0.269 \pm 0.013 ^a
96 h	0.994 \pm 0.057	0.588 \pm 0.051 ^a	0.391 \pm 0.029 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

显微镜下观察凋亡细胞形态。蓝色荧光波长465 nm, 正常细胞核大淡染, 凋亡细胞见核固缩、碎裂及凋亡小体。(4)流式细胞仪PI法检测细胞凋亡百分率、细胞周期各期比率。根据细胞增殖结果, 选择凋亡检测最佳时间点, 胰酶消化细胞成单一细胞悬液, 转速1 000 r/min, 离心10 min, PBS洗3遍, 加入700 mL/L乙醇5 mL 4 $^{\circ}$ C固定过夜, PBS洗2遍, 1 g/L RNase 37 $^{\circ}$ C, 20 mL PI 4 $^{\circ}$ C孵育1 h。实验重复3次, 取平均值。

1.2.4 动物实验: (1)实验动物: 裸鼠品系, BALB/c nu/nu, 5 wk龄, 体质量: 17-21 g。中国医学科学院北京协和医院动物房提供, SPF级。(2)动物实验器械、用品及试剂: 手术剪, 止血钳, 组织剪, 组织分离镊, 手术刀片。用品: 培养皿, 吸管, 1 mL注射器, 游标卡尺, 细胞计数板, 1.5 mL离心管。(3)裸鼠胰腺癌荷瘤模型的建立: 12只裸鼠随机分成两组: 对照组和PD98059处理组, 给每只裸鼠编号。选取对数生长期、状态良好胰腺癌Panc-1细胞, 细胞80%-90%融合时胰酶消化。无血清培养基清洗2次, 计数板计数细胞, 调整细胞密度至 $(1-2) \times 10^6/0.2$ mL。750 mL/L酒精消毒裸鼠背部, 细胞株混悬液注射入背部皮下。每3-4 d观察1次, 称量体质量, 2 wk后裸鼠荷瘤长出后, 固定时间测量、记录荷瘤直径、横径和高度。(4)PD98059处理荷瘤模型: 实验组每日在瘤周和瘤体注射PD98059(50 μ mol/L), 对照组注射等体积生理盐水。每日注射前测量、记录瘤体长(a)、短(b)、高径(c)。10 d左右断髓处死裸鼠, 切取肿瘤放于冰袋中。(5)Western blot法检测MAPK/ERK1/2细胞信号通路蛋白。使用细胞裂解液于冰上裂解PD98059处理和生理盐水处理的荷瘤组织, 收集上清液, 采用福林酚法测定蛋白含量。上样孔中加入蛋白、上样缓冲液及预染Marker, 5%积层胶电泳8 V/cm, 12%分离胶15 V/cm, PVDF转膜、洗涤, 5% BSA封闭, P-ERK1/2、ERK1/2抗体用TBST稀释

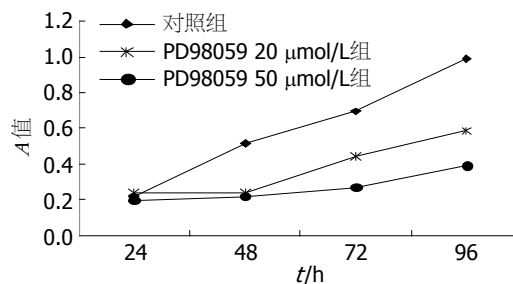


图 1 PD98059处理后Panc-1细胞增殖曲线。

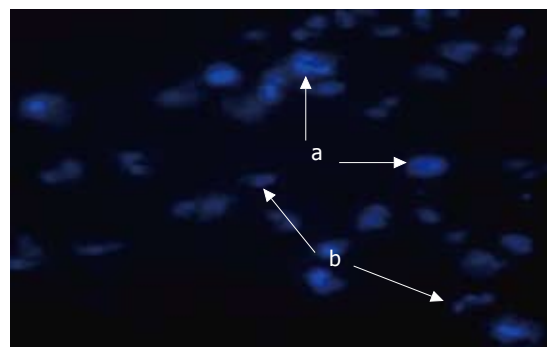


图 2 PD98059处理后Panc-1细胞凋亡的形态。a: 固缩核; b: 凋亡小体。

(1:1 000), 转移膜及一抗放置50 mL离心管中, 于4 $^{\circ}$ C冷室摇床过夜, 加入0.1% TBST洗涤3遍。每次10 min, 将PVDF置于TBST稀释的二抗(1:5 000)中, 室温振摇60 min。Super ECL Plus Western blot超敏发光液淋洗1-2 min, 在暗室中下曝光, 拍照记录。

统计学处理 每组实验至少重复3次, 实验数据以mean \pm SD表示, 应用SPSS10.0统计软件进行单因素方差(ANOVA)、组间 t 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 PD98059对胰腺癌Panc-1细胞增殖作用的影响 与对照组相比, 实验组PD98059 20 μ mol/L组、50 μ mol/L组Panc-1细胞增殖能力明显降低($P < 0.05$), 其中以50 μ mol/L PD98059增殖抑制作用最强, 其作用具有明显的时间依赖性, 随时间延长增殖抑制作用逐渐增强(图1, 表1)。

2.2 PD98059对Panc-1细胞凋亡的影响

2.2.1 凋亡细胞的形态: 结合细胞增殖结果, 接种Panc-1细胞, 予以PD98059 50 μ mol/L处理96 h, 固定后Hoechst 33258染色, 荧光显微镜下观察, 凋亡中晚期细胞核固缩, 核内染色质在局部区域凝集, 致密浓染, 核碎裂出现凋亡小体, 对照组细胞核呈均质状, 淡染(图2)。

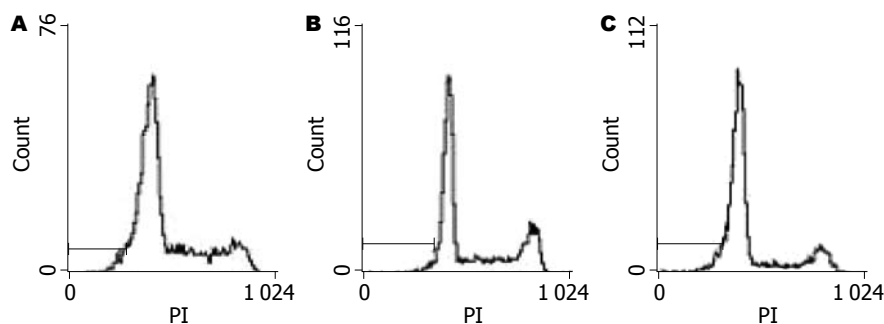


图 3 不同浓度PD98059对Panc-1细胞凋亡的影响. A: 对照组; B: PD98059 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; C: PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$ 组.

■创新盘点

PD98059是MAPK/ERK1/2信号通路特异性抑制剂, 本实验通过不同浓度PD98059处理胰腺癌细胞, 探讨胰腺癌细胞中MAPK/ERK1/2信号通路的作用机制, 并为肿瘤早期诊断治疗寻找新的靶点.

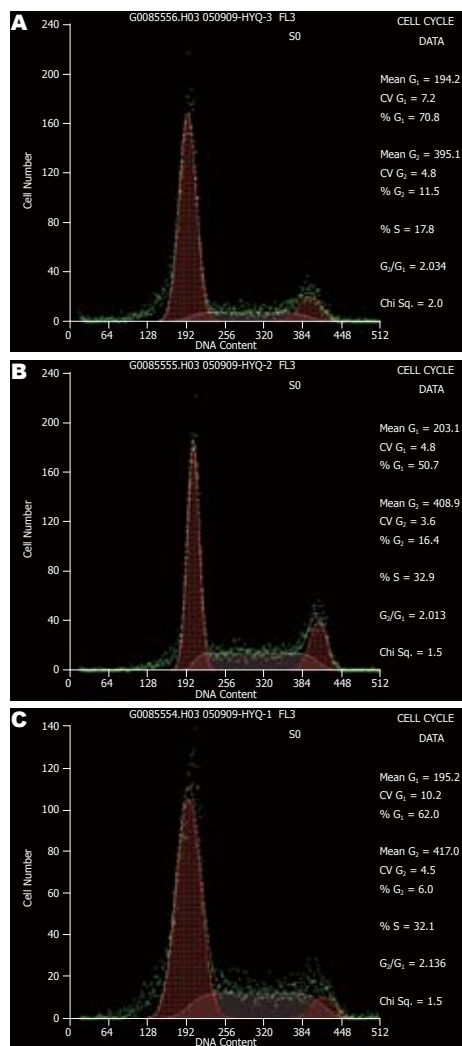


图 4 不同浓度PD98059对Panc-1细胞细胞周期的影响. A: 对照组; B: PD98059 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; C: PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$ 组.

2.2.2 流式细胞仪技术(PI染色)检测Panc-1细胞的凋亡: PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡百分率为11.77% \pm 1.33%, 与对照组(1.13% \pm 0.19%)比较差异显著($P<0.05$), 而PD98059 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡百分率为6.63% \pm 1.26%, 虽较对照组有所增加, 但统计学结果显示二者无显著性差异(图3).

2.2.3 流式细胞仪检测细胞周期的变化: 不同浓度PD98059处理, 均可致Panc-1 G₁期细胞百分率

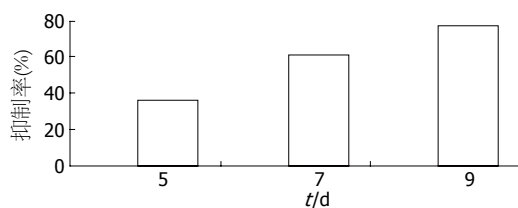


图 5 PD98059对胰腺癌Panc-1细胞荷瘤抑制率.

表 2 不同浓度PD98059对Panc-1细胞周期的影响 (mean \pm SD, $n=3$, %)

细胞周期	对照组	20 $\mu\text{mol/L}$ 组	50 $\mu\text{mol/L}$ 组	P值
G ₁	55.23 \pm 6.99	53.10 \pm 6.61	—	0.90
	55.23 \pm 6.99	—	70.01 \pm 0.40	0.07
S	25.17 \pm 7.90	30.87 \pm 6.06	—	0.59
	25.07 \pm 7.90	—	20.07 \pm 3.63	0.11

增加, DNA S期细胞百分率降低; Panc-1细胞虽然有上述趋势, 但统计学上与对照组相比无显著性差异(图4, 表2).

2.3 裸鼠荷瘤模型验证MAPK/ERK1/2信号通路对胰腺癌的影响

2.3.1 PD98059对胰腺癌Panc-1细胞荷瘤抑制率: PD98059(50 $\mu\text{mol/L}$)处理胰腺癌荷瘤裸鼠, 第3天开始测量瘤体体积, 第9天实验结束, 比较PD98059处理组和对照组荷瘤体积差异, 进行统计学分析, 计算抑瘤率, 结果可见PD98059处理可使肿瘤瘤体缩小, 第7天开始两组出现明显差异, 抑瘤率逐渐升高(图5, 表3).

2.3.2 PD98059对荷瘤的MAPK/ERK1/2信号通路的影响: PD98059(50 $\mu\text{mol/L}$)处理胰腺癌荷瘤模型第9天, 处死裸鼠, 切取荷瘤组织, 提取总蛋白, Western blot检测实验组及对照组胰腺癌荷瘤MAPK/ERK1/2细胞信号通路功能蛋白的表达情况, 结果发现实验组荷瘤P-ERK1/2蛋白表达明显受到抑制, 而对照组未受影响(图6), 提示MAPK/ERK1/2信号通路与胰腺癌进展相关, 其中P-ERK1/2蛋白可能在其中发挥重要作用.

■应用要点

MAPK信号通路有促进细胞增殖, 调节基因转录的作用, 是许多肿瘤发生的重要因素, 而ERK1/2信号通路是MAPK通路的重要组成部分. MAPK/ERK1/2信号通路在胰腺癌进展中发挥着重要作用. PD98059是MAPK/ERK1/2信号通路特异性抑制剂, PD98059的作用位点可以成为胰腺癌治疗的靶点.

表 3 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059对胰腺癌Panc-1细胞荷瘤抑瘤率的影响 ($n = 3$)

时间	瘤体积(cm^3)		抑瘤率 (%)	P值
	对照组	实验组		
第3天	0.051 \pm 0.012	0.059 \pm 0.008		
第5天	0.060 \pm 0.009	0.038 \pm 0.005	36.7	0.272
第7天	0.076 \pm 0.017	0.029 \pm 0.004 ^a	61.8	0.013
第9天	0.093 \pm 0.018	0.021 \pm 0.007 ^a	77.2	0.027

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

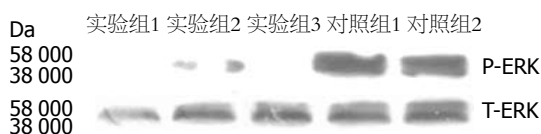


图 6 PD98059对荷瘤的MAPK/ERK1/2信号通路的影响. 实验组1-3: PD98059 50 $\mu\text{mol/L}$; 对照组: 生理盐水. ERK1蛋白: 44 000 Da; ERK2蛋白: 42 000 Da.

3 讨论

近年来, 尽管随着外科技术水平的提高、化疗药物的推陈出新以及治疗理念、方式的转变, 胰腺癌治疗较前已有了长足的进步, 但胰腺癌治疗的远期效果仍不令人满意, 基于细胞信号转导通路特定靶点的靶向治疗成为研究热点, 目前正在从基础研究转向临床研究, 并取得了一定的治疗效果, 而MAPK/ERK1/2信号通路是其中最为重要的研究对象和治疗方向^[4].

PD98059是MAPK/ERK1/2信号通路特异性抑制剂, MAPK信号通路有促进细胞增殖, 调节基因转录的作用, 是许多肿瘤发生的重要因素^[5], 而ERK1/2信号通路是MAPK通路的重要组成部分, 与其他恶性肿瘤类似^[6,7], 本实验通过对ERK1/2及其功能成分P-ERK1/2的研究证实, 在胰腺癌Panc-1细胞中存在ERK1/2及功能蛋白P-ERK1/2的活化及过度表达, 同时通过50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059下调MAPK/ERK1/2信号通路的表达, 从而使胰腺癌Panc-1细胞增殖明显受到抑制, 提示MAPK/ERK1/2信号通路在胰腺癌进展中发挥着重要作用, 而PD98059作用位点可以成为胰腺癌治疗的靶点. 从组织学上可证明PD98059对裸鼠荷瘤的抑瘤率. 切断MAPK/ERK1/2信号通路可以控制裸鼠胰腺癌荷瘤的快速增殖, 这与一些临床实验研究的结果相近^[8,9], P-ERK1/2蛋白作为MAPK/ERK1/2信号通路的功能蛋白, 参与、调节胰腺癌Panc-1细胞的恶性增殖作用, 控制P-ERK1/2蛋白在胰腺癌细

胞中的表达, 抑制其磷酸化. 这或许可以成为以MAPK/ERK1/2信号通路为目标的靶向治疗的核心与关键.

细胞凋亡是维持生物体平衡的重要环节, 与细胞生长、分裂和增殖联系紧密. 最近的一项研究也表明, 索拉非尼联合维生素K可通过调控磷酸化ERK1/2及Bcl-2基因表达水平来促进胰腺癌细胞凋亡^[10], 提示磷酸化ERK1/2可能与胰腺癌细胞凋亡密切相关, 其可作为联系细胞凋亡与其他肿瘤调控因子或基因的中间环节而存在. 目前的肿瘤实验研究中, 多侧重于ERK1/2通路中ERK1/2蛋白的增殖、转化、分化作用^[11,12], 对于ERK1/2蛋白与胰腺癌凋亡确切联系机制, 以及ERK1/2蛋白是否通过改变肿瘤细胞周期来促进细胞凋亡尚不明确. 本实验通过PD98059处理细胞, 检测细胞凋亡百分率、肿瘤细胞周期变化, 观察细胞凋亡大体形态, 结果证实其可阻断或部分阻断MAPK/ERK1/2细胞信号通路, 胰腺癌细胞出现了一定程度的凋亡. 通过Hoechst 33258染色, 荧光显微镜下可以观察到凋亡细胞形态的改变, 同时我们发现经过PD98059处理胰腺癌细胞, 凋亡百分率可以达到10%-15%, 与对照组有明显差异. 这也证明MAPK/ERK1/2细胞信号通路紊乱是胰腺癌发生进展的特定表现^[13]. 不过从实验中我们还可以看到, 与其他研究略有不同的是, 即使PD98059最大浓度阻断MAPK/ERK1/2细胞信号通路, 细胞凋亡率还是比较低. 因此我们推测, 在细胞凋亡调节的环节上存在多个因素或多个节点的调控, MAPK/ERK1/2细胞信号通路只是参与了细胞凋亡的调节, 而不是全部调节功能均由其完成, 也就是说以MAPK/ERK1/2细胞信号通路的靶向治疗还不足以完成胰腺癌细胞凋亡或促进其表型的逆转.

细胞周期的调控是一个复杂的过程, 癌基因、抑癌基因均参与其调节, 他们通过其下游的细胞信号通路来发挥作用. 本实验中, 通过对细胞周期的检测, 我们注意到PD98059处理对MAPK细胞信号通路的阻滞作用, 可以促使细胞周期由S期向G₁期转化, 而且不论PD98059浓度是否改变均有此趋势, 但作用效果并不显著, 与我们所做的细胞增殖的测定结果不甚一致. 一些抗胰腺癌细胞的体外研究也显示, 单一细胞信号通路靶点的阻滞对胰腺癌细胞并不能达到最佳治疗效果, 如果对多条细胞信号通路的节点联合治疗却能取得的良好疗效^[14]. 因此我们设想, 胰腺癌细胞中细胞周期的调控存在多条信

号通路, 他们之间相互联系, 共同参与细胞增殖过程调控, 对其中任何一条信号通路的阻断而得到的肿瘤控制作用有限, 为了解其中的机制, 在今后的实验中, 我们应采用多种信号通路抑制剂联合应用, 才能进一步明确胰腺癌细胞周期调控与细胞增殖的内在联系。

通过既往二十余年的研究, 人们不但克隆和鉴定了众多与肿瘤发生密切相关的癌基因和抑癌基因, 使人们对肿瘤的发生有了更深入的认识, 同时确立了细胞信号通路在肿瘤发生、发展、转化中的地位, 而且在分子水平为肿瘤治疗提供了新的方向, 进而有可能使肿瘤的治疗手段发生根本的变革。目前很多研究者都将注意力转向肿瘤的病因学与病理过程中起作用的特异的分子及生物靶点。通过对肿瘤细胞信号传导机制研究, 选择性阻断肿瘤细胞自分泌或旁分泌的信号传导通路, 破坏其自控性生长调节, 促进肿瘤细胞的分化, 恢复正常的生长调节机制, 已成为肿瘤治疗的研究热点。这些作用均可通过选择性地调节肿瘤细胞信号传导系统的不同成分而达到。但同时我们看到, 以肿瘤细胞信号传导系统为靶点的靶向治疗也具有一定的局限性, 单一的细胞信号通路的阻滞并不能完全控制恶性肿瘤的增殖、浸润和转移, 不能完全逆转其恶性表形。恶性肿瘤细胞内信号通路相互关联、相互作用, 形成一个巨大而又复杂的网络, 只有真正了解其机制, 才能使靶向治疗成为肿瘤治疗的有力手段。

4 参考文献

- 1 Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 238-244
- 2 Egan SE, Weinberg RA. The pathway to signal achievement. *Nature* 1993; 365: 781-783
- 3 Nichols A, Camps M, Gillieron C, Chabert C, Brunet A, Wilsbacher J, Cobb M, Pouyssegur J, Shaw JP, Arkinstall S. Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *J Biol Chem* 2000; 275: 24613-24621
- 4 Osada S, Yoshida K. A novel strategy for advanced pancreatic cancer - progression of molecular targeting therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 877-881
- 5 Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* 2002; 277: 33676-33682
- 6 Greenberg AK, Hu J, Basu S, Hay J, Reibman J, Yie TA, Tchou-Wong KM, Rom WN, Lee TC. Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular signal-related kinase pathway and cell cycle regulators. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 320-328
- 7 English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, Cobb MH. New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 1999; 253: 255-270
- 8 Cescato R, Loesch KA, Waser B, Mäcke HR, Rivier JE, Reubi JC, Schonbrunn A. Agonist-biased signaling at the sst2A receptor: the multi-somatostatin analogs KE108 and SOM230 activate and antagonize distinct signaling pathways. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 240-249
- 9 Ishiwata T, Yamamoto T, Kawahara K, Kawamoto Y, Matsuda Y, Ishiwata S, Naito Z. Enhanced expression of lumican inhibited the attachment and growth of human embryonic kidney 293 cells. *Exp Mol Pathol* 2010; 88: 363-370
- 10 Wei G, Wang M, Carr BI. Sorafenib combined vitamin K induces apoptosis in human pancreatic cancer cell lines through RAF/MEK/ERK and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *J Cell Physiol* 2010; 224: 112-119
- 11 Yang MD, Lai KC, Lai TY, Hsu SC, Kuo CL, Yu CS, Lin ML, Yang JS, Kuo HM, Wu SH, Chung JG. Phenethyl isothiocyanate inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells through suppressing MAPK and NF-kappaB signal pathways. *Anticancer Res* 2010; 30: 2135-2143
- 12 Li H, He C, Feng J, Zhang Y, Tang Q, Bian Z, Bai X, Zhou H, Jiang H, Heximer SP, Qin M, Huang H, Liu PP, Huang C. Regulator of G protein signaling 5 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 13818-13823
- 13 Zhao Y, Wu K, Yu Y, Li G. [Roles of ERK1/2 MAPK in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells] *Weisheng Yanjiu* 2003; 32: 573-575
- 14 Chang Q, Chen E, Hedley DW. Effects of combined inhibition of MEK and mTOR on downstream signaling and tumor growth in pancreatic cancer xenograft models. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1893-1901

■同行评价

本文具有一定的先进性和科学性, 为进一步的临床研究奠定基础。

编辑 李军亮 电编 何基才

MIC-1和uPA在食管鳞癌中蛋白表达的相关性及其临床病理意义

贺飞, 刘宇琼, 李惠翔

■背景资料

巨噬细胞抑制细胞因子-1(MIC-1)是TGF- β 超家族的新成员, 研究表明在许多病理状态下, 如急性损伤、炎症、肿瘤发生时, MIC-1的蛋白表达及血清水平会异常增高。

贺飞, 刘宇琼, 李惠翔, 郑州大学第一附属医院病理科 郑州大学基础医学院病理教研室 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市 450052

贺飞, 河南大学淮河医院心胸外科 河南省开封市 475000

贺飞, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究。

作者贡献分布: 此课题李惠翔设计; 研究过程由赵辉与刘宇琼操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李惠翔提供; 数据分析由赵辉与刘宇琼完成; 本论文写作由贺飞、刘宇琼及李惠翔完成。

通讯作者: 李惠翔, 教授, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院病理科。lslbjys@126.com

电话: 0371-66658175

收稿日期: 2010-05-15 修回日期: 2010-07-16

接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-09-18

Clinical pathological significance of MIC-1 and uPA expression in esophageal squamous cell carcinoma

Fei He, Yu-Qiong Liu, Hui-Xiang Li

Fei He, Yu-Qiong Liu, Hui-Xiang Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Department of Pathology, Basic Medical College of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Fei He, Department of Thoracic Surgery, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Hui-Xiang Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lslbjys@126.com

Received: 2010-05-15 Revised: 2010-07-16

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To explore the relationship of the protein expression of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) and urokinase plasminogen activator (uPA) with the development, progression, invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: The protein expression of MIC-1 and uPA was detected by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method in 45 ESCC specimens, 22 tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelial specimens and 45 normal esophageal epithelial specimens.

RESULTS: The expression of MIC-1 protein was closely correlated with tumor grade, infiltration, TNM grade and lymphatic metastasis in ESCC (all $P < 0.05$). The expression of uPA protein was closely correlated with tumor TNM grade and lymphatic metastasis in ESCC (both $P < 0.05$). The positive rates of MIC-1 expression in ESCC, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and normal esophageal epithelium were 64.4% (29/45), 40.9% (9/22) and 13.3% (6/45), respectively, with a significant difference among the three groups ($\chi^2 = 24.673$, $P < 0.01$). The positive rates of UPA protein expression in ESCC, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and normal esophageal epithelium were 68.9% (31/45), 27.3% (6/22) and 24.4% (11/45), respectively, with a significant difference among the three groups ($P < 0.01$). There is a positive correlation between the protein expression of MIC-1 and uPA ($\gamma_p = 0.403$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: MIC-1 and uPA play important roles in the carcinogenesis, infiltration and metastasis of ESCC. Combined detection of MIC-1 and uPA expression may be a promising molecular parameter for early diagnosis and prognostic evaluation of ESCC.

Key Words: Macrophage inhibitory cytokine-1; Urokinase plasminogen activator; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry; Invasion and metastasis

He F, Liu YQ, Li HX. Clinical pathological significance of MIC-1 and uPA expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2762-2767

摘要

目的: 探讨MIC-1及uPA蛋白表达与食管癌发生、发展及浸润、转移的关系。

方法: 应用免疫组织化学SP法检测45例食管鳞癌组织、22例癌旁不典型增生组织及45例正常食管黏膜组织中MIC-1及uPA蛋白的表达。

■同行评议者

刘丽江, 教授, 江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

结果: 食管鳞癌组织中MIC-1蛋白表达与癌的组织学分级、浸润深度、有无淋巴结转移及TNM分期密切相关($P<0.05$); uPA蛋白表达与癌的TNM分期及淋巴结转移密切相关($P<0.05$); 在食管鳞癌癌变过程中MIC-1蛋白表达在癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织中的表达率依次降低, 分别为64.4%(29/45)、40.9%(9/22)、13.3%(6/45), 组间比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 24.673$, 均 $P<0.01$); uPA蛋白在癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织中的表达率也依次降低, 分别为68.9%(31/45)、27.3%(6/22)、24.4%(11/45), 组间比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 20.863$, $P<0.01$); MIC-1与uPA的表达呈正相关关系($r_p = 0.403$, 均 $P<0.01$).

结论: MIC-1和uPA在食管癌的浸润、转移及黏膜上皮癌变过程中起重要作用, MIC-1及uPA的联合检测可望成为食管鳞癌早期诊断和判断预后的分子指标之一.

关键词: 巨噬细胞抑制细胞因子-1; 尿激酶型纤溶酶原激活剂; 食管鳞癌; 免疫组织化学; 浸润转移

贺飞, 刘宇琼, 李惠翔. MIC-1和uPA在食管鳞癌中蛋白表达的相关性及其临床病理意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2762-2767
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2762.asp>

0 引言

巨噬细胞抑制细胞因子-1(macrophage inhibitory cytokine-1, MIC-1)是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族的新成员^[1], 研究表明在许多病理状态下, 如急性损伤、炎症、肿瘤发生时, MIC-1的蛋白表达及血清水平会异常增高^[2,3]. 尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator, uPA)系统是一种重要的蛋白水解酶, 可通过激活纤溶酶原降解细胞外基质, 从而促进肿瘤细胞浸润和转移^[4,5]. 目前, 关于MIC-1基因与食管癌浸润、转移的关系及MIC-1、uPA表达相关性的研究, 迄今国内外均未见报道. 本文采用免疫组织化学SP法检测MIC-1及uPA在45例食管鳞癌组织、22例癌旁不典型增生组织及45例正常食管黏膜组织的表达情况, 探讨MIC-1及uPA在食管癌发生、发展中的作用, 以期寻找食管癌早期诊断和判断预后的分子指标.

1 材料和方法

1.1 材料 45例标本分别取自无坏死癌灶、癌旁

3 cm以内及远端正常黏膜组织(经HE染色证实, 癌旁组织中22例有中-重度以上不典型增生或原位癌), 经40 g/L多聚甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度4-6 μm , 分别用于HE、免疫组织化学染色. 所有标本均取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院, 所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史. 兔抗人MIC-1单克隆抗体购自美国USBIO公司, 兔抗人多克隆抗体uPA购自美国Santa Cruz公司, SP免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术开发公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色: 采用SP法, MIC-1及uPA抗体稀释倍数均为1:130及1:150, DAB显色, 苏木素复染. 染色步骤严格按说明书进行, 以PBS液代替一抗作为阴性对照.

1.2.2 免疫组织化学结果判定: MIC-1及uPA阳性信号呈黄色颗粒样物质, 均位于细胞质内. 高倍镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数不少于200个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定. 采用9分评分制: 按照阳性细胞比例 $\leq 10\%$ 为1分, 10%-50%为2分, $>50\%$ 为3分; 按染色强弱: 阴性为0分, 淡黄(蓝)色染色为1分; 中度黄(蓝)色染色为2分, 棕黄(紫蓝)色染色为3分. 然后按照“阳性细胞得分 \times 染色强弱得分”计总分, 总分 <3 为阴性, 总分 ≥ 3 为阳性^[6,7].

统计学处理 应用SPSS13.0统计学软件, 行 χ^2 检验和Spearman相关系数分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 MIC-1蛋白在食管鳞癌组织中的表达及其与临床生物学行为的关系 MIC-1蛋白阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞质中, 呈浅黄色至深黄色颗粒样物质(图1). 在食管鳞癌癌变过程中MIC-1蛋白表达在正常黏膜组织中、癌旁不典型增生组织及癌组织的表达率依次增高, 分别为64.4%(29/45)、40.9%(9/22)、13.3%(6/45), 组间比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 24.673$, 均 $P<0.01$, 表1). MIC-1蛋白表达与食管鳞癌患者的组织学分级、浸润深度、有无淋巴结转移及TNM分期有关($\chi^2 = 10.193, 10.132, 11.645, 7.162$; 均 $P<0.05$, 表2).

2.2 uPA蛋白在食管鳞癌中的表达及其与临床生物学行为的关系 uPA蛋白阳性着色定位于细胞质, 呈棕黄色或深黄色颗粒样物质(图2). 在食管鳞癌癌变过程中uPA蛋白在正常黏膜组织、癌

■研究前沿

目前, 关于MIC-1基因与食管癌浸润、转移的关系及MIC-1、uPA表达相关性的研究, 迄今国内外均未见报道. 而关于MIC-1与恶性肿瘤关系的研究已成为热点.

■相关报道

Lee等通过稳定转染MIC-1进入人胃癌细胞系SNU-216发现,其能显著增加胃癌细胞系的侵袭能力,转染的SNU-216细胞高度表达MIC-1,可能是通过胞外信号传导激酶1/2相关途径上调uPA/uPAR活性系统,从而诱导肿瘤细胞的侵袭和促进胃癌细胞的恶性程度,随着剂量的增加,肿瘤细胞侵袭能力和恶性程度也随之增强。

表 1 MIC-1及uPA在食管鳞癌组织、非典型增生及正常黏膜组织中的表达

	<i>n</i>	MIC-1			χ^2 值	<i>P</i> 值	uPA			χ^2 值	<i>P</i> 值
		-	+	阳性率(%)			-	+	阳性率(%)		
正常黏膜上皮组织	45	39	6	13.3	24.673	0.000	34	11	24.4	20.863	0.000
非典型增生组织	22	13	9	40.9			16	6	27.3		
鳞癌组织	45	16	29	64.4			14	31	68.9		

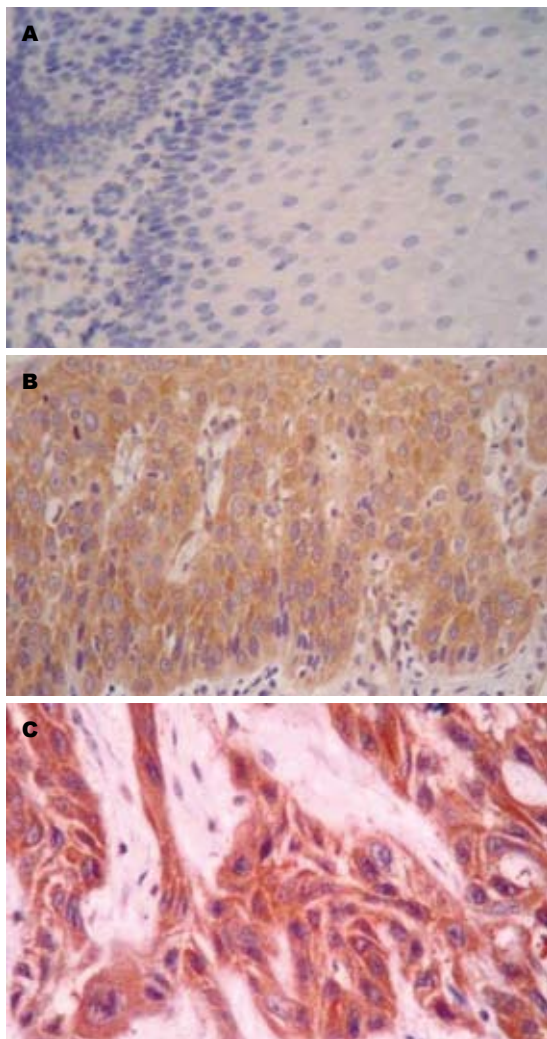


图 1 MIC-1的表达(SP × 200). A: 正常黏膜组织; B: 癌旁非典型增生组织; C: 癌组织.

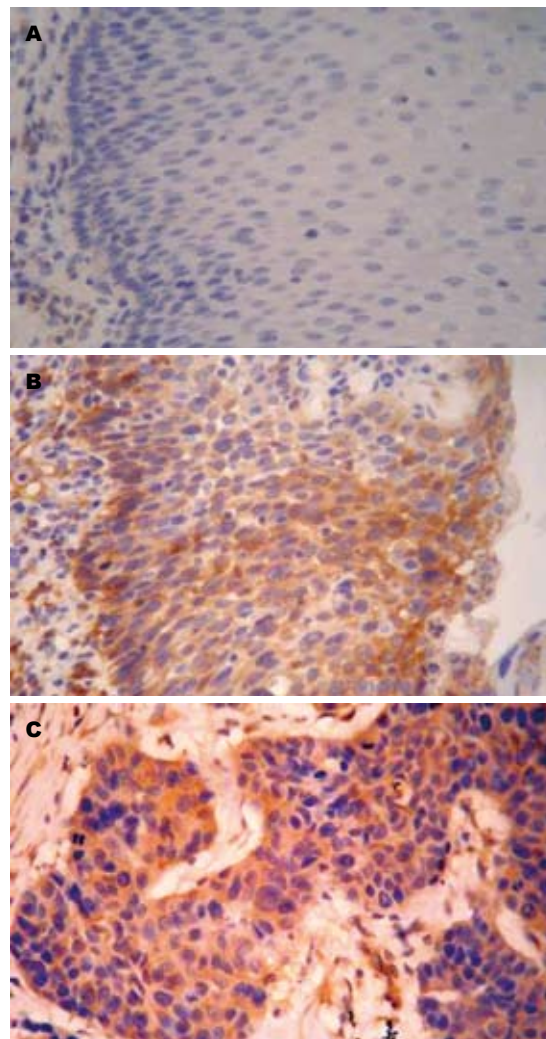


图 2 uPA的表达(SP × 200). A: 正常黏膜组织; B: 癌旁非典型增生组织; C: 癌组织.

旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次升高, 68.9%(31/45)、27.3%(6/22)、24.4%(11/45), 组间比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 20.863$, 均 $P < 0.01$, 表1). uPA蛋白表达与食管鳞癌组织学分级及浸润深度无关, 随着TNM分期级别的增加逐渐升高($\chi^2 = 15.758$, $P < 0.05$); 有淋巴结转移组uPA蛋白阳性表达率高于无淋巴结转移组($\chi^2 = 5.201$, $P < 0.05$, 表2).

2.3 MIC-1及uPA在食管鳞癌组织中表达的相关性分析 在45例食管鳞癌组织中, MIC-1阳性表达

29例中, 其uPA蛋白表达阳性占24例, 而MIC-1表达阴性的16病例中, 其uPA蛋白表达阴性的占9例. MIC-1及uPA蛋白在食管鳞癌组织中的表达强度呈正相关关系($\gamma_p = 0.403$, $P = 0.006$, 表3).

3 讨论

食管癌是一种具有高侵袭能力的恶性肿瘤, 一般都伴有周围组织的浸润和转移且比较容易复发, 其预后也比较差. 目前研究证明食管癌的发生发展是一个多阶段和多基因不断演变的过程,

表 2 MIC-1及uPA蛋白表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系

病理特征	MIC-1				uPA		
	<i>n</i>	阳性表达 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	阳性表达 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
组织学分级							
I	18	7(38.9)	10.193	0.006	12(66.7)	0.982	0.612
II	13	9(69.2)			8(61.5)		
III	14	13(92.9)			11(78.6)		
浸润深度							
浅层	17	6(35.3)	10.132	0.001	12(76.5)	0.037	0.848
深层	28	23(82.1)			19(75.0)		
淋巴结转移							
无	24	10(41.7)	11.645	0.001	13(54.2)	5.201	0.023
有	21	19(90.5)			18(85.7)		
TNM分期							
I、II	19	8(42.1)	7.162	0.007	7(36.8)	15.758	0.000
III、IV	26	21(80.8)			24(92.3)		

表 3 MIC-1及uPA蛋白在食管鳞癌中的表达及相关性分析

MIC-1蛋白	<i>n</i>	uPA蛋白		γ_e 值	<i>P</i> 值
		+	-		
+	29	24	5	0.403	0.006
-	16	7	9		

但对其发病机制的研究目前仍不十分清楚^[8], 长期以来, 如何从分子水平来寻找食管癌可能的分子治疗靶点长期以来备受人们关注. 本研究应用免疫组织化学技术系统的对比研究了食管黏膜上皮癌变过程中uPA及其抑制剂MIC-1蛋白的变化规律及其与食管鳞癌临床生物学行为的关系.

TGF-β是具有多种生物学功能的蛋白多肽, 大约有40多个成员, 参与调控细胞增殖、分化及凋亡等多种功能和生物学过程^[9,10]. MIC-1是从激活的巨噬细胞内发现的TGF-β超家族中的成员之一, 位于19q13-1^[11]. 目前, MIC-1被普遍认为是机体的一种保护因子, 在炎症、应激及恶性肿瘤的发生中起着十分重要的免疫保护作用. MIC-1前原蛋白相对分子质量大约为25 000 Da, 由308个氨基酸多肽组成, 包括29个氨基酸信号肽, 167个氨基酸前肽和112个氨基酸成熟区. MIC-1在人类胎盘组织内含量较高, 在肾脏、前列腺、胰腺等组织的上皮组织中含量较低, 在其他组织或器官内几乎无表达. 然而, 如果在机体出现缺血、缺氧、组织损伤及发生恶性肿瘤等病理变化时, P53及API等作为保护因子被激活, 诱导了其下游的MIC-1基因的表达量

■创新盘点
本文首次采用免疫组织化学方法检测食管癌高发区河南安阳的食管癌患者手术切除的癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织中MIC-1及uPA蛋白的表达情况.

显著升高^[12-15]. 目前的研究结果显示, 其在多种恶性肿瘤中, 如胃癌、前列腺癌及乳腺癌等高表达^[16-18]. MIC-1启动区域是抑癌基因P53产物的靶点, 有研究认为在肿瘤发生的早期, MIC-1介导抑癌基因P53途径, 抑制细胞生长和血管生成, 促使细胞周期停滞, 引起生长周期阻断, 诱导肿瘤细胞凋亡, 从而发挥抑制肿瘤发生发展的作用^[13,14]. 随着肿瘤的进展, 肿瘤细胞对MIC-1的细胞生长抑制出现耐受, MIC-1通过免疫抑制、合成细胞外基质、刺激肿瘤血管生成等, 提供了适宜肿瘤细胞生长、浸润及转移的微环境, 从而促进肿瘤播散, 从而促进肿瘤的发展^[3,19]. 本研究结果显示, MIC-1基因在正常食管组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中均有表达, 但在食管癌组织中的表达水平显著升高, 随着正常食管黏膜向食管不定型增生组织再到食管癌的演变过程中, MIC-1的表达显著增加, 提示MIC-1的表达是食管癌发生的早期事件, 参与并调节了食管癌的发生、发展过程. 此外, MIC-1于食管鳞癌组织学分级、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期有关, 提示MIC-1于食管鳞癌浸润转移密切相关.

癌细胞的侵袭转移能力与其产生降解细胞外基质的蛋白酶的能力密切相关, 降解基质的蛋白酶包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶及金属蛋白酶4类, 其中纤溶酶原激活因子(plasminogen activators, PA)和金属蛋白酶(matrix Metalloproteinase, MMP)起着关键作用^[20]. 纤溶酶原激活因子包括uPA和组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activa-

■同行评价

本文选题新颖, 结果可靠, 具有一定的临床参考价值.

tor, tPA). uPA是一种多功能丝氨酸蛋白酶, 相对分子质量约55 000 Da. uPA可在肾小管上皮细胞、单核细胞、肺上皮细胞及成纤维细胞中表达, 也可在肿瘤细胞内表达^[21,22]. Lee等^[23]通过稳定转染MIC-1进入人胃癌细胞系SNU-216发现, 其能显著增加胃癌细胞系的侵袭能力, 转染的SNU-216细胞高度表达MIC-1, 可能是通过胞外信号传导激酶1/2相关途径上调uPA/uPAR活性系统, 从而诱导肿瘤细胞的侵袭和促进胃癌细胞的恶性程度, 随着剂量的增加, 肿瘤细胞侵袭能力和恶性程度也随之增强. MIC-1基因引起肿瘤浸润及转移的可能机制还包括增强蛋白水解酶活性, 增加间质胶原的降解, 从而降低瘤细胞黏附力, 促进癌细胞的分离, 迁移和转移. 本研究结果显示, 食管癌组织中uPA的表达水平与正常组织相比显著升高. MIC-1及uPA均在食管鳞癌组织中呈高表达, 二者呈正相关关系, 表明二者在食管鳞癌癌变过程中起协调作用.

总之, 对MIC-1基因的深入研究有利于我们进一步的了解食管癌的生物学特性, 为食管癌的早期诊断和治疗提供一个新的发展方向.

4 参考文献

- Carstensen M, Herder C, Brunner EJ, Strassburger K, Tabak AG, Roden M, Witte DR. Macrophage inhibitory cytokine-1 is increased in individuals before type 2 diabetes diagnosis but is not an independent predictor of type 2 diabetes: the Whitehall II study. *Eur J Endocrinol* 2010; 162: 913-917
- Shnaper S, Desbaillets I, Brown DA, Murat A, Migliavacca E, Schluep M, Ostermann S, Hamou MF, Stupp R, Breit SN, de Tribolet N, Hegi ME. Elevated levels of MIC-1/GDF15 in the cerebrospinal fluid of patients are associated with glioblastoma and worse outcome. *Int J Cancer* 2009; 125: 2624-2630
- Wakchoure S, Swain TM, Hentunen TA, Bauskin AR, Brown DA, Breit SN, Vuopala KS, Harris KW, Selander KS. Expression of macrophage inhibitory cytokine-1 in prostate cancer bone metastases induces osteoclast activation and weight loss. *Prostate* 2009; 69: 652-661
- Owen KA, Qiu D, Alves J, Schumacher AM, Kilpatrick LM, Li J, Harris JL, Ellis V. Pericellular activation of hepatocyte growth factor by the transmembrane serine proteases matriptase and hepsin, but not by the membrane-associated protease uPA. *Biochem J* 2010; 426: 219-228
- Noskova V, Ahmadi S, Asander E, Casslén B. Ovarian cancer cells stimulate uPA gene expression in fibroblastic stromal cells via multiple paracrine and autocrine mechanisms. *Gynecol Oncol* 2009; 115: 121-126
- 高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉. 金属蛋白酶抑制基因RECK在食管鳞癌中的表达及生物学意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1634-1638
- 李晟磊, 赵秋民, 刘宗文, 赵志华, 高冬玲, 郑湘予, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌中RECK和MMP-9蛋白表达的相关性及临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1082-1086
- Goan YG, Chang HC, Hsu HK, Chou YP. An audit of surgical outcomes of esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007; 31: 536-544
- Shinto O, Yashiro M, Kawajiri H, Shimizu K, Shimizu T, Miwa A, Hirakawa K. Inhibitory effect of a TGFbeta receptor type-I inhibitor, Ki26894, on invasiveness of scirrhous gastric cancer cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 844-851
- Artman T, Schilling D, Gnann J, Molls M, Multhoff G, Bayer C. Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76: 574-582
- Hayes VM, Severi G, Southey MC, Padilla EJ, English DR, Hopper JL, Giles GG, Sutherland RL. Macrophage inhibitory cytokine-1 H6D polymorphism, prostate cancer risk, and survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1223-1225
- Kelly JA, Lucia MS, Lambert JR. p53 controls prostate-derived factor/macrophage inhibitory cytokine/NSAID-activated gene expression in response to cell density, DNA damage and hypoxia through diverse mechanisms. *Cancer Lett* 2009; 277: 38-47
- Brown DA, Moore J, Johnen H, Smeets TJ, Bauskin AR, Kuffner T, Weedon H, Milliken ST, Tak PP, Smith MD, Breit SN. Serum macrophage inhibitory cytokine 1 in rheumatoid arthritis: a potential marker of erosive joint destruction. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 753-764
- Agarwal MK, Hastak K, Jackson MW, Breit SN, Stark GR, Agarwal ML. Macrophage inhibitory cytokine 1 mediates a p53-dependent protective arrest in S phase in response to starvation for DNA precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16278-16283
- Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, McGrath SA, Esquela AF, Koniaris LG. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock* 2005; 23: 543-548
- Skipworth RJ, Deans DA, Tan BH, Sangster K, Paterson-Brown S, Brown DA, Hunter M, Breit SN, Ross JA, Fearon KC. Plasma MIC-1 correlates with systemic inflammation but is not an independent determinant of nutritional status or survival in oesophago-gastric cancer. *Br J Cancer* 2010; 102: 665-672
- Brown DA, Lindmark F, Stattin P, Bälter K, Adami HO, Zheng SL, Xu J, Isaacs WB, Grönberg H, Breit SN, Wiklund FE. Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6658-6664
- Wollmann W, Goodman ML, Bhat-Nakshatri P, Kishimoto H, Goulet RJ Jr, Mehrotra S, Morimiyama A, Badve S, Nakshatri H. The macrophage inhibitory cytokine integrates AKT/PKB and MAP kinase signaling pathways in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2005; 26: 900-907
- Selander KS, Brown DA, Sequeiros GB, Hunter M, Desmond R, Parpala T, Risteli J, Breit SN, Jukkola-Vuorinen A. Serum macrophage inhibitory cytokine-1 concentrations correlate with the presence of prostate cancer bone metastases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 532-537
- Schwock J, Dhani N, Hedley DW. Targeting focal

- adhesion kinase signaling in tumor growth and metastasis. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 77-94
- 21 Lootens L, Meuleman P, Pozo OJ, Van Eenoo P, Leroux-Roels G, Delbeke FT. uPA+/+SCID mouse with humanized liver as a model for in vivo metabolism of exogenous steroids: methandienone as a case study. *Clin Chem* 2009; 55: 1783-1793
- 22 Wu CY, Wu MS, Chen YJ, Chen HP, Chen CJ, Chang CS, Lin JT. Clinicopathological significance of urokinase-type plasminogen activator genotypes in gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1890-1894
- 23 Lee DH, Yang Y, Lee SJ, Kim KY, Koo TH, Shin SM, Song KS, Lee YH, Kim YJ, Lee JJ, Choi I, Lee JH. Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res* 2003; 63: 4648-4655

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版. 具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复.

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改. 作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复. 为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果.

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量. 对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知. 稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出.

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行检查, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对. 彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误. 排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误.

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校. 责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色. 责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对. 责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑.

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷. 责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件. 编务配合档案管理员邮寄杂志.

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原创文章、原始清样、制作文件等.

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章从投稿到刊出4 mo内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

β -胡萝卜素对肝纤维化的防治作用

徐开武, 万德芬, 黄和赞, 刘雄飞, 胡江敏, 刘飞, 罗明, 潘洁, 胡红丁, 冯耀, 万莉萍

■背景资料

肝纤维化的病理改变是以胶原为主的细胞外基质(ECM)过量增生与异常沉积。在肝纤维化期间肝星状细胞(HSC)激活是引起胶原过度沉积的主要原因, 它具有贮存维生素A脂滴的生理作用。HSC在向肌成纤维细胞转化的过程中, 胞质中的维生素A脂滴逐渐丢失, 由此推断维生素A类可抑制HSC的活化。 β -胡萝卜素作为维生素A前体, 除具有维生素A应有的活性外, 尚具有其独特的生物特征, 且大剂量应用不会产生对机体有害的不良反应。

徐开武, 黄和赞, 刘雄飞, 胡江敏, 刘飞, 南昌市中西医结合医院 江西省南昌市 330003

万德芬, 罗明, 潘洁, 胡红丁, 冯耀, 万莉萍, 南昌市医学科学研究所 江西省南昌市 330001

徐开武, 副主任医师, 主要从事消化内科及急救医学研究。

江西省科技支撑计划基金资助项目, No. 赣财教2008-212-5

作者贡献分布: 徐开武与万德芬对此文所作贡献均等; 徐开武参与课题设计、临床病例收集分析及课题组织实施; 万德芬完成课题总体设计、课题指导、统计分析处理及论文撰写; 黄和赞、刘雄飞、胡江敏、刘飞、罗明、潘洁、胡红丁及万莉萍完成实验与操作, 提供实验数据。

通讯作者: 万德芬, 研究员, 330001, 江西省南昌市, 南昌市医学科学研究所。wdf50@163.com

电话: 0791-5203402

收稿日期: 2010-06-01 修回日期: 2010-08-04

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-18

Oral β -carotene can reverse human liver fibrosis

Kai-Wu Xu, De-Fen Wan, Huo-Zan Huang, Xiong-Fei Liu, Jiang-Min Hu, Fei Liu, Ming Luo, Jie Pan, Hong-Ding Hu, Yao Feng, Li-Ping Wan

Kai-Wu Xu, Huo-Zan Huang, Xiong-Fei Liu, Jiang-Min Hu, Fei Liu, Nanchang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanchang 330003, Jiangxi Province, China

De-Fen Wan, Ming Luo, Jie Pan, Hong-Ding Hu, Yao Feng, Li-Ping Wan, Nanchang Institute of Medical Sciences, Nanchang 330001, Jiangxi Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Jiangxi Province, Gan Cai Jiao No. 2008-212-5

Correspondence to: De-Fen Wan, Nanchang Institute of Medical Sciences, Nanchang 330001, Jiangxi Province, China. wdf50@163.com

Received: 2010-06-01 Revised: 2010-08-04

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To observe the clinical efficacy of β -carotene in the treatment of patients with liver fibrosis.

METHODS: Sixty-three patients with liver fibrosis were divided into two groups according to pathological stage: patients with S_0 - S_1 liver fibrosis ($n = 31$) and those with S_2 - S_4 disease ($n = 32$). Oral β -carotene was given to all the patients. Sixty healthy volunteers were used as controls. Serum hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type IV collagen (IV-C), procollagen III (PCIII), connective tissue growth factor (CTGF), platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and

transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in these subjects were measured by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. Immunohistochemistry for IV-C was also performed.

RESULTS: Serum HA, LN, IV-C and PC III showed significant differences in patients with both S_0 - S_1 and S_2 - S_4 liver fibrosis between before and after β -carotene treatment (S_0 - S_1 : $t = 4.917, 2.120, 3.138, 3.583, P < 0.01$ or 0.05 ; S_2 - S_4 : $t = 5.963, 5.563, 9.162, 4.972$, all $P < 0.01$). Serum HA and IV-C were statistically significant between patients with S_2 - S_4 liver fibrosis after β -carotene treatment and normal controls (both $P < 0.01$). Serum CTGF, PDGF-BB, TIMP-1 and TGF- β 1 showed significant differences between in patients with both S_0 - S_1 and S_2 - S_4 liver fibrosis between before and after β -carotene treatment (S_0 - S_1 : $t = 4.176, 2.683, 2.098, 2.045, P < 0.01$ or 0.05 ; S_2 - S_4 : $t = 4.792, 7.519, 2.877, 2.305$, all $P < 0.01$). Serum CTGF and PDGF-BB were statistically significant between patients with S_2 - S_4 liver fibrosis after β -carotene treatment and normal controls (both $P < 0.01$). Immunohistochemistry analysis showed that oral β -carotene could improve hepatic fibrosis even in patients with S_4 disease.

CONCLUSION: Oral β -carotene can reverse human hepatic fibrosis by regulating the function of hepatic stellate cells and represents a promising anti-hepatic fibrosis drug.

Key Words: β -carotene; Liver fibrosis; Serum hepatic fibrosis marker; Pathological examination; Immunohistochemistry

Xu KW, Wan DF, Huang HZ, Liu XF, Hu JM, Liu F, Luo M, Pan J, Hu HD, Feng Y, Wan LP. Oral β -carotene can reverse human liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2768-2774

摘要

目的: 观察 β -胡萝卜素防治肝纤维化的临床疗效。

方法: 63例肝纤维化患者, 按病理分期 S_0 - S_1 期31例, S_2 - S_4 期32例。口服 β -胡萝卜素, 放射免疫

■同行评议者

吴俊华, 副主任医师, 南京大学医学院功能评价中心

分析法测定治疗前后血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、IV型前胶原(IV-C)、III型前胶原肽(PCIII), ELISA法测定血清结缔组织生长因子(CTGF)、血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)、金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1), 免疫组织化学检查IV型胶原及II型胶原, 并与60例正常人对照分析。

结果: β 胡萝卜素治疗前后, 肝纤维化S₀-S₁、S₂-S₄期患者HA、LN、IV-C、PCIII有统计学差异(S₀-S₁: $t = 4.917, 2.120, 3.138, 3.583, P < 0.01$ 或 0.05 ; S₂-S₄: $t = 5.963, 5.563, 9.162, 4.972$, 均 $P < 0.01$). S₂-S₄期患者与正常人比较HA、IV-C有统计学差异(均 $P < 0.01$). 治疗前后肝纤维化S₀-S₁、S₂-S₄期患者CTGF、PDGF-BB、TIMP-1、TGF- β 1均有统计学差异(S₀-S₁: $t = 4.176, 2.683, 2.098, 2.045, P < 0.01$ 或 0.05 ; S₂-S₄: $t = 4.792, 7.519, 2.877, 2.305$, 均 $P < 0.01$). S₂-S₄期患者与正常人比较CTGF、PDGF-BB有统计学差异(均 $P < 0.01$). 免疫组织化学检测结果表明, 免疫组织化学检查口服 β -胡萝卜素后S₄期患者病情有所改善。

结论: 口服 β -胡萝卜素, 通过调节肝星状细胞的功能, 对S₀-S₁、S₂-S₄期患者均有逆转肝纤维化的作用, 是一种很有前景的抗肝纤维化药物。

关键词: β -胡萝卜素; 肝纤维化; 血清肝纤维化标志; 病理检查; 免疫组织化学

徐开武, 万德芬, 黄和赞, 刘雄飞, 胡江敏, 刘飞, 罗明, 潘洁, 胡红丁, 冯耀, 万莉萍. β -胡萝卜素对肝纤维化的防治作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2768-2774
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2768.asp>

0 引言

肝纤维化是病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、中毒性肝病、自身免疫性肝病、胆道阻塞等生物、化学、物理因素导致肝脏损害后的一种修复过程, 胞外基质过度积累而造成肝功能障碍。其中肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活、转化为肌成纤维细胞, 合成大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 从而使ECM降解减少, 以致其在肝内大量沉积, 肝纤维化逐渐形成^[1]。Safadi等^[2]研究表明, 肝纤维化在去除损伤因素后尚有逆转的可能, 这大大激发了人们对肝纤维化诊治的研究。维生素A(vitA)类在细胞的生长、分化、胚胎形成和个体发育过程中发挥着重要作用。根据HSC和肝实质细胞(parenchymal cell, PC)在肝纤维化形成过

程中具有重要意义的理论^[3], 我们对VitA原-天然 β -胡萝卜素(nature beta-carotene)逆转肝纤维化的作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料 63例受试者, 男40例, 女23例, 年龄23-61(平均 43.52 ± 17.47)岁。其中慢性肝炎肝纤维化^[4]患者28例, 酒精性肝病肝纤维化^[5]16例, 非酒精性肝纤维化^[6]19例。另选健康体检60例正常者, 男39例, 女21例, 年龄25-58(平均 44.12 ± 16.73)岁。63例病理检查纤维化分期, S₀-S₁期31例, S₂-S₄期32例。血清结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)、血小板衍生生长因子-BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)、生物素-亲合素ELISA测定试剂盒购自Rapidbio Lab; 金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP-1)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)ELISA试剂盒购自Invitrogen公司。Bio-Rad Model 680酶联仪, 购自美国Bio-Rad公司。天然 β -胡萝卜素由广州佛山海力士药业公司生产。

1.2 方法

1.2.1 入选标准: (1)HBV、HCV感染、过量饮酒、营养不良、慢性缺氧、胆汁淤积等; (2)年龄18-65岁, 性别不限; (3)病程在6 mo以上; (4)肝纤维化[血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、IV型前胶原(type IV collagen, IV-C)、III型前胶原肽(type III procollagen, PCIII)]指标异常或任意一项指标高于正常值的2倍以上者; (5)知情同意, 志愿受试, 获得知情同意书过程应符合国家有关规定。

1.2.2 排除标准: (1)合并HAV, HDV, HEV感染者; (2)HBV所致的重型肝炎、失代偿期肝硬化和肝癌患者; (3)长期酗酒者、精神病患者及孕妇; (4)合并有心脑血管、呼吸、泌尿和造血系统等严重原发病者; (5)凝血机制异常者; (6)18岁以下或65岁以上的患者。

1.2.3 组织样本取材: 外科医生腹腔镜下, 使用电刀取得肝组织(直径1-2 cm), 由病理医师作出肝组织病理学诊断。纤维化分期按文献^[7]报道分为纤维化程度高(S₂-S₄)和纤维化程度低(S₀-S₁)。

1.2.4 血清肝纤维化指标检测: 肝取组织后第2天, 受试者空腹从肘静脉采血5 mL, 1 500 r/min, 离心15 min, 取血清置40℃冰箱保存。血清HA、LN、IV-C、PCIII采用放射免疫分析仪(西安FJ-2008P型)测定。

■研究前沿

一些研究表明, 肝纤维化在去除损伤因素后尚有逆转的可能, 这大大激发了人们对肝纤维化诊治的研究。目前, 肝纤维化的研究已深入到分子生物学领域。

■相关报道

研究显示,某些细胞因子在HSC活化以及ECM生成中起着非常关键的作用,其中TGF- β 1是肝纤维化进展中重要的细胞因子,在肝纤维化组织中TGF- β 1明显增加。

表 1 β -胡萝卜素对血清肝纤4项指标的影响 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>		HA(μ g/L)	LN(kU/L)	IV-C(μ g/L)	PC III (ng/L)
正常组	60		20.79 \pm 10.26	0.91 \pm 0.28	84.05 \pm 24.16	0.47 \pm 0.29
S ₀ -S ₁	31	治疗前	38.14 \pm 15.02	1.08 \pm 0.33	138.82 \pm 89.78	0.78 \pm 0.38
		治疗后	21.47 \pm 11.43	0.92 \pm 0.26	86.24 \pm 25.34	0.48 \pm 0.27
<i>t</i> 值			4.917	2.120	3.138	3.583
<i>P</i> 值			<0.01	<0.05	<0.01	<0.01
S ₂ -S ₄	32	治疗前	53.54 \pm 22.14	1.43 \pm 0.39	155.29 \pm 22.04	1.08 \pm 0.58
		治疗后	27.54 \pm 10.87 ^b	0.94 \pm 0.31	98.45 \pm 27.31 ^b	0.51 \pm 0.29
<i>t</i> 值			5.963	5.563	9.162	4.972
<i>P</i> 值			<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

t = 3.498, 3.059; ^b*P* < 0.01 vs 正常组同指标。

表 2 β -胡萝卜素对血清CTGF、PDGF-BB、TIMP-1、TGF- β 1的影响 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>		CTGF(μ g/L)	PDGF-BB(μ g/L)	TIMP-1(μ g/L)	TGF- β 1(ng/L)
正常组	60		4.53 \pm 1.21	2.81 \pm 0.57	136.86 \pm 56.24	15.40 \pm 5.22
S ₀ -S ₁	31	治疗前	6.14 \pm 1.85	3.34 \pm 0.91	164.34 \pm 46.23	19.02 \pm 8.16
		治疗后	4.49 \pm 1.19	2.83 \pm 0.54	136.92 \pm 56.21	15.46 \pm 5.23
<i>t</i> 值			4.176	2.683	2.098	2.045
<i>P</i> 值			<0.01	<0.01	<0.05	<0.05
S ₂ -S ₄	32	治疗前	12.87 \pm 6.18	7.34 \pm 2.72	203.56 \pm 92.84	21.43 \pm 9.96
		治疗后	7.52 \pm 1.30 ^b	3.42 \pm 1.14 ^b	149.03 \pm 53.62	16.78 \pm 5.57
<i>t</i> 值			4.792	7.519	2.877	2.305
<i>P</i> 值			<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

t = 13.041, 3.707, ^b*P* < 0.01 vs 同指标正常组。

1.2.5 肝组织免疫组织化学法检测: 所有标本均经40 g/L的中性甲醛固定, 常规脱水、石蜡切片, 4 μ m厚连续切片, 依次进行HE、Masson三色染色及网状纤维染色、免疫组织化学染色及原位杂交, 保证实验在同等条件下进行, 以减少实验的误差。每个标本各选5张片子做图像分析。

1.2.6 治疗: 所有患者给予天然 β -胡萝卜素每粒10 mg, 每日2次, 每次1粒, 空腹口服。每3 mo 1疗程, 1疗程后停药7 d, 再服1疗程, 共计6 mo。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 采用同体及配对对照*t*检验方法。

2 结果

2.1 HA、LN、IV-C、PCIII的检测水平 β -胡萝卜素治疗前后, 肝纤维化S₀-S₁、S₂-S₄期患者HA、LN、IV-C、PCIII有统计学差异(均*P* < 0.05或0.01), 治疗后肝纤维化S₀-S₁期患者与正常人比较HA、LN、IV-C、PCIII没有统计学差异, S₂-S₄期患者与正常人比较HA、IV-C有统计学差

异(*P* < 0.01), LN、PCIII没有统计学差异(表1)。

2.2 CTGF、PDGF-BB、TIMP-1、TGF- β 1的检测水平 β -胡萝卜素治疗前后, 肝纤维化S₀-S₁、S₂-S₄期患者CTGF、PDGF-BB、TIMP-1、TGF- β 1均有统计学差异(均*P* < 0.05或0.01)。治疗后肝纤维化S₀-S₁期患者与正常人比较CTGF、PDGF-BB、TIMP-1、TGF- β 1没有统计学差异, S₂-S₄期患者与正常人比较CTGF、PDGF-BB有统计学差异(*P* < 0.01), TIMP-1、TGF- β 1没有统计学差异(表2)。

2.3 肝纤维化免疫组织化学检测结果 β -胡萝卜素治疗前镜下示, 肝实质广泛破坏, 弥漫性纤维增生, 被分隔的肝细胞团呈不同程度的再生及假小叶形成; 纤维间隔宽大疏松, 纤维间隔内胆小管增生, 大量炎症细胞浸润, 界面明显(图1A); 网染显示宽窄不一的纤维间隔包绕大小不等的肝细胞结节(图1B); Masson显示宽窄不一的纤维间隔包绕大小不等的肝细胞结节(图1C); IV型胶原密集分布于纤维间隔中(图1D); II型胶原较稀疏

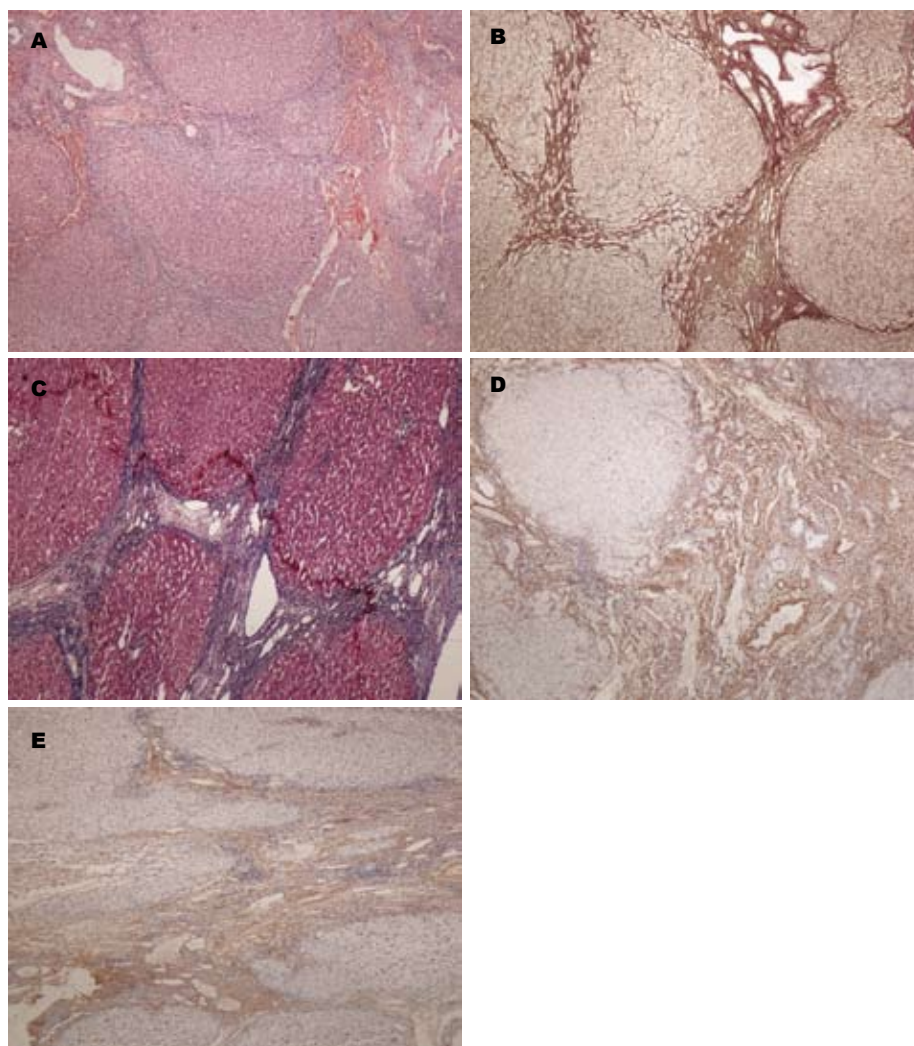


图 1 免疫组织化学法示重度肝纤维化患者 β -胡萝卜素治疗前的检测结果($\times 100$). A: HE; B: 网染; C: Masson; D: IV型胶原; E: II型胶原.

■创新盘点

抑制肝星状细胞活化是防治肝纤维化的关键途径,而许多基础医学研究表明作为维生素A前体,可抑制肝星状细胞活化,从而起到抗肝纤维化的作用.本文将 β -胡萝卜素用于临床抗慢性肝炎、酒精性肝病、非酒精性肝病引起的肝纤维化,并采用肝纤维化4项指标、生化指标、免疫组织化学检测验证了 β -胡萝卜素抗肝纤维化的有效作用.

分布于纤维间隔中(图1E).

β -胡萝卜素治疗后镜下示肝实质较广泛破坏,弥漫性纤维增生,被分隔的肝细胞团呈不同程度的再生及假小叶形成;纤维间隔宽大疏松,纤维间隔内胆小管增生,大量炎症细胞浸润,界面明显(图2A);网染显示宽窄不一的纤维间隔包绕大小不等的肝细胞结节(图2B);Masson显示宽窄不一的纤维间隔包绕大小不等的肝细胞结节(图2C);IV型胶原较稀疏分布于纤维间隔中(图2D);II型胶原稀疏分布于纤维间隔中(图2E).

3 讨论

肝纤维化是对慢性刺激的创伤愈合反应,具有ECM蛋白(I型胶原聚多)过度沉淀的特征,这改变肝脏的结构导致肝脏功能障碍. HSC激活在肝纤维化期间是引起胶原过度沉淀的主要原因.在纤维化形成过程中有两个重要方面:其一、由合成的EMC蛋白将HSC直接使纤维生成;其次、被激活的HSC增生,进一步促进了纤维生成反应.虽然HSC被激活的确切机制还不完全清

楚,实际上在HSC中,已获得了ECM产生和细胞增生的分子机制.激活的HSC引起两种因子增生,即血小板衍化生成因子和纤维生成TGF- β 1.很显然这些细胞因子激活细胞分裂活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)发信号,包括P38、局部黏附磷脂酰肌醇3-激酶-Akt-P70S6激酶[FAK-P13K-Akt-P70(S6K)]发级联信号,他们共同调节增生反应,促进细胞分裂周期的过程以及胶原的表达.此外,由Smad蛋白介导的TGF- β 1发送信号和P38 MAPK影响胶原的表达.已发现Smad和P38 MAPK在P38 MAPK时由转录激活单独地和累积地调节胶原基因(molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis)的表达,引起I型胶原合成增加和沉淀^[8],这预示了HSC增生和ECM过度产生的分子机制,并可确定肝纤维化新的治疗目标.

肝纤维化是急性损伤中肝脏没有发生任何疤痕变化和合并症,在慢性损伤过程由于ECM过度沉积造成肝脏大部组织形成纤维化状态,ECM过度沉积造成肝纤维化,从而肝纤维化发

■应用要点

本研究从血清HA、LN、IV-C、PCⅢ、CTGF、PDGF-BB、TIMP-1、TGF- β 1与免疫组织化学检测结果证明了 β -胡萝卜素对S₀-S₁、S₂-S₄期患者均有逆转肝纤维化的作用。 β -胡萝卜素是vitA的前体,他不仅具有vitA逆转肝纤维化的作用,而且临床观察证实了长时间使用 β -胡萝卜素无任何不良反应,他是一种很有前景的抗肝纤维化药物。

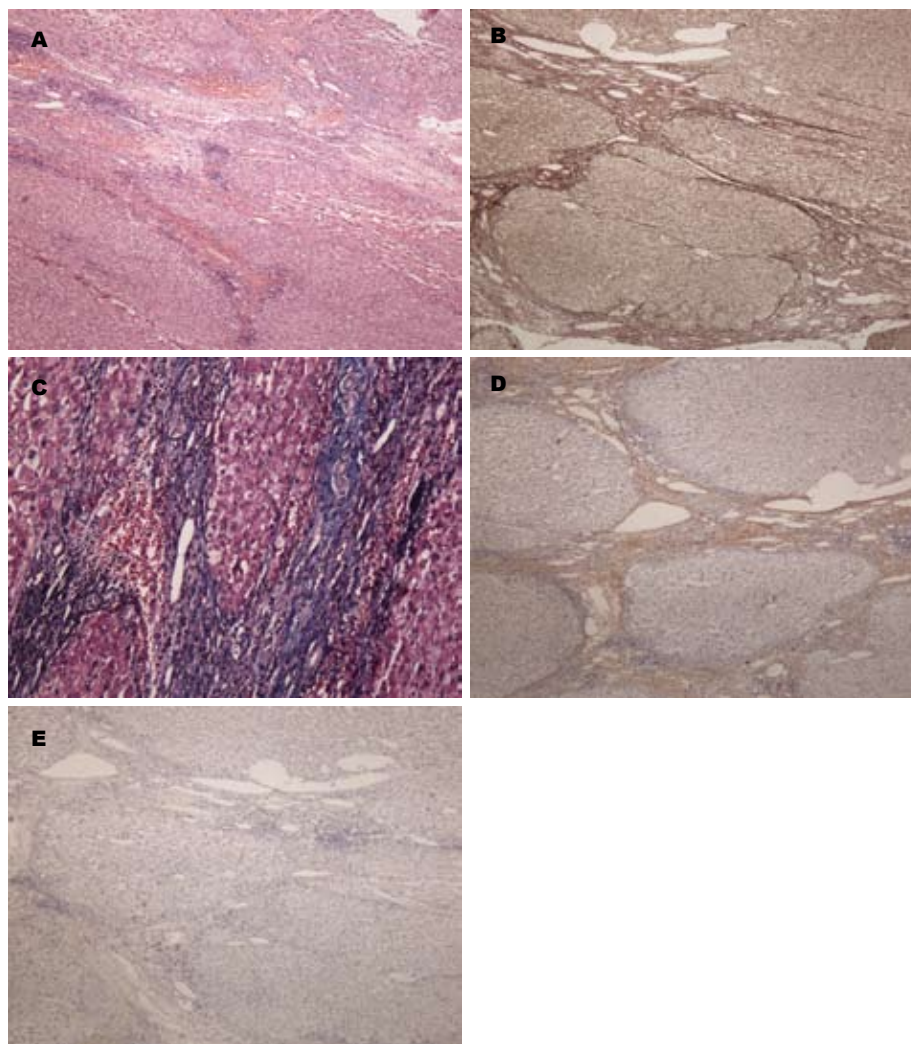


图2 免疫组织化学法示重度肝纤维化患者 β -胡萝卜素治疗后的检测结果($\times 100$)。A: HE; B: 网染; C: Masson; D: IV型胶原; E: II型胶原。

展成肝硬化的过程。肝硬化是一个不可逆和慢性肝病的最后阶段,为了阻断肝硬化的发展,在病毒和免疫学领域开始了各种形式的研究。目前,肝纤维化的研究已深入到分子生物学领域,HSC在由ECM积累引起的肝纤维化过程起了关键性的作用。肝纤维化的级别依据HSC的增殖、激活和胶原产物增加的程度。因此,抑制HSC的活性是阻止肝纤维化形成的主要途径,许多因素,如氧化应激、乙醛、维生素C、TGF- β 1和四氯化碳(CCl₄)有激活HSC和刺激胶原表达的作用^[9-11],虽然没有确切有效的抗纤维化剂,但可能的候选者有抗氧化剂、干扰素、类视黄醇、象 β -胡萝卜素黄酮类^[12]、肾素血管紧张素抑制剂、氧化物酶增殖激活 γ -受体(peroxidase proliferator activated receptor γ , PPAR γ)拮抗剂。

肝纤维化是常见的肝脏病,主要表现为肝内ECM的产生和降解之间失去平衡引起ECM过度增生和异常积聚。肝纤维化时,肝内及HSC内vitA的含量及视黄酸受体(retinoic acid receptor,

RAR)一类维生素AX受体(β RXR)-amRNA水平降低,缺乏vitA可促进肝纤维化,同时vitA可阻止肝纤维化的形成^[13-16]。其阻止肝纤维化形成的机制可能有:(1)调节HSC的增殖和分化^[17];(2)影响胶原等ECM的合成;(3)影响ECM的降解^[18]。由此可以推断,vitA阻止肝纤维化的作用是通过调节ECM而产生的。ECM一项重要的生理作用是贮存vitA脂滴,ECM在向肌成纤维细胞转化的过程中,脂质中的vitA脂滴逐渐丢失,可见vitA对ECM的转化有抑制作用^[19]。采用vitA逆转肝纤维化国外已有大量的报道,但由于vitA中起主要作用的物质是视黄醇^[20],这种物质过量会产生毒性,因此我们采用vitA前体物质 β -胡萝卜素逆转肝纤维化。

本研究采用 β -胡萝卜素胶囊治疗不同分期的肝纤维化患者,通过血清HA^[21]、LN、IV-C、PCⅢ、CTGF、PDGF-BB、TIMP-1、TGF- β 1的免疫组织化学检查来判断 β -胡萝卜素逆转肝纤维化的效果。HA、LN、IV-C、PCⅢ为肝纤

维化诊断指标已被国内外许多学者的研究结果证实^[22-25], 由于他的非创伤性特点, 现已广泛用于临床. 我们的研究表明, β -胡萝卜素治疗前后, 肝纤维化 S_0 - S_1 、 S_2 - S_4 期患者HA、LN、IV-C、PCIII有统计学差异, 治疗后肝纤维化 S_0 - S_1 期患者与正常人比较HA、LN、IV-C、PCIII没有统计学差异, S_2 - S_4 期患者与正常人比较HA、IV-C有统计学差异, LN、PCIII没有统计学差异, 血清HA、LN、IV-C、PCIII水平可从不同侧面反映慢性肝炎与肝硬化患者肝细胞炎症和坏死程度, 间接地反映肝纤维化的程度. 我们研究的病例虽然是在肝活检病理检查的基础上再行4项指标的放射免疫检测, 但诊断结果和病理结果相一致.

研究显示, 某些细胞因子在HSC活化以及ECM生成中起着非常关键的作用, 其中TGF- β 1是肝纤维化进展中重要的细胞因子, 在肝纤维化组织中TGF- β 1明显增加^[26], TGF- β 1诱导细胞外基质的产生等功能是通过下游效应元件CTGF基因起作用的^[27]. 使用免疫组织化学和Northern blot以及分子探针技术已证实肝纤维化组织中CTGF表达水平明显高于正常肝组织^[28]. 王念跃等^[29]用ELISA法检测慢性肝炎患者血清中的CTGF, 发现其和肝纤维化程度明显相关. 本项研究进一步印证了这一点.

PDGF-BB由Kupffer细胞和活化的HSC产生, 是强有力的HSC有丝分裂原, 在HSC活化和肝纤维化形成中均发挥重要作用. 阻止PDGF-BB与其受体结合可以明显减少HSC的增殖和抑制肝纤维化的发展^[30]. 本项研究中, 血清PDGF-BB和肝纤维化程度明显相关, 诊断肝纤维化的准确性也比较高, 是一种有价值的肝纤维化的标志物. 血清TIMP-1虽然和肝纤维化分期有一定的相关性, 但我们的研究显示重症肝纤维化患者肝纤维化水平, β -胡萝卜素胶囊治疗后, 只能适当改善, 但血清TIMP-1水平难以恢复正常水平.

本研究从血清HA、LN、IV-C、PCIII、CTGF、PDGF-BB、TIMP-1、TGF- β 1与免疫组织化学检测结果证明了 β -胡萝卜素对 S_0 - S_1 、 S_2 - S_4 期患者均有逆转肝纤维化的作用. β -胡萝卜素是vitA前体, 他不仅具有vitA逆转肝纤维化的作用, 而且我们的临床观察证实长期使用 β -胡萝卜素无任何不良反应, 他是一种很有前景的抗肝纤维化药物.

4 参考文献

- 1 陈骧, 徐世荣, 吴云鹏. 肝纤维化过程中血液动力学因素对肝星状细胞的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 185-191
- 2 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- 3 黄光存. 肝内维生素A类信号转导与肝纤维化. 国外医学·生理病理科学临床分册 2000; 20: 109-111
- 4 蔡卫民, 张彬彬. 慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2003; 11: 789-791
- 5 中华医学会肝病学分会. 脂肪肝和酒精性肝病学组酒精性肝病诊疗指南. 2008年消化及内镜学术交流会论文集汇编 2008: 12-14
- 6 葛宇黎, 孙慧伶, 雷水贤. 非酒精性脂肪性肝炎患者血清肝纤维化指标观察. 放射免疫学杂志 2009; 22: 23-25
- 7 Afdhal NH, Curry M. Technology evaluation: a critical step in the clinical utilization of novel diagnostic tests for liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46: 543-545
- 8 Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S79-S84
- 9 Lee KS. [Hepatic fibrogenesis] *Korean J Gastroenterol* 2006; 48: 297-305
- 10 Wardi J, Reifen R, Aeed H, Zadel L, Avni Y, Bruck R. Beta-carotene attenuates experimentally induced liver cirrhosis in rats. *Isr Med Assoc J* 2001; 3: 151-154
- 11 Yadav D, Hertan HI, Schweitzer P, Norkus EP, Pitchumoni CS. Serum and liver micronutrient antioxidants and serum oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2634-2639
- 12 Siems W, Salerno C, Crifò C, Sommerburg O, Wiswedel I. Beta-carotene degradation products - formation, toxicity and prevention of toxicity. *Forum Nutr* 2009; 61: 75-86
- 13 Floreani A, Baragiotta A, Martines D, Naccarato R, D'odorico A. Plasma antioxidant levels in chronic cholestatic liver diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 353-358
- 14 黄湛鏊. 肝纤维化的研究进展. 实用医学杂志 2004; 20: 717-718
- 15 Vitaglione P, Morisco F, Caporaso N, Fogliano V. Dietary antioxidant compounds and liver health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44: 575-586
- 16 艾永华, 但自力. 哌唑嗪长期给药对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的影响. 实用医学杂志 2008; 24: 723-725
- 17 Naves MM, Silveira ER, Dagli ML, Moreno FS. Effects of beta-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat(1). *J Nutr Biochem* 2001; 12: 685-692
- 18 潘越峻, 石裕明. 血清透明质酸和IV型胶原与肝纤维化病理的相关性分析. 实用医学杂志 2000; 16: 832-833
- 19 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor betar response and signaling during trandifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31:1049-1102.
- 20 Knook DL, Bosma A, Seifert WF. Role of vitamin A in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10 Suppl 1: S47-S49
- 21 Eboumbou C, Steghens JP, Abdallahi OM, Mirghani A, Gallian P, van Kappel A, Qurashi A, Gharib B, De Reggi M. Circulating markers of oxidative stress and liver fibrosis in Sudanese subjects at risk of schistosomiasis and hepatitis. *Acta Trop* 2005; 94: 99-106
- 22 李保森, 辛绍杰, 张双福, 邹正升, 毛远丽. 对几种肝

■同行评价

本文选题尚可, 具有较高的学术价值和临床应用价值.

- 纤维化诊断指标的评价. 中华实验和临床病毒学杂志 2000; 14: 289
- 23 舒欣, 徐启桓, 李刚, 姚集鲁. 慢性肝炎肝纤维化血清学指标与肝组织病理的相关性分析. 中山医科大学学报 2000; 21: 391-393, 396
- 24 张岱, 王念跃, 史玉领. 6项指标在肝纤维化评估中的临床应用. 临床检验杂志 2009; 27: 280-282
- 25 郑利平, 潘爱萍. 乙肝患者血清学标志物与肝纤维化的关系. 广东医学 2008; 29: 1143-1145
- 26 丁宁, 李岩. 转化生长因子 β -1和结缔组织生长因子在肝纤维化中的表达. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2521-2526
- 27 李招云, 李婉红, 王乐见. 肝病患者血清转化生长因子 β 1的检测及其意义. 实用医学杂志 2005; 21: 2646-2647
- 28 Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouvello AC, Huet S, Martinez V, Gauthier JM, Ba N, Sobesky R, Ratzu V, Bedossa P. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999; 30: 968-976
- 29 王念跃, 张岱, 杨成保. 血清结缔组织生长因子对慢性肝病的诊断价值. 临床检验杂志 2009; 27: 28-30
- 30 Si HF, Lv X, Guo A, Jiang H, Li J. Suppressive effect of leflunomide on rat hepatic stellate cell proliferation involves on PDGF-BB-elicited activation of three mitogen-activated protein kinases. *Cytokine* 2008; 42: 24-31

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医中药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

CTGF在肝细胞癌中的表达及作用

张瑞娟, 邹亚斌, 高润平, 张秀军, 朱杰

张瑞娟, 邹亚斌, 高润平, 张秀军, 朱杰, 吉林大学第一医院肝胆胰内科 吉林省长春市 130021
张瑞娟, 2010年吉林大学硕士毕业, 主要从事CTGF在肝癌生长和转移的调节研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30872236

作者贡献分布: 实验研究和论文初稿由张瑞娟完成; 实验设计、指导和论文定稿由高润平完成; 邹亚斌、张秀军及朱杰对实验工作给予大力协助。

通讯作者: 高润平, 教授, 130021, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林大学第一医院肝胆胰内科. gao_runping@yahoo.com

电话: 0431-88783929

收稿日期: 2010-06-29 修回日期: 2010-07-30

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-18

Expression and roles of connective tissue growth factor in human primary hepatocellular carcinoma

Rui-Juan Zhang, Ya-Bin Zou, Run-Ping Gao, Xiu-Jun Zhang, Jie Zhu

Rui-Juan Zhang, Ya-Bin Zou, Run-Ping Gao, Xiu-Jun Zhang, Jie Zhu, Department of Hepatic-Biliary-Pancreatic Medicine, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872236

Correspondence to: Professor Run-Ping Gao, Department of Hepatic-Biliary-Pancreatic Medicine, the First Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Avenue, Changchun 130021, Jilin Province, China. gao_runping@yahoo.com

Received: 2010-06-29 Revised: 2010-07-30

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To detect the expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in human hepatocellular carcinoma (HCC) and to elucidate its roles in the development of HCC *in vitro*.

METHODS: Liver samples from 36 HCC patients, who underwent hepatic resection, and 6 normal individuals were used to detect CTGF mRNA expression by *in situ* hybridization. Computer imaging analysis was performed to measure the integrated absorbance (IA) of CTGF mRNA-positive cells in carcinoma and surrounding stroma. The impact of CTGF on HepG2 cell migration and invasion was determined using commercial kits. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry.

RESULTS: *In situ* hybridization analysis showed a significance increase in CTGF mRNA expression that was mainly detected in connective tissue and blood vessels around carcinoma foci. Incubation of HepG2 cells with 100 ng/mL CTGF significantly promoted cell migration and invasion (both $P < 0.01$). Cell cycle analysis showed that addition of 100 ng/mL CTGF to HepG2 cell culture medium resulted in more cells progressing into S phase (10.94 ± 0.23 vs 23.85 ± 2.35 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: CTGF may play important roles in the development of HCC and is a potential novel therapeutic target for HCC.

Key Words: Connective tissue growth factor; Hepatocellular carcinoma; Hepatocellular carcinoma cell strain; Migration; Invasion; Cell cycle

Zhang RJ, Zou YB, Gao RP, Zhang XJ, Zhu J. Expression and roles of connective tissue growth factor in human primary hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2775-2779

摘要

目的: 探讨在细胞水平上结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)生长和转移中发挥的作用。

方法: 采用原位杂交技术检测36例HCC手术切除标本和6例正常肝组织中CTGF mRNA, 计算机图像分析系统测定癌灶及癌周基质CTGF mRNA阳性细胞的IA值, 试剂盒测定CTGF刺激肝癌细胞株HepG2细胞的迁移、侵袭力, 流式细胞仪测定HepG2细胞周期。

结果: 原位杂交结果显示CTGF mRNA主要在癌周结缔组织及动、静脉壁中表达。在细胞水平研究结果显示: 重组CTGF可明显提高HepG2细胞的迁移和侵袭力(均 $P < 0.01$); CTGF可使HepG2细胞周期中S期细胞数明显增加(10.94 ± 0.23 vs 23.85 ± 2.35 , $P < 0.01$)。

结论: CTGF在HCC生长和转移中发挥重要的

■背景资料

HCC通常是在慢性肝炎/肝硬化和增生性结节基础上演变而来, 而肝癌实质细胞的生长又依赖于其与基质的复杂联系。CTGF是一种富含半胱氨酸的细胞基质蛋白, 其对多种细胞发挥生物学作用, 包括促进细胞有丝分裂、增殖、黏附、迁移和促进ECM合成等, CTGF在体内参与血管再生、疤痕形成、器官纤维化、肿瘤生长等多种病理生理过程。目前, 有关CTGF在恶性肿瘤生长、转移过程中的调节作用受到人们的关注。

■同行评议者

单云峰, 副主任医师, 温州医学院附属第一医院肝胆外科

■相关报道

颜延启等研究报道HCC癌组织中CTGF的表达量明显高于癌周正常肝组织,推测CTGF与HCC的发生、发展有关。

作用,其有可能成为一个新的治疗靶点。

关键词: 结缔组织生长因子; 肝细胞癌; 肝癌细胞株; 迁移; 侵袭; 细胞周期

张瑞娟, 邹亚斌, 高润平, 张秀军, 朱杰. CTGF在肝细胞癌中的表达及作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2775-2779
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2775.asp>

0 引言

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种富含半胱氨酸的细胞基质蛋白^[1]. CTGF对多种细胞发挥生物学作用,包括促进细胞有丝分裂、增生、黏附、迁移和促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成等; CTGF在体内参与胚胎发育、分化,创伤愈合,疤痕形成,肿瘤生长等病理生理过程^[1,2]. 近年来,国内的研究发现,CTGF在人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中的表达量高于癌周正常肝组织,CTGF的高表达主要见于HCC晚期及具有静脉癌浸润的患者,初步认为CTGF与HCC的发生及转移有关^[3,4]. 本研究进一步明确CTGF在HCC癌组织及其周边结缔组织和血管的表达特点,并在人肝癌细胞株HepG2细胞水平上探讨CTGF在肝癌细胞迁移、侵袭和增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 36例HCC手术切除标本来自于2006-05/2009-06吉林大学第一医院,其中男26例,女10例,年龄27-71(平均 56.4 ± 14.2)岁. 依据Pittsburgh改良TNM分类标准,36例HCC包括小肝癌20例,孤立性大肝癌10例,结节性肝癌6例. 6例正常肝组织分别取自于肝海绵状血管瘤肝部分切除后远离瘤体的肝组织,其中男3例,女3例,年龄31-58(平均 44.5 ± 13.1)岁. 组织块经常规石蜡包埋,切片厚度为6 μm . 肝癌细胞株HepG2购自中南大学湘雅医学院细胞室. 人CTGF mRNA原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德公司,重组人CTGF购自以色列Prospec-Tany公司. 96孔细胞培养板购自美国Costa Corning公司,12孔细胞迁移试剂盒购自美国Millipore公司. 24孔细胞浸润ECM550试剂盒购自美国Chemicon公司. 高倍显微镜(Olympus DP72, 日本),计算机图像分析系统(Image Proplus 6.0, USA),流式细胞仪(美国BD公司).

1.2 方法

1.2.1 HCC组织的HE染色: 石蜡切片经常规脱蜡

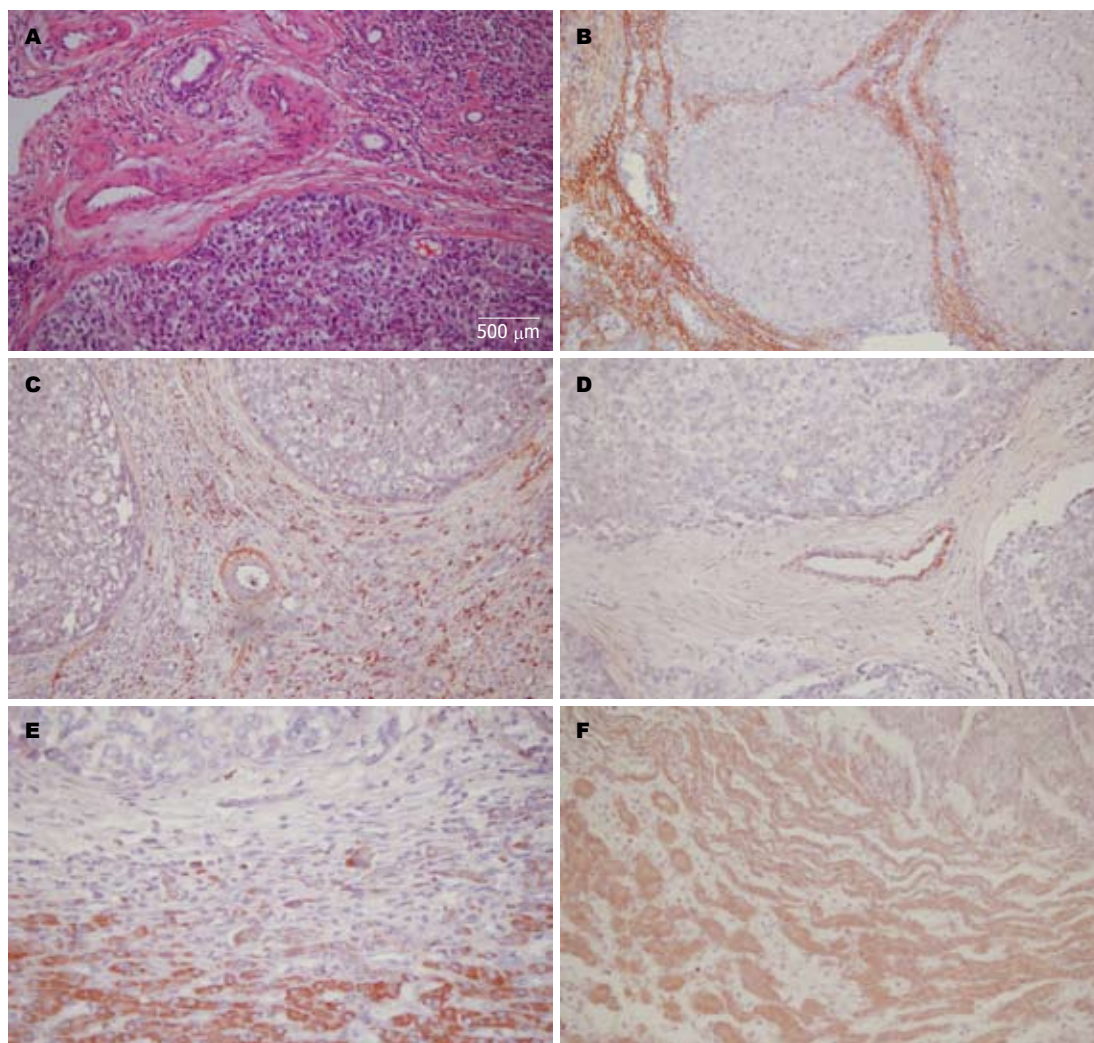
至水,苏木精染色2 min,自来水洗5 min,盐酸酒精分化数秒,自来水洗5 min,伊红染色5 min,水洗2次,梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封固.

1.2.2 原位杂交检测CTGF mRNA: 采用多项寡核苷酸探针和高敏感标记技术检测人肝组织CTGF mRNA. 主要步骤:切片脱蜡,3%柠檬酸胃蛋白酶37 $^{\circ}\text{C}$ 消化10 min;多聚甲醛室温固定10 min;42 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交2 h;42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜;次日依次于37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭30 min;生物素化鼠抗地高辛室温60 min,链霉亲和素-生物素复合物20 min及生物素化过氧化物酶20 min;AEC显色10 min,以着红色者为阳性,苏木素复染,水性封胶封片. 采用计算机图像分析系统Image ProPlus 6.0,随机对每张切片中10个400 \times 视野CTGF mRNA阳性细胞进行测定,计算其平均积分吸光度值(integrated optical density, I4). 6例正常肝组织作为对照.

1.2.3 CTGF对HepG2细胞迁移作用的检测: 用含1 mmol/L EDTA的PBS预处理75 cm^2 培养瓶使细胞分离,收集HepG2细胞,用DMEM将HepG2细胞浓度调至 $6 \times 10^4/\text{mL}$;取细胞悬液500 μL 分别置于插入式细胞培养的每个小室,并将其放入相匹配的12孔培养板,下室内加入相同培养基500 μL ,在下室内分别加入不同含量的CTGF,对照组加入等体积的PBS,CO₂培养箱培养6 h. 弃掉DMEM,100%甲醇固定5 min,迈格吉染液染色,甘油封片. 随机选择10个400 \times 的视野,计数上室筛网底面和上面的细胞数. 细胞迁移率 = 筛网底面的细胞数/筛网两面细胞总数 $\times 100\%$.

1.2.4 CTGF对HepG2细胞侵袭作用的检测: 将24孔细胞浸润ECM 550试剂盒置于CO₂培养箱预温,加300 μL 预温的DMEM至小室内,室温放置2 h使小室底部ECM湿化. 按上述方法分离、收集HepG2细胞,将细胞浓度调制 $5 \times 10^4/\text{mL}$. 弃掉湿化DMEM,加500 μL DMEM至下室,取300 μL 细胞悬液加至每个小室. 实验组取100 $\mu\text{g/L}$ CTGF加至相应的下室,对照组加入等量的PBS,于CO₂培养箱中培养24 h;弃去培养基,用PBS漂洗细胞;100%甲醇固定5 min;把上室浸入到500 μL 染色液中15 min;在烧杯中漂洗上室,取下筛网,放置玻片上,甘油封片,显微镜下计数. 细胞侵袭率 = 筛网底面的细胞数/筛网两面细胞总数 $\times 100\%$.

1.2.5 CTGF对HepG2细胞周期进程作用的检测: 常规消化、收集细胞,用含100 mL/L胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM将细胞浓度



■创新盘点

本研究采用原位杂交技术检测CTGF mRNA在HCC癌灶、癌灶周围基质的表达,与正常肝组织对照阐明了CTGF在HCC组织学的分布特征,首次在HepG2细胞水平上明确CTGF对肝癌实质细胞增殖、迁移、浸润的作用。

图1 CTGF mRNA在HCC中的表达($\times 200$)。A: HCC的HE染色; B-F: HCC原位杂交; B, C: 癌周结缔组织; C, D: 癌周动静脉壁; E, F: 癌周EMT过度细胞。

调至 $1.0 \times 10^5/\text{mL}$; 各取2 mL细胞悬液分别加入6孔板中的每个孔中, 每组为3孔, CO_2 培养箱中培养12 h, 换用含5 mL/L FBS的DMEM, 培养12 h; 重新换用5 mL/L FBS的DMEM, 实验组加入CTGF(100 $\mu\text{g/L}$), 对照组加入等体积的PBS, 继续培养24 h。常规消化, 收集并洗涤细胞; 70%的乙醇固定细胞, 4°C 保存, 待测。细胞周期检测前, 将细胞离心, 弃固定液; 3 mL PBS重悬, 震荡均匀, 加入终浓度为50 mg/L的RNase, 37°C 温浴45 min, 冰浴1 min; 加入终浓度为50 mg/L的PI, 于 4°C 避光染色30 min; 流式细胞仪检测, 汞激发波长为488 nm; 获取数据, 分析。

统计学处理 实验数据统计采用SPSS13.0软件分析, 实验数据采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 CTGF mRNA在HCC中的表达

HE染色于

光学显微镜下HCC呈多灶性分布, 癌灶周边被基质(结缔组织和血管)分隔或包绕(图1A)。原位杂交显示CTGF mRNA阳性细胞主要分布在癌周结缔组织(图1B, C)及其中的动、静脉壁内(图1C, D)。在12例(33.3%)HCC癌灶周边检测到CTGF mRNA在上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的过渡细胞表达(图1E, F), 提示在部分HCC患者CTGF可能通过参与EMT过程, 进而促进癌周基质的形成。通过计算机图像分析系统对CTGF mRNA阳性信号IA值分析结果显示: CTGF mRNA在癌灶及癌周基质表达水平均明显高于正常对照(12.36 ± 3.08 , 60.27 ± 28.71 vs 6.42 ± 2.35 , $P < 0.01$), 而癌周基质CTGF mRNA的表达水平又明显高于癌灶的水平。

2.2 CTGF可诱导HepG2细胞迁移 为明确CTGF在HCC癌周高表达的生物学作用, 在细胞水平上检测了重组CTGF对HepG2细胞迁移的作用。

■应用要点

本研究结果显示CTGF在肝癌实质细胞的增殖、转移及基质血管形成发挥重要的调节作用,提示CTGF有可能成为抗HCC的生物学治疗的新靶点。

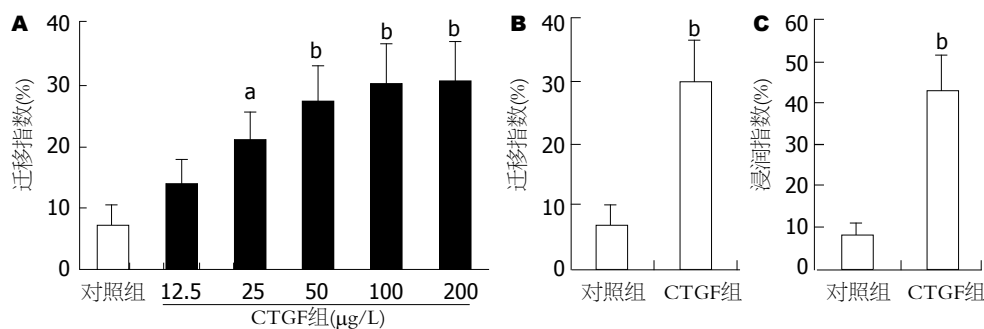


图2 在细胞水平上检测重组CTGF对HepG2细胞迁移和侵袭的作用。A: 不同浓度CTGF对HepG2细胞迁移的影响; B: 100 µg/L CTGF可明显刺激HepG2细胞迁移; C: 100 µg/L CTGF可明显诱导HepG2细胞侵袭。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

表1 CTGF对HepG2细胞周期进程的影响 (mean ± SD)

分组	细胞周期		
	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M
对照组	53.56 ± 2.51	10.94 ± 0.23	34.17 ± 1.29
CTGF组	41.01 ± 4.45 ^b	23.85 ± 2.35 ^b	34.14 ± 1.57

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

CTGF在诱导HepG2细胞通过上室底部微孔的迁移能力呈剂量依赖性, 100 µg/L CTGF是诱导HepG2迁移的最佳浓度(图2A)。与对照组比CTGF可明显提高HepG2细胞的迁移力($P < 0.01$, 图2B)。

2.3 CTGF可提高HepG2细胞的侵袭力 恶性肿瘤细胞侵袭突破ECM构成的屏障是其转移的重要步骤。为明确CTGF是否具有诱导HepG2细胞的侵袭作用, 本研究在细胞迁移实验基础上, 使用覆盖一薄层ECM于上室底部微孔的细胞浸润ECM 550试剂盒进行了细胞侵袭实验。结果显示: HepG2细胞具有基础低水平的侵袭力, CTGF可明显提高HepG2细胞的侵袭力($P < 0.01$, 图2C)。

2.4 CTGF对HepG2细胞周期进程的影响 与对照组比, CTGF可使HepG2细胞G₀-G₁期细胞数明显减少, 而反映DNA合成的S期细胞数明显增加($P < 0.01$, 表1), 结果表明CTGF具有促进HepG2细胞周期进程的作用。

3 讨论

HCC由肿瘤实质和基质构成, 肿瘤实质为肝癌细胞, 基质由结缔组织、血管和神经组成。由于HCC的发生通常经历一个由正常肝脏至慢性肝炎/肝硬化和增生性结节再到肝癌的过程, 肝癌实质细胞的生长依赖于肿瘤与基质之间的复杂联系, 肝癌实质细胞周围组织微环境成分, 包括ECM蛋白和各种生长因子, 他们在HCC细胞生

长过程中起着重要的调节作用^[5,6]。此外, HCC是一种富含血管的实体肿瘤, 血管生成通过提供营养物质和氧气对肝癌细胞的生长发挥重要的作用^[7]。CTGF参与体内多种病理生理过程, 其中包括纤维疤痕形成, 血管再生, 肿瘤生长等^[2,3,8]。近年来, 国内外的研究表明: CTGF的表达与多种肿瘤(包括胰腺癌和HCC等)的不良预后有关^[3,4,9]。颜延启等^[4]研究报道HCC癌组织中CTGF的表达量明显高于癌周正常肝组织, 推测CTGF与HCC的发生、发展有关。本研究结果显示CTGF mRNA在HCC组织中的表达明显高于正常肝组织, 癌周结缔组织, 动、静脉壁内的表达明显高于癌灶内的表达, 由此可见CTGF参与HCC癌周结缔组织及血管的形成, 在HCC的生长过程中发挥调节作用。

近年来的研究表明EMT是胚胎发育的一个重要过程, 人体的许多病理过程, 如伤口愈合, 组织纤维化及肿瘤进展亦存在EMT现象。细胞的EMT过程受到许多生长因子EGF, PDGF, TGF-β和ECM等的调节, EMT对良性肿瘤的恶性变过程起着重要的作用^[10]。在恶性肿瘤进展过程中, EMT不只针对癌细胞, 在肿瘤微环境内部的部分癌相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast, CAF)亦可从正常上皮细胞转化而来^[10]。Van Zijl等^[11]报道在实验性动物和人类HCC存在EMT现象, 部分EMT与胚胎发育程序相似, TGF-β信号通路参与EMT的过程。本研究有1/3的HCC患者癌灶周边检测到CTGF mRNA阳性EMT现象, 由此认为CTGF通过调节HCC患者EMT过程, 促进HCC基质形成和肿瘤生长。

迁移是细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质浓度梯度产生的移动, 与创伤愈合、免疫、感染和恶性肿瘤转移等病理生理过程有关; 侵袭是恶性肿瘤细胞突破基底膜从原始部位向周围组织进攻的过程, 肿瘤细胞与ECM

蛋白结合, 产生基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs), 降解基底膜和基质而实现细胞运动, 因此, 肿瘤细胞的迁移和侵袭与肿瘤转移密切相关^[12,13]. 小鼠乳腺癌与胰腺癌模型证明了CTGF具有促进癌细胞增殖、侵袭、转移的作用, 相反, 通过中和性抗体拮抗CTGF却明显抑制肿瘤的转移^[14,15]. 近来, 在一项异种移植的HCC动物模型的研究中显示TGF- β 抑制剂Ly2109761可抑制CTGF的合成和释放, 并且减少肿瘤基质的合成, 进而减低肿瘤生长, 侵袭和转移^[6]. 本研究结果显示CTGF可明显刺激肝癌细胞株HepG2细胞迁移、侵袭和细胞周期进程, 结合CTGF在HCC癌灶周围结缔组织及血管壁高表达的特征, 提示CTGF在HCC生长和转移过程中发挥重要的作用, CTGF有可能成为抗HCC的生物学治疗的新靶点.

4 参考文献

- 1 Chen CC, Lau LF. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 771-783
- 2 Brigstock DR. Strategies for blocking the fibrogenic actions of connective tissue growth factor (CCN2): From pharmacological inhibition in vitro to targeted siRNA therapy in vivo. *J Cell Commun Signal* 2009; 3: 5-18
- 3 Zeng ZJ, Yang LY, Ding X, Wang W. Expressions of cysteine-rich61, connective tissue growth factor and Nov genes in hepatocellular carcinoma and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3414-3418
- 4 颜延启, 易继林, 杨志芳, 沈文状, 刘峰, 朱志. CTGF和VEGF在肝癌中的表达及相关性研究. *临床外科杂志* 2009; 17: 394-395
- 5 Wong CM, Ng IO. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2008; 28: 160-174
- 6 Mazzocca A, Fransvea E, Dituri F, Lupo L, Antonaci S, Giannelli G. Down-regulation of connective tissue growth factor by inhibition of transforming growth factor beta blocks the tumor-stroma crosstalk and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 51: 523-534
- 7 Yang ZF, Poon RT. Vascular changes in hepatocellular carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)* 2008; 291: 721-734
- 8 Chu CY, Chang CC, Prakash E, Kuo ML. Connective tissue growth factor (CTGF) and cancer progression. *J Biomed Sci* 2008; 15: 675-685
- 9 Bennewith KL, Huang X, Ham CM, Graves EE, Erler JT, Kambham N, Feazell J, Yang GP, Koong A, Giaccia AJ. The role of tumor cell-derived connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in pancreatic tumor growth. *Cancer Res* 2009; 69: 775-784
- 10 Gos M, Miłoszewska J, Przybyszewska M. [Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression] *Postepy Biochem* 2009; 55: 121-128
- 11 van Zijl F, Zulehner G, Petz M, Schneller D, Kornauth C, Hau M, Machat G, Grubinger M, Huber H, Mikulits W. Epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Future Oncol* 2009; 5: 1169-1179
- 12 Tian T, Nan KJ, Guo H, Wang WJ, Ruan ZP, Wang SH, Liang X, Lu CX. PTEN inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by coordinately decreasing MMP expression via the PI3K/Akt pathway. *Oncol Rep* 2010; 23: 1593-1600
- 13 Chen PS, Wang MY, Wu SN, Su JL, Hong CC, Chuang SE, Chen MW, Hua KT, Wu YL, Cha ST, Babu MS, Chen CN, Lee PH, Chang KJ, Kuo ML. CTGF enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- α v β 3-ERK1/2-dependent S100A4-upregulated pathway. *J Cell Sci* 2007; 120: 2053-2065
- 14 Shimo T, Kubota S, Yoshioka N, Ibaragi S, Isowa S, Eguchi T, Sasaki A, Takigawa M. Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 1045-1059
- 15 Aikawa T, Gunn J, Spong SM, Klaus SJ, Korc M. Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth, metastasis, and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1108-1116

■同行评价

本文方法新颖, 论据充分, 结论可靠, 具有一定的学术价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

谷胱甘肽转硫酶基因多态性与浙江汉族溃疡性结肠炎易感性的相关性

吴昊, 郑波, 王建璋, 裴继华, 姜丽娜, 薛战雄

■背景资料

近年来UC在国内的发病率逐年升高, 由于病因不明, 临床治疗效果不佳, 患者病情常反复发作, 迁延不愈。因此对UC发病机制的研究日益受到国内外学者的重视。GSTs是人体重要的毒物代谢酶之一, 此酶的活性高低将直接影响人体对多种毒性物质的清除。而GSTs的活性是由其遗传基因多态性所决定的, 因此探讨GSTs基因多态性与UC患者易感性的关系, 将会对揭示UC的发病机制提供重要的遗传学依据。

■同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心; 白爱平, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

吴昊, 郑波, 王建璋, 裴继华, 姜丽娜, 薛战雄, 温州医学院附属第二医院消化内科 浙江省温州市 325027

吴昊, 在读硕士, 主要从事炎症性肠病基因多态性方面的研究。

温州市科技局基金资助项目, No. Y20080110

作者贡献分布: 此课题由薛战雄与吴昊设计; 标本收集登记工作由郑波完成; 实验室检测由王建璋完成; 数据统计与分析由裴继华与姜丽娜完成; 论文写作由吴昊完成。

通讯作者: 薛战雄, 主任医师, 325027, 浙江省温州市学院西路109号, 温州医学院附属第二医院消化内科。

xuezhanchong@163.com

电话: 0577-88830819

收稿日期: 2010-06-29 修回日期: 2010-08-22

接受日期: 2010-08-27 在线出版日期: 2010-09-18

Relationship between genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to ulcerative colitis in Zhejiang Han population

Hao Wu, Bo Zheng, Jian-Zhang Wang, Ji-Hua Pei, Li-Na Jiang, Zhan-Xiong Xue

Hao Wu, Bo Zheng, Jian-Zhang Wang, Ji-Hua Pei, Li-Na Jiang, Zhan-Xiong Xue, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China

Supported by: the Foundation of Wenzhou Science and Technology Commission, No. Y20080110

Correspondence to: Zhan-Xiong Xue, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. xuezhanchong@163.com

Received: 2010-06-29 Revised: 2010-08-22

Accepted: 2010-08-27 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To investigate the association between the genetic polymorphisms of glutathione S-transferases (GSTs) genes and susceptibility to ulcerative colitis (UC) in Zhejiang Han population.

METHODS: A total of 252 patients with UC were collected from the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College and other large general hospitals in Wenzhou City. The control group was composed of 578 healthy volunteers. PCR was used to examine the prevalence of GST (M1, T1, P1) gene polymor-

phisms in these subjects.

RESULTS: The frequencies of GSTM1 (-), GSTT1 (-) and GSTP1 (VaL/VaL) were significantly higher in UC patients than in controls (69.45% vs 46.30%, $P = 0.0003$; 61.51% vs 51.39%, $P = 0.007$; 48.81% vs 34.61%, $P < 0.0001$). A further observation was made on the UC patients according to the clinical features. The frequencies of GSTT1 (-) and GSTP1 (VaL/VaL) genotypes were higher in patients with distal colitis than in those with extensive colitis ($P = 0.0001$ and 0.001). However, the same result was not observed for GSTM1 (-) genotype ($P = 0.108$). In addition, the variant genotypes of GST (M1, T1, P1) were not significantly linked to the severity of the disease (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The GST (M1, T1, P1) variant genotypes are obviously correlated with the development of UC in Zhejiang Han population.

Key Words: Glutathione-S-transferase; Genetic polymorphism; Ulcerative colitis; Susceptibility

Wu H, Zheng B, Wang JZ, Pei JH, Jiang LN, Xue ZX. Relationship between genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes and susceptibility to ulcerative colitis in Zhejiang Han population. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2780-2784

摘要

目的: 探讨谷胱甘肽转硫酶(GSTs)基因多态性与浙江汉族溃疡性结肠炎(UC)易感性的关系。

方法: 选取浙江省温州医学院附属第二医院和温州市其他大型综合性医院UC患者252例, 对照组共578例, 系同期温州医学院附属第二医院体检中心的健康体检者。采用聚合酶链反应技术检测GST(M1、T1、P1)基因多态性在UC患者和正常对照者之间的分布差异。

结果: UC患者中GSTM1(-)、GSTT1(-)和GSTP1(VaL/VaL)基因型频率明显高于正常对照组(69.45% vs 46.30%, $P = 0.0003$; 61.51%

vs 51.39%, $P = 0.007$; 48.81% vs 34.61%, $P < 0.0001$). 进一步根据UC临床症状分层分析, 在远端结肠炎患者中GSTT1(-)、GSTP1(VaL/VaL)基因型的分布频率高于广泛性结肠炎患者($P = 0.0001$, $P = 0.001$); 而GSTM1(-)基因型与UC的病变部位无相关性($P = 0.108$). 并且GST(M1、T1、P1)突变基因型与UC患者病情严重程度无关(均 $P > 0.05$).

结论: GST(M1、T1、P1)基因突变与浙江汉族UC明显相关.

关键词: 谷胱甘肽转硫酶; 基因型; 溃疡性结肠炎; 易感性

吴昊, 郑波, 王建峰, 裴继华, 姜丽娜, 薛战雄. 谷胱甘肽转硫酶基因多态性与浙江汉族溃疡性结肠炎易感性的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2780-2784
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2780.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)两种临床亚型, 肠黏膜的慢性非特异性炎症为其病理组织学的共同表现. 目前认为UC的发病机制涉及遗传、环境、免疫、肠黏膜防御功能等因素的综合作用, 而遗传免疫因素对IBD的影响尤为肯定. 而且UC属于癌前病变, 其发生大肠癌的危险性与病变范围和疾病持续时间明确相关. 谷胱甘肽转硫酶(glutathione S-transferases, GSTs)是机体内重要的Ⅱ相代谢酶之一, 在肝脏、生殖腺及结肠中有较高表达. GSTs能催化Ⅰ相代谢过程产生的有毒致癌物与谷胱甘肽(glutathione, GSH)巯基(sulfhydryl group, -SH)共轭结合, 最终以亲水性结合物的形式排出体外, 从而实现机体对毒性致癌物的解毒作用. 现研究表明GSTs基因突变使机体发生多种肿瘤的易感性增加, 但至今鲜见在同一种族人群中同时研究GST(M1、T1、P1)3个基因位点多态性与UC之间相互关系的报道. 本研究收集252例浙江汉族UC患者和578例正常对照者, 同时检测GST(M1、T1、P1)基因多态性, 旨在探讨GSTs基因多态性与UC易感性的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 252例UC患者来自浙江省温州医学院附属第二医院和温州市其他大型综合性医院, 其中男140例, 女112例, 平均年龄(44.4±15.6)岁.

经临床、实验室、放射影像学、内镜及组织学检查结果综合确立UC诊断^[1]. 根据病变范围将UC患者分为: 远端结肠炎组(病变不超过结肠脾曲)187例; 广泛结肠炎组(病变超过结肠脾曲)65例. 并根据病变严重程度将UC患者分为两组: (轻度+中度)组190例, 重度组62例. 对照组共578例, 系同期温州医学院附属第二医院体检中心的健康体检者, 其中男317例, 女261例, 平均年龄(45.6±17.2)岁. 全部研究对象均为无血缘关系的浙江汉族人.

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取: 取空腹静脉血5 mL, EDTA抗凝, 蛋白酶K消化, 苯酚/氯仿法抽提DNA, -20℃冰箱保存备用.

1.2.2 GST(M1、T1、P1)基因多态性检测: (1)采用PCR技术扩增GST(M1、T1、P1)目的基因. 参照文献设计引物^[2,3], 引物由上海生物工程有限公司合成. 序列如下: GSTM1上游5'-GCTTCACGTGTTATGGAGGTTTC-3'; 下游5'-GAGATGAAGTCCTCCAGATTT-3'. GSTT1上游5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'; 下游5'-TTCCTTACTTGGTCCTCACATCTC-3'. GSTP1上游5'-GTAGTTTGCACAAGGTCAAG-3'; 下游5'-ACAAACCTGAGGGGTAAG-3'. (2)PCR反应条件: GST(M1、T1)总反应体系50 μL, 含灭菌双蒸水30 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL, 10×Buffer 10 μL, MgCl₂(25 mmol/L)2.5 μL, dNTPs(10 mmol/L)2 μL, Taq酶(1 U/μL)2.5 μL, 模板DNA(约40 ng/μL)1 μL. GSTP1总反应体系25 μL, 含灭菌双蒸水10.5 μL, 上、下游引物(10 pmol/μL)各1 μL, 10×Buffer 5 μL, MgCl₂(25mmol/L)2.5 μL, dNTPs(10 mmol/L)1.5 μL, Taq酶(1 U/μL)2.5 μL, 模板DNA(约40 ng/μL)1 μL. 酶切体系: PCR反应产物10 μL(0.1-0.5 μg DNA), 去离子水18 μL, 10×Buffer 2 μL, BsmA I限制性内切酶(MBI Fermentas, 美国)1-2 μL, 37℃水浴1-16 h. (3)GSTs基因型判定: GSTM1、GSTT1扩增产物用2.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 长度分别为157、480 bp. 若出现157 bp片段和480 bp片段, 分别为GSTM1(+)和GSTT1(+), 而无相应的扩增产物者则为纯合子基因缺失, 分别为GSTM1(-)和GSTT1(-). GSTP1酶切产物用2.5%琼脂糖凝胶电泳检测. 若酶切产物含329、113 bp两个片段, 则为ILe/ILe基因型(野生型); 若酶切产物含329、216、113 bp 3个片段, 则为ILe/VaL基因型

■研究前沿

单核苷酸多态性(SNP)与UC易感性的研究一直是国内外学者研究的重点和热点. 至今有关GSTs基因多态性与疾病相关性的研究主要集中在肿瘤领域, 鲜见GSTs基因多态性与IBD易感性的研究报道.

■创新盘点

本研究首次在浙江汉族人群和UC患者中同时检测GST(M1、T1、P1)3种SNP的分布差异,并探讨GST基因多态性与UC亚临床特征的关系,这将为揭示UC的遗传易感性提供一定的理论依据。

表 1 GST(M1、T1)基因多态性在UC组和正常对照组之间的分布比较 $n(\%)$

分组	n	GSTM1		GSTT1	
		(+)	(-)	(+)	(-)
对照组	578	310(53.70)	318(46.30)	281(48.61)	297(51.39)
UC组	252	77(30.55)	175(69.45)	97(38.49)	155(61.51)
临床特征					
远端结肠炎	187	52(27.81)	135(72.19)	53(28.34)	134(71.66)
广泛性结肠炎	65	25(38.46)	40(61.54)	44(67.69)	21(32.31)
(轻+中)度	190	56(40.51)	134(59.49)	75(39.47)	115(60.53)
重度	62	21(33.33)	41(66.67)	22(35.48)	40(64.52)

表 2 GSTP1基因多态性在UC组和正常对照组之间的分布比较 $n(\%)$

分组	n	GSTP1		
		ILe/ILe	ILe/VaL	VaL/VaL
对照组	578	234(40.48)	144(24.91)	200(34.61)
UC组	252	60(23.81)	69(27.38)	123(48.81)
临床特征				
远端结肠炎	187	40(21.39)	44(23.53)	103(55.08)
广泛性结肠炎	65	20(30.77)	25(38.46)	20(30.77)
(轻+中)度	190	43(22.63)	57(30.0)	90(47.37)
重度	62	17(27.42)	12(19.35)	33(53.23)

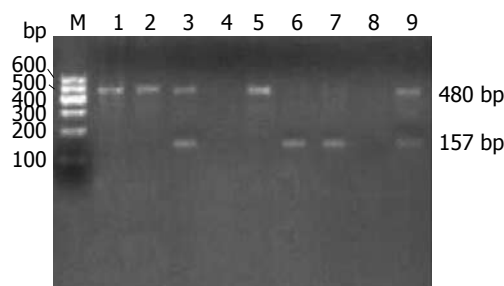


图 1 GSTM1、T1电泳结果. 1, 2, 5, 9: GSTT1(+); 3, 6, 7: GSTM1(+); 4: GSTM1(-); 8: GSTT1(-).

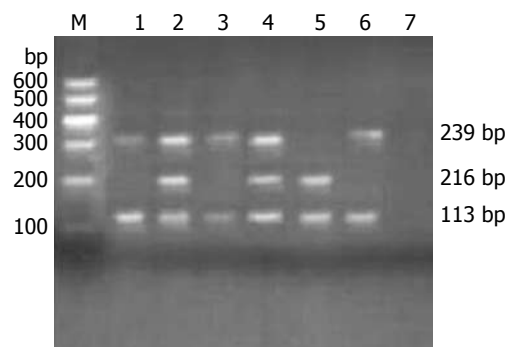


图 2 GSTP1电泳结果. 1, 3, 6: ILe/ILe; 2, 4: ILe/VaL; 5: VaL/VaL; 7: 空白.

(杂合突变型);若酶切产物含216、113 bp两片段,则为VaL/VaL基因型(纯合子突变型)。

统计学处理 计数资料采用 χ^2 检验,计算OR值和95%可信区间, $P < 0.05$ 有显著性差异. 所有数据输入SPSS13.0统计软件包。

2 结果

2.1 GSTM1、T1基因型及GSTP1基因型 GSTM1、T1基因型如图1所示: 1、2、5、9: GSTT1(+); 3、6、7: GSTM1(+); 4: GSTM1(-); 8: GSTT1(-). GSTP1基因型如图2所示: 1、3、6: ILe/ILe; 2、4: ILe/VaL; 5: VaL/VaL; 7: 空白。

2.2 GSTs基因多态性在UC患者和正常对照组之间的分布比较 GSTM1(-)、GSTT1(-)和突变的

GSTP1(VaL/VaL)基因型频率在UC患者中明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P = 0.0003$, $OR = 2.216$, 95%CI: 1.624-3.022; $P = 0.007$, $OR = 1.512$, 95%CI: 1.118-2.044; $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $OR = 3.009$, 95%CI: 1.650-5.490, 表1, 2)。

2.3 GSTs基因多态性与UC患者临床症状的关系 根据UC临床特征进一步分层分析发现, GSTT1(-)、GSTP1(VaL/VaL)基因型在远端结肠炎患者中的分布频率高于广泛结肠炎,差异有统计学意义($P = 0.0001$, $OR = 5.297$, 95%CI: 2.880-9.744; $P = 0.001$, $OR = 2.759$, 95%CI: 1.514-5.029);而GSTM1(-)基因型与UC的病

变部位无统计学关联($P = 0.108$, $OR = 0.616$, $95\%CI: 0.340-1.115$). GSTM1(-)、GSTT1(-)和GSTP1(VaL/VaL)基因型与UC患者病情严重程度无关(均 $P > 0.05$, 表1, 2).

3 讨论

GSTs在人体中的解毒作用取决于酶活性的高低, 而GSTs的活性是由其基因多态性所决定的. 在不同人群中, GSTs基因多态性导致体内GSTs对毒性代谢产物的清除能力产生差异, 使人体对多种疾病的易感性发生改变, 特别是肿瘤^[4]. 目前已证实GSTs α (GSTA)、GSTs μ (GSTM)、GSTs π (GSTP)均具有遗传多态性^[5]. 人类编码GSTs的基因容易产生缺失, 表现为GSTs空白基因型[GSTM1(-), GSTT1(-)], 个体如果携带这些空白基因型, 相应的GSTs蛋白不能在其肝脏中表达, 使个体对多种毒性物质的解毒能力减低, 导致各种毒物代谢相关性疾病发生的危险性增加.

GSTM1基因有3种等位基因: GSTM1A、GSTM1B、GSTM10(空白GSTM1等位基因), 由GSTM1A、GSTM1B等位基因编码的蛋白质只有单个氨基酸的差异, 且两者所表达的酶活性相似; 而GSTM10等位基因表达产物在体内无催化活性^[6]. 研究发现不同种族之间, 空白GSTM1基因型频率为22%-62%^[7]. 流行病学调查显示GSTM1基因突变与多种肿瘤的发生存在相关性, 如多发性皮肤肿瘤^[8]、绝经后乳腺癌^[9]、直肠癌肿瘤^[10]、头颈部肿瘤^[11]等, 尤其是与膀胱癌和肺癌关系密切^[12,13]. GSTM1基因表达产物主要在致癌性多环芳香族碳氢化合物和环氧化物的解毒方面具有重要作用^[14].

GSTT1酶在人体内主要促进烟草中所含毒物的代谢, 如甲烷、氧化乙烯等. 研究发现空白GSTT1基因型在不同种族人群的分布频率中为12%-62%^[15,16]. 空白GSTT1纯合子基因型携带者体内的所有组织缺乏GSTT1酶, 因此增加人体对某些疾病的易感性, 如少突神经胶质细胞瘤^[17]、脑脊髓膜瘤和星型细胞瘤^[18]以及大肠癌^[19]和肺癌^[14].

目前已经确定GSTP1基因位于11q13, 全长约3 kb, 由6个内含子和7个外显子组成. Watson等^[20]研究报道白种人群中的GSTP1基因型突变率约为50%. 国外有关GSTP1基因型与疾病相关性的研究报道, 突变型GSTP1基因与急性白血病^[21]、隐源性肝硬化^[22]、卵巢癌^[23]、子宫颈癌^[24]等相

关, 并且通过干预化疗药物在体内的代谢而影响患者的预后及存活率.

本研究发现在中国浙江正常汉族人群中, GST(M1、T1)空白基因型突变率和GSTP1(VaL/VaL)基因型携带率分别为46.30%、51.39%和34.61%, 与上述研究结果相近. 而GST(M1、T1)空白基因型频率和GSTP1(VaL/VaL)基因型携带率在汉族UC患者中则明显增高, 分别达到69.45%、61.51%和48.81%. 经统计分析, 发现GSTM1和GSTT1空白基因型以及突变的GSTP1基因型频率在UC患者中均明显增高. 进一步根据患者临床特征对UC组进行分层分析发现, GSTT1(-)及GSTP1(VaL/VaL)基因型在远端UC患者中的分布频率均显著高于广泛结肠炎患者, 而GSTM1(-)基因型与UC的病变部位无关. 并且GSTM1(-)和GSTT1(-)基因型与UC患者病情严重程度无关. 我们的研究结果显示携带GSTM1(-)、GSTT1(-)或GSTP1(VaL/VaL)基因型的个体其罹患UC的易感性增加, 这提示GSTs基因可能是浙江汉族人群UC的易感基因.

理论上, 由于人类编码GSTs的基因容易产生缺失, 当个体携带GSTs空白或突变基因型时, 相应的GSTs蛋白在人体内不能表达或表达降低, 使体内GSTs酶水平下降, 引起机体对毒性代谢产物的清除障碍, 毒性物质的过量蓄积, 加上其他诱发因素(如DNA损伤加重且修复功能降低), 共同诱发肠道异常免疫反应, 造成对结肠黏膜的不可逆损伤, 最终导致UC发生.

4 参考文献

- 1 欧阳钦, 潘国宗, 温忠慧, 万学红, 胡仁伟, 林三仁, 胡品津. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 中华消化杂志 2001; 21: 236-239
- 2 Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1159-1164
- 3 Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300 (Pt 1): 271-276
- 4 Curran JE, Weinstein SR, Griffiths LR. Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility. *Cancer Lett* 2000; 153: 113-120
- 5 Hirvonen A. Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ Health Perspect* 1999; 107 Suppl 1: 37-47
- 6 Pinarbasi H, Silig Y, Gurelik M. Genetic polymorphisms of GSTs and their association with primary brain tumor incidence. *Cancer Genet Cytogenet* 2005;

■应用要点

本文分析了GSTs基因多态性在浙江人群UC中的分布, 弥补了国内IBD研究在这一领域的空白, 同时对国内汉族人群IBD易感基因的研究产生深远影响.

■同行评价

本文设计合理, 科学性、创新性和可读性较好。

- 156: 144-149
- 7 Rebeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 733-743
- 8 Lear J, Heagerty A, Smith A, Bowers B, Jones P, Gilford J, Aldersea J, Fryer A, Strange R. Polymorphism in detoxifying enzymes and susceptibility to skin cancer. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 424-428
- 9 Helzlsouer KJ, Selmin O, Huang HY, Strickland PT, Hoffman S, Alberg AJ, Watson M, Comstock GW, Bell D. Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 512-518
- 10 Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 1993; 14: 1821-1824
- 11 Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR, Briggs KL, Goepfert H. Glutathione s-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg* 1995; 170: 499-501
- 12 Pinarbasi H, Silig Y, Cetinkaya O, Seyfikli Z, Pinarbasi E. Strong association between the GSTM1-null genotype and lung cancer in a Turkish population. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 146: 125-129
- 13 D'errico A, Taioli E, Chen X, Vineis P. Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of the literature. *Biomarkers* 1996; 1: 149-173
- 14 Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, OGREID D, Ulvik A, Vu P, Haugen A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1285-1289
- 15 Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M, Xu X. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1243-1245
- 16 Lee EJ, Wong JY, Yeoh PN, Gong NH. Glutathione S transferase-theta (GSTT1) genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 332-334
- 17 Kelsey KT, Wrensch M, Zuo ZF, Miike R, Wiencke JK. A population-based case-control study of the CYP2D6 and GSTT1 polymorphisms and malignant brain tumors. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 463-468
- 18 Elexpuru-Camiruaga J, Buxton N, Kandula V, Dias PS, Campbell D, McIntosh J, Broome J, Jones P, Inskip A, Aldersea J. Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 1995; 55: 4237-4239
- 19 Deakin M, Elder J, Hendrickse C, Peckham D, Baldwin D, Pantin C, Wild N, Leopard P, Bell DA, Jones P, Duncan H, Brannigan K, Aldersea J, Fryer AA, Strange RC. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 881-884
- 20 Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19: 275-280
- 21 Ye Z, Song H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005; 41: 980-989
- 22 Ghobadloo SM, Yaghmaei B, Bakayev V, Goudarzi H, Noorinayer B, Rad FH, Samiy S, Aghabozorghy S, Zali MR. GSTP1, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms in patients with cryptogenic liver cirrhosis. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 423-427
- 23 Beeghly A, Katsaros D, Chen H, Fracchioli S, Zhang Y, Massobrio M, Risch H, Jones B, Yu H. Glutathione S-transferase polymorphisms and ovarian cancer treatment and survival. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 330-337
- 24 Sobti RC, Kaur S, Kaur P, Singh J, Gupta I, Jain V, Nakahara A. Interaction of passive smoking with GST (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) genotypes in the risk of cervical cancer in India. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 166: 117-123

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

胃癌HER-2基因检测方法及其靶向治疗的研究现状

钟山, 余英豪

钟山, 余英豪, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科
福建省福州市 350025

作者贡献分布: 本文综述由钟山完成, 余英豪审校。

通讯作者: 余英豪, 主任医师, 教授, 350025, 福建省福州市, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科。

yuyinghao0808@126.com

电话: 0591-83717703

收稿日期: 2010-06-18 修回日期: 2010-08-10

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-18

Detection of HER-2 gene status and HER-2-targeted therapy in gastric cancer: recent advances

Shan Zhong, Ying-Hao Yu

Shan Zhong, Ying-Hao Yu, Department of Pathology,
Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of
Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Ying-Hao Yu, Department
of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military
Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Prov-
ince, China. yuyinghao0808@126.com

Received: 2010-06-18 Revised: 2010-08-10

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-18

Abstract

HER-2/neu, also known as cerbB-2, is the second member of the human epidermal growth factor receptor (EGFR) family. Some studies have shown that HER-2 gene amplification and/or protein overexpression occur in gastric carcinoma. HER-2 gene immunotherapy may become an important new option for patients with advanced gastric cancer. Therefore, the detection of HER-2 gene status becomes very important in these patients. This paper gives an overview of the recent advances in the detection of HER-2 gene status and HER-2-targeted therapy in gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; HER-2 gene; Targeted therapy; Detection Method; Gene amplification; Immunohistochemistry

Zhong S, Yu YH. Detection of HER-2 gene status and HER-2-targeted therapy in gastric cancer: recent advances. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2785-2789

摘要

HER-2/neu基因, 也称CerbB-2, 为人类表皮生长因子受体(EGFR)家族的第2个成员。许多研究认为胃癌组织中存在HER-2基因扩增和/或蛋白的过表达。针对HER-2基因的免疫治疗可能成为晚期胃癌患者新的重要治疗选择, 因此, 胃癌组织中HER-2基因状态的检测就显得非常重要。本文就胃癌HER-2基因检测方法及其靶向治疗的研究现状进行综述。

关键词: 胃癌; HER-2基因; 靶向治疗; 检测方法; 基因扩增; 免疫组织化学

钟山, 余英豪. 胃癌HER-2基因检测方法及其靶向治疗的研究现状. *世界华人消化杂志* 2010; 18(26): 2785-2789

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2785.asp>

0 引言

胃癌是最常见的消化系统肿瘤, 居恶性肿瘤死亡率的第2位, 对人群的生命安全及健康有着严重的危害。大多数胃癌患者在确诊时已处于中晚期, 虽然围手术期及手术后的放化疗可以改善患者的生存期, 但晚期胃癌的生存率仍然很低。因此, 胃癌的分子生物学及分子靶向治疗已成为目前肿瘤治疗及预后判断的研究热点之一。在HER-2基因与乳腺癌靶向治疗的研究取得了显著进展的同时, 近年来越来越多的学者将目光投向了HER-2基因与胃癌的关系, 并取得了一定的进展。本文就HER-2基因在胃癌中的表达, HER-2状态的检测方法以及HER-2基因与胃癌分子靶向治疗的研究现状进行综述。

1 HER-2基因结构、功能及机制

HER-2/neu是1981年Shih等在鼠神经母细胞瘤中发现的原癌基因, 他通常在人类胎儿期表达, 仅在成人部分组织中低水平表达。HER-2基因定位于人类染色体17q21上, 是人类表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族的第2个成员。EGFR家族包括4个成员, 分别是HER-1/EGFR、HER-2/neu、HER-3和HER-4, 他们具有相似的分子结构。不同的配体与胞外配

■背景资料

胃癌在全世界肿瘤死因中占第2位, 大部分患者在诊断时已属晚期, 化疗效果不理想。针对HER-2基因的免疫治疗可能成为晚期胃癌患者新的重要治疗选择, 提供相关的理论知识满足临床的迫切需求。

■同行评议者

石毓君, 副研究员, 四川大学华西医院外科

■ 研发前沿

胃癌组织中HER-2基因的扩增与靶向治疗虽已引起了广大学者的关注,但国内相关的综合性报道尚少.了解胃癌HER-2基因或蛋白表达的意义及其HER-2状态检测方法,为胃癌的靶向治疗提供依据.

体结合区结合,会引起一系列的级联瀑布式信号传导,从而影响细胞生物学结构,包括细胞增殖、凋亡、黏附性、迁移和分化^[1]. HER-2编码相对分子量为185 000 Da的单链跨膜糖蛋白,即p185,包括胞内区、跨膜区和胞外区,其胞内区具有酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)活性. HER-2不需要配体结合^[2],是其他HER家族异源二聚体的首选组成部分.当生长因子与HER1, HER3或HER4结合后,改变了蛋白胞外区的构象,并能与HER-2受体分子形成异源二聚体,使胞内区的PTK活性显著增加.异源二聚体比相应的同源二聚体更有效. HER-2自身也具有若干酪氨酸残基(Tyr)磷酸化位点. PTK底物可识别自身磷酸化位点,并作用于特定的信号蛋白,引起细胞增殖、分化和抗凋亡,从而诱发肿瘤的发生.细胞内HER-2基因大量扩增,会引起其蛋白产物p185的过表达,HER-2受体异源二聚体数量增加,引起细胞内PTK的活性增加,发生酪氨酸自身磷酸化,激活多种信号转导途径,从而使细胞大量增殖,同时抑制凋亡,促使癌变发生^[3].由于HER-2基因受体位于细胞表面,容易与抗体接近,因此适合成为抗肿瘤免疫治疗的靶位.

2 HER-2基因在胃癌组织中的表达

已证实在乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺腺癌等多种恶性肿瘤中存在HER-2基因扩增或蛋白的过表达,其中20%-30%的浸润性乳腺癌存在HER-2基因扩增和/或HER-2蛋白的过表达^[4-6].文献报道胃癌中HER-2基因的扩增率为7.1%-42.6%^[7-13],过表达率为6.8%-34%^[7,9,10,13-21].陈娟等^[22]采用CerbB-2单克隆抗体对775例大宗胃癌病例进行分析,结果显示胃癌组织中CerbB-2呈“+++”表达88例(11.35%),“++”表达44例(5.68%).造成实验数据相差如此之大的原因可能与评估HER-2状态的实验方法不同、病理学家判读的主观性和参照的HER-2评分系统不同等因素有关^[13].

Tanner等^[8]认为于胃食管连接部近端5 cm和远端5 cm之间(即胃食管连接部)的胃癌发生率比发生于胃部的胃癌HER-2的阳性表达率高(24% vs 12%).但国内的一些研究发现,HER-2的阳性表达与肿瘤的部位无关^[22,23].肠型胃癌HER-2基因扩增率和蛋白表达率显著高于混合型 and 弥漫型胃癌(胃型胃癌)^[8,24,25],提示HER-2基因激活可能与肠型胃癌特定细胞亚群的生长发育相关.HER-2表达与胃癌分化程度明显相关.

高、中分化癌阳性率明显高于低分化及未分化癌^[22,26],提示HER-2与胃高中分化腺癌的发生有密切关系.同时HER2表达患者的无病生存期和总生存期较短^[15],容易出现远处转移,提示预后不佳^[15,22,27-30].因此,HER-2基因扩增或过表达可能成为胃癌的一个重要的预后预测指标.

3 HER-2状态的检测方法

HER-2状态的检测方法主要包括免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC),荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)和显色原位杂交(chromogenic *in situ* hybridization, CISH)3种.鉴于CISH应用相对较少,这里重点讨论IHC和FISH方法.

3.1 IHC和FISH判读标准 Hofmann等^[13]发现胃癌病例较乳腺癌病例肿瘤异质性更常见,而且部分胃癌病例,尤其是高分化腺癌病例,位于腺腔面的瘤细胞保留分泌功能而不被标记物着色,形成“U”型(基底和侧面)不完整着色.据此认为胃癌的HER-2评分标准应该与乳腺癌的评分标准不同.为此,Hofmann等专门推荐了用于胃癌HER-2蛋白检测新的评分系统(2008),并且很快得到推崇.该系统判读要点如下^[22]: IHC着色“+++”判断为HER-2阳性,着色“+”及“-”则判断为HER-2阴性. HER-2阳性着色呈棕黄色颗粒状,定位于细胞膜.无着色/<10%肿瘤细胞膜着色(0/阴性); >10%肿瘤细胞呈现微弱、不完整的细胞膜着色(+/阴性); >10%肿瘤细胞呈现弱至中等强度完整的细胞膜着色(++/不确定); 大于10%肿瘤细胞呈现强的、完整的细胞膜着色(+++/阳性).该系统与传统的判读标准有两点主要的区别:一是肿瘤细胞出现中等至高强度的“U”形着色亦定为阳性,而不强调完整的细胞膜着色;二是取消了胃活检小标本中的肿瘤细胞着色的百分比临界值(原标准为>10%的瘤细胞着色,现定为不足10%的中等至高强度着色亦确定为阳性).该评分系统已被用于赫赛汀(Herceptin)联合化疗治疗胃癌的临床III期实验研究中. FISH方法是对石蜡组织切片进行原位杂交免疫荧光检查,计数切片中30个肿瘤细胞,统计红色信号总数与绿色信号总数的比值(Ratio值),当Ratio值 ≥ 2.2 或细胞内出现成簇的异常信号聚集(>10-15个/核)均视为阳性.

3.2 IHC和FISH方法的优缺点 IHC技术因具有简便、廉价、快速、更易推广等特点,是目前国内病理学实验室检测HER-2状态的首选方法.

但该技术存在一些潜在问题, 如组织固定与处理容易使蛋白质受到损伤, 敏感性和特异性受抗原修复过程影响, 抗体批次间存在差异, 染色结果观察具有主观性, 癌组织染色体非整倍体等遗传学特征性改变可导致IHC出现假阳性等。这些问题使HER-2检测结果存在着一定的不确定性。与蛋白质相比, DNA的稳定性则好得多。FISH法具有受实验操作程序影响小, 可消除多倍体的干扰, 结果定量判读, 从而避免主观上的影响等优点, 但实验过程较复杂, 相对耗时, 费用较昂贵, 失效率偏高等缺点。

3.3 HER-2基因状态检测方法的相关性 IHC与FISH结果的相关性存在差异。在乳腺癌组织的研究中, Yaziji等^[31]采用高度标准化实验流程对来自美国29个州135个研究机构的2 963例乳腺癌标本分别采用IHC和FISH方法在肿瘤组织切片上平行检测HER-2状态。结果发现, FISH检测显示HER-2基因扩增与IHC检测HER-2蛋白(+++)的病例, 以及FISH检测HER-2基因无扩增和IHC检测HER-2蛋白表达(0+)病例的结果之间有极好的相关性。提示如果严格控制实验流程, IHC方法检测HER-2蛋白(+++)及(0+)的病例可以不必行FISH检测。还有的研究认为, 因IHC(++)与FISH检测结果差异较大, 这类患者应加做FISH检测; 一些IHC(+++)的病例也可由于17号染色体非整倍体导致出现假阳性结果, 必要时也应行FISH检测^[32,33]。

日本学者^[9]对200例胃癌手术切除标本进行了比较, IHC显示23%病例有HER-2蛋白过表达, FISH检测显示27%病例存在HER-2基因扩增, 两者符合率为86.7%(++为58.5%, +++为88.2%)。Hofmann等^[13]对168例患者进行了研究, IHC与FISH的符合率为93.5%, 其中11例FISH阳性, 而IHC阴性(0+)或可疑阳性(++), 认为系“U”型着色(不完整的膜染色)以及肿瘤异质性导致了IHC与FISH检测结果的偏差。另一组^[34]结果显示IHC与FISH一致性为86.9%。胃癌HER-2研究全国协作组^[25]的结果显示, IHC评分为+++的病例与CISH基因扩增的符合率>90%, IHC评分++的病例比基因扩增的符合率明显降低。提示胃癌中IHC评分为+++的病例与基因扩增有良好的一致性。蛋白过表达与基因扩增不相符或IHC检测阳性结果高于CISH检测结果, 可能与17号染色体的多倍体以及IHC的假阳性等因素有关。目前关于胃癌组织FISH与IHC方法检测HER-2基因状态对比的大样本实验还比较少, 国内尚未见

报道。因此应用FISH与IHC等检测HER-2基因状态实验方法结果的一致性, 以及可能导致两者出现差异的原因, 检测HER-2基因的最合理方法等问题还有待进一步探讨。

4 HER-2基因与胃癌的靶向治疗

4.1 单克隆抗体 Herceptin的活性成分为曲妥珠单抗(trastuzumab), 是一种重组DNA衍生的人源化单克隆抗体, 选择性作用于人细胞膜上的HER-2受体。该抗体属IgG1型, 含人的框架区及可与HER-2结合的鼠抗-p185 HER-2抗体的互补决定区。Herceptin的作用对象为HER-2过表达的肿瘤细胞。Herceptin的抗肿瘤机制^[35,36]为干扰HER-2受体, 抑制HER-2与HER1、HER3或HER4形成异源二聚体, 减弱细胞信号传导系统的传递, 抑制肿瘤细胞的增殖; 介导HER-2受体的内吞降解以减少其细胞表面密度, 抑制肿瘤的进一步生长; 下调细胞表面的HER-2蛋白、减少血管内皮生长因子的产生; 为抗体依赖的细胞介导的细胞毒反应(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)的潜在介质, 抑制肿瘤的生长。Herceptin治疗主要的不良反应包括: 心脏问题(充血性心力衰竭等)、严重的输液反应和肺部问题等。

1998年曲妥珠单抗被美国FDA批准用于晚期转移性乳腺癌的治疗, 随后又被批准与其他药物联合应用治疗手术后HER-2阳性的乳腺癌(肿瘤切除术或乳房切除术), 因此, Herceptin对乳腺癌的靶向治疗作用已经得到一致公认。那么, Herceptin对胃癌的作用究竟如何, HER-2在胃癌组织中的表达能否为胃癌靶向治疗药物的选择提供理论依据, 是近年来的研究热点。有研究认为, Herceptin对HER-2阳性和阴性胃癌细胞, 都没有明显杀伤效应, 但Herceptin作用阳性细胞48 h后可以明显下调胃癌细胞HER-2的表达^[37,38]。对于HER-2阳性的胃癌, Herceptin与化疗药物的联合应用能增强化疗效果^[38]。Tanner等^[8]进行了Herceptin对胃癌和乳腺癌药物敏感性比较的研究, 发现Herceptin对HER-2高表达的胃癌N87细胞和乳腺癌SKBR-3细胞的抑制率相似, 说明两种肿瘤细胞对Herceptin的敏感性相同, 因此从理论上证明了Herceptin治疗HER-2高表达胃癌的有效性。Rebischung等^[39]证实Herceptin联合化疗对HER-2过表达的转移性胃癌有效。一项II期临床研究结果显示^[40], Herceptin联合顺铂治疗HER-2过表达或扩增的晚期胃癌的客观

■创新盘点

本文全面综述了胃癌组织HER-2基因或蛋白的表达状况, 检测方法及其应用, 晚期胃癌靶向治疗等最新进展, 使读者对胃癌HER-2基因研究现状有全新的认识。

■应用要点

本文为胃癌组织HER-2基因或蛋白检测提供方法及其判断标准,并为胃癌的诊断、个体化治疗及预后判断提供参考依据。

有效率比单用顺铂要高。迄今为止,全球例数最多的,第1个大型生物靶向药物胃癌研究的临床III期实验结果显示^[41],在标准化疗药物中添加Herceptin后,能显著延长HER-2阳性的晚期和不适合手术胃癌患者的生存期。不仅使患者的存活期由11.1 mo提高到了13.5 mo,而且未出现明显的不良反应。据报道,基于大型生物靶向药物胃癌研究的临床III期研究结果,欧盟委员会已批准对HER-2阳性转移性胃癌化疗患者使用Herceptin。2010-04-23,罗氏公司已向美国食品及药物管理局提交了Herceptin与化疗药物联合治疗中晚期胃癌的补充性生物制品许可申请。

4.2 PTK抑制剂 拉帕替尼(lapatinib)是一种直接作用于HER-2和HER-1/EGFR受体胞内区的小分子PTK抑制剂。在对曲妥珠单抗耐药的HER-2过表达的乳腺癌治疗中显示了良好的抗肿瘤活性^[42,44]。在SWOG II期临床研究中,采用拉帕替尼治疗晚期胃癌患者,2005-02/2006-05入组的46例患者中,3例(7%)获得确认的部分缓解,2例(5%)获得未经确认的部分缓解,9例(20%)病情稳定。中位治疗失败时间为2 mo,中位生存期5 mo,已获得了42例患者的相关分子资料。第一阶段目标已经达到,提示单药对进展期/转移性胃癌具有一定的疗效且药物耐受性良好,拟进一步研究拉帕替尼与化疗药物的联合作用^[43,44]。目前全球多家中心正在进行单用紫杉醇及联合应用紫杉醇治疗HER-2阳性晚期胃癌的III期临床研究,旨在评价拉帕替尼在晚期胃癌患者一线或二线治疗中的疗效和安全性。

5 结论

检测胃癌组织中HER-2状态不仅可以预测胃癌的预后,而且有助于指导临床治疗方案的选择。随着Herceptin等靶向药物与胃癌治疗相关性研究的进一步深入,有望为HER-2基因扩增或过表达的胃癌患者开辟一条新的治疗途径。

6 参考文献

- 1 Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol* 2008; 19: 1523-1529
- 2 Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997; 410: 83-86
- 3 Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol* 1999; 26: 51-59
- 4 Ménard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa S, Agresti R, Tagliabue E. HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the

development of invasive breast cancer. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 1: S15-S19

- 5 Press MF, Slamon DJ, Flom KJ, Park J, Zhou JY, Bernstein L. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3095-3105
- 6 Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-712
- 7 Takehana T, Kunitomo K, Kono K, Kitahara F, Iizuka H, Matsumoto Y, Fujino MA, Ooi A. Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immunosorbent assay. *Int J Cancer* 2002; 98: 833-837
- 8 Tanner M, Hollmén M, Junttila TT, Kapanen AI, Tammola S, Soini Y, Helin H, Salo J, Joensuu H, Sihvo E, Elenius K, Isola J. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 2005; 16: 273-278
- 9 Yano T, Ochiai A, Doi T, Hashizume K, Nakanishi M, Ouchi K, Tanaka Y, Ohtsu A. Expression of HER2 in gastric cancer: comparison between protein expression and gene amplification using a new commercial kit. *J Clin Oncol* 2004; 22 (14S): 4053
- 10 Risio M, De Rosa G, Sarotto I, Casorzo L, Capussotti L, Torchio B, Aglietta M, Chiecchio L. HER2 testing in gastric cancer: molecular morphology and storage time-related changes in archival samples. *Int J Oncol* 2003; 23: 1381-1387
- 11 Brien TP, Depowski PL, Sheehan CE, Ross JS, McKenna BJ. Prognostic factors in gastric cancer. *Mod Pathol* 1998; 11: 870-877
- 12 Ishikawa T, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Ooi A. Amplification of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1997; 151: 761-768
- 13 Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52: 797-805
- 14 Koeppen HK, Wright BD, Burt AD, Quirke P, McNicol AM, Dybdal NO, Sliwkowski MX, Hillan KJ. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology* 2001; 38: 96-104
- 15 Allgayer H, Babic R, Gruetzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2201-2209
- 16 Gürel S, Dolar E, Yerci O, Samli B, Oztürk H, Nak SG, Gülsen M, Memik F. The relationship between c-erbB-2 oncogene expression and clinicopathological factors in gastric cancer. *J Int Med Res* 1999; 27: 74-78
- 17 Lee KE, Lee HJ, Kim YH, Yu HJ, Yang HK, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003; 33: 173-179
- 18 Ougolkov A, Yamashita K, Bilim V, Takahashi

- Y, Mai M, Minamoto T. Abnormal expression of E-cadherin, beta-catenin, and c-erbB-2 in advanced gastric cancer: its association with liver metastasis. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 160-166
- 19 Sanz-Ortega J, Steinberg SM, Moro E, Saez M, Lopez JA, Sierra E, Sanz-Esponera J, Merino MJ. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFR as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2000; 15: 455-462
- 20 Wang YL, Sheu BS, Yang HB, Lin PW, Chang YC. Overexpression of c-erb-B2 proteins in tumor and non-tumor parts of gastric adenocarcinoma-emphasis on its relation to H. pylori infection and clinicohistological characteristics. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1172-1176
- 21 Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitão D, Preto JR, Seixas M, Pimenta A. c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2002; 10: 247-256
- 22 陈娟, 李东石, 余英豪, 王烈, 欧阳学农, 谢飞来, 熊喜生. Her-2蛋白在胃癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1375-1379
- 23 陈斌, 罗荣城, 崔斐, 钱新宇. 胃癌HER-2/neu基因表达与预后的相关性. *南方医科大学学报* 2006; 26: 344-347
- 24 张杰, 舒维清, 朱卫, 何康林, 王友珍, 李小静. 胃癌中HER-2/neu过表达与基因扩增及其意义. *中华病理学杂志* 2003; 32: 52-53
- 25 HER-2研究全国协作组, 张瑰红. 胃癌中HER-2/neu基因扩增和蛋白表达的多中心研究. *中华消化杂志* 2006; 26: 657-660
- 26 Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1331-1339
- 27 Ross JS, McKenna BJ. The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 2001; 19: 554-568
- 28 Shinohara H, Morita S, Kawai M, Miyamoto A, Sonoda T, Pastan I, Tanigawa N. Expression of HER2 in human gastric cancer cells directly correlates with antitumor activity of a recombinant disulfide-stabilized anti-HER2 immunotoxin. *J Surg Res* 2002; 102: 169-177
- 29 Yao T, Utsunomiya T, Oya M, Nishiyama K, Tsuneyoshi M. Extremely well-differentiated adenocarcinoma of the stomach: clinicopathological and immunohistochemical features. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2510-2516
- 30 宋岩, 黄镜, 王金万. HER2/neu基因扩增和蛋白表达与晚期胃癌患者预后的关系. *癌症* 2010; 29: 76-81
- 31 Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, Werling R, Hwang H, Ellis GK, Gralow JR, Livingston RB, Gown AM. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. *JAMA* 2004; 291: 1972-1977
- 32 曾瑄, 赵大春, 周炜洵, 武莎斐, 梁智勇, 刘彤华. 荧光原位杂交检测乳腺癌HER2基因状态. *中华病理学杂志* 2005; 34: 701-705
- 33 Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol* 2003; 34: 1043-1047
- 34 Yano T, Doi T, Ohtsu A, Boku N, Hashizume K, Nakanishi M, Ochiai A. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 65-71
- 35 Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol* 1999; 26: 71-77
- 36 王碧芸. Herceptin对转移性乳腺癌的靶向治疗作用. *中华肿瘤杂志* 2003; 25: 204-205
- 37 Gong SJ, Jin CJ, Rha SY, Chung HC. Growth inhibitory effects of trastuzumab and chemotherapeutic drugs in gastric cancer cell lines. *Cancer Lett* 2004; 214: 215-224
- 38 冯滢滢, 徐建明, 宋三泰, 李晓玲, 易少琼, 陈薇. Herceptin联合5-氟尿嘧啶和紫杉醇治疗胃癌的体外实验研究. *中国肿瘤临床* 2008; 35: 401-404
- 39 Rebischung C, Barnoud R, Stéfani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. *Gastric Cancer* 2005; 8: 249-252
- 40 Cortes-Funes H, Rivera F, Ales I, Marquez A, Velasco A, Colomer R, Garcia-Carbonero R, Sastre J, Guerra J, Gravalos C. Phase II of trastuzumab and cisplatin in patients (pts) with advanced gastric cancer (AGC) with HER-2/neu overexpression/amplification. *J Clin Oncol* 2007; 25 (18S): 4613
- 41 Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Hill J, Lehle M, Feyereislova A, Bang Y. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). *J Clin Oncol* 2009; 27 (18S): LBA4509
- 42 Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, Chan S, Jagiello-Gruszfeld A, Kaufman B, Crown J, Chan A, Campone M, Viens P, Davidson N, Gorbounova V, Raats JI, Skarlos D, Newstat B, Roychowdhury D, Paoletti P, Oliva C, Rubin S, Stein S, Geyer CE. A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112: 533-543
- 43 Iqbal S, Goldman B, Lenz H J, Fenoglio-Preiser CM, Blanke CD. A phase II SWOG study of GW572016 (lapatinib) as first line therapy in patients (pts) with advanced or metastatic gastric cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25 (18S): 4621
- 44 熊建萍, 赵建国. 胃癌分子靶向治疗的进展. *实用肿瘤杂志* 2008; 24: 329-333

■同行评价

本文可读性好, 内容详实, 文笔流畅, 具有较强的指导意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

原发性肝脏淋巴瘤的研究进展

马元吉, 陈恩强, 王娟, 唐红

■背景资料

原发性肝脏淋巴瘤是病变局限于肝内、早期无淋巴结与肝外扩散的淋巴瘤, 于1965年由Ata等首次报道。原发性肝脏淋巴瘤临床罕见, 其临床表现、实验室与影像学表现无特异性, 常常被误诊为多种肝病。

马元吉, 陈恩强, 王娟, 唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 马元吉、陈恩强及王娟对此文撰写做主要贡献; 文章思路由唐红提出; 唐红对文章进行审阅并提出修改意见。

通讯作者: 唐红, 教授, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院感染性疾病中心。htang6198@hotmail.com

电话: 028-85422647

收稿日期: 2010-06-14 修回日期: 2010-08-02

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-18

Progress in research of primary hepatic lymphoma

Yuan-Ji Ma, En-Qiang Chen, Juan Wang, Hong Tang

Yuan-Ji Ma, En-Qiang Chen, Juan Wang, Hong Tang, Center for Infectious Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Professor Hong Tang, Center for Infectious Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. htang6198@hotmail.com

Received: 2010-06-14 Revised: 2010-08-02

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-18

Abstract

Primary hepatic lymphoma (PHL) is a rare malignancy whose pathogenesis is still unclear. Most PHL patients present with upper abdominal pain, upper abdominal distention or discomfort. Laboratory tests may reveal either a cholestatic or a cytolytic process, with elevated lactate dehydrogenase in most patients. Imaging tests often reveal an isolated lesion in the liver. The predominant histological type of PHL is B-cell lymphoma. At present, there are no standard diagnostic criteria for PHL. PHL is often misdiagnosed as many other liver diseases. Biopsy is usually performed to make a definite diagnosis. Treatment options for PHL include various modalities, and the prognosis of PHL is better than that of primary hepatic carcinoma.

Key Words: Liver neoplasm; Lymphoma; Progress

Ma YJ, Chen EQ, Wang J, Tang H. Progress in research of primary hepatic lymphoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2790-2793

摘要

原发性肝脏淋巴瘤临床罕见, 其发病机制尚不

清楚。该病多见于中年男性, 临床表现主要为上腹痛、上腹胀或上腹不适感。实验室检查表现为肝内胆汁淤积或肝细胞溶解破坏, 多有血清乳酸脱氢酶升高。影像学表现以孤立性占位为主, 组织学类型以B淋巴细胞淋巴瘤为主。目前, 原发性肝脏淋巴瘤诊断标准不一, 临床容易误诊为多种肝脏疾病, 确诊依赖于病理检查, 治疗方法多样, 需结合患者个体情况决定, 预后较原发性肝癌好。

关键词: 肝脏肿瘤; 淋巴瘤; 进展

马元吉, 陈恩强, 王娟, 唐红. 原发性肝脏淋巴瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2790-2793

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2790.asp>

0 引言

近年来, 非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin lymphoma, NHL)的发病率呈逐渐增高的趋势, 在美国, 男性年发病率已达23.2/10万, 女性已达16.3/10万, 估计2009年有近66 000人被诊断为NHL, 死亡19 500人^[1]。大约25%-35% NHL原发于淋巴结外组织^[2], 原发性肝脏淋巴瘤(primary hepatic lymphoma, PHL)仅占结外NHL的0.4%、全部NHL的0.016%^[3]。PHL是病变局限于肝内、早期无淋巴结与肝外扩散的淋巴瘤^[4], 于1965年由Ata等^[5]首次报道。虽然随着淋巴瘤的进展, 肝脏常常于晚期受累, 但PHL临床罕见, 其临床表现、实验室与影像学表现无特异性, 容易误诊; 同时, 患者常常因上腹不适、肝功能异常或肝脏占位而首诊于消化科、感/传染科或肝胆胰外科, 因医生认识不足, 常常被误诊。本文就PHL的研究进展作一综述, 以期提高临床医师对本病的认识水平。

1 发病机制

NHL的病因和发病机制不完全清楚, 目前, 对PHL的病因和发病机制的研究主要集中在感染因素上, 特别是HCV感染^[6-8]。Bronowicki等^[7]报道PHL的发生可能和HCV感染有关, 该多中心回顾性研究的PHL病例中HCV检出率达21%, 远

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

高于当地HCV患病率1.1%。由于HCV RNA基因组不能整合至人类肝细胞基因组中, HCV导致PHL的发生可能通过下列间接途径实现^[7]: (1)持续刺激B淋巴细胞多克隆性增殖, 最终可能导致B淋巴细胞转变为单克隆性扩增; (2)引起t(8;14)易位, 导致抗细胞凋亡基因Bcl-2、单克隆性IgH基因重排的过度表达; (3)HCV病毒核心和(或)NS5蛋白导致P21、P53、H-ras等的转录调控转变。通过上述间接途径, 慢性HCV感染可以导致淋巴细胞持续性单克隆扩增和细胞凋亡的抑制, 进而诱发PHL的发生。Ohsawa等^[9]在肝脏淋巴瘤细胞中检测到HCV基因组进一步证实了HCV感染和PHL相关。早期亦有文献报道PHL可能和HBV感染有关^[10], 近期Ulcickas等^[11]的研究提示慢性HBV感染者NHL的发生率是非HBV感染的2.8倍(经调整的危害比2.8, 95%可信区间1.16-6.75), 这进一步提示PHL可能和HBV相关。此外, PHL的产生还可能与EB病毒感染有关^[12], 在免疫抑制病例如HIV感染、使用免疫抑制剂, 由于T淋巴细胞功能缺陷, EB病毒可持续刺激B淋巴细胞增殖, 最终可能进展为淋巴瘤。文献还报道PHL可能和自身免疫病^[13], 暴露于铬与丙烷等化学物质^[14]有关。

通过对PHL患者肝组织进行病理研究发现, PHL细胞起源可能来自于肝巨噬细胞和转化的淋巴细胞^[15]。镜下可见淋巴瘤细胞浸润呈结节样(67%)或弥漫性(34%)^[16], 病理提示PHL大多为B淋巴细胞淋巴瘤(62%-87%)^[7,12,17], 以弥漫性大B淋巴细胞淋巴瘤为主(71%), 其次为黏膜相关性淋巴样组织结外边缘区B淋巴细胞淋巴瘤(10%)、Burkitt淋巴瘤(3%), 其他类型少见(3%)^[7]; T淋巴细胞淋巴瘤占13%-30%, 主要是周围性T淋巴细胞淋巴瘤(无其他特征)和间变性大T淋巴细胞淋巴瘤; 此外尚有大约10%病例为非B、非T淋巴细胞淋巴瘤^[12,17]。淋巴瘤细胞呈结节样浸润者主要为高分化B淋巴细胞淋巴瘤, 而弥漫性浸润者既可能为T淋巴细胞淋巴瘤, 也可能为B淋巴细胞淋巴瘤^[16]。

2 临床表现

文献报道PHL多见于55岁左右中年人, 男女比为2.1-3.1:1^[10,12,17], 主要症状为上腹痛、上腹胀或上腹不适感, 见于40%-70%病例^[6,7,10,12,17]; 淋巴瘤B症状见于37.5%-49%病例^[6,10], 消瘦、发热、盗汗分别见于33%-40%、22%-26%、8%-10%病例^[12,17]; 镜下表现为结节样浸润者, 41%病例

存在淋巴瘤B症状, 而表现为弥漫性浸润者, 90%病例存在淋巴瘤B症状^[16]。此外, 大约10%病例先前有慢性肝炎、肝硬化等肝病病史^[17]; 大约10%病例无明显症状, 经偶然发现肝占位而确诊^[12,17]; 尚有罕见病例表现为急性肝衰竭, 多见于弥漫性浸润者^[15,16]。主要体征为肝脏长大和黄疸, 分别见于60%-80%、10%-20%病例^[10,12,17], 多见于肿瘤细胞弥漫性浸润者; 其他临床表现尚有脾脏长大、腹水等。值得一提的是, 这里所示脾脏长大系充血性脾脏长大, 是继发于PHL或基础肝病所致肝功能失代偿、门静脉高压, 非由淋巴瘤细胞浸润所致脾脏长大。

3 实验室及影像学表现

研究发现, 若病变确系局限于肝脏, 血常规指标通常无异常; 若骨髓或脾脏受累, 可出现贫血、白细胞减少或血小板减少^[12], 但需与充血性脾脏长大所致继发性血细胞减少相鉴别。肝功能可表现为转氨酶、胆管酶及胆红素异常, 见于71%-85%病例^[6,7,10,12,17], 表现为胆汁淤积或肝细胞溶解破坏^[7,8]。β2微球蛋白升高见于91.7%病例^[6], 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)升高见于大约85%病例^[16,17], 部分病例可能存在高钙血症^[6,12]、升高的血沉与C反应蛋白^[7]、冷球蛋白血症(特别是存在HCV感染者)^[7]、血脂升高^[18]。甲胎蛋白、癌胚抗原一般正常^[6,10,12,17]。此外, 上述实验室检查中尚有小部分病例无明显异常。

影像学上可出现3种类型^[6,7,10,17,19], 分别为孤立占位(55%-60%)、多发占位(35%-40%)和弥漫性浸润损害^[20]。淋巴瘤细胞呈结节样浸润者71%为孤立性占位, 而弥漫性浸润者均表现为肝脏长大^[16]。超声检查主要表现为低回声占位^[7,19,21], 部分病例表现为等回声占位, 周边可有低回声环, 形成“靶型”占位^[19]; 少部分病例还表现为无回声占位^[22], 若PHL发生于脂肪组织较多的门静脉周围, 超声还可能表现为强回声占位^[18]。CT检查主要表现为低密度占位^[7,19,21], 中心可有代表坏死的更低密度区^[19,22], 周边可有晕轮征^[19], 治疗后可出现钙化灶^[22]; 注射造影剂后, 50%病例无强化, 33%为片状强化, 16%为边缘环状强化^[20]。MRI检查在T1加权表现为低信号或等信号, T2加权表现为高信号^[21,22]。PET/CT表现为高摄取¹⁸氟-脱氧葡萄糖(¹⁸F-FDG)^[19,23]。

4 诊断和鉴别诊断

原发性结外淋巴瘤定义不一, 存在分歧, 分歧主要集中在淋巴结有无淋巴瘤浸润及其浸润部位

■ 相关报道

Bronowicki等的研究证实原发性肝脏淋巴瘤病例中HCV检出率远高于当地HCV患病率。Ohsawa等在肝脏淋巴瘤细胞中检测到HCV基因组。Emile等研究发发现化疗方案包含蒽环类抗生索的原发性肝淋巴瘤患者预后相对较好。

■创新盘点

本文较全面地综述的原发性肝脏淋巴瘤的发病机制、临床表现和治疗方案,有利于提高临床医师对本病的认识。

与程度,目前文献报道有2个版本的定义^[24]:(1)原发于结外组织,即淋巴结、骨髓、脾脏及其他淋巴样组织如咽淋巴环等以外的器官组织,伴或不伴轻微的淋巴结(包括非引流区域淋巴结)被累及,该定义较宽松;(2)原发于结外组织,伴或不伴局部引流区域淋巴结被累及,该定义较严格。由此导致PHL诊断标准不一,若按照PHL定义^[4],PHL则不应存在淋巴结累及。Lei等^[17]提出的PHL诊断标准为:(1)临床症状主要为肝脏浸润引起;(2)无可触及的浅表淋巴结,无远处淋巴结肿大的影像学证据;(3)外周血涂片无白血病累及。该诊断标准排除了骨髓、脾脏被淋巴瘤细胞浸润,允许肝脏局部引流区域淋巴结受累,但不能有远处淋巴结受累,符合原发性结外淋巴瘤的较严格的定义。由于PHL临床表现、实验室与影像学表现均无特异性,临床常常将其误诊为肝炎、肝脓肿、肝硬化、原发性肝癌、肝转移性肿瘤等。因此,当临床发现肝脏占位及肝病相关表现,同时患者具有淋巴瘤B症状及LDH增高、癌胚抗原与甲胎蛋白水平正常时,临床医师需要警惕肝脏淋巴瘤可能,至少在鉴别诊断中不应漏掉本病,应积极开展包括活检在内的相关检查明确诊断,若确系肝脏淋巴瘤,尚需明确具体类型、进一步区分是属于PHL或继发性肝脏淋巴瘤(其他部位淋巴瘤肝浸润)。

5 治疗与预后

目前,PHL治疗方法有手术切除肿瘤、化疗、放疗或上述方法的不同组合,具体治疗方案需综合考虑病理类型及患者个体情况。若患者一般情况较好,倾向于选择手术切除肿瘤^[17]。目前认为PHL手术治疗适用于能手术切除的局限性PHL病灶和化疗前或化疗后为减少肿瘤负荷的病例^[12],然而,手术切除只能达到平均22 mo的生存期^[17],且部分病例存在复发,因此,单纯手术治疗不能在所有病例中达到持续完全缓解。目前,化疗多应用于手术风险高和不适合手术治疗的病例,如有不能切除的肿瘤的病例、弥漫性肝脏浸润病例、疾病已进展累及肝外组织的病例、组织学亚型高度恶性的病例等,其平均生存期也较短(6 mo)^[17],但这部分早期报道病例同时存在化疗方案简略的因素,影响预后;之后使用CHOP方案(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱及强的松)等新化疗方案病例,预后明显提高,总体完全缓解率达83.3%,5年无复发,生存率达83.1%^[6]。如果经过化疗,病灶局限化,部分病例

可考虑手术治疗^[12]。目前,CHOP方案为NHL的标准治疗方案^[25],若肿瘤细胞表达CD20,则可再联合利妥昔单抗,组成R-CHOP方案,化疗效果要好于CHOP方案^[26],但其在PHL中的应用尚较少,目前仅有少量报道^[8,23],其效果较理想;值得注意的是,合并HCV感染者,似乎并未影响化疗反应及对化疗的耐受性^[8]。此外,在化疗的基础上再放疗,可取得较化疗更长的平均生存期^[17]。De Renzo等^[23]报道18F-FDG PET/CT检查有助于判断早期治疗反应、疾病缓解与否,化疗两周期后,肿瘤组织对¹⁸F-FDG的摄取明显降低,在疾病完全缓解后,¹⁸F-FDG PET/CT检查无明显异常,而CT检查仍然可能存在低密度影。Emile等^[16]研究发现,淋巴瘤细胞呈结节样浸润者预后较弥漫性浸润者好,结节样浸润者1年和3年生存率为70%和38%,而弥漫性浸润者为57%和18%,后者部分病例可能出现急性肝功能衰竭,容易快速致死^[15,16];研究还发现,淋巴瘤细胞呈结节样浸润者若使用了包含蒽环类抗生素(如CHOP方案中的多柔比星)在内的化疗方案,其预后相对较好,2年生存率超过90%,而未使用者2年生存率不足20%^[16]。

6 结论

PHL临床罕见,其临床表现、实验室与影像学表现无特异性,常常误诊为多种肝病,确诊有赖于病理检查。该病病理类型以弥漫性大B淋巴细胞淋巴瘤为主,治疗方法虽然多样,但无最佳治疗方法推荐,目前倾向于化疗前或后手术治疗,且化疗方案需包含蒽环类抗生素。由于本病治疗反应较好,预后较原发性肝癌好,因此应加深认识,努力做到早诊断、早治疗,以进一步改善预后。

7 参考文献

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 2 Newton R, Ferlay J, Beral V, Devesa SS. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: comparison of nodal and extra-nodal sites. *Int J Cancer* 1997; 72: 923-930
- 3 Freeman C, Berg JW, Cutler SJ. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer* 1972; 29: 252-260
- 4 Caccamo D, Pervez NK, Marchevsky A. Primary lymphoma of the liver in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 553-555
- 5 Ata AA, Kamel IA. Primary reticulum cell sarcoma of the liver. A case report. *J Egypt Med Assoc* 1965; 48: 514-521
- 6 Page RD, Romaguera JE, Osborne B, Medeiros LJ,

- Rodriguez J, North L, Sanz-Rodriguez C, Cabanillas F. Primary hepatic lymphoma: favorable outcome after combination chemotherapy. *Cancer* 2001; 92: 2023-2029
- 7 Bronowicki JP, Bineau C, Feugier P, Hermine O, Brousse N, Oberti F, Rousselet MC, Dharancy S, Gaulard P, Flejou JF, Cazals-Hatem D, Labouyrie E. Primary lymphoma of the liver: clinical-pathological features and relationship with HCV infection in French patients. *Hepatology* 2003; 37: 781-787
- 8 De Renzo A, Perna F, Persico M, Notaro R, Mainolfi C, de Sio I, Cancia G, Picardi M, Del Vecchio L, Pane F, Rotoli B. Excellent prognosis and prevalence of HCV infection of primary hepatic and splenic non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2008; 81: 51-57
- 9 Ohsawa M, Tomita Y, Hashimoto M, Kanno H, Aozasa K. Hepatitis C viral genome in a subset of primary hepatic lymphomas. *Mod Pathol* 1998; 11: 471-478
- 10 Ohsawa M, Aozasa K, Horiuchi K, Kataoka M, Hida J, Shimada H, Oka K, Wakata Y. Malignant lymphoma of the liver. Report of five cases and review of the literature. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1105-1109
- 11 Ulcickas Yood M, Quesenberry CP Jr, Guo D, Caldwell C, Wells K, Shan J, Sanders L, Skovron ML, Iloeje U, Manos MM. Incidence of non-Hodgkin's lymphoma among individuals with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2007; 46: 107-112
- 12 Avlonitis VS, Linos D. Primary hepatic lymphoma: a review. *Eur J Surg* 1999; 165: 725-729
- 13 Tsuruta S, Enjoji M, Nakamuta M, Makihata T, Kotoh K, Sakai H, Ando BE, Nawata H. Primary hepatic lymphoma in a patient with Sjögren's syndrome. *J Gastroenterol* 2002; 37: 129-132
- 14 DeMent SH, Mann RB, Staal SP, Kuhajda FP, Boitnott JK. Primary lymphomas of the liver. Report of six cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 255-263
- 15 Yasin M, Hartranft TH. Primary hepatic lymphoma: unusual presentation and clinical course. *Am Surg* 1997; 63: 951-953
- 16 Emile JF, Azoulay D, Gornet JM, Lopes G, Delvart V, Samuel D, Reynès M, Bismuth H, Goldwasser F. Primary non-Hodgkin's lymphomas of the liver with nodular and diffuse infiltration patterns have different prognoses. *Ann Oncol* 2001; 12: 1005-1010
- 17 Lei KI. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the liver. *Leuk Lymphoma* 1998; 29: 293-299
- 18 Kim H, Kim KW, Park MS, Kim H. Lymphoma presenting as an echogenic periportal mass: sonographic findings. *J Clin Ultrasound* 2008; 36: 437-439
- 19 Elsayes KM, Menias CO, Willatt JM, Pandya A, Wiggins M, Platt J. Primary hepatic lymphoma: imaging findings. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2009; 53: 373-379
- 20 Noronha V, Shafi NQ, Obando JA, Kummar S. Primary non-Hodgkin's lymphoma of the liver. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53: 199-207
- 21 Rizzi EB, Schinina V, Cristofaro M, David V, Bibbolino C. Non-hodgkin's lymphoma of the liver in patients with AIDS: sonographic, CT, and MRI findings. *J Clin Ultrasound* 2001; 29: 125-129
- 22 Maher MM, McDermott SR, Fenlon HM, Conroy D, O'Keane JC, Carney DN, Stack JP. Imaging of primary non-Hodgkin's lymphoma of the liver. *Clin Radiol* 2001; 56: 295-301
- 23 De Renzo A, Perna F, Persico M, Mainolfi C, Pace L. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in the evaluation of early response in a primary hepatic lymphoma. *Br J Haematol* 2006; 133: 580
- 24 Krol AD, le Cessie S, Snijder S, Kluin-Nelemans JC, Kluin PM, Noordijk EM. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphoma (NHL): the impact of alternative definitions tested in the Comprehensive Cancer Centre West population-based NHL registry. *Ann Oncol* 2003; 14: 131-139
- 25 Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, Glick JH, Coltman CA Jr, Miller TP. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 328: 1002-1006
- 26 Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van Den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Lederlin P, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 235-242

■同行评价

本文选题新颖, 内容全面, 对临床医生有一定的指导意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

三叶因子临床实验诊断学的研究进展

杜廷义, 秦海春, 刘俊, 张云

■背景资料

三叶因子(TFF)是一类在结构上具有1个或多个三叶因子结构域, 相对分子质量较小的蛋白质多肽家族, 具有耐热、耐酸、耐酶消化的理化特性。在体内, TFF可通过膜受体激活相关信号通路, 也可通过与其他蛋白质的结合而协同发挥作用, 是一类具有重要生理病理功能的蛋白质。

杜廷义, 中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理重点实验室 云南省第一人民医院检验科 云南省昆明市 650223

杜廷义, 中国科学院研究生院 北京市 100049

秦海春, 云南省第一人民医院消化科 云南省昆明市 650032

刘俊, 云南省第一人民医院肝胆科 云南省昆明市 650032

张云, 中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理重点实验室 云南省昆明市 650223

国家基础研究973基金资助项目, No. 2010CB529805

国家基金委重点资助项目, No. 30630014

国家基金委面上资助项目, No. 30570359

中国科学院重要方向基金资助项目, No. KSCX2-YW-R-088

作者贡献分布: 此课题由张云设计; 文献收集整理, 论文撰写由杜廷义完成; 论文的修正、校阅由秦海春与刘俊完成。

通讯作者: 张云, 研究员, 博士生导师, 650223, 云南省昆明市教场东路32号, 中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理重点实验室. zhangy@mail.kiz.ac.cn

电话: 0871-5194279 传真: 0871-5191823

收稿日期: 2010-05-14 修回日期: 2010-07-13

接受日期: 2010-07-21 在线出版日期: 2010-09-18

Trefoil factor: implications for clinical laboratory diagnostics

Ting-Yi Du, Hai-Chun Qin, Jun Liu, Yun Zhang

Ting-Yi Du, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences; Department of Clinical Laboratory Medicine, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650223, Yunnan Province, China

Ting-Yi Du, Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Hai-Chun Qin, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Jun Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Yun Zhang, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, Yunnan Province, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2010CB529805; National Natural Science Foundation of China, Nos. 30630014, 30570359; and the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences, No. KSCX2-YW-R-088

Correspondence to: Yun Zhang, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, 32 Jiaochang East Road, Kunming 650223, Yunnan Province, China. zhangy@mail.kiz.ac.cn

Received: 2010-05-14 Revised: 2010-07-13

Accepted: 2010-07-21 Published online: 2010-09-18

■同行评议者

任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

Abstract

Trefoil factors (TFF), expressed physiologically

in the secretory cells of gastrointestinal mucosa and other mucosal tissues, compose a unique peptide family with important biologic functions. Aberrant expression and/or continued secretion of TFF might exist concurrently with the processes of digestive system inflammation, tumor or other related pathological changes. Previous pathological studies have shown that the abnormal expression of TFF is associated with the prognosis of digestive system diseases. The results obtained from gene expression profiling, tumor secretomics and bioinformatic analysis have positively confirmed that clinical detection of TFF peptides or mRNAs has an excellent diagnostic performance to detect digestive system diseases, especially for the monitoring of recurrence or metastasis of tumors and for the estimation of therapeutic efficacy and prognosis. Therefore, TFF is a potential biomarker for diagnosis, treatment and prognosis of digestive system diseases.

Key Words: Trefoil factor; Gastrointestinal disease; Tumor; Biomarker

Du TY, Qin HC, Liu J, Zhang Y. Trefoil factor: implications for clinical laboratory diagnostics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2794-2799

摘要

三叶因子(trefoil factor, TFF)是一个具有重要功能的多肽家族, 生理状态下表达于胃肠道黏膜组织及其他黏膜组织中的分泌细胞。当机体发生消化系统炎症、肿瘤等病理改变时, TFF会伴随病理过程而发生异常表达和/或持续分泌。肿瘤病理学研究资料表明TFF的异常表达与疾病预后相关, 而从基因表达谱、肿瘤分泌蛋白谱、生物信息学等多种分析角度出发的研究结果, 进一步肯定了TFF多肽检测和TFF mRNA检测在相关疾病的临床实验诊断, 特别是在肿瘤复发、肿瘤转移的监测及疗效观察、预后判断等方面, 具有良好的实验诊断效能。因此, 对于相关疾病的实验诊断, TFF可能是一个潜在的生物学标志物。但其实际应用前景还需要更加充分的、前瞻性的临床研究资料来加以判断。

关键词: 三叶因子; 胃肠道疾病; 肿瘤; 生物学标志物

杜廷义, 秦海春, 刘俊, 张云. 三叶因子临床实验诊断学的研究进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2794-2799
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2794.asp>

0 引言

三叶因子(trefoil factor, TFF)是一类在结构上具有1个或多个三叶因子结构域, 相对分子质量较小的蛋白质多肽家族, 具有耐热、耐酸、耐酶消化的理化特性. TFF在脊椎动物中具有广泛的物种分布, 主要发现于两栖类和哺乳类. 在进化上, TFF成员的序列结构具有高度的保守性. 高度保守的氨基酸残基位点可能为其特征结构域的结构和功能所必需^[1]. 在体内, TFF可通过膜受体激活相关信号通路, 也可通过与其他蛋白质的结合而协同发挥作用, 是一类具有重要生理病理功能的蛋白质^[2,3]. 因此, TFF的研究进展及其临床应用一直受到了国内医学研究者的关注^[4-7]. 本文重点介绍近年来, 作为一个潜在的生物学标志物, TFF在消化系统疾病和肿瘤疾病的实验诊断学应用研究方面的进展.

1 TFF的生理病理表达

人类TFF的编码基因以串联的方式, 按顺序首尾相接集中排列于染色体21q22.3之上, 基因的5'非编码区均非常相似并各自包含有几个共同的调节基序, 提示TFF的表达可能存在协同调节机制^[8].

生理情况下, 胃肠道是TFF的主要分布场所, 同时在其他组织(如呼吸道黏膜、泌尿生殖道黏膜、眼睛、唾液腺、甲状腺、淋巴组织等)的分泌细胞中也广泛存在TFF的表达. 一项包括人体20种正常组织在内的平行研究进一步表明, TFF1在胃和直肠中表达量最大, 而TFF2仅在胃组织、TFF3仅在直肠组织中表达量最大. 上述的最高表达量与在其他组织中的表达量比较, 具有非常显著的差异. 该研究同时表明, 与TFF2仅局限于胃和胰腺组织不同, 分子结构关系更为紧密的TFF1和TFF3显示出更为广泛的组织分布, 并共定位于一系列的黏膜组织表面^[9].

而在胃肠道炎性疾病, 以及肝脏疾病、胰腺炎等的病变组织中, TFF出现异常表达现象. 这种异常一般表现为异位表达和/或表达量增加, 其作用与黏膜修复和再生有关^[10]. TFF的异常表达还发现于多种实体肿瘤组织, 在肿瘤病理过程中, TFF的表达受到雌激素、上皮细胞生

长因子、上皮细胞生长因子受体、自分泌的生长激素、胰岛素样生长因子1以及成纤维细胞生长因子等关键调节分子的控制, 调节机制的失衡会导致TFF的持续分泌, 而持续分泌的TFF则进一步影响到包括肿瘤基因改变、肿瘤细胞的存活及增殖、迁移和侵袭、肿瘤转移和耐药等整个病理进程^[11]. 这种伴随病理改变发生的异常表达和持续分泌, 提示TFF可能是一个具有临床应用价值的生物学标志物.

2 TFF异常表达与胃肠道肿瘤的诊断及预后

2002年, Yamachika等^[12]的报道首次将TFF3表达情况与临床病理学诊断及患者预后相结合, 该研究在追踪随访的基础上, 对209例原发性胃癌患者的手术切除组织样本进行了TFF3免疫组织化学染色分析, 其中55%的样本呈现出TFF3阳性表达. 进一步的分析发现, 在男性患者样本中, TFF3表达与病理分期、浸润生长及淋巴结转移的程度显著相关; 不论病理分期情况如何, TFF3阳性患者的预后情况明显差于阴性患者. 而在女性患者中, 虽然TFF3阳性的比例较高, 但未发现上述相关现象. 该报道认为, 针对原发性胃癌, TFF3可以是一个独立的预测指标, 其阳性标志着患者的预后较差. 男性的胃癌患病率和病死率均高于女性, 这一发现可能具有重要的临床应用价值.

Dhar等^[13]随后在mRNA和蛋白质水平上, 在TFF2的首次类似研究中发现, 在由111例晚期胃癌和33例早期胃癌手术切除组织构成的研究样本中, 细胞质内的TFF2阳性表达率为30%. TFF2阳性表达与患者的性别、年龄无关, 而与肿瘤分化程度密切相关. 阳性表达多见于弥散型肿瘤组织, 并随肿瘤分级程度的升高而增强. 综合分析结果显示, TFF2表达显著影响到患者的无病生存率, 总体生存率也表现出较差的趋势. 报道认为针对肿瘤扩散、肿瘤复发预测的实际需要, TFF2可能是一个较好的候选标志物. 同时TFF2也可能是一个肿瘤病程干预可利用的潜在靶点.

而对该111例晚期胃癌样本进行的TFF2、TFF3免疫组织化学染色分析结果显示TFF2的阳性表达率为36.9%, TFF3为44.1%. 延续至2004年的随访追踪结果表明TFF2高表达患者手术后的肿瘤复发率较高, 较高的复发率是TFF2对患者无病生存率具有显著影响的原因. 对预后因素的多变量分析显示影响无病生存率的主要

■研究前沿

自发现以来, 从结构到表达, 从生理功能到作用机制, TFF受到了广泛的关注和研究. 大量研究成果所揭示出的多种重要生理病理功能, 促进了人们对TFF临床应用价值的研究和开发, 而其在病理研究中的表现与病理改变之间的相关性, 引起了研究者们对于TFF是否可以成为一个新的生物学标志物的研究兴趣.

■相关报道

Suárez等的研究提示细胞内高水平表达的TFF1独立并显著地与胃癌患者的不良预后相关, 并认为对于胃癌, TFF1可能是一个有用的生物学标志物。

危险因素依次为肿瘤的TNM分期、TFF3的表达、TFF2的表达、手术失血量等。研究进一步证明了TFF3是一个胃癌手术后患者预后判断的有力指标。但与上述Yamachika等的报道不同的是, TFF3仅在女性患者中具有较强的预后影响。TFF3阴性的女性晚期胃癌患者, 其5年无病生存率为91.3%。这一生存率与早期胃癌患者的预后相当, 而远高于研究样本中TFF3阳性表达的患者(42.8%)^[14]。

关于TFF1在胃肠道肿瘤诊断及预后中的作用, Suárez等^[15]的研究提示细胞内高水平表达的TFF1独立并显著地与胃癌患者的不良预后相关, 并认为对于胃癌, TFF1可能是一个有用的生物学标志物。这一结论与TFF1是一个胃癌抑制基因的广泛认识之间存在矛盾, 而Fox的实验结果支持TFF1是一个胃癌抑制基因, 并提出TFF1的缺失才是一个可利用的检测指标^[16]。

实验研究与病历资料相结合的综合分析结果显示胃肠道肿瘤病理组织TFF表达情况与肿瘤的临床诊断及预后指标之间存在相关性。但就这种相关性的临床应用价值而言, 研究结论不尽一致。对30个肝细胞癌病例, 连续5年的病理组织进行的免疫组织化学实验研究证明, TFF3普遍表达于癌组织并与肿瘤分级高度相关, 低分化肿瘤具有较强的TFF3表达, 但这种表达与肝细胞癌患者的存活预期无关^[17]。也有研究表明位于染色体21q22.3的TFF家族与丝氨酸蛋白酶家族基因所发生的等位基因不平衡现象, 对于肝内胆管癌可能是一个具有预后判断价值的生物学标志物^[18]。

应用高通量分析技术和生物信息分析技术的研究结果进一步肯定了TFF所具备的临床诊断学价值。Argani等^[19]通过对肿瘤组织及正常组织的SAGE文库的比较, 筛选出的最有可能成为胰腺癌肿瘤标志物的3个基因依次为: 脂钙蛋白2(lipocalin 2)、TFF2和前列腺干细胞抗原(prostate stem cell antigen, PSCA)。同期Harsha等^[20]对多种文献库已有的海量资料的筛选分析结果认为, TFF1、TFF3在胰腺癌及其癌前期病变中有异常表达, 而在慢性胰腺炎病变中表达无明显异常, 提示TFF可能是胰腺癌早期诊断及鉴别潜在的生物学标志物。

病理学研究结果为TFF在临床诊断学上的应用和探索提供了大量的参考资料。尽管如此, 从临床诊断学实践出发, 体液中TFF蛋白水平检测及肿瘤细胞TFF mRNA表达分析更具实

用价值^[11]。

3 TFF检测分析与胃肠道炎症和肿瘤疾病的实验诊断

对于微量蛋白的检测, ELISA是临床实验诊断常用的成熟技术。Vestergaard等^[21,22]系统地设计开发了TFF的ELISA检测方法, 并进行了初步的应用尝试。其研究报道了在正常人群血清中TFF1、2、3的浓度依次为140-1 400 pmol/L、37-190 pmol/L及91-250 pmol/L, 发现了血清中的TFF浓度受病理改变的影响。研究结果提示血清TFF水平与临床病理改变之间的相关性及其应用价值是一个值得深入研究的问题。随后, 该研究小组进行的临床样本研究结果表明, 虽然血清TFF水平的增加与胃肠道炎症性疾病的活动度或病程发展存在相关性, 但由于在相同病理改变情况下的血清TFF水平变异较大并且与正常水平存在重叠, 因此认为血清TFF作为一个理想的胃肠道炎症性疾病标志物的应用前景并不乐观^[23]。而同期针对前列腺癌病例的研究结果支持血清TFF3检测对前列腺癌的侵袭性具有预测价值^[24]。对于TFF是否具有临床诊断价值这一问题, 该研究小组强调还需要更多的临床研究资料来加以判断, 因此其相关研究一直在继续^[25-27]。

肿瘤分泌蛋白组学分析是寻找肿瘤标志物的有力手段。Xue等^[28]应用差异分泌蛋白组学方法, 通过对来自于同一病例的结肠直肠癌原发癌细胞株SW480和淋巴结转移癌细胞株SW620的比较分析, 筛选出TFF3、GDP15等6个潜在的肿瘤标志物。为验证差异分泌蛋白组学分析结果, 该研究进行了Western blot和大规模的血清样本队列分析。ELISA检测结果显示病例组的血清TFF3水平显著高于正常对照组($1\ 925\ \mu\text{g/L} \pm 1\ 637\ \mu\text{g/L}$ vs $824\ \mu\text{g/L} \pm 278\ \mu\text{g/L}$), 淋巴转移癌高于非淋巴转移癌($2\ 690\ \mu\text{g/L} \pm 1\ 839\ \mu\text{g/L}$ vs $1\ 071\ \mu\text{g/L} \pm 727\ \mu\text{g/L}$)。ROC曲线分析结果表明, 作为病例组与正常对照组的鉴别实验, 其ROC曲线下面积(area under the curve, AUC)为0.730。当以 $1\ 323\ \mu\text{g/L}$ 为Cut-off值时, 诊断灵敏度和特异性依次为53.5%、97.4%。而对于淋巴结转移和非淋巴结转移的鉴别, AUC为0.822。Cut-off值设定为 $1\ 789\ \mu\text{g/L}$ 时, 实验的诊断灵敏度和特异性依次为73.7%、91.2%。而病例资料分析表明TFF3的高水平与肿瘤的较高组织学分级及TNM分期、转移的进展程度显著相关, 而与性别、年龄、肿瘤部位无显著性相关。其研究结论认

为血清TFF和GDP15检测可能成为一个结肠直肠癌鉴别,特别是癌转移监测的有价值的临床诊断试验。

对于肿瘤微转移及早期复发的监测,多基因联合检测策略的应用在临床实验诊断领域具有良好的发展趋势,而TFF mRNA在研究中也表现出较为理想的肿瘤标志物特性。为了改善以往采用的分子标志物癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA) mRNA的局限性, Mori等^[29]使用核酸微阵列的方法,筛选出了TFF1、TFF2、肝型脂肪酸结合蛋白1(fatty acid binding protein 1, FABP1)、细胞角蛋白20(cytokeratin 20, CK20)和黏蛋白2(mucoprotein 2, MUC2)5个基因为腹腔灌洗液中微量胃癌细胞检测的特异靶基因,以这5个基因构成的多基因mRNA巢式RT-PCR检测具有比常规检查方法更好的灵敏度和较理想的特异性(91%-100%)。由此可以认为,对于腹腔灌洗液中微量胃癌细胞检测,包括TFF在内的多基因mRNA巢式RT-PCR检测是一个敏感而特异的检测工具,这一方法的完善和应用,将进一步改善患者的治疗和预后。

4 TFF检测分析与其他系统肿瘤的实验诊断

同样采取多基因联合检测策略, van't Veer的研究团队针对TFF在乳腺癌转移中的诊断作用进行了探讨,其基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)筛选的结果显示TFF1、TFF3是较为理想的检测靶基因。随后,该团队将此两基因结合CK19、上皮糖蛋白2(epithelial glycoprotein 2, EGP2),组成4个癌特异基因共表达的RT-PCR检测方法,并将此方法用于血循环和周围淋巴结中的肿瘤细胞检测以判断患者的预后和监测肿瘤的转移^[30-32]。

TFF并不只是在多基因联合检测中表现出良好的肿瘤标志物特性。Mikhitarian等^[33]通过统计分析,注意到了对于肿瘤转移的早期诊断,最能提供有效诊断信息的是那些在肿瘤转移过程中表达最高的相关基因。其建立的稀释样本表达检测分析方法表明仅有*mam*和TFF1 2个基因在50倍稀释条件下有显著表达并具有较高的检测灵敏性。由此认为稀释样本表达检测分析是一个简便可行的肿瘤转移早期监测方法,TFF1是理想的基因标志物之一。Bignotti等^[34]应用基因表达图谱分析的方法筛选子宫内膜癌的血清标志物,发现在922个有差异表达的基因中,与

正常子宫内膜细胞相比较,子宫内膜样子宫内膜癌(endometrioid endometrial carcinomas, EEC)细胞的TFF3表现出最高倍数(21倍)的上调表达。随之进行的血清TFF3检测分析表明,EEC患者组血清中TFF3水平显著高于正常对照组和子宫内膜增生组。ROC分析显示,在Cut-off值设定为752 $\mu\text{g/L}$ 时,相对应于正常对照,血清TFF3检测对EEC的诊断灵敏度和特异性分别为56%、85%;当Cut-off值调整为587 $\mu\text{g/L}$ 时,对应于子宫内膜增生组,其灵敏度和特异性分别变为71%、77%。同时进行的与常用标志物糖抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)之间的比较分析显示TFF3具有更为优良的诊断性能。该项研究认为,对于EEC,血清TFF3检测可能是一个新的术前评估和术后监测的有效手段。而Takano等^[35]的研究发现TFF3 mRNA表达降低是甲状腺滤泡癌,特别是具有高侵袭、高转移风险癌的一个生物学标志。5年后,对同类研究的文献分析进一步说明,与其他候选分子标志物相比较,TFF3表达降低不仅得到了更多研究的证实,并且表现出与多基因检测策略相似的检测灵敏度、特异性和诊断准确性。综合考虑样本获得量的有限性及样本中不同靶基因mRNA拷贝丰度因素,TFF3 mRNA定量检测具有更好的临床可行性^[36]。

5 其他

TFF在其他体液(特别是尿液)中的存在及诊断价值也受到了关注。Chenard等^[37]在2004年的研究发现尿液TFF1水平是一个相当稳定的指标。研究使用了放射免疫测定的方法对10例健康个体进行了为期6 mo,每周检测1次的长期观察,结果显示在观察期间,同一个体尿液TFF1含量的变异小于10%。该研究同时也发现月经周期对尿液TFF1水平具有微弱影响,而怀孕期间尿液TFF1的明显升高反映出了体内其合成水平的增加。研究结论认为尿液TFF1定量检测可适用于乳腺癌激素依赖性的临床判断及激素治疗期的病情随访。2010年,Rinnert等^[38]使用Western blot的方法对12例肾结石患者及相同例数正常对照的尿液样本进行了TFF蛋白检测,其结果分析认为TFF2与TFF3的结合应用,可能是肾结石诊断的一个有价值的生物学标志物,也可用于治疗后的追踪观察和尿路感染的判断。而Yu等^[39]的研究发现,与传统的生物标志物相比较,尿液TFF3和白蛋白检测能为急性肾小管损伤提供更

■应用要点

TFF在相关疾病的诊断学应用,特别是在肿瘤复发、肿瘤转移的监测及疗效观测等方面,具有良好的潜在价值。

同行评价

本文可读性强, 先进性、科学性好。

加灵敏、更加可靠的诊断依据。相信新的研究成果还将会不断出现。

6 结论

自发现以来, 从结构到表达, 从生理功能到作用机制, TFF受到了广泛的关注和研究。大量研究成果所揭示出的多种重要生理病理功能, 促进了对TFF临床应用价值的研究和开发, 而其在病理研究中的表现与病理改变之间的相关性, 引起了研究者们对于TFF是否可以成为一个新的生物学标志物的研究兴趣。这种兴趣源自于临床诊断实践对诊断效能更佳的生物学标志物的不断需求。近十年来的研究结果一方面从基因表达谱、肿瘤分泌蛋白谱、生物信息学等不同角度, 对TFF作为潜在的生物学标志物在疾病的临床诊断、疗效观察、预后估计等方面的应用价值进行了肯定; 另一方面也从实际应用出发, 展示了血清TFF在实际应用中可能面临的诸如个体间变异较大, 病理值与参考值范围存在明显重叠等问题。因此, 对于TFF能否作为临床实验诊断生物学标志物, 还需要更多的、多中心的、特别是前瞻性的研究资料来加以判断。这也是研究者们共同强调的观点。总之, TFF在相关疾病的诊断学应用, 特别是在肿瘤复发、肿瘤转移的监测及疗效观测等方面, 具有良好的潜在价值。TFF的实验诊断学应用研究是一个非常有价值的工作, 因为相对于临床需求而言, 能够利用的诊断标志物实在是太少了^[40]。

7 参考文献

- Thim L, May FE. Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2956-2973
- Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, Le Floch N, Rivat C, Attoub S, Bruyneel E, Gespach C. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 2004; 25: 885-898
- Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histo-pathol* 2001; 16: 319-334
- 卢雅丕, 任建林. 三叶因子家族研究进展. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 2019-2021
- 任建林, 潘金水, 卢雅丕. 三叶因子与胃黏膜保护的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2575-2577
- 蔡稼燕, 任建林, 张靖. 三叶因子1的研究与进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2273-2278
- 陈美娅, 张靖, 任建林. 三叶因子3研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2267-2273
- Regalo G, Wright NA, Machado JC. Trefoil factors: from ulceration to neoplasia. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2910-2915
- Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and

- J Histochem Cytochem* 2007; 55: 505-513
- Kjellerv S. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 1350-1369
- Perry JK, Kannan N, Grandison PM, Mitchell MD, Lobie PE. Are trefoil factors oncogenic? *Trends Endocrinol Metab* 2008; 19: 74-81
- Yamachika T, Werther JL, Bodian C, Babyatsky M, Tatematsu M, Yamamura Y, Chen A, Itzkowitz S. Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1092-1099
- Dhar DK, Wang TC, Maruyama R, Udagawa J, Kubota H, Fuji T, Tachibana M, Ono T, Otani H, Nagasue N. Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. *Lab Invest* 2003; 83: 1343-1352
- Dhar DK, Wang TC, Tabara H, Tonomoto Y, Maruyama R, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N. Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoplasia. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6472-6478
- Suárez C, Vizoso F, Rodríguez JC, García I, Raigoso P, Allende MT, García-Muñoz JL, García-Morán M. Prognostic significance of cytosolic pS2 protein content in gastric cancer. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 37-44
- Fox CA, Sapinoso LM, Zhang H, Zhang W, McLeod HL, Petroni GR, Mullick T, Moskaluk CA, Frierson HF, Hampton GM, Powell SM. Altered expression of TFF-1 and CES-2 in Barrett's Esophagus and associated adenocarcinomas. *Neoplasia* 2005; 7: 407-416
- Khoury T, Chadha K, Javle M, Donohue K, Levea C, Iyer R, Okada H, Nagase H, Tan D. Expression of intestinal trefoil factor (TFF-3) in hepatocellular carcinoma. *Int J Gastrointest Cancer* 2005; 35: 171-177
- Muenphon K, Limpaboon T, Jearanaikoon P, Pairojikul C, Sripan B, Bhudhisawasdi V. Amplification of chromosome 21q22.3 harboring trefoil factor family genes in liver fluke related cholangiocarcinoma is associated with poor prognosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4143-4148
- Argani P, Rosty C, Reiter RE, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Ryu B, Skinner HG, Goggins M, Jaffee EM, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 4320-4324
- Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, Gollapudi S, Balakrishnan L, Dwivedi SB, Telikicherla D, Selvan LD, Goel R, Mathivanan S, Marimuthu A, Kashyap M, Vizza RF, Mayer RJ, Decaprio JA, Srivastava S, Hanash SM, Hruban RH, Pandey A. A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer. *PLoS Med* 2009; 6: e1000046
- Vestergaard EM, Poulsen SS, Grønbaek H, Larsen R, Nielsen AM, Ejlskjær K, Clausen JT, Thim L, Nexø E. Development and evaluation of an ELISA for human trefoil factor 3. *Clin Chem* 2002; 48: 1689-1695
- Vestergaard EM, Brynskov J, Ejlskjær K, Clausen JT, Thim L, Nexø E, Poulsen SS. Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2: measured on serum from patients with inflammatory bowel disease.

- Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 146-156
- 23 Grønbaek H, Vestergaard EM, Hey H, Nielsen JN, Nexø E. Serum trefoil factors in patients with inflammatory bowel disease. *Digestion* 2006; 74: 33-39
 - 24 Vestergaard EM, Borre M, Poulsen SS, Nexø E, Tørring N. Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 807-812
 - 25 Vestergaard EM, Nexø E, Wendt A, Guthmann F. Trefoil factors in human milk. *Early Hum Dev* 2008; 84: 631-635
 - 26 Samson MH, Vestergaard EM, Milman N, Poulsen SS, Nexø E. Circulating serum trefoil factors increase dramatically during pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 369-374
 - 27 Vestergaard EM, Nexø E, Tørring N, Borre M, Orntoft TF, Sørensen KD. Promoter hypomethylation and upregulation of trefoil factors in prostate cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 1857-1865
 - 28 Xue H, Lü B, Zhang J, Wu M, Huang Q, Wu Q, Sheng H, Wu D, Hu J, Lai M. Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. *J Proteome Res* 2010; 9: 545-555
 - 29 Mori K, Aoyagi K, Ueda T, Danjoh I, Tsubosa Y, Yanagihara K, Matsuno Y, Sasako M, Sakamoto H, Mafune K, Kaminishi M, Yoshida T, Terada M, Sasaki H. Highly specific marker genes for detecting minimal gastric cancer cells in cytology negative peritoneal washings. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 931-937
 - 30 Bosma AJ, Weigelt B, Lambrechts AC, Verhagen OJ, Pruntel R, Hart AA, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. Detection of circulating breast tumor cells by differential expression of marker genes. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1871-1877
 - 31 Weigelt B, Bosma AJ, Hart AA, Rodenhuis S, van 't Veer LJ. Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients. *Br J Cancer* 2003; 88: 1091-1094
 - 32 Weigelt B, Verduijn P, Bosma AJ, Rutgers EJ, Peterse HL, van't Veer LJ. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. *Br J Cancer* 2004; 90: 1531-1537
 - 33 Mikhitarian K, Gillanders WE, Almeida JS, Hebert Martin R, Varela JC, Metcalf JS, Cole DJ, Mitas M. An innovative microarray strategy identifies informative molecular markers for the detection of micrometastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3697-3704
 - 34 Bignotti E, Ravaggi A, Tassi RA, Calza S, Rossi E, Falchetti M, Romani C, Bandiera E, Odicino FE, Pecorelli S, Santin AD. Trefoil factor 3: a novel serum marker identified by gene expression profiling in high-grade endometrial carcinomas. *Br J Cancer* 2008; 99: 768-773
 - 35 Takano T, Miyauchi A, Yoshida H, Kuma K, Amino N. High-throughput differential screening of mRNAs by serial analysis of gene expression: decreased expression of trefoil factor 3 mRNA in thyroid follicular carcinomas. *Br J Cancer* 2004; 90: 1600-1605
 - 36 Takano T, Yamada H. Trefoil factor 3 (TFF3): a promising indicator for diagnosing thyroid follicular carcinoma. *Endocr J* 2009; 56: 9-16
 - 37 Chenard MP, Tomasetto C, Bellocq JP, Rio MC. Urinary pS2/TFF1 levels in the management of hormone-dependent breast carcinomas. *Peptides* 2004; 25: 737-743
 - 38 Rinnert M, Hinz M, Buhtz P, Reiher F, Lessel W, Hoffmann W. Synthesis and localization of trefoil factor family (TFF) peptides in the human urinary tract and TFF2 excretion into the urine. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 639-647
 - 39 Yu Y, Jin H, Holder D, Ozer JS, Villarreal S, Shughrue P, Shi S, Figueroa DJ, Clouse H, Su M, Muniappa N, Troth SP, Bailey W, Seng J, Aslamkhan AG, Thudium D, Sistare FD, Gerhold DL. Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injury. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 470-477
 - 40 McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM; Statistics Subcommittee of NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100: 229-235

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 WJG 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology* (WJG)(中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, WJG在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。(WJG编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

胃痛消痞方对功能性消化不良大鼠血清及胃组织中Ghrelin、Leptin的影响

陈苏宁, 礼海, 史业东

■背景资料

功能性消化不良(FD)是最常见的消化内科疾病。该病的病因和发病机制至今尚未清楚, 西医无特效药, 多采取对症治疗, 而中医治疗FD可获得较满意的疗效。因此寻找促胃动力中药具有现实的理论意义和实用价值。

陈苏宁, 史业东, 中国医科大学附属盛京医院 辽宁省沈阳市 110004

礼海, 沈阳市第二中医医院 辽宁省沈阳市 110101

辽宁省科技厅自然科学基金资助项目, No. 20082101

作者贡献分布: 陈苏宁、礼海及史业东在该实验中贡献均等; 陈苏宁负责设计课题、文章撰写、修改及数据分析; 礼海负责数据整理、统计分析、文章撰写; 史业东负责动物实验、数据搜集、整理及数据统计分析。

通讯作者: 陈苏宁, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院中医科。

chensn@sj-hospital.org

电话: 024-96615-66311

收稿日期: 2010-05-25 修回日期: 2010-07-08

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-09-18

Influence of Weitongxiaopi Decoction on serum and gastric ghrelin and leptin in rats with functional dyspepsia

Su-Ning Chen, Hai Li, Ye-Dong Shi

Su-Ning Chen, Ye-Dong Shi, Department of Traditional Chinese Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Hai Li, the Second Traditional Chinese Medicine Hospital of Shenyang, Shenyang 110101, Liaoning Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20082101

Correspondence to: Professor Su-Ning Chen, Department of Traditional Chinese Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chensn@sj-hospital.org

Received: 2010-05-25 Revised: 2010-07-08

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To observe the influence of Weitongxiaopi Decoction (WTXP) on serum and gastric ghrelin and leptin in rats with functional dyspepsia of liver-depression and spleen-deficiency type.

METHODS: A rat model of functional dyspepsia was established by the improved tail clamp method. The rats with functional dyspepsia were then given WTXP or cisapride (CP) for 3 wk. After the treatment, serum and gastric ghrelin and leptin were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot, respectively.

RESULTS: The content of serum ghrelin was significantly higher (132.7 ± 10.78 vs 103.17 ± 13.46 , $P < 0.01$) and that of serum leptin was significantly lower (31.30 ± 5.81 vs 37.55 ± 4.32 , $P < 0.01$) in the WTXP group than in the CP group. The expression level of gastric ghrelin was significantly higher (150.87 ± 12.76 vs 118.97 ± 8.93 , $P < 0.01$) and that of gastric leptin was significantly lower (60.28 ± 9.28 vs 67.75 ± 5.67 , $P < 0.01$) in the WTXP group than in the CP group.

CONCLUSION: Weitongxiaopi Decoction can increase the levels of serum and gastric ghrelin but decrease those of serum and gastric leptin in rats with functional dyspepsia.

Key Words: Functional dyspepsia; Ghrelin; Leptin

Chen SN, Li H, Shi YD. Influence of Weitongxiaopi Decoction on serum and gastric ghrelin and leptin in rats with functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2800-2803

摘要

目的: 探讨胃痛消痞方对功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)肝郁脾虚型大鼠血清及胃组织中Ghrelin、Leptin含量的影响。

方法: 通过改良夹尾刺激法建立FD大鼠模型, 胃痛消痞方(中药)组与西沙必利(西药)组灌服相应药物3 wk, 模型组 and 对照组进行对照观察。利用ELISA、Western blot检测血清与胃组织中Ghrelin与Leptin的含量。

结果: 利用ELISA检测Ghrelin、Leptin含量, 中药组中Ghrelin含量显著高于西药组($132.7 \text{ mg/L} \pm 10.78 \text{ mg/L}$ vs $103.17 \text{ mg/L} \pm 13.46 \text{ mg/L}$, $P < 0.01$); 中药组中Leptin含量显著低于西药组($31.30 \text{ mg/L} \pm 5.81 \text{ mg/L}$ vs $37.55 \text{ mg/L} \pm 4.32 \text{ mg/L}$, $P < 0.01$)。Western blot检测Ghrelin、Leptin蛋白表达水平, 中药组中Ghrelin蛋白表达水平显著高于西药组(150.87 ± 12.76 vs 118.97 ± 8.93 , $P < 0.01$); 中药组中Leptin蛋白表达水平显著低于西药组(60.28 ± 9.28 vs 67.75 ± 5.67 , $P < 0.01$)。

■同行评议者

魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院中西医结合科

结论:胃痛消痞方可以提高血清及胃组织蛋白中Ghrelin含量,降低Leptin含量。

关键词:功能性消化不良;胃促生长素;瘦素

陈苏宁, 礼海, 史业东. 胃痛消痞方对功能性消化不良大鼠血清及胃组织中Ghrelin、Leptin的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2800-2803
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2800.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是临床常见病,国内FD在社会人群中患病率在10%-30%,占消化门诊人数的40%以上^[1]。目前,西医治疗FD的药物主要以促胃动力药为主,如多巴胺受体阻滞剂或五羟色胺受体激动剂^[2-5]等,其疗效欠佳,并需长期服用,停药后易于复发。近年来,中药治疗FD方面由于其疗效突出,且不良反应小,引起医学界学者广泛关注。因此,探索及研究该病的机制和中药治疗方法,对研发新型有效、安全的药物治疗本病具有特别重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选择健康♂SPF级Wistar大鼠40只,12 wk,体质量180-220 g,由中国医科大学实验动物中心提供,动物使用许可证号SY SK(辽)2003-0019。碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG,PKA MPC-1,胃饥饿素(Ghrelin)及瘦素(Leptin)抗体购自北京中山生物技术有限公司;Ghrelin及Leptin酶联免疫吸附测定(ELISA法)试剂盒,由博士德生物工程有限公司提供。SW1022-ProfiBlot 48全自动蛋白印迹分析仪由美国Bioneer公司生产;RT-6000全自动酶标仪由美国雷杜公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模:采用随机数字表方法随机分为4组,即正常对照组、模型组、胃痛消痞方(中药)组,西沙必利(西药)组,每组10只。除正常对照组外,其余3组均采用改良夹尾刺激法制造FD肝郁脾虚模型^[6],即每日用长海绵镊子钳夹大鼠尾巴末端1/3处,以令其尖叫挣扎但不破皮为度(如有抓伤破皮,则用0.5%碘伏消毒受伤部位,以防感染),使其暴怒并与其他大鼠撕打,每次持续30 min,每日2次,连续刺激3 wk。造模期间,各组大鼠自由进食及饮水。大鼠出现躁动等紧张、焦虑反应,且进食量明显减少,即为造模

成功。

1.2.2 药物制备及给药:造模成功后,胃痛消痞方(柴胡、白芍、延胡索、炒枳实、炒砂仁、炒麦芽、焦山楂、炒鸡内金、党参、炙甘草、炒白术)由中国医科大学附属盛京医院药局负责煎煮制备;西沙必利,由西安杨森制药有限公司提供。给药剂量依据人和鼠给药剂量换算公式^[7] $dB = dARB/RA(WA/WB)1/3$ 进行计算,每日给予胃痛消痞方9 g/kg,西沙必利组给予含有2 mg/kg的药物,模型组及正常组给予灌服等量蒸馏水,每日2次灌胃,持续3 wk。

1.2.3 取材:在给药第21天后,禁食不禁水12 h,麻醉处死全部大鼠,心脏取血,分离血清,用于ELISA法检测血清中Ghrelin、Leptin的含量;每只大鼠取胃窦部组织100 mg,用蛋白印迹分析法检测胃组织中Ghrelin及Leptin蛋白表达水平,并于液氮中冷冻后在-80℃条件下保存待测。

1.2.4 Western blot蛋白印迹分析法检测胃组织中Ghrelin及Leptin蛋白表达:取标本解冻加入冰预冷的细胞裂解液500 μL,将组织块剪碎后,放入冰水浴中超声粉碎。4℃下12 000 r/min离心1 h取出上清。标准蛋白1 g/L,分别取蛋白样品,标准蛋白10 μL,标记清楚在空白管加入10 μL蒸馏水。每个管中加入2.5 mL碱性铜液混匀,室温放置20 min后分别加入0.25 mL酚试剂,混匀室温放置30 min,650 nm处、1 cm光径,空白管调零,测各管吸光度值。加入适当的分离胶2.5 mL,蒸馏水4 mL,凝胶液加至距离梳子齿约0.5 cm处,在分离胶上覆盖约15 mm的无水乙醇,30-40 min后胶体聚合。灌注分离胶后,加注少量去离子水,室温下充分聚合后,倾去去离子水,滤纸吸干,灌注浓缩胶,约30 min后聚合,拔出梳子。各标本蛋白上样50 μL;上清用10% SDS-PAGE分离, BIO-RAD电泳板,双板电泳条件为150 V, 30 mA, 1.5 h。硝酸纤维素膜在转印液中平衡10 min,胶在负极,膜在正极,经2 h, 50 V转印后TTBS洗膜1次。用含5%去脂奶粉的TTBS封闭,4℃过夜。取出膜后, TBS洗膜5 min×3次,加入一抗(1:400),置于室温下2 h。加入碱性磷酸酶标记的二抗(1:2 000),室温下2 h。清洗,显色,采用Image-Pro Plus6.0图像分析软件,记录每条蛋白电泳带的灰度值,进行定量分析。

1.2.5 ELISA法检测血清中Ghrelin、Leptin的含量:ELISA检测方法严格按照试剂盒说明进行操作。

统计学处理 各组各方法所测数据均以mean±SD表示,各组间差异应用统计学软件SPSS13.0

■研发前沿

中药对功能性消化不良肝郁脾虚型大鼠血清及胃组织中Ghrelin、Leptin含量的影响是目前治疗功能性消化不良领域中比较热门的研究。而亟待解决的问题是中药促胃肠激素分泌的作用机制。

■相关报道

近年来许多研究表明Leptin与Ghrelin是一对生物学效应相对抗的脂肪因子,他们相互作用,共同参与调节机体的能量代谢。

■创新亮点

本文首次研究了胃痛消痞方对肝郁脾虚型功能性消化不良大鼠模型血清及胃组织中Ghrelin、Leptin含量的影响,对研发新型有效、安全的药物治疗本病具有重要的意义。

表 1 胃痛消痞方对FD模型大鼠血清及胃组织中Ghrelin蛋白的影响

	空白对照组	模型组	中药组	西药组
血清(mg/L)	162.57 ± 12.83 ^b	64.37 ± 6.45	132.70 ± 10.78 ^{bd}	103.17 ± 13.46 ^b
胃组织	171.98 ± 16.19 ^b	80.22 ± 6.47	150.87 ± 12.76 ^{bd}	118.97 ± 8.93 ^b

^b*P*<0.01 vs 模型组; ^d*P*<0.01 vs 西药组。

表 2 胃痛消痞方对FD模型大鼠血清及胃组织中Leptin蛋白的影响

	空白对照组	模型组	中药组	西药组
血清(mg/L)	23.86 ± 5.16 ^b	43.74 ± 6.38	31.30 ± 5.81 ^{bd}	37.55 ± 4.32 ^b
胃组织	51.64 ± 7.89 ^b	76.47 ± 10.14	60.28 ± 9.28 ^{bd}	68.75 ± 5.67 ^b

^b*P*<0.01 vs 模型组; ^d*P*<0.01 vs 西药组。

进行方差分析,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃痛消痞方对FD模型大鼠血清及胃组织中Ghrelin蛋白的影响 各治疗组Ghrelin含量均低于空白对照组(*P*<0.01),但高于模型组(*P*<0.01);中药治疗组Ghrelin水平高于西药组(*P*<0.01,表1,图1A)。

2.2 胃痛消痞方对FD模型大鼠血清及胃组织中Leptin蛋白的影响 各治疗组Leptin含量均低于空白对照组(*P*<0.01),但高于模型组(*P*<0.01);中药治疗组Leptin水平高于西药组(*P*<0.01,表2,图1B)。

3 讨论

Ghrelin是由胃和下丘脑弓状核神经元释放的脑肠肽,其通过旁分泌、自分泌和内分泌产生,联系胃肠道和中枢调节消化系统功能。Ghrelin是中枢和外周调节胃酸分泌的活性肽之一,通过迷走神经参与调节中枢和外周的胃酸分泌。研究显示^[8],空腹血浆非酰基化Ghrelin水平和血浆总Ghrelin水平在FD患者显著降低,本实验也证明了这一观点。而Leptin是一种主要由白色脂肪组织分泌的蛋白质类激素,可以固定大脑对食欲的反应,能影响机体的摄食、能量代谢等功能,与其他胃肠激素协同作用进而达到调节胃肠功能作用。有学者研究发现,FD患者由于血清Leptin水平的异常从而改变了其对摄食及胃运动的调节,产生早饱、餐后饱胀不适等症状;FD患者血清Leptin水平的改变也可能是由于患者长期摄食减少,而导致的机体一种适应性反应。

■应用要点

胃痛消痞方可以升高血清及胃组织蛋白中Ghrelin的含量,同时降低血清及胃组织中Leptin蛋白的含量,为临床上应用胃痛消痞方治疗肝郁脾虚型功能性消化不良提供了理论和实验依据。

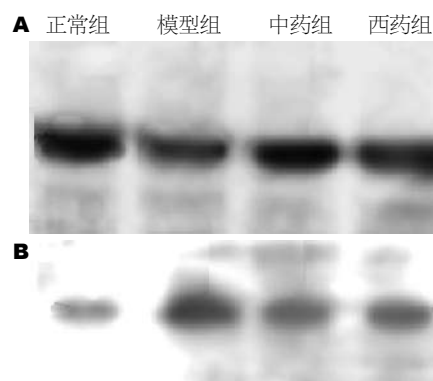


图 1 Western blot示胃痛消痞方对FD模型大鼠胃组织中Ghrelin和Leptin蛋白的影响。A: Ghrelin; B: Leptin。

综合Leptin与Ghrelin生理病理作用来看,他们是一对生物学效应相对抗的脂肪因子,共同参与调节机体的能量代谢,且Leptin与Ghrelin相互作用^[9]。Ghrelin相关神经元与Leptin相关神经元广泛重叠,Leptin与Ghrelin的分泌节律基本相同。Ghrelin能剂量性依赖地减弱Leptin对摄食的抑制作用,给予Ghrelin后可引起Leptin的mRNA表达增加并抵消Leptin引起的神经肽Y(neuropeptide Y, NPY) mRNA表达下降。另一方面,Leptin也能下调Ghrelin的表达,并且抑制Ghrelin引起的钙内流,进而抑制食欲。因此,研究两者的关系为进一步揭示FD发病机制奠定基础。从实验结果上看,用中医药治疗本病更具突出疗效。中医药治疗重视辨证论治,整体观念全面调节脏腑机能,与西药针对一点的靶向治疗更为全面。

FD在中医古籍中无此病名,就其临床表现当属中医之“胃痞”等症范畴。中医学对“胃痞”等证候病因病机的探析上,十分深入历代

医家阐述颇详。《素问·调经论》云：“有所劳倦，形气衰少，谷气不盛，上焦不行，下脱不通……”，论述了虚而有滞的病机，认为脾虚是其发病的重要病理基础。《素问·五运行大论》曰：“思伤脾”，已认识到FD的发病与精神、心理等因素相关。《景岳全书·痞满》对本病辨证颇为明细：“痞者，痞塞不开之谓；满者，胀满不行之谓。盖满则近胀，而痞则不必胀也。所以痞满一证，大有疑辨，则在虚实二字，凡有邪有滞而痞者，实痞也；无物无滞而痞者，虚痞也。”因此，在中医治疗上，应重视气机条畅与情志因素。胃痛痞满方在调节脾胃脏腑功能的同时，重视人体气机与情志的疏导。柴胡之药和解表里，疏肝理气，配伍健脾之药枢机条达，升降有序；实痞者，消滞泄实；虚痞者，调畅气机；可显柴胡泄热与理气之功。本方有四君之影，伏有白芍甘草汤与延胡索合用益气、缓急止痛疗效更佳。因此，本方其扶正而不矫正，益气而不补气，调畅而不通利，缓急而不镇痛，恰到好处，相得益彰。

4 参考文献

- 1 池肇春, 元玉琴, 董全江. 幽门螺杆菌感染及其相关疾病的诊断与治疗. 第1版. 北京: 军事医学科学出版社, 2008: 215-216
- 2 Holtmann G, Talley NJ, Liebrechts T, Adam B, Parow C. A placebo-controlled trial of itopride in functional dyspepsia. *N Engl J Med* 2006; 354: 832-840
- 3 Chiba T, Tokunaga Y, Ikeda K, Takagi R, Chishima R, Terui T, Kudara N, Endo M, Inomata M, Orie S, Suzuki K. Effects of itopride hydrochloride and ranitidine in patients with functional dyspepsia: comparison between prokinetic and acid suppression therapies. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1878-1881
- 4 Zeng J, Zuo XL, Li YQ, Wei W, Lv GP. Tegaserod for dyspepsia and reflux symptoms in patients with chronic constipation: an exploratory open-label study. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 529-536
- 5 Boeckxstaens GE, Tytgat GN, Wajsb E, van Nueten L, de Ridder F, Meulemans A, Tack J. The influence of the novel 5-HT₄ agonist R137696 on the proximal stomach function in healthy volunteers. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 919-926
- 6 郭海军, 林洁, 李国成. 功能性消化不良的动物模型研究. 中国中西医结合消化杂志 2001; 9: 141-142
- 7 孙敬方. 动物实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 357
- 8 郝国强, 王德征, 费乃昕, 薛承锐. Ghrelin对急性胰腺炎大鼠胃肠动力的影响作用. 安徽医药 2008; 12: 216-217
- 9 陈莹. 功能性消化不良患者血清Ghrelin和瘦素水平以及心理因素的研究. 天津: 天津医科大学, 2008: 1-67

■同行评价

本文选题尚可, 设计合理, 方法科学, 具有一定的临床意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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 2009-03-26)

TKTL1蛋白及mRNA在食管鳞癌组织中的表达及其临床意义

闫艳琴, 崔黎, 李晟磊, 刘红涛

■背景资料

TKTL1是连接磷酸戊糖途径和糖酵解途径代谢通路的关键酶, 而酮基转移酶活性上调的肿瘤细胞, 能通过不依赖氧产生的ATP使得葡萄糖作为一种能量来源, 与多种肿瘤的发生、发展密切相关。

闫艳琴, 河南省郑州市骨科医院普内科 河南省郑州市450001

崔黎, 李晟磊, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市450052

刘红涛, 郑州大学生物工程系细胞生物学研究室 河南省郑州市450001

河南省教育厅自然科学基金资助项目, No. 2010A310008

作者贡献分布: 此课题李晟磊设计; 研究过程由闫艳琴、崔黎及刘红涛操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘红涛提供; 数据分析由刘红涛与李晟磊完成; 本论文写作由闫艳琴、崔黎、李晟磊及刘红涛共同完成。

通讯作者: 刘红涛, 450001, 河南省郑州市, 郑州大学生物工程系细胞生物学研究室. liuh1230@126.com

电话: 0371-66658175

收稿日期: 2010-06-21 修回日期: 2010-08-03

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-18

Clinical significance of TKTL1 expression in esophageal squamous cell carcinoma

Yan-Qin Yan, Li Cui, Sheng-Lei Li, Hong-Tao Liu

Yan-Qin Yan, Department of Internal Medicine, Zhengzhou Orthopedics Hospital, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Sheng-Lei Li, Li Cui, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Hong-Tao Liu, Laboratory of Cell Biology, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of the Education Department of Henan Province, No. 2010A310008

Correspondence to: Hong-Tao Liu, Laboratory of Cell Biology, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. liuh1230@126.com

Received: 2010-06-21 Revised: 2010-08-03

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of transketolase like-1 (TKTL1) protein and mRNA and to analyze its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: The expression of TKTL1 protein and mRNA was detected by immunohistochemistry and *in situ* hybridization in 62 ESCC specimens, 31 tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelial specimens, and 62 normal esophageal mucosal specimens, respectively.

RESULTS: The positive rates of TKTL1 protein expression in normal esophageal epithelium, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and ESCC were 17.7% (11/62), 29.0% (9/31) and 53.2% (33/62), respectively, with significant differences among the three groups (all $P < 0.05$). TKTL1 protein expression was closely correlated with infiltrative depth, lymphatic metastasis and TNM grade in ESCC (all $P < 0.05$). The positive rates of TKTL1 mRNA expression in normal esophageal epithelium, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and ESCC were 4.8% (3/62), 22.6% (7/31) and 43.5% (27/62), respectively, with significant difference among the three groups (all $P < 0.05$). TKTL1 mRNA expression was closely associated with infiltrative depth, lymphatic metastasis and TNM grade in ESCC (all $P < 0.05$). There is a positive correlation between TKTL1 mRNA and protein expression ($\gamma_p = 0.302$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: TKTL1 expression may be associated with the development, invasion and metastasis of ESCC.

Key Words: Transketolase like-1 gene; Immunohistochemistry; *In situ* hybridization; Esophageal squamous cell carcinoma

Yan YQ, Cui L, Li SL, Liu HT. Clinical significance of TKTL1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2804-2808

摘要

目的: 探讨TKTL1在食管鳞状细胞癌中的表达及其临床意义。

方法: 分别采用原位杂交及免疫组织化学的方法检测62例食管鳞癌组织、31例癌旁不典型增生组织及62例正常食管黏膜组织中TKTL1蛋白及其mRNA的表达。

结果: 正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织中TKTL1蛋白阳性表达率依次增高, 分别为17.7%(11/62)、29.0%(9/31)、53.2%(33/62), 组间比较差异有统计学意义(均 $P < 0.05$); TKTL1蛋白表达与癌的浸润深

■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

度、淋巴结转移及TNM分期密切相关, 组间比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及食管鳞癌组织中TKTL1 mRNA的阳性表达率依次增高, 分别为4.8%(3/62)、22.6%(7/31)、43.5%(27/62), 组间比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$); TKTL1 mRNA表达与癌的浸润深度、淋巴结转移及TNM分期密切相关, 组间比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。TKTL1蛋白及其mRNA的表达呈正相关关系($\gamma_p=0.302$, $P<0.01$)。

结论: TKTL1蛋白及其mRNA表达率升高可能与食管鳞癌的发生、发展及浸润、转移有关。

关键词: 酮醇酶样基因-1; 免疫组织化学; 原位杂交; 食管鳞状细胞癌

闫艳琴, 崔黎, 李晟磊, 刘红涛. TKTL1蛋白及mRNA在食管鳞癌组织中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2804-2808
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2804.asp>

0 引言

浸润和转移既是食管鳞癌的重要生物学特性, 也是其难以治愈并导致患者死亡的关键问题之一。转酮醇酶(transketolase, TKT)是磷酸戊糖代谢中联系磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)和葡萄糖氧化的关键酶, 很多病理过程中存在TKT活性的改变, 其异常表达与多种恶性肿瘤细胞的生长、侵袭及转移过程密切相关^[1-3]。因此, TKT已成为研究抗肿瘤药物极具吸引力的新靶点。为了探讨转酮醇酶样基因-1(transketolase like gene-1, TKTL1)在食管鳞癌发生、发展及演变过程中的作用, 我们采用了免疫组织化学及原位杂交的方法, 联合检测了TKTL1蛋白及其mRNA在食管鳞癌中的表达, 以期寻找食管癌早期诊断和判断预后的分子指标。

1 材料和方法

1.1 材料 62例食管癌手术切除标本于2006-02-26/03-16取自安阳市肿瘤医院。其中男36例, 女26例, 年龄38-75岁, 所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学、原位杂交染色: 全部62例标本分别取自无坏死癌灶、癌旁3 cm以内及远端(>3 cm, 经HE染色证实, 癌旁组织中31例有不典型增生)正常黏膜组织, 经40 g/L多聚甲醛固

定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度4-6 μm , 分别用于HE、免疫组织化学及原位杂交染色。62例均经组织学证实为鳞状细胞癌。其中组织学分级 I 级15例, II 级25例, III级22例; 伴淋巴结转移者20例, 无淋巴结转移者42例; 浸润至浅层(黏膜下层或浅肌层)者7例, 浸润深层(深肌层或外膜层)者55例; 按1997年UICC的TNM分期, I、II期19例, III、IV期43例。鼠抗人单克隆抗体TKTL1购自美国R&D公司, SP免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术开发公司。采用SP法, TKTL1单抗稀释, 稀释倍数均为1:170, DAB显色, 苏木素复染。染色步骤严格按说明书进行, 以PBS液代替一抗作为阴性对照。预杂交液、SA-Bio-AP、BCIP/NBT均购自武汉博士德生物技术有限公司。探针序列: 原位杂交5'端生物素标记、全硫代修饰探针由北京奥科生物技术有限公司合成。TKTL1探针序列: GTGGACGGACCATTGCTTTTG。标本经新鲜配制二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水后, 用新鲜配制的0.5% H_2O_2 室温处理30 min, 以灭活内源性过氧化物酶; 3%柠檬酸新鲜配制蛋白酶(0.01 g/L), 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 消化标本DNA结合蛋白; 每张玻片滴加20 μL 不含探针的预杂交液(42 $^{\circ}\text{C}$), 预杂交4 h; 加含探针(1 ng/L)的杂交液, 42 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒内杂交12 h; 0.1 \times 标准柠檬酸盐42 $^{\circ}\text{C}$ 洗后, 加SA-Bio-AP 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 漂洗后加BCIP/NBT, 避光显色2-4 h。以不含探针的标本作阴性对照。

1.2.2 免疫组织化学及原位杂交染色结果判定: TKTL1蛋白阳性信号呈浅黄色至棕黄色颗粒, 位于细胞质内; mRNA阳性信号呈棕紫蓝色颗粒样物质, 也位于细胞质内。高倍镜下随机选取5个视野(每个视野观察细胞数不少于200个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定。采用9分评分制: 按照阳性细胞比例 $\leq 10\%$ 为1分, 10%-50%为2分, $>50\%$ 为3分; 按染色强弱: 阴性为0分; 淡黄(蓝)色染色为1分; 中度黄(蓝)色染色为2分, 棕黄(紫蓝)色染色为3分。然后按照“阳性细胞得分 \times 染色强弱得分”计总分, 总分 <3 为阴性, 总分 ≥ 3 为阳性^[4,5]。

统计学处理 应用SPSS11.0统计学软件, 行 χ^2 检验, 相关性检验用Spearman相关分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 TKTL1蛋白及其mRNA在食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中的表达 TKTL1蛋白定位于细胞胞质中, 偶可见有胞核

■研究前沿

关于TKTL1基因与食管癌浸润、转移的关系及TKTL1表达相关性的研究, 迄今国内外均未见报道。关于TKTL1与恶性肿瘤关系的研究已成为热点。

■创新盘点

本文首次采用免疫组织化学及原位杂交方法联合检测了食管癌高发区河南安阳的食管癌患者手术切除的癌组织、癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜组织中TKTL1蛋白及mRNA的表达情况。

表 1 TKTL1蛋白及其mRNA在食管鳞癌组织、癌旁不典型增生组织及正常黏膜组织中的表达

部位	TKTL1蛋白				TKTL1 mRNA		
	<i>n</i>	阳性表达 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	阳性表达 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
正常黏膜上皮	62	11(17.7)	17.805	0.000	3(4.8)	25.597	0.000
非典型增生组织	31	9(29.0)			7(22.6)		
鳞癌组织	62	33(53.2)			27(43.5)		

表 2 TKTL1蛋白及其mRNA的表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系

病理特征	TKTL1蛋白				TKTL1 mRNA		
	<i>n</i>	阳性表达 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	阳性表达 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
组织学分级							
I	15	5(33.3)	3.419	0.181	4(26.7)	2.313	0.315
II	25	14(56.0)			12(48.0)		
III	22	14(63.6)			11(50.0)		
浸润深度							
浅层	7	1(14.3)	4.806	0.028	0(0.0)	6.087	0.014
深层	55	32(58.2)			27(100.0)		
淋巴结转移							
无	42	17(40.5)	8.501	0.004	13(31.0)	8.403	0.004
有	20	16(80.0)			14(70.0)		
TNM分期							
I、II	19	5(26.3)	7.968	0.005	3(31.6)	8.587	0.003
III、IV	43	28(65.1)			24(76.7)		

及周边不等量的间质细胞着色, 阳性信号呈浅黄色至棕黄色颗粒. 对照组标本中无阳性信号显示. 不同临床病理特征食管组织中TKTL1蛋白表达的情况见表1和图1. TKTL1 mRNA定位于细胞胞质中, 呈蓝紫色颗粒. 对照组标本中无阳性信号显示. 不同临床病理特征食管组织中TKTL1 mRNA表达的情况见表1和图2.

2.2 TKTL1蛋白及mRNA表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系 TKTL1蛋白及其mRNA表达均与食管鳞癌组织学分级无关($P>0.05$), 与浸润深度、有无淋巴结转移及TNM分期密切相关(均 $P<0.05$ 或 0.01 , 表2).

2.3 TKTL1蛋白及其mRNA在食管鳞癌组织中表达的相关性 在62例食管鳞癌组织中, TKTL1蛋白表达阳性表达33例中, TKTL1 mRNA表达阳性占19例, 而TKTL1蛋白表达阴性的29病例中, TKTL1 mRNA表达阴性的占21例. TKTL1蛋白及mRNA在食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系($\gamma_p = 0.302$, $P<0.05$, 表3).

3 讨论

人类多数恶性肿瘤的发生是因为细胞失去了增

表 3 TKTL1蛋白及其mRNA在食管鳞癌组织中表达的相关性

TKTL1 mRNA	<i>n</i>	TKTL1蛋白		γ_p 值	<i>P</i> 值
		+	-		
+	27	19	8	0.302	0.017
-	35	14	21		

殖及分化成熟的能力所引起的, 其发生发展过程是多因素参与及多步骤调控的复杂过程, 其中涉及了遗传学和表观遗传学等改变^[6,7].

糖酵解途径及PPP是肿瘤中葡萄糖代谢的两个通路. 研究发现, 许多恶性肿瘤的肿瘤细胞内都存在有与糖酵解有关的酶类表达显著升高的现象, 而这些酶类的活性增强与肿瘤细胞糖酵解的增强密切相关. PPP可以向肿瘤细胞提供腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)、还原型辅酶II(reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化还原同等物及戊糖, 这都与恶性肿瘤的发生关系非常密切^[8-10]. 酮醇基转移酶是PPP的非氧化分支的限速酶, 而PPP的非氧化分支是恶

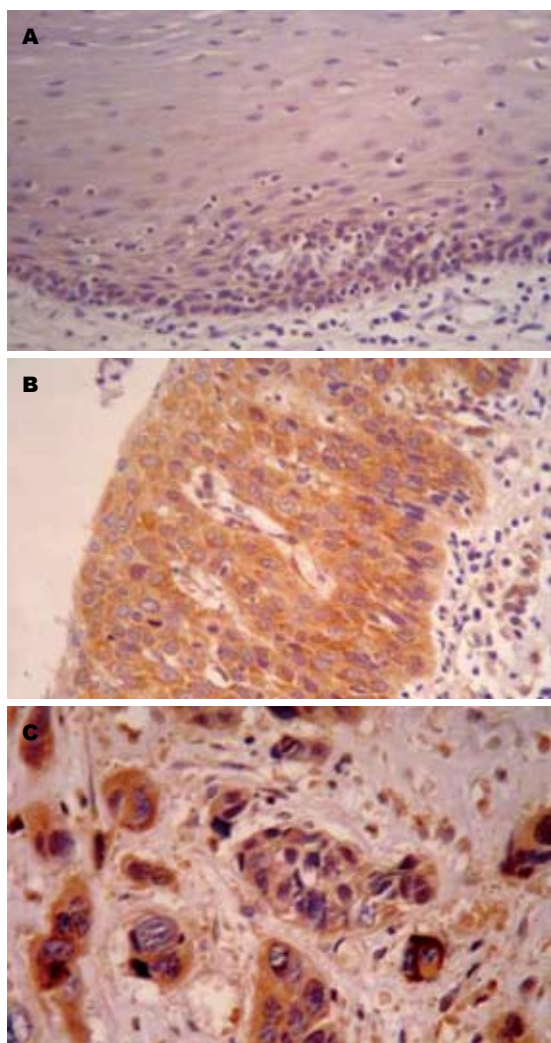


图 1 TKTL1蛋白的表达(SP × 200). A: 正常黏膜; B: 癌旁组织; C: 癌组织.

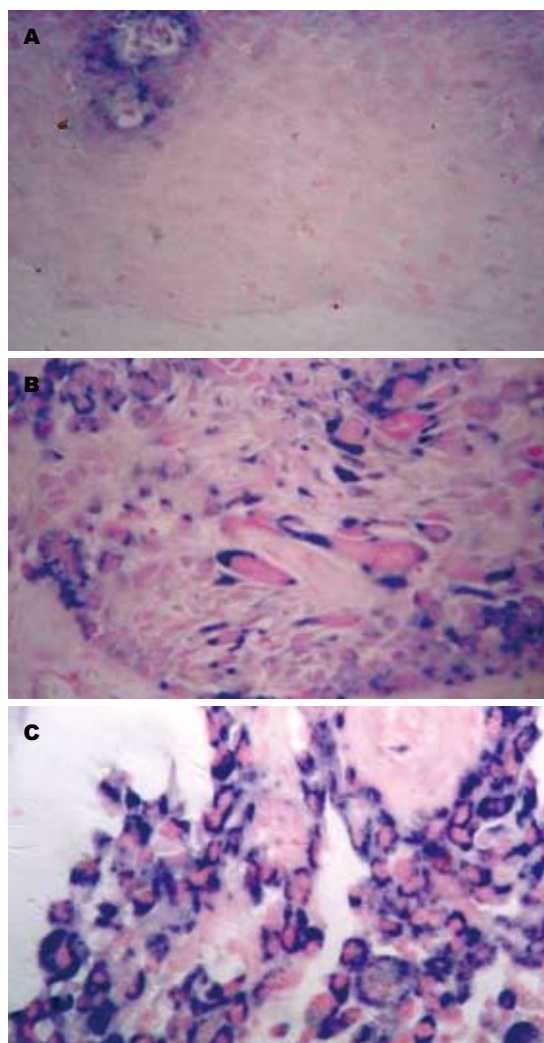


图 2 TKTL1 mRNA的表达(ISH × 200). A: 正常黏膜; B: 癌旁组织; C: 癌组织.

■名词解释

转酮醇酶(TKT): 是磷酸戊糖代谢中联系磷酸戊糖途径(PPP)和葡萄糖氧化的关键酶, 很多病理过程中存在TKT活性的改变, 其异常表达与多种恶性肿瘤细胞的生长、侵袭及转移过程密切相关.

性肿瘤细胞中核苷酸中核糖的主要来源地, 并产生NADPH^[11]. TKT家族包含有3种TKT基因: TKT、TKTL1和TKTL2. TKTL1是TKT家族成员之一, 其定位于Xq28, 该区域包含了多种与恶性肿瘤转化及与细胞周期有关的基因, 在肿瘤发生发展上起到非常重要的作用. TKTL1蛋白过表达与葡萄糖代谢高度相关, 在许多肿瘤里其蛋白质水平与肿瘤转移和预后差相关. TKTL1是连接PPP和糖酵解途径的代谢通路的关键酶, 而酮醇基转移酶活性上调的肿瘤细胞, 能通过不依赖氧的产生的ATP使得葡萄糖作为一种能量来源. 另外, 酮醇基转移酶通过利用乙酰辅酶A连接着需氧糖酵解和脂肪酸盐产物, 在肿瘤细胞中TKTL1对于细胞增殖和葡萄糖代谢都有非常重要的意义^[12-14].

本研究将收集到的62食管癌标本进行免疫组织化学及原位杂交染色分析, 比较了食管鳞

癌患者远端正常食管黏膜、癌旁不典型组织及癌组织中TKTL1蛋白及mRNA的表达程度及其与癌组织的组织学分级、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期的关系. 结果显示正常食管黏膜组织中TKTL1的表达极低, 而癌组织中TKTL1表达程度较高($P<0.05$), 这个结果与其他恶性肿瘤的结果基本吻合, 表明TKTL1在食管癌中也存在高表达的现象. 同时, 我们又比较了局限在浅肌层以内的癌组织与已经浸润至深肌层或纤维膜的癌组织中TKTL1表达的差异. 结果显示浸润深肌层和/或纤维膜的癌组织中TKTL1蛋白及mRNA的表达水平明显高于其在浸润深度为浅肌层以内的癌组织($P<0.05$), 这提示TKTL1的高表达与食管癌的侵袭性有关; 同时我们又比较了食管癌组织中不同的TNM分级与TKTL1表达程度的关系, 结果显示不同分级与TKTL1表达程度具有显著相关性($P<0.05$); 实

同行评价

本文设计较合理, 论述清晰, 结论明确, 具有一定的参考价值.

验结果还显示, 在伴有淋巴结转移的癌组织中 TKTL1 蛋白及 mRNA 的表达同样也远高于其在无淋巴结转移的癌组织 ($P < 0.05$). 由本次的实验结果推测, TKTL1 可能参与了食管癌的浸润与发展, TKTL1 的异常高表达可能是判定食管癌是否具有高浸润性的一个指标, 为临床是否采取更加积极的治疗措施提供参考.

参考文献

- Xu X, Zur Hausen A, Coy JF, Löchelt M. Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 1330-1337
- Zhang S, Yue JX, Yang JH, Cai PC, Kong WJ. Overexpression of transketolase protein TKTL1 is associated with occurrence and progression in nasopharyngeal carcinoma: a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 517-522
- Langbein S, Zerilli M, Zur Hausen A, Staiger W, Rensch-Boschert K, Lukan N, Popa J, Ternullo MP, Steidler A, Weiss C, Grobholz R, Willeke F, Alken P, Stassi G, Schubert P, Coy JF. Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer* 2006; 94: 578-585
- 高冬玲, 李晟磊, 陈奎生, 赵志华, 赵秋民, 刘宗文, 张云汉. 金属蛋白酶抑制基因 RECK 在食管鳞癌中的表达及生物学意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1634-1638
- 李晟磊, 赵秋民, 刘宗文, 赵志华, 高冬玲, 郑湘予, 陈奎生, 张云汉. 食管鳞癌中 RECK 和 MMP-9 蛋白表达的相关性及临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1082-1086
- Kashyap V, Gudas LJ. Epigenetic regulatory mechanisms distinguish retinoic acid-mediated transcriptional responses in stem cells and fibroblasts. *J Biol Chem* 2010; 285: 14534-14548
- Chang X, Monitto CL, Demokan S, Kim MS, Chang SS, Zhong X, Califano JA, Sidransky D. Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers. *Cancer Res* 2010; 70: 2870-2879
- Wittig R, Coy JF. The role of glucose metabolism and glucose-associated signalling in cancer. *Perspect Medicin Chem* 2008; 1: 64-82
- Langbein S, Frederiks WM, zur Hausen A, Popa J, Lehmann J, Weiss C, Alken P, Coy JF. Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer. *Int J Cancer* 2008; 122: 2422-2428
- Lee JD, Yang WI, Park YN, Kim KS, Choi JS, Yun M, Ko D, Kim TS, Cho AE, Kim HM, Han KH, Im SS, Ahn YH, Choi CW, Park JH. Different glucose uptake and glycolytic mechanisms between hepatocellular carcinoma and intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma with increased (18)F-FDG uptake. *J Nucl Med* 2005; 46: 1753-1759
- Frederiks WM, Vizan P, Bosch KS, Vreeling-Sindelárová H, Boren J, Cascante M. Elevated activity of the oxidative and non-oxidative pentose phosphate pathway in (pre)neoplastic lesions in rat liver. *Int J Exp Pathol* 2008; 89: 232-240
- Chiu HC, Liang JS, Wang JS, Lu JF. Mutational analyses of Taiwanese kindred with X-linked adrenoleukodystrophy. *Pediatr Neurol* 2006; 35: 250-256
- Moser HW, Mahmood A, Raymond GV. X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3: 140-151
- Sutovský S, Petrovic R, Chandoga J, Turcáni P. Adult onset cerebral form of X-linked adrenoleukodystrophy with dementia of frontal lobe type with new L160P mutation in ABCD1 gene. *J Neurol Sci* 2007; 263: 149-153

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《2009 年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布 《世界华人消化杂志》2008 年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

放射治疗联合扩张术治疗晚期食管癌26例

陈章兴, 戴益琛, 朱小三, 谢军培, 傅育卡, 曾伟, 连清娜, 桑巧芳, 林园园, 詹小娟

陈章兴, 戴益琛, 朱小三, 谢军培, 傅育卡, 曾伟, 连清娜, 桑巧芳, 林园园, 詹小娟, 中国人民解放军174医院消化内科 福建省厦门市 361003

作者贡献分布: 此研究由陈章兴设计; 病例收集由朱小三、谢军培、傅育卡、曾伟、连清娜及桑巧芳完成; 治疗后随访工作由林园园与詹小娟完成; 数据分析由林园园完成; 本论文写作由陈章兴与朱小三完成; 论文审核由戴益琛完成。

通讯作者: 戴益琛, 博士, 主任医师, 361003, 福建省厦门市, 中国人民解放军174医院消化内科。dyichen@sina.com

收稿日期: 2010-05-14 修回日期: 2010-07-06

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-09-18

Efficacy of radiotherapy alone and in combination with esophageal dilation in the treatment of advanced esophageal carcinoma: an analysis of 26 cases

Zhang-Xin Chen, Yi-Chen Dai, Xiao-San Zhu, Jun-Pei Xie, Yu-Ka Fu, Wei Zeng, Qing-Na Lian, Qiao-Fang Sang, Yuan-Yuan Lin, Xiao-Juan Zhan

Zhang-Xin Chen, Yi-Chen Dai, Xiao-San Zhu, Jun-Pei Xie, Yu-Ka Fu, Wei Zeng, Qing-Na Lian, Qiao-Fang Sang, Yuan-Yuan Lin, Xiao-Juan Zhan, Department of Gastroenterology, the 174th Hospital of Chinese PLA, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Correspondence to: Yi-Chen Dai, Department of Gastroenterology, the 174th Hospital of Chinese PLA, Xiamen 361003, Fujian Province, China. dyichen@sina.com

Received: 2010-05-14 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy of three-dimensional conformal radiotherapy in combination with esophageal dilatation in the treatment of advanced esophageal carcinoma.

METHODS: Thirty-six patients with advanced esophageal carcinoma who underwent three-dimensional conformal radiotherapy were randomly divided into two groups: patients receiving only radiotherapy (radiotherapy group, $n = 10$) and those receiving radiotherapy in combination with esophageal dilation (combination treatment group, $n = 26$). The 1- and 2-years survival rates, the incidence of complications, and dysphagia grade in these patients were then determined.

RESULTS: There are no significant differences

in the 1- and 2-year survival rates and the incidence of complications between the radiotherapy group and the combination treatment group (1-year survival rate: 33.23% vs 34.88%; 2-year survival rate: 29.16% vs 30.91%; incidence of complications: 50.00% vs 42.31%; all $P > 0.05$). The numbers of patients with Stooler grades 0, 1, 2, 3 and 4 dysphagia in the radiotherapy group are 0, 1, 2, 1 and 6, and the corresponding figures in the combination treatment group are 1, 2, 4, 6 and 13, respectively. Dysphagia improvement was more significant in the combination treatment group than in the radiotherapy group ($\chi^2 = 5.11$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Three-dimensional conformal radiotherapy in combination with esophageal dilatation is superior to radiotherapy alone in improving dysphagia in patients with advanced esophageal carcinoma.

Key Words: Esophageal carcinoma; Three-dimensional conformal radiotherapy; Esophageal dilatation

Chen ZX, Dai YC, Zhu XS, Xie JP, Fu YK, Zeng W, Lian QN, Sang QF, Lin YY, Zhan XJ. Efficacy of radiotherapy alone and in combination with esophageal dilation in the treatment of advanced esophageal carcinoma: an analysis of 26 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2809-2811

摘要

目的: 观察三维适形放射治疗联合扩张术在治疗晚期食管癌中的疗效。

方法: 将中国人民解放军174医院行三维适形放射治疗的36例食管癌患者随机分为两组, A组10例仅行放射治疗; B组26例行放射治疗联合扩张术。分别观察1、2年生存率、并发症发生率及吞咽困难分级情况。

结果: A组1、2年生存率分别为33.23%、29.16%; 并发症发生率50.00%; 治疗后吞咽困难Stooler分级0级0例、1级1例、2级2例、3级1例、4级6例; B组1、2年生存率分别为34.88%、30.91%; 并发症发生率42.31%; 治疗后吞咽困难Stooler分级0级1例、1级2例、2级

■背景资料

随着食管癌发病率的逐年增高, 患者大部分就诊时已属中晚期, 且常因癌肿梗阻无法进食导致营养不良, 甚至危及生命。

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

■应用要点

本文均在放射治疗开始前采用扩张治疗,改善患者的进食状况,再结合三维适形放射治疗,控制肿瘤的生长,减少食管的再狭窄,患者吞咽困难的状况明显改善。

4例、3级6例、4级13例;1、2年生存率、并发症发生率两者无明显差别,吞咽困难改善程度上,B组疗效均优于A组,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.11, P < 0.05$)。

结论: 三维适形放射治疗联合扩张术治疗晚期食管癌吞咽困难疗效明显。

关键词: 食管癌; 三维适形放射治疗; 扩张术

陈章兴, 戴益琛, 朱小三, 谢军培, 傅育卡, 曾伟, 连清娜, 桑巧芳, 林园园, 詹小娟. 放射治疗联合扩张术治疗晚期食管癌26例. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2809-2811

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2809.asp>

0 引言

随着食管癌发病率的逐年增高,患者大部分就诊时已属中晚期,且常因肿瘤梗阻无法进食导致营养不良,甚至危及生命. 2003-03/2009-03中国人民解放军174医院的晚期食管癌患者行三维适形放射治疗或(与)联合扩张术治疗,发现联合扩张术较单纯三维适形放射治疗疗效佳,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 本组36例中,男20例,女16例;年龄42-86(平均64)岁;上段食管癌5例、中段19例、下段12例;狭窄的长度2-9(平均5.5) cm;所有病例均经病理证实为食管鳞状细胞癌。

1.2 方法

1.2.1 放射治疗方法: A、B两组均行三维适形放射治疗(机型: FYC-50H型), B组在放射治疗前行扩张术,模拟机定位,采用60 Co γ 线常规三野外照射,DT 60-70 Gy, 5-7 wk,每周监测血常规。

1.2.2 扩张术: 根据狭窄程度选择相应粗细的扩张器,在胃镜引导下插入,然后选用直径为5、7、9、11、13 mm的扩张条由小到大依次扩张,根据患者的反应及临床的经验,再由胃镜观察,术后创面喷洒止血药,观察有无并发症发生。

统计学处理 计数资料均采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组治疗前TNM分期及吞咽困难Stooler分级 所研究病例均按UICC食管癌TNM分期(2009),入选病例均为III期(T3 N1 M0或T4 Any N M0)或IV期(Any T Any N M1),两组在TNM分期及吞咽困难Stooler分级上无明显差异($\chi^2 =$

表 1 两组患者治疗前TNM分期及吞咽困难分级 (n)

分组	TNM分期		Stooler分级				
	III期	IV期	0级	1级	2级	3级	4级
A组	6	4	0	2	1	3	4
B组	16	10	1	1	5	4	15

表 2 两组患者生存率 (%)

分组	n	1年	2年
A组	10	33.23%	29.16%
B组	26	34.88%	30.91%
合计	36	34.42%	30.41%

表 3 两组患者治疗并发症

分组	n	出血	穿孔	放射性肺炎	再狭窄	发生率(%)
A组	10	1	0	1	3	50.00
B组	26	6	1	2	2	42.30
合计	36	7	1	3	5	44.44

表 4 两组患者治疗后吞咽困难Stooler分级 (n)

分组	n	0级	1级	2级	3级	4级
A组	10	0	1	2	1	6
B组	26	1	2	4	6	13
合计	36	1	3	6	7	19

2.13, 1.22; $P > 0.05$, 表1)。

2.2 两组1、2年生存率 A组1、2年生存率分别为33.23%、29.16%; B组1、2年生存率分别为34.88%、30.91%; B组生存率较A组稍高,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.13, P > 0.05$, 表2)。

2.3 两组患者治疗后并发症 治疗后采用电话方式随访所有病例(无失访),了解1 mo内并发症,主要评估有无出血、穿孔、放射性肺炎、再狭窄, B组并发症发生率稍高于A组,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.75, P > 0.05$, 表3)。

2.4 两组治疗后吞咽困难Stooler分级 吞咽困难Stooler分级标准^[1-3]: 0级能进各种食物、1级能进软食、2级能进半流食、3级能进流食、4级不能进食. B组治疗后患者吞咽困难明显改善,优于A组,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.11, P < 0.05$, 表4)。

3 讨论

晚期食管癌患者常因进食梗阻而影响生活质量

及生存率,甚至加速全身衰竭.对于已经失去手术机会的晚期食管鳞状细胞癌,放射治疗就成为主要的治疗方法.但单纯放射治疗改善吞咽困难的疗效缓慢、局部黏膜反应大,部分患者甚至加重梗阻^[4-6].目前内镜下治疗食管癌狭窄已广泛应用临床,主要有内镜下支架植入术、内镜下扩张术^[7-10].内镜下支架置入可缓解肿瘤灶局部狭窄,既解决患者饮食问题,又可在一定程度上阻止肿瘤向腔内生长,甚至可防止食管气管瘘及纵膈瘘,可明显延长生存时间,提高生存质量,并给根治性放射治疗提供时机.但支架植入术对癌灶本身并无明显治疗意义,费用较高,术后各种并发症较多,增加患者的痛苦,故中国人民解放军174医院晚期食管癌患者采用三维适形放射治疗联合扩张术.本研究26例均先行扩张术再联合三维适形放射治疗,探条扩张术治疗食管癌狭窄,可迅速缓解梗阻,效果明显,可部分替代食管支架的作用.但大部分患者因恶性肿瘤的生长,需多次扩张,放射治疗后扩张易出现食管穿孔、大出血等并发症^[11-15].我们均在放射治疗开始前采用扩张治疗,改善患者的进食状况,再结合三维适形放射治疗,控制肿瘤的生长,减少食管的再狭窄,患者吞咽困难的症状明显改善.放射治疗联合扩张术更经济、实惠、方便、可重复性好.治疗过程中还可以观察放射治疗的效果.

4 参考文献

- 1 周丹,章淑华,许小江,隋杰.内镜直视下支架置入治疗食管恶性狭窄的应用.吉林医药学院学报 2007; 28: 36-37
- 2 王承伟,吴霞,祝玲.三维适形放射治疗食管癌75例临床疗效分析.肿瘤基础与临床 2007; 20: 154-156
- 3 周毛.支架后放疗对晚期食管癌的疗效观察.中国肿瘤临床与康复 2004; 11: 148
- 4 王捷忠,郑步宏,李云.食管癌放射治疗影响预后因素分析.实用肿瘤学杂志 2000; 14: 75-76
- 5 张宜勤,陆进成,翟振宇,魏青.三维适形放疗食管癌临床研究初步结果.中华放射肿瘤学杂志 2005; 14: 31-34
- 6 于甬华,陈延条,于金明,田国栋,韩俊庆,孙新东.298例中期食管癌单纯放疗结果分析.中华放射肿瘤学杂志 1997; 6: 247-248
- 7 沈伟明,王娟,刘怀兰,许德巧.内镜下细管预扩张术在食管胃吻合口重度狭窄中的应用.中华消化内镜杂志 2004; 21: 137-138
- 8 王澜,韩春,祝淑钗,迟子锋,曹彦坤.食管癌常规照射与三维适形放疗的剂量学研究.中华放射肿瘤学杂志 2006; 15: 176-180
- 9 郭素珍,杨国玲.食管癌及贲门癌术后吻合口狭窄内镜综合治疗.中华消化内镜杂志 2000; 6: 73-74
- 10 程惠华,赖红斌,李东石,张志坚,傅志超.镍钛合金支架置入术联合放射治疗晚期食管癌临床研究.中国癌症杂志 2004; 14: 65-67
- 11 包德强,夏玲,林春丽,董泽华,林凤飞.56例食管癌三维适形放疗的疗效观察.中华放射肿瘤学杂志 2006; 15: 382-383
- 12 李明,严衍伟,甘少光,陈容芳,陈笑愉.内镜下Savary-Gillard扩张器扩张治疗食管癌术后吻合口狭窄.广东医学 2002; 23: 1176-1177
- 13 韩继彪,于奇.气囊扩张治疗消化道术后吻合口狭窄及贲门失弛症.安徽医学 2005; 5: 34-36
- 14 程英升,李明华,庄奇新,尚克中,陈维雄,陈尼维.上胃肠道良性狭窄的介入治疗随访研究和评价.中华放射学杂志 2001; 35: 774
- 15 程惠华,原锦,林贵山,陈建英,徐利亚,翁振乾.镍钛合金支架对食管癌放射治疗的影响.中华放射肿瘤学杂志 2001; 10: 216

■同行评价

本文选题尚可,对临床应用有一定参考价值.

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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32 400余万篇次(2003-2005年),涉及期刊12 400余种.本版还加大了专家评审力度,5 500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1 980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). (编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

中药复方旋复代赭汤合左金丸干预胃食管反流病的疗效

王其进, 吴仕文, 陈景利, 黄寅奎

■背景资料

胃食管反流病(GERD)是最常见的上消化系疾病之一, 症状因胃、十二指肠内容物反流入食管所引起, 该病严重影响患者的生活质量甚至生命, 目前现代医学治疗GERD主要应用质子泵抑制剂(PPI)抑酸为主, 因其价格昂贵, 患者难以耐受。尽管文献报道传统中医药治疗GERD疗效明显, 但因缺乏严格的科研设计, 而难以得到承认。

王其进, 吴仕文, 海南省中医院 海南省海口市 570100
陈景利, 广东省佛山市中医院 广东省佛山市 528000
黄寅奎, 广东省深圳市宝安区中医院 广东省深圳市 518000
作者贡献分布: 王其进与吴仕文对此文所作贡献均等; 此课题由王其进与吴仕文设计; 研究过程由王其进, 吴仕文, 陈景利及黄寅奎操作完成; 数据分析由王其进完成; 本论文写作由王其进与吴仕文完成。
通讯作者: 吴仕文, 副主任中医师, 570100, 海南省海口市美兰区和平北路47号, 海南省中医院消化肝胆内科。
zhangxuan271@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-05-28 修回日期: 2010-07-06
接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-09-18

Efficacy of Xuanfudaizhe Decoction in combination with Zuojin Pill in the treatment of gastroesophageal reflux disease

Qi-Jing Wang, Shi-Wen Wu, Jing-Li Chen,
Yin-Ruan Huang

Qi-Jing Wang, Shi-Wen Wu, Traditional Chinese Medicine Hospital of Hainan Province, Haikou 570100, Hainan Province, China

Jing-Li Chen, Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong Province, Foshan 528000, Guangdong Province, China

Yin-Ruan Huang, Traditional Chinese Medicine Hospital of Baoan District of Shenzhen, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Shi-Wen Wu, Department of Digestive and Hepatobiliary Medicine, Traditional Chinese Medicine Hospital of Hainan Province, 47 North Heping Road, Meilan District, Haikou 5701100, Hainan Province, China. zhangxuan271@yahoo.com.cn

Received: 2010-05-28 Revised: 2010-07-06

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of Xuanfudaizhe Decoction in combination with Zuojin Pill in the treatment of gastroesophageal reflux disease (GERD).

METHODS: One hundred and twenty patients with GERD were randomly and equally divided into two groups: intervention group and control group. The intervention group was treated with Xuanfudaizhe Decoction in combination with Zuojin Pill for 4 wk, while the control group was treated with lansoprazole for the same dura-

tion. The clinical and endoscopic manifestations of esophageal mucosal lesions in these patients were then observed.

RESULTS: Before treatment, there is no significant difference in baseline data between the two groups. After treatment for 4 wk, the scores of chest pain and heart-burn and endoscopic manifestations of esophageal mucosal erosion declined in both groups. No significant difference was observed in the total response rate between the intervention group and control group (90% vs 86.66%, $P > 0.05$).

CONCLUSION: Xuanfudaizhe Decoction in combination with Zuojin Pill has comparable efficacy to lansoprazole in the treatment of GERD.

Key Words: Xuanfudaizhe Decoction; Zuojin Pill; Gastroesophageal reflux disease; Clinical research

Wang QJ, Wu SW, Chen JL, Huang YR. Efficacy of Xuanfudaizhe Decoction in combination with Zuojin Pill in the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2812-2815

摘要

目的: 探讨旋复代赭汤合左金丸干预胃食管反流病的临床疗效。

方法: 符合纳入标准、诊断标准及不符合排除标准的胃食管反流病患者120例, 按1:1随机分为两组; 治疗组予旋复代赭汤合左金丸颗粒剂干预4 wk, 对照组予兰索拉唑胶囊干预4 wk。观察分析患者胸痛、胸骨后烧灼感等症状及胃镜变化。

结果: 治疗前, 两组患者基线资料分析, 无统计学差异, 具有可比性; 予不同药物干预4 wk, 胸痛、胸骨后烧灼感及内镜下食管糜烂积分均呈下降趋势, 两组患者治疗前、后胃镜积分比较无统计学差异; 两组治疗后胸痛, 胸骨后烧灼感均明显好转(均 $P < 0.05$)。其中治疗组总有效率为90.00%, 对照组总有效率为86.66%, 两组总体疗效比较无统计学差异。

结论: 旋复代赭汤合左金丸具有明确改善内

■同行评议者

施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科; 李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

镜下食管糜烂, 缓解胸痛、胸骨后烧灼感等症状, 疗效与兰索拉唑相似, 值得临床推广应用。

关键词: 旋复代赭汤; 左金丸; 胃食管反流病; 临床研究

王其进, 吴仕文, 陈景利, 黄寅鉴. 中药复方旋复代赭汤合左金丸干预胃食管反流病的疗效. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2812-2815

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2812.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是最常见的上消化系疾病之一, 症状因胃、十二指肠内容物反流入食管所引起, 可直接导致食管病理性损害。他还可引起食管外的组织损害及相应的临床表现, 该病严重影响患者的生活质量甚至生命, 其发病率随年龄增长而增加。近年我国学者对北京和上海城乡5000例问卷调查, 伴有反流症状者分别为10.19%和7.76%, 推测GERD的患病率为5.77%, 而国外对GERD患病率的报道一般为7%-15%, 也有高达20%以上的^[1,2]。目前现代医学治疗GERD主要应用质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)抑酸为主, 因其价格昂贵, 患者难以耐受。尽管文献报道传统中医药治疗GERD疗效明显, 但因缺乏严格的科研设计, 而难以得到承认^[3,4]。我们采用前瞻性、随机、开放、平行对照设计, 以公认有效的PPI为对照组, 探讨旋复代赭汤加味治疗GERD病临床疗效, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 全部病例源自于2008-01/2010-04, 广州中医药大学附属海南省中医院消化科、广东省佛山市中医院消化科、广东省深圳市宝安区中医院消化科门诊患者。其中男80例, 女40例, 平均年龄49.01岁±12.85岁, 平均病程3.26年±1.33年。旋复代赭汤加味: 旋复花12 g、代赭石12 g、法半夏6 g、甘草6 g、吴茱萸3 g、黄连6 g、干姜6 g、党参12 g, 每日1剂, 分2次服, 颗粒剂由广州一方制药有限公司提供。兰索拉唑胶囊(商品名: 兰悉多, 国药准字H10980136)30 mg, qd。胃镜型号(富士通-400)。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: 参照2003年中华医学会消化内镜学会制定的《反流性食管炎诊断及治疗指南》标准^[5]。(1)胃食管反流的典型症状如明显烧心、反酸、胸骨后灼痛等;(2)胃镜检查有 I -

IV级食管炎症状表现, 即以糜烂为主;(3)排除妊娠、贲门失弛缓症、幽门梗阻、滑动型食管裂孔疝。

1.2.2 纳入标准: (1)符合西医诊断标准;(2)年龄18-65岁;(3)能签署和理解知情同意书。

1.2.3 排除标准: (1)不符合上述诊断标准与纳入标准;(2)合并出血、狭窄、Barrett's食管;胃癌、食管癌、胃出血者以及胆道、胰腺等器质性病变;(3)合并有心血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病, 精神病患者;(4)妊娠期或哺乳期妇女。过敏体质或已知对本品及兰索拉唑胶囊的成分过敏者;(5)需同时应用可能影响药品疗效和安全性评价药物者;(6)研究中认为有任何不适宜入选的情况。

1.2.4 研究设计: 前瞻性、简单随机、开放、平行对照设计。采用简单随机对照试验设计方法, 按1:1对照原则分为治疗组、对照组两组, 总的例数确定为120例。通过SAS统计软件包, 根据样本量120例及分组数2输入计算机, 产生随机种子数及随机分组数, 制成随机分配卡(随机分配卡由课题组中与临床试验无关的研究人员统一制作), 装入依次编号的信封, 信封上的编号与卡片上的顺序号相同, 合格的受试对象按进入试验的先后顺序依照信封编号, 拆封取卡, 严格按照卡片规定分组和用药。实行研究者(临床医生、数据管理与分析人员)、受试者开放研究(非盲法)。

1.2.5 分组: 治疗组: 旋复代赭汤加味, 每日1剂, 分2次服, 连续4 wk。对照组: 兰悉多, 15 mg, qd, 连续4 wk。

1.2.6 观察指标: 基线指标包括病程、性别、年龄等。疗效观察指标包括: (1)主要疗效指标: 胃镜食管糜烂检测;(2)次要疗效指标: 胸痛、胸骨后烧灼感等症状;(3)观测时点: 主要症状指标监测: 治疗前及治疗开始后每2 wk记录1次症状评分; 实验室指标监测: 治疗前及治疗后4 wk检测。

1.2.7 疗效判定标准: (1)主要效应指标: 胃镜疗效判定标准^[6]; 显效: 食管黏膜病变(糜烂)积分减少2级以上; 有效: 食管黏膜病变积分(糜烂)减少1级; 无效: 食管黏膜病变(糜烂)无改变或加重。(2)次要效应指标: 主要症状疗效判定参照国家药品监督管理局主编《中药新药临床研究指导原则》^[7], 采用半定量积分比法, 具体如下: 计算公式(尼莫地平法): 疗效指数 = (治疗前总分-治疗后总分)/治疗前总分×100%。显效: 治疗后各症状明显减轻, 疗效指数≥70%, <95%; 有效: 治

■ 研发前沿

目前胃食管反流病研究热点以内镜下非糜烂性食管炎为主, 因该病临床表现与胃镜检查不相符合, 传统的抑酸治疗效果不甚明显, 24 h食道pH监测并不能发现异常, 许多学者提出48 h食道pH监测, 提高对十二指肠反流(碱性反流)的认识。

■ 创新盘点

本文研究目的明确, 设计合理, 严格符合纳入标准、诊断标准、排除标准等, 其结果具有重复性。科学客观地评价中药复方干预胃食管反流病疗效是本文的创新点。

■应用要点

本文通过RCT设计探讨中医药复方干预GERD,并明确观察终点指标,其研究结果对中医药应用于干预GERD有一定的参考价值.

表 1 两组患者比较 ($n = 60$)

分组	病程(年)	男(n)	女(n)	年龄(岁)
治疗组	3.21 ± 1.24	42	18	47.54 ± 12.33
对照组	3.32 ± 1.42	38	22	50.48 ± 13.28

表 2 两组患者总体疗效分析 ($n = 60$)

分组	显效	有效	无效
治疗组	32	22	6
对照组	31	21	8

表 3 两组患者治疗前、后胃镜积分 ($n = 60$, mean ± SD)

分组	治疗前	治疗后
治疗组	2.54 ± 0.54	1.44 ± 0.57
对照组	2.66 ± 0.51	1.36 ± 0.59

表 4 两组患者治疗前、后胸痛积分 ($n = 60$, mean ± SD)

分组	治疗前	治疗14 d	治疗28 d
治疗组	5.28 ± 0.96	2.48 ± 1.96	2.32 ± 1.47
对照组	5.40 ± 0.92	2.56 ± 1.57	2.20 ± 1.77

表 5 两组患者治疗前、后胸骨后烧灼感积分 ($n = 60$, mean ± SD)

分组	治疗前	治疗14 d	治疗28 d
治疗组	5.12 ± 1.01	2.72 ± 1.88	2.48 ± 0.95
对照组	5.24 ± 0.98	2.72 ± 1.80	2.64 ± 1.74

疗后各症状有所减轻, 疗效指数 $\geq 30\%$, $< 70\%$; 无效: 治疗后各症状无改善或有加重, 疗效指数 $< 30\%$.

1.2.8 研究终点: 本项目根据主要效应指标即胃镜下食管黏膜糜烂破损愈合情况为观察终点. 结合文献及临床实践, 确定药物干预时间为4 wk.

统计学处理 采用SPSS16.0 for Windows软件分析包. 基线资料(性别、年龄、病程、疾病种类)的均衡性分析: 采用方差分析, 或列联表卡方检验, 或Fisher精确概率法比较2组基线水平和衡量均衡性. 计数指标(如主要症状积分)用频数和构成比描述, 2组疗效比较采用列联表卡方检验或秩和检验, 等级资料秩和检验; 计量指标用mean ± SD进行描述, 采用方差分析或秩和检验.

2 结果

2.1 基线资料可比性分析 经统计学分析, 两组患者在病程、性别、年龄上无明显差异, 具有可比性(表1).

2.2 两组患者总体疗效分析 治疗组显效32例, 有效22例, 无效6例, 总有效率为90.00%; 对照组显效31例, 有效21例, 无效8例, 总有效率为86.66%. 两组疗效基本相近(表2). 经Ridit分析, $R = 0.4120$, 根据公式计算, 得(0.5936, 0.4304), Ridit值的95%CI包括0.5, 故 $P > 0.05$.

2.3 两组患者治疗前、后胃镜积分比较 治疗前, 两组患者胃镜下糜烂积分比较无明显差异, 说明具有可比性; 予旋复代赭汤加味颗粒剂治疗后, 内镜下食管糜烂有明显好转, 与治疗前比较, 有明显差异; 与对照组比较, 无明显差异. 旋复代赭汤加味颗粒剂在内镜改善的疗效与对照组相似(表3).

2.4 两组患者治疗前、后胸痛积分比较 治疗前,

两组患者胸痛积分比较无明显差异, 具有可比性; 予旋复代赭汤加味颗粒剂治疗14及28 d后, 胸痛明显好转, 与治疗前比较, 有明显差异; 与对照组比较, 无明显差异. 说明旋复代赭汤加味颗粒剂具有明确改善胸痛的效应, 其疗效与兰索拉唑相似(表4).

2.5 两组患者治疗前、后胸骨后烧灼感积分比较 治疗前, 两组患者胸骨后烧灼感积分比较无明显差异, 具有可比性; 予旋复代赭汤加味颗粒剂治疗14及28 d后, 胸骨后烧灼感明显好转, 与治疗前比较, 有明显差异; 与对照组比较, 无明显差异. 说明旋复代赭汤加味颗粒剂具有明确改善胸骨后烧灼感的效应, 其疗效与兰索拉唑相似(表5).

3 讨论

GERD是由于食管下括约肌张力降低、或胃排空能力下降, 导致胃、十二指肠内容物反流入食管, 引起食管炎症而产生的1组症状. 祖国医学将本病归属于反胃、嘈杂、吐酸等范畴^[8], 《素问·至真要大论》中云: “少阳之胜, 热客于胃, 烦心心痛, 目赤欲呕, 呕酸善饥”, “盖寒则阳气不舒, 气不舒则郁而化热, 热则酸矣”. 我们在古代文献指导下, 结合临床所见, 认为本病无或因饮食所伤、或因情志不舒, 或因素体亏虚, 其病位在食管, 与肝、胆、脾胃密切相关, 其病机为肝木气机不舒, 横逆犯胃, 肝胃郁热,

胃失和降, 痰热上逆化为吞酸, 并导致胸痛、烧心等表现, 诚如《医家心法》云: “凡为吞酸, 尽属肝木, 曲直作酸也”。GERD中医临床辨证以肝胃郁热、胆热痰扰等证型多见^[9,10], 我们根据祖国医学六腑以通为用、胃气以和降为顺的理论, 以益气和胃、化痰降逆之旋复代赭汤配合疏肝清胃热之左金丸作为基本方剂来治疗, 取得了满意疗效。结果提示, 旋复代赭汤合左金丸加味治疗GERD, 其总体疗效与兰索拉唑相似, 具有明确改善内镜下食管糜烂, 缓解胸痛、胸骨后烧灼感等症状。

旋复代赭汤出自张仲景《伤寒杂病论》, 方中旋复花性温而能下气消痰涎, 降逆以除噫, 故为君药; 代赭石体重而沉降, 善镇冲逆, 以治胃气上逆、呃逆、嗳气, 为臣药; 生姜温胃化痰, 散寒止呕; 半夏祛痰散结, 降逆和胃, 助君臣药以平噫气而消痞硬; 人参益气补虚, 大枣温益中气, 扶助已伤之中气, 与生姜、半夏共为佐药; 炙甘草养胃补脾, 调和诸药, 为使药。方中代赭石虽味苦气寒, 但与其他温药相伍, 取其质重沉降之性, 以降逆气。诸药配合, 共成降逆化痰、益气和胃之剂, 使中焦健运, 清升浊降, 痰浊得除, 故可达到“上焦得通, 津液得下, 胃气因和”之目的^[11]。左金丸出自金元时期著名医家朱丹溪所著之《丹溪心法》, 原书记载用于治疗嘈杂吞酸。方中黄连配吴茱萸一寒一热, 苦降辛开; 黄连的用量6倍于吴茱萸, 黄连清心火而泻肝火, 并清胃热, 其气自降。黄连泻去心火, 则

肺金无畏, 得以行令于左以平肝。少量吴茱萸降逆和胃, 散胃气郁结, 又引药入厥阴肝, 行气解郁, 还能引热下行, 故以为佐^[12]。两方相合, 共奏降逆和胃, 疏肝清热之功, 用来治疗GERD, 切合病机, 药证相符, 故能获得良好疗效, 值得临床推广。

4 参考文献

- 1 胡兆元, 周丽雅, 林三仁, 薛艳. 十年2088例反流性食管炎临床分析. 中华消化杂志 2005; 25: 717-725
- 2 van der Velden AW, de Wit NJ, Quartero AO, Grobbee DE, Numans ME. Pharmacological dependency in chronic treatment of gastroesophageal reflux disease: a randomized controlled clinical trial. *Digestion* 2010; 81: 43-52
- 3 鹿红, 苏晓兰, 刘启泉, 王志坤, 王艳玲, 张晓利. 枳实陷胸方联合电针治疗肝胃郁热型胃食管反流病42例临床观察. 中国药物与临床 2010; 10: 352-353
- 4 宋希仁, 陈峰. 旋复枳实汤治疗反流性食管炎35例疗效观察. 新中医 2007; 39: 22-23
- 5 中华医学会消化内镜学分会. 反流性食管炎诊断及治疗指南(2003年). 中华消化内镜杂志 2004; 21: 221-226
- 6 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 胃食管反流病治疗共识意见(2007, 西安). 中华消化杂志 2007; 27: 689-690
- 7 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则. 第1版. 北京: 中国中医药科技出版社, 2002: 234-238
- 8 朱日. 胃食管反流病的中医辨治. 中医杂志 2008; 49: 189
- 9 余利华. 单兆伟教授辨治反流性食管炎经验浅析. 云南中医学院学报 2009; 32: 40-42
- 10 吴沛田. 胃食管反流病中医辨治应注意什么. 中医杂志 2008; 49: 1132
- 11 代二庆, 袁红霞. 旋覆代赭汤配伍意义的拆方研究. 天津: 天津中医学院 2003: 56-60
- 12 龚艳桥, 童吕珍. 四逆散合左金丸治疗反流性食管炎的临床研究. 武汉: 湖北中医学院 2009: 11-16

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

■同行评价

本文学术价值一般, 对治疗胃食管反流病具有一定的临床参考价值。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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。

经胃内镜腹腔探查活检术诊断腹水病因3例

郑永志, 王东, 陈丹磊, 吴仁培, 杨丽, 于恩达, 郑成竹, 李兆申

■背景资料

经胃腹腔镜探查及活检术属于NOTES的范畴, 该项新型微创技术具有手术创伤小、恢复快、腹壁无疤痕、无疼痛等诸多优点, 被誉为有可能继开腹手术和腹腔镜之后的第3代手术方式。

郑永志, 王东, 吴仁培, 杨丽, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433

陈丹磊, 于恩达, 郑成竹, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院普外科 上海市 200433

作者贡献分布: 郑永志与王东对本文贡献均等; 此课题由李兆申、郑成竹及于恩达设计; 研究过程由王东、陈丹磊、吴仁培、杨丽及郑永志操作完成; 本论文写作由郑永志、王东及李兆申完成。

通讯作者: 李兆申, 教授, 200433, 上海市长海路168号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科。

zhslchxh@163.com

收稿日期: 2010-08-02 修回日期: 2010-08-13

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-18

Transgastric endoscopic peritoneoscopy and biopsy for causal diagnosis of ascites: report of 3 cases

Yong-Zhi Zheng, Dong Wang, Dan-Lei Chen, Ren-Pei Wu, Li Yang, En-Da Yu, Cheng-Zhu Zheng, Zhao-Shen Li

Yong-Zhi Zheng, Dong Wang, Ren-Pei Wu, Li Yang, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Dan-Lei Chen, En-Da Yu, Cheng-Zhu Zheng, Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Correspondence to: Professor Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, 168 Changhai Road, Shanghai 200433, China. zhslchxh@163.com

Received: 2010-08-02 Revised: 2010-08-13

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To evaluate the application of transgastric endoscopic peritoneoscopy and biopsy to the causal diagnosis of ascites.

METHODS: Three patients with ascites of unknown origin after routine examinations underwent transgastric endoscopic peritoneoscopy and biopsy for causal diagnosis of ascites.

RESULTS: A definite diagnosis was achieved in all the three patients. They were diagnosed with metastatic peritoneal adenocarcinoma, mucinous borderline tumor and tuberculous peritonitis, respectively. No intraoperative or postoperative

complications occurred.

CONCLUSION: Transgastric endoscopic peritoneoscopy is a safe and feasible method for causal diagnosis of ascites.

Key Words: Endoscope; Transgastric endoscopic surgery; Ascites; Peritoneoscopy

Zheng YZ, Wang D, Chen DL, Wu RP, Yang L, Yu ED, Zheng CZ, Li ZS. Transgastric endoscopic peritoneoscopy and biopsy for causal diagnosis of ascites: report of 3 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2816-2821

摘要

目的: 初步探讨经胃内镜腹腔探查活检术在腹水病因诊断中的作用。

方法: 分析中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化科和普外科共同开展的3例腹水待查患者, 在完善各项常规检查后仍无法明确腹水性质, 遂进行经胃内镜腹腔探查活检术。

结果: 3例患者腹水性质明确, 分别为腹腔转移性腺癌、交界性黏液瘤及结核性腹膜炎, 术中及术后无手术相关并发症发生。

结论: 经胃内镜腹腔探查活检术可以明确腹水性质, 是安全可行的。但作为一种新技术, 其安全性需进一步的大规模研究评估。

关键词: 内镜; 经胃内镜手术; 腹水; 腹腔探查活检

郑永志, 王东, 陈丹磊, 吴仁培, 杨丽, 于恩达, 郑成竹, 李兆申. 经胃内镜腹腔探查活检术诊断腹水病因3例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(26): 2816-2821

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2816.asp>

0 引言

经胃内镜腹腔探查活检术属于经自然腔道内镜手术(natural orifice transluminal endoscopic surgery, NOTES)的范畴, NOTES是指经口腔、胃、结(直)肠、阴道、膀胱、食管等自然腔道进入腹腔、纵隔、胸腔等进行各种内镜下操作, 包括腹腔探查、腹膜活检、肝脏活检、胃肠及肠

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

吻合、阑尾切除、胆囊切除、输卵管结扎、子宫部分切除、肾切除、脾脏切除、胰腺尾部切除、纵隔探查、肋骨及淋巴结活检、胸导管结扎、胸腺切除、心包膜开窗、脊柱手术等^[1]。腹水是临床上的常见征象,其病因多样。在我国失代偿期慢性肝病是其最常见病因,其他还包括腹腔肿瘤心功能不全结核性腹膜炎等^[2]。由于不同病因腹水的治疗及预后不尽相同故临床上鉴别至关重要。临床上有许多腹水患者,在完善内科各项常规检查包括多次腹水穿刺检查后仍无法明确病因。这些腹水患者,要想进一步明确病因,往往需要进行腹腔镜探查活检。在腹腔镜应用临床之前,多进行开腹手术的方法;在腹腔镜广泛应用临床后,目前多选择腹腔镜的手术方法,其创伤明显减轻,尤其是对非肿瘤引起的不明原因腹水诊断更有意义。近年来,作为一种新型微创技术,NOTES开始在世界范围内开展起来。经胃内镜腹腔镜探查术是较早开展的一种手术方法。作为国内较早开展进行此项新型微创技术研究的单位,长海医院消化科与普外科合作成立NOTES研究组,在动物实验的基础上,并借鉴国内外经验,在医院伦理委员会批准后,开展了临床研究,已经对3例腹水查因患者进行经胃内镜腹腔镜探查活检术,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2009-03/2009-11中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化科住院的腹水待查患者3例,在完善内科各项常规检查包括多次腹水穿刺检查后仍无法明确病因,通过医院伦理委员会批准后,对3例患者进行经胃内镜腹腔镜探查活检术。患者1为58岁的男性,在腹腔镜视频辅助下进行腹腔探查活检术,手术持续时间89 min,术后诊断为腹腔转移性腺癌;患者2为48岁的女性,实施经胃内镜腹腔镜探查活检术,手术时间109 min,术后明确诊断为(腹腔)交界性黏液瘤;患者3为68岁男性,进行经胃内镜腹腔镜探查活检术,手术进行93 min,术后诊断为结核性腹膜炎。

1.2 方法 术前与患者及其家属充分沟通,对整个手术的必要性、可行性、安全性和并发症情况作了详细的解释说明,并详尽解答患者疑问,患者及其家属表示理解并在各项协议书上签字同意。患者术前12 h禁食、水。手术在腹腔镜手术室进行,患者取仰卧位,常规气管插管麻醉后,腹部皮肤按腹腔镜常规消毒。

第1例患者在腹腔镜辅助下进行手术,经脐置入5 mm套管针(trocar),建立气腹,插入腹腔镜。随GIF-260灭菌胃镜置入灭菌外套管,吸净胃内容物,先用2 000 mL生理盐水冲洗食管及胃腔,再用1 000 mL抗生素(甲磺酸帕珠沙星及甲硝唑)冲洗,留置10 min后吸出,最后用聚维酮碘喷洒消毒后内镜吸净。更换灭菌内镜和外套管,进入胃腔后选择胃体下部前壁,针刀切开胃壁,置入黄斑马导丝,更换成型气囊扩张胃壁至1.2 cm左右,内镜进入腹腔,此过程在腹腔镜监视下完成。胃镜沿腹壁向盆腔方向插入,依次从盆腔开始进行腹腔探查,在腹腔内壁可见淡黄色结节样隆起,大网膜上亦见隆起结节,在腹腔镜监视下,以活检钳取出活检组织8块,经胃壁切口经由胃腔、食管、口腔取出送病理标本。以止血夹闭合胃壁切口后退镜。置入胃管胃肠减压。为防止出现意外,术后患者被送入ICU病房,予脱机、监护及对症处理,病情平稳,12 h后转出ICU,回到消化科病房。给予心电监护、舒普深和奥硝唑抗感染、质子泵抑制剂抑酸及营养支持处理。术后最高体温37.6℃,仍诉有腹痛,部位及性质同术前,腹壁腹腔镜穿刺点疼痛,上腹部胃壁切口区域未诉疼痛。术后第3 d拔除胃管,逐渐正常恢复饮食,下地活动。

第2和3例患者亦在腹腔镜手术室进行手术,随GIF-260灭菌胃镜置入灭菌外套管,吸净胃内容物,先用2 000 mL生理盐水冲洗食管及胃腔,用聚维酮碘喷洒消毒后内镜吸净。更换灭菌内镜和外套管,进入胃腔后,在上腹部置入经皮内镜胃造瘘术(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG)针,随即经腹壁PEG针道置入黄斑马导丝,经胃镜活检通道牵引出导丝,随后置入扩张气囊,逐步扩张胃壁切口至1.5 cm左右,内镜进入腹腔,内镜沿腹壁向盆腔方向插入,依次从盆腔开始进行腹腔探查,在病变部位取活检,经胃壁切口经由胃腔、食管、口腔取出送病理标本。以止血夹闭合胃壁切口后退镜。置入胃管胃肠减压。为防止出现意外,术后患者被送入ICU病房,予脱机、监护及对症处理,病情平稳,12 h后转出ICU,回到消化科病房。给予心电监护、舒普深和奥硝唑抗感染、质子泵抑制剂抑酸及营养支持处理。术后未诉明显腹痛,术后第3 d拔除胃管,逐渐正常恢复饮食,下地活动。

2 结果

行经胃内镜腹腔镜探查活检术手术(其手术过程见

■创新盘点

作为国内较早开展进行此项新型微创技术研究的单位,长海医院消化科与普外科合作成立NOTES研究组,在动物实验的基础上,借鉴国内外经验,在医院伦理委员会批准后,开展了临床研究,已经对3例腹水查因患者进行经胃内镜腹腔镜探查活检术。

■应用要点

随着手术操作者熟练度的提高及新型操作平台的建立, NOTES的操作可以在更广泛的领域内进行, 开展各种复杂手术, 如肾脏切除、胆囊切除术、阑尾切除术、肠吻合等。

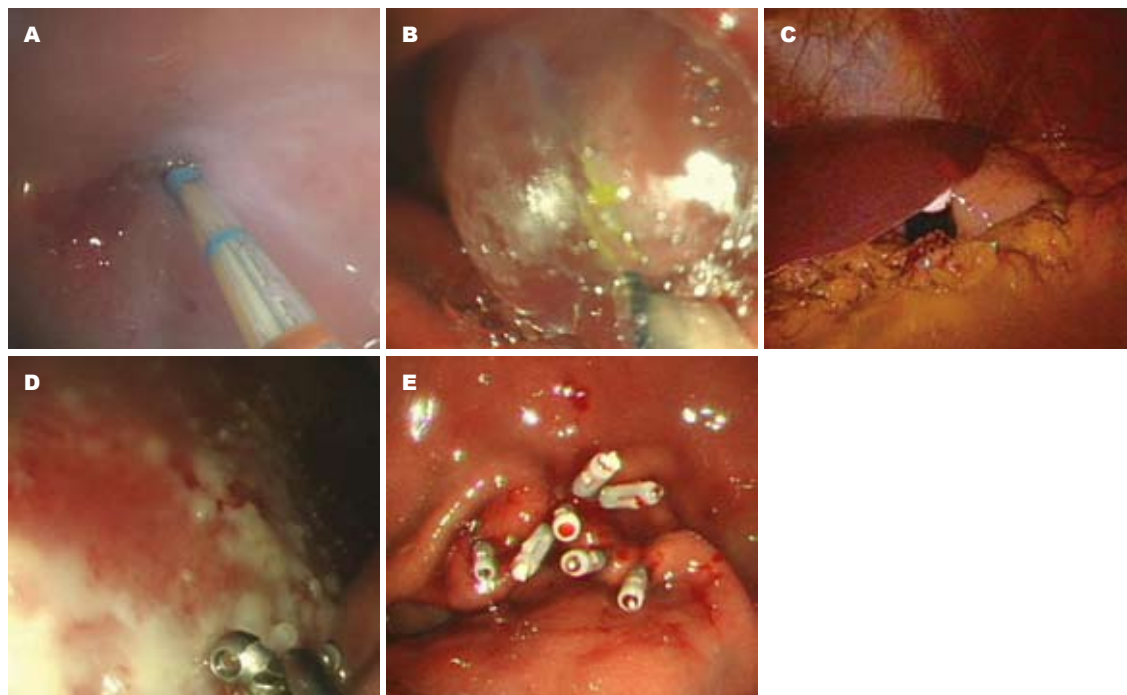


图1 经胃内镜腹腔镜探查活检术手术过程。A: 针刀切开胃壁; B: 气囊扩张胃壁切口; C: 胃镜进入腹腔(腹腔镜监视图像); D: 活检钳取病变活检; E: 钛夹夹闭胃壁切口。

图1)后, 3例患者腹水病因均明确。第1例患者术中送检物病理诊断提示: 有数个大小不等的腺样结构, 细胞为立方或低柱状, 结合免疫组织化学标志结果和临床, 倾向转移性腺癌。免疫组织化学诊断: (大网膜)转移性腺癌, 增殖细胞活性为低度。于NOTES腹膜活检术后1 wk复查胃镜提示: 糜烂性胃炎(图2)。术中及术后随访6 mo无手术相关并发症。明确诊断后, 患者回当地医院进一步治疗。

第2例患者术中送检物病理诊断提示: (1)送检腹腔黏稠积液见大量均匀淡染物, 其中找到少量柱状上皮, 异型不明显; (2)膈肌活检: 结合形态学, 提示(腹膜)间皮细胞增生伴黏液池形成, 结合病史, 倾向于黏液性上皮种植假黏液瘤。妇产科专家会诊后综合考虑倾向于交界性黏液瘤。NOTES术后复查胃镜提示: 浅表性胃炎。术中及术后随访6 mo无手术相关并发症。后患者转妇产科予手术治疗, 术后予常规化学治疗。

第3例患者术中送检物病理诊断提示: (大网膜)上皮样细胞肉芽肿性炎, (肝圆韧带)凝固性坏死组织等, 综合考虑为结核性腹膜炎。NOTES术后复查胃镜提示: 糜烂性胃炎, 术中及术后随访6 mo无手术相关并发症。患者转结核病专科医院继续治疗。

3 讨论

经胃腹腔镜探查及活检术属于NOTES的范畴, 该



图2 经胃内镜腹腔镜探查活检术后1 wk复查。

项新型微创技术具有手术创伤小、恢复快、腹壁无疤痕、无疼痛等诸多优点, 被誉为有可能继开腹手术和腹腔镜之后的第3代手术方式^[3]。

2000年Johns Hopkins医院的Kalloo等^[4]在消化病周上报了经胃内镜下肝脏活检和腹腔镜探查术, 这一最终成果于2004年发表。2003年Rao等^[5]首次尝试在人体上行经胃阑尾切除术, 但是该病例没有公开发表。

作为国内较早开展NOTES研究的单位, 上海长海医院消化科建立了内镜技术研究室, 专人开展NOTES研究, 已经在动物(雌猪)实验中成功实施了腹膜及肝脏活检术、部分肝脏切除术、胆囊切除术、输卵管切除术、脾脏切除术等^[6,7]。并由消化内科与普外科合作进行NOTES的临床研究。经过精心准备, 于2008-12-05进行国内首例腹腔镜辅助的经胃内镜腹膜后肿大淋巴结活检术, 术后证实为淋巴瘤^[8]。并

于2009-03-19进行国内第1例严格意义上的NOTES-经胃内镜肝脏囊肿开窗引流术, 亦取得成功^[9].

在动物实验及前期临床应用的基础上, 我们开始将经胃内镜腹腔探查活检术应用于临床, 初步应用表明该项新技术是可行的, 当然, 作为一项新技术, 其安全性需要进一步的评估, 就目前已经开展的3例经胃内镜腹腔探查活检术, 我们有如下的一些体会: (1)关于胃壁切口的选择: 经胃内镜手术尚处于研究的初期, 关于最佳的手术切口尚无统一的意见. 美国胃肠内镜协会与美国胃肠内镜外科协会制定的NOTES的白皮书中提到: 多数研究者采用改良经皮内镜胃切技术, 经胃前壁造口进入腹膜腔, 并用球囊将其扩张至18 mm或在胃壁打一隧道, 形成一活瓣, 可简化随后闭合程序^[5]. 我们在已经进行的3例手术中, 都是选择胃前壁切口, 这与胃前壁不像后壁有相对复杂的临近器官组织有关, 同时从前壁可以更有利于内镜进入腹腔. 当然, 如果要进行腹膜后的器官的探查活检, 胃后壁应该更易于手术操作的进行. 考虑到将来可能会出现开腹、腹腔镜及NOTES并存的局面, 为患者提供更多的选择性, 目前对于腹腔镜胆囊切除术已经可以说是“金标准”, 也许以后NOTES的发展要有自身的独特适应证, 例如对胰腺等腹膜后器官进行手术探查活检、胰腺坏死组织清除^[10]甚至切除等, 探索胃后壁的安全可行的切口将是一个重要课题, 有学者已经在探讨超声内镜引导在内镜安全进入腹腔中的作用, 利用超声的引导从而减少对周围组织的损伤, 避免出血等并发症的出现^[11]. (2)关于感染的预防: 经胃入路可能增加腹腔内污染及感染风险. 早期试验中, 偶有并发腹腔脓肿. 而胃壁穿刺前消毒胃腔及使用无菌外套管, 如果胃壁造口可靠闭合, 似能降低腹腔内感染几率. 从肠道开腹手术经验得知, 如能术前给予预防性抗生素, 且术中避免肠道内容物大量外泄, 则患者可耐受腹膜细菌污染. 因此, 工作组认为尽管这一问题需要更多研究, 但并非开展NOTES的主要障碍^[5]. 在我们进行的临床研究中, 开始采用的无菌措施包括: 先用2 000 mL生理盐水冲洗食管及胃腔, 再用1 000 mL抗生素(甲磺酸帕珠沙星及甲硝唑)冲洗, 留置10 min后吸出, 最后用聚维酮碘喷洒消毒后内镜吸净. 经过对生理盐水、抗生素及聚维酮碘分别消毒处理后取胃液进行细菌培养发现, 在抗生素及聚维酮碘处理后细菌

培养均为阴性, 同时考虑到抗生素的作用机制以及术后常规静脉使用抗生素, 临床上也没有发生感染并发症. 在接下来的研究中, 包括本研究中的第2、3例患者, 术前均使用生理盐水和聚维酮碘消毒处理, 细菌培养为阴性, 术后仍常规应用静脉抗生素, 临床也未发生感染并发症. 当然, 这可能与胃腔的高酸环境也有关系. 关于NOTES的感染预防, 有学者进行较为系统的综述^[12], 目前的感染并发症集中在动物研究中, 临床应用多为个案, 同时作为一项新技术, 更加谨慎, 所以尚没有临床关于感染的报道及系统研究. 也许感染不是主要的NOTES开展的障碍, 然而, 作为一项新型微创手术, 患者的安全是首要的, 必须最大限度地避免感染并发症的发生. (3)关于操作技术平台的问题: 最简单的经胃操作(如腹腔探查、标本回收)无需平台, 但对NOTES长远发展而言, 一个多功能操作平台非常关键. 许多组织处理的重要操作即使使用双腔道内镜, 也很困难. 例如, 强有力地抓握组织, 形成牵拉与反牵拉力, 以便结构暴露与分离, 目前尚不可能. 内镜的可曲性, 有利于通过胃腔, 却不利于向组织用力, 因为同时牵拉与推开极其困难, 经腔道操作将要求内镜固定与加硬. 这些操作需要一个团队合作操纵各种配件. 带多个锚点的装置也很重要. 机器人运动在该领域前景乐观, 但是很多拓展性工作仍有待进行. 声控技术也许最终能在帮助操作者控制各种装置方面发挥重要作用, 但初级阶段仍应立足于手控工具开发, 并最终将其改良为机器控制^[5]. 我们在研究中也深有体会, 由于该项新技术尚处于研究阶段, 相关器械的开发尚处于实验室, 目前进行各种操作, 就只能使用传统的内镜器械, 如用以切开或闭合胃壁通路的器械包括胆道导丝、针状刀、牵拉型乳头括约肌切开刀和金属夹. 很明显, 目前的内镜和器械尚不足以实施复杂的手术. 同时, 目前胃镜等软式内镜在操作过程中无法提供所需的力矩, 给操作带来困难. 另外现有内镜尚不能提供良好的三维视觉. 有学者尝试使用磁力来助推NOTES操作的进行^[13]. 尽管在2009年美国消化疾病周期间, 又有许多学者报道了新型器械及操作平台的研究进展, 但是与理想的方便实用还有差距. (4)关于胃壁切口的闭合及缝合: 许多研究者认为缝合能力将是一项必要技能, 缝合技巧将为操作者处理各种问题提供最大便利. 然而, 工作组承认腹腔镜胆囊切除术的引入先于腹腔镜缝合技术的普遍应

■名词解释

自然腔道内镜手术(NOTES): 是指经口腔、胃、结(直)肠、阴道、膀胱、食管等自然腔道进入腹腔、纵隔、胸腔等进行各种内镜下操作, 包括腹腔探查、腹膜活检、肝脏活检、胃肠及肠吻合、阑尾切除、及淋巴结活检.

■同行评价

本文中手术流程严谨, 结果理想, 具有较好的临床意义。

用。同理, 最初经腔道手术的普及也可能是那些不要求缝合能力的手术。工作组某些成员坚持认为胃壁闭合技术虽已准备用于临床, 缝合技术仍然是用于补救机械闭合装置(即使极少发生操作失败)。早期内镜缝合极其繁琐, 目前这一领域研究非常活跃。工作组认为生物胶喷黏合及激光焊接等组织连接方法仍有待进一步的研究。随着更多复杂手术开展吻合装置也将成为必须。但缝合装置似乎非常繁琐, 需要代以防水防气的机械吻合装置。目前能够通过纤维内镜工作通道的改良“订书机”装置似乎是合理的发展目标^[5]。使用止血夹等只能称之为简单的闭合切口, 缝合则是采用符合经典的外科手术要求的方法使切口有效的闭合。有效的切口闭合对于手术的成功实施是非常重要的, 尤其是对于感染出血渗漏等有重要意义。我们进行的临床操作也深有同感, 对于切口的闭合主要采用内镜止血夹夹闭的方法, 最大限度地避免胃内容物渗漏, 术后予胃肠减压, 并予抑酸药及黏膜保护剂促进切口的愈合, 术后1 wk复查胃镜可见止血夹仍在位, 切口闭合尚可, 术后第3天逐步恢复饮食; 目前许多关于缝合的器械都正在开发研究, 如新型的夹子、改进的丝线缝合系统及“鹰爪”等, 然而, 距离简单实用似乎仍有差距^[14-17]。我们正在进行研究开发简单实用的缝合器械, 如果能够成功, 则可以增加手术操作的安全性, 有效的缝合没有术后胃内容物渗漏的风险, 就可以使患者更早地恢复饮食, 推动该项技术的广泛开展。(5)关于腹腔镜辅助的作用: 作为一种比较成熟的微创外科技术, 腹腔镜已经广泛应用于临床, 尤其是胆囊切除术几乎已经替代开腹手术成为“金标准”。腹腔镜辅助可以减少NOTES的风险, 增加操作的安全性。然而, 腹腔镜的辅助使NOTES处于一个尴尬的境地。因为许多腹腔镜辅助进行的NOTES操作如果单用腹腔镜会更加易于完成, 所以, 腹腔镜辅助应该是严格意义的NOTES操作的一个“桥梁”, 最终仍要发展到不必使用腹腔镜辅助^[18]。正如开腹手术“保驾”腹腔镜的开展一样。我们进行的第1例腹膜后淋巴结活检术就是在腹腔镜的辅助下完成的^[8]。本研究的第1例腹腔探查病例, 为了安全起见, 仍有腹腔镜提供视频引导辅助, 随着研究的深入发展, 逐步在没有腹腔镜视频引导监视下完成操作^[9]。随着手术操作者熟练度的提高及新型操作平台的建立, 相信NOTES的操作可以在更广泛的领域内进行, 开展各种复杂手术, 如肾脏切

除、胆囊切除术、阑尾切除术、肠吻合等。

经胃内镜腹腔镜探查活检术明确腹水性质, 是可行的, 当然, 作为一种新型微创技术, 还有许多问题亟待解决, 尤其是操作平台的建立等, 同时其安全性需进一步研究评估。对于这一新兴技术, 我们要正确看待, 必须谨慎进行临床研究^[19,20]。技术的创新固然重要, 患者的安全却是决定性的因素。然而, 正如腹腔镜的发展应用一样, NOTES技术早期阶段可能存在各种技术上和观念上的障碍, 因此推广NOTES的应用, 需要多学科专家的通力合作。NOTES技术能否广泛应用于临床, 体现其优势, 与传统的剖腹手术和腹腔镜手术一起成为患者可以选择的手术方式, 尚需接受严格的临床实践检验。

4 参考文献

- 1 郑永志, 王东, 李兆申. 经自然腔道内镜手术. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1753-1758
- 2 Runyon BA. Care of patients with ascites. *N Engl J Med* 1994; 330: 337-342
- 3 Kobiela J, Stefaniak T, Mackowiak M, Lachinski AJ, Sledzinski Z. NOTES--third generation surgery. Vain hopes or the reality of tomorrow? *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 405-411
- 4 Kalloo AN, Singh VK, Jagannath SB, Niiyama H, Hill SL, Vaughn CA, Magee CA, Kantsevoy SV. Flexible transgastric peritoneoscopy: a novel approach to diagnostic and therapeutic interventions in the peritoneal cavity. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 114-117
- 5 ASGE/SAGES Working Group on Natural Orifice Translumenal Endoscopic Surgery White Paper October 2005. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 199-203
- 6 王东, 郑永志, 吴仁培, 于恩达, 李兆申. 经自然腔道内镜手术的实验研究. 中华消化内镜杂志 2009; 26: 6-10
- 7 王东, 郑永志, 吴仁培, 于恩达, 李兆申. 经自然腔道内镜胆囊切除术的实验研究. 中华消化内镜杂志 2009; 26: 480-484
- 8 王东, 于恩达, 李际辉, 陈丹磊, 郑成竹, 吴仁培, 杨丽, 郑永志, 李兆申. 腹腔镜辅助下经胃内镜腹膜后淋巴结活检术一例. 中华消化内镜杂志 2009; 26: 171-174
- 9 王东, 陈丹磊, 于恩达, 吴仁培, 杨丽, 郑永志, 郑成竹, 李兆申. 经胃内镜肝囊肿开窗术(附1例报告). 中国实用外科杂志 2009; 29: 440-443
- 10 Friedland S, Kaltenbach T, Sugimoto M, Soetikno R. Endoscopic necrosectomy of organized pancreatic necrosis: a currently practiced NOTES procedure. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 266-269
- 11 Elmunzer BJ, Schomisch SJ, Trunzo JA, Poulou BK, Delaney CP, McGee MF, Faulx AL, Marks JM, Ponsky JL, Chak A. EUS in localizing safe alternate access sites for natural orifice transluminal endoscopic surgery: initial experience in a porcine model. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 108-114
- 12 Kantsevoy SV. Infection prevention in NOTES. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008; 18: 291-296; ix
- 13 Ryou M, Thompson CC. Magnetic retraction in natural-orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES): addressing the problem of traction and countertraction. *Endoscopy* 2009; 41: 143-148
- 14 von Renteln D, Eickhoff A, Kaehler G, Riecken B, Caca K. Endoscopic closure of the natural orifice

- transluminal endoscopic surgery (NOTES) access site to the peritoneal cavity by means of transmural resorbable sutures: an animal survival study. *Endoscopy* 2009; 41: 154-159
- 15 Voermans RP, Worm AM, van Berge Henegouwen MI, Breedveld P, Bemelman WA, Fockens P. In vitro comparison and evaluation of seven gastric closure modalities for natural orifice transluminal endoscopic surgery (NOTES). *Endoscopy* 2008; 40: 595-601
- 16 Rolanda C, Lima E, Silva D, Moreira I, Pêgo JM, Macedo G, Correia-Pinto J. In vivo assessment of gastrotomy closure with over-the-scope clips in an experimental model for varicoelectomy (with video). *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 1137-1145
- 17 Hookey LC, Khokhotva V, Bielawska B, Samis A, Jalink D, Hurlbut D, Mercer D. The Queen's closure: a novel technique for closure of endoscopic gastrotomy for natural-orifice transluminal endoscopic surgery. *Endoscopy* 2009; 41: 149-153
- 18 Pearl JP, Marks JM, Ponsky JL. Hybrid surgery: combined laparoscopy and natural orifice surgery. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008; 18: 325-332; ix
- 19 Giday SA, Magno P, Kalloo AN. NOTES: the future. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008; 18: 387-395; xi
- 20 Kano N. The future of NOTES from the conservative point of view. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 288-291

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*)编辑委员会共计400人,全部为副教授及副主任医师以上。*WCJD*编委会审稿费结算工作于次年01-05开始。本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费费用,共计40 850元,数据以稿件审回日期为准。*WCJD*共计审稿1 418篇,其中送审专家377位,共计送审次数2 094次,成功审回次数1 634,成功率78.03%。其中审稿次数排前三位的为:西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位,各17篇;南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位,16篇;中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位,各15篇。

*WCJD*编辑部感谢各位编委2009年对*WCJD*工作的支持,同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作。审稿费已经通过邮局汇款,如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差,请各位编委与编辑部联系,联系电话:010-85381892,联系人:李军亮。(编辑部主任:李军亮 2010-04-20)

ERCP干预移植肝胆道狭窄预后的影响因素

陆雷, 王轩, 仇毓东

■背景资料

进入21世纪以后, 肝脏移植技术在我国飞速发展, 但是2003-2007年移植术后胆道并发症的发生率相对国外报道明显偏高, 这成为此项外科技术发展的瓶颈。

陆雷, 仇毓东, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

王轩, 中国人民解放军八一医院肝移植中心 江苏省南京市 210002

作者贡献分布: 陆雷与仇毓东对此文所作贡献均等; 此课题由陆雷与仇毓东设计; 研究过程由陆雷与仇毓东操作完成; 研究所用设备及部分随访资料由王轩提供; 数据分析由陆雷完成; 本论文写作由陆雷完成。

通讯作者: 仇毓东, 副教授, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科, yudongqiu510@163.com

收稿日期: 2010-05-10 修回日期: 2010-07-05

接受日期: 2010-07-12 在线出版日期: 2010-09-18

Prognostic factors in patients undergoing endoscopic retrograde cholangiopancreatography for biliary strictures after orthotopic liver transplantation

Lei Lu, Xuan Wang, Yu-Dong Qiu

Lei Lu, Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Xuan Wang, Liver Transplantation Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Associate Professor Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@163.com

Received: 2010-05-10 Revised: 2010-07-05

Accepted: 2010-07-12 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To investigate prognostic factors in patients undergoing endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) for biliary strictures after orthotopic liver transplantation.

METHODS: The clinical data for 41 patients who developed biliary strictures after liver transplantation from March 2003 to May 2007 were collected and retrospectively reviewed. Of all the 41 patients, 17 underwent liver transplantation for primary liver cancer, 22 for liver cirrhosis, and 2 for autoimmune hepatitis.

RESULTS: All the 41 patients developed pancreatitis after ERCP intervention and recovered

after treatment. Thirty-four patients suffered from bile duct infection, of which 10 died (seven from renal failure and three from liver failure). Twenty-four patients developing anastomotic strictures were discharged from hospital and lived in a normal life with biliary stents for 6 mo, and only 3 of them suffered from disease recurrence at 1 year of follow-up. Fifteen patients were complicated with biliary sludge-case formation, of which 10 died from biliary strictures and 5 had a protracted course of disease with liver dysfunction.

CONCLUSION: ERCP is an effective diagnostic method for biliary complications of liver transplantation. Biliary stent drainage may be one of effective measures to treat biliary complications. Early diagnosis, prompt biliary drainage and effective antibiotic therapy are vital factors to achieve successful ERCP-mediated biliary stent drainage. Biliary stent drainage is not indicated in patients with diffuse intrahepatic biliary strictures.

Key Words: Liver transplantation; Biliary stricture; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Early diagnosis; Antibiotic therapy

Lu L, Wang X, Qiu YD. Prognostic factors in patients undergoing endoscopic retrograde cholangiopancreatography for biliary strictures after orthotopic liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2822-2825

摘要

目的: 探讨肝移植术后胆道狭窄十二指肠镜逆行胰胆管造影(ERCP)及治疗干预的预后影响因素。

方法: 收集2003-03/2007-05院内及院外肝移植中心收治的41例肝移植术后胆道狭窄患者的临床资料, 41例患者中原发性肝癌17例, 肝炎后肝硬化22例, 自身免疫性肝炎2例, 对其临床资料进行回顾性分析。

结果: ERCP干预后41例患者均发生医源性胰腺炎, 治疗后痊愈; 34例发生胆道感染, 10例

■同行评议者

王德盛, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

死亡, 其中7例并发肾功能衰竭, 3例肝衰死亡; 24例吻合口狭窄术后2 mo正常出院, 院外带支架正常生活, 6 mo后支架拔除, 肝功正常, 随访1年中, 3例再次发生吻合口狭窄; 15例胆泥、胆道铸型及10例肝内胆道狭窄干预后死亡; 5例存活者肝功能反复异常, 迁延不愈。

结论: ERCP下的介入胆道造影是诊断胆道并发症的有效方法, 胆道支架引流是肝移植术后胆道狭窄的有效治疗方法之一, 但肝内弥漫性胆道狭窄胆道支架引流效果差。早期诊断、及时内支架引流及有效的抗感染是影响ERCP胆道支架引流成功的重要因素。

关键词: 肝移植; 胆道狭窄; 逆行胰胆管造影; 早期诊断; 抗感染

陆雷, 王轩, 仇毓东. ERCP干预移植肝胆道狭窄预后的影响因素. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2822-2825
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2822.asp>

0 引言

随着医学技术的发展, 我国肝移植手术技术逐渐趋向成熟, 围手术期成活率逐渐达到国际水平, 各种并发症越来越少, 但胆道并发症逐渐显现为肝移植的瓶颈。由于我国特殊的供体情况, 据多中心报道目前胆道并发症仍维持在8%-20%^[1], 其死亡率约为19%^[2], 再移植率为6%-13%^[3,4], 预防及处理胆道并发症对肝移植的发展及提高患者生存质量至关重要, 逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)及内支架引流是治疗胆道并发症的有效手段^[1], 但影响预后的因素较多, 预后差别较大^[5], 现针对我们收集的院内及院外肝移植后胆道并发症患者41例的处理情况及预后进行分析, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2003-03/2007-05多中心收治的肝移植术后胆道狭窄患者临床资料41例, 其中男35例, 女5例, 均为移植3-12 mo发生, 最早为术后3 mo, 最晚为术后11 mo, 年龄为21-68(平均年龄41)岁, 原发性肝癌17例, 肝炎后肝硬化22例, 自身免疫性肝炎2例, 胆道干预后死亡10例, 死于肝肾功能衰竭。供肝采用UW液4000-6000 mL灌注, 肝肾联合切取, 供肝缺血时间3-6(平均4)min, 冷缺血时间2-12(平均7)h; 胆道吻合为端端吻合, 无T管引流。GE Prestige-II数字多功能X线机, 奥林巴

斯JE-140十二指肠电子镜和配套的各种导管、引导钢丝、针式或弓式乳头切开刀、电切电凝装置及网篮、碎石器、气囊导管、高频电源、内支架等。

1.2 方法

1.2.1 胆道并发症的诊断与介入治疗时机的选择: 由于胆道并发症缺乏统一的诊断标准, 主要是术后严密观察, 对于术后反复出现皮肤瘙痒、肝功异常、早期主要为丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转移酶(aspartate aminotransferase, AST)升高, 伴有γ-谷氨酰转肽酶(gamma-glutamyl transferase, GGT)缓慢升高; 部分病例MRCP检查发现胆道吻合口狭窄, B超肝内胆管轻度扩张或无扩张; 病理排除排斥及药物性肝损害; 排除乙型肝炎病毒标志物、丙肝病毒性肝炎及药物性肝炎者, 应高度怀疑胆道并发症, 列入ERCP介入诊断范围, 造影后由主管医师与介入科医师联合诊断, ERCP术后医源性胰腺炎符合胰腺炎诊断标准。

1.2.2 术前准备: 术前禁食6 h, 术前用药: 杜冷丁100 mg肌注, 654-2 10 mg肌注。

1.2.3 ERCP检查及支架置入: 患者取左侧卧屈膝或俯卧位, 先行十二指肠电子镜至十二指肠大乳头处逆行插管造影, 根据胆道显影情况做出诊断, 然后选择性置入引导钢丝, 部分由于造影导管未能插入胆管酌情直接行针式刀乳头括约肌切开(4EF), 网篮取结石或胆泥, 放置鼻胆管外引流(4/GH)、或塑料内支架内引流(4GH)。术后禁食, 善宁皮下注射抑制胰腺分泌预防胰腺炎, 至胰酶正常, 注意观察有无发热、腹痛、黄疸等的变化情况, 定期抽血查血常规、肝功能及血清淀粉酶, 积极防治穿孔及胰腺炎等并发症的发生。常规应用广谱抗生素, 预防胆道感染, 尤其是内支架引流者, 加强抗感染治疗, 酌情预防真菌。

1.2.4 效果判断标准: 治愈, 胆红素和转氨酶降至正常, 临床症状和体征消失, 维持1 mo以上; 好转, 胆红素和转氨酶均有所下降但不能降至正常范围, 临床症状和体征好转; 无效, 胆红素继续升高, 临床症状和体征继续加重, 需要2次肝移植或死亡^[6]。

2 结果

41例肝移植术后患者符合入选标准, 胆道造影证实胆道狭窄, 与预制诊断条件相符, 行ERCP(表1, 2)。

2.1 胆管吻合口狭窄 24例患者ERCP造影显示肝

■ 研发前沿

医务工作者从供肝的缺血灌注损伤、胆道吻合技术等各环节进行了深入研究和改进, 同时针对胆道并发症, ERCP及内镜下治疗得到了大量应用并且效果显著, 目前学术界的主要争议是治疗手段和治疗时间的选择。

■ 创新亮点

本文在常规肝移植术后胆道并发症内镜治疗的基础上,进一步探讨了内镜早期介入的选择时间节点,对于临床治疗有一定的参考意义。

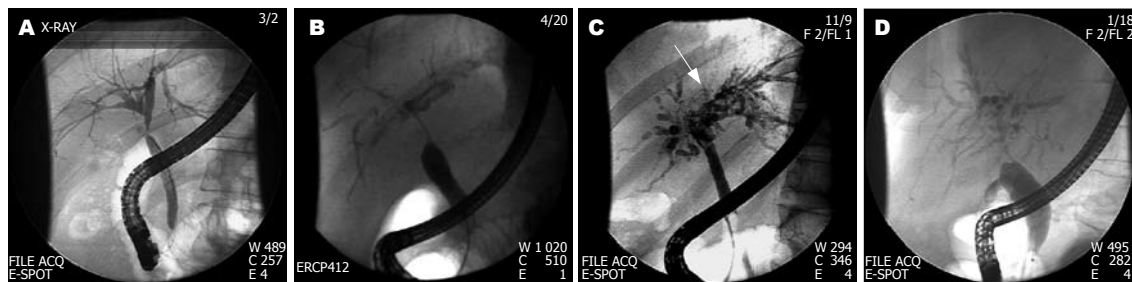


图1 肝移植术后常见类型胆道并发症. A: 胆总管吻合口狭窄; B: ERCP处理前肝内胆管铸形结石; C: 弥漫性肝内胆管狭窄, 箭头所指为肝内胆管囊性扩张; D: ERCP处理后肝内胆管铸形结石。

表1 胆道不同部位狭窄ERCP干预后的感染比较 (n)

	感染	未感染	死亡	合计
吻合口瘘	0	2	0	2
胆泥形成	6	0	4	6
胆道铸型	5	0	3	5
吻合口狭窄	19	5	0	23
肝内胆管狭窄	4	0	3	4
合计	34	7	10	41

表2 胆道不同部位狭窄ERCP干预后并发症比较 (n)

	感染	胰腺炎	肾衰	肝衰
吻合口瘘	0	2	0	0
胆泥形成	6	6	3	1
胆道铸型	5	5	2	1
吻合口狭窄	19	24	0	0
肝内胆管狭窄	4	4	2	1
合计	34	41	8	5

移植术后胆管吻合口狭窄均行球囊扩张, 内支架管引流术或鼻胆管外引流术(4/GH)(图1A), 相对狭窄18例, 6例行乳头切开球囊扩张, 放置鼻胆管外引流管(4/GH), 15例塑料内支架引流管置入术(45GH), 所有患者短期内症状明显改善; 9例因就诊延迟, 吻合口处极度阻塞, 鼻胆管引流后, 内支架引流, 痊愈出院。

2.2 胆道胆泥形成 6例行乳头切开及网篮取胆道冲洗, 患者分别为肝移植术后6 mo和12 mo, ERCP造影显示肝外胆管内见一长条状充盈缺损, 胆泥塑型为胆管状似蛔虫影像表现(图1B)。均行乳头切开及网篮拉出胆泥, 冲洗后鼻胆管引流, 定期冲洗, 更换双鼻胆管内引流, 抗感染治疗, 4例因术后反复感染, 鼻胆管引流液培养为大肠埃希菌+耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant staphylococcus aureus, MRSA), 胆汁引流不畅, 死于肾功能衰竭, 2例3 mo后出院, 病情迁延不愈, 定期复查, 更换支架。

2.3 弥漫性肝内胆管狭窄 4例患者分别为肝移植术后6 mo和12 mo, ERCP造影显示肝内胆管内见树枝形条状充盈缺损, 肝内胆管冲洗可见胆泥流出(图1C)。均行乳头切开及网篮拉出胆泥, 冲洗后鼻胆管引流, 定期冲洗, 4 wk后更换内支架内引流, 经抗感染治疗, 定期更换支架, 未痊愈, 带支架生存, 3例因术后反复感染, 鼻胆管引流液培养为大肠埃希菌+MRSA+真菌, 胆汁引流

不畅, 2例死于肾功能衰竭, 1例因肝功能衰竭二次肝移植。

2.4 胆道铸型形成 5例行乳头切开及网篮取胆道冲洗, 患者分别为肝移植术后6和24 mo, ERCP造影肝内胆道不显影, 取出铸形为鹿角状。经送检取出物诊断为胆泥, 成分为纤维组织、上皮细胞及胆固醇、胆红素等物质构成。2例术后定期更换支架, 未痊愈存活, 3例术后胆泥形成, 引流不畅, 并发胆道感染、肾功能衰竭、肝功能衰竭死亡(图1D)。

2.5 胆道腹腔漏 2例行鼻胆管外引流术(4/GH), 同上述治疗后愈合。

3 讨论

肝移植术后, 胆道并发症的出现原因很多^[7-9], 虽然吻合技术水平直接决定胆道并发症的发生, 但随着手术技术水平的日益提高, 对胆道并发症的影响已处于次要作用, 多中心调查发现, 国内动脉血供中断或减少、缺血再灌注损伤, 排斥反应, 巨细胞病毒感染等仍是主要原因^[7-9]。随着手术技术的日益完善, 抗排斥治疗的个性化, 使胆道并发症呈下降趋势, 但仍高达8%-20%^[1]。且胆道并发症处理疗效不一, 很多患者成功地度过了围手术期, 却因胆道问题, 降低了生活质量, 或/和降低了术后成活率, 结合中心目前对术后胆道并发症处理成功及失败病例做如下综合分析。

早期动态观察,及时发现是治疗的关键^[10]. 移植后由于吻合口瘢痕的形成,导管神经损伤等导致胆道动力异常,胆汁排泄通而不畅^[11]. 此时,虽无黄疸出现,但由于胆管内高压,胆汁分泌的异常,易造成细胞损伤,主要表现为酶学的异常,GGT升高,出现皮肤瘙痒,常规治疗无效,需高度怀疑发生胆道并发症. 综合临床情况,我们在治疗中发现,如果出现:(1)总胆红素轻度异常或正常;(2)转反复异常,GGT持续性升高,保肝治疗无效;(3)出现皮肤瘙痒,无肝炎的乏力、纳差症状,排除肝炎复发;(4)B超检查未见胆管扩张,MRCF提示有胆道狭窄表现;应高度怀疑胆道并发症,应及时ERCP造影证实,及时处理解除胆道内的压力,预防胆泥形成. 诊断胆泥形成的4例中,死亡2例患者均为延迟就诊,感染经久不愈,胆道损伤蔓延,并发感染胆泥形成,最终严重胆道感染出现肾功能衰竭死亡. 造影中证实轻度狭窄28例,术后均在3 mo内痊愈出院,与对照组相比,住院时间明显缩短.

及时支架引流是重点. 早期发现胆道并发症,为治疗赢得时间,避免胆汁淤积、沉淀,形成胆泥. 胆泥形成与胆道狭窄,梗阻不能及时解除,胆道内压力持续增高,肝内及肝门部胆管囊性扩张,胆道纤维化形成有关^[12]. 及时的支架引流,减少了胆道内压力,胆汁流出道通畅,降低胆道内压力,减少肝脏损伤,减少并发症的发生,缩短了住院时间,并最终提高肝移植术后的生活质量,降低了术后死亡率^[13]. 对比41例患者,胆泥、胆道铸型形成多于延迟治疗有关,而早期干预相对于延迟干预患者,住院时间明显缩短,感染率明显降低,支架更换次数明显减少.

术后的有效抗感染治疗是有力保障. ERCP术后,均有医源性胰腺炎发生,41例均发生水肿型胰腺炎,这与造影时胰管内高压,胰液内流有关,经治疗均1 wk内痊愈,无1例重症胰腺炎发生,未有因胰腺炎死亡. 但由于Oddi括约肌切开,胆道开放,肠道细菌易逆行感染^[11,12],肝移植术后,由于免疫抑制剂及大量抗菌素的运用,易出现二重感染,主要为真菌感染. 41例患者术后34例发生感染,10例死亡病例均存在反复多重感染,出现感染休克,器官功能障碍死亡;4例感染后细菌定植长期反复发热,生活质量下降;且胆道感染时,胆道内皮肿胀,胆汁排泄不畅,胆泥形成,胆道内压增加,胆汁流速下降,为细菌繁殖创造条件,反复胆汁淤积,细菌代谢产物,胆道坏死内皮沉积,出现胆泥,随之出现肝内弥

漫性胆泥沉积,铸型形成. 因此,胆道内支架引流后,感染的控制是决定预后的重要因素. 对于反复感染者建议行鼻胆道引流,引流液细菌培养根据药敏抗感染治疗,感染控制后内支架引流效果较好.

总之,目前医疗条件,胆道并发症不可绝对避免,为提高肝移植术后生存率及生活质量,减少胆道并发症的发生. 早期发现胆道并发症,及时支架引流保持胆道通畅,有效的抗感染治疗,可有效提高患者生存率,改善预后,缩短住院时间,从而更好提高肝移植患者生存质量.

4 参考文献

- 1 Keogan MT, McDermott VG, Price SK, Low VH, Baillie J. The role of imaging in the diagnosis and management of biliary complications after liver transplantation. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 215-219
- 2 Greif F, Bronsther OL, Van Thiel DH, Casavilla A, Iwatsuki S, Tzakis A, Todo S, Fung JJ, Starzl TE. The incidence, timing, and management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Ann Surg* 1994; 219: 40-45
- 3 Osorio RW, Freise CE, Stock PG, Lake JR, Laberge JM, Gordon RL, Ring EJ, Ascher NL, Roberts JP. Nonoperative management of biliary leaks after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1993; 55: 1074-1077
- 4 Letourneau JG, Castañeda-Zuñiga WR. The role of radiology in the diagnosis and treatment of biliary complications after liver transplantation. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1990; 13: 278-282
- 5 崔东旭, 刘臻, 刘宝林, 张小薄, 许维雪, 邓永林, 沈中阳, 崔东旭, 刘臻, 刘宝林, 张小薄, 许维雪, 邓永林, 沈中阳. 原位肝移植术后胆道并发症诊治134例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3045-3048
- 6 汪根树, 陈规划, 陆敏强, 杨扬, 蔡常洁, 王卫东, 郑丰平, 单鸿, 姜在波, 李华, 许赤, 易述红, 易慧敏, 许长谋, 何可可. 原位肝移植术后胆管狭窄的治疗(附43例报告). *中国实用外科杂志* 2006; 26: 432-433
- 7 O'Connor TP, Lewis WD, Jenkins RL. Biliary tract complications after liver transplantation. *Arch Surg* 1995; 130: 312-317
- 8 Verran DJ, Asfar SK, Ghent CN, Grant DR, Wall WJ. Biliary reconstruction without T tubes or stents in liver transplantation: report of 502 consecutive cases. *Liver Transpl Surg* 1997; 3: 365-373
- 9 Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Wahlstrom HE, Moore SB, Wiesner RH, Krom RA. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1992; 16: 49-53
- 10 郑树森, 徐晓, 吴健, 梁廷波, 黄东胜, 王伟林, 张珉, 沈岩. 原位肝移植后胆道并发症的诊断与治疗. *中华器官移植杂志* 2002; 23: 154-156
- 11 徐华. Oddi氏括约肌的运动功能及影响因素. *国外医学·消化系疾病分册* 2003; 23: 239-242
- 12 陈焕伟, 甄作均, 苏树英, 许卓明. 肝移植术后胆道结石及胆泥形成原因与诊治. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 94-97
- 13 易述红, 陈规划, 陆敏强, 蔡常洁, 杨扬, 许赤, 李华. 原位肝移植术后胆道结石的临床研究. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 234-236

■同行评价

本文临床资料较好,学术价值一般.

基因芯片检测对*H.pylori*感染的诊断价值及*H.pylori*毒力因子与疾病组织病理的相关性

任海涛, 徐樾巍, 李爱华

■背景资料

目前诊断*H.pylori*感染的方法分为侵袭性和非侵袭性两大类, 但对*H.pylori*毒力分型的检测较少, 单独检测CagA和VacA方法复杂, 很难在临床开展。因此很有必要发展新的高质量的, 灵敏度和特异度较高的, 且能够对*H.pylori*进行毒力分型的检测方法, 以更好的指导临床治疗。

任海涛, 徐樾巍, 李爱华, 首都医科大学附属北京儿童医院 北京市 100045

任海涛, 航空工业中心医院 北京市 100012

作者贡献分布: 本文的课题由任海涛与徐樾巍共同设计完成; 临床病例由任海涛收集完成; 研究过程和数据分析由任海涛与徐樾巍共同完成; 试剂盒由徐樾巍提供; 试验部分由李爱华完成。

通讯作者: 徐樾巍, 教授, 100045, 北京市西城区南礼士路56号, 首都医科大学附属北京儿童医院血清室。xxiwei@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-06-09 修回日期: 2010-07-27

接受日期: 2010-08-03 在线出版日期: 2010-09-18

Diagnostic value of gene chip test for detection of *H.pylori* infection and relationship between *H.pylori* virulence factors and the severity of gastroduodenal lesions

Hai-Tao Ren, Xi-Wei Xu, Ai-Hua Li

Hai-Tao Ren, Xi-Wei Xu, Ai-Hua Li, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China
Hai-Tao Ren, Aviation Industry Central Hospital, Beijing 100045, China

Correspondence to: Professor Xi-Wei Xu, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, 56 Nanlishi Road, Xicheng District, Beijing 100045, China. xxiwei@Yahoo.com.cn

Received: 2010-06-09 Revised: 2010-07-27

Accepted: 2010-08-03 Published online: 2010-09-18

Abstract

AIM: To investigate the diagnostic value of gene chip test for detection of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection in children, and to assess the relationship between *H.pylori* virulence factors and the severity of gastroduodenal lesions.

METHODS: A total of 30 children with symptoms of the digestive system, such as abdominal pain, vomiting, melena and hematemesis, underwent the ¹³C breath test at Beijing Children's Hospital from October 2007 to April 2008. A gene chip test was then performed for positive cases. The sensitivity and specificity of the gene chip test were analyzed. Gastroscopy was performed in patients diagnosed with *H.pylori* infection by both of the above methods. The pathological

changes in gastroduodenal lesions were examined by gastroscopy to assess the relationship between *H.pylori* virulence factors and the severity of *H.pylori*. The results were analyzed by the Kappa test.

RESULTS: The gene chip test has a sensitivity of 93.7%, a specificity of 60%, and a rate of missed diagnosis of 6.3%. The coincidence rate between the ¹³C breath test and gene chip test is 89.1%, showing a good consistency. *H.pylori* CagA antibody was detected in 96.6% (29/30) of the patients, while the detection rate of VacA antibody is 3.3%. *H.pylori* carrying CagA may have a stronger pathogenicity. The presence of CagA antibody was often related with gastritis, peptic ulcer and Henoch-Schonlein syndrome (abdominal type), while the presence of VacA antibody predicted more severe pathological manifestations.

CONCLUSION: The gene chip test has a high specificity and sensitivity in detection of *H.pylori* infection, and is useful for finding the relationship between *H.pylori* virulence factors and the severity of disease.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Gene chip; Virulence factor; Antibody

Ren HT, Xu XW, Li AH. Diagnostic value of gene chip test for detection of *H.pylori* infection and relationship between *H.pylori* virulence factors and the severity of gastroduodenal lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2826-2830

摘要

目的: 探讨基因芯片检测对幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染的诊断价值及*H.pylori*致病毒力因子抗体与疾病病理严重程度的关系。

方法: 对2007-10/2008-04具有腹痛, 呕吐, 呕血, 黑便等消化系统症状的30例患儿经¹³C呼气试验等方法进行*H.pylori*检测, 对阳性的患儿做血清基因芯片检测, 对基因芯片的检测方

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

法进行敏感性、特异性分析;对两种方法均诊断*H.pylori*感染的病例行胃镜检查,观察镜下病变情况及组织病理改变,评估*H.pylori*毒力因子抗体与胃镜下表现及组织学严重程度的相关性.统计学分析采用诊断一致性分析Kappa检验.

结果:血清学基因芯片毒力因子抗体检测与¹³C呼气试验等检测方法比较,敏感性为93.7%,特异性为60.0%,漏诊率为6.3%,总的符合率89.1%,显示较好的一致性.说明基因芯片检测对*H.pylori*感染的诊断具有一定的价值.*H.pylori*致病因子抗体谱中,抗CagA阳性的患者,对应的疾病有胃炎,消化性溃疡,过敏性紫癜腹型等.抗体谱最常见的是抗CagA阳性的表达,说明与抗原决定簇有关,而对应疾病病理较重时会有抗VacA阳性的表达.

结论:基因芯片法检测*H.pylori*感染,具有特异性高,敏感性强的优点;同时能显示5种*H.pylori*毒力因子抗体,对了解*H.pylori*与疾病相关性、与疾病的严重程度关系及其指导用药均具有一定的意义.

关键词:幽门螺杆菌;基因芯片;毒力因子;抗体谱

任海涛, 徐桦巍, 李爱华. 基因芯片检测对*H.pylori*感染的诊断价值及*H.pylori*毒力因子与疾病组织病理的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2826-2830
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2826.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)与消化性溃疡,慢性胃炎,胃癌及黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤的发生密切相关^[1],如何通过有效的方法来诊断*H.pylori*感染,分析*H.pylori*毒力致病因子的情况,从而进一步根除*H.pylori*变得十分迫切和重要.目前诊断*H.pylori*感染的方法分为侵袭性和非侵袭性两大类^[2],侵袭性方法分为快速尿素酶法,细菌培养,病理组织切片.非侵袭性方法有血清学与¹³C, ¹⁴C呼气实验,粪便*H.pylori*多肽抗原检测等^[3].无论是侵袭性方法还是非侵袭性方法,均难以同时对*H.pylori*进行毒力分型,单独检测CagA和VacA方法复杂,很难在临床开展.因此,有些学者^[4,5]认为,很有必要发展新的高质量、灵敏度和特异度较高,且能够对*H.pylori*进行毒力分型的检测方法,以更好地指导临床治疗.基因芯片^[6]是20世纪90年代发展起来的一项前沿生物

技术,基因芯片又称DNA微阵列,是指按照预定位置固定在固相载体上很小面积内的千万个核酸分子所组成的微阵列.基因芯片技术是将待测样品DNA/RNA通过PCR/RT-PCR扩增,体外转录等技术渗入探针分子后,与位于芯片上的探针分子杂交,再通过扫描系统检测探针分子杂交信号强度,并且以计算机对探针信号进行综合分析,可获得样品大量基因序列即表达信息^[7-9].

1 材料和方法

1.1 材料 选择2007-10/2008-05患儿30例,男17例,女13例,其中年龄最大16岁,年龄最小14 mo,具有腹痛,呕吐,反酸,暖气,呕血,黑便等消化系统症状.其中腹痛24例,呕吐17例,呕血3例,便血3例,泛酸6例,暖气4例.腹痛部位以脐周最多见,共20例,其次分别为中上腹、右上腹、右下腹、全腹.首发症状为皮肤紫癜者2例.所有患者在2 wk内未服用抗生素及抑酸药治疗.所有患者进行血清*H.pylori*现症感染条带或¹³C呼气试验,或病理组织学,或尿素酶快速试验检查等,对2种以上方法*H.pylori*检测阳性的患者做基因芯片检查.其中病理诊断*H.pylori*阳性4例,¹³C呼气试验诊断*H.pylori*阳性3例,血清学诊断*H.pylori*阳性27例.*H.pylori*蛋白检测芯片试剂盒由深圳欣康基因数码科技有限公司生产,批号:080307. Olympus GIF-XP240或GIF-XQ 240小儿电子胃镜.

1.2 方法 所有入组病例采集静脉血1 mL于干燥管中,分离血清.在芯片的窗口内加洗涤剂4滴,均匀湿润所有膜面,滤液时间90-120 s.血液抽出后,静置40 min,待血块自然收缩,剥离,离心后使用.取待检血清20 μL,迅速加于窗口膜面上,待其渗出后,加洗涤剂6滴(分2次加入,每次3滴).血清滤液时间90-160 s.将显色剂6滴(约300 μL)一次加入窗口膜面内,待渗入后,加洗涤液5滴. Cut-off值是生物芯片阅读仪进行结果分析的主要依据,每批产品有其特定的数值,测定前必须将该值输入阅读仪,设定Cut-off值.本次试验的Cut-off值如下:抗-CagA: 3, 抗-VacA: 6, 抗-尿素酶(urease, Ure): 6, 抗-热休克蛋白60(heat shock protein 60, Hsp60): 45, 抗-RdxA: 45. 本文采用慢性胃炎的组织学诊断分级标准,有5种组织学变化要分级(*H.pylori*, 慢性炎症, 活动性, 萎缩和肠化),分为无(0), 轻度(+), 中度(++)和重度(+++)4级. 分级方法用下述标准,与悉尼系统的直观模

■创新盘点

本文主要探讨基因芯片诊断*H.pylori*感染的方法,同时分析*H.pylori*毒力因子与疾病及病理的相关性.

■应用要点

基因芯片属于非侵入性检查方法, 对患者危害小, 能分析出多种 *H.pylori* 致病毒力因子, 但注意作校正, 防止假阴性, 假阳性的发生。

拟评分法(visual analogue scale)并用, 病理检查要观察每块活检标本的组织学变化。

统计学处理 本研究采用诊断试验的一致性检验Kappa检验。

2 结果

2.1 基因芯片对幽门螺杆菌的诊断价值 基因芯片法与对照组比较见表1。做诊断试验的一致性检验-Kappa检验。敏感性 $Se = a/a+c = 93.7\%$, 特异度检验 $Sp = d/b+d = 60.0\%$, 漏诊率为 $B = 1-c/a+c = 6.3\%$, 总的符合率 $= a+d/a+b+c+d = 89.1\%$, Kappa检验 $= 0.891 \geq 0.75$, 说明已取得较好的一致性。

2.2 毒力因子抗体谱的结果与胃镜下病变情况及病理组织学严重程度相关性 患者上消化系黏膜出现不同程度的充血、水肿、点片状出血、糜烂、花斑样改变及浅溃疡。病变以胃窦部为多见, 约24例, 多表现为点片状出血合并多发性糜烂灶, 花斑样及颗粒样改变并可有溃疡出现。十二指肠球部溃疡有2例(表2)。

胃镜下黏膜病变特点: 29例胃镜下均存在上消化系黏膜受损, 占总数的96.6%, 黏膜均表现为不同程度充血、水肿, 并在此基础上其中3例患儿黏膜表现为散在出血点及点片状出血斑; 3例表现为条片状出血斑及散在小糜烂灶; 3例可见溃疡, 周围黏膜明显充血、水肿; 9例表现颗粒样变性, 16例花斑样变性, 2例有食管胃底静脉曲张。

胃镜检查发现胃窦部病变发生率最高, 达24例, 胃角及十二指肠次之, 食管2例。其中病变最严重者为胃窦部, 其黏膜病变多表现为明显充血、水肿、多发性大片状出血斑及颗粒样变性, 并可见不规则溃疡形成。

所有两种以上方法诊断*H.pylori*阳性的病例都出现抗体谱毒力因子的改变, 试验发现5种组织学变化中以*H.pylori*慢性炎症, 活动性病变的毒力因子改变为主, 其中最多见的是抗-CagA阳性的表达, 其次为抗-RdxA阳性, 抗-Ure阳性的表达, 同时说明黏膜组织在毒力因子作用下会出现不同程度的组织变化(表3)。

3 讨论

*H.pylori*是消化系疾病的致病菌, 1994年世界卫生组织已将其定为I类致癌因子^[11-13], 充分说明他对人类健康的影响。*H.pylori*本身是一个复合抗原, 所含的CagA、VacA、Ure、Hsp60和硝基

表1 基因芯片法与对照组的比较 $n(\%)$

基因芯片法	对照组		合计
	阳性	阴性	
阳性	30(93.7)	2(6.3)	32(100)
阴性	2(40.0)	3(60.0)	5(100)
合计	32(86.4)	5(13.6)	37(100)

还原酶(nitroreductase, RdxA)在不同阶段刺激机体免疫系统, 从而产生各种针对不同抗原决定簇的抗体, 在体液中组成了特殊的*H.pylori*抗体谱。大量研究表明: *H.pylori*致病的多样性与Ure, 黏附因子, 应激反应蛋白, 脂多糖, VacA, CagA等毒力因子相关^[13]。所以通过有效的方法诊断并且分析毒力致病因子情况变化非常重要。

基因芯片诊断技术^[10,14]是一种新发展的医学检验技术, 他以方阵形式固定于支持膜上, 待检标本中的特异性抗体(IgG)与抗原发生反应后, 便在膜上形成抗原抗体免疫复合物, 再用胶体金标志物(显色剂)与该免疫复合物结合, 最终形成肉眼可见的红色斑点。借助芯片阅读仪对待检标本的抗体做定性分析。

*H.pylori*阳性致病毒力因子抗体谱中, 抗-CagA阳性的表达相对应的疾病情况最为广泛。有慢性胃炎、胃溃疡、过敏性紫癜腹型、慢性胃炎合并消化系出血等疾病。抗VacA阳性多见于慢性胃炎, 多与感染分型有关。患儿临床症状较重, 胃镜表现胃窦黏膜充血水肿, 呈明显颗粒样改变, 病理显示*H.pylori*相关性慢性胃炎(重度), 淋巴细胞浸润, GIMSA染色*H.pylori*(+)。有文献报道: 把*H.pylori*感染分为I型感染和II型感染, 便于临床分型及根据分型诊断及治疗^[15]。

从组织病理学角度看, 消化系疾病与*H.pylori*感染具有密切的关系, *H.pylori*感染与*H.pylori*相关的毒力因子有关, 毒力因子对黏膜的损害间接说明*H.pylori*阳性的病例都出现抗体谱毒力因子的改变, 最多见的是抗-CagA阳性的表达, 其次为抗-RdxA阳性, 抗-Ure阳性的表达, 同时说明黏膜组织在毒力因子作用下会出现不同程度的组织变化。萎缩和肠化因病例有限未发现, 需进一步探讨。本文资料还显示了小儿慢性胃炎病理类型以慢性浅表性为主, 炎症程度主要是轻度至中度, 表明小儿胃黏膜病变较成人轻^[16,17]。同时发现*H.pylori*阳性率与炎症程度, 炎症活动性等相关。在*H.pylori*阳性的小儿黏膜病理主要以中性粒细胞浸润, 淋巴滤泡增生为

■同行评价
本文选题一般, 有一定的研究价值。

表 2 毒力因子抗体与对应的胃镜下黏膜病变情况 *n*(%)

	抗CagA+	抗VacA+	抗RdxA+	抗-Ure+	抗Hsp60+	合计(<i>n</i>)
花斑样改变	5(20.8)	0(0.0)	4(30.8)	5(31.3)	2(33.3)	16
黏膜充血水肿	10(41.7)	1(50.0)	5(38.4)	9(56.3)	3(50)	29
颗粒样变	3(12.5)	0(0.0)	4(30.8)	1(6.2)	1(16.7)	9
溃疡改变	3(12.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3
出血样变	3(12.5)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	3
食管静脉曲张	0(0.0)	1(50.0)	0(0.0)	1(6.2)	0(0.0)	2
合计(<i>n</i>)	24	2	13	16	6	

表 3 病理组织学分级与毒力因子的对照分析 (*n*)

	分级	抗CagA+	抗VacA+	抗RdxA+	抗-Ure+	抗Hsp60+
<i>H.pylori</i>	0	0	0	0	0	0
	+	1	0	1	2	0
	++	3	0	1	2	1
	+++	0	0	0	0	0
慢性炎症	0	0	0	0	0	0
	+	2	0	1	0	1
	++	3	0	1	1	1
	+++	5	1	3	1	1
活动性	0	0	0	0	0	0
	+	3	0	3	0	1
	++	8	1	9	2	3
	+++	5	1	4	1	1

主, 而腺体萎缩, 肠化较成人少见^[3,18,19]。

通过对两种以上方法诊断*H.pylori*阳性的患者, 对其做血清基因芯片对比, 同时观察胃镜下表现及组织学严重程度的相关性, 观察基因芯片诊断*H.pylori*感染的可靠性。发现基因芯片毒力因子抗体检测与¹³C呼气试验等检测方法的比较结果为: 敏感性为93.7%, 特异性为60.0%, 漏诊率为6.3%, 总的符合率89.1%, 显示较好的一致性。

试验证明, 基因芯片法检测*H.pylori*感染, 具有特异性高, 敏感性强的优点; 同时能显示出5种*H.pylori*毒力因子特异性抗体, 对了解*H.pylori*与疾病的相关性、疾病严重程度的关系及其指导用药均具有一定意义。

4 参考文献

- 1 陈旻湖, 彭铁力. 幽门螺杆菌的传播途径. 临床消化病杂志 2006; 18: 68-70
- 2 邹全明, 郭刚. 人幽门螺杆菌基因组研究概述. 国外医学·临床生物化学与检验学分册 2002; 23: 65-66
- 3 Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 5-19
- 4 闫伟, 曹建彪. 胃幽门螺杆菌检测技术进展. 世界华人

- 消化杂志 2009; 17: 1527-1533
- 5 Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 63-96
- 6 Ladeira MS, Rodrigues MA, Salvadori DM, Neto PP, Achilles P, Lerco MM, Rodrigues PA, Gonçalves I Jr, Queiroz DM, Freire-Maia DV. Relationships between *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* and DNA damage in the gastric mucosa. *Environ Mol Mutagen* 2004; 44: 91-98
- 7 Gasbarrini A, Anti M, Franceschi F, Armuzzi A, Cotichini R, Ojetti V, Candelli M, Lippi ME, Paolucci M, Cicconi V, Cammarota G, Danese S, Silveri NG, Catananti C, Pola P, Stroffolini T, Gasbarrini G. Prevalence of and risk factors for *Helicobacter pylori* infection among healthcare workers at a teaching hospital in Rome: the Catholic University Epidemiological Study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 185-189
- 8 Hornsby MJ, Huff JL, Kays RJ, Canfield DR, Bevins CL, Solnick JV. *Helicobacter pylori* induces an antimicrobial response in rhesus macaques in a *cag* pathogenicity island-dependent manner. *Gastroenterology* 2008; 134: 1049-1057
- 9 Argent RH, Thomas RJ, Letley DP, Rittig MG, Hardie KR, Atherton JC. Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors *VacA* and *CagA*. *J Med Microbiol* 2008; 57: 145-150
- 10 Stack WA, Atherton JC, Hawkey GM, Logan RF, Hawkey CJ. Interactions between *Helicobacter pylori* and other risk factors for peptic ulcer bleeding.

- Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 497-506
- 11 Rosenstock S, Jørgensen T, Bonnevie O, Andersen L. Risk factors for peptic ulcer disease: a population based prospective cohort study comprising 2416 Danish adults. *Gut* 2003; 52: 186-193
 - 12 周平, 范学工, 邓世林, 李铁刚, 刘平. 医务人员幽门螺杆菌感染的血清流行病学调查. 湖南医科大学学报 2000; 25: 341
 - 13 Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 14648-14653
 - 14 刘晓君, 杜雅菊, 沈滨. 幽门螺杆菌 *cagA* 基因与胃上皮细胞凋亡、增生的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13: 246-249
 - 15 Falsafi T, Favaedi R, Mahjoub F, Najafi M. Application of stool-PCR test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 484-488
 - 16 汤宏峰, 叶华英, 吴秀英, 欧弼悠, 陈肖肖, 朱敏仙. 354例小儿胃粘膜标本病理组织学研究. 中国实用儿科杂志 1994; 9: 301
 - 17 沈小明, 许春娣, 陈舜年. 532例小儿胃十二指肠疾病的临床与病理特点. 临床儿科杂志 1999; 17: 133
 - 18 Kusters JG, Gerriets MM, Van Strijp JA, Vandenbroucke-Grauls CM. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun* 1997; 65: 3672-3679
 - 19 Russo A, Maconi G, Spinelli P, Felice GD, Eboli M, Andreola S, Ravagnani F, Settesoldi D, Ferrari D, Lombardo C, Bertario L. Effect of lifestyle, smoking, and diet on development of intestinal metaplasia in *H. pylori*-positive subjects. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1402-1408

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010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.

麦胶性肠病1例

姚怡然, 周力

姚怡然, 周力, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550004

通讯作者: 周力, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院 消化内科. yaoyiran724@163.com

电话: 0851-6758323

收稿日期: 2010-04-12 修回日期: 2010-06-16

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-09-18

Gluten-induced enteropathy: report of one case

Yi-Ran Yao, Li Zhou

Yi-Ran Yao, Li Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Correspondence to: Li Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. yaoyiran724@163.com

Received: 2010-04-12 Revised: 2010-06-16

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-09-18

Abstract

This paper reports a case of gluten-induced enteropathy in a 20-year-old boy whose growth and development was influenced. He presented with episodic diarrhea and was diagnosed with gluten-induced enteropathy by jejunal biopsy. After eating a gluten-free diet, his diarrhea ceased and his body weight and stature went up. We therefore propose that gluten-induced enteropathy can be diagnosed by digestive endoscopic biopsy and managed by following a gluten-free diet.

Key Words: Gluten-induced enteropathy; Endoscopic biopsy technique; Gluten-free diet

Yao YR, Zhou L. Gluten-induced enteropathy: report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(26): 2831-2833

摘要

本文报道1例因麦胶性肠病而严重影响患者生长发育的20岁男性患者。该患者表现间断腹泻, 麦胶性肠病通过空肠活检而诊断, 予无麸质饮食后, 其腹泻停止, 体质量、身高增加。麦胶性肠病确诊依赖于消化系内镜活检, 治疗关

键在于无麸质饮食。

关键词: 麦胶性肠病; 内镜活检技术; 无麸质饮食

姚怡然, 周力. 麦胶性肠病1例. 世界华人消化杂志 2010; 18(26): 2831-2833

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2831.asp>

0 引言

麦胶性肠病(gluten induced enteropathy)又称麸质敏感性肠病(gluten sensitive enteropathy)或非热带脂肪泻(nontropical sprue). 本病发病机制并非十分清楚, 可能与遗传、环境及免疫学因素有关. 其发病有明显的地域差异, 欧洲某些国家发病率极高, 瑞士儿童发病率为0.35%, 意大利学龄儿童发病率可高达0.5%^[1,2]. 但在我国及日本人群中本病则较为罕见. 由于多数患者症状轻微或缺如, 极易漏诊. 本文报道1例因长期误诊而严重影响患者生长发育的患者。

1 病例报告

男, 20岁, 因反复腹泻18年于2009-11-27入院. 患者自幼无明显诱因出现腹泻, 大便常为乳白色稀糊状或黄稀糊状, 伴恶臭, 每日2-4次, 时有左下腹痛, 曾多次在贵阳医学院附属医院就诊, 结肠镜检查结果不详, 予水杨酸柳氮磺胺吡啶治疗后症状可暂时缓解. 既往史: 患者12年前出现生长发育停滞, 10年来双上肢和双下肢反复出现水疱, 伴剧烈瘙痒, 可自行好转. 父母是近亲结婚(表兄妹). 查体: 身高134 cm, 体质量23 kg, 发育迟缓, 营养不良, 面色苍白, 双上肢及双膝关节以下见散在多发豌豆大小色素沉着, 肋骨呈串珠状, 双下肢轻微凹陷性水肿. 血常规示血红蛋白下降(74 g/L)、红细胞平均容量(mean corpuscular volume, MCV)(123.5 fL)、平均红细胞血红蛋白浓度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)(43.5 pg)均增高; 叶酸(3.08 nmol/L)、VB12(94.55 pmol/L)降低; 血钙(1.32 mmol/L)降低; 血沉(22 mm/h)增快; 血腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)正常; 抗结核抗体

■背景资料

麦胶性肠病的发病过程是在遗传易感的基础上, 环境因子(进食大麦、小麦、燕麦、黑麦等食物)激发了对麦胶的免疫反应, 在此过程中, 活化的T淋巴细胞释放细胞因子, B淋巴细胞及浆细胞产生相应的抗体, 促使细胞介导的细胞毒性细胞释放毒性介质, 其结果造成黏膜损伤, 黏液分泌增加及营养物质吸收受损。

■同行评议者

王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

■ 研发前沿

麦胶性肠病发病机制并非十分清楚,可能与遗传、环境及免疫学因素有关。其发病有明显的地域差异,欧洲某些国家发病率极高,瑞士儿童发病率为0.35%,意大利学龄儿童发病率可高达0.5%。但在我国及日本人群中本病则较为罕见。



图1 内镜示上消化道空肠黏膜。

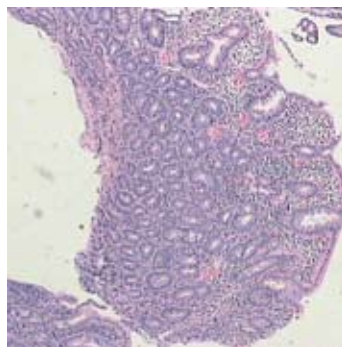


图2 病理检查示空肠绒毛(HE × 40)。

阴性;纯蛋白衍生物(purified protein derivative, PPD)阴性;甲状旁腺素(606 ng/L)升高;甲状腺激素和性腺激素均正常;皮质醇、促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)节律及浓度均正常;免疫球蛋白+补体正常;抗核抗体、可提取性核抗原(extractable nuclear antigen, ENA)多肽抗体谱、抗中性粒细胞胞浆抗体均阴性;粪便常规检查正常;肠镜示:升结肠、横结肠、降结肠黏膜光滑,有散在少量红斑,分别于升结肠、横结肠、降结肠、回肠末段正常黏膜及红斑处活检,病理检查示回肠末段黏膜绒毛异常,绒毛变短、萎缩、黏膜扁平,固有层内有大量淋巴及浆细胞浸润;上消化道内镜示:十二指肠球部、降部、空肠上段黏膜粗糙,稍水肿,十二指肠降部部分区域黏膜皱襞稍扁平,空肠上段黏膜皱襞变细(图1)。病理检查示绒毛异常,肠黏膜绒毛明显缩短,黏膜扁平,固有层内有大量浆细胞及淋巴细胞浸润(图2);腹部CT(平扫+增强)示腹腔多发淋巴结肿大;小肠CT造影示空肠黏膜皱襞萎缩、变短,回肠黏膜皱襞增多,肠系膜血管增粗,肠系膜周围淋巴结肿大(符合乳糜泻CT表现),同时小肠CT造影提示骨盆及双侧股骨头、股骨颈骨质密度减少,骨小梁稀疏(考虑骨质疏松);骨骼片符合14岁男孩骨龄、骨发育迟缓。结合患者症状及内镜检查和病理结果,经全院会诊后认为患者符合麦胶性肠病诊断,制定无麸质饮食(gluten-free diet),1 wk后患者腹泻停止,1 mo复查血常规示血红蛋白明显上升(101 g/L),血钙上升(1.72 mmol/L),体质量增加4 kg,身高增加2 cm。

2 讨论

早在1888年Gee就描述了本病的临床表现,但至1950年Dicke在其研究中,注意到本病患者多食用面食,如不进食面食,症状即可缓解,从而提示麦胶可能是引起患者症状的原因^[3]。Rubin的研究证实了这一观点,如予已无症状的患者麸

质,则可诱发腹泻及肠黏膜的病理改变。

现已认为麦胶性肠病与遗传有关,近亲属之间发病率远高于对照人群,同胞兄弟姐妹患者之间HLA的一致为30%,95%患者人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)基因编码为DQ。另外一些其他遗传物质如细胞上同种异型抗原和IgG重链Gm同种异物标志物,亦可能与这些造成易感个体的发病有关。本例患者父母为近亲属,是否携带有相关致病基因遗传致子代,形成纯合子而出现严重临床症状,有待进一步研究。

在麦胶性肠病的发病中,免疫功能的异常起着重要作用。患者小肠黏膜固有层免疫球蛋白生成细胞比正常黏膜增加2-6倍,患者血清IgA水平增加。近年已在这类患者血清中检出麦胶蛋白组分抗体,这种抗体可参与抗体依赖细胞介导细胞毒性反应。另外,局部免疫复合物诱导补体的活化也可造成黏膜的损害。本例患者肠黏膜活检见大量浆细胞及淋巴细胞浸润也提示病变与免疫反应有关。近年研究认为细胞免疫反应在麦胶性肠病的发病中尤为重要,在患者固有层及上皮间浸润的大量T淋巴细胞主要是CD8⁺ T淋巴细胞,黏膜内也见CD45RO细胞表达增加,固有层内活化的淋巴细胞多为CD4⁺细胞,其可对麦胶蛋白发生特异免疫反应,现已证明,这些淋巴细胞活化标志物(CD25 TNF α γ 干扰素)表达增高,活化的T淋巴细胞与人类胎儿小肠黏膜一起培养,可见产生类似麦胶性肠病的黏膜结构改变。

因此,麦胶性肠病的发病过程是在遗传易感的基础上,环境因子(进食大麦、小麦、燕麦、黑麦等食物)激发了对麦胶的免疫反应,在此过程中,活化的T淋巴细胞释放细胞因子,B淋巴细胞及浆细胞产生相应的抗体,促使细胞介导的细胞毒性细胞释放毒性介质,其结果造成黏膜损伤,黏液分泌增加及营养物质吸收受损。

临床表现不尽一致, 儿童多在出生后24 mo内发病, 本例正是如此。他主要表现生长迟缓, 体质量不增, 腹泻, 腹胀, 时间一长, 还可有浮肿, 贫血, 低钙抽搐, 有时可以出现易怒、忧郁, 学习成绩下降, 严重者发生佝偻病, 复发性疱疹性口炎, 关节疼痛, 牙釉质改变, 血清转氨酶升高。成人发病可不典型, 可仅有疲倦劳累感、胃肠功能紊乱、贫血、骨质疏松。典型患者予无麸质饮食症状即可好转, 再进食又立即复发。部分患者可完全无症状。近年发现, 麦胶性肠病可伴发相当多其他疾病, 最常见的是疱疹样皮炎, 皮肤活检可在85%-95%患者表皮交界处见颗粒状Ig沉积物, 5%-15%见线状Ig沉积物。麦胶性肠病中I型糖尿病发病率亦明显增加, 这类患者也多有麦胶性肠病相关的DQ基因表达。患者中常有自身免疫性甲状腺疾病, 以甲减为主。另外, 亦有报道患者伴有选择性IgA缺乏、结缔组织疾病、IgA肾病、炎症性肠病、硬化性胆管炎、原发性胆汁肝硬化及Down综合征、癫痫等。

本病的诊断并非困难, 但因在我国罕见, 部分患者无症状或症状不典型, 且亦肠外表现而就诊, 加之忽视病史询问, 则极易漏诊误诊。本例患者曾在贵阳医学院附属医院反复就诊达10余年, 均无一临床医生考虑本病。临床如见明显脂肪泻或乳糜泻并伴有疱疹样皮炎、贫血、骨质疏松、I型糖尿病或其他自身免疫性疾病表现者, 应高度疑似本病, 去麸质饮食有效, 则基本可以确诊。胃肠道内镜活检组织学检查见绒毛变短、萎缩、隐窝肥大、上皮层中性淋巴细胞增多、固有层中淋巴细胞浆细胞浸润。本例患者去麸质治疗有效, 内镜检查示十二指肠降部部分区域黏膜皱襞稍扁平, 空肠上段黏膜皱襞变细, 病理检查肠黏膜绒毛明显缩短, 固有层大量淋巴细胞及浆细胞浸润, 均支持本病的诊断。

在本病治疗中无麸质饮食是最基本而必需的, 数月之后部分患者对含少量麸质食物可以耐受, 但有些则出现严重水泻导致脱水休克乃至危及生命, 此称为麦胶蛋白休克(gliadin shock)。此外, 应补充所缺乏的营养物质, 贫血患者应补充铁、叶酸、VB12; 如有皮肤紫癜或出血倾向或凝血酶原时间(prothrombin time, PT)延长, 应给予VitK; 凡有低血钙或骨软化的患者均应补充钙剂及VitD, 如低钙引起手足抽搐时可静脉给予葡萄糖酸钙及镁剂, 但如过量补钙及VitD可能有害, 故治疗中应复查血钙, 如出现高钙血症, 则应中断此治疗; 患者亦同时给予多种复合维生素。本例患者予无麸质饮食治疗1 wk后腹泻停止, 在其他支持治疗下, 1 mo复查血常规示血红蛋白明显上升, 血钙上升, 体质量增加4 kg, 身高增加2 cm。

总之, 麦胶性肠病是一种在罕见地区普遍易被误诊的疾病, 一旦确诊, 予简单地去除麸质饮食即可迅速改善患者的临床症状和生活质量。但如延误诊断或误诊, 严重时患者可因极度营养不良、衰竭并发出血感染而死亡。对于麦胶性肠病的长期随访亦很重要, 有报道称此病患者分别有13%和11%发生淋巴瘤和食管鳞状细胞癌, 极少数患者可出现小肠溃疡、出血、狭窄、穿孔等, 但其机制不明。

3 参考文献

- 1 Catassi C, RÃ¶tsch IM, Fabiani E, Ricci S, Bordicchia F, Pierdomenico R, Giorgi PL. High prevalence of undiagnosed coeliac disease in 5280 Italian students screened by antigliadin antibodies. *Acta Paediatr* 1995; 84: 672-676
- 2 Cavell B, Stenhammar L, Ascher H, Danielsson L, Danneus A, Lindberg T, Lindquist B. Increasing incidence of childhood coeliac disease in Sweden. Results of a national study. *Acta Paediatr* 1992; 81: 589-592
- 3 孙自勤, 刘晓峰. 肠道病学. 第1版. 山东科学技术出版社, 2005: 913

■同行评价

本文选题新颖, 有一定的临床指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕