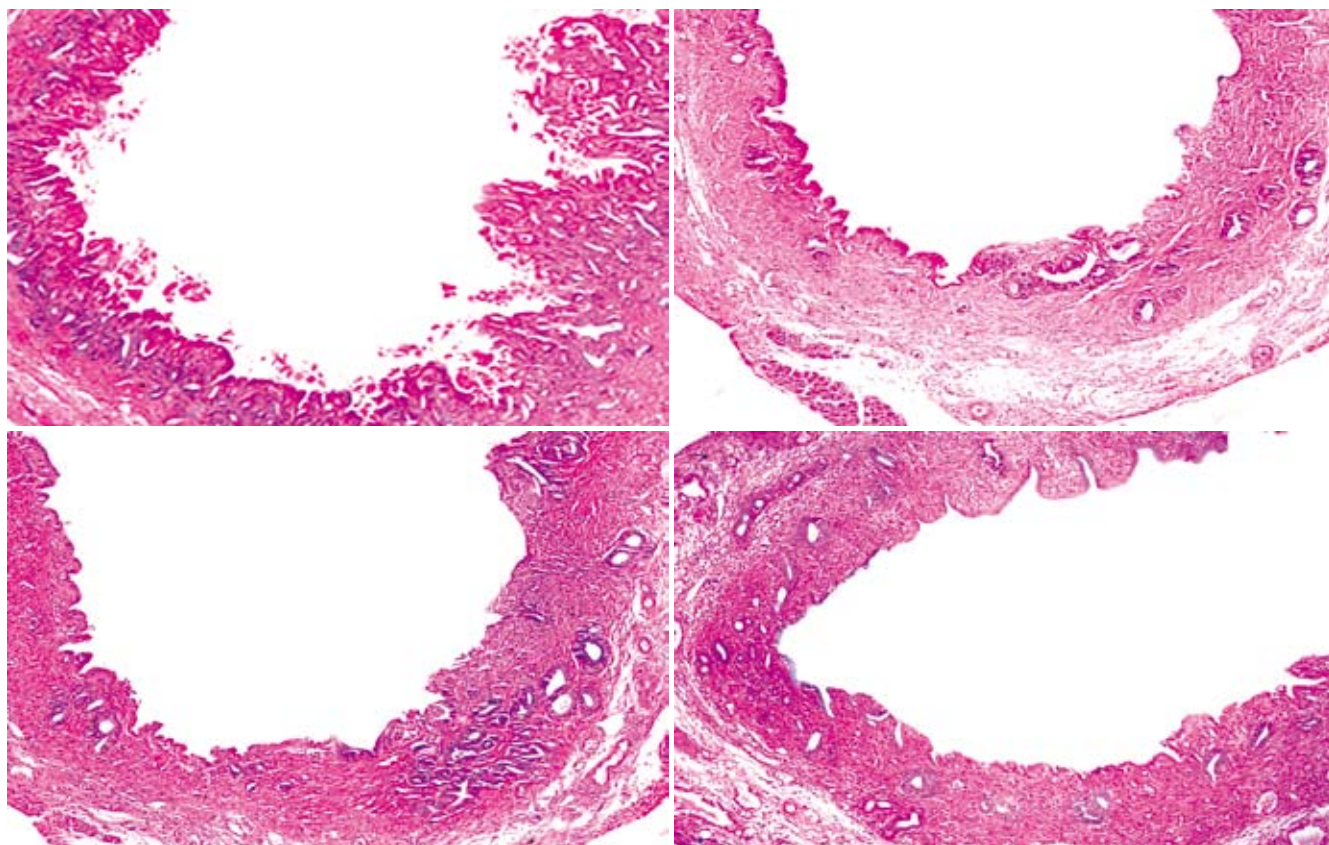


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010 年 3 月 18 日 第 18 卷 第 8 期 (Volume 18 Number 8)



8 / 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
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
苒新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
马红主任医师

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

消化外科学

蔡开琳副教授
蔡三军主任医师

曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗副教授

李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
汤恢焕教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郝宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授

高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璦教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
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
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授

袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授

周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010年3月18日 第18卷 第8期 (总第304期)

述 评

- 751 《世界华人消化杂志》开放获取的出版模式实现了临床医师和公众的利益最大化
王苑本

基础 研究

- 755 新型乙型肝炎病毒细胞感染模型的建立
姚永远, 马立宪, 赛林涛, 邵丽华, 关彦彦, 王刚
- 761 硝普钠诱导肝星状细胞HSC-T6凋亡及其机制
张明明, 杨帅, 高福祿, 马洪骏, 邵克江, 崔东来, 张振科
- 767 反义基因治疗对慢性增生性胆管炎的抗增殖作用
周涌, 李富宇, 王晓东, 蒋力生, 程南生, 李全生, 何生
- 773 cFLIP和caspase-8在犬胆道良性损伤修复过程中的表达
李可洲, 骆乐, 姚豫桐, 张晓, 闫洪涛

临 床 研 究

- 779 拉米夫定耐药后序贯治疗中HBV准种的演变
吴珍萍, 韩涛, 高英堂, 李莹, 刘彤, 景丽, 刘磊, 杜智
- 786 p14ARF基因甲基化及蛋白表达在直肠癌中的作用
熊超亮, 黄缘
- 791 侵袭转移相关因子在胃肠道间质瘤中的检测及其意义
赵毅, 王强, 邓鑫, 赵滢, 张天彪

文 献 综 述

- 798 胃黏蛋白在抗幽门螺杆菌感染中的作用
邓敏, 靖大道
- 803 直肠癌前切除术后吻合口漏的危险因素
高云峰, 董明
- 808 大肠癌microRNA与DNA甲基化修饰相互调控的研究进展
王峰, 秦环龙

研 究 快 报

- 815 生长抑素类似物联合丝裂霉素对胃癌细胞的抑制作用
苏海燕, 刘文天, 王邦茂, 张文治, 苏心
- 819 肝细胞生长因子对肝癌细胞系SMMC-7721失巢凋亡的影响
谷艳娇, 奥瑞芳, 苏荣健
- 825 氨基胍对饥饿大鼠肠道胆碱能神经元及肠动力功能的保护
陆之辉, 张小平, 程爱国

临 床 经 验

- 830 被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄32例
郑文棋, 林海凤, 杨长青, 龚锦容, 吴荔珊, 张美金, 翁丽贤
- 834 胃食管反流病患者生活质量调查187例
瞿国强, 胡宏艳, 李安, 郭金芝, 梁先发, 汤胜君, 龙翔, 钱立康, 程雪霞, 曹彬
- 839 针刺足阳明经特定穴治疗功能性消化不良30例
常小荣, 兰蕾, 严洁, 王小娟, 陈慧敏
- 845 慢性胃炎脾胃湿热证与血清胃泌素及幽门螺杆菌感染的相关性
周慧敏, 吕文亮, 高清华, 周燕萍, 王阶, 李天望, 刘林

| | |
|-------|--|
| | <p>848 腹腔镜及开腹手术治疗小儿复杂性阑尾炎268例 田鹏, 王旺河, 张超, 王志凯, 赵淑坤</p> <p>851 综合医院消化门诊以躯体症状为首发的抑郁症调查5 754例 王涛, 陈玉龙, 卢艳如</p> |
| 附 录 | <p>854 《世界华人消化杂志》投稿须知</p> <p>859 2010年国内国际会议预告</p> |
| 志 谢 | 860 志谢世界华人消化杂志编委 |
| 消 息 | <p>754 《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务</p> <p>766 WJG成功通过评审被PMC收录</p> <p>778 《世界华人消化杂志》修回稿须知</p> <p>785 《世界华人消化杂志》出版流程</p> <p>790 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>797 《世界华人消化杂志》计量单位标准</p> <p>802 汤姆森-路透公布2008年WJG影响因子2.081</p> <p>807 《世界华人消化杂志》正文要求</p> <p>814 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>818 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729</p> <p>833 《世界华人消化杂志》外文字符标准</p> <p>838 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》</p> <p>844 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>847 《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</p> |
| 封面故事 | <p>周涌, 李富宇, 王晓东, 蒋力生, 程南生, 李全生, 何生. 反义基因治疗对慢性增生性胆管炎的抗增殖作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 767-772 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/767.asp</p> |
| 本期责任人 | <p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李瑞敏; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 形式规范 马连生</p> |

| | | |
|---|---|---|
| <p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2010-03-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>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</p> | <p>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</p> <p>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</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>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)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>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</p> | <p>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.</p> <p>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.</p> <p>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.</p> <p>2010年版权归世界华人消化杂志所有</p> |
| <p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p> | <p>邮发代号 82-262 国外代号 M 4481</p> | <p>国内定价 每册56.00元 全年2016.00元 广告经营许可证 1401004000050</p> |

World Chinese Journal of Digestology

March 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 8

| | |
|----------------------------|--|
| EDITORIAL | 751 Open-access publishing model for <i>World Chinese Journal of Digestology</i> achieves maximization of the benefits to readers, authors and the society <i>Wang YB</i> |
| BASIC RESEARCH | <p>755 Establishment of a novel cell model of hepatitis B virus infection <i>Yao YY, Ma LX, Sai LT, Shao LH, Guan YY, Wang G</i></p> <p>761 Apoptosis of hepatic stellate cells (HSC-T6) induced by sodium nitroprusside and mechanisms involved <i>Zhang MM, Yang S, Gao FL, Ma HJ, Pi KJ, Cui DL, Zhang ZK</i></p> <p>767 Efficacy of antisense gene therapy for proliferative cholangitis <i>Zhou Y, Li FY, Wang XD, Jiang LS, Cheng NS, Li QS, He S</i></p> <p>773 Expression of c-FLIP and caspase-8 during the formation of canine benign biliary strictures after bile duct injury <i>Li KZ, Luo L, Yao YT, Zhang X, Yan HT</i></p> |
| CLINICAL RESEARCH | <p>779 Evolution of hepatitis B virus quasispecies during sequential therapy in patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus infection <i>Wu ZP, Han T, Gao YT, Li Y, Liu T, Jing L, Liu L, Du Z</i></p> <p>786 Methylation and expression of p14ARF in colorectal cancer <i>Xiong CL, Huang Y</i></p> <p>791 Significance of expression of metastasis-related factors uPA, MMP-2, MMP-9 and TGF-β1 in gastrointestinal stromal tumors <i>Zhao Y, Wang Q, Deng X, Zhao Y, Zhang TB</i></p> |
| REVIEW | <p>798 Protective role of gastric mucin against <i>Helicobacter pylori</i> infection <i>Deng M, Jing DD</i></p> <p>803 Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer <i>Gao YF, Dong M</i></p> <p>808 Reciprocal regulation between microRNAs and DNA methylation in colorectal cancer <i>Wang F, Qin HL</i></p> |
| RAPID COMMUNICATION | <p>815 Octreotide enhances the inhibitory effects of mitomycin on the growth of gastric cancer SGC-7901 cells <i>Su HY, Liu WT, Wang BM, Zhang WZ, Su X</i></p> <p>819 Hepatocellular growth factor reduces anoikis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 <i>Gu YJ, Ao RF, Su RJ</i></p> <p>825 Protective effects of aminoguanidine on enteric cholinergic neurons and gastrointestinal motility in starved rats <i>Lu ZH, Zhang XP, Cheng AG</i></p> |
| CLINICAL PRACTICE | <p>830 Treatment of benign esophageal and cardiac stricture with covered esophageal stents: an analysis of 32 cases <i>Zheng WQ, Lin HF, Yang CQ, Gong JR, Wu LS, Zhang MJ, Weng LX</i></p> <p>834 Quality of life in patients with gastroesophageal reflux disease: an analysis of 187 cases <i>Qu GQ, Hu HY, Li A, Guo JZ, Liang XF, Tang SJ, Long X, Qian LK, Cheng XX, Cao B</i></p> <p>839 Efficacy of acupuncture at acupoints of Foot-Yangming Meridian in the treatment of patients</p> |

| | |
|---|---|
| | <p>with functional dyspepsia: an analysis of 30 cases <i>Chang XR, Lan L, Yan J, Wang XJ, Chen HM</i></p> <p>845 Correlations among serum gastrin, <i>Helicobacter pylori</i> infection and spleen-stomach damp-heat syndrome in patients with chronic gastritis <i>Zhou HM, Lv WL, Gao QH, Zhou YP, Wang J, Li TW, Liu L</i></p> <p>848 Laparoscopic versus open appendectomy in the treatment of complicated appendicitis in children: an analysis of 268 cases <i>Tian P, Wang WH, Zhang C, Wang ZK, Zhao SK</i></p> <p>851 A survey of depression patients with physical symptoms as the first symptom attending gastroenterology outpatient clinic of a general hospital: an analysis of 5 754 cases <i>Wang T, Chen YL, Lu YR</i></p> |
| APPENDIX | <p>854 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>859 Meeting events calendar in 2010</p> |
| ACKNOWLEDGMENT | 860 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology |
| COVER | <p><i>Zhou Y, Li FY, Wang XD, Jiang LS, Cheng NS, Li QS, He S.</i> Efficacy of antisense gene therapy for proliferative cholangitis.</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(8): 767-772</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/767.asp</p> |
| RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE | <p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Rui-Min Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i></p> <p>English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p> |

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date March 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 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*

《世界华人消化杂志》开放获取的出版模式实现了临床医师和公众的利益最大化

王苑本

王苑本, 中国人民解放军二七二医院 天津市 300191
通讯作者: 王苑本, 教授, 300191, 天津市, 中国人民解放军二七二医院. wangyuanben@126.com
收稿日期: 2009-12-01 修回日期: 2009-12-30
接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-03-18

Open-access publishing model for World Chinese Journal of Digestology achieves maximization of the benefits to readers, authors and the society

Yuan-Ben Wang

Yuan-Ben Wang, the 271st Hospital of Chinese PLA, Tianjing 300191, China
Correspondence to: Professor Yuan-Ben Wang, the 271st Hospital of Chinese PLA, Tianjing 300191, China. wangyuanben@126.com
Received: 2009-12-01 Revised: 2009-12-30
Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-03-18

Abstract

World Chinese Journal of Digestology (WCJD) is a peer-reviewed, online, open-access (OA) journal. The biggest advantage of the OA model is that it provides free, full-text articles in PDF and other formats for experts and the public without registration, which eliminates the obstacle that traditional journals possess and usually delays the speed of the propagation and communication of scientific research results. The open-access model has been proven to be a true approach that may achieve the ultimate goal of the journal, i.e., the maximization of the benefits to readers, authors and the society.

Key Words: World Chinese Journal of Digestology; Open-access journal; Publishing model; Maximization

Wang YB. Open-access publishing model for World Chinese Journal of Digestology achieves maximization of the benefits to readers, authors and the society. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(8): 751-754

摘要

《世界华人消化杂志》是一本全国性开放获取(open-access, OA)的学术类期刊. 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, 实现了读者、作者和社会三个价值最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展.

关键词: 世界华人消化杂志; 开放获取; 出版模式; 价值最大化

王苑本. 《世界华人消化杂志》开放获取的出版模式实现了临床医师和公众的利益最大化. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 751-754
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/751.asp>

0 引言

《世界华人消化杂志》从2004-06-06, 开始采用开放获取(open-access, OA)的出版模式^[1]. 从事临床医疗工作的医师, 其主要任务是全心全意为广大患者服务, 也就是说应以其自身良好的服务态度、精湛的技术水平为患者解除痛苦、延长甚至挽救其生命, 更为重要的事情是将自己成功的临床诊断和治疗经验总结成文发表在医学期刊上, 让更多的同行知道, 使更多的患者受益, 以发挥更大的作用. 我将自己发表文章的过程及作为《世界华人消化杂志》副总编辑谈一些OA的出版模式对临床医师和公众利益最大化的看法.

1 传统出版文章的传播作用

我自1955年从事临床医疗工作以来, 一直按上述要求努力工作. 随着时间的迁移, 确实是解除了不少患者的痛苦, 也延长、挽救了一些患者的生命, 此时, 除使我内心感到极大欣慰外, 也激励着我应更加勤奋学习, 更快、更进一步提高自己的技术水平, 以便在为患者服务中发挥

《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(科技部遴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。

更大的作用。但经过多年工作后,逐渐使我感觉到,我在临床医疗工作中所积累的一些成功经验的受益者,仅是经我治疗的少数患者,更多的患者是否受益,就不得而知了。如果是这种情况的话,在为患者服务中发挥更大作用的心愿就根本没有实现,多年来积累的宝贵经验仍被包围在一个非常局限的范围内。为此,1962年开始我采取把一些成功的、有较大实用价值的经验撰写成论文,让更多的同行知道,使更多的患者受益,以达到发挥更大作用的目的;但经数10年的观察,发挥最大作用的想法一直未能实现,现举2篇文章发表的过程。

1.1 第1篇文章回顾 我将1961-1962年在北京协和医院进修后的毕业论文《硫脲类药物对甲状腺机能亢进症的远期疗效》发表在《中华内科杂志》^[2],在该文中我们把一些最重要的经验做了阐述,除适应证、不良反应外,还特别指出:“服药时间太短”、“不要进行间断治疗”、“治疗中出现甲状腺增大和暂时性甲低如何处理”等对甲状腺机能亢进治疗成败的关键问题,但从这篇文章发至今的40多年中,我又接诊了大量在外院治疗失败转诊患者。他们都是因为没有按我在本篇文章^[2]中所提出的那些经验去做所致,而这些患者经我按上述经验进行正规治疗后,大部分得到长期缓解,部分患者临床治愈。

1.2 第2篇文章回顾 在纤维胃镜引进以前,国内各种内科学资料均认为“季节性、规律性、饥饿性上腹痛是诊断十二指肠球部溃疡的重要依据”,内科医师对凡具有上述临床表现均按十二指肠溃疡诊治。1973年我院引进日产奥林巴斯纤维内镜并用于临床,经一段时间工作后,我发现上述理论较片面、甚至不正确。于是1975年开始,我对一些具上述症状的患者都进行了包括胃镜、活组织病理学在内的简单临床研究,至1980年共积累了341例。根据结果我们得到的体会是:典型、规律性、饥饿性上腹痛可以是十二指肠溃疡的重要临床表现,而不是诊断十二指肠的主要依据。为了使更多的患者得到正确诊治,减少误诊误治给患者带来的不良后果(尤其是胃癌患者),我把这一研究结果在《人民军医》杂志上发表^[3],文章发表已近30年,期间我又接诊了大量被外院医师按老观点误诊的患者,其中最多的是慢性浅表性胃炎、慢性萎缩性胃炎、单纯十二指肠炎、胃溃疡及部分早期胃癌;这些误诊而长期疗效不佳的患者,经我们纠正其错误诊断并给予合理治疗后都得到

了长期缓解或治愈,最使我欣慰的是一些被误诊的早期胃癌都得到了手术治疗,恢复了健康。

回顾历史证明:我多年积累的经验未被广泛推广,受益患者为数极少;用李镇西先生的话讲:作者价值最大化、读者价值最大化、社会价值最大化,对我来说根本未能实现^[4]。

2 OA出版文章的传播作用

随着改革开放的深入发展,具有市场经济和计划经济并存方针的内涵不断更新,走具有中国特色社会主义道路受到了13亿人民的热烈拥护,全国上下一齐努力,国民经济得到了飞速的发展;目前,我国已成为世界经济强国,在这种国情下,胡锦涛总书记在全国科技大会上提出:“15年要建成创新型国家,这是一条道路,是一个新的起点,现在各行各业都在研究如何走出具有中国特色的创新型道路这个大问题……”。那么作为与全国人民身体健康紧密相关的医学期刊,如何通过创新,打造成中国的一流期刊就成为我们当前的重要任务,实际上,从1993年开始,马连生教授白手起家,在当时山西省科委李镇西主任鼎力支持下就开始创办了第1期《新消化病学杂志》;担任总编辑的马连生教授从杂志创办开始,就严格遵循着市场经济规律和计划经济相结合的原则,并着重市场经济模式成功创办我国唯一的一本“特殊性杂志”;但自这本特殊性杂志开始创办后10多年中,可以说历经了千辛万苦,走过了无数高低不平、布满荆棘的坎坷道路,如:当时国内的“权威性”医学杂志及一些医学界的“权威专家”,不但对这一新问世的期刊不给予支持,反而发表了冷嘲热讽的恶意语言挖苦。随即不少医学院校也做出不成文的规定:“凡在《新消化病学杂志》上刊登的文章不能做医师晋升的依据”等,一时间“乌云密布”,似乎《新消化病学杂志》只能昙花一现就必定要消失。面对这些情况,马连生教授对外界的各种杂音,不但不予以理会,反而更加辛勤、努力地对杂志未来的发展进行思考和规划,如确定杂志阶段发展目标,聘请大量具有高技术水平的医学专家,改造和扩大编辑队伍,制定杂志出版、流通、经营等管理制度,使以市场经济为主体的杂志纳入社会主义市场经济运行轨道。加之李镇西先生一直热情、坚持,特别是国家改革开放政策的深入发展,被当时称为“个体户”所办的杂志,不但没有“昙花一现”而消失,反而越办越

好,逐渐升级为《中国新消化病杂志》、《华人消化杂志》,直到现在的《世界华人消化杂志》,并于1995年、1997年经有关部门批准,又出版发行了《中国新消化杂志(英文版)》.由于英文版质量迅速提高,1998年又被国家有关部门命名为《世界胃肠病杂志(英文版)》,即 *World Journal of Gastroenterology(WJG)*,向全世界公开发行.目前,《世界华人消化杂志》、*WJG*已被国际上诸多著名医学文库收录,尤其是*WJG*被世界最权威性的Index Medicus, Medline, PubMed, Science Citation Index Expanded收录.2004年《世界华人消化杂志》被国家定为核心期刊,2006年中华人民共和国新闻出版总署给*WJG*颁发“荣获为第三届国家期刊奖百种重点期刊”证书,同年中国科学技术信息研究所给*WJG*颁发了“百种中国杰出学术期刊”证书及“中国科技核心期刊”证书,至此*WJG*与《世界华人消化杂志》已成功的实现了与国际期刊接轨的目标,而成为国内外具有一定分量的著名医学期刊.在杂志迅速发展的同时,作为两个杂志领军人物的潘伯荣名誉总编辑和马连生总编辑,其脚步不但未停止,在李镇西先生的支持下,又迈出了更大的步伐,即*WJG*在形成在线办公和网络版系统的基础上,于2004年率先在国内启动了其内涵为:“学术信息共享的自由理念和出版原创开放的新型商业模式”^[4].在这种出版模式下,学术成果可以无障碍地进行传播,任何研究人员可以平等地、免费地获取和使用,这一步为实现“作者价值最大化、读者价值最大化、社会价值最大化”,更好地为进行研究成果的快速信息传导、更好地为广大患者服务提供了一个新途径,为医学期刊办得更好提出了新方向和创新模式.一心想使自己积累多年的临床经验和一些科研成果能发挥更大作用,而又一直未能实现的我,此时才见到了曙光,内心得到了极大欣慰.只举1例即可说明:在多年临床工作中,发现了不少“胃息肉”患者,这对一般医师来说,给予息肉消融治疗即算完成任务,而对我来说,必须对发现的息肉取活组织进行病理检查明确息肉性质后再行治疗;巧合的是,在众多被发现的胃息肉中经病理证明有2例是低恶性程度的胃类癌,众所周知早期胃类癌在内镜下用肉眼观察与胃息肉是无法区别的,如果把早期胃类癌按息肉治疗方法去处理,将会给患者留下长期不良后果.为减少或者避免误诊误治,我对胃类癌的流行病学、病

因及发病机制、病理组织学所见、临床表现、诊断及治疗等问题,以述评形式发表在2002年《世界华人消化杂志》^[5].由于2004年《世界华人消化杂志》已启动了新型的模式,文章发表后,引起了的强烈反应,甚至普通患者都亲自登门拜访本人,后又应邀在天津市约200人消化内科医师参加的学术会议上做了报告,2009-04又受中华医学会总会邀请在桂林召开的“消化系统疾病新进展研讨会”上做发言交流.仅此例(当然还有一些例子),对我来说实现了多年来一直想使自己的临床经验和临床研究发挥更大作用理想,从而也证明目前的OA模式确能发挥“作者、读者、社会价值最大化”.

3 再接再厉更上一层楼

多年以前,山西省软科学院李镇西院长,在《从*WJG*创新商业模式看中国科技期刊的“突围”》一文中^[4],明确指出了三个重要观点:(1)新经济时代呼唤新的办刊理念和模式;(2)创新商业模式是突围的切入点和突破口;(3)关键在于创业的应战模式与创新活力.在文章中李先生还打了一个幽默的比喻,“一位科学家感叹地说:对于一个中国科学家来说,在国际著名期刊上发表文章,只是买了一张船票,如果我们自己打造一艘驶向国际学术界的宝船,也就是自己的精品期刊,那该多好!”.生动的比喻进一步说明了中国科技期刊必须突围创新模式,才能够立于世界先进期刊之林的道理.实际上,当时世界胃肠病杂志社马连生社长已经按着李镇西院长所提出的观点,并在李镇西院长鼎力支持下艰难地为杂志社所办的杂志进行着一系列的“突围”工作,和编辑部所有人员一起一步一步地打造着我国的精品期刊.功夫不负有心人,多年辛勤地劳动终于出现了丰硕的成果.2004-06 *WJG*正式启动了开放存取的新型期刊商业运作模式,也初步实现了作者、读者、社会价值最大化,使这种运作模式显示出巨大的生命力.因此,国家自然科学基金委杂志部祖广安主任在其发表的一篇“路在他们的脚下-*WJG*开始走向国际化”的论文中^[6],明确而肯定的评价:“*WJG*国际化取得了初步成功,成功的原因就在于他完全是按照国际上办刊模式,制定并贯彻了期刊、编辑和出版标准,成为科技期刊实行国际化得一个榜样”.同时,祖广安主任在其1篇“希望*WJG*能够成为中国学术期刊实现国际化的旗帜”一文中指出:“我们这一代参

与中国学术期刊改革的人们不可以小瞧WJG期刊的探索与发展,是在披荆斩棘、在与中国几十年来办刊的固有习惯和势力的抗争中艰难的求发展,但是前途是光明的,是每个人都可以看到的.只是看他有没有坦荡的胸怀去承认他,去鼓励他!我为自己能创办国际优秀学术期刊的远大理想和一些思路能被马社长和他的WJG期刊所采纳并逐步实现而感到高兴!为在中国大地上能够树立起这样的一面旗帜做出了一些贡献而感到欣慰!”^[7].作为《世界华人消化杂志》副总编辑,我认为有义务说:WJG在中国科技期刊突围中所取得的丰硕成果,已载入光荣的历史手册,已成为过去,今后的任务仍十分繁重,困难仍会不断出现,对于各级领导对我们的赞扬应视为是对我们的激励和把杂志办得更好所提出的进一步要求.

因此我们衷心希望世界胃肠病杂志社的全

体同仁,在今后的岁月中,应进一步认清形势、埋头苦干、锐意创新、加倍努力地工作,使杂志社越办越好,从而得到更多患者、读者、作者及社会各界的尊重和热爱;努力吧,我们的期刊一定会有更新的起色,在科技期刊突围中一定会更上一层楼.

4 参考文献

- 1 任胜利. 开放存取(Open Access): 现状与展望. 中国科技期刊研究 2005; 16: 151-154
- 2 王苑本, 史轶繁, 池芝盛. 硫脲类药物对甲状腺机能亢进症的远期疗效. 中华内科杂志 1965; 13: 933-936
- 3 王苑本, 苏正高. 规律性上腹痛在胃十二指肠疾病诊断中的意义. 人民军医 1981; 7: 42-43
- 4 李镇西. 从WJG创新商业模式看中国科技期刊的“突围”. 中国科技期刊研究 2008; 19: 667-671
- 5 王苑本, 郑伟. 胃类癌. 世界华人消化杂志 2002; 10: 995-998
- 6 中国科学基金编辑部. 路在他们的脚下-WJG期刊开始走向国际化. 中国科学基金 2007; 21: 288
- 7 祖广安. 希望WJG能够成为中国学术期刊实现国际化的旗帜. 生物医学核心期刊指南 2006; 第3版: 3-5

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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》按时完成2009年度出版任务

本刊讯 2009-12-28,《世界华人消化杂志》按时完成2009年1-36期的出版任务,出版各类文章774篇,全部经过同行专家评议.其中评论性文章158篇(20.41%),原创性文章237篇(30.62%),研究快报91篇(11.76%),临床经验253篇(32.69%),病例报告13篇(1.68%),会议纪要2篇(0.26%).

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.(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

新型乙型肝炎病毒细胞感染模型的建立

姚永远, 马立宪, 赛林涛, 邵丽华, 关彦彦, 王刚

姚永远, 马立宪, 赛林涛, 关彦彦, 王刚, 山东大学齐鲁医院
感染病科 山东省济南市 250012

邵丽华, 山东大学公共卫生学院 山东省济南市 250012
姚永远, 山东大学医学院在读硕士, 主要从事乙型肝炎病毒感染发病机制的研究。

作者贡献分布: 马立宪与姚永远对此文所作贡献均等; 此课题由马立宪、姚永远及王刚设计; 研究过程由姚永远、赛林涛、关彦彦及王刚操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由马立宪与邵丽华提供; 数据分析由姚永远、赛林涛及关彦彦完成; 本论文写作由姚永远与马立宪完成。

通讯作者: 马立宪, 教授, 主任医师, 250012, 山东省济南市文化西路107号, 山东大学齐鲁医院感染病科。mlx@sdu.edu.cn

电话: 0531-82169388

收稿日期: 2009-11-07 修回日期: 2010-01-25

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Establishment of a novel cell model of hepatitis B virus infection

Yong-Yuan Yao, Li-Xian Ma, Lin-Tao Sai, Li-Hua Shao, Yan-Yan Guan, Gang Wang

Yong-Yuan Yao, Li-Xian Ma, Lin-Tao Sai, Yan-Yan Guan, Gang Wang, Department of Infectious Diseases, Qilu Hospital, Jinan 250012, Shandong Province, China

Li-Hua Shao, College of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China

Correspondence to: Professor Li-Xian Ma, Department of Infectious Diseases, Qilu Hospital, 107 Wenhua West Road, Jinan 250012, Shandong Province, China. mlx@sdu.edu.cn

Received: 2009-11-07 Revised: 2010-01-25

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To establish a hybrid cell line (by fusing HepG2 cells with primary human hepatocytes) that can be infected by hepatitis B virus (HBV) and be serially subcultured *in vitro*, and to evaluate the infection ability of HBV in this hybrid cell line.

METHODS: Normal human hepatocytes were isolated and cultured. Primary human hepatocytes were then fused with HGPRT-deficient HepG2 cells (induced with ethyl methanesulfonate). The hybrid cells were identified by the trypsin G-banding method. After the hybrid cells and normal HepG2 cells were infected with serum-derived HBV virions, intracellular and secreted HBV DNA as well as intracellular HBV cccDNA (covalent closed circle DNA) were

detected by nested polymerase chain reaction (PCR). HBcAg in infected cells was analyzed by indirect immunofluorescence. HBsAg and HBeAg in the supernatants of infected cells were identified by electrochemiluminescence.

RESULTS: A hybrid cell line was established successfully by fusing HepG2 cells with primary human hepatocytes. This hybrid cell line could be subcultured *in vitro*. Karyotype analysis showed that the modal chromosome number of hybrid cells was 99. HBV DNA was detected consistently in both hybrid cells and their culture medium 4 days post-infection. HBV cccDNA was detected consistently 3 days post-infection. HBcAg, HBsAg and HBeAg were also detected consistently 4 days post-infection. In contrast, negative results were obtained in control HepG2 cells infected with HBV virions.

CONCLUSION: A new hybrid cell line that can be used for establishing an *in vitro* cell model of HBV infection is established successfully. This new hybrid cell line inherits the characteristics of both HepG2 cells and primary human hepatocytes.

Key Words: Hepatitis B virus; Cell model; Cell fusion; Infection

Yao YY, Ma LX, Sai LT, Shao LH, Guan YY, Wang G. Establishment of a novel cell model of hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 755-760

摘要

目的: 建立一新型细胞株, 使该细胞株既能自然感染HBV又能传代培养, 评价杂交细胞对HBV的自然感染能力。

方法: 分离培养未携带HBV的人原代肝细胞, 与诱导突变的HepG2细胞进行融合得杂交细胞, 经HAT培养基筛选, 利用胰蛋白酶G显带技术鉴定所得细胞, 用含HBV的慢性乙型肝炎患者血清感染杂交细胞(同时感染HepG2作为对照), 巢式PCR检测感染后细胞内HBV DNA合成及分泌情况以及有无HBV复制中间产

■背景资料

由于缺乏有效的体外病毒感染和复制模型系统, HBV感染肝脏的早期机制研究进展较为缓慢, 从而在一定程度上影响了乙型肝炎及其相关肝脏疾病的基础和临床研究。

■同行评议者

刘成海, 研究员, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

■研发前沿

体外模型是研究乙型肝炎的一种重要工具,迄今为止缺乏良好的HBV感染细胞模型,因此一种新的更理想的细胞模型的建立显得极为重要。

物HBV cccDNA,间接免疫荧光检测感染后细胞内HBcAg的表达,电化学发光法检测感染后细胞培养上清中的HBsAg和HBeAg。

结果: 成功建立人原代肝细胞与HepG2的杂交细胞,能体外传代培养,染色体核型分析示杂交细胞染色体众数为99条,证实为融合细胞,HBV感染后第4天起,杂交细胞内和培养上清中均能检测到HBV DNA,HBV感染后第3天起,杂交细胞内可以检测到HBV的复制中间产物HBV cccDNA,HBV感染后第4天起,杂交细胞胞质及部分胞核内HBcAg始终是阳性表达,间接免疫荧光染色呈胞质弥漫性着色,电化学发光法检测培养上清中HBsAg及HBeAg持续表达;而感染后的HepG2细胞检测结果均为阴性。

结论: 成功建立的兼具有人原代肝细胞和HepG2遗传特性的杂交细胞株可以被慢性乙型肝炎患者血清中的HBV病毒自然感染,可进一步用作研究HBV感染的体外细胞模型。

关键词: 乙型肝炎病毒; 细胞模型; 细胞融合; 感染

姚永远, 马立宪, 赛林涛, 邵丽华, 关彦彦, 王刚. 新型乙型肝炎病毒细胞感染模型的建立. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 755-760

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/755.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球范围内影响人类健康的重大问题,我国是乙型肝炎高流行地区,全国一般人群HBsAg阳性率为9.09%,估计约1.1亿人为慢性HBV感染,占全世界慢性HBV感染人数的1/3^[1]。目前人们对HBV及其所致疾病有了相当深入的认识,但由于缺乏合适的动物模型及体外细胞培养系统,HBV的生物学研究和治疗进展缓慢^[2-6]。常用的HBV细胞模型2.2.15细胞系由于HBV基因整合于细胞染色体,不能形成HBV自然生活周期中至为关键的cccDNA,与病毒自然感染存在很大差异。为此,本研究旨在建立一新型细胞系,能够自然感染HBV并能体外传代培养,为HBV感染宿主细胞的早期机制的研究,以及病毒侵入人肝细胞后完整的复制过程的研究提供一个强有力的工具。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,成人原代肝细胞取自齐鲁医

院一未携带HBV的肝血管瘤手术患者,胎牛血清、DMEM培养基、HAT选择培养基、HT培养基均购自Gibco公司,6-巯基嘌呤(6-MP)、乙基甲磺酸(EMS)、秋水仙素购自Sigma公司,二甲基亚砜(DMSO)购自Gibco公司,聚乙二醇1500(PEG)购自罗氏公司,微量样品基因组DNA提取试剂盒(TIANamp Micro DNA Kit)为北京天根生化科技有限公司产品,HBV DNA和HBV cccDNA基因扩增引物由上海博尚生物工程有限公司合成,Taq DNA聚合酶、dNTPs、DNA Marker为天根(TIANGEN)产品,绿豆核酸酶为美国Promega公司产品,单克隆抗体Mouse Anti-HBcAg为美国Chemicon公司产品,FITC标记的二抗: FITC-conjugated goat anti-mouse IgG(H+L chain specific)为美国Southern Biotechnology Associates产品,封闭用山羊血清为进口分装产品,购自上海麦莎生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HGPRT缺陷HepG2细胞(HGPRT-HepG2)的诱导和筛选^[7,8]: 选择增殖活力强并处于对数生长期的HepG2细胞,用含EMS 0.3 g/L的完全培养基作用16 h后,换为含胎牛血清100 mL/L的培养基培养7-10 d,然后更换为含6-MP 0.01 g/L的完全培养基作用48 h后用含胎牛血清50 mL/L的培养基维持生长,为防止回复突变,每3 wk左右加入6-MP重复筛选。

1.2.2 人原代肝细胞的分离与培养: 参照文献[9],取自一未携带HBV的肝血管瘤患者手术切除的肝脏组织,经病理学证实为非癌组织,超净工作台内去除坏死部位及结缔组织,用含青霉素、链霉素终浓度分别为100 IU/mL和100 mg/L的PBS缓冲液冲洗肝脏组织标本3-4次,用手术剪将标本剪成细小碎块($\leq 5 \text{ mm}^3$),采用直接胶原酶消化法在肝组织碎块中加入5 mL左右0.1 g/L的IV型胶原酶,37 °C消化15 min,将含胶原酶的上清液移入离心管中,重复上述操作1次,收集上清,将剩余组织块在200目铜网上研磨,培养基冲洗,收集上清,将收集的所有上清一起离心,500 r/min离心5 min,重复3次,以去除血细胞。用不完全培养基重悬离心所得沉淀,采用差异贴壁法分离肝实质细胞与成纤维细胞,将纯化的肝细胞用肝细胞培养基(含胎牛血清、胰岛素、地塞米松、谷胱甘肽等)培养,经台盼兰染色排除法确定肝细胞存活率 $\geq 90\%$ 。

1.2.3 细胞融合和杂交细胞的筛选: 将HGPRT-HepG2细胞和人原代肝细胞制成细胞悬液,计

数板计数, 调整浓度分别为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 等体积混合两细胞悬液, $1\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min , 30 s 内加入 $1\text{ mL } 50\%$ PEG溶液^[10], 作用 2 min , 800 r/min 离心 5 min 弃上清, 用完全培养基重悬细胞, 移入培养板, 24 h 后加HAT选择培养基, $2\text{--}3\text{ d}$ 换液1次, 2 wk 后利用有限稀释法将融合后细胞进行单克隆, 直至每孔含1个细胞, 等细胞稳定生长后换HT选择培养基, 1 wk 后换含胎牛血清 100 mL/L 胎牛血清的DMEM培养基维持培养。

1.2.4 杂交细胞的染色体核型分析: 利用常规胰蛋白酶G显带技术^[11]处理对数生长期的野生型HepG2细胞、HGPRT-HepG2细胞和杂交细胞, 高倍显微镜下观察细胞染色体标本, 分别随机计数这3种细胞的20个分裂相的染色体数。

1.2.5 HBV感染杂交细胞: 经实时定量PCR检测的HBV DNA阳性血清(来自山东大学齐鲁医院检验科)以无血清DMEM培养基稀释至 1.5×10^8 拷贝/ mL , 以HepG2细胞作为对照细胞, 将杂交细胞和HepG2细胞接种至6孔板, 生长至铺满 60% 孔板面积时(约 $4 \times 10^5/\text{孔}$)开始感染, 每孔加入 2 mL 病毒血清稀释液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 50 mL/L CO_2 条件下孵育 2 h , PBS冲洗细胞5次, 换成完全培养基, 将细胞放回 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 50 mL/L CO_2 的培养箱中继续培养^[12], 此时开始计算为 0 d 。

1.2.6 HBV感染后杂交细胞内及培养上清液中HBV DNA的检测: 从HBV感染后第1天起, 每天收集感染后杂交细胞和HepG2细胞, 用微量样品基因组DNA提取试剂盒提取感染后各天的杂交细胞和HepG2细胞的基因组DNA, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 储存备用; 为避免感染血清里病毒残留的可能, 从感染后第3天开始收集杂交细胞和HepG2细胞的培养上清液, $1\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min , 去除沉淀后煮沸裂解 10 min , $15\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min , 取上清 $10\text{ }\mu\text{L}$ 作为第1轮PCR反应的模板。巢式PCR检测感染后细胞及培养上清液内是否存在HBV DNA, 引物序列P1-1: 5'-TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3', P1-2: 5'-CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3'; P2-1: 5'-GGC TCA AGT TCA GGA ACA GT-3', P2B(B型HBV DNA下游引物): 5'-CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3', P2C(C型HBV DNA下游引物): 5'-GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3'。巢式PCR实验流程及扩增条件参考文献^[13-16]。

1.2.7 感染后杂交细胞内HBV cccDNA的检测: 选用绿豆核酸酶消化法结合缺口引物法检测

HBV cccDNA。微量样品基因组DNA提取试剂盒提取感染后各天的杂交细胞和HepG2细胞的基因组DNA, 用绿豆核酸酶消化基因组DNA, 绿豆核酸酶是单链水解酶, 使rcDNA线性化, 而cccDNA可以抵抗绿豆核酸酶的消化而保持完整双链结构, 继续作为PCR模板而被选择性扩增^[17-20], 引物序列P3-1: 5'-CTG AAT CCC GCG GAC GAC CC-3', P3-2: 5'-ACC CAA GGC ACA GCT TGG AGG-3'; P4-1: 5'-GTC TGT GCC TTC TCA TCT GCC-3', P4-2: 5'-AGA TGA TTA GGC AGA GGT GAA AAA-3'。

1.2.8 电化学发光法检测感染后细胞培养上清液中的HBsAg和HBeAg: 为了避免感染血清病毒残留的可能, 从感染后第4天开始收集杂交细胞和HepG2细胞的培养上清液, $1\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min 去除沉淀, 送往齐鲁医院检验科, 按Roche公司的HBsAg、HBeAg定量检测试剂盒说明书及Roche Elecsys 2010全自动电化学发光免疫分析仪操作流程进行检测, 计算机自动给出所测样本的COI值(Cutoff值指数)。所购Roche公司的HBsAg、HBeAg定量检测试剂盒的阳性标准为 $\text{COI} \geq 1.0$ 。

1.2.9 间接免疫荧光检测感染后杂交细胞内HBcAg的表达: 从感染后第1天起, 每天收集1孔细胞, 40 g/L 多聚甲醛(冰预冷) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 固定细胞 $15\text{--}20\text{ min}$, 100 mL/L 的山羊血清封闭 30 min , 加入抗-HBcAg一抗 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 二抗为FITC标记的山羊抗鼠IgG, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min , 荧光显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 成功建立了人原代肝细胞与HepG2细胞的杂交细胞 该杂交细胞在培养瓶中呈单层贴壁生长, 细胞呈长多角形, 比HepG2细胞略饱满, 可传代培养, 传代一次约需 $2\text{--}4\text{ d}$, 经冻存复苏后可继续生长。利用胰蛋白酶G显带技术分别对野生型HepG2细胞、HGPRT-HepG2细胞和杂交细胞的20个分裂相的染色体进行计数, 所得染色体众数分别为: 51 、 53 、 99 条(图1)。该结果表明杂交细胞为人原代肝细胞与HGPRT-HepG2细胞的杂合体。

2.2 感染后细胞及培养上清液中HBV DNA的检测 巢式PCR检测感染后细胞及培养上清液发现, 从感染后的第4天到第20天的杂交细胞及培养上清液都可以扩增 120 bp 的HBV DNA特异性片段(图2); 而对照细胞HepG2在感染后不能检出HBV DNA。这说明HBV病毒颗粒能够自然感染

■ 相关报道

常用的细胞模型HepG2.2.15细胞系稳定转染了完整的HBV基因组, 表达HBV DNA、病毒蛋白并能产生病毒样颗粒, 但由于HBV基因是通过转染而非自然感染的方式进入细胞, 不能用于HBV早期感染过程的研究, 不能形成HBV自然生活周期中至为关键的cccDNA, 与病毒自然感染存在很大差异。

■创新盘点

本研究借鉴体细胞杂交技术将人原代肝细胞与HGPRT-HepG2细胞融合得到一新型杂交细胞株,该细胞株既能自然感染HBV又能传代培养,为HBV侵入人肝脏的机制研究提供一个强有力的工具。

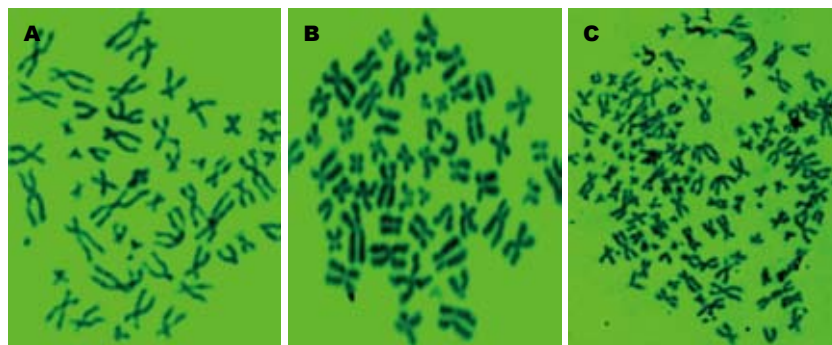


图1 细胞染色体众数. A: HepG2细胞; B: HGPRT-HepG2细胞; C: 杂交细胞。

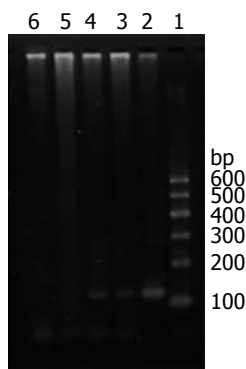


图2 HBV感染后细胞及培养上清液中的HBV DNA. 1: 分子质量标准; 2: 阳性对照(乙型肝炎患者血清中HBV DNA, C型); 3: 感染后杂交细胞培养上清中HBV DNA(C型); 4: 感染后杂交细胞中HBV DNA(C型); 5: 未感染杂交细胞中HBV DNA; 6: 感染后HepG2细胞中HBV DNA。

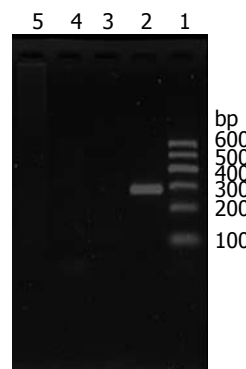


图3 HBV感染后细胞内的HBV cccDNA(294 bp为HBV cccDNA的特异性扩增片段). 1: 分子质量标准; 2: 感染后杂交细胞中HBV cccDNA; 3: 感染后HepG2细胞中HBV cccDNA; 4: 未感染杂交细胞中HBV cccDNA; 5: 乙型肝炎患者血清中HBV cccDNA。

该杂交细胞并且能够合成HBV DNA分泌到胞外。

2.3 感染后杂交细胞中HBV cccDNA的检测 绿豆核酸酶消化法结合缺口引物法检测HBV的复制中间产物HBV cccDNA发现,从感染第3天至第20天,杂交细胞内可以检测到HBV cccDNA(图3)。而对照细胞HepG2在HBV感染后没有检出HBV cccDNA。该结果提示HBV侵入细胞后启动了病毒在细胞内自然复制,合成了HBV cccDNA作为HBV DNA复制和转录的最初模板。

2.4 感染后细胞培养上清液中HBsAg和HBeAg的检测 收集感染后第4天到第20天的杂交细胞培养上清液,利用电化学发光法检测结果显示:从HBV感染后第4天起,杂交细胞能持续分泌HBsAg,最低值为2.12 IU/mL,最高值为93.16 IU/mL(≥ 1 为阳性),从感染后第5天起,杂交细胞能持续分泌HBeAg,最低值为1.012 S/Co,最高值为2.146 S/Co(≥ 1 为阳性),而对照细胞HepG2检测结果为阴性(图4)。

2.5 感染后杂交细胞内HBcAg的检测 间接免疫荧光检测证实,从感染后第1天到感染后第20天,杂交细胞胞质及部分胞核内HBcAg始终阳性表达,荧光染色后呈弥漫性着色,而对照细胞HepG2在HBV感染后没有检测到HBcAg的表达(图5)。

3 讨论

HBV属于嗜肝DNA病毒科,其感染具有高度的

种属特异性和组织特异性,能用做感染的动物模型只能是与人类亲缘关系相近的灵长类动物如黑猩猩、树鼩等^[21],然而由于黑猩猩体积较大、成本高以及受伦理道德约束等因素限制了其应用;而树鼩由于其感染效率低,且仅导致短暂的轻度感染,病毒滴度也很低^[22],因此也难以推广应用。另外,HBV相关病毒如土拨鼠HBV(WHV)、鸭HBV(DHBV)等也有用来做HBV的相关研究^[23-26],但是由于这些病毒与HBV存在一定差异,不能真实反映HBV的复制及转录情况,因此上述这些动物都不是理想的HBV动物模型。现有HBV体外感染细胞模型主要包括人原代肝细胞(primary human hepatocytes, PHH)^[27]、树鼩原代肝细胞(primary tupaia hepatocytes, PTH)和HepRG细胞^[28,29],但各自都有其缺陷,PHH来源困难、体外存活时间短,而PTH体外HBV感染效率很低, HepRG细胞在肾上腺皮质激素和DMSO连续诱导2 wk以上可获得对HBV的易感性^[30-32],但其培养条件苛刻并且化学处理后可能对HBV感染过程影响也限制了其应用。能在体外长期培养的HepG2.2.15细胞也是目前应用较广泛的细胞模型,问题是HBV是整合在宿主细胞染色体上,不能模拟HBV自然感染细胞的过程,不能形成HBV自然生活周期中至为关键的cccDNA,病毒复制水平低且不能人为改变^[33,34]。总之,目前应用于HBV

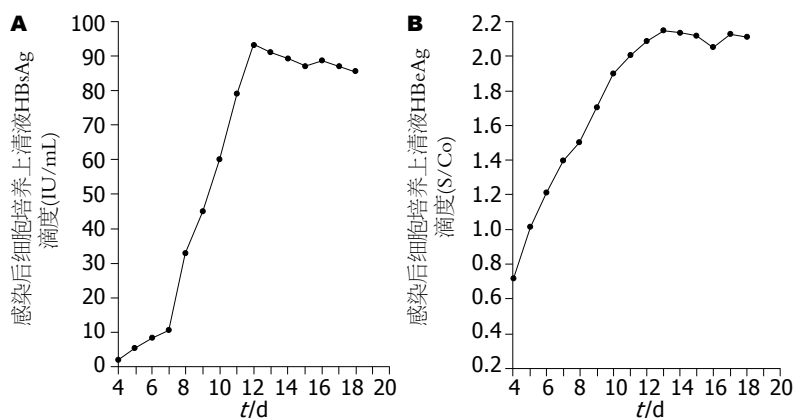


图 4 HBV感染后电化学发光法检测HBsAg和HBeAg. A: 感染后细胞培养上清液中HBsAg(≥ 1 IU/mL为阳性); B: 感染后细胞培养上清液中HBeAg(≥ 1 S/Co为阳性).

■同行评价

本文具有创新性, 方法学基本可靠, 所建立的细胞株对于乙型肝炎的基础研究与体外药效评价等均有重要意义.

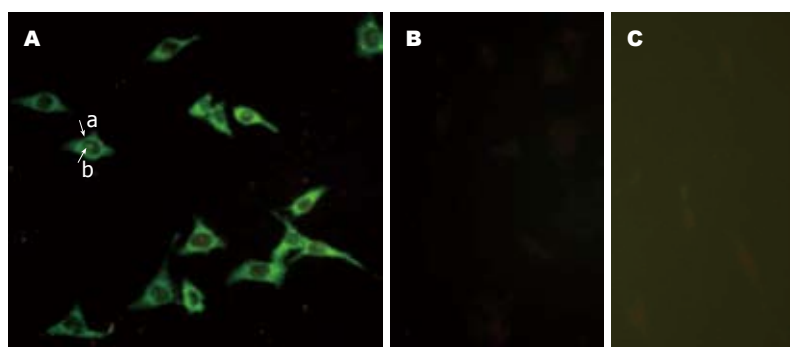


图 5 HBV感染后间接免疫荧光检测细胞内HBcAg. A: 感染后杂交细胞(a: 胞质; b: 胞核); B: 未感染杂交细胞; C: 感染后HepG2细胞.

感染的模型均存在明显的缺陷.

本实验借鉴体细胞杂交技术将人原代肝细胞与HGPRT-HepG2细胞融合, 经HAT选择培养基筛选及有限稀释法得到一新型杂交细胞株, 之所以选择HepG2细胞不仅因为他具有可传代性, 并且因其属肝胚胎瘤细胞系, 与原代肝细胞具有同源性. 核型分析证实该杂交细胞株染色体众数为99条, 人原代肝细胞为46条, HGPRT-HepG2细胞为53条, 据此可推测该杂交细胞是含人原代肝细胞和HGPRT-HepG2细胞基因组的杂交细胞. 经HBV感染实验证实, 杂交细胞株对血清来源的HBV自然感染易感, 并能在感染后启动有效的病毒复制, 合成HBV复制中间产物cccDNA, 合成HBV DNA和HBV特异性蛋白抗原HBsAg、HBeAg和HBcAg. 因此, 该杂交细胞株可作为HBV自然感染的细胞模型, 进行HBV感染宿主细胞的早期机制, 包括病毒黏附、胞吞、脱壳等早期感染过程的研究和病毒侵入人肝细胞后完整的复制过程的研究, 为体外研究HBV的自然感染及其生命过程提供新的研究平台, 目前国际上尚无类似用作HBV体外感染的细胞模型^[2,33,35].

杂交细胞融合成功到现在已经历时9 mo余, 已传至40代以上. 第40代的杂交细胞与第1代杂交细胞相比, 除在染色体数目上稍有丢失外, 在

细胞形态、生长特性和对HBV的易感性等方面没有明显差别, 说明我们建立的杂交细胞株具有较好的遗传稳定性.

本课题组之前曾用HBV携带者的原代肝细胞与HepG2细胞融合建立了一株杂交细胞HepCHLine-4^[12], 与之相比该新型细胞株有着独特的优势, 用于HBV体外感染时可以完全排除细胞模型自带病毒的影响(经巢式PCR检测, 该新型杂交细胞株本身并未携带HBV基因组), 由于是空白模型, 因此同理推测该杂交细胞株也可用作其他类型病毒性肝炎如丙型肝炎、戊型肝炎等体外感染的研究, 因硕士期间时间及精力有限, 未能进行其他病毒性肝炎的探究, 接下来将由课题组继续探讨.

4 参考文献

- 1 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长缨, 白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. 中华流行病学杂志 2005; 26: 655-658
- 2 Fellig Y, Almogy G, Galun E, Ketzinel-Gilad M. A hepatocellular carcinoma cell line producing mature hepatitis B viral particles. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 269-274
- 3 Guha C, Mohan S, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Cell culture and animal models of viral hepatitis. Part I: hepatitis B. *Lab Anim (NY)* 2004; 33: 37-46
- 4 Dandri M, Volz TK, Lütgehetmann M, Petersen J. Animal models for the study of HBV replication

- and its variants. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S54-S62
- 5 Nassal M, Dallmeier K, Schultz U, Sun D. Phenotyping hepatitis B virus variants: from transfection towards a small animal in vivo infection model. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S89-S95
- 6 Liu FJ, Liu L, He F, Wang S, Zhou TY, Liu C, Deng LY, Tang H. Establishment and primary application of a mouse model with hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5324-5330
- 7 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol* 2005; 174: 2453-2455
- 8 翁秀芳, 吴雄文, 梁智辉, 陆盛军, 卢小玲, 张彩娥, 钟茂华, 陈雪玲, 龚非力. HGPRT缺陷型T淋巴瘤细胞系的建立与鉴定. *华中科技大学学报(医学版)* 2006; 35: 701-704
- 9 LeCluyse EL, Alexandre E, Hamilton GA, Viollon-Abadie C, Coon DJ, Jolley S, Richert L. Isolation and culture of primary human hepatocytes. *Methods Mol Biol* 2005; 290: 207-229
- 10 Zhu HC, Wu SH, Huang BY, Zhu B, Gu HH, Luo XB, Xiong Z, Chen WS. [Activation of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes by fusion of human dendritic cells and melanoma cells] *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2008; 33: 1012-1018
- 11 Schreck RR, Distèche CM. Chromosome banding techniques. *Curr Protoc Hum Genet* 2001; Chapter 4: Unit4.2
- 12 Jiang Y, Wang AH, Shao LH, Wang G, Yao YY, Sai LT, Chen FZ, Zheng F, Li Y, Ma LX. A new cell culture system for infection with hepatitis B virus that fuses HepG2 cells with primary human hepatocytes. *J Int Med Res* 2009; 37: 650-661
- 13 Kirschberg O, Schüttler C, Repp R, Schaefer S. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus--genotypes A-F. *J Clin Virol* 2004; 29: 39-43
- 14 Chen J, Yin J, Tan X, Zhang H, Zhang H, Chen B, Chang W, Schaefer S, Cao G. Improved multiplex-PCR to identify hepatitis B virus genotypes A-F and subgenotypes B1, B2, C1 and C2. *J Clin Virol* 2007; 38: 238-243
- 15 Liu WC, Lindh M, Buti M, Phiet PH, Mizokami M, Li HH, Sun KT, Young KC, Cheng PN, Wu IC, Chang TT. Genotyping of hepatitis B virus--genotypes a to g by multiplex polymerase chain reaction. *Intervirology* 2008; 51: 247-252
- 16 Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. *Rev Med Virol* 2004; 14: 3-16
- 17 Kim MH, Cha CH, An D, Choi SE, Oh HB. [Performance evaluation of Abbott RealTime HBV Quantification Kit for HBV viral load by real-time PCR] *Korean J Lab Med* 2008; 28: 144-150
- 18 Hagelstein J, Fathinejad F, Stremmel W, Galle PR. pH-independent uptake of hepatitis B virus in primary human hepatocytes. *Virology* 1997; 229: 292-294
- 19 Thibault V, Pichoud C, Mullen C, Rhoads J, Smith JB, Bitbol A, Thamm S, Zoulim F. Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isolated from patients with hepatitis B virus infections. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3948-3953
- 20 Pawlotsky JM. [Virologic techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B] *Gastroenterol Clin Biol* 2008; 32: S56-S63
- 21 Feitelson MA, Larkin JD. New animal models of hepatitis B and C. *ILAR J* 2001; 42: 127-138
- 22 von Weizsäcker F, Köck J, MacNelly S, Ren S, Blum HE, Nassal M. The tupaia model for the study of hepatitis B virus: direct infection and HBV genome transduction of primary tupaia hepatocytes. *Methods Mol Med* 2004; 96: 153-161
- 23 Gudima S, He Y, Chai N, Bruss V, Urban S, Mason W, Taylor J. Primary human hepatocytes are susceptible to infection by hepatitis delta virus assembled with envelope proteins of woodchuck hepatitis virus. *J Virol* 2008; 82: 7276-7283
- 24 Kulkarni K, Jacobson IM, Tennant BC. The role of the woodchuck model in the treatment of hepatitis B virus infection. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 707-725, vii
- 25 Hu Q, Fang Y, Zhang ZM, Zhang XY, Zhang ZH, Yang DL. [Establishment of an in vivo model for duck hepatitis B virus infection using Hubei duckling] *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2008; 22: 113-115
- 26 Chen ZY, Cheng AC, Wang MS, Xu DW, Zeng W, Li Z. Antiviral effects of PNA in duck hepatitis B virus infection model. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28: 1652-1658
- 27 蔡大伟, 侯艳. 原代肝细胞培养技术研究现状及其新药研发中的应用. *解放军药理学学报* 2009; 25: 245-246
- 28 Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 22-38
- 29 刘大斌, 童贻刚. HBV的小鼠模型研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3859-3864
- 30 Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15655-15660
- 31 Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 2007; 168: 66-73
- 32 Jossé R, Aninat C, Glaise D, Dumont J, Fessard V, Morel F, Poul JM, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 1111-1118
- 33 王选举, 黄正明, 宋建国. 乙型肝炎病毒感染模型的研究进展. *传染病信息* 2009; 22: 189-192
- 34 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1005-1009
- 35 Wang K, Wang W, Song S. Dynamics of an HBV model with diffusion and delay. *J Theor Biol* 2008; 253: 36-44

编辑 李军亮 电编 何基才

硝普钠诱导肝星状细胞HSC-T6凋亡及其机制

张明明, 杨 帅, 高福禄, 马洪骏, 邵克江, 崔东来, 张振科

张明明, 崔东来, 张振科, 河北医科大学第二医院消化内科
河北省石家庄市 050000

杨帅, 承德医学院附属医院肿瘤外科 河北省承德市 067000

高福禄, 河北师范大学 河北省石家庄市 050017

马洪骏, 邵克江, 河北医科大学 河北省石家庄市 050017

张明明, 河北医科大学硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 本课题由崔东来与张明明设计; 数据分析由张明明与杨帅共同完成; 研究过程操作由张明明完成; 论文撰写由张明明完成; 修改由崔东来与张振科完成; 研究所用新试剂, 新设备及分析工具由高福禄、马洪骏及邵克江提供; 研究过程由高福禄、马洪骏、邵克江及张振科指导。

通讯作者: 崔东来, 主任医师, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科。liver369@126.com
电话: 0314-66002951

收稿日期: 2009-12-13 修回日期: 2010-01-26

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Apoptosis of hepatic stellate cells (HSC-T6) induced by sodium nitroprusside and mechanisms involved

Ming-Ming Zhang, Shuai Yang, Fu-Lu Gao,
Hong-Jun Ma, Ke-Jiang Pi, Dong-Lai Cui,
Zhen-Ke Zhang

Ming-Ming Zhang, Dong-Lai Cui, Zhen-Ke Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Shuai Yang, Department of Surgical Oncology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

Fu-Lu Gao, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Hong-Jun Ma, Ke-Jiang Pi, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Correspondence to: Dong-Lai Cui, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. liver369@126.com

Received: 2009-12-13 Revised: 2010-01-26

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate whether nitric oxide (NO) donor sodium nitroprusside (SNP) can induce the apoptosis of hepatic stellate cells (HSC-T6) and to explore potential mechanisms involved.

METHODS: The apoptosis of HSC-T6 cells was determined by flow cytometry and Hoechst staining. The nuclear translocation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 was detected by laser

scanning confocal microscopy. The expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1), type I procollagen (procollagen I), and growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD45 β) mRNAs was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The apoptosis rate was significantly higher in HSC-T6 cells treated with SNP than in control cells (20.78% \pm 5.91% *vs* 3.25% \pm 1.26%, *P* = 0.031). Apoptotic HSC-T6 cells showed dense nuclear staining or granular fluorescence after Hoechst staining. Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-mediated nuclear translocation of NF- κ B p65 was inhibited by SNP treatment. With the increase in SNP dose, the expression levels of TIMP-1, procollagen I and GADD45 β mRNAs were reduced (all *P* < 0.05).

CONCLUSION: SNP can induce the apoptosis of HSC-T6 cells and reduce the expression of TIMP-1 and procollagen I mRNAs perhaps by inhibiting NF- κ B activity and reducing GADD45 β mRNA expression.

Key Words: Sodium nitroprusside; Nuclear factor- κ B; Hepatic fibrosis

Zhang MM, Yang S, Gao FL, Ma HJ, Pi KJ, Cui DL, Zhang ZK. Apoptosis of hepatic stellate cells (HSC-T6) induced by sodium nitroprusside and mechanisms involved. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 761-766

摘要

目的: 探讨一氧化氮(nitric oxide, NO)供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)在诱导肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC-T6)凋亡中的作用及其机制。

方法: 应用流式细胞仪和Hoechst 33258染色法检测HSC凋亡; 激光扫描共聚焦显微镜检测荧光标记NF- κ B p65的核转位; Real-time PCR方法检测基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1, TIMP-1)、I型前胶原(Procollagen I)、抗凋

■背景资料

HSC的活化、增殖是肝纤维化形成的中心环节, 抑制其活化或诱导其凋亡是逆转肝纤维化的有效策略, 而核因子- κ B参与细胞凋亡的调控, 能抑制多种类型的细胞凋亡, 抑制NF- κ B活性可以诱导HSC凋亡, 近年来, NO对NF- κ B活性的调控作用是该研究领域中的热点。本实验通过NF- κ B通路研究NO供体SNP诱导HSC凋亡作用的机制, 从而为临床应用该药物抗肝纤维化治疗提供了新的理论基础。

■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

■研究前沿

国外有人报道NO可诱导HSC凋亡,其机制是通过线粒体膜通路,而NO是否可通过NF- κ B通路诱导HSC凋亡,目前尚未见人报道。

亡蛋白基因(growth arrest and DNA damage-inducible protein, GADD45 β) mRNA表达。

结果: SNP组HSC凋亡率较对照组显著增加($20.78\% \pm 5.91\%$ vs $3.25\% \pm 1.26\%$, $P = 0.031$), Hoechst 33258染色法显示SNP组HSC细胞核呈致密浓染块状或颗粒状的荧光,提示细胞出现凋亡; SNP抑制TNF介导活化的HSC NF- κ B p65核转位; 随着其剂量不断增加, TIMP-1, Procollagen I, GADD45 β mRNA表达随之减少($P < 0.05$)。

结论: SNP能诱导HSC凋亡,减少TIMP-1, Procollagen I mRNA表达,其机制可能与通过抑制NF- κ B活性,减少抗凋亡蛋白基因GADD45 β mRNA表达有关。

关键词: 硝普钠; 核因子- κ B; 肝纤维化

张明明, 杨帅, 高福祿, 马洪骏, 邵克江, 崔东来, 张振科. 硝普钠诱导肝星状细胞HSC-T6凋亡及其机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 761-766

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/761.asp>

0 引言

近年来研究认为核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路在诱导肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)凋亡, 逆转肝纤维化(hepatic fibrosis)中有重要作用^[1]. 文献报道一氧化氮(nitric oxide, NO)可调控NF- κ B活性^[2], 并可通过线粒体膜通路诱导HSC凋亡^[3], 而NO通过NF- κ B通路诱导HSC凋亡作用的机制尚未见人报道. 本实验研究NO供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)通过NF- κ B通路诱导HSC凋亡的作用, 从而为临床应用该药物抗肝纤维化治疗提供了新的希望和理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 肝星状细胞系HSC-T6系上海中医药大学徐列明教授惠赠, 其表型为活化的HSC. 小鼠抗NF- κ B p65抗体(美国Santa Cruz公司); SYBR Green Real-time PCR Master Mix(北京天根生化科技有限公司); TRIzol(北京赛百盛基因技术有限公司); PI染色剂、人型TNF- α (上海Sigma公司); NO供体硝普钠(SNP)、免疫荧光染色试剂盒-抗小鼠CY3、Hoechst染色试剂盒(江苏省海门市碧云天生物技术研究). 应用Real-time PCR测定mRNA表达: 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成, 引物序列为: GAPDH上游5'-

TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3', 下游5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'. 扩增产物: 286 bp. GADD45 β 上游5'-GCTCTAGACCCTCATCCCCCAGAACAATC-3', 下游5'-CGGAATTCGCCCTCCGCTGACTTATG-3', 扩增产物: 332 bp. I型前胶原上游5'-TTCACCTACAGCACGCTTGTG-3', 下游5'-GATGACTGTCTTGCCCCAAGTT-3', 扩增产物: 67 bp. TIMP-1上游5'-GTGTTTCCCTGTTCAGCCAT-3'. 下游5'-TATTGCCAGGTGCAAAATC-3', 扩增产物: 375 bp.

1.2 方法

1.2.1 HSCs的培养及分组: 复苏HSC-T6后, 接种于含80 mL/L胎牛血清、100 IU/mL青霉素、100 mg/L链霉素及1 mol/L HEPES的DMEM培养液中, 37 °C、50 mL/L CO₂条件下培养至对数生长期, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化终止反应, 吹打制成单细胞悬液, 细胞计数板准确计数. 实验分组: 分别设立对照组: 仅以含80 mL/L胎牛血清的DMEM细胞培养液培养细胞; SNP处理组: 加入浓度分别为1、5、10 mmol/L SNP; TNF- α 刺激组: 浓度为100 μ g/L; SNP+TNF- α 组: 先加10 mmol/L SNP 1 h后再加100 μ g/L的TNF- α 刺激1 h.

1.2.2 应用Real-time PCR测定mRNA表达: 采用TRIzol试剂盒, 按说明一步法提取细胞总RNA, 测定RNA纯度及定量并完整性鉴定, 逆转录cDNA第一链合成后行PCR; 利用基因设计软件Primer 5.0进行引物对设计. 在PE5700实时荧光定量PCR仪上进行实时定量扩增. SYBR反应体系: 25 μ L. 反应条件为: 93 °C 5 min, 1个循环; 93 °C 45 s, 55 °C 1 min, 10个循环; 93 °C 30 s, 55 °C 45 s, 30个循环. 设空白对照, PCR反应前3-15个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 调节基线至适宜处, 各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为Ct值. 扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳证实, 照相. Real-time PCR方法结果使用比较阈值法进行定量分析: 目的基因定量拷贝数 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式比较^[4,5], Ct值是热循环仪中荧光达到荧光阈值(Threshold)的循环数, ΔCt 值 = 目的基因Ct值-内参照基因Ct值, $\Delta\Delta Ct$ = 实验组 ΔCt 值-对照组 ΔCt . 对每一标本计算目的基因的拷贝数. 以对照组基因表达量为1, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值即为实验组较对照组基因表达的倍数。

1.2.3 免疫荧光染色法-抗小鼠Cy3检测NF- κ B的活性: 将计数 5×10^4 /mL细胞接种于六孔板内, 设立TNF- α 组、SNP+TNF- α 组作用HSC 2 h后, 吸尽培养液, 加入固定液固定, 固定10 min或更

长时间(可4℃固定过夜);用封闭液封闭60 min;用稀释的特定一抗(1:300)作用60 min,为增强与一抗的结合,可以4℃作用过夜;加入1 mL稀释好的荧光标记的二抗(1:500)作用60 min,回收荧光标记的二抗(注避光);以上每步间均用洗涤液洗3次,每次5 min,也可以在摇床上轻轻摇动;滴一滴本试剂盒提供的抗荧光淬灭封片液于载玻片上,使细胞接触封片液切勿弄反;如果一抗选用适当,在荧光显微镜下可以观察到红色的荧光。

1.2.4 流式细胞仪-碘化丙啶(PI)染色法检测HSC凋亡:设立对照组、SNP组(10 mmol/L SNP),每组设立3份标本重复培养24 h后,收集各组细胞 2×10^6 mL, 500-1 000 r/min离心5 min,弃去上清,3 mL PBS洗涤2次,离心后弃去,700 mL/L乙醇4℃固定过夜,用1 g/L的RNA酶37℃处理30 min,加0.5 g/L碘化丙啶染色,避光30 min,用流式细胞仪进行测定作凋亡分析。

1.2.5 Hoechst 33258染色法观察凋亡细胞的形态学改变:将计数 5×10^4 /mL细胞接种于六孔板内,设立对照组、SNP组(10 mmol/L SNP)作用HSC 24 h后,吸尽培养液,加入0.5 mL固定液,固定10 min或更长时间(可4℃过夜);去固定液,用PBS或0.9% NaCl洗2遍,每次3 min,吸尽液体,加入0.5 mL Hoechst 33258染色液,染色5 min;去染色液,用PBS或0.9% NaCl洗2遍,每次3 min,吸尽液体,滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,让细胞接触封片液,荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。

统计学处理 数据均用mean±SD表示,用SPSS15.0软件进行统计分析.两组间应用两样本均数比较的*t*检验,多组间均数差异性比较采用单因素方差分析及SNK-*q*检验进行两两比较, $P < 0.05$ 即认为有统计学意义。

2 结果

2.1 SNP对HSCs凋亡的影响 流式细胞仪-碘化丙啶(PI)染色法显示SNP组HSC凋亡率较对照组显著增加($20.78\% \pm 5.91\%$ vs $3.25\% \pm 1.26\%$, $P = 0.031 < 0.05$, 图1)。Hoechst 33258荧光染色显示对照组HSC细胞核呈弥散均匀的荧光;SNP组部分HSC的细胞核出现浓染致密的块状或颗粒状荧光,提示细胞核浓缩、染色质凝集、DNA片段化,细胞出现凋亡(图2)。

2.2 SNP对NF-κB p65的活性的影响 静息状态下NF-κB存在于细胞质,激活后转移到细胞核内,

表 1 SNP对TIMP-1, Procollagen I, GADD45β mRNA的表达影响 ($n = 3$, mean ± SD)

| 分组 | TIMP-1 | Procollagen I | GADD45β |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 对照组 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| SNP(mmol/L) | | | |
| 1 | 0.67 ± 0.35^a | 0.80 ± 0.17^a | 0.43 ± 0.20^a |
| 5 | 0.50 ± 0.28^a | 0.56 ± 0.16^a | 0.36 ± 0.18^a |
| 10 | 0.37 ± 0.27^a | 0.43 ± 0.15^a | 0.26 ± 0.07^a |

^a $P = 0.003$, $P = 0.004$, $P = 0.001$ vs 对照组。

结果显示TNF-α组激活HSC-T6 p65, SNP组抑制TNF-α介导活化的HSC-T6 p65从细胞质转移到细胞核(图3)。

2.3 SNP对TIMP-1, Procollagen I, GADD45β mRNA的表达影响 应用Real-time PCR测定TIMP-1, Procollagen I, GADD45β mRNA表达,结果表明SNP组较对照组明显减少($P = 0.003$, $P = 0.004$, $P = 0.001$)并呈剂量相关性,提示SNP抑制TIMP-1, Procollagen I, GADD45β mRNA表达见表1。

3 讨论

HSC的活化、增殖是肝纤维化形成的中心环节,在肝纤维化过程中扮演重要角色^[6-8],活化的HSC分泌大量I型前胶原(Procollagen I)、基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-1, TIMP-1)^[9],抑制其活性或诱导其凋亡是抗肝纤维化研究的热点^[10,11]。文献报道NF-κB能抑制多种类型的细胞凋亡^[12],故抑制NF-κB活性可以诱导HSC凋亡。

NO对基因表达的调节作用是近年来发现的NO的一种新的生物学效应^[2],其中NO对NF-κB活性的调控作用是该研究领域中的热点。近年来,NO发展趋势已从单纯的基础研究逐渐向应用方面转化,NO供体型药物研究取得了重大进展^[13-17]。

NF-κB是1986年由Sen和Baltimore在小鼠B淋巴细胞中发现的一种能与免疫球蛋白κ轻链基因增强子B位点特异结合的核蛋白因子^[18],具有代表性的是由p65和p50组成的异源二聚体。在非激活条件下,与其NF-κB抑制蛋白(inhibitor of κB, IκB)组合成无活性的三聚体形式,存在于细胞质中。作为可诱发的转录调节因子,NF-κB结合位点可接受免疫刺激如肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,

■ 相关报道

文献报道NO可通过线粒体膜通路诱导HSC凋亡,这为临床应用NO供体型药物治疗慢性肝病提供新的理论依据;张宁等研究发现中高浓度SNP抑制NF-κB活性的机制与其通过NO减少IκBα降解、促进IκBα再合成有关;李异玲等证明NO不但参与了化学性肝纤维化过程,并在此过程中起到抑制纤维化发展的作用。

■创新盘点

本文通过NO供体SNP抑制NF- κ B活性,减少抗凋亡蛋白基因GADD45 β mRNA表达研究SNP诱导HSC凋亡作用的机制,为肝纤维化治疗揭示新的可能靶点。

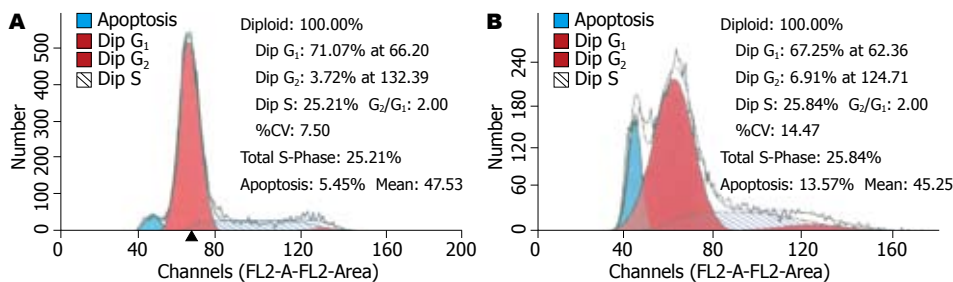


图1 流式细胞仪检测SNP对HSC-T6凋亡的作用. A: 对照组; B: SNP组.

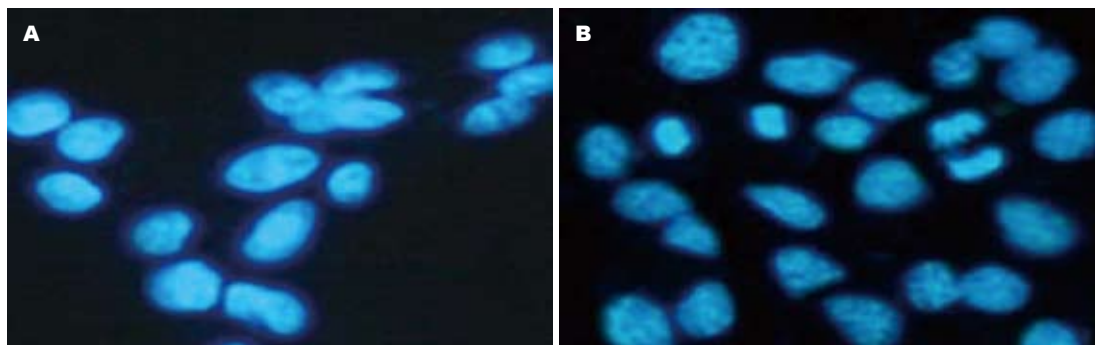


图2 Hoechst 33258荧光染色法检测SNP对HSC-T6凋亡的作用. A: 对照组; B: SNP组.

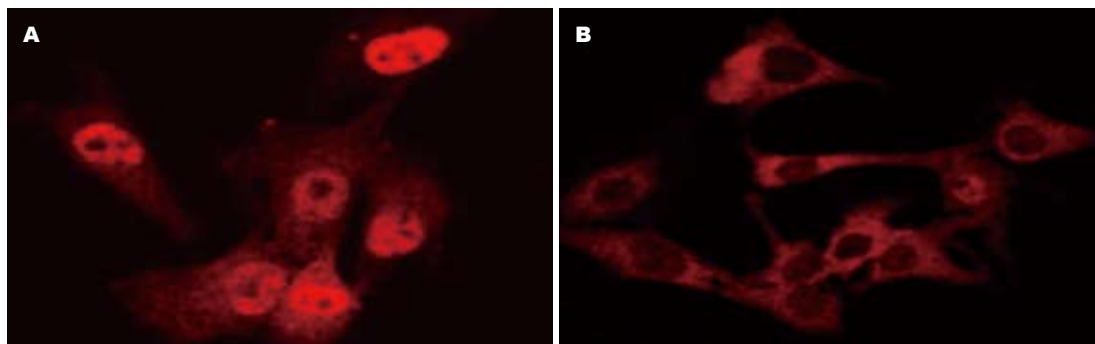


图3 激光扫描共聚焦显微镜检测荧光标记NF- κ B p65的核转位($\times 400$). A: TNF- α 组; B: SNP+TNF- α 组.

TNF- α)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)或T细胞激活剂,此外紫外线照射、电离辐射、炎症性细胞因子生长因子,以及细菌或病毒感染等均可激活NF- κ B.活化的NF- κ B被释放出来,并移位入核中,与特异性的 κ B位点结合,通过启动炎症因子的基因转录而使炎症反应放大,从而参与了肝脏的炎症损伤过程^[19-22].张宁等^[23]研究发现中高浓度SNP抑制NF- κ B活性的机制与其通过NO减少I κ B α 降解、促进I κ B α 再合成有关,本实验研究与上述报道的结果一致,通过激光扫描共聚焦显微镜形态学的观察证实了TNF- α 激活HSC的NF- κ B p65活性,SNP阻断了TNF- α 介导活化HSC的核转位,抑制了NF- κ B p65活性,进而诱导

HSC的凋亡.本实验也通过流式细胞仪和Hoechst染色法结果证实SNP可诱导HSC-T6凋亡.

肝纤维化特征是以胶原为主的细胞外间质(extracellular matrix, ECM)在肝内过多沉积^[24,25],其中I型胶原是ECM的主要成分.基质金属蛋白酶抑制因子(TIMPS)通过阻止ECM降解,从而形成或促进肝纤维化,邹海峰等^[26]研究表明TIMP-1参与肝纤维化的形成过程,并与肝纤维化的程度成正相关.本实验通过Real-time PCR方法检测TIMP-1, Procollagen I mRNA表达,结果显示随着SNP浓度不断增加, TIMP-1, Procollagen I mRNA表达随之减少($P = 0.003, 0.004$),提示SNP可以减少TIMP-1, Procollagen I mRNA表达,故我们认为SNP可以减少TIMP-1,

Procollagen I 从而抑制肝纤维化, 李异玲等^[27]证明NO不但参与了化学性肝纤维化过程, 并在此过程中起到抑制纤维化发展的作用. 我们的研究与其报道的结果一致.

GADD45(growth arrest and DNA damage-inducible protein, GADD45)是抑制细胞生长及DNA损伤诱导表达的蛋白, 其基因家族参与细胞周期进程及细胞凋亡的调控^[28], GADD45 β 是GADD45家族中的一员, 属于核内蛋白, 是个抑制细胞凋亡的基因, 受NF- κ B调控, GADD45 β 的表达需要NF- κ B的诱导, 细胞核因子NF- κ B是GADD45 β 的上游调节因子^[29-31]. 本实验通过Real-time PCR方法检测GADD45 β mRNA表达, 结果显示随着SNP浓度不断增加, GADD45 β mRNA表达随之减少($P = 0.001$), 提示SNP可以下调抗凋亡蛋白基因GADD45 β 表达. 因此, 我们认为SNP诱导HSC凋亡的可能机制为SNP通过抑制NF- κ B活性, 阻断下游靶基因GADD45 β 表达, 从而诱导HSC凋亡.

总之, 我们认为SNP能诱导HSC凋亡, 减少TIMP-1, Procollagen I mRNA表达, 其机制可能与通过抑制NF- κ B活性, 减少抗凋亡蛋白基因GADD45 β mRNA表达有关. 本实验通过NF- κ B通路研究SNP诱导HSC凋亡作用的机制, 从而为肝纤维化形成的分子机制研究提供新的理论依据, 也为肝纤维化治疗揭示新的可能靶点.

4 参考文献

- Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 33: 49-58
- Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 66-75
- Langer DA, Das A, Semela D, Kang-Decker N, Hendrickson H, Bronk SF, Katusic ZS, Gores GJ, Shah VH. Nitric oxide promotes caspase-independent hepatic stellate cell apoptosis through the generation of reactive oxygen species. *Hepatology* 2008; 47: 1983-1993
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- Arocho A, Chen B, Ladanyi M, Pan Q. Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn Mol Pathol* 2006; 15: 56-61
- 姜慧卿, 姚希贤. 肝星状细胞的活化与肝纤维化. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 86-89
- Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 311-335
- Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G256-G265
- Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384
- 武晓茜, 汪晖, 廖长秀. 吡啶-3-原醇对乙酰醛所致精密肝切片中星状细胞活化的影响. *中国药理学通报* 2007; 23: 441-445
- Arthur MJ. Reversibility of liver fibrosis and cirrhosis following treatment for hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1525-1528
- Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* 2007; 46: 590-597
- Megson IL, Webb DJ. Nitric oxide donor drugs: current status and future trends. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 587-601
- Scatena R, Bottoni P, Martorana GE, Giardina B. Nitric oxide donor drugs: an update on pathophysiology and therapeutic potential. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14: 835-846
- Hou YC, Janczuk A, Wang PG. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des* 1999; 5: 417-441
- Wang PG, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, Janczuk AJ. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev* 2002; 102: 1091-1134
- Cirino G. Nitric oxide releasing drugs: from bench to bedside. *Dig Liver Dis* 2003; 35 Suppl 2: S2-S8
- Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716. *J Immunol* 2006; 177: 7485-7496
- Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med* 1998; 24: 1131-1138
- Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kappaB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 64-73
- Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 749-759
- Inoue J, Gohda J, Akiyama T, Semba K. NF-kappaB activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci* 2007; 98: 268-274
- 张宁, 徐永健, 张珍祥. 硝普钠对核因子 κ B活性影响的初步研究. *中国病理生理杂志* 2004; 20: 1013-1016
- Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut* 2001; 49: 577-583
- Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549
- 邹海峰, 刘洋, 徐华锋, 林平, 王立峰, 于晓光. TIMP-1在肝纤维化形成过程中的作用. *哈尔滨医科大学学报* 2005; 39: 25-28
- 李异玲, 王天骄, 傅宝玉. 一氧化氮在实验化学性肝纤维化中作用的探讨. *中国医科大学学报* 2000; 29:

■应用要点

本文通过NF- κ B通路研究SNP诱导HSC凋亡作用的机制, 从而为临床应用NO供体型药物治疗肝纤维化提供新的理论依据.

■同行评价

本研究选题有一定新意,设计合理,统计学处理恰当,结论可靠,有一定的学术价值.

- 51-52
- 28 Zhang W, Bae I, Krishnaraju K, Azam N, Fan W, Smith K, Hoffman B, Liebermann DA. CR6: A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control. *Oncogene* 1999; 18: 4899-4907
- 29 Papa S, Monti SM, Vitale RM, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, De Smaele E, Dathan N, Pedone C, Ruvo M, Franzoso G. Insights into the structural basis of the GADD45beta-mediated inactivation of the JNK kinase, MKK7/JNKK2. *J Biol Chem* 2007; 282: 19029-19041
- 30 De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R, Franzoso G. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 2001; 414: 308-313
- 31 Papa S, Zazzeroni F, Bubici C, Jayawardena S, Alvarez K, Matsuda S, Nguyen DU, Pham CG, Nelsbach AH, Melis T, De Smaele E, Tang WJ, D'Adamio L, Franzoso G. Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 146-153

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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)

反义基因治疗对慢性增生性胆管炎的抗增殖作用

周涌, 李富宇, 王晓东, 蒋力生, 程南生, 李全生, 何生

周涌, 李富宇, 王晓东, 蒋力生, 程南生, 李全生, 何生, 四川大学华西医院肝胆外科 四川省成都市 610041
王晓东, 佳木斯市中心医院 黑龙江省佳木斯市 154002
周涌, 副教授, 主要从事肝胆胰外科的基础和临床研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30801111
教育部博士点新教师基金资助项目, No. 200806101065
作者贡献分布: 此课题由周涌、李富宇及何生设计; 研究过程由王晓东与蒋力生操作完成; 数据分析由程南生与李全生完成; 本论文写作由周涌与李富宇完成.
通讯作者: 周涌, 副教授, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院肝胆外科. lfy_74@vip.163.com
收稿日期: 2009-11-26 修回日期: 2010-01-18
接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-18

Efficacy of antisense gene therapy for proliferative cholangitis

Yong Zhou, Fu-Yu Li, Xiao-Dong Wang, Li-Sheng Jiang, Nan-Sheng Cheng, Quan-Sheng Li, Sheng He

Yong Zhou, Fu-Yu Li, Xiao-Dong Wang, Li-Sheng Jiang, Nan-Sheng Cheng, Quan-Sheng Li, Sheng He, Department of Hepatobiliary Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Xiao-Dong Wang, Central Hospital of Jiamusi City, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China
Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30801111; and the Doctoral Fund of Ministry of Education of China, No. 200806101065
Correspondence to: Associate Professor Yong Zhou, Department of Hepatobiliary Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. lfy_74@vip.163.com
Received: 2009-11-26 Revised: 2010-01-18
Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To compare the effects of short hairpin RNAs (shRNAs) targeting the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), c-Myc and cdc2 k genes on the hyperplastic behavior and lithogenic potential of proliferative cholangitis (PC), and to select the best target for antiproliferative treatment of PC.

METHODS: A rat model of PC was developed by retrogradely inserting a nylon thread into the common bile duct. Using the nylon thread as the guide wire, an intraluminal injection of PCNA, c-Myc and cdc2 k shRNAs into the common bile

duct was performed in three different groups of model rats, respectively.

RESULTS: Compared to the c-Myc and cdc2 k shRNA treatment groups, the degree of hyperplasia of biliary epithelium and collagen fibers in the bile duct wall in the PCNA shRNA treatment group were significantly decreased. In addition, the protein expression and secretion of mucin from the hyperplastic biliary epithelium and peribiliary gland were remarkably reduced in the PCNA shRNA treatment group.

CONCLUSION: PCNA shRNA possesses more strong inhibitory effects on collagen fiber hyperplasia in and mucin secretion from the bile duct wall of rats with experimental PC than c-Myc and cdc2 k shRNAs. Therefore, PCNA shRNA holds more promise for prevention of postoperative biliary restenosis and stone recurrence in PC patients.

Key Words: Proliferative cholangitis; Hepatolithiasis; Recurrence; Biliary restenosis; Antisense gene therapy

Zhou Y, Li FY, Wang XD, Jiang LS, Cheng NS, Li QS, He S. Efficacy of antisense gene therapy for proliferative cholangitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 767-772

摘要

目的: 探讨并对比PCNA、c-Myc、cdc2 k shRNA对PC的过度增殖和成石潜力的影响, 以期筛选PC抗增殖治疗的最佳靶点.

方法: 经十二指肠乳头向胆总管内逆行插入尼龙缝合线建立慢性增生性胆管炎的大鼠实验模型. 三种反义治疗组则以尼龙缝合线为导引向胆总管内分别注入0.5 mL的PCNA、c-Myc或cdc2 k shRNA.

结果: PCNA shRNA治疗组的胆道黏膜上皮和胆管壁胶原纤维的过度增殖程度均明显低于c-Myc、cdc2 k shRNA治疗组; 此外, PCNA shRNA治疗组胆管壁的黏蛋白基因表达及黏蛋白分泌也低于c-Myc、cdc2 k shRNA治疗组.

■背景资料

近年来, 随着对肝内胆管结石病理的深入研究发现, 结石的术后高复发率和胆道再狭窄率均与术后遗留的慢性增生性胆管炎(PC)密切相关. PC在肝内胆管结石的发生和发展中发挥着极为重要的作用. PC业已被认为是结石术后复发的主要诱因和病理学基础所在, 而对PC的后续治疗将有助于降低结石复发率和胆道再狭窄率, 但遗憾的是对于PC的治疗现阶段仍无行之有效的办法.

■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科; 刘连新, 教授, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

■研究前沿

PC这种慢性增殖性炎症结构亦是肝内胆管结石并发胆管癌的病理学结构基础, 对这种慢性增殖性炎症的早期阻断亦有助于预防胆管癌的发生, 但遗憾的是对于PC的治疗现阶段仍无有效的解决办法。

结论: PCNA shRNA治疗能够更为有效的抑制PC病变胆管的胶原纤维过度增生及黏液过度分泌, 更有望达到预防胆道再狭窄和结石术后复发的目的。

关键词: 肝内胆管结石; 慢性增生性胆管炎; 复发; 胆道狭窄; 反义基因治疗

周涌, 李富宇, 王晓东, 蒋力生, 程南生, 李全生, 何生. 反义基因治疗对慢性增生性胆管炎的抗增殖作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 767-772

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/767.asp>

0 引言

肝内胆管结石虽是亚太地区的常见病, 但其至今仍被视为是一种难治性疾病; 单纯的手术治疗已很难使当今肝内胆管结石的远期疗效有较大的提高, 如何预防肝内胆管结石的术后复发和胆道再狭窄至今依然是肝胆外科中的难点, 对其治疗亦需探讨新的途径^[1-5]. 近年来, 随着对肝内胆管结石病理的深入研究发现, 结石的术后高复发率和胆道再狭窄率均与术后遗留的慢性增生性胆管炎(proliferative cholangitis, PC)密切相关^[6-10]. PC在肝内胆管结石的发生和发展中发挥着极为重要的作用^[11,12]. 首先, PC病变胆管壁内过度增生的纤维结缔组织可促使胆管腔的变形及狭窄, 造成胆汁淤积. 其次, 大部分的胆管周围腺体均有旺盛的黏液分泌功能, 这进一步的加剧了病变胆管腔内的胆汁淤积. 另需着重指出的是, 这些分泌至胆管腔内的过多的黏液不仅参与形成启动结石生成的成核因子, 而且还可通过促使胆汁中其他成分的聚集、沉淀, 形成丝网状支架而使结石增大^[8,13,14]. 鉴于此, PC业已被认为是结石术后复发的主要诱因和病理学基础所在, 而对PC的后续治疗将有助于降低结石复发率和胆道再狭窄率, 但遗憾的是对于PC的治疗现阶段仍无行之有效的办法^[13-17].

鉴于PC是一种慢性增殖性疾病的特点, 抗增殖治疗可能会有助于抑制PC的过度增殖行为, 而这种过度增殖行为又恰恰与肝内胆管结石的形成密切相关^[7,9,18]. 鉴于此, 我们在前期研究中曾分别探讨了PCNA、c-Myc、cdc2k shRNA对PC的抗增殖疗效, 以期通过控制或逆转PC, 而达到预防结石术后复发和胆道再狭窄的目的^[8,10]. 本研究拟在前期研究基础上, 进一步对比三种反义治疗的确切疗效, 以期筛选PC抗增殖治疗的最佳靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠56只, 体质量220-250 g, 由四川大学华西实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 随机分为以下5组: 慢性增生性胆管炎模型组(PC模型组, 10只): 按Park等介绍的方法建立慢性增生性胆管炎动物模型^[9]. 以26号针头刺破十二指肠前壁, 经十二指肠乳头向胆总管内逆行插入5-0的尼龙缝合线直至肝门处, 缝合线末端缝合戳孔处; 三种反义治疗组(PCNA组、c-Myc组、cdc2k组, 每组10只): 以尼龙缝线为导引, 向胆总管内插入20号静脉留置针, 分别注入0.5 mL的PCNA、c-Myc或cdc2k shRNA; 假手术组(SO组, 6只): 仅行开腹手术. 7 d后, 收集胆总管内的胆汁以备Mucin 3的ELISA检测, 切取大鼠胆总管以备进一步检测。

1.2.2 Ki-67和Mucin3的Real time-PCR检测: 以TRIzol提取胆管壁总RNA, RNA的逆转录反应按照试剂盒说明进行. 用SYBR Green进行实时荧光定量分析, 以目标基因与GAPDH的比值作为相对表达水平。

1.2.3 Mucin 3的ELISA检测: 胆汁标本与Mucin 3抗体在96孔板内孵育1 h, PBS漂洗后每空加入100 μ L过氧化物聚合羊抗鼠血清孵育1 h, PBS漂洗3次, TMB显色, 450 nm读取积分光密度。

1.2.4 collagen I 的Western blot检测: 取100 μ g蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳, 电转膜至PVDF后进行杂交. 滴加collagen I 一抗后4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBS漂洗后, 滴加HRP结合的二抗孵育2 h, X线显影, 以目标基因与 β -actin表达的积分光密度比值作为相对表达水平。

统计学处理 应用SPSS10.01统计软件进行分析处理. 计量资料以mean \pm SD表示, 各组间比较用方差分析(One-way ANOVA), 两两比较用LSD过程. 差异显著标准: $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 组织学观察 PC模型组胆管的主要病理特点为: 乳头状增生的胆管黏膜上皮、过度增生的黏膜下腺体、纤维化增厚的胆管壁, 这些病理改变均可导致胆管腔的阻塞及狭窄(图1A), 而且上述病理变化与肝内胆管结石病例中经常观察到的慢性增生性胆管炎十分相似. 值得关注的是, 三种反义治疗组的胆道黏膜上皮、管周黏膜下腺体、管壁胶原纤维的过度增殖情况、胆管壁的纤维化增厚程度均较PC模型组明显降

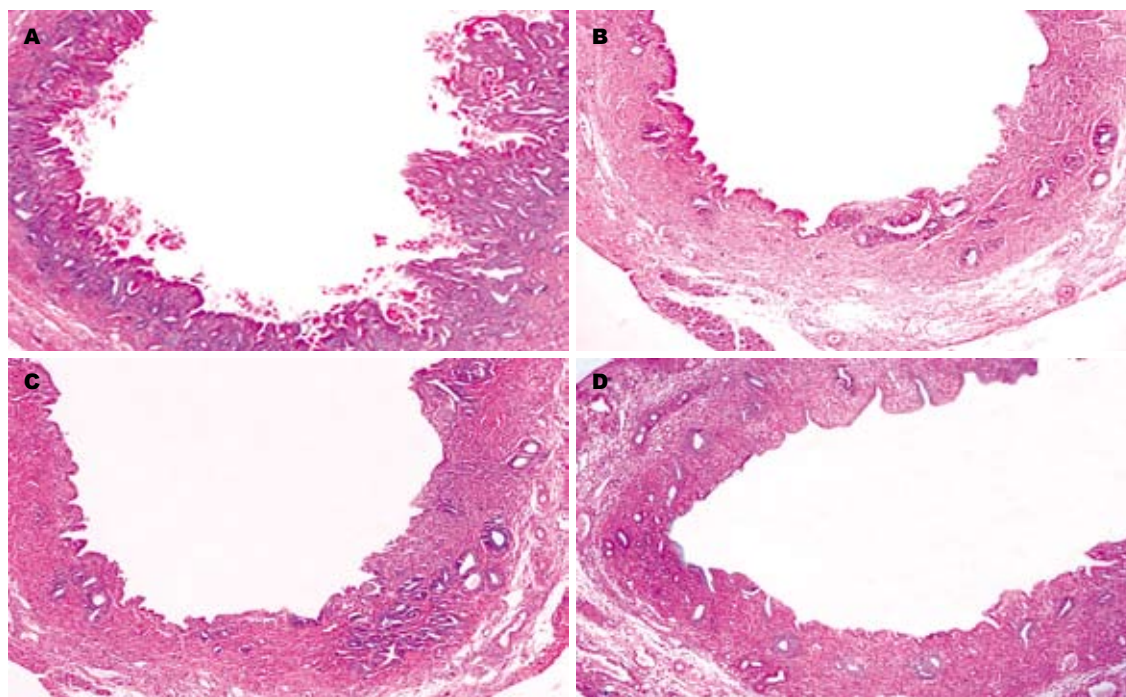


图1 各组胆管壁的HE染色。A: PC组; B: PCNA shRNA组; C: c-Myc shRNA组; D: cdc2k shRNA组。

低, 特别是PCNA shRNA治疗组(图1B-D)。此外, PCNA shRNA治疗组的胆管壁纤维化增厚程度虽略低于c-Myc和cdc2k shRNA组, 但差异并未达到统计学意义($P>0.05$, 图2)。

2.2 Ki-67的表达变化 PC模型组胆管壁的Ki-67表达明显上调; c-Myc和cdc2k shRNA治疗组的Ki-67 mRNA表达较PC组已明显降低, 而PCNA shRNA治疗组的降低程度要更为明显, 但其表达水平仍高于假手术组($P<0.05$)。c-Myc和cdc2k shRNA治疗组之间的Ki-67表达并无显著性差异($P>0.05$, 图3)。

2.3 胆管壁Mucin 3 mRNA表达变化 PC模型组胆管壁的Mucin 3 mRNA表达明显上调, 但经PCNA、c-Myc或cdc2k shRNA治疗后, Mucin 3 mRNA表达明显降低, 其中PCNA shRNA治疗组的Mucin 3 mRNA表达又要略低于c-Myc和cdc2k shRNA治疗组, 但仍高于假手术组($P<0.05$, 图4)。

2.4 胆汁中Mucin 3蛋白表达 PC模型组胆汁的Mucin 3蛋白含量增加至假手术组的3倍, 而经PCNA、c-Myc或cdc2k shRNA治疗后, Mucin 3蛋白含量明显下降。此外, PCNA shRNA治疗组的Mucin 3蛋白虽略低于c-Myc和cdc2k shRNA治疗组, 但差异并不显著($P>0.05$, 图5)。

2.5 病变胆管壁的collagen I检测 PC模型组的collagen I蛋白表达明显上调, 但经PCNA、c-Myc或cdc2k shRNA治疗后, collagen I蛋白表达明显降低, 其中PCNA shRNA治疗组的减低程

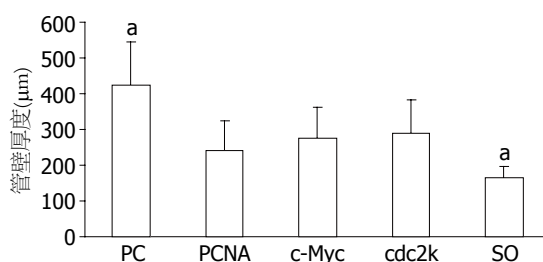


图2 不同组胆管壁厚度比较。* $P<0.05$ vs PCNA shRNA组。

度最为明显, 但仍高于假手术组($P<0.05$, 图6)。

3 讨论

作为一种难治性疾病, 肝内胆管结石具有治疗失败率高和复发率高(4.2%-40%)等特点, 其术后4-10年的再手术率可高达37.1%-74.4%^[19-21]。过去, 由于我们过多的关注于如何提高肝内胆管结石的手术技能, 未能充分的认识到PC与结石形成及发展之间的关系, 对取石后尚遗留的PC一直未给与足够的重视, 由此而造成的术后胆道再狭窄和结石复发等问题极大地影响了当今肝内胆管结石的术后远期疗效^[2-4,7-10,15]。PC与结石之间可形成恶性循环: 结石本身及其继发的感染均可刺激胆管壁组织持续性过度增生, 发生PC和胆管狭窄, 而反过来PC的反复发作, 又可通过产生黏蛋白及造成胆道狭窄、胆汁淤积等病理改变促成新的结石形成^[13-18]。因而即使取净结石后, 由结石引发的PC仍将持续、广泛的

■相关报道

近年来, 多项体内、外研究业已表明, 应用反义技术特异性的封闭增殖相关基因(PCNA、c-Myc、cdc2k或E2F等)的表达, 可通过阻止细胞从G₁进入S期或从G₂进入M期进行DNA复制, 使细胞的增殖活动明显受到抑制, 可有效地防止球囊成形术后因血管内膜细胞过度增殖所致的管腔狭窄, 在过度增殖性疾病的治疗中显示了良好的应用前景。

■应用要点

通过对手术后或胆道镜取石后遗留的PC的后续治疗将有助于预防肝内胆管结石的术后复发及胆管再狭窄率,从而减少肝内胆管结石患者的再次手术或内镜取石的机率。

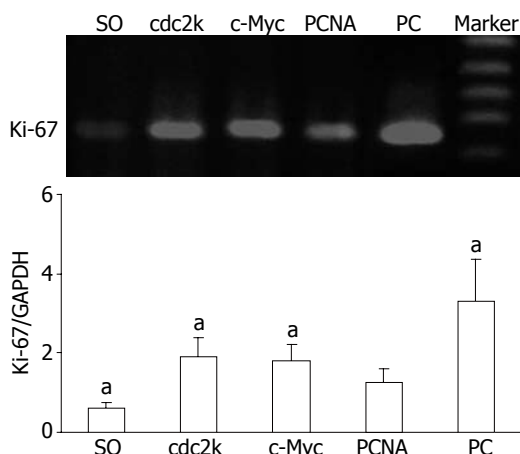


图3 Ki-67的RT-PCR检测. ^a $P < 0.05$ vs PCNA shRNA组.

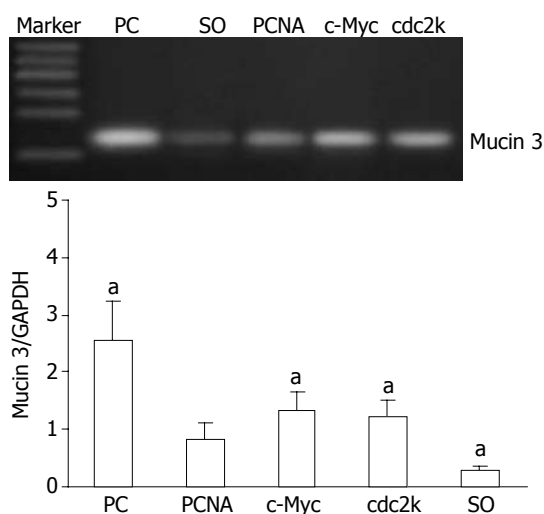


图4 胆管壁Mucin 3的RT-PCR检测结果. ^a $P < 0.05$ vs PCNA shRNA组.

存在,成为结石术后复发的隐患.由此可见,对肝内胆管结石的治疗,不仅要重视结石的清除和病变胆管狭窄的纠正,更要注重对术后遗留的PC的后续治疗,因PC恰是该恶性循环的中枢环节^[9,14,17].鉴于此,我们有理由相信,通过对手术后或胆道镜取石后遗留的PC的后续治疗将有助于预防肝内胆管结石的术后复发及胆管再狭窄率,从而减少肝内胆管结石患者的再次手术或内镜取石的机率^[3,15,20-22].另需着重指出的是,PC这种慢性增殖性炎症结构亦是肝内胆管结石并发胆管癌的病理学结构基础,对这种慢性增殖性炎症的早期阻断亦有助于预防胆管癌的发生^[14-18,23].但遗憾的是对于PC的治疗现阶段仍无有效的解决办法.

作为慢性增生性胆管炎的主要病理学表现,胆道黏膜上皮的过度增殖在肝内胆管结石的形成及发展中起到了至关重要的作用,但现阶段

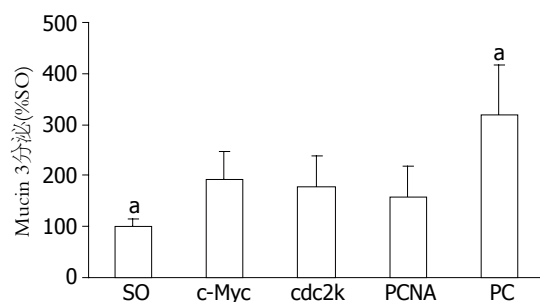


图5 胆汁中Mucin 3蛋白的ELISA检测. ^a $P < 0.05$ vs PCNA shRNA组.

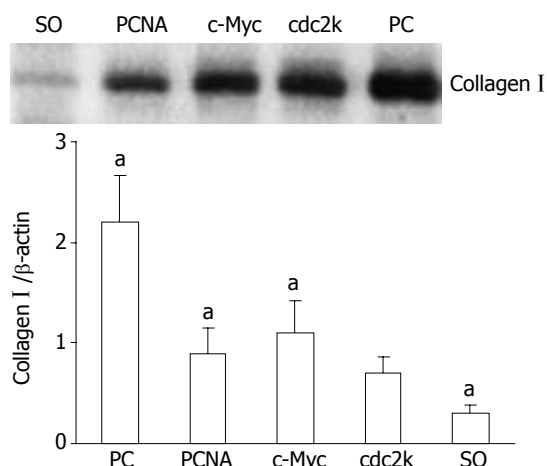


图6 胆管壁collagen I的Western blot检测. ^a $P < 0.05$ vs PCNA shRNA组.

却无任何行之有效的治疗措施来控制或逆转病变胆管黏膜的这种过度增殖行为^[9,17-21].近年来,多项体内、外研究业已表明,应用反义技术特异性的封闭增殖相关基因(PCNA, c-Myc, cdc2k或E2F等)的表达,可通过阻止细胞从G₁进入S期或从G₂进入M期进行DNA复制,使细胞的增殖活动明显受到抑制,可有效地防止球囊成形术后因血管内膜细胞过度增殖所致的管腔狭窄,在过度增殖性疾病的治疗中显示了良好的应用前景^[24-28].鉴于PC也是一种慢性增殖性疾病的特征,我们在前期研究中探讨并证实了,病变胆管腔内给予PCNA、c-Myc、cdc2k shRNA能够通过特异性的封闭PCNA、Ki-67等细胞增殖相关基因的表达,抑制胆管黏膜上皮的过度增殖及胆管壁的纤维化增厚^[8,10].在本研究中进一步的对比上述三种反义治疗的确切抗增殖疗效时发现,PCNA shRNA治疗组的胆管黏膜的增生程度及Ki-67表达水平均明显低于c-Myc或cdc2k shRNA治疗组.该结果提示,PCNA shRNA治疗能够更为有效的抑制胆管黏膜的过度增殖行为,更有望成为PC抗增殖治疗的最佳靶点.

作为慢性增生性胆管炎的另两项主要病理学表现, 病变胆管壁胶原纤维的过度增生及黏液的过度分泌亦在胆道狭窄及结石形成中起到了至关重要的作用^[9,16,28,29]. 首先, 由胶原纤维过度增生所致的胆道狭窄可改变胆汁流, 造成胆汁淤积; 而胆汁淤积及胆道狭窄又可引发细菌定植及胆道感染, 可刺激胆管黏膜分泌大量的黏液^[16,21,30]. 分泌至胆管腔内过多的黏液将促使非结合胆红素及钙盐的溶解性降低, 并相互结合形成结石的成核因子. 不仅如此, 胆汁中如存在过多的黏液还可促使胆汁中的其他成分聚集、沉淀, 形成结石的丝网状支架而使结石增大^[29,31]. 鉴于此, 我们有理由相信, 通过对这种胶原纤维过度增殖及黏液过度分泌的有效抑制, 将有助于减少结石的术后复发率及胆道再狭窄率, 但现阶段对此却无任何行之有效的治疗措施^[23,27-29].

对此, 我们在前期研究中曾探讨并证实了, PCNA、c-Myc或cdc2k shRNA治疗能够通过抑制增殖相关基因的表达来抑制病变胆管壁胶原纤维的过度增殖; 此外, 三种反义治疗对胆管黏膜上皮及黏膜下腺体的抗增殖疗效还有助于降低病变胆管的黏液分泌^[8,10]. 在本研究中进一步对比三种反义治疗的确切疗效时发现, PCNA shRNA治疗组的胆汁中Mucin 3含量和胆管壁厚度虽略低于c-Myc或cdc2k shRNA治疗组, 但差异并不显著. 然而, PCNA shRNA治疗组的胆管壁Mucin 3 mRNA和collagen I 蛋白表达却显著低于c-Myc或cdc2k shRNA治疗组. 上述结果表明, PCNA shRNA治疗能够更为有效的抑制PC病变胆管壁的胶原纤维过度增生及黏液过度分泌, 更有望达到抑制病变胆管成石潜力的目的. 上述三种反义治疗的不同疗效的根源可能在于: PCNA作为细胞增殖所必需的核抗原, 是DNA聚合酶 δ 的重要辅助因子, 许多细胞内、外增殖因子如c-Myc、EGF、TGF- α 的信号传导过程都必须经过PCNA的参与, 才能引发细胞的DNA合成及分裂增殖; 与c-Myc、cdc2k相比, PCNA在DNA复制、细胞增殖和细胞周期调控中可能发挥着更为广泛和关键的作用, 因而, 靶向PCNA的反义抗增殖治疗, 能够更为有效的抑制PC的过度增殖行为和成石潜力, 更有望达到预防结石复发和胆管再狭窄的目的^[15,27,32,33].

现阶段肝内胆管结石术后高复发率的根源即在于: 目前尚无任何有效的药物来控制结石复发的病理基础-PC, 因而在胆道镜取石后也无

任何的后续的药物治疗措施, 只有任凭结石的复发, 这使此类患者常需多次进行手术或胆道镜取石^[7-11]. 对此, 我们的研究结果显示, 三种反义治疗, 特别是应用PCNA shRNA治疗能够有效的抑制PC的过度增殖行为和成石潜力. 虽然本实验是在胆总管上验证而不是在肝内胆管, 但这种新的抗增殖疗法依然在PC的治疗中显示了良好的应用前景, 因本研究中所选用的大鼠PC模型业已被证实与人肝内胆管结石的病理学和细菌学均十分相似^[9,17-19]. 鉴于此, 本研究可能会为预防肝内胆管结石术后复发和胆管再狭窄的药物研发奠定相关实验基础, 以期减少或避免肝内胆管结石患者的再次手术或内镜治疗机率, 从而提高当今肝内胆管结石的术后远期疗效^[3,5,19-21,34]. 但目前该方面的研究甚少, 本研究也仅对其疗效进行了初步的探讨, 该新疗法的远期疗效、相关并发症及更为全面的靶基因筛选均需在后续的研究中进一步探讨和验证^[24-27,35].

4 参考文献

- 1 Liu CL, Fan ST, Wong J. Primary biliary stones: diagnosis and management. *World J Surg* 1998; 22: 1162-1166
- 2 Huang ZQ, Huang XQ. Evolution of surgical treatment of intrahepatic lithiasis in China. *World J Gastroenterol* 1997; 3: 131-133
- 3 He XD, Liu W, Li BL, Zhang ZH, Zhang JX. Combined surgical therapy for hepatolithiasis. *Chin Med Sci J* 2005; 20: 123-125
- 4 Chijiwa K, Yamashita H, Yoshida J, Kuroki S, Tanaka M. Current management and long-term prognosis of hepatolithiasis. *Arch Surg* 1995; 130: 194-197
- 5 Uchiyama K, Onishi H, Tani M, Kinoshita H, Ueno M, Yamaue H. Indication and procedure for treatment of hepatolithiasis. *Arch Surg* 2002; 137: 149-153
- 6 Ker CG, Kuo KK, Chen HJ, Chen JS, Lee KT, Sheen PC. Morphology of intrahepatic duct in surgical treatment of hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 317-321
- 7 Lu S, Yan L, Rao L, Xia T, Gou J, Zhang S, Lei S. Down stream involvement of the bile duct in hepatolithiasis. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 62-64
- 8 Li FY, Cheng NS, Cheng JQ, Mao H, Jiang LS, Li N, He S. Treatment of chronic proliferative cholangitis with c-myc shRNA. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 95-101
- 9 Park SM, Choi JW, Kim ST, Cho MC, Sung RH, Jang LC, Park JW, Lee SP, Park YH. Suppression of proliferative cholangitis in a rat model by local delivery of paclitaxel. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 176-182
- 10 Li FY, Cheng NS, Cheng JQ, Mao H, Zhou Y, Jiang LS, Li N. Proliferating cell nuclear antigen shRNA treatment attenuates chronic proliferative cholangitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 920-926
- 11 Li FY, Cheng JQ, Li N, He S, Zhang MM, Dong

■同行评价

本研究有一定的实用性和先进性, 对于临床工作有指导意义.

- JH, Jiang LS, Cheng NS. Effectiveness of chemical biliary duct embolization for chemical hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 880-886
- 12 Otani K, Shimizu S, Chijiwa K, Ogawa T, Morisaki T, Sugitani A, Yamaguchi K, Tanaka M. Comparison of treatments for hepatolithiasis: hepatic resection versus cholangioscopic lithotomy. *J Am Coll Surg* 1999; 189: 177-182
- 13 Li F, Cheng J, He S, Li N, Zhang M, Dong J, Jiang L, Cheng N, Xiong X. The practical value of applying chemical biliary duct embolization to chemical hepatectomy for treatment of hepatolithiasis. *J Surg Res* 2005; 127: 131-138
- 14 Terada T, Nakanuma Y. Pathologic observations of intrahepatic peribiliary glands in 1,000 consecutive autopsy livers: IV. Hyperplasia of intramural and extramural glands. *Hum Pathol* 1992; 23: 483-490
- 15 Li FY, Cheng NS, Mao H, Jiang LS, Cheng JQ, Li QS, Munireddy S. Significance of controlling chronic proliferative cholangitis in the treatment of hepatolithiasis. *World J Surg* 2009; 33: 2155-2160
- 16 Cheng YF, Lee TY, Sheen-Chen SM, Huang TL, Chen TY. Treatment of complicated hepatolithiasis with intrahepatic biliary stricture by ductal dilatation and stenting: long-term results. *World J Surg* 2000; 24: 712-716
- 17 Nakanuma Y, Yamaguchi K, Ohta G, Terada T. Pathologic features of hepatolithiasis in Japan. *Hum Pathol* 1988; 19: 1181-1186
- 18 Terada T, Nakanuma Y. Innervation of intrahepatic bile ducts and peribiliary glands in normal human livers, extrahepatic biliary obstruction and hepatolithiasis. An immunohistochemical study. *J Hepatol* 1989; 9: 141-148
- 19 Fan ST, Choi TK, Lo CM, Mok FP, Lai EC, Wong J. Treatment of hepatolithiasis: improvement of result by a systematic approach. *Surgery* 1991; 109: 474-480
- 20 Lee SK, Seo DW, Myung SJ, Park ET, Lim BC, Kim HJ, Yoo KS, Park HJ, Joo YH, Kim MH, Min YI. Percutaneous transhepatic cholangioscopic treatment for hepatolithiasis: an evaluation of long-term results and risk factors for recurrence. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 318-323
- 21 Hwang JH, Yoon YB, Kim YT, Cheon JH, Jeong JB. Risk factors for recurrent cholangitis after initial hepatolithiasis treatment. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 364-367
- 22 Lee TY, Chen YL, Chang HC, Chan CP, Kuo SJ. Outcomes of hepatectomy for hepatolithiasis. *World J Surg* 2007; 31: 479-482
- 23 Yamamoto K. Intrahepatic periductal glands and their significance in primary intrahepatic lithiasis. *Jpn J Surg* 1982; 12: 163-170
- 24 Ehsan A, Mann MJ. Antisense and gene therapy to prevent restenosis. *Vasc Med* 2000; 5: 103-114
- 25 Mitra AK, Agrawal DK. Gene therapy of fibro-proliferative vasculopathies: current ideas in molecular mechanisms and biomedical technology. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 1185-1198
- 26 Quarck R, Holvoet P. Restenosis and gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1: 79-91
- 27 Fulton GJ, Davies MG, Barber L, Svendsen E, Hagen PO. Locally applied antisense oligonucleotide to proliferating cell nuclear antigen inhibits intimal thickening in experimental vein grafts. *Ann Vasc Surg* 1998; 12: 412-417
- 28 Li N, Xiao LJ, Chen SW, Li L, Xiao BL, Chen WB, Gao XK, Gu SJ. [Mucus histochemical study of bilirubin cholangiolithiasis in rabbit model] *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 1989; 20: 417-420
- 29 Bouchier IA, Cooperband SR, el-Kodsi BM. Mucous substances and viscosity of normal and pathological human bile. *Gastroenterology* 1965; 49: 343-353
- 30 Yoon HK, Sung KB, Song HY, Kang SG, Kim MH, Lee SG, Lee SK, Auh YH. Benign biliary strictures associated with recurrent pyogenic cholangitis: treatment with expandable metallic stents. *AJR Am J Roentgenol* 1997; 169: 1523-1527
- 31 Yamasaki T, Nakayama F, Tamura S, Endo M. Characterization of mucin in the hepatic bile of patients with intrahepatic pigment stones. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7: 36-41
- 32 Pickering JG, Isner JM, Ford CM, Weir L, Lazarovits A, Rocnik EF, Chow LH. Processing of chimeric antisense oligonucleotides by human vascular smooth muscle cells and human atherosclerotic plaque. Implications for antisense therapy of restenosis after angioplasty. *Circulation* 1996; 93: 772-780
- 33 Miniati DN, Hoyt EG, Feeley BT, Poston RS, Robbins RC. Ex vivo antisense oligonucleotides to proliferating cell nuclear antigen and Cdc2 kinase inhibit graft coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: III237-III242
- 34 Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3789-3808
- 35 Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 2003; 116: 3051-3060

编辑 李军亮 电编 何基才

cFLIP和caspase-8在犬胆道良性损伤修复过程中的表达

李可洲, 骆乐, 姚豫桐, 张晓, 闫洪涛

李可洲, 骆乐, 姚豫桐, 张晓, 闫洪涛, 中国人民解放军成都军区总医院全军腹部外科中心肝胆病区 四川省成都市 610083

李可洲, 博士后, 主任医师, 硕士导师, 主要从事肝胆胰外科疾病的基础与临床研究.

四川省科技厅公益性基金资助项目, No. 2008SG0028

作者贡献分布: 此课题由李可洲与骆乐设计; 研究过程由李可洲、骆乐、姚豫桐、张晓及闫洪涛操作完成; 数据分析与论文写作由李可洲与骆乐完成.

通讯作者: 李可洲, 主任医师, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院全军腹部外科中心肝胆病区.

kzlcchina@yahoo.com

电话: 028-86570353

收稿日期: 2009-11-18 修回日期: 2010-01-05

接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-03-18

Expression of c-FLIP and caspase-8 during the formation of canine benign biliary strictures after bile duct injury

Ke-Zhou Li, Le Luo, Yu-Tong Yao, Xiao Zhang, Hong-Tao Yan

Ke-Zhou Li, Le Luo, Yu-Tong Yao, Xiao Zhang, Hong-Tao Yan, Department of Hepatobiliary Surgery, Chinese PLA Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Supported by: the Public Welfare Foundation of Department of Science and Technology of Sichuan Province, No. 2008SG0028

Correspondence to: Ke-Zhou Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Chinese PLA Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. kzlcchina@yahoo.com

Received: 2009-11-18 Revised: 2010-01-05

Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the expression and localization of apoptosis-regulatory protein cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) and its downstream apoptotic factor caspase-8 in the formation of benign biliary strictures after bile duct injury.

METHODS: An animal model of benign biliary strictures was established in dogs by inducing bile duct injury. Tissue specimens were taken from the anastomotic sites created in 15 model dogs (experimental group) and 15 matched sham-operated dogs (control group) at 2, 3, 4, 5

and 6 months after injury induction. The expression and localization of c-FLIP and caspase-8 proteins in these specimens was detected by immunohistochemistry using the streptavidin-biotin complex (SABC) method. The average optical density for each slice was then calculated, and the differential expression of c-FLIP and caspase-8 proteins at different time points was compared between the two groups.

RESULTS: Strong positive expression of c-FLIP protein was found in anastomotic tissue in the experimental group at all time points, mainly distributed in the cytoplasm of fibroblasts. Significant differences were noted in the expression levels of c-FLIP protein between the experimental group and the control group at all time points (22.33 ± 3.40 vs 3.41 ± 0.69 , 21.01 ± 5.43 vs 3.28 ± 0.95 , 18.93 ± 2.54 vs 3.11 ± 1.01 , 18.88 ± 3.40 vs 3.35 ± 0.74 , and 17.23 ± 3.53 vs 3.19 ± 0.91 , respectively; all $P < 0.05$), but not among different time points in either of the two groups (all $P > 0.05$). Weak expression of caspase-8 was observed in anastomotic tissue in the experimental group at all time points, mainly concentrated in glandular epithelium and less localized in stromal tissue. Significant differences were also noted in the expression levels of caspase-8 between the experimental group and the control group at all time points (3.20 ± 0.86 vs 11.66 ± 2.80 , 3.42 ± 1.17 vs 10.16 ± 3.08 , 3.65 ± 0.90 vs 10.03 ± 1.93 , 3.91 ± 0.71 vs 10.90 ± 4.02 , and 4.01 ± 0.88 vs 11.23 ± 2.73 , respectively; all $P < 0.05$) but not among different time points in either of the two groups (all $P > 0.05$). A negative correlation was noted between the expression of c-FLIP and caspase-8 ($r = -0.94$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: cFLIP may exert anti-apoptotic effects during the formation of benign biliary stricture by down-regulating the expression of caspase-8.

Key Words: Bile duct; Immunohistochemistry; Apoptosis; Cellular FLICE-like inhibitory protein; Caspase-8

Li KZ, Luo L, Yao YT, Zhang X, Yan HT. Expression of

■背景资料

胆道良性狭窄即胆道在受到急性慢性良性损伤后以瘢痕形式愈合, 从而导致后期瘢痕挛缩形成狭窄的病理转归. 常导致胆道梗阻, 结石形成以及肝硬化的发生. 病理特点以慢性炎症的持续, 成纤维及肌成纤维细胞大量增生为主.

■同行评议者

姜慧卿, 教授, 河北医科大学第二医院消化科

■研究前沿

胆道良性损伤后的远期狭窄问题一直是临床上非常棘手的难题。目前对其机制的探讨国内外相关报道较少,但已有学者证实其与瘢痕发生机制相类似,而胆道环境的复杂性使其具有异于普通瘢痕形成机制的独特性。胆汁成分对创面的影响使其愈合处于慢性持续性的炎症环境中。现今热点及重点集中于对肌成纤维细胞表型转化,胆管细胞群的生物特性,及某些细胞因子,信号通路的作用研究。而胆管细胞群之间的作用与影响以及如何减少成纤维细胞增生,基质成分沉积是目前亟待研究的问题。

c-FLIP and caspase-8 during the formation of canine benign biliary strictures after bile duct injury. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(8): 773-778

摘要

目的: 观察凋亡调控蛋白FLICE样抑制蛋白 (FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP)及其下游凋亡因子caspase-8在胆道损伤愈合良性狭窄形成过程中的表达和定位。

方法: 建立胆管损伤后良性狭窄犬模型, 利用免疫组织化学SABC法分别对15例犬胆道损伤后2、3、4、5、6 mo及其配对的15例假手术组的吻合口组织中c-FLIP及caspase-8表达和定位进行分析, 根据染色细胞的比例, 计算每张切片的平均吸光度值, 分别比较cFLIP及caspase-8在实验组及其配对的假手术组胆道吻合口组织表达的差异, 及两组内不同时间相之间c-FLIP及caspase-8在吻合口组织表达的差异。

结果: c-FLIP蛋白于实验组内各时间点均呈阳性表达, 定位于间质细胞, 以成纤维细胞胞质最明显, 各时间点内实验组与对照组比较有显著性差异(22.33 ± 3.40 vs 3.41 ± 0.69 , 21.01 ± 5.43 vs 3.28 ± 0.95 , 18.93 ± 2.54 vs 3.11 ± 1.01 , 18.88 ± 3.40 vs 3.35 ± 0.74 , 17.23 ± 3.53 vs 3.19 ± 0.91 , 均 $P < 0.05$), 而各时间点之间无显著性差异($P > 0.05$)。caspase-8于实验组各时间相均呈现弱表达, 定位以腺上皮居多, 间质组织表达相对较弱, 与配对之对照组比较均差异显著(3.20 ± 0.86 vs 11.66 ± 2.80 , 3.42 ± 1.17 vs 10.16 ± 3.08 , 3.65 ± 0.90 vs 10.03 ± 1.93 , 3.91 ± 0.71 vs 10.90 ± 4.02 , 4.01 ± 0.88 vs 11.23 ± 2.73 , $P < 0.05$), 而各时间点之间亦无显著性差异($P > 0.05$)。c-FLIP与caspase-8蛋白表达成负相关($r = -0.94$, $P < 0.05$)。

结论: cFLIP可能通过抑制caspase-8的激活在胆道良性狭窄形成过程中发挥了其抗凋亡的作用。

关键词: 胆道; 免疫组织化学; 凋亡; FLICE样抑制蛋白; 半胱氨酸特异性蛋白酶8

李可洲, 骆乐, 姚豫桐, 张晓, 闫洪涛. cFLIP和caspase-8在犬胆道良性损伤修复过程中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 773-778

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/773.asp>

0 引言

有研究表明, 胆道良性狭窄的形成类似于皮肤

病理性瘢痕的发生机制, 均由成纤维细胞大量增殖分化, 细胞外基质过度合成及分泌所造成^[1]。而近年来对病理性瘢痕机制的探索日益深入, 细胞增殖与凋亡平衡观的引入^[2,3]也为胆道良性狭窄形成机制的研究提供了新的思路, 但在胆道良性狭窄研究领域中, 尚未涉及对细胞凋亡的探索。本实验旨在通过犬胆道良性狭窄模型, 对凋亡调控蛋白cFLIP及其下游凋亡因子caspase-8在胆道损伤吻合后狭窄瘢痕组织内的表达水平进行动态观察及定位情况研究, 为寻求胆道良性狭窄解决办法提供一条新思路。

1 材料和方法

1.1 材料 本地健康杂交犬30只, 由四川大学动物实验中心提供, 雌雄不限, 平均体质量 $12.6 \text{ kg} \pm 2.1 \text{ kg}$ 。40 g/L多聚甲醛溶液及PBS(pH7.0-7.6)均购于四川大学华西医学中心, 第一抗体c-FLIPs/兔抗狗IgG(bs-0119R, 北京博奥森), caspase-8兔抗狗IgG(bs-0052R); 二抗羊抗兔IgG生物素标记(ZB2010.Lot Uo221, 北京中杉金桥), DAB显色试剂盒(DAB-0031, 福州迈新)。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 分笼饲养, 并随机(数字法)分为实验组15只, 对照组15只。术前晚禁食, 氯胺酮 4 mg/kg 及速眠醒 0.1 mL/kg 肌肉注射诱导麻醉, 上肢静脉穿刺补液, 青霉素320万U加入10%葡萄糖氯化钠注射液中, 术中静滴。经右上腹肋缘下弧形切口入腹, 首先距十二指肠上缘2 cm处游离出胆总管(上下游离范围不超过1 cm), 实验组横向切开胆总管前壁及侧壁, 保留后壁2 mm, 以5-0不吸收丝线作胆总管壁全层吻合, 针距约0.4-0.5 mm, 边距约0.3-0.4 mm。术毕探查吻合口无渗漏, 于肝肾隐窝放置引流管后关腹。对照组游离胆总管后直接关腹。术后于皮下注射生理盐水补液并预防感染治疗3 d, 3 d后拔除腹腔引流管。

1.2.2 标本采集及检测: 分别于术后2、3、4、5、6 mo取材, 每次取材6只, 实验组及对照组各3只。切取吻合口连同上、下1 cm组织, 40 g/L多聚甲醛溶液, PBS(pH7.0-7.6)固定, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋制成蜡块后行4 μm 连续切片, HE染色, 光镜观察。免疫组织化学染色采用SABC法, 切片常规脱蜡至水, H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶, 微波修复抗原, 正常山羊血清封闭, 分别滴加一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 滴加生物素化二抗及SABC复合液, DAB- H_2O_2 显色, 染色步骤按DAB

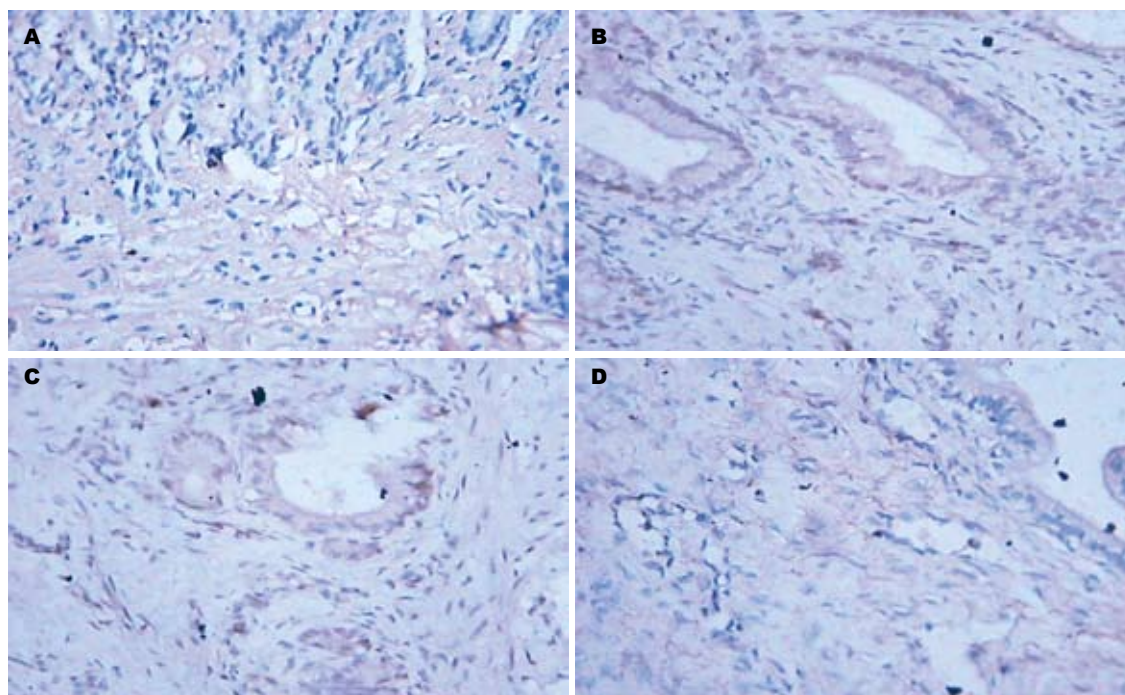


图1 cFLIP和caspase-8在实验组及对照组犬胆道吻合口组织中的表达($\times 400$)。A: 实验组cFLIP在间质组织中染色明显, 在腺体组织中无明显染色; B: 对照组cFLIP总体表达较弱, 部分腺体组织轻度染色; C: 实验组caspase-8总体表达较弱, 在腺体组织中染色较间质组织明显; D: 对照组caspase-8在间质及腺体组织中均有表达。

■ 相关报道

Lu等发现, Fas介导的凋亡途径的阻断可能是导致病理性瘢痕的原因之一, 他们在文中引入了凋亡与增殖的平衡观。Aarabi等也证实, 在增生性瘢痕形成过程中, AKT通路依赖的凋亡的抑制发挥了重要作用。而Geng等发现胆道损伤后即处于慢性炎症环境下, 成纤维及肌成纤维细胞大量增生, 胶原过度沉积造成了瘢痕的增生及塑形失败。TGF- β 是此过程中最为重要的信号蛋白。

试剂盒说明进行; 苏木素复染, 封片, 观察。用已知c-FLIP/caspase-8的阳性切片作阳性对照, 用PBS液分别代替一抗、二抗作阴性对照。每张切片随机选取5个互不重叠的高倍镜视野($400\times$), 进行统计。

1.2.3 结果判定标准及统计指标: 阳性细胞评定标准: c-FLIP/caspase-8均以细胞质或核染成黄色为阳性细胞。应用Image pro plus4.5图像分析软件, 对各组切片平均表达强度进行定量分析, 即测量其平均吸光度值(I4)。

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件包进行统计学分析, 各组数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示; 组间及组内比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。c-FLIP及caspase-8数据进行Spearman相关性分析, $P < 0.01$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 实验组1只犬术后15 d死于腹腔感染, 另有1犬术后9 d死于胆漏, 为保证样本量, 于同样条件下按上述造模方法, 另外补入新样本。其余犬只, 食欲, 反应尚可。

2.2 组织学观察 各组均有慢性炎症细胞浸润, 纤维组织增生并分割腺上皮, 灶性淋巴滤泡形成的现象, 为典型的慢性炎症表现。其中2、3、4 mo组均有胆管壁, 上皮下的灶性充血及出血现

象。并有不同程度的腺体扩张。而5、6 mo组出现腺体深陷肌层的表现, 这可能是纤维增生所造成的腺体移位。由此可见, 胆管损伤愈合后即处于慢性持续性的炎症环境中, 管壁结构明显破坏, 纤维组织大量增生是其主要的病理改变。

2.3 免疫组织化学结果 c-FLIP蛋白于实验组内各时间点均为阳性表达, 定位上来看, 主要集中于上皮下间质组织细胞质, 以成纤维细胞最为明显, 染色较深, 炎症细胞如单核巨噬细胞, 淋巴细胞及血管内皮细胞均有不同程度表达, 而腺上皮表达不明显(图1)。caspase-8于实验组各时相均呈现弱表达, 定位上以腺上皮居多, 间质组织表达相对较弱(图1)。

c-FLIP蛋白于实验组内各时间点均较与其配对的对照组有显著表达($P < 0.05$), 前者明显强于后者。各时间点之间比较无明显差异($P > 0.05$), 但总体上随时间推移呈下降趋势(表1)。caspase-8于实验各组均呈现弱表达, 与对照组差异显著($P < 0.05$), 各时间点间亦无显著性差异($P > 0.05$), 但总体上随时间推移呈上升趋势(表2)。相关性分析结果: 胆道损伤愈合之瘢痕形成过程中, c-FLIP与caspase-8蛋白表达成负相关($P < 0.01, r = -0.94$)。

3 讨论

胆道良性损伤后的远期狭窄问题一直是临床上

■创新盘点

本文借鉴瘢痕研究中的凋亡增殖平衡观,并结合胆道自身环境,引入目前研究热点之一的炎症关键性核转录因子NF- κ B,取其下游凋亡因子,从凋亡角度对胆道损伤愈合的独特性有了较为新颖的认识。本文虽然没有花哨的检测手段,但从实用角度讲,免疫组织化学因其独到的组织定位以及节约标本量的优点而非非常适合本实验。另外,文中所提出的ASBT对NF- κ B信号通路的影响也是一大亮点。这是作者总结大量相关文献后所提炼的一个非常值得探究的新课题。

表 1 两组术后不同时间点吻合口组织c-FLIP蛋白表达测定 ($n = 3$, t值, mean \pm SD)

| 分组 | 2 mo | 3 mo | 4 mo | 5 mo | 6 mo |
|-----|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 实验组 | 22.33 \pm 3.40 ^a | 21.01 \pm 5.43 ^a | 18.93 \pm 2.54 ^a | 18.88 \pm 3.40 ^a | 17.23 \pm 3.53 ^a |
| 对照组 | 3.41 \pm 0.69 | 3.28 \pm 0.95 | 3.11 \pm 1.01 | 3.35 \pm 0.74 | 3.19 \pm 0.91 |

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表 2 两组术后不同时间点吻合口组织caspase-8蛋白表达测定 ($n = 3$, t值, mean \pm SD)

| 分组 | 2 mo | 3 mo | 4 mo | 5 mo | 6 mo |
|-----|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 实验组 | 3.20 \pm 0.86 ^a | 3.42 \pm 1.17 ^a | 3.65 \pm 0.90 ^a | 3.91 \pm 0.71 ^a | 4.01 \pm 0.88 ^a |
| 对照组 | 11.66 \pm 2.80 | 10.16 \pm 3.08 | 10.03 \pm 1.93 | 10.90 \pm 4.02 | 11.23 \pm 2.73 |

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

非常棘手的难题。目前对其机制的探讨国内外相关报道较少,但已有学者证实其与瘢痕发生机制相类似,均由成纤维细胞大量增殖并过度分泌胶原等基质成分所致^[1]。而胆道环境的复杂性又使其具有异于普通瘢痕形成机制的独特性,由此对其的研究进展远远落后于对病理性瘢痕的探究。就前者来说,胆道损伤后即处于胆汁成分所造就的慢性炎症环境下^[1],各种复杂的刺激因素仍于探索之中。而就后者而言,目前研究集中与对凋亡的探讨。Aarabi等^[2]证实了在增生性瘢痕形成过程中,AKT依赖的凋亡通路的抑制发挥了重要作用。Lu等^[3]也发现,Fas介导的凋亡途径的阻断可能是导致病理性瘢痕的原因之一。而Messadi等^[4]则认为NF- κ B及其靶基因,尤其是抗凋亡基因可能在瘢痕疙瘩的发病机制中起重要作用。本实验即是选取受NF- κ B激活的下游抗凋亡基因cFLIP作为研究重点。

caspase-8同源结构FLICE抑制蛋白(cFLIP)是一种针对死亡受体诱导凋亡的负性调节因子。因其碳末端含有两个类似caspase蛋白的死亡效应域(death effector domains, DEDs)可竞争性招募某些死亡域(death domain, DD),从而造成caspase失活,凋亡受阻。cFLIP对抑制caspase-8前体特异性较高,与其结构上所具有的caspase-8同源性有关。本实验中选用caspase-8作为观察cFLIP凋亡抑制作用的另一个指标也正是基于此点。目前,发现受cFLIP抑制的死亡受体包括:Fas, TRAIL, DR3、DR4以及DR5等^[5]。cFLIP已经被发现在胃癌^[6],胰腺癌^[7],大肠癌^[8]等肿瘤细胞中处于表达上调的状态。其突出的抗凋亡功能使肿瘤细胞无论何时都能逃脱由死亡诱导

信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC)所发起的凋亡攻势,被众多学者称为“免疫逃逸”的始作者^[9]。目前认为,cFLIP表达受核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)所调控。Kreuz等^[10]发现在药物干预诱导肿瘤坏死因子激活NF- κ B的SV80细胞系中,cFLIP呈现表达上调。Banno等^[11]应用siRNA沉默子证明在表皮角质形成细胞中,cFLIP是主要的NF- κ B依赖性抗凋亡基因。NF- κ B受TNF、IL-1等外源性炎症因子所激活,进入核内启动了包括许多炎症细胞因子,抗凋亡蛋白,免疫相关抗体,黏附分子等基因表达。因而在炎症,肿瘤,免疫等众多生物学进程中被看做是最重要的枢纽性蛋白^[12]。胆道环境下的伤口愈合过程是一个慢性持续性的炎症过程^[1],大量炎症因子,免疫因子地持续释放及缺血缺氧因素均可造成NF- κ B的持续激活^[13]。cFLIP作为NF- κ B依赖性抗凋亡基因完全有可能处于过度表达状态。本实验恰恰验证了这一点。cFLIP于各时间点均有较强表达,并以纤维结缔组织为主。这说明成纤维细胞较上皮细胞有更强的凋亡抑制趋势,其机制可能与胆道上皮细胞的特殊结构有关。胆管上皮细胞内的胆酸转运蛋白(apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT)类似于膜受体,决定了细胞对胆酸的选择性和敏感性,而他的表达量受胆汁成分的调节^[14-16]。有研究表明^[17],胆管上皮细胞内胆酸浓度的改变,可通过Ca²⁺, P13K, PKC等信号通路影响细胞的增殖、凋亡、分泌及基因表达。而Lilienbaum等^[18]在研究神经元NF- κ B信号通路时发现:Ca²⁺, P13K, PKC这三条信号途径均与NF- κ B的激活关系密切。因此,有可能是胆道

损伤愈合过程中的胆汁内环境的变化使ASBT表达改变, 进而影响了胆管上皮细胞对胆汁成分地摄取及反应, 通过复杂的信号网络传导, 最终导致NF- κ B的激活减少或c-FLIP基因表达直接受到抑制, 但其具体机制还有待进一步探究。总之, 胆道纤维结缔组织细胞凋亡增殖失衡可能是造成最终瘢痕形成, 胆管狭窄的原因之一。另外, Jiang等^[19]发现, 在原发性硬化性胆管炎鼠模型中, CD4⁺ T细胞内cFLIPL表达的上调促进了其抗凋亡能力, 并导致了肝门部炎症的恶化。本实验中, cFLIP在炎症细胞如单核巨噬细胞, 淋巴细胞及血管内皮细胞中均有不同程度的表达, 这些炎症细胞将因为caspase-8的激活受阻而失凋亡, 从而大量增殖并分泌炎症介质, 导致炎症的持续并再次激活NF- κ B, 进而又将启动下游cFLIP表达, 如此反复, 成为一个正反馈的过程, 造成炎症的不断进行且凋亡持续受阻。这可能也是造成胆道慢性炎症环境形成, 最终成纤维细胞大量增殖并不断分泌基质成分导致胆道吻合口瘢痕形成的原因之一。

caspase即半胱氨酸特异性蛋白酶, 因含有能在天冬氨酸残基后切割其他蛋白的关键性半胱氨酸残基而具有独特性。他们是细胞凋亡进程的启动者。caspase通常以酶原(procaspase)的形式存在, 相对分子质量为29-49 kDa。N末端具有一个原结构(prodomain), C端包含约20 kDa的大亚基和约10 kDa的小亚基, C端同源区存在半胱氨酸激活位点, 此激活位点结构域为QACR/QG。当DISC与此结构域偶联后, N端原结构域被去除, 在大小亚基中进行切割; 大小亚基形成异源二聚体, 进而形成四聚体, caspase激活完成^[20]。因此我们可通过测定caspase的表达量来了解Procaspase被激活的程度, 即凋亡发生率的高低。caspase-8作为凋亡启动者在本实验中普遍弱阳性表达, 说明细胞凋亡程度较低, 进一步表明: (1)胆道修复细胞凋亡受阻, 尤其是成纤维细胞, 其大量增殖分化可能与此有关。(2)cFLIP可能发挥了竞争性抑制作用。另外, caspase-8持续性的弱阳性表达, 证明其前体激活持续受阻, 这和本实验中光镜所发现的慢性炎症的持续性相吻合。本实验中应用Spearman相关分析还发现, cFLIP和caspase-8的蛋白表达呈负相关, 这说明了cFLIP通过抑制caspase-8的激活, 充分发挥了其在胆道修复过程中的抗凋亡作用。

有文献表明^[21], cFLIP的表达下调对许多不同种类的肿瘤细胞抵抗均敏感, 并已成功发现

几种小分子物质能通过降低cFLIP表达以达到抗肿瘤的目的。他们包括DNA损伤剂(顺铂和阿霉素), RNA的合成抑制剂(放线菌素D), 蛋白质合成抑制剂(放线菌酮), 拓扑异构酶 I 抑制剂(喜树碱, 9-NC的, 拓扑替康)和组蛋白去乙酰化酶抑制剂(菌素A)。是否我们可以将此运用于胆道狭窄的治疗中, 提高成纤维细胞的凋亡率, 从而达到减轻瘢痕形成的作用, 这还有待于进一步的探究。

4 参考文献

- 1 Geng ZM, Yao YM, Liu QG, Niu XJ, Liu XG. Mechanism of benign biliary stricture: a morphological and immunohistochemical study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 293-295
- 2 Aarabi S, Bhatt KA, Shi Y, Paterno J, Chang EI, Loh SA, Holmes JW, Longaker MT, Yee H, Gurtner GC. Mechanical load initiates hypertrophic scar formation through decreased cellular apoptosis. *FASEB J* 2007; 21: 3250-3261
- 3 Lu F, Gao J, Ogawa R, Hyakusoku H, Ou C. Fas-mediated apoptotic signal transduction in keloid and hypertrophic scar. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119: 1714-1721
- 4 Messadi DV, Doung HS, Zhang Q, Kelly AP, Tuan TL, Reichenberger E, Le AD. Activation of NFkappaB signal pathways in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2004; 296: 125-133
- 5 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190-195
- 6 Lee SH, Kim HS, Kim SY, Lee YS, Park WS, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Increased expression of FLIP, an inhibitor of Fas-mediated apoptosis, in stomach cancer. *APMIS* 2003; 111: 309-314
- 7 Mori T, Doi R, Kida A, Nagai K, Kami K, Ito D, Toyoda E, Kawaguchi Y, Uemoto S. Effect of the XIAP inhibitor Embelin on TRAIL-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *J Surg Res* 2007; 142: 281-286
- 8 高文超, 孙延平, 阮灿平, 徐昕昀, 张军初, 倪灿荣, 王强. cFLIP在大肠癌组织中的表达及意义. *中国普外基础与临床杂志* 2009; 12: 218-222
- 9 Pajak B, Orzechowski A. [FLIP--an enemy which might lose the battle against the specific inhibitors of translation] *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2005; 59: 140-149
- 10 Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3964-3973
- 11 Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependent tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 18973-18980
- 12 Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004; 82: 434-448
- 13 Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-

■应用要点

可通过下调cFLIP表达来抑制胆道成纤维细胞增殖, 如: 局部注射, 支架载药, 手术植入等方式将cFLIP阻断剂运用于损伤胆道局部, 达到减少瘢痕形成及增生, 治疗胆道良性狭窄的目的。

■同行评价

本研究选题尚可,设计合理,结果可靠,有一定的学术价值。

- kappaB signaling. *Cell* 2008; 132: 344-362
- 14 Kusters A, Karpen SJ. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica* 2008; 38: 1043-1071
- 15 Pellicoro A, Faber KN. Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26 Suppl 2: 149-160
- 16 Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* 2007; 24: 1803-1823
- 17 Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3553-3563
- 18 Lilienbaum A, Israël A. From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 2680-2698
- 19 Jiang T, Han Z, Chen S, Wu C, Tang Y, Qian C, Chen Y, Zhou Y, Zhu Y, Gu M, Zhu L, Yao D, Deng A, Zhong R. Resistance to activation-induced cell death and elevated FLIPL expression of CD4+ T cells in a polyI:C-induced primary biliary cirrhosis mouse model. *Clin Exp Med* 2009; 9: 269-276
- 20 Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 299-306
- 21 Yang JK. FLIP as an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J* 2008; 49: 19-27

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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出版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删节时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、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。

拉米夫定耐药后序贯治疗中HBV准种的演变

吴珍萍, 韩涛, 高英堂, 李莹, 刘彤, 景丽, 刘磊, 杜智

吴珍萍, 天津医科大学三中心临床学院 天津市 300170
韩涛, 高英堂, 李莹, 刘彤, 景丽, 刘磊, 杜智, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170
吴珍萍, 天津医科大学硕士, 主要从事乙型肝炎病毒耐药变异的临床研究。

国家重点基础研究发展规划(973计划)基金资助项目, No. 2007CB512801

科技部科技重大专项基金资助项目, No. 2008ZX10002-005
天津市科委重点攻关专项基金资助项目, No. 05YFSZSF02500

天津市科委应用基础研究计划面上基金资助项目, No. 06YFJMJC13100

作者贡献分布: 吴珍萍与韩涛对此文所作贡献均等; 此课题的设计与写作由吴珍萍、韩涛、高英堂及杜智完成; 数据采集与分析由吴珍萍、李莹、韩涛及高英堂完成; 研究过程由吴珍萍、高英堂、刘彤及景丽完成。

通讯作者: 韩涛, 教授, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院肝内科, hantaomd@126.com

电话: 022-84112315 传真: 022-24382234

收稿日期: 2009-11-10 修回日期: 2010-02-01

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Evolution of hepatitis B virus quasispecies during sequential therapy in patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus infection

Zhen-Ping Wu, Tao Han, Ying-Tang Gao, Ying Li, Tong Liu, Li Jing, Lei Liu, Zhi Du

Zhen-Ping Wu, the Third Central Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China.

Tao Han, Ying-Tang Gao, Ying Li, Tong Liu, Li Jing, Lei Liu, Zhi Du, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2007CB512801; the Major Research Project of the Ministry of Science and Technology of China, No. 2008ZX10002-005; the Key Science and Technology Project of Tianjin Municipal Science and Technology Commission, No. 05YFSZSF02500; and the General Program of Applied Basic Research Foundation of Tianjin Municipal Science and Technology Commission, No. 06YFJMJC13100

Correspondence to: Professor Tao Han, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China. hantaomd@126.com

Received: 2009-11-10 Revised: 2010-02-01

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the evolution characteristics of hepatitis B virus (HBV) quasispecies during sequential therapy in patients with lamivudine-resistant HBV infection.

METHODS: Serum samples were collected from seven patients with lamivudine-resistant HBV infection during sequential therapy. The reverse-transcriptase (RT) region of the HBV polymerase gene was amplified, cloned and sequenced. Sequence mutations were analyzed to characterize the evolution of HBV quasispecies.

RESULTS: Lamivudine-resistant strains were persistently present in the serum of patients 1, 4 and 5. The main mutation patterns were M204I+L80I, M204I+L80I+L180M, M204V+L180M+G173L, and M204V+L180M. The proportion of these mutant strains changed constantly. The wild-type strain was detected in patients 2 and 3. However, lamivudine-resistant strains were detected in patient 2 during following therapy. Double-resistant mutant strains M204V+L180M+G173L+T184A and M204V+L180M+G173L+N236D were detected in patient 6, who underwent combination therapy with adefovir dipivoxil and lamivudine, and in patient 7, who underwent adefovir dipivoxil monotherapy.

CONCLUSION: Lamivudine-resistant mutant strains in the serum of patients with HBV infection do not easily disappear during sequential therapy. Cross-resistant or multi-resistant strains of HBV quasispecies are often present during sequential therapy and affect the response to the therapy, thereby resulting in therapeutic failure.

Key Words: Lamivudine; Resistance; Hepatitis B virus; Quasispecies

Wu ZP, Han T, Gao YT, Li Y, Liu T, Jing L, Liu L, Du Z. Evolution of hepatitis B virus quasispecies during sequential therapy in patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 779-785

摘要

目的: 探讨拉米夫定(LAM)耐药后序贯治疗中HBV准种的演变特点。

方法: 收集7例拉米夫定耐药患者序贯治疗中的血清, 对HBV聚合酶基因逆转录酶区进行

■背景资料

拉米夫定(LAM)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)、替比夫定(LdT)等核苷(酸)类似物(NAs)被广泛用于抗乙型肝炎病毒(HBV)治疗, 但长期服用NAs易使HBV聚合酶基因发生选择性耐药突变。拉米夫定能够快速抑制HBV的复制, 但耐药发生率很高, 针对这些LAM耐药患者, 目前常用的有效补救治疗方案是联合ADV或换用ETV治疗。在长期应用LAM治疗过程中HBV聚合酶基因会连续变异产生不同类型的耐药位点。那么LAM耐药后的序贯治疗中HBV聚合酶基因耐药突变如何演变? 值得进一步深入研究。

■同行评议者

王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

■相关报道

Gerolami等报道服用LAM时出现ADV耐药株A181V.

PCR扩增克隆并测序,结合临床用药分析序列突变,探讨其演变特征.

结果:患者1、4、5在序贯治疗中LAM耐药变异株一直存在,主要以M204I+L80I、M204I+L80I+L180M、M204V+L180M+G173L、M204V+L180M为主,所占比例在不断发生变化.患者2、3在序贯治疗中检测出野生株,但患者2在后续治疗中又选择出LAM耐药变异株.患者6在ADV联合ETV治疗时、患者7在单用ADV治疗时测时分别测出双重耐药株M204V+L180M+G173L+T184A和M204V+L180M+G173L+236D.

结论:拉米夫定耐药后序贯治疗中原耐药突变不易消失,且容易在此基础上筛选出交叉耐药株或多重耐药株,他的出现影响序贯治疗的应答甚至导致序贯治疗的失败.

关键词:拉米夫定; 耐药; 乙型肝炎病毒; 准种

吴珍萍, 韩涛, 高英堂, 李莹, 刘彤, 景丽, 刘磊, 杜智. 拉米夫定耐药后序贯治疗中HBV准种的演变. 世界华人消化杂志. 2010; 18(8): 779-785

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/779.asp>

0 引言

拉米夫定(LAM)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)、替比夫定(LdT)等核苷(酸)类似物(nucleotide/side analogs, NAs)被广泛用于抗乙型肝炎病毒(HBV)治疗,但长期服用NAs易使HBV聚合酶基因发生选择性耐药突变.拉米夫定能够快速抑制HBV的复制,但耐药发生率很高,针对这些LAM耐药患者,目前常用的有效补救治疗方案是联合ADV或换用ETV治疗^[1,2].在长期应用LAM治疗过程中HBV聚合酶基因会连续变异产生不同类型的耐药位点^[3].那么LAM耐药后的序贯治疗中HBV聚合酶基因耐药突变如何演变?值得进一步深入研究,本研究主要探讨7例LAM耐药患者序贯治疗中HBV准种的演变特征.

1 材料和方法

1.1 材料 选取7名2003-2008年间在天津市第三中心医院肝胆内科就诊的HBV患者,这些患者LAM耐药后接受NAs序贯治疗.每例患者选取3-4份不同时间点的血清进行HBV聚合酶基因的序列分析.7例患者基本特征及临床用药见表1.此研究经本院医学伦理委员会批准,患者签署

知情同意书.

1.2 方法

1.2.1 HBV DNA的定量:采用上海科华生物工程有限公司生产的HBV核酸扩增(PCR)荧光定量检测试剂盒(S200359),检测下限为500拷贝/mL,本研究中将低于检测下限定为阴性.

1.2.2 巢式PCR扩增:用上述试剂盒处理的血清样品进行巢式PCR扩增,扩增区域为聚合酶基因的逆转录酶区(A-F, rt40-rt280).应用Primer Express 2.0软件设计引物,上游引物1为5'-GAGTCTAGACTCGTGGTGGAC-3',下游引物2为5'-GGGTCTTTTGGGCTTTGCTGCC-3',下游引物3为5'-TGATTGGAAAGTATGTCAGAGAC-3'.一次PCR反应体系包括:5 μL 10×PCR缓冲液(含Mg²⁺)、4 μL dNTP(各1.25 mmol/L)、引物1/2各1、2 μL Taq酶(1 U/μL)、4 μL模板,加超纯水至50 μL 反应条件:预变性94 °C, 2 min;变性94 °C, 1 min;复性60 °C, 45 s;延伸72 °C, 45 s; 35个循环,延长72 °C, 5 min.二次PCR反应体系同前,引物为1/3,模板为一次PCR产物.

1.2.3 克隆及测序:将二次PCR产物电泳、纯化回收后克隆到PMD18-T载体中,每个样本挑选5-12个重组克隆送上海英俊生物技术有限公司测序,序列峰图应用Chromas(V1.62)分析,序列比对采用BioEdit(V7.0.4)软件,选用的GenBank序列包括M57663(A基因型)、D00329(B型)、X01587/X75656/X75665(C型)、X02496(D型)、X75657(E型)、X69798(F型)、AF160501(G型),患者HBV序列均与X01587相似性最高,为C基因型.

2 结果

2.1 患者临床特征 患者1、2、5用药过程中HBV DNA(以下简称DNA)和ALT的动态演变分别见图1-3.患者1开始服LAM时Child-Pugh分级为A级,在LAM耐药后联合ADV治疗22 wk,由于DNA持续阳性而换用LdT, 10 wk后DNA反弹至6.32log₁₀拷贝/mL,同时出现ALT反弹,故换用ETV 0.5 mg/d, 13 wk后DNA持续阴性,ALT亦恢复正常,患者病程中未出现任何并发症.患者2开始服LAM时已并发腹水、胸水,Child-Pugh分级为B级,服LAM 63 wk时出现DNA反弹至5.64log₁₀拷贝/mL,继续服LAM仍维持在5-7log₁₀拷贝/mL, 132 wk后ALT反复异常, 139 wk时DNA反弹至8.53log₁₀拷贝/mL,后联合ADV治疗, 56 wk后DNA基本维持阴性,但ALT仍异常,且

表 1 患者的基本特征及序贯用药情况

| 患者 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------|--------------|------------|---------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 诊断 | CR | CR | HCC | HCC | HCC | CHB | CHB |
| 年龄/性别 | 36/男 | 55/男 | 58/女 | 70/男 | 51/男 | 22/男 | 34/女 |
| HBeAg/HBeAb | +/- | +/- | -/+ | +/+ | +/- | +/- | +/- |
| 基因分型 | C型 | C型 | C型 | C型 | C型 | C型 | C型 |
| 初始治疗药物 | LAM | LAM | LAM | LAM | LAM | LAM | LAM |
| 用药时间(wk) | 40 | 139 | 62 | 28 | 48 | 48 | 40 |
| 第2次序贯用药 | LAM+ADV | LAM+ADV | LAM+ADV | LAM | LAM | LAM | ETV |
| 用药时间(wk) | 22 | 119 | 88 | 60 | 40 | 48 | 12 |
| 第3次序贯用药 | LdT | ETV 1 mg/d | | LAM+ADV | LAM+ETV 0.5 mg/d | ADV | ADV |
| 用药时间(wk) | 10 | 55 | | 22 | 8 | 70 | 48 |
| 第4次序贯用药 | ETV 0.5 mg/d | | | | ETV 1 mg/d | ETV 1 mg/d | ADV+ETV 0.5 mg/d |
| 用药时间(wk) | 45 | | | | 44 | 20 | 28 |
| 第5次序贯用药 | | | | | | ADV+ETV 0.5 mg/d | |
| 用药时间(wk) | | | | | | 36 | |

患者4、5、6服用LAM中间自动停药, 后再次服用LAM, 第2次用药时间为停药后重新服LAM的时间; CR: 肝硬化; HCC: 肝细胞癌, CHB: 慢性乙型病毒性肝炎。

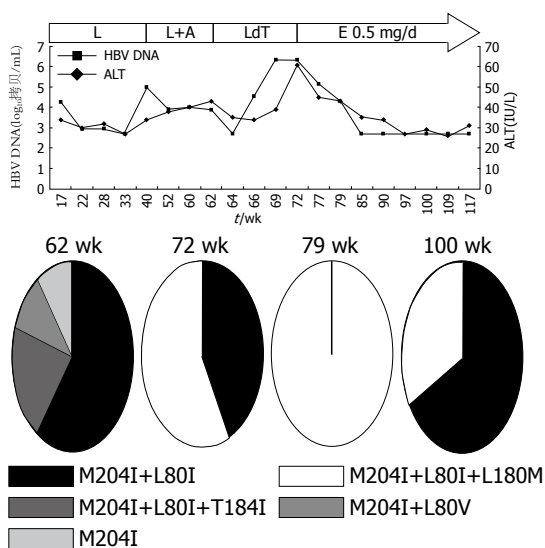


图 1 患者1病毒耐药突变的临床过程和进化. 该患者LAM耐药后联合ADV序贯治疗, 病毒载量一直在 $3-4\log_{10}$ 拷贝/mL, 换用LdT 10 wk后出现病毒反弹, 后改用ETV 0.5 mg/d. 抗病毒治疗方案在图的上方显示, L: 拉米夫定; A: 阿德福韦酯; E: 恩替卡韦。

119 wk时患者出现肾损害, 故换用ETV 1 mg/d, 同时予胸腺肽调节免疫, DNA仍维持阴性, 26 wk后ALT正常, 该患者病程中反复出现腹水、胸水及食管胃底静脉曲张出血, 予保肝、利尿、补充白蛋白、间断放腹水、胸水治疗, 食管胃底静脉曲张予套扎治疗, 病情稳定. 患者5

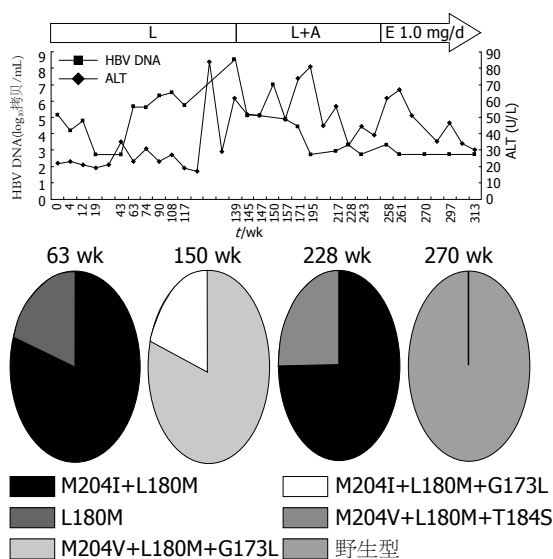


图 2 患者2病毒耐药突变的临床过程和进化. 该患者在使用LAM 63 wk后出现病毒反弹继续使用LAM, 病毒一直维持在 $5-7\log_{10}$ 拷贝/mL, 139 wk时为 $8.53\log_{10}$ 拷贝/mL联合ADV治疗, 56 wk后病毒基本维持阴性, 但119 wk时患者出现肾损害, 最终换用ETV 1 mg/d.

开始服LAM时Child-Pugh分级为A级, 停药24 wk后再服LAM, 32-40 wk DNA在 $4-5\log_{10}$ 拷贝/mL波动, 联合ETV 0.5 mg/d治疗, 8 wk后DNA仍为 $4.75\log_{10}$ 拷贝/mL, 换用ETV 1 mg/d, DNA从第6周开始持续阴性, 治疗期间ALT基本维持正常, 在此期间先后行8次TACE治疗, 84 wk时ALT的

应用要点

对需抗病毒治疗的HBV感染者, 初始治疗尽可能选耐药率低的NAs。

■同行评价

本文选题明确,具有一定的创新性,方法简单可靠,可重复性强,较准确反映了研究工作的科学问题和特定内容。

表 2 3例患者的准种分析

| 各患者在不同时间点的HBV聚合酶基因与参考序列X01857C比对的全部氨基酸替代位点 | |
|--|--|
| 患者1 | |
| LAM+ADV 22 wk | (G ₀ 173V ₁₀ M ₀ 204I ₁₀ C ₀ 256S ₁₀ L ₁ 80I ₉ V ₁ E ₁ 263D ₉ D ₅ 131N ₅ H ₅ 55Q ₄ H ₇ 94R ₃ T ₈ 184I ₂ S ₉ 117P ₁ R ₉ 120K ₁ N ₉ 139S ₁ S ₉ 246P ₁) ₁₀ |
| LdT 10 wk | (H ₀ 55Q ₇ L ₀ 80I ₇ G ₀ 173V ₇ M ₀ 204I ₇ C ₀ 256S ₇ E ₀ 263D ₇ V ₃ 112A ₄ L ₃ 180M ₄) ₇ |
| ETV 7 wk | (H ₀ 55Q ₅ L ₀ 80I ₅ V ₀ 112A ₅ G ₀ 173V ₅ L ₀ 180M ₅ M ₀ 204I ₅ C ₀ 256S ₅ E ₀ 263D ₅) ₅ |
| ETV 21 wk | (H ₀ 55Q ₁₂ L ₀ 80I ₁₂ G ₀ 173V ₁₂ M ₀ 204I ₁₂ C ₀ 256S ₁₂ E ₀ 263D ₁₂ V ₈ 112A ₄ L ₈ 180M ₄ F ₁₀ 46L ₂ D ₁₀ 131G ₂ S ₁₀ 143P ₂) ₁₂ |
| 患者2 | |
| LAM 60 wk | (G ₀ 173V ₁₀ L ₀ 180M ₁₀ M ₀ 204V ₉ A ₂ L ₅ 231S ₅ S ₈ 57T ₂ S ₉ 116A ₁ F ₉ 249L ₁) ₁₀ |
| LAM+ADV 11 wk | (G ₀ 173L ₁₀ L ₀ 180M ₁₀ M ₀ 204V ₉ I ₂ C ₀ 256S ₁₀ L ₀ 267Q ₁₀ V ₈ 207A ₂ F ₈ 249S ₂) ₁₀ |
| LAM+ADV 89 wk | (G ₀ 173V ₈ L ₀ 180M ₈ M ₀ 204V ₈ S ₀ 223A ₈ I ₀ 224V ₈ C ₀ 256S ₈ N ₆ 65D ₂ L ₆ 72P ₂ K ₆ 168R ₂ F ₆ 178S ₂ L ₆ 229F ₂ R ₆ 280S ₂) ₈ |
| ETV 1 mg/d, 12 wk | (R ₀ 153W ₁₀ G ₀ 173V ₁₀ L ₀ 267Q ₁₀ M ₈ 129V ₂ S ₈ 223P ₂) ₁₀ |
| 患者5 | |
| 再服LAM 40 wk | (N ₀ 139K ₁₁ G ₀ 173L ₉ V ₅ L ₀ 180M ₁₁ M ₀ 204V ₁₁ S ₀ 213T ₁₁ I ₀ 224V ₁₁ C ₀ 256S ₁₁ D ₂ 134N ₉ L ₈ 229F ₃ S ₉ 116P ₂ R ₉ 120G ₂ F ₉ 227S ₂ P ₉ 237H ₂ S ₁₀ 137P ₁ L ₁₀ 144P ₁ G ₁₀ 165X ₁) ₁₁ |
| ETV 1 mg/d, 16 wk | (D ₀ 134N ₁₀ N ₀ 139K ₁₀ G ₀ 173L ₁₀ L ₀ 180M ₁₀ M ₀ 204V ₁₀ S ₀ 213T ₁₀ I ₀ 224V ₁₀ C ₀ 256S ₁₀ L ₈ 77S ₂ S ₈ 185G ₂ Y ₉ 245H ₁) ₁₀ |
| ETV 1 mg/d, 44 wk | (D ₀ 134N ₇ N ₀ 139K ₇ G ₀ 173L ₇ L ₀ 180M ₇ M ₀ 204V ₇ S ₀ 213T ₇ I ₀ 224V ₇ C ₀ 256S ₇ A ₈ 86T ₁) ₇ |

扩号内大写字母为氨基酸缩写, 大写字母的下标数字表示克隆数, 大写字母之间数字表示其在逆转录酶区的位置, 数字前的氨基酸代表与参考株相同, 后面的氨基酸代表变异株, 括号外的下标数字为总克隆数。

反弹可能由于在此期间接受了TACE治疗, 病程中病情稳定未出现并发症。

患者3开始服LAM时Child-Pugh分级为A级, 在LAM耐药后联合ADV治疗, 28 wk后DNA持续阴性, 在此期间先后行5次TACE治疗, 并出现食管胃底静脉曲张出血给予套扎治疗, 病情稳定。患者4开始服LAM时Child-Pugh分级为A级, 停药4 wk后DNA为4.89log₁₀拷贝/mL, YMDD为野生型, 再次服LAM 60 wk时DNA反弹至6.69log₁₀拷贝/mL, 联合ADV治疗12 wk时DNA转阴, 但22 wk时又升至3.25log₁₀拷贝/mL, 在此期间先后4次行TACE治疗, 病情稳定未出现并发症。患者6停药64 wk后, 再次服LAM 48 wk时DNA反弹, 换用ADV 70 wk时DNA再次反弹, 后换服ETV 1 mg/d 20 wk, DNA仍阳性; 又换成ADV联合ETV 0.5 mg/d治疗, 16 wk时DNA为5.49log₁₀拷贝/mL, 36 wk时下降到3.72log₁₀拷贝/mL, 目前仍在随访中。患者7服LAM 40 wk时发生耐药, DNA为6.63log₁₀拷贝/mL, 换用ETV 0.5 mg/d治疗12 wk降至5.72log₁₀拷贝/mL, 后因经济原因换用ADV 48 wk, DNA持续在4-5 log₁₀拷贝/mL波动, 改ADV联合ETV 0.5 mg/d治疗, 28 wk后DNA转阴, 目前仍在随访中。

2.2 克隆分析及多重耐药突变的演化 每例患者选取3-4份不同时间点的血清进行克隆测序做准种分析, 研究耐药株聚合酶基因的序

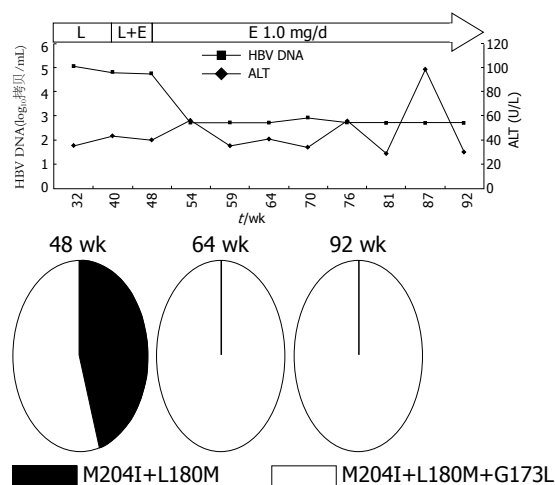


图 3 患者5病毒耐药突变的临床过程和进化。该患者LAM服用48 wk病毒转阴后自动停药24 wk, 重新服用LAM 40 wk时耐药, 改联合ETV 0.5 mg/d治疗, 8 wk后持续不降, 改单用ETV 1 mg/d。

列变化, 总克隆数为225个(表2)。患者1、2、5的耐药突变模式及克隆数见表3, 值得注意的是患者1联合ADV治疗22 wk时, 有20%(2/10)的克隆出现T184I, 在LdT 10 wk时57%(4/7)的克隆出现L180M, 同时出现DNA及ALT反弹, ETV 21 wk时虽然DNA为阴性, 但采用巢式PCR扩增, 克隆测序发现仍存在LAM耐药突变M204I+L80I约67%(8/12)和M204I+L180M+L80I约33%(4/12)。患者2经联合ADV治疗11 wk后,

表 3 耐药突变及克隆分析

| | 用药时间(wk) | 耐药突变模式 | 克隆数(总) |
|------|---------------------|-------------------|--------|
| 患者 1 | LAM+ADV 22 | M204I+L80I | 6 |
| | | M204I+L80I+T184I | 2 |
| | | M204I+L80V | 1 |
| | | M204I | 1(10) |
| | LdT 10 | M204I+L180M+L80I | 4 |
| | | M204I+L80I | 3(7) |
| | ETV 7 | M204I+L180M+L80I | 5(5) |
| | ETV 21 | M204I+L80I | 8 |
| | | M204I+L180M+L80I | 4(12) |
| 患者2 | LAM 63 | M204V+L180M | 8 |
| | | L180M | 2(10) |
| | LAM+ADV 11 | M204V+L180M+G173L | 8 |
| | | M204I+L180M+G173L | 2(10) |
| | LAM+ADV 89 | M204V+L180M | 6 |
| | | M204V+L180M+T184S | 2(8) |
| | ETV 1 mg/d, 12 | 无耐药突变 | 10(10) |
| 患者5 | LAM+ETV 0.5 mg/d, 8 | M204V+L180M+G173L | 6 |
| | | M204V+L180M | 5(11) |
| | ETV 1 mg/d, 16 | M204V+L180M+G173L | 10(10) |
| | ETV 1 mg/d, 44 | M204V+L180M+G173L | 7(7) |

在原耐药突变基础上选择出100%(10/10)的G173L及20%(2/10)的M204I, 但89 wk时G173L及M204I突变消失, 25%(2/8)的耐药株上出现T184S, 换用ETV 1 mg/d, 12 wk时均为野生型(10/10)。患者5在ETV 1 mg/d序贯治疗6 wk后虽然DNA持续阴性, 但16、44 wk时仍检测到M204V+L180M+G173L(10/10、7/7)。

患者3在LAM 62 wk时出现DNA反弹, 检测均为M204I+L80I(10/10)突变, 联合ADV治疗20 wk时恢复野生型(9/9), 虽然28 wk后DNA持续阴性, 但36、54 wk时仍检测到M204I+L80I(11/11)、M204V+L180M(10/10)。患者4停药4 wk时均为野生型(10/10), 再服LAM出现DNA反弹时以M204I为优势株(90%, 9/10), 联合ADV治疗22 wk时选择出M204I+L180M+L80I约56%(5/9)和M204I+L80I约44%(4/9)。患者6再次服LAM 48 wk时均为M204V+L180M+G173L(6/6), 换用ADV 70 wk后DNA反弹, 仍为M204V+L180M+G173L(10/10), 在ADV联合ETV 0.5 mg/d治疗36 wk时出现双重耐药株M204V+L180M+G173L+T184A(10%, 1/10)。患者7在LAM耐药时均为M204V+L180M+G173L(10/10), 在ADV治疗15 wk时出现10%(1/10)双重耐药株

M204V+L180M+G173L+N236D, 48 wk时出现40%(4/10)的M204V+L180V+G173L。

3 讨论

HBV耐药是乙肝患者抗病毒治疗过程中最棘手的问题之一。HBV耐药的根源在于: HBV复制水平很高, 但由于其聚合酶缺乏校正功能, 因而复制过程中很容易参入错误碱基形成变异株。这些变异株的特点各不相同, 在一个HBV感染者体内常形成以某一个优势株为主的相关突变株组成的病毒群称为准种, 他是一个不断变化的病毒群。

本研究除了患者2和3在LAM耐药后的序贯治疗过程中选择出野生株为优势株外, 其余5名患者仍以LAM耐药株为优势株, 且L180M与L80I分别伴随M204V及M204I出现, G173L多在M204V/I+L180M的基础上发生。患者3联合ADV治疗后短期内恢复为野生株, 但随着用药时间的延长, LAM耐药株将再次被筛选出来, 并且呈动态演变, 36 wk时为M204I+L80I, 54 wk时为M204V+L180M。患者1换用ETV后虽然DNA阴性, 但通过巢式PCR提高扩增效率, 仍检测到M204I+L180M+L80I和M204I+L80I耐药株。患者5换用ETV治疗, 在DNA阴性后亦发现

M204V+L180M+G173L耐药株, ETV耐药主要发生在LAM耐药基础上, M204V+L180M+G173L的存在增加了ETV耐药风险^[4]. 这些耐药株影响HBV复制能力及对NAs的敏感性, 此3例患者虽然在目前随访中DNA仍保持阴性, 但从准种角度讲, 序贯治疗仍具有潜在的耐药风险, 对于这类患者将考虑从免疫学等角度进行综合治疗.

患者1、2、5在LAM耐药后最终都采用ETV治疗, 经ETV治疗后患者1和5仍能检测出LAM耐药株, 而患者2中M204V+L180M+T184S和M204V+L180M突变株则全部演变为野生型. 推测这可能与不同的变异株的复制性、对ETV的敏感性及宿主的免疫有关. 突变株M204V+L180M+T184S对ETV耐药, 但患者2经ETV治疗后病毒株却全部演变为野生型, 这提示ETV加倍剂量同时给予胸腺肽调节免疫治疗能更有效地抑制耐药病毒株的复制.

患者6在ADV联合ETV治疗、患者7在单用ADV序贯治疗过程中分别出现双重耐药株M204V+L180M+G173L+T184A和M204V+L180M+G173L+N236D, N236D与ADV的耐药相关, 这与Yim等报道相似^[5,6]. 这种双重耐药变异株可能导致HBV复制能力增强及对NAs敏感性降低, 容易导致序贯治疗的失败^[7].

准种分析揭示了HBV以群体、动态的形式存在, 很多位点的改变是DNA复制过程中非特异的变异, 受内源(宿主免疫)和外源性(NAs)因素的影响, HBV的变异位点众多, 文中列出患者1、2、5的HBV逆转录酶区域与参考序列比对的所有不同“变异”, 从中可发现患者1在联合ADV治疗时并无L180M变异, 但在换用LdT后57%的克隆上出现L180M, 目前尚无报道此位点与LdT耐药直接相关, 但是LdT与LAM同属左旋类核苷酸类似物, 所以在其作用下是否更容易筛选出L180M值得进一步观察. T184S/I与ETV耐药相关, 患者1和2在LAM联合ADV后分别出现T184I和T184S变异, 同样, 患者5在LAM耐药时11份克隆里有2份出现P237H, 有报道Q215H、P237H、N236D与ADV的耐药有关^[5,8]. 推测这些患者在体内HBV仍复制的情况下, 药物作用更容易筛选出对其他NA耐药的突变, Gerolami等亦报道服用LAM时出现ADV耐药株A181V^[9]. 另外患者2在LAM耐药时20%克隆为M204A, 推测可能是HBV复制过程的非特异突变, 与LAM耐药无关, 他不影响HBV复制能力及对NAs的敏感性, 因而在联合ADV治疗过

程中能被完全抑制, 故联合治疗后M204A消失, 而只检测到M204V/I耐药突变. 患者7在ADV治疗48 wk时40%的突变株出现L180V, 他是否与耐药相关有待进一步实验验证. 另外, 从结果中可看出H55Q、C256S、E263D、S223A、I224V等位点突变率较高, 这些突变的临床意义还需要做体外表型实验来检测其对HBV复制能力及对NAs敏感性的影响^[10].

总之, 本研究分析了7例LAM耐药患者序贯治疗后HBV准种的演变特点, 结果显示部分患者即使采用ADV、ETV等序贯治疗, LAM耐药突变仍不易消失, 即使DNA检测为阴性, 提高扩增效率仍可检测到耐药变异株, 即使短时间内HBV野生株恢复为优势株, 但随着用药时间的延长, 原耐药变异株仍然会被筛选出来, 甚至在此基础上筛选出交叉耐药株或多重耐药株. 因此, 一旦发生耐药, 将对序贯治疗产生持续的影响, 因而进一步说明对需抗病毒治疗的HBV感染者, 初始治疗尽可能选耐药率低的NAs.

4 参考文献

- 1 Yim HJ. [Management of antiviral-resistant chronic hepatitis B virus infection] *Korean J Gastroenterol* 2008; 51: 346-359
- 2 Yuen MF, Fung J, Wong DK, Lai CL. Prevention and management of drug resistance for antihepatitis B treatment. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 256-264
- 3 Natsuizaka M, Hige S, Ono Y, Ogawa K, Nakanishi M, Chuma M, Yoshida S, Asaka M. Long-term follow-up of chronic hepatitis B after the emergence of mutations in the hepatitis B virus polymerase region. *J Viral Hepat* 2005; 12: 154-159
- 4 Choe WH, Hong SP, Kim BK, Ko SY, Jung YK, Kim JH, Yeon JE, Byun KS, Kim KH, Ji SI, Kim SO, Lee CH, Kwon SY. Evolution of hepatitis B virus mutation during entecavir rescue therapy in patients with antiviral resistance to lamivudine and adefovir. *Antivir Ther* 2009; 14: 985-993
- 5 Bartholomeusz A, Locarnini SA, Ayres A, Thompson G, Sozzi V, Angus P. Molecular modelling of hepatitis B virus polymerase and adefovir resistance identifies three clusters of mutations. *Hepatology* 2004; 40 (Suppl): 246A
- 6 Yim HJ, Hussain M, Liu Y, Wong SN, Fung SK, Lok AS. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy. *Hepatology* 2006; 44: 703-712
- 7 Brunelle MN, Jacquard AC, Pichoud C, Durantel D, Carrouée-Durantel S, Villeneuve JP, Trépo C, Zoulim F. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology* 2005; 41: 1391-1398
- 8 Bartholomeusz A, Locarnini SA. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects. *Semin Liver Dis* 2006; 26: 162-170
- 9 Gerolami R, Bourliere M, Colson P, Halfon P, Borentain P, Henry M, Botta D, Thibault V, Khiri

H, Tamalet C. Unusual selection of rtA181V HBV mutants cross-resistant to adefovir following prolonged lamivudine monotherapy: report of two cases. *Antivir Ther* 2006; 11: 1103-1106

10 Durantel D, Carrouée-Durantel S, Werle-

Lapostolle B, Brunelle MN, Pichoud C, Trépo C, Zoulim F. A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus. *Hepatology* 2004; 40: 855-864

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

p14ARF基因甲基化及蛋白表达在直肠癌中的作用

熊超亮, 黄缘

■背景资料

目前表观遗传学在肿瘤中的作用机制研究越来越成为热点, 也为预防肿瘤发生、进行肿瘤基因治疗提供了新的思路。目前, 在很多肿瘤中发现了p14ARF基因表达异常, 但研究直肠腺瘤-癌演变过程p14ARF甲基化情况较少, p14ARF基因恢复去甲基化状态治疗直肠癌尚处在临床研究阶段。

熊超亮, 黄缘, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 此课题由黄缘设计; 实验实施与论文写作由熊超亮完成, 黄缘审核。

通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市, 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: 0791-6292163

收稿日期: 2009-11-29 修回日期: 2010-01-18

接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-18

Methylation and expression of p14ARF in colorectal cancer

Chao-Liang Xiong, Yuan Huang

Chao-Liang Xiong, Yuan Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Yuan Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huan9815@yahoo.com

Received: 2009-11-29 Revised: 2010-01-18

Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate p14ARF (alternative reading frame) methylation and expression in colorectal cancer and to analyze their relationship with the biological behavior of colorectal cancer.

METHODS: The methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) method was used to detect p14ARF gene methylation in 30 colorectal cancer specimens, 30 colorectal adenoma specimens, and 30 normal mucosa specimens. The expression of p14ARF mRNA and protein in these specimens was detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: The expression level of p14ARF mRNA in colorectal cancer was not only lower than that in colorectal adenoma (0.283 ± 0.011 vs 0.721 ± 0.023 , $P < 0.05$) but also significantly lower than that in normal mucosa tissue (0.283 ± 0.011 vs 0.958 ± 0.015 , $P < 0.01$). Similar results were also obtained for the positive rate of

p14ARF protein expression (20.0% vs 56.7% , $P < 0.05$; and 20.0% vs 76.7% , $P < 0.01$). The methylation rates of the p14ARF gene were 46.6% , 20.0% and 0.0% in colorectal cancer, colorectal adenoma and normal mucosa tissue, respectively, with significant differences among the three groups. The methylation of p14ARF is correlated with cancer differentiation and lymph node metastasis (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The methylation of p14ARF may be involved in the evolution of colorectal cancer and may be an early event in the carcinogenesis of colorectal cancer. Therefore, p14ARF methylation may be used as a marker for early diagnosis of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; p14ARF; Methylation; Immunohistochemistry

Xiong CL, Huang Y. Methylation and expression of p14ARF in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 786-790

摘要

目的: 研究p14ARF基因甲基化及蛋白表达在直肠癌中的作用, 探讨p14ARF基因与直肠癌生物学行为的关系。

方法: 采用MSP方法(甲基化特异性PCR)检测30例直肠癌组织、腺瘤组织、正常黏膜组织p14ARF基因甲基化情况。采用RT-PCR方法(半定量逆转录PCR)检测p14ARF基因在大肠癌组织、腺瘤组织、正常黏膜组织中的表达情况及采用免疫组织化学法(SP法)检测p14ARF蛋白在这些组织中的表达情况。然后用t检验及卡方检验对其数据进行分析。

结果: p14ARF基因在30例直肠癌组织、腺瘤组织、直肠正常黏膜组织中表达量分别为 0.283 ± 0.011 , 0.721 ± 0.023 , 0.958 ± 0.015 。直肠癌组织中p14ARF基因表达低于腺瘤组织($P < 0.05$), 明显低于直肠正常黏膜组织($P < 0.01$), 三者差异有统计学意义($P < 0.05$)。p14ARF蛋白在30例直肠癌组织、腺瘤组织、正常黏膜组织中表达率分别为20.0%、

■同行评议者

李华山, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院肛肠科; 刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

56.7%、76.7%。p14ARF蛋白在正常组织中的表达高于直肠腺瘤($P<0.05$), 明显高于直肠癌组织($P<0.01$); p14ARF甲基化在30例直肠癌组织、腺瘤组织、正常黏膜组织中表达率分别为46.6%、20.0%、0.0%。三者差异有统计学意义。p14ARF基因甲基化与直肠癌分化程度及淋巴转移密切相关($P<0.05$)。

结论: p14ARF甲基化可能参与了直肠腺瘤-腺癌的演变过程, 可能是直肠癌发生的早期事件。p14ARF甲基化状态可作为直肠癌患者早期诊断的一个生物学指标。

关键词: 大肠癌; p14ARF; 甲基化; 免疫组织化学

熊超亮, 黄缘. p14ARF基因甲基化及蛋白表达在直肠癌中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 786-790
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/786.asp>

0 引言

目前随着DNA翻译后修饰的表观遗传学研究发展, 人们发现DNA甲基化与肿瘤发生的关系越来越密切, 在许多肿瘤中存在一个或多个肿瘤抑制基因的CpG岛的甲基化, 由于甲基化可使这些关键基因表达失活, 功能丧失, 从而导致了肿瘤的发生^[1,2]。研究发现跟其他遗传学改变方式不同的是启动子区甲基化具有可逆性, 这就使的甲基化造成的基因沉默可由去甲基化试剂恢复其表达成为一种可能, 这为临床抗肿瘤化疗无疑开辟了一条新的道路^[3-5]。因此现在研究抑癌基因的甲基化越来越受到人们的关注, 研究5'启动子区CpG岛甲基化已成为当今研究肿瘤分子生物学的热点。我们研究p14ARF基因甲基化及蛋白表达在直肠癌中的作用, 无论是在对直肠癌发生机制的理论研究, 还是在直肠癌早期诊治、预后判断的临床研究都具有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集南昌大学第二附属医院2008-2009年直肠腺瘤手术标本30例, 其中中分化20例, 低分化10例, 年龄40-75(平均57.4)岁, 男17例, 女13例, 所有癌标本术前未进行化疗、放疗。到内镜室收集30例直肠腺瘤组织、30例正常黏膜组织对照。腺瘤组织中绒毛状腺瘤15例, 管状腺瘤15例, 年龄30-75(平均51.3)岁, 男18例, 女12例。正常直肠黏膜组织, 年龄30-72(平均48.7)岁, 其中男15例, 女15例。试剂: TRIzol RNA试剂盒, 逆转

录试剂盒, 2×TaqPCR MasterMix, DNA Marker DL600, 蛋白酶K, Wizard DNA Clean-up试剂盒, 鼠抗人p14ARF单克隆抗体, SP试剂盒, DAB显色试剂盒等。

1.2 方法

1.2.1 甲基化特异性PCR: (1)采用蛋白酶K消化、酚-氯仿抽提法提取基因组DNA。(2)DNA纯化及修饰: DNA纯化用Wizard clean-up system试剂盒纯化。具体步骤按说明书进行。DNA亚硫酸氢盐修饰: 取2 μL DNA, 加入50 μL灭菌双蒸水, 加3 mol/L的NaOH 3.3 μL, 37 °C变性15 min, 加10 mol/L对苯二酚30 mL和3 mol/L亚硫酸氢钠520 μL混匀, 加200 μL液状石蜡封闭, 锡纸包裹55 °C水浴16 h。(3)甲基化特异性PCR: 取纯化及修饰后DNA 2 μL加入目的基因上下游引物各1 μL, 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, 无核酶水8.5 μL建立25 μL反应体系行PCR扩增。甲基化p14ARF引物: 5'-GTGTTAAAGGGCGGCGTAG C-3', 5'-AAAACCCTCACTCGCGACGA-3'; 扩增条件: 95 °C预变性5 min, 94 °C 45 s, 54 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35个循环, 72 °C再延伸7 min; 非甲基化p14ARF引物: 5'-TTTTTGGTGTAAAG GGTGGTGTAGT-3', 5'-CACAAAAACCCTCAC TCACAACAA-3'; 扩增条件: 95 °C预变性5 min, 94 °C 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35个循环, 72 °C再延伸7 min; PCR扩增产物鉴定: 各取上述产物10 μL在2%的琼脂糖凝胶上电泳观察结果, p14ARF基因甲基化条带大小为122 bp, 未甲基化条带为132 bp; 结果判定: MSP产物电泳时只出现未甲基化条带, 样本计为未甲基化; 出现甲基化条带, 无论是否出现未甲基化条带, 均为甲基化。

1.2.2 半定量逆转录PCR: (1)用TRIzol试剂分别提取直肠癌组织和腺瘤组织、正常直肠黏膜组织的总RNA(A_{260}/A_{280} 均在1.8-2.0)。(2)用逆转录酶和Oligo(dT)合成cDNA, 严格按逆转录试剂盒说明步骤进行。(3)基因组扩增(PCR): 取上述产物2 μL依次加入目的基因上下游引物各1 μL, 2×TaqPCR MasterMix 12.5 μL无核酶水8.5 μL建立25 μL反应体系, 行PCR扩增: 内参β-actin基因引物: 正义: 5'-CCAGGCACCAGGGCGTGAT GGTGGGCATGG-3', 反义: 5'-AGCAGCCGTGG CCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'; p14ARF基因引物: 正义: 5'-GGTTTTCGTGGTTCACATCC-3', 反义: 5'-CAGGAAGCCCTCCCGGGCA-3'; 扩增条件: 95 °C预变性5 min; 94 °C变性45 s, 56 °C退火

■研发前沿

目前研究认为p14ARF基因表达异常与多种肿瘤的发生及转移有关, 相关分子机制的研究中还有不少问题需要进一步阐明: (1)p14ARF基因表达失活形式有多种, 他们是不是单一作用于肿瘤发生过程; (2)p14ARF甲基化在直肠腺瘤-癌演变生物学行为中涉及到的信号通路及与其他癌基因及抑癌基因的相互作用如何; (3)用去甲基化试剂使p14ARF基因恢复去甲基化状态对抑制直肠癌发生、发展价值有多大, 去甲基化过程相关机制如何。

■相关报道

已有多项研究支持p14ARF基因在肿瘤发生过程中发挥抑制性调节作用, 目前对其可能的机制研究主要包括如何参与正常细胞生长周期调控及异常表达对肿瘤细胞的成瘤、侵袭、转移能力影响等。不少研究认为p14ARF基因在肿瘤组织中表达缺失与p14ARF基因甲基化水平有关。

■创新盘点

p14ARF基因是人类最重要的正常细胞生长周期调控基因之一,关于p14ARF基因失活与肿瘤的关系研究很多,但迄今关于p14ARF基因甲基化在直肠腺瘤-癌演变过程中的相关作用报道尚少。

表 1 p14ARF甲基化在直肠癌、腺瘤组织、正常黏膜组织中的表达 ($n = 30$)

| 分组 | p14ARF | | χ^2 值 | P 值 |
|--------|--------|------|------------|-------|
| | 甲基化 | 非甲基化 | | |
| 直肠癌组织 | 14 | 16 | 18.26 | <0.01 |
| 正常黏膜组织 | 0 | 30 | 4.63 | <0.05 |
| 直肠腺瘤组织 | 6 | 24 | 4.80 | <0.05 |

表 2 p14ARF蛋白在直肠癌、腺瘤组织、正常黏膜组织中的表达 ($n = 30$)

| 分组 | p14ARF蛋白 | | χ^2 值 | P 值 |
|--------|----------|----|------------|-------|
| | 阳性 | 阴性 | | |
| 直肠癌组织 | 6 | 24 | 19.28 | <0.01 |
| 正常黏膜组织 | 23 | 7 | 6.16 | <0.05 |
| 直肠腺瘤组织 | 17 | 13 | 8.53 | <0.05 |

45 s, 72 °C延伸45 s, 30个循环; 72 °C末次延伸5 min. (4)电泳鉴定: 各取上述产物5 μ L在2%的琼脂糖凝胶上电泳, 在紫外下观察条带并用凝胶成像系统分析, p14ARF基因条带大小为254 bp, 内参 β -actin基因为581 bp, PCR产物量以光密度/面积表示, 以p14ARF基因产物量/ β -actin产物量的比值作为表达结果。

1.2.3 免疫组织化学法: (1)采用免疫组织化学SP法, 具体实验步骤按免疫组织化学试剂盒说明书进行, 用PBS代替一抗做阴性对照. (2)结果判定: p14ARF蛋白阳性反应主要定位于细胞核, 参照Sulzers分级法, 阴性(-): 阳性细胞<10%; 阳性(+): 阳性细胞数10%-50%; 强阳性(++): 阳性细胞数>50%。

统计学处理 采用 t 检验对RT-PCR数据; χ^2 检验对甲基化及免疫组织化学相关数据进行分析, 检验显著性水准取 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义. 数据由SPSS13.0统计软件处理。

2 结果

2.1 p14ARF甲基化表达情况 在30例直肠癌组织中有14例(46.67%)发生了p14ARF基因甲基化, 30例直肠腺瘤组织中有6例(20%)发生了p14ARF基因甲基化, 30例正常黏膜组织中有0例(0%)发生甲基化. 他们之间两两比较差异均存在统计学意义($P < 0.05$, 图1, 表1)。

2.2 p14ARF基因mRNA表达情况 p14ARF基因mRNA在直肠癌组织中基本不表达, 在直肠腺瘤组织中可见表达, 在直肠正常黏膜组织中明显表达. 正常黏膜组织mRNA表达量(0.958 ± 0.015)高于腺瘤组织(0.721 ± 0.023)($P < 0.05$), 明显高于肿瘤组织组织(0.283 ± 0.011)($P < 0.01$, 图2)。

2.3 p14ARF蛋白表达 p14ARF蛋白在直肠癌组织中表达率为20%(6/30), 在腺瘤组织中表达率为56.67%(17/30), 在直肠正常黏膜组织中表达率为76.67%(23/30), 他们三者之间差异均存在统计学意义($P < 0.05$, 图3, 表2)。

2.4 p14ARF甲基化与直肠癌临床病理特点

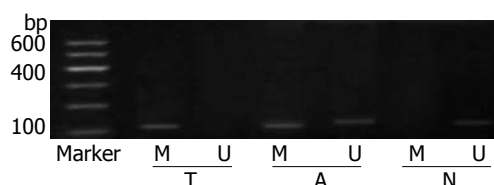


图 1 p14ARF甲基化在直肠癌、腺瘤组织、正常黏膜组织中表达电泳图. T: 直肠癌; A: 直肠腺瘤; N: 正常组织; M: 甲基化; U: 非甲基化。

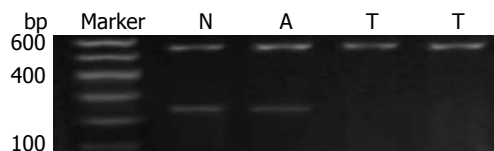


图 2 p14ARF基因在直肠癌、腺瘤组织、正常黏膜组织中表达电泳图. T: 直肠癌; A: 直肠腺瘤; N: 正常黏膜组织。

p14ARF甲基化与直肠癌发生关系密切, 在直肠癌临床病理特点中, p14ARF甲基化与直肠癌患者年龄、性别、肿瘤大小无关; 但与肿瘤分化程度及淋巴转移呈正相关, 分化程度越低, p14ARF甲基化程度相对越高(表3)。

3 讨论

直肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 占大肠癌发病率中70%以上, 且随人们生活习惯、饮食结构及环境的改变, 发病率有逐年上升趋势^[6]. 现代分子生物学研究证实肿瘤的发生是一个多基因、多因素、多阶段参与的复杂过程, 涉及各种抑癌基因的失活及癌基因的激活, 同时凋亡调节基因、DNA修复调节基因和端粒等也在其中发挥着重要的作用. p14ARF基因作为人体一种重要抑癌基因, 在正常细胞生长周期调控中起着重要作用。

ARF基因位于人染色体9p21, 通过可变阅读框, 编码两种蛋白质: p16INK4a和p14ARF. p14ARF含有2个外显子, 即Exon1 β 和Exon2. p14ARF蛋白是一种核蛋白, 蛋白折叠产生一个由5个大约32个氨基酸残基锚蛋白样重复组成

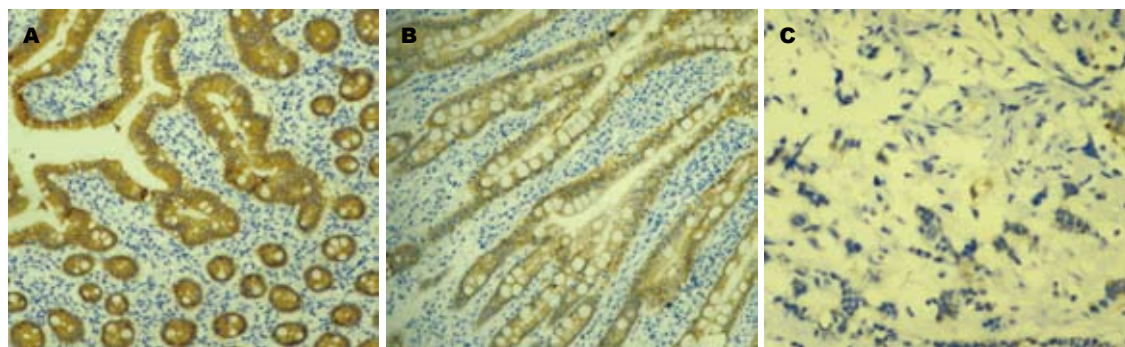


图 3 p14ARF蛋白在直肠癌、腺瘤组织、正常黏膜组织中表达情况(SP × 200). A: 直肠正常黏膜组织中表达强阳性; B: 直肠腺瘤组织中表达阳性; C: 直肠癌组织中表达阴性.

■应用要点

本研究表明 p14ARF 基因甲基化是直肠癌发生过程中的重要分子事件, 检测 p14ARF 基因甲基化状态可作为直肠癌患者早期诊断或判断预后中的一个生物学指标. 恢复 p14ARF 基因去甲基化状态可能成为直肠癌治疗的一种重要手段.

表 3 p14ARF甲基化与直肠癌临床病理特点

| 临床病理参数 | n | p14ARF甲基化 | | 甲基化率(%) | P值 |
|----------|----|-----------|----|---------|-------|
| | | + | - | | |
| 性别 | | | | | |
| 男 | 17 | 8 | 9 | 47.1 | >0.05 |
| 女 | 13 | 6 | 7 | 46.1 | |
| 年龄(岁) | | | | | |
| ≤50 | 11 | 5 | 6 | 45.4 | >0.05 |
| >50 | 19 | 9 | 10 | 47.4 | |
| 肿瘤大小(cm) | | | | | |
| ≤3 | 12 | 6 | 6 | 50.0 | >0.05 |
| >3 | 18 | 8 | 10 | 44.4 | |
| 分化程度 | | | | | |
| 中分化 | 20 | 6 | 14 | 30.0 | <0.05 |
| 低分化 | 10 | 8 | 2 | 80.0 | |
| 淋巴结转移 | | | | | |
| 无 | 18 | 7 | 11 | 38.9 | <0.05 |
| 有 | 12 | 7 | 5 | 58.3 | |

的椭圆形分子. 该蛋白相对十分稳定, 半衰期接近6 h, 主要经过蛋白酶体途径降解. p14ARF 基因通过减弱mdm2介导的p53基因降解而起作用, 形成了人类正常细胞生长周期调控的p53依赖性通路, 并在此通路中扮演着源头开关作用. p14ARF基因通过加速癌基因mdm2表达蛋白的降解, 能恢复和稳定细胞野生型p53水平, 增强p53的G₁/S卡点效应, 抑制细胞生长^[7]. 从我们的研究中可以看到: p14ARF基因及蛋白表达在直肠癌、直肠腺瘤、直肠正常黏膜组织中均存在明显差异, 在直肠癌表达中低于直肠腺瘤($P<0.05$), 明显低于直肠黏膜正常组织($P<0.01$). 这说明p14ARF基因在维持直肠正常黏膜细胞生长周期中起着十分重要的作用, 他的存在有效地抑制了直肠癌的发生. 而各种原因引起p14ARF基因的异常表达, 使p14ARF基因丧失

了对正常细胞生长周期的调控, 致p53依赖性通路失效, p53不能抑制细胞发生凋亡, 细胞生长失控, 从而导致肿瘤的发生. 目前, 在很多肿瘤中发现有p14ARF基因表达异常, 常见于非小细胞肺癌、胃癌、神经胶质瘤、白血病和黑色素瘤, 这也说明p14ARF基因异常表达与多种肿瘤发生关系密切^[8]. 作为抑癌基因, p14ARF基因失活方式主要包括基因的甲基化、基因缺失和突变^[9]. 而近年来随着表观遗传学的兴起, 人们发现DNA甲基化是表观遗传学的主要方式之一, 许多肿瘤存在一个或多个抑癌基因的CpG岛的甲基化. 5'启动子区CpG岛富含C-G对, 此区高度甲基化可影响启动子功能, 导致基因表达受影响, 在癌变过程中发挥着主要作用^[10]. 本研究发现p14ARF基因甲基化同样存在于直肠癌中. 我们的研究显示: 30例直肠癌组织中有14例(46.67%)发生了p14ARF基因甲基化, 30例直肠腺瘤组织中有6例(20%)发生了甲基化, 30例正常黏膜组织中有0例(0%)发生甲基化. 他们之间两两比较差异均存在统计学意义($P<0.05$). 这说明p14ARF基因甲基化在直肠癌、直肠腺瘤、直肠正常黏膜组织中3组之间明显存在差异, 在直肠癌中呈现高甲基化状态, 甲基化率可高达46.67%, 而腺瘤组织也存在部分甲基化(甲基化率为20%), 且p14ARF基因甲基化与直肠癌肿瘤分化有关($P<0.05$), 而与直肠癌患者性别、年龄、及肿瘤大小无关($P>0.05$), 这说明p14ARF基因甲基化可能参与了直肠癌由腺瘤演变为腺癌的形成过程, 可能是直肠癌发生中的早期事件. 我们的研究还显示: p14ARF基因甲基化不仅与肿瘤分化程度呈正相关, 与直肠癌淋巴转移也存在正相关, 这说明p14ARF基因甲基化可能也参与了直肠癌的转移机制, 也可能是因为直肠癌组织分化程度低、恶性程度更高、侵袭性

■同行评价

本研究选题较好,思路清晰,结构完整,有一定的临床意义。

更强,以致更容易发生早期转移。我们还研究了
下直肠癌中p14ARF基因甲基化与p14ARF蛋白
表达的关系,我们发现14例p14ARF基因甲基
化的直肠癌组织4例发生了p14ARF蛋白阳性表
达,其解释原因可能是部分甲基化只发生在单
等位基因上,而另一等位基因未发生甲基化,故
能编码蛋白表达。而16例未发生p14ARF基因甲
基化直肠癌组织有14例p14ARF蛋白阴性表达。
这说明可能还有其他p14ARF基因失活方式参与
直肠癌的形成,如突变、缺失等。

总之,我们通过研究p14ARF基因甲基化及
蛋白表达在直肠癌中的作用,探讨直肠癌发生
发展的分子机制,检测p14ARF基因甲基化状
态可作为直肠癌患者早期诊断或判断预后的
一个生物学指标。如果我们能通过对直肠癌中
p14ARF甲基化进行干扰,寻找合适的去甲基化
试剂使直肠癌甲基化基因恢复去甲基化状态,
从可以在源头上防止p14ARF甲基化对直肠癌产
生的影响,这将为临床药物抗肿瘤治疗及基因
干扰治疗提供了一种可能,开辟一条新的重要
途径。

4 参考文献

- 1 Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA
methylation in cancer development. *Folia Histochem
Cytobiol* 2006; 44: 143-154
- 2 Mosskalev EA, Eprintsev AT, Hoheisel JD. [DNA
methylation profiling in cancer: from single
nucleotides towards methylome] *Mol Biol (Mosk)*
2007; 41: 793-807
- 3 Karpf AR, Jones DA. Reactivating the expression
of methylation silenced genes in human cancer.
Oncogene 2002; 21: 5496-5503
- 4 Ghoshal K, Bai S. DNA methyltransferases as
targets for cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 2007;
43: 395-422
- 5 Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD,
Robertson KD. DNA methylation inhibitor 5-Aza-
2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide
DNA damage that is distinctly influenced by DNA
methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol* 2008; 28:
752-771
- 6 Sung JJ, Lau JY, Goh KL, Leung WK. Increasing
incidence of colorectal cancer in Asia: implications
for screening. *Lancet Oncol* 2005; 6: 871-876
- 7 Gallagher SJ, Kefford RF, Rizos H. The ARF
tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38:
1637-1641
- 8 Pimkina IuS, Dorosevich AE. [Role of the tumor
suppressor ARF in oncogenesis] *Arkh Patol* 2009; 71:
60-63
- 9 Watanabe T, Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues
P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation and
homozygous deletion of the p14ARF and p16INK4a
genes in oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 2001;
101: 185-189
- 10 Boland CR, Shin SK, Goel A. Promoter methylation
in the genesis of gastrointestinal cancer. *Yonsei Med
J* 2009; 50: 309-321

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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。

侵袭转移相关因子在胃肠道间质瘤中的检测及其意义

赵毅, 王强, 邓鑫, 赵滢, 张天彪

赵毅, 王强, 邓鑫, 赵滢, 中国医科大学附属盛京医院胃肠外科 辽宁省沈阳市 110004

张天彪, 中国医科大学分子生物学教研室 辽宁省沈阳市 110001

赵毅, 副教授, 副主任医师, 2004年沈阳中国医科大学博士, 主要从事胃肠肿瘤及缺血损伤研究。

辽宁省教育厅基金资助项目, No. 2009A726

作者贡献分布: 此课题由王强与赵毅设计并指导实验完成; 研究过程由张天彪、邓鑫及赵滢操作完成; 数据分析由赵毅与张天彪完成; 本论文写作由赵毅、张天彪及王强完成。

通讯作者: 王强, 主任医师, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院胃肠外科。

wangq@sj-hospital.org

收稿日期: 2009-12-14 修回日期: 2010-01-26

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Significance of expression of metastasis-related factors uPA, MMP-2, MMP-9 and TGF- β 1 in gastrointestinal stromal tumors

Yi Zhao, Qiang Wang, Xin Deng, Ying Zhao, Tian-Biao Zhang

Yi Zhao, Qiang Wang, Xin Deng, Ying Zhao, Department of Gastrointestinal Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Tian-Biao Zhang, Department of Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Foundation of Education Department of Liaoning Province, No. 2009A726

Correspondence to: Professor Qiang Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wangq@sj-hospital.org

Received: 2009-12-14 Revised: 2010-01-26

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the significance of expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in gastrointestinal stromal tumors (GISTs).

METHODS: The expression of uPA, MMP-2, MMP-9 and TGF- β 1 mRNAs and proteins in 124 GISTs specimens was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

and Western blot, respectively.

RESULTS: In gastrointestinal stromal tumors, the mRNA expression of uPA, MMP-2, MMP-9 and TGF- β 1 is closely correlated with tumor stage (NIH classification), mucosal invasion and lymphatic metastasis. The mRNA expression levels of uPA, MMP-2, MMP-9 and TGF- β 1 were up-regulated with increasing tumor stage, showing significant differences among low-, moderate- and high-risk GISTs. The positive rates of uPA, MMP-2, MMP-9 and TGF- β 1 mRNA expression was not correlated with age, sex and histological type. Similar results were obtained for the expression of uPA, MMP-2, MMP-9 and TGF- β 1 proteins in GISTs. The expression of uPA protein is positively correlated with that of TGF- β 1, MMP-2 and MMP-9 ($r = 0.356, 0.323$ and 0.346 , respectively).

CONCLUSION: The positive activation of TGF- β 1 in GISTs possibly up-regulates uPA expression which in turn activates MMP-2 and MMP-9. The activation of MMP-2 and MMP-9 may lead to the degradation of extracellular matrix degradation and promote tumor invasion and metastasis.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumor; Urokinase-type plasminogen activator; Matrix metalloproteinase-2; Matrix metalloproteinase-9; Transforming growth factor- β 1; Invasion and metastasis

Zhao Y, Wang Q, Deng X, Zhao Y, Zhang TB. Significance of expression of metastasis-related factors uPA, MMP-2, MMP-9 and TGF- β 1 in gastrointestinal stromal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 791-797

摘要

目的: 研究uPA、MMP-2、MMP-9、TGF- β 1等侵袭转移相关因子在胃肠道间质瘤(GISTs)中的表达及其临床病理意义。

方法: 应用RT-PCR及Western blot法检测uPA、MMP-2、MMP-9、TGF- β 1在124例GISTs中的表达。

结果: 在GISTs中, 随着NIH分级增高, uPA、

■背景资料

胃肠道间质瘤(GISTs)是一类独立起源于胃肠道原始间质干细胞呈非定向分化的消化系间叶肿瘤, 占全部胃肠道恶性肿瘤的2.2%。GISTs主要发生血行转移, 极少经淋巴转移, 且其治疗措施单一, 手术治疗是其主要的治疗手段, 术后化疗均不敏感。研究GISTs的侵袭与转移对肿瘤的治疗具有重要意义。

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■研究前沿

TGF- β 1作为生长因子,具有调节细胞增殖、分化和凋亡等多种生物活性。近年的研究表明,他还在调节细胞增殖、分化、细胞外基质形成、细胞的移动、黏附、肿瘤转移等方面具有重要作用。

MMP-2、MMP-9、TGF- β 1的mRNA表达水平上调,低、中、高危组有明显差异($P < 0.05$ 或 0.01),其阳性表达率与性别、年龄、组织学类型无关,与肿瘤侵袭转移和黏膜受侵关系密切;四者的蛋白表达水平与mRNA表达一致;uPA与TGF- β 1蛋白阳性表达之间呈显著正相关($r = 0.356$)、uPA与MMP-2、MMP-9蛋白阳性表达之间亦呈显著正相关($r = 0.323, 0.346$)。

结论: TGF- β 1、uPA、MMP-2及MMP-9参与了GISTs的浸润和转移;TGF- β 1可能通过上调uPA,激活MMP-2及MMP-9,进而降解细胞外基质。

关键词: 胃肠道间质瘤;尿激酶型纤溶酶原激活物;基质金属蛋白酶2;基质金属蛋白酶9;转化生长因子 β 1;侵袭转移

赵毅, 王强, 邓鑫, 赵滢, 张天彪. 侵袭转移相关因子在胃肠道间质瘤中的检测及其意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 791-797

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/791.asp>

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤,占胃肠道肿瘤的1%-4%,每年发病率约2/10万^[1]。过去对GISTs的组织发生、生物学行为、肿瘤的恶性程度都不十分明确,给临床诊治带来了很大混淆。近几年随着免疫组织化学、分子生物学、基因诊断和治疗的发展,GISTs诊断与治疗取得了很大的进展。尽管如此,与其他肿瘤相比,GISTs肿瘤性质不可预测性仍较为突出,其生物学特征仍较难以评估,如何控制肿瘤的侵袭与转移仍是其治疗目前面临的主要问题^[2]。

肿瘤的侵袭、转移依赖于肿瘤细胞具备的降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及基底膜的能力,而这一降解过程主要依靠蛋白水解酶来完成。尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)和基质金属蛋白酶类(matrix metallo proteinase, MMPs)能有效地降解ECM,参与肿瘤的侵袭及转移过程。

迄今为止,关于GISTs侵袭转移相关因子的研究报道极少,因此我们采用RT-PCR和Western blot方法检测GISTs组织中转化生长因子 β (TGF- β 1)、尿激酶型纤溶酶原激活因子uPA和基质金属蛋白酶MMP-2、MMP-9基因以及蛋白的表达,以探讨其与GISTs侵袭转移的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选择临床病理资料完整、随访结果确切的中国医科大学附属盛京医院1990/2007-02手术切除、病理证实的GISTs新鲜组织标本124例。男64例、女60例,年龄9-79(中位年龄54.3)岁。其中肿瘤发生于胃62例(50.0%)、小肠28例(22.6%)、结直肠14例(11.3%)、食管9例(7.3%)、胃肠道外11例(8.9%,其中网膜4例、肠系膜4例、后腹膜3例);一抗为兔抗人购自美国Santa Cruz公司。二抗为牛抗兔购自中山金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 GISTs的诊断标准: 常规形态符合GISTs诊断要点,免疫组织化学CD117阳性确诊;或者常规形态符合GISTs诊断要点,CD117阴性而CD34阳性确诊,或者CD117、CD34阴性,并且平滑肌肌动蛋白(SMA)、结蛋白(Desmin)、神经脊突细胞抗原(S-100)蛋白也均阴性,排除平滑肌源性和神经源性肿瘤,病理组织学形态符合GISTs而纳入本研究。其中CD117阳性113例(91.1%)、CD34阳性109例(87.9%)。依据Fletcher等^[3]提出的GISTs生物学行为分级标准进行分级(NIH分级): 肿瘤直径 < 2 cm和核分裂相 $< 5/50$ HPF为极低度侵袭危险性(I级);肿瘤直径2-5 cm和核分裂相 $< 5/50$ HPF为低度侵袭危险性(II级);肿瘤直径5-10 cm和核分裂相 $< 5/50$ HPF或肿瘤 < 5 cm和核分裂相6-10/50 HPF为中度侵袭危险性(III级);肿瘤直径 > 5 cm和核分裂相 $> 5/50$ HPF或肿瘤 > 10 cm和核分裂相 $> 10/50$ HPF为高度侵袭危险性(IV级)。本文124例GISTs中、除9例因其他原因死亡外,其余115例随访资料完整,随访时间10-204 mo,中位随访时间52 mo。

1.2.2 RT-PCR检测GISTs中uPA、MMP-2、MMP-9及TGF- β 1的mRNA表达: 选择特异性引物序列分别为: uPA上游序列5'-ccatctacaggaggcaccg-3',下游序列5'-gccaaactggggatcggttat-3'; MMP-2上游序列5'-ccccaaaacggacaaagagt-3',下游序列5'-gcacgagcaaaggcatcat-3'; MMP-9上游序列5'-cgaactttgacagcgacaaga-3',下游序列5'-agggcgaggaccatagagg-3'; TGF- β 1上游序列5'-ctgctgtggctactggtgc-3',下游序列5'-catagatttcgtgtgggttcc-3'; 内参照 β -actin上游序列5'-aaatcgtgcgtgacattaa-3',下游序列5'-ctcgtcactactcctgcttg-3'。PCR反应条件为95 °C变性1 min, 52 °C-57 °C退火2 min, 72 °C延伸10 min。所有的标本都经过3次重复检测。产物大小分别为347、315、212及322 bp。将各目

表 1 GISTs中uPA、MMP-2、MMP-9及TGF- β 1 mRNA的表达与临床病理特征关系

| 临床病理指标 | <i>n</i> | uPA | MMP-2 | MMP-9 | TGF- β 1 |
|-----------|----------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 性别 | | | | | |
| 男 | 65 | 0.7285 \pm 0.0801 ^a | 0.4426 \pm 0.0575 ^a | 0.5826 \pm 0.0641 ^a | 0.6389 \pm 0.0792 |
| 女 | 59 | 0.7264 \pm 0.0872 ^b | 0.4251 \pm 0.0510 ^a | 0.6198 \pm 0.0806 ^a | 0.6226 \pm 0.0770 |
| 年龄(岁) | | | | | |
| ≥ 55 | 70 | 0.7086 \pm 0.0921 ^a | 0.4189 \pm 0.0503 ^a | 0.6025 \pm 0.0723 ^b | 0.6128 \pm 0.0735 ^b |
| < 55 | 54 | 0.7116 \pm 0.0996 ^a | 0.4496 \pm 0.0540 ^a | 0.6084 \pm 0.0791 ^a | 0.6351 \pm 0.0714 ^a |
| 组织学类型 | | | | | |
| 上皮样 | 28 | 0.7183 \pm 0.0791 ^a | 0.4283 \pm 0.0474 ^a | 0.6188 \pm 0.0804 ^a | 0.6238 \pm 0.0772 ^a |
| 梭形 | 73 | 0.7015 \pm 0.0842 ^b | 0.4305 \pm 0.0689 ^a | 0.5925 \pm 0.0770 ^a | 0.6024 \pm 0.0904 ^a |
| 混合型 | 23 | 0.7265 \pm 0.0799 ^a | 0.4534 \pm 0.0589 ^b | 0.6286 \pm 0.0817 ^a | 0.6373 \pm 0.1024 ^a |
| 肿瘤侵袭转移 | | | | | |
| 无 | 84 | 0.6297 \pm 0.0693 ^a | 0.3206 \pm 0.0353 ^a | 0.4827 \pm 0.0531 ^a | 0.3429 \pm 0.0477 ^b |
| 有 | 40 | 0.7502 \pm 0.0825 ^{ac} | 0.4587 \pm 0.0551 ^{ac} | 0.6482 \pm 0.0843 ^{ac} | 0.7518 \pm 0.0456 ^{ac} |
| 肿瘤旁组织 | 124 | 0.4302 \pm 0.0645 | 0.2749 \pm 0.0412 | 0.2357 \pm 0.0353 | 0.1928 \pm 0.0289 |
| NIH分级 | | | | | |
| 超低危 | 6 | 0.5555 \pm 0.0889 ^{bc} | 0.3260 \pm 0.0522 ^{bc} | 0.3450 \pm 0.0552 ^{bc} | 0.3460 \pm 0.0554 ^{ad} |
| 低危 | 20 | 0.6444 \pm 0.0709 ^{ac} | 0.3673 \pm 0.0404 ^{ad} | 0.5448 \pm 0.0599 ^{ad} | 0.4881 \pm 0.0537 ^{ac} |
| 中危 | 37 | 0.7063 \pm 0.0848 ^{ad} | 0.4534 \pm 0.0544 ^{ac} | 0.6132 \pm 0.0736 ^{ac} | 0.6024 \pm 0.0723 ^{ad} |
| 高危 | 61 | 0.7488 \pm 0.0899 ^{ac} | 0.4552 \pm 0.0546 ^{bc} | 0.6455 \pm 0.0775 ^{bc} | 0.7336 \pm 0.0880 ^{bc} |
| 黏膜受侵 | | | | | |
| 无 | 79 | 0.5986 \pm 0.0841 ^a | 0.3341 \pm 0.0357 ^a | 0.4752 \pm 0.0618 ^a | 0.3829 \pm 0.0388 ^a |
| 有 | 34 | 0.7134 \pm 0.0856 ^a | 0.4592 \pm 0.0597 ^a | 0.6382 \pm 0.0845 ^{ac} | 0.7208 \pm 0.0963 ^{ac} |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 肿瘤旁组织; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 同检测项目同病理指标的其他组。

的基因的PCR反应产物在20 g/L的琼脂糖溴化乙锭凝胶上电泳, 采用UVP凝胶成像分析系统扫描测定PCR产物带的密度, 将各目的基因产物带所测得的密度值与内对照 β -actin产物带的密度值进行比较, 各目的基因表达水平以与 β -actin内对照比值的形式来表达。

1.2.3 Western印迹法检测GISTs中uPA、MMP-2、MMP-9及TGF- β 1的蛋白表达: 0.5 g GISTs加入1 mL细胞裂解缓冲液(cell signaling technology, Beverly, MA)及1 mmol的PMSF(苯甲基磺酰氟)匀浆。按常规步骤提取蛋白, 测定蛋白浓度。电泳前, 加入SDS样品缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸5 min, 离心后上样, 12% SDS-PAGE分离, 然后将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 一抗孵育, 碱性磷酸酶偶联的IgG作为二抗, O-dianidine及 β -naphthyl acid phosphate作为碱性磷酸酶底物显色。

统计学处理 所有统计资料应用SPSS13.0软件包进行数据分析, 采用 t 检验和相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GISTs中uPA、MMP-2、MMP-9及TGF- β 1

的mRNA的表达 在124例GISTs患者中, TGF- β 1 mRNA的表达随NIH分级而上调($P < 0.05$ 或0.01, 图1), TGF- β 1的阳性表达率与性别、年龄、组织学类型无关, 但与黏膜受侵和肿瘤侵袭转移均显著相关($P < 0.05$ 或0.01, 表1); 同时我们也发现uPA mRNA的表达随NIH分级上调($P < 0.05$ 或0.01, 图1), uPA的阳性表达率与性别、年龄、组织学类型无关, 与肿瘤侵袭转移和黏膜受侵显著相关($P < 0.05$ 或0.01, 表1); MMP-2、MMP-9 mRNA的表达随NIH分级上调($P < 0.05$ 或0.01, 图1), 其阳性表达率与性别、年龄、组织学类型无关, 但与黏膜受侵和肿瘤侵袭转移均显著相关($P < 0.05$ 或0.01, 表1)。各指标与临床病理特征之间的关系详见表1。

2.2 GISTs中uPA、MMP-2、MMP-9及TGF- β 1蛋白的表达 在124例GISTs患者中, TGF- β 1蛋白的表达随NIH分级而上调, TGF- β 1蛋白的阳性表达率随着肿瘤侵袭转移危险性的升高呈现逐渐升高的趋势($P < 0.05$ 或0.01, 图2, 3)。TGF- β 1蛋白的阳性表达率与性别、年龄、组织学类型无关, 但与黏膜受侵和肿瘤侵袭转移均显著相关

■ 相关报道

Desruisseau等通过对乳腺癌的研究发现, TGF- β 1 mRNA的表达与肿瘤浸润深度、生长方式和肿瘤侵袭转移等生物学行为密切相关, 能在一定程度上促进肿瘤的侵袭和转移。

■创新盘点

迄今为止,关于GISTs侵袭转移相关因子的研究报道极少,因此本研究采用RT-PCR和Western blot方法检测GISTs组织中TGF- β 1、尿激酶型纤溶酶原激活因子uPA和基质金属蛋白酶MMP-2、MMP-9基因以及蛋白的表达,以探讨其与GISTs侵袭转移的关系。

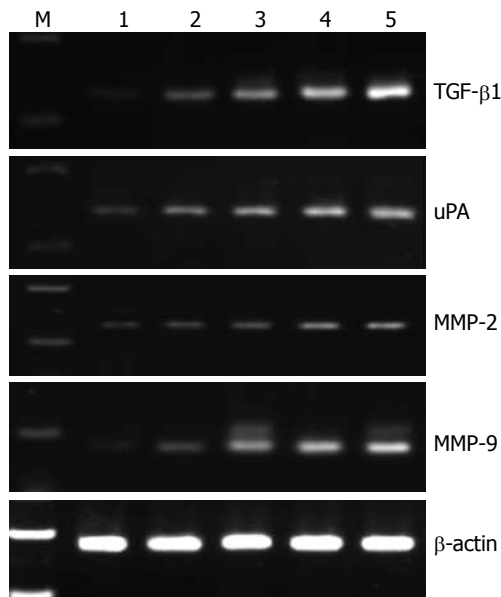


图1 GISTs中uPA、MMP-2、MMP-9及TGF- β 1的mRNA的表达。M: Marker; 1: 肿瘤旁组织; 2: 极低度侵袭危险性; 3: 低度侵袭危险性; 4: 中度侵袭危险性; 5: 高度侵袭危险性。

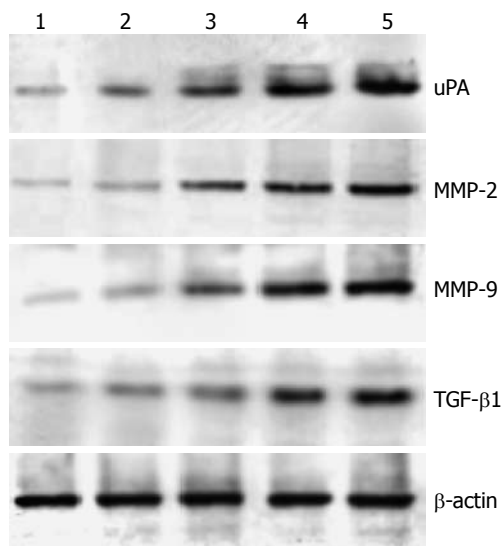


图2 GISTs中uPA、MMP-2、MMP-9及TGF- β 1的蛋白表达。1: 肿瘤旁组织; 2: 极低度侵袭危险性; 3: 低度侵袭危险性; 4: 中度侵袭危险性; 5: 高度侵袭危险性。

($P < 0.05$ 或 0.01); 同时我们也发现uPA蛋白的表达随NIH分级亦呈上调趋势($P < 0.05$ 或 0.01 , 图2, 3), uPA的阳性表达率亦与性别、年龄、组织学类型无关, 与黏膜受侵和肿瘤侵袭转移显著相关($P < 0.05$ 或 0.01)。MMP-2、MMP-9蛋白的表达也随着NIH分级的增加而上调($P < 0.05$ 或 0.01 , 图2, 3)。本研究的124例GISTs组织中, TGF- β 1与uPA蛋白阳性表达之间呈显著正相关($r = 0.356$, $P = 0.036$); TGF- β 1与MMP-2、MMP-9蛋白阳性表达之间呈显著正相关($r = 0.266$, $P = 0.0031$; r

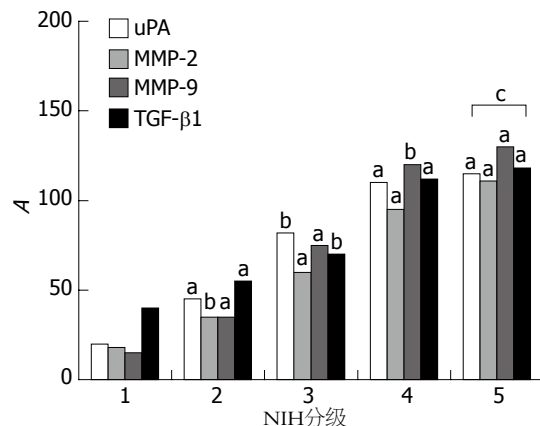


图3 GISTs中uPA、MMP-2、MMP-9和TGF- β 1蛋白表达与NIH分级的关系。1: 肿瘤旁组织; 2: 极低度侵袭危险性; 3: 低度侵袭危险性; 4: 中度侵袭危险性; 5: 高度侵袭危险性。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 肿瘤旁组织; ^c $P < 0.05$ vs 组间比较。

$= 0.532$, $P = 0.0053$); uPA与MMP-2、MMP-9蛋白阳性表达之间亦呈显著正相关($r = 0.323$, $P = 0.031$; $r = 0.346$, $P = 0.024$)

3 讨论

肿瘤的侵袭和转移是牵涉多个分子生物学事件的极其复杂过程, 他是决定肿瘤恶性度的最重要因素^[4]。肿瘤转移过程涉及多种机制, ECM的降解和基底膜破坏是肿瘤浸润和转移的先决条件^[5], ECM和基底膜既能为肿瘤的生长和转移提供酶作用底物, 同时又是肿瘤侵袭和转移的屏障^[6]。研究表明, 肿瘤细胞首先必须具备降解ECM及基底膜的能力, 然后通过已存在的或新形成的结合位点与ECM结合, 进而溶解ECM, 最后向外扩散、侵袭和转移至邻近组织及远处器官^[7]。

TGF- β 家族是一组结构相关蛋白的异二聚体多肽, 能够通过与细胞膜上的TGF- β 受体结合, 发挥信号传导作用^[8]。目前发现TGF- β 至少包括5种亚型, 其中, TGF- β 1是体内的主要存在形式, 因此, 对TGF- β 1的研究有助于我们进一步明确TGF- β 在体内的生物学活性。成熟的TGF- β 1是由112个氨基酸亚单位通过二硫键形成的二聚体多肽, 相对分子质量为25 kDa。主要在内皮细胞、血细胞、结缔组织细胞和上皮细胞中表达。TGF- β 1作为生长因子, 具有调节细胞增殖、分化和凋亡等多种生物活性。近年的研究表明, 他还在调节细胞增殖、分化、细胞外基质形成、细胞的移动、黏附、肿瘤转移等方面具有重要作用^[9]。

uPA由Astedt等首先发现, 其基因定位于10

号染色体长臂上, 长度为6.5 kb, 编码相对分子质量为53 kDa的蛋白酶^[10]. uPA是一种丝氨酸蛋白水解酶, 具有水解蛋白和信号转导等多种功能, 最重要的作用是激活纤溶酶原转变为纤溶酶, 后者可催化降解多种底物, 如细胞外基质的重要组成部分: 纤维蛋白、纤维结合素和层粘连蛋白等. 另外, 活性纤溶酶还能激活MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13等基质金属蛋白酶的前体, 活化的MMPs可进一步降解细胞外基质, 特别是降解其中的基质和IV型胶原, 对细胞迁移和肿瘤侵袭转移过程中细胞外基质的降解有重要作用^[11]. 目前有大量研究证实uPA与乳腺癌及其他肿瘤转移密切相关^[12], 但对于其表达与信号转导通路的关系目前研究较少.

许多学者通过对乳腺癌、胆囊癌、结肠癌^[13-15]等肿瘤的研究发现, TGF- β 1 mRNA的表达与肿瘤浸润深度、生长方式和肿瘤侵袭转移等生物学行为密切相关, 能在一定程度上促进肿瘤的侵袭和转移^[16]. 本研究中, 124例GISTs均检测到TGF- β 1 mRNA的表达, 且与年龄、性别及组织学类型无显著关系, 而与肿瘤侵袭转移、NIH分级及黏膜受侵有显著相关. 这一结果提示, GISTs中TGF- β 1 mRNA的水平与GISTs的恶性表型有关. TGF- β 1 mRNA水平高的病灶具有较强的纵深浸润和广泛转移的倾向和能力, 表现出较恶的生物学行为, 预后也较差^[17-19], 可能是TGF- β 1通过上调蛋白水解酶和其他细胞因子的分泌等机制, 增强了肿瘤的侵袭转移能力; 此外, TGF- β 1本身还可作为一种运动因子, 促进肿瘤细胞的运动和迁移^[20,21]. Bae等^[22]研究结果显示, 胃癌组织内TGF- β 1表达和血管生成之间无任何关系, 而另一血管生成因子VEGF与肿瘤内的MVD^[23]有高度相关性, 认为其差异可能由TGF- β 1首先通过刺激VEGF高表达间接影响肿瘤中血管生成而产生^[24-26]. 有试验表明, TGF- β 能以剂量和时间依赖的方式上调uPA mRNA和蛋白的表达, 促进转移^[27,28], 而其上调uPA的作用主要是通过PI3K/Akt/NF- κ B通路所介导的^[29]. 本研究中发现: 随着GISTs组织中TGF- β 1 mRNA表达的增高, uPA mRNA亦呈高表达, 其近肿瘤旁组织表达较弱. 且与TGF- β 1 mRNA表达趋势一致, uPA mRNA阳性表达率在黏膜侵袭和肿瘤侵袭组显著增高, 与年龄、性别、组织学类型不相关. 此结果与我们观察到的TGF- β 1 mRNA表达结果相同. 同时二者的蛋白表达水平与mRNA表达水平一致, 提示TGF- β 1可能介导uPA的上

调; uPA在具有浸润能力的GISTs恶性肿瘤细胞中高表达, 表明uPA与GISTs的进展有关, 提示uPA可作为判断GISTs侵袭和转移的指标. uPA可以激活纤溶酶原转变为纤溶酶^[30], 纤溶酶能激活MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13等MMPs的前体. 这些MMPs是一组Zn离子依赖性内肽酶, 可以降解所有ECM. 肿瘤细胞分泌的MMPs一方面通过降解基底膜和包绕肿瘤的基质(IV型胶原), 另一方面则通过新生血管生成等促进肿瘤生长和扩散, 从而促进肿瘤的浸润和转移^[31]. 其中MMP-2、MMP-9与肿瘤浸润和转移关系最密切^[32,33]. Bloomston等^[34]通过基因转染, 将MMP-2基因转入人乳腺癌细胞株中, 发现转基因后的肿瘤细胞侵袭能力明显增加.

本试验中我们发现: MMP-2阳性表达与患者的年龄、性别及组织学分型无明显相关性, 而与肿瘤侵袭转移、NIH分级有关, 说明MMP-2参与了GISTs的浸润和转移, 与患者预后密切相关; 随着GISTs恶性程度的增高, MMP-9表达亦呈递增趋势, 结果提示MMP-2、MMP-9的过度表达可以降解细胞外基质及基底膜, 水解血管基底膜, 使血管通透性增高, 导致肿瘤的局部浸润和远处转移. 在GISTs中MMP-2与MMP-9的表达呈明显正相关, uPA和MMP-2、MMP-9表达之间呈明显正相关, 故我们猜测在GISTs中uPA在PI3K/Akt信号转导通路介导的TGF- β 1调节下, 可进一步激活MMP-2和MMP-2同时也具有激活MMP-9的功能. 四者在GISTs的发生、发展过程中的密切相关, 协同促进GISTs肿瘤ECM的降解和肿瘤细胞的侵袭、转移.

肿瘤的侵袭和转移程度是影响预后的主要因素, uPA、MMP-2、MMP-9和TGF- β 1四者之间相互调节、共同参与GISTs的发生发展. 因此, 我们认为uPA、MMP-2、MMP-9和TGF- β 1的表达可能是GISTs恶性肿瘤生长、浸润、转移以及判断预后的重要指标. 以他们作为靶点, 抑制其表达可阻断肿瘤的转移通道, 进而治疗肿瘤改善预后.

4 参考文献

- 1 Nowain A, Bhakta H, Pais S, Kanel G, Verma S. Gastrointestinal stromal tumors: clinical profile, pathogenesis, treatment strategies and prognosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 818-824
- 2 魏志刚, 韩超, 李健丁. 胃肠道间质瘤的诊断治疗. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 65-69
- 3 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH,

■同行评价

本研究选题较好, 新颖性强, 设计合理, 证据充足, 学术价值较好.

- Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Int J Surg Pathol* 2002; 10: 81-89
- 4 Korfel A, Thiel E. Targeted therapy and blood-brain barrier. *Recent Results Cancer Res* 2007; 176: 123-133
- 5 Stewart DA, Cooper CR, Sikes RA. Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 2
- 6 Adler G. Has the biology and treatment of pancreatic diseases evolved? *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18 Suppl: 83-90
- 7 Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL. Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 3275-3285
- 8 De Crescenzo G, Hinck CS, Shu Z, Zúñiga J, Yang J, Tang Y, Baardsnes J, Mendoza V, Sun L, López-Casillas F, O'Connor-McCourt M, Hinck AP. Three key residues underlie the differential affinity of the TGFbeta isoforms for the TGFbeta type II receptor. *J Mol Biol* 2006; 355: 47-62
- 9 Yatsuya H, Tamakoshi A, Tamakoshi K, Hoshiyama Y, Fujino Y, Tokui N, Mizoue T, Kikuchi S, Sakata K, Hayakawa N, Kondo T, Toyoshima H, Yoshimura T. Lack of an association between serum level of transforming growth factor beta -1 and stomach cancer risk in the JACC study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2005; 6: 170-176
- 10 Romer J, Nielsen BS, Ploug M. The urokinase receptor as a potential target in cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2359-2376
- 11 Davis DR, Wilson K, Sam MJ, Kennedy SE, Mackman N, Charlesworth JA, Erlich JH. The development of cardiac fibrosis in low tissue factor mice is gender-dependent and is associated with differential regulation of urokinase plasminogen activator. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 42: 559-571
- 12 Yoon SY, Lee YJ, Seo JH, Sung HJ, Park KH, Choi IK, Kim SJ, Oh SC, Choi CW, Kim BS, Shin SW, Kim YH, Kim JS. uPAR expression under hypoxic conditions depends on iNOS modulated ERK phosphorylation in the MDA-MB-231 breast carcinoma cell line. *Cell Res* 2006; 16: 75-81
- 13 Desruisseau S, Palmari J, Giusti C, Romain S, Martin PM, Berthois Y. Determination of TGFbeta1 protein level in human primary breast cancers and its relationship with survival. *Br J Cancer* 2006; 94: 239-246
- 14 Pasini FS, Brentani MM, Kowalski LP, Federico MH. Transforming growth factor beta1, urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in head and neck squamous carcinoma and normal adjacent mucosa. *Head Neck* 2001; 23: 725-732
- 15 Liu S, Liang Y, Huang H, Wang L, Li Y, Li J, Li X, Wang H. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16: 207-216
- 16 Ylä-Outinen H, Aaltonen V, Björkstrand AS, Hirvonen O, Lakkakorpi J, Vähä-Kreula M, Laato M, Pelttonen J. Upregulation of tumor suppressor protein neurofibromin in normal human wound healing and in vitro evidence for platelet derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) elicited increase in neurofibromin mRNA steady-state levels in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 232-237
- 17 Xiangming C, Natsugoe S, Takao S, Hokita S, Ishigami S, Tanabe G, Baba M, Kuroshima K, Aikou T. Preserved Smad4 expression in the transforming growth factor beta signaling pathway is a favorable prognostic factor in patients with advanced gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 277-282
- 18 Venkatasubbarao K, Ahmed MM, Mohiuddin M, Swiderski C, Lee E, Gower WR Jr, Salhab KF, McGrath P, Strodel W, Freeman JW. Differential expression of transforming growth factor beta receptors in human pancreatic adenocarcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 43-51
- 19 Reinacher-Schick A, Baldus SE, Romdhana B, Landsberg S, Zapotka M, Mönig SP, Hölscher AH, Dienes HP, Schmiegel W, Schwarte-Waldhoff I. Loss of Smad4 correlates with loss of the invasion suppressor E-cadherin in advanced colorectal carcinomas. *J Pathol* 2004; 202: 412-420
- 20 Hyman KM, Seghezzi G, Pintucci G, Stellari G, Kim JH, Grossi EA, Galloway AC, Mignatti P. Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in vascular endothelial cells by activation of mitogen-activated protein kinase. *Surgery* 2002; 132: 173-179
- 21 Warner DR, Roberts EA, Greene RM, Pisano MM. Identification of novel Smad binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 1185-1190
- 22 Bae SC, Choi JK. Tumor suppressor activity of RUNX3. *Oncogene* 2004; 23: 4336-4340
- 23 牛保华, 皇甫超申, 赵卫. CD105及微血管密度与胃癌的关系. *河南大学学报(医学版)* 2008; 27: 24-25
- 24 Kalo E, Buganim Y, Shapira KE, Besserglick H, Goldfinger N, Weisz L, Stambolsky P, Henis YI, Rotter V. Mutant p53 attenuates the SMAD-dependent transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling pathway by repressing the expression of TGF-beta receptor type II. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 8228-8242
- 25 Benckert C, Jonas S, Cramer T, Von Marschall Z, Schäfer G, Peters M, Wagner K, Radke C, Wiedenmann B, Neuhaus P, Höcker M, Rosewicz S. Transforming growth factor beta 1 stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human cholangiocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2003; 63: 1083-1092
- 26 Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1421-1426
- 27 Unlü A, Leake RE. Transforming growth factor beta1 stimulates urokinase plasminogen activator system on prostate cancer cells. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 147-151
- 28 Tan X, Egami H, Nozawa F, Abe M, Baba H. Analysis of the invasion-metastasis mechanism in pancreatic cancer: involvement of plasmin(ogen) cascade proteins in the invasion of pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2006; 28: 369-374
- 29 Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Transforming growth factor-beta1-dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-MAPK-dependent signaling in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 8567-8576
- 30 Belkacemi L, Lam E, Caldwell JD, Siemens

- DR, Graham CH. Stimulation of human breast carcinoma cell invasiveness and urokinase plasminogen activator activity by glucose deprivation. *Exp Cell Res* 2006; 312: 1685-1692
- 31 Kinoh H, Inoue M. New cancer therapy using genetically-engineered oncolytic Sendai virus vector. *Front Biosci* 2008; 13: 2327-2334
- 32 Quaranta M, Daniele A, Coviello M, Venneri MT, Abbate I, Caringella ME, Di Tardo S, Divella R, Trerotoli P, Di Gennaro M, Schittulli F, Fransvea E, Giannelli G. MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 3593-3600
- 33 Kurakata H, Oka M, Matsubara Y, Niwa T, Utsunomiya H, Fujishiro M, Miki K, Fukamachi H, Kubota S, Ichinose M. Developmentally regulated expression of matrix metalloproteinases during fetal rat colon morphogenesis. *Dev Growth Differ* 2008; 50: 41-48
- 34 Bloomston M, Zervos EE, Rosemurgy AS 2nd. Matrix metalloproteinases and their role in pancreatic cancer: a review of preclinical studies and clinical trials. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 668-674

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如 $37.6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $45.6\text{岁} \pm 24\text{岁}$, $56.4\text{ d} \pm 0.5\text{ d}$. $3.56 \pm 0.27\text{ pg/ml}$ 应为 $3.56\text{ ng/L} \pm 0.27\text{ ng/L}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成 $10\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}\text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7}\text{ g}$ 之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 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酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

胃黏蛋白在抗幽门螺杆菌感染中的作用

邓敏, 靖大道

■背景资料

黏蛋白是构成胃上皮表面黏液凝胶的主要组成成分, 因在其多肽链的丝/苏氨酸的羟基上连接上N-乙酰半乳糖基, 然后逐个加上糖基直至O-连接寡糖链形成, 因此是一种O-连接型糖蛋白。其多变的连接方式和分支结构对于糖蛋白的生物学功能起着至关重要的作用。关于黏蛋白在抗幽门螺杆菌感染中的作用已被人们所关注, 这可能为抗幽门螺杆菌的治疗带来突破。

邓敏, 靖大道, 上海交通大学附属第一人民医院消化科 上海市 200080

作者贡献分布: 本文由邓敏综述, 靖大道审校。

通讯作者: 靖大道, 主任医师, 200080, 上海市, 上海市第一人民医院消化科。jingdadao@medmail.com.cn

收稿日期: 2009-12-22 修回日期: 2010-02-03

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-18

Protective role of gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection

Min Deng, Da-Dao Jing

Min Deng, Da-Dao Jing, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Da-Dao Jing, Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China. jingdadao@medmail.com.cn

Received: 2009-12-22 Revised: 2010-02-03

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-18

Abstract

Mucins (MUCs), the main components of the gastric mucus gel, are a family of high-molecular-weight glycoproteins expressed by specialized epithelial cells lining the luminal surface of different organs. Numerous studies have indicated that *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) colonizes the gastric mucosa by utilizing adhesins or non-adhesins that bind the MUCs expressed on gastric epithelial cells. During the infection process, *H.pylori* causes alterations of mucin expression. On the other hand, MUCs can exert protective effects against *H.pylori* infection owing to its unique structure. In this review, we give an overview of the protective role of MUCs against *H.pylori* infection.

Key Words: Gastric mucin; *Helicobacter pylori*; Adhesin

Deng M, Jing DD. Protective role of gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 798-802

摘要

黏蛋白(MUCs)是由特殊的上皮细胞分泌的大

分子量的糖蛋白, 是构成胃黏液凝胶的主要组成成分。多项研究显示幽门螺杆菌(*H.pylori*)通过其表面的黏附素分子或非黏附素分子与胃黏蛋白结合从而定植在胃黏膜上皮上。在*H.pylori*感染过程中, *H.pylori*导致了胃黏蛋白的表达发生了改变。反之, 胃黏蛋白也因其特有的结构在抗*H.pylori*感染中也发挥了重要作用。此文就目前有关胃黏蛋白在抗*H.pylori*感染中的作用的研究现状及进展作一简要概述。

关键词: 胃黏蛋白; 幽门螺杆菌; 黏附素

邓敏, 靖大道. 胃黏蛋白在抗幽门螺杆菌感染中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 798-802

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/798.asp>

0 引言

全世界超过50%的人口感染幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), 其可导致各种胃部疾病, 如慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌。目前, *H.pylori*已被视为I级致癌因素。三联疗法是目前所推荐的根除*H.pylori*的一线疗法, 但该方案的根除失败率已经达到25%, 而且还有逐年上升的趋势, 其失败的主要原因中就包括对*H.pylori*的获得性耐药^[1]。这在治疗*H.pylori*相关的胃十二指肠疾病中引起了广泛的关注。*H.pylori*通过其表面的黏附素分子或非黏附素分子与黏蛋白相结合来定植在胃黏膜上皮上。近年的研究发现胃黏蛋白因其特有的结构在抗*H.pylori*感染, 尤其在抗*H.pylori*的黏附中发挥了重要作用。现就目前有关胃黏蛋白在抗*H.pylori*感染中的作用研究现状作一综述。

1 黏蛋白的类型及其表达特征

黏蛋白是由特殊的上皮细胞分泌的大分子量的糖蛋白。他位于不同的管腔表面, 如呼吸道、胃肠道、生殖道等。黏蛋白是构成上皮表面黏液凝胶的主要组成成分, 其分布位置的独特性使其成为黏膜防御体系的一道屏障, 保护黏膜不受外来物质及微生物致病源的侵袭, 另一方面通过他们的特殊结构向上皮细胞内传递信息从

■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

而有利于上皮的更新.根据黏蛋白在上皮细胞的表达模式不同,将其分为跨膜型和分泌型.跨膜型黏蛋白包括MUC1、MUC12、MUC13、MUC15、MUC16、MUC17、MUC20.分泌型包括MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6、MUC7、MUC8、MUC19.正常成人的胃黏膜表达MUC1、MUC5AC、MUC6.黏蛋白MUC1在胃窦部的表层黏膜上皮广泛表达,而在胃窦部幽门腺和胃体腺中则呈灶状表达.MUC5AC的分布则局限于小凹上皮的细胞质中和黏液颈细胞中.MUC6分布于幽门窦腺体的细胞质中,也分布于胃体的黏液颈细胞和主细胞中.尽管这些黏蛋白的基因在染色体上定位不同,但他们的主要结构是蛋白骨架,即黏液核心肽.黏液核心肽的典型结构是串联重复区(variable number of tandem repeats, VNTR),其中丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸尤为丰富,这些都是糖基化的潜在位点.Ho等研究发现^[2],MUC5AC和MUC6在胃黏液凝胶中保持分离,呈层状线性排列.MUC5AC主要位于凝胶中的表层和底层,而MUC6则位于其中.黏蛋白的这种自然的分层现象为胃的黏液层提供了更强的黏液性,为胃上皮细胞提供了独立的而且充分的保护作用.相对于MUC5AC来说,MUC6在深部黏液中存在,其特征为该黏蛋白的O-聚糖侧链具有 $\alpha 1$,4-GlcNAc残端.胃黏液凝胶的厚度是可变的,大致为5-300 μm .关于*H.pylori*感染导致胃黏液凝胶的厚度报道不一.Al-Marhoon等研究发现,虽然cagA⁺菌株感染有导致黏液层厚度增加的趋势,cagA⁺或cagA⁻的*H.pylori*感染与无*H.pylori*感染比较,两者均不影响胃黏液凝胶的厚度^[3].

2 *H.pylori*的特性

2.1 *H.pylori*如何穿过胃黏液凝胶 *H.pylori*是革兰阴性的微需氧菌,其形态为螺旋形,长度大约2.5-5.0 μm .*H.pylori*自身的一些特点使其可以在胃十二指肠这一不利于细菌生长的环境中生存,但*H.pylori*是通过什么方式来穿过胃壁表面的黏液凝胶仍不清楚.早先研究认为,*H.pylori*拥有为数众多的长鞭毛,鞭毛运动可以使他们像螺钉穿过木塞那样穿过黏稠的胃液.最近,Celli等^[4]研究发现,胃上皮表面黏液凝胶中黏蛋白的流变学改变是pH依赖性的,在中性pH时为黏液溶液形式,而在酸性情况下为黏液凝胶形式.由于*H.pylori*感染提高了胃腔pH值,从而导致了胃黏液的黏弹性的明显下降.在分别对*H.pylori*

在酸性和中性胃黏液中的运动力研究显示,*H.pylori*在较高的pH值中可以自由穿梭,而在较低的pH值时活动明显受到限制.因此认为螺旋形的*H.pylori*并不是穿过胃的黏液凝胶,而是通过改变了周围环境中黏液的流变学性质从而获得运动力.

2.2 *H.pylori*对胃黏蛋白的黏附力 黏附是细菌定植于上皮细胞表面的必备条件,由细菌表面的黏附素分子介导.穿过胃黏液凝胶的*H.pylori*可通过黏附素识别胃上皮细胞表面的聚糖结构,而这些结构主要存在于胃黏液凝胶中的黏蛋白上.而不能黏附在上皮上的*H.pylori*,很快就从上皮细胞的表面和黏液凝胶中清除.

目前认为*H.pylori*主要的黏附素均为*H.pylori*外膜蛋白的家族成员.在这些黏附素中,血型相关抗原结合黏附素(blood group antigen-binding adhesin, BabA)识别果糖化的ABO/Lewis b抗原(Le^b),而该抗原存在于红细胞和胃肠道的黏膜上皮细胞上.在胃黏膜上,Le^b抗原主要表达于表面的上皮细胞和分泌型黏蛋白MUC5AC上^[5].另一个黏附素是唾液酸结合黏附素(sialic acid-binding adhesin, SabA),结合黏液酰LewisX(sLe^x)和黏液酰Lewis a(sLe^a)抗原,黏液酰Lewis抗原则在感染和炎症的胃黏膜上常见^[6].此外,*H.pylori*通过其表面的BabA和SabA黏附素也可以与从人胃上皮细胞上脱落在胃液中的MUC1相结合^[7].

另外,最近Loke等^[8]在实验中发现,经DIG(digoxigenin-3-O-succinyl-e-aminocaproic acid hydrazide)标记的黏蛋白结合在*H.pylori*的烷基氢过氧化物还原酶(AhpC)和尿素酶上,此说明*H.pylori*的这两种蛋白在与黏蛋白的结合中同样也发挥了作用.虽然位于*H.pylori*表面的尿素酶及AhpC并不属于*H.pylori*外膜蛋白的家族成员,但他们是*H.pylori*胞膜的组成部分,同样具有与胃黏蛋白的亲和力.因此,*H.pylori*表面存在的其他的非外膜蛋白在黏附中的作用还有待进一步的研究.

3 *H.pylori*感染对胃黏蛋白表达的影响

先前有关*H.pylori*感染导致的胃黏蛋白表达改变的研究主要集中于对MUC5AC、MUC6表达的影响.这些研究显示胃黏膜*H.pylori*感染导致了MUC5AC的表达下调^[9,10]、MUC5AC合成的抑制^[11,12]、MUC6的过表达^[13]以及表面上皮的MUC6的异常表达^[14].最近,Marques等^[15]研究

■研发前沿

目前对于包括黏蛋白在内的糖蛋白的结构研究是糖组学领域一个研究热点,但是人类疾病样本的收集、糖蛋白的分离富集以及现有的分析技术都制约着黏蛋白结构解析的发展.

■应用要点

本文对目前已有的关于黏蛋白的抗幽门螺杆菌感染的机制的研究进行综述,为今后研发基于黏蛋白结构的抗幽门螺杆菌感染的新药提供参考。

发现,在*H.pylori*感染和*H.pylori*非感染中, MUC5AC的表达无明显区别. Kang等^[16]研究也显示, MUC5AC的表达与*H.pylori*感染无关. 同样, 关于*H.pylori*感染导致的MUC6的表达也报道不一. Kang和Morgenstern^[17]的研究都认为*H.pylori*感染的胃黏膜上MUC6的表达下调.

4 黏蛋白抗*H.pylori*感染机制

4.1 MUC6抗*H.pylori*感染机制 唾液和胃的黏蛋白均具有高度的和特异性的结合*H.pylori* I 的能力^[18], 而胃的黏液凝胶可以使大多数的*H.pylori*从上皮细胞表面清除. 如在罗猴模型中, 不分泌黏蛋白的罗猴则具有较少的*H.pylori*的结合能力从而具有更高的*H.pylori*感染密度并发展为胃炎^[6]. 同样, Sjogren's综合征(干燥综合征)的患者因其产生较少的黏蛋白, 胃黏膜则出现更明显的*H.pylori*相关的病理学改变^[19], 说明分泌的黏蛋白结合了*H.pylori* I 从而保护了胃黏膜上皮.

*H.pylori*细胞壁包含有特征性的 α -胆固醇葡萄糖苷类, 如胆固醇- α -D-吡喃葡萄糖苷(cholesteryl- α -D-glucopyranoside, CGL). CGL是二磷酸尿苷葡萄糖(UDP-Glc)在胆固醇- α -葡萄糖基转移酶的作用下, 将其上的糖基以 α 键转移到胆固醇的C3端而形成的. 2004年, Kawakubo等^[20]研究发现, 胃黏蛋白MUC6的O-聚糖侧链的 α 1, 4-GlcNAc残端有强大的抗*H.pylori*作用. α 1, 4-GlcNAc结构则是胆固醇- α -葡萄糖基转移酶的有效抑制剂, 而胆固醇- α -葡萄糖基转移酶只存在于*H.pylori*上, 这就意味着由胃腺颈黏液细胞和胃窦幽门腺产生的MUC6可能在宿主抵抗*H.pylori*感染中发挥重要作用. 已经有实验研究发现*H.pylori*的生长可被含 α 1, 4-GlcNAc残端的有效浓度为0.5 mmol/L的黏蛋白型O-聚糖明显抑制^[21]. 因此, 胆固醇- α -葡萄糖基转移酶抑制剂的发现对于研发含有 α 1, 4-GlcNAc残端结构的黏蛋白型O-聚糖药物作为*H.pylori*的抗菌剂, 从而有效防治*H.pylori*感染十分重要.

4.2 MUC1抗*H.pylori*感染机制 在黏液层下, 细胞表面的黏蛋白MUC1广泛表达于所有黏膜上皮细胞的顶端. 由于黏蛋白MUC1本身具有很长的丝状结构, 因此其有可能是宿主和穿透黏液层的微生物之间相互作用的第一站. 已经发现缺乏Muc1基因的小鼠对*H.pylori*^[22]和空肠弯曲杆菌^[23]的感染具有易感性, 并且发现Muc1基因的小鼠无论是在*H.pylori*定植的范围方面还是在其导致的病理学发展的程度方面都更严

重. 但是关于MUC1如何限制*H.pylori*感染的机制仍不十分清楚. Lindén等^[7]认为, 当*H.pylori*还没有结合到MUC1上时, MUC1的长达200-400 nm的胞外区域就能够在空间上阻挡*H.pylori*黏附到宿主细胞表面, 因此立体阻碍了其黏附到细胞表面的其他配体上; 当*H.pylori*结合到了MUC1上时, MUC1的胞外区域就从上皮细胞的表面释放出来, 因此其作用就类似于一个诱饵覆盖了*H.pylori*的BabA和SabA黏附素, 从而阻止*H.pylori*的进一步黏附. 这与先前的研究认为*H.pylori*可以导致MUC1的表达降低相一致^[11]. 通过这两种限制*H.pylori*与上皮细胞的黏附就可以减少其致病性, 因为这限制了*H.pylori*的由Cag致病岛编码的分泌系统的活性, 从而减少了*H.pylori*释放的促炎因子进入上皮细胞内^[24]. 然而在Linden的实验也发现^[7], 同时去除*H.pylori*的2种黏附素BabA和SabA对*H.pylori*所导致的细胞凋亡的影响要远远大于去除CagA的影响. 虽然黏附素和CagA同时影响了上皮细胞的活性, 但是CagA要达到最大的影响, 就必须通过*H.pylori*上的黏附素黏附在上皮细胞上. 在人的胃窦的活检标本中发现感染了BabA阳性的*H.pylori*菌株则会出现更明显的淋巴细胞的浸润, 明显的上皮增生, 腺体的萎缩和肠化^[25]. 同样, 严重的中性粒细胞浸润和萎缩(更为严重的病理学表现)与SabA的表达相关^[26]. Lindén等发现*H.pylori*导致的胃上皮细胞的凋亡和坏死与黏附素BabA和SabA的表达呈剂量依赖性, 缺失编码BabA和SabA黏附素的等位基因突变的菌株就大大减少了导致细胞死亡的能力. 这说明这些黏附素是*H.pylori*细胞表面的主要决定因素, 而附着于上皮的*H.pylori*的数量决定了对上皮细胞活力的影响.

有关MUC1胞外区域的长短是否影响其在空间上立体阻碍*H.pylori*黏附到细胞表面的其他配体上; 已研究发现具有编码短的胞外糖基化区域的短VNTR等位基因的MUC1与疾病密切相关. 有解释认为MUC1的短的形式在空间阻碍附着或在作为可释放的诱饵方面都是很难奏效的, 因此无法阻止*H.pylori*与上皮细胞表面的结合, 从而不能阻止其所致的病理学改变. 同时, Costa等从转染了编码不同VNTR长度的MUC1VNTR等位基因的细胞的实验中说明长的等位基因在与*H.pylori*结合方面更有效, 这可能是因为长的VNTR区域提供了更多的细菌结合的位点^[27].

至于与MUC1胞外区域释放相关的蛋白水解酶, Lindén等和Thathiah^[28]都认为是MMP-14而不是ADAM17. 然而, MMP-14只是部分影响了感染细胞的MUC1的脱落, 对非感染细胞的MUC1的脱落并无影响, 这就意味着在MUC1的释放中存在其他因素. 虽然, 并不能肯定排除其他目前未知的酶, 但是很有可能也存在MUC1的SEA区域中的跨膜域和胞外域的非共价作用的分离从而导致其胞外区域的释放. 目前发现许多细胞表面黏蛋白在合成过程中, SEA是其分离的部位^[29]. 同样, 胞外区域的释放也可能是由于MUC1结合了*H.pylori*后构象发生了变化, 或者是由于具有高度运动能力的*H.pylori*所产生的剪力的作用.

5 结论

大量的研究显示*H.pylori*通过其表面的黏附素分子或非黏附素分子与黏蛋白相结合来定植在胃黏膜上皮上, 从而进一步致病. 对黏蛋白在抗*H.pylori*感染, 包括其作为*H.pylori*的胆固醇- α -葡萄糖基转移酶的抑制剂或者在抗*H.pylori*黏附中发挥的作用的进一步了解将有助于我们制备抗菌剂或者抗黏附抗体进行抗*H.pylori*感染治疗, 这可能对*H.pylori*耐药的防治具有突破性的进展.

6 参考文献

- Malfertheiner P, Mégraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-180
- Ho SB, Takamura K, Anway R, Shekels LL, Toribara NW, Ota H. The adherent gastric mucous layer is composed of alternating layers of MUC5AC and MUC6 mucin proteins. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1598-1606
- Al-Marhoon MS, Nunn S, Soames RW. Effects of cagA+ and cagA- strains of Helicobacter pylori on the human gastric mucus layer thickness. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1246-1252
- Celli JP, Turner BS, Afdhal NH, Keates S, Ghiran I, Kelly CP, Ewoldt RH, McKinley GH, So P, Erramilli S, Bansil R. Helicobacter pylori moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 14321-14326
- Van de Bovenkamp JH, Mahdavi J, Korteland-Van Male AM, Büller HA, Einerhand AW, Borén T, Dekker J. The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for Helicobacter pylori in the human stomach. *Helicobacter* 2003; 8: 521-532
- Lindén S, Mahdavi J, Semino-Mora C, Olsen C, Carlstedt I, Borén T, Dubois A. Role of ABO secretor status in mucosal innate immunity and H. pylori infection. *PLoS Pathog* 2008; 4: e2
- Lindén SK, Sheng YH, Every AL, Miles KM, Skoog EC, Florin TH, Sutton P, McGuckin MA. MUC1 limits Helicobacter pylori infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000617
- Loke MF, Lui SY, Ng BL, Gong M, Ho B. Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of Helicobacter pylori to gastric mucin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 231-238
- Beil W, Enss ML, Müller S, Obst B, Sewing KF, Wagner S. Role of vacA and cagA in Helicobacter pylori inhibition of mucin synthesis in gastric mucous cells. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2215-2218
- Van den Brink GR, Tytgat KM, Van der Hulst RW, Van der Loos CM, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J. H pylori colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut* 2000; 46: 601-607
- Byrd JC, Yunker CK, Xu QS, Sternberg LR, Bresalier RS. Inhibition of gastric mucin synthesis by Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2000; 118: 1072-1079
- Slomiany BL, Slomiany A. Disruption in gastric mucin synthesis by Helicobacter pylori lipopolysaccharide involves ERK and p38 mitogen-activated protein kinase participation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 220-224
- Matsuzwa M, Ota H, Hayama M, Zhang MX, Sano K, Honda T, Ueno I, Akamatsu T, Nakayama J. Helicobacter pylori infection up-regulates gland mucous cell-type mucins in gastric pyloric mucosa. *Helicobacter* 2003; 8: 594-600
- Byrd JC, Yan P, Sternberg L, Yunker CK, Scheiman JM, Bresalier RS. Aberrant expression of gland-type gastric mucin in the surface epithelium of Helicobacter pylori-infected patients. *Gastroenterology* 1997; 113: 455-464
- Marques T, David L, Reis C, Nogueira A. Topographic expression of MUC5AC and MUC6 in the gastric mucosa infected by Helicobacter pylori and in associated diseases. *Pathol Res Pract* 2005; 201: 665-672
- Kang HM, Kim N, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Lee HS, Jung HC, Song IS. Effects of Helicobacter pylori Infection on gastric mucin expression. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 29-35
- Morgenstern S, Koren R, Moss SF, Fraser G, Okon E, Niv Y. Does Helicobacter pylori affect gastric mucin expression? Relationship between gastric antral mucin expression and H. pylori colonization. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 19-23
- Lindén SK, Wickström C, Lindell G, Gilshenan K, Carlstedt I. Four modes of adhesion are used during Helicobacter pylori binding to human mucins in the oral and gastric niches. *Helicobacter* 2008; 13: 81-93
- El Miedany YM, Baddour M, Ahmed I, Fahmy H. Sjogren's syndrome: concomitant H. pylori infection and possible correlation with clinical parameters. *Joint Bone Spine* 2005; 72: 135-141
- Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, Kobayashi M, Sakura K, Kasama S, Fukuda MN, Fukuda M, Katsuyama T, Nakayama J. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against Helicobacter pylori infection. *Science* 2004; 305: 1003-1006
- Lee H, Wang P, Hoshino H, Ito Y, Kobayashi

同行评价

本文立题有一定新颖性, 综述较为全面, 有一定参考价值.

- M, Nakayama J, Seeberger PH, Fukuda M. Alpha1,4GlcNAc-capped mucin-type O-glycan inhibits cholesterol alpha-glucosyltransferase from *Helicobacter pylori* and suppresses *H. pylori* growth. *Glycobiology* 2008; 18: 549-558
- 22 McGuckin MA, Every AL, Skene CD, Linden SK, Chionh YT, Swierczak A, McAuley J, Harbour S, Kaparakis M, Ferrero R, Sutton P. Muc1 mucin limits both *Helicobacter pylori* colonization of the murine gastric mucosa and associated gastritis. *Gastroenterology* 2007; 133: 1210-1218
- 23 McAuley JL, Linden SK, Png CW, King RM, Pennington HL, Gendler SJ, Florin TH, Hill GR, Korolik V, McGuckin MA. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J Clin Invest* 2007; 117: 2313-2324
- 24 Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; 5: 1166-1174
- 25 Yu J, Leung WK, Go MY, Chan MC, To KF, Ng EK, Chan FK, Ling TK, Chung SC, Sung JJ. Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut* 2002; 51: 480-484
- 26 Yanai A, Maeda S, Hikiba Y, Shibata W, Ohmae T, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, Omata M. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* sabA genotype in Japanese clinical isolates. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2228-2232
- 27 Costa NR, Mendes N, Marcos NT, Reis CA, Caffrey T, Hollingsworth MA, Santos-Silva F. Relevance of MUC1 mucin variable number of tandem repeats polymorphism in *H. pylori* adhesion to gastric epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1411-1414
- 28 Thathiah A, Blobel CP, Carson DD. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *J Biol Chem* 2003; 278: 3386-3394
- 29 Macao B, Johansson DG, Hansson GC, Härd T. Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 71-76

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果:*World Journal of Gastroenterology*(WJG)的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, WJG的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-06-19)

直肠癌前切除术后吻合口漏的危险因素

高云峰, 董明

高云峰, 董明, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室
胃肠胰脾外科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 本文由高云峰综述, 董明审校。

通讯作者: 董明, 主任医师, 博士生导师, 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脾外科。
mingdong@mail.cmu.edu.cn

收稿日期: 2009-11-09 修回日期: 2010-01-22

接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-18

Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer

Yun-Feng Gao, Ming Dong

Yun-Feng Gao, Ming Dong, Department of General Surgery (Division of Gastroenteropancreatic Surgery), the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ming Dong, Department of General Surgery (Division of Gastroenteropancreatic Surgery), the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. mingdong@mail.cmu.edu.cn

Received: 2009-11-09 Revised: 2010-01-22

Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-18

Abstract

Anastomotic leakage is a common complication after anterior resection for rectal cancer. It can increase postoperative mortality rate and local tumor recurrence rate, lower long-term survival, result in long-term impairment of anorectal function and increase patients' suffering, raise treatment costs, and prolong hospital stay. A better understanding of the risk factors for AL has important clinical implications for the management of such complication.

Key Words: Rectal cancer; Anastomotic leakage; Risk factor

Gao YF, Dong M. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 803-807

摘要

吻合口漏(anastomotic leakage, AL)是直肠癌前切除术后常见并发症之一, 使术后病死率、

肿瘤局部复发率提高, 降低长期生存率, 并使肛管直肠功能长期受损, 增加患者痛苦, 增加治疗费用, 延长住院时间。因而加深对AL危险因素认识, 具有重要临床意义。

关键词: 直肠癌; 吻合口漏; 危险因素

高云峰, 董明. 直肠癌前切除术后吻合口漏的危险因素. *世界华人消化杂志* 2010; 18(8): 803-807

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/803.asp>

0 引言

吻合口漏(anastomotic leakage, AL)是直肠癌前切除术后常见并发症之一, 其发生率2%-28%^[1-4], 差异之大, 部分是由于目前对于AL还没有广泛认同的定义, 限制了不同研究单位和机构资料的可比性; 部分是由于选择患者的标准、手术医生的专业技术水平等差别所造成的。AL为肠内容物从两个空腔脏器外科吻合口处漏出, 肠内容物可见于切口或者引流管内, 或者积聚于吻合口周围, 导致发热, 脓肿, 败血症, 代谢失调, 和/或多器官功能衰竭。对于没有肠内容物自吻合口出现, 没有临床症状或体征的, 而被影像学检查发现的AL应被定义为亚临床漏。AL的临床诊断是指无需影像学检查就能确诊的任何肠内容物渗漏造成的腹膜炎, 直肠阴道瘘和盆腔脓肿; 也可通过临床, 内镜或影像学检查判断^[4]。由于AL与较高的死亡率相关, 故早期诊断具有重要意义, 但目前尚无有效的术后监测方法。den Dulk等采用临床容易获得的术后监测指标进行评分, 并根据评分进行相应的处理, 从而减低对AL的延误诊断及其继发的病死率; 标准监测组与历史对照组检出率分别为9.4%, 7.0%, 病死率由39%降低至24%; 多变量分析显示延误诊断时间显著的缩短(4 d vs 1.5 d, $P = 0.01$), 从而可以减少首发症状与确诊时的时间^[5]。另有作者指出术后血清C-反应蛋白升高是AL的重要指标; 吻合口黏膜内pH值是形成AL的独立危险因素^[6]; 腹膜内乳酸/丙酮酸比值, 细胞因子IL-6, IL-10及TNF- α 在发展为有症状的AL组明显增

■背景资料

AL的临床诊断是指无需影像学检查就能确诊的任何肠内容物渗漏造成的腹膜炎, 直肠阴道瘘和盆腔脓肿; 也可通过临床, 内镜或影像学检查判断。由于AL与较高的死亡率相关, 故早期诊断具有重要意义, 但目前尚无有效的术后监测方法。

■同行评议者

蔡三军, 主任医师, 复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

■研发前沿

吻合口漏(AL)是直肠癌前切除术后常见并发症之一,其发生率2%-28%;差异之大,部分是由于目前对于AL还没有广泛认同的定义,限制了不同研究单位和机构资料的可比性;部分是由于选择患者的标准、手术医生的专业技术水平等差别所造成的。

加^[7],但在临床上未普遍使用。

1 直肠癌切除术后AL发生的高危因素

1.1 与患者基础状态相关的危险因素 一般危险因素,如:高龄,男性,体质量指数(BMI \geq 30 kg/m²),不良生活习惯(吸烟、酗酒)等;病理相关危险因素,如:糖尿病,心脑血管疾病(如冠心病),肺部疾病(如COPD),贫血、低蛋白(ALB $<$ 30 g/L),术前激素使用,术前放化疗等;与肿瘤相关的危险因素:如肿瘤的大小,位置,病理类型对AL作用不明显^[2,8]。

1.2 与手术相关危险因素

1.2.1 与术者相关因素:结直肠癌外科治疗结果在不同手术者之间有显著的差异,一般认为是由术者专业技术水平或手术量的差异造成的。1项前瞻性研究发现,专业较非专业医师,有较低的术后死亡率、AL发生率,较高的无局部复发率和长期生存率。对于择期结直肠手术来说,高手术量(\geq 18.5次/年)外科医师有较低的围手术期死亡率,AL的危险随着手术量的增加而降低^[8]。其他与术者相关因素如:手术时间延长 \geq 3 h(OR = 2.5, 95%CI: 1.5-4.3, P = 0.02)、术中失血量超过500 mL、多次输血、术中污染、医源性远端直肠撕裂、医源性肿瘤或临近直肠穿孔等与较高的AL相关^[9,10]。

1.2.2 全直肠系膜切除术(total mesorectal excision: TME): TME进入临床应用以后,低位前切除手术方式明显增加,并使局部复发率较传统手术显著降低。同时,临床AL的发生率也随之增加。Carlsen等研究指出: TME可以把5、10年局部复发率降低到5%, 5年生存率达到80%, TME组术后死亡率为7%, AL发生率为16%, 发生AL后需要手术处理的比非TME组要高。Law等指出TME比较复杂,比高位肿瘤施行部分直肠系膜切除术有较高的AL发生率(8.1% vs 1.3%, P < 0.001),中、远端直肠癌施行TME与近端直肠癌施行部分直肠系膜切除术相比,其局部AL发生率与生存率相近^[10]。国内蓝祥海等报道单用吻合器与吻合器结合全TME术后AL的发生率分别为7.4%(5/68)与17.3%(9/52)^[11]。但最近1项Meta分析指出: TME手术是导致AL的高危因素(OR = 1.24, 95%CI: 0.84-1.83, P = 0.29),但与传统手术治疗直肠癌相比,差异无统计学意义(OR = 1.98, 95%CI: 0.85-4.61, P = 0.11)^[12]。

1.2.3 吻合口位置: 距肛缘的位置越高, AL的风险越小。Platell等指出: 腹膜内AL为1.5%, 腹膜外

为6.6%, 超低位前切除与AL的高发生率相关, 腹膜外吻合患者AL并发症及病死率均升高^[13]。中低位肿瘤行TME比高位肿瘤行部分直肠系膜切除术更加困难并且有较高的AL发生率^[10]。吻合口距肛缘 \leq 10 cm的AL发生率是 $>$ 10 cm的3.5倍^[2]。

1.2.4 吻合口的血运/张力: 1项术中使用激光多普勒测量仪在预测结直肠癌进行器械吻合后AL发生的可靠性研究显示, 直肠残端血流减少与较高的AL相关; 和基础测量值相比, 在结肠切除后血流减少76.3%, 在AL与血流减少之间存在正相关。国内陈创奇等指出, 于肠系膜下动脉根部结扎, 只要保留中结肠动脉和边缘动脉弓, 则可保证前切除术时吻合口的良好血运, 避免发生AL, 并能达到根治的目的; 否则有时会危及吻合口近端的血供, 从而引起AL。腹膜返折平面以下直肠缺乏浆膜层结构, 因对张力的耐受性差, 如肠管游离不充分, 勉强拉拢缝合, 则吻合口张力大。有作者认为常规进行脾曲松解是直肠癌低位前切除术中的必须步骤, 可以提供安全、无张力的吻合条件, 然而另有作者认为脾曲松解可能增加脾脏损伤的机会, 不做脾曲松解可以节省手术时间, 不增加AL、局部复发率及术后病死率^[14]。

1.2.5 吻合方式/技术: 低位直肠癌术后结、直肠连续性的恢复有4种: 结肠肛管端对端吻合(the straight coloanal anastomosis, CAA), J形贮袋吻合(the colon J pouch, CJP), 结肠成形术(the transverse coloplasty pouch, TCP), 侧端吻合(side-to-end)。在1项随机对照研究中显示TCP(15.9%)较CJP(0%)有较高的AL; CJP具有较低的AL, 可能是由于吻合口近端肠管具有较好血液供应(已被激光多普勒技术证实); TCP术式AL与CAA相当^[15]。大多数学者认为吻合技术(手法与器械)不是AL发生的决定性因素, Lustosa等指出如果不考虑吻合口位置的话, 目前数据尚不能说明手法缝合与器械吻合哪个较优, 及双层较单层缝合哪个更好的结论。Slawomir等研究指出: 单吻合器双荷包吻合法消除了双吻合器相互交叉的吻合线及吻合死角的弊端, 吻合确实, 术后AL的发生率较低(0.6%)^[16]。国内邱辉忠等报道文献统计的双吻合技术在低位直肠肿瘤手术后AL发生率为2.5%-11.0%^[17]。提示单吻合器双荷包吻合法在降低AL方面可能优于双吻合技术。

2 与预防措施相关的危险因素

2.1 术前准备 传统观念认为术前常规使用机械

性肠道准备,可以降低择期结直肠外科术后AL,但此措施缺乏科学证据。1项Meta分析指出就术后AL发生率而言,机械性肠道准备有害(可以使大肠壁结构及炎性改变^[18]),不能降低AL发生率,并建议对于结直肠外科手术前省略此措施^[19]。虽然有试验证据支持术前不使用机械性肠道准备,但对于具体患者应具体分析,如果做出了错误的决定,将给患者带来巨大的不良后果。另外对于术前预防性使用抗生素已被确认有效,一致认为预防性抗生素应当覆盖需氧及厌氧菌,毒性最低,效果确实。但就给药方式,不主张使用口服肠道抗生素^[20],静脉给药效果较好,切皮前,及之后再每隔8 h连续给药2次的效果,要比仅切皮前一次给药的预防效果好^[21]。

2.2 局部感染 Keshava等在AL周围发现艰难梭菌毒素,并强调指出术后感染艰难梭菌对结直肠吻合口的潜在损害作用^[22]。右半结肠切除术较左半结肠切除术后吻合口漏发生率显著降低。对于左半结肠切除术,如果结肠清洁度较差,应进行术中结肠盥洗。当结肠清洁度较差进行姑息性切除及低位远端直肠吻合时,应该考虑使用预防性造口^[23]。术前肠道准备不充分,术区污染,术后引流不畅使盆腔积液和吻合口周围感染是发生漏的重要因素。急诊手术(3.7%)较择期手术(1.6%, $P<0.001$)有较高的AL发生率,考虑也与肠道准备欠佳,术区污染有关^[8]。

2.3 预防性造口的作用 低位前切除(low anterior resection, LAR)术后同期使用造口(回或结肠造口术)保护结、直肠吻合口,一直是个有争议的问题。最近1项Meta分析1 024名患者后指出在结直肠术后AL发生率方面,行回肠或结肠辅助性造口方式之间尚未发现差异^[24]。回肠造口增加并发症发生率及住院费用,因而不应作为常规使用,但可以选择性的用于肠道准备较差,和有促进AL发生的并存病的情况^[25]。虽然在低位直肠癌保留括约肌的手术中经常使用临时性造口,但其对AL的作用尚不明确,而且造口术后有一定的并发症,最常见如:皮炎、红斑,最严重的是脱水及造口脱出;造口关闭后切口感染,小肠梗阻等不良反应,因而应该慎重使用造口。Huh等研究指出,即使没有使用造口,吻合口并发症发生率也不高,低位直肠癌手工结肠肛管吻合的患者没有必要使用造口,但术前接受放疗的患者为促进吻合口良好愈合应该使用^[26]。Lipska等指出,男性,腹部手术史及低位直肠癌与AL发生率增加相关,建议有这些危险因素时应考虑

使用预防性造口术,并可选择性的应用于女性患者^[27]。良好的术前准备,包括新辅助化疗后选择手术时间,正确的外科手术方式,对于大部分直肠癌,包括TME及超低位吻合的患者,可以避免使用造口,并可以减少因此而需要的二次手术;对于急诊,吻合环不完整,水气试验阳性,及高危患者仍需要一期预防性造口^[28]。最近一项关于预防性造口的Meta分析研究结果指出:预防性造口不影响AL的发生率,但可以改善漏发生后的不良后果,如粪性腹膜炎及败血症;与临床相关AL的A值为0.32(95%CI: 0.17-0.59),提示预防性造口对降低AL并发症具有统计学意义($Z = 3.65, P = 0.0003$);由于AL导致的并发症而需要再手术的A值为0.27(95%CI: 0.41-0.45),因此预防性造口可以显著减少二次手术($Z = 3.95, P<0.0001$);降低临床相关的AL发生率,并推荐用于低位直肠癌外科^[29]。

2.4 盆腔引流管 常规使用盆腔引流未被证明对减少AL有用,不鼓励使用。Yeh等对978例择期行前切除的直肠癌患者AL的危险因素进行调查,单变量研究指出预防性的使用盆腔引流不能降低AL的发生,对于择期的患者不鼓励常规使用盆腔引流^[30]。荷兰1项随机对照研究对比了引流对TME合并及不合并术前放射治疗的作用,多变量分析显示TME术后不放置盆腔引流是AL的独立危险因素,TME术后放置一根或两根盆腔引流,可以降低AL的不良后果^[31]。恰当的低位盆腔引流对治疗AL并发症非常重要,如手术操作困难,预防盆腔血肿,但除外灌洗作用之外而行引流。

2.5 术中检测吻合口 关于AL的检测方法常用的为水气试验。Griffith等使用该方法检测器械吻合的严密性,发现不完整的“面包圈”与术后AL的发生具有统计学相关性,在修补经气水试验发现的吻合口缺陷后,没有患者术后出现有临床症状的AL发生。但Schmidt等研究发现,术后AL在检测试验中正常与异常的患者中没有差异^[32];另有作者报道术中使用亚甲蓝灌肠进行检测。

3 结论

直肠癌术后AL的发生受多种因素影响,如性别、年龄、直肠肛管的解剖结构、血供分布特点,肿瘤大小、位置等是我们术前不能改变的事实;术前贫血、低蛋白、合并其他器官疾病与功能障碍可以通过充分的术前准备予以纠正,

■相关报道

大多数学者认为吻合技术(手法与器械)不是AL发生的决定性因素,Lustosa等指出如果不考虑吻合口位置的话,目前数据尚不能说明手法缝合与器械吻合哪个较优,及双层较单层缝合哪个更好的结论。

■同行评价

本综述对临床有一定的参考价值, 有较好的学术价值。

以改善患者的手术耐受力; 术中遵守无瘤、无菌、无血、微创原则, 减少裸化肠管的距离, 减少对吻合端的张力与血供的破坏, 熟悉吻合器械的操作等; 术后细心的观察, 积极的治疗等。充分认识这些因素后, 我们可以针对具体患者采取相应的预防措施, 从而有效减少AL的发生。

4 参考文献

- 1 Branagan G, Finnis D. Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1021-1026
- 2 Rudinskaite G, Tamelis A, Saladzinskas Z, Pavalkis D. Risk factors for clinical anastomotic leakage following the resection of sigmoid and rectal cancer. *Medicina (Kaunas)* 2005; 41: 741-746
- 3 Phitayakorn R, Delaney CP, Reynolds HL, Champagne BJ, Heriot AG, Neary P, Senagore AJ. Standardized algorithms for management of anastomotic leaks and related abdominal and pelvic abscesses after colorectal surgery. *World J Surg* 2008; 32: 1147-1156
- 4 Matthiessen P, Hallböök O, Rutegård J, Simert G, Sjödaahl R. Defunctioning stoma reduces symptomatic anastomotic leakage after low anterior resection of the rectum for cancer: a randomized multicenter trial. *Ann Surg* 2007; 246: 207-214
- 5 den Dulk M, Noter SL, Hendriks ER, Brouwers MA, van der Vlies CH, Oostenbroek RJ, Menon AG, Steup WH, van de Velde CJ. Improved diagnosis and treatment of anastomotic leakage after colorectal surgery. *Eur J Surg Oncol* 2009; 35: 420-426
- 6 Millan M, García-Granero E, Flor B, García-Botello S, Lledo S. Early prediction of anastomotic leak in colorectal cancer surgery by intramucosal pH. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 595-601
- 7 Matthiessen P, Strand I, Jansson K, Törnquist C, Andersson M, Rutegård J, Norgren L. Is early detection of anastomotic leakage possible by intraperitoneal microdialysis and intraperitoneal cytokines after anterior resection of the rectum for cancer? *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1918-1927
- 8 Borowski DW, Kelly SB, Bradburn DM, Wilson RG, Gunn A, Ratcliffe AA. Impact of surgeon volume and specialization on short-term outcomes in colorectal cancer surgery. *Br J Surg* 2007; 94: 880-889
- 9 Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P. Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 265-270
- 10 Law WL, Chu KW. Anterior resection for rectal cancer with mesorectal excision: a prospective evaluation of 622 patients. *Ann Surg* 2004; 240: 260-268
- 11 蓝祥海, 万礼仪, 徐亮, 权毅, 易国平. 应用吻合器行中下段直肠癌前切除术吻合口漏的发生原因及防治措施. *中国综合临床* 2005; 21: 1026-1028
- 12 Liang YC, Qing SH, Ding WX, Chen PY, Huang YB, Yu HT. [Total mesorectal excision versus conventional radical surgery for rectal cancer: a meta analysis] *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2007; 10: 43-48
- 13 Platell C, Barwood N, Dorfmann G, Makin G.

The incidence of anastomotic leaks in patients undergoing colorectal surgery. *Colorectal Dis* 2007; 9: 71-79

- 14 Brennan DJ, Moynagh M, Brannigan AE, Gleeson F, Rowland M, O'Connell PR. Routine mobilization of the splenic flexure is not necessary during anterior resection for rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 302-307; discussion 307
- 15 Ho YH, Brown S, Heah SM, Tsang C, Seow-Choen F, Eu KW, Tang CL. Comparison of J-pouch and coloplasty pouch for low rectal cancers: a randomized, controlled trial investigating functional results and comparative anastomotic leak rates. *Ann Surg* 2002; 236: 49-55
- 16 Marecik SJ, Chaudhry V, Pearl R, Park JJ, Prasad LM. Single-stapled double-pursestring anastomosis after anterior resection of the rectum. *Am J Surg* 2007; 193: 395-399
- 17 邱辉忠. 双吻合技术在低位直肠肿瘤手术中的应用. *中国实用外科杂志* 2005; 25: 139-141
- 18 Bucher P, Gervaz P, Egger JF, Soravia C, Morel P. Morphologic alterations associated with mechanical bowel preparation before elective colorectal surgery: a randomized trial. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 109-112
- 19 Slim K, Vicaute E, Launay-Savary MV, Contant C, Chipponi J. Updated systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials on the role of mechanical bowel preparation before colorectal surgery. *Ann Surg* 2009; 249: 203-209
- 20 Espin-Basany E, Sanchez-Garcia JL, Lopez-Cano M, Lozoya-Trujillo R, Medarde-Ferrer M, Armadans-Gil L, Alemany-Vilches L, Armengol-Carrasco M. Prospective, randomised study on antibiotic prophylaxis in colorectal surgery. Is it really necessary to use oral antibiotics? *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 542-546
- 21 Fujita S, Saito N, Yamada T, Takii Y, Kondo K, Ohue M, Ikeda E, Moriya Y. Randomized, multicenter trial of antibiotic prophylaxis in elective colorectal surgery: single dose vs 3 doses of a second-generation cephalosporin without metronidazole and oral antibiotics. *Arch Surg* 2007; 142: 657-661
- 22 Keshava A, Collie MH, Anderson DN. Nosocomial *Clostridium difficile* infection: possible cause of anastomotic leakage after anterior resection of the rectum. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 764
- 23 Veyrie N, Ata T, Muscari F, Couchard AC, Msika S, Hay JM, Fingerhut A, Dziri C. Anastomotic leakage after elective right versus left colectomy for cancer: prevalence and independent risk factors. *J Am Coll Surg* 2007; 205: 785-793
- 24 Tilney HS, Sains PS, Lovegrove RE, Reese GE, Heriot AG, Tekkis PP. Comparison of outcomes following ileostomy versus colostomy for defunctioning colorectal anastomoses. *World J Surg* 2007; 31: 1142-1151
- 25 Wong NY, Eu KW. A defunctioning ileostomy does not prevent clinical anastomotic leak after a low anterior resection: a prospective, comparative study. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 2076-2079
- 26 Huh JW, Park YA, Sohn SK. A diverting stoma is not necessary when performing a handsewn coloanal anastomosis for lower rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1040-1046
- 27 Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AE. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ J Surg*

- 2006; 76: 579-585
- 28 Pappalardo G, Spoletni D, Proposito D, Giorgiano F, Conte AM, Frattaroli FM. Protective stoma in anterior resection of the rectum: when, how and why? *Surg Oncol* 2007; 16 Suppl 1: S105-S108
- 29 Hüser N, Michalski CW, Erkan M, Schuster T, Rosenberg R, Kleeff J, Friess H. Systematic review and meta-analysis of the role of defunctioning stoma in low rectal cancer surgery. *Ann Surg* 2008; 248: 52-60
- 30 Yeh CY, Changchien CR, Wang JY, Chen JS, Chen HH, Chiang JM, Tang R. Pelvic drainage and other risk factors for leakage after elective anterior resection in rectal cancer patients: a prospective study of 978 patients. *Ann Surg* 2005; 241: 9-13
- 31 Peeters KC, Tollenaar RA, Marijnen CA, Klein Kranenburg E, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, van de Velde CJ. Risk factors for anastomotic failure after total mesorectal excision of rectal cancer. *Br J Surg* 2005; 92: 211-216
- 32 Schmidt O, Merkel S, Hohenberger W. Anastomotic leakage after low rectal stapler anastomosis: significance of intraoperative anastomotic testing. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 239-243

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文. 以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按 ●、○、■、□、▲、△ 顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 ¹ $P < 0.05$, ² $P < 0.01$; 第 3 套为 ³ $P < 0.05$, ⁴ $P < 0.01$. 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、同上等等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

大肠癌microRNA与DNA甲基化修饰相互调控的研究进展

王峰, 秦环龙

■背景资料

表观遗传是指细胞内的基因型未发生变化而表型却发生了改变的遗传现象, 主要涉及DNA甲基化、非编码RNA等方面的调控; 大肠癌是最常见的消化系统肿瘤之一, 近年来研究表明, 表观遗传在大肠癌的发生发展中起到了重要的作用, 对其深入研究将为认识和治疗肿瘤提供新的思路。

王峰, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院 上海市200233

上海市科委基金资助项目, No. 07DZ19505

作者贡献分布: 本文由王峰综述, 秦环龙审校。

通讯作者: 秦环龙, 主任医师, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院普外科, huanlong_qin@live.cn

电话: 021-64361369

收稿日期: 2009-12-23 修回日期: 2010-02-03

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-18

Reciprocal regulation between microRNAs and DNA methylation in colorectal cancer

Feng Wang, Huan-Long Qin

Feng Wang, Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Supported by: the Foundation of Shanghai Municipal Science and Technology Commission, No. 07DZ19505

Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. huanlong_qin@live.cn

Received: 2009-12-23 Revised: 2010-02-03

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-18

Abstract

The research on the regulation of microRNAs (miRNAs) and DNA methylation belongs to the scope of epigenetics. Both microRNAs (miRNAs) and DNA methylation play an important role in the development and progression of human cancers. Recently, it has been demonstrated that there exist complex reciprocal regulatory mechanisms between microRNAs and DNA methylation. In this paper, we will give a review of the recent advances in understanding such reciprocal regulation in colorectal cancer, with an aim to offer new insight into the diagnosis and treatment of the disease.

Key Words: Colorectal cancer; MicroRNA; DNA methylation; Epigenetics

Wang F, Qin HL. Reciprocal regulation between microRNAs and DNA methylation in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 808-814

摘要

microRNA(miRNA)及DNA的甲基化修饰都属于表观遗传学的重要内容, 两者在肿瘤的发生发展中起着重要的作用. 目前发现, microRNA与DNA甲基化之间存在着复杂的相互调控机制. 本文将就两者在大肠癌中相互作用的研究进展进行综述, 旨在为大肠癌的研究提供新的思路.

关键词: 大肠肿瘤; miRNA; DNA甲基化; 表观遗传学

王峰, 秦环龙. 大肠癌microRNA与DNA甲基化修饰相互调控的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(8): 808-814

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/808.asp>

0 引言

大肠癌是最常见的消化系统肿瘤之一. miRNA是新近发现的一类在动植物及病毒中广泛存在的单链非编码RNA, 鉴于其作用机制, 有学者^[1]将其归入表观遗传学(epigenetics)的范畴. DNA甲基化异常是表观遗传学的重要内容. miRNA及DNA甲基化都与肿瘤的形成有着密切的联系^[2,3]. 目前研究发现, 他们之间的相互调控在肿瘤的发生、发展进程中同样发挥了十分重要的作用. 本文就大肠癌中两者相互作用的研究进展作一综述.

1 microRNA概述及在大肠癌中的表达

miRNA的编码基因首先转录产生1 000 bp左右的初级产物(pri-miRNA), 后者在细胞核内被RNaseIII内切酶家族的Drosha酶进一步切割成70 bp左右的发夹状前体(pre-miRNA), 该前体在exportin-5蛋白的作用下转运至细胞质, 然后经Dicer酶切割成约22 nt的成熟miRNA. 成熟的miRNA在RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)的引导下, 与靶mRNA 3'端非翻译区(3'UTR)完全或不完全匹配结合, 诱导靶mRNA降解或阻遏其翻译, 从而在转录后水平沉默基因的表达, 并通过细胞内复杂的调控网络对细胞发育、分化、增殖与凋亡等进行精

■同行评议者

李玉民, 教授, 兰州大学第一医院普外科

确调节^[4,5]。

miRNA对mRNA的沉默方式取决于两者特异性结合的程度^[6]。大多数的植物miRNA可以与靶序列完全匹配而进入RNA干涉途径降解靶分子; 而绝大多数哺乳动物miRNA与靶mRNA的3'UTR序列不完全配对, 通过RISC复合体降低靶基因蛋白的表达, 在转录后翻译水平抑制靶基因的表达。

越来越多的研究证实, 正常组织与肿瘤组织中miRNA的表达存在显著的差异, miRNA在肿瘤的发生、发展中起着重要的调控作用^[7,8]。目前的研究表明, 大肠癌相关miRNA达几十种之多(表1)。miRNA具有促癌和抑癌的作用, 这取决于他们在细胞中的表达方式以及在细胞恶性转化进程中的作用^[9]。Kumar等^[10]在研究包括大肠癌在内的多种人类肿瘤细胞中miRNA的表达调控时发现, miRNA的普遍抑制(global inhibition)可引起细胞成瘤性的增加并导致肿瘤的形成。Monzo等^[11]发现, miR-17-5p及其靶分子E2F转录因子1(E2F transcription factor 1, E2F1)在人类结肠的早期胚胎发育和肿瘤的发生中存在着相似的表达模式, 且肿瘤的恶性程度越高, 其表达模式越接近胚胎中的表达。提示胚胎发育期, 结肠组织中miR-17-5p的高表达通过下调E2F1的表达促进细胞的增殖; 而结肠癌发生过程中miR-17-5p的表达重新被激活, 并导致了细胞的恶性增殖。

大肠癌中miRNA的表达与临床病理特征及肿瘤的预后存在相关性。研究者检测197例结肠癌组织中miRNA的表达并结合病例随访发现, 37种miRNA的表达存在差异, 其中miR-20a、miR-21、miR-106a、miR-181b及miR-203的表达升高, 而又以miR-21的升高最显著, 且其在结肠癌中的高表达与较差的分化、较差的化疗疗效及较低的生存率相关^[12]。Kopetz等^[13]发现, miR-320和miR-498的表达与Ⅱ期大肠癌患者无进展生存期(progression-free survival, PFS, 指从开始对肿瘤进行针对性治疗直至肿瘤出现继发进展生长的时间跨度, 是肿瘤治疗的临床研究常用的权衡指标之一)有关, 两者高表达的患者, 其PFS明显缩短。Schepeler等^[14]对49例Ⅱ期大肠癌的肿瘤标本进行检测发现, miR-142-3p、miR-212、miR-151及miR-144四种miRNA的差异性表达可以将受检的大肠癌分成微卫星稳定(microsatellite stable, MSS)及不稳定型(microsatellite unstable, MIS), 其准确率、特异性和

表 1 大肠癌中miRNA的表达概况

| 上调miRNA | 预测靶点 | 下调miRNA | 预测靶点 |
|------------|--------------------------|------------------------|---|
| let-7b | | let-7a ⁿ | |
| let-7g | TGFR2 | miR-10a ⁿ | |
| miR-9 | TCF4, MSH2 | miR-15b | |
| miR-17-3p | | miR-23a | |
| miR-17-5p | | miR-25 | |
| miR-21 | | miR-27a | |
| miR-26a | | miR-27b | |
| miR-29b-2 | | miR-30c | |
| miR-30a-3p | | miR-34b/c ⁿ | |
| miR-30a-5p | | miR-107 | |
| miR-31 | | miR-124a ⁿ | CDK6, Rb |
| miR-96 | K-Ras | miR-125a | |
| miR-124b | MLH1 | miR-125b | VEGF, IGFR1, VEGFR |
| miR-128b | | | |
| miR-132 | | miR-127 | |
| miR-135a | MSH2 | miR-130a | TGFR2 |
| | | miR-133a | BAX, K-Ras |
| miR-135b | | miR-133b | K-Ras |
| miR-141 | APC, MSH2 | miR-134 | |
| miR-142-3p | | miR-137 | TGF2I |
| miR-142-5p | | miR-143 | |
| miR-181a | | miR-145 | TGFR2, APC |
| miR-181b | | miR-147 | |
| miR-182 | IGFR1 | miR-154 | MLH1 |
| miR-183 | | miR-191 | |
| miR-194 | | miR-199a | |
| miR-200a | MSH2 | miR-199b | |
| miR-200b | MLH1 | miR-214 | TP53, β-catenin, TGFR2, BAX, CDKN2b, EGFR |
| miR-200c | MLH1, SMAD2 | | |
| miR-203 | | miR-296 | |
| miR-205 | K-Ras, SMAD4, MSH2, PTEN | miR-299 | β-catenin, CDKN2a |
| | | miR-337 | |
| miR-215 | | miR-339 | |
| miR-219 | TGFR2 | miR-342 ⁿ | |
| | | miR-368 | |
| miR-320 | | miR-370 | BAX, AKT1 |
| miR-338 | | miR-582 | |
| miR-372 | TGFR2, SMAD2, MLH1, AKT1 | | |

ⁿ可被DNA甲基化调控。

■研究前沿

miRNA是新近发现的一类在动植物及病毒中广泛存在的单链非编码RNA, 其与DNA甲基化都属于表观遗传学的范畴, 且都与肿瘤的形成有着密切的联系。目前发现, 他们之间的相互调控在肿瘤的发生、发展进程中同样发挥了十分重要的作用, 两者之间相互作用的机制有待进一步的研究发现。

敏感性分别为84%、81%和92%。这两种类型区分的意义在于, 微卫星不稳定型具有较好的预

■相关报道

编码基因启动子区域CpG岛的DNA甲基化可以影响miRNA的表达,而miRNA则可通过调节甲基化的关键酶作用于DNA甲基化,两者之间的相互调控同时还受到多种因素的作用。

后,而其化疗的效果较差。

鉴于miRNA在大肠癌中的重要作用,研究其调节机制对于揭示肿瘤的发生发展及制定相关的治疗策略有重要意义。近年来,miRNA与DNA甲基化的关联性报告明显增多,越来越多的研究表明,两者之间存在着复杂的相关调节机制。

2 大肠癌中miRNA与DNA甲基化修饰的相互作用

miRNA的表达调控可以发生在转录水平,也可发生在转录后的加工成熟阶段。miRNA编码基因启动子序列的CpG岛可以发生DNA的甲基化,而甲基化所导致表达沉默即是在转录水平对miRNA进行调节;此外,Michael等^[15]还发现,大肠癌和腺瘤组织中miR-143和miR-145的表达均减少,而pre-miR-143水平却没有显著的变化,这提示miR-143的表达在转录后(post-transcriptional)受到调节而下调。目前研究显示,与mRNA相似, pri-miRNA也具有7-甲基鸟嘌呤核苷帽结构和多聚腺苷酸尾部^[5],且人类miRNA编码基因中约有47%与CpG岛相关^[16]。这些都提示:miRNA可能像一般的蛋白编码基因一样,可以被DNA甲基化等表观遗传修饰调控。

与此同时,miRNA分子也可以调控表观遗传作用。DNA甲基化转移酶(DNMT)催化S-腺苷甲基硫酸胺(SAM)的甲基基团转移至胞嘧啶上,在甲基化过程中发挥关键作用。miRNA可以通过调节DNMT的表达进而调节DNA的甲基化。

2.1 甲基化调控miRNA在大肠癌中的表达

2.1.1 CpG岛甲基化调控miRNA的表达:哺乳动物中,DNA的甲基化发生在CpG二核苷酸中胞嘧啶的5位碳原子上。CpG按一定的含量成簇地出现形成CpG岛。人类基因组中大约包括38 000个CpG岛,70%已知基因的5'端调节区有CpG岛存在^[17]。在人体正常细胞中,多数与基因表达有关的CpG岛未被甲基化,而只有富含CpG重复序列和逆转录因子(retroelements)被彻底地甲基化。在肿瘤形成过程中,这种模式发生了改变^[18],出现了基因间重复序列的低甲基化和编码区域CpG的高甲基化。Lujambio等^[19]比较了结肠癌细胞HCT-116的野生型和DNA甲基化酶DNMT1/3B基因双敲除(DKO)型细胞中miRNA的表达,发现缺乏DNMT的细胞中,18/320的miRNA表达升高3倍以上,其中miR-124a、373、200c、130b及517c这5种miRNA包埋于典型的CpG岛内,而miR-124a所处的CpG岛在DKO细胞中被特异性

的甲基化。随后,研究者在大肠癌组织中也发现了相当比例甲基化的miR-124a,并证实甲基化导致的miR-124a表达减少可以诱导下游CDK6的激活,继而引起Rb蛋白的磷酸化,促使肿瘤发生。CpG岛甲基化调节miRNA的表达与大肠癌临床病理特征存在相关性。Grady等^[20]发现,去甲基化剂作用后,大肠癌细胞中has-miR-342的表达上调,并且肿瘤细胞的凋亡明显增加。在检测40种其他类型的肿瘤细胞中,只在一种肺癌细胞中检测到has-miR-342的部分甲基化,这说明has-miR-342的甲基化失活具有大肠癌特异性。Bandres等^[21]在大肠癌细胞系中发现了表达下调的has-miR-9、has-miR-129及has-miR-137,采用甲基化特异性PCR(MSP)及亚硫酸盐测序分析发现,其中has-miR-9的表达与CpG岛的甲基化水平呈反比,且与淋巴结转移存在相关性。Lujambio等^[22]发现,包括结肠癌淋巴结转移细胞系中,miR-148a、miR-34b/c及miR-9由于启动子CpG岛的甲基化而表达下调,而他们相应靶点如C-MYC、E2F3(E2F transcription factor 3)、CDK6和TGIF2(TGFB-induced factor homeobox 2)的表达随之升高,并与肿瘤的转移能力相关。

2.1.2 去甲基化或低甲基化作用调控miRNA的表达:DNA的去甲基化通过作用于基因的重复单元(repetitive elements)、逆转座子、缺乏CpG的启动子、内含子及基因沙漠(gene desert)等引起染色体的重构和基因的易位,进而影响基因的稳定性^[23-26]。其同样也参与miRNA的调控。正常情况下,细胞中的let-7a-3所在CpG岛高度甲基化而致其失活,肺癌细胞中则出现了相应CpG岛的低甲基化,并导致let-7a-3的激活,激活的let-7a-3使得近200个基因调节障碍,参与肿瘤的形成^[27]。可见,低甲基化或去甲基化作用也可以增加miRNA分子的表达,并参与肿瘤的形成。这种现象在大肠癌中尚未发现,但其提示DNA甲基化调控miRNA表达的复杂性。

2.1.3 miRNA的甲基化调控的影响因素:miRNA的甲基化同时受到其他因素的调控。MBP家族中的甲基化CpG结合蛋白2(methyl CpG-binding protein 2, MeCP2)通过结合于甲基化的CpG而抑制基因的表达^[28]。Nomura等^[29]发现,磷酸化导致的去极化作用可以解除其与CpG的结合,并引起miR-184的表达上调。有实验表明,基因中单个核苷酸改变引起了pre-miRNA结构的变化。Bemis等在黑色素瘤细胞中发现^[30], pri-miRNA中核苷酸串联重复序列变异(VNTR)影

响了成熟miRNA的表达和功能. 谷胱甘肽-S-转氨酶P1(glutathione S- transferase P1, GSTP1)与包括大肠癌在内的多种肿瘤的化疗耐药相关^[31], Ronneberg等^[32]发现, 乳腺癌细胞GSTP1启动子区域存在ATAAA重复片段的变异和四种单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs), 这些序列的变化导致转录因子c-Myb结合位点的改变, 影响GSTP1转录的活性. 而其转录活性的改变导致启动子区域DNA甲基化的改变. Hazra等^[33]发现, 大肠癌中参与一碳代谢途径的某些基因的单核苷酸多态性, 如rs1801131及rs1801198与启动子CpG岛甲基化表型(CpG island methylator phenotype, CIMP)相关, 也就是说这两种SNPs可以影响细胞某些基因的甲基化. 可见, 核苷酸串联重复序列变异及单核苷酸多态性可能参与了miRNA的甲基化调节. 以上结果均提示, 大肠癌的发生发展中, 异常DNA甲基化修饰可以通过类似于调节mRNA甲基化的方式对miRNA的表达进行调控.

2.2 大肠癌中miRNA对DNA甲基化的影响 随着研究的不断深入, 人们发现, miRNA作为表观遗传的重要方面, 参与了对DNA甲基化的调控. Lewis等^[34]预测的miRNA分子调节靶点中, 包括了组蛋白甲基化转移酶、MBPs、染色体区域结合蛋白和组蛋白去乙酰化酶, 这些蛋白产物涉及包括DNA甲基化在内的表观遗传的调节过程. Bao等^[35]最初在植物中发现, 基因启动子区域CpG岛的甲基化过程需要miRNA的参与; Ting等^[36]研究缺乏Dicer的结肠癌细胞系发现miRNA参与了抗分泌型卷曲相关蛋白-4(secreted frizzled-related protein 4, SFRP-4)编码基因CpG岛的甲基化作用.

2.2.1 miRNA调节DNA甲基化的关键酶: DNA的甲基化由DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)介导, 该酶包括3种亚型: DNMT1、DNMT3A和DNMT3B, 他们从S-腺苷-L-蛋氨酸中转移一个甲基到CpG二核苷酸的胞嘧啶上, 介导DNA的甲基化^[37]. 传统观点认为, DNMT1主要维持体细胞中DNA甲基化的状态, 而DNMT3A/3B则负责DNA甲基化的从头合成; 但目前的研究表明, 他们都具有这两种作用^[38]. miRNA可以通过调节DNMT影响DNA的甲基化. Ng等^[39]利用大肠癌细胞中miR-143为研究对象, 观察miRNA与DNA甲基化转移酶以及细胞甲基化的关系. 发现大肠癌肿瘤组织中miR-143的表达与DNMT3A基因mRNA及蛋白

的表达呈负相关($r = -0.59$, $P = 0.0066$), 通过计算机预测发现, DNMT3A可能是miR-143的作用靶点. 随后, 他们从大肠癌细胞中克隆DNMT3A基因mRNA的3'UTR序列, 并将该序列插入到pGL3-promotor载体上荧光素酶基因下游, 部分插入后的3'UTR经基因定点突变试剂盒作用, 致其种子序列发生点突变作为对照, 随后将带有突变及野生型3'UTR序列的pGL3-promotor载体与miR-143共转染结肠癌细胞系228和SW480. 结果发现, 带有野生型3'UTR序列的载体和miR-143共转染的肿瘤细胞表现出了显著增强的荧光活性, 而发生突变的3'UTR序列则不与miR-143结合. 这说明, miR-143将DNMT3A作为直接作用靶点, 而抑制DNMT3A的表达; 随后, 通过转染增加大肠癌细胞miR-143的表达可以引起DNMT3A基因mRNA显著降低, 并抑制了肿瘤细胞的生长, 而使用siRNA沉默DNMT3A基因同样使肿瘤细胞的生长受到抑制. 这说明, miR-143将DNMT3A作为直接作用靶点, 而抑制其的表达, 发挥抑癌作用, 大肠癌中miR-143的表达下调, 促进了肿瘤的发生. 还有研究表明, miRNA可以通过其他靶点而间接作用于DNMT, 从而调节DNA的甲基化. Benetti等^[40]研究Dicer缺陷小鼠胚胎干细胞的甲基化调节时发现, Dicer的缺乏导致的miR-290表达下调, 可以引起其下游靶点Rbl2的表达上调, 后者作为甲基化转移酶Dnmt3A和3B的抑制因子, 抑制了这两种酶的表达, 进而导致细胞基因组甲基化水平降低, 并引起端粒的异常重构和延长. miRNA还可作用于组蛋白修饰过程中的甲基化转移酶而调节组蛋白氨基酸基团的甲基化, 影响基因的表达. Wang等^[41]发现, B细胞转化型慢性淋巴细胞白血病中, miR-19a等特异性miRNA的下调导致蛋白精氨酸甲基转移酶PRMT5(protein arginine methyl- transferases)的表达增高, 后者介导RB抑癌基因家族中RBI、RBL1及RBL2启动子区域组蛋白的甲基化, 从而导致其表达减少. Varambally等^[42]发现, miR-101的下调导致组蛋白甲基转移酶EZH2的表达增加, 后者介导靶基因启动子组蛋白H3的赖氨酸27(H3K27)的甲基化, 导致基因沉默, 参与肿瘤的进展.

2.2.2 其他: 除了对甲基化转移酶的作用, miRNA还可以通过其他机制调节DNA的甲基化. Bao等^[35]研究拟南芥植物发现, 胞质中成熟的miRNA可进入细胞核与转录的mRNA配对, 并结合其他因子而形成非特异性染色质重构复合

■创新盘点

本文综述了大肠癌相关的microRNA与DNA甲基化相互作用及意义, 并探讨了相关调控因素及在肿瘤相关信号通路中的作用, 旨在为大肠癌的诊治提供新的思路.

■应用要点

本文有助于深入理解miRNA及DNA甲基化在大肠癌发生发展中的作用机制,从而为研究大肠癌的发病机制提供新的思路,同时也为大肠癌的治疗开拓了新的视野。

物(unspecified chromatin remodeling complex),诱导基因启动子的甲基化。Ting等^[36]发现,在结肠癌细胞系HCT116中,突变的Dicer可以引起一些基因启动子区域的去甲基化改变,而在此过程中,DNMTs的活性并未受到影响。提示miRNA或是其他类型的非编码RNA分子,通过调节DNMTs以外的途径参与了细胞DNA的甲基化调节^[37]。

3 两者的相互调控与肿瘤相关信号传导通路的关系

越来越多的研究表明,miRNA通过大肠癌相关的信号传导通路发挥作用,其中包括Wnt/ β -catenin通路、EGFR(KRAS及磷脂酰肌醇-3激酶)通路、P53通路、IGF通路等^[43,44];另外,许多信号通路的共有成分,如c-Myc、COX-2等也与miRNA存在相互调控^[45]。同样,miRNA与DNA甲基化之间的调控与这些信号传导通路也存在关联。Toyota等^[46]发现,作为P53直接作用靶点的miR-34b/c在大肠癌中表达受DNA甲基化的调节。他们先用甲基转移酶抑制剂处理大肠癌细胞系,然后检测其中137种miRNA的表达,发现mir-34b/c的表达明显上调,而mir-34b/c编码基因的上游存在密集CpG岛,在大肠癌组织及细胞系中甲基化也是广泛存在的。去甲基化剂作用后可以重新激活miR-34b/c的表达,而抑制其下游靶蛋白肝细胞生长因子受体(c-Met)、细胞周期蛋白依赖激酶4(CDK4)和SF2/ASF(splicing factor arginine/serine-rich 2)的表达,其中,CDK4是P53的作用靶点,而MET和SF2/ASF都与P53调节网络有关,提示DNA甲基化导致的miR-34b/c失活通过P53网络的作用来促进大肠癌的发生发展。Benetti等^[40]发现miR-290对Dnmt3A和3B的调控中,作为甲基化转移酶抑制因子而起中介作用的Rbl2,属于Rb家族成员,同样参与细胞周期的网络调控。

4 结论

大肠癌miRNA与DNA的甲基化相互调控机制的研究还刚起步,还存在着许多问题。比如,大肠癌作为一种异质性的肿瘤,包括许多的亚型(DNA微卫星稳定及不稳定型、CpG高甲基化型及低甲基化型等),而不同亚型之间两者的相互调控有什么差异,差异有什么意义尚有待于深入的研究;此外,大肠癌的发生是一个多阶段的演进过程,两者的调控在哪个阶段发挥作用、

谁是启动因素、确切的作用机制以及同细胞调控网络的相互作用等问题尚待研究解决。

5 参考文献

- 1 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463
- 2 Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA Jr, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E, Raymond CK, Roberts BS, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3687-3692
- 3 Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1: R50-R59
- 4 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269
- 5 Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22: 165-173
- 6 Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 2002; 30: 363-364
- 7 Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2257-2261
- 8 Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-1801
- 9 Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12
- 10 Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 673-677
- 11 Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, Ibeas R, Moreno J, Martinez F, Diaz T, Martinez A, Balagué O, Garcia-Foncillas J. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res* 2008; 18: 823-833
- 12 Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-436
- 13 Kopetz S, Freitas D, Calabrich AF, Hoff PM. Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Oncology (Williston Park)* 2008; 22: 260-270; discussion 270, 273, 275
- 14 Schepeler T, Reinert JT, Ostensfeld MS, Christensen LL, Silahatoglu AN, Dyrskjot L, Wiuf C, Sorensen FJ, Kruhoffer M, Laurberg S, Kauppinen S, Ørntoft

- TF, Andersen CL. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 6416-6424
- 15 Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-891
 - 16 Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle* 2007; 6: 1001-1005
 - 17 McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3927-3937
 - 18 Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-692
 - 19 Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez-Gauthier A, Sanchez-Céspedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1424-1429
 - 20 Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, Lee JH, Kim YH, Tsuchiya KD, Washington MK, Paraskeva C, Willson JK, Kaz AM, Kroh EM, Allen A, Fritz BR, Markowitz SD, Tewari M. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 3880-3888
 - 21 Bandres E, Agirre X, Bitarte N, Ramirez N, Zarate R, Roman-Gomez J, Prosper F, Garcia-Foncillas J. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009; 125: 2737-2743
 - 22 Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sánchez-Céspedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13556-13561
 - 23 Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, Moreno V, Esteller M, Capellà G, Ribas M, Peinado MA. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res* 2006; 66: 8462-9468
 - 24 Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 2008; 27: 404-408
 - 25 Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428
 - 26 Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003; 300: 455
 - 27 Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, Mund C, Musch T, Meister M, Sültmann H, Lyko F. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res* 2007; 67: 1419-1423
 - 28 Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992; 69: 905-914
 - 29 Nomura T, Kimura M, Horii T, Morita S, Soejima H, Kudo S, Hatada I. MeCP2-dependent repression of an imprinted miR-184 released by depolarization. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1192-1199
 - 30 Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, Erickson PF, Shellman YG, Robinson WA. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res* 2008; 68: 1362-1368
 - 31 Mulder TP, Verspaget HW, Sier CF, Roelofs HM, Ganesh S, Griffioen G, Peters WH. Glutathione S-transferase pi in colorectal tumors is predictive for overall survival. *Cancer Res* 1995; 55: 2696-2702
 - 32 Rønneberg JA, Tost J, Solvang HK, Alnaes GI, Johansen FE, Brendeford EM, Yakhini Z, Gut IG, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Gabrielsen OS, Kristensen VN. GSTP1 promoter haplotypes affect DNA methylation levels and promoter activity in breast carcinomas. *Cancer Res* 2008; 68: 5562-5571
 - 33 Hazra A, Fuchs CS, Kawasaki T, Kirkner GJ, Hunter DJ, Ogino S. Germline polymorphisms in the one-carbon metabolism pathway and DNA methylation in colorectal cancer. *Cancer Causes Control* 2009 Nov 21. [Epub ahead of print]
 - 34 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20
 - 35 Bao N, Lye KW, Barton MK. MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell* 2004; 7: 653-662
 - 36 Ting AH, Suzuki H, Cope L, Schuebel KE, Lee BH, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Baylin SB. A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2570-2575
 - 37 Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 87-95
 - 38 Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2571-2587
 - 39 Ng EK, Tsang WP, Ng SS, Jin HC, Yu J, Li JJ, Röcken C, Ebert MP, Kwok TT, Sung JJ. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 699-706
 - 40 Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Muñoz P, Gonzalez S, Schoeftner S, Murchison E, Andl T, Chen T, Klatt P, Li E, Serrano M, Millar S, Hannon G, Blasco MA. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 268-279
 - 41 Wang L, Pal S, Sif S. Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 6262-6277
 - 42 Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 2008; 322: 1695-1699
 - 43 Faber C, Kirchner T, Hlubek F. The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Arch* 2009; 454: 359-367
 - 44 李琼, 王阁. MicroRNAs与p53基因在肿瘤中相互关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1332-1336
 - 45 Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R.

■同行评价

本文选题新颖, 层次分明, 表达准确, 对大肠癌的研究有一定的指导意义。

- MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer* 2009; 8: 102
- 46 Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai

- K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 4123-4132

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

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

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

肝细胞生长因子对肝癌细胞系SMMC-7721失巢凋亡的影响

谷艳娇, 奥瑞芳, 苏荣健

谷艳娇, 辽宁医学院病理学教研室 辽宁省锦州市 121001
奥瑞芳, 山西省荣军医院病理科 山西省太原市 30031
苏荣健, 辽宁医学院科学实验中心 辽宁省高校分子细胞生物学和新药开发重点实验室 辽宁省锦州市 121001
辽宁省博士启动基金资助项目, No. 20061074
辽宁省教育厅重点实验室基金资助项目, No. 2008S142
作者贡献分布: 本研究由苏荣健提出设计并分析结果; 奥瑞芳与谷艳娇负责具体的实验操作; 论文撰写由苏荣健完成。
通讯作者: 苏荣健, 副教授, 121001, 辽宁省锦州市, 辽宁医学院科学实验中心, 辽宁省高校分子细胞生物学和新药开发重点实验室。rongjiansu@hotmail.com
电话: 0416-4673183
收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2010-01-28
接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Hepatocellular growth factor reduces anoikis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Yan-Jiao Gu, Rui-Fang Ao, Rong-Jian Su

Yan-Jiao Gu, Department of Pathology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Rui-Fang Ao, Department of Pathology, Rongjun Hospital, Taiyuan 30031, Shanxi Province, China
Rong-Jian Su, Central Laboratory, Liaoning Medical University; Key Laboratory of Molecular Cell Biology and Drug Development of the Education Department of Liaoning Province, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Supported by: the Doctor Startup Foundation of Liaoning Province, No. 20061074; and the Key Laboratory Foundation of the Education Department of Liaoning Province, No. 2008S142
Correspondence to: Associate Professor Rong-Jian Su, Central Laboratory, Liaoning Medical University; Key Laboratory of Molecular Cell Biology and Drug Development of the Education Department of Liaoning Province, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. rongjiansu@hotmail.com
Received: 2009-10-16 Revised: 2010-01-28
Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of hepatocellular growth factor (HGF) on the anoikis of SMMC-7721 cells and the role of phosphoinositide 3 kinase (PI3K) in this process.

METHODS: SMMC-7721 cells were suspended to induce anoikis. The anoikis rate of suspended cells was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. SMMC-7721 cells cultured in suspension were divided into three groups: control cells,

cells treated with HGF, and those pretreated with LY294002 and then treated with HGF. After HGF treatment, cell survival and proliferation were evaluated by trypan blue staining and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, respectively; anoikis was detected by flow cytometry; and the expression of Akt, phosphorylated Akt (p-Akt), focal adhesion kinase (FAK), and phosphorylated FAK (p-FAK) was detected by Western blot.

RESULTS: The anoikis rate of suspended SMMC-7721 is higher than that of adherent cells ($21.72\% \pm 6.85\%$ vs $66.67\% \pm 7.66\%$, $P < 0.05$). The survival rate of suspended SMMC-7721 treated with HGF is significantly higher than that of control cells ($P < 0.05$). However, HGF treatment could not significantly improve the survival of suspended SMMC-7721 pre-treated with LY294002 ($P < 0.05$). MTT assay showed that HGF treatment could improve the proliferation of suspended SMMC-7721 but showed little impact on the proliferation of suspended SMMC-7721 pre-treated with LY294002 (both $P < 0.05$). FCM and Hoechst 33258 staining results indicated that HGF could reduce the anoikis of SMMC-7721 while LY294002 could inhibit such effect (both $P < 0.05$). Western blot analysis showed that HGF treatment could up-regulate the expression of Akt, FAK, p-Akt and p-FAK in suspended SMMC-7721 cells but not in suspended SMMC-7721 cells pre-treated with LY294002.

CONCLUSION: HGF can reduce the anoikis of SMMC-7721 cells by activating Akt and FAK in a PI3K-dependent manner.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Anoikis, Hepatocellular growth factor; Akt; phosphoinositide 3 kinase

Gu YJ, Ao RF, Su RJ. Hepatocellular growth factor reduces anoikis in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 819-824

摘要

目的: 探讨HGF对SMMC-7721失巢凋亡的影响

■背景资料

肝细胞癌是一种恶性肿瘤,其病死率仅次于第一位的肺癌。肝细胞生长因子(HGF)是间充质细胞分泌的多效应因子,对细胞增殖等多种生物学行为具有调节作用。失巢凋亡是细胞由于脱离其黏附的基质而产生的,其对于维护内环境的稳定有重要作用,而肿瘤细胞具有抗失巢凋亡的能力。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■研究前沿

HGF能够促进很多肿瘤细胞的侵袭和转移,而对于其可以促进细胞的抗失巢凋亡能力研究才刚刚开始。并且,抗失巢的分子机制研究目前报道较少。故而, HGF促进肝细胞癌抗失巢凋亡机制的研究成为国内外学者的研究热点。通过促进肿瘤细胞的失巢凋亡成为亟待解决的问题之一。

响以及PI3K在该过程中的作用。

方法: 悬浮培养SMMC-7721, 建立失巢凋亡模型, 应用TUNEL染色观察凋亡率。分别悬浮培养SMMC-7721、HGF处理后SMMC-7721及LY294002预处理后的HGF处理细胞, 用台盼蓝染色观察细胞失巢凋亡后存活率, 用MTT检测细胞的增殖能力的变化, 流式细胞仪检测失巢凋亡细胞的早、晚期凋亡率, Hoechst染色观察不同处理细胞的凋亡情况。应用免疫印迹技术检测失巢凋亡后Akt、p-Akt、FAK、p-FAK的表达。

结果: TUNEL染色显示, 悬浮培养的SMMC-7721失巢凋亡率远大于贴壁培养的SMMC-7721($21.72\% \pm 6.85\%$ vs $66.67\% \pm 7.66\%$, $P < 0.05$); 台盼蓝染色显示, HGF处理后的SMMC-7721存活率明显高于悬浮培养细胞($P < 0.05$), 而HGF不能提高经LY294002预处理后细胞的存活率; MTT实验显示HGF处理细胞A值明显大于悬浮培养细胞($P < 0.05$), LY294002预处理细胞与悬浮培养细胞相似。流式细胞仪和Hoechst 33258染色均显示HGF处理后细胞的失巢凋亡明显低于悬浮培养细胞($P < 0.05$), 而经LY294002处理后细胞的失巢凋亡率明显升高。蛋白印迹结果显示HGF处理后细胞Akt、FAK、p-Akt、p-FAK的表达均升高, 而经LY294002预处理后, 其表达与悬浮培养SMMC-7721一致。

结论: 在肝细胞癌SMMC-7721失巢凋亡过程中, HGF通过活化Akt和FAK来增强细胞的抗失巢凋亡能力, 该作用受PI3K的调节。

关键词: 肝细胞癌; 失巢凋亡; 肝细胞生长因子; Akt; 磷酸肌酸3激酶

谷艳娇, 奥瑞芳, 苏荣健. 肝细胞生长因子对肝癌细胞系SMMC-7721失巢凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 819-824

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/819.asp>

0 引言

肝细胞癌是一种常见的恶性肿瘤, 其发病率呈逐年上升的趋势, 居全球第5位, 死亡率居第3位, 仅次于肺癌和胃癌^[1]。肝细胞生长因子(hepatocellular growth factor, HGF)是间质细胞(如成纤维细胞、巨噬细胞等)分泌的一种多效应生长因子, 对细胞增殖等多种生物学行为具有调节作用^[2]。失巢凋亡是一种细胞的程序死亡, 由于是细胞外基质和其他细胞脱离接触而诱发

的, 他的存在对于维护组织内环境稳定和结构完整具有重要意义^[3]。当肿瘤细胞离开原发部位, 获得逃逸失巢凋亡的能力, 便能长时间存活, 这是恶性肿瘤获得侵袭和转移能力的先决条件。我们之前的研究已经证明HGF可以促进肝细胞癌的侵袭和转移, 并且明确HGF对肝细胞癌侵袭和转移作用与PI3K有关^[4,5]。

为了进一步论证在失巢凋亡状态下HGF对肝细胞癌SMMC-7721的作用及影响, 本实验应用poly-HEMA对肝细胞癌SMMC-7721细胞悬浮培养, 观察细胞的存活状况, 并初步探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 肝细胞癌细胞系SMMC-7721为中国医科大学发育生物学教研室惠赠; HGF、LY294002购于Sigma公司; Akt和磷酸化Akt(Ser-473)抗体购于Cell Signal公司; FAK和磷酸化FAK(Tyr-397)抗体购于Invitrogen公司; poly-HEMA(P3932-10G)购于Sigma公司; 原位凋亡试剂盒, 购于日本TaKaRa生物。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝细胞癌细胞系SMMC-7721培养于含100 mL/L胎牛血清、100 g/L青霉素、100 g/L链霉素的DMEM培养液中, 当细胞生长至培养瓶底面的70%-80%进行传代。

1.2.2 失巢凋亡的诱导: 为避免细胞贴壁, 按照Folkman等的方法^[10], 取poly-HEMA用950 mL/L的乙醇, 配置成浓度为120 g/L的储存液, 混合过夜。800 g离心, 去除未溶物, 1:10用950 mL/L乙醇稀释, 制成工作液。加入平皿, 室温干燥过夜, 用之前, 用PBS漂洗2次。然后, 将细胞以 1×10^6 /mL接种于培养皿中, 培养于含血清10 mL/L的DMEM培养基中, 37 °C, 50 mL/L CO₂, 培养。

1.2.3 TUNEL染色: 取贴壁培养与悬浮培养24 h的SMMC-7721做TUNEL染色, 比较二者凋亡的差别。将贴壁培养和悬浮培养的细胞悬浮于PBS中, 滴加于硅烷处理的载玻片上, 均匀涂片, 风干, 40 g/L多聚甲醛室温固定30 min。PBS漂洗2次, 加入透化缓冲液100 μL冰上孵育5 min。PBS漂洗2次, 加入预冷的TdT反应液(FITC标记)50 μL孵育在湿盒中, 37 °C反应60 min, PBS冲洗, Hoechst33258复染细胞核, 封片。计数每200个细胞中, TUNEL染色阳性的细胞数, 计算百分率。计数至少3次独立实验的结果, 记为细胞凋亡率, 统计分析。

1.2.4 HGF处理: 将SMMC-7721细胞血清饥饿3

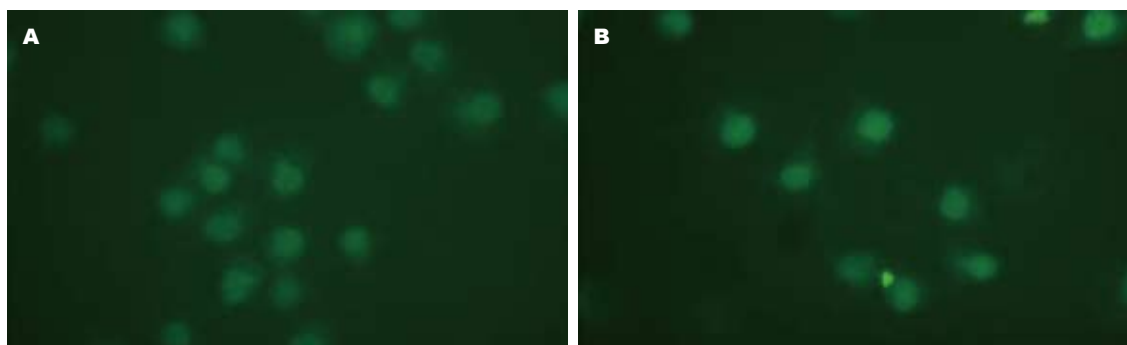


图 1 不同培养对SMMC-7721细胞存活率的影响(TUNEL染色 $\times 400$). A: 悬浮培养; B: 贴壁培养.

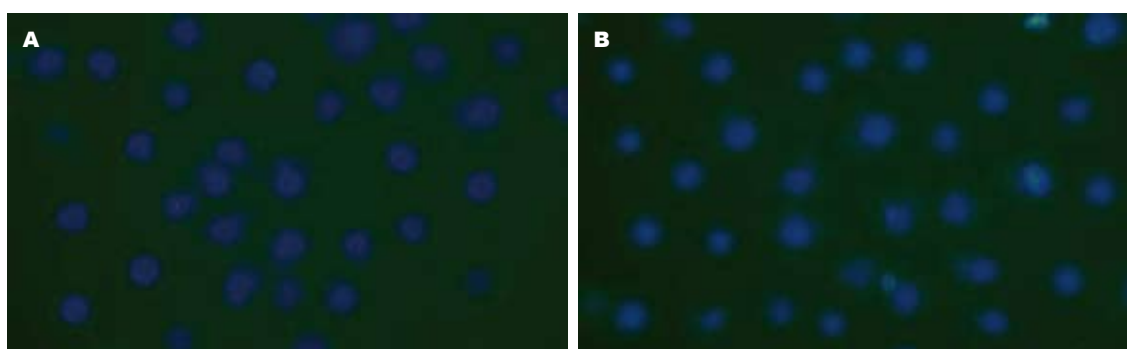


图 2 不同培养对SMMC-7721细胞存活率的影响(Hoechst33258染色 $\times 400$). A: 悬浮培养; B: 贴壁培养.

■ 相关报道

目前的研究认为, HGF对于肿瘤细胞抗失巢凋亡的机制是通过多信号通路实现的, PI3K信号通路在此过程中发挥了重要的作用. HGF与c-Met结合, 激活下游很多激酶, 引起肿瘤细胞的抗失巢凋亡.

h, 消化收集, 用无血清DMEM悬浮, 细胞计数后, 以 1×10^5 /mL细胞密度悬浮, 加入HGF浓度为 $50 \mu\text{g/L}$ ^[4], 处理12 h. 对照组细胞加入等体积无血清培养液.

1.2.5 LY294002处理: 细胞培养方法同上, 血清饥饿3 h, 加入LY294002(终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$)预处理1 h, PBS漂洗3次, 加入HGF(终浓度 $50 \mu\text{g/L}$)处理12 h.

1.2.6 台盼蓝染色: 分别取HGF, HGF+LY294002处理组细胞和对照SMMC-7721细胞取无血清培养液处理, 悬浮培养0、6、12、24 h, 1:1(V/V)与2 g/L的台盼蓝溶液混合, 用血细胞计数板计数每100倍视野活细胞数, 连续计数3个. 统计分析, 计算存活率.

1.2.7 细胞增殖实验(MTT): 将HGF, LY294002处理组细胞和对照组细胞分别以 5×10^4 /mL悬浮, 每孔100 μL 接种于96孔板, 每组3孔, 72 h后取出孔板, 用PBS漂洗3次, 每孔加入无血清DMEM 200 μL , 每孔20 μL MTT(pH7.2-7.4)5 g/mL, 37°C , 50 mL/L CO_2 , 培养4 h, 小心吸弃上清, 每孔加入DMSO 100 μL , 振荡, 溶解, 于酶标仪以595 nm 波长扫描, 测定吸光度(A)值. 平行3次, 取平均值.

1.2.8 流式细胞仪检测: 用流式细胞仪检测贴壁培养SMMC-7721、悬浮培养24 h后的

SMMC-7721、HGF处理以及HGF+PI3K处理细胞的失巢凋亡率. 将细胞收集, 用PBS漂洗2次, 悬浮于85 μL 的缓冲液中, 加入10 μL FITC标记的AV和5 μL PI, 立即流式细胞仪检测.

1.2.9 Hoechst33258染色: 贴壁培养SMMC-7721、悬浮培养24 h后的SMMC-7721、HGF处理以及HGF+PI3K处理细胞, 全部以 1×10^6 /mL涂片. 40 g/L多聚甲醛固定, PBS漂洗, 加入Hoechst33258染色10 min, PBS漂洗, 甘油封片. 倒置荧光显微镜观察拍照.

1.2.10 免疫印迹: 细胞处理方法同上, 24 h后, 离心收集悬浮培养的细胞, PBS漂洗3次, RIPA缓冲液冰上裂解30 min, BCA法测定蛋白含量. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 1 g/L BSA封闭, 一抗(Akt, p-Akt, FAK, p-FAK)室温孵育3 h, 二抗室温孵育1 h, BCIP/NBT显色.

统计学处理 文中所有数据均用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. SPSS13.0统计分析, 应用 t 检验比较分析.

2 结果

2.1 SMMC-7721细胞存活率 贴壁培养细胞的细胞凋亡率很低, 而悬浮培养24 h后, 细胞的凋亡率明显增加(图1, 2); 贴壁培养细胞TUNEL染色阳性率较悬浮细胞显著降低($21.72\% \pm 6.85\%$ vs

■创新盘点

本文以肝细胞癌细胞系 SMMC-7721 为研究对象, 用 HGF 和 PI3K 抑制剂 LY294002 处理, 观察其对于在失巢凋亡时, HGF 和 LY294002 对于肝癌细胞的抗失巢凋亡能力的不同影响, 简要论述 SMMC-7721 的抗失巢凋亡能力的机制。

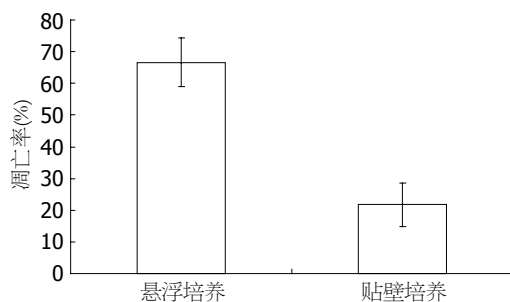


图 3 TUNEL染色阳性率分析。

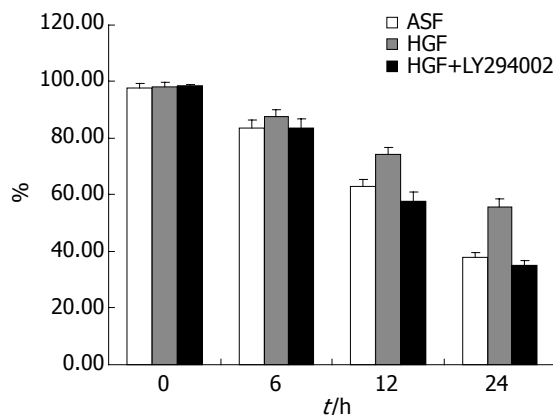


图 4 HGF对失巢凋亡细胞生存率的影响. ASF: 无血清培养基悬浮培养SMMC-7721; HGF: HGF处理后SMMC-7721; HGF+LY294002: LY294002预处理后加入HGF处理SMMC-7721。

66.67%±7.66%, $P<0.05$, 图3)。

2.2 HGF对失巢凋亡细胞生存率的影响 SMMC-7721分别于无血清培养基(ASF)悬浮培养, HGF和HGF+LY294002处理后, 经过不同时间的悬浮培养处理后, ASF台盼蓝染色结果可见, 3组细胞随着时间的延长, 存活率均逐渐降低, 而经HGF处理后的SMMC-7721活性明显大于ASF和HGF+LY294002处理组(图4)。

2.3 HGF对失巢凋亡细胞增殖能力的影响 选择24 h作为细胞悬浮培养后增殖能力检测的时间。HGF处理后的SMMC-7721细胞的增殖能力明显高于无血清培养液对照组(约2倍), 而经HGF+LY294002预处理后的SMMC-7721细胞增殖能力与对照组无明显差别(图5)。

2.4 HGF对细胞失巢凋亡率的影响 由图6可见, 单染AV的细胞表示早期凋亡; AV和PI双染的细胞表示晚期凋亡; 贴壁的SMMC-7721早期凋亡率为5.14%, 悬浮培养24 h后的凋亡率为20.56%, 加HGF处理后为13.19%, HGF+LY294002处理细胞的凋亡率为23.12%。总凋亡率分别为: 13.36%, 60.82%, 41.24%, 68.75%, 见表1。贴壁细胞与悬

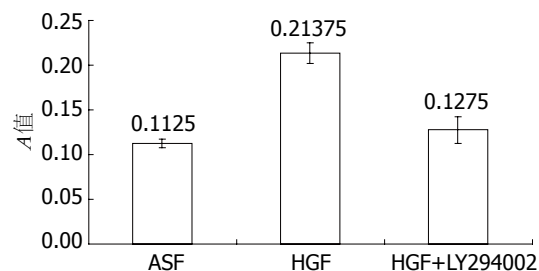


图 5 HGF对失巢凋亡细胞增殖能力的影响. ASF: 无血清培养基悬浮培养SMMC-7721; HGF: HGF处理后SMMC-7721; HGF+LY294002: LY294002预处理后加入HGF处理SMMC-7721。

表 1 流式细胞仪检测细胞凋亡率 (%)

| 分组 | 早期凋亡率 | 晚期凋亡率 | 总凋亡率 |
|---------------|-------|-------|-------|
| 贴壁SMMC-7721组 | 5.14 | 8.22 | 13.36 |
| 悬浮SMMC-7721组 | 20.56 | 40.26 | 60.82 |
| HGF组 | 13.19 | 28.05 | 41.24 |
| HGF+LY294002组 | 23.12 | 45.63 | 68.75 |

浮培养细胞、HGF处理细胞与悬浮培养细胞、HGF+LY294002组细胞与HGF处理细胞相比在早期凋亡率方面差异具有统计学差异($P<0.05$); 由图7可见, 悬浮培养24 h后, 细胞的凋亡率明显高于贴壁细胞, 经HGF处理后细胞的凋亡率明显降低, 而经LY294002抑制后, 凋亡率又重新升高。

2.5 HGF对Akt和FAK的影响 由图8A可见, HGF处理组细胞的Akt和p-Akt表达约为ASF组的3倍, LY294002组约为HGF组细胞的1/3。HGF(50 μg/L)可以促进Akt的高表达和Akt位点的磷酸化。由图8B可见, HGF处理组细胞的FAK表达约为ASF组的4倍, LY294002组约为HGF组细胞的1/3, 而p-FAK表达约为ASF组的6倍, LY294002组约为HGF组细胞的1/5, 所以HGF可以促进FAK表达增高和磷酸化。(ASF为无血清培养液处理的悬浮培养细胞; HGF为HGF处理SMMC-7721; LY294002为LY294002预处理后加入HGF处理的SMMC-7721)。

3 讨论

正常细胞依赖于细胞外的基质成分黏附生存, 当脱离这些基质后, 黏附状态被破坏, 即可发生细胞的失巢凋亡, 这对于维持体正常的组织内环境是非常重要的。肿瘤细胞获得了抗失巢凋亡能力, 即产生了侵袭和转移能力^[11-15]。据文献报道, 很多恶性肿瘤在失去与细胞外基质的黏附以后FAK和Akt仍然可以有较高水平的磷酸

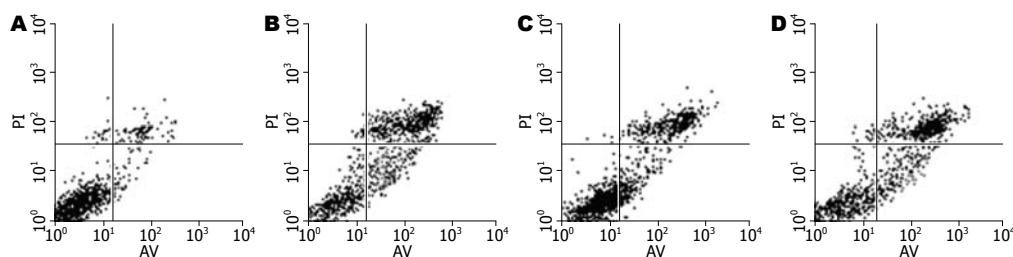


图 6 流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率. A: 贴壁培养SMMC-7721; B: 悬浮培养SMMC-7721; C: HGF处理SMMC-7721; D: LY294002预处理后加HGF处理SMMC-7721.

应用要点

本文探讨肝细胞癌SMMC-7721失巢凋亡时, HGF与LY294002对其影响及作用机制. 通过对SMMC-7721的抗失巢凋亡机制的论述, 阐明肿瘤细胞抗失巢凋亡能力的获得与HGF有关. 为肝细胞癌的研究及治疗提出一个新的思路.

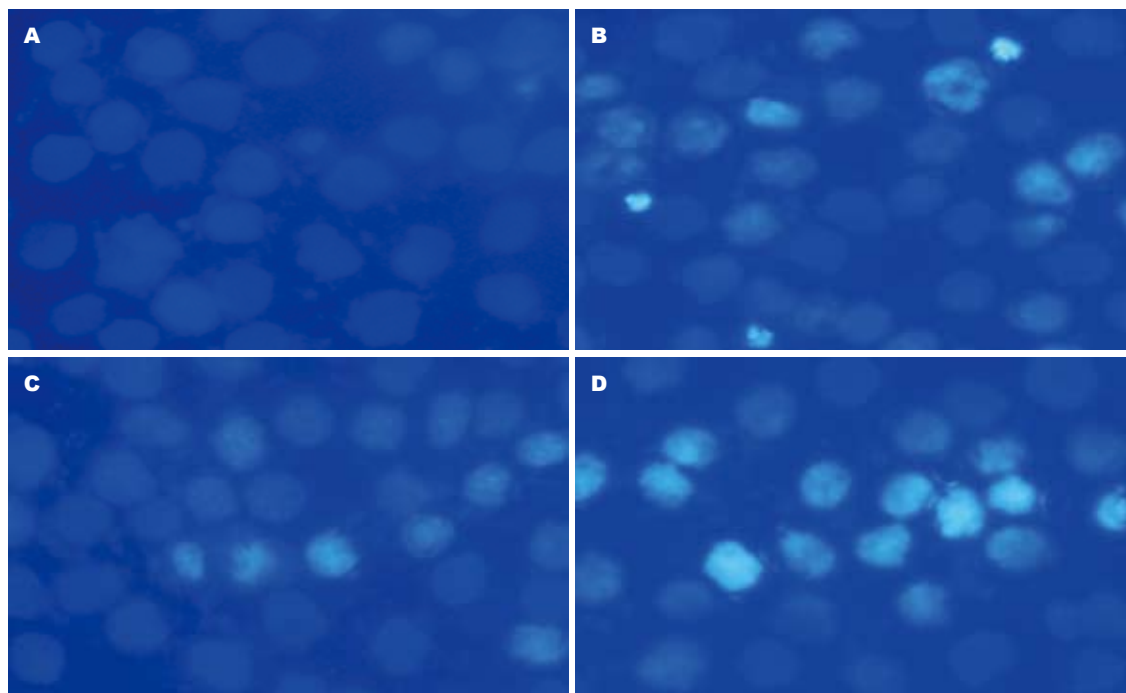


图 7 HGF对细胞失巢凋亡率的影响(Hoechst33258染色). A: 贴壁培养SMMC-7721; B: 悬浮培养SMMC-7721; C: HGF处理SMMC-7721; D: LY294002预处理后加HGF处理SMMC-7721.

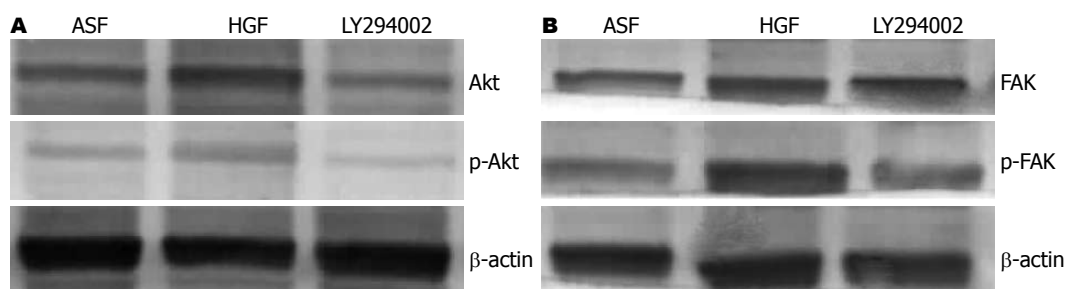


图 8 Western blot检测HGF对Akt和FAK的影响. A: 各组Akt与p-Akt的表达结果; B: 各组FAK和p-FAK的表达结果.

化^[3,6], 这说明Akt和FAK与肿瘤细胞的抗失巢凋亡能力的获得有关^[7,8]. 我们之前的研究证实, HGF能够促进肝细胞癌SMMC-7721的上皮间叶转化作用, 增强其侵袭和转移能力^[4], 增加其黏着斑激酶的表达^[5]. 然而, HGF对于肝细胞癌细胞失巢凋亡的研究尚未见报道.

本实验应用poly-HEMA^[9,10]包被六孔板, 悬

浮培养细胞, 由TUNEL染色发现悬浮培养细胞的凋亡率明显高于贴壁细胞, 说明该方法能够成功制造失巢凋亡模型; 台盼蓝染色结果表明, 0 h时, 细胞的生存率相同, 从6-24 h, 应用HGF处理后SMMC-7721细胞的生存能力逐渐强于ASF组, 而当加入PI3K抑制剂LY294002以后, 细胞的生存能力明显受到抑制, 与对照组细胞相似. 差

同行评价

本研究选题较好, 新颖性强, 但需进一步研究探讨。

别以24 h的结果最为明显, 可见HGF+LY294002, 即PI3K抑制剂能够明显抑制HGF引起的细胞活性增强; MTT实验结果说明, HGF处理后的细胞抗失巢凋亡能力明显强于对照组细胞, 约为对照组细胞的2倍, 而经PI3K抑制物LY294002预处理后, SMMC-7721细胞的增殖能力明显下降, 与对照组细胞相似; 流式细胞仪结果发现, 悬浮培养细胞的早期凋亡率, 即AV单染细胞, 约为贴壁培养细胞4倍, 而经HGF处理后再悬浮培养, 其凋亡率明显降低, 约为正常贴壁细胞的2.5倍, 而经LY294002预处理后, HGF的抑制失巢凋亡作用消失, 与悬浮培养细胞相近, 这说明HGF对细胞失巢凋亡的抑制作用与PI3K信号通路有关; Hoechst33258染色也显示了HGF处理后肝细胞癌的抗凋亡作用增强, 经PI3K抑制剂抑制后, 该作用明显消失。由此可见, HGF可以增强肝细胞癌细胞SMMC-7721的抗失巢凋亡能力, 并且是通过调节PI3K信号通路的来调节细胞的抗失巢凋亡能力。

Western blot结果显示, HGF处理后的细胞Akt和p-Akt的表达均高于对照组细胞, 应用PI3K抑制物LY294002处理后, Akt的表达与磷酸化水平显著降低约为HGF处理组细胞的1/3。这些说明在肝细胞癌SMMC-7721失巢凋亡细胞中PI3K参与调节Akt的活化过程, 抑制Akt的表达及活化。本研究结果也显示了, PI3K抑制剂能够明显抑制该作用。FAK的表达在HGF处理后也增加, 但其磷酸化更为明显, 他们都在LY294002预处理后下降, 但以磷酸化FAK更为明显。这说明HGF处理后的肝细胞癌SMMC-7721的抗失巢凋亡能力增强, 而这种增强作用受PI3K调节。总之, HGF通过活化PI3K激活Akt和FAK, 从而抑制肝细胞癌细胞的失巢凋亡。

总之, HGF对于肝细胞癌SMMC-7721的抗失巢凋亡具有重要的增强作用。而该作用是通过PI3K信号通路调节的, 抑制PI3K便可以抑制HGF引起的SMMC-7721抗失巢凋亡能力的增强。这可能为肝细胞癌的治疗提供一个新思路。

参考文献

- 1 Yau T, Chan P, Epstein R, Poon RT. Evolution of systemic therapy of advanced hepatocellular

- 2 carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6437-6441
- 3 You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep* 2008; 41: 833-839
- 4 Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Hui PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1996; 134: 793-799
- 5 王庆军, 孙抒, 李宏丹, 魏嘉, 苏荣健. 肝细胞生长因子对肝细胞癌侵袭和转移的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3152-3156
- 6 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
- 7 Dufour G, Demers MJ, Gagné D, Dydensborg AB, Teller IC, Bouchard V, Degongre I, Beaulieu JF, Cheng JQ, Fujita N, Tsuruo T, Vallée K, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J Biol Chem* 2004; 279: 44113-44122
- 8 Liu G, Meng X, Jin Y, Bai J, Zhao Y, Cui X, Chen F, Fu S. Inhibitory role of focal adhesion kinase on anoikis in the lung cancer cell A549. *Cell Biol Int* 2008; 32: 663-670
- 9 Vachon PH, Harnois C, Grenier A, Dufour G, Bouchard V, Han J, Landry J, Beaulieu JF, Vézina A, Dydensborg AB, Gauthier R, Côté A, Drolet JF, Lareau F. Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* 2002; 123: 1980-1991
- 10 Richardson NE, Davies DJ, Meakin BJ, Norton DA. The interaction of preservatives with polyhydroxy ethylmethacrylate (polyHEMA). *J Pharm Pharmacol* 1978; 30: 469-475
- 11 Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 1978; 273: 345-349
- 12 Li H, Ray G, Yoo BH, Erdogan M, Rosen KV. Down-regulation of death-associated protein kinase-2 is required for beta-catenin-induced anoikis resistance of malignant epithelial cells. *J Biol Chem* 2009; 284: 2012-2022
- 13 De Herdt MJ, Baatenburg de Jong RJ. HGF and c-MET as potential orchestrators of invasive growth in head and neck squamous cell carcinoma. *Front Biosci* 2008; 13: 2516-2526
- 14 Zeng Q, McCauley LK, Wang CY. Hepatocyte growth factor inhibits anoikis by induction of activator protein 1-dependent cyclooxygenase-2. Implication in head and neck squamous cell carcinoma progression. *J Biol Chem* 2002; 277: 50137-50142
- 15 Shelly C, Herrera R. Activation of SGK1 by HGF, Rac1 and integrin-mediated cell adhesion in MDCK cells: PI-3K-dependent and -independent pathways. *J Cell Sci* 2002; 115: 1985-1993
- 16 Cheng H, Liu P, Wang ZC, Zou L, Santiago S, Garbitt V, Gjoerup OV, Iglehart JD, Miron A, Richardson AL, Hahn WC, Zhao JJ. SIK1 couples LKB1 to p53-dependent anoikis and suppresses metastasis. *Sci Signal* 2009; 2: ra35

编辑 李瑞敏 电编 何基才

生长抑素类似物联合丝裂霉素对胃癌细胞的抑制作用

苏海燕, 刘文天, 王邦茂, 张文治, 苏心

苏海燕, 刘文天, 王邦茂, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

张文治, 苏心, 天津环湖医院神经细胞室 天津市 300060

作者贡献分布: 苏海燕与刘文天对此文所作贡献均等; 此课题由王邦茂与刘文天设计; 研究过程由张文治、苏海燕及苏心共同操作完成; 研究所用分析工具由苏海燕提供; 数据分析由苏海燕完成; 本论文写作由刘文天与苏海燕完成。

通讯作者: 刘文天, 主任医师, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化科。lwentian@sohu.com

收稿日期: 2009-11-25 修回日期: 2010-01-25

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Octreotide enhances the inhibitory effects of mitomycin on the growth of gastric cancer SGC-7901 cells

Hai-Yan Su, Wen-Tian Liu, Bang-Mao Wang, Wen-Zhi Zhang, Xin Su

Hai-Yan Su, Wen-Tian Liu, Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Wen-Zhi Zhang, Xin Su, Laboratory of Neural Cells, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

Correspondence to: Wen-Tian Liu, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China. lwentian@sohu.com

Received: 2009-11-25 Revised: 2010-01-25

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the synergistic effects of somatostatin analogue octreotide (OCT) and chemotherapeutic drug mitomycin (MMC) on the growth of gastric cancer SGC-7901 cells.

METHODS: SGC-7901 cells were cultured *in vitro* and divided into four groups: control group, OCT group, MMC group and OCT plus MMC group. The proliferation of SGC-7901 cells was evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The expression of apoptosis-related protein Bcl-2 was measured by immunohistochemistry.

RESULTS: OCT at concentrations ranging from 1×10^{-9} g/L to 1×10^{-3} g/L could exert inhibitory effects on the growth of SGC-7901 cells. OCT at a concentration of 1×10^{-5} g/L achieved a reduced rate of cell proliferation of 20.9%, significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$).

The reduced rates of cell proliferation varied from 14.1% to 71.1% when the concentrations of MMC increased from 1×10^{-4} g/L to 1×10^{-2} g/L. OCT in combination with MMC showed a synergistic effect on the growth of SGC-7901 cells: the reduced rates of cell proliferation varied from 22% to 45.8% when the concentration of MMC increased from 1×10^{-3} g/L to 5×10^{-3} g/L ($P < 0.05$). The combined inhibitory effects of MMC and OCT were higher than that of MMC (5×10^{-3} g/L) alone (54.8% vs 30.4%, $P < 0.05$). The percentages of Bcl-2-positive cells were reduced in the OCT group, MMC group and OCT plus MMC group (12.9%, 6.7% and 5.0%, respectively). The percentage of Bcl-2-positive cells was significantly lower in the OCT plus MMC group than in the OCT group and MMC group (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: OCT can enhance the inhibitory effects of MMC on the growth of SGC-7901 cells.

Key Words: Somatostatin analogue; Gastric cancer; Chemotherapy; Apoptosis

Su HY, Liu WT, Wang BM, Zhang WZ, Su X. Octreotide enhances the inhibitory effects of mitomycin on the growth of gastric cancer SGC-7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 815-818

摘要

目的: 探讨生长抑素类似物奥曲肽(OCT)联合细胞毒化疗药物丝裂霉素(MMC)对胃癌细胞系SGC-7901的抑制作用。

方法: 体外培养人胃癌细胞株SGC-7901, 分别设空白组、对照组、OCT组、MMC组以及OCT+MMC组。用MTT比色法观察对胃癌细胞生长的影响; 用免疫组织化学法分析对细胞凋亡调节基因Bcl-2表达的影响。

结果: 在OCT组中, 当浓度从 1×10^{-9} g/L到 1×10^{-3} g/L变化时, OCT对胃癌细胞均有抑制, 当OCT为 1×10^{-5} g/L时, 其抑制作用最明显(20.9%, $P < 0.05$)。MMC随着浓度由 1×10^{-4} g/L增加至 1×10^{-2} g/L其抑制率也由14.1%增加至71.1%, 呈递增趋势。OCT联合MMC的抑制作

■背景资料

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 发病率、死亡率高, 手术和化疗是主要治疗手段。但是由于恶性程度高、转移早以及术后复发和转移等, 远期疗效不理想。化疗药物不良反应大, 患者耐受性差, 因此本课题组希望找到一种不良反应小、具有抗肿瘤活性的药物, 能够增强化疗药的作用。

■同行评议者

宋于刚, 教授, 南方医科大学南方医院消化内科研究所

■研究前沿

生长抑素类似物-奥曲肽(OCT)对胃癌抑制作用和机制的研究已有报道,但是单独应用抑制率不高,效果不明显。因此本研究应用OCT联合丝裂霉素(MMC),结果显示联合应用抑制率高于MMC单独用药,其机制可能是通过下调细胞凋亡抑制基因Bcl-2的表达,今后仍需要进一步的进行动物实验,以明确其临床价值。

用随着MMC浓度由 1×10^{-3} g/L增加至 5×10^{-3} g/L,抑制率也由22%增加至45.8%(均 $P < 0.05$);当MMC为 5×10^{-3} g/L时,联合治疗组优于单独给药组(54.8% vs 30.4%, $P < 0.05$)。OCT、MMC及OCT+MMC均可以下调Bcl-2的表达,阳性细胞数分别为12.9%、6.7%和5.0%(均 $P < 0.05$),其中OCT+MMC组下调作用最明显。

结论: OCT联合MMC可以增强对胃癌细胞的抑制作用,联合应用可以减低MMC的剂量。

关键词: 生长抑素类似物;胃癌;化学治疗;细胞凋亡

苏海燕, 刘文天, 王邦茂, 张文治, 苏心. 生长抑素类似物联合丝裂霉素对胃癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 815-818

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/815.asp>

0 引言

胃癌是消化系常见恶性肿瘤之一,其发病率占所有恶性肿瘤的第1位,近年我国胃癌死亡率呈上升趋势^[1]。手术是治疗胃癌的主要方法,但其恶性程度高、转移早及多药耐药等问题常导致进展期胃癌术后复发和转移、远期疗效不理想,因此化疗仍占有重要地位。近年来,生长抑素类似物(somatostatin analogue, SSTA)的抗肿瘤活性备受关注,本文将着重研究OCT对胃癌细胞的抑制作用以及联合MMC的抗肿瘤效果。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC-7901,由本实验室提供。标准胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)及二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司。胰蛋白酶购自美国Gibco公司。丝裂霉素(MMC)购自协和发酵工业株式会社。SSTA-奥曲肽(OCT)由瑞士诺华公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃癌细胞株SGC-7901培养于含100 g/L热灭活FBS的RPMI 1640培养基中,在37℃、50 mL/L CO₂及饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 MTT实验: 取对数生长期的人胃癌细胞株SGC-7901,调整细胞浓度为 1×10^4 /mL,接种于96孔培养板中,每孔100 μL,同时进行以下实验: (1)空白组,不含细胞; (2)对照组,含细胞不加药物; (3)OCT组,每孔中加入OCT后其终浓度分别为 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} g/L; (4)MMC组,每

孔中加入MMC后其终浓度分别为: 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、 7.5×10^{-3} 、 1×10^{-2} g/L; (5)OCT(1×10^{-5} g/L)+MMC组: MMC取小于IC₅₀的3个浓度 1×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} 和 5×10^{-3} g/L。每个浓度设8个平行复孔,培养24 h后加入MTT(5 g/L)每孔15 μL,再培养4 h,弃去上清液,每孔加入DMSO 150 μL,震荡至MTT完全溶解,酶联检测仪600 nm处测吸光度(A)值,求抑制率。抑制率 = (对照组A值-实验组A值)/对照组A值 × 100%。

1.2.3 免疫组织化学法测定Bcl-2蛋白在胃癌细胞的表达: 将实验分为对照组、OCT组(1×10^{-5} g/L)、MMC组(5×10^{-3} g/L)和OCT+MMC组,37℃、50 mL/L CO₂孵育箱中培育24 h后, PBS冲洗,固定,室温孵育,血清封闭,加鼠抗人P53单克隆抗体4℃过夜,次日加入山羊抗小鼠IgG,滴加SABC,加入DAB-H₂O₂显色,显微镜观察。在Olympus倒置光学显微镜下Bcl-2阳性细胞呈棕黄或棕黑色,与背景同色为阴性。而后200倍显微镜下计数5个视野,计算阳性细胞百分数。

统计学处理 实验数据均由3次以上独立的重复实验得出,计量资料以mean ± SD描述,数据统计用SAS统计软件进行t检验、组间资料的方差分析及χ²检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 OCT对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响 随着OCT浓度由 1×10^{-9} g/L增加至 1×10^{-5} g/L,其抑制率由7.9%增加至20.9%,再增加浓度至 1×10^{-3} g/L其抑制率转而下降为14.3%。当OCT为 1×10^{-5} g/L时,其A值与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 MMC对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响 随着MMC浓度由 1×10^{-4} g/L增加至 1×10^{-2} g/L其抑制率也由14.1%增加至71.1%,呈递增趋势。当MMC浓度为 1×10^{-4} g/L时,其A值与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$),余治疗组与对照组相比均有统计学差异(均 $P < 0.05$)。

2.3 联合用药对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响 随着MMC浓度由 1×10^{-3} g/L增加至 5×10^{-3} g/L, MMC+OCT的抑制率也由22%增加至45.8%。各治疗组与对照组相比均有统计学差异(均 $P < 0.05$)。

2.4 单独及联合用药的抑制率比较 当MMC为 1×10^{-3} g/L时, OCT、MMC及OCT+MMC三者的抑制率之间无统计学差异($P > 0.05$); 当

■创新盘点

OCT具有抗肿瘤活性,但其自身的抑癌活性较弱,单独用药尚不能达到满意的疗效,因此本课题组研究OCT联合经典的化疗药物MMC的作用,探讨OCT是否具有化疗药增敏剂的作用,并进一步从细胞凋亡调节基因Bcl-2表达上探讨了二者联合的机制和可能。

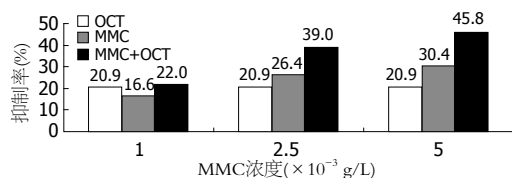


图 1 10^{-5} g/L 奥曲肽联合不同浓度 MMC 对胃癌细胞系 SGC-7901 的抑制。

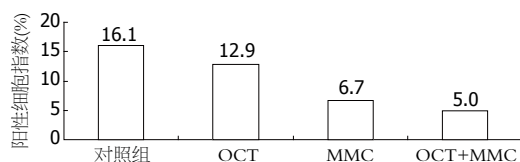


图 2 OCT、MMC、OCT+MMC 对胃癌细胞 Bcl-2 表达的影响。

MMC 为 2.5×10^{-3} g/L 时, OCT 与 MMC 及 MMC 与 OCT+MMC 之间无统计学差异 ($P > 0.05$), 但 OCT 与 OCT+MMC 之间有统计学差异 ($P < 0.05$); 当 MMC 为 5×10^{-3} g/L 时, OCT 与 MMC 之间无统计学差异 ($P > 0.05$), OCT+MMC 与 OCT 及 OCT+MMC 与 MMC 之间均有统计学差异 (均 $P < 0.05$, 图 1)。

2.5 单独及联合用药对胃癌细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 OCT、MMC 及 OCT+MMC 均可以下调 Bcl-2 的表达, MMC 及 OCT+MMC 与对照组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 其中 OCT+MMC 组下调作用最明显 (图 2)。

3 讨论

生长抑素 (somatostatin, SST) 是一种下丘脑及胃肠道 D 细胞分泌的神经肽类激素, 具有抑制脑垂体生长激素分泌、调节胃肠激素分泌、消化系外分泌以及胃肠内脏血流的作用。天然 SST 的血浆半衰期较短 (不超过 3 min), 临床开发出几种 SSTA, 其血浆半衰期约为 120 min, 而且抑制生长激素从垂体释放的作用较 SST 强约 50 倍。目前, SSTA 已用于许多临床疾病的治疗, 例如: 垂体瘤、肝硬化食管静脉曲张出血以及急性胰腺炎等, 并取得良好疗效。由于 SST 具有诱导癌细胞凋亡和抑制肿瘤细胞生长等作用, 应用 SSTA 治疗肿瘤, 特别是胃肠道肿瘤已成为一个研究热点^[2,3]。OCT 是目前临床中常用的 SSTA。

生长抑素受体 (somatostatin receptor, SSTR) 在体内不仅存在于正常组织中, 多种肿瘤也表达 SSTR, 这是应用 SSTA 治疗肿瘤的分子基础^[4,5]。大量研究显示^[6-8], SSTA 抗肿瘤机制包括 (1) 与存在于肿瘤细胞表面的 SSTR 结合后发挥

的直接作用; (2) 与存在于正常细胞表面的 SSTR 结合的间接作用。Denzler 等报道, 在 1 例胃癌患者的肿瘤周围黏膜下层血管有成倍的 SSTR 表达, 而在来自食管或胰腺癌而没有胃部病变的对照组胃黏膜下层血管中 SSTR 表达就很少^[9]。SSTR 亚型的研究显示, 胃癌细胞膜上有 SSTR3 蛋白表达^[10]。还有研究显示胃癌肿瘤组织中存在 5 种 SSTR 亚型的表达, 并以 SSTR2 表达最为显著^[11]。胃癌细胞系 SGC-7901 是人低分化胃腺癌细胞, 细胞膜表达 SSTR2、3^[12,13]。因此, 这为 OCT 治疗胃癌提供了可能。间接的抗肿瘤作用是通过抑制 GH/IGF-1 轴, 从而抑制促肿瘤生长的细胞因子或激素 (EGF、胰岛素、IGF-1、CCK 等) 的合成与分泌、抑制肿瘤血管的形成、诱导肿瘤细胞发生凋亡。Ferjoux 等^[14]认为受体亚型不同, SSTA 抗增殖作用就会涉及不同的传导通路。

本研究显示, 单独应用 OCT 作用于胃癌细胞系 SGC-7901, 随着浓度的增加其抑制率也增加, 但当其浓度达到 1×10^{-5} g/L 时, 其抑制率最大为 20.9%, 再增加浓度其抑制率反而下降, 提示 OCT 对 SGC-7901 的抑制具有饱和性, 这也间接提示了 SGC-7901 表面存在与 OCT 结合的 SSTR。

当 OCT 与 MMC 联合应用时, 其抑制率与两药单独应用相比有所增加。随着 MMC 浓度由 1×10^{-3} g/L 增加至 5×10^{-3} g/L 时, 其抑制率由 16.6% 增加至 30.4%, 联合 OCT (1×10^{-5} g/L) 后其抑制率由 22.0% 增至 45.8%。由实验结果可见, 1×10^{-5} g/L OCT 及低浓度的 MMC 对 SGC-7901 的抑制无明显差异, 但当二者联合应用时, 轻度 MMC 浓度的增加, 可以导致对 SGC-7901 的明显抑制。该结果显示, OCT 可以增强 MMC 对胃癌细胞的抑制作用, 联合应用可以使小剂量的 MMC 抑制作用增加, 因而减少 MMC 的不良反应。

Bcl-2 是目前公认的调节细胞凋亡的重要基因之一, 其激活和过度表达能抑制细胞正常的凋亡, 延长细胞寿命, 使生理状态下细胞凋亡和增殖的动态平衡发生紊乱, 从而增加肿瘤发生的机会并促进肿瘤的发展。有研究证实 Bcl-2 基因在胃癌中呈高表达^[15,16]。本研究结果显示, OCT 可以下调 Bcl-2 的表达, 这可能是 OCT 抑制胃癌细胞生长的机制之一。OCT 联合 MMC 后, 使其阳性细胞指数由 6.7% 下降至 5.0%。由此可见, OCT 可协同 MMC 下调 Bcl-2 的表达, 减少 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制, 进而达到抑制胃癌细胞生长的作用。

■应用要点

本研究从细胞水平探讨了 OCT 联合 MMC 对胃癌细胞的抑制作用, 为今后进一步的临床试验提供了细胞水平的应用基础。

■同行评价

本研究选题较好,设计基本合理,结果可靠,学术价值较好。

OCT是自身分泌的神经肽类激素,有较低的毒性,同时又具有一定的抗肿瘤特性;细胞毒化疗药物具有抑制肿瘤细胞生长的作用,但其存在抑制效率低、不良反应多的缺陷,二者的联合应用则有可能增强作用效率、减少用药剂量,从而减少不良反应,本研究的结果初步显示了OCT与MMC联合应用的优势。

4 参考文献

- 1 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连第, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9
- 2 Wängler C, Buchmann I, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W. Radiolabeled peptides and proteins in cancer therapy. *Protein Pept Lett* 2007; 14: 273-279
- 3 Parry JJ, Eiblmaier M, Andrews R, Meyer LA, Higashikubo R, Anderson CJ, Rogers BE. Characterization of somatostatin receptor subtype 2 expression in stably transfected A-427 human cancer cells. *Mol Imaging* 2007; 6: 56-67
- 4 Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Cordelier P, Bousquet C, Pyronnet S, Susini C. Physiology of somatostatin receptors. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 5-9
- 5 Reubi JC, Maecke HR. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med* 2008; 49: 1735-1738
- 6 Charland S, Boucher MJ, Houde M, Rivard N. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and

tumoral pancreatic acinar cells. *Endocrinology* 2001; 142: 121-128

- 7 徐秀英, 张岱, 姜若兰, 卢香兰, 宗志宏. 生长抑素对人胃癌细胞BGC-823生长的调控作用. 中国现代医学杂志 2007; 17: 1037-1040
- 8 邹奕, 肖小平, 李月琴, 张欣, 周天鸿. 生长抑素类似物通过细胞生长抑制和细胞溶解途径以SSTR2依赖的方式抑制癌细胞增殖. 暨南大学学报(自然科学与医学版) 2009; 30: 325-330
- 9 Denzler B, Reubi JC. Expression of somatostatin receptors in peritumoral veins of human tumors. *Cancer* 1999; 85: 188-198
- 10 Hu C, Yi C, Hao Z, Cao S, Li H, Shao X, Zhang J, Qiao T, Fan D. The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 726-730
- 11 瞿卫, 王自正, 王书奎, 王峰. 胃癌生长抑素受体mRNA表达的研究. 中华肿瘤防治杂志 2006; 13: 498-500
- 12 王承党, 刘霞, 陈滢珊. 胃癌细胞株SGC-7901生长抑素2型受体表达和外源性生长抑素类似物的影响. 中国肿瘤临床 2008; 35: 109-112
- 13 王春晖, 唐承薇, 汤丽平. 奥曲肽抑制胃癌生长的实验研究. 胃肠病学 2002; 7: 158-162
- 14 Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 2000; 94: 205-210
- 15 张子房, 唐炜, 尹江涛. 环氧化酶-2、p53和Bcl-2在胃癌组织中的表达及其意义. 中国医学创新 2009; 6: 12-15
- 16 李霆. Bcl-2家族在胃癌组织中的表达及意义. 山东医药 2008; 48: 37-38

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统,在“万方数据-数字化期刊群”基础上,结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),以我国正式出版的各种学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据,严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后,进行规范化处理和有效链接,经统计分析,编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次,影响因子0.729,即年指标0.142,引用期刊数732,学科扩散指标0.533,被引半衰期4.303,H指数8。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

氨基胍对饥饿大鼠肠道胆碱能神经元及肠动力功能的保护

陆之辉, 张小平, 程爱国

陆之辉, 唐山工人医院麻醉科 河北省唐山市 063000
张小平, 华北煤炭医学院附属医院麻醉科 河北省唐山市 063000
程爱国, 华北煤炭医学院附属医院骨科 河北省唐山市 063000
作者贡献分布: 此课题由陆之辉、张小平及程爱国设计; 研究过程由陆之辉操作完成; 研究所用试剂及分析工具由张小平与程爱国提供; 数据分析由陆之辉完成; 本论文写作由陆之辉、张小平及程爱国完成。
通讯作者: 张小平, 博士, 教授, 主任医师, 063000, 河北省唐山市, 华北煤炭医学院附属医院麻醉科. xpzh55@sohu.com
电话: 0315-3725396 传真: 0315-2852195
收稿日期: 2009-12-26 修回日期: 2010-02-04
接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-18

Protective effects of aminoguanidine on enteric cholinergic neurons and gastrointestinal motility in starved rats

Zhi-Hui Lu, Xiao-Ping Zhang, Ai-Guo Cheng

Zhi-Hui Lu, Department of Anesthesiology, Tangshan Municipal Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Xiao-Ping Zhang, Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Ai-Guo Cheng, Department of Orthopedic Surgery, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China
Correspondence to: Professor Xiao-Ping Zhang, Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China. xpzh55@sohu.com
Received: 2009-12-26 Revised: 2010-02-04
Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the changes in enteric cholinergic neurons and intestinal transit in starved rats and to explore the protective mechanism of aminoguanidine (AG) on enteric nervous system and gastrointestinal motility.

METHODS: Ninety male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal control group ($n = 10$), starvation group ($n = 40$) and AG group ($n = 40$). The starvation group and AG group were further divided into four subgroups for testing on 3, 5, 7 and 9 days after starvation. The AG group was intraperitoneally

injected with AG 150 mg/(kg·d) from the first day of starvation. Rats were killed on days 3, 5, 7 and 9 after starvation to take intestinal samples. The rate of intestinal transit was assessed with dextran blue-2000. The distribution density of cholinergic neurons in the ileal myenteric plexus were evaluated by acetylcholinesterase (AChE) histochemistry.

RESULTS: The rates of intestinal transit were significantly lower at all time points after starvation in the starvation group and AG group than in the control group (all $P < 0.05$ or 0.01). The rates of intestinal transit in the starvation group and AG group decreased with time, reaching the lowest point on day 9. However, the rates of intestinal transit were significantly higher on days 3, 5 and 7 in the AG group than in the starvation group ($52.2\% \pm 4.7\%$ vs $47.5\% \pm 4.2\%$, $49.8\% \pm 5.6\%$ vs $42.3\% \pm 5.4\%$, and $43.3\% \pm 6.4\%$ vs $36.6\% \pm 5.2\%$, all $P < 0.05$) though there was no obvious difference on day 9. The density of cholinergic neurons was significantly lower in the starvation group and AG group than in the control group at all time points (all $P < 0.01$). The density of cholinergic neurons in the starvation group and AG group decreased with time, reaching the lowest point on day 9. The density of cholinergic neurons was significantly higher on days 5 and 7 in the AG group than in the starvation group (both $P < 0.05$) though there was no obvious difference on days 3 and 9.

CONCLUSION: Early intraperitoneal supplement of aminoguanidine is helpful in promoting enteric nervous system function and intestinal transit in starved rats.

Key Words: Starvation; Aminoguanidine; Enteric nervous system; Cholinergic neuron; Gastrointestinal motility

Lu ZH, Zhang XP, Cheng AG. Protective effects of aminoguanidine on enteric cholinergic neurons and gastrointestinal motility in starved rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 825-829

摘要

目的: 观察饥饿大鼠肠道胆碱能神经元和肠

■背景资料

在重大事故及自然灾害中被埋困人员饥饿状态下机体发生应激反应, 肠道为应激的中心器官, 但肠神经对肠动力功能的影响及变化规律尚不十分清楚。本研究饥饿大鼠肠神经及肠动力功能的变化过程, 探索氨基胍的肠神经保护机制, 以期为深入研究和被困人员肠道保护提供依据。

■同行评议者

陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物教研室; 张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

■研究前沿

肠神经及其分泌递质种类多,调节机制复杂,应激状态下对其干预必将产生复杂的变化,选取适当的应激条件和强度、干预时间、干预药物种类、剂量和给药方式,需要精心研究、设计。

传输功能的变化,探讨氨基胍对肠动力功能保护的神经机制。

方法: 90只♂SD大鼠随机分为正常对照组(C组, $n = 10$)、全饥饿组(S组, $n = 40$)和氨基胍(aminoguanidine AG)组(A组, $n = 40$)。S、A组随机分为饥饿3、5、7、9 d亚组($n = 10$)。A组给予AG 150 mg/(kg·d)腹腔注射。采用葡聚糖蓝染色法测定各组肠道色素推进比率, AchE组织化学染色法测定各组回肠肌间神经丛胆碱能神经元分布密度。

结果: S、A组各时间点肠道色素推进率较对照组明显降低($P < 0.05$ 或 0.01),并随饥饿时间延长呈进行性下降,均于9 d达最低点, A组在饥饿后3、5、7 d较S组高且有显著性差异($52.2\% \pm 4.7\%$, $49.8\% \pm 5.6\%$, $43.3\% \pm 6.4\%$ vs $47.5\% \pm 4.2\%$, $42.3\% \pm 5.4\%$, $36.6\% \pm 5.2\%$, 均 $P < 0.05$),饥饿后9 d A组较S组无显著差异。S、A组各时间点胆碱能神经元分布密度较对照组明显降低($P < 0.01$),并随饥饿时间延长呈进行性下降,均于9 d达最低点, A组在饥饿后5、7 d较S组高且有显著性差异(均 $P < 0.05$),饥饿后3、9 d A组较S组无显著差异。

结论: 饥饿后早期给予氨基胍能够一定程度减轻肠胆碱能神经元损伤,改善肠传输功能,发挥肠神经保护作用。

关键词: 饥饿; 氨基胍; 肠神经系统; 胆碱能神经元; 胃肠动力

陆之辉, 张小平, 程爱国. 氨基胍对饥饿大鼠肠道胆碱能神经元及肠动力功能的保护. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 825-829

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/825.asp>

0 引言

在重大事故及自然灾害中被埋困人员饥饿状态下机体发生应激反应,其中,肠神经及肠动力功能在饥饿应激中的病理变化是需要关注的重要环节。肠神经系统(enteric nervous system, ENS)由肠肌间神经丛和黏膜下神经丛组成^[1],在各种调节胃肠蠕动功能的机制中起主要作用,其中主要的兴奋性神经元是乙酰胆碱能神经元^[2],在肠道淤血、缺血再灌注等应激条件下,肠壁内的乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)阳性神经元数量减少,提示应激条件会造成ENS神经元功能异常^[3],氨基胍(aminoguanidine, AG)作为一种选择性诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抑制剂,能有效地抑制应

激状态下肠道产生的过多NO,发挥肠道保护作用^[4],但对于完全饥饿状态下ENS神经元及肠动力功能的保护作用还鲜见报道。本研究采用AchE组织化学染色技术,观察氨基胍(AG)对饥饿大鼠肠神经及肠动力功能的影响,探讨早期添加AG对肠神经的保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠90只(北京维通利华实验动物技术有限公司提供清洁级),质量 $250 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$,随机分为正常对照组(C组, $n = 10$)、全饥饿组(S组, $n = 40$)和氨基胍+全饥饿组(A组, $n = 40$)。

1.2 方法

1.2.1 造模: 单笼适应性喂养1 wk后进行实验,实验期无饲料供应,自由饮水,自然光照,室温控制在 $18^\circ\text{C} - 25^\circ\text{C}$ 。饥饿组和氨基胍组随机分为3、5、7、9 d 4个亚组,氨基胍组于饥饿当天开始干预,氨基胍按 $150 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 配制 2 mL 溶液定时腹腔注射;饥饿组定时腹腔注射生理盐水 $2 \text{ mL}/\text{d}$,排除腹腔注射操作本身干扰因素,两组实验期间自由饮水,直至被处死。

1.2.2 小肠传输速率测定: 各亚组大鼠禁水12 h,于相应时间点采用 $20 \text{ g}/\text{L}$ 葡聚糖蓝-2000溶液 0.4 mL 灌胃后30 min, 10% 水合氯醛($0.3 \text{ mL}/100 \text{ g}$)腹腔注射麻醉,开胸经左心室顺序灌注 37°C $9 \text{ g}/\text{L}$ 氯化钠溶液、 4°C 含 $10 \text{ g}/\text{L}$ 氯化钙的 $40 \text{ g}/\text{L}$ 甲醛液固定组织。剖腹取出胃肠道,截取幽门至回盲部整段小肠,盲肠侧在上、幽门侧在下,以 5 g 重物垂直牵引悬挂,测量并记录幽门至葡聚糖蓝-2000色素推进最前端(推进长度)、幽门至盲肠(总长度)的长度,二者之比为小肠传输速率。

1.2.3 组织标本制备: 小肠传输速率测定完毕,迅速截取距回盲部 3 cm 一段回肠(5 cm),用 $0.01 \text{ mol}/\text{L}$ PBS冲洗后用 $10 \text{ g}/\text{L}$ 多聚甲醛+ 1% 氯化钙溶液稍充盈,将肠管两端结扎紧,立即置入 4°C 上述溶液中过夜,次日如下述行全层铺片, $0.01 \text{ mol}/\text{L}$ PBS冲洗,沿肠系膜处剪开肠管,再将组织剪成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的组织块,在解剖显微镜下用钟表镊剥除黏膜层和黏膜下层,再用镊尖轻轻挑去附于肌间神经丛的环行肌,即得外纵肌层标本(肠肌间神经丛附于其上)。

1.2.4 酶组织化学染色: 每只大鼠各取5片外纵肌层标本分别进行乙酰胆碱酯酶(AchE)组织化学染色。AchE染色法^[3]: 按Karnovsky-Roots直接法进行AchE神经元染色,将剥离的上段纵肌层标本用 $0.01 \text{ mol}/\text{L}$ PBS冲洗3次,置入含碘化乙

表 1 大鼠小肠传输速率比较 (mean \pm SD)

| 分组 | 时间(d) | 总长度(cm) | 推进长度(cm) | 推进比率(%) |
|-----|-------|------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 对照组 | 0 | 122.3 \pm 10.5 | 71.4 \pm 8.9 | 59.2 \pm 7.1 |
| 饥饿组 | 3 | 126.4 \pm 10.1 | 59.9 \pm 6.2 ^b | 47.5 \pm 4.2 ^b |
| | 5 | 121.4 \pm 10.7 | 51.4 \pm 6.4 ^b | 42.3 \pm 5.4 ^b |
| | 7 | 128.4 \pm 11.7 | 46.5 \pm 8.8 ^b | 36.6 \pm 5.2 ^b |
| | 9 | 122.9 \pm 10.3 | 34.8 \pm 6.9 ^b | 28.1 \pm 4.9 ^b |
| AG组 | 3 | 122.0 \pm 10.5 | 63.6 \pm 7.1 ^a | 52.2 \pm 4.7 ^{ac} |
| | 5 | 124.1 \pm 10.2 | 60.3 \pm 7.1 ^b | 49.8 \pm 5.6 ^{bc} |
| | 7 | 119.8 \pm 11.4 | 51.3 \pm 8.6 ^b | 43.3 \pm 6.4 ^{bc} |
| | 9 | 126.8 \pm 12.9 | 41.0 \pm 8.8 ^b | 32.2 \pm 5.6 ^b |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 饥饿组。

酰硫代胆碱(美国Sigma公司)5 mg、0.1 mol/L醋酸缓冲液(pH5.5)6.5 mL、0.1 mol/L枸橼酸钠0.5 mL、30 mmol/L硫酸铜1 mL及蒸馏水1 mL的孵育液中37 °C孵育60 min。PBS冲洗、贴片、铺平, 牵拉率小于1:1.1, 晾干、逐级酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。另设对照实验: 孵育液中不加碘化乙酰硫代胆碱。

1.2.5 结果观察: Olympus光学显微镜下观察, 比较各组大鼠肠肌间神经丛AChE阳性神经染色强弱, 每只标本随机计数5个200倍视野, 单盲下测定被检测的外纵肌层标本AChE阳性神经元细胞数量, 用于比较各组AChE阳性神经元密度。

统计学处理 计量资料数据以mean \pm SD表示, 多组间比较采用完全随机设计方差分析, 进一步采用均数间两两比较的LSD法, SPSS13.0统计分析软件对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 小肠传输速率 小肠传输速率在饥饿后3 d开始进行性降低, 并于饥饿后9 d达最低点, S、A组各时间点比对照组明显降低, 其中3 d时A组差异显著($P < 0.05$), 其余各组差异非常显著($P < 0.01$)。A组在饥饿后3、5、7 d较S组高且有显著性差异($P < 0.05$), 饥饿后9 d A组较S组无显著差异(表1)。

2.2 回肠肌间神经丛AChE组织化学染色结果 光镜下, 对照组AChE阳性神经元染色呈棕黄色, 胞体大小不等, 形态多样, 细胞核不着色, 胞体内可见大量棕黄色或棕黑色强阳性染色颗粒; 随饥饿时间延长, 饥饿各组强阳性神经元及其胞体内强阳性染色颗粒着色逐渐变浅, 数目呈减少趋势, AChE组织化学染色对照实验结果呈阴性, 具体结果及数值如下述: 回肠肌间神经丛胆碱能神经元分布密度在饥饿后3天开始进行性

■相关报道

研究证实, 适当应用肠神经调节药物更有利于应激状态下肠神经及肠传输功能的保护, 有利于肠道黏膜屏障功能的保护, 延缓肠道内毒素积聚和细菌移位。

表 2 大鼠回肠肌间神经丛AChE阳性神经元分布密度 (mean \pm SD, $\times 200$)

| 分组 | 时间(d) | AChE阳性神经元 (个/200倍视野) |
|-----|-------|--------------------------------|
| 对照组 | 0 | 77.63 \pm 6.41 |
| 饥饿组 | 3 | 65.25 \pm 6.36 ^d |
| | 5 | 53.75 \pm 6.54 ^d |
| | 7 | 38.13 \pm 6.96 ^d |
| | 9 | 30.75 \pm 6.19 ^d |
| AG组 | 3 | 69.50 \pm 6.32 ^d |
| | 5 | 61.25 \pm 5.70 ^{ad} |
| | 7 | 47.35 \pm 7.58 ^{ad} |
| | 9 | 36.38 \pm 6.09 ^d |

^a $P < 0.05$ vs 饥饿组; ^d $P < 0.01$ vs 正常对照组。

降低, 并于饥饿后9 d达最低点, S、A组各时间点比对照组明显降低($P < 0.01$), A组在饥饿后5、7 d较S组高且有显著性差异($P < 0.05$), 饥饿后3、9 d A组较S组无显著差异(表2, 图1)。

3 讨论

在胃肠道诸多功能中, 正常的肠蠕动功能意义不仅在于参与食物的消化、吸收和排泄, 同时也是胃肠道非免疫防御的重要机制, 可防止肠内有害物质包括内毒素的积聚和限制细菌生长, 是肠腔内环境的“清道夫”^[5]。胃肠蠕动反映了胃肠道平滑肌、黏膜上皮和血管的整合的功能^[6], 其神经调节主要依赖3个系统即中枢神经、自主神经和ENS, 其中ENS起主要作用, ENS是独立的具有与脑和脊髓类似的整合和处理信息功能机制的神经系统, 可以不依赖中枢而具有高度的自主性, 因此称作胃肠道的“微型脑”^[1,7,8]。ENS主要兴奋性神经递质是乙酰

■应用要点

本文为进一步研究灾害中被困人员肠神经及肠动力功能保护提供依据。

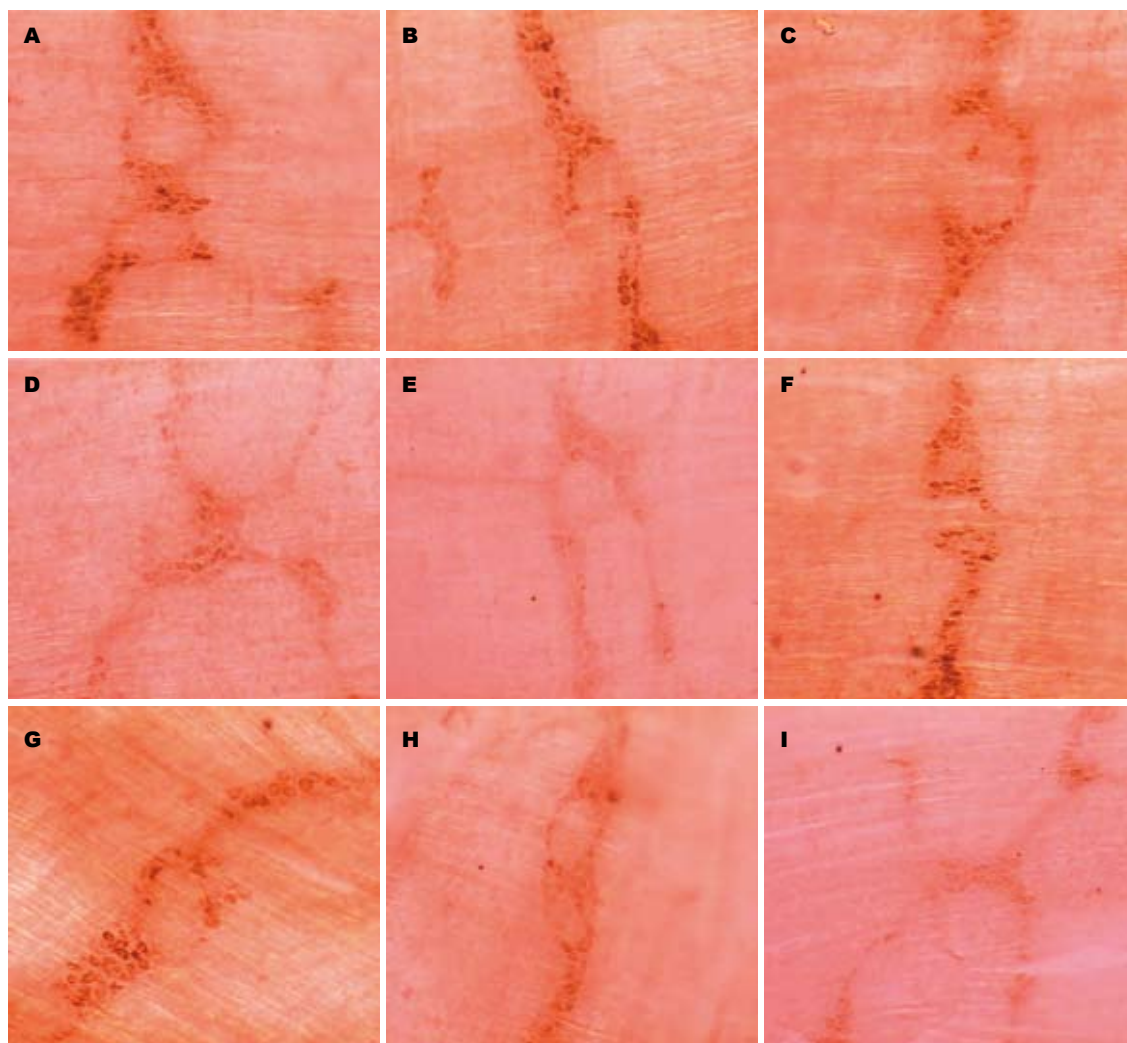


图1 大鼠回肠肌间神经丛AChE表达($\times 200$)。A: 对照组; B: 饥饿3 d组; C: 饥饿5 d组; D: 饥饿7 d组; E: 饥饿9 d组; F: AG 3 d组; G: AG 5 d组; H: AG 7 d组; I: AG 9 d组。

胆碱(acetylcholine, Ach), AchE是Ach的水解酶, AchE活性增强代表Ach释放增加, 胆碱能神经兴奋性增高。ENS与胃肠蠕动密切相关, 研究显示, 糖尿病、间断禁食应激大鼠肠胆碱能神经元分布密度异常, 同时出现肠蠕动功能损伤^[9,10]。

肠道为应激的中心器官, 在应激反应中, 机体为保证心、脑重要器官血液供应, 通过复杂的神经-内分泌系统介导, 调节全身血流重新分配, 产生选择性内脏血管痉挛, 肠道缺血、缺氧^[11], 肠黏膜屏障受损, 肠道细菌、内毒素群移位, 引起炎症反应及多种细胞因子表达, 过氧化物酶水平升高, 抗氧化防御系统的清除能力下降, 产生大量的氧自由基^[12]等肠道损伤机制。完全饥饿是一种严重应激状态, 可通过上述机制损害肠道功能, 本实验结果显示, 肠动力方面, 全饥饿组大鼠肠道传输比率明显低于对照组, 并随着饥饿时间延长进行性降低, 提示肠传输

功能障碍; ENS方面, 回肠肌间神经丛胆碱能神经元分布密度明显低于对照组, 并随着饥饿时间延长进行性降低, 提示ENS兴奋功能降低。以上结果证实饥饿应激损害ENS及胃肠运动功能, 并随饥饿时间延长, 这种损害进行性加重, ENS及胃肠运动功能损害在时间和程度上基本一致。

AG是一种具有亲核作用的胍化物, 基本的化学结构为HN-NH-C-NH, 带有一个能与缺乏电子的羰基起反应的无毒亲核胍基团, 能使过量的氧化酶失活^[13,14], AG与L-精氨酸(NO合成底物)和L-精氨酸类似物(N-单甲基-L-精氨酸, NOS竞争性抑制剂)的化学结构相似, 为iNOS的选择性抑制剂, 这些化学结构特点使AG具有独特的生化作用。研究显示, AG对应激诱导的肠黏膜损伤、肠道炎症反应、肠道微循环障碍具有保护作用^[15,16], 我们建立饥饿应激模型, 研究AG对ENS及胃肠运动的影响, 结果显示, AG组大鼠肠

道传输比率在饥饿后3、5、7 d明显高于全饥饿组, 回肠肌间神经丛胆碱能神经元分布密度在饥饿后5、7 d明显高于全饥饿组, 提示AG能一定程度减轻饥饿应激对胆碱能神经元及肠道传输功能的损伤作用, 发挥ENS及胃肠运动保护作用。

AG可能通过以下途径保护ENS及胃肠运动功能: AG能够使应激状态下肠道nNOS的mRNA转录水平升高^[17], 促进nNOS合成, 进而保持正常神经源性NO的稳定合成, 发挥其对肠道平滑肌^[18]、黏膜屏障、血管紧张度及血管渗透性的生理调节作用, 保证ENS及胃肠运动功能正常运行; 作为iNOS的选择性抑制剂, AG能抑制应激时被炎症刺激、内毒素及细胞因子激活的iNOS合成, 进而减轻诱导型NO大量合成引起的抑制线粒体呼吸链、脂质过氧化或DNA断裂等细胞毒性作用及参与炎症细胞趋化、炎症反应逐步放大等有害反应^[15], 减少应激对ENS及胃肠运动功能的伤害; AG还能降低毛细血管内白细胞的黏滞、抑制血管内皮生长因子^[14,19]。但AG的这种保护作用是有限的, 饥饿终末期, AG组较全饥饿组肠道传输比率, 胆碱能神经元分布密度无显著差异, 可能是由于神经递质合成原料耗竭, 损伤因素进行性积累加重, 胆碱能神经元结构已严重破坏, AG失去有效保护作用。

总之, 饥饿后早期给予氨基胍可明显改善肠道胆碱能神经元结构和功能, 改善肠传输功能; 但其不能完全阻止饥饿后肠神经及肠传输功能受损。

4 参考文献

- 1 Garipey CE. Developmental disorders of the enteric nervous system: genetic and molecular bases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 39: 5-11
- 2 Schemann M. Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"--the enteric nervous system. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41 Suppl 1: S4-S6
- 3 张军明, 刘芬, 任艳华, 雷亚宁, 钱旭. 肠淤血大鼠肠神经系统内胆碱能和氮能神经的改变. *解放军医学杂志* 2006; 31: 798-801
- 4 全巧云, 周纳新, 罗和生, 朱宗耀. 慢性应激大鼠结肠黏膜形态学变化及氨基胍的保护作用. *中国临床康复* 2006; 10: 100-103
- 5 史洪涛, 冷恩仁, 陈东风. 胃肠动力与肠源性内毒素血症关系的动物实验研究. *第三军医大学学报* 2001; 23: 1249-1250
- 6 Costa M, Brookes SJ, Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 2000; 47 Suppl 4: iv15-iv19; discussion iv26
- 7 Gershon MD. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S184-S193
- 8 谷成明. 胃肠动力研究进展. *世界医学杂志* 1999; 3: 7
- 9 向国春, 龙庆林, 王振华, 房殿春. 禁食对小肠传输功能损伤的实验研究. *重庆医学* 2005; 34: 1182-1183
- 10 雷亚宁, 丁友梅, 钱旭, 郑裕勇. 糖尿病大鼠胃肠动力及肌间神经丛形态学改变. *中华消化杂志* 2006; 26: 666-669
- 11 Ishimaru K, Mitsuoka H, Unno N, Inuzuka K, Nakamura S, Schmid-Schönbein GW. Pancreatic proteases and inflammatory mediators in peritoneal fluid during splanchnic arterial occlusion and reperfusion. *Shock* 2004; 22: 467-471
- 12 Tost H, Gógl A, Lendvai A, Bartha J. Effect of extracellular volume expansion and surgical stress on splanchnic blood flow and cardiac output in anesthetized rats: role of nitric oxide. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41: 452-459
- 13 刘朝巍, 石如玲, 齐锦生, 李彬, 牛涛. 氨基胍对糖尿病大鼠心肌损伤的拮抗作用. *中国病理生理杂志* 2007; 23: 505-508
- 14 吴群, 李剑欣, 曹朝晖, 刘峰, 王彩云, 张卓, 贺金莲. 维生素C和氨基胍对糖尿病大鼠肾功能的影响及机制研究. *中国现代医学杂志* 2007; 17: 558-564
- 15 杨英, 陈隆典, 陈裁容, 孙静. 一氧化氮合酶抑制剂对实验性大鼠结肠炎疗效的研究. *胃肠病学* 2007; 12: 27-30
- 16 宋冰冰, 王俊科, 盛卓人, 崔涌, 孙新艳. 诱导性一氧化氮合酶抑制药对感染性休克兔肠系膜微循环的影响. *中华麻醉学杂志* 1998; 18: 286-288
- 17 石胜军, 吴坤莹, 赵克森, 肖能坎. 氨基胍等对严重烧伤大鼠一氧化氮表达及烧伤休克的影响. *中国病理生理杂志* 2003; 19: 47-50
- 18 彭双勤, 龚红萍, 余上斌, 熊宗斌, 祝兰, 胡还忠. NO对小鼠结肠平滑肌自主收缩活动的影响及其机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2239-2243
- 19 Griffiths MJ, Messent M, MacAllister RJ, Evans TW. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 963-968

■同行评价

本研究内容具有很强的实用性, 提供了较多有意义的信息且具有一定的创新性。

编辑 李军亮 电编 何基才

被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄32例

郑文棋, 林海凤, 杨长青, 龚锦容, 吴荔珊, 张美金, 翁丽贤

■背景资料

食管贲门良性狭窄是临床上的一种常见病, 包括手术后吻合口狭窄、化学灼伤性狭窄、肿瘤放疗后单纯疤痕性狭窄、贲门失弛缓症等。近年来有不少学者研究内镜下不同类型的支架置入术在各种疾病中的应用。

郑文棋, 林海凤, 杨长青, 龚锦容, 吴荔珊, 张美金, 翁丽贤, 福建省莆田学院附属医院 福建医科大学教学医院消化内科 福建省莆田市 351100

作者贡献分布: 郑文棋对此文作主要贡献; 此课题由郑文棋、林海凤、杨长青及龚锦容设计; 研究过程由郑文棋、林海凤、杨长青、龚锦容、吴荔珊、张美金及翁丽贤共同操作完成; 数据分析由林海凤完成; 本论文写作由郑文棋与林海凤完成。

通讯作者: 郑文棋, 主任医师, 351100, 福建省莆田市, 莆田学院附属医院消化内科。phybee@126.com

收稿日期: 2009-12-01 修回日期: 2010-01-28

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Treatment of benign esophageal and cardial stricture with covered esophageal stents: an analysis of 32 cases

Wen-Qi Zheng, Hai-Feng Lin, Chang-Qing Yang, Jin-Rong Gong, Li-Shan Wu, Mei-Jin Zhang, Li-Xian Weng

Wen-Qi Zheng, Hai-Feng Lin, Chang-Qing Yang, Jin-Rong Gong, Li-Shan Wu, Mei-Jin Zhang, Li-Xian Weng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Putian University & Teaching Hospital of Fujian Medical University, Putian 351100, Fujian Province, China

Correspondence to: Wen-Qi Zheng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Putian University, Putian 351100, Fujian Province, China. phybee@126.com

Received: 2009-12-01 Revised: 2010-01-28

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of covered esophageal stents for the treatment of benign esophageal and cardial stricture.

METHODS: Thirty two patients with benign esophageal and cardial stricture were selected. Appropriate stents were inserted depending on particular patient's condition. The success rate of stent insertion, the improvement in swallow function, the complications and their management were recorded.

RESULTS: Stents were placed successfully in all patients. Dysphagia was resolved persistently in all patients after stent placement. No serious complications, such as esophageal perforation, and massive hemorrhage, occurred. However,

all patients suffered varying degrees of chest pain. Four patients developed severe chest pain but got relieved after intramuscular injection of analgesics. Stent migration occurred in 3 patients. Granulation tissue hyperplasia at the proximal portion of the stent occurred in one patient. Esophageal fistula can be closed after stent placement. Stents could be removed successfully under endoscopic assistance six months after stent placement.

CONCLUSION: Covered esophageal stent insertion is a safe and effective treatment for benign esophageal and cardial stricture.

Key Words: Esophageal stricture; Benignity; Stent; Treatment

Zheng WQ, Lin HF, Yang CQ, Gong JR, Wu LS, Zhang MJ, Weng LX. Treatment of benign esophageal and cardial stricture with covered esophageal stents: an analysis of 32 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 830-833

摘要

目的: 评价被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄的疗效和安全性。

方法: 选择食管贲门良性狭窄患者32例, 根据不同患者选择合适的被膜食管支架置入狭窄段。观察操作成功率、吞咽困难改善情况、术中术后并发症的发生及其处理等。

结果: 32例均一次性成功置入支架, 支架置入后吞咽困难症状均得到持续改善。所有患者未出现食管穿孔、出血等严重并发症, 但均出现不同程度的胸骨后闷胀隐痛不适, 其中4例患者胸痛较明显, 肌注止痛剂后缓解; 3例出现支架脱落; 1例出现支架近端肉芽组织增生。支架置入后可有效封闭食管气管瘘、食管纵隔瘘等。术后6 mo可经内镜成功取出支架。

结论: 内镜下置入被膜食管支架是治疗食管贲门良性狭窄的一种安全、有效的方法。

关键词: 食管狭窄; 良性; 支架; 治疗

■同行评议者

姜慧卿, 教授, 河北医科大学第二医院消化科

郑文棋, 林海凤, 杨长青, 龚锦容, 吴荔珊, 张美金, 翁丽贤. 被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄32例. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 830-833

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/830.asp>

0 引言

食管贲门良性狭窄包括手术后吻合口狭窄、化学灼伤性狭窄、肿瘤放疗后单纯疤痕性狭窄、贲门失弛缓症等. 食管贲门良性狭窄既往曾采取手术治疗, 随着微创概念的推广及介入医学的迅速发展, 出现了内镜下探条或球囊导管扩张术、永久性金属支架扩张术、暂时性不带膜或带膜金属支架扩张术等. 每种治疗方法各有优缺点, 有学者提出内镜下扩张术和永久性金属支架扩张术的中远期疗效欠佳^[1], 暂时性带膜金属支架扩张术有望能较长期有效缓解吞咽困难等症状^[2,3]. 为探寻有效的治疗方法, 我们进行了被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄的临床观察, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-12/2009-03莆田学院附属医院共治疗食管贲门良性狭窄32例, 其中男25例, 女7例, 年龄44-80(平均年龄64)岁. 其中单纯食管癌或贲门癌术后吻合口狭窄19例, 吻合口狭窄合并食管气管瘘3例, 合并食管纵隔瘘5例, 食管癌放疗后单纯疤痕性狭窄2例, 贲门失弛缓症2例, 纵隔淋巴结肿大压迫中段食管致食管狭窄1例.

1.2 方法 根据不同患者选择合适的被膜食管支架置入狭窄段. 本研究采用江苏省淮安市西格玛公司的CZES型覆膜食管支架. 术后观察进食改善情况及可能出现的并发症, 并积极处理. 3 d后行泛影葡胺造影了解支架情况, 术后1、3、6 mo行造影或胃镜检查观察支架扩张以及移位、脱落、肉芽组织增生等. 术后6 mo取出支架, 以后6-12 mo复查胃镜.

2 结果

32例患者均一次性成功置入支架, 共置入支架33个(有1例因狭窄段较长, 且合并有中段食管自发性破裂, 予重叠置入2支被膜食管支架), 操作成功率100%.

2.1 吞咽困难缓解情况 吞咽困难根据Stooler分级: I级: 能进软食; II级: 能进半流质; III级: 仅能进流质饮食; IV级: 不能进食. 术前II级5例, III级21例, IV级6例; 术后I级21例, II级11例; 术后梗阻解除, 吞咽困难缓解I-III级. 32例患者

随访4-30 mo, 中位随访时间6.5 mo, 吞咽困难症状仍能得到持续改善.

2.2 术中术后并发症及处理 所有患者术中术后均未出现操作相关性食管穿孔、大出血等严重并发症, 但均出现不同程度的胸骨后闷胀隐痛不适. 术后轻度的胸痛、胸部异物感无需特殊处理, 大部分在1-3 d后缓解. 4例患者胸骨后疼痛明显, 肌注止痛剂后缓解; 3例患者取出支架时出现少量渗血, 予制酸、止血治疗后好转; 2例患者出现反流症状, 予制酸剂及黏膜保护剂后缓解; 1例出现肉团堵塞支架, 予胃镜下取出肉团; 3例分别在术后15 d、2 mo及5 mo出现支架脱落予胃镜下取出支架后重新置入; 1例在术后6 mo出现肉芽组织长入支架近端, 予胃镜下重叠置入支架; 其余患者未发现明显支架端口黏膜增生及支架再狭窄等.

2.3 瘘口封闭效果 32例患者中有3例合并食管气管瘘, 5例合并食管纵隔瘘, 目前瘘口均已封闭, 支架已取出.

3 讨论

食管良性狭窄是食管疾病的常见并发症, 主要引起吞咽困难等临床症状, 严重者甚至无法进食, 影响了患者的生活质量并可危及生命, 因此, 探寻一种安全有效的治疗方法显得尤为重要. 多数学者认为暂时性覆膜金属支架置入术是治疗食管良性狭窄的最有效方法之一^[1-7]. 当然, 也有部分学者持不同观点. 2008年来自美国威斯康星大学的1项双中心前瞻性研究: 该研究应用一种可取自扩性的聚四氟乙烯树脂支架治疗难治性食管良性狭窄, 结果只有约40%的患者吞咽困难症状能获得长期缓解, 但这种操作具有较大的风险, 因此建议要谨慎选择操作患者^[8]. 另有学者指出在金属支架放置期间可能有效, 但是在支架取出后吞咽困难的复发率高, 尤其是长段狭窄的患者^[9]. 国内也有学者研究指出, 对于难治性食管良性狭窄, 可采用支架治疗, 但是在安全性及远期疗效上选用非自扩支架优于自扩金属支架^[10]. 基于以上, 我们进行了被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄的临床观察.

本研究中32例患者成功置入支架后吞咽困难症状均可改善I-III级, 与术前比较有显著差异, 这与国内外许多学者的报道结果相一致. 通过随访4-30 mo(中位随访时间6.5 mo), 吞咽困难症状仍能得到持续改善. 说明了暂时性置入被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄的近期及中

■应用要点

本研究进行了内镜下被膜食管支架置入术治疗食管贲门良性狭窄的临床观察. 研究显示内镜下置入被膜食管支架治疗食管贲门良性狭窄是安全、有效的, 可以较满意地提高患者的生活质量.

■同行评价

食管贲门良性狭窄是临床上常见的一种病理现象,对其治疗的研究具有临床实用价值。

期效果是值得肯定的。我们认为应优先选择暂时性被膜食管支架置入术治疗食管贲门良性狭窄,而并非永久性金属支架扩张术、内镜下球囊扩张术。分析如下:(1)食管贲门良性狭窄的患者可能还有相当长的一段生存期,金属支架若“永久性”地置入狭窄段毕竟是一异物,可能长期刺激食管黏膜致肉芽组织增生、再狭窄、食管气管瘘等,况且其中远期的有效性及安全性尚有待进一步考究。(2)内镜下球囊扩张术对食管壁肌层的撕裂是急性、不规则的,因此修复时产生的疤痕较多,易导致再狭窄。支架置入术是随着支架的逐渐扩张造成食管壁肌层慢性均匀撕裂,修复时疤痕产生少,再狭窄发生率低。且有研究显示即使支架移除后出现再狭窄的患者对后续(球囊扩张或二次支架置入等)治疗也较前敏感,效果较放支架前要好^[11]。而且球囊扩张术的疗效受球囊位置、压力等多种因素影响,比较不易掌握。研究还显示暂时性被膜食管支架置入术不仅可以有效缓解吞咽困难等症状,同时还可以有效封闭食管气管瘘、食管纵隔瘘等,这是其他介入手段所无法做到的。一些新型的生物可降解的食管支架正在进一步的研发当中,其安全性、有效性及并发症的发生率等正在进一步的研究当中^[12]。因此,我们认为在新型的生物可降解的食管支架普及之前,暂时性被膜食管支架置入术仍应是治疗食管贲门良性狭窄的首选方法。

32例术中术后均未出现操作相关性食管穿孔、大出血等严重并发症,因此我们认为只要严格掌握手术适应证、禁忌证,严防暴力操作,食管支架置入术仍是一种安全的操作。该操作最常见的并发症为胸骨后闷胀隐痛不适。这是因为支架扩张造成食管壁肌层的撕裂和贲门生理结构的破坏造成的,疼痛大多能忍受并在数日后自行缓解,较剧烈者肌注止痛剂后亦可缓解。研究中亦有少数患者出现出血、反流、食物堵塞、支架脱落等并发症,但经过处理后均已好转。这与其他学者研究所阐述的内镜下食管支架置入术的并发症相一致^[13]。

支架置入后多长时间再取出最合适,目前对于这一问题国内外学者尚未统一意见。不同的学者在其各自的研究中支架放置的时间均不同。支架置入体内后随着温度上升而逐渐扩张,当支架温度达35℃-37℃时,约需12-24 h,支架即可完全扩张达预定的直径。早期有学者认为支架放置的时间越长,黏膜增生包裹支架两端

致胃镜下取出支架的难度越大。因此认为,支架放置的最佳时间为4-8 wk^[14],甚至有人认为最好在1 wk内取出^[15]。但是,我们可以发现在一些随访研究中吞咽困难复发率较高的患者其支架放置的时间较短。况且,随着科技的进步,现在支架的质量较前已有明显改善,异物感轻,并发症少。有学者用个体化设计的全覆膜金属支架治疗难治性食管良性狭窄,最长放置时间达12 mo,竟无1例因为黏膜增生致支架再狭窄或无法取出^[6]。因此,我们认为应在尽量减少黏膜增生、保证支架可再取出的前提下延长支架放置时间,在两者中寻找一平衡点。本研究中支架放置时间为6 mo,结果显示在随访满6 mo的患者中仅1例在术后6 mo出现肉芽组织长入支架近端,其余患者未发现黏膜增生等现象,支架可顺利取出。且随访4-30 mo(中位随访时间6.5 mo),吞咽困难症状仍能得到持续改善。当然,我们这次临床观察的例数仅32例,且随访时间仍不够长,因此在以后的研究中,我们准备进一步扩大临床观察的患者数量并延长随访时间以不断的探索改进。

总之,内镜下置入被膜食管支架是治疗食管贲门良性狭窄的一种安全、有效的方法,可以满意地提高患者的生活质量。

4 参考文献

- 1 陈维雄,程英升,杨仁杰,李明华,尚克中,庄奇新,陈尼维. 食管良性狭窄金属内支架介入治疗随访研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 333-336
- 2 Cheng YS, Li MH, Chen WX, Chen NW, Zhuang QX, Shang KZ. Temporary partially-covered metal stent insertion in benign esophageal stricture. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2359-2361
- 3 Repici A, Conio M, De Angelis C, Battaglia E, Musso A, Pellicano R, Goss M, Venezia G, Rizzetto M, Saracco G. Temporary placement of an expandable polyester silicone-covered stent for treatment of refractory benign esophageal strictures. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 513-519
- 4 吴以龙. 36例食管支架放置术的临床分析. 微创医学 2008; 3: 626-627
- 5 洪晓翔. 复杂食管狭窄内支架置入术的临床分析. 临床消化病杂志 2007; 19: 374-376
- 6 王志强,王向东,孙刚,黄启阳,杨云生. 全覆膜可取出金属支架治疗难治性食管良性狭窄. 中华消化内镜杂志 2005; 22: 376-379
- 7 肖永祺,樊志勇,方海宁,邵宏华,谭伟,卢建英. 食管支架置入术36例的临床应用分析. 广西医学 2008; 30: 1768-1769
- 8 Dua KS, Vleggaar FP, Santharam R, Siersema PD. Removable self-expanding plastic esophageal stent as a continuous, non-permanent dilator in treating refractory benign esophageal strictures: a prospective two-center study. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2988-2994
- 9 Kim JH, Song HY, Choi EK, Kim KR, Shin JH, Lim JO. Temporary metallic stent placement in

- the treatment of refractory benign esophageal strictures: results and factors associated with outcome in 55 patients. *Eur Radiol* 2009; 19: 384-390
- 10 傅剑华, 戎铁华, 黄植藩, 杨名添, 林鹏, 李小东, 马国伟. 非自扩支架与自扩金属支架治疗难治性食管良性狭窄的对照研究. *中华胃肠外科杂志* 2001; 4: 228-230
 - 11 裴庆山, 刘吉勇. 食管支架研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3410-3415
 - 12 Saito Y, Tanaka T, Andoh A, Minematsu H, Hata K, Tsujikawa T, Nitta N, Murata K, Fujiyama Y. Novel biodegradable stents for benign esophageal strictures following endoscopic submucosal dissection. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 330-333
 - 13 朱文玉, 沈丰, 范谷洪, 吴军. 内支架治疗食管恶性狭窄的并发症及处理. *上海医学影像* 2007; 16: 215-217
 - 14 Song HY, Park SI, Do YS, Yoon HK, Sung KB, Sohn KH, Min YI. Expandable metallic stent placement in patients with benign esophageal strictures: results of long-term follow-up. *Radiology* 1997; 203: 131-136
 - 15 程英升, 杨仁杰, 尚克中, 李明华, 陈维雄, 庄奇新, 许建荣, 陈尼维, 杨世坝. 暂时性内支架治疗食管良性狭窄疗效分析. *介入放射学杂志* 1999; 8: 31-33

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, 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.

胃食管反流病患者生活质量调查187例

瞿国强, 胡宏艳, 李安, 郭金芝, 梁先发, 汤胜君, 龙翔, 钱立康, 程雪霞, 曹彬

■背景资料

GERD已成为严重影响人们生活的主要消化疾病之一。资料显示甚至比糖尿病、高血压等患者更差。GERD患者因生活质量差而劳动力下降, 给社会及家庭造成了重大的疾病负担。因此GERD患者生活质量的研究具有重要临床意义。

瞿国强, 胡宏艳, 李安, 郭金芝, 梁先发, 汤胜君, 钱立康, 程雪霞, 曹彬, 安徽省铜陵市第四人民医院消化内科 安徽省铜陵市 244000

龙翔, 安徽省铜陵市第四人民医院儿童保健科 安徽省铜陵市 244000

安徽省铜陵市卫生局科研基金资助项目, No. 卫科研[2007]04
作者贡献分布: 此课题由瞿国强设计; 研究过程由瞿国强、胡宏艳、李安、郭金芝、梁先发、汤胜君、钱立康、程雪霞及曹彬操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由瞿国强与龙翔提供; 数据分析由瞿国强与龙翔完成; 本论文写作由瞿国强完成。

通讯作者: 瞿国强, 主治医师, 244000, 安徽省铜陵市杨家山路98号, 安徽省铜陵市第四人民医院消化内科. qqqahtl@163.com
电话: 0562-2827821

收稿日期: 2009-12-16 修回日期: 2010-01-20

接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-18

Quality of life in patients with gastroesophageal reflux disease: an analysis of 187 cases

Guo-Qiang Qu, Hong-Yan Hu, An Li, Jin-Zhi Guo, Xian-Fa Liang, Sheng-Jun Tang, Xiang Long, Li-Kang Qian, Xue-Xia Cheng, Bin Cao

Guo-Qiang Qu, Hong-Yan Hu, An Li, Jin-Zhi Guo, Xian-Fa Liang, Sheng-Jun Tang, Li-Kang Qian, Xue-Xia Cheng, Bin Cao, Department of Gastroenterology, the Fourth People's Hospital of Tongling, Tongling 244000, Anhui Province, China

Xiang Long, Department of the Child Health Care, the Fourth People's Hospital of Tongling, Tongling 244000, Anhui Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of the Board of Health of Tongling, No. [2007]04

Correspondence to: Guo-Qiang Qu, Department of Gastroenterology, the Fourth People's Hospital of Tongling, 98 Yangjiashan Road, Tongling 244000, Anhui Province, China. qqqahtl@163.com

Received: 2009-12-16 Revised: 2010-01-20

Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To analyze the quality of life in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD) attending the gastroenterology outpatient clinics of three hospitals in Tongling, Anhui Province.

METHODS: GERD patients were identified from consecutive patients attending the gastroenterology outpatient clinics of three hospitals in Tongling, Anhui Province from June 2008 to August 2008 according to the clinical diagnostic

criteria of GERD (RDQ score ≥ 12) by using the validated Chinese version Reflux Disease Questionnaire (RDQ) and the Los Angeles Classification for diagnosis and grading of reflux esophagitis (RE). Each GERD patient was matched to two healthy subjects. The impact of GERD on the quality of life in these subjects was evaluated using the Chinese version of the Short Form-36 (SF-36) survey scale. The survey data were used to create a database with the Epi Data 3.0 program. Statistical analysis was performed using the SPSS 13.0 software package.

RESULTS: A total of 199 GERD patients were identified from 7 352 consecutive outpatients, of which 187 patients participated in the survey. The quality of life score (SF-36) was significantly lower in GERD patients than in healthy controls, in nonerosive reflux disease (NERD) patients than in RE patients, and in female GERD patients than in male GERD patients.

CONCLUSION: The quality of life declines obviously in NERD patients and female GERD patients when compared with RE patients and male GERD patients, respectively. Psychological factors may play an important role in the development of GERD.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Epidemiology; Quality of life

Qu GQ, Hu HY, Li A, Guo JZ, Liang XF, Tang SJ, Long X, Qian LK, Cheng XX, Cao B. Quality of life in patients with gastroesophageal reflux disease: an analysis of 187 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 834-838

摘要

目的: 调查消化门诊人群胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)生活质量状况。

方法: 针对安徽铜陵三家市级医院2008-06/08消化内科门诊连续就诊人群, 根据国内通用的GERD临床诊断标准(RDQ总积分 ≥ 12 分)和洛杉矶反流性食管炎(RE)内镜诊断标准进行GERD调查和诊断。采用中文版SF-36生存质

■同行评议者

刘海峰, 教授, 武警总医院消化科

量表进行GERD患者生活质量状况地评估。所有调查资料使用Epi Data 3.0软件建立数据库, 利用SPSS13.0做统计学分析。根据数据的分布特征, 分别采用 χ^2 检验、非参数检验、两样本 t 检验。

结果: 三家市级医院消化内科门诊7 352例连续就诊患者中共调查诊断出GERD 199例。187例GERD患者实际参与了生活质量状况的调查, 选取了374例同年龄同性别的正常健康人群进行了病例对照研究。结果显示, GERD病例组8个纬度生活质量评分、SF-36量表总分均明显低于健康对照组, 有显著性差异($P<0.05$)。非糜烂性反流病(nonerosive reflux disease, NERD)组7个纬度生活质量评分、SF-36量表总分均明显低于反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)组患者, 有显著性差异($P<0.05$)。无论NERD或RE组女性患者生活质量量表总分均明显低于男性, 有显著性差异($P<0.05$)。

结论: GERD患者生活质量较正常健康人群明显下降; 在NERD、女性患者中更为突出。精神心理因素可能在GERD发病中起到一定作用。

关键词: 胃食管反流病; 流行病学; 生活质量

瞿国强, 胡宏艳, 李安, 郭金芝, 梁先发, 汤胜君, 龙翔, 钱立康, 程雪霞, 曹彬. 胃食管反流病患者生活质量调查187例. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 834-838
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/834.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是由多种因素造成的消化系动力障碍性疾病^[1], 又根据内镜下有无食管炎表现分为反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)和非糜烂性反流病(nonerosive reflux disease, NERD)^[1]。GERD临床十分常见, 且发病率呈逐年增长趋势^[2], 已成为严重影响人们生活质量的主要消化疾病之一^[3]。有资料显示GERD无论是RE或NERD, 其生活质量均较健康人群明显下降, 甚至在某些方面比一些慢性器质性疾病如糖尿病、高血压等患者更差^[4]。GERD患者因生活质量差而劳动力下降, 给社会及家庭也造成了重大的负担^[5]。因此, 本研究针对安徽铜陵三家市级医院消化内科门诊连续就诊人群进行了GERD的诊断与调查, 旨在分析本地区GERD患者的生活质量, 为改善本地区GERD生活质量状况提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 采用症状问卷筛查法, 针对2008-06/08本地区三家市级医院(安徽铜陵市第一、第四人民医院和有色职工总医院)消化内科门诊连续就诊的人群进行筛查。凡有烧心、反食、反酸、非心源性胸痛反流症状之一的患者均作为入选对象, 剔除重复病例。所有入选对象均进行国内通用的反流性疾病问卷(reflux disease questionnaire, RDQ)调查和胃镜检查, 凡符合诊断标准者即为本组所需GERD病例。健康对照者在各社区居委会或社区卫生服务中心(站)随机抽取产生。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: 凡是符合以下任何一项标准者即为GERD, 排除重复病例。(1)国内通用的GERD临床诊断标准^[6]: 有典型“烧心、反流”等不适症状, 且RDQ症状总积分 ≥ 12 分者; 根据罗马III标准排除功能性烧心、食管源性胸痛以及功能性消化不良等且无器质性疾病、无手术史。这些患者再结合胃镜进一步区分NERD或RE。(2)内镜标准: 凡是内镜显示食管远端黏膜有糜烂破损者均为RE, 分级标准参照洛杉矶RE内镜分级标准^[1], 排除化学、物理及霉菌性食管炎等。

1.2.2 调查方法: 所有入选对象均进行RDQ问卷和胃镜检查, 根据诊断标准确立GERD病例。调查中每发现1例GERD病例, 选取2例同年龄同性别健康志愿者, 采用中文版SF-36生活质量量表进行GERD患者生活质量状况的病例对照研究。

1.2.3 调查方式与内容: 所有被调查对象均由经严格培训的消化内科及内镜医师和护师等直接面对面、以询问填写的方式进行问卷调查。内容涉及人口学特征资料、中文版RDQ问卷、内镜资料、SF-36量表等内容。

1.2.4 RDQ症状问卷调查与积分方法: RDQ问卷主要以被调查者过去4 wk中烧心、反流(反食)、非心源性胸痛和反酸四种为统计症状。根据这4种症状的频次及严重程度调查计分, 积分为各项症状出现的频次与程度的积分相加。具体RDQ积分方法参照中国GERD研究协作组推荐的国内通用的方法^[6]。

1.2.5 GERD生活质量评估与SF-36量表简介: 本组采用中文版SF-36量表进行GERD患者生活质量地评估。该量表^[7]共有8个维度和36个条目, 还有1个条目-健康变化(HT)条目用于评价对健康状况总体变化的主观感受。这8个维度分别是生

■研发前沿

GERD发病率呈逐年增长趋势, 是近年来消化疾病研究的热点。GERD是慢性病, 病情易反复, 治疗效果差, 严重影响着患者的健康状况和生活质量。近年来GERD生活质量的研究受到广泛关注, 而国内学者对此研究却不多。

■相关报道

张艳丽等报道RE和NERD组生活质量各纬度和综合评分均较健康人群明显下降, 而NERD在躯体和精神方面的生活质量则更差。GERD患者生活质量下降很可能与患者的异常精神心理状态有关。

■创新盘点

本文比较了NERD与RE、男女性别之间的差异,生活质量下降在NERD和女性患者中则更为突出。进一步探讨机体性激素水平的变化与GERD症状的发生和生活质量的关系,深入研究精神心理因素在NERD和女性患者发病机制中的作用,将有助于指导临床治疗。

表 1 病例组和健康对照组SF-36量表各项纬度的非参检验

| | GH1 | PF1 | RP1 | BP1 | SF1 | RE1 | MH1 | vt1 |
|----------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 病例组(中位数) | 67.00 | 95.00 | 84.00 | 62.00 | 62.50 | 100.00 | 84.00 | 77.50 |
| 对照组(中位数) | 72.00 | 100.00 | 100.00 | 84.00 | 62.50 | 66.67 | 86.00 | 80.00 |
| 最大值 | 100.00 | 140.00 | 100.00 | 100.00 | 87.50 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 最小值 | 0.00 | 10.00 | 0.00 | 12.50 | 12.50 | 0.00 | 4.00 | 0.00 |
| Z值 | -10.592 | -7.155 | -11.611 | -7.117 | -9.435 | -4.825 | -9.408 | -7.858 |
| P值 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |

理功能(PF)、生理职能(RP)、躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(VT)、社会功能(SF)、情感职能(RE)、精神健康(MH)。8个维度各自包括不同的条目,采用评分方法也不同。而健康变化(HT)条目不进行重新评分;SF-36的主要统计指标是计算8个纬度的健康得分和反映健康变化(HT)条目地评分。根据8个纬度各个条目的重新评分值,可以计算出8个纬度的初得分和终得分。因为各纬度包含的条目不同,初得分不便于相互比较。对初得分进行标准公式转换即可得到终得分,终得分为0-100,可以用于纬度间的相互比较。各维度得分高低能够直接反映健康状况的好坏,得分高说明健康状况好。

统计学处理 所有调查资料均输入电脑,资料实行双人录入双人校对,使用Epi Data 3.0软件建立数据库,利用SPSS13.0进行统计学处理。根据数据的分布特征,分别采用 χ^2 检验、非参数检验、两样本t检验等方法。

2 结果

本地区三家医院消化内科门诊7 352例连续就诊患者中共调查诊断出GERD 199例,其中RE 94例,NERD 105例,排除重复病例。187例GERD患者实际参与了生活质量状况的调查,按照1:2配比选取374例同年龄同性别的正常健康人群进行了病例对照研究。收回有效调查问卷病例组187份,对照组374份。

2.1 各纬度生活质量状况分析与SF-36量表总分比较 GERD病例组8个纬度生活质量评分、SF-36量表总分均明显低于对照组,有显著性差异($P<0.05$,表1, 2)。NERD组7个纬度生活质量评分、量表总分均明显低于RE组,有显著性差异($P<0.05$,表2, 3)。

2.2 GERD男性患者与女性患者的生活质量状况比较 GERD病例组中,无论NERD组或RE组,女性生活质量量表总分均明显低于男性,有显著

表 2 不同组SF-36量表总分的比较

| 分组 | 量表总分 | t值 | P值 |
|-------|-----------------|---------|-------|
| RE组 | 531.21 ± 159.87 | 3.190 | 0.002 |
| NERD组 | 452.08 ± 176.67 | | |
| 病例组 | 489.52 ± 173.07 | -13.294 | 0.001 |
| 对照组 | 642.29 ± 100.03 | | |

性差异($P<0.05$,表4)。

3 讨论

GERD是近年来消化疾病学研究的热点^[8]。GERD是慢性病,病情易反复,治疗效果差;反酸、烧灼感和反食严重影响着患者的健康状况和生活质量^[9]。近年来,GERD患者生活质量的研究开始受到广泛关注。然而国内学者对此研究却较少^[10]。

GERD健康相关生活质量量表(GERD-HRQL)属于疾病专用问卷,侧重反映酸反流对日常生活的影响,对全面评估患者的生活质量有局限性,适宜于临床对生活质量治疗效果的评价^[11]。而SF-36量表是一个普适性量表^[7],近年来越来越多地被用于各种慢性疾病对生活质量影响的评估。该量表是由美国波士顿健康研究所研制的简明健康测量量表,是从量化的角度,较为全面、直观地反映患者生理、心理和社会功能等方面的健康状况,注重生理和心理健康两方面的评价^[7]。量表的生理功能(PF)、生理职能(RP)和躯体疼痛(BP)注重生理方面,情感职能(RE)和精神健康(MH)注重心理方面,而总体健康(GH)、活力(VT)和社会功能(SF)3个维度同时受生理和心理两个方面的影响。健康变化(HT)条目是对健康转变状况的自评。各个维度的得分高低能够直接反映健康状况的好坏,得分高说明健康状况好。SF-36量表可以综合评价出GERD患者和普通人群生活质量的差别,而且能反映出不同疾病和症状对患者健康生活质量的

表 3 RE组和NERD组患者SF-36量表各项纬度的非参检验

| | GH1 | PF1 | RP1 | BP1 | SF1 | RE1 | MHI | vt1 |
|------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| RE组(中位数) | 47.00 | 90.00 | 50.00 | 72.00 | 62.50 | 66.67 | 72.00 | 67.50 |
| NERD组(中位数) | 45.00 | 85.00 | 25.00 | 62.00 | 62.50 | 33.33 | 68.00 | 60.00 |
| 最大值 | 97.00 | 140.00 | 100.00 | 100.00 | 87.50 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 最小值 | 0.00 | 10.00 | 0.00 | 12.00 | 12.50 | 0.00 | 4.00 | 0.00 |
| Z值 | -3.113 | -3.451 | -2.354 | -2.809 | -0.485 | -2.329 | -2.662 | -2.825 |
| P值 | 0.002 | 0.001 | 0.019 | 0.005 | 0.628 | 0.020 | 0.008 | 0.005 |

表 4 男女性别差异在不同组别中SF-36量表总分的比较

| 分组 | 性别 | 量表总分 | Z值 | P值 |
|-------|----|-----------------|-------|-------|
| RE组 | 男 | 531.24 ± 159.87 | 1.525 | 0.002 |
| | 女 | 452.08 ± 176.66 | | |
| NERD组 | 男 | 506.70 ± 167.60 | 3.510 | 0.001 |
| | 女 | 387.76 ± 166.67 | | |
| 病例组 | 男 | 528.40 ± 161.60 | 4.380 | 0.001 |
| | 女 | 417.15 ± 171.58 | | |

影响及治疗前后生活质量的变化,也可以对同一病种的不同亚群进行比较^[7,12]。因此本研究采用SF-36量表进行了GERD患者生活质量地评估。

本组结果显示GERD病例组8个纬度生活质量评分和量表总分均明显低于健康对照组,有显著性差异;两个亚组中NERD组7个纬度生活质量评分和量表总分均明显低于RE组,说明与健康人群比较,GERD患者生活质量明显下降。与RE患者比较,NERD患者生活质量则更差,提示NERD与RE可能是两种不同的疾病状态,表现在对生活质量的影晌上也有不同。张艳丽等^[13]也报道RE和NERD组生活质量各纬度和综合评分均较健康人群明显下降,而NERD在躯体和精神方面的生活质量则更差。

本组进行了男性与女性患者的生活质量量表总分地比较,结果显示无论是NERD或RE,女性患者量表总分均明显低于男性;说明与男性患者比较,无论是NERD还是RE,女性患者生活质量更差,国内尚罕见报道,提示男性与女性患者之间也可能存在病因发病机制的差异,可能是两类不同的疾患者群,值得临床进一步地研究和探讨。美国40个临床中心进行了1项性激素水平与GERD症状发生的关系的试验,结果显示对绝经期妇女单独给予雌激素治疗,而不加孕激素治疗可能会导致GER症状的发生;提示某些生理性激素如雌激素等性激素水平有可能参与了GERD的发病^[14]。因此本组男性与女性患者

之间的差异很可能与其性激素等生理激素水平有关,进一步从生理性激素水平的变化角度来探讨机体性激素水平的变化与GERD症状的发生和生活质量状况的关系,可能会有新的发现。

SF-36量表同时注重生理和心理健康两方面的评价。GERD患者生活质量下降很可能与患者的异常精神心理状态有关^[13]。精神心理异常状态可能会对患者生活质量产生负面的影响,而这一影响可能在NERD和女性患者中则表现地更为突出。进一步深入研究精神心理因素在NERD和女性患者发病机制中的作用,有助于指导临床医师进行更有效的治疗。临床上,慢性消化系统疾病如肠易激综合征、GERD对患者生活质量地影响明显;在长期治疗与反复的过程中,很多患者出现抑郁和/或焦虑。因此,改善慢性疾病患者的生活质量亦是治疗的重点目标之一^[15]。

总之,GERD患者的生活质量较正常健康人群明显下降,值得重视的是,表现在NERD患者和女性患者中则更为突出。精神心理异常可能对患者生活质量产生负面的影响。临床医师在治疗上应注重患者,尤其是NERD患者和女性患者给予及时地心理疏导或心理治疗,着力改善其生活质量状况,强调躯体疾病和精神心理的整体治疗,努力提高其生活质量,可能为治疗带来新的突破。

致谢: 感谢安徽医科大学附属省立医院消化科王巧民教授的指导,及安徽铜陵市第一人民医院消化科束庆文主任、有色职工总医院消化科何向阳副院长的大力支持与帮助。

4 参考文献

- 1 陆再英,钟南山. 内科学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 372-375
- 2 Shaw MJ, Talley NJ, Beebe TJ, Rockwood T, Carlsson R, Adlis S, Fendrick AM, Jones R, Dent J, Bytzer P. Initial validation of a diagnostic questionnaire for gastroesophageal reflux disease.

■应用要点

改善GERD患者生活质量是治疗的重点目标之一。精神心理异常可能对GERD患者生活质量产生负面的影响。临床治疗上应注重患者,尤其是NERD和女性患者给予及时地心理疏导或心理治疗,着力改善其生活质量,强调躯体疾病和精神心理的整体治疗。

■同行评价

文章的科学性和可读性较好,具有一定的创新性,对临床工作有一定的指导作用,较好地反映我国胃食管反流病临床研究的先进水平。

- 3 *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 52-57
- 章宏, 徐晶, 厉有名, 虞朝辉, 许国强, 陈春晓, 季峰. 浙江省内科门诊人群胃食管反流病及危险因素流行病学调查. *中华消化杂志* 2007; 27: 443-446
- 4 Wiklund I. Review of the quality of life and burden of illness in gastroesophageal reflux disease. *Dig Dis* 2004; 22: 108-114
- 5 Sifrim D, Zhang X. Pathophysiology of GERD in China: the same factors at a lower scale. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2094-2097
- 6 中国胃食管反流病研究协作组. 反流性疾病问卷在胃食管反流病诊断中的价值. *中华消化杂志* 2003; 23: 651-654
- 7 魏朝晖, 莫一心, 陈和年. 生命质量测定量表SF-36的应用. *国外医学·社会医学分册* 1997; 14: 145-147
- 8 Wong BC, Kinoshita Y. Systematic review on epidemiology of gastroesophageal reflux disease in Asia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 398-407
- 9 庄永芳, 赵金光, 周永红, 李九菊. 张掖市门诊人群胃食管反流症状流行病学调查及影响因素分析. *医学综述* 2009; 15: 1109-1111
- 10 牟向东, 谢鹏雁. 胃食管反流病生活质量的研究现状. *社区医学杂志* 2008; 6: 47-49
- 11 Fass R, Tougas G. Functional heartburn: the stimulus, the pain, and the brain. *Gut* 2002; 51: 885-892
- 12 刘晓红, 柯美云, 宋志强, 罗金燕, 袁耀宗, 侯晓华, 朱有玲, 孙菁, 查慧. 雷贝拉唑对胃食管反流病患者生活质量的影响. *中华内科杂志* 2005; 44: 818-821
- 13 张艳丽, 孙晓红, 陈春晓, 柯美云, 王智凤, 方秀才. 反流性食管炎和非糜烂性反流病患者症状谱、生活质量和精神心理状态调查. *胃肠病学* 2008; 13: 82-86
- 14 Zheng Z, Margolis KL, Liu S, Tinker LF, Ye W. Effects of estrogen with and without progestin and obesity on symptomatic gastroesophageal reflux. *Gastroenterology* 2008; 135: 72-81
- 15 朱风尚, 陈锡美, 王志荣, 张东伟, 张霞. 埃索美拉唑对胃食管反流病患者症状和生活质量的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 530-534

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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)

针刺足阳明经特定穴治疗功能性消化不良30例

常小荣, 兰 蕾, 严 洁, 王小娟, 陈慧敏

常小荣, 严洁, 湖南中医药大学针灸推拿学院 湖南省长沙市 410007

兰蕾, 陈慧敏, 湖南中医药大学 湖南省长沙市 410007

王小娟, 湖南中医药大学第一附属医院 湖南省长沙市 410007

国家重点基础研究973计划基金资助项目, No. 2006-CB504501

作者贡献分布: 常小荣与严洁对此文作主要贡献; 此课题由严洁与常小荣设计; 临床收集患者由兰蕾、王小娟及陈慧敏完成; 数据分析由兰蕾与陈慧敏完成; 论文写作由常小荣、兰蕾及严洁完成。

通讯作者: 严洁, 教授, 博士生导师, 410007, 湖南省长沙市韶山路113号, 湖南中医药大学针灸推拿学院。

yj5381159@yahoo.com.cn

电话: 0731-88458187 传真: 0731-88458187

收稿日期: 2009-09-25 修回日期: 2010-01-11

接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-03-18

Efficacy of acupuncture at acupoints of Foot-Yangming Meridian in the treatment of patients with functional dyspepsia: an analysis of 30 cases

Xiao-Rong Chang, Lei Lan, Jie Yan, Xiao-Juan Wang, Hui-Min Chen

Xiao-Rong Chang, Jie Yan, College of Acupuncture-Moxibustion and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China
Lei Lan, Hui-Min Chen, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China
Xiao-Juan Wang, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2006-CB504501

Correspondence to: Professor Jie Yan, College of Acupuncture-Moxibustion and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, 113 Shaoshan Middle Road, Changsha 410007, Hunan Province, China. yj5381159@yahoo.com.cn

Received: 2009-09-25 Revised: 2010-01-11

Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To observe the efficacy of acupuncture at acupoints of Foot-Yangming Meridian in the treatment of patient with functional dyspepsia (FD) and to compare with that of unspecific acupuncture.

METHODS: Sixty FD patients were randomly di-

vided into two groups: control group and treatment group. The treatment group was treated by acupuncture at acupoints of Foot-Yangming Meridian, while the control group was treated by unspecific acupuncture. All patients received a total of four treatment cycles, each of which consisted of acupuncture once a day (0.5 h each time) for one week (five times). Immediately before and after the treatment and at one month after the treatment, all patients were requested to fill in several scales, such as Nepean Dyspepsia Index [NDI, including Nepean Dyspepsia Symptom Index (NDSI) and Nepean Dyspepsia Life Quality Index (NDLQI)], FD Symptom Index (FDI), and MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36).

RESULTS: The efficacy of acupuncture at acupoints of Foot-Yangming Meridian in improving the symptoms of FD patients was better than that of unspecific acupuncture. The total response rates achieved in treating postprandial fullness, early satiation, epigastric pain, and epigastric burning were significantly higher in the treatment group than in the control groups (85.72% vs 19.23%, 78.26% vs 20.00%, 94.11% vs 6.25%, and 60.00% vs 7.69%, respectively; all $P < 0.01$). At the end of the treatment or at one month after the treatment, NDSI and FDI decreased significantly, and NDLQI and SF-36 increased significantly in the two groups compared to pretherapy values (all $P < 0.01$). NDSI and FDI were significantly lower, and NDLQI and SF-36 were significantly higher in the treatment group than in the control group (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Acupuncture at acupoints of Foot-Yangming Meridian is effective in the treatment of FD patients. Both the short-term (at the end of the treatment) and long-term efficacy (one month after the treatment) of acupuncture at acupoints are superior to those of unspecific acupuncture in FD patients.

Key Words: Functional dyspepsia; Acupuncture; Acupoints of Foot-Yangming Meridian

Chang XR, Lan L, Yan J, Wang XJ, Chen HM. Efficacy of

■背景资料

关于经穴主治的特异性, 是一个争论了几十年的热点问题, 至今肯定者与否定者的观点仍针锋相对, 各持其说。本研究围绕经穴效应特异性基本规律是“经脉循行是基础, 经气会聚是关键”的工作假说, 选用针灸临床疗效肯定的功能性消化不良为研究载体, 结合针灸临床研究规范、临床流行病学、循证医学和GCP临床研究设计, 通过科学、规范的临床研究设计, 以临床效应严格评价经穴效应特异性的基本规律。

■同行评议者

沈洪, 教授, 南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

■研究前沿

通过观察针刺足阳明经特定穴(原穴冲阳、络穴丰隆、合穴足三里、郄穴梁丘)和非经非穴对照,治疗功能性消化不良(FD)患者的临床疗效和各量表积分的变化,分析针刺足阳明胃经特定穴治疗FD的临床疗效,探讨针刺足阳明经特定穴对FD是否具有相对的经穴效应特异性。为阐明经穴效应特异性的基本规律是“经脉循行是基础、经气会聚是关键”的工作假说提供临床科学依据。

acupuncture at acupoints of Foot-Yangming Meridian in the treatment of patients with functional dyspepsia: an analysis of 30 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(8): 839-844

摘要

目的: 分析针刺足阳明经特定穴治疗功能性消化不良(FD)的临床疗效,探讨针刺足阳明经特定穴对FD的经穴效应特异性。

方法: 将60例FD患者随机分到治疗组(A)和对照组(B)各30例。治疗组针刺足阳明经特定穴,对照组针刺非经非穴。两组均每日针刺1次,每次0.5 h,每周5次为1个疗程,治疗4个疗程。分别于治疗前、治疗完成、治疗后1 mo由受试者填写尼平消化不良指数(NDI),包括症状指数(NDSI)和生活质量指数(NDLQI),消化不良症状积分(FDI),健康相关生活质量评分(SF-36)。统计与分析所获资料。

结果: 治疗组各种症状的疗效高于对照组。治疗组各症状上腹饱胀不适、早饱、上腹痛、上腹烧灼感的总有效率分别为85.72%、78.26%、94.11%、60.00%,明显高于对照组(19.23%、20.00%、6.25%、7.69%),差异有统计学意义($P<0.01$);治疗完成和1 mo随访时,两组相对治疗前NDSI, FDI均显著降低, NDLQI, SF-36均显著增加(均 $P<0.01$);且同期比较治疗组NDSI, FDI明显低于对照组, NDLQI, SF-36明显高于对照组(均 $P<0.01$)。

结论: 针刺足阳明经特定穴与非经非穴治疗FD都是有效的治疗方法,但前者治疗FD近期疗效(治疗完成)和远期疗效(治疗后1 mo)都明显优于后者。

关键词: 功能性消化不良; 针刺; 足阳明经特定穴

常小荣, 兰蕾, 严洁, 王小娟, 陈慧敏. 针刺足阳明经特定穴治疗功能性消化不良30例. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 839-844

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/839.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是一种常见的消化系统疾病,属中医的“痞证”、“胃脘痛”、“嘈杂”、“纳呆”、“暖气”等范畴。罗马III学术委员会使用下面的定义: FD系指存在被认为源自胃十二指肠区域的症状,且无任何可以解释这些症状的器质性、系统性或代谢性疾病。临床上消化不良可单独出现或

组合出现餐后饱胀不适、早饱、上腹部疼痛、上腹烧灼感等症状。FD的发生与胃酸分泌、胃动力功能障碍、胃肠道激素、内脏敏感、心理因素、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染、迷走神经张力低下、血液流变等相关,但迄今对FD发生症状的机制尚未完全明确。所以对FD的治疗以对症治疗为主,目的在于缓解或消除消化不良症状,改善患者的生活质量^[1,2]。本课题组从2007-10/2008-05采用针刺胃经上特定穴和非经非穴治疗FD,比较受试者的临床疗效和各项量表积分的变化。现将有关情况报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 FD患者60例病例来源于2007-09/2008-05湖南中医药大学第一附属医院针灸科门诊、消化内科门诊、社会上招募的符合FD诊断标准的志愿者,均统一在湖南中医药大学第一附属医院针灸科门诊室治疗。2008-06完成随访。60例患者随机分成两组(足阳明经特定穴组-治疗组、非经非穴组-对照组),患者基本情况为: (1)治疗组30例,年龄21-51(平均 27.93 ± 6.30)岁,病程2.1-6.5(平均 3.71 ± 1.78)年, FDI (4.33 ± 1.45); (2)对照组30例,年龄23-46(平均 28.87 ± 6.40)岁,病程1.7-5.6(平均 3.10 ± 1.59)年, FDI(3.97 ± 1.38)。两组年龄和病程及各量表积分比较均无显著性差异($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准: 参照2006年罗马III标准^[1]: (1)必须符合以下一点或一点以上: 餐后饱胀不适、早饱、上腹痛、上腹烧灼感; (2)没有可以解释上述症状的器质性疾病(包括上消化系内镜下)的证据。诊断前症状出现至少6 mo, 近3 mo症状符合以上标准。

1.2.2 纳入标准: 参照标准同1.2.1: (1)符合FD的诊断标准者; (2)年龄在18-65岁者(包括18和65岁); (3)在治疗前至少15 d内没有服用过任何胃肠促动力药,未参加其他临床研究; (4)签署知情同意书(根据赫尔辛基宣言所制定),自愿参加本项研究者。同时符合以上4项的患者,方可纳入本研究。

1.2.3 排除标准: 参照标准同1.2.1: (1)意识不清,不能表达主观不适症状,精神病患者; (2)进展性恶性肿瘤或其他严重消耗性疾病,易合并感染及出血者; (3)合并心血管、肝、肾、消化、造血系统等严重原发性疾病者; (4)孕妇及哺乳期

表 1 两组不同症状疗效

| 症状 | 分组 | n | 治愈n(%) | 有效n(%) | 无效n(%) | 总有效率(%) |
|--------|-----|----|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| 餐后饱胀不适 | 治疗组 | 28 | 5(17.86) | 19(67.86) | 4(14.29) | 85.72 ^b |
| | 对照组 | 26 | 0(0.00) | 5(19.23) | 21(80.77) | 19.23 |
| 早饱 | 治疗组 | 23 | 15(65.22) | 3(13.04) | 5(21.74) | 78.26 ^b |
| | 对照组 | 25 | 2(8.00) | 3(12.00) | 20(80.00) | 20.00 |
| 上腹痛 | 治疗组 | 17 | 12(70.59) | 4(23.52) | 1(5.89) | 94.11 ^b |
| | 对照组 | 16 | 0(0.00) | 1(6.25) | 15(93.75) | 6.25 |
| 上腹烧灼感 | 治疗组 | 10 | 5(50.00) | 1(10.00) | 4(40.00) | 60.00 ^b |
| | 对照组 | 13 | 1(7.69) | 0(0.00) | 12(92.31) | 7.69 |

^bP<0.01 vs 对照组。

妇女。凡符合上述任何1条的患者,即予以排除。

1.2.4 治疗方案: (1)取穴部位: 治疗组取胃经原穴冲阳、络穴丰隆、合穴足三里、郄穴梁丘。对照组取冲阳、丰隆、足三里、梁丘水平旁开,胃经胆经连线的中点,避开血管。穴位定位参照WHO1990-12346颁布的《腧穴国际标准化方案》的定位标准,针刺操作参照文献[3]; (2)针具的选择: 针灸针选用苏州医疗用品厂生产的华佗牌一次性针灸针,规格必须是 $\phi 0.30 \times (25-50 \text{ mm})$; (3)具体操作: 常规消毒,针刺后行提插捻转手法捻转的角度90-180度,提插的幅度0.3-0.5 cm,频率在每分钟60-90次,出针后用干棉球按压针孔以防出血。治疗组和对照组均每日针刺1次,每次0.5 h,每周5次为1个疗程,共治疗4个疗程。分别于治疗前、治疗结束时,治疗后1 mo分别由受试者填写尼平消化不良指数(NDI)、消化不良症状积分(FDI)、健康相关生活质量评分(SF-36)。再对结果进行统计与分析。

1.2.5 疗效标准: (1)NDI疗效标准: NDI,包括症状指数NDSI和生活质量指数NDLQI。据参考文献[4],NDSI评分: 分值 = 频率计分+强度计分+影响度计分,得分越高其症状越重。NDLQI评分: 本部分共25个条目得分转换为首先将各个条目的原始分相加S,总的最小分M(每个条目最小可能得分的总和),R(总的得分的最大范围)。则转换后的总得分 = $100 - \{[(S-M)/R] \times 100\}$; (2)FDI疗效标准: FDI标准参照中华中医药学会脾胃病专业委员会制定的分级标准^[5]先按4分法积分。消化不良主要症状(餐后饱胀不适、早饱、上腹痛、上腹烧灼感)的4分严重程度积分方法如下: 无: 没有症状,积0分;轻度: 有症状但完全能忍受,积1分;中度: 感觉不适并已影响工作和睡眠等正常生活,积2分;重度: 不能进行工作和睡眠等正常生活,积3分;疗效评定标准参照

文献[6]。因为受试者不是每项症状都有,每项改善的程度也不同。所以按4个症状分别计算其疗效。临床控制→患者主诉症状积分改善3分或症状完全消失;显效→患者主诉症状积分改善2分;有效→患者主诉症状积分改善1分;无效→患者主诉症状积分未改变或下降;症状积分改善程度: 总有效率 $(A+B+C)/(A+B+C+D)$;总显效率 $(A+B)/(A+B+C+D)$;治愈率 $A/(A+B+C+D)$; (3)SF-36是美国波士顿健康研究所研制的简明健康调查问卷,他被广泛应用于普通人群的生存质量测定、临床试验效果评价以及卫生政策评估等领域^[7];评分方法参照文献[8],SF-36量表的计分方法,按积分法计分后,采用极差法再计算总的转化分。即用每项原始分之和减去这项可能最低分之和,除以每项最高可能分数之和减去每项最低分数之和,得出总转化分。具体公式为: 转换分数 = $(\text{原始分数} - \text{最低可能分数}) / (\text{最高可能分数} - \text{最低可能分数}) \times 10$ 。

统计学处理 所有数据采用SPSS16.0统计分析软件进行处理,用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。首先进行正态性、方差齐性检验,满足条件者组内治疗前后比较用配对t检验,两组间比较用成组t检验;不满足条件者用秩和检验。等级数据采用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 两组不同症状疗效比较 治疗结束治疗组: 腹饱胀不适、早饱、上腹痛、上腹烧灼感的总有效率分别为85.72%、78.26%、94.11%及60.00%,明显高于对照组: 19.23%、20.00%、6.25%及7.69%,差异有显著性意义($P < 0.01$,表1)。提示针刺足阳明胃经特定穴治疗FD的疗效明显高于非经非穴组(表中显效一列缺失,说明: 因为入组患者中没有重度患者,症状积分都为1-2分,

■ 相关报道

大量的临床资料证明针灸对胃肠道功能具有双向调节作用,尤其对胃动力具有良好的双向调节作用。张晓军等将92例FD患者随机分为,针刺组46例和对照组46例,针刺组针刺足三里、内关、中脘、太冲等穴,对照组用多潘立酮和雷尼替丁治疗,两组均以10 d为一疗程,疗程间隔2 d,共3个疗程。结果针刺治疗能明显减轻FD引起的上腹疼痛、饱胀、嗝气等症状,总有效率84.8%,对照组63.0%。

■同行评价

本研究实用性强,对临床医师有较好的参考价值。

表 2 两组各种量表积分比较 (mean ± SD)

| 量表 | 治疗组 | | | 对照组 | | |
|-------|----------------|------------------------------|------------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 治疗前 | 治疗后 | 随访(1 mo) | 治疗前 | 治疗后 | 随访(1 mo) |
| NDSI | 42.53 ± 16.642 | 17.86 ± 12.660 ^{bd} | 14.14 ± 13.120 ^{bd} | 39.53 ± 15.088 | 30.45 ± 16.917 ^b | 27.69 ± 14.707 ^b |
| NDLQI | 76.43 ± 13.337 | 91.60 ± 6.237 ^{bd} | 94.20 ± 6.706 ^{bd} | 77.97 ± 9.813 | 81.51 ± 10.522 ^b | 82.10 ± 9.813 ^b |
| FDI | 4.33 ± 1.446 | 1.50 ± 1.036 ^{bd} | 1.25 ± 1.236 ^{bd} | 3.97 ± 1.377 | 3.38 ± 1.568 ^b | 3.00 ± 1.336 ^b |
| SF-36 | 64.19 ± 14.349 | 82.04 ± 9.084 ^{bd} | 88.57 ± 5.691 ^{bd} | 68.76 ± 11.264 | 75.53 ± 9.082 ^b | 77.70 ± 8.476 ^b |

^b $P < 0.01$ vs 同组治疗前; ^d $P < 0.01$ vs 对照组。

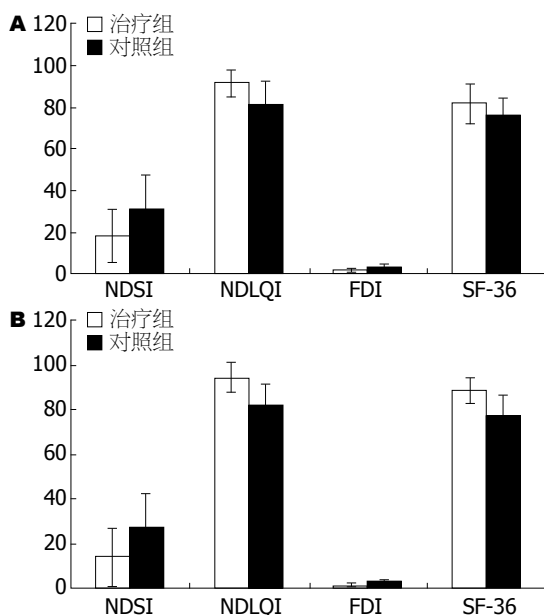


图 1 两组各种量表积分比较(mean ± SD). A: 治疗后; B: 1 mo随访。

所以当积分改善2分呈显效时其实已治愈)。

2.2 两组各量表积分比较 治疗完成和治疗后1 mo随访时2组相对治疗前NDSI与FDI显著降低, NDLQI与SF-36显著增加(均 $P < 0.01$); 且同期比较治疗组NDSI与FDI明显低于对照组, NDLQI与SF-36则明显高于对照组(均 $P < 0.01$, 表2, 图1)。

3 讨论

本研究选择了对不同症状的疗效进行评价, 是因为罗马III提出新的分型标准是基于对FD发病机制的不断深入认识^[9,10], “消化不良症状群”包括很多不同的症状, 没有一个症状会出现在所有的FD患者中, 不同的患者症状有相当大的变化。人群研究显示FD并不是一个均质性疾病。不同的FD患者的病理生理不同, 一种症状相对应于一种病理生理学机制异常。不同的病理生理学机制异常相关症状的所需的治疗不同, 疗效也不同。临床上并没有专用于治疗消化不良总体症

状的特定药物, 通常是针对某一个症状的。

因为胃排空、胃电图、血胃动素等客观疗效指标缺乏特异性, 在临床研究发现FD患者的胃排空、胃电图、血胃动素等指标发生了改变, 此时患者的症状可能并无任何变化, 这在国内外不少临床研究中已经得到证实^[11-13]。而FD的疗效评价指标SF-36、NDI等的科学性在国际上早已得到了认可, 这些量表的信度与效度已在多个不同国家的临床研究中得到一致认可, 根据目前的研究情况, 本研究选用国际通用的指标尼群消化不良指数(NDI)^[4], 健康相关生活质量评分(SF-36)^[6], 同时选择了国内常用简便易行的消化不良症状积分(FDI)^[5]评价疗效。这几个指标能很好地评价FD患者的临床症状和生活质量, 且在本研究中疗效评价取得一致。

中医认为FD多属脾胃之病, 病位在胃, 涉及肝脾两脏。由于外感时邪, 饮食不节, 脾胃虚弱, 情志不畅等所致。从本研究得知, 针刺足阳明胃经特定穴治疗FD有效, 并且疗效明显高于非经非穴组。治疗组各症状上腹饱胀不适、早饱、上腹痛、上腹烧灼感的总有效率分别为85.72%, 78.26%, 94.11%, 60.00%, 明显高于对照组(19.23%, 20.00%, 6.25%, 7.69%, 均 $P < 0.01$)。比较两组各项量表积分能够得出针刺足阳明经在改善患者症状, 提高患者生活质量方面近期疗效和远期疗效都明显高于非经非穴对照组。即本研究结果表明针刺足阳明经特定穴治疗FD具有经穴效应特异性。那么为什么足阳明经特定穴治疗FD具有经穴效应相对特异性? 可以从以下几个方面认识。

以前临床研究发现针刺健康人胃经四白、天枢、足三里、上巨虚、内庭等穴大多能使胃窦容积明显增大, 而针刺经穴左右旁开1-2 cm的对照点则变化不明显^[14]。动物研究显示, 电针家兔胃经“四白”、“梁门”、“足三里”均可使家兔胃黏膜损伤指数显著降低, 而电针足三

里外2 mm的对照点则未见显著性差异^[15]。在实验研究方面, 有学者发现在升高实验性胃溃疡兔胃黏膜PGE₂(前列腺素E₂)、EGF(表皮生长因子)含量方面, 针刺胃经穴组优于脾经穴组、肝经穴组、膀胱经穴组和胆经穴组, 脾经次之。虽然多条经脉可联系同一脏腑, 但从作用强度和广度看, 经脉与脏腑的联系仍具有相对特异性^[16]。有研究发现, 在对十二指肠溃疡疼痛消失时间、*H.pylori*清除率及次要症状的改善方面, 足三里优于上巨虚、下巨虚(尤其在疼痛的消失时间方面), 上巨虚与下巨虚的效果基本相似^[17]。

祖国医学认为体表与内脏的联系是通过经脉实现的。这种相关表现在脏腑病变可反应到经络, 又表现在经络对脏腑的调治。经脉脏腑相关是经穴特异性的理论依据。脾与胃互为表里, 足阳明经脉属胃络脾, 足太阴经脉属脾络胃, 使得脾与胃气血相通, 生理上互相影响, 病理上密切相关。杨上善在《黄帝内经太素》说: “胃受水谷, 化生气血, 为足阳明脉, 资润五脏六腑, 五脏六腑禀成气血, 譬之四海滋泽无穷, 故名为海也。”足阳明胃经属胃, 为多血多气之经, 而胃为后天之本, 具有受纳水谷, 化生气血之功, 直接关系到全身消化吸收功能与营养状况, 所以足阳明胃经能有效调节脾胃功能, 促进胃肠动力, 改善消化不良的症状。

经络是运行全身气血, 联络脏腑形体官窍, 沟通上下内外, 感应传导信息的通路系统, 是人体功能的调节系统, 是人体结构的重要组成部分。经络的功能活动表现为经气。腧穴是脏腑经络气血输注于躯体外部的特殊部位, 是疾病的反应点和针灸疗法的刺激点。“经脉所过, 主治所及”指的是腧穴能治本经循行部位及远隔部位的组织、器官、脏腑的病症。体现在本研究即所选腧穴冲阳、丰隆、足三里、梁丘都在足阳明经下肢部位, 但能调节相关脏腑脾胃的功能, 治疗相关脏腑脾胃的病变, 能有效调节脾胃功能, 促进胃肠动力, 改善消化不良的症状, 这几个穴位治疗FD与非经非穴对照疗效有特异性。

特定腧穴, 特定主治。主治相同, 疗效有别。即特定穴不仅有一般腧穴的主治特性, 还有独特的主治作用。本研究选取了足阳明胃经的几个特定穴进行治疗: 冲阳, 是足阳明胃经原穴。原气是十二经脉维持正常生理功能的根本, 原穴是脏腑原气留止的部位, 脏腑发病时会相应反映到原穴上来, 五脏六腑有病可取原穴治疗。《难经·六十六难》云: “五藏六府之有病者,

皆取其原也。”丰隆, 是足阳明胃经之络穴, 别走于足太阴脾经, 故可治脾胃二经疾患。丰隆还能去痰化湿, 《玉龙歌》云: “痰多宜向丰隆寻”。针刺丰隆穴可通调脾胃气机, 使气行津布, 中土得运, 湿痰自化, 所以能很好地改善消化不良的症状。足三里, 是胃经的合穴, 同时又是胃的下合穴, 能健脾和胃、疏通经络、调和气血、理气消胀、化积导滞、行气止痛, 《四总穴歌》云: “肚腹三里留”, 《灵枢·邪气脏腑病形》记载“合治内腑”, 强调下合穴是治疗六腑疾病的主要穴位, 治疗胃病自然离不开取胃经的下合穴了。梁丘, 为胃经郄穴, 郄穴是各经脉在四肢部经气深聚的部位, 用来治疗急症。阳经郄穴多用来治疗急性疼痛, 所以梁丘是治疗胃痛不可缺少的穴位。疗效是肯定的。即本研究所选足阳明胃经特定穴治疗FD相对本经非特定穴疗效有特异性。

针灸调理胃肠功能作用是通过神经-内分泌-免疫网络调控途径来实现的^[18]。胃肠道功能的神经调节主要依赖3个系统, 即中枢神经系统、自主神经系统和肠道神经系统^[14,15,19]。当针灸信息到达下丘脑时, 可以进一步经下丘脑-腺垂体-肾上腺轴^[18](HPA)对内分泌系统产生调节, 这可能是针灸持续效应的重要机制。针灸刺激躯体感觉神经的游离末梢所释放的神经肽如P物质(SP)、生长抑素(SS)、降钙素基因相关肽(CGRP)等能增强或抑制各种免疫细胞如淋巴细胞、肥大细胞和白细胞等功能, 诱导或抑制炎性介质体液成分产生, 从而参与局部免疫功能的调节^[15,16,19]。也就是说针刺足阳明胃经特定穴和非经非穴都能通过神经-内分泌-免疫网络调控途径在针灸调整胃肠作用机制中起作用, 这就是为什么治疗完成和1 mo随访时两组各疗效指标相对治疗前均显著改善。但针刺足阳明经特定穴调整胃肠作用明显高于非经非穴治疗组, 两组同期比较治疗组疗效指标改善程度明显高于对照组。

由以上的结果及解释我们可以得出如下的结论: (1)针刺足阳明经特定穴与非经非穴治疗FD都是有效的治疗方法, 且前者治疗FD近期疗效(治疗完成)和远期疗效(治疗后1 mo)都明显优于后者。(2)两者均能改善患者的症状, 提高患者的生活质量, 其改善程度前者明显优于后者。

4 参考文献

- 1 Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu

- P, Malagelada JR, Stanghellini V. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1466-1479
- 2 莫剑忠. 功能性消化不良与罗马Ⅲ. 胃肠病学 2006; 11: 726-733
- 3 石学敏. 针灸学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 46-47
- 4 Talley NJ, Verlinden M, Jones M. Validity of a new quality of life scale for functional dyspepsia: a United States multicenter trial of the Nepean Dyspepsia Index. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2390-2397
- 5 张声生, 汪红兵, 李乾构. 功能性消化不良中医诊疗规范(草案). 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 1
- 6 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行). 北京: 中国中医药出版社, 2002: 139
- 7 Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* 1992; 30: 473-483
- 8 方积乾. 生存质量测定方法及应用. 第1版. 北京: 北京大学医学出版社, 2000: 55
- 9 孙菁, 袁耀宗. 对功能性消化不良罗马Ⅲ标准的浅识. 中华消化杂志 2006; 26: 764-765
- 10 Drossman DA. Rome III: the new criteria. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 181-185
- 11 Stanghellini V, Corinaldesi R, Tosetti C. Relevance of gastrointestinal motor disturbances in functional dyspepsia. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1998; 12: 533-544
- 12 Veldhuyzen van Zanten SJ, Jones MJ, Verlinden M, Talley NJ. Efficacy of cisapride and domperidone in functional (nonulcer) dyspepsia: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 689-696
- 13 Bonapace ES, Parkman HP, Fisher RS. Edrophonium provocative testing during electrogastrography (EGG): effects on dyspeptic symptoms and the EGG. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1494-1500
- 14 龚洪翰, 王永正, 肖香佐, 邱春梅, 汪丽娅, 纪玉强, 王敏, 王敏君, 王进华, 曾献军. fMRI探讨针刺足三里穴和下巨虚穴的大脑功能区分布. 影像诊断与介入放射学 2003; 12: 13
- 15 严洁, 阳仁达, 易受乡, 常小荣, 林亚平. 从针刺不同经穴对家兔胃黏膜保护作用探讨多经司控同一脏腑的规律. 中国针灸 2004; 24: 579-582
- 16 许冠荪, 申国明, 方正清, 刘自兵, 徐颖, 张荣军. 功能性胃肠病及针灸对其防治的机制. 安徽中医学院学报 2004; 23: 30-32
- 17 余明哲, 朱忠春, 彭美凤, 杨光正. 针刺治疗十二指肠溃疡的腧穴特异性研究. 上海针灸杂志 2001; 20: 4-6
- 18 严洁, 常小荣, 刘建华, 邓常青, 李铁浪, 李江山, 易受乡, 林亚平. 电针足阳明经穴对家兔胃粘膜损伤防御性保护作用的研究. 中国针灸 2001; 21: 350-352
- 19 常小荣, 严洁, 林亚平, 易受乡, 邓沅江. 针刺足三里对功能性消化不良患者血浆胃肠激素的影响. 中国中西医结合消化杂志 2001; 9: 283-284

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

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

慢性胃炎脾胃湿热证与血清胃泌素及幽门螺杆菌感染的相关性

周慧敏, 吕文亮, 高清华, 周燕萍, 王阶, 李天望, 刘林

周慧敏, 吕文亮, 高清华, 周燕萍, 王阶, 李天望, 刘林, 湖北中医学院 湖北省武汉市 430061

作者贡献分布: 此课题由吕文亮与王阶设计; 研究过程由周慧敏、高清华及周燕萍操作完成; 研究所用病例及试剂由李天望与周慧敏提供; 数据分析由周慧敏、周燕萍及刘林完成; 本论文写作由吕文亮与周慧敏完成。

通讯作者: 吕文亮, 教授, 430061, 湖北省武汉市武昌区昙华林特1号, 湖北中医学院. lvwenliang66@126.com

电话: 027-62704227 传真: 027-68889091

收稿日期: 2009-11-29 修回日期: 2010-01-04

接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-03-18

Correlations among serum gastrin, *Helicobacter pylori* infection and spleen-stomach damp-heat syndrome in patients with chronic gastritis

Hui-Min Zhou, Wen-Liang Lv, Qing-Hua Gao, Yan-Ping Zhou, Jie Wang, Tian-Wang Li, Lin Liu

Hui-Min Zhou, Wen-Liang Lv, Qing-Hua Gao, Yan-Ping Zhou, Jie Wang, Tian-Wang Li, Lin Liu, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China

Correspondence to: Wen-Liang Lv, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, Hubei Province, China. lvwenliang66@126.com

Received: 2009-11-29 Revised: 2010-01-04

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the correlations among *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection, serum gastrin (GAS) and spleen-stomach damp-heat syndrome in patients with chronic gastritis.

METHODS: Based on the combination of disease and syndrome, a total of 209 patients with chronic gastritis were clinically studied. The positive rate of *H.pylori* infection in these patients was examined by the ^{14}C -urea breath test. Serum GAS was determined by radioimmunoassay.

RESULTS: The positive rate of *H.pylori* infection and serum GAS level in chronic gastritis patients with the spleen-stomach damp-heat syndrome were significantly higher than those in patients without the spleen-stomach damp-heat syn-

drome ($\chi^2 = 10.572, t = 8.984, \text{both } P < 0.01$).

CONCLUSION: *H.pylori* infection is closely associated with chronic gastritis and spleen-stomach damp-heat. Elevated serum gastrin level may be a reflection of spleen-stomach damp-heat.

Key Words: Spleen-stomach damp-heat syndrome; Serum gastrin; *Helicobacter pylori*; Chronic gastritis

Zhou HM, Lv WL, Gao QH, Zhou YP, Wang J, Li TW, Liu L. Correlations among serum gastrin, *Helicobacter pylori* infection and spleen-stomach damp-heat syndrome in patients with chronic gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 845-847

摘要

目的: 探讨微观指标幽门螺杆菌(*H.pylori*)、血清胃泌素(GAS)与慢性胃炎脾胃湿热证的相关性。

方法: 在病证结合的模式下, 对209例慢性胃炎患者进行临床研究, 运用 ^{14}C -尿素呼气试验指进行*H.pylori*检测; 放射免疫法检测分析GAS水平。

结果: 脾胃湿热证组的*H.pylori*感染阳性率及血清胃泌素均明显高于非脾胃湿热组, 差异有统计学意义($\chi^2 = 10.572, t = 8.984, \text{均 } P < 0.01$)。

结论: *H.pylori*感染与慢性胃炎脾胃湿热证高度相关; 血清胃泌素升高可能是“脾胃湿热证”的微观证据之一。

关键词: 脾胃湿热证; 血清胃泌素; 幽门螺杆菌; 慢性胃炎

周慧敏, 吕文亮, 高清华, 周燕萍, 王阶, 李天望, 刘林. 慢性胃炎脾胃湿热证与血清胃泌素及幽门螺杆菌感染的相关性. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 845-847

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/845.asp>

0 引言

湿热证是中医临床常见病证, 随着当前疾病谱

■背景资料

GAS是最重要的胃肠激素之一, 他是胃酸分泌的主要调节激素, 能最大限度刺激壁细胞分泌盐酸, 改善胃黏膜血液循环, 而胃酸分泌增多是慢性胃炎发病的一个重要因素。在胃肠激素的相关性研究方面, 发现湿热证患者血清胃泌素、GAS等增高。

■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科; 邵先玉, 主任医师, 泰山医学院附属医院消化内科

■相关报道

多数学者认为 *H.pylori* 感染以实证、热证为多见, 有学者提出湿热之邪与 *H.pylori* 在病因学上是同一致病原的观点, 张琳认为 *H.pylori* 具有类似湿热病邪的致病特点(隐匿性、渐进性、反复性、迁延性), 胃内“湿热”环境有利于 *H.pylori* 的生存。

的改变, 人们体质以及饮食结构的变化, 湿热证愈来愈多见。对脾胃病实证中湿热证的临床研究显示, 慢性胃炎中脾胃湿热证占首位^[1]。而“病证结合”研究是目前临床证候规律研究的方向之一, 我们认为在提高“病”的证据质量同时, 中医“证”的证据同样需要重视, 这也是中医疗效评价标准的需要。基于以上认识, 本课题在病证结合的模式下, 对209例慢性胃炎病例进行临床研究, 探讨微观指标幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)、血清胃泌素(gastrin, GAS)与慢性胃炎脾胃湿热证的相关性, 为深入开展湿热证临床及本质研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2008-03/2008-09湖北省中医院消化门诊的慢性浅表性胃炎患者209例(经电子胃镜确诊)进行 *H.pylori* 检测。其中中医辨证为脾胃湿热证组105例, 包括男47例, 女58例, 平均年龄46.96岁±10.51岁; 非脾胃湿热证组104例, 包括男38例, 女66例, 平均年龄46.88岁±11.10岁。两组无性别($\chi^2 = 1.464$, $P = 0.226$)和年龄差异($t = 0.058$, $P = 0.954$)。从上述慢性浅表性胃炎患者209例中抽取自愿进行血清胃泌素检测的患者110例, 其中脾胃湿热证组50例, 包括男23例, 女27例, 平均年龄47.96岁±10.889岁; 非脾胃湿热证组60例, 包括男26例, 女34例, 平均年龄46.95岁±10.893岁。两组无性别($\chi^2 = 0.079$, $P = 0.779$)和年龄差异($t = 0.484$, $P = 0.629$)。

1.2 方法

1.2.1 排除标准: 参考《中药新药临床研究指导原则》中胃痞中医脾胃湿热证证候诊断标准, 并排除有明显兼夹证候或合并证候的胃炎患者、或合并有消化性溃疡、及合并有严重心脑血管、肝、肾功能损害的患者。

1.2.2 *H.pylori* 检测: 运用¹⁴C尿素呼气试验法, 让患者空腹状态或进食后2 h受检, 服下¹⁴C尿素胶囊一粒(¹⁴C-UBT试剂盒购自深圳海得威生物科技有限公司), 静坐25 min后向专用的集气瓶中吹气, 收集呼气样品, 向样品瓶内加入稀释闪烁液4.5 mL, 加盖密封, 液体摇匀后放入 *H.pylori* 测试仪上测定。结果用dpm/mmol表示, 大于100 dpm/mmol为阳性, 小于100 dpm/mmol为阴性。

1.2.3 血清GAS检测: 试剂盒购自北京北方生物技术研究所, 批号: S10940100。取慢性胃炎患者空腹肘正中静脉血2 mL, 置于不抗凝试管中, 静置后在离心机中3 000 r/min离心10 min, 分离血

清, 冻存于-60℃待测, 备检。按说明书用放射免疫 γ 计数器(GC-1200 γ 放射免疫计数器)检测样本。由湖北省中医院核医学放免室协助完成。结果用 t 检验。

统计学处理 *H.pylori* ¹⁴C尿素呼气试验检测结果用卡方检验; 血清胃泌素(GAS)检测结果用mean±SD表示, 采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *H.pylori* 检测 慢性胃炎脾胃湿热证组 *H.pylori* 感染阳性患者64例, 阴性41例明显高于非湿热证组(*H.pylori*感染阳性患者40例, 阴性64例), 2组相比有非常显著性差异($\chi^2 = 10.572$, $P = 0.001$)。

2.2 GAS检测 脾胃湿热证组(患者50例)较非脾胃湿热组(患者60例)GAS水平显著增高(53.79 ng/L±28.67 ng/L vs 18.10 ng/L±10.81 ng/L, $t = 8.984$, $P = 0.000$)。

3 讨论

H.pylori 是1983年由Warren与Marshall从慢性胃炎患者的胃黏膜组织中首先发现的^[2], 他是一种革兰阴性、S形或弧形弯曲的细菌, 具有很强的运动能力, 可以穿透覆盖于胃黏膜上皮细胞的黏液层。*H.pylori* 感染属中医“邪气”侵袭的范畴, 有关研究^[3,4]认为, 慢性胃病脾胃湿热证 *H.pylori* 感染率最高。多数学者认为 *H.pylori* 感染以实证、热证为多见, 有学者^[5]提出湿热之邪与 *H.pylori* 在病因学上是同一致病原的观点, 张琳认为^[6] *H.pylori* 具有类似湿热病邪的致病特点(隐匿性、渐进性、反复性、迁延性), 胃内“湿热”环境有利于 *H.pylori* 的生存。

GAS是最重要的胃肠激素之一, 他是胃酸分泌的主要调节激素, 能最大限度刺激壁细胞分泌盐酸, 改善胃黏膜血液循环, 而胃酸分泌增多是慢性胃炎发病的一个重要因素^[7]。在胃肠激素的相关性研究方面, 发现湿热证患者血清胃动素、GAS等增高。如武一曼等^[8]观测到脾胃湿热组胃窦黏膜分泌GAS的G细胞数显著高于脾气虚组、分泌生长抑素的D细胞数则显著降低, G/D细胞比值显著升高, 并认为其与 *H.pylori* 介入有关, 指出GAS和生长抑素是研究脾胃湿热证的首选指标。

本研究的结果表明 *H.pylori* 感染与慢性胃炎脾胃湿热证高度相关; 脾胃湿热证组血清GAS

分泌水平显著高于非脾胃湿热组, 推测GAS升高可能是“脾胃湿热证”的微观辨证证据之一。由于脾胃湿热组*H.pylori*感染率高, *H.pylori*损害胃黏膜屏障, 破坏了胃酸对GAS的反馈作用, 从而使胃窦G细胞释放GAS增加, 导致血清GAS升高, 因此将宏观的脾胃湿热证与实验室微观的*H.pylori*及GAS结合起来, 探讨其内在联系是很有必要的。

4 参考文献

- 1 刘新生, 陈群. 脾胃病实证相关指标的临床研究进展. 国医论坛 1999; 14: 46-48
- 2 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315
- 3 陈朝元, 王岩. 幽门螺杆菌与慢性萎缩性胃炎及其证型的关系. 中医药学刊 2002; 20: 828
- 4 冯莲君, 延文. 幽门螺杆菌与胃脘痛中医分型的关系. 现代中西医结合杂志 2000; 9: 105-106
- 5 张闰光, 朱国曙. 糜烂性胃炎中医分型与幽门螺杆菌感染的相关研究. 现代中西医结合杂志 2002; 11: 7
- 6 张琳. 幽门螺杆菌与慢性萎缩性胃炎防治研究. 中医杂志 1992; 33: 411
- 7 Komori M, Tsuji S, Sun WH, Tsujii M, Kawai N, Yasumaru M, Kakiuchi Y, Kimura A, Sasaki Y, Higashiyama S, Kawano S, Hori M. Gastrin enhances gastric mucosal integrity through cyclooxygenase-2 upregulation in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1368-G1378
- 8 武一曼, 葛振华, 周凡, 任彦, 王若愚, 姚欣. 胃泌素、生长抑素与脾胃湿热证慢性浅表性胃炎的相关性研究. 中医杂志 2004; 45: 215-216

■同行评价

本文立意新颖, 方法合理, 结论可靠, 有较好的临床参考价值。

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 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)

腹腔镜及开腹手术治疗小儿复杂性阑尾炎268例

田 鹏, 王旺河, 张 超, 王志凯, 赵淑坤

■背景资料

小儿阑尾由于其解剖特点,一旦感染,发展很快,且易坏疽与穿孔。腹腔镜应用于小儿阑尾炎,既是一种早期诊断手段,又是一种治疗方法,随着腹腔镜技术的发展,腹腔镜阑尾切除术(LA)已成为治疗单纯性阑尾炎的首选方法。而在复杂性阑尾炎中的应用还存在争议。

田鹏, 王旺河, 张超, 王志凯, 赵淑坤, 河南省人民医院微创外科 河南省郑州市 450003

作者贡献分布: 田鹏与王旺河对此文所作贡献均等; 此课题由田鹏与王旺河设计; 研究过程由田鹏、王旺河及张超操作完成; 资料收集、数据分析由王志凯与赵淑坤完成; 本论文写作由田鹏完成。

通讯作者: 田鹏, 主治医师, 450003, 河南省郑州市纬五路7号, 河南省人民医院微创外科。49229483@qq.com

电话: 0371-65580425 传真: 0371-65580426

收稿日期: 2009-12-31 修回日期: 2010-02-05

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-18

Laparoscopic versus open appendectomy in the treatment of complicated appendicitis in children: an analysis of 268 cases

Peng Tian, Wang-He Wang, Chao Zhang, Zhi-Kai Wang, Shu-Kun Zhao

Peng Tian, Wang-He Wang, Chao Zhang, Zhi-Kai Wang, Shu-Kun Zhao, Department of Minimally Invasive Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Correspondence to: Peng Tian, Department of Minimally Invasive Surgery, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China. 49229483@qq.com

Received: 2009-12-31 Revised: 2010-02-05

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To compare the efficacy of laparoscopic appendectomy (LA) versus open appendectomy (OA) in the treatment of complicated appendicitis in children.

METHODS: A total of 268 children with complicated appendicitis who underwent either LA (LA group, $n = 128$) or OA (OA group, $n = 140$) from January 2000 to November 2009 were retrospectively analyzed. The surgical outcomes and therapeutic effects were compared between the two groups.

RESULTS: The operative time was significantly longer in the LA group than in the OA group ($62.2 \text{ min} \pm 15.3 \text{ min}$ vs $57.1 \text{ min} \pm 6.4 \text{ min}$, $P < 0.01$). The time required for postoperative restoration of anal exhaust was significantly shorter in the LA group

than in the OA group ($26.8 \text{ h} \pm 7.6 \text{ h}$ vs $42.9 \text{ h} \pm 8.3 \text{ h}$, $P < 0.001$). Postoperative hospital stay in the LA group was significantly shorter than that in the OA group ($5.2 \text{ d} \pm 2.3 \text{ d}$ vs $9.5 \text{ d} \pm 2.6 \text{ d}$, $P < 0.001$). Postoperative intraabdominal abscess occurred in 1 child in the LA group and in 9 children in the OA group ($P = 0.036$). Wound infection occurred in 3 children in the LA group and in 28 children in the OA group ($P < 0.001$). Bowel obstruction occurred in 2 children in the LA group and in 5 children in the OA group ($P = 0.518$).

CONCLUSION: LA has many advantages over OA in the treatment of complicated appendicitis in children, such as minimal invasion, early recovery, low complication rate, short hospital stay and good cosmetic appearance. Therefore, LA is safe and effective in the treatment of complicated appendicitis in children.

Key Words: Complicated appendicitis; Laparoscopic appendectomy; Children

Tian P, Wang WH, Zhang C, Wang ZK, Zhao SK. Laparoscopic versus open appendectomy in the treatment of complicated appendicitis in children: an analysis of 268 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 848-850

摘要

目的: 对比分析腹腔镜和开腹阑尾切除术在治疗小儿复杂性阑尾炎中的疗效。

方法: 回顾性分析2000-01/2009-11小儿复杂性阑尾炎患者268例临床资料,其中腹腔镜阑尾切除术(LA)128例,开腹阑尾切除术(OA)140例,比较两组手术情况和疗效。

结果: 手术时间: LA组较OA组长($62.2 \text{ min} \pm 15.3 \text{ min}$ vs $57.1 \text{ min} \pm 6.4 \text{ min}$, $P < 0.01$); 术后肛门排气时间: LA组较OA组短($26.8 \text{ h} \pm 7.6 \text{ h}$ vs $42.9 \text{ h} \pm 8.3 \text{ h}$, $P < 0.001$); 术后住院时间: LA组较OA组短($5.2 \text{ d} \pm 2.3 \text{ d}$ vs $9.5 \text{ d} \pm 2.6 \text{ d}$, $P < 0.001$); 术后腹腔脓肿LA组1例, OA组9例($P = 0.036$); 切口感染: LA组3例, OA组28例($P < 0.001$); 肠梗阻: LA组2例, OA组5例($P = 0.518$)。

■同行评议者

李永翔, 主任医师, 安徽医科大学第一附属医院普外科

结论: LA较OA具有创伤小、恢复快、并发症少、住院时间短和美容效果好等优点,是治疗小儿复杂性阑尾炎一种安全有效的手术方式。

关键词: 复杂性阑尾炎;腹腔镜阑尾切除术;小儿

田鹏,王旺河,张超,王志凯,赵淑坤.腹腔镜及开腹手术治疗小儿复杂性阑尾炎268例.世界华人消化杂志 2010; 18(8): 848-850
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/848.asp>

0 引言

自1983年德国Semm^[1]首次成功实施腹腔镜阑尾切除术(laparoscopic appendectomy, LA)以来,以其创伤小、恢复快、并发症少等优点^[2,4],受到广大患者欢迎,LA已成为治疗小儿单纯性阑尾炎的首选方法,但是在复杂性阑尾炎(包括阑尾穿孔,阑尾坏疽,阑尾周围脓肿)中的应用还存在争议。本研究回顾性分析2000-01/2009-11我院小儿复杂性阑尾炎患者268例的临床病例资料,对比LA及开腹阑尾切除术(open appendectomy, OA)手术情况及疗效,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 LA组128例,其中男75例,女53例,年龄5-14(8.3±2.4)岁。其中阑尾穿孔、坏疽、周围脓肿分别为70例、25例、33例。OA组140例,其中男78例,女62例,年龄4-14(7.8±2.5)岁。其中阑尾穿孔、坏疽、周围脓肿分别为80例、21例、39例。两组患者均有发热、腹痛、腹胀、恶心、呕吐、右下腹部压痛、反跳痛,B超检查可见腹腔、盆腔积液,部分患者可见肿大阑尾影及阑尾区包块形成。均经手术或术后病理学检查证实病理分型。

1.2 方法

1.2.1 手术: LA组均采用气管插管全麻。先行平卧位,取脐上方5 mm切口,建立二氧化碳气腹8-12 mmHg。置入Trocarr和腹腔镜,常规腹腔探查,取脐与耻骨联合之间连线的中点切口5 mm、右中腹切口10 mm,吸除腹腔及盆腔脓液。取体位采用头低足高15度,向左倾斜15-30度。阑尾周围脓肿病例一般由回肠、盲肠、大网膜、腹壁组成脓壁,用吸引棒或分离钳钝性分离脓肿及腹壁粘连,也可用超声刀锐性分离,显露阑尾。用超声刀分段分离阑尾系膜至阑尾根部。对于阑尾末端或体部穿孔,分别用可吸收夹或7号线双重结扎阑尾根部,于远侧0.5 cm剪断,阑尾残端黏膜电凝处理。对于阑尾根部穿孔或坏疽,由于无法结扎,残端用缝合线“8”字缝合关闭,大网膜覆盖,缝合加固。腹盆

腔用生理盐水和甲硝唑反复冲洗,直至液体变清,经10 mm Trocar或用标本袋取出阑尾,戳孔碘伏消毒液消毒,送病理检查。根据术中情况放置引流管。

OA组采用全麻或硬膜外麻醉,在麦氏点或右下经腹直肌切口,吸除腹腔积液,常规处理系膜及阑尾,荷包或8字包埋阑尾残端,甲硝唑冲洗腹腔,常规碘伏溶液冲洗切口,根据术中情况放置引流管。

1.2.2 指标观测: 观察两组手术时间,术后肛门排气时间,腹腔脓肿发生率,切口感染率,肠梗阻发生率及术后住院时间加以对比。

统计学处理 采用SPSS16.0软件进行处理,选用 u 检验或者 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

两组手术均成功,LA组无中转开腹。LA组较OA组手术时间长,差异有统计学意义($P<0.05$)。对比,LA组较OA组术后肛门排气时间及术后住院时间短,差异有统计学意义($P<0.05$)。术后随访1-24 mo。LA组腹腔脓肿1例,经彩超引导下穿刺引流后痊愈;术后切口感染3例,经局部切口换药治疗愈合;肠梗阻2例,保守治疗痊愈。OA组腹腔脓肿9例,7例彩超引导下穿刺引流,1例彩超引导下穿刺置管引流,1例再次开腹探查脓腔,吸尽脓液置管引流痊愈;切口感染28例,经局部切口换药和二期切口缝合痊愈;肠梗阻5例,4例保守治疗,1例再次手术行肠粘连松解术痊愈。两组均无术后出血、肠瘘和切口疝等并发症。两组腹腔脓肿发生率及切口感染率比较,LA组较OA组低,差异有统计学意义($P<0.05$)。术后肠梗阻发生率比较差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

3 讨论

腹腔镜应用于小儿阑尾炎,既是一种早期诊断手段,又是一种治疗方法。随着腔镜技术的发展,腹腔镜阑尾切除术治疗单纯性或慢性阑尾炎,损伤小、机体的应激反应轻、免疫抑制少^[3,4]、并发症少、胃肠功能恢复快、疤痕小,住院时间短的优势已得到公认^[5,6]。而在复杂性阑尾炎中的应用还存在争议。

Lintula等^[7]认为在处理阑尾周围脓肿的时候,因腔镜器械无手感而易有医源性损伤,导致术后并发症,建议及时中转开腹;Krisher等^[8]建议穿孔性阑尾炎应用开腹手术,因为LA增加腹腔脓肿几率。但近年来学者研究认为LA治疗复杂性阑尾炎是安全有效的手术方式。Nadler等^[9]报道穿孔性阑尾炎时应用LA总的并发症明显低于OA,但感染性并发症无明显差别。另有学者报道LA治疗穿孔

■研发前沿

腹腔镜阑尾切除术治疗单纯性阑尾炎,损伤小、并发症少、恢复快,住院时间短的优势已得到公认。而在复杂性阑尾炎(包括阑尾穿孔,阑尾坏疽,阑尾周围脓肿)中应用的安全性和可行性还存在争议。

■相关报道

Mallick等报道LA治疗穿孔性阑尾炎,在切口感染率和再就诊率,形成腹腔脓肿几率均明显降低;Nadler等报道穿孔性阑尾炎时应用LA总的并发症明显低于开腹手术,但感染性并发症无明显差别。

同行评价

本文设计方案合理,方法可行,结果较可信,但开展这些手术也不能盲目,必须在保证安全的情况下开展。

表 1 两组术后各项临床观察指标对比

| 分组 | n | 手术时间(min) | 术后肛门排气时间(h) | 腹腔脓肿 n(%) | 切口感染 n(%) | 肠梗阻 n(%) | 术后住院时间(d) |
|-------------------|-----|-------------|-------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| LA组 | 128 | 62.2 ± 15.3 | 26.8 ± 7.6 | 1(0.8) | 3(2.3) | 2(1.6) | 5.2 ± 2.3 |
| OA组 | 140 | 57.1 ± 6.4 | 42.9 ± 8.3 | 9(6.4) | 28(20.0) | 5(3.6) | 9.5 ± 2.6 |
| χ^2 值或 u 值 | | 3.50 | 16.58 | 4.374 | 20.378 | 0.418 | 14.36 |
| P值 | | <0.01 | <0.001 | 0.036 | <0.001 | 0.518 | <0.001 |

性阑尾炎,在切口感染率和再就诊率,形成腹腔脓肿几率均明显降低^[10-12]。本研究结果显示,LA与OA相比,腹腔脓肿、切口感染并发症的发生率均较低,考虑原因可能有:(1)LA减少了对肠管的牵拉翻转,避免了纱布对肠壁的反复摩擦,损伤。(2)大量盐水冲洗腹腔、盆腔。由于小儿大网膜尚未发育完善,炎症不易局限,脓液扩散机率大。利用腹腔镜视野广的特性,可彻底吸净腹腔隐匿部位的残余渗液,并做彻底冲洗及通畅引流,最大限度地清除了感染灶。(3)超声刀等器械的改进及广泛应用,减少了术中出血,减少了由热传导引起的副损伤,缩短了手术时间。(4)LA对肌肉和筋膜损伤小,体壁神经和肌肉免遭切断,疼痛轻,术后下床活动早,腹腔粘连减少^[10]。(5)三孔法延长腹膜创口与手术操作位置的距离,避免了腹壁切口的污染,可进一步减少了腹膜粘连的发生。有报道称使用一孔法或两孔法应用于LA^[13,14],因增加切口感染率,故不建议在复杂性阑尾炎时使用。(6)由于标本用标本袋或自套管中直接取出,减少了病灶接触内脏及筋膜,减轻了腹腔的污染,可进一步减少术后腹腔脓肿及窦道形成的发生率。(7)根部结扎,缝扎比用套扎形成残端瘘的几率小^[15]。(8)术中常规置入防粘连剂。(9)围手术期抗生素的应用。两组术前,术后均静脉应用头孢菌素或联合应用甲硝唑抗菌治疗。术中甲硝唑溶液冲洗腹盆腔,在腹腔镜监视下,可以对病灶进行更有针对性的冲洗。(10)手术均由有经验的术者施行。

本结果显示,手术时间LA组较OA组长,考虑由于腔镜下全腹腔冲洗,以及腔镜下缝合时间较长有关。但这并不影响术后恢复,相反,LA由于更彻底清除了感染病灶,使肛门排气时间缩短,胃肠道功能恢复更快,住院时间更短。

总之,本研究表明,LA较OA术后胃肠道功能恢复早,并发症少,住院时间短,痛苦小,美容效果好。故在腹腔镜手术操作熟练以后,复杂性阑尾炎已不再是手术禁忌,经腹腔镜行脓肿引流及阑尾切除术是安全可行的。

参考文献

- Semm K. Endoscopic appendectomy. *Endoscopy* 1983; 15: 59-64
- Chung RS, Rowland DY, Li P, Diaz J. A meta-analysis of randomized controlled trials of laparoscopic versus conventional appendectomy. *Am J Surg* 1999; 177: 250-256
- 覃兴尤, 李智勇, 陈卫民, 丁虹. 慢性阑尾炎腹腔镜与开腹手术切除阑尾对机体免疫功能影响的比较. *中国内镜杂志* 2008; 14: 539-541
- 李鹏, 郭正团, 徐泉, 张宪生, 高亚, 纪宗正. 小儿腹腔镜阑尾切除术与传统阑尾切除术创伤反应的对比研究. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 589-590
- Esposito C, Borzi P, Valla JS, Mekki M, Nouri A, Becmeur F, Allal H, Settini A, Shier F, Sabin MG, Mastroianni L. Laparoscopic versus open appendectomy in children: a retrospective comparative study of 2,332 cases. *World J Surg* 2007; 31: 750-755
- 王宇鹏, 吴晔明. 腹腔镜治疗儿童阑尾炎的系统评价. *中华小儿外科杂志* 2008; 29: 317-320
- Lintula H, Kokki H, Vanamo K, Antila P, Eskelinen M. Laparoscopy in children with complicated appendicitis. *J Pediatr Surg* 2002; 37: 1317-1320
- Krisher SL, Browne A, Dibbins A, Tkacz N, Curci M. Intra-abdominal abscess after laparoscopic appendectomy for perforated appendicitis. *Arch Surg* 2001; 136: 438-441
- Nadler EP, Reblock KK, Qureshi FG, Hackam DJ, Gaines BA, Kane TD. Laparoscopic appendectomy in children with perforated appendicitis. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2006; 16: 159-163
- Mallick MS, Al-Qahtani A, Al-Bassam A. Laparoscopic appendectomy is a favorable alternative for complicated appendicitis in children. *Pediatr Surg Int* 2007; 23: 257-259
- Taqi E, Al Hadher S, Ryckman J, Su W, Aspirot A, Puligandla P, Flageole H, Laberge JM. Outcome of laparoscopic appendectomy for perforated appendicitis in children. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 893-895
- Lin HF, Wu JM, Tseng LM, Chen KH, Huang SH, Lai IR. Laparoscopic versus open appendectomy for perforated appendicitis. *J Gastrointest Surg* 2006; 10: 906-910
- 李波, 胡三元, 张光永, 张强. 腹腔镜三孔法与二孔法阑尾切除术戳孔感染率的对比研究. *腹腔镜外科杂志* 2002; 7: 155-156
- 张强, 李波, 王建新, 付勤桦, 于文滨, 李霞. 两孔法, 三孔法腹腔镜及开腹阑尾切除术的对比. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 274-275
- Yagmurlu A, Vernon A, Barnhart DC, Georgeson KE, Harmon CM. Laparoscopic appendectomy for perforated appendicitis: a comparison with open appendectomy. *Surg Endosc* 2006; 20: 1051-1054

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

综合医院消化门诊以躯体症状为首发的抑郁症调查5 754例

王涛, 陈玉龙, 卢艳如

王涛, 陈玉龙, 卢艳如, 郑州大学第一临床学院老年科 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 王涛与陈玉龙对此文所作贡献均等; 此调查由王涛与陈玉龙设计; 调查过程由王涛与陈玉龙完成; 调查所用分析工具由陈玉龙提供; 数据分析由王涛与卢艳如完成; 本论文写作由王涛与卢艳如完成。

通讯作者: 卢艳如, 主任医师, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一临床学院老年科四病区. baiyuan6@126.com

收稿日期: 2009-12-04 修回日期: 2010-01-06

接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-03-18

A survey of depression patients with physical symptoms as the first symptom attending gastroenterology outpatient clinic of a general hospital: an analysis of 5 754 cases

Tao Wang, Yu-Long Chen, Yan-Ru Lu

Tao Wang, Yu-Long Chen, Yan-Ru Lu, Department of Geriatrics, the First of Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Yan-Ru Lu, Department of Geriatrics, the First of Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. baiyuan6@126.com

Received: 2009-12-04 Revised: 2010-01-06

Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To make a survey of depression patients with physical symptoms as the first symptoms attending gastroenterology outpatient clinic of a general hospital and to analyze the reasons for misdiagnosis of the disease.

METHODS: A total of 5 754 depression patients with somatic symptoms as the first symptom were surveyed with a self-rating mental health scale (SCL-90) and Chinese Classification and Diagnostic Criteria for Mental Disorders, 3rd edition (CCMD-3).

RESULTS: Only a small part of the patients (5.3%) visited psychological department, while most of the patients visited other clinical departments, of which only a small number of patients (7.2%) were identified by non-psychological physicians.

CONCLUSION: Only very few depression patients with physical symptoms as the first symptom can be identified and given appropriate treatment in gastroenterology outpatient clinics of general hospitals.

Key Words: Physical symptom; Depression; Gastroenterology outpatient clinic; Misdiagnosis

Wang T, Chen YL, Lu YR. A survey of depression patients with physical symptoms as the first symptom attending gastroenterology outpatient clinic of a general hospital: an analysis of 5 754 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 851-853

摘要

目的: 了解综合医院消化门诊以躯体症状为首发的抑郁症患者就诊状况和误诊分析。

方法: 采用心理健康症状自评量表(SCL-90)与中国精神疾病(心理障碍)分类方案与诊断标准(CCMD-3)调查我院消化门诊5 754例以躯体症状为首发的抑郁症患者。

结果: 只有少部分(5.3%)患者直接就诊于心理精神科, 大部分就诊于其他临床科室, 且表现的躯体症状多种多样, 其中仅7.2%被临床科室医师识别, 大部分被漏诊误治。

结论: 综合医院消化门诊就诊者以躯体症状为首发的抑郁症识别率很低。临床科室医师应提高对躯体疾病伴有抑郁症的识别和处理能力。

关键词: 躯体症状; 抑郁症; 消化门诊; 误诊

王涛, 陈玉龙, 卢艳如. 综合医院消化门诊以躯体症状为首发的抑郁症调查5 754例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(8): 851-853

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/851.asp>

0 引言

随着社会的快速发展、生活节奏的加快、紧张因素的增加, 抑郁现象已成为临床上一种常见疾病, 其发病率很高, 据世界卫生组织估计, 全

■背景资料

抑郁症是一种综合征, 涉及躯体和心理两个方面, 导致抑郁患者就诊途径的多样化, 特别是以躯体症状为首发的抑郁患者更应引起临床各专业医生的注意, 如果不能早期识别及对症治疗, 不仅不能及时有效地为患者减轻痛苦, 还会增加患者医疗费用, 延误治疗时机。

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

■研究前沿

本次研究是一项以消化门诊为基础的现况研究,研究共连续收集了合格研究对象5 754例,合格率98.6%,研究的样本量较充足,统计效率较高。

球发病率3%-5%,中国为6.9%^[1],近年来发病率呈上升趋势。国外报道抑郁症已是目前综合医院门诊中最常见的精神障碍,其患病率约为12%-40%^[2]。我国国内情况也基本相似,抑郁症在精神科的就诊率远远低于其他临床科室,约74%左右的抑郁症患者大多会首先选择在综合医疗机构就诊^[3]。抑郁症是一种综合征,涉及躯体和心理两个方面^[4,5],导致抑郁患者就诊途径的多样化,特别是以躯体症状为首发的抑郁症患者更应引起临床各专业医生的注意,如果不能早期识别及对症治疗,不仅不能及时有效地为患者减轻痛苦,还会增加患者医疗费用,延误治疗时机。因此,在综合医疗机构中开展对抑郁症的识别、诊治情况研究有着十分重要的意义^[6]。本调查对5 754例以躯体症状为首发的抑郁患者在消化门诊就诊和误诊状况进行了分析。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-07/2009-09我院消化门诊以躯体症状为首发症状的抑郁症患者5 836例,其中5 754例接受SCL-90量表及CCMD-3标准评价,应答率98.6%。诊断标准符合SCL-90 2级或因子分 ≥ 3 分。其中男2 803例(48.71%),女2 951例(51.29%);工人1 414例(24.57%),农民1 612例(28.01%),干部589例(10.23%),商人836例(14.53%),教师681例(11.84%),学生406例(7.06%),其他216例(3.76%)。平均年龄 (38.13 ± 2.12) 岁;平均病程 (3.4 ± 1.2) 年。将搜集到的合格病例的诊断分为心理精神专科医师(调查员)组和非专科医师组。两组间年龄、病程无统计学差异。

1.2 方法 本研究以消化门诊患者为基础的横断面研究。所有研究对象在调查前均签署了知情同意书,并由3名调查员使用统一自制临床资料调查表面对面调查。所有调查员均经过严格培训,能熟练掌握各项工具的使用及询问技巧,各工具的一致性检验均达高度一致性(组内相关系数 $ICC = 0.853, P < 0.05$)。调查内容包括对象的一般情况(姓名、性别、年龄、病程时间、文化程度、职业、社会经济状况等),躯体症状,首诊科室、检查、首诊诊断、治疗等。并进行SCL-90评分和CCMD-3评价。

统计学处理 所有数据均采用SPSS13.0统计软件包处理。疾病的识别率、构成比均以百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

表1 专科医师和非专科医师对抑郁症的识别比较 $n(\%)$

| | 抑郁症的识别 | | χ^2 值 | P 值 |
|-------|-------------|-------------|------------|-------|
| | 正确 | 不正确 | | |
| 专科医师 | 5 294(92.0) | 460(8.0) | 0.791 | 0.006 |
| 非专科医师 | 748(13.0) | 5 006(87.0) | | |

表2 5 754例抑郁患者的躯体症状分布情况

| 躯体症状类型 | $n(\%)$ |
|----------|-------------|
| 头痛 | 63(1.1) |
| 头晕或昏倒 | 52(0.9) |
| 胸痛 | 144(2.5) |
| 腰痛 | 305(5.3) |
| 恶心或胃部不舒服 | 3 867(67.2) |
| 肌肉酸痛 | 322(5.6) |
| 胸闷 | 69(1.2) |
| 发冷或发热 | 46(0.8) |
| 身体发麻或刺痛 | 40(0.7) |
| 咽部不适 | 362(6.3) |
| 身体无力 | 265(4.6) |
| 思维离奇 | 219(3.8) |

2 结果

2.1 一般情况 在5 754例合格研究对象中,平均年龄 (38.13 ± 2.12) 岁,平均病程 (3.4 ± 1.2) 年,其中男性2 803例,女性2 951例。

2.2 误诊率比较 对心理精神专科医师组和非专科医师组对就诊者抑郁症的识别情况进行比较发现,专科组对抑郁症的识别率高达92%,非专科组则为13%,见表1。结果表明,在综合医院消化门诊中非精神专科医师对抑郁症的识别率远远低于专科医师,其差别具有显著性($\chi^2 = 0.791, P = 0.006$)。5 754例抑郁患者的躯体症状按系统归类,各躯体症状类型分布情况见表2。

2.3 首诊科室情况 5 754例抑郁患者中首诊心理精神科305例(5.3%),心血管内科771例(13.4%),消化内科1174例(20.4%),神经内科650例(11.3%),内分泌科621例(10.8%),呼吸科644例(11.2%),外科616例(10.7%),风湿科512例(8.9%),疼痛科449例(7.8%),其他科12例(0.2%)。

2.4 首诊时非精神科诊治情况 5 754例抑郁患者中,除305例(5.3%)首诊时直接就诊与心理精神科门诊外,其余患者5449例(94.7%)就诊于非精神科时,曾给予了不同的诊断。其中神经衰弱、神经官能症610例(11.2%),植物神经紊乱801例(14.7%),冠心病567例(10.4%),更年期综

合征670例(12.3%), 风湿/类风湿病311例(5.7%), 胆囊炎234例(4.3%), 阑尾炎207例(3.8%), 乳腺增生263例(4.8%), 慢性胃肠炎1220例(22.4%), 心理障碍392例(7.2%), 其他174例(3.2%)。识别率7.2%, 误诊率92.8%, 就诊于非精神科抑郁症患者均有大量非精神科检查和相应治疗, 均无抗抑郁治疗。有68例患者曾经被诊断为抑郁症而未进行任何治疗, 其中34例认为没有必要治疗, 22例认为自己没有抑郁症状, 12例惧怕药物不良反应而不接受治疗。

3 讨论

抑郁症现已是一种高患病率、高复发率、高致残率和高自杀率的严重精神疾病^[7], 已成为危害人类健康及加重医疗负担的主要疾病之一^[8]。本次研究是一项以消化门诊为基础的现况研究, 研究共连续收集了合格研究对象5 754例, 合格率98.6%, 研究的样本量较充足, 统计效率较高。心理健康症状自评量表(SCL-90)和中国精神疾病分类方案与诊断标准(CCMD-3)评价率超过了95%, 表明本次研究有较好的代表性和依从性, 主要研究结果能较好真实、准确地反映当前我院消化门诊抑郁症的状况。

抑郁症在精神科的就诊率远远低于其他临床专业科室, 本次研究约94.7%左右的抑郁症患者首先选择在综合医疗非精神科就诊, 其就诊症状多种多样, 如头痛、头晕或昏倒、胸痛、腰痛、恶心或胃部不舒服、肌肉酸痛、呼吸困难、发冷或发热、身体发麻或刺痛、喉咙有梗死感、身体某一部位无力及有一些别人没有的想法或念头, 而在消化门诊则以恶心或胃部不舒服、咽部不适等为高表现症状。这些以躯体症状为首发的抑郁症患者因心理障碍症状不明显, 突出了躯体不适, 而且大多数只强调躯体症状, 坚持把症状归因与躯体疾病, 缺乏精神疾病知识, 从而造成非精神科医师难于正确识别, 进而导致漏误诊治^[9]; 其次非精神科医师缺乏精神科知识以及询问病史简单化也是造成低识别率的另一个主要原因^[10,11]。因此亟需加强对公众关于抑郁症科普知识的普及和宣传, 并且提高综合医院消化门诊医师对当前抑郁症的识别

情况、临床特点等现状的了解, 改变以往旧的生物学模式, 向生物-心理-社会医学模式转变, 加强精神专业知识, 提高对以躯体症状为首发的抑郁症的识别率, 减少误诊率, 避免不必要的昂贵检查和治疗, 并给予患者规范、合理、全程、个体化的心理及药物治疗, 使以躯体症状为首发的抑郁症患者早期就能得以正确诊治, 减少患者的经济负担、躯体痛苦和精神压力, 从而改善患者的社会功能和生活质量。

4 参考文献

- 1 吴文源. 综合医疗机构中抑郁症的诊断. 中华医学信息导报 2003; 18: 19
- 2 Balestrieri M, Bisoffi G, Tansella M, Martucci M, Goldberg DP. Identification of depression by medical and surgical general hospital physicians. *Gen Hosp Psychiatry* 2002; 24: 4-11
- 3 汤宜朗, 蔡焯基, 马辛. 抑郁症-基础与临床. 北京: 科学教育出版社, 2001: 36-37
- 4 Racette SB, Deusinger SS, Deusinger RH. Obesity: overview of prevalence, etiology, and treatment. *Phys Ther* 2003; 83: 276-288
- 5 胡大一. 心脏患者精神卫生. 北京: 人民军医出版社, 2006: 23-26
- 6 吴文源, 季建林. 综合医院精神卫生. 北京: 科学技术文献出版社, 2001: 20-24
- 7 Rentsch D, Dumont P, Borgacci S, Carballeira Y, deTonnac N, Archinard M, Andreoli A. Prevalence and treatment of depression in a hospital department of internal medicine. *Gen Hosp Psychiatry* 2007; 29: 25-31
- 8 范红. 60例躯体形式障碍临床特征分析. 临床精神医学杂志 2005; 15: 374
- 9 Isacson D, Bingeors K, von Knorring L. The impact of depression is unevenly distributed in the population. *Eur Psychiatry* 2005; 20: 205-212
- 10 Papakostas GI, Petersen T, Mahal Y, Mischoulon D, Nierenberg AA, Fava M. Quality of life assessments in major depressive disorder: a review of the literature. *Gen Hosp Psychiatry* 2004; 26: 13-17
- 11 Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, Gasquet I, Kovess V, Lepine JP, Angermeyer MC, Bernert S, de Girolamo G, Morosini P, Polidori G, Kikkawa T, Kawakami N, Ono Y, Takeshima T, Uda H, Karam EG, Fayyad JA, Karam AN, Mneimneh ZN, Medina-Mora ME, Borges G, Lara C, de Graaf R, Ormel J, Gureje O, Shen Y, Huang Y, Zhang M, Alonso J, Haro JM, Vilagut G, Bromet EJ, Gluzman S, Webb C, Kessler RC, Merikangas KR, Anthony JC, Von Korff MR, Wang PS, Brugha TS, Aguilar-Gaxiola S, Lee S, Heeringa S, Pennell BE, Zaslavsky AM, Ustun TB, Chatterji S. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA* 2004; 291: 2581-2590

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本文初步分析了以躯体症状为首发的抑郁症患者的门诊误诊状况, 对临床工作有一定参考价值。

《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, 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字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L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: 010-85381892, 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志谢中. 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 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1

材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。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。参考文献格式如下:

- 1 Jung EM, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6356-6364 [PMID: 18081224; DOI: 10.3748/wjg.13.6356]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

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 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)。

5 修回稿须知

5.1 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、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。

5.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删节时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、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。

5.3 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年国内国际会议预告

2010-03-25/28

第二十届亚太肝病学会年会

会议地点: 北京市

联系方式: info@apasl2010beijing.org

2010-04-02/05

第九届全国儿科放射学术大会

会议地点: 南京市

联系方式: gausli@yahoo.com.cn

2010-04-09/12

第二十六届国际放射学大会

会议地点: 上海市

联系方式: icr2010@cma.org.cn

2010-04-14/18

第四十五届欧洲肝脏研究协会会议(EASL)

会议地点: 奥地利, 维也纳

联系方式: <http://www2.kenes.com/liver-congress/pages/home.aspx>

2010-04-16/17

2010消化疾病诊断与鉴别诊断临床思维医师论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cmdabm@yahoo.com.cn

2010-05-01/05

美国消化疾病周(DDW)

会议地点: 美国, 新奥尔良

联系方式: <http://www.ddw.org/wmspage.cfm?parm1=679>

2010-05-13/16

第四届MDCA肿瘤分子靶向及个体化医疗高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: 010-58430577

2010-05-13/15

第五届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 南京市

联系方式: office@cnsld.org

2010-05-28/31

2010中国普外科焦点问题学术论坛

会议地点: 兰州市

联系方式: 2010fis@gmail.com

2010-06-04/06

2010国际腹部创伤暨第十届全国脾脏外科学术研讨会

会议地点: 合肥市

联系方式: qiaohaiquan2008@yahoo.com.cn

2010-06-04/06

第二届世纪坛国际结直肠肛门病论坛

会议地点: 北京市

联系方式: luoch301@gmail.com; luoch301@gmail.com

2010-06-17/21

2010年全国肝脏疾病临床学术大会暨欧洲肝病学会日

会议地点: 厦门市

联系方式: zhgz@vip.163.com

2010-08-18/21

第二十一届世界癌症大会

会议地点: 深圳市

联系方式: bgs@caca.sina.net

2010-08-19/22

第二十二次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: szzyy88@163.com

2010-09-01

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.csgd.org.cn/2010/>

2010-09-08/12

第九届全国介入放射学学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: csir2010@163.com

2010-09-09/11

中华医学会第十一次全国感染病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: infectioncma@163.com

2010-09-10/12

第四届国际肝病学会年会

会议地点: 加拿大, 蒙特利尔

联系方式: info@ilca-online.org

2010-09-16/19

第十三届全国临床肿瘤学大会暨2010年CSCO学术年会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://reg.cSCO.org.cn/reg2010/>

2010-10-23/27

第十八届欧盟胃肠病周

会议地点: 西班牙, 巴塞罗那

联系方式: <http://uegw10.uegf.org/>

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!

陈进宏 副主任医师
复旦大学附属华山医院外科

陈敬贤 教授
安徽医科大学微生物教研室

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

范建高 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

房林 副教授
同济大学附属上海市第十人民医院普外科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

黄志勇 教授
华中科技大学同济医院普外科

季国忠 教授
南京医科大学第二附属医院消化科

姜慧卿 教授
河北医科大学第二医院消化科

李华山 主任医师
中国中医科学院广安门医院肛肠科

李军祥 教授
北京中医药大学附属东方医院消化内科

李永翔 主任医师
安徽医科大学第一附属医院普外科

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

李玉民 教授
兰州大学第一医院普外科

刘成海 研究员
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

刘改芳 主任医师
河北医科大学第三医院消化内科

刘海峰 教授
武警总医院消化科

刘海林 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房

邵先玉 主任医师
泰山医学院附属医院消化内科

沈洪 教授
南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科

宋于刚 教授
南方医科大学南方医院消化内科研究所

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝胆外科中心

王炳元 教授
中国医科大学附属第一医院消化内科

王凯 教授
山东大学齐鲁医院肝病科

杨建民 教授
浙江省人民医院消化内科

张国梁 主任医师
天津市第一中心医院消化内科

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

张志坚 教授
福州总医院消化内科

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科