

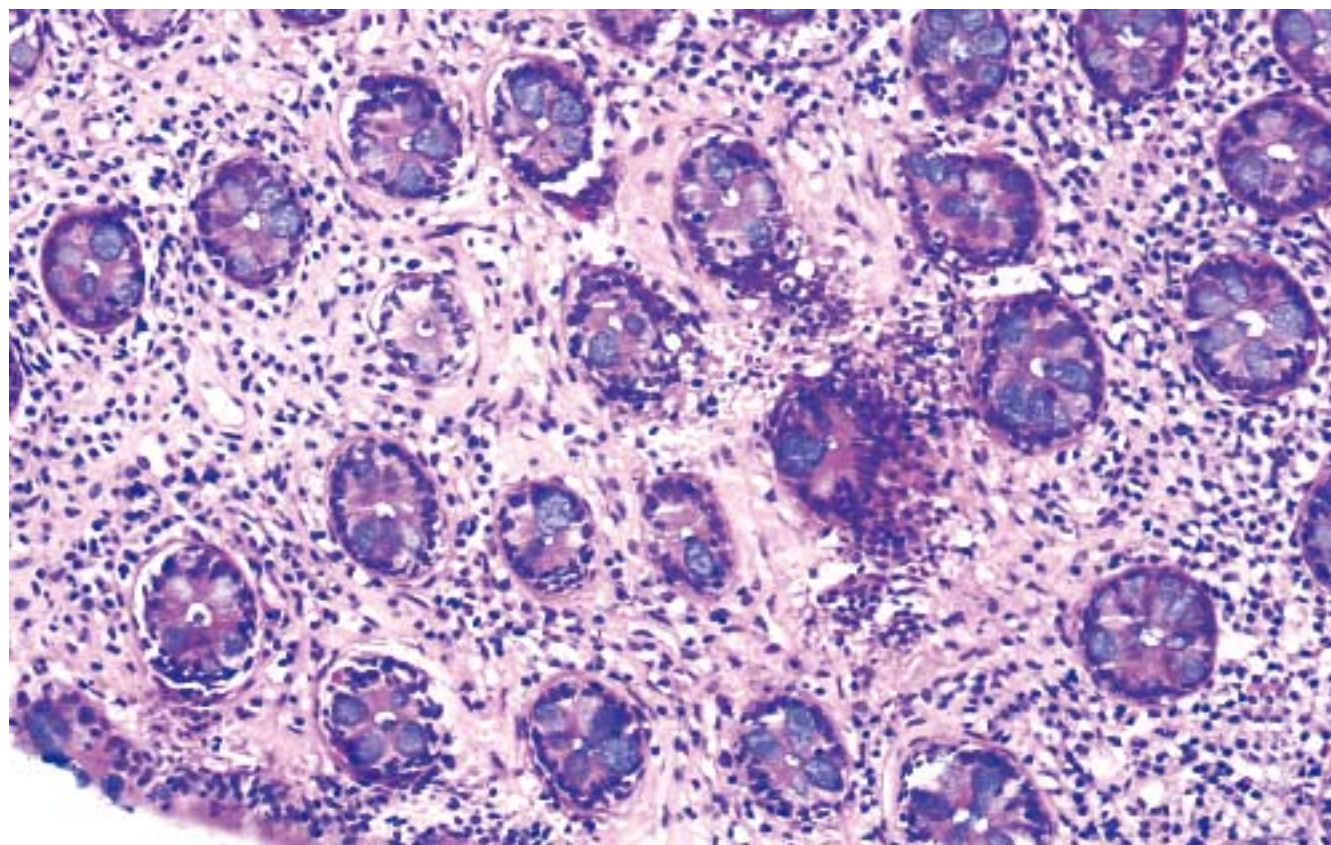
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2011年1月28日 第19卷 第3期 (Volume 19 Number 3)



# 3/2011

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

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

### 编委

#### 消化内科学

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

崔立红教授  
邓长生教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师

高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授  
何松教授

洪天配教授  
侯晓华教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
霍丽娟教授  
季国忠教授  
江米足主任医师

姜春萌教授  
姜慧卿教授  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
廖家智副主任医师

林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师  
刘铁夫教授  
刘莹副主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
吕志武教授  
马红主任医师  
马欣主任医师

毛高平教授  
孟庆华教授  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵玉玉教授

沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授

田宇彬教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授

许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张晓岚教授  
张筱茵副教授

张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
周国雄主任医师  
周晓东副教授  
周宇教授  
朱春兰主任医师  
邹晓平主任医师  
诸琦教授

#### 消化外科学

白雪巍副主任医师  
蔡开琳副教授

蔡三军主任医师  
曹杰主任医师  
陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波教授  
陈凜教授  
陈强谱教授

陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
崔云甫教授

戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
董明教授  
杜成友教授  
杜顺达副主任医师  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师

高成新教授  
葛海燕教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾国利副主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
郝立强副教授  
何超教授

何晓顺教授  
何裕隆教授  
黄志勇教授  
季加孚教授  
姜卫东教授  
姜波健教授  
蒋龙元副教授  
金山副教授  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师  
李杰教授

李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
李小荣教授  
李旭副教授  
李永翔主任医师  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授

刘宝林教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘颖斌主任医师  
卢实春教授  
陆才德教授  
陆云飞教授  
禄韶英副主任医师

吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师

邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
仇毓东副教授  
裘正军教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
施宝民教授  
施诚仁教授  
施晓雷副主任医师

石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤恢焕教授  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

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

张宗明教授  
赵刚副教授  
智绪亭教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈任珠主任医师  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
高润平教授  
高泽立副教授  
高志良主任医师  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
郝春秋副教授  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
靳雪源副主任医师  
林菊生教授  
刘正稳教授  
宁琴教授  
牛俊奇教授  
钱林学主任医师  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
唐晓鹏教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
魏来教授  
吴建国教授  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨华副主任医师  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵连三教授  
赵秀英副教授  
周霞秋教授  
朱传武主任医师

庄林主任医师

### 消化中医学

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

### 消化肿瘤学

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

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授

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

### 消化内镜及介入治疗学

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

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
杨钦河教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

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

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

### 消化病理学

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

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011年1月28日 第19卷 第3期 (总第335期)

述 评	221 原发性肝细胞癌介入治疗的现状与进展 李臻, 张文广, 韩新巍
基础研究	227 己酮可可碱对重度失血性休克大鼠再灌注后肝损伤的影响 陆化梅, 耿智隆, 赵峰, 杨木强 233 ITF对PAF引起的肠上皮细胞骨架F-actin破坏的抑制作用 许玲芬, 滕旭, 吴捷, 郭静, 毛志芹, 孙梅 240 SUMO-1、MDM2和P53对5-Fu诱导细胞凋亡的影响 卢星榕, 沈松菲, 池畔
临床研究	246 TTF2在胃癌、癌旁及正常胃黏膜组织中的表达及其与血管生成的关系 石磊, 赖铭裕, 梁志海, 刘诗权, 黄杰安, 唐国都, 姜海行 251 WWOX基因转染对胆管癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响 朱凯, 黄强, 邵峰, 任维华 257 针刺治疗腹泻型肠易激综合征的随机对照试验 钱火辉, 朱永革, 蒙珊, 齐国豪, 赵星星 262 $\beta$ -catenin在锯齿状腺瘤中的蛋白表达及基因突变 代小娟, 王鲁平, 韩英, 王瑾
文献综述	268 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展 邵祥强, 肖华胜 275 小鼠部分肝切除术的现状与应用 李一, 胡建军, 韩伟, 俞雁
研究快报	281 CO及肺泡血管壁通透性在肝硬化大鼠中的变化 杨树平, 王吉耀, 郭津生 284 Wnt信号通路在HepG2细胞株及其克隆形成细胞中表达的异质性 王宝松, 魏德全, 于树娜, 姜栋栋, 赵金岭, 史才兴, 蒋吉英
临床经验	289 内镜治疗并发胃肠道出血的预防与处理 赵保民, 赵曙光, 刘震雄, 王旭霞, 杨琦, 赵玉玲, 周惠萍, 姜慧玲, 闻勤生 295 血清载脂蛋白水平在HBV慢性肝病肝损伤程度判断中的作用 邢欣悦, 刘梅, 郑素军, 张莹, 武聚山, 俞豪, 李长勇, 白丽, 刘霜, 段钟平 301 糖尿病患者胆囊排空功能障碍40例 卢丽君, 严祥, 马苏美 305 十二指肠镜在诊治腹腔镜胆囊切除术后胆漏中的应用 丁国乾, 秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁 309 肠易激综合征患者的精神心理因素与自主神经功能紊乱 常媛媛, 王邦茂, 王玉明, 张洁, 苏帅 314 Twist1, MMP-2和MMP-9在结直肠癌组织中的表达及意义 杨振忠, 吴正升, 法文, 李守新, 吕永芳

	318 结直肠癌脾转移3例 王军, 张宝良, 郭德智, 袁庆鑫
病例报告	321 胶原性肠炎1例 郭亮, 曲丽梅, 王银萍, 徐红
附录	324 《世界华人消化杂志》投稿须知 329 2011年国内国际会议预告
志 谢	330 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	226 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625 239 《世界华人消化杂志》正文要求 245 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 250 《世界华人消化杂志》栏目设置 256 《世界华人消化杂志》修回稿须知 267 《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》 280 《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》 288 <i>WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR</i> 6本期刊被PMC收录 304 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 308 《世界华人消化杂志》出版流程 313 《世界华人消化杂志》参考文献要求 320 汤姆森-路透公布2009年 <i>WJG</i> 影响因子2.092 323 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
封面故事	郭亮, 曲丽梅, 王银萍, 徐红. 胶原性肠炎1例. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 321-323 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/321.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/321.asp</a>
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

# 世界华人消化杂志

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创刊 1993-01-15

改刊 1998-01-25

出版 2011-01-28

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣

总编辑 马连生

编辑部主任 李军亮

期刊名称 世界华人消化杂志

主管单位 山西省科学技术厅

主办单位 太原消化病研治中心

**编辑** 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街77号  
电话: 0351-4078656

E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

**出版** 世界华人消化杂志编辑部  
030001, 山西省太原市双塔西街77号  
电话: 0351-4078656

E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

**印刷** 北京科信印刷厂

**发行** 国内: 北京报刊发行局  
国外: 中国国际图书贸易总公司  
(100044, 北京市399信箱)

**订购** 全国各地邮电局

**邮购** 世界华人消化杂志编辑部  
030001, 山西省太原市双塔西街77号  
电话: 0351-4078656  
E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

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

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.baishideng.com/wjcd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.

### 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2011年版版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)** 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证  
CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期56.00元 全年2016.00元 1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# World Chinese Journal of Digestology

## January 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 3

<b>EDITORIAL</b>	221 Recent advances in interventional therapy of hepatocellular carcinoma <i>Li Z, Zhang WG, Han XW</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	227 Treatment with pentoxifylline reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats with severe hemorrhagic shock <i>Lu HM, Geng ZL, Zhao F, Yang MQ</i> 233 Treatment with ITF attenuates PAF-induced disruption of the F-actin cytoskeleton in an <i>in vitro</i> model of intestinal epithelium <i>Xu LF, Teng X, Wu J, Guo J, Mao ZQ, Sun M</i> 240 Role of SUMO-1, MDM2 and P53 in 5-fluorouracil-induced apoptosis of HepG2 cells <i>Lu XR, Shen SF, Chi P</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	246 Correlation between TFF 2 expression and tumor angiogenesis in gastric carcinoma, adjacent carcinoma and normal gastric mucosa <i>Shi L, Lai MY, Liang ZH, Liu SQ, Huang JA, Tang GD, Jiang HX</i> 251 WWOX gene transfection inhibits proliferation, accelerates apoptosis, and reduces invasion in human cholangiocarcinoma cell line QBC939 <i>Zhu K, Huang Q, Shao F, Ren WH</i> 257 Acupuncture treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial <i>Qian HH, Zhu YP, Meng S, Qi GH, Zhao XX</i> 262 Protein expression and gene mutations of $\beta$ -catenin in colorectal serrated adenoma <i>Dai XJ, Wang LP, Han Y, Wang J</i>
<b>REVIEW</b>	268 Liver fibrosis: pathogenesis and clinical diagnosis <i>Shao XQ, Xiao HS</i> 275 Partial hepatectomy in mice: current status of research and implications for clinical practice <i>Li Y, Hu JJ, Han W, Yu Y</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	281 Alterations in plasma carbon monoxide levels and alveolar permeability in cirrhotic rats <i>Yang SP, Wang JY, Guo JS</i> 284 Heterogeneous expression of Wnt signal molecules in parental HepG2 cells and HepG2 colony-forming cells <i>Wang BS, Wei DQ, Yu SN, Jiang DD, Zhao JL, Shi CX, Jiang JY</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	289 Prevention and treatment of gastrointestinal bleeding after therapeutic endoscopy for alimentary tract disease <i>Zhao BM, Zhao SG, Liu ZX, Wang XX, Yang Q, Zhao YL, Zhou HP, Jiang HL, Wen QS</i> 295 Significance of serum apolipoprotein levels in assessing the degree of liver injury in patients with HBV-related chronic liver disease <i>Xing XY, Liu M, Zheng SJ, Zhang Y, Wu JS, Yu H, Li CY, Bai L, Liu S, Duan ZP</i> 301 Gallbladder emptying dysfunction in diabetic patients: an analysis of 40 cases <i>Lu LJ, Yan X, Ma SM</i> 305 Duodenoscopic diagnosis and treatment of bile leakage after laparoscopic cholecystectomy

	<p><i>Ding GQ, Qin MF, Wang Q, Gou CY, Li N</i></p> <p>309 Psychological alterations and autonomic nervous dysfunction in patients with irritable bowel syndrome <i>Chang YY, Wang BM, Wang YM, Zhang J, Su S</i></p> <p>314 Expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 in colorectal cancer <i>Yang ZZ, Wu ZS, Fa W, Li SX, Lv YF</i></p> <p>318 Clinical and pathological features of splenic metastases of colorectal carcinoma: an analysis of three cases <i>Wang J, Zhang BL, Guo DZ, Yuan QX</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>321 Collagenous colitis: a report of one case <i>Guo L, Qu LM, Wang YP, Xu H</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>324 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>329 Meeting events calendar in 2011</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>330 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Guo L, Qu LM, Wang YP, Xu H</i>. Collagenous colitis: a report of one case. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(3): 321-323 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/321.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/321.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></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** January 28, 2011

### 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](mailto: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](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

### SUBSCRIPTION

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

### CSSN

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

### COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights re-  
served; 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, re-  
cording, or otherwise without the prior per-  
mission of *WCJD*. Authors are required to  
grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

### SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal repre-  
sent 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](http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp). If  
you do not have web access please contact  
the editorial office.

**Copyright** © 2011 by Editorial Department  
of *World Chinese Journal of Digestology*

# 原发性肝癌介入治疗的现状与进展

李臻, 张文广, 韩新巍

李臻, 张文广, 韩新巍, 郑州大学第一附属医院放射介入科  
郑州大学介入治疗研究所 河南省高等学校临床医学重点开  
放实验室 河南省郑州市 450052  
韩新巍, 教授, 主任医师, 主要从事影像诊断与介入放射治疗方  
面的研究。  
作者贡献分布: 李臻与张文广综述; 韩新巍审校。  
通讯作者: 韩新巍, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市, 郑  
州大学第一附属医院放射介入科, 郑州大学介入治疗研究所。  
hanxinwei2006@163.com  
收稿日期: 2010-11-24 修回日期: 2010-12-30  
接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-01-28

## Recent advances in interventional therapy of hepatocellular carcinoma

Zhen Li, Wen-Guang Zhang, Xin-Wei Han

Zhen Li, Wen-Guang Zhang, Xin-Wei Han, Department of Interventional Therapy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Interventional Radiology Institute, Zhengzhou University; Key Laboratory of Clinical Medicine of Universities in Henan, Zhengzhou 450052, Henan Province, China  
Correspondence to: Professor Xin-Wei Han, Department of Interventional Therapy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. hanxinwei 2006@163.com  
Received: 2010-11-24 Revised: 2010-12-30  
Accepted: 2011-01-06 Published online: 2011-01-28

## Abstract

Great progress has been made in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) in recent years. Interventional therapy-containing multimodal therapy plays a predominant role in the treatment of HCC. There are mainly two intervention methods available: intervascular and non-vascular interventional therapy. Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) and local ablation therapy are representative means of them, respectively. Interventional radiology in combination with targeted therapy further enriches the content of interventional therapy for HCC. In this article, we summarize the recent advances in interventional therapy of HCC in terms of therapeutic principles, indications, therapeutic effects, contraindications, and pros and cons of various therapeutic methods.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Inter-

tional radiology; Ablation; Targeted therapy

Li Z, Zhang WG, Han XW. Recent advances in interventional therapy of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 221-226

## 摘要

临床对原发性肝癌(HCC)的治疗已取得了长足进步,其中以介入放射学为主的综合治疗在整个治疗中占据重要地位。HCC的介入治疗方法主要包括以肝动脉化疗栓塞(TACE)为代表的血管内介入治疗和以局部消融为主的非血管介入治疗,而介入结合靶向治疗更进一步丰富了HCC介入治疗的内涵。本文将分别从HCC介入治疗的不同方法、原理、适应证、疗效和优缺点等方面就其治疗现状与进展作一综述。

关键词: 肝癌; 介入放射学; 消融; 靶向治疗

李臻, 张文广, 韩新巍. 原发性肝癌介入治疗的现状与进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(3): 221-226  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/221.asp>

## 0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是消化系常见恶性肿瘤,具有发病率高、复发率高、预后差的特点,5年生存率极低。HCC早期不论通过肝切除术、肝移植术或介入治疗等,5年生存率均可达到50%左右<sup>[1]</sup>。但临床中多数患者确诊时已达晚期,且多伴有乙肝、肝硬化,具有外科手术指证者不足25%。目前,采用以介入为主的非手术综合治疗HCC取得很大进展,其疗效已为临床所公认。现就HCC介入治疗的现状和进展作一综述。

## 1 血管内介入治疗

1.1 经导管肝动脉化疗栓塞术 经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是目前中晚期HCC治疗的主要方法,原理是通过栓塞肿瘤供血动脉使肿瘤缺血坏死、缩小,有助于二期切除;同时抗肿瘤药物可

## ■背景资料

原发性肝癌细胞癌(HCC)的综合治疗已备受临床重视,介入治疗在其综合治疗策略中占有重要地位,取得了公认的疗效。不同的介入治疗方法各有利弊,互相结合,优势互补,以最大程度发挥疗效,是临床研究的发展方向。介入结合分子靶向治疗已初见成效,临床应用前景广阔。

## ■同行评议者

钱林学, 教授, 首都医科大学附属北京友谊医院内科



## ■ 研发前沿

介入治疗已成为原发性HCC治疗的主要手段,尤其对于进展期肝细胞癌,是临床研究的热点问题.随着医学科技的不断发展,介入治疗的方法在不断革新,如何充分发挥各治疗方法的优点,如何规范、科学的联合治疗是临床研究的重点方向.

在肿瘤局部缓慢释放发挥化疗作用,但起主要作用的是栓塞.此外,对于小肝癌的疗效亦肯定,可与外科切除相媲美.主要适应证<sup>[2]</sup>:外科无法根治性切除且肝功能尚好,无门脉主干癌栓;肿瘤体积不超过全肝70%;拟二期切除者;外科术后预防性治疗等.无严重肝肾功能障碍者一般均可耐受.TACE不足之处为肿瘤易复发、转移,常需多次治疗.即使完全彻底的栓塞亦不能保证肿瘤完全灭活,残留细胞在特定机制调控下可逐渐适应乏氧微环境,血管内皮生长因子高表达,致侵袭转移能力提高<sup>[3]</sup>.所以控制肿瘤复发与转移是目前HCC研究的焦点<sup>[4]</sup>.

近年超微导管技术应用实现了肝段或亚肝段栓塞,进一步提高了疗效<sup>[5]</sup>.日本学者分析了8 510例无法手术切除的HCC患者接受TACE治疗,中位生存期为34 mo,1、3、5和7年的生存率分别为82%、47%、26%和16%<sup>[6]</sup>;Varela等<sup>[7]</sup>报道经TACE治疗的患者,1、2年的生存率分别是92.5%、88.9%,即使伴门脉癌栓者经TACE治疗也可使平均生存时间延长至9.5 mo,1年生存率达25%<sup>[8,9]</sup>.

**1.2 热化疗栓塞** 介入术中经导管以温热化疗药、碘化油乳剂进行化疗栓塞,称热化疗栓塞<sup>[10]</sup>.其原理是基于细胞的热敏感差异,正常细胞加热到45℃以上开始死亡,而肿瘤细胞一般只耐受40℃-43℃的温度.温热使细胞膜通透性增强,促进化疗药进入细胞内并在细胞内移行,同时提高癌组织中活性氧含量,杀伤各期癌细胞;亦能快速增加血液中T淋巴细胞及NK细胞的数量,对控制肿瘤转移起积极作用.影响其疗效的因素主要有热化疗时间、温度、灌注液总量及流速、热疗的连续性等.实验证明<sup>[11]</sup>,科学的灌注液温度为(47.55±0.44)℃,并维持灌注10 min,以达到最大杀伤作用;短期有效率和1年生存率分别达到79.2%和50.0%.适应证选择:直径<3 cm原发与转移性单发肿瘤或病灶个数<3个;直径在3-8 cm,病灶数目3个以下者.有大量腹水,重度黄疸和肝功能衰竭者、严重凝血功能障碍者为禁忌.另有学者对门脉栓塞(portal vein embolism, PVE)及肝动脉-门脉联合栓塞术进行了研究,相关研究证实<sup>[12]</sup>,PVE已广泛用于肝切除术前,疗效肯定;但由于部分HCC病变广泛,即使PVE后残肝仍不能充分代偿功能需要,此时TACE为配合治疗首选方法.

## 2 非血管介入治疗

主要指经皮穿刺局部消融治疗,即消融针经

皮肝穿刺途径至肿瘤靶区,利用化学和(或)物理方法对瘤床进行毁损,主要包括以下内容.

### 2.1 化学消融术

**2.1.1 经皮瘤内无水乙醇注射:**属化学消融,治疗机制为无水乙醇的蛋白凝固作用和继发微血管栓塞.因瘤灶内阻力低于周围肝组织,无水乙醇可在瘤灶内良好扩散,发挥治疗作用,具有费用低廉、安全、并发症少等优点,可实施于肝区任何部位.对瘤径<2 cm的肿瘤有效率可达90%-100%<sup>[13]</sup>,等同根治性切除.对于瘤径<3 cm以及肿瘤数目≤3的患者,经皮瘤内无水乙醇注射(percutaneous ethanol injection, PEI)后5年生存率可达64.7%<sup>[14]</sup>,但缺点是对于较大肿瘤往往难以达到彻底灭活,需多次注射;乙醇流向不易控制,易损害门脉、胆管等结构.肿瘤大小、有无分隔、剂量及穿刺准确性等都是影响疗效的因素.新型消融针的问世提高了PEI疗效,其由18G注射针杆和3支可伸缩子针组成,每支子针上有4个注射孔.穿刺进入肿瘤后从母针先端展开伞状子针,乙醇从12个注射孔同时喷射,使弥散范围扩展到直径为5 cm的肿瘤,但仍需反复治疗<sup>[15]</sup>.

无论注射无水乙醇抑或醋酸均可造成组织即刻坏死,从而在注射针周围形成一蛋白坏死膜,限制了药物弥散而难以均匀分布于瘤内.冰醋酸虽弥散性好,但可穿透包膜引起周围组织的损伤,应慎用<sup>[16]</sup>.法国一项单中心试验表明,荧光CT引导下经皮注射醋酸治疗小肝癌近期疗效较好,风险小,并可用于有腹水及严重凝血功能障碍者.但因HCC的高复发率和病灶多点起源的特点,限制了该技术的临床应用<sup>[17]</sup>.目前醋酸消融在国内已淘汰,国外也仅日本少数国家应用. PEI和TACE比较,各具特点: TACE很难一次性灭活肿瘤,复发率、转移率较高,反复TACE亦可加重肝功损害.而PEI对正常肝功能无损害,对碘油缺失区治疗有效,但因无水乙醇在肿瘤内弥散程度有限,不适宜大肝癌的治疗, TACE与PEI联合应用,可取长补短,较单一治疗生存率均有显著提高<sup>[18]</sup>.

### 2.2 物理消融

**2.2.1 经皮射频消融治疗:**为肿瘤微创热疗新技术,经皮射频消融治疗(radiofrequency ablation, RFA)治疗HCC疗效已得到临床肯定.射频电流经电极针使靶组织产生正负离子,其在射频电场中高速振动、升温,使局部组织发生变性、坏死.研究表明, RFA可以抑制肿瘤的血管生成,

减少肿瘤血供, 限制肿瘤生长, 故在肿瘤血管生成阶段来阻断肿瘤进展是RFA的治疗机制之一。此外, RFA通过诱导高温凝固坏死区周边细胞凋亡可扩大消融范围, 为RFA另一重要治疗机制。

如何使一次治疗能够尽可能多的使肿瘤坏死、扩大消融范围等一直是研究的核心问题。近年RFA取得的主要进展是: 多叉电极针及集束电极针、带冷却装置电极针的临床应用, 减少了组织碳化, 提高了疗效。张耀军等<sup>[19]</sup>报道RFA治疗803例肝脏恶性肿瘤(其中HCC 672例、肝转移瘤131例), 完全消融率达92.5%, 术后1、2、3、4及5年累积生存率分别为95.1%、85.6%、75.7%、60.7%、47.5%。鉴于RFA与PEI的适应证类似, Seror等<sup>[20]</sup>比较了二者疗效, 其2年总生存率分别为91.2%、70.8%, 有显著性差异, 提示RFA疗效优于PEI, 与Doros<sup>[21]</sup>报道一致。对单发、直径 $\leq 5$  cm或肿瘤数目1-3个且直径 $\leq 3$  cm的小肝癌RFA总体疗效优于PEI<sup>[22]</sup>。小肝癌、不能手术或术后复发的肝癌及肝转移瘤均为RFA治疗指征。对小肝癌的疗效可等同外科手术, 3年生存率明显高于3-5cm大小的肿瘤(61.46% vs 38.71%); 当直径 $> 5$  cm时, 3年生存率仅为27.62%<sup>[23]</sup>。Shibata等<sup>[24]</sup>亦通过对照研究发现TACE联合RFA治疗小肝癌较单一RFA疗效无差异, 认为无需联合治疗。

对于邻近胃肠道或位于膈顶、有巨大血管包绕等特殊部位的HCC病灶, RFA技术操作风险较大, 此时PEI可作为候选治疗方法; 其联合TACE或RFA治疗HCC, 疗效较满意<sup>[25]</sup>。虽有报道RFA可引起0.5%-2.8%针道种植发生率, 但针道消融可基本避免该并发症。对严重肝功能障碍、大量腹水、凝血功能障碍者、弥漫性肝癌、妊娠及安装心脏起搏器的患者, 应视为RFA禁忌。作为治疗HCC的新技术, RFA尚缺乏大样本、前瞻性对照研究及长期的随访研究。如何提高RFA疗效一直是临床面临的主要问题, 目前已公认将多种微创治疗手段相结合、序贯联合应用以及联合生物治疗的综合治疗。

**2.2.2 经皮微波消融治疗:** 经皮微波消融治疗(percutaneous microwave coagulation therapy, PMCT)通过多针组合等方法显著提高了一次性肿瘤灭活的体积, 在HCC非手术治疗中的作用日益突出。其原理类似于RFA, 使肿瘤组织温度升高、变性、凝固坏死, 具有升温效率高、有效凝固区大、适形调控性强、坏死彻底及对正常肝组织损伤小等优点, 完全消融率可达91.9%<sup>[26]</sup>。Shibata等<sup>[24]</sup>比较了PMCT与RFA对

HCC的疗效, 认为完全消融率和肿瘤残存率无显著差异, 但射频组治疗次数明显少于微波组, 而治疗时间显著长于微波组。吕明德等<sup>[27]</sup>也分别比较了两种方法消融率、不良反应、并发症及生存率, 亦无明显差异。可见RFA、PMCT二者疗效基本相同, 近期疗效同手术切除<sup>[28]</sup>。其适应证和RFA类似, 不同之处在于PMCT可适用于带有心脏起搏器的HCC患者。由于微波消融在日本、中国应用较多, 彼此采用设备不同, 研究结果也有差异。2005年美国肝病学会将RFA、PEI列入肝癌治疗指南<sup>[29,30]</sup>。

**2.2.3 高强度聚焦超声:** 高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)的临床应用始于治疗前列腺增生肥大, 1997年底我国将这一自主知识产权技术率先用于肿瘤临床治疗, 并使我国在该领域中的研究水平处于国际领先地位<sup>[15]</sup>。其作用机制是利用超声的可视性、组织穿透性和聚焦性等物理特征, 通过其加热效应、空化效应和机械效应, 从体外定位, 直接破坏体内深部肿瘤组织, 使局部肿瘤组织温度骤升(达65℃以上), 细胞内蛋白质迅速凝固, 引起肿瘤细胞不可逆性死亡。随机对照及长期随访研究<sup>[31,32]</sup>表明, 对于巨块型HCC, HIFU联合TACE治疗疗效明显强于TACE组, 无严重并发症发生, 技术安全。虽然HIFU可对深部肿瘤进行治疗, 但治疗耗时, 且对于边缘不规则的肿块, 因呼吸运动影响, 治疗时可能会产生“脱靶”现象, 影响疗效。

另有经皮穿刺激光消融术, 其疗效与输出功率和作用时间有关; 与其他热消融疗法相比, 组织凝固范围较小, 对于较大肿瘤消融耗时太长, 又因其他热消融方法的普及, 已被临床逐渐淘汰。

**2.3 冷消融** 主要是氩氦刀冷冻消融术(argon helium system cryo-ablation, AHSCA): 1850年Arnett曾报道应用冰冻盐溶液(约-18℃~-24℃)作为冷媒局部治疗进展期乳腺癌、宫颈癌, 发现肿瘤缩小, 疼痛减轻, 开创了冷冻治疗肿瘤的先河<sup>[15]</sup>。其原理是通过细胞损伤和血管损伤两个机制产生肿瘤坏死效应。细胞损伤主要由冻-融循环的有害作用即时产生, 累进的微循环衰竭造成血管损伤、血流停滞, 引起组织坏死; 具有精确定位、准确控温、适时监测等优点, 开辟了HCC治疗新领域。此外, AHSCA可激发机体抗肿瘤免疫功能: 术后肿瘤大分子抗原成分明显减少, 小分子蛋白抗原和巨噬细胞增加, INF和PGE<sub>2</sub>活性增强<sup>[33]</sup>。马志刚等<sup>[34]</sup>研究表明治疗后肿块缩小或形成空洞者占81.2%, AFP转阴率66.7%, 术后

#### ■ 相关报道

Davis、Zhang等均强调对进展期HCC, TACE应联合其他介入治疗方法行序贯、综合治疗以获得最佳疗效。

### ■应用要点

通过分析、比较不同HCC介入治疗方法间的疗效、优缺点等,为临床个体化、规范化治疗HCC提供了依据。

6 mo生存率达76.9%。在冷消融中冰球覆盖范围要求超过影像学显示的肿瘤边缘1 cm以上,以保证肿瘤完全灭活,这是预防复发、提高疗效的关键。冷冻消融疗效肯定,可短期内减轻瘤负荷,生存率可与外科相媲美<sup>[35]</sup>,但临床亟需远期随访研究以充分评价疗效。

影响AHSCA疗效的因素包括靶组织损伤温度和冷冻-复温速率、消融次数、组织物性参数及冷刀半径等。组织物性参数(如血液灌注率、代谢率等)不同,形成冰球直径不同。血液灌注率、代谢率越高,相同条件下形成的冰球尺寸越小,有效治疗半径就越小。所以在实施AHSCA时应充分考虑不同组织间冷冻及复温特性的差别、肿瘤的大小和位置,使治疗方案个体化以确保疗效<sup>[36]</sup>。

关于各种消融术的并发症和安全性评价,总体认识是一致的,即并发症和致死率均较低。多中心研究表明物理消融致死率约为0.1%-0.5%,严重并发症和轻微并发症的发生率分别为2.2%-3.1%和5%-8.9%<sup>[37]</sup>。化学消融的并发症亦较少,除极少人对酒精过敏外,多数耐受性良好。总之,消融治疗HCC是比较安全的。

### 3 靶向治疗

随着基础医学研究的不断进步,HCC的介入治疗逐渐由临床研究深入到基础研究,新一代分子靶向药物已应用于临床并与介入放射学相结合,取得较好的疗效,应用前景广阔。分子靶向治疗以改变肿瘤细胞特性为作用靶点,在发挥更强的抗肿瘤活性的同时减少对正常细胞的不良反应。根据药物的作用靶点和性质,主要将分子靶向药物分为以下几类:小分子表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂、抗EGFR单抗、抗HER-2单抗、Bcr-Abl酪氨酸激酶抑制剂、血管内皮生长因子受体抑制剂、抗CD20的单抗、IGFR-1激酶抑制剂、泛素-蛋白酶体抑制剂等。虽然靶向治疗药物种类较多,但目前用于治疗HCC的药物仍以索拉非尼,利卡汀(<sup>131</sup>I标记美妥昔单抗)等药物较具代表性。

**3.1 介入性靶向治疗** <sup>131</sup>I美妥昔单抗(利卡汀)是一种用于导向放射治疗HCC的<sup>131</sup>I标记的新型单抗,抗体的靶抗原Hab18G/CD147是HCC特异性抗原,在肿瘤侵袭和转移中起到重要作用,单抗与靶抗原特异性结合可降低癌细胞转移与复发通道的信号传导,不但可以将放射性<sup>131</sup>I带到肿

瘤细胞,实现对肿瘤细胞的直接照射作用,其本身还可以通过抗体依赖的细胞毒性作用杀伤肿瘤细胞,同时阻断其效应细胞分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),以防止癌细胞进一步扩散,达到双重的治疗作用<sup>[38]</sup>。利卡汀治疗HCC的临床试验及初步临床应用已表明疗效肯定,安全、可行,对各种类型血供的肝癌均有一定的瘤体缩小率<sup>[39,40]</sup>。近年,作为新的治疗策略经动脉注入放射性微球体和微粒技术初露端倪<sup>[41]</sup>。

**3.2 全身性靶向治疗** 索拉非尼是第一个上市、唯一由FDA批准用于治疗HCC的多靶点、多激酶抑制剂,也是第一个被证明通过抑制肿瘤复发和转移延长生存期的治疗方法。与安慰剂比较,可延长中位生存期(10.7 mo vs 6.5 mo)和疾病进展时间(5.5 mo vs 2.8 mo),耐受性较好<sup>[42]</sup>。索拉非尼加阿霉素的I期、II期试验也证实了联合治疗的有效性,与阿霉素相比有延长疾病进展时间的趋势。未来需重点研究和解决的关键问题是如何将索拉非尼与传统手术、TACE和其他分子靶向治疗药物联合起来,最大程度提高疗效<sup>[43]</sup>。研究表明,索拉非尼联合介入(TACE、RFA等)治疗晚期肝细胞癌,肿瘤反应率增加,延长疾病进展时间,患者临床获益明显<sup>[44]</sup>。为抑制肝癌不同的生长、侵袭途径,其他分子靶向药物正处于研制与临床实验阶段,有较好的临床前景<sup>[45]</sup>。

**3.3 基因治疗** 他是指通过在特定靶细胞中表达本来不表达的基因,或采用特定的方式关闭、抑制异常表达的基因,达到治疗疾病的目的,为肿瘤治疗的热点。主要方法有<sup>[46]</sup>:自杀基因治疗、导入抑癌基因(如p53)或反义基因(如ras, mys等)治疗、免疫因子基因治疗(如IL-2、GM-CSF、IFN等)及RNA干扰技术。目前,临床中超选择性经肝动脉导入P53治疗HCC报道较多,初步疗效肯定<sup>[47]</sup>。

此外,部分中医药有助于提高HCC的临床疗效。特别是配合微创介入、放疗,化疗等方法,可改善患者临床症状、减轻不良反应、延长生存期等,值得借鉴<sup>[48]</sup>。

### 4 结论

目前治疗HCC较成熟的介入技术较多,各具优势,TACE联合其他介入治疗方法行序贯、综合治疗被公认可提高疗效,但临床实践中很多具体技术路线欠规范,还需要更多的随机对照研

究,做到治疗方案的规范化、个体化的统一,以获得较好的预后<sup>[49,50]</sup>。可以深信:随着HCC基础研究的不断深入、介入诊疗技术的不断进步,介入放射学与分子生物学相结合拥有良好的发展前景,必将使HCC的治疗进入一个崭新时代<sup>[51]</sup>。

## 5 参考文献

- 1 丁义涛. 肝细胞癌的肝脏切除治疗进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 955-961
- 2 Vogl TJ, Naguib NN, Nour-Eldin NE, Rao P, Emami AH, Zangos S, Nabil M, Abdelkader A. Review on transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: palliative, combined, neoadjuvant, bridging, and symptomatic indications. *Eur J Radiol* 2009; 72: 505-516
- 3 Sergio A, Cristofori C, Cardin R, Pivetta G, Ragazzi R, Baldan A, Girardi L, Cillo U, Burra P, Giacomini A, Farinati F. Transcatheter arterial chemoembolization (TACE) in hepatocellular carcinoma (HCC): the role of angiogenesis and invasiveness. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 914-921
- 4 陈自谦, 杨利, 杨熙章, 杨永岩. 肝癌介入治疗现状与进展. 介入放射学杂志 2008; 17: 223-226
- 5 Malagari K, Pomoni M, Kelekis A, Pomoni A, Dourakis S, Spyridopoulos T, Moschouris H, Emmanouil E, Rizos S, Kelekis D. Prospective randomized comparison of chemoembolization with doxorubicin-eluting beads and bland embolization with BeadBlock for hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010; 33: 541-551
- 6 Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, Matsuyama Y, Nakanuma Y, Kojiro M, Makuuchi M, Yamaoka Y. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology* 2006; 131: 461-469
- 7 Varela M, Real MI, Burrel M, Forner A, Sala M, Brunet M, Ayuso C, Castells L, Montañá X, Llovet JM, Bruix J. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma with drug eluting beads: efficacy and doxorubicin pharmacokinetics. *J Hepatol* 2007; 46: 474-481
- 8 Tezuka M, Hayashi K, Kubota K, Sekine S, Okada Y, Ina H, Irie T. Growth rate of locally recurrent hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization: comparing the growth rate of locally recurrent tumor with that of primary hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 783-788
- 9 Georgiades CS, Hong K, D'Angelo M, Geschwind JF. Safety and efficacy of transarterial chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma and portal vein thrombosis. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 1653-1659
- 10 王执民, 曹玮. 介入性热化疗治疗肝癌的研究现状. 中国微创外科杂志 2007; 7: 666-667
- 11 张家兴, 樊树峰, 郑家平, 叶强, 汝复明, 奚顺法, 童乾纲, 顾伟中. 肝癌的介入性热化疗: 最佳灌注温度的探讨. 介入放射学杂志 2004; 13: 450-452
- 12 Kang BK, Kim JH, Kim KM, Ko GY, Yoon HK, Gwon DI, Sung KB. Transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma after attempted portal vein embolization in 25 patients. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 193: W446-W451
- 13 Sala M, Llovet JM, Vilana R, Bianchi L, Solé M, Ayuso C, Brú C, Bruix J. Initial response to percutaneous ablation predicts survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2004; 40: 1352-1360
- 14 Omata M, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S. Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous tumor ablation methods: Ethanol injection therapy and radiofrequency ablation. *Gastroenterology* 2004; 127: S159-S166
- 15 钱林学, 魏红涛, 胡向东. 肝癌局部消融治疗的现状和进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1955-1961
- 16 李红兵, 陈勇, 程寿林, 李彦豪, 李其祥, 黄冬云. 经动脉化疗栓塞术结合消融术治疗外生型肝癌. 放射学实践 2009; 24: 316-319
- 17 Fartoux L, Arrive L, Andreani T, Serfaty L, Chazouillères O, Tubiana JM, Poupon R, Rosmorduc O. Treatment of small hepatocellular carcinoma with acetic acid percutaneous injection: A single French center experience. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; 29: 1213-1219
- 18 陈晓明, 罗鹏飞, 林华欢, 周泽健, 邵培坚, 符力, 李伟科. 经导管肝动脉化疗栓塞联合经皮无水乙醇注射治疗肝癌的长期疗效观察. 癌症 2004; 23: 829-832
- 19 张耀军, 陈敏山, 李锦清, 梁惠宏, 张亚奇, 林小军, 郑云, 徐立, 刘允怡. 射频消融治疗肝脏恶性肿瘤803例分析. 中华外科学杂志 2007; 21: 21
- 20 Seror O, N'Kontchou G, Tin Tin Htar M, Durand-Zaleski I, Trinchet JC, Sellier N, Beaugrand M. Ethanol versus radiofrequency ablation for the treatment of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a retrospective study of efficacy and cost. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 1265-1273
- 21 Doros A. [Interventional radiological treatment of hepatocellular carcinoma]. *Orv Hetil* 2010; 151: 1204-1208
- 22 卢冠铭, 龚艺贞, 黎乐群. 经皮射频消融与无水乙醇注射治疗合并肝硬化的小肝癌疗效比较的Meta分析. 重庆医学 2010; 39: 1805-1808
- 23 倪雪君, 周国雄, 成建萍. 射频消融治疗肝癌机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3416-3420
- 24 Shibata T, Isoda H, Hirokawa Y, Arizono S, Shimada K, Togashi K. Small hepatocellular carcinoma: is radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization more effective than radiofrequency ablation alone for treatment? *Radiology* 2009; 252: 905-913
- 25 Kwon JH. Is Percutaneous Ethanol Injection Therapy Still Effective for Hepatocellular Carcinoma in the Era of Radiofrequency Ablation? *Gut Liver* 2010; 4: S105-S112
- 26 张磊, 卞建民. 不同肝癌治疗中超声引导微波热凝的临床分析. 实用医学杂志 2008; 24: 3546-3548
- 27 吕明德, 徐辉雄, 谢晓燕, 殷晓煜, 匡铭, 徐作峰, 刘广健, 郑艳玲, 梁瑾瑜. 经皮微波和射频消融治疗肝细胞性肝癌的临床比较研究. 中华肝胆外科杂志 2007; 13: 528
- 28 Okuwaki Y, Nakazawa T, Shibuya A, Ono K, Hidaka H, Watanabe M, Kokubu S, Saigenji K. Intrahepatic distant recurrence after radiofrequency ablation for a single small hepatocellular carcinoma: risk factors and patterns. *J Gastroenterol* 2008; 43: 71-78
- 29 Liang P, Wang Y. Microwave ablation of hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2007; 72 Suppl 1: 124-131
- 30 Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-1236
- 31 Li C, Zhang W, Zhang R, Zhang L, Wu P, Zhang F. Therapeutic effects and prognostic factors in high-intensity focused ultrasound combined with chemoembolisation for larger hepatocellular carcinoma.

## ■同行评价

本文对肝细胞癌的介入治疗有一定的参考意义。

- noma. *Eur J Cancer* 2010; 46: 2513-2521
- 32 Jin C, Zhu H, Wang Z, Wu F, Chen W, Li K, Su H, Zhou K, Gong W. High-intensity focused ultrasound combined with transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: Long-term follow-up and clinical analysis. *Eur J Radiol* 2010 Sep 21. [Epub ahead of print]
- 33 Rupp CC, Hoffmann NE, Schmidlin FR, Swanlund DJ, Bischof JC, Coad JE. Cryosurgical changes in the porcine kidney: histologic analysis with thermal history correlation. *Cryobiology* 2002; 45: 167-182
- 34 马志刚, 张艳桥, 陶冀, 李志伟. 经皮穿刺氩氦刀靶向治疗肝癌32例疗效观察. *实用肿瘤学杂志* 2008; 22: 365-367
- 35 Kerkar S, Carlin AM, Sohn RL, Steffes C, Tyburski J, Littrup P, Weaver D. Long-term follow up and prognostic factors for cryotherapy of malignant liver tumors. *Surgery* 2004; 136: 770-779
- 36 史东宏, 许健, 曹建民. 肝脏肿瘤冷冻消融治疗的进展. *中国介入影像与治疗学* 2007; 4: 321-324
- 37 Rhim H. Complications of radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging* 2005; 30: 409-418
- 38 Tran L, Baars JW, Maessen HJ, Hoefnagel CA, Beijnen JH, Huitema AD. A simple and safe method for <sup>131</sup>I radiolabeling of rituximab for myeloablative high-dose radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 103-110
- 39 Chen ZN, Mi L, Xu J, Song F, Zhang Q, Zhang Z, Xing JL, Bian HJ, Jiang JL, Wang XH, Shang P, Qian AR, Zhang SH, Li L, Li Y, Feng Q, Yu XL, Feng Y, Yang XM, Tian R, Wu ZB, Leng N, Mo TS, Kuang AR, Tan TZ, Li YC, Liang DR, Lu WS, Miao J, Xu GH, Zhang ZH, Nan KJ, Han J, Liu QG, Zhang HX, Zhu P. Targeting radioimmunotherapy of hepatocellular carcinoma with iodine (<sup>131</sup>I) metuximab injection: clinical phase I/II trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 435-444
- 40 吴少平, 卢武胜, 徐大伟, 郑志勇. 肝癌DSA血供类型与经肝动脉灌注<sup>131</sup>I-HAb18F(ab')<sub>2</sub>治疗后瘤体大小变化的关系探讨. *介入放射学杂志* 2007; 16: 243-245
- 41 Hilgard P, Müller S, Hamami M, Sauerwein WS, Haberkorn U, Gerken G, Antoch G. [Selective internal radiotherapy (radioembolization) and radiation therapy for HCC--current status and perspectives]. *Z Gastroenterol* 2009; 47: 37-54
- 42 Copur MS. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 2498; author reply 2498-2499
- 43 秦叔逵, 龚新雷. 索拉非尼治疗原发性肝癌的研究进展. *临床肿瘤学杂志* 2008; 13: 1057-1067
- 44 李枫, 王峰, 李军, 杨新顺. 多吉美联合介入治疗原发性肝癌20例. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 517-520
- 45 Zhu AX. Beyond sorafenib: novel targeted therapies for advanced hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19: 663-672
- 46 陈星明, 官成浓. 原发性肝癌的综合治疗. *医学研究杂志* 2008; 37: 18-22
- 47 陈世晞, 陈骏, 徐卫东, 尹国文, 席玮. 动脉灌注p53基因治疗晚期肝癌的初步临床应用. *介入放射学杂志* 2007; 16: 127-129
- 48 刘蒙, 董卫国. 原发性肝癌非手术治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1224-1228
- 49 Davis CR. Interventional radiological treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Control* 2010; 17: 87-99
- 50 Zhang L, Fan WJ, Huang JH, Li CX, Zhao M, Wang LG, Tang T. Comprehensive sequential interventional therapy for hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 2292-2298
- 51 Sherman M. Modern Approach to Hepatocellular Carcinoma. *Curr Gastroenterol Rep* 2010 Nov 23. [Epub ahead of print]

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。(编辑部主任: 李军亮 2010-11-28)

# 己酮可可碱对重度失血性休克大鼠再灌注后肝损伤的影响

陆化梅, 耿智隆, 赵峰, 杨木强

陆化梅, 兰州大学第二临床医学院麻醉系 甘肃省兰州市 730050

耿智隆, 杨木强, 赵峰, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院麻醉科 甘肃省兰州市 730050

陆化梅, 在读硕士, 主要从事危重病与器官保护方面的研究。

全军“十一五”面上基金资助项目, No. 06 MA083

作者贡献分布: 陆化梅与耿智隆对此文所作贡献均等; 此课题由陆化梅与耿智隆设计; 研究过程由陆化梅、赵峰及杨木强操作完成; 研究用试剂及分析工具由耿智隆提供; 数据分析由陆化梅完成; 本论文写作由陆化梅与耿智隆完成。

通讯作者: 耿智隆, 教授, 主任医师, 730050, 甘肃省兰州市, 中国人民解放军兰州军区兰州总医院麻醉科. zlgch@hotmail.com  
电话: 0931-8994448

收稿日期: 2010-10-26 修回日期: 2010-12-09

接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-01-28

## Treatment with pentoxifylline reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats with severe hemorrhagic shock

Hua-Mei Lu, Zhi-Long Geng, Feng Zhao, Mu-Qiang Yang

Hua-Mei Lu, Department of Anesthesia, the Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Zhi-Long Geng, Feng Zhao, Mu-Qiang Yang, Department of Anesthesiology, Lanzhou General Hospital of Chinese PLA Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Supported by: Chinese Military Medicine Science and Technology Research “11.5” Plan, No. 06 MA083

Correspondence to: Professor Zhi-Long Geng, Department of Anesthesiology, Lanzhou General Hospital of Chinese PLA Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. zlgch@hotmail.com

Received: 2010-10-26 Revised: 2010-12-09

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of treatment with pentoxifylline (PTX) on ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats with severe hemorrhagic shock.

**METHODS:** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into four groups: control group, shock group (NR group), Lactated Ringer's (LR) solution-treated group (LR group), LR solution plus PTX group (LR-PTX group). A rat model of severe hemorrhagic shock was generated, and arterial blood pressure

(MAP) was determined continuously. Blood specimens were collected before shock and 1 and 4 h after resuscitation for determination of serum AST and ALT levels. The rats of the NR group were killed 1 h after shock to collect liver samples. The rats of the LR and LR-PTX groups were resuscitated with LR and LR-PTX (25 mg/kg, three times the volume of shed blood), respectively, and then killed 4 h after resuscitation to collect liver samples to determine the expression of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B and MIP-2 proteins and MPO activity. Liver injury was examined by light microscopy and electron microscopy.

**RESULTS:** Compared with the control group, MAP (mmHg) decreased significantly 1 h after shock in the other groups ( $37.3 \pm 2.1$ ,  $37.0 \pm 2.0$ ,  $37.6 \pm 2.2$  vs  $106.0 \pm 2.6$ , all  $P < 0.05$ ). After resuscitation, MAP rose initially but decreased at 3 and 4 h in the LR and LR-PTX groups ( $88.3 \pm 3.0$ ,  $87.6 \pm 4.3$  vs  $105.0 \pm 2.9$ ;  $69.0 \pm 2.0$ ,  $66.7 \pm 2.1$  vs  $102.1 \pm 1.1$ ,  $P < 0.05$ ). Serum AST and ALT levels at 1 h after shock and 4 h after resuscitation in the NR, LR and LR-PTX groups were significantly higher than those in the control group ( $142.0 \pm 8.3$ ,  $144.1 \pm 7.6$ ,  $147.2 \pm 8.1$  vs  $45.1 \pm 6.3$ ;  $427.0 \pm 12.5$ ,  $365.3 \pm 8.0$  vs  $51.1 \pm 6.3$ , all  $P < 0.01$ ;  $86.3 \pm 7.8$ ,  $88.3 \pm 6.6$ ,  $89.1 \pm 5.9$  vs  $53.6 \pm 6.1$ ;  $342.9 \pm 4.7$ ,  $280.4 \pm 9.1$  vs  $50.6 \pm 7.6$ , all  $P < 0.05$ ). The expression of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and MIP-2 proteins and MPO activity in the liver were significantly increased and pathologic injury was more significant in the NR, LR and LR-PTX groups compared with the control group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the LR group, serum AST and ALT levels at 4 h after resuscitation were significantly lower in the LR-PTX group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$  and MIP-2 proteins and MPO activity in the liver were significantly lower (all  $P < 0.05$ ) and pathologic injury was milder in the LR-PTX group than in the LR group.

**CONCLUSION:** Treatment with PTX can protect against ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats with severe hemorrhagic shock by inhibiting TNF- $\alpha$  release and NF- $\kappa$ B activation and decreasing the expression of inflammatory mediators.

### ■背景资料

肝脏是人体各种物质代谢、能量转换及供应的枢纽和主导器官,也是应激条件下代谢最为活跃的器官,失血性休克后肝组织损伤,可产生大量的细胞因子如TNF- $\alpha$ 等,这些因子一方面可使循环中的中性粒细胞在肝内趋化、黏附聚集、活化进而损伤肝细胞;另一方面可以通过血液循环影响肺脏和其他器官;其次还能随胆汁分泌到肠道加重肠道的损伤。肝组织损伤程度对失血性休克后SIRS、MODS的发生、发展有重要的意义。

### ■同行评议者

张进祥, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院急诊外科

## ■ 研究前沿

目前,临床上用于失血性休克复苏的溶液,各有其优缺点,能有效改善失血性休克后液体再灌注导致的细胞损伤和炎症反应的理想液体尚无。因此,早期采取有效的复苏策略(既联合应用细胞保护的药物)比损伤后再企图免疫调节来减轻细胞损伤的观点,已成为当今失血性休克研究的热点。

**Key Words:** Hemorrhagic shock; Liver injury; Resuscitation; Pentoxifylline

Lu HM, Geng ZL, Zhao F, Yang MQ. Treatment with pentoxifylline reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats with severe hemorrhagic shock. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 227-232

大鼠再灌注后肝损伤的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(3): 227-232

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/227.asp>

## 摘要

**目的:** 研究己酮可可碱(PTX)对重度失血性休克大鼠再灌注后肝损伤的影响,并探讨其可能的作用机制。

**方法:** 48只SD大鼠随机分为4组:对照组(C组)、单纯休克组(NR组)、乳酸林格氏液组(LR组)、乳酸林格氏液联合PTX组(LRPTX组)。复制重度失血性休克模型,连续检测MAP的变化。LR及LRPTX组以3倍失血量LR/LRPTX(PTX 25 mg/kg)液复苏。各组分别于休克前、休克1 h及复苏4 h时间点测谷丙转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST)。NR组在休克1 h处死大鼠,LR组、LRPTX组及C组在复苏4 h处死大鼠,取肝组织检测TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)的蛋白表达及髓过氧化物酶(MPO)活性。电镜及光镜下观察肝组织病理变化。

**结果:** 与C组比较,各组大鼠休克1 h MAP(mmHg)降低( $37.3 \pm 2.1$ ,  $37.0 \pm 2.0$ ,  $37.6 \pm 2.2$  vs  $106.0 \pm 2.6$ , 均 $P < 0.05$ ),液体复苏后MAP上升,LR及LRPTX组复苏后3 h及4 h时间点,MAP(mmHg)下降( $88.3 \pm 3.0$ ,  $87.6 \pm 4.3$  vs  $105.0 \pm 2.9$ ;  $69.0 \pm 2.0$ ,  $66.7 \pm 2.1$  vs  $102.1 \pm 1.1$ , 均 $P < 0.05$ )。与C组比较,其他各组血中AST(U/L)( $142.0 \pm 8.3$ ,  $144.1 \pm 7.6$ ,  $147.2 \pm 8.1$  vs  $45.1 \pm 6.3$ ;  $427.0 \pm 12.5$ ,  $365.3 \pm 8.0$  vs  $51.1 \pm 6.3$ , 均 $P < 0.01$ )及ALT(U/L)明显升高( $86.3 \pm 7.8$ ,  $88.3 \pm 6.6$ ,  $89.1 \pm 5.9$  vs  $53.6 \pm 6.1$ ;  $342.9 \pm 4.7$ ,  $280.4 \pm 9.1$  vs  $50.6 \pm 7.6$ , 均 $P < 0.05$ );肝组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B及MIP-2的蛋白表达明显升高,MPO活性增加(均 $P < 0.05$ ),肝组织病理学损伤明显;与LR组比较,LRPTX组复苏后4 h血中AST及ALT明显降低(均 $P < 0.05$ ),TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B及MIP-2的蛋白含量明显下降,MPO活性降低(均 $P < 0.05$ ),肝组织病理学损伤减轻。

**结论:** PTX通过减少TNF- $\alpha$ 的释放,抑制NF- $\kappa$ B的活化,下调趋化因子的表达,减轻失血性休克再灌注后肝组织损伤。

**关键词:** 失血性休克; 肝损伤; 复苏; 己酮可可碱

陆化梅, 耿智隆, 赵峰, 杨木强. 己酮可可碱对重度失血性休克

## 0 引言

失血性休克及液体复苏所导致的细胞损伤、细胞因子过度释放是全身炎症反应(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、以及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的主要病理生理基础<sup>[1,2]</sup>。目前,临床上用于失血性休克复苏的溶液,各有其优缺点,能够恢复器官灌注、维持组织氧供,又不加重细胞损伤及诱发激烈免疫反应的理想液体尚无<sup>[3,4]</sup>。因此,早期采取有效的复苏策略(既联合应用细胞保护的药物)比损伤后再企图免疫调节来减轻细胞损伤的观点,已成为当今失血性休克研究的热点<sup>[5,6]</sup>。己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)属黄嘌呤衍生物,是非选择性磷酸二酯酶抑制剂,近年来有研究表明<sup>[7,8]</sup>其有选择性抗炎作用,尤其对缺血再灌注后肺、肠损伤有一定的抑制作用,但其是否对失血性休克再灌注后肝损伤具有抑制作用及可能的作用机制目前尚未完全阐明。本研究通过建立重度失血性休克大鼠模型,观察乳酸林格氏液联合PTX复苏对肝脏损伤后炎症因子及超微结构变化的影响,探讨PTX对重度失血性休克再灌注后肝损伤的影响和其可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年♂SD大鼠48只,体质量280-320 g,购于甘肃省中医学院动物实验中心。实验前适应性饲养5 d,环境温度控制在22℃-26℃,湿度控制在40%-70%,自由进食饮水,每12 h昼夜交替1次。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模:** 实验前12 h禁食,自由饮水。实验当日,实验室温度控制在22℃-26℃,经腹腔给予3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,右股动脉插管监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)和放血,右股静脉插管用于输液。所有导管均用7.5 kU/L的肝素生理盐水预充。术毕,按500 U/kg给予全身肝素化处理。动物稳定10 min,待生命体征平稳。采用改良Wiggers等<sup>[9]</sup>的方法复制失血性休克模型。经右侧股动脉导管放血,30 min内使MAP降低至35 mmHg,通过放血或自体血回

输维持MAP 35 mmHg $\pm$ 5 mmHg水平60 min, 复制重度失血性休克模型. 实验全程动物保持自主呼吸, 肛温控制在37 $^{\circ}$ C $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C.

1.2.2 复苏方案及分组: 采用随机数字表法将实验动物分为4组, 分别为对照组(C组12只)、单纯休克组(NR组12只)乳酸林格液(安徽环球药业股份有限公司生产)复苏组(LR组12只)、乳酸林格液复合己酮可可碱(开封康诺药业有限公司)复苏组(LRPTX组12只). C组动物只麻醉, 右股动静脉置管, 不放血, 不复苏; LR、LRPTX组动物麻醉后, 右股动静脉置管, 复制重度失血性休克模型, NR组动物麻醉后, 右股动静脉置管, 复制重度失血性休克模型, 休克1 h后处死, 取肝组织保存. LR及LRPTX(PTX按照25 mg/kg加入液体)组动物在休克1 h后经以右股静脉给予3倍失血量RL/LRPTX液复苏, 20 min内恒速输入, C组、LR组及LRPTX组(复苏液恒速输注完毕后)给予生理盐水6 mL/(kg $\cdot$ h)维持输注4 h.

1.2.2 指标检测: (1)静脉血AST、ALT检测: 在休克前(基础值)、复苏前(休克1 h即刻)及复苏后4 h时间点从股静脉抽血1 mL, 抽血同时以等量血回输, 血液4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心15 min, 取上清液采用紫外分光光度计测量AST、ALT的活性; (2)肝组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B蛋白含量测定: NR组在休克1 h即刻, 其余各组在复苏后4 h时间点, 采用穿刺心脏法处死大鼠, 取左叶部分肝组织, 用40 g/L多聚甲醛固定后常规石蜡包埋并做肝组织切片, 采用免疫组织化学S-P法染色, 检测肝组织中TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B(试剂盒购自美国R&D公司)的蛋白表达. 全自动图像分析系统分析阳性染色, 测定TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B阳性表达的吸光度值, 随机选择5个视野, 取其平均值反应TNF- $\alpha$ 和NF- $\kappa$ B蛋白表达; (3)肝组织巨噬细胞炎性蛋白2(macrophage inflammatory protein-2, MIP-2)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)测定: NR组在休克1 h即刻, 其余各组在复苏后4 h时间点, 处死大鼠取新鲜左叶肝组织100 mg, 制备肝组织匀浆, 采用比色法测定肝组织中MPO的含量<sup>[10]</sup>; 采用ELISA双抗夹心法测定MIP-2蛋白含量<sup>[11]</sup>; (4)肝组织病理学观察: NR组在休克1 h即刻, 其余各组在复苏后4 h时间点, 处死大鼠, 取左叶部分肝组织, 用40 g/L的甲醛固定, 经脱水、石蜡包埋、切片, 行苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察肝组织病理学变化. 取0.1 cm $\times$ 0.1 cm $\times$ 0.1 cm左叶肝组织, 立即置于2.5%的戊二醛溶液中, 常规电镜制作, 透射电镜下观察肝细

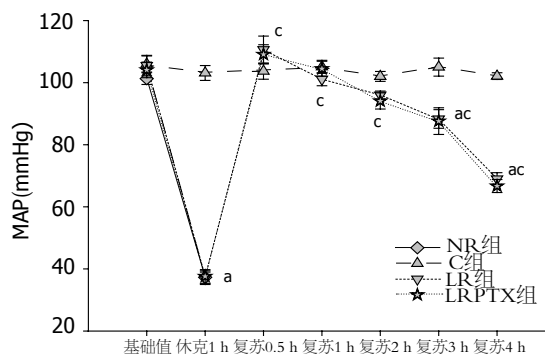


图1 各组大鼠实验期间MAP变化. \* $P$ <0.05 vs C组相同时间点;  $^{\#}$  $P$ <0.05 vs 休克1 h.

胞超微结构改变.

**统计学处理** 应用SPSS11.0统计学软件进行统计学分析, 计量资料以mean $\pm$ SD表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用SNK法. 组内不同时间点比较采用重复测量的方差分析,  $P$ <0.05为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 各组大鼠实验期间MAP、AST及ALT的变化 各组大鼠MAP基础值比较差异无统计学意义. 与C组比较, 各组休克1 h时间点MAP(mmHg)降低(37.3 $\pm$ 2.1, 37.0 $\pm$ 2.0, 37.6 $\pm$ 2.2 vs 106.0 $\pm$ 2.6, 均 $P$ <0.05), LR组及LRPTX组复苏3、4 h时间点MAP下降(88.3 $\pm$ 3.0, 87.6 $\pm$ 4.3 vs 105.0 $\pm$ 2.9; 69.0 $\pm$ 2.0, 66.7 $\pm$ 2.1 vs 102.1 $\pm$ 1.1, 均 $P$ <0.05, 图1). 与同组内休克1 h即刻时间点比较, LR及LRPTX复苏后各时间点, MAP上升( $P$ <0.05). LR组与LRPTX组组间比较各时间点MAP无明显变化( $P$ >0.05); 血中AST、ALT的变化(图2): 与C组比较, 其余3组在休克1 h即刻及复苏后4 h时间点血中AST、ALT升高(AST: 142.0 $\pm$ 8.3, 144.1 $\pm$ 7.6, 147.2 $\pm$ 8.1 vs 45.1; 427.0 $\pm$ 12.5, 365.3 $\pm$ 8.0 vs 51.1 $\pm$ 6.3, 均 $P$ <0.05; ALT: 86.3 $\pm$ 7.8, 88.3 $\pm$ 6.6, 89.1 $\pm$ 5.9 vs 53.6 $\pm$ 6.1; 342.9 $\pm$ 4.7, 280.4 $\pm$ 9.1 vs 50.6 $\pm$ 7.6, 均 $P$ <0.05); 与同组内休克1 h即刻时间点比较, LR及LRPTX复苏后4 h血中AST(U/L)、ALT(U/L)升高( $P$ <0.05); 与LR比较, LRPTX复苏后4 h血中AST、ALT降低( $P$ <0.05).

2.2 肝组织中TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、MIP-2及MPO的变化 与C组比较, 各组NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、MIP-2( $\mu$ g/L)及MPO(U/g)明显升高(0.54 $\pm$ 0.04, 0.96 $\pm$ 0.63, 0.82 $\pm$ 0.02 vs 0.31 $\pm$ 0.02; 0.53 $\pm$ 0.01, 0.97 $\pm$ 0.02, 0.82 $\pm$ 0.02 vs 0.12 $\pm$ 0.02; 279.17 $\pm$ 4.88, 389.89 $\pm$ 8.22, 364.01 $\pm$ 7.27 vs 111.57; 1.15

### ■ 相关报道

己酮可可碱非选择性磷酸二酯酶抑制剂, 有研究表明其有选择性抗炎作用, 尤其对缺血再灌注后肺、肠损伤有一定的保护作用, 能抑制中性粒细胞在肺、肠内积聚, 降低炎症介质的生成等.



### ■ 创新盘点

本研究通过复制重度失血性休克动物模型,观察液体复苏早期联合应用己酮可可碱对肝组织损伤的影响,探讨其可能的作用机制。

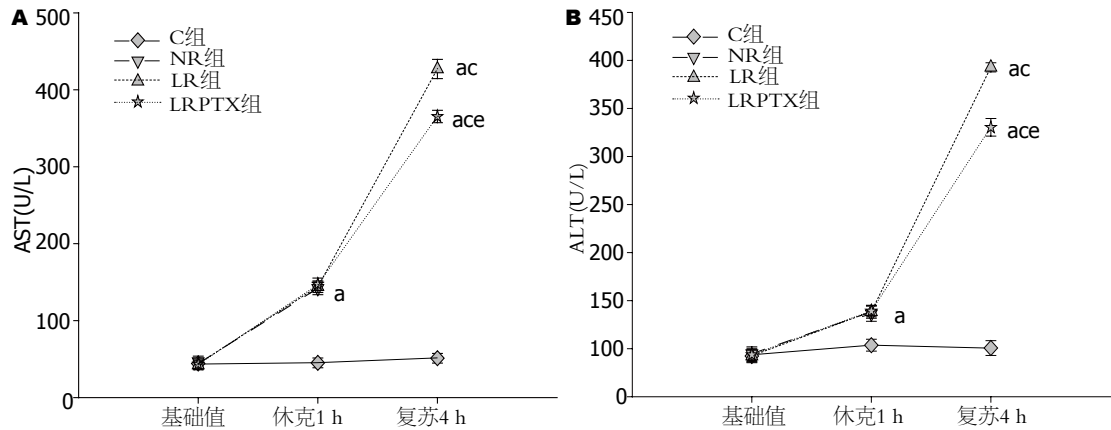


图2 各组大鼠AST、ALT变化。A: AST; B: ALT。\* $P < 0.05$  vs C组;  $^{\#}P < 0.05$  vs 休克1 h,  $^{\circ}P < 0.05$  vs LR组。

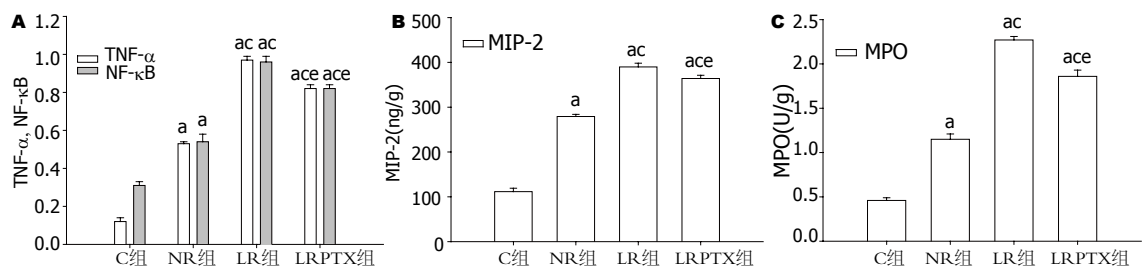


图3 各组肝脏组织NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、MIP-2含量及MPO活性的比较。A: NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ ; B: MIP-2; C: MPO。\* $P < 0.05$  vs C组;  $^{\#}P < 0.05$  vs NR组,  $^{\circ}P < 0.05$  vs LR组。

$\pm 0.06$ ,  $2.27 \pm 0.04$ ,  $1.86 \pm 0.07$  vs  $0.46 \pm 0.03$ , 均  $P < 0.05$ ); 与NR比较, LR及LRPTX组NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、MIP-2及MPO明显升高( $P < 0.05$ , 图3); 与LR组比较, LRPTX组各指标明显降低( $P < 0.05$ )。

**2.3 肝组织病理学改变** 光镜下观察(图4): C组可见肝索排列整齐, 肝窦形态正常, 肝细胞边界清楚、形态正常; NR组, 肝小叶细胞轻微肿胀, 肝窦基本正常部分肝细胞边界不清, 血管周围有炎性细胞浸润。LR组肝索排列部分紊乱, 肝窦间隙明显狭窄, 肝细胞肿胀, 部分肝细胞空泡变性, 局灶性肝细胞坏死; LRPTX组, 肝细胞肿胀, 肝窦形态基本正常, 部分肝细胞边界不清, 偶有肝细胞固缩, 汇管区有炎性细胞浸润。电镜下(图5)可见C组肝细胞超微结构基本正常, 未见肿胀, 细胞核结构完整, 线粒体脊完整, 粗面内质网结构完整, 排列整齐; NR细胞线粒体轻微肿胀, 线粒体嵴疏松, 毛细胆管有少量胆汁淤积; LR组肝细胞染色质边集, 核膜溶解, 线粒体肿胀明显, 大量空泡形成, 局灶性肝细胞溶解坏死; LRPTX组肝细胞, 线粒体仍有肿胀, 空泡形成少。

### 3 讨论

本实验参照文献<sup>[5,6]</sup>选用25 mg/kg作为PTX应用

剂量, 联合LR复苏重度失血性休克大鼠, 结果显示, 液体复苏后, 大鼠MAP显著升高, 尽管复苏后3 h MAP有所下降, 但仍能满足组织灌注<sup>[12,13]</sup>。然而LR组及LRPTX组复苏后4 h时间点血浆中AST、ALT含量较NR组(休克1 h时间点)明显升高; 光镜及电镜观察显示LR组及LRPTX组肝组织损伤较NR组明显。国内周虹等的研究<sup>[14]</sup>显示出血性休克再灌注后肺、肾、心脏组织中MDA含量及病理损伤明显较单纯休克重。国外研究<sup>[15,16]</sup>也显示: 失血性休克液体复苏后肺组织中性粒细胞聚集明显较单纯休克多, 组织损伤较单纯休克严重。本实验中大鼠经历1 h出血性休克在液体复苏前虽已导致肝功能及肝组织结构受损, 但液体复苏后, 大鼠肝功能受损更为明显。而与LR组比较, LRPTX组AST、ALT含量显著降低, 肝组织损伤明显减轻, 说明早期联合应用PTX可减轻失血性休克再灌注后肝组织的损伤程度。

目前认为TNF- $\alpha$ 是失血性休克炎症反应的启动因子, 可上调其他因子的产生<sup>[4,17]</sup>。肝脏含有人体大约80%的单核/巨噬细胞, 是细胞因子的产地和储库, 失血性休克及液体再灌注可刺激肝组织分泌大量的TNF- $\alpha$ 等细胞因子<sup>[18]</sup>。这些

**■应用要点**  
本研究证实液体复苏后肝组织出现明显的损伤, PTX能够抑制炎症因子的释放, 从而降低肝损伤, 为临床应用提供实验依据。

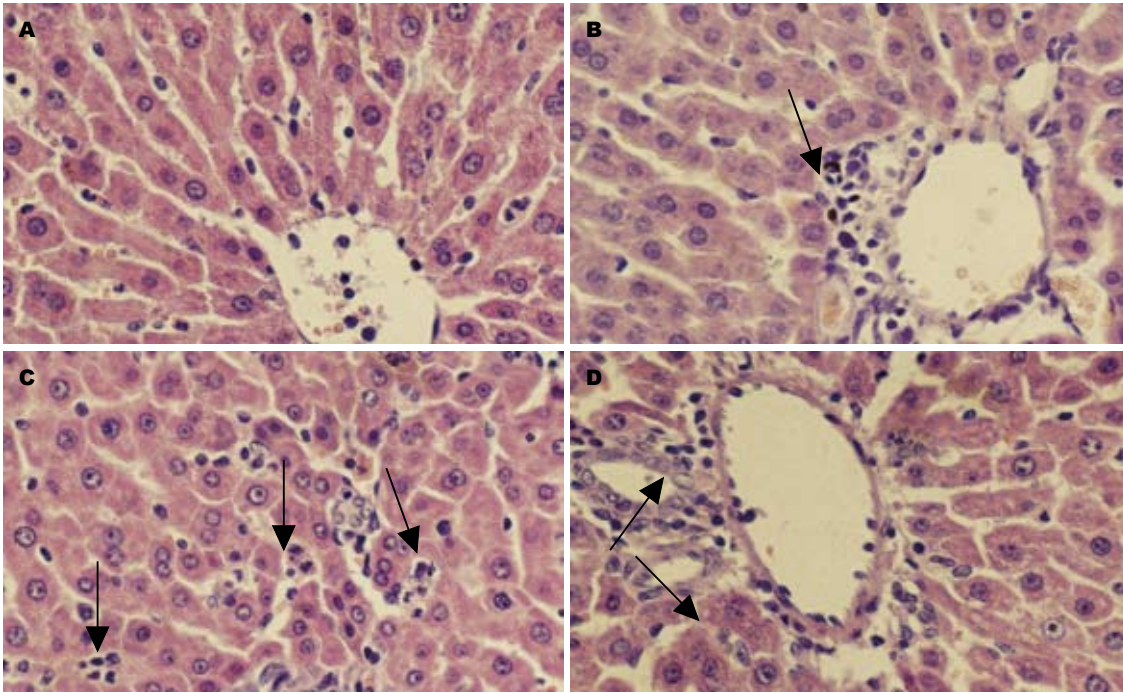


图 4 各组肝组织病理学变化(HE × 400)。A: C组; B: NR组肝窦基本正常部分肝细胞边界不清, 血管周围有炎性细胞浸润; C: LR组肝细胞肿胀, 部分肝细胞空泡变性, 局灶性肝细胞坏死; D: LRPTX组部分肝细胞边界不清, 偶有肝细胞固缩, 汇管区有炎性细胞浸润。

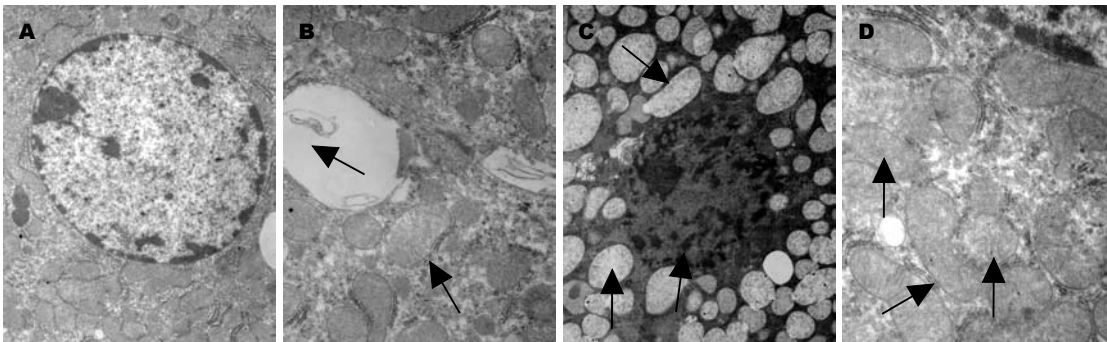


图 5 各组肝组织超微结构变化。A: C组肝细胞超微结构基本正常(× 5 000); B: NR组肝细胞线粒体轻微肿胀, 线粒体嵴疏松, 毛细胆管有少量胆汁淤积(× 6 000); C: LR组肝细胞染色质边集, 核膜溶解, 线粒体肿胀明显, 大量空泡形成粗面内质网脱颗粒, 局灶性肝细胞溶解坏死(× 5 000); D: LRPTX组肝细胞, 线粒体仍有肿胀, 空泡形成少(× 2 500)。

因子一方面可使循环中的中性粒细胞在肝组织内趋化、黏附聚集、活化进而损伤肝细胞; 另一方面可以通过血液循环影响肺脏和其他器官; 其次还能随胆汁分泌到肠道加重肠道的损伤<sup>[19]</sup>。NF- $\kappa$ B是一种细胞内普遍存在的转录因子, 具有和多种细胞因子基因启动子区域固定核苷酸序列结合而启动基因转录的功能, 正常情况下与其抑制物I $\kappa$ B结合, 存在于静止期细胞的胞浆中。当诱导因子TNF- $\alpha$ 等刺激时, I $\kappa$ B磷酸化而被降解, NF- $\kappa$ B二聚体被激活, 进入细胞核内, 和多种细胞因子基因启动子结合, 诱导基因转录, 参与组织损伤<sup>[20]</sup>。本研究结果显示, 与LR组比较, LRPTX组TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B的表达下降, MPO活性

降低; 肝索排列基本正常, 肝窦间隙正常, 肝细胞线粒体肿胀减轻且空泡形成减少, 说明PTX通过抑制炎症因子TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B的生成, 阻止其之间的循环, 减轻失血性休克再灌注后肝脏损伤。其作用机制为: (1)PTX抑制磷酸二酯酶活性, 引起细胞内cAMP浓度升高, 直接抑制TNF- $\alpha$ 的生成<sup>[7,8]</sup>; (2)PTX活化cAMP依赖的PKA, 抑制NF- $\kappa$ B与其抑制物I $\kappa$ B解离, 从而抑制NF- $\kappa$ B进入核内, 和基因启动子结合, 诱导基因转录<sup>[21]</sup>。

MIP-2是以中性粒细胞为特定靶细胞的趋化因子, 关于MIP-2的产生机制目前还不清楚。Lentsh等<sup>[19]</sup>在鼠肝缺血再灌注损伤中观察到MIP-2与TNF- $\alpha$ 的变化正相关, 用抑制剂预

### ■同行评价

本文选题恰当, 为已酮可可碱在临床上的应用奠定了实验基础, 有一定的临床参考价值。

处理后显著减少了MIP-2、TNF- $\alpha$ 蛋白的表达。Hehlgans等<sup>[20,23]</sup>在鼠的纤维肉瘤细胞中发现, MIP-2的分泌是NF- $\kappa$ B依赖性的, MIP-2具有NF- $\kappa$ B的结合位点。本研究结果显示, 与LR组比较, LRPTX组MIP-2的表达下降, MPO活性降低, 其机制可能是PTX通过减少TNF- $\alpha$ 生成, 抑制NF- $\kappa$ B的活化, 减少活化的NF- $\kappa$ B进入核内与MIP-2基因启动子区域的固定核苷酸序列结合, 进一步减少MIP-2的合成。

总之, 在液体复苏早期联合应用PTX能够从炎症反应上游阻断损伤放大作用的共同传导途径, 显著减轻重度失血性休克大鼠再灌注后肝损伤。但是本实验观察时间较短, 许多方面尚有待进一步研究。

### 4 参考文献

- 1 Bilkovski RN, Rivers EP, Horst HM. Targeted resuscitation strategies after injury. *Curr Opin Crit Care* 2004; 10: 529-538
- 2 Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res* 1998; 47: 201-210
- 3 Nascimento P Jr, de Paiva Filho O, de Carvalho LR, Braz JR. Early hemodynamic and renal effects of hemorrhagic shock resuscitation with lactated Ringer's solution, hydroxyethyl starch, and hypertonic saline with or without 6% dextran-70. *J Surg Res* 2006; 136: 98-105
- 4 Alam HB, Rhee P. New developments in fluid resuscitation. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 55-72, vi
- 5 Santry HP, Alam HB. Fluid resuscitation: past, present, and the future. *Shock* 2010; 33: 229-241
- 6 Boomer L, Jones W, Davis B, Williams S, Barber A. Optimal fluid resuscitation: timing and composition of intravenous fluids. *Surg Infect (Larchmt)* 2009; 10: 379-387
- 7 Deree J, de Campos T, Shenvi E, Loomis WH, Hoyt DB, Coimbra R. Hypertonic saline and pentoxifylline attenuates gut injury after hemorrhagic shock: the kinder, gentler resuscitation. *J Trauma* 2007; 62: 818-827; discussion 827-828
- 8 Deree J, Martins JO, Leedom A, Lamon B, Putnam J, de Campos T, Hoyt DB, Wolf P, Coimbra R. Hypertonic saline and pentoxifylline reduces hemorrhagic shock resuscitation-induced pulmonary inflammation through attenuation of neutrophil degranulation and proinflammatory mediator synthesis. *J Trauma* 2007; 62: 104-111
- 9 Wiggers HC, Ingraham RC. Hemorrhagic shock; definition and criteria for its diagnosis. *J Clin Invest* 1946; 25: 30-36
- 10 Hei ZQ, Huang HQ, Zhang JJ, Chen BX, Li XY. Protective effect of Astragalus membranaceus on intestinal mucosa reperfusion injury after hemorrhagic shock in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4986-4991
- 11 Liu C, Li A, Weng YB, Duan ML, Wang BE, Zhang SW. Changes in intestinal mucosal immune barrier in rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5843-5850
- 12 Vincenzi R, Cepeda LA, Pirani WM, Sannomyia P, Rocha-E-Silva M, Cruz RJ Jr. Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *Am J Surg* 2009; 198: 407-414
- 13 Wang P, Li Y, Li J. Hydroxyethyl starch 130/0.4 prevents the early pulmonary inflammatory response and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *International Immunopharmacology* 2009; 9: 347-353
- 14 管利东, 王字玲, 赵莲, 王波, 王广义, 魏广智, 周虹. 丙酮酸钠对失血性休克大鼠缺血/再灌注损伤的保护作用. *中国应用生理学杂志* 2007; 23: 264-268
- 15 Alama HB, Stanton K, Koustova E, Burris D, Rich N, Rhee P. Effect of different resuscitation strategies on neutrophil activation in a swine model of hemorrhagic shock. *Resuscitation* 2004; 60: 91-99
- 16 Hierholzer C, Billiar TR. Molecular mechanisms in the early phase of hemorrhagic shock. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386: 302-308
- 17 Lehnert M, Arteel GE, Smutney OM, Conzelmann LO, Zhong Z, Thurman RG, Lemasters JJ. Dependence of liver injury after hemorrhage/resuscitation in mice on NADPH oxidase-derived superoxide. *Shock* 2003; 19: 345-351
- 18 Lee CC, Chang IJ, Yen ZS, Hsu CY, Chen SY, Su CP, Chiang WC, Chen SC, Chen WJ. Delayed fluid resuscitation in hemorrhagic shock induces proinflammatory cytokine response. *Ann Emerg Med* 2007; 49: 37-44
- 19 Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, Miller FN, Edwards MJ. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and Kupffer cells. *Hepatology* 1998; 27: 507-512
- 20 Hehlgans T, Müller P, Stopfer P, Männel DN. Activation of the lymphotoxin-beta receptor induces NF $\kappa$ B-dependent interleukin-6 and MIP-2 secretion in mouse fibrosarcoma cells. *Eur Cytokine Netw* 2003; 14: 103-107
- 21 Ha J, Choi HS, Lee Y, Kwon HJ, Song YW, Kim HH. CXC chemokine ligand 2 induced by receptor activator of NF-kappa B ligand enhances osteoclastogenesis. *J Immunol* 2010; 184: 4717-4724

编辑 李薇 电编 李薇

# ITF对PAF引起的肠上皮细胞骨架F-actin破坏的抑制作用

许玲芬, 滕旭, 吴捷, 郭静, 毛志芹, 孙梅

许玲芬, 滕旭, 吴捷, 郭静, 毛志芹, 孙梅, 中国医科大学附属盛京医院儿科 辽宁省沈阳市 110004  
许玲芬, 博士, 副教授, 主要从事小儿消化系统疾病方面的研究。高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20092104110010  
辽宁省教育厅科技计划基金资助项目, No. L2010624  
辽宁省博士启动基金资助项目, No. 20101147  
沈阳市科学技术计划基金资助项目, No. F10-205-1-45  
作者贡献分布: 许玲芬与孙梅对本文所作贡献均等; 此课题由许玲芬与孙梅设计; 研究过程由许玲芬、滕旭、吴捷、郭静及毛志芹操作完成; 数据分析由许玲芬、滕旭及孙梅完成; 本论文写作由许玲芬与孙梅完成。  
通讯作者: 孙梅, 教授, 主任医师, 博士生导师, 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儿科。sunm@sj-hospital.org  
电话: 024-96615-56311  
收稿日期: 2010-10-29 修回日期: 2010-12-06  
接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-01-28

## Treatment with ITF attenuates PAF-induced disruption of the F-actin cytoskeleton in an *in vitro* model of intestinal epithelium

Ling-Fen Xu, Xu Teng, Jie Wu, Jing Guo, Zhi-Qin Mao, Mei Sun

Ling-Fen Xu, Xu Teng, Jie Wu, Jing Guo, Zhi-Qin Mao, Mei Sun, Department of Pediatrics, Shengjing Hospital of China Medical University; Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (RFDP), No. 20092104110010; the Scientific and Technological Program of Educational Commission of Liaoning Province, No. L2010624; the Liaoning Province Doctor Startup Fund, No. 20101147; and the Science and Technology Program of Shenyang, No. F10-205-1-45  
Correspondence to: Professor Mei Sun, Department of Pediatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunm@sj-hospital.org  
Received: 2010-10-29 Revised: 2010-12-06  
Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To explore whether treatment with platelet-activating factor (PAF) disrupts the intestinal epithelial barrier by altering the F-actin cytoskeleton and, if so, whether treatment with intestinal trefoil factor (ITF) exerts a protective effect against PAF-induced disruption of the F-actin cytoskeleton.

**METHODS:** An *in vitro* model of intestinal epi-

thelium was established with Caco-2 cells. PAF at different concentrations (0, 50, 100, 200 nmol/L) was incubated with postconfluent monolayers of Caco-2 cells for 24 h. Moreover, 100 nmol/L PAF was administered for different periods (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h). ITF (0.3 mol/L) was administered 30 min before or after PAF treatment (100 nmol/L). Transendothelial electrical resistance (TEER) was measured to evaluate the permeability of intestinal epithelial cell monolayers. Immunofluorescent staining and flow cytometry were used to observe the morphological alterations and conduct protein quantitation of the F-actin cytoskeleton.

**RESULTS:** Compared with the control group, TEER decreased in cells treated with PAF (100 nmol/L) for 24 h ( $232.75 \Omega/\text{cm}^2 \pm 15.74 \Omega/\text{cm}^2$  vs  $346.75 \Omega/\text{cm}^2 \pm 26.69 \Omega/\text{cm}^2$ ,  $P < 0.01$ ). While compared with the model group, TEER had little enhancement in cells treated with ITF ( $313.75 \Omega/\text{cm}^2 \pm 18.28 \Omega/\text{cm}^2$ ,  $299 \Omega/\text{cm}^2 \pm 13.16 \Omega/\text{cm}^2$  vs  $232.75 \Omega/\text{cm}^2 \pm 15.74 \Omega/\text{cm}^2$ , both  $P < 0.01$ ). Treatment with PAF induced a significant decline in paracellular permeability. After treatment with PAF (100 nmol/L) for 24 h, extensive disorganization, kinking, condensation, and beading of the F-actin ring could be seen and the mean fluorescent intensity of F-actin had a significant decline ( $218.56 \pm 23.18$  vs  $425.35 \pm 40.31$ ,  $P < 0.01$ ). Treatment with ITF could reverse the high permeability of intestinal epithelial cell monolayers partly by recovering the normal structure of F-actin and increasing the content of F-actin ( $391.76 \pm 58.57$ ,  $360.86 \pm 8.68$  vs  $218.56 \pm 23.18$ , both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** PAF plays an important role in the regulation of intestinal mucosal permeability and induces the structural alterations of the F-actin cytoskeleton. Treatment with ITF can protect intestinal epithelium by restricting the rearrangement of the F-actin cytoskeleton.

**Key Words:** Platelet-activating factor; Intestinal trefoil factor; Filamentous-actin; Cytoskeleton

Xu LF, Teng X, Wu J, Guo J, Mao ZQ, Sun M. Treatment

### ■背景资料

肠黏膜屏障作为机体最重要的免疫防御屏障,其完整性与多种疾病状态相关,如感染、创伤、应激、缺血/再灌注等急性过程以及肠道的慢性炎症性疾病如克罗恩病、溃疡性结肠炎等。细胞骨架成分F-actin的重组与细胞旁通路的开放之间存在着结构和功能的关系。PAF引起的肠黏膜屏障通透性的改变是否与F-actin的结构改变相关,ITF对肠黏膜屏障的保护作用是否与稳定细胞骨架结构,防止细胞骨架重排有关尚无报道。

### ■同行评议者

杨桦, 教授, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院普通外科

## ■ 研发前沿

肠黏膜屏障通透性增高是多种疾病的发病基础。探讨引起通透性增高的关键环节,其发病的信号转导机制,并研制有效的预防和治疗药物,是此领域的研究热点。

with ITF attenuates PAF-induced disruption of the F-actin cytoskeleton in an *in vitro* model of intestinal epithelium. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 233-239

## 摘要

**目的:** 探讨血小板活化因子(PAF)对肠上皮细胞骨架F-actin的影响以及肠三叶因子(ITF)对此影响的抑制作用。

**方法:** 体外培养人结肠腺癌细胞株Caco-2, 分为4组。对照组: 不加刺激物及干预因素; 实验组: 加入PAF, 终浓度分别为0、50、100和200 nmol/L, 作用24 h; PAF 100 nmol/L, 分别作用0、2、4、8、12、24、48 h; ITF预防组: 先加入ITF 0.3 mol/L, 30 min后加入PAF 100 nmol/L; ITF治疗组: 先加入PAF 100 nmol/L, 30 min后加入ITF 0.3 mol/L, 24 h后进行实验。应用跨上皮电阻(TEER)反映肠上皮细胞屏障通透性; 免疫荧光染色法观察F-actin的定位、重排以及形态学变化; 流式细胞术对F-actin蛋白进行定量分析。

**结果:** 给予50 nmol/L PAF, 作用8-12 h即可引起TEER的下降, PAF 100 nmol/L作用24 h, TEER降到最低点, 与对照组相比, 差异显著( $232.75 \Omega/\text{cm}^2 \pm 15.74 \Omega/\text{cm}^2$  vs  $346.75 \Omega/\text{cm}^2 \pm 26.69 \Omega/\text{cm}^2$ ,  $P < 0.01$ ); 预防或治疗性给予ITF, TEER有所恢复, 与模型组相比, 差异显著( $313.75 \Omega/\text{cm}^2 \pm 18.28 \Omega/\text{cm}^2$ ,  $299 \Omega/\text{cm}^2 \pm 13.16 \Omega/\text{cm}^2$  vs  $232.75 \Omega/\text{cm}^2 \pm 15.74 \Omega/\text{cm}^2$ , 均 $P < 0.01$ )。TRITC-phalloidin直接免疫荧光染色显示正常Caco-2细胞, F-actin主要环绕于细胞周边, 排列紧密圆滑, 无明显间隙, 细胞界限清晰。PAF 100 nmol/L作用24 h后, F-actin出现重排, 断裂, 周边肌动蛋白丝带模糊, 部分细胞出现横跨细胞的应力纤维结构。预防或治疗性给予ITF后, 具有正常F-actin染色的细胞比例增加, 周边肌动蛋白丝带逐渐清晰, 胞质内应力纤维减少, 但环点状断裂未完全修复。预防组作用更强。以TRITC-phalloidin的相对平均荧光强度表示F-actin的含量, 经流式细胞仪检测发现PAF 100 nmol/L作用24 h后, F-actin含量明显减少( $218.56 \pm 23.18$  vs  $425.35 \pm 40.31$ ,  $P < 0.01$ ), 给予ITF后F-actin的含量有所增加, 与模型组相比差异显著( $391.76 \pm 58.57$ ,  $360.86 \pm 8.68$  vs  $218.56 \pm 23.18$ , 均 $P < 0.01$ ), 但仍低于对照组。

**结论:** PAF可以改变肠上皮细胞骨架F-actin的定位及定量, 从而影响肠上皮细胞屏障功能; ITF可以通过抑制F-actin重排, 恢复F-actin蛋白定量而稳定细胞骨架。

**关键词:** 血小板活化因子; 肠三叶因子; 纤维状肌动蛋白; 细胞骨架

许玲芬, 滕旭, 吴捷, 郭静, 毛志芹, 孙梅. ITF对PAF引起的肠上皮细胞骨架F-actin破坏的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(3): 233-239

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/233.asp>

## 0 引言

肠黏膜屏障是机体最重要的免疫防御屏障, 将机体与肠道内的外源性物质隔离开来, 避免病原微生物的侵袭和抗原分子的损伤<sup>[1-5]</sup>。屏障的完整性受一个复杂的网络调控, 包括细胞骨架、紧密连接、黏附连接等。其中细胞骨架成分F-actin对维持正常肠黏膜通透性具有重要作用, 上皮细胞F-actin的重组和/或再分布可以引起上皮细胞屏障通透性改变<sup>[6-8]</sup>。有研究资料表明肌动蛋白在维持胃肠黏膜屏障的完整性和功能中是关键成分, 若其破坏将导致黏膜损伤<sup>[9]</sup>。用乙醇破坏胃肠黏膜屏障的完整性而观察到微管骨架的破坏<sup>[10]</sup>。

血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)是一种具有生物活性的脂性介质, 主要由血小板、中性粒细胞、单核细胞以及内皮细胞产生<sup>[11]</sup>。PAF同样可以由肠上皮细胞产生<sup>[12,13]</sup>, 参与肠道的生理及病理过程: 生理状态下, 他可以调节肠道的正常通透性<sup>[14]</sup>; 在多种肠道疾病如炎症性肠病、坏死性小肠结肠炎等中, 均发现PAF发挥着重要作用<sup>[15,16]</sup>, 即使未引起肠损伤的小剂量PAF, 也可以引起其他细胞因子和转录因子的活化, 增加肠黏膜通透性<sup>[17-22]</sup>, 在多种细胞系中也发现了PAF的特异性受体<sup>[23,24]</sup>。但PAF引起上皮细胞屏障通透性改变是否与细胞骨架成分F-actin的重排有关, 尚无研究证实。

肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)属三叶肽家族, 是近年来被人们注意到的对胃肠道黏膜屏障有重要保护和修复作用的多肽<sup>[25,26]</sup>。大量的动物实验也证明ITF在维持肠上皮细胞的完整性, 恢复肠黏膜的正常通透性方面均起到重要作用<sup>[27,28]</sup>。但其作用机制仍不明了。

本实验应用Caco-2细胞建立体外肠上皮细胞屏障模型, 观察PAF是否引起细胞骨架F-actin的重排? ITF是否通过抑制F-actin的重排而起保护作用? 为ITF的临床应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人结肠腺癌细胞株(Caco-2)购于中国

科学院上海细胞所, 由ATCC引进; DMEM培养基、胰酶和胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)购自Gibco公司; PAF、罗丹明-鬼笔环肽(TRITC-phalloidin)购自Sigma公司; 基因重组肠三叶因子(recombinant intestinal trefoil factor, rITF)由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** Caco-2细胞常规培养, 培养液为DMEM培养基, 含150 mL/L进口FBS, 1%青链霉素双抗液, 通入50 mL/L CO<sub>2</sub>(相对湿度90%), 置37 °C培养箱, 传代后7 d左右细胞生长达到融合开始进行实验, 每种实验均选取3组非同代细胞进行。

**1.2.2 分组:** 分别设对照组、实验组、ITF预防组、ITF治疗组。对照组: 不加刺激物及干预因素。实验组: 加入PAF, 终浓度分别为0、50、100、200 nmol/L, 作用24 h; 加入PAF 100 nmol/L, 分别作用0、2、4、8、12、24、48 h。ITF预防组: 先加入rITF 0.3 mol/L, 30 min后加入PAF 100 nmol/L, 24 h后进行实验。ITF治疗组: 先加入PAF 100 nmol/L, 30 min后加入rITF 0.3 mol/L, 24 h后进行实验。

**1.2.3 跨上皮电阻测定:** 将细胞接种于Transwell, 应用EVOM测定跨上皮电阻(transsepithelial electrical resistance, TEER)。整个过程在恒定温度下(37 °C)进行, 每个Transwell均取不同方向的3个点, 重复测定3次, 取平均值即为该样品的TEER值, 以Ω/cm<sup>2</sup>表示; 因为Transwell膜本身也具有一定的TEER, 因此标准的TEER应将样品的实测TEER值减去空白对照的TEER值。

**1.2.4 F-actin的免疫荧光染色:** 采用直接免疫荧光染色法。置盖玻片于六孔板中接种细胞, 爬片生长至融合, 换无血清培养液, 按照实验分组加入PAF及rITF。弃培养液, PBS洗涤, 40 g/L多聚甲醛固定, 0.5% Triton X-100打孔, 10% BSA封闭, 加入浓度为1:100的TRITC-phalloidin, 每片约100 μL, 室温避光反应40 min, 弃染料, PBS漂洗, 甘油封片, 用荧光显微镜观察并拍照。

**1.2.5 流式细胞术对肠上皮细胞F-actin的定量分析:** 将细胞接种于六孔板中, 生长至融合, 换无血清培养液, 按照实验分组加入PAF及rITF。弃培养液, 加胰酶消化, 弃胰酶, 终止消化, 反复吹打成单细胞悬液, 收集细胞。4 °C PBS离心洗涤, 加无水乙醇, -20 °C过夜固定; 0.5% Triton X-100打孔; 加入浓度为1:60的TRITC-phalloidin, 每管100 μL, 室温避光反应1 h, 弃染料, PBS离心

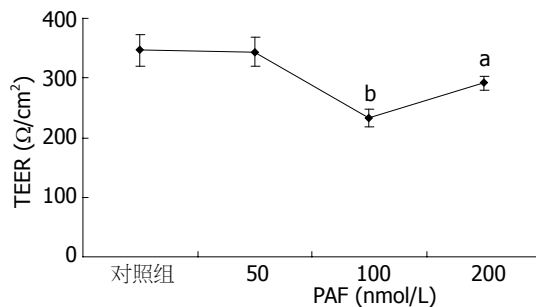


图1 不同浓度PAF对Caco-2单层上皮细胞TEER的影响。<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组。

洗涤; PBS稀释至1 mL, 混匀细胞, 转移至流式管中, 上流式细胞仪分析, FL2通道, 每个样品记数10 000个细胞。

**统计学处理** 所有实验均重复4次, 结果用mean±SD表示, 统计由SPSS12.0软件完成。采用One-way ANOVA法对各组间数据进行比较, *P*<0.05被认为有显著差异。

## 2 结果

**2.1 PAF及ITF对Caco-2单层细胞TEER的影响** 给予50 nmol/L PAF, 作用8-12 h即可引起TEER的下降, PAF 100 nmol/L作用24 h, TEER降到最低点, 与对照组相比, 差异显著(232.75 Ω/cm<sup>2</sup> ± 15.74 Ω/cm<sup>2</sup> vs 346.75 Ω/cm<sup>2</sup> ± 26.69 Ω/cm<sup>2</sup>, *P*<0.01); 预防或治疗性给予ITF, TEER有所恢复, 与模型组相比, 差异显著(313.75 Ω/cm<sup>2</sup> ± 18.28 Ω/cm<sup>2</sup>, 299.00 Ω/cm<sup>2</sup> ± 13.16 Ω/cm<sup>2</sup> vs 232.75 Ω/cm<sup>2</sup> ± 15.74 Ω/cm<sup>2</sup>, 均*P*<0.01)。提示PAF可以直接降低Caco-2细胞屏障的TEER, 而ITF可以部分恢复肠黏膜屏障通透性(图1-3)。

**2.2 PAF引起细胞骨架F-actin的重排以及ITF的逆转作用** F-actin染色应用的是TRITC-phalloidin特异性荧光探针直接标记, 因为其有专一结合微丝骨架应力纤维主要成分F-actin的特性, 用于显示F-actin的分布。在正常Caco-2细胞, F-actin主要环绕于细胞周边, 形成周边肌动蛋白丝带, 在细胞与细胞接触部位呈束状相互连接, 细胞中央偶尔可见不规则纤维丝。细胞生长融合为单层后, 可见细胞间F-actin排列紧密圆滑, 轮廓完整连续, 无明显间隙, 细胞界限清晰。PAF作用8-12 h后, 就可见细胞骨架F-actin出现重排, 表现为外周致密带边缘变的毛糙不规整, 出现环点状断裂, 细胞中央有弥散actin及少量应力纤维形成。作用24 h, 可见周边肌动蛋白丝带模糊, 在细胞皮质区的F-actin纤维致密斑减少, 部分细胞出现明显横跨细胞的应力纤维结构。48 h后周边肌

### ■ 相关报道

相关资料表明在维持胃黏膜屏障的完整性和功能中肌动蛋白是关键成分, 若其破坏将导致黏膜损伤; 用乙醇破坏胃黏膜屏障的完整性而观察到微管骨架的破坏。体外研究也发现ITF高表达的细胞, 其TEER明显增高, 肠通透性降低。

### ■ 创新盘点

目前关于PAF引起肠黏膜通透性增高的体外实验报道极少,他对于细胞骨架结构F-actin的重组和/或再分布的影响的文章国内尚未见报道.研究ITF对肠黏膜损伤的抑制作用并从稳定细胞骨架结构,防止细胞骨架重排的角度探讨其作用机制是本研究的创新点.

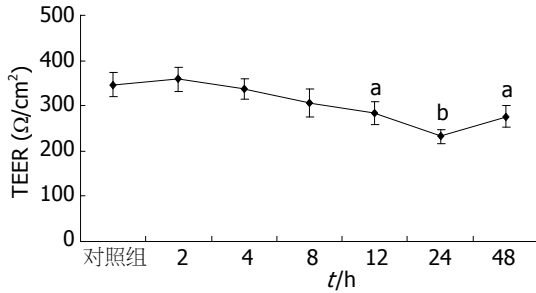


图2 PAF(100 nmol/L)作用不同时间对Caco-2单层上皮细胞TEER的影响。<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

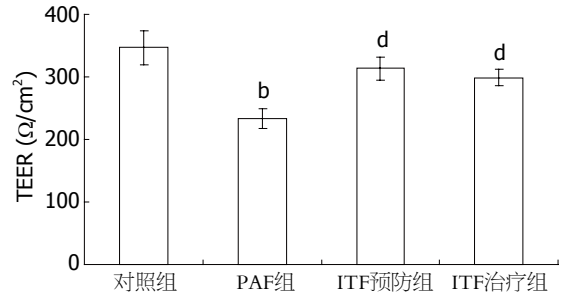


图3 PAF及ITF对Caco-2单层上皮细胞TEER的影响。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs PAF组。

动蛋白丝带变细,断断续续,胞质内仍可见少量应力纤维.给予不同浓度的PAF发现,以PAF 100 nmol/L破坏最为明显.当预防或治疗性给予rITF并共同培养24 h后,免疫荧光染色发现,具有正常F-actin染色的细胞比例在增加,周边肌动蛋白丝带逐渐清晰,胞质内应力纤维减少,但外周致密带边缘仍毛糙不规整,环点状断裂未完全修复.比较而言,预防性给药恢复细胞骨架正常结构的能力更强(图4).

**2.3 PAF及ITF对F-actin含量的影响** 流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种可以对细胞或亚细胞结构进行快速测量的新型分析技术和分选技术,TRITC-phalloidin可以专一结合F-actin.以TRITC-phalloidin的平均荧光强度表示F-actin的含量.经FCM检测发现:PAF作用8 h后,F-actin含量开始减少,峰左移;24 h后明显下降,峰左移明显,与对照组相比差异显著( $298.26 \pm 23.18$ ,  $218.56 \pm 23.18$  vs  $425.35 \pm 40.31$ , 均 $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),作用持续到48 h,但48 h与24 h相比无明显差异( $282.41 \pm 29.5$  vs  $218.56 \pm 23.18$ ,  $P > 0.05$ , 图5).而PAF作用浓度对F-actin含量的影响更为显著,以PAF 100 nmol/L下降最为明显,与对照组相比差异显著( $218.56 \pm 23.18$  vs  $425.35 \pm 40.31$ ,  $P < 0.01$ , 图6).给予rITF作用24 h,F-actin的含量有所增加,与PAF 100 nmol/L组相比差异显著( $391.76 \pm 58.57$ ,  $360.86 \pm 8.68$  vs  $218.56 \pm 23.18$ , 均 $P < 0.01$ ),但仍低于对照组,峰右移,但未移回原位.预防组较治疗组作用更强,但无统计学意义(图7, 8).

### 3 讨论

肌动蛋白骨架介导了许多真核细胞重要的生理功能,作为网络结构还为细胞提供必要的形态和极性.F-actin是个动力结构蛋白,其特殊的性质决定和主导了细胞的移动、分泌和信号转导等功能<sup>[29,30]</sup>.F-actin的重组与细胞旁通路的开放

之间存在着结构和功能的关系.在多种急慢性疾病状态下如感染<sup>[31]</sup>、创伤、烧伤、应激、窒息缺氧<sup>[32]</sup>、缺血/再灌注<sup>[33]</sup>、药物、毒素等以及肠道的慢性炎症性疾病如克罗恩病、溃疡性结肠炎<sup>[34,35]</sup>等均可引起肠黏膜屏障的破坏,肠通透性的增加,进而造成全身炎症反应.为了观察在这个过程中是否出现了上皮细胞骨架成分F-actin的重组和/或再分布?这种改变与炎症因子作用的时间以及剂量之间的关系如何?我们进行了如下实验.

首先应用Caco-2细胞建立体外肠上皮细胞屏障模型.观察正常Caco-2细胞F-actin的结构,显示其分布于胞质内近细胞膜处,形成环状致密周围带,光滑连续,分布均匀,排列整齐,形成典型的鹅卵石样形态,这是保持细胞形态和细胞间连接的结构基础.胞质中未见密集的F-actin纤维,细胞间连接紧密,没有明显间隙形成.

我们在以往的研究中已经证实<sup>[36]</sup>,PAF可以直接引起肠黏膜屏障通透性的改变.本实验应用TEER测定肠黏膜屏障通透性,也证实了不同浓度PAF作用不同时间对通透性的影响以及ITF的保护作用.但这种改变是否与细胞骨架蛋白F-actin的结构改变有关是本文研究的目的.当PAF作用于Caco-2细胞8-12 h时,发现骨架蛋白F-actin的结构就已发生改变,细胞间连接略松散,周边肌动蛋白致密带毛糙,胞质内出现中央短纤维和少量应力纤维;作用24 h,细胞形态结构发生进一步变化,胞质内actin纤维聚集成束,形成应力纤维,而细胞边缘actin致密带却变薄、变细或变模糊甚至消失,细胞间缝隙增大、增多;而在作用48 h时,F-actin的重组有所恢复.所有这些改变以PAF浓度为100 nmol/L时最重.通过流式细胞仪定量分析F-actin的蛋白含量,结果显示F-actin蛋白量较正常明显减少,以24 h减少最显著.定量检测的结果和形态学的变化意义基本一致.说明PAF影响了F-actin的再分

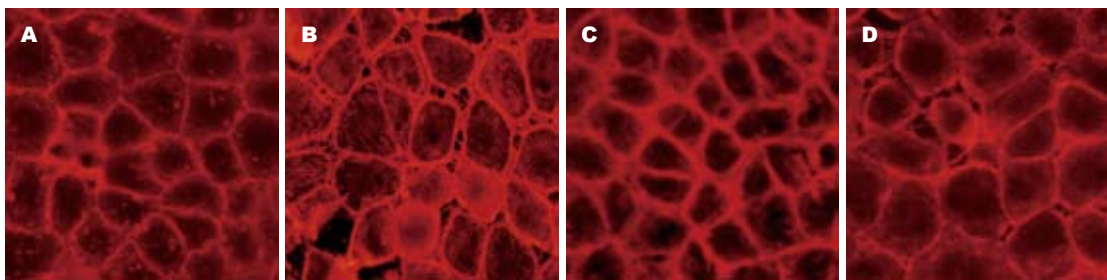


图 4 PAF引起F-actin重排及ITF的保护作用(TRITC-phalloidin染色×400). A: 对照组; B: PAF模型组; C: ITF预防组; D: ITF治疗组.

**应用要点**  
 本文发现PAF可以改变肠上皮细胞骨架F-actin的定位及定量, 从而影响肠黏膜屏障功能; ITF可以通过抑制F-actin重排, 恢复F-actin蛋白定量而稳定细胞骨架, 起到保护作用. 为进一步探讨肠黏膜屏障破坏机制及ITF的研发及应用奠定基础.

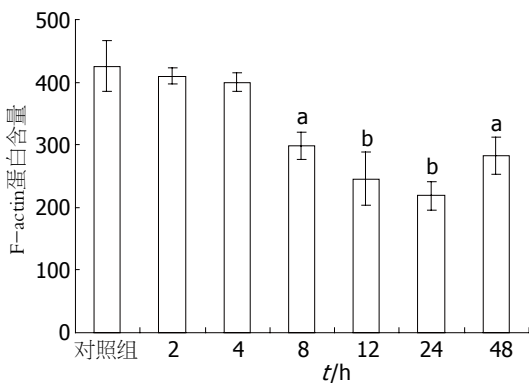


图 5 FCM检测100 nmol/L PAF作用不同时间对F-actin蛋白含量的影响. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

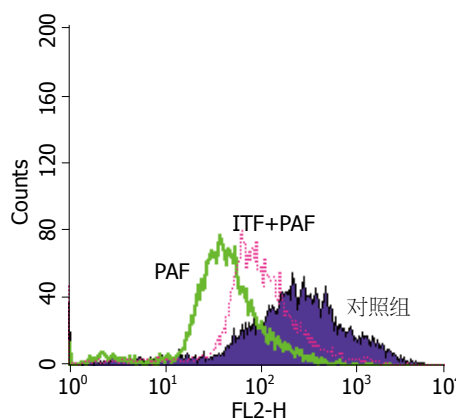


图 7 PAF和ITF对F-actin含量的影响(FCM, TRITC-phalloidin染色).

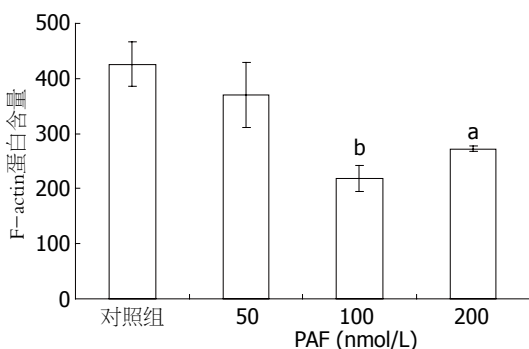


图 6 FCM检测不同浓度PAF对F-actin蛋白含量的影响. <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组.

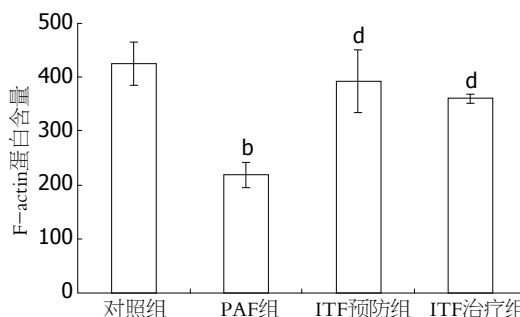


图 8 FCM检测预防或治疗性给予rITF对F-actin蛋白含量的影响. <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs PAF组.

布和重构, 且具有时间效应, 其剂量效应可能与受体饱和度有关. 这也证实了细胞骨架F-actin的重排是PAF引起肠上皮细胞屏障通透性增强的一个重要机制.

ITF属三叶肽家族, 是近年来被人们注意到的对胃肠道黏膜屏障有重要保护和修复作用的多肽, 是一种新型的生长因子类多肽物质. 他的生理功能主要体现在两个方面<sup>[25,26]</sup>: 首先ITF可与黏液糖蛋白相互作用或交联, 形成黏弹性的黏液凝胶层, 对肠道黏液层起固定和支持作用, 防止有害物质对肠黏膜细胞的损伤, 从而增强胃肠道黏膜屏障的保护能力; 其次ITF具有很强

的促进细胞增殖与移行的能力, 被认为是黏膜损伤的快速反应肽, 在损伤早期即可表达, 促进受损区域上皮细胞重建并加快上皮细胞移行速度, 因而在肠道的自我保护机制中占据重要地位. 大量的动物实验也证明ITF在维持肠上皮细胞的完整性, 恢复肠黏膜的正常通透性方面均起到重要作用, 但作用机制仍不明了. 体外研究发现ITF高表达的细胞, 其TEER明显增高, 肠通透性降低<sup>[37]</sup>, 但与细胞骨架的重排是否相关, 尚无研究证实.

本实验中我们预防或治疗性给予rITF后, 周边肌动蛋白丝带逐渐清晰, 胞质内应力纤维减



### ■同行评价

本文创新性较好,为研究肠三叶因子抑制细胞骨架破坏的机制奠定了实验基础。

少,但外周致密带边缘仍毛糙不规整,环点状断裂未完全修复;FCM检测F-actin蛋白含量较前增加,预防性给药改变更显著。由此我们认为稳定细胞骨架结构,防止细胞骨架重排也是ITF恢复肠黏膜的正常通透性的一个机制,为ITF作为一个肠道保护因子提供理论依据。

### 4 参考文献

- Hollander D. The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 721-726
- Purohit V, Bode JC, Bode C, Brenner DA, Choudhry MA, Hamilton F, Kang YJ, Keshavarzian A, Rao R, Sartor RB, Swanson C, Turner JR. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: summary of a symposium. *Alcohol* 2008; 42: 349-361
- Choudhry MA, Chaudry IH. Alcohol, burn injury, and the intestine. *J Emerg Trauma Shock* 2008; 1: 81-87
- Menconi MJ, Salzman AL, Unno N, Ezzell RM, Casey DM, Brown DA, Tsuji Y, Fink MP. Acidosis induces hyperpermeability in Caco-2BBE cultured intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* 1997; 272: G1007-G1021
- Unno N, Menconi MJ, Smith M, Aguirre DE, Fink MP. Hyperpermeability of intestinal epithelial monolayers is induced by NO: effect of low extracellular pH. *Am J Physiol* 1997; 272: G923-G934
- Yuan SY. Signal transduction pathways in enhanced microvascular permeability. *Microcirculation* 2000; 7: 395-403
- Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L, Pardi R, Bender JR. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol* 1997; 273: H286-H294
- Banan A, Zhang Y, Losurdo J, Keshavarzian A. Carbonylation and disassembly of the F-actin cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in a human colonic cell line. *Gut* 2000; 46: 830-837
- Banan A, Fitzpatrick L, Zhang Y, Keshavarzian A. OPC-compounds prevent oxidant-induced carbonylation and depolymerization of the F-actin cytoskeleton and intestinal barrier hyperpermeability. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 287-298
- Banan A, Fields JZ, Decker H, Zhang Y, Keshavarzian A. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 997-1008
- Jeong YI, Jung ID, Lee CM, Chang JH, Chun SH, Noh KT, Jeong SK, Shin YK, Lee WS, Kang MS, Lee SY, Lee JD, Park YM. The novel role of platelet-activating factor in protecting mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *PLoS One* 2009; 4: e6503
- Guerrant RL, Fang GD, Thielman NM, Fonteles MC. Role of platelet activating factor in the intestinal epithelial secretory and Chinese hamster ovary cell cytoskeletal responses to cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9655-9658
- Gustafson C, Kald B, Sjö Dahl R, Tagesson C. Phospholipase C from *Clostridium perfringens* stimulates formation and release of platelet-activating factor (PAF-acether) in cultured intestinal epithelial cells (INT 407). *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 1000-1006
- Tan XD, Chang H, Qu XW, Caplan M, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Platelet-activating factor increases mucosal permeability in rat intestine via tyrosine phosphorylation of E-cadherin. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1522-1529
- Wardle TD, Hall L, Turnberg LA. Platelet activating factor: release from colonic mucosa in patients with ulcerative colitis and its effect on colonic secretion. *Gut* 1996; 38: 355-361
- Hsueh W, Caplan MS, Sun X, Tan X, MacKendrick W, Gonzalez-Crussi F. Platelet-activating factor, tumor necrosis factor, hypoxia and necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 396: 11-17
- Liu SX, Tian R, Baskind H, Hsueh W, De Plaen IG. Platelet-activating factor induces the processing of nuclear factor-kappaB p105 into p50, which mediates acute bowel injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G76-G81
- Wang H, Qu X, De Plaen IG, Hsueh W. Platelet-activating factor and endotoxin activate CCAAT/enhancer binding protein in rat small intestine. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 713-721
- Tan X, Sun X, Gonzalez-Crussi FX, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. PAF and TNF increase the precursor of NF-kappa B p50 mRNA in mouse intestine: quantitative analysis by competitive PCR. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1215: 157-162
- Tan XD, Wang H, Gonzalez-Crussi FX, Chang H, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Platelet activating factor and endotoxin increase the enzyme activity and gene expression of type II phospholipase A2 in the rat intestine. Role of polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1996; 156: 2985-2990
- Wang H, Tan X, Chang H, Gonzalez-Crussi F, Remick DG, Hsueh W. Regulation of platelet-activating factor receptor gene expression in vivo by endotoxin, platelet-activating factor and endogenous tumour necrosis factor. *Biochem J* 1997; 322 (Pt 2): 603-608
- Duncan KR, Baker PN, Gowland PA, Issa B, Moore R, Worthington B, Johnson IR. Demonstration of changes in fetal liver erythropoiesis using echoplanar magnetic resonance imaging. *Am J Physiol* 1997; 273: G965-G967
- Youlyouy I, Magnoux E, Guglielmi L, Denizot Y. Expression of a splice variant of the platelet-activating factor receptor transcript 2 in various human cancer cell lines. *Mediators Inflamm* 2002; 11: 329-331
- Merendino N, Dwinell MB, Varki N, Eckmann L, Kagnoff MF. Human intestinal epithelial cells express receptors for platelet-activating factor. *Am J Physiol* 1999; 277: G810-G818
- Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, Lynch-Devaney K, Podolsky DK. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology* 1995; 109: 516-523
- Hernández C, Santamatilde E, McCreath KJ, Cervera AM, Díez I, Ortiz-Masiá D, Martínez N, Calatayud S, Esplugues JV, Barrachina MD. Induction of trefoil factor (TFF)1, TFF2 and TFF3 by hypoxia

- is mediated by hypoxia inducible factor-1: implications for gastric mucosal healing. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 262-272
- 27 陈丽萍, 张丙宏, 李艳, 麦根荣, 刘仲熊. 肠三叶因子对新生鼠缺氧肠损伤模型白细胞介素8、丙二醛的影响及意义. *中华围产医学杂志* 2003; 6: 306
- 28 李军, 许玲芬, 孙梅, 李强, 高红, 姜卫国. 肠三叶因子在内毒素致幼鼠肠损伤中的作用及意义. *中国当代儿科杂志* 2006; 8: 425
- 29 Carpenter CL. Actin cytoskeleton and cell signaling. *Crit Care Med* 2000; 28: N94-N99
- 30 dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 2003; 83: 433-473
- 31 Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, Bueno L. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol* 2005; 167: 1071-1079
- 32 Tazuke Y, Drongowski RA, Teitelbaum DH, Coran AG. The effect of hypoxia on permeability and bacterial translocation in Caco-2 adult and I-407 fetal enterocyte cell culture models. *Pediatr Surg Int* 2003; 19: 316-320
- 33 Kozar RA, Verner-Cole E, Schultz SG, Sato N, Bick RJ, Desoignie R, Poindexter BJ, Moore FA. The immune-enhancing enteral agents arginine and glutamine differentially modulate gut barrier function following mesenteric ischemia/reperfusion. *J Trauma* 2004; 57: 1150-1156
- 34 Oshitani N, Watanabe K, Nakamura S, Fujiwara Y, Higuchi K, Arakawa T. Dislocation of tight junction proteins without F-actin disruption in inactive Crohn's disease. *Int J Mol Med* 2005; 15: 407-410
- 35 崔巍, 刘冬妍, 马力, 刘沛. TNF- $\alpha$ 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1788-1793
- 36 许玲芬, 董亚络, 孙梅, 马力, 毛志芹. PAF对肠上皮细胞紧密连接的影响及ITF的保护作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 372-378
- 37 Meyer zum Büschenfelde D, Tauber R, Huber O. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. *Peptides* 2006; 27: 3383-3390

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>1</sup> $P<0.05$ , <sup>2</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>3</sup> $P<0.05$ , <sup>4</sup> $P<0.01$ .  $P$ 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. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 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.

# SUMO-1、MDM2和P53对5-Fu诱导细胞凋亡的影响

卢星榕, 沈松菲, 池畔

## ■背景资料

SUMO-1可通过对P53蛋白的翻译后修饰而增强P53的转录活性,同时也可与其他因子共同调节MDM2作为E1泛素连接酶的活性,而增强或减弱MDM2对P53的降解,说明P53、MDM2和SUMO-1三者间有着千丝万缕的联系。

卢星榕, 福建医科大学附属协和医院普外科结直肠外科专业组 福建省福州市 350001

沈松菲, 福建省血液病研究所 福建省福州市 350001

池畔, 福建医科大学附属协和医院普外科结直肠外科专业组 福建省福州市 350001

卢星榕, 副主任医师, 副教授, 主要从事结肠肿瘤方面的研究。

作者贡献分布: 卢星榕、沈松菲及池畔对此文所作贡献均等; 由卢星榕、沈松菲及池畔共同设计并写作完成; 研究所用试剂及数据分析由卢星榕与沈松菲完成。

通讯作者: 池畔, 主任医师, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院普外科结直肠外科专业组。

cp3169@163.com

收稿日期: 2010-10-25 修回日期: 2010-12-01

接受日期: 2010-12-07 在线出版日期: 2011-01-28

## Role of SUMO-1, MDM2 and P53 in 5-fluorouracil-induced apoptosis of HepG2 cells

Xing-Rong Lu, Song-Fei Shen, Pan Chi

Xing-Rong Lu, Department of Colorectal Surgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Song-Fei Shen, Hematologic Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Pan Chi, Department of Colorectal Surgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Pan Chi, Department of Colorectal Surgery, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. cp3169@163.com

Received: 2010-10-25 Revised: 2010-12-01

Accepted: 2010-12-07 Published online: 2011-01-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1), murine double minute gene 2 (MDM2) and P53 in 5-fluorouracil (5-Fu)-induced apoptosis of HepG2 cells.

**METHODS:** Non-transfected HepG2 cells and HepG2 cells transfected with pMDM2 and pSUMO-1 plasmids, alone or both, were treated with different concentrations of 5-Fu for 36 hours. The expression of endogenous P53 protein in HepG2 cells was detected by Western blot.

**RESULTS:** Treatment with 5-Fu significantly increased the relative expression level of endogenous P53 protein and the apoptosis rate of

HepG2 cells in a concentration-dependent manner ( $90.15\% \pm 4.22\%$  vs  $11.27\% \pm 1.18\%$ ,  $33.61\% \pm 3.15\%$  vs  $3.22\% \pm 0.60\%$ , both  $P < 0.05$ ). Cells transfected with the pMDM2 plasmid had an apparent resistance to 5-Fu-induced apoptosis of HepG2 cells. The relative expression level of P53 protein and the apoptosis rate in cells transfected with the pMDM2 plasmid were much lower than those in non-transfected cells treated with the same concentration of 5-Fu ( $51.80\% \pm 0.78\%$  vs  $90.15\% \pm 4.22\%$ ;  $20.45\% \pm 2.23\%$  vs  $33.61\% \pm 3.15\%$ , both  $P < 0.05$ ). No significant differences were noted in the relative expression level of P53 protein and the apoptosis rate between cells co-transfected with the pSUMO-1 and pMDM2 plasmids and non-transfected cells ( $78.85\% \pm 2.43\%$  vs  $51.80\% \pm 0.78\%$ ,  $29.83\% \pm 0.53\%$  vs  $20.45\% \pm 2.23\%$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** SUMO-1 could inhibit MDM2-induced degradation of P53 protein and enhance the nuclear expression of P53, thus promoting 5-Fu-induced cell apoptosis and elevating chemosensitivity.

**Key Words:** Small ubiquitin-like modifier-1; P53; Murine double minute gene 2; Chemotherapy; HepG2 cell; Apoptosis

Lu XR, Shen SF, Chi P. Role of SUMO-1, MDM2 and P53 in 5-fluorouracil-induced apoptosis of HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 240-245

## 摘要

**目的:** 探讨SUMO-1、MDM2和P53对化疗药5-Fu诱导的HepG2细胞凋亡的影响。

**方法:** 5-Fu诱导HepG2细胞产生凋亡,以质粒pCMV-HDM1B(pMDM2)和pcDNA3-His6-SUMO-1(pSUMO-1)转染细胞,应用Western blot检测经药物诱导及转染前后细胞中内源性P53蛋白的表达强度,流式细胞仪检测细胞凋亡比例变化。

**结果:** HepG2细胞内源性P53蛋白表达强度与空白对照组相比明显增高,于 $1 \times 10^{-3}$  mol/L浓

## ■同行评议者

陈积圣, 教授, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

度处最强(90.15%±4.22% vs 11.27%±1.18%,  $P<0.05$ ). 随5-Fu浓度的增加, HepG2细胞凋亡率逐渐升高, 于 $1\times 10^2$  mol/L浓度处凋亡率最高(33.61%±3.15% vs 3.22%±0.60%,  $P<0.05$ ). 转染pMDM2的细胞具有明显的抗凋亡特性, 与同浓度未转染细胞相比, P53蛋白表达强度和细胞凋亡率均明显下降(51.80%±0.78% vs 90.15%±4.22%; 20.45%±2.23% vs 33.61%±3.15%, 均 $P<0.05$ ). 共转染pSUMO-1的细胞其浓度-蛋白表达强度-凋亡率曲线又接近未转染细胞, 与单纯转染pMDM2细胞相比, P53蛋白表达强度和细胞凋亡率显著上升, 差异有统计学意义(78.85%±2.43% vs 51.80%±0.78%, 29.83%±0.53% vs 20.45%±2.23%, 均 $P<0.05$ ). 只转染pSUMO-1细胞的P53蛋白表达和凋亡率与未转染细胞相似, 两者间差异无统计学意义.

**结论:** SUMO-1通过抑制MDM2对P53在胞质的降解及增强P53在细胞核内的表达, 可促进化疗药物诱导的细胞凋亡, 提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 在药物诱导的细胞凋亡中具有显著协同效应.

**关键词:** 小分子泛素样修饰体-1; P53; 鼠双微体基因2; 化疗; HepG2细胞; 凋亡

卢星榕, 沈松菲, 池畔. SUMO-1、MDM2和P53对5-Fu诱导细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 240-245  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/240.asp

## 0 引言

野生型p53基因(*wtp53*)可诱发细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞形成和生长, 鼠双微体基因2(murine double minute gene 2, MDM2, 人同源基因为HDM2)蛋白由*wtp53*基因诱导表达, 与P53蛋白结合后通过促进P53蛋白的泛素化降解, 形成P53-MDM2反馈调节环路, 小分子泛素样修饰体-1(small ubiquitin-like modifier-1, SUMO-1)在蛋白翻译后修饰中具有很重要的作用, 可与泛素竞争某些底物蛋白的受体结合位点, 抑制泛素对诸如P53蛋白等底物的降解, 增强*wtp53*等抑癌基因的稳定性和转录活性<sup>[1]</sup>. 本实验以HepG2细胞为靶细胞, 分别及同时转染p*wtp53*、pMDM2和pSUMO-1质粒后, 观察其对化疗药5-Fu诱导的HepG2细胞凋亡的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞HepG2购自武汉典型培养物保藏中心. 培养在RPMI 1640培养基中,

37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度, 用时补加100 mL/L热灭活胎牛血清, 2 mmol/L谷氨酰胺, 100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素. 取对数生长期细胞接种孔板使用. 5-Fu: 制剂规格0.25 g/10 mL/支, 上海旭东海普药业有限公司.

## 1.2 方法

1.2.1 质粒瞬时转染: 利用阳离子脂质体转染试剂Lipofectamine2000(购自Invitrogen公司), 按试剂盒说明步骤, 将pcDNA3-wtp53(p*wtp53*)、pCMV-HDM1B(pMDM2)、pcDNA3-His6-SUMO-1(pSUMO-1)质粒和空质粒pcDNA3分别及同时转染HepG2细胞, 培养36 h后, 获得不同转染细胞系. 上述质粒由英国St.Andrews大学David Lane实验室的Dimitris Xirodimas教授惠赠.

1.2.2 抗肿瘤药物5-Fu诱导HepG2细胞凋亡: 将HepG2细胞悬液以 $5\times 10^5$ 个/孔接种于6孔板上, 其中供免疫荧光原位检测的孔板中置入盖玻片, 常规培养24 h至细胞汇合度达80%-90%后行同步化处理, 实验组于转染后各孔加入化疗药物5-Fu, 浓度梯度为0,  $1\times 10^{-5}$ ,  $1\times 10^{-4}$ ,  $1\times 10^{-3}$ ,  $1\times 10^{-2}$ ,  $1\times 10^{-1}$  mol/L, 每个浓度3个平行样, 培养36 h后检测各项指标.

1.2.3 Western blot检测P53蛋白在HepG2细胞中的表达强度: 用全自动图像分析仪分析测定条带的面积和灰度值, 计算出积分灰度值与内参蛋白 $\beta$ -actin灰度值相比得到P53蛋白表达强度值(%).

1.2.4 流式细胞仪检测HepG2细胞凋亡比例: 以未转染任何质粒的HepG2细胞为空白阴性对照, 在FACScan流式细胞仪上波长>620 nm处测定PI产生的红光, 得到各组细胞凋亡比例, 每组重复3次, 每个样本测定 $1\times 10^4$ 个细胞.

**统计学处理** P53蛋白表达强度值(%)及细胞凋亡率(%)以mean±SD表示, 使用SAS9.2软件进行统计学处理, 两样本间蛋白表达强度值及凋亡率比较采用t检验(SNK法),  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 Western blot分析P53蛋白在药物诱导及转染前后的表达强度 药物诱导后, 随5-Fu浓度的增加, P53蛋白表达亦逐渐增强, 于 $1\times 10^{-3}$  mol/L浓度处最强, 是诱导P53表达的敏感浓度. 在同一药物浓度不同组之间, 未转染细胞P53蛋白表达最明显, 只转染pMDM2的细胞, P53蛋白表达明显下降, 与除对照组以外的其他各组比较差异

## ■ 研发前沿

小分子泛素样修饰蛋白-1(SUMO-1)是近几年出现的研究新热点, SUMO-1对真核细胞中蛋白的翻译后修饰具有重要作用, 包括核质质的信号传递、复杂基因组的精确复制以及基因表达的调控.

## ■ 相关报道

Kaaser等应用RNA干扰技术封闭成纤维细胞内MDM2基因, 阻断了P53-MDM2负反馈调节环, 可以提高p53目的基因的表达, 细胞对5-Fu化疗敏感性上升50%.

## ■应用要点

P53蛋白被SUMO-1修饰后,可促进其核定位或在核内某一区域浓聚而脱逃MDM2对其在胞质的降解,最终增强P53的转录及诱导凋亡活性, SUMO-1-P53修饰机制的建立,为试图通过调控P53功能治疗肿瘤提供了新思路。

表1 不同浓度5-Fu诱导及转染前后p53蛋白表达强度值 (mean ± SD, %)

分组	0	1×10 <sup>-5</sup>	1×10 <sup>-4</sup>	1×10 <sup>-3</sup>	1×10 <sup>-2</sup>	1×10 <sup>-1</sup>
空白对照组	11.27 ± 1.18 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
5-Fu组	-	38.10 ± 3.91	59.58 ± 3.72	90.15 ± 4.22	80.46 ± 4.66	77.44 ± 3.35
pMDM2组	-	39.64 ± 3.03	36.48 ± 1.87 <sup>c</sup>	51.80 ± 0.78 <sup>c</sup>	47.23 ± 2.53 <sup>c</sup>	41.43 ± 1.39 <sup>c</sup>
pMDM2+pSUMO-1组	-	33.60 ± 3.77	54.32 ± 2.39 <sup>e</sup>	78.85 ± 2.43 <sup>e</sup>	76.81 ± 2.91 <sup>e</sup>	73.91 ± 5.09 <sup>e</sup>
pSUMO-1组	-	41.46 ± 8.77	63.80 ± 3.72	88.43 ± 6.37	80.71 ± 4.64	80.96 ± 5.20

<sup>a</sup>P<0.05 vs 其他组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 同浓度其他组; <sup>e</sup>P<0.05 vs 同浓度pMDM2组。

表2 不同浓度5-Fu诱导及转染前后HepG2细胞凋亡率 (%)

分组	0	1×10 <sup>-5</sup>	1×10 <sup>-4</sup>	1×10 <sup>-3</sup>	1×10 <sup>-2</sup>	1×10 <sup>-1</sup>
空白对照组	3.22 ± 0.60 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
5-Fu组	4.33 ± 0.58	11.47 ± 2.10	18.52 ± 2.62	23.43 ± 3.34	33.61 ± 3.15	17.68 ± 3.68
pMDM2组	6.11 ± 0.39	6.88 ± 1.66 <sup>c</sup>	10.05 ± 2.45 <sup>c</sup>	12.09 ± 1.29 <sup>c</sup>	20.45 ± 2.23 <sup>c</sup>	15.16 ± 2.34
pMDM2+pSUMO-1组	2.81 ± 0.40	13.25 ± 1.68 <sup>e</sup>	15.23 ± 1.00 <sup>e</sup>	23.56 ± 0.59 <sup>e</sup>	29.83 ± 0.53 <sup>e</sup>	18.28 ± 0.54
pSUMO-1组	4.13 ± 0.48	11.10 ± 0.53	16.40 ± 1.75	24.15 ± 1.75	35.05 ± 0.86	20.41 ± 1.00

<sup>a</sup>P<0.05 vs 其他组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 同浓度其他组; <sup>e</sup>P<0.05 vs 同浓度pMDM2组。

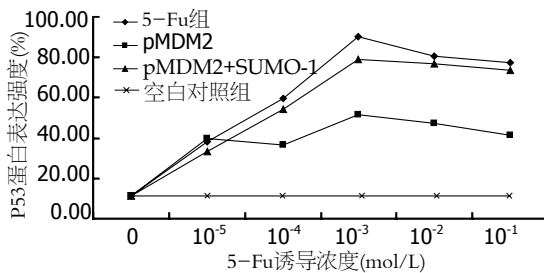


图1 不同浓度5-Fu诱导及转染前后P53蛋白表达强度值曲线。

有统计学意义( $P<0.05$ ), 而共转染pSUMO-1后, 细胞P53蛋白表达则又接近未转染细胞或仅转染pSUMO-1的细胞, 与只转染pMDM2细胞相比差异有统计学意义( $P<0.05$ , 表1, 图1)。

2.2 流式细胞分析HepG2细胞在药物诱导及转染前后凋亡比例变化 药物诱导后, 随5-Fu浓度的增加, HepG2细胞凋亡率逐渐升高, 在细胞周期G1期前, 出现明显的亚二倍体凋亡峰, 于 $1\times 10^{-2}$  mol/L浓度处凋亡率最高, 该浓度是诱导细胞凋亡的敏感浓度, 5-Fu浓度增加至 $1\times 10^{-1}$  mol/L时, 细胞死亡以坏死为主, 凋亡率反而下降。在同一药物浓度不同组之间, 未转染细胞凋亡率最高, 只转染pMDM2的细胞凋亡率明显下降, 与除对照组以外的其他各组比较差异有显著意义( $P<0.05$ ), 而共转染pSUMO-1后, 细胞凋亡率

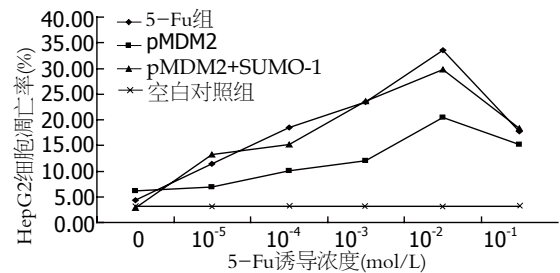


图2 不同浓度5-Fu诱导及转染前后细胞凋亡率曲线。

又与未转染细胞或仅转染pSUMO-1的细胞相近, 与只转染pMDM2细胞相比差异有显著意义( $P<0.05$ , 表2, 图2)。

## 3 讨论

目前, 在肿瘤的分子生物学领域, p53是研究最多的抑癌基因, 主要参与DNA复制和修复过程, 能通过调节转录因子控制细胞周期, 并可依据需要诱导细胞凋亡, p53基因发生突变后, 由于空间构象发生改变, 失去了对细胞生长、凋亡和DNA损伤的修复调控作用, p53基因即由抑癌基因转变为癌基因。大约50%以上的肿瘤中存在p53基因的突变<sup>[2]</sup>, 是人类肿瘤中最常失活的抑癌基因, 说明该基因的突变很可能是人类肿瘤产生的主要原因。

另外, 对于有关癌基因MDM2的功能被描述

最多的就是与P53结合从而调节其活性<sup>[3,4]</sup>, Dong等<sup>[5]</sup>应用免疫组织化学方法发现胰腺癌中P53和MDM2蛋白表达均升高, 提示其与肿瘤增殖及判断预后相关, 而另一项研究则显示MDM2基因的点突变与肝细胞癌无显著相关<sup>[6]</sup>; 但MDM2仍有许多功能未得到阐明, 1996年鉴定出的MDM2类似物MDMX<sup>[7]</sup>, 他也能与P53结合并抑制其转录活性, 哪些激酶是真正调节MDM2与P53相互作用的<sup>[8]</sup>, 是否还有其他的生物大分子能直接干扰MDM2和P53的相互作用<sup>[9]</sup>, 似乎MDM2会和*p53*一样成为一个基因家族, MDM2的作用机制也会变得越来越复杂.

SUMO-1是近几年出现的研究新热点<sup>[10,11]</sup>, SUMO-1对真核细胞中蛋白的翻译后修饰具有重要作用, 包括核胞质的信号传递、复杂基因组的精确复制以及基因表达的调控<sup>[12-14]</sup>. SUMO-1可通过对P53蛋白的翻译后修饰而增强P53的转录活性<sup>[15]</sup>, 同时也可与其他因子共同调节MDM2作为E1泛素连接酶的活性, 而增强或减弱MDM2对P53的降解<sup>[16]</sup>, 说明P53、MDM2和SUMO-1三者间有着千丝万缕的联系.

5-Fu广泛应用于消化道癌肿包括胃肠道肿瘤、原发性和转移性肝癌的栓塞化疗等, 为细胞周期特异性药, 主要抑制S期瘤细胞, 5-Fu在体内先转变为5-氟-2-脱氧尿嘧啶核苷酸, 后者抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶, 阻断脱氧尿嘧啶核苷酸转变为脱氧胸腺嘧啶核苷酸, 从而抑制DNA的生物合成, 此外, 还能通过阻止尿嘧啶和乳清酸掺入RNA而达到抑制其合成的作用.

许多抗肿瘤药物可诱导细胞凋亡, 由于化疗药物的细胞毒作用, 诱导凋亡的同时也阻断程序中某些代谢途径, Inada等<sup>[17]</sup>就裸鼠内移植胃癌和结肠癌细胞株用5-Fu做凋亡诱导实验, 发现随药物浓度及作用时间延长凋亡细胞增加, 停滞于S期细胞增多, 同时一组有关大肠癌的数据也显示术前经5-Fu化疗的患者其细胞凋亡指数明显高于未化疗的对照组, 且与增殖指数呈负相关<sup>[18]</sup>. 以5-杂氮类药物干预细胞亦能导致*p53*基因上调<sup>[19]</sup>, 体外培养细胞经紫外线等损伤因素作用后, 细胞DNA发生断裂, 可诱导细胞内源性P53蛋白表达, 细胞生长停滞于G1期并导致细胞发生凋亡<sup>[20]</sup>. 本实验结果亦显示, HepG2细胞经5-Fu诱导后, 随药物浓度的递增, 细胞内P53蛋白表达明显升高, 同时细胞凋亡也越明显, 说明5-Fu通过P53途径诱导细胞产生凋亡, 也说明诱导细胞内产生P53蛋白的高表达是5-Fu抗肿

瘤的重要机制之一. 当药物浓度超过一定范围时(本实验为 $>1 \times 10^{-3}$  mol/L), 细胞主要以坏死为主, 编码P53蛋白的DNA亦发生不可逆性损伤, P53蛋白的表达及凋亡率反而下降.

Shetty等<sup>[21]</sup>用含野生型*p53*基因的腺病毒载体(Ad-P53)转染横纹肌肉瘤细胞系, 然后以5-Fu、更生霉素D、博来霉素及长春新碱染毒细胞, P53出现0-20倍不同程度的表达, 化疗敏感性与pax3-FKHR、p21、Bax或Bcl-2的表达水平无关, 而与P53及其调节基因MDM2的表达相关. Schumacher等<sup>[22]</sup>对SCID鼠种植HT29结肠癌细胞并经5-Fu化疗后, 印戒型细胞中野生型P53阳性表达率由17%增高到45%, 同时MDM2蛋白的表达也明显增加, 而未分化癌细胞中突变型P53的表达又高于印戒型细胞, 说明突变型P53蛋白的表达与肿瘤组织的病理分型有关, 含有野生型*p53*基因的癌细胞对5-Fu化疗更敏感. Kaeser等<sup>[23]</sup>应用RNA干扰技术封闭成纤维细胞内的MDM2基因, 阻断了P53-MDM2负反馈调节环, 可以提高*p53*目的基因的表达, 细胞对5-Fu化疗敏感性上升50%. Pääjärvi等<sup>[24]</sup>在研究HepG2细胞中P53-MDM2相互作用时发现, 3-羟基-3-甲基-戊二酰-辅酶A(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA, HMG-CoA)还原酶抑制剂普伐他汀(常用作降脂药), 可以诱导MDM2蛋白Ser166位点及2A10特异性抗原决定簇位点的磷酸化, 该位点的磷酸化可激活MDM2蛋白的泛素连接酶活性, 增强MDM2对P53的降解, HepG2细胞内P53/MDM2半衰期缩短, 最终减弱5-Fu等药物诱导HepG2细胞的凋亡. P53羧基端含有与MDM2相互作用的结构域, Zhao等<sup>[25]</sup>用一种可与该结构域结合的Daxx蛋白来调控P53的功能, 当有MDM2表达时, P53的去乙酰化可以促进Daxx与P53的结合, 共转染Daxx和MDM2基因, 可以明显抑制P53对其下游启动子的激活, 细胞对5-Fu诱导的凋亡具有极强的抵抗性, 产生5-Fu耐药. 本实验结果显示转染pMDM2的细胞对5-Fu诱导的细胞凋亡有抵抗性, 转染质粒在细胞内表达MDM2蛋白, 大量降解药物诱导产生的内源性P53蛋白, 与未转染细胞相比, 其P53蛋白表达和细胞凋亡率均明显下降( $P < 0.05$ ).

SUMO-1在细胞增殖、分化、凋亡等多种生理过程中发挥重要作用, 至今已发现193种SUMO-1潜在的作用底物, 其中23种已被证实存在于细胞核内, 如小核糖核蛋白、不均一性核糖核蛋白、核糖体蛋白、组蛋白、RNA组合蛋

■同行评价  
本文可读性较好,  
具有较高的学术  
价值.

白及转录蛋白<sup>[26]</sup>,而在EGFP-SUMO-1高表达的HepG2细胞中,利用双向凝胶电泳及质谱检测,发现不均一性核糖核蛋白hnRNP A2/B1的表达上调<sup>[27]</sup>. Shao等<sup>[28]</sup>通过降低促性腺激素以诱导鼠卵巢颗粒细胞凋亡,其SUMO-1蛋白表达明显升高,提示SUMO-1在调控细胞核蛋白的定位及稳定性方面具有重要功能.本实验通过SUMO-1的修饰以调控P53功能,在共转染SUMO-1和MDM2基因的细胞中,可显著恢复P53的凋亡活性,提示不仅存在直接的对P53蛋白降解和抑制降解作用,P53诱导的细胞凋亡还与其细胞定位有关.P53蛋白的C末端是其促进细胞凋亡的中心区域,这一区域的磷酸化和乙酰化状态将影响P53与DNA的结合活性,也即影响P53下游其他凋亡因子的启动活性<sup>[29,30]</sup>,推测SUMO-1可与P53蛋白C末端结合而阻止泛素类蛋白分子对P53的降解,增强P53的转录活性.

总之,P53蛋白被SUMO-1修饰后,可促进其核定位或在核内某一区域浓聚而脱逃MDM2对其在胞质的降解,最终增强P53的转录及诱导凋亡活性,SUMO-1-P53修饰机制的建立,为试图通过调控P53功能治疗肿瘤提供了新思路.

#### 4 参考文献

- Lu X, Yi J. SUMO-1 enhancing the p53-induced HepG2 cell apoptosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005; 25: 289-291
- Keegan PE, Lunec J, Neal DE. p53 and p53-regulated genes in bladder cancer. *Br J Urol* 1998; 82: 710-720
- Vaseva AV, Marchenko ND, Moll UM. The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells. *Cell Cycle* 2009; 8: 1711-1719
- Shangary S, Ding K, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Bauer JA, Liu M, Wang G, Lu Y, McEachern D, Bernard D, Bradford CR, Carey TE, Wang S. Reactivation of p53 by a specific MDM2 antagonist (MI-43) leads to p21-mediated cell cycle arrest and selective cell death in colon cancer. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1533-1542
- Dong M, Ma G, Tu W, Guo KJ, Tian YL, Dong YT. Clinicopathological significance of p53 and mdm2 protein expression in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2162-2165
- Leu JD, Lin IF, Sun YF, Chen SM, Liu CC, Lee YJ. Association between MDM2-SNP309 and hepatocellular carcinoma in Taiwanese population. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5592-5597
- Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, van Laar T, Dekker P, Bazuine M, van Ham RC, van der Houven van Oordt W, Hateboer G, van der Eb AJ, Jochemsen AG. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J* 1996; 15: 5349-5357
- Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Ruvolo V, Andreeff M. Mitogen-activated protein kinase inhibition enhances nuclear proapoptotic function of p53 in acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 2007; 67: 3210-3219
- Becker K, Marchenko ND, Palacios G, Moll UM. A role of HAUSP in tumor suppression in a human colon carcinoma xenograft model. *Cell Cycle* 2008; 7: 1205-1213
- Hochstrasser M. SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 2001; 107: 5-8
- Cheng JK. [SUMO-specific protease 1 and cancer]. *Ai Zhong* 2008; 27: 771-774
- Kaikkonen S, Jääskeläinen T, Karvonen U, Rytinki MM, Makkonen H, Gioeli D, Paschal BM, Palvimo JJ. SUMO-specific protease 1 (SEN1) reverses the hormone-augmented SUMOylation of androgen receptor and modulates gene responses in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 292-307
- Campbell LA, Faivre EJ, Show MD, Ingraham JG, Flinders J, Gross JD, Ingraham HA. Decreased recognition of SUMO-sensitive target genes following modification of SF-1 (NR5A1). *Mol Cell Biol* 2008; 28: 7476-7486
- Brunet Simioni M, De Thonel A, Hammann A, Joly AL, Bossis G, Fourmaux E, Bouchot A, Landry J, Piechaczyk M, Garrido C. Heat shock protein 27 is involved in SUMO-2/3 modification of heat shock factor 1 and thereby modulates the transcription factor activity. *Oncogene* 2009; 28: 3332-3344
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* 1999; 18: 6455-6461
- Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 2000; 101: 753-762
- Inada T, Ichikawa A, Kubota T, Ogata Y, Moossa AR, Hoffman RM. 5-FU-induced apoptosis correlates with efficacy against human gastric and colon cancer xenografts in nude mice. *Anticancer Res* 1997; 17: 1965-1971
- 任峰,李玉涛,周建平,刘栋才.短程氟尿嘧啶/LV方案新辅助化疗对大肠癌细胞凋亡和增殖的影响.临床医学研究 2007; 24: 1883-1886
- Xiao WH, Sanren GW, Zhu JH, Li QW, Kang HR, Wang RL, Song LP, Ye M. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on immune-associated proteins in exosomes from hepatoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2371-2377
- Latonen L, Kurki S, Pitkänen K, Laiho M. p53 and MDM2 are regulated by PI-3-kinases on multiple levels under stress induced by UV radiation and proteasome dysfunction. *Cell Signal* 2003; 15: 95-102
- Shetty S, Taylor AC, Harris LC. Selective chemosensitization of rhabdomyosarcoma cell lines following wild-type p53 adenoviral transduction. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 881-889
- Schumacher U, Adam E, Feldhaus S, Katoh M, Lane DP. Cell differentiation and chemotherapy influence p53 and Mdm2 immunoreactivity in human HT29 colon cancer cells grown in scid mice. *Cancer Lett* 2001; 166: 215-221
- Kaaser MD, Pebernard S, Iggo RD. Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 7598-7605
- Pääjärvi G, Roudier E, Crisby M, Högberg J, Stenius

- U. HMG-CoA reductase inhibitors, statins, induce phosphorylation of Mdm2 and attenuate the p53 response to DNA damage. *FASEB J* 2005; 19: 476-478
- 25 Zhao LY, Liu J, Sidhu GS, Niu Y, Liu Y, Wang R, Liao D. Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2. *J Biol Chem* 2004; 279: 50566-50579
- 26 Matafora V, D'Amato A, Mori S, Blasi F, Bachi A. Proteomics analysis of nucleolar SUMO-1 target proteins upon proteasome inhibition. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8: 2243-2255
- 27 Ma KW, Au SW, Waye MM. Over-expression of SUMO-1 induces the up-regulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1 (hnRNP A2/B1 isoform B1) and uracil DNA glycosylase (UDG) in hepG2 cells. *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 228-237
- 28 Shao R, Rung E, Weijdegård B, Billig H. Induction of apoptosis increases SUMO-1 protein expression and conjugation in mouse periovulatory granulosa cells in vitro. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 50-60
- 29 Hupp TR, Lane DP, Ball KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* 2000; 352 Pt 1: 1-17
- 30 Gu W, Luo J, Brooks CL, Nikolaev AY, Li M. Dynamics of the p53 acetylation pathway. *Novartis Found Symp* 2004; 259: 197-205; discussion 205-207, 223-225

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究人员服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。



# TFF2在胃癌、癌旁及正常胃黏膜组织中的表达及其与血管生成的关系

石磊, 赖铭裕, 梁志海, 刘诗权, 黄杰安, 唐国都, 姜海行

## ■背景资料

血管生成是肿瘤生长和扩散的必要条件, VEGF被认为是肿瘤血管形成中最关键的驱动因子。国外研究发现TFF1、TFF3具有同VEGF的血管生成作用, 但TFF2作为胃癌的一个抑制因子, 在胃癌的发生、发展过程中与血管生成的关系尚未阐明。

石磊, 赖铭裕, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

梁志海, 刘诗权, 黄杰安, 唐国都, 姜海行, 广西医科大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530021

石磊, 在读硕士, 主要从事胃癌发病机制方面的研究。

广西卫生厅自筹经费科研课题基金资助项目, No. Z2008111

作者贡献分布: 石磊与赖铭裕对此文所作贡献均等; 此课题由赖铭裕、梁志海及黄杰安设计; 研究过程由石磊、刘诗权、唐国都及姜海行操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赖铭裕提供; 数据分析由赖铭裕与石磊完成; 本论文写作由石磊与赖铭裕完成。

通讯作者: 赖铭裕, 副教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科。

laimingyu2005103@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-09-21 修回日期: 2010-11-26

接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-28

## Correlation between TFF 2 expression and tumor angiogenesis in gastric carcinoma, adjacent carcinoma and normal gastric mucosa

Lei Shi, Ming-Yu Lai, Zhi-Hai Liang, Shi-Quan Liu, Jie-An Huang, Guo-Du Tang, Hai-Xing Jiang

Lei Shi, Ming-Yu Lai, Department of Geriatric Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Zhi-Hai Liang, Shi-Quan Liu, Jie-An Huang, Guo-Du Tang, Hai-Xing Jiang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Self-raised Foundation of Department of Public Health of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. Z2008111

Correspondence to: Associate Professor Ming-Yu Lai, Department of Geriatric Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. laimingyu2005103@yahoo.com.cn

Received: 2010-09-21 Revised: 2010-11-26

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the correlation among the expression of trefoil factor 2 (TFF2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) in gastric carcinoma.

**METHODS:** The expression of TFF2 and VEGF

and MVD were determined by immunohistochemistry in 50 gastric carcinoma specimens, 50 tumor-adjacent gastric mucosal specimens, and 30 normal gastric mucosa specimens.

**RESULTS:** The expression level of TFF2 was highest in normal gastric mucosa, followed by tumor-adjacent gastric mucosa and gastric carcinoma ( $165.80 \pm 16.42$ ,  $184.44 \pm 19.02$ ,  $206.79 \pm 17.62$ , all  $P < 0.01$ ). The expression of TFF2 in gastric cancer was significantly associated with the degree of tumor differentiation and lymph node metastasis (both  $P < 0.01$ ). The expression level of VEGF and MVD were lowest in normal gastric mucosa, followed by tumor-adjacent gastric mucosa and gastric carcinoma ( $36.7\%$ ,  $42.0\%$ ,  $72.6\%$ ;  $26.35 \pm 4.54$ ,  $30.78 \pm 5.64$ ,  $40.13 \pm 6.92$ , all  $P < 0.01$ ). The expression of VEGF and MVD in gastric cancer were associated with tumor differentiation, invasion and lymph node metastasis (all  $P < 0.01$ ). There is a negative correlation between the expression of TFF2 and MVD ( $r = -0.781$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** TFF2 may be a negative regulatory factor of gastric carcinogenesis. The expression of TFF2 is down-regulated during the development of gastric cancer, while that of VEGF and MVD are up-regulated during this process.

**Key Words:** Trefoil factor 2; Vascular endothelial growth factor; Microvessel density; Gastric cancer; Immunohistochemistry

Shi L, Lai MY, Liang ZH, Liu SQ, Huang JA, Tang GD, Jiang HX. Correlation between TFF 2 expression and tumor angiogenesis in gastric carcinoma, adjacent carcinoma and normal gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 246-250

## 摘要

**目的:** 探讨三叶因子2(TFF2)、血管内皮生长因子(VEGF)和微血管密度(MVD)在胃癌发生、发展、浸润和转移中的作用。

**方法:** 选取广西医科大学第一附属医院2008-01/2009-06接受胃大部切除术的胃癌标本50

■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

例, 采用SP免疫组织化学方法检测30例正常胃黏膜组织、50例癌旁组织和50例胃癌组织中TFF2、VEGF和MVD的表达情况。

**结果:** 正常胃黏膜组织→癌旁组织→胃癌组织中, TFF2表达呈逐渐减弱趋势( $165.80 \pm 16.42$ ,  $184.44 \pm 19.02$ ,  $206.79 \pm 17.62$ , 均 $P < 0.01$ ), TFF2的表达与肿瘤的分化程度和淋巴结转移有关(均 $P < 0.01$ ), 而VEGF的表达和MVD值呈逐渐上升趋势( $36.7\%$ ,  $42.0\%$ ,  $72.6\%$ ;  $26.35 \pm 4.54$ ,  $30.78 \pm 5.64$ ,  $40.13 \pm 6.92$ , 均 $P < 0.01$ ), 两者表达与肿瘤的分化程度、浸润深度和淋巴结转移有关(均 $P < 0.01$ )。TFF2与MVD的表达呈负相关( $r = -0.781$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** TFF2作为一种胃癌的抑制因子, 在胃癌发展过程中表达逐渐减弱, 对胃癌的抑制作用降低, 同时一些促进肿瘤浸润转移的因子如VEGF、MVD表达水平逐渐增强, 促进了肿瘤的发展转移。

**关键词:** 三叶因子2; 血管内皮生长因子; 微血管密度; 胃癌; 免疫组织化学

石磊, 赖铭裕, 梁志海, 刘诗权, 黄杰安, 唐国都, 姜海行. TFF2在胃癌、癌旁及正常胃黏膜组织中的表达及其与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 246-250  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/246.asp>

## 0 引言

近年来, 关于胃癌发病机制的研究中, 三叶因子(trefoil factor, TFF)与胃癌的发生、发展逐渐引起关注。TFF2是TFF家族之一, TFF2作为TFF家族中唯一具有两个三叶型结构域(P-结构域), 这种结构的稳定性使其具有明显的抗酸、抗蛋白酶和抗热分解特性, 对胃肠道黏膜有保护和修复作用。TFF2与胃癌之间的关系尚不十分明确, 因此, 我们用免疫组织化学方法研究TFF2、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和微血管密度(microvessel density, MVD)在正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织的表达情况及其与各临床病理特征的关系, 初步探讨其在胃癌发生发展中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取广西医科大学第一附属医院2008-01/2009-06接受胃大部切除术的胃癌标本50例, 均经组织病理学检查证实。所有标本术前均未接受非甾体抗炎药治疗及放疗。男32例, 女18例, 年龄31-76(中位年龄54.7)岁。其中高分化、

中分化腺癌14例, 低未分化腺癌36例; 未侵及浆膜层者18例, 侵及浆膜层及浆膜外者32例; 发生局部淋巴结转移者30例, 无局部淋巴结转移者20例。同时取距癌缘3-5 cm的癌旁组织50例, 正常胃黏膜组织30例作为对照组。试剂采用鼠抗人TFF2单克隆抗体(工作浓度1:100), 购自美国Abcam公司, 链霉菌抗生素蛋白-生物素-过氧化氢酶(SP)免疫组织化学试剂盒、二氨基联苯(DAB)显色剂、鼠抗人VEGF单克隆抗体和鼠抗人CD34单克隆抗体均购自福建迈新生物技术开发公司。

**1.2 方法** 所有标本均经40 g/L甲醛固定, 常规脱水、透明、渗蜡、包埋, 4 μm厚连续切片。常规脱蜡、水化, 采用免疫组织化学超敏两步法(SP染色), DAB显色, 苏木素复染, 吹干, 具体操作按SP试剂盒说明书进行。阴性对照采用生理盐水磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗, 以已知阳性病例作阳性对照。操作严格按产品说明书进行。评判标准: (1)TFF2: 阳性信号为细胞胞质和胞膜上出现黄色或棕黄色染色。每例取5个高倍视野( $\times 400$ ), 用病理图像分析仪测定阳性信号平均灰度值, 灰度值越高, TFF2表达越弱; (2)VEGF: 阳性信号为细胞胞质和胞膜上出现黄色或棕黄色染色, 每张切片中看到有 $>5\%$ 的肿瘤细胞胞质或胞膜染色阳性, 即判定为VEGF阳性; (3)MVD: 被染成棕色的血管内皮细胞或血管内皮细胞簇均作为一个血管计数。每例先在低倍镜( $\times 100$ )下观察全片以确定肿瘤内血管密度最高处, 再在中倍镜( $\times 200$ )下记录5个视野内的微血管数, 取其平均值作为该病例的MVD值。

**统计学处理** 使用统计学软件SPSS13.0进行分析, 计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 来表示, 组间均数比较采用单因素方差分析和SNK法检验, 计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验, 等级相关性采用Spearman等级相关分析,  $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 TFF2、VEGF在不同胃黏膜组织中的表达** TFF2在正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织中的阳性信号平均灰度值分别为 $165.80 \pm 16.42$ ,  $184.44 \pm 19.02$ 和 $206.79 \pm 17.62$ , 各组间两两比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); VEGF在正常胃黏膜组织、癌旁组织和胃癌组织中的阳性表达率分别为 $36.7\%$ (11/30),  $42.0\%$ (21/50)和 $72.6\%$ (36/50), 各组间两两比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ , 图1, 2)。

## ■ 相关报道

Shi等研究发现TFF2在低分化胃癌组织中的表达均低于高分化胃癌, Dhar等研究发现TFF2在有肿瘤浸润以及已出现淋巴结和血行转移患者中的表达明显增高。

### ■创新盘点

本实验联合检测胃癌组织的TFF2、VEGF及MVD有助于了解TFF2在胃癌发病机制中的作用途径,了解他与其他指标的相互关系,以及各观察指标在胃癌发病机制中各自的地位。

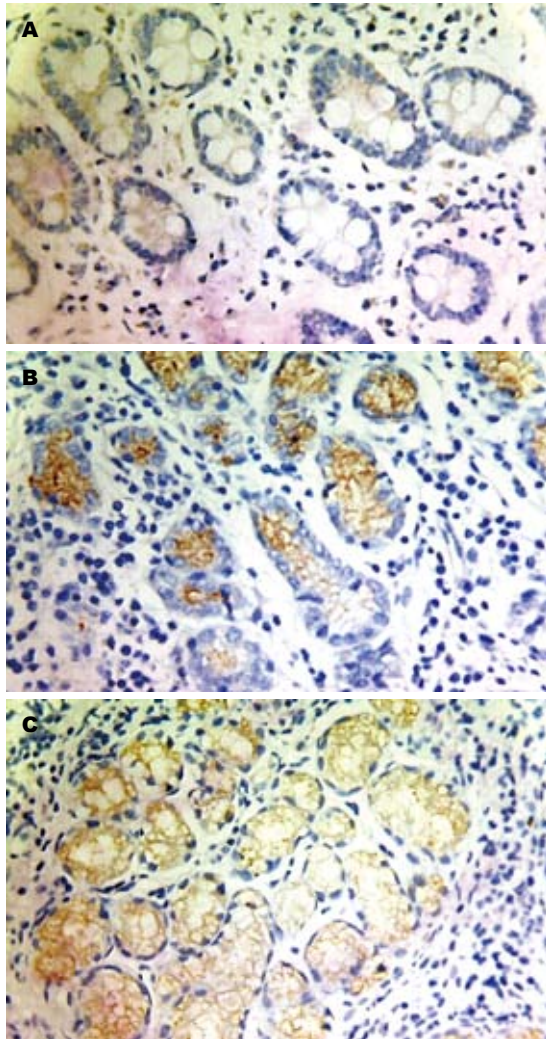


图1 TFF2在不同胃黏膜组织中的表达(SP×400)。A: 胃癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常胃黏膜组织。

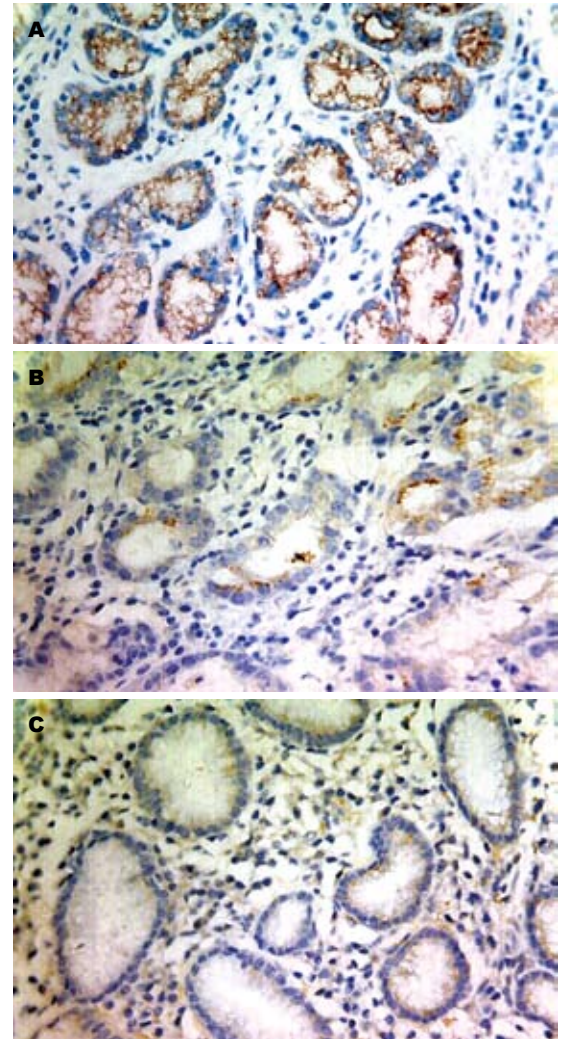


图2 VEGF在不同胃黏膜组织中的表达(SP×400)。A: 胃癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常胃黏膜组织。

2.2 不同胃组织中MVD值 MVD在胃癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织中的平均值分别为 $40.13 \pm 6.92$ ,  $30.78 \pm 5.64$ 和 $26.35 \pm 4.54$ , 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ , 图3)。

2.3 TFF2、VEGF和MVD表达与胃癌临床病理特征的关系 TFF2的表达与胃癌的分化程度和淋巴结转移有关( $P < 0.01$ ), 而VEGF的表达和MVD值呈逐渐上升趋势( $P < 0.01$ ), TFF2的表达与患者的性别、年龄、胃癌的浸润程度无关。VEGF和MVD表达还与胃癌浸润深度程度有关( $P < 0.01$ , 表1)。

2.4 TFF2与血管生成关系的分析 TFF2在VEGF阳性表达组和阴性表达组中的阳性信号平均灰度值分别为 $211.34 \pm 17.29$ 和 $198.09 \pm 12.16$ ( $P < 0.01$ ); VEGF阳性表达组和阴性表达组中MVD平均值分别为 $42.28 \pm 7.08$ 和 $35.49 \pm 2.32$ , VEGF阳性表达组的MVD值高于阴性表达组中的MVD值( $P < 0.01$ ); TFF2与MVD的表达呈负

相关( $r = -0.781, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

20世纪80年代发现TFF家族, 家族成员包括TFF1、TFF2及TFF3。TFF2是TFF家族中的重要成员, TFF2在胃、十二指肠特异性表达, 主要由胃体颈黏液细胞、胃窦和幽门腺基底细胞和十二指肠布伦纳氏腺合成及分泌<sup>[1]</sup>。已有大量研究发现TFF2对胃肠道有上皮保护和促进破损黏膜愈合的功能<sup>[2,3]</sup>。还有研究发现TFF2蛋白有助于从损伤胃肠黏膜保护, 稳定黏液凝胶, 刺激上皮恢复原状, 并抑制相关炎症<sup>[4,5]</sup>。Shi等<sup>[6]</sup>研究发现TFF2在低分化胃癌组织中的表达均低于高分化胃癌, Dhar等<sup>[7]</sup>研究发现TFF2在有肿瘤浸润以及已出现淋巴结和血行转移患者中的表达明显增高。Yamachika等<sup>[8]</sup>则认为TFF2有抑制细胞黏附, 促进癌细胞侵袭, 阻断细胞凋亡的作用, 提出TFF可作为胃癌预后不良的标志物。本研究结

表 1 TFF2、VEGF和MVD的表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	TFF2(mean ± SD)	VEGF阳性率%(n)	MVD(mean ± SD)
性别				
男	32	206.27 ± 18.32	71.9(23)	40.25 ± 7.46
女	18	207.71 ± 13.58	77.8(14)	39.92 ± 5.78
年龄(岁)				
≥55	29	206.39 ± 17.30	75.9(22)	39.93 ± 7.25
<55	21	207.34 ± 17.93	66.7(14)	40.41 ± 6.32
分化程度				
高中分化	14	197.63 ± 15.52	42.9(6)	35.57 ± 6.82
低未分化	36	210.35 ± 16.47 <sup>b</sup>	80.5(29) <sup>b</sup>	41.90 ± 7.27 <sup>b</sup>
浆膜浸润				
有	32	207.45 ± 15.78	84.4(27) <sup>d</sup>	41.75 ± 7.36 <sup>d</sup>
无	18	205.62 ± 12.09	44.4(8)	37.25 ± 6.19
淋巴结转移				
有	32	211.47 ± 14.89 <sup>f</sup>	84.5(27) <sup>f</sup>	41.26 ± 6.80 <sup>e</sup>
无	18	198.47 ± 14.43	55.6(8)	38.12 ± 6.46

<sup>b</sup>P<0.01 vs 高中分化; <sup>d</sup>P<0.01 vs 无浆膜浸润; <sup>e</sup>P<0.05, <sup>f</sup>P<0.01 vs 无淋巴结转移。

### ■应用要点

本课题采用免疫组织化学技术对TFF2、VEGF及MVD在不同胃黏膜病变中的表达进行了检测分析, 结果提示TFF2在胃癌演进过程中起重要作用, 为胃癌的防治提供理论依据。

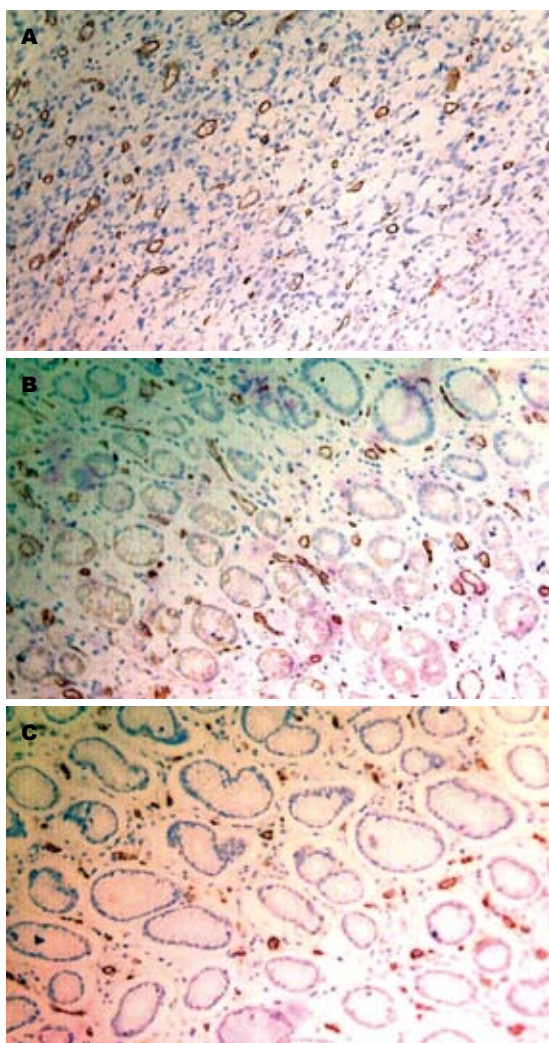


图 3 MVD在不同胃黏膜组织中的表达(SP × 400). A: 胃癌组织; B: 癌旁组织; C: 正常胃黏膜组织。

果显示, 正常胃黏膜组织→癌旁组织→胃癌组织中, TFF2表达呈逐渐减弱趋势( $P<0.01$ ), TFF2的表达与胃癌的分化程度和淋巴结转移有关( $P<0.01$ ).

VEGF是1989年Ferrara等<sup>[9]</sup>从牛垂体滤泡星状细胞培养液首先纯化出来, 并发现具有促进血管内皮细胞有丝分裂的活性. VEGF被认为是肿瘤血管形成中最关键的驱动因子<sup>[10]</sup>, 与微血管的形成密切相关, 而微血管的生成是直接影响胃癌浸润、转移和预后的重要因素. VEGF通过与细胞膜上的相应VEGF结合而发挥作用. 血管内皮生长因子受体(KDR)作为一种表面受体, 与VEGF结合后可上调VEGF表达, 诱导肿瘤血管形成. VEGF直接刺激KDR阳性表达的肿瘤细胞, 提示在促进肿瘤生长和转移过程中起重要作用<sup>[11]</sup>. Lazăr等<sup>[12]</sup>则对高表达VEGF的胃癌组织进行了MVD检测, 结果显示MVD与VEGF之间存在明显正相关性.

血管生成是肿瘤细胞适应局部缺氧环境而发生的, 缺氧导致新生血管形成基因的表达, 是肿瘤生长和扩散的必要条件. 近年来有研究发现TFF家族成员TFF3可促进鸡胚绒毛尿囊膜的血管生成, 诱导人脐静脉内皮细胞形成类微血管结构, 提示其在血管生成中的作用<sup>[13]</sup>, 我们以前的研究发现TFF1在胃癌发生发展过程中并未促进新生血管的生成<sup>[14]</sup>.

目前有关TFF2和胃癌新生血管生成的研究较少, 本研究观察到在正常胃黏膜组织→癌

### ■同行评价

本文学术性较好,对于探讨胃癌的发生机制及其转归有一定的参考价值。

旁组织→胃癌组织中, TFF2表达呈逐渐减弱趋势( $P<0.01$ ), 而VEGF、MVD表达率呈逐渐上升趋势( $P<0.01$ ); TFF2的表达与肿瘤的分化程度和淋巴结转移有关( $P<0.01$ ), 而VEGF的表达和MVD呈逐渐上升趋势( $P<0.01$ ), 两者表达与肿瘤的分化程度、浸润深度( $P<0.01$ )和淋巴结转移有关( $P<0.05$ ). TFF2与MVD的表达呈负相关( $r = -0.781, P<0.01$ ). 可认为在TFF2作为一种可能的胃癌特异性抑制因子, 其在胃癌发生发展过程中的表达逐渐减弱, 对胃癌的抑制作用降低, 同时一些促进肿瘤浸润转移的因子如VEGF、MVD表达水平逐渐增强, 促进了肿瘤的发展转移. TFF2在胃癌发生、发展中的作用及调控机制, 需要进一步研究.

### 4 参考文献

- Kato M. Trefoil factors and human gastric cancer (review). *Int J Mol Med* 2003; 12: 3-9
- Cook GA, Thim L, Yeomans ND, Giraud AS. Oral human spasmolytic polypeptide protects against aspirin-induced gastric injury in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 363-370
- Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002; 197: 582-588
- Dubeykovskaya Z, Dubeykovskiy A, Solal-Cohen J, Wang TC. Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines. *J Biol Chem* 2009; 284: 3650-3662
- Chi AL, Lim S, Wang TC. Characterization of a CCAAT-enhancer element of trefoil factor family 2 (TFF2) promoter in MCF-7 cells. *Peptides* 2004; 25: 839-847
- Shi SQ, Cai JT, Yang JM. Expression of trefoil factors 1 and 2 in precancerous condition and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3119-3122
- Dhar DK, Wang TC, Maruyama R, Udagawa J, Kubota H, Fuji T, Tachibana M, Ono T, Otani H, Nagasue N. Expression of cytoplasmic TFF2 is a marker of tumor metastasis and negative prognostic factor in gastric cancer. *Lab Invest* 2003; 83: 1343-1352
- Yamachika T, Werther JL, Bodian C, Babyatsky M, Tatematsu M, Yamamura Y, Chen A, Itzkowitz S. Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1092-1099
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858
- Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer* 1998; 78: 1573-1577
- Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 994-998
- Lazăr D, Tăban S, Raica M, Sporea I, Cornianu M, Goldiș A, Vernic C. Immunohistochemical evaluation of the tumor neoangiogenesis as a prognostic factor for gastric cancers. *Rom J Morphol Embryol* 2008; 49: 137-148
- Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Gespach C, Emami S. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* 2003; 17: 7-16
- 赖铭裕, 廖晓霞, 林瑶光, 梁志海, 陈晖, 李素艳, 蒋敦科, 刘莹. TFF1与胃癌发生发展过程中血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 931-934

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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.

# WVVOX基因转染对胆管癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响

朱凯, 黄强, 邵峰, 任维华

朱凯, 黄强, 邵峰, 安徽医科大学附属省立医院普外科 安徽省合肥市 230001

任维华, 安徽医科大学附属省立医院肝胆实验室 安徽省合肥市 230001

朱凯, 住院医师, 主要从事胆道肿瘤的基础性研究和胆胰微创外科临床研究。

作者贡献分布: 朱凯与黄强对本文贡献均等; 课题由朱凯与黄强共同设计; 实验过程及数据分析由朱凯完成; 邵峰与任维华参与论文资料的查询、整理; 本论文写作由朱凯与黄强完成。

通讯作者: 黄强, 教授, 主任医师, 230001, 安徽省合肥市, 安徽医科大学附属省立医院普外科. zk231500@163.com

收稿日期: 2010-11-03 修回日期: 2010-12-07

接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-01-28

## WVVOX gene transfection inhibits proliferation, accelerates apoptosis, and reduces invasion in human cholangiocarcinoma cell line QBC939

Kai Zhu, Qiang Huang, Feng Shao, Wei-Hua Ren

Kai Zhu, Qiang Huang, Feng Shao, Department of General Surgery, the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China  
Wei-Hua Ren, Laboratory of Hepatobiliary Diseases, the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

Correspondence to: Professor Qiang Huang, Department of General Surgery, the Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China. zk231500@163.com

Received: 2010-11-03 Revised: 2010-12-07

Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of transfection with the WVVO domain-containing oxidoreductase (WVVOX) gene on cell proliferation, apoptosis and invasion in human cholangiocarcinoma cell line QBC939.

**METHODS:** A recombinant eukaryotic expression plasmid containing the WVVOX gene was introduced into QBC939 cells by liposome-mediated transfection. The mRNA and protein expression of WVVOX in QBC939 cells stably transfected with the recombinant plasmid was detected by quantitative RT-PCR and Western blotting, respectively. Cell proliferation was test-

ed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Cell apoptosis was assessed by flow cytometry (FCM). Cell invasion was determined by Transwell chamber assay.

**RESULTS:** QBC939 cells stably transfected with the recombinant plasmid were successfully generated. The expression of WVVOX mRNA and protein was markedly increased in QBC939 cells transfected with the recombinant plasmid when compared with untransfected QBC939 cells and those transfected with control plasmid [3.71(3.64-3.78) vs 1.00(0.98-1.02), 1.07(1.02-1.13); 0.86 ± 0.03 vs 0.25 ± 0.01, 0.27 ± 0.02, all *P* < 0.05]. WVVOX gene transfection significantly decreased cell proliferation [0.63 ± 0.04 vs 0.90 ± 0.05, 0.87 ± 0.04, both *P* < 0.01] but promoted apoptosis (21.40% ± 2.35% vs 1.24% ± 0.35%, 1.73% ± 0.48%, both *P* < 0.01). Transwell chamber assay showed that the number of transfected cells that passed the Transwell membrane was significantly less than those of control cells (70.00 ± 4.58 vs 102.33 ± 8.33, 107.00 ± 9.00, both *P* < 0.01).

**CONCLUSION:** WVVOX expression inhibits proliferation, accelerates apoptosis, and reduces invasion in human cholangiocarcinoma cell line QBC939, suggesting that the WVVOX gene may be a novel target for gene therapy of cholangiocarcinoma.

**Key Words:** Cholangiocarcinoma; Gene expression; Transfection; Proliferation; Apoptosis; Invasion; WVVO domain-containing oxidoreductase gene

Zhu K, Huang Q, Shao F, Ren WH. WVVOX gene transfection inhibits proliferation, accelerates apoptosis, and reduces invasion in human cholangiocarcinoma cell line QBC939. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 251-256

### 摘要

**目的:** 探讨WVVOX基因转染胆管癌细胞株QBC939后对其增殖、凋亡与侵袭性的影响。

**方法:** 用脂质体转染法将WVVOX重组真核表达质粒转染QBC939细胞, 建立稳定表达

### 背景资料

胆管癌恶性程度高、早期诊断困难、手术切除率低, 对其分子发病机制的研究可以加深对胆管癌的了解。WVVOX基因是目前肿瘤研究的新兴领域和热点, 近年来研究发现多种肿瘤组织WVVOX蛋白表达降低或丢失, 提示WVVOX基因为多种肿瘤的候选抑制基因。

### 同行评议者

姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

## ■ 研究前沿

细胞癌基因的激活和抑癌基因的失活是近年来肿瘤研究中的热点,其中抑癌基因的失活被认为是重要的致癌因素。

WWOX基因的细胞株. 将其分为以下3组: QBC939组, QBC939/con组和QBC939/WWOX组. 荧光定量RT-PCR和Western blot法检测各组WWOX mRNA和蛋白水平的表达; MTT实验检测转染前后各组细胞增殖活性的变化; FCM法检测各组细胞的凋亡; Transwell小室侵袭实验检测各组肿瘤细胞侵袭力的变化。

**结果:** 建立了稳定表达WWOX基因的QBC939/WWOX细胞株, WWOX mRNA和蛋白的表达增加[3.71(3.64-3.78) vs 1.00(0.98-1.02), 1.07(1.02-1.13);  $0.86 \pm 0.03$  vs  $0.25 \pm 0.01$ ,  $0.27 \pm 0.02$ , 均 $P < 0.05$ ], 转染后的QBC939细胞MTT吸光度明显下降( $0.63 \pm 0.04$  vs  $0.90 \pm 0.05$ ,  $0.87 \pm 0.04$ , 均 $P < 0.01$ ), FCM显示QBC939/WWOX组的细胞凋亡率明显增高( $21.4\% \pm 2.35\%$  vs  $1.24\% \pm 0.35\%$ ,  $1.73\% \pm 0.48\%$ , 均 $P < 0.01$ ), 侵袭实验显示转移至下室滤膜的细胞数明显减少( $70.00 \pm 4.58$  vs  $102.33 \pm 8.33$ ,  $107.00 \pm 9.00$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:** WWOX基因能抑制胆管癌细胞株QBC939的增殖, 加速肿瘤细胞凋亡并降低其侵袭力, 可能作为胆管癌基因治疗的一个新靶点。

**关键词:** 胆管癌; 基因表达; 转染; 增殖; 凋亡; 侵袭; 含有WW结构域的氧化还原酶基因

朱凯, 黄强, 邵峰, 任维华. WWOX基因转染对胆管癌细胞增殖、凋亡及侵袭的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 251-256

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/251.asp>

## 0 引言

胆管癌是起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤, 其特点是起病隐匿、恶性程度高、早期诊断困难、手术切除率低, 近年来胆管癌的发病率有增加趋势<sup>[1]</sup>. 含有WW结构域的氧化还原酶基因(WW domain-containing oxidoreductase, WWOX)是2000年Bednarek等<sup>[2]</sup>应用鸟枪法基因测序技术在染色体普通脆性位点(common fragile sites, CFS)区域鉴别出的一个新的抑癌基因. WWOX基因定位于染色体16q23.3-24.1区, 并跨越了整个常见染色体脆性部位FRA16D. 近年来的大量研究发现多种肿瘤组织中WWOX蛋白表达降低或丢失, 并发现这与WWOX基因转录及缺失有关, 提示WWOX基因为多种肿瘤的候选抑制基因<sup>[3]</sup>. 本研究通过基因转染, 有限恢复胆管癌细胞中抑癌基因的表达, 观察WWOX基因对胆管癌细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** pmCherry-N1-WWOX由我们自行构建, 胆管癌细胞株QBC939购于ScienCell Research Laboratories U.S, TRIzol、Lipofectamine2000(美国Invitrogen公司), RPMI 1640培养液、胎牛血清(美国Hyclon公司), 小剂量质粒提取试剂盒和SYBR Green I 荧光定量RT-PCR试剂盒购自Promega公司, 鼠抗人WWOX抗体, GAPDH抗体(美国Santa Cruz), 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司), 胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、G418购于美国Sigma公司, Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自Roche公司, Transwell小室、Matrigel Matrix、Fibronectin购于美国BD公司, 其他常规试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及转染:** QBC939细胞在含10%胎牛血清RPMI 1640的培养液中于37 °C、饱和湿度及50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中传代培养. QBC939细胞呈单层贴壁生长. 将QBC939细胞接种至6孔板中, 每孔 $5 \times 10^5$ 个细胞, 以完全培养液培养24 h后用不含血清的RPMI 1640培养液洗涤2次, 分别加入含有WWOX基因的pmCherry-N1-WWOX质粒和不含有WWOX基因的pmCherry-N1对照质粒各5 μg, 25 min后再加入脂质体Lipofectamine2000 10 μL/孔. 转染6 h后, 更换为完全培养液, 继续培养24 h后加入G418(500 mg/L)进行筛选, 7 d后以200 mg/L维持筛选压力. 2 wk后挑取单克隆进行鉴定并扩增培养, 稳定转染WWOX的细胞命名为QBC939/WWOX细胞, 对照质粒转染细胞命名为QBC939/con细胞, 进行后续实验。

**1.2.2 WWOX基因表达检测:** 采用TRIzol试剂提取3组细胞总RNA, 取定量的RNA 1 μg. 转染前后QBC939细胞的WWOX表达情况通过荧光定量RT-PCR进行检测. 根据GenBank所查询的序列(NM\_016373.1), 使用Primer 5.0软件设计引物: 上游引物F: 5'-GACTGGCGTTTACTGTG-GATGA-3', 下游引物R: 5'-CAAAGACTTGGC-GGTTTCG-3'; 看家基因选择β-actin, 上游引物F: 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游引物R: 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'. 按试剂盒说明书设定荧光定量PCR反应体系及参数, 确定标准曲线后进行荧光定量RT-PCR. 反转录反应条件的设置: 25 °C 10 min, 40 °C 60 min, 85 °C 5 min; 扩增条件的设置: 94 °C 4 min; 94 °C

表 1 WWOX荧光定量RT-PCR结果

	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
QBC939	$1.341 \pm 0.035$	$0.000 \pm 0.035$	1.00(0.98-1.02)
QBC939/con	$1.238 \pm 0.069$	$-0.103 \pm 0.069$	1.07(1.02-1.13)
QBC939/WWOX	$-0.549 \pm 0.027$	$-1.890 \pm 0.027$	3.71(3.64-3.78)

20 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s, 循环35次; 72 °C 检测信号. 3个实验组各做6次重复实验, 每次目的基因和看家基因的Ct值相减得到 $\Delta Ct$ , 把自然生长的QBC939细胞作为参照因子(calibrator), 经看家基因均一化处理, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算<sup>[4]</sup>. WWOX基因表达差异通过实验组细胞相对于自然生长组细胞的倍数来表示.

1.2.3 Western blot检测WWOX蛋白表达: 取 $1 \times 10^6$ 个细胞, 冷PBS缓冲液洗涤3次后, 再用双去污剂裂解液裂解细胞, 12 000 r/min离心15 min, 取上清液采用BCA法测定蛋白浓度. 蛋白量调整一致后, 加入SDS缓冲液, 100 °C变性5 min. 根据待测目的蛋白分子量配制相应浓度的SDS-PAGE胶. 蛋白样品经电泳分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上. 将膜置于含5%脱脂奶粉的TBST中封闭2 h, 随后加入相应一抗反应过夜, 最后与HRP标记的二抗在室温下反应1 h后ECL法显影. 以目的蛋白与GAPDH条带灰度值之比表示目的蛋白的相对表达水平.

1.2.4 MTT法检测体外细胞增殖情况: 收集培养到对数生长期的QBC939细胞, 调整细胞悬液浓度并计数, 用微量移液器加入96孔板中, 每孔200  $\mu\text{L}$ , 细胞数为 $3 \times 10^3$ 个, 未使用的边缘孔用无菌PBS填充. 分别培养0、24、48、72和96 h后加入30  $\mu\text{L}$  MTT(5 g/L), 继续培养4 h, 离心后除去上清液, 加入200  $\mu\text{L}$  DMSO振荡20 min, 使用酶标仪检测490 nm波长处的吸光度A值, 每组细胞设3个复孔, 取4孔的平均值作为结果.

1.2.5 FCM检测细胞凋亡: 用标记了FITC的Annexin V作为荧光探针, 利用流式细胞仪可检测细胞凋亡的发生, 正常细胞和早期凋亡细胞的细胞膜是完整的. 碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种核酸染料, 他不能透过完整的细胞膜, 但在凋亡中晚期的细胞和死细胞, PI能透过细胞膜与细胞核结合呈现红色. 将Annexin V与PI匹配使用, 可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞以及死细胞区分开来. 离心收集细胞, 用预冷PBS洗涤细胞2次, 用Binding Buffer悬浮细胞后调整细胞浓度为 $1 \times 10^9$  cells/L. 细胞悬液中加入5  $\mu\text{L}$

Annexin V-FITC摇匀避光孵育15 min后加入10  $\mu\text{L}$  PI染液避光孵育5 min后立即上流式细胞仪分析, 每组实验重复4次.

1.2.6 Transwell小室侵袭实验: 在穿膜小室(transwell chamber)的上、下室之间铺有用基质胶(Matrigel)制备好的膜, 取不含血清的浓度为 $2 \times 10^8$  cells/L的细胞悬液200  $\mu\text{L}$ 种植于上室, 下室加入含胎牛血清的培养基, 肿瘤细胞会向营养成分高的下室迁移. 37 °C、饱和湿度及50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24 h, 小心取出上室, 用湿棉签擦去膜上未穿过膜的细胞, 0.1%结晶紫染色, 取左上、左下、右上、右下及中心5个视野, 倒置显微镜下直接计数穿膜细胞数.

**统计学处理** 计量资料以mean $\pm$ SD表示, 采用方差分析检验, 率的比较采用 $\chi^2$ 检验, 所有数据录入SPSS13.0软件进行计算, 以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 WWOX基因mRNA表达的变化 荧光定量RT-PCR显示, QBC939/WWOX实验组在质粒转染后, WWOX的表达量比QBC939/con和QBC939自然生长组有所升高, 表达量是自然生长的QBC939细胞的3.71倍( $P < 0.05$ ), 可见转染后的WWOX基因表达上调(表1).

2.2 WWOX蛋白表达的变化 Western blot检测结果显示, QBC939组、QBC939/con组和QBC939/WWOX组的WWOX/GAPDH的比值分别为 $0.25 \pm 0.01$ ,  $0.27 \pm 0.02$ 和 $0.86 \pm 0.03$ . 可见WWOX蛋白表达水平在稳定转染的胆管癌细胞中显著升高( $P < 0.05$ , 图1).

2.3 细胞增殖情况 从每天MTT检测情况结合统计学分析, 实验当天各组A值差别无统计学意义, 各组处于接种时的状态; 随着时间的推移, QBC939/WWOX组的细胞增殖下调明显, 第2天的A值与QBC939自然生长细胞以及QBC939/con细胞比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ). 实验组细胞增殖相对于2个对照组被明显抑制(表2, 图2).

## ■ 相关报道

顾军等采用RT-PCR及免疫组织化学方法研究发现肝外胆管癌中WWOX低表达且其表达与胆管癌的组织学分级呈负相关. Aqeilan等发现WWOX基因为多种肿瘤的候选抑制基因.



### ■ 创新盘点

本研究证实了WWOX基因在胆管癌细胞系中低表达,恢复其表达后可以有效逆转胆管癌细胞的恶性生物学行为,证明该基因可能作为胆管癌基因治疗以及预测肿瘤复发的一个新靶点。

表 2 MTT检测 $A_{490}$ 值

分组	第0天	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
QBC939组	0.19 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.62 ± 0.02	0.75 ± 0.05	0.87 ± 0.04
QBC939/con组	0.19 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.42 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.90 ± 0.05
QBC939/WWOX组	0.19 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.45 ± 0.04	0.54 ± 0.03	0.63 ± 0.04
F值	0.263	19.866	25.466	24.517	38.708	51.357
P值	0.774	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

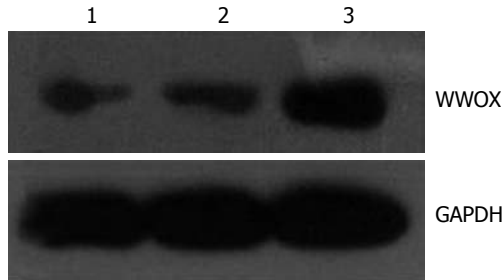


图 1 Western blot检测WWOX表达. 1: QBC939组; 2: QBC939/con组; 3: QBC939/WWOX组.

2.4 FCM法检测WWOX转染对QBC939细胞凋亡的影响 WinMDI 2.9软件分析发现, QBC939/con和QBC939组、QBC939/WWOX组细胞凋亡率分别为 $1.24\% \pm 0.35\%$ 、 $1.73\% \pm 0.48\%$ 和 $21.4\% \pm 2.35\%$ , 实验组与2个对照组间的差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ). 实验组细胞的凋亡率要明显高于2个对照组(图3).

2.5 转染WWOX基因后QBC939细胞侵袭能力的变化 结果显示QBC939/WWOX组与QBC939/con和QBC939组间的差异有统计学意义( $70 \pm 4.58$  vs  $102.33 \pm 8.33$ ,  $107 \pm 9.00$ ,  $P < 0.01$ ), 2个对照组间的细胞侵袭力差异无统计学意义, 说明QBC939/WWOX细胞组侵袭力减弱.

### 3 讨论

肝外胆管癌占肝胆系统恶性肿瘤的10%-15%, 早在1990年中华医学会的调查就发现胆管癌的发病率以每年5%的速度上升<sup>[5]</sup>. 胆管癌的生长以浸润性生长为特征, 其浸润和转移导致手术切除范围不能达到根治的目的, 是术后复发的主要原因. 对胆管癌组织的相关研究发现, WWOX基因和蛋白表达在胆管癌中高频缺失, 且缺失发生与组织分级呈负相关<sup>[6]</sup>, 因此推测该基因与胆管癌的发生、发展关系密切.

细胞癌基因的激活和抑癌基因的失活是近年来肿瘤研究中的热点, 其中抑癌基因的失活被认为是重要的致癌因素. 一些研究认为, DNA

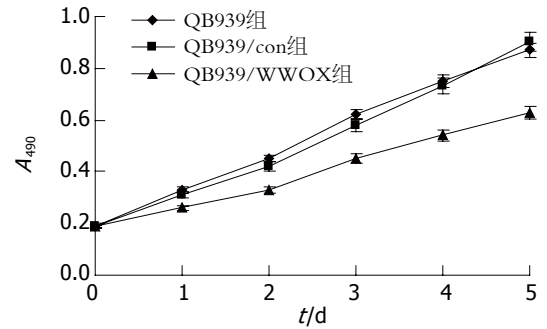


图 2 MTT观察细胞增殖.

损伤是恶性肿瘤发生、发展的重要机制, 染色体脆性位点抑癌基因对DNA损伤高度敏感, 而这些常见脆性位点往往对应着一些新的抑癌基因<sup>[7,8]</sup>.

WWOX长约1.1 Mb, 其开放读码框长约1 245 bp, 编码414个氨基酸组成的蛋白. WWOX蛋白通过WW结构域与富含比咯氨酸的配基结合介导蛋白-蛋白间的相互作用, 而此过程受到酪氨酸磷酸化的调控<sup>[9]</sup>. WWOX蛋白是一种促凋亡蛋白, 参与多种信号转导途径<sup>[10-12]</sup>: 增强肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)介导的细胞毒性, 与TNF凋亡途径中的TRADD和TRAF2作用; 与 $\kappa B\alpha$ /P53凋亡途径中的P53作用; 与细胞应激途径中的JNK1作用. WWOX转录产物异常及WWOX蛋白表达缺失或减少, 已在多种原发性肿瘤及肿瘤细胞株中得到证实, 尤其在与环境致癌因素密切相关的肿瘤如胃癌、肺癌、乳腺癌、食管癌、肝癌、结肠癌、造血系统恶性肿瘤等<sup>[13-19]</sup>更是如此. Fabbri等<sup>[20]</sup>通过对不同肿瘤中该基因的研究证明, WWOX基因是一个常见的基因组不稳定者也是一个潜在的肿瘤生长的抑制者.

胆管癌发病隐匿、缺乏理想的早期诊断标志物、对常规放疗化疗缺乏敏感性, 这些原因造成胆管癌患者的预后极差. 加强胆管癌分子生物学特性的研究是改善胆管癌诊疗现状的最重要的途径之一<sup>[21]</sup>. 本研究通过构建了

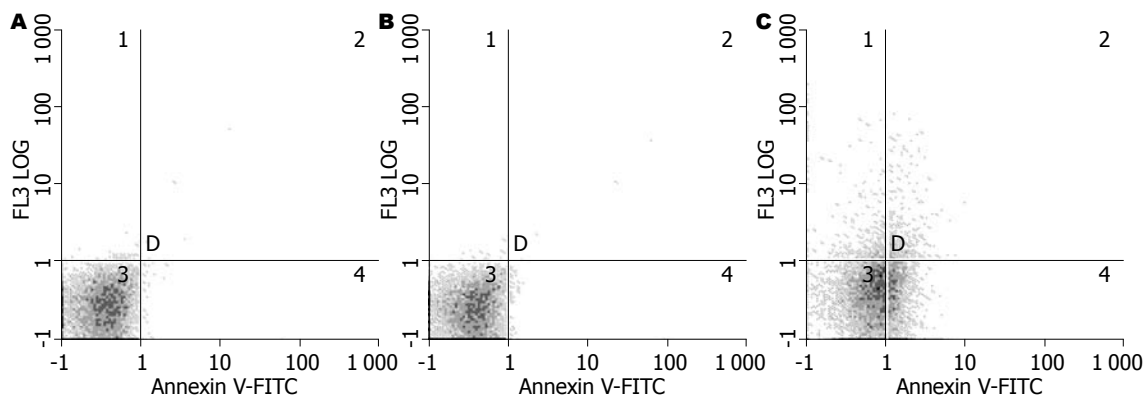


图3 流式细胞仪分析3组细胞凋亡率的变化. A: QBC939组; B: QBC939/con组; C: QBC939/WWOX组.

#### 应用要点

本研究证实过表达WWOX基因能抑制胆管癌细胞的增殖, 加速肿瘤细胞凋亡并降低其侵袭力, 临床研究也发现该基因与性激素相关肿瘤的预后显著相关, 这些都为进一步探索胆管癌的发病机制及基因治疗提供了新的思路.

人WWOX基因的真核表达载体pmCherry-N1-WWOX, 建立稳定表达WWOX基因QBC939/WWOX细胞株. 荧光定量RT-PCR及Western blot检测结果显示WWOX基因在QBC939/WWOX细胞中mRNA及蛋白表达明显增加. 采用MTT、流式细胞术和小室侵袭实验等手段观察细胞生物学行为变化. 结果表明稳定表达WWOX基因的胆管癌细胞增殖减慢; 侵袭能力是衡量肿瘤转移潜能的重要标志之一, 本研究表明, 转染WWOX基因后QBC939细胞的侵袭能力明显下降, 说明WWOX基因对肿瘤细胞的运动能力有明显抑制作用; FCM实验表明恢复WWOX基因的表达可以加速胆管癌细胞的凋亡, 推测WWOX基因可能是通过加速细胞凋亡而抑制QBC939细胞的增殖. WWOX作为基因治疗的一种候选基因, 能有效逆转肿瘤细胞的生物学行为, 将在肿瘤的临床治疗中发挥重要的作用. 但是WWOX在胆管细胞癌变过程中的具体作用机制目前尚不完全清楚<sup>[22]</sup>. 进一步探WWOX的功能, 将对深入了解其在胆管癌发生、发展过程中的作用提供新的线索, 为胆管癌的诊断、治疗提供新的靶点和研究方向.

#### 4 参考文献

- 1 Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, Taylor-Robinson SD. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366: 1303-1314
- 2 Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2140-2145
- 3 Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y, Hagan JP, Zanasi N, Kaou M, Stein GS, Lian JB, Croce CM. Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 3949-3954
- 4 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
- 5 周宁新, 黄志强, 划永雄. 肝外胆道癌全国调查1098例分析. *中华外科杂志* 1990; 28: 516-517
- 6 顾军, 王梅, 王雅杰, 李咏梅, 袁杨, 薛春燕. 抑癌基因WWOX在肝外胆管癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1302-1305
- 7 Finnis M, Dayan S, Hobson L, Chenevix-Trench G, Friend K, Ried K, Venter D, Woollatt E, Baker E, Richards RI. Common chromosomal fragile site FRA16D mutation in cancer cells. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1341-1349
- 8 Smith DI, McAvoy S, Zhu Y, Perez DS. Large common fragile site genes and cancer. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 31-41
- 9 Ingham RJ, Colwill K, Howard C, Dettwiler S, Lim CS, Yu J, Hersi K, Raaijmakers J, Gish G, Mbamalu G, Taylor L, Yeung B, Vassilovski G, Amin M, Chen F, Matskova L, Winberg G, Ernberg I, Lindberg R, O'donnell P, Starostine A, Keller W, Metalnikov P, Stark C, Pawson T. WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 7092-7106
- 10 Chang NS, Doherty J, Ensign A, Lewis J, Heath J, Schultz L, Chen ST, Oppermann U. Molecular mechanisms underlying WOX1 activation during apoptotic and stress responses. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1347-1354
- 11 Chang NS, Pratt N, Heath J, Schultz L, Sleva D, Carey GB, Zevotek N. Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem* 2001; 276: 3361-3370
- 12 Chang NS, Doherty J, Ensign A. JNK1 physically interacts with WW domain-containing oxidoreductase (WOX1) and inhibits WOX1-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 9195-9202
- 13 Aqeilan RI, Kuroki T, Pekarsky Y, Albagha O, Trapasso F, Baffa R, Huebner K, Edmonds P, Croce CM. Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3053-3058
- 14 Donati V, Fontanini G, Dell'Omodarme M, Prati MC, Nuti S, Lucchi M, Mussi A, Fabbri M, Basolo F, Croce CM, Aqeilan RI. WWOX expression in different histologic types and subtypes of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 884-891
- 15 Pluciennik E, Kusińska R, Potemski P, Kubiak R, Kordek R, Bednarek AK. WWOX--the FRA16D cancer gene: expression correlation with breast cancer progression and prognosis. *Eur J Surg Oncol* 2006;

### ■同行评价

本文可读性较好,具有一定的临床参考意义.

- 32: 153-157
- 16 Kuroki T, Trapasso F, Shiraiishi T, Alder H, Mimori K, Mori M, Croce CM. Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 2258-2260
- 17 Park SW, Ludes-Meyers J, Zimonjic DB, Durkin ME, Popescu NC, Aldaz CM. Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 91: 753-759
- 18 许红霞, 周建农, 莫伏根, 侯宁, 胡赛男, 束永前. 抑癌基因WWOX和FHIT在结直肠癌中的表达及其临床意义. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2007; 27: 812-815
- 19 Ishii H, Vecchione A, Furukawa Y, Sutheesophon K, Han SY, Druck T, Kuroki T, Trapasso F, Nishimura M, Saito Y, Ozawa K, Croce CM, Huebner K, Furukawa Y. Expression of FRA16D/WWOX and FRA3B/FHIT genes in hematopoietic malignancies. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 940-947
- 20 Fabbri M, Iliopoulos D, Trapasso F, Aqeilan RI, Cimmino A, Zanesi N, Yendamuri S, Han SY, Amadori D, Huebner K, Croce CM. WWOX gene restoration prevents lung cancer growth in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 15611-15616
- 21 Yee K, Sheppard BC, Domreis J, Blanke CD. Cancers of the gallbladder and biliary ducts. *Oncology (Williston Park)* 2002; 16: 939-946, 949; discussion 949-950, 952-953, 956-957
- 22 Chang NS, Hsu LJ, Lin YS, Lai FJ, Sheu HM. WW domain-containing oxidoreductase: a candidate tumor suppressor. *Trends Mol Med* 2007; 13: 12-22

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

#### 1 修回稿信件

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

#### 2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回的,作重新投稿处理.

#### 3 版权

本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负.作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期):起止页码.如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有.编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

## 针刺治疗腹泻型肠易激综合征的随机对照试验

钱火辉, 朱永苹, 蒙珊, 齐国豪, 赵星星

钱火辉, 蒙珊, 广西中医学院附属瑞康医院针灸科 广西壮族自治区南宁市 530011

朱永苹, 广西中医学院附属瑞康医院消化科 广西壮族自治区南宁市 530011

齐国豪, 赵星星, 广西中医学院 广西壮族自治区南宁市 530011

钱火辉, 副主任中医师, 主要从事针灸治疗消化系统疾病方面的研究。

作者贡献分布: 钱火辉与朱永苹对此文所作贡献均等; 此研究由钱火辉、朱永苹及蒙珊设计; 研究过程由钱火辉、朱永苹、蒙珊、齐国豪及赵星星操作完成; 数据分析由齐国豪与赵星星完成; 本论文写作由钱火辉、朱永苹及蒙珊完成。

通讯作者: 钱火辉, 副教授, 530011, 广西壮族自治区南宁市兴宁区华东路10号, 广西中医学院附属瑞康医院针灸科。

327664246@qq.com

收稿日期: 2010-10-31 修回日期: 2010-12-03

接受日期: 2010-12-07 在线出版日期: 2011-01-28

### Acupuncture treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial

Huo-Hui Qian, Yong-Pin Zhu, Shan Meng, Guo-Hao Qi, Xing-Xing Zhao

Huo-Hui Qian, Shan Meng, Department of Acupuncture and Moxibustion, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yong-Pin Zhu, Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Guo-Hao Qi, Xing-Xing Zhao, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Associate Professor Huo-Hui Qian, Department of Acupuncture and Moxibustion, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi Traditional Chinese Medical University, 10 Huadong Road, Xingning District, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. 327664246@qq.com

Received: 2010-10-31 Revised: 2010-12-03

Accepted: 2010-12-07 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To evaluate the clinical effect of acupuncture treatment for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS).

**METHODS:** This is a prospective, randomized, controlled trial. According to diagnostic criteria and selection criteria, 120 patients were randomized into two equal groups: intervention group

and control group. The intervention group underwent acupuncture therapy and pinaverium treatment, while the control group underwent sham acupuncture and pinaverium treatment. The period of treatment is four weeks. After treatment for 2 and 4 wk, the changes of symptoms, including abdominal pain, abdominal distension, and stool characters, were observed and serum vasoactive intestinal peptide (VIP) levels were measured by ELISA.

**RESULTS:** The total response rate was significantly higher in the intervention group than in the control group (96% vs 76%,  $P < 0.05$ ). The improvement in abdominal pain, abdominal distension, and stool characters was more significant in the intervention group than in the control group ( $1.32 \pm 0.17$  vs  $3.37 \pm 0.49$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.95 \pm 0.06$  vs  $3.34 \pm 0.24$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.48 \pm 0.15$  vs  $3.64 \pm 0.78$ ,  $P = 0.000$ ). Before treatment, there is no significant difference in serum VIP levels between the two groups. However, after treatment, serum VIP levels in the intervention group were significantly lower than those in the control group ( $42.72 \mu\text{g/L} \pm 12.78 \mu\text{g/L}$  vs  $102.72 \mu\text{g/L} \pm 21.23 \mu\text{g/L}$ ,  $P = 0.000$ ).

**CONCLUSION:** Acupuncture treatment can relieve gastrointestinal symptoms and exert a treatment effect on D-IBS possibly by regulating VIP secretion.

**Key Words:** Acupuncture; Pinaverium; Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Randomized controlled trial

Qian HH, Zhu YP, Meng S, Qi GH, Zhao XX. Acupuncture treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a randomized controlled trial. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 257-261

### 摘要

**目的:** 客观评价针刺治疗腹泻型肠易激综合征(IBS)的临床疗效。

**方法:** 采用前瞻性、随机、平行对照设计, 将120例符合诊断标准、纳入标准的D-IBS患者, 按1:1随机分为两组, 每组60例。治疗组予针

### 背景资料

肠易激综合征作为中医治疗的优势病种, 开展针刺治疗IBS的临床研究具有现实意义。同时, 基于针灸是否具有特异性疗效一直是西方医学界的争论点, 对穴位特异性的解释经常困扰临床研究的设计和结论。因此, 研究采用安慰针刺组对照, 以期能为针刺治疗IBS提供临床证据和理论支持。

### 同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

### ■创新盘点

本文的创新之处在于采用前瞻性、随机、单盲、平行对照设计,对照组选择安慰针刺对照,采用国际通用的反映IBS临床疗效评价指标结合血浆胃肠激素VIP变化,观察针刺对IBS的疗效。

刺结合得舒特处理;对照组予假针刺结合得舒特处理,连续4 wk。记录治疗前、治疗后2及4 wk两组患者腹痛、腹部不适、大便性状等症状变化,应用ELISA技术检测治疗前、后患者血浆血管活性肠肽(VIP)的变化。

**结果:**从总体疗效分析,治疗组疗效明显优于对照组(96% vs 76%)。治疗组能有效改善患者腹痛、腹部不适及大便性状改变等症状,经统计学比较,治疗组优于对照组( $1.32 \pm 0.17$  vs  $3.37 \pm 0.49$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.95 \pm 0.06$  vs  $3.34 \pm 0.24$ ,  $P = 0.000$ ;  $0.48 \pm 0.15$  vs  $3.64 \pm 0.78$ ,  $P = 0.000$ )。治疗前,两组患者血浆VIP表达均呈上升趋势, VIP变化无明显差异( $P = 0.891$ );治疗后,治疗组血浆VIP表达呈下降趋势,与治疗前比较有统计学意义( $42.72 \mu\text{g/L} \pm 12.78 \mu\text{g/L}$  vs  $105.12 \mu\text{g/L} \pm 21.01 \mu\text{g/L}$ ,  $P = 0.000$ )。对照组治疗后血浆VIP表达未见明显变化,与治疗前比较,无统计学意义( $P = 1.000$ )。治疗组与对照组治疗后血浆VIP变化比较,有统计学意义( $42.72 \mu\text{g/L} \pm 12.78 \mu\text{g/L}$  vs  $102.72 \mu\text{g/L} \pm 21.23 \mu\text{g/L}$ ,  $P = 0.000$ )。

**结论:**针刺可能通过影响VIP的释放,调节内脏敏感性,发挥缓解腹痛、腹部不适,改善大便性状的效应。

**关键词:**针刺;得舒特;腹泻型肠易激综合征;随机对照试验

钱火辉,朱永平,蒙珊,齐国豪,赵星星. 针刺治疗腹泻型肠易激综合征的随机对照试验. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 257-261

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/257.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一组以腹痛或腹部不适,伴排便习惯改变的症候群,因其发病机制尚不明确,目前仍缺乏特效的治疗手段。据流行病学调查数据表明<sup>[1,2]</sup>,欧美地区IBS发病率为15%-22%,每年有约500万人因此而就诊,年消耗医疗费80亿美元。IBS在中国同样已经成为消化科就诊的常见病之一,严重影响患者的生活质量,并占用大量的医疗资源<sup>[3,4]</sup>。现代医学对于IBS尚无特效的治疗方法,基本以对症处理为主。尽管传统中医药治疗尤其是针灸治疗IBS的疗效较为满意,但因缺乏严格的随机、对照设计,因此其研究结果亦缺乏说服力,亦无法提供充分证据证明针刺治疗IBS的可靠性<sup>[5]</sup>。我们因此在循证医学指导下,采用

前瞻性、随机、对照试验设计,观察针刺治疗腹泻型肠易激综合征(diarrhea-predominant irritable bowel syndrome, D-IBS)的临床疗效,现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 全部病例主要源自于2007-01/2009-12广西中医学院附属瑞康医院消化科、针灸科门诊患者。其中男47例,女73例,平均年龄43.01 ± 7.45岁,平均病程3.46 ± 1.20年。

### 1.2 方法

**1.2.1 诊断标准:**参照2006年罗马III诊断标准<sup>[6]</sup>,诊断前症状出现至少6 mo,近3 mo满足如下标准。反复发作的腹痛或腹部不适,最近3 mo内每mo至少有3 d出现症状,合并以下2条或多条:(1)排便后症状缓解;(2)发作时伴有排便频率改变;(3)发作时伴有大便性状(外观)改变,属于Bristol评分在4分及6分者<sup>[7]</sup>。结合电子结肠镜检查提示部分患者肠蠕动亢进,甚至痉挛,无明显黏膜异常,活检组织学检查基本正常,以排除器质性疾病。

**1.2.2 纳入标准:**(1)符合诊断标准;(2)年龄18-65岁;(3)能签署和理解知情同意书。

**1.2.3 排除标准:**(1)不符合诊断标准和符合纳入标准中的排除;(2)合并结肠憩室、息肉以及结肠原发性肿瘤等器质性病变;(3)合并有心血管、肝、肾和造血系统等严重原发性疾病,精神病患者;(4)研究中认为有任何不适宜入选的情况。

**1.2.4 样本量估算:**详细检索前期临床治疗及国内外相关文献,针刺对研究的主要效应指标即腹痛、腹部不适明显减轻(adequate relief, AR)的有效率86%-96%<sup>[8-10]</sup>,得舒特有效率76.34%<sup>[11]</sup>为进行样本量估算,采用“非劣效试验”样本量估算公式,参照郑青山教授文献报道<sup>[12]</sup>,公式如下:非劣性试验:  $N = [2 \times (U\alpha + U\beta) \times P(1-P)] / \delta^2 = C1 \times P(1-P) / \delta^2$ ,其中 $\delta$ 是等效标准(界值), $U\alpha$ ,  $U\beta$ 为单侧标准正态离差界值, $n$ 为样本含量, $P$ 是平均有效率, $C1$ 和 $C2$ 为系数项。取 $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.1$ (检验效能power = 1-0.1 = 0.90)。经过样本量估算为104例,根据临床研究目的、实际可操作性以及样本脱落15%计算,课题组最终观察样本数为120例,按1:1分配,每组60例。

**1.2.5 研究设计:**前瞻性、随机、开放、平行对照设计;实行研究者(临床医生、数据分析人员)、受试者开放研究(非盲法)。按1:1对照原

表 1 两组患者基线资料比较 ( $n = 60$ )

分组	病程(年)	男( $n$ )	女( $n$ )	年龄(岁)
治疗组	3.54 ± 1.14	22	38	42.54 ± 7.33
对照组	3.38 ± 0.96	25	35	43.48 ± 7.57

表 2 两组患者总体疗效分析 ( $n = 60$ )

分组	临床痊愈	显效	有效	无效
治疗组	24	26	8	2
对照组	10	13	22	15

则分为治疗组、对照组两组, 总例数确定为120例。通过简明统计分析软件, 将样本量100例及分组数2输入计算机, 产生随机种子数及随机分组数, 制成随机分配卡(随机分配卡由课题组中与临床试验无关的研究人员统一制作), 装入依次编号的信封, 信封上的编号与卡片上的顺序号相同, 合格的受试对象按就诊的先后顺序依照信封编号, 拆封取卡, 严格按照卡片规定分组处理。

1.2.6 分组处理: 参照文献报道, 治疗组予针刺治疗, 对照组予假针刺治疗<sup>[13-16]</sup>, 具体如下: (1)治疗组: 采用针刺治疗, 选穴: 中脘, 天枢, 下巨虚, 上巨虚, 内关, 太冲, 足三里, 脾俞。操作: 针刺法, 直刺1-1.5寸, 得气后, 行平补平泻手法, 留针30 min, 每日治疗1次, 14 d为1个疗程, 2个疗程后观察疗效; 同时予得舒特口服, 每次50 mg, 每日3次, 连续4 wk; (2)对照组: 采用假针刺治疗, 选穴: 上述治疗选经穴旁开2 cm。操作: 针刺法, 直刺0.5寸, 不予得气及任何补泻手法干预, 每日1次, 连续4 wk; 同时予得舒特(pinaverium, 法国苏威特制药公司生产, 批号: H20070424)口服, 每次50 mg, 每日3次; 疗程均为4 wk。

1.2.7 观察指标: 记录患者基线资料(年龄、性别、病程等)。

1.2.8 疗效评价指标: (1)主要疗效指标: 腹痛或腹部不适症状积分变化<sup>[17]</sup>。每隔2 wk, 记录上述症状积分变化。轻度: 每天偶有腹痛, 可自行缓解, 计2分; 中度: 每天经常腹痛, 程度可忍受, 计4分; 重度: 每天明显感腹痛, 程度多不能忍受, 需服药后能缓解, 计6分。轻度: 偶有腹部不适, 30 min左右能缓解, 计2分; 中度: 经常腹部不适, 1-2 h不能缓解, 计4分; 重度: 整日腹部不适不能缓解, 需服药后才能缓解, 计6分; (2)次要疗效指标: 每隔2 wk记录大便性状改变, 采用ELISA法检测治疗前及治疗4 wk后血浆血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)变化。大便性状变化: 大便似腊肠或蛇, 光滑柔软, 计0分; 软团, 边缘清楚, 计2分; 绒状物, 边缘不清, 糊状便, 计4分; 水样便, 无固体成分, 完全是液体, 计6分。

1.2.9 疗效判定标准: 采用尼莫地平法进行疗效评价。疗效指数(%) = (治疗前症状总积分-治疗

后症状总积分)/治疗前症状总积分×100%(尼莫地平法)。 (1)临床痊愈: 主要、次要症状消失, 疗效指数≥95%; (2)临床显效: 主要症状消失, 次要症状明显减轻, 疗效指数≥70%, <95%; (3)临床有效: 主要、次要症状减轻, 疗效指数≥30%, <70%; (4)临床无效: 无变化或症状轻度减轻, 疗效指数<30%。

统计学处理 采用SPSS16.0 For Windows软件分析包。基线资料(性别、年龄、病程、疾病种类)的均衡性分析: 采用方差分析, 或列联表卡方检验, 或Fisher精确概率法比较2组基线水平和衡量均衡性。计数指标(如主要症状积分)用频数和构成比描述, 2组疗效比较采用列联表卡方检验或秩和检验, 等级资料秩和检验; 计量指标用mean±SD进行描述, 采用方差分析或秩和检验。

## 2 结果

2.1 基线资料可比性分析 整个研究过程中无1例患者退出或中止试验。经统计学分析, 两组患者在病程、性别、年龄上无明显差异, 具有可比性( $P > 0.05$ , 表1)。

2.2 两组患者总体疗效分析 治疗组临床痊愈24例, 显效26例, 有效8例, 无效2例, 总有效率为96.66%; 对照组临床痊愈10例, 显效13例, 有效22例, 无效15例, 总有效率为75.00%; 治疗组总体疗效优于对照组(表2)。经Ridit分析,  $R = 0.2572$ , 根据公式计算, Ridit值的95%CI不包括0.5, 故 $P < 0.05$ 。

2.3 两组患者治疗前、后腹痛积分比较 治疗前, 治疗组腹痛积分为 $5.48 \pm 0.52$ ; 对照组为 $5.59 \pm 0.41$ , 经统计学比较, 无明显差异( $P > 0.05$ ), 具有可比性; 治疗组治疗14 d及28 d后, 腹痛明显好转, 其积分分别为 $1.48 \pm 0.15$ 、 $1.32 \pm 0.17$ , 与治疗前比较, 有明显差异( $P = 0.000$ ,  $P = 0.000$ ); 对照组腹痛积分分别为 $3.56 \pm 0.39$ 、 $3.37 \pm 0.49$ , 与治疗前比较有明显差异( $P = 0.036$ ,  $P = 0.023$ ); 但是, 治疗组与对照组治疗后14 d及28 d比较, 腹痛积分有明显差异( $P = 0.015$ ,  $P = 0.022$ )。说明治疗组改善腹痛效应优于对照组。

## 应用要点

本文可以初步指导如何从随机、双盲、平行对照角度出发, 科学设计针刺治疗功能性胃肠病。未来的研究中, 应当重视患者的生存质量及心理状态变化在功能性胃肠疾病中的比重。建立具有中医药特色的临床疗效评价体系, 为中医药临床治疗客观化和规范化提供思路。

### ■同行评价

本文选题恰当,对于治疗腹泻型肠易激综合征有一定的参考价值.

2.4 两组患者治疗前、后腹部不适积分比较 治疗前,治疗组腹部不适积分为 $4.42 \pm 0.88$ ;对照组为 $4.54 \pm 0.76$ ,经统计学比较,无明显差异( $P > 0.05$ ),具有可比性;治疗组治疗14 d及28 d后,腹部不适好转,其积分分别为 $1.12 \pm 0.10$ 、 $0.95 \pm 0.06$ ,与治疗前比较,有明显差异( $P = 0.017$ ,  $P = 0.001$ );对照组腹部不适积分分别为 $3.42 \pm 0.31$ 、 $3.34 \pm 0.24$ ,与治疗前比较有明显差异( $P = 0.047$ ,  $P = 0.033$ );但是,治疗组与对照组治疗后14 d及28 d比较,腹部不适积分有明显差异( $P = 0.017$ ,  $P = 0.012$ ).说明治疗组改善腹部不适效应优于对照组.

2.5 两组患者治疗前、后大便性状积分比较 治疗前,治疗组大便性状积分 $4.72 \pm 0.98$ ,对照组为 $4.64 \pm 1.01$ ,经统计学比较,无明显差异( $P > 0.05$ ),具有可比性;治疗组治疗14 d及28 d后,大便性状明显好转,由稀便转为软便,其积分分别为 $1.02 \pm 0.08$ 、 $0.48 \pm 0.15$ ,与治疗前比较,有明显差异( $P = 0.023$ ,  $P = 0.000$ );与对照组比较,有明显差异( $P = 0.031$ ,  $P = 0.013$ ).对照组治疗14 d及28 d后,大便性状积分变化不甚明显,其积分分别为 $3.72 \pm 0.90$ 、 $3.64 \pm 0.78$ ,治疗前后差异不明显.说明治疗组具有明确改善大便性状的效应,其疗效优于对照组.

2.6 两组患者治疗前、后血浆VIP比较 治疗前,治疗组血浆VIP为 $105.12 \text{ ng/L} \pm 21.01 \text{ ng/L}$ ;对照组血浆VIP为 $115.24 \text{ ng/L} \pm 19.98 \text{ ng/L}$ ;经统计学比较,无明显差异( $P > 0.05$ ).治疗后,治疗组血浆VIP为 $42.72 \text{ ng/L} \pm 12.78 \text{ ng/L}$ ,与治疗前比较有统计学意义( $P = 0.000$ ).对照组治疗后血浆VIP为 $102.72 \text{ ng/L} \pm 21.23 \text{ ng/L}$ ,与治疗前比较,无统计学意义.治疗组与对照组治疗后血浆VIP变化比较,有统计学意义.说明针刺治疗具有调节血浆VIP表达效应.

### 3 讨论

IBS属于功能性胃肠疾病的一种,依据2006年制订的ROME III标准,根据其主要临床表现可分为腹泻型、便秘型、混合型和未定型. IBS临床治疗尚无特效药物,不少药物因严重的毒副作用而撤市,目前主要应用匹维溴铵(商品名:得舒特)为主,得舒特是胃肠道具有高度选择性解痉作用的钙通道拮抗剂,作用于平滑肌细胞,能减少平台期慢波,抑制钙内流,从而减少慢波频率和基于慢波的峰电位幅度.故而可减少肠道的收缩活动,减少峰电位,对结肠平滑肌具有解痉

作用;发挥缓解IBS相关症状的效应<sup>[18]</sup>.基于上述研究,本研究在循证医学和伦理学指导下,采用随机、对照、单盲设计,以得舒特为基础治疗,开展针刺法治疗D-IBS的临床研究,对照组选用安慰针或称为假针刺组,采用浅刺法,所选针刺点距离经穴原穴点2 cm处<sup>[19]</sup>.同时,本研究主要效应指标采用国际上通用反映IBS疾病的临床疗效评价指标包括AR和IBS症状严重程度量表,因此研究结果的可靠性、有效性及对针刺治疗的敏感性得到保证<sup>[20-22]</sup>.

IBS发病机制复杂,尚未被人类充分认识,可能与包括心理因素、胃肠道异常运动与分泌、内脏高敏感性在内的中枢和外周因素有关.其中胃肠激素既能够调节胃肠道的运动,又能够调节内脏的敏感性,使IBS患者的胃肠道对应激及食物的敏感性增强<sup>[23,24]</sup>.VIP是在D-IBS发病机制占据重要地位的胃肠肽类物质,和NO一起作用,起到正向调节作用,刺激肠道水、电解质分泌导致内脏运动及敏感性异常,从而出现腹痛、腹部不适、大便水样等症状,调节血浆VIP的释放,对于缓解D-IBS的症状可能是有益的<sup>[25-27]</sup>.因此,我们选择VIP作为客观指标配合主要症状指标,综合评价针刺治疗D-IBS的效应.本研究发现,D-IBS患者治疗前血浆VIP水平显著升高,经针刺治疗后血浆VIP水平呈下降趋势( $P < 0.05$ ),并与患者主要症状改善呈正比;而假针刺组治疗后血浆VIP水平变化无明显差异( $P < 0.05$ ),这表明,针刺治疗可能具有调节VIP分泌的效应.根据D-IBS临床表现,可以归于祖国医学的“泄泻”、“腹痛”等范畴.张声生等<sup>[28]</sup>采用聚类分析,研究350例D-IBS患者证候分布规律提示,D-IBS患者症状以肠内症状为主,并伴有精神心理症状,临床证型以肝郁脾虚、脾虚湿阻、脾胃湿热、脾肾亏虚多见.我们亦认识到IBS的腹痛、腹胀、排便习惯改变及大便性状异常等症状多以肝脾不和,木旺乘土或土虚木乘为病机,其症状的加重又与精神因素或一些应激状态密切相关.诚如“泻责之脾,痛责之肝.肝责之实,脾责之虚,脾虚肝实,故令痛泻也”.我们在临床治疗D-IBS时以调和肝脾为治疗大法,辨证选穴以肝脾两经俞穴为主,并配以大肠经及小肠经俞穴,针灸治疗中太冲为四关穴,又是肝之原穴疏肝理气,解痉止痛;足三里胃之合穴及脾俞穴健脾和胃,调理气血;天枢属大肠之募穴,上巨虚大肠下合穴,下巨虚小肠下合穴,三穴均属足阳明胃经,能疏理肠腑,清化

湿浊, 健脾助运; 取心包经的内关穴开胸行气解郁, 诸穴合用, 则调理肝脾, 安神定志, 发挥标本兼治的效应。

我们通过本研究, 可以初步证实针刺治疗D-IBS疗效确切, 具备“简”、“便”、“效”、“廉”优势, 值得临床推广应用。其可能机制为针刺调节VIP释放, 改善内脏敏感性及胃肠运动功能紊乱, 发挥缓解腹痛、腹部不适、大便性状异常效应。但是, 由于本研究未能采用反映IBS患者生活质量的评价指标、反映IBS患者心理状态的评价指标等, 因此存在IBS观察评价体系不够完善等问题<sup>[29]</sup>。未来的研究中, 应当采用大样本、多中心、中央随机区组设计, 建立综合症状、生活质量、心理状态等具备中医药特色的评价体系<sup>[30]</sup>, 以更好的客观评价针刺治疗IBS的效应。

#### 4 参考文献

- 1 Khoshkrood-Mansoori B, Pourhoseingholi MA, Sa-fae A, Moghimi-Dehkordi B, Sedigh-Tonekaboni B, Pourhoseingholi A, Habibi M, Zali MR. Irritable bowel syndrome: a population based study. *J Gastrointestin Liver Dis* 2009; 18: 413-418
- 2 Haagsma JA, Siersema PD, De Wit NJ, Havelaar AH. Disease burden of post-infectious irritable bowel syndrome in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 2010; 138: 1650-1656
- 3 姒健敏, 陈淑洁, 孙蕾民. 浙江省肠易激综合征的流行病学和患者生活质量研究. *中华内科杂志* 2003; 42: 34-38
- 4 Zhao Y, Zou D, Wang R, Ma X, Yan X, Man X, Gao L, Fang J, Yan H, Kang X, Yin P, Hao Y, Li Q, Dent J, Sung J, Halling K, Wernersson B, Johansson S, He J. Dyspepsia and irritable bowel syndrome in China: a population-based endoscopy study of prevalence and impact. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 562-572
- 5 MacPherson H, Bland M, Bloor K, Cox H, Geddes D, Kang'ombe A, Reynolds J, Stumuli E, Stuardi T, Tilbrook H, Torgerson D, Whorwell P. Acupuncture for irritable bowel syndrome: a protocol for a pragmatic randomised controlled trial. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 63
- 6 Drossman DA, Dumitrascu DL. Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. *J Gastrointestin Liver Dis* 2006; 15: 237-241
- 7 Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480-1491
- 8 李文波, 刘诗. 针刺疗法治疗功能性肠疾病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 197-200
- 9 黄志刚, 尤斌, 雷震. 针灸辨证治疗肠易激综合征172例. *上海针灸杂志* 2006; 25: 21-22
- 10 李种泰. 痛泻要方加减结合针灸治疗肠易激综合征57例. *时珍国医国药* 2005; 16: 638
- 11 詹丽杏, 李兆申, 邹多武, 许国铭, 尹宁. 匹维溴铵治疗肠易激综合征的临床疗效及改变肛门直肠动力和内脏敏感性研究. *中华消化杂志* 2002; 22: 477-481
- 12 郑青山, 孙瑞元, 陈志扬. 新药临床非劣性及等效性试验中的例数估计和等效标准. *中国新药杂志* 2003; 12: 368-372
- 13 刘京, 王俊英, 刘俊岭, 朱兵. 安慰针刺对照设计的研究进展与相关问题探讨. *针刺研究* 2007; 32: 389-393
- 14 朱倩, 赵晓峰, 王舒. 再谈针刺对照组的设计与问题. *新中医* 2009; 41: 85-88
- 15 吴帮启, 刘存志, 于建春, 韩景献. 针刺研究中假针刺组的设置概况. *上海针灸杂志* 2009; 28: 59-62
- 16 杨佐琴, 郑倩华, 李瑛, 吴曦. 针灸临床研究中假针刺的运用及研究概况. *新中医* 2009; 41: 93-96
- 17 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 139-143
- 18 Boyer JC, Magous R, Christen MO, Balmes JL, Bali JP. Contraction of human colonic circular smooth muscle cells is inhibited by the calcium channel blocker pinaverium bromide. *Cell Calcium* 2001; 29: 429-438
- 19 张宏伟, 唐金陵. 针灸临床试验中安慰针的设计与选用. *中国中西医结合杂志* 2003; 23: 247-250
- 20 Schneider A, Enck P, Streitberger K, Weiland C, Bagheri S, Witte S, Friederich HC, Herzog W, Zipfel S. Acupuncture treatment in irritable bowel syndrome. *Gut* 2006; 55: 649-654
- 21 Vejdani R, Shalmani HR, Mir-Fattahi M, Sajed-Nia F, Abdollahi M, Zali MR, Alizadeh AH, Bahari A, Amin G. The efficacy of an herbal medicine, Carmint, on the relief of abdominal pain and bloating in patients with irritable bowel syndrome: a pilot study. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1501-1507
- 22 Francis CY, Morris J, Whorwell PJ. The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 395-402
- 23 Pan F, Zhang T, Zhang YH, Xu JJ, Chen FM. Effect of Tongxie Yaofang Granule in treating diarrhea-predominate irritable bowel syndrome. *Chin J Integr Med* 2009; 15: 216-219
- 24 Leventer SM, Raudibaugh K, Frissora CL, Kassem N, Keogh JC, Phillips J, Mangel AW. Clinical trial: dextofisopam in the treatment of patients with diarrhoea-predominant or alternating irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 197-206
- 25 Wu HG, Jiang B, Zhou EH, Shi Z, Shi DR, Cui YH, Kou ST, Liu HR. Regulatory mechanism of electroacupuncture in irritable bowel syndrome: preventing MC activation and decreasing SP VIP secretion. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1644-1651
- 26 Simrén M, Stotzer PO, Sjövall H, Abrahamsson H, Björnsson ES. Abnormal levels of neuropeptide Y and peptide YY in the colon in irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 55-62
- 27 Zhang H, Yan Y, Shi R, Lin Z, Wang M, Lin L. Correlation of gut hormones with irritable bowel syndrome. *Digestion* 2008; 78: 72-76
- 28 张声生, 汪红兵, 李振华, 唐旭东, 王新月, 张福文, 吴兵, 陈明, 陶琳, 唐博祥, 朱培一, 李保双, 宋秀江, 刘敏, 查波. 360例腹泻型肠易激综合征的聚类分析及证候特征研究. *中华中医药杂志* 2010; 25: 1183-1188
- 29 Patrick DL, Drossman DA, Frederick IO, DiCesare J, Puder KL. Quality of life in persons with irritable bowel syndrome: development and validation of a new measure. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 400-411
- 30 唐旭东, 卞立群, 李振华, 李保双. 对肠易激综合征中医药临床疗效评价指标体系建设的一些思考. *中国中西医结合杂志* 2010; 30: 538-541

编辑 李薇 电编 何基才



## β-catenin在锯齿状腺瘤中的蛋白表达及基因突变

代小娟, 王鲁平, 韩英, 王瑾

### ■背景资料

新近在研究锯齿状腺瘤癌变的途径中发现结肠癌突变基因(MCC)联合β-catenin, 抑制Wnt信号转导的新结直肠癌变通路, 目前该通路与锯齿状病变癌变的关系尚不清楚。

代小娟, 韩英, 中国人民解放军北京军区总医院消化科 北京市 100700  
王鲁平, 王瑾, 中国人民解放军北京军区总医院病理科 北京市 100700  
代小娟, 硕士研究生, 主要从事胃肠病理方面的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30872956  
首都医学发展基金资助项目, No. 2007-3025  
作者贡献分布: 课题由王鲁平与韩英设计指导; 代小娟完成实验及数理统计; 代小娟完成论文写作; 王瑾英文缩写校对; 王鲁平与韩英审核修改。  
通讯作者: 王鲁平, 主任医师, 100700, 北京市, 中国人民解放军北京军区总医院病理科. bzwlp@yahoo.com  
收稿日期: 2010-09-29 修回日期: 2010-11-25  
接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-28

### Protein expression and gene mutations of β-catenin in colorectal serrated adenoma

Xiao-Juan Dai, Lu-Ping Wang, Ying Han, Jin Wang

Xiao-Juan Dai, Ying Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Area, Beijing 100700, China

Lu-Ping Wang, Jin Wang, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Area, Beijing 100700, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872956; the Capital Medical Development Foundation, No. 2007-3025

Correspondence to: Lu-Ping Wang, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA Beijing Military Area, Beijing 100700, China. bzwlp@yahoo.com

Received: 2010-09-29 Revised: 2010-11-25

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the protein expression of β-catenin and the mutations in exon 3 of the β-catenin gene in colorectal traditional serrated adenoma (TSA), conventional adenoma (TA/VTA) and colorectal carcinoma (CRC), and to analyze the relationship between β-catenin expression and the carcinogenesis of TSA.

**METHODS:** Thirty TSA specimens, 20 TA/VTA specimens, and 21 CRC specimens were collected. The protein expression of β-catenin was detected by immunohistochemical staining. β-catenin exon 3 mutations were detected by sequencing DNA from β-catenin-positive TSA (8 cases), TA (6 cases), VTA (5 cases), and CRC (10 cases) specimens.

■同行评议者  
李瑗, 教授, 广西  
肿瘤研究所

**RESULTS:** There are significant differences in the positive rates of β-catenin expression among TSA, TA/VTA and CRC ( $P = 0.000$ ). No significant difference was noted in the positive rate of β-catenin expression between TSA and TA/VTA ( $P > 0.05$ ) though a significant difference was found between TSA and CRC ( $P < 0.05$ ). The degree of dysplasia in both TSA and TA/VTA was correlated with the positive rate of β-catenin expression (TSA:  $P < 0.01$ ; TA/VTA:  $P < 0.05$ ). No β-catenin exon 3 mutations were detected in TSA, TA/VTA or CRC.

**CONCLUSION:** Abnormal expression of β-catenin is related to the degree of dysplasia in TSA. β-catenin may play a role in the neoplastic progression of TSA.

**Key Words:** β-catenin; Serrated adenoma; Immunohistochemistry; Gene sequencing

Dai XJ, Wang LP, Han Y, Wang J. Protein expression and gene mutations of β-catenin in colorectal serrated adenoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 262-267

### 摘要

**目的:** 观察β-catenin在结直肠传统锯齿状腺瘤(TSA)、普通腺瘤及腺癌中的免疫组织化学表达及外显子3基因突变, 分析β-catenin与锯齿状腺瘤癌变的关系及意义。

**方法:** 收集TSA 30例, 管状腺瘤/绒毛管状腺瘤(TA/VTA) 20例, 结直肠腺癌(CRC) 21例, 应用免疫组织化学方法检测β-catenin在病变组织中的表达情况; 选取细胞质/核表达阳性的TSA 8例、TA 6例、VA 5例及CRC 10例进行了β-catenin外显子3突变的检测。

**结果:** 免疫组织化学结果显示β-catenin在TSA中的表达阳性率为76.6%(23/30), TA/VTA中70.0%(14/20), CRC中为95.2%(20/21); β-catenin在3种病变中的表达具有显著差异( $P = 0.000$ ), 对其进行两两比较后发现β-catenin在TSA(23/30)中的表达与TA/VTA组(14/20)之间无显著性差异( $P > 0.05$ ), 与CRC(20/21)之间有显著性差异( $P < 0.05$ ); 随着TSA及普通腺

瘤异型增生程度增加,  $\beta$ -catenin表达阳性率增高, 异型增生程度与 $\beta$ -catenin阳性率呈正相关, 差异有统计学意义(TSA:  $P < 0.01$ ; TA/VTA:  $P < 0.05$ ). 基因测序结果显示TSA、TA/VTA、CRC均未检测到外显子3的突变.

**结论:**  $\beta$ -catenin在TSA的异常表达随异型增生程度增加而表达增加.  $\beta$ -catenin蛋白水平的异常表达与外显子3基因突变不同步.  $\beta$ -catenin在锯齿状腺瘤癌变的过程中有促进肿瘤进展的作用.

**关键词:**  $\beta$ -catenin; 锯齿状腺瘤; 免疫组织化学; 基因测序

代小娟, 王鲁平, 韩英, 王瑾.  $\beta$ -catenin在锯齿状腺瘤中的蛋白表达及基因突变. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 262-267  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/262.asp>

## 0 引言

继结直肠腺瘤-癌顺序癌变(adenoma-carcinoma procedure of carcinogenesis, APC)通路外, 近年来锯齿状癌变通道已为结直肠癌第二通路. 一般认为锯齿状癌变通路主要分子遗传学改变包括: (1) BRAF基因突变; (2) CpG岛甲基化现象(island methylation phenomenon, CIMP); (3) 微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)表达<sup>[1-3]</sup>. 新近在研究锯齿状腺瘤癌变的途径中发现结肠癌突变基因(mutation gene of colon cancer, MCC)联合 $\beta$ -catenin, 抑制Wnt信号转导的新结直肠癌变通路, 目前该通路与锯齿状病变癌变的关系尚不很清楚<sup>[4-7]</sup>. 本文观察30例传统锯齿状腺瘤(traditional serrated adenoma, TSA), 20例普通腺瘤及21例浸润性腺瘤 $\beta$ -catenin的免疫组织化学表达及其外显子3突变的情况, 重点观察 $\beta$ -catenin在TSA中的表达和突变情况以及与异型增生分级的关系, 并比较TSA与普通腺瘤及腺瘤有否差异, 旨在探讨 $\beta$ -catenin与锯齿状癌变的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集中国人民解放军252医院、河北省巨鹿县医院病理科2003-01/2008-01病理诊断为结直肠腺瘤及息肉的切片共1 685例, 从中筛选出腺体以锯齿状结构为特征的病变91例; 由专长胃肠病理诊断的高年资医师根据WHO及文献[8-11]标准进行2-3轮病理组织学诊断分类, 将锯齿状病变分为增生性息肉(hyperplastic

polyps, HP)、广基锯齿状腺瘤(sessile serrated adenoma, SSA)、传统锯齿状腺瘤(traditional serrated adenoma, TSA)、混合性锯齿状息肉/腺瘤、混合性锯齿状/管状腺瘤. 从中筛选出TSA 30例. 随机抽取病理诊断为结直肠管状腺瘤(tubular adenoma, TA), 绒毛管状腺瘤(tubulovillous adenoma, VTA) 20例, 结直肠腺癌(colorectal carcinoma, CRC) 21例, 将各类腺瘤按异型增生程度分为轻中重度异型增生. 应用 $\beta$ -catenin单克隆抗体(CAT-5H10)对30例TSA、20例TA及VTA、21例CRC进行免疫组织化学染色. 并对8例TSA、6例TA、5例VTA及10例CRC进行 $\beta$ -catenin基因外显子3的突变检测.

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学方法:** 标本经40 g/L中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 行4  $\mu$ m厚的连续切片, 免疫组织化学采用MaxVision即用型染色方法: 常规脱蜡、脱水, 加入一抗后室温放置2 h, PBS液浸泡3次, 加二抗(通用型)室温孵育20 min, DAB显色, 苏木素染色.  $\beta$ -catenin单克隆抗体购自福州迈新生物技术有限公司.

**1.2.2  $\beta$ -catenin基因的提取及外显子3的突变检测:** (1) DNA提取: 采用德国QIAamp DNA FFPE试剂盒从石蜡包埋的组织中按说明书提取DNA, 具体步骤: 将蜡块切成10  $\mu$ m的切片(3片), 加入1 mL的二甲苯, 封闭并剧烈摇晃10 s, 室温放置15 min, 重复1次; 高速离心2 min, 用吸管移除上清液, 加入1 mL的酒精(96%-100%), 摇晃, 室温放置5 min, 重复1次; 室温下高速离心2 min, 用吸管移除上清液; 37  $^{\circ}$ C孵育10 min, 直到残留的酒精全部蒸发; 加入180  $\mu$ L的ATL缓冲液并加入20  $\mu$ L的蛋白酶K, 剧烈摇晃混匀; 56  $^{\circ}$ C孵育1 h; 90  $^{\circ}$ C孵育1 h; 将滴液转移到1.5 mL的离心管中, 在样品中加入200  $\mu$ L的AL缓冲液, 振荡并充分混匀, 再加入200  $\mu$ L的酒精(100%), 振荡并充分混匀; 将滴液转移到1.5 mL的离心管中; 将整个溶解产物转移到QIAamp MinElute柱中(2 mL的管), 以6 000-8 000 r/min离心1 min; 将QIAamp MinElute柱放置到2 mL的管中, 弃去包含液体的收集管, 加入500  $\mu$ L的AW1缓冲液, 6 000-8 000 r/min离心1 min; 将QIAamp MinElute柱放置到2 mL的管中, 弃去包含液体的收集管. 小心打开离心柱, 加入500  $\mu$ L的AW2缓冲液, 6 000-8 000 r/min离心1 min, 将QIAamp MinElute柱放置到2 mL的管中; 高速离心(20 000-14 000 r/min)3 min使膜完全烘干, 将离心柱放置到1.5

### ■ 相关报道

Hugh等也发现 $\beta$ -catenin的广泛的核表达及胞质表达揭示了肿瘤生长的异常性, 且在对患者生存预后的判断上有统计学意义.

### ■应用要点

$\beta$ -catenin在TSA的异常表达随异型增生程度增加而表达增加。 $\beta$ -catenin蛋白水平的异常表达与外显子3基因突变不同步。 $\beta$ -catenin在锯齿状腺瘤癌变的过程中有促进肿瘤进展的作用。

表 1  $\beta$ -catenin在各类型病变中的表达

类别	<i>n</i>	-( <i>n</i> )	+ <i>n</i> (%)	++ <i>n</i> (%)	+++ <i>n</i> (%)	阳性 <i>n</i> (%)
TSA	30	7	21(63.3)	2(10.0)	0(0.0)	23(76.6)
TA/VTA	20	6	9(45.0)	5(25.0)	0(0.0)	14(70.0)
CRC	21	1	5(23.8)	6(28.5)	9(42.8)	20(95.2)
$\chi^2$ 值	22.805					
<i>P</i> 值	0.000					

mL的离心管中,弃去含有液体的收集管;小心打开离心柱并向膜的中心加入20-100  $\mu$ L的ATE缓冲液,室温下孵育1 min,高速20 000-14 000 r/min离心1 min;离心后的液体即为提取的DNA,并用紫外分光光度计测其浓度;(2)引物序列及引物合成:引物根据参考文献[12]获取引物序列:上游引物5'-TAACATTTCCAATCTACTAATGC-3',下游引物5'-AGCTACTTGTCTTGAGTGAAG-3',扩增的片段长度为272 bp;引物由上海英俊生物有限技术公司合成;(3)PCR反应及电泳:PCR反应试剂盒PrimeSTAR<sup>TM</sup> HS(Premix)购自日本TaKaRa公司.反应体系为50  $\mu$ L, Premix 25  $\mu$ L,模板DNA 1  $\mu$ L,引物1 1  $\mu$ L,引物2 1  $\mu$ L,灭菌蒸馏水22  $\mu$ L.反应条件:热启动95  $^{\circ}$ C 5 min;变性:94  $^{\circ}$ C 1 min;退火:57.6  $^{\circ}$ C 1 min;延伸:72  $^{\circ}$ C 1 min,共35个循环;继续延伸:72  $^{\circ}$ C 7 min.取扩增产物7.5  $\mu$ L与1.5  $\mu$ L上样缓冲液混合,在2%琼脂糖胶上电泳,电压80 V,30 min后在凝胶成像仪上扫描,记录结果,凝胶电泳在270 bp处可见一亮条带,与引物序列一致,扩增成功;(3)测序:将PCR产物送上海英俊生物技术公司进行测序.测序引物序列与PCR反应的引物序列相同,方法是终止法,测序仪器为ABI公司的3730,用axygen胶回收试剂盒经过切胶纯化,测序的试剂盒是ABI公司的BigDyer<sup>R</sup>XTermin<sup>TM</sup>V3.1.测序图通过Chromas软件打开,并通过PubMed的BLAST功能与GenBank的全基因序列进行对照。

1.2.3 免疫组织化学及基因突变结果判断:(1)免疫组织化学结果判定:按照Maruyama等<sup>[13]</sup>方法,分别从细胞膜、细胞质、细胞核3方面判断 $\beta$ -catenin在细胞内的分布特征:细胞膜阳性表达细胞率>70%为正常表达,反之为表达减弱或缺失;胞质或胞核阳性表达细胞率>10%定为异位表达;细胞膜表达减弱或缺失及异位表达统称为异常表达.其中正常表达记作阴性(-),异常表达记作阳性(+);异常表达进一步根据其染色强度分为3个等级:染色呈淡黄色为染色弱,记作

(+);染色呈黄色者为染色中等,记作(++);染色呈棕黄色者为染色强,记作(+++);(2) $\beta$ -catenin基因外显子3的突变检测测序结果判断:观察测序的峰图有无双峰,对于基线无杂波,看见明显的呈双峰的图像即为突变,通过PubMed的基因库,对所测序列进行BLAST,如有突变进一步分析突变的位点及突变的具体类型。

**统计学处理** 采用SPSS16.0统计软件进行统计分析,免疫组织化学的结果采用Fisher确切概率法进行统计, $P<0.05$ 差异有显著性。

## 2 结果

2.1  $\beta$ -catenin在各类型病变中的表达  $\beta$ -catenin在TSA中的表达阳性率为76.6%,TA/VTA中70.0%,CRC中为95.2%; $\beta$ -catenin在3种病变中的表达具有显著差异( $P=0.000$ ),TSA与TA/VTA之间无显著性差异( $P>0.05$ ),与CRC之间有显著性差异( $P<0.05$ ),TSA及TA/VTA的阳性表达率明显低于CRC(图1).并且观察到随着恶性程度增加,免疫组织化学染色强度明显增加,TSA及普通腺瘤中没有+++染色,而在癌组织中42.8%为+++。本文观察到1例TSA存在部分核表达异常,3例CRC存在部分核表达异常,而TA/VTA均未见核表达异常(表1)。

2.2  $\beta$ -catenin表达与腺瘤异型增生程度的关系 将TSA、TA/VTA腺体分为轻度、轻-中度及中度、重度异型增生3组,所有CRC均为浸润性癌共4组,比较 $\beta$ -catenin的表达有否差异.其中TSA伴轻度异型增生 $\beta$ -catenin 53.8%表达阳性,TSA伴中度异型增生100%阳性,TSA伴重度异型增生80.0%阳性;相比之下,TA/VTA伴轻度、轻-中及中度、重度异型增生阳性率分别为50%、83.3%、100%,其中4例伴重度异型增生者均为VTA,经统计学处理差异有显著性(表2). $\beta$ -catenin表达阳性率与两组腺瘤异型增生程度均呈正相关。

2.3 测序结果 根据免疫组织化学的结果选取了

表 2  $\beta$ -catenin表达与腺瘤异型增生程度的关系

类型	<i>n</i>	轻度异型增生 <i>n</i> (%)	轻-中及中度异性 <i>n</i> (%)	重度异型增生 <i>n</i> (%)	浸润癌 <i>n</i> (%)	<i>P</i> 值
TSA	30	13(43.3)	12(33.3)	5(16.6)		
阳性	23	7(53.8)	12(100.0)	4(80.0)		
阴性	7	6(46.1)	0(0.0)	1(20.0)		<0.01
TA/VTA	20	10(50.0)	6(30.0)	4(20.0)		
阳性	14	5(50.0)	5(83.3)	4(100.0)		
阴性	6	5(50.0)	1(16.6)	0(0.0)		<0.05
CRC	21	—	—	—	21	
阳性	20	—	—	—	20(95.2)	
阴性	1	—	—	—	1(4.7)	

## ■同行评价

本文学术性较好, 具有较高的临床参考价值。

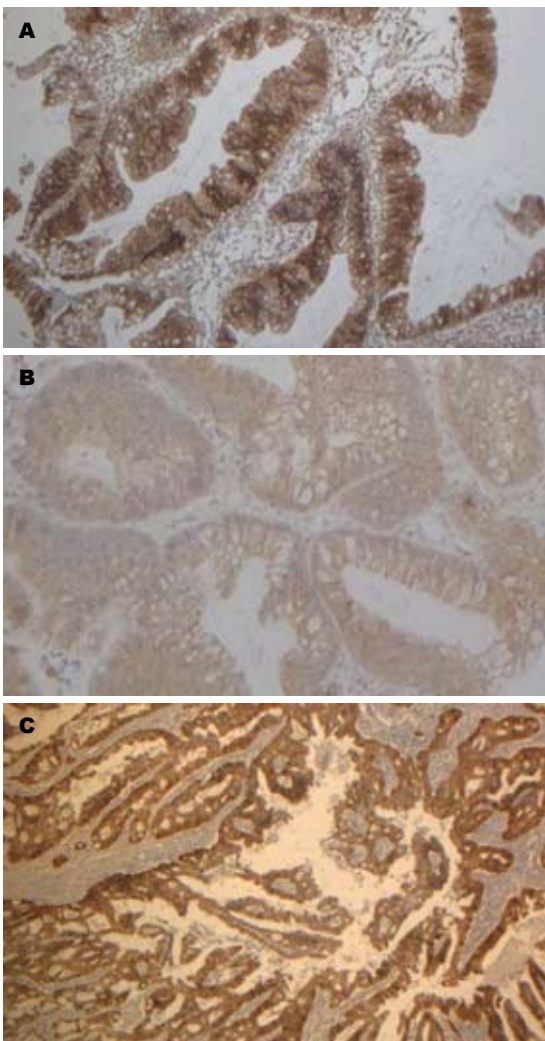


图 1  $\beta$ -catenin免疫组织化学结果. A: TSA胞质及胞膜明显阳性; B: TA胞膜阳性为主, 少数胞质阳性; C: 腺瘤胞质明显阳性。

异常表达的8例TSA、6例TA、5例VTA及10例CRC进行了外显子3的突变检测, 发现无一例病变存在外显子3的突变, 1例部分核表达阳性的TSA及3例核表达阳性的CRC均未发现 $\beta$ -catenin外显子3的突变(图2)。

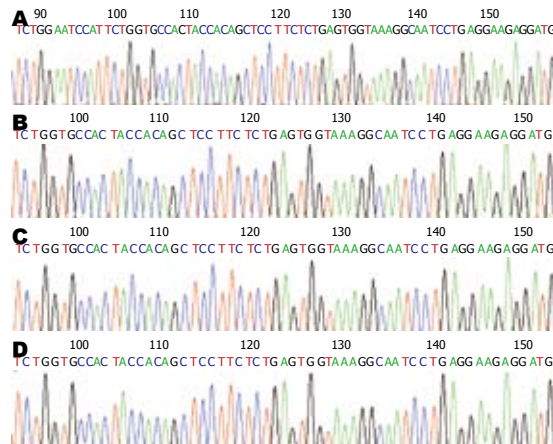


图 2 各类病变组织的测序图. A: TSA; B: TA; C: VTA; D: CRC. 各组病变测序图基线平稳, 未见杂波及双峰。

## 3 讨论

现已发现Wnt信号途径的多种成分在人类肿瘤发生过程中存在突变, 且所有突变结果多表现为游离 $\beta$ -catenin增多, 形成 $\beta$ -catenin-T细胞因子(T cell factor, Tcf)/LEF转录复合体, 激活下游原癌基因, 这些原癌基因所表达的癌蛋白决定了肿瘤组织的恶性表型. 使Wnt途径异常激活的最常见因素便是APC基因及 $\beta$ -catenin基因的突变, 二者的突变都会使胞质内游离的 $\beta$ -catenin增多, 在结直肠肿瘤中这两个基因的突变是经常出现的.  $\beta$ -catenin作为一种抑癌基因, 其作用涉及两个相对独立的过程, 既是细胞间黏附连接的主要结构成分, 又是APC  $\beta$ -catenin-T细胞因子信号通路(Wnt信号通路)的中枢成分. 在正常分化成熟的细胞中,  $\beta$ -catenin主要与膜表面E黏蛋白结合, 参与同质性黏附. 而胞质内游离的 $\beta$ -catenin因被磷酸泛素化, 可被蛋白酶体降解始终保持在低水平<sup>[14]</sup>. 但当 $\beta$ -catenin降解障碍时, 胞质内 $\beta$ -catenin水平升高, 导致 $\beta$ -catenin大量聚集进入细胞核内与T细胞转录因子结合启动下游靶基

因的转录,从而启动肿瘤的生长程序。

有文献报道<sup>[15,16]</sup>在结直肠癌组织中 $\beta$ -catenin 细胞质和细胞核表达增加是提示患者发生转移和不良预后的良好指标,国内<sup>[17]</sup>研究发现 $\beta$ -catenin的异常表达与结直肠癌分化程度、Duke's分期、淋巴结转移有关,提示 $\beta$ -catenin的异常表达与细胞恶性转化及疾病进展紧密联系。还有研究<sup>[4]</sup>表明 $\beta$ -catenin在正常黏膜均为膜表达,而大肠腺瘤和腺瘤癌变存在不同程度的细胞核异位表达增加和细胞膜表达下降,异位表达的程度随大肠腺瘤上皮不典型增生程度增高而增强,故认为 $\beta$ -catenin的膜表达下降和核表达增加与大肠腺瘤向腺癌转变有关。然而目前对于结直肠肿瘤 $\beta$ -catenin基因突变情况的研究结果差异较大,一些学者认为结直肠肿瘤中 $\beta$ -catenin基因突变极少,只有10%左右<sup>[5,6]</sup>,也有人认为较为普遍,约占40-50%<sup>[7]</sup>。本文中测得的 $\beta$ -catenin在CRC中的突变率为0%(0/10)。

在大肠癌发生发展的多阶段、多步骤过程中,腺瘤恶变是腺瘤由良性向恶性转化的最早期阶段,大量研究发现 $\beta$ -catenin异位表达率在腺瘤恶变组织中显著增高,提示 $\beta$ -catenin的胞质积聚并进入核内,导致 $\beta$ -catenin的肿瘤性活化并激活下游靶癌基因,可能在腺瘤恶变过程中发挥关键作用。Wong等<sup>[16]</sup>依次对正常结直肠组织、结直肠息肉组织,腺瘤组织及癌组织的 $\beta$ -catenin表达进行研究发现: $\beta$ -catenin的胞质/核表达率在这4种组织中分别为0、8%、92%、100%,且发现 $\beta$ -catenin的异位表达与患者淋巴结转移及其不良预后存在显著相关。Hugh等<sup>[18]</sup>也发现 $\beta$ -catenin的广泛的核表达及胞质表达揭示了肿瘤生长的异常性,且在对患者生存预后的判断上有统计学意义。本研究亦发现 $\beta$ -catenin的异位表达率在伴高度异型增生的TSA、普通腺瘤及CRC中明显增高,且差异有统计学意义。因此 $\beta$ -catenin胞膜至胞质表达异位的情况可作为结直肠上皮性肿瘤恶变的评估指标。

Wu等<sup>[19]</sup>对22例SSA和19例HP进行了 $\beta$ -catenin免疫组织化学染色观察,发现 $\beta$ -catenin在SSA中主要分布在基底部,而在HP中呈广泛阳性分布,其中发现9例SSA核表达阳性,无1例HP核表达阳性。Yachida等<sup>[20]</sup>观察到54例SSA中,35例(67%)存在 $\beta$ -catenin核异常表达,而HP 12例均无异常核表达(0/12),推测 $\beta$ -catenin在锯齿状病变的演变过程中起着重要作用,Wnt信号参与SSA的肿瘤进展过程。

本研究应用免疫组织化学方法发现 $\beta$ -catenin在TSA的阳性表达率为76.6%,普通腺瘤中70.0%,CRC中为95.2%;TSA与普通腺瘤之间差异无显著性,但与CRC之间差异具有统计学意义。观察发现 $\beta$ -catenin表达与异型增生程度密切相关,其中 $\beta$ -catenin在TSA伴轻、中、重度异型增生的阳性率分别为53.8%、100%、80%;在普通腺瘤伴轻、中、重度异型增生的阳性率分别为50.0%、83%、100%;CRC的阳性率为95.2%,与文献结果一致,提示Wnt信号同时参与锯齿状腺瘤与普通腺瘤癌变通路进程,同时与恶变程度相关。

根据免疫组织化学的结果,我们选取了具有细胞质异位表达的8例TSA、6例TA、5例VTA组织进行了测序,未发现一例病变存在 $\beta$ -catenin外显子3的突变,本研究中选取10例CRC作为对照,均无外显子3的突变。在本文中发现3例CRC局部核表达阳性,1例TSA局部核表达阳性,而TA及VTA无一例核表达阳性。因APC基因的突变亦会导致胞质内 $\beta$ -catenin的积聚,不能除外存在APC基因的突变,还有待于进一步进行APC基因突变的测定,Fukuchi等<sup>[21]</sup>亦发现CRC有 $\beta$ -catenin细胞质或细胞核聚集而无基因突变的情况,并分析其可能机制为:(1)存在第3外显子以外的基因突变;(2)轻微的APC改变;(3)Wnt家族蛋白的参与。因此 $\beta$ -catenin细胞质或核的聚集可能还有其他分子事件发生,有待于进一步的研究。

**志谢:**中国人民解放军252医院陈健医师、河北省巨鹿县医院张新忠医师收集提供病理切片及蜡块,对课题给予大力帮助,在此衷心感谢。

#### 4 参考文献

- 1 Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004; 53: 1137-1144
- 2 O'Brien MJ, Yang S, Clebanoff JL, Mulcahy E, Farraye FA, Amoroso M, Swan N. Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 423-434
- 3 O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amoroso M, Farraye FA. Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates sepa-

- rate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 1491-1501
- 4 Hao X, Tomlinson I, Ilyas M, Palazzo JP, Talbot IC. Reciprocity between membranous and nuclear expression of beta-catenin in colorectal tumours. *Virchows Arch* 1997; 431: 167-172
  - 5 Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170
  - 6 吴文新, 张祥宏.  $\beta$ -catenin及其通路相关基因在大肠腺瘤癌变中的意义. *癌症* 2001; 20: 1005-1007
  - 7 Wong SC, Lo SF, Cheung MT, Ng KO, Tse CW, Lai BS, Lee KC, Lo YM. Quantification of plasma beta-catenin mRNA in colorectal cancer and adenoma patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1613-1617
  - 8 Farris AB, Misdraji J, Srivastava A, Muzikansky A, Deshpande V, Lauwers GY, Mino-Kenudson M. Sessile serrated adenoma: challenging discrimination from other serrated colonic polyps. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 30-35
  - 9 Torlakovic EE, Gomez JD, Driman DK, Parfitt JR, Wang C, Benerjee T, Snover DC. Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 21-29
  - 10 East JE, Saunders BP, Jass JR. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am* 2008; 37: 25-46, v
  - 11 王鲁平, 杨光之, 周志勇, 李琳, 高宝琳, 陈健. 结直肠锯齿状病变104例形态学及细胞增殖活性的观察. *中华病理学杂志* 2009; 38: 100-105
  - 12 Xia J, Urabe K, Moroi Y, Koga T, Duan H, Li Y, Furue M. beta-Catenin mutation and its nuclear localization are confirmed to be frequent causes of Wnt signaling pathway activation in pilomatricomas. *J Dermatol Sci* 2006; 41: 67-75
  - 13 Maruyama K, Ochiai A, Akimoto S, Nakamura S, Baba S, Moriya Y, Hirohashi S. Cytoplasmic beta-catenin accumulation as a predictor of hematogenous metastasis in human colorectal cancer. *Oncology* 2000; 59: 302-309
  - 14 Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287: 1606-1609
  - 15 Cheah PY, Choo PH, Yao J, Eu KW, Seow-Choen F. A survival-stratification model of human colorectal carcinomas with beta-catenin and p27kip1. *Cancer* 2002; 95: 2479-2486
  - 16 Wong SC, Lo ES, Lee KC, Chan JK, Hsiao WL. Prognostic and diagnostic significance of beta-catenin nuclear immunostaining in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1401-1408
  - 17 汪洋, 林从尧, 周夏. 大肠癌中 $\beta$ -catenin表达及与COX-2、VEGF表达的关系. *肿瘤防治研究* 2006; 33: 20-22
  - 18 Hugh TJ, Dillon SA, Taylor BA, Pignatelli M, Poston GJ, Kinsella AR. Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: a survival analysis. *Br J Cancer* 1999; 80: 1046-1051
  - 19 Wu JM, Montgomery EA, Iacobuzio-Donahue CA. Frequent beta-catenin nuclear labeling in sessile serrated polyps of the colorectum with neoplastic potential. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 416-423
  - 20 Yachida S, Mudali S, Martin SA, Montgomery EA, Iacobuzio-Donahue CA. Beta-catenin nuclear labeling is a common feature of sessile serrated adenomas and correlates with early neoplastic progression after BRAF activation. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1823-1832
  - 21 Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 1998; 58: 3526-3528

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

# 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展

邵祥强, 肖华胜

## ■背景资料

肝纤维化是机体对各种病因引起的慢性肝损伤后的一种损伤修复反应, 所引起的肝硬化及肝硬化并发症影响着人类的健康, HSC的激活是肝纤维化发生过程中的一个重要事件. 在肝纤维化的诊断领域, 除了传统的肝活检技术, 新型分子标志物以及影像学诊断技术均为临床诊断提供了准确的诊断依据.

邵祥强, 中国科学院上海生命科学研究院系统生物学重点实验室功能基因组 中国科学院研究生院 上海市 200031  
肖华胜, 中国科学院上海生命科学研究院系统生物学重点实验室功能基因组 上海市 200031  
肖华胜, 生物芯片上海国家工程研究中心 上海市 201203  
国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目, No. 2006AA02A411  
作者贡献分布: 本文综述由邵祥强完成; 肖华胜审核.  
通讯作者: 肖华胜, 副研究员, 200031, 上海市, 中国科学院上海生命科学研究院系统生物学重点实验室功能基因组.  
huasheng\_xiao@shbiochip.com  
电话: 021-51320288  
收稿日期: 2010-09-19 修回日期: 2010-12-13  
接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-01-28

## Liver fibrosis: pathogenesis and clinical diagnosis

Xiang-Qiang Shao, Hua-Sheng Xiao

Xiang-Qiang Shao, Center for Functional Genomics, Key Laboratory of Systems Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences; Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

Hua-Sheng Xiao, Center for Functional Genomics, Key Laboratory of Systems Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

Hua-Sheng Xiao, National Engineering Center for Biochip at Shanghai, Shanghai 201203, China

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02A411

Correspondence to: Hua-Sheng Xiao, Center for Functional Genomics, Key Laboratory of Systems Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China. huasheng\_xiao@shbiochip.com

Received: 2010-09-19 Revised: 2010-12-13

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-01-28

## Abstract

Hepatic fibrosis represents a wound healing response to liver injury due to various causes. Cirrhosis is the most advanced stage of fibrosis and, along with its complications, constitutes one of the major causes of morbidity and mortality worldwide. Past decades have witnessed tremendous progress in understanding the mechanisms of hepatic fibrosis. Activation of hepatic stellate cells is a key event in fibrosis, while a wide range of cytokines and their receptors and inflammatory cell subsets participate in the dy-

namic regulation of fibrosis progression. In terms of the diagnosis of hepatic fibrosis, novel serum markers and transient elastography have helped a lot in the assessment of liver fibrosis in addition to traditional liver biopsy. These findings both in the mechanism of liver fibrosis and the diagnosis of fibrosis are important for the implementation of rationally based approaches to limit fibrosis, accelerate repair and enhance liver regeneration in patients with chronic liver disease.

Key Words: Liver fibrosis; Hepatic stellate cells; Fibrogenesis; Diagnosis; Liver biopsy; Serum biomarker

Shao XQ, Xiao HS. Liver fibrosis: pathogenesis and clinical diagnosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 268-274

## 摘要

肝纤维化是机体对各种病因引起的慢性肝损伤后的一种损伤修复反应, 慢性肝病发展至最后将发展成为肝硬化, 肝硬化及其并发症威胁着全球居民的生命健康. 在过去的几十年中, 人们在肝纤维化的发生机制方面已经取得了很大的进展. HSC的激活是肝纤维化发生过程中的一个重要事件, 同时各类细胞因子与其对应受体; 以及各类炎症细胞均在纤维化发展过程中扮演着重要的角色. 在肝纤维化的诊断领域, 除了传统的肝活检技术, 新型分子标志物以及影像学诊断技术均为临床诊断提供了准确的诊断依据. 肝纤维化发生机制与诊断技术领域所取得的重大发现, 给慢性肝病患者的纤维化治疗以及康复带来了新的曙光.

关键词: 肝纤维化; 肝星状细胞; 纤维化发生; 诊断; 肝活检; 血清学标志物

邵祥强, 肖华胜. 肝纤维化发病机制与临床诊断的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 268-274

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/268.asp>

## 0 引言

肝纤维化是指肝脏内弥漫性细胞外基质(特别是胶原物质)过度沉积, 是机体对各种病因引起的

## ■同行评议者

高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

慢性肝损伤后的一种损伤修复反应<sup>[1]</sup>, 是肝硬化的早期可逆阶段. 如不及时治疗则可能进展成为失代偿期肝硬化并出现各种终末期肝病并发症<sup>[2]</sup>, 肝硬化及其并发症已经成了全球发病与死亡的主要因素, 肝纤维化是很多肝病终末期阶段复杂病症发生的基础, 如肝门静脉高压、肝腹水、合成功能紊乱、代谢能力受损等等. 因此, 肝纤维化的深入研究对缓解肝纤维化病情具有重要的临床意义.

大部分慢性肝病患者, 尽管肝脏被持续刺激长达十多年, 但是因为肝脏显著的再生能力纤维化的发展仍是比较缓慢的. 然而, 纤维化的发展进程往往又会发生改变, 这就促使着我们去揭秘纤维化的发病机制, 以及控制肝损伤沉积速度的遗传因素.

在肝纤维化的临床诊断上, 通常认为肝活检是肝纤维化分期诊断的金标准. 然而, 肝活检也存在着一定的局限性, 例如样本误差、不同阅片者之间的偏倚、昂贵的检查费用、患者承受的巨大痛苦等, 这些局限性使得人们寻找新的方法以代替肝活检对肝纤维化进行诊断.

本文将就肝纤维化的发病机制以及临床诊断方面的研究进展情况进行具体介绍.

## 1 肝纤维化的发生机制

肝纤维化的形成是一个相当复杂的过程, 他涵括了肝细胞的凋亡、间充质细胞的增殖、细胞外基质中 I 型胶原蛋白; III型胶原蛋白的沉积等过程<sup>[3]</sup>. 细胞外基质的沉积破坏了肝脏的正常组织学结构, 最终导致了肝硬化的发生

**1.1 细胞外基质在正常肝与纤维化肝中的细胞来源** 肝纤维化过程中, 细胞外基质细胞来源的确定是纤维化发生机制及纤维化治疗研究工作中的一个巨大进步. 在正常肝及纤维化肝中, 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是主要细胞来源<sup>[4]</sup>, 另外, 某些间充质细胞也在细胞外基质的沉积中起到了重要的作用, 如: 肝门成纤维细胞<sup>[5]</sup>, 骨髓分化而来的相关细胞<sup>[6]</sup>, 以及表皮细胞-间充质细胞转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程形成的成纤维细胞等<sup>[7]</sup>. EMT转换在肾脏中比较典型, 但是其在肝纤维化过程中的扮演的角色日益受到人们的关注.

HSC处于肝实质细胞与窦状小管内皮层细胞之间<sup>[8]</sup>, 是人体内储存维生素A的一类细胞. HSC具有促纤维形成的潜力且并不局限于肝脏中, 在慢性胰腺炎及胰腺癌患者的胰腺中也发

现了这类星形细胞<sup>[9]</sup>. 正常情况下, HSC处于静息状态并且只产生少量的细胞外基质组分用于基质膜的形成<sup>[10]</sup>.

**1.2 HSC的激活机制** 在肝纤维化的病理学研究中, 人们通常以HSC的激活为基础来展开研究. HSC的整个激活过程包括两个重要的阶段: 起始阶段和永久阶段<sup>[11]</sup>, 紧接着便是炎症消退阶段. 起始阶段: 起始阶段同样也称作炎症前阶段, 代表使得细胞能够对外界细胞因子及刺激产生反应的早期基因表达与表型变化. 起始阶段主要是由细胞外基质环境的变化以及受损肝细胞产生的过氧化物等产物所引起的. 永久阶段: 永久阶段主要源于那些为维持活化表型并促进纤维化产生的刺激效应. 永久阶段包括增殖, 收缩, 纤维形成, 基质降解, 维生素A损失等几个分散过程. 炎症的消退阶段: 炎症的消退则指促进HSC凋亡或者使得HSC转变至静息状态的过程.

**1.2.1 起始阶段:** HSC激活初始阶段的变化是由于相邻细胞(如窦状小管内皮细胞, 肝细胞以及血小板等)的旁分泌刺激引起的. 肝细胞在膜损伤及脂过氧化作用过程中可以为纤维化的产生提供活性氧<sup>[12]</sup>. 受损伤后死亡的肝细胞可以通过Fas的调节来激发HSC的起始阶段, 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导性配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)也参与了这个过程. 从肝实质细胞中释放出来的凋亡片段对于成熟的HSC和Kupffer细胞来说是促进纤维生成的<sup>[13]</sup>, Kupffer细胞的浸润与激活同样对HSC的激活起着重要的作用. Kupffer细胞通过细胞因子[尤其是转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF $\beta$ 1)]与活性氧物质的作用促进基质的合成, 细胞的增殖以及HSC中维生素A的释放<sup>[14]</sup>. 窦状小管内皮细胞同样也促进TGF $\beta$ 从潜伏状态转变为活化状态; 促进某种纤连蛋白的产生以促使早期HSC的激活. 血小板也通过血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF), TGF $\beta$ , 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)提供旁分泌刺激.

**1.2.2 永久阶段:** 在HSC激活的永久阶段, 细胞在行为上至少有6种不同的表现: 增殖、趋化、纤维生成、收缩、基质降解以及维生素A的流失. 整个变化的网络体系促进了细胞外基质的沉积并加速正常细胞外基质被损伤痕迹所代替. (1)增殖: PDGF是目前为止发现的最有效的HSC促分裂剂<sup>[15]</sup>. 在HSC中, PDGF的下游信号

### ■ 研发前沿

目前肝纤维化的发病机制是研究纤维化分子治疗领域的重点, 热点; 而在纤维化的诊断领域, 人们正在努力寻求可以用于肝纤维化精确诊断的新型分子标志物.



### ■相关报道

Hsieh等报道了Fibroscan这种全新的、非创伤性的临床检测方法,用于肝纤维化的准确诊断,这是一种可重复且不依赖于操作者的检测方法。

通路包括PI3激酶以及ERK/MAP激酶等<sup>[16]</sup>。另外,血管内皮细胞生长因子<sup>[17]</sup>,凝血酶及其受体,EGF, TGF $\alpha$ , 角质化细胞生长因子<sup>[18]</sup>及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)<sup>[19]</sup>等在HSC中也具有促有丝分裂能力及促纤维形成能力。这些有丝分裂原在HSC中的信号通路已经被阐释清楚,从而为临床干扰治疗提供了很多潜在的靶点<sup>[20]</sup>;(2)趋化: HSC细胞在细胞因子化学诱导剂的作用下可以发生迁移现象<sup>[21]</sup>。人们已经鉴定出很多这样的化学诱导剂,比较显著的包括PDGF, 单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein, MCP-1), 趋化因子受体(chemokine receptor 3, CXCR3)<sup>[22]</sup>。相反,人们发现,阿糖腺苷可以弱化这种趋化现象,并且在细胞到达损伤处之后停止移动。HSC的这种特征性趋化现象的机制目前已经被人们揭示,研究发现,顶端细胞的扩散以及胞体向诱导剂方向移动跟PDGF的刺激相关,而细胞拖尾的突触缩回则跟肌球蛋白的瞬间磷酸化相关<sup>[23]</sup>;(3)纤维的形成: HSC同时通过增加细胞的数目以及每个细胞的细胞外基质的生成量来实现纤维化。在肝脏损伤中研究得最多的是I型胶原蛋白, I型胶原蛋白在HSC中的表达可以通过转录调控及转录后调控两种方式被很多种刺激及信号通路所调控。TGF $\beta$ 1有旁分泌和自分泌两种来源,刺激HSC产生I型胶原蛋白及其他基质组分的能力最强<sup>[24]</sup>。TGF $\beta$ 的下游信号分子中有一类具有双重功能的分子家族Smads, Smads调节很多胞外及胞内信号,并增强TGF $\beta$ 在纤维生成过程中的影响。TGF $\beta$ 1同样可以促进很多种其他胞外基质成分如细胞纤连蛋白, 蛋白多糖等的产生<sup>[25]</sup>。另外除了Smads调控之外, TGF $\beta$ 1还可以通过过氧化物的还原以及依赖于C/EBP $\beta$ 等的机制来促进HSC产生胶原蛋白。另外, Smads在急性肝损伤与慢性肝损伤中的反应也是不同的<sup>[26]</sup>。脂类物质的过氧化产物也是细胞外基质产生的一种重要刺激源<sup>[27]</sup>。这种刺激作用会随着HSC在激活过程中抗氧化能力的丧失而被放大,这就给利用抗氧化剂对各种肝脏疾病进行治疗提供了理论依据。同时,结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)对于HSC来说也是一种促纤维生成信号<sup>[28]</sup>,并且可以因高血糖及胰岛功能亢奋等因素而表达上升;(4)收缩: HSC的收缩是肝纤维化早期及晚期中肝门抗性上升的一个重要因素。晚期肝硬化患者中分离得到的胶原蛋白束中含有大量的活化HSC,他

通过对肝脏整体的压缩以及对单个窦状小管的压迫阻碍肝门部位的血液流动。HSC在活化的过程中可以获得伸缩性的现象已经通过体外培养及体内实验得到证明,且该过程通过钙离子受体调控与细胞外基质发生相互作用<sup>[29]</sup>。内皮因子-1与一氧化氮是HSC收缩性调节的对立调节因子,除此之外,血管收缩素II, 生长激素抑制素, 一氧化碳等都是HSC收缩性调节因子。同时,随着HSC的激活,细胞骨架蛋白 $\alpha$ -SMA的表达也会上升,同样为细胞的伸缩能力提供了支撑;(5)细胞外基质的降解: 肝纤维化是一个细胞外基质生成与降解的动态平衡过程。因此,跟基质的生成一样,肝纤维化过程中的细胞外基质降解对于纤维化治疗来说也是一个可以调控的过程。基质降解蛋白酶催化正常肝胞外基质的分解,促使胞外正常基质被损伤基质所取代,从而对细胞的功能造成损害。从另外一个方面来说,对慢性肝病患者增生的细胞外基质进行再吸收可以逆转肝功能失调以及肝门脉高压的情况。

在过去的这些年中,细胞外基质重构的机制研究已经有了很大的进展。其中,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),起着重要的作用, MMP是一类钙离子依赖性的蛋白酶。HSC是MMP-2, MMP-9, MMP-13主要来源<sup>[30]</sup>,同时,处于静息状态的MMP-2的激活需要肝实质细胞的共同作用。在肝硬化患者中, MMP-2的表达显著上升<sup>[31]</sup>。MMP-1是I型胶原蛋白的主要蛋白酶,且I型胶原蛋白是纤维化肝脏中的主要胶原蛋白,然而,这种酶的来源目前却不清楚, HSC中虽然可以检测到MMP-1 mRNA的表达,却检测不到有活性的MMP-1<sup>[32]</sup>。

MMP活性的调控表现在多个水平上: 可以通过与基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP)的结合来抑制MMP的活性。HSC能够分泌具有活性的TIMP-1, TIMP-2。在肝损伤过程中,这类蛋白酶的释放可以抑制间隙胶原蛋白酶的活性,从而导致聚集的基质无法降解。同时TIMP-1可以抑制HSC的凋亡,因此, TIMP-1的持续表达可以增加活性HSC的数目<sup>[33]</sup>。

1.2.3 炎症的消退阶段: 在我们寻求肝纤维化治疗的过程中, HSC的激活是如何被消退的便成了一个重要的议题。我们可以通过两种途径来减少活性HSC的数目,从而将活性HSC逆转至静息状态; 或者通过凋亡途径实现HSC的清除。

在体外实验中,人们已经成功地将处于活化状态的HSC逆转为基膜基质<sup>[34]</sup>,但是在体内还未能实现。

同时,有很多报导表明在肝纤维化缓解的过程中,HSC可发生凋亡<sup>[35]</sup>。在细胞培养实验中,HSC对CD95-L以及TRAIL控制的凋亡途径比较敏感,且NK细胞可以通过TRAIL调控的机制诱导HSC发生凋亡<sup>[36]</sup>。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)对HSC也有促凋亡作用。在最近的一项研究中,NK细胞的抗纤维化作用已被证实,在NK细胞敲除的小鼠体内,纤维化程度加深;而当NK细胞被重新活化之后,纤维化程度缓解<sup>[36]</sup>。且NK细胞诱导的HSC凋亡只对有NK细胞活化受体NKG2D表达的HSC有效,同时,NK细胞的功能也是依赖于IFN $\gamma$ 的,这同时也验证了先前人们发现的IFN $\gamma$ 抗纤维化作用。除了NK细胞,活化的Kupffer细胞同样可以通过caspase 9以及受体相互作用的机制诱导HSC发生凋亡<sup>[37]</sup>。既然NK细胞可以通过促进HSC凋亡来抑制肝纤维化的发生,那么我们可以推测NK细胞的功能在纤维化进展迅速的患者中相对那些纤维化进展缓慢的患者来说是有所削弱的。这就部分解释了为什么纤维化会随着年龄而加重,因为NK细胞的功能会随着年龄的增长而退化。

1.3 宿主基因型是影响纤维化进展的内在决定因素 研究发现,基因型在肝损伤时HSC的活化过程中起着重要的作用,并以单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的形式表现出来<sup>[38]</sup>。全基因组扫描等高通量基因组学技术已经被广泛应用于筛选与肝纤维化进展相关的基因位点。在一些研究中,发现了先前从未报道的与肝纤维化相关的基因,从而揭示了肝创伤痕迹产生与降解的新的调控通路。而在某些研究报告中,会发现某些基因发生了序列上的突变,如Toll样受体4(toll like receptor 4, TLR4)基因。曾有报道综合7个SNP位点并制定出一个肝硬化风险系数用于评估患者感染HCV病毒之后发展成为肝硬化的风险概率<sup>[38]</sup>。这样的信息对于临床上的个体化治疗非常有意义。

目前,人们已经在肝纤维化发展相关的宿主调控基因的筛选与鉴定工作上取得了很大的进展,同样,人类自身的免疫相关因子也在纤维化的发病机理中扮演着重要的角色。研究发现,在HCV感染过程中,Th1细胞因子反应的程度往往与肝损伤及纤维化程度成正比<sup>[39]</sup>。在HCV, HIV共同感染的患者中,纤维化的程度往往要比

表 1 常用的纤维化 I 类标志物

标志物	诊断方法	灵敏度(%)	特异性(%)
III型胶原N端肽	放射免疫测定法	78	81
透明质酸	ELISA	86-100	88
层粘蛋白	放射免疫测定法	80	83
YKL-40	酶免疫分析法 放射免疫测定法	78	81
TIMP-1, TIMP-2	ELISA	67	69

一般患者严重,这也暗示了免疫系统在纤维化的进展过程中起着一定的调节作用<sup>[40]</sup>。另外,雌激素可能对纤维化的发生起着一定的抵御作用,因为人们发现女性患者比男性患者的纤维化进展过程要缓慢一些<sup>[41]</sup>。

## 2 肝纤维化的诊断

一直以来,肝活检通常被人们当做肝纤维化诊断的金标准。然而,肝活检本身也存在着一定的缺陷,比如说给患者带来的痛苦及风险,取样过程中产生的误差以及不同阅片者对纤维化等级鉴定结果的误差等。因此人们一直在寻找着能够代替肝活检的非创伤性诊断标志物。理想的标志物应该是肝纤维化特异性的,能够对纤维化进行准确分级,不受其他并发症的影响,并且具有灵敏、可重复、经济节约等特点。

2.1 纤维化 I 类标志物 很多研究发现了一些能够反映肝细胞外基质降解情况的适用型血清标志物,包括透明质酸,层粘连蛋白,IV型胶原蛋白, MMP, TIMP-1等等(表1)。在这些标志物中,透明质酸具有大概86%-100%的灵敏度以及88%的特异性<sup>[42]</sup>。透明质酸由活化的HSC分泌,且直接进入窦状小管中,因此,血清中的透明质酸的水平可以直接反映HSC细胞的活动程度,并间接反映了纤维化的进展状况。而其他血清学标志物的诊断标准在不同的研究中则在一定的值域内呈波动状态<sup>[43]</sup>。很有可能是由于这些标志物并不是纤维化特异性的,因为在自身免疫疾病,肾脏疾病,胰腺炎以及肺纤维化中也有这些标志物指数上升的报道。对C型肝炎长期抗肝硬化的治疗数据显示:将透明质酸, TIMP-1, 以及血小板数目三者结合的诊断模型要比其他报道的一些诊断模型要更加准确。当然,我们还需要对这些标志物进行进一步的验证实验,并且将他们与其他的血清标志物进行比较,如FibroTest, Hepascore等<sup>[44]</sup>。一个新的方法是测量慢性肝病

## ■创新盘点

肝纤维化的发病机制及其临床诊断是目前肝病研究领域的一大热点,但是国内很少有研究者综合这两方面进行详细总结。本文就肝脏星形细胞的激活对肝纤维化的发病机制进行了详细总结,并对纤维化临床诊断领域的传统方法与最新技术进行了总结概括。对广大的医学工作者有很好的参考作用。

### ■应用要点

肝纤维化发病机制的研究,可以为肝纤维化的治疗提供新的治疗靶点;而肝纤维化诊断领域的研究,可以加速新的临床诊断方法的应用,可以更加准确地对肝纤维化进行诊断,并减少患者的痛苦。

表 2 常用的纤维化 II 类间接标志物/指数

标志物/指数	参数	灵敏性(%)	特异性(%)
APRI	AST, 血小板数目	89	75
FibroTest	结合珠蛋白, $\alpha_2$ -巨球蛋白, 载脂蛋白	75	85
Forn's指数	年龄, 血小板数目, 谷氨酰转氨酶, 胆固醇	94	91
Hepascore	年龄, 性别, 胆红素, 谷氨酰转氨酶, 透明质酸, $\alpha_2$ -巨球蛋白	63	89

患者血清中细胞角质蛋白18磷酸化水平<sup>[45]</sup>, 从而成为细胞中蛋白酶活性以及凋亡情况的替代性标志物, 在HCV感染患者中, 这种检测方法已经达到85.7%的灵敏度以及99.9%的特异性。

2.2 纤维化 II 类标志物 对纤维化进行诊断的第二种方法往往是根据常规血液检查来判断的, 用于检测肝脏合成功能的变化。通常需要检查的标志物包括血小板数目, 胆红素, 转运蛋白, ECM参数, 丙氨酸转氨酶(alanine amino transferase, ALT), 谷草转氨酶(aspartate amino transferase, AST)等等。这些检查项目可以通过统计学方法被编辑成各种生化评分系统。通常有APRI, FibroTest, Forn's指数等<sup>[46]</sup>(表2)。最为常用的是FibroTest, 他可以对各个阶段的纤维化进行分类, 但是, FibroTest的弊端就在于他使用3种不常规的检测参数, 因此必须对实验室检测标准进行统一。将APRI, FibroTest, Forn's指数3种运算方法有序地结合起来可以使得诊断结果更加准确, 使得50%-70%的HCV感染患者没有必要进行肝活镜检查<sup>[47]</sup>。

尽管这些血清学标志物可以作为肝纤维化诊断的有力工具, 但是, 他们的不足之处就在于利用这些标志物无法反应纤维化早期的微小变化<sup>[48]</sup>。

2.3 纤维化的影像学诊断 对肝脏进行的超声成像技术仅局限应用于那些已经发展成肝硬化的患者。而FibroScan则是一种全新的, 非创伤性的临床检测方法<sup>[49]</sup>, 他通过对肝脏的硬度进行检测从而对纤维化做出诊断判断。通过对慢性丙肝患者的研究表明FibroScan可以检测显著性的纤维化, 对于METAVIR等级 $\geq 2$ 的患者其工作特征曲线下面积可达到0.79, 而对于肝硬化患者其工作特征曲线下面积可达到0.97<sup>[50]</sup>。同时, 研究还发现, 利用FibroScan可以检测出丙肝患者在接受肝移植之后复发时的移植性肝纤维化<sup>[51]</sup>。利用FibroScan对肝硬度进行测定是一种可重复的, 且不依赖于操作者的检测方法, 可应用于临床上肝硬化患者的诊断。然而FibroScan的缺陷在于其无法对肥胖患者做出正确的诊断, 因为信

号穿透的深度是有限的; 同时, 由于肝脏的硬度随着年龄会发生变化, 因此还需要对检测结果进行深入的标准化的分析。近些年, 随着技术的发展, 已经将核磁共振成像技术应用于肝脏的临床检测<sup>[52]</sup>, 而且, 已经有越来越多的研究将核磁共振谱引入到肝纤维化检测中来。然而这些研究大多样本量比较少, 因此, 对核磁共振在纤维化检测上的应用还需要更加标准化的实验来检测验证, 核磁共振成像技术很有可能为肝脏的病理生理学研究带来更多的有效生物学信息。

### 3 结论

在过去的几十年中, 肝纤维化发病机制方面的研究已经取得了很大的进展, 人们已经揭示出细胞外基质的细胞来源, 并且HSC激活的各个阶段过程中的调控通路也在慢慢被研究人员逐步向人们展示。在纤维化的诊断技术上, 除了传统的肝活检技术, 也出现了一些新的分子标志物, 用于诊断评估纤维化的发展情况, 同时, 影像学技术也为纤维化的诊断提供了大量的诊断信息, 在临床上若能将这几种诊断方法结合起来, 则能够更有效准确地纤维化进行诊断。

不管是纤维化发病机制还是纤维化的诊断方面的研究, 最终目的都是希望能够优化纤维化的临床治疗, 干预或逆转纤维化的发生。随着纤维化发病机制的研究不断深入, 将会给临床治疗提供越来越多的治疗靶点; 并且, 新的诊断技术的出现, 使得纤维化的临床诊断变得更为准确, 能够帮助医生确定诊疗方案。在今后的研究工作中, 随着后基因组时代的到来, 更多的基因多态性信息以及基因的表达谱信息将给纤维化的临床治疗提供更多的诊断信息。随着实验室研究工作与临床实际应用的结合, 将给慢性肝病患者的有效抗纤维化治疗带来新的曙光。

### 4 参考文献

- 1 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibro-

- sis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 2 Ismail MH, Pinzani M. Reversal of liver fibrosis. *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15: 72-79
  - 3 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
  - 4 Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
  - 5 Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett* 2004; 559: 107-110
  - 6 Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 955-963
  - 7 Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776-1784
  - 8 Friedman SL. Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53
  - 9 Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandolfi SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 50-59
  - 10 Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 311-335
  - 11 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
  - 12 Novo E, Marra F, Zamara E, Valfrè di Bonzo L, Caligiuri A, Cannito S, Antonaci C, Colombatto S, Pinzani M, Parola M. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut* 2006; 55: 90-97
  - 13 Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003; 38: 1188-1198
  - 14 Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006; 26: 1175-1186
  - 15 Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46: 1064-1074
  - 16 Lechuga CG, Hernández-Nazara ZH, Hernández E, Bustamante M, Desierto G, Cotty A, Dharker N, Choe M, Rojkind M. PI3K is involved in PDGF-beta receptor upregulation post-PDGF-BB treatment in mouse HSC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1051-G1061
  - 17 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Wu Y, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Masaki T, Fukui H. Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut* 2003; 52: 1347-1354
  - 18 Steiling H, Mühlbauer M, Bataille F, Schölmerich J, Werner S, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol* 2004; 165: 1233-1241
  - 19 Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, Miller DL, Basilico C, McKeehan WL. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am J Pathol* 2003; 163: 1653-1662
  - 20 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 397-416
  - 21 Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 417-426
  - 22 Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 9945-9954
  - 23 Melton AC, Yee HF. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis. *Hepatology* 2007; 45: 1446-1453
  - 24 Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007; 56: 284-292
  - 25 George J, Wang SS, Sevcsik AM, Sanicola M, Cate RL, Koteliensky VE, Bissell DM. Transforming growth factor-beta initiates wound repair in rat liver through induction of the EIIIA-fibronectin splice isoform. *Am J Pathol* 2000; 156: 115-124
  - 26 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35: 49-61
  - 27 Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Di Sario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1998; 27: 720-726
  - 28 Gao R, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 2004; 279: 8848-8855
  - 29 Melton AC, Datta A, Yee HF Jr. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-independent contractile force generation by rat hepatic stellate cells in response to endothelin-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G7-G13
  - 30 Han YP. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21 Suppl 3: S88-S91
  - 31 Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110: 821-831
  - 32 Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabrà<sup>3</sup> A, Ciancio G, Stefanini F. Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1994; 144: 528-537
  - 33 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 11069-11076
  - 34 Gaça MD, Zhou X, Issa R, Kiriella K, Iredale JP, Benyon RC. Basement membrane-like matrix inhibits

■同行评价  
本文选题恰当, 具有较好的可读性和科学性。

- proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol* 2003; 22: 229-239
- 35 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 427-436
- 36 Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006; 130: 435-452
- 37 Fischer R, Carriers A, Reinehr R, Häussinger D. Caspase 9-dependent killing of hepatic stellate cells by activated Kupffer cells. *Gastroenterology* 2002; 123: 845-861
- 38 Huang H, Shiffman ML, Friedman S, Venkatesh R, Bzowej N, Abar OT, Rowland CM, Catanese JJ, Leong DU, Sninsky JJ, Layden TJ, Wright TL, White T, Cheung RC. A 7 gene signature identifies the risk of developing cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2007; 46: 297-306
- 39 Baroni GS, Pastorelli A, Manzin A, Benedetti A, Marucci L, Solforosi L, Di Sario A, Brunelli E, Orlandi F, Clementi M, Macarri G. Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver* 1999; 19: 212-219
- 40 Di Martino V, Lebray P, Myers RP, Pannier E, Paradis V, Charlotte F, Moussalli J, Thabut D, Buffet C, Poynard T. Progression of liver fibrosis in women infected with hepatitis C: long-term benefit of estrogen exposure. *Hepatology* 2004; 40: 1426-1433
- 41 Poynard T, Ratzu V, Charlotte F, Goodman Z, McHutchison J, Albrecht J. Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *J Hepatol* 2001; 34: 730-739
- 42 Guéchet J, Laudat A, Loria A, Serfaty L, Poupon R, Giboudeau J. Diagnostic accuracy of hyaluronan and type III procollagen amino-terminal peptide serum assays as markers of liver fibrosis in chronic viral hepatitis C evaluated by ROC curve analysis. *Clin Chem* 1996; 42: 558-563
- 43 Plebani M, Basso D. Non-invasive assessment of chronic liver and gastric diseases. *Clin Chim Acta* 2007; 381: 39-49
- 44 Calès P, Oberti F, Michalak S, Hubert-Fouchard I, Rousselet MC, Konaté A, Gallois Y, Ternisien C, Chevaller A, Lunel F. A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology* 2005; 42: 1373-1381
- 45 Shi Y, Sun S, Liu Y, Li J, Zhang T, Wu H, Chen X, Chen D, Zhou Y. Keratin 18 phosphorylation as a progression marker of chronic hepatitis B. *Virology* 2010; 7: 70
- 46 Török NJ. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2008; 43: 315-321
- 47 Pinzani M, Vizzutti F, Arena U, Marra F. Technology Insight: noninvasive assessment of liver fibrosis by biochemical scores and elastography. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 95-106
- 48 Lackner C, Struber G, Liegl B, Leibl S, Ofner P, Bankuti C, Bauer B, Stauber RE. Comparison and validation of simple noninvasive tests for prediction of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 1376-1382
- 49 Hsieh YY, Tung SY, Lee IL, Lee K, Shen CH, Wei KL, Chang TS, Chuang CS, Wu CS, Lin YH. FibroQ: an easy and useful noninvasive test for predicting liver fibrosis in patients with chronic viral hepatitis. *Chang Gung Med J* 2009; 32: 614-622
- 50 Ziol M, Handra-Luca A, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, de Lédizinghen V, Marcellin P, Dhumeaux D, Trinchet JC, Beaugrand M. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 48-54
- 51 Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castéra L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de Lédizinghen V. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut* 2006; 55: 403-408
- 52 Faria SC, Ganesan K, Mwangi I, Shiehmorteza M, Viamonte B, Mazhar S, Peterson M, Kono Y, Santillan C, Casola G, Sirlin CB. MR imaging of liver fibrosis: current state of the art. *Radiographics* 2009; 29: 1615-1635

编辑 李薇 电编 李薇

# 小鼠部分肝切除术的现状与应用

李一, 胡建军, 韩伟, 俞雁

李一, 俞雁, 上海交通大学农业与生物学院兽医生物技术上海市重点实验室 上海市 200240

胡建军, 上海交通大学医学院附属上海市第六人民医院感染科 上海市 200233

韩伟, 上海交通大学药学院再生医学实验室 上海市 200240

作者贡献分布: 本综述由李一与胡建军完成; 韩伟与俞雁审校。

通讯作者: 俞雁, 教授, 博士生导师, 200240, 上海市闵行区东川路800号, 上海交通大学农业与生物学院兽医生物技术上海市重点实验室. yanyu@sju.edu.cn

电话: 021-34205769

收稿日期: 2010-11-12 修回日期: 2010-12-18

接受日期: 2010-12-29 在线出版日期: 2011-01-28

## Partial hepatectomy in mice: current status of research and implications for clinical practice

Yi Li, Jian-Jun Hu, Wei Han, Yan Yu

Yi Li, Yan Yu, Shanghai Municipality Key Laboratory for Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China  
Jian-Jun Hu, Department of Infectious Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Wei Han, Laboratory for Regenerative Medicine, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Correspondence to: Professor Yan Yu, Shanghai Municipality Key Laboratory for Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China. yanyu@sju.edu.cn

Received: 2010-11-12 Revised: 2010-12-18

Accepted: 2010-12-29 Published online: 2011-01-28

## Abstract

The classic model of partial hepatectomy was first established in the 1930s and played a key role in the research of liver regeneration and liver disease in mammals. Rats and mice are the most commonly used animals for research, but surgery is usually performed in rats. Considering many differences between rats and mice, this paper aims to summarize the crucial points in the surgical procedure for mice and the principles and methods of partial hepatectomy.

**Key Words:** Partial Hepatectomy; Liver regeneration; Mouse

Li Y, Hu JJ, Han W, Yu Y. Partial hepatectomy in mice: current status of research and implications for clinical practice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 275-280

cal practice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 275-280

## 摘要

部分肝切除术创建于20世纪30年代, 他为哺乳动物的肝再生和肝疾病等研究提供了重要的实验工具, 现有的手术方法主要以大鼠和小鼠为对象. 小鼠的部分肝切除手术与大鼠的手术方法有较大的相似性, 但因其体质差异不能完全复制大鼠的手术方法. 本文结合文献报道和实践操作的经验, 除了对部分肝切除术的原理和主要方法进行介绍外, 也对小鼠部分肝切除手术流程及其关键控制点进行了总结.

**关键词:** 肝部分切除术; 肝再生; 小鼠

李一, 胡建军, 韩伟, 俞雁. 小鼠部分肝切除术的现状与应用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(3): 275-280

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/275.asp>

## 0 引言

早在1931年, Higgins和Anderson建立了大鼠部分肝切除(partial hepatectomy, PH)模型<sup>[1]</sup>. 几十年来, 哺乳动物的肝切除手术已经广泛应用于肝再生、肝肿瘤和急慢性肝衰竭等模型<sup>[2-10]</sup>. 鼠类肝的分叶结构比较明显, 每叶各具有肝蒂及肝门静脉分支, 且占总肝质量的比例各不相同, 因此可根据不同的实验要求进行不同程度的肝切除. 对大鼠进行肝切除手术仅需要具备基本的外科手术技能, 可重复性高且死亡率低<sup>[1,6,10-14]</sup>. 但是当今基于基因组学的模式动物肝再生研究中, 小鼠肝切除模型的地位也越来越重要; 通过对基因敲除小鼠施行部分肝切除术已经成为研究特定基因对肝再生影响的一个经典策略<sup>[15-25]</sup>. 然而, 小鼠对手术的耐受性不及大鼠, 实际手术过程的复杂性和细致性也相对较高, 因此不能完全复制大鼠的肝切手术方法. 下文对大鼠和小鼠PH模型(主要是小鼠模型)的研究进展进行了综述并根据实践经验对小鼠部分肝切除术进行了总结.

## ■背景资料

肝脏是机体中最大的消化器官, 也是体内新陈代谢的重要场所, 具有强大再生能力. 而临床上大量肝衰竭、肝硬化等肝再生不足的病例, 使得肝再生机制研究及治疗肝再生障碍类疾病的药物研发成为一个热点, 而哺乳动物的部分肝切除术是公认的研究肝再生最经典的模型.

## ■同行评议者

李华, 副教授, 中山大学附属第三医院肝脏外科

## ■ 研发前沿

肝再生一直以来是医学领域研究的热点. 部分肝切除术是目前肝再生机制研究及治疗肝再生障碍类疾病研发工作中最重要的动物模型, 然而该模型相比临床真实病例中的肝状况还有一定差距, 如何进一步建立复杂病理基础上的肝切除模型(如肝硬化基础上的肝癌切除术)是亟待解决的问题.

## 1 PH后肝再生模型

肝再生一直以来是医学领域研究的热点. 临床上大量患者因肝再生不足(如肝衰竭)等病症急需药物治疗, 而目前对肝再生的机制还没有完全阐明, 能直接促进肝再生的药物研发也尚处在实验室阶段.

肝脏在受到损伤后就立即开始了再生过程. 在对大鼠进行肝切除后的16 h内, DNA复制开始, 在70%肝切除的经典模型中, 肝脏的剩余部分在切除后24 h代偿性增生至原肝质量的45%, 72 h后达到70%, 7-14 d达到93%, 并在大约20 d时基本恢复至原肝质量<sup>[1]</sup>. 同样, 人类的肝再生也非常迅速, 在活体肝脏移植中, 捐助者的剩余肝脏在7 d内增生了1倍, 而受助者接受移植的肝叶后, 达到同样的增生结果也仅仅需要14 d, 两者都在手术后1 mo左右分别恢复到各自的原始肝质量<sup>[26,27]</sup>.

肝再生的速度和肝被切除的比例呈现一定正相关, 切除比例越大, 肝再生速度越快. 但是肝切除的比例过大(>85%)或者过小(<30%)都会导致肝细胞再生减缓<sup>[28]</sup>. 同时有研究表明, 肝脏各独立肝叶的再生能力也有显著差异<sup>[29]</sup>.

哺乳动物肝再生的过程和人类相似, 从动物模型中获得的某些结论也能很好地应用到人类肝脏的研究中<sup>[28]</sup>. 目前, PH是研究肝再生机制及药物研发过程中最常用的实验手段, 大鼠和小鼠肝切除模型是研究较为广泛和深入的肝再生模型<sup>[1,11,30,31]</sup>.

## 2 小鼠PH模型的研究现状

**2.1 小鼠肝解剖示意** 小鼠和大鼠在肝组成方面的一个显著区别是小鼠含有胆囊, 而大鼠没有胆囊. 此外, 他们在肝体积和各自分叶比重等方面也有所不同. 基本上, 小鼠和大鼠在基本的肝脏分叶结构, 肝静脉和门静脉的分支, 以及胆道系统等方面都是类似的<sup>[32]</sup>.

小鼠的肝主要由4个部分组成: 中叶(median lobe, ML)、左外叶(left lateral lobe, LLL)、右叶(right liver lobe, RLL)和尾叶(caudate lobe, CL). 各叶间的叶间裂明晰, 层次突出. 中叶又分为左中叶(left median lobe, LML)和右中叶(right median lobe, RML), 左中叶覆盖于左外叶之上. 右叶又分为右上叶(superior right lobe, SRL)和右下叶(inferior right lobe, IRL), 右上叶被覆于右中叶之下, 右下叶毗邻右肾. 尾叶根据与下腔静脉的关系又分前尾叶(anterior caudate lobe, AC)和后

尾叶(posterior caudate lobe, PC), 尾状突(caudate process, CP)贴合下腔静脉, 一般很少出现.

**2.2 根据肝脏各叶的比重选择肝切除模型** 总体而言, 大鼠肝脏各叶所占肝总质量的比例分别是: ML 38%(LML 13%+RML 25%)、LLL 30%、RLL 22%(SRL 12%+IRL 10%)、CL 10%(AC 4%+PC 4%+CP 2%)<sup>[12,14]</sup>. 在1931年, Higgins和Anderson通过对大鼠中叶和左外叶共同肝蒂处的结扎, 切除肝脏的中叶和左外叶, 成功实施了70%肝切除手术. 此后, 这个经典模型得到广泛运用和研究, 并且手术时间也大幅缩短<sup>[1,11]</sup>. 而在其他一些模型中(如急性肝衰竭等), 肝组织被切除的比例则常常达到90%以上<sup>[13,33]</sup>. 大鼠90%的肝切除的对象包括中叶、右叶和左外叶这三部分肝叶; 若进行95%肝切除, 则还需增加前尾叶; 而在97%模型中, 除了腔静脉部分保留之外, 几乎所有肝叶均被切除.

汤朝晖等<sup>[34]</sup>通过对C57/B6 ♂ 小鼠进行简单的分叶顺次肝切除, 得到各肝叶占总肝质量的比例分别为: LLL 37.12%、LML 9.46%、RML 19.40%、SRL 13.46%、IRL 11.48%、CL 7.30%. 而更先进的核磁共振成像技术表明<sup>[35]</sup>, 中叶占40%, 而左外叶占约30%(各叶的比例分别是: LLL 30.8±1.3%、ML 39.9±8.0%、SRL 16.2±1.7%、IRL 12.3±1.4%、CL 8.8±1.4%), 可见由于区位因素和饲养条件的差异, 即便是同品系同性别的小鼠, 肝脏各叶的比例依然存在显著差异. 因此在建立肝切除模型之前, 应首先进行预实验, 确定样本小鼠肝脏各叶的比重, 才能对切除率进行较为准确的控制.

在测量获取肝脏各叶分别占总肝质量的比重后, 即可根据模型要求, 选择切除单个或多个肝叶. 一般在30%肝切除模型中, 考虑到存在胆管阻塞、胆源性肝损等并发症的风险, 不建议单独切除中叶或者左外叶<sup>[32]</sup>. 常见的肝叶组合如表1.

**2.3 常见的肝切除技术手段** 随着医疗技术的发展, 肝切除手术也越来越精细化. 迄今为止的各种研究中, 已报导的有以下4种技术手段.

**2.3.1 传统大部结扎法:** 这种方法是在肝门部进行整体的结扎. 尽管最为经典和常用, 但是风险较高, 尤其当中叶和左外叶一并结扎时, 可能导致下腔静脉狭窄和肝脏充血. 而针对大鼠, 还可借助腹腔镜实施<sup>[36]</sup>, 但手术时间长, 且对技术的要求比较高.

**2.3.2 止血夹法:** 止血夹法是在传统结扎法基础

表 1 不同比例肝切除所推荐的肝叶组合

切除比例(%)	切除肝叶	保留肝叶
10	CL	ML, LLL, RLLs
20	CL, SRL	ML, LLL, IRL
30	CL, RLLs	ML, LLL
40	LLL, IRL	ML, SRL, CL
50	ML, SRL	LLL, IRL, CL
60	RLLs, ML	LLL, CL
70	ML, LLL	RLLs, CL
80	ML, LLL, IRL	SRL, CL
90	ML, LLL, RLLs	CL

上的改进, 最早见于Schaeffer等<sup>[37]</sup>在1994年的报导. 传统结扎中所使用的丝线被替换为钛金属止血夹. 手术时间大幅缩短, 但和传统结扎法一样存在可能发生较多并发症的风险; 同时也存在一些疑虑, 如金属止血夹置于体内是否影响肝再生<sup>[30,37]</sup>. Nikfarjam等<sup>[30]</sup>报道, 利用改进的止血夹法对小鼠进行2/3肝切除, 通过统计手术前后小鼠的肝脏质量变化, 发现体内即使放置了止血夹, 宏观上小鼠肝脏的再生过程也并未受到显著影响.

**2.3.3 基于血管定位的肝实质保留法:** 该技术无需对肝门进行结扎<sup>[13]</sup>, 而是根据血管定位; 先行使用蚊式止血钳夹住所切肝叶靠近根部的位置, 再对止血钳以上的部分进行切除, 止血钳以下的肝实质部分则用丝线进行结扎. 这种方法留下来的坏死组织切面平整, 不易感染剩余的肝叶. 但由于血管并非单独呈现, 且多分支, 止血钳可能对血管的其他分支造成损伤, 因此不建议在切除左中叶或者右中叶时使用这种方法.

**2.3.4 基于血管定位的显微手术法:** 显微手术法比上述方法在操作上更为细致. 在肝叶切除之前, 需要对肝脏的门静脉和动脉的相应分支进行结扎<sup>[38]</sup>. 在肝叶实质切除时, 再对相应的肝静脉进行结扎, 方法和上述肝实质保留法类似. 显微手术法的优点在于降低了因结扎导致的下腔静脉阻塞的风险, 准确的脉管结扎也更符合临床的肝段切除术; 左中叶和右中叶也可以依此法结扎, 分别进行切除. 这种手术方法的缺点在于需要专用的设备和专门的技术, 手术耗时较长. 专业性强但不易推广.

### 3 小鼠PH技术的应用

**3.1 小鼠PH流程** 本手术需要两名人员参与(一名主刀, 一名助手), 两人对面而坐协同进行. (1)

麻醉: 按体质量10 mg/kg腹腔注射利多卡因, 也可选择戊巴比妥等麻醉药物; (2)消毒: 待小鼠麻醉后, 四肢远端以手术线打成活结牵引, 背靠鼠板, 以头部朝向助手, 尾部朝向主刀的位置固定, 使用碘伏消毒腹部手术部位(上至腋窝连线水平, 下至腹股沟上缘连线水平); (3)开腹: 选择肋弓下缘连线为手术口; 剪开皮毛, 术口长约1.5-2 cm左右; 在与腹白线交界处先剪开一约0.5 cm的小切口, 在助手以止血钳夹住两侧的腹壁动脉后, 继续向两侧延伸切口宽度至合适长度(1.5-2 cm); (4)游离、结扎及切除: 先将左外叶与尾叶、胃、膈肌之间的系膜及肝胃韧带等剪去, 令各肝叶完全游离, 以手术线结扎需要切除的肝叶的肝门部, 在其颜色变深后, 剪去该叶; (5)缝合: 在清除完腹腔残留血液后(注意检查有无继续渗血或者损伤周围组织器官), 逐层缝合腹壁肌层及皮毛层; (6)补液: 术毕在小鼠背部皮下注射生理盐水0.5 mL以给予支持治疗; (7)温室复苏及恢复: 将小鼠置于37 °C通风保温箱复苏, 在12-24 h后若小鼠行为活跃, 可逐步将小鼠环境温度降至室温; 注意观察小鼠活动及进食变化, 必要时延长温室恢复时间.

**3.2 小鼠PH的注意事项** 小鼠死亡原因分析及体会: (1)手术操作失误: 因结扎部位不恰当(结扎在肝叶部位时, 手术线匝绕等效于切割肝脏, 残肝结扎部位在关闭腹腔后仍不断渗血, 最后因失血性休克导致小鼠死亡); 手术器械误伤周围器官等. 结扎肝叶时, 止血夹和丝线都比较常用. 我们采用丝线结扎法, 主要是考虑到丝线占用小鼠体内的空间较小, 具有一定韧性, 且没有止血夹的金属刚性, 在小鼠正常生理活动时, 不会误伤体内其他脏器. 此外, 丝线的材质一般为尼龙、真丝等高分子材料, 相比止血夹使用重金属钛, 对动物安全性较高, 且价格低廉. 最后, 用丝线结扎对于操作人员的技术要求不高, 方法更容易普及; (2)复苏温度不适: 我们发现, 在室温下进行术后恢复小鼠死亡率很高, 而给予一个合适的温室环境可以显著提高小鼠的术后生存率. 我们推荐一种经过实践研究总结出来的“梯度式温控复苏”方法: 在术后的6-12 h, 将小鼠置于35 °C-37 °C环境; 12-24 h, 置于32 °C-35 °C环境; 24 h以后可以置于30 °C以下或者室温环境中; 根据小鼠恢复状况(活动、进食等)可适当延长或缩短各个阶段的时间. 在手术过程中, 小鼠因失血导致体温下降, 可通过设置加热毯或加热灯来保持体温<sup>[30,31]</sup>; (3)伤口感染: 手术

### ■ 相关报道

Higgins和Anderson首次建立大鼠的部分肝切除模型, Greene和Nikfarjam等各自报道了与小鼠部分肝切除相关的技术要点与方法.



### ■创新盘点

本文在总结部分肝切除术的解剖基础、原理、方法、应用范围与前景的基础上,并结合实践首次详细地阐述了小鼠部分肝切除术的实施流程和注意事项。

最好在负压空间进行以减少感染可能性; 注意手术过程中术口消毒, 术后恢复过程中要防止饮用水污染伤口; (4) 术口的选择: 腹腔手术较多使用纵行切口开腹, 这样可以减少腹壁肌肉的离断, 但可能会延长肝叶结扎所需时间并增加小鼠的手术消耗; 我们通过实践证明, 横行切口开腹也可以具有相对较轻的手术损伤和较好的术后恢复表现, 而且横行切口更有利于肝叶的游离和结扎; (5) 麻醉不当: 小鼠个体对麻醉剂的敏感程度具有一定的差异性, 同时身体各部位对麻醉剂的吸收速度也有差别, 应确认麻醉剂的注射和起效部位在腹腔而不是皮下. 设计和应用合理的麻醉方案, 是满足手术需要和保证实验动物安全的前提. 常用的全身麻醉剂乙醚因其挥发性过高, 麻醉深度不容易掌握, 且麻醉后恢复相对过快, 并不适用于本手术. Greene等<sup>[31]</sup>认为通过腹腔或静脉注射的麻醉剂都具有肝毒性, 因此他们采用“吸入式麻醉法”, 即通过给小鼠套上一种带有汽化喷雾装置的面具, 通入异氟烷和氧气的液气混合物, 从而达到麻醉目的. Nikfarjam等<sup>[30]</sup>则采用了“混合式麻醉法”, 通过腹腔注射氯胺酮和赛拉嗪的混合麻醉剂, 同时辅以皮下注射卡洛芬起止痛作用. 而有文献证实三溴乙醇和氯胺酮/赛拉嗪混合剂, 在早期对淋巴细胞、肝脏Kupffer细胞以及内皮细胞有损伤作用, 因而并不推荐在涉及肝脏组织的实验中使用<sup>[39]</sup>. 因小鼠性别、周龄、品系等的差异可能导致个体对麻醉药的敏感度差别较大, 因此需要在术前摸索一个合适的给药剂量. 中等麻醉深度有助于缩短小鼠术后的苏醒时间并提高存活率; (6) 术后支持、对症治疗不足: 手术过程中小鼠会有较多的体液流失, 术毕可以皮下注射或腹腔灌填生理盐水, 以补充体液. 针对术后疼痛, 可每隔8 h注射叔丁啡等止痛剂<sup>[31]</sup>.

**3.3 小鼠PH模型的实验应用** 小鼠的PH模型是研究肝再生相关细胞因子和信号通路的主要模型<sup>[17-20,23,24,40]</sup>. Jin等<sup>[41]</sup>对小鼠注射人IL-6非重组蛋白后, 进行87%肝切除, 研究IL-6在抑制肝氧化损伤和坏死方面的作用; Cataldegirmen等<sup>[42]</sup>对小鼠分别进行70%和85%肝切除, 对比发现阻断糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)可以提高85%肝切小鼠的存活率, 并论证RAGE可以通过调控抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的表达来削弱损伤后肝的再生能力; 此外, 通过对患有血小板增多症的小鼠进行90%肝切除, 发现血小

板在维持肝脏功能, 预防急性肝衰竭等方面也有着一定作用<sup>[43]</sup>.

## 4 结论

鼠类PH实验模型常被用作为研究人类肝再生机制及治疗相关疾病药物研发的平台. 但是, 由于进行肝再生基础研究的科研人员缺乏相应的临床知识, 导致该模型的普遍采用受到了一定的限制(尤其是小鼠模型). 事实上, 如果能控制好手术过程中的各个关键环节, 仅需要基本的外科手术技巧即可建立这种动物模型; 而且, 手术可重复性高, 动物死亡率低. 因此, 对PH动物模型进行细致描述具有重要的意义. 虽然小鼠PH模型在手术流程和术后护理等方面, 与大鼠相比较显得更加繁杂, 但考虑到小鼠作为最常用的实验动物, 其饲养成本低、繁殖周期短、全基因组序列清楚、品系纯, 使其作为研究平台更有优势.

当然, 这一模型与人类正常的解剖生理及病理等方面还存在较大的差别. 比如, 人类肝脏与鼠类肝脏的脉管系统也存在着显著差异, 人类肝脏的各划分区与鼠类肝脏的各分叶之间的对应性也仍有待进一步研究<sup>[44]</sup>. 哺乳动物的肝再生动力学因物种不同呈现的机制也不同, 人类肝脏所能接受部分切除的最大比例是70-80%<sup>[45,46]</sup>, 而鼠类却几乎能耐受95%的肝切除<sup>[13]</sup>, 可见动物模型的结果不能完全转化到人类肝脏的研究中. 此外, 常见的急性肝衰竭模型仅是通过PH, 通过肝质量减少来模拟, 这与临床上更为常见的因病毒引起的肝组织损伤与坏死存在相当的差距, 因此在肝切除后, 还需对剩余肝组织进行局部缺血, 甚至添加肝毒性物才能达到与临床接近的效果. 而临床肝衰竭的患者小范围还常患有精神方面的并发症, 如肝性脑病, 这些更是动物模型中无法反映出的. 其他的一些局限还表现在, 动物肝切除之后, 常规的肝功能指标和人类肝脏指标的变化不一致<sup>[47]</sup>.

不可否认部分肝切除术动物模型还存在某些局限性, 但是考虑到这一经典模型对肝再生过程具有独特的、可控性的呈现方式, 因此他已经成为肝再生领域研究一个重要的平台. 而且随着基因操作技术的逐渐成熟, 转基因小鼠与基因敲除小鼠越来越多地应用到肝再生障碍相关病的研究中, 小鼠PH模型必将得到更为深入的发展.

## 5 参考文献

- 1 Higgins G, Anderson R. Experimental pathology of

- the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202
- 2 Slotta JE, Laschke MW, Schilling MK, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin attenuates hepatic sensitization to lipopolysaccharide after partial hepatectomy. *J Surg Res* 2010; 162: 184-192
  - 3 Arab JP, Pizarro M, Solis N, Sun H, Thevananther S, Arrese M. Mild hypothermia does not affect liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Liver Int* 2009; 29: 344-348
  - 4 Shimizu T, Togo S, Kumamoto T, Makino H, Morita T, Tanaka K, Kubota T, Ichikawa Y, Nagasima Y, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Shimada H. Gene expression during liver regeneration after partial hepatectomy in mice lacking type 1 tumor necrosis factor receptor. *J Surg Res* 2009; 152: 178-188
  - 5 Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, Mittal V, Kobayashi H, Shido K, Lyden D, Sato TN, Rabbany SY, Rafii S. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 2010; 468: 310-315
  - 6 Fausto N, Riehle KJ. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 181-189
  - 7 Lin PW. Hemodynamic changes after hepatectomy in rats studied with radioactive microspheres. *J Formos Med Assoc* 1990; 89: 177-181
  - 8 de Jong KP, Brouwers MA, Huls GA, Dam A, Bun JC, Wubben AS, Nieuwenhuis P, Slooff MJ. Liver cell proliferation after partial hepatectomy in rats with liver metastases. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; 20: 59-68
  - 9 de Jong KP, Lont HE, Bijma AM, Brouwers MA, de Vries EG, van Veen ML, Marquet RL, Slooff MJ, Terpstra OT. The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: in vivo and in vitro studies. *Hepatology* 1995; 22: 1263-1272
  - 10 Weinbren K, Taghizadeh A. The mitotic response after subtotal hepatectomy in the rat. *Br J Exp Pathol* 1965; 46: 413-417
  - 11 Rodríguez G, Lorente L, Durán HJ, Aller MA, Arias J. A 70% hepatectomy in the rat using a microsurgical technique. *Int Surg* 1999; 84: 135-138
  - 12 Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int* 2007; 27: 384-392
  - 13 Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Ann Surg* 2006; 244: 89-98
  - 14 Lorente L, Aller M, Rodríguez G, Duran M, Duran H, Alonso S, Arias J. Surgical anatomy of the liver in Wistar rats. *Surg Res Comm* 1995; 17: 113
  - 15 Ledda-Columbano GM, Curto M, Piga R, Zedda AI, Menegazzi M, Sartori C, Shinozuka H, Bluethmann H, Poli V, Ciliberto G, Columbano A. In vivo hepatocyte proliferation is inducible through a TNF and IL-6-independent pathway. *Oncogene* 1998; 17: 1039-1044
  - 16 Lu SC, Mato JM. S-Adenosylmethionine in cell growth, apoptosis and liver cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S73-S77
  - 17 Yuan H, Zhang H, Wu X, Zhang Z, Du D, Zhou W, Zhou S, Brakebusch C, Chen Z. Hepatocyte-specific deletion of Cdc42 results in delayed liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2009; 49: 240-249
  - 18 Blanc V, Sessa KJ, Kennedy S, Luo J, Davidson NO. Apobec-1 complementation factor modulates liver regeneration by post-transcriptional regulation of interleukin-6 mRNA stability. *J Biol Chem* 2010; 285: 19184-19192
  - 19 Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, Natt F, Schwemberger S, Hall J, Babcock GF, Bernardi R, Pandolfi PP, Thomas G. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 501-508
  - 20 Natarajan A, Wagner B, Sibilica M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 17081-17086
  - 21 Ho KJ, Bass CE, Kroemer AH, Ma C, Terwilliger E, Karp SJ. Optimized adeno-associated virus 8 produces hepatocyte-specific Cre-mediated recombination without toxicity or affecting liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G412-G419
  - 22 Haga S, Ozaki M, Inoue H, Okamoto Y, Ogawa W, Takeda K, Akira S, Todo S. The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology* 2009; 49: 204-214
  - 23 Wang X, Kiyokawa H, Dennewitz MB, Costa RH. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16881-16886
  - 24 Behrens A, Sibilica M, David JP, Möhle-Steinlein U, Tronche F, Schütz G, Wagner EF. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* 2002; 21: 1782-1790
  - 25 Lazzarini Denchi E, Celli G, de Lange T. Hepatocytes with extensive telomere deprotection and fusion remain viable and regenerate liver mass through endoreduplication. *Genes Dev* 2006; 20: 2648-2653
  - 26 Marcos A, Fisher RA, Ham JM, Shiffman ML, Sanyal AJ, Luketic VA, Sterling RK, Fulcher AS, Posner MP. Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 1375-1379
  - 27 Nishizaki T, Ikegami T, Hiroshige S, Hashimoto K, Uchiyama H, Yoshizumi T, Kishikawa K, Shimada M, Sugimachi K. Small graft for living donor liver transplantation. *Ann Surg* 2001; 233: 575-580
  - 28 Fausto N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* 2001; 7: 835-844
  - 29 Inderbitzin D, Studer P, Sidler D, Beldi G, Djonov V, Keogh A, Candinas D. Regenerative capacity of individual liver lobes in the microsurgical mouse model. *Microsurgery* 2006; 26: 465-469
  - 30 Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Fanartzis M, Daruwalla J, Christophi C. A model of partial hepatectomy in mice. *J Invest Surg* 2004; 17: 291-294
  - 31 Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 2003; 16: 99-102
  - 32 Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 2008; 28:

#### ■应用要点

本文对此前小鼠部分肝切除模型相关文献报道进行了深入具体的总结和阐述, 其中结合自身实践的体会对于非临床专业研究人员具有一定的借鉴意义。

### ■同行评价

本文综述较全面, 具有较高的学术价值。

- 33 Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4: 902-904
- 34 汤朝晖, 周露婷, 谢志芳, 胡以平, 杨甲梅, 章卫平, 吴孟超. 利用分叶顺次肝切除术建立小鼠肝脏大部切除后再生模型. *第二军医大学学报* 2009; 30: 524-526
- 35 Inderbitzin D, Gass M, Beldi G, Ayouni E, Nordin A, Sidler D, Gloor B, Candinas D, Stoupis C. Magnetic resonance imaging provides accurate and precise volume determination of the regenerating mouse liver. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 806-811
- 36 Krähenbühl L, Feodorovici M, Renzulli P, Schäfer M, Abou-Shady M, Baer HU. Laparoscopic partial hepatectomy in the rat: a new resectional technique. *Dig Surg* 1998; 15: 140-144
- 37 Schaeffer DO, Hosgood G, Oakes MG, St Amant LG, Koon CE. An alternative technique for partial hepatectomy in mice. *Lab Anim Sci* 1994; 44: 189-190
- 38 Kubota T, Takabe K, Yang M, Sekido H, Endo I, Ichikawa Y, Togo S, Shimada H. Minimum sizes for remnant and transplanted livers in rats. *J Hepa Pancr Surg* 1997; 4: 398-404
- 39 Thompson JS, Brown SA, Khurdayan V, Zeynalzadedan A, Sullivan PG, Scheff SW. Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbital, and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. *Comp Med* 2002; 52: 63-67
- 40 Desbarats J, Newell MK. Fas engagement accelerates liver regeneration after partial hepatectomy. *Nat Med* 2000; 6: 920-923
- 41 Jin X, Zhang Z, Beer-Stolz D, Zimmers TA, Koniaris LG. Interleukin-6 inhibits oxidative injury and necrosis after extreme liver resection. *Hepatology* 2007; 46: 802-812
- 42 Cataldegirmen G, Zeng S, Feirt N, Ippagunta N, Dun H, Qu W, Lu Y, Rong LL, Hofmann MA, Kislinger T, Pachydaki SI, Jenkins DG, Weinberg A, Lefkowitz J, Rogiers X, Yan SF, Schmidt AM, Emond JC. RAGE limits regeneration after massive liver injury by coordinated suppression of TNF-alpha and NF-kappaB. *J Exp Med* 2005; 201: 473-484
- 43 Myronovych A, Murata S, Chiba M, Matsuo R, Ikeda O, Watanabe M, Hisakura K, Nakano Y, Kohno K, Kawasaki T, Hashimoto I, Shibasaki Y, Yasue H, Ohkohchi N. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2008; 49: 363-372
- 44 Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 171-175
- 45 Schindl MJ, Redhead DN, Fearon KC, Garden OJ, Wigmore SJ. The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection. *Gut* 2005; 54: 289-296
- 46 Zou Y, Brandacher G, Margreiter R, Steurer W. Cervical heterotopic arterialized liver transplantation in the mouse. *J Surg Res* 2000; 93: 97-100
- 47 Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 145-157

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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(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)

# CO及肺泡血管壁通透性在肝硬化大鼠中的变化

杨树平, 王吉耀, 郭津生

杨树平, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

王吉耀, 郭津生, 复旦大学附属中山医院消化科 上海市 200032

作者贡献分布: 此课题由杨树平、王吉耀及郭津生设计; 研究过程、数据分析及论文书写由杨树平完成。

通讯作者: 王吉耀, 教授, 200032, 上海市, 复旦大学附属中山医院消化科. jiyao\_wang@gmail.com

收稿日期: 2010-10-18 修回日期: 2010-12-15

接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-01-28

## Alterations in plasma carbon monoxide levels and alveolar permeability in cirrhotic rats

Shu-Ping Yang, Ji-Yao Wang, Jin-Sheng Guo

Shu-Ping Yang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Ji-Yao Wang, Jin-Sheng Guo, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Professor Ji-Yao Wang, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. jiyao\_wang@gmail.com

Received: 2010-10-18 Revised: 2010-12-15

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-01-28

## Abstract

**AIM:** To examine possible alterations in plasma carbon monoxide (CO) levels and alveolar permeability in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis.

**METHODS:** Liver cirrhosis was induced in rats by subcutaneous administration of carbon tetrachloride. Mean arterial pressure (MAP, kPa), heart rate (HR, b/min), and portal pressure (PP, cm/H<sub>2</sub>O) were monitored by using an indwelling catheter. Plasma CO levels were determined by Chalmers method, and alveolar permeability was measured using the Evens blue extravasation technique.

**RESULTS:** Typical features of cirrhosis were histologically observed in carbon tetrachloride-treated rats. Compared with normal control rats, cirrhotic rats presented a significant increase in portal pressure (16.67 cmH<sub>2</sub>O ± 0.63 cmH<sub>2</sub>O vs 8.82 cmH<sub>2</sub>O ± 0.29 cmH<sub>2</sub>O; *P* < 0.01), plasma

CO levels (18.69 μmol/L ± 1.86 μmol/L vs 10.27 μmol/L ± 1.21 μmol/L; *P* < 0.01), and Evens blue extravasation (36.57 μg/g ± 1.69 μg/g vs 29.83 μg/g ± 2.34 μg/g; *P* < 0.01), but a significant decrease in mean arterial pressure (15.92 kPa ± 0.74 kPa vs 18.93 kPa ± 0.71 kPa; *P* < 0.01).

**CONCLUSION:** Activation of the HO-CO system and increased alveolar permeability may be important causes of development of hepatopulmonary syndrome in patients with cirrhosis.

**Key Words:** Cirrhosis; Hepatopulmonary syndrome; Carbon monoxide; Alveolar permeability

Yang SP, Wang JY, Guo JS. Alterations in plasma carbon monoxide levels and alveolar permeability in cirrhotic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 281-283

## 摘要

**目的:** 观察CCl<sub>4</sub>诱导的肝硬化模型中, CO及肺泡血管壁通透性的变化。

**方法:** CCl<sub>4</sub>皮下注射制备大鼠肝硬化模型, 动脉插管生理多导仪记录心率、平均动脉压的变化, 门静脉插管测定门静脉压力, 血浆CO水平的测定用联二亚硫酸盐还原法, 静脉注射伊文思蓝测定肺泡血管壁通透性。

**结果:** CCl<sub>4</sub>成功复制肝硬化模型, 显微镜下见正常肝小叶被完全破坏, 有典型的假小叶形成。肺组织肺泡壁增厚, 肺毛细血管管腔扩张, 部分肺泡腔变小。与正常对照组相比, 肝硬化组平均动脉压显著降低(15.92 kPa ± 0.74 kPa vs 18.93 kPa ± 0.71 kPa, *P* < 0.01), 门脉压力显著增高(16.67 cmH<sub>2</sub>O ± 0.63 cmH<sub>2</sub>O vs 8.82 cmH<sub>2</sub>O ± 0.29 cmH<sub>2</sub>O, *P* < 0.01); 血浆CO水平显著升高(18.69 μmol/L ± 1.86 μmol/L vs 10.27 μmol/L ± 1.21 μmol/L, *P* < 0.01); 肺组织EB含量明显增加(36.57 μg/g ± 1.69 μg/g vs 29.83 μg/g ± 2.34 μg/g, *P* < 0.01)。

**结论:** HO-CO的激活、肺泡血管壁通透性增加可能是肝肺综合征的重要原因。

**关键词:** 肝硬化; 肝肺综合征; 一氧化碳; 肺泡通透性

## ■背景资料

肝硬化尤其是晚期常伴发肺部结构和功能的改变, 如出现低氧血症并伴有肺部血管扩张即称为肝肺综合征(HPS), 是肝硬化严重并发症之一, 发病机制尚不清楚, 目前认为可能与扩血管物质/缩血管物质的失衡、肺部微血管增生及通透性增加等因素有关。

## ■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

### ■ 相关报道

Zhang等在结扎胆管造成胆汁性肝硬化模型,发现3-5 wk肺组织HO-1表达升高、COHb逐渐上升,用HO抑制剂后,COHb降到正常,动脉血氧分压和肺内血管的扩张得到改善。

杨树平,王吉耀,郭津生. CO及肺泡血管壁通透性在肝硬化大鼠中的变化. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 281-283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/281.asp>

## 0 引言

肝硬化尤其是晚期常伴发肺部结构和功能的改变,如出现低氧血症并伴有肺部血管扩张即称为肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS),是肝硬化严重并发症之一,发病机制尚不清楚,目前认为可能与扩血管物质/缩血管物质的失衡、肺部微血管增生及通透性增加等因素有关<sup>[1]</sup>. CO是一种扩血管物质,是由血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)催化血红素降解而产生的,HO是这一过程的限速酶. 研究提示肝硬化时HO-CO系统被激活,CO过量产生导致全身血管扩张,在HPS发病中的作用受到重视<sup>[2]</sup>. 本文拟在CCl<sub>4</sub>大鼠肝硬化模型上,观察血CO水平以及肺血管通透性的变化,并探讨在HPS发病中的作用.

## 1 材料和方法

1.1 材料 伊文思蓝(Eans Blue, EB)、甲酰胺、联二亚硫酸钠等购自上海化学试剂采购站. 主要仪器有754型分光光度计、生理多导仪(SMUP-PC型包括四路放大器、换能器、数模转换卡、计算机及信号处理软件)等.

### 1.2 方法

1.2.1 造模及分组: ♂ SD大鼠(购于上海中科院实验动物中心),体质量为180-220 g. 按传统方法制备CCl<sub>4</sub>肝硬化模型,即大鼠皮下注射500 mL/L CCl<sub>4</sub>(以橄榄油稀释)3 mL/kg体质量(首次加倍),每周两次,正常对照组给予相同剂量的橄榄油. 第12周末结束. 取肝硬化大鼠10只、正常对照大鼠10只进行实验.

1.2.2 血流动力学检测: 用1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉,取右侧股动脉插管,将接有三通的PE50导管插入,连接生理多导仪以测定心率、血压. 平均动脉压(mean arterial pressure, MAP kPa) = 舒张压+(收缩压-舒张压)/3. 于大鼠腹中线位置纵向剪开皮肤和腹肌,用16G的套管穿刺针在远断刺入门静脉主干开口处,用丝线结扎固定,拔去针芯,接三通和测压管(管中注满肝素生理盐水稀释液),读取水柱高度为门静脉压力.

1.2.3 肺泡壁血管通透性测定<sup>[3]</sup>: 股静脉注射1.5% EB, 2 h后放血处死大鼠,用生理盐水灌洗肺血管后,取肺称其质量,用甲酰胺水浴,分光光度仪比色,蒸馏水作空白对照,测定吸光度,

表1 各组大鼠心率、平均动脉压、门脉压力的变化 (n = 10)

分组	HR(b/min)	MAP(kPa)	PP(cmH <sub>2</sub> O)
对照组	395.9 ± 14.9	18.93 ± 0.71	8.82 ± 0.29
Cirrhosis	409.6 ± 15.6	15.92 ± 0.74 <sup>a</sup>	16.67 ± 0.63 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 对照组. HR: 心率; MAP: 平均动脉压; PP: 门脉压力.

根据标准曲线计算出EB含量.

1.2.4 血浆CO的测定<sup>[4]</sup>: 用联二亚硫酸盐还原法: 取两支试管分别标明为实验管和对照管,各加入1% Hb溶液1 mL. 实验管加入待测血浆1 mL,对照管加入蒸馏水1 mL. 两管均加入联二亚硫酸钠溶液0.1 mL,混匀,静置10 min. 在波长为540 nm、555 nm分别测吸光度,计算两者的比值R,根据标准曲线计算出CO的量.

1.2.5 形态学检查: 组织用Carnoy液(醋酸:氯仿:无水酒精为1:3:6)固定,石蜡包埋切片,HE染色,光镜下观察肝脏、肺等形态学改变.

**统计学处理** 采用方差齐性检验及t检验. 数值以mean ± SD表示. P<0.05差异有显著性.

## 2 结果

2.1 病理情况 肝硬化大鼠肝脾明显肿大,肝脏变形、表面凹凸不平呈结节状、质地变硬、边缘变钝. 显微镜下见正常肝小叶被完全破坏,肝细胞脂肪变性、结缔组织明显增生形成纤维条索并包绕肝细胞、肝内脉管系统已完全紊乱,形成典型的假小叶. 肺组织肺泡壁增厚,可见大量吞噬细胞和中性粒细胞浸润,肺毛细血管管腔扩张,部分肺泡腔变小.

2.2 血流动力学指标 肝硬化模型组与正常对照组比较,肝硬化组MAP显著降低,门脉压力显著增高,而两组大鼠的心率无显著性变化(表1).

2.3 各组大鼠血浆CO水平及肺组织EB含量的变化 肝硬化大鼠血浆CO水平显著高于正常对照大鼠(18.37 μmol/L ± 1.79 μmol/L vs 10.27 μmol/L ± 1.21 μmol/L; P<0.01),肺组织EB含量肝硬化组明显高于正常对照组(36.57 μg/g ± 1.69 μg/g vs 29.83 μg/g ± 2.34 μg/g; P<0.01).

## 3 讨论

HPS是肝硬化或非肝原性门静脉高压的严重并发症之一,发病机制还不清楚,可能与肺循环血管的普遍扩张、肺部血管增生和通透性增加等有关. 研究提示NO在HPS的血管扩张中起重要

作用, CO同NO一样也是一种扩血管气体信使物质<sup>[5]</sup>, 肝硬化时CO产生增加, 在血管功能紊乱中的作用受到广泛关注<sup>[6]</sup>.

内源性CO是由HO催化血红素而产生的, 并同时释放等摩尔数的Fe和胆绿素, 后者在胆绿素还原酶的催化下很快还原为胆红素. HO是这一过程的限速酶, 是一种微粒体酶, 目前发现有HO-1、HO-2、HO-3, HO-1是诱导型, 是热休克蛋白32(heat shock protein 32, HSP32), 在缺O<sub>2</sub>、内毒素、NO、TNF、重金属、氧化应急等刺激情况下产生, 在正常情况下脾脏有大量的HO-1的表达, 肝脏有少量的表达, 可能与衰老红细胞和游离血红蛋白的清除有关; HO-2是结构型, 是细胞的组成部分, 广泛分布肝脏、脾脏、肺及中枢神经系统等, 起维持血管张力和发挥信息传递作用. HO-3活性很低, 功能目前尚不清楚<sup>[7]</sup>.

本实验结果显示, 肝硬化大鼠门静脉压力明显升高, 存在门脉高压, MAP显著降低出现血流动力学紊乱现象即所谓的高动力循环状态, 肝硬化大鼠血浆CO水平明显升高, 说明肝硬化时HO-CO系统发生变化, CO产生增加, 这与文献报道一致<sup>[8]</sup>. 肺组织病理示肺泡壁增厚, 毛细血管扩张, 肺血管壁通透性增加, 也存在肝硬化发生肺血管并发症的病理生理基础. 有临床研究发现肝硬化合并有HPS患者血COHb水平明显升高<sup>[9]</sup>, Zhang等<sup>[10]</sup>在结扎胆管造成胆汁性肝硬化模型, 发现3-5 wk肺组织HO-1表达升高、COHb逐渐上升, 用HO抑制剂后, COHb降到正常, 动脉血氧分压和肺内血管的扩张得到改善. 该研究同时还发现肝硬化大鼠肺组织内皮细胞中NOS表达也增强, 而这种内皮源性的NOS是毛细血管增生的媒介, 在部分结扎门静脉引起的门脉高压模型和结扎胆管引起的肝硬化模型上观察到内脏毛细血管明显增生并与NOS表达呈正相关, 在肝硬化模型上还观察到内脏微血管壁通透性增加<sup>[11]</sup>, 临床研究发现肝硬化患者肺泡通透性很容易受损<sup>[12]</sup>. 肝硬化状态下HO表达增加、CO水平的上升, 不仅能引起内脏血管扩张, 也能引起肺部血管的扩张, 同时肺部血管通透性的改变更易发生HPS.

肝硬化门脉高压时, HO活性增加、CO产生增多的原因尚不清楚. 肝硬化时常伴有内毒素血症、细胞因子增加、血管切应力改变等, 这些可诱导HO-1的表达. 有研究发现NO能调节HO-1的表达<sup>[13]</sup>. NO的供体能刺激主动脉平滑肌细胞的HO-1基因的转录, 引起HO-1 mRNA的表达和蛋白的合成增加. 肝硬化时NO合成增多, 因

而NO也是HO活性增强的原因之一. 肺血管通透性增加可能与血管扩张、低白蛋白等有关. 在临床上HPS在肝硬化中的发病率为4%-47%<sup>[14]</sup>, 目前只有肝移植, 尚没有其他的有效方法, 故加强这方面的研究对预防和治疗HPS可能有很重要的意义<sup>[15]</sup>.

#### 4 参考文献

- Varghese J, Ilias-basha H, Dhanasekaran R, Singh S, Venkataraman J. Hepatopulmonary syndrome - past to present. *Ann Hepatol* 2007; 6: 135-142
- Fallon MB. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S138-S142
- 李少华, 吴中立. 伊文思蓝荧光法测定肺血管壁通透性. *中国病理生理杂志* 1990; 6: 220-221, 206
- Chalmers AH. Simple, sensitive measurement of carbon monoxide in plasma. *Clin Chem* 1991; 37: 1442-1445
- Chung HT, Choi BM, Kwon YG, Kim YM. Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): heme oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO-mediated antiapoptosis and anti-inflammation. *Methods Enzymol* 2008; 441: 329-338
- Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 588-594
- Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 479-491
- Chen YC, Ginès P, Yang J, Summer SN, Falk S, Russell NS, Schrier RW. Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 2004; 39: 1075-1087
- Arguedas MR, Drake BB, Kapoor A, Fallon MB. Carboxyhemoglobin levels in cirrhotic patients with and without hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2005; 128: 328-333
- Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, Grizzle WE, Fallon MB. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2003; 125: 1441-1451
- Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, Van Vlierberghe H, Mortier S, Cheung KJ, Demetter P, Lameire N, De Vos M, Colle I. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int* 2006; 26: 889-898
- Kao CH, Huang CK, Tsai SC, Wang SJ, Chen GH. Evaluation of lung ventilation and alveolar permeability in cirrhosis. *J Nucl Med* 1996; 37: 437-441
- Ghosh S, Gal J, Marczin N. Carbon monoxide: endogenous mediator, potential diagnostic and therapeutic target. *Ann Med* 2010; 42: 1-12
- Colle I, Van Steenkiste C, Geerts A, Van Vlierberghe H. Hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension: what's new? *Acta Gastroenterol Belg* 2007; 70: 203-209
- Zhang ZJ, Yang CQ. Progress in investigating the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 355-360

■同行评价  
本文选题较好, 具有一定的临床意义.

# Wnt信号通路在HepG2细胞株及其克隆形成细胞中表达的异质性

王宝松, 魏德全, 于树娜, 姜栋栋, 赵金岭, 史才兴, 蒋吉英

## ■背景资料

Wnt信号通路是一条在生物进化过程中十分保守的信号通路, 该通路异常或不恰当的活化与肿瘤干细胞的形成以及肿瘤的发生、发展密切相关。

王宝松, 魏德全, 于树娜, 姜栋栋, 赵金岭, 史才兴, 蒋吉英, 潍坊医学院解剖学教研室 山东省潍坊市 261053  
山东省“泰山学者”建设工程专项基金资助项目  
山东省科技攻关计划项目基金资助项目, No. 2006GG3202016  
作者贡献分布: 王宝松与蒋吉英对此文贡献均等; 此课题由王宝松、蒋吉英、魏德全及于树娜设计; 研究过程由王宝松、魏德全、姜栋栋、赵金岭及史才兴操作完成; 研究所用试剂由王宝松与蒋吉英提供; 数据分析由王宝松、蒋吉英及魏德全完成; 本论文写作由王宝松、蒋吉英及于树娜完成。  
通讯作者: 蒋吉英, 教授, 261053, 山东省潍坊市, 潍坊医学院解剖学教研室. jiangjiying2002@163.com  
电话: 0536-8462049  
收稿日期: 2010-09-16 修回日期: 2010-10-27  
接受日期: 2010-11-02 在线出版日期: 2011-01-28

## Heterogeneous expression of Wnt signal molecules in parental HepG2 cells and HepG2 colony-forming cells

Bao-Song Wang, De-Quan Wei, Shu-Na Yu, Dong-Dong Jiang, Jin-Ling Zhao, Cai-Xing Shi, Ji-Ying Jiang

Bao-Song Wang, De-Quan Wei, Shu-Na Yu, Dong-Dong Jiang, Jin-Ling Zhao, Cai-Xing Shi, Ji-Ying Jiang, Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China  
Supported by: the Special Fund of the "Taishan Scholar" Project; and the Foundation of Department of Science and Technology of Shandong Province, No. 2006GG3202016  
Correspondence to: Professor Ji-Ying Jiang, Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang 261053, Shandong Province, China. jiangjiying2002@163.com  
Received: 2010-09-16 Revised: 2010-10-27  
Accepted: 2010-11-02 Published online: 2011-01-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the heterogeneous expression of Wnt signal molecules in HepG2 cells with different proliferative ability.

**METHODS:** The soft agar colony formation assay was used to separate HepG2 colony-forming cells. The mRNA expression and protein expression and distribution of  $\beta$ -catenin and COX-2 in parental HepG2 cells and HepG2 colony-forming cells were detected by RT-PCR, Western blotting and immunochemistry, respectively.

**RESULTS:** The expression levels of  $\beta$ -catenin

mRNA and protein in HepG2 colony-forming cells were significantly higher than those in parental HepG2 cells (0.905 vs 0.549; 1.021 vs 0.700; both  $P < 0.05$ ).  $\beta$ -catenin was mainly localized in the cytoplasm in parental HepG2 cells and in the nucleus in HepG2 colony-forming cells. The expression levels of COX-2 mRNA and protein in parental HepG2 cells were significantly higher than those in HepG2 colony-forming cells (0.857 vs 0.527; 0.731 vs 0.434; both  $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry analysis showed that most HepG2 cells were positive for COX-2.

**CONCLUSION:**  $\beta$ -catenin and COX-2 may be closely related to the degree of differentiation of hepatocellular carcinoma. The expression patterns of  $\beta$ -catenin and COX-2 in parental HepG2 cells and HepG2 colony-forming cells imply that HepG2 colony-forming cells have the characteristics of liver cancer stem cells.

**Key Words:** Wnt;  $\beta$ -catenin; COX-2; Soft agar; Hepatocellular carcinoma; HepG2 cell line

Wang BS, Wei DQ, Yu SN, Jiang DD, Zhao JL, Shi CX, Jiang JY. Heterogeneous expression of Wnt signal molecules in parental HepG2 cells and HepG2 colony-forming cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 284-288

## 摘要

**目的:** 研究Wnt信号传导通路的关键因子 $\beta$ -catenin和COX-2在肝癌细胞株HepG2及其克隆形成细胞中的表达, 探讨Wnt信号传导通路在不同增殖能力细胞中表达的异质性。

**方法:** 以HepG2细胞为研究对象, 采用软琼脂克隆形成实验筛选克隆形成细胞, 应用RT-PCR、免疫化学和Western blot等技术, 检测Wnt信号传导通路的关键因子 $\beta$ -catenin和COX-2在肝癌细胞株HepG2及其克隆形成细胞中的表达。

**结果:**  $\beta$ -catenin mRNA和蛋白质在克隆形成细胞中的表达水平高于HepG2细胞(0.905 vs 0.549; 1.021 vs 0.700; 均 $P < 0.05$ )。  $\beta$ -catenin的

## ■同行评议者

秦建民, 副教授, 上海中医药大学附属普陀医院肝胆外科

阳性信号在HepG2细胞中主要分布于细胞质, 克隆形成细胞中主要分布于细胞核. COX-2 mRNA和蛋白质在HepG2细胞中的表达高于克隆形成细胞(0.857 vs 0.527; 0.731 vs 0.434; 均 $P < 0.05$ ). 大多数HepG2细胞中表达COX-2蛋白, 阳性反应沉淀物主要位于细胞质, 少数克隆形成细胞中有COX-2蛋白弱表达.

**结论:** Wnt信号传导途径的关键因子 $\beta$ -catenin和COX-2与肝癌分化程度相关.  $\beta$ -catenin和COX-2等Wnt信号传导通路的关键因子在肝癌细胞HepG2及其克隆形成细胞的分布模式支持克隆形成细胞具有肝癌干细胞的特征.

**关键词:** Wnt;  $\beta$ -catenin; COX-2; 软琼脂克隆; 肝癌; HepG2

王宝松, 魏德全, 于树娜, 姜栋栋, 赵金岭, 史才兴, 蒋吉英. Wnt信号通路在HepG2细胞株及其克隆形成细胞中表达的异质性. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 284-288  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/284.asp>

## 0 引言

肿瘤异质性概念汇集了肿瘤在空间、时间和结构等方面的表现, 研究表明肿瘤细胞间或细胞内的信号传导也是存在异质性的. Wnt信号通路是一条在生物进化过程中十分保守的信号通路, 该通路异常或不恰当的活化与肿瘤干细胞的形成以及肿瘤的发生、发展密切相关. 近年来Wnt信号通路异常与肝癌发病机制的关系已成为研究的热点. 本研究选取Wnt信号通路的关键因子 $\beta$ -catenin和COX-2, 检测其在人肝癌HepG2细胞株及其克隆形成细胞中的表达, 探讨Wnt信号通路在不同增殖能力细胞中表达的异质性, 为肝癌的靶向治疗提供新的治疗靶点.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌HepG2细胞株由潍坊医学院免疫学教研室梁淑娟博士惠赠. DMEM高糖培养基(美国Gibco公司), 低熔点琼脂(上海YITO Bio-instrument公司), 胎牛血清(杭州四季青生物技术有限公司), 胰蛋白酶(美国Sigma公司), 96孔板、24空板(青岛爱普科生物工程有限公司), 鼠抗人 $\beta$ -catenin单克隆抗体、羊抗人COX-2多克隆抗体(Santa Cruz公司), 即用型DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司), RNA提取试剂盒、AMV第1链cDNA合成试剂盒、PCR扩增试剂盒、 $\beta$ -catenin和COX-2引物(上海生工生物工程技术有限公司); PVDF膜(Sigma),

ECL发光试剂盒(Pierce Biotechnology), 封闭蛋白干粉(武汉博士德生物工程有限公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 软琼脂克隆:** 以1%的琼脂糖凝胶作为储备胶, 冷却至50 °C时, 与培养基按比例混合配制0.6%的底层胶铺于培养皿中; 再冷却至42 °C时, 按比例与细胞悬液混合, 0.2%的上层琼脂. 待上层琼脂凝固后在其表面覆盖一层完全培养基以防止琼脂表面干燥, 然后放入细胞培养箱中培养, 每日镜下观察, 并补充培养基, 约2 wk后取出分离单个细胞克隆群落进行培养.

**1.2.2 RT-PCR:** 根据人 $\beta$ -catenin、COX-2的mRNA序列, 利用Primer 5.0引物设计软件, 设计引物序列.  $\beta$ -catenin: 上游引物5'-GGTGGCTGCAGAAAATGGTT-3', 下游引物5'-GATGGCAGGCTCAGTGATGTCTTC-3', 扩增产物567 bp. COX-2: 上游引物5'-CGAGGTGTATGTATGAGTGT-3', 下游引物5'-AGTGGTAAGTATGTAGTGC-3', 扩增产物157 bp.  $\beta$ -actin: 上游引物5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3', 下游引物5'-GAAGCATTGCGGTGGACGAT-3', 扩增产物314 bp. 按RNA提取试剂盒说明提取总RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 将合格的RNA样品保存于-70 °C冰箱备用. 按照美国Fermentas公司逆转录试剂盒说明合成cDNA的第1链. 再进行PCR扩增. PCR反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C(COX-2: 51 °C)30 s, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C延伸7 min. 用BiospectrumAC分析软件分析电泳条带, 计算目的基因与内参照( $\beta$ -actin)扩增带灰度值之比, 即得目的基因mRNA的相对表达量.

**1.2.3 免疫细胞化学染色:** 常规免疫细胞化学染色观察 $\beta$ -catenin、COX-2蛋白质的表达. 两人双盲法观察切片. 采用Image-Pro Plus 5.0图像处理软件, 在高倍镜下( $\times 40$ )每张图片随机选取10个视野区, 对阳性结果区域进行灰度扫描, 以其平均相对灰度值作为表达量的值.

**1.2.4 免疫蛋白印迹:** 常规免疫蛋白印迹方法, 用BiospectrumAC分析软件分析电泳条带, 计算目的基因与内参照( $\beta$ -actin)扩增带灰度值之比, 即得目的蛋白的相对表达量.

**统计学处理** 采用SPSS11.0统计软件对结果进行分析, 结果用mean $\pm$ SD记录, 数据采用两组均数的 $t$ 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

**2.1  $\beta$ -catenin在HepG2细胞及其克隆形成细胞中**

**■ 研发前沿**  
近年来Wnt信号通路异常与肝癌发病机制的关系已成为研究的热点.



### ■创新盘点

本文研究了Wnt信号传导通路的关键因子 $\beta$ -catenin和COX-2在肝癌细胞株HepG2及其克隆形成细胞中的表达,结果显示 $\beta$ -catenin在克隆形成细胞中高表达,而COX-2在克隆形成细胞中低表达,支持克隆形成细胞分化程度低,具备肿瘤干细胞的特征。

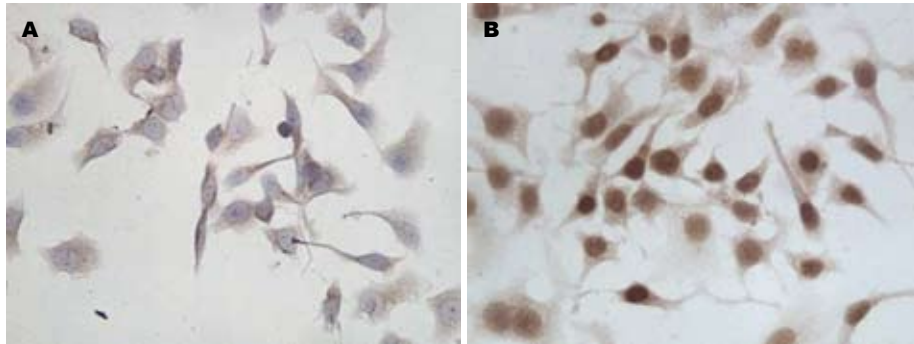


图1  $\beta$ -catenin在HepG2细胞及克隆形成细胞中的表达(免疫组织化学染色 $\times 400$ )。A: HepG2细胞; B: 克隆形成细胞。

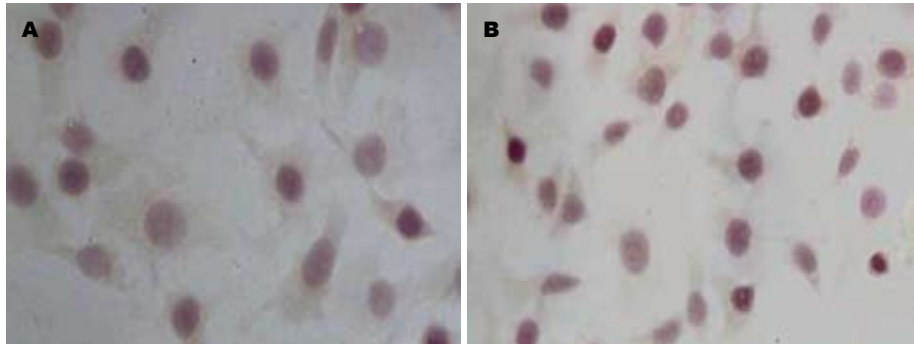


图2 COX-2在HepG2细胞及克隆形成细胞中的表达(免疫组织化学染色 $\times 400$ )。A: HepG2细胞; B: 克隆形成细胞。

的表达 免疫化学发现, HepG2细胞多呈 $\beta$ -catenin阳性反应, 阳性反应沉淀物主要分布于细胞质, 少见细胞核表达; 克隆形成细胞中, 多呈 $\beta$ -catenin强阳性, 阳性反应沉淀物主要分布于细胞核, 少数细胞质也有表达, 且在胞核的表达较强, 在胞质的表达较弱(图1)。  $\beta$ -catenin在HepG2细胞及其克隆形成细胞中的免疫化学灰度值见表1, 结果显示阳性细胞的数量在HepG2细胞及其克隆形成细胞中呈增高趋势, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。 RT-PCR检测 $\beta$ -catenin mRNA在HepG2细胞及其克隆形成细胞中 $\beta$ -catenin/ $\beta$ -actin的灰度比值见表2,  $\beta$ -catenin mRNA在克隆形成细胞中的表达水平高于HepG2细胞, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。 免疫印迹检测 $\beta$ -catenin蛋白在HepG2细胞及其克隆形成细胞中 $\beta$ -catenin/ $\beta$ -actin的灰度比值见表3; 在克隆形成细胞中 $\beta$ -catenin蛋白表达水平高于HepG2细胞中的表达水平, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 COX-2在HepG2细胞及其克隆形成细胞中的表达** 免疫化学发现, HepG2细胞多可表达COX-2蛋白, 阳性反应沉淀物主要位于细胞质, 少数克隆形成细胞中有COX-2蛋白弱表达(图2)。 COX-2在HepG2细胞及其克隆形成细胞中的免疫化学灰度值见表1, 结果显示COX-2在HepG2细胞中的表达高于克隆形成细胞, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。 RT-PCR结果显示, COX-2 mRNA在HepG2细胞及其克隆形成细胞中的表达见表2,

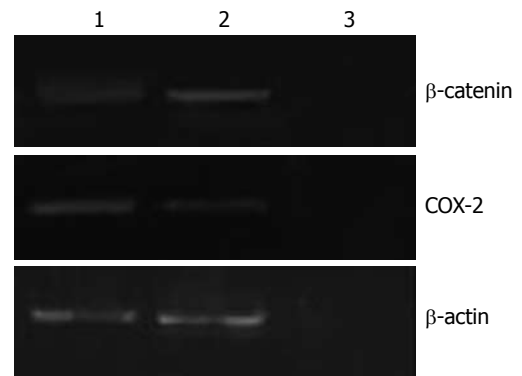


图3 1%琼脂糖凝胶电泳显示 $\beta$ -catenin、COX-2的RT-PCR产物。1: HepG2细胞; 2: 克隆形成细胞; 3: 阴性对照。

COX-2 mRNA在HepG2细胞中的表达高于克隆形成细胞, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图3)。 免疫印迹检测COX-2蛋白在HepG2细胞及其克隆形成细胞中COX-2/ $\beta$ -actin的灰度比值见表3; COX-2蛋白在HepG2细胞中的表达高于克隆形成细胞, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图4)。

### 3 讨论

Wnt信号通路是一条十分保守的信号转导通路, 存在于从线虫到人类的各种动物体内, 参与调节细胞的生长、迁移和分化及多种肿瘤的发生发展, 被认为是肿瘤发生过程中的关键信号通路之一<sup>[1]</sup>。 Wnt信号通路在成体细胞中的不恰当激活将导致机体发育的异常, 肿瘤的发生, 研究表明Wnt信号通路的异常与大肠癌、胃癌、乳

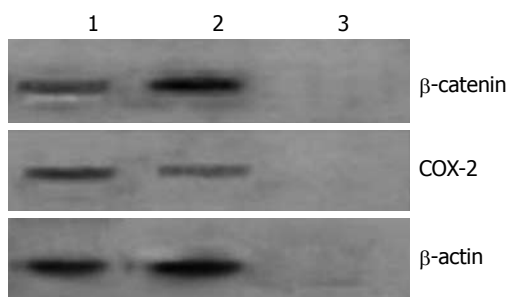


图 4  $\beta$ -catenin、COX-2蛋白在HepG2细胞及其克隆形成细胞中的表达。1: HepG2细胞; 2: 克隆形成细胞; 3: 阴性对照。

表 1  $\beta$ -catenin和COX-2免疫化学灰度扫描值

细胞类型	$\beta$ -catenin	COX-2
HepG2细胞	120.35 $\pm$ 10.58	145.31 $\pm$ 12.37
克隆形成细胞	107.68 $\pm$ 9.81 <sup>a</sup>	191.13 $\pm$ 14.29 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs HepG2细胞。

腺癌、肺癌、前列腺癌<sup>[2-6]</sup>等多种恶性肿瘤的发生密切相关。

肝癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 我国肝癌的发病率和死亡率均较高, 其中死亡率位于恶性肿瘤的第2位。Wnt信号通路与肝癌的关系已取得了不少研究成果, 但Wnt信号传导通路在肝癌中的具体作用机制以及肝癌中是否存在肝癌干细胞至今尚无定论。

软琼脂克隆形成实验是一种公认的被用来分离具有克隆能力的细胞的实验方法。Hamburger等<sup>[7]</sup>研究发现, 只有约0.02%-0.10%的癌细胞可以在软琼脂上形成克隆。Sell等<sup>[8]</sup>认为仅少数癌细胞是实际上致瘤性的细胞, 而那些可在软琼脂上形成克隆的肿瘤细胞有可能就是肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSS)或肿瘤起始细胞(tumor initiating cell, TSC)。本研究通过软琼脂克隆形成实验对HepG2细胞进行筛选, 筛选出的克隆形成细胞增殖能力更强。进一步检测Wnt信号通路在HepG2细胞及其克隆形成细胞中的表达, 为肝癌干细胞的存在提供依据。

$\beta$ -catenin是Wnt信号转导途径中的关键因子, 是连环蛋白家族的成员之一。正常成熟细胞内的Wnt信号通路是关闭的,  $\beta$ -catenin蛋白在细胞质内的表达水平很低, 不进入细胞核。当Wnt信号通路异常时, 胞外的蛋白可失磷酸化, 而造成 $\beta$ -catenin在胞质积累, 当达到一定水平时即进入胞核, 如激活cyclin D1和c-Myc等可导致细胞的增殖<sup>[9]</sup>。已有研究表明,  $\beta$ -catenin在肝癌中

表 2  $\beta$ -catenin、COX-2 mRNA在HepG2细胞及其克隆形成细胞中的表达

细胞类型	$\beta$ -catenin/ $\beta$ -actin	COX-2/ $\beta$ -actin
HepG2细胞	0.549	0.857
克隆形成细胞	0.905 <sup>a</sup>	0.527 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs HepG2细胞。

表 3  $\beta$ -catenin、COX-2蛋白在HepG2细胞及其克隆形成细胞中的表达

细胞类型	$\beta$ -catenin/ $\beta$ -actin	COX-2/ $\beta$ -actin
HepG2细胞	0.700	0.731
克隆形成细胞	1.021 <sup>a</sup>	0.434 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs HepG2细胞。

存在异常表达, 但与其与肝癌的分化程度是否相关尚存在争议<sup>[10-12]</sup>。本研究结果显示 $\beta$ -catenin在HepG2细胞中以胞质表达为主, 而在克隆形成细胞中则以胞核表达为主,  $\beta$ -catenin在克隆形成细胞中的表达水平高于HepG2细胞, 提示 $\beta$ -catenin在克隆形成细胞中的异位表达率高, 说明细胞的成熟可能受阻。提示克隆形成细胞为非成熟细胞。 $\beta$ -catenin异常表达可能与肝癌的分化程度有关。

COX-2是前列腺素合成限速酶, 是炎症过程中的一个重要的诱导酶。已有研究多表明<sup>[13-16]</sup>, COX-2在肝癌中的表达与分化程度有关, 分化好的HCC中COX-2的表达明显高于分化差的HCC。本研究结果显示, COX-2在HepG2细胞中呈胞质阳性表达, 而在克隆形成细胞中仅极少数细胞出现COX-2的弱阳性表达, COX-2在HepG2细胞中的表达高于克隆形成细胞, 提示COX-2可能与肝癌的分化程度相关。

通过探讨Wnt信号通路与肝癌以及肝癌干细胞的关系, 我们发现Wnt信号传导途径的关键因子 $\beta$ -catenin在克隆形成细胞中高表达, 而COX-2在克隆形成细胞中低表达, 支持克隆形成细胞分化程度低, 具备肿瘤干细胞的特征, 这将有助于深入了解肝癌产生的具体机制, 进而探讨肝癌发生、转移、耐药性以及预后相关的分子机制, 为肝癌的治疗提供有效的治疗靶点。

#### 4 参考文献

- 1 Pennisi E. How a growth control path takes a wrong turn to cancer. *Science* 1998; 281: 1438-1439,

#### ■应用要点

本文探讨了Wnt信号通路在不同增殖能力肝癌细胞中表达的异质性, 为肝癌的靶向治疗提供新的治疗靶点。

## ■同行评价

本文可读性较好, 具有一定的学术参考价值.

- 1441
- 2 Jansson EA, Are A, Greicius G, Kuo IC, Kelly D, Arulampalam V, Pettersson S. The Wnt/beta-catenin signaling pathway targets PPARgamma activity in colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1460-1465
  - 3 Pan KF, Liu WG, Zhang L, You WC, Lu YY. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1570-1574
  - 4 Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A, Hynes NE. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R63
  - 5 Tennis M, Van Scoyk M, Winn RA. Role of the wnt signaling pathway and lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 889-892
  - 6 Jiang YG, Luo Y, He DL, Li X, Zhang LL, Peng T, Li MC, Lin YH. Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Int J Urol* 2007; 14: 1034-1039
  - 7 Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977; 197: 461-463
  - 8 Sell S, Leffert HL. Liver cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2800-2805
  - 9 Krieghoff E, Behrens J, Mayr B. Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci* 2006; 119: 1453-1463
  - 10 Wang XH, Sun X, Meng XW, Lü ZW, Liu MN, Pei FH. [The role and significance of Wnt/beta-catenin signaling pathway regulating the signaling molecules in hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Gan-zangbing Zazhi* 2010; 18: 672-675
  - 11 Yang W, Yan HX, Chen L, Liu Q, He YQ, Yu LX, Zhang SH, Huang DD, Tang L, Kong XN, Chen C, Liu SQ, Wu MC, Wang HY. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4287-4295
  - 12 张影, 张福奎, 王宝恩. 经典Wnt信号通路与肝脏关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 975-981
  - 13 Tang TC, Poon RT, Lau CP, Xie D, Fan ST. Tumor cyclooxygenase-2 levels correlate with tumor invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1896-1902
  - 14 齐亚灵, 方艳秋, 段秀梅, 谭岩, 陈东. 环氧合酶-2在原发性肝细胞癌中的表达及其与HCC临床病理特征之间的关系. *中国免疫学杂志* 2007; 23: 989-992
  - 15 左朝晖, 谌忠友, 莫胜川, 周晓, 肖斌生, 吴胜其. 肝细胞癌及癌旁组织中环氧合酶-2的表达及临床意义. *肿瘤研究与临床* 2005; 17: 309-312
  - 16 虞长春, 吴正升, 吴强, 丁向东, 杨枫. COX-2在肝细胞肝癌中的表达及其与细胞凋亡的关系. *肝胆外科杂志* 2007; 15: 305-307

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

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

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

# 内镜治疗并发胃肠道出血的预防与处理

赵保民, 赵曙光, 刘震雄, 王旭霞, 杨琦, 赵玉玲, 周惠萍, 姜慧玲, 闻勤生

赵保民, 赵曙光, 刘震雄, 王旭霞, 杨琦, 赵玉玲, 周惠萍, 姜慧玲, 闻勤生, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科 陕西省西安市 710038

作者贡献分布: 此课题由赵保民设计; 研究过程由赵保民、赵曙光、刘震雄、王旭霞及杨琦操作完成; 内镜资料由周惠萍与赵玉玲完成; 数据分析由赵保民与赵曙光完成; 本论文写作由赵保民完成; 论文策划和审阅由赵保民与闻勤生完成。

通讯作者: 赵保民, 主任医师, 教授, 710038, 陕西省西安市灞桥区新寺路1号, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科, zhaobm@163.com

电话: 029-84777831 传真: 029-84777597

收稿日期: 2010-10-30 修回日期: 2010-12-17

接受日期: 2010-12-29 在线出版日期: 2011-01-28

## Prevention and treatment of gastrointestinal bleeding after therapeutic endoscopy for alimentary tract disease

Bao-Min Zhao, Shu-Guang Zhao, Zhen-Xiong Liu, Xu-Xia Wang, Qi Yang, Yu-Ling Zhao, Hui-Ping Zhou, Hui-Ling Jiang, Qin-Sheng Wen

Bao-Min Zhao, Shu-Guang Zhao, Zhen-Xiong Liu, Xu-Xia Wang, Qi Yang, Yu-Ling Zhao, Hui-Ping Zhou, Hui-Ling Jiang, Qin-Sheng Wen, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Professor Bao-Min Zhao, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. zhaobm@163.com

Received: 2010-10-30 Revised: 2010-12-17

Accepted: 2010-12-29 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To analyze the prevention and treatment of gastrointestinal bleeding after therapeutic endoscopy for alimentary tract disease.

**METHODS:** The clinical data for 42 patients who received endoscopic treatment for acute hemorrhage after endoscopic therapy were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** Of 1 089 patients undergoing therapeutic endoscopy, 392 underwent argon plasma coagulation (APC), of them 3 (0.8%) had gastrointestinal bleeding; 36 underwent loop ligation, of them 4 (11.1%) had bleeding; 64 underwent endoscopic mucosal resection (EMR), of them 8 (12.5%) had bleeding; 367 underwent high fre-

quency electric coagulation, of them 17 (4.6%) had bleeding; 230 underwent ERCP-EST, of them 10 (4.4%) had bleeding. The total incidence of iatrogenic bleeding was 3.9% (42/1 089). The majority of patients developing bleeding were managed successfully by APC or titanium clipping during endoscopic procedures, whereas 4 patients developed uncontrolled bleeding and turned to surgical intervention. One patient developed bleeding after loop ligation and died of multiple organ dysfunction syndrome and diaphragmatic paralysis after vascular interventional therapy.

**CONCLUSION:** Gastrointestinal bleeding after minimally invasive endoscopic surgery is preventable and controllable. Effective therapeutic measures for hemorrhage within 48 hours can decrease blood loss, blood transfusion and drug consumption, and increase the rate of cost/effectiveness. Preventive usage of metal clip can significantly decrease the incidence of post-operative bleeding after therapeutic endoscopy.

**Key Words:** Therapeutic endoscopy; Minimally invasive surgery; Complications; Gastrointestinal hemorrhage

Zhao BM, Zhao SG, Liu ZX, Wang XX, Yang Q, Zhao YL, Zhou HP, Jiang HL, Wen QS. Prevention and treatment of gastrointestinal bleeding after therapeutic endoscopy for alimentary tract disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 289-294

### 摘要

**目的:** 探讨内镜介入微创治疗消化道疾病并发出血的原因及预防和处理措施。

**方法:** 分析42例内镜治疗术并发出血的原因, 比较不同治疗方法出血后的处理措施、安全性和有效性。

**结果:** 在13 516例检查内镜中有1 089例治疗内镜, 其中氩气刀治疗术(APC)392例, 并发出血3例, 出血率0.8%; 橡皮圈套扎术36例, 并发出血4例, 出血率11.1%; 内镜黏膜切除术(EMR)64例, 并发出血8例, 出血率12.5%, 高

### 背景资料

随着内镜技术的发展, 越来越多的疾病可通过内镜介入微创技术得到诊治。内镜微创技术创伤小、花费少、效果好, 受到广大患者的欢迎。近年来开展的早期肿瘤内镜黏膜切除术(EMR)、内镜黏膜下切除术(ESD)、内镜下乳头括约肌切开取石术(ERCP-EST)等完全可以取代外科手术。但是难度高、风险大, 给内科专家提出更高要求, 如何规避风险、减少并发症, 提高安全性, 是内科医生必须面对的技术问题。

### 同行评议者

冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科

## ■研究前沿

消化系早期肿瘤的内镜黏膜下切除术(ESD)和内镜下胰胆管结石取出术(ERCP-EST)是近年来消化内镜领域发展最快、研究最多、最热门的技术之一,受到广大医生的青睐。但其技术要求高、难度风险大,如何完整切除病灶,降低出血并发症,较少疾病复发率,尚存在较多尚待研究和解决的问题。

频电凝电切治疗术367例(其中预置钛夹265例无1例出血,无预置钛夹102例),并发出血17例,出血率4.6%;十二指肠乳头切开术(ERCP-EST)230例,并发出血10例,出血率4.4%。多数术中即刻出血经内镜下钛夹止血或氩等离子凝固术止血成功;4例出血内镜无法控制,中途转外科手术成功止血;1例贲门息肉套扎术后并发大出血,经内镜下无效处理,48 h内行血管介入治疗后并发多脏器栓塞坏死及膈肌麻痹,患者死亡;1例胆总管结石患者ERCP-EST术后切口大出血,经保守治疗6 d,输血7 000 mL,最终内镜下钛夹止血成功;1例结肠息肉电凝电切术后并发大出血和1例十二指肠镜检查致贲门黏膜撕裂大出血,分别在48 h内经内镜下氩等离子凝固术治疗止血成功。

**结论:** 内镜下微创治疗术并发胃肠道出血,具有可预防性,可确定性和可治疗性的特点。术中即刻出血采用氩气刀或钛夹止血最有效。延迟出血在48 h内采用有效治疗措施可减少失血量、输血量 and 用药量,提高临床成效比。预置钛夹是预防电凝电切并发出血的有效措施。

**关键词:** 内镜治疗;微创术;并发症;消化道出血

赵保民, 赵曙光, 刘震雄, 王旭霞, 杨琦, 赵玉玲, 周惠萍, 姜慧玲, 闻勤生. 内镜治疗并发胃肠道出血的预防与处理. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 289-294

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/289.asp>

## 0 引言

随着现代科学技术的发展,内镜介入微创技术如内镜黏膜切除术(endoscopic mucosal resection, EMR)和内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)等技术得到广泛开展。但内镜微创技术与外科手术治疗一样,存在巨大的医疗风险。常规内镜检查的最常见并发症是肠穿孔<sup>[1,2]</sup>,发生率0.1%,而治疗性内镜的最常见并发症是出血,发生率1%-10%,穿孔0.03%-17.00%<sup>[3]</sup>,但并发症是可预防的和可控制的<sup>[4]</sup>,治疗性内镜又对控制出血起着关键作用<sup>[5]</sup>。预防并发出血的关键在于术前准备是否充分,是否掌握适应证、禁忌证、预防措施是否到位,严重程度的判断及发生出血后的处理方法是否及时有效<sup>[6]</sup>。本文就治疗性内镜术后并发消化道出血42例做评估与分析,仅供同道参考。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 门诊内镜检查13 516例病例,发现病变住院治疗1 089例,其中,男875例,女214例。最

小年龄4岁,最大年龄90岁,平均年龄42.5±12.3岁。根据病变的形态分类:无蒂隆起性病变492例:其中,食管病变49例,贲门病变22例,胃病变183例,十二指肠病变9例,结肠病变229例。息肉样病变367例:其中食管17例,贲门11例,胃67例,十二指肠息肉7例,结肠265例。胆总管病变230例:胆总管结石105例,胆道肿瘤53例,其他胆道病变45例,胰腺疾病27例。全部病例均采用Olympus电子内镜诊疗系统进行诊治。EMR手术平台:以OLYMPUS-XQ260电子诊疗系统为基础,治疗专用配件圈套器SD-221U-25;透明黏膜吸套MAJ-293;注射针NM-200L-0423。电切技术平台:高频电切仪为德国产ERBE的ENDO CUT系统。橡皮圈套扎术平台:套扎仪为天津医用硅胶二厂研制和生产的内镜牵拉式套扎器。ERCP手术平台:以Olympus-XQ260电子诊疗系统为基础,治疗专用配件KD-V411M-0725型乳头切开刀。

## 1.2 方法

**1.2.1 术前准备:** 包括(1)适应证条件检查:血常规、出凝血时间、肝肾功能检查、心电图等。如有必要给予纠正性治疗;(2)预防并发症准备:血型、交叉配血、备血,急救药物、急救设备与器材等;(3)手术条件准备:禁食12 h、肠道准备、生命体征监测、心肺功能检查等;(4)心理准备:告知患者及家属手术目的、过程、必要性、可行性、并发症、医疗费用、预后等,征得家属及患者意见并签署手术同意书。

**1.2.2 操作:** 根据病变的大小和形态,选择不同的内镜治疗方案。包括(1)EMR手术:首先内镜发现病灶并染色确定病变范围,其次于病变下注射生理盐水或甘油果糖,病变抬举征阳性,可施行透明帽吸入后电圈套电凝电切术,然后止血及边缘修整和术后护理;(2)橡皮圈套扎术(rubber band trap technic, RTT):对于<1 cm的病变,在内镜头端带透明帽及圈套器,充分吸入后释放橡皮圈套扎,等待病变自动脱落;(3)高频电凝电切术(high frequency electric coagulation electrotony, HFECE):对于有蒂病变根据蒂的长短,决定是否行预防性钛夹治疗,然后施行电凝电切治疗;(4)逆行胰胆管造影术及乳头括约肌切开术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography-endoscopic sphincterotomy, ERCP-EST):按照ERCP手术常规准备,插管成功后,在导丝引导下,高频电切开十二指肠乳头括约肌,网篮取石;(5)氩等离子

表 1 消化系病变的形态及病理特征、手术方案及电切参数

病变形态特征	n	病理特征	手术类型	高频电凝切参数
无蒂隆起病变(cm)				
<0.5	392	异型增生	APC术	功率60 W, 时间3-6 s
<1	36	异型增生	RTT术	
1.0-2.0	64	腺瘤性	EMR术	CUT60w, COAG40w
带蒂息肉	367	腺瘤性	HFECE术	CUT80w, COAG60w
胆道病变	230	胆总管结石	ERCP-EST术	CUT80w, COAG60w

## ■ 相关报道

Kihara等报道采用APC技术治疗内镜检查导致黏膜创伤出血的成功案例和Busch等报道内镜专家、介入专家和外科专家的密切合作,是抢救胃肠道出血成功的重要保障。

子凝固术(argon plasma coagulation, APC): 对于<0.5 cm的病灶或<1.0 cm的扁平病灶可行氩等离子凝固治疗, ERBE ICC300氩等离子治疗仪, 探头与病灶间隔5-10 mm, 功率60 W, 时间3-6 s, 达到病灶变白变焦无出血即可。

1.2.3 判断术后出血的标准: (1)术中即刻出血; (2)术后延迟出血; (3)喷射状活动性出血; (4)渗出性活动性出血。

1.2.4 治疗方案: 根据病变的形态、性质决定治疗方法、方案(表1)。

**统计学处理** 采用SPSS12.0统计软件分析, 经 $\chi^2$ 检验和t检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 一般情况 内镜微创治疗前后患者一般资料、血常规、肝肾功及出凝血时间比较, 5种治疗方法组间基础条件均衡性检验无显著性差异(表2)。

2.2 不同内镜治疗术式出血发生率及处理 内镜治疗术1 089例, 发生出血数42例, 总出血发生率3.9%。氩气刀治疗术并发出血共3例, 出血发生率0.8%; EMR手术并发出血共8例, 出血发生率12.5%; 电凝电切术预置钛夹无一例出血, 无预置钛夹出血17例, 出血率4.6%; 中转外科4例, 占9.5%; 治愈41例, 占97.6%; 死亡1例, 占2.4%(表3)。

### 2.3 特殊病例

2.3.1 应贲门息肉套扎术后并发大出血: 女, 50岁, 因上腹部疼痛1年, 胃镜检查发现贲门息肉入院。内镜见食管左前壁齿状线上0.5 cm处有一枚0.3 cm×0.4 cm岛状红色增生, 略隆。后壁齿状线下约0.5 cm处有一枚1.0 cm×1.0 cm亚蒂息肉, 略红, 表面光滑。经充分换气后, 对左前壁岛状增生病变行APC治疗, 功率60 W, 时间3 s(ERBE-ICC200, 德国产)。然后对食管后壁齿状线下息肉行橡皮圈套扎术, 内镜头端嵌入套扎器, 将息肉吸入套扎器内, 满视野, 释放套扎橡皮圈, 完

整套入息肉, 即刻见息肉变紫无出血。术后第24 h患者开始呕血; 28 h大量出血达休克状态。急诊胃镜下见息肉脱落, 套扎圈留在原处上方1 cm处。套扎点可见喷射状活动出血, 镜下喷洒凝血酶及1:10 000肾上腺素液, 未行钛夹止血及其他镜下止血措施, 因出血不止, 转外科治疗。于出血后12 h在三腔管压迫止血下行腹腔动脉灌注及超选择胃左动脉甘油栓塞术, 术后双气囊三腔管保留48 h, 胃管内无新鲜出血, 拔管后开始出现腹痛、腹膜刺激征, 于72 h明显加重并出现呼吸困难, 中毒性休克, 脾梗死, 局限性肝坏死, 胃底大弯侧及胰尾部局限性坏死, 胃穿孔, 终因膈肌麻痹, 呼吸衰竭, 抢救2 wk无效死亡。

2.3.2 升结肠息肉电凝电切术后并发大出血: 男, 56岁, 因结肠镜下息肉电凝电切术后1 wk并发便血5 h入院。患者升结肠息肉约1.0 cm×1.0 cm亚蒂, 表面糜烂, 质脆。电切术后观察5 d, 排便正常, 患者出院。次日上午, 剧烈运动, 12 h后排暗红色血便约200 mL, 以后每小时排便1次, 于5 h后急诊入院。入院后积极止血、输血、补液, 生命体征平稳。观察期间每4-6 h排便1次, 于出血后48 h行结肠镜检查发现升结肠原息肉切除部位新鲜活动出血, 呈涌泉状, 生理盐水冲洗后, 可清楚显示活动出血部位, 立即行APC(A60, 6s), 血痂形成, 出血停止, 患者痊愈出院。

2.3.3 十二指肠镜检查致贲门黏膜撕裂伤并发大出血: 男, 69岁, 因皮肤巩膜黄染1 wk入院。磁共振及MRCP结果示胆囊颈部及胆囊管占位病变, 诊断胆管细胞癌伴高位梗阻。经术前准备后, 行ERCP检查及治疗。退镜过程中, 发现胃底及贲门有新鲜血迹, 未见活动出血。术后给予抑酸止血治疗, 6 h后患者出现呕血、便血, 经积极止血输血等治疗, 出血不止, 累积失血达2 000 mL, 并发出血性休克。于ERCP术后30 h, 行内镜检查, 发现贲门后壁三角形黏膜撕裂约1.5 cm×0.5 cm, 并持续喷射状活动性出血, 立即给予氩等离子

### ■创新盘点

本文着重阐述了如何根据疾病性质选择治疗手段和方法,如何预测发生并发症的可能性,如何及时有效处理并发症,阐述作者的经验和教训,尤其是典型案例的巧妙陈述。

表 2 各组患者一般特征、血小板计数及凝血酶原时间

内镜术式	n	男女比例	平均年龄(岁)	血小板计数( $\times 10^{12}/L$ )	凝血酶原时间(s)
APC术	3	2 : 1	46.3	12.7 ± 1.0	12.7 ± 1.1
RTT术	4	3 : 1	49.5	13.2 ± 0.9	12.0 ± 1.0
EMR术	8	1.6 : 1	55.6	14.4 ± 1.2	13.1 ± 1.0
HFECE	17	2.4 : 1	49.9	12.6 ± 1.4	13.1 ± 0.9
ERCP-EST术	10	2.3 : 1	45.4	11.3 ± 1.2	13.0 ± 0.9
合计	42	3 : 1	49.6	12.7 ± 1.9	12.9 ± 0.9

表 3 不同内镜治疗术式出血发生率、出血特点、处理措施与预后

内镜治疗术式	出血率 % (n)	高频电参数	病变及出血特点	止血措施与预后
APC术	0.8(3/392)	功率: 60 W, 时间: 3-6 s	即刻出血3例	APC止血2例, 钛夹止血1例
RTT术	11.1(4/36)		即刻脱落3例, 延迟脱落并大出血1例	即刻止血3例, 血管介入1例失败
EMR术	12.5(8/64)	CUT60w, COAG40w	术中出血7例, 术后延迟出血1例	即刻止血成功7例, 中转外科1例成功
HFECE术	4.6(17/367)	CUT80w, COAG60w	术中出血15例, 延迟出血2例	预置钛夹265例(无出血), 无预置钛夹102例, 中转外科3例成功, 即刻钛夹止血12例, 延迟钛夹止血2例
ERCP-EST术	4.4(10/230)	CUT80w, COAG60w	术中出血9例, 术后延迟出血1例	即刻止血成功9例, 延迟钛夹止血1例
合计	3.9(42/1 089)			死亡1例, 治愈41例

子凝固术, 功率60 W, 时间 6 s, 血痂形成, 血止, 观察10 min, 未再活动出血, 1 wk后痊愈出院。

2.3.4 十二指肠乳头切开术并发大出血: 男, 43岁, 因上腹痛向背部放散, 伴高热、黄疸5 d入院。B超显示: 胆总管内径增宽, 下段可见结石一枚约1.0 cm × 1.0 cm。MRI及MRCP示: 胆总管中下段结石并肝内外胆管扩张, 胆石症, 脾大。于十二指肠镜下行ERCP及EST手术, 术中见胆总管下端2枚结石分别约1.0 cm × 1.0 cm及0.3 cm × 0.3 cm, 行十二指肠乳头括约肌切开, 网篮取石, 球囊胆道清理。术后患者上腹部疼痛, 进行性加重, 12 h伴呕吐咖啡胃内容物并排黑便, 当时考虑急性胃黏膜病变少量出血, 给予口服凝血酶, 静脉止血, 抑酸药物, 抗菌消炎等治疗, 24 h后继续便血, 48 h便血开始增多, 并出现休克表现, 继续以急性胃黏膜病变并大出血抗休克治疗。期间置胃管抽出清亮胃液, 考虑到EST术后并发大出血, 血色素57 g/L, 心率120次/min, 处于休克状态。为明确出血部位, 最终在加压输血输液后, 血压平稳状态下, 于第6 d行十二指肠镜检查见胆管开口通畅, 胆汁排泄正常, 乳头切口7点处可见一动脉搏动性出血, 行三枚钛夹止血, 成功夹止出血动脉, 局部黏膜下注射1 : 10 000

肾上腺素液, 喷洒凝血酶, 观察10 min无活动出血。共计输血7 000 mL, 生命体征保持平稳, 1 wk后痊愈出院。

### 3 讨论

内镜下介入治疗术并发胃肠道出血, 属医源性出血, 是最常见的内镜下治疗并发症之一。Bhatia等<sup>[3]</sup>报道内镜治疗出血发生率1%。医源性出血与消化道疾病的自发性出血的明显区别是, 具有可预见性, 可预防性, 可确定性和可治疗性。做好术前准备, 术中精心, 术后监控, 及时正确处理, 可以做到控制出血, 但如果处理不当, 可能延误抢救时机。

通常依据病变的部位及性质, 选择治疗方案。本案针对消化道隆起性病变的四种治疗方案中, APC最安全, 出血发生率0.8%; 橡皮圈套扎术后出血发生率11.1%; 高频电切术4.6%, EMR术出血发生率12.5%, 低于Shiba等<sup>[7]</sup>报道的EMR出血率19.5%。可以看出, EMR手术风险最大, 术者应当充分认识和提高EMR技术水平, 从内镜基础做起, 逐步开展, 循序渐进。橡皮圈套扎术虽说安全, 但也有风险, 把握适应证非常重要, 从本案经验得出, 观察息肉表面糜烂、触之出

血是息肉质脆易出血之征兆, 尽量避免选用套扎术, 选用电凝电切较好. 本案ERCP-EST并发出血率为4.4%, 与施新岗等<sup>[8]</sup>的报道接近, 远较Christoforidis等<sup>[9]</sup>和Yao等<sup>[10]</sup>报道的发生率0.5%和0.3%为高. Talar-Wojnarowska等<sup>[11]</sup>报道80岁老人ERCP的出血和穿孔率分别是12.5%和2.1%. 但仍然认为比较安全. 针对EST术后出血, 可采用预防性使用止血夹, 尤其是EST过程中一度有活动出血的患者经及时处理后, 有必要钛夹局部止血, 以便预防术后大出血<sup>[12]</sup>.

内镜治疗并发出血的特点以术中即刻出血为最多, 大多数采取镜下氩气刀止血或钛夹止血完全成功. 极少数出血因局部视野不清, 无法继续镜下处理, 需要外科处理. 术后延迟出血多以大出血为主要表现, 采取积极措施, 直接在治疗原点施行内镜钛夹或氩气刀治疗是最直接和最有效的办法. 不宜采取局部喷洒药物止血. 对于有蒂息肉, 可预先钛夹阻断血供, 预防出血, 尤其是宽蒂大息肉切除前先行尼龙绳套扎或钛夹预防性止血, 可明显减少出血发生率<sup>[13]</sup>. 术后及时处理手术创面, 对渗血性活动出血、血管残端、血块附着、出血基底及血点, 采取积极措施可预防出血, 显著改进临床治疗效果<sup>[14]</sup>.

影响内镜治疗术并发出血的因素较多, 不同性质的病变及处理方法不同存在较大差异. Con-solo等<sup>[15]</sup>报道切除息肉并发出血率与息肉大小和管状腺瘤及患者有无心脏病有关. 如本案病例一贲门息肉, 选择了RTT, 从最终结果来看, 不是最佳的治疗方案. 此例出血的可能原因是: (1)套扎的息肉根部小血管内尚未形成血栓前息肉提早脱落, 或已有血栓被动脉压冲开. 息肉脱落一般在3-5 d脱落, 此例于24 h脱落, 属较早脱落, 可能与息肉处于特殊部位有关, 受贲门的收缩与开放的影响, 进食或呕吐动作后导致腹压增高, 贲门动作过大, 息肉可提早脱落; (2)已缺血息肉易受胃酸侵蚀, 可致较早脱落; (3)从出血后的内镜观察发现, 动脉性出血位于贲门胃侧, 而橡皮圈尚保留在食管侧, 说明食管侧牵拉力大于胃侧, 可能与胃侧黏膜脆弱有关; (4)由于息肉质脆, 橡皮圈的自然收缩力造成息肉较早脱落.

本案病例2, 息肉小, 质地脆, 术中电凝电切电流符合常规要求, 术后1 wk并发大出血与剧烈活动有密切关系, 属迟发性血痂脱落出血. 本案病例3, 由于十二指肠镜操作用力不当, 致贲门黏膜撕裂伤所致出血, 但出血发生于术后12 h, 可能与术后未有效的抑酸止血治疗有关. 强力

抑酸如质子泵抑制剂可使胃内酸度达pH6以上, 可有效地使体内凝血机制发挥最佳止血效果, 提高费用效益比例<sup>[16]</sup>. 本案病例4, 术后12 h发生出血, 可能的原因有切开电凝电流不足、切开后取石通过出口划伤乳头黏膜、切开刀张力过高等有关. 因此, 术中选择正确的电凝电切电流参数与强度, 避免操作用力不当, 是预防出血的关键因素.

内镜介入术后治疗管理遵循三大原则, 其一, 禁食水, 以确保胃肠得到休息, 避免创面活动导致出血; 其二, 密切监护生命体征, 及早发现病情变化; 其三, 强力抑酸可以达到显著止血效果<sup>[17]</sup>, 抗菌消炎预防创面出血与感染. 一旦出现出血, 应立即想到与治疗有关的部位发生出血的可能性最大. 力争在24 h内行胃镜检查, 但如果未行有效的镜下止血措施, 错过止血机会, 将延误治疗或出现严重后果. 对于喷射状出血最有效的止血方法是钛夹止血; 其次是氩等离子凝固术, 将探头对准出血灶或在其周边电凝, 也能收到明显止血效果; 亦可采用局部注射1:10 000肾上腺素液止血. 病例1, 出血后未行外科手术止血, 而是选择了血管介入灌注栓塞治疗技术, 虽然止血成功, 但并发大面积多脏器栓塞坏死, 膈肌麻痹, 多脏器功能障碍, 最终导致患者死亡. 此例是在三腔管压迫状态下, 进行栓塞止血, 导致栓塞剂多向分流的原因可能与胃底受胃囊压力的影响有关. 该病例强烈提示内镜专家、介入放射专家和外科学专家组成的多学科综合小组在抢救消化道出血方面的合作非常必要<sup>[18]</sup>. 血管介入栓塞治疗最适合于胰胆管出血, 肠道憩室出血和小肠血管病的出血<sup>[19]</sup>. 病例2和3分别于术后1 wk和术后12 h发生出血, 首先考虑到出血与内镜治疗有关, 所以, 最短时间内在内镜下找到出血灶, 实施了有效的APC止血措施, 与Kihara等<sup>[20]</sup>报道的由于经食管行超声心动检查导致的贲门黏膜撕裂出血行APC治疗有相同的效果. 病例4: 术后12 h发生呕血和黑便, 由于最初判断是急性胃黏膜病变出血, 又未行内镜检查证实, 抢救期间, 一直未能明确出血病灶, 于第6天行十二指肠镜检查, 发现出血灶并实施了有效的镜下钛夹止血和局部注射止血, 止血成功, 但此时失血量已达7 000 mL, 由于没有估计到出血并发症和严重程度, 使得治疗延误.

总之, 内镜治疗并发大出血, 充分做好术前准备工作, 出血发生后, 应首先考虑治疗部位并发出血, 争取在24 h内实施有效的止血措施. 随

**■应用要点**  
消化系内镜微创手术并发出血后, 及时通过内镜检查, 可以快速发现和找到出血部位, 再次实施有效处理措施, 完全可以避免更大的损失. 因此, 内镜术后并发出血具有可预防性、可预测性、可确定性和可治疗性, 对于实际应用具有明确的指导性和改进作用, 具有广阔的应用前景.



#### ■同行评价

本文学术性较好,对减少消化内镜治疗中胃肠道出血并发症的发生具有较好的临床意义。

着出血时间的延长,失血与输血量的增大,身体状况和凝血机制发生变化,增加了后续治疗的风险和难度,临床医疗的成本增加,效率下降,成效比显著降低。

#### 4 参考文献

- 1 Boustière C. [Complications of routine digestive endoscopy]. *Rev Prat* 2008; 58: 701-705
- 2 Lüning TH, Keemers-Gels ME, Barendregt WB, Tan AC, Rosman C. Colonoscopic perforations: a review of 30,366 patients. *Surg Endosc* 2007; 21: 994-997
- 3 Bhatia NL, Collins JM, Nguyen CC, Jaroszewski DE, Vikram HR, Charles JC. Esophageal perforation as a complication of esophagogastroduodenoscopy. *J Hosp Med* 2008; 3: 256-262
- 4 Jałocha L, Wojtuń S, Gil J. [Incidence and prevention methods of complications of gastrointestinal endoscopy procedures]. *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22: 495-498
- 5 Celiński K, Cichoz-Lach H. Therapeutic endoscopy in gastroenterology. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 Suppl 3: 33-41
- 6 Martins NB, Wassef W. Upper gastrointestinal bleeding. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 612-619
- 7 Shiba M, Higuchi K, Kadouchi K, Montani A, Yamamori K, Okazaki H, Taguchi M, Wada T, Itani A, Watanabe T, Tominaga K, Fujiwara Y, Hayashi T, Tsumura K, Arakawa T. Risk factors for bleeding after endoscopic mucosal resection. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7335-7339
- 8 施新岗, 李兆申, 许国铭. 儿童胰腺炎ERCP术后并发症研究. *胰腺病学* 2002; 2: 141-143
- 9 Christoforidis E, Goulimaris I, Kanellos I, Tsalis K, Demetriades C, Betsis D. Post-ERCP pancreatitis and hyperamylasemia: patient-related and operative risk factors. *Endoscopy* 2002; 34: 286-292
- 10 Yao LQ, Zhang YQ, Zhou PH, Gao WD, He GJ, Xu MD. Endoscopic sphincterotomy or papillary balloon dilatation for choledocholithiasis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 101-105
- 11 Talar-Wojnarowska R, Szulc G, Woźniak B, Pazurek M, Małacka-Panas E. Assessment of frequency and

safety of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in patients over 80 years of age. *Pol Arch Med Wewn* 2009; 119: 136-140

- 12 龚彪, 王实, 别里克, 潘亚敏, 李新萍, 陆蕊. EST术后止血夹预防性止血的回响性研究. *中华消化内镜杂志*, 2006; 23: 183-185
- 13 王萍, 吴杰, 黄晓东, 孙圣斌, 张衡, 郑丹, 宋敏, 刘文敏. 经结肠镜高频电圈套联合尼龙绳套扎和或钛夹治疗大肠宽蒂和大息肉156例. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1838-1841
- 14 Kapetanios D, Beltsis A, Chatzimavroudis G, Katsinelos P. The use of endoclips in the treatment of nonvariceal gastrointestinal bleeding. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2009; 19: 2-10
- 15 Consolo P, Luigiano C, Strangio G, Scaffidi MG, Giacobbe G, Di Giuseppe G, Zirilli A, Familiari L. Efficacy, risk factors and complications of endoscopic polypectomy: ten year experience at a single center. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2364-2369
- 16 Leontiadis GI, Sreedharan A, Dorward S, Barton P, Delaney B, Howden CW, Orhewere M, Gisbert J, Sharma VK, Rostom A, Moayyedi P, Forman D. Systematic reviews of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of proton pump inhibitors in acute upper gastrointestinal bleeding. *Health Technol Assess* 2007; 11: iii-iv, 1-164
- 17 Jeong HK, Park CH, Jun CH, Lee GH, Kim HI, Kim HS, Choi SK, Rew JS. A prospective randomized trial of either famotidine or pantoprazole for the prevention of bleeding after endoscopic submucosal dissection. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 1055-1059
- 18 Busch OR, van Delden OM, Gouma DJ. Therapeutic options for endoscopic haemostatic failures: the place of the surgeon and radiologist in gastrointestinal tract bleeding. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 341-354
- 19 Millward SF. ACR Appropriateness Criteria on treatment of acute nonvariceal gastrointestinal tract bleeding. *J Am Coll Radiol* 2008; 5: 550-554
- 20 Kihara S, Mizutani T, Shimizu T, Toyooka H. Bleeding from a tear in the gastric mucosa caused by transoesophageal echocardiography during cardiac surgery: effective haemostasis by endoscopic argon plasma coagulation. *Br J Anaesth* 1999; 82: 948-950

编辑 李薇 电编 李薇

# 血清载脂蛋白水平在HBV慢性肝病肝损伤程度判断中的作用

邢欣悦, 刘梅, 郑素军, 张莹, 武聚山, 俞豪, 李长勇, 白丽, 刘霜, 段钟平

邢欣悦, 刘梅, 郑素军, 张莹, 武聚山, 白丽, 刘霜, 段钟平, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝中心 北京市 100069  
俞豪, 李长勇, 首都医科大学基础医学院细胞生物学系 北京市 100069  
“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项课题基金资助项目, No. 2008ZX10002-005-3  
国家自然科学基金资助项目, No. 30800979  
北京自然科学基金资助项目, No. 7102085  
北京市科技新星资助项目, No. 2007B055  
首都医科大学基础-临床科研合作基金, No. 2007JL02; 2010JL02  
北京市教育委员会科技发展计划项目基金资助项目, No. KM201010025024  
作者贡献分布: 邢欣悦、刘梅、郑素军、张莹、武聚山、白丽及刘霜负责收集临床病例资料; 俞豪与李长勇参与课题设计和给予统计指导; 邢欣悦完成数据统计和论文撰写; 郑素军与段钟平负责课题设计和统筹; 郑素军给予论文审核修改。  
通讯作者: 郑素军, 副主任医师, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院. zhengsujun003@126.com  
收稿日期: 2010-10-08 修回日期: 2010-12-02  
接受日期: 2010-12-07 在线出版日期: 2011-01-28

## Significance of serum apolipoprotein levels in assessing the degree of liver injury in patients with HBV-related chronic liver disease

Xin-Yue Xing, Mei Liu, Su-Jun Zheng, Ying Zhang, Ju-Shan Wu, Hao Yu, Chang-Yong Li, Li Bai, Shuang Liu, Zhong-Ping Duan

Xin-Yue Xing, Mei Liu, Su-Jun Zheng, Ying Zhang, Ju-Shan Wu, Li Bai, Shuang Liu, Zhong-Ping Duan, Artificial Liver Treatment & Training Center, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China  
Hao Yu, Chang-Yong Li, Department of Cell Biology, Capital Medical University, Beijing 100069, China  
Supported by: the National Science and Technology Key Project on “Major Infectious Diseases such as HIV/AIDS, Viral Hepatitis Prevention and Treatment”, No. 2008ZX10002-005-3; National Natural Science Foundation of China, No. 30800979; the Beijing Municipal Natural Science Foundation, No. 7102085; the Beijing New Star Project of Science & Technology, No. 2007B055; the Basic-Clinic Scientific Research Cooperation Foundation of Capital Medical University, Nos. 2007JL02, 2010JL02; the Science and Technology Development Project of the Beijing Municipal Education Commission Science and Technology, No. KM201010025024  
Correspondence to: Su-Jun Zheng, Beijing You'an Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China. zhengsujun003@126.com  
Received: 2010-10-08 Revised: 2010-12-02  
Accepted: 2010-12-07 Published online: 2011-01-28

## Abstract

**AIM:** To observe the changes in serum apolipoprotein levels in patients with HBV-related chronic liver disease and to assess the relationship between serum apolipoprotein levels and the degree of liver injury in these patients.

**METHODS:** A total of 113 patients with HBV-related chronic liver disease were involved in the study, including 33 patients with chronic hepatitis B, 46 patients with liver cirrhosis and 34 patients with liver failure. Patients with liver failure were further subdivided into good prognosis group and poor prognosis group. Fasting serum ApoA1 and ApoB levels were measured and MELD and Child-Pugh scores were calculated in these patients to analyze the correlation between the levels of serum apolipoproteins (including ApoA1, ApoB and ApoA1/B ratio) and liver disease scores (including MELD score and Child-Pugh score).

**RESULTS:** Serum ApoA1 and ApoB levels were highest in the chronic hepatitis B group, followed by the liver cirrhosis group and liver failure group ( $F = 41.592, P = 0.000; F = 9.178, P = 0.000; ApoA1/B$  ratio:  $1.31 \pm 0.73, 1.38 \pm 0.65, 0.51 \pm 0.38, F = 22.759, P = 0.000$ ). Serum ApoA1 levels and ApoA1/B ratio were not statistically different between the chronic hepatitis B group and liver cirrhosis group ( $P = 0.057, 0.625$ ), but were significantly lower in the liver failure group than in the other two groups (both  $P = 0.000$ ). Serum ApoB levels did not differ significantly between patients with liver cirrhosis and those with hepatic failure ( $P = 0.082$ ), but were significantly lower in the chronic hepatitis B group than in the other two groups ( $P = 0.006, 0.000$ ). Child-Pugh and MELD scores were lowest in the chronic hepatitis B group, followed by the liver cirrhosis group and liver failure group ( $F = 74.961, P = 0.000; F = 56.405, P = 0.000$ ). In patients with HBV-related chronic liver disease, serum levels of ApoA1 and ApoB and ApoA1/B ratio were negatively correlated with Child-Pugh and MELD scores (all  $P < 0.05$ ). In the liver

## 背景资料

肝脏在脂类的消化、吸收、分解、合成及运输等代谢过程中均具有重要作用,当肝细胞受损时, ApoA1和ApoB水平可能出现下降. 目前,血清Apo用于病毒性肝炎、肝硬化、肝衰竭导致的肝损伤程度判断在国内外有一些研究.

## 同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

### ■相关报道

有的研究显示 ApoA1 随着慢性乙型肝炎、肝硬化、重型肝炎进展, 其浓度下降, 而也有研究则无下降。又如有的研究表明 ApoA1 和 ApoB 与胆红素、PTA 等指标相关, 有的则发现 ApoB 无显著相关性。

failure group, serum levels of ApoA1 and ApoB, ApoA1/B ratio, Child-Pugh and MELD scores showed no significant difference between the good and poor prognosis groups (all  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Serum levels of ApoA1, ApoB and ApoA1/ApoB ratio are good parameters to reflect the degree of liver injury in patients with HBV-related chronic liver disease.

**Key Words:** Serum apolipoprotein; Apolipoprotein A1; Apolipoprotein B; Hepatitis B virus; Chronic liver disease; Liver injury

Xing XY, Liu M, Zheng SJ, Zhang Y, Wu JS, Yu H, Li CY, Bai L, Liu S, Duan ZP. Significance of serum apolipoprotein levels in assessing the degree of liver injury in patients with HBV-related chronic liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 295-300

### 摘要

**目的:** 研究HBV慢性肝病中的血清载脂蛋白水平的变化与肝损伤严重程度的关系。

**方法:** 113例HBV相关的慢性肝病患者, 其中慢性乙型肝炎33例, 肝硬化46例, 重型肝炎肝衰竭34例, 肝衰竭又分为良好预后组和不良预后组, 检测其入院时空腹血清载脂蛋白ApoA1和ApoB水平, 计算患者的MELD和Child-Pugh评分, 并分析ApoA1、ApoB水平, 以及ApoA1/ApoB比值与患者的MELD和Child-Pugh评分的相关性。

**结果:** 慢性乙型肝炎、肝硬化和重型肝炎肝衰竭3组患者血清ApoA1、ApoB均逐渐下降 ( $F = 41.592, P = 0.000; F = 9.178, P = 0.000$ ). ApoA1/B在3组患者分别为  $1.31 \pm 0.73, 1.38 \pm 0.65, 0.51 \pm 0.38$ , 三组间差别明显 ( $F = 22.759, P = 0.000$ ). 两两比较显示, ApoA1、ApoA1/B在慢性乙型肝炎组和肝硬化组间均无统计学差异 ( $P = 0.057, P = 0.625$ ), 但重型肝炎肝衰竭组较慢性乙型肝炎组、肝硬化组明显下降 (均  $P = 0.000$ ); ApoB在肝硬化组和肝衰竭组间无统计学差异 ( $P = 0.082$ ), 慢性乙型肝炎分别与肝硬化和肝衰竭比较, 差异均明显 ( $P = 0.006, P = 0.000$ ). 慢性乙型肝炎、肝硬化和肝衰竭3组中Child-Pugh和MELD评分逐渐增高 ( $F = 74.961, P = 0.000; F = 56.405, P = 0.000$ ). HBV慢性肝病患者ApoA1、ApoB及ApoA1/B分别与Child-Pugh和MELD评分具有负相关性 (均  $P < 0.05$ ). 在重型肝炎肝衰竭组, ApoA1、ApoB、ApoA1/B、Child-Pugh和MELD评分在良好预后和不良预后组间均无统计学差异 ( $P > 0.05$ ).

**结论:** 血清ApoA1、ApoB水平, 以及ApoA1/ApoB比值是反映HBV慢性肝病肝损伤程度的较好指标。

**关键词:** 血清载脂蛋白; 载脂蛋白A1; 载脂蛋白B; 乙型肝炎病毒; 慢性肝病; 肝损伤

邢欣悦, 刘梅, 郑素军, 张莹, 武聚山, 俞豪, 李长勇, 白丽, 刘霜, 段钟平. 血清载脂蛋白水平在HBV慢性肝病肝损伤程度判断中的作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(3): 295-300

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/295.asp>

### 0 引言

载脂蛋白(apolipoprotein, Apo)在脂类的代谢中发挥重要的功能, 是脂蛋白的主要构成蛋白, 其中ApoA1和ApoB主要由肝脏合成. ApoA1是血清高密度脂蛋白的主要载脂蛋白, 其主要作用是激活卵磷脂胆固醇酰基转移酶; ApoB是低密度脂蛋白的主要Apo, 在运输内源性胆固醇, 以及三酰甘油及低密度脂蛋白的代谢中起着重要作用<sup>[1]</sup>.

肝脏在脂类的消化、吸收、分解、合成及运输等代谢过程中均具有重要作用, 当肝细胞受损时, ApoA1和ApoB水平可能出现下降. 目前, 血清Apo用于病毒性肝炎、肝硬化、肝衰竭导致的肝损伤程度判断在国内外有一些研究<sup>[2-10]</sup>, 其研究现状是: (1)虽然针对病毒性肝炎、肝硬化有较多研究<sup>[2,3]</sup>, 但这些研究或者未说明病因具体是何种病毒, 或者肝硬化患者由病毒性肝炎(乙型肝炎、丙型肝炎)、酒精性肝硬化、血吸虫性肝硬化、自身免疫性肝病等多病种组成; 而由于酒精、丙型肝炎病毒性肝炎可直接影响血脂代谢<sup>[11,12]</sup>, 原发性胆汁性肝硬化影响血脂分泌排泄<sup>[4]</sup>, 以上原因可能直接导致血清Apo水平改变, 而使其难以用含量高低来精确反映肝损伤程度; (2)HBV可引起慢性肝炎、肝硬化、肝衰竭等不同程度的病变, 但目前上述病变患者血清中ApoA1和ApoB水平变化研究尚少且存在矛盾之处, 需要进一步验证和探讨. 如有的研究显示ApoA1随着慢性乙型肝炎、肝硬化、重型肝炎进展, 其浓度下降<sup>[5,6]</sup>, 而也有研究则无下降<sup>[7]</sup>. 又如有的研究表明ApoA1和ApoB与胆红素、PTA等指标相关<sup>[5]</sup>, 有的则发现ApoB无显著相关性<sup>[8]</sup>; 由于乙型肝炎肝衰竭死亡率高, 尚缺乏特异、有效反映肝衰竭预后的指标, 积极探索反映肝损伤严重程度的指标, 对于判断肝衰竭预后判断和指导治疗, 有重要意义. 本研究拟摒弃

表 1 HBV相关慢性肝病患者的—般信息

	疾病分组			总数( <i>n</i> = 113)
	慢性肝炎( <i>n</i> = 33)	肝硬化( <i>n</i> = 46)	重型肝炎肝衰竭( <i>n</i> = 34)	
性别( <i>n</i> )				
男	26	40	28	94
女	7	6	6	19
年龄(岁)	36.61 ± 9.15	52.44 ± 139.81	44.77 ± 11.05	44.69 ± 10.97
ALT(U/L)	328.62 ± 363.24	81.54 ± 139.81	399.94 ± 468.39	251.00 ± 362.27
AST(U/L)	174.28 ± 193.78	73.66 ± 90.17	373.98 ± 513.10	200.62 ± 337.12
TBIL(μmol/L)	75.09 ± 133.05	65.93 ± 106.83	388.51 ± 190.26	166.55 ± 205.11
ALB(g/L)	37.79 ± 3.45	31.20 ± 6.49	30.03 ± 5.37	32.79 ± 6.28
CR(μmol/L)	71.2 ± 14.23	73.00 ± 19.63	86.64 ± 40.41	76.61 ± 27.23
INR	1.22 ± 0.60	1.37 ± 0.39	2.40 ± 1.02	2.39 ± 1.01

## ■应用要点

血清ApoA1、ApoB水平, 以及ApoA1/ApoB比值是反映HBV慢性肝病肝损伤程度的较好指标。

其他病因引起的慢性肝病, 观察HBV慢性肝病中的血清Apo水平的变化, 判断其与肝损伤严重程度的关系, 现报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 113例HBV相关的慢性肝病患者, 于2006-06/2009曾在首都医科大学附属北京佑安医院住院诊治, 均具有详细的临床资料。患者的一般信息(年龄、性别及诊断), 谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT), 谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST), 总胆红素(total bilirubin, TBIL), 白蛋白(albumin, ALB), 肌酐(creatinine, CR)和凝血酶原国际标准化比值(international normalized ratio of plasmozyme, INR)的水平见表1。所有患者无糖尿病、甲状腺功能异常和肾功能不全等影响血脂代谢的疾病。依据2000年西安会议所制定的病毒性肝炎防治方案<sup>[13]</sup>, 113例患者被分为3组。第1组为33例慢性乙型肝炎患者, 包括男26例和女7例, 年龄为22-58岁。第2组为46例乙型肝炎肝硬化患者, 包括男40例和女6例, 年龄为36-66岁, 14例肝硬化患者处于代偿期, 32例肝硬化患者处于失代偿期。第3组为34例重型肝炎肝衰竭患者, 包括男28例和女6例, 年龄为20-65岁, 肝衰竭诊断依据我国《肝衰竭诊疗指南》<sup>[14]</sup>。其中急性肝衰竭1例, 亚急性肝衰竭2例, 慢性肝衰竭4例, 慢加亚急性肝衰竭27例。对重型肝炎肝衰竭患者以入院为起点随访3 mo, 其中良好预后患者(未作肝移植, 发病3 mo后仍存活者)13例, 不良预后患者(包括做肝移植患者和发病3 mo内死亡者)21例, 有14例患者接受肝移植手术。

1.2 方法 患者入院后第2天清晨抽取空腹血, 送生化室检测。采用日本OLYMPUS AU5400全自

动生化分析仪检测生化指标; 美国ACL-TOP全自动凝血分析系统检测凝血指标。比较慢性乙型肝炎、肝硬化、重型肝炎肝衰竭3组患者间血清ApoA1、ApoB含量, 以及ApoA1/ApoB比值差别, 其中肝衰竭患者进一步分为具有良好预后和不良预后2组进行比较。计算所有患者的MELD和Child-Pugh评分, 统计分析这两种评分各自与血清ApoA1、ApoB含量, 以及ApoA1/ApoB比值的相关性。

**统计学处理** 使用统计学软件SPSS16.0处理数据。计量资料用mean ± SD表示, 多组间比较用方差分析; 进一步应用Kruskal-Wallis方法比较不同组间血清Apo的水平。应用Spearman's Rank Correlation方法分析HBV慢性肝病患者血中Apo水平与MELD和Child-Pugh评分间的关系。应用两独立样本 $t$ 检验方法比较重型肝炎肝衰竭组中具有良好预后和不良预后的血清Apo水平。

## 2 结果

2.1 血清Apo水平的组间比较 由表2可知, 慢性乙型肝炎、肝硬化和重型肝炎肝衰竭3组中血清ApoA1的平均值各自分别为92.76, 78.04, 22.89, 血清ApoA1浓度在HBV慢性肝病患者组间差异明显( $F = 41.592, P = 0.000$ ), 提示随着病情由慢性乙型肝炎进展至肝硬化, 以致重型肝炎肝衰竭, 血清ApoA1浓度是逐渐降低的。但进行两两组间比较时, 慢性乙型肝炎组和肝硬化组间无统计学差异( $P = 0.057$ ), 而两者分别和肝衰竭组相比均有统计学差异( $P = 0.000$ )。

慢性乙型肝炎、肝硬化和肝衰竭三组中血清ApoB的平均值分别为77.58, 61.91, 52.18, 血清ApoB的浓度在不同HBV慢性肝病间同样有

### 同行评价

本文选题一般,对临床上将血清载脂蛋白作为辅助指标判断肝病变程度有一定的意义。

表 2 HBV慢性肝病ApoA1、ApoB、ApoA1/B、MELD及Child-Pugh比较 (mean ± SD)

	<i>n</i>	ApoA1(mg/dL)	ApoB(mg/dL)	ApoA1/B	MELD评分	Child-Pugh评分
慢性乙型肝炎	33	92.76 ± 44.62 <sup>a</sup>	77.58 ± 26.12	1.31 ± 0.73 <sup>a</sup>	8.76 ± 7.00 <sup>a</sup>	6.42 ± 2.00 <sup>ab</sup>
肝硬化	46	78.04 ± 33.44 <sup>a</sup>	61.91 ± 22.22 <sup>c</sup>	1.38 ± 0.65 <sup>a</sup>	9.56 ± 6.05 <sup>a</sup>	8.07 ± 2.51 <sup>a</sup>
肝衰竭(总体)	34	22.89 ± 17.04	52.18 ± 26.22 <sup>c</sup>	0.51 ± 0.38	25.52 ± 6.57	11.56 ± 1.16
良好预后组	13	22.37 ± 13.53	55.84 ± 29.51	0.45 ± 0.29	21.17 ± 5.40	11.08 ± 1.12
不良预后组	21	23.21 ± 19.21	49.91 ± 23.68	0.54 ± 0.43	28.22 ± 5.82	11.86 ± 1.11

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 肝衰竭(总体); <sup>b</sup>*P*<0.05 vs 慢性乙型肝炎; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs 肝硬化。

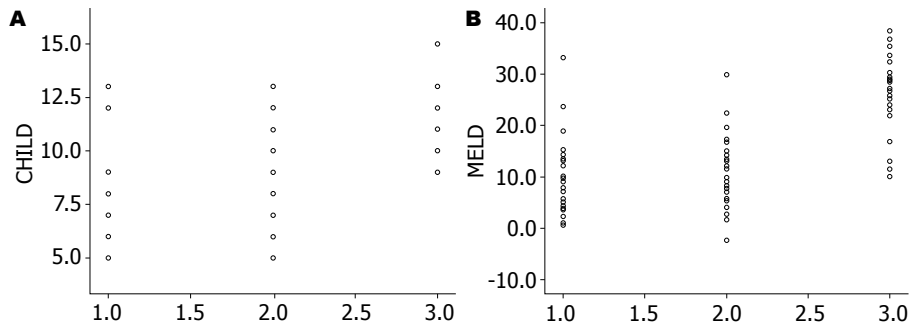


图 1 HBV慢性肝病患者的Child-Pugh和MELD评分分布图。A: Child-Pugh; B: MELD; 1: 慢性乙型肝炎; 2: 肝硬化; 3: 重型肝炎肝衰竭。

显著差异( $F = 9.178, P = 0.000$ )。两两比较显示,肝硬化组和肝衰竭组间无统计学差异( $P = 0.082, P > 0.05$ ),而两者分别和慢性乙型肝炎组相比均有统计学差异( $P$ 值分别为0.006和0.000)。

慢性乙型肝炎、肝硬化和肝衰竭3组中血清ApoA1/B的平均值各自分别为1.31, 1.38, 0.51, ApoA1/B在不同HBV慢性肝病间同样有显著差异( $F = 22.759, P = 0.000$ ),虽慢性乙型肝炎组与肝硬化组无明显差异( $P = 0.625, P > 0.05$ ),但二者分别与肝衰竭组间均有显著差异(均 $P = 0.000$ )。

34例肝衰竭患者中,有13例患者有良好预后,21例患者有不良预后。血清ApoA1、ApoB浓度,以及ApoA1/B在两组之间均无明显差异( $t = 0.138, P = 0.891; t = 0.645, P = 0.523$ ,以及 $t = 0.695, P = 0.492$ ,表2)。

**2.2 HBV慢性肝病患者的Child-Pugh和MELD评分** 由患者相关的临床检验数据可将Child-Pugh和MELD评分计算出,在慢性乙型肝炎、肝硬化和肝衰竭三组中Child-Pugh和MELD评分逐渐增高(表2,图1),方差分析显示,三组之间均差异明显( $F = 74.961, P = 0.000; F = 56.405, P = 0.000$ );其中MELD评分在慢性乙型肝炎与肝硬化间无明显差异( $P = 0.592$ ),慢性乙型肝炎、肝硬化分别和肝衰竭相比,均有明显差异(均 $P = 0.000$ );Child-Pugh评分在慢性乙型肝炎与肝硬化间差异明显( $P = 0.001$ );慢性乙型肝炎、肝硬化分别

和肝衰竭差异明显(均 $P = 0.000$ )。

**2.3 HBV慢性肝病患者的血清Apo含量与Child-Pugh和MELD评分间的关系** 相关分析显示,HBV慢性肝病患者的血清ApoA1浓度分别与Child-Pugh评分、MELD评分呈负相关( $r = -0.048, P < 0.05; r = -0.167, P < 0.05$ ),即血清ApoA1浓度越高,Child-Pugh评分、MELD评分越低(图2)。同样,血清ApoB浓度分别与Child-Pugh评分、MELD评分呈负相关( $r = -0.041, P < 0.05; r = -0.1, P < 0.05$ ,图3)。相关分析也显示,与ApoA1、ApoB较低的相关性不同,患者血清ApoA1/B分别与Child-Pugh评分、MELD评分间的关系呈显著负相关( $r = -2.13, P < 0.05; r = -8.563, P < 0.05$ ),即血清ApoA1/B越高,患者Child-Pugh评分和MELD评分越低(图4)。

### 3 讨论

肝脏在脂蛋白及Apo合成、降解及储存中起枢纽作用。当肝实质细胞发生病变时,必将引起脂蛋白及Apo的代谢紊乱。Apo是脂蛋白中的主要构成蛋白,在脂类的代谢中发挥重要的功能,其中ApoA1、ApoB是由肝脏合成的两类主要的Apo<sup>[1]</sup>。当发生肝损伤时,合成ApoA1和ApoB的能力会下降。

本试验证实了ApoA1和ApoB浓度在HBV慢性肝病的不同阶段(慢性乙型肝炎、肝硬化和重型肝炎肝衰竭)中是有显著差异的,即随着病情

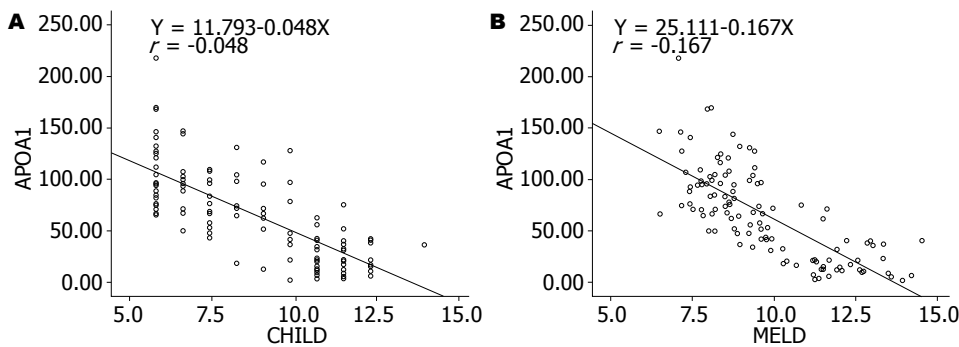


图2 ApoA1分别与CHILD和MELD评分相关性的分析. A: Child-Pugh; B: MELD.

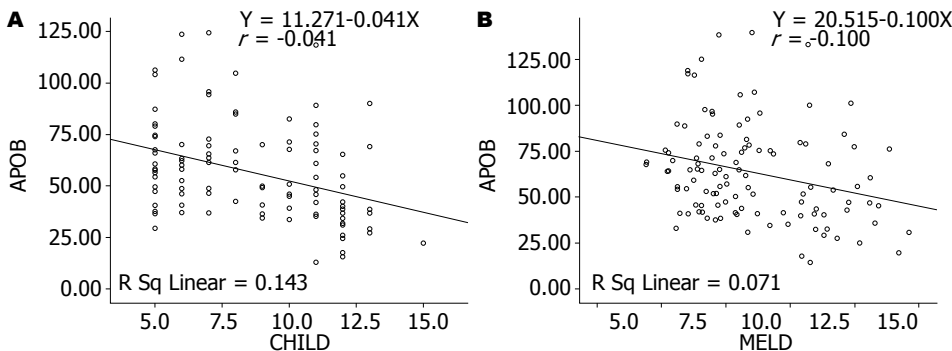


图3 ApoB分别与CHILD和MELD评分相关性的分析. A: Child-Pugh; B: MELD.

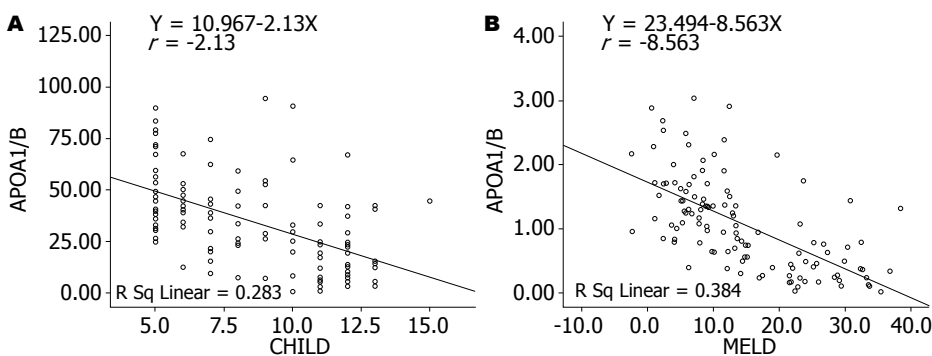


图4 ApoA1/B分别与CHILD和MELD评分相关性的分析. A: Child-Pugh; B: MELD.

由慢性乙型肝炎进展至肝硬化, 以致肝衰竭, 血清Apo的浓度逐渐降低, 提示ApoA1和ApoB水平可反映肝损伤程度. 肝衰竭的本质是肝脏大块或亚大块坏死, 肝硬化的本质是假小叶形成, 两者在病理和发病机制存在不同. 本研究中, 乙型肝炎重型肝炎肝衰竭ApoA1分别与肝硬化、慢性乙型肝炎有明显差别, 表明ApoA1随着大量肝细胞坏死, 其合成急剧下降, ApoA1有可能是反映肝衰竭或诊断肝衰竭的敏感指标. 而ApoB在肝衰竭虽较肝硬化有所下降, 但统计显示无明显区别, 可能与ApoB的合成、降解特点相关, 即其主要功能是作为肝细胞和肝外一些组织细胞表面脂蛋白受体的识别标志, 能使含有他的低密度脂蛋白被肝细胞及肝外组织细胞表面的受体识别结合发挥处理功能, 同时其也被降解, 即ApoB在肝脏合成本身亦在肝脏中降解<sup>[1]</sup>. 肝衰竭时, 除了肝细胞坏死引起ApoB合成障碍外,

而肝细胞表面ApoB受体表达减少, 也可能引起其分解减少, 最终在一定程度上减少了与肝硬化患者血清ApoB间差异.

目前, 在失代偿期肝硬化、肝衰竭等终末期肝病肝功能评价和预后判断中, MELD评分及CHILD评分系统是最好的评分系统之一, 他们可以较准确地反映患者的病情, 均具有良好的预测价值和准确性<sup>[15]</sup>. 现也有一些研究表明其可用于HBV引起的慢性肝炎、肝硬化、肝衰竭等肝功能评价<sup>[15-18]</sup>. 本实验也进一步证实了随着慢性乙型肝炎进展, CHILD和MELD评分均明显升高.

在本研究中, 统计分析表明, HBV慢性肝病患者的血清中, 载脂蛋白ApoA1、ApoB含量分别与Child-Pugh和MELD评分呈负相关, 随着肝病逐渐严重, Child-Pugh和MELD评分越高, 而血清Apo含量则越低. 该结果提示, 血清载脂蛋白ApoA1、ApoB水平可反映HBV慢性肝病肝功能

状态。

目前,只有个别研究探讨了ApoA1/ApoB与肝纤维化指标的关系,其研究表明随着肝硬化Child-Pugh分级及血清HPCIII、IV-C、HA水平的升高,ApoB/ApoA1也随之升高,两者显示了一定的一致性<sup>[9]</sup>。ApoA1/ApoB在乙型肝炎肝功能判断中作用缺乏更多的研究和探讨。本研究在对血清Apo与Child和MELD评分相关性的分析中,发现ApoA1/B与Child和MELD评分相关性的相关系数最高,分别是-2.13和-8.563,相关性远远高于ApoA1的 $r = -0.048$ 和 $r = -0.167$ ,以及ApoB的 $r = -0.041$ 和 $r = -0.1$ ,这提示了ApoA1/B有可能可作为判断HBV慢性肝病严重程度和了解预后的指标,较单独测定ApoA1、ApoB的水平更有意义。

本研究也发现,对于肝衰竭组良好预后和预后不良组之间,血清载脂蛋白ApoA1、血清载脂蛋白ApoB和血清载脂蛋白A1/B浓度比值、CHILD和MELD评分均无明显的统计学意义,产生这种结果可能与样本量较小有一定关系,我们将进一步扩大样本量进行研究。

总之,本文对慢性乙型肝炎患者血清载脂蛋白ApoA1、ApoB及其对肝功能判断中作用做了研究。由于研究对象为单一的HBV引起的慢性肝病患者,因此摒弃了其他诸多直接影响血脂代谢的因素;而应用MELD和Child-Pugh评分作为参照,也增加了血清Apo对肝功判断的可信性。同时血脂作为临床常规的检查,基层单位也可开展检测,易于推广。血清ApoA1、ApoB含量及其比值的测定可能作为检测肝功能的指标之一,他不仅反映和评估HBV慢性肝病的肝功储备和预后预后,对指导临床治疗也具有一定的意义。

#### 4 参考文献

1 Olofsson SO, Wiklund O, Borén J. Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3: 491-502

2 陶华兴,袁小妹,曹康元.病毒性肝炎患者血清载脂蛋白A1、B水平检测的临床意义. *中国医师杂志* 2001; 3: 295-296

3 梁丽,李澜,黄国美.肝硬化患者血清脂类及载脂蛋白的变化及意义. *贵州医药* 2007; 31: 741-742

4 黎芳,黎志良,林炳亮,谢奇峰.病毒性肝炎肝硬化与胆汁性肝硬化的血脂及载脂蛋白分析比较. *中国现代医学杂志* 2004; 14: 52-54

5 黎志良,林炳亮,肖杰生,谢奇峰.血脂、载脂蛋白与慢性病毒性肝炎肝损害关系-附178例报告. *新医学* 2002; 33: 660-662

6 何凯茵,肖光明,张春兰.慢性乙型肝炎患者血脂和载脂蛋白水平变化及其意义. *实用肝脏病杂志* 2005; 8: 326-327

7 刘艳辉,洪伟.慢性肝损害患者血清载脂蛋白的测定. *锦州医学院报* 1999; 20: 24-25

8 王海霞,谢俊强,尹进强,程厚文.血脂及血清载脂蛋白在慢性乙型重型肝炎患者中的临床价值. *肝脏* 2005; 10: 66-67

9 Tsai MH, Peng YS, Chen YC, Lien JM, Tian YC, Fang JT, Weng HH, Chen PC, Yang CW, Wu CS. Low serum concentration of apolipoprotein A-I is an indicator of poor prognosis in cirrhotic patients with severe sepsis. *J Hepatol* 2009; 50: 906-915

10 Spósito AC, Vinagre CG, Pandullo FL, Mies S, Raia S, Ramires JA. Apolipoprotein and lipid abnormalities in chronic liver failure. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 1287-1290

11 Hannuksela ML, Rämetsä ME, Nissinen AE, Liisanantti MK, Savolainen MJ. Effects of ethanol on lipids and atherosclerosis. *Pathophysiology* 2004; 10: 93-103

12 Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol* 2009; 90: 1055-1070

13 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学会分会.病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329

14 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组.中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组.肝衰竭诊疗指南. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 643-646

15 Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* 2007; 45: 797-805

16 Chan HL, Chim AM, Lau JT, Hui AY, Wong VW, Sung JJ. Evaluation of model for end-stage liver disease for prediction of mortality in decompensated chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1516-1523

17 魏倪,杨方,吴晓枫,李兴海.失代偿期肝硬化患者的MELD评分与预后. *胃肠病学和肝病学杂志* 2008; 17: 142-144

18 陈瑞玲,罗瑞虹,崇雨田,吴元凯,赵志新,高志良. MELD评分对慢性重型乙型病毒性肝炎患者短期预后评价的价值. *中山大学学报(医学科学版)* 2006; 27: 594-596

19 陈卓鹏.肝硬化患者血清载脂蛋白B/A1比值与肝纤维化指标的相关性研究. *实用肝脏病杂志* 2003; 6: 214-216

编辑 李薇 电编 何基才

## 糖尿病患者胆囊排空功能障碍40例

卢丽君, 严祥, 马苏美

卢丽君, 马苏美, 兰州大学第一医院超声医学科 甘肃省兰州市 730000

严祥, 兰州大学第一医院 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 卢丽君与严祥对此文贡献均等; 此课题由卢丽君与严祥设计; 研究过程由卢丽君、严祥及马苏美操作完成; 数据分析和论文撰写由卢丽君与严祥完成。

通讯作者: 严祥, 教授, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院. yanxiang528@sohu.com

收稿日期: 2010-09-12 修回日期: 2010-11-25

接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-28

### Gallbladder emptying dysfunction in diabetic patients: an analysis of 40 cases

Li-Jun Lu, Xiang Yan, Su-Mei Ma

Li-Jun Lu, Su-Mei Ma, Department of Ultrasonography, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Xiang Yan, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Professor Xiang Yan, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. yanxiang528@sohu.com

Received: 2010-09-12 Revised: 2010-11-25

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To explore the mechanisms underlying gallbladder emptying dysfunction in diabetic patients.

**METHODS:** Gallbladder volume and gallbladder arterial blood flow were measured on an empty stomach and gallbladder emptying after a fatty meal was measured by B-mode ultrasound in 24 diabetic patients with autonomic neuropathy (AN group), 16 diabetic patients without autonomic neuropathy (NAN group), and 20 healthy controls (HC group).

**RESULTS:** Fasting gallbladder volume increased more significantly in the AN group than in the HC group and NAN group ( $22.71 \text{ mL} \pm 6.67 \text{ mL}$  vs  $14.39 \text{ mL} \pm 5.10 \text{ mL}$ ,  $15.49 \text{ mL} \pm 4.66 \text{ mL}$ , both  $P < 0.01$ ). Postprandial gallbladder volume significantly increased at all time points (all  $P < 0.01$ ), while the rate of gallbladder emptying at

all time points was significantly lower in the AN group than in the other two groups (all  $P < 0.01$ ). Gallbladder arterial resistance index (RI) was significantly higher in the AN group than in the other two groups ( $0.74 \pm 0.07$  vs  $0.65 \pm 0.05$ ,  $0.61 \pm 0.06$ , both  $P < 0.01$ ). The minimum diastolic blood flow velocity ( $V_{\min}$ ) was significantly lower in the AN group than in the other two groups ( $5.62 \pm 1.19$  vs  $8.31 \pm 1.86$ ,  $8.72 \pm 1.43$ , both  $P < 0.01$ ). Gallbladder arterial RI showed a significant correlation with glycosylated hemoglobin level and insulin resistance index (HOMA-IR) ( $r = 0.648$ ,  $0.822$ , both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The development of gallbladder emptying dysfunction in diabetic patients is partly due to impaired autonomic nerve. There are significant differences in gallbladder arterial RI and  $V_{\min}$  among the AN group, NAN group and HC group. Gallbladder emptying dysfunction may be associated with hemodynamic changes in the gallbladder.

**Key Words:** Diabetes mellitus; Gallbladder emptying; Artery; Ultrasonography

Lu LJ, Yan X, Ma SM. Gallbladder emptying dysfunction in diabetic patients: an analysis of 40 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 301-304

### 摘要

**目的:** 探讨糖尿病患者胆囊排空功能的改变及其发生机制。

**方法:** B超测定24例糖尿病合并自主神经病变患者(AN组)、16例不合并自主神经病变患者(NAN组)及20例正常对照组空腹胆囊体积、胆囊动脉血流及脂餐后胆囊的排空功能。

**结果:** AN组较NAN组及正常组空腹胆囊体积明显增大( $22.71 \text{ mL} \pm 6.67 \text{ mL}$  vs  $14.39 \text{ mL} \pm 5.10 \text{ mL}$ ,  $15.49 \text{ mL} \pm 4.66 \text{ mL}$ , 均 $P < 0.01$ ), 餐后各时点胆囊体积也显著增大( $P < 0.01$ ), 各时点胆囊排空率明显减低( $P < 0.01$ ); AN组胆囊动脉血流参数阻力指数(RI)较NAN组及正常组明显升高( $0.74 \pm 0.07$  vs  $0.65 \pm 0.05$ ,  $0.61 \pm 0.06$ ,

### 背景资料

糖尿病患者胆石症发生率较正常人高2-3倍, 其高发原因的研究多侧重于血浆胰岛素水平及脂代谢等方面。近年研究发现胆囊排空功能减低也是胆石形成的重要原因之一。

### 同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科



### ■相关报道

国内外有关报道认为糖尿病患者迷走神经受损是导致胆囊排空障碍的原因之一。Ding等研究表明糖尿病伴胆囊结石胆囊动脉壁明显增厚, PAS染色后其平均光密度增加, 说明其微血管改变可能是导致胆囊排空障碍加重的重要原因。

均 $P<0.01$ ), 而舒张期最低流速( $V_{\min}$ )较NAN组及正常组明显降低( $5.62\pm 1.19$  vs  $8.31\pm 1.86$ ,  $8.72\pm 1.43$ , 均 $P<0.01$ ); 胆囊动脉RI与糖化血红蛋白及胰岛素抵抗指数(Homa-IR)显著相关( $r=0.648, 0.822, P<0.05$ )。

**结论:** 糖尿病患者胆囊排空功能明显减低与自主神经受损有关; 糖尿病合并自主神经病变时其胆囊动脉RI和 $V_{\min}$ 较NAN组及正常组有明显差异, 糖尿病胆囊动脉血管病变也是影响胆囊排空功能的重要原因。

**关键词:** 糖尿病; 胆囊排空; 动脉; 超声检查

卢丽君, 严祥, 马苏美. 糖尿病患者胆囊排空功能障碍40例. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 301-304  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/301.asp>

## 0 引言

糖尿病患者胆石症发生率较正常人高2-3倍<sup>[1,2]</sup>, 胆囊排空功能减低是胆石形成的重要原因之一, 推测糖尿病自主神经受损是导致胆囊排空不良的重要因素. 本研究旨在从超声显像的角度观察糖尿病患者胆囊排空功能及胆囊血流动力学的改变以期探讨胆囊排空不良的发生机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择兰州大学第一医院住院糖尿病患者共40例, 男22例, 女18例, 年龄32-65(平均44.3)岁, 病程3-20年, 糖尿病诊断标准符合1998年WHO诊断标准. 40例糖尿病患者根据有无内脏神经变分为A组(单纯糖尿病组, NAN组, 16例)和B组(糖尿病合并内脏神经病变组, AN组, 24例). 具有下列情况之一者合并内脏神经病变<sup>[3]</sup>: (1)平卧位静息状态下心率 $>90/\text{min}$ , 立卧位收缩压差 $>30\text{ mmHg}$ , 深呼吸时每分钟心率差 $<10/\text{min}$ , Valsalvs动作指数R-R比值 $\leq 1.10$ , 立卧位时每分钟心率差 $<15/\text{min}$ ; (2)无其他因素所致的胆囊膨大, 腹泻、便秘或两者交替出现; (3)汗腺分泌异常; (4)无其他原因的瞳孔调节异常; (5)无其他原因所致的尿潴留. 健康对照组20例(男12例, 女8例)为C组, 年龄30-65(平均42.8)岁. 入选者均除外胆石症、肝病等消化系器质性疾, 检查前3 d停用一切影响胆囊收缩功能的药物. 糖尿病患者均给予糖尿病饮食, 降糖药物治疗. 各組间年龄、性别、体重无统计学差异。

**1.2 方法** 胆囊排空功能测定: 受检者禁食12 h后取仰卧位, 于空腹及脂肪餐(油煎鸡蛋2个)后

30、60、90、120 min, 重复3次测量胆囊的最大长径(L)、最大宽径(W)和前后径(H), 取平均值. 根据公式 $V=0.52\times L\times W\times H$ 计算胆囊容积(空腹胆囊体积为 $V_0$ , 餐后各时点胆囊体积为 $V_t$ ). 计算各时点胆囊排空率 $EF(\%)=(1-V_t/V_0)\times 100\%$ . 彩超仪为LOGIQ 7, 由一名固定医生进行检查. 胆囊动脉血流动力学指标测定: 采用LOGIQ 7超声诊断仪, 探头频率为2.5-6.0 MHz可变频率, 彩色多普勒阈值 $\leq 0.10\text{ cm}$ , 脉冲多普勒PW取样容积1.5-2.0 mm, 取样角度 $<30^\circ$ , 患者禁食8-12 h后检查, 取仰卧位, 在距胆囊颈部0.5-1.5 cm处寻找胆囊动脉血流取频谱, 测量血流参数: 收缩期最大流速( $V_{\max}$ )、舒张期最低流速( $V_{\min}$ )、阻力指数(resistance index, RI). 由一名固定医生进行检查. 测量空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)及餐后2 h血糖(postprandial blood glucose, PBG)浓度, 同时测量血HbA1c、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)和血清空腹胰岛素, 计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, Homa-IR).

**统计学处理** 用SPSS11.0统计软件, 各組实验数据均以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示, 用方差分析和直线回归分析进行统计学处理,  $P<0.05$ 为差异有显著性,  $P<0.01$ 为差异有极显著性。

## 2 结果

**2.1 胆囊的排空功能** AN组空腹及餐后30、60、90 min胆囊体积显著大于NAN组和C组, 餐后120 min胆囊体积与NAN组和C组无显著性差异( $P<0.01$ , 表1). 其 $EF_{30\text{min}}$ 、 $EF_{60\text{min}}$ 、 $EF_{90\text{min}}$ 、 $EF_{120\text{min}}$ 明显低于C组和NAN组( $P<0.01$ , 表2). NAN组和C组之间各时点胆囊体积及EF均无显著性差异。

**2.2 胆囊动脉血流参数** 彩色多普勒CDFI: 各組胆囊动脉显示率100%, 表现为点状、短条状及条状血流束. 脉冲多普勒PW: 各組胆囊动脉血流参数结果测量重复率100%, AN组RI及 $V_{\min}$ 较NAN组和C组有极显著性差异( $P<0.01$ , 表3, 图1).

**2.3 胆囊动脉RI与HbA1c及IR的关系** 糖尿病组胆囊动脉RI与HbA1c及IR均呈正相关( $r=0.648, 0.822, P<0.05$ ); 与FBG、PBG、TG及TC无相关性。

## 3 讨论

随着超声显像技术的不断发展, 超声检查不仅可以用于评价胆囊的形态及功能, 而且可以通

### ■创新点

本研究从胆囊动脉血流动力学角度探讨糖尿病患者胆囊排空障碍的机制, 为糖尿病患者胆囊排空障碍的治疗提供更详实的理论依据。

■应用要点

本文通过对糖尿病患者胆囊收缩功能测定、胆囊血管及阻力指数测定,了解胆囊排空障碍的机理,为糖尿病患者胆囊排空障碍的治疗提供了一定的理论依据。

表 1 各组胆囊各时点的体积 (mean ± SD, mL)

分组	n	FV	RV <sub>30min</sub>	RV <sub>60min</sub>	RV <sub>90min</sub>	RV <sub>120min</sub>
C组	20	15.49 ± 4.66 <sup>b</sup>	6.95 ± 1.57 <sup>b</sup>	5.52 ± 1.68 <sup>b</sup>	10.10 ± 2.29 <sup>b</sup>	12.86 ± 4.48
AN组	24	22.71 ± 6.67	12.48 ± 3.73	10.18 ± 3.96	13.26 ± 3.32	14.91 ± 5.28
NAN组	16	14.39 ± 5.10 <sup>b</sup>	7.54 ± 1.67 <sup>b</sup>	5.05 ± 1.11 <sup>b</sup>	7.94 ± 1.60 <sup>b</sup>	13.44 ± 4.62

<sup>b</sup>P<0.01 vs AN组.

表 2 各组胆囊各时点排空率EF (mean ± SD, %)

分组	n	EF <sub>30min</sub>	EF <sub>60min</sub>	EF <sub>90min</sub>	EF <sub>120min</sub>
C组	20	65.6 ± 9.2 <sup>b</sup>	68.9 ± 5.5 <sup>b</sup>	46.7 ± 3.8 <sup>b</sup>	23.8 ± 4.4 <sup>b</sup>
AN组	24	41.5 ± 7.1	46.7 ± 6.8	28.7 ± 5.1	17.3 ± 4.9
NAN组	16	60.0 ± 10.6 <sup>b</sup>	64.8 ± 3.8 <sup>b</sup>	45.2 ± 4.3 <sup>b</sup>	23.1 ± 2.1 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs AN组.

表 3 各组胆囊动脉血流参数比较 (mean ± SD)

分组	n	V <sub>max</sub> (cm/s)	V <sub>min</sub> (cm/s)	RI
C组	20	23.18 ± 3.67	8.72 ± 1.43 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.06 <sup>b</sup>
AN组	24	23.43 ± 7.92	5.62 ± 1.19	0.74 ± 0.07
NAN组	16	24.22 ± 3.87	8.31 ± 1.86 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.05 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs AN组.

过彩色多普勒探测胆囊动脉血流参数来了解其血流动力学改变. 本文通过超声检查观察糖尿病患者的胆囊排空功能,发现合并自主神经病变的糖尿病患者胆囊排空功能明显低于不合并自主神经病变的糖尿病患者和正常人,提示糖尿病患者存在胆囊排空障碍,且与支配胆囊运动的自主神经受损有关,与国内外报道的文献相一致<sup>[4-8]</sup>.

长期的糖尿病患者常合并微血管的病变,而糖尿病的微血管损伤是引起糖尿病并发症的重要病理生理基础<sup>[9]</sup>. 本文通过彩色多普勒超声检查对胆囊动脉血流动力学观察,发现合并自主神经病变的糖尿病组胆囊动脉RI明显高于正常组及不合并自主神经病变组,而舒张期最低流速明显低于正常组及不合并自主神经病变组,表现为高阻力,低流量的血流特点,提示糖尿病患者胆囊动脉血管壁弹性降低,血流阻力增大,血流量相对减少,证实糖尿病患者存在胆囊动脉的血管病变,与相关文献<sup>[10-12]</sup>报道糖尿病患者存在胆囊壁广泛微血管腔狭窄相吻合. 糖尿病患者胆囊动脉病变造成微循环有效灌注

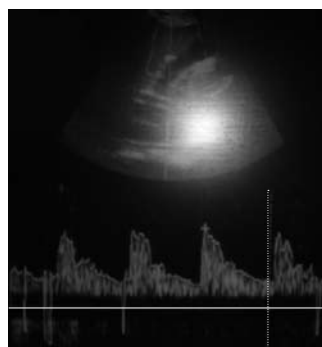


图 1 糖尿病患者胆囊动脉频谱.

不足,一方面可引起支配胆囊的迷走神经滋养血管出现微循环障碍,导致自主神经及其神经元、髓鞘的损伤,引起神经冲动的传导阻滞,继而表现为胆囊排空功能减低;另一方面糖尿病胆囊动脉病变可造成胆囊壁局部缺血,胆囊壁平滑肌细胞变性,从而影响平滑肌的正常舒缩功能,同时神经营养的减弱或丧失也会加快平滑肌细胞的病理改变,加重胆囊的排空障碍.

本文观察糖尿病组胆囊动脉RI与HbA1c及IR均呈正相关,说明糖尿病胆囊微血管病变与长期的高血糖、高胰岛素血症状态密切相关<sup>[13,14]</sup>. 由于长期高糖化血红蛋白使红细胞黏滞度升高,膜流动性降低,导致变形性降低,难以通过微血管而发生滞留,致使血流阻力增加,血管弹性降低,血流相对减少,微循环有效灌注不足;同时在IR状态下的高胰岛素血症又可引起细胞内皮功能障碍,引起胰岛素介导的扩张血管作用减弱,并且可导致血液的高凝状态,加重糖尿病胆囊微血管病变,引起糖尿病胆囊动脉血流动力学改变.

#### ■同行评价

本文科学性较好, 具有较好的临床实用价值.

糖尿病患者普遍存在胆囊收缩排空功能障碍. 支配胆囊的自主神经受损是重要原因之一; 而长期高血糖、高胰岛素血症导致胆囊壁微血管病变是另一重要原因, 因此糖尿病患者应积极有效地控制血糖, 防止血管病变, 从而降低和延缓胆囊排空功能障碍的发生.

#### 4 参考文献

- Ikard RW. Gallstones, cholecystitis and diabetes. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 171: 528-532
- 杨炜. 糖尿病与胆囊排空障碍. *医学理论与实践* 2010; 23: 1332-1333
- Dyrberg T, Benn J, Christiansen JS, Hilsted J, Nerup J. Prevalence of diabetic autonomic neuropathy measured by simple bedside tests. *Diabetologia* 1981; 20: 190-194
- 王艳军, 徐永泉, 林艳, 李士星. 糖尿病患者胆囊排空功能与胃肠激素的关系. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1841-1843
- 姜学忠, 代旭科. 应用Simpson法评价老年2型糖尿病患者胆囊收缩功能. *江苏医药* 2009; 35: 1292-1294
- 邱菊, 梁文龙, 单莉, 高博. 超声观察甲钴胺对糖尿病自主神经病变患者胆囊收缩功能的影响. *中国医刊* 2009; 44: 48-49
- Hahm J, Park J, Cho Y, Eun C, Lee Y, Choi H, Yoon B, Lee M, Kee C, Park K, Lim H, Kwon S. Changes in gallbladder motility in gastrectomized patients. *Korean J Intern Med* 2000; 15: 19-24
- Muramatsu S, Sonobe K, Tohara K, Tanaka T, Mizumoto A, Ibuki R, Suzuki H, Itoh Z. Effect of truncal vagotomy on gallbladder bile kinetics in conscious dogs. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11: 357-364
- 龙建军, 付强. 糖尿病病人血流动力学及微循环改变的研究. *中国血液流变学杂志* 2009; 4: 535-536
- Ding X, Gong JP, Lu CY, Liu CA, Shi YJ, Gao GW. Relation of abnormal gallbladder arterioles to gallbladder emptying in patients with gallstone and diabetes mellitus. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 275-278
- 曹泽伟, 李方儒, 白景文, 杨海贤. 糖尿病胆囊超微结构的改变. *天津医药* 2004; 32: 421-422
- 郭颖华, 冯泽华, 胡茂清. 糖尿病患者的胆囊收缩功能与其血流动力学相互关系的超声研究. *四川省卫生管理干部学院学报* 2003; 22: 1-3
- 李青, 张磊, 潘洁敏, 包玉倩, 张锋, 周健, 李鸣, 于浩泳, 贾伟平. 2型糖尿病住院患者微血管病变危险因素分析. *复旦学报·医学版* 2010; 37: 211-215
- 黄林锋, 董仁寿, 林广玲. 糖尿病患者血管病变与糖化血红蛋白和血小板参数的相关性. *中国血液流变学杂志* 2010; 20: 232-234

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)

# 十二指肠镜在诊治腹腔镜胆囊切除术后胆漏中的应用

丁国乾, 秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁

丁国乾, 天津医科大学研究生院 天津市 300070  
秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁, 天津市南开医院微创外科 天津市 300100  
作者贡献分布: 此文资料总结及论文撰写由丁国乾完成; 内镜操作由秦鸣放、王庆、勾承月及李宁完成; 秦鸣放负责全文理论指导。  
通讯作者: 秦鸣放, 主任医师, 300100, 天津市, 天津市南开医院微创外科中心. dingguoqian@126.com  
电话: 022-27435268  
收稿日期: 2010-10-25 修回日期: 2010-11-27  
接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-28

## Duodenoscopic diagnosis and treatment of bile leakage after laparoscopic cholecystectomy

Guo-Qian Ding, Ming-Fang Qin, Qing Wang,  
Cheng-Yue Gou, Ning Li

Guo-Qian Ding, Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
Ming-Fang Qin, Qing Wang, Cheng-Yue Gou, Ning Li, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China  
Correspondence to: Ming-Fang Qin, Department of Minimally Invasive Surgery, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China. dingguoqian@126.com  
Received: 2010-10-25 Revised: 2010-11-27  
Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the value of duodenoscopy in the diagnosis and treatment of bile leakage after laparoscopic cholecystectomy (LC).

**METHODS:** The clinical data for 32 patients who had bile leakage after LC and were treated at Tianjin Nankai Hospital from June 2004 to January 2010 were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** All 32 patients received endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP), and the nature of bile leakage in all of them was elucidated. Of all patients, 20 had cystic duct stump leakage, 7 had common bile duct leakage, 3 had hepatic duct leakage, 2 had aberrant bile duct leakage; 28 were cured by endoscopic nasobiliary drainage (ENBD), and 4 by plastic biliary stent implantation. The overall cure rate was 100%. The length of hospitalization stay ranged from 1 to 6 wk, with an average length of 24 d.

No recurrence occurred in all patients during 3 to 72 months of follow-up.

**CONCLUSION:** Duodenoscopy is a feasible and effective approach for the diagnosis and treatment of bile leakage after LC.

**Key Words:** Duodenoscopy; Laparoscopy; Cholecystectomy; Bile leakage

Ding GQ, Qin MF, Wang Q, Gou CY, Li N. Duodenoscopic diagnosis and treatment of bile leakage after laparoscopic cholecystectomy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 305-308

### 摘要

**目的:** 探讨十二指肠镜在诊治腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)术后胆漏中的应用。

**方法:** 对天津市南开医院2004-06/2010-01十二指肠镜诊治LC术后出现胆漏的32例患者处理方法及效果进行回顾性分析。

**结果:** 经十二指肠镜诊查, 32例胆漏患者中, 胆囊管残端胆漏20例, 胆总管漏7例, 肝总管漏3例, 迷走胆管漏2例, 其中28例经内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)治愈, 4例行胆道内塑料支架植入术治愈, 32例患者均治愈出院, 总治愈率100%, 住院时间为1-6 wk, 平均住院时间18 d。所有患者随访3-72 mo, 未见复发。

**结论:** 十二指肠镜是诊治LC术后胆漏患者的有效治疗方法, 对胆漏的诊断、治疗有很好的效果。

**关键词:** 十二指肠镜; 腹腔镜; 胆囊切除; 胆漏

丁国乾, 秦鸣放, 王庆, 勾承月, 李宁. 十二指肠镜在诊治腹腔镜胆囊切除术后胆漏中的应用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(3): 305-308  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/305.asp>

### 0 引言

腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy,

### ■背景资料

随着LC的广泛开展, 适应证逐渐放宽, 该项技术已经在许多区县医院得到普及, 但其并发症发生率仍较开腹手术为高且严重, 作为严重并发症之一的胆漏也呈增多的趋势。

### ■同行评议者

智绪亭, 教授, 山东大学齐鲁医院普外科

## ■ 研发前沿

胆漏是LC术后的常见并发症,如何有效地诊断及治疗,一直是困扰胆道外科医生的棘手问题。

LC)后胆漏是临床上常见的胆囊切除术后或医源性胆道损伤的并发症,既往多以B超引导下腹腔镜穿刺引流或再次外科手术治疗为主要手段。本文回顾分析2004-06/2010-01天津市南开医院应用十二指肠镜诊治LC术后胆漏患者32例,现报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 本组32例患者中,男14例,女18例,年龄31-83(平均62)岁。其中急性结石性胆囊炎患者16例,慢性结石性胆囊炎患者11例,胆囊息肉患者5例。全部患者均行LC术,手术方法包括经典的美式4孔法、改良的3孔法,无中转开腹病例,8例手术后于文氏孔放置腹引管。出现症状的时间是术后2-7 d,临床主要表现为腹痛13例、发热10例、皮肤巩膜黄染7例、局限或弥漫性腹膜炎2例。

1.2 方法 观看手术录像资料,初步了解术中情况。除8例LC术后放置腹引管患者密切观察病情变化外,其他患者发现后立即行十二指肠镜治疗。先行内镜下逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)检查,进一步明确诊断胆漏发生及胆道损伤的部位、性质及程度,根据胆道情况行相应的内镜治疗,造影示胆囊管残端胆漏20例,胆总管漏7例,肝总管漏3例,迷走胆管漏2例。本组无胆总管横断伤等重大并发症发生,明确病因后行经内镜乳头括约肌切开术(endoscopic sphincter papillotomy, EST)放置鼻胆管引流。4例患者因胆总管漏较大(漏口为0.6-0.8 cm)行胆道内塑料支架植入术,使支架越过漏口处,经支架充分引流,堵塞漏口,引流胆汁,以利于漏口的修复和愈合。5例胆囊窝积液较多行经内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)的同时行彩超或CT下穿刺引流术。

## 2 结果

32例胆漏患者均十二指肠镜治疗一次成功,28例患者行ENBD,4例患者行胆道塑料支架植入术。内镜后禁食24-48 h,给予抗炎补液、保肝减黄、维持水、电、酸碱平衡等支持治疗,使用生长激素等药物以促进漏口愈合。定期复查肝功能等生化检查,定期复查B超或经鼻胆管造影。28例ENBD患者待经鼻胆管造影无明显渗漏,腹痛黄疸症状基本消失后拔除鼻胆管。4例胆道支架患者3 mo后复查胆管造影未见明显异常取出支架。32例患者均治愈出院,总治愈率100%,住院时间为1-6 wk,平均住院时间18 d。所有患者

随访3-72 mo,未见复发,生活质量良好。

## 3 讨论

LC术后胆漏并非罕见,临床处理困难,往往成为医疗纠纷的源头,是临床医师无法回避的问题<sup>[1]</sup>。LC手术过程较快,胆漏发生的时间较晚,诊断上略有困难。了解其发病特点及发病机制对诊断与治疗均有帮助,在临床必须引起足够的重视。

胆漏发生的常见原因:(1)胆囊三角辨认不清,盲目将胆囊管离断;(2)过度牵拉造成胆囊管残端漏,术中未仔细探查发现<sup>[2]</sup>;(3)钛夹夹闭胆囊管不彻底、胆囊管残端钛夹脱落;(4)胆囊残端坏死致胆囊管残端漏<sup>[3]</sup>;(5)胆管变异<sup>[4,5]</sup>,主要有副肝管、迷走胆管和胆囊旁支胆管,其汇入越接近胆囊管开口,手术损伤的机会越多,副肝管汇入胆囊壶腹或漏斗部,术中损伤的可能性很大,另外迷走胆管纤细,多位于胆囊窝内,行走方向无规律、剥离胆囊床时、难以分辨、极易损伤。

胆漏发生的预防:(1)预防的关键是对此要保持高度警惕<sup>[6]</sup>,解剖Calot三角时尽量少用电切和电凝,禁止盲目抓持大量组织电凝和钳夹止血,遇有Calot三角解剖不清时应及时中转开腹。胆囊炎症较重切除胆囊难度较大或无把握时,应行胆囊大部切除术或胆囊取石造口,日后酌情再行胆囊切除<sup>[7]</sup>;(2)切断胆囊管之前一定要清晰确认三角的关系,并避免胆管牵拉成角,对胆道系统有明显变异者,应考虑行逆行或顺逆结合胆囊切除,肝门区直径>2 mm副肝管要妥善保护,避免损伤;(3)胆囊颈部结石嵌顿,影响胆囊三角显露时,应先用穿刺针做胆囊减压,或者取出嵌顿的结石,然后再分离三角区;(4)保护完整的胆囊床,术中不要破坏胆囊床肝脏表面的筋膜组织;对胆囊床做全面的电凝处理,避免迷走胆管漏,切除胆囊后反复仔细检查胆囊床和胆囊三角区剖面有无胆汁溢出,常规用清洁敷料填压肝门区及胆囊床3-5 min,认真查看有无胆汁沾染,如发现胆汁漏应及时钛夹夹闭或缝合,必要时于文氏孔(小网膜孔)处放置引流管,以便观察病情;(5)术中分离胆囊床间隙时应遵循“钝性分离”和“贴胆囊壁分离”原则,发现不易分开的细小管状或条索状组织有可能是迷走胆管,通常直径较细的迷走胆管电凝或电切一般可将其闭合,较粗大者钛夹夹闭;(6)胆囊管施夹必须完全、牢固、可靠,遇胆囊管过粗时应改用大号钛夹,或结扎法与钛夹法结合使用,或采用阶梯施夹法夹闭<sup>[8]</sup>。胆囊管应用剪刀锐性离断,尽量无张力,避免胆囊管与肝总管牵

拉成角; (7)尽量使用可吸收生物夹, 因其不导电可有效地避免钛夹介导的电灼伤, 情况允许时尽可能使用小号钛夹, 因为在胆囊三角如此狭小的空间, 特别是胆囊颈部与胆管粘连严重时, 大号钛夹会占据很大空间, 影响操作并可以成为钛夹介导的电灼伤的巨大隐患; (8)对于胆囊三角和肝十二指肠韧带前后壁的出血, 建议使用无创钳夹止血或纱布压迫止血, 如确实需要电凝止血, 应使用弯血管钳钳夹出血部位并上提后电凝, 条件允许时提倡使用超声刀, 既能保证手术视野的清晰, 又可避免胆管的热灼伤。

处理LC术后胆漏, 应综合考虑, 根据情况相应处理, 特别是非主胆道损伤引起的术后胆漏, 内镜治疗发挥着越来越重要的作用<sup>[9]</sup>, 可早期明确胆漏的原因和部位, 有助于治疗方案的选择, 也可作为判断胆漏愈合的依据, ERCP检查可明确胆管是部分损伤、阻塞还是完全损伤<sup>[10]</sup>, 为选择治疗方案提供有力的证据, 减少患者的痛苦和经济负担, 加速胆管损伤的修复。

ENBD的效果最优, 不但可以充分引流胆汁为胆道减压, 而且可观察胆汁引流量及性状, 且可随时造影了解胆漏愈合情况, 同时具有支架作用, 无须再次通过内镜取出支架。缺点是患者有不适感, 不能长期应用, 且胆汁丢失易引起电解质紊乱。胆道内塑料支架植入术为胆道内引流, 胆总管损伤导致的胆漏可置入塑料于漏口处, 利用支架堵塞漏口引流胆汁<sup>[11]</sup>, 可以充分降低胆囊管残端漏压力, 减少胆囊管残端漏压力, 减少胆囊管残端漏胆汁量, 缩短漏口闭合时间, 达到早期治愈的目的<sup>[12]</sup>。缺点是不能动态观察胆汁引流量, 不能反复造影了解胆道情况, 且需行二次内镜治疗, 但因胆道内支架可放置较长时间, 持续扩张支撑胆管, 故常用于治疗胆管狭窄<sup>[13]</sup>, 3 mo后取出胆管支架时, 应仔细检查胆总管有无损伤或狭窄, 必要时再重新放置塑料支架。另外在使用内镜治疗胆漏的同时可配合B超或CT穿刺引流, 以减轻腹腔感染。对腹膜炎有扩散趋势、鼻胆管引流不畅、黄疸进行性加重者, 仍应尽早开腹手术探查, 以免延误病情<sup>[14]</sup>。

十二指肠镜诊治LC术后胆漏具有微创的特点, 患者痛苦小, 避免短期内再次手术的风险及并发症, 特别适用于危重和不能耐受手术患者, 能较好地适用于LC后胆道并发症的诊断<sup>[15]</sup>。术后胆漏主要有胆囊管残端漏、副肝管损伤漏、迷走胆管漏等, 根据术后胆汁漏出量和漏胆持续时间判断胆漏的来源准确性较差, 行十二指肠镜胆道造影可清晰显示整个胆道, 还可发现

胆管内的造影剂经漏口溢入腹腔, 本组32例患者均经ERCP明确胆漏的原因, 2例ERCP胆管造影示肝外胆管完整, 无造影剂外溢, 推测为迷走胆管漏。十二指肠镜治疗胆漏的原理是充分降低胆道和十二指肠间的压力梯度, 使胆汁尽可能多的进入十二指肠, 减轻腹腔污染, 达到漏口自愈的目的<sup>[16]</sup>。LC术后行十二指肠镜干预治疗的同时应充分重视腹腔引流的必要性。对LC术中已放置膈下引流者应保持引流管通畅, 如未放置引流必要时行B超引导下穿刺置管引流。十二指肠镜治疗胆漏的优越性还在于简单有效, 内镜治疗只需常规咽麻, 对生理干扰小, 术前准备时间短, 胆漏患者一般体质较虚弱, 特别适合于创伤小的微创治疗<sup>[17]</sup>。

总之, 十二指肠镜是诊治LC术后胆漏患者的有效治疗方法<sup>[18]</sup>, 其治疗手段应个体化、多元化综合应用, 以通畅引流为治疗的原则, 十二指肠镜治疗可明确胆漏部位、原因, 行十二指肠镜治疗可有效减少胆汁外溢, 避免再次手术。对于LC术后胆漏, 十二指肠镜治疗是一种微创、安全、有效的治疗手段, 值得临床推广应用, 但要严格掌握其适应证。

#### 4 参考文献

- 寇玉彬, 王毅本, 钱晓忠, 朱永其. 内镜鼻胆管引流在腹腔镜胆囊切除术后迟发性胆漏中的诊疗价值. *腹腔镜外科杂志* 2009; 14: 360-361
- Selvaggi F, Cappello G, Astolfi A, Di Sebastiano P, Del Ciotto N, Di Bartolomeo N, Innocenti P. Endoscopic therapy for type B surgical biliary injury in a patient with short cystic duct. *G Chir* 2010; 31: 229-232
- 高荣军. 腹腔镜胆囊切除术并发胆汁漏及胆管损伤临床分析(附14例报告). *中国现代普通外科进展* 2008; 11: 359-360
- 邱永梅. 腹腔镜胆囊切除术后28例漏胆的观察及护理. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 477-478
- Noji T, Nakamura F, Nakamura T, Kato K, Suzuki O, Ambo Y, Kishida A, Maguchi H, Kondo S, Kashimura N. ENBD tube placement prior to laparoscopic cholecystectomy may reduce the rate of complications in cases with predictably complicating biliary anomalies. *J Gastroenterol* 2011; 46: 73-77
- 王五俊, 勾承月, 王桂杰, 于金波, 张晓东. 上腹部手术后腹腔镜胆囊切除术30例. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2258-2259
- 李虎城, 刘吉奎, 邹一平, 李为民, 黄辉, 王庆松, 谢文刚. 腹腔镜胆囊切除术后迟发性胆漏的发生机制及预防措施. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 521-523
- 宿砚明, 张宗明, 钟华, 蒋艺, 郭金星. 腹腔镜胆囊切除术中粗大胆囊管的处理. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2260-2262
- Singh V, Singh G, Verma GR, Gupta R. Endoscopic management of postcholecystectomy biliary leakage. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 409-413
- Ichiya T, Maguchi H, Takahashi K, Katanuma A, Osanai M, Kin T. Endoscopic management of lapa-

#### ■ 相关报道

据国外文献报道, 腹腔镜胆囊切除术后胆漏的发生率为1.7%, 国内已有学者对胆道术后胆漏患者辅以ENBD或ERBD, 这既可明确瘘口的位置和大小, 又可促进胆漏愈合, 具有诊断、治疗的双重效果。

### ■同行评价

本文科学性和创新性较好,对读者有重要的启迪作用。

- roscopic cholecystectomy-associated bile duct injuries. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011; 18: 81-86
- 11 Dolay K, Soylu A, Aygun E. The role of ERCP in the management of bile leakage: endoscopic sphincterotomy versus biliary stenting. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2010; 20: 455-459
- 12 刘明. 腹腔引流联合ERCP治疗胆囊管残端漏12例体会. *中华肝胆外科杂志* 2010; 16: 58-59
- 13 孙昊, 姚英民, 于良, 张梅, 刘青光. 腹腔镜胆囊切除术术后胆漏的内镜处理. *腹腔镜外科杂志* 2009; 14: 28-30
- 14 闵凯, 刘彦, 叶芳. 内镜在腹腔镜胆囊切除术后胆漏治疗中的应用. *腹腔镜外科杂志* 2006; 11: 140-141
- 15 龚建平, 汪华林. ERCP对诊断腹腔镜胆囊切除术后胆道并发症的诊断价值. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 479
- 16 王勇, 阎波. 腹腔镜胆囊切除术后胆漏的十二指肠镜干预. *腹腔镜外科杂志* 2007; 12: 58-59
- 17 杨波, 麻树人, 周文平, 张宁, 李顺明, 展谢延, 程广明. 内镜治疗胆囊切除术后胆漏. *中国内镜杂志* 2008; 14: 780-781
- 18 Fatima J, Barton JG, Grotz TE, Geng Z, Harmsen WS, Huebner M, Baron TH, Kendrick ML, Donohue JH, Que FG, Nagorney DM, Farnell MB. Is there a role for endoscopic therapy as a definitive treatment for post-laparoscopic bile duct injuries? *J Am Coll Surg* 2010; 211: 495-502

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊,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](mailto: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核对, 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16 wk内完成出版。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

# 肠易激综合征患者的精神心理因素与自主神经功能紊乱

常媛媛, 王邦茂, 王玉明, 张洁, 苏帅

常媛媛, 王邦茂, 王玉明, 张洁, 苏帅, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

作者贡献分布: 常媛媛进行此课题的数据采集、统计分析、总结、论文撰写及修改; 王邦茂对此课题的设计、知识性内容的批评性审阅及修改; 王玉明、张洁及苏帅实施、操作、技术资料支持。

通讯作者: 王邦茂, 主任医师, 教授, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科. gi.tmuh@sohu.com

收稿日期: 2010-11-01 修回日期: 2010-12-01

接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-01-28

## Psychological alterations and autonomic nervous dysfunction in patients with irritable bowel syndrome

Yuan-Yuan Chang, Bang-Mao Wang, Yu-Ming Wang, Jie Zhang, Shuai Su

Yuan-Yuan Chang, Bang-Mao Wang, Yu-Ming Wang, Jie Zhang, Shuai Su, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China  
Correspondence to: Professor Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China. gi.tmuh@sohu.com  
Received: 2010-11-01 Revised: 2010-12-01  
Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To examine the psychological alterations and autonomic nervous dysfunction in patients with irritable bowel syndrome (IBS).

**METHODS:** Twenty-three patients with diarrhea-predominant IBS (IBS-D), 22 patients with constipation-predominant IBS (IBS-C), and 30 healthy people were included in the study. Orthostatic testing was used to analyze the short-range frequency domain of heart rate variability (ratio of low to high frequency power, LF/HF) and to evaluate psychological alterations and autonomic nervous dysfunction in these patients. Psychological symptoms were measured with the SCL-90 scale.

**RESULTS:** Psychological alterations, such as depression, anxiety, phobia, compulsion and hypersensitivity, were more obvious in IBS patients than in controls (depression:  $2.61 \pm 0.62$  vs  $1.39 \pm 0.44$ ; anxiety:  $2.28 \pm 0.54$  vs  $1.41 \pm 0.51$ , both  $P$

$< 0.05$ ). There were a more significant increase in the LF/HF and a more significant decrease in the high frequency power in IBS-D patients than in IBS-C patients and normal controls ( $13.00 \text{ nu} \pm 0.70 \text{ nu}$  vs  $33.34 \text{ nu} \pm 2.40 \text{ nu}$ ,  $42.20 \text{ nu} \pm 1.37 \text{ nu}$ ;  $4.14 \pm 0.30$  vs  $1.93 \pm 0.23$ ,  $1.33 \pm 0.04$ , all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Psychological alterations and autonomic nervous dysfunction were noted in patients with IBS, especially in IBS-D patients.

**Key Words:** Irritable bowel syndrome; Psychological alteration; Sympathetic nervous system; Parasympathetic nervous system; Orthostatic testing; Heart rate variability

Chang YY, Wang BM, Wang YM, Zhang J, Su S. Psychological alterations and autonomic nervous dysfunction in patients with irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 309-313

### 摘要

**目的:** 探讨精神心理因素、自主神经功能与肠易激综合征(IBS)的关系。

**方法:** 对IBS患者45例, 其中腹泻型23例、便秘型22例, 对照组30例。采用症状自评量表(SCL-90)进行心理因素评分, 体位应激实验来进行心率变异(低频功率/高频功率)的短程频域分析, 进而评价精神心理因素、自主神经功能与IBS的关系。

**结果:** (1)IBS患者较对照组普遍存在抑郁、焦虑、恐惧、强迫观念和人际关系敏感等异常心理, 以焦虑和抑郁更为突出( $2.61 \pm 0.62$  vs  $1.39 \pm 0.44$ ,  $2.28 \pm 0.54$  vs  $1.41 \pm 0.51$ , 均  $P < 0.05$ ); (2)静息状态下, 病例组与对照组之间在低频功率(LF), 高频功率(HF)及LF/HF指标无差别, 但是, 体位应激后, 腹泻型较便秘型、对照组HF明显降低( $13.00 \text{ nu} \pm 0.70 \text{ nu}$  vs  $33.34 \text{ nu} \pm 2.40 \text{ nu}$ ,  $42.20 \text{ nu} \pm 1.37 \text{ nu}$ , 均  $P < 0.05$ ), LF/HF值增高( $4.14 \pm 0.30$  vs  $1.93 \pm 0.23$ ,  $1.33 \pm 0.04$ , 均  $P < 0.05$ )。

**结论:** IBS患者多伴有心理异常和自主神经功能紊乱, 经过体位应激后表现为迷走神经活

### ■背景资料

肠易激综合征(IBS)是一种胃肠道功能紊乱性疾病, 以腹痛、腹胀、腹部不适, 排便习惯及排便性状改变为特征, 其患病率高, 治疗困难, 其发病机制尚不完全清楚, 缺乏形态学、细菌学和生化学指标的特异性改变, 其中精神心理因素及自主神经功能与IBS的关系日趋引起消化科医师的关注。

### ■同行评议者

邢建峰, 副教授, 西安交通大学医学院



## ■相关报道

丁美红等认为精神心理因素异常、自主神经功能障碍在功能性胃肠病的发病机制中可能起一定作用。Heitkemper等通过研究应激前后病例组与对照组HRV的变化,认为在应激状态下IBS患者交感神经活性较健康人增强,然而邹细岩等认为IBS患者存在心率变异性异常,主要表现为胆碱能神经功能亢进,交感神经张力代偿性增高,进而确认该类患者存在自主神经系统功能失调。

性减弱,交感神经活性相对增强,腹泻型尤为显著。

**关键词:** 肠易激综合征; 心理因素; 交感神经; 迷走神经; 体位试验; 心率变异

常媛媛, 王邦茂, 王玉明, 张洁, 苏帅. 肠易激综合征患者的精神心理因素与自主神经功能紊乱. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 309-313

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/309.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种胃肠功能紊乱性疾病,以腹痛、腹胀、腹部不适,排便习惯及排便性状改变为特征,其患病率高,治疗困难,人群发病率约为10%-15%,占胃肠道门诊的20%-25%<sup>[1]</sup>,发病机制尚不完全清楚,缺乏形态学,细菌学和生化学指标的特异性改变,其中精神心理因素及自主神经功能失调在IBS发病中的作用日趋引起消化科医师的关注。心率变异(heart rate variability, HRV)作为可定量反应自主神经活性及其调节功能的一种无创性检测方法<sup>[2,3]</sup>,对IBS的应用价值越来越受到重视。通过实施躯体的,心理的或内脏的应激来检测HRV的情况,从而研究IBS患者的自主神经功能状态和其功能失调的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 病例组为在天津医科大学总医院消化科门诊及内镜室收集的符合罗马III<sup>[4]</sup>诊断标准的IBS患者45例,年龄20-60(平均42)岁,其中腹泻型患者23例,便秘型患者22例,并排除心血管疾病,贫血,发热,泌尿及内分泌系统等器质性疾病,且没有服用心血管药物史,以消除其对心率变化的影响。对照组为在查体中心的查体者,无腹痛或腹部不适及排便性状的改变,结肠镜或者钡剂灌肠检查阴性的人群30例,年龄25-58(平均40)岁。病例组及对照组均已签署知情同意书。

**1.2 方法** 试验前12 h禁饮咖啡、茶、酒,禁止吸烟,并禁用任何影响血压及心率的药物,保证充足睡眠,避免剧烈运动。试验在舒适、安静的环境下进行。

**1.2.1 心理测评:** 采用SCL-90对IBS患者和对照组进行心理因素评分,由研究调查者统一指导,每个研究对象均独立完成心理量表测查。

**1.2.2 自主神经功能测定:** 对病例组和对照组分别进行心率变异率分析,采用5 min短程频域分

析的方法,与体位应激试验同步进行,嘱受试者由仰卧位转为直立位,分别记录仰卧位及直立位时的高频,低频功率及低、高频功率的比值,以反应交感、迷走神经的张力比,从而分析体位应激前后的短程频域心率变异率。

**统计学处理** 将试验数据应用SPSS13.0统计软件进行统计分析,结果均以mean±SD表示,两组样本资料的均数比较采用两组独立样本资料的t检验,多组资料的组间比较通过方差分析进行样本均数的两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

IBS患者较对照组普遍存在抑郁、焦虑、恐惧、强迫观念和人际关系敏感等异常心理,以焦虑和抑郁更为突出( $P<0.05$ ,表1)。

在静息状态下,IBS患者与对照组在高频功率,低频功率,及低频功率/高频功率差别无统计学意义;经过体位应激之后低频功率在两组之间的差异无统计学意义,而高频功率较对照组减低,低频功率/高频功率较对照组明显升高,差别具有显著的统计学差异( $P<0.05$ ,表2)。

在静息状态下,腹泻型及便秘型IBS患者与对照组在高频功率,低频功率,及低频功率/高频功率差别无统计学意义;经过体位应激后,高频功率及低频功率/高频功率IBS组腹泻型与便秘型及对照组相比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),IBS组便秘型与正常对照组相比较,差异也有统计学意义( $P<0.05$ ,表3)。

## 3 讨论

目前公认IBS患者存在自主神经功能紊乱,随着近年来人们生活节奏的加快、饮食结构的改变,神经、精神、感染因素所致的肠易激综合征发病率有上升趋势。丁美红等<sup>[5]</sup>认为精神心理因素异常、自主神经功能障碍在功能性胃肠病的发病机制中可能起一定作用;精神心理因素异常是否通过自主神经功能障碍使精神心理因素躯体化还有待进一步研究。Ladep等<sup>[6]</sup>的研究显示,132例IBS患者中75例(56.8%)存在抑郁状况,显著高于对照组的20.1%。穆标等<sup>[7]</sup>的研究表明,IBS患者的心理异常明显多于正常对照组,IBS患者在不同的精神实验中可表现为躯体不适、焦虑、抑郁、睡眠差、易疲劳、存在敌意及有悲哀情绪。本研究采用的是SCL-90心理量表,结果与上述文献报道一致,显示IBS患者大部分因子分较对照组有显著差异,表现为抑郁、焦

表 1 IBS组与对照组SCL-90症状自评分比较

	IBS患者	正常人	t值	P值
躯体化	1.88 ± 0.51	0.96 ± 0.33	8.714	<0.05
强迫	1.99 ± 0.47	0.98 ± 0.41	9.534	<0.05
人际关系	1.14 ± 0.44	1.06 ± 0.43	0.766	>0.05
抑郁	2.28 ± 0.54	1.41 ± 0.51	7.035	<0.05
焦虑	2.61 ± 0.62	1.39 ± 0.44	9.309	<0.05
敌对	1.30 ± 0.54	1.16 ± 0.43	1.256	>0.05
恐惧	2.14 ± 0.59	1.20 ± 0.55	6.949	<0.05
偏执	1.93 ± 0.57	1.37 ± 0.58	4.146	<0.05
神经质	1.47 ± 0.59	1.25 ± 0.51	1.680	>0.05
其他	0.97 ± 0.33	0.91 ± 0.34	0.792	>0.05

## ■创新亮点

通过对肠易激综合征患者及对照组采用症状自评量表(SCL-90)进行心理因素评分, 体位应激试验来进行心率变异(低频功率/高频功率)的短程频域分析, 进而评价精神心理因素、自主神经功能与肠易激综合征的关系。

表 2 IBS组与对照组应激前后心率变异率变化比较

	IBS患者	对照组	t值	P值
静息状态				
LF(nu)	46.28 ± 2.70	38.37 ± 3.48	1.816	>0.05
HF(nu)	37.74 ± 2.01	42.88 ± 3.15	-1.445	>0.05
LF/HF	1.33 ± 0.07	1.05 ± 0.13	1.889	>0.05
体位应激后				
LF(nu)	54.88 ± 2.85	56.97 ± 2.98	-0.491	>0.05
HF(nu)	22.94 ± 1.95	42.20 ± 1.37	-7.279	<0.05
LF/HF	3.06 ± 0.25	1.33 ± 0.04	5.631	<0.05

LF: 低频功率; HF: 高频功率。

表 3 不同类型IBS患者与对照组应激前后心率变异率变化比较

	IBS组		对照组
	腹泻型	便秘型	
静息状态			
LF(nu)	46.55 ± 4.24	46.00 ± 3.38	38.37 ± 3.48
HF(nu)	38.22 ± 3.26	37.23 ± 2.37	42.87 ± 3.15
LF/HF	1.37 ± 0.11	1.30 ± 0.10	1.04 ± 0.13
体位应激后			
LF(nu)	52.70 ± 4.07	57.16 ± 4.03	56.97 ± 2.98
HF(nu)	13.00 ± 0.70 <sup>ac</sup>	33.34 ± 2.40 <sup>c</sup>	42.20 ± 1.37
LF/HF	4.14 ± 0.30 <sup>ac</sup>	1.93 ± 0.23 <sup>c</sup>	1.33 ± 0.04

LF: 低频功率; HF: 高频功率。<sup>a</sup>P<0.05 vs 便秘型IBS组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 对照组。

虑、恐怖、强迫观念、人际关系敏感及心理异常的症状躯体化, 突出表现为焦虑和抑郁。我们认为, IBS是一种身心疾病, 心理因素可能通过植物神经系统和脑-肠轴进而影响肠道的功能, 按照“生物-心理-社会”医学模式的要求, 现代医学要求用整体的观点看待健康和疾病, 注重在患者的心理方面予以帮助, 必要时辅以抗抑

郁药, 使其改善不良心态, 只有心理与生理的联合治疗才能从根本上促进患者的康复。

HRV分析是指在观察时间内对心脏节律的R-R间期持续时间变化规律的分析, HRV信号蕴含了有关心血管调节的大量信息, 对这些信息的提取和分析可以定量评估心脏交感神经和迷走神经活动的紧张性、均衡性及其对心血管系

### ■应用要点

IBS患者存在精神心理异常和心血管自主神经功能异常,对于部分IBS患者,进行适当的和有针对性的心理干预很有必要,甚至适当应用精神类药物,对于提高疗效和改善预后都有重要的现实意义.通过HRV分析可以直观地反映IBS患者的心血管自主神经功能早期变化,并可为临床诊疗方案的制订提供依据.

统活动的影响,其中低频功率(0.04-0.15 Hz)反映交感神经的调节,高频功率(0.15-0.40 Hz)反映迷走神经的调节,低频功率/高频功率较好地反映交感神经/迷走神经调节的平衡<sup>[8]</sup>. Heitkemper等<sup>[2]</sup>通过研究应激前后病例组与对照组HRV的变化,认为在应激状态下IBS患者交感神经活性较健康人增强,然而邹细岩等<sup>[9]</sup>IBS患者存在心率变异性异常,主要表现为胆碱能神经功能亢进,即迷走神经张力升高或迷走神经张力增高,交感神经张力代偿性增高,但与迷走神经张力相比,仍存在交感神经张力相对不足,进而确认该类患者存在自主神经系统功能失调.在清醒状态下,自主神经的功能受到情绪、呼吸、运动等因素的影响,故在睡眠状态下测定HRV更能准确的评定自主神经的功能. Orr等<sup>[10]</sup>和Thompson等<sup>[11]</sup>使用睡眠多导图将睡眠分为快动眼睡眠(rapid eye movement sleep, REM)和非快动眼睡眠(nonrapid eye movement sleep, NREM),指出在REM期,IBS组较对照组的低频功率/高频功率明显增高,并指出IBS患者由于迷走神经活性减低导致交感神经活性相对增强. Heitkemper等<sup>[2]</sup>通过分析25例IBS女性患者和15例健康对照的24 h HRV,发现前者比后者的低频功率/高频功率增高,高频功率减低,低频功率没有明显不同.然而, Jarrett等<sup>[12]</sup>指出在睡眠状态下,IBS和健康对照组的HRV参数没有明显不同.

本试验中在静息状态下,病例组与健康对照组在高频功率,低频功率,及低频功率/高频功率差别无统计学意义,说明在静息状态下IBS患者的自主神经功能与健康人没有明显差别,经过体位应激之后低频功率在两组之间的差异无统计学意义,而高频功率较对照组减低,低频功率/高频功率较对照组明显升高,差别具有显著的统计学差异,因低频功率/高频功率的升高主要是由于高频功率降低造成的,低频功率的差异无统计学差异,且高频功率主要是反映迷走神经张力的高低,故我们可以看出IBS的患者较健康人经过体位应激后迷走神经张力减低,交感神经活性相对增强,其是一种继发性变化,而不是交感神经本身的张力增高.国内外多项研究表明IBS腹泻型及便秘型患者存在基因型的差别,为明确其各自对应激的反应是否有所不同,本试验进一步将IBS的腹泻型和便秘型患者进行单独分析,结果发现IBS腹泻型较便秘型高频功率降低,低频功率/高频功率升高,差异有统计学意义,而低频功率差异无统计学意义,由此

可以看出IBS腹泻型较便秘型迷走神经张力减低,相对地交感神经张力增强,更易伴有自主神经功能紊乱,但由于腹泻型较便秘型患者易出现水电解质紊乱而可能导致继发性自主神经功能紊乱,且由于本试验样本量较小及实验误差的存在,尚需大样本研究以得到进一步证实.有研究认为IBS腹泻型中植物神经功能处于失衡状态,交感神经活性增高,迷走神经活性降低,表明心血管自主神经功能异常可影响IBS患者的临床症状类型<sup>[13-15]</sup>, Elsenbruch等<sup>[16]</sup>认为摄食后腹泻型IBS较便秘型IBS迷走神经张力降低并伴随体内激素水平的升高,推测其可能通过脑-肠轴而进一步影响到排便的性状. Mayer<sup>[17]</sup>认为迷走神经通过对结肠的调节可使高幅传播收缩波频率发生改变,对便秘和腹泻起着重要作用,因而决定着患者的排便性状.

总之,IBS患者存在精神心理异常和心血管自主神经功能异常,这种异常可能是IBS的重要发病原因之一,其潜在机制尚需深入研究.对于部分IBS患者,进行适当的和有针对性的心理干预很有必要,甚至适当应用精神类药物,对于提高疗效和改善预后都有重要的现实意义.通过HRV分析可以直观地反映IBS患者的心血管自主神经功能早期变化,并可为临床诊疗方案的制订提供依据.由于HRV分析应用较广泛,在很多疾病中均存在,缺乏特异性,但可作为评估某些疾病预后的一个指标.

### 4 参考文献

- 1 孙建,李延青,陈建,吕翠霞,左秀丽,郭玉亭,张海燕,赵宪邨. 肠易激综合症的心理检测及对应治疗. 中华腹部疾病杂志 2003; 3: 19-20
- 2 Heitkemper M, Burr RL, Jarrett M, Hertig V, Lustyk MK, Bond EF. Evidence for autonomic nervous system imbalance in women with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2093-2098
- 3 Kamath MV, Fallen EL. Power spectral analysis of heart rate variability: a noninvasive signature of cardiac autonomic function. *Crit Rev Biomed Eng* 1993; 21: 245-311
- 4 姚欣,杨云生,赵卡冰,孙刚,刘英圣,王巍峰. 罗马Ⅲ标准研究肠易激综合征临床特点及亚型. 世界华人消化杂志 2008; 16: 563-566
- 5 丁美红,林征,林琳,朱芬芬,王美峰,张红杰,周丽荣. 精神心理因素和自主神经功能在功能性胃肠病发病中的意义. 江苏医药 2009; 35: 643-645
- 6 Ladep NG, Obindo TJ, Audu MD, Okeke EN, Malu AO. Depression in patients with irritable bowel syndrome in Jos, Nigeria. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7844-7847
- 7 穆标,王邦茂,黄乃侠,吴琳,刘文天. 肠易激综合征病人的心理因素研究. 天津医科大学学报 2003; 9: 543-544
- 8 孙京霞,白延强. 心率变异分析方法的进展. 航天医学与医学工程 2001; 14: 230-234
- 9 邹细岩,李文芳,王琰玫. 肠易激综合征与心率变异性

- 的相关性探讨. 中国现代医药杂志 2008; 10: 69-70
- 10 Orr WC, Elsenbruch S, Harnish MJ. Autonomic regulation of cardiac function during sleep in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2865-2871
- 11 Thompson JJ, Elsenbruch S, Harnish MJ, Orr WC. Autonomic functioning during REM sleep differentiates IBS symptom subgroups. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 3147-3153
- 12 Jarrett ME, Burr RL, Cain KC, Rothermel JD, Landis CA, Heitkemper MM. Autonomic nervous system function during sleep among women with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 694-703
- 13 张志雄, 侯晓华. 精神因素和应激对功能性胃肠疾病内脏感觉的影响. 临床消化病杂志 2002; 14: 277
- 14 张洁, 凌奇荷. 肠易激综合征患者的应激状态和植物神经功能改变. 中华消化杂志 2001; 21: 250
- 15 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 肠易激综合征的发病机制. 胃肠病学和肝病学杂志 2001; 10: 100
- 16 Elsenbruch S, Orr WC. Diarrhea- and constipation-predominant IBS patients differ in postprandial autonomic and cortisol responses. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 460-466
- 17 Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47: 861-869

■同行评价  
本文选题较好, 对肠易激综合征的综合治疗提供了依据, 具有一定的实际意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

# Twist1, MMP-2和MMP-9在结直肠癌组织中的表达及意义

杨振忠, 吴正升, 法文, 李守新, 吕永芳

## ■背景资料

目前研究显示, 明胶酶(MMP-2和MMP-9)及其抑制因子(TIMP-1和TIMP-2)在结直肠癌侵袭转移过程中发挥了重要作用. 探讨结直肠癌明胶酶上游调控因子对认识肿瘤侵袭转移过程有着重要意义.

杨振忠, 法文, 李守新, 吕永芳, 新华医疗集团新华医院病理科 安徽省淮南市 232007

吴正升, 安徽医科大学病理学教研室 安徽省合肥市 230032  
作者贡献分布: 杨振忠与吴正升对此文所作贡献均等; 此课题由杨振忠与吴正升共同设计; 研究过程由杨振忠、法文、李守新及吕永芳共同完成; 研究使用新试剂及分析工具由吴正升提供; 论文写作由杨振忠与吴正升完成.

通讯作者: 吴正升, 副教授, 230032, 安徽省合肥市, 安徽医科大学病理学教研室. woozson@126.com

电话: 0551-5161130 传真: 0551-5161130

收稿日期: 2010-11-03 修回日期: 2010-12-10

接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-01-28

## Expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 in colorectal cancer

Zhen-Zhong Yang, Zheng-Sheng Wu, Wen Fa, Shou-Xin Li, Yong-Fang Lv

Zhen-Zhong Yang, Wen Fa, Shou-Xin Li, Yong-Fang Lv, Department of Pathology, Xinhua Hospital, Huainan Xinhua Medical Group, Huainan 232052, Anhui Province, China  
Zheng-Sheng Wu, Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Correspondence to: Associate Professor Zheng-Sheng Wu, Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. woozson@126.com

Received: 2010-11-03 Revised: 2010-12-10

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-01-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the clinical significance of the expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 proteins in colorectal cancer.

**METHODS:** The expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 proteins was examined on tissue chips containing 92 colorectal cancer samples by immunohistochemistry.

**RESULTS:** The positive rates of Twist1, MMP-2 and MMP-9 protein expression in colorectal cancer were 64.1%, 66.3% and 67.4%, respectively. High expression of Twist1 was positively correlated with lymph node metastasis and TNM stage (both  $P < 0.05$ ) but inversely with patient's overall survival and relapse-free survival ( $P < 0.05$  and  $0.01$ , respectively). The expression of MMP-2 and MMP-9 was significantly correlated with lymph node metastasis (both  $P < 0.01$ ). A

positive correlation was also found between MMP-9 expression and tumor size ( $P < 0.01$ ). The expression of Twist1 was positively correlated with that of MMP-9 ( $P < 0.05$ ), but not with that of MMP-2 ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 plays an important role in tumor invasion and metastasis in colorectal cancer. The expression of MMP-9 might be partly regulated by Twist1.

**Key Words:** Colorectal cancer; Twist1; MMP-2; MMP-9; Immunohistochemistry

Yang ZZ, Wu ZS, Fa W, Li SX, Lv YF. Expression of Twist1, MMP-2 and MMP-9 in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 314-317

## 摘要

**目的:** 研究Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白在结直肠癌组织中的表达及其相互关系.

**方法:** 建立组织微阵列平台, 应用免疫组织化学方法检测92例结直肠癌组织Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白的表达情况.

**结果:** 结直肠癌中Twist1的表达率为64.1%, MMP-2和MMP-9阳性率分别为66.3%和67.4%; Twist1的表达与肿瘤淋巴结受累和TNM分期均呈正相关(均 $P < 0.05$ ), 并且与患者总生存率和无复发生存率呈负相关( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); MMP-2、MMP-9蛋白表达与肿瘤淋巴结受累均呈显著正相关(均 $P < 0.01$ ), 并且MMP-9蛋白表达与肿瘤大小也呈显著正相关( $P < 0.01$ ); Twist1表达状况与MMP-9的表达呈显著正相关( $r = 0.205$ ,  $P < 0.05$ ), 而与MMP-2表达无显著相关性.

**结论:** 结直肠癌Twist1、MMP-2和MMP-9表达状况与肿瘤侵袭转移有密切关系; MMP-9表达可能在一定水平上受到Twist1调控.

**关键词:** 结直肠癌; Twist1; MMP-2; MMP-9; 免疫组织化学

杨振忠, 吴正升, 法文, 李守新, 吕永芳. Twist1, MMP-2和

## ■同行评议者

纪小龙, 教授, 武警总医院纳米医学研究所

MMP-9在结直肠癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 314-317

http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/314.asp

## 0 引言

结直肠癌是临床最常见的恶性肿瘤之一, 癌细胞的侵袭转移是其难以根治和导致患者死亡的主要原因. 目前研究显示: 明胶酶(MMP-2和MMP-9)及其抑制因子(TIMP-1和TIMP-2)在结直肠癌侵袭转移过程中发挥了重要作用<sup>[1-4]</sup>. 探索结直肠癌明胶酶上游调控因子对认识肿瘤侵袭转移过程有着重要意义. 近期研究显示, Twist1基因具有癌基因的特性, 能够通过多种途径控制肿瘤细胞凋亡, 血管生成和侵袭转移, 在恶性肿瘤发生和发展过程中发挥了重要作用<sup>[5,6]</sup>. 本研究在结直肠癌组织微阵列平台上, 通过免疫组织化学技术检测Twist1基因表达, 分析Twist1表达强度与肿瘤临床病理特征和患者预后的相关性, 并进一步探讨其与明胶酶表达的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集淮南市新华医疗集团新华医院病理科结直肠癌患者92例, 年龄27-78(中位年龄50.0)岁, 术前均未接受过化疗、免疫或放射等抗肿瘤治疗. 按WHO最新标准对各病例进行病理学分级和分型, 其中高分化腺癌8例, 中分化腺癌44例, 低分化腺癌40例. Duke's分期: A和B期37例、C和D期55例. 所有组织均以40 g/L甲醛液固定, 石蜡包埋. 兔抗人Twist1多克隆抗体购自Santa Cruz公司, 鼠抗人MMP-2和MMP-9单克隆抗体、通用型SP法免疫组织化学试剂盒及DAB显色剂均购自福州迈新公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 组织芯片制备:** 复查每例HE染色切片, 选取代表性组织位点, 使用定位器在切片上进行标记, 每例样本选3个位点; 使用组织芯片制备仪(HT-1, 辽宁恒泰公司), 采用取样针内径为1 mm, 通过打孔、定位、取样、点样和二次包埋制成直径1 mm, 间距1 mm的组织芯片蜡块; 以3 μm厚度连续切片, 敷贴于10%多聚赖氨酸预先处理的载玻片上, 待用.

**1.2.2 免疫组织化学法检测Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白在结直肠癌组织中的表达:** 具体操作按试剂盒说明书染色步骤进行. 以PBS缓冲液代替一抗作阴性对照, 用已知阳性标本作为阳性对照.

**1.2.3 结果判定:** Twist1染色以细胞质出现明显的

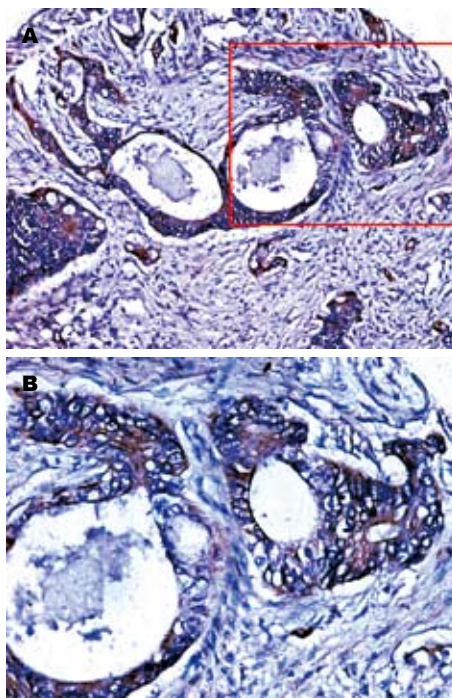


图1 Twist1在结直肠癌组织中的表达(免疫组织化学染色). A: 结直肠癌细胞高表达Twist1( $\times 100$ ); B: 结直肠癌Twist1阳性表达主要定位于细胞质(图1A方框,  $\times 200$ ).

黄色或棕黄色颗粒视为阳性着色, 参照Kyo等<sup>[7]</sup>提出的染色标准综合阳性细胞率及染色强度进行评估, 判断表达强度: 两者积分之和 $<6$ 为弱表达,  $\geq 6$ 为高表达. MMP-2和MMP-9以细胞膜或胞质出现明显的黄色或棕黄色颗粒视为阳性着色, 按Shimizu等<sup>[8]</sup>评分标准进行半定量分析, 根据镜下观察阳性细胞比例及阳性着色强度. 阳性细胞数按无着色、阳性细胞数 $<1/3$ 、 $1/3-2/3$ 和 $>2/3$ 分别判为0、1、2、3分, 每张切片阳性细胞的着色强度按无着色、黄色、棕黄色和棕褐色分别判为0、1、2、3分, 根据两项积分之和判断其结果,  $\geq 3$ 分为阳性.

**统计学处理** 采用SPSS10.0 for Window软件进行统计学处理. 采用 $\chi^2$ 检验, 非参数Spearman等级相关检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白在结直肠癌中表达和分布** Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白阳性信号呈黄色或棕黄色颗粒状, 主要定位于细胞胞质(图1). 92例结直肠癌组织中, Twist1高表达率为64.1%, MMP-2和MMP-9阳性率分别为66.3%和67.4%. 阳性肿瘤细胞分布呈异质性, 表现为片状、灶状或散在分布.

**2.2 Twist1蛋白表达与结直肠癌临床病理特征以及患者预后的关系** 结直肠癌Twist1的表达与肿

### ■ 相关报道

Lee等研究发现MMP-2和MMP-9直接参与了TGF $\beta$ 1和Twist1介导的乳腺癌细胞EMT过程; Okamura等将Twist1基因稳定转染到恶性骨肉瘤细胞中, 发现肿瘤细胞TIMP-1基因表达显著下调; 因而可以推测Twist1基因可能间接促进MMP-9表达.

### ■ 创新盘点

本研究在结直肠癌组织微阵列平台上, 通过免疫组织化学技术检测Twist1、MMP-2和MMP-9蛋白的表达, 结果表明Twist1、MMP-2和MMP-9表达状况与结直肠癌侵袭转移有密切关系; MMP-9表达可能在一定水平上受到Twist1调控. Twist1基因在结直肠癌侵袭转移过程中可能发挥了重要作用.

### 应用要点

Twist1基因在结直肠癌侵袭转移过程中可能发挥了重要作用,是一个辅助判断结直肠癌患者预后的有效生物标志物,并且Twist1和MMP-9在结直肠癌演进过程中关系密切;两者之间具体调控机制有待进一步研究。

表1 结直肠癌组织Twist1蛋白表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Twist1高表达n(%)	P值
年龄(岁)			
≤55	38	25(65.8)	0.781
>55	54	34(63.0)	
肿瘤大小(cm)			
≤5	54	34(63.0)	0.781
>5	38	25(65.8)	
淋巴结转移			
无	35	12(34.3)	0.001
有	57	47(82.5)	
组织学分级			
I	8	4(50.0)	0.301
II	44	26(59.1)	
III	40	29(72.5)	
Duke's分期			
A+B	37	15(40.5)	0.001
C+D	55	44(80.0)	

瘤淋巴结转移和Duke's分期均呈正相关( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), 而与患者年龄、肿块大小、组织学分级均无统计学意义(均 $P>0.05$ ); Twist1的表达与结直肠癌患者总生存率和无复发生存率均呈负相关( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ , 表1, 图2)。

2.3 MMP-2和MMP-9蛋白表达与结直肠癌临床病理特征的关系 结直肠癌MMP-2和MMP-9的表达与肿瘤淋巴结转移和TNM分期均呈正相关(均 $P<0.01$ ), 且MMP-9的表达与肿瘤大小呈正相关( $P<0.01$ ), 而与患者年龄和组织学分级均无统计学意义(均 $P>0.05$ )。

2.4 结直肠癌组织中Twist1表达与MMP-2、MMP-9表达的相关性 Spearman相关性分析显示: Twist1和MMP-9的表达均呈显著正相关( $r = 0.205$ ,  $P<0.05$ ), 而与MMP-2表达无显著相关性( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

Twist1基因属于碱性螺旋-环-螺旋蛋白家族中高度保守的转录因子, 在胚胎生长发育阶段诱导细胞迁移的调控过程中发挥重要作用, 最早在果蝇中被发现, 广泛表达于中胚层起源的组织和细胞, 在出生后降至低水平。最近研究发现, Twist1具有癌基因的特征, 能够抑制肿瘤细胞凋亡, 参与肿瘤细胞周期的调控, 并通过调解肿瘤细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)等参与了恶性肿瘤的发生, 并且促进肿瘤侵袭转移。Yang等<sup>[9]</sup>研究发现Twist1高表达的乳腺癌细胞易发生转移, 而Twist1低表达的

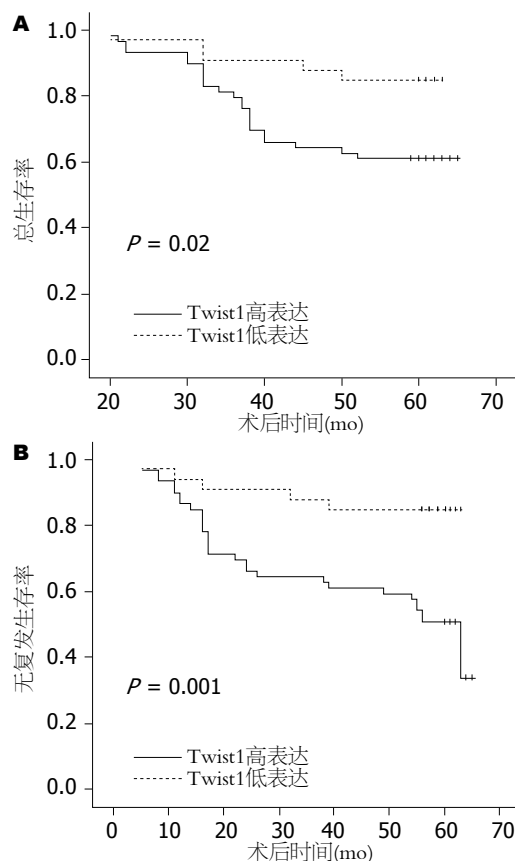


图2 结直肠癌Twist1表达与患者预后的相关性分析。

乳腺癌细胞没有或极少发生转移。Kyo等<sup>[7]</sup>检测了70例人子宫内膜癌的Twist1表达, 发现51%病例呈Twist1高表达, 并且Twist1表达状况与肿瘤局部侵袭和患者生存期呈显著正相关, 是一个独立的预后因子。Valdés-Mora等<sup>[10]</sup>使用实时定量PCR技术检测了54例结直肠癌及其癌旁正常黏膜Twist1的mRNA表达, 发现结直肠癌Twist1 mRNA表达显著高于正常黏膜组织表达, 并且其表达还与肿瘤淋巴结转移呈显著正相关。本研究在92例结直肠癌中检测了Twist1蛋白的表达, 发现64.1%的结直肠癌为高表达, 且Twist1的表达与肿瘤淋巴结受累和TNM分期均呈正相关, 并且与患者总生存率和无复发生存率均呈负相关, 结果与文献报道相似, 提示Twist1是结直肠癌演进过程中一个重要因子, 对肿瘤侵袭转移有着重要促进作用, 是一个辅助判断结直肠癌进展和患者预后的标志物。鉴于Twist1在肿瘤发生发展中的重要角色, 我们进一步探讨了Twist1发挥作用可能的下游靶基因。

明胶酶(MMP-2和MMP-9), 是基质金属蛋白酶家族重要成员, 能够特异性降解基底膜和细胞外基质的大多数蛋白质, 在肿瘤侵袭、转移中起着极为重要的作用, 这一点已在对多种

肿瘤组织的侵袭行为、转移潜能与明胶酶表达水平的相关分析的研究中得到证实<sup>[11]</sup>. 在本课题组既往研究中, 我们也发现肿瘤组织MMP-2和MMP-9的表达与肿瘤淋巴结转移、临床分期以及患者预后均有密切关系<sup>[12,13]</sup>. 本研究同时检测了MMP-2和MMP-9在结直肠癌组织中表达, 结果显示MMP-2、MMP-9与结直肠癌的肿块大小和转移有显著相关性.

进一步, 我们将结直肠癌Twist1表达分别与MMP-2和MMP-9进行相关性分析, 结果显示Twist1表达状况与MMP-9的表达呈显著正相关, 而与MMP-2表达无显著相关性. Lee等研究发现MMP-2和MMP-9直接参与了TGF $\beta$ 1和Twist1介导的乳腺细胞EMT过程<sup>[14]</sup>; Okamura等<sup>[15]</sup>将Twist1基因稳定转染到恶性骨肉瘤细胞中, 发现肿瘤细胞TIMP-1基因表达显著下调, 而TIMP-1是MMP-9的天然抑制物, 因而可以推测Twist1基因可能间接促进MMP-9表达. 本研究结果结合文献报道表明, Twist1基因和明胶酶中MMP-9在结直肠癌中关系密切, Twist1可能在一定水平上调控MMP-9的表达.

总之, Twist1基因在结直肠癌侵袭转移过程中可能发挥了重要作用, 是一个辅助判断结直肠癌患者预后的有效生物标志物, 并且Twist1和MMP-9在结直肠癌演进过程中关系密切; 两者之间具体调控机制有待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Lai KC, Huang AC, Hsu SC, Kuo CL, Yang JS, Wu SH, Chung JG. Benzyl isothiocyanate (BITC) inhibits migration and invasion of human colon cancer HT29 cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 and urokinase plasminogen (uPA) through PKC and MAPK signaling pathway. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 2935-2942
- 2 Buhmeida A, Bendardaf R, Hilska M, Collan Y, Laato M, Syrjänen S, Syrjänen K, Pyrhönen S. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in stage II colorectal carcinoma. *J Gastrointest Cancer* 2009; 40: 91-97
- 3 Sundov Z, Tomić S, Vilović K, Kunac N, Kalebić M, Bezić J. Immunohistochemically detected high expression of matrix metalloproteinase-2 as predictor

- of poor prognosis in Duke's B colon cancer. *Croat Med J* 2008; 49: 636-642
- 4 Zuzga DS, Gibbons AV, Li P, Lubbe WJ, Chervoneva I, Pitari GM. Overexpression of matrix metalloproteinase 9 in tumor epithelial cells correlates with colorectal cancer metastasis. *Clin Transl Sci* 2008; 1: 136-141
- 5 Martin A, Cano A. Tumorigenesis: Twist1 links EMT to self-renewal. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 924-925
- 6 Browne G, Sayan AE, Tulchinsky E. ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer. *Cell Cycle* 2010; 9: 886-891
- 7 Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, Mizumoto Y, Maida Y, Hashimoto M, Nakamura M, Takakura M, Nakajima M, Masutomi K, Inoue M. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum Pathol* 2006; 37: 431-438
- 8 Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol* 1990; 21: 607-612
- 9 Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117: 927-939
- 10 Valdés-Mora F, Gómez del Pulgar T, Bandrés E, Cejas P, Ramírez de Molina A, Pérez-Palacios R, Gallego-Ortega D, García-Cabezas MA, Casado E, Larrauri J, Nistal M, González-Barón M, García-Foncillas J, Lacal JC. TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 78-87
- 11 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43 Suppl: S42-S51
- 12 Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F, Xu XC. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer* 2008; 122: 2050-2056
- 13 薛松, 李守新, 吴正升, 王晓楠, 吴强, 杨枫. CD147、基质金属蛋白酶和转化生长因子 $\beta$ 1在乳腺癌中的表达与肿瘤转移和预后及其相互间关系. *中华病理学杂志* 2009; 38: 524-528
- 14 Lee YH, Albig AR, Regner M, Schiemann BJ, Schiemann WP. Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2243-2251
- 15 Okamura H, Yoshida K, Haneji T. Negative regulation of TIMP1 is mediated by transcription factor TWIST1. *Int J Oncol* 2009; 35: 181-186

#### ■同行评价

本文可读性较好, 有一定的临床指导意义.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才



## 结直肠癌脾转移3例

王军, 张宝良, 郭德智, 袁庆鑫

### ■背景资料

结直肠癌脾转移临床发病率低, 为提高对本病的认识, 减少漏诊、误诊率, 探讨其临床病理特征及诊断和治疗具有重要意义。

王军, 张宝良, 郭德智, 袁庆鑫, 河北医科大学附属唐山工人医院普外科 河北省唐山市 063000

作者贡献分布: 王军、张宝良、郭德智及袁庆鑫对此文所作贡献均等; 此课题由王军、张宝良、郭德智及袁庆鑫设计; 研究过程由王军、张宝良、郭德智及袁庆鑫完成; 数据分析由王军与张宝良完成; 本论文写作由王军完成。

通讯作者: 袁庆鑫, 主任医师, 063000, 河北省唐山市, 河北医科大学附属唐山工人医院普外科. jscn005@gmail.com  
电话: 0315-3722469

收稿日期: 2010-09-24 修回日期: 2010-11-23

接受日期: 2010-12-01 在线出版日期: 2011-01-28

### Clinical and pathological features of splenic metastases of colorectal carcinoma: an analysis of three cases

Jun Wang, Bao-Liang Zhang, De-Zhi Guo, Qing-Xin Yuan

Jun Wang, Bao-Liang Zhang, De-Zhi Guo, Qing-Xin Yuan, Department of General Surgery, Tangshan Worker's Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Qing-Xin Yuan, Department of General Surgery, Tangshan Worker's Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China. jscn005@gmail.com

Received: 2010-09-24 Revised: 2010-11-23

Accepted: 2010-12-01 Published online: 2011-01-28

### Abstract

**AIM:** To study the clinicopathological features and diagnosis of splenic metastases of colorectal carcinoma.

**METHODS:** The clinical data for three patients with splenic metastases of colorectal carcinoma were retrospectively analyzed to investigate the clinical features, methods of diagnosis and treatment, and prognosis of the disease.

**RESULTS:** A definite diagnosis was achieved preoperatively by PET/CT in one patient. Two patients were initially diagnosed with splenic abscess. Splenectomy was performed in two patients, and exploratory laparoscopy in one patient. One patient died 2 wk after operation, and the other two patients survived for 2 and 6 years, respectively.

**CONCLUSION:** Splenic metastases of colorectal

carcinoma are a rare disease that is frequently misdiagnosed. Imaging examination is helpful in diagnosing splenic metastases of colorectal carcinoma. Patients with splenic abscess should be suspected of having concomitant colorectal carcinoma. Long-term survival can be achieved by splenectomy in colorectal carcinoma patients with isolated splenic metastasis.

**Key Words:** Colorectal Carcinoma; Splenic Metastasis; Diagnosis; Therapy

Wang J, Zhang BL, Guo DZ, Yuan QX. Clinical and pathological features of splenic metastases of colorectal carcinoma: an analysis of three cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 318-320

### 摘要

**目的:** 探讨结直肠癌脾转移的临床特征及诊治。

**方法:** 回顾分析河北医科大学附属唐山工人医院2003-2008年3例结直肠癌脾转移的临床特征、诊断、治疗及预后。

**结果:** 3例结直肠癌脾转移患者, 1例结肠癌术后行PET/CT检查确诊, 其余2例均诊断为脾脓肿, 2例行脾切除术, 1例行剖腹探查术确诊, 术后2 wk死亡1例, 其余2例已存活2、6年。

**结论:** 结直肠癌脾转移少见, 临床误诊率高, 影像学检查有助于诊断。脾脓肿患者应注意是否同时伴有结直肠癌, 并行进一步检查。孤立的脾转移手术效果好。

**关键词:** 结直肠癌; 脾转移癌; 诊断; 治疗

王军, 张宝良, 郭德智, 袁庆鑫. 结直肠癌脾转移3例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(3): 318-320

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/318.asp>

### 0 引言

脾转移癌指来源于上皮系统的恶性肿瘤, 而不包括来源于造血系统的恶性肿瘤, 主要来源于乳腺癌、肺癌、结直肠癌、卵巢癌及恶性黑色素瘤。目前国内文献报导不足百例, 尤其是在结

### ■同行评议者

王正康, 教授, 北京中日友好医院普外科

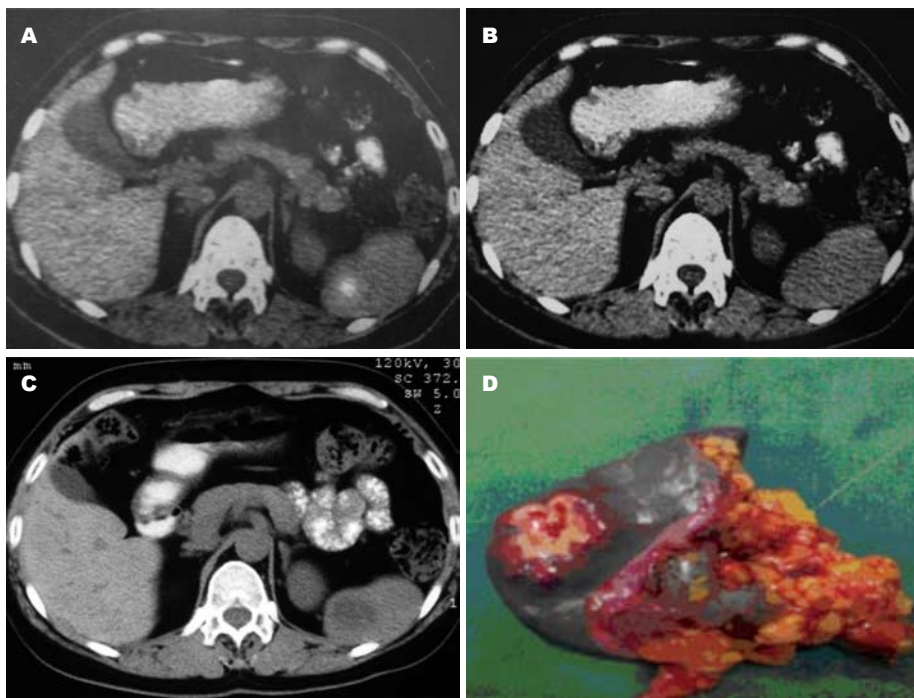


图1 结直肠癌脾转移影像学及大体图。A: 结直肠癌脾转移PET/CT; B: 结直肠癌脾转移与图A对应的CT图; C: 结直肠癌脾转移CT图; D: 结直肠癌脾转移大体标本。

■应用要点  
PET/CT能发现早期结直肠癌脾转移, 脾脓肿患者应注意是否同时伴有结直肠癌, 以免漏诊, 延误治疗。

直肠癌脾转移更是罕见。为提高临床医师对本病的认识, 减少漏诊、误诊率, 本文探讨其临床病理特征及诊治要点。

## 1 材料和方法

1.1 材料 收集河北医科大学附属唐山工人医院2003-2008年确诊结直肠癌脾转移3例。本组3例患者均为女性, 年龄47-60岁, 病程1 d-1年。临床表现为腹痛伴发热2例, 无临床症状1例。既往1例有异时多原发结直肠癌史, 1例有高血压, 糖尿病史。

1.2 方法 本组患者术前确诊为脾转移癌1例, 该患者由于异时多原发结直肠癌术后30 d行PCT/CT检查发现脾脏可见明显放射性摄取增高灶, 延迟扫描进一步增高, 考虑转移癌(图1A), 同期CT脾脏未见异常(图1B), CEA 3.5(0-10)  $\mu\text{g/L}$ 。患者因无不适症状, 拒绝手术, 要求定期观察, 于1年后CT发现肿物增大(图1C), CEA 6.8(0-10)  $\mu\text{g/L}$ , 遂行脾切除术, 术中见脾下极有一3 cm $\times$ 3 cm大小色灰白肿物, 突破浆膜层(图1D), 脾门淋巴结无肿大。病理诊断: 脾转移性腺癌, 脾动脉旁淋巴结未见转移癌0/8。其余2例术前均诊断为脾脓肿, 1例腹部超声诊断为脾脓肿, 遂行脾切除术, 术中见: 脾下极有一约4 cm $\times$ 3 cm质硬肿物, 中央伴有直径约2 cm脓肿, 术后病理回报脾转移性腺癌伴脾脓肿形成, 其后行CT示结肠脾曲肿物, 遂再次手术, 发现结肠脾曲肿物侵出浆膜阻塞部分肠腔, 术中冰冻提示结肠腺癌, 遂行左半结肠切除(D3), 术后病理: 结肠腺癌。另1例腹部超声及CT均诊断为脾脓肿, 给予抗炎治

疗及超声引导下的穿刺治疗, 反复穿刺治疗后体温正常, 但患者腹痛加剧且出现血性腹水, 查CEA 17.1(0-10)  $\mu\text{g/L}$ , 遂行剖腹探查, 见结肠脾曲肿物, 腹腔及系膜广泛粟粒样灰白结节, 脾肿大伴结节及脓肿形成, 取结节做病理报: 腹腔及脾脏转移性腺癌。所有患者手术恢复后, 于术后3 wk行Folfox4方案化疗12周期。

## 2 结果

所有患者均随访, 结肠癌伴腹腔及脾脏转移性腺癌患者术后2 wk因多发性脏器功能衰竭死亡。其余2例患者一直连续监测肿瘤系列及胸腹部CT变化均未出现转移及复发征象, 其中多原发结直肠癌伴脾转移患者已存活2年, 结肠癌伴脾转移性腺癌伴脾脓肿患者已存活6年。

## 3 讨论

结直肠癌脾转移分为结直肠癌晚期多脏器转移累及脾脏和孤立性脾转移<sup>[1]</sup>。虽然, 尸检中结直肠癌脾转移发生率为2%<sup>[2]</sup>, 但由于脾动脉从腹腔干呈锐角发出、脾脏的节律性收缩、脾实质无输入淋巴管以及脾脏微环境对转移的癌细胞的抑制作用等因素, 导致其在临床上仍为罕见疾病<sup>[1,2]</sup>。但由于医学影像学技术进步尤其是PET/CT的应用以及对结直肠癌患者的长期随访, 近年来对结直肠癌脾转移的报道明显增多<sup>[3,4]</sup>。结直肠癌脾转移的途径包括: 血行转移途径、淋巴管途径、腹膜种植转移以及邻近器官癌组织直接侵犯。目前认为可能以血性转移

### ■同行评价

本文选题恰当, 病例罕见, 具有很好的参考价值。

为主<sup>[2-3,5]</sup>。

大多数结直肠癌脾转移患者无明显特异性临床症状, 极少数可伴发脾脓肿或自发性脾破裂的症状与体征<sup>[6-10]</sup>。其诊断主要通过通过对结直肠癌的随访行影像学检查确诊。大多报道因结直肠癌术后随访CEA增高, 其后进一步影像学检查确诊<sup>[11]</sup>。但本组第1例患者由于结肠癌术后再发直肠癌术后1 mo行PET/CT检查确诊, 而同期CEA、B超、CT均未见异常, PET/CT较常规影像学检查更能早期发现结直肠癌脾转移灶, 虽然其价格仍较昂贵, 但对于结直肠癌术后CEA增高或异时多原发结直肠癌患者, 建议常规行PET/CT检查有助于发现脾转移或其他脏器转移, 可为下一步治疗制定合理方案。本组2例患者均以脾脓肿为表现, 因此对于中老年脾脓肿患者应注意是否同时伴有结直肠癌, 并行相关检查, 不要满足于脾脓肿诊断, 以免漏诊, 延误治疗。细针穿刺或经皮活检有助于脾转移瘤的诊断, 应予以推广<sup>[12]</sup>。

孤立性结直肠癌脾转移瘤虽然是远处转移, 但早期行脾切除术, 术后给予化疗, 能获得较满意的预后, 文献报道可最长达144 mo<sup>[13-16]</sup>。因此对孤立性结直肠癌脾转移瘤患者应积极行脾切除术, 术后给予化疗, 对经济条件较好患者, 可以化疗联合靶向治疗。但对于结直肠癌晚期广泛性转移者, 则失去手术机会, 预后不佳, 应以姑息辅助治疗。

### 4 参考文献

- 1 Compérat E, Bardier-Dupas A, Camparo P, Capron F, Charlotte F. Splenic metastases: clinicopathologic presentation, differential diagnosis, and pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 965-969
- 2 Berge T. Splenic metastases. Frequencies and patterns. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1974; 82: 499-506
- 3 Gencosmanoglu R, Aker F, Kir G, Tozun N. Isolated

metachronous splenic metastasis from synchronous colon cancer. *World J Surg Oncol* 2006; 4: 42

- 4 Metser U, Miller E, Kessler A, Lerman H, Lievshitz G, Oren R, Even-Sapir E. Solid splenic masses: evaluation with 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med* 2005; 46: 52-59
- 5 Indudhara R, Vogt D, Levin HS, Church J. Isolated splenic metastases from colon cancer. *South Med J* 1997; 90: 633-636
- 6 Pisanu A, Ravarino A, Nieddu R, Uccheddu A. Synchronous isolated splenic metastasis from colon carcinoma and concomitant splenic abscess: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5516-5520
- 7 Achuthan R, Joseph A, Haray PN. Splenic metastasis from a rectal tumour: an unusual presentation. *Ann R Coll Surg Engl* 1999; 81: 139
- 8 张兆祥, 方忠, 叶军平, 陶彩云, 易慕华, 鲁华. 脾转移瘤的诊断及临床病理特征. *中华外科杂志* 2002; 40: 585-588
- 9 涂朝勇, 章平禄, 邵初晓, 朱景德, 方基兴, 周新木, 陈君, 回充中, 王向阳. 脾转移性肿瘤临床分析(附22例报告). *肝胆外科杂志* 2003; 11: 432-435
- 10 王洪江, 罗海峰, 王玉林, 李克军, 王忠裕. 直肠癌脾脏转移破裂1例. *中国现代普通外科进展* 2009; 12: 273-274
- 11 Kim JC, Jeong CS, Kim HC, Yu CS, Kang GH, Lee MG. Isolated splenic metastasis from colorectal carcinoma: a case report. *J Korean Med Sci* 2000; 15: 355-358
- 12 Keogan MT, Freed KS, Paulson EK, Nelson RC, Dodd LG. Imaging-guided percutaneous biopsy of focal splenic lesions: update on safety and effectiveness. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172: 933-937
- 13 Busić Z, Cupurdija K, Kolovrat M, Cavka V, Cavka M, Patrlj L, Servis D, Kvesić A. Isolated splenic metastasis from colon cancer--case report and literature review. *Coll Antropol* 2010; 34 Suppl 1: 287-290
- 14 Avesani EC, Cioffi U, De Simone M, Botti F, Carrara A, Ferrero S. Synchronous isolated splenic metastasis from colon carcinoma. *Am J Clin Oncol* 2001; 24: 311-312
- 15 Okuyama T, Oya M, Ishikawa H. Isolated splenic metastasis of sigmoid colon cancer: a case report. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31: 341-345
- 16 Weathers BK, Modesto VL, Gordon D. Isolated splenic metastasis from colorectal carcinoma: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1345-1348

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 汤姆森-路透公布2009年WJG影响因子2.092

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

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

# 胶原性肠炎1例

郭亮, 曲丽梅, 王银萍, 徐红

郭亮, 曲丽梅, 王银萍, 吉林大学第一医院病理科 吉林省长春市 130021  
徐红, 吉林大学第一医院胃肠病科 吉林省长春市 130021  
作者贡献分布: 郭亮撰写初稿; 曲丽梅撰写二稿; 王银萍诊断、选题及修稿; 徐红做肠镜检查。  
通讯作者: 王银萍, 教授, 主任医师, 130021, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林大学第一医院病理科。  
wangyinpingpathology@yahoo.com.cn  
电话: 0431-88782636  
收稿日期: 2010-10-12 修回日期: 2010-11-10  
接受日期: 2010-11-17 在线出版日期: 2011-01-28

## Collagenous colitis: a report of one case

Liang Guo, Li-Mei Qu, Yin-Ping Wang, Hong Xu

Liang Guo, Li-Mei Qu, Yin-Ping Wang, Department of Pathology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China  
Hong Xu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Professor Yin-Ping Wang, Department of Pathology, the First Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Avenue, Changchun 130021, Jilin Province, China. wangyinpingpathology@yahoo.com.cn  
Received: 2010-10-12 Revised: 2010-11-10  
Accepted: 2010-11-17 Published online: 2011-01-28

## Abstract

Collagenous colitis is a rare inflammatory bowel disease that is not hard to diagnose but easy to be neglected by physicians. Here we report a case of collagenous colitis. A 71-year-old female patient presented with persistent watery diarrhea. A diagnosis of collagenous colitis was made after multidiscipline consultation. The patient was totally relieved of symptoms after hormone therapy.

Key Words: Collagenous colitis; Pathological diagnosis; Colonoscopic diagnosis

Guo L, Qu LM, Wang YP, Xu H. Collagenous colitis: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 321-323

## 摘要

胶原性肠炎是一种少见的肠道炎症性疾病, 诊断并不困难, 但容易漏诊。本例患者表现

为顽固性的水样腹泻, 经过多学科会诊, 最终诊断为胶原性肠炎, 经激素治疗后症状完全缓解。

关键词: 胶原性肠炎; 病理诊断; 肠镜诊断

郭亮, 曲丽梅, 王银萍, 徐红. 胶原性肠炎1例. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 321-323  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/321.asp>

## 0 引言

胶原性肠炎是一种少见的肠道炎症性疾病, 截止到1996年底全世界共报到了500多例<sup>[1]</sup>。通过CHKD期刊全文数据库搜索1994-2010年仅见有3篇文章报道。病变主要累及横结肠<sup>[2]</sup>, 小肠和胃也可以受累<sup>[3]</sup>。现将吉林大学第一医院1例以水样腹泻为症状的胶原性肠炎报道如下。

## 1 病例报告

女, 71岁, 10 mo前无明显诱因开始腹泻, 起病急, 每日20-30次, 水样便, 粪便呈深绿色, 量多, 禁食后腹泻无缓解。病情严重时伴恶心、呕吐, 呕吐物为胃内容物, 每天4-8次, 亦呈深绿色。便潜血及细菌培养均呈阴性。患者逐渐出现少尿, 血肌酐尿素氮升高, 肾功能不全症状。患者1992年曾患结肠炎, 当时急性起病, 发热、脓血便, 经当地医院治疗40余天后痊愈出院。于2010-03-02和2010-03-12行肠镜检查见乙状结肠和直肠黏膜片状充血水肿(图1)。显微镜下观察, 肠黏膜上皮内淋巴细胞浸润, 每100个上皮细胞内<20个, 小凹结构正常, 局部黏膜上皮剥脱, HE切片上黏膜上皮可见大量粉染均质物呈线性(图2A)和斑片状(图2B), 厚度超过10 μm, Masson三色染色进一步证实大量粉染均质物是胶原纤维(图3)。胶原纤维内可见被包绕的淋巴细胞和血管。

病理诊断: 胶原性肠炎。后经美国约翰·霍普金斯大学病理学专家会诊, 诊断与吉林大学第一医院诊断意见一致。给予患者甲强龙和其他对症治疗, 病情好转。

## ■背景资料

在世界范围内, 随着人们对胶原性肠炎的认识越来越深入, 他的诊断率也在不断升高, 然而国内却很少有人报道。作为一个严重影响生活质量并可以治愈的疾病, 他应该引起大家的重视。

## ■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

### ■相关报道

Fernández-Bañares等强调了胃肠内科医师、内镜医师和病理医师在诊断胶原性肠炎的过程中进行密切合作的重要性,并阐述了三者各自诊断过程中应避免的误区。



图1 肠黏膜片状充血水肿。

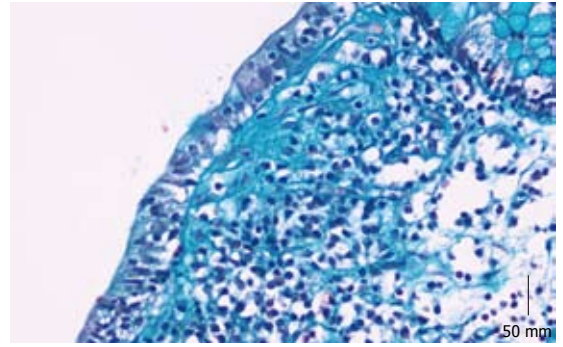


图3 Masson三色染色显示胶原带增厚( $\times 400$ )。

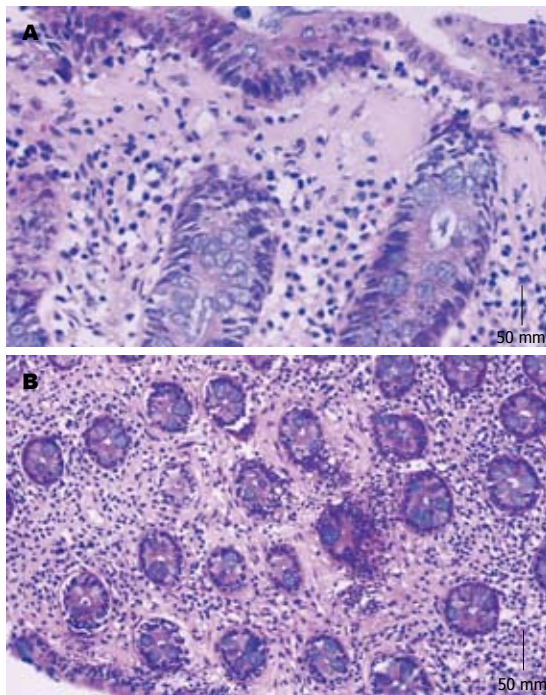


图2 肠黏膜HE染色病理检查。A: 肠黏膜上皮皮下胶原纤维带明显增厚( $\times 400$ ); B: 胶原纤维带斑片样增厚( $\times 200$ )。

## 2 讨论

胶原性肠炎又称显微镜下肠炎,最早在1976年由Lindström描述<sup>[4]</sup>,临床表现为不明原因难治性水样腹泻,可自行缓解或复发,严重影响了患者的生活质量<sup>[5]</sup>。胶原性肠炎病因尚不明确,有研究者认为是一种自身免疫性疾病,还有一些研究者发现毒素、感染因子及非类固醇抗炎药等诱因可引起腺体周围成纤维细胞的活动紊乱、胶原沉积、吸收障碍,导致胶原纤维在上皮基底膜沉积,这些假说都有待于进一步证实<sup>[6]</sup>。

病理学诊断及鉴别诊断: (1)胶原性肠炎特征性改变是上皮皮下胶原沉积,厚度达 $10\ \mu\text{m}$ 以上(正常胶原带 $<7\ \mu\text{m}$ )<sup>[7]</sup>,胶原层的下缘界限不清,呈指状突起延伸入表浅的固有层内; (2)上皮内淋巴细胞浸润,但是每100个上皮细胞间 $<20$ 个

淋巴细胞,  $>20$ 个的为淋巴细胞性肠炎,正常情况下可见3-5个淋巴细胞<sup>[8]</sup>; (3)肠上皮细胞扁平,局部剥离或缺失; (4)肠隐窝的结构正常,这是与溃疡性结肠炎和克罗恩病鉴别的要点; (5)固有层内可见淋巴细胞及嗜酸性粒细胞浸润<sup>[9]</sup>。

胶原性肠炎的诊断需要多学科医师的紧密合作: 首先胃肠内科医师应该根据患者的病史和症状安排患者做内镜检查; 然后内镜医师即使在内镜下发现肠黏膜是正常的, 仍然应该在肠道多点取材<sup>[10]</sup>; 最后, 由病理科医师综合病史、症状、内镜所见及显微镜下的特点客观的得出最终的诊断<sup>[11]</sup>。本例患者就是经过多学科会诊, 得到及时、正确的诊断和治疗。

由于胶原性肠炎的病因不明, 抗腹泻药物(洛哌丁胺等), 5-氨基水杨酸, 皮质类固醇和消胆胺都被用来治疗并取得了不同程度的疗效<sup>[12]</sup>。目前进行临床随机、双盲、对照实验最多并得到肯定效果的药物是布地奈德, 一种皮质类固醇<sup>[13]</sup>。可是, 停药后易复发, 所以推荐长期低剂量的维持用药。胶原性肠炎呈现良性临床过程, 他的发病并没有增加癌变的风险<sup>[14]</sup>。对于病情较重且内科治疗无效者, 可手术治疗<sup>[15]</sup>。

该患者接受激素治疗后, 症状已明显好转。07-05随访后, 已经无症状。11-02再次随访已痊愈。

## 3 参考文献

- Bohr J. A review of collagenous colitis. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 2-9
- Koch TR. Collagenous colitis: towards improving our biopsy aim. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3650-3651
- Suskind D, Wahbeh G, Murray K, Christie D, Kapur RP. Collagenous gastritis, a new spectrum of disease in pediatric patients: two case reports. *Cases J* 2009; 2: 7511
- Lindström CG. 'Collagenous colitis' with watery diarrhoea--a new entity? *Pathol Eur* 1976; 11: 87-89
- Hjortswang H, Tysk C, Bohr J, Benoni C, Vignren L, Kilander A, Larsson L, Taha Y, Ström M. Health-

### ■创新盘点

本文在国内首次提出了多学科协作在胶原性肠炎诊断过程中的重要性, 提供了简洁的诊断要点, 易于读者的掌握。

- related quality of life is impaired in active collagenous colitis. *Dig Liver Dis* 2010
- 6 Tysk C, Bohr J, Nyhlin N, Wickbom A, Eriksson S. Diagnosis and management of microscopic colitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 7280-7288
  - 7 Liszka Ł, Woszczyk D, Pajak J. Histopathological diagnosis of microscopic colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 792-797
  - 8 van der Wouden EJ, Karrenbeld A, Kleibeuker JH, Dijkstra G. Microscopic colitis: an unfamiliar but treatable disease. *Neth J Med* 2009; 67: 41-45
  - 9 Treanor D, Sheahan K. Microscopic colitis: lymphocytic and collagenous colitis. *Current Diagnostic Pathology* 2002; 8: 33-41
  - 10 Jobse P, Flens MJ, Loffeld RJ. Collagenous colitis: description of a single centre series of 83 patients. *Eur J Intern Med* 2009; 20: 499-502
  - 11 Fernández-Bañares F, Salas A, Esteve M. Pitfalls and errors in the diagnosis of collagenous and lymphocytic colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* 2008; 2: 343-347
  - 12 Abdo A, Raboud J, Freeman HJ, Zetler P, Tilley J, Chaun H, Whittaker JS, Amar J, Halparin L, Enns R. Clinical and histological predictors of response to medical therapy in collagenous colitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1164-1168
  - 13 Bonderup OK, Hansen JB, Teglbjaerg PS, Christensen LA, Fallingborg JF. Long-term budesonide treatment of collagenous colitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Gut* 2009; 58: 68-72
  - 14 Kao KT, Pedraza BA, McClune AC, Rios DA, Mao YQ, Zuch RH, Kanter MH, Wirio S, Contreas CN. Microscopic colitis: a large retrospective analysis from a health maintenance organization experience. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3122-3127
  - 15 Nyhlin N, Bohr J, Eriksson S, Tysk C. Microscopic colitis: a common and an easily overlooked cause of chronic diarrhoea. *Eur J Intern Med* 2008; 19: 181-186

■同行评价  
本文科学性尚可,对临床上治疗胶原性肠炎有一定的参考价值。

编辑 李薇 电编 李薇

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿,保证稿件尽快公平、公正的处理,《世界华人消化杂志》编辑部研究决定,从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任:李军亮 2011-01-01)

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册,免费获取PDF等格式的全文,切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具,编委、作者和读者利益的最大化的目标,努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元,全年2016.00元,邮发代号82-262,由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章,具体内容涉及:食管疾病,如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等;胃部疾病,胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等;肠道疾病,如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等;肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等;胰腺疾病,如胰腺炎和胰腺癌等;全身性疾病涉及消化系统,如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等;以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等);除以上外,本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和

中国知识资源总库收录。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次,影响因子0.625,综合评价总分49.4分,分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位,分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位;其他指标:即年指标0.112,他引率0.79,引用刊数473种,扩散因子15.72,权威因子1 170.03,被引半衰期4.0,来源文献量752,文献选出率0.93,地区分布数30,机构分布数30,基金论文比0.39,海外论文比0.01。

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。文稿应具有科学性、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fengstroke, 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<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如ln-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (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 $1 \times 10^{12}/L$ , WBC数用 $1 \times 10^9/L$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M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、CO<sub>2</sub>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 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量 $\gamma$ 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% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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 =  $45 \times 10^{-6}$ ; 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(2010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: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wcyj@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)卡方检验用希腊文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希腊文小写 $\nu$ ; (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 $\text{SD}/3 = 0.09$  cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 百分数到个位;  $101 \leq$  分母  $\leq 1000$ , 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. wcyj@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致.

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值).

3.11 正文标题层次 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述.

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾.

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 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 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达.

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角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认

《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。

为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto: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发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该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。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

## 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2011年国内国际会议预告

2011-03

中华医学会第四次全国感染性疾病中青年学术会议  
会议地点: 长沙市  
联系方式: medcon@126.com

2011-03-01/31

湖北省医学会结直肠肛门外科学分会2011年学术会议  
会议地点: 十堰市  
联系方式: chqjiang@hotmail.com

2011-03-25

第六届中国消化外科学术会议暨第七届全军肝胆外科学术会议  
会议地点: 北京市  
联系方式: 010-67534765-8888

2011-03-25/26

2011北京多镜联合模拟教学与临床应用研讨会  
会议地点: 北京市  
联系方式: pgyy2001@126.com

2011-03-25/27

首届中国腹膜后肿瘤论坛  
会议地点: 北京市  
联系方式: sjtcolorectalsurgery@gmail.com

2011-04-01/30

第九届全国儿童感染性疾病暨第十届全国儿童肝脏疾病学术会议  
会议地点: 扬州市  
联系方式: fuxiaoxia@cma.org.cn

2011-04-08

2011第五届中华消化病学年度讲坛  
会议地点: 北京市  
联系方式: cma\_spd@yahoo.com

2011-04-09/10

第四届NCCN亚洲学术会议暨2011NCCN指南中国版修订会  
会议地点: 上海市  
联系方式: nccn-asia@emdchina.com

2011-04-14/17

第四届全国消化内科危重疑难少见病学术大会  
会议地点: 桂林市  
联系方式: xiaohuayinan2011@yahoo.com.cn

2011-04-15/17

第二届中国肿瘤介入与微创治疗大会  
会议地点: 上海市  
联系方式: 010-84288944

2011-04-22/24

第九届全国内镜外科学术研讨会  
会议地点: 济南市  
联系方式: gandannejing@163.com

2011-05-01/31

2011年安徽省消化、消化内镜学术年会暨肝脏疾病诊治难点与对策学习班  
会议地点: 合肥市  
联系方式: meiqiaomq@yahoo.com.cn

2011-05-27/29

第十四届中西医结合学会大肠肛门病专业委员会学术研讨会  
会议地点: 沈阳市  
联系方式: gcyy88@163.com

2011-06-11/12

2011国际消化疾病论坛  
会议地点: 香港  
联系方式: www.iddforum.com

2011-06-16/20

第二十三次全国中西医结合消化学术会议  
会议地点: 太原市  
联系方式: 0351-4174328

2011-06-23/26

第十五次全国病毒性肝炎及肝病学术会议  
会议地点: 沈阳市  
联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2011-07-07

第八届全国大肠癌学术会议暨2011哈尔滨国际结直肠癌外科周  
会议地点: 哈尔滨市  
联系方式: rainy\_gg@yeah.net

2011-07-22/24

第四届全国脂肪肝病专题研讨会  
会议地点: 重庆市  
联系方式: 010-85867619

2011-08-04/07

第五届中国肿瘤内科大会  
会议地点: 北京市  
联系方式: 010-87788701

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会  
会议地点: 福州市  
联系方式: 010-67726451

## 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!

杜顺达 副主任医师  
北京协和医院肝外科

范学工 教授  
中南大学湘雅医院感染病科

傅春彬 主任医师  
吉化集团公司总医院消化内科

高英堂 研究员  
天津市第三中心医院 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

管冬元 副教授  
上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

郭晓钟 教授  
中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

韩天权 教授  
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科 上海消化外科研究所

何敏 教授  
广西医科大学医学科学实验中心

江米足 教授  
浙江大学医学院附属儿童医院儿科

李涛 副主任医师  
北京大学人民医院肝胆外科

梁力建 教授  
中山大学附属第一医院肝胆外科

刘超 副教授  
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆胰外科

刘改芳 主任医师  
河北医科大学第三医院消化内科

龙学颖 副主任医师  
中南大学湘雅医院放射科

齐清会 教授  
大连医科大学附属第一医院普通外科

邱伟华 副主任医师  
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

汤华 研究员  
重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室

唐南洪 教授  
福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

王健生 教授  
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王江滨 教授  
吉林大学中日联谊医院消化内科

王娅兰 教授  
重庆医科大学基础医学院病理教研室

王志刚 副主任医师  
上海市第六人民医院普外科

肖文华 主任医师  
中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤科

严惟力 副教授  
上海交通大学医学院附属仁济医院核医学科

颜宏利 教授  
中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

张春虎 副教授  
中南大学湘雅医院中西医结合研究所

张俊 副教授  
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科

张占卿 主任医师  
上海市(复旦大学)公共卫生中心

郑鹏远 教授  
郑州大学第二附属医院消化科

朱亮 副教授  
大连医科大学生理教研室