

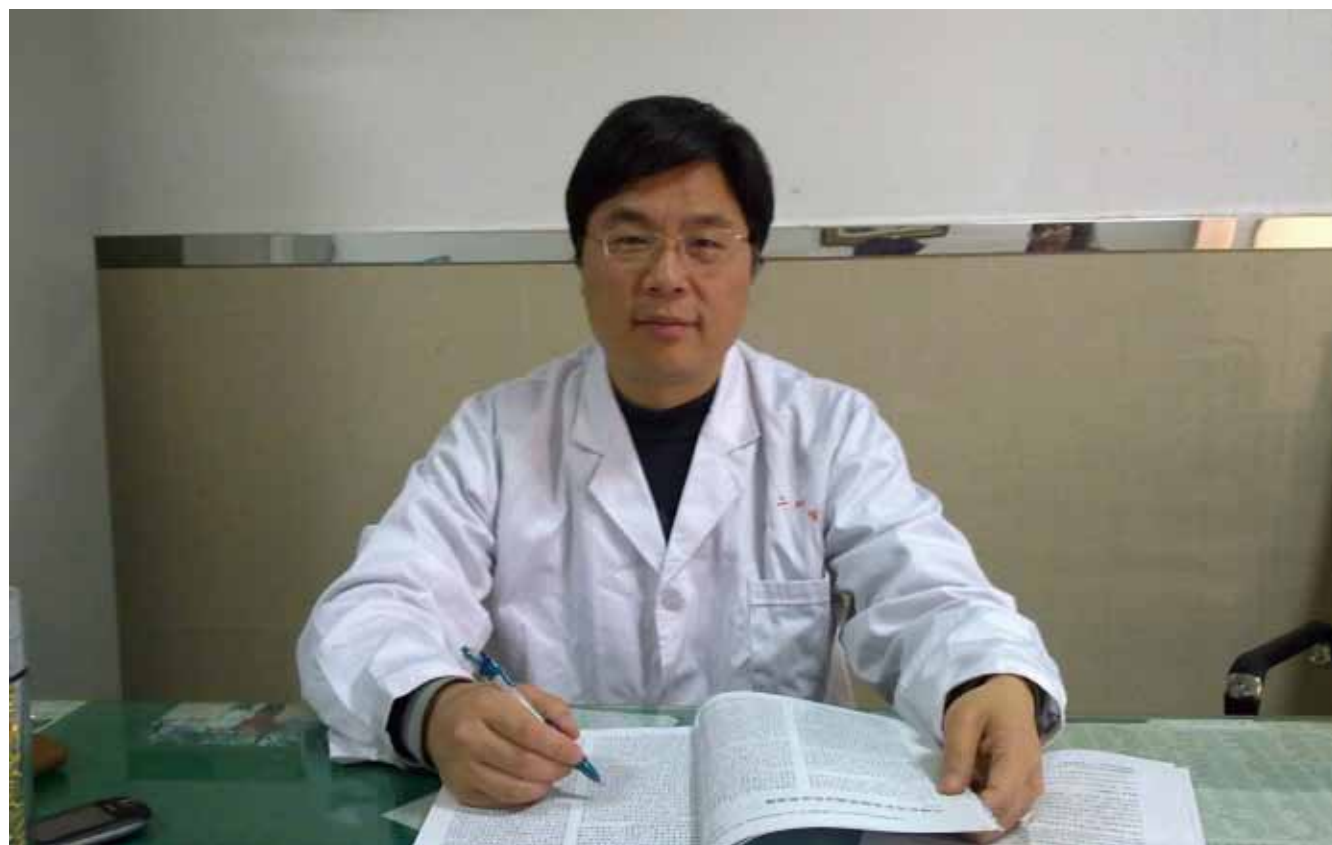
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012年1月18日 第20卷 第2期 (Volume 20 Number 2)



# 2/2012

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《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

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

陈可冀教授  
黄志强教授  
纪小龙教授  
王苑本教授  
王宝恩教授  
杨春波教授  
杨思凤教授  
姚希贤教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 名誉主编

潘伯荣教授

### 主编

程英升教授  
党双锁教授  
江学良教授  
刘连新教授  
刘占举教授  
吕宾教授  
马大烈教授  
王小众教授  
姚登福教授  
张宗明教授

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
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  
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  
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  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
姜相君主任医师  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
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  
刘莹副主任医师  
陆伦根教授  
马红主任医师  
马欣主任医师  
毛高平教授  
孟庆华教授  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
宛新建副教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王俊平教授  
王晓艳副教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授

杨建民教授  
姚树坤教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
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  
周宇教授  
邹晓平主任医师  
诸琦教授  
于珮主任医师

#### 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  
陈凜教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
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  
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  
高毅主任医师  
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  
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  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
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  
陆云飞教授  
禄韶英副主任医师  
吕云福教授  
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  
邱伟华副主任医师  
仇毓东副教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
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  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师  
汪根树副教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王健生教授

王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
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  
吴泰璜教授  
伍晓汀教授  
谢敏主任医师  
徐迅迪教授  
徐泱副主任医师  
许戈良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨银学教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
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  
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  
陈志辉副主任医师  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
范学工教授  
高润平教授  
高泽立副教授  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
胡国信副主任医师  
靳雪源副主任医师  
刘正稳教授  
钱林学主任医师

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
王凯教授  
王怡主任医师  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副教授  
姚鹏副教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵秀英副教授  
周霞秋教授  
朱传武教授  
庄林主任医师

### 消化中医药学

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  
南极星教授  
牛英才研究员  
王富春教授  
邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
徐庆教授  
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  
代智副研究员  
李璦教授  
刘宝瑞教授  
刘云鹏教授  
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  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
官泳松教授

胡红杰主任医师  
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  
徐辉雄教授  
严惟力副教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师  
茅爱武教授  
孙明军教授  
万军教授  
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  
陈敬贤教授

陈志龙教授  
崔莲花副教授  
樊红教授  
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  
李刚教授  
李君文研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
刘森副教授  
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  
汪思应教授  
王钦红教授  
魏继福副研究员  
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  
阴赅宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授  
周晓武副主任医师

### 消化病理学

杜祥教授  
李菊玲副教授  
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  
门秀丽教授  
潘兴华副主任医师  
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  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2012年1月18日 第20卷 第2期 (总第370期)

基础研究	91 健脾疏肝方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脂代谢分子网络的影响 苏冬梅, 诸葛丽, 李健, 李军祥 100 蟾毒灵介导JNK信号通路诱导人胰腺癌细胞的凋亡 胡强, 殷佩浩, 陆品相, 沈玉根, 余琛, 李水军, 贾晶莹, 刘罡一, 缪怡, 范耀祖 106 三硝基苯磺酸诱导小鼠溃疡性结肠炎模型制备的技术改良 徐阳, 李伟光, 刘海峰, 张成岗
临床研究	113 MID1在大肠癌组织中的表达及其对预后的意义 赵震, 杨磊, 丁彦青, 于倩
文献综述	119 IL-28B基因多态性-丙型肝炎个体化治疗的新起点 李沛元, 姚蓝, 郭波, 宋家武 125 慢性戊型肝炎的研究进展 耿彦生, 周艳, 王佑春 131 Cyclin E与结直肠癌的研究进展 秦光明, 黄晓俊, 魏义胜
研究快报	135 姜黄素对人肝癌耐药细胞株Bel7402/5-FU多药耐药性的逆转作用 曹仕琼, 李萍, 尹太勇, 杨盛力 140 白介素-18在急性胰腺炎大鼠中性粒细胞凋亡中的作用 吴彦彦, 许兰涛 145 联合应用p38MAPK抑制剂对降低结肠癌阿霉素耐药性的影响 李金鹏, 周巍, 张军, 于皆平, 于红刚
临床经验	149 经鼻胃镜取出食管异物19例 黄秀江, 吴良慧, 杨凯茜, 方德娟, 李爱英, 杨瑾 152 器械吻合在胸中下段食管癌手术中应用231例 游咏, 莫靓, 陈碾, 贺大璞, 冯耀光 155 不同胃疾病来源幽门螺杆菌菌株PPIase编码基因分布频率及其意义 陈莫耶, 宫月华, 袁媛 160 MRP、LRP和MDR1基因在胃癌中的表达及其意义 靳胜 164 塑料支架内引流在老年难取性胆管结石中的应用 李伟志, 秦鸣放, 勾承月, 张莉 167 肠系膜静脉血栓31例 陈建立, 张国志, 常艳, 谭欣, 戚峰, 刘彤
病例报告	171 以急性胰腺炎为主要特征的肾综合征出血热3例 易珍, 叶长根, 刘翠云, 刘佩佩, 张伟, 孙水林

<b>附 录</b>	174 《世界华人消化杂志》投稿须知 179 2012年国内国际会议预告
<b>志 谢</b>	180 志谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	105 《世界华人消化杂志》外文字符标准 124 《世界华人消化杂志》参考文献要求 130 《世界华人消化杂志》出版流程 144 《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》 151 《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》 163 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 170 《世界华人消化杂志》修回稿须知 173 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694
<b>封面故事</b>	《世界华人消化杂志》主编: 党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科
<b>本期责任人</b>	编务 周媛; 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 张姗姗; 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 2012-01-18

原刊名 新消化病学杂志

期 刊 名 称 世界华人消化杂志  
主 管 单 位 山西省科学技术厅  
主 办 单 位 太原消化病研治中心

编 辑 世界华人消化杂志编辑委员会  
030001, 山西省太原市双塔西街77号  
电话: 0351-4078656  
E-mail: wcjd@wjgnet.com  
http://www.wjgnet.com

出 版 世界华人消化杂志编辑部  
030001, 山西省太原市双塔西街77号  
电话: 0351-4078656  
E-mail: wcjd@wjgnet.com  
http://www.wjgnet.com

### 主 编

程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编 辑 部 主 任 李军亮

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

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

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

### 特 别 声 明

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

2012年版版权归世界华人消化杂志所有

# World Chinese Journal of Digestology

January 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 2

<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>91 Effect of Jianpishugan Decoction on hepatic lipid metabolism in rats with non-alcoholic steatohepatitis <i>Su DM, Zhuge L, Li J, Li JX</i></p> <p>100 Bufalin induces apoptosis of pancreatic cancer cells via the JNK signaling pathway <i>Hu Q, Yin PH, Lu PX, Shen YG, Yu C, Li SJ, Jia JY, Liu GY, Miao Y, Fan YZ</i></p> <p>106 Preparation of a mouse model of TNBS-induced ulcerative colitis: technology improvement and optimal dose exploration <i>Xu Y, Li WG, Liu HF, Zhang CG</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>113 Prognostic significance of MID1 expression in colorectal carcinoma <i>Zhao Z, Yang L, Ding YQ, Yu Q</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>119 Interleukin-28B gene polymorphisms: a new beginning of personalized treatment of hepatitis C <i>Li PY, Yao L, Guo B, Song JW</i></p> <p>125 Progress in research of chronic hepatitis E <i>Geng YS, Zhou Y, Wang YC</i></p> <p>131 Advances in understanding the relationship between cyclin E and human colorectal cancer <i>Qin GM, Huang XJ, Wei YS</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>135 Curcumin reverses multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma bel7402/5-FU cells <i>Cao SQ, Li P, Yin TY, Yang SL</i></p> <p>140 Role of IL-18 in peripheral neutrophil apoptosis in rats with sever acute pancreatitis <i>Wu YY, Xu LT</i></p> <p>145 Use of p38 MAPK inhibitor reduces resistance of colon cancer cells to doxorubicin <i>Li JP, Zhou W, Zhang J, Yu JP, Yu HG</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>149 Nasal endoscopy for removal of foreign bodies in the esophageal tract: an analysis of 19 cases <i>Huang XJ, Wu LH, Yang KX, Fang DJ, Li AY, Yang J</i></p> <p>152 Mechanical anastomosis after surgical removal of esophageal carcinoma: an analysis of 231 cases <i>You Y, Mo L, Chen N, He DP, Feng YG</i></p> <p>155 Differential distribution of the PPLase gene in <i>Helicobacter pylori</i> strains isolated from patients with different gastric diseases <i>Chen MY, Gong YH, Yuan Y</i></p> <p>160 Clinical significance of expression of MRP, MDR1 and LRP in gastric cancer <i>Jin S</i></p> <p>164 Application of endoscopic plastic biliary stents in elderly patients with unextractable common bile duct stones <i>Li WZ, Qin MF, Gou CY, Zhang L</i></p> <p>167 Diagnosis and management of mesenteric venous thrombosis: an analysis of 31 cases <i>Chen JL, Zhang GZ, Chang Y, Tan X, Qi F, Liu T</i></p>
<b>CASE REPORT</b>	<p>171 Acute pancreatitis as the main feature of hemorrhagic fever with renal syndrome: a report of three cases <i>Yi Z, Ye CG, Liu CY, Liu PP, Zhang W, Sun SL</i></p>

<b>APPENDIX</b>	174 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 179 Meeting events calendar in 2012
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	180 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
<b>COVER</b>	Editor-in-Chief <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</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>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** January 18, 2012

#### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

#### RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology of Shanxi Province

#### SPONSOR

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

#### EDITING

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

#### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

#### PUBLISHING

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

#### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

#### EDITOR-IN-CHIEF

**Ying-Sheng Cheng, Professor**, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

**Shuang-Suo Dang, Professor**, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

**Xue-Liang Jiang, Professor**, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

**Lian-Xin Liu, Professor**, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

**Zhan-Ju Liu, Professor**, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

**Bin Lv, Professor**, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

**Da-Lie Ma, Professor**, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

**Xiao-Zhong Wang, Professor**, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

**Deng-Fu Yao, Professor**, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Zong-Ming Zhang, Professor**, Department of General Surgery, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

#### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

#### SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue  
RMB 2448 Yuan for one year

#### CSSN

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

#### COPYRIGHT

© 2012 Published by *World Chinese Journal of Digestology (WCJD)*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

#### SPECIAL STATEMENT

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

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

**Copyright © 2012 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology***

# 健脾疏肝方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脂代谢分子网络的影响

苏冬梅, 诸葛丽, 李健, 李军祥

苏冬梅, 中国中医科学院广安门医院南区一科 北京市 102618  
诸葛丽, 李军祥, 北京中医药大学东方医院消化内科 北京市 100078  
李健, 北京中医药大学基础医学院人体形态学系 北京市 100029  
苏冬梅, 医学博士, 住院医师, 主要从事中医药防治慢性肝病研究。“十一五”国家科技支撑计划中医治疗常见病研究—“非酒精性脂肪性肝炎治疗方案临床研究”基金资助项目, No. 2007BAI20B096  
作者贡献分布: 苏冬梅对此文所作贡献最大; 此课题由苏冬梅、诸葛丽、李健及李军祥设计; 研究过程由苏冬梅与诸葛丽操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李军祥提供; 数据分析由苏冬梅与李健完成; 本论文写作由苏冬梅完成。  
通讯作者: 李军祥, 教授, 主任医师, 博士生导师, 100078, 北京中医药大学东方医院消化内科。ljx970508@sohu.com  
电话: 010-67689766  
收稿日期: 2011-09-05 修回日期: 2011-11-26  
接受日期: 2011-12-23 在线出版日期: 2012-01-18

## Effect of Jianpishugan Decoction on hepatic lipid metabolism in rats with non-alcoholic steatohepatitis

Dong-Mei Su, Li Zhuge, Jian Li, Jun-Xiang Li

Dong-Mei Su, Department of Gastroenterology, the Southern Branch of Guang An Men Hospital of China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102618, China  
Li Zhuge, Jun-Xiang Li, Department of Gastroenterology, Beijing University of Chinese Medicine Subsidiary Dongfang Hospital, Beijing 100078, China  
Jian Li, Human Morphology, Department of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China  
Supported by: the National Key Technology R&D Program: Chinese Medicine Treatment of Common Diseases—"Non-alcoholic Steatohepatitis", No. 2007BAI20B096  
Correspondence to: Jun-Xiang Li, Professor, Beijing University of Chinese Medicine Subsidiary Dongfang Hospital, Beijing 100078, China. ljx970508@sohu.com  
Received: 2011-09-05 Revised: 2011-11-26  
Accepted: 2011-12-23 Published online: 2012-01-18

## Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy of Jianpishugan Decoction in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and the effect of such treatment on hepatic lipid metabolism in rats with NASH.

**METHODS:** Forty male rats were randomly divided into four groups: blank control group, model group, Jianpishugan Decoction group, and Essentiale treatment group. Rats of all groups except the blank control group were fed a high-fat diet for eight weeks to induce NASH. The Jianpishugan Decoction and Essentiale treatment groups were treated with Jianpishugan Decoction and Essentiale for four weeks, respectively. Hepatic histopathological changes, serum transaminase, serum lipid, liver fat, SOD, MDA, GSH-PX and the mRNA expression of SREBP-1c, SCAP, PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$  and LXR in the liver were examined.

**RESULTS:** Compared to the model and Essentiale treatment groups, serum ALT, AST, lipids, hepatic TG, and the severity of hepatic steatosis and inflammation obviously decreased, and hepatic antioxidant levels significantly increased in the Jianpishugan group (all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ). Compared to the model group, the level of SREBP-1c mRNA significantly decreased and that of PPAR $\alpha$  mRNA significantly increased in the Jianpishugan Decoction and essentiale treatment groups (all  $P < 0.05$  or  $0.01$ ).

**CONCLUSION:** Jianpishugan Decoction can regulate hepatic lipid metabolism, inhibit the expression of SREBP-1c and SCAP, and up-regulate the expression of PPAR $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  in rats with NASH.

**Key Words:** Jianpishugan Decoction; Non-alcoholic steatohepatitis; Hepatic lipid metabolism; Network regulation

Su DM, Zhuge L, Li J, Li JX. Effect of Jianpishugan Decoction on hepatic lipid metabolism in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 91-99

## 摘要

**目的:** 观察健脾疏肝方对非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的疗效

## ■背景资料

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)为目前常见的肝脏疾病之一,其预后不佳,可转化为肝纤维化、肝硬化,而导致肝衰甚至死亡。目前本病的发病机制尚未明确,现代医学尚无特效药物治疗。

## ■同行评议者

郑培永, 副研究员, 上海中医药大学附属龙华医院

## ■ 研究前沿

由于NASH发病机制不清,且无特效的防治药物,本病已成为目前肝病界的研究热点.现代医学尚无特效药物,而本病为中医药治疗的特色病种之一,从传统医学角度探讨中医药治疗本病的靶点,为今后本病的防治具有重要意义.

以及对NASH大鼠肝脂代谢分子网络的影响.

**方法:** 将40只♂SD大鼠随机分成空白组、模型组、健脾疏肝方组、易善复组4组,采用高脂饲料造模连续8 wk.模型成立后,改用普通饲料饲喂,同时健脾疏肝方组及易善复组分别予健脾疏肝方浸膏和易善复混悬液灌胃,模型组和空白组予去离子水灌胃,连续4 wk;实验结束后处死全部大鼠,观察大鼠肝组织病理改变,测定大鼠肝功、血脂、肝脂以及抗氧化指标水平,观察大鼠肝组织SREBP-1c、SCAP、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 、LXR mRNA表达.

**结果:** 健脾疏肝方可有效改善大鼠肝组织脂肪变性及炎症损伤,降低肝功、血脂、肝脂水平,提高抗氧化物质,并可同时上调PPAR $\alpha$ 及PGC-1 $\alpha$ ,下调SREBP-1c及SCAP mRNA表达( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),且在改善大鼠肝指数、体质量,降低谷丙转氨酶(ALT)水平、肝甘油三酯(TG)、MDA含量,提高GSH-PX含量,上调PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$  mRNA表达等方面优于易善复( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ).

**结论:** 健脾疏肝方可通过网络调控NASH肝脂代谢而防治NASH,在今后研究中,可将健脾疏肝方作为基础,结合其他治法,辨证施治.

**关键词:** 健脾疏肝方; 非酒精性脂肪性肝炎; 肝脂代谢; 分子网络调控

苏冬梅, 诸葛丽, 李健, 李军祥. 健脾疏肝方对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脂代谢分子网络的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 91-99  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/91.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一类肝脏组织学改变与酒精性肝病相似,但无过量饮酒史的临床病理综合征,已成为临床常见的肝脏疾病之一.从NAFLD到非酒精性脂肪性肝硬化的转化过程中,非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是一个非常重要的中间环节,是隐源性肝硬化的重要原因之一,预后不佳,约50%患者随访6年后可进展成肝纤维化,10%-15%在10-20年内可进展成肝硬化,而9%-26%在随访的4-10年内可因终末期肝病死亡<sup>[1-6]</sup>.因此,针对NASH防治的研究对降低肝硬化发生率具有重要的意义,也是NAFLD防治研究中的关键问题.目前现代医学尚无治疗NASH的特效药物,而中医药

在防治NASH方面具有独特的作用和优势,尤其是在保肝降酶降脂以及改善患者生活质量方面.笔者认为NASH的关键病机为“脾虚肝郁,痰浊瘀阻”,结合传统医学“见肝之病,当先实脾”的理论,从肝脾论治创立健脾疏肝方,观察该方治疗NASH的疗效及对NASH肝脂代谢的分子调控机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本实验选用♂8周龄SD大鼠,体质量120 g $\pm$ 20 g(北京维通利华实验动物技术有限公司提供)<sup>[7]</sup>.常规饲养于北京中医药大学清洁级动物房,12 h光照和黑夜循环,温度22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,湿度50%-60%.健脾疏肝方(炒白术15 g、茯苓15 g、绞股兰10 g、泽泻20 g、水飞蓟15 g、草决明10 g、广郁金10 g、丹参30 g、白芥子10 g、生山楂15 g)由北京同仁堂药材公司提供,用药剂量按实验动物与人体体表面积比等效量核算比率,计算动物的等效剂量制作成浸膏;多烯磷脂酰胆碱(易善复)胶囊:规格:228 mg/粒,由赛诺菲安万特(北京)制药有限公司生产,按上述方法制成混悬液;高脂饲料由北京科澳协力饲料有限公司加工制作(10 kg/包),真空包装常温保存. ALT、AST、TG试剂盒由中生北控生物科技股份有限公司生产;SOD、MDA、GSH-PX试剂盒由南京建成生物工程公司生产;SREBP-1c、SCAP、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 、LXR PCR引物由生工生物工程(上海)有限公司提供;TRIzol试剂盒购自美国Invitrogen公司;M-MLV反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司;Real-time PCR扩增试剂盒购自北京泽平生物技术有限公司;Agarose购自Promega公司;DEPC、油红O及HE染色相关试剂购自Sigma公司;100 bp DNA Ladder购自北京全式金生物技术有限公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 造模:** 采用高脂饲料(88%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇)饲喂,自由饮水、摄食,连续8 wk(结合文献和前期预实验的动态监测结果),建立NASH大鼠模型<sup>[8-9]</sup>.

**1.2.2 分组及处置:** 40只大鼠按随机数字表随机分成空白组、模型组、健脾疏肝方组及易善复组4组,每组10只.空白组饲喂普通饲料,其余各组饲喂高脂饲料连续8 wk.模型成立后,各组饲喂普通饲料,健脾疏肝方组及易善复组分别予健脾疏肝方浸膏和易善复混悬液灌胃,健脾疏肝方组给药量为:15.05 g生药/kg,易善复组给药

量为: 137.3 mg/kg, 两组给药量相当于临床成人日用量的7倍(剂量根据人和动物体表面积折算的等效剂量比值表<sup>[10]</sup>, 结合前期实验结果测定), 模型组和空白组按10 mL/kg鼠重灌服去离子水; 每日1次, 自由摄食、饮水, 连续4 wk, 观察动物进食、饮水、行为、精神状态、毛发及二便等情况, 每周计量动物体质量1次。

1.2.3 指标检测: 4 wk治疗结束后处死各组大鼠, 取大鼠腹主动脉血及肝组织用于各项指标检测, 处死前禁食禁水24 h. (1)血清生化指标、肝脂含量及抗氧化指标测定: 大鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、甘油三酯(TG)采用全自动生化分析仪进行测定; 肝脏TG含量、SOD活性、MDA及GSH-PX含量测定: 精确称取肝组织0.5 g, 采用超声匀浆机制成匀浆(冰水中进行), 取1%肝匀浆, 离心后取上清, 按试剂盒说明进行检测; (2)肝组织病理学检测: 新鲜肝组织冰冻切片, 行常规油红O染色; 肝组织石蜡切片, 行常规HE染色. 油红O及HE切片光镜下评估肝脏脂肪变性和炎症活动情况. 根据NAFLD活动度积分(NAFLD Activity Score, NAS)<sup>[11]</sup>对大鼠肝组织病理改变进行评估. NAS组织学评分系统对14项病理改变, 3项指标进行了半定量评估计分: 肝脂肪变性程度(按发生脂肪变性实质细胞/总细胞数, <5%、5%-33%、33%-66%、>66%, 分别计0-3分)、小叶内炎症(按病灶大小, <2、2-4、>4, 分别计0-2分)、肝细胞气球样变(按无、少量气球样细胞、较多/显著气球样变, 分别计0-2分), 其中NAS≥5分者可明确NASH的诊断, NAS<3分则可排除NASH, 两者之间者为NASH可能. 油红O及HE切片使用Olympus摄像系统进行观察和摄片; (3)实时荧光定量PCR检测肝组织SREBP-1c、SCAP、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 和LXR mRNA水平: 依据试剂盒说明提取组织RNA, 核酸紫外分光光度计测定经稀释的RNA提取物的吸光度(A)值和浓度, 判断RNA纯度, 并计算其浓度. 放-70℃冰箱保存备用; RNA逆转录: 37℃恒温1 h, 然后95℃, 3 min灭活, 将逆转录产物放-20℃冰箱备用; 定量PCR测定: 反应条件为: 94℃预变性15 min, 94℃ 15 s, 60℃ 34 s, 72℃ 15 s, 共40循环, 72℃ 10 min. PCR引物序列见表1. 选阳性标准梯度点分析, 若相关系数 $r^2$ 大于0.90, 表明线性关系良好, 可确定为定量标准曲线, 根据标准曲线得出样本荧光定量反应的绝对定量值, 定量的单位是 $B = \text{拷贝数}/\mu\text{L cDNA}$ . 考虑到各个样本总RNA浓度的差异,

最终计算结果按下列公式换算:  $A(\text{拷贝数}/\mu\text{g 总RNA}) = B(\text{拷贝数}/\mu\text{L cDNA})/\text{样本RNA的}A_{260}\text{值} \times 5/6$ .

**统计学处理** 应用SPSS17.0 for Windows软件进行资料的统计分析, 计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 一般情况 空白组大鼠毛色洁白、富有光泽, 行动敏捷, 饮食量及排泄物无异常, 体质量随造模时间逐渐增加. 模型组大鼠毛色枯黄, 色泽黯淡, 喜团聚蜷卧, 饮食量较空白组减少, 大便干稀不调, 体质量随造模时间逐渐增加, 且增加幅度比空白组大. 各治疗组大鼠毛色、行为、饮食以及排泄物与空白组相比, 无明显异常, 个别大鼠可见大便稀软, 体质量增长介于模型组与空白组之间. 具体表现为: 与空白组相比, 模型组体质量及肝指数均明显升高, 均有显著性差异(均 $P < 0.001$ ). 与模型组相比, 中药组及西药组体质量及肝指数均显著下降(体质量:  $P_{\text{中}} < 0.001$ ,  $P_{\text{西}} = 0.001$ ; 肝指数:  $P_{\text{中}} < 0.001$ ,  $P_{\text{西}} = 0.003$ ), 且中药组体质量比西药组下降更明显( $P = 0.045$ ), 而中药组与西药组间肝指数无显著性差异( $P = 0.054$ , 表2)。

### 2.2 肝脏病理学变化

2.2.1 肝脏肉眼观察情况: 空白组大鼠肝脏呈红褐色, 表面光滑, 质软, 富有弹性, 边缘锐利, 肝脏切面光滑致密. 而模型组大鼠肝脏呈土黄色, 肝体积明显增大, 肝表面包膜紧张, 可见散在脂肪斑, 质地较韧, 边缘圆钝, 切面疏松. 各治疗组大鼠肝脏体积略增大, 色泽较空白组略浅, 质地、弹性较空白组略差, 各用药组之间肉眼无明显差异。

2.2.2 肝脏光镜观察情况: 空白组大鼠肝小叶结构清晰, 肝索排列整齐. 而模型组大鼠肝细胞弥漫性脂肪变性, 以中央静脉周围最为明显, 肝细胞体积增大, 胞浆内可见大小不一的脂滴, 部分肝组织汇管区、小叶内或者中央静脉管壁周围有炎细胞浸润, 未见纤维化表现. 各治疗组大鼠肝细胞脂肪变明显减轻, 胞浆内脂滴明显减少, 甚至消失, 肝索排列较为整齐, 可见少量炎细胞, 小叶内坏死灶明显减少。

油红O染色结果显示: 空白组大鼠肝组织未见红色脂滴; 模型组大鼠肝组织可见大量红色脂滴, 表现为脂滴弥漫浸润入肝细胞中, 融合

### ■ 相关报道

近年来中医药领域对NASH发病机制的不断深入, 已知NASH发病过程伴随脂质过氧化、炎症等病理过程, SREBP-1c、SCAP、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 、LXR等脂质代谢分子网络上的关键基因/蛋白表达异常是脂质代谢的关键因素。

### ■创新盘点

本研究结合目前NASH中医病机特点以及中医传统理论,采用中药治疗NASH,以探讨中药对NASH大鼠肝脂代谢分子网络的调控,明确中药的作用靶点以及与西药的异同点。

表 1 PCR引物序列

引物名称	探针	产物(bp)
XR	5'-GACTTCGAGTCACGCCTTG-3'	131
	5'-GAGCTGTTTGGCAAAGTCAA-3'	
PGC-1 $\alpha$	5'-GACTGGCAGGGGCACATCT-3'	156
	5'-TGGGATGACCGAAGTGCTT-3'	
PPAR $\alpha$	5'-GGCGAACTATTCGGCTAAAG-3'	138
	5'-AACGGATTGCATTGTGTGAC-3'	
SCAP	5'-AGAGTTGCAAGGCAGTCTCA-3'	153
	5'-CGAGCAGCTACAATCCTCCT-3'	
SREBP-1c	5'-GGGCAGCTCTGACTCCTTC-3'	157
	5'-ATGGCCTTGCAATGGAAGT-3'	
GAPDH	5'-CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	128
	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'	

成片,脂滴细胞数/总细胞数约为46%-60%。健脾疏肝方治疗组及易善复治疗组大鼠肝组织内也可见红色脂滴,但数量较模型组少,且融合成片情况较少,脂滴细胞数所占比例分别为20%-30%、30%-40%(图1A-D)。

HE染色结果显示:空白组大鼠肝组织形态结构均正常;模型组大鼠肝组织出现脂肪变性,表现为肝细胞肿胀呈圆形,体积较正常明显增加,胞质内可见大量脂肪空泡及气球样变,其中汇管区和小叶内可见炎性细胞浸润,呈灶状分布,肝小叶内脂肪空泡、肝细胞气球样变、炎性细胞灶性浸润并存;其中肝细胞损害主要集中在中腺泡3区,炎性细胞以单核细胞、淋巴细胞为主;健脾疏肝方治疗组及易善复治疗组大鼠肝组织脂肪病变较模型组减轻,脂肪空泡、气球样变以及炎症浸润情况均有所改善(图1E-H)。

按NAS病理评分标准进行评分:模型组总分 $6.67 \pm 0.52$ ,与空白组相比有显著性差异( $P < 0.001$ );与模型组相比,健脾疏肝方治疗组及易善复治疗组无论脂肪变性、小叶内炎症、气球样变或者总分均明显下降,均有显著性差异(均 $P < 0.001$ );健脾疏肝方治疗组与易善复治疗组之间无统计学差异(表3)。

2.3 大鼠血清转氨酶变化 4 wk治疗结束后,与空白组相比,模型组血清ALT、AST水平均显著升高(均 $P < 0.001$ );与模型组相比,中药组及西药组血清ALT、AST水平均明显下降(均 $P < 0.001$ );而中药组与西药组之间无显著性差异(表4,图2)。

2.4 大鼠血清及肝脏TG含量变化 4 wk治疗结束后,与空白组相比,模型组血清及肝脏TG含量均增多,尤其是肝内TG含量有统计学差异( $P_{血清} =$

表 2 大鼠体重及肝指数 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	体质量(g)	肝指数
空白组	543.0 $\pm$ 24.2	0.020 $\pm$ 0.002
模型组	610.7 $\pm$ 30.1 <sup>b</sup>	0.031 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>
中药组	532.3 $\pm$ 31.6 <sup>de</sup>	0.026 $\pm$ 0.002 <sup>d</sup>
西药组	560.4 $\pm$ 34.0 <sup>d</sup>	0.028 $\pm$ 0.002 <sup>d</sup>

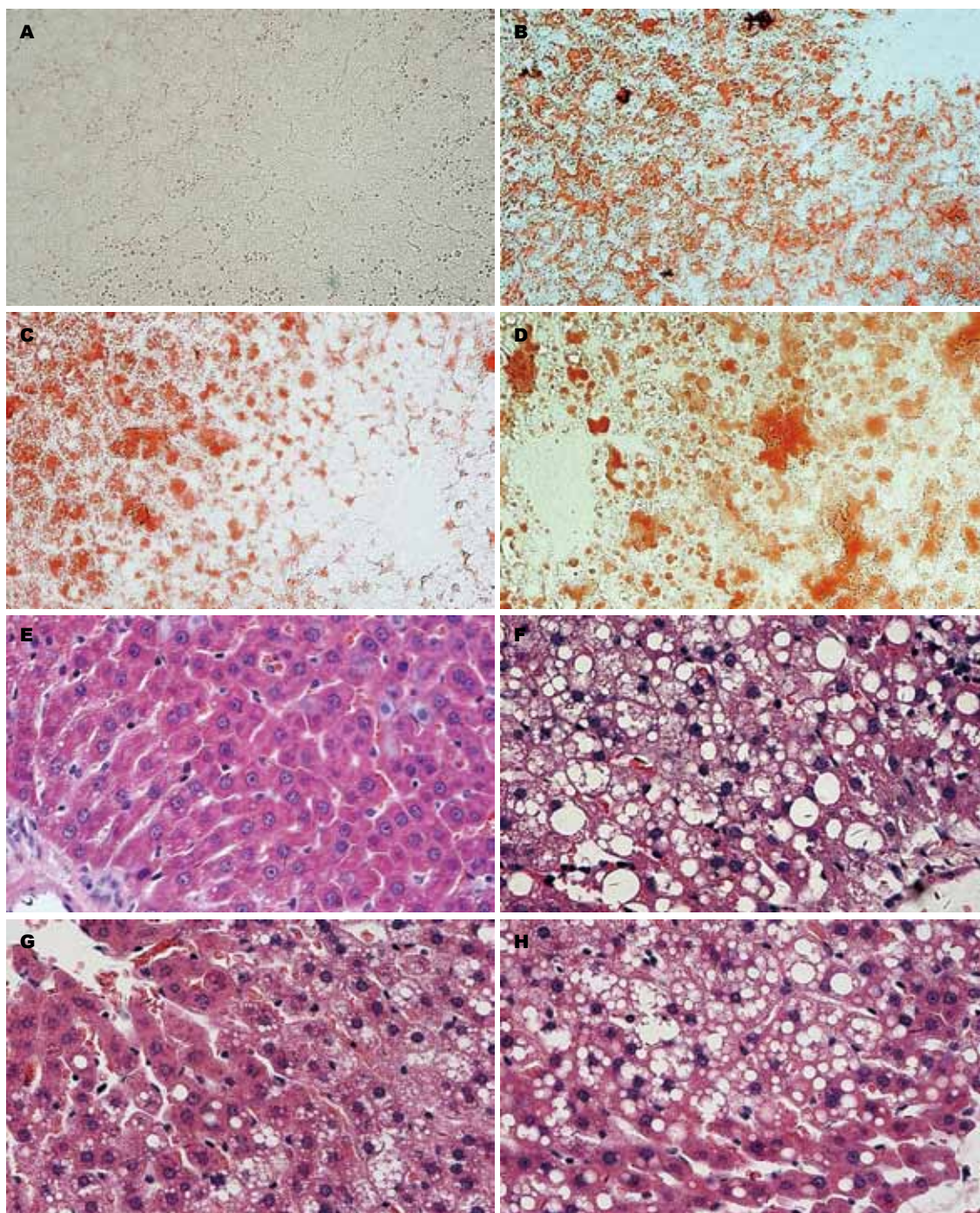
<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 空白组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 模型组; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 西药组。

0.068,  $P_{肝脏} < 0.001$ );与模型组相比,中药组及西药组肝TG含量均下降,其中中药组下降较为明显( $P_{中} = 0.032$ ,  $P_{西} = 0.093$ );中药组与西药组之间无显著性差异( $P = 0.584$ ,表4,图3)。

### 2.5 脂质代谢相关因子水平

2.5.1 大鼠抗氧化指标变化: 4 wk治疗结束后,与空白组相比,模型组SOD、GSH-PX活性下降( $P = 0.384$ ,  $P = 0.103$ ),MDA含量升高( $P < 0.001$ )。与模型组相比,中药组SOD、GSH-PX活性均明显升高( $P = 0.003$ ,  $P < 0.001$ ),MDA含量有所下降,但无显著性差异( $P = 0.874$ );西药组SOD、GSH-PX活性也升高( $P = 0.058$ ,  $P < 0.001$ ),MDA含量下降( $P = 0.05$ )。与西药组相比,中药组SOD、GSH-PX活性升高更明显,但无显著性差异( $P = 0.16$ ,  $P = 0.181$ ,表5)。

2.5.2 脂质代谢相关因子肝组织mRNA表达: 与空白组相比,模型组肝组织LXR、PPAR $\alpha$  mRNA表达下降,而SREBP-1c、SCAP mRNA表达上调,其中PPAR $\alpha$ 、SREBP-1c mRNA表达与空白组相比有显著性差异( $P = 0.025$ ,  $P = 0.029$ )。与模型组相比,中药组肝组织LXR、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$  mRNA表达上调,SREBP-1c、



**■应用要点**  
本研究采用中药治疗NASH, 以探讨中药对NASH大鼠肝脂代谢分子网络的调控, 为今后中医药防治NASH提供实验依据及理论依据.

图 1 NASH大鼠肝组织病理结果(×400). A-D: 油红O染色; E-H: HE染色. A, E: 空白组; B, F: 模型组; C, G: 健脾疏肝方组; D, H: 易善复组.

SCAP mRNA表达均下调, 其中PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 、SREBP-1c mRNA表达与模型组相比有显著性差异( $P = 0.011, P = 0.003, P = 0.0001$ ); 西药组LXR、SREBP-1c、SCAP mRNA表达下调, PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$  mRNA表达略上调, 但仅SREBP-1c、SCAP mRNA表达与模型组相比有显著性差异( $P = 0.0001, P = 0.013$ ). 中药组与西药组相比肝组织LXR、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$  mRNA表达上调( $P = 0.098, P = 0.012, P = 0.011$ ),

SREBP-1c、SCAP mRNA表达两组间无显著性差异( $P = 0.952, P = 0.163$ , 表6, 图4).

### 3 讨论

目前, 国内外有关NASH的动物模型主要包括3类<sup>[12,13]</sup>: (1)基因敲除或基因突变模型; (2)营养、药物或毒物诱导模型; (3)复合模型(联合基因模型和营养模型). 其中, 高脂饮食诱导的NASH鼠类模型最为常见, 该模型在病因学、发病机制

### ■同行评价

本研究立意新颖,条理清晰,文字表述简明通顺,有一定的学术价值。

表 3 大鼠病理评分 (mean ± SD, 分, n = 5)

分组	脂肪变	小叶内炎症	气球样变	总分
空白组	0	0	0	0
模型组	2.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	2.67 ± 0.52 <sup>b</sup>	2.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	6.67 ± 0.52 <sup>b</sup>
中药组	1.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	1.17 ± 0.41 <sup>d</sup>	1.17 ± 0.41 <sup>d</sup>	3.33 ± 0.52 <sup>d</sup>
西药组	1.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	1.50 ± 0.55 <sup>d</sup>	1.17 ± 0.41 <sup>d</sup>	3.67 ± 0.52 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 空白组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 模型组。

表 4 大鼠血清转氨酶水平和血清及肝脏TG含量 (mean ± SD, U/L, n = 10)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	血清TG(mmol/L)	肝TG(mmol/L)
空白组	21.68 ± 3.06	95.90 ± 6.45	0.86 ± 0.20	1.11 ± 0.09
模型组	75.77 ± 30.72 <sup>b</sup>	154.38 ± 16.76 <sup>b</sup>	1.07 ± 0.17	1.54 ± 0.26 <sup>b</sup>
中药组	21.92 ± 2.58 <sup>d</sup>	92.05 ± 14.98 <sup>d</sup>	1.19 ± 0.21	1.32 ± 0.10 <sup>d</sup>
西药组	33.23 ± 11.55 <sup>d</sup>	91.20 ± 14.39 <sup>d</sup>	1.01 ± 0.17	1.38 ± 0.02

<sup>b</sup>P<0.01 vs 空白组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 模型组。

表 5 大鼠肝SOD、MDA、GSH-PX含量 (mean ± SD, n = 10)

分组	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/L)	GSH-PX(μmol/L)
空白组	75.47 ± 6.26	3.53 ± 0.27	597.42 ± 61.50
模型组	63.87 ± 5.48	5.89 ± 0.55 <sup>b</sup>	397.76 ± 41.53
中药组	109.38 ± 39.48 <sup>d</sup>	5.80 ± 1.26	1 211.14 ± 291.95 <sup>d</sup>
西药组	90.28 ± 7.02	4.82 ± 0.75	1 049.74 ± 206.63 <sup>d</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 空白组; <sup>d</sup>P<0.01 vs 模型组。

及组织病理学上与人类NASH极为相似,且多合并肥胖、胰岛素抵抗及其他代谢综合征等全身疾病背景。据文献报道<sup>[8,9]</sup>,该模型造模周期为8-12 wk,本研究经过动态监测在较短的时间(8 wk)内成功复制了NASH大鼠模型。其表现为:模型组大鼠体质量及肝指数明显增加,肝细胞弥漫性脂肪病变,病变以腺泡3区为重,肝小叶内炎性细胞浸润,血清ALT、AST、TG水平及肝TG含量升高,肝脏NAS病理评分模型组大于5分,表明该模型复制成功。

我们认为本病病因病机较为复杂,病理演变过程中各种因素相互影响,互为因果。如饮食不节、情志失调、病后失调等所致脾胃运化失司,湿聚成痰,阻滞脉络。认为本病病机关键为“脾虚肝郁,痰浊瘀阻”,结合“见肝之病,当先实脾”的理论出发,从肝脾论治创立健脾疏肝方。其中绞股蓝甘、苦、寒,归脾肺肾经,健

脾益气、活血降脂,郁金辛、苦、寒,归肝心肺经,疏肝解郁、活血祛瘀,二者共奏健脾疏肝,故为君药;白术甘、苦、温,归脾胃经,健脾益气、化湿降浊,水飞蓟性寒、味苦,归肝胆经,疏肝利胆、化浊降脂,泽泻甘淡渗泄、利湿化浊,三者助君药健脾疏肝,并可利湿化浊,共为臣药;茯苓甘、淡、平,归心脾肾经,健脾益气、淡渗利湿,决明子甘、苦、咸、微寒,归肝大肠经,平降肝阳、通便化浊,丹参活血化瘀、清心安神,白芥子化痰降浊、散结通络,山楂健胃消食、化痰降浊,共为佐使药。全方共奏健脾疏肝、活血化浊。

随着近年来对NASH发病机制的不断深入探讨,已知NASH发病过程伴随脂质过氧化、炎症等病理过程,其根源在于肝细胞脂质代谢紊乱,其中SREBP-1c、SCAP、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 、LXR等脂质代谢分子网络上的关键基因/蛋

表 6 大鼠脂代谢相关因子肝组织 mRNA表达 (mean ± SD, n = 10)

分组	LXR	PPAR $\alpha$	PGC-1 $\alpha$	SREBP-1c	SCAP
空白组	0.864 ± 0.118	0.907 ± 0.092	0.758 ± 0.223	0.869 ± 0.465	0.935 ± 0.254
模型组	0.802 ± 0.071	0.296 ± 0.198 <sup>a</sup>	0.819 ± 0.092	1.598 ± 0.629 <sup>b</sup>	0.944 ± 0.045
中药组	1.262 ± 0.703	1.005 ± 0.405 <sup>ab</sup>	1.645 ± 0.608 <sup>de</sup>	0.441 ± 0.270 <sup>d</sup>	0.712 ± 0.474
西药组	0.791 ± 0.796	0.312 ± 0.302	0.959 ± 0.194	0.422 ± 0.499 <sup>d</sup>	0.442 ± 0.335 <sup>e</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 空白组; <sup>b</sup>P<0.05, <sup>c</sup>P<0.01 vs 模型组; <sup>d</sup>P<0.05 vs 西药组.

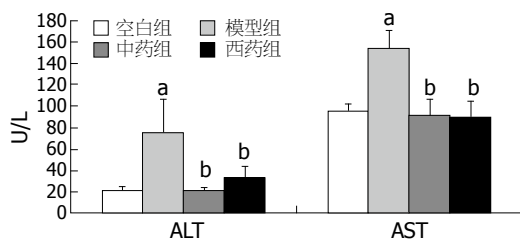


图 2 大鼠肝功能水平. <sup>a</sup>P<0.05 vs 空白组; <sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组.

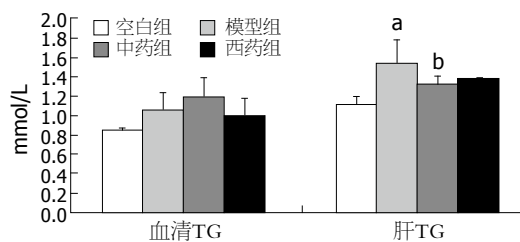


图 3 大鼠血清TG及肝TG含量. <sup>a</sup>P<0.05 vs 空白组; <sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组.

白表达异常是脂质代谢的关键因素. SREBP-1c和SCAP, PPAR $\alpha$ 和PGC-1以及LXR $\alpha$ 是肝内脂质代谢的重要因子, 在脂质代谢过程中形成网络, 共同调控肝内脂质代谢.

其中, SREBPs是一种核转录因子, 其亚型SREBP-1c主要在啮齿类动物和人类的肝脏和脂肪细胞中表达, 选择性地调控脂肪酸、甘油三酯以及糖代谢中基因的表达水平. 其靶基因包括LDL受体、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、脂肪酸合酶(FAS)等<sup>[14]</sup>. 正常情况下, 大鼠肝脏SREBP-1c蛋白表达较低, 但在高脂饮食的诱导下, 其表达明显增高, 表明高脂饲料的摄入可明显促进FFA及TG合成, 诱导脂肪肝的形成<sup>[15]</sup>, 而FFA及其衍生物可作为PPAR的配体而激活PPAR<sup>[16]</sup>. 而SCAP是哺乳动物脂质合成和摄入的中心调节因子, 在脂质代谢的平衡调节中起着非常重要的作用<sup>[17]</sup>. SCAP定位于内质网膜, 与膜结合转录因子胆固醇调节元件结合蛋白(SREBPs)等调节因子共同控制一系列酶编码基因的转录过

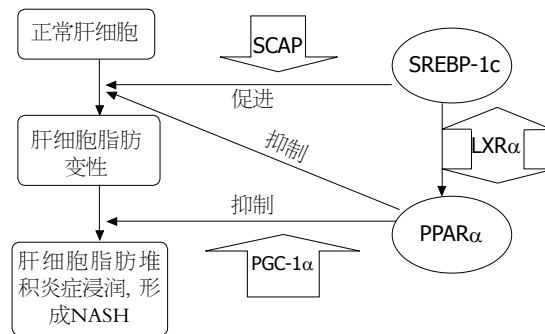


图 4 LXR $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ 、SREBP-1c、SCAP与NASH的关系.

程. SCAP具有感觉胆固醇的水平和条件性地把SREBPs从内质网运送到高尔基体的功能, 从而通过调控固醇调节元件结合蛋白(SREBPs)的水解反应而控制细胞内的脂质合成.

PPAR是一类由配体激活的核转录因子, 其中PPAR $\alpha$ 在肝细胞中大量表达. PPAR $\alpha$ 可通过对肝内脂肪酸氧化相关基因表达的调控, 在肝脏脂肪细胞分化、脂质贮存、转运和脂肪酸氧化中发挥重要作用. 肝脏脂肪酸水平的增高可激活PPAR $\alpha$ , 然后转录激活参与脂肪酸氧化的基因, 主要包括线粒体和过氧化物酶体的 $\beta$ 氧化系统及微粒体 $\omega$ 氧化系统, 增加对脂肪酸氧化能力<sup>[18]</sup>, 从而加速脂肪酸的分解. 而PGC-1 $\alpha$ 即PPARGC-1(PPAR gamma coactivator-1), 属于PGC-1(PPAR $\gamma$ 的辅激活因子)家族, 是PPAR的辅激活因子, 通过PPAR $\alpha$ 调控编码与脂质代谢、脂质运输有关功能蛋白的基因表达, 影响体内脂代谢平衡. PGC-1 $\alpha$ 参与多种代谢过程, 包括葡萄糖的摄取、肝脏糖异生、肝脏脂肪酸 $\beta$ 氧化、脂肪细胞分化等. Michael等<sup>[19]</sup>发现, PGC-1 $\alpha$ 敲除鼠导致了脂肪酸氧化基因表达的下调, 从PGC-1缺陷鼠分离出的肝细胞中的脂肪酸的氧化速率减少, 同时线粒体呼吸率也减少, 因此, PGC-1 $\alpha$ 缺陷, 线粒体呼吸率下降, 最终导致脂肪酸氧化能力下降.

而肝X受体 $\alpha$ (liver X receptor  $\alpha$ , LXR $\alpha$ )为胆固醇代谢关键感受器,在调节胆固醇分解代谢中具有至关重要的作用.肝细胞内过多的胆固醇通过代谢生成氧化甾醇激活LXRs,而活化的LXRs可上调胆汁酸经典合成途径限速酶—胆固醇7 $\alpha$ 羟化酶(cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP7A1)的表达,加速胆固醇向胆汁酸转化<sup>[20]</sup>.LXR $\alpha$ 还可以通过对其下游基因,如乙酰CoA羟化酶、脂肪酸合成酶等脂肪酸生成的关键酶基因的调控,参与脂肪酸的代谢调节.此外,Higuchi等<sup>[21]</sup>认为,LXR通过调控SREBP-1c的表达,在NAFLD的发生发展过程中起着脂质代谢调控器的作用.在高胆固醇条件下,LXRs上调SREBP-1c的表达<sup>[22]</sup>.随着LXR $\alpha$ 、SREBP-1c的过度表达,脂肪酸合成异常增多,导致NAFLD发生<sup>[23]</sup>.而PPAR $\alpha$ 可通过LXR $\alpha$ 对ABCA1间接调控,促进胆固醇的逆向转运,同时二者通过交互作用对细胞脂肪酸和胆固醇代谢进行复杂而精密的调节<sup>[24]</sup>.

本研究显示:模型组肝组织SREBP-1c、SCAP mRNA水平较空白组显著升高,而PPAR $\alpha$ 和PGC-1 $\alpha$  mRNA表达明显下降.表明由SREBP-1c和SCAP介导的脂质代谢异常可能是NASH产生脂肪变性的主要机制,而PPAR $\alpha$ 和PGC-1 $\alpha$  mRNA表达减少,导致脂肪酸在肝脏的氧化能力下降,增加了脂质在肝脏的沉积,可能成为新的刺激因素而增加ROS,引起脂质过氧化,从而导致NASH和肝纤维化.

健脾疏肝方组和易善复组肝组织SREBP-1c、SCAP mRNA水平与模型组比较显著降低,表明健脾疏肝方和易善复可能通过下调SREBP-1c、SCAP mRNA水平从而改善脂肪代谢紊乱,调节TG的合成量和TG在肝细胞内的贮存量,减少NASH大鼠肝脏脂质积聚、脂肪变性,从而防治NASH.此外,健脾疏肝方组大鼠肝脏PPAR $\alpha$ 和PGC-1 $\alpha$  mRNA表达增强,提示健脾疏肝方可能加速脂肪酸进入线粒体和微粒体进行氧化,从而减少TG的合成,调解肝脏脂肪代谢,达到改善和减轻肝细胞脂肪变性和肝组织损伤的作用.与此同时,健脾疏肝方组大鼠血脂、血清转氨酶和肝脂含量明显降低,肝脏病理情况改善明显,肝脏SOD活性、GSH-PX含量升高,MDA含量下降,肝脏SREBP-1c和SCAP mRNA表达减少,表明健脾疏肝方不仅调节NASH发生发展的单个靶点,而且对多个角度的相关因子进行调控,影响脂质代谢和氧化应激、脂质过氧化等

全过程,表明其作用机制是通过多层次多靶点而发挥作用的,从侧面反证了中医治疗疾病强调整体观念.

本研究显示,易善复可下调SREBP-1c和SCAP mRNA在肝脏的表达,促进脂质代谢,减少肝内脂质蓄积;而健脾疏肝方不仅可通过抑制SREBP-1c和SCAP的表达,促进脂质代谢,减少肝脏脂质蓄积,且可通过上调PPAR $\alpha$ 和PGC-1 $\alpha$ 以及LXR的活性,达到抑制脂质过氧化以及抗炎等,从而防治NASH.

易善复乃大豆中提取的一种磷脂,其主要活性成分为多聚磷脂酰胆碱二酰甘油或多聚乙酰卵磷脂,是构成所有细胞膜和亚细胞膜的重要组成部分,具有增加细胞膜完整性、稳定性、和流动性的功用,可修复受损的细胞膜,减少氧应激和脂质过氧化<sup>[25-27]</sup>.易善复组成成分简单,作用靶点相对单一,本研究结果也表明,易善复仅对部分脂质代谢因子起调控作用;而中药复方为多种药物的配伍组合物,其组成多样,经过熬制等加工后成分更是复杂,而这些复杂的成分又具有各自多样的功效,可作用于脂质代谢多个不同的靶点,从而达到网络调控的功用.本研究结果也表明,健脾疏肝方对脂质代谢多个因子均具有较好的调控作用,从侧面反映了健脾疏肝方可通过对脂质代谢的网络调控而达到防治NASH的目的,相较于易善复单一的作用靶点,中药复方可通过多个不同的作用靶点达到网络调控的功效,与中医整体观念的治病思想相符合.

总之,健脾疏肝方可网络调控NASH肝脂代谢,从而反证脾虚肝郁、痰浊瘀阻证是NASH的关键病机,也表明健脾疏肝方在改善NASH肝脂代谢方面较易善复有一定优势.今后的研究中,可将健脾疏肝方作为基础,结合其他治法,辨证施治,进一步提高中医药防治NASH的疗效.

#### 4 参考文献

- 1 Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol* 2005; 42: 132-138
- 2 Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999; 30: 1356-1362
- 3 Kashi MR, Torres DM, Harrison SA. Current and emerging therapies in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 396-406
- 4 Hui JM, Kench JG, Chitturi S, Sud A, Farrell GC, Byth K, Hall P, Khan M, George J. Long-term out-

- comes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 420-427
- 5 Hashimoto E, Yatsuji S, Kaneda H, Yoshioka Y, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K. The characteristics and natural history of Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2005; 33: 72-76
- 6 Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT, Shiffman ML, Heuman D, Coterrell A, Fisher RA, Contos MJ, Mills AS. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43: 682-689
- 7 Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall Pde L. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1272-1282
- 8 范建高, 方继伟, 陆元善, 钱燕, 蔡晓波. U230A芯片动态观察非酒精性脂肪性肝病大鼠肝脏基因表达. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 597-601
- 9 顾小红, 张云东, 冯爱娟. 解偶联蛋白-2在大鼠非酒精性脂肪肝中的表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2310-2313
- 10 施新欲. 现代医学实验动物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2000: 334
- 11 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321
- 12 London RM, George J. Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 55-74, viii
- 13 申川, 高健, 赵彩彦. 非酒精性脂肪性肝病动物模型研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3414-3419
- 14 Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 2004; 43: 134-176
- 15 艾正琳, 陈东风. SREBP-1c在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义. *第三军医大学学报* 2006; 28: 1063-1065
- 16 Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152
- 17 Yu-Poth S, Yin D, Kris-Etherton PM, Zhao G, Etherington TD. Long-chain polyunsaturated fatty acids upregulate LDL receptor protein expression in fibroblasts and HepG2 cells. *J Nutr* 2005; 135: 2541-2545
- 18 孙龙, 迟宝荣, 张填, 王春妍. 过氧化物酶体增殖物激活受体- $\alpha$ 与肝脏疾病的关系. *新医学* 2007; 38: 127-129
- 19 Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 3820-3825
- 20 Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 3137-3140
- 21 Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 2831-2838
- 22 Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H, Tanaka M, Yamashita N, Kohjima M, Kotoh K, Nakamura M, Takayanagi R, Enjoji M. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2008; 38: 1122-1129
- 23 艾正琳, 陈东风, 史洪涛. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝X受体 $\alpha$ 和固醇调节元件结合蛋白-1c的表达及意义. *重庆医学* 2007; 36: 689-691
- 24 李海丽, 姜玲玲. PPAR $\alpha$ 、LXR $\alpha$ 在脂肪酸和胆固醇代谢中的作用. *河北医科大学学报* 2008; 29: 301-304
- 25 Lieber CS. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med Białymst* 2005; 50: 7-20
- 26 Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19
- 27 Bai J, Cederbaum AI. Overexpression of CYP2E1 in mitochondria sensitizes HepG2 cells to the toxicity caused by depletion of glutathione. *J Biol Chem* 2006; 281: 5128-5136

编辑 张姗姗 电编 何基才

# 蟾毒灵介导JNK信号通路诱导人胰腺癌细胞的凋亡

胡强, 殷佩浩, 陆品相, 沈玉根, 余琛, 李水军, 贾晶莹, 刘罡一, 缪怡, 范耀祖

## ■背景资料

胰腺癌是一种临床表现隐匿、发病迅速且预后不良的消化系统恶性肿瘤, 手术治疗5年生存率低于20%。近年来, 中药或其提取物在抑制肿瘤生长、促进肿瘤细胞凋亡中的作用正日益受到国内外研究者的重视。

胡强, 陆品相, 沈玉根, 上海市徐汇区中心医院普外科 上海市 200031

殷佩浩, 上海市普陀区中心医院肿瘤实验室 上海市 200062  
余琛, 李水军, 贾晶莹, 刘罡一, 缪怡, 上海市徐汇区中心医院中心实验室 上海市 200031

范耀祖, 上海市同济医院普外科 上海市 200442

胡强, 在读博士, 主要从事胰腺癌的基础研究。

江苏大学课题基金资助项目, No. JLY20080093

作者贡献分布: 胡强与殷佩浩对此文所作贡献均等; 此课题由胡强与殷佩浩设计; 研究过程由胡强与殷佩浩操作完成; 数据分析由胡强完成; 本论文写作由胡强与殷佩浩共同完成。

通讯作者: 殷佩浩, 教授, 200062, 上海市普陀区, 上海市普陀区中心医院。lzwf@hotmail.com

电话: 021-54039762

收稿日期: 2011-06-18 修回日期: 2011-10-30

接受日期: 2011-12-23 在线出版日期: 2012-01-18

## Bufalin induces apoptosis of pancreatic cancer cells via the JNK signaling pathway

Qiang Hu, Pei-Hao Yin, Pin-Xiang Lu, Yu-Gen Shen, Chen Yu, Shui-Jun Li, Jing-Ying Jia, Gang-Yi Liu, Yi Miao, Yao-Zu Fan

Qiang Hu, Pin-Xiang Lu, Yu-Gen Shen, Department of Surgery, Shanghai Xuhui Central Hospital, Shanghai 200031, China

Pei-Hao Yin, Department of Oncology, Shanghai Putuo Central Hospital, Shanghai 200062, China

Chen Yu, Shui-Jun Li, Jing-Ying Jia, Gang-Yi Liu, Yi Miao, Central Laboratory, Shanghai Xuhui Central Hospital, Shanghai 200031, China

Yao-Zu Fan, Department of Surgery, Shanghai Tongji Hospital, Shanghai 200442, China

Supported by: the Science Foundation of Jiangsu University, No. JLY20080093

Correspondence to: Pei-Hao Yin, Professor, Department of Oncology, Shanghai Putuo Central Hospital, Putuo 200062, Shanghai, China. lzwf@hotmail.com

Received: 2011-06-18 Revised: 2011-10-30

Accepted: 2011-12-23 Published online: 2012-01-18

## Abstract

**AIM:** To investigate whether bufalin induces apoptosis of human pancreatic cancer cells via the JNK signaling pathway.

**METHODS:** The cytostatic effect of bufalin on human pancreatic cancer cell line BxPC-3 was evaluated by MTT assay. The impact of bufalin on apoptosis and p-JNK expression was determined by flow cytometry (FCM) and Western

blot, respectively. The mRNA expression level of survivin was detected by fluorescent quantitative PCR in BxPC-3 cells treated with bufalin in the absence or presence of a JNK inhibitor.

**RESULTS:** Bufalin inhibited cell growth in a concentration- and time-dependent manner. BxPC-3 cells treated with 0.16, 0.32, or 0.64 mg/L of bufalin for 48 h had cell apoptotic rates of 19.36% ± 0.39%, 40.69% ± 0.44% and 59.63% ± 1.14%, respectively, showing a significant difference among the three groups ( $P < 0.01$ ). After the JNK signaling pathway was blocked, cell apoptotic rate decreased significantly ( $P < 0.01$ ). After bufalin treatment, p-JNK expression was up-regulated at 1 h and reached the peak at 2 h. The mRNA expression of survivin decreased obviously after treatment with 0.32 mg/L of bufalin for 48 h, but increased significantly when the NK signaling pathway was blocked.

**CONCLUSION:** Bufalin can induce apoptosis of human pancreatic cancer cells. The anti-pancreatic cancer activity of bufalin might involve down-regulation of survivin mRNA via the SAPK/JNK signal transduction pathway.

**Key Words:** Bufalin; Pancreatic cancer; Apoptosis; Signal transduction

Hu Q, Yin PH, Lu PX, Shen YG, Yu C, Li SJ, Jia JY, Liu GY, Miao Y, Fan YZ. Bufalin induces apoptosis of pancreatic cancer cells via the JNK signaling pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 100-105

## 摘要

**目的:** 研究蟾毒灵诱导人胰腺癌细胞凋亡以及凋亡相关基因表达的JNK信号转导通路, 揭示其抗胰腺癌的部分机制。

**方法:** MTT法观察蟾毒灵对人胰腺癌BxPC-3细胞的生长抑制作用; 0.16、0.32、0.64 mg/L蟾毒灵分别作用人胰腺癌BxPC-3细胞48 h后, 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)检测细胞周期和细胞凋亡; Western印迹法检测蟾毒灵作用BxPC-3细胞后SAPK/JNK信号通路的激活

## ■同行评议者

齐清会, 教授, 大连医科大学附属第一医院; 周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

情况, 荧光定量PCR检测Survivin基因mRNA的表达水平; 并比较阻断JNK信号通路后丹参酮ⅡA对胰腺癌细胞凋亡Survivin基因mRNA的表达。

**结果:** MTT法测得蟾毒灵对人胰腺癌BxPC-3细胞具有显著的抑制作用, 其作用效果与剂量和作用时间成正相关; 0.16、0.32、0.64 mg/L浓度蟾毒灵作用人胰腺癌细胞后的细胞凋亡率分别为 $19.36\% \pm 0.39\%$ 、 $40.69\% \pm 0.44\%$ 、 $59.63\% \pm 1.14\%$ , 与对照组 $2.24\% \pm 0.37\%$ 比较均有显著性差异( $P < 0.01$ ); 蟾毒灵作用人胰腺癌细胞1 h后JNK信号通路被激活, 2 h达峰值; 阻断JNK信号通路后, 凋亡率明显降低( $P < 0.01$ ); 0.32 mg/L蟾毒灵作用人胰腺癌细胞48 h后Survivin mRNA的表达明显下降; 阻断JNK信号通路后, 蟾毒灵作用人胰腺癌细胞的Survivin mRNA的表达明显上升。

**结论:** 蟾毒灵通过JNK信号转导通路下调人胰腺癌BxPC-3细胞Survivin mRNA的表达, 可能是其诱导胰腺癌细胞凋亡的机制。

**关键词:** 蟾毒灵; 胰腺癌; 凋亡; 信号转导

胡强, 殷佩浩, 陆品相, 沈玉根, 余琛, 李水军, 贾晶莹, 刘罡一, 缪恰, 范耀祖. 蟾毒灵介导JNK信号通路诱导人胰腺癌细胞的凋亡. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 100-105  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/100.asp>

## 0 引言

胰腺癌是一种临床表现隐匿、发病迅速且预后不良的消化系统恶性肿瘤, 手术治疗5年生存率低于20%<sup>[1-3]</sup>。近年来, 中药或其提取物在抑制肿瘤生长、促进肿瘤细胞凋亡中的作用正日益受到国内外研究者的重视<sup>[4-7]</sup>。蟾毒灵是蟾蜍中的有效抗癌成分, 近年来发现具有抗癌作用, 但对胰腺癌的作用尚未见报道。本研究重点探讨蟾毒灵对人胰腺癌细胞周期和凋亡的影响及其作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胰腺癌细胞株BxPC-3购于中科院上海细胞研究所; 蟾毒灵(bufalin)购自南昌贝塔生物公司, 纯度 $\geq 98\%$ ; JNK特异性的抑制剂sp600125购于美国SerologlIcais公司; 总RNA抽提试剂RNAiso Reagent、荧光定量PCR试剂购自日本TaKaRa公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、Survivin上下游引物和探针由上海闪晶分子生物科技有限公司设计并合成, 其中

5'端标记上报告荧光基团FAM(6-carboxy-fluorescein-phosphoramidite), 3'端标记上淬灭荧光基团TAMRA(carboxy-tetramethyl-rhodamine)的引物序列如下: 上游引物: 5'-GGTTCATCCAGTC-GCTTTGT-3', 下游引物: 5'-AATTCTGTTGC-CACCTTTCG-3'; 内参GAPDH作为对照, 上游引物: 5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3', 下游引物: 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'。氯仿、异丙醇、无水乙醇均为分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 MTT法测定蟾毒灵对人胰腺癌细胞的生长抑制作用:** 取对数生长期的人胰腺癌BxPC-3细胞, 调整细胞浓度至 $2 \times 10^4$ /mL, 以每孔100  $\mu$ L接种于96孔培养板中, 在50 mL/L CO<sub>2</sub>、饱和湿度、37  $^{\circ}$ C孵箱中预培养24 h后加入100  $\mu$ L不同浓度培养液配制的蟾毒灵, 使最终每组含蟾毒灵浓度分别为: 0.04、0.08、0.16、0.32、0.64、1.28 mg/L 6个剂量, 每个剂量分别设4个复孔, 并设正常细胞组作对照, 继续培养。分别于24、48、72 h 3个时相进行MTT比色实验: 每次于实验结束前每孔加入浓度为5 g/L MTT液20  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C避光培养继续培养4 h, 使MTT还原为formazan。每孔加DMSO 150  $\mu$ L, 震荡10 min, 混匀使formazan充分溶解, 10 min后置于酶标仪570 nm检测吸光度A值, 以空白组平均值调零, 按以下公式计算抑制率: 细胞生长抑制率 = (1-实验孔平均A值)/对照孔平均A值 $\times 100\%$ , 以剂量和生长抑制率作直线相关分析。

**1.2.2 流式细胞仪检测:** 人胰腺癌BxPC-3细胞常规培养至对数生长期, 换无血清培养液培养12 h使细胞周期同步化, 设0.16、0.32、0.64 mg/L蟾毒灵组, 20  $\mu$ mol/L的JNK抑制剂sp600125组, 20  $\mu$ mol/L的JNK抑制剂sp600125丹参酮IIA组, 培养48 h后, 分别收集各组细胞置于10 mL离心管中。各样本的细胞密度为 $1 \times 10^6$ /mL, 1 000 r/min离心5 min后弃去培养液。用孵育缓冲液洗涤1次, 1 000 r/min离心5 min, 用100  $\mu$ L标记溶液重悬细胞, 室温下避光孵育15 min, 1 000 r/min离心5 min沉淀细胞, 孵育缓冲液洗1次。加入Annexin V-FITC/PI溶液5  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C下孵育20 min。最后补400  $\mu$ L PBS, 用流式细胞仪(FACS Calibur, BD公司)检测细胞周期和凋亡情况。每个样品检测1万个细胞, 用cellquest软件分析细胞凋亡情况。

**1.2.3 Western印迹法检测JNK的磷酸化:** 将各组细胞用预冷的PBS液洗2次, 吸弃PBS液, 加入预冷的含抑制剂的蛋白质抽提试剂, 轻轻摇动5

**■ 研发前沿**  
蟾毒灵是蟾蜍中的有效抗癌成分, 近年来发现具有抗癌作用, 但对胰腺癌的作用尚未见报道。

### ■ 相关报道

目前,多数研究认为JNK通路是化疗药物、紫外线照射及Fas蛋白等诱导细胞凋亡所必需的通路,并必须持续激活JNK才能诱导细胞凋亡。

min; 后用一预冷的橡胶和塑料细胞刮刮下培养瓶壁上细胞, 转移细胞悬液到离心管中, 冰浴15 min进行裂解. 裂解液于预冷的离心机中14 000 r/min离心15 min, 吸弃上清液; BCA分析试剂测定蛋白质浓度. 50  $\mu$ g总蛋白质在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 电转移至PVDF膜, 膜在5% BSA溶液中室温培养1 h以封闭膜上的非特异结合. 封闭过的膜加入一抗4  $^{\circ}$ C过夜. TBS/T洗膜3次, 每次5 min; 再加入HRP标记的二抗, 室温孵育1 h, TBS/T洗膜3次, 每次5min; 同样方法标记鼠单克隆抗GAPDH作对照. 洗膜稍干后, 按1:1加入AB显影液(与二抗HRP结合), 在Bio-Rad的化学发光成像仪上显影. 然后分析灰度值, 计算灰度系数比.

1.2.4 荧光定量PCR: 将蟾毒灵稀释至终浓度为0.32 mg/L, 处理人胰腺癌细胞48 h后加胰酶消化离心收集细胞. 将各组细胞分别加入2 mL RNAiso, 按说明书提取总RNA. 1  $\mu$ L总RNA在20  $\mu$ L体系中按照标准程序进行反转录, 反应条件: 37  $^{\circ}$ C 15 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s. Survivin和GAPDH基因荧光定量PCR反应体系均如下: Premix EX Taq<sup>TM</sup> 10  $\mu$ L, Rox Reference Dye 0.4  $\mu$ L, 上下游引物各0.4  $\mu$ L, 荧光探针0.8  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L, cDNA 2  $\mu$ L, 共20  $\mu$ L体系. 反应条件如下: 预变性: 95  $^{\circ}$ C 10 s; 变性: 95  $^{\circ}$ C 5 s; 退火延伸: 60  $^{\circ}$ C 31 s, 40个循环. 数据采用ABI 7300 SDS Software分析. 相对mRNA表达 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta Ct$ 值 = 靶基因Ct值 - GAPDH Ct值. 以GAPDH作为内参照, 同时以PANC-1细胞作为基准, 各组细胞mRNA的表达量表示成PANC-1细胞的N倍,  $N = \text{样品表达量} / \text{基准表达量} = 2^{\text{样本} \Delta Ct} / 2^{\text{基准} \Delta Ct}$ , 每组均做3个样本, 取均数.

**统计学处理** 采用PEMS3.1医学统计软件包进行统计分析; 计量资料以mean  $\pm$  SD表示; 多样本比较采用单因素方差分析; 用Student's *t*检验、Rank sum检验和SNK检验方法进行统计分析; 组间比较用*t*或*F*检验.  $P < 0.05$ 具有统计学差异.

## 2 结果

2.1 蟾毒灵对BxPC-3细胞的生长抑制作用 倒置显微镜观察, 用药后细胞排列稀疏, 部分变圆, 随作用时间延长、药物浓度的增加细胞数明显减少. 不同剂量的蟾毒灵对BxPC-3细胞的生长均有一定的抑制作用, 抑制率与药物浓度和作用时间成正相关. 24 h、48 h、72 h蟾毒灵剂量和生长抑制率之间的直线回归方程分别为:  $y = 16.28x + 31.446$ ,  $r = 0.9233$ ;  $y = 15.334x + 37.945$ ,

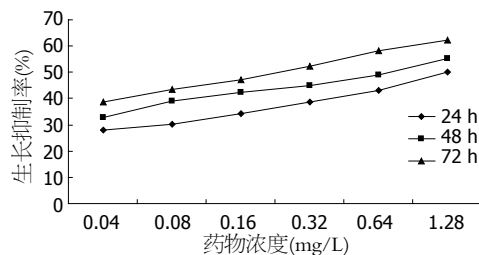


图1 蟾毒灵对BxPC-3细胞生长的抑制作用.

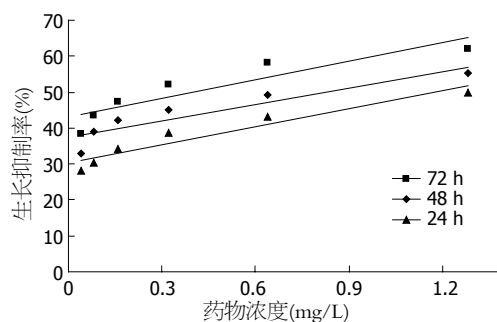


图2 蟾毒灵对BxPC-3细胞生长抑制率与剂量直线相关图.

$r = 0.9155$ ;  $y = 16.862x + 43.756$ ,  $r = 0.9054$  ( $y$ 为抑制率,  $x$ 为蟾毒灵剂量,  $r$ 为相关系数). 24 h、48 h、72 h IC<sub>50</sub> (半数抑制浓度) 分别为1.14 mg/L、0.79 mg/L、0.37 mg/L (图1, 2).

2.2 蟾毒灵对BxPC-3细胞周期的影响 蟾毒灵作用48 h后, 细胞周期均受到不同程度的影响, 与对照组相比, 3个剂量组 G<sub>2</sub>/M期细胞比例均显著增加 ( $P < 0.05$ ); 且随着药物剂量的增加, G<sub>2</sub>/M期的比例也显著增加. 以上结果提示蟾毒灵可通过G<sub>2</sub>/M期阻滞抑制胰腺癌细胞的生长 (表1).

2.3 蟾毒灵对BxPC-3细胞凋亡的影响 0.16、0.32、0.64 mg/L浓度蟾毒灵作用人胰腺癌细胞后的细胞凋亡率明显高于对照组的凋亡率 (19.36%  $\pm$  0.39%, 40.69%  $\pm$  0.44%, 59.63%  $\pm$  1.14% vs 2.24%  $\pm$  0.37%), 并出现凋亡典型性特征峰. 加入抑制剂sp600125组的细胞凋亡率 (1.78%  $\pm$  0.21% vs 2.24%  $\pm$  0.37%), 蟾毒灵组作用人胰腺癌细胞后凋亡率显著提高 ( $P < 0.01$ ); 阻断SAPK/JNK信号转导通路后蟾毒灵作用人胰腺癌细胞后凋亡率明显降低 ( $P < 0.01$ ). 提示蟾毒灵通过胰腺癌细胞内SAPK/JNK信号转导途径诱导细胞凋亡 (表2).

2.4 蟾毒灵对BxPC-3细胞JNK的激活作用 Western印迹法检测JNK及磷酸化JNK蛋白. 结果发现对照组BxPC-3细胞p-JNK弱表达, 0.32 mg/L蟾毒灵作用BxPC-3细胞1 h时JNK被迅速激活, 2 h达峰值, 约为对照组的3.15倍 (图3).

**应用要点**  
本实验显示蟾毒灵具有较好的诱导胰腺癌细胞凋亡的作用, 在治疗胰腺癌方面具有较好的应用前景。

表 1 蟾毒灵对BxPC-3细胞周期的影响 (mean ± SD, %)

分组	细胞周期		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
对照组	59.44 ± 0.43	18.04 ± 0.88	22.52 ± 0.35
蟾毒灵低剂量组	55.84 ± 2.44 <sup>a</sup>	19.07 ± 2.64	25.09 ± 5.05 <sup>a</sup>
蟾毒灵中剂量组	45.00 ± 1.49 <sup>ac</sup>	18.39 ± 1.92	36.61 ± 2.36 <sup>ac</sup>
蟾毒灵高剂量组	44.12 ± 2.87 <sup>ae</sup>	16.87 ± 1.45	39.01 ± 2.84 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 蟾毒灵低剂量组; <sup>e</sup>P<0.05 vs 蟾毒灵中剂量组。

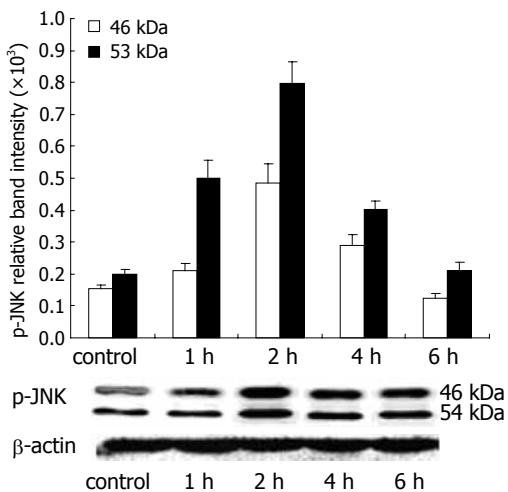


图 3 蟾毒灵对BxPC-3细胞JNK的激活作用。

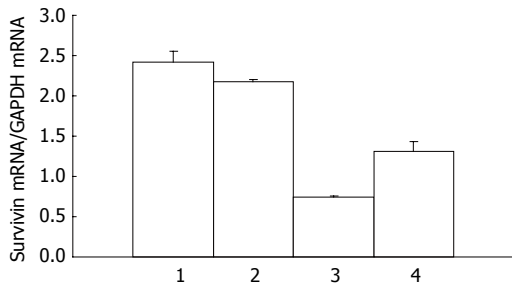


图 4 SAPK/JNK信号通路对蟾毒灵诱导胰腺癌细胞凋亡 Survivin mRNA的影响。1: 正常细胞组; 2: Sp600125组; 3: 蟾毒灵0.08 mg/L组; 4: 蟾毒灵+Sp600125组。

2.5 SAPK/JNK信号通路对蟾毒灵诱导胰腺癌细胞凋亡Survivin mRNA的影响 荧光定量PCR结果显示, 0.32 mg/L蟾毒灵作用人胰腺癌细胞48 h后Survivin mRNA的表达明显下调( $P<0.01$ ), 为正常细胞的0.27倍; 阻断SAPK/JNK信号通路后Survivin mRNA的表达明显上调( $P<0.01$ , 图4)。

### 3 讨论

胰腺癌属于中医中“癥瘕”、“积聚”等范畴, 其发生发展与后天失养、饮食失调、七情郁结

表 2 各治疗组对BxPC-3细胞凋亡率的影响 (mean ± SD, %)

分组	凋亡率
对照组	2.24 ± 0.37
Sp600125组	1.78 ± 0.21
蟾毒灵低剂量组	19.36 ± 0.39
蟾毒灵中剂量组	40.69 ± 0.44
蟾毒灵高剂量组	59.63 ± 1.14
蟾毒灵中剂量+Sp600125组	16.98 ± 0.48

导致机体免疫监控功能失调、基因突变密切相关。病理因素以邪实为主: 有邪毒内攻、气滞血瘀、寒湿阻滞、湿热蕴结。应用中医“以毒攻毒”理论, 传统中药蟾酥治疗肿瘤有悠久的历史。蟾毒灵是中药蟾酥中的有效成分之一, 属于蟾毒甙类化合物, 分子式为C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>, 相对分子质量386 kDa, 其疏水性较强, 具有广泛的药理作用<sup>[8]</sup>。现代研究发现其具有较强的抗肿瘤作用, 在控制肿瘤发展、延长生存期、缓解症状、改善生活质量方面有较好的疗效, 作用机制涉及促进凋亡、诱导分化、抑制肿瘤血管新生等<sup>[9-11]</sup>。

细胞凋亡(Apoptosis)是在基因调控下的细胞程序化死亡, 临床上除了大剂量化疗、放疗可能引起细胞坏死外<sup>[12-15]</sup>, 一般抗癌药物、激素制剂、放疗、中药等的主要作用机制都是通过诱导各自敏感的细胞发生凋亡来达到治疗目的。凋亡不仅直接影响着机体组织的正常发育、分化与死亡, 他在肿瘤治疗中的作用也已受到极大的重视<sup>[16-18]</sup>。

JNK(c-Jun N-terminal kinase, c-Jun氨基末端激酶)也被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK), 作为丝裂原活化蛋白酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中的重要成员, 是细胞内重要的信号转导通路之一<sup>[19-22]</sup>。JNK位于细胞质, 是分子质量为54 kDa的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。他包含双磷酸化的

### ■同行评价

本文研究了中药蟾毒灵对人胰腺癌细胞周期和凋亡的影响及其作用机制, 选题较好, 内容丰富, 统计正确, 结论可靠, 有较好的价值。

功能区Thr-Pro-Tyr, JNK与其下游c-JunN端的活化区结合并使其第63, 73位丝氨酸残基磷酸化。JNK的活化是通过其氨基酸残基端的磷酸化, 在静止细胞中, JNK通过磷酸化反应而激活, 一旦被激活, 胞浆中的JNK移位到细胞核, 通过对转录因子c-Jun、ATF-2、Elk-1等的磷酸化促进基因的表达及新蛋白质的合成而促进或引起细胞凋亡<sup>[23-27]</sup>。目前, 多数研究认为JNK通路是化疗药物、紫外线照射及Fas蛋白等诱导细胞凋亡所必需的通路, 并必须持续激活JNK才能诱导细胞凋亡<sup>[27-29]</sup>。

我们在实验中发现蟾毒灵对人胰腺癌BxPC-3细胞的生长抑制率均有显著的抑制作用, 其作用与剂量和作用时间成正相关; 0.16、0.32、0.64 mg/L浓度蟾毒灵作用人胰腺癌细胞后的细胞凋亡率分别为(19.36%±0.39%), (40.69%±0.44%)和(59.63%±1.14%), 与对照组比较均有显著性差异( $P<0.01$ ); 阻断JNK信号通路后, 凋亡率明显降低( $P<0.01$ )。蟾毒灵作用人胰腺癌细胞1 h后JNK信号通路被激活, 2 h达峰值, 0.32 mg/L蟾毒灵作用人胰腺癌细胞48 h后Survivin mRNA的表达明显下降; 阻断JNK信号通路后, 蟾毒灵作用人胰腺癌细胞的Survivin mRNA的表达明显上升。提示蟾毒灵治疗胰腺癌的机制与诱导胰腺癌细胞凋亡有关, 通过JNK信号转导下调Survivin mRNA是蟾毒灵诱导胰腺癌细胞凋亡的重要机制之一。本实验显示蟾毒灵具有较好的诱导胰腺癌细胞凋亡的作用, 在治疗胰腺癌方面具有较好的应用前景。

### 4 参考文献

- DuBois RN. New paradigms for cancer prevention. *Carcinogenesis* 2001; 22: 691-692
- Gumbs AA, Rodriguez Rivera AM, Milone L, Hoffman JP. Laparoscopic pancreatoduodenectomy: a review of 285 published cases. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 1335-1341
- Pan FC, Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn* 2011; 240: 530-565
- 王炎, 李琦, 范忠泽, 王忆勤, 邱艳艳, 靳宝辉, 陈星竹, 殷佩浩. 丹参酮 II A 对人胰腺癌细胞凋亡的诱导作用及其对SAPK/JNK信号转导通路的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 1028-1033
- 高振北, 康潇, 许传莲. 甘草次酸抗肿瘤作用机制的研究进展. *中国中药杂志* 2011; 36: 3213-3216
- 王熙月, 韩凤娟, 汤欣, 吴效科, 侯丽辉. 中药复方药物血清对CDKN2A和RPS3a基因在人卵巢癌细胞株SKOV3中表达的影响. *世界中西医结合杂志* 2011; 6: 747-750
- 万光升, 孙珏, 王炎, 邓志红, 李琦. 肠胃清对多药耐药人结肠癌裸鼠异位移植瘤的抑制作用及其细胞凋亡的影响. *时珍国医国药* 2011; 22: 2369-2370
- Lee DY, Yasuda M, Yamamoto T, Yoshida T, Kuroiwa Y. Bufalin inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis in vitro. *Life Sci* 1997; 60: 127-134
- Jiang Y, Zhang Y, Luan J, Duan H, Zhang F, Yagasaki K, Zhang G. Effects of bufalin on the proliferation of human lung cancer cells and its molecular mechanisms of action. *Cytotechnology* 2010; 62: 573-583
- 殷佩浩, 李琦, 秦爱军, 王炎, 刘宁宁, 隋华, 李先茜, 吴琼. 蟾毒灵诱导人胰腺癌细胞凋亡及其作用机制研究. *上海中医药杂志* 2008; 42: 78-81
- Qi F, Inagaki Y, Gao B, Cui X, Xu H, Kokudo N, Li A, Tang W. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways. *Cancer Sci* 2011; 102: 951-958
- Ribatti D, Vacca A. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. *Genes Nutr* 2008; 3: 29-34
- Zhao P, Zhong W, Ying X, Yuan Z, Fu J, Zhou Z. Manganese chloride-induced G0/G1 and S phase arrest in A549 cells. *Toxicology* 2008; 250: 39-46
- Johansson M, Persson JL. Cancer therapy: targeting cell cycle regulators. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8: 723-731
- 张红英, 李锦毅, 张建永. Fas、FasL及Caspase-3在维甲酸诱导胃癌细胞凋亡中的作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3255-3260
- 王炎, 李琦, 范忠泽, 孙珏, 王忆勤, 刘瑞海, 高虹. 丹参酮 II A 介导p38MAPK信号转导诱导人肝癌细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 124-129
- Lee SK, Kim HN, Kang YR, Lee CW, Kim HM, Han DC, Shin J, Bae K, Kwon BM. Obovatol inhibits colorectal cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and inducing apoptosis. *Bioorg Med Chem* 2008; 16: 8397-8402
- 汤睿, 朱正纲. 凋亡途径与肿瘤治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 13: 2469-2472
- Huang Y, Huang X, Cai J, Ye F, Qin Q. Involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway in soft-shelled turtle iridovirus-induced apoptosis. *Apoptosis* 2011; 16: 581-593
- Thévenin AF, Zony CL, Bahnson BJ, Colman RF. Activation by phosphorylation and purification of human c-Jun N-terminal kinase (JNK) isoforms in milligram amounts. *Protein Expr Purif* 2011; 75: 138-146
- Nix P, Hisamoto N, Matsumoto K, Bastiani M. Axon regeneration requires coordinate activation of p38 and JNK MAPK pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 10738-10743
- Kovac A, Zilka N, Kazmerova Z, Cente M, Zilkova M, Novak M. Misfolded truncated protein  $\tau$  induces innate immune response via MAPK pathway. *J Immunol* 2011; 187: 2732-2739
- Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 463-475
- Séverin S, Ghevaert C, Mazharian A. The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 17-26
- Geest CR, Coffey PJ. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 237-250
- Yu MK, Lee YH, Yoon MR, Bhattarai G, Lee NH, Kim TG, Jhee EC, Yi HK. Attenuation of AH26-

- induced apoptosis by inhibition of SAPK/JNK pathway in MC-3T3 E1 cells. *J Endoc* 2010; 36: 1967-1971
- 27 Brnjic S, Olofsson MH, Havelka AM, Linder S. Chemical biology suggests a role for calcium signaling in mediating sustained JNK activation during apoptosis. *Mol Biosyst* 2010; 6: 767-774
- 28 Bermudez O, Pagès G, Gimond C. The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299: C189-C202
- 29 Igaki T. Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis* 2009; 14: 1021-1028

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig。s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成t<sub>1/2</sub>或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>不能V<sub>max</sub>, μ不写为英文u。需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> 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。

# 三硝基苯磺酸诱导小鼠溃疡性结肠炎模型制备的技术改良

徐阳, 李伟光, 刘海峰, 张成岗

## ■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)属于非特异性炎症性肠病,在我国UC发病率逐年升高,临床上也缺乏特异性的治疗药物。因此,优化小鼠UC造模方法,开展动物实验对UC发病机制及治疗药物的相关研究,具有极为重要的意义。

徐阳, 刘海峰, 辽宁医学院武警总医院研究生培养基地 武警总医院消化内科 北京市 100039

徐阳, 李伟光, 张成岗, 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所 蛋白质组学国家重点实验室 全军军事认知与心理卫生研究中心 北京市 100850

徐阳, 硕士研究生, 主要从事消化系统疾病相关研究。

作者贡献分布: 本文由徐阳撰写; 李伟光、张成岗及刘海峰审校。  
通讯作者: 刘海峰, 教授, 100039, 北京市, 武警总医院消化内科。  
haifengliu333@163.com

电话: 010-66930210

收稿日期: 2011-09-06 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-28 在线出版日期: 2012-01-18

## Preparation of a mouse model of TNBS-induced ulcerative colitis: technology improvement and optimal dose exploration

Yang Xu, Wei-Guang Li, Hai-Feng Liu, Cheng-Gang Zhang

Yang Xu, Hai-Feng Liu, Department of Gastroenterology, Graduate Cultivation Base, Armed Police General Hospital of Liaoning Medical University, Beijing 100039, China

Yang Xu, Wei-Guang Li, Cheng-Gang Zhang, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences; State Key Laboratory of Proteomics; Research Center for Military Cognition and Mental Hygiene of Chinese PLA, Beijing 100850, China

Correspondence to: Hai-Feng Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Graduate Cultivation Base, Armed Police General Hospital of Liaoning Medical University, Beijing 100039, China. haifengliu333@163.com

Received: 2011-09-06 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-28 Published online: 2012-01-18

## Abstract

**AIM:** To establish a mouse model of 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis using the "gavage needle" instead of "silicone tube", and to explore the optimal dosage and induction time of TNBS.

**METHODS:** Forty SPF male Balb/c mice were randomly and equally divided into five groups: normal control group and four TNBS groups (treated with 37.5, 75, 150, and 200 mg/kg of TNBS). Four mice in each group were killed on

days 2 and 4 after model induction to observe the physical status and evaluate pathologic changes in the colon.

**RESULTS:** No death occurred during the "gavage needle"-based modeling preparation. The control group showed no abnormalities. Higher doses of TNBS induced more severe congestion, hemorrhage, edema, inflammation and ulcer in the colon mucosa. Colonic tissue edema, inflammatory cell infiltration, goblet cell deletion, and formation of ulcer were aggravated significantly as the dosage of TNBS increased. The above mentioned features recovered from day 2 after model induction in mice treated with 37.5 and 75 mg/kg of TNBS, but showed no obvious alterations on day 4 after model induction in mice treated with 150 and 200 mg/kg of TNBS.

**CONCLUSION:** The "gavage needle"-based method could improve efficiency and increase stability in preparing the mouse model of TNBS-induced ulcerative colitis.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Gavage needle; 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid

Xu Y, Li WG, Liu HF, Zhang CG. Preparation of a mouse model of TNBS-induced ulcerative colitis: technology improvement and optimal dose exploration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 106-112

## 摘要

**目的:** 改良2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)硅胶管灌肠诱导制备小鼠溃疡性结肠炎(UC)模型的方法, 提高造模的成功率和模型的稳定性, 并探索造模的适宜剂量和时间。

**方法:** 选用40只SPF级♂Balb/c小鼠, 6-8周龄, 随机分为正常对照组、不同浓度TNBS组(37.5 mg/kg、75 mg/kg、150 mg/kg、200 mg/kg), 每组8只, 使用“灌胃针”替代“硅胶管”灌肠, 并于灌肠后2 d和4 d分别处死4只小鼠, 观察不同组别小鼠生理状态、结肠组织的

## ■同行评议者

程斌, 教授, 主任医师, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科

损伤及病理学的改变情况。

**结果:** 在“灌胃针”造模过程中未发生小鼠死亡现象; 对照组小鼠一般情况及结肠黏膜组织无异常改变; 小鼠灌肠后出现少食、少动、体质量下降、皮毛光泽度下降、腹泻、便血。不同浓度TNBS造模组随着TNBS剂量的增加, 小鼠结肠黏膜组织出现充血、出血、水肿、炎症、溃疡的程度增加。HE染色可见结肠组织水肿、炎症细胞浸润、杯状细胞缺失、溃疡形成的程度逐渐增加。其中TNBS 37.5 mg/kg、75 mg/kg组于造模后2 d, 以上损伤现象开始缓解, 未形成稳定的UC模型; 150 mg/kg、200 mg/kg组持续时间较长, 以上损伤现象4 d内未见明显缓解, 150 mg/kg组表现为较典型的UC模型, 200 mg/kg为重症UC模型。

**结论:** 对制造小鼠UC模型进行相关技术改进, 使灌肠更加简便, 提高造模效率, 显著增加了模型的稳定性。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 灌胃针; 三硝基苯磺酸

徐阳, 李伟光, 刘海峰, 张成岗. 三硝基苯磺酸诱导小鼠溃疡性结肠炎模型制备的技术改良. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 106-112

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/106.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种以黏膜及黏膜下层浸润为主、特发于大肠的慢性非特异性炎症, UC的发病机制至今还不十分明确, 已有研究报道可能与免疫、遗传、自由基损伤等因素相关<sup>[1-3]</sup>。目前, UC在欧美国家比较常见, 近年来在我国的发病率也呈持续上升趋势<sup>[4-6]</sup>。到目前为止, 临床上尚无有效的UC治疗药物和治疗方法, 针对UC治疗药物和治疗方法的研究, 主要建立在UC动物模型基础之上。因此, 操作简便、效果明显、稳定性高、易重复的UC动物模型就显得尤为重要。其中, 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)诱导的小鼠UC模型是目前比较公认的模型, 此模型于1984年由Morris首次成功建立<sup>[7-9]</sup>, 常被用来作为UC的病理和药效相关研究<sup>[10-12]</sup>。本文在现有TNBS诱导UC模型形成的基础上, 进行了相关技术改进, 同时本方法探索了利用TNBS建立UC模型的适宜剂量和时间。利用本方法建立UC模型, 具有造模难度小、效率高、模型的稳定性和一致性较好的优点, 提高了在此基础上进行的UC

相关研究的可信度, 为后续治疗药物和治疗方法的研究奠定了重要基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ SPF级Balb/c小鼠, 6-8周龄, 体质量18-22 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供; 麻醉机(北京益仁恒业科技有限公司)、TNBS(Sigma公司)、小鼠灌胃针(北京健力园医疗器械有限公司)、液体石蜡(国药集团化学试剂北京有限公司)、1 mL注射器(山东新华安德医疗用品有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 TNBS溶液配置和动物分组:** 于冰盒上用380 g/L的乙醇溶液配制分别含TNBS 37.5 mg/kg、75 mg/kg、150 mg/kg、200 mg/kg的混合液体; 将40只小鼠随机分为对照组、TNBS 37.5 mg/kg、75 mg/kg、150 mg/kg、200 mg/kg组, 每组8只。各组小鼠适应性喂养1 wk, 造模前禁食36 h, 自由饮水。造模前1 h称质量, 计算给药剂量。

**1.2.2 动物麻醉:** 将麻醉机氧气流量调节至0.5-0.7 nL/min后, 将小鼠转移至透明麻醉箱中, 异氟烷浓度调节至4%-5%进行麻醉。若小鼠出现躁动、不安及动作异常等现象, 再持续麻醉1-2 min后将小鼠放至麻醉台上。将异氟烷浓度调节至1-2%, 麻醉开关选择至维持麻醉管, 用维持麻醉管前端胶皮漏斗罩住小鼠口鼻以维持麻醉, 观察小鼠若安静仰卧, 呼吸平稳, 则麻醉成功。

**1.2.3 造模:** 用1 mL注射器针管连接小鼠灌胃针, 液体石蜡润滑灌胃针外壁, 按体质量吸取适量灌肠液。将灌胃针缓缓插入小鼠肛门口, 当深度到达2 cm左右时轻推注射器, 边缓慢注射药物, 边继续向肛门内推进灌胃针, 当灌胃针推进4-5 cm左右深度时, 即可将药物完全注射至小鼠结肠内。为确保注入的TNBS能在大肠内弥散分布, 可将小鼠尾部缓缓提起, 使小鼠身体和麻醉台面呈45-60°夹角放置, 持续1 min左右。分别于灌肠2 d、4 d后颈椎脱臼处死4只小鼠, 分离小鼠全结肠, 观察肠壁大体形态后, 沿肠系膜剪开肠腔, 观察结肠黏膜组织的一般状态。生理盐水冲洗后留取远端结肠, 于福尔马林溶液中固定1-2 d后, HE染色, 做病理组织切片。

**1.2.4 造模成功标准:** 若模型建立成功, 小鼠将出现以下症状: (1)生理状态: 小鼠将出现少食、少动、体质量下降、腹泻、便血(垫料上可见血迹)、皮毛的光泽度下降等现象; (2)小鼠结肠黏膜将出现明显的充血、水肿、出血、炎症及溃

## ■ 研发前沿

三硝基苯磺酸(TNBS)是一种有机酸半抗原, 与肠道组织蛋白结合后可诱发机体发生免疫反应导致结肠炎的发生, 常用来复制溃疡性结肠炎(UC)的动物模型。

### ■创新盘点

本文对现有UC造模方法进行技术改良及剂量探索,提高UC动物模型制造的效率和可信度。

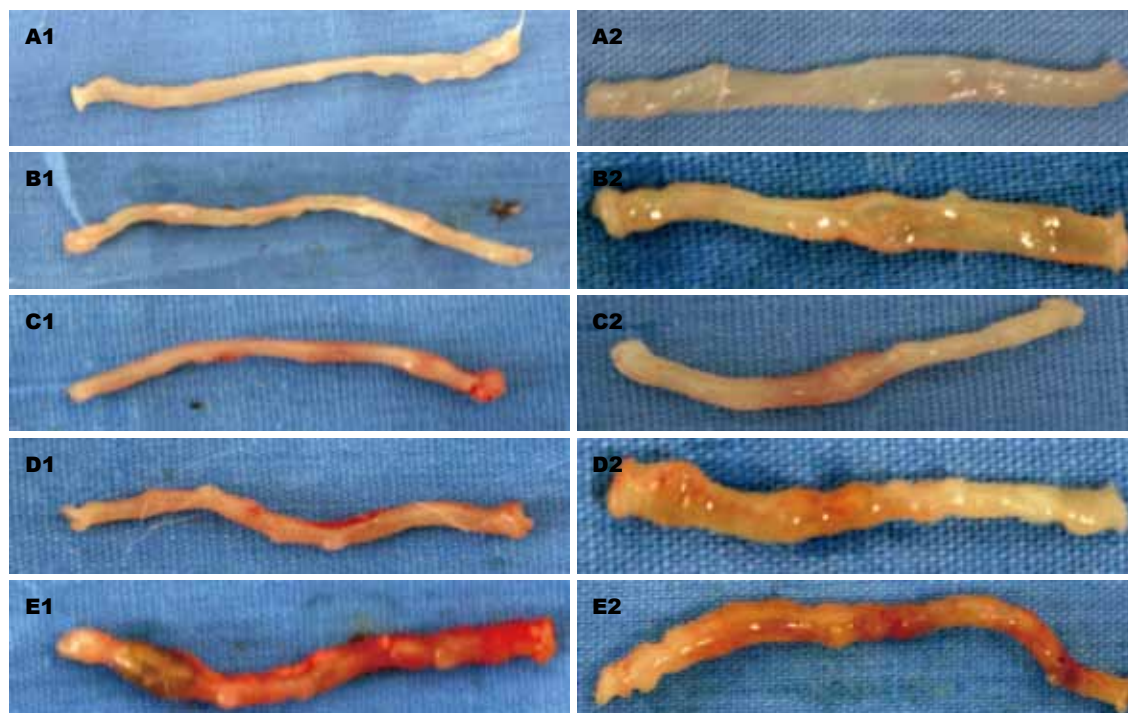


图1 利用“灌胃针”使用TNBS造模后第2天、第4天结肠外表面大体外观图. A: 对照组; B-E: 37.5、75、150、200 mg/kg TNBS处理组. 1: 第2天; 2: 第4天.

表1 结肠黏膜组织损伤评价标准

分数	肉眼观察结肠标准
0	无损伤
1	黏膜充血、水肿、无溃疡
2	黏膜充血、水肿、轻度糜烂,无溃疡
3	黏膜充血、水肿、中度糜烂,有单个溃疡
4	黏膜充血、水肿、高度糜烂,有多个溃疡
5	黏膜充血、水肿、重度糜烂,有多个溃疡

表2 各组小鼠结肠黏膜损伤评分比较

分组	造模后第2天	造模后第4天
对照组	0	0
TNBS 37.5 mg/kg组	1	0
TNBS 75 mg/kg组	2	1
TNBS 150 mg/kg组	3	2
TNBS 200 mg/kg组	4	2

疡的形成; (3)结肠组织将出现细胞结构紊乱、杯状细胞消失、淋巴细胞和中性粒细胞等炎症细胞浸润的现象(表1)。

## 2 结果

2.1 造模后一般情况 对照组小鼠一般生理情况良好; TNBS灌肠后,小鼠均出现少食、少动、体质量下降、皮毛光泽度下降、腹泻、便血等现象. 其中TNBS 37.5 mg/kg、75 mg/kg组以上现象于2 d后有所好转, 150 mg/kg、200 mg/kg组4 d内上述现象持续存在, 无明显好转迹象. 对照组小鼠未见以上改变。

2.2 造模后结肠一般形态及结肠黏膜组织外观 灌肠后小鼠结肠充血、出血、水肿、炎症, 溃疡形成. 各造模组随TNBS剂量的增加, 以上损伤程度逐渐增加(图1, 2, 表2), 其中37.5 mg/kg、75

mg/kg组上述损伤于造模后2 d开始缓解, 而150 mg/kg、200 mg/kg组4 d内上述损伤无明显缓解(图2, 3, 表2); 150 mg/kg组表现为较典型的UC症状, 200 mg/kg表现为重症UC模型. 对照组小鼠结肠黏膜组织光滑, 未见以上损伤出现。

2.3 各组小鼠结肠黏膜病理组织学观察 显微镜下可见小鼠肠组织水肿、细胞排列紊乱, 炎症细胞浸润、杯状细胞缺失, 溃疡形成. 各造模组随TNBS剂量的增加以上损伤程度逐渐增加, 其中37.5 mg/kg、75 mg/kg组于造模后4 d以上现象有所缓解; 150 mg/kg、200 mg/kg组4 d内以上现象无明显变化(图3). 150 mg/kg组表现为较典型的UC症状, 200 mg/kg表现为重症UC模型. 对照组小鼠结肠组织细胞排列整齐、结构完整、腺体丰富, 无杯状细胞缺失及炎性细胞浸润。

2.4 技术改良前后造模效率及造模效果比较

2.4.1 麻醉方法改良前后比较: 传统动物麻醉方

表 3 改良前后麻醉方法比较

	麻醉机吸入麻醉	人工吸入麻醉	腹腔注射麻醉
麻醉药物	异氟烷	乙醚	异戊巴比妥
麻醉起效时间(min)	1	5	30
麻醉剂量	0.5–0.7 nL/min	较难控制流量	2%, 40 mg/kg
麻醉维持时间	可控	不稳定且难维持	2–3 h
优缺点比较	操作简单、刺激性小、效果稳定	操作困难、稳定性差、效果较难维持	药物的浓度和剂量较难控制, 对动物的刺激性大, 动物死亡率高

## ■应用要点

利用灌胃针替代硅胶管作为TNBS灌肠诱导小鼠溃疡性结肠炎发生的工具, 可应用于UC动物模型制造, 提高了造模效率和模型的稳定性。

表 4 改良前后两种灌肠器材比较

	灌胃针	硅胶管
价格	7元/只, 可重复使用	300元/米, 不可重复使用
内径(mm)	1.5	2.0
与1 mm注射器连接情况	连接紧密	有缝隙存在
平均溢液量	<5%	>50%
材质	金属(铜、锡), 有一定硬度, 经石蜡润滑后较易插入肛门	硅胶, 较软, 不易插入肛门, 石蜡润滑效果不明显

表 5 其他相关技术改良前后造模效果分析

	技术改良前	技术改良后
动物选择	一般为大鼠, 20元/只, 对灌肠液敏感性差, 造模时间长	选用小鼠, 12元/只, 对灌肠液敏感, 造模时间短
灌肠前禁食时间	24 h, 灌肠时仍有粪便排出, 影响造模效果	36 h, 灌肠时基本无粪便排出, 造模效果较好
灌肠前准备工作	未使用石蜡润滑灌肠器材, 操作困难	使用石蜡润滑灌肠器材表面, 操作顺利

法有人工吸入麻醉及腹腔注射麻醉2种方法<sup>[13-15]</sup>, 腹腔注射麻醉常用药物为2%异戊巴比妥钠, 40 mg/kg, 注射有30 min起效, 可维持2-3 h, 该麻醉方法麻醉效果稳定, 但麻醉时间和苏醒时间过长, 对动物伤害性刺激较大, 不易把握药物的浓度和剂量, 麻醉后动物容易造成意外死亡, 适用于动物小型手术实验; 人工吸入麻醉常用脱脂棉球蘸取乙醚放入广口瓶中, 再将小鼠头部伸入广口瓶进行麻醉, 此种麻醉方法相较腹腔注射麻醉方法, 对小鼠的刺激较小, 死亡率较低, 但麻醉剂量较难控制, 效果不容易维持, 操作困难且广口瓶密闭效果差, 乙醚挥发后易对实验环境造成污染; 通过麻醉机进行吸入麻醉对动物本身刺激较小, 机器控制流量使麻醉效果得到较好的维持且操作简便, 是较好的麻醉方法(表3)。

2.4.2 灌肠器材改良前后比较: TNBS灌肠诱导小鼠UC形成的传统器材为硅胶管(图4), 其与1 mL注射器连接不紧密, 推动1 mL注射器灌肠过程

中, 灌肠液容易从连接缝隙处溢出, 影响造模效果及模型的稳定性. 改良后灌肠器材为灌胃针, 其与1 mL注射器连接紧密, 基本无溢液现象, 造模效果良好, 模型稳定性高, 是比较好的造模器材(表4)。

2.4.3 其他技术改良及效果: 除灌肠器材和麻醉方式外, 对动物选择和禁食时间的把握等方面, 也进行了一系列技术改良(表5), 经过改良后, 整体模型制造成本降低, 造模过程简便, 模型制造时间缩短, 所制模型稳定性好。

### 3 讨论

UC的发病病因至今未明. 以往研究中, 有学者提出一系列证据, 证明UC可能为一种自身免疫性疾病或其发病与自身免疫系统的过度免疫相关<sup>[16,17]</sup>. UC患者的血清中, 抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)阳性率可达50%-85%, 提示UC患者机体中存在免疫紊乱<sup>[18,19]</sup>. 生理情况下, T细胞识别抗原后通过发挥细胞毒作用及分泌细胞因子而

同行评价

本研究结果发现“灌胃针”使灌肠更简便,造模成功率更高.为今后开展UC治疗的实验研究提供了良好的工具和平台,具有应用前景.且选题较新颖,课题设计合理,研究思路清晰,方法较先进、科学.

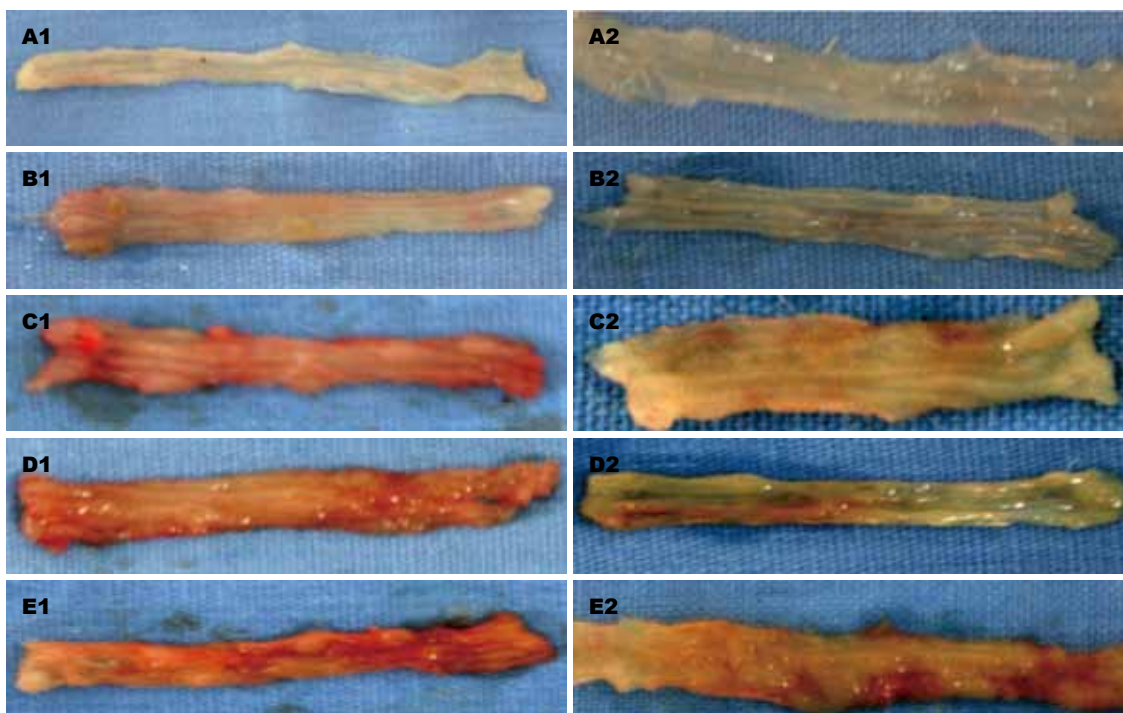


图 2 利用“灌胃针”使用TNBS造模后第2天、第4天结肠黏膜组织大体外观图. A: 对照组; B-E: 37.5、75、150、200 mg/kg TNBS处理组. 1: 第2天; 2: 第4天.

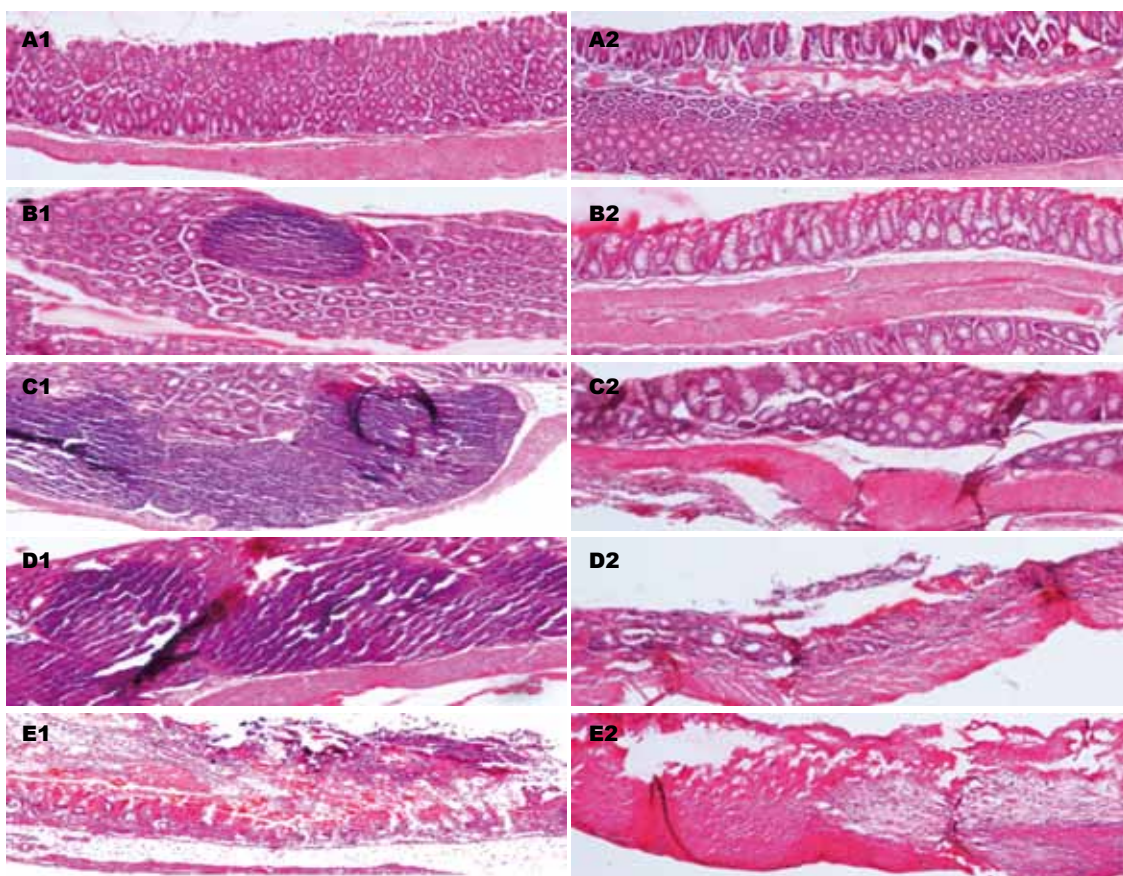


图 3 利用“灌胃针”使用TNBS造模后第2天、第4天结肠组织形态. A: 对照组; B-E: 37.5、75、150、200 mg/kg TNBS处理组. 1: 第2天; 2: 第4天.

产生免疫作用, UC患者肠道黏膜免疫平衡被打破,发生了免疫炎症反应, CD4<sup>+</sup> T细胞亚群(辅助



图 4 改良前后2种灌肠器材与注射器针管连接情况比较. A: 灌胃针+注射器针管; B: 硅胶管+注射器针管.

性/诱导性T细胞)在这一过程中发挥了重要的作用<sup>[20,21]</sup>. 细胞因子则与UC的进程密切相关<sup>[22,23]</sup>, 其中IL-10的遗传多态性和ANCA的合成有显著关系<sup>[24,25]</sup>. 有研究发现<sup>[26]</sup>, IL-23在UC患者的炎性黏膜中高表达, 并促使肠上皮内淋巴细胞(IEL)及NK细胞激活产生细胞毒性作用, 同时刺激IL-17A等炎性因子的分泌. IL-23在NK细胞和T细胞激活, 促炎性细胞因子释放及Th17细胞分化中发挥了关键性的作用. 每种细胞因子相互协同或相互拮抗, 是UC发病机制中的重要环节. 经由胆碱能神经的嗜酸细胞和肥大细胞间的回路障碍可能会加重UC患者的肠黏膜炎症<sup>[27]</sup>. TNBS灌入肠道后, 与大分子组织蛋白相结合, 形成一种抗原物质, 可诱发小鼠机体产生免疫反应, 从而模拟类似人的溃疡性结肠炎的发病机制和临床症状<sup>[28]</sup>.

传统硅胶管灌肠方法不足之处在于: (1)硅胶管硬度较小, 且内径稍大, 不易进入小鼠结肠深处, 使灌肠液不能很好地弥漫至整个结肠组织; (2)硅胶管与注射器连接的密闭性不够, 需要进行特殊处理以保证密闭性, 操作繁琐, 否则会导致所诱导出的小鼠UC模型不稳定, 病情轻重程度不一, 影响后续药物治疗的评价; (3)小口径硅胶管(内径2 mm), 多从国外进口, 较难购买, 造价昂贵. 使用“灌胃针”替代“硅胶管”灌肠的优点在于: (1)硬度适宜、内径小, 经液体石蜡润滑灌胃针外部后, 很容易进入小鼠结肠深处, 能很好地将液体弥漫至小鼠整个结肠, 且不易损伤肠壁; (2)与1 mL注射器连接紧密: 无需特殊处理, 操作简便, 可保证模型的稳定性和一致性; (3)属于金属材料, 制作简单, 造价便宜, 容易购买.

除此之外, 我们在对动物进行麻醉方面也进行了优化, 使用麻醉机替代腹腔注射等麻醉方法的优点在于: (1)麻醉速度快, 平均为1 min, 比腹腔麻醉的速度平均提升5 min; (2)动物苏醒速度快, 平均为5 min, 比腹腔麻醉的速度平均提升25 min; (3)麻醉机为异氟烷吸入麻醉方式, 与腹腔注射方式相比, 对动物刺激较小; (4)机械控制

用药浓度, 操作简便、麻醉程度均一、模型稳定性高; (5)吸入麻醉剂异氟烷本身对小鼠的应激作用较小, 减轻了小鼠除TNBS刺激所产生的应激以外, 由麻醉作用引起的小鼠应激作用, 也减小了造模过程中外部因素所造成的干扰.

其他相关技术的改进还包括: (1)动物选择: 选用小鼠作为造模对象而非TNBS造模常用的大鼠. 这是由于小鼠对TNBS刺激较为敏感, 且液体灌注完全, 造模后2 d左右即可得到比较典型的类似临床溃疡性结肠炎模型, 可显著节省造模时间, 提高造模效率, 而大鼠通常所需的造模时间为7-14 d. (2)造模时间: 小鼠禁食24 h后仍可能有粪便堆积于结肠处, 将禁食时间延长至36 h, 则结肠处粪便排空比较完全. 在TNBS灌肠剂量探索方面, 各组小鼠的结肠黏膜组织损伤随剂量的增加而增加, 给药浓度与病变严重程度呈正相关. TNBS剂量在150 mg/kg及200 mg/kg时, 模型小鼠结肠组织出现较稳定的慢性持续性炎症反应. 结肠整体可见充血、水肿, 结肠黏膜组织粘连、出血, 并有溃疡形成. 经实验证实150 mg/kg为较适宜的造模剂量, 病变程度和持续时间适中, 有利于后续药物治疗实验的开展, 200 mg/kg则可复制重症溃疡性结肠炎模型, 适于UC模型的其他相关研究. 在TNBS灌肠时间方面: 4组模型在灌肠2 d内均有腹泻、便血、少动、进食量和皮毛光泽度下降等现象, 第2日37.5 mg/kg组、75 mg/kg组上述现象开始好转. 150 mg/kg组、300 mg/kg组, 4 d内上述现象持续存在, 4 d后无明显好转. 分别于灌肠后2 d、4 d处死小鼠各2只, 2 d时处死小鼠见结肠组织较明显病理现象产生, 病理切片可见肠道全层增厚, 固有层增厚, 腺体肥大、细胞排列紊乱, 杯状细胞缺失及炎性细胞浸润; 4 d处死第二批小鼠, 37.5 mg/kg组、75 mg/kg组上述现象有所减轻.

总之, 本研究对现有利用TNBS灌肠制备小鼠UC的造模方法进行了优化, 减少了造模过程中的干扰因素, 显著提高了UC模型的稳定性. 实验中通过对TNBS灌肠剂量和时间的探索, 得出了比较理想的时间剂量效应, 使得UC造模方法更加成熟, 且具有周期短、操作简便、重复性高等优点, 为临床UC病变的研究提供了理想的动物模型, 必将有助于UC防治药物的研发.

#### 4 参考文献

- 1 Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and

- clinical characteristics. *Gastroenterology* 2003; 124: 1767-1773
- 2 Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1371-1385
  - 3 Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 145-153
  - 4 Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, Peeters M, Vlietinck R. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut* 2004; 53: 980-986
  - 5 Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, Pan GZ, Fock KM, Fiocchi C, Lam SK, Xiao SD. Management consensus of inflammatory bowel disease for the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1772-1782
  - 6 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年, 济南). *中华消化杂志* 2007; 27: 545-550
  - 7 Fonager K, Sørensen HT, Olsen J. Change in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Denmark. A study based on the National Registry of Patients, 1981-1992. *Int J Epidemiol* 1997; 26: 1003-1008
  - 8 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803
  - 9 Gryglewski A, Szczepanik M, Szczepanik R. [Colitis in laboratory experimentation]. *Przegl Lek* 1997; 54: 558-560
  - 10 Smith MS, Warren BF, Fox JD, Watkins PE, Hudson M, Pounder RE, Wakefield AJ. Detection of herpesvirus DNA in cottontop tamarins: no association with colitis. *Int J Exp Pathol* 1995; 76: 201-203
  - 11 盛艳梅, 颜晓燕. 溃疡性结肠炎动物模型在药效研究中的应用. *生理科学杂志* 2006; 28: 65-66
  - 12 郑礼. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究. *中国药理学报* 1998; 14: 370
  - 13 Warren BF. Cytokines in the cotton top tamarin model of human ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 Suppl 2: 45-47; discussion 48
  - 14 Crawford MW, Lerman J, Saldivia V, Carmichael FJ. Hemodynamic and organ blood flow responses to halothane and sevoflurane anesthesia during spontaneous ventilation. *Anesth Analg* 1992; 75: 1000-1006
  - 15 Bernard JM, Doursout MF, Wouters P, Hartley CJ, Merin RG, Chelly JE. Effects of sevoflurane and isoflurane on hepatic circulation in the chronically instrumented dog. *Anesthesiology* 1992; 77: 541-545
  - 16 Hikasa Y, Saito K, Takase K, Ogasawara S. Clinical, cardiopulmonary, hematological and serum biochemical effects of sevoflurane and isoflurane anesthesia in oxygen under spontaneous breathing in sheep. *Small Rumin Res* 2000; 36: 241-249
  - 17 巴德年. 当代免疫学技术与应用. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998: 892
  - 18 Russel MG. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur J Intern Med* 2000; 11: 191-196
  - 19 Billing P, Tahir S, Calfin B, Gagne G, Cobb L, Targan S, Vidrich A. Nuclear localization of the antigen detected by ulcerative colitis-associated perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Pathol* 1995; 147: 979-987
  - 20 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
  - 21 Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 1999; 5: 1178-1182
  - 22 Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993; 75: 274-282
  - 23 王伟宁, 张熙纯, 刘丽. 活动期溃疡性结肠炎发病机制的免疫学探讨. *中国现代医学杂志* 2003; 13: 74-76
  - 24 Present DH. Ciprofloxacin as a treatment for ulcerative colitis-not yet. *Gastroenterology* 1998; 115: 1289-1291
  - 25 Castro-Santos P, Suarez A, Mozo L, Gutierrez C. Association of IL-10 and TNFalpha genotypes with ANCA appearance in ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2007; 122: 108-114
  - 26 Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 1998; 16: 351-355
  - 27 Liu Z, Yadav PK, Xu X, Su J, Chen C, Tang M, Lin H, Yu J, Qian J, Yang PC, Wang X. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 597-606
  - 28 Wallon C, Persborn M, Jönsson M, Wang A, Phan V, Lampinen M, Vicario M, Santos J, Sherman PM, Carlson M, Ericson AC, McKay DM, Söderholm JD. Eosinophils express muscarinic receptors and corticotropin-releasing factor to disrupt the mucosal barrier in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011; 140: 1597-1607

编辑 张姗姗 电编 何基才

# MID1在大肠癌组织中的表达及其对预后的意义

赵震, 杨磊, 丁彦青, 于倩

赵震, 杨磊, 丁彦青, 于倩, 南方医科大学基础医学院病理学系 广东省广州市 510515

赵震, 硕士, 主要研究方向是大肠癌的迁徙与转移机制。

作者贡献分布: 此课题由赵震、丁彦青及杨磊设计主持; 研究过程由赵震与于倩操作完成; 研究结果数据分析由赵震完成; 本文写作由赵震完成。

通讯作者: 杨磊, 副教授, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学基础医学院病理学系. yanglei@fimmu.com

电话: 020-61648223 传真: 020-61642148

收稿日期: 2011-10-30 修回日期: 2011-11-25

接受日期: 2011-12-15 在线出版日期: 2012-01-18

## Prognostic significance of MID1 expression in colorectal carcinoma

Zhen Zhao, Lei Yang, Yan-Qing Ding, Qian Yu

Zhen Zhao, Lei Yang, Yan-Qing Ding, Qian Yu, Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Lei Yang, Associate Professor, Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. yanglei@fimmu.com

Received: 2011-10-30 Revised: 2011-11-25

Accepted: 2011-12-15 Published online: 2012-01-18

### Abstract

**AIM:** To detect the expression of midline 1 (MID1) in human colorectal carcinoma and to assess its prognostic significance.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to detect the expression of MID1 protein in colorectal carcinoma specimens ( $n = 109$ ). The relationship between the survival of patients with colorectal cancer and the expression of MID1 was investigated. Survival analyses were performed using the Kaplan-Meier method and Cox regression model.

**RESULTS:** MID1 expression significantly affected the survival of patients with colorectal carcinoma ( $P < 0.05$ ). MID1 expression had a significantly negative correlation with lymph node metastasis ( $r = -0.204, P = 0.034$ ) and depth of invasion ( $r = -0.223, P = 0.020$ ), but was significantly positively correlated with differentiation de-

gree ( $r = 0.236, P = 0.014$ ). MID1 expression had no relationship with sex, age or tumor pathologic type. Kaplan-Meier analysis indicated that the 7-year cumulative survival rates for patients with high, medium and low MID1 expression were 69.2%, 45.0% and 30.0%, respectively, and their mean survival time was 91.101 mo  $\pm$  6.127 mo, 69.389 mo  $\pm$  7.512 mo, 50.358 mo  $\pm$  8.091 mo.

**CONCLUSION:** MID1 expression can be used as a parameter for the judgment of colorectal carcinoma differentiation, invasion and lymph node metastasis, and as a useful prognostic marker in patient with colorectal carcinoma.

**Key Words:** Midline 1; Immunohistochemistry; Colorectal carcinoma; Prognosis

Zhao Z, Yang L, Ding YQ, Yu Q. Prognostic significance of MID1 expression in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 113-118

### 摘要

**目的:** 探讨MID1在人大肠癌中表达的临床意义及其对术后生存时间的影响。

**方法:** 采用SP免疫组织化学法检测109例大肠癌手术切除组织标本中MID1的表达, 分析MID1的表达与大肠癌的关系, 用Kaplan-Meier和Cox回归分析法进行生存分析。

**结果:** MID1的表达对大肠癌的术后的生存时间有显著影响( $P < 0.05$ ); 与大肠癌的淋巴结转移情况呈显著性负相关( $r = -0.204, P = 0.034 < 0.05$ ); 与大肠癌的浸润深度呈显著性负相关( $r = -0.223, P = 0.020 < 0.05$ ); 与大肠癌的分化程度呈显著性正相关( $r = 0.236, P = 0.014 < 0.05$ ); MID1的表达与大肠癌的年龄、性别及其病理类型没有关系。Kaplan-Meier生存曲线结果显示, 随访期内MID1高中低各组7年累积生存率分别为69.2%、45.0%、30.0%; 高中低各表达组患者术后平均生存时间分别为: 91.101 mo  $\pm$  6.127 mo, 69.389 mo  $\pm$  7.512 mo, 50.358 mo  $\pm$  8.091 mo, Log-rank检验证明, 整体水平及各组间水平均有统计学意义

### ■背景资料

随着我国人口老龄化、生活习惯、饮食结构以及环境的改变, 大肠癌的发病率呈上升趋势。影响大肠癌预后的主要因素是肿瘤的生长分化和侵袭转移。其过程十分复杂, 诸多因素参与和调控大肠癌的上述生物学行为。

### ■同行评议者

郝立强, 副教授, 上海长海医院普外二科

## ■ 研究前沿

研究发现MID1在细胞内与形态发生、泛素循环、金属离子及锌离子结合、微管复合体形成等功能有关,参与了连接酶活化、微管组织等信号转导通路,与异常增生及多种发育畸形有关。

( $P < 0.05$ ); 经多因素Cox回归分析发现, MID1低表达、淋巴结的转移可显著增加患者的死亡风险( $P < 0.05$ )。

**结论:** MID1可以作为大肠癌分化、侵袭、淋巴结转移以及预后的一项指标。

**关键词:** MID1; 免疫组织化学; 大肠癌; 预后

赵震, 杨磊, 丁彦青, 于倩. MID1在大肠癌组织中的表达及其对预后的意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 113-118  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/113.asp>

## 0 引言

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是一种常见的、严重威胁人类生命健康的消化系统恶性肿瘤。近年来,随着国民经济的发展,人民生活水平的提高,尤其是膳食结构的改变,结直肠癌的发病率与死亡率呈逐年上升的趋势<sup>[1-3]</sup>。为了获得更高的生存率和更长的生存期,除了早期诊断、早期治疗外,选择具有高危预后因素患者进行辅助治疗也是有效的方法之一。因此准确的预后判断就显得格外重要。MID1定位于细胞质,研究发现其在细胞内与形态发生、泛素循环、金属离子及锌离子结合、微管复合体形成等功能有关,参与了连接酶活化、微管组织等信号转导通路,与异常增生及多种发育畸形有关<sup>[4-6]</sup>。MID1是OS(Opitz Syndrome)相关基因,OS主要累及中缝结构,最初为2种综合征,以唇、腭裂和智力发育迟缓为特征的BBB综合征和以胃肠道畸形为特征的G综合征<sup>[7,8]</sup>。其功能和作用在结直肠癌中未见报道。本实验室在前期研究中通过在不同转移潜能的细胞系进行基因表达谱分析表明其可能参与大肠癌的发生和转移<sup>[9]</sup>。本研究分析随访10年的109例原发性大肠癌患者中年龄、性别、组织类型、淋巴结转移状态、癌细胞浸润深度以及癌组织的分化情况;分析MID1的表达与临床各病理因素的关系,以及MID1的表达对术后生存率的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究标本取自南方医科大学附属医院南方医院2001-01/2003-12原发性大肠癌石蜡标本109例,随访至2011-01,最短随访时间为7年。其中男性病例69例,女性病例40例;平均年龄60.7岁;死亡58例,生存51例;无淋巴结转移64例,有淋巴结转移45例;浸润至黏膜层6例,肌

层16例,浆膜层87例;低分化大肠癌16例,中分化大肠癌42例,高分化大肠癌51例;黏液癌10例,腺癌99例。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本固定和染色:** 所有标本均经10%甲醛固定,4 μm连续切片分别作HE染色和免疫组织化学。兔抗人MID1多克隆抗体购于美国Abcam生物技术公司,免疫组织化学染色试剂盒购于福州迈新生物技术开发公司。免疫组织化学法采用链霉素-生物素免疫组织化学法即SP法。每个染色流程均有对照作为染色质量控制标准。取已知含有待检抗原的切片为阳性对照,空白对照采用PBS代替I抗,替代对照用正常血清代替一抗。

**1.2.2 结果判定:** 免疫组织化学结果阳性反应为黄色到棕黄色细颗粒。MID1定位于细胞质内,以细胞质着色为阳性标记。染色阳性以细胞呈棕黄色颗粒状染色为标准。免疫组织化学结果判断参照Hirsch等的方法<sup>[10-12]</sup>。首先对每张切片不同区域的染色强度进行打分:阴性为1分,弱阳性为2分,中等程度阳性为3分,强阳性为4分;同时物镜下计数不同染色强度区域面积百分比,每张切片的总分为不同区域染色强度分值与所占面积百分比乘积的总和,总得分1-200为低表达,201-300为中表达,301-400为高表达(图1A-D)。

**统计学处理** 本实验所有数据采用SPSS13.0软件完成各种统计分析。其中MID1与临床病理因素的关系采用计数资料的 $\chi^2$ 检验及相关分析法。生存率分析采用Kaplan Meier法及Log-rank检验。

## 2 结果

**2.1 MID1与大肠癌各临床因素之间的关系** 在109例大肠癌组织中MID1的高中低表达率分别为35.8%( $n = 39$ ), 36.7%( $n = 40$ ), 27.5%( $n = 30$ ),从表1中可以看到, MID1在大肠癌组织中的表达与大肠癌的年龄、性别、组织类型无相关性;与大肠癌的淋巴结转移情况呈显著性负相关( $r = -0.204, P = 0.034 < 0.05$ );与大肠癌的浸润深度呈显著性负相关( $r = -0.223, P = 0.020 < 0.05$ );与大肠癌的分化程度呈显著性正相关( $r = 0.236, P = 0.014 < 0.05$ )。

**2.2 MID1对大肠癌患者术后生存时间的影响** 为了确定MID1表达与大肠癌患者预后的关系,我们绘制了Kaplan-Meier生存曲线(图2)。在随访期内病例最短有效随访时间为7年,表2中可看到

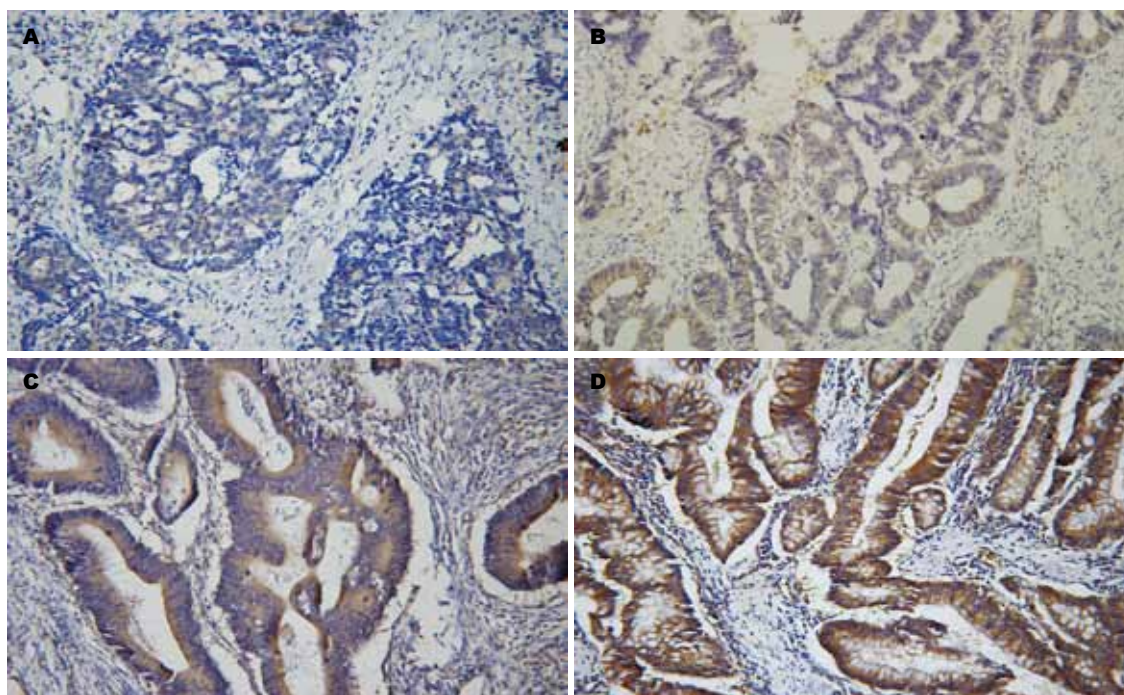


图 1 不同时期大肠癌的MID1免疫组织化学染色强度评分. A: 1分阴性; B: 2分弱阳; C: 3分中阳; D: 4分强阳.

#### ■ 相关报道

MID1是OS(Opitz Syndrome)相关基因, OS主要累及中缝结构, 最初为2种综合征, 即以唇、腭裂和智力发育迟缓为特征的BBB综合征, 和以胃肠道畸形为特征的G综合征. 近期有文章报道其可能参与大肠癌的发生和转移.

在随访期内MID1高中低各组7年累积生存率分别为69.2%、45.0%、30.0%; 高中低各表达组患者术后平均生存时间分别为: 高表达组91.101 mo $\pm$ 6.127 mo, 中表达组69.389 mo $\pm$ 7.512 mo, 低表达组50.358 mo $\pm$ 8.091 mo, 各组差异经Log-rank检验, 整体水平及各组间水平均有统计学意义( $P<0.05$ ).

2.3 其他各临床因素对大肠癌术后生存时间的影响 在其他各临床因素中淋巴结转移情况对患者术后生存时间有显著性影响(图3, 表3), 无淋巴结转移组平均生存时间为86.184 mo $\pm$ 5.358 mo、7年累计生存率为60.9%, 有淋巴结转移组术后平均生存时间为51.811 mo $\pm$ 6.588 mo、7年累计生存率为33.3%, 其差异经Log-rank检验有统计学意义( $P=0.001<0.05$ ); 而患者的性别、年龄、组织分化、病理类型及大肠癌的浸润深度对术后生存时间无显著性影响(表3).

2.4 影响生存期的Cox模型多因素分析 将MID1的表达、年龄、性别、淋巴结转移、浸润深度、癌组织分化、病理组织类型经多因素Cox回归分析发现, MID1低表达、淋巴结的转移可显著增加患者的死亡风险( $P<0.05$ , 表4).

### 3 讨论

转移是大肠癌的重要生物学行为, 也是肿瘤患者死亡的主要原因之一. 大肠癌的生长分化和侵袭转移过程十分复杂. 肿瘤转移(tumor metas-

表 1 MID1的表达与大肠癌各临床因素的关系

	n	MID1表达			r/z值	P值
		高	中	低		
性别						
男	69	24	26	19	-0.184 <sup>z</sup>	0.854
女	40	15	14	11		
年龄(岁)						
$\leq 60$	47	14	19	14	0.093	0.336
$>60$	62	25	21	16		
组织类型						
腺癌	99	36	35	28	-0.039 <sup>z</sup>	0.969
黏液癌	10	3	5	2		
淋巴结转移						
有转移	45	12	16	17		
无转移	64	27	24	13	-0.204	0.034
组织分化						
高	51	24	17	10	0.236	0.014
中	42	12	16	14		
低	16	3	7	6		
浸润深度						
黏膜层	6	5	1	0	-0.223	0.020
肌层	16	7	6	3		
浆膜层	87	27	33	27		

<sup>z</sup>: 两独立样本检验的z值.

tasis)是一个多步骤、多因素、多基因的复杂过程, 每一阶段都受多种基因/蛋白质的调控<sup>[13,14]</sup>. 转移的肿瘤细胞经历了细胞骨架变化、黏附特

■创新盘点

本文通过详细长期的随访资料对MID1与大肠癌的各临床参数以及术后生存率作了详细的统计分析,阐明了MID1与大肠癌的关系。

表 2 MID1的表达对大肠癌患者术后生存的影响

	平均生存时间(mo)	7年生存率(%)	<sup>a</sup> P	<sup>b</sup> P		
				MID1低表达	MID1中表达	MID1高表达
MID1低表达	50.358 ± 8.091	30.0	0.001	0.136	0.000	
MID1中表达	69.389 ± 7.512	45.0		0.136	0.018	
MID1高表达	91.101 ± 6.127	69.2		0.000	0.018	

<sup>a</sup>P: 总体水平差异的意义; <sup>b</sup>P: 各个组间水平差异意义。

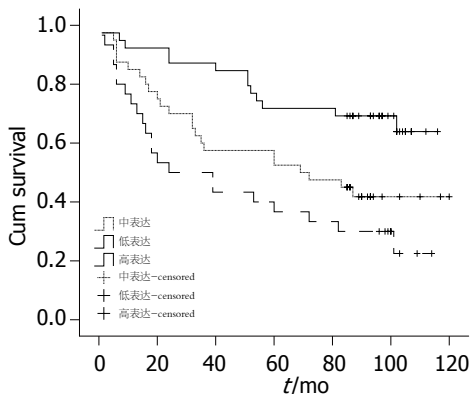


图 2 大肠癌患者生存曲线与MID1的表达。

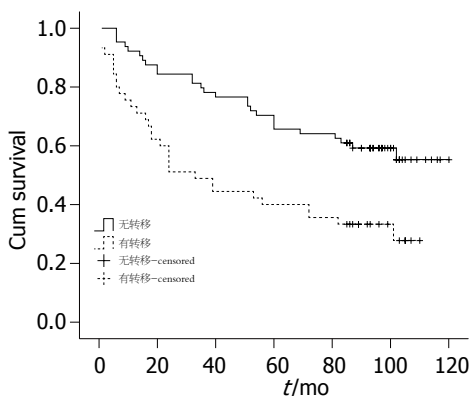


图 3 大肠癌患者生存曲线与淋巴结的转移。

性改变、运动能力增强以及蛋白水解酶表达增加等一系列改变<sup>[15]</sup>。因此, 确定肿瘤的转移潜能及其相关因素对判断预后、指导治疗、提高患者生活质量具有十分重要的意义。MID1基因位于Xp22.3, 约300 kb, 包含9个编码外显子, 编码667个氨基酸的蛋白质, 属于B-box家族的一员, 包含1个RING-finger, 2个B-box, 和1个coiled-coil结构域<sup>[16-21]</sup>。MID1表达于细胞质, 研究发现他在细胞内与形态发生、泛素循环、金属离子及锌离子结合、微管复合体形成等功能有关, 参与了连接酶活化、微管组织等信号转导通路<sup>[22-25]</sup>。MID1与异常增生及多种发育畸形有关, 是OS(Optiz Syn-

表 3 各临床因素对大肠癌患者术后生存的影响

	平均生存时间(mo)	7年生存率(%)	P值
性别			
男	71.269 ± 5.867	47.8	0.550
女	74.950 ± 7.008	52.5	
年龄(岁)			
≤60	80.255 ± 6.665	53.2	0.236
>60	66.549 ± 5.954	46.8	
组织类型			
腺癌	70.742 ± 4.645	47.5	0.366
黏液癌	85.480 ± 15.164	70.0	
淋巴结转移			
有转移	51.811 ± 6.588	33.3	0.001
无转移	86.184 ± 5.358	60.9	
组织分化			
高	80.796 ± 5.995	56.9	0.181
中	62.143 ± 6.549	42.9	
低	59.281 ± 12.918	43.8	
浸润深度			
黏膜层	94.000 ± 7.303	0.833	0.091
肌层	84.500 ± 11.835	0.625	
浆膜层	67.406 ± 4.961	0.448	

表 4 影响预后多因素Cox回归分析

	B	SE	RR	P值
性别	0.013	0.219	1.013	0.964
年龄	0.518	0.285	1.678	0.069
MID1	-0.498	0.175	0.607	0.004
淋巴结转移	0.644	0.278	1.905	0.020
组织分化	-0.289	0.199	0.749	0.146
浸润深度	0.278	0.345	1.321	0.420
组织类型	0.912	0.557	2.489	0.102

drome)相关基因, 参与中缝结构的发育及细胞的转化<sup>[26-31]</sup>。本实验室的前期研究发现MID1有可能参与大肠癌的发生和转移。为了探讨MID1在大肠癌发生发展中的作用, 本研究以石蜡组织为研究对象, 应用免疫组织化学技术, 初步探讨

MID1与大肠癌的转移、预后的关系, 为确定一个新的大肠癌肿瘤标记物提供新的线索. 本研究分析了109例原发性大肠癌者中MID1的表达, 其中MID1的高中低表达率分别为35.8( $n = 39$ ), 36.7%( $n = 40$ ), 27.5%( $n = 30$ ). 免疫组织化学检测结果显示, 在大肠癌组织中随着癌组织分化程度的增高MID1染色越来越强, 阳性率越来越高; 随着其浸润深度的发展MID1的染色越来越低, 阳性率越来越低; 无淋巴结转移的大肠癌的MID1表达比发生淋巴结转移的大肠癌高. 这些结果提示MID1表达与大肠癌的分化正相关, 促进大肠癌向正常细胞的分化; 与大肠癌的浸润程度负相关, 抑制大肠癌的侵袭能力; 与大肠癌的淋巴结转移负相关, 抑制大肠癌向淋巴结的转移. 这表明MID1对大肠癌的转移和发展起着抑制作用. 在预后方面随着MID1表达的降低患者术后的生存时间也缩短, 而有淋巴结转移的患者术后生存时间要明显短于无淋巴结转移组, 这与前面分析MID1的表达与转移情况显著相关吻合, 多因素分析分析表明MID1可作为大肠癌独立预后因素.

总之, MID1与大肠癌的淋巴结转移、癌组织分化、侵袭能力密切相关, MID1表达下调是大肠癌发生、发展中的重要分子生物学事件, 可作为提示肿瘤分化、侵袭和淋巴结转移的一项指标, 可能成为大肠癌的预后指标和治疗的目标. 对于MID1在大肠癌中的具体作用机制国内外研究很少, 其对大肠癌细胞生物学特性的影响, 信号通路等尚需进一步研究.

#### 4 参考文献

- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 23-47
- Zheng S, Cai SR. Colorectal Cancer Epidemiology and Prevention Study in China. *Chin-Ger J Clin Oncol* 2003; 2: 72-75
- Sung JJ, Lau JY, Goh KL, Leung WK. Increasing incidence of colorectal cancer in Asia: implications for screening. *Lancet Oncol* 2005; 6: 871-876
- Cainarca S, Messali S, Ballabio A, Meroni G. Functional characterization of the Opitz syndrome gene product (midin): evidence for homodimerization and association with microtubules throughout the cell cycle. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1387-1396
- Tao H, Simmons BN, Singireddy S, Jakkidi M, Short KM, Cox TC, Massiah MA. Structure of the MID1 tandem B-boxes reveals an interaction reminiscent of intermolecular ring heterodimers. *Biochemistry* 2008; 47: 2450-2457
- Clifford DM, Wolfe BA, Roberts-Galbraith RH, McDonald WH, Yates JR, Gould KL. The Clp1/Cdc14 phosphatase contributes to the robustness of cytokinesis by association with anillin-related Mid1. *J Cell Biol* 2008; 181: 79-88
- So J, Suckow V, Kijas Z, Kalscheuer V, Moser B, Winter J, Baars M, Firth H, Lunt P, Hamel B, Meinecke P, Moraine C, Odent S, Schinzel A, van der Smagt JJ, Devriendt K, Albrecht B, Gillissen-Kaesbach G, van der Burgt I, Petrij F, Faivre L, McGaughan J, McKenzie F, Opitz JM, Cox T, Schweiger S. Mild phenotypes in a series of patients with Opitz GBBB syndrome with MID1 mutations. *Am J Med Genet A* 2005; 132A: 1-7
- Schweiger S, Schneider R. The MID1/PP2A complex: a key to the pathogenesis of Opitz BBB/G syndrome. *Bioessays* 2003; 25: 356-366
- Hao JM, Chen JZ, Sui HM, Si-Ma XQ, Li GQ, Liu C, Li JL, Ding YQ, Li JM. A five-gene signature as a potential predictor of metastasis and survival in colorectal cancer. *J Pathol* 2010; 220: 475-489
- Okuda K, Sasaki H, Kawano O, Yukiue H, Yokoyama T, Yano M, Fujii Y. Epidermal growth factor receptor gene mutation, amplification and protein expression in malignant pleural mesothelioma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 1105-1111
- Ionescu DN, Sasatomi E, Cieply K, Nola M, Dacic S. Protein expression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in thymomas. *Cancer* 2005; 103: 630-636
- Hirsch FR, Varela-Garcia M, Bunn PA, Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, Barón AE, Zeng C, Franklin WA. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3798-3807
- Tsunoda T, Nakamura T, Ishimoto K, Yamaue H, Tanimura H, Saijo N, Nishio K. Upregulated expression of angiogenesis genes and down regulation of cell cycle genes in human colorectal cancer tissue determined by cDNA macroarray. *Anticancer Res* 2001; 21: 137-143
- Hunter K, Welch DR, Liu ET. Genetic background is an important determinant of metastatic potential. *Nat Genet* 2003; 34: 23-24; author reply 25
- Herbst RS, Yano S, Kuniyasu H, Khuri FR, Bucana CD, Guo F, Liu D, Kemp B, Lee JJ, Hong WK, Fidler IJ. Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 790-797
- Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, Franco B, Rugarli EI, Berger W, Feldman GJ, Volta M, Andolfi G, Gilgenkrantz S, Marion RW, Hennekam RC, Opitz JM, Muenke M, Ropers HH, Ballabio A. Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet* 1997; 17: 285-291
- Massiah MA, Simmons BN, Short KM, Cox TC. Solution structure of the RBCC/TRIM B-box1 domain of human MID1: B-box with a RING. *J Mol Biol* 2006; 358: 532-545
- Perry J, Feather S, Smith A, Palmer S, Ashworth A. The human FXI gene is located within Xp22.3: implications for evolution of the mammalian X chromosome. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 299-305
- Van den Veyver IB, Cormier TA, Jurecic V, Baldini A, Zoghbi HY. Characterization and physical mapping in human and mouse of a novel RING finger gene in Xp22. *Genomics* 1998; 51: 251-261
- Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S,

#### ■同行评价

对于MID1与大肠癌的关系研究较少, 本文提出将MID1作为大肠癌的独立预后因素的观点有一定的临床意义, 对大肠癌预后的判断有一定的帮助, 结论可靠.

- Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 2001; 20: 2140-2151
- 21 Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K, Kimura K, Makita H, Sekine M, Obayashi M, Nishi T, Shibahara T, Tanaka T, Ishii S, Yamamoto J, Saito K, Kawai Y, Isono Y, Nakamura Y, Nagahari K, Murakami K, Yasuda T, Iwayanagi T, Wagatsuma M, Shiratori A, Sudo H, Hosoiri T, Kaku Y, Kodaira H, Kondo H, Sugawara M, Takahashi M, Kanda K, Yokoi T, Furuya T, Kikkawa E, Omura Y, Abe K, Kamihara K, Katsuta N, Sato K, Tanikawa M, Yamazaki M, Ninomiya K, Ishibashi T, Yamashita H, Murakawa K, Fujimori K, Tanai H, Kimata M, Watanabe M, Hiraoka S, Chiba Y, Ishida S, Ono Y, Takiguchi S, Watanabe S, Yosida M, Hotuta T, Kusano J, Kanehori K, Takahashi-Fujii A, Hara H, Tanase TO, Nomura Y, Togiya S, Komai F, Hara R, Takeuchi K, Arita M, Imose N, Musashino K, Yuuki H, Oshima A, Sasaki N, Aotsuka S, Yoshikawa Y, Matsunawa H, Ichihara T, Shiohata N, Sano S, Moriya S, Momiyama H, Satoh N, Takami S, Terashima Y, Suzuki O, Nakagawa S, Senoh A, Mizoguchi H, Goto Y, Shimizu F, Wakebe H, Hishigaki H, Watanabe T, Sugiyama A, Takemoto M, Kawakami B, Yamazaki M, Watanabe K, Kumagai A, Itakura S, Fukuzumi Y, Fujimori Y, Komiyama M, Tashiro H, Tanigami A, Fujiwara T, Ono T, Yamada K, Fujii Y, Ozaki K, Hirao M, Ohmori Y, Kawabata A, Hikiji T, Kobatake N, Inagaki H, Ikema Y, Okamoto S, Okitani R, Kawakami T, Noguchi S, Itoh T, Shigeta K, Senba T, Matsumura K, Nakajima Y, Mizuno T, Morinaga M, Sasaki M, Togashi T, Oyama M, Hata H, Watanabe M, Komatsu T, Mizushima-Sugano J, Satoh T, Shirai Y, Takahashi Y, Nakagawa K, Okumura K, Nagase T, Nomura N, Kikuchi H, Masuho Y, Yamashita R, Nakai K, Yada T, Nakamura Y, Ohara O, Isogai T, Sugano S. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet* 2004; 36: 40-45
- 22 Schweiger S, Foerster J, Lehmann T, Suckow V, Muller YA, Walter G, Davies T, Porter H, van Bokhoven H, Lunt PW, Traub P, Ropers HH. The Opitz syndrome gene product, MID1, associates with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2794-2799
- 23 Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, Winter J, Krauss S, Ropers HH, Schneider R, Schweiger S. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet* 2001; 29: 287-294
- 24 Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem* 2006; 281: 8970-8980
- 25 Aranda-Orgillés B, Aigner J, Kunath M, Lurz R, Schneider R, Schweiger S. Active transport of the ubiquitin ligase MID1 along the microtubules is regulated by protein phosphatase 2A. *PLoS One* 2008; 3: e3507
- 26 Cox TC, Allen LR, Cox LL, Hopwood B, Goodwin B, Haan E, Suthers GK. New mutations in MID1 provide support for loss of function as the cause of X-linked Opitz syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2553-2562
- 27 Aranda-Orgillés B, Trockenbacher A, Winter J, Aigner J, Köhler A, Jastrzebska E, Stahl J, Müller EC, Otto A, Wanker EE, Schneider R, Schweiger S. The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Hum Genet* 2008; 123: 163-176
- 28 Lancioni A, Pizzo M, Fontanella B, Ferrentino R, Napolitano LM, De Leonibus E, Meroni G. Lack of Mid1, the mouse ortholog of the Opitz syndrome gene, causes abnormal development of the anterior cerebellar vermis. *J Neurosci* 2010; 30: 2880-2887
- 29 Mnayer L, Khuri S, Merheby HA, Meroni G, Elsas LJ. A structure-function study of MID1 mutations associated with a mild Opitz phenotype. *Mol Genet Metab* 2006; 87: 198-203
- 30 Ruiter M, Kamsteeg EJ, Meroni G, de Vries BB. A MID1 mutation associated with reduced penetrance of X-linked Opitz G/BBB syndrome. *Clin Dysmorphol* 2010; 19: 195-197
- 31 Alexander M, Selman G, Seetharaman A, Chan KK, D'Souza SA, Byrne AB, Roy PJ. MADD-2, a homolog of the Opitz syndrome protein MID1, regulates guidance to the midline through UNC-40 in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* 2010; 18: 961-972

编辑 张姗姗 电编 何基才

# IL-28B基因多态性-丙型肝炎个体化治疗的新起点

李沛元, 姚蓝, 郭波, 宋家武

李沛元, 宋家武, 中山大学附属第五医院消化内科 广东省珠海市 519000

姚蓝, 中山大学附属第五医院急诊科 广东省珠海市 519000  
郭波, 中山大学附属第五医院内分泌科 广东省珠海市 519000

李沛元, 2009年中山大学硕士, 主要从事病毒性肝炎的研究。

作者贡献分布: 本文综述由李沛元和姚蓝共同写作完成; 郭波协助文献查阅, 宋家武审核。

通讯作者: 宋家武, 副教授, 副主任医师, 519000, 广东省珠海市, 中山大学附属第五医院消化内科. songjw@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-16 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-15 在线出版日期: 2012-01-18

## Interleukin-28B gene polymorphisms: a new beginning of personalized treatment of hepatitis C

Pei-Yuan Li, Lao Yao, Bo Guo, Jia-Wu Song

Pei-Yuan Li, Jia-Wu Song, Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Lao Yao, Department of Emergency Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Bo Guo, Department of Endocrinology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jia-Wu Song, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China. songjw@mail.sysu.edu.cn

Received: 2011-10-16 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-15 Published online: 2012-01-18

## Abstract

It is well known that genetic diversity of individual hosts plays a significant role in the treatment of patients with chronic hepatitis C. From August 2009 to January 2010, four independent genome-wide association studies (GWAS) around the world have demonstrated that interleukin-28B (IL28B) gene polymorphisms are associated with antiviral treatment response to pegylated interferon and ribavirin combination therapy (PEG-IFN/RBV). Two single nucleotide polymorphisms (SNPs), rs8099917 and rs12979860, in the IL28B gene are most strongly associated with sustained virological response (SVR). This review aims to describe the association of IL28B genotypes with treatment response, natural

clearance of HCV, molecular epidemiology of HCV infection and some drug side effects. Current observations give us a hint that the era of personalized therapy based on IL28B genotypes may come in the near future.

**Key Words:** Hepatitis C virus; Interleukin-28B; Gene Polymorphism; Personalized therapy

Li PY, Yao L, Guo B, Song JW. Interleukin-28B gene polymorphisms: a new beginning of personalized treatment of hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 119-124

## 摘要

众所周知, 个体基因的差异在慢性丙型肝炎患者的治疗中有重要的影响. 2009-08/2010-01, 世界上4个独立的全基因组关联研究发现白介素28B的基因型与长效干扰素-利巴韦林的治疗效果相关联. 同时证实, rs8099917和rs12979860的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)与抗病毒治疗的持续病毒应答率(sustained virological response, SVR)联系最为密切. 本综述旨在阐述白介素28B多态性与丙型肝炎治疗效果、丙型肝炎病毒自发清除及分子流行病学特点、部分药物不良反应之间的联系. 这些研究提示我们, 在不久的将来, 一个以白介素28B基因型为基础的个体化治疗时代将会来到.

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 白介素28B; 基因多态性; 个体化治疗

李沛元, 姚蓝, 郭波, 宋家武. IL-28B基因多态性-丙型肝炎个体化治疗的新起点. *世界华人消化杂志* 2012; 20(2): 119-124

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/119.asp>

## 0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的感染已经成为一个世界性的卫生难题. 据1999年世界卫生组织对丙型肝炎所做的流行病学调查, 全球HCV的感染人口接近3%, 达到1.7亿人, 并且以每年300-400万的病例递增<sup>[1,2]</sup>, 约75%-80%的急性感染者发展为慢性肝炎, 经过10-20年的发

## ■背景资料

干扰素和利巴韦林联合治疗已经成为国际上抗丙型肝炎病毒的标准治疗方案, 提高患者的续病毒应答率并最终实现丙型肝炎抗病毒治疗的个体化医疗是当前丙型肝炎研究领域的热点.

## ■同行评议者

王怡, 主任医师, 天津市传染病医院, 天津市肝病研究所

## ■ 研发前沿

有研究表明,丙型肝炎抗病毒治疗过程中,宿主的个体差异与标准方案的抗病毒疗效联系紧密,近年的全基因关联研究证实白介素28B附近的单核苷酸多态性与持续病毒应答率相关。

展,至少20%的患者发展为肝硬化,是目前国际上慢性终末期肝病和肝癌的主要病因之一<sup>[3,4]</sup>。因此,及早发现并给予有效的抗丙型肝炎病毒治疗,是丙型肝炎现症患者治疗的关键。然而,国际标准治疗方案中的长效干扰素与利巴韦林联合治疗方案,尽管在丙型肝炎的治疗上取得了重大的成就,但对于未经仔细筛选的慢性丙型肝炎人群,特别是临床上最为常见的1型丙型肝炎患者,其持续病毒应答率(sustained virological response, SVR)只有40-50%,甚至20%的患者完全没有应答(null virological response, NVR)<sup>[5,6]</sup>。同时,由于标准的联合治疗方案价格昂贵(国内价格约6万元),出于经济的原因,使得医务人员和患者都难以对是否使用本方案进行取舍。此外,长期使用相关药物所带来的严重不良反应,如严重的骨髓抑制等,也是医务人员及患者必须考虑的重要因素之一<sup>[7,8]</sup>。所以,在重点寻找新的治疗药物和治疗方案的同时,如能在治疗前对现有的治疗效果进行判定,优化现有治疗方案,提高医患对长效干扰素与利巴韦林联合治疗方案的效果和信心,对于丙型肝炎的抗病毒治疗,亦具有非常重大的临床意义。

在长期的临床研究中,人们发现,丙型肝炎的治疗效果,除受病毒基因型<sup>[9,10]</sup>、干扰素种类的影响外<sup>[6]</sup>,患者个体的差异,对丙型肝炎治疗影响尤其突出<sup>[11]</sup>。在美国丙型肝炎感染最常见的1型HCV人群中,不同种族之间治疗效果的比较发现,亚裔美国人的持续病毒反应率要明显高于欧裔美国人<sup>[12,13]</sup>。同时有临床研究证实,在治疗过程中有20%左右的1型HCV感染者及5%左右的2型或者3型HCV感染者对长效干扰素与利巴韦林联合治疗方案完全没有应答<sup>[14,15]</sup>。流行病学上,亚洲丙型肝炎的感染率,明显低于欧美及非洲,这些均强烈提示种族和个体的遗传特性对丙型肝炎的治疗效果及流行有重要影响<sup>[16]</sup>。

## 1 IL28B基因多态性与1型HCV抗病毒疗效关系的发现

最新的研究证实,人体对抗丙型肝炎病毒治疗的持续病毒应答率,确实与IL28B的基因型别有密切关系。不仅如此,个体的基因型别也影响着丙型肝炎的流行病学分布特点,甚至HCV的自发清除及治疗所带来的毒副作用个体差异<sup>[17]</sup>。

2009-08/2010-01,世界上有4个独立的研究小组,各自在不同种族的丙型肝炎患者中进行全基因关联研究,证实IL28B区域附近存在与长

效干扰素 $\alpha$ 与利巴韦林标准方案疗效相关的单核苷酸多态位点。美国杜克大学Ge等报道,19号染色体上IL-28B基因上游3 kb的一个单核苷酸多态位点rs12979860,与1型丙型肝炎治疗的持续病毒反应率密切相关。研究表明,不管是在欧裔美国人中,还是在非裔美国人中,具有CC基因型的患者,标准方案治疗所带来的持续病毒反应率比少见的TT型别人群要高2倍左右。且种族的基因型别分布与治疗效果具有很好的一致性,这部分地解释了接受同样的治疗,不同种族之间的疗效差异,因为欧裔美国人中CC型别出现的频率比非裔美国人要高很多<sup>[18]</sup>。

澳大利亚悉尼大学的Suppiah等、日本名古屋城市大学Tanaka等以及瑞士伯尔尼大学Rauch等人通过在不同种族的丙型肝炎中所进行的全基因关联研究,一致证实了另1个与持续病毒反应率密切相关的单核苷酸多态位点的存在-rs8099917。在Suppiah等<sup>[19]</sup>的报道中,848例1型慢性丙型肝炎患者中,442例TT型别患者中持续病毒反应率高达55.9%,而在357例GT型别、49例GG型别中则分别只达到了36.4%和30.6%。Tanaka等<sup>[20]</sup>的研究则明确指出,相对于欧美人群,日本1型慢性病毒性肝炎患者单核苷酸多态位点rs8099917与持续病毒反应率具有更强的相关性,TT型别和GT型别患者的持续病毒反应率分别是63.8%、13.3%,而纯合子GG型别中患者完全没有持续病毒学反应。Ranch等<sup>[21]</sup>的研究进一步表明,无论是对于慢性丙型肝炎病毒感染的人群,还是对于丙型肝炎病毒-艾滋病毒混合感染的患者,在达到持续病毒反应或者自发性病毒清除人群中,TT型别的比率分别达到了78%和68%,而GT型别仅为21%和29%,而GG型别只有1%和3%。均强烈提示,GG型患者对于标准的抗病毒治疗方案疗效极差或完全无反应。

以上可见,一个以患者的基因型为基础的丙型肝炎个体化治疗时代已经来临<sup>[22-24]</sup>。为此,各国学者亦在此基础上,竞相开展了人体基因型别对丙型肝炎个体化治疗的诊断、治疗和预后影响的细致研究,以期达到通过早期的个体化基因型别的研究或诊断,指导丙型肝炎的治疗,获得更好的治疗效果,并将不良反应降至最低水平的目的,提高医患在治疗决策中的科学性以及决策的信心和决心<sup>[25-30]</sup>。而对于治疗效果预期欠佳患者,则等待新的更好的治疗方案进行治疗,减少不必要的经济负担及不良反应的危害,并将有效的治疗资源,用于更多更有效患者

的治疗<sup>[14,31-33]</sup>.

## 2 IL28B基因多态性的后续研究

2.1 IL28B基因多态性与非1型HCV治疗的相关性及临床意义 在rs12979860对治疗效果的预测作用如何方面, McCarthy等在对多人种的横向对比研究中证实, rs12979860 基因型别对1型丙型肝炎患者标准治疗方案的持续病毒反应率(SVR)具有独特的预测作用. 在对178例高加索裔美国人研究中, 68例为CC型患者, 42例达到了SVR, 而110例非CC型(CT/TT型)患者中, 仅有25例患者达到了SVR, 在对SVR的预测方面, CC型别对非CC型别优势比达到了5.79, 相对于其他影响抗病毒疗效的各种因素, 如性别, 感染的型别, rs12979860基因型别是其中最强的一个预测指标, 其优势比高达7.88, 且rs12979860 CC型别对标准方案SVR预测的特异性及敏感性分别达到了78%和65%, 说明rs12979860型别是预测1型HCV患者标准方案疗效的非常重要的独立指标<sup>[34]</sup>. Sarrazin等人的研究则进一步证实了该位点的多态性对非1型慢性丙型肝炎患者标准方案的疗效具有同样的预测作用, 特别是对具有早期病毒学反应(rapid virological response, RVR)的这部分患者的最终疗效的预测<sup>[35-39]</sup>.

所以, 在慢性丙型肝炎的治疗过程中, 对于携带rs12979860 CC型别患者, 即使没有达到早期病毒学反应, 也应建议其接受抗病毒治疗, 因为这部分患者有仍有65%的可能性获得SVR<sup>[40-43]</sup>. 同时, 对于这部分患者也不应该再过多去考虑成本-效益比, 而应鼓励他们度过当前面临的各种难关, 如抗病毒治疗所带来的不良反应等, 积极地接受当前标准方案的治疗. 反之, 对于非rs12979860 CC型别患者, 其抗病毒治疗所带来的SVR明显低于CC型患者, 而这部分患者最终SVR的提高很大程度上依赖将来问世的各种抗丙型肝炎病毒新药<sup>[17-19]</sup>. 所以对于这部分患者, 比较明智的做法是暂时推迟抗病毒治疗, 等待新的治疗方法的出现. 目前对rs12979860型别是否能改变当前标准方案抗病毒治疗疗程仍未可知, 仍需将来更多的临床对照试验来验证.

而对于rs8099917基因型别, Kurosaki等的研究表明, 相对于其他与1型HCV患者抗病毒方案疗效相关的因素, 如年龄, HCV-RNA水平等, rs8099917基因型别对持续病毒反应及无病毒反应(NVR)的预测最为重要. 他们的研究发现, 常见的rs8099917 TT基因型与SVR密切相关, 其

优势比达到了6.21, 95%的置信区间达到3.75-10.31, 在该研究所涉及的345例TT型别患者中, SVR达到了50%, NVR仅为12%, 而5例GG型患者中, SVR则为0%, NVR则高达80%, 而146例GT型别的SVR及NVR则介于TT型别与GG型别之间, 这充分说明rs8099917基因型别可以作为预测1型HCV患者标准方案抗病毒治疗的另一个指标, 特别是对于NVR的预测<sup>[44]</sup>. 有研究进一步证实, rs8099917对其他非1型HCV患者联合治疗方案疗效同样具有预测作用<sup>[45,46]</sup>. 其中rs8099917 TT型别患者的SVR要高于非TT型别患者(SVR为76% vs 51%), 特别是对于其中的2a型HCV患者, 经单变量分析可知rs8099917 TT型别可以作为一个预测持续病毒反应的独立指标<sup>[47]</sup>.

因此, 未来慢性丙型肝炎病人的治疗, 将进入一个个体化治疗的新时代, 通过检测IL28B型别(rs12979860和rs8099917)为基础, 结合丙型肝炎的基因分型以及其他临床特点(如肝纤维化、病毒的负荷数、年龄等), 以帮助临床决策, 获得最佳的抗病毒治疗效果.

2.2 IL28B基因多态性对HCV感染转归、流行病学、治疗不良反应的影响 除上述对治疗效果的预测作用外, IL28B基因型别还与HCV感染流行特点、HCV的自发清除率、标准治疗相关的不良反应也存在着一定的关联. Montes-Cano等所进行的一项涉及731例西班牙人研究中发现, HCV慢性感染的284例患者中, 非1型HCV患者中, rs12979860 CC型别的概率明显高于1型患者(66.7% vs 39.1%)<sup>[48]</sup>, CC型的非1型HCV感染率显著高于其他基因型的患者. Thomas等的研究表明, 无论是欧洲还是非洲人群中, rs12979860 CC型别的患者发生的病毒自发清除率, 要远远高于非CC型患者(欧洲人80.3% vs 66.7%; 非洲人56.2% vs 37.0%)<sup>[11,49-51]</sup>. 此外, hLotrich等的研究还发现, rs12979860 TT型别患者食欲不振、乏力等常见不良反应的发生率明显低于非TT型患者, 其严重不良反应发生率仅为3.1%, 而在C/T型、CC型患者中则分别达到了10.1%、8.9%<sup>[52]</sup>. 因此, IL28B基因型别不仅与SVR存在着很大的相关性, 而且在一定程度上也与HCV感染的流行病学分布、自发清除及治疗中所带来的各种副作用相关.

## 3 结论

目前已有多个全基因关联研究证实, IL-28B基因区域附近的SNPs rs8099917和rs12979860基因型

### ■ 相关报道

2009-08/2010-01, 美国学者Ge等主持的4个独立研究小组, 通过多人种、多中心、全基因关联研究发现, 白介素28B附近的rs12979860和rs8099917两个位点多态性与持续病毒应答率联系最为紧密.

### ■创新盘点

对当前国际最新研究成果中与持续病毒应答率关系最为密切的两个基因多态位点进行综述,并对这两个位点对丙型肝炎病毒的自发清除、丙型肝炎的流行病学特点及抗病毒药物不良反应的影响进行了总结。

别与当前标准方案抗病毒疗效密切相关。通过该位点基因型别的检测,可以达到对丙型肝炎标准方案疗效的预测,从而对不同型别的患者采取区别对待及治疗的原则,从而改变当前丙型肝炎治疗策略,提高整个丙型肝炎诊疗水平。因此,2011年欧洲肝脏病学会的HCV感染防治指南已将IL-28基因多态性,与HCV基因型、肝纤维化分期一起作为基线预测SVR的最主要因素之一<sup>[53]</sup>。

### 4 参考文献

- 1 Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S21-S29
- 2 Ray Kim W. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes Infect* 2002; 4: 1219-1225
- 3 Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 448-458
- 4 Thomas DL, Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 383-398, vi
- 5 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-965
- 6 Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Watahiki S, Sato J, Matsuda M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology* 2005; 48: 372-380
- 7 Fried MW. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology* 2002; 36: S237-S244
- 8 Maddock C, Landau S, Barry K, Maulayah P, Hotopf M, Cleare AJ, Norris S, Pariante CM. Psychopathological symptoms during interferon-alpha and ribavirin treatment: effects on virologic response. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 332-333
- 9 Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S121-S127
- 10 Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S, Gadano A, Zein N, Lai CL, Pawlotsky JM, Heathcote EJ, Dusheiko G, Marcellin P. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int* 2010; 30: 342-355
- 11 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 975-982
- 12 Yan KK, Guirgis M, Dinh T, George J, Dev A, Lee A, Zekry A. Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3416-3420
- 13 Liu CH, Liu CJ, Lin CL, Liang CC, Hsu SJ, Yang SS, Hsu CS, Tseng TC, Wang CC, Lai MY, Chen JH, Chen PJ, Chen DS, Kao JH. Pegylated interferon-

alpha-2a plus ribavirin for treatment-naive Asian patients with hepatitis C virus genotype 1 infection: a multicenter, randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1260-1269

- 14 Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S, Komatsu M, Tanaka N, Umemura T, Ichijo T, Yoshizawa K, Kiyosawa K, Tanaka E. Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors. *Hepatology* 2008; 48: 1753-1760
- 15 Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol* 2007; 46: 403-410
- 16 Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29 Suppl 1: 74-81
- 17 Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801
- 18 Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399-401
- 19 Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100-1104
- 20 Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105-1109
- 21 Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battagay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 1338-1345
- 22 Iadonato SP, Katze MG. Genomics: Hepatitis C virus gets personal. *Nature* 2009; 461: 357-358
- 23 Imazeki F, Yokosuka O, Omata M. Impact of IL-28B SNPs on control of hepatitis C virus infection: a genome-wide association study. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 497-499

- 24 Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 38-45
- 25 Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut* 2011; 60: 261-267
- 26 Labie D, Gilgenkrantz H. [IL28 (interferon lambda3) gene polymorphisms and response to IFN-alpha treatment in patients infected with hepatitis virus C]. *Med Sci (Paris)* 2010; 26: 225-226
- 27 Lindh M, Lagging M, Norkrans G, Hellstrand K. A model explaining the correlations between IL28B-related genotypes, hepatitis C virus genotypes, and viral RNA levels. *Gastroenterology* 2010; 139: 1794-1796
- 28 Nakamoto S, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Arai M, Fujiwara K, Yokosuka O. Simple assay based on restriction fragment length polymorphism associated with IL28B in chronic hepatitis C patients. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 955-961
- 29 Wapner J. Pharmacogenomics. Gene variants affect hepatitis C treatment, but link is elusive. *Science* 2010; 330: 579
- 30 Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. Genetic variation in IL28B: impact on drug development for chronic hepatitis C infection. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 88: 708-711
- 31 Chung RT. Reaping the early harvest of the genomics revolution. *Gastroenterology* 2010; 138: 1653-1654
- 32 Thio CL, Thomas DL. Interleukin-28b: a key piece of the hepatitis C virus recovery puzzle. *Gastroenterology* 2010; 138: 1240-1243
- 33 Moradpour D, Dorta G. [Hepatitis C at a crossroads]. *Rev Med Suisse* 2010; 6: 163-164
- 34 McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, Tillmann HL, Muir AJ, McHutchison JG. Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 2010; 138: 2307-2314
- 35 Sarrazin C, Susser S, Doehring A, Lange CM, Müller T, Schlecker C, Herrmann E, Löttsch J, Berg T. Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *J Hepatol* 2011; 54: 415-421
- 36 Medrano J, Neukam K, Rallón N, Rivero A, Resino S, Naggie S, Caruz A, Calvino A, Macías J, Benito JM, Sánchez-Piedra C, Vispo E, Barreiro P, McHutchison J, Pineda JA, Soriano V. Modeling the probability of sustained virological response to therapy with pegylated interferon plus ribavirin in patients coinfecting with hepatitis C virus and HIV. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1209-1216
- 37 Pineda JA, Caruz A, Rivero A, Neukam K, Salas I, Camacho A, Palomares JC, Mira JA, Martínez A, Roldán C, de la Torre J, Macías J. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL28B gene variation in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 788-795
- 38 Rallón NI, Naggie S, Benito JM, Medrano J, Restrepo C, Goldstein D, Shianna KV, Vispo E, Thompson A, McHutchison J, Soriano V. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 2010; 24: F23-F29
- 39 Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K, Shianna KV, Mottola L, Petruzzellis D, Bacca D, Carretta V, Minerva N, Goldstein DB, McHutchison JG. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology* 2010; 139: 821-827, 827.e1
- 40 Dela Cruz AC, Engelson E, Ionescu G, Dubrovskaya V, Kotler D. Hepatitis C treatment in an urban population. *Hepatology* 2010; 52: 1524-1525
- 41 Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010; 139: 120-129.e18
- 42 Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, Fellay J, Schuppan D, Cronin KD, Hong L, McKenzie A, Patel K, Shianna KV, McHutchison JG, Goldstein DB, Afdhal N. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 52: 1888-1896
- 43 Lange CM, Moradpour D, Doehring A, Lehr HA, Müllhaupt B, Bibert S, Bochud PY, Antonino AT, Pascual M, Farnik H, Shi Y, Bechstein WO, Moench C, Hansmann ML, Sarrazin C, Löttsch J, Zeuzem S, Hofmann WP. Impact of donor and recipient IL28B rs12979860 genotypes on hepatitis C virus liver graft reinfection. *J Hepatol* 2011; 55: 322-327
- 44 Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pretreatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 2011; 54: 439-448
- 45 Aparicio E, Parera M, Franco S, Pérez-Alvarez N, Tural C, Clotet B, Martínez MA. IL28B SNP rs8099917 is strongly associated with pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy treatment failure in HCV/HIV-1 coinfecting patients. *PLoS One* 2010; 5: e13771
- 46 Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 139: 1577-1585
- 47 Kawaoka T, Hayes CN, Ohishi W, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Tsuge M, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Tsunoda T, Nakamura

**■应用要点**  
 在开始标准抗病毒治疗方案之前,通过检测患者的基因特性,从而对抗病毒治疗方案效果及不良反应进行预测,实现丙型肝炎的个体化医疗,去除治疗无效人群,将有限的医疗资源应用于更需要的人群,同时,对治疗效果较好的人群,坚定治疗信心,及早决策进行治疗。

### ■同行评价

该文将国际上有关丙型肝炎治疗最新重大进展,及时介绍给国内同行,观点新颖;由于丙型肝炎个体化医疗,临床意义重大,及时普及及开展相应的个体化治疗,社会和经济学意义重大。

- Y, Kumada H, Chayama K. Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b. *J Hepatol* 2011; 54: 408-414
- 48 Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gómez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology* 2010; 52: 33-37
- 49 Clausen LN, Weis N, Astvad K, Schønning K, Fenger M, Krarup H, Bukh J, Benfield T. Interleukin-28B polymorphisms are associated with hepatitis C virus clearance and viral load in a HIV-1-infected cohort. *J Viral Hepat* 2011; 18: e66-e74
- 50 Grebely J, Petoumenos K, Hellard M, Matthews GV, Suppiah V, Applegate T, Yeung B, Marks P, Rawlinson W, Lloyd AR, Booth D, Kaldor JM, George J, Dore GJ. Potential role for interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010; 52: 1216-1224
- 51 Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, Wiese M, Tenckhoff H, Nischalke HD, Lokhnygina Y, Kullig U, Göbel U, Capka E, Wiegand J, Schiefke I, Gütthoff W, Grüngreiff K, König I, Spengler U, McCarthy J, Shianna KV, Goldstein DB, McHutchison JG, Timm J, Nattermann J. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology* 2010; 139: 1586-1592, 1592.e1
- 52 Lotrich FE, Loftis JM, Ferrell RE, Rabinovitz M, Hauser P. IL28B Polymorphism Is Associated with Both Side Effects and Clearance of Hepatitis C During Interferon-Alpha Therapy. *J Interferon Cytokine Res* 2010 Dec 6. [Epub ahead of print]
- 53 EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2011; 55: 245-264

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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.

# 慢性戊型肝炎的研究进展

耿彦生, 周艳, 王佑春

耿彦生, 河北大学医学部 河北省保定市 071000  
周艳, 王佑春, 中国食品药品检定研究院细胞室 北京市 100050  
耿彦生, 博士, 副教授, 主要研究方向是病毒学。  
作者贡献分布: 本文综述由耿彦生和周艳完成; 王佑春审核。  
通讯作者: 王佑春, 研究员, 100050, 北京市天坛西里2号, 中国食品药品检定研究院。 wychun3@yahoo.com  
电话: 0312-5078526  
收稿日期: 2011-11-04 修回日期: 2011-12-14  
接受日期: 2011-12-23 在线出版日期: 2012-01-18

## Progress in research of chronic hepatitis E

Yan-Sheng Geng, Yan Zhou, You-Chun Wang

Yan-Sheng Geng, Health Science Center, Hebei University, Baoding 071000, Hebei Province, China  
Yan Zhou, You-Chun Wang, Department of Cellular Biology, National Institutes of Food and Drug Control, Beijing 100050, China  
Correspondence to: You-Chun Wang, Researcher, National Institutes of Food and Drug Control, No.2 Tiantanxili, Beijing 100050, China. wychun3@yahoo.com  
Received: 2011-11-04 Revised: 2011-12-14  
Accepted: 2011-12-23 Published online: 2012-01-18

### Abstract

Hepatitis E caused by hepatitis E virus (HEV) has long been considered as an acute self-limiting disease. But in recent years, cases which progress to chronic liver disease mainly in immunocompromised patients have been detected, such as organ transplant recipients and patients with human immunodeficiency virus infection. Studies indicate that chronic HEV hepatitis may result in cirrhosis and end-stage liver disease. Since clearance of the virus depends on the development of specific immunity, lowering the immunosuppressive medication is generally recommended. Ribavirin, interferon-alpha-2a and interferon-alpha-2b were found to be effective in patients with chronic HEV infection.

**Key Words:** Hepatitis E virus; Chronic hepatitis E; Persistent infection; Organ transplantation; Human immunodeficiency virus infection

Geng YS, Zhou Y, Wang YC. Progress in research of chronic hepatitis E. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 125-130

### 摘要

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)引起的戊型肝炎一直被认为是一种急性自限性感染过程, 然而最近发现, 器官移植、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者等免疫力低下的患者感染HEV能够发展为慢性戊型肝炎。有些慢性戊型肝炎病例肝脏快速纤维化而出现肝硬化, 并最终导致肝脏衰竭。患者免疫抑制作用减弱, 免疫功能恢复有助于体内持续存在的HEV清除。研究发现 $\alpha$ 干扰素和利巴韦林对治疗慢性戊型肝炎有效。

**关键词:** 戊型肝炎病毒; 慢性戊型肝炎; 持续性感染; 器官移植; 人类免疫缺陷病毒感染

耿彦生, 周艳, 王佑春. 慢性戊型肝炎的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 125-130

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/125.asp>

### 0 引言

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)属于戊型肝炎病毒科、戊型肝炎病毒属, 病毒体为小球型颗粒, 无包膜; 其基因组为单股、正链RNA, 长约7.2 kb<sup>[1-3]</sup>。HEV既能感染人也能感染一些动物, 哺乳动物HEV主要有4个基因型: 基因1型和2型HEV只感染人类, 主要分布在亚洲、非洲等经济条件比较差的地区, 通过污染水源能够引起戊型肝炎的大流行; 基因3型和4型HEV能够感染人和猪等动物, 全球均有分布, 主要引起散发病例<sup>[4-6]</sup>。HEV的主要传播途径为粪-口途径, 但与动物密切接触<sup>[7,8]</sup>、生食肉类<sup>[9-11]</sup>以及输血等<sup>[12-14]</sup>也能引起感染。HEV感染引起的疾病即为戊型肝炎。急性戊型肝炎的临床表现通常与甲型肝炎类似, 潜伏期为15-60 d, 平均40 d左右; 发病后1 wk左右血清中能够检测到HEV RNA, 3-4 wk后HEV RNA消失; 粪便中HEV RNA的出现和消失都稍晚于血清, 持续时间2-3 wk; 发病后转氨酶水平升高, 一般3 wk左右恢复正常<sup>[15,16]</sup>。孕妇和有肝脏疾病者如果感染HEV有可能引发重症肝炎(fulminant hepatitis), 病死率高<sup>[17-19]</sup>。长期以来戊型肝炎一直被认为是一种急性发病过

### ■背景资料

戊型肝炎由戊型肝炎病毒(HEV)感染引起, 通常为急性发病过程, 其临床表现与甲型肝炎类似。长期以来一直认为戊型肝炎不形成慢性感染。然而, 最近研究发现器官移植患者、HIV感染者等免疫力低下的人群感染HEV后能够形成持续性感染和慢性肝炎, 并能进一步发展为肝硬化。

### ■同行评议者

胡国信, 副教授, 副主任医师, 南昌大学第一附属医院感染内科

## ■ 研发前沿

目前慢性戊型肝炎的病例报道主要来自欧洲,我国有关慢性戊型肝炎的情况还不清楚。

程,不形成慢性感染<sup>[4]</sup>。然而,最近发现器官移植患者、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者等免疫力低下的人群感染HEV后能够形成持续性感染和慢性肝炎,并能进一步发展为肝硬化。在本文中,我们对慢性戊型肝炎的研究进展进行了综述。

## 1 器官移植与慢性戊型肝炎

2008年Kamar等<sup>[20]</sup>首先报告了慢性戊型肝炎的病例,他们对接受肝、肾、胰腺等器官移植的217名患者进行了HEV感染情况的调查,其中14位患者转氨酶升高,血清HEV RNA阳性,并能够排除HAV、HBV、HCV等病毒的感染;对这14位患者进行追踪观察,其中8位患者血清中HEV RNA持续阳性超过6 mo,同时转氨酶水平持续高于正常值,患者肝脏呈现慢性肝炎的组织学特征,因此认定这些患者由急性戊型肝炎发展成了慢性戊型肝炎。此后又不断有接受器官移植者合并慢性戊型肝炎的病例报告<sup>[21-24]</sup>。研究认为接受器官移植患者的HEV感染率并不比其他人群高,但是感染之后容易形成慢性感染<sup>[25]</sup>。一项回顾性研究显示,接受器官移植者合并HEV感染的患者,60%以上发展成了慢性戊型肝炎<sup>[26]</sup>。

实体器官移植患者合并慢性戊型肝炎的一个重要特征是肝纤维化发展迅速,肝硬化形成时间短,一般少于3年<sup>[27-29]</sup>。在一项研究中,2例器官移植前未曾感染HEV的患者,其中1例在进行胰肾移植60 mo后患急性戊型肝炎,此后患者转氨酶等持续异常,血清中能持续检测到HEV RNA,急性阶段后20 mo患者出现肝硬化,表现为腹水和门静脉高压;而另1位肾脏移植者在36 mo后患急性肝炎,此后血清和粪便中能持续检测到HEV RNA,38 mo后患者形成了肝硬化<sup>[27]</sup>。

慢性戊型肝炎有可能导致肝脏移植的失败。一项回顾性研究报道了2例肝移植患者合并肝慢性感染戊型肝炎的情况:其中1个患者首次肝脏移植后3 wk,血清中检测到基因3型HEV RNA,并且肝组织中HEV RNA持续阳性,2 mo后形成慢性活动性肝炎,又进一步发展成肝硬化,7年后患者需要再次进行肝脏移植;另1位患者在肝脏移植后也发展成了慢性感染,5年后需要再次进行肝脏移植,而在慢性肝炎期间,直到再次进行肝脏移植,体内能够持续检测到基因3型HEV RNA<sup>[24]</sup>。

器官移植者容易形成慢性戊型肝炎的主要原因,可能是由于长期应用免疫抑制剂,致使

机体免疫功能降低,HEV感染后不能被及时清除。研究显示,慢性HEV感染者体内CD4+细胞数量明显少于HEV急性患者<sup>[20]</sup>,表明机体的免疫状况与慢性戊型肝炎的形成有关。一项前瞻性研究中,器官移植前HEV抗体阴性的601例患者,在接受器官移植后34例发生HEV感染,感染时间的中位数为15 mo,这34例感染者中,16例(47%)发展为慢性感染;与此相对照,99例HEV抗体阳性的患者接受器官移植后均没有HEV感染<sup>[30]</sup>。这说明接受器官移植之前HEV IgG抗体阳性的患者不容易感染HEV;若HEV IgG抗体阴性,则容易感染HEV,并有可能进一步发展为慢性感染<sup>[30]</sup>。

目前尚不能确定免疫抑制引起的HEV持续性感染是否为一种普遍现象。但研究显示,除了实体器官移植容易形成HEV持续感染,其他使用免疫抑制剂的患者也容易形成HEV持续性感染。接受化疗的1位T淋巴细胞癌患者在输血后感染了HEV,追踪观察6 mo血清中HEV RNA持续阳性,然而HEV抗体为阴性,这种HEV持续感染的形成可能是由于淋巴细胞癌变以及化学药物的应用,从而使抗HEV特异性抗体的产生受到影响,以至于HEV无法被清除<sup>[31]</sup>。另据报道,1名急性淋巴细胞白血病患者,曾患急性戊型肝炎已经恢复,但在接受同种异体干细胞移植14 wk后,体内重新出现HEV RNA,核苷酸序列与先前急性感染的HEV相同,表明第一次感染后体内已经无法检出的少量存在的病毒又重新被激活,可能是由于应用免疫抑制剂的原因<sup>[32]</sup>。

接受器官移植合并慢性戊型肝炎的患者容易导致肝硬化和终末期肝病<sup>[25,27]</sup>。然而,症状比较轻微的一部分患者在免疫抑制解除之后能够通过机体自身免疫力的恢复,经过数年自行清除病毒<sup>[33]</sup>。

## 2 HIV感染与慢性戊型肝炎

HIV合并HEV感染也能形成HEV的持续性感染,并有可能形成慢性活动性肝炎。Dalton等<sup>[34]</sup>首先报告了1例HIV合并HEV感染,疑似形成了慢性戊型肝炎的病例:男性患者在确诊为HIV感染6年后出现艾滋病症状并开始应用抗逆转录病毒药物进行治疗,在治疗期间发现其转氨酶水平逐渐升高并持续异常,HEV抗体转为阳性,并且血清和粪便标本中能够检测到HEV RNA,表明感染了HEV。此后对其进行了18 mo的追踪观察,血清和粪便中一直能检测到HEV RNA,转氨酶

水平持续异常, 而血液中CD4+细胞持续小于200 cells/mm<sup>3</sup>.

在瑞典对原因不明的转氨酶升高的HIV感染者进行的一项回顾性定群研究中, 发现HEV RNA能够在CD4+细胞低的患者体内持续存在, 有1例患者HEV RNA在体内持续存在超过了24 mo, 当其由于抗病毒治疗使CD4+ T细胞数量回升超过100 cells/mm<sup>3</sup>后, HEV RNA被清除, 转氨酶水平也恢复了正常<sup>[35]</sup>. 然而这位患者血清中抗HEV IgG抗体的却是在HEV RNA出现后的12 mo才由阴性转为阳性, 分析其原因, 可能是由于HIV感染, CD4+ T细胞数降低, 影响了免疫反应, 使HEV抗体产生时间延迟、产生水平降低<sup>[35]</sup>.

到目前为止, 艾滋病病毒感染合并戊型肝炎病毒感染的病例报告只有几例<sup>[34-36]</sup>, 而临床实际存在的这样一些病例可能会因为下列一些原因容易漏诊. 第一, 由于HIV感染者使用抗逆转录病毒药物经常会引起肝脏损伤, HEV感染引起急、慢性肝炎时, 有可能被误诊为药物引起的肝脏损伤<sup>[37]</sup>. 因此, 有学者建议原因不明的慢性转氨酶升高的HIV感染者都应该进行HEV感染的检测<sup>[38]</sup>. 第二, 由于HIV感染者CD4+ T细胞减少, 特异性抗体的产生会受到影响, 应用血清学方法检测抗HEV抗体对HEV感染进行诊断并不可靠<sup>[35]</sup>. 通过PCR检测HEV RNA是诊断HEV感染的必要手段. 然而, 由于抗逆转录病毒药物的应用, HEV的复制转录很可能也会受到影响, 而使患者血清中HEV浓度降低, PCR检测结果受到影响, 在这种情况下, HEV感染也容易被忽略.

HIV感染者中HEV的感染率、慢性感染形成的情况和对患者整个病程的影响作用, 以及HIV感染者中HEV持续性感染的流行病学意义等尚需进一步研究<sup>[34]</sup>.

### 3 慢性戊型肝炎的诊断

急性戊型肝炎的诊断比较常用的方法是通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中的抗HEV IgM, 一般当患者出现症状而初次就诊时, 抗HEV IgM已经能够检出; 也可以通过巢式RT-PCR或real-time PCR检测血清中或粪便标本中的HEV RNA进行诊断<sup>[3]</sup>.

然而, HEV慢性感染都发生在免疫抑制患者, 例如上述使用免疫抑制剂的器官移植者、CD4+ T细胞数量很低的艾滋病患者等. 由于患者免疫力低下, 抗体的产生受到影响, 有些患者体

内虽然能检测到HEV RNA, 但检测不到抗HEV抗体. 这样, 通过血清学方法检测抗HEV抗体进行HEV感染的诊断不容易实现. 因此, 判定HEV持续性感染需要通过PCR检测血浆或粪便中的HEV RNA<sup>[39,40]</sup>. 一般慢性持续性HEV感染是指HEV RNA在血液中持续存在6 mo以上; 而慢性戊型肝炎是指HEV RNA在体内持续存在, 患者转氨酶水平持续高于正常水平或者有肝脏组织学的变化<sup>[20]</sup>.

### 4 慢性戊型肝炎的治疗和预防

由于HEV持续性感染的形成与机体免疫力低下有关, 因此机体免疫力的恢复与提高有助于病毒的清除<sup>[41]</sup>. 例如, 应用免疫抑制药物他克莫司(Tacrolimus)容易形成慢性感染, 当降低药物的使用剂量时, 部分患者能够清除病毒使感染终止<sup>[26]</sup>. AIDS患者应用抗逆转录病毒治疗后, 随着血液中CD4+ T细胞数量增加, 体内持续性感染的HEV能够被清除<sup>[35]</sup>. 由于HEV IgG抗体阳性的患者能避免感染HEV, 患者在器官移植前进行疫苗接种可能是预防形成HEV慢性感染的有效方法. HEV疫苗尚在研制中<sup>[42,43]</sup>. 目前临床上还没有治疗慢性戊型肝炎的具体治疗方案, 但研究显示 $\alpha$ 干扰素和三氮唑核苷清除HEV的效果比较好.

$\alpha$ 干扰素是已知的强效免疫刺激剂, 是治疗慢性乙型肝炎和丙型肝炎的常用药物. 用聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2a以每周135 mg的剂量对肾移植合并慢性戊型肝炎的患者进行治疗, 疗程为3 mo, 治疗3 wk后患者血清 HEV RNA 转为阴性, 停药后6 mo时HEV RNA仍为阴性, 这表明聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2a能有效抑制HEV的复制, 并产生了持续性病毒应答<sup>[44]</sup>. 在另外一项研究中, 应用聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2a对3个肝移植患者合并慢性活动性HEV感染治疗3 mo, 其中2个患者病毒应答持续5-6 mo, 但另1个患者HEV在停药后HEV感染复发<sup>[45]</sup>. 因此, 聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2a治疗慢性戊型肝炎的使用剂量、治疗周期等还需要进一步观察研究. 聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2b也能有效清除持续存在于体内的HEV, 用干扰素 $\alpha$ -2b对肝移植合并慢性戊型肝炎的患者进行治疗, 剂量为100-60  $\mu$ g/wk, 治疗4 wk后2名患者HEV载量分别降低2-log和3-log, 经过16-20 wk的治疗患者血清中就检测不到HEV RNA了, 血清中的转氨酶及肝脏各项检测指标逐渐恢复恢复正常<sup>[33]</sup>. 使外周血白细胞和血小板减少是 $\alpha$ 干扰素的主要

#### ■创新盘点

本文对各种不同的慢性戊型肝炎病例进行了分析, 并对慢性戊型肝炎诊断以及治疗的研究进展进行了综述.

### ■应用要点

本文对慢性戊型肝炎的临床诊断和治疗具有一定指导意义。

不良反应, 当患者出现此类不良反应时, 应适当减少 $\alpha$ 干扰素的使用剂量<sup>[33]</sup>。

利巴韦林(ribavirin), 又名三唑核苷、病毒唑, 具有广谱抗病毒作用, 广泛应用于病毒性疾病的防治, 也是治疗乙型肝炎和丙型肝炎的有效药物。研究表明, 利巴韦林能够抑制体内HEV的复制增殖。1名接受心脏移植后患慢性戊型肝炎的患者, 以17 mg/(kg·d)的剂量, 连续3 mo口服利巴韦林, 治疗1 mo后, 血清中HEV RNA无法检出, 2 mo后粪便中HEV RNA也无法检出, 治疗结束时肝脏的各项指标恢复到正常值范围内<sup>[46]</sup>。在另一项研究, 1个接受肾脏和胰腺移植的患者以及1个原发性CD4+淋巴细胞减少症患者合并HEV慢性感染, 按照12 mg/(kg·d)的剂量口服利巴韦林12 wk, 开始治疗后2 wk患者肝功能检测都恢复正常, 4 wk后血清中检测不到HEV RNA, 2-3 mo后患者血液和粪便中HEV RNA均消失<sup>[47]</sup>。上述2例报告表明, 12-17 mg/(kg·d)的剂量, 治疗3 mo左右, 慢性戊型肝炎体内HEV能够被有效抑制, 肝脏功能恢复。然而, 在另一项研究中, 接受肾脏移植合并慢性戊型肝炎感染的6例患者, 用利巴韦林以600-800 mg/d的剂量治疗3 mo, 所有患者HEV RNA均不能检出, 转氨酶水平达到正常, 但是其中的2位患者在治疗结束后有出现了HEV感染复发<sup>[48]</sup>。由于不能确定HEV是否被完全清除, 因此治疗结束后还需要进行跟踪观察。利巴韦林所导致的主要不良反应为贫血。

## 5 结论

目前慢性戊型肝炎的病例报告主要来自欧洲, 我国有关慢性戊型肝炎的情况还不清楚。但由于我国是戊型肝炎的流行区, 发病率比较高, 处于免疫抑制状态的患者感染HEV的机会可能比欧洲国家更高, 因此这类患者如果出现不明原因的转氨酶升高肝炎症状, 应该进行HEV的检测, 若确定为HEV感染应及时进行治疗, 以免形成慢性感染。

## 6 参考文献

- 1 Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991; 185: 120-131
- 2 Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol* 2006; 16: 5-36
- 3 Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* 2011; 161: 47-58
- 4 Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging

awareness of an old disease. *J Hepatol* 2008; 48: 494-503

- 5 Meng XJ. Recent advances in Hepatitis E virus. *J Viral Hepat* 2010; 17: 153-161
- 6 Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 2010; 140: 256-265
- 7 Christensen PB, Engle RE, Hjort C, Homburg KM, Vach W, Georgsen J, Purcell RH. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 1026-1031
- 8 Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, Emerson SU, Purcell RH. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 117-122
- 9 Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1958-1960
- 10 Tei S, Kitajima N, Takahashi K, Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 2003; 362: 371-373
- 11 Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Sasaki N, Gotanda Y, Okamoto H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol* 2003; 84: 2351-2357
- 12 Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, Teo CG. Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med* 2006; 16: 79-83
- 13 Colson P, Coze C, Gallian P, Henry M, De Micco P, Tamalet C. Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 648-649
- 14 Mansuy JM, Huynh A, Abravanel F, Recher C, Peron JM, Izopet J. Molecular evidence of patient-to-patient transmission of hepatitis E virus in a hematology ward. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 373-374
- 15 Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol* 2008; 80: 646-658
- 16 Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 49-56
- 17 Dalton HR, Thuraiajah PH, Fellows HJ, Hussaini HS, Mitchell J, Bendall R, Banks M, Ijaz S, Teo CG, Levine DF. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J Viral Hepat* 2007; 14: 304-309
- 18 Péron JM, Bureau C, Poirson H, Mansuy JM, Alric L, Selves J, Dupuis E, Izopet J, Vinel JP. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J Viral Hepat* 2007; 14: 298-303
- 19 Mateos Lindemann ML, Morales JG, Fernández-Barredo S, Domínguez MR, García de la Hoz F, Halfon P, Pérez Gracia MT. Fulminant hepatitis E in a woman taking oral contraceptive medication. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 12-15
- 20 Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Péron

- JM, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel JP, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008; 358: 811-817
- 21 Gérolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med* 2008; 358: 859-860
- 22 Gérolami R, Moal V, Picard C, Colson P. Hepatitis E virus as an emerging cause of chronic liver disease in organ transplant recipients. *J Hepatol* 2009; 50: 622-624
- 23 Pischke S, Wedemeyer H. Chronic hepatitis E in liver transplant recipients: a significant clinical problem? *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010; 56: 121-128
- 24 Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JH, Koopmans MP. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2008; 14: 547-553
- 25 Haagsma EB, Niesters HG, van den Berg AP, Riezebos-Brilman A, Porte RJ, Vennema H, Reimerink JH, Koopmans MP. Prevalence of hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2009; 15: 1225-1228
- 26 Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, Dumortier J, Cannesson A, Cassuto-Viguier E, Thervet E, Conti F, Lebray P, Dalton HR, Santella R, Kanaan N, Essig M, Mousson C, Radenne S, Roque-Afonso AM, Izopet J, Rostaing L. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology* 2011; 140: 1481-1489
- 27 Kamar N, Mansuy JM, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M, Ota P, Esposito L, Durand D, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am J Transplant* 2008; 8: 1744-1748
- 28 Radha Krishna Y, Saraswat VA, Das K, Himanshu G, Yachha SK, Aggarwal R, Choudhuri G. Clinical features and predictors of outcome in acute hepatitis A and hepatitis E virus hepatitis on cirrhosis. *Liver Int* 2009; 29: 392-398
- 29 Schlosser B, Stein A, Neuhaus R, Pahl S, Ramez B, Krüger DH, Berg T, Hofmann J. Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol* 2011 Jul 26. [Epub ahead of print]
- 30 Legrand-Abravanel F, Kamar N, Sandres-Saune K, Lhomme S, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, Rostaing L, Izopet J. Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 30-37
- 31 Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, Mishiro S, Shimizu K, Moriyama M. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatology* 2007; 37: 113-120
- 32 le Coutre P, Meisel H, Hofmann J, Röcken C, Vuong GL, Neuburger S, Hemmati PG, Dörken B, Arnold R. Reactivation of hepatitis E infection in a patient with acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Gut* 2009; 58: 699-702
- 33 Haagsma EB, Riezebos-Brilman A, van den Berg AP, Porte RJ, Niesters HG. Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl* 2010; 16: 474-477
- 34 Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2009; 361: 1025-1027
- 35 Kenfak-Foguena A, Schöni-Affolter F, Bürgisser P, Witteck A, Darling KE, Kovari H, Kaiser L, Evison JM, Elzi L, Gurter-De La Fuente V, Jost J, Moradpour D, Abravanel F, Izopet J, Cavassini M. Hepatitis E Virus seroprevalence and chronic infections in patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1074-1078
- 36 Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol* 2009; 45: 269-271
- 37 Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ, Hayashi PH, Protiva P, Kleiner DE, Engle RE, Nguyen H, Emerson SU, Purcell RH, Tillmann HL, Gu J, Serrano J, Hoofnagle JH. Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 2011; 141: 1665-1672.e1-9
- 38 Kuniholm MH, Labrique AB, Nelson KE. Should HIV-infected patients with unexplained chronic liver enzyme elevations be tested for hepatitis E virus? *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1545-1546; author reply 1546
- 39 Nelson KE, Kmush B, Labrique AB. The epidemiology of hepatitis E virus infections in developed countries and among immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 1133-1148
- 40 Kaba M, Richet H, Ravaux I, Moreau J, Poizot-Martin I, Motte A, Nicolino-Brunet C, Dignat-George F, Ménard A, Dhiver C, Brouqui P, Colson P. Hepatitis E virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *J Med Virol* 2011; 83: 1704-1716
- 41 Schildgen O, Müller A, Simon A. Chronic hepatitis E and organ transplants. *N Engl J Med* 2008; 358: 2521-2522; author reply 2522
- 42 Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis E vaccine. *Hepatol Int* 2008; 2: 308-315
- 43 Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, Wang H, Yang CL, Jiang HM, Cai JP, Wang YJ, Ai X, Hu YM, Tang Q, Yao X, Yan Q, Xian YL, Wu T, Li YM, Miao J, Ng MH, Shih JW, Xia NS. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376: 895-902
- 44 Kamar N, Abravanel F, Garrouste C, Cardeau-Desangles I, Mansuy JM, Weclawiak H, Izopet J, Rostaing L. Three-month pegylated interferon-alpha-2a therapy for chronic hepatitis E virus infection in a haemodialysis patient. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2792-2795
- 45 Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Mansuy JM, Selves J, Peron JM, Ota P, Muscari F, Izopet J. Pegylated interferon-alpha for treating chronic hepatitis E virus infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 2010; 50: e30-e33
- 46 Chaillon A, Sirinelli A, De Muret A, Nicand E, d'Alteroche L, Goudeau A. Sustained virologic response with ribavirin in chronic hepatitis E virus infection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 841-843

#### ■同行评价

本文比较全面地综述了慢性戊型肝炎的研究进展, 内容新颖, 可读性强。

- 47 Mallet V, Nicand E, Sultanik P, Chakvetadze C, Tessé S, Thervet E, Mouthon L, Sogni P, Pol S. Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Ann Intern Med* 2010; 153: 85-89
- 48 Kamar N, Rostaing L, Abravanel F, Garrouste C, Lhomme S, Esposito L, Basse G, Cointault O, Ribes D, Nogier MB, Alric L, Peron JM, Izopet J. Ribavirin therapy inhibits viral replication on patients with chronic hepatitis e virus infection. *Gastroenterology* 2010; 139: 1612-1618

编辑 张姗姗 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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审核, 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4个月内完成。(编辑部主任: 李军亮 2012-01-08)

# Cyclin E与结直肠癌的研究进展

秦光明, 黄晓俊, 魏义胜

秦光明, 黄晓俊, 兰州大学第二临床医学院消化内科 甘肃省兰州市 730050

魏义胜, 咸阳市第一人民医院消化内科 陕西省咸阳市 712000

秦光明, 兰州大学第二临床医学院消化内科在职研究生.

作者贡献分布: 秦光明负责文献检索及论文撰写; 黄晓俊与魏义胜负责论文审阅及修改.

通讯作者: 黄晓俊, 主任医师, 硕士研究生导师, 730050, 甘肃省兰州市, 兰州大学第二临床医学院消化内科.

letmefly456@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-10-30 修回日期: 2011-11-15

接受日期: 2011-11-24 在线出版日期: 2012-01-18

子. 研究表明, Cyclin E在结直肠癌的发生、发展中起作用, 可能具有评估结直肠癌预后的能力.

关键词: 细胞周期蛋白E; 结直肠癌; 预后

秦光明, 黄晓俊, 魏义胜. Cyclin E与结直肠癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 131-134

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/131.asp>

## ■背景资料

多项研究已经证实Cyclin E的异常表达与多种恶性肿瘤的形成有关, 表现为Cyclin E基因明显扩增并且在细胞周期各个时相呈高表达, 有可能成为一项独立的预后指标.

## Advances in understanding the relationship between cyclin E and human colorectal cancer

Guang-Min Qin, Xiao-Jun Huang, Yi-Sheng Wei

Guang-Min Qin, Xiao-Jun Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China  
Yi-Sheng Wei, the First People's Hospital of Xianyang, Xianyang 712000, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Xiao-Jun Huang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. letmefly456@yahoo.com.cn

Received: 2011-10-30 Revised: 2011-11-15

Accepted: 2011-11-24 Published online: 2012-01-18

## Abstract

Cell cycle deregulation is one of important mechanisms leading to human colorectal cancer. It has been revealed that cyclin E is the most important regulatory factor for cell cycle control and plays an important role in the occurrence and development of human colorectal cancer. Detection of cyclin E expression can be used to assess the prognosis of colorectal cancer.

Key Words: Cyclin E; Colorectal cancer; Prognosis

Qin GM, Huang XJ, Wei YS. Advances in understanding the relationship between cyclin E and human colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 131-134

## 摘要

细胞周期调控紊乱是结直肠癌重要发病机制之一, 而Cyclin E是细胞周期最重要的调节因

## 0 引言

Cyclin E是主要的细胞周期限速调节因子之一, 1991年由美国2个蛋白基因研究组在筛选人cDNA文库时发现了Cyclin E<sup>[1]</sup>. Cyclin E的表达在细胞周期不同时相差异较大, 在G<sub>1</sub>晚期和临近S期表达达到高峰, 当细胞进入分裂期后, Cyclin E被迅速降解. 因此, Cyclin E的关键功能是调节细胞周期从G<sub>1</sub>期进入S期, 也就是DNA合成期<sup>[2]</sup>. 多项研究已经证实Cyclin E的异常表达与多种恶性肿瘤的形成有关, 表现为Cyclin E基因明显扩增并且在细胞周期各个时相呈高表达, 有可能成为一项独立的预后指标<sup>[3-5]</sup>. 相对于其他肿瘤而言, Cyclin E与结直肠癌的关系日前研究尚有不一致的地方. 我们就Cyclin E的结构、功能、致癌机制、结直肠癌的关系作一综述.

## 1 Cyclin E的结构与功能

Cyclin E位于人类染色体19q12-q13<sup>[6]</sup>, 有4个外显子及3个内含子<sup>[1,7]</sup>, 编码分子量为39-52 kDa的多肽. 和其他细胞周期素相似有1个周期蛋白盒(Cyclin box), 位于氨基酸序列的129-215. Cyclin E蛋白的C端存在一个富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(S)、苏氨酸(T)残基序列, 称为PEST序列, 该序列在蛋白质的降解中有重要作用, Cyclin E能被SCF(skp1 cullin F box protein)中的SKP2(F box protein)经泛素途径降解<sup>[8]</sup>.

Cyclin E为G<sub>1</sub>期细胞周期蛋白, 其在G<sub>1</sub>中期升高, 至G<sub>1</sub>晚期的G<sub>1</sub>-S交界处时达高峰, 后随细胞进入S期, Cyclin E开始下降, 到G<sub>2</sub>/M期降为零. 细胞周期依赖激酶(cyclin-dependent kinase,

## ■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

## ■ 研发前沿

与其他肿瘤不同, Cyclin E与结直肠癌的关系目前研究各家报道不一, 特别是在Cyclin E与结直肠癌的发生发展过程中所起的作用, 还有是否可以作为一项预后指标, 目前的研究尚有不一致的地方。

CDK)是一类蛋白激酶家族, 最初发现于酵母菌: P34cdc2. 在哺乳动物中, 目前已经发现的CDK至少有7种, 分别命名为CDC2(CDK1), CDK 2-7. CDK 2作为其中成员之一, CDK 2可与Cyclin E形成功能性复合物, Cyclin E是CDK2的调节亚基, 调节着CDK2的活性, 其对细胞周期的影响通过与CDK2形成复合物体现. Cyclin E与CDK2结合构成Cyclin E-CDK2复合体, 并激活DNA复制所必需的蛋白质, 促进细胞周期由G<sub>1</sub>进入S期<sup>[9]</sup>.

研究人员发现Cyclin E可分为全长型和低分子量型(low molecular weight cyclin E, LMW cyclin E), LMW Cyclin E缺乏全长型Cyclin E中的氨基酸末端. 形成LMW Cyclin E的机制: 一是肿瘤组织产生细胞外弹性蛋白酶可以将全长型的Cyclin E剪切成为LMW Cyclin E<sup>[10]</sup>; 二是钙蛋白酶2(calpain 2)可能参与了将全长型Cyclin E剪切为LMW Cyclin E的过程<sup>[11]</sup>.

## 2 Cyclin E引起肿瘤的机制

研究表明Cyclin E高表达可以缩短G<sub>1</sub>期, 导致中心体过增殖, 干扰有丝分裂, 形成不稳定的染色体, 从而诱发肿瘤<sup>[12]</sup>. 但是更多的研究表明在恶性肿瘤中, 经常表现为Cyclin E的失调, 且这种失调常常与肿瘤的侵袭性及不良预后有相关性<sup>[12]</sup>. Cyclin E由Cyclin E基因表达合成, 而其降解则是通过泛素-蛋白酶体(ubiquitin-proteasome)途径来实现<sup>[13]</sup>. 因此, Cyclin E在胞内的高表达大部分情况下是由于基因的扩增引起合成的增加<sup>[14]</sup>, 通过蛋白酶体降解途径减少也能引起Cyclin E的高表达<sup>[15]</sup>. 另外一种可能的原因是转运机制的错误<sup>[16]</sup>.

除过上述原因, 还有研究证实Cyclin E与目前发现的一些致癌病毒有关联, 人类乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV), 特别是与HPV-E7蛋白, 通过与P21(是一种细胞周期依赖性激酶抑制剂)的相互作用, 可提高Cyclin E相关激酶的活性, 而HPV E7蛋白与宫颈癌的发生有密切关联<sup>[17]</sup>. 而人类巨细胞病毒(human Cytomegalovirus, CMV)对Cyclin E有双重作用机制, 一方面可直接诱导Cyclin E的生成, 另一方面使CDKi(cyclin-dependent kinase inhibitors)失活<sup>[18]</sup>. 而人类结直肠癌的发生主要是通过2种不同的方式, 都与基因的不稳定性(genetic instability)有关. 约12%-15%的肿瘤表现为MIN型(microsatellite instability)而大部分结直肠癌表现为CIN型(chromosomal instability)<sup>[19]</sup>. MIN型指微卫星不

稳定, 主要是指在核苷酸序列水平表现出来的不稳定性是由于错配修复(mismatch repair deficiency, MMR)缺陷导致, MMR功能失活使细胞基因组易于突变, 特别是那些简单重复序列<sup>[20,21]</sup>. CIN型主要是指染色体数目的异常, 是大多数散发实体肿瘤的优势机制<sup>[22]</sup>. 主要与Cyclin E的高表达和hCDC4的失活有关<sup>[23,24]</sup>. 即使是在MIN型结直肠癌中, 大多数也存在着Cyclin E的失调<sup>[25]</sup>. 更为重要的是逐渐升高的Cyclin E蛋白水平预示着结直肠腺瘤到腺癌的转变<sup>[26]</sup>. 在结直肠癌中Cyclin E蛋白高表达主要有以下机制可以解释. 一方面通过基因扩增, 提高转录效率和上调E2F转录因子<sup>[27,28]</sup>. 另一方面通过减少Cyclin E蛋白的降解, 例如使hCDC4失活<sup>[24]</sup>, 或者是选择剪切型Parkin基因在结直肠癌组织中的表达, 使Cyclin E通过泛素-蛋白酶体(ubiquitin-proteasome)途径降解减少<sup>[29]</sup>. 在正常的上皮细胞中, DNA损伤检测点(DNA-damage checkpoint)在防止基因不稳定性方面起决定性作用, 主要是通过几个蛋白, 包括转录因子P53来调节细胞周期和DNA修复. P53一旦被激活, 就会启动一系列目标基因的表达, 如P21和hCDC4<sup>[30,31]</sup>, 这2个蛋白主要是Cyclin E和P53之间的功能连接. 当Cyclin E高表达时引起一个P53依赖性反应抑制CDK2活性, 机制主要是通过诱导P21的表达. 当P53或者是P21失活后就会引起Cyclin E的高表达, 导致细胞周期中S期缺陷, 引起中心体增殖, 形成CIN型结直肠癌<sup>[32,33]</sup>.

## 3 Cyclin E在结直肠癌中表达的意义

1995年学者Kitahara等<sup>[27]</sup>研究了53例原发性结直肠癌组织中Cyclin A, D1, E及CDK2的基因表达情况, 结果发现5例有Cyclin E基因扩增, 在这5例肿瘤中有3例同时发现CDK2的基因扩增, 因此他们认为 Cyclin E和CDK2基因扩增可能在结直肠黏膜癌变中起重要作用. 1996年Yasui等<sup>[26]</sup>应用免疫组织化学方法检验了358例结直肠腺瘤和267例结直肠癌患者组织中的Cyclin E及P53, 结果显示25%的腺瘤与56%的腺瘤中Cyclin E呈高表达, 同时发现Cyclin E表达与不典型增生的分级相关, 研究结果显示Cyclin E高表达更多见结直肠癌1级-2级中, 与细胞的增殖活性指标Ki-67显著关联, 认为, Cyclin E蛋白表达可以作为早期或进展期结直肠癌的一个标志. 2001年Cam等<sup>[34]</sup>应用Western blot和免疫组织化学方法, 检测了27例结直肠癌和10例结直肠腺瘤中Cyclin E和Cy-

clin E依赖蛋白激酶(cyclin E-dependant kinase)的活性,发现虽然Cyclin E蛋白表达在结直肠癌和腺瘤中的表达相似,但Cyclin E蛋白依赖激酶活性在结直肠癌中显著高于腺瘤中,他们认为,Cyclin E及其依赖激酶在结直肠癌的发生发展中具有重要作用. Li等<sup>[35]</sup>研究了203例原发结直肠癌及正常结直肠黏膜、息肉、腺瘤及腺瘤恶变病例的Cyclin E和CDK2的表达发现:Cyclin E表达与肿瘤大小、病理分期及浸润程度、淋巴结转移具有相关性,认为Cyclin E和CDK2可以作为结直肠癌预后的判断指标. 2004年Lim等<sup>[36]</sup>研究了41例按照美国癌症分期联合委员会(AJCC)分级标准处于II期的结直肠癌患者肿瘤组织中Cyclin E、P27和变异的P53的表达情况后认为,Cyclin E、27和变异的P53并不能成为AJCC分期中II期预后的指标. 2006年Corin等<sup>[37]</sup>研究了20例没有发生转移的单个结肠癌组织及其相邻的正常组织中及结直肠癌细胞系中Cyclin E与LMW Cyclin E表达情况后发现,与Cyclin E相比,LMW Cyclin E有肿瘤特异性,只表现于结直肠癌组织中,且MIN与CIN型结直肠癌细胞系均可检测到LMW Cyclin E,而Cyclin E既可出现在正常组织中,也可出现在肿瘤组织中,相对于Cyclin E而言,更有可能成为预测结直肠癌预后的指标. 2010年Corin等<sup>[38]</sup>进一步研究了114例早期结肠癌行根治手术且没有转移患者的肿瘤组织及相邻黏膜中Cyclin E与LMW Cyclin E的表达情况,经统计学分析后认为Cyclin E与性别、年龄、肿瘤位置及病理类型并无相关性. 而高表达的LMW Cyclin E或者是总的Cyclin E(Cyclin E+LMW Cyclin E)明显升高时有更高的复发风险和更差的预后.

#### 4 结论

Cyclin E目前研究已经证实与多种肿瘤的发生发展有关,但是各种研究文章之间还有不一致的地方,如Cyclin E究竟是参与肿瘤发生的早期事件之一,还是与肿瘤的侵袭和转移有关,目前报道还不一致需要有更多的研究进行证实,另外也有文章指出结肠癌与直肠癌在肿瘤的发生过程中可能有不同的分子机制参与<sup>[39]</sup>. 目前Cyclin E与直肠癌的关系的研究文章还相对较少. Zhou等<sup>[40]</sup>研究了360例分期为I-III期的直肠癌患者手术标本中Cyclin E与LMW Cyclin E的表达情况后认为高表达的LMW Cyclin E与总的Cyclin E升高时生存期缩短. 预后较差. 而对Cyclin E的

进一步研究会指导我们选择合适的治疗方案.

#### 5 参考文献

- 1 Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, Roberts JM. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 1991; 66: 1217-1228
- 2 Hwang HC, Clurman BE. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* 2005; 24: 2776-2786
- 3 Nanos-Webb A, Jabbour NA, Multani AS, Wingate H, Oumata N, Galons H, Joseph B, Meijer L, Hunt KK, Keyomarsi K. Targeting low molecular weight cyclin E (LMW-E) in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011 Jun 22. [Epub ahead of print]
- 4 Risch HA. Cyclin E overexpression relates to ovarian cancer histology but not to risk factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 1841; author reply 1841-1842
- 5 Bales ES, Dietrich C, Bandyopadhyay D, Schwahn DJ, Xu W, Didenko V, Leiss P, Conrad N, Pereira-Smith O, Orengo I, Medrano EE. High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1039-1046
- 6 Demetrick DJ, Matsumoto S, Hannon GJ, Okamoto K, Xiong Y, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet Cell Genet* 1995; 69: 190-192
- 7 Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 1992; 257: 1689-1694
- 8 Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J* 2000; 19: 2069-2081
- 9 Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2612-2624
- 10 Porter DC, Zhang N, Danes C, McGahren MJ, Harwell RM, Faruki S, Keyomarsi K. Tumor-specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive lower-molecular-weight forms. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6254-6269
- 11 Wingate H, Bedrosian I, Akli S, Keyomarsi K. The low molecular weight (LMW) isoforms of cyclin E deregulate the cell cycle of mammary epithelial cells. *Cell Cycle* 2003; 2: 461-466
- 12 Mussman JG, Horn HF, Carroll PE, Okuda M, Tarapore P, Donehower LA, Fukasawa K. Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene* 2000; 19: 1635-1646
- 13 Winston JT, Chu C, Harper JW. Culprits in the degradation of cyclin E apprehended. *Genes Dev* 1999; 13: 2751-2757
- 14 Geisen C, Moroy T. The oncogenic activity of cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein. *J*

#### ■ 相关报道

周永健等研究了360例分期为I-III期的直肠癌患者手术标本中Cyclin E与LMW Cyclin E的表达情况后认为高表达的LMW Cyclin E与总的Cyclin E升高时生存期缩短.

### ■同行评价

综述选题得当,文献较全面,数据可靠,结论客观可信,研究内容对未来结直肠癌的治疗及研究有潜在指导意义。

- Biol Chem* 2002; 277: 39909-39918
- 15 Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, Manning DL, Nicholson RI, deFazio A, Watts CK, Musgrove EA, Sutherland RL. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 1993; 8: 2127-2133
  - 16 Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J* 1999; 13: 773-780
  - 17 Ruesch MN, Laimins LA. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. *J Virol* 1997; 71: 5570-5578
  - 18 Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* 1996; 224: 150-160
  - 19 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386: 623-627
  - 20 Shaw IM, Rees M, Welsh FK, Bygrave S, John TG. Repeat hepatic resection for recurrent colorectal liver metastases is associated with favourable long-term survival. *Br J Surg* 2006; 93: 457-464
  - 21 Oda S, Maehara Y, Ikeda Y, Oki E, Egashira A, Okamura Y, Takahashi I, Kakeji Y, Sumiyoshi Y, Miyashita K, Yamada Y, Zhao Y, Hattori H, Taguchi K, Ikeuchi T, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Karran P, Yoshida MA. Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 1628-1636
  - 22 Dunican DS, McWilliam P, Tighe O, Parle-McDermott A, Croke DT. Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization. *Oncogene* 2002; 21: 3253-3257
  - 23 Simone C, Resta N, Bagella L, Giordano A, Guanti G. Cyclin E and chromosome instability in colorectal cancer cell lines. *Mol Pathol* 2002; 55: 200-203
  - 24 Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 2004; 428: 77-81
  - 25 Sutter T, Dansranjavin T, Lubinski J, Debniak T, Giannakudis J, Hoang-Vu C, Dralle H. Overexpression of cyclin E protein is closely related to the mutator phenotype of colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 374-380
  - 26 Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semba S, Shimamoto F, Tahara E. Expression of cyclin E in colorectal adenomas and adenocarcinomas: correlation with expression of Ki-67 antigen and p53 protein. *Virchows Arch* 1996; 429: 13-19
  - 27 Kitahara K, Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaki H, Akama Y, Yunotani S, Hisatsugu T, Tahara E. Concurrent amplification of cyclin E and CDK2 genes in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 1995; 62: 25-28
  - 28 Yasui W, Naka K, Suzuki T, Fujimoto J, Hayashi K, Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E. Expression of p27Kip1, cyclin E and E2F-1 in primary and metastatic tumors of gastric carcinoma. *Oncol Rep* 1999; 6: 983-987
  - 29 Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T. Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 2009; 125: 2029-2035
  - 30 el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-825
  - 31 Kimura T, Gotoh M, Nakamura Y, Arakawa H. hCDC4b, a regulator of cyclin E, as a direct transcriptional target of p53. *Cancer Sci* 2003; 94: 431-436
  - 32 Minella AC, Swanger J, Bryant E, Welcker M, Hwang H, Clurman BE. p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 deregulation. *Curr Biol* 2002; 12: 1817-1827
  - 33 Kawamura K, Izumi H, Ma Z, Ikeda R, Moriyama M, Tanaka T, Nojima T, Levin LS, Fujikawa-Yamamoto K, Suzuki K, Fukasawa K. Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer Res* 2004; 64: 4800-4809
  - 34 Cam WR, Masaki T, Shiratori TY, Kato N, Okamoto M, Yamaji Y, Igarashi K, Sano T, Omata M. Activation of cyclin E-dependent kinase activity in colorectal cancer. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2187-2198
  - 35 Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y. Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2001; 32: 945-953
  - 36 Lim YJ, Kim YH, Ahn GH, Chun HK, Jang WY, Lee JH, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Paik SW, Yoo BC, Rhee JC. Cyclin E, p27 and mutant p53 do not predict the prognosis in AJCC stage II colorectal carcinomas. *Korean J Gastroenterol* 2004; 44: 314-320
  - 37 Corin I, Di Giacomo MC, Lastella P, Bagnulo R, Guanti G, Simone C. Tumor-specific hyperactive low-molecular-weight cyclin E isoforms detection and characterization in non-metastatic colorectal tumors. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 198-203
  - 38 Corin I, Larsson L, Bergström J, Gustavsson B, Derwinger K. A study of the expression of Cyclin E and its isoforms in tumor and adjacent mucosa, correlated to patient outcome in early colon cancer. *Acta Oncol* 2010; 49: 63-69
  - 39 Aamodt R, Jonsdottir K, Andersen SN, Bondi J, Bukholm G, Bukholm IR. Differences in protein expression and gene amplification of cyclins between colon and rectal adenocarcinomas. *Gastroenterol Res Pract* 2009; 2009: 285830
  - 40 Zhou YJ, Xie YT, Gu J, Yan L, Guan GX, Liu X. Overexpression of cyclin E isoforms correlates with poor prognosis in rectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2011; 37: 1078-1084

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 姜黄素对人肝癌耐药细胞株Bel7402/5-FU多药耐药性的逆转作用

曹仕琼, 李萍, 尹太勇, 杨盛力

曹仕琼, 李萍, 尹太勇, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院消化内科 湖北省武汉市 430077

杨盛力, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院普通外科 湖北省武汉市 430077

曹仕琼, 副主任医师, 主要研究方向是药物对肝癌的多药耐药性作用机制。

湖北省自然科学基金资助项目, No. 2009CDB117

作者贡献分布: 此课题由曹仕琼与杨盛力设计; 耐药细胞系的建立及耐药性检测由尹太勇完成; Western blot及结果分析由李萍完成; 论文写作由曹仕琼与李萍完成。

通讯作者: 曹仕琼, 副主任医师, 430077, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属梨园医院消化内科。

caoshiqiong1965@126.com

电话: 027-86785196

收稿日期: 2011-11-14 修回日期: 2011-12-13

接受日期: 2011-12-31 在线出版日期: 2012-01-18

## Curcumin reverses multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma bel7402/5-FU cells

Shi-Qiong Cao, Ping Li, Tai-Yong Yin, Sheng-Li Yang

Shi-Qiong Cao, Ping Li, Tai-Yong Yin, Department of Gastroenterology, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei Province, China

Sheng-Li Yang, Department of General Surgery, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Hubei Province, No.2009CDB117

Correspondence to: Shi-Qiong Cao, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, Hubei Province, China. caoshiqiong1965@126.com

Received: 2011-11-14 Revised: 2011-12-13

Accepted: 2011-12-31 Published online: 2012-01-18

### Abstract

**AIM:** To investigate whether curcumin reverses multidrug resistance of hepatocellular carcinoma drug-resistant cell line Bel7402/5-FU and to explore potential mechanisms involved.

**METHODS:** The cell line Bel7402 was induced to form a multidrug resistant cell subline Bel7402/5-FU by exposing increasing concentra-

tions of fluorouracil (5-FU). The sensitivity of Bel7402 and Bel7402/5-FU cells to chemotherapeutics and curcumin were tested by MTT assay. The protein levels of multi-resistance related protein 1 (MRP1), lung resistance-related protein (LRP), p-glycoprotein (P-gp) and programmed cell death 5 (PDCD5) were detected by Western blotting in Bel7402 cells, Bel7402/5-FU cells and Bel7402/5-FU cells treated with different concentrations of curcumin.

**RESULTS:** The Bel7402/5-FU cell line showed cross-resistance to six drugs, among which 5-FU had the highest RI. The protein expression levels of MRP1, LRP and P-gp in Bel-7402/5-FU cells were obviously higher than those in Bel7402 cells, while the expression of PDCD5 protein in Bel7402/5-FU cells was lower than that in Bel7402 cells. The expression of MRP1, LRP and P-gp proteins was down-regulated after curcumin treatment, while the PDCD5 protein was significantly increased.

**CONCLUSION:** Curcumin can reverse multidrug resistance of the Bel7402/5-FU cell line via mechanisms possibly associated with down-regulation of MRP1, LRP and P-gp expression and up-regulation of PDCD5 expression.

**Key Words:** Curcumin; Hepatocellular carcinoma; Multidrug resistance

Cao SQ, Li P, Yin TY, Yang SL. Curcumin reverses multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma bel7402/5-FU cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 135-139

### 摘要

**目的:** 探讨姜黄素对人肝癌耐药细胞株Bel7402/5-FU多药耐药性的逆转作用及可能的作用机制。

**方法:** 采用氟尿嘧啶(fluorouracil, 5-FU)药物浓度梯度递增法诱导建立肝癌耐药细胞亚系Bel7402/5-FU; MTT法检测人肝癌细胞株

### 背景资料

肿瘤细胞多药耐药性的存在使得许多肝癌患者化疗失败。研究肝癌多药耐药的逆转, 从而提高肝癌的化疗效果是急需解决的问题。寻找高效、低毒、高选择性的逆转剂显得尤为重要。

### 同行评议者

郑培永, 副研究员, 上海中医药大学附属龙华医院

## ■ 研发前沿

姜黄素是从姜科植物姜黄中提取的一种色素,具有抗炎、抗凝血、抗氧化、降血脂、抗病毒等广泛的药理作用。近来有研究报道姜黄素具有抗肿瘤的作用,并影响肿瘤细胞的多药耐药性。

Bel7402及其耐药细胞株Bel7402/5-FU对6种化疗药物以及姜黄素的敏感性;Western blot法检测Bel7402细胞、Bel7402/5-FU细胞及经过0、5、10、20 g/L姜黄素作用后的Bel7402/5-FU细胞中多药耐药相关蛋白1(MRP1)、肺耐药相关蛋白(LRP)、P-糖蛋白(P-gp)、程序化死亡因子5(PDCD5)蛋白的表达水平。

**结果:** Bel7402/5-FU细胞对6种化疗药物表现出交叉耐药性,其中对5-FU耐药指数最高;与Bel7402细胞相比, Bel7402/5-FU细胞中的MRP1、LRP、P-gp蛋白表达升高, PDCD5蛋白表达降低;随姜黄素浓度的升高, Bel7402/5-FU细胞中MRP1、LRP、P-gp蛋白表达逐渐降低, PDCD5蛋白表达逐渐增高。

**结论:** 姜黄素具有逆转肝癌细胞多药耐药性的作用,可能与下调多药耐药相关蛋白MRP1、LRP、P-gp,上调凋亡相关蛋白PDCD5表达有关。

**关键词:** 姜黄素; 肝癌; 多药耐药

曹仕琼, 李萍, 尹太勇, 杨盛力. 姜黄素对人肝癌耐药细胞株Bel7402/5-FU多药耐药性的逆转作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 135-139  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/135.asp>

## 0 引言

肝癌是我国最常见、恶性程度最高的肿瘤之一,治疗手段包括手术切除、化疗、介入、放疗、中医药治疗等,其中化疗占有非常重要的地位。然而由于肝癌细胞多药耐药(MDR)作用的存在,化疗效果并不理想。因此寻找多药耐药逆转剂变得尤为重要。姜黄素是从姜科植物姜黄中提取的一种色素,有研究报道姜黄素具有预防和治疗肿瘤的作用。本研究以人肝癌多药耐药细胞株Bel7402/5-FU为研究对象,旨在探讨姜黄素对肝癌细胞多药耐药的逆转作用,及其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞株Bel7402购自南京凯基生物科技发展有限公司姜黄素(Sigma公司); MTT(北京索莱宝科技有限公司)、氟尿嘧啶(5-FU, 250mg/支,南通总厂)、阿霉素(ADM, 10 mg/瓶,浙江海正制药厂)、丝裂霉素(MMC, 2 mg/支,浙江海正制药厂)、甲氨蝶呤(MTX, 5 mg/瓶,上海华联制药厂)、环磷酰胺(CTX, 0.2 g/

支,连云港恒瑞制药厂)、顺铂(CDDP, 20 mg/瓶,齐鲁制药厂)、鼠抗人MRP1抗体(美国Novus Biological公司)、鼠抗人LRP抗体(美国NeoMarker公司)、鼠抗人P-gp抗体(美国NeoMarker公司)、兔抗人PDCD5抗体(北大生科院)、 $\beta$ -actin抗体(美国Santa Cruz公司)、ECL试剂(碧云天公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 Bel7402/5-FU的建立和姜黄素作用的Bel7402/5-FU细胞的培养:** 用含100 mL/L胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RPMI 1640培养基培养人肝癌细胞株Bel7402,置于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养。采用5-FU药物浓度梯度递增诱导法建立Bel7402/5-FU细胞系。取对数生长期Bel7402细胞,计数后接种于培养瓶中,使细胞浓度为 $5 \times 10^5$ /mL。待细胞贴壁后,更换含5-FU的培养液继续培养细胞。5-FU的起始浓度为2 000  $\mu$ g/L,培养3-5 d,弃去上清及死亡后悬浮细胞,更换含同等浓度的含药培养液继续培养3-5 d。弃去上清及死亡后悬浮细胞,再加入含剂量加倍浓度的含药培养液,重复上述步骤。4 mo后,细胞可在含 $2 \times 10^5$   $\mu$ g/L 5-FU的培养液中稳定生长增殖,将该细胞亚系命名为Bel7402/5-FU。更换培养液,使Bel7402/5-FU细胞在含5-FU浓度为 $2 \times 10^5$   $\mu$ g/L的培养液中继续培养维持其耐药性。

实验前2 wk撤去药物,以正常的RPMI 1640培养液培养,然后用于实验以及后续的检测。分别用浓度为5、10、20 g/L的姜黄素作用Bel7402/5-FU细胞,置于50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中37 °C、饱和湿度条件下培养48 h后,换入新鲜培养液,再培养24 h,以备下阶段实验用。

**1.2.2 MTT法检测Bel7402及Bel7402/5-FU细胞对6种化疗药物的敏感性:** 分别取对数生长期的亲本和耐药细胞,制成浓度为 $(2-5) \times 10^5$ /mL的细胞悬液,每孔200  $\mu$ L接种于96孔板中,培养24 h,使细胞贴壁良好。更换新鲜培养液,并加入不同的化疗药物。每种化疗药物按2倍稀释成6种浓度梯度。3孔/组,并设3孔不加药的平行对照孔,同时设不含细胞的培养液作为调零孔。继续培养48 h后,弃去含药培养液,更换新鲜培养液培养24 h。最后细胞中加入5 g/L的MTT溶液50  $\mu$ L培养4 h后,小心弃去上清,加入200 mL DMSO/孔,震荡溶解沉淀,酶标仪在波长492 nm下读取吸光度(A)值。使用改良寇氏法计算各种化疗药物对Bel7402细胞和Bel7402/5-FU细胞

## ■ 相关报道

研究发现姜黄素对宫颈癌多药耐药细胞株KB-V1、卵巢癌多药耐药细胞COC1/DDP以及胃癌SGC7901/VCR细胞的多药耐药性具有一定的逆转作用。

的50%抑制率的剂量( $IC_{50}$ ), 计算耐药指数(RI) =  $IC_{50}(\text{Bel7402/5-FU})/IC_{50}(\text{Bel7402})$ .

1.2.3 MTT法检测Bel7402/5-FU细胞对姜黄素的敏感性: 实验分组: (1)空白对照组: 含Bel7402/5-FU细胞的RPMI 1640培养液; (2)姜黄素组: 分别加5、10、20 g/L浓度的姜黄素. 每组均设3个复孔, 用MTT法测定每组A值, 使用改良寇氏法计算姜黄素对Bel7402/5-FU细胞的50%抑制率的剂量( $IC_{50}$ ).

1.2.4 Western blot法检测MRP1、LRP、P-gp、PDCD5蛋白的表达: 取Bel7402细胞、Bel7402/5-FU细胞以及姜黄素作用后的Bel7402/5-FU细胞, 分别加入200  $\mu\text{L}$ 含cocktail的裂解液提取总蛋白, 测定蛋白浓度, 计算含50  $\mu\text{g}$ 蛋白的溶液体积即为上样量, 各组样品加入上样缓冲液后于37  $^{\circ}\text{C}$ 放置40 min使蛋白变性, 于10% SDS-PAGE凝胶电泳分离, 2-3 h后将蛋白电转移至PVDF膜, 室温下于脱色摇床上用5%的脱脂奶粉摇动封闭40 min, 弃去封闭液, 于相应一抗中37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h, PBST洗4次 $\times$ 8 min, 加入二抗37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h, PBST洗4次 $\times$ 8 min. 然后加入ECL显色液暗室显色, 当出现明显条带后立即放入定影液中, 冲洗后室温下晾干. 将胶片进行扫描, 用凝胶图像分析软件分析目标带的吸光度值. 以 $\beta$ -actin蛋白作为内参, 用目的条带与内参条带吸光度值之比代表目的蛋白的相对表达水平, 每组重复3次.

**统计学处理** 采用SPSS16.0软件进行统计分析, 计数资料以mean $\pm$ SD表示, 两样本均数比较采用独立样本 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 MTT法检测Bel7402及Bel7402/5-FU细胞对6种化疗药物的敏感性 与Bel7402细胞相比, Bel7402/5-FU细胞对6种化疗药物表现出不同程度的耐药性. 其中对5-FU耐药指数最高, 耐药指数为109.55 $\pm$ 14.30. 对ADM、MMC、MTX、CTX、CDDP的耐药指数分别为23.49 $\pm$ 6.19、19.19 $\pm$ 2.91、2.52 $\pm$ 0.30、13.32 $\pm$ 4.01、1.85 $\pm$ 0.29 (表1).

2.2 MTT法检测不同浓度姜黄素对Bel7402/5-FU细胞的抑制率 不同浓度的姜黄素(5、10、20 mg/mL姜黄素)对Bel7402/5-FU细胞的抑制率分别为: 6.74% $\pm$ 0.13%, 9.31% $\pm$ 0.21%, 4.45% $\pm$ 1.02%. 使用改良寇氏法计算姜黄素对

表1 肝癌细胞对化疗药物敏感性检测结果

化疗药物	$IC_{50}(\mu\text{g/L})$	
	Bel7402	Bel7402/5-FU
5-FU	2.83 $\pm$ 0.40	305.72 $\pm$ 16.63 <sup>a</sup>
ADM	0.43 $\pm$ 0.08	9.82 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>
MMC	1.48 $\pm$ 0.14	28.28 $\pm$ 3.82 <sup>a</sup>
MTX	1.12 $\pm$ 0.13	2.81 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>
CTX	2.77 $\pm$ 0.86	34.11 $\pm$ 3.48 <sup>a</sup>
CDDP	0.54 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs Bel7402细胞.

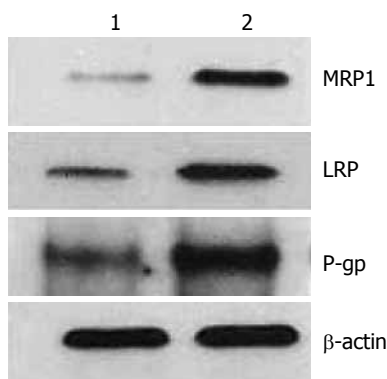


图1 两种细胞中MRP1、LRP、P-gp的表达. 1: Bel7402细胞; 2: Bel7402/5-FU细胞.

Bel7402/5-FU细胞的50%抑制率的剂量( $IC_{50}$ )为28.28 $\pm$ 3.53 g/L.

2.3 MRP1、LRP、P-gp、PDCD5蛋白在Bel7402及Bel7402/5-FU细胞中的表达 Bel7402/5-FU细胞中MRP1、LRP、P-gp蛋白的表达增高, PDCD5蛋白的表达降低, 与Bel7402细胞相比, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ , 图1, 2, 表2)

2.4 MRP1、LRP、P-gp、PDCD5蛋白在经过不同浓度姜黄素作用后的Bel7402/5-FU细胞中的表达 经过0(对照组)、5、10、20 g/L姜黄素作用48 h后的Bel7402/5-FU细胞中, MRP1、LRP、P-gp蛋白表达随姜黄素浓度的升高逐渐降低, PDCD5蛋白表达随姜黄素浓度的升高逐渐增高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ , 图3, 表3).

## 3 讨论

化疗是治疗肿瘤的重要手段之一, 但是由于肿瘤细胞多药耐药性的存在, 使得许多肝癌患者化疗失败. MDR是指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物具有耐药性的同时, 对其他结构不同、作用靶点不同的抗肿瘤药物也具有耐药性. 肿瘤细胞MDR的形成机制十分复杂, 需要多个因子的

### ■创新盘点

本文研究了姜黄素对肝癌耐药细胞株中多药耐药相关蛋白及凋亡相关蛋白表达的影响, 进而探讨姜黄素对肝癌多药耐药性的逆转作用.

### 应用要点

本文探讨了姜黄素对肝癌细胞多药耐药的逆转作用,及其可能的作用机制,为姜黄素作为耐药逆转剂在临床的应用奠定了基础。

表 2 Bel7402及Bel7402/5-FU细胞中MRP1、LRP、P-gp、PDCD5蛋白的表达

细胞	MRP1	LRP	P-gp	PDCD5
Bel7402	0.27 ± 0.03	0.39 ± 0.02	1.06 ± 0.04	1.18 ± 0.02
Bel7402/5-FU	0.94 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.74 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.02 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs Bel7402细胞.

表 3 姜黄素作用后细胞中MRP1、LRP、P-gp、PDCD5蛋白的表达

分组	MRP1	LRP	P-gp	PDCD5
对照组	0.98 ± 0.03	0.78 ± 0.02	1.77 ± 0.02	0.73 ± 0.02
姜黄素组				
5 mg/L	0.82 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.72 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.02 <sup>b</sup>
10 mg/L	0.52 ± 0.02 <sup>bd</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>bd</sup>	0.71 ± 0.02 <sup>bd</sup>	1.35 ± 0.03 <sup>bd</sup>
20 mg/L	0.23 ± 0.01 <sup>bdf</sup>	0.24 ± 0.01 <sup>bdf</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>bdf</sup>	1.45 ± 0.02 <sup>bdf</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 对照组; <sup>c</sup>*P* < 0.01 vs 5 mg/L姜黄素组; <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs 10 mg/L姜黄素组.

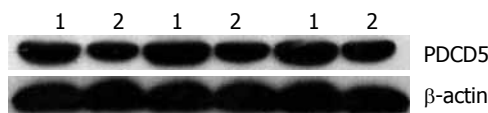


图 2 两种细胞中PDCD5的表达. 1: Bel7402细胞; 2: Bel7402/5-FU细胞.

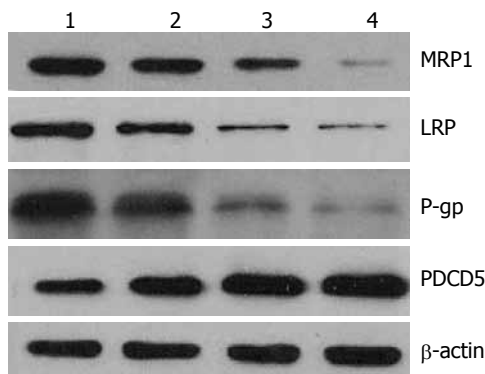


图 3 姜黄素作用后细胞中MRP1、LRP、P-gp、PDCD5的表达. 1-4: 姜黄素0、5、10和20 mg/L.

共同参与,并通过多个途径来完成,主要涉及:(1)耐药蛋白如MRP、P-gp、LRP的高表达;(2)与药物代谢相关的酶活性的异常,如谷胱甘肽转移酶、DNA拓扑异构酶等;(3)凋亡抑制途径异常;(4)缺氧、低糖微环境等其他因素。

MRP1是由位于16号染色体的MRP基因编码的分子质量为190 kDa的糖蛋白。P-gp是由MDR1基因编码的分子量为170 kDa的跨膜糖蛋白。两者都是ABC转运蛋白(ATP结合膜转运蛋

白)超家族的重要成员,可以利用ATP供能,介导多种药物在细胞内外的转运,使化疗药物在肿瘤细胞内的浓度降低,从而产生MDR<sup>[1]</sup>。MRP1主要将与谷胱甘肽结合的底物泵出细胞外,从而降低药物在细胞内的聚集,介导MDR<sup>[2]</sup>。而P-gp能够将一些亲脂类抗癌药物如阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、长春碱类泵出肿瘤细胞外,介导肿瘤细胞的多药耐药<sup>[3]</sup>。

LRP由位于16号染色体短臂的LRP基因编码,是分子量为110 KDa的非糖类蛋白质,他不属于ABC转运蛋白超家族成员,而是一种位于细胞质和核膜上的穹窿体蛋白(MVP)。Scheper等<sup>[4]</sup>认为LRP介导肿瘤细胞产生MDR的主要机制是阻止药物通过核孔进入细胞核,并将核内的药物转运到胞质,从而降低药物的核质分布比率;通过囊泡运输及胞吐机制将药物运输到细胞外,降低细胞内的药物浓度。PDCD5原名TFAR19,是一种人类新基因,参与调控细胞凋亡<sup>[5]</sup>。PDCD5在人类50多种组织中均有表达,其中在造血系统、成人心脏、肾脏、肾上腺、胎盘等组织中呈高表达,而在胚胎组织中低表达<sup>[6]</sup>。研究表明,PDCD5在卵巢上皮性癌<sup>[7]</sup>、胃癌<sup>[8]</sup>、肺癌<sup>[9]</sup>、肝癌<sup>[10]</sup>等恶性肿瘤中表达下降。PDCD5作为一种重要的凋亡调控因子,他在肿瘤组织中的异常表达,使肿瘤细胞的凋亡与增殖失衡,导致肿瘤细胞的凋亡受到抑制,从而引起多药耐药。

目前,研究肝癌多药耐药的逆转,从而提

高肝癌的化疗效果是急需解决的问题. 许多已研制的逆转剂如环孢菌素A、维拉帕米、奎尼丁、三氟拉嗪、三氧苯胺等由于毒性明显或活性较低而难以在临床上推广<sup>[11]</sup>. 因此寻找高效、低毒、高选择性的逆转剂显得尤为重要. 姜黄素是从姜科植物姜黄中提取的一种色素, 具有抗炎、抗凝血、抗氧化、降血脂、抗病毒等广泛的药理作用. 近来有研究报道姜黄素具有抗肿瘤的作用<sup>[12]</sup>, 其作用机制主要与诱导肿瘤细胞凋亡有关<sup>[13]</sup>. 另外, 姜黄素可以调节肿瘤细胞中耐药基因及凋亡基因的表达, 从而影响肿瘤细胞的多药耐药性. Limtrakul等<sup>[14]</sup>发现姜黄素能降低宫颈癌多药耐药细胞株KB-V1的MDR1基因及其产物P-gp的表达, 从而增加KB-V1对化疗药物的敏感性. 同时, 姜黄素可以增加卵巢癌多药耐药细胞COC1/DDP对顺铂的敏感性<sup>[15]</sup>. Tang等<sup>[16]</sup>发现姜黄素可以逆转胃癌SGC7901/VCR细胞的多药耐药性.

本研究采用不同浓度的姜黄素作用于肝癌耐药细胞株Bel7402/5-FU, 观测其是否可以逆转Bel7402/5-FU细胞株的耐药性. Western blot检测表明Bel7402/5-FU细胞中MRP1、LRP、P170的表达明显高于亲本bel7402细胞, PDCD5的表达明显低于亲本细胞. 经过姜黄素处理后, 随姜黄素浓度的增加其MRP1、LRP、P170的表达逐渐降低, PDCD5的表达则逐渐升高. 以上结果说明, 姜黄素对肝癌耐药细胞株Bel7402/5-FU的耐药性具有逆转作用, 其作用机制可能是通过降低耐药蛋白MRP1、LRP、P170的表达, 减少肿瘤细胞对化疗药物的外排, 增加细胞内药物浓度, 并上调PDCD5的表达, 抑制肿瘤细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡, 从而部分逆转肿瘤细胞的多药耐药性. 因此, 姜黄素可以作为一种新的肝癌耐药逆转剂, 具有一定的临床应用价值.

#### 4 参考文献

- 1 Shukla S, Wu CP, Ambudkar SV. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4: 205-223
- 2 Benlloch M, Ortega A, Ferrer P, Segarra R, Obrador E, Asensi M, Carretero J, Estrela JM. Acceleration of glutathione efflux and inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2005; 280: 6950-6959

- 3 Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease? *Gut* 2003; 52: 759-766
- 4 Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA, Scheper RJ. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 550-556
- 5 Chen Y, Sun R, Han W, Zhang Y, Song Q, Di C, Ma D. Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis? *FEBS Lett* 2001; 509: 191-196
- 6 Liu H, Wang Y, Zhang Y, Song Q, Di C, Chen G, Tang J, Ma D. TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 203-210
- 7 冯静, 崔恒, 魏丽惠, 马大龙. TFAR19蛋白在卵巢上皮性癌中的表达. *中国妇产科临床* 2002; 3: 164-167
- 8 Yang YH, Zhao M, Li WM, Lu YY, Chen YY, Kang B, Lu YY. Expression of programmed cell death 5 gene involves in regulation of apoptosis in gastric tumor cells. *Apoptosis* 2006; 11: 993-1001
- 9 Spinola M, Meyer P, Kammerer S, Falvella FS, Boettger MB, Hoyal CR, Pignatiello C, Fischer R, Roth RB, Pastorino U, Haeussinger K, Nelson MR, Dierkesmann R, Dragani TA, Braun A. Association of the PDCD5 locus with lung cancer risk and prognosis in smokers. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1672-1678
- 10 Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, Zhang X, Xiao HS, Qu J, Liu F, Huang QH, Cheng ZH, Li NG, Du JJ, Hu W, Shen KT, Lu G, Fu G, Zhong M, Xu SH, Gu WY, Huang W, Zhao XT, Hu GX, Gu JR, Chen Z, Han ZG. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 15089-15094
- 11 舒鹏, 刘沈林. 肿瘤多药耐药逆转剂研究现状. *现代中西医结合杂志* 2005; 14: 2884-2886
- 12 Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H, Wakabayashi K. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1835-1841
- 13 Karunagaran D, Rashmi R, Kumar TR. Induction of apoptosis by curcumin and its implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5: 117-129
- 14 Limtrakul P, Anuchapreeda S, Buddhasukh D. Modulation of human multidrug-resistance MDR-1 gene by natural curcuminoids. *BMC Cancer* 2004; 4: 13
- 15 吕靖, 英焕春, 戴进. 姜黄素增强卵巢癌耐药细胞株COC1/DDP对顺铂敏感性的研究. *实用医学杂志* 2009; 25: 1183-1186
- 16 Garcea G, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ, Berry DP. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer* 2004; 90: 1011-1015

#### ■同行评价

课题研究了不同浓度的姜黄素对肝癌耐药细胞株BEL7402/5-FU的多药耐药蛋白的表达影响. 研究结果具有一定的学术意义和价值.

编辑 张姗姗 电编 何基才

# 白介素-18在急性胰腺炎大鼠中性粒细胞凋亡中的作用

吴彦彦, 许兰涛

## ■背景资料

有学者提出SAP时炎症反应的消退依赖于PMN的凋亡, 而PMN的延迟凋亡是SAP患者发生SIRS并进展为MODS的重要环节。IL-18是一种新发现的促炎细胞因子, 近来发现其与PMN凋亡存在关系。

吴彦彦, 苏州大学研究生部 江苏省苏州市 215021  
许兰涛, 上海交通大学附属第六人民医院奉贤分院消化科 上海市 201400  
上海市卫生局基金资助项目, No. 2009226  
作者贡献分布: 此课题由吴彦彦与许兰涛设计; 研究过程由吴彦彦完成; 研究所用试剂由许兰涛提供; 论文数据分析由吴彦彦完成; 论文写作由吴彦彦与许兰涛完成。  
通讯作者: 许兰涛, 主任医师, 201400, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院奉贤分院消化科。sccdix@sohu.com  
电话: 021-57420713  
收稿日期: 2011-11-10 修回日期: 2011-12-01  
接受日期: 2011-12-23 在线出版日期: 2012-01-18

## Role of IL-18 in peripheral neutrophil apoptosis in rats with sever acute pancreatitis

Yan-Yan Wu, Lan-Tao Xu

Yan-Yan Wu, Graduate School, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China  
Lan-Tao Xu, Fengxian Branch of the Sixth Affiliated Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201400, China  
Supported by: the Foundation of Shanghai Municipal Health Bureau, No. 2009226  
Correspondence to: Lan-Tao Xu, Chief Physician, Fengxian Branch of the Sixth Affiliated Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201400, China. sccdix@sohu.com  
Received: 2011-11-10 Revised: 2011-12-01  
Accepted: 2011-12-23 Published online: 2012-01-18

## Abstract

**AIM:** To examine the role of interleukin-18 (IL-18) in apoptosis of peripheral blood neutrophils (PMNs) in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

**METHODS:** Sixty SD rats were randomly divided into two groups: SAP group and sham operation (SO) group. At 3, 6 and 12 h after SAP induction, blood samples were collected from the inferior vena cava to measure serum amylase and IL 18; PMNs were separated to detect their apoptosis; and pancreatic specimens were taken for pathological examination.

**RESULTS:** PMN apoptosis rate decreased remarkably in the SAP group than in the SO group, and the decrease became more obvious

over time ( $P < 0.01$ ). Serum levels of IL-18 in the SAP group increased significantly compared with those in the SO group ( $P < 0.01$ ). There was a negative correlation between the apoptosis rate of PMNs and serum levels of IL-18 in SAP rats ( $r = -0.742, P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Compared to control rats, PMN apoptosis was obviously delayed and serum levels of IL-18 remarkably increased in SAP rats, indicating that IL-18 may play an important role in peripheral neutrophil apoptosis in SAP.

**Key Words:** Interleukin-18; Severe acute pancreatitis; Neutrophils; Apoptosis

Wu YY, Xu LT. Role of IL-18 in Peripheral neutrophil apoptosis in rats with sever acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 140-144

## 摘要

**目的:** 探讨白介素-18(IL-18)在重症急性胰腺炎(SAP)时外周血中性粒细胞(PMN)凋亡中的作用。

**方法:** SD大鼠60只, 随机分为2组, 每组30只, 分别建立大鼠急性坏死性胰腺炎组(ANP)及假手术组(SO)模型, 在制模后3、6、12 h分期分批处死大鼠, 抽取下腔静脉血测定血清淀粉酶含量及血清中IL-18的含量, 作中性粒细胞分离并检测外周血中性粒细胞凋亡率; 同时对大鼠胰腺组织行病理切片HE染色, 并对胰腺组织进行病理评分。

**结果:** ANP组中性粒细胞(PMN)凋亡率较SO组明显降低, 并随着时间的延长逐渐明显( $P < 0.01$ ), 至术后12 h降至 $2.15\% \pm 0.45\%$ ; ANP组血清中IL-18的含量较SO组明显升高, 而且随着时间的延长更明显( $P < 0.01$ ), 在12 h达到 $4705.70 \pm 296.30$ ; ANP组PMN的凋亡率与血清中IL-18的水平呈负相关( $r = -0.78, P < 0.01$ )。

**结论:** ANP组外周血PMN的凋亡明显延迟, 血清中IL-18的含量明显增高, IL-18可能在急性胰腺炎外周血的PMN凋亡中发挥作用。

## ■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

**关键词:** 白介素-18; 急性胰腺炎; 中性粒细胞; 凋亡

吴彦彦, 许兰涛. 白介素-18在急性胰腺炎大鼠中性粒细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 140-144  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/140.asp>

## 0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一个死亡率极高的疾病,其发病机制复杂.白介素-18(interleukin-18, IL-18)是一个新发现的促炎症细胞因子,属于IL-1细胞因子超家族.近年来,有学者研究发现,IL-18可以延迟酒精中毒和烧伤患者中外周血中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)的凋亡<sup>[1]</sup>. Ueda等<sup>[2]</sup>研究发现,IL-18在重症急性胰腺炎患者血清中明显增加,并且与患者的严重程度呈明显的相关性.虽然现有学者研究了IL-18在SAP中的相关作用,但是,IL-18在延迟PMN凋亡方面的研究少有报道,本研究建立SAP大鼠模型,动态监测IL-18在血清中的表达,并测定PMN凋亡情况,探讨IL-18与SAP时PMN凋亡的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂健康SD大鼠60只,清洁级,体质量250-300 g,由上海交通大学附属第六人民医院实验动物中心提供;牛黄胆酸钠(Sigma公司,美国);大鼠中性粒细胞分离液(LZS1091)(天津灏洋生物制品科技有限公司,中国);凋亡试剂盒(BD公司,美国);流式分析仪BD FACSCalibur(美国);大鼠IL-18 ELASA试剂盒(RND公司,美国).

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及造模:**健康SD大鼠60只随机分为2组:急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)组和假手术组(SO组). ANP组30只,假手术SO组30只,每组在术后3 h、6 h、12 h下腔静脉抽血(各组各时间点10只),随即处死大鼠,取胰腺组织,用100 g/L甲醛溶液固定. ANP组模型的制作参照Banerjee<sup>[3]</sup>方法加以改进制作大鼠重症胰腺炎模型:各组动物术前12 h禁食,可以自由饮水,采用30 g/L戊巴比妥钠(1 mL/kg体质量)腹腔内注射麻醉;麻醉成功后仰卧,正中切口进入腹腔,提起十二指肠,在胰胆管开口十二指肠系膜缘对侧肠壁上,用穿刺针(套管针内芯)穿入胰胆管约0.4 cm,用无损伤的动脉夹临时阻断胰胆管的上下端后加压注射50 g/L牛黄胆酸钠(1 mL/kg体质量),注射速度为0.2 mL/min,注射

完毕后5 min拔针,检查无出血,关腹;SO组仅开腹,翻动胰腺,再关腹.每组大鼠麻醉苏醒后,自由饮水、禁食.

**1.2.2 血清淀粉酶的检测:**血清淀粉酶采用全自动生化分析仪(VITROS.950)检测.

**1.2.3 中性粒细胞的分离:**采血后,立即用梯度离心法进行PMN的分离,加入PBS液悬浮细胞,计数板计数,调整细胞浓度至 $1 \times 10^6$ /mL.

**1.2.4 PMN活力检测:**取2滴细胞悬液加滴4%台盼蓝染色,活细胞不着色,死细胞染成蓝色,计数200个细胞,计算活细胞百分率,拒染细胞数应 $>95\%$ . PMN活力 = 拒染细胞数/200  $\times 100\%$ .

**1.2.5 中性粒细胞凋亡检测:**用4℃的PBS洗涤分离的中性粒细胞2次,加Binding Buffer 60  $\mu$ L,加入Annexin V-FITC 5  $\mu$ L,摇匀后于室温避光孵育15 min,上机前5 min在反应管中加入Propidium Iodide 5  $\mu$ L,然后再补加Binding Buffer 150  $\mu$ L,流式细胞仪检测中性粒细胞凋亡指数. Annexin V阳性为凋亡细胞,PI阳性为坏死细胞,Annexin V及PI双阴性为存活细胞.

**1.2.6 血清中IL-18水平的测定:**采用酶联免疫吸附法,试剂盒购自RND公司,操作方法严格按照试剂盒说明书进行.

**1.2.7 光镜下胰腺组织病理学改变:**常规石蜡包埋、切片、HE染色,制作病理HE切片.有资深病理科医师盲法对胰腺病理切片进行观察并按照Schmids法<sup>[4]</sup>的标准进行组织病理评分,观察各组胰腺组织病变程度.

**统计学处理** 所有数据用mean  $\pm$  SD表示,采用SPSS17.0统计软件分析处理;组间计量资料采用配对t检验,组内计量资料采用单因素方差分析;两变量间关系采用直线相关分析; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 各组血清淀粉酶含量变化** ANP组血中的淀粉酶水平在模型建立成后逐渐升高,并在12 h达峰值( $9888.0 \pm 1498.06$ ),各时间点均较SO组高( $P < 0.05$ ),而SO组血清淀粉酶的含量较低(表1).

**2.2 胰腺组织变化** 肉眼观察:SO组胰腺无明显变化,腹腔内未见异常;ANP组大鼠腹腔内可见血性腹水,胰腺有坏死灶,腹腔脏器粘连,肠系膜、大网膜上有大量皂化斑.光镜下:SO组大鼠的胰腺组织无明显变化;SAP组的大鼠胰腺组织可见胰腺腺泡水肿、组织坏死,中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润以及出血坏死病

## ■ 研究前沿

当前研究认为IL-18与PMN的凋亡有关,相关分子机制的研究中还有不少问题需要进一步阐明:如IL-18在PMN凋亡延迟中涉及的信号转导通路及作用环节;IL-18在凋亡中所涉及的凋亡调控蛋白,其与促、抗凋亡蛋白的关系等.

### ■应用要点

本研究为进一步阐明PMN延迟凋亡在SAP发病过程中的作用,探讨IL-18延迟PMN凋亡的具体作用机制以及研究SAP新的治疗靶点方面提供了科学的实验依据。

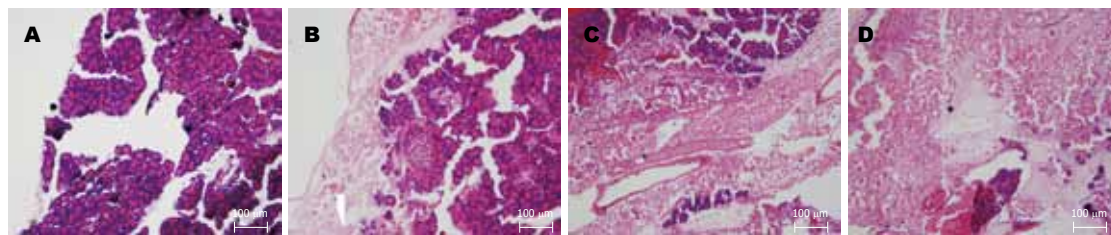


图1 各时间点胰腺组织HE染色病理情况( $\times 100$ ). A: SO组3 h; B: ANP组3 h; C: ANP组6 h; D: ANP组12 h.

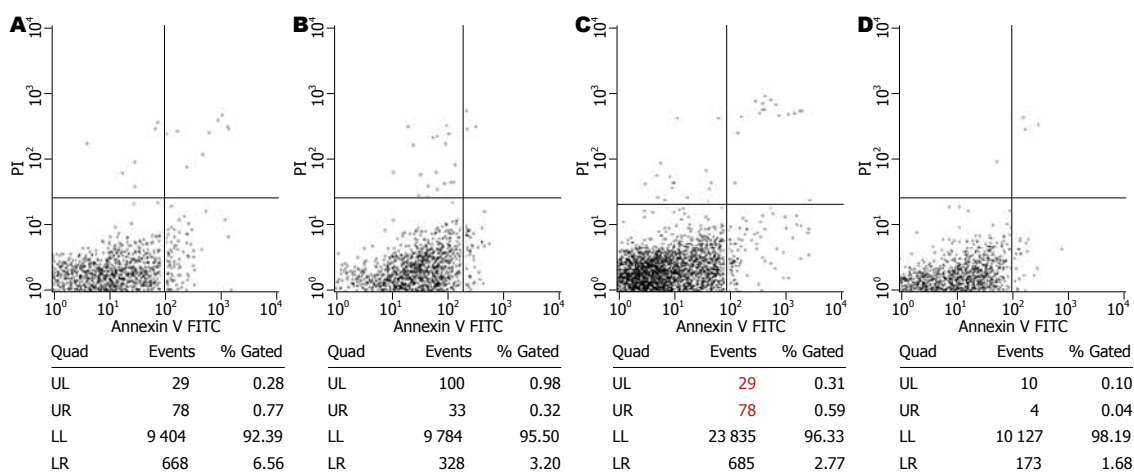


图2 各组大鼠外周血PMN凋亡率的变化. A: SO组3 h; B: ANP组3 h; C: ANP组6 h; D: ANP组12 h.

表1 各组血淀粉酶、胰腺组织病理评分变化 ( $n = 10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	时间(h)	血淀粉酶(U/L)	胰腺组织病理评分
ANP组	3	2 577.00 $\pm$ 890.22 <sup>ac</sup>	6.4 $\pm$ 1.35 <sup>ac</sup>
	6	5 521.30 $\pm$ 1 177.08 <sup>ac</sup>	8.3 $\pm$ 1.34 <sup>ac</sup>
	12	9 888.0 $\pm$ 1 498.06 <sup>ac</sup>	10.7 $\pm$ 1.95 <sup>ac</sup>
SO组	3	770.60 $\pm$ 161.25	0.1 $\pm$ 0.32
	6	788.10 $\pm$ 192.01	0.2 $\pm$ 0.42
	12	713.80 $\pm$ 199.97	0.1 $\pm$ 0.32

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs SO组各时间点; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs ANP组间.

灶形成,且随着时间的延长病变逐渐加重(图1). ANP组各时间点的胰腺组织病理学评分均较SO组高( $P < 0.05$ ,表1).

2.3 各组大鼠不同时间外周血中性粒细胞凋亡率的变化 模型制成后,随着时间推移,ANP组大鼠的凋亡率逐步下降,12 h达到最低( $2.15 \pm 0.45$ ),与SO组各个时间段(3、6、12 h)两两相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,表2,图2).

2.4 各组大鼠不同时间血清中IL-18含量的变化 SO组的血清IL-18含量较低,且各时间点无明显差别;而ANP组大鼠的血清IL-18含量明显增高,且随着时间的延长逐渐增加,在12 h最高( $4705.70 \pm 296.30$ ),各时间点两两相比较差异有

统计学意义( $P < 0.01$ ). ANP组与SO组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,表2,图3).

2.5 相关性 ANP组外周血PMN凋亡率与胰腺病理评分及血清IL-18浓度的变化均呈负相关,相关系数分别为 $r = -0.602$ ,  $-0.78$ (均 $P < 0.01$ ).

### 3 讨论

中性粒细胞是寿命很短的一种细胞,正常衰老的PMN多以凋亡的方式死亡,之后多被巨噬细胞识别、吞噬、清除;凋亡时不发生细胞膜的破裂,被吞噬细胞吞噬后不释放其毒性细胞内容物,这对促进炎症的消散和局限发挥着重要的作用<sup>[5]</sup>.而在一些炎症性疾病如SAP时,PMN

**■同行评价**  
本研究通过建立SAP大鼠模型, 动态监测IL-18在血清中的表达, 测定PMN凋亡情况, 证明IL-18可能在SAP外周血PMN凋亡中发挥作用. 本研究有新意, 可能对SAP的发病机制和治疗有新的认识.

表 2 各组大鼠PMN凋亡率及血清IL-18的变化 (n = 10, mean ± SD)

分组	PMN凋亡率(%)			血清IL-18(μg/L)		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
ANP组	4.51 ± 0.69 <sup>bd</sup>	3.30 ± 0.59 <sup>bd</sup>	2.15 ± 0.45 <sup>bd</sup>	1 974.80 ± 374.54 <sup>bd</sup>	3 585.10 ± 466.26 <sup>bd</sup>	4 705.70 ± 296.30 <sup>bd</sup>
SO组	6.56 ± 0.62	6.67 ± 0.76	6.37 ± 1.01	804.25 ± 471.18	845.07 ± 514.30	756.08 ± 412.81

<sup>b</sup>P<0.01 vs SO组各时间点; <sup>d</sup>P<0.01 vs ANP组间.

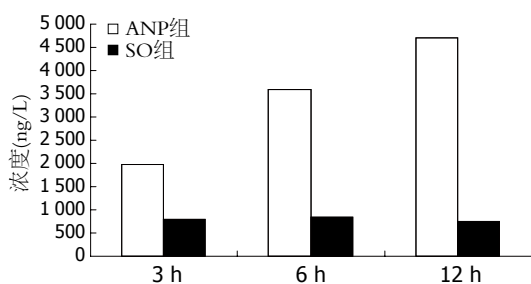


图 3 各组大鼠血清IL-18浓度变化.

的凋亡延迟, 中性粒细胞过度激活, 导致了其除了分泌细胞因子外, 还引起“呼吸爆发”, 释放大量的自由基、蛋白水解酶及炎症介质等有害物质引起组织的损害, 产生级联反应, 诱发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的发生. 导致炎症性疾病的病情加重, 造成恶性循环, 从而引起SAP等炎症性疾病时SIRS甚至多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome MODS)的发生<sup>[6]</sup>.

本实验发现, 在SAP时, 大鼠造模成功后的3 h、6 h、12 h, 外周血的PMN的凋亡率逐渐下降, 至12 h达到最低值(2.15 ± 0.45), 而SO组大鼠的凋亡率维持在较高的水平, 且各个时间点ANP组均较SO组为低, 两两比较差异有统计学意义(P<0.01), 在ANP组不同的时间点两两比较亦有统计学意义(P<0.01). 这与李俊等<sup>[7]</sup>的研究相一致, 他们发现, 在ANP组大鼠循环中的PMN凋亡明显降低, 提示PMN的凋亡参与了急性胰腺炎的病理生理过程, 并对急性胰腺炎的严重程度和转归有很大的影响.

IL-18是IL-1细胞因子超家族的成员, 是一种新近发现的促炎症细胞因子, 与IL-1β相似, 主要由枯否细胞和活化的巨噬细胞产生, 他由不具有生物活性的母体蛋白合成, 需要被caspase-1裂解为具有活性的成熟蛋白<sup>[8]</sup>. 近年来, 有学者研究发现, IL-18可以通过调控促凋亡蛋白、抗凋亡蛋白、TNF-α以及激活NF-κB等作用机制来抑制PMN的凋亡<sup>[1,9,10]</sup>. 关于IL-18与急性胰腺

炎的关系, 有学者研究发现血清IL-18的浓度与急性胰腺炎合并胰腺外脏器的损害存在着明显的相关性<sup>[11]</sup>. 也有学者报道, 在急性胰腺炎患者的血清中, IL-18的水平在病变早期就开始增加, 到病变后期, 患者出现胰腺坏死及全身并发症时都一直维持着较高的水平<sup>[12]</sup>. 虽然现在有众多学者研究了IL-18在SAP中的相关作用, 但是, 在IL-18在延迟SAP时中性粒细胞凋亡方面的研究少有报道.

本实验发现, 在造模成功后的3 h、6 h、12 h, ANP组大鼠血清中的IL-18的含量在逐渐升高, 在12 h时达到最高值(4705.70 ± 296.30); 而SO组含量较低, ANP组内相比较差异有统计学意义(P<0.01), ANP组与SO组各时间点相比较, 差异有统计学意义(P<0.01); 且ANP组大鼠外周血的PMN的凋亡率与血清中的IL-18的含量呈明显的负相关(r = -0.78; P<0.01), 与胰腺病理评分亦呈负相关(r = -0.602, 均P<0.01). 说明IL-18可能参与了ANP大鼠外周血PMN的凋亡延迟作用.

根据我们的研究发现, SAP大鼠外周血PMN的凋亡呈现明显延迟, 同时, 血清IL-18的含量逐渐增加, 二者呈明显的负相关(r = -0.78; P<0.05), 说明IL-18可能参与了PMN的凋亡延迟作用, 但是具体机制仍未完全清楚, 需要进一步的研究.

总之, IL-18在全身炎症包括SAP时是一个有力的抑制中性粒细胞凋亡的介质, 能够成为一个新的治疗靶点, 进而阻止中性粒细胞相关的组织损害以及随后发生的SIRS以及MODS.

#### 4 参考文献

- 1 Akhtar S, Li X, Kovacs EJ, Gamelli RL, Choudhry MA. Interleukin-18 delays neutrophil apoptosis following alcohol intoxication and burn injury. *Mol Med* 2011; 17: 88-94
- 2 Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Sawa H, Nakajima T, Ajiki T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Significant elevation of serum interleukin-18 levels in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 158-165
- 3 Banerjee AK, Galloway SW, Kingsnorth AN. Exper-

- imental models of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1994; 81: 1096-1103
- 4 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
- 5 Maianski NA, Maianski AN, Kuipers TW, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol* 2004; 111: 56-66
- 6 王晓龙, 周向东. 核转录因子- $\kappa$ B抑制因子对中性粒细胞凋亡的影响. *中国老年学杂志* 2010; 30: 194-196
- 7 李俊, 刘震, 李晓东, 陈玉祥, 张跃天, 黄卫, 刘友春, 方向, 刘续宝. 外周血中性粒细胞凋亡与急性胰腺炎的关系探讨. *四川医学* 2009; 30: 301-303
- 8 Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 213-224
- 9 Hirata J, Kotani J, Aoyama M, Kashiwamura S, Ueda H, Kuroda Y, Usami M, Okamura H, Marukawa S. A role for IL-18 in human neutrophil apoptosis. *Shock* 2008; 30: 628-633
- 10 史薇, 辜金莲, 曾峥, 黎钟燕, 朱人敏, 张晓华. 白介素-18在实验性重症急性胰腺炎肺损伤中的作用. *现代消化及介入诊疗* 2009; 14: 223-227
- 11 Wereszczynska-Siemiatkowska U, Mroczko B, Siemiatkowski A. Serum profiles of interleukin-18 in different severity forms of human acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1097-1102
- 12 Rau B, Baumgart K, Paszkowski AS, Mayer JM, Beger HG. Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: high correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications. *Crit Care Med* 2001; 29: 1556-1562

编辑 张姗姗 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆  
2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

# 联合应用p38MAPK抑制剂对降低结肠癌阿霉素耐药性的影响

李金鹏, 周巍, 张军, 于皆平, 于红刚

李金鹏, 周巍, 张军, 于皆平, 于红刚, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

李金鹏, 硕士, 主要从事消化系肿瘤的防治研究.

作者贡献分布: 此课题实验设计, 实验操作及论文撰写由李金鹏完成, 周巍和张军参与实验指导; 于皆平和于红刚参与论文修改.

通讯作者: 于红刚, 教授, 主任医师, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科. yuhonggang@yahoo.com

电话: 027-88041919-8455 传真: 027-88041919-8455

收稿日期: 2011-10-05 修回日期: 2011-11-20

接受日期: 2011-12-28 在线出版日期: 2012-01-18

## Use of p38 MAPK inhibitor reduces resistance of colon cancer cells to doxorubicin

Jin-Peng Li, Wei Zhou, Jun Zhang, Jie-Ping Yu, Hong-Gang Yu

Jin-Peng Li, Wei Zhou, Jun Zhang, Jie-Ping Yu, Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Hong-Gang Yu, Professor, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yuhonggang@yahoo.com

Received: 2011-10-05 Revised: 2011-11-20

Accepted: 2011-12-28 Published online: 2012-01-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate whether SB203580, a p38MAPK inhibitor, reduces resistance of colon cancer HCT-116 cells to doxorubicin and to explore possible mechanisms involved.

**METHODS:** Doxorubicin alone or in combination with SB203580 was used to treat subcultured HCT-116 cells. After treatment, cell growth was determined by MTT assay, and Akt and p-AKT expression was detected by Western blotting.

**RESULTS:** Either doxorubicin or SB203580 inhibited HCT-116 cell growth, and the latter had a stronger inhibitory effect than the former (26.60% vs 33.87%). Combined use of doxorubicin and SB203580 had more strong inhibitory effect than treatment with either of them alone (56.04%). Expression of Akt showed no significant difference

between cells treated with doxorubicin alone and those treated with combined doxorubicin and SB203580, while the phosphorylation of Akt was significantly higher in the doxorubicin group than in the combination group.

**CONCLUSION:** The p38 MAPK inhibitor SB203580 could block the Akt signaling pathways and increase the sensitivity of colon cancer cells to doxorubicin.

**Key Words:** Doxorubicin; p38MAPK inhibitor; Colon cancer; Anti-resistance

Li JP, Zhou W, Zhang J, Yu JP, Yu HG. Use of p38 MAPK inhibitor reduces resistance of colon cancer cells to doxorubicin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 145-148

### 摘要

**目的:** 探讨p38MAPK抑制剂通过Akt(蛋白激酶B)有关的信号途径对结肠癌细胞阿霉素(Doxorubicin)化疗敏感性的影响.

**方法:** 应用阿霉素(Dox)和p38MAPK特异性抑制剂SB203580及两者联合应用去处理结肠癌HCT-116细胞株. 采用MTT[3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐]法检测化疗药物对肿瘤细胞的生存抑制率, Western blot蛋白免疫印迹技术检测化疗药物处理后癌细胞Akt和磷酸化Akt的表达水平.

**结果:** MTT显示阿霉素和抑制剂SB203580对结肠癌细胞均有抑制作用(26.60%, 33.87%), 后者大于前者, 两者相同用量联合后癌细胞抑制率更明显(56.04%). Western blot显带说明阿霉素处理组较联合组的Akt表达水平并无明显差异, 而磷酸化的Akt水平较SB203580组和联合组显著升高. 亦即抑制剂组和联合组方案可降低结肠癌细胞磷酸化Akt的表达水平.

**结论:** p38MAPK抑制剂SB203580可能通过阻断P13K/Akt信号途径或其他有关Akt的通路

### 背景资料

以往的流行病学资料显示大肠癌中直肠癌、结肠癌的比例约1.5:1, 然而近年来, 随着国人生活水平的提高, 尤其是高脂高蛋白低纤维素的饮食习惯, 使大肠癌的发病率呈上升趋势.

### 同行评议者

高泽立, 副教授, 上海交大医学院九院周浦分院

## ■相关报道

国外学者报道有多种方法可去拮抗经典化疗药物的多重耐药(MDR): (1)对药物的化学结构本身加以改进; (2)联合应用针对耐药表达途径的化疗药物; (3)应用新的载体,使药物更好地进入肿瘤细胞并予以杀伤。

以提高结肠癌细胞阿霉素化疗的敏感性。

**关键词:** 阿霉素; p38MAPK; 抑制剂; 结肠癌; 抗耐药性

李金鹏, 周巍, 张军, 于皆平, 于红刚. 联合应用p38MAPK抑制剂对降低结肠癌阿霉素耐药性的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 145-148

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/145.asp>

## 0 引言

阿霉素(Doxorubicin)是一种临床上常用的抗生素类抗肿瘤药物,但其有效治疗剂量下的心脏毒性和随着作用时间的推移靶癌细胞产生的分子学抵抗机制限制了该药抗癌作用的发挥<sup>[1]</sup>. 所在课题组的前期研究显示Akt(蛋白激酶B)的活化可能参与了胃癌细胞的抗凋亡信号反应<sup>[2]</sup>. PI3K/Akt(磷脂酰肌醇3'激酶/蛋白激酶B)和p38MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)通路在细胞生物生长中起着重要的作用,且两条通路的酶级联反应有交叉作用,可促进肿瘤细胞的增殖,其选择性抑制剂LY294002和SB203580对多种实体肿瘤都有杀伤作用<sup>[3,4]</sup>. 本研究拟单独及联合应用阿霉素和p38MAPK通路抑制剂SB203580,观察和探讨阿霉素联合应用SB203580体外实验方案对降低结肠癌细胞阿霉素耐药性的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 结肠癌HCT-116细胞购自中科院上海细胞库,并由湖北省消化系疾病重点实验室传代保存. RPMI 1640培养基来源于美国Gibco公司; Akt抗体、磷酸化Akt抗体以及相关二抗试剂盒均为CST公司产品; 四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)和抑制剂SB203580购自美国Sigma公司; 阿霉素(Doxorubicin)购自美国Alex公司; 提取总蛋白试剂盒及Western blot所需其他试剂购自碧云天生物技术研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 传代培养结肠癌HCT-116细胞于含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640培养液中. 50 mL/L CO<sub>2</sub>浓度、37 °C培养环境下培养。

**1.2.2 MTT检测细胞增殖:** 用含100 mL/L胎牛血清的培养液将贴壁细胞配成单个细胞悬液,浓度为10 000-20 000/mL,每孔体积200 μL细胞接种到96孔板. 细胞贴壁后即加药. 每种处理设5个复孔,对照(不加药物处理)5个孔,阿霉素组5个孔,抑制剂组5个孔,药物联合组5个孔,共20

个孔. 阿霉素2 g/L,每5个孔加10 μL, SB203580抑制剂20 g/L,每5个孔加1 μL. 联合组药物用量同单用组. 药物均混匀于无血清培养基后再加入到相应孔中. 作用24 h后,每孔加MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐]溶液(5 g/L用PBS配制, pH7.4)10 μL. 继续孵育4 h后终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加100 μL DMSO,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解. 选择A<sub>490nm</sub>波长在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值,记录结果并计算细胞抑制率 = (空白组吸光度值均值 - 各浓度组吸光度值均值/空白组吸光度值均值) × 100%,并绘制直方图. 实验重复3次。

**1.2.3 6孔板加药处理:** 对照组设1个孔(不加任何药物),实验组阿霉素(2 g/L)10 μL处理2个孔,抑制剂(20 g/L)1 μL处理1个孔和两者联合(同上浓度同体积)处理2个孔. 以细胞长至80%-90%孔域并处于对数生长期开始加药,作用24 h后提取各组总蛋白,行Western blot检测各组蛋白Akt和磷酸化的Akt水平(以β-actin蛋白为内参对照). 步骤包括提取并测定总蛋白浓度,计算20 μg体积下的上样量,蛋白电泳,纤维膜电转和X光胶片显影等。

## 2 结果

MTT结果显示阿霉素和抑制剂SB203580对结肠癌细胞的生长较对照组均有抑制作用(26.60%)(33.87%),后者大于前者,两药联合处理癌细胞后抑制率则更明显(56.04%,图1). Western blot结果提示阿霉素处理组较抑制剂组和联合组的Akt表达无显著差异,而磷酸化的Akt阿霉素组较抑制剂组和联合组显著升高,也即表明抑制剂组和联合组方案可降低结肠癌细胞磷酸化Akt的表达水平(图2).

## 3 讨论

阿霉素Doxorubicin(DOX),是蒽环霉素类抗生素,也是临床上常用的抗肿瘤化合物. 其主要是干扰快速增长的肿瘤细胞的增殖,通过结合和嵌入癌细胞DNA分子进而抑制靶细胞的DNA和RNA的生物合成起到抗癌作用. 但是有效治疗剂量下的心脏毒性和随着作用时间的推移癌细胞产生的分子学抵抗机制限制了阿霉素的抗肿瘤应用<sup>[1]</sup>.

磷酸肌醇3'激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路在多种癌细胞中呈现高表达,蛋白激酶B(Akt)

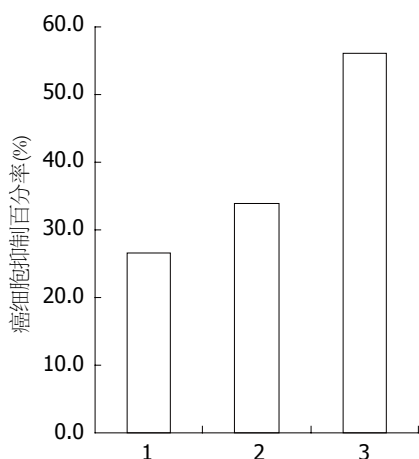


图 1 各处理组药物癌细胞的抑制率. 1: 阿霉素组; 2: 抑制剂组; 3: 联合组.

的活化位于PI3K超家族信号转导过程中的下游, 主要负责由PI3K始动的生物信息的传导, 处于这一通路的中心环节. 采用特异性抑制剂降低其下游磷酸化Akt的水平, 从而阻断Akt的磷酸化活化及其下游信号级联反应进而阻断PI3K通路的生物学效应<sup>[5]</sup>. 一些肿瘤细胞可通过对负责细胞生长和凋亡的细胞信息传导通路进行调控而获得对化疗药物的耐药性<sup>[6]</sup>. 我们前期的研究<sup>[7]</sup>发现PI3K/Akt通路的激活能抑制或下调p27kip1的表达(一种广谱周期蛋白依赖性激酶抑制剂), 进而使肿瘤细胞产生对细胞毒药物的抵抗和继续增值.

研究表明许多肿瘤细胞的生长和增值伴有p38MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)的活化, 其特异性抑制剂SB203580则表现出对多种恶性肿瘤细胞(食管癌、子宫内膜癌)的杀伤和促凋亡特性<sup>[8,9]</sup>. 英国科学家<sup>[10]</sup>发现p38MAPK抑制剂SB203580与5-氟尿嘧啶联合作用于结肠癌细胞, 通过上调Bax(一种凋亡蛋白)的表达和caspase酶(半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶, 一种凋亡蛋白酶)的活性可提高后者对癌细胞的杀伤敏感性, 提示SB203580可提高经典化疗药物对结肠癌细胞的杀伤, 可通过不同的信号传导通路起到抗化疗耐药作用. 韩国学者<sup>[11]</sup>研究认为, SB203580可加强抗肿瘤药物Exisulind(一种新型选择性凋亡性抗肿瘤药物)对结肠癌的敏感性. 被Exisulind处理的结肠癌细胞磷酸化的p38MAPK升高, 而其选择性抑制剂SB203580可抑制p38MAPK的磷酸化和诱导caspase酶的活化, 进而提高该化疗药物的抗肿瘤效果.

p38MAPK和PI3K/Akt作为整体通路参与某些病理生理过程. 且联合抑制该整体通路有抑

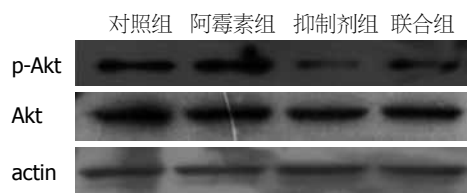


图 2 各处理组Akt和磷酸化Akt表达水平.

制癌细胞增值的作用. 研究人员观察到在糖尿病神经病理性疼痛的形成中p38MAPK和PI3K/Akt信号通路都发生了高度激活, p38MAPK特异性抑制药可同时阻断p38MAPK和PI3K/Akt两条信号通路. 此时PI3K/Akt是p38MAPK的下游信号通路<sup>[12]</sup>. MK2(MAPKAP激酶)和p38MAPK与HSP27组成复合物, 再与Akt结合可以活化之, 进而激活PI3K/Akt通路<sup>[13]</sup>. 在炎症反应过程中, p38MAPK抑制剂SB203580可以同时阻断AKT和p38MAPK这两个通路<sup>[14]</sup>. 有学者<sup>[15]</sup>指出ERK<sub>1/2</sub>的抑制剂(PD98059)和p38MAPK抑制剂(SB203580可以减少或者清除磷酸化的Akt, 进而阻断其下游信号传导. 研究显示<sup>[3]</sup>PI3K/Akt与p38MAPK通路在骨骼肌生成过程中起协调作用. 也揭示二者可能存在内在关联. 在骨骼肌的生成和分化过程中Akt在p38MAPK通路下游发挥生物学作用, 阻断p38途径可抑制Akt的激活, 在肌生成过程中发现p38途径可在转录水平和蛋白水平直接影响Akt及其下游的级联反映, 进而影响细胞的生长和增殖. PI3K和p38通路在细胞生物生长中起着重要的作用, 并且相互作用. 对PI3K/Akt和p38MAPK通路的抑制可增加和提高阿霉素诱导的癌细胞凋亡<sup>[4]</sup>. 国外学者<sup>[16]</sup>指出GRP78(一种葡萄糖调节蛋白)可作用于MAPK/PI3K通路, 抑制人肿瘤的生长, 这就提示这两个通路之间的是有密切联系的, 这吸引着我们进一步研究.

近年来诸多的研究显示许多癌细胞对经典抗癌药物如阿霉素产生耐药性, 其中就涉及到磷酸化的Akt水平升高<sup>[17]</sup>. 本课题组前期研究<sup>[2]</sup>在体外培养的细胞中发现PI3K/Akt通路与胃癌细胞化疗耐药性的形成密切相关, 发现化疗药物作用于结肠癌细胞, 一方面诱导了细胞凋亡, 另一方面也活化了PI3K通路并通过一系列的下游信号分子抑制细胞凋亡. PI3K通路的活化可能是肿瘤细胞抵御外来损伤因子的一种自我保护, 这种自我保护作用降低了化疗药物的敏感性, 这可能是导致化疗药物耐药的机制之一.

#### ■ 创新盘点

阿霉素具有抗肿瘤活性, 但易产生多重耐药现象. p38MAPK抑制剂SB203580除了具有拮抗炎症通路作用外, 也具有对多种实体肿瘤的杀伤效应. 如果后者可以去阻断阿霉素的某种耐药机制, 那么两者联合, 不仅可以起到各自的抗肿瘤效果, 而且还可以增强疗效.

### ■同行评价

本文选题紧扣当前肿瘤治疗热点,密切联系临床,选题合理,实验设计严谨,统计学应用合理,参考文献较新,非常值得临床医生阅读。

我们此次实验观察到运用阿霉素和SB203580以及两者联合处理结肠癌细胞后癌细胞Akt的蛋白表达水平并无显著差异性趋势,而抑制剂组和联合组癌细胞Akt的磷酸化水平则较对照组和阿霉素组显著下降,显示该抑制剂可阻断PI3K/Akt或Akt相关的信号通路,这与文献报道的一致。MTT实验结果显示HCT-116细胞受药物处理后生长明显抑制。其中SB203580(20 g/L)联合阿霉素(2mg/mL)对细胞的生长抑制作用要显著优于相同浓度的SB203580单用组和阿霉素单用组。上述实验结果表明p38MAPK抑制剂SB203580也具有抗结肠癌的作用,且其与阿霉素联合作用后可明显提高阿霉素对结肠癌细胞株的抑制增殖作用。SB203580与阿霉素具有协同抗结肠癌效果,可能是SB203580通过阻断Akt相关的信号途径,抑制其磷酸化活化。进而起到促进癌细胞凋亡和抑制其增殖作用。

针对经典化疗药物的耐药性问题,解决方法之一是联合应用化疗药物。如果肿瘤患者接受化疗治疗前能了解此种肿瘤增殖由哪条或哪几条传导通路起主要作用,就可有针对性地应用传导通路抑制剂,提高化疗效果<sup>[8]</sup>。本研究表明,p38MAPK抑制剂SB203580对结肠癌细胞阿霉素耐药具有逆转作用,通过降低细胞信号级联反应中的Akt磷酸化途径诱导凋亡可能为其提高阿霉素化疗敏感性的机制之一。加上该抑制剂的阻断p38MAPK的磷酸化作用,联合应用阿霉素可达到较为理想的抗肿瘤效果。故我们认为p38MAPK选择性抑制剂SB203580和传统化疗药物的联合应用在肿瘤的防治方面可提供一种低毒而高效的化疗方案,但还需进一步的体内实验和临床研究和证实。

### 4 参考文献

- Lin R, Shi Ng L, Wang CH. In vitro study of anti-cancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles. *Biomaterials* 2005; 26: 4476-4485
- 艾耀伟, 于红刚, 于皆平, 杨艳, 李欢, 胡晓雯. 磷脂酰肌醇3'-激酶通路活化对化疗药物诱导的胃癌细胞凋亡的影响. *中华内科杂志* 2007; 46: 588
- Cabane C, Coldefy AS, Yeow K, Dérjard B. The p38 pathway regulates Akt both at the protein and transcriptional activation levels during myogenesis. *Cell Signal* 2004; 16: 1405-1415
- Lee ER, Kim JY, Kang YJ, Ahn JY, Kim JH, Kim BW, Choi HY, Jeong MY, Cho SG. Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 958-968
- Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 193-204
- Poh TW, Pervaiz S. LY294002 and LY303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen peroxide production independent of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Cancer Res* 2005; 65: 6264-6274
- 张利, 于红刚, 于皆平, 罗和生. PI3K/Akt/p27kip1通道介导胃癌细胞对阿霉素、足叶乙甙化疗的耐药性及其机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 575-581
- 李小毛, 肖兰, 杨越波, 沈慧敏, 曾海涛, 王泽华. SB203580与雷帕霉素联合对子宫内癌Ishikawa细胞的体外抗肿瘤作用. *广东医学* 2009; 30: 26
- Ogunwobi O, Mutungi G, Beales IL. Leptin stimulates proliferation and inhibits apoptosis in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells by cyclooxygenase-2-dependent, prostaglandin-E2-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor and c-Jun NH2-terminal kinase activation. *Endocrinology* 2006; 147: 4505-4516
- Yang SY, Miah A, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet M. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *Int J Oncol* 2011; 38: 1695-1702
- Lim SJ, Lee YJ, Lee E. p38MAPK inhibitor SB203580 sensitizes human SNU-C4 colon cancer cells to exsulind-induced apoptosis. *Oncol Rep* 2006; 16: 1131-1135
- 柯昌斌, 黄晓霞, 许先成, 李清, 秦成名, 刘菊英. P38 MAPK和PI3K/Akt信号通路在大鼠糖尿病神经病理性疼痛中的交互作用. *临床麻醉学杂志* 2010; 26: 790
- Rane MJ, Klein JB. Regulation of neutrophil apoptosis by modulation of PKB/Akt activation. *Front Biosci* 2009; 14: 2400-2412
- Wang Y, Zeigler MM, Lam GK, Hunter MG, Eubank TD, Khramtsov VV, Tridandapani S, Sen CK, Marsh CB. The role of the NADPH oxidase complex, p38 MAPK, and Akt in regulating human monocyte/macrophage survival. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 68-77
- Yang XS, Liu S, Liu YJ, Liu JW, Liu TJ, Wang XQ, Yan Q. Overexpression of fucosyltransferase IV promotes A431 cell proliferation through activating MAPK and PI3K/Akt signaling pathways. *J Cell Physiol* 2010; 225: 612-619
- Kelber JA, Panopoulos AD, Shani G, Booker EC, Belmonte JC, Vale WW, Gray PC. Blockade of Cripto binding to cell surface GRP78 inhibits oncogenic Cripto signaling via MAPK/PI3K and Smad2/3 pathways. *Oncogene* 2009; 28: 2324-2336
- 张莲芬, 马晓峰, 张小平, 朱威, 金坚. 阿霉素和紫杉醇诱发的人乳腺癌耐药细胞株的比较研究. *中国药理学通报* 2009; 25: 609

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 经鼻胃镜取出食管异物19例

黄秀江, 吴良慧, 杨凯茜, 方德娟, 李爱英, 杨瑾

黄秀江, 吴良慧, 杨凯茜, 方德娟, 李爱英, 杨瑾, 黔东南州人民医院消化内科 贵州省凯里市 556000

黄秀江, 副主任医师, 主要从事消化内科内镜的研究。

作者贡献分布: 黄秀江进行此课题的数据采集、统计分析、论文撰写; 吴良慧与杨凯茜对此课题设计、内容审阅及修改; 方德娟、李爱英及杨瑾对此课题实施、总结和修改。

通讯作者: 黄秀江, 副主任医师, 556000, 贵州省凯里市韶山路31号, 黔东南州人民医院消化内科。hxj0118@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2011-10-23 修回日期: 2011-11-13

接受日期: 2011-11-25 在线出版日期: 2012-01-18

## Nasal endoscopy for removal of foreign bodies in the esophageal tract: an analysis of 19 cases

Xiu-Jiang Huang, Liang-Hui Wu, Kai-Xi Yang, De-Juan Fang, Ai-Ying Li, Jin Yang

Xiu-Jiang Huang, Liang-Hui Wu, Kai-Xi Yang, De-Juan Fang, Ai-Ying Li, Jin Yang, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Qian Southeast Miaozi Dongzu Autonomous Prefecture, Kaili 556000, Guizhou Province, China

Correspondence to: Xiu-Jiang Huang, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Qian Southeast Miaozi Dongzu Autonomous Prefecture, 31 Shao Shan South Road, Kaili 556000, Guizhou Province, China. hxj0118@yahoo.com.cn

Received: 2011-10-23 Revised: 2011-11-13

Accepted: 2011-11-25 Published online: 2012-01-18

### Abstract

**AIM:** To explore the methods and skills of nasal endoscopy for removal of foreign bodies in the esophageal tract.

**METHODS:** From January 2010 to October 2011, 32 patients with foreign bodies in the esophageal tract were treated at our hospital. Among them, 19 underwent nasal endoscopy, and others were treated by surgery or other methods. The clinical data for 19 patients who underwent nasal endoscopy were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** Of patients who did not undergo nasal endoscopy, foreign bodies were removed by loop under a normal endoscope in 12 cases and by surgery in 1 case. Of patients who underwent nasal endoscopy, all foreign bodies in the esoph-

ageal tract were successfully removed. The duration of the procedures was 2-10 minutes. During the procedures, no bleeding, tearing, perforation or other serious complications in the throat and esophagus occurred.

**CONCLUSION:** Nasal endoscopy allows to safely and easily remove sharp or flat foreign bodies from the esophageal tract with less pain, few complications, high efficiency.

**Key Words:** Nasal endoscopy; Esophageal foreign bodies; Clinical application

Huang XJ, Wu LH, Yang KX, Fang DJ, Li AY, Yang J. Nasal endoscopy for removal of foreign bodies in the esophageal tract: an analysis of 19 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 149-151

### 摘要

**目的:** 探讨经鼻胃镜治疗食管异物的方法及技巧。

**方法:** 2010-01/2011-10我院共发现食管异物患者32例, 其中, 13例通过其他手术方法取出, 19例经鼻插入胃镜的方法取出。本文回顾性分析急诊经鼻胃镜下食管异物取出术患者19例的临床资料。

**结果:** 32例患者中12例球型或团块状异物经常规胃镜圈套取出; 1例为义齿嵌顿1 wk, 位于主动脉弓附近, 义齿钢丝穿透食管壁, 内镜试取不成功, 转外科手术取出。19例食管尖锐异物和扁平规则异物经鼻胃镜成功取出。操作时间2-10 min, 术中未出现咽部及食管出血、撕裂、穿孔等严重并发症。

**结论:** 经鼻胃镜取出食管尖锐异物、扁平规则异物具有安全简便, 患者痛苦小, 并发症少, 成功率高等特点, 是一种较为理想的治疗方法, 为临床治疗食管异物提供了新的途径。

**关键词:** 经鼻胃镜; 食管异物; 临床应用

黄秀江, 吴良慧, 杨凯茜, 方德娟, 李爱英, 杨瑾。经鼻胃镜取出食管异物19例。世界华人消化杂志 2012; 20(2): 149-151

### 背景资料

近年来, 麻醉胃镜应用于食管异物取出术, 可消除患者的痛苦, 减少呕吐的发生, 提高了取出的成功率。但丙泊酚等麻醉药品有一定的呼吸循环抑制作用, 增加了医疗风险以及患者的医疗负担。

### 同行评议者

周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

## ■创新盘点

经鼻胃镜取出食管异物, 由于患者恶心呕吐等反应少, 对食管入口及上段异物鼻胃镜易于抓取, 提高了治疗的成功率。

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/149.asp>

## 0 引言

食管异物是临床常见急症, 处理方法以内镜取出为首选, 常规食管镜及胃镜经口插入治疗, 患者呕吐等反应较重, 异物抓取困难. 我院2010-01/2011-10应用超细胃镜经鼻插入取出食管尖锐异物和扁平异物19例, 该方法操作简便, 安全有效, 患者痛苦小, 现报道如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2010-01/2011-10共发现食管异物患者32例, 其中, 12例球型或团块状异物经常规胃镜圈套取出; 1例为义齿嵌顿1 wk, 位于主动脉弓附近, 义齿钢丝穿透食管壁, 内镜试取不成功, 转外科手术取出; 19例经鼻插入胃镜的方法取出食管异物, 其中男10例, 女9例, 年龄8-74岁, 平均46.3岁. 就诊时间最短1 h, 最长7 d. 食管尖锐异物15例, 其中鱼刺4例、骨刺11例; 食管扁平边缘规则异物4例, 其中硬币2例、塑料瓶盖2例. 异物滞留部位: 食管第1狭窄(距前鼻孔约18-20 cm处)12例, 第2狭窄(距前鼻孔约24-26 cm处) 6例, 第3狭窄(距前鼻孔约38-40 cm处) 1例.

### 1.2 方法

1.2.1 器械准备: 采用Olympus GIF-N260和Pentax EG-1540前视式鼻胃镜, 有效工作长度1.03 m, 插入部外径5.0-5.3 mm, 内镜钳道直径2.0 mm; 根据异物大小、形态、性质选择钳取异物器械, 包括可通过内镜钳道的活检钳、鼠齿钳、鳄鱼钳等, 钳子直径约1.8 mm.

1.2.2 术前准备: 术前详细询问病史, 了解吞服异物的性质、大小、时间等, 行颈胸正侧位X线检查, 明确异物位置、形状及与邻近器官的关系等. 不需严格禁饮禁食, 术前15 min于两侧鼻孔内滴入数滴盐酸萘甲唑林溶液, 使鼻甲收缩, 便于术中内镜通过, 同时含服利多卡因胶浆完成咽部表面麻醉. 患者取左侧卧位, 内镜弯曲部表面涂擦盐酸丁卡因胶浆, 选择较宽的一侧鼻腔插入<sup>[1]</sup>.

1.2.3 手术: (1)食管尖锐异物: 经鼻胃镜插入部及镜身外径细小, 大多数情况下可通过异物嵌顿处, 充分观察异物的大小、形态、位置, 了解是否合并黏膜损伤、感染以及异物的移动度等. 尖锐异物大多嵌入食管壁形成嵌顿, 对两端嵌顿的异物, 应利用异物钳调整内镜头端将嵌顿一端松解游离. 长条状异物可用异物钳钳夹上

端, 调整异物长轴方向与镜身保持一致; V字型异物一般V型开口向上, 可将其推送至胃腔, 调节开口向下然后取出; 边缘不规则且锐利的异物, 经食管入口时应尽量将异物拉近胃镜头端缓慢退出, 常规头部后仰, 使咽部与食管尽可能成直线<sup>[2]</sup>. 直径较小的条状异物可经鼻腔直接取出, 体积较大或形态不规则异物不能通过鼻腔, 可将异物放置于患者口咽部, 退出内镜及异物钳后嘱患者经口吐出. 对不能主动配合的患者, 可在异物钳释放前经口置入止血钳夹住异物后经口取出. 异物取出后, 再次进镜观察是否有组织损伤及异物遗留等<sup>[3-7]</sup>. (2)食管扁平规则异物: 此类异物常成游离状态, 内镜在食管腔充气扩张或内镜通过时异物容易滑脱入胃内. 胃镜不必越过异物, 应抓住时机钳夹异物近端, 可选择鳄鱼钳等异物钳增加其钳取的稳固性. 在不影响视野的情况下尽量拉近镜身先端部, 经过食管入口时应缓慢退镜. 将异物放置于患者口咽部, 退出内镜及异物钳后嘱患者吐出.

1.2.4 术后处理: 对异物嵌顿引起食管黏膜擦伤有出血、糜烂、溃疡等, 可术后予禁食, 应用止血药、抑酸剂治疗, 合并感染者应用抗生素. 无食管擦伤糜烂出血者, 1 wk后随访.

## 2 结果

32例食管异物除12例球型或团块状异物经常规胃镜圈套取出, 另1例为义齿嵌顿1 wk, 位于主动脉弓附近, 义齿钢丝穿透食管壁, 内镜试取不成功, 转外科手术取出. 其余19例患者食管尖锐异物及扁平边缘规则异物经鼻胃镜成功取出, 内镜操作时间2-10 min. 12例食管异物取出后异物嵌顿处有轻度黏膜糜烂, 术中未出现咽部及食管出血、撕裂、穿孔等严重并发症.

## 3 讨论

食管异物是临床常见急诊, 异物本身或处理不当可引起大出血、穿孔、纵膈脓肿等严重并发症. 内镜下取食管异物是目前临床上较为安全、快捷、有效地方法. 但常规食管镜和胃镜经口插入, 患者恶心、呕吐等反应较重, 在食管入口及上段异物取出过程中, 异物抓取困难. 近年来, 麻醉胃镜应用于食管异物取出术, 可消除患者的痛苦, 减少呕吐的发生, 提高了取出的成功率<sup>[8-13]</sup>. 但丙泊酚等麻醉药品有一定的呼吸循环抑制作用, 增加了医疗风险以及患者的医疗负担<sup>[14,15]</sup>. 食管异物患者吞咽困难、疼痛等症状

明显, 希望急诊取出异物, 但麻醉下胃镜常规需禁食4-6 h, 治疗只能择期进行。

我们通过经鼻胃镜取出尖锐异物、扁平规则异物, 取得了较好的效果, 与常规胃镜相比较具有以下优点: (1)经鼻插入胃镜镜身不压迫舌根, 减少了患者的恶心、呕吐等反应, 有效地减轻了患者的痛苦; (2)鼻胃镜镜身细小, 可越过大多数嵌顿的异物, 对异物的大小、形态、嵌顿情况可进行全面的观察; (3)由于患者恶心呕吐等反应少, 对食管入口及上段异物鼻胃镜易于抓取, 提高了治疗的成功率; (4)术前无需严格禁食的要求, 可急诊内镜取出异物, 及时解除患者的痛苦。

异物的多样性决定了治疗方案的个性化, 我们应注意: (1)目前可通过鼻胃镜钳道的器械只有活检钳、鳄嘴钳、鼠齿钳等, 对较大的异物以及球型异物(食团、果仁等)不易抓取, 需选择常规胃镜经口圈套取出; (2)对边缘锐利的不规则异物应将其锋利的边缘完全纳入保护套管内后取出, 经鼻插入胃镜不能放置保护套管, 需选择常规胃镜经口圈套取出; (3)经鼻胃镜将异物放置于口咽部时, 患者若吞咽可使异物再次滑入食管, 误吸可进入气管内, 对不能主动配合的患者, 可在异物钳释放前经口置入止血钳钳夹住异物后经口取出; (4)食管中段主动脉弓附近的嵌顿性异物, 应首选外科手术治疗。

总之, 经鼻胃镜取出食管尖锐异物、扁平规则异物具有安全简便, 患者痛苦小, 并发症少,

成功率高等特点, 是一种较为理想的治疗方法, 为临床治疗食管异物提供了新的途径。

#### 4 参考文献

- 1 黄秀江, 刘杰民. 超细胃镜经鼻检查的临床应用. 中华消化内镜杂志 2006; 23: 383-384
- 2 李益农, 陆星华. 消化内镜学. 北京: 科学出版社, 2006: 670-672
- 3 杜虎, 王萍. 急诊胃镜下取食管尖锐异物48例体会. 中国现代医药杂志 2009; 11: 84-85
- 4 胡茂东, 高娜, 宋云霞. 上消化道异物胃镜下治疗60例分析. 中外医学研究 2011; 3: 87-88
- 5 赵庆儒. 食管异物取出的临床体会. 中国医药指南 2010; 1: 77-78
- 6 黄哲洙, 孙坤. 小儿食管异物120例临床分析. 中国现代医生 2008; 35: 159-160
- 7 李金辉, 张福才, 郑秀春. 胃镜在上消化道异物治疗中的作用. 中国医药导报 2006; 11: 54
- 8 孔庆印, 曾宪忠, 李兆申. 美国消化道异物处理指南. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 69-70
- 9 王盛根, 王寿九, 郭峰, 涂金兰, 吴楠, 潘桂红, 焦霞. 91例上消化道异物胃镜治疗体会. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 19
- 10 叶明凡, 韩涛, 陈同, 欧德彬. 26例胸段食管异物的临床治疗体会. 中国中医药咨讯 2009; 2: 32
- 11 孙红, 王飞. 经胃镜食管异物取出58例体会. 中国当代医药 2010; 34: 166-170
- 12 许科斌, 屠惠明, 乔峤. 内镜下使用透明帽取食管异物38例的临床应用. 实用临床医药杂志 2009; 2: 56-57
- 13 唐玉虎, 姜东方, 石瑞春, 靳伟民, 张三定, 姚春蓉, 石宝玲, 王敏. 穿线钳取法治疗嵌顿性食管异物. 中华消化内镜杂志 2007; 24: 151-152
- 14 王震凯, 汪芳裕, 刘炯, 许文安, 王少东. 无痛胃镜在食管上段异物取出术中的应用体会. 东南国防医药 2010; 12: 246-247
- 15 盛小艳, 赵春明, 董伟群, 袁小凌. 无痛胃镜在老年人上消化道异物取出术中的应用与护理. 东南国防医药 2008; 10: 371-372

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

#### ■同行评价

经鼻胃镜取出食管尖锐异物、扁平规则异物是一种较为理想的治疗方法, 为临床治疗食管异物提供了新的途径。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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)

## 器械吻合在胸中下段食管癌手术中应用231例

游咏, 莫靛, 陈碾, 贺大璞, 冯耀光

### ■背景资料

食管癌手术治疗中, 上消化道重建多采用胸内食管胃吻合术, 术后吻合口出血、吻合口瘘、吻合口狭窄和胃食管反流是常见并发症。机械吻合使胃与食管黏膜对合整齐, 有利于组织的愈合, 减少了吻合口瘘, 降低了并发症的发生率, 明显降低了病死率。

游咏, 南华大学医学院临床技能中心 湖南省衡阳市 421001  
莫靛, 陈碾, 贺大璞, 冯耀光, 南华大学附属第一医院心胸外科 湖南省衡阳市 421001

作者贡献分布: 游咏与莫靛对此文所作贡献均等; 此课题由游咏、莫靛、陈碾、贺大璞及冯耀光设计; 研究过程由莫靛、陈碾、贺大璞及冯耀光操作完成; 数据分析由莫靛、陈碾、贺大璞及冯耀光完成; 本论文写作由游咏完成。

通讯作者: 游咏, 讲师, 421001, 湖南省衡阳市, 湖南省衡阳市南华大学医学院临床技能中心, yoyomo916@163.com

收稿日期: 2011-05-10 修回日期: 2011-11-07

接受日期: 2011-12-25 在线出版日期: 2012-01-18

### Mechanical anastomosis after surgical removal of esophageal carcinoma: an analysis of 231 cases

Yong You, Liang Mo, Nian Chen, Da-Pu He, Yao-Guang Feng

Yong You, Clinical Skills Center, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China  
Liang Mo, Nian Chen, Da-Pu He, Yao-Guang Feng, Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Yong You, Lecturer, Clinical Skills Center, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. yoyomo916@163.com

Received: 2011-05-10 Revised: 2011-11-07

Accepted: 2011-12-25 Published online: 2012-01-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the clinical value of mechanical anastomosis after surgical removal of esophageal carcinoma.

**METHODS:** The clinical data for 231 patients who underwent surgical resection of middle and inferior esophageal carcinoma located in the middle and inferior segments and received esophagogastric anastomosis using a domestic WH-Y gastrointestinal stapler from January 2005 to November 2009 were retrospectively analyzed.

**RESULTS:** Of 231 cases, the incidence of anastomotic fistula was 1.30% (3/231). One patient developed anastomotic fistula on postoperative day 4 and died, and two patients developed

anastomotic fistula on postoperative day 10 and were cured after medical conservative treatment. The incidence of anastomotic constriction was 2.16% (3/231) after 4 weeks, and all cases were cured after endoscopic balloon dilation. The mean operation time, average bleeding volume and mean postoperative hospital stay were 160 min, 500 mL and 15 d, respectively. A total of 207 patients were followed up, and the 1-, 3- and 5-year survival rates were 53.1%, 27.5% and 18.4%, respectively.

**CONCLUSION:** Intrathoracic esophagogastric end-to-side anastomosis using a stapler is reliable in the management of patients after surgical removal of esophageal carcinoma.

**Key Words:** Esophageal carcinoma; Mechanical anastomosis; Cancer

You Y, Mo L, Chen N, He DP, Feng YG. Mechanical anastomosis after surgical removal of esophageal carcinoma: an analysis of 231 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 152-154

### 摘要

**目的:** 总结胸中下段食管癌切除术后胸内食管胃端侧器械吻合的经验和体会。

**方法:** 使用国产WH-Y型胃肠吻合器对231例胸中下段食管癌患者进行胸内器械吻合。231例患者术前均经上消化道钡餐造影及纤维胃镜病理检查明确诊断为食管鳞癌。其中胸中段食管癌51例, 下段食管癌180例。病变长度0.5-12 cm。本文回顾性分析2005-01/2009-12食管癌患者231例的临床资料。

**结果:** 本组231例中, 吻合口瘘3例, 发生率1.30%(3/231), 其中死亡1例, 为术后4 d出现吻合口瘘。余2例为术后10 d出现吻合口瘘, 均经通畅引流、营养支持等内科保守治疗治愈。术后4 w发生吻合口狭窄2.16%(3/231), 均予以胃镜下球囊扩张后治愈。本组手术平均耗时160 min, 出血平均为500 mL, 术后平均住院15 d。术后随访207例, 1、3、5年生存率为53.1%、27.5%、18.4%。

### ■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

**结论:**应用器械吻合行胸内食管胃端侧吻合术效果可靠, 操作方便。

**关键词:**食管癌; 器械吻合; 肿瘤

游咏, 莫颢, 陈磊, 贺大璞, 冯耀光. 器械吻合在胸中下段食管癌手术中应用231例. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 152-154  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/152.asp

## 0 引言

在食管癌手术治疗中, 上消化道重建多采用胸内食管胃吻合术, 术后吻合口出血、吻合口瘘、吻合口狭窄和胃食管反流是常见并发症. 2005-01/2009-12我院使用国产WH-Y型胃肠吻合器对231例胸中下段食管癌患者进行肿瘤切除后胸内器械吻合, 取得满意效果, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胸内食管胃端侧器械吻合共231例, 其中男204例, 女27例, 年龄37-76岁, 平均52岁; 全部患者术前经上消化道钡餐造影及纤维胃镜病理检查明确诊断为食管鳞癌. 其中胸中段食管癌51例, 下段食管癌180例. 病变长度0.5-12 cm.

**1.2 方法** 全组均采用双腔气管插管, 全麻, 取右侧卧位, 经左胸前外侧切口断第6或第7肋进胸, 探查明确肿瘤可以切除后, 打开膈肌, 探查腹部情况, 再由下向上游离胸部食管, 分离胃大小弯缝扎切断胃左动脉, 把胃沿食管床上提至胸腔, 采用常州生产的国产WH-Y型一次性管状吻合器, 直径为26 mm. 在食管肿瘤上方约2 cm切开食管插入抵钉座, 距离肿瘤5 cm以上7-0线荷包缝合, 将食管壁组织均匀结扎在抵钉座的中心杆上, 由贲门口置入吻合器达胃后壁最高点, 戳一小洞, 引入抵钉座插入器身, 顺时针旋紧调节螺杆, 使指针在到达钉合间距指示区中间时, 打开保险闸, 握紧手柄, 击发吻合钉完成吻合切割, 握持手柄30 s后, 放松螺杆, 缓慢退出吻合器, 仔细检查切下的食管及胃两块环形组织是否完整, 放入胃管然后全层间断减张缝合吻合口, 吻合口周围涂适量医用止血胶, 封闭贲门部. 大部分胃纳入食管床内与纵隔胸膜缝合固定, 将胃尽量放平拉直, 注意胸胃不能太多, 应保持适当张力, 否则易引起胃扩张. 然后胸胃与纵隔胸膜减张缝合数针. 其中弓上吻合81例, 弓下吻合150例, 止血、关膈肌、置胸管、关胸。

## 2 结果

本组231例1次吻合成功, 吻合口瘘3例, 总发生

率1.30%(3/231), 其中死亡1例, 为术后4 d出现吻合口瘘. 余2例为术后10 d出现吻合口瘘, 均经通畅引流、营养支持等内科保守治疗治愈. 术后4 wk发生吻合口狭窄5例2.16%(3/231), 均予以胃镜下球囊扩张后治愈. 本组手术平均耗时160 min, 出血平均为500 mL, 术后平均住院15 d. 术后随访207例, 1、3、5年生存率为53.1%、27.5%、18.4%。

## 3 讨论

器械吻合器的基本原理主要是依据订书机的原理设计, 吻合钉在外力的作用下, 穿过需要吻合的食管和胃(或肠)壁, 然后使吻合钉弯曲成“B”形, 将两层组织缝在一起<sup>[1]</sup>. 1827年Denans研制出一种活动性金属“箍环”, 用于治疗小肠破损, 随后各种缝合器和吻合器在临床上得到广泛应用. 器械吻合技术用于食管胃外科已有27年的历史, 最初是端端吻合器(EEA), 我国1972年邵令方等研制出食管-胃吻合器首先成功用于临床, 1977年上海手术器械六厂与上海中山医院协作研制了GF-1型管状吻合器, 在全国开始应用. 食管癌手术中行胃-食管胸内吻合时, 使用吻合器, 以器械吻合替代繁琐的手工缝合, 可明显缩短手术时间. 2005年以前我们采用手工食管胸内吻合, 平均吻合时间为40 min, 自2005年以后, 使用管状吻合器行器械吻合, 平均吻合时间为20 min, 手术时间缩短了近50%。

器械吻合术后重要并发症仍是吻合口瘘和吻合口狭窄, 而由于手术时间缩短, 减少食管及残端的暴露, 使胸腔及吻合区感染的机会减少, 且机械吻合使胃与食管黏膜对合整齐, 有利于组织的愈合, 减少了吻合口瘘, 降低了并发症的发生率, 明显降低了病死率. 本组病例中吻合口瘘的发生率为1.30%等同于国内的报道<sup>[2]</sup>. 吻合口瘘发生多与吻合口张力过大、血运不良、感染、选用器械型号欠妥、机械故障(如切割不全、钽钉脱落等)或操作不当等因素有关<sup>[3,4]</sup>. 为减少其发生率我们在实际操作中应用体会如下: 熟悉吻合器的结构与性能, 据食管腔直径大小, 病变部位以及食管壁厚度选择恰当吻合器型号, 一般选略小于食管腔的型号为佳, 选用的吻合器口径过大, 则易导致食管肌层的撕裂, 直接引起吻合口瘘, 在实际临床应用中我们常选择26号. 使用前仔细检查吻合器型号、装配是否正确, 吻合钉是否齐全, 吻合处食管向上游离长度不超过2.0 cm, 过长则影响食管的血供, 荷包

### ■相关报道

牛世海等报道也证实食管癌、贲门癌器械吻合手术方便、安全、有效, 能明显降低并发症发生率, 值得临床推广。

### ■应用要点

用胃肠道吻合器行食管胃机械吻合克服了暴露不良的缺陷, 具有污染轻, 食道黏膜及黏膜下层对合准确, 操作简便、切割整齐、省时可靠等优点, 适于临床推广应用。

### ■同行评价

本研究经大组临床病例观察,应用国产器械吻合行胸内食管胃端侧吻合术效果可靠,操作方便,对临床应用有一定借鉴作用。

缝合要包括食管壁全层,针距亦短,纵行切开食管全层后,用2把Allis钳钳夹向两侧拉开送入吻合器抵钉座,荷包线结扎松紧适度,在距结扎线0.2-0.5 cm处切断食管,使食管黏膜长于肌层0.2-0.3 cm,可防黏膜回缩过短致使黏膜钉合不全,完成吻合和切割后,保持一定张力,握持手柄15 s,松开器身尾端螺丝,边左右转动、边倾斜后退出,动作轻柔,以防吻合口撕裂,取出吻合器后必须检查切下的两个环形食管、胃壁组织完整性,若欠满意,可在薄弱处间断全层缝合数针加固,并引导胃管通过吻合口至胃内恰当位置固定好以利于术后胃肠减压。另外食管梗阻严重致近端食管壁炎性水肿,肌层过度增生肥厚超过1.0 cm者,如果勉强吻合,会造成钛钉异常弯曲,钉合不全<sup>[5]</sup>,术前我们对于这些食管明显扩张患者常规予以禁食,留置胃管予以温生理盐水加庆大霉素冲洗食管,口服庆大霉素针剂或甲硝唑片,并积极静脉抗炎以保证吻合器击发后钛钉良好成型。

吻合口狭窄是胃食管器械吻合的另一常见并发症,一旦发生,将影响患者的生活质量,本组吻合口狭窄5例,占2.16%,未高于国内报道2.5%。吻合口狭窄多见于吻合器口径选择偏小、而食管腔过大、食管壁和胃壁太厚,嵌入钉仓内的组织过多使得钉合的间距过大而导致钉合不全<sup>[6]</sup>;吻合器击发前较长时间的压榨胃食管壁、术后吻合口有张力、术后局部感染、不正确的包套吻合口造成,此外,在一定程度上与患者术后的进食结构以及瘢痕体质有关<sup>[7-9]</sup>。为避免以上因素,尽可能选用口径较大的吻合器,可以减少吻合口狭窄的发生<sup>[10]</sup>;保证胃壁、食管残端的血供、保证吻合口无张力,术后良好的胃肠减压及正确的饮食和护理也是患者顺利康复的必备条件。出现吻合口狭窄患者可予以胃镜下球囊扩张,本组病例经胃镜下球囊扩张后均获得治愈。

临床实践表明,食管-胃胸内器械吻合术的安全性等于或优于手工吻合术,其吻合口切缘组织无缺血性坏死,吻合区的组织反应比手工吻合者轻,吻合口的组织愈合过程更为迅速和牢固<sup>[11]</sup>。因此,术后并发症发生率很低,手术效果明显提高<sup>[12,13]</sup>。总之,吻合器的使用克服了暴露不良带来的困难,污染轻,各层组织尤其食道黏膜及黏膜下层对合准确,用胃肠道吻合器行食管胃机械吻合有操作简便、切割整齐、省时可靠等优点<sup>[14,15]</sup>,适于临床推广应用。

### 4 参考文献

- 1 赵锡江,张熙曾. 食管癌诊断与治疗. 第1版. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1999: 92-101
- 2 吴仲军,柯良松. 胃肠吻合器在消化道重建术中的应用(附162例报告). 右江民族医学院学报 2000; 22: 575-576
- 3 张福维,何振波,李东涛,梁友君. 国产吻合器在胸内胃食管重建术中的应用. 广西医学 2008; 30: 1577-1578
- 4 李伟,李作娅. 国产吻合器和缝合器在食管癌消化道重建术中的应用. 华西医学 2010; 25: 1062-1064
- 5 戈峰, MingLui, 李琦. 基础胸外科学. 北京: 中国医科大学出版社, 2003: 787-788
- 6 Kenneth L, Franco MD, Joe B, Putnam Jr, 陈克能, 许绍发. 现代胸外科治疗学. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 454-456
- 7 张兴国,李道堂,李辉,杨瑞森,张利民,张百江,王国范,张为迪. 胸内食管胃端侧器械吻合1555例的经验和体会. 中国肿瘤临床 2007; 34: 3
- 8 公斌,张志勇,宿学家,孙新,朱斌. 食管癌和贲门癌切除器械吻合1360例. 实用医药杂志 2007; 24: 526-528
- 9 牛世海. 食管癌、贲门癌器械吻合280例疗效观察. 中国现代医生 2011; 49: 139-140
- 10 卫劲铨,邵令方. 食管外科手术技巧. 合肥: 科学技术出版社, 2000: 116-118
- 11 张效公. 高级医师案头丛书-胸外科学. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2001: 294-296
- 12 李亮星,崔刘宝,樊长胜,齐拥军. 吻合器在食管癌和贲门癌手术中的应用. 亚太传统医药 2008; 4: 71-73
- 13 刘云,黄汉扬,刘世维. 国产机械吻合器在食管癌和贲门癌术中的应用体会. 中国实用医药 2009; 4: 40-42
- 14 周乃康,柳曦,梁朝阳,田晓东,刘阳,袁瑗. 机械吻合器在食管癌和贲门癌手术中的应用. 中华医学杂志 2006; 86: 1450-1452
- 15 付斌彬,王振辉,郭志刚. 机械吻合器在胸内消化道重建术中的应用. 华西医学 2010; 25: 951-952

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 不同胃疾病来源幽门螺杆菌菌株PPIase编码基因分布频率及其意义

陈莫耶, 官月华, 袁媛

陈莫耶, 官月华, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所暨普通外科研究所肿瘤病因与筛查研究室 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室 辽宁省沈阳市 110001  
陈莫耶, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的病因研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 31000074  
辽宁省高校重点实验室基金资助项目, No. 2009S106  
作者贡献分布: 陈莫耶与袁媛对此文所作贡献均等; 此课题由袁媛与陈莫耶设计; 研究过程由陈莫耶操作完成; 研究所用试剂及分析工具由袁媛提供; 数据分析由陈莫耶与官月华完成; 本论文写作由陈莫耶与袁媛完成。  
通讯作者: 袁媛, 教授, 博士生导师, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所暨普通外科研究所肿瘤病因与筛查研究室, 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室, yuuan3@hotmail.com  
电话: 024-83282153  
收稿日期: 2011-10-28 修回日期: 2011-11-25  
接受日期: 2011-12-14 在线出版日期: 2012-01-18

## Differential distribution of the PPIase gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with different gastric diseases

Mo-Ye Chen, Yue-Hua Gong, Yuan Yuan

Mo-Ye Chen, Yue-Hua Gong, Yuan Yuan, Department of Tumor Etiology and Screening, Institute of Oncology and General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University; Key Laboratory of Cancer Control in Liaoning Province, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 31000074; and the Foundation of the Key Laboratory of Cancer Control in Liaoning Province, No. 2009S106  
Correspondence to: Yuan Yuan, Professor, Department of Tumor Etiology and Screening, Institute of Oncology and General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University; Key Laboratory of Cancer Control in Liaoning Province, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yuuan3@hotmail.com  
Received: 2011-10-28 Revised: 2011-11-25  
Accepted: 2011-12-14 Published online: 2012-01-18

## Abstract

**AIM:** To explore the distribution of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) gene in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) strains isolated from patients with different gastric diseases.

**METHODS:** Biopsy specimens were taken from

the gastric mucosa of patients with superficial gastritis (GS), atrophic gastritis (GA) or gastric cancer (GC) and used to isolate a total of 64 *H. pylori* strains. The distribution of the PPIase gene in these strains was analyzed by PCR.

**RESULTS:** The GA group had the highest distribution frequency (94.4%) of the PPIase gene, which was significantly higher than those in the GS (57.7%) and GC (65.0%) groups ( $P = 0.014, 0.045$ ). Although the frequency of the PPIase gene was higher in the GC group than in the GS group, there was no statistical difference between them ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** *H. pylori* strains isolated from patients with AG carried a higher frequency of the PPIase gene.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase gene; Superficial gastritis; Atrophic gastritis

Chen MY, Gong YH, Yuan Y. Differential distribution of the PPIase gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with different gastric diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 155-159

## 摘要

**目的:** 探讨肽酰-脯氨酰-顺反式异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase)编码基因在不同胃疾病来源幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)菌株中的分布情况, 旨在揭示其在胃疾病动态发展过程中的作用及其与胃疾病相关性。

**方法:** 选取浅表性胃炎(superficial gastritis, GS)、萎缩性胃炎(atrophic gastritis, GA)、胃癌(gastric cancer, GC)三组疾病来源胃黏膜活检标本分离培养出的*H. pylori*菌株64例, 其中GS26例、GA18例、GC20例, 使用酚-氯仿法提取菌种DNA, 经聚合酶链反应及琼脂糖凝胶电泳对PPIase编码基因进行检测。用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确检验分析不同胃疾病来源*H.*

## 背景资料

不同胃疾病来源的*H. pylori*分离株具有明显的遗传异质性, 其毒力因子的类型和频率分布存在明显差异, 与长期感染所导致的不同的临床结局密切相关, 寻找胃疾病进展过程中可以作为疾病潜在标志物的*H. pylori*菌株特异性毒力基因是目前研究热点。

## 同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

## ■ 研发前沿

目前有研究证实PPIase编码基因的蛋白产物PPIase是*H. pylori*释放的5个分泌抗原之一,可以在*H. pylori*感染者血清中被识别,并且PPIase蛋白与炎症因子的释放,细胞的凋亡等密切相关,可能参与了胃疾病发生发展的不同环节。

*pylori*菌株PPIase编码基因分布频率差异。

**结果:** GA组来源的*H. pylori*菌株PPIase基因分布频率(94.4%)最高,与GS组(57.7%)和GC组(65.0%)相比差异有统计学意义( $P = 0.014$ ,  $P = 0.045$ ); GC组(65.0%) PPIase基因分布频率高于GS组(57.7%),无统计学差异( $P > 0.05$ )。

**结论:** 萎缩性胃炎来源*H. pylori*菌株携带较高频率PPIase编码基因,其与萎缩性胃炎的发生密切相关。

**关键词:** 幽门螺杆菌; PPIase编码基因; 浅表性胃炎; 萎缩性胃炎

陈莫耶, 宫月华, 袁媛. 不同胃疾病来源幽门螺杆菌菌株PPIase编码基因分布频率及其意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 155-159

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/155.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是成功定植于胃酸性环境的微生物之一<sup>[1]</sup>,是引起慢性胃炎的主要原因,少数感染者会罹患消化性溃疡,萎缩性胃炎,胃癌等程度不等的严重临床疾病<sup>[2]</sup>。*H. pylori*导致的不同临床结局除了与环境因素以及宿主易感性相关以外,*H. pylori*菌株毒力基因的差异也在胃疾病的发生发展中起到重要作用,目前寻找胃疾病进展过程中可以作为疾病潜在标志物的*H. pylori*菌株特异性毒力基因仍然是研究热点<sup>[3-5]</sup>。目前较为关注的一些*H. pylori*与临床结局相关的毒力基因,包括*cagA*, *vacA s1*, *oipA*, *babA2*, *dupA*以及*hrgA*等基因,然而目前在东亚地区没有任何一个确定的*H. pylori*毒力基因具有疾病特异性,尚不能作为与临床结局相关的潜在标志基因<sup>[6,7]</sup>。确定*H. pylori*菌株与疾病相关的毒力基因对于高危人群的筛查,临床疾病诊断以及预后的估计都有至关重要的作用。本室在前期研究中,采用抑制性消减杂交(SSH)以及斑点杂交的方法构建了*H. pylori*胃癌来源株和浅表性胃炎来源株差异基因文库,对筛选出的差异基因进行鉴定,发现肽酰-脯氨酰-顺反式异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase)编码基因为胃癌来源株的高拷贝基因,可能与胃癌发生发展密切相关<sup>[8]</sup>。本研究采用聚合酶链式反应(PCR)检测浅表性胃炎,萎缩性胃炎以及胃癌3组不同疾病来源的*H. pylori*菌株PPIase编码基因的分布情况,旨在揭示其在胃疾

病动态发展过程中的作用及其与胃疾病相关性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究经中国医科大学伦理委员会批准,共选取浅表性胃炎(superficial gastritis, GS)、萎缩性胃炎(atrophic gastritis, GA)、胃癌(gastric cancer, GC)3种疾病来源的新鲜胃黏膜活检标本221例。每例取胃黏膜4块,其中3块(包括胃体、胃窦、胃角各1块)进行病理组织学检查,另1块(胃窦)进行*H. pylori*培养。

### 1.2 方法

**1.2.1 *H. pylori*培养及鉴定:** *H. pylori*培养采用脑心浸液琼脂培养基,培养基内包含:绵羊血(70 mL/L)、soVitaleX(4 mL/L)、两性霉素B(8 g/mL)、甲氧胺苄嘧啶(5 g/mL)、万古霉素(6 g/mL)。将脑心浸液琼脂培养基置于含有50 mL/L O<sub>2</sub>、100 mL/L CO<sub>2</sub>、850 mL/L N<sub>2</sub>、37 °C相对湿度为95%的培养箱中,培养3-6 d之后观察结果。通过3种方法鉴定阳性*H. pylori*分离株:包括典型菌落的观察、革兰氏染色以及通用型引物16srRNA聚合酶链式反应,其中2种方法鉴定为阳性即判定为*H. pylori*阳性。收集典型菌落放入新鲜胃黏膜保存液500 μL中,吹打混匀,-70 °C保存备用。

**1.2.2 *H. pylori*菌株DNA提取:** 采用酚-氯仿方法提取*H. pylori* DNA。菌种置于2 mL EP管中离心5 min(10 000 g/min),去除上清液,加入TE缓冲液318 μL,10% SDS 80 μL,蛋白酶K(20 g/L)2 μL,振荡混匀;37 °C恒温水浴过夜;加入等体积酚、氯仿、异戊醇,3种试剂比例为25:24:1,混匀后离心10 min;将上层水相吸出加入等体积氯仿、异戊醇,试剂比例为24:1,混匀后离心10 min;再次吸取上层水相,加入1/10体积乙酸钠以及RNA酶(终浓度0.25-0.3 g/L),混匀后37 °C水浴30 min;加入2.5倍体积预冷无水乙醇,于-20 °C放置2 h;离心15 min(10 000 g/min),除去上清液,使用75%乙醇将沉淀洗涤两次,沉淀干燥后重新溶于50 μL TE缓冲液中。利用分光光度计测定*H. pylori* DNA浓度,使用TE缓冲液将DNA浓度统一调整为100 ng/μL。

**1.2.3 PPIase编码基因聚合酶链式反应(PCR):** *H. pylori* PPIase编码基因经过PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳,genefinder染色观察。PCR反应体系为25 μL,包括去离子水,4种dNTP各2.5 mmol/L, Taq DNA聚合酶2.5 U,基因组DNA 2 μL,10 pmol引物。引物序列为P1: 5'-CCCACCTTTCTTTC-

表 1 不同胃疾病来源*H. pylori*菌株PPIase编码基因分布频率

疾病	<i>n</i>	阳性 <i>n</i>	阴性 <i>n</i>	检出率(%)
浅表性胃炎	26	15	11	57.7
萎缩性胃炎	18	17	1	94.4
胃癌	20	13	7	65.0

CG-3'; P2: 5'-CCATTCAAGCCACTATCAA-3': 预期片段203 bp<sup>[8]</sup>. 反应参数为: 94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性45 s, 59 °C 退火45 s, 72 °C 延伸45 s, 经过35个循环后72 °C 延伸10 min. 扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析, 置于紫外光凝胶成像系统观察结果.

**统计学处理** 采用SPSS16.0软件进行 $\chi^2$ 或Fisher精确检验, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ .

## 2 结果

**2.1 *H. pylori* 菌株鉴定** 221例新鲜胃黏膜标本共培养出*H. pylori*菌株64例, 其中GS26例、GA18例、GC20例. 菌落特点: 培养基上观察到半透明, 针尖状典型菌落. 细菌形态: 常规革兰染色, 油镜下观察到革兰氏染色阴性, "C"形弯曲、S形或“海鸥型”弯曲的典型细菌形态. PCR反应: *H. pylori*通用型引物16srRNA基因检测出阳性条带(图1).

**2.2 *H. pylori* 菌株PPIase编码基因分布** *H. pylori*菌株PPIase编码基因PCR扩增产物片段长度为203 bp(图2). 64株*H. pylori*菌株中, 70.31%(45/64)的PPIase编码基因扩增结果为阳性.

**2.3 不同胃疾病来源*H. pylori*菌株PPIase编码基因分布** GS, GA, GC 3组疾病来源的*H. pylori*菌株PPIase编码基因检出率分别为57.7%, 94.4%, 65.0%. GA组*H. pylori* PPIase编码基因检出率(94.4%)最高, 与GS组(57.7%)和GC组(65.0%)相比差异具有统计学差异( $P = 0.014$ ,  $P = 0.045$ ), GS组(57.7%)与GC组(65.0%)相比, GC来源的*H. pylori*菌株PPIase编码基因检出率高于GS组, 但是差异无统计学差异( $P > 0.05$ , 表1).

## 3 讨论

*H. pylori* PPIase编码基因编码蛋白为PPIase, 已经有学者明确指出PPIase与细菌感染以及毒力密切相关, 嗜肺军团杆菌的Mip蛋白是PPIase家族成员, 与进入细胞以及细胞内复制密切相关<sup>[9]</sup>, 而PPIase家族的另一成员SlrA蛋白则与肺炎球菌的定植相关<sup>[10]</sup>. 那么PPIase是否也作为*H. py-*

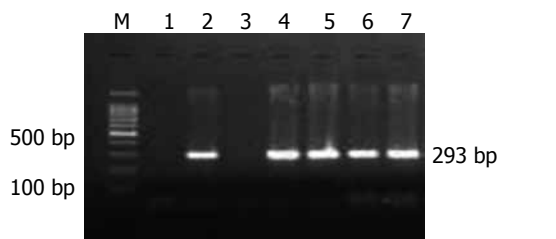


图 1 16srRNA基因PCR扩增结果. 1, 3孔: 阴性; 2, 4, 5, 6, 7孔: 阳性, 目的条带293 bp; M: 100 bp Marker.

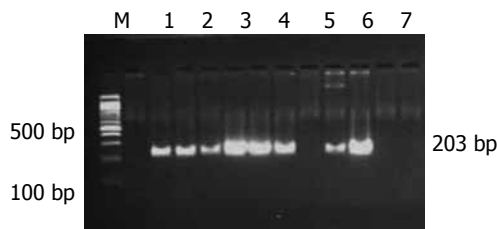


图 2 PPIase编码基因 PCR扩增结果. 1, 8, 11, 12孔: 阴性; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10孔: 阳性, 目的条带203 bp; M: 100 bp DNA Marker.

*lori*的毒力因子之一参与*H. pylori*相关性胃疾病的发生与发展成为研究所关注的问题. 目前有研究证实PPIase编码基因的蛋白产物PPIase是*H. pylori*释放的5个分泌抗原之一, 可以在*H. pylori*感染者血清中被识别, 对其抗体的检测可能有助于*H. pylori*感染后疾病的诊断以及预后的预测<sup>[11,12]</sup>. *H. pylori*分泌的PPIase可以诱导胃上皮细胞凋亡<sup>[13]</sup>, 还可以诱导巨噬细胞IL-6的产生, 与慢性炎症密不可分<sup>[14]</sup>, 并且可以诱导TLR4依赖性因子EGFR超激活以及VGF产生, 与致胃溃疡致胃癌作用相关<sup>[15]</sup>, 目前对于*H. pylori* PPIase功能方面的研究较少, 还有待于进行更广泛的体内以及体外实验进一步探讨PPIase的致病机制. Correa曾根据流行病学和病理学研究总结出人肠型胃癌发生的模式: 正常胃黏膜→浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生/不典型增生→胃癌<sup>[16]</sup>, *H. pylori*携带不同的毒力因子可能增加胃疾病发生进展动态过程中不同疾病的发病风险, 如在西方国家携带*cagA*基因的*H. pylori*菌株主要增加胃癌的发病风险<sup>[17]</sup>, 而携带*vacAd1*等位基因的菌株主要增加萎缩性胃炎的发病风险<sup>[18]</sup>, 那么, PPIase在致病过程中主要在哪一环节起到关键作用还有待探讨.

本研究对不同疾病来源的64株*H. pylori*菌株进行了PPIase编码基因的检测, 检测结果证实GS、GA、GC 3组不同疾病来源的*H. pylori*菌株中, PPIase编码基因的分布频率存在差异, 检

**应用要点**  
根据本研究结果, PPIase编码基因可能作为萎缩性胃炎发生的潜在标志基因, 感染PPIase编码基因阳性*H. pylori*菌株提示预后不良, 为临床高危人群的筛查、疗效判定以及预测预后提供线索.

### ■同行评价

本文设计合理, 有一定的研究价值, 可读性和科学性较好, 对临床实践有一定指导意义。

出率分别为57.7%, 94.4%, 65.0%。GA组*H. pylori* PPIase编码基因检出率(94.4%)明显高于GS组(57.7%)和GC组(65.0%)( $P = 0.014$ ,  $P = 0.045$ ), 表明PPIase编码基因与萎缩性胃炎的发生密切相关, 感染PPIase编码基因阳性的菌株明显增加了萎缩性胃炎发生的风险。曾有报道, *H. pylori* 感染可以诱导萎缩性胃炎的发生, 其毒力基因 *cagA*、*vacA*可能是导致萎缩性胃炎发生的机制之一<sup>[19,20]</sup>, *CagE*能够直接诱导壁细胞凋亡, 导致腺体萎缩<sup>[21]</sup>, *CagA*、*VacA*、*HcpC*以及GroEL同时存在的*H. pylori*菌株则更容易导致萎缩性胃炎的发生<sup>[22]</sup>。据本研究结果, PPIase编码基因可能是*H. pylori*另一个重要的导致萎缩性胃炎发病的机制之一。有研究报道, PPIase作为凋亡诱导因子通过与TLR-4以及ASK-1相互作用, 启动细胞程序性死亡通路, 导致胃上皮细胞过度凋亡, 打破新细胞生成率和凋亡导致的细胞丧失率之间的平衡, 而细胞损失过度, 可能与萎缩性胃炎的发生有关<sup>[13,23]</sup>, 而萎缩性胃炎以及肠上皮化生又可以加速细胞凋亡<sup>[24]</sup>, 两者互相推进, 加速疾病进展。在Correa胃疾病进展模型中, 萎缩性胃炎是其中一个最关键的环节, 是肠型胃癌发生的关键因素<sup>[16]</sup>。严重的萎缩性胃炎伴肠上皮化生可以明显增加胃癌发生的风险<sup>[25,26]</sup>。Uemura等<sup>[27]</sup>经过平均7.8年的随访发现大约有10%的中度萎缩性胃炎患者发展为胃恶性肿瘤。本研究结果显示, 感染PPIase编码基因阳性*H. pylori*菌株与萎缩性胃炎密切相关, 而萎缩性胃炎又是导致肠型胃癌发生的重要癌前疾病, 增加萎缩性胃炎的发病风险, 就有可能提高胃癌, 尤其是肠型胃癌的发病风险。另有研究发现, PPIase可以活化EGFR从而刺激VEGF的产生<sup>[15]</sup>, VEGF家族在调节肿瘤血管生成方面起到至关重要的作用, 并且可以诱导细胞增殖, 分化以及血管内皮细胞迁移, 有利于肿瘤的生长和转移<sup>[28]</sup>。Meta分析的结果显示, 在亚洲罹患胃癌的人群中, VEGF过表达与胃癌患者生存率密切相关<sup>[29]</sup>, 调节VEGF的表达与肿瘤的进展和预后密切相关<sup>[30]</sup>, 研究结果支持PPIase在胃癌形成过程中可能起到了一定的作用。综合本研究结果及相关研究报道, 我们推测, PPIase可能作为*H. pylori*毒力因子之一主要参与萎缩性胃炎发生的环节, 直接增加胃癌前疾病发病风险, 进而增加了胃癌发生的风险。

总之, 萎缩性胃炎来源*H. pylori*菌株携带较高频率PPIase编码基因, 其与萎缩性胃炎的发生

密切相关, 在浅表性胃炎发展为萎缩性胃炎直至进展为胃癌的动态变化过程中起到重要作用。检测PPIase编码基因对于*H. pylori*相关性萎缩性胃炎的诊断, 临床疗效判定及预测预后都具有良好的指导作用。

**志谢:** 感谢本室孙丽萍、徐倩、董楠楠及王兰等给予本实验的大力帮助。

### 4 参考文献

- Sachs G, Scott DR, Wen Y. Gastric Infection by *Helicobacter pylori*. *Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13: 540-546
- Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 629-641
- Marteau P, Chaput U. Bacteria as trigger for chronic gastrointestinal disorders. *Dig Dis* 2011; 29: 166-171
- Bornschein J, Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. From gastric inflammation to gastric cancer. *Dig Dis* 2010; 28: 609-614
- Hamajima N, Naito M, Kondo T, Goto Y. Genetic factors involved in the development of *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97: 1129-1138
- Lu H, Graham DY, Yamaoka Y. The *Helicobacter pylori* restriction endonuclease-replacing gene, *hrgA*, and clinical outcome: comparison of East Asia and Western countries. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1551-1555
- Nguyen LT, Uchida T, Tsukamoto Y, Kuroda A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Fujioka T, Moriyama M. *Helicobacter pylori* dupA gene is not associated with clinical outcomes in the Japanese population. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1264-1269
- Gong YH, Chen M, Xu Y, Dong N, Sang Z, Liu J, Yuan Y. Subtractive hybridization analysis of gastric diseases-associated *Helicobacter pylori* identifies peptidyl-prolyl isomerase as a potential marker for gastric cancer. *FEMS Microbiol Lett* 2011; 320: 103-109
- Köhler R, Fanghänel J, König B, Lüneberg E, Frosch M, Rahfeld JU, Hilgenfeld R, Fischer G, Hacker J, Steinert M. Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 2003; 71: 4389-4397
- Hermans PW, Adrian PV, Albert C, Estevão S, Hoogenboezem T, Luijendijk IH, Kamphausen T, Hammerschmidt S. The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. *J Biol Chem* 2006; 281: 968-976
- Atanassov C, Pezennec L, d'Alayer J, Grollier G, Picard B, Fauchère JL. Novel antigens of *Helicobacter pylori* correspond to ulcer-related antibody pattern of sera from infected patients. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 547-552
- Kim N, Weeks DL, Shin JM, Scott DR, Young MK, Sachs G. Proteins released by *Helicobacter pylori* in vitro. *J Bacteriol* 2002; 184: 6155-6162
- Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, Pathak S,

- Basu J, Kundu M. The secreted peptidyl prolyl cis,trans-isomerase HP0175 of *Helicobacter pylori* induces apoptosis of gastric epithelial cells in a TLR4- and apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent manner. *J Immunol* 2005; 174: 5672-5680
- 14 Pathak SK, Basu S, Bhattacharyya A, Pathak S, Banerjee A, Basu J, Kundu M. TLR4-dependent NF-kappaB activation and mitogen- and stress-activated protein kinase 1-triggered phosphorylation events are central to *Helicobacter pylori* peptidyl prolyl cis-, trans-isomerase (HP0175)-mediated induction of IL-6 release from macrophages. *J Immunol* 2006; 177: 7950-7958
- 15 Basu S, Pathak SK, Chatterjee G, Pathak S, Basu J, Kundu M. *Helicobacter pylori* protein HP0175 transactivates epidermal growth factor receptor through TLR4 in gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 32369-32376
- 16 Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
- 17 Peleteiro B, Lunet N, Barros R, La Vecchia C, Barros H. Factors contributing to the underestimation of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer risk in a high-prevalence population. *Cancer Causes Control* 2010; 21: 1257-1264
- 18 Ogiwara H, Sugimoto M, Ohno T, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY, Yamaoka Y. Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the *Helicobacter pylori* vacA gene in cases of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3493-3500
- 19 Adamu MA, Weck MN, Rothenbacher D, Brenner H. Incidence and risk factors for the development of chronic atrophic gastritis: five year follow-up of a population-based cohort study. *Int J Cancer* 2011; 128: 1652-1658
- 20 Adamu MA, Weck MN, Gao L, Brenner H. Incidence of chronic atrophic gastritis: systematic review and meta-analysis of follow-up studies. *Eur J Epidemiol* 2010; 25: 439-448
- 21 Neu B, Randlkofer P, Neuhofer M, Volland P, Mayerhofer A, Gerhard M, Schepp W, Prinz C. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of rat gastric parietal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G309-G318
- 22 Gao L, Weck MN, Michel A, Pawlita M, Brenner H. Association between chronic atrophic gastritis and serum antibodies to 15 *Helicobacter pylori* proteins measured by multiplex serology. *Cancer Res* 2009; 69: 2973-2980
- 23 Targa AC, César AC, Cury PM, Silva AE. Apoptosis in different gastric lesions and gastric cancer: relationship with *Helicobacter pylori*, overexpression of p53 and aneuploidy. *Genet Mol Res* 2007; 6: 554-565
- 24 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 16-26
- 25 Yanaoka K, Oka M, Mukoubayashi C, Yoshimura N, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Arii K, Ohata H, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M. Cancer high-risk subjects identified by serum pepsinogen tests: outcomes after 10-year follow-up in asymptomatic middle-aged males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 838-845
- 26 Ohata H, Kitauchi S, Yoshimura N, Mugitani K, Iwane M, Nakamura H, Yoshikawa A, Yanaoka K, Arii K, Tamai H, Shimizu Y, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 2004; 109: 138-143
- 27 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789
- 28 Kut C, Mac Gabhann F, Popel AS. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 978-985
- 29 Chen J, Li T, Wu Y, He L, Zhang L, Shi T, Yi Z, Liu M, Pang X. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 1799-1812
- 30 Zhao B, Yang P, Yang J, Cai D. A randomized trial of somatostatin to regulate the VEGFs/VEGFRs in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1425-1430

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# MRP、LRP和MDR1基因在胃癌中的表达及其意义

靳胜

## ■背景资料

目前研究证实多数肿瘤多药耐药的发生是通过MDR1、MRP以及LRP基因编码的相应蛋白,以药泵作用将药物排出肿瘤细胞外;或者改变药物在细胞内分布而导致耐药,探讨他们与胃癌临床病理特征及预后的关系,评价其在病程发展监控中的意义,对临床治疗具有一定指导价值。

靳胜,首都医科大学附属北京世纪坛医院临检中心 北京市100038

靳胜,主管技师,主要研究方向是肿瘤的多药耐药机制及其逆转。

作者贡献分布: 本文的实验、数据分析和文章撰写均由靳胜完成。  
通讯作者: 靳胜, 硕士, 主管技师, 100038, 北京市海淀区, 首都医科大学附属北京世纪坛医院临检中心. js14446@yahoo.com.cn  
电话: 010-63929391

收稿日期: 2011-08-31 修回日期: 2011-10-22

接受日期: 2011-12-23 在线出版日期: 2012-01-18

## Clinical significance of expression of MRP, MDR1 and LRP in gastric cancer

Sheng Jin

Sheng Jin, Central Clinical Laboratory, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Correspondence to: Sheng Jin, Chief Technician, Central Clinical Laboratory, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China. js14446@yahoo.com.cn

Received: 2011-08-31 Revised: 2011-10-22

Accepted: 2011-12-23 Published online: 2012-01-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of the MRP, MDR1 and LRP genes in gastric cancer and to analyze their clinical significance.

**METHODS:** The mRNA expression of the MRP, MDR1 and LRP genes in 47 gastric cancer specimens and 17 normal gastric mucosal specimens was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR).

**RESULTS:** The expression of the MRP, MDR1 and LRP genes was significantly higher in gastric cancer than in normal gastric mucosal tissue. Positive expression of the MRP gene was correlated with tumor differentiation and stage, while LRP expression was correlated with lymph nodes metastasis. The expression level of the MRP gene increased by 30% in patients with progressing disease.

**CONCLUSION:** The expression of MRP, LRP and MDR1 genes was significantly higher in gastric

cancer than in normal gastric tissue and may be associated with multi-drug resistance in gastric cancer.

**Key Words:** Gastric cancer; Multi-drug resistance; Multi-drug resistance 1; Lung resistance protein; Multi-drug resistance-associated protein

Jin S. Clinical significance of expression of MRP, MDR1 and LRP in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 160-163

## 摘要

**目的:** 探讨MRP基因、LRP基因和MDR1基因在胃癌中的表达及其与疾病发生发展相关性的研究。

**方法:** 应用实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)分别检测47例胃癌标本和17例正常胃组织对照标本的MRP基因、LRP基因和MDR1基因表达,分析其与病情发生发展以及转归的关系。

**结果:** MRP基因、LRP基因和MDR1基因在胃癌组织中的表达均高于正常标本, MRP在早期胃癌中显著高于进展期胃癌( $P<0.05$ ),高、中分化腺癌显著高于低、未分化腺癌( $P<0.05$ ); LRP基因表达无淋巴结转移组显著高于淋巴结转移组( $P<0.05$ )。MRP在病情恶化患者中上调30%。

**结论:** MRP基因、LRP基因和MDR1在胃癌组织中均有较高的表达,三者可能具有协同作用,检测3种基因的表达有利于制定更合理的治疗方案。

**关键词:** 胃癌; 多药耐药; MDR1基因; LRP基因; MRP基因

靳胜. MRP、LRP和MDR1基因在胃癌中的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2012; 20(2): 160-163

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/160.asp>

## 0 引言

肿瘤的多药耐药(multi-drug resistance, MDR)是

## ■同行评议者

李淑德, 主任医师, 教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

表 1 各基因引物及探针序列<sup>[2,3]</sup>

检测基因	上、下游引物	探针
MDR1	5'-GCTGGTTTGTATGTGCACGATGTTGG-3' CTTAACACCCGACTTACAGATGATGTCTCCA	5'-ATTTTGTCCACCAATTCCTTCATTAA-3'
MRP	5'-TGTGCCCTCTCCAGACCT-3' CCCAGTGGGGATCGGACAGAG	5'-CAGACAGGTTACGGCCCT-3'
LRP	5'-GGGCTTGGTGTGTTTGTATG-3' CAGGGCAAGTTCGGCTTCGCC	5'-AGCCGGATCTCGAGGTCAGCG-3'

指肿瘤细胞对分子结构不同、作用机制各异的抗肿瘤药物产生交叉耐药,是目前所知的肿瘤化疗失败的最重要的原因。目前研究证实多数肿瘤多药耐药的发生是通过MDR1基因和多药耐药相关蛋白(multi-drug resistance-associated protein, MRP)基因以及肺耐药蛋白基因(lung resistance protein, LRP)编码的相应蛋白,通过药泵作用将药物排出肿瘤细胞外或者改变药物在细胞内分布而导致耐药<sup>[1,2]</sup>。这3个耐药基因是目前研究证实最重要的肿瘤耐药机制,本文通过检测胃癌MDR1、MRP和LRP基因的定量表达,探讨其与胃癌临床病理特征及预后的关系,评价其在患者病程发展监控中的意义,以制定更为合理的治疗方案。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选择诊断明确、病历资料完整、未经任何治疗的患者手术切除胃癌标本共47例。其中有淋巴结转移的15例,男性29例,女性18例,年龄35-74岁,中位年龄61岁。对照组17例,均为胃及十二指肠溃疡行胃大部切除术患者。提取试剂盒(QIAGEN公司),组织RNA提取试剂盒(Bioteke公司);cDNA逆转录试剂盒(Promega公司);扩增体系PCR Mix购于TIANGEN公司;引物、探针由华美公司合成;所用定量PCR仪为罗氏公司的Light Cycle及其配套的分析软件系统。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA提取:收集手术所取肿瘤组织,液氮研磨、匀浆器匀浆,再按RNA提取试剂盒(RNA pure高纯总RNA快速提取试剂盒)的说明提取组织中的总RNA。通过测定吸光度 $A_{260}$ 计算RNA的浓度,以 $A_{260}/280$ 判定纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.2.2 合成cDNA:总RNA在70℃中孵育10 min。按逆转录cDNA试剂盒(Promega公司)的说明进行cDNA的合成,-20℃保存。

表 2 3种基因在胃癌以及对照组中的表达

分组	n	MRP	Mdr1	LRP
胃癌组	47	$1.70 \times 10^{5b}$	$2.70 \times 10^{4d}$	$2.30 \times 10^{4f}$
对照组	17	$0.54 \times 10^2$	$0.47 \times 10^2$	$0.37 \times 10^2$

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs MRP组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs MDR1组; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs LRP组。

1.2.3 PCR反应:设计合成引物探针(表1),依据试剂盒上的说明进行PCR扩增。具体为:2× Real-time PCR MasterMix 8 μL, Enhancer 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL, 上、下游引物(20 μmol/L)各1 μL, 探针(20 μmol/L) 0.5 μL, cDNA 1 μL, 同时将定量模板稀释做标准曲线。首先在95℃水平起始模板变性5 min,然后按以下反应条件完成40个循环:95℃ 15 s, 58℃ 40 s。在每1批PCR反应中设立水模板作为阴性对照。检测系统自带的软件可以计算Ct(threshold cycle)值,根据所获得的标准曲线,得到各标本的起始浓度(基因拷贝数/mL)。

1.2.4 PCR产物处理:将扩增完毕的PCR产物进行2%琼脂糖电泳,并进行切胶回收。紫外分光和电泳定量后,根据公式:标准品浓度(拷贝/mL) =  $6.02 \times 10^{23} \times C \times A_{260} / MWt$ ,其中 $C = 5 \times 10^{-5} / mL$ , MWt = PCR产物的相对分子质量(碱基数×6.58×10<sup>2</sup>),  $A_{260}$ 是在260 nm的吸光度值,将标准品稀释到10<sup>12</sup>拷贝/μL,-80℃保存。

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件进行t检验、方差分析及两变量相关性分析。

## 2 结果

2.1 荧光定量PCR相关曲线 PCR反应的前15个循环的荧光信号作为荧光本底信号,Ct值是每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。横坐标代表起始拷贝数的对数,纵坐标代表Ct值,只要获得未品的Ct值,即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。以Ct值作为纵坐标,MDR1、MRP1、LRP起始拷贝数作为横坐标,建立标准曲线,此曲线显示4个数量

### ■ 相关报道

研究发现在胃癌病变组织中3种耐药基因表达均明显上调,但在病程发生发展中MRP较MDR1有更重要的作用,提示MRP的表达与耐药的发生以及预后生存具有一定关系。

### ■ 创新盘点

本研究证明,在胃癌耐药发生过程中MRP的重要性高于MDR1,为进一步深入研究胃癌多药耐药的发生发展提供了新的路径。

### ■应用要点

对胃癌患者的MRP、MDR1以及LRP基因进行检测有助于指导临床化疗用药以及个体化的治疗,对改善预后生存具有一定价值。

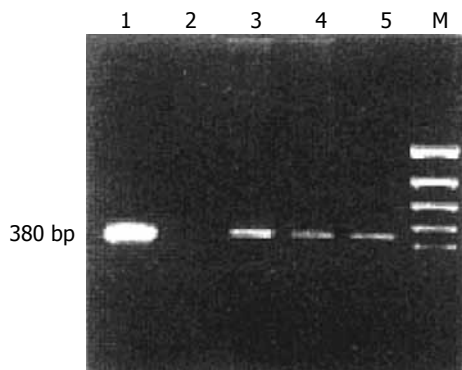


图1 MRP电泳图谱。

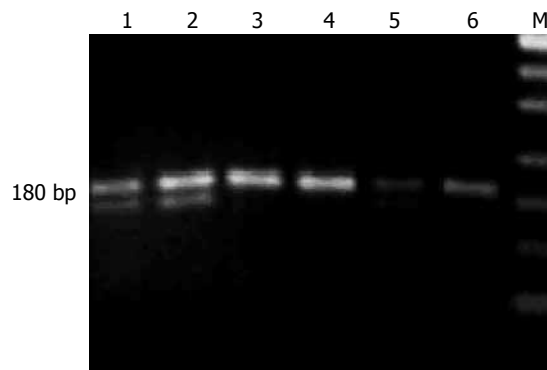


图2 MDR1和LRP电泳图谱。1-4: MDR1; 5, 6: LRP。

表3 3种基因与病理分期进展的关系

临床病理特征	<i>n</i>	MRP	MDR1	LRP
病理分期: 早期	9	$2.8 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$
进展期	38	$1.5 \times 10^{5a}$	$2.6 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$
淋巴转移: 无	32	$1.8 \times 10^5$	$2.9 \times 10^4$	$2.7 \times 10^4$
转移	15	$1.5 \times 10^5$	$2.3 \times 10^4$	$1.4 \times 10^{4e}$
分化: 高和中分化	17	$2.4 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$
未和低分化	30	$1.3 \times 10^{5c}$	$2.5 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 早期; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 高中分化; <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 未转移。

级的动态范围。荧光定量PCR的扩增过程包括3个阶段: 基线期(baseline phase)、对数期(exponential phase)及平台期(plateau phase), 检测发生在对数期。

2.2 MRP、LRP和MDR1基因在胃癌中的表达 通过检测3种基因表达, 胃癌组与正常对照组相比均有明显差异(图1, 2, 表2)。

2.3 MRP基因、LRP基因和MDR1基因的定量表达与病理分型以及分化的关系 在上述基础上我们通过对不同病理分型的标本进行拷贝表达分析, 发现MDR1基因的定量表达与组织学类型、浸润深度、淋巴结转移与否均无明显相关性。MRP基因在早期胃癌中显著高于进展期胃癌( $P < 0.05$ ), 高、中分化腺癌显著高于低、未分化腺癌( $P < 0.05$ ); 而LRP基因在无淋巴结转移组胃癌组中显著高于淋巴结转移组( $P < 0.05$ , 表3)。

2.4 患者预后 在47份病例中, 11例在1年中出现复发转移或者其他恶化状况, 对其单独分组与其他36份病例的定量结果进行分析, 发现MDR1和LRP基因表达无显著性差异; MRP基因表达亦无显著性差异, 但表达量上调达35%。

### 3 讨论

MDR是肿瘤进行有效化疗的主要障碍<sup>[4]</sup>, 目前认

为肿瘤出现耐药与多种耐药基因的过度表达有关, 比较肯定的有MDR1、MRP1、LRP等<sup>[5,6]</sup>, 其中MDR1的过度表达被认为是肿瘤多药耐药的最重要机制<sup>[7,8]</sup>。MDR1是具有能量依赖性药泵功能的跨膜糖蛋白, 可主动将进入细胞内的抗癌药物泵出细胞外, 降低细胞内药物的浓度, 产生耐药<sup>[9]</sup>。MRP基因编码表达ATP能量依赖性跨膜糖蛋白泵分子Pgp-190, 该蛋白将疏水性化疗药物逆浓度差泵出细胞外, 减少细胞内药物蓄积, 导致耐药发生。LRP为人的弯隆体主蛋白(MVP), 通过调节囊泡和核质的药物转运, 将化疗药物储存于囊泡并减少其在核与胞质间的比例而致耐药; 就目前研究而言, 这3个机制构成了临床耐药的主要原因: 药泵的作用。

研究认为在胃癌的多药耐药中, MRP较MDR1占有更为重要的作用<sup>[5,10]</sup>, 我们的研究证实MRP基因表达量与胃癌的发生发展以及预后状况具有相关性, 而MDR1则无差异; LRP在淋巴结转移胃癌组中表达明显上调, 此结果说明MRP和LRP的基因表达与病情发展或者转移具有一定的关联性, 同时MRP基因表达影响患者预后状况。这提示MRP基因可能在胃癌发生发展以及耐药产生过程中比MDR1和LRP起到了

更重要的作用, 而传统上最重要的MDR1因素在其中的影响似乎相对最弱。

我们研究证实胃癌组织中上述耐药基因表达均明显上调, 说明多药耐药的发生是一个复杂的多因素复合过程; 提示胃癌多药耐药的发生是内源性获得的早期事件, 与未接受化疗的其他肿瘤, 如小细胞型肺癌、头颈部肿瘤、急性非淋巴细胞白血病、卵巢癌及乳癌中耐药基因的低表达不同<sup>[11,12]</sup>; 术前MRP基因表达上调的患者预后不良, 这说明后天的获得性药物刺激进一步影响治疗的结果和耐药的进展。本研究提示上述耐药基因在胃癌多药耐药发生过程中作用有所不同: MRP可能比LRP和MDR1基因具有更为重要的影响, 他的表达量和患者的预后生存具有一定关系; 对其进一步研究可能会有助于我们对胃癌发生发展以及治疗的理解; 进一步对耐药基因尤其是MRP进行研究并将其用于病情监测, 会有助于提高治疗效率提高患者的有效生存时间。

#### 4 参考文献

- 1 Li DQ, Wang ZB, Bai J, Zhao J, Wang Y, Hu K, Du YH. Reversal of multidrug resistance in drug-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR by antiprogesterin drug mifepristone. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1722-1725
- 2 邓晓斌, 王珊, 邹琳, 李长春, 章均, 欧阳军. 小儿恶性淋巴瘤化疗前后外周血多药耐药基因、多药耐药相关蛋白基因、肺耐药蛋白基因的变化及临床意义. *第三军医大学学报* 2010; 32: 1087-1090
- 3 Woodahl EL, Ho RJ. The role of MDR1 genetic polymorphisms in interindividual variability in P-glycoprotein expression and function. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 11-19
- 4 Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45: 228-247
- 5 张秀亚, 王珊, 李圆, 孔祥如, 王江波. 多药耐药基因转染对荷瘤小鼠骨髓造血细胞的保护作用. *第三军医大学学报* 2008; 30: 2164-2167
- 6 靳胜, 陈书恩, 张曼, 张敏, 张秀敏, 郝林, 许华林. 姜黄素逆转HL60/ADR及MCF-7/ADR的多药耐药研究. *重庆医学* 2010; 39: 21-23
- 7 Soranzo N, Cavalleri GL, Weale ME, Wood NW, Depondt C, Marguerie R, Sisodiya SM, Goldstein DB. Identifying candidate causal variants responsible for altered activity of the ABCB1 multidrug resistance gene. *Genome Res* 2004; 14: 1333-1344
- 8 Ponte-Sucre A. Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 76: 279-286
- 9 Baird NJ, Fang XW, Srividya N, Pan T, Sosnick TR. Folding of a universal ribozyme: the ribonuclease P RNA. *Q Rev Biophys* 2007; 40: 113-161
- 10 Zhou Y, Xu Y, Tan Y, Qi J, Xiao Y, Yang C, Zhu Z, Xiong D. Sorcin, an important gene associated with multidrug-resistance in human leukemia cells. *Leuk Res* 2006; 30: 469-476
- 11 李向上, 林阳, 胡蕴慧, 苏晔, 程昕, 杨铭, 杨纯正, 王金宏. PH II -7逆转肿瘤细胞K562/A02耐药机制的研究. *中国药理学通报* 2010; 26: 750-753
- 12 Jerry DJ, Tao L, Yan H. Regulation of cancer stem cells by p53. *Breast Cancer Res* 2008; 10: 304

#### ■同行评价

本文探讨MRP、LRP和MDR1基因在胃癌中的表达, 对阐明胃癌的发生与转移, 借以指导临床治疗, 有重要临床指导意义。

编辑 张姗姗 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

# 塑料支架内引流在老年性难取性胆管结石中的应用

李伟志, 秦鸣放, 勾承月, 张莉

## ■背景资料

内镜治疗已经成为治疗胆总管结石的主要手段, 应用乳头括约肌切开及网篮技术取石的成功率达到80%-90%, 然而在某些情况下结石无法完全取出, 而老年患者又因基础条件差不愿或不能接受手术时, 成为临床治疗中的一个难题。

李伟志, 秦鸣放, 勾承月, 张莉, 南开医院消化内镜中心 南开医院微创外科中心 天津市 300100

作者贡献分布: 资料收集、总结及论文撰写由李伟志完成; 秦鸣放与勾承月负责全文理论指导; 张莉负责资料整理。

通讯作者: 秦鸣放, 主任医师, 教授, 博士生导师, 300100, 天津市南开区南开三纬路122号, 天津南开医院. wisonic@sina.com

收稿日期: 2011-09-22 修回日期: 2011-10-20

接受日期: 2011-12-23 在线出版日期: 2012-01-18

## Application of endoscopic plastic biliary stents in elderly patients with unextractable common bile duct stones

Wei-Zhi Li, Ming-Fang Qin, Cheng-Yue Gou, Li Zhang

Wei-Zhi Li, Ming-Fang Qin, Cheng-Yue Gou, Li Zhang, Center for Digestive Endoscopy, Department of Minimally Invasive Surgery, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China  
Correspondence to: Ming-Fang Qin, Professor, Center for Digestive Endoscopy, Department of Minimally Invasive Surgery, Nankai Hospital, Tianjin 300100, China. wisonic@sina.com  
Received: 2011-09-22 Revised: 2011-10-20  
Accepted: 2011-12-23 Published online: 2012-01-18

## Abstract

**AIM:** To evaluate the safety and effectiveness of placement of plastic stents in the common bile duct in the treatment of elderly patients with unextractable common bile duct stones.

**METHODS:** The clinical data for 103 elderly patients with unextractable common bile duct stones who underwent endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) and placement of plastic stents in the bile duct were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** After placement of plastic stents in the bile duct, 60 patients (58.2%) had small stone fragments that were easily extracted with a balloon and basket; 13 patients (12.6%) continued to have large stones and had to received repeat ERCP and long-term stenting; 11 patients (10.6%) eventually underwent surgery; and 16 patients (15.5%) did not undergo repeat ERCP and were therefore treated by long-term stent placement.

**CONCLUSION:** Plastic biliary stent placement

is a reasonable alternative treatment in patients with unextractable common bile duct stones, especially in elderly patients.

**Key Words:** Unextractable common bile duct stones; Plastic biliary stent; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography

Li WZ, Qin MF, Gou CY, Zhang L. Application of endoscopic plastic biliary stents in elderly patients with unextractable common bile duct stones. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 164-166

## 摘要

**目的:** 回顾性分析在老年性难取性胆总管结石患者中胆道塑料支架置入治疗的安全性和有效性。

**方法:** 先行常规逆行性胆胰管造影(ERCP)明确诊断, 根据胆管扩张及结石大小情况, 行十二指肠乳头括约肌切开后经导丝引导放置胆道塑料支架通畅引流。

**结果:** 103例取石困难患者在常规ERCP后置入塑料支架. 3-6 mo后复查ERCP显示有60例(58.2%)结石成为小结石, 经内镜应用网篮取出; 13例(12.6%)结石未变化, 重新更换支架引流; 11例(10.6%)最后行腹腔镜胆囊切除胆管探查取石治疗; 16例(15.5%)患者因无特殊不适未复查ERCP, 长期行内支架引流。

**结论:** 对于老年性难取性胆管结石患者, 塑料支架内引流是一种十分有效和相对安全的手术方式。

**关键词:** 老年性难取性胆管结石; 胆道塑料支架; 逆行性胆胰管造影

李伟志, 秦鸣放, 勾承月, 张莉. 塑料支架内引流在老年性难取性胆管结石中的应用. *世界华人消化杂志* 2012; 20(2): 164-166  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/164.asp>

## 0 引言

随着内镜技术的发展, 内镜治疗已经成为治疗胆总管结石的主要手段, 应用乳头括约肌切开

## ■同行评议者

齐清会, 教授, 大连医科大学附属第一医院

及网篮技术取石的成功率达到80%-90%<sup>[1]</sup>。然而在某些情况下如结石过大或铸型用网篮无法套取、结石过多无法长时间操作, 乳头条件差相对结石切开范围小或胆总管下端相对狭窄结石无法完全取出, 而老年患者又因基础条件差不愿或不能接受手术时, 胆道塑料支架置入常常能减轻患者痛苦, 通畅胆道引流, 解决胆道梗阻或为下一阶段治疗创造条件<sup>[2]</sup>。我科对2008-03/2011-03胆总管结石无法取出的老年患者103例行放置塑料内支架治疗, 大部分患者通过2次内镜下取净结石或择期手术取出结石, 疗效满意。

## 1 材料和方法

1.1 材料 2008-03/2011-03我科接收的胆总管结石老年患者103例, 男性49例, 女54例; 年龄59岁-91岁, 平均74岁。临床症状: 上腹胀痛76例, 发热69例, 黄疸61例, 有胰腺炎病史21例, 合并胆囊炎胆囊结石13例。所有病例在放置支架前均进行B超、CT或MRCP等影像学检查确诊为胆总管结石, 常规内镜取石困难。

1.2 方法 经常规内镜下逆行胰胆管造影(ERCP), 见胆总管结石直径>1.5 cm者73例; 结石较多伴胆总管下端相对狭窄者22例, 扁平乳头切开条件差者12例, 憩室内乳头10例。

先行内镜下常规取石, 取石失败后患者行内镜下胆道塑料内支架置入治疗, 支架直径为8.5 F-11.5 F, 支架长度根据结石位置选择, 以先端越过结石上方保证引流通畅, 下端位于十二指肠乳头外约1.0 cm为准。胆总管下端相对狭窄者用扩张水囊扩张后置入支架。所有患者置入支架前均需行乳头切开以防止支架压迫胰管开口并发胰腺炎, 根据胆管的扩张程度决定塑料支架置入的直径及数量<sup>[3,4]</sup>。

所有患者均在塑料内支架置入术后3-6 mo时再次ERCP复查, ERCP造影检查若发现结石变小或碎裂为小结石则再次或第3次行内镜下取净结石; 对于结石无明显变化取石仍有困难者行更换支架治疗, 可在下一次患者出现腹痛或黄疸发热时再次行ERCP造影观察结石直径变化情况决定取石或更换支架。胆管结石仍很多合并胆囊炎、胆囊结石但可以耐受手术的患者择期行腹腔镜下胆囊切除胆管探查取石术<sup>[5,6]</sup>。

## 2 结果

本组中胆道塑料支架放置全部成功, 术后ERCP

复查造影发现结石变小或碎裂为小结石60例(58.2%), 行内镜取净结石; 结石较大但网篮可套取的应用体外机械碎石器碎石后取石治疗; 对结石碎裂和结石直径明显缩小胆管下端相对狭窄患者, 经扩张球囊扩张后, 用网篮或气囊顺利取出结石。

2次取净结石者41例(39.8%), 3次内镜取净结石者19例(18.4%)。13(12.6%)例患者结石直径始终无法变小, 且高龄, 心肺功能不全, 无法耐受外科手术或长时间内镜下操作, 最后留置塑料支架长期放置引流。16(15.5%)例因无明显不适未回院复查, 继续原支架引流。11(10.6%)例合并胆囊结石患者待基本情况良好后行腹腔镜下胆囊切除胆管探查取石术。

未发生与内镜操作相关的严重并发症。内镜治疗后有9(8.7%)例患者再次出现了黄疸或腹痛, 内镜检查发现支架脱落或阻塞, 经更换支架后症状消失。

## 3 讨论

常规ERCP取石治疗通过球囊或网篮能取出绝大部分胆总管结石, 但由于各种原因仍有5%-10%取出困难<sup>[7]</sup>。由于老年患者身体基础条件差无法耐受长时间内镜取石治疗或手术治疗, 内镜下塑料支架置入解决了难题, 为二次内镜取石或择期手术治疗创造了条件。

难取性胆总管结石常见原因多为胆管内直径>1.5 cm的巨大结石, 结石为充满型或铸型网篮无法套取, 结石下端胆管相对狭窄, 憩室内乳头或扁平乳头而使乳头切开困难。塑料支架置入一方面可以立竿见影解除胆道梗阻, 建立内引流克服鼻胆管引流液体丢失的缺点, 另一方面通过支架在胆道内对结石进行摩擦使结石逐渐变小甚至碎裂为二次内镜取石创造条件<sup>[8]</sup>。

Jain等<sup>[9]</sup>认为胆管支架可以减小结石, 使结石自行排出或下次内镜治疗时取出更容易。20例取石困难患者在常规ERCP后置入7F双猪尾塑料支架, 随访6 mo。7例(35%)患者行ERCP检查发现结石自行排出, 4例(20%)成为小结石碎片经内镜应用气囊很容易的取出, 6例(30%)结石未变化, 其中2例最后行外科手术治疗, 3例行体外机械碎石清除结石, 1例长期支架引流。3例(15%)患者未再行ERCP, 因而一直长期支架引流。他们认为双猪尾支架置入是一种安全有效地治疗方法, 经过6 mo的留置, 结石可能自行排出或变小使结石的取出更容易。

## ■ 研发前沿

国内外文献研究认为对于身体基础条件差无法耐受长时间内镜取石治疗或手术治疗的老年患者, 内镜下塑料支架置入解决了难题, 为二次内镜取石或择期手术治疗创造了条件。

## ■ 创新盘点

对于难取性胆道结石患者, 尤其对于高危患者的治疗, 胆道塑料支架内引流是一种安全有效的方法。

### ■同行评价

老年性难取性胆总管结石是临床治疗棘手的疾病。作者采用了塑料支架治疗取得了较好的疗效,值得借鉴。

Katsinelos等<sup>[10]</sup>研究得出结论,49例高危患者因结石巨大或应用常规取石方法取出困难行支架引流,无相关并发症,其最大结石直径大于12 mm。24例因其他并发症死亡;11例患者第2次行内镜取石结石取出,其中4例内镜检查时支架移位,经内镜取出支架及结石,7例结石变小或碎裂,最后经内镜取出;14例结石没有变化或碎裂而更换支架。结论认为胆道塑料支架是一种有效的方法,尤其对于高危患者的治疗。

我们认为在操作上塑料支架引流的位置应该选择在结石以上的扩张胆管内,塑料支架的先端至少越过结石上缘1 cm,保证引流通畅,尾端位于十二指肠乳头外1 cm,总和即为所需支架总长。为使放置支架过程顺利,短暂的胆管狭窄扩张往往是必要的<sup>[11]</sup>,可根据内镜及支架的大小,采用8.5 F、10 F或11.5 F扩张管逐级扩张,当扩张管的金属标记通过狭窄段后,表明狭窄部位已被扩至最大径。由于所放支架受内镜活检孔道及具体患者狭窄情况的限制,应根据具体情况确定支架直径。原则是直径越大,引流效果越好<sup>[12,13]</sup>。可根据胆管扩张情况放置一根或多根支架,更好的提高引流效果并可充分摩擦结石。

胆道塑料支架置入前应常规先行乳头括约肌切开,可以预防术后胰腺炎的发生,有研究表明这对老年患者的切开也是安全有效的<sup>[14]</sup>。塑料支架放置好后,应按压十二指肠镜吸引钮,吸出胆汁和造影剂,观察支架引流效果,确信引流满意后方可退出内镜。

胆道塑料支架置入的后期并发症主要是支架的阻塞或移位,造成引流失效<sup>[15]</sup>。一般10 F-11.5 F支架的平均通畅期为6 mo。因此应根据需要尽量选择内径较大、引流效果好的支架,一旦患者黄疸复发或有胆管炎发作,应及时更换支架,可采用圈套器、取石篮或支架回收器将支架取出,然后置入新支架。

总之,内镜下胆道塑料支架置入是治疗难取性胆总管结石的简单有效的方法,快速解决了通畅引流并为二次内镜取石或择期手术治疗建

立起了一座桥梁,尤其适合年龄较大、身体条件差而不宜长时间内镜操作或行外科手术治疗的患者。

### 4 参考文献

- Mizukami Y, Saito H, Obara T, Arisato S, Nakano Y, Sakurai Y, Izawa T, Kohgo Y. Temporary use of an accuflex stent for unextractable common bile duct stones. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 680-683
- 秦鸣放. ERCP在胆胰结合部疾病中的应用. *中国实用外科杂志* 2010; 30: 337-339
- 雷宇锋, 刘变英. 内镜下胆管内、外引流术治疗梗阻性黄疸. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1474-1475
- 林秀英, 张啸, 张筱凤. 塑料内支架在难取性胆总管结石中的应用. *中国内镜杂志* 2008; 1: 61-63
- 钱东, 秦鸣放, 王庆, 李宁, 勾承月. 十二指肠镜治疗胆总管多发结石440例. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3155-3158
- 司丽娟, 任建林, 迟宝荣. 肝内外胆管结石的内镜治疗. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3233-3236
- McHenry L, Lehman G. Difficult bile duct stones. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2006; 9: 123-132
- Chan AC, Ng EK, Chung SC, Lai CW, Lau JY, Sung JJ, Leung JW, Li AK. Common bile duct stones become smaller after endoscopic biliary stenting. *Endoscopy* 1998; 30: 356-359
- Jain SK, Stein R, Bhuvra M, Goldberg MJ. Pigtail stents: an alternative in the treatment of difficult bile duct stones. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 490-493
- Katsinelos P, Galanis I, Pilpilidis I, Paroutoglou G, Tsolkas P, Papaziogas B, Dimiroopoulos S, Kamperis E, Katsiba D, Kalomenopoulou M, Papagiannis A. The effect of indwelling endoprosthesis on stone size or fragmentation after long-term treatment with biliary stenting for large stones. *Surg Endosc* 2003; 17: 1552-1555
- 官爱霞, 马静, 葛林梅, 冷敬, 郭世斌, 孙康, 孙颖. 内镜治疗肝外胆管良性狭窄29例. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 950-953
- Ku MK, Lai KH, Lo GH, Cheng JS, Hsu PI, Lin CK, Chan HH, Hsu JH, Lin WT, Wang EM, Peng NJ. Long-term effect of large biliary endoprostheses in high-risk surgical patients with irretrievable common bile duct stones. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 1999; 62: 666-672
- 吴志强, 殷健, 候鹏, 陈立新, 唐晓兰, 杨立. ERCP预防胆道感染及梗阻性黄疸429例. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 120-121
- Sugiyama M, Atomi Y. Endoscopic sphincterotomy for bile duct stones in patients 90 years of age and older. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 187-191
- 苏悦, 秦鸣放, 吴瑜, 蔡旺. 胆道支架移位胆道良性疾病中的影响因素. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 192-195

编辑 李军亮 电编 何基才

## 肠系膜静脉血栓31例

陈建立, 张国志, 常艳, 谭欣, 戚峰, 刘彤

陈建立, 戚峰, 刘彤, 天津医科大学总医院普外科 天津市 300052

陈建立, 张国志, 河北联合大学附属医院普外科 河北省唐山市 063000

常艳, 谭欣, 河北联合大学附属医院唐海县医院 河北省唐山市 063200

陈建立, 副主任医师, 主要从事胃肠外科方面的研究.

作者贡献分布: 陈建立与张国志对此文贡献均等; 此课题由陈建立、张国志、刘彤及戚峰设计; 研究过程由陈建立、张国志、谭欣及常艳完成; 数据分析由陈建立完成; 本论文写作由陈建立完成.

通讯作者: 刘彤, 教授, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院普外科. liutonga@126.com

电话: 0315-3725997

收稿日期: 2011-11-10 修回日期: 2011-12-16

接受日期: 2011-12-31 在线出版日期: 2012-01-18

### Diagnosis and management of mesenteric venous thrombosis: an analysis of 31 cases

Jian-Li Chen, Guo-Zhi Zhang, Yan Chang, Xin Tan, Feng Qi, Tong Liu

Jian-Li Chen, Feng Qi, Tong Liu, Department of General Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Jian-Li Chen, Guo-Zhi Zhang, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital to Hebei United University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Xin Tan, Yan Chang, Tanghai Hospital, the Affiliated Hospital to Hebei United University, Tangshan 063200, Hebei Province, China

Correspondence to: Tong Liu, Professor, Department of General Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China. liutonga@126.com

Received: 2011-11-10 Revised: 2011-12-16

Accepted: 2011-12-31 Published online: 2012-01-18

### Abstract

**AIM:** To summarize the experience of diagnosis and management of mesenteric venous thrombosis (MVT).

**METHODS:** The clinical data for 31 patients with MVT treated at Tangshan Hospital from 1990 to 2010 were retrospectively analyzed. The risk factors, history of thrombosis, chief complaints, medical examination, laboratory examination, radiological examination, treatment methods, and prognosis were analyzed.

**RESULTS:** Of 31 patients, 24 were males and 7

were females. Their median age was 55.6 years. Main symptoms at presentation were abdominal pain (100%), vomiting (77.4%, 24/31), abdominal distension (64.5%, 20/31), and constipation (41.9%, 13/31). Main risk factors were liver disease, previous operation history, diabetes and malignancies. Contrast-enhanced CT is the most sensitive means for detection of MVT. Seven patients were treated by anticoagulation and 24 patients by surgery. Four patients died. Anticoagulation therapy and surgery were main treatments.

**CONCLUSION:** Increased awareness, earlier diagnosis and anticoagulation therapy are associated with decreased mortality rates in patients with MVT.

**Key Words:** Mesenteric venous thrombosis; Anticoagulation therapy; Surgical procedures

Chen JL, Chang Y, Tan X, Zhang GZ, Qi F, Liu T. Diagnosis and management of mesenteric venous thrombosis: an analysis of 31 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 167-170

### 摘要

**目的:** 总结肠系膜静脉血栓形成(mesenteric venous thrombosis, MVT)的临床经验, 探讨MVT形成的临床表现、诊断和治疗。

**方法:** 回顾性分析河北联合大学附属医院31例MVT住院患者的临床资料, 调查其危险因素、既往血栓史、主诉和查体、实验室检查、放射学检查、治疗及预后。

**结果:** 1990-2010共收治MVT患者31例; 男性24例, 女性7例; 平均年龄55.6岁; 主要的临床表现为腹痛(100%)、呕吐(77.4%, 24/31)、腹胀(64.5%, 20/31)、便秘(41.9%, 13/31); 肝脏疾病、既往手术史、糖尿病和恶性肿瘤是MVT的主要高危因素; 增强CT扫描是首选检查手段。7例患者接受单纯抗凝治疗, 24例患者接受手术治疗; 4例患者死亡。抗凝和手术治疗是MVT的主要治疗手段。

**结论:** MVT临床表现无特异性; 早期诊断, 及

### 背景资料

肠系膜静脉血栓(MVT)是引起肠缺血的少见原因, 约占所有肠缺血的1.5%-15.0%。临床上, MVT的症状和肠系膜上动脉栓塞相似。MVT的预后较肠系膜动脉栓塞为好。

### 同行评议者

郝建宇, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科

### ■研发前沿

MVT临床不常见,多起病较缓,症状不典型,早期体征不明显.由于病情进展可引起绞窄性肠梗阻,病情严重,病死率高,是一种早期难以诊断的危重急腹症.

时治疗是改善预后的关键.

**关键词:** 肠系膜上静脉血栓; 抗凝治疗; 外科手术

陈建立, 张国志, 常艳, 谭欣, 戚峰, 刘彤. 肠系膜静脉血栓31例. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 167-170  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/167.asp>

## 0 引言

肠系膜静脉血栓(mesenteric venous thrombosis, MVT)是引起肠缺血的少见原因, 约占所有肠缺血的1.5%-15.0%<sup>[1]</sup>. 临床上, MVT的症状和肠系膜上动脉栓塞相似. MVT的预后较肠系膜动脉栓塞为好, 统计表明, MVT的死亡率为13%-26%, 而肠系膜动脉栓塞为50%-90%<sup>[2]</sup>. 近年来的临床实践表明, 由于早期诊断和早期抗凝治疗, MVT的死亡率有所降低. 本研究为回顾性研究, 结合我院20年的临床经验, 探讨MVT的诊断与治疗方法.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1990-01/2010-01河北联合大学附属医院共收治MVT患者31例. 其中男性患者24例, 女性患者7例; 年龄24-73岁, 平均55.6岁.

**1.2 方法** 依据手术、血管造影、CT证实MVT形成. 调查的临床资料包括危险因素、既往血栓史、主诉和查体、实验室检查、放射学检查、治疗方法及预后. 实验室检查包括血红蛋白、白细胞、凝血系列、D-二聚体. 通过门诊复查及电话随访1-5年.

## 2 结果

**2.1 临床表现** 住院前症状出现时间1-40 d, 平均11.7 d. 最常见症状为腹痛, 占100%; 其次是呕吐占77.4%(24/31); 腹胀占64.5%(20/31); 便秘占41.9%(13/31); 腹泻占16.1%(5/31); 发热占12.9%(4/31). 17例患者出现的是定位模糊的腹痛; 8例患者为上腹疼痛; 6例患者为脐周和右上腹痛; 1例患者出现左下腹痛. 多数患者伴有脱水及心动过速的表现. 住院后平均确诊时间为24.1 h; 2个病例确诊时间较晚, 其中1例患者最初通过超声检查诊断为胰腺炎, 4 d后确诊; 另1例为乙型肝炎肝硬化患者, 确诊时间为7 d.

**2.2 导致MVT发生的高危因素** 调查发现, 58.1%(18/31)的患者存在轻重不等的肝脏疾病, 其中12例患者为肝硬化患者. 既往腹部手术史占患者的22.6%(7/31), 最常见的手术是脾切除术, 占

57.1%(4/7). 19.4%(6/31)的患者伴有心脏疾病. 16.1%(5/31)的患者伴有糖尿病. 6例患者并发有恶性肿瘤, 包括2例肝癌, 1例胰腺癌, 1例前列腺癌和1例结肠癌. 2例患者有既往肠系膜静脉血栓的病史. 其他因素包括真红细胞增多症, 克隆氏病, 口服避孕药和急性胰腺炎.

**2.3 实验室及影像学学检查** 患者的平均血红蛋白含量为135 g/L; 25例患者白细胞数升高, 平均白细胞总数为 $13.5 \times 10^9/L$ ; 8例血小板增多, 平均血小板总数 $335 \times 10^9/L$ ; 16例凝血酶原时间延长, 平均PT值为18.7 s和平均INR值为1.2; 18例患者纤维蛋白原及D-二聚体升高. 所有的患者接受了腹部X线检查, 48.1%(15/31)的患者表现为轻度的肠道积气; 9.7%(3/31)的患者表现为多发小肠气液平面; 42.9%(13/31)的患者未见异常. 18例患者接受了增强CT检查, 诊断正确率90%.

**2.4 治疗方法及预后** 7例患者接受单纯抗凝治疗; 24例患者接受手术治疗; 25例患者接受长期华法令抗凝治疗. 手术探查回肠受累占33.3%(8/24); 空回肠均受累占33.3%(8/24); 空肠受累占12.5%(3/24); 结肠受累占20.1%(5/24); 十二指肠受累占12.5%(3/24). 手术中探查21例患者腹腔渗液为淡血性, 1例为暗红色陈旧性渗液. 肠管坏死20-180(平均80) cm. 22例行坏死肠管切除吻合, 其余2例行坏死肠管切除, I期造瘘, II期还纳; 5例患者同时行肠系膜静脉取栓术. 3例患者接受二次手术, 其中1例患者进一步切除坏死小肠; 1名患者接受结肠造口术; 另1例患者接受回肠造口术.

4例患者30 d内死亡, 1例患者死于第11天, 2例患者死于第7天; 1例患者死于第27天; 均死于脓毒血症和多脏器功能衰竭. 随访5年6例患者死亡, 分别死于第3、4、6、11、17、34月; 2例患者死于肝功能衰竭; 1例患者死于心功能衰竭; 3例患者死于术后的严重短肠综合征.

## 3 讨论

MVT临床不常见, 多起病较缓, 症状不典型, 早期体征不明显. 由于病情进展可引起绞窄性肠梗阻, 病情严重, 病死率高, 是一种早期难以诊断的危重急腹症. 近年来, 随着对本病的研究增多及影像学检查手段的提高, 获得早期诊断的病例也逐渐增多, 治疗效果也有了提高. 然而, 临床医师对本病的认识和处理水平尚难如愿, 至今, 急性MVT死亡率未能获得进一步改善, 文献报道在13%-26%<sup>[3]</sup>.

### ■相关报道

Abdu等回顾性分析1911-1984年的共372例病例, 66%的患者存在高凝状态, 33%患者无高凝状态.

在本研究中, 男性患者占25例, 综合文献, 男性发病率较女性为高<sup>[4]</sup>. 平均年龄54.6岁, 较肠系膜动脉缺血性疾病发病年龄偏低. 事实上, MVT的年龄结构可以分为两组, 发病年龄较低的一组多是高凝状态或有腹部手术因素. 老年组多是由于恶性肿瘤, 肝脏疾病或心功能衰竭<sup>[5]</sup>.

在我们的研究中, 肝脏疾病是影响MVT的最主要因素, 其次是心脏疾病. 局部因素包括既往腹部手术史, 尤其是脾切除术. 许多文献也显示脾切除术是导致MVT的最重要的手术因素<sup>[6]</sup>. 可能是由于脾静脉结扎导致脾静脉血栓并向肠系膜静脉蔓延. 患者的高凝状态, 比如红细胞增多症, 口服避孕药等也是导致MVT的危险因素<sup>[7]</sup>.

由于MVT病变程度和范围的不同, 临床表现也不尽相同<sup>[4]</sup>. 不同程度的腹痛是其主要的临床表现. 轻者表现为餐后上腹部隐痛, 多见于慢性MVT; 重症者常呈持续性全腹绞痛, 并进行性加重, 多见于急性MVT的表现. 尽管每个患者的疼痛部位, 程度和持续时间有很大差异, 但也大体反映了患者病变的部位和程度. 腹胀和呕吐仍很常见. 大部分患者腹胀伴有上腹压痛, 还可表现为肠梗阻和腹膜炎.

由于MVT的症状、体征及实验室检查缺乏特异性, 其诊断则有赖于医生对患者进行超声、CT和血管造影的检查. 对于放射学辅助检查, 表现最多见的是小肠胀气, 偶尔可见小肠气液平面. 超声检查可以对部分MVT做出诊断, 而且可以检查出肝脏及门脉系统的功能状态. 但MVT患者多伴有腹胀症状, 气体干扰了超声的视野, 使诊断正确率不高. CT检查是诊断MVT的首选, 诊断正确率大于90%<sup>[8]</sup>. 对临床医师来说, 凡是不明原因腹痛及腹腔有渗出液的患者, 查体与腹痛性质不符, 既往有深静脉血栓或门静脉高压等病史, 均应行腹部增强CT检查. 增强CT检查可见肠系膜静脉或门静脉内低密度血栓影像, 肠壁增厚, 肠腔大量积气, 呈“靶样征”或“轨道征”<sup>[9]</sup>. 我们在研究中发现, 几乎每个患者血栓的范围都很广, 波及大血管和小血管, 这说明目前CT早期诊断孤立的小血管静脉血栓在技术是非常困难的. 因此, 连续的观察与渐进式的诊断对于发现MVT非常重要, 必要时需二次CT增强扫描.

在20世纪50年代, 肝素开始临床应用<sup>[10]</sup>. Abdu等回顾性分析1911-1984年的共372例病例, 66%的患者存在高凝状态, 33%患者无高凝状态<sup>[11]</sup>. 医学界普遍认为, 抗凝治疗可以增加患

者的生存率, 可显著减少复发率<sup>[12]</sup>. 我们的经验表明, 抗凝治疗是一个很好的选择. 由于抗凝治疗, 使肠坏死变为一个可逆的过程. 通过增强CT迅速诊断可以使大量的患者接受抗凝治疗避免肠坏死的发生. 溶栓治疗目前还未被明确, 对于血液动力学稳定, 没有肠梗死的临床或影像学改变的病例有帮助. 理论上当静脉主干阻塞时, 溶栓药物自旁路流失, 减少了溶栓的效果, 我们推测溶栓治疗是肝素化的辅助治疗手段, 是一种治疗作用较弱的药物.

手术治疗的原则是有限性或弥漫性腹膜炎存在时才应进行剖腹探查术. 手术中对受累肠管的处理原是尽可能多地保留肠管<sup>[13]</sup>. MVT并不是静止的疾病, 即使手术后仍有可能进一步形成血栓<sup>[4]</sup>, 所以术后维持抗凝治疗十分重. 可应用肝素5 000-8 000 U, 皮下注射, 每12 h 1次, 维持1 wk, 而后改为口服肠溶阿司匹林或华法令, 一般无诱发因素引起的MVT术后抗凝3 mo, 继发性引起MVT术后抗凝6 mo, 有些患者甚至需要终身抗凝.

总之, MVT临床表现无特异性. 早期诊断, 及时治疗是改善预后的关键. 相信随着对MVT认识的不断提高, 各种诊断技术的完善和进一步发展, MVT的诊治水平将获得更大改善.

#### 4 参考文献

- Ikeda M, Sekimoto M, Takiguchi S, Kubota M, Ikenaga M, Yamamoto H, Fujiwara Y, Ohue M, Yasuda T, Imamura H, Tatsuta M, Yano M, Furukawa H, Monden M. High incidence of thrombosis of the portal venous system after laparoscopic splenectomy: a prospective study with contrast-enhanced CT scan. *Ann Surg* 2005; 241: 208-216
- 王晓东, 孙巍. 肠系膜血管缺血外科诊治进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1400-1405
- Acosta S, Alhadad A, Svensson P, Ekberg O. Epidemiology, risk and prognostic factors in mesenteric venous thrombosis. *Br J Surg* 2008; 95: 1245-1251
- Acosta S, Ogren M, Sternby NH, Bergqvist D, Björck M. Mesenteric venous thrombosis with transmural intestinal infarction: a population-based study. *J Vasc Surg* 2005; 41: 59-63
- 张健, 王玉波, 张强. 急性肠系膜静脉血栓形成的非手术治疗. *中国实用外科杂志* 2003; 23: 220-222
- Hedayati N, Riha GM, Kougiass P, Huynh TT, Cheng C, Bechara C, Bismuth J, Dardik A, Lin PH. Prognostic factors and treatment outcome in mesenteric vein thrombosis. *Vasc Endovascular Surg* 2008; 42: 217-224
- Hotoleanu C, Andercou O, Andercou A. Mesenteric venous thrombosis: clinical and therapeutical approach. *Int Angiol* 2008; 27: 462-465
- Gore RM, Yaghmai V, Thakrar KH, Berlin JW, Mehta UK, Newmark GM, Miller FH. Imaging in intestinal ischemic disorders. *Radiol Clin North Am*

**■应用要点**  
超声检查可以对部分MVT做出诊断, 而且可以检查出肝脏及门脉系统的功能状态.

### ■同行评价

本文选题结合临床, 统计方法正确, 结果可靠, 结论对临床工作有较大帮助.

- 2008; 46: 845-875
- 9 Herbert GS, Steele SR. Acute and chronic mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 1115-1134, ix
- 10 王荫槐, 何三光, 段志泉. 现代肠系膜静脉血栓形成的诊治. *中国医科大学学报* 2002; 31: 314-315
- 11 Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology. *Surg Today* 2005; 35: 185-195
- 12 Parikh S, Shah R, Kapoor P. Portal vein thrombosis. *Am J Med* 2010; 123: 111-119
- 13 Kearon C. Diagnosis of pulmonary embolism. *CMAJ* 2003; 168: 183-194
- 14 Alvi AR, Khan S, Niazi SK, Ghulam M, Bibi S. Acute mesenteric venous thrombosis: improved outcome with early diagnosis and prompt anticoagulation therapy. *Int J Surg* 2009; 7: 210-213

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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版权, 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, 须经得《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.

## 以急性胰腺炎为主要特征的肾综合征出血热3例

易珍, 叶长根, 刘翠云, 刘佩佩, 张伟, 孙水林

易珍, 叶长根, 刘翠云, 刘佩佩, 张伟, 孙水林, 南昌大学第二附属医院感染科 江西省南昌市 330006  
易珍, 南昌大学医学院在读硕士, 主要从事肝脏等传染性疾病的临床研究。

作者贡献分布: 孙水林负责诊治, 组织会诊; 易珍、叶长根、刘翠云、刘佩佩及张伟共同收集资料; 易珍与叶长根完成写作部分。

通讯作者: 孙水林, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院感染性疾病科。sunshuilin2280@126.com  
电话: 0791-88188380

收稿日期: 2011-10-22 修回日期: 2011-11-21

接受日期: 2011-11-28 在线出版日期: 2012-01-18

### Acute pancreatitis as the main feature of hemorrhagic fever with renal syndrome: a report of three cases

Zhen Yi, Chang-Gen Ye, Cui-Yun Liu, Pei-Pei Liu, Wei Zhang, Shui-Lin Sun

Zhen Yi, Chang-Gen Ye, Cui-Yun Liu, Pei-Pei Liu, Wei Zhang, Shui-Lin Sun, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Shui-Lin Sun, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. sunshuilin2280@126.com

Received: 2011-10-22 Revised: 2011-11-21

Accepted: 2011-11-28 Published online: 2012-01-18

### Abstract

Hemorrhagic fever with renal syndrome mainly manifesting as acute pancreatitis is rarely seen and is easy to be misdiagnosed. Here we report three such cases of patients who presented with abdominal pain. Their hematuria amylase levels were significantly high. CT and ultrasonography revealed pancreatic enlargement. Based on these data, a diagnosis of acute pancreatitis was easily made. However, after comprehensive evaluation of epidemiology, clinical features and laboratory findings, hemorrhagic fever with renal syndrome was diagnosed. Clinicians should be aware of the possibility of hemorrhagic fever with renal syndrome when patients present with symptoms of acute pancreatitis.

Key Words: Hemorrhagic fever with renal syndrome; Acute pancreatitis; Fever

Yi Z, Ye CG, Liu CY, Liu PP, Zhang W, Sun SL. Acute pancreatitis as the main feature of hemorrhagic fever with renal syndrome: a report of three case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 171-173

### 摘要

肾综合征出血热以急性胰腺炎为主要特征表现较少, 表现特殊, 易造成误诊. 本3例患者临床表现均以腹痛为主, 查血尿淀粉酶明显增高, CT及彩超胰腺肿大, 易误诊为“急性胰腺炎”. 后经感染科会诊结合流病病学, 临床特征与实验室检查才得以确诊. 临床医生需开阔思路, 在临床诊治过程中遇到类似病例不排除为肾综合征出血热.

关键字: 肾综合征出血热; 急性胰腺炎; 发热

易珍, 叶长根, 刘翠云, 刘佩佩, 张伟, 孙水林. 以急性胰腺炎为主要特征的肾综合征出血热3例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(2): 171-173

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/171.asp>

### 0 引言

肾综合征出血热是一种自然疫源性疾病, 脏器损害以肾脏病变最明显, 其次为心、肝、脑、肺、胃肠及内分泌器官, 胰腺很少受累, 现将我院3例以急性胰腺炎为主要特征肾综合征出血热报道如下.

### 1 病例报告

患者1, 男, 56岁, 江西抚州农民, 8 d前受凉后出现畏寒, 发热5 d, 伴鼻塞流涕, 2 d后出现腹泻, 每日7-8次, 初为黄水样便, 带少许黏液, 无脓血, 无里急后重, 后期有柏油样便, 伴恶心, 伴呕吐, 脐周阵发性绞痛, 4 d后现面红肿, 尿量减少. 于2010-12-23, 16:00拟“急性胰腺炎, 急性肾功能衰竭”急诊转入我院急诊科诊治. 查体: 神志清楚, T: 36.7 °C, P: 78次/min, R: 21次/min, BP: 136/92 mmHg, 注射部位皮肤可见瘀斑, 球结膜充血及外渗水肿明显, 双肺呼吸音清, 心律齐, 未闻及杂音, 腹平, 全腹压痛, 反跳痛明显, 尤以

### ■背景资料

肾综合征出血热是一种自然疫源性疾病, 脏器损害以肾脏病变最明显, 其次为心、肝、脑、肺、胃肠及内分泌器官, 胰腺很少受累. 本文收集的3例以急性胰腺炎为主要特征肾综合征出血热都有胰腺的明显损害同时伴有肾功能损害, 为广大医务工作者拓展临床思路提供依据.

### ■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

### ■创新盘点

本文突出了在肾综合征出血热发病过程也会造成胰腺的损害,为临床医生提供新的思路。

左上腹明显,肝脾未触及,肝肾区有叩痛. 实验室检查:生化:TBIL 16.5  $\mu\text{mol/L}$ , DBIL 4.7  $\mu\text{mol/L}$ , ALT 72 IU/L, AST 142  $\mu\text{mol/L}$ , 总蛋白58 g/L, 白蛋白32 g/L, 球蛋白26 g/L, BUN 35.3 mmol/L, Cr 467  $\mu\text{mol/L}$ , 尿酸 517  $\mu\text{mol/L}$ , 总胆固醇 2.48 mmol/L, 甘油三酯3.9 mmol/L, 葡萄糖7.7 mmol/L, 高密度脂蛋白0.57 mmol/L, 低密度脂蛋白0.14 mmol/L, 载脂蛋白A 0.55 g/L, 载脂蛋白B 0.45 g/L, 载脂蛋白比值1.22, 钾3.8 mmol/L, 钠130 mmol/L, 氯90 mmol/L, 钙1.8 mmol/L, 二氧化碳结合率16.5 mmol/L, 肌酸激酶681 U/L, 肌酸激酶同工酶81 U/L, 乳酸脱氢酶1149 U/L,  $\alpha$ -羟丁酸脱氢酶997 U/L, 血淀粉酶313 U/L, 总胆汁酸7.5  $\mu\text{mol/L}$ , 纤维蛋白原1.74 g/L, 凝血酶原时间10.6 s, 凝血酶时间26.4 s, D二聚体定量913.0  $\mu\text{g/L}$ , 血常规: WBC  $34.6 \times 10^9/\text{L}$ , RBC  $4.0 \times 10^{12}/\text{L}$ , PLT  $23 \times 10^9/\text{L}$ , HGB 115 g/L, 中性粒细胞百分比0.796, 尿液分析: 蛋白+++、血+++、白细胞+, 镜检: 红细胞+++/高倍视野. CT示: (1)急性胰腺炎, 腹腔积液; (2)双侧胸腔积液并两肺下叶膨胀不全. 会诊后确诊: 肾综合性出血热并胰腺炎, 给予禁食, 稳定内环境, 促进利尿, 等对症处理后, 逐渐转为多尿期, 胰腺炎未给予特别处理, 胰腺功能与肾功能逐步好转, 患者痊愈出院。

患者2, 女, 43岁, 江西弋阳农民, 因发热, 腹痛5 d, 低血压少尿1 d就诊; 伴头晕、畏寒及寒战, 无流涕及鼻塞, 有头痛及全身酸痛, 腰痛明显, 无咳嗽, 咽痛及腹泻, 在当地医院就诊未见好转, 出现胸闷、少尿, 血压低, 于2011-01-07, 18:00拟“急性胰腺炎, 急性肾功能衰竭”急诊转入急诊科诊治. 查体: T: 37.5  $^{\circ}\text{C}$ , P: 135次/min, R: 25次/min, BP: 110/70 mmHg; 神志清楚, 全身皮肤未见明显斑点, 球结膜充血及水肿, 双肺呼吸音清, 心律齐, 未及杂音, 腹平, 腹壁压痛反跳痛明显, 肝脾未及, 肝区无叩击痛, 双肾区有叩击痛. 实验室检查: 血常规: WBC  $32.00 \times 10^9/\text{L}$ , PLT  $18 \times 10^9/\text{L}$ , 见少量异常淋巴细胞, 心电图: 窦性心动过速, T波改变, 尿常规: 尿蛋白+++、RBC 1-3个/HP, 尿淀粉酶1300 U/L, 血淀粉酶302 U/L, 尿素氮15 mmol/L. CT示: (1)胰腺炎、少量腹腔积液; (2)两侧少量胸腔积液; (3)两肾肿大, 肾周积液. 会诊后确诊: 肾综合征出血热并胰腺炎. 给予禁食, 稳定内环境, 促进利尿, 血液透析等对症处理后患者逐步进入多尿期, 胰腺炎亦未做特别处理, 肾功能和胰腺功能逐步好转, 痊愈出院。

患者3, 男, 55岁, 江西崇仁县农民. 急性起病, 发热、腹痛、腰痛12 d, 腹泻3 d, 黑便1 d就诊, 体温最高至38.9  $^{\circ}\text{C}$ , 有畏寒及寒战, 无咳嗽、咳痰, 有腹泻, 为黄色稀便, 3-4次/d, 有呕吐、恶心, 解黑便1次, 量约50 g, 无眼眶痛, 感头痛、腹痛及腰痛, 病程中无少尿和低血压表现. 检查: WBC  $15.00 \times 10^9/\text{L}$ , 血小板 $69 \times 10^9/\text{L}$ , 血淀粉酶306 U/L, 尿淀粉酶1 364 U/L, BUN: 40.2 mmol/L, Cr: 704.8  $\mu\text{mol/L}$ , 尿蛋白++, 拟“急性肾衰, 急性胰腺炎”于2011-11-16转入肾内科诊治. 查体: T: 36.5  $^{\circ}\text{C}$ , P: 75次/min, R: 20次/min, BP: 176/120 mmHg; 神志清楚, 精神差, 皮肤巩膜无明显黄染, 未见出血点及瘀斑, 球结膜有充血和轻度外渗水肿, 浅表淋巴结未触及肿大, 咽不红, 上颌可见散在出血点, 扁桃体无肿大, 无脓性分泌物, 颈软, 心肺听诊无异常, 腹稍隆, 有轻压痛及反跳痛, 肝脾肋下未触及肿大, 移动性浊音阴性, 双下肢无水肿, 双肾区轻叩痛. 实验室检查: TBIL 13.2  $\mu\text{mol/L}$ , DBIL 5.6  $\mu\text{mol/L}$ , ALT: 72 U/L, AST: 45 U/L, 腹部彩超示: 双肾体积增大, 胰腺肿大. 会诊后确诊: 肾综合性出血热并胰腺炎, 给予禁食, 稳定内环境, 促进利尿等对症处理后, 逐渐转为多尿期, 胰腺炎未给予特别处理, 胰腺功能与肾功能逐步好转, 患者痊愈。

## 2 讨论

以上3例患者最大的特征都有胰腺的明显损害同时伴有肾功能损害、有生化及影像学的证实, 故入院后均首先考虑原发病为急性胰腺炎引起, 但随着病情的进展及治疗的深入, 临床上的一系列症状及体征无法完全用原发急性胰腺炎来解释, 可能上述多器官的损害都源于另外一种原发疾病, 后经感染科会诊, 根据流行病学如患者均来自肾综合征出血热疫区、又有老鼠接触史在该病高发季节发病; 临床特征方面又有发热等中毒症状以及毛细血管损害的出血和外渗体征及多期临床经过等; 实验室检查都有尿蛋白、肾功能损害以及血常规白细胞升高等表现故考虑肾综合征出血热为原发病可能性大, 转感染科并按该病治疗原则处理且效果佳, 3例患者的胰腺炎均未给予特别处理, 后都进入多尿期, 胰腺功能与肾功能都逐步好转并最终痊愈, 住院期间的临床诊断后来得到血清病原学结果证实并确诊, 3例患者肾综合征出血热特异性IgM均阳性。

肾综合征出血热是一种自然疫源性疾病, 为

病毒性出血热的一种, 临床上以短暂发热, 继之出现休克、出血、急性肾功能衰竭等症状群为其特征, 病理变化以小血管水肿、变性、坏死为主. 脏器损害以肾脏病变最明显, 其次为心、肝、脑、肺、胃肠及内分泌器官. 因此, 临床上大多数患者以肾损害为主要表现, 故该类患者也较易做出临床诊断; 但临床上以胰腺损害为主要表现的肾综合征出血热患者鲜见报道, 易导致误诊不易早期做出正确诊断以致延误患者的治疗. 以上3例患者临床表现均以腹痛为主, 查血尿淀粉酶明显增高, CT及彩超胰腺肿大, 易误诊为“急性胰腺炎”, 但患者同时出现高热, 脐周皮肤无青紫, 血小板明显减少, 肝功能异常, 尿蛋白(++)-(+++), 单从急性胰腺炎不能完全解释上述情况, 此时应结合流行病学, 临床特征:

如“三红、三痛”及组织水肿和多期临床经过, 实验室检查出现尿蛋白、肾功能损害以及白细胞明显升高等表现等做出肾综合征出血热的临床诊断. 本病预后除与病情轻重有关外, 与治疗早迟、措施是否恰当有关, 治疗上主要是早诊断、早休息、早治疗, 就近治疗. 本病的早期诊断尤为重要, 直接影响患者的愈后. 因此, 在以腹痛为主并伴有明显的胰腺损害的患者, 若同时伴有不能完全用急性胰腺炎解释的临床特征时, 应注意到本病的可能, 可请感染科会诊并尽早做肾综合征出血热特异性抗体检测, 以便能早诊断, 早治疗, 以免误诊、延误病情<sup>[1]</sup>.

### 3 参考文献

- 1 柴玉萍. 流行性出血热误诊急性胰腺炎1例. 临床荟萃 2002; 17: 235

### ■同行评价

肾综合征出血热的胰腺损伤少见, 以首发为急性胰腺炎表现者, 在临床上易于误诊. 本文对提高临床医师对两种疾病的认识, 做好鉴别诊断具有一定临床意义.

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012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 0.694

本刊讯 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果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, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

# 《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68.00元,全年2448.00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。2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次,影响因子0.694,综合评价总分60.6分,分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位,分别位居1998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位;其他指标:他引率0.83,被引半衰期4.9,来源文献量712,文献选出率0.90,参考文献量17963,平均引文数25.23,平均作者数4.35,地区分布数29,机构分布数349,基金论文比0.45,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, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P<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: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) $t$ 检验用小写 $t$ ; (2) $F$ 检验用英文大写 $F$ ; (3)卡方检验用希腊文小写 $\chi^2$ ; (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1 000-1 500 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6 347意指6 000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3 614.5 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 $\leq 1\ 000$ , 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1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学

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注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 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号. 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.

《世界华人消化杂志》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>

## 2012年国内国际会议预告

2012-01-04/10

2011全国中医药创新发展学术交流大会  
会议地点: 南宁市  
联系方式: yxhy2000@163.com

2012-03-16/19

第三十二期全国超声诊断新进展暨介入超声高级研修班  
会议地点: 北京市  
联系方式: 13311335788@163.com

2012-03-22/25

2012年北京第六届疝和腹壁外科国际学术研讨会  
会议地点: 北京市  
联系方式: cmameeting@163.com

2012-03-23/25

国际肝胆胰协会中国分会第五届全国学术研讨会  
会议地点: 武汉市  
联系方式: lilu19870509@163.com

2012-03-31

第二届国际消化道内镜活检和病理学诊断研讨会  
会议地点: 杭州市  
联系方式: fyanfei@sina.com

2012-04-06/08

2012年脂质代谢与器官损害国际学术研讨会  
会议地点: 重庆市  
联系方式: islt2012@yahoo.com.cn;

2012-04-27/30

中华医学会2012年第十三届中华肝胆胰脾外科专业学术论坛  
会议地点: 九江市  
联系方式: zhgdwz@vip.163.com

2012-04-20/22

中国医学影像技术研究会第二十六次全国学术大会  
会议地点: 济南市  
联系方式: camit@vip.163.com

2012-05-26/31

2012年世界医学物理与生物医学工程大会  
会议地点: 北京市  
联系方式: info@wc2012.org

2012-06-01/03

2012中国北京超声医师学术大会  
会议地点: 北京市  
联系方式: zhumin301@163.com

2012-06-15/17

第一届糖尿病大会、第二届内分泌与代谢大会  
会议地点: 北京市  
联系方式: medical585@163.com

2012-06-15/17

第九届全国抗菌药物临床药理学术会议  
会议地点: 北京市  
联系方式: doctorzhengbo@163.com; liyun1907@sina.com

2012-06-29/07-01

第二十四次全国中西医结合消化学术会议  
会议地点: 宁波市  
联系方式: qgzxyjhxh@163.com

2012-06-30/07-01

中华医学会肝病与代谢学术研讨会  
会议地点: 哈尔滨市  
联系方式: lilyjia@163.com

2012-07-01/31

第一届全国普通外科青年医师学术论坛  
会议地点: 北京市  
联系方式: cmacjs@cma.org.cn

2012-07-01/31

第二届全国普通外科手术技术学术会议  
会议地点: 青岛市  
联系方式: lining@126.com

2012-08-25/29

第八届世界华人药物化学研讨会暨第九届IUPAC化学生物学国际研讨会  
会议地点: 北京市  
联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议  
会议地点: 广州市  
联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议  
会议地点: 青岛市  
联系方式: lilyjia@163.com

2012-10-25/28

第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)  
会议地点: 北京市  
联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

## 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!

白爱平 副教授  
南昌大学第一附属医院消化内科

蔡三军 主任医师  
复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

陈贻胜 教授  
福建省立医院消化内科

代智 副研究员  
复旦大学附属中山医院肝癌研究所

丁惠国 主任医师  
首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

董蕾 教授  
西安交通大学第二附属医院消化内科

樊晓明 主任医师  
复旦大学附属金山医院消化科

傅春彬 主任医师  
吉化集团公司总医院消化内科

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

郭晓钟 教授  
中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

郝立强 副教授  
上海长海医院普外二科

黄恒青 主任医师  
福建省第二人民医院消化内科

黄培林 教授  
东南大学

黄晓东 主任医师  
武汉市中心医院消化内科

季加孚 教授  
北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

金瑞 教授  
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李华 副教授  
中山大学附属第三医院肝脏外科

吕宾 教授  
浙江中医学院附属医院消化科

孙诚谊 教授  
贵阳医学院附属医院院长办

唐南洪 教授  
福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

王炳元 教授  
中国医科大学附属第一医院消化内科

王健生 教授  
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

魏继福 副研究员  
江苏省人民医院中心实验室

吴军 研究员  
军事医学科学院生物工程研究所

姚树坤 教授  
中日友好医院消化内科

于聪慧 教授  
中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科

禹正杨 副教授  
南华大学附属第一医院肿瘤外科

张凤春 教授  
上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤中心

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

周素芳 教授  
广西医科大学科技处