

慢性肝病与骨质疏松症

段雪飞, 范小玲

段雪飞, 范小玲, 北京地坛医院 北京市 100015
范小玲, 主任医师, 教授, 主要从事病毒性肝炎合并糖尿病的
临床研究工作。

国家十一五重大专项基金资助项目, No. 2009ZX10004-903
作者贡献分布: 范小玲负责本文的构思立题和文章审核; 段雪飞
负责收集文献, 整理书写。

通讯作者: 范小玲, 主任医师, 教授, 100015, 北京市, 北京地坛
医院. fanxl2001@163.com

电话: 010-84322327

收稿日期: 2010-07-22 修回日期: 2010-08-25

接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-09-28

Chronic liver disease and osteoporosis

Xue-Fei Duan, Xiao-Ling Fan

Xue-Fei Duan, Xiao-Ling Fan, Beijing Ditan Hospital,
Beijing 100015, China

Supported by: the National Major Science and Tech-
nology Project during the Eleventh Five-Year Plan, No.
2009ZX10004-903

Correspondence to: Professor Xiao-Ling Fan, Beijing Di-
tan Hospital, Beijing 100015, China. fanxl2001@163.com

Received: 2010-07-22 Revised: 2010-08-25

Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-09-28

Abstract

Hepatic osteodystrophy, manifesting mainly as osteoporosis, can occur in patients with chronic liver disease (CLD) or after liver transplantation and lead to vertebral compression fracture, radial or femoral fracture. Currently, the pathogenesis of hepatic osteodystrophy is still not completely clear. The reported incidence of osteoporosis in CLD patients ranged from 12% to 55%. For CLD patients, attention should be paid to monitor osteoporosis by measuring bone mineral density on the basis of controlling liver disease to choose safe and effective medication to improve their quality of life.

Key Words: Chronic liver disease; Osteoporosis; Bone mineral density

Duan XF, Fan XL. Chronic liver disease and osteoporosis.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(27): 2841-2845

摘要

各种原因的慢性肝病如病毒性、胆汁淤积

性、酒精性肝病以及肝移植术后患者均可发生肝性骨营养不良, 主要表现为骨质疏松症, 可导致椎体及股骨颈等部位骨折, 严重影响肝病患者生活质量。据不同文献报道, 慢性肝病合并骨质疏松症的发生率为12%-55%, 其发病机制尚未完全明了。对于慢性肝病患者, 临床医生应在治疗管理肝病同时关注其骨质疏松状况, 及时进行骨密度检查, 选用安全有效的药物治疗, 改善其生活质量。

关键词: 慢性肝病; 骨质疏松症; 骨密度

段雪飞, 范小玲. 慢性肝病与骨质疏松症. 世界华人消化杂志
2010; 18(27): 2841-2845

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2841.asp>

0 引言

随着医疗技术水平的提高, 慢性肝病患者的生存时间不断延长, 肝病引起的其他器官系统损害逐渐成为临床医生关注的问题。研究发现, 各种病因导致的慢性肝病、肝硬化及终末期肝病、肝移植术后均可并发不同程度的骨营养不良, 主要表现为骨质疏松症(osteoporosis, OP)。慢性肝病合并OP患者可发生椎体压缩性骨折、桡骨及股骨骨折等, 是致残、致死的重要原因, 严重影响了慢性肝病患者的生存质量及长期预后。因此, 正确认识、积极防治OP, 对于提高慢性肝病患者的生活质量具有重要意义。

1 OP的定义与诊断标准

OP是一种以骨量低下、骨微结构破坏, 导致骨脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病^[1]。根据病因不同, 可分为原发性OP和继发性OP。原发性OP的病因主要为老年及绝经。继发性骨质疏松的常见病因则包括内分泌代谢疾病、肝肾疾病、某些药物、器官移植术后等。

腰背酸痛、脊柱变形和发生脆性骨折是OP最典型的临床表现, 但多数患者早期常无明显症状, 往往是在骨折发生后经X线或骨密度检查时才发现已有骨质疏松改变。临床上用于诊断OP的通用指标是: 发生了脆性骨折及/或骨密

■背景资料

各种原因的慢性肝病、肝移植术后均可发生骨质疏松症等肝性骨营养不良, 从而导致脆性骨折, 影响肝病患者的生活质量。目前慢性肝病合并骨质疏松症的发病机制尚不清楚, 发生率报道不一, 亟待临床医生的高度关注及进一步研究。

■同行评议者

陈红松, 研究员,
北京大学人民医
院肝病研究所

■研究前沿

原发性胆汁性肝硬化、肝移植术后合并骨质疏松症的报道相对较多,但慢性病毒性肝病、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病合并骨密度异常尚缺乏大规模的临床流行病学报道,各种慢性肝病合并骨质疏松症的流行病学、发病机制及合理用药已经成为目前研究的热点。

度低下。目前国际学术界公认的骨密度检查方法是双能X线吸收法(dual-energy X-ray absorptiometry, DXA),其测定值T值为诊断的金标准,推荐测量部位是腰椎1-4和股骨颈。参照世界卫生组织推荐的诊断标准,测得的骨密度值与同性别、同种族健康成人的骨峰值相比,降低1-2.5个标准差(即 $-2.5SD < T值 < -1SD$)为骨量减少;降低2.5个标准差或以上($T值 \leq -2.5SD$)为骨质疏松。符合骨质疏松标准同时伴有1处或多处骨折为严重骨质疏松。

2 不同病因的慢性肝病与OP

据不同文献报道,慢性肝病合并OP的发生率为12%-55%^[2-4],骨折发生率为5%-20%^[2]。由于慢性肝病病因不同,研究方法、研究群体的差异,使OP的发生率报道不一。

2.1 病毒性肝炎肝硬化并发OP 慢性病毒性肝炎、肝硬化引起的骨密度异常目前尚缺乏大规模的临床流行病学研究报道。Schiefke等^[5]测量了43例慢性病毒性肝炎患者的骨密度,其中慢性丙型肝炎30例、慢性乙型肝炎13例,发现骨密度下降25例(58%),诊断OP 8例(19%)。Cijevski等^[6]的研究显示93例肝炎后肝硬化患者中,发生骨量减少或骨质疏松的比例为30/93(32.3%),且骨密度降低与低体质量指数($<20 \text{ kg/m}^2$)、胆汁淤积、Child-Pugh C级、较长病程(>10 年)等因素存在明显相关性。Wang等^[7]分析17例乙型肝炎肝硬化的骨活检结果,14例(82.4%)存在程度不等的骨质疏松,表现为骨细胞萎缩、减少或消失,骨小梁变细、断裂,骨小梁间隙增宽。我们曾观察32例乙型肝炎肝硬化患者的骨密度(采用DXA检测),发现14例合并骨量减少(44%),9例合并骨质疏松(28%),与健康对照组相比有显著性差异,Child-Pugh评分C级与骨密度降低存在相关性。以上资料均提示慢性病毒性肝炎、肝硬化患者易合并OP。

病毒性肝病相关性骨质疏松的发生机制相当复杂,目前尚未完全明了。多位学者对其发病机制进行过相关的综述,包括维生素D和钙代谢异常、营养不良、性腺功能减退等。近年研究发现^[3],多种细胞因子如白介素1(interleukin-1, IL-1)、白介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)参与了骨代谢过程。IL-1、IL-6、TNF- α 是较强的骨吸收因子,可共同促进破骨细胞形成,诱发骨吸收,影响正常骨重建,IGF-1是主要在肝脏合

成的骨形成强刺激因子。乙型肝炎肝硬化患者血清IL-1、IL-6、TNF- α 明显升高,IGF-1明显降低,均可引起骨吸收增加、骨形成减少,从而导致OP。还有文献^[8]报道慢性丙型肝炎患者血清IGF-1水平明显降低。提示细胞因子可能在病毒性肝炎肝硬化患者并发OP的发病机制中扮演重要的角色。

2.2 非病毒性肝病与OP 原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种慢性进行性以胆汁淤积为特征的自身免疫性肝病,大约1/3的患者会发生OP。早期英国^[9]、加拿大^[10]、美国^[11]进行的较大样本量的3项流行病学调查显示,PBC患者OP发生率分别为31%、35%、24%。近期1项调查则显示^[12],33例PBC患者中17例发生OP(51.5%),3例(9%)发生椎体骨折。PBC患者发生OP的主要原因为胆汁淤积导致钙与维生素D吸收障碍,其他因素还包括:血清护骨素等调节骨骼生长的细胞因子水平异常^[13]、维生素D受体基因型分布差异^[14]、皮质激素的应用等。关于OP是否为PBC的特异性并发症,一直存在争议,近期研究证实PBC患者,尤其是进展期患者,是发生骨质疏松及脆性骨折的高危人群^[15]。

酒精性肝病包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝硬化,是欧美国家最常见的肝病。Malik等^[16]报道57例中青年非硬化性酒精性肝病(年龄27-50岁),发生骨密度降低的比例为10/57(17.5%),明显高于同年龄的对照组。George等^[17]报道37例酒精性肝硬化患者中,21(56.7%)发生骨密度降低。一般认为OP的发生与营养不良、酒精对成骨细胞的毒性作用有关,在未发生肝硬化之前就已经发生,进展到肝硬化后,病情往往加重,发生骨折的概率为一般人群的2-3倍。此外,酒精还可通过IL-6诱导激活NK- κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor κ B ligand, RANKL)途径来诱导骨丢失^[18]。

非酒精性脂肪性肝病作为代谢综合征的一种组成成分,与2型糖尿病密切相关,而2型糖尿病患者骨质疏松患病率较高,提示非酒精性脂肪性肝病与骨质疏松可能存在相关性。国内学者^[19]研究发现,2型糖尿病合并脂肪肝的患者骨质疏松患病率明显高于不合并脂肪肝的2型糖尿病患者。Lee及Ferron等^[20,21]发现骨钙素(反映成骨细胞活性的小分子蛋白)可促进胰岛素分泌、改善胰岛素抵抗、阻止脂肪累积,还可促进脂肪细胞分泌脂联素,提示骨质疏松的发生与糖、脂代谢紊乱密切相关。

2.3 肝移植术与OP 肝移植术作为终末期肝病的有效治疗措施已被广泛接受, 肝性骨营养不良作为其并发症之一近年亦受到关注. 研究发现, 肝移植患者术前多已存在骨量减少或骨质疏松. Loria等^[22]报道肝移植术前的终末期肝病患者骨量减少及骨质疏松发生率为40%. 移植术后由于免疫抑制剂的使用、遗传及手术相关因素, 患者易出现骨量丢失甚至脆性骨折^[23]. Valta等^[24]对40例平均年龄14岁的肝移植受者随访了7年, 发现58%出现骨密度下降, 18%出现无症状椎体压缩性骨折. 早期研究认为, 肝移植术后骨密度的明显下降发生在术后头3-6 mo, 但近期研究^[25]则认为多发生于术后第6-12 mo, 此期间脆性骨折发生率也最高(24%-65%), 常见骨折部位为肋骨、椎体.

3 慢性肝病合并OP的防治

慢性肝病合并OP患者早期症状如腰背酸痛等是非特异性的, 不易引起重视, 一旦发生脆性骨折, 可致死或致残, 严重影响生活质量. 因此, 预防比治疗更为现实和重要.

首先要强调积极治疗原发病. Hofmann等^[26]回顾性调查了30例接受聚乙二醇化干扰素及利巴韦林治疗的基因1型慢性丙型肝炎患者, 发现抗病毒治疗期间骨密度较治疗前明显增加, 如果能获得持续病毒学应答, 该效应还可持续. Arase等^[27]报道, 病毒清除可以降低绝经后慢性丙型肝炎妇女骨质疏松性骨折的风险. Gur等^[28]报道54例接受干扰素治疗的慢性乙型肝炎儿童患者骨密度高于对照组. 对于PBC患者, 使用熊去氧胆酸可以减轻胆汁淤积, 增加维生素D及钙的吸收. 酒精性肝病患者通过戒酒, 可改善肝功能, 有利于预防骨质疏松. 但应注意, 个别抗病毒药物如替诺福韦酯使用期间可出现骨密度下降, 因此治疗期间应注意密切监测^[29].

其次, 应注意防治骨质疏松的基础措施以及高危人群的骨密度检测. 基础措施包括摄入含钙丰富的均衡饮食、适当锻炼、补充钙剂和维生素D. 钙剂每日需800-1 200 mg. 同时建议应用活性维生素D₃, 如骨化三醇[1, 25-(OH)₂ VitD₃] 0.25-0.5 μg/d, 该药不受肝肾功能的影响, 更适用于慢性肝病患者, 治疗期间应监测血钙. 对高危人群进行骨密度检查是早期发现骨质疏松的前提. 美国胃肠学会建议^[30], 对曾经脆性骨折、绝经后、需长期使用糖皮质激素治疗(>3 mo)、初次诊断PBC、肝硬化、肝移植术前的患者, 均应

检测骨密度, 具有上述危险因素而骨密度正常者应2-3年后复查, 应用大剂量糖皮质激素者, 应1年后复查.

然而, 慢性肝病患者一旦确诊OP, 或已发生过脆性骨折, 仅仅依靠上述措施是不够的, 必须在上述措施基础上使用抗骨吸收或促骨形成的药物治疗. 抗骨吸收药物包括二膦酸盐类药物、雌激素类药物、选择性雌激素受体调节剂、降钙素等. 促骨形成药物目前主要是甲状旁腺激素.

二膦酸盐可有效抑制破骨细胞活性, 降低骨转换, 常见药物包括依替膦酸二钠、阿仑膦酸钠、利塞膦酸钠等. 日本学者^[31]报道依替膦酸二钠可降低慢性肝病合并OP患者骨折的风险. 但此类药物存在不同程度的消化系不良反应, 可导致食管炎、食管溃疡, 对于合并食管静脉曲张的慢性肝病患者, 其应用受到限制. 唑来膦酸注射液^[32]对食管黏膜无不良反应, 用于治疗OP 1年仅需静脉滴注1次, 每次5 mg, 可连续用药3年, 是目前较新的二膦酸盐制剂.

降钙素可抑制破骨细胞活性, 促进钙在骨质上沉着, 对于二膦酸盐不能耐受的慢性肝病患者, 可考虑经鼻或皮下给予降钙素. 荟萃分析表明降钙素可防止绝经后PBC合并OP妇女的骨质丢失, 增加骨密度, 降低椎体骨折的发生率.

雌激素替代治疗可抑制骨转换, 阻止骨丢失, 但可增加乳腺癌、子宫内膜癌、出血及血栓性疾病的风险, 还可引起胆汁淤积, 因此慢性肝病患者应慎重使用. 选择性雌激素受体调节剂如雷诺昔芬^[33], 则可选择性作用于雌激素靶器官, 在骨组织中呈现雌激素样活性, 抑制破骨细胞的骨吸收活性, 且不会增加乳腺癌的发生率.

甲状旁腺激素及其相关片段(1-34)注射剂可显著促进骨形成, 增加骨密度, 降低骨折发生率. FDA已批准甲状旁腺激素用于治疗严重OP患者, 但在慢性肝病合并OP患者中的应用尚无报道.

此外, 雷奈酸锶干混悬剂兼有抗骨吸收及促骨形成作用. SOTI研究(一项双盲对照研究)^[34]表明, 使用雷奈酸锶36 mo, 可显著升高腰椎骨密度(比安慰剂组高14.4%)和股骨颈骨密度(比安慰剂组高8.3%), 并显著降低椎体骨折及髌骨骨折的风险. 雷奈酸锶安全性较好, 不良反应轻微而短暂, 偶见恶心、腹泻, 为慢性肝病合并OP患者的治疗提供了新的方向.

对于终末期肝病合并OP, 肝移植术仍然是最有效的治疗方法之一. 尽管肝移植术后短期

■相关报道

Hofmann等回顾性调查了30例接受聚乙二醇化干扰素及利巴韦林治疗的基因1型慢性丙型肝炎患者, 发现抗病毒治疗期间骨密度较治疗前明显增加, 如果能获得持续病毒学应答, 该效应还可持续.

■应用要点

本文总结了国内外较新的文献,报道了各种慢性肝病患者合并骨质疏松的发病情况,并提出了预防、监测、治疗方案,有助于临床医生及时为慢性肝患者群监测骨密度,早诊断,早治疗。

内骨质疏松和脆性骨折发生率增高^[27],但在术后2-3年,患者骨密度值趋于正常,骨折风险也明显降低^[35]。文献[36]报道肝移植术前应用二膦酸盐可降低移植术后骨折的风险。因此建议肝移植术前检测骨密度、积极预防和治疗OP、术后尽量减少皮质激素用量,以预防术后脆性骨折。

4 结论

目前慢性肝病合并OP的研究还不够充分,如病毒性肝病与骨质疏松的关系还缺乏大样本的流行病学资料,发病机制需要更加有力的基础研究证据,如何选择更加有效的药物治疗也缺乏更多的循证医学证据,这一切都需要更深入的研究,也需要临床医生的高度重视。作为肝病科医生,在慢性肝炎肝硬化患者的诊疗随访管理中,还需要同时关注患者的骨质疏松状况,及时进行相关检查及治疗,改善慢性肝病患者的生活质量。

5 参考文献

- 1 Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994; 843: 1-129
- 2 Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005; 115: 3318-3325
- 3 Goral V, Simsek M, Mete N. Hepatic osteodystrophy and liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1639-1643
- 4 Collier J. Bone disorders in chronic liver disease. *Hepatology* 2007; 46: 1271-1278
- 5 Schiefke I, Fach A, Wiedmann M, Aretin AV, Schenker E, Borte G, Wiese M, Moessner J. Reduced bone mineral density and altered bone turnover markers in patients with non-cirrhotic chronic hepatitis B or C infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1843-1847
- 6 Cijevski C, Mihai C, Drug VL, Zbranca E, Gogălniceanu P. Osteoporosis in liver cirrhosis-overview. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2005; 109: 700-704
- 7 Wang YG, Liu Q, Wang WQ, Chen ZP, Yan MX. [A clinical study of abnormal bone metabolism in patients with HBV liver cirrhosis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2006; 14: 33-36
- 8 Raslan HM, Elhosary Y, Ezzat WM, Rasheed EA, Rasheed MA. The potential role of insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding protein 3 and bone mineral density in patients with chronic hepatitis C virus in Cairo, Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104: 429-432
- 9 Newton J, Francis R, Prince M, James O, Bassendine M, Rawlings D, Jones D. Osteoporosis in primary biliary cirrhosis revisited. *Gut* 2001; 49: 282-287
- 10 Springer JE, Cole DE, Rubin LA, Cauch-Dudek K, Harewood L, Evroviski J, Peltekova VD, Heathcote EJ. Vitamin D-receptor genotypes as independent genetic predictors of decreased bone mineral density in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology*

2000; 118: 145-151

- 11 Menon KV, Angulo P, Weston S, Dickson ER, Lindor KD. Bone disease in primary biliary cirrhosis: independent indicators and rate of progression. *J Hepatol* 2001; 35: 316-323
- 12 Mounach A, Ouzzif Z, Wariaghli G, Achemlal L, Benbaghdadi I, Aouragh A, Bezza A, El Maghraoui A. Primary biliary cirrhosis and osteoporosis: a case-control study. *J Bone Miner Metab* 2008; 26: 379-384
- 13 Gasser RW. Cholestasis and metabolic bone disease - a clinical review. *Wien Med Wochenschr* 2008; 158: 553-557
- 14 Horst-Sikorska W, Kalak R, Wawrzyniak A, Marcinkowska M, Celczynska-Bajew L, Slomski R. Association analysis of the polymorphisms of the VDR gene with bone mineral density and the occurrence of fractures. *J Bone Miner Metab* 2007; 25: 310-319
- 15 Solaymani-Dodaran M, Card TR, Aithal GP, West J. Fracture risk in people with primary biliary cirrhosis: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2006; 131: 1752-1757
- 16 Malik P, Gasser RW, Kemmler G, Moncayo R, Finkenstedt G, Kurz M, Fleischhacker WW. Low bone mineral density and impaired bone metabolism in young alcoholic patients without liver cirrhosis: a cross-sectional study. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33: 375-381
- 17 George J, Ganesh HK, Acharya S, Bandgar TR, Shivane V, Karvat A, Bhatia SJ, Shah S, Menon PS, Shah N. Bone mineral density and disorders of mineral metabolism in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3516-3522
- 18 Liappas IA, Nicolaou C, Chatzipanagiotou S, Tzavellas EO, Piperi C, Papageorgiou C, Boufidou F, Bagos P, Soldatos CR. Vitamin B12 and hepatic enzyme serum levels correlate with interleukin-6 in alcohol-dependent individuals without liver disease. *Clin Biochem* 2007; 40: 781-786
- 19 张莹, 郑永雄, 唐彬等, 谢毅娟, 陈慧. 2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝相关因素分析及与骨质疏松的关系. *黑龙江医学* 2009; 33: 418-420
- 20 Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130: 456-469
- 21 Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 5266-5270
- 22 Loria I, Albanese C, Giusto M, Galtieri PA, Gianneli V, Lucidi C, Di Menna S, Pirazzi C, Corradini SG, Mennini G, Rossi M, Berloco P, Merli M. Bone disorders in patients with chronic liver disease awaiting liver transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42: 1191-1193
- 23 Kulak CA, Borba VZ, Kulak Júnior J, Campos DJ, Shane E. Post-transplantation osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010; 54: 143-149
- 24 Valta H, Jalanko H, Holmberg C, Helenius I, Mäkitie O. Impaired bone health in adolescents after liver transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 150-157
- 25 Ebeling PR. Approach to the patient with transplantation-related bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 1483-1490
- 26 Hofmann WP, Kronenberger B, Bojunga J, Stamm

- B, Herrmann E, Bucker A, Mihm U, von Wagner M, Zeuzem S, Sarrazin C. Prospective study of bone mineral density and metabolism in patients with chronic hepatitis C during pegylated interferon alpha and ribavirin therapy. *J Viral Hepat* 2008; 15: 790-796
- 27 Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Hosaka T, Kawamura Y, Yatsuji H, Hirakawa M, Ikeda K, Hsieh SD, Oomoto Y, Amakawa K, Kato H, Kazawa T, Tsuji H, Kobayashi T, Kumada H. Virus clearance reduces bone fracture in postmenopausal women with osteoporosis and chronic liver disease caused by hepatitis C virus. *J Med Virol* 2010; 82: 390-395
- 28 Gur A, Dikici B, Nas K, Bosnak M, Haspolat K, Sarac AJ. Bone mineral density and cytokine levels during interferon therapy in children with chronic hepatitis B: does interferon therapy prevent from osteoporosis? *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 30
- 29 Jones S, Restrepo D, Kasowitz A, Korenstein D, Wallenstein S, Schneider A, Keller MJ. Risk factors for decreased bone density and effects of HIV on bone in the elderly. *Osteoporos Int* 2008; 19: 913-918
- 30 Leslie WD, Bernstein CN, Leboff MS. AGA technical review on osteoporosis in hepatic disorders. *Gastroenterology* 2003; 125: 941-966
- 31 Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H. Prolonged-efficacy of bisphosphonate in postmenopausal women with osteoporosis and chronic liver disease. *J Med Virol* 2008; 80: 1302-1307
- 32 Silverman SL. New therapies for osteoporosis: zoledronic acid, bazedoxifene, and denosumab. *Curr Osteoporos Rep* 2009; 7: 91-95
- 33 Lee WL, Chao HT, Cheng MH, Wang PH. Rationale for using raloxifene to prevent both osteoporosis and breast cancer in postmenopausal women. *Maturitas* 2008; 60: 92-107
- 34 Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel EM, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster JY. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004; 350: 459-468
- 35 Guichelaar MM, Schmoll J, Malinchoc M, Hay JE. Fractures and avascular necrosis before and after orthotopic liver transplantation: long-term follow-up and predictive factors. *Hepatology* 2007; 46: 1198-1207
- 36 Bodingbauer M, Wekerle T, Pakrah B, Roschger P, Peck-Radosavljevic M, Silberhumer G, Grampp S, Rockenschaub S, Berlakovich G, Steininger R, Klaushofer K, Oberbauer R, Mühlbacher F. Prophylactic bisphosphonate treatment prevents bone fractures after liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7: 1763-1769

■同行评价

本文有助于提高肝病患者的生活质量, 具有较高的临床参考价值, 能够反映最新的研究进展。

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》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。

Pim-3基因表达下调及其对食管鳞癌EC9706细胞增殖和凋亡的影响

王琛, 刘宇琼, 冯天平, 赵景志, 李惠翔

■背景资料

Pim-3作为表达丝/苏氨酸激酶活性的原癌基因Pim家族中的一员,首次在鼠嗜铬细胞瘤PC12细胞中作为去极化诱导基因KID-1被证实。后来越来越多的研究表明其与肿瘤的发生发展关系十分密切,在多数已报道的肿瘤中呈现高表达,但其在食管鳞癌中的作用尚未见报道。

王琛, 刘宇琼, 李惠翔, 郑州大学基础医学院病理教研室 河南省郑州市 450052

王琛, 河南大学淮河医院妇产科 河南省开封市 475000

刘宇琼, 李惠翔, 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

冯天平, 赵景志, 河南省军区医院病理科 河南省郑州市 450001

王琛, 住院医师, 主要从事消化系肿瘤研究。

作者贡献分布: 此课题李惠翔设计; 研究过程由王琛、冯天平、赵景志及刘宇琼操作完成; 研究用新试剂及分析工具由李惠翔提供; 数据分析由刘宇琼与李惠翔完成; 本论文写作由王琛、刘宇琼、冯天平、赵景志及李惠翔完成。

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。lsbljys@126.com

电话: 0371-66658175

收稿日期: 2010-04-30 修回日期: 2010-08-13

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-28

Pim-3 knockdown suppresses cell proliferation but promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706

Chen Wang, Yu-Qiong Liu, Tian-Ping Feng, Jing-Zhi Zhao, Hui-Xiang Li

Chen Wang, Yu-Qiong Liu, Hui-Xiang Li, Department of Pathology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Chen Wang, Department of Gynaecology and Obstetrics, Huaihe Hospital, Henan University, Kaifeng 475000, Henan Province, China

Yu-Qiong Liu, Hui-Xiang Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Tian-Ping Feng, Jing-Zhi Zhao, Department of Pathology, the Military Region in Henan, Zhengzhou 450051, Henan Province, China

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

Received: 2010-04-30 Revised: 2010-08-13

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of down-regulation of Pim-3 expression on cell proliferation and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cell line EC9706 and to explore possible molecular mechanisms involved.

METHODS: Small interfering RNA (siRNA) against the Pim-3 gene was transfected into EC9706 cells using Lipofectamine™ 2000. After transfection, Pim-3 mRNA and protein expression was detected by RT-PCR and Western blot, respectively; cell proliferation was determined using Cell Counting Kit-8 (CCK-8); and apoptosis was measured by flow cytometry. Furthermore, the mRNA and protein expression of P21, Bcl-2 and Bax was detected by RT-PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: Pim-3 mRNA and protein expression was significantly down-regulated after transfection with Pim-3 siRNA (both $P < 0.05$). Compared with untransfected cells and cells transfected with control siRNA, the proliferation of EC9706 cells was significantly restrained after transfection with Pim-3 siRNA for 24, 48, 72 and 96 h (96 h: 0.878 ± 0.061 vs 2.254 ± 0.062 and 2.219 ± 0.064 , both $P < 0.05$), and the early apoptosis rate of EC9706 cells transfected with Pim-3 siRNA was significantly increased ($19.70\% \pm 1.46\%$ vs $5.35\% \pm 0.80\%$ and $5.50\% \pm 0.61\%$, $F = 195.692$, $P = 0.000$). In addition, Pim-3 knockdown up-regulated P21 expression but down-regulated Bax and Bcl-2 expression in EC9706 cells (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Pim-3 plays an important role in the proliferation and apoptosis of EC9706 cells.

Key Words: Pim-3 gene; Small interfering RNA; Esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells; Proliferation; Apoptosis

Wang C, Liu YQ, Feng TP, Zhao JZ, Li HX. Pim-3 knockdown suppresses cell proliferation but promotes apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line EC9706. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2846-2851

摘要

目的: 研究Pim-3基因的表达下调及其对食管鳞癌EC9706细胞增殖及凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。

■同行评议者

钱睿哲, 教授, 复旦大学上海医学院生理与病理生理学系血管分子生物学实验室

方法: 利用Pim-3 siRNA转染食管鳞癌EC9706细胞, 并利用RT-PCR和Western blot技术检测转染Pim-3 siRNA后食管鳞癌EC9706细胞中Pim-3的表达. 此外, 利用CCK-8试剂盒和流式细胞术分别研究下调Pim-3基因的表达对EC9706细胞增殖和凋亡的影响, 进一步利用RT-PCR和Western blot检测与增殖相关的P21基因, 与凋亡相关的Bcl-2、Bax基因的表达.

结果: 转染Pim-3后, Pim-3基因在食管鳞癌EC9706细胞中的表达明显下调($P < 0.05$). 与未处理组和对照siRNA组相比, Pim-3 siRNA组在转染24、48、72、96 h EC9706细胞的增殖均明显受到抑制(96 h: 0.878 ± 0.061 vs 2.254 ± 0.062 , 2.219 ± 0.064 , 均 $P < 0.05$). 转染48 h后, Pim-3 siRNA组细胞早期凋亡率为 $19.70\% \pm 1.46\%$, 显著高于未处理组和对照siRNA组的早期凋亡率($5.35\% \pm 0.80\%$, $5.50\% \pm 0.61\%$, $F = 195.692$, $P = 0.000$). 此外, Pim-3表达的下调能引起P21和Bax基因表达的升高(均 $P < 0.05$), Bcl-2基因表达的下调($P < 0.05$).

结论: Pim-3可能在食管鳞癌EC9706细胞的增殖和凋亡中发挥重要作用.

关键词: Pim-3基因; 小干扰RNA; 食管鳞癌EC9706细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

王琛, 刘宇琼, 冯天平, 赵景志, 李惠翔. Pim-3基因表达下调及其对食管鳞癌EC9706细胞增殖和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2846-2851

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2846.asp>

0 引言

Pim-3作为表达丝/苏氨酸激酶活性的原癌基因Pim家族中的一员, 首次在鼠嗜铬细胞瘤PC12细胞中作为去极化诱导基因KID-1被证实^[1]. KID-1基因与原癌基因Pim-1和Pim-2序列高度一致, 于是命名为Pim-3^[2]. 研究表明, Pim-3选择性在内皮起源的器官(包括肝脏^[3]、胰腺^[4])的恶性病变中表达, 但在正常组织中不表达^[5]. 目前, 国内外研究者关于Pim-3的研究主要集中在肝癌^[3]、胰腺癌^[4]、结肠癌^[5]等多种不同的肿瘤, 提示其与肿瘤的发生发展密切相关. 然而, 迄今为止, 在国内外均未见Pim-3在食管鳞癌中的研究报道. 因此在本研究中, 我们利用RNA干扰技术, 下调食管鳞癌细胞株EC9706细胞中Pim-3的表达, 通过RT-PCR和Western blot研究Pim-3 siRNA的转入对EC9706细胞中Pim-3 mRNA和蛋白表达的影响. 利用CCK-8(cell counting kit-8)细胞增殖试

剂盒和流式细胞术分别研究下调Pim-3表达对EC9706细胞增殖和细胞凋亡的影响, 最后通过半定量RT-PCR和Western blot研究与细胞增殖相关的基因P21以及凋亡抑制因子Bcl-2和促凋亡基因Bax mRNAs和蛋白表达的变化, 以期为食管鳞癌的分子靶向治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 Pim-3 siRNA(h), Pim-3、P21、Bcl-2、Bax和 β -actin抗体均购自美国Santa Cruz公司; 一步法RT-PCR试剂盒购自美国Promega公司; CCK-8购自中国Beyotime生物有限公司; 蛋白裂解液购自宝生物工程(大连)有限公司; Annexin V-FITC购自BD Biosciences公司; 用于RT-PCR的引物见表1, 引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染: EC9706细胞生长于含100 mL/L胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RPMI 1640培养液中, 置于37 °C、50 mL/L CO₂相对饱和的培养箱中传代培养, 实验细胞均处于对数生长期. 当EC9706细胞生长至大于90%融合时, 按Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书将对对照siRNA和Pim-3 siRNA分别转染, 转染后细胞分为3组: 未处理组, 对照siRNA组及Pim-3 siRNA组, 将3组细胞分别用于下面实验, 如细胞增殖、细胞凋亡、RT-PCR及Western blot检测.

1.2.2 细胞增殖分析: CCK-8是一种灵敏的非放射性的比色分析方法, 在细胞增殖和细胞毒性实验中他可以检测活细胞的数量. CCK-8溶液可直接加入到细胞中进行检测, 具体的实验步骤为: 分别收集转染后24、48、72及96 h的细胞, 当测定生长速率时, 加入含10% CCK-8的等量新鲜培养基于37 °C培养1-4 h, 然后用酶标仪测450 nm的吸光度.

1.2.3 Annexin V-FITC细胞凋亡分析: 转染后于48 h收获3组细胞, 预冷PBS洗涤, 按 1×10^6 /mL密度重悬, 然后取100 μ L细胞置于流式管中, 加入Annexin V-FITC和碘化丙锭各5 μ L, 避光孵育15 min后FCM检测 1×10^4 个细胞, CellQuest分析3组细胞凋亡情况.

1.2.4 半定量RT-PCR检测3组细胞RNA的表达: 利用TRIzol试剂分别从3组细胞中提取总RNA, 然后按照一步法RT-PCR试剂盒的操作说明书进行RT-PCR, 其反应程序为: 反转录反应50 °C

■ 研发前沿

Pim-3基因在介导肿瘤细胞的增殖与凋亡过程中发挥着极其重要的作用, 明确Pim-3在食管鳞癌中的作用是目前研究的重点.

■创新盘点

本文首次采用RNA干扰技术研究下调食管鳞癌EC9706细胞中Pim-3的表达对EC9706细胞增殖和细胞凋亡的影响,并探讨其可能的分子作用机制。

表 1 半定量RT-PCR的引物序列

引物名称	正反向引物(5'-3')	GenBank登录号	退火温度(°C)	产物大小(bp)
Pim-3	F: GCACGTGGTGAAGGAGCGGG R: GAGAAGCACGCCAGCGACC	NM_001001852	56	499
P21	F: GCCCAGTGGACAGCGAGCAG R: GCCGCCGTTTTTCGACCCTGA	NM_000389	54	363
Bcl-2	F: GTCCACCTGACCCTCCGCCA R: GGTGTGCAGGTGCCGGTTCA	NM_000633	54	285
Bax	F: GCCGCCGTGGACACAGACTC R: GCCACGTGGGCGTCCCAAAG	NM_138763	56	271
β -actin	F: ATATCGCCGCGCTCGTCGTC R: CACCATCACGCCCTGGTGCC	NM_001101	55	125

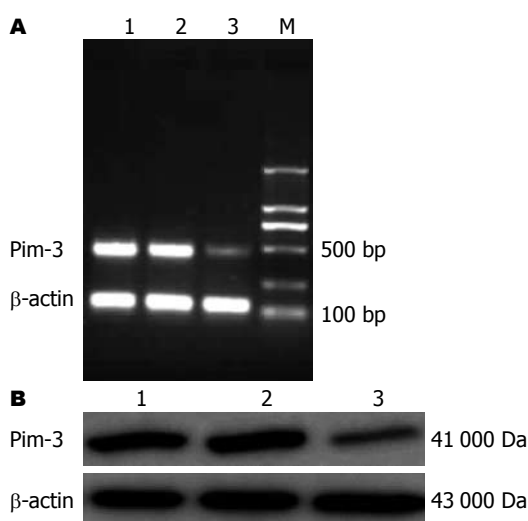


图 1 RT-PCR和Western blot示Pim-3 mRNA和蛋白的表达水平。A: RT-PCR; B: Western blot. 1: 未处理组; 2: 对照siRNA组; 3: Pim-3 siRNA组; M: D2000 Marker.

30 min, PCR初始变性94 °C 2 min, 然后35个循环94 °C 30 s, 退火30 s(不同基因退火温度见表1), 65 °C延伸30 s. 实验中每个样品重复3次, Pim-3、P21、Bcl-2和Bax基因的相对表达量利用Image-Pro Plus软件进行分析, 其中 β -actin作为内参。

1.2.5 Western blot检测3组细胞蛋白的表达: 收集48 h未处理和转染的EC9706细胞, 并在裂解缓冲液中进行裂解。收集细胞提取物于12 000 r/min 5 min离心, 蛋白浓度用Bradford法进行测定。60 μ g总蛋白在上样缓冲液中煮沸5 min, 于10% SDS-PAGE电泳, 然后电转到硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜用含50 g/L脱脂奶粉的TBST于室温封闭2 h, 然后分别加一抗(和 β -actin)于含5%脱脂奶粉的TBST中, 4 °C过夜, 第2天, 用TBST清洗5 min \times 3次, 然后分别加合适的二抗作用1 h, 再次清洗5 min \times 3次, 曝光。最后用Image-Pro Plus软

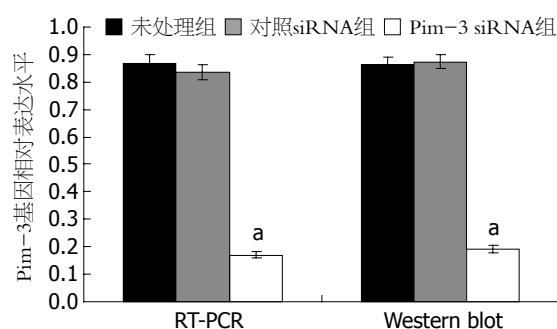


图 2 Pim-3基因的相对表达水平. * $P<0.05$ vs 未处理组, 对照siRNA组。

件进行相对表达量分析。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行统计学处理, 统计学数据用mean \pm SD表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 多个样本均数比较应用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 食管鳞癌细胞中Pim-3基因mRNA和蛋白表达分析 收集48 h 3组细胞, Pim-3 siRNA转染后, Pim-3基因的mRNA和蛋白均下降到约为未处理组和对照siRNA组的1/5, 未处理组和对照siRNA组之间Pim-3的表达无差异($P>0.05$, 图1, 2)。这一结果表明, Pim-3 siRNA的转入能明显抑制Pim-3 mRNA和蛋白的表达。

2.2 细胞增殖的分析 分别收集24、48、72及96 h的3组细胞, 利用CCK-8进行细胞增殖分析, 结果表明, 在未处理组和对照siRNA组的EC9706细胞中, EC9706细胞的增殖没有差异($P>0.05$)。但是, 与未处理组和对照siRNA组相比, Pim-3 siRNA组在转染24 h以后的各个不同时间点, EC9706细胞的增殖均明显受到抑制($P<0.05$, 表2), 表明Pim-3基因表达的下调能明显抑制食管鳞癌EC9706

表 2 下调Pim-3基因的表达对EC9706细胞增殖的影响

分组	A_{450}				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
未处理组	0.435 ± 0.051	0.757 ± 0.046	1.266 ± 0.039	1.813 ± 0.057	2.254 ± 0.062
对照siRNA组	0.443 ± 0.043	0.779 ± 0.041	1.275 ± 0.044	1.801 ± 0.062	2.219 ± 0.064
Pim-3 siRNA组	0.450 ± 0.050	0.559 ± 0.054 ^a	0.633 ± 0.054 ^a	0.794 ± 0.052 ^a	0.878 ± 0.061 ^a
<i>F</i> 值	0.073	19.683	191.339	314.263	475.030
<i>P</i> 值	0.930	0.002	0.000	0.000	0.000

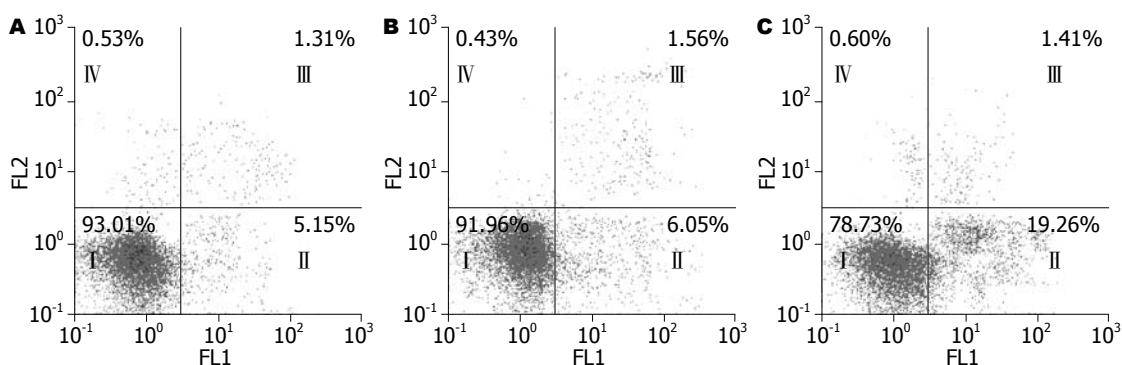
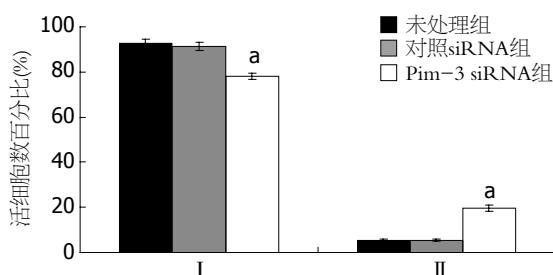
^a*P* < 0.05 vs 未处理组, 对照siRNA组.

图 3 3组细胞的细胞周期分析. A: 未处理组; B: 对照siRNA组; C: Pim-3 siRNA组.

图 4 3组细胞中细胞凋亡的统计分析. ^a*P* < 0.05 vs 未处理组, 对照siRNA组.

细胞的增殖.

2.3 细胞凋亡的检测 转染48 h后, Annexin V检测的Pim-3 siRNA组细胞早期凋亡率为19.70% ± 1.46%, 显著高于未处理组和对照siRNA组的早期凋亡率(5.35% ± 0.80%, 5.50% ± 0.61%, *F* = 195.692, *P* = 0.000), 而未处理组和对照siRNA组的EC9706的活细胞数分别为92.87% ± 1.52%和91.29% ± 2.01%, 显著高于Pim-3 siRNA组的活细胞数(78.03% ± 1.47%, *F* = 70.227, *P* < 0.000, 图3, 4), 提示Pim-3基因表达下调能明显诱导EC9706细胞发生凋亡.

2.4 增殖、凋亡相关基因表达水平的检测 与未处理组和对照siRNA组相比, Pim-3 siRNA组中Bcl-2 mRNA和蛋白的表达均明显下调(*P* < 0.05),

但P21和Bax mRNA和蛋白的表达水平明显上升, 且差异具有统计学意义(*P* < 0.05). 此外, 未处理组和对照siRNA组之间上述基因的mRNA和蛋白的表达水平均没有差异(*P* > 0.05, 图5-8).

3 讨论

食管鳞癌是一种侵袭性很强的恶性肿瘤, 多伴有转移, 且易复发, 其预后极差. 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, 但对其发病机制仍不十分清楚^[6]. 长期以来, 如何从分子水平上来寻找食管癌可能的分子治疗靶点备受人们关注. Pim-3作为表达丝/苏氨酸激酶活性的原癌基因Pim家族中的一员, 近年来发现其与肿瘤的发生发展密切相关^[3-5]. 但迄今为止, 国内外尚未见有关Pim-3在食管癌中的研究和报道. 因此在本研究中我们通过下调食管鳞癌细胞中Pim-3的表达, 分析其对食管鳞癌细胞EC9706增殖和凋亡的影响, 并初步探讨其可能的分子作用机制.

近年来, RNA干扰技术因具有高效、低毒、快捷等特点, 在抗肿瘤治疗中显示出巨大的应用前景. 在本研究中, 利用Pim-3 siRNA转染食管癌细胞, 通过半定量RT-PCR和Western blot检测转染前后Pim-3 mRNA和蛋白的表达. 结果

■应用要点

本研究在体外探讨Pim-3在食管鳞癌EC9706细胞中的可能作用, 有望为食管鳞癌的分子靶向治疗提供理论依据.

■同行评价

本文实验设计合理,方法可行,思路清晰,具有一定的参考价值。

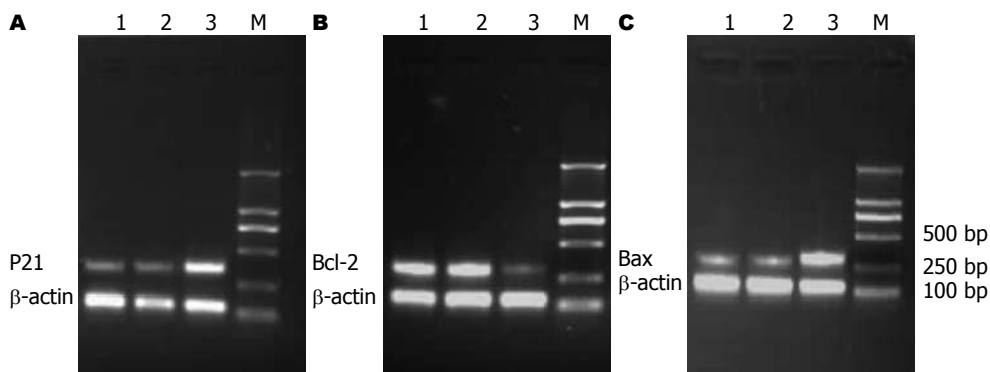


图 5 RT-PCR示P21、Bcl-2和Bax mRNA的表达水平. A: P21; B: Bcl-2; C: Bax. 1: 未处理组; 2: 对照siRNA组; 3: Pim-3 siRNA组; M: D2000 Marker.

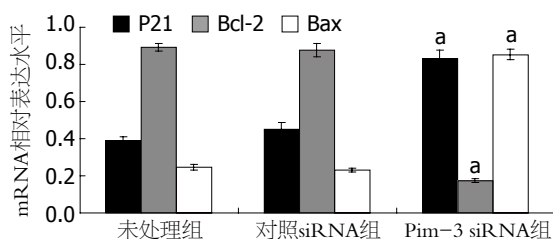


图 6 P21、Bcl-2和Bax mRNA相对表达水平. $^aP<0.05$ vs 未处理组, 对照siRNA组.

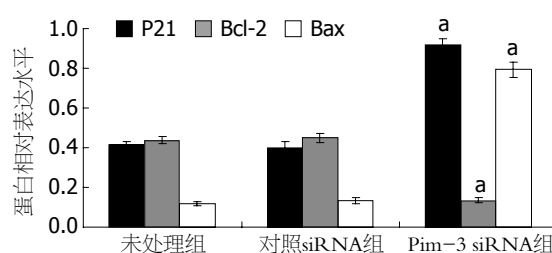


图 8 P21、Bcl-2和Bax蛋白相对表达水平. $^aP<0.05$ vs 未处理组, 对照siRNA组.

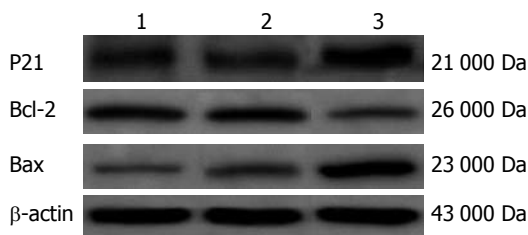


图 7 Western blot示P21、Bcl-2和Bax的蛋白表达水平. 1: 未处理组; 2: 对照siRNA组; 3: Pim-3 siRNA组.

表明, Pim-3的表达水平与未处理组和对照siRNA组相比, 大约下降了80%, 提示Pim-3 siRNA能有效地沉默食管鳞癌EC9706细胞中Pim-3基因的表达. 这为我们进一步研究Pim-3的下调对食管鳞癌EC9706细胞生物学行为的影响奠定了基础. 此外, 最近的研究显示, Pim-3与肿瘤的增殖、细胞周期改变以及细胞凋亡之间的关系十分密切^[3,5]. 我们的结果显示, 转染Pim-3 siRNA后, 食管鳞癌EC9706细胞的增殖受到明显的抑制, 并诱导细胞发生凋亡. 因此, Pim-3有望成为肿瘤治疗的一个新的重要分子靶点, 抑制Pim-3活性有可能成为治疗肿瘤的重要手段.

P21作为一个潜在的普遍的细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制剂, 其生物学作用是直接参与细胞生长抑制、DNA复制、发育和分化等调控过程, 与肿瘤的

发生发展机制密切相关^[7,8]. Bcl-2、Bax基因是现今研究较多、较重要的两个细胞凋亡相关基因. 此外有研究表明Pim激酶具有加速细胞周期进程的效应, 主要通过P21磷酸化, 促使休眠期细胞进入细胞周期^[9]; 另外Pim激酶能够抑制Bcl-2家族的前凋亡基因Bad, 阻止Bad-Bcl-xL的相互作用, 从而抑制凋亡^[10], 或者通过协同或调控Bcl-2家族的抗凋亡蛋白的功能, 抑制细胞凋亡的线粒体通路^[11]. 这些研究提示Pim-3可能与P21、Bcl-2和Bax具有直接的关系. 为了深入了解Pim-3 siRNA介导的EC9706细胞增殖抑制和凋亡发生的可能作用机制, 我们转染Pim-3 siRNA后通过RT-PCR和Western blot研究与增殖有关的P21基因以及与细胞凋亡有关的Bcl-2、Bax基因的表达, 以期初步阐明Pim-3基因表达下调引发食管鳞癌EC9706细胞增殖抑制和凋亡发生的可能作用机制. 结果表明, Pim-3基因表达的下调能明显上调P21和Bax基因的表达, 下调Bcl-2的表达. 这可能是Pim-3基因表达下调介导的食管鳞癌细胞增殖抑制和凋亡发生的分子机制之一.

总之, 我们的研究结果表明, Pim-3 siRNA能有效下调Pim-3基因的表达, Pim-3表达水平的下调能引起食管鳞癌的增殖抑制和细胞凋亡的发

生, 而通过干扰Pim-3基因的表达来治疗肿瘤, 使之成为治疗食管鳞癌新的分子靶点.

4 参考文献

- 1 Feldman JD, Vician L, Crispino M, Tocco G, Marcheselli VL, Bazan NG, Baudry M, Herschman HR. KID-1, a protein kinase induced by depolarization in brain. *J Biol Chem* 1998; 273: 16535-16543
- 2 Konietzko U, Kauselmann G, Scafidi J, Staubli U, Mikkers H, Berns A, Schweizer M, Waltereit R, Kuhl D. Pim kinase expression is induced by LTP stimulation and required for the consolidation of enduring LTP. *EMBO J* 1999; 18: 3359-3369
- 3 Fujii C, Nakamoto Y, Lu P, Tsuneyama K, Popivanova BK, Kaneko S, Mukaida N. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 2005; 114: 209-218
- 4 Li YY, Popivanova BK, Nagai Y, Ishikura H, Fujii C, Mukaida N. Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates bad to block bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines. *Cancer Res* 2006; 66: 6741-6747
- 5 Popivanova BK, Li YY, Zheng H, Omura K, Fujii C, Tsuneyama K, Mukaida N. Proto-oncogene, Pim-3 with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human colon cancer cells and can prevent Bad-mediated apoptosis. *Cancer Sci* 2007; 98: 321-328
- 6 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
- 7 Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805-816
- 8 Røtterud R, Berner A, Holm R, Skovlund E, Fosså SD. p53, p21 and mdm2 expression vs the response to radiotherapy in transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int* 2001; 88: 202-208
- 9 Bachmann M, Hennemann H, Xing PX, Hoffmann I, Mörry T. The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J Biol Chem* 2004; 279: 48319-48328
- 10 Aho TL, Sandholm J, Peltola KJ, Mankonen HP, Lilly M, Koskinen PJ. Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* 2004; 571: 43-49
- 11 Lilly M, Sandholm J, Cooper JJ, Koskinen PJ, Kraft A. The PIM-1 serine kinase prolongs survival and inhibits apoptosis-related mitochondrial dysfunction in part through a bcl-2-dependent pathway. *Oncogene* 1999; 18: 4022-4031

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 •

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)

抑酸对胃黏膜损伤修复时CTGF、EGFR水平的影响

王 健, 谭庆华, 曾 青

■背景资料

在胃溃疡的愈合过程中, 坏死物质的消除、肉芽组织的生长、新生血管的生成、纤维组织的形成和上皮细胞的增殖、迁移, 均受各种生长因子及其受体的调控。

王健, 谭庆华, 曾青, 贵阳医学院附属医院内镜中心 贵州省贵阳市 550004

王健, 贵阳医学院硕士研究生, 现在山东省临沂市人民医院工作, 主要从事消化内镜诊疗技术方面的研究。

贵州省省长资金资助项目, No. 黔省专合字(2007)-67号

作者贡献分布: 王健负责实验及论文撰写; 谭庆华设计及组织课题; 曾青协助实验。

通讯作者: 谭庆华, 主任医师, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院内镜中心. tanqh2007@163.com

收稿日期: 2010-06-10 修回日期: 2010-07-28

接受日期: 2010-08-03 在线出版日期: 2010-09-28

Effect of acid inhibitors on CTGF and EGFR expression during gastric mucosa repair

Jian Wang, Qing-Hua Tan, Qing Zeng

Jian Wang, Qing-Hua Tan, Qing Zeng, Center of Gastrointestinal Endoscopy, the First Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Governor Foundation of Guizhou Province, No. (2007)-67

Correspondence to: Qing-Hua Tan, Center of Gastrointestinal Endoscopy, the First Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. tanqh2007@163.com

Received: 2010-06-10 Revised: 2010-07-28

Accepted: 2010-08-03 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of acid inhibitors on the expression of connective tissue growth factor (CTGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) during gastric mucosa repair in rats.

METHODS: Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: normal control group ($n = 6$), untreated group ($n = 18$), ranitidine group ($n = 18$), and omeprazole group ($n = 18$). All rats except those in the normal control group underwent gastric mucosal electrocution at the front wall of the antrum. The ranitidine and omeprazole groups were injected with ranitidine [11 mg/(kg·d)] and omeprazole [1.8 mg/(kg·d)] through the caudal vein, respectively, while the normal control group was given equal volume of normal saline. Rats in all the groups were executed at the end of 1, 2 and 4

wk after operation. The expression of CTGF and EGFR during gastric mucosa repair was determined by immunohistochemistry.

RESULTS: In the normal control group and untreated group, positive CTGF signals were located in the lamina propria and submucosal connective tissue. In contrast, positive CTGF signals were mainly located in the cytoplasm of gastric parietal cells in the ranitidine and omeprazole groups. The area and integrated absorbance (IA) of CTGF staining was higher in the ranitidine and omeprazole groups than in the normal control and untreated groups at weeks 1, 2 and 4 (IA at week 4: $10\ 888 \pm 2\ 195$ and $19\ 179 \pm 2\ 048$ vs $2\ 370 \pm 844$ and $5\ 237 \pm 1\ 035$, all $P < 0.05$). The expression level of CTGF in the omeprazole group increased gradually and became higher than that in the ranitidine group at week 4 ($P < 0.05$). Weak EGFR staining was observed in parietal cells in the superficial layer of the gastric mucosa in the normal control group. In the untreated group, ranitidine group and omeprazole group, positive EGFR signals were mainly located in the cytoplasm of parietal cells and submucosal vascular endothelial cells. The area and IA of EGFR staining at week 1 were increased markedly in the untreated group, ranitidine group and omeprazole group compared with that in the normal control group (all $P < 0.05$). At week 4, there were no significant differences in the area and IA of EGFR staining among the four groups (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Acid inhibitors, especially omeprazole, can promote ulcer healing in rats undergoing gastric mucosa electrocution.

Key Words: Gastric mucosa; Mucosal resection; Acid inhibitor; Connective tissue growth factor; Epidermal growth factor receptor

Wang J, Tan QH, Zeng Q. Effect of acid inhibitors on CTGF and EGFR expression during gastric mucosa repair. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2852-2857

摘要

目的: 研究抑酸治疗对电切创面周边组织中

■同行评议者

沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

结缔组织生长因子(CTGF)、表皮生长因子受体(EGFR)水平的影响。

方法: 60只SD大鼠,随机分为4组:正常对照组6只,未治疗组18只,雷尼替丁组18只,奥美拉唑组18只。除正常对照组外,对其他动物经腹壁切口及胃窦前壁切口进入胃腔,对胃窦后壁黏膜行电切。术后,各组分别给予雷尼替丁[11 mg/(kg·d)]、奥美拉唑[1.8 mg/(kg·d)]行尾静脉注射,未治疗组则用等量生理盐水代替。术后1、2、4 wk,用免疫组织化学法测定电切创面周边胃黏膜中CTGF及EGFR的变化,并测定I4值。

结果: 正常组及未治疗组CTGF阳性染色主要在上皮细胞间和黏膜下层的结缔组织中,而雷尼替丁组、奥美拉唑组则主要出现在胃壁细胞内,后两组术后1、2、4 wk, CTGF在局部组织中明显增加(4 wk, I4: 10 888±2 195, 19 179±2 048 vs 2 370±844, 5 237±1 035, 均 $P<0.05$)。其中奥美拉唑组在第4周时已明显高于雷尼替丁组($P<0.05$)。在正常对照组, EGFR阳性染色主要位于胃黏膜浅层壁细胞膜上。术后EGFR主要表达在壁细胞胞浆和黏膜下层的血管内皮细胞的胞浆中。术后1 wk, EGFR的表达水平以奥美拉唑组>雷尼替丁组>未治疗组>正常对照组的顺序依次降低(均 $P<0.05$)。术后2-4 wk, 各组均逐渐回落到正常水平(均 $P>0.05$)。

结论: 抑酸治疗有助于胃黏膜电切术后创面的修复,奥美拉唑的修复作用最强,该研究为临床微创治疗后抑酸药的应用以及选择提供了实验依据。

关键词: 胃黏膜;黏膜切除术;抑酸剂;结缔组织生长因子;表皮生长因子受体

王健,谭庆华,曾青.抑酸对胃黏膜损伤修复时CTGF、EGFR水平的影响.世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2852-2857
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2852.asp>

0 引言

随着内镜微创技术的进步,对某些胃肠道黏膜病变及黏膜下浅表病变,可行内镜下电切术,完全摘除病变^[1]。术后局部随即形成溃疡,当溃疡完全愈合后,才真正达到临床治愈的目的。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)具有促进细胞增殖、合成胶原等诸多生理作用^[2]。而表皮生长因子与其受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)结合形成二聚体,

启动相应的信号转导通路,促进细胞有丝分裂,促进损伤组织的修复^[2]。内镜电切术后胃肠道创面的修复和愈合,也必然会有CTGF、EGFR等生长因子的变化。本研究测定了大鼠胃黏膜部分电切除术后局部组织中CTGF和EGFR的变化,以及抑酸治疗对这一变化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康纯种SD大鼠60只(长沙实验动物中心)雌雄各半,体质量215 g±30 g,周龄6 wk,室温喂养,实验前适应性喂养1 wk。

1.2 方法

1.2.1 分组: 正常对照组6只,未治疗组、雷尼替丁组、奥美拉唑组各18只,各组动物体质量之间无差异。

1.2.2 造模: 术前24 h禁食,8 h禁饮。腹腔内注射麻醉(10%水合氯醛3-6 mL/kg)后,无菌条件下取左侧腹直肌切口入腹腔,将胃钳拉出腹壁外,在胃窦前壁切开胃,切口约5 mm,在距切口约5 mm处的胃窦黏膜下注射生理盐水至黏膜隆起,用单极电刀(CHR-EIII多功能手术仪,春光医疗美容仪器有限公司,武汉,中国)电切隆起的胃黏膜,切除面约3 mm×3 mm。关闭胃腔、腹腔,常规消毒、包扎腹壁切口。所有动物术后禁食、禁水24 h。

1.2.3 术后观察及给药: 术后,雷尼替丁组经尾静脉注射雷尼替丁(国药准字H32021588,莱恩药业有限公司),11 mg/(kg·d);奥美拉唑组经尾静脉注射奥美拉唑(国药准字H20010183,吴中医药集团有限公司),1.8 mg/(kg·d)。未治疗组仅给予等量生理盐水尾静脉注射。雷尼替丁组、奥美拉唑组和未治疗组分别于术后第1、2、4周用离断颈椎法处死。正常对照组不做特殊处理,适应性喂养1 wk后处死。

1.2.4 免疫组织化学法测定CTGF及EGFR: 各组动物处死后,解剖出胃,留取电切术后局部胃壁组织,用40 g/L的甲醛固定24 h。常规石蜡包埋、切片备用。用SABC法(SA1025-大鼠IgG, SA1022-大鼠IgG,博士德生物工程有限公司,武汉,中国)进行免疫组织化学染色。煮沸法修复抗原,修复液为0.01 mol/L橘橼酸盐缓冲液(pH6.0)。CTGF一抗为兔抗CTGF(Rabbit Anti-CTGF, 1:100),EGFR一抗为兔抗EGFR(Rabbit Anti-EGFR, 1:100)。DAB显色(AR1022,博士德生物工程有限公司)、中性树胶封片观察,各组以PBS设立阴性对照。采用Image Pro Plus图像分析

■研究前沿

抑酸治疗增加CTGF分泌的具体机制,目前尚不清楚。是否与CTGF通过TGF-β/SMADs、Ras/Raf/ERK等信号通路和信号分子在胃溃疡的愈合中发挥了作用有关,还有待进一步研究。

■创新盘点

本研究测定了大鼠胃黏膜部分电切除术后局部组织中CTGF和EGFR的变化,以及抑酸治疗对这一变化的影响,为临床微创治疗后抑酸药的应用以及选择提供了实验依据。

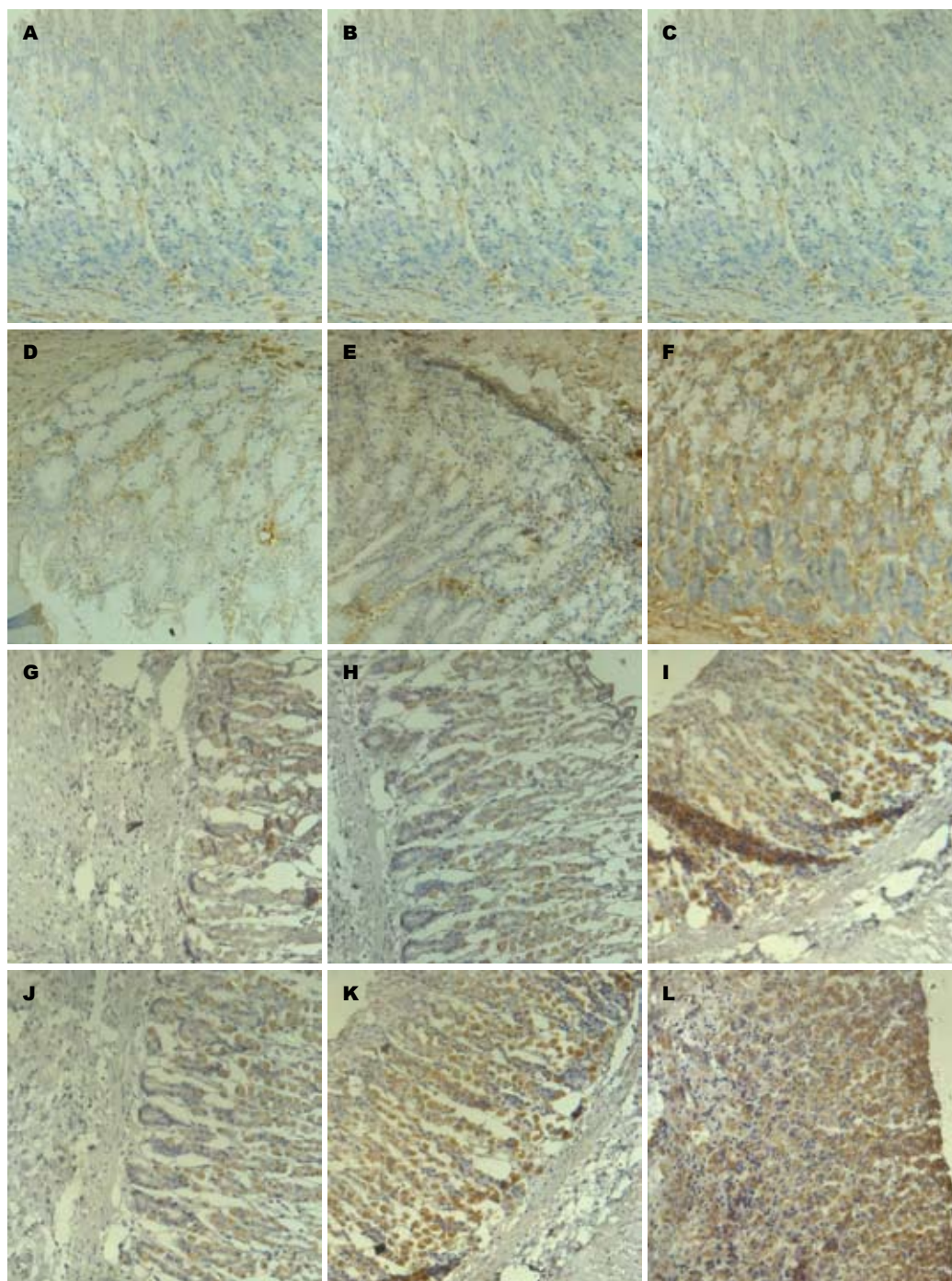


图1 大鼠胃黏膜电切创面胃壁组织中CTGF的变化(IHC $\times 200$). A-C: 正常对照组; D-F: 未治疗组; G-I: 雷尼替丁组; J-L: 奥美拉唑组. A, D, G, J: 第1周; B, E, H, K: 第2周; C, F, I, L: 第4周.

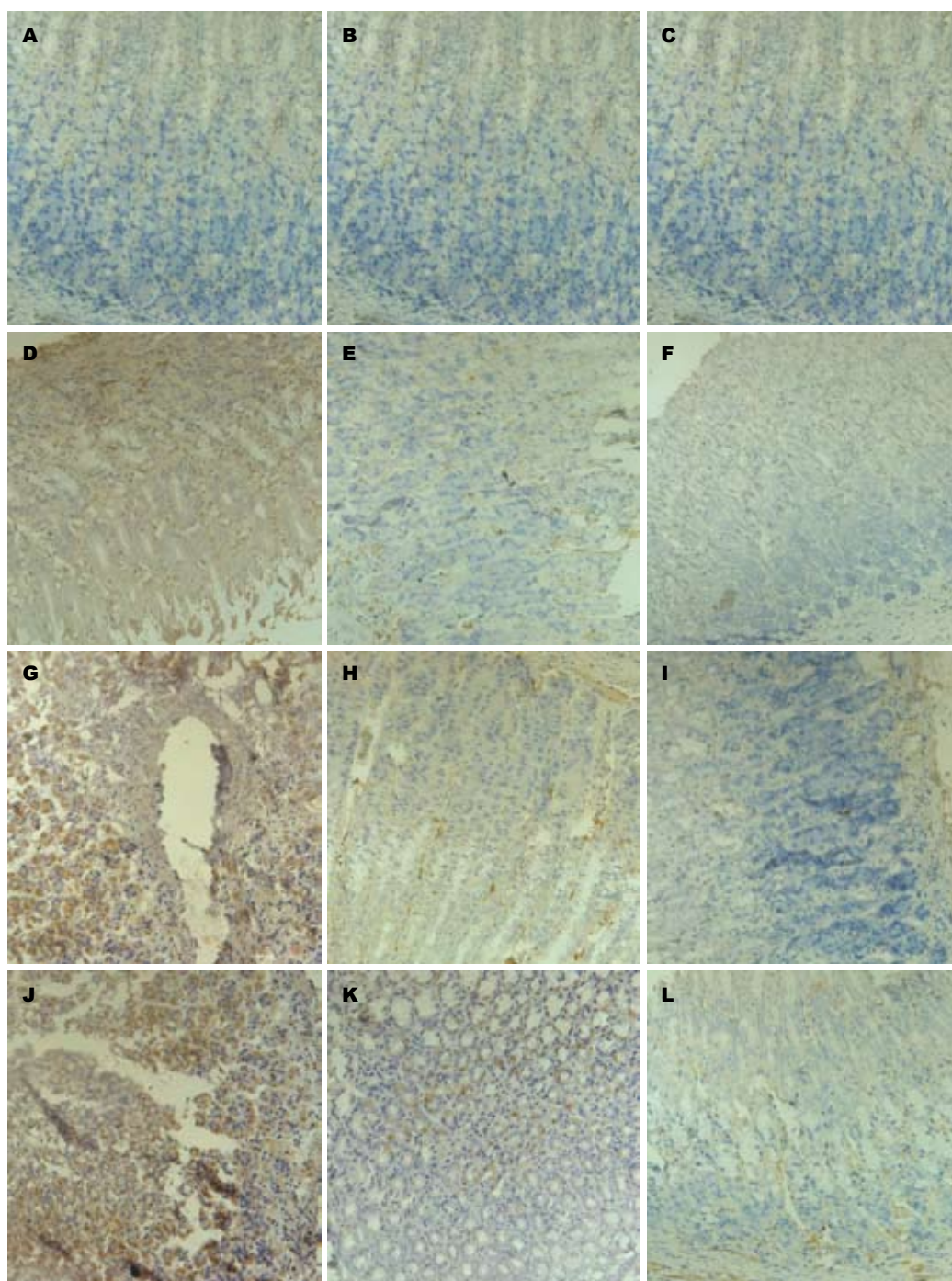
软件进行半定量分析, 每个样本随机选5个高倍视野($\times 200$), 测定阳性表达部位的积分吸光度值(I_A)和面积百分比.

统计学处理 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 进行完全随机设计方差分析, 多个样本间均数两两比较用 q 检验法. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠胃黏膜电切创面周边组织中CTGF的

变化 正常组及未治疗组CTGF阳性染色主要在上皮细胞间和黏膜下层的结缔组织中. 未治疗组第4周除了上述部位阳性染色外, 部分壁细胞质内也出现明显的阳性染色. 经雷尼替丁或奥美拉唑治疗后, CTGF阳性染色主要出现在胃壁细胞内, 而在结缔组织中的阳性染色明显减弱(图1). 未治疗组、雷尼替丁组、奥美拉唑组术后1、2、4 wk电切周边局部组织中CTGF阳性染色的面积百分比和I_A, 较正常对照组增加



■应用要点

CTGF不仅通过诱导成纤维细胞的增殖和细胞外基质的合成, 参与结缔组织的再生、肉芽组织的形成和机化, 还可能参与结构重建, 最终有助于胃黏膜电切处缺损组织的愈合。

图2 大鼠胃黏膜电切创面周边胃组织中EGFR的变化(IHC $\times 200$). A-C: 正常对照组; D-F: 未治疗组; G-I: 雷尼替丁组; J-L: 奥美拉唑组. A, D, G, J: 第1周; B, E, H, K: 第2周; C, F, I, L: 第4周.

($P < 0.05$). 而雷尼替丁组、奥美拉唑组与未治疗组术后同期相比, CTGF明显增加($P < 0.05$). 术后1、2 wk, CTGF的面积百分比和LA在奥美拉唑组与雷尼替丁组没有差异($P > 0.05$). 而4 wk时, 奥美拉唑组比雷尼替丁组明显增加($P < 0.05$). 奥美拉唑组随治疗时间延长, CTGF的变化呈逐渐增加趋势($P < 0.05$). 未治疗组、雷尼替丁组CTGF的面积百分比和LA随时间的延长没有明显变化($P > 0.05$, 表1).

2.2 大鼠胃黏膜电切创面周边组织中EGFR的变化 在正常大鼠, EGFR阳性染色主要位于胃黏膜浅层壁细胞膜上, 呈弱阳性染色. 术后EGFR主要表达在壁细胞胞浆和黏膜下层的血管内皮细胞的胞浆中(图2). 术后1 wk, 未治疗组、雷尼替丁组、奥美拉唑组大鼠胃黏膜电切周边创面组织中EGFR的面积百分比和LA均较正常对照组明显升高($P < 0.05$), 以奥美拉唑组升高最明显, 依次是雷尼替丁组和未治疗组($P < 0.05$). 术后2

■同行评价

本文选题新颖, 为临床微创治疗后抑酸药的应用以及选择提供了实验依据。

表 1 术后不同时间局部胃黏膜组织中CTGF水平 (mean \pm SD)

分组	第1周		第2周		第4周	
	面积百分比(%)	I4值	面积百分比(%)	I4值	面积百分比(%)	I4值
正常对照	43 \pm 23	2 370 \pm 844	43 \pm 23	2 370 \pm 844	43 \pm 23	2 370 \pm 844
未治疗组	103 \pm 16 ^a	4 788 \pm 1 048 ^a	119 \pm 42 ^a	5 120 \pm 1 511 ^a	153 \pm 40 ^a	5 237 \pm 1 035 ^a
雷尼替丁组	230 \pm 66 ^{bc}	8 184 \pm 1 727 ^{bc}	272 \pm 70 ^{bc}	10 295 \pm 2 302 ^{bc}	297 \pm 57 ^{bc}	10 888 \pm 2 195 ^{bc}
奥美拉唑组	247 \pm 55 ^{bc}	9 511 \pm 2 136 ^{bc}	349 \pm 60 ^{bc}	13 710 \pm 2 429 ^{bc}	420 \pm 84 ^{bc}	19 179 \pm 2 048 ^{abc}

^a P <0.05 vs 正常对照组; ^b P <0.05 vs 未治疗组; ^c P <0.05 vs 雷尼替丁组。

表 2 术后不同时间局部胃黏膜组织中EGFR水平 (mean \pm SD)

分组	第1周		第2周		第4周	
	面积百分比(%)	I4值	面积百分比(%)	I4值	面积百分比(%)	I4值
正常对照	25 \pm 8	1 885 \pm 279	25 \pm 8	1 885 \pm 279	25 \pm 8	1 885 \pm 279
未治疗组	60 \pm 18 ^a	5 582 \pm 1 513 ^a	37 \pm 9	3 464 \pm 1 025	26 \pm 9	1 964 \pm 340
雷尼替丁组	93 \pm 23 ^{bc}	8 224 \pm 2 298 ^{bc}	42 \pm 15	3 798 \pm 989	26 \pm 9	2 137 \pm 297
奥美拉唑组	136 \pm 27 ^{abc}	11 800 \pm 2 496 ^{abc}	45 \pm 10 ^b	4 413 \pm 758 ^b	28 \pm 7	2 073 \pm 320

^a P <0.05 vs 正常对照组; ^b P <0.05 vs 未治疗组; ^c P <0.05 vs 雷尼替丁组。

wk, 未治疗组、雷尼替丁组、奥美拉唑组大鼠胃黏膜电切周边创面组织EGFR的面积百分比及I4都明显回落。但奥美拉唑组仍较正常对照组高(P <0.05)。未治疗组、雷尼替丁组与正常对照组比较无差异(P >0.05)。术后4 wk, 未治疗组、雷尼替丁组、奥美拉唑组EGFR的表达与正常对照组比较无明显差异(P >0.05, 表2)。

3 讨论

在胃溃疡的愈合过程中, 坏死物质的消除、肉芽组织的生长、新生血管的生成、纤维组织的形成和上皮细胞的增殖、迁移, 均受各种生长因子及其受体的调控^[2]。特别是TGF- β 的作用最广泛, 可诱导多种生长因子的产生, 促进细胞外基质的合成分泌, 最终促进溃疡的修复^[3]。在正常结缔组织中, 由成纤维细胞产生的CTGF直接受TGF- β 1的调控, 介导着TGF- β 1的部分生物学效应, 包括刺激成纤维细胞增殖和细胞外基质的生成, 参与机体组织的创伤修复及器官纤维化形成的过程^[4]。

本研究中, 正常大鼠胃黏膜下层及上皮细胞间弱阳性表达CTGF说明, 少量的CTGF即可以确保胃壁内结缔组织的生理性更新, 使得结缔组织中的相关成分处于一种动态平衡。而未治疗组第4周CTGF除黏膜下层、黏膜固有层出现阳性染色外, 部分壁细胞也出现阳性染色。表明

创伤后随着修复时间的延长, 主要功能为分泌胃酸的胃壁细胞, 也逐渐参与了局部纤维肉芽组织形成的调节, 这可能是胃黏膜代偿机制的一种表现。经抑酸治疗后, CTGF阳性染色主要出现在胃壁细胞内, 而在结缔组织中的阳性染色几乎消失。显示抑酸治疗增强了这一代偿机制活动, 可能更有助于溃疡面的愈合。

CTGF分泌增多是调节创伤修复的重要环节, 未治疗组胃壁组织中高水平表达CTGF, 应该是胃黏膜电切创伤引起机体的自身修复反应。这种反应在创伤后第1、2周反应不明显, 而在溃疡已经愈合的第4周, 其表达明显增加, 而抑酸治疗后壁细胞中CTGF升高更加明显, 这可能是抑酸治疗促进壁细胞中CTGF的合成, 增强了溃疡的愈合过程, 这种效应以奥美拉唑最明显。说明CTGF不仅促进溃疡修复过程中的纤维化过程, 在瘢痕组织的重建或改建过程中可能也起着更重要的调节作用, 这种调节作用由溃疡及周边结缔组织中的CTGF和壁细胞中的CTGF协同完成。另外, CTGF不仅通过诱导成纤维细胞的增殖和细胞外基质的合成, 参与结缔组织的再生、肉芽组织的形成和机化。还可能参与结构重建, 最终有助于胃黏膜电切处缺损组织的愈合。但抑酸治疗增加CTGF分泌的具体机制, 目前尚不清楚。是否与CTGF通过TGF- β /SMADs、Ras/Raf/ERK等信号通路和信号分子在胃溃疡的愈合中发挥了

作用^[5]有关,还有待进一步研究。

EGFR是一个跨膜受体,正常胃肠道很多调节因子都影响EGFR的表达,EGFR及其配体EGF结合后,在胃黏膜细胞增殖和组织修复中发挥重要作用,保持胃肠道上皮组织的完整性,并有抑制胃酸分泌的作用^[6]。正常大鼠胃黏膜浅层壁细胞膜上或部分位于颈黏液细胞中有EGFR的阳性染色,可能与大鼠胃黏膜上皮细胞的生理性更新,维持胃黏膜的正常完整性相关。可能还同时促进胃黏膜表面黏液的合成和分泌^[7]。由于EGFR可调节正常上皮细胞的分化、增殖、上皮细胞间黏附及接触抑制^[8]。当上皮细胞更新时,EGFR表达增加,而当创伤被修复或上皮细胞的更新完成后,其表达明显降低,这可能是术后各组的EGFR在第1周明显升高,而在第2、4周明显降低的原因。在第2周以前,由于EGFR的高表达,促进了胃黏膜上皮细胞的增殖,尽快覆盖溃疡面,同时增加胃黏膜颈黏液细胞合成和分泌黏液,避免溃疡面的继续加深。当溃疡表面得以初步修复后,EGFR的表达通过一定的机制回落到正常生理状态时的水平,这也是正常黏膜上皮细胞增殖和肿瘤性上皮细胞增殖的不同处之一^[8]。大鼠胃黏膜电切术后,这种变化在抑酸治疗后变得更加明显,而其中又以奥美拉唑组最明显。这可能与抑酸剂能上调EGFR的表达有关^[9],但奥美拉唑与雷尼替丁是否是通过不同的途径促进EGFR的表达,目前还不清楚。

总之,正常大鼠胃黏膜组织中均存在CTGF和EGFR,胃黏膜的电切术可刺激这两种细胞因

子的合成和分泌。生理状态下主要功能为分泌胃酸的壁细胞,在上皮修复过程中发挥重要调节作用,抑酸治疗可增强这种调节功能。与雷尼替丁相比,奥美拉唑的这种作用更强。

4 参考文献

- 1 Yoshida N, Yagi N, Naito Y, Yoshikawa T. Safe procedure in endoscopic submucosal dissection for colorectal tumors focused on preventing complications. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1688-1695
- 2 Tarnawski A, Szabo IL, Husain SS, Soreghan B. Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways. *J Physiol Paris* 2001; 95: 337-344
- 3 Shih SC, Tseng KW, Lin SC, Kao CR, Chou SY, Wang HY, Chang WH, Chu CH, Wang TE, Chien CL. Expression patterns of transforming growth factor-beta and its receptors in gastric mucosa of patients with refractory gastric ulcer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 136-141
- 4 Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002; 21: 473-482
- 5 Tarnawski AS. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 2005; 50 Suppl 1: S24-S33
- 6 Dockray GJ. Topical review. Gastrin and gastric epithelial physiology. *J Physiol* 1999; 518 (Pt 2): 315-324
- 7 Nadel JA. Role of epidermal growth factor receptor activation in regulating mucin synthesis. *Respir Res* 2001; 2: 85-89
- 8 Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 11-31
- 9 Milani S, Calabrò A. Role of growth factors and their receptors in gastric ulcer healing. *Microsc Res Tech* 2001; 53: 360-371

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》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)

组织间植入¹²⁵I粒子对大肠腺癌细胞HCT-116诱导凋亡及增殖抑制的影响

陈 亿, 罗开元, 李晓刚, 李滢旭, 张万福, 章治平, 褚 焱

■背景资料

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

陈亿, 罗开元, 李晓刚, 李滢旭, 张万福, 章治平, 褚焱, 昆明医学院第四附属医院普外科 云南省昆明市 650021

陈亿, 硕士, 现在都江堰市人民医院普外科工作, 主要从事普外科工作。

云南省应用基础研究联合专项基金资助项目, No. 2007C0039R
云南省应用基础研究重点基金资助项目, No. 2008CC002

作者贡献分布: 此课题由陈亿、罗开元、李晓刚、李滢旭、张万福、章治平及褚焱设计; 研究过程由陈亿与李滢旭操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张万福提供; 数据分析由陈亿与张万福完成; 本论文写作由陈亿、罗开元及李晓刚完成。

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

收稿日期: 2010-05-04 修回日期: 2010-08-05

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Interstitial implantation of iodine-125 seeds induces apoptosis but inhibits cell proliferation in HCT-116-xenografted tumors in nude mice

Yi Chen, Kai-Yuan Luo, Xiao-Gang Li, Ying-Xu Li, Wan-Fu Zhang, Zhi-Ping Zhang, Yan Chu

Yi Chen, Kai-Yuan Luo, Xiao-Gang Li, Ying-Xu Li, Wan-Fu Zhang, Zhi-Ping Zhang, Yan Chu, Department of General Surgery, the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650021, Yunnan Province, China

Supported by: the Special Applied and Basic Research Foundation of Yunnan Province, No. 2007C0039R; and the Key Applied and Basic Research Program of Yunnan Province, No. 2008CC002

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

Received: 2010-05-04 Revised: 2010-08-05

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of interstitial implantation of iodine-125 on the growth of adenocarcinoma of the large intestine and to explore potential mechanisms involved.

METHODS: Nude mice bearing HCT-116-xenografted tumors were randomly divided into two groups ($n = 24$ each): control group and

experimental group. The control group underwent implantation of empty seeds, while the experiment group underwent implantation of iodine-125 seeds (14.8 MBq). On days 7, 14, 21 and 28 after implantation, mice were killed to calculate tumor growth, detect the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in tumor tissue by immunohistochemistry, determine the apoptosis of tumor cells by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay, and observe the ultrastructural changes of tumor cells by transmission electron microscopy (TEM).

RESULTS: On days 7, 14, 21 and 28 after implantation, both tumor volume and weight were significantly lower in the experiment group than in the control group (tumor volume on day 28: $497.3 \text{ mm}^3 \pm 7.8 \text{ mm}^3$ vs $947.2 \text{ mm}^3 \pm 40.4 \text{ mm}^3$, $P < 0.01$; tumor weight on day 28: $1.131 \text{ g} \pm 0.079 \text{ g}$ vs $2.139 \text{ g} \pm 0.094 \text{ g}$, $P < 0.01$). The reduced rate of tumor growth in the experimental group was higher than that in the control group (on day 28: 47.12% vs 25.77%). The expression of PCNA in the experiment group decreased with time and was significantly lower on day 28 than that in the control group. On day 14, apoptotic bodies began to appear and then gradually increased in number, reaching the peak on day 28.

CONCLUSION: Interstitial implantation of iodine-125 seeds induces apoptosis but inhibits cell proliferation in HCT-116-xenografted tumors in nude mice.

Key Words: Iodine-125 seed; Colorectal cancer; Apoptosis; Proliferating cell nuclear antigen

Chen Y, Luo KY, Li XG, Li YX, Zhang WF, Zhang ZP, Chu Y. Interstitial implantation of iodine-125 seeds induces apoptosis but inhibits cell proliferation in HCT-116-xenografted tumors in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2858-2862

摘要

目的: 探讨¹²⁵I粒子对低分化大肠腺癌的抑制

■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

作用及其可能的机制。

方法:以人低分化结肠癌HCT-116细胞的荷瘤小鼠作为动物模型,随机将其分成对照组和实验组(每组24只),对照组植入空白粒子,实验组植入剂量为14.8 MBq的¹²⁵I粒子,分别在植入后第7天、14天、21天、28天处死裸鼠。计算生长曲线,用免疫组织化学法检测增殖细胞核抗原;以原位末端标记法检测¹²⁵I粒子诱导肿瘤细胞凋亡的程度;通过透射电镜对比观察肿瘤组织的形态学变化。

结果:植入¹²⁵I粒子第7、14、21、28天后,实验组荷瘤小鼠肿瘤体积均明显小于对照组(第28天: $497.3 \text{ mm}^3 \pm 7.8 \text{ mm}^3$ vs $947.2 \text{ mm}^3 \pm 40.4 \text{ mm}^3$, $P < 0.01$)。同时,实验组荷瘤小鼠肿瘤质量也均明显小于对照组(第28天: $1.131 \text{ g} \pm 0.079 \text{ g}$ vs $2.139 \text{ g} \pm 0.094 \text{ g}$, $P < 0.01$)。实验组的抑瘤率高于对照组(第28天: 47.12% vs 25.77%)。从第21天开始PCNA的表达逐渐降低,在第28天时明显低于对照组,其表达呈弱阳性(+)。植入¹²⁵I粒子14 d后,开始出现凋亡小体,且数量逐渐增多,以第28天时达到最大。

结论:¹²⁵I粒子对低分化大肠腺癌的治疗有效,他能抑制肿瘤细胞的增殖生长,诱导肿瘤凋亡。

关键词:¹²⁵I粒子; 大肠癌; 凋亡; 增殖细胞核抗原

陈亿, 罗开元, 李晓刚, 李滢旭, 张万福, 章治平, 褚焱. 组织间植入¹²⁵I粒子对大肠腺癌细胞HCT-116诱导凋亡及增殖抑制的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2858-2862
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2858.asp>

0 引言

随着社会经济的发展以及生活方式和饮食习惯的改变,大肠癌在我国发病率呈逐年上升趋势,自20世纪70年代开始其年增长率达4%。目前在美国大肠癌已成为导致患者癌性死亡的第3大疾病,接近25%的结直肠癌患者在确立诊断时即已存在肝转移,患者生存期明显缩短且生活质量不高^[1-4]。近年来国外已有报道¹²⁵I粒子(全称是¹²⁵I密封粒子)组织间植入内放疗对肿瘤的治疗取得了良好疗效,使之成为治疗大肠癌的重要手段^[5,6]。本研究设计了以¹²⁵I粒子为干预因素,研究肿瘤细胞的增殖和凋亡以及起效的时间周期,证实了¹²⁵I粒子在不同的时间周期对大肠腺癌均有疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 48只BLAB/c-nu/nu裸鼠,♂,购于中国

医学科学院肿瘤研究所,4-6周龄时接种癌细胞株,体质量为17-18 g。瘤体位于腋下或肩胛区,瘤体长径为8-10 mm,在昆明医学院动物实验室无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)条件下饲养。¹²⁵I粒子:¹²⁵I粒子24粒(放射性活度: 14.8 MBq),空载粒子(0 MBq)24粒(购于上海欣科医药公司)。¹²⁵I是一种人工合成的同位素,由¹²⁴Xe吸收一个中子并以电子俘获方式变为¹²⁵I,释放能量为27-31 KEV的X线和35 KEV的γ射线。¹²⁵I粒子目前已被广泛应用于临床各种实体恶性肿瘤的放射治疗^[7]。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模:按单纯随机化原则分为实验组和对照组,其中每组为24只,每组又按处死时间的不同,即植入粒子后第1周(7 d)、第2周(14 d)、第3周(21 d)、第4周(28 d)分为A、B、C、D 4组。对照组中的每只裸小鼠于肿瘤中心处植入一粒空白粒子(0 MBq),实验组中的每只裸小鼠用18号植入针经皮于瘤体中心处(平行于瘤体长轴)植入一¹²⁵I粒子(14.8 MBq)。植入后每隔3 d用游标卡尺测量肿瘤长径(a)及宽径(b),计算肿瘤体积($V = ab^2/2$),并绘制出各组裸小鼠移植瘤生长曲线图。

1.2.2 TUNEL法检测原位凋亡:镜下观察凋亡细胞计算染色阳性细胞所占百分比,即为细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)^[8]。

1.2.3 增殖细胞核抗原的阳性判断:增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)位于细胞核膜上,免疫组织化学染色,PCNA阳性表现为细胞核呈棕黄色。结果判定参照Shimizu判定标准:无明显阳性细胞为(-),阳性细胞百分率1%-25%为(+),26%-50%为(++),51%-75%为(+++),76%-100%为(++++) ,并分析比较PCNA标记指数(labeling index, LI)^[9]。

统计学处理 实验数据均用SPSS11.5医学统计软件进行统计分析。数据以mean±SD表示,采用LSD法和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义, $P < 0.01$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 粒子植入后荷瘤小鼠肿瘤体积变化比较及其生长曲线 随着时间的推移,对照组多数裸小鼠进食、活动明显减少,而实验组裸小鼠多活跃且进食多,背部肿瘤局部皮肤未见溃烂现象。对照组首先进行数据正态性检验,统计量 $Z = 1.162$, $P = 0.134$ 。采用随机区组方差分析进行检

■ 研发前沿

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

■创新盘点

本研究设计了以 ^{125}I 粒子为干预因素,研究肿瘤细胞的增殖和凋亡以及起效的时间周期,证实了 ^{125}I 粒子在不同的时间周期对大肠腺癌均有疗效。

表 1 粒子植入后荷瘤小鼠肿瘤体积变化 (mean \pm SD)

分组	第7天	第14天	第21天	第28天
对照组	241.8 \pm 10.9	391.3 \pm 8.0	694.4 \pm 9.8	947.2 \pm 40.4
实验组	243.9 \pm 9.5 ^a	287.9 \pm 12.4 ^a	433.5 \pm 7.9 ^b	497.3 \pm 7.8 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表 2 粒子植入后荷瘤小鼠瘤质量的变化 (mean \pm SD, g)

分组	第7天	第14天	第21天	第28天
对照组	0.689 \pm 0.029	0.867 \pm 0.042	1.335 \pm 0.054	2.139 \pm 0.094
实验组	0.608 \pm 0.074 ^a	0.738 \pm 0.068 ^a	0.991 \pm 0.093 ^b	1.131 \pm 0.079 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

验, 差异显著($F = 35.289$, $P = 0.000$), 粒子植入后对照组瘤体积大于实验组(表1). 肉眼观察也可见对照组的瘤体积明显大于实验组. 从各组的生长曲线看, 对照组的肿瘤生长曲线高抬, 粒子植入后第10天可见生长曲线明显上抬, 表明肿瘤生长速度显著增快. 而实验组生长曲线一直低平, 无明显曲线抬高现象, 从大体标本上也可看出对照组的瘤体生长迅速, 部分瘤体出现坏死, 破溃, 两组肿瘤大小差异显著($P < 0.01$, 图1).

2.2 瘤质量 肿瘤抑制率对照组瘤质量大于实验组瘤质量, 两组瘤质量差异有统计学意义($P < 0.05$). 实验组荷瘤裸鼠在粒子植入21 d时, 瘤质量增长的速度开始减慢, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 28 d时的瘤质量, 与植入21 d相比, 瘤体生长速度继续减慢, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 与对照组相比, 21 d以前, 瘤体生长速度不明显, 21 d以后, 瘤体生长速度明显增高. 4个组的抑瘤率分别为: 11.76%, 14.88%, 25.77%, 47.12%(表2).

2.3 肿瘤病理学PCNA免疫组织化学检测 PCNA指数是计数资料, 经卡方检验分析, 实验组第1组与对照组第1组之间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$). 其余实验组与相应对照组之间对比, 差异有统计学意义($P < 0.05$). 提示实验组第1组PCNA表达降低不明显, 与对照组第1组一致, PCNA表达均呈强阳性(++++)。从21 d开始, 实验组PCNA表达逐渐减弱, 到28 d PCNA表达呈弱阳性(+)(图2).

2.4 透射电镜结果 经 ^{125}I 粒子作用后, 第1、2、3、4实验组均可见不同时期的细胞凋亡, 胞质固缩染色体边集, 以早中期凋亡为主. 照射14 d以后, 开始出现凋亡小体, 且数量也增多, 以第

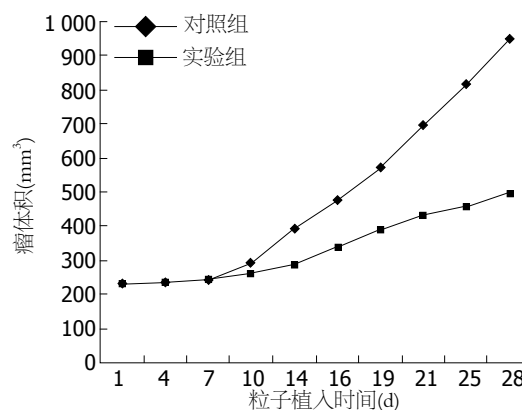


图 1 各组裸鼠移植瘤生长曲线.

28天时最多. 部分切片肿瘤细胞中可见空泡, 微丝的形成, 内部的细胞器也增多, 与对照组相比, 凋亡细胞明显. 对照组早期癌细胞排列整齐, 核大, 有异形, 细胞内少见凋亡. 中晚期细胞以坏死为主, 并伴有较多炎性细胞, 几乎不能找到凋亡小体, 与实验组相比, 凋亡小体较少见(图3).

2.5 TUNEL法检测细胞凋亡情况 实验组中随着粒子照射时间的延长, 凋亡小体逐渐增多, 照射第14天后凋亡小体增多明显, 第28天时最多, 镜下可见细胞核呈棕黄色, 细胞核明显偏位, 呈月牙形, 可见空泡现象. 高倍镜视野(400 \times HP)下可见较多凋亡小体, 与对照组相比, 凋亡情况明显(图4).

3 讨论

大肠癌的发生不仅与抑癌基因失活有关, 还与细胞增生凋亡被抑制有关^[10-12]. 细胞凋亡是1972年由Kerr等^[13]首先提出的, 他又被称为细胞的程序性死亡, 是指在一定的条件下, 细胞接受到

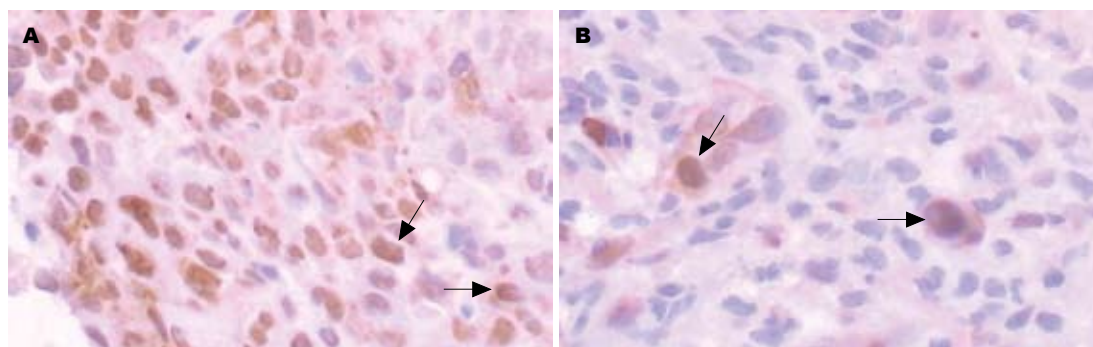


图 2 免疫组织化学检测PCNA(×400). A: 对照组28 d; B: 实验组28 d.

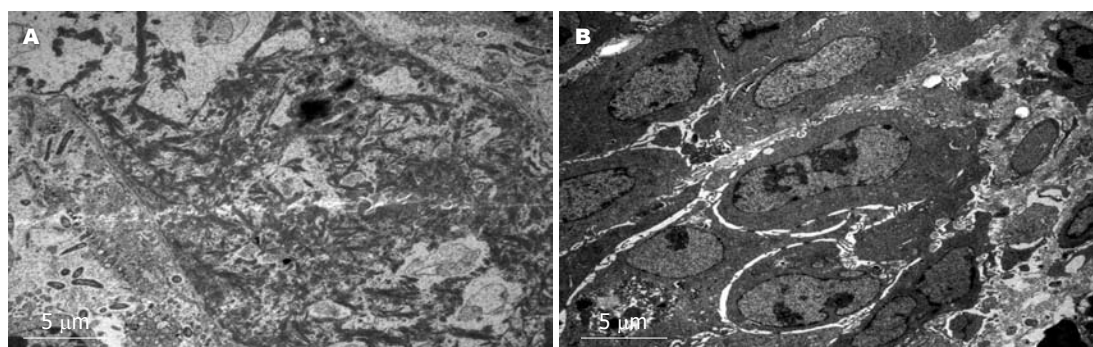


图 3 透射电镜示细胞凋亡(×4 000). A: 对照组28 d; B: 实验组28 d.

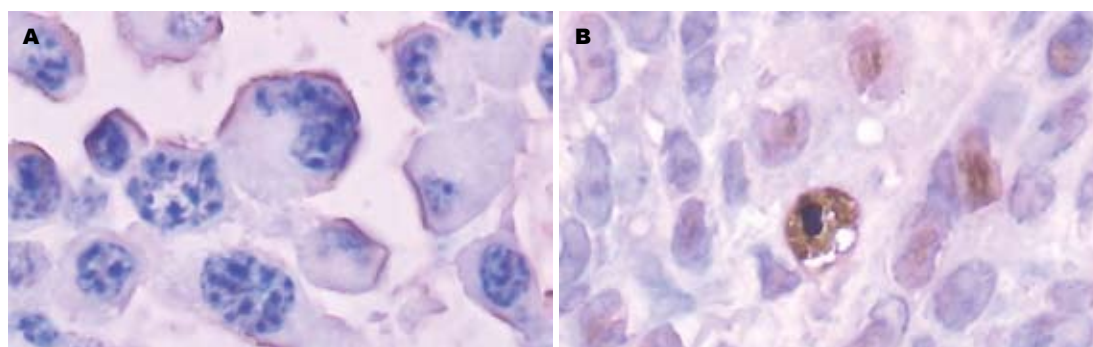


图 4 TUNEL法检测细胞凋亡(×1 000). A: 对照组28 d; B: 实验组28 d.

某种信号的刺激后,自行控制发生的自杀死亡过程.在本实验中,对照组标本同本课题组前期实验中空白剂量组标本相似^[14],其中难以找到凋亡细胞.实验组电镜标本中可见较多,较清楚的凋亡细胞,说明在治疗组瘤体内凋亡确实发生. TUNEL法检测组织切片上原位凋亡,对照组中棕黄色染色的细胞数量少.实验组中棕黄色染色细胞明显增多,且染色加深,说明在瘤体内自发凋亡细胞数量少,当一定活度的¹²⁵I粒子植入组织间一段时间后,凋亡细胞数量明显增加,而且组织间植入的¹²⁵I粒子时间不同,凋亡情况也不一样.从21 d开始,随着放射时间的延长,凋亡小体的数量明显增多,并伴有肿瘤细胞分化的

改变,微丝的形成,高尔基体和粗面内质网数量有少许增多.¹²⁵I粒子诱导了肿瘤细胞的凋亡.凋亡率随着放射时间的延长而增高,从而可以推测肿瘤细胞对放射的敏感度^[15].

PCNA首先由Miyachi等^[16]提出,发现其存在于细胞核,也是核内合成的,而不是从细胞质进入细胞核.他是与细胞周期相关的36×103核蛋白,又称周期素,是反映肿瘤增殖细胞活性的一个重要指标,也是DNA聚合酶的辅助因子,参与DNA的合成^[17-19].本实验从PCNA的免疫组织化学照片可以看到,PCNA在对照组中表达均较高,染色细胞呈深黄色且阳性细胞密集.在实验组中其表达均降低,染色细胞呈棕黄色且阳

■应用要点

治疗结直肠癌并肝脏转移的主要方式为手术切除主要转移灶,而后植入¹²⁵I,放射治疗潜在的残余病灶,切除困难者以及可能发生的转移灶,并联合新辅助化疗,这在大肠癌的治疗中具有重要意义.本文为提高肿瘤患者的生存率,改善患者的生活质量,为肿瘤的综合治疗提供一种新的有效的治疗方法.

同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 结果可信, 具有一定的科学价值。

性细胞稀疏。从21 d开始, 随着放射时间的延长, PCNA的表达明显减弱。结果提示我们, ^{125}I 粒子组织间植入后明显降低了肿瘤组织中PCNA的表达, 从21 d开始效果较为明显。这表明 ^{125}I 粒子组织间植入治疗可以抑制瘤组织中肿瘤细胞的增殖活性, 并且随着时间的延长, 肿瘤细胞的增殖活性受到的抑制增强^[20]。

本实验研究结果显示: ^{125}I 粒子对大肠腺癌治疗有效, 从21 d开始效果较明显, 并持续作用; ^{125}I 粒子组织间植入治疗降低了肿瘤细胞PCNA的表达, 促使凋亡增加, 并伴有微丝的形成, 高尔基体和粗面内质网数量有少许增多。 ^{125}I 粒子组织间植入内放疗的并发症较少见, 国内外对放射性粒子植入治疗的并发症均有报道。常见的并发症有: (1)穿刺误入血管引起栓塞, 穿破空腔脏器肠管; (2)皮肤溃疡少数患者(0.5%)可造成放射性肠炎、肝脓肿^[21]。合适的粒子剂量、及时有效地预测粒子迁移^[22], 可以明显减少并发症。

参考文献

- Kunnumakkara AB, Diagaradjane P, Anand P, Harikumar KB, Deorukhkar A, Gelovani J, Guha S, Krishnan S, Aggarwal BB. Curcumin sensitizes human colorectal cancer to capecitabine by modulation of cyclin D1, COX-2, MMP-9, VEGF and CXCR4 expression in an orthotopic mouse model. *Int J Cancer* 2009; 125: 2187-2197
- Grundmann RT, Hermanek P, Merkel S, Germer CT, Grundmann RT, Hauss J, Henne-Bruns D, Herfarth K, Hermanek P, Hopt UT, Junginger T, Klar E, Klempnauer J, Knapp WH, Kraus M, Lang H, Link KH, Löhe F, Merkel S, Oldhafer KJ, Raab HR, Rau HG, Reinacher-Schick A, Rieke J, Roder J, Schäfer AO, Schlitt HJ, Schön MR, Stippel D, Tannapfel A, Tatsch K, Vogl TJ. [Diagnosis and treatment of colorectal liver metastases - workflow] *Zentralbl Chir* 2008; 133: 267-284
- Donadon M, Torzilli G. [Surgical treatment of liver metastases from colorectal carcinoma] *Minerva Chir* 2007; 62: 257-267
- Donadon M, Ribero D, Morris-Stiff G, Abdalla EK, Vauthey JN. New paradigm in the management of liver-only metastases from colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2007; 1: 20-27
- 陈亿, 罗开元, 李滢旭. ^{125}I 粒子近距离植入治疗结直肠癌肝转移的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3324-3327
- Chino K, Silvain D, Grace A, Stubbs J, Stea B. Feasibility and safety of outpatient brachytherapy in 37 patients with brain tumors using the GliSite Radiation Therapy System. *Med Phys* 2008; 35: 3383-3388
- 罗开元. 实用组织间植入内放射治疗恶性肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 39-45
- Mitsuhashi N, Kobayashi S, Doki T, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Furukawa K, Takeuchi D, Suda K, Miura S, Miyazaki M. Clinical significance of alpha-fetoprotein: involvement in proliferation, angiogenesis, and apoptosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e189-e197
- Gestin JF, Loussouarn A, Bardiès M, Gautherot E, Gruaz-Guyon A, Sai-Maurel C, Barbet J, Curtet C, Chatal JF, Faivre-Chauvet A. Two-step targeting of xenografted colon carcinoma using a bispecific antibody and 188Re-labeled bivalent hapten: biodistribution and dosimetry studies. *J Nucl Med* 2001; 42: 146-153
- Tritz R, Hickey MJ, Lin AH, Hadwiger P, Sah DW, Neuwelt EA, Mueller BM, Kruse CA. FAPP2 gene downregulation increases tumor cell sensitivity to Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383: 167-171
- Benchabane H, Ahmed Y. The adenomatous polypoidosis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2009; 656: 75-84
- Imamura T, Kikuchi H, Herraiz MT, Park DY, Mizukami Y, Mino-Kenduson M, Lynch MP, Rueda BR, Benita Y, Xavier RJ, Chung DC. HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer. *Int J Cancer* 2009; 124: 763-771
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
- 赵泉, 罗开元, 时德. ^{125}I 粒子肝肿瘤组织间植入治疗诱导凋亡的研究. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 112-114
- Sahu RP, Epperly MW, Srivastava SK. Benzyl isothiocyanate sensitizes human pancreatic cancer cells to radiation therapy. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009; 1: 568-576
- Miyachi H, Azuma A, Hioki E, Kobayashi Y, Iwasaki S, Hashimoto Y. Inducer-specific regulators of tumor necrosis factor alpha production. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996; 44: 1980-1982
- López Castel A, Tomkinson AE, Pearson CE. CTG/CAG repeat instability is modulated by the levels of human DNA ligase I and its interaction with proliferating cell nuclear antigen: a distinction between replication and slipped-DNA repair. *J Biol Chem* 2009; 284: 26631-26645
- Stoimenov I, Helleday T. PCNA on the crossroad of cancer. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 605-613
- Ramakrishnan G, Lo Muzio L, Elinos-Báez CM, Jagan S, Augustine TA, Kamaraj S, Anandakumar P, Devaki T. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. *Cell Prolif* 2009; 42: 229-240
- Kumar R, Singh PK, Sharma A, Prasad J, Sagar R, Singh S, Arora R, Sharma RK. Podophyllum hexandrum (Himalayan mayapple) extract provides radioprotection by modulating the expression of proteins associated with apoptosis. *Biotechnol Appl Biochem* 2005; 42: 81-92
- Gasent Blesa JM, Dawson LA. Options for radiotherapy in the treatment of liver metastases. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 638-645
- Zhu AX, Wallner KE, Frivold GP, Ferry D, Jutzy KR, Foster GP. Prostate brachytherapy seed migration to the right coronary artery associated with an acute myocardial infarction. *Brachytherapy* 2006; 5: 262-265

编辑 李军亮 电编 何基才

葱白提取物对非酒精性脂肪肝大鼠的治疗作用

时昭红, 王湘宁, 张长弓, 林丽莉, 郭洁, 刘浩

时昭红, 张长弓, 郭洁, 刘浩, 武汉市第一医院消化内科 湖北省武汉市 430022

王湘宁, 林丽莉, 湖北中医药大学临床医学院 湖北省武汉市 430061

时昭红, 2006年湖北中医学院中医内科学博士, 主要从事消化系统疾病的诊治研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30873346

作者贡献分布: 时昭红对此文做主要贡献; 此课题由时昭红、张长弓、郭洁及刘浩设计; 研究过程由王湘宁与林丽莉操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王湘宁完成; 数据分析由王湘宁与林丽莉完成; 本论文写作由时昭红、林丽莉及王湘宁完成。

通讯作者: 时昭红, 教授, 430022, 湖北省武汉市中山大道215号, 武汉市第一医院消化内科, ycfyx2000@126.com

电话: 027-85855332

收稿日期: 2010-06-29 修回日期: 2010-08-04

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-28

Therapeutic effects of fistular onion stalk extract on nonalcoholic fatty liver in rats

Zhao-Hong Shi, Xiang-Ning Wang,
Chang-Gong Zhang, Li-Li Lin, Jie Guo, Hao Liu

Zhao-Hong Shi, Chang-Gong Zhang, Jie Guo, Hao Liu,
Department of Gastroenterology, Wuhan First Hospital,
Wuhan 430022, Hubei Province, China

Xiang-Ning Wang, Li-Li Lin, Clinical Medical College,
Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061,
Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 30873346

Correspondence to: Professor Zhao-Hong Shi, Department of Gastroenterology, Wuhan First Hospital, 215 Zhongshan Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. ycfyx2000@126.com

Received: 2010-06-29 Revised: 2010-08-04

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effects of fistular onion stalk extract on nonalcoholic fatty liver (NAFL) in rats.

METHODS: Sixty-four Wistar rats were randomly divided into two groups: blank control group ($n = 8$) and fat milk group ($n = 56$). The fat milk group was intragastrically given fat milk once a day to induce NAFL. After induction of NAFL, eight rats from each group were killed. The remaining rats of the fat milk group were further randomly divided into six subgroups: model control subgroup, Jiaogulan subgroup, polyene

phosphatidylcholine subgroup, and low-, medium- and high-dose fistular onion stalk extract subgroups. Except the model control subgroup, each of the other subgroups was given the corresponding drug. After 8 weeks, all the animals were sacrificed. The contents of plasma total triglyceride (TG), cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), and low-density lipoprotein (LDL) were determined. The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver tissue were measured by spectrophotometry. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determined the changes in the content of TNF- α in the liver.

RESULTS: Compared with the model control subgroup, serum lipid levels showed different degrees of improvement in the low-, medium- and high-dose fistular onion stalk extract, Jiaogulan and polyene phosphatidylcholine subgroups: the levels of TG, TC and LDL decreased significantly (TG: $0.57 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $0.51 \text{ mmol/L} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$, $0.58 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $0.52 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$ and $0.50 \text{ mmol/L} \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ vs $0.73 \text{ mmol/L} \pm 0.06 \text{ mmol/L}$, all $P < 0.01$; TC: $2.04 \text{ mmol/L} \pm 0.18 \text{ mmol/L}$, $1.69 \text{ mmol/L} \pm 0.15 \text{ mmol/L}$, $2.03 \text{ mmol/L} \pm 0.41 \text{ mmol/L}$, $1.88 \text{ mmol/L} \pm 0.18 \text{ mmol/L}$ and $1.70 \text{ mmol/L} \pm 0.39 \text{ mmol/L}$ vs $3.42 \text{ mmol/L} \pm 0.42 \text{ mmol/L}$, all $P < 0.01$; LDL: $0.41 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $0.36 \text{ mmol/L} \pm 0.12 \text{ mmol/L}$, $0.46 \text{ mmol/L} \pm 0.13 \text{ mmol/L}$ and $0.40 \text{ mmol/L} \pm 0.15 \text{ mmol/L}$ vs $0.81 \text{ mmol/L} \pm 0.24 \text{ mmol/L}$, all $P < 0.01$); the levels of MDA and TNF- α were reduced significantly (all $P < 0.01$); and SOD activity increased ($61.79 \text{ U/mg} \pm 5.72 \text{ U/mg}$, $83.03 \text{ U/mg} \pm 7.47 \text{ U/mg}$, $70.51 \text{ U/mg} \pm 4.84 \text{ U/mg}$, $66.66 \text{ U/mg} \pm 9.23 \text{ U/mg}$ and $73.12 \pm 4.87 \text{ U/mg}$ vs $49.50 \text{ U/mg} \pm 9.31 \text{ U/mg}$, all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Fistular onion stalk extract may exert a protective effect on liver function by decreasing the levels of TG and TC and the activity of MDA and increasing the activity of SOD.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver; Fistular onion stalk; Therapeutic effect; Rat

■背景资料

非酒精性脂肪肝是临床上常见的肝脏疾病之一, 发病率呈逐年上升的趋势。中医药特别是通阳药物, 对非酒精性脂肪肝的治疗积累了丰富的经验。葱白提取物作为疏通阳气的要药, 缺少动物实验方面的系统研究。

■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

■研究前沿

对非酒精性脂肪肝的研究是近些年来国内外医学研究的热点,运用中医药治疗此病已经逐渐得到广泛的重视。

Shi ZH, Wang XN, Zhang CG, Lin LL, Guo J, Liu H. Therapeutic effects of fistular onion stalk extract on non-alcoholic fatty liver in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2863-2868

摘要

目的: 研究葱白提取物对非酒精性脂肪肝(non alcoholic fatty liver, NAFL)大鼠的治疗作用。

方法: Wistar大鼠64只,首先随机分为两组,正常组8只、脂肪乳灌胃组56只。通过灌胃脂肪乳的方法复制NAFL大鼠模型。造模结束后,处死正常组8只及模型组8只,观察模型复制情况。确定模型复制成功后,将剩余模型组大鼠随机分为6组:模型(A)组、葱白提取物高剂量(B)组、中剂量(C)组、低剂量(D)组、绞股蓝(E)组、多烯磷脂酰胆碱(F)组。各组分别给予相应剂量的葱白提取物或药物。连续给药8 wk后处死大鼠,HE染色法观察病理变化,生化法检测血清三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL),ELISA法测定肝组织匀浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量,比色法检测肝组织匀浆中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的含量。

结果: 与A组比较,B、C、D、E、F组血清脂类有不同程度的改善。其TG、TC、LDL含量明显下降(TG: $0.57 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $0.51 \text{ mmol/L} \pm 0.04 \text{ mmol/L}$, $0.58 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $0.52 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $0.50 \text{ mmol/L} \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ vs $0.73 \text{ mmol/L} \pm 0.06 \text{ mmol/L}$, $P < 0.01$; TC: $2.04 \text{ mmol/L} \pm 0.18 \text{ mmol/L}$, $1.69 \text{ mmol/L} \pm 0.15 \text{ mmol/L}$, $2.03 \text{ mmol/L} \pm 0.41 \text{ mmol/L}$, $1.88 \text{ mmol/L} \pm 0.18 \text{ mmol/L}$, $1.70 \text{ mmol/L} \pm 0.39 \text{ mmol/L}$ vs $3.42 \text{ mmol/L} \pm 0.42 \text{ mmol/L}$, $P < 0.01$; LDL: $0.41 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $0.36 \text{ mmol/L} \pm 0.12 \text{ mmol/L}$, $0.46 \text{ mmol/L} \pm 0.13 \text{ mmol/L}$, $0.40 \text{ mmol/L} \pm 0.15 \text{ mmol/L}$ vs $0.81 \text{ mmol/L} \pm 0.24 \text{ mmol/L}$, $P < 0.01$); MDA、TNF- α 含量明显下降($P < 0.01$), SOD活性提高($61.79 \text{ U/mg} \pm 5.72 \text{ U/mg}$, $83.03 \text{ U/mg} \pm 7.47 \text{ U/mg}$, $70.51 \text{ U/mg} \pm 4.84 \text{ U/mg}$, $66.66 \text{ U/mg} \pm 9.23 \text{ U/mg}$, $73.12 \text{ U/mg} \pm 4.87 \text{ U/mg}$ vs $49.50 \text{ U/mg} \pm 9.31 \text{ U/mg}$, $P < 0.01$)。

结论: 葱白提取物可以降低血清中TG、TC的含量,降低肝脏组织中MDA、TNF- α 的含量,提高SOD的活性,从而起到抑制脂肪在肝脏的堆积和NAFL发展的作用。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 葱白提取物; 治疗作用;

大鼠

时昭红, 王湘宁, 张长弓, 林丽莉, 郭洁, 刘浩. 葱白提取物对非酒精性脂肪肝大鼠的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(27): 2863-2868

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2863.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(non alcoholic fatty liver, NAFL)是指无过量饮酒史,以肝脏实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床综合征^[1]。随着生活水平和饮食结构的不断改变,NAFL发病率逐年增高,目前西方国家NAFL的发病率在20%-30%^[2],而全球流行病学调查表明,NAFL的发病率在17%-33%^[3]。在我国,NAFL现已成为最常见的慢性肝病之一,其检出率位居各大医院健康体检项目中的第1位^[4]。随着病情的进展,NAFL患者可以发生不同程度的肝纤维化,并可发展成肝硬化,甚至导致肝癌^[5]。其发病机制目前尚未完全阐明,且缺乏有效的治疗手段。中医学认为脂肪在肝脏的过度贮积,与体内阳气不通密切相关。葱白,为百合科植物葱的近根部的茎,主要成分有二烯丙基硫醚、儿茶素等,其性辛散,具有很强的通阳作用^[6]。本研究将通过探讨葱白提取物对NAFL的治疗作用,为其临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级Wistar大鼠64只,体质量 $200 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$,购自湖北省疾病控制中心(合格证编号:SCXK鄂2003-0005)。胆固醇(武汉市天益生化试剂有限公司)、丙塞优(上海朝晖药业有限公司,国药准字H31021082)、1,2-丙二醇(天津市博迪化工有限公司,批号:津Q/HG 31018-85)、脱氧胆酸钠(上海如吉生物科技有限公司)、吐温80(天津市博迪化工有限公司,批号:津Q/HG 3020-99)、猪油为市场采购。多烯磷脂酰胆碱胶囊(多烯磷脂酰胆碱,由赛诺菲·安万特公司生产,国药准字:HZ20059010)配置成 14.25 g/L 的溶液,绞股蓝总甙片(由广州白云山和记黄埔中药有限公司生产,国药准字Z44021756)配置成 1.875 g/L 的溶液,葱白提取物(由武汉市第一医院制剂中心提供,批号080304)用植物油调匀,分别配置成高剂量 7.5 g/L 、中剂量 5 g/L 、低剂量 2.5 g/L 的混悬液。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,大鼠肿

瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)检测试剂盒(由美国RD公司生产), 电子恒温不锈钢水浴锅(由上海光地仪器设备有限公司生产), TU-1800S紫外可见分光光度计(由北京普析通用仪器有限责任公司生产), 医学图文分析系统(由武汉千屏影像技术有限责任公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 造模: 64只Wistar大鼠饲养于SPF级动物房, 给予普通饲料喂养, 自由饮水进食, 环境温度为17℃-24℃, 适应性喂养1 wk后, 随机分为2组: 正常组8只, 脂肪乳灌胃组56只。参照Charles方法制备脂肪乳, 以脂肪乳灌胃法造模^[7]。正常组: 按10 mL/(kg·d)灌胃生理盐水; 脂肪乳灌胃组: 按10 mL/(kg·d)灌胃脂肪乳。

1.2.2 脂肪乳的制作: 取2 000 mL烧杯, 加入猪油250 g, 磁力搅拌至100℃, 加入100 g胆固醇, 待融化后再加入10 g丙塞优, 搅拌均匀后加入250 mL吐温80, 制成油相; 取另一烧杯, 加入300 mL水和200 mL丙二醇, 加热至60℃, 再加入20 g脱氧胆酸钠, 搅拌后混匀, 制成水相。油相与水相相混, 制备成脂肪乳。于灌胃造模16 wk后处死8只正常组和8只脂肪乳灌胃组大鼠。比较两组的肝组织病理切片及肝组织生化检测结果, 以脂肪乳灌胃组大鼠肝脏30%^[8]以上的肝细胞均已形成大泡伴小泡性脂肪变性, 及肝脏脂肪含量水平上升为标准, 确定造模成功。

1.2.3 药物干预: 造模结束后, 将剩余脂肪乳灌胃组大鼠随机分为6组(每组8只), 各自进行灌胃治疗: 模型组[灌胃生理盐水10 mL/(kg·d)]、葱白高剂量组[灌胃高浓度葱白提取物75 mg/(kg·d)]、葱白中剂量组[灌胃中浓度葱白提取物50 mg/(kg·d)]、葱白低剂量组[灌胃低浓度葱白提取物25 mg/(kg·d)]、绞股蓝组[灌胃绞股蓝溶液18.75 mg/(kg·d)]、多烯磷脂酰胆碱组[灌胃多烯磷脂酰胆碱溶液142.5 mg/(kg·d)]。8 wk后处死动物, 采集血液和肝脏标本备用。

1.2.4 观察指标及检测: (1)一般情况: 实验过程中每周称质量1次, 观察大鼠毛发、精神及食欲等情况。处死动物时称质量及肝脏湿质量, 计算肝指数(liver index, LI, 肝指数 = 肝湿质量/体质量×100%)。 (2)血清生化: 测定血清三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)含量。采集血液标本送交武汉市中西医结合医院检验科完成。 (3)组织学病检: 40 g/L多聚甲醛固定标本, 石蜡切片进行HE染色, 在光镜下观察肝脏脂肪变性的情况。肝细胞脂肪变性程度

表 1 各组大鼠肝指数的比较 ($n = 8$, mean \pm SD, %)

分组	肝指数
正常组	2.25 \pm 0.08
模型组	3.31 \pm 0.44 ^b
葱白高剂量组	2.49 \pm 0.15 ^d
葱白中剂量组	2.40 \pm 0.14 ^d
葱白低剂量组	2.42 \pm 0.21 ^d
绞股蓝组	2.76 \pm 0.33 ^d
多烯磷脂酰胆碱组	2.58 \pm 0.16 ^d

^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

判断标准参考文献[9], 以肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数比值计算。 (4)ELISA法测定肝组织TNF- α 含量: 在相同部位精确称取肝组织约100 mg加入匀浆器中, 制作10%组织匀浆液。采用ELISA法检测TNF- α 含量。按照试剂盒说明书进行操作。 (5)比色法测定肝组织MDA、SOD的含量: 在相同部位精确称取肝脏300 mg, 加入预冷的2 700 μ L生理盐水中, 在冰水中制成10%的匀浆, 4℃ 3 000 r/min离心10 min, 提取上清液测定MDA含量。余下操作按试剂盒说明书进行。紫外分光光度计下比色, 记录光度, 按试剂盒给出的公式计算出组织中MDA的含量。在相同部位精确称取肝脏300 mg, 加入预冷的2 700 μ L生理盐水中, 在冰水中制成10%的匀浆, 然后从10%的组织匀浆中用微量移液器取出10 μ L, 加入另一100 μ L的生理盐水, 制备成1%的组织匀浆。4℃ 3 000 r/min离心10 min, 提取上清液测定SOD含量。余下操作按试剂盒说明书进行。紫外分光光度计下比色, 记录吸光度值, 按试剂盒给出的公式计算出组织中SOD的含量。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD来表示, 结果用单因素方差分析, 组间用 q 检验, $P < 0.05$ 为有显著差异性; $P < 0.01$ 为有非常显著差异性; $P > 0.05$ 则为无统计学意义。软件选用SPSS13.0软件包。

2 结果

2.1 一般情况 实验期间各组大鼠体质量无明显差异性; 模型组大鼠精神较差, 偶见有腹泻、便溏的情况, 活动度明显不及5个治疗组($P < 0.01$, 表1)。

2.2 血清TG、TC、HDL、LDL变化 与正常组比较, 模型组TG、TC、LDL均显著升高, HDL显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组TG、TC、LDL有不同程度的下降($P < 0.01$)。给药治疗有提高HDL的作用, 但与模型组比较, 无统计学

■ 相关报道

吴佳等对目前中医药治疗非酒精性脂肪肝的研究做出了综述。葛仁美等就血清脂类变化与非酒精性脂肪肝的关系进行了深入探讨。

■创新盘点

本课题改传统的多味中药汤剂为单味中药提取物,从与非酒精性脂肪肝病发展密切相关的脂类指标入手,探讨葱白提取物的作用机制,充分体现了中医药的特色与优势。

表 2 各组大鼠血清TG、TC、HDL、LDL的变化 ($n = 8$, mean \pm SD, mmol/L)

分组	TG	TC	HDL	LDL
正常组	0.48 \pm 0.08	1.32 \pm 0.19	1.18 \pm 0.23	0.29 \pm 0.09
模型组	0.73 \pm 0.06 ^b	3.42 \pm 0.42 ^b	0.61 \pm 0.07 ^b	0.81 \pm 0.24 ^b
葱白高剂量组	0.57 \pm 0.05 ^d	2.04 \pm 0.18 ^d	0.64 \pm 0.07	0.41 \pm 0.05 ^d
葱白中剂量组	0.51 \pm 0.04 ^d	1.69 \pm 0.15 ^d	0.74 \pm 0.10	0.36 \pm 0.12 ^d
葱白低剂量组	0.58 \pm 0.05 ^d	2.03 \pm 0.41 ^d	0.62 \pm 0.11	0.46 \pm 0.13 ^d
绞股蓝组	0.52 \pm 0.05 ^d	1.88 \pm 0.18 ^d	0.70 \pm 0.12	0.40 \pm 0.15 ^d
多烯磷脂酰胆碱组	0.50 \pm 0.03 ^d	1.70 \pm 0.39 ^d	0.69 \pm 0.12	0.36 \pm 0.13 ^d

^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

表 3 各组大鼠肝组织脂肪变性结果比较 ($n = 8$)

分组	脂肪变性程度 (n)				脂肪变性(%)
	-	+	++	+++	
正常组	8	0	0	0	0.0
模型组	0	2	5	1	100.0
葱白高剂量组	5	2	1	0	37.5
葱白中剂量组	6	1	1	0	25.0
葱白低剂量组	3	3	1	1	62.5
绞股蓝组	4	2	2	0	50.0
多烯磷脂酰胆碱组	7	1	0	0	12.5

表 4 各组大鼠肝组织TNF- α 含量比较 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	TNF- α (pg/mL)
正常组	290.36 \pm 78.11
模型组	806.58 \pm 157.32 ^b
高剂量组	445.86 \pm 119.73 ^d
中剂量组	416.77 \pm 94.49 ^d
低剂量组	500.17 \pm 86.84 ^d
绞股蓝组	553.03 \pm 77.86 ^d
多烯磷脂酰胆碱组	437.87 \pm 130.65 ^d

^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

表 5 各组大鼠肝组织MDA和SOD含量比较 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	MDA(nmol/mg \cdot prot)	SOD(U/mg \cdot prot)
正常组	1.24 \pm 0.26	95.67 \pm 3.76
模型组	3.26 \pm 0.66 ^b	49.50 \pm 9.31 ^b
葱白高剂量组	2.46 \pm 0.47 ^d	61.79 \pm 5.72 ^d
葱白中剂量组	2.18 \pm 0.42 ^d	83.03 \pm 7.47 ^{de}
葱白低剂量组	2.29 \pm 0.55 ^d	70.51 \pm 4.84 ^d
绞股蓝组	2.13 \pm 0.57 ^d	66.66 \pm 9.23 ^d
多烯磷脂酰胆碱组	2.05 \pm 0.19 ^d	73.12 \pm 4.87 ^d

^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组; ^e $P < 0.05$ vs 多烯磷脂酰胆碱组。

差异(表2)。

2.3 肝脏病理学变化 光镜下, 正常组大鼠肝脏基本无异常变化, 未见明显脂滴分布。模型组大鼠均出现不同程度的弥漫性肝细胞脂肪变性, 肝细胞发生明显的肿胀, 呈圆形, 细胞质内可见大量的脂肪空泡, 空泡之间界限模糊。少量肝细胞发生坏死(图1, 表3)。

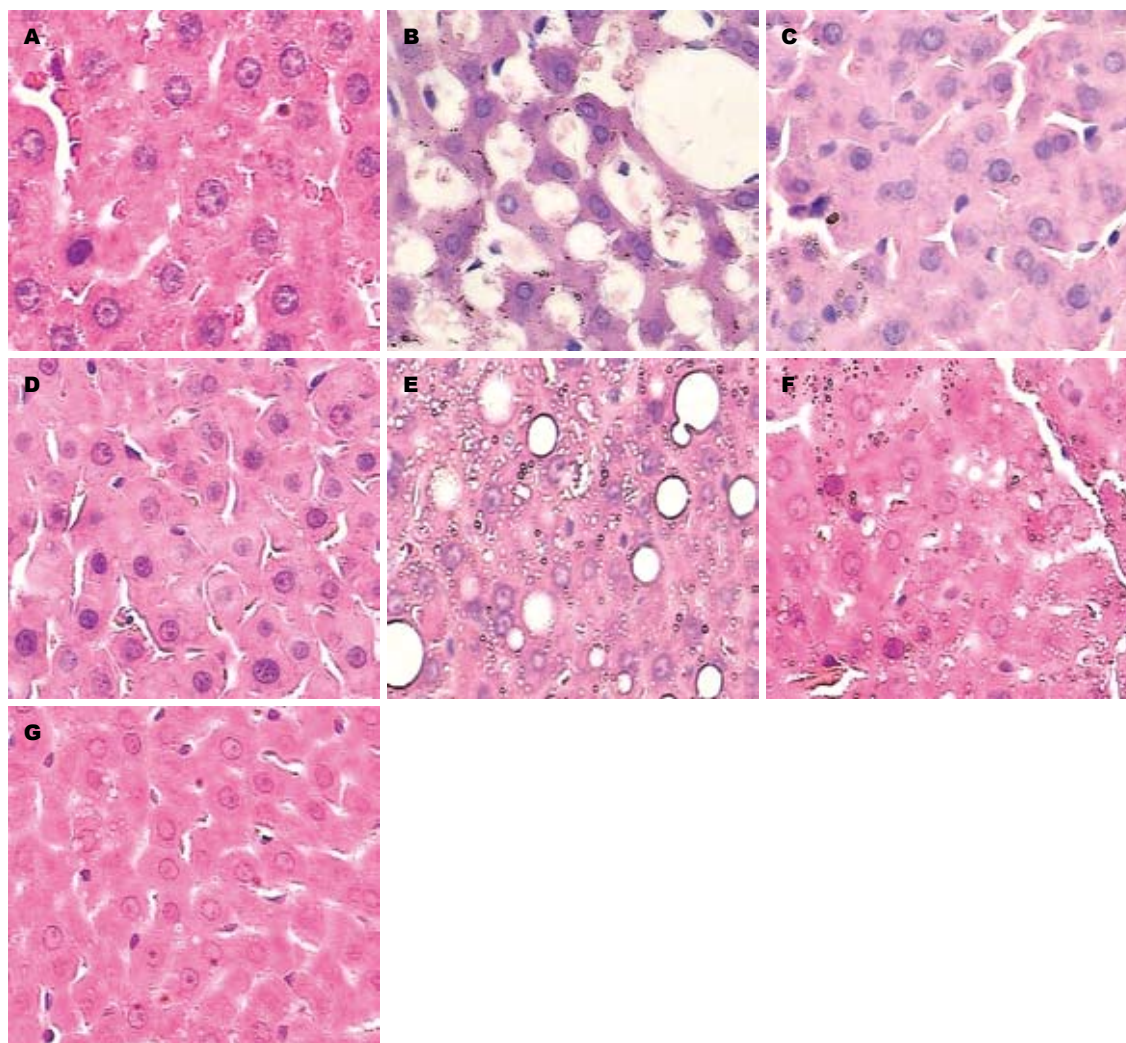
2.4 肝脏TNF- α 含量变化 与正常组比较, 模型组TNF- α 明显升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组TNF- α 均显著下降($P < 0.01$, 表4)。

2.5 肝脏MDA和SOD变化 与正常组比较, 模型组MDA明显升高, SOD则降低($P < 0.01$); 与模型

组比较, 各治疗组MDA降低, SOD升高($P < 0.01$, 表5)。

3 讨论

NAFL是由于过量脂肪向肝细胞内渗透, 堆积形成脂肪浸润变化。目前大多数人认同NAFL发病机制的“二次打击”学说^[10]。“初次打击”主要是胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 他通过促使外周脂肪分解增加和高胰岛素血症引起肝细胞脂肪储积, 并诱使肝细胞对损害因子的敏感性增高; “二次打击”主要是氧应激、脂质



■应用要点

葱白提取物是治疗非酒精性脂肪肝的有效制剂, 对其在脂类代谢等方面的作用机制的研究有助于进一步明确其作用范围, 在临床上推广应用。

图 1 光镜示各组大鼠肝脏细胞(HE × 400). A: 正常组; B: 模型组; C: 葱白高剂量组; D: 葱白中剂量组; E: 葱白低剂量组; F: 绞股蓝组; G: 多烯磷脂酰胆碱组。

过氧化、线粒体解偶联蛋白(TNF- α 的调节基因)表达增加、细胞因子及Fas配体被诱导活化, 从而引起炎症和纤维化。“二次打击”学说强调了NAFL发病机制中线粒体、氧应激、脂质过氧化及细胞防御机制改变的作用及其相互关联的关系^[11-13]。

以脂肪乳灌胃复制出来的NAFL模型, 动物血清中TG、TC含量显著上升, 病理切片也显示肝脏脂质过度沉积, 并且有不同程度的大泡或小泡的脂肪变性, 符合人类NAFL的发病机制^[14,15]。我们进一步采用药物进行治疗, 观察药物对血清脂类物质的影响以及改善脂肪过度堆积的状况。有研究证实, NAFL与血清中TG、TC有密切关系^[16]。正常情况下肝脏在脂类代谢中保持着动态平衡, 一方面摄取游离脂肪酸合成TG, 另一方面又以脂蛋白的形式将TG运入血清中, 如果该动态平衡失调, 脂肪就在肝脏堆积, 形成脂肪肝^[17]。

“二次打击”中的脂质过氧化在NAFL的

发病过程中起着十分重要的作用^[18]。MDA为脂质过氧化最终产物, 可作用于线粒体的膜脂、膜蛋白NH₂, 使膜的流动性降低, 影响膜中酶的活性, 干扰了脂肪酸的 β -氧化, 加重了脂肪在肝内的蓄积, 形成恶性循环; 亦可激活NF- κ B, 他通过调节多种前炎症细胞因子如TNF- α 、IL-8、ICAM-1和E-selectin等引起炎症反应, 他们与蛋白形成复合物后还可妨碍TG的运转^[19]。因此, 测定TNF- α 、MDA可以反映机体内脂质过氧化的程度, 间接反映肝细胞受损的程度; 机体的抗氧化系统分为内源性酶类抗氧化剂和外源性营养抗氧化剂, 两者均具有中和, 减轻活性氧毒性反应的功能。内源性酶类抗氧化剂主要是SOD和过氧化氢等。因此SOD活性的高低直接反应了机体清除脂质过氧化最终产物能力的大小, 局部提高SOD活性可以有效地预防NAFL的进一步发展^[20,21]。

实验结果显示, 模型组大鼠TG、TC水平明

■同行评价

本文选题新颖,具有一定临床参考价值。

显升高,血脂含量异常是导致NAFL发生的主要原因。而模型组大鼠MDA、TNF- α 表达的增加,SOD表达的减少则可能是脂质过氧化最终产物造成肝脏损伤的结果。

NALFD属中医“胁痛”、“积聚”、“痞满”等病范畴,病位虽在肝脏,但阳气不通是其基本病机,气滞血瘀是其病理关键^[22,23]。气血津液的化生和运行依赖于一身阳气的温煦和推动。阳气通则水津四布,五津并行;阳气瘀滞则津聚为痰、血停为瘀^[24,25]。葱白提取物为百合科植物葱的近根部茎萃取处理后的产物,在中医理论中具有性温通阳的作用,能使血清中TG、TC含量减少,进而改善肝脏脂肪过度堆积的状态;降低肝组织中MDA的含量,提高SOD的活性,抑制NAFL的进一步发展,促进肝组织的修复。因此,葱白提取物就是通过调节血清中TG、TC的含量,进而改善脂质代谢,恢复肝脏的功能,维持正常代谢平衡。

与模型组比较,葱白提取物高、中、低3个剂量组大鼠肝组织TNF- α 均有不同程度的下降($P<0.01$),MDA均有不同程度的降低($P<0.01$),SOD有不同程度的升高($P<0.01$);其中葱白高、中、低剂量组对MDA、SOD、TNF- α 作用与多烯磷脂酰胆碱组无明显差异性;葱白中剂量组对SOD的作用优于多烯磷脂酰胆碱组($P<0.05$),这可能与葱白提取物的通阳、和里作用有关,与西医的降脂药有相同的功效。降脂药主要功效仅局限为降低血脂,并且存在着肝毒性、不能恢复肝脏脂类代谢平衡等诸多问题^[26,27]。肝脏脂类代谢失衡属于中医“阳气瘀滞”范畴,应责其阳气不通,而致阴邪阻滞。前期的实验研究表明,葱白对降低血脂、对抗动脉粥样硬化有较好的作用,对肝脏脂类代谢失衡也有一定的改善^[28-30]。

因此,葱白提取物可能通过降低血清中TG、TC的含量来改善脂肪在肝脏过度蓄积的状态;降低肝脏中MDA、TNF- α 的含量,提高SOD的活性,抑制脂质代谢终产物对肝脏的进一步损伤,使肝脏脂质代谢恢复到平衡的状态。从而阻止脂肪肝的进一步发展,达到改善临床症状,治疗NAFL的目的。

4 参考文献

- Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ* 2005; 172: 899-905
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single

- Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- 曾民德. 葡萄糖毒性、脂肪毒性与非酒精性脂肪性肝病. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 81-82
- 范建高. 第二讲非酒精性脂肪肝的临床流行病学研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 106-107
- 范建高, 曾民德. 脂肪性肝病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 200-201
- 常青, 赵立波, 郝建军. 华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠的防治作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 683-685
- 杨坤, 孔华丽, 黄正明. 脂肪肝动物实验模型的方法学研究进展. *解放军药学报* 2005; 21: 374-400
- 江庆澜, 徐邦牢, 杨辉, 聂玉强, 李瑜元. 多烯磷脂酰胆碱对非酒精性脂肪肝大鼠的干预效果. *广州医学院学报* 2005; 33: 4-6
- 钟岚, 范建高, 王国良, 李为真, 吴伟清, 姜军梅. 非酒精性脂肪性肝炎发病机制的实验研究. *中华消化杂志* 2001; 21: 481-484
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 李洁, 王坚. 非酒精性脂肪肝病的研究进展. *东南国防医药* 2008; 10: 280-282
- 何淑梅, 孔俭, 牛俊奇. 非酒精性脂肪性肝病研究现状及进展. *中国老年学杂志* 2008; 28: 725-727
- 黄颖秋. 非酒精性脂肪性肝炎发病机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3181-3188
- 南月敏, 王蕾, 李良宵, 付娜. 非酒精性脂肪肝动物模型研究进展. *河北医科大学学报* 2007; 28: 67-69
- 王倩, 管小琴. 大鼠非酒精性脂肪肝造模方法的改进. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1219-1224
- 葛仁美, 钱开成, 于银坤, 陈万珍. 非酒精性脂肪肝患者血清脂类变化. *检验医学与临床* 2008; 5: 348-349
- 赵树波, 邢国雄, 于娟. 血脂、血糖与血液流变相关性的探讨. *检验医学与临床* 2007; 4: 1047-1048
- George J, Pera N, Phung N, Leclercq I, Yun Hou J, Farrell G. Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *J Hepatol* 2003; 39: 756-764
- 黄妙珍. 脂肪肝脂质过氧化与细胞因子TNF- α 、IGF-1水平的临床观察. *临床肝胆病杂志* 2006; 22: 211-212
- 张晓兰, 张志钢, 海春旭, 王旭霞, 冯国华, 闻勤生. 网络抗氧化剂对大鼠非酒精性脂肪肝模型疗效的动态观察. *现代生物医学进展* 2008; 8: 213-218
- 叶宝华, 王智明, 钟伟华, 卢兵, 陈明远. 穿心莲内酯对大鼠非酒精性脂肪肝的防治作用. *安徽医药* 2008; 12: 582-584
- 李焕荣. 非酒精性脂肪肝的中医药治疗现状. *中华中医药杂志* 2007; 22: 876-878
- 武润梅, 苏娟萍. 非酒精性脂肪肝的中医研究进展. *山西中医* 2008; 24: 52-53
- 张玉宇. 论通阳扶阳的重要性. *光明中医* 2008; 33: 600-601
- 王勇. 论温病救阴与通阳. *中国中医急症* 2008; 17: 199-200
- 王浩, 周岳君. 中医药治疗非酒精性脂肪肝的概况. *医学研究杂志* 2008; 37: 121-122, 134
- 韩雪晶, 曲德伟. 非酒精性脂肪肝病与代谢综合征. *浙江临床医学* 2009; 11: 1066-1067
- 张介眉, 时昭红, 郝建军, 邢飞虹. 搏心通对动脉粥样硬化兔生长调节因子影响的实验研究. *中华中医药杂志* 2005; 20: 692-694
- 柯于鹤, 张介眉, 郝建军, 郭洁, 苏文, 关江锋, 何娟娟. 张介眉运用葱白防治支架术后狭窄研究报告. *山东中医药大学学报* 2008; 32: 213-214
- 时昭红, 张介眉, 郑亚琼, 陈洲, 朱旭, 冯云霞. 鲜葱白提取物对实验性非酒精性脂肪肝的药效作用. *现代消化及介入诊疗* 2009; 14: 137-140

编辑 李军亮 电编 何基才

HMGA1和HMGA2蛋白在食管鳞癌中表达的相关性及其临床病理意义

闫艳琴, 刘红涛, 冯天平, 赵景志, 李晟磊

闫艳琴, 河南省郑州市骨科医院普内科 河南省郑州市 450001
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

冯天平, 赵景志, 河南省军区医院病理科 河南省郑州市 450001
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

闫艳琴, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的研究。

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, 冯天平, 赵景志及刘红涛操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李晟磊提供; 数据分析由刘红涛与李晟磊完成; 本论文写作由闫艳琴, 刘红涛, 冯天平, 赵景志及李晟磊完成。

通讯作者: 李晟磊, 副主任医师, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 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。lsbljys@126.com

电话: 0371-66658175 传真: 0371-66658175

收稿日期: 2010-06-01 修回日期: 2010-08-03

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Clinical pathological significance of HMGA1 and HMGA2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma

Yan-Qin Yan, Hong-Tao Liu, Tian-Ping Feng,
Jing-Zhi Zhao, Sheng-Lei Li

Yan-Qin Yan, Department of Internal Medicine, Zhengzhou Orthopedics Hospital, Zhengzhou 450001, Henan Province, China
Hong-Tao Liu, Laboratory of Cell Biology, Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Tian-Ping Feng, Jing-Zhi Zhao, Department of Pathology, the Military Region in Henan, Zhengzhou 450051, Henan Province, China

Sheng-Lei Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Educational Department of Henan Province, No. 2010A310008

Correspondence to: Sheng-Lei Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lsbljys@126.com

Received: 2010-06-01 Revised: 2010-08-03

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To explore the relationship of the protein expression of high mobility group protein AT-hook 1 (HMGA1) and HMGA2 with the devel-

opment, progression, invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma.

METHODS: Sixty-two patients with esophageal squamous cell carcinoma treated at Anyang Tumor Hospital from February 2006 to March 2006 were included in this study. Immunohistochemistry was used to detect the protein expression of HMGA1 and HMGA2 in 62 esophageal squamous cell carcinoma specimens, 31 tumor adjacent atypical hyperplastic epithelial specimens, and 62 normal esophageal epithelial specimens.

RESULTS: The expression of HMGA1 protein was closely correlated with tumor grade, infiltration, lymphatic metastasis and TNM grade in esophageal squamous cell carcinoma ($\chi^2 = 6.649, 6.175, 5.921$ and 11.341 , respectively; all $P < 0.05$). The positive rates of HMGA1 protein expression in normal esophageal epithelium, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and carcinoma were 8.1% ($5/62$), 58.1% ($18/31$) and 69.4% ($43/62$), respectively, with a significant difference among the three groups ($\chi^2 = 51.429, P < 0.01$). The expression of HMGA2 protein was closely correlated with lymphatic metastasis and TNM grade in esophageal squamous cell carcinoma ($\chi^2 = 8.276$ and 17.851 , respectively; both $P < 0.05$). The positive rates of HMGA2 protein expression in normal esophageal epithelium, tumor-adjacent atypical hyperplastic epithelium and carcinoma were 71.0% ($44/62$), 48.4% ($15/31$) and 4.8% ($3/62$), respectively, with a significant difference among the three groups ($\chi^2 = 57.621, P < 0.01$). There is a positive correlation between the protein expression of HMGA1 and HMGA2 ($\gamma_p = 0.346, P = 0.006$).

CONCLUSION: HMGA1 and HMGA2 play an important role in the carcinogenesis, infiltration and metastasis of esophageal carcinoma. Combined detection of HMGA1 and HMGA2 expression may be used as a molecular parameter for early diagnosis and prognostic evaluation of esophageal squamous cell carcinoma.

Key Words: High mobility group protein AT-hook 1;

■背景资料

HMGA家族包括HMGA1及HMGA2两大类蛋白,二者均参与了细胞生长,分化和转化等过程,他们有结构转录因子的功能,同时还参与了多条途径的靶基因启动因子结构的激活,并参与了多种人体的不同细胞的分化进程。

■同行评议者

纪小龙,教授,武警总医院纳米医学研究所

■研究前沿

目前,关于HMGA1、HMGA2基因与食管癌浸润、转移的关系及HMGA1、HMGA2表达相关性的研究,迄今国内外均未见报道.关于HMGA1及HMGA2与恶性肿瘤关系的研究已成为热点.

High mobility group protein AT-hook 2; Esophageal squamous cell carcinoma; Immunohistochemistry; Invasion and metastasis

Yan YQ, Liu HT, Feng TP, Zhao JZ, Li SL. Clinical pathological significance of HMGA1 and HMGA2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2869-2873

摘要

目的: 探讨HMGA1及HMGA2的表达与食管癌发生、发展及浸润、转移的关系.

方法: 62例食管癌手术切除标本于2006-02-26/03-16取自食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院.应用免疫组织化学SP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RECK及MMP-9蛋白的表达.

结果: 食管鳞癌组织中HMGA1蛋白表达与癌的组织学分级、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期均密切相关($\chi^2 = 6.649, 6.175, 5.921, 11.341$, 均 $P < 0.05$);在食管鳞癌癌变过程中HMGA1蛋白在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次增高,分别为8.1%(5/62)、58.1%(18/31)、69.4%(43/62),组间比较有明显差异($\chi^2 = 51.429, P < 0.01$);HMGA2蛋白表达与癌的淋巴结转移及TNM分期密切相关($\chi^2 = 8.276, 17.851$, 均 $P < 0.05$);HMGA2蛋白在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次增高,分别为71.0%(44/62)、48.4%(15/31)、4.8%(3/62),组间比较有明显差异($\chi^2 = 57.621, P < 0.01$),HMGA1及HMGA2的表达呈正相关关系($\gamma_p = 0.346, P = 0.006$).

结论: HMGA1及HMGA2蛋白在食管鳞癌组织中表达显著下降,并与食管鳞癌生物学行为关系密切,提示HMGA1及HMGA2低表达与食管鳞癌的发生、发展有关, HMGA1及HMGA2可作为食管鳞癌早期诊断和判断预后的辅助指标.

关键词: 高迁移率族蛋白A1; 高迁移率族蛋白A2; 食管鳞癌; 免疫组织化学; 浸润转移

闫艳琴, 刘红涛, 冯天平, 赵景志, 李晟磊. HMGA1和HMGA2蛋白在食管鳞癌中表达的相关性及其临床病理意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18(27): 2869-2873

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2869.asp>

0 引言

高迁移率族蛋白(high mobility group protein,

HMG)起初是在牛胸腺细胞内被发现的,是细胞核内的一种强水溶性的,在聚丙烯酰胺凝胶电泳过程中表现出很高迁移率的一类小分子蛋白质. HMG是其家族成员之一,其又可分为HMGA1及HMGA2两个家族成员.研究表明HMG家族成员,尤其是HMGA1及HMGA2均参与了多种肿瘤有关基因的转录调控^[1-3],与乳腺癌、皮肤癌及卵巢癌等多种恶性癌变的发生密切相关^[4-6].有关HMGA1及HMGA2与食管癌浸润转移的关系及二者表达相关性的研究,迄今国内外均未见报道.我们采用了免疫组织化学SP法系统地检测了HMGA1及HMGA2基因在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的表达,探讨HMGA1及HMGA2在食管癌演变过程中的作用,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 62例食管癌手术切除标本于2006-02-26/03-16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.其中男36例,女26例,年龄38-75(平均60.6±9.5)岁.全部病理组织学证实均为鳞状细胞癌.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.浸润深度分两组,浸达浅层者(包括黏膜层、黏膜下层及浅肌层)7例,浸达深者(包括深肌层及纤维膜).全部样本分别在癌灶、癌旁3 cm以内及远端正常黏膜组织3处取材,经40 g/L多聚甲醛液固定,常规脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚度4-6 μm,分别用于HE和免疫组织化学染色.兔抗入HMGA1多克隆抗体及鼠抗人HMGA2单克隆抗体均购自英国Abcam公司产品,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, HMGA1及HMGA2单抗稀释,稀释倍数分别为1:200和1:230, 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,阳性对照为已知的HMGA1及HMGA2阳性的乳腺癌组织切片.

1.2.2 结果判定: HMGA1及HMGA2蛋白阳性信号均呈棕黄色颗粒样物质,主要位于细胞核内.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^[7,8]. (1)按阳性细胞数占同类细胞数的百分比, <30%为1分, 30%-70%为2分,

表 1 HMGA1及HMGA2在食管鳞癌组织、非典型增生及正常黏膜组织中的表达

	HMGA1						HMGA2				
	<i>n</i>	−(<i>n</i>)	+(<i>n</i>)	阳性率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	−(<i>n</i>)	+(<i>n</i>)	阳性率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
正常黏膜上皮组织	62	57	5	8.1	51.429	0.000	59	3	4.8	57.621	0.000
非典型增生组织	31	13	18	58.1			16	15	48.4		
鳞癌组织	62	19	43	69.4			18	44	71.0		

表 2 HMGA1及HMGA2蛋白表达与食管鳞癌临床生物学行为的关系

病理特征	HMGA1				HMGA2		
	<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	7(46.7)	6.649	0.036	11(73.3)	0.181	0.914
Ⅱ	25	17(68.0)			17(68.0)		
Ⅲ	22	19(86.4)			16(72.7)		
浸润深度							
浅层	7	2(28.6)	6.175	0.013	4(57.1)	0.732	0.392
深层	55	41(74.5)			40(72.7)		
淋巴结转移							
无	42	25(59.5)	5.921	0.015	25(54.2)	8.276	0.004
有	20	18(90.0)			19(85.7)		
TNM分期							
Ⅰ、Ⅱ	26	12(46.2)	11.341	0.001	11(42.3)	17.851	0.000
Ⅲ、Ⅳ	36	31(86.1)			33(91.7)		

■创新盘点

本文首次采用免疫组织化学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HMGA1及HMGA2蛋白的表达情况。

>70%为3分; (2)按切片中细胞着色深浅评分: 0分, 细胞无显色; 1分, 浅黄色; 2分, 棕黄色; 3分, 棕褐色。取(1)(2)两项评分的乘积作为总积分, 0-1分为阴性(-), >1分为阳性(++)。

统计学处理 应用SPSS13.0统计学软件, 采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HMGA1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 HMGA1蛋白阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞核中, 呈浅黄色至深黄色颗粒(图1)。在食管鳞癌癌变过程中HMGA1蛋白表达在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次增高, 分别为8.1%(5/62)、58.1%(18/31)、69.4%(43/62), 组间比较有明显差异($\chi^2 = 51.429$, $P < 0.01$, 表1)。HMGA1蛋白表达与食管鳞癌组织学分级、浸润深度、淋巴结转移及TNM分期均有关($\chi^2 = 6.649, 6.175, 5.921$ 及 11.341 , 均 $P < 0.05$, 表2)。

2.2 HMGA2蛋白在食管鳞癌中的表达及其与临床生物学行为的关系 HMGA2蛋白阳性着色定位于细胞核, 呈棕黄色或深黄色颗粒(图2)。在食管鳞

癌癌变过程中HMGA2蛋白在正常黏膜组织、癌旁不典型增生组织及癌组织中的表达率依次升高, 分别为71.0%(44/62)、48.4%(15/31)、4.8%(3/62), 组间比较有明显差异($\chi^2 = 57.621$, $P < 0.01$, 表1)。HMGA2蛋白表达与食管鳞癌组织的组织学分级及浸润深度无关, 组间比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.181, 0.732$, 均 $P > 0.05$), HMGA2蛋白阳性表达率与癌组织的淋巴结转移及TNM分期密切相关($\chi^2 = 8.276$ 及 17.851 ; 均 $P < 0.05$, 表2)。

2.3 HMGA1及HMGA2在食管鳞癌组织中表达的相关性分析 在62例食管鳞癌组织中, HMGA1阳性表达43例中, 其HMGA2蛋白表达阳性占35例, 而HMGA1表达阴性的29病例中, 其HMGA2蛋白表达阴性的占10例。HMGA1及HMGA2蛋白在食管鳞癌组织中的表达呈正相关关系($\gamma_p = 0.346$, $P = 0.006$, 表3)。

3 讨论

HMG是一种染色体相关蛋白, 广泛存在于真核细胞内, 通常以其相对分子质量的大小、DNA结合的特异性及序列不同被研究者分为3个家

■应用要点

HMGA1及HMGA2可能共同参与了食管鳞癌浸润转移的过程,在食管鳞癌发生发展过程中可能起协同作用.联合检测HMGA1及HMGA2蛋白的表达有利于进一步地了解食管癌的生物学行为,为食管鳞癌的早期诊断和治疗提供新的途径.

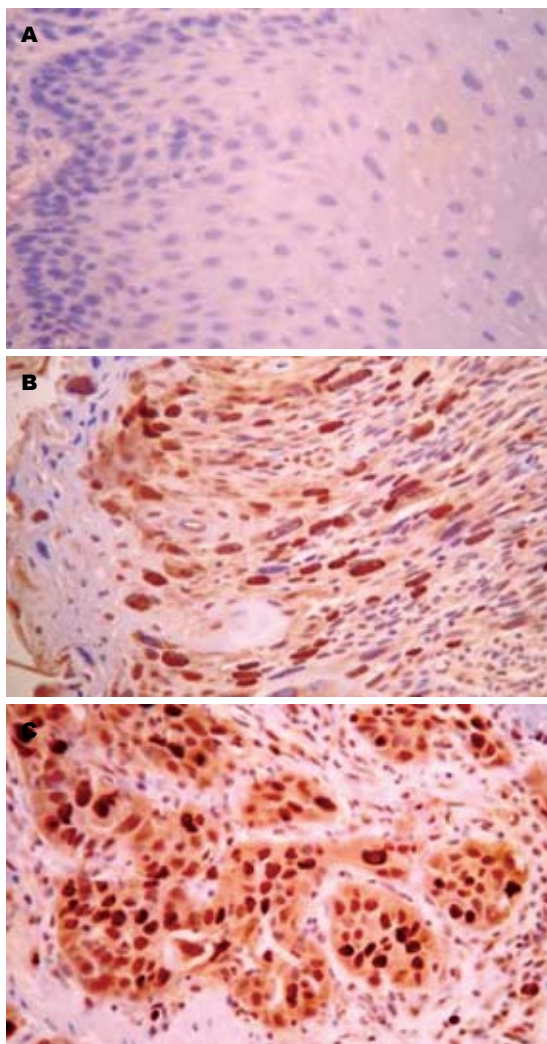


图1 HMGA1的表达(SP×200). A: 正常黏膜; B: 癌旁组织; C: 癌组织.

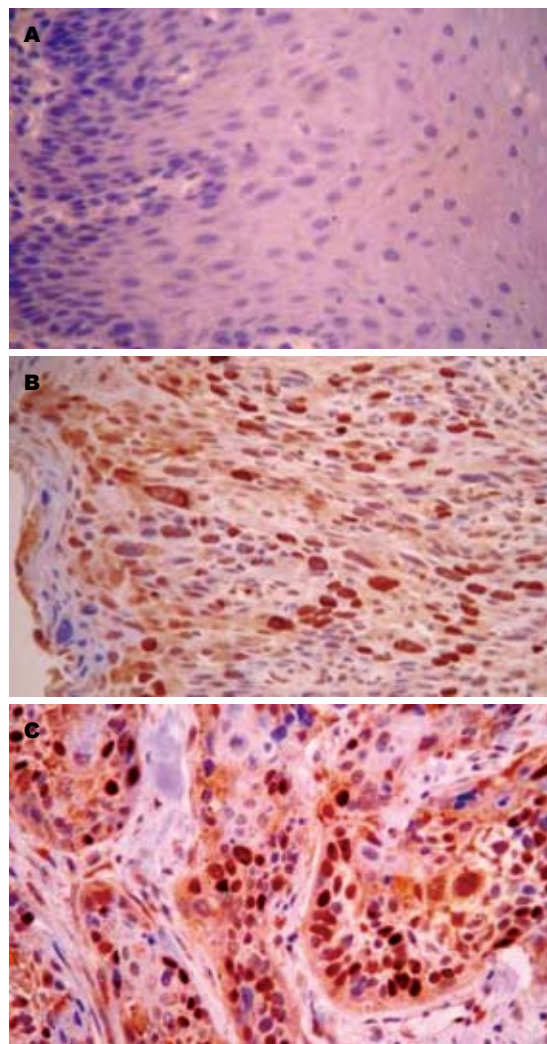


图2 HMGA2的表达(SP×200). A: 正常黏膜; B: 癌旁组织; C: 癌组织.

表3 HMGA1及HMGA2在食管鳞癌组织中表达的相关性分析

HMGA1	n	HMGA2(n)		γ_p 值	P值
		+	-		
+	43	35	8	0.346	0.006
-	19	9	10		

族成员,包括HMGB、HMGN及HMGA,其中HMGA与恶性肿瘤的关系十分密切. HMGA家族包括HMGA1及HMGA2两大类蛋白,二者均参与了包括细胞生长,分化和转化等过程,有结构转录因子的功能,同时还参与了多条途径的靶基因启动因子结构的激活并参与多种人体的不同细胞的分化进程.可诱导肿瘤细胞的生长和迁移,参与肿瘤细胞的演变过程^[9-13]. HMGA1是一种相对分子质量大约为10 000 Da,位于6p21,有4个转录外显子及4个增

强区域; HMGA2位于12q14-15,有5个外显子^[14-16]. HMGA1与HMGA2蛋白序列基本相似,相对分子质量大小相差无几,其特征性结构3个碱性的八肽DNA结合基序和1个酸性的C末端几乎完全相同.这3个DNA结合基序都能与DNA分子小沟内的A-T丰富区优先结合,因而被称为A-T hooks. A-T hooks的核心结构能诱导DNA分子空间结构发生变化如弯曲、拉直等,从而发挥调节基因转录的作用^[17,18]. 通常情况下, HMGA主要存在于胚胎发育期及处于快速增殖的细胞内,而在分化成熟的组织内几乎没有表达,近期的研究结果显示HMGA可能与恶性肿瘤的复发、侵袭、转移及预后关系密切^[1-3]. 目前的研究还发现HMGA参与了许多基因转录的调节,例如HMGA1与P53家族转录因子寡聚化区域直接发生作用,阻止正常寡聚化及DNA结合,进一步抑制其转录及抑癌活性,并抑制凋亡.许多生物、环境和转录因子可诱导HMGA1基因的表

达, 如TPA、FGF、转化TGF- α 、缺氧以及转录因子AP-1、c-Myc. 有趣的是这其中许多刺激因子也可诱导HMGA2基因的表达, 其5'端启动/增强区域较HMGA1基因有更为简单的结构, 就HMGA2基因来说, PI3K、Ras/MAP激酶和缺氧刺激信号传导通路则是更强的刺激物. 这都充分说明了HMGA与肿瘤的进展、转移及凋亡过程密切相关^[19-21].

本研究结果显示, HMGA1及HMGA2在食管鳞癌组织中的表达远高于其在相对应的癌旁不典型增生组织及正常食管黏膜内, 说明HMGA1及HMGA2高表达的食管鳞癌具有更强的侵袭能力. HMGA1与食管鳞癌的组织学分级、TNM分期、浸润深度及有无淋巴结转移密切相关, HMGA2与TNM分期及有无淋巴结转移密切相关, 提示二者可能共同参与了食管鳞癌浸润转移的过程. HMGA1及HMGA2蛋白表达呈正相关关系, 提示了二者在食管鳞癌发生发展过程中可能起到了协同作用. 联合检测HMGA1及HMGA2蛋白的表达有利于我们进一步地了解食管癌的生物行为, 为食管鳞癌的早期诊断和治疗提供一个新的途径.

4 参考文献

- Lyngaard C, Stemmer C, Stensballe A, Graf M, Gorr G, Decker E, Grasser KD. Physcomitrella HMGA-type proteins display structural differences compared to their higher plant counterparts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 653-657
- Di Cello F, Hillion J, Hristov A, Wood LJ, Mukherjee M, Schuldenfrei A, Kowalski J, Bhattacharya R, Ashfaq R, Resar LM. HMGA2 participates in transformation in human lung cancer. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 743-750
- Strichman-Almashanu LZ, Bustin M, Landsman D. Retroposed copies of the HMG genes: a window to genome dynamics. *Genome Res* 2003; 13: 800-812
- Laezza C, Malfitano AM, Proto MC, Esposito I, Gazzero P, Formisano P, Pisanti S, Santoro A, Caruso MG, Bifulco M. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity and of Ras farnesylation mediate antitumor effects of anandamide in human breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: 495-503
- Sharma A, Ray R, Rajeswari MR. Overexpression of high mobility group (HMG) B1 and B2 proteins directly correlates with the progression of squamous cell carcinoma in skin. *Cancer Invest* 2008; 26: 843-851
- Mahajan A, Liu Z, Gellert L, Zou X, Yang G, Lee P, Yang X, Wei JJ. HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol* 2010; 23: 673-681
- 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
- Pogna EA, Clayton AL, Mahadevan LC. Signalling to chromatin through post-translational modifications of HMGN. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799: 93-100
- Tecle E, Zielinski L, Kass DH. Recent integrations of mammalian Hmg retropseudogenes. *J Genet* 2006; 85: 179-185
- Rahman MM, Qian ZR, Wang EL, Sultana R, Kudo E, Nakasono M, Hayashi T, Kakiuchi S, Sano T. Frequent overexpression of HMGA1 and 2 in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours and its relationship to let-7 downregulation. *Br J Cancer* 2009; 100: 501-510
- Franco R, Esposito F, Fedele M, Liguori G, Pierantoni GM, Botti G, Tramontano D, Fusco A, Chieffi P. Detection of high-mobility group proteins A1 and A2 represents a valid diagnostic marker in post-pubertal testicular germ cell tumours. *J Pathol* 2008; 214: 58-64
- Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, Kuosma E, Sioris T, Salo J, Karjalainen A, Knuutila S, Anttila S. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol* 2006; 209: 206-212
- Medeiros F, Araujo AR, Erickson-Johnson MR, Kashyap PC, Dal Cin P, Nucci M, Wang X, Bell DA, Oliveira AM. HMGA1 and HMGA2 rearrangements in mass-forming endometriosis. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 630-634
- Liu Y, Shete S, Etzel CJ, Scheurer M, Alexiou G, Armstrong G, Tsavachidis S, Liang FW, Gilbert M, Aldape K, Armstrong T, Houlston R, Hosking F, Robertson L, Xiao Y, Wiencke J, Wrensch M, Andersson U, Melin BS, Bondy M. Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2467-2474
- Ahmed KM, Tsai CY, Lee WH. Derepression of HMGA2 via removal of ZBRK1/BRCA1/ChP complex enhances mammary tumorigenesis. *J Biol Chem* 2010; 285: 4464-4471
- Pierantoni GM, Rinaldo C, Esposito F, Mottolese M, Soddu S, Fusco A. High Mobility Group A1 (HMGA1) proteins interact with p53 and inhibit its apoptotic activity. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1554-1563
- Cleynen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debiec-Rychter M, Sciort R, Van de Ven WJ, Petit MM. HMGA2 regulates transcription of the Imp2 gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 363-372
- Dhar A, Hu J, Reeves R, Resar LM, Colburn NH. Dominant-negative c-Jun (TAM67) target genes: HMGA1 is required for tumor promoter-induced transformation. *Oncogene* 2004; 23: 4466-4476
- Liau SS, Jazag A, Whang EE. HMGA1 is a determinant of cellular invasiveness and in vivo metastatic potential in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2006; 66: 11613-11622
- Biswas A, Bhattacharya S, Dasgupta S, Kundu R, Roy SS, Pal BC, Bhattacharya S. Insulin resistance due to lipid-induced signaling defects could be prevented by mahanine. *Mol Cell Biochem* 2010; 336: 97-107

■同行评价

本研究有一定得参考价值, 但学术价值一般.

β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9、Bmi-1与食管鳞癌预后的关系

吕进, 曹秀峰, 纪律, 朱斌, 陶磊, 王冬冬

■背景资料

在食管癌的临床诊治过程中, 经典的TNM病理分期系统起着重要作用, 但由于肿瘤异质性和个体的不同, 在临床应用中并不能完全准确反映患者病情的进展程度。寻找新的肿瘤标志物和判断预后的分子指标, 作为TNM病理分期系统的有益补充, 对指导个体治疗和评价预后将很有帮助。

吕进, 曹秀峰, 纪律, 朱斌, 陶磊, 王冬冬, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤外科 南京医科大学肿瘤中心 江苏省南京市 210006

吕进, 肿瘤学硕士, 主治医师, 主要从事胸腹部肿瘤以手术为主的综合治疗的临床研究。

南京市医学发展重点基金资助项目, No. ZKX0114

作者贡献分布: 此课题由曹秀峰与吕进设计; 研究过程由吕进、纪律、朱斌、陶磊及王冬冬操作完成; 研究所用试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由吕进及纪律完成; 本论文写作由吕进完成。

通讯作者: 曹秀峰, 教授, 博士生导师, 主任医师, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤外科, 南京医科大学肿瘤中心。 cxf551101@sina.com

收稿日期: 2010-06-17 修回日期: 2010-08-04

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-28

Relationship of β -catenin, Wnt1, Smad4, Hoxa9 and Bmi-1 expression with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma

Jin Lv, Xiu-Feng Cao, Lv Ji, Bin Zhu, Lei Tao, Dong-Dong Wang

Jin Lv, Xiu-Feng Cao, Lv Ji, Bin Zhu, Lei Tao, Dong-Dong Wang, Department of Oncological Surgery, Affiliated Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University; Oncology Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Supported by: The Grant from the Key Development Programs of Nanjing Medical Foundation, No. ZKX0114

Correspondence to: Professor Xiu-Feng Cao, Department of Oncological Surgery, Affiliated Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University; Oncology Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. cxf551101@sina.com

Received: 2010-06-17 Revised: 2010-08-04

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the association of β -catenin, Wnt1, Smad4, Hoxa9 and Bmi-1 expression with the prognosis and clinicopathologic characteristics of patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: Seventy paraffin-embedded ESCC specimens collected at Nanjing First Hospital from July 2002 to December 2003 were studied. The mRNA and protein expression of β -catenin,

Wnt1, Smad4, Hoxa9 and Bmi-1 in these specimens was detected by real-time quantitative RT-PCR and immunohistochemistry. The correlation between the expression of these markers with the prognosis and clinicopathologic characteristics of ESCC patients was then analyzed.

RESULTS: The mRNA expression levels of β -catenin, Wnt1, Smad4, Hoxa9 and Bmi-1 in ESCC were significantly higher than those in tumor-adjacent non-cancerous tissue (0.0821 ± 0.0416 vs 0.0185 ± 0.0201 , $P = 0.0000$; 1.9934 ± 1.9888 vs 0.8863 ± 0.665 , $P = 0.0184$; 0.0298 ± 0.0215 vs 0.0189 ± 0.0187 , $P = 0.0017$; 2.098 ± 0.091 vs 1.016 ± 0.078 , $P = 0.0000$; 2.181 ± 2.158 vs 0.931 ± 0.894 , $P = 0.0152$). The protein expression levels of β -catenin, Wnt1, Smad4, Hoxa9 and Bmi-1 in ESCC were also significantly higher than those in tumor-adjacent non-cancerous tissue (0.2835 ± 0.0844 vs 0.2352 ± 0.0670 , $P = 0.0003$; 0.3830 ± 0.0947 vs 0.2721 ± 0.1474 , $P = 0.0000$; 0.2637 ± 0.0348 vs 0.2042 ± 0.0180 , $P = 0.0000$; 0.2058 ± 0.0316 vs 0.1218 ± 0.0518 , $P = 0.0000$; 0.2736 ± 0.0834 vs 0.2251 ± 0.0571 , $P = 0.0001$). Except for Smad4, the mRNA and protein levels of all the other markers were closely associated with pathological stage and lymph node metastasis in ESCC patients (all $P < 0.05$). The protein level of Hoxa9 was not associated with the prognosis of ESCC ($P > 0.05$). The hypo-expression of Smad4 mRNA was closely associated with advanced pathological stage, lymph node metastasis and prognosis in patients with ESCC (all $P < 0.05$). The Smad4 protein expression level was associated with pathological stage ($P < 0.05$), but not with prognosis and lymph node metastasis ($P > 0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that the prognostic factors for ESCC patients included positive protein expression of β -catenin, Wnt1 or Bmi-1 ($\chi^2 = 17.65$, $P = 0.0072$).

CONCLUSION: The prognosis of ESCC patients with Wnt1/ β -catenin and Bmi-1 overexpression is relatively poor. The levels of Wnt1/ β -catenin and Bmi-1 are conversely correlated with advanced pathological stage and lymph node

■同行评议者

张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

metastasis in ESCC. Although the mRNA expression levels of Smad4 and Hoxa9 are also associated with prognosis, pathological stage and lymph node metastasis in ESCC patients, they might not be independent prognostic factors for ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; β -catenin; Wnt-1; Bmi-1; Smad4; Hoxa9; Prognosis; Clinical pathology

Lv J, Cao XF, Ji L, Zhu B, Tao L, Wang DD. Relationship of β -catenin, Wnt1, Smad4, Hoxa9 and Bmi-1 expression with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2874-2883

摘要

目的: 探讨 β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9、Bmi-1基因与食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)预后及临床病理的关系。

方法: 从南京医科大学附属第一医院2002-07/2003-12 106例ESCC石蜡标本中随机选取70例。运用免疫组织化学及实时定量PCR检测70例ESCC患者肿瘤切除石蜡标本中待测基因的mRNA及蛋白表达水平, 统计学分析其与ESCC预后及临床病理的关系。

结果: ESCC中的 β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9、Bmi-1 mRNA表达水平明显高于癌旁组织(0.0821 ± 0.0416 vs 0.0185 ± 0.0201 , $P = 0.0000$; 1.9934 ± 1.9888 vs 0.8863 ± 0.6658 , $P = 0.0184$; 0.0298 ± 0.0215 vs 0.0189 ± 0.0187 , $P = 0.0017$; 2.098 ± 0.091 vs 1.016 ± 0.078 , $P = 0.0000$; 2.181 ± 2.158 vs 0.931 ± 0.894 , $P = 0.0152$)。ESCC中的 β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9、Bmi-1的蛋白水平明显高于癌旁组织(0.2835 ± 0.0844 vs 0.2352 ± 0.0670 , $P = 0.0003$; 0.3830 ± 0.0947 vs 0.2721 ± 0.1474 , $P = 0.0000$; 0.2637 ± 0.0348 vs 0.2042 ± 0.0180 , $P = 0.0000$; 0.2058 ± 0.0316 vs 0.1218 ± 0.0518 , $P = 0.0000$; 0.2736 ± 0.0834 vs 0.2251 ± 0.0571 , $P = 0.0001$)。除Smad4外, 待测基因mRNA及蛋白质表达水平均与病理分期和淋巴结转移相关(均 $P < 0.05$), 高表达者预后较差(均 $P < 0.05$), 但Hoxa9蛋白质表达水平与预后无关($P > 0.05$)。Smad4 mRNA表达水平与病理分期和淋巴结转移相关(均 $P < 0.05$), mRNA低水平表达者预后欠佳(均 $P < 0.05$); 蛋白质表达水平与病理分期有关($P < 0.05$), 但与淋巴结转移无关($P > 0.05$), 与患者预后无关($P > 0.05$)。Logistic多因素分析显示预后有关的因素有 β -catenin、Wnt1、Bmi-1表达阳性或Wnt1及 β -catenin二者表达阳性者或Wnt1、 β -catenin、Bmi-1三

者表达阳性者($\chi^2 = 17.65$, $P = 0.0072$)。

结论: Wnt1/ β -catenin、Bmi-1高表达者预后不佳, 表达水平与ESCC临床病理分期、淋巴结转移呈逆相关; Smad4、Hoxa9 mRNA表达水平虽与ESCC预后及临床病理分期、淋巴结转移相关, 但可能不是独立的预后因素。

关键词: 食管鳞癌; β -catenin; Wnt-1; Bmi-1; Smad4; Hoxa9; 预后; 临床病理

吕进, 曹秀峰, 纪律, 朱斌, 陶磊, 王冬冬. β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9、Bmi-1与食管鳞癌预后的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18(27): 2874-2883

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2874.asp>

0 引言

食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是世界上常见的恶性肿瘤之一, 居癌症死亡第7位, 具有一定的地域相关性^[1]。在食管癌的临床诊治过程中, 经典的TNM病理分期系统起着重要作用, 但由于肿瘤异质性和个体的不同在临床应用中并不能完全准确反映患者病情的进展程度。寻找新的肿瘤标志物和判断预后的分子指标, 作为TNM病理分期系统的有益补充, 对指导个体治疗和评价预后将很有帮助。目前除了环境因素的影响, 有关ESCC的分子生物学研究已受到世界广泛关注, 但仍有众多分子机制作用很不明朗。

前期研究我们通过人癌通路发现者基因芯片和肿瘤信号转导基因芯片筛选出ESCC和正常食管黏膜组织中差异表达增高2倍以上的基因 β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9及Bmi-1^[2]。在此基础上, 本研究通过实时定量PCR(Real-time PCR, RT-PCR)和免疫组织化学进一步探讨ESCC组织中这些基因的mRNA、蛋白质表达水平及其与临床病理、预后之间的关系, 判断这些基因在ESCC诊治方面应用的前景。

1 材料和方法

1.1 材料 从南京医科大学附属第一医院2002-07/2003-12 106例ESCC石蜡标本中随机选取70例用于免疫组织化学及RT-PCR检测(包括肿瘤组织和癌旁组织标本), 患者的一般资料见表1。患者术前均通过食管内镜活检确诊, 未经其他术前治疗。所有患者均给予根治性手术。术后标本根据2002年美国癌症分期联合委员会(American Joint Committee on Cancer Staging, AJCC)制定的

■研究前沿

目前除了环境因素的影响, 有关ESCC的分子生物学研究已受到世界广泛的关注, 但仍有众多分子机制作用很不明朗。

■相关报道

Osterheld等报道食管癌的 β -catenin异常表达率为61%, β -catenin异常表达与病理分化、淋巴结转移无关, β -catenin异常表达与较好预后相关。

肿瘤大小, 淋巴结及其转移率的病理级别(pathological grade of tumor size and lymph node and metastasis, PTNM)分期标准进行分期^[3]。术后患者通过电话或门诊获得随访。70例患者随访时间为术后至2009-10-31, 中位生存期为42.0(8-84) mo, 4例失访(5.7%)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR: 从70例ESCC石蜡切片中提取总RNA, 纯化, 合成cDNA, 设计待测基因双向引物(表2)。标记后进行RT-PCR反应。待测基因mRNA模板拷贝数以 β -actin为内参得出校正后的mRNA表达的相对值^[4]。

1.2.2 免疫组织化学SABC法: 制成4 μ m厚的石蜡切片。一抗+生物素标记二抗+滴加试剂SABC(链霉卵白素+辣根酶标记生物素)+辣根酶底物显色。脱水、透明、封固。每张切片吸光度的平均值记为蛋白质表达水平。

统计学处理 应用stata10.0软件。临床参数之间的比较采用 t 检验、方差分析、卡方检验和Fisher's确切概率法。Kaplan-Meier和Log-rank分析生存率。双侧 $P < 0.05$ 有显著统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR相关结果

2.1.1 RT-PCR检测结果: Wnt1、 β -catenin、Bmi-1、Smad4及Hoxa9 RT-PCR的扩增曲线及标准曲线见图1。

2.1.2 食管癌相关基因与ESCC临床资料及病理分期之间的关系: ESCC组织中 β -catenin、Wnt1、Smad4、Bmi-1及Hoxa9的mRNA表达水平明显高于癌旁非癌组织。mRNA表达水平与性别、年龄无关($P > 0.05$), 但均与淋巴结转移、病理分期密切相关($P < 0.05$, 表3)。

2.1.3 食管癌相关基因mRNA的表达水平与ESCC患者预后的关系: β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9及Bmi-1 mRNA的中位表达水平分别为: 0.0385、0.166、0.0118、1.3、0.5935。以其为参考值, 高于参考值的为高表达组, 反之为低表达组。 β -catenin、Wnt1、Bmi-1及Hoxa9 mRNA高表达者预后较差, Smad4 mRNA低表达者预后较差(图2)。

2.2 免疫组织化学检测结果

2.2.1 食管癌相关基因与临床资料及病理分期之间的关系: ESCC组织中 β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9及Bmi-1的蛋白表达水平较癌旁非癌组织明显高表达(图3)。蛋白表达水平与

表 1 70例ESCC患者的一般资料

一般特性	患者资料
年龄(中位年龄, 岁)	38-82(60)
性别 n (%)	
男	51(72.9)
女	19(27.1)
肿瘤分段 n (%)	
颈段	3(4.3)
上胸段	13(18.6)
中胸段	39(55.7)
下胸段	15(21.4)
肿瘤长度(中位数, mm)	10-90(44)
AJCC分期 n (%)	
I-II期	56(80.0)
III-IV期	14(20.0)
淋巴结转移 n (%)	
无淋巴结转移	25(35.7)
有淋巴结转移	45(64.3)
细胞分化 n (%)	
高分化	12(17.2)
中分化	43(61.4)
低分化	15(21.4)

性别、年龄无关($P > 0.05$), 但均和病理分期密切相关($P < 0.05$)。除Smad4蛋白表达水平与淋巴结转移无关外($P > 0.05$), 其余均与淋巴结转移相关($P < 0.05$, 表4)。

2.2.2 食管癌相关基因的蛋白表达水平与ESCC患者预后的关系: β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9及Bmi-1蛋白的中位表达水平分别为: 0.2491、0.3784、0.2293、0.1734、0.2382, 以其为参考, 将患者分为高表达组和低表达组。 β -catenin、Wnt1及Bmi-1高表达组预后较差, Smad4、Hoxa9分析无统计学意义($P > 0.05$, 表5)。

2.2.3 食管癌相关基因蛋白表达联合检测结果及与预后之间的关系: 以癌组织中目标蛋白染色强于或等同于非癌组织染色为阳性, 以癌组织中目标蛋白染色弱于非癌组织或无染色为阴性。对70例ESCC患者 β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9及Bmi-1蛋白表达与预后之间的关系通过Logistic回归分析进行多因素分析, 得出与预后有关的因素有 β -catenin、Wnt1、Bmi-1、Wnt1及 β -catenin二者表达阳性或Wnt1、 β -catenin及Bmi-1三者表达阳性(总 $\chi^2 = 17.65$, $P = 0.0072$, 表6)。

3 讨论

根据作用机制和发挥功能的不同, Wnt信号通路分为典型和非典型两种通路, 均由细胞外的Wnt

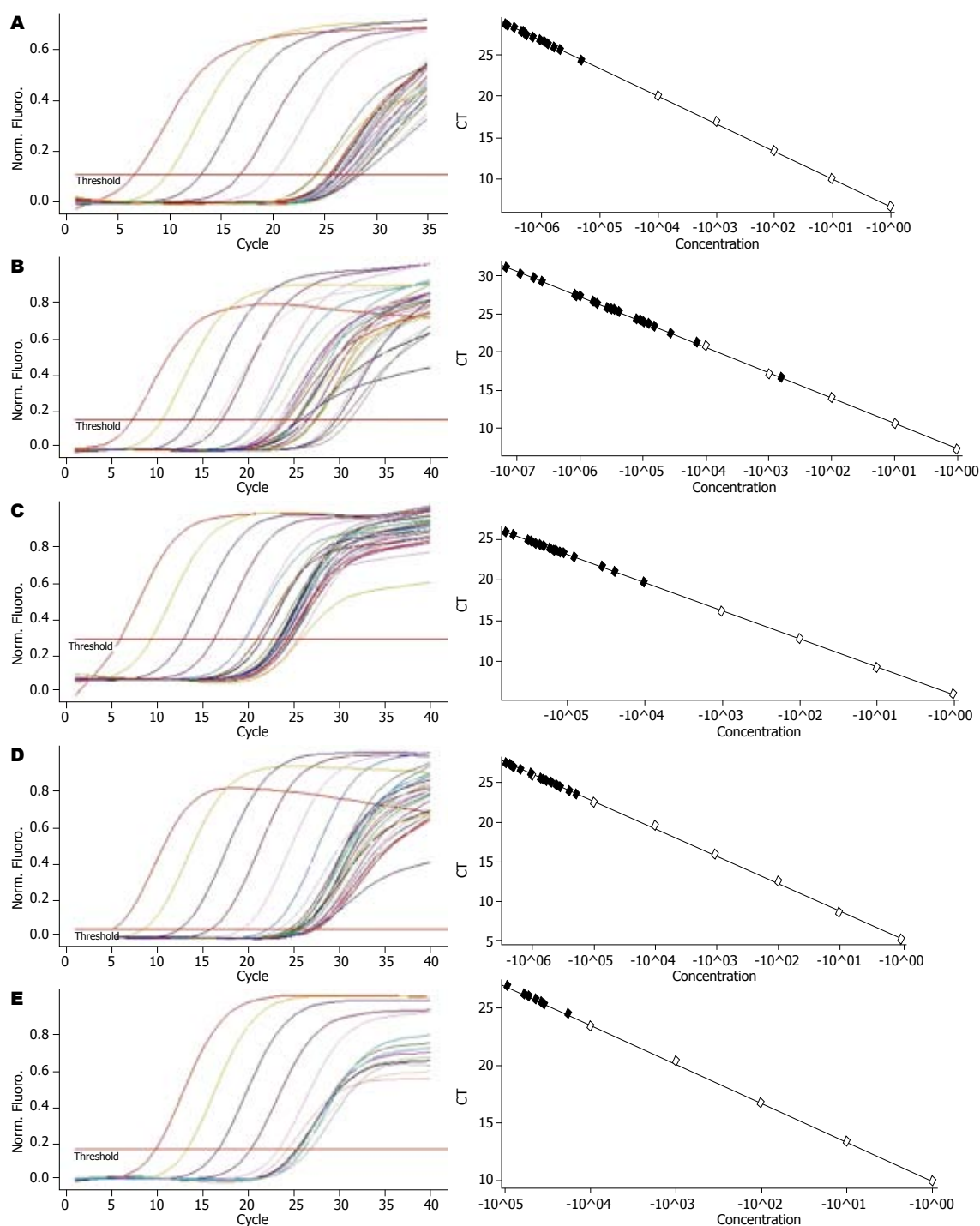


图 1 样品RT-PCR的溶解曲线和标准曲线. A: Wnt1, 直线斜率 $a = -3.30684$, 截距 $b = 6.77005$, $r = 0.99971$; B: β -catenin, 直线斜率 $a = -3.329$, 截距 $b = 7.7249$, $r = 0.9998$; C: Bmi-1, 直线斜率 $a = -3.42089$, 截距 $b = 5.97517$, $r = 0.9996$; D: Smad4, 直线斜率 $a = -3.42687$, 截距 $b = 5.42153$, $r = 0.99934$; E: Hoxa9, 直线斜率 $a = -3.3009$, 截距 $b = 9.95528$, $r = 0.99923$.

■创新盘点

通过人癌通路发现者基因芯片和肿瘤信号转导基因芯片筛选出ESCC和正常食管黏膜组织中差异表达增高2倍以上的基因 β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9及Bmi-1, 继之探讨他们在转录水平及蛋白水平上与ESCC的关系. 与既往研究相比, 更具连续性、系统性、完整性, 且有长期随访资料.

捆绑于卷曲的跨膜受体来激活^[5]. 典型Wnt通路中, Wnt捆绑于跨膜受体(frizzled, FZD)和低浓度脂蛋白受体相关蛋白(low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP)家族, 从而抑制 β -catenin降解复合体^[6], β -catenin在细胞质中蓄积并进入细胞核内, 捆绑于T淋巴细胞因子/淋巴增强因子(T-cell factor, TCF/lymphoid enhancer factor, LEF)家族激活Wnt的靶基因, 导致细胞程

序和转化的改变而调节细胞增殖和凋亡^[7-9]; 而非典型Wnt信号通路则有许多不同的下游效应器, 由FZD家族的受体和复合受体所介导, 从而控制细胞的运动和组织的极性^[10]. 有研究证实, Wnt/ β -catenin将为肿瘤的分子靶向治疗提供新的手段^[11,12]. 已有研究显示在富含Wnt1分子的条件培养基中生长的ESCC细胞, 胞质中 β -catenin蓄积, 进而激活TCF依赖的转录^[13]. 因此, 探究

■应用要点

本研究通过实时定量PCR和免疫组织化学探讨ESCC组织中和正常食管黏膜组织中差异表达增高2倍以上的基因 β -catenin、Wnt1、Smad4、Hoxa9及Bmi-1的mRNA及蛋白质表达水平及其与临床病理、预后之间的关系,判断这些基因在ESCC诊治方面的应用前景。

表 2 RT-PCR引物序列

基因	双向引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
β -actin	F 5'CCTGTACGCCAACACAGTGC3' R 5'ATACTCCTGCTTGCTGATCC3'	60	211
Wnt1	F 5'CAGAGCCACGAGTTTGGATGTT3' R 5'GATTGGGTTGGGTTGGAGGT3'	60	92
β -catenin	F 5'AAAATGGCAGTGCCTTTAG3' R 5'TTTGAAGGCAGTCTGTCGTA3'	60	100
Bmi-1	F 5'GTATCCCTCCACCTCTTCTTG3' R 5'TGCTGATGACCCATTTACTGAT3'	60	176
Smad4	F 5'ATGGATACGTGGACCCTTCT3' R 5'CTCAATGGCTTCTGTCCTGT3'	60	80
Hoxa9	F 5'CTCTAAACCTCAGGCCACATC3' R 5'CAATACCTCCTCCATCAAAGC3'	60	85

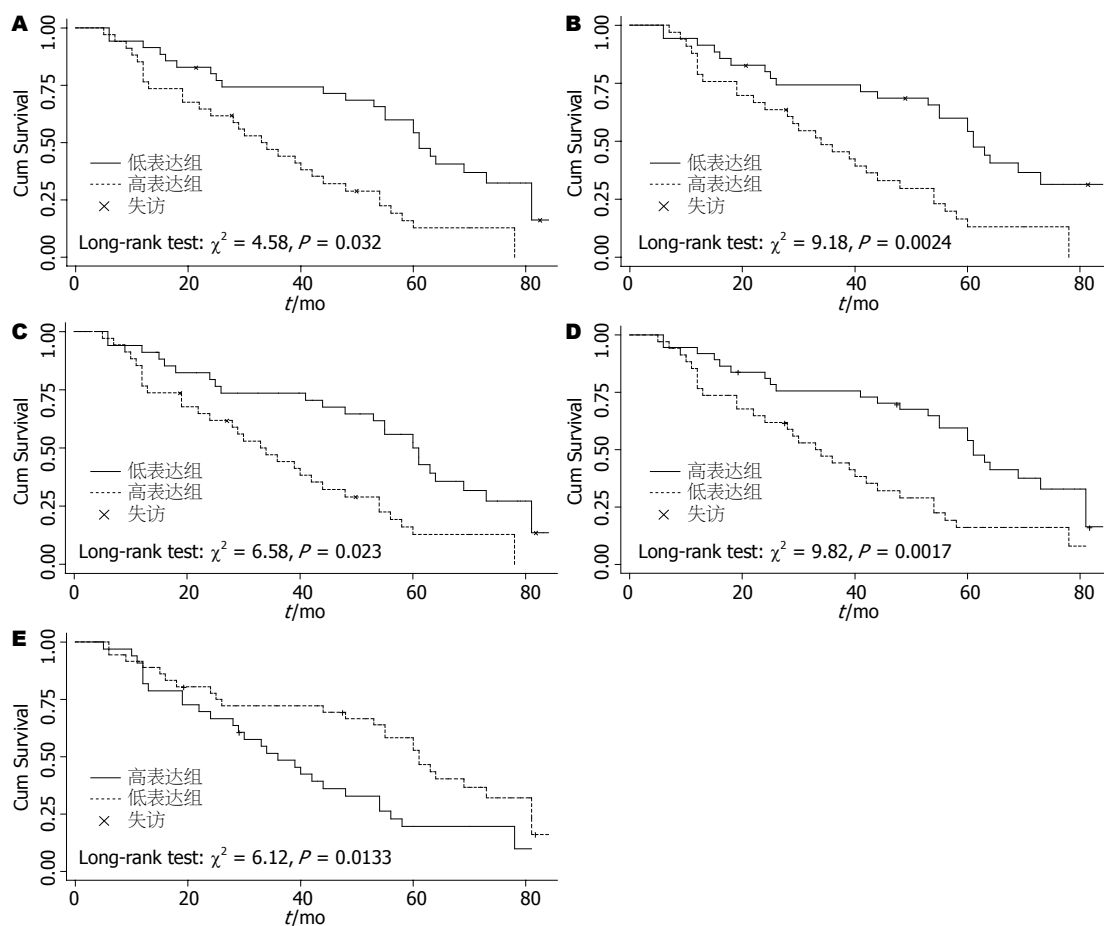
表 3 食管癌相关基因mRNA在食管鳞癌中的表达及其与临床病理因素的相关性

临床病理因素	Wnt1	β -catenin	Bmi-1	Smad4	Hoxa9
组织分类	0.0184	0.0000	0.0152	0.0017	0.0000
癌组织	1.9934 \pm 1.9888	0.0821 \pm 0.0416	2.1810 \pm 2.1580	0.0298 \pm 0.0215	2.0980 \pm 0.0910
癌旁组织	0.8863 \pm 0.6658	0.0185 \pm 0.0201	0.9310 \pm 0.8940	0.0189 \pm 0.0187	1.0160 \pm 0.0780
病理分期	<0.0001	0.0186	0.0001	0.0003	0.0000
I - II 期	0.2685 \pm 0.0984	0.0268 \pm 0.0416	1.5900 \pm 0.7350	0.0235 \pm 0.0052	2.0650 \pm 0.0584
III - IV 期	0.6870 \pm 0.3530	0.0658 \pm 0.0894	3.8270 \pm 2.6730	0.0173 \pm 0.0062	2.8490 \pm 1.0090
淋巴结转移	<0.0001	0.0048	0.0003	0.0000	0.0093
+	0.7125 \pm 0.3659	0.0721 \pm 0.0569	3.5800 \pm 2.4870	0.0166 \pm 0.0057	2.6860 \pm 0.9484
-	0.2511 \pm 0.0928	0.0232 \pm 0.0829	1.7030 \pm 0.7580	0.0239 \pm 0.0053	2.1230 \pm 0.6040
分化程度	0.1361	0.1423	0.0000	0.0000	0.1299
低分化	1.3995 \pm 1.2760	0.0959 \pm 0.0261	3.5800 \pm 2.4870	0.0274 \pm 0.0124	2.4047 \pm 0.0611
中分化	1.1735 \pm 1.0862	0.0753 \pm 0.0826	1.8580 \pm 0.9790	0.0179 \pm 0.0109	2.3067 \pm 0.0809
高分化	0.5909 \pm 0.5665	0.0911 \pm 0.0566	0.8810 \pm 0.4180	0.0154 \pm 0.0101	2.2491 \pm 0.0924

表 4 食管癌相关基因在食管鳞癌中的蛋白表达及其与临床病理因素的相关性

临床病理因素	Wnt1	β -catenin	Bmi-1	Smad4	Hoxa9
组织分类	0.0000	0.0003	0.0001	0.0000	0.0000
癌组织	0.3830 \pm 0.0947	0.2835 \pm 0.0844	0.2736 \pm 0.0834	0.2637 \pm 0.0348	0.2058 \pm 0.0316
癌旁组织	0.2721 \pm 0.1474	0.2352 \pm 0.0670	0.2251 \pm 0.0571	0.2042 \pm 0.0180	0.1218 \pm 0.0518
病理分期	0.0144	0.0147	0.0208	0.0006	0.0349
I - II 期	0.3221 \pm 0.1021	0.2380 \pm 0.0642	0.2371 \pm 0.0531	0.2756 \pm 0.0528	0.1756 \pm 0.0457
III - IV 期	0.3933 \pm 0.0548	0.2899 \pm 0.0881	0.2788 \pm 0.0791	0.2238 \pm 0.0149	0.2026 \pm 0.0194
淋巴结转移	0.0047	0.0189	0.0023	0.1799	0.0001
+	0.3891 \pm 0.1024	0.2739 \pm 0.0619	0.2993 \pm 0.0724	0.2598 \pm 0.0384	0.1948 \pm 0.0285
-	0.3170 \pm 0.0920	0.2298 \pm 0.0910	0.2389 \pm 0.0834	0.2739 \pm 0.0472	0.1593 \pm 0.0427
分化程度	0.5070	0.9070	0.9160	0.9340	0.9670
低分化	0.3817 \pm 0.0831	0.2908 \pm 0.0933	0.2817 \pm 0.0917	0.2623 \pm 0.0406	0.1701 \pm 0.0316
中分化	0.3796 \pm 0.1029	0.2785 \pm 0.0826	0.2674 \pm 0.0715	0.2532 \pm 0.0312	0.1732 \pm 0.0132
高分化	0.3967 \pm 0.0827	0.2920 \pm 0.0873	0.2819 \pm 0.0762	0.2605 \pm 0.0301	0.1825 \pm 0.0321

Wnt1/ β -catenin在ESCC中发挥怎样的作用就显得非常重要. 而Bmi-1作为维持复合体(polycomb



同行评价

文章及研究完成过程中, 作者的确做了大量工作, 有一定的参考价值, 但研究内容重要性及新颖性一般。

图 2 Wnt1、 β -catenin、Bmi-1、Smad4、Hoxa9 mRNA不同表达水平的Kaplan-Meier生存曲线。A: Wnt1; B: β -catenin; C: Bmi-1; D: Smad4; E: Hoxa9。

表 5 食管癌相关基因的蛋白表达水平与ESCC患者预后的关系

	5年生存率(中位生存时间) %(mo)		χ^2 值	P值
	高表达组	低表达组		
β -catenin	25.3(23.0)	35.6(30.0)	3.1085	0.0446
Wnt1	24.5(22.5)	42.1(33.5)	3.8068	0.0352
Smad4	32.3(26.5)	38.9(31.0)	2.1085	0.0646
Hoxa9	32.3(26.0)	37.4(29.0)	1.8123	0.0859
Bmi-1	26.8(25.5)	45.7(36.0)	4.0974	0.0318

repressive complex 1, PRC1)的组成之一, 抑制INK4A/ARF抑癌基因簇编码的p16INK4a和p19ARF抑癌蛋白, 进而抑制体内两条主要的细胞周期调控通路-pRb信号通路和P53信号通路, 发挥原癌基因作用^[14], 且与Wnt/ β -catenin信号通路的众多靶基因存在交集, 通过抑制细胞衰老和凋亡, 维持肿瘤干细胞活性等在肿瘤的发生及发展中发挥着重要作用。但Bmi-1在ESCC发病过程中的作用有待证实。

本研究发现在ESCC组织中 β -catenin mRNA

异常表达明显, 表达水平与ESCC患者淋巴结转移和病理分期有关, 其中 β -catenin高表达者预后较差, 病理分期III-IV期患者 β -catenin的表达水平明显高于I-II期患者, 与前期研究结果一致^[4]。为进一步验证 β -catenin与ESCC临床病理及预后的关系, 继以免疫组织化学的方法在蛋白质水平上对其进行分析。结果显示ESCC中的 β -catenin蛋白表达水平较癌旁非癌组织明显增高($P<0.05$), 且与病理分期、淋巴结转移相关, 表达水平影响患者5年生存率($P<0.05$)。纵观文献, β -catenin在食管癌中的异常表达率与预后及临床病理指标之间的关系报道不一。Nakanishi等^[15]报道 β -catenin在食管癌细胞膜表达减弱为73%, β -catenin的表达与病理分化程度呈正相关, 但无预后价值。Krishnadath等^[16]报道食管癌中 β -catenin的减弱表达率为72%, β -catenin的异常表达与病理分化程度、较短生存期有关($P<0.01$), 他们认为 β -catenin减弱表达与不良预后有关。而Osterheld等^[17]报道食管癌的 β -catenin异常表达率为61%, β -catenin异常表达与病理

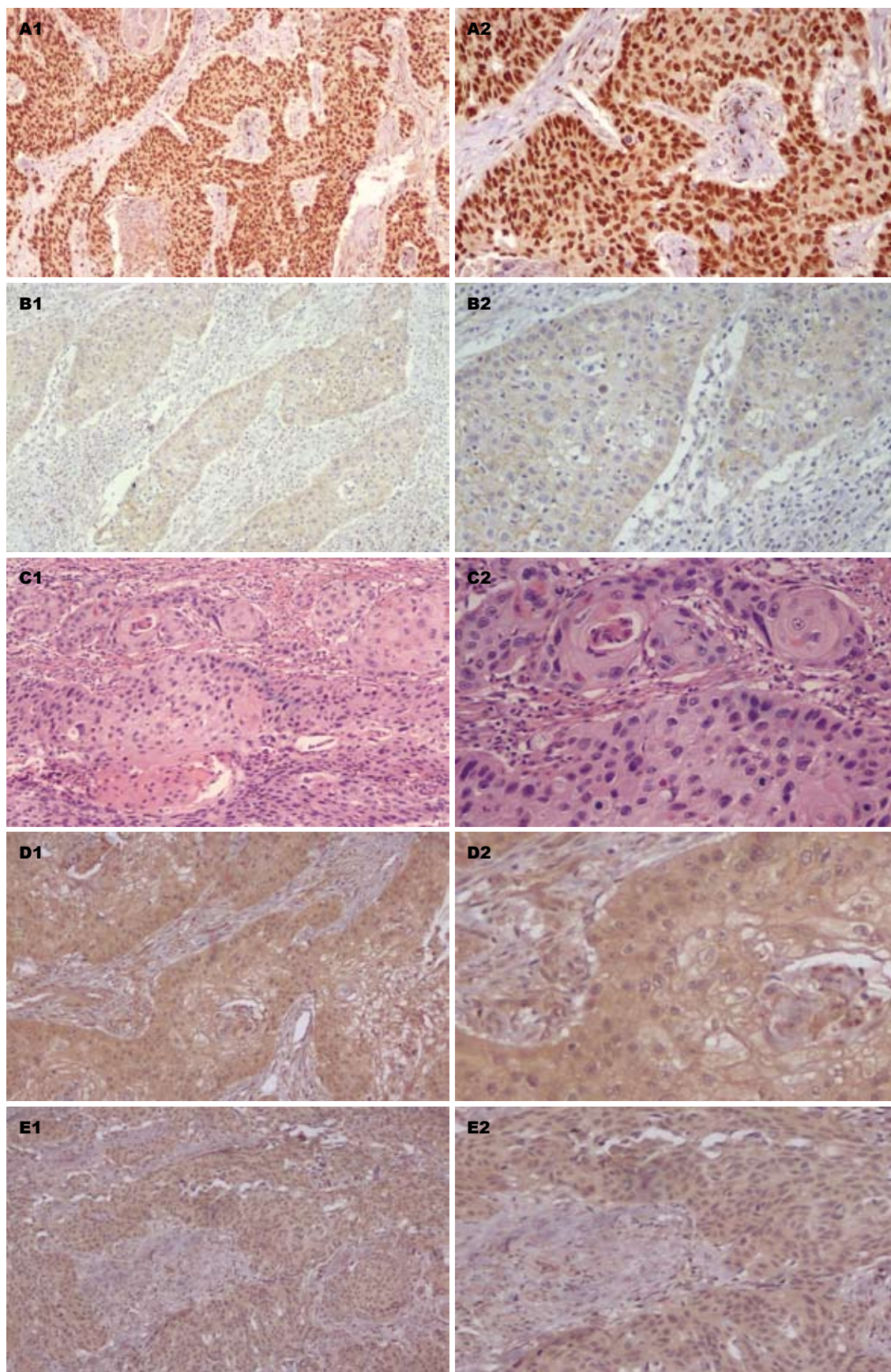


图 3 免疫组织化学示ESCC组织中Wnt1、 β -catenin、Bmi-1、Smad4、Hoxa9的蛋白表达水平。A1, B1, C1, D1, E1: Wnt1、 β -catenin、Bmi-1、Smad4、Hoxa9($\times 100$); A2, B2, C2, D2, E2: Wnt1、 β -catenin、Bmi-1、Smad4、Hoxa9($\times 200$)。

分化、淋巴结转移无关, β -catenin异常表达与 较好预后相关。以上研究样本量较小且主要是

表 6 Logistic回归分析70例ESCC组织中目标蛋白表达与预后的关系

变量	比数比值	标准误差	Z统计量	P值	95%CI
β -catenin	0.0345371	0.0322135	-2.12	0.002	0.0092133-0.1440125
Wnt-1	0.0462245	0.0401351	-3.01	0.001	0.0045402-0.2501234
Bmi-1	0.0516528	0.0512158	-2.81	0.001	0.0060348-0.3604512
Wnt1+ β -catenin	0.0456564	0.0432686	-3.26	0.001	0.0071255-0.2925401
Wnt1+ β -catenin+Bmi-1	0.0871797	0.0645319	-3.30	0.001	0.00204334-0.3719543

利用免疫组织化学的方法来测定食管癌标本中的 β -catenin蛋白表达的含里, 未检测食管标本 β -catenin基因变化的水平. 本研究通过RT-PCR及免疫组织化学技术观察 β -catenin转录水平和蛋白质水平在ESCC组织中的变化, 二者是一致的, 且在与患者临床病理分期及预后的相关性上保持一致.

结果同时还显示了Wnt1在转录水平和蛋白质水平上的表达及其对临床病理和预后影响上的一致性. Wnt1在ESCC中较癌旁组织中显著高表达($P<0.05$), 结合 β -catenin在ESCC中转录后水平和蛋白质水平的高表达, 提示在ESCC中Wnt1诱导 β -catenin/TCF转录, 这与文献报道一致^[13]. 结果显示Wnt1 mRNA水平及蛋白水平均与病理分期、淋巴结转移密切相关(均 $P<0.05$), 在进展期和有淋巴结转移的样本中, 都显示出高表达, 这在很大程度上说明Wnt1在ESCC的进展期而不是起始阶段发挥作用, 同时发现他与肿瘤细胞的分化程度没有关系($P>0.05$). 由此, Wnt1/ β -catenin在ESCC的发展过程中发挥重要作用, 并有可能成为食管鳞癌判断疾病分期和预后的重要分子标志物.

本研究证实一系列细胞分化调控信号传导通路相关基因如Wnt1、 β -catenin、Bmi-1在ESCC组织较相应癌旁组织明显高表达, 这和Bmi-1的原癌基因角色是一致的, 表明Bmi-1过表达导致信号传导通路异常而引起细胞分化调控障碍可能与ESCC的发生、发展有关. 同时发现, Bmi-1 mRNA表达水平与性别、年龄无关, 但与淋巴结转移、细胞分化、病理分期密切相关($P<0.05$). 这些证据提示Bmi-1在ESCC的中晚期发生浸润转移过程中可能起重要作用. 淋巴结转移和临床分期均与食管癌的诊治和预后关系密切, 临床分期高和/或出现淋巴结转移的患者多数预后不良, 这在本实验中得到证实, Bmi-1 mRNA高表达组预后差($P<0.05$). 这些证据说明Bmi-1有可能作为预测食管癌患者的转

移和预后的分子标志物. 而且在其蛋白表达水平上, Bmi-1对患者病理分期、淋巴结转移及预后的影响也显示了与其转录水平一致.

Smad4最初作为肿瘤抑癌基因被发现, 又称DPC4(deleted in pancreatic cancer 4)位于染色体18q21.1^[18,19], 是调节转录和TGF- β 抗增殖应答的重要分子, TGF- β 介导的生长抑制功能可被显性失活的Smad4全部抑制. 近年来证实Smad4表达水平与一些恶性肿瘤发生、发展、生物学行为及其预后有密切关系, 阳性与阴性表达者比较, Smad4阳性表达者肿瘤多分化好、生长速度慢, 侵袭和转移能力弱^[20]. 我们通过RT-PCR分析发现, Smad4 mRNA表达的下降与ESCC的发生、发展及生物学行为有关, 低表达者预后欠佳. 随着病理分期的进展, Smad4的表达逐渐减少, 在III-IV期肿瘤中Smad4 mRNA表达水平低于I-II期肿瘤, 且有显著性差异, 提示Smad4在ESCC中表达的减少, 影响了TGF- β 信号从细胞膜向细胞核的传导, 使其对ESCC细胞的抑制作用减弱, 促进了肿瘤的发生发展. 另外, Smad4 mRNA表达的减少和细胞分化程度有一定相关性, Smad4在细胞分化好的ESCC组织比分化较差的ESCC组织中表达水平高. 从另外的角度证实了在食管癌的发生发展过程中, Smad4扮演的是一个抑癌基因的角色. 但有趣的是, 免疫组织化学结果并未显示出与其mRNA表达的完全一致性, 这与以往研究结果是一致的^[21], 其蛋白表达水平除了与病理分期有关外, 与其他并未显示相关性, 且与预后的关系未显示出统计学意义. 考虑其原因除可能是样本偏倚外, 也提示Smad4不是独立的预后因素, 在蛋白质水平上可能有其他基因的异常表达参与了ESCC的进展或由于某种尚未明了的机制导致了Smad4的翻译阶段或其蛋白的不稳定性, 这种机制是否是因TGF- β 信号传导复合体某种成分的降解或Smad4或其家族的突变所致, 值得进一步研究.

Hoxa9是同源盒基因家族中的一员. 同源

盒基因在生物的发育过程中发挥着重要的作用,近年来,不断有研究发现同源盒基因在恶性肿瘤,特别是血液系统恶性疾病发病过程中起重要作用,实体肿瘤中的异常表达也有相继报道,研究发现在肺癌和恶性黑色素瘤中,同源盒基因的表达水平与是否转移有相关性^[22-30]。本研究发现Hoxa9 mRNA表达水平与ESCC淋巴结转移、病理分期密切相关($P<0.05$),且高表达者预后差。与Smad4一样,免疫组织化学结果并未显示一致性,考虑除样本偏倚外,Hoxa9在ESCC的发生发展过程中并不是一个独立的预后因素,其同源盒基因家族众多成员均有可能影响Hoxa9或产生交互作用,其中机制需要进一步研究。

研究结果同时显示Wnt1/ β -catenin、Bmi-1三者或二者蛋白表达阳性者预后相对不佳。虽只是一个定性观察,但还是从侧面支持了在影响ESCC预后因素中Wnt1/ β -catenin、Bmi-1这三者的重要性,并且Logistic回归分析结果也显示了Wnt1/ β -catenin二者表达阳性者或Wnt1/ β -catenin、Bmi-1三者表达阳性者ESCC预后的风险显著升高。由于Bmi-1与Wnt/ β -catenin信号通路的众多靶基因存在交集,这或许可以解释Wnt1/ β -catenin、Bmi-1三者或二者蛋白表达阳性者ESCC预后的风险显著升高的原因。

总之,本实验研究结果表明Wnt1/ β -catenin、Bmi-1 mRNA表达水平与蛋白表达水平是一致的,高表达者ESCC患者预后不佳,表达水平与ESCC临床病理分期、淋巴结转移呈逆相关;Smad4、Hoxa9 mRNA表达水平与蛋白表达水平并未显示一致性,Smad4、Hoxa9 mRNA表达水平虽与ESCC预后及临床病理分期、淋巴结转移相关,但可能不是独立的预后因素,有必要通过大宗实验、更完善的随访方式和更先进的实验技术进一步验证。

4 参考文献

- 1 Fisichella PM, Patti MG. Esophageal Cancer. eMedicine: Oncology, 2008-08-26; cited 2010-09-28. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/277930-overview>
- 2 纪律. 食管癌基因组与临床病理及预后的相关性. 南京: 南京医科大学, 2007: 1-84
- 3 Greene FL, American Joint Committee on Cancer, American Cancer Society. AJCC cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer, 2002: 91-98
- 4 Ji L, Cao XF, Wang HM, Li YS, Zhu B, Xiao J, Wang D. Expression level of beta-catenin is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2622-2625
- 5 James RG, Conrad WH, Moon RT. Beta-catenin-independent Wnt pathways: signals, core proteins, and effectors. *Methods Mol Biol* 2008; 468: 131-144
- 6 Corrigan PM, Dobbin E, Freeburn RW, Wheadon H. Patterns of Wnt/Fzd/LRP gene expression during embryonic hematopoiesis. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 759-772
- 7 Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 997-1014
- 8 Dihlmann S, von Knebel Doeberitz M. Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int J Cancer* 2005; 113: 515-524
- 9 Huang M, Wang Y, Sun D, Zhu H, Yin Y, Zhang W, Yang S, Quan L, Bai J, Wang S, Chen Q, Li S, Xu N. Identification of genes regulated by Wnt/beta-catenin pathway and involved in apoptosis via microarray analysis. *BMC Cancer* 2006; 6: 221
- 10 Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4042-4045
- 11 Paul S, Dey A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. *Neoplasia* 2008; 55: 165-176
- 12 Herbst A, Koligs FT. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. *Methods Mol Biol* 2007; 361: 63-91
- 13 Mizushima T, Nakagawa H, Kamberov YG, Wilder EL, Klein PS, Rustgi AK. Wnt-1 but not epidermal growth factor induces beta-catenin/T-cell factor-dependent transcription in esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 277-282
- 14 Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 1999; 397: 164-168
- 15 Nakanishi Y, Ochiai A, Akimoto S, Kato H, Watanabe H, Tachimori Y, Yamamoto S, Hirohashi S. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 96 lesions. *Oncology* 1997; 54: 158-165
- 16 Krishnadath KK, Tilanus HW, van Blankenstein M, Hop WC, Kremers ED, Dinjens WN, Bosman FT. Reduced expression of the cadherin-catenin complex in oesophageal adenocarcinoma correlates with poor prognosis. *J Pathol* 1997; 182: 331-338
- 17 Osterheld MC, Bian YS, Bosman FT, Benhattar J, Fontollet C. Beta-catenin expression and its association with prognostic factors in adenocarcinoma developed in Barrett esophagus. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 451-456
- 18 Yanagisawa J, Yanagi Y, Masuhiro Y, Suzawa M, Watanabe M, Kashiwagi K, Toriyabe T, Kawabata M, Miyazono K, Kato S. Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 1999; 283: 1317-1321
- 19 Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350-353
- 20 Kim JY, Park DY, Kim GH, Choi KU, Lee CH, Huh GY, Sol MY, Song GA, Jeon TY, Kim DH, Sim MS. Smad4 expression in gastric adenoma and adenocarcinoma: frequent loss of expression in diffuse type of gastric adenocarcinoma. *Histol Histopathol*

- 2005; 20: 543-549
- 21 Fukuchi M, Masuda N, Miyazaki T, Nakajima M, Osawa H, Kato H, Kuwano H. Decreased Smad4 expression in the transforming growth factor-beta signaling pathway during progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 737-743
- 22 Cillo C, Barba P, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. *Int J Cancer* 1992; 51: 892-897
- 23 De Vita G, Barba P, Odartchenko N, Givel JC, Freschi G, Bucciarelli G, Magli MC, Boncinelli E, Cillo C. Expression of homeobox-containing genes in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 887-893
- 24 Cantile M, Cindolo L, Napodano G, Altieri V, Cillo C. Hyperexpression of locus C genes in the HOX network is strongly associated in vivo with human bladder transitional cell carcinomas. *Oncogene* 2003; 22: 6462-6468
- 25 Waltregny D, Alami Y, Clausse N, de Leval J, Castonovo V. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. *Prostate* 2002; 50: 162-169
- 26 Hamada Ji, Omatsu T, Okada F, Furuuchi K, Okubo Y, Takahashi Y, Tada M, Miyazaki YJ, Taniguchi Y, Shirato H, Miyasaka K, Moriuchi T. Overexpression of homeobox gene HOXD3 induces coordinate expression of metastasis-related genes in human lung cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 93: 516-525
- 27 Maeda K, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Yamamoto Y, Sugihara T, Moriuchi T. Altered expressions of HOX genes in human cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer* 2005; 114: 436-441
- 28 Takahashi O, Hamada J, Abe M, Hata S, Asano T, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, Kondo S, Moriuchi T. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007; 17: 753-760
- 29 Kok CH, Brown AL, Ekert PG, D'Andrea RJ. Gene expression analysis reveals HOX gene upregulation in trisomy 8 AML. *Leukemia* 2010; 24: 1239-1243
- 30 Avraham A, Sandbank J, Yarom N, Shalom A, Karni T, Pappo I, Sella A, Fich A, Walfisch S, Gheber L, Evron E. A similar cell-specific pattern of HOXA methylation in normal and in cancer tissues. *Epigenetics* 2010; 5: 41-46

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 •

《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)

神经营养因子影响肠道的研究进展

徐国萍, 范一宏, 吕宾

■背景资料

神经营养因子(NT)是一类由神经所支配的组织(如肌肉)和星形胶质细胞产生的且为神经元生长与存活所必需的蛋白质分子。肠道动力的产生是依赖于肠道神经元的发育, 相关营养因子及其受体在肠道的表达影响肠道神经元的发育。全面了解多种神经营养因子对肠道的影响, 可充分运用于肠道疾病的治疗。

徐国萍, 范一宏, 吕宾, 浙江中医药大学第一附属医院消化内科 浙江省杭州市 310006

作者贡献分布: 本文由徐国萍综述; 范一宏与吕宾选题和审校。

通讯作者: 范一宏, 副教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学第一附属医院消化内科。fanyihong@medmail.com.cn

收稿日期: 2010-06-08 修回日期: 2010-08-10

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-09-28

Advances in understanding the role of neurotrophins in physiological and pathological processes in the intestinal tract

Guo-Ping Xu, Yi-Hong Fan, Bin Lv

Guo-Ping Xu, Yi-Hong Fan, Bin Lv, Department of Digestion, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Associate Professor Yi-Hong Fan, Department of Digestion, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China. fanyihong@medmail.com.cn

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

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-09-28

Abstract

Neurotrophins (NT) play an important role in the process of neuronal growth, development, protection and repair. In recent years, great advances have been achieved in the research of neurotrophins. Glial cell line-derived neurotrophic factor is a nutritional factor that has the most potential to promote neuronal growth, differentiation and repair. It can also modulate intestinal neuronal growth and neurotransmitter expression. Brain-derived neurotrophic factor plays an important role in the development of the enteric nervous system, intestinal infection, and the modulation of gastrointestinal motility. Neurotrophin-3 can increase excitatory peptides that are expressed by neurons in the intestinal muscularis to accelerate colonic transit. Ciliary neurotrophic factor and other neurotrophins have a synergistic effect on neurons. In this article, we will review the recent advances in understanding the role of neurotrophins in physiological and pathological processes in the intestinal tract.

■同行评议者

陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物教研室

Key Words: Neurotrophin; Intestinal tract; Advance

Xu GP, Fan YH, Lv B. Advances in understanding the role of neurotrophins in physiological and pathological processes in the intestinal tract. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2884-2888

摘要

神经营养因子家族在神经细胞的生长发育、保护修复过程中起着极其重要的作用。胶质源性神经营养因子是最具有促进神经元生长、分化和修复潜力的营养因子, 他可影响肠道神经元的发育和神经递质的表达; 脑源性神经营养因子在肠内神经系统发育有着重要的作用, 他参与肠道感染和胃肠动力调节; 神经营养因子-3可增加肠肌层神经结神经元所表达的兴奋性神经肽而加速结肠转运; 睫状神经营养因子与其他神经营养因子对神经细胞有协同作用。本文综述了近年来关于神经营养因子影响肠道的研究进展。

关键词: 神经营养因子; 肠道; 研究进展

徐国萍, 范一宏, 吕宾. 神经营养因子影响肠道的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(27): 2884-2888

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2884.asp>

0 引言

神经营养因子(neurotrophin, NT)是一类由神经所支配的组织(如肌肉)和星形胶质细胞产生的且为神经元生长与存活所必需的蛋白质分子。NT通常在神经末梢以受体介导式入胞的方式进入神经末梢, 再经逆向轴浆运输抵达胞体, 促进胞体合成有关的蛋白质, 从而发挥其支持神经元生长、发育和功能完整性的作用。研究资料显示, 肠道动力的产生是依赖于肠道神经元的发育, 相关营养因子及其受体在肠道的表达影响肠道神经元的发育^[1]且神经递质的表达是受NT的调控^[2]。本文就部分NT及其受体对肠道的影响作一综述。

1 NT及其受体

目前, 已有多种主要的NT从哺乳动物中分离出

表 1 NT受体

受体	亲和力	特点
原癌基因Trk家族编码的3种酪氨酸蛋白激酶(TrkA、TrkB、TrkC)	亲和力较强	其和NT的结合有选择性. TrkA是NGF的特异性受体, TrkB是BDNF和NT-4/5的特异性受体, TrkC是NT-3的特异性受体. 其能识别NT家族所有成员.
相对分子质量为75 000 Da的跨膜型糖蛋白(P75蛋白)	亲和力较弱	

来. NT是一个多基因家族, 对神经元存活、生长有维持作用的多肽类生长因子^[3], 包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性NT(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质源性NT(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、睫状NT(ciliary neurotrophic factor, CDFN)、碱性成纤维细胞生长因子(base Fibroblast growth factor, bFGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、白细胞介素(interleukin, IL)、NT-3、NT-4/5和NT-6等^[4,5]. 受体介绍^[6-9]如下(表1).

2 对肠道神经系统的影响

ENS(enteric nervous system, ENS)由胃肠道壁内的神经成分组成, 他在结构和功能上与中枢神经系统(central nervous system, CNS)类似, 而不同于交感和副交感神经系统, 属于自主神经系统的一个组成部分. 其最突出的一个特点就是在去除中枢神经控制的情况下, 仍能通过感觉神经元、中间神经元和运动神经元对消化系实现一定程度的局部整合功能^[10]. 这表明ENS不仅是调节消化系功能的神经通路的中继站, 还是一个具有独立调节消化系的运动、分泌、吸收、感觉及血液循环等功能的系统^[11]. ENS包含胃肠道的黏膜下神经丛和肠肌神经丛的神经节细胞、中间连结纤维以及从神经丛发出供应胃肠道平滑肌、腺体和血管的神经纤维. 他们共同调节肠道的肌肉组织活动、上皮细胞以及血管系统的活动进而调节肠道的消化和吸收功能^[12].

NT可影响肠壁内的肌间神经丛和黏膜下神经丛、肠肌神经丛-ENS而调节肠道动力. 这些神经元和神经束的结构并不像大多数神经纤维那样是由结缔组织和施万细胞支持的, 而是由一种独特的胶质细胞群-肠道神经胶质细胞支持的^[13,14]. NT选择性地作用于特定的神经通路而产生特定的动力效应, 少数研究也发现一些外源性NT可以改变肠动力, 特别是可以加速结肠转运功能^[15,16].

2.1 GDNF对肠道的影响 神经元在生长、发育和受损时的存活依赖于多种营养因子的作用, 其中GDNF是促进神经元生长、分化和修复最有潜力的营养因子^[17]. Hsu等^[18]证实GDNF对中枢和周围神经系统的运动、感觉神经元以及自主神经元亦具有营养和保护作用, 且可促使神经元再生、免受外界损伤引起的凋亡以及促进存活. 周磊^[19]在探讨内源性GDNF对猫L6DRG神经元生长的作用时通过在体外培养背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)细胞中加入抗GDNF抗体后, 将抗体组与对照组相比较, 加入GDNF抗体后, 能明显抑制DRG神经突起生长($P<0.05$). 可知内源性GDNF可能有促进感觉神经元生长的作用. 消化系中的GDNF分布于胃肠道平滑肌细胞且其在结肠中的表达高于其他部位^[20], 这种高度区域性表达提示GDNF对人类结肠肌层的神经化分布有着关键作用. 神经元细胞膜上分布有GDNF家族受体GFR α , 其中GFR α 1是GDNF的主要受体^[21]. Rosenthal等^[22]研究发现, 肠道神经节细胞在分化和发育过程中, 以及正在发育的胚胎期胃肠道中, 都可检测到GFR α 的表达, 且这种表达与GDNF和神经秩蛋白(neurturin, NRTN)的存在密不可分, 如果发生突变或表达缺失, 则可引起肠道神经元发育不全.

有研究发现GDNF具有抗肠上皮细胞凋亡, 促肠上皮细胞增生的作用. von Boyen等^[23,24]在体外培养胚胎生殖细胞(embryonic germ cell, EGC), 以抗胶质纤维酸性蛋白、高尔基氏标记、抗GDNF等对培养的EGC进行标记, 发现EGC及GDNF在克罗恩病(Crohn's disease, CD)中是显著增加的, 并证实了GDNF是由EGC分泌的, IL-1、TNF- α 及脂多糖类等炎症因子激发其分泌GDNF, 且促炎细胞因子消失后这种分泌作用还可持续超过12 h, 两者之间呈剂量依赖关系. 除此之外, 还有研究发现EGC及其分泌的GDNF有可能促进和修复肠上皮细胞的完整性, 从而参与调节肠道炎症过程^[25,26]. 有研究表明, 敲除GDNF的转基因小鼠模型往往会导致以出血、

■研究前沿

目前胶质源性神经营养因子作为促进神经元生长、分化和修复最有潜力的营养因子, 其对肠道影响的研究较多. 神经生长因子与肠易激综合征的关系的研究在国外比较多见, 但他们具体的作用机制仍不清楚.

■相关报道

von Boyen等在体外培养胚胎生殖细胞(EGC),以抗胶质纤维酸性蛋白、高尔基氏标记、抗GDNF等对培养的EGC进行标记,发现EGC及GDNF在克罗恩病(CD)中是显著增加的,并证实了GDNF是由EGC分泌的,IL-1、TNF- α 及脂多糖类等炎症因子激发其分泌GDNF,且促炎细胞因子消失后这种分泌作用还可持续超过12 h,两者之间呈剂量依赖关系。

坏死和肠黏膜完整性破坏为特征的、极其严重的小肠炎症(如暴发性肠炎)^[10]。实验^[16,27]利用大黄建立慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)动物模型,给予外源性GDNF,观察肠神经的修复和再生情况以及肠道动力的改变,并采用墨汁推进实验测定大鼠肠道传输功能、采用免疫组织化学和RT-PCR方法测定结肠GDNF的分布和表达;结果STC组墨汁推进长度及百分比(黑染肠管长度/总长度)与正常大鼠组及STC大鼠GDNF组相比明显缩短($P<0.01$);免疫组织化学显示结肠肌间神经丛GDNF的表达, GDNF的阳性面积STC组与正常大鼠组及STC大鼠GDNF组相比明显减少($P<0.01$); RT-PCR显示STC对照组结肠组织中GDNF mRNA的表达明显低于正常大鼠GDNF组和STC大鼠GDNF组(均 $P<0.01$);可知外源性GDNF对肠道传输有明显改善作用; GDNF作为一种NT,能有效改善ENS的病变,提高病变结肠的肠道推动力,对大鼠STC的结肠传输功能有一定的治疗作用,作用机制可能与他通过在肠道的表达水平影响肠道神经元的发育和神经递质的表达,从而影响肠道动力有关^[28]。

2.2 BDNF对肠道的影响 BDNT是神经营养物质(neurotrophins, NTs)的一种,在CNS和周围神经系统发育过程中起重要作用^[29],并参与维持成熟神经元的正常功能。肠道在出生后各个阶段均表达BDNF,其不仅在ENS的生长发育过程中发挥重要作用,实验发现BDNF还与P物质(substance P, SP)、5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)等调节肠道感觉和动力的因子相关^[30,31]。故其与肠道感觉、运动功能密切相关^[32]。

研究表明BDNF与炎症引起的内脏高敏感相关,并能增强肠道蠕动^[30,33,34]。赖华梅等^[35]通过建立乳鼠结肠扩张动物模型,检测成年大鼠对结肠扩张的行为学反应评估内脏感觉及全胃肠和小肠传输功能评估肠道动力;比较腹腔注射BDNF抗体后内脏感觉和肠道动力的变化情况;并以RT-PCR、Western blot、ELISA检测各组回肠、结肠BDNF及其受体TrkB的表达的方法,研究乳鼠结肠扩张刺激动物模型成年后内脏感觉和肠道动力的变化以及BDNF在其中所起的作用,从而探讨BDNF在肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)发病机制中的作用。结果为模型组成年后内脏敏感性增高,肠道动力增强;应用BDNF抗体后模型组内脏敏感性

降低,肠道动力减弱;除成年期模型组结肠TrkB mRNA表达外,其余各组BDNF和TrkB mRNA表达均显著高于对照组(均 $P<0.05$);乳鼠期和成年期模型组回肠、结肠BDNF和TrkB蛋白表达均显著高于对照组(均 $P<0.05$)。从而得出BDNF在慢性内脏高敏感和肠道动力的变化中起一定作用,并参与了IBS的发生。

2.3 NT-3对肠道的影响 体外初步研究表明NT-3能增加兴奋性神经传导和降低抑制性神经传导。毕建清等^[36]在研究神经干细胞和NT-3对帕金森病(parkinson disease, PD)的修复作用的过程中,移植表达NT-3的神经干细胞有利于神经干细胞向多巴胺能神经元分化。另有研究发现NT-3可降低豚鼠结肠肌层神经丛所表达的一氧化氮合酶的量,并可增加体外培养的肠肌层神经结神经元所表达的兴奋性神经肽和生长抑素的量^[37]。部分研究还表明NT-3可加速结肠转运,使排便容易和增加排便频率。柴宁莉等^[38]通过在大鼠的胃窦、十二指肠、空肠及结肠处手术埋植银丝电极5-7 d后,在清醒空腹状态下通过尾静脉注射20 $\mu\text{g/kg}$ 的rh-NT-3或安慰剂,对照分析注射前后各2 h大鼠的胃肠肌电活动变化的方法探讨进行人重组rh-NT-3对大鼠胃肠动力及消化间期移行性复合肌电(migrating myoelectrical complex, MMC)的影响;结果显示rh-NT-3对胃窦及小肠处的肌电活动有增强效应($P<0.05$),但对其MMC周期无显著影响;在横结肠, rh-NT-3不但可显著增强峰电的频率、振幅及延长峰电周期,而且可以使MMC周期延长(25 min \pm 11 min vs 19 min \pm 6 min, $P<0.05$);在远端结肠处, rh-NT-3打断MMC模式,引起类似MMCIII相的连续的峰电活动,持续约为48 min \pm 6 min。由此可见外源性的rh-NT-3对大鼠的胃肠肌电活动具有加强作用。

2.4 CDNF对肠道的影响 目前,国内对CDNF的研究并不多,CDNF与其他NF对神经细胞有协同作用,共同参与神经元的营养调节^[39]。刘庆山等^[40,41]采用链脲佐菌素诱发的糖尿病大鼠胃肠神经功能紊乱模型,并将动物随机分为正常组、模型组、NGF组、rhCDNF组、NGF和rhCDNF联合用药组,连续给药85 d,分别肌注rhCDNF 0.1、0.3、0.9 mg/kg,并测定rhCDNF对血糖、胃肠慢波点位、小肠壁内神经蛋白含量。结果显示联合用药和单独用药均可改善糖尿病大鼠胃肠慢波电位、提高胃肠推进功能、增强胃肠壁内神经蛋白含量,且联合用药效果优于单独用药。可见NGF与CDNF联合用药具有较好

的抗糖尿病导致的胃肠神经功能紊乱作用, 其机制可能与他们对内脏植物神经的神经营养和神经保护作用有关, 且具有一定的协同作用。

2.5 NGF对肠道的影响 NGF的生物学特性目前研究的比较透彻, 是具有神经元营养和促突起生长双重生物学功能的一种神经细胞生长调节因子, 他对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用。国外研究表明NGF在胃肠道中的分布除了肠道上皮细胞, 在肠道神经胶质细胞、成纤维细胞和其他多种免疫细胞(如有活性的T淋巴细胞、肥大细胞、树突状细胞)均有分泌, 并在这些组织中均有NGF受体分布^[42]。目前, 学者对NGF与IBS的关系研究和讨论较多^[43-47]。NGF能独立或协同其他NF产生内脏高敏感, 并参与炎症反应及胃肠动力。刘浩等^[48]在实验中发现先天性巨结肠(hirschsprung disease, HD)病变肠壁内肠间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)数量减少、网状结构破坏, 缺乏NGFR及一氧化氮合酶阳性神经节细胞和神经纤维。可见NFG对消化系的神经系统发育及运动功能具有重要意义。

3 结论

总之, 多种及多功能的NF与肠道之间肯定存在着密切关系。NF通过自身及其受体在肠道的广泛表达, 影响肠道神经元的释放、发育和神经递质的表达, 调节肠道动力, 肠道肌电活动及肠道感觉等, 从而影响肠道消化吸收功能。但其作用的具体效应及具体机制仍未完全明了, 有待进一步深入的研究。相信随着肠神经生物学的进展和先进技术的发展, 我们会对多种NF对肠道的影响有更全面的了解, 并充分运用于肠道疾病的治疗中。

4 参考文献

- 1 Facer P, Knowles CH, Thomas PK, Tam PK, Williams NS, Anand P. Decreased tyrosine kinase C expression may reflect developmental abnormalities in Hirschsprung's disease and idiopathic slow-transit constipation. *Br J Surg* 2001; 88: 545-552
- 2 Tu S, Debski EA. Neurotrophins, but not depolarization, regulate substance P expression in the developing optic tectum. *J Neurobiol* 2001; 48: 131-149
- 3 Sharma HS. Neurotrophic factors in combination: a possible new therapeutic strategy to influence pathophysiology of spinal cord injury and repair mechanisms. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 1841-1874
- 4 白春娇, 王廷华. 神经营养因子研究现状. *四川解剖学杂志* 2008; 16: 30-35
- 5 吴家华, 罗焕敏. 神经干细胞与神经营养因子. *中国老年学杂志* 2008; 28: 1558-1560
- 6 Cohen-Cory S, Dreyfus CF, Black IB. Expression of high- and low-affinity nerve growth factor receptors by Purkinje cells in the developing rat cerebellum. *Exp Neurol* 1989; 105: 104-109
- 7 柴宁莉. 神经营养因子及其受体与胃肠动力的关系. *国外医学·消化系疾病分册* 2002; 22: 159
- 8 路露, 陈美婉, 罗焕敏. 神经营养因子受体的研究进展. *中国老年学杂志* 2010; 30: 126-131
- 9 沈义刚, 刘佳, 李力燕, 王廷华. 神经营养因子及其受体在造血干细胞的体外表达检测. *四川解剖学杂志* 2009; 17: 3-9
- 10 Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci* 2006; 126-127: 264-272
- 11 Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007; 132: 1344-1358
- 12 Nasser Y, Fernandez E, Keenan CM, Ho W, Oland LD, Tibbles LA, Schemann M, MacNaughton WK, Rühl A, Sharkey KA. Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G912-G927
- 13 Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 2003; 41: 81-93
- 14 Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1861-1867
- 15 Fischer M, Stüben G, Klahold M, Stuschke M, Budach V, Sack H, Jahnke K. Accelerated hyperfractionated radiotherapy with concurrent chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: a phase II study. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127: 507-511
- 16 范一宏, 周钰, 李延玲, 吕宾, 张璐, 黄争. 外源性胶质细胞源性神经营养因子对慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛超微结构的影响. *中华消化杂志* 2009; 29: 845-846
- 17 Peterziel H, Unsicker K, Kriegelstein K. TGFbeta induces GDNF responsiveness in neurons by recruitment of GFRalpha1 to the plasma membrane. *J Cell Biol* 2002; 159: 157-167
- 18 Hsu YC, Lee DC, Chiu IM. Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors. *Cell Transplant* 2007; 16: 133-150
- 19 周磊. 内源性GDNF对体外培养DRG神经元的影响. *昆明医学院学报* 2009; 30: 1-6
- 20 Wartiovaara K, Salo M, Sainio K, Rintala R, Sariola H. Distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA in human colon suggests roles for muscularis mucosae in innervation. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 1501-1506
- 21 Garcès A, Haase G, Airaksinen MS, Livet J, Filippi P, deLapeyrière O. GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron. *J Neurosci* 2000; 20: 4992-5000
- 22 Rosenthal A. The GDNF protein family: gene ablation studies reveal what they really do and how. *Neuron* 1999; 22: 201-203
- 23 von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut* 2004; 53: 222-228
- 24 von Boyen G, Steinkamp M. [The enteric glia and neurotrophic factors] *Z Gastroenterol* 2006; 44:

■应用要点

神经营养因子对肠道神经的发育、存活、修复等多种生理活动发挥至关重要的作用, 对肠道组织生理功能的完整有重要意义, 对于推动胃肠道的基础和临床研究都有积极的意义, 他能充分运用于肠道疾病的治疗中。

■同行评价

本文选题较好,具有一定的临床研究价值。

- 985-990
- 25 von Boyen GB, Steinkamp M, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by pro-inflammatory cytokines. *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 820-825
- 26 von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 346-354
- 27 李延玲, 范一宏, 吕宾, 张璐. 胶质细胞系源性神经营养因子对泻药性结肠大鼠肠道传输功能的影响. *胃肠病学* 2008; 13: 679-681
- 28 李延玲, 范一宏. 胶质细胞源性神经生长因子与慢传输性便秘. *国际消化病杂志* 2008; 28: 498-500
- 29 袁建华, 何平. 脑源性神经营养因子及其临床研究. *医学综述* 2008; 14: 177-180
- 30 Grider JR, Piland BE, Gulick MA, Qiao LY. Brain-derived neurotrophic factor augments peristalsis by augmenting 5-HT and calcitonin gene-related peptide release. *Gastroenterology* 2006; 130: 771-780
- 31 Boesmans W, Gomes P, Janssens J, Tack J, Vanden Berghe P. Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut* 2008; 57: 314-322
- 32 赖华梅, 诸琦. 脑源性神经营养因子在肠道中的作用. *国际内科学杂志* 2007; 34: 654-656
- 33 Delafoy L, Gelot A, Ardid D, Eschaliere A, Bertrand C, Doherty AM, Diop L. Interactive involvement of brain derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and calcitonin gene related peptide in colonic hypersensitivity in the rat. *Gut* 2006; 55: 940-945
- 34 Johansson M, Norrgård O, Forsgren S. Study of expression patterns and levels of neurotrophins and neurotrophin receptors in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 398-409
- 35 赖华梅, 诸琦, 王静, 张明均. 脑源性神经营养因子在乳鼠结肠扩张刺激诱导的慢性内脏高敏感和肠道动力异常中的作用. *胃肠病学* 2008; 13: 223-227
- 36 毕建清, 姚远, 文铁桥. 神经营养因子NT-3神经干细胞移植对帕金森病大鼠功能修复研究. *科技导报* 2009; 27: 48-53
- 37 郑淑蓓, 项尊, 季峰. 神经营养因子调节肠道动力的研究进展. *浙江医学* 2005; 27: 633-634
- 38 柴宁莉, 董蕾, 杜克莘, 王建华, 闫立坤, 董西林, 方萍. 神经营养因子-3对大鼠胃肠肌电活动的影响. *西安交通大学学报(医学版)* 2003; 24: 265-267
- 39 Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hajarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4652-4657
- 40 刘庆山, 朱深银, 李韶菁, 崔箭, 竺晓明, 谭初兵, 张莉, 杜冠华. 重组人睫状神经营养因子对糖尿病大鼠胃肠功能的影响. *中国药理学杂志* 2008; 43: 1078-1081
- 41 刘庆山, 张莉, 李韶菁, 杨志宏, 崔箭, 杜冠华. NGF与CNTF联合治疗糖尿病大鼠胃肠神经病变的实验研究. *中国药理学杂志* 2010; 45: 111-114
- 42 Reinshagen M, Steinkamp M. NGF---not just a nerve growth factor in the gut. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R1322
- 43 王万亮, 吴万春. 神经生长因子与肠易激综合征. *胃肠病学和肝病杂志* 2010; 19: 285-287
- 44 Akbar A, Yiangou Y, Facer P, Walters JR, Anand P, Ghosh S. Increased capsaicin receptor TRPV1-expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. *Gut* 2008; 57: 923-929
- 45 王亚雷, 姚玮艳, 章永平, 乔敏敏, 袁耀宗. 电压门控钠通道亚单位在大鼠肠易激综合征模型中变化的研究. *胃肠病学* 2006; 11: 143-147
- 46 Barreau F, Salvador-Cartier C, Houdeau E, Bueno L, Fioramonti J. Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut* 2008; 57: 582-590
- 47 Piche T, Saint-Paul MC, Dainese R, Marine-Barjoan E, Iannelli A, Montoya ML, Peyron JF, Czerucka D, Cherikh F, Filippi J, Tran A, Hébuterne X. Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome. *Gut* 2008; 57: 468-473
- 48 刘浩, 史松, 白晓斌, 陈进才, 樊林, 霍雄伟, 张道维, 席孝忠, 陈刚, 王红军, 王荣, 王康. 肠间质细胞和神经生长因子受体及一氧化氮合酶在先天性巨结肠的分布及意义. *第四军医大学学报* 2008; 29: 829-831

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》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。

肿瘤血管靶向治疗策略的新进展

刘臻臻, 罗琪

刘臻臻, 厦门大学医学院 福建省厦门市 361005
罗琪, 厦门大学附属中山医院普外科 福建省厦门市 361004
作者贡献分布: 本文综述由刘臻臻完成, 罗琪审校。
通讯作者: 罗琪, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学附属中山医院普外科. luoximzsh@126.com
收稿日期: 2010-05-02 修回日期: 2010-08-19
接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-09-28

Recent advances in research of vascular targeting strategy for tumor therapy

Zhen-Zhen Liu, Qi Luo

Zhen-Zhen Liu, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China
Qi Luo, Department of General Surgery, Affiliated Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China
Correspondence to: Qi Luo, Department of General Surgery, Affiliated Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. luoximzsh@126.com
Received: 2010-05-02 Revised: 2010-08-19
Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-09-28

Abstract

Tumor angiogenesis is a complicated pathologic process and plays an important role in the growth and metastasis of many solid tumors. There are two vascular targeting strategies for tumor therapy: inhibition of tumor angiogenesis and blockage of tumor blood flow. The former aims to inhibit tumor neovascularization, while the latter seeks to induce a rapid and selective tumor vascular shutdown so that the blood flow to tumors, especially large tumors, is arrested. Vascular targeting therapy is a potential new and important mean of treatment for malignant tumors. In this paper, we summarize the recent advances in research of vascular targeting strategy for tumor therapy.

Key Words: Vascular targeting therapy; Antiangiogenic strategy; Vascular-disrupting reagent

Liu ZZ, Luo Q. Recent advances in research of vascular targeting strategy for tumor therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2889-2893

摘要

肿瘤血管生成(tumor angiogenesis)对大多数实

体瘤的生长和转移具有重要意义, 他是一个多步骤多因素参与的复杂病理过程. 抗肿瘤血管的治疗策略分为抑制肿瘤新生血管生成和阻断肿瘤血管血流两方面. 抑制肿瘤新生血管生成旨在抑制肿瘤新生血管生成的过程, 目前研究的成果比较多; 而阻断肿瘤血管血流则是通过快速而选择性地破坏肿瘤血管功能, 使肿瘤血供受阻, 对于治疗较大体积的肿瘤有显著的疗效. 肿瘤血管的靶向治疗特别是阻断肿瘤血管血流将成为恶性肿瘤的一种新的、重要的常规治疗手段. 本文对近年来这两方面的研究进展进行综述.

关键词: 肿瘤血管靶向治疗; 肿瘤血管生成抑制策略; 血管阻断制剂

刘臻臻, 罗琪. 肿瘤血管靶向治疗策略的新进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(27): 2889-2893
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2889.asp>

0 引言

近年来, 恶性肿瘤发病率逐年上升, 尽管人类对肿瘤细胞生物学和遗传学的认识已深入到分子生物学水平, 新的治疗理念, 治疗方法不断涌现, 癌症的治疗研究已经取得了相当大的进步, 已有部分癌症可以借助于药物治疗而提高治愈率和延长生存期, 但是癌症的整体治愈率依然低下. 随着分子肿瘤学的发展以及人们对肿瘤本质认识的逐步深入, 分子靶向治疗在癌症的治疗中发挥着愈来愈重要的作用, 其中以肿瘤血管为靶点的治疗策略是众多学者关注的焦点^[1]. 肿瘤血管的分子靶向治疗是以肿瘤血管系统为靶点, 选择性地作用在肿瘤新生血管上, 在分子水平发挥抗肿瘤作用, 而对正常组织的不良反应极小, 他成为目前探索肿瘤治疗新方法的热点领域. 1971年Folkman首先提出抗血管形成可作为肿瘤治疗的一个途径. 随后, 这种以肿瘤血管为靶点的治疗策略-肿瘤血管靶向治疗(vascular targeting therapy)日益受到重视. 目前, 肿瘤血管靶向治疗策略主要包括两方面: 抑制肿瘤血管生成和阻断肿瘤血管血流. 本文就其有关研究

■背景资料

1971年Folkman首先提出抗血管形成可作为肿瘤治疗的一个途径. 随后, 这种以肿瘤血管为靶点的治疗策略-肿瘤血管靶向治疗(vascular targeting therapy)日益受到重视. 目前, 肿瘤血管靶向治疗策略主要包括两方面: 抑制肿瘤血管生成和阻断肿瘤血管血流.

■同行评议者

黄园, 教授, 四川大学华西药学院药剂系

■ 研发前沿

随着分子肿瘤学的发展以及人们对肿瘤本质认识的逐步深入,分子靶向治疗在癌症的治疗中发挥这愈来愈重要的作用,其中以肿瘤血管为靶点的治疗策略是众多学者关注的焦点.肿瘤血管的分子靶向治疗是以肿瘤血管系统为靶点,选择性地作用在肿瘤新生血管上,在分子水平发挥抗肿瘤作用,而对正常组织的不良反应极小,他成为目前探索肿瘤治疗新方法的热点领域.

进展综述如下.

1 针对抑制肿瘤新生血管生成的治疗策略

肿瘤血管生成抑制策略就是一种以阻止和减少肿瘤组织血管生成为目的的治疗方法.血管生成是肿瘤生长的关键,实体瘤的进行性生长依赖于其诱导产生的血管网的建立.血管形成还确保了肿瘤代谢的进行,对肿瘤增殖必不可少,肿瘤需要功能性的血管网络提供氧气、养料并清除代谢产物.肿瘤除了通过与宿主血管融合而获得部分血管外,还必须通过形成新生血管网构建自己的血管系统,这样才能持续地生长和发展.如果没有血管系统提供氧气和养料,实体瘤的增长不会超过 $1\text{ mm}^{3[2]}$.当肿瘤体积大于 2 mm^3 时,肿瘤血管化开始形成,肿瘤增殖进入血管期,肿瘤体积迅速成倍增大.而新生的血管不成熟,管壁薄弱,基膜不完整,因此通透性较高,为肿瘤细胞提供了转移通道.众多研究表明,肿瘤内微血管密度(micro vessel density, MVD)与肿瘤的恶性表型密切相关,肿瘤MVD与其恶性度、术后复发转移率等呈正相关,与生存率和生存时间呈负相关^[3].

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可直接作用于血管内皮细胞,刺激其发生有丝分裂,从而促进新生血管的生长,他是最重要的血管形成因子.VEGF是内皮细胞的特异性生长因子,并且是最特异和最关键的血管生成刺激因子,几乎参与了生理性和病理性血管形成的每一步,可以直接作用于血管内皮细胞,刺激其发生有丝分裂,从而促进新生血管的生长,结直肠癌、乳腺癌、肺癌等恶性肿瘤细胞均有自分泌VEGF的功能,发生游走转移的肿瘤细胞在局部可以释放VEGF刺激局部血管的形成.VEGF及其受体在多种肿瘤中表达,而在血管生成活跃组织(如肿瘤等)以外较少表达.因此,VEGF被视为抑制血管形成的最重要的靶向分子之一^[4].

迄今,抗VEGF单克隆抗体贝伐单抗和VEGF受体(VEGF receptor, VEGFR)的酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKI)索拉非尼(sorafenib)和苏尼替尼(sunitinib)已被美国食品与药品管理局批准上市.但是, Ebos等^[5]和 Pàez-Ribes等^[6]的最新研究互为补充,共同证实了在某些肿瘤类型中,靶向作用于VEGF通路的各种抗血管生成治疗可能引起转移的增多.童强等^[7]利用包裹阿霉素的VEGF-脂质体于体外

靶向杀伤肿瘤血管内皮细胞.证明VEGF-脂质体可特异性的识别肿瘤血管内皮细胞,并作为良好载体将阿霉素带入细胞,实现其杀伤作用,减少对生理性血管的影响.

目前一些血管生成抑制剂特别是针对VEGF及其受体的各类抑制剂,已被证明具有良好的抗肿瘤效应.相对于传统的化疗药物,不引起耐药性是抗血管生成治疗的最大优点.但使用VEGF抑制剂最令人担心的是VEGF的生理性和保护性功能也可能被抑制,从而产生远期毒性.因而寻找高度特异性的抗VEGF抑制剂,从而避免对生理性血管生成的影响、加强抗肿瘤活性,是十分必要的.随着对VEGF抑制剂及其他血管生成抑制剂的不断研究,抗血管生成必将为肿瘤治疗带来新的希望.

Notch-1的小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA),是近年发展起来的一种新的基因工程技术.曲妥单抗或TKI与Notch-1的siRNA联用可比其单用更好地抑制肿瘤细胞的增殖,且可以有效逆转许多肿瘤细胞对曲妥单抗的耐药性,并能完全抑制曲妥单抗敏感和不敏感型BT474乳腺癌细胞的增殖^[8].碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)作为成纤维细胞生长因子家族中的一员,不仅直接促进细胞的增殖,还参与肿瘤新生血管的形成,在肿瘤的发生发展中可能起重要作用^[9].bFGF和VEGF具有协同作用, O'Connor等^[10]报道通过bFGF可以使内皮细胞的凋亡抑制因子(survivin)表达快速上升. bFGF可通过激活PI3K/Akt途径上调survivin的表达^[11].有报道称, survivin与bFGF在肺癌、口腔鳞癌等的表达呈正相关, survivin和bFGF的协同作用是肺癌进展和转移的重要环节,与肺癌的不良生物学行为和不良预后相关.

在诸多的抗肿瘤血管生成因子中,研究较多且疗效较好的主要有:抗VEGF抗体、血管抑素(angiostatin)、内皮抑素(endostatin)和血管内皮生长抑制剂(vascular endothelial growth inhibitor, VEGI)等,然而,这些抑制因子多数仍以阻止或减缓肿瘤血管进一步生长为主,对已形成的血管则难以达到破坏作用.

2 血管阻断作用特点及血管阻断制剂

肿瘤血管阻断制剂(vascular-disrupting agents, VDAs)是一种可以快速而选择性地引起肿瘤即存血管损伤的药物.与抗血管新生制剂旨在阻

表 1 两种肿瘤血管靶向治疗策略的比较

比较项目	抗血管新生	肿瘤血管阻断
作用机制	抑制肿瘤新生血管新生的瀑布式生化反应过程	损坏或阻塞已构建成熟的肿瘤血管
治疗效果	抑制了肿瘤新生血管的生成	肿瘤血管塌陷、闭塞、血栓, 形成致肿瘤血供受阻
治疗类型	预防早期肿瘤或无症状转移瘤, 为慢性治疗	治疗血管已构建的较大体积肿瘤, 为急性治疗

止血管出芽增殖生成新生血管这一链式反应过程不同的是, VDAs作用机制是破坏实体瘤血管内皮细胞导致肿瘤细胞缺乏养料和氧气而死亡, 引起肿瘤内大部分已构建成熟的血管和芽生毛细血管的阻塞, 迅速导致肿瘤的大面积坏死。

抗血管新生制剂旨在抑制肿瘤新生血管新生的过程, 抗血管新生剂抑制肿瘤新生血管的形成, 应用于处于早期阶段的肿瘤或无症状的转移瘤的预防, 因此对已形成的血管影响比较小。而VDAs则是通过快速而有选择地损坏或阻塞已构建完成的肿瘤血管, 使肿瘤血供受阻从而引起肿瘤坏死, 对于治疗较大体积的肿瘤有显著的疗效。后者能间接的杀死已对传统抗肿瘤增殖的放化疗方法产生抵抗的肿瘤细胞(表1)。

耶鲁大学的Hu和Garen等^[12-14]研究出一种以组织因子(tissue factor, TF)为靶向的免疫结合物(immunoconjugate), 可以选择性破坏已形成的肿瘤血管而不损害正常血管。

TF是血液凝固的生理性始动因子, 他是一种跨膜糖蛋白, 广泛存在于血管外膜层和某些组织血管外细胞, 他的配体是血浆第VII因子, 正常时两者保持分离状态, 当组织受损伤时, TF被释放, 并与VII因子、钙离子结合形成复合物, 从而激活外源性凝血系统, 以使血凝块形成。研究表明, 正常生理状态下, TF在细胞表面处于非激活状态, 在正常血管内皮细胞上, 血液中血小板及单核细胞不表达TF, 活化TF的浓度可能在20 fmol/L以下。在炎症、肿瘤、缺氧等病理状态下, 诸多活性物质如组胺、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、C-反应蛋白(c-reactive protein, CRP)等均可诱导血管内皮细胞表达TF^[15-18]。

选择性促进肿瘤血管内血栓形成而诱发肿瘤梗塞坏死是一种很有前景的抗肿瘤策略。以截短组织因子(truncated tissue factor, tTF)作为效应因子, 结合肿瘤血管靶向载体实现选择性诱发肿瘤组织血管栓塞, 阻断肿瘤血管血流供应导致肿瘤坏死, 开创了肿瘤血管靶向治疗新方法。研究证明仅含有TF胞外区的tTF, 仍保留与凝

血因子VII(anti-hemophilic factor VII, FVII)或FVIIa结合并激活FX和FIX的活性, 并且游离的tTF对FX的激活能力要比完整的跨膜TF低5个数量级, 这是因为TF-FVIIa复合物在带负电荷的磷脂膜表面能更有效地结合并激活FX和FIX^[19,20]。构建载体-tTF的融合蛋白, 通过载体部分识别肿瘤血管标志物, 将tTF选择性靶向于肿瘤组织血管, 并起到TF膜结合区的作用, 当正确靶向结合后, 开始凝血而阻断肿瘤内血液流通, 肿瘤开始坏死。但单独是tTF与FVII的结合并不能有效激活FX, 杨桂旺等^[21]将特异性结合肿瘤血管内皮细胞膜标记物-整合素受体 $\alpha v \beta 3$ 的小肽RGD-4C作为tTF的特异性载体, 利用基因工程技术成功获得RGD/tTF/pET22(+)重组子, 并在*E.coli* BL21(DE3)中高效表达, 得到的融合蛋白RGD/tTF能特异性结合于肿瘤血管内皮细胞整合素受体 $\alpha v \beta 3$, 且保留有TF活化FX引起血液凝固的特性。Yan等^[22]利用基因工程技术成功构建表达了3个串联RGD-4C与tTF的新型融合蛋白(RGD)3/tTF, 并证明其可以有效增加TF融合蛋白载体组分RGD与受体 $\alpha v \beta 3$ 的结合能力, 利用间接ELISA分析(RGD)3/tTF与 $\alpha v \beta 3$ 的特异结合能力, 发现(RGD)3/tTF与 $\alpha v \beta 3$ 的特异结合能力比RGD/tTF提高了32%。新型融合蛋白(RGD)3/tTF已在*E.coli*系统成功表达, 表达蛋白保持tTF的活性并显示比RGD/tTF更高的与 $\alpha v \beta 3$ 的结合能力, 表明改善TF融合蛋白的定位与富集速度, 能更有效地诱发肿瘤组织血管栓塞。黄正接等^[23]也对(RGD)3/tTF与肿瘤血管标志物 $\alpha v \beta 3$ 特异性结合能力进行了研究, 发现(RGD)3/tTF与RGD/tTF融合蛋白凝血活性相似($F = 0.019$, $P > 0.05$), 但(RGD)3/tTF融合蛋白特异性结合整合素 $\alpha v \beta 3$ 的能力明显升高($F = 140.17$, $P < 0.01$)。当融合蛋白浓度为0.24 $\mu\text{mol/L}$ 时, (RGD)3/tTF融合蛋白的 A_{405} 值是RGD/tTF融合蛋白的1.32倍(1.25 vs 0.95), (RGD)3/tTF融合蛋白带有3个二硫键和3个RGD多肽, 保留了TF凝血活性的同时, 提高了与整合素 $\alpha v \beta 3$ 特异性结合。黄正接等^[24]证明(RGD)3-tTF融合蛋白通过配体RGD特异性结

■ 相关报道

童强等利用包裹阿霉素的VEGF-脂质体于体外靶向杀伤肿瘤血管内皮细胞, 证明VEGF-脂质体可特异性的识别肿瘤血管内皮细胞, 并作为良好载体将阿霉素带入细胞, 实现其杀伤作用, 减少对生理性血管的影响。

■应用要点

由于作用机制不同,靶向治疗与细胞毒治疗的联合治疗可能发挥更好的效果,相信在今后肿瘤血管的靶向治疗必将作为治疗肿瘤的一种重要的手段。

合 $\alpha v\beta 3$ 的途径选择性地结合到结肠癌裸鼠模型肿瘤血管,不会被肝脏等正常组织吸附,而且(RGD)3-tTF融合蛋白选择性结合结肠癌肿瘤血管的能力高于RGD-tTF融合蛋白。(RGD)3-tTF融合蛋白在保留TF凝血活性的同时能够高效、特异地结合 $\alpha v\beta 3$,选择性地结合到结肠癌肿瘤血管。Huang等^[25]证明当载体-tTF融合蛋白的载体结合于细胞膜后,tTF激活FX诱导肿瘤组织血管形成血栓,而治疗剂量的游离tTF融合蛋白对正常组织血管的凝血功能影响甚微,由于肿瘤组织中单一靶点数量的有限性及其表达的异质性,结合单一位点的载体介导的肿瘤血管靶向治疗效果并不理想,可以考虑多靶点联合治疗来克服这一缺点,以实现多靶点联合治疗。

Hu等^[26]更以嵌合性肿瘤细胞核单克隆抗体-3(chTNT-3)作为tTF的特异性载体,得到融合蛋白chTNT-3/tTF, chTNT-3是小鼠的Fv基因与人IgG(1)Fc基因的嵌合重组产物,人源部分占70%,鼠源部分占30%。将chTNT-3/tTF与融合蛋白RGD/tTF以及两者联合治疗BALB/c小鼠, chTNT-3/tTF的抑瘤率比RGD/tTF的要高,而二者联合治疗的抑瘤率比两者分别作用都要高。

3 结论

探讨抗肿瘤血管的靶向治疗策略是医学研究的前沿课题,人们一直致力于寻找选择性作用于肿瘤而非正常组织的抗肿瘤策略。一个理想的靶向肿瘤的治疗策略应该是:能特异性靶向肿瘤组织;不影响正常组织及正常细胞;既能杀灭肿瘤细胞,也能杀灭肿瘤干细胞;能进入肿瘤组织内部,无免疫障碍。虽然目前大多均处于临床前阶段,但随着人们对肿瘤的基因及其功能认识的不断深入,相信在不久的将来,有可能研究出更多新的靶向更精确、疗效更确切的肿瘤治疗方案。此外,由于作用机制不同,靶向治疗与细胞毒治疗的联合治疗可能发挥更好的效果,相信在今后肿瘤血管的靶向治疗必将作为治疗肿瘤的一种重要的手段。

4 参考文献

- Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438: 967-974
- Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14: 53-65
- Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the

literature and meta-analysis. *Cancer Res* 2004; 64: 2941-2955

- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676
- Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2009; 15: 232-239
- Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 2009; 15: 220-231
- 童强, 王国斌, 卢晓明, 宋波, 黎维勇, 陶凯雄, 陈道达. 血管内皮生长因子-阿霉素脂质体的制备及体外靶向杀伤肿瘤血管内皮细胞的研究. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 313-315
- Osipo C, Patel P, Rizzo P, Clementz AG, Hao L, Golde TE, Miele L. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor. *Oncogene* 2008; 27: 5019-5032
- Polnaszek N, Kwabi-Addo B, Peterson LE, Ozen M, Greenberg NM, Ortega S, Basilico C, Ittmann M. Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 5754-5760
- O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, Nath AK, Pober JS, Altieri DC. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 393-398
- Wu X, Yan Q, Huang Y, Huang H, Su Z, Xiao J, Zeng Y, Wang Y, Nie C, Yang Y, Li X. Isolation of a novel basic FGF-binding peptide with potent antiangiogenic activity. *J Cell Mol Med* 2008 Sep 15. [Epub ahead of print]
- Hu Z, Garen A. Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12180-12185
- Hu Z, Sun Y, Garen A. Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8161-8166
- Hu Z, Garen A. Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 9221-9225
- Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 2005; 105: 2764-2770
- Steffel J, Arnet C, Akhmedov A, Iseli SM, Lüscher TF, Tanner FC. Histamine differentially interacts with tumor necrosis factor-alpha and thrombin in endothelial tissue factor induction: the role of c-Jun NH2-terminal kinase. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2452-2460
- Cirillo P, Golino P, Calabrò P, Cali G, Ragni M, De Rosa S, Cimmino G, Pacileo M, De Palma R, Forte L, Gargiulo A, Corigliano FG, Angri V, Spagnuolo R, Nitsch L, Chiariello M. C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation. *Cardiovasc Res* 2005; 68: 47-55
- Nadir Y, Brenner B, Zetser A, Ilan N, Shafat I, Zcharia E, Goldshmidt O, Vlodavsky I. Heparanase induces tissue factor expression in vascular endo-

- thelial and cancer cells. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2443-2451
- 19 Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey JH, Edgington TS. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem* 1991; 266: 2158-2166
 - 20 Krishnaswamy S, Field KA, Edgington TS, Morrissey JH, Mann KG. Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X. *J Biol Chem* 1992; 267: 26110-26120
 - 21 杨桂旺, 庄国洪, 王阶平, 李文珠, 吴娜, 颜江华. 用于肿瘤血管靶向治疗的RGD/tTF融合蛋白的表达及活性鉴定. *中国免疫学杂志* 2006; 22: 71-74
 - 22 Yan JH, Yang GW, Wang JP, Wu N, Zhuang GH. [Gene expression and activities analysis of a new fusion protein (RGD) 3/tTF] *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2007; 23: 409-412
 - 23 黄正接, 罗琪, 颜江华, 王生育. 靶向血栓蛋白(RGD)_3-tTF与肿瘤血管标志物 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合能力的研究. *癌变·畸变·突变* 2009; 21: 413-417
 - 24 黄正接, 罗琪, 颜江华, 王生育. (RGD)3/tTF融合蛋白选择性结合结肠癌裸鼠模型肿瘤血管的实验研究. *中国癌症杂志* 2009; 19: 735-741
 - 25 Huang X, Ding WQ, Vaught JL, Wolf RF, Morrissey JH, Harrison RG, Lind SE. A soluble tissue factor-annexin V chimeric protein has both procoagulant and anticoagulant properties. *Blood* 2006; 107: 980-986
 - 26 Hu P, Yan J, Sharifi J, Bai T, Khawli LA, Epstein AL. Comparison of three different targeted tissue factor fusion proteins for inducing tumor vessel thrombosis. *Cancer Res* 2003; 63: 5046-5053

■同行评价

本文选题尚可, 内容详实, 可读性好。

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》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 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、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。

VEGF在肿瘤生长和血管生成中的作用

段泽星, 谢立群

■背景资料

在人类许多种癌症中, 增加的肿瘤血管化作用和肿瘤促血管生成因子的表达被证实与肿瘤的分级和恶性预后有关. VEGF和他的受体在正常和病理血管生成中发挥着中枢作用. 启动VEGF/VEGFR轴触发多重信号网络, 导致上皮细胞存活、有丝分裂、转移和分化、血管渗透.

段泽星, 谢立群, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科 天津市 300162

作者贡献分布: 本文由段泽星完成; 谢立群审校.

通讯作者: 谢立群, 300162, 天津市, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科. xieliquan66@hotmail.com

收稿日期: 2010-03-30 修回日期: 2010-06-10

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-09-28

Role of the vascular endothelial growth factor signaling pathway in tumor growth and angiogenesis

Ze-Xing Duan, Li-Qun Xie

Ze-Xing Duan, Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Correspondence to: Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China. xieliquan66@hotmail.com

Received: 2010-03-30 Revised: 2010-06-10

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-09-28

Abstract

New blood vessel formation (angiogenesis) is a fundamental event in the process of tumor growth and metastatic dissemination. Hence, the molecular basis of tumor angiogenesis has been of keen interest in the field of cancer research. The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway is well established as one of the key regulators of this process. The VEGF/VEGF-receptor axis is composed of multiple ligands and receptors with overlapping and distinct ligand-receptor binding specificities, cell-type expression, and function. Activation of the VEGF signaling pathway triggers a network of signaling processes that promote endothelial cell growth, migration, and survival from pre-existing vasculature. In addition, VEGF-mediated vessel permeability has been associated with malignant effusions. More recently, an important role of VEGF has emerged in mobilization of endothelial progenitor cells from the bone marrow to distant site neovascularization. The well-established role of VEGF in promoting tumor angiogenesis and the pathogenesis of human cancers has led to the rational design

and development of reagents that selectively target this pathway. Studies with various anti-VEGF/VEGFR therapies have shown that these reagents can potentially inhibit angiogenesis and tumor growth in preclinical models.

Key Words: Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis; Lymphogenesis; Tumor

Duan ZX, Xie LQ. Role of the vascular endothelial growth factor signaling pathway in tumor growth and angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2894-2900

摘要

新血管的形成(angiogenesis)是肿瘤生长转移和传播过程中的一种基本活动. 因此,在癌症研究领域,人们对研究肿瘤血管生成的分子机制十分感兴趣. 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)路径是这一过程的关键调节者. VEGF/VEGFR轴由多重配基和受体质量叠加交错组成,并且受体与配基结合具有专一性,在不同的细胞中具有不同的细胞类型表达和功能. 启动VEGFR信号通路,触发了一个网状的信号过程,从而促进血管内皮细胞生长、转移和存活. 此外,VEGF介导的血管渗透性,已经被证实与恶性渗出有关. 最近,VEGF的一个重要作用表现为可动员内皮祖细胞从骨髓向远处转移而形成新生血管. VEGF促进肿瘤血管生成的作用和与人类癌症的发病机制的关系是确定的,因而有必要设计和发展针对这一途径的抑制因子. 许多的抗VEGF/VEGFR治疗的研究表明,这些因子能有效地抑制临床前模型的血管生成和肿瘤生长. 因此,抑制VEGF途径被确认为是一种重要的有效的抗癌模式.

关键词: 血管内皮生长因子; 血管生成; 淋巴管生成; 肿瘤

段泽星, 谢立群. VEGF在肿瘤生长和血管生成中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2894-2900

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2894.asp>

0 引言

肿瘤生长依赖新生血管的形成已经是肿瘤生物

■同行评议者

曹杰, 主任医师, 广州医学院附属广州市第一人民医院胃肠外科

学上研究比较透彻的一个方面. 血管生成可提供氧气、营养物质、生长因子、荷尔蒙及蛋白水解酶, 对控制凝血和纤维蛋白溶解系统的止血因子和对于肿瘤细胞向远处散布是有影响的. 血管生成是一个高度复杂的动态过程, 由许多促或抗血管生成分子调节. 血管生成的开关被认为是促血管生成机制超过抗血管生成的一个恶性标志^[1]. 总体来说, 在人类许多种癌症中, 增加的肿瘤血管化作用和肿瘤促血管生成因子的表达被证实与肿瘤的分级和恶性预后有关. VEGF和他的受体在正常和病理血管生成中发挥着中枢作用. 启动VEGF/VEGFR轴触发多重信号网络, 导致上皮细胞存活、有丝分裂、转移和分化、血管渗透. 另外, VEGF介导血管渗透已经被证实与恶性渗液有关. VEGF诱导的血管渗透性导致蛋白在间质沉积, 从而促进血管生成. 过量表达VEGF与多种肿瘤的发展和恶性预后有关, 包括结肠癌, 乳腺癌, 前列腺癌, 肺癌和黑素瘤. 由于VEGF及VEGFR途径在肿瘤血管生成中的中心作用, 他已经是肿瘤学领域药物发展和基础研究的焦点. 这篇综述着重阐述VEGF及其受体在调节血管生成方面的生物学作用, 及其在阻断VEGF信号途径在肿瘤血管生成方面的作用.

1 VEGF及VEGFR家族的特性

1.1 VEGF家族的特性 VEGF相关基因家族包括6个分泌型的糖蛋白, 分别为VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E和胎盘生长因子(placenta growth factor, PDGF)-1and-2. VEGF-A(通常被标为VEGF)首先被Senger等^[2]证实为一个肿瘤细胞分泌的血管渗透性因子, 被称为血管通透性因子(vascular permeability factor, VPF). Leung等^[3]后来分离和克隆的VEGF-A为一种内皮特殊分裂素. VEGF-A是一个45 000 Da的具有广泛血管生成活性的糖蛋白. VEGF-A由8个外显子和7个内含子组成, 不同的剪切方式形成分为5种单体, 即VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189、VEGF206, 其中VEGF165是VEGF-A最重要的同源单体, 缺少由外显子6编码的残基, 具有肝素结合位点, 既可分泌到细胞外液也可结合到细胞表面或细胞外基质, 同时含量最多, 分裂原性也最强. VEGF-B和PIGF裸鼠在胚胎血管生成和畸形发育方面显示为没有作用, 这说明PIGF和VEGF-B的作用可能是多余的. 但是缺少PIGF在缺血、炎症、伤口愈合及

肿瘤生长时损害血管生成、血浆外渗及侧突生长, 表明PIGF在成人病理状态时是发挥作用的. VEGF-C和VEGF-D在胚胎和出生后的淋巴管生成方面发挥着关键作用. 纯合子缺乏VEGF-C基因小鼠在胚胎期是致命的, 杂合子缺乏导致出生后小鼠淋巴管发展缺陷. VEGF-C和VEGF-D可能在新生血管方面也发挥着重要作用, 特别在病理期时, 如肿瘤生长. 但是, VEGF-C和VEGF-D在血管生成方面的作用还没有明确. VEGF-E 是从羊口疮病毒感染组分离出来的, 具有刺激内皮细胞的增殖、迁移, 还具有增强血管的通透性的作用.

1.2 VEGF受体分子生物学特性与功能 VEGF配基通过多种不同受体介导血管生成作用. 两个受体最初在内皮细胞证实, 他们为特殊的酪氨酸激酶受体(receptor tyrosine kinase, RTK)VEGFR-1(Fit-1)和VEGFR-2(FiK-1). 后来证实在成人多种生血细胞谱上也是表达的. 这两种受体由具有7个免疫球蛋白样结构的细胞外区、膜区及酪氨酸激酶区组成, 均是跨膜受体, 属于RTKⅢ型, 其共同特点是催化域内有酪氨酸激酶插入区, 该酪氨酸激酶的活性通过受体和配体结合而激活, 受体磷酸化可引起细胞内许多酶和其他反应, 在细胞的生长和分化中起重要作用. 最近, 一种另外的RTK, VEGFR-3(Fit-4)被证实, 并且发现与淋巴管生成密切相关. 不同的VEGF家族具有不同的受体结合位点, 这可帮助阐明他们的功能. 所有的VEGF-A亚型可同时VEGFR-1和VEGFR-2, 但PIGF-1、PIGF-2及VEGF-B与VEGFR-1特异性结合和激活. 天然生成的VEGF-A和PIGF异二聚体也证实能结合和激活VEGFR-2. VEGF-E特异性的与VEGFR-2有关, 但VEGF-C与VEGF-D可与VEGFR-3和VEGFR-2结合. 肿瘤中可同时表达几种不同的VEGF配基, 但是VEGFRs却在特定的内皮细胞床上表达, VEGFR-2在所有的内皮细胞都能表达, 但VEGFR-1和VEGFR-3选择性的表达于不同的血管床的内皮细胞上.

2 VEGF与肿瘤

2.1 VEGF在内皮细胞中的作用

2.1.1 血管渗透性: VEGF是一个通过刺激内皮细胞上同系受体介导多重功能的多效的生长因子. VEGF由于其对小静脉有高渗作用而被命名为VPF. 事实上, VEGF是已知的最有效的VPF, 比组织胺要强50 000倍. VEGF增强微血管渗透

■研发前沿

过量表达VEGF与多种肿瘤的发展和恶性预后有关, 包括结肠癌, 乳腺癌, 前列腺癌, 肺癌和黑素瘤. 由于VEGF及VEGFR途径在肿瘤血管生成中的中心作用, 他已经是肿瘤学领域药物发展和基础研究的焦点.

■相关报道

Salven等报道VEGF-C的表达与淋巴管的发育有关, VEGF-C能够作为一个重要的分子调节肿瘤细胞和淋巴管上皮细胞之间的相互旁分泌关系。

性的能力是他最重要的一个特性, 肿瘤血管的高渗透性被认为与肿瘤细胞表达VEGF有关。血管高渗透性可导致多种血浆蛋白, 包括纤维蛋白原及其他凝固蛋白的外漏。这种能力可导致纤维蛋白在细胞外间质沉积, 最终可延缓水肿液体的清除, 从而使正常组织抗血管生成向促血管生成转化^[4]。VEGF可增加多种血管床的渗透性, 包括皮肤、腹膜、肠系膜和隔膜的血管床, 可导致恶性腹水和恶性肿瘤性胸腔积液等病理状态。事实上, 抑制VEGF可减少胸腔积液和腹水的形成。VEGF增加微血管渗透性的精确机制还不是很清楚。Dvorak等^[5]已经发现VEGF通过跨内皮细胞途径诱导大分子从内皮细胞渗出。其他研究者证实VEGF可通过其他跨细胞途径诱导内皮细胞开窗, 或者是VEGF增加细胞间内皮细胞而打开相邻内皮细胞间的连接。最近更多的研究证明VEGF诱导渗透性可能是介导钙离子依赖通路, 他涉及氧化亚氮生成、激活Akt通路和增加cGMP, 这是除了激活前列腺素的Erk1/2途径外的一条新途径。

2.1.2 内皮细胞的激活: VEGF在血管内皮和内皮细胞中发挥着许多不同的作用。这些作用包括细胞形态学的改变, 细胞骨架的变更以及刺激内皮细胞迁移和生长。VEGF可诱导增加许多不同的内皮细胞基因表达, 包括促凝血组织因子和溶解纤维蛋白途径的蛋白, 其中溶解纤维蛋白途径的蛋白包括尿激酶, 组织型纤维蛋白溶酶原激活剂, 纤维蛋白溶酶原激活剂的抑制剂, 尿激酶抑制剂, 金属基质蛋白酶, 谷氨酸葡萄糖载体, 氮氧合酶, 整合素, 和多种分裂素。VEGF已经被证实能通过释放氧化亚氮和前列腺素诱导活体外血管舒张。将VEGF注射入大鼠体内可造成短暂的心动过速, 低血压和心脏输出量的减少。VEGF的这种作用可能可以从部分上解释临床抗VEGF实验时偶然发生高血压和头痛的现象。

2.1.3 存活: VEGF被首先发现为视网膜上皮细胞的一种存活因子, 然后现在被视为能促进活体内和活体外几种上皮细胞存活。在活体外, VEGF被发现可通过PI3K-Akt途径抑制细胞凋亡, 另外也可通过上调Bcl-2和A1等抗凋亡蛋白抑制细胞凋亡。VEGF可抑制上游caspase的激活, 上调抑制抗凋亡家族成员, 包括存活因子和XIAP^[6]。VEGF也被证实为可激活黏着激酶(focal adhesion kinase, FAK)和相关蛋白, 从而维持上皮细胞的存活信号通路。在活体内, 抑制VEGF

发现能引起新生小鼠视网膜血管强烈的凋亡改变, 而不是成熟小鼠。注射外源性VEGF可挽回未成熟小鼠视网膜血管的这种凋亡损害, 这种VEGF依赖也可见于新生肿瘤血管的上皮细胞, 而不是已经建立起来的脉管系统^[7]。成熟血管的这种VEGF失依赖性可能部分上可解释为被周皮细胞覆盖所致。

2.1.4 增殖: VEGF是上皮细胞的一种分裂素。这种上皮细胞增殖显现为涉及VEGFR-2介导激活细胞外激酶ERK1/2, 而不是另外一种MAP激酶家族成员JNK/SAPK。VEGF的这种有丝分裂活性也可涉及蛋白激酶C途径, 也许, 部分上, 被氧化亚氮所调节。尽管VEGF是一种重要的上皮细胞分裂素, 但是应该指出的是另外一种血管生成因子可能比上皮细胞分裂素更强, 这些血管生成因子缺乏VEGF活性。

2.1.5 浸润和迁移: 降解基底膜是上皮细胞浸润和迁移的必要的, 是启动血管生成的重要早期步骤。VEGF诱导降解过程的许多种酶和蛋白, 包括基质降解金属蛋白酶, 金属蛋白酶间质胶原酶及丝氨酸蛋白酶, 如尿激酶纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator, uPA)和组织型纤溶酶原激活剂。激活这些不同的复合物可降解周围环境从而利于内皮细胞迁移和萌芽。

另外的研究证明VEGF可促进内皮细胞uPA受体的表达。考虑到PA-纤维蛋白溶酶系统, 特别是uPA和uPAR的相互作用, 是介导细胞间浸润包括蛋白水解作用和组织重塑的关键步骤, 这些发现与VEGF的促血管生成活性是一致的。此外, uPA自己也可导致多种不同的血管生成因子的产量增加, 包括VEGF, 这证明了一种自分泌调节环路的存在。

VEGF导致上皮细胞转移的细胞间机制还不太清楚, 但是可显示出与FAK相关途径有关, 导致黏着斑翻转和肌动蛋白丝组建, 和P38诱导肌动蛋白重组一样。另外, NO被认为也在VEGF诱导上皮细胞迁移过程中发挥重要作用。Akt依赖激活内皮细胞氧化亚氮合成, 被认为是VEGF诱导细胞迁移所需要的。NO也被报道为能调节黏着斑合FAK酪氨酸磷酸化, 表明FAK和NO在调节细胞迁移的通路。

2.2 VEGF与肿瘤血管生成 肿瘤生长依赖血液供应, 需要生成新生血管, 而VEGF在新生血管生长过程中发挥着中心作用。在众多血管再生性因子当中, VEGF及其受体是公认的介导新生血管生成的关键因素, 他强烈促使血管内皮有丝

分裂并最终形成新生血管, 是刺激肿瘤血管生成最强的细胞因子. Fang等^[8]用小鸡绒毛膜尿囊膜和基质胶堵塞法证明三羟黄酮可明显抑制活体内肿瘤血管的发生. 这种抑制血管的作用与降低肿瘤组织内HIF-1和VEGF的表达有关. 而且, HIF-1与VEGF存在非常密切的关系, 有研究表明HIF-1可促进VEGF的表达, 从而促进肿瘤血管的发生. 血管内皮因子VEGF是一个有生物功能的血管源性肽, 包括调节造血干细胞的发育、细胞外基质的重塑、和炎性细胞因子的再生. Chang等^[9]报道肿瘤启动血管生成首先靠分泌型的血管内皮生长因子(VEGF-A164), 为鉴定“mother vessel”该血管网缺乏平滑肌细胞或周皮细胞(毛细血管的肌性细胞)的形成的特殊蛋白酶, 他们用一个表达VEGF-A164的腺病毒带菌体或用分泌VEGF-A的TA3/St乳腺肿瘤在小鼠组织内诱导血管生成. 他们发现“mother vessel”的形成是由于小静脉内的组织蛋白酶大量的进入到毛细血管, 同时小静脉的几种半胱氨酸蛋白酶抑制剂如stefinA和胱蛋白B和C相互减少. 用荧光探针选择性的结合活体内组织蛋白酶活性细胞位点, 我们发现增加的组织蛋白酶活性专有的聚集在周围细胞, 而不是在小静脉内皮细胞. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂显著地抑制基质胶的血管生成, 带有VEGF-A164的腺病毒带菌体在敲除组织蛋白酶B小鼠中诱导血管生成的作用减少了50%. 这样, VEGF-A在感染腺病毒的间质细胞还是在肿瘤细胞中, 由于他扰乱附近小静脉组织蛋白酶CPI的平衡, 导致基底膜的降解, 这是血管生成中的重要一步. Cao等^[10]用定量分析的方法报道了VEGF-A和VEGF-C诱导的血管和淋巴管的结构和大分子渗透性. 他们的结果显示VEGF-A刺激分裂的形成, 毛细血管融合成早熟的血管丛形成新的脉管系统. 超微结构分析揭示VEGF-A诱导血管形成包含多数内皮穿透介导对铁蛋白的高渗透性. VEGF-C诱导近似相等数量的血管和淋巴管, 内皮穿透仅存在于毛细血管. 在VEGF-A和VEGF-C诱导的淋巴管中没有发现内皮穿透. 这些发现高度揭示VEGF-A和VEGF-C诱导的血管和淋巴管中的结构和功能的差异. 这些信息对于使用这些血管生成因子的新奇治疗策略是非常重要的. Ouchi等^[11]报道血管内皮生长因子是血管生成的关键调节者, 几种应力诱导因子如缺氧和细胞因子及生长因子的刺激也能上调VEGF. 在此, 我们研究AMPK信号在肌

肉中是否具有调节VEGF介导的血管生成过程的作用. AICAR刺激C2C12肌管培养的VEGF mRNA和蛋白水平. 转导显性负性的AMPK废除AICAR诱导的VEGF稳定状态的mRNA和蛋白水平. AICAR增加VEGF mRNA稳定性而不影响VEGF启动子的活性. AICAR也能刺激P38细胞分裂素活化蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinase, P38MAPK)的磷酸化. 转导显性负相腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)可抑制P38MAPK的活化, 表明AMPK是P38MAPK的上游. P38MAPK抑制剂SB203580阻断AICAR诱导VEGF mRNA和蛋白水平的增加, 表明AICAR介导VEGF诱导作用依赖于P38MAPK信号途径. 给予AICAR增加VEGF表达加速小鼠缺血后肢的血管修复, 这依赖于AMPK途径. 这些数据表明AMPK-P38MAPK信号级联能增加肌肉中VEGF的产量和促进缺血损伤的血管生成. Ouyang等^[12]用12只皮下移植HT-29人类结肠癌细胞的无胸腺小鼠, 按每周2次连续3 wk给予载体, 或m-NO-ASA或p-NO-ASA瘤内注射, 或不注射. 结果显示VEGF表达对应于NO-ASA明显减少, p亚型比m亚型更有效. NO-ASA改变VEGF表达的空间分布, 相比于那些用m-(58.3%)或p-NO-ASA(75%, $P<0.01$ 与对照作比较)处理的小鼠, 16.7%的载体处理的异种嫁接物显示坏死和肿瘤外面周边区域的内部局部的VEGF减少. 我们的研究表明NO-ASA可抑制VEGF的表达, 这又导致抑制血管形成. Schwarz等^[13]结扎大鼠左冠状动脉诱导心肌梗塞模型, 在梗塞33 d后在特定位置注射phVEGF165, 其他两组分别注射对照质粒和盐水. 33 d后切断心脏作宏观和组织学分析. 分析表明: phVEGF165处理位点的大鼠心脏显示有肉眼可见的血管瘤样结构, 但是对照DNA和盐水组没有类似情况. 组织学上可见, 21/24phVEGF165处理的心脏显示局部心外膜上血管密度和血管瘤样物质形成. 说明, 在心肌梗塞区域注射phVEGF165可诱导血管生成.

2.3 VEGF与肿瘤淋巴管形成 过去认为血管发生(angiogenesis), 在肿瘤生长和演进过程中发挥着关键作用, 但现在有一种更新的观点认为淋巴管生成在肿瘤扩散过程中发挥着更重要的作用. 大量的临床病理学资料发现淋巴系统是肿瘤转移的最初途径, 尤其在实体瘤^[14]. Salven等^[15]报道VEGF-C的表达与淋巴管的发育有关, VEGF-C能够作为一个重要分子调节肿瘤细胞和淋巴管

■应用要点

VEGF可促进内皮细胞渗透、激活、存活、增殖、浸润和迁移, 与肿瘤血管生成和淋巴管形成密切相关, 阻断VEGF信号途径可抑制肿瘤的生长和转移.

■同行评价

本文选题恰当, 科学性、可读性较好。

上皮细胞之间的相互旁分泌关系。Benest等^[16]发现VEGF-C得血管生成作用当出现生长的淋巴网络后被明显的减弱了。此外, 我们还发现这种淋巴管的生长能募集孤立的淋巴岛而形成一个连接的网络, 还可以靠丝状伪足发芽。后者是不依赖于顶端细胞分化极化能自始至终的产生毛细淋巴管, 不依赖于毛细淋巴管的增值状态。这些结果同时证明VEGF-C介导的血管生成作用是依赖于淋巴管网络的, 还有表明VEGF-C介导淋巴管的生成机制是不同于经典血管生成机制。Hirakawa等^[17]发现VEGF-C的一个重要作用: 诱导淋巴结的淋巴管形成从而促进肿瘤转移超出标记的淋巴结, 因此VEGF-C是一个减慢甚至阻止转移开始的靶点。Pradeep等^[18]报道VEGF-C和VEGF-D通过淋巴管内皮上的VEGFR-3受体介导淋巴管形成。我们制造模拟人类慢性手术后的淋巴功能不全兔子模型, 在手术部位注射VEGF-C, 对照组注射生理盐水。在VEGF-C处理8 d后, 出现一个可以计量的淋巴功能改善, 免疫组织化学显示淋巴管的明显增加, 伴随着未处理的淋巴水肿造成的强烈的组织细胞过多现象的逆转。这个研究证实单个剂量的VEGF-C可导致后天性淋巴水肿的治疗性淋巴管生成作用。Breier等^[19]报道在VEGF-C基因缺乏小鼠, 内皮细胞可以成定型为淋巴管谱系, 但是不能萌芽形成淋巴管, 结果VEGF-C基因敲除小鼠胚胎死于出产前因为组织中的液体聚集。Pepper等^[20]前期发现 $\alpha 9 \beta 1$ 直接结合到VEGF-C和VEGF-D可促成淋巴管的形成。

3 阻断VEGF信号传导在抗肿瘤血管生成中的研究进展

肿瘤的血管生成是肿瘤的生长侵袭过程中重要的阶段, 因此抑制肿瘤血管生成可以被认为饥饿肿瘤和扰乱肿瘤生长的重要治疗方法。越来越多的研究证实阻断VEGF信号传导可以抑制肿瘤血管生成, 从而达到抑制肿瘤生长的目的。作为血管发生的中心调节者, VEGF成为一种重要的抗血管生成的靶向治疗^[21]。

3.1 抗VEGF的抗体 HuMV833, 一种人源化的鼠抗VEGF-A单克隆抗体, 也进入了II期临床试验阶段^[22]。Fan等^[23]报道用可溶性VEGF受体(VEGF Trap), 一种有力的VEGF阻滞剂, 阻断VEGF的功能, 能完全抑制2种模型子宫内膜再生过程中的新生血管形成, 但是在预成或新近形成的血管中没有明显作用, 表明VEGF对于新生血管

是必要的, 但是对于这种血管床的成熟血管来说是没有作用的。阻断VEGF也阻滞月经后子宫内膜和蜕膜故障后的小鼠子宫的上皮再形成, 为VEGF在子宫内膜具有多重效应提供证据。Wedge等^[24]报道AZD2171为一种VEGF抑制剂, 他能抑制VEGF信号途径从而抑制活体内的肿瘤血管的形成。AZD2171已成为当前临床上治疗肿瘤的口服用药。Nguyen等^[25]报道ZD4190是一种VEGFR信号抑制剂, 他能选择性的废除VEGF在胶原凝胶剂和小鸡心脏碎片的病变效应。单剂量的口服ZD4190后可70%的抑制HCT8/S11异种嫁接肿瘤细胞的生长。Binion等^[26]用姜黄作用VEGF处理的人类肠微血管上皮细胞, 结果显示姜黄能抑制VEGF诱导的人肠微血管上皮细胞的细胞增殖、细胞转移及微管形成, 表明姜黄能抑制微血管上皮细胞血管生成, 可作为癌症的辅助治疗。Rad等^[27]报道“mVEGF kinoid”为一种VEGF衍生的致免源, 包括1个鼠类(m)VEGF和钉形贝血蓝蛋白的络合物, 可以在小鼠体内触发一种强烈的抗原抗体反应。他还可以不仅抑制人类脐静脉上皮细胞的增殖还抑制mVEGF和他的受体2 FIK-1的结合。在mVEGF kinoid免疫的BALB/c小鼠体内同系基因型CT26结直肠癌细胞激发免疫反应, 肺转移灶的数目和大小都显著减少。

3.2 可溶性的VEGF受体 研究显示, 构建一个由VEGFR1的SH2结构域、VEGFR2的SH3结构域和人免疫球蛋白的Fc结构域的工程蛋白, 即VEGFR1/2-trap可以与VEGF和PlGF结合, 而VEGFR3-trap是一种嵌合的VEGFR3-Ig则可以与VEGF-3特异结合, 从而有效地抑制肿瘤淋巴管的生成和癌症的转移^[28], 目前已进入临床I期试验阶段。

3.3 VEGF受体蛋白激酶抑制剂 2006-01, FDA批准了Sunitinib(SU-11248)在转移性试验阶段的应用。SU-11248可以抑制多种受体蛋白激酶的活性, 包括VEGFR2、VEGFR3、Flt-3、Kit、PDGFR和Raf^[29]。其他的一些药物, 如PTK787/ZK222584(一种VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、PDGFR、Flt-3 和Kit抑制剂)还处于临床试验阶段^[30]。Lang等^[31]发现阻断Raf/VEGFR-2信号传导途径明显抑制肿瘤细胞生长和血管化作用从而减少癌症转移。Qian等^[32]报道EXEL-2880是一种小分子VEGF RTK抑制剂, EXEL2880可阻止含氧量正常和低两种情况下的不依赖于贴壁的肿瘤细胞的增殖。EXEL2880能直接抑制肿

瘤细胞增殖从而阻止肿瘤生长. McMahon^[33]认为抑制VEGF酪氨酸激酶信号途径可抑制生长中的肿瘤新生血管的形成, 导致肿瘤生长停滞或退化. Davis等^[34]报道用一种VEGF受体抑制剂SU6668处理畸形嫁接胰腺癌肿瘤, 明显的抑制肿瘤微血管密度和生长及增加肿瘤细胞凋亡. He等^[35]报道抑制VEGFR-3信号通路可抑制肿瘤淋巴管形成和转移到局部淋巴结但不是到肺脏. Tille等^[36]证明在血管发生小鼠模型中, VEGFR-2抑制剂可完全阻断VEGF诱导的血管生成, 惊奇的是他也能不同程度的抑制碱性纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的作用. 在活体外, VEGF和bFGF诱导的小牛微血管和主动脉内皮细胞胶原浸润作用也能分别被VEGFR-2 100%和90%抑制.

4 结论

研究证明VEGF可促进内皮细胞渗透、激活、存活、增殖、浸润和迁移, 与肿瘤血管生成和淋巴管形成密切相关, 阻断VEGF信号途径可抑制肿瘤的生长和转移. 肿瘤为自身的生存发展创造了有利的微环境, 他可促进其微血管的生成, 获取丰富的营养供应, 而淋巴管的生成在肿瘤扩散过程中发挥着更重要的作用, 因此阐明VEGF在肿瘤血管生成成淋巴管生成的机制, 有利于为抗肿瘤治疗开辟一条有效的途径.

5 参考文献

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309
- Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4368-4380
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-1039
- Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 568-581
- Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 2003; : S46-S58
- Fang J, Zhou Q, Liu LZ, Xia C, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 α and VEGF expression. *Carcinogenesis* 2007; 28: 858-864
- Chang SH, Kanasaki K, Gocheva V, Blum G, Harper J, Moses MA, Shih SC, Nagy JA, Joyce J, Bogoy M, Kalluri R, Dvorak HF. VEGF-A induces angiogenesis by perturbing the cathepsin-cysteine protease inhibitor balance in venules, causing basement membrane degradation and mother vessel formation. *Cancer Res* 2009; 69: 4537-4544
- Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2, VEGF-A, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 2004; 94: 664-670
- Ouchi N, Shibata R, Walsh K. AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res* 2005; 96: 838-846
- Ouyang N, Williams JL, Rigas B. NO-donating aspirin inhibits angiogenesis by suppressing VEGF expression in HT-29 human colon cancer mouse xenografts. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1794-1798
- Schwarz ER, Speakman MT, Patterson M, Hale SS, Isner JM, Kedes LH, Kloner RA. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat-angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 1323-1330
- Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002; 16: 922-934
- Salven P, Lymboussaki A, Heikkilä P, Jääskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von Euler G, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998; 153: 103-108
- Benest AV, Harper SJ, Herttuala SY, Alitalo K, Bates DO. VEGF-C induced angiogenesis preferentially occurs at a distance from lymphangiogenesis. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 315-323
- Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 2007; 109: 1010-1017
- Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther* 2005; 4: 315-321
- Breier G. Lymphangiogenesis in regenerating tissue: is VEGF-C sufficient? *Circ Res* 2005; 96: 1132-1134
- Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 2001; 7: 462-468
- Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, Hawkrigde AE, Issaka RB, Boudreau N, Sheppard D. Integrin $\alpha 9 \beta 1$ directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis. *J Biol Chem* 2007; 282: 15187-15196
- Jayson GC, Mulatero C, Ranson M, Zweit J, Jackson A, Broughton L, Wagstaff J, Hakansson L, Groenewegen G, Lawrance J, Tang M, Wauk L, Levitt D, Marreaud S, Lehmann FF, Herold M, Zwierzina H. Phase I investigation of recombinant anti-human vascular endothelial growth factor antibody in pa-

- tients with advanced cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 555-563
- 23 Fan X, Krieg S, Kuo CJ, Wiegand SJ, Rabinovitch M, Druzin ML, Brenner RM, Giudice LC, Nayak NR. VEGF blockade inhibits angiogenesis and reepithelialization of endometrium. *FASEB J* 2008; 22: 3571-3580
 - 24 Wedge SR, Kendrew J, Valentine PJ, Kilburn LL, Curwen JO, Musgrove HL, Mellor MJ, Barnett S, Wadsworth PF, Richmond GH, Bigley AL, Hennequin LF, Ple P, Stokes ES, Ogilvie DJ. The VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor AZD2171 inhibits VEGF signaling, angiogenesis, and tumor growth in vivo. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2004; 45: Abstract 4555
 - 25 Nguyen QD, Rodrigues S, Rodrigue CM, Rivat C, Grijelmo C, Bruyneel E, Emami S, Attoub S, Gespach C. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-165 and semaphorin 3A-mediated cellular invasion and tumor growth by the VEGF signaling inhibitor ZD4190 in human colon cancer cells and xenografts. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2070-2077
 - 26 Binion DG, Otterson MF, Rafiee P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* 2008; 57: 1509-1517
 - 27 Rad FH, Le Buanec H, Paturance S, Larcier P, Genne P, Ryffel B, Bensussan A, Bizzini B, Gallo RC, Zagury D, Uzan G. VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2837-2842
 - 28 Rüegg C, Hasmim M, Lejeune FJ, Alghisi GC. Anti-angiogenic peptides and proteins: from experimental tools to clinical drugs. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765: 155-177
 - 29 Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Winkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004; 64: 7099-7109
 - 30 Manley PW, Bold G, Brügger J, Fendrich G, Furet P, Mestan J, Schnell C, Stolz B, Meyer T, Meyhack B, Stark W, Strauss A, Wood J. Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGF-R kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1697: 17-27
 - 31 Lang SA, Schachtschneider P, Moser C, Mori A, Hackl C, Gaumann A, Batt D, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O. Dual targeting of Raf and VEGF receptor 2 reduces growth and metastasis of pancreatic cancer through direct effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 3509-3518
 - 32 Qian F, Engst S, Yamaguchi K, Yu P, Won KA, Mock L, Lou T, Tan J, Li C, Tam D, Loughheed J, Yakes FM, Bentzien F, Xu W, Zaks T, Wooster R, Greshock J, Joly AH. Inhibition of tumor cell growth, invasion, and metastasis by EXEL-2880 (XL880, GSK1363089), a novel inhibitor of HGF and VEGF receptor tyrosine kinases. *Cancer Res* 2009; 69: 8009-8016
 - 33 McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1: 3-10
 - 34 Davis DW, Takamori R, Raut CP, Xiong HQ, Herbst RS, Stadler WM, Heymach JV, Demetri GD, Rashid A, Shen Y, Wen S, Abbruzzese JL, McConkey DJ. Pharmacodynamic analysis of target inhibition and endothelial cell death in tumors treated with the vascular endothelial growth factor receptor antagonists SU5416 or SU6668. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 678-689
 - 35 He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 819-825
 - 36 Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, Schnell C, Ferrari S, Mestan J, Zhu Z, Witte L, Pepper MS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 1073-1085

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》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

多普勒彩超评估生长抑素对肝切除术后门静脉血流动力学的影 响

叶 华, 何 波, 王 捷

叶华, 王捷, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科 广东省广州市 510120
何波, 中山大学孙逸仙纪念医院麻醉科 广东省广州市 510120
广东省医学科研基金资助项目, No. A2009187
作者贡献分布: 叶华与何波对此文所作贡献均等; 此课题由王捷设计; 研究过程由叶华与何波操作完成; 数据分析由何波完成; 本论文写作由叶华与王捷完成.
通讯作者: 王捷, 教授, 510120, 广东省广州市, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科. sumsjw@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-08-08 修回日期: 2010-09-08
接受日期: 2010-09-12 在线出版日期: 2010-09-28

Evaluation of the effects of somatostatin on portal hemodynamics in rabbits after hepatectomy by color Doppler ultrasound

Hua Ye, Bo He, Jie Wang

Hua Ye, Jie Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Bo He, Department of Anesthesiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Supported by: the Medical Science Research Program of Guangdong Province, No. A2009187
Correspondence to: Professor Jie Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. sumsjw@yahoo.com.cn
Received: 2010-08-08 Revised: 2010-09-08
Accepted: 2010-09-12 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the value of color Doppler ultrasound in evaluating the effects of somatostatin on portal hemodynamics in rabbits after hepatectomy.

METHODS: Thirty-two rabbits were randomly divided into three groups: control group ($n = 6$), normal saline group ($n = 13$), somatostatin group ($n = 13$). The normal saline group and somatostatin group underwent 50% hepatectomy, while the control group underwent a sham operation. Color Doppler ultrasound was then used to measure and compare various portal vein hemodynamic

parameters, including flow direction, diameter, hemokinetic velocity, average flow rate, and blood flow volume, among each group.

RESULTS: There were no significant differences in portal diameter and hemokinetic velocity among all the three groups before and after the surgery (all $P > 0.05$). However, the average flow rate and blood flow volume were significant lower in the somatostatin group than in the control group and normal saline group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Application of somatostatin early after hepatectomy may reduce the flow rate and blood flow volume in the portal vein, which may be the cause that somatostatin reduces elevated portal pressure. Color Doppler ultrasound is effective in evaluating the effects of somatostatin on portal hemodynamics in rabbits after hepatectomy.

Key Words: Color Doppler ultrasound; Hepatectomy; Somatostatin; Portal hemodynamics

Ye H, He B, Wang J. Evaluation of the effects of somatostatin on portal hemodynamics in rabbits after hepatectomy by color Doppler ultrasound. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2901-2904

摘要

目的: 探讨多普勒彩超在评估生长抑素对肝切除术后门静脉血流动力学影响中的价值.

方法: 将32只健康家兔随机分为: A组: 正常对照组; B组: 生理盐水治疗组和C组: 生长抑素治疗组. A组为假手术组; B组和C组均施行50%肝切除术, 并于术中及术后早期分别滴注生理盐水和生长抑素. 定期用多普勒彩超检测动物模型门静脉血流方向、血管内径、截面积、平均血流速率及血流量, 并进行组间比较.

结果: 术中及术后早期检测A、B、C 3组动物门静脉血管内径和截面积无明显差异 ($P > 0.05$), 但C组门静脉平均血流速率及血流量显著低于A组和B组 ($P < 0.05$).

■背景资料

肝切除术后出血、胆瘘、难治性腹水、肝功能不全等并发症的发生与门静脉压力升高的幅度呈正相关. 尽管已明确生长抑素(SS)及其类似物可以降低肝切除术后门静脉压力升高的幅度, 但是其血液动力学机制仍未完全揭示, 这在一定程度上限制了SS在临床治疗中的优化用药.

■同行评议者

李涛, 副主任医师, 北京大学人民医院肝胆外科

■研发前沿

尽管生长抑素降低门静脉压力的作用已得到广泛认可,然而其是否通过影响机体的血液动力学来发挥作用,尚需进一步临床和实验研究证实。

结论: 肝部分切除术后,早期应用生长抑素可降低门静脉平均血流速率及血流量,这可能是生长抑素降低门静脉压力的主要原因;应用多普勒彩超评估生长抑素对肝切除术后门静脉血流动力学的影响具有重要意义。

关键词: 多普勒彩超; 肝切除; 生长抑素; 门静脉血流动力学

叶华, 何波, 王捷. 多普勒彩超评估生长抑素对肝切除术后门静脉血流动力学的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2901-2904

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2901.asp>

0 引言

研究表明,肝切除术后出血、胆瘘、难治性腹水、肝功能不全等并发症的发生与门静脉压力升高的幅度呈正相关。尽管已明确生长抑素(somatostatin, SS)及其类似物可以降低肝切除术后门静脉压力升高的幅度,但是其血液动力学机制仍未完全揭示^[1-3],这在一定程度上限制了SS在临床治疗中的优化用药。针对上述问题,本研究采用多普勒彩超评估了SS对兔肝脏大部分切除术后血流动力学的影响,这为进一步探讨肝切除术后早期应用SS降低门静脉压力的具体机制奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康家兔32只,由中山大学医学院实验动物中心提供,雌雄不拘,兔龄在10 mo左右,体质量2.4-3.0 kg,在无特殊病原菌条件下(specific pathogen free, SPF)分笼饲养; SS类似物思他宁由瑞士雪兰诺公司提供,每支3 000 μ g; 外科手术器械包括:手术刀、眼科剪、缝针、缝线、眼科尖镊等,无菌平皿,取样器,1 mL、5 mL注射器等; 多普勒彩色超声(型号Esaote Technos D116)。

1.2 方法

1.2.1 分组及处理: 32只健康家兔随机分为3组。A组:假手术对照组6只,氯胺酮肌肉注射麻醉,消毒后上腹肋缘下切口开腹,然后关腹,不行任何手术,作为假手术对照组; B组:生理盐水治疗组13只,按照A组方法常规麻醉开腹后,建立50%肝切除术动物模型。从阻断肝十二指肠韧带肝缺血开始,至切肝后2 h内,经耳缘静脉持续滴入生理盐水100 mL(50 mL/h); C组:SS治疗组13只,采用与B组相同的方法建立50%肝切除术动物模型。从阻断肝十二指肠韧带肝缺血开始,至切肝后2 h内,经耳缘静脉持续滴入生理盐水

100 mL+思他宁(滴速50 mL/h, 思他宁剂量为84 μ g/kg)。

1.2.2 指标检测: B组、C组剖腹后建立肝切除术动物模型,采用多普勒彩超分别测量阻断肝门前、切肝后0.5、1、2 h的门静脉平均血流速率、血管内径、截面积、门静脉血流量和血流方向。同时,于对应的时间点采用多普勒彩超测量A组实验动物的门静脉平均血流速率、血管内径、截面积、门静脉血流量和血流方向。

统计学处理 所有实验数据以mean \pm SD表示,不同组间实验数据差异比较采用 t 检验和重复测量方差分析,统计软件采用SPSS 11.0 for Windows, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 门静脉血流方向 A、B、C 3组动物肝切除术前及术后0.5、1、2 h均通过多普勒彩超检测观察到向肝血流,未见离肝血流。

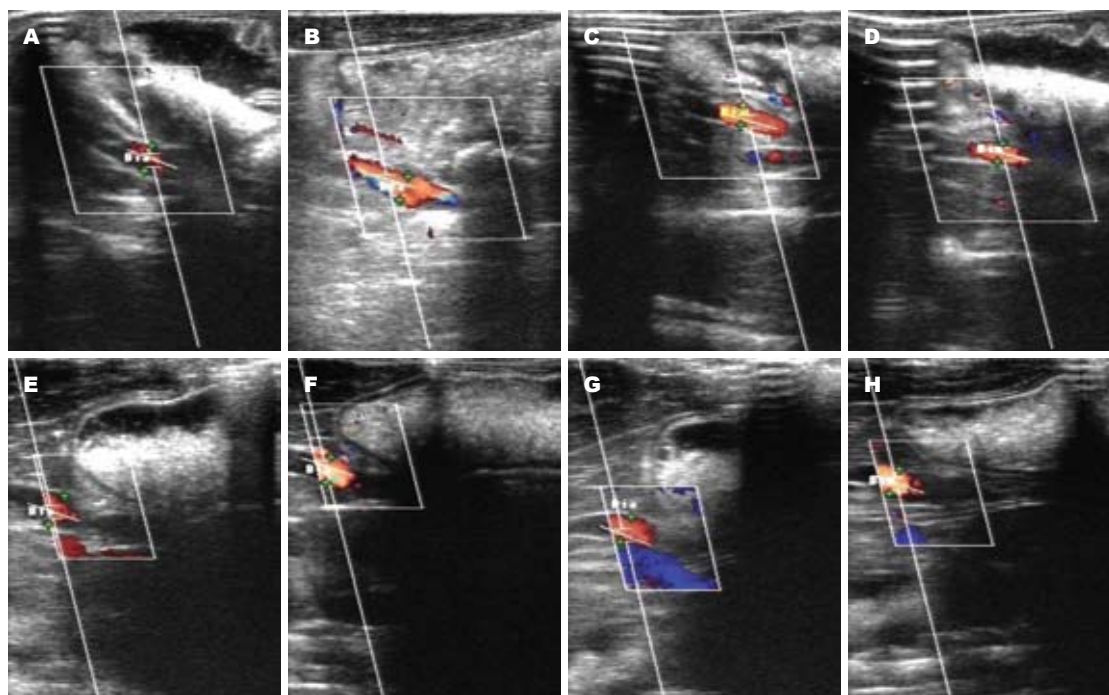
2.2 门静脉血管内径、截面积、平均血流速率及血流量检测 各组术后0.5、1、2 h的门静脉血管内径数值与术前比较的差值见表1,经重复测量方差分析, A组与B组之间, A组与C组之间, B组与C组之间, 均无显著性差异($P = 0.170, 0.686, 0.219$)。各组术后0.5、1、2 h的门静脉截面积数值与术前比较的差值见表2,经重复测量方差分析, A组与B组之间, A组与C组之间, B组与C组之间, 均无显著性差异($P = 0.247, 0.824, 0.087$)。各组术后0.5、1、2 h的门静脉平均血流速率数值与术前比较的差值见表3, A组与B组之间($P = 0.895$), A组与C组之间($P < 0.001$), B组与C组之间($P < 0.001$)的差异,显示使用SS后门静脉平均血流速率明显降低。各组术后0.5、1、2 h的门静脉血流量数值与术前比较的差值见表4, A组与B组之间($P = 0.933$), A组与C组之间($P = 0.106$), B组与C组之间($P = 0.035$)的差异,表明SS治疗组较生理盐水治疗组其门静脉血流量明显降低(图1)。

3 讨论

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的消化系恶性肿瘤之一,以手术为主的综合治疗目前被公认为是治疗HCC的最佳策略。在采用外科手术治疗HCC的过程中,肝切除术后并发症的防治,一直是一个重点和难点问题。研究表明,肝切除术后出血、胆瘘、难治性腹水、肝功能不全等并发症的发生与门静脉压力升高的幅度呈正相关。文献报道及我们前期实验研究表明^[4-8],应用SS及其类似物可

■创新盘点

本研究在前期证明肝切除术后早期应用生长抑素可以降低门静脉压力升高幅度的基础上,进一步探讨了多普勒彩超在评估生长抑素对肝切除术后门静脉血流动力学影响中的价值。



■应用要点
多普勒彩超为定量评价肝脏血流变化提供了无创简便的方法, 能够获取门静脉血流动力学变化参数, 在评价门静脉血流动力学变化情况、估计病情及预后等方面有重要价值。

图 1 超声多普勒扫描肝切除前后不同时间点的门静脉血流平均流速和血流量. A-D: 生理盐水治疗组; E-H: SS治疗组; A, E: 术前; B, F: 术后0.5 h; C, G: 术后1 h; D, H: 术后2 h.

表 1 3组动物肝切除术前与术后门静脉血管内径比较的差值 (mean \pm SD, mm)

分组	<i>n</i>	术后0.5 h	术后1 h	术后2 h
A组	6	-0.900 ± 1.594	0.100 ± 0.415	0.067 ± 0.476
B组	13	0.623 ± 0.803	0.369 ± 1.259	0.139 ± 1.161
C组	13	0.077 ± 0.894	0.069 ± 0.988	-0.339 ± 0.737

表 2 3组动物肝切除术前与术后门静脉截面积比较的差值 (mean \pm SD, mm²)

分组	<i>n</i>	术后0.5 h	术后1 h	术后2 h
A组	6	0.170 ± 1.626	0.449 ± 1.841	0.653 ± 1.577
B组	13	2.953 ± 4.995	2.946 ± 6.006	1.424 ± 4.395
C组	13	0.781 ± 2.573	0.520 ± 2.739	-1.183 ± 1.069

表 3 3组动物肝切除术前与术后门静脉平均血流速率比较的差值 (mean \pm SD, m/s)

分组	<i>n</i>	术后0.5 h	术后1 h	术后2 h
A组	6	-0.013 ± 0.025	-0.015 ± 0.031	-0.000 ± 0.020
B组	13	-0.003 ± 0.026	-0.014 ± 0.030	-0.006 ± 0.031
C组	13	-0.090 ± 0.037	-0.112 ± 0.032	-0.112 ± 0.047

以降低肝切除术后门静脉压力升高的幅度, 有助于出血、胆瘘、难治性腹水、肝功能不全等并发症的防治. 但是, SS及其类似物降低肝切除术后门静脉压力的血流动力学机制仍未完全阐明^[9-12], SS的临床应用并非建立在血流动力学研

究基础之上, 绝大部分用药是基于经验的总结, 这在一定程度上限制了SS在临床治疗中更充分的发挥治疗作用. 因此, 血流动力学机制的明确, 将有助于指导SS在临床治疗中的优化用药, 具有重要意义.

■同行评价

本研究设计合理, 创新性较好, 具有一定的科学价值.

表 4 3组动物肝切除术前与术后门静脉血流量比较的差值 (mean \pm SD, mL/min)

分组	n	术后0.5 h	术后1 h	术后2 h
A组	6	-4.823 \pm 2.363	-4.833 \pm 3.764	-5.167 \pm 1.941
B组	13	-4.000 \pm 22.931	-7.769 \pm 30.362	-13.308 \pm 29.293
C组	13	-18.692 \pm 29.310	-33.308 \pm 54.879	-47.385 \pm 26.544

多年临床实际应用表明, 多普勒彩超为定量评价肝脏血流变化提供了无创简便的方法, 能够获取门静脉血流动力学变化参数, 在评价门静脉血流动力学变化情况、估计病情及预后等方面有重要价值^[13-15]. 在本研究中, 我们采用多普勒彩超检测了兔肝切除术前门静脉直径、血管截面积、平均血流速率、血流量和血流方向变化以及SS对其的影响. 研究结果显示, SS治疗组和生理盐水治疗组的门静脉血流方向均为向肝性血流, 未见离肝血流. 使用SS后门静脉直径、血管截面积, 与生理盐水治疗组相比差异无显著意义, 即SS不能够直接收缩门静脉. 而门静脉平均血流速率、血流量锐减, 与生理盐水治疗组相比差异有显著意义. 由此, 我们推断SS降低门静脉压力的作用可能是通过降低门静脉血流速率, 从而使门静脉血流量减少, 最终使得门静脉压力降低.

本研究结果显示: 肝部分切除术后, 早期应用SS可降低门静脉平均血流速率及血流量, 这可能是SS降低门静脉压力的主要原因; 应用多普勒彩超评估SS对肝切除术后门静脉血流动力学的影响具有重要意义. 这为进一步探讨肝切除术后早期应用SS降低门静脉压力的具体机制奠定了实验基础. 但是, 由于肝切除前后机体病理生理和血流动力学的变化是一个极为复杂的过程, 本项目仅在动物实验方面进行了初步探讨, SS对肝切除术后全肝血流动力学的影响及其具体作用机制还有待进一步深入、全面地研究.

4 参考文献

- 1 潘勤, 李定国, 杜学良, 徐芹芳. 生长抑素及奥曲肽的肝细胞保护作用及其机制研究. *中国病理生理杂志* 2008; 24: 730-733
- 2 叶华, 何波, 王捷. 肝切除术后早期应用生长抑素对门静脉血流动力学的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2026-2030
- 3 杨文燕, 吴建新, 戴强, 江佛湖. 长效奥曲肽对大鼠肝纤维化门静脉高压形成的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2815-2819
- 4 Vanheule E, Geerts AM, Reynaert H, Van Vlierberghe H, Geerts A, De Vos M, Colle I. Influence of somatostatin and octreotide on liver microcirculation in an experimental mouse model of cirrhosis studied by intravital fluorescence microscopy. *Liver Int* 2008; 28: 107-116
- 5 Xu H, Shi BM, Lu XF, Liang F, Jin X, Wu TH, Xu J. Vascular endothelial growth factor attenuates hepatic sinusoidal capillarization in thioacetamide-induced cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2349-2357
- 6 Laviña B, Gracia-Sancho J, Rodríguez-Vilarrupla A, Chu Y, Heistad DD, Bosch J, García-Pagán JC. Superoxide dismutase gene transfer reduces portal pressure in CCl₄ cirrhotic rats with portal hypertension. *Gut* 2009; 58: 118-125
- 7 Deli A, Kreidl E, Santifaller S, Trotter B, Seir K, Berger W, Schulte-Hermann R, Rodgarkia-Dara C, Grusch M. Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1699-1709
- 8 罗蓉. 肝硬化门静脉高压症患者门脉血流动力学改变的超声检测. *临床超声医学杂志* 2007; 9: 304-305
- 9 Vorobioff JD, Ferretti SE, Zangroniz P, Gamen M, Picabea E, Bessone FO, Reggiardo V, Diez AR, Tanno M, Cuesta C, Tanno HE. Octreotide enhances portal pressure reduction induced by propranolol in cirrhosis: a randomized, controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2206-2213
- 10 Trebicka J, Hennenberg M, Laleman W, Shelest N, Biecker E, Schepke M, Nevens F, Sauerbruch T, Heller J. Atorvastatin lowers portal pressure in cirrhotic rats by inhibition of RhoA/Rho-kinase and activation of endothelial nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007; 46: 242-253
- 11 Trebicka J, Leifeld L, Hennenberg M, Biecker E, Eckhardt A, Fischer N, Pröbsting AS, Clemens C, Lammert F, Sauerbruch T, Heller J. Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology* 2008; 47: 1264-1276
- 12 Yang YP, Ma XM, Wang CP, Han J, Lu YY, Xiang Y, Su SH, Feng YY. Effect of increased hepatic platelet activating factor and its receptor portal hypertension in CCl₄-induced liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 709-715
- 13 Patella S, Phillips DJ, Tchongue J, de Kretser DM, Sievert W. Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G137-G144
- 14 Jung Y, Oh SH, Zheng D, Shupe TD, Witek RP, Petersen BE. A potential role of somatostatin and its receptor SSTIR4 in the migration of hepatic oval cells. *Lab Invest* 2006; 86: 477-489
- 15 Song SH, Leng XS, Li T, Qin ZZ, Peng JR, Zhao L, Wei YH, Yu X. Expression of subtypes of somatostatin receptors in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1663-1665

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

白藜芦醇对溃疡性结肠炎小鼠外周血和肠系膜淋巴结CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节T淋巴细胞表达的影响

姚君, 王立生, 李迎雪, 王建尧, 孙丽萍, 莫镜, 邵聪文

姚君, 王立生, 李迎雪, 孙丽萍, 暨南大学第二临床医学院 广东省深圳市 518020

王建尧, 深圳市儿童医院 广东省深圳市 518020

莫镜, 广州医学院第三附属医院 广东省深圳市 510500

邵聪文, 南方医科大学 广东省广州市 510515

广东省自然科学基金资助项目, No. 8151802001000004

作者贡献分布: 王立生与姚君对此文所作贡献均等; 此课题由王立生设计; 研究过程由姚君, 李迎雪, 王建尧, 邵聪文及莫镜操作完成; 研究用新试剂及分析工具由王立生提供; 数据分析由王建尧, 孙丽萍及莫镜完成; 本论文写作由姚君与李迎雪完成。

通讯作者: 王立生, 博士生导师, 518020, 广东省深圳市, 暨南大学第二临床医学院消化内科。wangls168@163.com

电话: 0755-25533018

收稿日期: 2010-06-12 修回日期: 2010-07-29

接受日期: 2010-08-03 在线出版日期: 2010-09-28

Resveratrol increases the percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in peripheral blood and mesenteric lymph nodes of mice with ulcerative colitis

Jun Yao, Li-Sheng Wang, Ying-Xue Li, Jian-Yao Wang, Li-Ping Sun, Jing Mo, Cong-Wen Shao

Jun Yao, Li-Sheng Wang, Ying-Xue Li, Li-Ping Sun, Department of Gastroenterology, the Second School of Clinical Medicine of Jinan University (Shenzhen People's Hospital) Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Jian-Yao Wang, Department of General Surgery, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen 518026, Guangdong Province, China

Jing Mo, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Shenzhen 510500, Guangdong Province, China

Cong-Wen Shao, Department of Cell Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: the Nature Science Foundation of Guangdong Province, No. 8151802001000004

Correspondence to: Li-Sheng Wang, Department of Gastroenterology, the Second School of Clinical Medicine of Jinan University; Shenzhen Municipal People's Hospital, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. wangls168@163.com

Received: 2010-06-12 Revised: 2010-07-29

Accepted: 2010-08-03 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the mechanism behind the therapeutic effect of resveratrol against ulcerative colitis (UC).

METHODS: UC was induced in mice by oral ad-

ministration of synthetic dextran sulfate sodium for 7 d. Mice were divided into four groups: normal control (NC) group, colitis model (MD) group, low-dose resveratrol (RLD) group, and high-dose resveratrol (RHD) group. The RLD and RHD groups were given low- and high-dose resveratrol for 7 d, respectively, while the NC and MD groups were given normal drinking water. The percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ regulatory T cells (Treg) in peripheral blood and mesenteric lymph nodes of these mice were detected by flow cytometry.

RESULTS: The HDS was significantly higher in the MD group than in the NC group, but significantly lower in the RLD and RHD groups than in the MD group (0.88 ± 0.32 and 0.23 ± 0.20 vs 1.39 ± 0.21 , both $P < 0.05$). The percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ Treg in peripheral blood and mesenteric lymph nodes in the RLD and RHD groups were significantly higher than those in the MD group (all $P < 0.05$), but lower than those in NC group (all $P < 0.05$). The percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺ Treg in peripheral blood and mesenteric lymph nodes in the RHD group were higher than those in the RLD group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Resveratrol inhibits colonic inflammation in UC possibly by increasing the percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg in peripheral blood and mesenteric lymph nodes.

Key Words: Ulcerative colitis; Resveratrol; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell

Yao J, Wang LS, Li YX, Wang JY, Sun LP, Mo J, Shao CW. Resveratrol increases the percentages of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in peripheral blood and mesenteric lymph nodes of mice with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2905-2908

摘要

目的: 探讨CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg在葡聚糖硫酸钠(DSS)诱发的UC小鼠模型中的变化情况以及白藜芦醇对溃疡性结肠炎(UC)治疗的可能机制。

■背景资料

溃疡性结肠炎作为一种病因未明的侵犯直肠和结肠的自身免疫性疾病,患者免疫系统的紊乱不容忽视。调节性T淋巴细胞(Treg)是能抑制其他免疫细胞活化、增殖的一群细胞,在维持自身内环境的稳定、防止自身免疫性疾病的发生中发挥重要的保护作用。

■同行评议者

秦成勇, 教授, 山东省立医院消化内科

■相关报道

白金叶等发现白藜芦醇具有抑制LTB₄、LTC₄和LTD₄生成的作用。高路等利用白藜芦醇通过对巨噬细胞吞噬率、血清抗体形成数量和淋巴细胞转化率的研究,发现其调节免疫功能的作用显著。

方法: 采用DSS制作UC小鼠模型,小鼠随机分成4组:正常对照(NC)组,模型(MD)组,低剂量(RLD)、高剂量(RHD)白藜芦醇治疗组。造模7 d后停用造模药物,给予白藜芦醇后继续治疗7 d。14 d后,处死小鼠,结肠行HE染色和病理学评分(HDS);流式细胞仪检测外周血和肠系膜淋巴细胞CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞占CD4⁺ T淋巴细胞的百分率。

结果: MD组HDS明显高于NC组($P<0.05$); RLD和RHD组的HDS明显低于MD组($0.88 \pm 0.32, 0.23 \pm 0.20$ vs 1.39 ± 0.21 , 均 $P<0.05$); RHD组的HDS明显低于RLD组($P<0.05$)。RLD和RHD组结肠外周血和肠系膜淋巴细胞CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞占CD4⁺ T淋巴细胞的百分率明显高于MD组(均 $P<0.05$),低于NC组(均 $P<0.05$); RHD组外周血和肠系膜淋巴细胞CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg细胞占CD4⁺ T淋巴细胞的百分率高于RLD组(均 $P<0.05$)。

结论: 白藜芦醇可以提高CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg数量,调节机体和肠道免疫功能,对UC的治疗发挥了一定的作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; 白藜芦醇; CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节T淋巴细胞

姚君, 王立生, 李迎雪, 王建尧, 孙丽萍, 莫镜, 邵晓文. 白藜芦醇对溃疡性结肠炎小鼠外周血和肠系膜淋巴结CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节T淋巴细胞表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2905-2908
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2905.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称慢性非特异性UC,是一种病因不明的直肠和结肠慢性炎症疾病,但主要认为本病与免疫、遗传和环境等多种因素相互作用有关^[1]。调节性T淋巴细胞(regulatory T cell, Treg)是能抑制其他免疫细胞活化、增殖的一群细胞,在维持自身内环境的稳定、防止自身免疫性疾病的发生中发挥重要的保护作用。白藜芦醇是广泛存在葡萄、花生和多种植物中的一种酚类化合物。它具有多种生物学活性:调节免疫,抗炎,抗氧化,抗肿瘤、促进肿瘤细胞凋亡,抗心血管疾病等作用,此外还能减轻多种因素造成的组织器官损伤及保护肝细胞的作用^[2-4]。本实验拟研究白藜芦醇对UC的免疫调节作用。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c, ♂, 周龄6-8 wk, 40只, SPF级,

购于广东省实验动物中心,合格证号SCXK粤2008-0002,标准饲养,自由饮水,日常光照。白藜芦醇购于深圳汇鑫荣生物有限公司(纯度 $\geq 99\%$, 编号: 090226)。DSS(相对分子质量5 000 Da)购于广州齐云生物科技有限公司。1640淋巴细胞分离液、胶原酶III购于广州斯佳公司,小鼠Treg流式染色试剂盒购于eBioscience。

1.2 方法

1.2.1 模型的制备与药物干预: 40只小鼠随机分成4组,每组10只:正常对照(NC)组、模型(MD)组、低剂量白藜芦醇治疗组RLD组[50 mg/(kg·d)]和高剂量白藜芦醇RHD组[100 mg/(kg·d)]治疗组。正常对照组饮用蒸馏水,模型组与白藜芦醇治疗组饮用5%葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)蒸馏水7 d后,然后模型组与白藜芦醇治疗组5% DSS饮用水换为无DSS饮用蒸馏水再连续7 d。造模第8天开始,正常对照组与模型组,每日0.2 mL 5 mL/L乙醇灌胃7 d;白藜芦醇治疗组按上述低、高剂量溶于0.2 mL 5 mL/L乙醇灌胃7 d。14 d后全部小鼠处死,取距肛门1 cm上的结肠组织行病理切片,并取外周血和肠系膜淋巴结。

1.2.2 小鼠结肠炎组织病理学评估: 取新鲜的小鼠结肠组织,40 g/L甲醛溶液固定24 h,行脱水、透明、浸蜡后包埋组织,病理切片行苏木精-伊红(HE)染色,镜下观察。放大100倍的切片随机选择8处评分并取均值, HDS评分系统^[5]: 0分为正常肠黏膜;1分为缺少1/3隐窝;2分为缺少2/3隐窝;3分为固有层被单层上皮细胞覆盖和较少的炎症细胞浸润;4分为炎症细胞数量增多并有炎症细胞明显浸润。

1.2.3 流式细胞法检测: 摘取小鼠摘眼球取血400 μ L放入EDTA抗凝管后,与等体积无血清1640混匀后,按淋巴细胞分离液说明书分离全血淋巴细胞。摘取小鼠肠系膜淋巴结后,去外膜与脂肪组织后,切成0.5 cm \times 0.5 cm的小块,在0.1%的胶原酶III中37 $^{\circ}$ C孵育20 min后,取组织块200目不锈钢筛网研磨,无血清1640制成细胞悬液与4 $^{\circ}$ C保存。将全血淋巴细胞和肠系膜淋巴细胞悬液溶于1 \times 流式染色缓冲液后,将细胞数调到1 $\times 10^6$ /管,分别按试剂盒要求标记抗小鼠CD4⁺ 0.125 μ g/管和CD25⁺ 0.06 μ g/管单克隆抗体后,清洗离心后,固定/透化工作液4 $^{\circ}$ C避光孵育12 h穿孔后,行核内Foxp3⁺ 0.5 μ g/管抗体标记,设抗IgG2a为同型阴性对照,4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min,清洗液清洗2遍,流式细胞仪上机检测。

统计学处理 实验数据均以mean \pm SD表示。

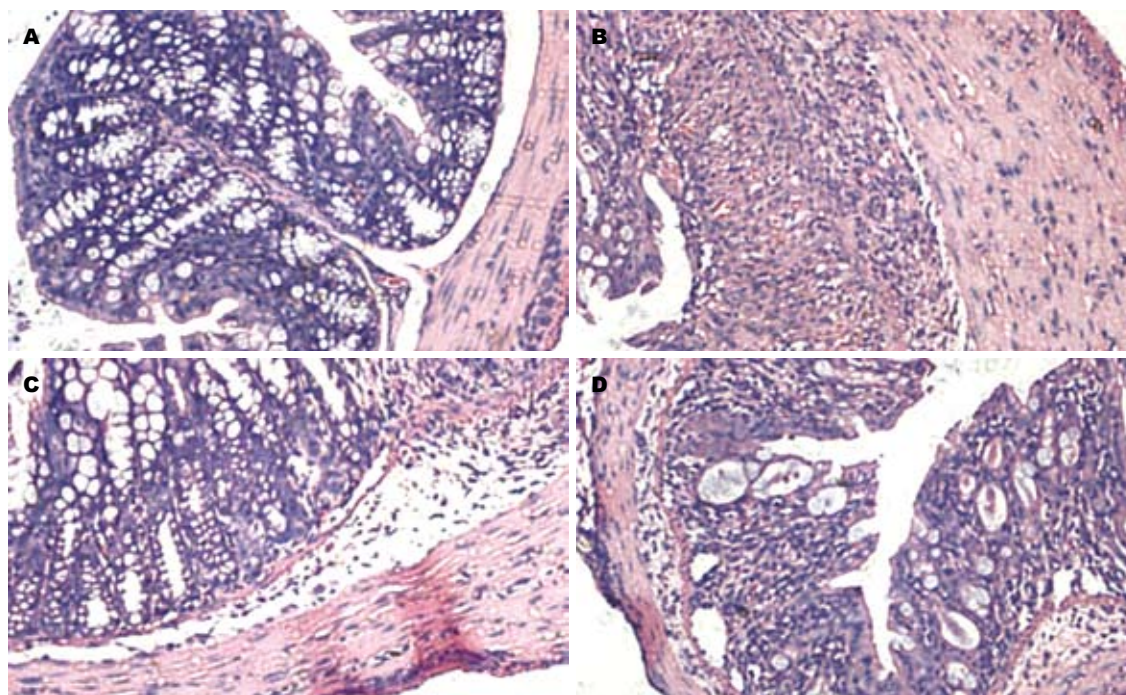


图1 小鼠结肠炎组织病理学(HE × 100). A: NC组; B: MD组; C: RLD组; D: RHD组.

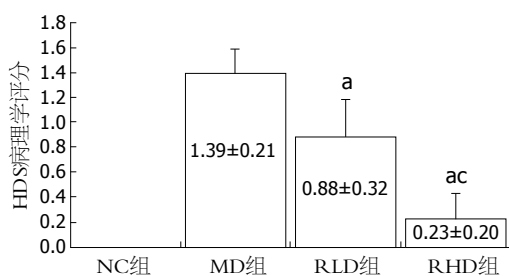


图2 白藜芦醇对溃疡性结肠炎小鼠H&S病理学评分的影响。^a $P < 0.05$ vs MD组; ^c $P < 0.05$ vs RLD组。

全部资料利用SPSS13.0统计软件进行统计分析, 组间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理评分 与NC组(图1A)相比, MD组(图1B)组织学特征为炎症急性期, 有黏膜糜烂、水肿、隐窝减少、中性粒细胞侵入黏膜层和固有层。RLD组(图1C)和RHD组(图1D)侵蚀、炎细胞浸润和腺上皮消失的情况明显低于模型组。病理学评分见图2。

2.2 白藜芦醇对炎症因子外周血与肠系膜淋巴结CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺的影响 外周血与肠系膜淋巴结CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺百分率见表1。

3 讨论

UC是一种病因未明的侵犯结肠的自身免疫性

■应用要点

本文通过纯天然植物提取物白藜芦醇作用于溃疡性结肠炎小鼠, 并对其免疫细胞进行深入研究, 发现其对结肠炎小鼠具有免疫调节功能, 对结肠炎具有治疗作用。

表1 白藜芦醇对炎症因子外周血与肠系膜淋巴结CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺的影响 (mean ± SD, %)

分组	外周血CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺	肠系膜淋巴结CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ /CD4 ⁺
NC组	5.76 ± 1.21	6.21 ± 2.02
MD组	2.82 ± 1.43 ^a	3.88 ± 1.89 ^a
RLD组	3.69 ± 1.77 ^c	4.62 ± 2.14 ^c
RHD组	4.66 ± 1.85 ^{ce}	5.77 ± 2.15 ^{ce}

^a $P < 0.05$ vs NC组; ^c $P < 0.05$ vs MD组; ^e $P < 0.05$ vs RLD组。

疾病。Treg在UC中有重要的免疫调节作用, Treg分为CD4⁺CD25⁺Treg、Tr1和Tr3等多种亚型, CD4⁺CD25⁺Treg对UC有预防和治疗作用, 其功能异常或数量减少均可发生导致自身免疫性疾病发生^[6]。

Foxp3是新近发现的转录因子, 属于foxhead家族成员, 对CD4⁺CD25⁺Treg表达、成熟及功能发挥起到了关键的作用, 仅有Foxp3表达的CD4⁺CD25⁺Treg才具有免疫调节作用^[7]。成熟树突状细胞能够诱导自体CD4⁺CD25⁺Treg向CD4⁺CD25⁺Treg转化, 其作用依赖于Foxp3^[8], Foxp3敲除小鼠诱生发的自身免疫病。本研究显示, 在DSS诱导的结肠炎小鼠模型中其肠系膜淋巴结CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺百分率下降, 证实了CD4⁺CD25⁺Treg数量减少引起小鼠免疫调节能力下降, 抑制了肠道Treg的功能, 诱发了肠道炎症的发生; 同时, 全血的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/

■同行评价

本文选题尚可,思路清晰,设计合理,方法先进,对溃疡性结肠炎的进一步基础理论研究有促进作用。

CD4⁺百分率也有明显的下降,证实了有局部肠道炎症和免疫紊乱,引起了宿主机体的自发免疫反应;另由病理切片的宏观表现和病理评分观察,可以证实,肠道为炎症急性期,有黏膜糜烂、水肿、隐窝减少、中性粒细胞侵入黏膜层和固有层,炎症表现明显。进一步证实CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg于UC的密切相关性,在结肠炎的发生发展过程的重要作用。本研究通过给予结肠炎小鼠白藜芦醇干预治疗后,发现肠道炎症病理改变明显缓解,糜烂、水肿、炎症细胞浸润等较模型组减轻;同时,全血与肠系膜淋巴结内淋巴细胞CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺百分率较模型组提高,而且,RHD组百分率高于RLD组。考虑有以下原因:(1)白藜芦醇的调节免疫功能,通过增加Foxp3⁺的表达,可以改善肠道免疫状态,对肠道内CD4⁺CD25⁺Treg有一定的恢复和激活作用,减轻了肠道的局部炎症反应,从而使紊乱的肠道免疫状态得到了相应的恢复。(2)同时,从全血内CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg百分率的提高可以得出,肠道免疫功能的恢复和平衡及肠道炎症反应的减轻,进一步对全身免疫系统形成了一种良性反馈作用,使结肠炎诱发的宿主自身免疫紊乱得到了改善,利于自身免疫性疾病的恢复。(3)白藜芦醇本身具有一定的抗炎作用,抑制了肠道炎症负反馈环路,减少中性粒细胞数量,并抑制中性粒细胞和分泌、增殖和过度表达的活化状态,缓解肠道内皮细胞肿胀及通透性的增加。(4)白藜芦醇治疗过程中,有一定的剂量依赖性,高剂量的效果优于低剂量。既往研究证实,白金叶等^[9]发现白藜芦醇具有抑制LTB₄、LTC₄和LTD₄生成作用。高路等^[10]利用白藜芦醇通过对巨噬细胞吞噬率、血清抗体形成数量和淋巴细胞转化率的研究,发现其调节免疫功能的作用显著。新近研究也表明^[11],白藜芦醇通过抑制UC小鼠NF-κB通路,也发挥了一定的抗炎作用,与本研究结论相一致。

总之,白藜芦醇通过增加Foxp3⁺表达,可以提高CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg数量和功能,通过调节肠道过度的免疫反应和抗炎作用,对UC发挥了一定的治疗效果。此外,由于结肠炎是一种长期慢性反复的肠道免疫炎症性疾病,结肠细胞突变率明显增高,可导致结肠癌^[12]。而白藜芦醇则具有诱导肿瘤细胞凋亡及抗肿瘤的作用^[13,14],也提高了他在UC治疗中的药用价值。故作为一种天然药物有多方面的药理活性,其临床应用前景广阔,有望发展成为UC的新一代预防与治疗的药物。

4 参考文献

- 1 Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126: 1620-1633
- 2 Park HJ, Jeong SK, Kim SR, Bae SK, Kim WS, Jin SD, Koo TH, Jang HO, Yun I, Kim KW, Bae MK. Resveratrol inhibits Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced endothelial adhesion molecule expression by suppressing NF-kappaB activation. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 583-591
- 3 Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, Satofuka S, Noda K, Ozawa Y, Oike Y, Ishida S, Tsubota K. Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 3512-3519
- 4 Sha HC, Ma QY, Jha RK, Ma ZH, Zhang M. [Protective effect of resveratrol on intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis] *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2008; 39: 740-743
- 5 Hirata I, Yasumoto S, Toshina K, Inoue T, Nishikawa T, Murano N, Murano M, Wang FY, Katsu K. Evaluation of the effect of pyrrolidine dithiocarbamate in suppressing inflammation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1666-1671
- 6 Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3⁺ CD4⁺ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 191-199
- 7 Kamikozuru K, Fukunaga K, Hirota S, Hida N, Ohda Y, Yoshida K, Yokoyama Y, Tozawa K, Kawa K, Iimuro M, Nagase K, Saniabadi AR, Nakamura S, Miwa H, Matsumoto T. The expression profile of functional regulatory T cells, CD4⁺CD25^{high}/forkhead box protein P3⁺, in patients with ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Clin Exp Immunol* 2009; 156: 320-327
- 8 Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004; 172: 5213-5221
- 9 白金叶, 陈洁, 程桂芳, 林茂, 朱秀媛. 白藜芦醇对白三烯类化合物生成抑制作用. *海峡药学* 2003; 15: 19-20
- 10 高路, 袁育康, 吕卓人, 范桂香, 王军阳, 任会勋. 白藜芦醇的免疫调节作用. *西安交通大学学报(医学版)* 2003; 24: 121-123
- 11 Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 829-839
- 12 Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526-535
- 13 Bai Y, Mao QQ, Qin J, Zheng XY, Wang YB, Yang K, Shen HF, Xie LP. Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Sci* 2010; 101: 488-493
- 14 Choi HY, Chong SA, Nam MJ. Resveratrol induces apoptosis in human SK-HEP-1 hepatic cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics* 2009; 6: 263-268

食管黏膜上皮内瘤变的临床症状分析101例

杨天, 张晓琦, 邹晓平

杨天, 张晓琦, 邹晓平, 南京大学医学院附属鼓楼医院消化内科 江苏省南京市 210008

作者贡献分布: 杨天与张晓琦对此文所作贡献均等; 此课题由杨天、张晓琦及邹晓平设计; 研究过程由杨天与张晓琦操作完成; 研究数据分析由杨天完成; 本论文写作由杨天与张晓琦完成。

通讯作者: 张晓琦, 副主任医师, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院消化内科。zhangxiaoqi.nj@gmail.com
电话: 025-83106666-20601

收稿日期: 2010-06-10 修回日期: 2010-08-22

接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-09-28

Clinical symptoms of esophageal intraepithelial neoplasia: an analysis of 101 cases

Tian Yang, Xiao-Qi Zhang, Xiao-Ping Zou

Tian Yang, Xiao-Qi Zhang, Xiao-Ping Zou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Nanjing Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Qi Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Nanjing Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. zhangxiaoqi.nj@gmail.com

Received: 2010-06-10 Revised: 2010-08-22

Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical symptoms of esophageal intraepithelial neoplasia (EIN), their frequency, and relationship with disease location.

METHODS: One hundred and one patients with EIN treated by endoscopic mucosal resection (EMR) from January 2009 to December 2009 at the Affiliated Nanjing Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University were enrolled in this study. The patients were given questionnaires to fill in the gastroesophageal symptoms they experienced. The data were then analyzed.

RESULTS: The study population consists of 71 men and 30 women. Of all the patients, 41.58% (42/101) had symptoms of sour regurgitation and belching, 27.72% (28/101) had substernal pain, and 2.97% (3/101) had no symptoms. The frequency of these symptoms is 2-3 d per week. The pathological results after endoscopic mucosal resection showed that 35 patients had high-

grade intraepithelial neoplasia, 54 had low-grade intraepithelial neoplasia, and 12 had cancer. More patients with intraepithelial neoplasia in the middle of the esophagus had reflux symptoms than those with the lesions in the upper one third and lower one third of the esophagus ($P < 0.001$).

CONCLUSION: The majority of patients with EIN have reflux symptoms. The incidence of symptoms is related to the location of EIN. For patients with the above symptoms, comprehensive endoscopic and pathological examinations should be performed.

Key Words: Esophagus; Intraepithelial neoplasia; Symptom

Yang T, Zhang XQ, Zou XP. Clinical symptoms of esophageal intraepithelial neoplasia: an analysis of 101 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2909-2912

摘要

目的: 研究食管黏膜上皮内瘤变患者症状特点、频率及其与疾病范围的关系。

方法: 选择2009-01/2009-12因食管黏膜上皮内瘤变来南京大学医学院附属鼓楼医院行内镜下黏膜切除术(EMR)的患者, 对他们进行问卷调查, 建立信息库, 并对结果进行统计分析。

结果: 101例食管黏膜上皮内瘤变患者中男71例, 女30例。101例患者中有42例(41.58%)患者存在反酸、嗝气症状, 28例(27.72%)患者有胸痛, 仅3例(2.97%)患者无症状。多数患者发生上述症状频率为2-3 d/周, 食管黏膜切除术后病理结果显示, 高级别上皮内瘤变35例, 低级别上皮内瘤变54例, 癌变12例。病变位于中段的患者发生反流症状较病变位于下段和上段者更多($P < 0.001$)。

结论: 食管黏膜上皮内瘤变患者有反流相关症状, 而且与病变发生部位有一定相关性, 临床上应重视并对具有这类症状的患者进行全面的内镜检查。

关键词: 食管; 上皮内瘤变; 症状

■背景资料

食管鳞癌是我国常见的恶性肿瘤, 而食管黏膜上皮内瘤变的患者, 其发生癌变的机会显著高于无黏膜增生者, 因此食管黏膜上皮内瘤变的早期诊断和治疗尤为重要。

■同行评议者

陈洪, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科

■创新盘点

本文发现部分食管鳞状上皮内瘤变的患者存在胃食管反流病相关症状,如反酸、嗝气、胸痛等,而且反流发生的比例与病变范围亦有一定相关性,故临床上应重视50岁以上有上述症状的患者并对其进行详尽地检查。

杨天, 张晓琦, 邹晓平. 食管黏膜上皮内瘤变的临床症状分析 101例. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2909-2912

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2909.asp>

0 引言

食管鳞状细胞癌是一种亚洲国家常见的消化系统恶性肿瘤,2000年WHO资料显示,中国食管癌患者占世界总数的50%以上^[1],大多数食管癌患者就诊时已是中晚期,5年生存率低于10%,而早期食管癌经手术切除的5年生存率高达90%以上^[2,3].所以食管癌早期诊断意义重大.目前认为,食管鳞癌的发生是一个渐进的过程,正常食管鳞状上皮在各种原因的刺激下产生炎症,由炎性增生逐步发展为上皮内瘤变(intraepithelial neoplasia),最后进展为癌^[3].近年来,随着内镜诊断技术的进步,食管上皮内瘤变的检出率不断增高,本研究拟分析这些患者的症状特点,了解癌前病变状态时,症状与病变范围、程度的关系,为进一步的临床研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2009-01/2009-12因食管黏膜上皮内瘤变来南京大学医学院附属鼓楼医院行内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)的患者,将其全部纳入本研究.全部患者入院前均经胃镜活检病理及超声胃镜诊断为食管黏膜上皮内瘤变,入院后立即接受症状问卷调查,病变行EMR并获得病理诊断。

1.2 方法

1.2.1 症状调查问卷:内容包括一般资料(性别、年龄)、合并诊断及用药、疾病病程、症状特点及发生频率、程度、病灶范围及EMR后病理结果等;频率按每周发作天数计分:1分为不发作,2分为<1 d/wk,3分为1 d/wk,4分为2-3 d/wk,5分为4-5 d/wk,6分为6-7 d/wk;症状按严重程度计分:0分为无症状,1分为症状不明显,在医师提醒下发现,2分为介于1、3之间,3分为症状明显影响日常生活,偶尔服药,4分为介于3、5之间,5分为症状非常明显,影响日常生活,常常就医或服药.问卷由消化科住院医师填写完成,并由本文第一作者全部审核确认。

1.2.2 建立信息库:将所有患者资料输入Excel文件。

统计学处理 使用SPSS软件进行卡方检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 本研究共纳入101例患者,其中男

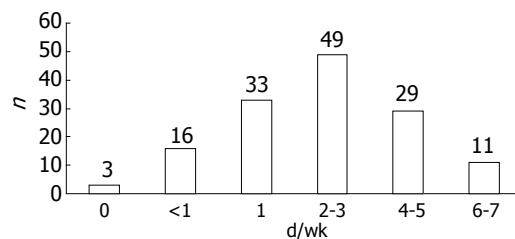


图1 食管上皮内瘤变患者症状发生频率。

71例,女30例,男女之比为2.37:1.年龄44-79(平均60.8)岁,其中40-50岁5人,50-60岁46人,60-70岁36人,70岁以上14人.病程最短为15 d,最长为6年.合并症中,有17例合并高血压病,均有服用钙通道拮抗剂病史,11例合并糜烂性胃炎,2例合并食管平滑肌瘤;4例有胆囊切除史.内镜下表现为:片状充血糜烂55例,粗糙不平41例,白斑5例,经Lugol's液喷洒均能明确显示病变范围,EMR后病理结果为高级别上皮内瘤变35例,低级别上皮内瘤变54例,癌变12例。

2.2 主要症状分析 患者主诉症状包括反酸42(41.58%),嗝气42(41.58%),胸骨后痛28(27.72%),胸骨后不适21(20.79%),梗噎感、咽下困难15(14.85%),上腹痛14(13.86%),烧心13(12.87%),上腹不适11(10.89%),腹胀8(7.92%),恶心、呕吐5(4.92%),异物感4(3.96%),胸骨后闷胀感3(2.97%),吞咽不适3(2.97%),呃逆2(1.98%),吞咽时食物滞留感2(1.98%),纳差2(1.98%),食物反流,吞咽痛1(0.99%).其中与胃食管反流相关的症状(反酸、嗝气、胸骨后痛、胸骨后不适、烧心)发生比例较高,因此进一步就反流症状与病变部位作比较.上述症状中仅有1项症状者30人(29.70%),2项症状者28人(27.72%),3项症状者27人(26.73%),4项症状者10人(9.9%),5项及5项以上症状者3人(2.97%),无症状者3人(2.97%)。

2.3 症状发生频率 所有症状发生频率中,食管上皮内瘤变症状发生频率最高为2-3 d/wk(49例),其次是1 d/wk(33例)和4-5 d/wk(29例,图1)。

2.4 症状严重程度 食管上皮内瘤变患者的各种症状明显影响日常生活,需要服药70例(图2)。

2.5 病灶范围与反流症状的关系 根据内镜结果,在101处病灶中,分布于食管上段(距门齿15-23 cm)的有12例,中段(距门齿24-32 cm)58例,下段(距门齿33-40 cm)19例,另有5例为食管全段弥漫性分布,7例病变位于中下段,未纳入比较.其中有反流症状者上、中、下段分别为5、38、12例;其中无反流症状者上、中、下段分别为7、

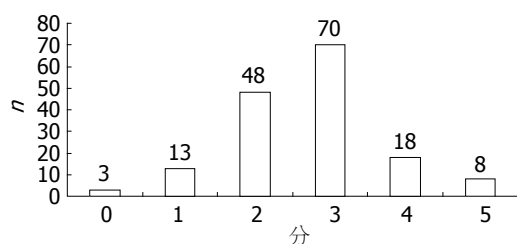


图2 食管上皮内瘤变患者症状严重程度。

20、7例统计学分析发现, 病变位于中段者反流症状的发生率较上段、下段反流症状发生率增多($P<0.001$)。

3 讨论

食管鳞癌是发生在食管鳞状上皮组织的恶性肿瘤, 与亚硝胺、慢性刺激、炎症与创伤、遗传因素以及饮水、粮食和蔬菜中的微量元素含量有关。目前较为明确的观点认为, 在促癌因素长期作用下, 食管黏膜上皮经历了基底细胞单纯性增生, 轻度、中度和重度异型增生, 原位癌, 早期浸润癌, 最终发展为浸润癌。2000年世界卫生组织将食管异型增生改称为上皮内瘤变, 分为高级别上皮内瘤变(high-grade intraepithelial neoplasia, HGIN)及低级别上皮内瘤变(low-grade intraepithelial neoplasia, LGIN)。HGIN包括以往所说的重度异型增生及原位癌, LGIN包括轻度及中度异型增生^[4]。我国研究者长期深入到食管癌高发区进行研究, 发现食管黏膜重度异型增生的患者, 其发生癌变的机会可达30%, 明显高于无黏膜增生者, 重度异型增生者发生癌变几率比正常人群高出140倍^[5]。因此若能阻断食管上皮内瘤变的进展对于食管癌治疗具有重大意义。

一般认为, 食管上皮内瘤变患者多没有症状^[6], 但我们的研究发现大多数食管病变的患者都有不同程度的症状, 主要表现为反酸、嗝气、胸骨后痛、胸骨后不适、梗噎感、咽下困难、烧心等, 并且多数人同时存在2-3种症状, 而仅有3人没有任何症状常规体检发现了食管上皮内瘤变。在食管的早期病变会有上述症状的原因, 一般认为这些微小癌灶的周围常伴有不同程度的炎症, 刺激局部黏膜导致神经性运动功能失调或局部痉挛。但是这些症状均为非特异性症状, 而且我们的研究提示大多数患者发生上述症状的频率较低(少于每周2-3 d者多见), 有些持续数月或数年无明显变化, 且程度也不严重, 故常常被患者或医生忽视, 未得到应有的重视, 也未进一步详细检查。本研究中上皮内瘤

变病变处黏膜表现多为充血、肿胀, 粗糙颗粒状斑块、轻度糜烂或有小结节突起, 肉眼不难辨认, 而且结合Lugol's液染色及超声内镜均明确诊断, 这同以往的文献报道是一致的^[6,7]。我们的研究提示对于有上述不适主诉的50岁以上人群时, 应积极进行详尽的内镜检查, 同时进行必要的染色或放大内镜、超声内镜检查以尽早发现病变。

本研究发现, 食管鳞状上皮内瘤变患者最常见的症状为反酸、嗝气、胸骨后痛、胸骨后不适等。目前已经明确, 胃食管反流在Barrett's食管及食管腺癌的发病过程中起到重要作用, 但在食管鳞癌中的作用还未见报道^[8,9]。另外本研究发现上皮内瘤变病灶位于食管中段者反流症状的发生率较上段及下段均增多, 提示反流因素可能参与了食管鳞状上皮内瘤变的发病过程, 还是食管上皮内瘤变的患者可能同时合并非糜烂性食管炎(non-erosive reflux disease, NERD), 这需要进一步的研究证实。

我们认为, 反流因素可能参与了食管鳞状上皮内瘤变的发病过程。首先, 既往的文献提示胃大部分切除术后患者更易发生食管下段鳞癌, 十二指肠内容物反流可能作为反流因素间接或直接的促进肿瘤的发生^[10,11]。还有研究发现通过食管空肠吻合手术制造小鼠食管腺癌模型, 反而全部发生鳞癌^[12], 说明碱性反流因素在食管鳞状上皮内瘤变及鳞癌的发病过程中可能有一定作用^[13], 但酸性反流的作用还未见报道。部分学者认为反流最终导致鳞癌或腺癌与反流量有关, 长期大量的反流常常导致腺癌, 而少量反流可能引起鳞癌^[14]。其次, 我们的研究发现, 嗝气发生比例也较高。众所周知嗝气的生理基础是过性食管下括约肌松弛, 可能由此带来胃内容物的反流。我国北京、上海地区调查表明每日发生烧心者占2.1%^[15], 而本研究中反酸、烧心、胸骨后痛的发生率均高于此项调查结果。

总之, 本研究表明食管鳞状上皮内瘤变常见的症状包括反酸、嗝气、胸骨后痛、胸骨后不适等, 反流症状与病变范围有一定的相关性, 故临床及内镜医师应充分关注50岁以上有上述症状的患者并给予详尽的内镜检查, 必要时结合染色内镜、超声内镜等以避免遗漏病灶。

4 参考文献

- 1 Parking DM, Whehan SL, Ferlay J. Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Available from: <http://www.dep.iarc.fr/>

■同行评价
本文选题新颖, 有进一步深入研究的临床价值。

- dataava/globocan/who.htm
- 2 Wong Kee Song LM, Wilson BC. Endoscopic detection of early upper GI cancers. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 833-856
 - 3 Song ZB, Gao SS, Yi XN, Li YJ, Wang QM, Zhuang ZH, Wang LD. Expression of MUC1 in esophageal squamous-cell carcinoma and its relationship with prognosis of patients from Linzhou city, a high incidence area of northern China. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 404-407
 - 4 黄受方, 廖松林. 重视WHO肿瘤组织学新分类. *中华病理学杂志* 2002; 31: 101-103
 - 5 张志庸. 早期食管癌诊疗新进展. *中华临床医师杂志(电子版)* 2009; 3: 1-3
 - 6 Shimizu M, Nagata K, Yamaguchi H, Kita H. Squamous intraepithelial neoplasia of the esophagus: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2009; 44: 103-112
 - 7 Dry SM, Lewin KJ. Esophageal squamous dysplasia. *Semin Diagn Pathol* 2002; 19: 2-11
 - 8 Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 825-831
 - 9 Pera M, Manterola C, Vidal O, Grande L. Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2005; 92: 151-159
 - 10 Cammarota G, Galli J, Cianci R, De Corso E, Pasceri V, Palli D, Masala G, Buffon A, Gasbarrini A, Almadori G, Paludetti G, Gasbarrini G, Maurizi M. Association of laryngeal cancer with previous gastric resection. *Ann Surg* 2004; 240: 817-824
 - 11 Hashimoto N, Inayama M, Fujishima M, Ho H, Shinkai M, Hirai N, Kawanishi K, Imano M, Shigeoka H, Imamoto H, Shiozaki H. Esophageal cancer after distal gastrectomy. *Dis Esophagus* 2006; 19: 346-349
 - 12 Chen KH, Mukaisho K, Ling ZQ, Shimomura A, Sugihara H, Hattori T. Association between duodenal contents reflux and squamous cell carcinoma-establishment of an esophageal cancer cell line derived from the metastatic tumor in a rat reflux model. *Anticancer Res* 2007; 27: 175-181
 - 13 Kuroiwa Y, Okamura T, Ishii Y, Umemura T, Tasaki M, Kanki K, Mitsumori K, Hirose M, Nishikawa A. Enhancement of esophageal carcinogenesis in acid reflux model rats treated with ascorbic acid and sodium nitrite in combination with or without initiation. *Cancer Sci* 2008; 99: 7-13
 - 14 Miwa K, Sahara H, Segawa M, Kinami S, Sato T, Miyazaki I, Hattori T. Reflux of duodenal or gastroduodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int J Cancer* 1996; 67: 269-274
 - 15 潘国宗, 许国铭, 郭慧平. 北京上海胃食管反流症状的流行病学调查. *中华消化杂志* 1999; 19: 223-226

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)

自发性食管破裂11例

高丽萍, 马洪升

高丽萍, 马洪升, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 此课题由马洪升与高丽萍设计; 研究过程由马洪升与高丽萍共同操作完成; 本论文写作由高丽萍完成。

通讯作者: 马洪升, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科. mahongsheng@163.com

收稿日期: 2010-06-25 修回日期: 2010-08-05

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Spontaneous esophageal rupture: analysis of 11 cases

Li-Ping Gao, Hong-Sheng Ma

Li-Ping Gao, Hong-Sheng Ma, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Hong-Sheng Ma, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, 37 Wainan Guoxue Road, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. mahongsheng@163.com

Received: 2010-06-25 Revised: 2010-08-05

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the clinical characteristics, diagnosis, treatment of spontaneous esophageal rupture.

METHODS: The clinical data for 11 patients with spontaneous esophageal rupture treated from 1995 to 2009 at West China Hospital of Sichuan University were collected. The clinical characteristics, diagnosis and treatment of spontaneous esophageal rupture were retrospectively analyzed.

RESULTS: All patients were male and had clear causes for the disease. Primary clinical symptoms include chest pain (9 patients), chest tightness (6 patients), abdominal pain (6 patients), and subcutaneous emphysema (3 patients). Of the 11 patients, 1 abandoned treatment, 4 received esophageal repair, 2 received jejunostomy, 1 received gastrostomy and jejunostomy, 1 received esophagogastric anastomosis, and 2 received endoscopic stent implantation; 10 were cured or showed improvement. Of 7 patients followed up, 2 died within 6 mo after discharge from hospital, 3 had acid reflux and difficulty swallowing, and 2 had no complications.

CONCLUSION: Early and accurate diagnosis is important for the treatment and prognosis of spontaneous esophageal rupture. Endoscopic treatment is a promising approach for spontaneous esophageal rupture.

Key Words: Spontaneity; Esophageal rupture; Diagnosis; Treatment

Gao LP, Ma HS. Spontaneous esophageal rupture: analysis of 11 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2913-2915

摘要

目的: 探讨自发性食管破裂的临床特点 and 治疗方法。

方法: 回顾性分析1995-2009四川大学华西医院收治的11例自发性食管破裂患者的临床表现、诊断及疗效。

结果: 所有患者发病前均有诱因, 均为男性, 主要症状是胸痛9例(82%), 气紧6例(54%), 腹痛5例(45%)和皮下气肿3例(27%)。11例患者中, 1例自动出院, 4例患者行食管一期修补术, 2例患者行空肠造瘘术, 1例行胃造瘘术+空肠造瘘术, 1例行食管胃吻合术, 2例内镜下全覆膜可回收食管支架置入术。10例患者均治愈或好转出院, 7例有随访应答, 其中2例出院后6 mo内死亡, 3例术后有反酸、吞咽困难等不适, 2例现无任何并发症。

结论: 早期正确诊断对治疗方案的选择和预后都有很大的影响。内镜下治疗对自发性食管破裂患者将会是一个重要的治疗措施。

关键词: 自发性; 食管破裂; 诊断; 治疗

高丽萍, 马洪升. 自发性食管破裂11例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(27): 2913-2915

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2913.asp>

0 引言

自发性食管破裂(spontaneous esophageal rupture, SER)指非外伤引起的食管壁全层的破裂, 为较

■背景资料

自然性食管破裂是指非外伤引起的食管壁全层的破裂, 发病率较低, 其病情凶险, 如延误治疗, 病死率高。临床医生要提高对此病的认识, 早期诊断, 及时给予适合患者的最佳治疗方案。

■同行评议者

董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科

■创新盘点

对SER患者内镜下覆膜可回收支架置入、内镜下安置胃肠营养管、经皮内镜胃造瘘和经皮内镜小肠造瘘进行讨论,同时长期随访患者,提出经各种治疗方案后患者会出现并发症,值得临床医生关注。

■应用要点

内镜治疗操作简便、安全、并发症少,费用较低,患者易接受,创伤较小,可提高患者的生活质量,重复性强,具有广阔的应用前景。

少见的急性胸部疾患,本病是由荷兰内科医生Hermann Boerhaave于1724年最先报道^[1]。SER是致死频率最高的胃肠道穿孔性疾病之一,食管破裂后,胃内容物、唾液和气体通过破裂口迅速进入纵隔及胸腔,引起感染等多种并发症。其病情凶险,病死率高。现回顾性分析四川大学华西医院1995-2009年收治的SER患者11例的诊疗情况。

1 材料和方法

1.1 材料 收集四川大学华西医院1995-2009年住院的11例SER患者,均为男性,年龄35-75(中位年龄57)岁。11例患者发病前均有剧烈呕吐(100%),5例因饮酒后,1例因暴饮暴食后,食管破裂部位均发生在食管下段,其中左侧6例,右侧5例,胸痛、胸闷不适9例(82%),气促、呼吸困难6例(54%),上腹痛、腹胀不适5例(45%),皮下气肿3例(27%)。

1.2 方法 上述11例患者入院后血常规均有白细胞计数及中性粒细胞百分比升高,11例均行胸部X线检查,10例(91%)显示胸腔积液、气胸,有肺不张或肺实变表现1例(9.1%),有纵隔气肿和液平。均行胸部CT平扫检查,8例行食管造影,明确诊断,确定了裂口位置、大小。除1例患者自动出院放弃治疗外,其余10例患者均接受了有效的治疗。4例患者行剖腹探查+I期食管修补术,2例患者行空肠造瘘术,1例行胃造瘘术+空肠造瘘术,1例行食管胃吻合术,2例内镜下食管支架置入术。10例患者术后均行胸腔闭式引流。其中1例老年患者首次SER行食管修补术+空肠造瘘术+胸腔闭式引流7 mo后,再次出现食管破裂,入院后再次给予食管破裂口修补术^[2]。1例老年患者行空肠造瘘术+胸腔闭式引流20 d后,因瘘口出现化脓性分泌物,持续胸腔积液、高热等症状,行食管支架置入术。1例因患者食管破裂确诊时间延误,胸腔污染重,患者一般情况差,行食管支架置入术。

2 结果

2.1 疗效评价 10例患者均复查胸部X线或食管造影,未见胸腔积液或造影剂溢入破口,好转出院。

2.2 并发症 7例有随访应答,其中2例(18.2%)出院后6 mo内破裂口未愈合死亡;3例(27.3%)术后有反酸、吞咽困难等不适;2例(18.2%)现无任何并发症。其中安置食管支架的两例患者,行内镜下支架置入术,出院后因患者一般情况差,因基础疾病如上消化道出血未痊愈而死亡。

3 讨论

不协调的呕吐反射、食管内压突然升高和基础食管疾病等均可导致SER。剧烈呕吐是诱发SER最重要的发病诱因,多发生于暴饮暴食、饮酒后^[3]。裂口部位以下段多见,这与食管的解剖密切相关^[4],中下段缺乏柔韧的浆膜层,以平滑肌为主,纵形肌纤维逐渐减少,肌层薄,周围血管神经也较少,先天性薄弱区,食管内压力骤然升高易破裂。文献报道,破裂常发生在食管下段左侧。

典型症状为呕吐、胸痛和皮下气肿“三联征”^[5]。但因食管破裂的部位不同、大小不一及纵隔胸膜破损与否,其临床表现可能不完全相同,患者症状不一定典型。患者多数出现胸痛、胸闷不适,气促、呼吸困难,腹痛、腹胀等胸腹部症状,少数患者会出现皮下气肿。除皮下气肿具有诊断意义,上述症状缺乏特异性,与其他常见的上消化道急症和心胸疾病表现类似,常易误诊为:胃十二指肠溃疡穿孔、急性胰腺炎、急性胆囊炎等;心绞痛、心肌梗死、主动脉夹层、肺动脉栓塞等。

早期诊断及鉴别诊断是治疗该病的关键。该病诊断主要依靠详细询问病史和相关辅助检查。胸部X线检查对诊断有重要价值。怀疑食管破裂时,应做上消化道造影,可确定破裂口的大小、部位和复查术后情况。胸部CT具有诊断意义^[6]。胸水检查提示淀粉酶含量高、低pH值、查见较多鳞状细胞及食物残渣,则可以明确诊断^[7]。急诊内镜检查也有助于该病的诊断,可直接了解瘘口大小、部位和是否合并其他疾病^[8],有条件的患者也可以直接行内镜下治疗,如夹夹闭裂口、支架置入术、胃肠造瘘术等。

目前SER的治疗方法有外科手术、内科保守治疗及内镜下治疗。近年来,关于SER的治疗方法的选择方面存在着较大的争议^[9]。外科手术仍是患者的首选及主要治疗方式^[10]。术后给予积极控制感染、抑酸剂、抑酶剂及营养支持治疗预后良好。国内外文献均有报道,该病有内科保守治疗成功的病例^[11]。对于破口小,立即就诊,进入胸腔食物残渣少,感染较轻,可采取内科保守支持治疗,等待破裂口能自行愈合。随着内镜技术的不断发展,食管破裂的内镜下治疗方法也愈来愈多,在许多医院已广泛开展的有夹夹直接夹闭较小的裂口、自膨式带膜金属食管内支架置入术、安置内镜下胃肠营养管、经皮内镜胃造瘘术和经皮内镜小肠造瘘术等^[12]。食管内支架目前已广泛用于临床治疗食管良恶性

狭窄和各种食管瘘等, SER的主要临床表现为食管胸膜瘘, 目前也有将食管支架用于SER的患者^[13]. 用于一般情况不佳、心肺功能差、或术后再次破裂的患者. 肽夹和食管支架可封闭瘘口, 切断胸腔感染源, 患者可进食, 易接受, 创伤较小, 可改善患者的症状并提高生活质量. 内镜下安置胃肠营养管, 可用于患者进食少或不能进食者. 经皮内镜胃造瘘术和经皮内镜小肠造瘘术, 创伤均较外科造瘘术明显减少. 上述操作简便、安全、并发症少, 既能进行胃肠减压, 减少反流, 促进破裂口愈合, 又可早期进行肠内营养, 避免肠内细菌易位^[14]. 但内镜治疗仍存在一些不足, 如易移位、梗塞感、疼痛感及消化液的漏出等. 内镜诊疗现已成为一种趋势, 但内镜技术及食管支架材料工艺技术仍需改进和发展, 才能使内科及内镜治疗应用范围及指征扩大. 多数临床医生, 通常都只关注入院后的手术及内镜治疗的近期效果, 很少去考虑患者出院由于术后食管解剖结构的改变、食管蠕动功能的减退产生的并发症及破裂口长期不愈合或再次破裂^[15]. SER患者术后常会出现食管狭窄、反流性食管炎的症状, 同样影响患者的生活质量. SER的治疗方法的优化选择及远期预后仍然值得临床医生进一步探讨.

4 参考文献

- 1 Kundra M, Yousaf S, Maqbool S, Mahajan PV. Boerhaave syndrome--unusual cause of chest pain. *Pediatr Emerg Care* 2007; 23: 489-491
- 2 Khan OA, Barlow CW, Weeden DF, Amer KM. Recurrent spontaneous esophageal rupture. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 28: 178-179
- 3 Atallah FN, Riu BM, Nguyen LB, Seguin PO, Fourcade OA. Boerhaave's syndrome after postoperative vomiting. *Anesth Analg* 2004; 98: 1164-1166, table of contents
- 4 Korn O, Oñate JC, López R. Anatomy of the Boerhaave syndrome. *Surgery* 2007; 141: 222-228
- 5 Craik JD, Laffer CH, Newton A. Boerhaave's syndrome: a pain in the neck. *Emerg Med J* 2009; 26: 461-462
- 6 Young CA, Menias CO, Bhalla S, Prasad SR. CT features of esophageal emergencies. *Radiographics* 2008; 28: 1541-1553
- 7 Singh H, Warshawsky ME, Herman S, Shannies HM. Spontaneous Esophageal Rupture: Boerhaave's Syndrome. *Clin Pulm Med* 2003; 10: 177-182
- 8 Ortiz Moyano C, Gómez Rodríguez BJ, Pellicer Bautista F, Herrerías Gutiérrez JM. Intramural rupture of the esophagus: clinical presentation and outcome. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98: 303-305
- 9 Vallböhmer D, Hölscher AH, Hölscher M, Bludau M, Gutschow C, Stippel D, Bollschweiler E, Schröder W. Options in the management of esophageal perforation: analysis over a 12-year period. *Dis Esophagus* 2010; 23: 185-190
- 10 Jougon J, Mc Bride T, Delcambre F, Minniti A, Velly JF. Primary esophageal repair for Boerhaave's syndrome whatever the free interval between perforation and treatment. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 475-479
- 11 Matsuda A, Miyashita M, Sasajima K, Nomura T, Makino H, Matsutani T, Katsuno A, Sasaki J, Tajiri T. Boerhaave syndrome treated conservatively following early endoscopic diagnosis: a case report. *J Nippon Med Sch* 2006; 73: 341-345
- 12 Areia M, Amaro P, Figueiredo P, Portela F, Ferreira M, Rosa A, Romãozinho JM, Gouveia H, Freitas D. [Spontaneous extensive esophageal tear with upper digestive haemorrhage treated by endoclip application] *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 233-234
- 13 Salminen P, Gullichsen R, Laine S. Use of self-expandable metal stents for the treatment of esophageal perforations and anastomotic leaks. *Surg Endosc* 2009; 23: 1526-1530
- 14 赵莉, 吕志武, 耿莹. 自发性食管破裂的诊断和治疗. *胃肠病学* 2008; 13: 505-507
- 15 D'Journo XB, Doddoli C, Avaro JP, Lienne P, Giovannini MA, Giudicelli R, Fuentes PA, Thomas PA. Long-term observation and functional state of the esophagus after primary repair of spontaneous esophageal rupture. *Ann Thorac Surg* 2006; 81: 1858-1862

■同行评价

本文科学性较好, 对内科医生有一定的临床指导作用.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

贲门失迟缓症临床分析57例

王建鑫, 尚占民, 黄皖农, 裴艳香, 高 岩

■背景资料

贲门失弛缓症是一种原发性食管运动障碍性疾病。以往诊断主要根据临床表现、上消化道造影和胃镜。但是对于早期患者这种诊断方法并不敏感。食管测压可以反映食管压力和运动功能, 为贲门失弛缓症的早期诊断提供了比较特异的方法。

王建鑫, 尚占民, 黄皖农, 裴艳香, 高岩, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科 北京市 100020

作者贡献分布: 此课题由王建鑫设计; 研究过程由王建鑫、尚占民、黄皖农、裴艳香及高岩操作完成; 数据分析由王建鑫完成; 本论文写作由王建鑫完成。

通讯作者: 王建鑫, 副主任医师, 100020, 北京市朝阳区工体南路8号, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科。

1wjx@163.com

电话: 010-85231502

收稿日期: 2010-06-17 修回日期: 2010-08-04

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Achalasia: analysis of 57 cases

Jian-Xin Wang, Zhan-Min Shang, Wan-Nong Huang,
Yan-Xiang Pei, Yan Gao

Jian-Xin Wang, Zhan-Min Shang, Wan-Nong Huang,
Yan-Xiang Pei, Yan Gao, Department of Gastroenterology,
Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical
University, Beijing 100020, China

Correspondence to: Jian-Xin Wang, Department of Gas-
troenterology, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Cap-
ital Medical University, 8 North Gongti Road, Chaoyang
District, Beijing 100020, China. 1wjx@163.com

Received: 2010-06-17 Revised: 2010-08-04

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To analyze the clinical manifestations of patients with achalasia and to characterize the manometric parameters of the esophageal body and lower esophageal sphincter (LES) in these patients.

METHODS: The clinical manifestations of 57 patients with achalasia were analyzed. LES length (LESL), LES pressure (LESP), LES relaxation rate (LESRR), and the type and amplitude of esophageal peristaltic contraction in these patients and 20 healthy controls were measured. A pneumo-hydraulic capillary perfusion system with 6-lumen Dent-Sleeve catheter from MMS was used to record esophageal manometric parameters.

RESULTS: The ratio of male to female for all the 57 patients was 1.1 : 1. The majority (80%) of patients ranged in age between 25-60 years. Chief complaints in these patients were dysphagia and regurgitation. LESRR in the achalasia group was significantly lower than that in the healthy

control group ($41.5\% \pm 18.6\%$ vs $96.1\% \pm 2.5\%$, $P < 0.01$). Aperistalsis in the esophageal body was detected in all achalasia patients but not in healthy controls (100% vs 0 , $P < 0.01$). LESL, LESP and the amplitude of esophageal body showed no significant differences between the achalasia group and healthy control group.

CONCLUSION: Incomplete LES relaxation and aperistalsis of the esophageal body are two manometric features of achalasia, and elevated resting LESP and low average contraction amplitude of the esophageal body are not present in all the patients. The results obtained in this study will be helpful for early diagnosis of achalasia and selection of therapeutic modality.

Key Words: Achalasia; Esophageal manometry; Lower esophageal sphincter

Wang JX, Shang ZM, Huang WN, Pei YX, Gao Y. Achalasia: analysis of 57 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2916-2919

摘要

目的: 探讨贲门失弛缓症患者的临床表现、食管体部和下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)的动力学特征。

方法: 分析57例确诊为贲门失弛缓症患者的临床表现, 并使用荷兰MMS多功能消化管测压仪测定患者和20例健康对照组的LES长度、压力和松弛率, 以及食管体部蠕动波的类型和波幅。

结果: 贲门失弛缓症患者的男女发病比率是1.1 : 1, 发病年龄25-60岁占80.5%, 其主要的临床症状是吞咽困难, 反食; 贲门失弛缓症患者与健康对照组相比, LES松弛率明显下降($41.5\% \pm 18.6\%$ vs $96.1\% \pm 2.5\%$, $P < 0.01$), 食管体部主要为非传导性同步收缩波(100% vs 0 , $P < 0.01$), 没有推进性蠕动; 贲门失弛缓症组的LES长度、压力和食管体部蠕动波波幅与健康对照组比较无显著性差异。

结论: LES松弛率下降和食管体部的非推进性

■同行评议者

李旭, 副教授, 广东省广州市南方医院急诊科

同步收缩波是贲门失弛缓症的特征性动力学表现, LES压力增高和食管体部蠕动波幅下降不是诊断的必备条件. 本研究对于贲门失弛缓症的早期诊断和治疗方法的选择有指导意义.

关键词: 贲门失迟缓症; 食管压力测定; 下食管括约肌

王建鑫, 尚占民, 黄皖农, 裴艳香, 高岩. 贲门失迟缓症临床分析57例. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2916-2919
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2916.asp>

0 引言

贲门失弛缓症(achalasia)是一种原发性食管运动障碍性疾病, 主要是由食管肌间神经丛的抑制性神经节细胞变性导致. 临床表现主要为吞咽困难、反食、呕吐以及食管外症状等. 贲门失弛缓症临床少见, 早期症状不明显, 往往历经多年才能确诊, 延误最佳的治疗时机. 以往诊断贲门失弛缓症主要依靠以下3方面: (1)典型的临床表现; (2)上消化道造影提示食管扩张, 食管下端漏斗状狭窄, 边缘光滑似“鸟嘴”; (3)胃镜检查除外继发性因素. 但是对于早期贲门失弛缓症患者以上诊断方法并不敏感. 食管压力测定可以反映食管体部和下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)的压力变化, 对贲门失迟缓症的诊断较为特异. 本研究通过分析首都医科大学附属北京朝阳医院57例确诊的贲门失弛缓症患者的临床表现和食管压力参数, 探讨贲门失弛缓症的特点, 为早期诊断、治疗方法的选择等提供初步依据.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2001-2010年首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科、胸外科确诊为贲门失迟缓症患者57例, 其中男30例, 女27例, 男女比为1.1:1. 年龄11-82(平均40.2)岁, 其中25-60岁占80.5%. 病程2 mo-20(平均3)年. 所有患者根据典型的临床表现、上消化道造影或/和胃镜、食管压力测定确诊. 健康对照组20例, 男11例, 女9例, 平均32.5岁, 均无任何上消化道症状.

1.2 方法 应用荷兰MMS多功能胃肠压力测定系统进行检测. 受试者停用影响压力测定结果的药物(如多潘立酮、硝酸酯类等)5 d, 测压前禁食8 h. 检测时将测压管经一侧鼻孔插入胃中, 确定6个测压孔均位于胃内后调零, 用牵拉法测定LES的压力(LES pressure, LESP)、长度(LES

length, LESL). 食管蠕动功能检测: 将1号测压孔置于胃内, 2号测压孔置于LES处, 3-6号测压孔分被置于LES上方5、10、15、20 cm处. 每隔30 s湿咽5 mL纯净水, 共10次. 测定的数据经MMS软件分析. 观察指标: (1)LESL, LESP, LES松弛率(LES relaxation rate, LESRR); (2)食管体部蠕动的类型和蠕动的平均波幅, 强力型贲门失弛缓症^[1](vigorous achalasia, 蠕动的平均波幅>37 mmHg)比例.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行处理, 组间比较采用 t 检验和 χ^2 检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 临床表现 57例贲门失弛缓症患者出现吞咽困难50例(87.7%), 反食40例(70.2%), 恶心、呕吐25例(43.8%), 胸痛11例(19.2%), 反酸、烧心10例(17.5%), 咽部异物感3例(5.3%).

2.2 LESL、LESP和LESRR 57例贲门失弛缓症患者LESL 2-5 cm, LESP平均值34.3 mmHg, 与健康对照组比较差异无显著性; 患者组LESRR为 $41.5\% \pm 18.6\%$, 其中2例LESRR大于90%, 显著低于健康对照组($P<0.01$, 表1).

2.3 食管体部蠕动的类型和波幅 57例贲门失弛缓症患者中44例食管体部蠕动波均为同步收缩波, 其余13例患者同步收缩波为8-9次, 逆向蠕动波1-2次, 明显高于健康对照组($P<0.01$); 食管体部蠕动的平均波幅为32.6 mmHg, 与健康对照组比较差异无显著性(表2). 本组强力型贲门失弛缓症患者12例(21.1%).

3 讨论

贲门失弛缓症是一种病因尚不明确的食管运动障碍性疾病, 主要表现为食管远端非推进性蠕动, LES缺乏吞咽性松弛. 贲门失弛缓症临床较为少见, 国外报道贲门失迟缓症的年发病率为1/10万^[2], 男女发病率相仿, 虽然该病可以发生在任何年龄, 但主要集中在25-60的中青年^[3]. 我国缺乏贲门失弛缓症发病率的流行病学资料. 首都医科大学附属北京朝阳医院57例确诊贲门失迟缓症的患者男女发病比例为1.1:1, 25-60岁的患者占80.5%. 本组患者的主要症状依次为吞咽困难(87.7%), 反食(70.2%), 恶心、呕吐(43.8%), 胸痛(19.2%), 反酸、烧心(17.5%), 与国外资料相仿^[4], 其中3例患者以咽部不适为首发和主要症状, 提示如果出现食管外症状也要考

■ 研发前沿

近年来食管测压技术从传统的水灌注法发展到了高精度压力测定(HRM). HRM操作方法简单、准确, 可以获得食管压力和运动功能的更多信息. 根据HRM特点, 贲门失弛缓症分为了3种类型, 根据不同类型选择不同的治疗方法已成为研究热点.

■应用要点

本文认为LESRR的下降和食管体部的非推进性同步收缩是贲门失弛缓症特征性的动力学表现,LESP增高和食管蠕动波波幅降低不是诊断的必要条件,这为贲门失弛缓症的早期诊断提供了帮助。

表 1 两组LESL、LESP和LESRR的比较

分组	n	LESL(cm)	LESP(mmHg)	LESRR(%)
贲门失弛缓症组	57	2-5	34.3±12.9	41.5±18.6 ^b
健康对照组	20	2-4	26.4±6.7	96.1±2.5

^bP<0.01 vs 健康对照组.

表 2 两组食管体部蠕动波幅和传导性的比较

分组	n	食管体部蠕动波幅(mmHg)	无传导性同步收缩 n(%)
贲门失弛缓症组	57	32.6±12.1	57(100) ^b
健康对照组	20	39.6±8.9	0

^bP<0.01 vs 健康对照组.

虑贲门失弛缓症的诊断.

贲门失弛缓症最早由Those Willis在1674年首先描述^[5],他认为是由于食管远端缺乏正常抑制导致此病.目前贲门失弛缓症的病因仍未清楚,主要考虑与遗传因素、病毒感染和自身免疫有关^[6].贲门失弛缓症的发病机制有先天性、肌源性和神经源性等3种学说.目前大多数学者支持神经源性学说^[7],该学说认为不是因为食管和LES肌肉本身,而是由于食管间神经丛的抑制性神经节细胞变性或消失,使一氧化氮、血管活性肠肽等神经介质的分泌减少,导致LES松弛障碍和食管体部非推进性蠕动.

贲门失弛缓症的诊断以往主要结合典型的临床表现、上消化系造影和胃镜.但是早期贲门失弛缓症患者症状往往不典型,上消化系造影和胃镜也容易延误诊断.例如Howard等^[8]研究发现,在随访观察的33例患者中,只有22例患者有典型的钡剂造影表现.食管压力测定可以准确、快速的观察食管体部和LES的运动和压力情况,为贲门失弛缓症的早期诊断提供了可靠、特异的方法.

本研究对57例确诊贲门失弛缓症患者进行食管压力测定显示,患者LESL多位于正常范围(75.4%);70.1%患者的LESP位于10-40 mmHg,处于正常范围或轻度偏高,与健康对照组的LESL、LESP相比较差异无显著性,提示LESL和LESP对诊断缺乏敏感性,他们不是诊断本病的必要条件.57例贲门失弛缓症患者中55例(96.5%)存在LESRR明显的下降,其中仅2例有LES完全松弛,较健康对照组明显下降,说明

LESRR的下降是贲门失弛缓症的特征性表现.本组患者中44例患者食管体部蠕动波全是同步收缩波,13例患者食管体部蠕动波中同步收缩波8-9次,逆向蠕动波1-2次,所有患者均未见推进性蠕动收缩波,明显高于健康对照组,但蠕动波波幅与健康对照组相比无统计学意义.提示食管体部远端非传导性同步蠕动收缩对贲门失弛缓症的诊断有很高的特异性,但蠕动波幅降低不是诊断的必要条件.本组强力型贲门失弛缓症患者较多,共12例,相关研究表明强力性贲门失弛缓症是贲门失弛缓症的早期形式,这时候抑制性神经节细胞还未被毁损,食管通过强力收缩对抗LES不完全松弛引起的食管贲门连接处的梗阻^[9].

贲门失弛缓症的治疗主要包括:(1)药物治疗^[10]:主要指平滑肌松弛剂,如消心痛和硝苯地平,由于长期疗效欠佳,且不良反应较大,目前仅用于症状较轻,无法接受侵入性治疗的患者;(2)内镜下肉毒杆菌毒素注射^[11]:肉毒杆菌毒素是一种神经毒素,注射后可使LES松弛,但是其疗效是一次性的,多在1年内复发,一般用于无法接受侵入性治疗的患者;(3)内镜下球囊扩张^[12]:通过撕裂LES处的环形肌达到治疗目的,这是最有效的非手术治疗贲门失弛缓症的治疗方法,远期缓解率较高;(4)腹腔镜下Heller肌肉切开术联合胃底折叠术是手术治疗的首选,具有疗效佳,创伤小等优点^[13].近年来发展的内镜下可回收抗反流食管支架置入治疗贲门失弛缓症取得了较好疗效,但最佳放置时间和远期效果等有待进一步观察^[14].

贲门失弛缓症作为一种常见的食管动力障碍性疾病,选择适宜的治疗方法非常关键,Pandolfino等^[15]做出了有益的探索,下一步我们将比较不同贲门失弛缓症动力障碍类型的治疗效果,为我国贲门失弛缓症治疗方法的选择提供理论基础.

4 参考文献

- Pandolfino JE, Ghosh SK, Rice J, Clarke JO, Kwiatek

- MA, Kahrilas PJ. Classifying esophageal motility by pressure topography characteristics: a study of 400 patients and 75 controls. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 27-37
- 2 Vela MF, Vaezi MF. Cost-assessment of alternative management strategies for achalasia. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 2019-2025
- 3 Farrokhi F, Vaezi MF. Idiopathic (primary) achalasia. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2: 38
- 4 Fisichella PM, Raz D, Palazzo F, Niponmick I, Patti MG. Clinical, radiological, and manometric profile in 145 patients with untreated achalasia. *World J Surg* 2008; 32: 1974-1979
- 5 Birgisson S, Richter JE. Achalasia: what's new in diagnosis and treatment? *Dig Dis* 1997; 15 Suppl 1: 1-27
- 6 Park W, Vaezi MF. Etiology and pathogenesis of achalasia: the current understanding. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1404-1414
- 7 Walzer N, Hirano I. Achalasia. *Gastroenterol Clin North Am* 2008; 37: 807-825, viii
- 8 Howard PJ, Maher L, Pryde A, Cameron EW, Heading RC. Five year prospective study of the incidence, clinical features, and diagnosis of achalasia in Edinburgh. *Gut* 1992; 33: 1011-1015
- 9 Camacho-Lobato L, Katz PO, Eveland J, Vela M, Castell DO. Vigorous achalasia: original description requires minor change. *J Clin Gastroenterol* 2001; 33: 375-377
- 10 Annese V, Bassotti G. Non-surgical treatment of esophageal achalasia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5763-5766
- 11 李柯蓓, 施瑞华. 贲门失弛缓症的治疗进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2334-2337
- 12 杨艳, 于皆平, 李欢, 曹俊, 于红刚. 内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症81例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1024-1026
- 13 范莹, 吴硕东, 苏琪. 腹腔镜联合胃镜食管Heller肌切开加Dor胃底折叠术治疗贲门失弛缓症的临床应用. *中国内镜杂志* 2008; 14: 1235-1237
- 14 郑荣浩, 金珍成, 陈伟训, 蔡萌芽. 可回收抗反流食管支架治疗贲门失弛缓症临床疗效观察. *中国内镜杂志* 2008; 14: 1229-1232
- 15 Pandolfino JE, Kwiatek MA, Nealis T, Bulsiewicz W, Post J, Kahrilas PJ. Achalasia: a new clinically relevant classification by high-resolution manometry. *Gastroenterology* 2008; 135: 1526-1533

■同行评价

本文选题尚可, 内容详实可靠, 有一定的临床参考价值。

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}¹, Vmax不能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n-(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。

胃癌根治术后生存状态的5年随访

马海波, 王爽, 魏克飞, 孙小梁

■背景资料

胃癌是消化系统高发恶性肿瘤,其死亡率居所有恶性肿瘤之首,根治性手术被认为是最有可能获得治愈的手段,但术后患者的远期生存状况不尽相同,即手术的根治度并不是影响胃癌患者预后的唯一因素。探求影响胃癌术后患者生存的其他临床及病理学因素,不但可以为设立治疗方案和预后评估提供科学依据,也必将有利于患者的长期生存。

马海波, 王爽, 魏克飞, 孙小梁, 吉林中西医结合医院 吉林省吉林市 132012

作者贡献分布: 马海波与王爽对此文所作贡献均等; 此课题由马海波与王爽设计; 病例资料采集由马海波、王爽及魏克飞完成; 随访由马海波与孙小梁完成; 数据分析由马海波完成; 本论文写作由马海波、王爽、魏克飞及孙小梁完成。

通讯作者: 马海波, 副主任医师, 132032, 吉林省吉林市长春路9号, 吉林中西医结合医院普外科, jiccmhb@126.com

收稿日期: 2010-06-09 修回日期: 2010-08-03

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Survival status of patients with gastric cancer after radical resection: a five-year follow-up study

Hai-Bo Ma, Shuang Wang, Ke-Fei Wei, Xiao-Liang Sun

Hai-Bo Ma, Shuang Wang, Ke-Fei Wei, Xiao-Liang Sun, Jilin Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Jilin 132012, Jilin Province, China

Correspondence to: Hai-Bo Ma, Department of Surgery, Jilin Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, 9 Changchun Road, Jilin 132032, Jilin Province, China. jiccmhb@126.com

Received: 2010-06-09 Revised: 2010-08-03

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To survey the survival status of gastric cancer patients after radical resection and to evaluate prognostic factors in these patients.

METHODS: The clinical data for 298 patients with gastric cancer who underwent radical resection from August 2003 to August 2006 at Jilin Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine were followed up for 5 years were retrospectively reviewed. The life table, Kaplan-Meier and Cox proportional hazard analyses were used to evaluate the survival status of these patients.

RESULTS: (1) A total of 154 patients died within 5 years. The median survival time was 48.225 mo, and the 1-, 3- and 5-year survival rates were 78%, 57% and 47%, respectively. Death hazard was highest between 9-11 mo after surgery. (2) Univariate analysis indicated that TNM stage, tumor size, differentiation, lymph node metastasis and distant metastasis, combined multiple

organ resection, therapy with Chinese medicine, and extent of tumor resection were significant predictors of the prognosis in these patients. (3) Multivariate analysis showed that TNM stage (RR = 1.497), lymph node metastasis (RR = 1.613), distant metastasis (RR = 1.458), and therapy with Chinese medicine (RR = 0.592) were independent prognostic factors in these patients.

CONCLUSION: The prognosis of patients with gastric cancer after radical resection is poor. TNM stage, lymph node metastasis and distant metastasis are independent factors affecting the prognosis of patients with gastric cancer after radical resection. Therapy with Chinese medicine can improve the survival of patients with gastric cancer after radical resection.

Key Words: Gastric cancer; Radical operation; Prognosis; Prognostic factor; Survival analysis

Ma HB, Wang S, Wei KF, Sun XL. Survival status of patients with gastric cancer after radical resection: a five-year follow-up study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2920-2924

摘要

目的: 了解胃癌根治术后生存情况, 探讨影响预后的相关因素。

方法: 回顾性采集2003-08/2006-08吉林中西医结合医院298例胃癌根治术后患者临床资料, 随访5年, Life Tables、Kaplan Meier、Cox比例风险回归进行生存分析。

结果: (1)5年内死亡154例, 中位生存时间48.225 mo, 1、3和5年生存率分别是78%、57%和47%, 以术后9-11 mo死亡风险最高。(2)单因素分析: TNM分期、肿瘤大小、组织分化、淋巴结状态、远隔转移、联合脏器切除、中药治疗、根治度是影响预后的因素。(3)多因素分析: TNM分期(RR = 1.497)、淋巴结状态(RR = 1.613)、远隔转移(RR = 1.458)和中药治疗(RR = 0.592)是影响预后的独立因素。

结论: 胃癌根治术后预后不良, TNM分期、淋

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

巴结转移、远隔转移是预后的显著危险因素, 中药治疗是保护因素。

关键词: 胃癌; 根治术; 预后; 预后因素; 生存分析

马海波, 王爽, 魏克飞, 孙小梁. 胃癌根治术后生存状态的5年随访. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2920-2924

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2920.asp>

0 引言

胃癌是消化系高发恶性肿瘤, 手术切除是治疗早期胃癌的首选方法, 然而术后复发死亡率仍然很高. 探讨影响胃癌术后生存的相关因素和对危险度分层必将有利于患者的长期生存. 虽然以往文献也有关于此方面的报道, 但多是单因素分析, 缺乏多因素作用下的综合评定. 本研究对298例根治性切除术的胃癌患者进行综合分析, 探讨影响其预后的有关因素.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-08/2006-08在吉林省吉林中西医结合医院接受胃癌根治术的患者647例, 通过电话和信访, 最终有298例获得随访结果, 所有患者均病理诊断证实. 其中男224例, 女74例; 年龄33-79(中位年龄60.25)岁; 根据国际抗癌联盟(UICC)TNM标准^[1], I、II、III、IV期分别为42、74、101、81例; D0、D1、D2、D3、D4根治分别为21、32、187、45、3例.

1.2 方法 登录美国国家卫生图书馆网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)和中国知网(<http://www.cnki.net/>)网站, 查阅《Dig Surg》、《J Surg Oncol》、《中国癌症杂志》等高影响因子杂志. 参考文献[2-4]初步拟定纳入分析的因素是: 性别、年龄、肿瘤部位、TNM分期、肿瘤大小、病理类型、组织分化、浸润深度、淋巴结状态、远处转移、血管癌细胞侵犯、联合脏器切除、根治程度、肿瘤残留、术后化疗、胃切除范围、消化系重建方式、免疫治疗、中药治疗等.

统计学处理 Life Tables法、Kaplan-Meier法生存分析, Log Rank检验. Cox回归筛选影响预后的相关因素. 统计软件使用SPSS11.5.

2 结果

2.1 随访结果及生存描述 本研究观察终点为术后5年, 因胃癌复发死亡作为终点事件, 其他原因死亡和随访结束作为截尾处理, 生存时间从

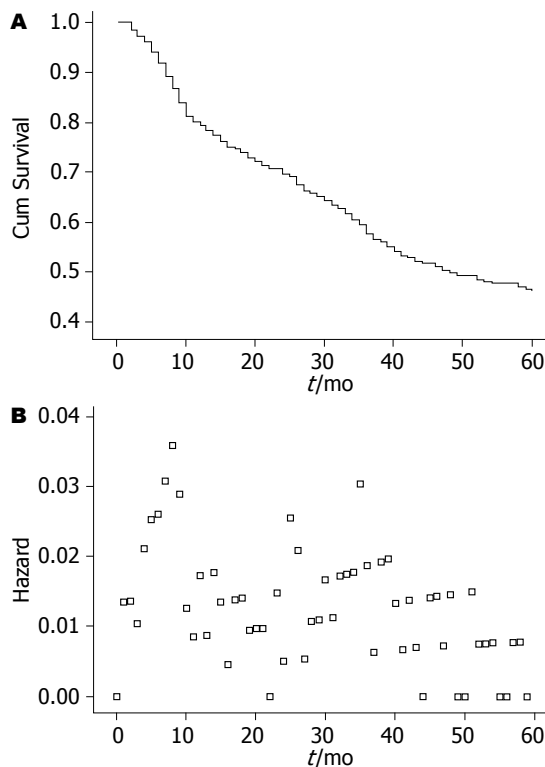


图1 Life Tables示298例胃癌患者根治术后生存曲线和死亡风险分布. A: 生存曲线; B: 死亡风险分布.

术日算起, 以月为测度单位, 在298例患者中, 死亡154例, 中位生存时间48.225 mo, Life Tables计算1、3和5年生存率分别是78%、57%和47%. 死亡分布以术后9-11 mo最高(图1).

2.2 影响预后的单因素分析 变量数量化见表1. Cox回归显示: TNM分期、肿瘤大小、组织分化、淋巴结状态、远隔转移、联合脏器切除、中药治疗、根治度是影响预后的因素, 5年生存状态与性别、年龄、肿瘤部位、病理类型、浸润深度、血管癌细胞侵犯、胃肠道重建方式、胃切除范围、术后化疗和免疫治疗的相关性无统计学意义(表2).

2.3 影响预后的多因素分析 逐步退出法Cox回归: 保留在模型的因素是: TNM分期(RR = 1.497)、淋巴结状态(RR = 1.613)、远隔转移(RR = 1.458)和中药治疗(RR = 0.424). TNM分期I期、II期、III期和IV期5年生存率分别是78.6%、51.4%、45.5%和33.3%, Log Rank(Mantel-Cox), $\chi^2 = 26.049$, $P = 0.000$. 无、第一站、第二站、第三站淋巴结转移者5年生存率分别是82.1%、58.1%、43.0%和26.0%($\chi^2 = 42.429$, $P = 0.000$). 有、无远隔转移者的5年生存率分别是17.0%和55.1%($\chi^2 = 48.585$, $P = 0.000$). 有、无中药治疗者的5年生存率分别是50.8%和36.5%(χ^2

■ 研究前沿

虽然现代医学诊疗技术在飞速发展, 但胃癌患者总体预后并没有得到显著改善, 究其原因在于影响胃癌患者预后的相关因素未有彻底明确. 因此, 探讨影响其预后的因素一直是学者们研究的热点和难点.

■创新盘点

本研究采用多因素Cox比例风险回归,探讨了影响胃癌根治术后患者预后的相关因素,这种高级数理统计方法可以排除混杂因素干扰,显示某一因素的独立作用强度。另外,本研究还分析了中医药治疗对胃癌术后预后的影响,相关文献鲜少涉及。

表 1 变量数量化

变量	赋值编码	变量	赋值编码
应变变量	生存 = 0, 死亡 = 1	远隔转移	无 = 0, 有 = 1
性别	男 = 0, 女 = 1	血管癌细胞侵犯	无 = 0, 有 = 1
年龄	<60岁 = 0, ≥60岁 = 1	联合脏器切除	无 = 0, 有 = 1
肿瘤部位 ^a	胃上部 = 0, 胃中部 = 1, 胃下部 = 2	根治程度 ^a	D0、D1 = 0, D2 = 1, D3、D4 = 3
TNM分期	I = 0, II = 1, III = 2, IV = 3	切缘肿瘤残留	无 = 0, 有 = 1
肿瘤大小	<3 cm = 0, ≥3 cm = 1	术后化疗	无 = 0, 有 = 1
病理类型 ^a	管状腺癌 = 0, 乳头状腺癌 = 1, 黏液腺癌 = 2, 印戒细胞癌 = 3, 未分化癌 = 4	消化道重建方式 ^a	Roux-en-Y = 0, 胃十二指肠吻合 = 1, 空肠代胃 = 2, 食管胃吻合 = 3
组织分化	差 = 0, 中 = 1, 好 = 2	胃切除范围	部分切除 = 0, 全部切除 = 1
浸润深度	黏膜层 = 0, 浅肌层 = 1, 深肌层 = 2, 全层 = 3	免疫治疗	否 = 0, 是 = 1
淋巴结转移	无 = 0, 第一站 = 1, 第二站 = 2, 第三站 = 3	中药治疗	无 = 0, 有 = 1

^a设为哑变量。

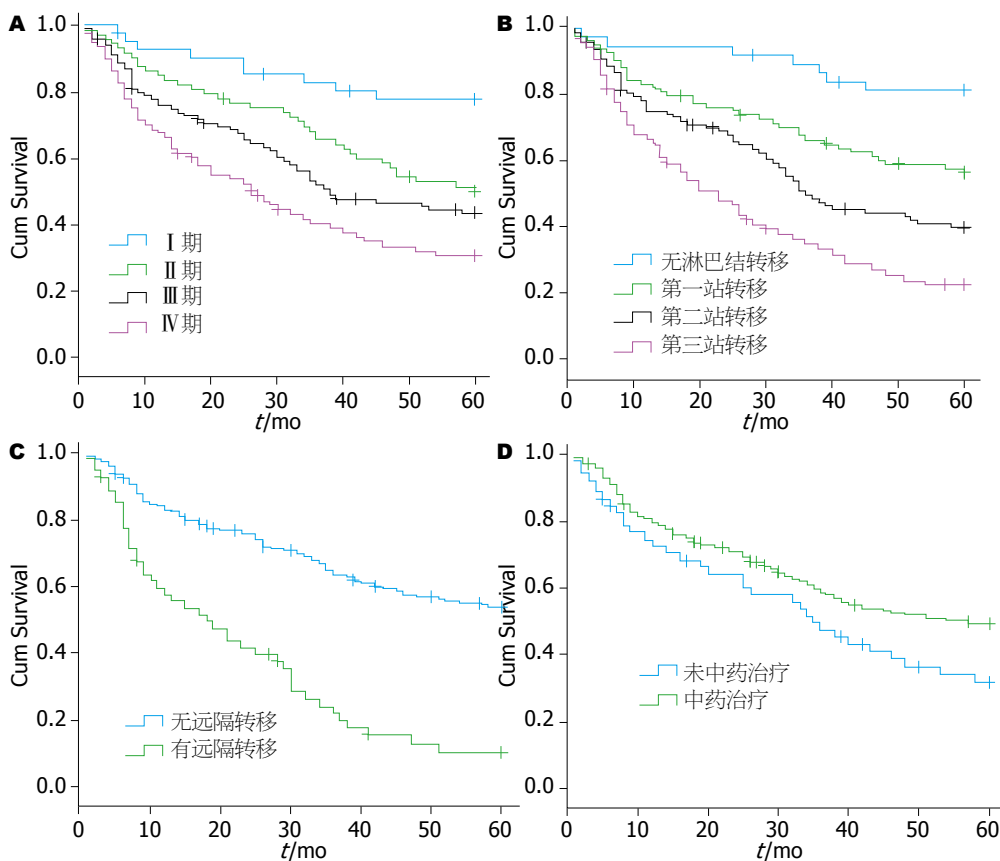


图 2 独立因素与生存状态。A: TNM分期; B: 淋巴结状态; C: 远隔转移; D: 中药治疗。

= 4.544, $P = 0.033$, 表3, 图2)。

3 讨论

本资料胃癌术后患者中位生存时间48.23 mo, 5年累计生存率为47%, 高于福州1992-1999年24.29%的生存率^[5], 与文献[6]的结果接近。吉林

中西医结合医院胃癌患者的治疗效果的提高, 得益于早期胃癌诊断率的提高以及包括规范化的胃癌根治手术、辅助化疗等综合治疗^[7], 虽然随着诊疗技术的提高, 胃癌的生存状况有所改善, 但总体生存状况不容乐观, 如何进一步提高远期生存率仍是今后医疗卫生工作的重点。

表 2 影响胃癌根治术后生存的单因素Cox回归

变量	B	SE	Wald	Sig.	Exp(B)	95%CI for Exp(B)	
						Lower	Upper
远隔转移	1.194	0.183	42.763	0.000	3.301	2.308	4.721
TNM分期	0.403	0.085	22.579	0.000	1.496	1.267	1.766
肿瘤大小	0.455	0.180	6.392	0.011	1.576	1.108	2.243
组织分化	0.526	0.183	8.283	0.004	1.692	1.183	2.421
淋巴结状态	0.557	0.089	39.096	0.000	1.745	1.465	2.077
联合脏器切除	0.413	0.197	4.417	0.036	1.511	1.028	2.222
中药治疗	-0.529	0.166	10.229	0.001	0.589	0.426	0.815
根治度			11.186	0.004			
D2	0.751	0.225	11.186	0.001	2.120	1.365	3.292
D3、D4	0.604	0.269	5.042	0.025	1.830	1.080	3.100

■应用要点

本研究证实胃癌根治术后预后多为不良, 5年生存率仅47%, 因此, 应重视患者的远期生存状况, 治疗方案的确立应参考TNM分期、淋巴结转移和远隔转移情况, 术后应实行包括中医药治疗在内的综合干预。

表 3 影响胃癌术后预后的多因素Cox回归

变量	B	SE	Wald	Sig.	Exp(B)	95%CI for Exp(B)	
						Lower	Upper
TNM分期	0.404	0.087	21.589	0.000	1.497	1.263	1.775
淋巴结状态	0.478	0.088	29.754	0.000	1.613	1.359	1.916
远隔转移	0.377	0.085	19.659	0.000	1.458	1.234	1.722
中药治疗	-0.524	0.170	9.497	0.002	0.592	0.424	0.827

肿瘤的TNM分期是以肿瘤的浸润深度和淋巴结转移度为依据, 可以反映肿瘤的生物学特性, 其他影响胃癌预后的因素也与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移度相关。有研究认为随着肿瘤的浸润深度逐渐加深, 患者的5年生存率也逐渐降低, 从T1的97.6%逐渐下降到T4的10.2%; 淋巴结转移数越多, 患者的5年生存率也从N0的85.5%逐渐下降到N3的0.0%^[4]。本文TNM分期 I 期、II 期、III 期和IV 期5年生存率分别是78.6%、51.4%、45.5%和33.3%。在均衡了其他影响因素后TNM分期每增加1级, 死亡的风险增加1.497倍(RR = 1.497, 95%CI: 1.263-1.775)。可见, 胃癌患者的预后在很大程度上取决于治疗时所处的病期, 其对预后的作用强度超过治疗的干预作用^[8]。因此, 在TNM早期阶段手术治疗可望改善预后, 但胃癌早期症状隐匿和非特异, 有47.6%早期胃癌患者无症状, 31.2%患者有不确定症状^[9]。因此, 临床上对有消化系统症状的人群应高度怀疑胃癌的可能, 并提倡行胃镜、CT等检测以尽早确诊。

相关文献报道^[10], 有42%的胃癌患者中发生了淋巴结转移, 淋巴结是否转移, 转移的部位、转移站数等均影响早期胃癌预后, 无淋巴结转移胃癌术后5年存活率64%, 高于淋巴结转移者

的54%($P < 0.05$)。在319例接受胃癌根治术的对比分析中, 淋巴结转移率0%、<30%、30%-60%及>60%各组2年生存率分别为84.4%、66.1%、35.0%、15.1%; 3年生存率分别为80.5%、45.0%、15.0%、5.5%; 4年生存率分别为71.4%、33.0%、5.0%、1.4%($P < 0.05$)。淋巴结转移率与预后有良好的一致性^[11]。本文在扣除了其他因素的影响后, 无、第一站、第二站、第三站淋巴结转移者的5年生存率分别是82.1%、58.1%、43.0%和26.0%($P = 0.000$), 提示淋巴结状态是影响预后的强相关因素。因此, 扩大淋巴结清扫范围能改善胃癌患者的预后, 如术中肉眼无法确定淋巴结转移状况时, 应对哨兵淋巴结进行活检^[12]。

一项纳入了160例术后胃癌患者随机对照显示, 接受中药治疗的复发转移灶大小抑制率为30.00%, 未接受中药治疗者为17.85%($P < 0.05$)^[13]。本资料部分患者术后接受了中药治疗, 单因素和多因素均证实中药治疗能改善生存率, 接受中药治疗者5年生存率高于未接受中药治疗者(50.8% vs 36.5%), 提示中药治疗可能改善患者状况。中药抗肿瘤效果可能是多靶点作用的结果, 胃癌术后中药干预可改善呕吐、减轻术后化疗不良反应、提高机体免疫力, 提

■同行评价

本文回顾性分析了多因素对胃癌根治术后5年生存率的影响,对临床工作有一定的参考价值。

高患者生活质量^[14],诱导细胞凋亡^[15,16],抑制肿瘤转移相关因子的表达^[17-19]。从而使其处于不利于肿瘤复发转移的状况,提高生存率。中医是中华民族的优秀文化遗产,如何发挥中西医结合抗肿瘤效果,是今后研究工作的重点。

单因素分析时肿瘤大小、组织分化、联合脏器切除和根治度也是影响预后的因素,多因素分析时与预后的相关性未得到统计学支持,但并不表明这些因素的作用不重要。另外,一些肿瘤相关因子、基因(如microRNA^[20]、P53-Altered FBXW7^[21]、RUNX3^[22]、Oct-4^[23]等)表达等也是预后因素。但本研究并未有涉及。随着医学诊疗水平的发展,肿瘤患者的预后也不断改善,同样对患者预后的评估需要纳入新的元素。

总之,胃癌根治术后远期生存不理想,TNM分期越高、淋巴结转移站数越多、远隔转移者预后多为不良,中药治疗可改善预后。胃癌的早期发现、早期诊断和治疗是提高生存率的关键。故对有消化系统症状的人群在积极对症治疗的同时,应尽早行胃镜检查,常规活检。

4 参考文献

- 徐光炜. 新编常见恶性肿瘤诊治规范(胃癌分册). 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1999: 5-7
- Hu X, Tian DY, Cao L, Yu Y. Progression and prognosis of gastric stump cancer. *J Surg Oncol* 2009; 100: 472-476
- Moreira H, Pinto-de-Sousa J, Carneiro F, Cardoso de Oliveira M, Pimenta A. Early onset gastric cancer no longer presents as an advanced disease with ominous prognosis. *Dig Surg* 2009; 26: 215-221
- 赵刚, 邱江峰, 吴志勇. 603例胃癌根治术的预后因素分析. *中国癌症杂志* 2007; 17: 556-559
- 罗仁夏, 吴彬, 田俊. 福州市胃癌患者的生存分析. *现代预防医学* 2006; 33: 1570-1572
- 赵力军, 赵燕萍, 赵迎新, 齐倩. 104例胃癌术后患者生存分析. *西南军医* 2009; 11: 705-706
- 蔡世荣, 陈创奇, 马晋平, 陈剑辉, 宋武, 何裕隆, 詹文华. 不同时期胃癌的临床病理特点及预后比较分析. *中华医学杂志* 2009; 89: 1264-1268
- 潘原, 薛强, 梁寒, 张汝鹏, 崔青皓, 刘宁. 320例胃癌根治术后预后因素的回顾性分析. *中国肿瘤临床* 2008; 35: 739-743
- 丸山雅一. 早期胃癌的临床基础. *中华腹部肿瘤杂志* 2003; 3: 79-81
- 陆立, 刘景坤. 影响无淋巴结转移胃癌病人预后的因素. *临床军医杂志* 2005; 33: 542-545
- 王晓娜, 倪姗姗, 梁寒. 淋巴结转移率对胃癌患者预后的影响. *中华普通外科杂志* 2008; 23: 411-415
- Song X, Wang L, Chen W, Pan T, Zhu H, Xu J, Jin M, Finley RK 3rd, Wu J. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in gastric cancer. *Am J Surg* 2004; 187: 270-273
- 邓鑫, 梁健, 覃黎葵, 朱朝阳, 李龙华. 中药胃宁颗粒联合化疗防治胃癌复发转移的临床分析. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 175-1769
- 魏辉, 侯俊明, 张勇, 田博, 贾奇. 胃癌术后化疗联合中药治疗对患者生存质量的影响. *甘肃中医* 2009; 22: 41-42
- 刘永衡, 孙桂芝, 张培彤. 中药诱导人胃癌MGC-803细胞凋亡研究近况. *天津中医药* 2009; 26: 522-523
- 吴昊, 李薇, 葛红梅, 刘平. 芍药苷抑制NF- κ B的活性促进人胃癌细胞凋亡. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2008; 28: 161-165
- 邵佳, 骆殊, 沈洪, 朱学军, 刘丽, 李春婷, 刘亚军. 黄芪、莪术配伍方对胃癌cox-2、ppary及转移相关因子表达的影响. *药学与临床研究* 2009; 17: 14-17
- 曹志群, 张维东, 姜娜娜, 孟庆坤. 昆参颗粒对诱导型胃癌模型大鼠血管内皮生成因子的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2008; 16: 11-14
- 冯春霞, 李庆明. 胃康宁冲剂抑制胃癌生长与转移的实验研究. *中国中西医结合消化杂志* 2007; 15: 294-296
- Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA, Croce CM. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11: 136-146
- Yokobori T, Mimori K, Iwatsuki M, Ishii H, Onoyama I, Fukagawa T, Kuwano H, Nakayama KI, Mori M. p53-Altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases. *Cancer Res* 2009; 69: 3788-3794
- Hsu PI, Hsieh HL, Lee J, Lin LF, Chen HC, Lu PJ, Hsiao M. Loss of RUNX3 expression correlates with differentiation, nodal metastasis, and poor prognosis of gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1686-1694
- 秦薇, 张晓伟, 章莉, 张凤春. Oct-4在胃癌组织中的表达及临床意义. *上海交通大学学报(医学版)* 2009; 29: 733-736

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

小剂量干扰素联合利巴韦林对丙型肝炎失代偿期肝硬化的治疗

陈立艳, 周莉, 马英骥, 颜炳柱, 毕蔓茹, 杨宝山, 王威

陈立艳, 颜炳柱, 毕蔓茹, 杨宝山, 王威, 哈尔滨医科大学附属第二医院感染二科 黑龙江省哈尔滨市 150086
周莉, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069
马英骥, 哈尔滨医科大学附属第四医院感染科 黑龙江省哈尔滨市 150001
通讯作者: 颜炳柱, 讲师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路38号, 哈尔滨医科大学附属第二临床医院感染二科.
bingzhuyan@hotmail.com
电话: 0451-86297509
收稿日期: 2010-06-25 修回日期: 2010-07-29
接受日期: 2010-08-03 在线出版日期: 2010-09-28

Low-dose interferon in combination with ribavirin for treatment of hepatitis C in patients with decompensated cirrhosis

Li-Yan Chen, Li Zhou, Ying-Ji Ma, Bing-Zhu Yan, Man-Ru Bi, Bao-Shan Yang, Wei Wang

Li-Yan Chen, Bing-Zhu Yan, Man-Ru Bi, Wei Wang, Department of Infectious Disease (Division II), the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Li Zhou, Center of Artificial Liver, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China
Ying-Ji Ma, Department of Infectious Diseases, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Bing-Zhu Yan, Department of Infectious Disease (Division II), the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 38 Xuefu Road Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. bingzhuyan@hotmail.com
Received: 2010-06-25 Revised: 2010-07-29
Accepted: 2010-08-03 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To assess the efficacy and safety of low-dose interferon in combination with ribavirin in the treatment of hepatitis C in patients with decompensated cirrhosis.

METHODS: One hundred and seventeen patients who were diagnosed with chronic hepatitis C were divided into two groups: antiviral treatment group ($n = 58$) and control group ($n = 59$). The antiviral treatment group was treated with low-dose interferon and ribavirin for 12

mo, while the control group was treated with common liver-protecting drugs.

RESULTS: After antiviral treatment for 12 mo, the negative conversion rate of HCV-RNA was 93.1%, significantly higher than that in the control group (0%, $P < 0.01$). ALT in the antiviral treatment group was decreased to <40 U/L, while that in the control group was decreased to normal level temporarily and rebounded after discontinuation of therapy. No serious adverse reactions occurred in patients undergoing antiviral treatment; however, two (3.3%) patients in the control group developed major complications and died.

CONCLUSION: Low-dose interferon in combination with ribavirin is safe and effective in the treatment of hepatitis C in patients with decompensated cirrhosis.

Key Words: Hepatitis C; Cirrhosis; Decompensation; Interferon

Chen LY, Zhou L, Ma YJ, Yan BZ, Bi MR, Yang BS, Wang W. Low-dose interferon in combination with ribavirin for treatment of hepatitis C in patients with decompensated cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2925-2928

摘要

目的: 评价小剂量干扰素联合利巴韦林治疗丙型肝炎失代偿期肝硬化的疗效和安全性。

方法: 将慢性丙型肝炎患者117例分为两组: 抗病毒治疗组58例, 服用小剂量干扰素和利巴韦林进行抗病毒治疗, 疗程12 mo; 对照组59例, 服用一般护肝、降酶药物。

结果: 抗病毒治疗组治疗12 mo HCV RNA转阴率为93.1%, 对照组为0, 两组比较差异有显著性($P < 0.01$)。抗病毒治疗后随着HCV RNA的转阴ALT均下降到40 U/L以下, 而对照组ALT水平经降酶治疗后可暂时降至正常, 停药后又会出现升高。抗病毒治疗组中无1例患者出现严重不良反应, 对照组中有2例(3.3%)因严重并发症而导致死亡。

结论: 小剂量干扰素联合利巴韦林对丙型肝炎

■背景资料

我国一般人群抗HCV阳性率为3.2%。慢性丙型肝炎并发症的发生率和死亡率与纤维化逐步进展和肝硬化的发展有着密切的关系。肝硬化和肝癌目前被认为是慢性丙型肝炎患者的主要死因, 其中最主要的死因是失代偿期肝硬化。

■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心

■研发前沿

虽然新药的研发已取得了可喜的进展,但仍存在许多的问题,如治疗的有效率没有明显的提高,不良反应较大等.因此面对这些困难,如何利用现有的成熟的药物给患者带来最大的收益,仍然是临床医生应该极力达到的目标.

炎失代偿期肝硬化的治疗是安全、有效的.

关键词: 丙型肝炎;肝硬化;失代偿期;干扰素

陈立艳, 周莉, 马英骥, 颜炳柱, 毕蔓茹, 杨宝山, 王威. 小剂量干扰素联合利巴韦林对丙型肝炎失代偿期肝硬化的治疗. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2925-2928

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2925.asp>

0 引言

2004年我国《丙型肝炎防治指南》^[1]对丙型肝炎肝硬化治疗建议中明确指出:失代偿期肝硬化患者,多难以耐受 α -干扰素(interferon α , IFN- α)治疗的不良反应^[2],有条件者应行肝脏移植术.由于可能出现严重的不良反应,干扰素治疗对进展性肝硬化的患者列为禁忌证.所以通常认为失代偿期肝硬化不适用于干扰素、利巴韦林联合治疗,不做抗病毒治疗的依据是源于人们担心治疗可能使病情进一步恶化,这是基于临床判断,并无数据支持.实际上,许多失代偿期肝硬化患者具有相对稳定的实验室指标,是符合抗病毒治疗的.针对这种情况我们将2004-2008年收治的117例失代偿期丙型肝炎肝硬化的患者分为抗病毒治疗组和一般治疗组,并对其治疗效果和安全性进行评估.

1 材料和方法

1.1 材料 哈尔滨医科大学附属第二医院2004-01/2008-12门诊或住院的丙型肝炎肝硬化失代偿期患者117例,诊断均符合2004年丙型肝炎防治指南,所有患者经全身体检排除了自身免疫性肝炎、糖尿病、甲状腺疾病、高血压、冠心病、急慢性肾脏疾病、精神类疾病.全部患者分为抗病毒治疗组(A组)和一般治疗组(B组),抗病毒治疗组的所有患者在接受治疗前均签署书面知情同意书,并通过哈尔滨医科大学伦理委员会的审批.

A组58例,男22例,女36例,年龄为60岁 \pm 13岁,体质量为63 kg \pm 19 kg.治疗前基线病毒载量(HCV RNA): >500 IU/L;谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT).ALT的测定应用日立7600全自动生化分析仪检测.参考值:0-40 U/L;67 U/L \pm 23 U/L;白细胞(white blood cell, WBC): $<2.7 \times 10^9$ /L $\pm 1.3 \times 10^9$ /L;中性粒细胞(neutrophils, NEU)绝对值: 2.0×10^9 /L;血小板(platelet, PLT): $<60.3 \times 10^9$ /L $\pm 11.7 \times 10^9$ /L;Child评分^[3]A级29例,B级28例.基因分型基因II型23例;基因III型19例;基因II/III混合型16例.B组59例,男9例,女50例,年龄为59岁 \pm 11岁,体质量为76 kg \pm 18 kg.治疗前HCV RNA: >500 IU/L;ALT:74 U/L \pm

19 U/L;WBC: $<2.0 \times 10^9$ /L $\pm 1.0 \times 10^9$ /L;NEU: $<2.0 \times 10^9$ /L;PLT: $<59.9 \times 10^9$ /L $\pm 10.5 \times 10^9$ /L;Child评分A级30例,B级29例.基因分型基因II型25例;基因III型15例;基因II/III混合型19例.

1.2 方法

1.2.1 治疗方案:A组,IFN α -2b的开始用量为1.0 Mu/qd,治疗1 mo后根据患者对干扰素的耐受情况将IFN α -2b调整为3.0 Mu/qd;利巴韦林的用量为800 mg/d分次口服.抗病毒治疗过程中,根据患者的病情选择间断性的保肝、降酶、对症治疗,抗病毒治疗的疗程为48 wk.B组,仅间断给予护肝、降酶等对症治疗.

1.2.2 检测指标:A组,干扰素治疗的第1个月每周复查肝功及血常规.1 mo后每半个月复查1次肝功、血常规.3 mo后每1 mo复查1次肝功、血常规、HCV RNA定量(HCV RNA的检测应用瑞氏罗氏公司的全自动PCR检测仪进行检测.参考值: <500 IU/L为阴性)及肝脏超声.HCV RNA定量检测 <500 IU/L后3 mo复查1次HCV RNA.B组,每3 mo复查1次肝功、血常规、HCV RNA定量及肝脏超声.观察所有患者肝性脑病、消化系出血及肝细胞癌等严重并发症的发生率和生存率.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行统计学处理, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 HCV RNA水平 A组:58例患者应用干扰素联合利巴韦林治疗3 mo后患者HCV RNA开始转阴,且随着治疗时间的延长HCV RNA转阴率逐渐增加.B组:59例患者治疗和随访期间HCV RNA均持续 >500 IU/L(表1).

2.2 ALT水平 A组:抗病毒治疗后随着HCV RNA的转阴ALT均下降到40 U/L以下.B组:ALT水平经降酶治疗后可暂时降至正常,停药后又会出现升高(表2).

2.3 治疗前后Child评分情况 A组:经抗病毒治疗的患者治疗前Child评分B级的24例患者在治疗后重新进行Child评分为A级.B组:患者的病情逐渐加重,Child评分减低,治疗后重新进行Child评分,30例(50.8%)患者为C级,19例(32.3%)患者为C级(表3).

2.4 并发症的发生率 A组:58例患者中4例因严重不良反应治疗6 mo后终止治疗,停药后1 mo后有2例患者丙型肝炎病毒又重新复制;所有经抗病毒治疗的患者均无肝性脑病、上消化道出血、原发性肝细胞癌等严重并发症的出现.B组中有4例(6.8%)发生原发性肝细胞癌,有11例(18.6%)出现了不同程度的肝性脑病的表现,有6

表 1 治疗后HCV RNA转阴情况 $n(\%)$

分组	n	HCV RNA(IU/L)	治疗0 mo	治疗3 mo	治疗6 mo	治疗12 mo
抗病毒治疗(A)组	58	<500	0(0.0)	21(36.2) ^b	42(72.4) ^b	54(93.1) ^b
一般治疗(B)组	59	<500	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

^b $P<0.01$ vs 一般治疗组。表 2 治疗后ALT的改变情况 $n(\%)$

分组	n	ALT情况(U/L)	治疗0 mo	治疗3 mo	治疗6 mo	治疗12 mo
抗病毒(A)组	58	<40	0(0.0)	32(55.2)	58(100.0) ^b	54(93.1) ^b
一般治疗(B)组	59	<40	0(0.0)	10(16.9)	23(38.9)	20(33.9)

^b $P<0.01$ vs 一般治疗组。表 3 治疗前后Child评分情况 $n(\%)$

	抗病毒治疗(A)组			一般治疗(B)组		
	A级	B级	C级	A级	B级	C级
治疗前	34(58.6)	24(41.4) ^b	0(0.0)	30(50.9) ^b	29(49.1)	0(0.0) ^b
治疗后	58(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	10(16.9)	30(50.8)	19(32.3)

^b $P<0.01$ vs 一般治疗组。

例(10.1%)发生了上消化道出血, 有2例(3.3%)因严重并发症而导致死亡(表4)。

2.5 不良反应 在58例抗病毒治疗组中, 早期均出现发热、肌肉酸痛、头痛、乏力、脱发、可逆性白细胞及血小板减少。用药过程中有33例患者因骨髓抑制应用过粒细胞集落刺激因子和/或促红细胞生成素。有4例因严重不良反应于治疗6 mo后终止治疗, 其中1例为严重的过敏反应, 3例为重度乏力及严重的消化系症状。

3 讨论

丙型肝炎是全球性流行疾病, 是欧美及日本等国家终末期肝病的最主要原因。据世界卫生组织统计, 全球HCV的感染率约为3%^[4], 估计约1.7亿人感染了HCV, 每年新发丙型肝炎病例约3.5万例。我国血清流行病学调查资料显示, 我国一般人群抗HCV阳性率为3.2%。慢性丙型肝炎并发症的发生率和死亡率与纤维化逐步进展和肝硬化的发展有着密切的关系。肝硬化和肝癌目前被认为是慢性丙型肝炎患者的主要死因, 其中最主要的死因是失代偿期肝硬化^[5]。有报道, 代偿期肝硬化患者每年发展为失代偿期的比例为3.6%-6.0%。失代偿期肝硬化的5年生存率仅为50%^[6]。目前干扰素是治

■应用要点

在掌握好患者的一般情况, 严密地监测下应用小剂量干扰素和利巴韦林进行抗病毒治疗是安全有效的, 并且在一定程度上可以减少慢性丙型肝炎肝硬化患者并发症的发生率和死亡率。

表 4 治疗后并发症的发生率 $n(\%)$

分组	n	肝癌	肝性脑病	上消化道出血	死亡
抗病毒(A)组	58	0(0.0) ^a	0(0.0) ^b	0(0.0) ^b	0(0.0)
一般治疗(B)组	59	4(6.8)	11(18.6)	6(10.1)	2(3.3)

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 一般治疗组。

疗慢性丙型肝炎唯一肯定有疗效的药物^[7], 并有研究证明干扰素联合利巴韦林治疗可以使慢性丙型肝炎患者的持续病毒应答(sustained virological response, SVR)率达到44.3%^[8], 还指出应用干扰素治疗可以减缓、阻止甚至逆转肝纤维化^[9,10]。但失代偿期肝硬化的患者对干扰素治疗的耐受性差, 对这类患者丙型肝炎治疗指南不建议应用干扰素联合利巴韦林进行抗病毒治疗^[11]。在以往的临床工作中对丙型肝炎失代偿期肝硬化的患者应用免疫治疗等未能达到良好的抗病毒作用, 不能明显降低患者并发症的发生率和患者的死亡率。虽然近年来, 慢性丙型肝炎抗病毒治疗的研究进展迅速, 针对不同的靶点、不同作用机制的药物正在探索和研究, 主要有NS3-4A丝氨酸蛋白

■同行评价

本文选题合适, 有一定的临床研究意义。

酶抑制剂^[12]; NS5B聚合酶抑制剂^[13]; 免疫调节剂^[14]; 核酸、反义寡核苷酸^[15]、小干扰RNA、miRNA^[16]核酸靶向治疗及新型干扰素等。另外, 在中医中药方面学者们也做了不少的研究, 尝试着用中药来进行抗病毒治疗, 例如应用氧化苦参碱治疗慢性丙型肝炎^[17]。虽然新药的研发已取得了可喜的进展, 但仍存在许多的问题, 如治疗的有效率没有明显的提高, 不良反应较大等。因此面对这些困难, 如何利用现有的成熟的药物给患者带来最大的收益, 仍然是临床医生应该极力达到的目标。针对这种情况, 我们分析了2004-2008于哈尔滨医科大学附属第二医院门诊部及住院部的117例患者, 其中58例给予小剂量干扰素抗病毒治疗, 59例给予一般治疗。通过48 wk的观察、比较、分析发现给予丙型肝炎肝硬化失代偿期的患者小剂量干扰素进行抗病毒治疗可以使HCV RNA的载量在24 wk时转阴率达到72.4%; 48 wk转阴率达到93.1%。并观察到经干扰素治疗的患者在治疗期间均未出现严重的副反应和肝性脑病、上消化道出血及原发性肝癌细胞癌等严重的并发症。并且经抗病毒治疗的患者治疗前Child评分B级的24例患者在治疗后重新进行Child评分为A级。虽然有33例患者因为干扰素和利巴韦林的副作用出现了骨髓抑制的现象, 可经过对症处理后均能够继续耐受干扰素和利巴韦林治疗, 而未经抗病毒治疗的患者HVC RNA载量持续维持在500 IU/L以上, 并且患者的病情逐渐加重, Child评分减低, 其中有21例患者出现了严重的并发症, 并且有2例患者因并发症而死亡。通过本研究分析, 我们可以得出这样一个结论, 在掌握好患者的一般情况, 严密的监测下应用小剂量干扰素和利巴韦林进行抗病毒治疗是安全有效的, 并且在一定程度上可以减少慢性丙型肝炎肝硬化患者并发症的发生率和死亡率。当然, 由于本研究例数较少, 而且所选的患者也均为丙型肝炎肝硬化失代偿早期的患者, 且基因分型为基因II型、III型和II/III混合型, 对干扰素治疗均比较敏感。因此还不能够完全说明给予丙型肝炎肝硬化失代偿期患者小剂量干扰素进行抗病毒治疗是完全有效、切实可行的治疗方案。因此今后还要通过采用多中心、扩大观察例数及观察范围摸索出一个安全、有效的个体化治疗剂量和给药方法, 为更多的丙型肝炎肝硬化失代偿期患者提供一个更好的治疗方案。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学分会、传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. 临床肝胆病杂志 2004; 20:

197-203

- 2 Tang S, Cheng IK, Leung VK, Kuok UI, Tang AW, Wing Ho Y, Neng Lai K, Mao Chan T. Successful treatment of hepatitis C after kidney transplantation with combined interferon alpha-2b and ribavirin. *J Hepatol* 2003; 39: 875-878
- 3 占国清, 郑三菊, 朱琳, 王崇慧, 李金科, 张薇薇. 终末期肝病模型及Child-Pugh分级对失代偿期肝硬化患者的预后分析. 临床肝胆病杂志 2009; 25: 124-128
- 4 Patel K, Muir AJ, McHutchison JG. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis C infection. *BMJ* 2006; 332: 1013-1017
- 5 Poynard T, Afdhal NH. Perspectives on fibrosis progression in hepatitis C: an à la carte approach to risk factors and staging of fibrosis. *Antivir Ther* 2010; 15: 281-291
- 6 Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology* 1997; 112: 463-472
- 7 Wilkins T, Malcolm JK, Raina D, Schade RR. Hepatitis C: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2010; 81: 1351-1357
- 8 Maieron A, Metz-Gercek S, Hackl F, Ziachehabi A, Fuchsteiner H, Luger C, Mittermayer H, Schöfl R. Antiviral treatment of chronic hepatitis C in clinical routine. *Wien Klin Wochenschr* 2010; 122: 237-242
- 9 Mendoza J, Trapero-Marugán M, González-Moreno L, Jones EA, Gómez-Domínguez E, Moreno-Otero R. Hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C assessed by transient elastography: implications for determining the efficacy of antiviral therapy. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102: 426-434
- 10 Wang JH, Changchien CS, Hung CH, Tung WC, Kee KM, Chen CH, Hu TH, Lee CM, Lu SN. Liver stiffness decrease after effective antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C: Longitudinal study using FibroScan. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 964-969
- 11 Husa P, Slesinger P, Stroblová H, Svobodník A. [The meaning of viral kinetics in the beginning of the pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C] *Vnitr Lek* 2006; 52: 153-159
- 12 Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F. Report of the first International Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transpl* 2003; 9: S1-S9
- 13 Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M Jr. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 2003; 300: 1145-1148
- 14 Moradpour D, Brass V, Bieck E, Friebe P, Gosert R, Blum HE, Bartenschlager R, Penin F, Lohmann V. Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004; 78: 13278-13284
- 15 McHutchison JG, Patel K, Pockros P, Nyberg L, Pianko S, Yu RZ, Dorr FA, Kwok TJ. A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 2006; 44: 88-96
- 16 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- 17 李玲, 王淑兰. 苦参素治疗老年慢性丙型肝炎伴合并症临床分析. 传染病信息 2006; 19: 41

基因芯片技术对结直肠癌相关基因SNPs位点的相关性分析

邹江, 张国梁, 姚宏昌, 谭东毅

邹江, 张国梁, 姚宏昌, 谭东毅, 天津第一中心医院 天津市 300192

作者贡献分布: 此课题由姚洪昌指导; 邹江设计; 研究过程由邹江、张国梁及谭东毅操作完成; 数据分析由邹江完成; 本论文写作由邹江与谭东毅完成。

通讯作者: 邹江, 主任医师, 300192, 天津市, 天津第一中心医院消化科. ericzou@yahoo.com.cn
电话: 022-23626816

收稿日期: 2010-07-06 修回日期: 2010-08-02

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Chip-based analysis of single nucleotide polymorphisms in colorectal cancer-related genes

Jiang Zou, Guo-Liang Zhang, Hong-Chang Yao, Dong-Yi Tang

Jiang Zou, Guo-Liang Zhang, Hong-Chang Yao, Dong-Yi Tang, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China
Correspondence to: Jiang Zou, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China. ericzou@yahoo.com.cn
Received: 2010-07-06 Revised: 2010-08-02
Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) in colorectal cancer (CRC)-related genes using gene chip technology and to investigate the relationship between these SNPs and the risk of developing CRC.

METHODS: Blood samples collected from 20 CRC patients and 30 healthy adults were used for DNA extraction, PCR amplification and SNP genotyping using the GenomeLab™ SNPstream Genotyping System. We tested 12 SNPs in 8 genes which were known to be related to the carcinogenesis of CRC. The relationship between the SNPs and the risk of developing CRC was then analyzed.

RESULTS: A significant association was observed between 2 SNPs (MTRR-01 and CYP19A1-06) and the risk of developing CRC (both $P < 0.05$). A significant association was also noted among CYP19A1-09, CYP19A1-06, CYP19A1-14 and CYP19A1-01, which had strong LD ($D' > 0.75$) in pairwise LD.

CONCLUSION: Two SNPs (MTRR-01 and CYP19A1-06) are related to the susceptibility to CRC. SNP array is a simple and fast method to detect SNPs in colorectal cancer-related genes.

Key Words: Colorectal cancer; Polymorphism; Single nucleotide; Oligonucleotide array sequence analysis

Zou J, Zhang GL, Yao HC, Tang DY. Chip-based analysis of single nucleotide polymorphisms in colorectal cancer-related genes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2929-2933

摘要

目的: 探讨结直肠癌(CRC)相关基因的单核苷酸多态性(SNPs)位点与结直肠癌(CRC)发生发展的关联性。

方法: 对20例CRC患者和30例正常对照组血液标本进行DNA提取、PCR扩增及SNPs芯片测序分析, 检测选定的同CRC发病关系较为密切的8个基因中的12个SNPs位点, 对其实验结果进行分析, 判断各位点与CRC的关联性。

结果: MTRR-01、CYP19A1-09与CRC之间有较强的关联性($P < 0.05$); 连锁不平衡(LD)分析发现, CYP19A1-09、CYP19A1-06、CYP19A1-14、CYP19A1-01存在强LD($D' > 0.75$), 其SNPs位点之间有明确的相关性。

结论: 本研究发现2个SNPs位点与CRC发病有密切联系, 应用SNPs芯片技术研究CRC相关基因是一种简便、快捷的方法。

关键词: 结直肠肿瘤; 多态性; 单核苷酸; 寡核苷酸序列分析

邹江, 张国梁, 姚宏昌, 谭东毅. 基因芯片技术对结直肠癌相关基因SNPs位点的相关性分析. *世界华人消化杂志* 2010; 18(27): 2929-2933

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2929.asp>

0 引言

近年研究发现, 结直肠癌(colorectal cancer, CRC)

■背景资料

单核苷酸多态性(SNPs)是指在基因组内某一特定核苷酸位置上存在两种碱基, 其在群体中的分布频率不低于1%。作为第3代分子遗传标记, 具有比第1代、第2代遗传标记更高的密度、稳定和易于分型检测的优势, 因而在疾病特别是多基因疾病研究领域显示出了巨大的优势。

■同行评议者

周素芳, 教授, 广西医科大学科技处

■研究前沿

SNPs的解读给疾病的防治带来了一场革命,关于SNPs的研究已成为人类基因组计划于肿瘤基因组解剖计划(CGAP)中的重要补充和研究热点。其中SNPs与结肠癌的关系目前已成为研究热点。

的发生与发展过程与众多基因的异常相关,除了以往关注较多的*K-ras*、*p53*等基因外,白介素(interleukin, IL)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)等代谢酶基因多态性也都受到了相当的重视。随着分子生物学的不断进展,越来越多的研究显示单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)位点与基因的表达调控密切相关^[1]。尽管已经鉴定出了大量的SNPs位点,但对于与CRC有关的SNPs研究还不够完善。2006-04/2008-04,我们根据前人研究报道选择CRC易感基因的SNPs,进一步研究其与CRC发病的关联性。

1 材料和方法

1.1 材料 病例组收集2006-04/2008-04天津第一医院收治的结直肠癌患者20例术前血液标本。所收集病例均为CRC散发病例,排除家族性腺瘤样息肉病和遗传性非息肉病性CRC等典型遗传性CRC。患者术前均未接受放、化疗,其中男7例、女13例,年龄41-84(65.35 ± 11.95)岁。临床Dukes分期: A期3例, B期9例, C期4例, D期4例。对照组选择健康成年人体检采血所获得的血液标本,共30例,其中男21例、女9例,年龄47-81(67.32 ± 11.93)岁。两组在年龄上无统计学差异,所有受试对象均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 CRC相关基因和SNPs位点的选择: 选择在既往文献中曾被证实或有过报道与癌症发病风险关联的8个基因共12个SNPs位点进行检测研究^[2]。分别是IL1 β -01、CYP19A1-09、GSTP1-01、IL4-01、CYP19A1-14、CYP19A1-01、IL10-02、SOD2-01、IL10-03、CYP19A1-06、MRTT-01、TP53-01。上述基因及SNPs位点资料均来自<http://snp500cancer.nci.nih.gov>^[3]和<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, 详细信息及碱基序列见这两处网站的SNPs数据库。

1.2.2 检测方法: DNA抽提、PCR扩增和杂交步骤均严格按照上海生物芯片公司的易感基因基因型检测芯片试剂盒使用说明书进行,用Autoprimer软件设计相关多重PCR引物和SNP引物。GenomeLabTM SNPstream Genotyping System12 plex高通量分析仪进行数据检测及分析。在每次检测中都设置阴性、阳性对照品。

统计学处理 采用SNPstats软件,通过Handy-

Weinberg平衡检验确定对照组的群体基因频率分布代表性,计算基因型和等位基因频率,检验基因型和CRC发生风险之间的相关性采用 χ^2 检验、OR及95%CI表示。将选定的12个SNPs位点做连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)分析。以 $P \leq 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 基因多态性分布 经Hardy-Weinberg平衡定律检验,对照组人群均符合遗传平衡($P > 0.05$),表明该样本具有人群代表性。

2.2 SNPs位点基因型与CRC的关系 病例组和对照组SNPs位点基因型频率比较见表1。

2.3 SNPs位点等位基因频率 病例组和对照组SNPs位点等位基因频率比较见表2。

2.4 相关位点的LD分析 对12个SNPs两两间的配对LD分析表明, CYP19A1-09、CYP19A1-06、CYP19A1-14、CYP19A1-01存在强LD($D' > 0.75$),其SNP位点之间有明确的相关性。

3 讨论

大量实验证明CRC的发生与发展是一个多基因参与的复杂过程,既有原癌基因的激活,又有抑癌基因的失活、突变,涉及多个基因、多个位点的突变与丢失。目前发现激活和过度表达的癌基因有*ras*基因、*myc*基因等,发现有突变的癌基因有*p53*、*apc*、*mcc*、*dcc*和*p16*,另外还发现一些错配修复基因和酶活性缺乏或明显减少的酶类,如谷胱甘肽-S转移酶GSTP1、N乙酰基转移酶、亚甲基四氢叶酸还原酶、CYP、蛋氨酸合酶还原酶MRTT等。

SNPs作为第3代遗传标志物具有很多优点,包括高密度、高度稳定,容易实现高通量检测,易于基因分型及等位基因频率的估算^[4],在疾病特别是多基因疾病研究领域显示了巨大优势。进一步研究证实不同人群通常有不同的遗传背景,其SNPs同样存在种族差异,如一个SNPs在某一种族中于某种肿瘤易感相关,但与另一种族就可能不相关,在肺癌^[5,6]和子宫癌^[7,8]中已有研究证实。本研究根据国外文献报道针对CRC高频突变基因的关键突变位点和SNPs位点设计实验检测,旨在对国内临床CRC患者和正常人群检测结果进行比较分析,探索这些位点在中国人群分布规律,以期探讨CRC早期发现、早期治疗新途径。

本研究结果显示, CYP19A1-09基因型频

表 1 病例组和对照组SNPs位点基因型频率比较 $n(\%)$

基因位点	基因型	病例组	对照组	OR值	95%CI	P值
IL1 β -01	T/T	7(35.0)	8(26.7)	1.00		>0.05
	T/G	5(25.0)	16(53.3)	2.00	0.52-7.70	
	G/G	6(30.0)	6(20.0)	0.87	0.19-4.00	
CYP19A1-09	T/T	15(75.0)	11(36.7)	1.00		<0.05
	T/C	4(20.0)	13(43.3)	4.43	1.13-17.34	
	C/C	1(5.0)	6(20.0)	8.18	0.86-78.05	
GSTP1-01	A/A	9(45.0)	17(56.7)	1.00		>0.05
	A/G	10(50.0)	9(30.0)	0.48	0.14-1.60	
	G/G	1(5.0)	4(13.3)	2.12	0.20-21.89	
IL4-01	T/T	9(45.0)	17(56.7)	1.00		>0.05
	T/C	8(40.0)	12(40.0)	0.79	0.24-2.65	
	C/C	3(15.0)	1(3.3)	0.18	0.02-1.95	
CYP19A1-14	T/T	6(30.0)	7(23.3)	1.00		>0.05
	T/C	10(50.0)	16(53.3)	1.37	0.36-5.27	
	C/C	4(20.0)	7(23.3)	1.50	0.29-7.75	
CYP19A1-01	G/G	7(35.0)	7(23.3)	1.00		>0.05
	A/G	10(50.0)	16(53.3)	1.60	0.43-5.94	
	A/A	3(15.0)	7(23.3)	2.33	0.42-12.91	
IL10-02	A/A	10(50.0)	10(33.3)	1.00		>0.05
	A/C	7(35.0)	18(60.0)	2.57	0.75-8.86	
	C/C	3(15.0)	2(6.7)	0.67	0.09-4.89	
SOD2-01	T/T	18(90.0)	25(83.3)	1.00		>0.05
	T/C	2(10.0)	5(16.7)	1.80	0.31-10.34	
IL10-03	A/A	17(85.0)	20(66.7)	1.00		>0.05
	A/G	3(15.0)	9(30.0)	2.55	0.59-10.96	
	G/G	0(0.0)	1(3.3)			
CYP19A1-06	G/G	11(55.0)	11(36.7)	1.00		>0.05
	T/G	8(40.0)	13(43.3)	1.62	0.48-5.45	
	T/T	1(5.0)	6(20.0)	6.00	0.62-58.43	
MRTT-01	A/A	18(90.0)	16(53.3)	1.00		<0.05
	A/G	2(10.0)	13(43.3)	7.31	1.43-37.47	
	G/G	0(0.0)	1(3.3)			
TP53-01	C/C	7(35.0)	10(33.3)	1.00		>0.05
	G/C	11(55.0)	15(50.0)	0.95	0.28-3.30	
	G/G	2(10.0)	5(16.7)	1.75	0.26-11.74	

■创新盘点

本文采用高通量SNPs芯片技术, 一次性检测8个SNPs 12个相关位点与结肠癌的相关性, 分析中国人在这些位点的特点, 为将来在流行病学调查中确定结肠癌的高危人群以及进行患病危险度地评价选择相应的标志物。

率在病例组和对照组间有统计学差异, T、C等位基因比例为69%、31%, 携带基因型T/C患者罹患CRC的发病风险比T/T发病风险增加了4.43倍。有文献报道, CYP系统在人体各种代谢活动中发挥重要的作用, 其相关基因的变异也与众多疾病的发生有关^[9-11]。Bethke等^[12]大样本调查研究发现CYP系统中的CYP1A2和CYP1B1基因与CRC的关系十分密切, 与我们结果相符。MTRR-01基因型频率在两组间也有差异, A、G等位基因比例为83%、17%, 携带基因型A/G患者罹患CRC的发病风险比A/A发病风险增加了7.31倍。Matsuo等^[13]和Otani等^[14]研究表明, 在亚洲人群中, G等位基因与CRC

显著相关, 与我们结果相符。有报道TP53-01、IL10-03、IL10-03、IL10-03、GSTP1等位点与结肠癌相关^[3], 本研究两组间均无统计学差异。本研究还发现CYP19A1-09、CYP19A1-06、CYP19A1-14、CYP19A1-01存在强LD, 说明位点间历史上发生重组的可能性很小, 只需任选其一, 便可了解其余3个位点情况。避免了SNPs与疾病关联研究时选点的盲目性^[15]。

本研究采用高通量分析系统, 应用SNPs芯片为载体对这些位点进行检测, 该方法快速、高效、准确, 是一种十分有应用价值的基因检测方法。本研究由于时间、资金所限所做标本例数不够充足, 有待下一步在实验中扩展。

■同行评价

本文科学性尚可,
对CRC临床诊断
有一定的意义.

表 2 病例组和对照组SNPs位点等位基因频率比较

基因位点	等位基因		病例组		对照组	
	等位基因	%	n	%	n	%
IL1 β -01	T	53	21	52	32	53
	C	47	19	48	28	47
CYP19A1-09	T	69	34	85	35	58
	C	31	6	15	25	42
GSTP1-01	A	71	28	70	43	72
	G	29	12	30	17	28
IL4-01	T	72	26	65	46	77
	C	28	14	35	14	23
CYP19A1-14	T	52	22	55	30	50
	C	48	18	45	30	50
CYP19A1-01	G	54	24	60	30	50
	A	46	16	40	30	50
IL10-02	A	65	27	68	38	63
	C	35	13	32	22	37
SOD2-01	T	93	38	95	55	92
	C	7	2	5	5	8
IL10-03	A	86	37	85	49	82
	G	14	3	15	11	18
CYP19A1-06	G	65	30	75	35	58
	T	35	10	25	25	42
MRTT-01	A	83	38	95	45	75
	G	17	2	5	15	25
TP53-01	C	60	25	62	35	58
	G	40	15	38	25	42

4 参考文献

- Clifford R, Edmonson M, Hu Y, Nguyen C, Scherpbier T, Buetow KH. Expression-based genetic/physical maps of single-nucleotide polymorphisms identified by the cancer genome anatomy project. *Genome Res* 2000; 10: 1259-1265
- Goodman JE, Mechanic LE, Luke BT, Ambs S, Chanock S, Harris CC. Exploring SNP-SNP interactions and colon cancer risk using polymorphism interaction analysis. *Int J Cancer* 2006; 118: 1790-1797
- Packer BR, Yeager M, Staats B, Welch R, Crenshaw A, Kiley M, Eckert A, Beerman M, Miller E, Bergen A, Rothman N, Strausberg R, Chanock SJ. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation and assay development for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D528-D532
- 席素雅, 韩雅玲. 单核苷酸多态性的特点及其在医学中的应用进展. *辽宁医学杂志* 2007; 21: 36-39
- Zhou W, Goodman SN, Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Pignatelli C, Purdie CA, Piris J, Morris R, Harrison DJ, Paty PB, Culliford A, Romans KE, Montgomery EA, Choti MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers. *Lancet* 2002; 359: 219-225
- Primdahl H, Wikman FP, von der Maase H, Zhou XG, Wolf H, Orntoft TF. Allelic imbalances in human bladder cancer: genome-wide detection with high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 216-223
- Zavras AI, Wu T, Laskaris G, Wang YF, Cartos V, Segas J, Lefantzis D, Joshipura K, Douglass CW, Diehl SR. Interaction between a single nucleotide polymorphism in the alcohol dehydrogenase 3 gene, alcohol consumption and oral cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 97: 526-530
- Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Jonsson HH, Kristjansson K, Arnason S, Gudnason V, Isaksson HJ, Hallgrimsson J, Gulcher JR, Amundadottir LT, Kong A, Stefansson K. Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population. *JAMA* 2004; 292: 2977-2983
- Lee KM, Abel J, Ko Y, Harth V, Park WY, Seo JS, Yoo KY, Choi JY, Shin A, Ahn SH, Noh DY, Hirvonen A, Kang D. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 19 and 1B1, alcohol use, and breast cancer risk in Korean women. *Br J Cancer* 2003; 88: 675-678
- Han W, Kang D, Park IA, Kim SW, Bae JY, Chung KW, Noh DY. Associations between breast cancer susceptibility gene polymorphisms and clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 124-130
- Bethke L, Webb E, Sellick G, Rudd M, Penegar S, Withey L, Qureshi M, Houlston R. Polymorphisms in the cytochrome P450 genes CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4, CYP3A5, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 and colorectal cancer risk. *BMC Cancer* 2007; 7: 123
- Matsuo K, Hamajima N, Hirai T, Kato T, Inoue M, Takezaki T, Tajima K. Methionine Synthase Reduc-

- tase Gene A66G Polymorphism is Associated with Risk of Colorectal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002; 3: 353-359
- 13 Otani T, Iwasaki M, Hanaoka T, Kobayashi M, Ishihara J, Natsukawa S, Shaura K, Koizumi Y, Kasuga Y, Yoshimura K, Yoshida T, Tsugane S. Folate, vitamin B6, vitamin B12, and vitamin B2 intake, genetic polymorphisms of related enzymes, and risk of colorectal cancer in a hospital-based case-control study in Japan. *Nutr Cancer* 2005; 53: 42-50
- 14 A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-1320

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•

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.

线粒体基因在大肠癌组织中缺失突变的检测

崔海宏, 王滨, 韩英, 李爱民, 魏伟, 张宝燕

■背景资料

mtDNA突变目前已在胃癌、肺癌、食管癌和白血病等多种肿瘤及肿瘤细胞株中发现, 但有关mtDNA 4 977 bp缺失突变在细胞癌变中的作用及其生物学意义目前还不清楚。

崔海宏, 王滨, 李爱民, 魏伟, 中国人民解放军第456医院内科 山东省济南市 250031

韩英, 北京军区总医院消化科 北京市 100700

张宝燕, 中国人民解放军第117医院病理科 江苏省杭州市 310013

作者贡献分布: 此课题由崔海宏, 王滨及韩英设计; 研究过程由崔海宏, 李爱民, 魏伟及张宝燕操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张宝燕提供; 数据分析由崔海宏与张宝燕完成; 本论文写作由崔海宏, 王滨及韩英完成。

通讯作者: 韩英, 100700, 北京市, 北京军区总医院消化科。

yingh721003@sina.com

电话: 0531-51653534

收稿日期: 2010-04-29 修回日期: 2010-08-03

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Detection of the 4 977 bp deletion mutation of mitochondrial DNA in colorectal cancer

Hai-Hong Cui, Bin Wang, Ying Han, Ai-Min Li, Wei Wei, Bao-Yan Zhang

Hai-Hong Cui, Bin Wang, Ai-Min Li, Wei Wei, Department of Internal Medicine, the 456th Hospital of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Ying Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China

Bao-Yan Zhang, Department of Pathology, the 117th Hospital of Chinese PLA, Hangzhou 310013, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Ying Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China. yingh721003@sina.com

Received: 2010-04-29 Revised: 2010-08-03

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the 4 977-bp deletion mutation of mitochondrial DNA (mtDNA4977 deletion mutation) and the development of colorectal cancer.

METHODS: Colorectal cancer and cancer-adjacent neoplastic tissue samples taken from 50 colorectal cancer patients treated at the General Hospital of Beijing Military Command and the 117th Hospital of Chinese PLA in 2008, and normal colorectal tissue samples collected from 20 patients without colorectal cancer were included in this study. The mtDNA4977 deletion mutation in these samples was detected by long PCR.

RESULTS: The mtDNA4977 deletion mutation was detected in 10% (5/50) of colorectal cancer samples, 18% (9/50) of cancer-adjacent neoplastic tissue samples, and 15% (3/20) of normal colorectal tissue samples. The detection rate of the mtDNA4977 deletion mutation increased with age in all the three types of samples. The detection rate of the mtDNA4977 deletion mutation in high-age (≥ 60 years) group was significantly higher than that in low-age (< 60 years) group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The mtDNA4977 deletion mutation is not specific to colorectal cancer and may not play an important role in the carcinogenesis of colorectal cancer.

Key Words: Mitochondrial DNA; Colorectal cancer; Deletion; Mutation

Cui HH, Wang B, Han Y, Li AM, Wei W, Zhang BY. Detection of the 4 977 bp deletion mutation of mitochondrial DNA in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2934-2937

摘要

目的: 探讨4 977 bp大片段线粒体DNA(mtDNA)缺失与肿瘤的关系。

方法: 收集2008年中国人民解放军北京军区总医院及济南军区第456医院50例外科手术患者的大肠癌(colorectal cancer, CRC)组织和癌旁正常组织标本。采用长距离PCR方法检测50例CRC组织、相应的癌旁正常组织和20例非癌患者正常肠组织中4 977 bp mtDNA的缺失情况。

结果: CRC组织标本中检测到4 977 bp mtDNA的缺失率为10%(5/50), 相应的癌旁组织缺失率为18%(9/50), 其中3例CRC组织和癌旁正常组织中4 977 bp mtDNA均有缺失, 6例在CRC组织中未发现却在癌旁正常组织中检测到4 977 bp mtDNA缺失。20例非癌患者正常肠黏膜组织中4 977 bp mtDNA片段缺失率为15%(3/20)。4 977 bp mtDNA缺失率具有随年龄增大而升高的趋势, 将组织样本分为高年龄

■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

组(≥ 60)和低年龄组(< 60). 高年龄组4 977 bp mtDNA缺失率显著高于低年龄组($P < 0.01$).

结论: CRC癌变过程中, 线粒体缺失不是导致CRC的主要原因.

关键词: 线粒体DNA; 大肠癌; 缺失; 突变

崔海宏, 王滨, 韩英, 李爱民, 魏伟, 张宝燕. 线粒体基因在大肠癌组织中缺失突变的检测. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2934-2937

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2934.asp>

0 引言

线粒体是真核细胞的重要胞质细胞器, 他含有自己的基因组, 且能够复制、转录和翻译. 随着对线粒体在细胞凋亡和诱发细胞癌变等肿瘤生物学过程中作用地进一步研究, mtDNA突变成成为肿瘤研究的热点之一. 报道的mtDNA序列改变包括发生于编码区及非编码区内的各种点突变、片段缺失、重复或插入突变及微卫星不稳定性等^[1]. 线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)4 977 bp大片段缺失是最常见的一种片段缺失突变, 已在胃癌、喉癌、食管癌、肺癌、乳腺癌等多种肿瘤中相继被报道. 为探讨mtDNA 4 977 bp大片段缺失与大肠癌的关系, 我们检测了mtDNA 4 977 bp大片段缺失在大肠癌组织、癌旁正常组织及非癌患者肠组织的分布频率.

1 材料和方法

1.1 材料 50例大肠癌组织和癌旁肠组织标本均取自2008年中国人民解放军北京军区总医院及济南军区第456医院外科手术患者, 均经病理确诊. 癌旁肠组织标本为同一患者病灶远端5 cm以上的正常大肠组织, 每例癌标本均用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 5 μ m连续切片15-20张, 取中间部分切片HE染色后进行组织学诊断. 病灶远端非癌组织也进行组织学诊断, 证实其没有癌细胞. 其中男31例, 女19例, 年龄27-84(平均年龄54)岁. 根据大肠癌PTNM分期标准进行诊断, 其中直肠27例, 左半结肠12例, 右半结肠11例. 所有大肠癌标本均经病理诊断证实, 其中高分化22例, 中分化23例, 低分化5例, 临床分期 I 期5例, II 期13例, III期18例, IV期14例. 全部患者术前均未接受放射治疗和化学治疗.

1.2 方法

1.2.1 组织基因组总DNA提取: 采用酚、氯仿、异丙醇抽提法提取基因组总DNA. 所得DNA溶

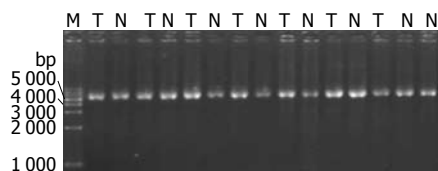


图1 P1/P2对线粒体保守片段的检测.

于TE溶液, 紫外分光光度计进行定量, -20°C 保存备用.

1.2.2 mtDNA长距离PCR扩增: 为验证所提取的总DNA质量能否满足长距离PCR扩增的需要, 我们在很少发生缺失突变的mtDNA保守区域设计了1对引物(P1/P2), 序列如下: P1, 5'-AACATACCCATGGCCAACCTCCTAC-3' (3 304-3 328 nt); P2, 5'-AGTTAGCTTTACAGTGGGCTCTAGA-3' (8 310-8 286 nt), 待扩增mtDNA片段长度为5 006 bp. 因为线粒体存在异质性, 我们只能在可能发生缺失的两侧设计引物. 检测mtDNA 4 977 bp缺失突变的存在情况所用引物对(P3/P4), 引物序列如下: P3, 5'-TACTCCTTACACTATTCCTCATCAC-3' (8 412-8 436 nt); P4, 5'-GGGGAAGCGAGGTTGACCTGT-TAGG-3' (3 650-3 626 nt). 预期扩增mtDNA片段长度为5 238 bp, 若存在mtDNA 4 977 bp缺失突变, 将扩增出长为261 bp的DNA片段.

PCR扩增采用TaKaRa PCR kit Ver 2.1扩增试剂盒. PCR反应体系为10 μ L, 终浓度为: TaKaRa Taq酶 0.1 U, MgCl_2 0.5 μ L, dNTP 0.5 μ L, 引物各1 μ L, 模板DNA约200 ng. 反应条件: 94°C 预变性3 min, 其余30个循环 94°C 30 s、 62°C 30 s、 68°C 7 min, 最后 72°C 延伸10 min. PCR产物5 μ L于加有溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液为1 \times TBE, 电压60 V. 凝胶在凝胶成像仪上观察, 摄片.

统计学处理 实验数据分析使用SPSS16.0统计学分析软件进行处理, 采用卡方Fisher精确概率检验, $P < 0.05$ 时有显著性差异.

2 结果

2.1 大肠癌组织、癌旁正常组织及正常肠组织mtDNA 4 977 bp缺失率的检测 组织样本中提取的总DNA应用引物对P1/P2均可扩增出mtDNA保守片段的5 006 bp产物(图1), 说明所提取的mtDNA模板质量良好, 长距离PCR扩增方法可靠. 所有标本使用引物对P3/P4可扩增出5 238 bp产物(图2), 缩短延长时间(10 min-45 s), 用普通Taq酶扩增P3/P4引物, 部分DNA可扩增出261

■研发前沿

线粒体是真核细胞的重要胞质细胞器, 随着对线粒体在细胞凋亡和诱发细胞癌变等肿瘤生物学过程中所起作用地进一步研究, mtDNA突变成成为肿瘤研究的热点之一.

■相关报道

Ye等在研究55例乳腺癌及21例乳腺良性肿瘤中发现, mtDNA 4 977 bp缺失率为7.0%左右, 并表明其与临床病理学特征无关.

■应用要点

本研究发现mtDNA缺失率有随年龄增大而升高的趋势,此现象表明,年龄因素在mtDNA缺失突变的积累过程中可能起重要作用。

表 1 大肠癌组织、癌旁正常组织及正常肠组织mtDNA 4 977 bp缺失率和年龄的相关性 (%)

年龄	结肠癌			癌旁组织			正常对照			P值
	+	-	+	+	-	+	+	-	+	
<60	0	25	0	1	24	4	1	11	8.3	0.390
≥60	5	20	20	8	17	32	2	6	25.0	0.624
合计	5	45	10	9	41	18	3	17	15.0	0.514
P值	0.05			0.023			0.54			

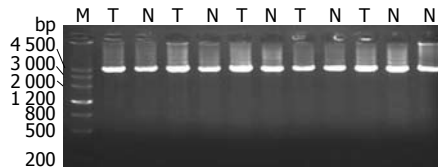


图 2 P3/P4对mtDNA 4 977 bp缺失的检测。



图 3 mtDNA 4 977 bp缺失的检测。

bp产物(图3), 其经克隆测序证实为261 bp目的片段(图4)。这说明大肠癌组织中存在4 977 bp mtDNA缺失的现象。大肠癌组织、癌旁正常组织及正常肠组织mtDNA 4 977 bp缺失率和年龄的相关性见表1。

3 讨论

mtDNA 4 977 bp缺失是最为常见的一种缺失突变。他位于mtDNA序列8 472-13 447, 4 977 bp缺失区的两端为13个碱基的重复序列, 即8 472-8 484和13 447-13 459。错配的关键位点在缺失两侧的直接重复序列。缺失影响构成线粒体呼吸链7个多肽(ATP酶亚单位6和8、细胞色素氧化酶III和NADH亚单位ND3、ND4、ND4L和ND5)的编码基因和线粒体蛋白质合成必须tRNA 22个中的5个, 进而影响呼吸链的完整性, 导致生物功能缺陷。这种缺失已经引起人们的广泛兴趣, 因为他已被认为是引起骨髓-胰腺综合征(bone marrow-pancreatic syndrome, pearson)、Keams-Sayre综合征(KSS)、慢性进行性眼外肌麻痹(chronic progressive external ophthalmoplegia, CEPO)的原因^[2]。此外, 还认为这种缺失在老化过程中会引起神经肌肉功能失调, 他是一个机体老年化的分子生物学标志。滑

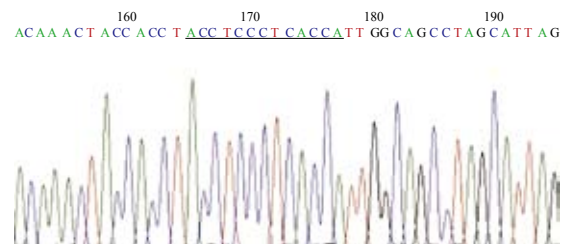


图 4 mtDNA 4 977 bp缺失片段的测序结果。

行错配、氧化物损伤和有限的自我修复能力可能是导致mtDNA 4 977 bp缺失发生的原因。生长缓慢的组织mtDNA缺失发生率通常远高于那些分裂增生活跃的组织。研究认为越是分裂增生活跃的组织能承受缺失mtDNA占总mtDNA数比例的阈值越低^[3]。mtDNA是致癌物作用的重要靶点, mtDNA突变目前已在胃癌、肺癌、食管癌和白血病等多种肿瘤及肿瘤细胞株中发现^[4]。有关mtDNA 4 977 bp缺失突变在细胞癌变中的作用及其生物学意义目前还不清楚。Ye等^[5]在研究55例乳腺癌及21例乳腺良性肿瘤中发现, mtDNA 4 977 bp缺失率为7.0%左右, 并表明其与临床病理学特征无关。Futyma等^[6]对子宫内膜癌及癌旁组织的研究发现, mtDNA 4 977 bp缺失率分别为84%和81%, 其与绝经后妇女的子宫内膜癌有相关性。Dai等^[7]在肺癌组织、肺正常癌旁组织及非癌患者正常肺组织中均检测出mtDNA 4 977 bp片段缺失率分别是54.1%, 59.5%, 30.0%, 缺失与年龄及吸烟相关。在本研究中, 我们采用长距离PCR方法对50例CRC组织、50例相应的癌旁组织和20例正常结肠组织mtDNA 4 977 bp片段缺失进行了检测, 肠癌组织、癌旁正常组织及正常肠组织的mtDNA 4 977 bp缺失率均不高, 分别是10%, 18%, 15%, 癌旁组织缺失率高于癌组织。与上述文献比较, 缺失率高的肿瘤早期肿瘤生长糖酵解能力高于氧化磷酸化, 无需太多线粒体支持, 细胞内线粒体生成受到抑制, 出现很多缺陷, 但肿瘤也能生长, 这种缺陷的线粒体蓄积多了, 细胞就会死亡, 所以可能是肿瘤

早期的一种现象. 我们的数据提示: 大肠癌生长过程中氧化磷酸化能力起重要作用, 因此缺陷的线粒体相对少, 这可能是不同的肿瘤发生机制不同所引起的. 我们还发现缺失有随年龄增大而升高的趋势. 这些现象表明, 环境和年龄因素在mtDNA缺失突变的积累过程中可能起重要作用.

总之, 不同肿瘤中mtDNA 4 977 bp缺失率有明显不同, 目前的研究表明: 氧化磷酸化和糖酵解一样, 在肿瘤的生存和生长过程中起非常重要的作用. 因此, 那些含较高比例缺失突变的肿瘤细胞可能会因线粒体呼吸功能和ATP合成能力的降低而容易死亡. 许多研究者在肝癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤中发现肿瘤组织4 977 bp缺失率远低于相应的正常组织, 这也支持了以上的结论. 因此我们认为, mtDNA大片段缺失突变, 在癌变过程中不太可能起很重要的作用.

4 参考文献

- 1 Jakupciak JP, Maragh S, Markowitz ME, Greenberg AK, Hoque MO, Maitra A, Barker PE, Wagner PD, Rom WN, Srivastava S, Sidransky D, O'Connell CD. Performance of mitochondrial DNA mutations detecting early stage cancer. *BMC Cancer* 2008; 8: 285
- 2 Schoser BG, Pongratz D. Extraocular mitochondrial myopathies and their differential diagnoses. *Strabismus* 2006; 14: 107-113
- 3 Meissner C, Bruse P, Mohamed SA, Schulz A, Warnk H, Storm T, Oehmichen M. The 4977 bp deletion of mitochondrial DNA in human skeletal muscle, heart and different areas of the brain: a useful biomarker or more? *Exp Gerontol* 2008; 43: 645-652
- 4 Fosslien E. Cancer morphogenesis: role of mitochondrial failure. *Ann Clin Lab Sci* 2008; 38: 307-329
- 5 Ye C, Shu XO, Wen W, Pierce L, Courtney R, Gao YT, Zheng W, Cai Q. Quantitative analysis of mitochondrial DNA 4977-bp deletion in sporadic breast cancer and benign breast diseases. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 108: 427-434
- 6 Futyma K, Putowski L, Cybulski M, Miotla P, Rechberger T, Semczuk A. The prevalence of mtDNA4977 deletion in primary human endometrial carcinomas and matched control samples. *Oncol Rep* 2008; 20: 683-688
- 7 Dai JG, Xiao YB, Min JX, Zhang GQ, Yao K, Zhou RJ. Mitochondrial DNA 4977 BP deletion mutations in lung carcinoma. *Indian J Cancer* 2006; 43: 20-25

■同行评价

本文探讨大肠癌组织中线粒体基因缺失突变与肿瘤生物学行为的关系, 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 •

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)

中医为主要措施治疗功能性消化不良复发率的Meta分析

陈苏宁, 史业东, 马丽, 高宪新

■背景资料

功能性消化不良 (FD) 在我国的发生率为20%-30%。虽然目前FD发病机制尚未阐明, 但目前西医及中医治疗却取得了不同程度的疗效, 各项研究成果及研究快报频频见诸于各医学杂志。

陈苏宁, 史业东, 马丽, 高宪新, 中国医科大学附属盛京医院辽宁省沈阳市 110004

作者贡献分布: 陈苏宁、史业东、马丽及高宪新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; 史业东、马丽及高宪新负责数据整理、统计分析、文章撰写; 马丽与高宪新负责文献筛选及Jadad评分; 史业东负责数据整理统计分析。

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: 2010-08-04

接受日期: 2010-08-10 在线出版日期: 2010-09-28

Relapse rate of functional dyspepsia after Chinese medicine-based therapy: a meta-analysis

Su-Ning Chen, Ye-Dong Shi, Li Ma, Xian-Xin Gao

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

Correspondence to: Professor Su-Ning Chen, Department of Traditional Chinese Medicine, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Avenue Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chensn@sj-hospital.org

Received: 2010-05-25 Revised: 2010-08-04

Accepted: 2010-08-10 Published online: 2010-09-28

Abstract

AIM: To evaluate the relapse rate of functional dyspepsia after Chinese medicine-based therapy by conducting a meta-analysis.

METHODS: According to the requirements of evidence-based medicine, we searched China Academic Journals Full-text Database, Chinese Periodicals Topic of Full-text Database, Chinese VIP Full-text Database and PubMed database. A total of 15 studies meeting the criteria were subjected to a meta-analysis using the RevMan4.2 software developed by the Cochrane Collaboration.

RESULTS: The duration of treatment and efficacy evaluation ranges between 14-60 d, and the duration of follow-up ranges between 1-60 mo. The relapse rate is lower in Chinese medicine-

based therapy group than in the Western medicine-based therapy group ($11.77\% \pm 6.46\%$ vs $39.54\% \pm 15.63\%$). According to the Jadad scale, all the trials receive a Jadad score of 1-2 and have a low level of evidence. A meta-analysis showed that the 15 studies possessed the characteristics of homogeneity ($\chi^2 = 19.50$, $df = 14$, $P = 0.15$). For the fixed-effect model, the odds ratio is 0.16 [95%CI: (0.12, 0.21), $\chi^2 = 11.79$, $P < 0.0001$].

CONCLUSION: Chinese medicine-based therapy is associated with a lower relapse rate than Western medicine-based therapy.

Key Words: Chinese medicine-based therapy; Functional dyspepsia; Relapse rate; Meta-analysis

Chen SN, Shi YD, Ma L, Gao XX. Relapse rate of functional dyspepsia after Chinese medicine-based therapy: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(27): 2938-2941

摘要

目的: Meta分析中医为主要治疗措施治疗功能性消化不良的复发率, 评价中医对功能性消化不良的临床效果。

方法: 按照循证医学的要求, 全面检索中国期刊全文数据库、中国期刊网专题全文数据库、中国维普全文数据库及PubMed数据库等, 把符合纳入标准的15项研究进行Meta分析。采用Cochrane协作网提供的RevMan4.2专用软件进行合并统计分析。

结果: 疗程及疗效的评定时间14-60 d不等, 随访时间1-6 mo, 中医为主治疗功能性消化不良的复发率低于西药治疗组($11.77\% \pm 6.46\%$ vs $39.54\% \pm 15.63\%$)。按Jadad评分标准, 全部的15篇文献计分均1-2分, 属于低质量研究, 其敏感性分析意义不大。经Meta分析合并, 表明15项研究具有同质性($\chi^2 = 19.50$, $df = 14$, $P = 0.15$)。固定效应模型的合并比值为 $OR = 0.16$, 95%CI为[0.12, 0.21], $\chi^2 = 11.79$ ($P < 0.0001$)。

结论: 中医为主要措施治疗功能性消化不良的复发率较西药治疗组低。

■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

关键词: 中医治疗; 功能性消化不良; 复发率; Meta分析

陈苏宁, 史业东, 马丽, 高宪新. 中医为主要措施治疗功能性消化不良复发率的Meta分析. 世界华人消化杂志 2010; 18(27): 2938-2941
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2938.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)在我国的发病率为20%-30%^[1]. 虽然目前FD发病机制尚未阐明, 但目前西医及中医治疗却取得了不同程度的疗效, 各项研究成果及研究快报频频见于各医学杂志. 然而在诸多的研究中, 尚未见关于FD预后的报道, 特别是中医治疗FD, 鲜见关于预后的报道. 我们检索了最近5年发表的关于FD的临床研究, 利用Revman软件进行Meta分析, 现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 以功能性消化不良、临床研究、中医治疗、functional dyspepsia、clinical research、Traditional Chinese Medicine therapy等为关键词, 检索2005-2010中国期刊全文数据库、PubMed数据库、中国期刊网专题全文数据库、中国维普全文数据库, 共检索出相关文献775篇, 无英文文献. 对775篇文献逐一阅读摘要及原文, 进行评价、筛选, 最后有15篇文献^[2-16], 共计1 450例随访患者(其中治疗组940例, 对照组490例)符合纳入标准, 从而进行研究.

1.2 方法

1.2.1 资料纳入标准: (1)原始资料为已公开发表的文献; (2)原始文献必须是随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)或临床对照试验(controlled clinical trial, CCT), 治疗组干预措施为中医治疗措施为主, 并且设立了采用西药为治疗手段的对照组; (3)治疗过程中, 按时随访, 根据病情适当加减, 及时并得当的处理并发症; (4)治疗后进行一段时间的随访, 对其复发及不良反应进行跟踪调查; (5)有综合的统计指标, 一般资料齐全.

1.2.2 纳入文献的质量评价: 由两位评价者独立的对入选的资料采用Jadad量表评分法^[17]进行质量评分和资料提取, 主要评价以下几方面: 方案设计、盲法水平、随机化方法和患者的失访比例. 1-2分为低质量研究; 3-5分为高质量研究. 然后交叉核对, 如有分歧, 通过讨论解决.

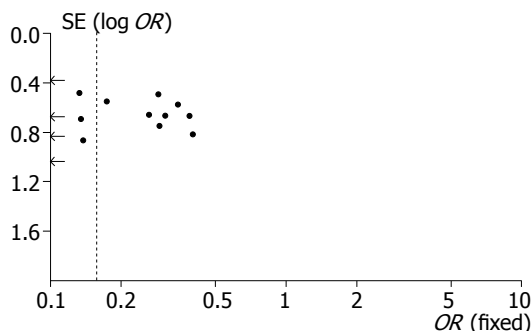


图1 纳入文献的漏斗图.

统计学处理 使用Cochrane协作网提供的RevMan4.2(Review Manager)专用软件进行统计分析. 采用计数资料的优势比(Odds Ratio, OR)作为合并统计量95%可信区间(Confidence Intervals, CI), 并作出森林图(Forest Plots). 将检验水准定为 $\alpha = 0.10$ ^[18], 对纳入的研究进行异质性检验, 异质性检验显示试验结果的差异有无统计学意义时($P > 0.10$), 选择固定效应模型的Peto法进行分析; 试验结果的异质性差异有统计学意义时($P < 0.10$), 选择随机效应模型DerSimonian-Laird(D-L)法进行检验. 通过漏斗图的对称程度来判断发表性偏倚的大小^[16,19], 最后对研究结果进行敏感性分析.

2 结果

2.1 纳入研究的描述 治疗组均采用中医方法为主的治疗措施(包括四逆散、左金丸、香砂六君子汤等中药方剂)进行治疗; 对照组采用有别于治疗组的西医治疗, 如多潘立酮、莫沙必利、西沙必利、奥美拉唑、雷尼替丁等对症治疗; 疗程及疗效结果的评定时间14-60 d不等, 随访时间1-6 mo, 治疗组复发率为 $11.77\% \pm 6.46\%$; 对照组复发率为 $39.54\% \pm 15.63\%$.

2.2 纳入研究的资料情况 纳入研究15篇文献均采用中药常规剂量, 进行治疗, 对照组采用多潘立酮、莫沙必利、西沙必利、奥美拉唑、雷尼替丁等常用药物的常用剂量.

2.3 方法学质量评价 纳入的15篇文献中, 全部描述采用随机分组, 但均未描述随机方法及随机方案是否隐藏, 未描述盲法及如何揭盲. 基线比较方面, 纳入的15篇文献均有描述纳入研究的治疗组及对照组病例差异无统计学意义, 并对基本资料进行了统计学分析($P > 0.05$). 全部文献中未提及有无失访及退出病例. 按Jadad评分标准, 全部的15篇文献计分均1-2分, 属于低质量研究.

2.4 纳入临床试验的发表性偏倚 用漏斗图分析

■ 创新盘点

在诸多的研究中, 尚未见关于FD预后的报道, 特别是中医治疗FD, 鲜见关于预后的报道. 本文检索了最近5年发表的关于FD的临床研究, 利用Revman软件进行Meta分析.

■同行评价

本文研究思路新颖, 对于中医文献的再次利用和总结治疗规律有指导意义.

Review: 中医为主要措施治疗功能性消化不良复发率的Meta分析

Comparison: 01 复发情况

Outcome: 03 中医治疗组复发情况

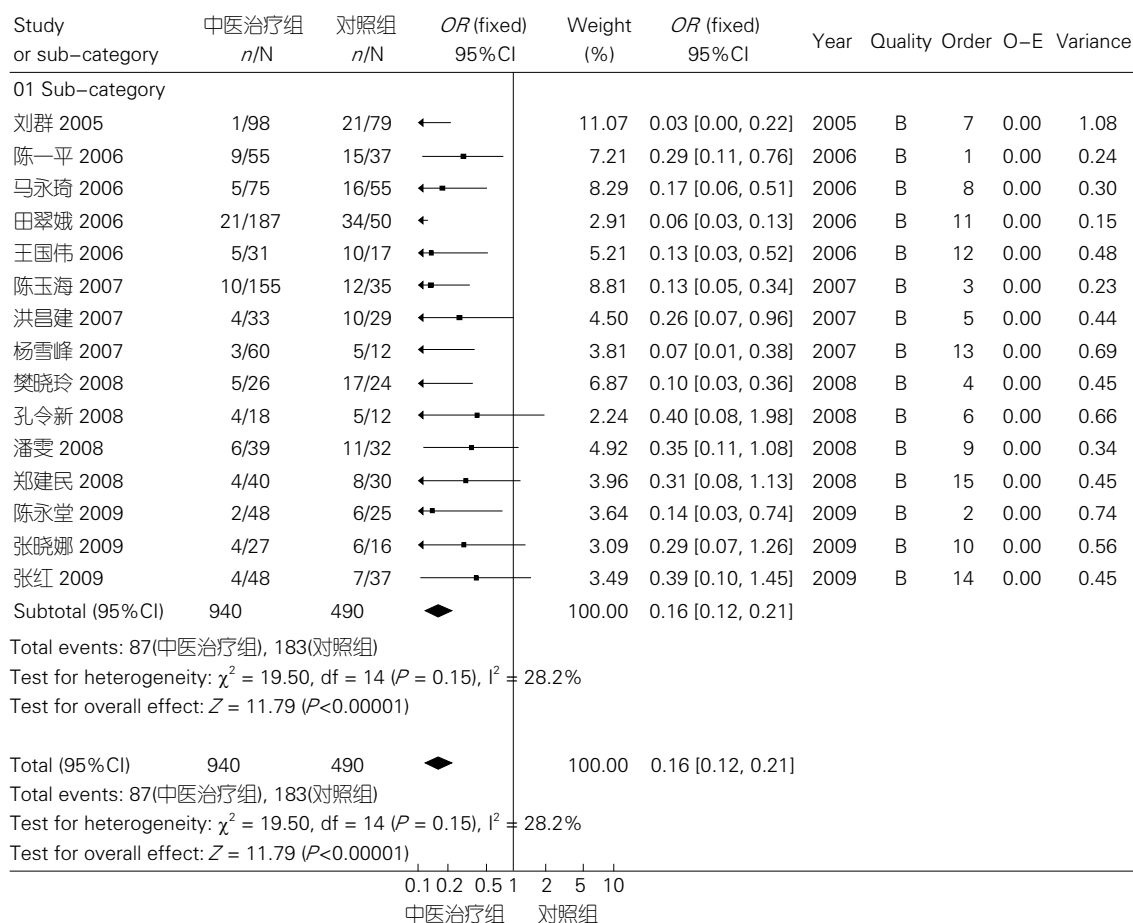


图 2 Meta分析森林图.

所收集的临床研究资料的分布形态, 如图显示各点分布不对称. 从漏斗图可以看出, 搜集的资料存在一定的偏倚(图1). 原因可能是: (1)研究结果没有统计学意义或无效而不发表论文所致的发表偏倚; (2)检索用词不当或检索策略失误导致漏检或误检文献的查找偏倚; (3)未发表的研究未纳入研究; (4)方法学质量低下、试验组和对照组基线资料的差异、机遇和弄虚作假等因素也会导致倒漏斗图的不对称分布.

2.5 合并分析 以FD的治疗效果作为效应尺度, 以FD西医常用治疗药物为对照组的15项研究同质性检验, 表明15项研究具有同质性($\chi^2 = 19.50$, $df = 14$, $P = 0.15$), 选择固定效应模型的Peto法进行分析计算、汇总统计量. 合并效应量的统计: 15项研究的OR值为0.16(95%CI: 0.12-0.21), 提示中医治疗组在FD复发率上的可能性是西药对照组的0.16倍, 其真实值可能存在于0.12-0.22. OR合并检验: $\chi^2 = 11.79$, 提示治疗组与对照组

比较($P < 0.0001$), 降低复发率的差异有统计学意义(图2).

2.6 敏感性分析 由于所有的纳入文献没有报道失访或退出病例, 所以不能将失访病例作为治疗失败进行敏感性分析. 15篇文献的Jadad评分较低, 敏感性分析意义不大. 选用不同模型时效应合并值点估计和区间估计的差异, 结论无明显变化; 按研究质量评价标准从纳入的文献中剔除质量差的文献后重新进行Meta分析, 结论无明显变化; 根据样本量的大小对纳入的文献作分层Meta分析, 考察结论无明显变化.

2.7 不良反应 全部15篇文献中只有8篇对不良反应进行了观察和说明, 但均未影响治疗, 给予对症处理后症状缓解.

3 讨论

理想的Meta分析应纳入当前所有相关的阴性和阳性的同质研究, 并采用正确的统计方法, 由于此次研究纳入的研究试验方法质量普遍较低,

大多数仅描述及采用随机分组, 极少描述研究设计、随机化方法及随机方案的隐藏, 未给予足够的信息, 以判断该试验是否科学合理, 避免偏倚。另外, 无与临床相关的长期随访结局的资料, 在一定程度上导致这些独立研究的结果难以令人信服。虽然经过Meta分析初步表明中医治疗组较西医对照组在降低FD复发率上有明显的优势, 但需要注意的是Meta分析本身也有一定的局限性。

现有证据表明, 以中医为主要措施治疗FD, 其随访的复发率较西药复发率低。随着进一步的临床研究的出现, 结论应不断的加以更新, 其结论可能会发生变化。关于FD复发率目前尚未有一个统一的结论, 更多的研究需要日后的添加补充, 从而得出一个较为真实、可靠的复发率的结果。

另外在进行文献阅读及筛选的同时, 我们发现, 许多作者对复发率的计算上有一定的误区, 正确的复发率计算公式为: 复发率 = 某病复发者人数/接受治疗缓解或病愈患者总人数 × 100%。

4 参考文献

- 1 沈志祥, 陈喜兰, 谭诗云. 消化系统疾病诊断和治疗学. 北京: 中国医药科技出版社, 2004: 166
- 2 张红. 疏肝健脾法治疗功能性消化不良50例. 时珍国医国药 2009; 20: 1537-1538
- 3 陈一平, 臧家琪. 疏肝调胃汤加黛力新治疗功能性消化不良观察. 中医药学刊 2006; 24: 1966-1967
- 4 田翠娥. 疏肝益胃汤治疗功能性消化不良150例疗效观察. 中原医刊 2006; 33: 75
- 5 洪昌建, 俞明仙. 四逆散合左金丸加减为主治疗功能性消化不良40例临床观察. 浙江中医杂志 2007; 42: 213
- 6 陈玉海, 马军廷, 田在泉. 胃动合剂治疗功能性消化不良160例观察. 实用中医药杂志 2007; 23: 623
- 7 陈永堂, 胡一丽. 五花芍草加味汤合心理干预治疗功能性消化不良50例临床观察. 浙江中医药大学学报 2009; 33: 202-203
- 8 郑建民. 中西医结合治疗功能性消化不良49例. 河南中医 2008; 28: 73-74
- 9 孙晓娜. 中西医结合治疗功能性消化不良的疗效观察. 中国中医基础医学杂志 2009; 15: 559
- 10 孔令新, 杨东明. 温阳益胃汤治疗血液透析患者功能性消化不良临床观察. 实用中医药杂志 2008; 24: 354-355
- 11 潘雯, 李昌平. 莫沙比利与黛力新和六味能消胶囊联用治疗功能性消化不良疗效观察. 泸州医学院学报 2008; 31: 297-298
- 12 马永琦, 巨小绒. 从肝郁脾虚论治功能性消化不良79例总结. 甘肃中医 2006; 19: 15-16
- 13 王国伟. 加味香苏饮配合心理治疗功能性消化不良临床观察. 实用中医药杂志 2006; 22: 677
- 14 刘群, 马贵同. 健脾理气法治疗功能性消化不良105例临床观察. 山东中医杂志 2005; 24: 267-269
- 15 杨雪峰. 健脾理中汤治疗功能性消化不良120例. 实用中医内科杂志 2007; 21: 44-45
- 16 樊晓玲, 李进安. 健脾舒肝汤治疗肝郁脾虚型功能性消化不良31例临床观察. 中医药导报 2008; 14: 35-36
- 17 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12
- 18 孙振球. 医学统计学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 623
- 19 王吉耀. 循证医学与临床实践. 北京: 科学出版社, 2002: 118-121

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)