

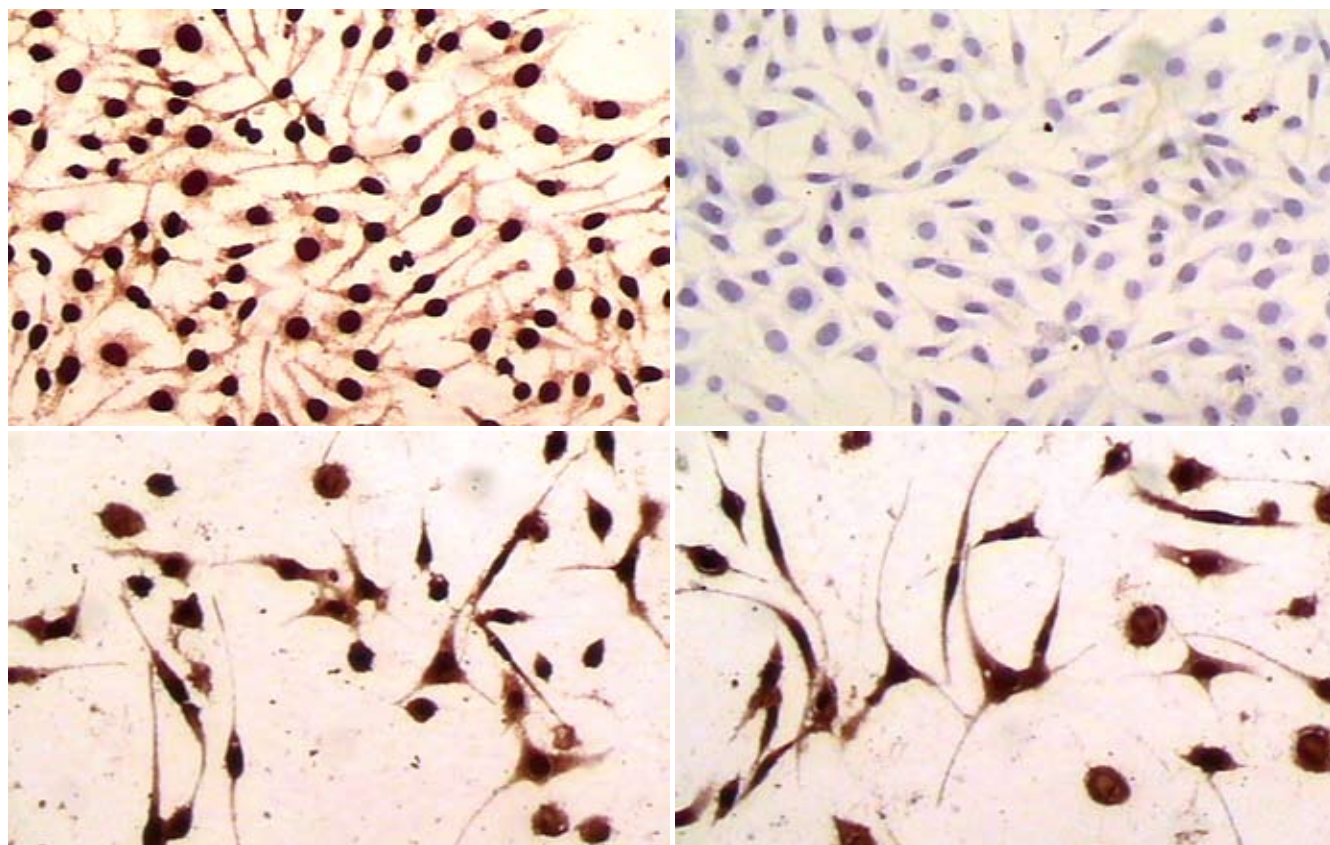
ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010 年 11 月 18 日 第 18 卷 第 32 期 (Volume 18 Number 32)



32/2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
栾新明教授
陈国忠副主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授

崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
霍丽娟教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
廖家智副主任医师
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘莹副主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马红主任医师
马欣主任医师

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

消化外科学

白雪巍副主任医师
蔡开琳副教授

蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
杜成友教授
杜顺达副主任医师
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
姜卫东教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
金山副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李杰教授

李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔主任医师
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超副教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
仇毓东副教授
裘正军教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
沈世强教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤恢焕教授
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授
汪波副主任医师

汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨维良教授
杨银学教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张群华教授
张水军教授

张宗明教授
赵刚副教授
智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
高志良主任医师
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
靳雪源副主任医师

林菊生教授
刘正稳教授
宁琴教授
牛俊奇教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
赵秀英副教授
周霞秋教授
朱传武主任医师

庄林主任医师

消化中医学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
南极星教授
牛英才研究员
沈洪教授
司富春教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
邢建峰副教授
徐列明教授
许玲副教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
陈克能教授
代智副研究员
华海清教授
李璦教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
秦叔逵教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
谢丹教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授

韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐辉雄教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

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

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
曹师承教授
陈志龙教授
樊红教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
李东辉教授
李刚教授
李杰副教授
李君文研究员
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
刘森副教授

梅林教授
钱其军研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
王钦红教授
吴道澄教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赓宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
朱进霞教授

消化病理学

杜祥教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
门秀丽教授
潘兴华副主任医师
孙伟副研究员
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010 年 11 月 18 日 第 18 卷 第 32 期 (总第328期)

述 评

3391 直肠脱垂常见的经会阴术式选择

马树梅, 王晓锋, 李华山

基 础 研 究

3396 复方苦参、奥沙利铂及重组人血管内皮抑素联合对人肝癌细胞株SMMC-7721凋亡的影响

姜子瑜, 华海清, 杨爱珍, 秦叔逵

3402 氧化苦参碱对人胰腺癌细胞血管内皮生长因子表达的影响

冀润利, 夏时海, 李飞, 邱瑶

3407 冬凌草甲素对人胰腺癌细胞增殖的抑制作用及其机制

刘军楼, 汪悦, 徐力, 杨继兵, 孙志岭, 邓海山, 徐建亚

3413 结肠黏膜低度炎症对小鼠结肠PAR-2活化和内脏感觉过敏的诱发作用

刘玮, 王承党

临 床 研 究

3420 256层智能CT肝容积和门脉三维重建对Glisson鞘横断法肝切除的指导作用

唐继红, 付必莽, 朱洪, 唐波, 孙勇, 张捷, 杨达宽, 何晓顺

文 献 综 述

3425 短链脂肪酸对结肠病变及作用机制的影响

李国法, 郑红斌

3428 肛周坏死性筋膜炎的诊治进展

林秋, 竺平, 孙桂东, 杨柏霖

3432 体质学说对中医药治疗幽门螺杆菌感染的启示

陆为民, 潘琳, 吴静

3436 儿童腹型过敏性紫癜

王宁, 钱林学

3443 钠氢交换蛋白1在肿瘤侵袭转移中的作用

孙伟, 杨薛康, 王德盛

研 究 快 报

3448 EDNRB基因启动子甲基化状态在胃癌KATO III细胞系中的检测

孙文早, 韩高雄

3452 TNF- α 对人肝细胞Mfn2基因表达的调节及对线粒体形态功能的影响

张勇, 江隆昌, 胡文君, 胡青铜, 郑启昌

3457 葱白提取物对脂肪变性肝细胞NF- κ B及TNF- α 表达的影响

时昭红, 林丽莉, 冯云霞, 郑娅琼

临 床 经 验

3462 外周血CD44⁺低表达与食管鳞癌患者预后的关系

王长春, 凌志强, 毛伟敏

3467 磷酸化FAK、Paxillin在胃腺癌中的表达及其意义

李山林, 王进, 杨丽敏, 刘丽

3471 ANGPTL3在肝细胞癌中的表达及其与肿瘤血管生成的关系

李德宇, 陈孝平

3476 超声内镜联合EMR或ESD在异位胰腺诊断和治疗中的作用

周传文, 李倩君

3480 急性胰腺炎患者sICAM-1、TNF- α 和D-二聚体水平与病情严重程度的关系

李春燕, 雍桂珍, 冯迎春, 贺国斌, 向军英, 明文

3485 机械性肠梗阻的术前诊断127例

王宁, 范建鹏, 郭仁宣, 郭克建

	3489 全直肠系膜切除术中预防盆段输尿管损伤的解剖标志 孙轶, 卢永刚, 梁天伟, 范吉利
病例报告	3492 覆膜食管支架置入术治疗医源性食管穿孔1例 章诺贝, 黄年根
附录	3494 《世界华人消化杂志》投稿须知 3499 2010-2011年国内国际会议预告
志 谢	3500 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	3401 《世界华人消化杂志》栏目设置 3419 《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》 3442 WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6本期刊被PMC收录 3451 WJG成功通过评审被PMC收录 3466 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结 3470 汤姆森-路透公布2009年WJG影响因子2.092 3479 《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》 3484 《世界华人消化杂志》修回稿须知 3491 《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 3493 《世界华人消化杂志》参考文献要求
封面故事	姜子瑜, 华海清, 杨爱珍, 秦叔逵. 复方苦参、奥沙利铂及重组人血管内皮抑素联合对人肝癌细胞株 SMMC-7721凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3396-3401 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3396.asp
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

世界华人消化杂志 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2010-11-18 原刊名 新消化病学杂志 名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心	编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com	世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录. 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流. 特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换. 2010年版权归世界华人消化杂志所有
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证 CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期56.00元 全年1616.00元 1401004000050 www.wjgnet.com		

World Chinese Journal of Digestology

November 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 32

EDITORIAL	3391 Common transperineal surgical options for rectal prolapse <i>Ma SM, Wang XF, Li HS</i>
BASIC RESEARCH	3396 Effects of Fufangkushen Injection in combination with oxaliplatin and recombinant human endostatin injection on apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721 <i>Jiang ZY, Hua HQ, Yang AZ, Qin SK</i> 3402 Oxymatrine down-regulates VEGF expression in human pancreatic carcinoma SW1990 cells <i>Ji RL, Xia SH, Li F, Di Y</i> 3407 Oridonin suppresses the proliferation of human pancreatic carcinoma SW1990 cells <i>Liu JL, Wang Y, Xu L, Yang JB, Sun ZL, Deng HS, Xu JY</i> 3413 Low-grade mucosal inflammation induces colonic PAR-2 activation and visceral hypersensitivity in mice <i>Liu W, Wang CD</i>
CLINICAL RESEARCH	3420 Three-dimensional CT angiography for preoperative evaluation of patients undergoing hepatic resection using the Glissonean pedicle transection method <i>Tang JH, Fu BM, Zhu H, Tang B, Sun Y, Zhang J, Yang DK, He XS</i>
REVIEW	3425 Effects of short-chain fatty acids on colonopathies and mechanisms involved <i>Li GF, Zheng HB</i> 3428 Diagnosis and treatment of perianal necrotizing fasciitis <i>Lin Q, Zhu P, Sun GD, Yang BL</i> 3432 Treatment of <i>Helicobacter pylori</i> infection by Chinese medicine: what we can learn from the physical constitution theory? <i>Lu WM, Pan L, Wu J</i> 3436 Gastrointestinal manifestations of Henoch-Schonlein purpura in children <i>Wang N, Qian LX</i> 3443 Role of Na⁺/H⁺ exchanger 1 in tumor invasion and metastasis <i>Sun W, Yang XK, Wang DS</i>
RAPID COMMUNICATION	3448 Detection of the promoter methylation status of the EDNRB gene in human gastric cancer cell line KATO III <i>Sun WZ, Han GX</i> 3452 TNF-α treatment alters Mfn2 expression and mitochondrial morphology and function in hepatic LO2 cells <i>Zhang Y, Jiang LC, Hu WJ, Hu QG, Zheng QC</i> 3457 Fistular onion stalk extract reduces NF-κB expression and TNF-α secretion in steatotic HepG2 cells <i>Shi ZH, Lin LL, Feng YX, Zheng YQ</i>
CLINICAL PRACTICE	3462 Decreased percentage of CD44⁺ lymphocytes in the peripheral blood correlates with a remarkable survival advantage in patients with esophageal carcinoma <i>Wang CC, Ling ZQ, Mao WM</i> 3467 Significance of expression of p-FAK and paxillin in gastric adenocarcinoma <i>Li SL, Wang J, Yang LM, Liu L</i> 3471 Correlation between ANGPTL3 expression and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma <i>Li DY, Chen XP</i>

	3476 Endoscopic ultrasound in combination with endoscopic mucosal resection/endoscopic submucosal dissection for diagnosis and treatment of heterotopic pancreas <i>Zhou CW, Li QJ</i> 3480 Relationship of plasma levels of sICAM-1, TNF-α and D-dimer with disease severity in patients with acute pancreatitis <i>Li CY, Yong GZ, Feng YC, He GB, Xiang JY, Ming W</i> 3485 Preoperative diagnosis of mechanical intestinal obstruction: analysis of 127 cases <i>Wang N, Fan JP, Guo RX, Guo KJ</i> 3489 Anatomic landmark to prevent intrapelvic ureteral injury during total mesorectal excision <i>Sun Y, Lu YG, Liang TW, Fan JL</i>
CASE REPORT	3492 Esophageal stent placement for the treatment of iatrogenic esophageal perforation: report of one case <i>Zhang NB, Huang NG</i>
APPENDIX	3494 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 3499 Meeting events calendar in 2010-2011
ACKNOWLEDGMENT	3500 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Jiang ZY, Hua HQ, Yang AZ, Qin SK.</i> Effects of Fufangkushen Injection in combination with oxaliplatin and recombinant human endostatin injection on apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2010; 18(32): 3396-3401 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3396.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date November 18, 2010

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2010 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2010 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

直肠脱垂常见的经会阴术式选择

马树梅, 王晓锋, 李华山

马树梅, 王晓锋, 李华山, 中国中医科学院广安门医院肛肠科 北京市 100053

李华山, 主任医师, 主要从事肛肠疾病的防治与研究工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 30973757

作者贡献分布: 本文选题设计及审校由李华山完成; 文献资料搜集由王晓锋与马树梅共同完成; 写作由马树梅完成。

通讯作者: 李华山, 主任医师, 100053, 北京市宣武区北线阁5号, 中国中医科学院广安门医院肛肠科. lihuashan@263.net

电话: 010-88001025 传真: 010-63014195

收稿日期: 2010-08-30 修回日期: 2010-09-27

接受日期: 2010-10-18 在线出版日期: 2010-11-18

Common transperineal surgical options for rectal prolapse

Shu-Mei Ma, Xiao-Feng Wang, Hua-Shan Li

Shu-Mei Ma, Xiao-Feng Wang, Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30973757

Correspondence to: Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, 5 Beixiangge, Xuanwu District, Beijing 100053, China. lihuashan@263.net

Received: 2010-08-30 Revised: 2010-09-27

Accepted: 2010-10-18 Published online: 2010-11-18

Abstract

Rectal prolapse is a troublesome anorectal disorder. Surgical procedures for rectal prolapse contain transabdominal and transperineal approaches. There are hundreds of transabdominal approaches currently available for treatment of rectal prolapse. In contrast, only tens of transperineal approaches available for the disease, such as Delorme procedure, Altemeier procedure, Thiersch procedure and Gant-Miwa procedure. Procedure for prolapse and hemorrhoids (PPH) represents the latest advance in transperineal treatment of rectal prolapse. Injection treatment is applied widely in China and has remarkable superiority. As each procedure has its strength and weakness, selection of appropriate procedure based on individual difference can greatly improve surgical outcome. Individualized diagnosis and treatment plan may represent a new direction for transperineal surgical treatment of rectal prolapse.

Key Words: Rectal prolapse; Transperineal ap-

proach; Injection treatment

Ma SM, Wang XF, Li HS. Common transperineal surgical options for rectal prolapse. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3391-3395

摘要

直肠脱垂是肛肠科比较棘手的病症, 手术总体上有经腹和经会阴两种途径, 经腹手术方法百余种, 经会阴手术亦有数十种, 如经会阴直肠黏膜切除及肠壁肌层折叠缝合(Delorme)术、经会阴直肠乙状结肠部分切除(Altemeier)术、肛管环缩(Thiersch)术、黏膜结扎术和肛管缩窄(Gant-Miwa)术等, 痔上黏膜环切(PPH)手术是其最新进展, 但注射疗法在我国应用较为广泛, 具有显著优势。当然, 每一种术式都有其优缺点, 根据患者个体差异, 有选择性地应用各种术式较之单一术式能很好地改善临床效果, 个体化诊疗方案可能是今后研究的重要方向。

关键词: 直肠脱垂; 经会阴手术; 注射疗法

马树梅, 王晓锋, 李华山. 直肠脱垂常见的经会阴术式选择. *世界华人消化杂志* 2010; 18(32): 3391-3395

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3391.asp>

0 引言

直肠脱垂是直肠、肛管、甚至部分乙状结肠移位下降和外脱的一种疾病。多见于年轻人和老人, 常引起诸如大便失禁等痛苦的症状。其最初病因仍旧不是很清楚, 争论也很多, 但有两种学说比较流行, 即滑动疝学说和肠套叠学说。手术仍是治疗直肠脱垂的主要手段, 有经腹与经会阴两种途径, 经腹手术方法超过百种, 经会阴手术亦有数十种, 现将常见经会阴术式归纳分析如下。

1 Delorme术

即经会阴直肠黏膜切除及肠壁肌层折叠缝合术。Delorme等在1900年提出, 他于肛门外做直肠黏膜袖状切除, 将脱垂全部脱出, 黏膜下注入盐水,

■背景资料

直肠脱垂是肛肠科比较棘手的病症, 其发病因素复杂, 治疗手段多样, 经腹手术方式近200种, 经会阴手术亦有数十种, 如何合理选择治疗方法, 一直是临床研究的重要课题。

■同行评议者

傅华群, 教授, 南昌大学第二附属医院普外科

■研发前沿

选择性地应用各种术式较之单一术式能大大地提高疗效, 进一步研究直肠脱垂的发病机制, 区别不同类型的直肠脱垂, 建立个体化诊疗方案可能是今后研究的重要方向。

距离齿线1-2 cm环形切开黏膜到黏膜下层, 将黏膜由肌层分离成为袖状, 直到脱垂顶端, 并将黏膜完全切除。再将6条缝线穿过脱垂底部黏膜边缘, 并穿过数处肌层, 由顶部黏膜边缘穿出, 结扎后使肌层折叠, 黏膜对合。这种术式多用于治疗内套叠。对于低位较小的脱垂是比较理想的, 年老体弱生命有限伴脱垂症状者也适合这种术式。有报道取得了满意的效果, Senapati等^[1]对1978-1990年的32例患者实施了本手术, 病程2 wk-10年, 术后无失访, 在平均24 mo的随访期内4例复发, 复发率15%。他们认为此术式虽然复发率较之经腹直肠固定术(5%)高, 但是没有开腹的危险。而且, 相较经腹直肠固定术后高的便秘发生率(40%), Delorme术远期肠功能恢复好。Tsunoda等^[2]认为本术式不引起便秘, 他改善了肛门括约肌和直肠的感觉功能, 可能源于其降低了术后便秘问题的发生。但是其也存在着不尽如人意的地方, 他长期复发率高, 可能源于手术只切除了部分脱垂, 没有治疗根本的解剖学缺陷。也没有治疗盆底及出口处的缺损, 术后会阴下降仍然存在。所以有人提倡改良Delorme术, 扩大黏膜切除范围, Watkins等^[3]1975/2001-12对52例患者实施了改良术式, 平均脱垂长度8.2 cm, 平均随访61.4 mo, 其中12例术前有失禁, 术后10例改善。术后5年脱垂发生率6%(3/52), 26年结束后总体复发率是10%(5/52)。并发症发生率4%。实施适当的改良术式后, 复发率有所降低, 对于存在显著并发症者也能安全实施。

2 Altemeier术

即经会阴直肠乙状结肠部分切除术。本术式最初是由Mikulicz于1889年阐述的^[4], 而备受欢迎的是Altemeier等^[5]1971年做的改良的会阴切除术。术中经肛门切除脱垂冗长的肠管并吻合, 可同时修补滑动性疝及肛提肌, 他报道了106例患者, 术后无死亡, 只有3例复发。Kimmins等^[6]对63例患者1993-02/1999-12平均随访20.8 mo, 70%患者是局麻, 平均切除长度为11.6 cm, 83%的患者用了吻合器。复发率为6.4%, 复发患者可再行本术式。并发症少(10%)。由于80%的患者可在24 h内出院, 且不需全麻, 所以手术可于门诊实施。虽然复发率较之经腹切除稍高, 但是发病率及花销低, 而且能够容易、安全地重复实施。Habr-Gama等^[7]回顾分析1985-2000年44例直肠脱垂患者行经会阴直肠乙状结肠切除术并肛提肌修复术。平均病程是29.2(1-40) mo。直肠

脱垂的平均长度8.3 cm, 切除肠段的平均长度21.2 cm。并发症发生率9.1%。本术式没有死亡病例。平均住院期是3.9 d。在平均随访期49 mo, 复发率7.1%(2例患者脱垂复发, 另1例直肠黏膜脱垂)。36例患者(85.7%)肛门扩约功能改善, 可见本改良术式能达到令人满意的功能改善和可接受的低复发率。对于手术器械, Boccasanta等^[8]对1999-01/2003-12年58例患者分别施行传统的单极电烙法并手工吻合术和用解剖刀及圆形吻合器, 结果显示经会阴直肠乙状结肠切除术并提肌成形术的临床和功能的远期结果不受外科器械和肛肠吻合类型的影响。在高风险患者, 临床中肯的短期结果应明确研究。另外本术式无吻合口瘘以及因悬吊支持材料而发生盆腔脓肿的危险, 且不会出现经腹手术所带来的泌尿生殖系统问题, 但长期效果不佳, 复发率较高, 约5%-20%^[9]。主要适用于年老体弱不能耐受经腹手术者以及脱垂肠段较长、嵌顿不能复位或是肠管已经坏死者。

3 Thiersch术

即肛管环缩术。1891年, Thiersch首先用银线环植入肛门部皮下, 紧缩松弛的肛门括约肌, 12 wk后取出。该手术能在局麻下完成, 手术操作简单, 损伤少。但是不能解除引起直肠脱垂的诸多原因, 而出现粪便嵌顿、植入环断裂或松弛、置环处溃疡感染、急性脱垂等并发症^[10], 疗效不满意, 复发率很高。后来外科医生尝试了很多材料改良本术式, 如, 筋膜、肌腱、尼龙、聚丙烯、Teflon等, 这些材料都不易断裂, 并发症要少。Khanduja等^[11]改良了本术式, 他用硅树脂环代替银丝环, 治疗16例急诊患者, 脱垂都得以纠正, 其中3例发生植入环断裂, 1例术后2年发生轻微感染, 但无须拆除。故本术式为一古老而实用的术式。近年来, Gupta^[12]描述了本术式结合肛周皮下凝结诱导纤维化治疗脱垂对于行其他外科术式风险较大的老年人有较好的疗效。随访2年, 2例出现并发症, 其中的1例是因为置线圈处化脓, 需移除, 另外1例出现线圈松弛。3例复发, 其中1例诉大便失禁。可见本术式适应证少, 对于轻度直肠脱垂和年老体弱不能耐受其他手术者可作为一种辅助性姑息治疗。

4 Gant-Miwa手术

Gant(1923)用黏膜结扎术和肛管缩窄术治疗完全脱垂。Miwa(1966)推广了此术式。方法是: 先将脱垂完全脱出肛门, 以止血钳牵起黏膜和黏

■相关报道

Raftopoulos等对643例成人完全性直肠脱垂经腹手术后复发率进行长期多中心随访观察, 发现术后1年平均复发率为1.06%, 5年为6.61%, 10年为28.92%。

膜下层,再以弯针将不可吸收的缝线穿过黏膜下层,围绕钳尖端结扎,成为较大的黏膜结节.由脱垂的最上部开始,围绕脱垂做环形结扎,每一环形线上做4-6个结节,一直到齿线上方.黏膜结节数目按脱垂大小不同,有的可达100个,使黏膜缩短,脱垂缩小.然后将脱垂复回,并在皮下做肛管缩窄术.尽管本术式在英语课本中有描述,但是很少被使用.在日本,自从1960后,本术式加上肛门环缩术在治疗直肠脱垂中起了主要的作用.Yamana等^[13]认为技术的细节(例如Teflon带的使用和相对于外扩约肌深面和外面的路线)对于手术成功与否起了重要的作用.结果显示复发率0%-31%,无死亡,基本上没有诸如大出血和严重败血症等并发症.另外肛门静息压和直肠感觉改善了,这对于排便功能是个积极的影响.所以我们认为本术式加上肛门环缩是会阴术式中比较好的选择.Arakawa(1979)报道治疗了206例完全脱垂,复发率是14%.

5 痔上黏膜环切术手术

自从1998年Longo发明了痔上黏膜环切术(produce of prolapse and hemorrhoids, PPH)治疗重度内痔脱垂并应用于临床,随后国内文献相继报道应用吻合器PPH治疗内脱垂,亦获得良好疗效^[14]. PPH用于治疗直肠黏膜脱垂,效果显著.张连阳等^[15]对42例直肠黏膜脱垂患者行PPH,总有效率为88.1%(37/42),其中直肠内黏膜脱垂有效率为81.8%(18/22),直肠外黏膜脱垂有效率达95.0%(19/20),证明PPH术治疗直肠外黏膜脱垂优于直肠内黏膜脱垂.郑新等^[16]报道2例术后直肠黏膜仍脱垂者系术前症状较重,所以建议对这样的患者宜行双荷包缝合,另外报道了本术式可以改善直肠前突的症状.王本军^[17]术时在定位齿线后测量反折间距(最大游离缘距齿线的“S”形距离),探查明确后于齿线上6 cm和5 cm处行双荷包缝合,最后用吻合器环切吻合.术后配合长期疗效维持“套餐”,从整体上调理患者身体状态,临床总有效率达93.3%,术后随访3 mo,总有效率达85.7%.马慧^[18]的双荷包缝合是远侧缝线距齿状线上3-4 cm,近侧缝线距远侧缝线1.0-1.5 cm,以保证切除足够的环形黏膜,造成黏膜与肌层粘连而达到治疗直肠内脱垂的目的,切除黏膜宽度4-6 cm.全部患者临床症状基本消失,患者感觉满意.另有报道在行PPH时配合齿线上3、7、11点母痔区纵行缝合直肠黏膜6-8 cm,可以减少术后复发,解除排便困难^[19].对

于外脱垂,邱磊等^[20]在应用PPH后,配合母痔区三点黏膜柱状缝合、直肠周围高位注射消痔灵亦取得了很好的治疗效果.术后随访6-18 mo,全部治愈.对于II、III度直肠脱垂,行双荷包吻合,亦能取得好的预期效果^[21]. PPH术式治疗直肠脱垂操作简单、并发症少、愈合时间短.

6 注射疗法

国外注射疗法多用于治疗儿童直肠脱垂,其机制是通过炎症反应引起直肠周围组织纤维化,导致直肠壁与周围组织固定在一起,从而阻止了脱垂的发生.硬化剂的选择包括:5%石炭酸甘油、1%石炭酸蓖麻油、1%奎宁和尿素氢氯化物、70%乙醇、30%的盐水、25%的盐水、50%葡萄糖、牛奶^[22],每一种剂型的治愈率和并发症都不同.一些剂型效果好但是并发症较多,一些没有并发症但是治愈率低,一些剂型很有效也没有并发症但是注射困难.Shah等^[23]回顾了1995-2003年5岁以下的17例患者,黏膜下注射高渗盐水,一次注射治愈率14/17(83%),3例因为饮食中的牛乳蛋白(cow's milk protein, CMP)过敏而致硬化治疗失败.Abes等^[24]认为将高渗溶液直接注射到肠黏膜会导致黏膜细胞损伤,所以选择了15%相对低渗的溶液代替30%的用以治疗脱垂.并且在1992-06/2003-05对16例儿童行15%的盐水注射.方法是在全麻下,患者取截石位,术者左手食指置肛中做引导,以控制针的位置.取黏膜下组织、右侧直肠周围区域、左侧直肠周围区域、直肠后的几个点位,针头通过肛周皮肤刺入,盐水边退针边缓慢注射,每个点位注射2-3 mL,并注射直肠黏膜下组织.因直肠前壁挨近膀胱颈,所以不予注射.注射后可以出院,并给予大便软化剂以防止便秘.结果获得15/16(93.7%)一次治愈率,只有1例需二次注射.Sasaki等^[25]用石炭酸杏仁油注射液治疗9例(年龄5-14岁)儿童直肠脱垂,术后用肛门直肠测压发现注射后肛门直肠反射和其他参数都正常.4例曾诉便秘患者中,2例症状解除.Fahmy等^[26]对比了98%的普通乙醇、5%的石炭酸杏仁油注射液和聚糖酐玻尿酸的共聚物(dextranomer/hyaluronic acid copolymer, Deflux)的注射效果,结果显示Deflux无黏膜坏死及脓肿形成,长期随访无复发,石炭酸杏仁油注射液因其高复发率而不太合适于治疗.乙醇比较便宜,容易获得,可以作为Deflux的替代品.Hachiro等^[27]在2005-10/2006-06对14例成人完全性直肠脱垂者

■创新盘点

本文所涉及的术式基本涵盖了目前国内外治疗直肠脱垂的经会阴手术方式,有一定的代表性,PPH为其最新进展,消痔灵注射疗法在我国运用广泛,对临床实践有较好的借鉴意义.

■应用要点

直肠脱垂的手术方式有经腹与会阴两种途径,经腹损伤较大,经会阴损伤较小,即使同为经会阴手术,其损伤程度还是有所区别。在临床应用时应以个体化为原则,先易后难,尽量减少对患者的损伤。消痔灵注射疗法损伤较小,可以作为直肠脱垂的首选治疗方法。

[年龄34-91(平均76)岁],实施硫酸钾铝和鞣酸的注射液硬化治疗。在平均6 mo的随访期间,14例患者均治愈,无术中或术后的并发症。只有1例需二次注射。便秘症状没有加剧,也没有狭窄。7/10例大便失禁患者症状得到缓解。

我国著名肛肠专家黄乃健教授等^[28]通过直肠脱垂动物标本的采集和动物模型的建立研究,提出了人类直肠脱垂的实质是直肠与直肠套叠,其脱垂平面多在直肠壶腹部,位置比较恒定。而乙状结肠套入直肠,是直肠脱垂病情加重的结果,即由于病情的逐渐发展,低位肠管脱垂,牵及高位肠管下降。这就证实了为何采用中西医结合的明矾液注射疗法,可治愈脱垂肠管外露部分长达15 cm左右的病例。另外,对于完全性直肠脱垂,李华山等^[29]报道采用消痔灵注射液双层4步注射疗法治疗,取得了良好疗效。所谓双层4步注射疗法是指在直肠外层(直肠周围间隙)与直肠内层(直肠黏膜下层)分4步进行注射。即将药物(如消痔灵注射液)分别注射于:(1)两侧骨盆直肠间隙:使直肠与直肠侧韧带粘连固定;(2)直肠后间隙:使直肠与骶前筋膜粘连固定;(3)直肠黏膜下层:使松弛的直肠黏膜与肌层粘连固定,从而达到治疗目的。此外,张燕生等^[30]报道在直肠黏膜下注射及缝扎以产生瘢痕支持固定、直肠周围高位间隙注射消痔灵硬化剂、并配合肛管紧缩术,封闭肛尾三角,以达到对完全性直肠脱垂的有效治疗,减少单一注射易复发的可能性。可见,治疗完全性直肠脱垂,在应用传统的注射疗法时,配合一些辅助的治疗措施,如肛门环缩、紧缩、括约肌折叠^[31]、瘢痕直肠固定术等,可以增强注射的治疗效果,达到更高的一期根治的目的。

7 结论

直肠脱垂仍是一个较为棘手的问题,因其发病是多种因素综合作用的结果,尚没有明确有效的治疗方式选择,手术仍是目前治愈本病的主要手段,手术的基本原则大体包括6点^[5]:(1)切除脱垂的冗长肠管;(2)缩小肛门;(3)重建或加强盆底;(4)经腹悬吊或固定脱垂肠管;(5)消除道格拉斯腔;(6)修补会阴滑动疝。Theuerkauf等^[32]综合了各种手术治疗直肠脱垂的结果,治疗总人数3 505例,死亡48例,随访总人数2 858例,复发480例。其中54例行Altemeier术无死亡,随访54例,复发2例;336例行Delorme术,死亡8例,随访328例,复发82例。手术方式的多样性恰恰也证

明了没有一种方法适合于所有的患者,对于每一种方法的优劣的评价需要大量的随机对照试验来证明。Raftopoulos等^[33]对643例成人完全性直肠脱垂经腹手术后复发率进行长期多中心随访观察,发现术后1年平均复发率为1.06%,5年为6.61%,10年为28.92%。且不同的医疗单位、手术入路、手术方法、手术技巧等对术后复发率均无显著影响。Kim等^[4]对372例成人完全性直肠脱垂术后随访(1976-1994年),发现经腹手术复发率为5.1%(平均随访98 mo),经会阴手术复发率为15.8%(平均随访47 mo)。经腹手术复发率较低,对于年轻体强的患者是理想的。然而,腹部手术需游离或固定直肠、或切除结肠、或二者均有,故并发症相对较高,如感染、吻合口漏、死亡率等相对增高^[34]。在我国直肠脱垂的治疗中,注射疗法具有较为广泛的运用,特别是消痔灵注射治疗成人完全性直肠脱垂^[35,36],采取双层4步注射法或直肠周围注射,或注射配合PPH术,肛门紧缩术,均取得了较好的疗效。注射疗法具有患者基本无痛苦,并发症少,住院时间短,医疗费用低,可重复使用等诸多优点。但其疗效与药物剂量、浓度、注射方法、注射次数等密切相关。况且,尚缺乏与开腹或其他各种经会阴手术的大样本的随机对照研究或队列研究,以及长期的临床随访分析。远期疗效如何是评价该疗法的关键。总之,选择性地应用各种术式较之单一使用一种术式能大大地提高疗效,进一步研究直肠脱垂的发病机制,区别不同类型的直肠脱垂,建立个体化诊疗方案可能是今后研究的重要方向。

8 参考文献

- 1 Senapati A, Nicholls RJ, Thomson JP, Phillips RK. Results of Delorme's procedure for rectal prolapse. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 456-460
- 2 Tsunoda A, Yasuda N, Yokoyama N, Kamiyama G, Kusano M. Delorme's procedure for rectal prolapse: clinical and physiological analysis. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1260-1265
- 3 Watkins BP, Landercasper J, Belzer GE, Rechner P, Knudson R, Bintz M, Lambert P. Long-term follow-up of the modified Delorme procedure for rectal prolapse. *Arch Surg* 2003; 138: 498-502; discussion 502-503
- 4 Kim DS, Tsang CB, Wong WD, Lowry AC, Goldberg SM, Madoff RD. Complete rectal prolapse: evolution of management and results. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 460-466; discussion 466-469
- 5 Altemeier WA, Culbertson WR, Schowengerdt C, Hunt J. Nineteen years' experience with the one-stage perineal repair of rectal prolapse. *Ann Surg* 1971; 173: 993-1006
- 6 Kimmins MH, Evetts BK, Isler J, Billingham R. The

- Altemeier repair: outpatient treatment of rectal prolapse. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 565-570
- 7 Habr-Gama A, Jacob CE, Jorge JM, Seid VE, Marques CF, Mantese JC, Kiss DR, Gama-Rodrigues J. Rectal procidentia treatment by perineal rectosigmoidectomy combined with levator ani repair. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 213-217
 - 8 Boccasanta P, Venturi M, Barbieri S, Roviato G. Impact of new technologies on the clinical and functional outcome of Altemeier's procedure: a randomized, controlled trial. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 652-660
 - 9 Ramanujam PS, Venkatesh KS, Fietz MJ. Perineal excision of rectal procidentia in elderly high-risk patients. A ten-year experience. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 1027-1030
 - 10 Mcpherson AG. Complete prolapse of rectum: Thiersch's operation. *Proc R Soc Med* 1956; 49: 957-958
 - 11 Khanduja KS, Hardy TG Jr, Aguilar PS, Plasencia G, Hartmann RF, Bowers F, Stewart WR. A new silicone-prosthesis in the modified Thiersch operation. *Dis Colon Rectum* 1988; 31: 380-383
 - 12 Gupta PJ. Combined Thiersch's procedure and sub-anodermal coagulation for complete rectal prolapse in the elderly. *Dig Surg* 2006; 23: 146-149
 - 13 Yamana T, Iwadare J. Mucosal plication (Gant-Miwa procedure) with anal encircling for rectal prolapse—a review of the Japanese experience. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: S94-S99
 - 14 任翔英, 汤浩. 吻合器在直肠脱垂治疗中的应用. *现代实用医学* 2003; 15: 447-448
 - 15 张连阳, 刘宝华, 童卫东, 张胜本. 圆形吻合器直肠黏膜环切术治疗直肠黏膜脱垂. *中国普外基础与临床杂志* 2008; 15: 61-62
 - 16 郑新, 郑志杰, 周本世, 戴宗晴. PPH治疗直肠粘膜脱垂及直肠前突所致出口梗阻型便秘. *腹部外科* 2004; 17: 298-299
 - 17 王本军. 经肛门吻合器微创环切悬吊术治疗直肠内脱垂型便秘的临床研究. *山东中医药大学* 2004; 1-56
 - 18 马慧. 吻合器痔上黏膜环切治疗直肠内脱垂的效果. *齐鲁医学杂志* 2004; 19: 246-247
 - 19 涂经楷, 傅仲学, 张胜本. PPH结合直肠黏膜纵行缝合术治疗直肠黏膜内脱垂与脱垂痔. *临床外科杂志* 2007; 15: 763-764
 - 20 邱磊, 廖健南, 谢沛标, 廖一平. PPH加黏膜柱状缝合、直肠周围高位注射治疗完全性直肠脱垂(附15例报告). *大肠肛门病外科杂志* 2005; 11: 120-121
 - 21 徐靖平, 王华, 余雁, 李宁, 钱东刚. 吻合器痔上黏膜环切术双荷包治疗成人直肠脱垂效果分析. *实用医院临床杂志* 2008; 5: 61
 - 22 Zganjer M, Cizmic A, Cigit I, Zupancic B, Bumci I, Popovic L, Kljenak A. Treatment of rectal prolapse in children with cow milk injection sclerotherapy: 30-year experience. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 737-740
 - 23 Shah A, Parikh D, Jawaheer G, Gornall P. Persistent rectal prolapse in children: sclerotherapy and surgical management. *Pediatr Surg Int* 2005; 21: 270-273
 - 24 Abeş M, Sarihan H. Injection sclerotherapy of rectal prolapse in children with 15 percent saline solution. *Eur J Pediatr Surg* 2004; 14: 100-102
 - 25 Sasaki Y, Iwai N, Kimura O, Hibi M. The treatment of rectal prolapse in children with phenol in almond oil injection. *Eur J Pediatr Surg* 2004; 14: 414-417
 - 26 Fahmy MA, Ezzelarab S. Outcome of submucosal injection of different sclerosing materials for rectal prolapse in children. *Pediatr Surg Int* 2004; 20: 353-356
 - 27 Hachiro Y, Kunimoto M, Abe T, Kitada M, Ebisawa Y. Aluminum potassium sulfate and tannic acid injection in the treatment of total rectal prolapse: early outcomes. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1996-2000
 - 28 黄乃健, 李殿伟, 王立柱, 史学文, 贝绍生, 孙洪生, 栾耀芳, 贾小强, 梁新成, 李金顺. 直肠脱垂动物标本的采集和动物模型的建立. *中国肛肠病杂志* 2006; 26: 11-18
 - 29 李华山, 李国栋. 消痔灵双层四步注射治疗成人完全性直肠脱垂117例. *大肠肛门病外科杂志* 2003; 9: 185
 - 30 张燕生, 刘仍海, 李薇, 代红雨, 赵虎, 武朝鲁, 张淑伶, 宋庆伟, 李德庆. “消痔灵”注射加肛管紧缩术治疗完全性直肠脱垂. *北京中医药大学学报(中医临床版)* 2004; 11: 28-29
 - 31 刘高峰, 郭海青. 括约肌折叠加消痔灵液注射治疗直肠脱垂26例分析. *中国误诊学杂志* 2008; 8: 701-702
 - 32 Theuerkauf FJ Jr, Beahrs OH, Hill JR. Rectal prolapse. Causation and surgical treatment. *Ann Surg* 1970; 171: 819-835
 - 33 Raftopoulos Y, Senagore AJ, Di Giuro G, Bergamaschi R. Recurrence rates after abdominal surgery for complete rectal prolapse: a multicenter pooled analysis of 643 individual patient data. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1200-1206
 - 34 Madiba TE, Baig MK, Wexner SD. Surgical management of rectal prolapse. *Arch Surg* 2005; 140: 63-73
 - 35 李华山, 李国栋, 李东冰, 王春晓, 景建中, 寇玉明, 张建华, 胡占岭. 消痔灵双层4步注射治疗完全性直肠脱垂临床疗效评价. *首都医科大学学报* 2006; 27: 789-791
 - 36 李华山, 王晓锋, 李国栋. 消痔灵注射治疗完全性直肠脱垂. *中华临床医师杂志(电子版)* 2008; 2: 1181-1183

同行评价

本文科学性与可读性较好, 对于继续探讨直肠脱垂的治疗有一定的参考价值.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

复方苦参、奥沙利铂及重组人血管内皮抑素联合对人肝癌细胞株SMMC-7721凋亡的影响

姜子瑜, 华海清, 杨爱珍, 秦叔逵

■背景资料

临床上早期肝细胞癌的治疗以手术为主, 然而由于其恶性程度高, 起病隐匿, 早期诊断困难, 大多数患者确诊时已发展到晚期, 失去了手术及局部治疗的机会, 因此, 化疗、中药、免疫调节以及近年来兴起的分子靶向药物等成为肝癌的主要治疗方法。

姜子瑜, 南京中医药大学附属八一医院 江苏省南京市 210046

华海清, 杨爱珍, 秦叔逵, 中国人民解放军八一医院全军肿瘤中心 江苏省南京市 210002

姜子瑜, 南京中医药大学在读博士, 主要从事中西医结合临床肿瘤内科学的研究。

“十一五”军队中医药重大临床攻关基金资助项目, No. 2006051005

作者贡献分布: 实验由姜子瑜完成并撰写论文; 华海清审修; 课题由华海清设计; 秦叔逵指导; 杨爱珍提供实验指导。

通讯作者: 华海清, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军八一医院全军肿瘤中心。

huahaiqing@csc.org.cn

电话: 025-80864055

收稿日期: 2010-08-04 修回日期: 2010-09-14

接受日期: 2010-09-25 在线出版日期: 2010-11-18

Effects of Fufangkushen Injection in combination with oxaliplatin and recombinant human endostatin injection on apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721

Zi-Yu Jiang, Hai-Qing Hua, Ai-Zhen Yang, Shu-Kui Qin

Zi-Yu Jiang, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Hai-Qing Hua, Ai-Zhen Yang, Shu-Kui Qin, Cancer Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Supported by: the Major Clinical Research Project of Chinese PLA During the “11th Five-Year Plan” Period, No. 2006051005

Correspondence to: Professor Hai-Qing Hua, Cancer Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. huahaiqing@csc.org.cn

Received: 2010-08-04 Revised: 2010-09-14

Accepted: 2010-09-25 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the possible synergistic effects of Fufangkushen Injection, oxaliplatin and recombinant human endostatin (Endostar) on apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721.

METHODS: Fluorescence microscopy and TUNEL assay were employed to evaluate apoptosis of SMMC-7721 cells. Immunohistochemistry

was used to detect the expression of apoptosis-associated proteins survivin, Bcl-2 and caspase-3 in SMMC-7721 cells.

RESULTS: Fluorescence microscopy analysis showed that the apoptosis index (AI) of cells treated with Fufangkushen Injection and oxaliplatin and those treated with Fufangkushen Injection, oxaliplatin and Endostar was 44.33% and 46.33%, respectively, with no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). TUNEL analysis showed that the AI of the above two groups of cells were 36.3% and 34.2%, respectively, with no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). Immunohistochemistry analysis demonstrated that, although the expression of survivin and Bcl-2 decreased and the expression of caspase-3 increased in the above two groups of cells (1.426 ± 0.007 , 1.442 ± 0.011 vs 2.485 ± 0.013 ; 1.308 ± 0.012 , 1.298 ± 0.008 vs 2.195 ± 0.021 ; 2.503 ± 0.017 , 2.526 ± 0.013 vs 1.536 ± 0.007 , all $P < 0.01$), there was no significant difference in the expression levels of these proteins between the two groups.

CONCLUSION: Combined Fufangkushen Injection, oxaliplatin and Endostar have comparable apoptosis-inducing ability to combined Fufangkushen Injection and oxaliplatin in SMMC-7721 cells. The above drugs induce SMMC-7721 cell apoptosis possibly by altering the expression of survivin, Bcl-2 and caspase-3.

Key Words: Fufangkushen Injection; Oxaliplatin; Endostar; Recombinant human endostatin injection; Human hepatoma cell; Apoptosis

Jiang ZY, Hua HQ, Yang AZ, Qin SK. Effects of Fufangkushen Injection in combination with oxaliplatin and recombinant human endostatin injection on apoptosis in human hepatoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3396-3401

摘要

目的: 探讨中药、化疗药物以及抗血管生成药物联合应用对人肝癌SMMC-7721细胞的协同增效作用及其相关机制。

■同行评议者

英卫东, 教授, 安徽省立医院肝胆外科

方法: 采用荧光显微镜、原位末端标记技术(TUNEL)观察两药组(复方苦参联合奥沙利铂)及三药组[复方苦参联合奥沙利铂和重组人血管内皮抑素(恩度)]对SMMC-7721细胞的诱导凋亡作用; 应用免疫组织化学法观察药物作用后对凋亡相关基因Survivin、Bcl-2和caspase-3蛋白表达的影响。

结果: 荧光显微镜观察发现, 复方苦参注射液(50 mL/L)和奥沙利铂(1 mg/L)两药组以及同时联合恩度(12.5 mg/L)的三药组作用于SMMC-7721细胞后, 凋亡指数(AI)分别为44.33%和46.33%, 两组间未见明显差异($P>0.05$); TUNEL检测结果亦显示, 两药组与三药组比较, AI分别为36.3%和34.2%, 无明显差异($P>0.05$); 免疫组织化学法观察显示, 两药组与三药组均可使Survivin、Bcl-2蛋白表达减弱, caspase-3蛋白表达增强(1.426 ± 0.007 , 1.442 ± 0.011 vs 2.485 ± 0.013 ; 1.308 ± 0.012 , 1.298 ± 0.008 vs 2.195 ± 0.021 ; 2.503 ± 0.017 , 2.526 ± 0.013 vs 1.536 ± 0.007 , 均 $P<0.01$), 但两组之间亦无明显差异。

结论: 复方苦参注射液、奥沙利铂两药联合以及再与恩度的三药联合均能诱导人肝癌SMMC-7721细胞的凋亡, 但三药联合并未能增加诱导凋亡的作用; 其诱导凋亡的机制可能与调节细胞Survivin、Bcl-2、caspase-3蛋白的表达有关。

关键词: 复方苦参注射液; 奥沙利铂; 恩度; 重组人血管内皮抑素; 人肝癌细胞; 细胞凋亡

姜子瑜, 华海清, 杨爱珍, 秦叔逵. 复方苦参、奥沙利铂及重组人血管内皮抑素联合对人肝癌细胞株SMMC-7721凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3396-3401
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3396.asp>

0 引言

临床上早期肝细胞癌(以下简称肝癌)的治疗以手术为主, 然而由于其恶性程度高, 起病隐匿, 早期诊断困难, 大多数患者确诊时已发展到晚期, 失去了手术及局部治疗的机会, 因此, 化疗、中药、免疫调节以及近年来兴起的分子靶向药物等成为肝癌的主要治疗方法。我们前期的研究发现, 复方苦参注射液和奥沙利铂均可抑制肝癌SMMC-7721细胞的增殖并诱导其凋亡, 当两药联合时复方苦参对奥沙利铂有增效作用^[1]。恩度(endostar, YH-16)是我国自主开发的重组人血管内皮抑素, 他以血管内皮细胞为靶点抑制肿瘤新生血管生成, 已有III期临床研

究证实, 与化疗联用可以提高晚期肺癌的疗效。为了进一步探索提高肝癌疗效的综合治疗方案, 我们在复方苦参联合奥沙利铂的基础上加用恩度, 进行了两药联合与三药联合的比较研究, 现将其结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌SMMC-7721细胞株购自中科院上海细胞生物研究所。复方苦参注射液(简称复方苦参, 商品名岩舒): 山西振东金晶制药公司生产, 批号: 20080520; 注射用奥沙利铂: 南京制药厂生产, 批号: 20080505; 恩度: 山东先声麦得津生物制药有限公司生产, 批号: 20080901; Roche原位细胞凋亡检测(TUNEL)试剂盒、Survivin兔抗人多克隆抗体、Bcl-2鼠抗人单克隆抗体、caspase-3兔抗人单克隆抗体: 北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 荧光显微镜观察细胞形态变化: 取对数生长期的SMMC-7721细胞, 消化制成单细胞悬液后, 以 5×10^4 /mL浓度接种于培养瓶中, 每瓶加培养液8 mL, 在37℃、50 mL/L CO₂饱和湿度条件下培养24 h后, 两药组予50 mL/L的复方苦参和1 mg/L的奥沙利铂联合处理, 三药组在两药组的基础上加用12.5 mg/L的恩度联合处理, 阴性对照组加等量普通培养液, 于37℃、50 mL/L CO₂条件下继续培养48 h, 0.25%胰蛋白酶消化后, 收集上清细胞及贴壁细胞, 细胞离心1 000 r/min×10 min, 弃上清液, 离心出的细胞用PBS洗涤2次, 1 000 r/min×10 min再次离心后, 吸尽上清液。离心出的细胞中加入200 μL培养液, 8 μL AO/EB染液, 制成细胞悬液, 取1滴于载玻片上, 盖以玻片, 在荧光显微镜下观察300个细胞, 分别计数活细胞(VN)、早期凋亡细胞(VA)、晚期凋亡细胞(NVA)和死细胞(NVM), 按照公式计算凋亡率: 凋亡率 = (VA+NVA)/(VA+NVA+NVM+VN)。

1.2.2 原位末端标记法(TUNEL): 按试剂盒说明书TUNEL法染色后, 在光镜下观察, 凋亡细胞的细胞核呈黄褐色。10×10低倍镜下随机选取5个细胞均匀分布的视野, 10×20中倍镜下每个视野随机选50个细胞计数凋亡细胞数目和总的细胞数目, 计算凋亡指数(apoptosis index, AI) = 凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.2.3 免疫组织化学法(PV法): 按PV免疫试剂盒说明书步骤检测Survivin、Bcl-2、caspase-3蛋白的表达。10×10低倍镜下随机选取10个细胞均匀分布的视野, 10×20中倍镜下每个视野随

■ 研发前沿

在体外实验中, 复方苦参、奥沙利铂两药或与恩度三药联用均可诱导肝癌细胞凋亡, 但三药联用未能明显提高疗效; 其诱导凋亡的机制可能与抑制Survivin和Bcl-2蛋白的表达以及促进caspase-3蛋白的表达有关, 但是否还存在其他机制, 尚需进一步的探讨。

■相关报道

Yen等报道了奥沙利铂单药治疗晚期肝癌的Ⅱ期临床研究,随后本课题组及国内外的一些学者开展的奥沙利铂联合氟尿嘧啶、卡培他滨、吉西他滨等治疗肝癌的临床研究,均显示了一定的疗效。

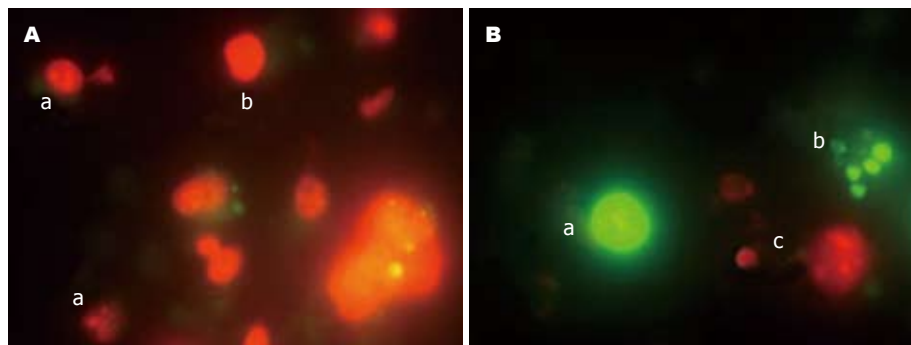


图1 荧光显微镜观察两药组和三药组处理后的细胞形态。A: 两药组, a: NVA; b: NVM; B: 三药组, a: VN; b: VA; c: NVA。

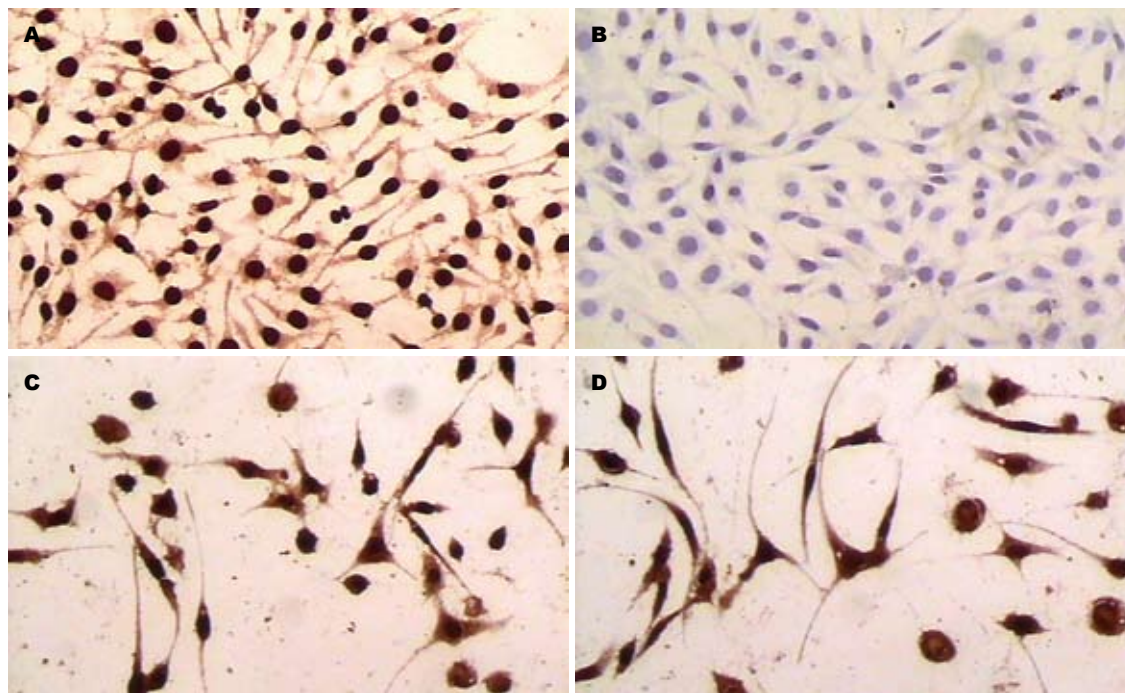


图2 TUNEL示各组细胞凋亡情况($\times 200$)。A: 阳性对照组; B: 阴性对照组; C: 两药组; D: 三药组。

机选50个细胞,按着色强弱分为4个等级:无着色0分,淡黄色1分,棕黄色2分,棕褐色3分。按公式 $HSCORE = \sum Pi(i+1)$ ($i = 0, 1, 2, 3$; Pi 表示评分为 i 的比例),计算HSCORE得分。

统计学处理 采用统计学软件SPSS16.0对相关数据进行分析,两样本均数比较采用配对 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察结果 VN核染色质着绿色呈正常结构,VA核染色质着绿色呈固缩状或碎裂状,NVA核染色质着橘红色呈固缩状或碎裂状,NVM核染色质着橘红色呈正常结构(图1)。细胞凋亡率计算结果显示,复方苦参、奥沙利铂和恩度三药联合组与复方苦参和奥沙利铂两药组比较凋亡率未见明显差异($P > 0.05$,表1)。

表1 药物作用48 h后的细胞凋亡率(细胞总数, $n = 300$)

分组	VA	NVA	VN	NVM	凋亡率(%)
对照组	2	3	259	36	1.67
两药组	82	51	83	84	44.33 ^b
三药组	102	37	90	71	46.33 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组。VN: 活细胞; VA: 早期凋亡细胞; NVA: 晚期凋亡细胞; NVM: 死细胞。

2.2 TUNEL观察结果 药物作用于SMMC-7721细胞后,用TUNEL检测细胞核的染色情况,凋亡细胞的细胞核塌陷固缩,被染上深褐色(图2)。在阳性对照组,经过脱氧核糖核酸酶 I (deoxyribonuclease I, DNase I) 处理后,染色体DNA双链断裂较充分,视野中细胞核几乎全部染成深褐色。而在阴性对照组,几乎没有细胞核被染上深褐色,因此在苏木精复染时被染上了淡紫色。

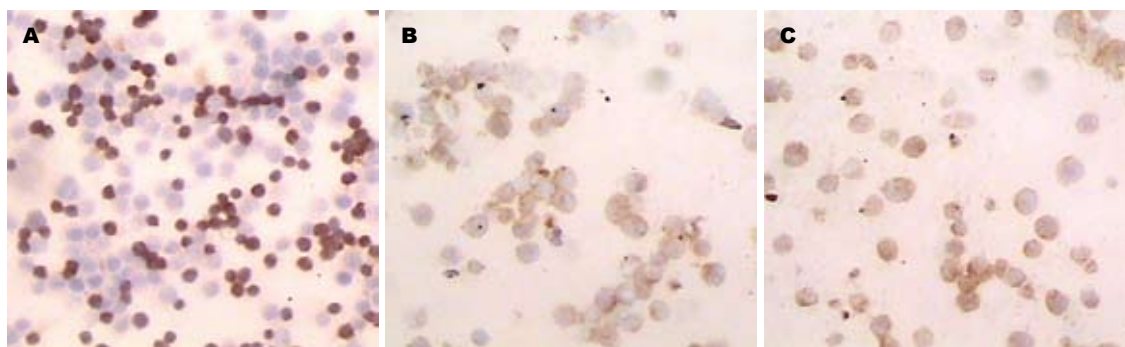


图 3 免疫组织化学示各组Survivin蛋白的表达($\times 200$). A: 对照组强阳性; B: 两药组弱阳性; C: 三药组弱阳性.

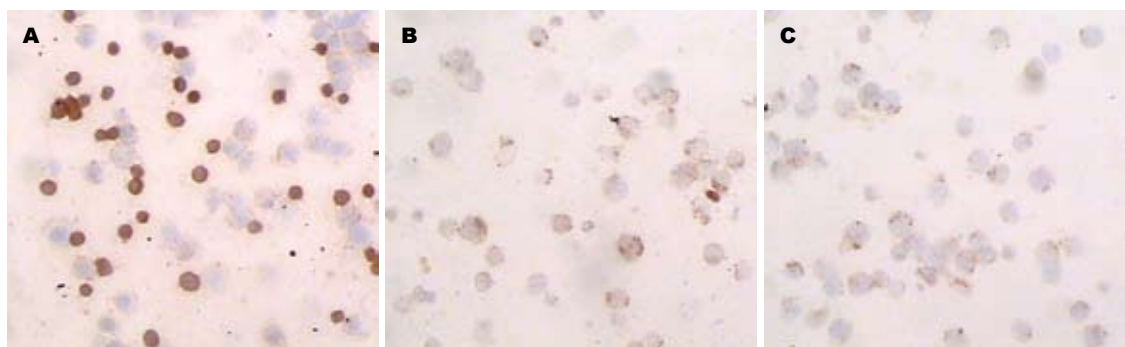


图 4 免疫组织化学示各组Bcl-2蛋白的表达($\times 200$). A: 对照组强阳性; B: 两药组弱阳性; C: 三药组弱阳性.

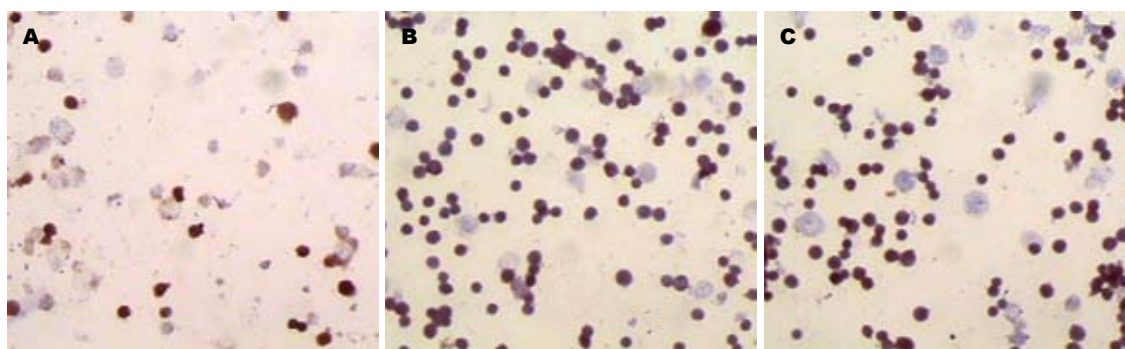


图 5 免疫组织化学示各组caspase-3蛋白的表达($\times 200$). A: 对照组弱阳性; B: 两药组强阳性; C: 三药组强阳性.

在药物组中, 因为非特异性吸附, 也有较多细胞被染上褐色, 但是仔细鉴别, 只有凋亡的细胞核不但染成深褐色, 而且颜色浓重, 体积较小, 符合凋亡时细胞核固缩的特征. 两药组凋亡率为36.3%, 而三药组为34.2%, 两组间差异无统计学意义($P>0.05$).

2.3 药物对SMMC-7721细胞凋亡相关蛋白Survivin、Bcl-2、caspase-3表达的影响 药物作用于SMMC-7721细胞48 h后, 用免疫组织化学法检测细胞凋亡相关基因蛋白Survivin、Bcl-2、caspase-3的表达, Survivin表达定位在细胞质中, Bcl-2表达定位在细胞膜或细胞质中, caspase-3的阳性表达可见于细胞质和细胞核. 免疫组

织化学检测结果显示, 两药组与三药组中Survivin、Bcl-2表达均减弱($P<0.01$), caspase-3表达增强($P<0.01$), 但两组之间差异不明显($P>0.05$, 图3-5, 表2).

3 讨论

复方苦参是由苦参、白茯苓等提取制成的现代中药制剂, 研究表明, 该药可有效缩小或稳定瘤体, 改善患者疼痛、发热、出血、乏力等临床症状, 配合放化疗可减毒增效、抑制肿瘤生长^[2]. 实验研究发现, 复方苦参对肝癌SGC-7901、HepG2和BEL-7402细胞具有明显的体外杀伤作用, 影响SGC-7901及HepG2的细胞周期, 促进凋亡^[3];

■应用要点

复方苦参对肝癌SGC-7901、HepG2和BEL-7402细胞具有明显的体外杀伤作用, 影响SGC-7901及HepG2的细胞周期, 促进凋亡.

同行评价

本文新颖性较好,设计合理,讨论全面,为进一步探讨提高肝癌疗效的综合治疗方案提供了新思路。

表 2 药物作用48 h后细胞凋亡相关蛋白的表达变化 (mean $\pm$ SD, 分)

分组	HSCORE得分		
	Survivin	Bcl-2	caspase-3
对照组	2.485 $\pm$ 0.013	2.195 $\pm$ 0.021	1.536 $\pm$ 0.007
两药组	1.426 $\pm$ 0.007 ^b	1.308 $\pm$ 0.012 ^b	2.503 $\pm$ 0.017 ^b
三药组	1.442 $\pm$ 0.011 ^b	1.298 $\pm$ 0.008 ^b	2.526 $\pm$ 0.013 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

对人肝癌细胞SMMC-7721^[4]、人结肠癌细胞SW480^[5]、人前列腺癌细胞PC-3^[6]等也均有诱导凋亡的作用。第4代铂类药物奥沙利铂是临床常用的化疗药物,他以DNA为作用部位,铂原子与DNA结合后形成链内与链间交联,抑制DNA的合成与复制,起到抗肿瘤的作用。实验研究显示,奥沙利铂对多种肝癌细胞的抑制作用均较其他铂类显著,且毒性较低^[7]。2004年ASCO会议上,Yen等^[8]报道了奥沙利铂单药治疗晚期肝癌的II期临床研究,随后我们及国内外的一些学者开展的奥沙利铂联合氟尿嘧啶、卡培他滨、吉西他滨等治疗肝癌的临床研究^[9-12],均显示了一定的疗效。在此基础上,由秦叔逵等牵头在亚太地区开展了FOLFOX4方案(奥沙利铂+氟尿嘧啶+亚叶酸钙)与阿霉素对照治疗晚期原发性肝癌的III期临床研究,在今年的ASCO年会上报告了最终研究结果,显示FOLFOX4组在中位无进展生存期、中位总生存等方面优于阿霉素,首次证明了以奥沙利铂为主的系统性化疗可以延长肝癌患者生存^[13]。内皮抑素(endostatin, ES)是一种广谱的内源性血管形成抑制因子,具有强效和选择性抗血管生成作用。血管内皮抑素通过特异性作用于新生血管的内皮细胞并抑制内皮细胞迁移,诱导其凋亡而直接发挥抗血管生成作用;还可通过调节肿瘤细胞表面血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达及蛋白水解酶的活性,多靶点地发挥抗血管生成作用,间接导致肿瘤休眠或退缩^[14]。恩度是我国自主开发的重组人血管ES,其III期和IV期临床研究显示,恩度联合一线化疗方案治疗晚期非小细胞肺癌可显著提高客观有效率和疾病控制率,且没有显著增加化疗的不良反应^[15,16]。受此启发,我们开展了恩度联合化疗治疗多种恶性肿瘤的临床研究,并取得了一定的疗效,且安全性和耐受性较好^[17]。肝癌是典型的富血管肿瘤,肝内丰富的血管为肝癌细胞产生的VEGF发挥诱导血管内皮细胞迁移、增殖及肿瘤血管生

成提供了良好的基础,因此,抗肿瘤血管生成治疗对于肝癌具有重要意义。

一般认为,中药与化疗药物联合应用,可减少患者的不良反应,提高机体免疫功能和改善生活质量,起到减毒增效作用^[18]。我们前期研究发现^[1],复方苦参、奥沙利铂均有诱导肝癌细胞株SMMC-7721凋亡的作用,当两者联合后,这种作用得到明显加强,提示中药与化疗药物联合有协同增效作用,那么在此基础上增加抗血管生成药物恩度能否进一步提高疗效?为此开展了进一步的研究。体外研究结果表明,无论是荧光显微镜观察法还是TUNEL均发现复方苦参和奥沙利铂联合应用对肝癌细胞株SMMC-7721有显著的诱导凋亡作用,但当在此基础上联合恩度后,这种作用却未能进一步提高。

Survivin是迄今发现的最强的凋亡抑制因子,其主要功能就是抗凋亡,在肝癌组织和几乎所有肝癌细胞株中均有高表达^[19]。Bcl-2蛋白表达在多种肿瘤中均出现异常,特别是他与Survivin蛋白在肝癌组织中的表达呈显著正相关,二者在肝癌的发展中起到协同作用^[20]。caspase-3是细胞蛋白酶级联反应的必经之路,有研究发现,Survivin表达阳性的肝癌组织中caspase-3的表达显著增高,推测Survivin对凋亡的抑制可能由caspase-3介导^[21]。因此,我们检测了复方苦参与奥沙利铂两药联合及其与恩度三药联合对Survivin、Bcl-2和caspase-3蛋白表达的影响,与对照组相比,两药组与三药组均下调了Survivin、Bcl-2蛋白的表达,上调了caspase-3蛋白的表达($P < 0.05$),因此推测两药联合及三药联合诱导肝癌细胞凋亡的作用可能是通过调节Survivin、Bcl-2、caspase-3蛋白的表达来实现的。但是与两药组比较,三药组对诱导肝癌细胞凋亡及蛋白表达的影响未见显著性差异($P > 0.05$),我们推测其原因主要是由于目前所知恩度的作用靶点在VEGF,通过抑制肿瘤新生血管的形成、切断肿瘤的营养供应起到抗肿瘤的作用,而体外培养的肿瘤细胞主要依赖于弥散获得营养,不像体内那样主要依靠新生血管供应养分,故在体外实验中复方苦参、奥沙利铂联合恩度未见效果增强。

总之,在体外实验中,复方苦参、奥沙利铂两药或与恩度三药联用均可诱导肝癌细胞凋亡,但三药联用未能明显提高疗效;其诱导凋亡的机制可能与抑制Survivin和Bcl-2蛋白的表达以及促进caspase-3蛋白的表达有关,但是否还存在

其他机制, 尚需进一步的探讨。

4 参考文献

- 1 华海清, 姜子瑜, 杨爱珍, 秦叔逵. 复方苦参注射液联合奥沙利铂对人肝癌细胞株SMMC-7721增殖与凋亡的影响. 临床肿瘤学杂志 2010; 15: 10-15
- 2 陈坚, 梅琪, 徐迎春, 杜佳, 魏燕, 徐周敏. 复方苦参注射液对恶性肿瘤患者伽玛刀放射治疗后T淋巴细胞亚群的影响. 中西医结合学报 2006; 4: 78-79
- 3 李芮, 杜健鹏, 侯仰韶, 陈泽涛. 复方苦参注射液对SGC-7901, HepG2和BEL-7402肿瘤细胞作用的实验研究. 肿瘤研究与临床 2006; 18: 8-10
- 4 叶正青, 梁重峰, 丁海, 易永祥, 周继宗. 复方苦参注射液对人肝癌SMMC-7721肿瘤细胞作用的实验研究. 山东医药 2009; 49: 44-45
- 5 周林, 韩石平, 杨冲, 金毅, 梁保康. 复方苦参含药血清体外诱导人结肠癌细胞SW480的凋亡. 中国中西医结合外科杂志 2006; 12: 54-56
- 6 张晏, 冯传首. 复方苦参注射液对PC-3细胞凋亡及cyclinE蛋白表达的影响. 中国医院用药评价与分析 2008; 8: 287-288
- 7 钱军, 秦叔逵, 杨爱珍, 徐海军, 华海清, 刘沈林. 不同铂类药物对人肝癌细胞株抑制作用的实验研究. 临床肿瘤学杂志 2009; 14: 414-417
- 8 Yen Y, Doroshow J, Leong L, Lim D, Wagman L, Morgan R, Frankel P, Lenz H, Gandara D, Shibata S. Phase II study of oxaliplatin in patients with unresectable, metastatic or recurrent hepatocellular cancer. *J Clin Oncol*, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) 2004; 22: 4169
- 9 秦叔逵, 曹梦苒, 钱军, 华海清, 王琳, 何泽明. 奥沙利铂为主的FOLFOX方案治疗晚期原发性肝癌. 临床肿瘤学杂志 2005; 10: 58-60
- 10 Boige V, Raoul JL, Pignon JP, Bouché O, Blanc JF, Dahan L, Jouve JL, Dupouy N, Ducreux M. Multicentre phase II trial of capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) in patients with advanced hepatocellular carcinoma: FFO3-03 trial. *Br J Cancer* 2007; 97: 862-867
- 11 Louvet C, Labianca R, Hammel P, Lledo G, Zampino MG, André T, Zaniboni A, Ducreux M, Aitini E, Taïeb J, Faroux R, Lepere C, de Gramont A. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3509-3516
- 12 Uhm JE, Park JO, Lee J, Park YS, Park SH, Yoo BC, Paik SW, Koh KC, Kang WK, Lim HY. A phase II study of oxaliplatin in combination with doxorubicin as first-line systemic chemotherapy in patients with inoperable hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 63: 929-935
- 13 Qin S, Bai Y, Ye S, Fan J, Lim H, Cho JY, Thongprasert S, Chao Y, Rau K, Sun Y. Phase III study of oxaliplatin plus 5-fluorouracil/leucovorin (FOLF-FOX4) versus doxorubicin as palliative systemic chemotherapy in advanced HCC in Asian patients. *J Clin Oncol* 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) 2010; 28: 4008
- 14 Noël A, Foidart JM. [Preclinical features of anti-angiogenesis therapy] *Bull Acad Natl Med* 2000; 184: 569-577; discussion 578
- 15 王金万, 孙燕, 刘永煜, 于起涛, 张沂平, 李凯, 朱允中, 周清华, 侯梅, 管忠震, 李维廉, 庄武, 王东林, 梁后杰, 秦凤展, 卢辉山, 刘晓晴, 孙红, 张燕军, 王杰军, 罗素霞, 杨瑞合, 涂远荣, 王秀问, 宋恕平, 周静敏, 游丽芬, 王竞, 姚晨. 重组人血管内皮抑素联合NP方案治疗晚期NSCLC随机、双盲、对照、多中心Ⅲ期临床研究. 中国肺癌杂志 2005; 8: 283-290
- 16 Wang J, Sun Y, Qin S, Endostar Phase IV Study Group. Results of phase IV clinical trial of combining endostar with chemotherapy for treatment of advanced non-small cell lung cancer(NSCLC). *J Clin Oncol* 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition) 2010; 28: 7598
- 17 刘秀峰, 秦叔逵, 王琳, 钱军, 陈映霞, 何泽明, 龚新雷, 杨柳青. 恩度与化疗联合治疗多种晚期恶性肿瘤的临床观察. 临床肿瘤学杂志 2007; 12: 241-250
- 18 段萍, 肖敏伟, 肖文, 李平. 复方苦参注射液在晚期非小细胞肺癌化疗中的增效减毒作用. 中国新药杂志 2009; 18: 1760-1763
- 19 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 1080-1085
- 20 李晓丽, 彭利, 张青云, 张萌, 王顺祥, 唐瑞峰, 张凤瑞. survivin、bcl-2在肝细胞肝癌组织中的表达及意义. 山东医药 2007; 47: 34-35
- 21 王颖, 吴亮, 王家. Survivin, Caspase-3在原发性肝癌中的表达及意义. 中西医结合肝病杂志 2005; 15: 329-333

编辑 李薇 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.

氧化苦参碱对人胰腺癌细胞血管内皮生长因子表达的影响

冀润利, 夏时海, 李飞, 邸瑶

■背景资料

胰腺癌是一种恶性程度高的消化系统肿瘤, 其发病率呈显著上升趋势。早期出现侵袭转移行为严重影响了胰腺癌患者生存率的提高, 应用血管形成抑制剂, 防治肿瘤的侵袭、转移是降低肿瘤死亡率的重要途径之一。

冀润利, 夏时海, 中国人民武装警察部队医学院附属医院肝胆胰脾内科 天津市 300162

李飞, 中国人民武装警察部队新疆总队医院内科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

邸瑶, 中国人民武装警察部队医学院生理与病理生理学教研室 天津市 300162

冀润利, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤及消化疾病的临床、教学和科研工作。

武警部队科研基金资助项目, No. WKH2006-9

武警医学院科研基金资助项目, No. WY2008-13

作者贡献分布: 冀润利与夏时海对此文所作贡献均等; 此课题由冀润利与夏时海设计; 研究过程由冀润利与邸瑶操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李飞提供; 数据分析由冀润利完成; 本论文写作由冀润利、夏时海及邸瑶完成。

通讯作者: 夏时海, 博士, 副主任医师, 副教授, 300162, 天津市, 中国人民武装警察部队医学院附属医院肝胆胰脾内科。

xshhcx@sina.com

电话: 022-60578765

收稿日期: 2010-08-27 修回日期: 2010-11-05

接受日期: 2010-11-10 在线出版日期: 2010-11-18

Oxymatrine down-regulates VEGF expression in human pancreatic carcinoma SW1990 cells

Run-Li Ji, Shi-Hai Xia, Fei Li, Yao Di

Run-Li Ji, Shi-Hai Xia, Department of Hepatopancreatobiliary and Splenic Medicine, Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Fei Li, Department of Gastroenterology, Xinjiang Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Urumqi 830000, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China

Yao Di, Department of Physiology, Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Chinese People's Armed Police Force, No. WKH2006-9; and the Scientific Research Foundation of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, No. WY2008-13

Correspondence to: Associate Professor Shi-Hai Xia, Department of Hepatopancreatobiliary and Splenic Medicine, Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China. xshhcx@sina.com

Received: 2010-08-27 Revised: 2010-11-05

Accepted: 2010-11-10 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To observe the influence of oxymatrine (OM) treatment on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human pancreatic carcinoma SW1990 cells and to assess the mechanism behind the cytotoxicity of OM against

SW1990 cells.

METHODS: Cultured SW1990 cells were divided into two groups: control group and OM group. The OM group was further divided into three subgroups and treated with 1, 2 and 4 g/L OM, respectively. The mRNA and protein expression of VEGF in SW1990 cells was analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. The changes in the cytotoxicity of OM against SW1990 cells were assessed by MTT assay. The effect of OM on the invasiveness of SW1990 cells was analyzed using cell invasion assay kit.

RESULTS: The expression levels of VEGF mRNA in SW1990 cells were significantly lower in the three OM subgroups than in the control group (0.648 ± 0.043 , 0.395 ± 0.012 , 0.317 ± 0.031 vs 0.889 ± 0.028 , all $P < 0.05$). Similar results were obtained for the protein expression of VEGF (1.668 ± 0.212 , 1.523 ± 0.345 , 1.388 ± 0.187 vs 1.876 ± 0.327 , all $P < 0.05$). The invasion of SW1990 cells in the OM subgroups was markedly lower than that in the control group (325 ± 64.43 , 206 ± 84.76 , 124 ± 46.78 vs 498 ± 78.54 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: OM is able to reduce the invasion of SW1990 cells possibly by down-regulating the expression of VEGF.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Tumor invasion; Vascular endothelial growth factor; Oxymatrine

Ji RL, Xia SH, Li F, Di Y. Oxymatrine down-regulates VEGF expression in human pancreatic carcinoma SW1990 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3402-3406

摘要

目的: 探讨氧化苦参碱(OM)对人胰腺癌细胞株SW1990的杀伤作用及机制。

方法: 取人胰腺癌细胞SW1990为研究对象, 随机分为对照(control)组和OM组, OM组再按照OM剂量不同, 分为1、2、4 g/L 3组。用RT-PCR和Western blot检测血管内皮生长因子(VEGF) mRNA和蛋白的表达变化, 用四甲基

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

偶氮唑蓝(MTT)比色法检测OM对SW1990细胞的杀伤作用, 细胞侵袭力测定试剂盒检测细胞侵袭力。

结果: RT-PCR显示VEGF mRNA在SW1990细胞中的表达, OM组较control组显著降低(0.648 ± 0.043 , 0.395 ± 0.012 , 0.317 ± 0.031 vs 0.889 ± 0.028 , $P < 0.05$), 在VEGF蛋白检测中, 也得到同样结果(1.668 ± 0.212 , 1.523 ± 0.345 , 1.388 ± 0.187 vs 1.876 ± 0.327 , 均 $P < 0.05$)。细胞侵袭力测定显示OM各组侵袭过Matrigel胶的细胞数显著低于control组(325 ± 64.43 , 206 ± 84.76 , 124 ± 46.78 vs 498 ± 78.54 , $P < 0.05$), OM组细胞侵袭能力较对照组显著降低。

结论: OM可能通过下调VEGF的表达, 抑制胰腺癌细胞侵袭转移能力。

关键词: 胰腺癌; 肿瘤侵袭; 血管内皮生长因子; 氧化苦参碱

冀润利, 夏时海, 李飞, 邱瑶. 氧化苦参碱对人胰腺癌细胞血管内皮生长因子表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3402-3406

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3402.asp>

0 引言

胰腺癌是一种恶性程度高、易转移且预后极差的消化系肿瘤^[1]。近年来胰腺癌的发病率在国内外均呈显著上升趋势^[2-4]。肿瘤的发生发展是一个多因素、多基因、多步骤的复杂过程^[5], 侵袭转移行为是胰腺癌等恶性肿瘤最本质的特性, 早期出现侵袭转移行为严重影响了胰腺癌患者生存率的提高^[6]。癌的侵袭转移是一个复杂的过程, 但肿瘤的生长和转移很大程度上依赖肿瘤血管的形成^[7]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)具有特异性促内皮细胞有丝分裂、促血管通透性增加的活性作用, 有利于肿瘤的转移和扩散^[8,9]。VEGF可能与胰腺癌预后相关, 在胰腺癌的发展、浸润和转移中起着重要作用^[10]。因此应用血管形成抑制剂, 防治肿瘤的侵袭、转移是降低肿瘤死亡率的重要途径之一^[11,12]。氧化苦参碱(oxymatrine, OM)是从中药苦参、苦豆子、广豆根中提取的一种生物碱^[13], 有多方面的药理作用^[14]。研究发现OM不但对肿瘤细胞和血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)增殖本身有一定的抑制作用, 而且对肿瘤细胞诱导的VEC增殖具有较强的抑制作用^[15]。本文以人胰腺癌细胞株SW1990为研究对

象, 研究OM对SW1990中VEGF蛋白及mRNA表达的影响, 探讨OM对SW1990体外侵袭转移能力的影响作用, 为中药OM治疗胰腺癌提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料 优质胎牛血清购自中科院天津血液学研究所; RPMI 1640培养基购自Gibco公司; OM购自正大天晴公司, VEGF抗体购自Santa Cruz公司; Triol购自Invitrogen公司; PCR Marker、RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司; Matrigel胶购自BD Biosciences公司、Transwell小室购自Milipore公司、VEGF引物合成购自Invitrogen生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: SW1990细胞由协和医科大学基础学院细胞中心提供, 细胞生长于含100 mL/L小牛血清的DMEM培养液中, 置于37℃、50 mL/L CO₂的孵育箱(相对湿度为95%)中培养。

1.2.2 分组: 随机分为对照组和OM组。经预实验证明, 在培养液中加入1-4 g/L OM均可抑制细胞生长, 故OM组再随机分为1, 2, 4 g/L 3组。选用含100 mL/L FBS的RPMI 1640完全培养基, 待细胞长满培养瓶底部70%-80%时, 用0.25%胰蛋白酶和0.03% EDTA(1:1)消化传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.3 RT-PCR: 采用Triol试剂从细胞中提取总RNA, 检测RNA的含量和纯度($A_{260}/A_{280} = 1.8-2.0$)。以1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性(28S和18S RNA条带比值 ≥ 2.0)。用1 μ g细胞总RNA进行逆转录, PCR反应条件如表1。

1.2.4 细胞侵袭实验: 收集对数生长期细胞, 分别用含有PBS(对照组), 和1, 2, 4 g/L OM的DMEM培养基悬浮细胞, 制成 1×10^6 /mL的单细胞悬液, 按照细胞侵袭测定试剂盒说明书操作。细胞在小室内培养48 h后, 染色并拍照, 显微镜下观察穿过膜的细胞数, 计数中间及四周5个高倍($\times 400$)镜下视野细胞数, 计算平均数。

统计学处理 数据采用SPSS11.5统计分析软件进行处理, 所得数值以mean $\pm$ SD表示, 组间比较采用方差分析和t检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 OM对SW1990细胞中VEGF mRNA的影响 结果显示SW1990细胞在基因水平有VEGF mRNA的表达。不同浓度的OM(1, 2, 4 g/L)作

■研发前沿

以VEGF为靶点的抗肿瘤血管新生治疗是目前研究的热点, 国内外研究证实VEGF抗体、VEGF受体拮抗剂可以明显减少肿瘤的血管新生、抑制肿瘤的生长, 但他们中多数用在人体内不理想, 存在着吸收、降解、毒性等问题, 因此寻找一种降低胰腺癌侵袭转移力且毒性较小的抗血管生成药物, 有着不可估量的临床价值和现实意义。

■相关报道

Griffin等的实验证实胰腺癌模型动物在注射VEGF-R抑制剂后, 肿瘤血供减少50%, 胰腺癌的生长受到抑制。

■创新盘点

本文以胰腺癌细胞株SW1990为研究对象,研究OM对SW1990中VEGF蛋白及mRNA表达的影响,探讨OM对SW1990体外侵袭转移干预作用的影响,为中药OM治疗胰腺癌提供实验数据。

表 1 PCR反应条件

VEGF	β -actin
FP: 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3'	FP: 5'-TGTTTGAGACCTTCAACACCC-3'
RP: 5'-TCTCTCCTATGTGCTGGCCT-3'	RP: 5'-AGCACTGTGTGGCGTACAGG-3'
扩增片段505 bp	扩增片段540 bp
94 °C, 1 min	94 °C, 1 min
61 °C, 45 s	58 °C, 30 s
72 °C, 1 min	72 °C, 1 min
30个循环	30个循环

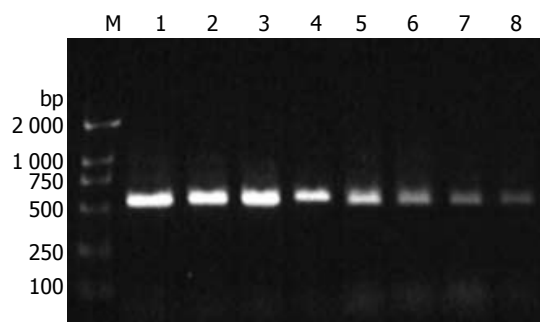


图 1 PCR示OM对SW1990细胞中VEGF mRNA的影响. M: DNA Marker; 1-4: β -actin对照、1 g/L、2 g/L和4 g/L组(540 bp); 5-8: VEGF对照、1 g/L、2 g/L和4 g/L OM组(505 bp).

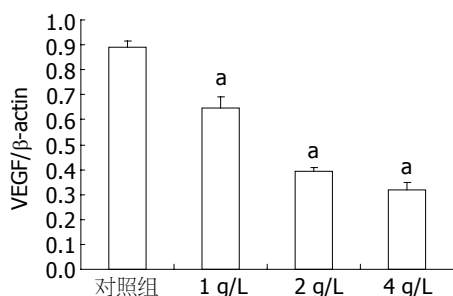


图 2 不同浓度OM对VEGF mRNA的影响. ^a $P < 0.05$ vs 对照组.

用于胰腺癌细胞SW1990 24 h, VEGF mRNA表达量与对照组相比显著降低(0.648 ± 0.043 , 0.395 ± 0.012 , 0.317 ± 0.031 vs 0.889 ± 0.028 , 均 $P < 0.05$,图1, 2).

2.2 OM对SW1990细胞中VEGF蛋白表达的影响 不同浓度的OM作用于胰腺癌细胞SW1990 24 h后, VEG蛋白表达与对照组比较显著减低(1.668 ± 0.212 , 1.523 ± 0.345 , 1.388 ± 0.187 vs 1.876 ± 0.327 , 均 $P < 0.05$, 图3, 4).

2.3 OM对SW1990细胞侵袭力的影响 OM处理SW1990细胞48 h后, 侵袭力测定显示不同浓度OM组侵袭过细胞Matrigel胶的细胞数显著低于对照组(325 ± 64.43 , 206 ± 84.76 , 124 ± 46.78 vs 498 ± 78.54), OM各组的细胞侵袭力均显著低于

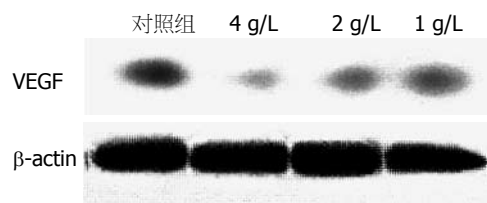


图 3 Western blot示不同浓度OM对SW1990细胞中VEGF蛋白表达的影响.

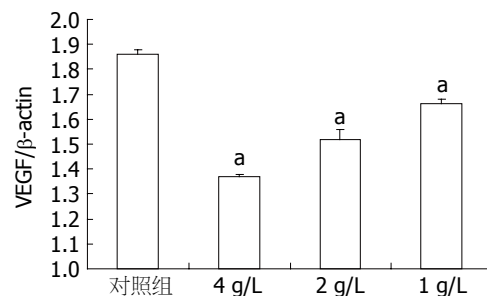


图 4 不同浓度OM对VEGF蛋白的影响. ^a $P < 0.05$ vs 对照组.

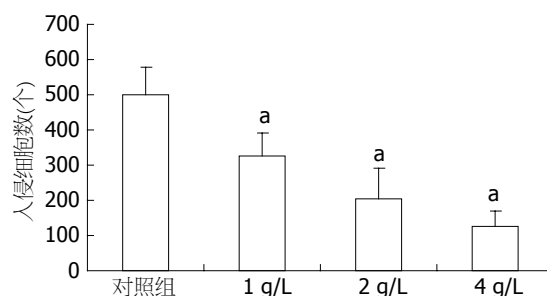


图 5 不同浓度OM对SW1990细胞侵袭力的影响. ^a $P < 0.05$ vs 对照组.

对照组($P < 0.05$). OM各组进入微孔膜内的细胞数也显著低于对照组(385 ± 58.9 , 287 ± 79.8 , 186 ± 60.9 vs 586 ± 85.8 , 均 $P < 0.05$, 图5, 6).

3 讨论

现已证实肿瘤血管生成是实体瘤产生、发展、转移过程中一个关键步骤. 血管是瘤细胞生命

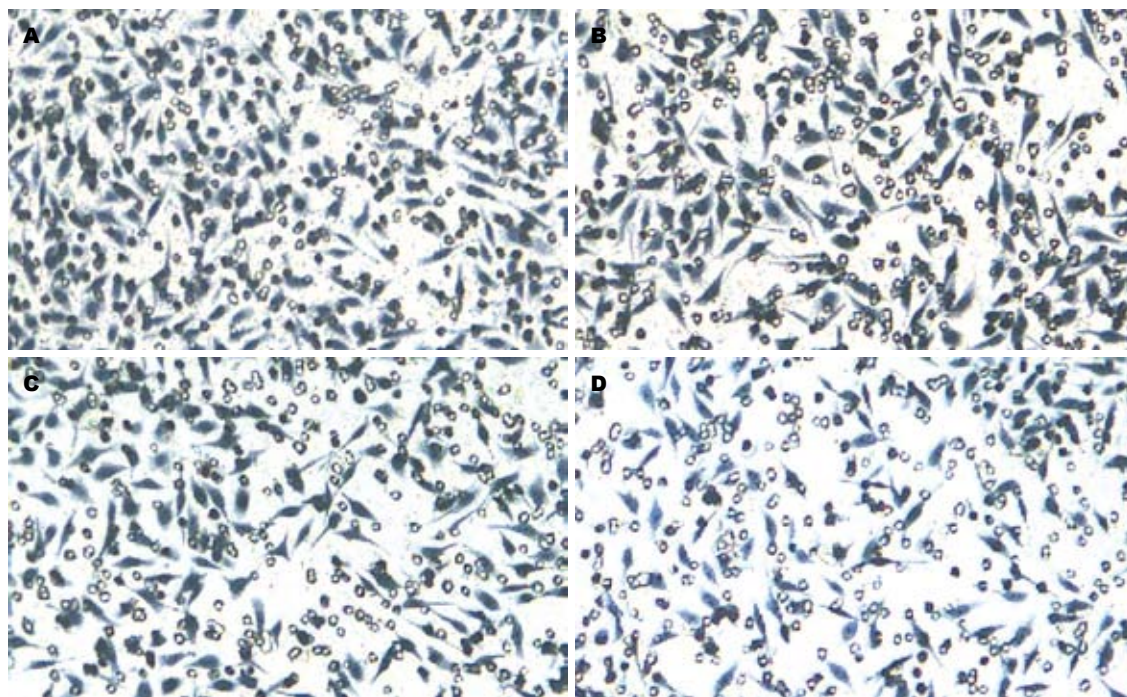


图 6 侵袭到微孔膜下表面的EC109细胞(倒置显微镜×200). A: 对照组; B: 1 g/L OM组; C: 2 g/L OM组; D: 4 g/L OM组.

■应用要点
OM有望成为新的抗肿瘤血管生成药物,为临床治疗肿瘤提出新的思路.

线及迁移通道, 肿瘤的血管生成极为复杂, 其中VEGF对血管生成的调控作用较强, 且特异性高^[16], 在肿瘤血管生成、肿瘤生长和转移中起到重要作用^[17,18]. 胰腺癌血管生成是指在原有血管的基础上通过内皮细胞增殖、基底膜与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解、内皮细胞迁移、重构以“出芽”的方式形成新的毛细血管^[19]. 在这个过程中有多种生长因子、ECM组分、蛋白水解酶和细胞黏附分子等因素参与血管生成的调控^[20]. 抗血管生成治疗可减少胰腺癌的血供, 从而抑制胰腺癌的生长和转移, 作为辅助治疗已显示出其重要作用^[21].

目前已进入II-III期临床试验的抗血管生成药物有两大类, 分别是VEGF抑制剂, 如烟曲霉素衍生物(TNP-470、SU6668、SU5416等), 以及碱性成纤维细胞生长因子抑制剂, 如干扰素, 反应停等. 还有一些抑制癌细胞黏附、移行的药物亦在研究之中. 这些化合物经临床前研究发现均有一定抗肿瘤侵袭、转移作用, 临床试验表明VEGF抑制剂疗效较好. 以VEGF为靶点的抗肿瘤血管新生治疗是目前研究的热点. 国内外已有多项研究证实应用VEGF抗体、VEGF受体拮抗剂, 抑制VEGF的表达或阻断其信号传导途径, 可以明显地减少肿瘤的血管新生、抑制肿瘤的生长^[22,23].

目前的抗血管生成药通过增加剂量可以完全抑制肿瘤的生长^[24,25], 但他们中多数用在人体

内不理想, 存在着吸收、降解、毒性等问题^[26], 比如在抑制肿瘤生长的同时, 也容易损失正常组织和血管, 包括心血管、内分泌和神经系统. 如bevacizumab(商品名Avastin)^[27]会增加高血压、血栓形成、胃肠道穿孔和出血的危险^[28], 且随着剂量的增加, 不良反应会更明显. 因此寻找一种降低胰腺癌侵袭转移力且毒性较小的抗血管生成药物, 有着不可估量的临床价值和现实意义.

OM化学分子式 $C_{15}H_{24}N_2O_2$, 相对分子量282, 是苦参型生物碱的主要活性成分, 有抗菌、抗炎、抗风湿、抗肿瘤、抗过敏、免疫及生物反应调节作用等^[29]. 大量的文献表明OM可以抑制肿瘤细胞的增殖、转移, 诱导其凋亡、及向正常细胞分化, 具有抗肿瘤的活性^[30]. OM在代谢水平对肿瘤细胞发生影响, 通过调节抑癌基因和癌基因的表达, 影响癌细胞的代谢, 抑制其增殖^[31-33].

本实验研究表明OM对人胰腺癌细胞SW1990具有杀伤作用. 已有大量的研究证明, 在胰腺癌组织和细胞中存在VEGF的高表达^[34,35], 且VEGF的表达于胰腺癌的转移密切相关. 我们的研究亦证实, 在SW1990细胞中存在VEGF的高表达, 通过划痕实验证明OM可以明显抑制肿瘤细胞的迁移能力, 以及肿瘤细胞对基底膜的穿透性. OM作用SW1990细胞48 h后, VEGF mRNA及其蛋白的表达明显下调, 且随着OM浓度增大, 其表达逐渐降低. 提示OM可以抑制胰

同行评价

本文创新性较好, 研究结果可靠, 为今后OM治疗胰腺癌的临床应用奠定了基础。

腺癌SW1990细胞VEGF的表达, 抑制血管的生成, 降低SW1990细胞的侵袭力, 阻止肿瘤生长和转移。

OM的毒性较小, 且具有提高白细胞数的作用, 因此, OM有望成为新的抗肿瘤血管生成药物, 如加强联合用药的研究, 更能充分发挥传统中药在抗肿瘤方面的独特效用, 为临床治疗肿瘤提出新的思路。大力研发具有我国自主知识产权的抗转移药物, 具有不可估量的经济利益和战略利益。

参考文献

- Rosenberg L. Pancreatic cancer: a review of emerging therapies. *Drugs* 2000; 59: 1071-1089
- 2005年上海市市区恶性肿瘤发病率. *肿瘤* 2008; 28: 726-727
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300
- 刘海林, 王磊. 胰腺癌早期诊断与治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3475-3479
- 张俊华, 韦达, 陈桂英, 黄润生, 俞力. NF- κ B基因对胰腺癌细胞侵袭作用的影响及机制. *山东医药* 2010; 50: 7-9
- 孙燕, 周际昌. 临床肿瘤内科手册. 第3版. 人民卫生出版社, 1996: 218
- Fanelli M, Locopo N, Gattuso D, Gasparini G. Assessment of tumor vascularization: immunohistochemical and non-invasive methods. *Int J Biol Markers* 1999; 14: 218-231
- Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 793-800
- Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005; 69 Suppl 3: 11-16
- 唐来, 刘煦禾, 赵永春, 杜媛, 李峰. VEGF在胰腺癌组织芯片中的表达及其临床意义的研究. *苏州大学学报(医学版)* 2009; 29: 733-735
- 孙燕, 袁耀宗. 抗血管生成治疗在胰腺癌治疗中的研究进展. *国际消化病杂志* 2007; 27: 103-107
- Bagri A, Berry L, Gunter B, Singh M, Kasman I, Damico LA, Xiang H, Schmidt M, Fuh G, Hollister B, Rosen O, Plowman GD. Effects of anti-VEGF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3887-3900
- 朱晓伟, 宝金荣, 布仁. 苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用研究进展. *化学试剂* 2010; 32: 82-84
- 王昱良, 郑永青, 夏时海, 汪海燕, 苏丽婷, 吴双. 氧化苦参碱对慢性胰腺炎胰腺组织中 I 型胶原及 α -SMA的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1331-1336
- Ho JW, Ngan Hon PL, Chim WO. Effects of oxymatrine from Ku Shen on cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9: 823-826
- 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: 2894-2900
- Alvarez RH, Valero V, Hortobagyi GN. Emerging targeted therapies for breast cancer. *J Clin Oncol*

2010; 28: 3366-3379

- Tabernero J. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 203-220
- 池鸣鸣, 黄华, 施公胜. 胰腺癌血管生成与其生物学行为的关系研究. *中国临床医学* 2003; 10: 552-553
- 陈哲京, 倪泉兴, 傅德良, 张启瑜. 胰腺癌血管生成特征对肿瘤血供的影响. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 851-852
- Schomber T, Kopfstein L, Djonov V, Albrecht I, Baeriswyl V, Strittmatter K, Christofori G. Placental growth factor-1 attenuates vascular endothelial growth factor-A-dependent tumor angiogenesis during beta cell carcinogenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 10840-10848
- Belotti D, Calcagno C, Garofalo A, Caronia D, Riccardi E, Giavazzi R, Tarabozetti G. Vascular endothelial growth factor stimulates organ-specific host matrix metalloproteinase-9 expression and ovarian cancer invasion. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 525-534
- 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
- Loges S, Schmidt T, Carmeliet P. Mechanisms of Resistance to Anti-Angiogenic Therapy and Development of Third-Generation Anti-Angiogenic Drug Candidates. *Gene Cancer* 2010; 1: 12-25
- Sato Y. [Anti-angiogenic drugs] *Nippon Rinsho* 2010; 68: 1054-1058
- Huang KW, Wu HL, Lin HL, Liang PC, Chen PJ, Chen SH, Lee HI, Su PY, Wu WH, Lee PH, Hwang LH, Chen DS. Combining antiangiogenic therapy with immunotherapy exerts better therapeutical effects on large tumors in a woodchuck hepatoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 14769-14774
- Brar VS, Sharma RK, Murthy RK, Chalam KV. Bevacizumab neutralizes the protective effect of vascular endothelial growth factor on retinal ganglion cells. *Mol Vis* 2010; 16: 1848-1853
- Van Meter ME, Kim ES. Bevacizumab: current updates in treatment. *Curr Opin Oncol* 2010; 22: 586-591
- 王俊学, 王国俊. 苦参碱及氧化苦参碱的药理作用及临床应用. *肝脏* 2000; 5: 116-117
- 刘益均, 郑军, 肖文波, 周军. 氧化苦参碱对人胃癌 SGC-7901细胞增殖及血管内皮生长因子表达的影响. *中国癌症杂志* 2010; 20: 22-26
- 李建国, 伍斌, 谢红付, 张江林, 易梅, 李吉. 氧化苦参碱对CD4+CD25+调节性T细胞(Tr)和淋巴细胞增殖的影响. *中国现代医学杂志* 2008; 18: 993-999
- 万旭英, 罗明, 贺平, 吴孟超. 苦参碱和氧化苦参碱体外对人肝癌细胞的诱导分化作用. *中国药理学通报* 2009; 25: 977-999
- 于晓峰, 邹健, 冉志华. 氧化苦参碱对人胃癌细胞杀伤作用的机制. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1725-1730
- 李春龙, 崔云甫, 杜雪飞, 邵升, 钟翔宇. VEGF和MMP-9在胰腺癌侵袭转移中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1012-1016
- 季沅, 张志德, 李建平. 血管内皮生长因子在胰腺癌中的表达及其意义. *齐齐哈尔医学院学报* 2003; 24: 1201-1202

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

冬凌草甲素对人胰腺癌细胞增殖的抑制作用及其机制

刘军楼, 汪悦, 徐力, 杨继兵, 孙志岭, 邓海山, 徐建亚

刘军楼, 汪悦, 徐力, 杨继兵, 孙志岭, 邓海山, 徐建亚, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210046
刘军楼, 讲师, 博士, 主要从事胰腺癌基础与临床研究.
江苏省高校自然科学基金资助项目, No. 08KJB360007
作者贡献分布: 此课题由刘军楼、杨继兵、徐力及汪悦设计; 研究过程刘军楼、杨继兵及徐建亚完成; 研究所用新试剂及分析工具由徐建亚与邓海山提供; 数据分析由刘军楼与孙志岭完成; 论文写作由刘军楼完成.
通讯作者: 徐力, 教授, 210046, 江苏省南京市栖霞区仙林大道138号, 南京中医药大学第一临床医学院. 51995102@163.com
电话: 025-85811644
收稿日期: 2010-08-11 修回日期: 2010-09-11
接受日期: 2010-09-25 在线出版日期: 2010-11-18

Oridonin suppresses the proliferation of human pancreatic carcinoma SW1990 cells

Jun-Lou Liu, Yue Wang, Li Xu, Ji-Bing Yang, Zhi-Ling Sun, Hai-Shan Deng, Jian-Ya Xu

Jun-Lou Liu, Yue Wang, Li Xu, Ji-Bing Yang, Zhi-Ling Sun, Hai-Shan Deng, Jian-Ya Xu, the First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Education Institutions, No. 08KJB360007
Correspondence to: Professor Li Xu, the First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, 138 Xianlin Avenue, Qixia District, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China. 51995102@163.com
Received: 2010-08-11 Revised: 2010-09-11
Accepted: 2010-09-25 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate whether oridonin has anti-proliferation effects against human pancreatic carcinoma SW1990 cells and to explore possible mechanisms involved.

METHODS: SW1990 cells were treated with different concentrations of oridonin. Cell proliferation was measured by MTT assay. Cell morphological changes were observed by laser confocal microscopy after double immunofluorescence staining. Cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM).

RESULTS: Treatment with oridonin significantly inhibited the growth of SW1990 cells. After treatment with oridonin, apoptosis-related

morphological changes, such as condensation of chromatin and nuclear fragmentation, were observed in SW1990 cells. The fluorescence intensity of β -actin in the cytoplasm was increased, especially in the perinuclear area. The early apoptotic rates of SW1990 cells treated with 12.5, 25.0 and 50.0 $\mu\text{mol/L}$ oridonin were significantly higher than those of control cells ($2.17\% \pm 0.57\%$, $5.83\% \pm 0.57\%$, $4.43\% \pm 0.78\%$ vs $0.30\% \pm 0.17\%$, all $P < 0.05$). The late apoptotic and cell necrosis rates were also significantly higher in oridonin-treated cells than in control cells ($5.10\% \pm 0.98\%$, $7.03\% \pm 1.52\%$, $10.13\% \pm 0.70\%$ vs $2.63\% \pm 0.06\%$, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Oridonin can significantly inhibit proliferation and induce apoptosis of SW1990 cells perhaps by altering β -actin depolymerization/polymerization.

Key Words: Oridonin; Pancreatic carcinoma; Antiproliferation; Apoptosis; β -actin

Liu JL, Wang Y, Xu L, Yang JB, Sun ZL, Deng HS, Xu JY. Oridonin suppresses the proliferation of human pancreatic carcinoma SW1990 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3407-3412

摘要

目的: 研究冬凌草甲素(Oridonin)对人胰腺癌SW1990细胞增殖的抑制作用并探究其可能的机制.

方法: 以不同浓度的冬凌草甲素作用于体外培养的SW1990细胞, MTT法检测细胞生长抑制率, 双重免疫荧光染色后激光共聚焦显微镜观察细胞的形态学变化, 流式细胞仪检测细胞凋亡率.

结果: 冬凌草甲素对人胰腺癌SW1990细胞具有明显增殖抑制作用. 给药组细胞核DAPI染色可见典型的凋亡形态学改变, 细胞质骨架蛋白 β -肌动蛋白荧光染色增强, 尤其是细胞中央近细胞核处荧光染色明显增强. 12.5, 25.0, 50.0 $\mu\text{mol/L}$ 给药组早期凋亡率显著高于未给药组($2.17\% \pm 0.57\%$, $5.83\% \pm 0.57\%$, $4.43\% \pm 0.78\%$ vs $0.30\% \pm 0.17\%$, 均 $P < 0.05$), 晚期

■背景资料

胰腺癌是一病情凶险、治愈率低、预后极差的消化系统恶性肿瘤, 近年来发病率有升高的趋势. 目前中晚期胰腺癌主要以非手术治疗为主, 由于中医药治疗肿瘤毒不良反应低且疗效显著, 在防治胰腺癌有较大的潜力与优势, 日益受到国内外医学界的关注.

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

■ 研发前沿

细胞凋亡又称为程序性死亡,是由基因控制的细胞自我消亡过程,在多种组织中对于控制细胞的数量起到关键性的作用。诱导肿瘤细胞凋亡治疗逐渐成为国际肿瘤研究的一个热点。

凋亡和坏死细胞的百分率也显著高于未给药组($5.10\% \pm 0.98\%$, $7.03\% \pm 1.52\%$, $10.13\% \pm 0.70\%$ vs $2.63\% \pm 0.06\%$, 均 $P < 0.05$)。

结论:冬凌草甲素可抑制胰腺癌SW1990细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,其作用机制可能是药物干预后引起了 β -肌动蛋白聚合/解聚状态的变化。

关键词:冬凌草甲素;胰腺癌;增殖抑制;凋亡; β -肌动蛋白

刘军楼, 汪悦, 徐力, 杨继兵, 孙志岭, 邓海山, 徐建亚. 冬凌草甲素对人胰腺癌细胞增殖的抑制作用及其机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3407-3412

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3407.asp>

0 引言

冬凌草系唇形科香茶菜属植物,学名碎米亚,在我国分布广泛。通常取其干燥地上部分入药,味苦甘、性微寒,具有清热解毒、消炎止痛、健胃活血及抗肿瘤等作用。冬凌草主要的化学成分为贝壳杉烯类的二萜,包括冬凌草甲素、乙素、丙素、丁素、戊素等,其中最重要的抗癌有效成分确定为冬凌草甲素(Oridonin)。研究表明,Oridonin对食管癌、肝癌、结肠癌、胃癌、宫颈癌、肺癌、鼻咽癌、白血病、人黑色素瘤、纤维肉瘤等具有一定的疗效^[1-6]。关于Oridonin治疗胰腺癌的实验研究,少有文献报道,新近研究提示其对人胰腺癌细胞株有生长抑制作用^[7]。本文研究Oridonin对人胰腺癌SW1990细胞增殖抑制作用并探究其可能机制,为其进一步应用于临床治疗胰腺癌提供有力的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Oridonin购自南京泽朗医药科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$);人胰腺癌SW1990细胞株为上海长海医院消化内科实验中心惠赠。SW1990细胞用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基培养于25 mL塑料培养瓶中,37℃,50 mL/L CO₂培养箱常规培养。Oridonin用1 mL DMSO溶解后加入三蒸水9 mL,配制成含10% DMSO浓度为100 mmol/L的母液,-4℃保存,应用时加培养基稀释成目标浓度(DMSO终浓度 $\leq 0.01\%$ 时,无明显细胞毒作用)。DMEM培养基(Gibco),MTT、DMSO(Sigma),DAPI试剂盒、抗 β -肌动蛋白(β -actin)小鼠单克隆抗体、Alexa Fluor 488标记山羊抗小鼠IgG(H+L)的二抗、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒(碧云天公司),小牛血清

(PAA laboratories)。

1.2 方法

1.2.1 细胞生长抑制率的测定:采用噻唑蓝(MTT)还原法进行检测。取对数生长期的SW1990细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,将细胞悬液接种于无菌96孔细胞培养板中,每孔100 μL ,培养12 h细胞完全贴壁后弃上清分别加入含3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin的DMEM培养基100 μL ,每种浓度均设6个平行孔;对照组加入不含药物的培养液100 μL 。将培养板置于37℃,饱和湿度,50 mL/L CO₂孵箱中常规培养至12,24,36,48 h后,于终止培养前4 h,各孔均加入5 g/L MTT溶液20 μL ,继续培养4 h后弃上清,各孔加入DMSO 150 μL ,振荡器上振荡5-10 min溶解蓝色结晶,待孔内结晶完全溶解并色素均匀后以酶标仪于490 nm处读取各孔吸光度值(A_{490}),计算细胞生长抑制率与IC₅₀。细胞生长抑制率(%) = [对照组A值-实验组A值]/对照组A值 $\times 100\%$ 。实验重复3次。

1.2.2 双重染色法后激光共聚焦显微镜观察细胞的形态学变化:本实验采用 β -actin抗体免疫荧光染色法观察细胞质细胞骨架蛋白变化,DAPI染色法观察细胞核凋亡变化。具体操作步骤为:(1)细胞爬片:洁净的盖玻片消毒灭菌后放置到6孔板内,取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 $2 \times 10^8/\text{L}$ 接种于6孔板中,每孔2 mL,培养12 h细胞完全贴壁后弃上清分别加入含12.5、25.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin的DMEM培养基2 mL,培养24 h后弃上清;(2)固定:用PBS分3次取代6孔板中的培养液后,移除PBS,培养细胞爬片在4℃预冷的4%多聚甲醛中固定30 min,常温下PBS漂洗3遍,每次5 min;(3)封闭:加入免疫染色封闭液,培养板放入湿盒,4℃冰箱封闭60 min;(4) β -actin一抗孵育:按照1:100比例用免疫染色一抗稀释液稀释Actin抗体,吸尽封闭液,立即加入稀释好的一抗,4℃冰箱孵育过夜后常温下PBS漂洗3次,每次5 min;(5)二抗孵育:按照1:100比例用免疫荧光染色二抗稀释液稀释Alexa Fluor 488标记山羊抗小鼠IgG(H+L)的二抗,吸尽PBS液,立即加入稀释好的二抗,4℃冰箱中孵育1 h后,常温下PBS漂洗3次,每次5 min;(6)DAPI染色:加入DAPI染色稀释液,室温染色3-5 min, PBS漂洗3次,每次5 min;(7)从培养板中取出盖玻片,立即倒置于载玻片上方,荧光封片剂封片,室温放置1-2 h待封片剂凝固,于激光共聚焦显微镜上观察并摄影。

表 1 流式细胞仪检测药物对细胞凋亡的影响 (mean $\pm$ SD, %)

细胞	对照组	Oridonin浓度(μ mol/L)		
		12.5	25.0	50.0
早期凋亡细胞	0.30 $\pm$ 0.17	2.17 $\pm$ 0.57 ^a	5.83 $\pm$ 0.57 ^{ac}	4.43 $\pm$ 0.78 ^{ace}
晚期凋亡和坏死细胞	2.63 $\pm$ 0.06	5.10 $\pm$ 0.98 ^a	7.03 $\pm$ 1.52 ^{ac}	10.13 $\pm$ 0.70 ^{ace}
死亡细胞总数	2.93 $\pm$ 0.15	7.27 $\pm$ 0.42 ^a	12.87 $\pm$ 1.39 ^{ac}	14.57 $\pm$ 1.46 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 12.5 μ mol/L组; ^e $P < 0.05$ vs 25 μ mol/L组。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡: 用Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒。取对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 2×10^8 /L接种于6孔板中, 每孔2 mL, 培养12 h细胞完全贴壁后弃上清分别加入含12.5、25.0、50.0 μ mol/L Oridonin的DMEM培养基2 mL, 培养24 h后弃上清。PBS洗涤贴壁细胞1次, 用胰酶细胞消化液(含有EDTA)消化细胞, 加入2 mL的DMEM培养基, 吹打细胞后转移到离心管内, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 收集细胞, 用PBS轻轻重悬细胞并计数。取 $(5-10) \times 10^4$ 重悬的细胞, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入195 μ L Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。加入5 μ L Annexin V-FITC, 轻轻混匀。室温(20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C)避光孵育10 min。1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入190 μ L Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞。加入10 μ L碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置。随即进行流式细胞仪检测。

统计学处理 统计分析应用SPSS16.0版统计软件, 实验数据mean $\pm$ SD表示, 计量资料用方差分析两两比较组间差异性, 计算 P 值。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Oridonin对SW1990细胞的生长抑制作用 3.125 μ mol/L、6.250 μ mol/L的Oridonin对细胞的生长无明显的抑制作用, Oridonin处理后细胞增殖抑制率随给药浓度增加和作用时间延长而逐渐增加, 呈明显的时间-剂量依赖关系。其中12.5、25.0、50.0 μ mol/L的药物作用24 h的抑制率分别为38.9%、45.9%、62.1%, 24 h Oridonin作用的IC₅₀值为35.43 μ mol/L(图1)。

2.2 激光共聚焦显微镜观察细胞的形态学变化 对细胞爬片进行扫描, 每次摄影形成DAPI染色细胞核图、 β -actin抗体免疫荧光染色细胞质图、光学显微镜细胞分布图以及双重染色合成图。DAPI染色细胞核图显示, 对照组细胞核较大, 核大小及染色均匀, 染色较浅(图2A1); 给药

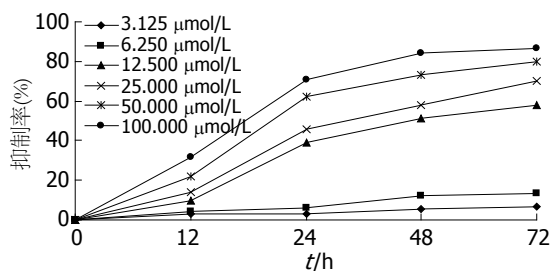


图 1 不同浓度Oridonin处理后细胞增殖抑制率变化曲线。

组随浓度升高细胞数量减少, 部分细胞核体积变小, 荧光染色增强, 细胞出现典型的凋亡改变, 凋亡细胞主要表现为细胞核浓缩及细胞核碎裂等典型改变(图2B1, 2C1)。 β -actin抗体免疫荧光染色细胞质图显示, 对照组细胞质 β -actin荧光染色分布均匀(图2A2); 给药组细胞质荧光染色增强(图2B2), 尤其是细胞中央近细胞核处荧光染色明显增强(图2C2)。经上述染色处理后, 光学显微镜细胞分布图显示, 对照组细胞呈椭圆形、梭形贴壁生长(图2A3), 经不同浓度Oridonin处理的实验组细胞生长受到不同程度的抑制, 随着浓度升高细胞数量减少(图2C3); 部分细胞形态逐渐变圆, 细胞体积缩小, 呈小类圆形细胞, 细胞内颗粒状物质增多, 另可见部分坏死崩解细胞(图2B3, 2C3)。双重染色合成图显示, 细胞核发出蓝色荧光, 细胞质发出绿色荧光, 结果与上述一致(图2A4, B4, C4)。

2.3 流式细胞仪分析结果 Oridonin均可诱导细胞凋亡发生。不同浓度组早期凋亡、晚期凋亡和坏死细胞、死亡细胞总数的百分率, 与对照组相比, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表1, 图3)。

3 讨论

胰腺癌是一病情凶险、治愈率低、预后极差的消化系恶性肿瘤。近年来发病率有升高的趋势, 在美国已成为消化系肿瘤致死原因的第2位^[8]。世界范围的综合资料显示, 胰腺癌的5年生存率仅为5.0%或更低, 是预后最差的肿瘤。目前胰腺癌

■ 相关报道

宋芳等2010年发现冬凌草甲素对人胰腺癌SW1990细胞有生长抑制作用, 认为冬凌草甲素通过诱导凋亡和G₂/M期周期阻滞来抑制人胰腺癌SW1990细胞生长, 其分子机制可能与Survivin和P21调节的信号途径有关。

■创新盘点

本研究采用双重免疫荧光染色法检测人胰腺癌细胞形态学变化,通过激光共聚焦显微镜观察细胞核和细胞质骨架蛋白 β -actin形态学变化,首次探讨了冬凌草甲素对细胞骨架蛋白的影响。

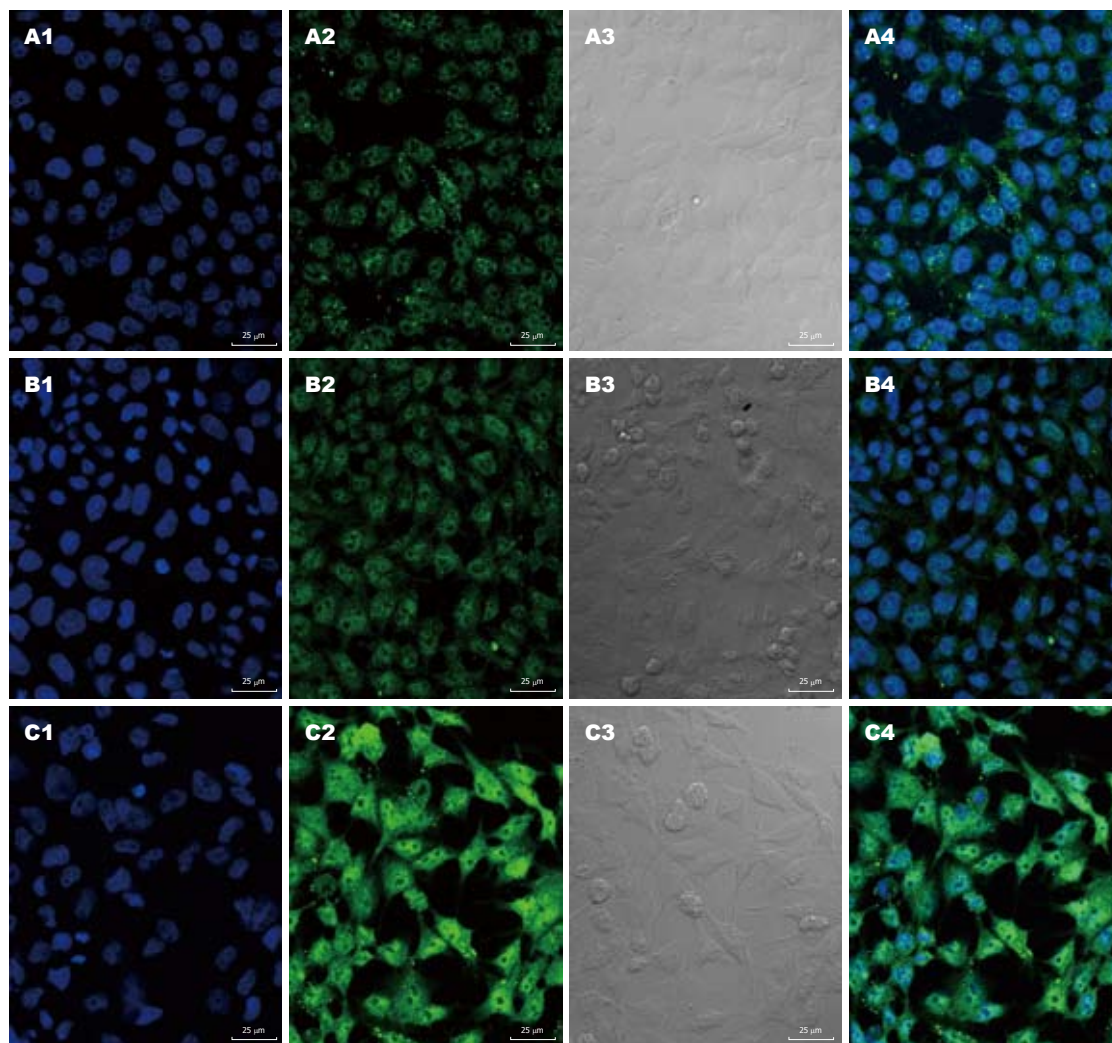


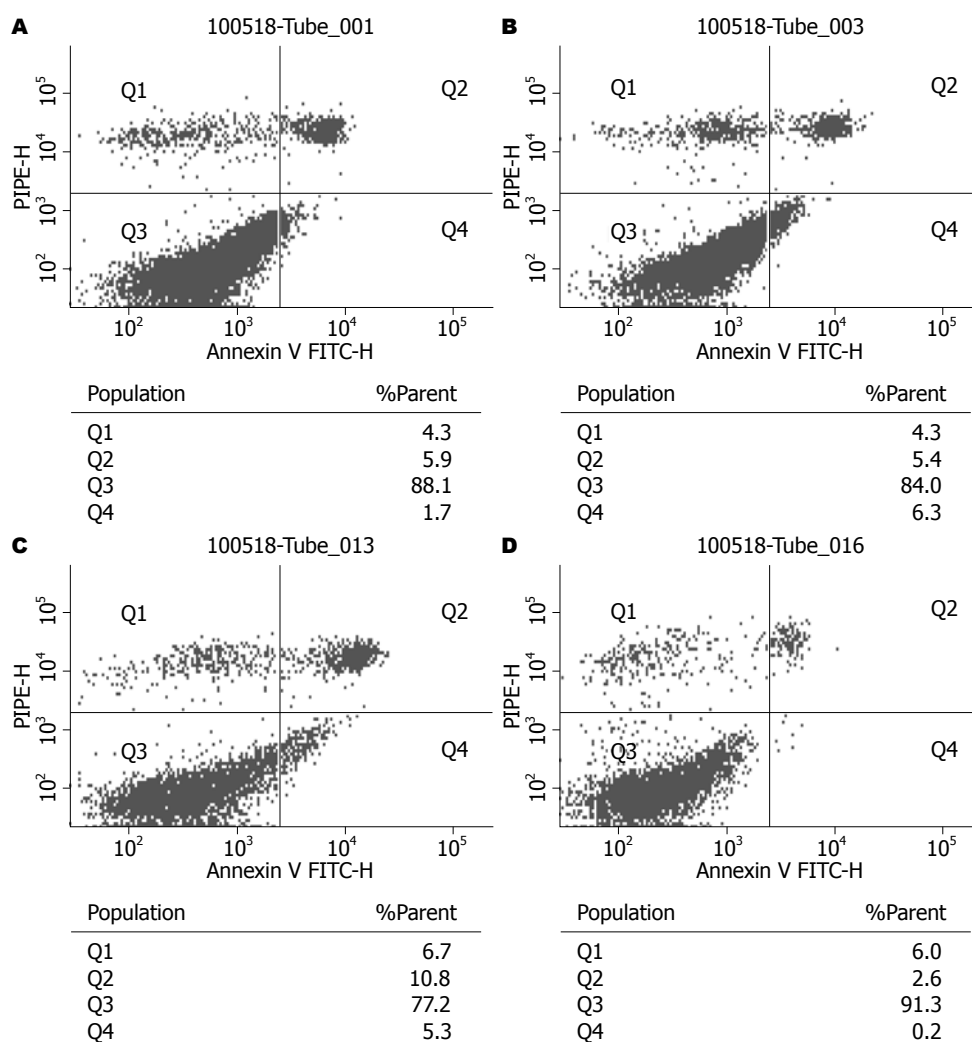
图2 不同浓度Oridonin处理后的细胞形态学变化。A: 对照组; B: 12.5 μ mol/L组; C: 50.0 μ mol/L组; 1: DAPI染色; 2: β -actin抗体免疫荧光染色; 3: 光学显微镜; 4: 双重染色。

治疗方法有手术和非手术治疗。根治性手术是最有效的治疗方法,然而80%-85%的胰腺癌病例确诊时已届中晚期^[9],无法切除。非手术治疗包括化疗、放疗、生物治疗、物理治疗、营养支持治疗、中医药治疗等。现今中晚期胰腺癌主要以非手术治疗为主,由于中医药治疗肿瘤不良反应低且疗效显著,在防治胰腺癌有较大的潜力与优势,正日益受到国内外医学界的关注^[10]。

本实验选择SW1900细胞株,应用多种方法观察中草药Oridonin对肿瘤细胞的影响。MTT结果显示Oridonin处理细胞后抑制率随给药浓度增加和作用时间延长而逐渐增加,呈明显的时间-剂量依赖关系,这与文献报道一致^[7]。本实验光学显微镜细胞分布图进一步证实,经不同浓度Oridonin处理的实验组细胞生长受到不同程度的抑制,随着浓度升高细胞数量减少;部分细胞呈小类圆形细胞,另可见部分坏死崩解细胞。

DAPI染色细胞核图显示给药组随浓度升高细胞数量减少,细胞出现典型的凋亡改变。流式细胞仪检测结果显示不同浓度组早期凋亡、晚期凋亡和坏死细胞、死亡细胞总数的百分率,均高于对照组。上述结果说明Oridonin可诱导细胞凋亡发生,其抑制肿瘤细胞增殖作用可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关。

细胞骨架是细胞内蛋白质成分组成的网络结构,包括微管、微丝和中间纤维。微丝是3种骨架结构中最细的,主要由肌动蛋白(actin)组成,以游离球状肌动蛋白(G-actin)或聚合纤维状肌动蛋白(F-actin)形式存在,正常细胞微丝聚合/解聚的动态变化和平衡是细胞运动、附着、细胞分裂周期的重要调控因素^[11-13]。研究表明, G-actin和F-actin平衡状态的改变,与肿瘤发生密切相关^[14]。关于actin改变与细胞癌变之间的关系,研究认为可能是由于微丝的组装和分布发生了变化,使微丝不能够和质膜相连,不能受细胞的正



■应用要点

本研究探讨了冬凌草甲素对细胞质细胞骨架蛋白 β -actin和细胞核的影响,显示该药是一种有良好活性的抗胰腺癌中药制剂,为其进一步应用于临床治疗胰腺癌提供有力的实验依据。

图 3 流式细胞仪检测不同药物浓度组处理24 h后细胞的凋亡情况. A: 12.5 μ mol/L组; B: 25.0 μ mol/L组; C: 50.0 μ mol/L组; D: 对照组. Q1: 检测误差; Q2: 晚期凋亡和坏死细胞; Q3: 正常活细胞; Q4: 早期凋亡细胞。

常调控,进而导致细胞生长与增殖的失控^[13,15-18]. Rao等^[19]表明actin聚合/解聚状态的改变,即actin骨架重组,对恶性肿瘤细胞的形态和表型有非常重要的调节作用,认为干预细胞骨架微丝actin重组可作为抗癌药物的作用靶点,也可作为研发新的抗肿瘤药物的依据.进一步研究表明,通过改变actin的聚合/解聚状态可以起到治疗肿瘤的作用^[20-23].

关于Oridonin作用于细胞骨架蛋白actin的研究,尚未见文献报道.真核细胞骨架蛋白actin至少分为6种:两个横纹肌型(α -心肌型, α -骨骼肌型),两个平滑肌型(α -血管平滑肌型, γ -内脏平滑肌型)和两个细胞质型(β 和 γ 亚型). β -actin为6种actin中的一种,属于非肌肉细胞骨架actin.本实验通过 β -actin抗体免疫荧光染色法观察Oridonin对肿瘤细胞骨架蛋白影响,激光共聚焦显微镜观察发现细胞质发绿色荧光,对照组细胞质 β -actin荧光染色分布均匀,给药组细胞质荧光染色

增强,提示药物干预后引起了 β -actin聚合/解聚状态的改变,可能是F-actin增加,导致了细胞质荧光染色增强.本实验同时发现细胞中央近细胞核处荧光染色明显增强,可能是药物干预使微丝actin的分布发生了变化.

目前,作用于细胞骨架蛋白actin的抗肿瘤药物,按作用机制特点,大致分为两类,第1类是促进肌丝蛋白解聚并使肌丝蛋白处于不稳定状态,以长春花生物碱类为代表.第2类是促进肌丝蛋白聚合并稳定肌丝蛋白,以紫杉醇为代表.尽管作用机制不同,但最终都可以抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡^[12,21,24].细胞凋亡又称为程序性死亡,是由基因控制的细胞自我消亡过程,在多种组织中对于控制细胞的数量起到关键性的作用^[25].诱导肿瘤细胞凋亡治疗逐渐成为国际肿瘤研究的一个热点. β -actin是主要的微丝组成成分,研究已明确显示微丝结构的动态变化能调控细胞凋亡^[13,26-29].本实验研究提

■同行评价

本文设计合理, 方法得当, 结果可靠, 为进一步研究冬凌草甲素对胰腺癌的临床治疗打下了基础。

示Oridonin引起了 β -actin聚合/解聚状态的改变, 可能是F-actin增加, 导致肿瘤细胞增殖受到抑制。本实验 β -actin聚合/解聚状态的改变, 必然导致微丝结构的变化, 这可能是药物诱导肿瘤细胞凋亡的机制之一。本实验结果也说明Oridonin是属于上述作用于细胞骨架的抗肿瘤药物中的第2类药物。本实验没有进一步运用分子生物学技术检测细胞中G-actin和F-actin含量和比例, 这也是本研究不足之处, 故F-actin增加有待实验进一步证实。

总之, Oridonin可抑制胰腺癌SW1990细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡, 其作用机制可能是药物干预后引起了 β -actin聚合/解聚状态的改变。我们研究结果提示, Oridonin作为一种有良好活性的抗胰腺癌中药制剂, 具有很好的临床应用和开发价值, 但其抗癌作用机制有待进一步深入研究。

志谢: 感谢尚文斌、刘佳及赵娟在本实验中给予的大力帮助。

4 参考文献

- Kang N, Zhang JH, Qiu F, Chen S, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Induction of G(2)/M phase arrest and apoptosis by oridonin in human laryngeal carcinoma cells. *J Nat Prod* 2010; 73: 1058-1063
- Cheng Y, Qiu F, Ye YC, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Oridonin induces G2/M arrest and apoptosis via activating ERK-p53 apoptotic pathway and inhibiting PTK-Ras-Raf-JNK survival pathway in murine fibrosarcoma L929 cells. *Arch Biochem Biophys* 2009; 490: 70-75
- Zhang Y, Wu Y, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Involvement of PKC signal pathways in oridonin-induced autophagy in HeLa cells: a protective mechanism against apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 273-278
- Zhu Y, Xie L, Chen G, Wang H, Zhang R. Effects of oridonin on proliferation of HT29 human colon carcinoma cell lines both in vitro and in vivo in mice. *Pharmazie* 2007; 62: 439-444
- Zhou GB, Kang H, Wang L, Gao L, Liu P, Xie J, Zhang FX, Weng XQ, Shen ZX, Chen J, Gu LJ, Yan M, Zhang DE, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z. Oridonin, a diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t(8;21) leukemia in vitro and in vivo. *Blood* 2007; 109: 3441-3450
- Huang J, Wu L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Reactive oxygen species mediate oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways. *J Pharmacol Sci* 2008; 107: 370-379
- 宋芳, 冯一中, 蒋小岗, 顾振纶, 郭次仪. 冬凌草甲素对人胰腺癌SW1990细胞系生长抑制作用. *中国药理学通报* 2010; 26: 240-243
- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8: S4-S66
- Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, Sauter PK, Coleman J, Hruban RH, Lillemoe KD. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* 2000; 4: 567-579
- 孙韬, 左明焕. 胰腺癌的中医研究进展. *北京中医药大学学报(中医临床版)* 2009; 16: 44-46
- Fridman R, Scott AF, Muller D, Reich R, Penno MB. The role of cell adhesion and migration in the in vitro invasiveness of mouse adrenal carcinoma cells. *Invasion Metastasis* 1990; 10: 208-224
- Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003; 22: 7280-7295
- Papakonstanti EA, Stournaras C. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2008; 582: 2120-2127
- Ruan W, Lai M. Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta* 2007; 385: 1-5
- Oshima RG. Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1981-1994
- Helfman DM, Flynn P, Khan P, Saeed A. Tropomyosin as a regulator of cancer cell transformation. *Adv Exp Med Biol* 2008; 644: 124-131
- Lindberg U, Karlsson R, Lassing I, Schutt CE, Höglund AS. The microfilament system and malignancy. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 2-11
- Samarakoon R, Goppelt-Strube M, Higgins PJ. Linking cell structure to gene regulation: signaling events and expression controls on the model genes PAI-1 and CTGF. *Cell Signal* 2010; 22: 1413-1419
- Rao J, Li N. Microfilament actin remodeling as a potential target for cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 345-354
- Jordan MA, Horwitz SB, Lobert S, Correia JJ. Exploring the mechanisms of action of the novel microtubule inhibitor vinflunine. *Semin Oncol* 2008; 35: S6-S12
- Shi J, Orth JD, Mitchison T. Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Res* 2008; 68: 3269-3276
- Ke H, Parron VI, Reece J, Zhang JY, Akiyama SK, French JE. BCL2 inhibits cell adhesion, spreading, and motility by enhancing actin polymerization. *Cell Res* 2010; 20: 458-469
- Liu T, Wu LY, Berkman CE. Prostate-specific membrane antigen-targeted photodynamic therapy induces rapid cytoskeletal disruption. *Cancer Lett* 2010; 296: 106-112
- Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 123-130
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92: 57-70
- Celeste Morley S, Sun GP, Bierer BE. Inhibition of actin polymerization enhances commitment to and execution of apoptosis induced by withdrawal of trophic support. *J Cell Biochem* 2003; 88: 1066-1076
- Wang H, Liu Y, Gao X, Carter CL, Liu ZR. The recombinant beta subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Lett* 2007; 247: 150-158
- Santra M, Santra S, Roberts C, Zhang RL, Chopp M. Doublecortin induces mitotic microtubule catastrophe and inhibits glioma cell invasion. *J Neurochem* 2009; 108: 231-245
- Moon DO, Kim MO, Nam TJ, Kim SK, Choi YH, Kim GY. Pectenotoxin-2 induces G2/M phase cell cycle arrest in human breast cancer cells via ATM and Chk1/2-mediated phosphorylation of cdc25C. *Oncol Rep* 2010; 24: 271-276

结肠黏膜低度炎症对小鼠结肠PAR-2活化和内脏感觉过敏的诱发作用

刘玮, 王承党

刘玮, 福建医科大学附属协和医院重症医学科 福建省福州市 350001

王承党, 福建医科大学附属第一医院消化内科 福建省福州市 350005

刘玮, 硕士, 主要从事消化系统疾病的研究.

福建省自然科学基金资助项目, No. 2009J01138

作者贡献分布: 此课题由王承党设计; 实验过程和数据分析由刘玮完成; 论文写作由刘玮与王承党完成.

通讯作者: 王承党, 教授, 研究生导师, 350005, 福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院消化内科. wangcdhl@sina.com

收稿日期: 2010-06-25 修回日期: 2010-09-22

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-11-18

Low-grade mucosal inflammation induces colonic PAR-2 activation and visceral hypersensitivity in mice

Wei Liu, Cheng-Dang Wang

Wei Liu, Department of Critical Care Medicine, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Cheng-Dang Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University; Laboratory for Digestive Diseases, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Fujian Province, China, No. 2009J01138

Correspondence to: Professor Cheng-Dang Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University; Laboratory for Digestive Diseases, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. wangcdhl@sina.com

Received: 2010-06-25 Revised: 2010-09-22

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To detect the expression of protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the colon and substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the cornu dorsale medullae spinalis and to explore the relationship between the activation of PAR-2 and visceral hypersensitivity in mice with dextran sulfate sodium (DSS)-induced low-grade colonic mucosal inflammation (LGI).

METHODS: Thirty-six C57BL/6 mice were randomly divided into two groups: LGI group and control group. The LGI group was given

1.5% DSS solution for 5 d and distilled water for another 10 d, while the control group was given distilled water only. After treatment, the myoelectric activity of the abdominal wall at different levels of colorectal distension (CRD) was recorded. The expression of SP and CGRP in the cornu dorsale medullae spinalis and PAR-2 in the colonic mucosa was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: After treatment, colonic histological index (HI) in the LGI group was 1.500 ± 0.926 . When the colon was distended to a pressure of 15 mmHg, the myoelectric activity of the abdominal wall in the LGI group was comparable to that in the control group ($27.958 \mu\text{V} \pm 1.660 \mu\text{V}$ vs $26.947 \mu\text{V} \pm 0.854 \mu\text{V}$, $P > 0.05$). However, the myoelectric activity of the abdominal wall was significantly higher in the LGI group than in the control group when the colon was distended to a pressure of 30, 45 or 60 mmHg ($33.455 \mu\text{V} \pm 3.786 \mu\text{V}$ vs $31.253 \mu\text{V} \pm 3.842 \mu\text{V}$; $46.848 \mu\text{V} \pm 4.038 \mu\text{V}$ vs $37.267 \mu\text{V} \pm 2.542 \mu\text{V}$; $47.207 \mu\text{V} \pm 18.151 \mu\text{V}$ vs $33.798 \mu\text{V} \pm 8.415 \mu\text{V}$, all $P < 0.05$). The integrated optical density (IA) of PAR-2 staining in the distal colon was significantly higher in the LGI group than in the control group. The IA of SP and CGRP staining in the spine cord was also significantly higher in the LGI group than in the control group (40.769 ± 8.422 vs 21.718 ± 4.131 ; 30.288 ± 13.530 vs 10.788 ± 4.490 ; 46.829 ± 26.261 vs 13.997 ± 3.340 , all $P < 0.05$). There is a positive correlation between the expression of PAR-2 and SP and between the expression of PAR-2 and CGRP in the LGI group ($r = 0.622$, $P < 0.05$, $r = 0.588$, $P < 0.05$). The expression of PAR-2, SP or CGRP was closely correlated with the myoelectric activity of the abdominal wall in the LGI group ($r = 0.439-0.835$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Low-grade mucosal inflammation induces visceral hypersensitivity in mice possibly by activating colonic PAR-2.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Low-grade mucosal inflammation; Visceral sensitivity; Prote-

■背景资料

已经明确内脏感觉过敏、肠动力紊乱在IBS的发生中起重要作用,但动力紊乱和内脏感觉过敏的机制还不清楚.既往的研究发现IBS患者肠道黏膜存在低度炎症,但这种炎症是怎样引起内脏感觉过敏还需要进一步研究.

■同行评议者

戈之铮, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

■相关报道

Bueno等发现, SP升高的水平与炎症引起的腹痛程度密切相关, 在肠炎过程中和肠炎后, SP在引起背角神经元敏感性增高中起重要作用。

ase-activated receptor-2; Colorectal distension; Substance P; Calcitonin gene-related peptide

Liu W, Wang CD. Low-grade mucosal inflammation induces colonic PAR-2 activation and visceral hypersensitivity in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3413-3419

摘要

目的: 探讨结肠蛋白酶激活受体(PAR-2)活化与结肠黏膜低度炎症时小鼠内脏感觉过敏的关系。

方法: 36只C57B/6小鼠随机分为2组。A组(对照组), 18只, 给予无菌蒸馏水自由饮用; 慢性低度炎症(LGI)组(S组), 18只, 1.5%葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液自由饮用5 d, 续以无菌蒸馏水10 d。第15天时观察病理学改变、测定腹壁肌电、免疫组织化学染色腰膨大部(L6-S1)脊髓背角SP、CGRP表达和结肠组织PAR-2表达。

结果: 第15天时, S组(LGI组)结肠黏膜炎症评分为 1.500 ± 0.926 。结肠内压力为15 mmHg时, S组的腹壁肌电幅值与A组比较无统计学意义($27.958 \mu\text{V} \pm 1.660 \mu\text{V}$ vs $26.947 \mu\text{V} \pm 0.854 \mu\text{V}$, $P > 0.05$)。当结肠内压力为30、45、60 mmHg时, S组的腹壁肌电幅值均高于A组($33.455 \mu\text{V} \pm 3.786 \mu\text{V}$ vs $31.253 \mu\text{V} \pm 3.842 \mu\text{V}$; $46.848 \mu\text{V} \pm 4.038 \mu\text{V}$ vs $37.267 \mu\text{V} \pm 2.542 \mu\text{V}$; $47.207 \mu\text{V} \pm 18.151 \mu\text{V}$ vs $33.798 \mu\text{V} \pm 8.415 \mu\text{V}$, 均 $P < 0.05$)。S组结肠PAR-2和脊髓背角之SP、CGRP IA值均高于A组(40.769 ± 8.422 vs 21.718 ± 4.131 ; 30.288 ± 13.530 vs 10.788 ± 4.490 ; 46.829 ± 26.261 vs 13.997 ± 3.340 , 均 $P < 0.05$)。PAR-2的IA值与SP、CGRP IA值之间都有正相关关系($r = 0.622$, $P < 0.05$; $r = 0.588$, $P < 0.05$)。SP、CGRP、PAR-2 IA值与腹壁肌电幅值也都呈正相关($r = 0.439-0.835$, $P < 0.05$)。

结论: 结肠黏膜低度炎症可增加小鼠结肠的内脏敏感性, 与结肠PAR-2的活化有关。

关键词: 肠易激综合征; 结肠黏膜低度炎症; 内脏感觉; 蛋白酶活化受体-2; 结肠扩张; P物质; 降钙素基因相关肽

刘玮, 王承党. 结肠黏膜低度炎症对小鼠结肠PAR-2活化和内脏感觉过敏的诱发作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(32): 3413-3419
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3413.asp>

0 引言

近年来研究^[1]表明肠道感染或炎症(即使存在短

暂性的轻微炎症)都可能是肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)内脏高敏感性的潜在激发因素^[2]。蛋白酶激活受体(protease-activated receptors, PARs)家族是一种跨膜受体7次的G蛋白耦联受体。PAR-2的激活在内脏高敏感性的发生中扮演着一个重要的角色。大量的研究表明肠道内持续存在的炎症是使外周神经末梢致敏的重要原因^[3]。肥大细胞活化后脱颗粒分泌类胰蛋白酶(tryptase)剪切激活神经细胞或炎症细胞上的PAR-2, 导致疼痛介质[5-HT、P物质(substance P, SP)、降钙素基因相关蛋白(calcitonin gene-related peptide, CGRP)等]从初级传入神经纤维末梢或炎症细胞等释放, 可直接作用于初级传入纤维, 或是间接经由肥大细胞, 启动活化和致敏机制的级联效应, 使附近的伤害性感受器产生继发性的过敏并产生广泛促炎效应, 破坏结肠黏膜屏障完整性, 肠黏膜对肠腔内细菌及各种蛋白酶通透性增加, 导致结肠炎症持续加重。从目前文献资料推理, 结肠黏膜低度炎症可能通过PARs系统介导引起内脏感觉敏感, 那么如果减少或者消除这种炎症是否可以使敏感的内脏感觉恢复正常呢? 因此, 本课题立足于研究肠道低度炎症时内脏敏感性的变化, 从而研究结肠黏膜低度炎症时是否通过PAR-2系统介导影响机体的内脏感觉功能, 为IBS的研究和治疗提供新的方向。

1 材料和方法

1.1 材料 健康C57B/6小鼠, ♂, 清洁级, 体质量18-22 g, 共36只, 购于上海斯莱克实验动物中心, 混合配方饲料喂养, 自由进食饮水, 每日更换饮水、饲料, 定期更换垫料, 保持小鼠生活环境通风及清洁卫生。葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)为美国MP Biomedicals公司产品; 浓缩型兔抗小鼠SP多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司产品; 浓缩型兔抗小鼠CGRP多克隆抗体购自北京博奥森生物工程有限公司; 浓缩型山羊抗大鼠PAR-2多克隆抗体为美国Santa cruz公司产品; 二步法免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。生理信号记录仪(RM6240)为成都仪器厂出品。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 实验动物的建模参照张艳丽等^[4]和Kim等^[5]的方法: 小鼠通过饮用3% DSS溶液5 d+蒸馏水10 d 1个循环可以诱导出慢性结肠炎症, 此时肠炎症状消失, 动物进食及体质量恢复。由于种属差异, 本实验让C57B/6大鼠自由饮

表 1 不同结肠内压力下的腹壁肌电幅值 (mean $\pm$ SD, μ V)

分组	15 mmHg	30 mmHg	45 mmHg	60 mmHg
A组	26.947 $\pm$ 0.854	31.253 $\pm$ 3.842 ^b	37.267 $\pm$ 2.542 ^b	33.798 $\pm$ 8.415 ^b
S组	27.958 $\pm$ 1.660	33.455 $\pm$ 3.786	46.848 $\pm$ 4.038	47.207 $\pm$ 18.151

^b $P = 0.000$ vs S组.

用1.5% DSS溶液5 d+蒸馏水10 d建立慢性低度结肠炎症模型. 将36只随机分为2个组: A组(对照组, $n = 18$): 不予DSS溶液饮用, 给予蒸馏水自由饮用. 慢性低度炎症(low-grade inflammation, IGL)组(S组, $n = 18$): 予1.5% DSS溶液自由饮用5 d+蒸馏水饮用10 d.

1.2.2 结肠扩张实验: 按照Kruschewski等^[6]的方法并略作改进, 每组小鼠在实验结束后(第15天)分别进行腹壁肌电的检测. 电生理记录仪参数设置: 采集频率: 2 kHz, 扫描速度: 200 ms/div, 灵敏度: 200 μ V, 时间常数: 0.001 s, 滤波频率: 3 kHz. 分别取15、30、45、60 mmHg的结肠扩张压力下10个腹壁放电幅值, 取其平均值, 然后再减去基础值, 即各个压力下腹壁放电幅值.

1.2.3 结肠和脊髓组织标本的处理: 结肠扩张实验结束后, 处死小鼠, 取腰膨大部(L6-S1)脊髓浸入40 g/L中性甲醛固定, 依次乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切成4 μ m厚度切片, SP和CGRP表达分别采用非生物素二步法进行免疫组织化学染色. 距肛门0.5 cm(称远端结肠DC)取结肠组织1 cm $\times$ 0.5 cm, 以40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 并采用非生物素二步法免疫组织化学染色了解PAR-2表达情况(羊抗鼠PAR-2抗体工作浓度为1:200). 结肠组织切片经HE染色后, 在高倍镜下观察($\times 400$)并根据Kruschewski法进行组织学指数(histological index, HI)评分^[6,19], HI 0分时为无炎症, 1-4分为轻度炎症, 5-8分为中度炎症; 9-12分为重度炎症. 每个组织块选取3张免疫组织化学切片, 每张切片随机选取3个视野, 采用IPP6.0图像分析系统测定所选图像的积分吸光度值(LA)进行计算, 3个视野LA的平均值为该组织块的LA.

统计学处理 所有实验数据用mean $\pm$ SD表示, 结肠扩张实验的结果和内脏感觉神经递质的检测结果采用组间两两比较的方差分析进行处理. 同一参数各组间运用 t 检验, 不同参数间运用直线相关分析, 具体统计方法采用SPSS17.0医学统计软件计算. 设 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示有显著差异.

2 结果

2.1 一般情况 本实验36只小鼠在建模的过程中均无死亡. S组小鼠在第3天出现进食减少, 第5天均出现体质量下降, 排稀便, 第5天停止饮用DSS改为饮用蒸馏水后, 小鼠进食恢复, 仍有部分小鼠排稀便. 第12天所有小鼠排便性状均恢复正常, 体质量有所增加. A组小鼠在整个过程中无进食减少、未排稀便、血便, 体质量有增加.

2.2 结肠HE染色炎症评分 S组HI评分为1.500 $\pm$ 0.926, A组HI评分为0.255 $\pm$ 0.744, 二者差异有统计学意义($P = 0.005$), 根据Kruschewski法则^[6], S组的结肠黏膜炎症属于低度炎症模型.

2.3 结直肠扩张后腹壁肌电变化 各组数据经Levene方差齐性检验, 满足方差齐性要求, 组间比较采用LSD- t 法进行比较分析: 当结肠扩张压力为15 mmHg时, 二组间腹壁肌电幅值的差异无统计学意义($P = 0.929$); 结肠内压力为30、45、60 mmHg时, S组的腹壁肌电幅值均高于A组(均 $P = 0.000$, 表1, 图1).

2.4 腰骶段脊髓背角SP、CGRP表达 SP阳性神经纤维集中分布于脊髓的背角浅层, 呈棕黄色颗粒或细丝状, 呈对称分布. CGRP表达于脊髓背角浅层, 呈深褐色, 为胞质内致密均匀分布, 体积较大的神经元细胞($\Phi > 50 \mu$ m)染色较深, 体积较小的神经元细胞染色浅或不染色(图2). S组SP和CGRP的平均LA与A组的差异均有统计学意义($P = 0.000$; $P = 0.001$, 表2).

2.5 结肠组织中PAR-2的表达 PAR-2表达于结肠肌间神经丛, 呈深褐色(图3), S组的PAR-2阳性细胞数较密集, LA值为40.769 $\pm$ 8.422, 而A组为21.718 $\pm$ 4.131, 二组间的差异有统计学意义($P = 0.000$).

2.6 结肠PAR-2表达与脊髓背角SP、CGRP表达的相关性 S组结肠肌间神经丛PAR-2阳性表达的LA值与脊髓背角SP、CGRP阳性表达的LA值之间呈正相关关系(PAR-2与CGRP: $r = 0.622$, $P = 0.006$; PAR-2与SP: $r = 0.588$, $P = 0.014$).

■创新盘点

本研究提示化学诱导的结肠黏膜低度炎症, 可以通过活化PAR-2受体, 引起内脏感觉过敏, 这为探讨IBS的发病机制提供了研究资料.

■应用要点

结肠黏膜低度炎症可以导致内脏感觉过敏,在临床处置IBS患者时,需要考虑这种因素的作用。

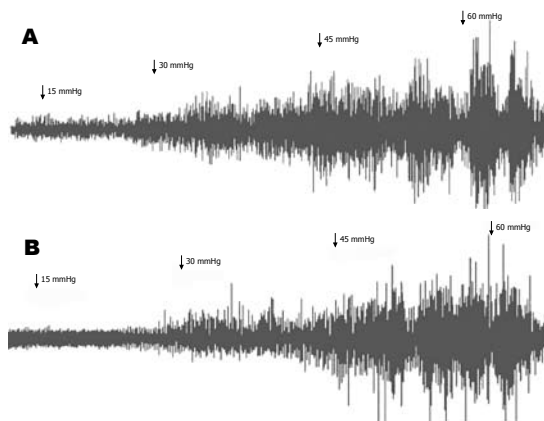


图1 扩张直肠时腹壁肌电变化. A: A组; B: S组.

表2 脊髓背角SP、CGRP的I4值 (mean $\pm$ SD)

分组	SP	CGRP
A组	10.788 $\pm$ 4.490	13.997 $\pm$ 3.340
S组	30.288 $\pm$ 13.530 ^a	46.829 $\pm$ 26.261 ^b

^a $P = 0.000$, ^b $P = 0.001$ vs A组.

表3 S组脊髓背角CGRP、SP与腹壁肌电水平的相关分析 (r 值)

指标	腹壁肌电水平(mmHg)			
	15	30	45	60
CGRP	0.042	0.610 ^a	0.521 ^a	0.740 ^b
SP	0.439	0.724 ^b	0.583 ^a	0.615 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 15 mmHg.

2.7 S组小鼠PAR-2与腹壁肌电幅值的相关性
直肠内压力为30、45、60 mmHg时, PAR-2阳性表达的I4值与腹壁肌电幅值之间正相关($r = 0.622$, $P = 0.006$; $r = 0.550$, $P = 0.017$; $r = 0.835$, $P = 0.000$).

2.8 S组脊髓背角CGRP、SP与小鼠腹壁肌电水平的相关性
球囊压力为30、45、60 mmHg时, 脊髓背角CGRP、SP阳性表达的I4值与腹壁肌电幅值之间正相关关系(表3).

3 讨论

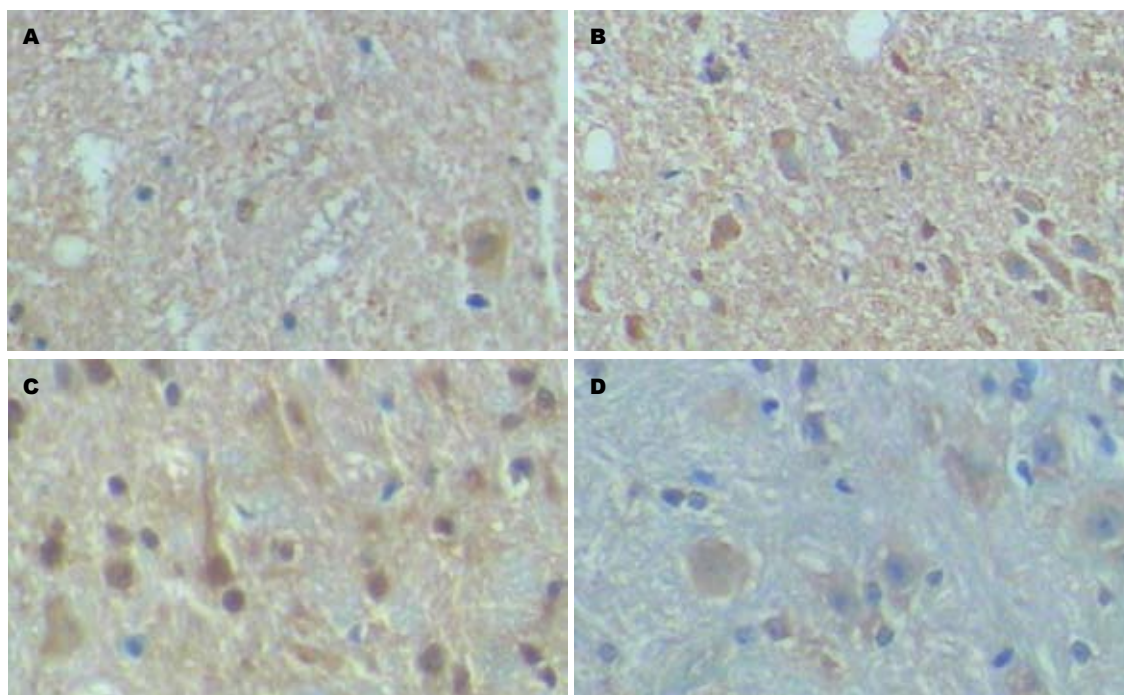
在本研究中, S组与A组病理评分比较有统计学差异($P < 0.05$), 且S组病理评分在低度炎症范围内, 说明肠道低度炎症造模是成功的. 腹外斜肌放电测量法评价内脏痛觉敏化是比较公认的^[7]. 本研究结果显示: (1)结肠黏膜低度炎症可以使

小鼠内脏感觉过敏; (2)结肠黏膜低度炎症可以使结肠肌间神经丛PAR-2表达上调, 这种变化与反应感觉敏化的指标SP、CGRP表达上调之间呈正相关关系. 因此, 结肠黏膜低度炎症通过诱发PAR-2活化可能在内脏感觉过敏中起一定的作用.

国内外研究表明, 肠道即使存在短暂性的低度炎症都可能是IBS内脏高敏感性的潜在激发因素^[2]. IBS患者通常在某种肠道感染恢复后或黏膜炎症反应消失后仍有异常的肠道感觉及运动功能持续存在^[8], 故而采用化学刺激物诱导结肠炎症来模拟上述临床特征是成熟可行的. 借鉴张艳丽等^[4]和Kim等^[5]的方法, 本研究显示采用1.5% DSS自由饮用5 d+自由饮用蒸馏水10 d后, S组小鼠结肠炎症评分为1.5分, 符合低度炎症标准, 故1.5% DSS自由饮用5 d+自由饮用蒸馏水10 d后制作出结肠黏膜低度炎症的小鼠模型, 且这种低度炎症可以导致小鼠内脏感觉过敏. DSS诱导的结肠炎症受浓度依赖, 个体差异小, 易于控制, 急性炎症期后有一稳定的慢性缓解过程, 能较好模拟慢性持续的轻微炎症, 所以本实验采用DSS建立小鼠结肠低度炎症模型是合适可行的.

肠道低度炎症是使外周神经末梢致敏的重要原因, 并被认为是IBS的发病机制, 致敏的肠道表现为疼痛阈值下降, 甚至正常生理状态下不引起痛觉的刺激也能诱发疼痛, 即所谓痛觉过敏. Al-Chaer等^[9]认为正常的成年大鼠, 46 mmHg的扩张压力可作为区分非伤害性刺激与伤害性刺激的临界值, 也就是说在相对于正常成年大鼠的非伤害性刺激可引起低度炎症组大鼠的强烈反应. 由于动物种属不同, 本研究中发现, 在15 mmHg时S组腹外斜肌的放电幅值与对照组无明显差异, 我们推测在球囊压力为15 mmHg时还未达到S组小鼠的疼痛阈值, 故与A组相比无明显差别. 而在球囊压力为30 mmHg起, S组腹外斜肌的放电幅值较A组明显升高, 表现出较A组更高的敏感性. 而与本研究结果相似, 国外也有许多学者研究发现乙酸诱导的结肠炎大鼠^[10]、曾经感染过巴西钩虫或旋毛形线虫的啮鼠类动物^[11,12]都存在肠道动力改变和内脏敏感性增加, 这些变化类似于IBS患者的病理生理学变化, 均表明结肠炎症时机体内脏敏感性增加.

本实验中, S组小鼠脊髓SP、CGRP表达和结肠肌间神经丛上的PAR-2的表达均较A组显著



■名词解释

结肠黏膜低度炎症是指结肠黏膜中存在慢性炎症细胞,但没有明显的腺体结构改变或破坏,也无明显的增生性改变。

图 2 脊髓背角SP、CGRP染色($\times 400$)。A, B: SP染色; C, D: CGRP染色; A, C: A组; B, D: S组。

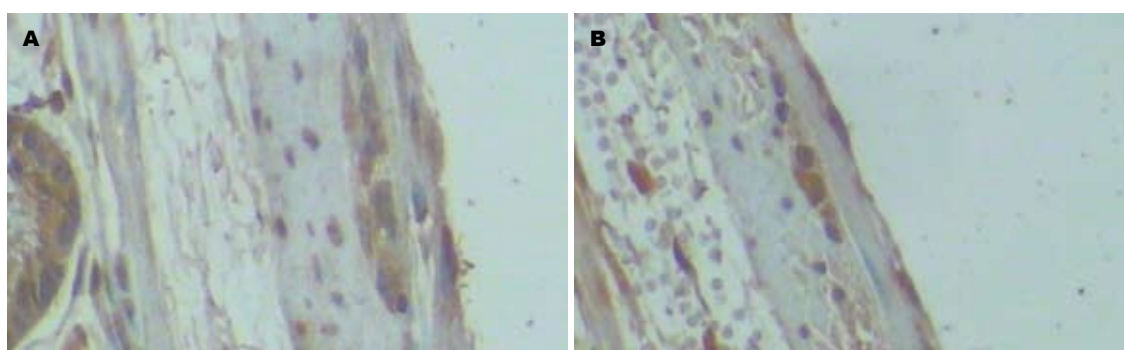


图 3 结肠PAR-2染色($\times 400$)。A: A组; B: S组。

增多。两者之间存在明显相关性,这表明PAR-2的表达增多可以引起脊髓背角神经元释放SP、CGRP增加,可造成脊髓背角的兴奋性增高。S组结肠肌间神经丛PAR-2阳性表达的I4值与脊髓SP、CGRP阳性表达的I4值之间密切相关,球囊压力为30、45、60 mmHg时,S组结肠肌间神经丛PAR-2阳性表达的I4值及S组脊髓CGRP、SP阳性表达的I4值均与腹壁肌电幅值之间密切相关,上述结论表明:结肠黏膜慢性炎症时肌间神经丛上PAR-2表达增多,引起脊髓痛觉神经递质(SP、CGRP)释放增加,从而引起内脏过敏表现为腹外斜肌的放电幅值增加。因此我们推测PAR-2有可能是治疗内脏感觉异常的重要靶点。

PAR-2是肥大细胞分泌的类胰蛋白酶作用的一种G蛋白耦联受体,类胰蛋白酶于肥大细胞

脱颗粒时释放至细胞外,能够激活多种组织及细胞的PAR-2,结肠内广泛存在PAR-2阳性的神经元,人工合成的PAR-2激动剂(SLIGRL-NH2)能剂量依赖性引起持久的整个神经细胞去极^[13]。这说明PAR-2的激活在内脏高敏感性的发生中扮演着一个重要的角色。临床研究发现腹泻型IBS患者升结肠肥大细胞数量和类胰蛋白酶水平增加,而且与IBS的症状有关^[14],把这些患者结肠活检组织培养上清液灌入小鼠结肠中可导致小鼠内脏感觉过敏^[15]。国外研究^[16]也发现这类患者结肠活检组织培养上清液中的类胰蛋白酶可以刺激背根神经节神经元的钙信号释放,将其注入小鼠脚掌,可致其躯体感觉过敏,而这种促伤害感受效应可被丝氨酸蛋白酶抑制剂和PAR-2拮抗剂所阻断,提示IBS患者结肠黏膜

■同行评价

本文设计合理, 为IBS的研究和治疗提供了可能的新方向。

释放的各种介质和蛋白酶可通过活化PAR-2使PAR-2阳性的神经元去极化, 导致内脏感觉过敏。

PAR-2通过细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)转导途径和激活腺苷环化酶, 引起钾通道的关闭、膜去极化, 继而开放电压敏感性钙通道。随着 Ca^{2+} 内流的增加, 继而激发其他在胃肠道运动和感觉方面起重要作用的神经递质如CGRP、SP和乙酰胆碱等的释放, 从而影响胃肠道动力及内脏感觉^[13,16]。另外, cAMP诱导的细胞内 Ca^{2+} 水平的降低也可使胃肠道和血管松弛。PAR-2激活时可减少时相性收缩, 增加推进性运动, 缩短肠通过时间, 降低内脏痛阈。

IBS患者存在脊髓背角神经致敏主要表现为: (1)感觉刺激-反应曲线左移, 即较小的刺激即产生明显的感觉; (2)对刺激的高敏感性, 即对感觉刺激产生过度反应; (3)内脏-躯体牵涉痛的异常放大。上述研究结果提示: 通过药物控制脊髓背角感觉神经元的痛觉处理过程可能会减少脊髓致敏的发生, 为IBS的治疗提供新方法。

SP^[17,18]是脊髓水平传递伤害性信息的重要兴奋性神经递质。而辣椒素敏感的神经纤维中80% CGRP免疫反应阳性, 这些神经元接受无髓鞘感觉神经纤维的投射, 是在外周感觉传入神经中与SP共存的一种神经肽, 除可以直接产生伤害性作用外, 还可能通过促进SP释放、抑制SP降解、延长SP的作用时间而参与炎症诱导的内脏伤害性感觉^[19]。Bueno等^[20]发现, SP升高的水平与炎症引起的腹痛程度密切相关, 在肠炎过程中和肠炎后, SP在引起背角神经元敏感性增高中起重要作用。从本实验结果看, 内脏高敏感时小鼠脊髓后角SP、CGRP表达上调, 参与了内脏刺激信号的传入过程, 放大了外周疼痛刺激, 致使小鼠痛阈降低, 表现为腹外斜肌放电幅值增加。

PAR-2是神经免疫链条中的一个重要环节, 通过活化局部免疫细胞和神经末梢的PAR-2, 可把刺激的免疫反应信息传达到神经系统, 并可接受神经系统的调控, 对靶器官引起更进一步的免疫反应^[3]。国外研究^[21]表明在小鼠中, 给予5 μg 的SLIGRL-NH₂肠腔内灌注就可以增加肠腔的渗透性, 而其余药物引起黏膜炎症所需的剂量为其十倍。但是, 当传入神经完整时和 γ -干扰素被用来引起黏膜髓过氧化物酶的增加时, 只有ML-7(一种肌球蛋白轻链激酶的选择性抑制剂)可以阻断低剂量SLIGRL-NH₂引起的渗透性

反应。研究^[22]发现预先给予全身性的辣椒素化和SP拮抗剂可以缩短炎症抗原诱导的持续性结肠运动功能改变的维持时间。这表明SP和辣椒素敏感神经纤维在炎症抗原引起的结肠运动紊乱中扮演了重要角色。因为肠肌间神经元的活化恰好出现在经辣椒素预处理后, 这似乎表明肠肌间神经元的PAR-2表达仅仅只是中枢神经系统介导的肌间神经元的活化反射的结果, 这就需要进行进一步研究肠肌间神经丛在肠道敏感中的作用。综上所述, 结肠黏膜低度炎症可以增强胃肠道的内脏敏感性。肠道肌间神经丛上的PAR-2表达增加可造成脊髓背角的兴奋性增高, 其在脊髓水平上表现为多种兴奋性神经递质, 尤其是传递痛觉信号的递质如(SP、CGRP)的表达增强。但是增加的PAR-2如何导致内脏高敏感性、PAR-2的抑制剂是否能够降低内脏感觉过敏等还需要进一步深入研究, 这些研究可以为开发新的IBS治疗药物提供理论依据。

4 参考文献

- 1 Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B, Corinaldesi R. New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 2: 1-9
- 2 Adam B, Liebrechts T, Gschossman JM, Krippner C, Scholl F, Ruwe M, Holtmann G. Severity of mucosal inflammation as a predictor for alterations of visceral sensory function in a rat model. *Pain* 2006; 123: 179-186
- 3 Bueno L. Protease activated receptor 2: a new target for IBS treatment. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12 Suppl 1: 95-102
- 4 张艳丽, 王承党. 葡聚糖硫酸钠结肠炎模型的制作方法、特点及影响因素. *胃肠病学* 2006; 11: 56-58
- 5 Kim TW, Seo JN, Suh YH, Park HJ, Kim JH, Kim JY, Oh KI. Involvement of lymphocytes in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 302-305
- 6 Kruschewski M, Foitzik T, Perez-Cantó A, Hübötter A, Buhr HJ. Changes of colonic mucosal microcirculation and histology in two colitis models: an experimental study using intravital microscopy and a new histological scoring system. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2336-2343
- 7 Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 51-58
- 8 Park H. [The pathophysiology of irritable bowel syndrome: inflammation and motor disorder] *Korean J Gastroenterol* 2006; 47: 101-110
- 9 Al-Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology* 2000; 119: 1276-1285
- 10 La JH, Kim TW, Sung TS, Kang JW, Kim HJ, Yang IS. Visceral hypersensitivity and altered colonic mo-

- tility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2791-2795
- 11 Gay J, Fioramonti J, Garcia-Villar R, Bueno L. Alterations of intestinal motor responses to various stimuli after *Nippostrongylus brasiliensis* infection in rats: role of mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 207-214
- 12 Barbara G, Vallance BA, Collins SM. Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* 1997; 113: 1224-1232
- 13 Kayssi A, Amadesi S, Bautista F, Bunnett NW, Vanner S. Mechanisms of protease-activated receptor 2-evoked hyperexcitability of nociceptive neurons innervating the mouse colon. *J Physiol* 2007; 580: 977-991
- 14 王承党, 郭朝书. 肥大细胞和类胰蛋白酶在腹泻型肠易激综合征升结肠黏膜中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1682-1686
- 15 王承党, 郑雪雁, 郑玮玮. 结肠黏膜低度炎症对大鼠内脏感觉的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1621-1625
- 16 Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, Chapman K, Cottrell G, Andrade-Gordon P, Steinhoff M, Barbara G, Beck P, Bunnett NW, Sharkey KA, Ferraz JG, Shaffer E, Vergnolle N. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *J Clin Invest* 2007; 117: 636-647
- 17 Ohtori S, Takahashi K, Ino H, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H. Up-regulation of substance P and NMDA receptor mRNA in dorsal horn and preganglionic sympathetic neurons during adjuvant-induced noxious stimulation in rats. *Ann Anat* 2002; 184: 71-76
- 18 Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA. Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci* 2002; 22: 9086-9098
- 19 Robinson DR, McNaughton PA, Evans ML, Hicks GA. Characterization of the primary spinal afferent innervation of the mouse colon using retrograde labelling. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 113-124
- 20 Bueno L, Fioramonti J. Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol* 1999; 13 Suppl A: 42A-46A
- 21 Cenac N, Chin AC, Garcia-Villar R, Salvador-Cartier C, Ferrier L, Vergnolle N, Buret AG, Fioramonti J, Bueno L. PAR2 activation alters colonic paracellular permeability in mice via IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *J Physiol* 2004; 558: 913-925
- 22 Miampamba M, Tan DT, Oliver MR, Sharkey KA, Scott RB. Intestinal anaphylaxis induces Fos immunoreactivity in myenteric plexus of rat small intestine. *Am J Physiol* 1997; 272: G181-G189

编辑 李军亮 电编 李薇

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)

256层智能CT肝容积和门脉三维重建对Glisson鞘横断法肝切除的指导作用

唐继红, 付必莽, 朱洪, 唐波, 孙勇, 张捷, 杨达宽, 何晓顺

■背景资料

iCT等技术的出现使得精确评估肝脏容积成为可能。Glisson鞘横断肝切除治疗肝占位病变的效果已经得到公认, 在解剖和鞘外钩扎Glisson鞘而达到目标肝段或叶的完全阻断是理想术式, 但如果没有高精度iCT等血管和肝容积的三维重建的支持, 直接阻断目标肝段Glisson鞘就显得盲目。

唐继红, 付必莽, 朱洪, 张捷, 杨达宽, 昆明医学院第二附属医院肝胆胰外科一病区 云南省肝胆外科研究所 云南省昆明市 650101

唐波, 孙勇, 昆明医学院第二附属医院医学影像科 云南省昆明市 650101

何晓顺, 中山大学附属第一医院器官移植中心 广东省广州市 510080

唐继红, 副主任医师, 主要从事肝脏肿瘤临床外科治疗研究。

作者贡献分布: 患者iCT扫描由孙勇完成; 数据收集和iCT图像三维重建、数据分析主要由付必莽完成; 文章撰写主要由唐继红与付必莽完成; 病例选择和临床资料整理由张捷、唐继红、付必莽、朱洪及唐波完成; 研究设计、文章修改和审阅由付必莽、张捷、杨达宽及何晓顺完成。

通讯作者: 付必莽, 博士, 650101, 云南省昆明市, 昆明医学院第二附属医院肝胆胰外科一病区。bmangfu@msn.com
电话: 0871-5351281-2681

收稿日期: 2010-05-09

修回日期: 2010-10-21

接受日期: 2010-10-28

在线出版日期: 2010-11-18

Three-dimensional CT angiography for preoperative evaluation of patients undergoing hepatic resection using the Glissonean pedicle transection method

Ji-Hong Tang, Bi-Mang Fu, Hong Zhu, Bo Tang, Yong Sun, Jie Zhang, Da-Kuan Yang, Xiao-Shun He

Ji-Hong Tang, Bi-Mang Fu, Hong Zhu, Jie Zhang, Da-Kuan Yang, Department of Hepatobiliary Surgery (Division I), the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 560101, Yunnan Province, China

Yong Sun, Bo Tang, Department of Radiology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Xiao-Shun He, Department of Organ Transplantation, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Bi-Mang Fu, Department of Hepatobiliary Surgery (Division I), the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 560101, Yunnan Province, China. bmangfu@msn.com

Received: 2010-05-09 Revised: 2010-10-21

Accepted: 2010-10-28 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the use of three-dimensional CT angiography for preoperative evaluation of patients undergoing hepatic resection using the Glissonean pedicle transection method.

METHODS: The image data for 23 patients undergoing CT angiography with a Philips 256-slice Intelligent CT Scanner were analyzed with Philips brilliance software. Three-dimensional and maximum intensity projection (MIP) image reconstruction was performed. Based on the reconstructed data, liver segment resection models were developed to evaluate the possibility of preoperative virtual liver segment resection.

RESULTS: Based on three-dimensional reconstruction data, the average liver volume and weight, excluding the portal vein and hepatic vein, were $1\,219\text{ mL} \pm 191\text{ mL}$ and $1\,451\text{ g} \pm 227\text{ g}$, respectively. The portal vein could be divided into four types: I, II, III and IV. Patients with types I and II portal vein were fit for hepatic resection using the Glissonean pedicle transection method. There is no significant difference in the weight of resected liver between virtual and actual hepatectomy ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Three-dimensional CT angiography is a good strategy for preoperative evaluation of patients undergoing hepatic resection using the Glissonean pedicle transection method.

Key Words: Philips 256-slice Intelligent CT Scanner; Liver volume; Portal vein; Three-dimensional reconstruction; Glissonean pedicle transection method for hepatic resection

Tang JH, Fu BM, Zhu H, Tang B, Sun Y, Zhang J, Yang DK, He XS. Three-dimensional CT angiography for preoperative evaluation of patients undergoing hepatic resection using the Glissonean pedicle transection method. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3420-3424

摘要

目的: 研究智能CT(iCT)肝脏三维重建对Glisson鞘横断肝切除的指导作用。

方法: 23例肝癌患者术前行Philips 256层iCT肝脏三期扫描, 并以iCT自带软件对肝容积和门脉行三维重建, 根据门脉类型和容积重建结

■同行评议者

李健丁, 教授, 山西医科大学第一医院放射科CT室

果建立模拟解剖性肝切除模型. 临床用模拟模型指导临床Glisson鞘横断法肝切除并评价该模型对临床肝切除的指导作用.

结果: 23例重建肝脏容积为 $1\,311\text{ mL} \pm 323\text{ mL}$, 肝质量为 $1\,102\text{ g} \pm 271\text{ g}$. 针对Glisson横断法肝切除可将门脉分为规则型(I)、左中右型(II)、左右型(III)和特殊型(IV). I和II型患者适合Glisson鞘横断肝切除, 而III型和IV型宜需解剖Glisson鞘后阻断肝血流. 模拟切除肝模型和实际切除肝之间的肝质量无统计学差异($P>0.05$).

结论: 以256层iCT 3D肝脏重建指导Glisson鞘横断肝切除不但可准确了解肝内门脉的走行和分支类型, 找到最佳Glisson鞘的阻断位置, 而且可以精确评估切除肝的容积, 保证了肝切除的精准性和安全性.

关键词: 256层智能CT; 肝容积; 门脉; 三维重建; Glisson横断肝切除

唐继红, 付必莽, 朱洪, 唐波, 孙勇, 张捷, 杨达宽, 何晓顺. 256层智能CT肝容积和门脉三维重建对Glisson鞘横断法肝切除的指导作用. 世界华人消化杂志. 2010; 18(32): 3420-3424
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3420.asp>

0 引言

Glisson鞘在肝内的分布是肝脏分叶和分段的基础^[1], 因此如何处理和阻断Glisson鞘内的管道结构以判断肝叶或肝段的血供是解剖性肝切除中的关键步骤^[2]. 传统的解剖性肝切除中, 需首先解剖Glisson鞘, 然后选择性阻断鞘内供应拟切除肝段或肝叶的门静脉和肝动脉以达到减少出血、同时最大程度地减少残留肝脏缺血性损伤^[2-4]. 20世纪末日本Takasaki^[5]报道了Glisson鞘横断切肝法, 该法与传统解剖性肝切除方案截然不同, 因其不需要解剖Glisson鞘即可达到完全阻断需切除肝叶血供的目的而得到肯定^[6]. 但是, 国内未见Glisson鞘横断法肝切除的相关临床研究报告. 究其原因可能在于肝外科医师认为不解剖Glisson鞘即直接阻断入肝管道系统存在一定的盲目感. CT三维重建不但可术前了解肝内管道结构和走行^[7-9], 还可以对肝脏进行容积重建^[7], 从而评价残肝体积和肝功能储备情况^[10]. 256层Philips智能CT机(philips brilliance intelligent CT, iCT)临床应用为术前详细了解肝脏Glisson鞘内的结构提供理想平台^[11], 克服了直接行Glisson鞘阻断的盲目性. 我们采用256层iCT术前对肝

脏容积和门脉进行三维重建(three dimensional reconstruction, 3D), 研究其对Glisson鞘横断法解剖性肝切除的指导作用. 结果证实iCT肝脏容积和门脉三维重建可精确了解门脉和肝动脉在肝内分支走行, 对Glisson鞘横断法切肝具有良好的指导作用.

1 材料和方法

1.1 材料 2009-08/2010-07收集昆明医学院第二附属医院肝胆外科、可行根治性切除的肝癌患者23例. 其中男12例, 女11例, 年龄26-65(47 ± 16)岁. 全组经CT平扫或MRI诊断肝脏占位且能够行肝段、联合肝段或肝叶切除达到根治水平, 甲胎蛋白升高大于正常值2倍, 无明显肝硬化, 既往无肝门区手术史. 肝功能分为Child-Pugh A级18例、B级5例.

1.2 方法

1.2.1 扫描条件: 采用256层Philips Brilliance iCT机(philips medical systems, cleveland, USA), 扫描层厚1-2 mm, 扫描速度0.27 s/r. 对比剂为碘普罗胺注射液(优维显, 拜耳医药保健公司广州分公司), 用高压注射器经前臂肘正中静脉注射, 注射速率3-4 mL/s, 总剂量70-90 mL. 分别在注射后30、70、120 s行动脉期、门脉期及实质期三期扫描.

1.2.2 图像重建: 采用iCT机自带Philips Brilliance Workspace Portal软件, 血管以最大密度投影(maximum indensity projection, MIP)二维或三维模式图像重建. 图像要求清晰显示肠系膜上静脉与脾静脉汇合处至肝门脉四级分支, 360度旋转观察, 排除周围结构对门脉系统的影响, 同时观察门脉各分支与肝动脉的关系及其支配的肝段, 并居于Glisson鞘横断肝切除理论为基础^[5,6], 按照我们报道的分型方案进行分型^[12]. 肝脏容积测定采用volume程序三维仿真重建完整肝脏, 肝脏质量根据Chan等^[13]的公式计算.

统计学处理 采用SPSS16.0软件分析, 行 t 检验, $P<0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 肝脏容积重建结果 重建测定区域以完整肝被膜为界限、并且肝实质区除管道系统外无散在虚点为准, 3D重建后可以得到完整肝脏, 并观察其外部形态(图1)和内部管道结构(图2), 并且在调整窗宽和窗位的过程可以观察肝内血管和占位之间的关系(图3). 不包括二级以内门静脉和肝静脉系统在内, 23例患者平均肝脏容积为1

■**研发前沿**
肝占位患者可切除容积的评估一直是肝外科的难点和重点.

■相关报道

Takasaki报道一组877例肝癌患者行肝叶切除病例, 5年和10年总的生存率为63%和44%, 而单发肿瘤切除后5年和10年生存率为76%和54%, 高出其他中心20%.

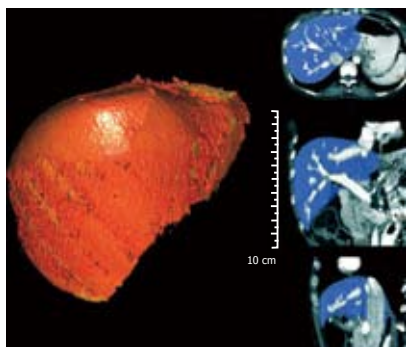


图1 肝脏三维重建及体积测定. 右侧图显示肝脏外形完整, 无其他比邻组织附着, 左侧图像显示除门脉和肝静脉系统外, 肝脏边界清楚、全部肝实质区域为无散在虚点存在, 表明整个肝脏得到完整重建, 并显示肝脏大小形态正常, 重建后整肝容积为1 270.8 cc.

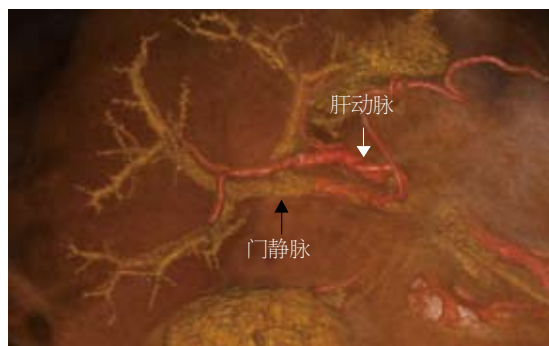


图2 重建清晰显示肝内门脉和动脉的走行. 可见门脉走于右后方(黑色箭头)、肝动脉走于左前方(白色箭头).

311 mL $\pm$ 323 mL, 肝质量为1 102 g $\pm$ 271 g.

2.2 门静脉的重建和分型 23例患者门脉一、二级分支类型可总结为以下四型: I型: 规则型. 门脉在第一肝门后先分为左右两支, 右侧主干 >1.0 cm且再分为右前叶支和右后叶支. 右前叶支分出S5、8段支, 右后叶支再分出S6、7段支. 左侧支分别发出S2、3、4段支(图4). II型: 左中右型. 门脉进入第一肝门即分成较为均一的左、中、右3支. 右侧支再发出S6、7段, 中间支发出S5、8段, 左侧支发出S2、3、4. 或者先分为左右两支主干, 但于右侧主干1.0 cm内发出有前叶支, 后者再分为S5、8段支; 或S6、7段支直接发自门脉主干, 在发出S5、8段和S2、3、4支(图5). III型: 左右型. 门脉进入第一肝门后分为左右两支, 右支主干的角度多大于左侧支, 且右侧主干同一水平分为较均一的3-4, 分别供应S5、6、7、8段, 而左侧支则发出S2、3、4段支(图6). IV型: 特殊型. 门脉在第一肝门分成左右两支, 但是左右两侧主干无规则的肝叶或肝段分支, 包括无规则的有前叶或有后叶支; 或门脉右后页支来自门脉主干等(图7). 各型所占比率

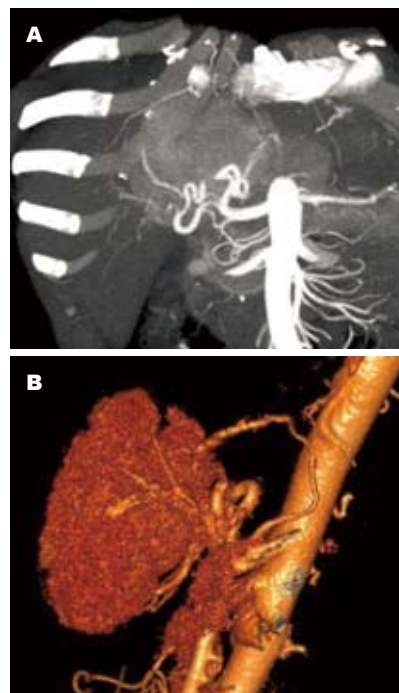


图3 肝内血管与肝占位间的关系. A: 可见肿瘤主要有肝动脉供血, 且肝左、右动脉均对肿瘤供血. B: 3D图像也可见肿瘤血供丰富.

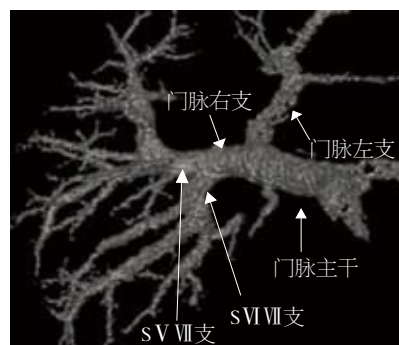


图4 规则型. 门脉在第一肝门分为左右两支. 右侧门脉主干分别发出右后叶(SV VII)支和右前叶(SVI VII)支, 左主干发出SII III IV支.

见表1.

2.3 实际切除肝与重建肝参数差异性分析 重建后按Takasaki Ken的理论行肝三段标志进行模拟解剖性肝切除(图8), 评估各段所占整肝容积的比例. 临床肝切除后立即称实际肝重, 对比分析模拟切除肝与实际切除肝之间的差异. 其中I和II患者按照Takasaki Ken的肝三段理论行解剖性临床肝切除, 并根据占位所在位置确定需切除的肝叶或段, 其中肝中段切除6例、肝左段切除8例、肝右段切除7例; 而III和IV型者则解剖Glisson鞘后再阻断切除肝段或叶血管. 全组病例术中术后无明显并发症发生, 顺利康复出院. 术前模拟切除肝质量与实际切除肝质量比较无

表 1 23例门静脉的分型及所占比率

分型	n	性别(男/女)	比率(%)
I	9	4/5	39.1
II	12	4/6	52.3
III	1	1/0	4.3
IV	1	1/0	4.3

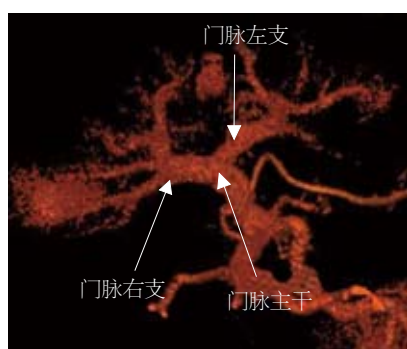


图 5 左右型. 门脉在第一肝门分为左右两支, 但S6、7段支在右侧主干不同平面发出。

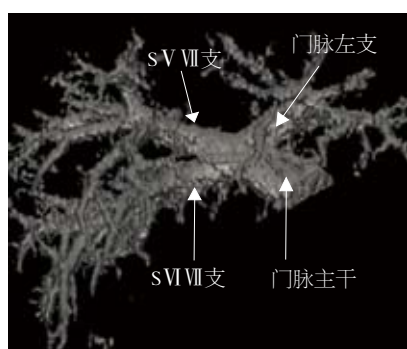


图 6 左中右型. 门脉在第一肝门同一水平发出较为均匀的左、中、右3支, 各主干再发出规则的肝段支。

统计学差异(表2)。

3 讨论

与Couinaud把肝脏的分为5叶8段的解剖不同^[14], Takasaki^[5,6]认为Glisson鞘及其鞘内管道在第一肝门分为左、中、右3支入肝, 分别独立支持左、中、右3个区域肝脏。左支位于肝圆韧带水平, 中支位于胆囊颈部水平, 而右支则位于胆囊颈右下方水平。因此, 除尾状叶外, 肝可分为左、中、右3叶, 每叶有独立的格林森系统支持。Takasaki^[5]的左段叶包括Couinaud分段的S2、3、4段, 肝中叶为Couinaud分段的S5、8段, 肝右段为S6、7段, 左中右叶约各占整肝体积1/3。如肝脏病变局限于其中一叶时, 可行相应的解剖性肝叶切除。由于左、中、右3个肝叶具有独立

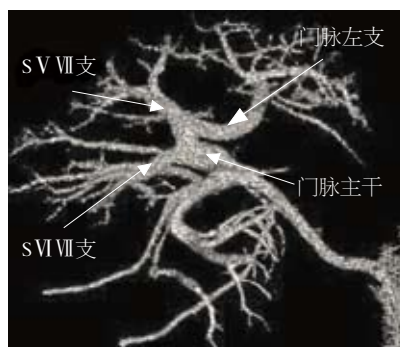


图 7 特殊型. 该例表现为门脉右主干缺如. 门脉主干在第一肝门先发出S V VII(右后叶)支, S V VIII段支与左主(S II III IV)支共干. 因此表现为右主干缺如, S V VIII段支源于左主干。

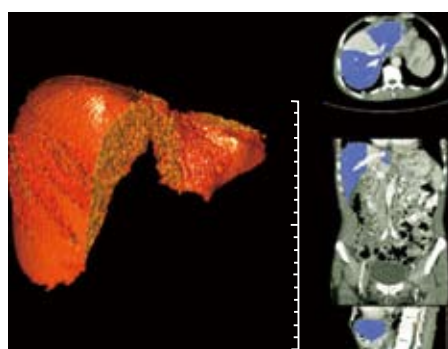


图 8 肝段切除模型. 模型显示整肝体积为1 270.8 cc, 切除SIV后的残肝体积为988.0 cc主干。

的格林森系统结构, 因此可在第一肝门部不解剖格林森鞘、直接于肝实质和Glisson间的潜在间隙绕过并结扎目标肝叶Glisson鞘即可阻断目标肝叶血流而达到解剖性肝切除目的。此法不但可减少解剖格林森系统带来的创伤, 而且减少手术时间和对肝脏的骚扰, 有利于降低医源性肿瘤转移率。Takasaki^[5,6]报道一组877例肝癌患者行肝叶切除病例, 5年和10年总的生存率为63%和44%, 而单发肿瘤切除后5年和10年生存率为76%和54%, 高出其他中心20%。

门静脉供血占肝脏供血的70%, 是格林森系统内管径最大的结构, 因此门脉解剖分布决定了解肝内格林森系统的分布。Glisson鞘横断肝叶切除时, 预先或术中判断肝内管道系统的走行是避免损伤的唯一有效手段。但由于肝脏解剖的复杂性和困难性, 术前获得第一肝门或肝内格林森系统具体走行一直是个难题, 门脉的分型与外科肝切除方案制定之间的关系也确鲜见文献报道。3D影像技术的出解决了这个难题^[8,10], 特别是256排iCT扫描的速度和层厚均明显优于64排和双源CT, 其重建技术可为更准确地了解格林森系统的详细分布提供更好的条件。

■创新盘点

本研究证实了利用iCT三维重建可以更有效地开展Glisson鞘肝切除, 做到术前即可清晰了解肝内Glisson鞘的分布, 有的放矢地阻断目标肝叶或肝段, 增加了肝部分切除治疗肝占位的安全性和有效性。

■同行评价

本文方法科学, 具有较高的临床应用价值, 对指导临床肝切除术提供了很好的影像技术。

表 2 256层iCT模拟切除肝与实际切除肝质量比较 (mean ± SD)

切除肝段或叶	质量对比(g)			占整肝百分率(%)		
	左肝切除	中肝切除	右肝切除	左肝	中肝	右肝
模拟切除肝质量	446 ± 122	489 ± 133	455 ± 106	31.3 ± 5.1	33.5 ± 3.3	35.4 ± 5.1
实际切除肝质量	455 ± 88	471 ± 100	497 ± 99	32.5 ± 7.3	32.4 ± 2.7	34.4 ± 3.6

本文对23例门脉一级和二级分支类型3D重建, 结果显示门脉类型与我们以前报道相吻合、与门脉类型与Covey等^[15]报道相似。但Covey等分型更注重门脉在肝内的变异, 而本研究分型则居于Glisson鞘横断肝切除。我们的重建显示不是所有的患者均适宜Glisson横断法切肝, 只有占91.3%的I和II型门脉适合采用该法, 而III和IV型(占8.6%)的患者如果不解剖Glisson鞘而直接结扎, 则有造成阻断不彻底导致出血过多或误伤的危险。术前采用256层iCT门脉3D重建可有效避免这一问题。本组病例由于具有术前3D重建支持, 故21例适合Glisson横断肝切除的采用该法阻断切肝, 而特殊类型者及时调整肝切除方案, 有效避免了损伤或阻断不彻底的可能。23例患者术中术后无任何并发症发生, 术后实际切除肝与重建模拟切除肝的质量对比结果也显示, 两者切除肝的质量无明显差异, 说明重建的可靠性并提高了解剖性肝切除的精准性。

可见, 256层iCT 3D重建获得了真实的肝容积和门脉类型, 解决了肝外科医师对肝内管道结构的抽象空间限制, 更容易理解需切除肝脏的具体界限。因此, 以256层iCT 3D肝脏重建指导Glisson鞘横断肝切除不但可准确了解肝内门脉的走行和分支类型, 找到最佳Glisson鞘的阻断位置, 而且可以精确评估切除肝的质量和体积, 保证了肝切除的精准性和安全性。

4 参考文献

- Couinaud C. [The anatomy of the liver] *Ann Ital Chir* 1992; 63: 693-697
- Bismuth H. Surgical anatomy and anatomical sur-

gery of the liver. *World J Surg* 1982; 6: 3-9

- Couinaud C. Surgical anatomy of the liver revisited. Pers ed, Paris 1989: 29-39
- Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am* 2010; 90: 643-653
- Takasaki K. Glissonean pedicle transection method for hepatic resection: a new concept of liver segmentation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5: 286-291
- Takasaki K. Glissonean Pedicle Transection Method for Hepatic Resection. *Springer* 2007: 1-13
- 陈熙, 杜正贵, 李波, 魏永刚, 严律南, 文天夫. 标准残肝体积对肝脏储备功能的评价. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1829-1833
- 钱农, 潘昌杰, 倪新初, 王翔, 刘炜, 邵燕惠, 薛跃君, 荣伟良. 多排CT三维血管成像在肝移植中的应用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 120-123
- 方驰华, 钟世镇, 吴坤成, 张刚庆, 虞春堂, 王兴海. MRI、CT三维重建肝脏管道系统的灌注和铸型的建模. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 216-217
- 李金平, 姜慧杰. 多层螺旋CT肝体积测量及临床应用. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1786-1791
- Chao SP, Law WY, Kuo CJ, Hung HF, Cheng JJ, Lo HM, Shyu KG. The diagnostic accuracy of 256-row computed tomographic angiography compared with invasive coronary angiography in patients with suspected coronary artery disease. *Eur Heart J* 2010; 31: 1916-1923
- 付必群, 张捷, 孙勇, 唐继红, 顾亚律, 唐波, 胡明道, 杨达宽, 何晓顺, 黄洁夫. 256层智能CT精准肝切除模型的建立及临床应用. *肝胆外科杂志* 2010; 18: 202-205
- Chan SC, Liu CL, Lo CM, Lam BK, Lee EW, Wong Y, Fan ST. Estimating liver weight of adults by body weight and gender. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2217-2222
- Hwang S, Lee SG, Choi ST, Moon DB, Ha TY, Lee YJ, Park KM, Kim KH, Ahn CS, Kim KK, Kim YD. Hepatic vein anatomy of the medial segment for living donor liver transplantation using extended right lobe graft. *Liver Transpl* 2005; 11: 449-455
- Covey AM, Brody LA, Getrajdman GI, Sofocleous CT, Brown KT. Incidence, patterns, and clinical relevance of variant portal vein anatomy. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 1055-1064

编辑 李军亮 电编 李薇

短链脂肪酸对结肠病变及作用机制的影响

李国法, 郑红斌

李国法, 浙江中医药大学第一临床医学院 浙江省杭州市 310053

郑红斌, 浙江中医药大学研究生处 浙江省杭州市 310053

作者贡献分布: 本文综述由李国法完成; 郑红斌审校。

通讯作者: 李国法, 310053, 浙江省杭州市滨江区滨文路, 浙江中医药大学第一临床医学院. guofa0401@163.com

收稿日期: 2010-07-18 修回日期: 2010-08-12

接受日期: 2010-08-17 在线出版日期: 2010-11-18

Effects of short-chain fatty acids on colonopathies and mechanisms involved

Guo-Fa Li, Hong-Bin Zheng

Guo-Fa Li, the First School of Clinical Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China

Hong-Bin Zheng, Graduate School, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Guo-Fa Li, Zhejiang Chinese Medical University, Binwen Road, Binjiang District, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China. guofa0401@163.com

Received: 2010-07-18 Revised: 2010-08-12

Accepted: 2010-08-17 Published online: 2010-11-18

Abstract

Short-chain fatty acids (SCFAs), primarily acetate, propionate and butyrate, are produced by anaerobic bacterial fermentation of undigested carbohydrates. They are not only the major source of energy for the colonic mucosa, but also can maintain the normal physiological functions of the colon, keep the homeostasis of the colonic mucosal barrier and prevent the occurrence of dysfunction, inflammation and canceration. In pathological state, SCFAs also play a role in inhibiting inflammation and tumor growth.

Key Words: Short-chain fatty acids; Colon; Inflammatory bowel disease; Tumor

Li GF, Zheng HB. Effects of short-chain fatty acids on colonopathies and mechanisms involved. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3425-3427

摘要

结肠内短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)主要包括乙酸、丙酸、丁酸, 他是由

不消化的碳水化合物经厌氧菌发酵后生成的。他不仅可以作为能源为结肠黏膜提供主要的能量, 而且能维护结肠的正常生理功能, 保持结肠肠道屏障的稳态, 预防肠道功能紊乱、炎症、癌变的发生。在病理状态下, SCFAs也能起到抑制炎症反应, 肿瘤细胞的生长的作用。

关键词: 短链脂肪酸; 结肠; 炎症性肠病; 肿瘤

李国法, 郑红斌. 短链脂肪酸对结肠病变及作用机制的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3425-3427

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3425.asp>

0 引言

短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)主要包括乙酸、丙酸、丁酸, 是指碳原子<6个的有机脂肪酸, 主要由食物中不消化的碳水化合物[包括: (1)非淀粉多糖; (2)抗性淀粉; (3)低聚糖; (4)糖醇], 在结肠腔内经厌氧菌酵解生成。SCFAs在结肠内可被结肠上皮细胞直接吸收, 不仅为结肠黏膜提供了主要的能量供应, 而且还可以维护黏膜免疫细胞, 肠道上皮细胞的完整性和杯状细胞的分泌功能; 可以降低结肠内pH值, 提高其酸性环境减少结肠内有害菌的生长; 增加水电解质的吸收。另外, SCFAs仍具有抗炎作用, 如减少促炎因子的生成、减轻炎症反应, 从而有利于黏膜炎症的修复。近来已经证实SCFAs能抑制某些肿瘤细胞增殖, 并诱导肿瘤细胞分化和凋亡。从而有必要对SCFAs对结肠病变及其作用机制的影响作一综述。

1 SCFAs对结肠生理功能的影响

结肠的生理屏障包括黏膜、黏膜分泌液、肠道益生菌、黏膜分泌免疫蛋白, 这些屏障对于维持结肠的生理功能起到重要作用。Sakata等^[1]报道SCFAs对黏膜有营养性作用。Sanderson^[2]报道SCFAs作用于肠上皮细胞可以协调黏膜的免疫系统。Barcelo等^[3]报道当丁酸浓度为5 mmol/L时可促进结肠黏液素的分泌, 增强黏液屏障功能。丁酸盐不仅为结肠上皮细胞提供主要能量, 而且在保障结肠黏膜屏障的正常的生理功

■背景资料

SCFAs在结肠内可被结肠上皮细胞直接吸收, 不仅为结肠黏膜提供了主要的能量供应, 而且还可以保护黏膜免疫细胞, 肠道上皮细胞的完整性和杯状细胞的分泌功能; 可以降低结肠内pH值, 提高其酸性环境, 减少结肠内有害菌的生长; 增加水电解质的吸收。

■同行评议者

陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第211医院中医科

■研发前沿

目前国内外学者对短链脂肪酸在结肠病变中发挥抗炎、免疫调节的研究, 以及其预防结肠黏膜癌变、诱导调控细胞生理凋亡、抑制肿瘤细胞增殖和浸润生长方面仍是研究热点、重点, 其确切机制和更深层次的探索是其亟待研究和解决的问题。

能、完整性上起到了极大作用, 其转运至细胞内被代谢主要是通过细胞膜上单羧酸转运蛋白-1(monocarboxylate transporter-1, MCT1)实现的, Borthakur等^[4]发现丁酸盐能促进MCT1的表达, 其机制是通过激活NF- κ B途径提高NF- κ B水平来激活MCT1启动子而起到调控作用的。

吸收水分电解质是结肠的主要功能之一, Zeissig等^[5]研究发现在糖皮质激素存在时, 丁酸盐通过SP3转录因子介导的蛋白转录, 可正性调节结肠上皮Na⁺通道, 维护结肠上皮对Na⁺的吸收。结肠的蠕动功能的调节受多方因素共同作用, Grider等^[6]发现, SCFAs通过刺激5-HT和神经降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)的持续释放来刺激大鼠结肠产生蠕动反射, 增加结肠蠕动。

2 SCFAs在炎症性肠病方面的作用

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 其病因病机仍不清楚。早在1980年Roediger就提出“饥饿学说”, 认为UC的发病与结肠上皮SCFAs氧化代谢障碍有关。从而引起了广大学者对SCFAs的研究和关注, 随着研究的不断深入, SCFAs对结肠炎症相关的细胞因子及基因调控的影响成为当前研究的热点。Nancey等^[7]研究发现IBD结肠黏膜丁酸氧化障碍与大量TNF- α 在结肠黏膜产生有关。Andoh等^[8]体外实验研究发现, 丁酸盐通过抑制NF- κ B活性起到抑制免疫应答的作用, 此外Lührs等^[9]临床试验研究发现UC患者丁酸盐灌肠治疗后, 黏膜炎症反应减轻也与减少NF- κ B阳性巨噬细胞数目有关。

另外, SCFAs通过影响某些炎性细胞释放细胞因子起到抗炎作用, 如Tedelind等^[10]在研究SCFAs影响中性粒细胞细胞因子释放时发现30 mmol/L的乙酸、丙酸、丁酸盐能减少中性粒细胞TNF- α 释放、对IL-8无影响, 各实验计量的SCFAs都可以抑制结肠320DM细胞内NF- κ B的活性及IL-6的释放, 30 mmol/L的丙酸盐和丁酸盐对免疫相关基因的表达有较强的抑制作用。Rose等^[11]认为丁酸盐能减少血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和细胞间黏附分子(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)表达; Cox等^[12]则发现SCFAs能诱导人单核细胞释放前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2), 同时能特异性抑制单核细胞趋化蛋

白1(monocyte chemotactic protein, MCP-1)的产生, 从而起到抗炎的作用。然而Kobori等^[13]研究发现, 丁酸盐能刺激肠道上皮促炎因子IL-32 α 的表达, 也能上调IL-1 β 诱导的IL-32 α mRNA的表达。这项研究如同许多学者所认为的, 目前有关SCFAs作用确实存在矛盾之处。

3 SCFAs在结肠肿瘤方面的作用

结肠肿瘤的发生与结肠上皮细胞在各种致病因素的作用下细胞发生无限增殖、分化不良及凋亡失控有关^[14], 近几年有关SCFAs能抑制某些肿瘤细胞增殖, 并诱导肿瘤细胞分化和凋亡为很多学者所证实。因而SCFAs尤其是丁酸产物的生物学作用近年来受到关注。丁酸不仅为正常结肠黏膜上皮细胞提供能量, 而且对黏膜上皮细胞的正常更新有监控作用。尽管丁酸盐抑癌机制仍不明确, 但其调控基因表达的作用被广大学者所认识。Emenaker等^[15]从多方面阐述了SCFAs抑制人结肠癌浸润生长机制: (1)细胞蛋白酶及蛋白酶抑制因子: SCFAs明显抑制尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase type plasminogen activator, uPA)表达、刺激基质金属蛋白酶抑制因子-1, 2的活性(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP-1, 2); (2)细胞凋亡、增殖基因蛋白: SCFAs明显抑制抑癌基因P53突变; 刺激P21基因、抗淋巴细胞凋亡蛋白Bcl-2的高表达, 同时对促淋巴细胞凋亡蛋白Bax起抑制作用。

Hinnebusch等^[16]认为SCFAs对结肠癌细胞表型的作用与丁酸诱导的组蛋白高度乙酰化密切相关。Waldecker等^[17]研究也发现SCFAs, 尤其丁酸对结肠腺癌细胞的组蛋白脱乙酰基酶活性的抑制效力最明显。然而, 另有学者认为丁酸盐还有其他细胞内作用位点, 如Daly等^[18]研究认为包括非组蛋白高度乙酰化、DNA甲基化作用改变、部分选择性抑制组蛋白磷酸化作用和细胞内激酶信号的调节作用。

Chen等^[19]研究丁酸盐对HT-29细胞作用发现, 丁酸盐可以抑制HT-29生长, 并使癌细胞处于细胞周期G₁期; 增加HT-29细胞锌指转录因子Kruppel样因子4/胃肠富集Kruppel样因子(Kruppel-like factor 4/gut-enriched Kruppel-like factor, KLF4/GKLF)mRNA水平及转活KLF4启动子。Lan等^[20]研究膳食纤维在结肠内酵解的产物SCFAs(丙酸和乙酸)所营造的不同酸性(pH5.5-7.5)环境发现, pH为6.0-7.5时SCFAs可触发HT-29腺癌细胞凋亡, pH为7.5时SCFAs诱导癌

■相关报道

Cox等则发现SCFAs能诱导人单核细胞释放前列腺素E2(PGE2), 同时能特异性抑制单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)的产生, 从而起到抗炎的作用。然而Kobori等研究发现, 丁酸盐能刺激肠道上皮促炎因子IL-32 α 的表达, 也能上调IL-1 β 诱导的IL-32 α mRNA的表达。

细胞处于细胞周期G₂/M期, 细胞随之凋亡; pH为5.5时SCFAs使癌细胞线粒体除极化、内膜通透性增加、ATP迅速耗竭、活性氧(reactive oxygen species, ROS)聚集增多, 从而导致细胞死亡。Scharlau等^[21]认为丁酸盐除了具有抑制结肠癌细胞生长和促进癌细胞凋亡作用外, SCFAs也能通过激活不同药物代谢酶如谷胱甘肽转移酶对癌变起到一定的预防作用, 这可以减少致癌物质的积累, 从而减少细胞突变降低癌症发生的危险因素。

4 结论

SCFAs对结肠的生理及病理的作用及其机制是极其复杂的, 随着分子生物技术和实验条件的进步, 其研究将会不断的深入。在炎症、肿瘤预防和治疗的诸多方面, SCFAs仍具有很多的研究价值和应用前景。

5 参考文献

- 1 Sakata T, Yajima T. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. *Q J Exp Physiol* 1984; 69: 639-648
- 2 Sanderson IR. Short chain fatty acid regulation of signaling genes expressed by the intestinal epithelium. *J Nutr* 2004; 134: 2450S-2454S
- 3 Barcelo A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC, Plaisancié P. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 2000; 46: 218-224
- 4 Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem* 2008; 103: 1452-1463
- 5 Zeissig S, Fromm A, Mankertz J, Weiske J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Butyrate induces intestinal sodium absorption via Sp3-mediated transcriptional up-regulation of epithelial sodium channels. *Gastroenterology* 2007; 132: 236-248
- 6 Grider JR, Piland BE. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G429-G437
- 7 Nancey S, Moussata D, Graber I, Claudel S, Saurin JC, Flourie B. Tumor necrosis factor alpha reduces butyrate oxidation in vitro in human colonic mucosa: a link from inflammatory process to mucosal damage? *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 559-566
- 8 Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Role of dietary fiber and short-chain fatty acids in the colon. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 347-358
- 9 Lührs H, Gerke T, Müller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberger F, Scheppach W, Menzel T. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 458-466
- 10 Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2826-2832
- 11 Rose DJ, DeMeo MT, Keshavarzian A, Hamaker BR. Influence of dietary fiber on inflammatory bowel disease and colon cancer: importance of fermentation pattern. *Nutr Rev* 2007; 65: 51-62
- 12 Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, Yang X, Zhu F, Liu J, Wang S, Monsma F, Vassileva G, Maguire M, Gustafson E, Bayne M, Chou CC, Lundell D, Jenh CH. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5549-5557
- 13 Kobori A, Bamba S, Imaeda H, Ban H, Tsujikawa T, Saito Y, Fujiyama Y, Andoh A. Butyrate stimulates IL-32alpha expression in human intestinal epithelial cell lines. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2355-2361
- 14 Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002; 89: 845-860
- 15 Emenaker NJ, Calaf GM, Cox D, Basson MD, Qureshi N. Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J Nutr* 2001; 131: 3041S-3046S
- 16 Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* 2002; 132: 1012-1017
- 17 Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 587-593
- 18 Daly K, Shirazi-Beechey SP. Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol* 2006; 25: 49-62
- 19 Chen ZY, Rex S, Tseng CC. Krüppel-like factor 4 is transactivated by butyrate in colon cancer cells. *J Nutr* 2004; 134: 792-798
- 20 Lan A, Lagadic-Gossman D, Lemaire C, Brenner C, Jan G. Acidic extracellular pH shifts colorectal cancer cell death from apoptosis to necrosis upon exposure to propionate and acetate, major end-products of the human probiotic propionibacteria. *Apoptosis* 2007; 12: 573-591
- 21 Scharlau D, Borowicki A, Habermann N, Hofmann T, Klenow S, Miene C, Munjal U, Stein K, Gleit M. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res* 2009; 682: 39-53

■创新盘点

本文从短链脂肪酸对结肠生理及具体的结肠相关疾病, 如炎症性肠病、结肠常见肿瘤的作用及其最新和热点的作用机制进行了深入的总结探讨。

■同行评价

本文综述全面, 可读性强, 具有重要的科学意义和实用价值。

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

肛周坏死性筋膜炎的诊治进展

林秋, 竺平, 孙桂东, 杨柏霖

■背景资料

肛周坏死性筋膜炎是一种发病率低, 疾病进展迅速, 死亡率高的疾病。由于临床表现无明显特征性, 易误诊, 导致治疗的不及时, 最终导致脓毒血症及多器官衰竭的死亡。目前治疗主要以彻底清创, 切开引流及抗生素的大剂量使用为主, 新的辅助疗法也可合理应用。

林秋, 竺平, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210029

孙桂东, 杨柏霖, 南京中医药大学附属医院肛肠科 江苏省南京市 210029

作者贡献分布: 本综述由林秋、竺平、孙桂东及杨柏霖共同完成; 杨柏霖审校。

通讯作者: 杨柏霖, 副主任医师, 210029, 江苏省南京市, 南京中医药大学附属医院肛肠科, blyang1971@163.com

收稿日期: 2010-07-31 修回日期: 2010-09-01

接受日期: 2010-09-07 在线出版日期: 2010-11-18

Diagnosis and treatment of perianal necrotizing fasciitis

Qiu Lin, Ping Zhu, Gui-Dong Sun, Bo-Lin Yang

Qiu Lin, Ping Zhu, the First Clinical Medical School, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Gui-Dong Sun, Bo-Lin Yang, Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Bo-Lin Yang, Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. blyang1971@163.com

Received: 2010-07-31 Revised: 2010-09-01

Accepted: 2010-09-07 Published online: 2010-11-18

Abstract

Perianal necrotizing fasciitis (PNF) is a serious infectious disease that results from a synergistic action of multiple bacteria and has a high mortality rate. In the early stage of PNF, symptoms are highly variable. Early diagnosis and adequate treatment are important for the prognosis of PNF. Therapeutic measures for PNF include surgical removal of necrotic tissue, drainage, debridement and full dose of broad-spectrum antibiotics. In this article, we will review the recent advances in the diagnosis and treatment of PNF.

Key Words: Perianal necrotizing fasciitis; Diagnosis; Treatment

Lin Q, Zhu P, Sun GD, Yang BL. Diagnosis and treatment of perianal necrotizing fasciitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3428-3431

摘要

肛周坏死性筋膜炎是由多种微生物协同作用

导致的一种高死亡率的严重感染性疾病。疾病初期, 全身症状和局部的表现常不一致, 延迟诊断与治疗可能会导致生命危险。治疗仍以外科手术清创为主, 如彻底清除坏死组织、充分引流创面及联合使用大剂量广谱抗生素等。我们就肛周坏死性筋膜炎的诊断与治疗作一综述。

关键词: 肛周坏死性筋膜炎; 诊断; 治疗

林秋, 竺平, 孙桂东, 杨柏霖. 肛周坏死性筋膜炎的诊治进展. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3428-3431

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3428.asp>

0 引言

肛周坏死性筋膜炎(perianal necrotizing fasciitis, PNF)是一种由多种细菌协同作用导致的严重、少见、快速进展的以肛周和会阴三角区筋膜坏死为特征的爆发性感染性疾病。男性发病率明显高于女性, 以50-60岁的老年男性为多见。临床表现从无明显皮肤坏死的肛管直肠或生殖区疼痛, 到感染部位皮肤和软组织的迅速坏死、蔓延, 最终导致全身脓毒血症和多器官衰竭^[1]。延迟诊断与治疗可能会导致生命危险。因此, 一旦怀疑为PNF, 必须进行积极的局部或全身治疗。目前, 国内外的文献均认为其治疗原则是以早期外科切开引流, 彻底清除局部坏死组织, 应用大剂量广谱抗生素为主。然而, 即使进行了积极的治疗, PNF的死亡率仍高达8%-67%^[2,3]。

1 解剖学

PNF常发生在肛周和生殖三角区, 并沿着筋膜层迅速蔓延, 通常只需数小时。掌握盆底和肛管会阴三角区筋膜结构对于理解PNF的炎症进展至关重要。会阴部最重要的浅筋膜是Colles'筋膜, 他延续为阴囊和阴茎的肉膜, 并与尿生殖膈融合。Colles'筋膜包绕阴茎, 向腹部延续成为腹壁浅筋膜深层(Scarpa's筋膜)。因此会阴部的任何感染能够快速侵犯阴囊和阴茎的皮肤, 以及腹壁浅筋膜。而侧方蔓延的感染被Colles'筋膜与耻骨支的连接和阔筋膜所限制。Bucks'筋膜是围绕

■同行评议者

沈克平, 主任医师, 上海龙华医院 肿瘤外科

阴茎的深筋膜. 尿道外伤或尿道周围腺体感染被Bucks'筋膜局限在阴茎腹侧. 如果Bucks'筋膜被感染导致损伤, 筋膜炎则能通过肉膜和Colles'筋膜, 侵犯全部的会阴部和腹壁. 尽管有报道称因PNF进展导致切除睾丸, 但由于睾丸特殊的筋膜保护, 并受到来源于腹膜后腔的血供, 这种病例极少见. 一旦出现感染涉及到睾丸, 必须警惕腹腔内或腹膜后的感染^[4].

会阴后侧被提肛肌所限制. 提肛肌与肛门外括约肌在肛管直肠后侧融合, 如果肛门括约肌复合体被原发感染或者坏死组织破坏, 感染能沿着直肠进入骶前间隙、膀胱后间隙以及骨盆直肠组织, 继而波及腹膜后间隙到达上腹部水平, 在极少数患者中甚至能够沿脊椎旁的间隙到达颈部, 最终, 感染渗入到腹膜腔, 引起弥漫性的腹膜炎.

2 细菌学

PNF通常是由多种细菌共同感染引起的. 最常见的有链球菌、葡萄球菌、大肠埃希杆菌、拟杆菌类、梭状芽孢杆菌、念珠菌等^[5]. 这些菌属通常存在于肛管及远端直肠. 生理情况下, 这些病原菌毒性很低, 不会对人体造成危害. 存在易感因素如免疫抑制、糖尿病等的患者当出现尿道、胃肠道和皮肤的侵袭性损伤时, 这些细菌就会变成致病菌, 并协同作用产生极强的毒性和破坏力^[6]. 因此, 在多数病例中, 感染特征表现为厌氧菌和需氧菌的合并感染, 局部培养存在3种或3种以上的细菌^[7,8], 只有极少数的病例伤口分泌物培养无细菌生长^[7,9].

3 病因学

PNF最常见的诱发因素是肛管直肠的感染、尿道生殖区的感染和损伤, 以及会阴生殖区皮肤损伤. 肛管直肠的感染是一个最主要的独立因素, 包括肛管直肠的原发感染、肛管直肠手术后的继发感染^[1]. Eke等^[10]统计的1 726例患者的感染来源, 其中皮肤感染24%, 结直肠感染21%, 泌尿道感染19%. 皮肤损伤的来源包括褥疮、脓肿及外伤, 此类患者多数同时存在糖尿病. 糖尿病患者皮肤通常因存在较多的细菌而容易感染, 同时由于糖尿病患者自身的趋化功能、吞噬功能受到损伤, 以及糖尿病血管病变影响了病变部位的血液循环等, 这些因素更有利于局部感染厌氧菌^[11]. 对于根据临床表现无法确定原始感染病灶的患者, 则怀疑感染来源于腹腔. 腹腔来源的感染有阑尾炎、

结肠憩室炎、结肠癌、克罗恩病和绞榨性疝. 此病的易感因素包括糖尿病、肿瘤、长期类固醇类药物的治疗、放化疗、免疫抑制、克罗恩病以及酒精滥用等. 糖尿病是最常见的易感因素, 文献报道36.4%-76.9%的患者合并糖尿病, 这些患者的死亡率明显升高^[4,12-14].

PNF的感染机制是多因素的, 多种感染细菌的协同作用可以很好地解释本病. 细菌体在人体内产生胶原酶和肝素酶, 需氧菌诱导血小板聚集和补体沉积, 进而导致微血管血栓的形成、皮肤的坏死; 厌氧菌如拟杆菌能产生肝素酶和胶原酶, 肝素酶激活血管中血栓形成, 也导致小血管中血栓形成, 加快缺血和坏死的进展. 链球菌和葡萄球菌产生透明质酸酶、链激酶和链道酶, 使坏死和缺血组织部位的吞噬细胞的功能严重受损, 导致感染坏死迅速发展, 局部表现为水样坏死, 而不是黏稠的脓液^[15]. 厌氧菌产生的氢气和氮气在皮下组织内聚集, 导致捻发音的产生^[16].

4 临床表现与诊断

PNF通常以会阴体或肛管直肠周围的疼痛为首发症状, 这种疼痛和患者局部的体格检查(如病变区域的肿胀、瘙痒)不相称^[1]. 多数患者的临床表现不明显, 并且容易误诊. 患者最初可能会出现一些前驱症状, 如会阴生殖区不适、乏力、体温持续升高. 继而局部红斑、肿胀, 会阴生殖区或生殖器官触痛明显. 随着皮肤及皮下组织的炎症加重和典型的皮肤坏死的出现, 临床表现变得清晰. 表皮坏死发黑是皮下血管栓塞所致. 因此, 表皮坏死发黑很少是首发症状. 尽管是细菌感染性疾病, 但局部并没有形成典型的脓液, 表现为洗肉水样的稀薄液体. 由于细菌导致皮下气体的形成, 局部检查时通常存在明显的捻发音. 病情进展非常迅速, 即使原发病灶没有明显的进展, 患者的全身状况急剧恶化. 疾病发生后不久, 就有可能并发持续高热、心动过速、容量不足、贫血、血清肌酐酶升高和电解质紊乱等全身脓毒血症. 若没有恰当及时的治疗, 最终可导致多脏器功能衰竭, 甚至死亡. 在1篇包括1 726例患者的文献报道中, 死亡率为16%, 死亡的主要因素不是局部疾病的进展, 而是严重的全身系统性病变, 如脓毒血症、凝血障碍、急性肾衰和多脏器功能衰竭^[10]. 许多学者认为合并糖尿病是患者发生全身脓毒血症的独立因素, 这些患者的死亡率高达36%-50%^[12,13].

诊断主要是建立在临床表现的基础上, 结

■ 相关报道

Jull等研究蜂蜜对于急慢性伤口的疗效, 与传统的敷料相比, 蜂蜜对于表浅的、小面积的烧伤伤口能够稍微缩短愈合时间(WMD-4.68 d, 95%CI: -4.28~-5.09 d), 但是对于腿部溃疡的慢性伤口没有显著作用(RR 1.15, 95%CI: 0.96-1.38). Korhonen高压氧联合彻底的外科清创、抗生素治疗33例坏死性筋膜炎死亡率9%.

■ 创新盘点

本文从肛周坏死性筋膜炎的诊断治疗出发, 系统阐述了现有的检查和治疗的研究, 为临床提供了总体的诊疗思路及方法.

■应用要点

本文为坏死性筋膜炎的诊断治疗提供了总体的思路与方法,并为以后该病的临床治疗和研究提供了新的方向.

合必要的实验室检查. 入院时这些患者的实验室检查结果与单纯的肛周脓肿明显不同, 通常会出现白细胞增多伴核左移, 血小板减少、高血糖症、低钠血症、低蛋白血症和贫血. 超声检查能够在疾病的早期阶段发现软组织内存在充满气体的囊泡状改变, 这是PNF局部特征性表现. 阴囊超声能够排除其他原因的阴囊急症, 证明阴囊皮下气体的存在和睾丸正常. CT和MRI能够帮助定位感染来源器官. CT扫描有可能会发现不对称的筋膜的增厚、皮下气肿、液体潴留和组织水肿. 尽管不是所有患者身上都能观察到皮下气肿, 但皮下气肿预示着PNF的可能性^[17]. 睾丸和附睾没有改变, 坏死区域存在捻发音, 是PNF的特征性表现.

5 治疗

及时地纠正水电解质平衡紊乱, 重新建立心肺功能在PNF合并有全身脓毒血症的患者具有重要意义^[4]. 多数患者一开始就需采用2种或3种大剂量广谱抗生素联合使用, 通常是三代头孢菌素、B-内酰胺酶抑制剂、克林霉素、甲硝唑、氨基糖苷类等联合应用, 共同对抗需氧菌和厌氧菌. 应根据药敏试验及时更换敏感的抗生素. 抗真菌的药物比如氟康唑、两性霉素B在确定存在真菌感染的患者中也必须使用.

PNF患者需急诊手术. 手术应清除所有的坏死组织以阻止感染的进一步蔓延, 减少坏死组织、细菌和毒素吸收导致的全身症状. 手术包括感染部位的彻底清创、坏死筋膜的切除、充分引流^[1-17]. 如果没有发现明显的会阴部病因, 应考虑腹部来源的感染, 必要时需破腹部探查^[18]. 会阴部皮肤、阴囊、和阴茎坏死组织必须去除, 直至出现具有正常血供的存活组织为止. 由于感染会沿着解剖学筋膜层蔓延, 因此清创时要尽可能避免损伤正常筋膜层, 防止感染蔓延到其他区域, 尤其是当坏死仍然局限在腹膜后间隙而腹膜未被侵犯时^[1]. 随后的24-48 h内, 可能需进一步的外科探查术和多次、必要的清创术, 这样可以阻止感染坏死进一步扩散. 术后应连续、多次进行创面坏死组织清除, 直到感染被很好地控制. 如果存在广泛的直肠或肛门括约肌的破坏或者大面积的会阴部的清创, 为了保护伤口避免排泄物环境的污染, 必要时需行结肠造口, 甚至直肠切除术^[1,3,19]. 当有腹腔内感染源, 或者在广泛清创后仍有坏死蔓延时, 睾丸可能会感染坏死, 则需要行睾丸切除术^[21].

术后必须每日进行常规换药, 局部应用生理盐水或0.25%的碘伏冲洗以去除创面分泌物和坏死组织. 手术后伤口的愈合可以使用未加工过的蜂蜜. 研究证实, 蜂蜜能够抑制细菌的繁殖, 产生氧气, 吸收创面分泌物, 并阻止坏死进展^[20,21]. Jull等^[22]通过随机对照研究评估蜂蜜对于急慢性伤口的疗效, 与传统的敷料相比, 蜂蜜对于表浅的、小面积的烧伤伤口能够稍微缩短愈合时间, 但是对于腿部溃疡的慢性伤口没有显著作用. 因此认为目前还没有足够的证据来指导临床. 多数患者术后创面能够愈合, 但对于部分进行广泛清创的患者可能需要通过皮瓣移植防止广泛疤痕^[23].

高压氧是有效的辅助治疗, 有助于改善预后情况^[24,25]. 首先, 通过形成氧自由基, 高压氧治疗对于厌氧菌有直接的对抗作用; 其次, 在进行吞噬作用的时候, 中性粒细胞耗氧量增加, 高压氧治疗可以提高中性粒细胞的活性; 最后, 高压氧治疗还可以促进成纤维细胞的生长和血管的形成, 从而促进创面的愈合. Al-Waili等^[26]认为高压氧的治疗能够消退炎症、减少炎症免疫细胞因子, 刺激伤口的修复, 维持伤口的氧合作用, 增加抗氧化剂的酶类, 以及治疗组织的低氧血症和放射性坏死. 多篇文献^[25,27,28]报道高压氧治疗能明显降低PNF患者的死亡率. 如果患者没有明确的禁忌证, 高压氧治疗可以在充分清创引流后进行. 部分作者推荐使用真空辅助闭合(vacuum-assisted closure, VAC)来帮助术后创面愈合, 通过一个便携式的泵连接着伤口上的一个泡沫海绵给予连续的负压促进伤口的愈合^[4,29].

6 预后

PNF的死亡率为8%-67%, 死亡主要源于疾病快速进展导致的脓毒血症和多器官衰竭^[2,3]. 当患者伴有糖尿病、脓毒血症、酒精依赖、免疫抑制、长期的应用类固醇类药物的时候, 都预示着一个较高的死亡率. Corcoran等^[30]通过回顾分析1996-2006年的PNF患者情况, 认为PNF严重指数(fournier's gangrene severity index, FGSI)是评价PNF患者代谢失常的一种客观有效的定量分析方法, 当FGSI>9时, 预示患者高死亡率. Bilali等^[31]认为患者白细胞计数对预后有影响, 当白细胞>20.000时死亡率增高.

7 结论

PNF主要是由多种微生物协同作用导致的严重

感染, 仍然是一个威胁生命, 高死亡率的疾病。疾病初期, 患者的全身症状和局部的表现常不一致。临床迅速的诊断和充分的治疗是必须的。外科清创、坏死组织的彻底清除、创面的充分引流以及抗生素的使用仍是治疗的主要手段。高压氧、VAC、蜂蜜等亦可以作为辅助的治疗手段。易感因素(糖尿病、免疫缺陷、酒精依赖、长期的类固醇类药物的使用等)对预后产生重要影响。

8 参考文献

- 1 Morpurgo E, Galandiuk S. Fournier's gangrene. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 1213-1224
- 2 Huber P Jr, Kissack AS, Simonton CT. Necrotizing soft-tissue infection from rectal abscess. *Dis Colon Rectum* 1983; 26: 507-511
- 3 Laucks SS 2nd. Fournier's gangrene. *Surg Clin North Am* 1994; 74: 1339-1352
- 4 Czymek R, Hildebrand P, Kleemann M, Roblick U, Hoffmann M, Jungbluth T, Bürk C, Bruch HP, Kujath P. New insights into the epidemiology and etiology of Fournier's gangrene: a review of 33 patients. *Infection* 2009; 37: 306-312
- 5 Ersay A, Yilmaz G, Akgun Y, Celik Y. Factors affecting mortality of Fournier's gangrene: review of 70 patients. *ANZ J Surg* 2007; 77: 43-48
- 6 Zaba R, Grzybowski A, Prokop J, Zaba Z, Zaba C. Fournier's gangrene: historical survey, current status, and case description. *Med Sci Monit* 2009; 15: CS34-CS39
- 7 Aşci R, Sarıkaya S, Büyükalpelli R, Yilmaz AF, Yıldız S. Fournier's gangrene: risk assessment and enzymatic debridement with lyophilized collagenase application. *Eur Urol* 1998; 34: 411-418
- 8 Yaghan RJ, Al-Jaberi TM, Bani-Hani I. Fournier's gangrene: changing face of the disease. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1300-1308
- 9 Enriquez JM, Moreno S, Devesa M, Morales V, Platas A, Vicente E. Fournier's syndrome of urogenital and anorectal origin. A retrospective, comparative study. *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 33-37
- 10 Eke N. Fournier's gangrene: a review of 1726 cases. *Br J Surg* 2000; 87: 718-728
- 11 Rajbhandari SM, Wilson RM. Unusual infections in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1998; 39: 123-128
- 12 Korkut M, İçöz G, Dayangaç M, Akgün E, Yeniay L, Erdoğan O, Cal C. Outcome analysis in patients with Fournier's gangrene: report of 45 cases. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 649-652
- 13 Yanar H, Taviloglu K, Ertekin C, Guloglu R, Zorba U, Cabioglu N, Baspinar I. Fournier's gangrene: risk factors and strategies for management. *World J Surg* 2006; 30: 1750-1754
- 14 Unalp HR, Kamer E, Derici H, Atahan K, Balci U, Demirdoven C, Nazli O, Onal MA. Fournier's gangrene: evaluation of 68 patients and analysis of prognostic variables. *J Postgrad Med* 2008; 54: 102-105
- 15 Smith GL, Bunker CB, Dinneen MD. Fournier's gangrene. *Br J Urol* 1998; 81: 347-355
- 16 Bhatnagar AM, Mohite PN, Suthar M. Fournier's gangrene: a review of 110 cases for aetiology, predisposing conditions, microorganisms, and modalities for coverage of necrosed scrotum with bare testes. *N Z Med J* 2008; 121: 46-56
- 17 Cabrera H, Skoczdoopole L, Marini M, Della Giovanna P, Saponaro A, Echeverría C. Necrotizing gangrene of the genitalia and perineum. *Int J Dermatol* 2002; 41: 847-851
- 18 Başoğlu M, Gül O, Yildirgan I, Balik AA, Ozbey I, Oren D. Fournier's gangrene: review of fifteen cases. *Am Surg* 1997; 63: 1019-1021
- 19 Caird J, Abbasakoor F, Quill R. Necrotising fasciitis in a HIV positive male: an unusual indication for abdomino-perineal resection. *Ir J Med Sci* 1999; 168: 251-253
- 20 Hejase MJ, Simonin JE, Bihrl R, Coogan CL. Genital Fournier's gangrene: experience with 38 patients. *Urology* 1996; 47: 734-739
- 21 Tahmaz L, Erdemir F, Kibar Y, Cosar A, Yalcın O. Fournier's gangrene: report of thirty-three cases and a review of the literature. *Int J Urol* 2006; 13: 960-967
- 22 Jull AB, Rodgers A, Walker N. Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD005083
- 23 Frezza EE, Atlas I. Minimal debridement in the treatment of Fournier's gangrene. *Am Surg* 1999; 65: 1031-1034
- 24 Korhonen K, Hirn M, Niinikoski J. Hyperbaric oxygen in the treatment of Fournier's gangrene. *Eur J Surg* 1998; 164: 251-255
- 25 Capelli-Schellpfeffer M, Gerber GS. The use of hyperbaric oxygen in urology. *J Urol* 1999; 162: 647-654
- 26 Al-Waili NS, Butler GJ, Lee BY, Carrey Z, Petrillo R. Possible application of hyperbaric oxygen technology in the management of urogenital and renal diseases. *J Med Eng Technol* 2009; 33: 507-515
- 27 Benizri E, Fabiani P, Migliori G, Chevallier D, Peyrottes A, Raucoules M, Amiel J, Mouiel J, Toubol J. Gangrene of the perineum. *Urology* 1996; 47: 935-939
- 28 Mindrup SR, Kealey GP, Fallon B. Hyperbaric oxygen for the treatment of Fournier's gangrene. *J Urol* 2005; 173: 1975-1977
- 29 Tucci G, Amabile D, Cadeddu F, Milito G. Fournier's gangrene wound therapy: our experience using VAC device. *Langenbecks Arch Surg* 2009; 394: 759-760; author reply 757-758
- 30 Corcoran AT, Smaldone MC, Gibbons EP, Walsh TJ, Davies BJ. Validation of the Fournier's gangrene severity index in a large contemporary series. *J Urol* 2008; 180: 944-948
- 31 Bilali S, Celiku E, Bilali V. It's Fournier's gangrene still dangerous? *Acta Chir Iugosl* 2009; 56: 77-80

■同行评价

本文内容新颖, 系统综述了坏死性筋膜炎发病、诊断及治疗的研究进展, 为该病诊治提供了新的思路。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

体质学说对中医药治疗幽门螺杆菌感染的启示

陆为民, 潘琳, 吴静

■背景资料

我国为*H.pylori*的高感染国家, 但并非所有的*H.pylori*感染者都必然发生胃炎、萎缩、肠化、异型增生, 甚至胃癌, 多数人终生无症状或仅表现为慢性胃炎。西医对*H.pylori*感染的治疗取得了一定的成效, 但抗生素的普遍使用, *H.pylori*的耐药、再感染等问题无法解决。其原因除了致病机制的复杂性以外, 可能与体质密切相关。体质学说的发展为中医药治疗*H.pylori*感染提供了新思路。

陆为民, 吴静, 江苏省中医院消化科 江苏省南京市 210029
潘琳, 江苏省南京市江宁区中医院内科 江苏省南京市 211100
江苏省中医药局基金资助项目, No. 200304
作者贡献分布: 陆为民负责论文整体构思、撰写; 潘琳负责文献检索、摘录; 吴静负责英文摘要书写。
通讯作者: 陆为民, 主任中医师, 硕士导师, 210029, 江苏省南京市, 江苏省中医院消化科. wmlu@163.com
电话: 025-86618941 传真: 025-86618941
收稿日期: 2010-07-17 修回日期: 2010-08-24
接受日期: 2010-09-07 在线出版日期: 2010-11-18

Treatment of *Helicobacter pylori* infection by Chinese medicine: what we can learn from the physical constitution theory?

Wei-Min Lu, Lin Pan, Jing Wu

Wei-Min Lu, Jing Wu, Department of Gastroenterology, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Lin Pan, Department of Internal Medicine, Jiangning District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 211100, Jiangsu Province, China
Supported by: the Foundation of Jiangsu Provincial Traditional Chinese Medicine Bureau, No. 200304
Correspondence to: Wei-Min Lu, Department of Gastroenterology, Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wmlu@163.com
Received: 2010-07-17 Revised: 2010-08-24
Accepted: 2010-09-07 Published online: 2010-11-18

Abstract

The widespread use of antibiotics has been linked to the development of resistance to antibiotics, bacterial variation and re-infection in the treatment of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection. Treatment of *H.pylori* infection by Chinese medicine possesses some advantages but has a low eradication rate. The research on the physical constitution provides us some new ideas. Spleen and Stomach are the foundation of physical constitution. *H.pylori* infection is closely related to the physical constitution of patients, and the physical constitution determines the development, syndrome transformation and prognosis of *H.pylori* infection. Treatment of *H.pylori* infection should not be limited to "eradication" or "killing bacteria once it was detected". Due

to the adjustability of the physical constitution, *H.pylori* infection can be treated by enhancing vital Qi and dispelling evil on the basis of syndrome differentiation, disease differentiation and constitution differentiation.

Key Words: Physical constitution; *Helicobacter pylori*; Treatment by Chinese medicine

Lu WM, Pan L, Wu J. Treatment of *Helicobacter pylori* infection by Chinese medicine: what we can learn from the physical constitution theory? *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3432-3435

摘要

由于抗生素的普遍使用, 幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染的治疗除副作用外, 耐药、变异及再感染等问题应引起重视和深思。中医药治疗*H.pylori*有一定优势, 但根除率低, 体质研究的开展为我们提供了新思路。本文认为脾胃是体质形成发展的基础, 与*H.pylori*感染的发生密切相关, 体质决定了*H.pylori*感染后的发病、预后及证候转化转归, 启示对*H.pylori*感染的治疗, 不能囿于“根除”及“见菌治菌”的论治思路, 结合体质的可调性, 通过邪正祛邪, 辨证辨病结合辨体论治, 有助于发挥中医药特色, 提高疗效。

关键词: 体质; 幽门螺杆菌; 中医药治疗

陆为民, 潘琳, 吴静. 体质学说对中医药治疗幽门螺杆菌感染的启示. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3432-3435
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3432.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H.pylori*)是多种慢性胃病的重要致病因子, 与胃癌的发生有关^[1], 1994年WHO将其定为 I 类致癌因子^[2], 根除*H.pylori*可阻断或延缓胃黏膜萎缩和肠化的发展。然而, *H.pylori*感染后只有少数人发病, 且目前西医对*H.pylori*耐药、再感染等问题尚无有效的解决方法。体质是人体生命过程中, 在先天禀赋和后天获得基础上所形成的形态结构、生理机能和心理状态方面的综合的、相对稳定的固有特质, 是生长、发育过程中所形成的与自然、社会环境相适应

■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

的人体个性特征, 表现为人体对某些病因和疾病的易感性, 以及疾病转变转归中的某种倾向性, 对机体疾病发生、发展和临床治疗有着重要的影响^[3,4]. 体质学说的发展为中医药治疗*H.pylori*感染提供了新思路. 本文拟从体质角度, 深化中医对*H.pylori*感染的认识, 探讨其对*H.pylori*感染中医药治疗带来的启示.

1 脾胃是体质形成发展的基础, 与*H.pylori*感染的发生密切相关

体质的概念揭示出体质在形成和发展的动态过程中, 始终遵循着“禀受于先天, 充养于后天”的基本规律, 如张介宾在《景岳全书》中所说: “盖人之始生, 本乎精血之源; 人之既生, 由乎水谷之养. 非精血无以立形体之基, 非水谷无以成形体之壮. 精血之司在命门, 水谷之司在脾胃……故人之身生至老, 凡先天之有不足者, 但得后天培养之力, 则补天之功, 亦可居其强半, 此脾胃之气所关于人生者不小.” 由此可见, 人之体质虽源于先天之精, 但体质的形成赖后天脾胃的滋养. 脾胃强, 则气血生化有源, 体质得养而强健; 脾胃弱, 体质失养而虚弱. 故脾胃实为体质强厚薄弱的根本.

*H.pylori*属中医学“邪气”的范畴, 中医理论认为“正气存内, 邪不可干”, “邪之所凑, 其气必虚”, 若后天之本不足, 则易受*H.pylori*的感染侵袭^[5]. 我们既往的研究^[6-12]结果证明脾胃虚弱是*H.pylori*感染的病理基础, 而在其基础上形成的气滞、血瘀、郁热、湿阻等病理变化为*H.pylori*附着、繁殖、致病提供了客观条件. 本病病程较长, 反复发作, 病机以正虚邪实, 虚实夹杂为主. 正虚是脾胃虚弱, 邪实为湿热蕴结. 脾胃虚弱, 运化不利, 水湿内停, 酿成湿热, 而*H.pylori*感染后可进一步损伤脾胃, 加重脾胃虚弱的程度, 使机体无力祛邪, 不能清除*H.pylori*. 脾胃为后天之本, 《脾胃论》提出: “平则万物安, 病则万化危”, “内伤脾胃, 百病由生”, “百病皆由脾胃衰而生也”. 张仲景则提出了“四季脾旺不受邪”的著名论点, 因此, 只有脾胃功能正常, 体质得以后天脾胃的滋养, *H.pylori*才不易侵入胃腑, 即使感染, 也不致发病, 或发病轻微, 或易于祛除.

2 体质与*H.pylori*感染后的发病、预后

我国为*H.pylori*的高感染国家, 普通人群中的感染率在50%-80%之间, 但并非所有的*H.pylori*感染者都必然发生胃炎、萎缩、肠化、异型增

生, 甚或胃癌, 多数人终生无症状或仅表现为慢性胃炎. 人类受*H.pylori*感染后之所以出现不同的临床结局, 单纯的细菌因素不能解释这一现象, 目前认为与宿主遗传易感性、胃黏膜防御功能、环境和菌株特异性等有关^[13-19]. 研究表明, 宿主的白细胞介素(interleukin, IL)1等细胞因子、HLA基因多态性、环境暴露和*H.pylori*毒力基因的协同作用决定了*H.pylori*感染的程度和萎缩、肠化的发生及发展. 细胞因子IL1 β 能促进胃部炎症的产生与发展, 启动或放大机体对*H.pylori*感染的炎性反应, 是目前发现的最有力的抑酸剂, 其抑酸作用可导致胃黏膜萎缩, 从而增加胃癌发生的危险性^[20]. El-Omar等^[21]研究显示, IL1 β -31C/T SNP影响转录起始复合体的形成, 杨婕等^[22]认为, 胃癌高发区IL1 β -31TT基因型使患胃癌的风险性增加了7倍以上. HLA-DQA1*0102、DQA1*0301和HLA-DQB1*0401等位基因缺乏、表达增加可能也是*H.pylori*相关萎缩性胃炎的危险因素^[23-25]. 也有研究表明^[26-28], *H.pylori*阳性患者中p21和p53的表达及突变率均高于*H.pylori*阴性患者, 提示*H.pylori*感染与宿主的癌基因活化有关. Ng等^[29]发现, *H.pylori*阳性胃癌患者中的GST2 μ 无效基因的表达及纯合子检出率均高于*H.pylori*阴性患者, GST2 μ 酶的丢失可能增加发展成为胃癌的风险. 由此可见, 宿主因素在*H.pylori*感染的发生及结局中起着重要作用. 从中医体质角度而言, 体质因素可能决定了*H.pylori*感染后的发病和预后.

3 体质与*H.pylori*感染后证候的转化转归

证候是疾病发生发展过程中对疾病某阶段病因病机本质的反映, 又是机体作为整体对致病因素作出反应所处的一种功能状态. 证候所体现的这一功能状态既与致病因素的性质、强弱有关, 更与患者个体的体质因素有关. 体质因素影响着证候的转归和疾病的预后.

体质对证候转化的影响主要表现在他对疾病的“从化”具有内在的制约性. 所谓从化, 指邪气入人后在与机体的作用过程中, 邪气性质随体质等发生变化, 从而使机体表现出不同的证型, 亦即“客随主变”, 诚如《医宗金鉴·伤寒心法要诀》所说: “人感受邪气虽一, 因其形藏不同, 或从寒化, 或从热化, 或从虚化, 或从实化, 故多端不齐也.” 目前, 中医对*H.pylori*感染的认识已达成一致意见, 即*H.pylori*属中医的“邪气”范畴, 且多具“热”、“毒”的性质^[6-12]. 然

■研究前沿
中医药治疗*H.pylori*感染取得了一定的疗效, 但同样存在着诸多不足, 常囿于“见菌治菌”的论治思路, 影响中医的临床疗效, 从中医体质角度进一步研究*H.pylori*感染的治疗, 值得关注.

■应用要点

对*H.pylori*感染的中医药治疗,若能结合体质的可调节性,从邪正两方面整体考虑,辨证辨病结合辨体论治,“因人制宜”制订治疗方案,通过调理体质达到扶正祛邪的目的,是中医药治疗*H.pylori*感染的新途径。

而,这种“热”、“毒”侵袭不同体质的人群后,临床可有不同的转化,阴虚或阳盛体质,无疑从阳化热、化燥;若阳虚或阴盛体质,则反可从阴化寒、化湿,而出现脾胃虚寒证或寒湿证。体质也制约着证候的转归。*H.pylori*感染,外邪侵袭,邪正相争,终致本虚标实,脾胃虚弱为其本,湿热(毒)中阻为其标。一方面,气之于血,有温煦、推动、统摄的作用,这些作用,均有赖于脾胃之气的旺盛充足。脾胃虚弱,“气虚不足以推血,则血必有瘀”(《读医随笔·承制生化论》),“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”(《医林改错》),《脾胃论》更是明确指出:“脾胃不足,皆为血病”;另一方面,*H.pylori*感染多病程迁延日久,反复不愈,中医认为久病则由气入血,即久病入络,久病必瘀,如《素问·痹论》所云:“病久入深,营卫之行涩……”,叶天士则明确提出:“初病气结在经,久病则血伤入络”,“初病在经,久病入络,以经主气,络主血,则知其治气治血之当然。”(《临证指南医案·积聚》)。如此,胃络血瘀,瘀滞胃体,最终形成正虚、湿热(毒)、瘀血等多种病理因素的存在,不仅使*H.pylori*感染缠绵难愈,日久还有癥积(胃癌)之虞。这一证候演变过程,与*H.pylori*感染→慢性胃炎→胃黏膜萎缩→肠化→异型增生→胃癌的发展模式非常相似,反应了中西医对*H.pylori*感染认识上的一致性。

4 体质学说对中医药治疗*H.pylori*感染的启示

西医对*H.pylori*感染的治疗已取得了一定的成效,但也存在不少问题,尤其是抗生素的普遍使用,造成*H.pylori*的耐药和变异等,*H.pylori*感染复发的问題还无法解决,更为可悲的是,许多患者经过抗*H.pylori*治疗后,临床症状根本没有改善,甚至加重,并带来了一些不良反应。其原因除了致病机制的复杂性以外,可能恰恰与体质密切相关。耐药是药物作用于机体后,由于内因在体质的变化而导致对药物的敏感性下降,甚至不敏感所致。而且耐药的个体差异亦与体质的个体差异有关。而微生物变异是在机体体质与药物的相互作用中,由于体质的改变,导致微生物所处环境的改变,促进其变异,并因变异加重耐药^[30]。古人早有“正虚不运药,不运药者死”(《温病条辨·中焦篇》)、“中气素亏,不能胜药”(《温疫论·药烦》)等论述,似表明体质与耐药、变异等有关。

目前,中医药对*H.pylori*感染的治疗取得了

可喜的成绩,无论是辨证分型治疗,专病复方治疗,还是单方治疗,中西医结合治疗,均有一定的疗效,展示了良好的应用前景。但同样存在着诸多不足,往往缺乏对*H.pylori*感染认识的整体性,往往一见*H.pylori*,就限于“邪”、“毒”的狭隘范围而径投清热解毒药,结果反致苦寒败胃,脾胃受戕伤,致脾胃益虚,无力祛邪,*H.pylori*无法清除,影响中医的临床疗效。我们的研究认为^[6-12],*H.pylori*感染,邪气侵袭,正邪相争,终致正虚邪实,通过扶正祛邪的治疗不仅对*H.pylori*有直接杀菌和抑菌作用,而且还能通过对机体的整体调节,提高机体自身免疫力和胃黏膜局部的屏障功能,达到“阴平阳秘”,以达到辅助抑杀并改变*H.pylori*寄居的微环境,使之不利*H.pylori*定居或繁殖,既能增强机体的保护因子,又能抑杀*H.pylori*以削弱其攻击因子,两者相辅相成,达到治疗*H.pylori*感染的目的。因此,扶正祛邪是治疗*H.pylori*感染的主要原则,这正是“正气存内,邪不可干”的运用体现。进一步的研究表明^[31,32],扶正祛邪法对*H.pylori*虽有一定的根除作用(根除率为36.5%),但与目前文献报道的西药根除率(80%-90%)相差甚远。然经中药治疗后,患者临床症状、胃镜及组织病理学检查均有显著改善,甚至康复。因此,对*H.pylori*感染来说,个体化治疗、辨证论治尤为重要。古人类似的论述非常丰富,章虚谷云:“治病之要,首当察人体质之阴阳强弱,而后方能调之使安。”如阳旺阴虚之人“每病多火,须用滋阴治火”;阴阳俱盛之质“每病多重,以邪蓄深久故也,须用重药”;阴盛阳虚之质“药不可过寒,……热退须用温补扶阳”;阴阳两弱之质“但宜和平之味,缓缓调之”;痰湿体质“若过凉则湿闭而阳更困矣”等等。徐灵胎又谓:“天下有同此一病,而治此则效,治彼则不效,且不唯无效,而反有大害者,何也?则以病同而人异也。……一概施治,则病情虽中,而于人之体质迥乎相反,则利害亦相反矣”(《医学源流论·病同人异论》)。叶天士《临证指南医案》指出:“凡论病先论体质,形色、脉象,以病乃外加于身也。”更是强调治病当以体质为先,重视参与体质辨证、遣方用药,并在《温热论》提出“素有瘀伤宿血”之瘀血质当加散血之品,湿热之阳虚质当须顾阳气而不可过于寒凉,湿热之阴虚质须顾津液而不可率投补剂等精辟论述,临床指导性强^[30]。一些难治性感染性疾病,特别是乙型肝炎病毒、EB病毒等感染,易成慢性状态,临床

症状不明显, 医者常苦于无证可辨, 但临床借助体质辨证, 立法处方, 可取得满意疗效^[33-36]。前人的这些经验, 对临床治疗*H.pylori*感染必须考虑个体的体质因素有非常重要的启示作用。

5 结论

任何细菌的感染都与体质的易感受性有密切关系, 对*H.pylori*感染的治疗, 不能仅局限于*H.pylori*的根除, 囿于“见菌治菌”的论治思路, 应该从中医体质学角度出发, 结合体质的可调性, 从邪正两个方面整体考虑, 辨证辨病论治结合辨体论治, 既着眼*H.pylori*感染所引起的临床表现, 又不忽视个体体质的特异性, “因人制宜”制订治疗方案, 通过调理病理体质达到扶正祛邪的目的, 有助于提高临床疗效, 并进一步发挥中医药的优势。

6 参考文献

- Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
- Blaser MJ. Intrastrain differences in *Helicobacter pylori*: a key question in mucosal damage? *Ann Med* 1995; 27: 559-563
- 王琦. 中医体质学说研究现状与展望. 中国中医基础医学杂志 2002; 8: 6-15
- 王琦. 9种基本中医体质类型的分类及其诊断表述依据. 北京中医药大学学报 2005; 28: 1-8
- 张琳, 杨连文, 郑晓光. 幽门螺杆菌与慢性萎缩性胃炎防治研究. 中医杂志 1992; 33: 4111
- 单兆伟, 张梅润, 陈静, 房静远. 益气活血清热法治疗幽门螺旋菌感染性胃病的临床研究. 南京中医药大学学报(自然科学版) 1991; 7: 142-144
- 房静远, 单兆伟, 张梅润, 朱云华. 扶正祛邪法治疗幽门弯曲菌感染性胃病的临床与理论探讨. 中西医结合杂志 1991; 11: 150-152
- 沈洪, 单兆伟. 幽门螺杆菌感染相关胃病证治规律的探讨. 中国中西医结合脾胃杂志 1994; 2: 6-8
- 戴高中. 对中医药治疗幽门螺杆菌感染相关性胃肠病的思考. 中医杂志 2005; 46: 323-325
- 陆为民, 单兆伟, 沈洪. 关于幽门螺杆菌感染中医药治疗对策的思考. 中国中西医结合脾胃杂志 2000; 8: 232-233
- Shan ZW, Shen H, Zhang MJ, Xu JG. Relationship between differentiation syndromes in stomach disease and *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 1996; 2: 73-75
- 汪悦, 单兆伟. 益气清热活血法治疗幽门螺杆菌相关性胃炎53例临床观察. 中医杂志 2002; 43: 114-116
- Day AS, Sherman PM. *Helicobacter pylori* infection, host genes, and disease outcome. *Pediatr Res* 2000; 47: 703
- Tajima K. Challenging epidemiological strategy for paradoxical evidence on the risk of gastric cancer from *Helicobacter pylori* infection. *Jpn J Clin Oncol* 2002; 32: 275-276
- 胡伏莲. 幽门螺杆菌感染的流行病学. 中国医刊 2007; 42: 17-18
- 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民, 成虹. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2457-2458
- 王凯娟, 王润田. 中国幽门螺杆菌感染流行病学Meta分析. 中华流行病学杂志 2003; 24: 43-446
- 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. 世界华人消化杂志 2000; 8: 1084-1088
- 潘秀珍, 陈明红. 幽门螺杆菌的毒力研究与分型. 世界华人消化杂志 2000; 8: 551-553
- Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 323-340
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402
- 杨婕, 湖之滨, 徐耀初, 沈靖, 钮菊英, 胡旭, 郭剑涛, 沈洪兵. IL1B及IL1RN基因多态性与胃癌易感性的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1769-1773
- Azuma T, Ito Y, Miyaji H, Dojyo M, Tanaka Y, Hirai M, Ito S, Kato T, Kohli Y. Immunogenetic analysis of the human leukocyte antigen DQA1 locus in patients with duodenal ulcer or chronic atrophic gastritis harbouring *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7 Suppl 1: S71-S73
- Sakai T, Aoyama N, Satonaka K, Shigeta S, Yoshida H, Shinoda Y, Shirasaka D, Miyamoto M, Nose Y, Kasuga M. HLA-DQB1 locus and the development of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol* 1999; 34 Suppl 11: 24-27
- 许春娣, 奚容平, 陈舜年, 杨玉琴, 范丽安, 徐家裕. 幽门螺杆菌感染的患儿人类白细胞抗原-DQA1的免疫遗传学分析. 中华儿科杂志 2000; 38: 746
- 李舒, 郭莲怡, 陈洋. 幽门螺杆菌感染与胃癌和癌前病变p53、ras基因表达. 辽宁医学院学报 2008; 29: 410-412
- 南泽忠, 吉卫卫, 王鹏, 刘明, 卫更红. 幽门螺杆菌与胃癌Ha-ras和p53基因点突变相关性的研究. 山西医药杂志 2003; 32: 101-103
- 苗英. 胃黏膜癌前病变中p53、p21^{ras}蛋白表达与幽门螺杆菌感染的关系. 胃肠病学和肝病学杂志 2004; 13: 616-618
- Ng EK, Sung JJ, Ling TK, Ip SM, Lau JY, Chan AC, Liew CT, Chung SC. *Helicobacter pylori* and the null genotype of glutathione-S-transferase-mu in patients with gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1998; 82: 268-273
- 冯全生. 从体质深化中医感染病学研究的思考. 中医杂志 2008; 49: 485-487
- 陆为民, 单兆伟, 杨学文, 孙志广, 沈洪, 李春婷, 吴静, 孙景军. 仁术健胃颗粒对慢性萎缩性胃炎患者幽门螺杆菌及其cagA基因的影响. 天津中医药 2003; 20: 26-29
- 陆为民, 沈洪, 吴静, 杨学文, 朱萱萱, 李克涓, 朱长乐, 单兆伟. 益气清热方对 I 型幽门螺杆菌感染裸鼠胃黏膜组织病理学的影响. 中医杂志 2009; 50: 646-648
- 曹吉宪, 李配方. 运用中医体质理论防治乙型肝炎病毒携带者证治探讨. 浙江中医杂志 2007; 42: 628-629
- 符小艳, 张永蓉. 体质的五态分型应用于无症状乙型肝炎的治疗体会. 四川中医 2004; 22: 12-13
- 邓光远. 论体质分型法治疗无症状性乙型肝炎. 中国中医药信息杂志 1997; 4: 22-23
- 徐庆文, 周小军, 邱宝珊, 孙一帆, 卢标清, 冯炳毅. 益气养阴清热解毒法对EB病毒感染患者中医体质证候的影响. 中医药学刊 2006; 24: 1864-1866

■同行评价

本文可读性和科学性较好, 全面分析了中医药对*H.pylori*感染的治疗作用。

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

儿童腹型过敏性紫癜

王宁, 钱林学

■背景资料

过敏性紫癜(HSP)是儿童期最常见的系统性血管炎,其作为一种独立的疾病最早在1801年由Heberden进行了较为详尽的叙述。

王宁, 钱林学, 首都医科大学附属北京友谊医院 北京市100050

作者贡献分布: 本文由王宁查阅文献并总结撰写; 钱林学审阅修改。
通讯作者: 钱林学, 教授, 主任医师, 100050, 北京市宣武区永安路95号, 首都医科大学附属北京友谊医院超声科。

qianlinxue2002@yahoo.com.cn

电话: 010-63138576

收稿日期: 2010-07-02 修回日期: 2010-11-04

接受日期: 2010-11-10 在线出版日期: 2010-11-18

Gastrointestinal manifestations of Henoch-Schonlein purpura in children

Ning Wang, Lin-Xue Qian

Ning Wang, Lin-Xue Qian, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China
Correspondence to: Professor Lin-Xue Qian, Department of Ultrasonography, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, 95 Yong'an Road, Xuanwu District, Beijing 100050, China. qianlinxue2002@yahoo.com.cn
Received: 2010-07-02 Revised: 2010-11-04
Accepted: 2010-11-10 Published online: 2010-11-18

Abstract

Henoch-Schonlein purpura (HSP) is the most common systemic vasculitis in childhood. The etiology and pathogenesis of HSP are still not very clear. The diagnostic criteria for HSP include palpable purpura with at least one other manifestation-abdominal pain, IgA deposition, arthritis or arthralgia, or renal involvement. Bacterial and viral infections are the most common triggers for HSP involving the gastrointestinal (GI) tract. The clinical manifestations of HSP include purpura, colicky abdominal pain and bloody stools. Some HSP patients have severe complications. Ultrasound is usually the first choice because it permits prompt detection of the involved gut and complications. Endoscopy permits direct observation of the mucous and biopsy of affected areas to detect abnormal IgA deposition or leukocytoclastic vasculitis (LCV). There are two types of diseases that should be differentiated from HSP involving the GI: diseases demonstrating purpura and those demonstrating thickened bowel wall. The majority of children with HSP improve spontaneously, and few patients need medications. Surgical inter-

vention is usually not recommended.

Key Words: Henoch-Schonlein purpura; Gastrointestinal manifestation; Child

Wang N, Qian LX. Gastrointestinal manifestations of Henoch-Schonlein purpura in children. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3436-3442

摘要

过敏性紫癜为儿童期最常见的系统性血管炎,其病因与致病机制尚不十分清楚,其诊断标准为,可触性皮疹并至少以下一项表现:腹痛, IgA沉积, 关节痛或关节炎, 或肾脏受累。以胃肠道表现为主的过敏性紫癜为腹型紫癜。临床表现多见皮疹, 阵发性腹痛及便血。超声检查为首选检查方法, 可及时发现异常肠管及并发症, 而内镜检查可直接观察胃肠道黏膜病变, 并取活检了解有无免疫复合物的沉积及是否存在白细胞碎裂性血管炎。腹型紫癜需要与具有相似皮疹或肠壁肿胀的两类疾病鉴别。大部分儿童存在自愈倾向, 部分患儿需服用激素等内科药物治疗, 多不建议外科治疗。

关键词: 过敏性紫癜; 胃肠道; 儿童

王宁, 钱林学. 儿童腹型过敏性紫癜. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3436-3442

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3436.asp>

0 引言

过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura, HSP)是儿童期最常见的系统性血管炎,其作为一种独立的疾病最早在1801年由Heberden进行了较为详尽的叙述。1832年, Lucas Schonlein描述了紫癜与关节炎的联系, 40年后其学生Eduard Henoch进而描述了紫癜与胃肠道症状的关系, 并在1895年由Henoch教授揭示了本病可有严重的肾脏并发症。目前在临床上, 过敏性紫癜可分为皮肤型、腹型、关节型、肾型及混合型共5型。

1 一般情况

HSP常见于儿童, 每年<14岁的儿童发病率约为

■同行评议者

李奇林, 教授, 南方医科大学
珠江医院急诊部

13.5/10万,是成人发病率的100倍^[1]。其发病无人种特异性,但非洲裔的美国人中发病较少见^[2]。在发病性别的问题上,既往文献报道男孩多见或两性发病率无明显差异但近来也有部分文献报道女孩多见^[1,3-6]。其发病的高峰年龄为3-7岁^[1,3,6-8](平均年龄6岁)^[1,9],<2岁者几乎不发病,而第一次发病年龄>20岁者也相对少见^[10]。秋冬季为该病的发病高峰季节^[1,3,9,11]。

2 病因

HSP病因不清,目前普遍认为其发病与感染或过敏有关。35%-52%的紫癜患儿在发病前存在有上呼吸道感染史^[7,11-13],大部分为链球菌^[14]及支原体感染。在HSP患者中有20%-50%存在抗链“O”滴度升高,而支原体感染所引起的HSP病情较重,常合并心、肺、脑、肾等脏器的损害^[15]。有文献指出,HSP存在人与人之间的呼吸道病原传播^[16]。此外食物中的异性蛋白,使用抗生素^[17],如青霉素、异烟肼等,及寒冷、花粉刺激,昆虫叮咬等均可引发HSP。目前尚有文献报道,HSP存在基因易感性,存在高危易感人群^[18]。而对于家族内发病成员的研究报告,发现存在家族内多发现象,但其具体的激发因素或确切的致病基因尚不能确定^[19],有学者指出人白细胞抗原与HSP发病有关^[20]。

对于腹型紫癜,既往文献中报道最多的激发因素为肠道的各种细菌或病毒感染,常见的包括:弧形杆菌感染^[21],志贺氏菌感染^[22],伤寒沙门氏菌及非伤寒沙门氏菌感染^[23],甲型肝炎^[18]及乙型肝炎病毒^[24],乙型肝炎疫苗^[25],阿米巴感染^[26],巨细胞病毒感染^[27],及幽门螺旋杆菌感染激发的腹型HSP。此外溃疡性结肠炎,克罗恩病等炎性肠病及肝硬化^[28,29]也可激发或同时伴发HSP。

3 发病机制

HSP的发病机制尚不完全清楚,目前公认的发病机制为:异常IgA在全身小血管的沉积,继发白细胞碎裂性血管炎(leukocytoclastic vasculitis, LCV)。

异常的IgA多为IgA1,这是由于在IgA1的重链上存在一个铰链“O”而IgA2上没有^[30]。IgA1“O”铰链区连接的低聚糖糖基化后形成异常的IgA1,此种IgA1不能完全在肝脏内代谢而沉积在各种组织的中小血管内。其沉积后激活补体的旁路途径,从而引起中小血管内皮细胞的损伤,继发LCV^[31]。LCV的特点为:(1)中-小血管

管壁的纤维素性坏死;(2)红细胞自破裂的管壁处渗出;(3)白细胞自损害的管壁处渗透入周围组织内部;(4)白细胞死亡后,核在血管壁内部及周围裂解呈团块状,称为核尘^[32]。

HSP对组织器官的损害来自于对小血管内皮细胞的破坏,小动脉内形成微小血栓,造成病变局部缺血。组成小血管管壁的内皮细胞的完整性被破坏后,红细胞及血浆通过破裂口漏入组织间质,白细胞受内皮细胞内炎症因子的趋化作用移动至病变区^[33]。在胃肠道,由于丰富血流的冲刷作用,使得特异IgA1很少沉积于胃肠道中等管径的血管内,使其避免受累。但由于小肠的长绒毛内富含大量袢状的静脉性毛细血管网,特异的IgA1由于体积较大不能通过而梗阻在毛细血管网的静脉端内,导致绒毛尖端的坏死。此外体内存在相同毛细血管网系统的部位还包括:皮肤的真皮-表皮交界处与骺板。因此腹型HSP在出现小肠病理改变的同时,可出现皮肤的紫癜与关节的病变^[34]。

4 腹型HSP临床表现

4.1 消化系统表现 腹痛为最常见的腹型HSP胃肠道表现,发生率为35%-60%^[35],其中出现严重腹痛的几率为42%^[36]。本病腹痛部位不固定,以脐周为主,为阵发性绞痛,可自行缓解,与肠痉挛表现相似,但与肠痉挛不同,其腹痛程度较重,影响患儿的正常生活且夜间更为明显,患儿可自睡眠中痛醒^[37]。触诊检查本病无肌紧张,移动性浊音等腹部体征,表现为症状与体征不符的特点。10%-40%的腹型HSP以腹痛表现为首发症状,常被误诊为外科急腹症,误诊率可高达73.08%^[38]。

18%-52%的患儿可出现胃肠道出血^[11],表现为潜血、黑便及大量鲜红色血便。由于病变胃肠道以小肠多见,故临床较常见的表现为便潜血或黑便,而大量鲜红色血便少见。在腹痛便血的同时,患儿还会自述恶心或出现呕吐的表现。

4.2 其他常见的临床表现

4.2.1 皮疹:多位于双侧下肢的伸面,为紫红色的突出于皮肤表面可触及的皮疹,严重者可彼此融合呈紫色的瘀斑,对皮肤的活检证实存在IgA及补体的沉积,病理表现为LCV。57%-69%的患儿以皮疹为首发症状^[1,9],是HSP较为特异的征象。

4.2.2 43%-82%的腹型HSP患儿存在关节受累^[11]:多为双侧对称性受累,受累关节疼痛,可出现关节腔积液,多见踝关节,膝关节及双足,双侧上

■ 相关报道

李华等花费十年时间,利用电子内镜,观察腹型HSP患者使用糖皮质激素治疗前后胃肠黏膜的病变,指出应用激素后确实影响了溃疡的愈合。

■应用要点

腹型紫癜需要与具有相似皮疹或肠壁肿胀的两类疾病鉴别。大部分儿童存在自愈倾向,部分患儿需服用激素等内科药物治疗,多不建议外科治疗。

肢受累少见。

4.2.3 腹型HSP并发症: 在HSP中,胃肠道并发症的发生率为3.9%-22.4%^[39]。其常见的并发症为肠套叠,肠管穿孔坏死与胃肠道大量血便少见。

肠套叠在腹型HSP中的发生率为0.7%-13.6%^[36],常见类型为回回型(51%)、回结型(39%),最少见的为结结型^[40]。有学者指出回回型肠套叠的多见是由于小肠受累肿胀明显所致,此与经典的肠套叠形成有所不同。经典肠套叠类型多为回结型,是由于末端回肠附近的淋巴组织增生所致^[34],但腹型HSP时腹腔内淋巴结也可出现非特异性的增生。

受累肠管穿孔坏死较肠套叠少见,多见于使用激素的患儿^[41]。李华等^[42]花费十年时间,利用电子内镜,观察腹型HSP患者使用糖皮质激素治疗前后胃肠黏膜的病变,指出应用激素后确实影响了溃疡的愈合。

其他少见的并发症为:(1)胃肠道狭窄、梗阻,肠管缺血常见于小肠^[43];(2)约有14%的腹型HSP患者可出现明显的短期大量胃肠道出血,并需输血治疗^[44];(3)蛋白丢失性肠病,由于小肠的黏膜受累,大量蛋白不能被吸收而流失;(4)急性胰腺炎^[45];(5)急性阑尾炎,腹型HSP累计末端回肠或升结肠时临床表现酷似急性阑尾炎,但HSP合并真正急性阑尾炎的病例很少^[46];(6)胆道系统缺血性坏死^[47];(7)阴囊及附睾肿胀,发病率为9%^[9];(8)腹壁与大阴唇的肿胀^[48]。

5 腹型HSP的影像学表现

5.1 彩色多普勒超声 彩色多普勒超声被认为是最常用的发现肠管病变及并发症,对临床治疗效果进行随访及评估的影像学方法^[48-50]。超声显示病变主要在小肠,且以空肠受累为主^[51],其表现为单一区域或多发小肠节段性扩张,运动减弱,和小肠壁的偏心性/对称性增厚,肠壁增厚较一般急性肠炎明显,最厚可达11 mm,肠壁回声均匀减低,肠壁内的无回声为出血表现,肠壁内各层可分辨,各层均增厚但以黏膜下层较为明显^[52]。黏膜层回声粗糙,黏膜皱襞不清楚^[50,51]。肠腔狭窄,肠蠕动消失,呈“腊肠样”表现,长轴面显示肠腔呈管状狭窄,横断面显示圆形低回声肿块,肠腔呈向心性或偏心性狭窄。受累区域肠系膜回声不均匀^[53]。肠管病变区存在游走性的特点。增厚的肠管壁的血管增粗增多,血流明显较周围的肠壁丰富,可见条状的红、蓝彩色血流由肠系膜根部进入肠壁浆膜下至肌层和黏

膜下层,为动静脉血流频谱,较正常肠壁血流速度稍减低,阻力指数有所下降。超声的间接征象可见增厚肠管壁周围及腹主动脉、肠系膜内部多个大小不等淋巴结,部分融合呈串珠状,血流由淋巴结门进入^[54]。文献报道盆腔积液最深者48 mm^[52]。超声检查可重复进行,是临床随访消化系统病情进展,了解有无并发症的首选方法。

5.2 胃肠道内镜检查 腹型HSP时,内镜常见的征象为:胃肠道黏膜红肿,黏膜下出现大小不等的出血点,重者可形成瘀斑或水肿,少数可出现黏膜表浅糜烂或/和溃疡^[55,56]。病变可出现在胃肠道,但以胃、十二指肠、回肠末端改变明显^[56]。小肠受累较结肠多见^[57],其中关于十二指肠降段受累的报道最多,有学者认为内镜检查发现十二指肠降段的黏膜病变是腹型HSP最常见的受累部位^[55,58]。结肠病变少见,但也有报道存在全结肠弥漫性红斑病变^[59]。使用靛胭脂的染色内视镜,为一种内镜的对比增强技术,可以更清晰地显示肠绒毛的病变,此法即可用于诊断也可用于治疗^[60]。

5.3 CT检查 仅有少数腹型HSP患儿进行CT检查,可发现多发的肠壁增厚,受累肠壁CT值较临近未受累肠壁平均减低11.4 HU,肠壁轮廓模糊不清,肠腔呈不规则非对称性或对称性狭窄,长轴面显示肠管呈管状,横断位显示肠腔呈环形狭窄。受累区域肠系膜水肿,模糊不清。血管增粗及非特异性的淋巴结增大。部分患儿伴有腹腔积液。CT增强显示受累肠壁轻度均匀强化。CT表现的消化系统损害范围与临床症状轻重不平行^[61]。

5.4 X线照相术检查 表现为充气肠管间距增宽。当出现腹水时,立位或卧位水平侧位片可见充气肠管向腹中部及前部集中,肠管向上有漂浮感,液体量很大时,实质脏器轮廓被液体淹没或消失。“前哨肠曲征象”(也称警卫肠管征或反射性肠淤积),为原发病变存在的一种信号:当X线表现为病变附近的肠管充气而不扩张或轻度扩张,小肠内径常<3 cm,肠管内出现少而浅的小气液面,但无梗阻的定位征象时,可视为非梗阻性急腹症的X线表现^[62]。总体来说,X线对诊断腹型HSP无特异性,在淋巴瘤或节段性肠炎的患者也可出现相同的表现^[63]。其作用在于,对于患儿体征与X线改变不一致的表现,应想到存在腹型紫癜的可能,而对于确诊腹型HSP的患者,X线可用于观察有无气腹或肠梗阻等急腹症情况。

6 实验室检查

6.1 血小板平均体积 血小板平均体积(mean

platelet volume, MPV)与血小板的功能及活性密切相关. 体积小的血小板其功能与活性相对减低. 对处于腹型HSP急性期有胃肠道出血的患者, 其MPV较正常对照组减小, 较同组患者恢复期的血小板平均体积也减小, 而血小板的数量却较高^[64]. 由于MPV包含于血常规的检查中无需患儿额外的花费或特别的技术支持, 其可作为有胃肠道出血的观察项目.

6.2 VIII因子相关抗原 VIII因子相关抗原(VIII wil-lebrand factor, VWF)主要沉积在内皮细胞胞质的内质网, 当内皮细胞受损时VWF即释放入血, 所以是对血管内皮损失的非特异性检测指标. 在HSP急性期其浓度升高, 在症状消失时恢复正常, 在症状持续时仍高于正常, 其作为血管损伤的标志可有效地监测疾病的活性^[65].

6.3 其他 除上述的两个监测项目外, 在腹型HSP急性期升高而恢复期降低的实验室检查项目尚有许多, 如: 黄嘌呤氧化酶^[66]肾上腺髓质素(adrenomedullin)和全亚硝酸盐(total nitrite)水平^[67]及各种病理相关的黏附分子^[68]等, 但目前仅了解这些实验室指标在腹型HSP急性期会出现变化但其具体致病机制尚不清晰, 且这些指标缺乏特异性, 也可出现在其他炎性肠病的急性期.

7 诊断

7.1 2006年新诊断标准 可触性皮炎伴至少以下一项表现, (1)无固定性的腹痛; (2)任何活检显示明显的IgA沉积; (3)关节炎(急性起病, 任何关节)或关节痛; (4)肾脏受累(任何表现的血尿和/或蛋白尿)^[69]; 但目前国内临床仍采用旧的诊断标准, 或两种标准并存.

7.2 1993年旧诊断标准 (1)可触性皮炎; (2)发病年龄<20岁; (3)急性腹痛; (4)病理显示小静脉或小动脉的壁内出现粒细胞浸润. 符合以上2条或2条以上者^[70].

8 鉴别诊断

8.1 与存在相似皮损的疾病鉴别 既往文献报道某些感染性疾病可引起的全身皮疹, 如败血症, 细菌性心内膜炎, 立克次体感染, 慢性脑膜炎球菌血症感染, 此外凝血障碍和血小板减少性紫癜也可出现相似的皮疹. 最近有学者指出皮损尚需注意与儿童虐待相鉴别^[71]. HSP的皮疹是由于静水压升高和小血管曲折导致的涡流和阻滞, 使免疫复合物和纤维素易于沉积所致, 故多分布在下肢, 可通过皮疹的位置, 分布及皮疹形态与其他出现皮疹的疾病相鉴别.

儿童急性出血性水肿(acute hemorrhagic edema of childhood, AHEC)或急性婴儿出血水肿(acute infantile hemorrhagic edema, AIHE), 本病为一种急性LCV, 仅累及2岁以下儿童. 其发病前的前驱症状及发病的季节, 易感人群, 皮损的形态及皮肤的活检结果均与HSP相同^[72]. 但AHEC的首发征象多为面部肿胀, 皮疹多见于面部及肢体远端, 躯干分布较稀疏, 皮损较HSP的皮疹略大似靶状并可发展成水泡. 此外患儿多见手脚疼痛肿胀. 与HSP不同的是其胃肠道或肾脏受累少见, 且复发率小.

加-戴二氏综合征(Gardner-Diamond syndrome)或自身红细胞过敏综合征(autoerythrocyte sensitization syndrome), 是一种见于女性患者的少见的瘀斑样病变, 表现为环形的皮损伴有痛感的瘀斑, 分布于下肢腹侧的皮肤及躯干, 并也可出现发热, 关节痛和胃肠道症状. 而与HSP不同点在于其存在轻-重的创伤史, 出现在受伤数周后, 而皮损活检可将两者区分开, 本病仅表现为红细胞的渗出无LCV或纤维蛋白样变性的表现^[73].

8.2 与肠壁增厚的疾病鉴别 如急性肠炎, 溃疡性结肠炎, 克罗恩病, 肠结核等. 急性肠炎肠壁多增厚 ≤ 6 mm, 无或伴极少量腹腔积液, 并肠管蠕动增强. 炎性肠病或肠结核多为慢性疾病有相应的病史.

此外, 在出现典型皮疹损害前, 腹型HSP尚需与其他急腹症相鉴别, 如阑尾炎, 绞窄性肠梗阻等.

9 治疗

9.1 脱敏治疗 对于已知明确过敏原的患儿可采用此方法, 治疗时间依患儿的过敏程度, 致敏物质性质及患儿耐受程度而定, 为3-5年, 最短 ≥ 2 年^[74]. 但由于大部分患儿过敏原不明, 故此法应用范围有限.

9.2 镇痛剂和/或非激素类抗炎药 HSP存在自愈倾向, 对大部分腹型HSP患儿主张对症治疗, 以缓解腹部和/或关节疼痛为主. 治疗过程中注意水电解质的平衡, 注意营养的均衡摄入. 对于关节痛和存在关节小血管炎症的患儿可给予镇痛剂和/或非激素类抗炎药^[9].

9.3 激素治疗 腹型HSP最主要的表现为腹痛, 不论是否使用激素, 腹痛的症状在最后均会消失, 但使用激素确实可以缩短腹痛持续时间^[75]. 当出现胃肠壁明显肿胀时, 激素可减轻胃肠道壁水肿, 缓解腹痛症状, 并可减少部分并发症如肠套叠等,

■同行评价

本文条理清楚, 可读性强, 对临床医生有一定的指导作用.

激素开始多使用氢化可的松5-8 mg/(kg·d), 3-7 d停用, 严重者可减为强的松, 逐渐减停^[37]。但也有学者认为激素的应用会延缓溃疡的愈合^[42]。长期使用或短期内使用大量激素在停药后易使病情反跳而加重。此外由于糖皮质激素的不良反应, 还可产生肥胖, 满月脸及全身水肿, 骨质疏松等表现, 增加患儿的心理负担^[76]。对于激素依赖性患者可使用环孢菌素A治疗^[77]。目前对于腹型HSP的患儿一般不主张外科手术的治疗方法, 由于急性期患儿体内正常的免疫防御体制被打乱, 术后恢复慢, 此外肿胀的肠壁对手术缝合也是一大挑战。此外研究表明, 全身应用激素, 如口服泼尼松龙或静脉使用甲泼尼龙对患儿的大量便血及由于广泛肠系膜血管炎引起的小肠缺血都有效^[78]。

但由于腹型HSP在其病程中有出现肠套叠等并发症的危险性, 故内科治疗期间应密切注意腹部变化情况, 出现下列情况时应及时手术: (1)HSP明显恶化出现腹膜刺激症状、X线检查有机械性肠梗阻表现或膈下游离气体; (2)腹腔穿刺抽出血性腹水, 怀疑有肠坏死或穿孔者; (3)非手术治疗肠梗阻48-72 h不能缓解或肠道大出血不能控制者; (4)皮肤紫癜消退, 但对症治疗腹部症状和体征无缓解并加重者或伴有休克症状、腹膜炎体征加重者^[79,80]。

10 预后

本病预后一般良好, 少数重症患儿可死于肠出血、肠套叠、肠坏死。病程一般1-2 wk或1-2 mo, 少数可长达数月或1年以上^[37]。本病可出现复发, 33%-35%的患者可出现一次或多次的反复, 病变复发约90%出现在第一次发病后的4 mo内^[9]。对患儿进行心理辅导, 对患儿家长进行病情的相关教育, 使其认识到腹型HSP是自限性疾病但也可出现严重的并发症。家长及医务工作者应对患儿进行细致的观察, 及早发现并发的外科急腹症是保证预后良好的关键因素^[81]。

11 参考文献

- Calviño MC, Llorca J, García-Porrúa C, Fernández-Iglesias JL, Rodríguez-Ledo P, González-Gay MA. Henoch-Schönlein purpura in children from north-western Spain: a 20-year epidemiologic and clinical study. *Medicine (Baltimore)* 2001; 80: 279-290
- Fervenza FC. Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Int J Dermatol* 2003; 42: 170-177
- Pabunruang W, Treepongkaruna S, Tangnaratthakrit K, Chunharas A, Phuapradit P. Henoch-Schönlein purpura: clinical manifestations and long-term outcomes in Thai children. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 Suppl 4: S1213-S1218
- García-Porrúa C, Calviño MC, Llorca J, Couselo JM, González-Gay MA. Henoch-Schönlein purpura in children and adults: clinical differences in a defined population. *Semin Arthritis Rheum* 2002; 32: 149-156
- Blanco R, Martínez-Taboada VM, Rodríguez-Valverde V, García-Fuentes M, González-Gay MA. Henoch-Schönlein purpura in adulthood and childhood: two different expressions of the same syndrome. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 859-864
- Rostoker G. Schönlein-henoch purpura in children and adults: diagnosis, pathophysiology and management. *BioDrugs* 2001; 15: 99-138
- Chang WL, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. Gastrointestinal manifestations in Henoch-Schönlein purpura: a review of 261 patients. *Acta Paediatr* 2004; 93: 1427-1431
- Gardner-Medwin JM, Dolezalova P, Cummins C, Southwood TR. Incidence of Henoch-Schönlein purpura, Kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins. *Lancet* 2002; 360: 1197-1202
- Saulsbury FT. Henoch-Schönlein purpura in children. Report of 100 patients and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78: 395-409
- Nielsen HE. Epidemiology of Schönlein-Henoch purpura. *Acta Paediatr Scand* 1988; 77: 125-131
- Trapani S, Micheli A, Grisolia F, Resti M, Chiappini E, Falcini F, De Martino M. Henoch Schonlein purpura in childhood: epidemiological and clinical analysis of 150 cases over a 5-year period and review of literature. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 35: 143-153
- Lindenauer SM, Tank ES. Surgical aspects of Henoch-Schönlein's purpura. *Surgery* 1966; 59: 982-987
- Chao HC, Kong MS, Lin SJ. Hepatobiliary involvement of Henoch-Schönlein purpura in children. *Acta Paediatr Taiwan* 2000; 41: 63-68
- al-Sheyyab M, el-Shanti H, Ajlouni S, Batieha A, Daoud AS. Henoch-Schönlein purpura: clinical experience and contemplations on a streptococcal association. *J Trop Pediatr* 1996; 42: 200-203
- 赵红霞, 刘伶, 阎铭军, 崔妮, 裘秀月. 支原体感染引起的过敏性紫癜32例临床分析. *中国实用儿科杂志* 2003; 18: 404
- Farley TA, Gillespie S, Rasoulpour M, Tolentino N, Hadler JL, Hurwitz E. Epidemiology of a cluster of Henoch-Schönlein purpura. *Am J Dis Child* 1989; 143: 798-803
- Yamada Y, Tanaka S, Kobayashi T, Tatsuguchi A, Sakamoto C. [Gastrointestinal manifestations in Henoch-Schönlein purpura] *Nippon Rinsho* 2008; 66: 1350-1356
- Islek I, Kalayci AG, Gok F, Muslu A. Henoch-Schönlein purpura associated with hepatitis A infection. *Pediatr Int* 2003; 45: 114-116
- Motoyama O, Iitaka K. Familial cases of Henoch-Schönlein purpura in eight families. *Pediatr Int* 2005; 47: 612-615
- Amoroso A, Berrino M, Canale L, Coppo R, Cornaglia M, Guarrera S, Mazzola G, Scolari F. Immunogenetics of Henoch-Schoenlein disease. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 323-333
- Apostolopoulos P, Vafiadis-Zouboulis E, Delladetsima I, Charalambopoulos D, Archimandritis A, Katsilambros N. Henoch-Schönlein purpura associated with *Campylobacter enterocolitis*. *J Clin Gas-*

- troenterol* 1999; 29: 346-347
- 22 Roza M, Galbe M, Gonzalez Baschwitz C, Fernandez M, Miguell MA. Henoch-Schoenlein purpura after shigellosis. *Clin Nephrol* 1983; 20: 269
 - 23 Youmbissi TJ, Malik TQ, Ajit Kumar S, Rafi A, Al Khursanny AI, Karkar A. Henoch-Schönlein nephritis and salmonella typhi septicaemia. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1081-1082
 - 24 Maggiore G, Martini A, Grifeo S, De Giacomo C, Scotta MS. Hepatitis B virus infection and Schönlein-Henoch purpura. *Am J Dis Child* 1984; 138: 681-682
 - 25 Chave T, Neal C, Camp R. Henoch-Schönlein purpura following hepatitis B vaccination. *J Dermatolog Treat* 2003; 14: 179-181
 - 26 Kim YO, Choi YS, Won YH, Kim YD, Woo YJ, Back HJ, Cho YK, Han DK, Song ES. Intestinal amebiasis with Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Int* 2010; 52: 667-669
 - 27 Nguyen-Ho P, Jewell LD, Thomson AB. Hemorrhagic intestinal Henoch-Schonlein purpura complicated by cytomegalovirus infection. *Can J Gastroenterol* 1998; 12: 71-74
 - 28 Madison DL, Allen E, Deodhar A, Morrison L. Henoch-Schönlein purpura: a possible complication of hepatitis C related liver cirrhosis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 281-282
 - 29 Aggarwal M, Manske CL, Lynch PJ, Paller MS. Henoch-Schönlein vasculitis as a manifestation of IgA-associated disease in cirrhosis. *Am J Kidney Dis* 1992; 20: 400-402
 - 30 Saulsbury FT. Henoch-Schönlein purpura. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 35-40
 - 31 González LM, Janniger CK, Schwartz RA. Pediatric Henoch-Schönlein purpura. *Int J Dermatol* 2009; 48: 1157-1165
 - 32 常建民. 白细胞碎裂性血管炎. *临床皮肤科杂志* 2007; 36: 62-64
 - 33 Glasier CM, Siegel MJ, McAlister WH, Shackelford GD. Henoch-Schonlein syndrome in children: gastrointestinal manifestations. *AJR Am J Roentgenol* 1981; 136: 1081-1085
 - 34 Ebert EC. Gastrointestinal manifestations of Henoch-Schonlein Purpura. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2011-2019
 - 35 Couture A, Veyrac C, Baud C, Galifer RB, Armelin I. Evaluation of abdominal pain in Henoch-Schönlein syndrome by high frequency ultrasound. *Pediatr Radiol* 1992; 22: 12-17
 - 36 Schwab J, Benya E, Lin R, Majd K. Contrast enema in children with Henoch-Schönlein purpura. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 1221-1223
 - 37 杨红梅, 赵建伟. 以腹痛为首发症状的过敏性紫癜53例分析. *中国误诊学杂志* 2008; 8: 4465-4466
 - 38 Cull DL, Rosario V, Lally KP, Ratner I, Mahour GH. Surgical implications of Henoch-Schönlein purpura. *J Pediatr Surg* 1990; 25: 741-743
 - 39 Katz S, Borst M, Seekri I, Grosfeld JL. Surgical evaluation of Henoch-Schönlein purpura. Experience with 110 children. *Arch Surg* 1991; 126: 849-853; discussion 853-854
 - 40 Choong CK, Kimble RM, Pease P, Beasley SW. Colo-colic intussusception in Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Surg Int* 1998; 14: 173-174
 - 41 Wu CS, Tung SY. Henoch-Schönlein purpura complicated by upper gastrointestinal bleeding with an unusual endoscopic picture. *J Clin Gastroenterol* 1994; 19: 128-131
 - 42 李华, 任万英, 赵军艳, 谢立群. 腹型过敏性紫癜治疗前后电子内镜下胃肠粘膜病变特点. *武警医学院学报* 2007; 16: 246-248
 - 43 Hameed S, Dua S, Taylor HW. Henoch-Schonlein purpura with ischaemic bowel. *Ann R Coll Surg Engl* 2008; 90: W16-W17
 - 44 FELDT RH, STICKLER GB. The gastrointestinal manifestations of anaphylactoid purpura in children. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1962; 37: 465-473
 - 45 Chen SY, Kong MS. Gastrointestinal manifestations and complications of Henoch-Schönlein purpura. *Chang Gung Med J* 2004; 27: 175-181
 - 46 Kim CJ, Chung HY, Kim SY, Kim YO, Ryu SY, Kim JC, Chung JH. Acute appendicitis in Henoch-Schönlein purpura: a case report. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 899-900
 - 47 Viola S, Meyer M, Fabre M, Tounian P, Goddon R, Dechelotte P, Valayer J, Gruner M, Bernard O. Ischemic necrosis of bile ducts complicating Schönlein-Henoch purpura. *Gastroenterology* 1999; 117: 211-214
 - 48 Hiram-Karasmanis R, Smith RG, Radina M, Soboleski DA. Abdominal wall and labial edema presenting in a girl with Henoch-Schönlein purpura: a case report. *J Med Case Reports* 2010; 4: 98
 - 49 Hu SC, Feeney MS, McNicholas M, O'Halpin D, Fitzgerald RJ. Ultrasonography to diagnose and exclude intussusception in Henoch-Schönlein purpura. *Arch Dis Child* 1991; 66: 1065-1067
 - 50 Ozdemir H, İşik S, Buyan N, Hasanoglu E. Sonographic demonstration of intestinal involvement in Henoch-Schönlein syndrome. *Eur J Radiol* 1995; 20: 32-34
 - 51 曹海玮, 郭爱玲, 李聪. 儿童腹型过敏性紫癜的彩色多普勒超声诊断分析. *中国超声医学杂志* 2008; 24: 95-97
 - 52 鲁敏, 袁阿彩. 腹型过敏性紫癜的超声表现. *浙江实用医学* 2007; 12: 119, 123
 - 53 李欣, 李林, 王春祥, 赵滨. 儿童过敏性紫癜胃肠道损害的CT、US表现. *中华放射学杂志* 2002; 36: 449-451
 - 54 胡原, 何静波, 陈文娟. 高频超声和彩色多普勒超声在诊断腹型过敏性紫癜中的价值. *中国超声诊断杂志* 2006; 7: 269-271
 - 55 Kato S, Shibuya H, Naganuma H, Nakagawa H. Gastrointestinal endoscopy in Henoch-Schönlein purpura. *Eur J Pediatr* 1992; 151: 482-484
 - 56 刘卓刚, 矫德馨. 腹型过敏性紫癜临床特点及内镜检查结果分析. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1494-1495
 - 57 Gunasekaran TS, Berman J, Gonzalez M. Duodenjejunitis: is it idiopathic or is it Henoch-Schönlein purpura without the purpura? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 22-28
 - 58 Kato S, Ebina K, Naganuma H, Sato S, Maisawa S, Nakagawa H. Intestinal IgA deposition in Henoch-Schönlein purpura with severe gastro-intestinal manifestations. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 91-95
 - 59 Cappell MS, Gupta AM. Colonic lesions associated with Henoch-Schonlein purpura. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1186-1188
 - 60 Oomori S, Abe K, Takagi S. Chromoendoscopic findings useful for diagnosis and assessment of treatments for ileac lesions of Henoch-Schönlein purpura. *Endoscopy* 2009; 41 Suppl 2: E111-E112
 - 61 Jeong YK, Ha HK, Yoon CH, Gong G, Kim PN, Lee MG, Min YI, Auh YH. Gastrointestinal involvement in Henoch-Schönlein syndrome: CT findings. *AJR Am J Roentgenol* 1997; 168: 965-968
 - 62 李金泉, 韩宏生, 董墨农. 腹型过敏性紫癜X线表现分析(附13例报告). *实用放射学杂志* 2005; 21: 211-212
 - 63 Yentis I. Henoch-Schönlein purpura mimicking

- acute appendicitis and Crohn's disease. *Br J Radiol* 1973; 46: 555-556
- 64 Makay B, Türkyilmaz Z, Duman M, Unsal E. Mean platelet volume in Henoch-Schönlein purpura: relationship to gastrointestinal bleeding. *Clin Rheumatol* 2009; 28: 1225-1228
 - 65 Ateş E, Bakkaloğlu A, Saatçi U, Söylemezoğlu O. von Willebrand factor antigen compared with other factors in vasculitic syndromes. *Arch Dis Child* 1994; 70: 40-43
 - 66 Chen T, Guo ZP, Zhang YH, Gao Y. Elevated serum xanthine oxidase activities in patients with Henoch-Schönlein purpura. *Clin Rheumatol* 2009; 28: 1355-1356
 - 67 Islek I, Balat A, Cekmen M, Yürekli M, Muslu A, Sahinöz S, Sivasli E. Adrenomedullin and total nitrite levels in children with Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Nephrol* 2003; 18: 1132-1137
 - 68 Gok F, Ugur Y, Ozen S, Dagdeviren A. Pathogenesis-related adhesion molecules in Henoch-Schönlein vasculitis. *Rheumatol Int* 2008; 28: 313-316
 - 69 Ozen S, Ruperto N, Dillon MJ, Bagga A, Barron K, Davin JC, Kawasaki T, Lindsley C, Petty RE, Prieur AM, Ravelli A, Woo P. EULAR/PreS endorsed consensus criteria for the classification of childhood vasculitides. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 936-941
 - 70 Mills JA, Michel BA, Bloch DA, Calabrese LH, Hunder GG, Arend WP, Edworthy SM, Fauci AS, Leavitt RY, Lie JT. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schönlein purpura. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1114-1121
 - 71 Swerdlin A, Berkowitz C, Craft N. Cutaneous signs of child abuse. *J Am Acad Dermatol* 2007; 57: 371-392
 - 72 Shah D, Goraya JS, Poddar B, Parmar VR. Acute infantile hemorrhagic edema and Henoch-Schönlein purpura overlap in a child. *Pediatr Dermatol* 2002; 19: 92-93
 - 73 Gardner FH, Diamond LK. Autoerythrocyte sensitization; a form of purpura producing painful bruising following autosensitization to red blood cells in certain women. *Blood* 1955; 10: 675-690
 - 74 Chehade M. IgE and non-IgE-mediated food allergy: treatment in 2007. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 264-268
 - 75 Reinehr T, Bürk G, Andler W. Does steroid treatment of abdominal pain prevent renal involvement in Henoch-Schönlein purpura? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31: 323-324
 - 76 Kawasaki Y, Suzuki J, Suzuki H. Efficacy of methylprednisolone and urokinase pulse therapy combined with or without cyclophosphamide in severe Henoch-Schönlein nephritis: a clinical and histopathological study. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 858-864
 - 77 Huang DC, Yang YH, Lin YT, Chiang BL. Cyclosporin A therapy for steroid-dependent Henoch-Schönlein purpura. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36: 61-64
 - 78 Wang L, Huang FC, Ko SF, Cheng MT. Successful treatment of mesenteric vasculitis caused by Henoch-Schönlein purpura with methylprednisolone pulse therapy. *Clin Rheumatol* 2003; 22: 140-142
 - 79 韩少良, 周宏众, 程骏, 陈哲京, 姚建高, 朱冠保. 腹型过敏性紫癜的误诊原因与外科治疗. *中华胃肠外科杂志* 2006; 9: 357-358
 - 80 刘彦, 张家衡, 李兵, 曾红玲, 杨红欣. 腹型紫癜误诊为外科疾病的原因分析. *临床外科杂志* 2005; 13: 396-397
 - 81 刘润兰, 新吉夫. 过敏性紫癜累及胃肠道危险因素分析及护理. *中国误诊学杂志* 2007; 7: 2745-2746

编辑 李薇 电编 李薇

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)

钠氢交换蛋白1在肿瘤侵袭转移中的作用

孙伟, 杨薛康, 王德盛

孙伟, 杨薛康, 王德盛, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科 陕西省西安市 710032
国家自然科学基金资助项目, No. 30872480
陕西省科技研究发展计划基金资助项目, No. 2008K09-05
西京医院学科助推计划基金资助项目, No. XJZT07M013
作者贡献分布: 本文由王德盛立题; 综述由孙伟与杨薛康完成; 王德盛审校。
通讯作者: 王德盛, 副教授, 副主任医师, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科。
wangds@fmmu.edu.cn
电话: 029-84775259 传真: 029-84775255
收稿日期: 2010-08-30 修回日期: 2010-10-14
接受日期: 2010-10-18 在线出版日期: 2010-11-18

Role of Na⁺/H⁺ exchanger 1 in tumor invasion and metastasis

Wei Sun, Xue-Kang Yang, De-Sheng Wang

Wei Sun, Xue-Kang Yang, De-Sheng Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872480; the Natural Science Foundation of Shaanxi Province, No. 2008K09-05; and the Science Promotion Program of Xijing Hospital, No. XJZT07M013

Correspondence to: Associate Professor De-Sheng Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. wangds@fmmu.edu.cn

Received: 2010-08-30 Revised: 2010-10-14

Accepted: 2010-10-18 Published online: 2010-11-18

Abstract

Mammalian Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) is a membrane protein that regulates intracellular pH homeostasis by extruding one intracellular proton in exchange for one extracellular sodium. It has been demonstrated that NHE1 expression and activity are increased in tumor cells and contribute to the acidification of extracellular microenvironment. NHE1 and extracellular microenvironment play an important role in tumor invasion. In addition, NHE1 activation is involved in the formation of pseudopodia and invadopodia in tumor cells and therefore increases tumor invasion. Therefore, NHE1 may be a potential target for tumor therapy.

Key Words: Na⁺/H⁺ exchanger 1; Tumor; pH

Sun W, Yang XK, Wang DS. Role of Na⁺/H⁺ exchanger 1

in tumor invasion and metastasis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(32): 3443-3447

摘要

钠氢交换蛋白1(Na⁺/H⁺ exchanger 1, NHE1)是存在于细胞膜表面的离子转运蛋白, 他负责将细胞内H⁺与胞外Na⁺按照1:1的比例进行交换来调控细胞内pH的动态平衡. 在肿瘤细胞中, NHE1表达增加及活性增强, 形成肿瘤细胞胞内碱性、胞外酸性的特殊微环境. NHE1和酸性的细胞外微环境在肿瘤细胞的侵袭过程中起着重要作用. NHE1还调节细胞伪足和侵袭性伪足(invadopodia)的形成, 增强细胞的侵袭能力, 两者共同促进肿瘤细胞的侵袭转移, 因此对NHE1的深入研究有可能找到肿瘤治疗的新靶点.

关键词: 钠氢交换蛋白1; 肿瘤; pH值

孙伟, 杨薛康, 王德盛. 钠氢交换蛋白1在肿瘤侵袭转移中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3443-3447

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3443.asp>

0 引言

研究发现, 实体肿瘤细胞有碱性的细胞内pH值, 大多为7.12-7.65(正常为6.99-7.20)和酸性的细胞外pH值, 多为6.2-6.9(正常为7.3-7.4)^[1]. 肿瘤细胞内的pH值明显高于组织间液, 这种细胞外的酸性微环境能够明显增强肿瘤细胞的浸润转移能力, 而钠氢交换蛋白1(Na⁺/H⁺ exchanger 1, NHE1)在形成与维持这种酸性微环境过程中起着重要的作用. 此外, NHE1还可影响细胞的形态和功能, 对细胞骨架的重塑及调节伪足和侵袭性伪足(invadopodia)的形成起作用, 进而促进肿瘤细胞的侵袭及转移. 本文就NHE1与肿瘤细胞侵袭转移的关系予以综述.

1 NHE家族成员及NHE1的化学结构与功能

迄今为止, 人们已知NHE基因家族中有10个亚型^[2,3], 所有亚型均具有相似的拓扑结构, 共同构成膜交换蛋白的一个基因家族, 各亚型之间

■背景资料

侵袭和转移是肿瘤的恶性表型, 是肿瘤发展的重要环节, 其影响因素很多, 但具体机制尚不明确. 近年来研究表明, 钠氢交换蛋白1在多种肿瘤细胞中的表达增加, 与肿瘤的侵袭转移密切相关. 钠氢交换蛋白1广泛存在于细胞膜表面. 可通过排出细胞内H⁺, 形成细胞外酸性微环境. 通过与肌动蛋白结合蛋白(ERM)的联系, 参与细胞形态的维持及侵袭结构的形成.

■同行评议者

陈钟, 主任医师, 南通大学附属医院普外科

■相关报道

Busco等在乳腺癌细胞中发现, 定位于侵袭性伪足的NHE1可在其周围形成酸性微环境, 利于细胞外基质降解, 进而促进肿瘤侵袭, 为证明NHE1在肿瘤侵袭中的作用提供了结构基础。

有25%-70%的氨基酸是一致的。NHE1-NHE5主要定位于细胞膜表面, NHE1广泛表达在各种组织细胞膜, NHE2和NHE3主要定位于肾脏和小肠, 与水钠吸收有关, NHE4主要在胃上皮细胞表达, 但也存在于小肠、肾脏^[4]。NHE5表达在脑组织细胞, 在神经组织功能的维持作用中发挥重要作用^[5]。NHE6-NHE9主要表达于细胞膜内, NHE6在心脏、大脑和骨骼肌高表达, 定位于早期循环小泡的膜表面, 与物质回收有关^[6]。NHE7主要定位于高尔基体的反面区, 间接负责 Na^+ 和 K^+ 在与 H^+ 交换后的内流^[7]。NHE8定位于高尔基体的中部和反面区域, 主要在骨骼肌和肾脏高表达^[8]。NHE9定位于晚期回收小泡^[9]。最近发现的NHE10则在破骨细胞中高表达^[3]。

NHE1亚型是NHE家族中最具特征性结构。NHE1基因是一种管家基因, 定位在染色体的1p35-36, cDNA全长约为5 kb, 开放阅读框长2 445 bp。NHE1蛋白定位在质膜上, 主要存在于人类, 其分子结构中有2个功能区域, 即疏水的N端和亲水的C端。疏水的N端功能域是NHE1介导一个 Na^+ 向细胞内和一个 H^+ 向细胞外进行交换的充分必要条件, C端功能域位于胞质内, 决定NHE1进行 Na^+/H^+ 交换的pH调定点, 从而决定胞内pH水平^[2]。另外, 因NHE1的结构有其特殊性, 可以作为锚定肌动蛋白的肌丝来控制表皮细胞骨架的完整性, 参与非肌性细胞的黏附、细胞形态的维持、伪足的形成以及细胞的运动能力^[10]。

2 NHE1与肿瘤细胞侵袭微环境

研究表明, 许多实体肿瘤的增长与其血管的生长并不平行, 导致一些缺氧区域的出现, 糖酵解加强, ATP的分解增加, 肿瘤细胞产生大量的乳酸盐及 H^+ , 以往人们一直认为肿瘤细胞内pH比正常细胞更偏酸性。但用磁共振波谱等技术证明肿瘤细胞内pH为中性或偏碱性。NHE1被认为是引起细胞微环境酸化主要机制之一。NHE1通过泵出肿瘤细胞因高代谢产生的 H^+ , 维持肿瘤细胞内的pH值, 形成外酸内碱的局部微环境, 对肿瘤的侵袭和转移起到重要的作用^[11]。NHE1在多种肿瘤细胞中都有过高表达, 且低血清^[12]和酸性细胞外环境^[13]均可引起NHE1活化, 促进 Na^+ 向细胞内和 H^+ 向细胞外交换, 进而引起细胞内碱化和细胞外酸化。NHE1的活化是由于其胞内C端离子结合位点对底物的亲和力增加, 使pH调定点高于静息细胞内pH值(intracellular pH, pHi), 因此, NHE1始终处于活化状态而造成细胞外微

环境酸化^[14]。升高的pHi可促进糖酵解, 产生的 H^+ 又通过NHE1排出细胞, 进一步加重了细胞外微环境的酸化。此外, 对乳腺癌细胞的研究发现, 间质中的透明质酸与其受体CD44相互作用可激活NHE1, 造成细胞外环境的酸化^[15]。

最近研究表明, 细胞膜表面还存在pH nanoenvironment, 并且细胞前端nanoenvironment pH比细胞尾部低, 其形成和NHE1有关, 并对调节整合素介导的细胞-基质黏附和细胞迁移起重要作用^[16]。在重症联合免疫缺陷的小鼠中, 稳定表达抗转移基因Nm23的人乳腺癌细胞比对照组细胞具有高细胞外pH(extracellular pH, pHe), 低pHi和低转移能力, 证明紊乱的pH动力学在肿瘤转移中的作用^[17]。而一项关于人黑色素瘤细胞的研究发现在NHE1缺陷或被抑制的情况下改变pHe, 细胞的转移和形态不变, 说明细胞对pHe改变的应变能力依赖于NHE1的存在^[18]。

NHE1还和多种蛋白酶的分泌相关。在前列腺癌细胞中, 肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)与其受体酪氨酸激酶受体结合后通过一系列相互作用, 导致组织蛋白酶B的分泌增多和肿瘤侵袭增强, 而5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利[5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride](EIPA, NHE1抑制剂)处理细胞后可减少组织蛋白酶B的分泌^[19]。由此可见NHE1及其介导的低pHe可以刺激组织蛋白酶B的释放。而Steffan等^[20]在前列腺癌的研究中发现NHE1在酸性pHe诱导的溶酶体向细胞外围转运和胞吐过程中起着重要作用。推测NHE1促进蛋白酶的分泌可能是通过增加细胞溶酶体的容量和刺激溶酶体向细胞膜移动完成的。Bourguignon等^[15]研究发现在乳腺癌细胞透明质酸(hyaluronan, HA)与CD44结合后, 可激活NHE1的活性, 引起肿瘤细胞外基质酸化, 进而引起透明质酸酶-2和组织蛋白酶B的活化, 增加了乳腺癌细胞的侵袭性, 也证明了NHE1在肿瘤侵袭转移中的作用。基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)在降解细胞外基质和肿瘤细胞侵袭转移中起着至关重要的作用。在对人仓鼠肺成纤维细胞的研究中发现, EIPA可抑制去氧肾上腺素(phenylephrine, PE)诱导的MMP-9活性及细胞侵袭性的增加, 并在非小细胞肺癌中发现相似的结果^[21]。而在转染离子转运缺陷的NHE1的肿瘤细胞中发现, MMP-9的活性及编码MMP-9的基因表达均降低^[22]。

腾小春等^[23]采用免疫组织化学的方法探讨了NHE1在胃癌及胃癌前病变中的表达, 结果显

示NHE1蛋白在胃癌的表达显著高于正常胃黏膜和胃癌前病变,可能与胃癌的发生、生长、转移有着密切的关系.通过NHE1反义基因转染SGC-7901胃癌细胞,可使NHE1基因表达下调,导致细胞内酸化,抑制细胞侵袭,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,并部分逆转肿瘤细胞的恶性表型^[24].我们的研究发现,在肝癌组织中NHE1在mRNA和蛋白水平均表达增加,NHE1表达增加和静脉侵袭,肿瘤的等级相关^[25].用NHE1抑制剂EIPA处理HepG2细胞,肿瘤细胞的侵袭和转移受到抑制,并且发现EIPA可下调MMP2、MMP-9和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的合成^[26].

肿瘤细胞的侵袭转移需要降解细胞外基质屏障,而由NHE1形成的细胞外酸性环境可激活肿瘤细胞分泌的酸性蛋白酶,加速对细胞外基质的降解过程.这些蛋白酶不仅可以分解蛋白质,而且可以降解糖胺聚糖.在这一过程中,MMP起着重要作用.尽管低pHe不是MMP发挥活性的最佳环境^[27],但基质金属蛋白酶原的活化需要其他蛋白酶的水解作用,而这些蛋白酶在酸性条件下可发挥最佳活性^[28].因此肿瘤细胞外微环境的酸化为蛋白酶水解作用提供了最佳环境,而且这种蛋白水解作用使基质金属蛋白酶原转变为MMP,利于降解细胞外基质.进而利于肿瘤的转移.提高pHe、应用多种蛋白酶抑制剂、NHE1抑制剂^[15]或抑制NHE1基因表达^[29],均可降低肿瘤细胞的侵袭能力.由此可见,NHE1及其介导的细胞外酸性微环境在肿瘤侵袭转移中有重要作用.

3 NHE1与肿瘤细胞侵袭结构

Denker等^[10]发现NHE1可以作为锚定肌动蛋白的肌丝来控制表皮细胞骨架的完整性.这种作用是通过NHE1与肌动蛋白结合蛋白(ezrin, radixin and moesin, ERM)之间发生结构联系而完成的.参与非肌性细胞的黏附、细胞形态的维持以及细胞的运动能力.在成纤维细胞中表达突变的NHE1,不影响离子交换,但可以阻断NHE1与ERM的结合,实验发现这种突变会降低细胞黏附力,影响细胞形状的调节.肿瘤细胞侵袭能力的强弱部分取决于其侵袭结构的形成能力,即形成细胞前端伪足和侵袭性伪足的能力.

3.1 细胞前端伪足 在正常哺乳动物细胞,NHE1定位于极性细胞的前端,对伪足形成和细胞趋化有重要作用^[30].许多侵袭性肿瘤细胞有长的

前端伪足^[31],这种伪足和肿瘤细胞的侵袭性密切相关.而这种细胞极性的建立以及细胞的定向移动都需要细胞骨架的重建、NHE1的活化以及NHE1在伪足顶端的再分布^[32,33].应用NHE1抑制剂可以阻断这种侵袭结构的形成以及减弱细胞的侵袭能力^[15].此外,肿瘤细胞在低pHe环境中可观察到溶酶体主要定位于伪足及其顶端,这表明伪足形成、NHE1的活化和蛋白酶分泌之间有紧密的相互依赖关系,并和肿瘤的侵袭相关^[34].Stock等^[35]应用人类黑色素瘤研究表明,黏着斑处由NHE1排出质子可稳定胞膜 $\alpha 2 \beta 1$ 整合素受体和细胞外基质的连接.当局部pHe适合质膜蛋白和细胞外基质成分之间的结合时,细胞和基质保持连接,形成长的伪足.由此可见,NHE1在侵袭性细胞骨架整合及细胞极性的维持中的有重要作用.

3.2 侵袭性伪足 侵袭性伪足是小的、富含 $\beta 1$ 整合素和蛋白酶的肌动蛋白结构,经常出现在伪足的顶端,伸入细胞外基质,在肿瘤细胞侵袭过程中他发挥着传递细胞外基质信号和介导细胞外基质降解的作用^[36].侵袭性伪足形成过程中蛋白质的相互作用和蛋白酶的分泌已经开始明确.但是,侵袭性伪足分泌的蛋白酶是如何被激活的还不清楚.肿瘤微环境的酸化是已知的激活这些蛋白酶的一个重要因素.通过比较肿瘤细胞的侵袭过程和破骨细胞伪足小体造成的骨降解过程,可以帮助理解侵袭性伪足的作用^[36].破骨细胞含有高度有序富含肌动蛋白的胞膜突起,介导与骨的黏附作用,由此建立一个密闭的环境,在这个密闭的环境里,胞膜突起分泌的蛋白酶可达到非常高的浓度.由NHE1和V-ATPases调节形成的骨-伪足小体间室酸化微环境是骨消化和吸收的主要因素^[37].同样,在侵袭性伪足由NHE1等排出的 H^+ 可能介导蛋白酶的活化和局部细胞外基质的降解,导致侵袭性肿瘤细胞前端定向移动通过被降解的组织^[38].研究表明,在乳腺癌细胞透明质酸和CD44结合后激活NHE1,引起细胞外酸化,进而促进肿瘤细胞的侵袭能力^[15].此外,另有报道,在侵袭性乳腺癌细胞中CD44和MMP-9共定位于侵袭性伪足,这也间接证明了NHE1在肿瘤侵袭转移中的作用^[39].

另外,NHE1还和其他分子相互作用,促进肿瘤细胞侵袭转移.RhoA是小分子G蛋白Rho家族的一员,在多种肿瘤中表达增加,并和肿瘤的侵袭、转移有关.Tominaga等^[40]在CCL39细胞中

■创新盘点

NHE1参与了肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移等多个过程,本文从侵袭微环境和侵袭结构两方面对NHE1在肿瘤侵袭转移中的作用进行了详细阐述.

■应用要点

由于NHE1介导形成的侵袭微环境和侵袭结构参与肿瘤的侵袭转移,故可通过抑制NHE1消除肿瘤细胞内外异常的pH梯度,或者抑制伪足和侵袭性伪足形成的中间环节,进而达到抑制肿瘤侵袭转移的目的。

的研究发现,NHE1可以作为RhoA的下游分子调节细胞骨架,进而调节细胞黏附和伸展。Paradiso等^[4]在MDA-MB-435的研究中发现,血清剥夺可以通过NHE1和RhoA交互作用,诱导NHE1依赖的细胞形态学和骨架改变,导致肿瘤细胞趋化和侵袭。而RhoA的抑制可以抑制NHE1活性,并且抑制血清剥夺诱导的细胞骨架改变,提示RhoA可能通过对NHE1的调节,引起细胞骨架改变,从而影响肿瘤细胞侵袭。

肿瘤细胞侵入正常组织通过4步实现,第一,肿瘤细胞和基底膜或细胞外基质间失去黏附作用;第二,肿瘤细胞排出的酸降解局部组织;第三,酸依赖性蛋白酶的分泌和激活;第四,肿瘤细胞运动能力增强侵入周围组织。NHE1在形成肿瘤细胞酸性微环境和介导蛋白酶的分泌过程中发挥着重要作用,而酸性微环境利于肿瘤分泌的蛋白酶分解细胞外基质,降低细胞外基质的结构和密度,同时通过NHE1的激活、再分布及和其他分子的相互作用,调节肿瘤细胞形成的细胞伪足和侵袭性伪足,增强细胞运动能力,并浸润周围间质。由NHE1介导形成的侵袭微环境和侵袭结构并不是孤立存在的,两者是相互影响,共同促进肿瘤的侵袭转移。

4 结论

侵袭和转移是肿瘤的恶性表型,而NHE1在肿瘤转移中有着重要的作用,目前许多研究针对NHE1及其在肿瘤转移中作用,以期找到治疗肿瘤的靶点。治疗研究主要集中在两方面:一是消除肿瘤细胞内外异常的pH梯度或抑制NHE1等其他方法阻断形成这一梯度的中间环节;二是在NHE1调节细胞骨架及介导调节伪足和侵袭性伪足形成机制中寻找突破。由于NHE1在所有真核细胞均有表达,药物的特异性问题还有待解决,而且NHE1在肿瘤转移中的机制还没有完全明确,有待更深入的研究。

5 参考文献

- Gillies RJ, Raghunand N, Karczmar GS, Bhujwala ZM. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 2002; 16: 430-450
- Slepkov ER, Rainey JK, Sykes BD, Fliegel L. Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J* 2007; 401: 623-633
- Lee SH, Kim T, Park ES, Yang S, Jeong D, Choi Y, Rho J. NHE10, an osteoclast-specific member of the Na⁺/H⁺ exchanger family, regulates osteoclast differentiation and survival [corrected] *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369: 320-326
- Malo ME, Fliegel L. Physiological role and regula-

tion of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84: 1081-1095

- Baird NR, Orlowski J, Szabó EZ, Zaun HC, Schultheis PJ, Menon AG, Shull GE. Molecular cloning, genomic organization, and functional expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 5 (NHE5) from human brain. *J Biol Chem* 1999; 274: 4377-4382
- Brett CL, Wei Y, Donowitz M, Rao R. Human Na⁺/H⁺ exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C1031-C1041
- Numata M, Orlowski J. Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺,K⁺)/H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 2001; 276: 17387-17394
- Goyal S, Vanden Heuvel G, Aronson PS. Renal expression of novel Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE8. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F467-F473
- Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H. Four Na⁺/H⁺ exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem* 2005; 280: 1561-1572
- Denker SP, Huang DC, Orlowski J, Furthmayr H, Barber DL. Direct binding of the Na⁺-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H⁺ translocation. *Mol Cell* 2000; 6: 1425-1436
- Slepkov E, Fliegel L. Structure and function of the NHE1 isoform of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 499-508
- Reshkin SJ, Bellizzi A, Albarani V, Guerra L, Tommasino M, Paradiso A, Casavola V. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the tumor-specific activation of human breast cancer cell Na⁺/H⁺ exchange, motility, and invasion induced by serum deprivation. *J Biol Chem* 2000; 275: 5361-5369
- Glunde K, Düsselmann H, Juretschke HP, Leibfritz D. Na⁺/H⁺ exchange subtype 1 inhibition during extracellular acidification and hypoxia in glioma cells. *J Neurochem* 2002; 80: 36-44
- Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldeira S, Albarani V, Malanchi I, Poignee M, Alunni-Fabbroni M, Casavola V, Tommasino M. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000; 14: 2185-2197
- Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 2004; 279: 26991-27007
- Stock C, Mueller M, Kraehling H, Mally S, Noël J, Eder C, Schwab A. pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 679-686
- Bhujwala ZM, Aboagye EO, Gillies RJ, Chacko VP, Mendola CE, Backer JM. Nm23-transfected MDA-MB-435 human breast carcinoma cells form tumors with altered phospholipid metabolism and pH: a 31P nuclear magnetic resonance study in vivo and in vitro. *Magn Reson Med* 1999; 41: 897-903
- Stüwe L, Müller M, Fabian A, Waning J, Mally S, Noël J, Schwab A, Stock C. pH dependence of melanoma cell migration: protons extruded by NHE1

- dominate protons of the bulk solution. *J Physiol* 2007; 585: 351-360
- 19 Steffan JJ, Williams BC, Welbourne T, Cardelli JA. HGF-induced invasion by prostate tumor cells requires anterograde lysosome trafficking and activity of Na⁺-H⁺ exchangers. *J Cell Sci* 2010; 123: 1151-1159
 - 20 Steffan JJ, Snider JL, Skalli O, Welbourne T, Cardelli JA. Na⁺/H⁺ exchangers and RhoA regulate acidic extracellular pH-induced lysosome trafficking in prostate cancer cells. *Traffic* 2009; 10: 737-753
 - 21 Taves J, Rastedt D, Canine J, Mork D, Wallert MA, Provost JJ. Sodium hydrogen exchanger and phospholipase D are required for alpha1-adrenergic receptor stimulation of metalloproteinase-9 and cellular invasion in CCL39 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 2008; 477: 60-66
 - 22 Putney LK, Barber DL. Expression profile of genes regulated by activity of the Na-H exchanger NHE1. *BMC Genomics* 2004; 5: 46
 - 23 滕小春, 刘海峰, 刘永生, 段丽, 王国安, 何俊堂. NHE1蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达及临床意义. 第三军医大学学报 2004; 26: 402-404
 - 24 Liu HF, Teng XC, Zheng JC, Chen G, Wang XW. Effect of NHE1 antisense gene transfection on the biological behavior of SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2162-2167
 - 25 Yang X, Wang D, Dong W, Song Z, Dou K. Over-expression of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1 and its clinicopathologic significance in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol* 2009 Oct 30. [Epub ahead of print]
 - 26 Yang X, Wang D, Dong W, Song Z, Dou K. Inhibition of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1 by 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride reduces hypoxia-induced hepatocellular carcinoma invasion and motility. *Cancer Lett* 2010; 295: 198-204
 - 27 Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755: 37-69
 - 28 Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF. Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 2000; 291: 113-135
 - 29 Yang X, Wang D, Dong W, Song Z, Dou K. Suppression of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger 1 by RNA interference or amiloride inhibits human hepatoma cell line SMMC-7721 cell invasion. *Med Oncol* 2010 Feb 12. [Epub ahead of print]
 - 30 Denker SP, Barber DL. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J Cell Biol* 2002; 159: 1087-1096
 - 31 Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 711-719
 - 32 Jia Z, Barbier L, Stuart H, Amraei M, Pelech S, Dennis JW, Metalnikov P, O'Donnell P, Nabi IR. Tumor cell pseudopodial protrusions. Localized signaling domains coordinating cytoskeleton remodeling, cell adhesion, glycolysis, RNA translocation, and protein translation. *J Biol Chem* 2005; 280: 30564-30573
 - 33 Stock C, Schwab A. Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflugers Arch* 2009; 458: 981-992
 - 34 Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 786-795
 - 35 Stock C, Gassner B, Hauck CR, Arnold H, Mally S, Eble JA, Dieterich P, Schwab A. Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *J Physiol* 2005; 567: 225-238
 - 36 Buccione R, Orth JD, McNiven MA. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 647-657
 - 37 Kajiya H, Okamoto F, Fukushima H, Okabe K. Calcitonin inhibits proton extrusion in resorbing rat osteoclasts via protein kinase A. *Pflugers Arch* 2003; 445: 651-658
 - 38 Busco G, Cardone RA, Greco MR, Bellizzi A, Colella M, Antelmi E, Mancini MT, Dell'Aquila ME, Casavola V, Paradiso A, Reshkin SJ. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *FASEB J* 2010; 24: 3903-3915
 - 39 Bourguignon LY, Gunja-Smith Z, Iida N, Zhu HB, Young LJ, Muller WJ, Cardiff RD. CD44v(3,8-10) is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 206-215
 - 40 Tominaga T, Barber DL. Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell* 1998; 9: 2287-2303
 - 41 Paradiso A, Cardone RA, Bellizzi A, Bagorda A, Guerra L, Tommasino M, Casavola V, Reshkin SJ. The Na⁺-H⁺ exchanger-1 induces cytoskeletal changes involving reciprocal RhoA and Rac1 signaling, resulting in motility and invasion in MDA-MB-435 cells. *Breast Cancer Res* 2004; 6: R616-R628

■同行评价

本文综述全面, 为肿瘤侵袭转移的研究奠定基础。

编辑 李薇 电编 何基才

EDNRB基因启动子甲基化状态在胃癌KATO III细胞系中的检测

孙文早, 韩高雄

■背景资料

EDNRB基因编码产物属于G蛋白偶联受体A家族, 位于细胞膜表面, 与配体内皮素结合后将细胞外信号传导至细胞内, 调控许多重要的生物过程, 包括血管的发育与收缩功能、某些激素的产生和刺激细胞生长和分化, 在Waardenburg综合征、先天性巨结肠和肿瘤发病机制中起到关键作用。

孙文早, 仙桃市第一人民医院内分泌科 湖北省仙桃市 433000

韩高雄, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 此课题由孙文早与韩高雄设计; 细胞培养与甲基化检测由孙文早完成; 论文写作由孙文早与韩高雄共同完成。

通讯作者: 韩高雄, 主治医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院腹腔镜外科。

han_gaoxiong@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-07-19 修回日期: 2010-08-16

接受日期: 2010-08-29 在线出版日期: 2010-11-18

Detection of the promoter methylation status of the EDNRB gene in human gastric cancer cell line KATO III

Wen-Zao Sun, Gao-Xiong Han

Wen-Zao Sun, Department of Endocrinology, the First People's Hospital of Xiantao, Xiantao 433000, Hubei Province, China

Gao-Xiong Han, Department of Laparoscopic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Gao-Xiong Han, Department of Laparoscopic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. wuhantongji163@163.com

Received: 2010-07-19 Revised: 2010-08-16

Accepted: 2010-08-29 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To detect the promoter methylation status and mRNA expression of the endothelin receptor type B (EDNRB) gene in human gastric cancer cell line KATO III and to analyze their clinical significance.

METHODS: Genomic DNA and total RNA were extracted from healthy adult peripheral blood samples and KATO III cells. Bisulfite sequencing PCR and reverse transcription-PCR were performed to analyze the promoter methylation status and mRNA expression of the EDNRB gene, respectively.

RESULTS: In KATO III cells, some CG loci

($\leq 20\%$) were not or lowly methylated, while some others ($\geq 50\%$) were hypermethylated. In healthy adult peripheral blood samples, only one CG locus (10%) was methylated, while the others were not methylated. The promoter methylation extent of the EDNRB gene in KATO III cells was higher than that in healthy adult peripheral blood samples. The mRNA expression was inhibited significantly in KATO III cells compared with healthy adult peripheral blood samples.

CONCLUSION: EDNRB gene promoter is hypermethylated in KATO III cells. The promoter methylation of the EDNRB gene may play an important role in the pathogenesis of gastric cancer.

Key Words: Endothelin receptor type B; Promoter; Methylation; Gastric cancer

Sun WZ, Han GX. Detection of the promoter methylation status of the EDNRB gene in human gastric cancer cell line KATO III. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3448-3451

摘要

目的: 探讨胃癌KATO III细胞系内皮素受体B(EDNRB)基因启动子甲基化状态及mRNA表达在临床中的应用。

方法: 提取正常健康人外周血和胃癌KATO III细胞系总DNA和总RNA, 分别进行亚硫酸氢盐测序PCR(bisulfite sequencing PCR, BSP)和逆转录PCR(reverse transcriptase PCR, RT-PCR)扩增, 以正常健康人外周血为对照, 比较EDNRB基因启动子甲基化状态和mRNA表达差异。

结果: 胃癌KATO III细胞系1-9、14和15等CG位点表现为无甲基化或低甲基化状态($\leq 20\%$), 其余位点表现高甲基化状态($\geq 50\%$), 正常健康人外周血EDNRB基因启动子除第22个CG甲基化率为10%外, 其余位点均表现为

■同行评议者

崔莲花, 副教授, 青岛大学医学院公共卫生系

无甲基化状态, 胃癌KATO III 细胞系甲基化发生率显著高于健康人外周血, 且其mRNA表达明显受到抑制。

结论: EDNRB基因启动子甲基化在胃癌发病机制中扮演重要角色。

关键词: 内皮素受体B; 启动子; 甲基化; 胃癌

孙文早, 韩高雄. EDNRB基因启动子甲基化状态在胃癌KATO III 细胞系中的检测. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3448–3451
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3448.asp>

0 引言

EDNRB基因编码产物为含有442个氨基酸的内皮素受体B(endothelin receptor type B, EDNRB), 属于G蛋白偶联受体A家族, 该蛋白质位于细胞膜表面, 与配体内皮素结合后将细胞外信号传导至细胞内^[1], 调控许多重要的生物过程, 包括血管的发育与收缩功能、某些激素的产生和刺激细胞生长和分化, 在Waardenburg综合征、先天性巨结肠和癌症发病机制中起到关键作用^[2,3]。目前很多文献报道表明EDNRB基因启动子在鼻咽癌^[4]、淋巴瘤^[5]、前列腺癌^[6,7]、食管癌^[8]和口腔鳞状细胞癌^[9]等患者中呈现高度甲基化状态, 而在胃癌患者中未见报道。胃癌作为我国最常见的恶性肿瘤之一, 检测和研究胃癌患者中EDNRB基因启动子甲基化状态对阐明胃癌发病机制具有极其重要的意义, 在胃癌早期检测和治疗指导、预后评估中有重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌KATO III 购自中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心)。对照为正常健康人外周血。胎牛血清、DMEM(高糖)为Gibco产品, DNA提取纯化与质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, TaKaRa Ex Taq Hot Start Version、pMD18-T Vector、RNAiso Plus和Prime-Script One Step RT-PCR Kit购自TaKaRa公司, EpiTect Bisulfite Kit购自QIAGEN。甲基化引物合成及测序由宝生物工程(大连)公司完成, PCR仪器为ABI 9700。

1.2 方法

1.2.1 亚硫酸氢盐测序PCR检测EDNRB基因启动子甲基化状态: 在PubMed的GenBank上检索人类EDNRB基因序列, 以转录起始点上游1 500 bp为启动子区域, 延伸至转录起始点下游200 bp, 按照CpG岛的定义预测其中181-1 700 bp为

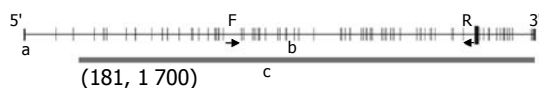


图1 人类EDNRB基因CpG岛。a: 转录起始位点; b: CG位点; c: CpG岛。F: forward primer; R: reverse primer。

CpG岛。用Methyl Primer Express v1.0设计亚硫酸氢盐测序PCR(bisulfite sequencing PCR, BSP)引物, 甲基化引物: forward primer, 5'-AAAAG-TATTTGTTTGTATGGTAGTAGAGATT-3', reverse primer, 5'-CCTTCCTAATACCCTCTCAAC-TATTTT-3', 扩增产物长度为809 bp, 含有45个CG位点。CpG岛与引物设计位点见图1。

按照DNA提取试剂盒操作说明提取胃癌KATO III 细胞系和正常健康人外周血总DNA, 重亚硫酸盐将未甲基化C转化为U, BSP总反应体系为25 μ L, 其中引物各1 μ L, 甲基化修饰后的DNA 2 μ L, BSP反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 65 $^{\circ}$ C退火90 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 循环35个周期后, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min结束, BSP后的产物采用TA克隆将其连接到pMD18-T质粒载体, 转化至DH5 α 感受态细胞后挑选10个阳性克隆测序, 测序结果采用BiQ Analyzer^[10]分析。

1.2.2 RT-PCR检测EDNRB基因mRNA表达: 按照RNAiso plus提取正常健康人外周血和胃癌KATO III 细胞系总RNA后进行RT-PCR扩增, 引物为: forward primer, 5'-CATCAAGCTGCTG-GCAGAGG-3', reverse primer, 5'-GATTCGCA-GATAACTTTTGTAG-3'。整个RT-PCR反应体系为50 μ L, RT-PCR反应条件为: 热启动94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 52 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 循环35个周期后, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min结束。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内对照, 产物进行琼脂糖凝胶电泳后检测。

2 结果

2.1 EDNRB基因启动子甲基化状态 正常健康人外周血EDNRB基因启动子除第22个CG甲基化率为10%外, 其余位点均表现为无甲基化状态, 胃癌KATO III 细胞系1-9、14和15等CG位点表现为无甲基化或低甲基化状态($\leq 20\%$), 其余位点表现高甲基化状态($\geq 50\%$), 甲基化发生率显著高于健康人外周血, 高甲基化状态主要位于转录起始点上游, 预示该区域可能为EDNRB基因核心启动子(图2)。

2.2 EDNRB基因mRNA表达结果 健康人外周血

■ 研发前沿

EDNRB基因启动子甲基化改变导致肿瘤的发病机制是目前消化系统肿瘤领域的研究热点, 亟待解决的是EDNRB基因启动子区域每个CG位点甲基化状态。

■ 相关报道

目前众多文献报道EDNRB基因启动子在鼻咽癌、淋巴瘤、前列腺癌、食管癌和口腔鳞状细胞癌等患者肿瘤组织中呈高度甲基化状态, 其基因甲基化灭活直接与肿瘤发病机制相关。

■ 创新盘点

本文首次研究揭示EDNRB基因启动子45个CpG位点甲基化状态,证明EDNRB基因启动子甲基化灭活与基因表达缺失之间相关,对胃癌发病机制的进一步研究提供参考数据。

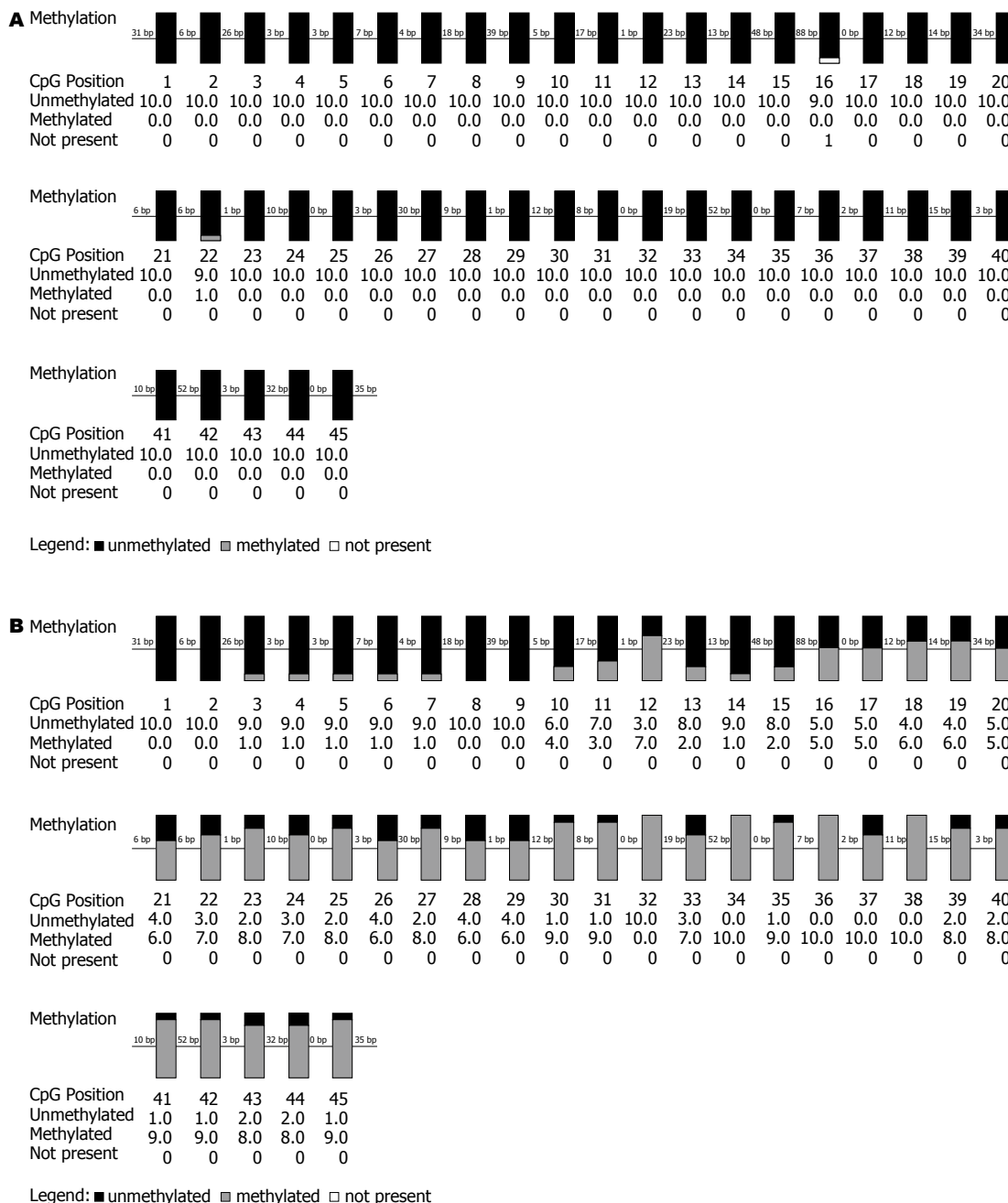


图2 EDNRB基因启动子在正常人外周血和胃癌KATO III细胞系中的甲基化状态。A: 正常人外周血; B: 胃癌KATO III细胞系。黑色: 未甲基化; 灰色: 甲基化; 白色: 缺失位点。

EDNRB基因mRNA表达显著高于胃癌KATO III细胞系,后者表达明显受到抑制(图3)。

3 讨论

DNA甲基化是最早发现的基因转录前修饰途径之一。在DNA甲基转移酶作用催化下, 5'CpG中的胞嘧啶加上甲基基团而变成5'mCpG^[10]。在真核生物基因组中接近80%的CpG位点均被甲基化, 这些甲基化主要位于启动子区域的CpG岛^[11]。大量研究表明, DNA甲基化能引起染色质结构、DNA构象、DNA稳定性及DNA与蛋白质相互

作用方式的改变, 从而调控基因表达, 已经成为表观遗传学修饰的最重要的作用方式^[12]。

DNA甲基化在癌症的发生机制中扮演重要角色^[13], 许多文献报道DNA启动子区域高甲基化状态抑制或完全灭活基因表达而产生癌症, 大多数肿瘤细胞呈现高甲基化状态, DNA甲基化已经成为肿瘤诊断中的生物标志物^[14]。EDNRB基因介导细胞信号传递, 调控细胞增殖分化, 启动子区域甲基化状态抑制基因表达而导致细胞发生恶性增殖, 最终产生癌症, 目前研究表明鼻咽癌、前列腺癌和结直肠癌等众多癌症

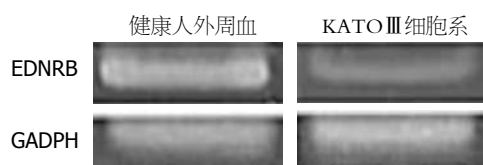


图 3 EDNRB基因mRNA在正常健康人外周血与胃癌KATO III 细胞系中的表达。

与EDNRB启动子高甲基化相关。胃癌KATOIII细胞系建系于1978年, 属于腺癌细胞系^[16], 目前已经成为研究胃癌发病机制的重要细胞系之一。本实验结果显示在胃癌KATOIII细胞系中, EDNRB基因表现为高甲基化状态, 转录起始点上游核心启动子区域甲基化程度更高(甲基化率接近100%), 其显著抑制EDNRB转录活性而导致mRNA表达降低, 该结果预示胃癌患者EDNRB基因可能呈现高甲基化状态, 检测该基因启动子甲基化程度可能为胃癌早期发现、治疗评估和预后预测提供一个重要的生物标志物。

4 参考文献

- 1 Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 485-498
- 2 Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med* 2010; 12: 39-43
- 3 张万里, 王国斌, 陶凯雄. 内皮素B受体基因与先天性巨结肠关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2607-2611
- 4 Zhou L, Feng X, Shan W, Zhou W, Liu W, Wang L, Zhu B, Yi H, Yao K, Ren C. Epigenetic and genetic alterations of the EDNRB gene in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology* 2007; 72: 357-363
- 5 Hsiao PC, Liu MC, Chen LM, Tsai CY, Wang YT, Chen J, Hsu LS. Promoter methylation of p16 and EDNRB gene in leukemia patients in Taiwan. *Chin J Physiol* 2008; 51: 27-31
- 6 Phé V, Cussenot O, Rouprêt M. Methylated genes as potential biomarkers in prostate cancer. *BJU Int* 2010; 105: 1364-1370
- 7 Ellinger J, Bastian PJ, Jurgan T, Biermann K, Kahl P, Heukamp LC, Wernert N, Müller SC, von Ruecker A. CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology* 2008; 71: 161-167
- 8 Zhao BJ, Sun DG, Zhang M, Tan SN, Ma X. Identification of aberrant promoter methylation of EDNRB gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22: 55-61
- 9 Kaur J, Demokan S, Tripathi SC, Macha MA, Begum S, Califano JA, Ralhan R. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 127: 2367-2373
- 10 Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 2005; 21: 4067-4068
- 11 Nagase H, Ghosh S. Epigenetics: differential DNA methylation in mammalian somatic tissues. *FEBS J* 2008; 275: 1617-1623
- 12 Feng J, Fan G. The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders. *Int Rev Neurobiol* 2009; 89: 67-84
- 13 Zhang TY, Meaney MJ. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu Rev Psychol* 2010; 61: 439-66, C1-C3
- 14 Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007; 115: 1039-1059
- 15 Qureshi SA, Bashir MU, Yaqinuddin A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. *Int J Surg* 2010; 8: 194-198
- 16 Sekiguchi M, Sakakibara K, Fujii G. Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn J Exp Med* 1978; 48: 61-68

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本文选题新颖, 对胃癌的临床治疗有一定的指导价值。

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

• 消息 •

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)

TNF- α 对人肝细胞Mfn2基因表达的调节及对线粒体形态功能的影响

张勇, 江隆昌, 胡文君, 胡青钢, 郑启昌

■背景资料

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 是病毒性肝炎、酒精性及非酒精性脂肪肝病、缺血再灌注损伤等损伤性病变时肝细胞损伤的主要细胞因子。研究发现TNF- α 能引起细胞线粒体损伤, 抑制线粒体的呼吸功能并增加线粒体活性氧(ROS)和过氧化脂质的形成, 但具体分子机制并不十分清楚。

张勇, 江隆昌, 胡文君, 胡青钢, 郑启昌, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 张勇与江隆昌对此文所作贡献均等; 此课题由张勇与郑启昌设计; 研究过程由张勇、江隆昌、胡文君及胡青钢操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由郑启昌提供; 数据分析由胡文君完成; 本论文写作由张勇与江隆昌完成。

通讯作者: 郑启昌, 教授, 主任医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科. zqc654@21cn.com

收稿日期: 2010-07-30 修回日期: 2010-09-07

接受日期: 2010-09-13 在线出版日期: 2010-11-18

TNF- α treatment alters Mfn2 expression and mitochondrial morphology and function in hepatic LO2 cells

Yong Zhang, Long-Chang Jiang, Wen-Jun Hu, Qing-Gang Hu, Qi-Chang Zheng

Yong Zhang, Long-Chang Jiang, Wen-Jun Hu, Qing-Gang Hu, Qi-Chang Zheng, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Qi-Chang Zheng, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. zqc654@21cn.com

Received: 2010-07-30 Revised: 2010-09-07

Accepted: 2010-09-13 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the influence of treatment with tumor necrosis factor- α (TNF- α) on the expression of mitofusin 2 (Mfn2) and mitochondrial morphology and function in hepatic LO2 cells.

METHODS: After pEGFP-Mfn2 plasmid was transfected into LO2 cells with Lipofectamine 2000, transfected LO2 cells were incubated with TNF- α for 12 h. The expression of Mfn2 mRNA and protein was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. MitoTracker Mitochondrion-Selective Probes were used to detect the changes in mitochondrial morphology. ATP synthesis and reactive oxygen species (ROS) pro-

duction were measured to assess mitochondrial function.

RESULTS: RT-PCR and Western blot analyses showed that Mfn2 was highly expressed in LO2 cells. After treatment of LO2 cells with TNF- α , Mfn2 expression was significantly suppressed (0.279 ± 0.026 vs 0.742 ± 0.018 ; 0.196 ± 0.024 vs 0.580 ± 0.011 , $P < 0.05$), ATP level decreased ($2.00 \mu\text{mol/g} \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$ vs $5.81 \mu\text{mol/g} \pm 0.31 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), ROS production increased (80.68 ± 4.02 vs 65.44 ± 3.47 , $P < 0.05$), and the normal tubular network of mitochondria was fragmented into short rods or spheres when compared to control cells. In contrast, these changes were not significant in Mfn2-transfected LO2 cells.

CONCLUSION: TNF- α treatment may alter mitochondrial morphology and impair mitochondrial function by decreasing the expression of Mfn2 in hepatic LO2 cells.

Key Words: Tumor necrosis factor- α ; Mitofusin 2; Adenosine triphosphate; Reactive oxygen species

Zhang Y, Jiang LC, Hu WJ, Hu QG, Zheng QC. TNF- α treatment alters Mfn2 expression and mitochondrial morphology and function in hepatic LO2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3452-3456

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 对肝细胞株LO2细胞线粒体融合蛋白基因2 (Mfn2) 基因表达的调节作用以及对线粒体形态和细胞三磷酸腺苷(ATP)、活性氧(ROS)生成的影响。

方法: 利用脂质体Lipofectamine 2000将Mfn2基因荧光表达载体(pEGFP-Mfn2)转染肝细胞株LO2细胞, 以终浓度为500 kU/L的TNF- α 作用LO2细胞株和稳定高表达Mfn2的LO2细胞株12 h, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot检测各组细胞Mfn2 mRNA转录水平以及蛋白的表达水平, 线粒体绿色荧光探针(Mito-Tracker Green)染色观察线粒体形态变

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

化, 荧光素酶ADP/ATP发光法检测各组细胞ATP含量, 荧光探针DCFH-DA测定细胞ROS生成水平.

结果: 经TNF- α 处理后LO2细胞中Mfn2基因的mRNA及蛋白表达水平显著低于空白对照组(0.279 ± 0.026 vs 0.742 ± 0.018 ; 0.196 ± 0.024 vs 0.580 ± 0.011 , $P < 0.05$); 对照组及转染Mfn2基因组肝细胞线粒体形态主要为丝状网络或长柱状, TNF- α 处理后未转染肝细胞线粒体断裂成点状碎片, 但转染组线粒体形态则无明显改变; TNF- α 处理后LO2细胞内ATP浓度显著下降($2.00 \mu\text{mol/g} \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$ vs $5.81 \mu\text{mol/g} \pm 0.31 \mu\text{mol/g}$, $P < 0.05$), 而ROS生成水平较空白对照组显著升高(FI: 80.68 ± 4.02 vs 65.44 ± 3.47 , $P < 0.05$), 但转染组细胞内ATP下降水平要显著低于未转染组, 而未转染组ROS升高程度则显著高于转染组($P < 0.05$).

结论: TNF- α 通过抑制肝细胞Mfn2的表达诱导线粒体形态改变及线粒体功能障碍.

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 线粒体融合蛋白基因2; 三磷酸腺苷; 活性氧

张勇, 江隆昌, 胡文君, 胡青钢, 郑启昌. TNF- α 对人肝细胞Mfn2基因表达的调节及对线粒体形态功能的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3452-3456
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3452.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)是病毒性肝炎^[1]、酒精性及非酒精性脂肪肝病^[2,3]、缺血再灌注损伤^[4]等损伤性病变时肝细胞损伤的主要细胞因子. 研究发现TNF- α 能引起细胞线粒体损伤, 抑制线粒体的呼吸功能并增加线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)和过氧化脂质的形成^[5,6], 但具体分子机制并不十分清楚. 线粒体融合蛋白基因2(mitofusin-2 gene, Mfn2)能促进线粒体的融合, 与线粒体形态、结构和功能有着密切联系^[7]. TNF- α 是否影响Mfn2基因的表达尚未见报道, 我们通过体外实验, 探讨TNF- α 对人肝细胞Mfn2基因表达的调节作用以及对线粒体形态和功能的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 绿色荧光蛋白-Mfn2基因表达载体(pEGFP-Mfn2)由本实验室构建并保存, 肝细胞株LO2细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心; TRIzol RNA抽提试剂、RT-PCR试

剂盒、RPMI 1640培养基、新生牛血清等购自美国Gibco公司; TNF- α 购自Invitrogen公司; Western blot化学发光试剂、硝酸纤维素膜、Mfn2单克隆抗体购自美国Sigma公司; BCA蛋白定量试剂、荧光素酶ADP/ATP发光检测试剂盒、7'-二氯荧光黄双乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针、ROS测定试剂盒购自美国Biomiga公司; 活体组织ROS初级荧光测定试剂盒购自GENMED公司; Mfn2引物由上海生物工程公司合成: 5'-ATGCATCCCCACTTAAGCAC-3', 5'-CCAGAGGGCAGAACTTTGTC-3', 内参GAPDH由ToYoBo公司试剂盒提供.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及pEGFP-Mfn2转染: 将人肝癌细胞株LO2细胞转入含100 mL/L血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液中培养, 3 d传代1次. 取 5×10^5 个细胞/孔接种6孔培养板, 在培养箱中过夜培养至铺满孔底面积80%以上, 采用脂质体介导方法转染pEGFP-Mfn2, 转染方法参照说明书. 每孔加入3 μL 脂质体包裹的siRNA(终浓度为10 nmol/L), 每孔最终体积是1 mL. 40 h后更换含血清培养基进行分析.

1.2.2 TNF- α 处理细胞: 将细胞分为TNF- α 组、TNF- α +Mfn2转染组、Mfn2转染组和空白对照组, 每组细胞取 5×10^5 个细胞/孔接种6孔培养板, 在培养箱中过夜培养至铺满孔底面积80%以上, 前两组分别加入含TNF- α (400 kU/L)的新鲜培养液作用12 h, 然后收集细胞检测, 每组均设4个重复.

1.2.3 Mfn2基因RT-PCR分析: 将约 1×10^6 细胞用TRIzol试剂提取各组细胞总RNA, 使用紫外分光光度计调整RNA浓度为1 g/L. 在9 μL 无RNA酶水中加入1 μg RNA, Oligo(dT)20 1 μL , 温度65 $^{\circ}\text{C}$, 10 min后立即置于冰上. 加入5 $\times$ RT Buffer 4 μL , dNTP mixture(各10 mmol/L)2 μL , RNase inhibitor(10 U/ μL)1 μL , ReverTra Ace 1 μL . 反应条件: 42 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min. 瞬间离心后置-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存. 在25 μL PCR体系中加入Cdc42上下游引物各1 μL , Taq DNA聚合酶1 μL , 循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ (GAPDH为55 $^{\circ}\text{C}$)30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s共35个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min. PCR产物25 μL 琼脂糖凝胶电泳, 50 V, 30-45 min后照相.

1.2.4 各组细胞Mfn2 Western blot定量分析: 将约 1×10^6 细胞加60 μL 去污剂裂解液进行匀浆. 置于冰上30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 r/min离心5 min, 取

■ 研发前沿

线粒体是细胞内高度动态变化的细胞器, 其在细胞内不断运动、融合、分裂并形成动态平衡的网状结构. 线粒体形态对于细胞维持正常生理代谢和机体发育起着重要的作用, 一旦调控出现障碍会导致严重的疾病, 因此防止或修复线粒体损伤是目前的研究热点.

■相关报道

Chen等发现Mfn2表达缺失时细胞呼吸率下降,进一步检测发现呼吸链中复合体I、III、IV的电子转移率下降。

上清液即为总蛋白抽提物。BCA试剂盒测定蛋白浓度,蛋白样品(每泳道60 μg)及蛋白分子量标准进行120 g/L SDS-PAGE电泳,再将蛋白质点转移到纤维素(NC)膜上,置于含50 g/L脱脂奶粉的TBST(50 mmol/L Tris-HCL, pH7.6; 150 mmol/L NaCl; 0.1% Tween20)中4 ℃过夜;加入以TBST稀释的抗Mfn2单克隆抗体(1:200, V/V, 兔抗鼠)和抗GAPDH抗体(1:500, V/V, 兔抗鼠)后4 ℃过夜;次日加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:2000, V/V, 羊抗兔IgG), 37 ℃摇床下杂交1 h, 洗膜后用ECL试剂盒检测, X光胶片曝光、照相。图像运用Quantitative one软件进行分析。

1.2.5 线粒体绿色荧光探针染色观察线粒体形态变化: 收集各组细胞用PBS洗涤细胞2次, PBS配制的3.7%甲醛溶液室温固定细胞10 min。含0.1% Triton X-100的PBS洗涤2-4次, 每次约5 min, 免疫荧光染色二抗稀释液(P0108)按照1:200的比例稀释绿色荧光探针(Mito-Tracker Green), 把Mito-Tracker Green染色工作液按照每个片子约200 μL的比例滴加到片子上, 室温避光孵育20-60 min。用免疫染色洗涤液洗2-4次, 每次约5 min, 后用荧光显微镜进行观察。

1.2.6 LO2细胞荧光素酶ADP/ATP发光检测: 取 1×10^6 细胞, 加入1 mL裂解液后匀浆。4 ℃ 12 000 r/min离心10 min, 保留上清。冰浴上溶解待用试剂, ATP标准溶液稀释成0.001、0.01、0.1、10和1 μmol/L 5个浓度。按照1:100的比例用ATP检测试剂稀释液稀释ATP检测试剂。在检测孔或检测管内加上10 μL样品或标准品, 迅速混匀, 间隔6 s后立即用液闪仪测定相对光单位(relative light unit, RLU)值。根据标准曲线计算出样品中ATP的浓度, 每组均设4个重复。各组组织蛋白定量, 把ATP的浓度换算成μmol/g蛋白的形式。

1.2.7 LO2细胞荧光探针DCFH-DA测定ROS: 使用活体组织ROS初级荧光测定试剂盒, 试剂B置于冰槽融化, 试剂C 37 ℃恒温水浴预热。取10 μL试剂B及990 μL试剂C于1.5 mL离心管中, 置入暗室。取 1×10^6 细胞消化离心后加入5 mL预冷的试剂C置入15 mL锥形离心管, 震荡5 s。移取5 μL细胞裂解液进行蛋白定量检测。移取50 μL细胞裂解液或50 μL试剂C(背景对照)到1 mL石英比色杯中, 加入950 μL GENMED染色工作液, 37 ℃恒温水浴20 min, 避免光照。荧光分光光度计检测: 激发波长490 nm, 散发波长520 nm。样品RFU-对照RFU = 实际RFU, 其增加表明ROS含量升高, 每组均设4个重复。

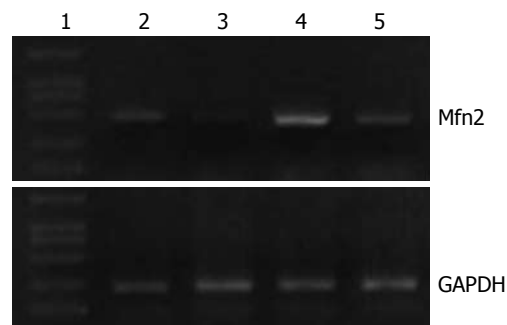


图1 各组细胞Mfn2 mRNA转录水平。1: DNA Marker; 2: 空白对照组; 3: TNF-α组; 4: pEGFP-Mfn2转染组; 5: TNF-α+pEGFP-Mfn2转染组。

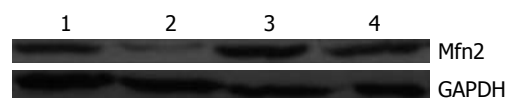


图2 Mfn2蛋白的表达。1: 空白对照组; 2: TNF-α组; 3: pEGFP-Mfn2转染组; 4: TNF-α+pEGFP-Mfn2转染组。

统计学处理 全部资料用SPSS10.0软件进行统计分析, 计量资料用mean±SD表示, 各组及组间比较用t检验。

2 结果

2.1 各组细胞Mfn2 mRNA的表达 TNF-α处理LO2细胞后Mfn2基因条带灰度值显著低于空白对照组细胞条带灰度值, 两组转录水平有显著差异(0.279 ± 0.026 vs 0.742 ± 0.018 , $n = 4$, $P < 0.05$), pEGFP-Mfn2转染组细胞中条带灰度值显著高于空白对照组(1.209 ± 0.021 vs 0.742 ± 0.018 , $n = 4$, $P < 0.05$), TNF-α处理转染组细胞后, Mfn2表达较处理前下降(0.911 ± 0.020), 但仍高于其他各组($n = 4$, 均 $P < 0.05$, 图1)。

2.2 各组细胞Mfn2蛋白的表达 转染pEGFP-Mfn2质粒后Mfn2蛋白的表达水平显著增高(0.813 ± 0.027 vs 0.580 ± 0.011 , $n = 4$, $P < 0.05$), 经TNF-α处理LO2细胞后Mfn2蛋白表达显著下降(0.196 ± 0.024 vs 0.580 ± 0.011 , $n = 4$, $P < 0.05$), 而转染组细胞蛋白表达较空白对照组无明显差异($n = 4$, $P > 0.05$, 图2)。

2.3 各组细胞线粒体绿色荧光染色 荧光显微镜观察发现空白对照组细胞线粒体成长柱状或网状, TNF-α处理细胞后线粒体破坏成短棒状或者点状, pEGFP-Mfn2质粒后线粒体主要为网状, 转染组细胞经TNF-α处理后线粒体改变并不显著(图3)。

2.4 荧光素酶ADP/ATP发光检测及荧光探针DCFH-DA ROS测定 ATP标准荧光发光曲线以

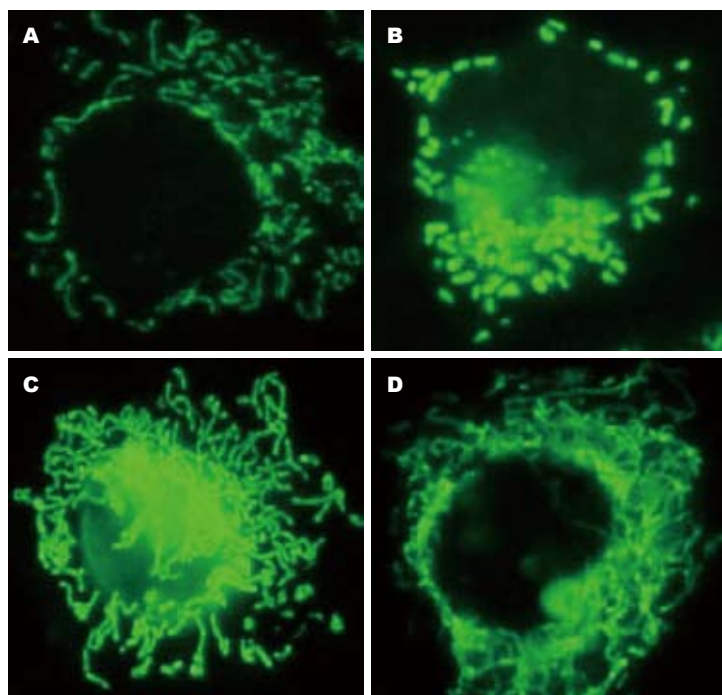


图3 LO2细胞线粒体荧光染色. A: 空白对照组; B: TNF- α 组; C: pEGFP-Mfn2转染组; D: TNF- α +pEGFP-Mfn2转染组.

应用要点

本研究发现TNF- α 能显著下调肝细胞Mfn2的表达, 导致线粒体融合障碍及功能损伤, 而高表达Mfn2能抑制TNF- α 对肝细胞线粒体的破坏作用, 为治疗TNF- α 所致的肝脏损伤性疾病提供了新的药物治疗靶点.

表1 各组细胞ATP含量及ROS相对吸光度值 (mean $\pm$ SD, $n = 20$)

分组	ATP(μ mol/g)	ROS(FI)
空白对照组	5.81 $\pm$ 0.31	65.44 $\pm$ 3.47
TNF- α +Mfn2转染组	5.70 $\pm$ 0.22 ^c	63.31 $\pm$ 3.03 ^c
TNF- α 组	2.00 $\pm$ 0.15 ^a	80.68 $\pm$ 4.02 ^a
Mfn2转染组	7.01 $\pm$ 0.27 ^a	50.20 $\pm$ 3.69 ^a

^a $P < 0.05$ vs 空白对照组; ^c $P < 0.01$ vs TNF- α 组.

6 s发光强度积分值的对数为纵坐标, ATP浓度的对数为横坐标, 按以下浓度配置ATP标准曲线测定液: 0.001、0.010、0.100、1.000、10.000 μ mol/g. 经线性回归分析后所得标准曲线为: $Y = 0.703X + 8.699$, $R^2 = 0.9874$.

TNF- α 处理后LO2细胞内ATP浓度显著下降 ($P < 0.05$), 而ROS生成水平则显著升高 ($P < 0.05$); 转染pEGFP-Mfn2质粒后, 细胞内ATP浓度显著升高 ($P < 0.05$), 而ROS生成水平较前均显著下降 ($P < 0.05$), TNF- α 处理转染组细胞后ATP下降水平要显著低于未转染组, 而未转染组ROS升高程度则显著高于转染组 ($P < 0.05$, 表1).

3 讨论

TNF- α 是一种具有广泛生物学功能的多肽类细胞因子, 参与内毒素性休克、炎症、免疫调节、细胞增生、细胞毒活性和抗病毒等过程. 肝脏细胞表面含有丰富的TNF- α 受体, 是其作用的主要靶器官. 在各种肝脏损伤性疾病损伤过

程中, TNF- α 作为炎症反应的始发细胞因子, 其作用越来越引起人们的关注^[8]. TNF- α 参与肝损伤的病理过程途径主要有两种: 一种为细胞外途径, 由肝细胞表面的受体介导; 另一种为细胞内途径, 主要由线粒体损伤介导, 但具体分子机制并不清楚.

肝脏是体内最大的代谢器官, 线粒体是肝细胞代谢的核心. 线粒体是高度动态的细胞器, 他们在细胞内彼此连接呈三位网络状. 同时, 线粒体在细胞内发生着频繁的融合与分裂, 线粒体融合对线粒体正常功能的发挥具有非常重要的作用. Mfn2是我国学者陈光慧利用差异显示技术得到的一个新基因, 在哺乳动物中, Mfn2对于线粒体融合事件是必需的^[9,10], 阻断Mfn2可导致葡萄糖氧化的减少、细胞呼吸、线粒体的基质渗漏和膜电位^[11], Mfn2通过维持线粒体的网状结构影响线粒体的新陈代谢. 我们研究发现, TNF- α 可以显著抑制肝细胞Mfn2基因的转录与表达, 并使LO2细胞线粒体从长管状或网状变成小球形或点状, 而高表达Mfn2可以逆转线粒体形态的破坏, 可见抑制Mfn2基因表达是TNF- α 诱导肝细胞线粒体形态变化的重要途径之一.

线粒体的正常呼吸、生成ATP的功能对维持组织器官功能和细胞结构的完整至关重要. ATP含量决定了细胞对应激的反应能力, 如果其含量降低, 会导致细胞对应激的反应不足而引起肝细胞的严重损伤. 因此组织中ATP的水平与组织细胞功能状态及其生命力直接相关^[12]. 而线粒体功能障碍导致的ROS产生增加在人类各

■同行评价

本文创新性较好,具有一定的临床参考价值.

种肝脏损伤性疾病中都能被观察到. 线粒体既是ROS形成的主要部位,也是ROS攻击的首要靶点. ROS通过传递1个或2个电子,氧化大分子物质,引起DNA损害、蛋白质和脂质等氧化和再氧化损害^[13]. 研究证实TNF- α 能诱导各种类型细胞ROS的生成^[14-16],该过程具体机制并不十分清楚. 本实验结果显示, TNF- α 能显著抑制肝细胞ATP生成水平并大量诱导ROS生成,但转染Mfn2基因后能显著抑制这一过程,说明TNF- α 可通过抑制Mfn2基因导致线粒体功能损伤. Chen等^[9]发现Mfn2表达缺失时细胞呼吸率下降,进一步检测发现呼吸链中复合体I、III、IV的电子转移率下降. 这种变化将导致ATP生成减少,细胞内能量障碍使还原性谷胱甘肽减少,对ROS产物清除能力下降,使ROS水平升高. 本实验结果说明Mfn2基因可能是TNF- α 导致细胞ATP生成减少及ROS水平升高的关键因子.

总之,通过实验我们发现TNF- α 能显著下调肝细胞Mfn2的表达,导致线粒体融合障碍及功能损伤,而高表达Mfn2能抑制TNF- α 对肝细胞线粒体的破坏作用. 该结果揭示了TNF- α 介导线粒体损伤新的分子机制,为治疗TNF- α 所导致的肝脏损伤性疾病提供了新的药物治疗靶点,但TNF- α 是通过何种机制调控Mfn2基因表达尚有待深入研究.

4 参考文献

- 1 Domm S, Cinatl J, Mrowietz U. The impact of treatment with tumour necrosis factor-alpha antagonists on the course of chronic viral infections: a review of the literature. *Br J Dermatol* 2008; 159: 1217-1228
- 2 Auguet T, Vidal F, López-Dupla M, Broch M, Gutiérrez C, Olona M, Oltra C, Aguilar C, González E, Quer JC, Sirvent JJ, Richart C. A study on the TNF-alpha system in Caucasian Spanish patients with alcoholic liver disease. *Drug Alcohol Depend* 2008; 92: 91-99
- 3 Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C. Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 2009; 9: 299-314
- 4 El-Ghoneimi A, Cursio R, Schmid-Alliana A, Tovey M, Lasfar A, Michiels JF, Rossi B, Gugenheim J. Pentoxifylline inhibits liver expression of tumor necrosis factor alpha mRNA following normothermic

- 5 ischemia-reperfusion. *HPB* (Oxford) 2007; 9: 112-119
- 6 Moe GW, Marin-Garcia J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, Feng Q. In vivo TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1813-H1820
- 7 Mariappan N, Soorappan RN, Haque M, Sriramula S, Francis J. TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2726-H2737
- 8 Honda S, Aihara T, Hontani M, Okubo K, Hirose S. Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2. *J Cell Sci* 2005; 118: 3153-3161
- 9 Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 445-454
- 10 Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003; 160: 189-200
- 11 Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005; 280: 26185-26192
- 12 Cartoni R, Léger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Dériaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 2005; 567: 349-358
- 13 Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl* 2007; 13: 382-390
- 14 Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G583-G589
- 15 Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 2003; 107: 1418-1423
- 16 Li J, Li Q, Xie C, Zhou H, Wang Y, Zhang N, Shao H, Chan SC, Peng X, Lin SC, Han J. Beta-actin is required for mitochondria clustering and ROS generation in TNF-induced, caspase-independent cell death. *J Cell Sci* 2004; 117: 4673-4680
- 17 Takano H, Zou Y, Hasegawa H, Akazawa H, Nagai T, Komuro I. Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 789-794

编辑 李军亮 电编 何基才

葱白提取物对脂肪变性肝细胞NF- κ B及TNF- α 表达的影响

时昭红, 林丽莉, 冯云霞, 郑娅琼

时昭红, 冯云霞, 武汉市第一医院消化内科 湖北省武汉市 430022

林丽莉, 郑娅琼, 湖北中医药大学临床医学院 湖北省武汉市 430061

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; 此课题由时昭红与冯云霞设计; 研究过程由林丽莉与郑娅琼操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由林丽莉与冯云霞完成; 数据分析由冯云霞与林丽莉完成; 本论文写作由时昭红与林丽莉完成。

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: 2010-07-12 修回日期: 2010-09-18

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-11-18

Fistular onion stalk extract reduces NF- κ B expression and TNF- α secretion in steatotic HepG2 cells

Zhao-Hong Shi, Li-Li Lin, Yun-Xia Feng,
Ya-Qiong Zheng

Zhao-Hong Shi, Yun-Xia Feng, Department of Gastroenterology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Li-Li Lin, Ya-Qiong Zheng, 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: 2010-07-12 Revised: 2010-09-18

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of fistular onion stalk extract on NF- κ B expression and TNF- α secretion in steatotic HepG2 cells and to explore possible molecular mechanisms involved.

METHODS: HepG2 cells were induced with free fatty acids to create a cell model of hepatic steatosis. Intracellular lipid droplets were detected by oil red O staining. Cell proliferation was determined by MTT assay. The expression of NF- κ B mRNA and protein was detected by RT-PCR and Western blot, respectively. NF- κ B activity was detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). TNF- α level was measured by

ELISA.

RESULTS: After treatment with free fatty acids for 24 h, steatosis was successfully induced in HepG2 cells. Triglyceride (TG) content was significantly higher in model cells than in control cells ($0.22 \text{ mmol/L} \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ vs $0.07 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $P < 0.01$). Treatment with different doses of fistular onion stalk extract significantly improved cell proliferation (0.35 ± 0.04 , 0.38 ± 0.03 , 0.43 ± 0.07 vs 0.29 ± 0.07 , all $P < 0.05$ or 0.01). The levels of NF- κ B mRNA and protein expression (1.10 ± 0.06 vs 0.67 ± 0.06 ; 0.41 ± 0.03 vs 0.27 ± 0.04 , $P < 0.01$) as well as TNF- α secretion ($P < 0.01$) were significantly higher in model cells than in control cells. Treatment with different doses of fistular onion stalk extract significantly reduced the levels of the above parameters (0.97 ± 0.05 , 0.94 ± 0.09 , 0.88 ± 0.08 vs 1.10 ± 0.06 ; 0.33 ± 0.06 , 0.24 ± 0.06 , 0.26 ± 0.05 vs 0.41 ± 0.03 ; $65.38 \text{ ng/L} \pm 9.55 \text{ ng/L}$, $59.93 \text{ ng/L} \pm 7.52 \text{ ng/L}$, $45.05 \text{ ng/L} \pm 9.22 \text{ ng/L}$ vs $76.92 \text{ ng/L} \pm 8.40 \text{ ng/L}$, all $P < 0.05$ or 0.01).

CONCLUSION: Fistular onion stalk extract has significant protective effects against steatosis in HepG2 cells possibly by inhibiting NF- κ B expression and reducing TNF- α secretion.

Key Words: Fistular onion stalk extract; Steatotic cell; TongYang; Nuclear factor kappa B; Tumor necrosis factor- α

Shi ZH, Lin LL, Feng YX, Zheng YQ. Fistular onion stalk extract reduces NF- κ B expression and TNF- α secretion in steatotic HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3457-3461

摘要

目的: 探讨葱白提取物影响脂肪变性肝细胞NF- κ B、TNF- α 表达的分子机制。

方法: 用游离脂肪酸诱导HepG2细胞, 油红O染色观察细胞内的脂滴, 检测TG含量确定建立肝细胞脂肪变模型; MTT检测细胞活性。RT-PCR法和Western blot法分别检测NF- κ B mRNA和蛋白的表达, 电泳迁移率改变分析(EMSA)

■背景资料

近年来, 随着我国饮食结构和生活习惯的改变, NAFLD的患病率呈现日渐增高的趋势, 成为仅次于慢性病毒性肝炎的第2大肝病, 其对人体健康的危害也越来越多。因此, 有效地预防及治疗NAFLD具有重大意义。

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

■相关报道

Day等提出的以脂代谢异常、细胞因子、氧应激以及脂质过氧化为特色的“二次打击”学说已被大多数学者所接受。

检测NF- κ B活性; ELISA检测TNF- α 含量。

结果: 游离脂肪酸诱导24 h后, 油红O染色显示脂肪变性; 模型组TG含量较对照组显著升高, 差异有统计学意义($0.22 \text{ mmol/L} \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ vs $0.07 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $P < 0.01$)。葱白提取物可明显改善细胞活性(0.35 ± 0.04 , 0.38 ± 0.03 , 0.43 ± 0.07 vs 0.29 ± 0.07 , $P < 0.05$ 或 0.01); 模型组胞内NF- κ B mRNA、蛋白的表达及其活性均高于正常对照组, 差异有统计学意义(1.10 ± 0.06 vs 0.67 ± 0.06 ; 0.41 ± 0.03 vs 0.27 ± 0.04 , $P < 0.01$), 同时上清TNF- α 水平显著上升($P < 0.01$); 而葱白提取物不同剂量药物作用组的上述指标则低于模型组(0.97 ± 0.05 , 0.94 ± 0.09 , 0.88 ± 0.08 vs 1.10 ± 0.06 ; 0.33 ± 0.06 , 0.24 ± 0.06 , 0.26 ± 0.05 vs 0.41 ± 0.03 ; $65.38 \text{ ng/L} \pm 9.55 \text{ ng/L}$, $59.93 \text{ ng/L} \pm 7.52 \text{ ng/L}$, $45.05 \text{ ng/L} \pm 9.22 \text{ ng/L}$ vs $76.92 \text{ ng/L} \pm 8.40 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$ 或 0.01)。

结论: 葱白提取物对脂肪变性肝细胞有明显的保护作用, 其机制可能与抑制NF- κ B表达降低其活性及TNF- α 分泌有关。

关键词: 葱白提取物; 脂肪变肝细胞; 通阳法; 核因子 κ B; 肿瘤坏死因子 α

时昭红, 林丽莉, 冯云霞, 郑娅琼. 葱白提取物对脂肪变性肝细胞NF- κ B及TNF- α 表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3457-3461

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3457.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史, 肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征。目前, NAFLD的发病率和早期诊断率逐年上升, 发病年龄年轻化, 已成为全球性的公共卫生问题^[1,2]。其发病机制较为复杂, 至今尚未完全明确, 多数人认为与脂质代谢紊乱、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、细胞因子、氧应激及脂质过氧化反应等因素密切相关。葱白提取物是从葱科植物细香葱成熟茎的下端葱白中提取的一类活性成分。前期研究表明^[3], 华夏小葱制剂能改善脂肪肝大鼠体内的脂质代谢, 对脂肪肝有一定的防治作用。本实验旨在观察葱白提取物对脂变性HepG2细胞的核因子NF- κ B mRNA和蛋白的表达及其活性, 以及测定TNF- α 含量水平, 初步探讨葱白提取物对肝细胞脂质变性的防治作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2, 购于华中科技大学同济医学院。胎牛血清(FBS)为四季青产品。高糖DMEM培养基为美国Gibco公司产品; 棕榈酸(palmitate)、油酸(oleate)均为美国Sigma公司产品。油红O试剂盒, 为武汉谷歌生物技术有限公司产品; TNF- α ELISA试剂盒为R&D公司产品。RNAout(TRIzol RNA提取试剂)为天泽基因工程有限公司产品; ReverTra Ace- α -TM-RT-PCR Kit为自东洋纺(上海)生物科技有限公司产品。PCR引物为武汉博洁公司产品。DNA Marker DL 2000(TaKaRa)为武汉亚法公司产品。Taq DNA聚合酶为MBI公司产品; 山羊抗人NF- κ B多克隆抗体为Santa Cruz公司产品, 兔抗山羊二抗为北京中杉生物公司产品。葱白提取物由武汉中西医结合医院制剂中心提供, 批号: 080304。利用无菌的基础培养液稀释葱白提取物, 使其终浓度分别为0.05、0.1、0.25 g/L。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: HepG2细胞以0.25%胰酶/0.02% EDTA消化传代, 以含100 mL/L FBS的高糖DMEM培养液在含50 mL/L CO₂的37 °C培养箱中培养。

1.2.2 造模及分组: HepG2细胞, 培养24-48 h, 细胞铺满80%-90%。分设正常组、模型组、药物作用组(在前期无毒剂量范围确立3个剂量组)。其中, 模型组加入游离脂肪酸(油酸: 棕榈酸浓度为1:0.5 mmol/L, 剂量参考文献[4]), 不同剂量药物作用组分别添加0.05、0.1、0.25 g/L的低、中、高剂量的葱白提取物与含游离脂肪酸的培养基进行混合培养细胞, 培养24 h后收集上清及细胞。

1.2.3 油红O染色观察细胞内脂滴变化: 同上, 取培养于6孔板培养内的各组盖玻片, 用PBS洗3次。按油红O试剂说明书进行染色, 明胶封片, HPIAS-1000型图像分析系统收集图像。

1.2.4 细胞内TG的测定: 同上, 取培养于6孔板培养内的各组细胞。反复冻融裂解细胞, 3 000 r/min离心10 min, 取上清, 送武汉中西医结合医院检验科用全自动生化仪检测。

1.2.5 MTT细胞活性分析: 石分组处理后, 96孔培养板各孔加MTT液10 μ L(5 g/L), 37 °C孵育4 h, 倾去上清液, 然后每孔加入DMSO 150 μ L, 振荡10 min, 在酶标仪上570 nm处吸光度(A)值。

1.2.6 RT-PCR技术检测肝细胞核因子NF- κ B mRNA的表达: 同上, 收集各组细胞。按TRIzol试

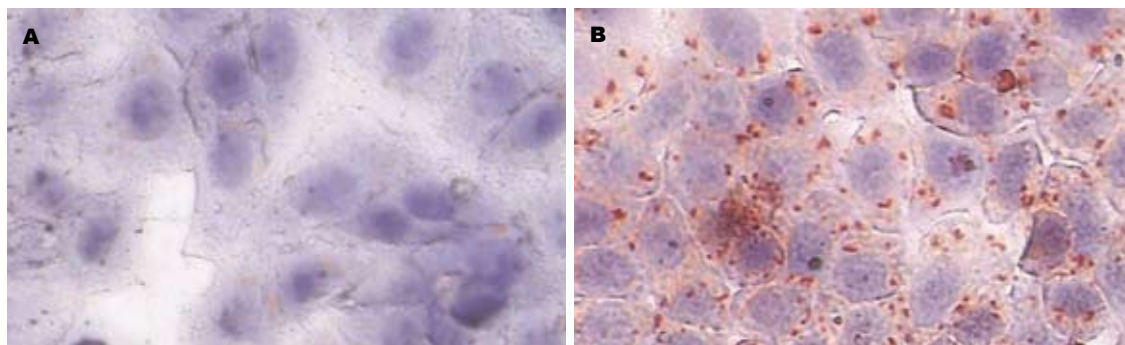


图1 不同浓度葱白提取物对脂肪变性细胞脂肪沉积的影响(油红O染色 $\times 400$)。A: 正常对照组; B: 模型组。

■创新盘点

本课题通过体外实验, 揭示细胞能量代谢障碍与“阳气不通”的关系, 阐明葱白提取物抗NAFLD的通阳作用机制, 体现了中草药在防治脂肪肝上的优势。

剂说明书提取各组细胞总mRNA电泳分析其完整性, 测纯度, 定量, -70°C 保存。根据NF- κ B基因序列, 用primer 5.0软件设计扩增引物: NF- κ B-F-sense: 5'-CCTTTTCGACTACGCGGTGAC-3', NF- κ B-R-anti-sense: 5'-GAATGGCATTTCAGACCGTCCC-3', 扩增片段大小为422 bp。内参GAPDH113引物为: GAPDH113-sense: 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3', GAPDH113-anti-sense: 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3', 扩增片段大小为113 bp。采用ReverTra Ace- α -TM-RT-PCR Kit逆转录试剂盒, 按操作说明将组织总RNA中的mRNA逆转录成cDNA, 再进行PCR扩增, 扩增参数: 95°C 预变性5 min, 95°C 20 s $\rightarrow 57.5^{\circ}\text{C}$ 20 s $\rightarrow 72^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共35个循环, 72°C 延长3 min。电泳结果用Quantity One(美国Bio-Rad公司)分析系统进行电泳条带光密度分析, 计算目的产物NF- κ B和内参照GAPDH113吸光光度值的比值来反映其相对含量。

1.2.7 Western blot技术检测肝细胞NF- κ B蛋白的表达: 同上, 提取各组细胞总蛋白, 细胞核裂解液裂解, 取20 μL 裂解样品液, 进行SDS-PAGE蛋白电泳, 表达产物电转移至硝酸纤维素膜上, 进行Western blot反应, 通过BandScan 5.0软件对杂交图进行分析, 以 β -actin作为定量Marker, 20 pmol为定量单位。

1.2.8 电泳迁移率改变分析检测NF- κ B活性: 电泳迁移率改变分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测参照试剂盒说明书进行, 提取细胞核内容物, 并检测NF- κ B的活性。同步检测上述各组细胞核蛋白与Biotin标记的NF- κ B序列探针(sense 5'-BIOTIN- $\cdots$ TAGCATATGCTA $\cdots$ -3', anti-sense 3'- $\cdots$ ATCGTATACGAT $\cdots$ -BIOTIN-5', 各0.2 mol/L)的结合活性; 同时, 通过采用无标记的NF- κ B(sense 5'- $\cdots$ TAGCATATGCTA $\cdots$ -3', anti-sense 3'- $\cdots$ ATCGTATACGAT $\cdots$ -5')的特异性

竞争实验, 进行葱白提取物对NF- κ B与DNA结合抑制作用的特异性分析。应用BandScan 5.0对所形成的特异性产物条带计算积分光密度分析。以葱白提取物作用组与阴性对照组的结合条带I4的比值表示葱白提取物作用组的相对结合活性。

1.2.9 检测各组培养上清中TNF- α 含量: 收集各组在培养箱中培养24 h后的培养上清, 用人TNF- α ELISA试剂盒分别检测其中TNF- α 的浓度。

统计学处理 所有数据均用SPSS14.0软件包进行统计学分析。计量资料以mean $\pm$ SD表示。组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 镜下形态观察和油红O染色结果 正常组细胞边缘清晰, 呈多角形排列呈铺路石样, 细胞间结合紧密, 无缝隙。油红O染色示细胞边缘清晰, 核大, 细胞内少见橘红色脂滴聚集; 模型组细胞边缘清晰, 大部分多角形, 有些细胞变圆, 细胞间结合欠紧密。油红O染色示细胞内橘红色脂滴较多, 部分细胞内脂滴成环状位于细胞膜内侧, 可见较大的脂滴。表明成功建立了肝细胞脂肪变性模型(图1)。

2.2 游离脂肪酸对胞内TG含量的影响 培养24 h后, 游离脂肪酸使细胞内TG含量明显增加($0.22 \text{ mmol/L} \pm 0.03 \text{ mmol/L}$ vs $0.07 \text{ mmol/L} \pm 0.05 \text{ mmol/L}$, $P < 0.01$)。

2.3 脂肪变性细胞的活性 模型组存活率较正常组明显降低(A 值: 0.29 ± 0.07 vs 0.56 ± 0.10 , $P < 0.01$), 葱白提取物可减轻细胞内脂毒性; 加药物组细胞活性较模型组明显增高(A 值: 0.35 ± 0.04 , 0.38 ± 0.03 , 0.43 ± 0.07 vs 0.29 ± 0.07 , $P < 0.05$ 或 0.01), 高剂量组明显强于中、低剂量组($P < 0.01$)。

2.4 不同浓度葱白提取物对脂肪变性细胞NF- κ B mRNA表达的影响 抽提各组细胞总RNA, 应

■应用要点

本研究证实葱白提取物可通过抑制NF- κ B表达降低其活性及TNF- α 分泌来保护肝脏,有助于进一步明确其作用范围,推广其在临床上的应用。

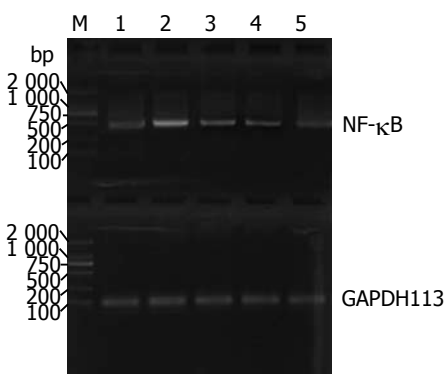


图2 不同浓度葱白提取物对脂肪变性细胞NF- κ B mRNA表达的影响. M: DNA Marker; 1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 低剂量组; 4: 中剂量组; 5: 高剂量组.

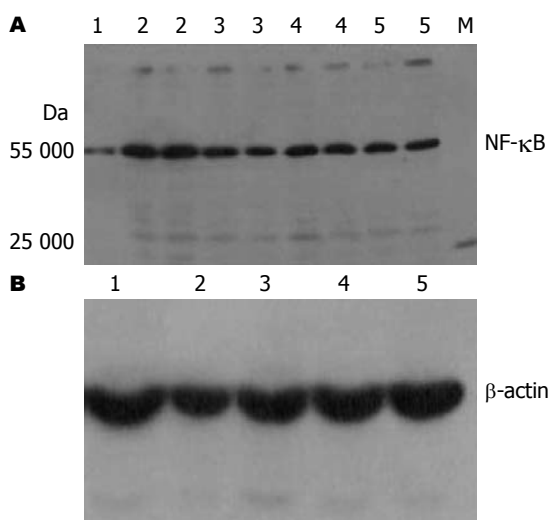


图3 不同浓度葱白提取物对脂肪变性细胞对NF- κ B蛋白表达的影响. A: NF- κ B; B: β -actin. 1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 低剂量组; 4: 中剂量组; 5: 高剂量组; M: Marker.

用荧光半定量RT-PCR检测各组NF- κ B mRNA水平变化(图2). 正常对照组, 模型组, 低、中、高浓度各剂量组CT值分别为 0.67 ± 0.06 , 1.10 ± 0.06 , 0.97 ± 0.05 , 0.94 ± 0.09 , 0.88 ± 0.08 . 将各药物作用组与模型组、阴性对照组(以PBS代替模板DNA)比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01), 表明葱白提取物能降低脂肪变性细胞NF- κ B的mRNA的表达.

2.5 不同浓度葱白提取物对脂肪变性细胞NF- κ B蛋白表达的影响 由图3可知, 各组均可见 β -actin略下方清晰杂带. 将杂带进行BandScan 5.0软件分析, 正常对照组, 模型组, 低、中、高浓度各组CT值NF- κ B分别为 0.27 ± 0.04 , 0.41 ± 0.03 , 0.33 ± 0.06 , 0.24 ± 0.06 , 0.26 ± 0.05 , 将药物作用各组与模型组比较, 表明葱白提取物能降低脂肪变性细胞NF- κ B的蛋白表达.

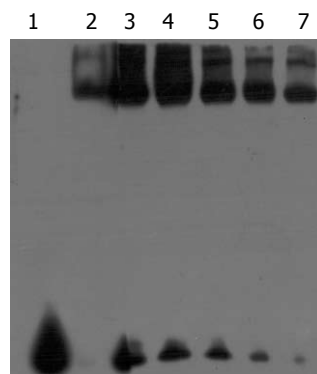


图4 EMSA示不同浓度葱白提取物干预脂肪变性细胞核蛋白. 1: 50倍的未标记NF- κ B冷探针特异性竞争抑制; 2: NF- κ B+探针的阳性对照组; 3: 游离脂肪酸诱导的脂肪变性细胞; 4, 5, 6: 低、中、高不同剂量葱白提取物干预组; 7: 空白对照组.

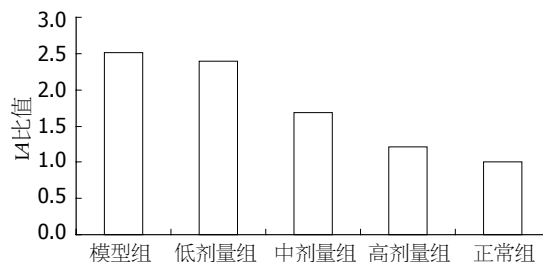


图5 各组与正常对照组的NF- κ B特异结合条带I4比值.

2.6 EMSA检测各组细胞NF- κ B活性 通过EMSA实验发现, 竞争性抑制实验中过量未标记的NF- κ B冷探针可完全抑制NF- κ B的DNA结合, 阳性对照出现特异的DNA结合条带, 提示该条带为NF- κ B与DNA特异性探针结合而形成. 用葱白提取物处理组的DNA结合条带减弱, 说明其细胞核提取物NF- κ B的DNA结合活性将低, 并随着药物浓度的增高而降低. 空白对照组在电泳图中部出现的一条较强的DNA结合条带, 说明HepG2细胞核提取物NF- κ B的DNA结合活性较高(图4, 5).

2.7 各组培养上清中TNF- α 水平 经游离脂肪酸刺激后, 细胞上清TNF- α 水平明显增高($76.92 \text{ ng/L} \pm 8.40 \text{ ng/L}$ vs $51.80 \text{ ng/L} \pm 10.15 \text{ ng/L}$), 各剂量组能明显抑制TNF- α 含量的升高($65.38 \text{ ng/L} \pm 9.55 \text{ ng/L}$, $59.93 \text{ ng/L} \pm 7.52 \text{ ng/L}$, $45.05 \text{ ng/L} \pm 9.22 \text{ ng/L}$ vs $76.92 \text{ ng/L} \pm 8.40 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$), 以高剂量组降低最明显($P < 0.01$).

3 讨论

随着人们生活水平的提高, 饮食结构的变化, 检测手段的提高, 肥胖、糖尿病、高脂血症等多种疾病发病率增加, NAFLD发病率呈逐年上升趋势. NAFLD包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和脂肪性肝硬化4个病理过程. NAFLD的发病机制较为复杂, 至今尚未完全明确, Day等^[5]提出的以脂代谢异常、

细胞因子、氧化应激(oxidative stress)以及脂质过氧化为特色的“二次打击”学说已被大多数学者所接受。

本实验使用油酸软脂酸2:1比例成功复制了非酒精性肝细胞脂变模型。实验模型组通过游离脂肪酸刺激后TG显著高于正常组,胞质内脂滴明显增多,提示该模型存在脂肪变性、肝损伤。葱白提取物能显著降低模型组细胞脂肪沉积,提示其防治脂肪肝的作用机制与通过降低肝脏游离脂肪酸含量,降低内源性TG的合成,改善脂质代谢,降低游离脂肪酸毒性有关。在细胞活性实验中,我们也发现葱白提取物可减轻细胞内脂毒性,增强细胞的活性。

中医学中并无脂肪肝这一病名,根据其形态特点属于“肝着”、“肝胀”、“肝积”一类,根据其临床表现,可将其归属于“胁痛”、“痞满”等范畴,根据其病因病机则可命名为“痰浊”、“瘀血”,若有饮酒史,还可根据病情发展归为“伤酒”、“酒癖”等^[6]。武汉市第一医院张介眉教授在积累了长期的临床经验,并进行了大量的理论研究之后,在总结古今医家经验的基础上,提出了“阳气不通”致病理论,用“通阳”法治疗脂质代谢异常收到明显的效果,为脂肪肝的防治提供了很好的研究思路。以中医“阳气不通”理论指导下,临床上运用通阳中药葱白制剂防治脂肪肝,取得满意疗效。前期研究表明^[7],葱白提取物对NAFLD模型大鼠具有降低TG、胆固醇,改善肝脏活性氮的作用。本研究结果显示,鲜葱白提取物能显著抑制细胞内含量,细胞内脂滴明显减少。说明葱白提取物显著抑制了细胞内沉积,明显改善细胞脂肪变性。

NF- κ B是与氧化应激、细胞因子相关的真核细胞转录因子,可调控多种促炎因子基因的表达,作用十分广泛,我们推测其在NAFLD发病中发挥着重要作用。TNF- α 和氧化应激等细胞因子通过激活NF- κ B抑制蛋白(inhibition NF- κ B, I κ B)激酶 β (I κ B kinase β , IKK β)使I κ B降解,从而活化NF- κ B和IKK β -TNF α 循环的自身增强,促进胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)、磷脂酰肌醇-3激酶信号障碍和慢性氧化应激等损害^[8-10]。在我们室验中,我们发现:模型组中NF- κ B表达增强,伴TNF- α 水平的增高。在药物作用组中,葱白提取物干预后的脂肪变性细胞脂肪沉积减轻, NF- κ B表达及TNF- α 水平也随

着降低。实验中我们还发现,肝癌细胞NF- κ B的基础表达较高,而文献报道的正常细胞NF- κ B的基础表达活性较低^[11,12]。提示肝癌细胞的非正常生长可能与NF- κ B信号通路的异常有关,这有待进一步研究。

由此,我们得出抑制NF- κ B表达及TNF- α 活化是葱白提取物防治脂肪肝和脂肪性肝炎的重要机制之一,能够抑制游离脂肪酸的脂毒性,从而抗肝细胞脂肪变性和改善细胞能量代谢障碍,显著减轻机体内脂质过氧化损伤以及细胞因子损伤的程度,保护肝细胞,对脂肪肝具有良好的防治作用。

4 参考文献

- 1 Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-1395
- 2 Chitturi S, Farrell GC, George J. Non-alcoholic steatohepatitis in the Asia-Pacific region: future shock? *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 368-374
- 3 张介眉, 郝建军, 时昭红, 常青, 祁飞虹. 华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠脂质代谢和组织形态学的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2447-2452
- 4 Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-1395
- 5 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 6 范建高, 曾民德. 脂肪肝的发病机制. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 75-76
- 7 张介眉, 时昭红, 郝建军, 常青, 祁飞虹. 华夏小葱制剂对脂肪肝大鼠一氧化氮、一氧化氮合酶及血管内皮生长因子的影响. *中西医结合肝病杂志* 2008; 18: 235-237
- 8 Medina J, Fernández-Salazar LI, García-Buey L, Moreno-Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2004; 27: 2057-2066
- 9 Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-1717
- 10 Crespo J, Cayón A, Fernández-Gil P, Hernández-Guerra M, Mayorga M, Domínguez-Díez A, Fernández-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163
- 11 Perkins ND. The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 434-440
- 12 Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1470: M55-M62

■同行评价

本文方法新颖, 结论明确, 为治疗脂肪变性肝细胞提供了新的思路。

外周血CD44⁺低表达与食管鳞癌患者预后的关系

王长春, 凌志强, 毛伟敏

■背景资料

肿瘤是一种全身性疾病, 机体的免疫状况与肿瘤的发生、发展、转移和预后密切相关。T淋巴细胞亚群、B淋巴细胞和NK细胞的功能变化已经成为评价人体免疫功能的重要指标, 业已成为临床肿瘤学研究的热点。大量文献报道了头颈鳞癌、乳腺癌、结肠癌、宫颈癌、卵巢癌及肝癌等患者外周血淋巴细胞亚群改变及其临床意义, 但有关食管癌的研究鲜有报道。

王长春, 凌志强, 毛伟敏, 浙江省肿瘤医院 浙江省肿瘤研究所 浙江省杭州市 310022

浙江省科技计划基金资助项目, No. 2009C33143

作者贡献分布: 王长春与毛伟敏对此文所作贡献均等; 此课题由凌志强设计指导; 研究过程、数据分析及论文撰写由王长春操作完成; 论文修改由毛伟敏完成。

通讯作者: 凌志强, 副研究员, 310022, 浙江省杭州市半山桥广济路38号, 浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤研究所。

lingzq@hotmail.com

电话: 0571-88122423 传真: 0571-88122413

收稿日期: 2010-07-26 修回日期: 2010-09-18

接受日期: 2010-09-25 在线出版日期: 2010-11-18

Decreased percentage of CD44⁺ lymphocytes in the peripheral blood correlates with a remarkable survival advantage in patients with esophageal carcinoma

Chang-Chun Wang, Zhi-Qiang Ling, Wei-Min Mao

Chang-Chun Wang, Zhi-Qiang Ling, Wei-Min Mao, Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China

Supported by: the Science and Technology Program of Zhejiang Province, No. 2009C33143

Correspondence to: Associate Professor Zhi-Qiang Ling, Zhejiang Cancer Research Institute, Zhejiang Cancer Hospital, 38 Guangji Road, Banshanqiao District, Hangzhou 310022, Zhejiang Province, China. lingzq@hotmail.com

Received: 2010-07-26 Revised: 2010-09-18

Accepted: 2010-09-25 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the changes in the percentages of lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with esophageal carcinoma and to analyze their relationship with survival.

METHODS: Flow cytometry was used to examine the subgroups of lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺, CD19⁺, CD25⁺, CD44⁺ and NK cells) in the peripheral blood of 171 esophageal carcinoma patients without any therapy and 96 healthy controls. The clinical and follow-up data for each patient were collected and subjected to Kaplan-Meier analysis.

RESULTS: The percentages of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD19⁺ lymphocytes in the peripheral

blood of patients with esophageal cancer were significant lower than those in healthy controls (66.28 ± 12.46 vs 73.32 ± 7.65 , 37.84 ± 11.16 vs 39.74 ± 6.51 ; 21.93 ± 10.06 vs 28.68 ± 4.83 ; 6.57 ± 4.75 vs 7.91 ± 2.98 , all $P < 0.05$). The percentages of CD4⁺/CD8⁺, CD25⁺, CD44⁺ lymphocytes and NK cells were significant higher in patients with esophageal cancer than in healthy controls (2.18 ± 1.35 vs 1.44 ± 0.42 ; 26.82 ± 9.39 vs 17.10 ± 5.21 ; 67.53 ± 16.33 vs 45.81 ± 13.50 ; 24.07 ± 12.83 vs 17.10 ± 8.00 , all $P < 0.05$). The percentages of lymphocyte subsets in the peripheral blood of esophageal cancer patients had no significant association with tumor stage, differentiation and lymph node metastasis (all $P > 0.05$). The mean survival time of patients with lower percentage of CD44⁺ lymphocytes was significantly higher than that of patients with higher percentage of CD44⁺ lymphocytes (20.32 mo $\pm$ 3.01 mo vs 11.50 mo $\pm$ 0.98 mo, $P < 0.05$). There is no significant difference in the survival between patients with low and high percentage of CD8⁺ lymphocytes.

CONCLUSION: There is a significant correlation between the percentage of CD44⁺ lymphocytes and survival in patients with esophageal carcinoma. Decreased percentage of CD44⁺ lymphocytes in the peripheral blood is associated with a remarkable survival advantage in patients with esophageal carcinoma.

Key Words: Esophageal carcinoma; Lymphocyte subset; CD44⁺; Prognosis

Wang CC, Ling ZQ, Mao WM. Decreased percentage of CD44⁺ lymphocytes in the peripheral blood correlates with a remarkable survival advantage in patients with esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3462-3466

摘要

目的: 研究食管癌患者外周血淋巴细胞亚群的变化及其与预后的关系。

方法: 用流式细胞仪检测171例食管癌首诊患者外周血的淋巴细胞亚群CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺、CD25⁺、CD44⁺

■同行评议者

陈洪, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科

及NK细胞, 与正常参考值(健康体检96例)对照, 并结合临床及随访资料进行Kaplan-Meier分析。

结果: (1)与健康对照组相比, 食管癌患者淋巴细胞亚群8项指标均呈显著性差异。表现CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺及CD19⁺明显低于健康对照组(66.28±12.46 vs 73.32±7.65, 37.84±11.16 vs 39.74±6.51; 21.93±10.06 vs 28.68±4.83; 6.57±4.75 vs 7.91±2.98, $P<0.05$); CD4⁺/CD8⁺、CD25⁺、CD44⁺及NK细胞明显高于健康对照组(2.18±1.35 vs 1.44±0.42; 26.82±9.39 vs 17.10±5.21; 67.53±16.33 vs 45.81±13.50; 24.07±12.83 vs 17.10±8.00, $P<0.05$)。食管癌患者淋巴细胞亚群与分化程度、淋巴结转移及病理分期均无关($P>0.05$); (2)CD44⁺表达低于健康对照者, 平均存活时间高于健康对照者, 有显著性差异(20.32 mo±3.01 mo vs 11.50 mo±0.98 mo, $P<0.05$)。但对于不同的CD8⁺表达水平来说, 患者生存无显著性差异。

结论: 食管癌患者外周血淋巴细胞亚群普遍发生显著性变化, CD44⁺的表达与患者预后明显相关, CD44⁺低表达具有显著的生存优势。

关键词: 食管癌; 淋巴细胞亚群; CD44⁺; 预后

王长春, 凌志强, 毛伟敏. 外周血CD44⁺低表达与食管鳞癌患者预后的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3462-3466
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3462.asp>

0 引言

食管癌总体上预后不佳, 近10年的研究发现食管癌常伴有机体免疫机能低下和紊乱。已有众多的学者报道了不同病理分期食管癌的3年及5年生存率, 鲜有外周血的免疫学指标与预后关系的报道。本研究用流式细胞仪检测食管癌首诊患者的淋巴细胞亚群CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺、CD25⁺、CD44⁺及自然杀伤(natural killer, NK)细胞, 与正常参考值对照, 并结合临床病理及随访资料进行分析。试图寻找淋巴细胞亚群与患者预后的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-08/2010-05在浙江省肿瘤医院住院治疗的食管癌首诊患者171例, 所有病例抽血化验前均未行放、化治疗, 并均经胃镜活检证实诊断为食管鳞癌。患者年龄38-86(平均年龄63.26)岁, 男154例, 女17例。其中34例患者经手术治疗并有相应的术后病理结果, 137例患者

因肿瘤位置高或局部晚期等原因未手术治疗、而行放化疗。未手术者取影像学分期, 以96名健康成年人作为对照组。随访截止日期2010-05-31, 失访2例。肿瘤分期根据胸腹部CT、腹腔及锁骨上B超及手术后病理结果采用UICC 2002版的TNM分期标准, 其中I期2例、II期27例、III期41例、IV期54例; 没有分期资料47例。淋巴结阴性27例、阳性84例(其中远处转移35例), 无法确定是否有淋巴结转移的60例。未分化、低分化、中低分化及低未分化30例、中分化及中高分化65例、高分化4例、分化程度未知的72例。美国Becton Dickinson公司FACS Calibur流式细胞仪, 采用美国Becton Dickinson公司配套的淋巴细胞亚群检测试剂盒(Smultest IMK-Lymphocyte), 试剂盒中的双色荧光抗体是异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)和藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的鼠抗人单克隆抗体(Catalog No. 340182)。

1.2 方法 171例患者和健康对照组于入院进行治疗之前清晨空腹抽静脉血2 mL, EDTA钾盐抗凝。获得标本后立即送检。真空灭菌注射器采集血液2 mL, 用肝素抗凝, 2 h内送达实验室。(1)用加样枪在流式试管内加相应单抗20 μL; (2)加入肝素抗凝的待测血浆100 μL; (3)混匀后室温避光30 min使样品与试剂充分反应; (4)加2 mL溶血素2次震荡混匀, 再室温避光5 min后, 1 200 r/min离心5 min; (5)倒去上清后加PBS震荡混匀, 1 200 r/min离心5 min倒去上清; (6)加固定液300 μL, 震荡混匀后上机。流式细胞仪分析使用Couter公司配套的System II 系统软件数据处理系统。先进行光路流路的较准, 较准后进行荧光补偿, 然后上样本检测。

统计学处理 检测结果以mean±SD表示。利用SPSS17.0处理试验结果, 两组之间均数比较采用独立样本的双侧 t 检验, $P<0.05$ 为有显著性差异; 生存分析中, 淋巴细胞亚群8项指标均以健康参考值为界分为两组, 进行Kaplan-Meier分析。

2 结果

与健康对照组相比, 食管癌患者淋巴细胞亚群8项指标均呈显著性差异($P<0.05$)。表现为CD3⁺%总T淋巴细胞、CD4⁺%辅助T淋巴细胞、CD8⁺%细胞毒T淋巴细胞及CD19⁺%B淋巴细胞明显低于健康对照组; CD4⁺/CD8⁺比值、NK%细胞、CD25⁺%白介素2受体及CD44⁺%黏附分子明显高于健康对照组(表1)。而I/II期与III/IV期相

■相关报道

胡振东等在1997年首次报道了CD8⁺降低与恶性肿瘤转移有关, 推测肿瘤转移患者的CD8⁺降低可能是循环血中CD8⁺Tc减少, 导致对肿瘤细胞杀伤功能降低, 瘤块释放到血中的肿瘤细胞得以存活而引起血行转移。

■创新盘点

本研究用流式细胞仪检测食管癌首诊患者的淋巴细胞亚群CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、CD19⁺、CD25⁺、CD44⁺及NK细胞,研究食管癌患者淋巴细胞亚群的变化规律,并研究淋巴细胞亚群与患者预后的关系。

表 1 各组淋巴亚群均值

分组	样本(n)	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NK细胞	CD19 ⁺	CD25 ⁺	CD44 ⁺
对照组	96	73.32 ± 7.65 ^a	39.74 ± 6.51 ^a	28.68 ± 4.83 ^a	1.44 ± 0.42 ^a	17.10 ± 8.00 ^a	7.91 ± 2.98 ^a	17.10 ± 5.21 ^a	45.81 ± 13.50 ^a
食管癌组	171	66.28 ± 12.46	37.84 ± 11.16	21.93 ± 10.06	2.18 ± 1.35	24.07 ± 12.83	6.57 ± 4.75	26.82 ± 9.39	67.53 ± 16.33
I/II期	29	67.18 ± 12.82	39.57 ± 10.37	22.79 ± 9.84	2.18 ± 1.46	22.64 ± 12.59	7.14 ± 5.11	29.00 ± 8.76	63.07 ± 18.28
III/IV期	95	66.06 ± 12.53	36.48 ± 10.79	23.27 ± 10.80	1.99 ± 1.23	25.14 ± 12.99	5.86 ± 3.97	25.5 ± 9.77	68.04 ± 15.36
淋巴结阴性	27	68.48 ± 14.63	39.33 ± 11.68	24.15 ± 9.73	1.98 ± 1.31	20.74 ± 14.39	7.00 ± 5.45	28.52 ± 10.17	61.81 ± 21.43
淋巴结阳性	84	66.00 ± 12.29	37.08 ± 10.46	23.13 ± 10.77	2.02 ± 1.22	25.07 ± 12.89	6.18 ± 4.13	26.45 ± 10.03	68.79 ± 14.26
低/未分化	30	64.5 ± 11.30	36.63 ± 11.08	21.23 ± 10.65	2.34 ± 1.73	26.9 ± 11.15	6.13 ± 2.85	26.47 ± 6.31	70.40 ± 14.54
中/高分化	69	67.08 ± 13.48	37.97 ± 12.23	23.25 ± 10.34	2.03 ± 1.29	23.49 ± 13.63	6.32 ± 4.46	28.13 ± 11.52	66.75 ± 16.17

^a*P* < 0.05 vs 对照组.

表 2 平均存活时间对比

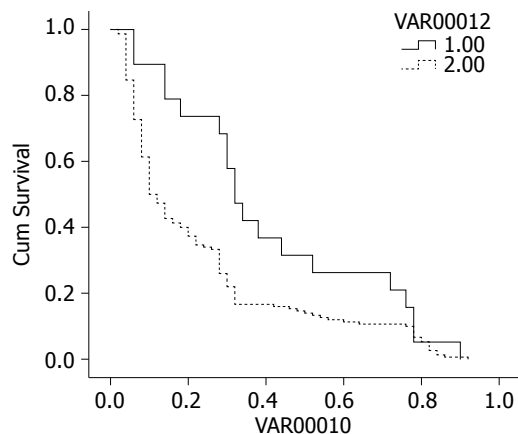
淋巴细胞亚群	平均存活时间(mo)		<i>P</i> 值
	检测值<对照组	检测值>对照组	
CD3 ⁺	12.07 ± 1.13	13.60 ± 1.80	0.50
CD4 ⁺	11.01 ± 1.20	14.30 ± 1.51	0.12
CD8 ⁺	12.19 ± 1.07	13.66 ± 2.16	0.47
NK细胞	14.36 ± 1.79	11.59 ± 1.12	0.25
CD19 ⁺	12.98 ± 1.15	11.25 ± 1.68	0.29
CD25 ⁺	11.88 ± 2.08	12.59 ± 1.06	0.92
CD44 ⁺	20.32 ± 3.02	11.50 ± 0.98	0.02

比、淋巴结阴性与淋巴结阳性相比、低/未分化与中/高分化相比,食管癌患者淋巴细胞亚群8项指标均无显著性差异(*P* > 0.05).

CD44⁺黏附分子表达低于健康对照者有显著生存优势(*P* = 0.024),而其余7项指标与患者预期生存无关(*P* > 0.05,表2,图1).

3 讨论

肿瘤免疫是一个复杂的过程,恶性肿瘤患者往往免疫功能状态紊乱和低下,发挥免疫功能的淋巴细胞约占白细胞总量的20%,可分为T、B淋巴细胞、NK细胞、巨噬细胞和树突状细胞.通常采用单克隆抗体来分析细胞表面抗原分子,并对其分化群进行了定义,用CD来描述白细胞表面抗原的不同成分,T淋巴细胞及表面抗原主要包括CD4⁺、CD8⁺、CD3⁺,B淋巴细胞及表面抗原主要包括CD19⁺、CD20⁺,NK细胞及表面抗

图 1 CD44⁺生存曲线.

原主要包括CD16⁺、CD56⁺,CD25⁺属活化淋巴细胞,CD44⁺为黏附分子.

绝大多数研究认为肿瘤患者的CD8⁺T淋巴细胞升高,CD4⁺/CD8⁺下降,而本研究结果恰恰相反,是CD8⁺T淋巴细胞下降,CD4⁺/CD8⁺上升.众所周知,CD8⁺T细胞从功能上表现为杀伤性T(cytotoxic T lymphocyte, Tc或CTL)与抑制性T(suppressor T cell, Ts)淋巴细胞两种.CD8⁺Tc被认为是抗肿瘤的主要效应细胞,而CD4⁺的辅助性T淋巴细胞(helper T cell, TH)细胞亚群则被认为与机体产生特异性抗肿瘤免疫有关,如致敏的TH细胞再次接触肿瘤细胞时,通过表面特异性受体识别并结合癌细胞表面抗原,产生一系列淋巴因子,并激活其他效应细胞Tc细胞、巨噬细胞、NK和B淋巴细胞等共同发挥其抗肿

瘤效应。胡振东等^[1]在1997年首次报道了CD8⁺降低与恶性肿瘤转移有关, 推测肿瘤转移患者的CD8⁺降低可能是循环血中CD8⁺ Tc减少, 导致对肿瘤细胞杀伤功能降低, 瘤块释放到血中的肿瘤细胞得以存活而引起血行转移。本研究比较了淋巴结阴性与淋巴结阳性患者的CD8⁺ Tc细胞, 并无显著性差异, 有可能在食管癌患者中CD8⁺ Tc减少占主导地位。Oliosio等^[2]报道进展性淋巴瘤、转移性肾癌、肝细胞癌在经细胞因子诱导的杀伤细胞治疗后CD8⁺上升, 提示在初始状态下CD8⁺是下降的, 与本研究相一致。但作者并未阐述CD8⁺在体内的免疫作用机制。可见CD8⁺ T淋巴细胞在抗肿瘤效应中机制不明, 尚需进一步研究。本研究中, 其他6项指标的改变与众多报道一致^[3-7], 不加赘述。Patel等^[8]研究发现人乳头状瘤病毒存在免疫逃避, CD4⁺在早期宫颈癌占主要地位, CD8⁺在进展期宫颈癌占主要地位, 可见淋巴细胞亚群的多因子联合检测才能完整反映机体的免疫状态。

本研究比较了不同分期、不同分化程度及淋巴结转移与否的食管癌外周血淋巴细胞亚群, 发现上述8项指标均无显著性差异。这一结果与多数报道不完全一致。秦子敏等^[9]报道外周血T淋巴细胞亚群CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺比值这4项指标与食管癌淋巴结微转移均显著相关, 有微转移组CD3⁺、CD4⁺水平及CD4⁺/CD8⁺比值明显低于无微转移组, CD8⁺水平明显高于无微转移组, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。沈玉光等^[10]报道早期(0、I期)食管癌、贲门癌患者和健康对照组之间T淋巴细胞各亚群相比没有统计学差异; 中、晚期(II、III期)食管癌、贲门癌患者和健康对照组相比, CD4⁺明显降低($P = 0.023$); CD8⁺则明显升高($P = 0.021$); CD4⁺/CD8⁺较正常有所下降, 但是没有显著性差异; 淋巴结阴性患者和淋巴结阳性患者比较T淋巴细胞各亚群没有明显差异。可见, 淋巴细胞亚群与肿瘤分期、分化程度、淋巴结转移的关系目前尚无定论, 值得进一步研究。

在本研究中, CD44⁺%黏附分子表达低于健康对照者, 有显著生存优势($P = 0.024$), 而其余7项指标与患者预期生存无关($P > 0.05$)。

CD44⁺指白细胞分化抗原分化簇第44号, 存在于人类CD44基因位于11号染色体短臂上, CD44基因的外显子按表达方式分为2种类型: 仅含组成型外显子的CD44转录子, 称为标准型CD44(standard CD44, CD44S), 另一种是V区变

异型外显子, 含有V区外显子的CD44转录子统称为CD44拼接变异体(CD44 alternative splice variant, CD44V)。CD44蛋白的主要功能可归纳为: (1)介导淋巴细胞与毛细血管后小静脉中的高柱状内皮细胞结合, 使淋巴细胞穿过血管壁回到淋巴组织; (2)参与淋巴细胞的激活过程; (3)与细胞外基质中的透明质酸、层粘连蛋白等基质分子结合; (4)能与细胞骨架蛋白结合, 参与细胞伪足形成, 并与细胞的迁移运动有关。CD44与肿瘤浸润转移关系的研究已有大量报道^[11-13]。已在人类各种恶性肿瘤的研究中发现CD44S普遍存在, CD44V在恶性肿瘤组织中阳性表达率高低不一但阳性表达者较易发生脉管浸润和远处转移, 本研究恰好从预后的角度印证了CD44的上述特点。

Nozoe等^[14]及Cho等^[15]报道CD4⁺、CD8⁺与食管癌患者的生存有关, 具有高百分比CD4⁺、CD8⁺细胞的患者生存率高。从免疫学观点看, 抗肿瘤免疫是整个免疫系统的协同作用, 各种免疫组分的免疫细胞会随着免疫状态的改变而发生变化, 联合多因子检测才能较完整的反映机体的免疫状态。

本实验报道了食管癌患者会出现CD8⁺降低, 并且报道了CD44⁺黏附分子低表达者有显著生存优势。有望为临床治疗策略提供一些帮助。

4 参考文献

- 胡振东, 方立德, 倪峰, 杜建伟, 陈昭明, 沈佰华, 李宁丽, 郑泽铎, 周光炎. CD8⁺T细胞与肿瘤血运转移的关系. 肿瘤 1997; 17: 162-163
- Oliosio P, Giancola R, Di Riti M, Contento A, Accorsi P, Iacone A. Immunotherapy with cytokine induced killer cells in solid and hematopoietic tumours: a pilot clinical trial. *Hematol Oncol* 2009; 27: 130-139
- 张力为, 伊力亚尔·夏合丁, 吴明拜. 食管癌患者外周血Th1/Th2及细胞因子表达的变化. 中华实验外科杂志 2008; 25: 1463-1465
- 冯伟华, 蔡蓓, 王兰兰. CD3+CD56+ NKT细胞及CD3-CD56+ NK细胞在恶性肿瘤患者的临床意义研究. 中国肺癌杂志 2007; 10: 429-432
- Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. *Cancer Sci* 2007; 98: 874-881
- Fabre-Guillevin E, Tabrizi R, Coulon V, Monnereau A, Eghbali H, Soubeyran I, Soubeyran P. Aggressive non-Hodgkin's lymphoma: concomitant evaluation of interleukin-2, soluble interleukin-2 receptor, interleukin-4, interleukin-6, interleukin-10 and correlation with outcome. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 603-611
- 赵松, 付明偶, 胡伟, 田川, 李文才, 李惠翔, 高冬玲, 赵

■应用要点

本实验报道了食管癌患者会出现CD8⁺降低, 并且报道了CD44⁺黏附分子低表达者有显著生存优势, 有望为临床治疗策略提供一些帮助。

■同行评价

本文选题尚可,对食管鳞癌患者的治疗提供临床参考.

- 高峰. 食管癌患者血清中SCD44V6及组织中CD44V6表达的临床意义. 中华医学杂志 2003; 83: 1919-1920
- 8 Patel S, Chiplunkar S. Host immune responses to cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21: 54-59
- 9 秦子敏, 李印, 邢文群. 免疫功能对食管癌淋巴结微转移的影响. 中国综合临床 2008; 24: 1055-1057
- 10 沈玉光, 高宗人, 许金良, 杨宗林, 赵婷茹. 流式细胞术对食管癌、贲门癌患者T细胞亚群的分析. 肿瘤防治研究 2006; 33: 818-820
- 11 Liu WK, Fu Q, Li YM, Jiang XY, Zhang MP, Zhang ZX. The relationship between cyclooxygenase-2, CD44v6, and nm23H1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Onkologie* 2009; 32: 574-578
- 12 Pozdnyakova O, Hoang MM, Dresser KA, Mahalingam M. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, CD44v6, and HER2/neu in metastatic cutaneous adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 1285-1290
- 13 Li DM, Li SS, Zhang YH, Zhang HJ, Gao DL, Wang YX. Expression of human chorionic gonadotropin, CD44v6 and CD44v4/5 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7401-7404
- 14 Nozoe T, Maehara Y, Sugimachi K. Preoperative sorting of circulating T lymphocytes in patients with esophageal squamous cell carcinoma: its prognostic significance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6689-6693
- 15 Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, Hida Y, Oshikiri T, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Murakami S, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1555-1559

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《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)

磷酸化FAK、Paxillin在胃腺癌中的表达及其意义

李山林, 王进, 杨丽敏, 刘丽

李山林, 王进, 杨丽敏, 刘丽, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 此课题由李山林与王进共同设计、操作并撰写; 王进与杨丽敏修稿; 刘丽统计分析。

通讯作者: 王进, 教授, 450052, 河南省郑州市建设路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科. wangjin3@medmail.com.cn

收稿日期: 2010-07-31 修回日期: 2010-08-16

接受日期: 2010-08-24 在线出版日期: 2010-11-18

Significance of expression of p-FAK and paxillin in gastric adenocarcinoma

Shan-Lin Li, Jin Wang, Li-Min Yang, Li Liu

Shan-Lin Li, Jin Wang, Li-Min Yang, Li Liu, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Jin Wang, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. wangjin3@medmail.com.cn

Received: 2010-07-31 Revised: 2010-08-16

Accepted: 2010-08-24 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of phosphorylated focal adhesion kinase (p-FAK) and paxillin in gastric adenocarcinoma and to analyze their clinical significance.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of p-FAK and paxillin in 85 gastric adenocarcinoma specimens and 20 normal gastric specimens.

RESULTS: The positive rates of both p-FAK and paxillin expression in gastric carcinoma were significantly higher than those in normal gastric tissue (47% vs 5%; 70% vs 30%, both $P < 0.05$). Both p-FAK and paxillin expression was related to tumor differentiation, invasion depth, lymph node metastasis and clinical stage (all $P < 0.05$), but not to age and gender (both $P > 0.05$). A positive correlation was also noted between the expression of p-FAK and paxillin in gastric carcinoma ($r = 0.505$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: P-FAK and paxillin play significant roles in the development and progression

of gastric adenocarcinoma. Expression of p-FAK and paxillin can be used as useful parameters for clinical assessment of tumor biological behavior and prognosis in patients with gastric adenocarcinoma.

Key Words: Focal adhesion kinase; Paxillin; Gastric adenocarcinoma; Immunohistochemistry

Li SL, Wang J, Yang LM, Liu L. Significance of expression of p-FAK and paxillin in gastric adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3467-3470

摘要

目的: 研究磷酸化黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和桩蛋白(Paxillin)在胃腺癌及正常组织中的表达及其临床意义。

方法: 应用免疫组织化学SP法分别检测P-FAK和Paxillin在85例胃腺癌及20例正常组织中的表达, 采用Spearman分析二者之间表达的相关性。

结果: P-FAK和Paxillin在胃腺癌组织中的表达明显高于正常组织(47% vs 5%; 70% vs 30%, 均 $P < 0.05$), 且与胃腺癌分化程度、浸润深度、淋巴结转移及临床分期有关($P < 0.05$), 与年龄和性别无关($P > 0.05$); 胃腺癌组织中P-FAK和Paxillin的表达升高, 呈协同关系($r = 0.505$, $P < 0.05$)。

结论: P-FAK和Paxillin在胃腺癌的发生、发展、转移及预后中发挥重要作用, 可考虑作为胃腺癌临床评价肿瘤生物学行为及评估预后的指标。

关键词: 黏着斑激酶; 桩蛋白; 胃腺癌; 免疫组织化学

李山林, 王进, 杨丽敏, 刘丽. 磷酸化FAK、Paxillin在胃腺癌中的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18(32): 3467-3470
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3467.asp>

0 引言

胃癌是在世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 我国每年新发胃癌患者约40万例。因此研究胃

■背景资料

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 其恶性程度高、病变进展快。因而, 需要有更好的检测手段来评价胃腺癌的生物学行为及其预后, 指导治疗。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■研发前沿

目前关于胃腺癌的发生、发展及转移变化备受关注,也是胃癌研究领域的热点,有关P-FAK和Paxillin具体发展机制有待于进一步阐明。

癌细胞的发生、发展、黏附、迁移的分子学机制,用来指导临床显得极为重要。最近发现磷酸化黏着斑激酶(phosphorylated focal adhesion kinase, P-FAK)和桩蛋白(Paxillin)在胃腺癌、胰腺癌、结肠癌等恶性肿瘤的增殖、浸润和转移过程中发挥着极其重要的作用^[1]。目前, P-FAK和Paxillin在胃腺癌中表达的研究国内尚无报道,本文采用免疫组织化学SP法检测P-FAK和Paxillin在胃腺癌及正常组织的表达,观察其与临床病理参数的关系,旨在探讨其与胃腺癌细胞的发生、浸润和转移的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 收集郑州大学第一附属医院病理科2008-01/2009-12经病理证实为胃腺癌的手术切除标本85例,患者术前均未接受化学、放射治疗及免疫治疗。其中男63例、女22例,中位年龄55.5岁。TNM分期: I期15例, II期20例, III期22例, IV期28例;病理分型: 高分化腺癌10例, 中分化腺癌40例, 低分化腺癌35例;浸润深度未超过浆膜层者40例, 超过浆膜层者45例;伴淋巴结转移者50例, 不伴淋巴结转移者35例;同期手术标本20例正常胃组织作为对照组。P-FAK(Y397)多克隆抗体来自Bioworld科技股份有限公司;鼠抗人Paxillin单克隆抗体购自美国纽马克有限公司;即用型SP试剂盒、DAB显色试剂盒及EDTA抗原修复液均购自北京中杉金桥有限公司。

1.2 方法

1.2.1 P-FAK和Paxillin的检测: 严格按免疫组织化学SP说明书操作,以已知P-FAK(Y397)、Paxillin阳性胃腺癌组织切片作阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。Paxillin, P-FAK(Y397)一抗工作浓度均为1:50。

1.2.2 结果判定: (1)Paxillin染色阳性信号定位于细胞质或细胞膜上,高倍镜下随机观察5个视野,每个视野计数200个细胞,共计1 000个,以细胞无棕黄色或与背景一致的浅棕黄色为阴性细胞,细胞中出现明显棕黄色颗粒为阳性细胞。计算每张切片阳性细胞百分率,根据Speiser^[2]的判定标准:切片中阳性细胞数<10%为阴性片,≥10%为阳性片。(2)P-FAK免疫组织化学阳性产物呈棕黄色细颗粒状,定位于细胞质内,局限性表达于肿瘤浸润面。参照文献[3]进行判定:计数500个细胞,按照染色强度计分,0分为无色,1分为淡黄色,2分为棕黄色,3分为棕褐色。按阳性细胞所占百分比计分:0分为无阳性细胞,1分为阳

性细胞≤10%, 2分为阳性细胞12%-50%, 3分为阳性细胞51%-75%, 4分为阳性细胞>75%。染色强度与阳性细胞计分乘积0-2分计为(-), 3-5分计为(+), 6-9分计为(++), 10-12分计为(+++)。

统计学处理 数据采用SPSS13.0软件进行分析处理,组间比较采用 χ^2 检验,各指标间的相关性研究采用Spearman相关性分析,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 P-FAK和Paxillin在胃腺癌及正常组织中的表达 胃腺癌及正常组织中P-FAK阳性率分别为47%(40/85)、5%(1/20), Paxillin阳性率分别为70%(60/85)、30%(6/20)。其中P-FAK和Paxillin共阳性的胃癌组织有38例;单纯P-FAK阳性的胃癌组织2例;单纯Paxillin阳性的胃癌有22例(图1)。

2.2 P-FAK和Paxillin在胃腺癌组织中的表达与其临床病理参数间的关系 胃腺癌组织中P-FAK和Paxillin的表达与癌组织的分化程度、浸润深度、临床分级、淋巴结转移有关($P < 0.05$),与性别、年龄无关($P > 0.05$,表1)。

2.3 P-FAK、Paxillin在胃腺癌组织中表达的相关性 Spearman相关性分析显示胃腺癌组织中P-FAK和Paxillin的表达呈正相关($r = 0.505$, $P < 0.05$)。

3 讨论

FAK的N-末端和催化部位相连处为Tyr397,是自身磷酸化和Tyr磷酸化的主要位点^[4],Tyr397自身磷酸化后形成了高亲和力的Src的SH2结构域结合位点^[5],即激活的FAK与Src的SH2结合,消除了自体抑制而使Src激活,活化的Src催化FAK其他磷酸化位点活化,使FAK完全活化^[6],接着通过复杂的信号传递,激活Ras蛋白,后者活化丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)^[7],进而引起级联反应,参与细胞的增殖与迁移等。P-FAK也可以与癌基因p130cas结合形成p130cas/Crk,而p130cas/Crk复合物的激活是生长因子引起细胞迁移的主要特征;同时P-FAK可以结合并活化PI-3K,而PI-3K可以促使细胞膜上整联蛋白与配体的亲和力增强,进一步增强细胞的迁移能力,因此P-FAK活性在一定程度上决定细胞的迁移能力^[8,9]。总之, P-FAK通过Paxillin及PI-3K等与信号转导有关的分子,激活多条信号转导通路,启动下游重要事件发生,从而参与肿瘤细胞的增殖、黏附及迁移。本试验发现,在胃腺癌组织中P-FAK的阳性表达率明

■相关报道

杨红军等研究发现, Paxillin介导细胞外基质和细胞骨架之间的黏附,与之结合的细胞骨架蛋白与损伤修复、细胞迁移、肿瘤转移有关,而癌的浸润和转移与细胞的黏附力、移动力的改变直接相关,因此, Paxillin与肿瘤的浸润和转移密切相关。

表 1 胃腺癌组织中Paxillin、P-FAK与临床病理参数的相关性

临床病理参数	<i>n</i>	Paxillin阳性 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值	P-FAK阳性 <i>n</i> (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别							
男	63	45(71)	0.083	>0.05	33(52)	2.767	>0.05
女	22	15(68)			7(31)		
年龄(岁)							
≥55	51	35(68)	0.236	>0.05	22(43)	0.787	>0.05
≤55	34	25(73)			18(52)		
组织学分级							
高、中分化	50	40(80)	5.181	<0.05	15(30)	14.184	<0.05
低分化	35	20(57)			25(71)		
浸润深度							
未超浆膜层	40	20(50)	15.426	<0.05	11(27)	11.602	<0.05
超过浆膜层	45	40(88)			29(64)		
淋巴结转移							
有	50	45(90)	22.039	<0.05	32(64)	13.989	<0.05
无	35	15(42)			8(22)		
TNM分级							
I – II	35	20(76)	5.181	<0.05	10(53)	8.163	<0.05
III –IV	50	40(50)			30(25)		

■应用要点
本文研究P-FAK和Paxillin在胃腺癌中的表达，结果显示，二者在胃腺癌的生长及转移过程中起了重要作用，联合检测可用于评价胃腺癌的预后，指导治疗。

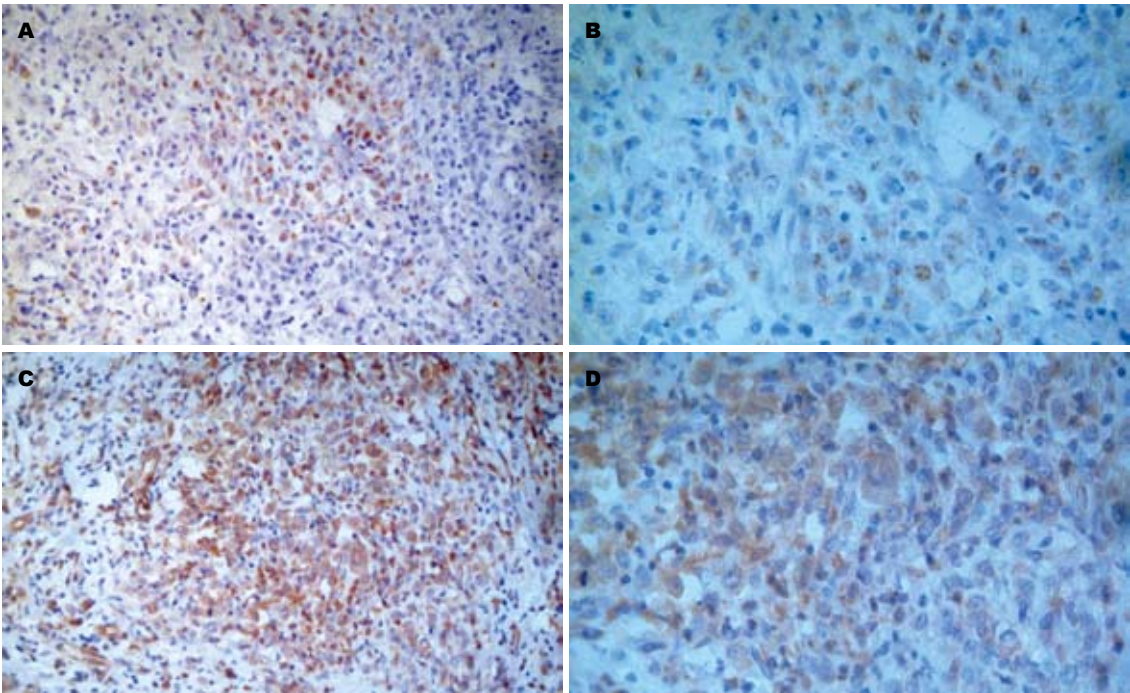


图 1 P-FAK和Paxillin在胃癌组织中的表达(SP). A: P-FAK(×200); B: P-FAK(×400); C: Paxillin(×200); D: Paxillin(×400).

显高于正常组织，并随肿瘤分化程度的降低、浸润度的加深、淋巴结转移及临床分期的增高而增高，与相关文献[10]报道相符，提示P-FAK在促进胃腺癌的发生、发展、浸润和转移过程中起着重要作用，而且可能为判断胃腺癌的恶性程度提供依据。

Paxillin是细胞骨架上的一种磷酸蛋白，定位

于人染色体12q24，相对分子质量为68 000 Da^[11]，是迄今发现的唯一能与癌基因结合的含Tyr的黏附调节蛋白^[12]，含5个LD模体和4个LIM结构域^[13](其中第3个是Paxillin结合到FAK的关键结构)，其中LD模体所含的丰富的亮氨酸易形成疏水性界面，提供与其他蛋白相互结合的平台，从而成为FAK的结合位点。Paxillin的上述结构加上其分

■同行评价

本文选题恰当, 有一定的新意, 具有较好的学术意义和潜在的临床应用价值。

子中散在的Tyr、丝氨酸和苏氨酸磷酸化位点使其在参与黏着斑的组装、细胞黏附和迁移过程中发挥重要作用。Paxillin的基序可与多种致癌性蛋白结合, 形成特异的信号分子复合物, 将信号向下游传递, 扰乱甚至误导正常黏附和细胞增殖所需的生长因子信号级联, 并使组织中细胞骨架效应发生改变, 这种改变是肿瘤转移的重要分子机制之一^[5]。研究发现^[14], Paxillin介导细胞外基质和细胞骨架之间的黏附, 与之结合的细胞骨架蛋白与损伤修复、细胞迁移、肿瘤转移有关, 而癌的浸润和转移与细胞的黏附力、移动力的改变直接相关, 因此, Paxillin与肿瘤的浸润和转移密切相关。本研究显示Paxillin在低分化胃腺癌组织中表达显著高于高、中分化腺癌, 表明Paxillin与胃腺癌的分化程度有关; Paxillin在伴有淋巴结转移的胃腺癌组中表达的阳性率显著高于不伴有淋巴结转移者, 表明Paxillin可能对胃腺癌细胞的移动起促进作用, 这与田素芳等^[15]研究结果一致。

本研究发现, P-FAK和Paxillin在胃腺癌组织中的表达呈正相关, 提示P-FAK的表达可能促进了Paxillin参与的胃腺癌的发生、发展、侵袭、转移等生物学行为, 因此, P-FAK和Paxillin可考虑作为判断胃腺癌生物学行为、预测肿瘤发展趋势的生物标志, 从而为临床提供依据。

4 参考文献

- 1 Pelagalli A, Scibelli A, Lombardi P, d'Angelo D, Tortora G, Staiano N, Avallone L. Expression of the focal adhesion protein paxillin in normal and breast cancer tissues. *Vet Res Commun* 2003; 27 Suppl 1: 343-346
- 2 张鑫, 彭品贤, 吕嘉春, 梁建辉, 吴建军. Paxillin基因

- 在肺癌组织中的表达研究. *广州医学院学报* 2004; 32: 4-7
- 3 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志* 1996; 6: 229-231
- 4 刘启胜, 于红刚, 齐元玲, 曹俊, 罗和生, 于皆平. 磷酸化黏着斑激酶在结肠癌中表达及意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2492
- 5 Siesser PM, Meenderink LM, Ryzhova L, Michael KE, Dumbauld DW, Garcia AJ, Kaverina I, Hanks SK. A FAK/Src chimera with gain-of-function properties promotes formation of large peripheral adhesions associated with dynamic actin assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008; 65: 25-39
- 6 Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 2003; 278: 2701-2712
- 7 苏荣健, 李贞, 李宏丹, 宋慧娟, 程留芳. 肝细胞生长因子对肝细胞癌细胞系SMMC-7721黏着斑激酶的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2070-2073
- 8 Cary LA, Chang JF, Guan JL. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 7): 1787-1794
- 9 Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 2002; 109: 999-1006
- 10 Giaginis CT, Vgenopoulou S, Tsourouflis GS, Politi EN, Kouraklis GP, Theocharis SE. Expression and clinical significance of focal adhesion kinase in the two distinct histological types, intestinal and diffuse, of human gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 2009; 15: 173-181
- 11 韩敬, 张璟. 人肾小管上皮细胞在转化生长因子 β 1诱导下桩蛋白表达研究. *第三军医大学学报* 2006; 28: 1068
- 12 杨红军, 丁彦青, 周军, 杨磊. paxillin在大肠癌中的表达及其生物学意义. *实用肿瘤杂志* 2007; 22: 414
- 13 Brown MC, Turner CE. Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* 2004; 84: 1315-1339
- 14 杨红军, 丁彦青, 周军. 大肠癌组织paxillin mRNA表达及其临床病理意义. *中国现代医学杂志* 2008; 18: 2933
- 15 田素芳, 熊永炎, 余少平, 汪必成. paxillin在胃腺癌中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1632-1634

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)

ANGPTL3在肝细胞癌中的表达及其与肿瘤血管生成的关系

李德宇, 陈孝平

李德宇, 陈孝平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022

李德宇, 河南省人民医院肝胆外科 河南省郑州市 450003

河南省基础与前沿技术研究计划基金资助项目, No. 102300410057

作者贡献分布: 此课题由李德宇与陈孝平设计; 李德宇完成实验; 论文写作由李德宇完成。

通讯作者: 李德宇, 主任医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科. yhb2101661@sina.com
电话: 0371-65897600

收稿日期: 2010-07-29 修回日期: 2010-09-26

接受日期: 2010-10-13 在线出版日期: 2010-11-18

Correlation between ANGPTL3 expression and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma

De-Yu Li, Xiao-Ping Chen

De-Yu Li, Xiao-Ping Chen, Department of Hepatobiliary Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, Hubei Province, China

De-Yu Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Supported by: the Research Program of Application Foundation and Advanced Technology of Henan Province, No. 102300410057

Correspondence to: De-Yu Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, Hubei Province, China. yhb2101661@sina.com

Received: 2010-07-29 Revised: 2010-09-26

Accepted: 2010-10-13 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the expression of angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3) and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: The expression of ANGPTL3 and VEGF proteins in 96 HCC specimens and matched tumor-adjacent specimens was detected by immunohistochemistry and Western blot. Immunohistochemical staining for CD34 was performed in the above specimens to evaluate microvessel density (MVD).

RESULTS: The positive rates of ANGPTL3 and VEGF expression in HCC were signifi-

cantly higher than that in tumor-adjacent tissue (62.50% vs 32.29%; 81.25% vs 29.17%, both $P < 0.05$). Active angiogenesis was detected in HCC compared to tumor-adjacent tissue (67.71% vs 31.25%, $P < 0.05$). Tumor angiogenesis was related with ANGPTL3 expression in HCC. The expression of ANGPTL3 and VEGF protein was significantly up-regulated in HCC compared with matched tumor-adjacent noncancerous tissue.

CONCLUSION: High expression of ANGPTL3 is associated with tumor angiogenesis in HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Angiopoietin-like protein 3; Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor

Li DY, Chen XP. Correlation between ANGPTL3 expression and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3471-3475

摘要

目的: 研究血管生成素样蛋白3(angiopoietin-like protein 3, ANGPTL3)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及其与血管生成的关系。

方法: 应用免疫组织化学方法检测96例肝癌组织和癌旁组织中ANGPTL3和VEGF的表达, 同时检测其肝癌组织内微血管密度(microvessel density, MVD)。应用Western blot方法检测肝癌组织和癌旁组织中ANGPTL3和VEGF的表达。

结果: 肝癌组织中ANGPTL3和VEGF表达与癌旁组织中比较显著增加(62.50% vs 32.29%; 81.25% vs 29.17%, $P < 0.05$)。HCC组织中存在活跃的血管生成(67.71% vs 31.25%, $P < 0.05$)。血管生成与ANGPTL3表达相关。Western blot提示肝癌组织中ANGPTL3和VEGF蛋白的表达明显高于癌旁组织, 且表达呈正相关。

结论: HCC中ANGPTL3高表达是肿瘤血管生成的重要因素。

关键词: 肝细胞癌; 血管生成素样蛋白3; 血管生成;

■背景资料

原发性肝癌(PHC)早期缺乏典型的临床表现, 早期就可能就存在肝内转移, 导致术后的复发率居高不下。此外肝癌患者多伴有肝炎、肝硬化背景, 容易造成严重的肝功能损害, 使得肝癌的生存率低下, 即使是根治性手术切除, 5年生存率仅为20%-30%。

■同行评议者

徐洪, 副教授, 上海复旦大学附属中山医院肝胆肿瘤外科

■ 研发前沿

血管新生和丰富的血流是肿瘤迅速生长和发生转移的病理基础和重要条件。故如何抑制早期血管生成、破坏肿瘤血管已经成为肿瘤治疗研究的热点和突破口。

血管内皮生长因子

李德宇, 陈孝平. ANGPTL3在肝细胞癌中的表达及其与肿瘤血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3471-3475
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3471.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是我国最常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率和死亡率都有明显上升趋势, 对人们的健康构成了很大威胁. PHC早期缺乏典型的临床表现, 早期就可能存在肝内转移, 导致术后的复发率居高不下. 此外肝癌患者多伴有肝炎、肝硬化背景, 容易造成严重的肝功能损害, 使得肝癌的生存率低下, 即使是根治性手术切除, 5年生存率仅为20%-30%^[1]. 肝癌的发生、发展及浸润转移与肿瘤血管的形成有密不可分的关系. 血管生成素样蛋白3(angio-poitin-like protein 3, ANGPTL3)是一种分泌性蛋白因子, 具有促进肿瘤新生血管形成的作用^[2]. 本研究通过免疫组化方法, 检测ANGPTL3在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达, 探讨ANGPTL3与肿瘤血管生成的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集河南省人民医院2007-01/2009-11术后病理诊断为HCC的手术切除肿瘤组织、癌旁组织标本96例, 患者术前均未经化学治疗或放射治疗. 其中男64例, 女32例, 年龄33-74(平均 56.3 ± 6.2)岁. 免疫组织检测试剂盒是美国Invitrogen公司最新推出的第3代二步法免疫组织化学检测试剂, 其他试剂均为进口超纯级或国产分析纯以上级产品. 鼠抗人CD34内皮细胞免疫组织化学单克隆抗体(产品编号: MAB-0034)为福州迈新生物技术开发有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 用自动切片机将石蜡标本切成5 μm 厚度切片, 脱水、透明、中性树胶封片. 严格按照产品说明书进行SP免疫组织化学染色. 取已知含有待检抗原的切片作为阳性对照, 用PBS缓冲液代替第一抗体, 采用同样的方法染色. DAB显色, Mayer氏苏木素复染核, 进行免疫组织化学, 检测ANGPTL3在人肝癌组织、癌旁组织中的表达差异. ANGPTL3表达以每张切片 ≥ 3 个视野中的细胞内棕黄色颗粒状染色, 且着色明显高于背景或背景不着色而细胞着色者为阳性表达. 按染色强度(未着色、弱、中、强)及染色阳性细胞的百分数(0%, 1%-25%,

26%-50%, $>50\%$), 分别积分为0, 1, 2, 3, 两项分数之和为0-2分者计为染色阴性, 3-6分者计为染色阳性^[3].

1.2.2 微血管密度计数: 肿瘤组织CD34免疫组织化学染色后, 计算肿瘤内着色的毛细血管和微小血管数. 凡呈现棕黄色单个或成群无管腔的染色细胞均作为个微血管计数, 而管腔 >8 个红细胞大小(管腔直径 $>50 \mu\text{m}$)及肌层较厚的血管不计数. 计数方法为: 每张切片先在低倍视野下观察整张切片的血管分布情况, 然后选取癌灶的5个微血管最丰富的区域, 在400倍视野下进行计数, 取其平均值^[4].

1.2.3 Western blot: 称取组织100 mg, 按组织和细胞裂解液1:10的比例加入全细胞裂解液, 于冰上匀浆器充分匀浆后15 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心10 min, 取上清提取总蛋白. 用酶标仪592 nm波长, BCA法蛋白定量. 按每孔100 μg 蛋白上样, 煮沸变性5 min后, 以12%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 80 V电压浓缩胶至分离胶后改为180 V电压至分离胶底部, 后经湿转法300 mA 1.5 h电转移至NC膜, 5%脱脂奶粉室温封闭2 h, NC膜置于鼠抗人一抗稀释液(1:1 000稀释)中4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST及PBS洗膜10 min $\times 4$ 次, 再置于羊抗鼠二抗稀释液(1:1 000稀释)中室温孵育2 h及PBS洗膜10 min $\times 4$ 次, 最后用DAB显色10-12 min, 直至膜上出现棕色条带, 显色适度时蒸馏水漂洗中止显色反应, 拍摄滤膜照片. 用Quantity One 4.3.1凝胶图像分析系统扫描灰度值, 取相应蛋白的灰度值与相应内参 β -actin的比值, 代表相应蛋白的相对表达水平进行统计学分析.

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件包进行多个独立样本非参数Kreskas-Wallis H检验和两独立样本非参数Mann-Whitney U检验.

2 结果

2.1 ANGPTL3在HCC中的表达 本研究96例标本肝癌肿瘤组织与癌旁肝组织的免疫组织化学检测结果显示, ANGPTL3阳性表达产物主要分布于细胞的胞质内, 在癌旁肝组织中ANGPTL3表达率为32.29%; 而在肝癌肿瘤组织中表达为62.50%. 肿瘤组织ANGPTL3阳性率远高于癌旁组织, 有显著性差异($P < 0.05$, 图1, 表1).

2.2 VEGF在HCC中的表达 本研究96例标本肝癌肿瘤组织与癌旁肝组织的免疫组织化学检测结果显示, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)阳性表达产物主要分布于细胞的胞质内, 在癌旁肝组织中VEGF表达率为

■相关报道
Camenisch等研究发现ANGPTL3通过和内皮细胞表面整合素 $\alpha v\beta 3$ 结合, 导致内皮细胞黏附、迁移, 刺激整合素信号转导途径包括AKT, MAPK, FAK磷酸化. 已经发现整合素 $\alpha v\beta 3$ 不仅可以影响肿瘤细胞的增殖和迁移, 也和肿瘤血管的生成相关.

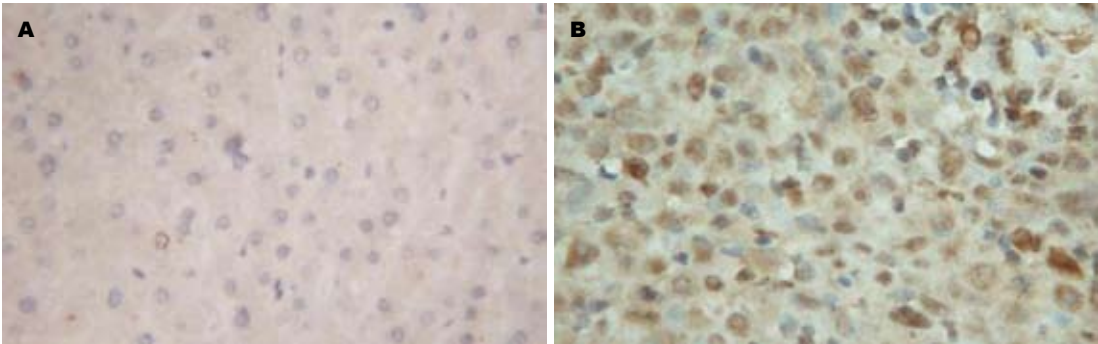


图 1 ANGPTL3在肝癌组织及癌旁组织中的表达(SP法 $\times 400$). A: 癌旁组织; B: 肝癌组织.

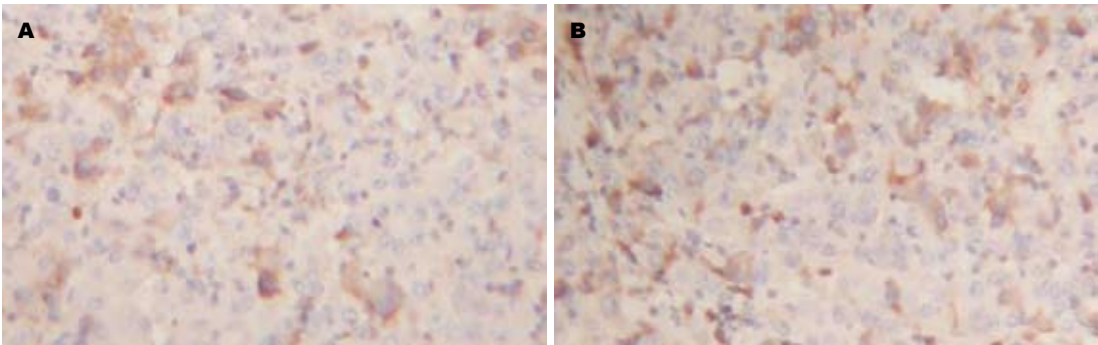


图 2 VEGF在肝癌组织及癌旁组织中的表达(SP法 $\times 200$). A: 癌旁组织; B: 肝癌组织.

表 1 ANGPTL3在肝癌肿瘤组织及癌旁肝组织中的表达 ($n = 96$)

分组	ANGPTL3蛋白表达(n)		阳性率(%)	P 值
	-	+		
癌旁组织	65	31	32.29	0.032
肿瘤组织	36	60	62.50	

29.17%; 而在肝癌肿瘤组织中表达为81.25%. 肿瘤组织VEGF阳性率远高于癌旁组织, 有显著性差异($P < 0.05$, 图2, 表2).

2.3 HCC中的微血管密度计数 肿瘤组织免疫组织化学染色结果, 微血管密度为56-183(平均 104.2 ± 56.7), 以均数104.2为界, 将他们分为多血管组(微血管密度 > 104.2)和少血管组(微血管密度 < 104.2). 结果显示, 肿瘤的新生血管生成和ANGPTL3在肿瘤组织中高表达相关(图3, 表3).

2.4 ANGPTL3与临床病理指标的关系 统计学分析各病理因素与ANGPTL3的关系, 结果显示ANGPTL3的阳性表达和淋巴结转移及TNM分期相关($P < 0.05$), 而与组织学分级、肿瘤体积、浸润深度、远处转移、AFP等临床病理因素无相关性($P > 0.05$, 表4).

2.5 肝癌组织及癌旁组织ANGPTL3和VEGF基因的表达 Western blot结果表明肝癌组织中

表 2 VEGF在肝癌肿瘤组织及癌旁肝组织中的表达 ($n = 96$)

分组	VEGF蛋白表达(n)		阳性率(%)	P 值
	-	+		
癌旁组织	68	28	29.17	0.022
肿瘤组织	18	78	81.25	

表 3 肝癌肿瘤组织及癌旁肝组织中微血管密度计数 ($n = 96$)

分组	多血管组(n)	少血管组(n)	阳性率(%)	P 值
癌旁组织	20	76	31.25	0.026
肿瘤组织	65	31	67.71	

ANGPTL3和VEGF表达均增加, 且表达呈正相关($P < 0.05$, 图4).

3 讨论

肝癌的发生、发展、转移与肿瘤新生血管有着密切的联系, 新生血管是肿瘤赖以生长和生存的物质基础, 是影响肿瘤生物学行为的重要因素之一. 肿瘤血管生成是指血管内皮细胞从现有的血管系统中分化、迁移而形成新的微血管的复杂生物学过程, 有多种生长因子、胞外基

■应用要点

ANGPTL3的表达与肿瘤血管生成呈正相关,表明其可能在促进HCC的发生、发展及转移过程中起着重要作用.

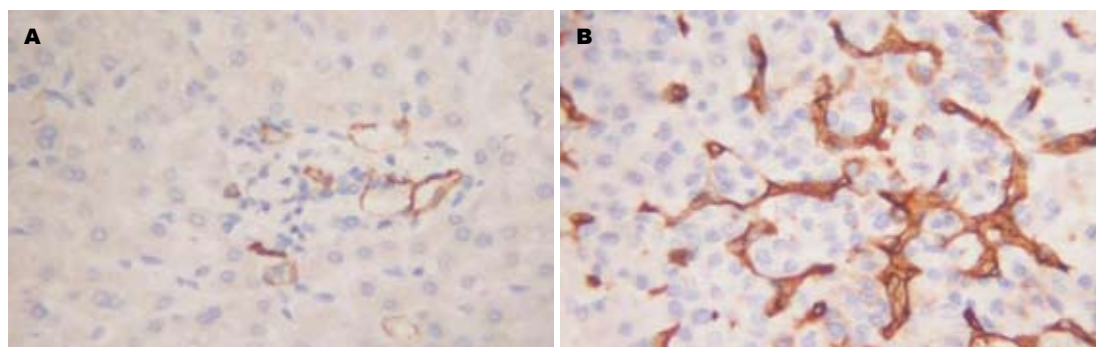


图3 肝癌组织及癌旁组织中的微血管密度(SP法×400). A: 癌旁组织; B: 肝癌组织.

表4 ANGPTL3蛋白表达与HCC临床病理因素之间的关系

临床病理因素	<i>n</i>	+(<i>n</i>)	-(<i>n</i>)	阳性率(%)	<i>P</i> 值
年龄					
≤60	64	38	26	59.4	0.206
>60	32	22	10	68.7	
性别					
男	64	42	22	65.6	0.527
女	32	18	14	56.2	
组织学分级					
I	14	8	6	57.1	0.623
II	46	32	14	69.6	
III	36	20	16	55.6	
肿瘤体积					
T≤5 cm	50	28	22	56.0	0.505
5 cm<T≤10 cm	28	18	10	64.3	
T≥10 cm	18	14	4	77.8	
浸润深度					
pT1	8	4	4	50.0	0.254
pT2	28	14	14	50.0	
pT3	60	42	18	70.0	
淋巴结转移					
-	28	8	20	28.6	0.003
+	68	52	16	76.5	
远处转移					
-	66	38	28	57.6	0.296
+	30	22	8	73.3	
TNM分期					
I+II	28	10	18	35.7	0.031
III	38	26	12	68.4	
IV	30	24	6	80.0	
AFP	96				
≤400 kU/L	38	24	14	63.2	0.547
>400 kU/L	68	36	22	61.8	

质成分、蛋白水解酶和细胞黏附分子参与此过程^[5]. 恶性肿瘤发生侵袭和转移是肿瘤治疗失败的主要原因, 而肿瘤血管生成在其转移的起始及终末阶段发挥着重要作用. 血管新生和丰富的血流是肿瘤迅速生长和发生转移的病理基础

和重要条件^[6,7]. 故如何抑制早期血管生成、破坏肿瘤血管已经成为肿瘤治疗研究的热点和突破口. 有研究表明^[8,9], 对肿瘤组织中已经存在的血管和/或正在血管生成的肿瘤进行干预, 阻断诱导血管生成的通路, 能够有效地抑制肿瘤增殖

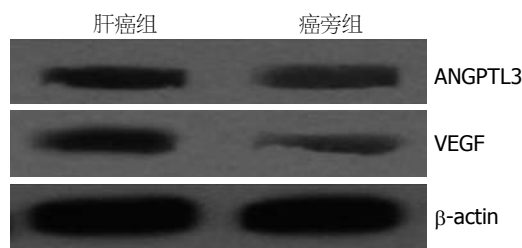


图 4 肝癌组织和癌旁组织中ANGPTL3和VEGF的表达。

和生长,使其处于休眠状态。近年来研究表明^[10],血管生成是包括HCC在内的许多实体瘤生长和转移的关键因素。目前认为,肿瘤组织微血管密度作为间接测量肿瘤血管生成的一项指标,与多种肿瘤临床分期、病理分级、淋巴结转移,以及患者预后有关^[11]。

ANGPTL3是一种分泌性蛋白因子即人ANGPTL3是由Ip31编码的460个氨基酸组成的多肽,其蛋白结构由分泌信号肽、N-端螺旋形卷曲结构域和C-端FBN样区组成。最先发现在发育的肝脏中特异的表达,成人肝脏中也有少量持续表达。和促血管生成素家族不同,ANGPTL3的FBN区和他们只有37%-39%的同源区,故不能和Tic2受体结合,但其FBN样区可以和整合素 $\alpha v\beta 3$ 结合。Camenisch等^[2]研究发现ANGPTL3通过和内皮细胞表面整合素 $\alpha v\beta 3$ 结合,导致内皮细胞黏附、迁移,刺激整合素信号转导途径包括AKT, MAPK, FAK磷酸化。已经发现整合素 $\alpha v\beta 3$ 不仅可以影响肿瘤细胞的增殖和迁移,也和肿瘤血管的生成相关,国外已有通过抑制其表达来治疗肿瘤的临床实验研究。此外 $\alpha v\beta 3$ 还和肝星形细胞的增殖和凋亡相关,因此也可能影响肝纤维化过程。动物实验发现ANGPTL3和VEGF具有相似的促进鼠角膜血管生长活性。可能和VEGF一样,ANGPTL3同样具有促进肿瘤新生血管形成,从而诱发侵袭转移作用。其中ANGPTL3和肿瘤新生血管形成的关系尚未见报道。宋其同等^[12,13]还发现,ANGPTL3 mRNA表达和肿瘤新生血管生成,癌栓的形成和肿瘤分级相关,而和肿瘤大小,包膜的完整性无明显相关,因此认为ANGPTL3在HCC的侵袭和转移中发挥重要作用,ANGPTL3可以促进肿瘤血管形成以及HCC的侵袭和转移;可以通过ANGPTL3的表达强度判断HCC的预后,设想通过调控ANGPTL3的表达以控制血糖,并抑制肿瘤血管生成,从而达到延长肝癌患者生存时间的目的。

本研究结果显示,ANGPTL3在人肝癌组

织、癌旁肝组织中均表达,但在肝癌组织中表达明显高于癌旁组织。同时发现肿瘤血管密度较高的肿瘤组织,其ANGPTL3表达也较高。研究表明ANGPTL3的表达与肿瘤血管生成呈正相关,表明其可能在促进HCC的发生、发展及转移过程中起着重要作用。

4 参考文献

- 1 Guruvayoorappan C. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther* 2008; 7: 90-95
- 2 Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, Kowalski J, Nagel M, Hass P, Xie MH, Gurney A, Bodary S, Liang XH, Clark K, Beresini M, Ferrara N, Gerber HP. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin $\alpha v\beta 3$ and induces blood vessel formation in vivo. *J Biol Chem* 2002; 277: 17281-17290
- 3 卫小红, 杜凤兰, 王鸿雁, 陆婉玲. 血管内皮生长因子与转化生长因子 β 在非小细胞肺癌的表达及其相关性. *西安交通大学学报(医学版)* 2003; 24: 43-46
- 4 Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2474-2484
- 5 Yance DR Jr, Sagar SM. Targeting angiogenesis with integrative cancer therapies. *Integr Cancer Ther* 2006; 5: 9-29
- 6 Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, Yamada S, Sugahara K, Rapraeger AC, Sanderson RD. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood* 2010; 115: 2449-2457
- 7 Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F, Ren GS. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 31
- 8 Chen JC, Uang BJ, Lyu PC, Chang JY, Liu KJ, Kuo CC, Hsieh HP, Wang HC, Cheng CS, Chang YH, Chang MD, Chang WS, Lin CC. Design and synthesis of alpha-ketoamides as cathepsin S inhibitors with potential applications against tumor invasion and angiogenesis. *J Med Chem* 2010; 53: 4545-4549
- 9 Manikandan P, Murugan RS, Priyadarsini RV, Vinodhini G, Nagini S. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life Sci* 2010; 86: 936-941
- 10 Blagosklonny MV. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell* 2004; 5: 13-17
- 11 Shi L, Chen XM, Wang L, Zhang L, Chen Z. Expression of caveolin-1 in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: correlation with vascular endothelial growth factor, microvessel density, and clinical outcome. *Cancer* 2007; 109: 1523-1531
- 12 宋其同, 单云峰, 周蒙滔, 张启瑜, 邹长林. 血管生成素样蛋白3的表达及其与肝细胞癌侵袭和生长的关系研究. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 450-452
- 13 宋其同, 单云峰, 周蒙滔, 施红旗, 张启瑜. 血管生成素样蛋白3在合并糖尿病肝癌中的表达. *肝胆胰外科杂志* 2006; 18: 230-231

■同行评价

本文创新性一般,对于肝癌的基础及临床研究具有一定的参考价值。

超声内镜联合EMR或ESD在异位胰腺诊断和治疗中的作用

周传文, 李倩君

■背景资料

异位胰腺是一种少见的,可发生于全消化系的疾病,甚至发生出血、溃疡、胰腺炎甚至发生癌变而危及到人类健康或生命。

周传文, 李倩君, 淮安市第一人民医院(南京医科大学附属淮安第一医院)消化科 江苏省淮安市 223300

作者贡献分布: 周传文参与了课题的设计、执行、统计和文章的书写; 李倩君参与了课题的执行和统计。

通讯作者: 周传文, 副主任医师, 223300, 江苏省淮安市, 江苏省淮安市淮阴区北京西路6号, 淮安市第一人民医院(南京医科大学附属淮安第一医院)消化科. zhou_cw1967@sina.cn

收稿日期: 2010-09-16 修回日期: 2010-10-21

接受日期: 2010-10-26 在线出版日期: 2010-11-18

Endoscopic ultrasound in combination with endoscopic mucosal resection/endoscopic submucosal dissection for diagnosis and treatment of heterotopic pancreas

Chuan-Wen Zhou, Qian-Jun Li

Chuan-Wen Zhou, Qian-Jun Li, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Huaian, Nanjing Medical University, Huaian 223300, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Chuan-Wen Zhou, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Huaian, Nanjing Medical University, Huaian 223300, Jiangsu Province, China. zhou_cw1967@sina.cn

Received: 2010-09-16 Revised: 2010-10-21

Accepted: 2010-10-26 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the use of endoscopic ultrasound in combination with endoscopic mucosal resection (EMR)/endoscopic submucosal dissection (ESD) for the diagnosis and treatment of heterotopic pancreas to improve the diagnosis of gastric heterotopic pancreas.

METHODS: The endoscopic and clinicopathologic data for 23 patients with suspected heterotopic pancreas who underwent EMR or ESD from September 2008 to February 2010 at our hospital were retrospectively analyzed. All tissue specimens underwent hematoxylin-eosin staining and observed by optical light microscopy.

RESULTS: Of all the 23 patients included, 19 underwent EMR and 4 underwent ESD; 13 were diagnosed with heterotopic pancreas by post-

operative pathological examination and 10 were misdiagnosed.

CONCLUSION: Endoscopic ultrasound in combination with EMR or ESD can improve the diagnosis of gastric heterotopic pancreas.

Key Words: Heterotopic pancreas; Endoscopic ultrasound; Endoscopic mucosal resection; Endoscopic submucosal dissection

Zhou CW, Li QJ. Endoscopic ultrasound in combination with endoscopic mucosal resection/endoscopic submucosal dissection for diagnosis and treatment of heterotopic pancreas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3476-3479

摘要

目的: 探讨超声内镜联合内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)或内镜下黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)在胃异位胰腺诊断和治疗中的作用,以提高胃异位胰腺的确诊率。

方法: 对2008-09/2010-02淮安市第一人民医院23例经超声胃镜检查拟诊为胃异位胰腺的病例进行回顾性分析,病例标本均经HE染色及光学显微镜检查。

结果: 23例病例中19例经EMR治疗,4例经ESD治疗。经病理组织学检查13例确诊为胃异位胰腺;误诊10例。23例病例中病灶体积最大的为24 mm×20 mm,体积最小的为5 mm×4 mm;经超声内镜证实23例中有7例起源于黏膜层,4例来源于肌层,12例起源于黏膜下层。

结论: 联合应用超声内镜学和EMR或ESD,可以提高胃异位胰腺的确诊率,同时EMR和ESD作为一种微创治疗方法,减轻了患者必须进行外科手术的痛苦并降低了医疗费用。

关键词: 异位胰腺; 超声内镜; 内镜下黏膜切除术; 内镜下黏膜剥离术

周传文, 李倩君. 超声内镜联合EMR或ESD在异位胰腺诊断和治疗中的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(32): 3476-3479
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3476.asp>

■同行评议者

韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

0 引言

异位胰腺又被称为迷走胰腺或胰腺异位, 指存在于正常胰腺位置以外的胰腺组织^[1], 多起源于胃肠道黏膜下层或肌层, 内镜检查结合病理组织活检往往能够确诊. 近年来随着内镜学的发展, 对胃肠道黏膜下病变, 包括异位胰腺的诊断明显增多. 临床上对异位胰腺的处理方法不尽相同, 本文即通过对23例拟诊胃异位胰腺的回顾性分析, 讨论超声内镜联合内镜下黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)或内镜下黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)在临床上诊断、治疗胃异位胰腺的应用.

1 材料和方法

1.1 材料 2007-09/2010-01在淮安市第一人民医院行超声内镜检查拟诊为胃异位胰腺的23例患者, 其中男14例, 女9例, 年龄14-79岁, 平均(55.2±12.6)岁. 临床表现: 腹部不适9例, 腹痛、腹胀8例, 反酸5例, 恶心、呕吐4例, 胃肠道出血2例, 2例患者无临床症状.

1.2 方法 纤维电子胃镜检查采用Olympus 260; EUS检查采Olympus GIF-UM 2000型电子超声内镜, 超声探头频率为12-20 MHz, 采用脱气水充盈法扫描. 记录病灶在纤维电子胃镜下的特点和病灶超声图像的起源层次及病灶回声特点. 超声内镜可以确定胃肠壁各层病变的来源和性质. 异位胰腺的细胞组成中可以有胰腺腺泡、胰岛细胞和导管, 各成分所占的比例在不同病例中有所不同, 导致不同病例的病灶在超声内镜下回声性质不同. 异位胰腺在超声内镜下的特点为边界不清的、形态不一、内部回声不一、可以有导管样结构的多数起源于黏膜下层或肌层的病变^[2]. 据此, 起源于肠壁任意一层的低回声、高回声或混合回声病灶, 病变内有不均匀的高回声点、导管状结构、或有微小液性囊肿, 病变中部有脐样凹陷等表现, 则符合异位胰腺的诊断, 并注意与间质瘤、脂肪瘤和血管瘤等病变鉴别. 病灶体积小于15 mm×15 mm者行EMR, 超过15 mm×15 mm者行ESD.

2 结果

23例中有19例采用了EMR术、4例采用了ESD术; 经病理组织学检查13例确诊为胃异位胰腺; 误诊10例中, 息肉3例, 间质瘤3例, 萎缩性胃炎2例, 上皮内瘤变1例, 腺癌1例. 23例病例中病灶体积最大的为24 mm×20 mm, 体积最小的为5 mm×4 mm; 经超声内镜证实23例中有7例起源

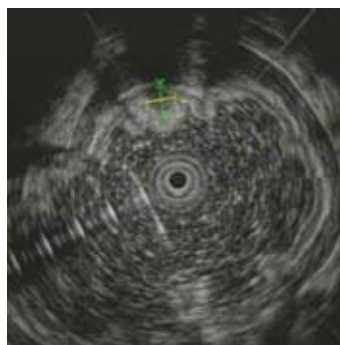


图1 在超声内镜下表现为低回声光团, 伴有不均匀高回声光点的异位胰腺病例.



图2 异位胰腺在纤维电子胃镜下表现为隆起样病灶.

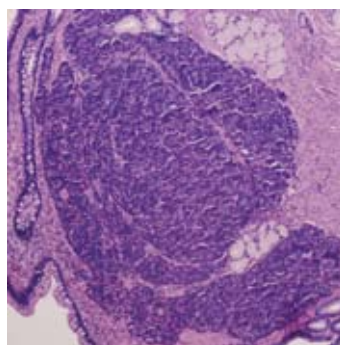


图3 起源于胃黏膜下层的异位胰腺.

于黏膜层(其中异位胰腺3例, 占42.86%, 在13例异位胰腺中占23.08%), 12例起源于黏膜下层(其中异位胰腺9例, 占75.00%, 在13例异位胰腺中占69.23%), 4例来源于肌层(其中异位胰腺1例, 占25%, 在13例异位胰腺中占7.69%). 23例病例回声结果: 低回声17例(其中异位胰腺10例, 在13例异位胰腺中占76.92%), 混合回声3例(其中异位胰腺2例, 在13例异位胰腺中占15.38%), 高回声3例(其中异位胰腺1例, 在13例异位胰腺中占7.69%)(图1-3, 表1).

3 讨论

异位胰腺是指一种少见的存在于正常胰腺位置以外的胰腺组织, 与正常胰腺组织无任何解剖和血管联系^[1], 可以发生于消化系的任何部位^[3], 更倾向发生在胃、十二指肠等上消化系. 首次于1927被发现于回肠憩室. 在尸检中异位胰腺的发病率为0.5%-13.7%, 更易发生于30-50岁的

■相关报道

Matsushita等认为异位胰腺在超声内镜下的特点为边界不清的、形态不一、内部回声不一、可以有导管样结构的多数起源于黏膜下层或肌层的病变.

同行评价

本文科学性较好, 为异位胰腺的诊断提供了新方法。

表 1 超声内镜特点和病理组织学检查结果

内镜下特点	n	异位胰腺(n = 13)	萎缩性胃炎(n = 2)	上皮内瘤变(n = 1)	息肉(n = 3)	间质瘤(n = 3)	腺癌(n = 1)
病变起源层次	23						
黏膜层	7	3	1	0	2	0	1
黏膜下层	12	9	0	1	0	2	0
黏膜肌层	4	1	0	1	0	2	0
回声特点	23						
低回声	17	10	2	1	1	2	1
高回声	3	1	0	0	1	1	0
混合回声	3	2	0	0	1	0	0

男性^[1]。

目前对异位胰腺的发生机制有几种不同的看法, 为大家普遍接受的一种机制是当胚胎时期正常的胰腺组织从原始肠基中的胰芽发展成形的过程中, 有部分胰芽残留在肠壁中, 残留下来的胰芽组织随着胃肠道的发展从而演变为异位胰腺组织^[4]; 另一种理论认为胚胎时期胰腺组织从内胚层演变的过程中, 有部分发育为胰腺组织的内胚层遗留在胃肠道黏膜下层, 从而发展为异位胰腺^[4]。

多数情况下, 异位胰腺是没有临床症状的, 但当并发炎症、出血、梗阻或发生恶性变时会出现与并发症相关的临床症状^[5]。Armstrong等^[6]认为病变>1.5 cm易出现临床症状。疼痛是异位胰腺较常见的一种症状, 目前认为疼痛产生的可能原因是异位胰腺组织的内、外分泌作用引起胃黏膜的炎症和化学刺激所致^[7]。在本次研究中, 13例经病理确诊为异位胰腺的患者中, 8例有腹痛; 而黏膜的糜烂和溃疡形成是导致胃出血的主要原因^[8], 本次研究中, 13例经病理确诊为异位胰腺的患者中, 1例有溃疡。

异位胰腺内镜下特点为: 隆起性病变, 形态大小不一, 表面覆盖绒毛样黏膜, 病变顶端可有脐样凹陷, 并有管样开口^[9]。超声内镜的发明为胃异位胰腺的诊断提供了大量有用的信息。Matsushita等^[2]认为异位胰腺在超声内镜下的特点为边界不清的、形态不一、内部回声不一、可以有导管样结构的多数起源于黏膜下层或肌层的病变。但即使根据典型的内镜或超声内镜下特点, 仍容易导致误诊; 本研究中, 23例拟诊的胃异位胰腺只有13例经病理组织检查所确诊。

目前公认的异位胰腺的病理诊断标准为Gaspar-Fuentes^[3]分类系统, 具体内容如下: I型: 像正常的胰腺组织一样, 在组织标本中发现胰腺腺泡、胰岛细胞和胰腺导管; II型: 组织标本

中只发现有胰腺导管; III型: 组织标本中只发现有具有外分泌功能的胰腺腺泡; IV型: 组织标本中只发现有具有内分泌功能的胰岛细胞。

本研究中, 所有患者都签署了术前知情同意书, 并进行了EMR或ESD手术。EMR或ESD可以为病理组织活检提供较为完整的病变组织, 避免常规组织检查中取材较浅或局限的问题, 且EMR或ESD作为一种治疗手段不仅可以达到治疗、减轻病痛的目的, 而且避免了患者进行外科手术治疗的痛苦和医疗费用。但对于病变较深不能进行EMR或ESD手术的拟诊异位胰腺患者, 伴有临床表现者, 亦进行外科手术^[7,10,11], 因为异位胰腺与胃肠道间质瘤、胃肠道自主神经瘤、良性肿瘤及淋巴瘤等在影像学检查下易混淆^[12,13]且异位胰腺本身可恶变为异位胰腺癌及异位胰岛细胞癌^[14,15]。

总之, 虽然异位胰腺的发病率较低, 但在临床中遇到有胃肠道黏膜或黏膜下病变时, 应将异位胰腺作为一个鉴别诊断考虑。尽管我们的医学检查技术在不断的提高, 但对异位胰腺的诊断还存在大量的挑战。

参考文献

- Mulholland KC, Wallace WD, Epanomeritakis E, Hall SR. Pseudocyst formation in gastric ectopic pancreas. *JOP* 2004; 5: 498-501
- Matsushita M, Hajiro K, Okazaki K, Takakuwa H. Gastric aberrant pancreas: EUS analysis in comparison with the histology. *Gastrointest Endosc* 1999; 49: 493-497
- Christodoulidis G, Zacharoulis D, Barbanis S, Katsogridakis E, Hatzitheofilou K. Heterotopic pancreas in the stomach: a case report and literature review. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6098-6100
- Chandan VS, Wang W. Pancreatic heterotopia in the gastric antrum. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 111-112
- Rimal D, Thapa SR, Munasinghe N, Chitre VV. Symptomatic gastric heterotopic pancreas: clinical presentation and review of the literature. *Int J Surg*

- 2008; 6: e52-e54
- 6 Armstrong CP, King PM, Dixon JM, Macleod IB. The clinical significance of heterotopic pancreas in the gastrointestinal tract. *Br J Surg* 1981; 68: 384-387
- 7 Ormarsson OT, Gudmundsdottir I, Márvik R. Diagnosis and treatment of gastric heterotopic pancreas. *World J Surg* 2006; 30: 1682-1689
- 8 Canbaz H, Colak T, Düşmez Apa D, Sezgin O, Aydin S. An unusual cause of acute abdomen: mesenteric heterotopic pancreatitis causing confusion in clinical diagnosis. *Turk J Gastroenterol* 2009; 20: 142-145
- 9 Hsia CY, Wu CW, Lui WY. Heterotopic pancreas: a difficult diagnosis. *J Clin Gastroenterol* 1999; 28: 144-147
- 10 Ayantunde AA, Pinder E, Heath DI. Symptomatic pyloric pancreatic heterotopia: report of three cases and review of the literature. *Med Sci Monit* 2006; 12: CS49-CS52
- 11 Erkan N, Vardar E, Vardar R. Heterotopic pancreas: report of two cases. *JOP* 2007; 8: 588-591
- 12 Yuan Z, Chen J, Zheng Q, Huang XY, Yang Z, Tang J. Heterotopic pancreas in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3701-3703
- 13 Jiang LX, Xu J, Wang XW, Zhou FR, Gao W, Yu GH, Lv ZC, Zheng HT. Gastric outlet obstruction caused by heterotopic pancreas: A case report and a quick review. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6757-6759
- 14 Eisenberger CF, Gocht A, Knoefel WT, Busch CB, Peiper M, Kutup A, Yekebas EF, Hosch SB, Lambrecht W, Izbicki JR. Heterotopic pancreas--clinical presentation and pathology with review of the literature. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 854-858
- 15 Inoue Y, Hayashi M, Arisaka Y, Higuchi K, Egashira Y, Tanigawa N. Adenocarcinoma arising in a heterotopic pancreas (Heinrich type III): a case report. *J Med Case Reports* 2010; 4: 39

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种。本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

急性胰腺炎患者sICAM-1、TNF- α 和D-二聚体水平与病情严重程度的关系

李春燕, 雍桂珍, 冯迎春, 贺国斌, 向军英, 明文

■背景资料

急性胰腺炎(AP)是消化系统常见的急腹症之一,重症急性胰腺炎(SAP)病情危重,可并发全身炎症反应综合征(SIRS),最终发展为多器官功能衰竭,其病死率为20%-30%,有并发症者病死率可高达47%,准确诊断疾病的严重程度有助于患者及时治疗 and 临床监测。

李春燕, 雍桂珍, 冯迎春, 贺国斌, 向军英, 明文, 川北医学院附属医院消化内科 四川省南充市 637000

四川省教育厅课题基金资助项目, No. 2004A082

作者贡献分布: 此课题由贺国斌与冯迎春共同设计; 实验操作由李春燕、向军英及明文完成; 论文写作由李春燕完成; 贺国斌与雍桂珍指导与审校。

通讯作者: 贺国斌, 教授, 硕士生导师, 637000, 四川省南充市, 川北医学院附属医院消化内科. heguobin@tom.com
电话: 0817-2262407

收稿日期: 2010-07-26 修回日期: 2010-08-30

接受日期: 2010-09-07 在线出版日期: 2010-11-18

Relationship of plasma levels of sICAM-1, TNF- α and D-dimer with disease severity in patients with acute pancreatitis

Chun-Yan Li, Gui-Zhen Yong, Ying-Chun Feng, Guo-Bin He, Jun-Ying Xiang, Wen Ming

Chun-Yan Li, Gui-Zhen Yong, Ying-Chun Feng, Guo-Bin He, Jun-Ying Xiang, Wen Ming, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China

Supported by: the Foundation of Education Department of Sichuan Province, No. 2004A082

Correspondence to: Professor Guo-Bin He, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan Province, China. heguobin@tom.com

Received: 2010-07-26 Revised: 2010-08-30

Accepted: 2010-09-07 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship of plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and D-dimer with disease severity in patients with acute pancreatitis (AP).

METHODS: Thirty-four patients with severe acute pancreatitis (SAP), 22 patients with mild acute pancreatitis (MAP), 36 patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS), 20 patients with non-SIRS diseases, and 24 healthy volunteers were evaluated in this study. Plasma concentrations of sICAM-1, TNF- α and D-dimer were measured by ELISA. The data

obtained were subjected to one-way ANOVA, Pearson correlation and ROC curve analyses.

RESULTS: There were significant differences in plasma sICAM-1 and D-dimer levels between SAP and MAP patients ($740.18 \mu\text{g/L} \pm 649.54 \mu\text{g/L}$ vs $481.18 \mu\text{g/L} \pm 306.50 \mu\text{g/L}$; $0.90 \text{ mg/L} \pm 0.20 \text{ mg/L}$ vs $0.69 \text{ mg/L} \pm 0.19 \text{ mg/L}$, both $P < 0.05$). Significant difference was also noted in plasma TNF- α level between AP patients and healthy controls though there was no significant difference in plasma TNF- α level between SAP and MAP patients. Compared with the non-SIRS group, the plasma concentrations of sICAM-1, TNF- α and D-dimer were significantly higher in the SIRS group ($741.17 \mu\text{g/L} \pm 592.95 \mu\text{g/L}$ vs $479.65 \mu\text{g/L} \pm 451.21 \mu\text{g/L}$; $17.82 \mu\text{g/L} \pm 13.84 \mu\text{g/L}$ vs $12.09 \mu\text{g/L} \pm 3.99 \mu\text{g/L}$; $0.90 \text{ mg/L} \pm 0.17 \text{ mg/L}$ vs $0.69 \text{ mg/L} \pm 0.23 \text{ mg/L}$, all $P < 0.05$). Plasma sICAM-1 level was related to D-dimer level in both MAP ($r = 0.738$, $P < 0.01$) and SAP patients ($r = 0.452$, $P < 0.01$). Plasma TNF- α level was not correlated with D-dimer level ($r = 0.110$, $P = 0.420$). D-dimer had larger area under the ROC curve in diagnosing SAP.

CONCLUSION: Plasma sICAM-1 and D-dimer concentrations increase greatly in SAP patients. Highly elevated plasma sICAM-1 or D-dimer levels may help identify SAP.

Key Words: Pancreatitis; Soluble intercellular adhesion molecule-1; Tumor necrosis factor- α ; D-dimer; Systemic inflammatory response syndrome

Li CY, Yong GZ, Feng YC, He GB, Xiang JY, Ming W. Relationship of plasma levels of sICAM-1, TNF- α and D-dimer with disease severity in patients with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3480-3484

摘要

目的: 探讨急性胰腺炎(AP)患者血浆sICAM-1、TNF- α 、D-二聚体水平以及与疾病严重程度的关系。

■同行评议者

谷俊朝, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科

方法: 收集轻型胰腺炎组(MAP)22例及重症胰腺炎组(SAP)34例, 全身炎症反应综合征(SIRS)组36例与非SIRS组20例, 正常对照24例. 应用ELISA检测患者血浆中sICAM-1、TNF- α 和D-二聚体水平, 结果用方差分析, Pearson相关分析和ROC曲线分析.

结果: SAP组血浆中sICAM-1、D-二聚体浓度明显高于MAP组($740.18 \mu\text{g/L} \pm 649.54 \mu\text{g/L}$ vs $481.18 \mu\text{g/L} \pm 306.50 \mu\text{g/L}$; $0.90 \text{ mg/L} \pm 0.20 \text{ mg/L}$ vs $0.69 \text{ mg/L} \pm 0.19 \text{ mg/L}$, 均 $P < 0.05$). TNF- α 浓度高于对照组, MAP组与SAP组比较无显著性差异. SIRS组患者血浆中sICAM-1、TNF- α 、D-二聚体浓度明显高于非SIRS组($741.17 \mu\text{g/L} \pm 592.95 \mu\text{g/L}$ vs $479.65 \mu\text{g/L} \pm 451.21 \mu\text{g/L}$; $17.82 \mu\text{g/L} \pm 13.84 \mu\text{g/L}$ vs $12.09 \mu\text{g/L} \pm 3.99 \mu\text{g/L}$; $0.90 \text{ mg/L} \pm 0.17 \text{ mg/L}$ vs $0.69 \text{ mg/L} \pm 0.23 \text{ mg/L}$, 均 $P < 0.05$). MAP、SAP的sICAM-1与D-二聚体相关分别为($r = 0.738$, $r = 0.452$; 均 $P < 0.01$). TNF- α 与D-二聚体无相关($r = 0.110$; $P = 0.420$), ROC曲线显示D-二聚体诊断SAP曲线下面积更大.

结论: sICAM-1和D-二聚体在SAP升高更明显. sICAM-1、D-二聚体明显升高提示SAP诊断, 在SAP患者D-二聚体升高提示治疗应防治血栓形成.

关键词: 胰腺炎; 可溶性细胞间黏附分子; 肿瘤坏死因子- α ; D-二聚体; 全身炎症反应综合征

李春燕, 雍桂珍, 冯迎春, 贺国斌, 向军英, 明文. 急性胰腺炎患者sICAM-1、TNF- α 和D-二聚体水平与病情严重程度的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3480-3484
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3480.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是消化系统常见急腹症之一, 分为轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)和重症急性胰腺炎(SAP). SAP是AP中病情危重, 可并发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 最终发展为多器官功能衰竭, 其病死率为20%-30%, 有并发症者可高达47%^[1], 准确诊断疾病的严重程度有助于患者及时治疗和临床监测. Kaufmann等^[2]报道AP患者血中可溶性黏附分子(soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1)升高的程度及方式与AP严重程度密切相关, 并可作为区分坏死性胰腺炎与非坏死性胰腺炎的标准. sICAM-1水平在临床上检测较少. D-二聚体为临床中常见检测指标, D-二聚体升

高提示形成血栓或微血栓, 可反应胰腺微循环障碍. 本文通过检测患者血浆sICAM-1、TNF- α 和D-二聚体浓度在MAP和SAP的差异, 分析sICAM-1、TNF- α 是否与D-二聚体相关以及D-二聚体变化是否可提示sICAM-1变化, 这些有助于提示SAP患者诊断分型与治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 所有病例均为川北医学院附属医院2007-03/2010-05住院的AP患者, 参照2004年中华医学会消化病学分会胰腺病学组制定的中国急性胰腺炎诊治指南(草案)^[1]收集56例AP患者, 其中MAP组22例及SAP组34例. MAP组男18例, 女4例, 年龄33-70(平均48)岁; SAP组34例, 其中男16例, 女18例, 年龄20-79(平均51)岁. SIRS是指任何致病因素作用于机体所引起的全身炎症反应, 并且具备以下两项或两项以上体征^[3]: 体温 $>38^\circ\text{C}$ 或 $<36^\circ\text{C}$; 心率 >90 次/分; 呼吸频率 >20 次/min或 $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$; 外周血白细胞计数 $>12 \times 10^9$ 或 $<4 \times 10^9$, 或未成熟粒细胞 $>10\%$; 据此将56例AP患者再分为SIRS组与非SIRS组, SIRS组36例, 其中男20例, 女16例, 年龄41-79(平均58)岁; 非SIRS组20例, 其中男12例, 女8例, 年龄20-63(平均44)岁. 选取健康志愿者24名作为对照组, 其中男11例, 女13例, 年龄20-75岁(平均50)岁, 均排除心、肝、肾、恶性肿瘤等器质性疾病. sICAM-1试剂盒、TNF- α 试剂盒购自武汉博士德生物有限公司, D-二聚体试剂盒购自上海太阳生物技术公司.

1.2 方法 所有患者于入院72 h时空腹抽取静脉血3 mL, 肝素抗凝, 离心后取血浆冻于 -80°C 冰箱保存备用, 采用ELISA测定血浆中sICAM-1、TNF- α 和D-二聚体水平. 样本稀释倍数分别为500倍、不稀释和10倍, 所有检测均严格按说明书进行.

统计学处理 数据由SPSS13.0统计软件包完成, 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 方差分析各组之间差异, 各组之间差异用LSD方法. 各变量相关分析用Pearson方法. ROC曲线分析诊断SAP的敏感性. 双侧检验, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 sICAM-1、TNF- α 与D-二聚体在MAP组、SAP组水平比较 AP患者重症组血浆中sICAM-1、D-二聚体浓度高于轻型组血中浓度(均 $P < 0.05$, 表1). AP组TNF- α 浓度高于对照组, 但MAP组与SAP组比较无显著性差异. D-二聚体最

■ 相关报道

Kaufmann等认为AP患者血中sICAM-1升高的程度及方式与AP严重程度密切相关, 并可作为区分坏死性胰腺炎与非坏死性胰腺炎的标准. D-二聚体水平升高提示已有凝血激活后形成血栓或微血栓, 反应了胰腺微循环障碍. AP患者D-二聚体水平升高说明了体内存在凝血和纤溶激活, SAP患者则可能进展为“DIC前状态”, 甚至DIC.

■应用要点

sICAM-1和D-二聚体浓度升高与AP的严重程度有关。在SAP中D-二聚体水平明显升高,治疗应考虑防治凝血系统激活。进一步研究sICAM-1与D-二聚体相关,D-二聚体为临床中常见的检测指标,诊断SAP可能比sICAM-1更敏感,D-二聚体水平明显升高提示为SAP。

表 1 MAP组、SAP组血浆中sICAM-1、TNF- α 和D-二聚体浓度比较 (mean $\pm$ SD)

分组	n	sICAM-1(μ g/L)	TNF- α (μ g/L)	D-二聚体(mg/L)
对照组	24	192.51 $\pm$ 76.97	12.73 $\pm$ 4.96	0.44 $\pm$ 0.089
MAP	22	481.18 $\pm$ 306.50 ^a	15.04 $\pm$ 5.58	0.69 $\pm$ 0.19 ^b
SAP	34	740.18 $\pm$ 649.54 ^{bc}	15.92 $\pm$ 13.96	0.90 $\pm$ 0.20 ^{bd}

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 对照组; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs MAP组。

表 2 SIRS组、非SIRS组血浆中的sICAM-1、TNF- α 和D-二聚体浓度比较 (mean $\pm$ SD)

分组	n	sICAM-1(μ g/L)	TNF- α (μ g/L)	D-二聚体(mg/L)
对照组	24	192.51 $\pm$ 77.00	12.73 $\pm$ 4.96	0.44 $\pm$ 0.09
非SIRS	20	479.65 $\pm$ 451.21 ^a	12.09 $\pm$ 3.99	0.69 $\pm$ 0.23 ^b
SIRS	36	741.17 $\pm$ 592.95 ^{bc}	17.82 $\pm$ 13.84 ^c	0.90 $\pm$ 0.17 ^{bd}

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 对照组; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs 非SIRS组。

高值3.11 mg/L,其中SAP组D-二聚体浓度88.2%高于正常值(<0.5 mg/L)1.8倍(SAP均值0.9 mg/L),41.2%高于正常值2倍,MAP组D-二聚体浓度72.7%高于正常值1.8倍,4.5%高于正常值2倍。

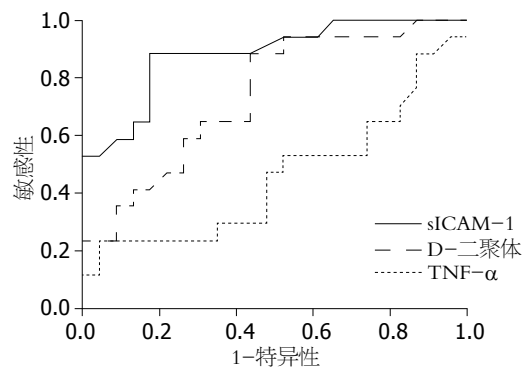
2.2 sICAM-1、TNF- α 与D-二聚体的相关性分析 sICAM-1与D-二聚体相关,AP总的sICAM-1与D-二聚体关系($r = 0.533$, $P < 0.01$),MAP、SAP的sICAM-1与D-二聚体关系分别($r = 0.738$, $P < 0.01$, $r = 0.452$, $P < 0.01$)。TNF- α 与D-二聚体无相关($r = 0.110$; $P = 0.420$)。

2.3 sICAM-1、TNF- α 与D-二聚体在非SIRS组与SIRS组水平比较 AP并发SIRS组患者血浆中sICAM-1、TNF- α 、D-二聚体浓度明显高于非SIRS组患者血浆中浓度(均 $P < 0.05$,表2)。

2.4 sICAM-1、TNF- α 与D-二聚体诊断SAP的ROC曲线 ROC的曲线显示D-二聚体诊断SAP更敏感;D-二聚体、sICAM-1、TNF- α 诊断SAP的ROC的曲线下面积分别为0.882、0.739、0.458(图1)。

3 讨论

ICAM-1属于免疫球蛋白分子超家族成员,是一种细胞表面跨膜糖蛋白,通过介导细胞间和细胞外基质间的黏附,参与多种炎症反应和免疫过程。白细胞主要是中性粒细胞自循环血液中游出并在炎症区域聚集,是AP时胰腺损伤及导致的中心环节。sICAM-1在介导中性粒细胞稳定黏附和穿越内皮细胞向炎症区游出中起关键作用^[2],李荣洲等^[4]报告MAP和SAP患者在入院第1天血清中的sICAM-1浓度无明显差异,而入院第

图 1 sICAM-1、TNF- α 、D-二聚体诊断SAP的ROC曲线。

3、5天SAP患者血清中的sICAM-1浓度明显高于MAP患者。Kaufmann等^[2]报告AP患者血中sICAM-1升高的程度及方式与AP严重程度密切相关,并可作为区分坏死性胰腺炎与非坏死性胰腺炎的标准。但Pezzilli等^[5]对15例AP患者的研究发现SAP患者血浆sICAM-1浓度与MAP血浆中sICAM-1浓度比较无显著性差异。此外sICAM-1水平在临床上检测较少,D-二聚体为临床中常见检测指标,因此本研究检测sICAM-1水平及进一步分析是否与D-二聚体相关,了解D-二聚体变化是否可提示sICAM-1变化。本研究发现第3天,SAP组血浆中sICAM-1水平明显高于MAP组,支持sICAM-1血浆水平与病情轻重有关,且sICAM-1与D-二聚体相关,D-二聚体变化也可能提示sICAM-1变化。

TNF- α 主要由活化的单核巨噬细胞产生,可以促进炎症区域白细胞的积聚和激活,激活的白细胞在其作用下又可释放如血小板活化因

子, 白三烯B₄、一氧化氮、血栓A₂、前列腺素、氧自由基等增强毛细血管通透性的细胞介质。TNF- α 对血管内皮的黏附分子如sICAM-1有上调作用, 黏附分子的上调又可促进白细胞的黏附和收缩, 造成毛细血管渗漏和组织损害^[6,7]。研究表明, 血清TNF- α 参与AP早期炎症的发生和发展, 并与病情的严重程度相关^[8-13]。本文34例SAP血浆中的TNF- α 的含量表达高于MAP组, 虽无统计意义, 但提示了TNF- α 与AP病情轻重的有关, 炎症介质在重症化过程中发挥重要作用。我们进一步研究TNF- α 与D-二聚体无明显相关, D-二聚体变化提示TNF- α 的变化有限。

AP时, 渗出可导致血液浓缩, 致血液黏滞度增加。加上大量炎性介质的释放, 血管内皮细胞受损, 血小板聚集, 导致AP患者尤其是SAP患者血液常处于高凝状态, 消耗凝血因子, 增加纤维蛋白降解产物的生成。D-二聚体是交联纤维蛋白被纤酶水解后形成的一种特异性降解产物, 是纤维蛋白降解产物中的最小片段^[14,15]。D-二聚体水平升高提示已有凝血激活后形成血栓或微血栓, 反应了胰腺微循环障碍。AP患者D-二聚体水平升高说明了体内存在凝血和纤溶激活, SAP患者则可能进展为“弥漫性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)前状态”, 甚至DIC^[16-18]。D-二聚体也可促进局部炎症细胞合成并释放某些细胞因子^[16,19]。最近Radenkovic等^[20]报道: AP患者入院时血浆中D-二聚体水平是预测其发展成多器官功能衰竭新的、准确的方法。本研究中也显示SAP患者D-二聚体浓度明显高于MAP患者, SAP患者最高浓度高于正常值6倍, 与文献报道基本一致^[15,16,21]。D-二聚体升高可反应病情严重程度, 同时提示胰腺微循环障碍, 有血栓或微血栓形成, 治疗应预防凝血系统激活形成微血栓或血栓。进一步研究表明MAP组D-二聚体浓度高于正常值1.8倍(SAP均值0.9 mg/L)少见。ROC曲线提示D-二聚体诊断SAP比sICAM-1更敏感。

AP不仅仅是局限于胰腺和胰周组织的炎症, 他常常出现严重的并发症如SIRS^[19]。SIRS时, 产生并释放大细胞因子如TNF- α , 广泛作用于微血管系统, 促进组织因子表达并激活外源性凝血途径, 加上内皮细胞黏附分子、细胞间黏附分子的表达, 造成微循环血栓形成及组织损伤^[22]。国内陈兵等^[23]报道, SIRS期2 h内TNF- α 明显升高达峰值, 而后下降, 于12 h再次逐渐升高, 24 h达峰值。张芝晶等^[24]报道, SIRS患者和非

SIRS患者各例相比较, SIRS组的血浆D-二聚体显著高于非SIRS组。本研究中也显示SIRS组血浆TNF- α 、sICAM-1、D-二聚体高于非SIRS组, 与文献一致^[22-24]。

总之, 我们研究发现, AP患者血浆D-二聚体、sICAM-1水平在SAP组和SIRS组高于MAP组和非SIRS组, 这些表明sICAM-1和D-二聚体浓度升高与AP的严重程度有关。在SAP中D-二聚体水平升高提示治疗应考虑防治凝血系统激活。研究sICAM-1与D-二聚体相关, D-二聚体为临床中常见检测指标, 提示诊断SAP可能比sICAM-1更敏感, D-二聚体水平明显升高提示为SAP。

4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). 中华内科杂志 2004; 43: 236-238
- 2 Kaufmann P, Demel U, Tilz GP, Krejs GJ. Time course of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) is related to severity of acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 2565-2571
- 3 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874
- 4 李荣洲, 任宗海, 林诵, 蔡积武. 急性胰腺炎患者血清ICAM-1、TNF- α 和P选择素浓度与病情严重程度的关系. *胰腺病学* 2005; 5: 170-171
- 5 Pezzilli R, Corsi MM, Barassi A, Morselli-Labate AM, D'Alessandro A, Dogliotti G, Fantini L, Malesci A, Corinaldesi R, Melzi d'Eril G. Serum adhesion molecules in acute pancreatitis: time course and early assessment of disease severity. *Pancreas* 2008; 37: 36-41
- 6 Yadav D, Agarwal N, Pitchumoni CS. A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1309-1318
- 7 Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. Cytokine modulation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 195-203
- 8 王彩花, 钱可大, 朱永良, 唐训球. 急性胰腺炎患者TNF和IL-6变化意义. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 1434
- 9 Papachristou GI. Prediction of severe acute pancreatitis: current knowledge and novel insights. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6273-6275
- 10 毛恩强, 汤耀卿, 张圣道, 刘伟, 武钧, 瞿洪平, 雷若庆. 重症胰腺炎感染期TNF- α 的变化及对器官功能的影响. *中华肝胆外科杂志* 2002; 8: 97-99
- 11 张晓云, 汪东剑, 余维涛. 血清IL-6、IL-8和TNF- α 在重症急性胰腺炎早期诊断中的临床意义. *胰腺病学* 2004; 4: 26-28
- 12 Sandberg AA, Borgström A. Early prediction of severity in acute pancreatitis. Is this possible? *JOP* 2002; 3: 116-125
- 13 Panek J, Karcz D, Pieton R, Zasada J, Tusinski M, Dolecki M, Winiarski M. Blood serum levels of pro-inflammatory cytokines in patients with different degrees of biliary pancreatitis. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 645-648
- 14 周永列, 刘建栋. D二聚体的测定及其临床意义. 国外

■同行评价

本文科学性一般, 具有一定的临床实用价值, 为急性胰腺炎的诊断提供参考。

- 医学·临床生物化学与检验学分册 1996; 17: 4-7
- 15 孔浩, 丁震, 朱先超, 高晓阳, 孙圣斌, 吴杰, 赵刚, 王春友, 侯晓华. 急性胰腺炎患者血浆D-二聚体变化与病情相关性研究. 中华内科杂志 2007; 46: 1011-1013
- 16 Salomone T, Tosi P, Palareti G, Tomassetti P, Migliori M, Guariento A, Saieva C, Raiti C, Romboli M, Gullo L. Coagulative disorders in human acute pancreatitis: role for the D-dimer. *Pancreas* 2003; 26: 111-116
- 17 Maeda K, Hirota M, Ichihara A, Ohmuraya M, Hashimoto D, Sugita H, Takamori H, Kanemitsu K, Baba H. Applicability of disseminated intravascular coagulation parameters in the assessment of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; 32: 87-92
- 18 Agarwal N, Pitchumoni CS. Acute pancreatitis: a multisystem disease. *Gastroenterologist* 1993; 1: 115-128
- 19 Radenković D, Bajec D, Karamarkovic A, Stefanovic B, Milic N, Ignjatović S, Gregoric P, Milicevic M. Disorders of hemostasis during the surgical management of severe necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2004; 29: 152-156
- 20 Radenkovic D, Bajec D, Ivancevic N, Milic N, Bumbasirevic V, Jeremic V, Djukic V, Stefanovic B, Stefanovic B, Milosevic-Zbutega G, Gregoric P. D-dimer in acute pancreatitis: a new approach for an early assessment of organ failure. *Pancreas* 2009; 38: 655-660
- 21 王常会, 王庆才, 胡月华, 张璐, 李磊. 血浆D-二聚体及三酰甘油水平对急性胰腺炎的评估价值. 中华胰腺病杂志 2009; 9: 277-278
- 22 Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112: 321S-329S
- 23 陈兵, 王洪霞, 刘健, 吴胜群, 马树林, 闫素英. 危重病患者SIRS早期细胞因子水平动态变化的研究. 中国急救医学 2001; 21: 707
- 24 张芝晶, 胡叶, 李洪芳. 老年全身炎症反应综合征患者血清D-二聚体和C反应蛋白检测的意义. 中国急救医学 2007; 27: 501-503

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》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

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

机械性肠梗阻的术前诊断127例

王宁, 范建鹏, 郭仁宣, 郭克建

王宁, 范建鹏, 郭仁宣, 郭克建, 中国医科大学附属第一医院
普通外科教研室胃肠胰外科 辽宁省沈阳市 110001

辽宁省教育厅一般基金资助项目, No. L2010600

作者贡献分布: 此课题由王宁、范建鹏、郭仁宣及郭克建共同
设计; 病例数据由王宁与范建鹏收集、分析; 本文撰写由王宁完
成、郭仁宣及郭克建修改。

通讯作者: 王宁, 副教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学
附属第一医院普通外科教研室胃肠胰外科. wn232@hotmail.com

收稿日期: 2010-07-19 修回日期: 2010-09-18

接受日期: 2010-09-27 在线出版日期: 2010-11-18

Preoperative diagnosis of mechanical intestinal obstruction: analysis of 127 cases

Ning Wang, Jian-Peng Fan, Ren-Xuan Guo,
Ke-Jian Guo

Ning Wang, Jian-Peng Fan, Ren-Xuan Guo, Ke-Jian
Guo, Department of General Surgery, the First Hospital
of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning
Province, China

Supported by: the Foundation of Department of Education
of Liaoning Province, No. L2010600

Correspondence to: Associate Professor Ning Wang,
Department of General Surgery, the First Hospital of China
Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province,
China. wn232@hotmail.com

Received: 2010-07-19 Revised: 2010-09-18

Accepted: 2010-09-27 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To improve the preoperative diagnosis of
mechanical intestinal obstruction.

METHODS: The clinical data for 127 patients
with mechanical intestinal obstruction confirmed
by laparotomy and pathological examination
were retrospectively analyzed. The diagnostic
value of abdominal plain film, ultrasonography
and CT in assessing the presence of intestinal
obstruction and strangulation or not, obstruction
site and etiology was comparatively analyzed.

RESULTS: The accuracy of CT in assessing the
presence of intestinal obstruction, obstruction
site and etiology were 97.4%, 98.7% and 75.6%,
respectively, significantly higher than that of
abdominal plain film and ultrasonography (all
 $P < 0.05$). The incidence of free fluid detected

by ultrasonography was significantly higher in
patients with strangulated intestinal obstruc-
tion than in those with non-strangulated disease
(87.1% vs 45.2%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: CT has higher diagnostic ac-
curacy than abdominal plain film and ultraso-
nography in assessing the presence of intestinal
obstruction or not, obstruction site and etiology.
When free fluid is detected by ultrasonography
in patients with small bowel obstruction, stran-
gulation should be considered.

Key Words: Intestinal obstruction; Diagnosis; CT;
Ultrasonography; X-ray

Wang N, Fan JP, Guo RX, Guo KJ. Preoperative diagnosis
of mechanical intestinal obstruction: analysis of 127 cases.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(32): 3485-3488

摘要

目的: 提高机械性肠梗阻术前诊断水平。

方法: 回顾性分析经手术探查和病理证实的
机械性肠梗阻共127例。比较腹部平片、超声
和CT对是否存在肠梗阻, 梗阻部位、原因及
是否存在绞窄的诊断价值。

结果: CT对是否存在肠梗阻, 梗阻部位和原
因诊断符合率(97.4%, 98.7%, 75.6%)显著优
于腹部平片和超声($P < 0.05$)。绞窄性小肠梗阻
时超声发现腹腔积液几率显著高于无绞窄者
(87.1% vs 45.2%, $P < 0.05$)。

结论: CT对是否存在肠梗阻, 梗阻部位和原
因的诊断符合率最高。小肠梗阻中超声发现腹腔
积液应考虑有绞窄的可能。

关键词: 肠梗阻; 诊断; CT; 超声; X线

王宁, 范建鹏, 郭仁宣, 郭克建. 机械性肠梗阻的术前诊断127
例. 世界华人消化杂志 2010; 18(32): 3485-3488
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3485.asp>

0 引言

机械性肠梗阻为普通外科常见急腹症之一。尽

■背景资料

肠梗阻起病急、
变化快, 是临床
上常见的急腹症,
临床医生面对着
患者常常迫切地
需要了解有无梗
阻, 梗阻部位, 梗
阻的原因以及有
无闭袢形成或绞
窄等情况。

■同行评议者

张俊, 副教授, 上
海交通大学医学
院附属瑞金医院
外科

■研发前沿

为机械性肠梗阻提供更详尽可靠的术前诊断信息是肠梗阻诊断方面的研究重点。小肠梗阻,尤其是粘连性的小肠梗阻,如何能在肠坏死前准确地预测绞窄的存在是亟待解决的问题。

管目前对其诊断和治疗水平有明显提高,但死亡率仍然高达5%-10%,绞窄性肠梗阻死亡率甚至高达10%-30%^[1]。为能做到早期诊断、及时治疗,我们对127例机械性肠梗阻回顾分析如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-04/2008-10中国医科大学附属第一医院收治的经手术探查和病理证实的机械性肠梗阻共127例。其中小肠梗阻(small bowel obstruction, SBO)62例,男30例,女32例,年龄20-92(平均55.6)岁;大肠梗阻(large bowel obstruction, LBO)65例,男39例,女26例,年龄26-82(平均61.35)岁。对以上病历资料进行回顾性分析。病因分析中无论何种原因引起套叠者,病因归为套叠。原发肿瘤和肿瘤术后复发、转移者,病因均归为肿瘤。

1.2 方法 腹部立位平片全部为DR摄像,CT均为16排以上多层螺旋CT,超声检查为高分辨彩色二维超声。小肠扩张直径 $>2.5\text{ cm}$ ^[1-3],结肠扩张直径 $>6.0\text{ cm}$ ^[1,3]者认为有肠梗阻存在。术前多次行腹部立位平片检查确诊肠梗阻者,按诊断肠梗阻计算。以上检查均经两名主治医师以上确诊。

统计学处理 诊断符合率的比较用 χ^2 或Fisher's Exact检验, $P<0.05$ 认为有显著的统计学差异。

2 结果

2.1 病因 SBO主要病因中粘连占53.2%(33/62),肿瘤占17.7%(11/62)和疝11.3%(7/62),还有套叠所致4例,粪石3例,炎症性疾病2例(其中结核1例),肠扭转1例,不明原因1例。而LBO中结直肠癌占87.7%(57/65),乙状结肠扭转,结直肠手术后吻合口炎性狭窄各占3.1%(2/65),外伤、结肠脾曲综合征、粪石、子宫肌瘤外压所致各1例。粘连所致SBO中90.9%(30/33)既往曾行剖腹手术,60.6%(20/33)为粘连索带卡压引起梗阻。结直肠癌所致LBO中17.5%(10/57)位于盲、升结肠,12.3%(7/57)位于结肠肝曲,12.3%(7/57)位于横结肠,15.8%(9/57)位于降结肠,29.8%(17/57)位于乙状结肠,12.3%(7/57)位于直肠。

2.2 腹部立位平片 SBO中58例术前行腹部立位平片检查,69.0%(40/58)诊断肠梗阻,其中包括12.1%(7/58)初次检查未确诊,复查时诊断肠梗阻。22.4%(13/58)疑似肠梗阻,8.6%(5/58)未见异常。LBO中56例术前行腹部立位平片检查,76.8%(43/56)诊断肠梗阻,其中包括3.6%(2/56)初次检查未确诊,复查时诊断肠梗阻。21.4%(12/56)

表 1 CT诊断肠梗阻的符合率 %/n

	有无梗阻	梗阻部位	病因诊断
小肠梗阻			
粘连	100.0(14/14)	100.0(14/14)	14.37(2/14)
肿瘤	100.0(9/9)	100.0(9/9)	88.9(8/9)
疝	100.0(4/4)	100.0(4/4)	100.0(4/4)
套叠	100.0(2/2)	100.0(2/2)	50.0(1/2)
粪石	100.0(2/2)	100.0(2/2)	100.0(2/2)
炎症疾病	100.0(2/2)	100.0(2/2)	50.0(1/2)
不明	100.0(1/1)	100.0(1/1)	100.0(1/1) ¹
大肠梗阻			
结直肠癌	94.9(37/39)	100.0(39/39)	97.4(38/39)
吻合口狭窄	100.0(1/1)	0.0(0/1)	0.0(0/1)
外伤	100.0(1/1)	100.0(1/1)	100.0(1/1)
结肠脾曲	100.0(1/1)	100.0(1/1)	0.0(0/1)
综合征			
粪石	100.0(1/1)	100.0(1/1)	0.0(0/1)
子宫肌瘤	100.0(1/1)	100.0(1/1)	100.0(1/1)
平均	97.4(76/78)	98.7(77/78)	75.6(59/78)

¹该病例术后诊断小肠局限性扩张,CT诊断同术后诊断,病理见该段小肠肌纤维稀疏。

疑似肠梗阻,1.8%(1/56)未见异常。腹部立位平片术前无法诊断病因(0.0%)。LBO中44.6%(25/56)因结肠扩张,粪便蓄积提示LBO,但难以判断准确部位。SBO确诊梗阻病例虽可见扩张的小肠,但不能就此确定梗阻一定位于小肠。

2.3 CT检查 SBO中34例术前行CT检查, LBO中44例术前行CT检查。因急诊就诊,及患者原因等CT未行增强扫描的分别为SBO 20.6%(7/34)和LBO 15.9%(7/44)。SBO术前行CT检查100%(34/34)诊断肠梗阻,100%梗阻部位诊断正确。44.1%(15/34)的病因未能正确诊断,其中80.0%(12/15)为粘连所致,另外3例包括1例回肠末端炎性息肉引起套叠误诊为脂肪瘤,1例回肠末端炎性息肉,1例为胃癌术后复发、转移所致。LBO术前行CT检查95.45%(42/44)诊断肠梗阻,另外未诊断梗阻2例均为降结肠癌,其中1例已穿孔形成腰大肌周围脓肿。97.7%(43/44)患者梗阻部位诊断正确,另1例为直肠癌术后吻合口炎性狭窄误诊为梗阻于脾曲部。9.1%(4/44)的病因未能正确诊断,其中1例为CT平扫未能诊断粪石,1例为直肠癌术后吻合口炎性狭窄,1例为CT平扫未能诊断直肠癌,1例为结肠脾曲综合征(表1)。

2.4 超声检查 SBO中51例术前行超声检查,82.35%(42/51)诊断肠梗阻,11.8%(6/51)诊断了梗阻部位及病因,其中2例为肠套叠,2例为

■相关报道

Grassi等研究认为SBO肠间积液是由于小肠壁静脉回流受阻,导致毛细血管内压力增高,通透性增加所致。

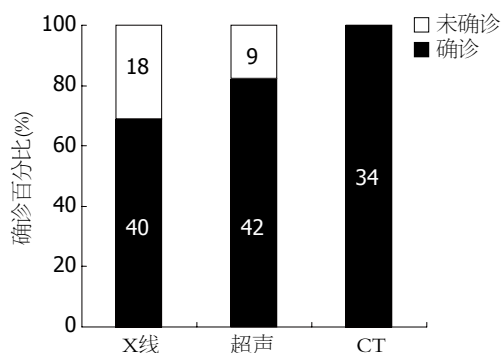


图1 SBO术前检查诊断是否存在梗阻符合率。

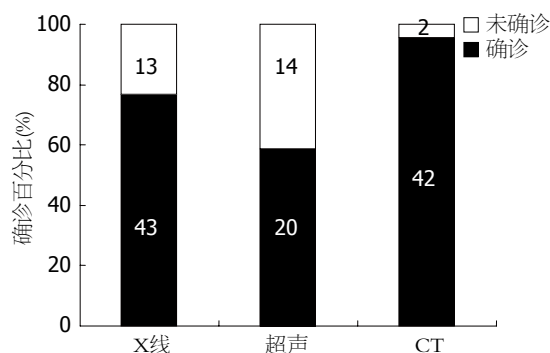


图2 LBO术前检查诊断是否存在梗阻符合率。

■创新盘点

本文站在外科医生的角度综合比较了腹部平片、超声、CT在诊断肠梗阻时的优缺点,并将术前查体、辅助检查和手术探查有机结合起来进行了详尽地讨论。

肿瘤,2例为腹外疝所致。74.5%(38/51)发现腹腔内有积液,而该51例中经手术探查证实有肠坏死或闭袢形成、绞窄等血运障碍者腹腔内87.1%(27/31)有积液,而其中仅45.2%(14/31)靠症状、体征提示肠绞窄;无明显血运障碍者55.0%(11/20)有积液,其中10.0%(2/20)有轻度腹膜刺激征。LBO中34例术前行超声检查,58.8%(20/34)诊断肠梗阻,29.4%(10/34)发现了腹腔内占位病变,从而确定了梗阻部位及病因。

2.5 腹部平片、超声和CT对肠梗阻诊断的比较
腹部平片与超声比较在确诊有无肠梗阻上无显著差异($P>0.05$,图1,2)。CT与腹部平片、超声比较在确诊有无肠梗阻上有显著差异($P<0.05$,图1,2)。CT在确诊肠梗阻的部位和病因的符合率上也显著高于超声和腹部平片($P<0.05$)。绞窄性SBO时超声检查发现腹腔内积液的几率显著增高($P<0.05$)。超声检查发现腹腔内积液预测绞窄性SBO的灵敏度为87.1%,特异度为45.0%;而靠症状、体征提示肠绞窄灵敏度为45.2%,特异度为90.0%。

3 讨论

肠梗阻起病急,变化快,是临床上常见的急腹症,对肠梗阻选择合适的治疗方案常常是临床医师面临的难题,而延误诊断、拖延手术时机是造成肠梗阻患者死亡的重要原因。但盲目的剖腹探查既增加了患者的痛苦,也浪费了资源^[4]。因此,临床医生面对着患者常常迫切地需要了解有无梗阻,梗阻部位,梗阻的原因以及有无闭袢形成或绞窄等情况。

与文献报道相似^[1-3,5],本组SBO主要病因依次为粘连、肿瘤、腹外疝和套叠;LBO常见病因为结直肠癌和肠扭转。

虽然肠梗阻的影像学检查公认的是首选腹部平片^[6],但根据本组资料显示腹部平片仅能诊

断69.0%(40/58)的SBO和76.8%(43/56)的LBO,而且其中12.1%(7/58)的SBO和3.6%(2/56)的LBO腹部平片是复查后确诊的。文献报道也认为20%-52%的病例腹部平片不能提出肯定的诊断,诊断梗阻部位的能力十分有限,而且不能诊断梗阻的病因^[1,3]。Frager等^[2]认为即使反复跟踪复查,也有大约20%的肠梗阻靠腹部平片是无法诊断的。这部分患者可能因为诊断的延迟导致不良后果。

本组CT诊断了全部SBO,而LBO中1例腰大肌周围脓肿于CT检查前已行脓肿引流术;另1例为不全梗阻,CT检查前已排气排便,CT虽未确诊梗阻,但正确诊断了肿瘤及其部位。纪建松等经口服和灌肠水溶性造影剂,再加增强CT扫描后三维重建等技术,肠梗阻确诊率达100%(419/419)。并认为由于结直肠位置比较固定,水平断层上其形态也易于与小肠区分,再加上根据扩张肠管和塌陷肠管间的移行带,CT判断梗阻部位有明显的优势^[1]。在病因的判断中,因扩张肠管和塌陷肠管间的移行带处无明显占位病变,而且粘连性SBO中多为(60.6%)粘连所导致,故CT诊断粘连性肠梗阻有些困难。明兵等也认为在不进行三维重建等条件下CT对粘连和小的肿瘤引起的梗阻比较困难^[3,7]。但本组粘连性肠梗阻90.9%既往曾行剖腹手术,根据病史不难诊断。由于未行增强扫描,2例LBO由粪石抑或肿瘤引起未能得以区分。由于增强后粪石无强化,而结直肠癌组织会有强化表现^[3],因此应尽量采取增强扫描。根据我们的经验,结直肠癌术后吻合口炎性狭窄或复发即使结肠镜也很难诊断,所以只要CT诊断了梗阻和部位,并不影响手术探查。Godfrey等^[8]的研究认为CT在诊断LBO中的价值显著优于腹部平片和灌肠。本组病例中套叠所致梗阻虽仅诊断50%(1/2),但据研究表明,CT是套叠最有效和准确的诊断方法^[9-11]。本

■同行评价

本文综合比较了腹部立位平片、B超及CT在诊断肠梗阻中的准确率,具有一定的临床实践意义。

组LBO中梗阻部位大约有50%和30%分属左、右半结肠,因肠梗阻常无法行肠道准备而行结肠镜检查,因此CT检查对LBO患者手术切口的选择非常重要。

SBO和LBO术前行超声检查,虽多可根据肠管的扩张程度断定有无梗阻(82.35%和61.8%),但与腹部平片相比无显著差异,而且对临床医生来说并不直观。腹外疝多可通过术前查体诊断,但少见的如闭孔疝却常靠CT才能做出术前诊断^[12]。虽然少数情况下超声能诊断肿瘤、套叠所致梗阻,但是受肠管内积气的影响与CT相比其判定梗阻部位和病因的能力显著降低。

本组资料显示绞窄性SBO时超声检查发现腹腔内积液的几率显著增高。而实际上绞窄性与非绞窄性SBO是同一疾病发展的不同病理过程,二者之间并无绝对界限。本研究属回顾性研究,本组所谓的绞窄性SBO是指病理证实的有出血坏死的,或术中探查有明显缺血表现的,并不能说明非绞窄性SBO组肠壁绝对没有缺血。虽然靠临床症状、体征也能提示肠绞窄,特异度可达90.0%,但其灵敏度仅为45.2%,此时很可能因肠坏死而不得不切除肠管。Grassi等^[13]研究认为SBO肠间积液是由于小肠壁静脉回流受阻,导致毛细血管内压力增高,通透性增加所致。在排除如心、肝、肾功能不全,肿瘤,外伤以及炎症性疾病等情况下,超声检查发现肠间积液的SBO常需手术治疗,而且如积液明显增加需立即手术。而本组非绞窄性SBO中也包含了肿瘤和炎症性疾病所致的梗阻,因此导致特异度较低。Schwenter等也认为腹腔游离液体是预测肠绞窄的重要因素之一^[14,15]。O'Daly等^[16]认为腹腔游离液体是预测粘连性SBO绞窄的独立的重要因素,并且绞窄的可能性是无腹腔游离液体的3倍。

总之,腹部平片只能作为诊断肠梗阻的初步筛选。CT对诊断是否存在肠梗阻,梗阻部位和原因有绝对优势。在排除如心、肝、肾功能不全,肿瘤,外伤以及炎症性疾病等情况下,小肠梗阻中超声发现腹腔积液应考虑有绞窄可能,并尽早手术。

4 参考文献

- 1 纪建松,王祖飞,赵中伟,徐民,涂建飞. 多层螺旋CT在肠梗阻诊断中的临床应用. 中华医学杂志 2009; 89: 3359-3362
- 2 Frager D. Intestinal obstruction role of CT. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 777-799
- 3 明兵,李振勋,高源统,汪永桢,王晓阳,蒲青凡,余瑞立. CT在机械性肠梗阻诊断中的作用. 中华放射学杂志 2002; 36: 896-900
- 4 王元和,阮灿平. 肠梗阻手术时机的选择. 中国实用外科杂志 2000; 20: 458-459
- 5 薛建国,王宇,谷俊朝,马新发. 螺旋CT对不明原因肠梗阻的诊断价值. 中国普通外科杂志 2008; 17: 381-382
- 6 Silva AC, Pimenta M, Guimarães LS. Small bowel obstruction: what to look for. *Radiographics* 2009; 29: 423-439
- 7 纪建松,章士正. 螺旋CT对粘连性肠梗阻的诊断价值. 中国医学科学院学报 2006; 28: 84-87
- 8 Godfrey EM, Addley HC, Shaw AS. The use of computed tomography in the detection and characterisation of large bowel obstruction. *N Z Med J* 2009; 122: 57-73
- 9 Wang N, Cui XY, Liu Y, Long J, Xu YH, Guo RX, Guo KJ. Adult intussusception: a retrospective review of 41 cases. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3303-3308
- 10 Guillén Paredes MP, Campillo Soto A, Martín Lorenzo JG, Torralba Martínez JA, Mengual Ballesster M, Cases Baldó MJ, Aguayo Albasini JL. Adult intussusception - 14 case reports and their outcomes. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102: 32-40
- 11 Ghaderi H, Jafarian A, Aminian A, Mirjafari Daryasari SA. Clinical presentations, diagnosis and treatment of adult intussusception, a 20 years survey. *Int J Surg* 2010; 8: 318-320
- 12 王宁,何忠野,刘宇,张浩,葛春林,郭仁宣,郭克建. 闭孔疝二例误诊分析. 中华外科杂志 2007; 45: 927
- 13 Grassi R, Romano S, D'Amario F, Giorgio Rossi A, Romano L, Pinto F, Di Mizio R. The relevance of free fluid between intestinal loops detected by sonography in the clinical assessment of small bowel obstruction in adults. *Eur J Radiol* 2004; 50: 5-14
- 14 Schwenter F, Poletti PA, Platon A, Perneger T, Morel P, Gervaz P. Clinicoradiological score for predicting the risk of strangulated small bowel obstruction. *Br J Surg* 2010; 97: 1119-1125
- 15 Zielinski MD, Eiken PW, Bannon MP, Heller SF, Lohse CM, Huebner M, Sarr MG. Small bowel obstruction-who needs an operation? A multivariate prediction model. *World J Surg* 2010; 34: 910-919
- 16 O'Daly BJ, Ridgway PF, Keenan N, Sweeney KJ, Brophy DP, Hill AD, Evoy D, O'Higgins NJ, McDermott EW. Detected peritoneal fluid in small bowel obstruction is associated with the need for surgical intervention. *Can J Surg* 2009; 52: 201-206

编辑 李军亮 电编 何基才

全直肠系膜切除术中预防盆段输尿管损伤的解剖标志

孙 轶, 卢永刚, 梁天伟, 范吉利

孙轶, 卢永刚, 梁天伟, 范吉利, 南方医科大学附属柳州医院
普外一科 广西壮族自治区柳州市 545007

作者贡献分布: 孙轶具体负责课题的设计、临床资料的搜集整理及文章的撰写, 为本文的主要贡献者; 卢永刚与梁天伟负责指导、审核; 卢永刚、梁天伟及范吉利协助完成此文。

通讯作者: 孙轶, 主治医师, 545007, 广西壮族自治区柳州市, 南方医科大学附属柳州医院普外一科. sunyi1166@sina.com
电话: 0772-3920717

收稿日期: 2010-08-16 修回日期: 2010-10-10

接受日期: 2010-10-13 在线出版日期: 2010-11-18

Anatomic landmark to prevent intrapelvic ureteral injury during total mesorectal excision

Yi Sun, Yong-Gang Lu, Tian-Wei Liang, Ji-Li Fan

Yi Sun, Yong-Gang Lu, Tian-Wei Liang, Ji-Li Fan, Department of General Surgery, Affiliated Liuzhou Hospital of Southern Medical University, Liuzhou 545007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Yi Su, Department of General Surgery, Affiliated Liuzhou Hospital of Southern Medical University, Liuzhou 545007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. sunyi1166@sina.com

Received: 2010-08-16 Revised: 2010-10-10

Accepted: 2010-10-13 Published online: 2010-11-18

Abstract

AIM: To find an anatomic landmark that can be used to avoid intrapelvic ureteral injury during total mesorectal excision (TME).

METHODS: Sixty-one patients undergoing TME at the Affiliated Liuzhou Hospital of Southern Medical University between June 2006 and June 2010 were observed intraoperatively to find an anatomic landmark.

RESULTS: Sacrogenital folds, located between the intrapelvic ureter and mesorectum, are an anatomic structure that was observed in all the 61 cases studied. No intrapelvic ureter injury occurred when we chose to operate inside the Sacrogenital folds.

CONCLUSION: Sacrogenital folds can be used as an anatomic landmark to prevent intrapelvic ureteral injury during TME.

Key Words: Sacrogenital folds; Intrapelvic ureter; Total mesorectal excision; Anatomic landmark

Sun Y, Lu YG, Liang TW, Fan JL. Anatomic landmark to prevent intrapelvic ureteral injury during total mesorectal excision. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3489-3491

摘要

目的: 寻找全直肠系膜切除术中预防盆段输尿管损伤的解剖标志, 有效地避免盆段输尿管损伤。

方法: 对南方医科大学附属柳州医院2006-06/2010-06施行的61例全直肠系膜切除术进行仔细地解剖标志及盆段输尿管观察。

结果: 61例全直肠系膜切除术中均可发现一恒定解剖结构-骶生殖襞。骶生殖襞均位于盆段输尿管与直肠系膜之间。选择在骶生殖襞的内侧层面操作, 本组病例均避免了盆段输尿管的损伤。

结论: 骶生殖襞可以作为预防盆段输尿管损伤的解剖标志。

关键词: 骶生殖襞; 盆段输尿管; 全直肠系膜切除术; 解剖标志

孙轶, 卢永刚, 梁天伟, 范吉利. 全直肠系膜切除术中预防盆段输尿管损伤的解剖标志. *世界华人消化杂志* 2010; 18(32): 3489-3491

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3489.asp>

0 引言

自1982年Heald等提出全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)这一概念^[1], TME因可以显著降低局部复发率^[2-4]. 目前已成为直肠癌根治术的“金标准”^[5,6], 但是术中输尿管损伤特别是盆段输尿管损伤仍是常见的并发症^[7,8]. TME中若能找到一个解剖标志, 以这个解剖标志为参照物进行手术操作就会有效地预防盆段输尿管损伤. 为了更好地掌握和寻找可靠的解剖学标志, 我们对南方医科大学附属柳州医院

■背景资料

目前全直肠系膜切除术已成为直肠癌根治术的“金标准”, 但是术中输尿管损伤特别是盆段输尿管损伤仍是常见的并发症, 因此在手术中找到一个解剖标志并且以他为参照物进行手术操作来避免输尿管损伤是非常有意义的。

■同行评议者

王忠裕, 教授, 大连医科大学附属第一医院普通外科二科

■研究前沿

输尿管损伤是全直肠系膜切除术常见的并发症,如何有效的预防术中输尿管损伤一直受到胃肠外科医生的关注。

2006-06/2010-06施行的61例TME中进行仔细观察,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 病例61例,男40例,女21例,年龄41-82(平均62)岁;其中上段直肠癌41例,中下段直肠癌20例,均行TME。

1.2 方法 61例均行TME,开腹探查后确认可行根治术,自肠系膜下动静脉根部开始清扫其周围脂肪组织及淋巴结。分别钳夹、切断、缝扎直肠上动静脉,进入盆筋膜壁层和脏层的疏松结缔组织间隙。在直视下,用电刀或超声刀沿此无血管的间隙作锐性解剖,并沿这一间隙平面向直肠的两侧解剖分离达侧韧带,仔细辨识骶生殖襞,在其外侧寻找盆段输尿管,明确输尿管的走行,在其内侧切除直肠系膜。直肠前方则在腹膜返折上切开盆腔腹膜,沿Denonvilliers筋膜(腹膜会阴筋膜)前作锐性分离,男性注意保护精囊及前列腺,女性注意保护阴道后壁,向两侧绕至侧韧带,切断结扎两侧侧韧带。注意始终保持在骶生殖襞内侧操作,避免损伤输尿管。向上向前牵拉直肠,切断两侧骶骨直肠韧带,即达盆底。至此完成TME。

2 结果

本组61例TME均无输尿管损伤,术中均可清晰的见到一恒定解剖结构-骶生殖襞,盆段输尿管在盆腔侧壁的腹膜外结缔组织走行直至进入膀胱,位于骶生殖襞的外侧,直肠系膜均在骶生殖襞内侧(图1)。在进行TME时严格在骶生殖襞内侧操作,均避免了盆部输尿管的损伤。

3 讨论

骶生殖襞是盆腔腹膜形成的皱襞,男女命名有所不同,男性称为骶膀胱襞,他自骶骨至膀胱两侧,内含骶骨膀胱韧带,女性称为骶子宫襞,他自骶骨至子宫颈两侧,内含骶子宫韧带。盆段输尿管在骶生殖襞的外侧盆腔侧壁的腹膜外结缔组织走行直至进入膀胱,首先走行于直肠系膜的侧后方,接近膀胱时走行于直肠系膜的侧前方,但盆段输尿管整个走行过程中与直肠系膜之间均有骶生殖襞间隔。由此来看,骶生殖襞就像条弧形带子一样将盆段输尿管与直肠系膜隔开,因此全直肠系膜手术中始终保持在骶生殖襞内侧的层面进行操作,可以避免盆段输尿管的损伤。

TME要求完全切除直肠系膜,须剥离直肠

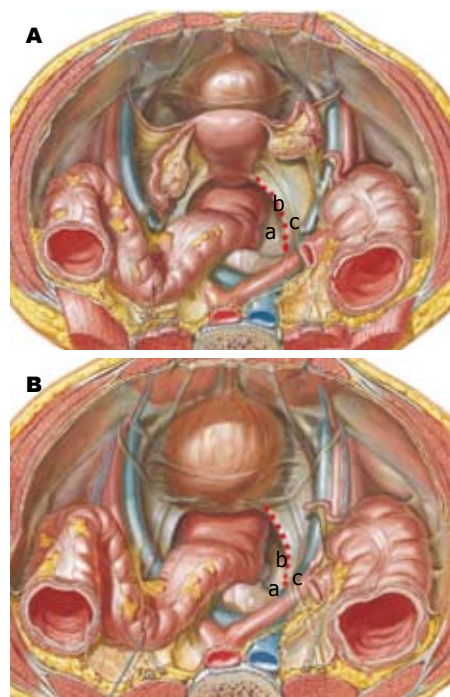


图1 盆腔解剖图(引自奈特解剖图谱)^[9]。A: 女性; B: 男性; a: 直肠系膜; b: 骶生殖(子宫、膀胱)襞; c: 输尿管。

的全部疏松结缔组织,再加上术中牵拉易使输尿管移位,肿瘤转移或浸润使解剖变得不清楚,故直肠癌手术时易造成输尿管损伤,国内报道其发生率为0.5%-2.4%^[8,10],国外报道其发生率为0.6%-5.7%^[11-13]。目前已有很多方法预防输尿管损伤,如术前预防性输尿管置管;术中保持肾前筋膜的完整性;使用超声刀紧贴直肠系膜侧面锐性切割,避免靠近盆侧壁;切断侧韧带之前,向前外侧牵引直肠,直视下操作;盆侧壁发生出血时,切忌盲目电凝止血等^[14-18]。TME中若能找到一个解剖标志,以这个解剖标志为参照物进行手术操作会更有效预防盆段输尿管损伤。我们认为选用的解剖学标志必须具备以下两个特点:一是解剖本身比较恒定;二是易于观察,方便实用。在TME中骶生殖襞可以满足以上两点要求,在本组61例病例中均可清晰地看到这一解剖标志,特别是肥胖患者及再次手术患者,在其他解剖结构不够清楚时,骶生殖襞仍可易于发现,通过盆段输尿管的观察我们发现输尿管走行于骶生殖襞的外侧,直肠系膜位于骶生殖襞的内侧,因此以骶生殖襞作为解剖标志具有预防盆段输尿管损伤的临床意义。在TME盆部操作时,首先找到骶生殖襞这一解剖标志,用这一解剖标志作为参照物(实际上是一条弧线),始终保持在这一解剖标志内侧操作,可以有效地避免输尿管的损伤。

骶生殖襻是TME中预防盆段输尿管损伤的恒定、理想和可靠的解剖标志, 进行TME时保持在骶生殖襻的内侧操作, 可以避免盆段输尿管损伤。

志谢: 感谢湖北省中山医院普外科刘胜新副主任医师在本文完成过程中给予的支持及帮助。

4 参考文献

- 1 Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69: 613-616
- 2 Arbman G, Nilsson E, Hallböök O, Sjö Dahl R. Local recurrence following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83: 375-379
- 3 Havenga K, Enker WE, Norstein J, Moriya Y, Heald RJ, van Houwelingen HC, van de Velde CJ. Improved survival and local control after total mesorectal excision or D3 lymphadenectomy in the treatment of primary rectal cancer: an international analysis of 1411 patients. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25: 368-374
- 4 Wibe A, Rendedal PR, Svensson E, Norstein J, Eide TJ, Myrvold HE, Søreide O. Prognostic significance of the circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 2002; 89: 327-334
- 5 Makin GB, Breen DJ, Monson JR. The impact of new technology on surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 612-621
- 6 Zheng YC, Tang YY, Zhou ZG, Li L, Wang TC, Deng YL, Chen DY, Liu WP. Tumor micrometastases in mesorectal lymph nodes and their clinical significance in patients with rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3369-3373
- 7 孙威, 江洋深, 姜立广, 盖雪峰, 卢羽. 全直肠系膜切除术的常见并发症分析. *中国医师进修杂志* 2007; 30: 29-30
- 8 刘荫华, 姚宏伟. 结直肠癌中医源性输尿管损伤的预防和处理. *中国实用外科杂志* 2005; 25: 526-528
- 9 Netter FH, 王怀经. 奈特人体解剖彩色图谱. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 349-350
- 10 胡湧, 魏海云. 直肠癌切除术输尿管损伤的处理. *实用癌症杂志* 2000; 15: 539-541
- 11 Andersson A, Bergdahl L. Urologic complications following abdominoperineal resection of the rectum. *Arch Surg* 1976; 111: 969-971
- 12 Yong L, Deane M, Monson JR, Darzi A. Systematic review of laparoscopic surgery for colorectal malignancy. *Surg Endosc* 2001; 15: 1431-1439
- 13 Bretagnol F, Lelong B, Laurent C, Moutardier V, Rullier A, Monges G, Delperro JR, Rullier E. The oncological safety of laparoscopic total mesorectal excision with sphincter preservation for rectal carcinoma. *Surg Endosc* 2005; 19: 892-896
- 14 张策, 李国新, 余江, 黄祥成, 丁自海, 钟世镇. 腹腔镜全直肠系膜切除术中输尿管保护的临床解剖. *解剖学杂志* 2006; 29: 360-361
- 15 李国新, 丁自海, 张策, 黄祥成, 钟世镇. 腹腔镜下左半结肠切除术相关筋膜平面的解剖观察. *中国临床解剖学杂志* 2006; 24: 298-301
- 16 渠浩, 杜燕夫, 李敏哲, 张峪东. 腹腔镜结直肠癌手术中输尿管的保护. *中华外科杂志* 2009; 47: 1915-1916
- 17 卢榜裕, 张慧明, 蔡小勇, 陆文奇, 黄玉斌, 靳小建, 孙志刚. 腹腔镜结直肠癌术中避免输尿管损伤的解剖学因素探讨: ToI dt筋膜的分离和显露. *中华腔镜外科杂志(电子版)* 2009; 2: 14-21
- 18 孟安启, 李咏梅, 张昌庆, 胡志涛, 周保成, 陈华萍, 陈卫东, 杨建国, 李正平. 自制发光输尿管导管系统在腹腔镜手术中预防输尿管损伤的临床应用. *中华腔镜泌尿外科杂志(电子版)* 2010; 4: 98-100

编辑 李薇 电编 何基才

■同行评价

本文实用性较好, 对临床医师尤其是基层医院的医生完成该手术有一定的帮助。

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)

覆膜食管支架置入术治疗医源性食管穿孔1例

章诺贝, 黄年根

■背景资料

医源性食管穿孔是非常棘手的医疗事件之一, 可导致严重的胸腹腔感染, 即使在24 h内行外科手术, 其死亡率仍高达12%-36%。

章诺贝, 黄年根, 南昌大学第二附属医院消化科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 资料的收集、分析与论文撰写由章诺贝完成; 审校由黄年根完成。

通讯作者: 黄年根, 主任医师, 教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院消化科. huangniangen@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-08-15 修回日期: 2010-09-17

接受日期: 2010-09-25 在线出版日期: 2010-11-18

Esophageal stent placement for the treatment of iatrogenic esophageal perforation: report of one case

Nuo-Bei Zhang, Nian-Gen Huang

Nuo-Bei Zhang, Nian-Gen Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Nian-Gen Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huangniangen@yahoo.com.cn

Received: 2010-08-15 Revised: 2010-09-17

Accepted: 2010-09-25 Published online: 2010-11-18

Abstract

Esophageal perforation during endoscopy or surgery can be a devastating event. Traditional therapy for iatrogenic esophageal perforation involves surgical repair of the esophagus. Esophageal stent placement provides a safer alternative for patients with iatrogenic esophageal perforation.

Key Words: Esophageal perforation; Endoluminal esophageal stent; Therapy

Zhang NB, Huang NG. Esophageal stent placement for the treatment of iatrogenic esophageal perforation: report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(32): 3492-3493

摘要

医源性食管穿孔是由外科手术、内镜介入等医疗操作引起的严重事件, 其传统的治疗方法为外科手术修复。应用覆膜食管支架置入术治疗食管穿孔可有效地封堵瘘口, 从而避免外科手术对患者的打击。

关键词: 食管穿孔; 食管支架; 治疗

章诺贝, 黄年根. 覆膜食管支架置入术治疗医源性食管穿孔1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(32): 3492-3493

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/3492.asp>

0 引言

食管支架置入术是治疗良、恶性食管狭窄非常有效的手段之一, 其并发症中食管穿孔的发生率为1%-5%^[1]。南昌大学第二附属医院应用覆膜食管支架成功治疗医源性食管穿孔1例, 现报道如下。

1 病例报告

男, 79岁, 因进行性进吞咽梗阻感3 mo余入院。入院后行电子胃镜检查示: 食管-贲门-胃底占位, 病灶起始部距门齿约37 cm。病理示中低分化腺癌。2 d后拟用长10 cm、直径2.0 cm的覆膜镍钛记忆合金食管支架行食管支架置入术。术中插入食管支架置入器时, 导丝滑脱未通过狭窄段因而没有起到引导作用, 故插入食管支架置入器后(支架尚未展开)即导致食管穿孔, 退出食管支架置入器, 复插胃镜见肿瘤上缘下方约2.0 cm处有一瘘口通向腹腔, 长约3.0 cm, 未超过贲门。患者诉上腹部疼痛, 体检腹肌紧张, 未出现皮下气肿。予泛影葡胺行食管造影显示造影剂漏入腹腔(图1A)。

拟应用上述食管支架在胃镜和X线透视配合下封堵瘘口。将导丝沿胃镜活检孔插入胃腔后退出胃镜, 留置导丝。在X线透视下将食管支架置入器沿导丝插入食管后, 再平行插入胃镜至瘘口上方, 逐渐将置入器外套管缓慢退出使支架自动展开后其近端距离瘘口上缘约4 cm同时越过肿瘤, 其远端越过贲门。术后口服造影剂未见外漏(图1B)。同时行持续胃肠减压管减压, 并配合禁食、抗炎、维持水电平衡, 营养支持等治疗。术后患者一直未出现发热, 血象升高等感染情况, 5 d后腹痛基本缓解, 拔除胃肠减压管, 进食流质, 术后第11 d病情平稳, 出院。

■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

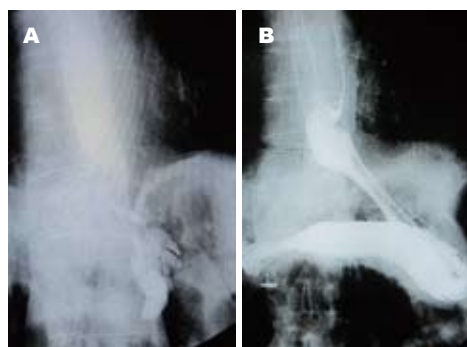


图1 行食管造影. A: 造影剂漏入腹腔; B: 造影剂未见外漏.

2 讨论

食管支架置入术导致的食管穿孔易发生在食管扭曲、狭窄部成角, 严重狭窄伴有溃疡、憩室和放疗化疗术后病例, 部分病例表现迟发性穿孔^[1]. 此病例肿瘤质地脆性大且表面有溃疡, 是造成穿孔的原因之一, 但更主要的原因是未能保持导丝的前端始终处于胃腔内, 导丝没有起到有效引导食管支架置入器的作用而导致穿孔.

采用覆膜食管支架置入术治疗食管穿孔, 其原理是通过将带有高纤维膜的网状支架置入食管后, 支架自行弹开固定在食管腔内, 其高纤维膜覆盖食管瘘口能有效地防止食物、分泌物及胃液从瘘口进入腹腔, 减少腹腔的污染和理化刺激, 且食管覆于支架上, 有利于瘘口愈合.

支架两端“喇叭口”直径必须大于食管正

常段直径1.5 cm, 才能确保支架两端能较好地固定在正常食管段. 不易滑动移位. 其次, 支架的长度必须超过食管裂口长度>4-6 cm(即支架两端必需各超过瘘口至少2-3 cm), 才能确保高纤维膜能完全覆盖食管瘘口不产生渗漏. 食管瘘口长度>10 cm不适宜采用本方法治疗, 因为食管的瘘口太大, 容易使支架脱入胸腔而导致手术失败. 另外, 食管穿孔下端若超过贲门, 支架下端无法紧贴食管壁, 胃内液体仍可渗入瘘口, 也不适宜采用本方法^[2]. 食管下段穿孔时, 支架下缘应超过贲门, 防止造影剂和食管内容物(胃反流液、唾液、食管分泌物等)在贲门处遇到阻力, 不能迅速通过, 积在食管下段, 沿食管支架下缘溢入瘘口^[3].

该病例食管穿孔发现及时, 在置入覆膜食管支架有效封堵瘘口的基础上配合胃肠减压、禁食、抗炎等治疗未出现严重后果.

3 参考文献

- 1 Kinsman KJ, DeGregorio BT, Katon RM, Morrison K, Saxon RR, Keller FS, Rosch J. Prior radiation and chemotherapy increase the risk of life-threatening complications after insertion of metallic stents for esophagogastric malignancy. *Gastrointest Endosc* 1996; 43: 196-203
- 2 蔡旭东, 刘玳瑄. 带膜食管内支架治疗食管破裂5例临床分析. *福建医科大学学报* 2001; 35: 388-389
- 3 姜管徐, 仇学明. 食管支架治疗食管破裂4例. *解放军医学杂志* 2004; 29: 372

■应用要点

覆膜食管支架置入可迅速封闭瘘口, 有效地防止食物、分泌物进入胸腹腔导致感染, 从而避免开胸或开腹手术, 患者可早期恢复进食并缩短住院天数.

■同行评价

本文实用性较好, 对与临床医师有一定的借鉴价值.

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

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.

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究

报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录。2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480, 位居内科学类41种期刊的第6位; 影响因子为0.547, 位居内科医学类41种期刊的第17位。《世界华人消化杂志》即年指标0.059, 他引率0.79, 地区分布数29, 基金论文比0.340, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.59, 综合评价总分49.5, 位居内科学类41种期刊的第8位。

1.2 栏目 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。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 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}, 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-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2009年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-85381901, 传真: 010-85381893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L $\pm$ 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴.

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

4 参考文献 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

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

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。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页,PMID和DOI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。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回,所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期):起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-8538-1892
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2010-2011年国内国际会议预告

2010-11-18/21

2010年中国肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: 021-68383773

2010-11-18/21

第十四届全国胆道外科学术会议暨2010中国国际肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: ncbs_cifhbs@126.com

2010-11-19/21

2010全国小肠镜及胶囊内镜学术会议暨消化内镜新技术高峰论坛

会议地点: 深圳市

联系方式: baiyang1030@hotmail.com

2010-11-26

国际结直肠外科论坛暨全国便秘基础与临床研讨会

会议地点: 重庆市

联系方式: 023-68757955-8

2010-11-26/27

全军首届临床营养支持研讨会暨北京肠外内营养专业委员会消化疾病营养支持专题研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: drqiaozhi@hotmail.com

2010-11-27

胆汁淤积和自身免疫性肝病专题学术研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: xumingyi@hotmail.com

2010-12-02/06

第九届广东省消化内镜学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 020-61641541

2010-12-03/06

肿瘤多学科综合诊治新概念学术研讨会

会议地点: 三亚市

联系方式: yxhy526@yahoo.com.cn

2010-12-10/12

2010江苏省腹腔镜临床应用进展研讨班

会议地点: 苏州市

联系方式: 0512-67784095/67784099

2010-12-18

北京平谷国际软硬镜超声联合技术暨动物模拟培训研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: pggy2001@126.com

2010-12-26/30

肝胆疾病-肝功能衰竭治疗新理念

会议地点: 南京市

联系方式: 025-83106666-66866

2011-01-20/22

2011年胃肠道癌症研讨会-胃肠道肿瘤的科学和多学科管理

会议地点: 美国旧金山

联系方式: giregistration@jspargo.com

2011-03

中华医学会第四次全国感染性疾病中青年学术会议

会议地点: 长沙市

联系方式: medcon@126.com

2011-03-25

第六届中国消化外科学术会议暨第七届全国肝胆外科学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: 010-67534765-8888

2011-03-25/27

首届中国腹膜后肿瘤论坛

会议地点: 北京市

联系方式: sjtcolorectalsurgery@gmail.com

2011-04-08

2011第五届中华消化病学年度讲坛

会议地点: 北京市

联系方式: cma_spd@yahoo.com

2011-04-15/17

第二届中国肿瘤介入与微创治疗大会

会议地点: 上海市

联系方式: 010-84288944

2011-06-11/12

2011国际消化疾病论坛

会议地点: 香港

联系方式: www.iddforum.com

2011-06-16/20

第二十三次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: 0351-4174328

2011-07-07

第八届全国大肠癌学术会议暨2011哈尔滨国际结直肠癌外科周

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: rainy_gg@yeah.net

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹鹏 副研究员

江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室

吕云福 教授

海南省人民医院外一科

曹秀峰 教授

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

牛英才 副研究员

齐齐哈尔医学院医药科学研究所

陈海龙 教授

大连医科大学附属第一医院院办

沈克平 主任医师

上海龙华医院肿瘤五科

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

谭德明 教授

中南大学湘雅医院感染病科

崔莲花 副教授

青岛大学医学院公共卫生系

谭晓冬 副教授

中国医科大学盛京医院胰腺甲状腺外科

郝立强 副教授

上海长海医院普外二科

汤朝晖 副主任医师

上海交大医学院附属新华医院普外科

黄昆 教授

华中科技大学同济药学院

唐霓 副研究员

重庆医科大学病毒性肝炎研究所国家级重点实验室

黄志勇 教授

华中科技大学同济医院普外科

田文静 副教授

哈尔滨医科大学公卫学院

季菊玲 副教授

南通大学医学院病理教研室

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

金瑞 教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

夏冰 教授

武汉大学中南医院消化内科

李淳 副教授

汕头大学医学院病理教研室

向德兵 讲师

中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心

李晓波 教授

上海交通大学药学院

徐泱 副教授

上海复旦大学附属中山医院肝肿瘤外科

刘宝林 教授

中国医科大学附属盛京医院普通外科

禹正杨 副教授

南华大学附属第一医院肿瘤外科

刘连新 教授

哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

智绪亭 教授

山东大学齐鲁医院普外科

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院消化科

周晓武 副主任医师

中国人民解放军空军总医院普通外科