

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 10 月 18 日 第 20 卷 第 29 期 (Volume 20 Number 29)



## 29 / 2012

ISSN 1009-3079



《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  
王宝恩教授  
王苑本教授  
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  
樊晓明教授  
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  
郝丽萍副教授

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  
江米足教授  
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  
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  
王蔚虹教授  
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  
张庆瑜教授  
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  
陈凇教授  
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  
崔亚甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
杜顺达副教授  
房林教授  
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  
莫卫东教授  
姜波健教授  
金山主任医师  
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  
李永翔教授  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超教授  
刘建教授  
刘颖斌主任医师  
陆云飞教授  
禄韶英副教授  
吕云福教授  
麻勇副教授  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民主任医师  
邱伟华主任医师  
仇毓东教授  
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  
孙星副教授  
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  
汪波主任医师

汪根树副教授  
王道荣主任医师  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王刚副研究员  
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  
王铮副研究员  
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  
俞继卫副主任医师  
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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

方今女教授  
高润平教授  
高泽立副教授  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
胡国信主任医师  
靳雪源主任医师  
刘正稳教授  
钱林学主任医师  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
王建明副教授  
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  
江建新副主任医师  
李璦教授  
刘宝瑞教授  
刘炳亚研究员  
刘平教授  
刘云鹏教授  
卢晓梅教授  
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  
袁建业副研究员  
张春虎副教授  
朱西杰教授

### 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  
洪艳教授  
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  
周素芳教授  
周晓武副主任医师  
竺亚斌研究员

### 消化病理学

陈云昭副教授  
杜祥教授  
邓昊副教授  
季菊玲副教授  
李淳副教授  
李晟磊副主任医师  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
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 10 月 18 日 第 20 卷 第 29 期 (总第397期)

## 述 评

2761 原发性胆汁性肝硬化发病机制的研究进展

黄颖秋

2771 消化系肿瘤分子影像诊断的研究进展

张丹, 和水祥, 禄韶英

## 基 础 研 究

2777 血必净对急性胰腺炎大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6浓度的影响

徐伟松, 范辉, 刘玉峰, 王一平, 李振东

2782 RPL31-siRNA对人胰腺癌BxPC-3细胞裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用

李朝东, 刘春亮, 夏玉叶, 戈梅, 陈代杰

## 临 床 研 究

2789 基于iTRAQ结合质谱筛选HBV肝纤维化的差异表达蛋白

张维维, 何晓, 吕小平, 李茵, 李洪涛, 罗蓉, 李翠萍, 何敏

## 文 献 综 述

2795 食管静脉曲张出血套扎术后再出血的预防及治疗

常菲菲, 杜雅菊

2800 全身 $\gamma$ 刀治疗中晚期胰腺癌的研究进展

刘智慧, 孙大庆

2806 遗传性非息肉病性结直肠癌临床分子诊断的研究进展

陈红锦, 林秋, 曾莉, 杨柏霖

2812 SFRP基因甲基化与消化系统肿瘤相关性的研究进展

戴结, 刘畅, 汪芳裕

## 临 床 经 验

2818 成年患者食管异物临床特点分析256例

路国涛, 王玉欣, 梁钰, 丁岩冰, 肖炜明, 李玉璠

2822 凋亡调节因子Smac、Cyt C在食管癌中的表达与预后的关系

高凤兰, 宋文刚, 李维山, 王宪远, 刘国良, 郭宝强

2827 甘草酸苷对乙型肝炎疫苗无应答者PBMC细胞因子mRNA表达的影响

李旭华, 陈月, 吴文苑, 陈玲玲, 费筠

2832 原发性肝癌合并肝动脉-门静脉瘘的相关因素及临床特点

徐国斌, 熊斌

2836 急性轻症胆源性胰腺炎患者胆汁病原菌的分布及耐药性

黄曙, 季国忠, 范志宁, 林洁, 王敏

2840 失眠及其相关精神因素对女性肠易激综合征患者的影响

杨微微, 汤玉蓉, 徐新寓, 王一琳, 林琳

2845 脂联素受体在结直肠癌和结直肠腺瘤组织中表达

宋敏, 畅婕, 孟宇, 李磊

2851 康莱特注射液联合FOLFOX4方案治疗晚期大肠癌20例

丁蓉, 霍介格, 张玉, 樊敏

2855 慢性便秘患者报告临床结局评估量表条目池的建立和筛选

金洵, 丁义江, 丁曙晴, 王玲玲, 倪敏, 张华, 王丽雯, 刘妮妮, 王静



<b>附 录</b>	2860 《世界华人消化杂志》投稿须知 2865 2012年国内国际会议预告
<b>志 谢</b>	2866 志谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	2770 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 2788 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 2799 WJG总被引频次排名位于第174名 2811 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2817 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2821 《世界华人消化杂志》出版流程 2826 《世界华人消化杂志》正文要求 2831 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2835 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 2844 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2859 《世界华人消化杂志》栏目设置
<b>封面故事</b>	《世界华人消化杂志》编委, 禄韶英, 副教授, 副主任医师, 医学博士, 硕士生导师, 710061, 西安交通大学第一附属医院普通外科
<b>本期责任人</b>	编务 马帅; 送审编辑 田滢, 翟欢欢; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 田滢; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-10-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p> <p>编 辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出 版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p><b>主 编</b> 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消化内科 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, 福建医科大学附属医院协和医院消化内科 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</p> <p><b>编 辑 部 主 任</b> 李军亮</p>	<p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂 <b>发行</b> 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) <b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p>《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<a href="http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx">http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx</a>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p><b>特别声明</b> 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>
---	--	---

# World Chinese Journal of Digestology

## October 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 29

<b>EDITORIAL</b>	<p>2761 Recent advances in understanding the pathogenesis of primary biliary cirrhosis <i>Huang YQ</i></p> <p>2771 Advances in molecular imaging for diagnosis of digestive tract cancers <i>Zhang D, He SX, Lu SY</i></p>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>2777 Treatment with Xuebijing injection decreases serum concentrations of TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math> and IL-6 in rats with acute pancreatitis <i>Xu WS, Fan H, Liu YF, Wang YP, Li ZD</i></p> <p>2782 siRNA-mediated <i>RPL31</i> gene silencing inhibits the growth of xenograft tumors derived from human pancreatic cancer BxPC-3 cells in nude mice <i>Li CD, Liu CL, Xia YY, Ge M, Chen DJ</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>2789 Screening of differentially expressed serum proteins in patients with HBV-related liver fibrosis by iTRAQ combined with mass spectrometry <i>Zhang WW, He X, Lv XP, Li Y, Li HT, Luo R, Li CP, He M</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>2795 Progress in prevention and treatment of rebleeding after endoscopic band ligation for esophageal variceal bleeding <i>Chang FF, Du YJ</i></p> <p>2800 Overview of whole body gamma knife for locally advanced pancreatic cancer <i>Liu ZH, Sun DQ</i></p> <p>2806 Recent advances in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer <i>Chen HJ, Lin Q, Zeng L, Yang BL</i></p> <p>2812 Progress in understanding the relationship between SFRP gene methylation and gastrointestinal tumors <i>Dai J, Liu C, Wang FY</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>2818 Clinical features of adult patients with esophageal foreign bodies: An analysis of 256 cases <i>Lu GT, Wang YX, Liang Y, Ding YB, Xiao WM, Li YT</i></p> <p>2822 Correlation between expression of apoptosis modulators Smac and Cyt C and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma <i>Gao FL, Song WG, Li WS, Wang XY, Liu GL, Guo BQ</i></p> <p>2827 Effect of glycyrrhizin on mRNA expression of cytokines in PBMCs from non-responders to hepatitis B vaccine <i>Li XH, Chen Y, Wu WY, Chen LL, Fei Y</i></p> <p>2832 Primary liver cancer complicated with hepatic arterioportal fistula: Clinical characteristics and risk factors <i>Xu GB, Xiong B</i></p> <p>2836 Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in bile cultures from patients with acute mild biliary pancreatitis <i>Huang S, Ji GZ, Fan ZN, Lin J, Wang M</i></p> <p>2840 Influence of insomnia and insomnia-related psychological factors on symptoms of female patients with irritable bowel syndrome <i>Yang WW, Tang YR, Xu XY, Wang YL, Lin L</i></p> <p>2845 Expression of adiponectin receptors R1 and R2 in colorectal carcinoma and colorectal adenoma <i>Song M, Chang J, Meng Y, Li L</i></p> <p>2851 Kanglaite injection combined with FOLFOX4 regimen for the treatment of advanced colorectal cancer: An analysis of 20 cases <i>Ding R, Huo JG, Zhang Y, Fan M</i></p>

	2855 Construction and screening of the item pool for the Patient-Reported Outcome of Chronic Constipation rating scale <i>Jin X, Ding YJ, Ding SQ, Wang LL, Ni M, Zhang H, Wang LW, Liu NN, Wang J</i>
<b>APPENDIX</b>	2860 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 2865 Meeting events calendar in 2012
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	2866 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
<b>COVER</b>	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Shao-Ying Lu, Associate Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	Assistant Editor: <i>Shuai Ma</i> Review Editor: <i>Ying Tian, Huan-Huan Zhai</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Ying Tian</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** October 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: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@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: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@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***

# 原发性胆汁性肝硬化发病机制的研究进展

黄颖秋

黄颖秋, 中国医科大学第五临床学院 本溪钢铁(集团)总医院  
消化内科 辽宁省本溪市 117000

黄颖秋, 教授, 主任医师, 研究生导师, 主要从事胃肠动力疾病、  
消化系统肿瘤及肝硬化的基础与临床研究。

通讯作者: 黄颖秋, 教授, 主任医师, 117000, 辽宁省本溪市平山区  
人民路29号, 中国医科大学第五临床学院, 本溪钢铁(集团)总  
医院消化内科. huangyingqiu\_bx@126.com

电话: 0414-2215137

收稿日期: 2012-07-26 修回日期: 2012-08-19

接受日期: 2012-09-04 在线出版日期: 2012-10-18

## Recent advances in understanding the pathogenesis of primary biliary cirrhosis

Ying-Qiu Huang

Ying-Qiu Huang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron(Group); the Fifth Clinical College of China Medical University, Benxi 117000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ying-Qiu Huang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group); the Fifth Clinical College of China Medical University, 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000, Liaoning Province, China. Huangyingqiu\_bx@126.com

Received: 2012-07-26 Revised: 2012-08-19

Accepted: 2012-09-04 Published online: 2012-10-18

## Abstract

Primary biliary cirrhosis (PBC) is a chronic progressive cholestatic autoimmune liver disease characterized by the destruction of small intrahepatic bile ducts and the presence of highly specific serum antimitochondrial antibodies (AMAs). The human leukocyte antigen (HLA) gene has been proved to have strongest association with PBC susceptibility, and non-HLA genes, including IL12A, IL12RB2, STAT4, IRF5-TNPO3, ORMDL3/IKZF3, MMEL1, SPIB, CTLA-4, FCRL3 and A2BP1, are also closely associated with PBC susceptibility. Four AMAs including anti-M2, anti-M4, anti-M8 and anti-M9, and antinuclear antibodies (ANAs), such as antinuclear dot antibodies (SP100, PML, NDP52, SP140), antinuclear pore antibodies (gp210, p62), antinuclear envelope antibodies (Lamin and Lamin B receptor), and anti-centromere antibodies, may also be involved in the pathogenesis of PBC. The imbalance between

Th17 cells and regulatory T lymphocytes (Treg) may also play an important role in the pathogenesis of PBC. In addition, senescence, autophagy, apoptosis of biliary epithelial cells (BECs), and environmental factors, such as Epstein-Barr virus (EBV) infection and smoking, may also contribute to the pathogenesis of PBC. Understanding of the mechanisms responsible for the pathogenesis of PBC has important implications for the treatment of PBC.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Genetic susceptibility; Autoantibodies; Biliary epithelial cells; Pathogenesis

Huang YQ. Recent advances in understanding the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(29): 2761-2770

## 摘要

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种慢性进行性胆汁淤积性自身免疫性肝病,以肝内小胆管破坏及血清高特异性抗线粒体抗体(antimitochondrial antibodies, AMAs)增加为特征。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)与PBC的易感性显著相关,非HLA基因,包括IL12A、IL12RB2、STAT4、IRF5-TNPO3、ORMDL3/IKZF3、MMEL1、SPIB、CTLA-4、FCRL3和A2BP1等也与PBC的易感性密切相关。4个AMAs(抗-M2、抗-M4、抗-M8、抗-M9)、抗核抗体(ANAs),包括抗多核点抗体(SP100、PML、NDP52和SP140)、抗核孔抗体(gp210和p62)、抗核膜抗体(核板层蛋白、核板层蛋白B受体)及抗着丝粒抗体可能也涉及PBC的发病机制。Th17细胞/调节性T细胞(Treg)的免疫失衡在PBC的发病机制中可能起重要作用。此外,胆管上皮细胞(biliary epithelial cells, BECs)的衰老、自噬、凋亡以及环境因素,如EB病毒(EBV)感染、吸烟等可能也参与PBC的发病。这些最新研究进展为PBC的治疗提供了新的思路。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 遗传易感性; 自身抗体; 胆管上皮细胞; 发病机制

## ■背景资料

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种慢性胆汁淤积性肝病,多见于中年女性,为自身免疫性肝病的一种类型,血清抗线粒体抗体(AMAs)滴度升高是诊断PBC的特异性指标。PBC的发病机制十分复杂,可能涉及遗传易感性、自身免疫、胆管上皮细胞的自噬、衰老、凋亡以及环境因素的影响。

## ■同行评议者

丁惠国,教授,首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科



## ■ 研发前沿

全基因组关联分析(GWA)技术的应用使原发性胆汁性肝硬化(PBC)相关易感基因的研究取得了巨大进展,新的易感基因和基因座不断被发现,对于研究其发病机制具有重要意义。

黄颖秋. 原发性胆汁性肝硬化发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2761-2770  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2761.asp>

## 0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种免疫介导的,进展缓慢的胆汁淤积性肝病<sup>[1]</sup>,为自身免疫性肝病(autoimmune liver disease, AILD)的一种类型<sup>[2]</sup>,以慢性阻塞性黄疸、血清抗线粒体抗体(antimitochondrial antibodies, AMAs)增加、组织病理学示肝内小胆管慢性非化脓性破坏性胆管炎,最终广泛的胆管破坏及胆汁性肝硬化为主要特征<sup>[3]</sup>。流行病学资料显示, PBC每年的发病率为38.3/100 000, 82%的患者为女性, 中位年龄为62岁, 其主要临床表现为乏力和皮肤瘙痒, 血清AMAs阳性为PBC的特异性诊断指标, PBC确诊后的平均生存期为15年<sup>[4]</sup>。尽管女性和男性PBC患者在组织学、血清学及生物化学方面似乎无任何差别, 但在症状学上可能略有不同, 男性PBC罹患致命性并发症的风险较高, 如消化道出血和肝癌<sup>[5]</sup>。PBC的早期诊断及熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)治疗方案的应用明显改善了PBC患者的预后, 但仍有1/3的PBC患者应用UDCA治疗无效, 需要肝移植治疗<sup>[2]</sup>。PBC具有强烈的自身免疫特征, 包括对普遍存在的线粒体抗原耐受性的高度特异性缺失<sup>[6]</sup>。此外, 环境和遗传因素也在其发病机制中起重要作用<sup>[6]</sup>。本文就PBC发病机制的最新进展概述如下。

## 1 遗传易感性

PBC患者家族患病率高、单卵双生者患病的高度一致性<sup>[7,8]</sup>以及女性患病率明显高于男性<sup>[8]</sup>, 均提示PBC的遗传易感性<sup>[7,8]</sup>。女性易感PBC与X染色体的失活密切相关, 若自身免疫性T细胞不能耐受两个X染色体所编码的抗原即可导致PBC。Mitchell等<sup>[8]</sup>研究显示, 影响PBC始发的表现遗传因素比X-连锁基因启动子的甲基化差异更为复杂, 可变X-连锁基因(X-linked genes)失活可能具有部分启动子的特征, 这或许是中年女性易感PBC的主要原因。此外, 全基因组关联分析(genome-wide association analysis, GWA)显示, 人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)与PBC的相关性最强<sup>[6]</sup>。此外, 许多与HLA作用相当的非HLA风险基因也已被确认, 包括IL12A(3q25)<sup>[9]</sup>、IL12RB2(1p31)<sup>[9]</sup>、

STAT4<sup>[9]</sup>、IRF5-TNPO3(7q32)<sup>[10,11]</sup>、ORMDL3/IKZF3(17q12.21)<sup>[10-12]</sup>、MMEL1(1p36)<sup>[10]</sup>、SPIB(19q13)<sup>[11]</sup>、CTLA-4<sup>[13,14]</sup>、FCRL3<sup>[15]</sup>和A2BP1<sup>[16]</sup>, 他们均支持先天性免疫和获得性免疫在PBC的发生、发展中起重要作用<sup>[6]</sup>。

HLA与PBC HLA是具有高度多态性的同种异体抗原, 位于6号染色体的短臂, 受控于主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的基因簇, 按其分布和功能分为I类抗原和II类抗原, 前者的特异性取决于 $\alpha$ 重链, 包括经典HLA-A、B、C分子和非经典HLA-E、G、F分子, 后者受控于HLA-D区(包括5个亚区), 由其中的A基因和B基因分别为 $\alpha$ 重链和 $\beta$ 轻链编码, 其基因多态性取决于 $\beta$ 轻链<sup>[17]</sup>。Hirschfield等<sup>[9]</sup>应用GWA研究发现, PBC与HLA II类基因区的13个基因座显著相关, 其中与HLA-DQB1基因座(编码II类MHC, DQ $\beta$ 链1)的相关性最强。Umemura等<sup>[18]</sup>研究发现, PBC的易感性与HLA DRB1\*08:03-DQB1\*06:01和DRB1\*04:05-DQB1\*04:01单体型显著相关, 相反, 与DRB1\*13:02-DQB1\*06:04和DRB1\*11:01-DQB1\*03:01有显著的保护性相关。PBC原位肝移植术后患者的DRB1\*09:01-DQB1\*03:03单体型频率明显升高, 其DR $\beta$ 链57位点的丝氨酸频率也与大多数PBC患者不同, 提示HLA单体型在PBC易感性上起重要作用, HLA区域的进一步重新排序有待于对PBC基因成分的精细定位分析。Invernizzi等<sup>[19]</sup>证实, 特异性HLA-DRB1基因\*08、\*11、\*14与PBC相关, 其中DRB1\*08是最强的易感等位基因, DRB1\*14和DPB1\*03:01是易感风险等位基因, 而DRB1\*11为保护性基因。因此, PBC与HLA II类基因座的遗传变异体之间有显著的相关性<sup>[9]</sup>。

Hirschfield等<sup>[9]</sup>发现, PBC与IL12A基因座(编码白介素-12 $\alpha$ )上的2个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)即rs6441286和rs574808, 以及IL12RB2基因座(编码白介素-12受体 $\beta$ 2)的1个SNP即rs3790567有显著并可重复的相关性。精细定位分析(fine-mapping analysis)显示, IL12A 3'侧的5'-等位基因单体型与PBC显著相关。STAT4基因座(编码信号转导子和转录激活因子4)和CTLA4基因座(编码细胞毒T淋巴细胞相关蛋白4)以及10个其他基因座的SNPs与PBC风险有轻微全基因组相关性。此研究表明, PBC与IL12A和IL12RB2基因座的常见遗传变异体之间有显著的相关性, IL12免疫调节信号传导

轴与PBC的病理生理学有关. 为寻找更多的易感基因, Mells等<sup>[20]</sup>应用GWA确认了12个新的风险基因座, 包括DENND1B(1q31)、STAT4(2q32)、CD80(3q13)、NFKB1(4q24)、IL7R(5p13)、7p14、CXCR5(11q23)、TNFRSF1A(12p13)、RAD51L1(14q24)、CLEC16A(16p13)、16q24和MAP3K7IP1(22q13). 此外, 他们还发现8个新的候选基因, 包括STAT4、DENND1B、CD80、IL7R、CXCR5、TNFRSF1A、CLEC16A和NFKB1. 另外, CTLA-4+49G>A多态性可能也是PBC的易感因素<sup>[21]</sup>. Aiba等<sup>[22]</sup>证实, CTLA4 rs231775、rs3087243、rs231725 SNPs与PBC的易感性显著相关, CTLA4 rs231725 SNP与PBC的终末期进展显著相关, CTLA-4单体型1(rs231775 G、rs231777 C、rs3087243 G、rs231725 A和GCGA)既是PBC易感性的危险因素, 也是PBC进展的保护性因素. 相反, CTLA-4单体型2(ACAG)则分别是PBC易感性保护性因素和PBC进展的危险因素. CTLA4 rs231777 SNP及单体型3(ATGG)与抗gp210抗体的生成显著相关, 而SLC4A2单体型4(rs2069443 A、rs2303933 G、rs2303937 A、rs2303941 T; AGAT)和单体型3(AAGC)分别与PBC的易感性及抗着丝粒抗体(anti-centromere antibody, ACA)的生成显著相关. Li等<sup>[23]</sup>认为, CTLA4 rs231775 G等位基因是PBC的危险因素, 而rs3087243 AA基因型以及rs231725 GG、GA和G等位基因与PBC呈负相关. 此外, Inamine等<sup>[24]</sup>发现, ITGAV 3个SNPs(rs3911238、rs10174098和rs1448427)与PBC进展的严重程度显著相关, 但与其易感性无关. 其中, rs1448427与PBC肝移植术后的严重肝衰竭显著相关. 此研究表明, ITGAV是PBC进展的遗传决定因素, ITGAV的基因多态性或许有助于确认PBC的风险, 包括初次诊断需肝移植者. 因此, 进一步识别PBC相关风险基因座和易感基因对未来理性控制PBC的进展和治疗有潜在的帮助<sup>[6]</sup>.

单卵(monozygotic, MZ)双生女性患病的高度一致<sup>[8]</sup>以及90%的PBC患者为中年女性<sup>[5]</sup>均提示PBC有强烈的遗传易感性. 鉴于女性PBC患病率的明显占优, X染色体的作用机制备受关注<sup>[25,26]</sup>. Xp11、Xq13.1的基因突变分别导致IPEX、XSCID综合征, 表明X染色体与免疫之间存在紧密关系<sup>[25]</sup>. 同时, X染色体缺陷在迟发型自身免疫性疾病的女性患者也更为常见<sup>[26]</sup>. X染色体失活(X chromosome inactivation, XCI)是

雌性哺乳类动物体内的一个必要过程, XCI通过抑制两条X染色体中的一条基因的表达来弥补两条X染色体存在这一“缺陷”, X染色体上的X去活化中心(X inactivation center, XIC)序列含有两个非转译RNA基因, 分别为Xist与Tsix, 二者参与去活化作用来调控其沉默化. 此外, XIC上的一些结合位点还可与一些已知或未知的调控蛋白结合参与其调控. XCI调控的多样性或许反映了在演化进程中发育过程的可变性<sup>[27]</sup>. XCI的表观遗传因素(epigenetic factors)可能也涉及PBC的进展以及双生子PBC和合率(concordance rate)的可变性<sup>[5]</sup>. Mitchell等<sup>[8]</sup>应用定量RT-PCR技术对MZ一致和不一致的外周血mRNA和DNA 125个可变XCI状态的转录物水平分析发现, CLIC2和PIN4基因在双生子PBC患者中始终下调, 而在健康双生子或对照组则无. CLIC2和PIN4基因不能预测转录物水平或XCI状态, 这2种基因在CpG位点呈现部分或可变的甲基化. 此研究表明, 影响PBC始发的表观遗传因素比X连锁基因(X-linked genes)启动子甲基化的差异更为复杂, 可变X连锁基因的失活可能具有部分启动子甲基化和等位基因转录的特征.

## 2 免疫机制

### 2.1 自身抗体

2.1.1 抗线粒体抗体: 绝大多数PBC患者很容易检测到AMAs, 而极少数PBC(<5%)即使应用重组诊断技术, AMAs仍为阴性<sup>[28]</sup>. AMAs有9个亚型, 其中抗-M2、抗-M4、抗-M8及抗-M9涉及PBC, 这4个亚型对PBC的诊断具有相对特异性<sup>[29]</sup>. 抗-M2识别的自身抗原位于线粒体内膜, 有5个抗原决定簇, 为线粒体呼吸链内2-酮酸脱氢酶复合体的家族成员, 包括丙酮酸脱氢酶复合体(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)E2亚单位(PDC-E2)<sup>[29]</sup>、支链2-氧酸脱氢酶复合体E2亚单位(BCOADC-E2)<sup>[29]</sup>、2-氧化戊二酸脱氢酶复合体E2亚单位(OGDC-E2)<sup>[29]</sup>、支链2-氧酸脱氢酶复合体E1 $\alpha$ 亚单位(BCOADC-E1 $\alpha$ )<sup>[30]</sup>及二氢硫辛酰胺脱氢酶结合蛋白(E3BP)<sup>[29]</sup>. PBC以AMAs与2-酮酸脱氢酶复合体(BCOADC、PDC)E2亚单位的硫辛酰基发生反应为特征, 含有主要抗原表位的E2硫辛酰基区域对免疫病理十分必要<sup>[30]</sup>. 大约90%-95%的PBC患者的血清标本呈现PDC-E2抵抗反应, 形成PBC最重要的自身抗原, 抗-M2是PBC常规诊断试验中最重要的亚型<sup>[29]</sup>. Naiyanetr等<sup>[31]</sup>对小鼠PBC模型的研

### ■相关报道

2005年, Harrington等和Park等分别发现了一类不同于Th1细胞和Th2细胞的独立T细胞亚群, 即Th17细胞, 使人们对PBC的自身免疫机制有了新的认识, 相关报道不断涌现, Th17细胞/调节性T细胞(Treg)平衡失调可能在PBC的自身免疫过程中起重要作用.

## ■创新盘点

本文引用了近5年的大量英文文献,对遗传易感基因、自身抗体、Th17细胞/Treg的免疫调控、趋化因子、抗原呈递细胞、PPAR- $\gamma$ 、胆管上皮细胞的自噬、衰老、凋亡以及环境因素在PBC发病机制中的最新进展进行了详尽阐述,提供了大量有价值的信息。

研究发现,亲电体修饰的硫辛酸PDC-E2衍生物也可激发AMAs反应。此外,抗-E1抗体总是于E2的抗原抗体结合时出现,E1的自身免疫机制虽不同于E2,但可能与之有关,含有E1亚单位的非硫辛酰基也常成为靶点<sup>[30]</sup>。Mori等<sup>[30]</sup>研究发现,BCOADC复合体的集群抗体反应与PDC复合体的抗体反应迥然不同,前者是以BCOADC复合体的集群抗体形式出现,许多抗原表位出现于BCOADC-E1 $\alpha$ 分子表面,主要抗原表位与活性中心重叠,抗BCOADC-E1 $\alpha$ 抗体强力抑制酶的活性。此研究表明,BCOADC复合体的E1 $\alpha$ 亚单位是一种免疫原,涉及AMAs生成的发病机制。抗-M4、抗-M8及抗-M9识别的自身抗原位于线粒体的外膜。其中,抗-M4抗体主要见于慢性活动性肝炎和PBC患者;抗-M8抗体见于进展期PBC活动者;抗-M9抗体主要见于无症状、早期及抗-M2阴性的PBC患者<sup>[29]</sup>。胆管细胞破坏是PBC的重要特征,对PDC-E2自身抗原特异的辨识性T细胞介导此过程,PBC患者的外周血可反映辨识性CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞最显著的免疫学特征,而其相关的AMAs特异性CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>细胞在肝脏的含量则分别是外周血的近10倍和100倍以上,PBC患者的B细胞和T细胞可与同一抗原同时反应,二者均涉及PBC的发病机制<sup>[29]</sup>。Jin等<sup>[28]</sup>研究发现,AMAs阳性PBC患者的门管区胆管损伤程度显著低于AMAs阴性者,后者胆管区域的变异CD5<sup>+</sup>细胞浸润簇显著增加,胆管损伤早期的B细胞浸润水平也更为严重,门管区受损胆管的CD5<sup>+</sup>和CD20<sup>+</sup>细胞浸润频率及幅度是胆管上皮细胞(biliary epithelial cell, BEC)损害的首要证据,除CD5<sup>+</sup>细胞持续超过CD20<sup>+</sup>细胞外,胆管缺失阶段(ductopenia stage)时减轻。此研究表明,B细胞在PBC特征性的胆管损伤中具有自身免疫调节作用。AMAs包含IgA、IgG和IgM亚类。血清或唾液中AMAs IgA的出现可能与PBC的进展相关,胆汁中较高浓度的AMAs IgA致使外露的细胞更易凋亡而致胆管损坏。此外,AMAs IgA可转运至血管一侧的胆管细胞,通过与位于管腔表层细胞膜的PDC-E2样分子的免疫反应诱导细胞凋亡<sup>[29]</sup>。不同的AMAs IgG亚类有其不同的临床意义。AMAs IgG3阳性的PBC患者较阴性者的组织学进展更严重,形成肝硬化的频率也更高<sup>[29]</sup>。此外,AMAs IgG3滴度与Mayo风险评分呈正相关,其与不良预后的关联可能反映了AMAs IgG3充当免疫损伤介质的特殊功能<sup>[29]</sup>。PBC患者AMAs IgM滴度升高可能

与细菌CpG诱导B细胞激活及NF- $\kappa$ B信号通路有关<sup>[32]</sup>。AMAs的生成机制可能涉及氧化应激(oxidative stress)<sup>[3]</sup>、分子模拟(molecular mimicry)<sup>[33]</sup>、BEC凋亡(apoptosis)<sup>[34,35]</sup>、衰老(senescence)<sup>[3,35]</sup>和自噬(autophagy)<sup>[3,35]</sup>等。

2.1.2 抗核抗体(antinuclear antibodies, ANAs): 大约90%-95%的PBC患者血清AMAs滴度升高<sup>[29]</sup>, AMAs无疑是PBC重要的血清学特征<sup>[36]</sup>。除此之外,应用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence, IIF)可在50%的PBC患者检测到特异性的ANAs,尤其在AMAs阴性的PBC患者更为常见<sup>[36]</sup>,提示ANAs可作为PBC的辅助血清学标志。PBC特异的ANAs包括多核点型(multiple nuclear dots, MND)和核膜型(nuclear rim-like/membranous)<sup>[36]</sup>。前者的靶抗原被认定为Sp100和早幼粒白血病(promyelocytic leukemia, PML)蛋白,在PBC的小鼠模型<sup>[37]</sup>以及PBC患者<sup>[38]</sup>中均已被证实。而后者则包括多重蛋白(multiple proteins)gp210、核孔蛋白(nucleoporin)p62及核板层B受体(lamin B receptor)<sup>[36]</sup>。而其他一些ANAs,尤其是一些风湿类疾病的已知抗体,如抗-着丝点抗体(anticentromere)、抗-SSA/Ro及抗-dsDNA抗体在PBC也时常出现,且常共存于同一患者<sup>[36]</sup>。(1)抗多核点抗体(抗-MND抗体): 与MND相关的主要抗原包括Sp100、PML蛋白、Sp140和NDP52<sup>[29]</sup>。Sp100、PML蛋白常同时出现,并联合参与PBC的自身免疫反应<sup>[29]</sup>。因缺乏PML蛋白的免疫测定手段,Mytilinaiou等<sup>[38]</sup>开发了一种新的线条免疫测定方法(line immunoassay, LIA)以此分析PBC同时出现的抗-PML和抗-Sp100特异性自身抗体。结果证实,LIA是检测PBC相关特异性MND抗体的精确测定方法。Sp100为转录激活蛋白(transcription-activating proteins)自身抗原,主要见于PBC,偶见于风湿类疾病患者。抗-Sp100抗体的阳性率大约占PBC的25%,若具有典型的临床表现,并能排除其他疾病,其对PBC的诊断似乎更具高度特异性,尤其对AMAs阴性者<sup>[29]</sup>。但Milkiewicz等<sup>[39]</sup>采用较先进的MIT3-ELISA(MIT3-based enzyme-linked immunosorbent assay)方法研究发现,57例经M2 ELISA方法认定为AMAs阴性的PBC患者,14例经MIT3-IgG方法被认定为AMAs阳性,由于采用的血清学检测方法更为敏感和特异,AMAs阳性的抗-Sp100抗体也似乎较AMAs阴性者更常见。此外,74%并发尿路感染的PBC患者,抗-Sp100抗

体阳性, 而无尿路感染者, 阳性率仅为4.8%, 提示大肠杆菌(*Escherichia coli*)等感染因素可能涉及PBC特异性自身抗体的诱导<sup>[29]</sup>. 免疫荧光显微镜显示, 大约19%的PBC患者血清抗-PML抗体与抗-Sp100共存于同一患者中, 而即使AMAs呈阴性时, 抗-PML抗体仍对PBC具有高度的特异性<sup>[29]</sup>. PBC患者的血清中存在一种新的PML核体(nuclear body, NB)蛋白, 即Sp140<sup>[40]</sup>. Granito等<sup>[40]</sup>对135例PBC患者研究发现, 20例(15%)PBC患者出现抗-Sp140抗体, 而对照组则无, 且AMAs阴性PBC患者的抗-Sp140抗体频率显著升高(53% vs 9%,  $P<0.0001$ ); 除1例外, 全部患者(19/20例, 90%)的抗-Sp140抗体与抗-Sp100抗体同时存在; 12例(60%)PBC患者含有抗-PML抗体. 此研究表明, Sp140是对PBC的一种高度特异性抗原, 特别有助于AMAs阴性PBC患者的诊断. MND相关抗原NDP52<sup>[29]</sup>为一种转接蛋白(adaptor protein)<sup>[41]</sup>, 其与泛素(ubiquitin)及微管相关蛋白-3 $\beta$ 轻链(microtubule-associated proteins-light chain 3 $\beta$ , LC3, 自噬标志物)捆绑, 参与TBK1(tank-binding kinase, TBK1)信号通路的调节<sup>[41]</sup>, DP52通过促进细菌自噬(autophagy), 限制宿主细胞的细菌复制, 在免疫反应中可能起关键作用<sup>[41]</sup>; (2)抗核孔复合体抗体(抗-NPC抗体), 除AMAs外, 一些核抗原已被作为PBC患者ANAs的靶抗原, 包括核孔复合体(nuclear pore complex, NPC)重要组成部分的核孔蛋白, 如gp210和Nup62蛋白<sup>[29]</sup>. 大约1/4的PBC患者存在抗-NPC抗体<sup>[42]</sup>. 跨膜糖蛋白(integral membrane glycoprotein)gp210是NPC中一种完整的膜蛋白, 分子量为210 kDa, 其抗原表位定位于核孔区的细胞质部分, 抗-gp210抗体大约见于25%的PBC患者<sup>[29]</sup>, 其对PBC的特异性接近100%, 并与PBC的进展程度密切相关<sup>[42]</sup>. 核孔蛋白(nucleoporin)p62是一种55 kDa的膜蛋白, 其抗原表位定位于NPC的中心, 调节核定位信号蛋白的输入<sup>[42]</sup>. 鉴于自噬参与PBC的发病机制, Sasaki等<sup>[43]</sup>观察了p62在PBC患者胆管上皮细胞自噬及衰老过程中的作用. 结果表明, p62的聚集在PBC受损胆管的增加特别显著, 这或许反映了功能失调的自噬及随之而来的细胞衰老在PBC胆管损伤的作用机制. 换言之, p62介导的胆管上皮自噬可能先于其细胞衰老参与PBC的胆管损伤机制<sup>[44]</sup>. 抗-gp210及抗-p62抗体对PBC具有高度特异性, 后者在PBC患者血清中的检出率似乎高于前者, 抗-M2抗体阴性的PBC患者中, 应用IIF检测常显示抗-p62抗体阳性, 这2种抗

-NPC抗体的自身免疫机制可能也与分子模拟有关<sup>[42]</sup>; (3)抗-核内膜抗体(抗-lamin抗体、抗-LBR抗体), 核板层蛋白(lamin)为构成核板层结构的蛋白质, 包括A、B、C 3种, 均以二聚体形式存在, 以头-头、尾-尾相接的方式构成核板层<sup>[36,45]</sup>. 应用IIF可检测出PBC患者血清中的抗-核板层蛋白抗体(抗-lamin抗体), 他包括3种亚型, 分别为抗-laminA抗体、抗-laminB抗体和抗-laminC抗体<sup>[29]</sup>. Tsangaridou等<sup>[45]</sup>对103例PBC患者的血清检测发现, 抗-laminA、抗-laminB及抗-laminC的阳性率分别为6.8%、1.0%和1.0%. 抗-laminA、抗-laminC常同时存在, 但几乎不与抗-laminB并存<sup>[29]</sup>. 换言之, 抗-laminA、抗-laminB、抗-laminC很少共存于同一PBC患者<sup>[29]</sup>. 核板层B受体(lamin B receptor, LBR)为核内膜多肽蛋白, 抗原表位定位于核内膜区多肽蛋白的氨基末端<sup>[36]</sup>, 抗-LBR抗体对PBC具有高度特异性<sup>[29,36]</sup>, 其阳性率为8.7%<sup>[45]</sup>; (4)抗着丝粒抗体(anti-centromere antibodies, ACA), ACA是系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)的重要诊断标志物, 有多个亚型<sup>[29]</sup>, 与之对应的靶抗原包括<sup>[46]</sup>CENPA、CENPB、CENPC、CENPH、CENPE、CENPF、INCENP和CENPI. 大约25%的SSc患者ACA阳性<sup>[29]</sup>. ACA也可见于原发性干燥综合征(sjögren syndrome, SS)、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)及PBC<sup>[29]</sup>. ACA阳性的PBC患者并发门脉高压症的风险明显升高<sup>[29]</sup>. Hamdouch等<sup>[46]</sup>对硬皮病(scleroderma)患者研究发现, 25%的抗-CENPI抗体阳性者合并PBC, 提示与硬皮病相关的抗-CENPI抗体可作为合并PBC的标志. Imura-Kumada等<sup>[47]</sup>通过对225例SSc患者的PBC相关抗体检测发现, 22例(9.8%)PBC位于其中. 他们认为, SSc患者群中的PBC发病率以及PBC相关抗体的阳性率较高, AMAs和ACA或可预示SSc群体中的PBC风险增加. 此外, ACA也与SS患者相关, 若其血清中同时出现AMAs可预示PBC的风险<sup>[48]</sup>.

2.1.3 其他自身抗体: PBC患者体内已发现60余种自身抗体, 包括抗-GW小体(anti-GW bodies)抗体<sup>[49]</sup>、抗-p53抗体<sup>[50]</sup>、抗-核染色质(anti-chromatin)抗体<sup>[39]</sup>、抗-单纯疱疹病毒(anti-herpes simplex viral)抗体<sup>[51]</sup>、抗-乙酰胆碱受体(anti-acetylcholine receptor)抗体<sup>[52]</sup>、抗-平滑肌(anti-smooth muscle)抗体<sup>[53]</sup>、抗-环瓜氨酸肽(anti-cyclic citrullinated peptides, CCP)抗体<sup>[54]</sup>、抗-1, 4, 5三磷酸肌醇受体(anti-inositol 1, 4, 5-trisphos-

#### ■应用要点

本文详尽阐述了遗传易感性、自身免疫、胆管上皮细胞的自噬、衰老、凋亡以及环境因素在PBC发病机制中的作用, 提供了大量有价值的信息, 对于PBC的基础和临床研究有重要的参考价值.

## ■名词解释

调节性T细胞(Treg): 不同于Th1、Th2和Th17细胞的T细胞亚群, 能抑制对自身或外源抗原有害的免疫反应, 在维持机体免疫自稳和诱导免疫耐受中起重要作用。

phate receptor 3, ITPR3)抗体<sup>[55]</sup>及抗-p97/VCR抗体<sup>[56]</sup>等。他们出现于PBC的频率不等, 特异性尚不清楚, 作用机制也有待于研究。

2.2 T细胞免疫异常 促纤维化细胞因子, 如转化生长因子(transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ )、白介素6(interleukin-6, IL-6)等, 不仅在PBC的炎症反应中起重要作用, 而且也涉及效应T淋巴细胞亚群(effector T lymphocyte subpopulation)Th17细胞(T helper 17 cells, Th17 cells)及调节性T细胞(regulatory T lymphocytes, Treg)的生成和功能, 过度生成的这些细胞因子所诱发的免疫失衡可能与PBC和系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)的纤维化机制有关<sup>[57]</sup>。Th17细胞是一种分化途径与Th1细胞、Th2细胞截然不同的CD4+T细胞亚群, 因其分泌IL-17而得名<sup>[57]</sup>。孤儿核受体(orphan nuclear receptor, ROR)的家族成员包括ROR $\alpha$ 、ROR $\beta$ 和ROR $\gamma$ 。ROR $\gamma$ t作为ROR $\gamma$ 的可变转录产物, 广泛表达于CD4+CD8+双阳性细胞, 并成为诱导Th17细胞产生的关键转录因子<sup>[58]</sup>。IL-17家族含有6个成员。其中, IL-17A与IL-17F是同型二聚体蛋白, 同源率为50%, 并有2个基因位于同一染色体区域<sup>[58]</sup>。Th17细胞通过分泌IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22、IL-6、TNF- $\alpha$ 等细胞因子发挥其特有的免疫功能<sup>[58]</sup>。PBC的发病机制可能涉及对细菌成分的固有免疫反应<sup>[59]</sup>。Harada等<sup>[59]</sup>对PBC患者的胆管上皮细胞(biliary epithelial cells, BECs)培养研究发现, BECs的IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-23p19以及IL-23/IL-12p40 mRNAs被病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)表达上调。而且, 含有IL-17受体的BECs被IL-17刺激诱导产生大量的IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-23p19和趋化因子。PBC患者的受损胆管可见IL-17阳性细胞浸润及IL-6、IL-1 $\beta$ 过度表达。因此, PBC的胆管慢性炎症与IL-17阳性细胞以及对PAMPs的固有免疫有关。Liu等<sup>[60]</sup>研究证实, IL-7是维持Th17细胞存活与扩展的关键细胞因子。IL-7受体(IL-7 receptor, IL-7R)与多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)的易感性相关。IL-7可直接使实验性自身免疫性脑脊髓膜炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠及MS患者的Th17细胞显著增多, 而不需Th17细胞活化。IL-7拮抗剂通过抑制JAK-STAT5信号转导通路、改变生存蛋白(prosurvival protein)Bcl-2及细胞凋亡蛋白(proapoptotic protein)Bax的表达, 使EAE及MS的Th17细胞很快进入凋亡程序, 提示抑制

IL-7受体活性有助于减少有害Th17细胞的产生, 从而缓解自身免疫性疾病的进程。Treg具有维持自身耐受和抑制过度免疫反应作用, 与Th17细胞同属CD4+T细胞亚群, Treg与Th17细胞在分化和功能上相互抑制, 以维持免疫内环境的稳定, 一旦动态平衡被打破, 即可导致全身或局部免疫应答异常, 出现自身免疫性疾病<sup>[61]</sup>。除CD4+Treg外, 部分CD8+细胞亚群也为Treg<sup>[57]</sup>。Fenoglio等<sup>[57]</sup>研究显示, PBC患者存在CD8+Treg亚群缺陷, 而SSc患者则表现出CD4+CD25+及CD8+Treg亚群的异常。因此, CD8+Treg亚群缺陷似乎是导致纤维化性自身免疫性疾病始发和持续的重要因素。

2.3 趋化因子 PBC的自身免疫机制与Th1或Th17细胞产生的IFN- $\gamma$ 或IL-17有关, 趋化因子(fractalkine)对受损胆管周围的T细胞、B细胞浸润起关键作用<sup>[62]</sup>。CCL2和CX3CL1分别为趋化因子CC亚家族和CX3C亚家族的重要成员, 他们可能参与PBC的发病。Zhang等<sup>[63]</sup>研究发现, PBC患者外周血及BECs可见趋化因子显著表达, 其门管区浸润的淋巴细胞及受损胆管上皮的T细胞可见CX3CR1表达。Sasaki等<sup>[64]</sup>研究证实, PBC患者受损小胆管的衰老BECs也可见CCL2和CX3CL1过度表达<sup>[64]</sup>, 提示CCL2和CX3CL1可能与BECs的炎症衰老机制有关。Shimoda等<sup>[65]</sup>研究认为, CX3CL1可作为PBC胆管炎症反应的标志。

2.4 抗原呈递细胞 抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)包括朗格汉斯细胞(Langerhans cells, LCs)和树突细胞(dendritic cells, DC), 已在PBC门管区和胆管上皮被发现<sup>[66]</sup>。APC过度呈递抗原可致自身免疫性疾病。Graham等<sup>[66]</sup>研究显示, 58%的PBC患者可确认LCs存在, 而原发性硬化性胆管炎(PSC)及自身免疫性肝炎(AIH)患者仅为14%和6%。说明LCs可能与PBC的发病机制有关。PBC患者的受损小胆管周围常出现上皮肉芽肿样改变<sup>[3]</sup>。You等<sup>[67]</sup>研究发现, 经典DC(classical dendritic cell)CD11c标志物在PBC肝肉芽肿患者呈高度表达, CD11c阳性的PBC肝肉芽肿患者血清IgM水平显著升高, CD11b(DC未成熟标志)使MHC II、IL-23、CCR7和CD83表达下调, 使C1q表达上调, PBC的肝肉芽肿周围可见大量B细胞、IgM阳性浆细胞及巨噬细胞浸润, 提示DC对肉芽肿的发病机制至关重要, PBC的肝肉芽肿可能由未成熟DC与IgM相互作用所致。

2.5 PPAR- $\gamma$  过氧化物酶体增殖物活化受体(peroxisome proliferator-activated receptor-gamma,



PPAR- $\gamma$ )是调节脂肪细胞分化及抗炎作用的核受体, 由其配体激活后抑制炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 的表达, 后者经NF- $\kappa$ B诱导产生<sup>[68]</sup>. PPAR- $\gamma$ 通过减弱BECs对PAMPs的炎症信号以维持胆道内环境平衡及无炎症产生, PBC患者受损胆管的PPAR- $\gamma$ 表达显著下调, 表明对PAMPs的易感性增加<sup>[68]</sup>. 对PBC患者的BECs培养显示, Th2细胞因子IL-4使PPAR- $\gamma$ 表达上调, 而Th1细胞因子IFN- $\gamma$ 则使PPAR- $\gamma$ 表达下调, 这种独特的细胞因子环境与PBC受损胆管的PPAR- $\gamma$ 表达下调有关<sup>[68]</sup>.

### 3 胆管上皮细胞

PBC以慢性非化脓性破坏性胆管炎为其主要特征, 其受损小胆管的BECs常显示出SA- $\beta$ -gal、p16<sup>INK4a</sup>及p21<sup>WAF1/Cip1</sup>表达增加的衰老(senescence)征象<sup>[3]</sup>. 应用定量荧光原位杂交检查发现, PBC受损小胆管的BECs端粒长度显著减少<sup>[3]</sup>. 此外, 在其受损小胆管的BECs还可检测到 $\gamma$ H2AX DNA损伤位点<sup>[3]</sup>. p16<sup>INK4a</sup>、p21<sup>WAF1/Cip1</sup>的表达增加与端粒缩短及 $\gamma$ H2AX DNA损伤位点相一致, 反之亦然<sup>[3]</sup>. 提示BECs衰老在PBC的胆管损伤乃至随后的缺失中发挥作用. PBC患者的BECs衰老还伴随其自噬(autophagy)增加<sup>[3]</sup>. LC3通常作为自噬标志物, 其在PBC受损胆管的细胞质囊泡中显著表达, 自噬标志物LC3也常与衰老标志物p21<sup>WAF1/Cip1</sup>、p16<sup>INK4a</sup>在PBC受损胆管的BECs共表达(coexpressed)<sup>[3]</sup>. BECs的自噬可能也介导其衰老的过程, 并涉及PBC胆管损伤的发病机制<sup>[3]</sup>. BECs的凋亡(apoptosis)在PBC十分常见, 他可能在PBC的发病机制中发挥独特作用<sup>[34]</sup>. 此外, PBC患者肝内皮细胞产生的内皮素(endothelins, ETs)显著增加, ETs可能起重要致病作用<sup>[69]</sup>. Mantaka等<sup>[69]</sup>研究发现, 肝内皮细胞相关基因eNOS、EDN-1的基因多态性也与PBC的发病有关.

### 4 环境因素

微生物感染、疫苗、吸烟、营养不良、紫外线和生物异源物质(xenobiotics)等环境因素可能与PBC的发病有关<sup>[70]</sup>. 一些流行病学研究显示, 几种风险因素与PBC的进展相关, 包括PBC的家族史、复发性尿路感染以及吸烟<sup>[71]</sup>. Smyk等<sup>[71]</sup>认为, 吸烟可能加速疾病的纤维化和肝硬化进程, 故将其视为PBC的风险因素以及PBC患者纤维化进展的潜在因素. 此外, 病原体的分子模拟机制使感染因素与PBC的关系不容小视. 内脏利什曼病(visceral leishmaniasis, VL)是利什曼原虫引

发的致命性感染, 自身免疫现象在VL中常见, 这可能与寄生虫致组织破坏所释放的大量自身抗原有关, 也可能涉及寄生虫引起的宿主免疫应答改变, VL可致SLE、类风湿性关节炎及AIH等自身免疫性疾病<sup>[72]</sup>. 最近, Tunccan等<sup>[72]</sup>报道的1例VL患者, 其临床特征与SLE、AIH及AMAs-M2阳性的PBC重叠. EB病毒(epstein-barr virus, EBV)感染与PBC相关, PBC患者的外周血、唾液及肝组织中可见EBV-DNA显著增加, EBV作为PBC的触发因素介导免疫反应<sup>[73]</sup>. Pender等<sup>[74]</sup>认为, CD8+T细胞缺陷降低了对EBV的控制, 导致EBV侵入及抗-EBV抗体增加, EBV感染靶器官辨识性B细胞, EBV克隆式扩张(cloning expansion), 辨识性T细胞浸润靶器官形成异常淋巴结. 此外, 维生素D缺陷<sup>[74]</sup>及其受体的多态性<sup>[75]</sup>也与PBC的发病和进展有关.

### 5 结论

PBC的发病机制十分复杂, 涉及遗传易感性、免疫异常、胆管上皮细胞的自噬、衰老、凋亡以及诸多环境因素的影响. 尽管其发病机制的研究已取得不少进展, 但仍有很多机制尚未阐明. 目前尚无与人类PBC发病过程及临床特征酷似的动物模型, 这无疑制肘了对其发病机制和免疫治疗深层次的研究. Th17细胞/Treg的免疫调控、自身反应性T细胞克隆的分离和调控以及理想PBC动物模型的建立应是目前研究的重点和未来努力的方向.

### 6 参考文献

- 1 Hohenester S, Oude-Elferink RP, Beuers U. Primary biliary cirrhosis. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 283-307
- 2 Kim KA, Jeong SH. The diagnosis and treatment of primary biliary cirrhosis. *Korean J Hepatol* 2011; 17: 173-179
- 3 Sasaki M, Nakanuma Y. Novel approach to bile duct damage in primary biliary cirrhosis: participation of cellular senescence and autophagy. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 452143
- 4 Baldursdottir TR, Bergmann OM, Jonasson JG, Ludviksson BR, Axelsson TA, Björnsson ES. The epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis: a nationwide population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 824-830
- 5 Smyk DS, Rigopoulou EI, Pares A, Billinis C, Burroughs AK, Muratori L, Invernizzi P, Bogdanos DP. Sex differences associated with primary biliary cirrhosis. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 610504
- 6 Hirschfield GM, Invernizzi P. Progress in the genetics of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2011; 31: 147-156
- 7 Invernizzi P. Human leukocyte antigen in primary biliary cirrhosis: an old story now reviving. *Hepatol-*

### ■同行评价

本文较全面的综述了PBC的发病机制, 内容新颖, 论据充分, 推理正确.

- ogy 2011; 54: 714-723
- 8 Mitchell MM, Lleo A, Zammataro L, Mayo MJ, Invernizzi P, Bach N, Shimoda S, Gordon S, Podda M, Gershwin ME, Selmi C, LaSalle JM. Epigenetic investigation of variably X chromosome inactivated genes in monozygotic female twins discordant for primary biliary cirrhosis. *Epigenetics* 2011; 6: 95-102
- 9 Hirschfield GM, Liu X, Xu C, Lu Y, Xie G, Lu Y, Gu X, Walker EJ, Jing K, Juran BD, Mason AL, Myers RP, Peltekian KM, Ghent CN, Coltescu C, Atkinson EJ, Heathcote EJ, Lazaridis KN, Amos CI, Siminovitch KA. Primary biliary cirrhosis associated with HLA, IL12A, and IL12RB2 variants. *N Engl J Med* 2009; 360: 2544-2555
- 10 Hirschfield GM, Liu X, Han Y, Gorlov IP, Lu Y, Xu C, Lu Y, Chen W, Juran BD, Coltescu C, Mason AL, Milkiewicz P, Myers RP, Odin JA, Luketic VA, Speiciene D, Vincent C, Levy C, Gregersen PK, Zhang J, Heathcote EJ, Lazaridis KN, Amos CI, Siminovitch KA. Variants at IRF5-TNPO3, 17q12-21 and MMEL1 are associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* 2010; 42: 655-657
- 11 Liu X, Invernizzi P, Lu Y, Kosoy R, Lu Y, Bianchi I, Podda M, Xu C, Xie G, Macciardi F, Selmi C, Lupoli S, Shigeta R, Ransom M, Lleo A, Lee AT, Mason AL, Myers RP, Peltekian KM, Ghent CN, Bernuzzi F, Zuin M, Rosina F, Borghesio E, Floreani A, Lazari R, Niro G, Andriulli A, Muratori L, Muratori P, Almasio PL, Andreone P, Margotti M, Brunetto M, Coco B, Alvaro D, Bragazzi MC, Marra F, Pisano A, Rigamonti C, Colombo M, Marzioni M, Benedetti A, Fabris L, Strazzabosco M, Portincasa P, Palmieri VO, Tiribelli C, Croce L, Bruno S, Rossi S, Vinci M, Prisco C, Mattalia A, Toniutto P, Picciotto A, Galli A, Ferrari C, Colombo S, Casella G, Morini L, Caporaso N, Colli A, Spinzi G, Montanari R, Gregersen PK, Heathcote EJ, Hirschfield GM, Siminovitch KA, Amos CI, Gershwin ME, Seldin MF. Genome-wide meta-analyses identify three loci associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* 2010; 42: 658-660
- 12 Tanaka A, Invernizzi P, Ohira H, Kikuchi K, Nezu S, Kosoy R, Seldin MF, Gershwin ME, Takikawa H. Replicated association of 17q12-21 with susceptibility of primary biliary cirrhosis in a Japanese cohort. *Tissue Antigens* 2011; 78: 65-68
- 13 Chen RR, Han ZY, Li JG, Shi YQ, Zhou XM, Wang JB, Cai XQ, Wang XC, Han Y, Fan DM. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene +49A/G polymorphism significantly associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *J Dig Dis* 2011; 12: 428-435
- 14 Miyake Y, Ikeda F, Takaki A, Nouse K, Yamamoto K. +49A/G polymorphism of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene in type 1 autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: A meta-analysis. *Hepatol Res* 2011; 41: 151-159
- 15 Tanaka A, Ohira H, Kikuchi K, Nezu S, Shibuya A, Bianchi I, Podda M, Invernizzi P, Takikawa H. Genetic association of Fc receptor-like 3 polymorphisms with susceptibility to primary biliary cirrhosis: ethnic comparative study in Japanese and Italian patients. *Tissue Antigens* 2011; 77: 239-243
- 16 Joshita S, Umemura T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Ota M. A2BP1 as a novel susceptible gene for primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *Hum Immunol* 2010; 71: 520-524
- 17 Erlich H. HLA DNA typing: past, present, and future. *Tissue Antigens* 2012; 80: 1-11
- 18 Umemura T, Joshita S, Ichijo T, Yoshizawa K, Katsuyama Y, Tanaka E, Ota M. Human leukocyte antigen class II molecules confer both susceptibility and progression in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2012; 55: 506-511
- 19 Invernizzi P, Ransom M, Raychaudhuri S, Kosoy R, Lleo A, Shigeta R, Franke A, Bossa F, Amos CI, Gregersen PK, Siminovitch KA, Cusi D, de Bakker PI, Podda M, Gershwin ME, Seldin MF; The Italian PBC Genetics Study Group. Classical HLA-DRB1 and DPB1 alleles account for HLA associations with primary biliary cirrhosis. *Genes Immun* 2012; 13: 461-468
- 20 Mells GF, Floyd JA, Morley KI, Cordell HJ, Franklin CS, Shin SY, Heneghan MA, Neuberger JM, Donaldson PT, Day DB, Ducker SJ, Muriithi AW, Wheeler EF, Hammond CJ, Dawwas MF, Jones DE, Peltonen L, Alexander GJ, Sandford RN, Anderson CA. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* 2011; 43: 329-332
- 21 Huang Q, Shao F, Wang C, Qiu LJ, Hu YG, Yu JH. Association between CTLA-4 exon-1 +49A/G polymorphism and primary biliary cirrhosis risk: a meta-analysis. *Arch Med Res* 2011; 42: 235-238
- 22 Aiba Y, Nakamura M, Joshita S, Inamine T, Komori A, Yoshizawa K, Umemura T, Horie H, Migita K, Yatsuhashi H, Nakamura M, Fukushima N, Saoshiro T, Hayashi S, Kouno H, Ota H, Muro T, Watanabe Y, Nakamura Y, Komeda T, Shimada M, Masaki N, Komatsu T, Yagura M, Sugi K, Koga M, Tsukamoto K, Tanaka E, Ishibashi H. Genetic polymorphisms in CTLA4 and SLC4A2 are differentially associated with the pathogenesis of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J Gastroenterol* 2011; 46: 1203-1212
- 23 Li M, Zheng H, Li T, Gao P, Zhang XL, Liu DW. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 gene polymorphisms and primary biliary cirrhosis: a systematic review. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1159-1166
- 24 Inamine T, Nakamura M, Kawauchi A, Shirakawa Y, Hashiguchi H, Aiba Y, Taketomi A, Shirabe K, Nakamura M, Hayashi S, Saoshiro T, Komori A, Yatsuhashi H, Kondo S, Omagari K, Maehara Y, Ishibashi H, Tsukamoto K. A polymorphism in the integrin  $\alpha V$  subunit gene affects the progression of primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *J Gastroenterol* 2011; 46: 676-686
- 25 Selmi C. The X in sex: how autoimmune diseases revolve around sex chromosomes. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22: 913-922
- 26 Bianchi I, Lleo A, Gershwin ME, Invernizzi P. The X chromosome and immune associated genes. *J Autoimmun* 2012; 38: J187-J192
- 27 Okamoto I, Patrat C, Thépot D, Peynot N, Fauque P, Daniel N, Diabangouaya P, Wolf JP, Renard JP, Duranthon V, Heard E. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* 2011; 472: 370-374
- 28 Jin Q, Moritoki Y, Lleo A, Tsuneyama K, Invernizzi P, Moritoki H, Kikuchi K, Lian ZX, Hirschfield GM, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME, Niu J. Comparative analysis of portal cell infiltrates in antimitochondrial autoantibody-positive versus antimitochondrial autoantibody-negative primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2012; 55: 1495-1506

- 29 Hu CJ, Zhang FC, Li YZ, Zhang X. Primary biliary cirrhosis: what do autoantibodies tell us? *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3616-3629
- 30 Mori T, Ohira H, Kuroda M, Kato M, Yamaguchi Y, Kochi H. Characterization of Autoantibodies against the E1 $\alpha$  Subunit of Branched-Chain 2-Oxo-acid Dehydrogenase in Patients with Primary Biliary Cirrhosis. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 369740
- 31 Naiyanetr P, Butler JD, Meng L, Pfeiff J, Kenny TP, Guggenheim KG, Reiger R, Lam K, Kurth MJ, Ansari AA, Coppel RL, López-Hoyos M, Gershwin ME, Leung PS. Electrophile-modified lipoic derivatives of PDC-E2 elicits anti-mitochondrial antibody reactivity. *J Autoimmun* 2011; 37: 209-216
- 32 Kikuchi K, Hsu W, Hosoya N, Moritoki Y, Kajiyama Y, Kawai T, Takai A, Hayami E, Selmi C, Gershwin ME, Miyakawa H. Ursodeoxycholic acid reduces CpG-induced IgM production in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2009; 39: 448-454
- 33 Wasilenko ST, Mason GE, Mason AL. Primary biliary cirrhosis, bacteria and molecular mimicry: what's the molecule and where's the mimic? *Liver Int* 2009; 29: 779-782
- 34 Kawata K, Kobayashi Y, Gershwin ME, Bowls CL. The Immunophysiology and Apoptosis of Biliary Epithelial Cells: Primary Biliary Cirrhosis and Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012 Jun 12. [Epub ahead of print]
- 35 Sasaki M, Nakanuma Y. Biliary epithelial apoptosis, autophagy, and senescence in primary biliary cirrhosis. *Hepat Res Treat* 2010; 2010: 205128
- 36 Granito A, Muratori P, Quarneri C, Pappas G, Cicola R, Muratori L. Antinuclear antibodies as ancillary markers in primary biliary cirrhosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2012; 12: 65-74
- 37 Yang CY, Leung PS, Yang GX, Kenny TP, Zhang W, Coppel R, Norman GL, Ansari AA, Mackay IR, Worman HJ, Gershwin ME. Epitope-specific antinuclear antibodies are expressed in a mouse model of primary biliary cirrhosis and are cytokine-dependent. *Clin Exp Immunol* 2012; 168: 261-267
- 38 Mytilinaiou MG, Meyer W, Scheper T, Rigopoulou EI, Probst C, Koutsoumpas AL, Abeles D, Burroughs AK, Komorowski L, Vergani D, Bogdanos DP. Diagnostic and clinical utility of antibodies against the nuclear body promyelocytic leukaemia and Sp100 antigens in patients with primary biliary cirrhosis. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1211-1216
- 39 Milkiewicz P, Buwaneswaran H, Coltescu C, Shums Z, Norman GL, Heathcote EJ. Value of autoantibody analysis in the differential diagnosis of chronic cholestatic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 1355-1360
- 40 Granito A, Yang WH, Muratori L, Lim MJ, Nakajima A, Ferri S, Pappas G, Quarneri C, Bianchi FB, Bloch DB, Muratori P. PML nuclear body component Sp140 is a novel autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 125-131
- 41 Cemina M, Kim PK, Brumell JH. The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target Salmonella to the autophagy pathway. *Autophagy* 2011; 7: 341-345
- 42 Duarte-Rey C, Bogdanos D, Yang CY, Roberts K, Leung PS, Anaya JM, Worman HJ, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis and the nuclear pore complex. *Autoimmun Rev* 2012; 11: 898-902
- 43 Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. A possible involvement of p62/sequestosome-1 in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2012; 32: 487-499
- 44 Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Autophagy may precede cellular senescence of bile ductular cells in ductular reaction in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 660-666
- 45 Tsangaridou E, Polioudaki H, Sfakianaki R, Samiotaki M, Tzardi M, Koulentaki M, Panayotou G, Kouroumalis E, Castanas E, Theodoropoulos PA. Differential detection of nuclear envelope autoantibodies in primary biliary cirrhosis using routine and alternative methods. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 28
- 46 Hamdouch K, Rodríguez C, Pérez-Venegas J, Rodríguez I, Astola A, Ortiz M, Yen TJ, Bennani M, Valdivia MM. Anti-CENPI autoantibodies in scleroderma patients with features of autoimmune liver diseases. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 2267-2271
- 47 Imura-Kumada S, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Encabo S, Shums Z, Norman GL, Takehara K, Fujimoto M. High prevalence of primary biliary cirrhosis and disease-associated autoantibodies in Japanese patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol* 2012 Feb 12. [Epub ahead of print]
- 48 Bournia VK, Vlachoyiannopoulos PG. Subgroups of Sjögren syndrome patients according to serological profiles. *J Autoimmun* 2012; 39: 15-26
- 49 Stinton LM, Swain M, Myers RP, Shaheen AA, Fritzler MJ. Autoantibodies to GW bodies and other autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2011; 163: 147-156
- 50 Himoto T, Yoneyama H, Kurokohchi K, Inukai M, Masugata H, Goda F, Haba R, Watanabe S, Senda S, Masaki T. Clinical significance of autoantibodies to p53 protein in patients with autoimmune liver diseases. *Can J Gastroenterol* 2012; 26: 125-129
- 51 Fujiwara K, Yokosuka O. Frequent detection of immunoglobulin M anti-herpes simplex viral antibody in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2012; 56: 395
- 52 Taddy H, Yoshida EM, Gibson G, Chatur N. Acetylcholine receptor antibody positive generalized myasthenia gravis in association with primary biliary cirrhosis. *Ann Hepatol* 2010; 9: 471-472
- 53 Zhao P, Han Y. Low incidence of positive smooth muscle antibody and high incidence of isolated IgM elevation in Chinese patients with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis overlap syndrome: a retrospective study. *BMC Gastroenterol* 2012; 12: 1
- 54 Santiago M, Baron M, Miyachi K, Fritzler MJ, Abuhakima M, Leclercq S, Bell M, Hudson M, Mathieu JP, Taillefer S, Jones N, Docherty P, Khraishi M, Markland J, Pope J, Robinson D, Smith D, Sutton E. A comparison of the frequency of antibodies to cyclic citrullinated peptides using a third generation anti-CCP assay (CCP3) in systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis and rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008; 27: 77-83
- 55 Miyachi K, Hankins R, Ihara M, Miyamoto A, Okano T, Iwai M, Mikoshiba K, Fritzler MJ. A case of limited cutaneous systemic sclerosis developing anti-mitochondria antibody positive primary biliary cirrhosis after acute myocardial infarction. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 1571-1574
- 56 Miyachi K, Hosaka H, Nakamura N, Miyakawa H,

- Mimori T, Shibata M, Matsushima S, Chinoh H, Horigome T, Hankins RW, Zhang M, Fritzler MJ. Anti-p97/VCP antibodies: an autoantibody marker for a subset of primary biliary cirrhosis patients with milder disease? *Scand J Immunol* 2006; 63: 376-382
- 57 Fenoglio D, Bernuzzi F, Battaglia F, Parodi A, Kalli F, Negrini S, De Palma R, Invernizzi P, Filaci G. Th17 and regulatory T lymphocytes in primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis as models of autoimmune fibrotic diseases. *Autoimmun Rev* 2012 May 23. [Epub ahead of print]
- 58 Black A, Bhaumik S, Kirkman RL, Weaver CT, Randolph DA. Developmental regulation of Th17-cell capacity in human neonates. *Eur J Immunol* 2012; 42: 311-319
- 59 Harada K, Shimoda S, Sato Y, Isse K, Ikeda H, Nakanuma Y. Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 261-270
- 60 Liu X, Leung S, Wang C, Tan Z, Wang J, Guo TB, Fang L, Zhao Y, Wan B, Qin X, Lu L, Li R, Pan H, Song M, Liu A, Hong J, Lu H, Zhang JZ. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease. *Nat Med* 2010; 16: 191-197
- 61 Bernuzzi F, Fenoglio D, Battaglia F, Fravega M, Gershwin ME, Indiveri F, Ansari AA, Podda M, Invernizzi P, Filaci G. Phenotypical and functional alterations of CD8 regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2010; 35: 176-180
- 62 Shimoda S, Selmi C, Gershwin ME. Fractalkine and other chemokines in primary biliary cirrhosis. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 102839
- 63 Zhang W, Ono Y, Miyamura Y, Bowlus CL, Gershwin ME, Mavarakis E. T cell clonal expansions detected in patients with primary biliary cirrhosis express CX3CR1. *J Autoimmun* 2011; 37: 71-78
- 64 Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Modulation of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 53: 318-325
- 65 Shimoda S, Harada K, Niino H, Taketomi A, Maebara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2010; 51: 567-575
- 66 Graham RP, Smyrk TC, Zhang L. Evaluation of langerhans cell infiltrate by CD1a immunostain in liver biopsy for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Am J Surg Pathol* 2012; 36: 732-736
- 67 You Z, Wang Q, Bian Z, Liu Y, Han X, Peng Y, Shen L, Chen X, Qiu D, Selmi C, Gershwin ME, Ma X. The immunopathology of liver granulomas in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2012; 39: 216-221
- 68 Harada K, Nakanuma Y. Biliary innate immunity: function and modulation. *Mediators Inflamm* 2010; 2010
- 69 Mantaka A, Goulielmos GN, Koulentaki M, Tsagournis O, Voumvouraki A, Kouroumalis EA. Polymorphisms of genes related to endothelial cells are associated with primary biliary cirrhosis patients of Cretan origin. *Hum Immunol* 2012; 73: 829-835
- 70 Selmi C, Maria Papini A, Pugliese P, Claudia Alcaro M, Gershwin ME. Environmental pathways to autoimmune diseases: the cases of primary biliary cirrhosis and multiple sclerosis. *Arch Med Sci* 2011; 7: 368-380
- 71 Smyk DS, Rigopoulou EI, Muratori L, Burroughs AK, Bogdanos DP. Smoking as a risk factor for autoimmune liver disease: what we can learn from primary biliary cirrhosis. *Ann Hepatol* 2012; 11: 7-14
- 72 Tunccan OG, Tufan A, Telli G, Akyurek N, Pamukcuoglu M, Yilmaz G, Hızal K. Visceral leishmaniasis mimicking autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis, and systemic lupus erythematosus overlap. *Korean J Parasitol* 2012; 50: 133-136
- 73 Rigopoulou EI, Smyk DS, Matthews CE, Billinis C, Burroughs AK, Lenzi M, Bogdanos DP. Epstein-barr virus as a trigger of autoimmune liver diseases. *Adv Virol* 2012; 2012: 987471
- 74 Pender MP. CD8+ T-Cell Deficiency, Epstein-Barr Virus Infection, Vitamin D Deficiency, and Steps to Autoimmunity: A Unifying Hypothesis. *Autoimmune Dis* 2012; 2012: 189096
- 75 Kempnińska-Podhorecka A, Wunsch E, Jarowicz T, Raszeja-Wyszomirska J, Loniewska B, Kaczmarczyk M, Milkiewicz M, Milkiewicz P. Vitamin d receptor polymorphisms predispose to primary biliary cirrhosis and severity of the disease in polish population. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012: 408723

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费. 审稿周期及发表周期不变. (编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

# 消化系统肿瘤分子影像诊断的研究进展

张丹, 和水祥, 禄韶英

张丹, 和水祥, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科  
陕西省西安市 710061

禄韶英, 西安交通大学医学院第一附属医院普通外科 陕西省  
西安市 710061

和水祥, 教授, 主任医师, 博士, 博士生导师, 主要从事消化系统  
肿瘤和肝纤维化的基础研究及临床工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 81172359

作者贡献分布: 和水祥与禄韶英负责全文的设计及审校; 张丹负  
责文献检索及文章撰写。

通讯作者: 禄韶英, 副教授, 副主任医师, 博士, 硕士生导师,  
710061, 陕西省西安市雁塔西路277号, 西安交通大学第一附属  
医院普通外科, robertlu@mail.xjtu.edu.cn

电话: 029-85323875

收稿日期: 2012-06-28 修回日期: 2012-09-02

接受日期: 2012-09-15 在线出版日期: 2012-10-18

## Advances in molecular imaging for diagnosis of digestive tract cancers

Dan Zhang, Shui-Xiang He, Shao-Ying Lu

Dan Zhang, Shui-Xiang He, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Shao-Ying Lu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81172359

Correspondence to: Shao-Ying Lu, Associate Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical School, Xi'an Jiaotong University of Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. robertlu@mail.xjtu.edu.cn

Received: 2012-06-28 Revised: 2012-09-02

Accepted: 2012-09-15 Published online: 2012-10-18

## Abstract

Digestive tract cancers are common cancer types and have high incidence and mortality. Currently available diagnostic methods have some limitations that make an early and accurate diagnosis and prompt treatment difficult. Molecular imaging, which has been formally defined as visualization, characterization and measurement at the molecular level instead of the anatomic level, significantly increases the sensitivity and specificity of cancer detection. Several modalities have been utilized for molecular imaging in digestive tract cancers, such as endoscopy, scintigraphy (PET/SPECT), magnetic resonance imaging (MRI),

and ultrasound (US). Antibodies, peptides, and aptamers are classes of molecular probes that have been extensively used as affinity ligands. After being conjugated with various labels such as radioisotopes, fluorophore, supermagnetic or paramagnetic metals and microbubbles, the probes can specifically target tumor cells and stroma and are used with imaging modalities to detect cancers. Molecular imaging is a methodology for not only the early detection of cancer, but also the judgment of tumor staging and the guidance of therapy. With the development of new instrument and probes, as well as multi-modal platforms, molecular imaging has been gradually perfected and taken from bench to bedside, bringing opportunities for early, accurate and comprehensive diagnosis of digestive tract cancers.

Key Words: Molecular imaging; Digestive tract cancers; Diagnosis

Zhang D, He SX, Lu SY. Advances in molecular imaging for diagnosis of digestive tract cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2771-2776

## 摘要

消化系统肿瘤具有高发病、高死亡的特点, 而现有检查手段难以实现早期、准确地诊断。分子影像以分子而非解剖结构为对象, 提升检查的灵敏及特异性。消化系统肿瘤分子影像涉及的成像方法包括光学内镜、闪烁扫描成像、磁共振、超声等。抗体、多肽、适体等均可作为特异性配体, 经显像基团标记成为探针, 实现对肿瘤细胞或间质的特异性结合及成像。这类技术不仅用于肿瘤早期诊断, 还可协助肿瘤分期, 指导治疗。随着新仪器及探针的开发, 以及多元化显像模式的发展, 分子影像已逐渐完善并从实验室进入临床, 使更早期、全面、准确诊断消化系统肿瘤成为可能。

关键词: 分子影像; 消化系统肿瘤; 诊断

张丹, 和水祥, 禄韶英. 消化系统肿瘤分子影像诊断的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(29): 2771-2776

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2771.asp>

## ■背景资料

消化系统肿瘤早期症状隐匿, 且现有常用检测手段灵敏度有限, 其早期诊断成为临床中的难点。由于肿瘤发生过程中分子变化早于组织或解剖结构改变, 对肿瘤相关分子的特异性显像, 即分子影像可以实现肿瘤的早期诊断。

## ■同行评议者

李振华, 教授, 中国中医科学院西苑医院消化科



## ■相关报道

多项报道显示经标记的各种配体分子,包括抗体、多肽、适体等,可以特异性结合肿瘤细胞或间质,并被闪烁扫描法、光学内镜等手段检测,使分子影像有望实现肿瘤早期诊断以及分期和分级。

## 0 引言

在世界范围内消化系统肿瘤有着比较高的发病率和死亡率,每年新增食管癌、胃癌及结肠癌病例分别占全身新发肿瘤的3.8%、7.8%和9.5%,而死亡病例占全身肿瘤死亡总数的5.8%、9.7%和8.0%<sup>[1]</sup>。我国为食管癌、胃癌高发区,而近年来随着人们生活饮食习惯的改变,结肠癌的发病率也逐渐提升,严重威胁我国人民健康<sup>[2]</sup>。目前消化系统肿瘤诊断主要依赖于症状、血清学检测、内窥镜及消化道造影等辅助检查。但是其早期症状隐匿,常规检测手段各有局限性,有相当多的消化系统肿瘤在临床发现时已经进入中晚期,失去根治机会。因为消化系统肿瘤尚缺乏高灵敏度及特异度的血清标志物,而消化道造影对早期肿瘤诊断价值有限,所以内窥镜是最重要的消化系统肿瘤检测手段。利用内窥镜诊断消化系统肿瘤需要检查者积累丰富的临床经验,对于内窥镜下的肿瘤形态学方面具备足够的辨别能力。另外,目前常规的内窥镜活检对于病变部位的选择是随机的,在广泛的癌前病变组织中,这种随机的活检发生漏检局灶癌变的可能性很大。同样不同的病理医生对于小块活检组织的病理诊断也存在差异,因而已发生漏诊。近年来随着内镜技术的发展,各种特殊内镜如放大内镜、染色内镜、窄谱成像内镜、激光共聚焦内镜等被应用于临床,在一定程度上提高了消化系统肿瘤的诊断率。但是其成像原理仍为以物理手段为基础的组织显像,无法从分子水平识别肿瘤细胞,难以实现高灵敏、高特异性的肿瘤早期诊断。

## 1 消化系统肿瘤分子影像技术

由于肿瘤发生过程中分子变化早于组织或解剖结构改变,因而分子水平的影像学检查手段可以实现肿瘤的早期诊断。肿瘤分子影像即寻找特异性结合肿瘤细胞或其间质的分子探针,耦联后形成能被现有影像手段所检测的显像基团,实现肿瘤分子显像,达到诊断目的<sup>[3]</sup>。消化系统肿瘤分子影像检查所涉及的成像手法包括光学内镜、闪烁扫描成像、核磁共振成像及超声成像等,这些技术不仅用于肿瘤早期诊断,还可以进行肿瘤定位、分期和分级,甚至靶向性肿瘤治疗<sup>[4]</sup>。

**1.1 闪烁扫描法** 闪烁扫描法以同位素标记探针作为显像剂,优点是敏感性高、稳定性好以及扫描范围广泛,临床应用相对成熟,因此成为分子影像研究的重点<sup>[5]</sup>。经批准用于临床的同位素

探针包括<sup>123</sup>I、<sup>99m</sup>Tc、<sup>64</sup>Cu、<sup>111</sup>In、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O和<sup>18</sup>F等,现有的检测手法主要包括正电子发射体层摄影(position emission tomography, PET)及单光子发射体层摄影(single photon emission computed tomography, SPECT)<sup>[6,7]</sup>。使用PET及相应探针<sup>18</sup>F脱氧葡萄糖(fludeoxyglucose <sup>18</sup>F, <sup>18</sup>F-FDG)在体内靶向显像高水平糖代谢细胞已经在临床中取得成功,人们借此可以判断肿瘤代谢活性、良恶倾向以及全身转移灶情况和肿瘤定位信息<sup>[8]</sup>。该技术在食管癌、胃癌、结肠癌的诊断中体现出了较高的应用价值,其发现原发病灶的敏感性远远高于传统解剖形态学检查,且在判断淋巴结转移及远处转移方面有着明显的优势,有利于判断肿瘤性质、分期等,进而可以协助推测疾病预后,制定相应治疗方案<sup>[9,10]</sup>。报道称在结肠癌的诊断中PET/CT对于癌或癌前病变原发灶的诊断率可达到95%-100%<sup>[11,12]</sup>,然而,在界定TNM分期中敏感性有所下降,但特异性相对上升<sup>[12]</sup>。闪烁扫描法因其优秀的临床特性使其成为分子影像研究中广泛使用的显像方式,多种特异性探针通过耦联放射性核素成为其显像剂。但闪烁扫描法也存在一些缺陷,例如放射性核素示踪剂所携带的电离辐射限制了该项检查的多次性及重复性,放射性物质半衰期短也影响了其临床应用,另外该检查的时间空间分辨力也有待提高(表1)<sup>[3]</sup>。

**1.2 光学内镜** 随着荧光内镜、激光共聚焦内镜等多种新型内镜的出现及不断发展,基于内镜的分子影像诊断也逐渐被开发,使用上述内镜可以检测到荧光基团标记的特异性探针<sup>[13]</sup>。分子靶向内镜较闪烁扫描成像具有更高的时间及空间分辨力,不仅为实时动态显像,而且使用共聚焦内镜还可以观察亚细胞水平的精细解剖结构。荧光造影剂具有理想的信噪比,且不具有放射性,可以短期重复检查<sup>[3,13]</sup>。另外利用肿瘤特异性荧光标记探针可以实现可疑病变的靶向性活检,提高肿瘤检出率<sup>[14]</sup>。该项策略能很好的定位并显示临床标本中的肿瘤细胞,同时在模拟临床内镜检查的动物活体实验中也取得了成功<sup>[15-17]</sup>,并有可能用于消化系统肿瘤及癌前病变的诊断<sup>[18]</sup>。但是分子影像内镜虽然具备很高的早期癌诊断敏感性,但内镜的检查范围较小仍为管状视野,不能明确肿瘤的临床分期,因而只有在联合了其他检查方法的前提下才能实现对肿瘤预后的判断及治疗的指导(表1)。

**1.3 核磁共振** 一些顺磁性或超磁性物质,与特异

表 1 分子影像成像技术		
成像技术	优点	缺点
闪烁扫描法	高灵敏、高特异性; 可实现全身扫描; 应用广泛、显像剂开发完善	空间时间分辨力较差; 电离辐射; 造影剂不良反应限制检查
光学内镜	高灵敏、高特异性; 高时间空间分辨力; 实时活检指导; 不良反应小, 无辐射	显像范围及深度不足
核磁共振	高空间分辨力; 扫描范围广; 无电离辐射	灵敏度、特异性差; 显像剂开发不足
超声	高时间分辨力; 经济; 无电离辐射	显像效果不佳

**■创新盘点**  
分子影像是肿瘤诊断的研究前沿及研究热点, 本文对消化系肿瘤分子影像的手段及探针的开发做了系统的阐述。

性探针耦联后可成为核磁共振(nuclear magnetic resonance, MRI)分子显像的造影剂<sup>[19]</sup>。探针与病灶特异性结合后, 局部的T1或T2信号会相应升高, 这可与解剖成像同时获得, 该手段也曾被用于结肠癌及淋巴转移的诊断<sup>[20]</sup>。该方法具备很高的空间分辨力, 但敏感性低于上述两种方法(表1)。

**1.4 超声** 超声是临床中简便、经济的检查方法。超声检查最常用显影剂为微气泡, 可以一定程度上实现理想空间分辨率的分子影像成像<sup>[21]</sup>。该项检查方法最主要被应用于脉管系统, 然而对血管外结构的显示并不理想<sup>[21,22]</sup>。超声虽曾被报道可以作为结肠癌诊断方法<sup>[23]</sup>, 但如今研究最多的是被用于显像肿瘤血管, 以血管数量、直径、结构来判断肿瘤情况(表1)<sup>[24]</sup>。

2 靶向特异性探针

除了发展各种显像手段, 肿瘤分子影像的另一个重要环节是寻找开发能够特异性结合肿瘤细胞或间质的靶向探针, 肿瘤相关分子机制研究的成熟为这种研究提供了可能。理想的肿瘤分子探针需具备以下几个条件: (1)与靶分子有高度亲和性; (2)靶向性强, 信噪比高; (3)有理想的药代动力及生物分布特性; (4)半衰期及体内清除时间适当; (5)低毒、低免疫原性; (6)易于制备合成<sup>[25]</sup>。至今已有包括抗体、抗体片段、多肽、适体、小分子等被开发做外源性分子探针中特异性配体。

**2.1 抗体及抗体片段** 抗体及抗体片段等抗体类似物可以产生理想的配体受体结合反应, 因而被广泛开发做为特异性探针。该类探针对靶点的结合具有极高的亲和性及特异性, 且经批准用于临床的抗体数目繁多, 机制明确, 是最常用的探针; 但抗体本身分子量大, 体内代谢速度缓慢, 难以清除, 且造价昂贵, 不易普及<sup>[26,27]</sup>。为改善这些不利因素, 有研究致力于抗体的化学加工, 如开发使用抗体片段作为探针, 大大提高了其在体内的药代动力特性, 但该类探针相对完整抗体探针制

备更为复杂, 使得造价更高(表2)<sup>[27,28]</sup>。

MUC1基因与肿瘤发生、转移相关, 高表达于多种肿瘤组织, 使用临床常用染料吲哚花青绿(indocyanine green, ICG)标记MUC1蛋白抗体制备探针, 可实现与食管癌、胃癌、结直肠癌临床标本稳定地结合, 并在近红外荧光中显示出优良的成像效果<sup>[29]</sup>。Goetz等<sup>[17]</sup>使用荧光标记的完整抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抗体作为探针诊断结肠癌, 研究人员使用高表达及低表达EGFR的细胞系, 在人临床标本及裸鼠移植瘤体内多个水平, 从原位肿瘤到转移灶多角度验证了针对EGFR的内镜分子影像可行性。另一项针对结肠癌的荧光探针研究, 使用抗癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)抗体, 标记近红外荧光染料后可以实现体内外肿瘤特异性显像<sup>[30]</sup>。也有研究使用抗CEA抗体片段, 即抗体Fab段标记<sup>125</sup>I制备探针, 试图通过放射显像胃癌腹膜转移灶协助治疗, 实现放射免疫指导下的手术, 研究证实该方法有很高的潜在应用价值<sup>[31]</sup>。同一课题组还开展了针对结肠癌放射免疫引导手术的临床实验, 在给10位患者局部动脉注射<sup>125</sup>I标记抗CEA抗体24 h后进行显像, 经手术切除可疑病灶, 结果显示该方法对于原发灶及淋巴结转移灶的检出正确率分别达100%和87%, 为更精确诊断治疗结肠癌提供了有力依据<sup>[32]</sup>。

**2.2 多肽** 多肽分子较抗体及抗体片段更小, 因而具有更加理想的药代动力及组织分布特性, 同时易于合成, 造价低廉。多肽在与靶点的结合中有良好的灵敏度及亲和力, 也具备低毒、低免疫原性, 因此多肽成为新一代理想探针之一<sup>[3,33]</sup>。如奥曲肽、胃泌素释放肽等天然多肽可以通过结合其特异性受体达到检测高表达其受体肿瘤的目的<sup>[34,35]</sup>。但仅仅以天然多肽为对象远远不能满足分子影像发展的需求, 为寻找适用于不同肿瘤、不同表面抗原的特异性探针, 非天然多肽的筛选及使用逐渐成为研究的热点。

### ■应用要点

在研究中,分子影像检查的灵敏性、特异性、时间空间分辨力、造影剂不良反应以及经济便捷程度均是需要考察并完善的方面。因而更多设计严谨的探针、成像平台的开发,为分子影像的临床应用做出贡献。

表 2 特异性探针配体

探针配体	优点	缺点
抗体及抗体片段	高亲和、高特异性;靶点已知;应用广泛、开发完善	药代动力及生物分布不理想;体内清除时间长;制备成本高
多肽	高亲和、高特异性;药代动力及生物分布理想;低毒、低免疫原性;成本低廉	体内易降解;部分靶点未知
适体	高亲和、高特异性;药代动力理想,结构稳定;低毒、低免疫原性;成本低廉	细胞内结合高于胞膜结合
小分子	高亲和性;药代动力理想,清除迅速 低毒、低免疫原性;成本低廉	易受体内原有分子影响;显像基团标记对结合力及药代动力影响大

噬菌体肽库展示技术,是一种非常成熟的多肽筛选手段。其主要原理是将编码外源多肽的基因序列插入噬菌体编码衣壳蛋白的基因中,使外源性的融合蛋展示在病毒颗粒的表面,一个成熟肽库可包含超过 $10^{10}$ 个不同多肽序列,实现针对肿瘤相关配体高通量筛选<sup>[36]</sup>。大量表达有不同肽序的噬菌体与肿瘤细胞、组织或抗原进行结合,经多次洗脱最终获得最具特异性肽段,成为靶向探针<sup>[37]</sup>。

Kelly等<sup>[38]</sup>曾以人结肠癌HT29细胞筛选出特异性多肽,该多肽具有与多种结肠癌细胞以及人结肠癌组织的特异性结合能力,在耦联了线粒体毒素后对HT29细胞可起到特异性杀伤作用。之后同一课题组发现该多肽结合靶点为整合素,而后使用同位素标记体内显像发现肿瘤局部浓聚情况为对照肽的7倍,课题组使用荧光标记探针全身给药,对原位、异种移植瘤模型进行结肠镜检,获得了理想的镜下荧光显像<sup>[39]</sup>。在另一项针对结肠癌前病变的多肽探针检测实验中使用了转基因小鼠来获得自然发生的息肉模型,以具有癌变风险的腺瘤样息肉为靶点,同时以增生性息肉模型作为对照。噬菌体肽库的筛选选择在模型小鼠体内进行,凭借此获得结合更符合实际检查情况的探针,结果证实体内筛选探针在体内验证中表现了良好的结合性<sup>[40]</sup>。以食管癌细胞为对象所筛选多肽,在临床标本的检测中也体现了其指导临床活检的价值<sup>[18]</sup>。除针对肿瘤组织细胞的筛选外,针对特异性肿瘤抗原的筛选也是获得多肽探针的途径之一。Chen等<sup>[41]</sup>使用TAG-72抗原为靶点,筛选出两条特异性多肽A2-6及A3-10,给予<sup>99</sup>Tm标记后可以实现TAG-72阳性细胞LS-147T体外显像以及LS-147T荷瘤小鼠体内肿瘤成像。同一课题组于2011年使用不同的洗脱手法,再次筛选TAG-72特异性多肽G3-15及T3-15,使用同位素标记后在体内及体

外验证均显示,这两条多肽可以作为TAG-72阳性结肠癌细胞的特异性探针(表2)<sup>[42]</sup>。

**2.3 适体** 适体是一段人工合成的核苷酸,是使用配体指数富集法系统演化技术从随机核苷酸序列中筛选出来可以结合特异性分子DNA或RNA序列<sup>[43]</sup>。与多肽相似,因其分子量小的特性,适体拥有优于抗体的药代动力学特性,同时免疫原性低,合成方便,易于修饰;适体与胞内分子的结合亲和力高于细胞表面分子,因而更多应用于药物的靶向治疗<sup>[43,44]</sup>,但也有报道提示其可以作为分子影像备选探针<sup>[45]</sup>。

以肿瘤细胞基质内高表达的细胞粘素C为对象筛选出特异性识别适体,标记<sup>99</sup>Tm或荧光素后可以靶向显像结肠癌及一些其他实体肿瘤<sup>[46]</sup>。在一项专门针对结肠癌细胞的适体筛选中,荧光标记所筛特异性适体在共聚焦显微镜检测下与结肠癌细胞表面有特异性结合,证实了其作为探针的潜在性<sup>[47]</sup>。核仁素被发现表达于胃癌细胞表面,可能是胃癌的抗原靶点,其特异性适体经荧光标记与胃癌细胞也有理想的亲和性(表2)<sup>[48]</sup>。

**2.4 小分子** 一些小分子,例如叶酸、钴胺素、双磷酸盐等,由于肿瘤细胞表面可能高表达其特异性受体,也可成为靶向探针,而且由于这些分子的分子量极小,因而可以快速强力穿透组织,并被很快清除代谢<sup>[3]</sup>。但部分此类分子本身在体内有分布,可能弱化成像效果,此外因其显像基团和连接分子明显大于探针本身,故而在受体的结合上也会有一定的干扰<sup>[3,49]</sup>。报道显示叶酸可以作为探针检测结肠腺瘤样息肉(表2)<sup>[50]</sup>。

### 3 结论

随着各种影像手段及特异性探针的不断开发,消化系统肿瘤的水平成像也日趋成熟,这是影像技术科学、肿瘤分子生物学、探针化学等多学科多研究方向交叉合作发展所得到的结果。

检查灵敏度、特异性、显像效果和对患者的不良反应均需要逐步的改善。本文回顾了常见的消化系肿瘤显像模式及探针种类, 叙述了其现阶段发展应用的水平及相应优缺点。这些模式及探针大多数已成功完成体内试验, 部分已应用于临床。近年来为综合多种分子影像方式的优点, 减少缺陷, 出现多模式、多标记探针显像, 研究者以巧妙的化学技术合成多配体探针, 也可对探针复合标记因而可被多种显像方法检测。例如在纳米粒上集成蛋白、核酸等多种配体, 同时具备特殊磁性的纳米粒结构因其易修饰性被标记多种荧光基团, 实现光学、MRI多形式成像<sup>[51]</sup>。分子影像技术可为消化系肿瘤的诊断灵敏度及精确度提供广阔的上升空间, 也可以在治疗中起到指导监测作用, 新技术的不断开发以及多技术的联合使用使消化系肿瘤早期、全面、准确诊断成为可能。我们期待更加卓越的仪器、探针、多模式策略的出现, 也期待分子影像技术能够从实验室研究或临床前期研究尽快转化为临床中高灵敏、高精度的诊断及治疗监测手段。

#### 4 参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
- Dai M, Ren JS, Li N, Li Q, Yang L, Chen YH. [Estimation and prediction on cancer related incidence and mortality in China, 2008]. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2012; 33: 57-61
- Joshi BP, Wang TD. Exogenous Molecular Probes for Targeted Imaging in Cancer: Focus on Multimodal Imaging. *Cancers (Basel)* 2010; 2: 1251-1287
- Wallace MB, Sullivan D, Rustgi AK. Advanced imaging and technology in gastrointestinal neoplasia: summary of the AGA-NCI Symposium October 4-5, 2004. *Gastroenterology* 2006; 130: 1333-1342
- Yang DJ, Kim EE, Inoue T. Targeted molecular imaging in oncology. *Ann Nucl Med* 2006; 20: 1-11
- Chowdhury FU, Scarsbrook AF. The role of hybrid SPECT-CT in oncology: current and emerging clinical applications. *Clin Radiol* 2008; 63: 241-251
- Brandon D, Alazraki A, Halkar RK, Alazraki NP. The role of single-photon emission computed tomography and SPECT/computed tomography in oncologic imaging. *Semin Oncol* 2011; 38: 87-108
- Kelloff GJ, Hoffman JM, Johnson B, Scher HI, Siegel BA, Cheng EY, Cheson BD, O'shaughnessy J, Guyton KZ, Mankoff DA, Shankar L, Larson SM, Sigman CC, Schilsky RL, Sullivan DC. Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2785-2808
- Israel O, Yefremov N, Bar-Shalom R, Kagana O, Frenkel A, Keidar Z, Fischer D. PET/CT detection of unexpected gastrointestinal foci of 18F-FDG uptake: incidence, localization patterns, and clinical significance. *J Nucl Med* 2005; 46: 758-762
- Karaosmanoglu AD, Blake MA. Applications of PET-CT in patients with esophageal cancer. *Diagn Interv Radiol* 2012; 18: 171-182
- Abdel-Nabi H, Doerr RJ, Lamonica DM, Cronin VR, Galantowicz PJ, Carbone GM, Spaulding MB. Staging of primary colorectal carcinomas with fluorine-18 fluorodeoxyglucose whole-body PET: correlation with histopathologic and CT findings. *Radiology* 1998; 206: 755-760
- Shin SS, Jeong YY, Min JJ, Kim HR, Chung TW, Kang HK. Preoperative staging of colorectal cancer: CT vs. integrated FDG PET/CT. *Abdom Imaging* 2008; 33: 270-277
- Elahi SF, Wang TD. Future and advances in endoscopy. *J Biophotonics* 2011; 4: 471-481
- Yentz S, Wang TD. Molecular imaging for guiding oncologic prognosis and therapy in esophageal adenocarcinoma. *Hosp Pract (Minneapolis)* 2011; 39: 97-106
- Lu S, Wang TD. In vivo cancer biomarkers of esophageal neoplasia. *Cancer Biomark* 2008; 4: 341-350
- Hsiung PL, Hardy J, Friedland S, Soetikno R, Du CB, Wu AP, Sahbaie P, Crawford JM, Lowe AW, Contag CH, Wang TD. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med* 2008; 14: 454-458
- Goetz M, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 2010; 138: 435-446
- Li M, Anastassiades CP, Joshi B, Komarck CM, Piraka C, Elmunzer BJ, Turgeon DK, Johnson TD, Appelman H, Beer DG, Wang TD. Affinity peptide for targeted detection of dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2010; 139: 1472-1480
- Lee HY, Jee HW, Seo SM, Kwak BK, Khang G, Cho SH. Diethylenetriaminepentaacetic acid-gadolinium (DTPA-Gd)-conjugated polysuccinimide derivatives as magnetic resonance imaging contrast agents. *Bioconjug Chem* 2006; 17: 700-706
- Curtet C, Maton F, Havet T, Slinkin M, Mishra A, Chatal JF, Muller RN. Polylysine-Gd-DTPAn and polylysine-Gd-DOTA coupled to anti-CEA F(ab')<sub>2</sub> fragments as potential immunocontrast agents. Relaxometry, biodistribution, and magnetic resonance imaging in nude mice grafted with human colorectal carcinoma. *Invest Radiol* 1998; 33: 752-761
- Inaba Y, Lindner JR. Molecular imaging of disease with targeted contrast ultrasound imaging. *Transl Res* 2012; 159: 140-148
- Chadderdon SM, Kaul S. Molecular imaging with contrast enhanced ultrasound. *J Nucl Cardiol* 2010; 17: 667-677
- Richardson NG, Heriot AG, Kumar D, Joseph AE. Abdominal ultrasonography in the diagnosis of colonic cancer. *Br J Surg* 1998; 85: 530-533
- Onji K, Yoshida S, Tanaka S, Takemura Y, Oka S, Yoshihara M, Yamada H, Okajima M, Chayama K. Microvascular structure and perfusion imaging of colon cancer by means of contrast-enhanced ultrasonography. *Abdom Imaging* 2012; 37: 297-303
- Kobayashi H, Choyke PL. Target-cancer-cell-specific activatable fluorescence imaging probes: rational design and in vivo applications. *Acc Chem Res* 2011; 44: 83-90
- Hoppin J, Orcutt KD, Hesterman JY, Silva MD,

#### 同行评价

本文对消化系肿瘤分子影像学的最新进展进行了较全面的介绍, 层次清楚, 文笔流畅, 可为临床提供一定参考, 并为科研提供思路。

- Cheng D, Lackas C, Rusckowski M. Assessing antibody pharmacokinetics in mice with in vivo imaging. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 350-358
- 27 Olafsen T, Wu AM. Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 2010; 40: 167-181
- 28 Day JJ, Marquez BV, Beck HE, Aweda TA, Gawande PD, Meares CF. Chemically modified antibodies as diagnostic imaging agents. *Curr Opin Chem Biol* 2010; 14: 803-809
- 29 Bando T, Muguruma N, Ito S, Musashi Y, Inayama K, Kusaka Y, Tadatsu M, Kunio I, Irimura T, Shibamura S, Takesako K. Basic studies on a labeled anti-mucin antibody detectable by infrared-fluorescence endoscopy. *J Gastroenterol* 2002; 37: 260-269
- 30 Lisy MR, Goermer A, Thomas C, Pauli J, Resch-Genger U, Kaiser WA, Hilger I. In vivo near-infrared fluorescence imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in mice. *Radiology* 2008; 247: 779-787
- 31 Kim JC, Hong HK, Lee KH, Ka IH, Roh SA, Koo KH, Kim HC, Oh ST, Oh SJ, Kim JS, Park KC. Experimental radioimmunoguided surgery for peritoneal metastases of gastric cancer using anticarcinoembryonic antigen-specific T84.66 F(ab')<sub>2</sub>. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 495-503
- 32 Kim JC, Roh SA, Koo KH, Cho YK, Kim HC, Yu CS, Oh SJ, Ryu JS, Bicknell DC, Bodmer WF. Preclinical application of radioimmunoguided surgery using anti-carcinoembryonic antigen biparatopic antibody in the colon cancer. *Eur Surg Res* 2005; 37: 36-44
- 33 Deutscher SL. Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer. *Chem Rev* 2010; 110: 3196-3211
- 34 Bakker WH, Krenning EP, Reubi JC, Breeman WA, Setyono-Han B, de Jong M, Kooij PP, Bruns C, van Hagen PM, Marbach P. In vivo application of [111In-DTPA-D-Phe1]-octreotide for detection of somatostatin receptor-positive tumors in rats. *Life Sci* 1991; 49: 1593-1601
- 35 Smith CJ, Volkert WA, Hoffman TJ. Gastrin releasing peptide (GRP) receptor targeted radiopharmaceuticals: a concise update. *Nucl Med Biol* 2003; 30: 861-868
- 36 Schirrmann T, Meyer T, Schütte M, Frenzel A, Hust M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules* 2011; 16: 412-426
- 37 Kelly KA, Waterman P, Weissleder R. In vivo imaging of molecularly targeted phage. *Neoplasia* 2006; 8: 1011-1018
- 38 Kelly KA, Jones DA. Isolation of a colon tumor specific binding peptide using phage display selection. *Neoplasia* 2003; 5: 437-444
- 39 Kelly K, Alencar H, Funovics M, Mahmood U, Weissleder R. Detection of invasive colon cancer using a novel, targeted, library-derived fluorescent peptide. *Cancer Res* 2004; 64: 6247-6251
- 40 Miller SJ, Joshi BP, Feng Y, Gaustad A, Fearon ER, Wang TD. In vivo fluorescence-based endoscopic detection of colon dysplasia in the mouse using a novel peptide probe. *PLoS One* 2011; 6: e17384
- 41 Chen L, Wang Y, Liu X, Dou S, Liu G, Hnatowich DJ, Rusckowski M. A new TAG-72 cancer marker peptide identified by phage display. *Cancer Lett* 2008; 272: 122-132
- 42 Xiao N, Cheng D, Wang Y, Chen L, Liu X, Dou S, Liu G, Liang M, Hnatowich DJ, Rusckowski M. Identification of a high affinity TAG-72 binding peptide by phage display selection. *Cancer Biol Ther* 2011; 11: 22-31
- 43 Wang J, Li G. Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application. *Curr Med Chem* 2011; 18: 4107-4116
- 44 Ni X, Castaneres M, Mukherjee A, Lupold SE. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr Med Chem* 2011; 18: 4206-4214
- 45 Soontornworajit B, Wang Y. Nucleic acid aptamers for clinical diagnosis: cell detection and molecular imaging. *Anal Bioanal Chem* 2011; 399: 1591-1599
- 46 Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, Heil J, Borkowski S, Hilger CS, Cook G, Warren S, Schmidt PG. Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med* 2006; 47: 668-678
- 47 Sefah K, Meng L, Lopez-Colon D, Jimenez E, Liu C, Tan W. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study. *PLoS One* 2010; 5: e14269
- 48 Watanabe T, Hirano K, Takahashi A, Yamaguchi K, Beppu M, Fujiki H, Suganuma M. Nucleolin on the cell surface as a new molecular target for gastric cancer treatment. *Biol Pharm Bull* 2010; 33: 796-803
- 49 Wysocki LM, Lavis LD. Advances in the chemistry of small molecule fluorescent probes. *Curr Opin Chem Biol* 2011; 15: 752-759
- 50 Chen WT, Khazaie K, Zhang G, Weissleder R, Tung CH. Detection of dysplastic intestinal adenomas using a fluorescent folate imaging probe. *Mol Imaging* 2005; 4: 67-74
- 51 Nam T, Park S, Lee SY, Park K, Choi K, Song IC, Han MH, Leary JJ, Yuk SA, Kwon IC, Kim K, Jeong SY. Tumor targeting chitosan nanoparticles for dual-modality optical/MR cancer imaging. *Bioconjug Chem* 2010; 21: 578-582

编辑 李军亮 电编 鲁亚静



# 血必净对急性胰腺炎大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6浓度的影响

徐伟松, 范辉, 刘玉峰, 王一平, 李振东

徐伟松, 范辉, 刘玉峰, 王一平, 李振东, 南通市第二人民医院消化内科 江苏省南通市 226002

徐伟松, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的基础与临床工作的研究。

**作者贡献分布:** 徐伟松与范辉对此篇文章所作贡献较大, 承担了课题的绝大部分工作; 课题设计由徐伟松、范辉、刘玉峰、王一平及李振东共同完成; 实验过程范辉与徐伟松共同操作完成; 数据分析由范辉完成; 本论文初稿写作、修改及定稿由徐伟松与范辉共同完成; 文献查阅及校对由刘玉峰完成; 特殊外送实验检查的联系与协调工作由王一平与李振东完成。

**通讯作者:** 徐伟松, 副主任医师, 226002, 江苏省南通市港闸区兴隆街43号, 南通市第二人民医院消化内科. xws71@sina.com  
收稿日期: 2012-06-08 修回日期: 2012-08-23

接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-18

## Treatment with Xuebijing injection decreases serum concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and IL-6 in rats with acute pancreatitis

Wei-Song Xu, Hui Fan, Yu-Feng Liu, Yi-Ping Wang, Zhen-Dong Li

Wei-Song Xu, Hui Fan, Yu-Feng Liu, Yi-Ping Wang, Zhen-Dong Li, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Nantong, Nantong 226002, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Wei-Song Xu, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Nantong, 43 Xinglong Street, Gangzha District, Nantong 226002, Jiangsu Province, China. xws71@sina.com  
Received: 2012-06-08 Revised: 2012-08-23  
Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between serum concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 and severity of pancreatic tissue injury and to investigate the possible mechanism by which Xuebijing relieves inflammatory responses in rats with acute pancreatitis (AP).

**METHODS:** Ninety male SD rats were randomly and equally divided into three groups: control group, AP model group, and treatment group. The rats in the AP model group and treatment group received two intraperitoneal injections of L-arginine (3.2 g/kg body weight) at an interval of 1 h to induce AP. At 6, 12 and 24 h after AP

induction, serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 were determined by ELISA, and pathological changes in pancreatic tissue were scored.

**RESULTS:** Serum concentration of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 at 6, 12 and 24 h in the AP model group were significantly higher than those in the control group (TNF- $\alpha$ :  $t = 17.72, 11.19, 13.70$ , all  $P = 0.00$ ; IL-1 $\beta$ :  $t = 9.61, 8.69, 8.08$ , all  $P = 0.00$ ; IL-6:  $t = 29.18, 18.59, 17.14$ , all  $P = 0.00$ ). Pathological scores of pancreatic tissue at 6, 12 and 24 h in the AP model group were significantly higher than those in the control group ( $t = 17.23, 18.72, 16.08$ , all  $P = 0.00$ ). Compared to the AP model group, treatment with Xuebijing injection significantly decreased serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 at 12 and 24 h (TNF- $\alpha$ :  $t = 7.56, 7.30$ ,  $P = 0.001, 0.00$ ; IL-1 $\beta$ :  $t = 8.76, 8.07$ ; both  $P = 0.00$ ; IL-6:  $t = 7.82, 6.72$ , both  $P = 0.00$ ) and pathological scores of pancreatic tissue at 24 h ( $t = 2.79, P = 0.015$ ).

**CONCLUSION:** Xuebijing injection is effective in attenuating pancreatic tissue injury in rats with AP via mechanisms possibly associated with decreasing serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6.

**Key Words:** Xuebijing; Acute pancreatitis; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Interleukin-1 $\beta$ ; Interleukin-6

Xu WS, Fan H, Liu YF, Wang YP, Li ZD. Treatment with Xuebijing injection decreases serum concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in rats with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2777-2781

## 摘要

**目的:** 检测血必净治疗前、后急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)大鼠血清细胞肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 和IL-6浓度变化、胰腺组织损伤的关系, 以探讨血必净缓解AP大鼠炎症反应的可能机制。

**方法:**  $\delta$  SD大鼠90只分为对照组(A组,  $n = 30$ ), AP组(B组,  $n = 30$ )和血必净治疗组(C组,  $n = 30$ ); 腹腔注射L-精氨酸制造AP大鼠模型, 观察

## ■背景资料

急性胰腺炎(AP)是临床常见的危重急症, 具有较高的致死、致残率。系统性炎症反应(SIRS)是AP早期的病理生理过程, 如果炎症失控, 常导致多器官功能不全、多器官衰竭。在系统性炎症反应期, 如何采取有效的干预措施, 减轻炎症反应程度, 以缩短病程、改善预后, 目前临床实践中尚无系统的研究, 需要进一步研究、探索。

## ■同行评议者

谭晓东, 副教授, 中国医科大学附属盛京医院

## ■ 研发前沿

血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6等炎症介质的浓度被认为是AP早期诊断、判断发展趋势的标志物。药物治疗能否缓解炎症损伤程度、能否降低TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6等炎症介质的血清浓度,是临床治疗过程中的热点、重点和难点问题,明确药物的作用机制的可以让我们对AP的治疗过程有新的认识,并更好地指导临床治疗。

模型成功制作后6、12及24 h各组大鼠血清细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6浓度变化,采用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)法测定血清细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的浓度。胰腺组织病理变化并对胰腺组织损伤进行评分。

**结果:**与A组比较, B组大鼠6、12及24 h血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6浓度升高,各时间点差异有统计学意义(TNF- $\alpha$ : 6 h:  $t = 17.72$ ,  $P = 0.00$ ; 12 h:  $t = 11.19$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 13.70$ ,  $P = 0.00$ ; IL-1 $\beta$ : 6 h:  $t = 9.61$ ,  $P = 0.00$ ; 12 h:  $t = 8.69$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 8.08$ ,  $P = 0.00$ . IL-6: 6 h:  $t = 29.18$ ,  $P = 0.00$ ; 12 h:  $t = 18.59$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 17.14$ ,  $P = 0.00$ ). B组大鼠6 h、12 h及24 h胰腺病理评分明显升高,各时间点差异有统计学意义(6 h:  $t = 17.23$ ,  $P = 0.00$ ; 12 h:  $t = 18.72$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 16.08$ ,  $P = 0.00$ ). 与B组比较, 血必净注射液可明显降低C组大鼠12、24 h血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6浓度, 12、24 h组间差异有统计学意义(TNF- $\alpha$ : 12 h:  $t = 7.56$ ,  $P = 0.001$ ; 24 h:  $t = 7.30$ ,  $P = 0.00$ . IL-1 $\beta$ : 12 h:  $t = 8.76$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 8.07$ ,  $P = 0.00$ . IL-6: 12 h:  $t = 7.82$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 6.72$ ,  $P = 0.00$ ); 并且明显降低C组24 h大鼠胰腺病理评分分值, 24 h点组间差异有统计学意义(24 h:  $t = 2.79$ ,  $P = 0.015$ ).

**结论:**血必净在早期能够降低AP大鼠血清细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的浓度. 通过抑制炎症反应来改善胰腺组织病理损伤, 这可能是血必净治疗AP的作用机制之一。

**关键词:** 血必净; 急性胰腺炎; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白介素-1 $\beta$ ; 白介素-6

徐伟松, 范辉, 刘玉峰, 王一平, 李振东. 血必净对急性胰腺炎大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6浓度的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2777-2781  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2777.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症. 在早期, 其本质是全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS). 在SIRS发生、发展过程中以及其后并发的多器官功能不全(multiple organs dysfunction, MODS)、多器官衰竭(multiple organs failure, MOF)过程中炎症介质起了重要作用. 本研究通过血必净对大鼠AP模型治疗前、后血清细胞肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 和IL-6浓度的变化检测以及病理学的改变进行评分, 来探讨血必净治

疗AP患者炎症反应的可能机制, 现将观察结果报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\delta$  健康SD大鼠90只, 体质量200-250 g, 由南通大学实验动物中心提供. L-精氨酸(250 g/L)购自上海第一生化制药厂产品(国药准字H31020517). 血必净注射液, 天津红日药业股份有限公司(国药准字: Z20040033).

### 1.2 方法

**1.2.1 AP模型制作:** 将90只清洁级SD大鼠随机分为3组, 分为正常对照组(A组,  $n = 30$ ), AP模型组(B组,  $n = 30$ )和血必净治疗组(C组,  $n = 30$ ), 实验前禁食12 h, 自由饮水. B、C组造模按照文献介绍方法给予腹腔注射250 g/L浓度L-精氨酸(剂量3.2 g/kg质量)2次, 间隔1 h<sup>[1,2]</sup>, B组于第2次注射L-精氨酸后1 h按照文献报道<sup>[3]</sup>予以肌注血必净注射液2 mL/(kg·d), 分2次, 间隔3 h. 对照组动物肌注等量的生理盐水. 每组于注射L-精氨酸制作AP模型术后6、12、24 h 3个时间点采用断颈法处死各组存活大鼠, 采集胰腺标本, 血液离心后血清-80 °C下保存。

**1.2.2 实验室和形态学检查:** 按照常规方法制作胰腺组织病理切片(HE), 应用Schmidt<sup>[4]</sup>评分标准对胰腺评分. 血液标本置于抗凝试管内, 摇匀, 常温离心3 000 r/min, 离心15 min, 分离血清放置于-80 °C冰箱内保存. 测定前室温下复苏, 用同一批号试剂测定, 双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6浓度(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6试剂盒由上海西唐生物科技有限公司提供, 美国A&D公司生产), 实验操作步骤严格按照说明书进行。

**统计学处理** 所有数据以mean $\pm$ SD表示, 用SPSS13.0统计软件包统计, 计量资料数据采用组间比较 $t$ 检验, 对各组均数进行显著性检验, 取 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组生存率** 对照组大鼠全部存活, AP模型大鼠6 h组存活10只, 12 h组存活8只, 24 h组存活7只; 治疗组6 h组存活10只, 12 h组存活10只, 24 h组存活9只。

**2.2 胰腺病理学改变** 对照组大鼠胰腺组织结构正常, 无炎症细胞浸润. AP组胰腺腺泡细胞肿胀、坏死, 间质有充血、水肿, 有不同程度的炎症细胞浸润. AP组6、12、24 h各时间点与对照

表 1 3组大鼠胰腺组织学评分比较 (mean  $\pm$  SD)

分组	6 h	12 h	24 h
A组	0.36 $\pm$ 0.15	0.39 $\pm$ 0.22	0.35 $\pm$ 0.17
B组	4.36 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	8.86 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	11.24 $\pm$ 2.15 <sup>ac</sup>
C组	4.62 $\pm$ 1.38	9.13 $\pm$ 1.25	8.12 $\pm$ 2.16

<sup>a</sup> $P$ <0.05 vs A组; <sup>c</sup> $P$ <0.05 vs C组.表 2 3组间血清TNF- $\alpha$ 浓度动态比较 (mean  $\pm$  SD, ng/mL)

分组	<i>n</i>	6 h	12 h	24 h
A组	30	82.46 $\pm$ 12.15	78.45 $\pm$ 35.46	76.54 $\pm$ 43.36
B组	25	288.37 $\pm$ 34.8 <sup>a</sup>	318.47 $\pm$ 55.26 <sup>ac</sup>	332.65 $\pm$ 33.65 <sup>ac</sup>
C组	29	278.48 $\pm$ 45.76 <sup>a</sup>	224.28 $\pm$ 47.57 <sup>a</sup>	185.38 $\pm$ 44.37 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05 vs A组; <sup>c</sup> $P$ <0.05 vs C组.

组间胰腺组织学评分差异有统计学意义(6 h:  $t = 17.23$ ,  $P = 0.00$ ; 12 h:  $t = 18.72$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 16.08$ ,  $P = 0.00$ ). C组病理改变明显减轻, 胰腺细胞轻度变性水肿, 间质血管扩张、充血、小叶间隔增宽, 少许炎症细胞浸润, 24 h与模型组间胰腺组织学评分差异有统计学意义(24 h:  $t = 2.79$ ,  $P = 0.015$ , 图1, 表1).

**2.3 血清TNF- $\alpha$ 浓度动态变化** AP大鼠血清TNF- $\alpha$ 浓度快速升高, 6 h即升至最高值, B组大鼠6、12、24 h血清TNF- $\alpha$ 浓度较A组显著升高, 各时间点差异有统计学意义(6 h:  $t = 17.72$ ,  $P = 0.00$ ; 12 h:  $t = 11.19$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 13.70$ ,  $P = 0.00$ ). 经过治疗, C组大鼠12、24 h血清TNF- $\alpha$ 浓度较B组显著降低, 差异有统计学意义(12 h:  $t = 7.56$ ,  $P = 0.001$ ; 24 h:  $t = 7.30$ ,  $P = 0.00$ , 表2).

**2.4 血清IL-1 $\beta$ 浓度动态变化** A组大鼠血清IL-1 $\beta$ 浓度处于较低水平, 和对照组相比较, B组大鼠血清IL-1 $\beta$ 浓度在发病6、12及24 h显著升高, 各时间点差异有统计学意义(6 h:  $t = 9.61$ ,  $P = 0.00$ ; 12 h:  $t = 8.69$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 8.08$ ,  $P = 0.00$ ). C组大鼠12、24 h血清IL-1 $\beta$ 浓度较B组显著降低, 差异有统计学意义(12 h:  $t = 8.76$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 8.07$ ,  $P = 0.00$ , 表3).

**2.5 血清IL-6浓度动态变化** 和对照组相比, AP大鼠血清IL-6浓度在发病6、12及24 h快速升高, 各时间点差异有统计学意义(6 h:  $t = 29.18$ ,  $P = 0.00$ ; 12 h:  $t = 18.59$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 17.14$ ,  $P = 0.00$ ). C组大鼠12、24 h血清IL-6浓度较B组显著降低, 差异有统计学意义(12 h:  $t = 7.82$ ,  $P = 0.00$ ; 24 h:  $t = 6.72$ ,  $P = 0.00$ , 表4).

表 3 3组间血清IL-1 $\beta$ 浓度的动态变化(mean  $\pm$  SD, ng/mL)

分组	<i>n</i>	6 h	12 h	24 h
A组	30	62.40 $\pm$ 23.26	66.64 $\pm$ 26.57	58.54 $\pm$ 32.12
B组	25	249.46 $\pm$ 56.18 <sup>a</sup>	255.32 $\pm$ 62.47 <sup>ac</sup>	182.58 $\pm$ 32.68 <sup>ac</sup>
C组	29	239.49 $\pm$ 36.82 <sup>a</sup>	98.35 $\pm$ 42.58 <sup>a</sup>	76.56 $\pm$ 12.24 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05 vs A组; <sup>c</sup> $P$ <0.05 vs C组.表 4 3组间血清IL-6浓度的动态变化(mean  $\pm$  SD, pg/mL)

分组	<i>n</i>	6 h	12 h	24 h
A组	30	98.40 $\pm$ 16.25	101.46 $\pm$ 25.68	108.43 $\pm$ 32.98
B组	25	562.63 $\pm$ 47.24 <sup>a</sup>	518.86 $\pm$ 65.38 <sup>ac</sup>	563.34 $\pm$ 75.86 <sup>ac</sup>
C组	29	356.72 $\pm$ 23.36 <sup>a</sup>	349.37 $\pm$ 46.28 <sup>a</sup>	337.85 $\pm$ 66.52 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P$ <0.05 vs A组; <sup>c</sup> $P$ <0.05 vs C组.

### 3 讨论

AP的发病机制与其后发生的SIRS密切相关, 由于胰腺局部炎症触发而激活了炎症细胞, 激活的炎症细胞产生一系列炎症性介质, 包括TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等炎症细胞因子, 这些炎症细胞因子反过来进一步激活炎症细胞, 从而引起正反馈式的炎症级联反应, 促进和加重由AP诱发的SIRS<sup>[5]</sup>, 如果SIRS进一步失控, 将导致肝、肺、心、脑、输尿管等器官受损, 部分或大部分功能丧失<sup>[6-8]</sup>, 最终发生MODS及MOF的发生. 因此, 在炎症反应的早期控制其发展和恶化, 避免SIRS的发生, 将有利于缩短病程及缓解病情, 对于改善患者的预后具有重要的临床价值. 血必净注射液是以血府逐瘀汤为基础, 精炼出的静脉使用制剂, 其主要成分为赤芍、川芎、丹参、红花和当归等, 具有活血化瘀、清热凉血、溃散毒邪等功效, 是对抗细菌、毒素, 降低内毒素水平, 调节免疫功能, 抑制炎症介质的释放, 改善微循环, 保护血管内皮细胞的有效药物.

TNF- $\alpha$ 是最重要的炎症细胞因子, 同时也是众多细胞因子的重要启动因子. 在AP发生后, TNF- $\alpha$ 可以被诱导, 其表达快速上调, 高浓度的TNF- $\alpha$ 导致中性粒细胞向发生炎症的病变胰腺局部黏附、聚集, 引起局部炎症的扩大, 加速胰腺局部坏死并同时引起SIRS<sup>[9,10]</sup>. TNF- $\alpha$ 可以通过刺激其他血管活性物质的合成、增加血管内皮细胞的通透性和诱导其他炎症介质的表达, 从而介导微循环障碍、恶化的病理过程<sup>[11,12]</sup>. 在本研究中, AP大鼠血清TNF- $\alpha$ 浓度在发病后快速上升, 6、12及24 h时间点较对照组明显升高, 差

### ■创新盘点

本文研究了使用血必净注射液治疗后大鼠胰腺形态学改变与血清相关炎症介质浓度变化, 探讨血必净缓解炎症反应的防治作用.



# 应用要点

本研究采用血清炎症介质浓度测定和组织病理学等手段阐明急性胰腺炎早期炎症介质的作用机制, 血必净注射液对降低血清炎症介质浓度的影响, 对临床医师采取有效治疗措施有一定指导意义。

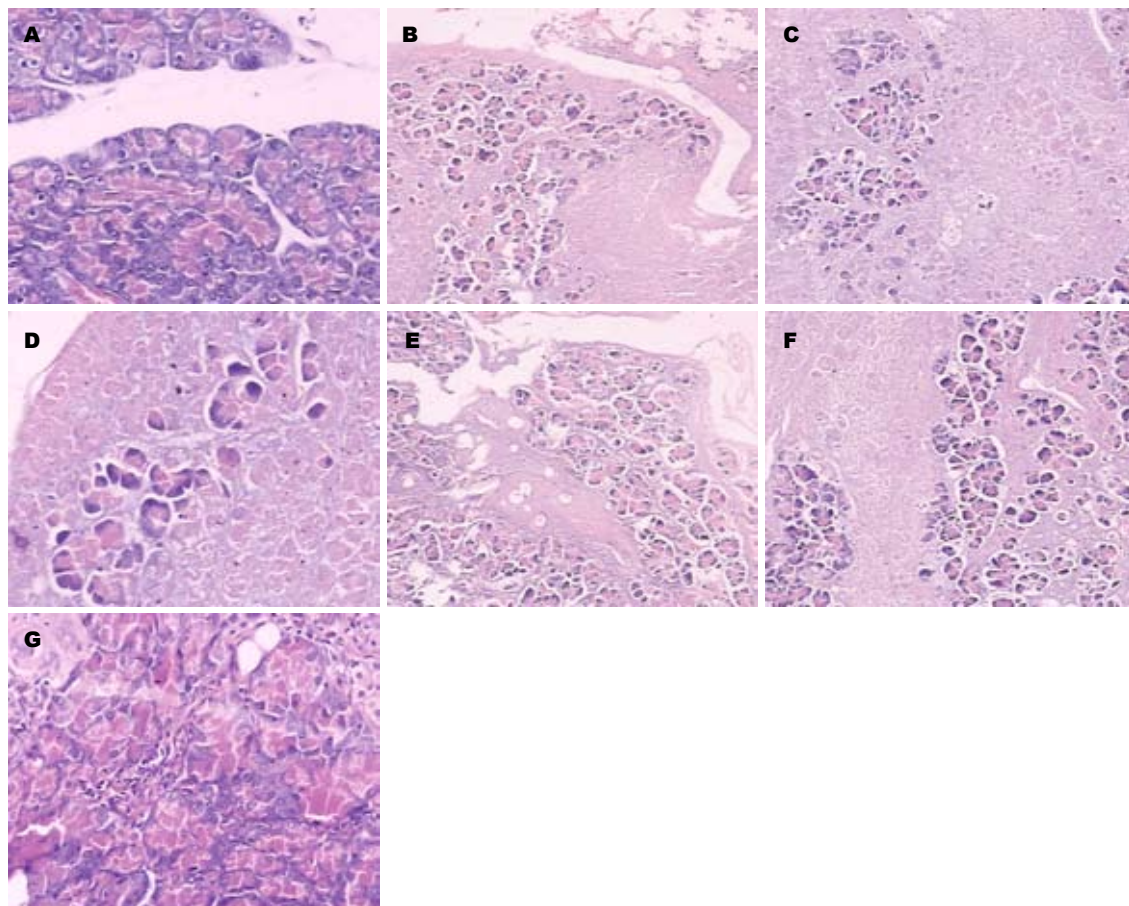


图1 胰腺病理学改变. A: 对照组; B: 胰腺炎6 h; C: 胰腺炎6 h; D: 胰腺炎24 h; E: 血必净6 h; F: 血必净12 h; G: 血必净24 h.

异有统计学意义( $P<0.05$ ). 在AP发生的早期(24 h内), AP患者血清TNF- $\alpha$ 浓度持续处于高水平状态, 持续高浓度TNF- $\alpha$ 的对局部胰腺组织及全身其他脏器的炎症反应产生严重的影响. 经血必净注射液治疗后, C组大鼠第12 h、24 h血清TNF- $\alpha$ 浓度较模型组大鼠显著降低, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ). 本研究结果提示, 血必净注射液对AP患者急性炎症反应有一定缓解作用, 其作用机制之一可能通过减少TNF- $\alpha$ 的生成而发挥作用.

IL-1 $\beta$ 是一种有多种生物学功能的细胞因子, 对炎症反应具有重要的调节作用. AP发生时, IL-1 $\beta$ 由胰腺内浸润的中性粒细胞和巨噬细胞产生的淋巴细胞激活因子及单核细胞因子, IL-1 $\beta$ 可直接刺激胰酶的产生、诱发其他促炎细胞因子的产生; 还可促进白细胞在发生炎症反应的胰腺局部聚集, 并激活中性粒细胞使之参与MODS及MOF的发展. 血清IL-1 $\beta$ 水平可作为AP早期诊断、判断发展趋势及防止多器官衰竭的指标之一, AP患者血清IL-1 $\beta$ 的检测有助于判断病情的严重程度<sup>[13-16]</sup>. 研究表明, 通过控制TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 及IL-6等炎症介质的血清浓度对降低AP的死

亡率非常重要<sup>[17]</sup>. 在本研究中, AP模型制作成功后, 大鼠在6 h内血清IL-1 $\beta$ 浓度快速升高, AP发病后24 h内, 患者血清IL-1 $\beta$ 浓度较对照组明显升高, 6、12及24 h各时间点差异有统计学意义( $P<0.05$ ). 经血必净治疗后, C组大鼠第12、24 h血清IL-1 $\beta$ 浓度较模型组明显下降, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ).

IL-6具有多种生物活性的细胞因子. 生理状态下, 低浓度的IL-6具有中枢免疫介导、神经修复和抗炎作用的作用. 在炎症状态下, 血清IL-6浓度异常增高, 其激活补体及C-反应蛋白的表达, 产生细胞损害; 还可诱导产生黏附因子、激活星形胶质细胞、血管内皮细胞、引起淋巴细胞活化, 进一步导致炎症反应的加剧<sup>[18]</sup>. 在本研究中, 在AP发生第6、12及24 h, 大鼠血清IL-6浓度快速上升, 明显高于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ). 经过血必净治疗后, C组大鼠12、24 h血清IL-6浓度显著降低, 和模型组相比, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ). 本研究结果提示, 血必净通过降低AP患者血清IL-6浓度改善急性炎症反应程度, 主要在病变早期降低血清IL-6浓度.

为了改善AP患者的预后, 研究人员探索了

多种药物<sup>[19,20]</sup>或治疗方法<sup>[21,22]</sup>来缓解AP早期全身性炎症反应,并取得了一定的实验结果或临床经验.传统中药在这方面体现了一定的优势,为临床治疗AP积累了宝贵的经验<sup>[23,24]</sup>.血必净在临床上主要用于治疗急危重病,如由感染引发的MODS,以及由于细菌感染引起的脓毒症(sepsis)<sup>[25,26]</sup>.本研究中,血必净治疗组病理改变较AP模型组大鼠病理损伤明显减轻,C组大鼠24 h与模型组间胰腺组织学评分差异有统计学意义( $P<0.05$ ).本研究结果表明,使用血必净治疗AP,可以在发病早期降低大鼠血清炎症性细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的浓度,缓解AP级联反应中炎症反应的程度,降低局部胰腺组织损伤程度,促进早期恢复.降低血清TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的浓度是血必净治疗AP可能的作用机制之一.

#### 4 参考文献

- Rakoncay Z, Hegyi P, Dósa S, Iványi B, Jármay K, Biczó G, Hracskó Z, Varga IS, Karg E, Kaszaki J, Varró A, Lonovics J, Boros I, Gukovsky I, Gukovskaya AS, Pandol SJ, Takács T. A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Crit Care Med* 2008; 36: 2117-2127
- Szabolcs A, Reiter RJ, Letoha T, Hegyi P, Papai G, Varga I, Jármay K, Kaszaki J, Sari R, Rakoncay Z, Lonovics J, Takacs T. Effect of melatonin on the severity of L-arginine-induced experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 251-258
- 陈齐红, 郑瑞强, 林华, 卢年芳, 邵俊, 於江泉. 血必净注射液治疗脓毒性休克的前瞻性随机对照研究. *中国中西医结合急救杂志* 2007; 14: 364-366
- 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
- 庄岩, 杨尹默, 王维民, 万远廉, 黄延庭. 急性胰腺炎鼠白细胞介素(IL) 1 $\beta$ /IL-18、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 转化酶的表达. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 71-72, i003
- 刘石龙, 廖雯俊, 鄢林泉. N-乙酰半胱氨酸对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1046-1050
- 牛桂军, 唐国都, 梁志海, 钟卫一, 黄文福. 硫氧还蛋白-1在急性坏死性胰腺炎大鼠肺组织中的表达及褪黑素干预的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 550-556
- 钟卫一, 唐国都, 梁志海, 黄文福, 梁金仙, 王珺平. 褪黑素对大鼠急性坏死性胰腺炎的干预作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2352-2356
- 程石, 宋茂民, 何三光. 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 对大鼠坏死性胰腺炎肺损伤的影响. *中华实验外科杂志* 2003; 20: 593-594
- 张超贤, 郭晓凤, 秦咏梅. 黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠NF- $\kappa$ B活性、NF- $\kappa$ B及TNF- $\alpha$  mRNA表达的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1051-1055
- 谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 袁海峰. 抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子 $\kappa$ B和一氧化氮合酶的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 711-713
- 王嵩卿, 曹书华, 常文秀. 血必净对多器官功能障碍综合征患者血浆蛋白C活性的影响. *天津医科大学学报* 2007; 13: 235-238
- 闫小梅, 王希平, 叶丽燕. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 和IL-2在评估急性胰腺炎病情中的临床意义. *中国医学工程* 2012; 20: 94-95
- 裴中美, 杨耀嫻, 张旭璞. TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6与急性胰腺炎的相关性研究. *包头医学院学报* 2009; 25: 44-46
- 柯超. 重症急性胰腺炎时大鼠血IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ 水平及B淋巴细胞百分比的变化. *医学新知杂志* 2009; 19: 87-90
- 胡端敏, 周春华, 王少峰. 急性胰腺炎患者IL-1 $\beta$ 和sE-selectin含量的变化及其意义. *中华胰腺病杂志* 2010; 10: 386-388
- 瞿建国, 范昕, 党胜春, 王莹, 张建新. 白细胞介素-1受体拮抗剂在急性胰腺炎中的作用及机制探讨. *广东医学* 2008; 29: 228-229
- 齐洛生, 杨宏富, 孙荣青, 李月霞, 张少雷. 影响重症急性胰腺炎预后的危险因素分析. *中国危重病急救医学* 2010; 22: 557-558
- 毕旭东, 赵晶, 付晓光. 清胰汤联合地塞米松对急性重型胰腺炎早期全身炎症反应综合征影响的实验研究. *中国现代医学杂志* 2010; 18: 2760-2766
- 蔡丹磊. 盐酸戊乙奎醚对大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤MIP和AQP-5表达的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 3672-3677
- 郑建臣, 程斌, 郑要初, 郭晓榕. 高容量血液滤过对重症急性胰腺炎的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2379-2384
- 刘晓政, 潘宏伟. 持续血液滤过治疗老年重症急性胰腺炎的疗效观察. *中国老年医学杂志* 2010; 30: 1509-1510
- 盛颖玥, 邹晓平, 于成功, 吕瑛, 张丽莉. 中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的系统评价. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 730-735
- 范辉, 胡雅兵, 王小红, 沈云志. 丹红注射液对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织ET-1、eNOS和iNOS基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2784-2790
- 陈齐红, 郑瑞祥, 林华, 汪华玲, 卢年芳, 邵俊, 於江泉. 血必净注射液对急性呼吸窘迫综合征患者预后影响的前瞻性随机对照临床研究. *中国危重病急救医学* 2009; 21: 405-408
- 段永庆, 甘平, 张家骅, 廖陈, 谭晶, 许世才. 血必净对急性重症胰腺炎患者炎性介质的影响. *国际中医中药杂志* 2011; 33: 104-106

#### ■同行评价

本文立题具有一定的创新性, 实验设计合理, 具有一定的科学性, 实验结果对临床具有一定指导意义.

编辑 田滢 电编 鲁亚静



# RPL31-siRNA对人胰腺癌BxPC-3细胞裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用

李朝东, 刘春亮, 夏玉叶, 戈梅, 陈代杰

## ■背景资料

全球胰腺癌发病率逐年上升, 其恶性程度高、预后差, RNA干扰可以快速、高效、特异性的抑制靶基因的表达式, 以RNA干扰技术为基础的基因治疗逐渐成为继手术、放疗和化疗等传统疗法之后的胰腺癌治疗新模式。

李朝东, 陈代杰, 华东理工大学生物工程学院 上海市 200237  
刘春亮, 夏玉叶, 苏州西山中科实验动物有限公司 江苏省苏州市 215111

戈梅, 上海交通大学药学院 上海市 200240

戈梅, 上海来益生物药物研究开发中心有限责任公司 上海市 201203

李朝东, 在读博士, 主要从事胰腺癌基因治疗方面的研究。

重大新药创制-微生物药物技术创新与新药创制产学研联盟基金资助项目, No. 2010ZX09401-403

作者贡献分布: 此课题由陈代杰与戈梅设计; 研究过程由李朝东与刘春亮完成; 本文撰写由李朝东完成; 数据分析由李朝东与刘春亮完成; 由夏玉叶提供实验指导和分析工具; 陈代杰与戈梅负责审阅论文、指导论文修改。

通讯作者: 陈代杰, 研究员, 博士生导师, 200237, 上海市梅陇路130号, 华东理工大学生物工程学院. hccbred@gmail.com  
电话: 021-34207020

收稿日期: 2012-07-12 修回日期: 2012-09-05

接受日期: 2012-09-26 在线出版日期: 2012-10-18

## SiRNA-mediated RPL31 gene silencing inhibits the growth of xenograft tumors derived from human pancreatic cancer BxPC-3 cells in nude mice

Chao-Dong Li, Chun-Liang Liu, Yu-Ye Xia, Mei Ge, Dai-Jie Chen

Chao-Dong Li, Dai-Jie Chen, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Chun-Liang Liu, Yu-Ye Xia, Suzhou Xishan Zhongke Laboratory Animal Co., Ltd, Suzhou 215111, Jiangsu Province, China

Mei Ge, School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; Shanghai Laiyi Center for Biopharmaceutical R&D, Shanghai 201203, China

Supported by: the National S&T Major Special Project on Major New Drug Innovation, No. 2010ZX09401-403

Correspondence to: Dai-Jie Chen, Professor, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, 130 Meilong Road, Shanghai 200237, China. hccbred@gmail.com

Received: 2012-07-12 Revised: 2012-09-05

Accepted: 2012-09-26 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of siRNA-mediated RPL31 gene silencing on the growth of xenograft tumors derived from human pancreatic cancer cell line BxPC-3 in nude mice, and to explore the potential role of the RPL31 gene in

pancreatic cancer.

**METHODS:** The siRNA sequence targeting to human RPL31 gene was designed. Human pancreatic cancer BxPC-3 cells were subcutaneously inoculated into Balb/c nude mice to develop a transplantation tumor model of human pancreatic cancer. According to the tumor volume, nude mice were randomly divided into three groups: vehicle control group, negative control group and RPL31-siRNA injection group. Mice of the RPL31-siRNA injection group were intratumorally injected with RPL31-siRNA using RNAi-Mate. Tumor volumes were calculated daily. On the 16th day after the first intratumoral injection, all the mice were sacrificed and the tumors were taken out to undergo real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot analyses to detect RPL31 expression. The expression of Ki-67 and CD31 proteins in xenograft tissue was detected by immunohistochemistry. Cell apoptosis in xenograft tumors was detected by TUNEL assay.

**RESULTS:** Compared with the vehicle control group and negative control group, mice in the RPL31-siRNA injection group exhibited slower tumor growth, significantly smaller tumor volume ( $P < 0.05$ ), and lower RPL31 expression level ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry results showed that the proportions of Ki-67- and CD31-positive cells decreased in xenograft tissue injected with RPL31-siRNA ( $55.78\% \pm 4.63\%$ ,  $51.37\% \pm 5.05\%$  vs  $11.08\% \pm 1.31\%$ ;  $56.53\% \pm 6.03\%$ ,  $44.84\% \pm 5.24\%$  vs  $9.67\% \pm 1.39\%$ ). TUNEL results showed that apoptosis increased in xenograft tissue injected with RPL31-siRNA ( $2.92\% \pm 0.54\%$ ,  $3.85\% \pm 0.87\%$  vs  $39.58\% \pm 4.02\%$ ).

**CONCLUSION:** Silencing of RPL31 expression could inhibit the growth of subcutaneous xenograft tumors derived from BxPC-3 cell line in nude mice, down-regulate the expression of Ki-67 and CD31, and induce cell apoptosis in the transplantation tumors. The RPL31 gene is a potential target for gene therapy of pancreatic cancer.

## ■同行评议者

刘炳亚, 研究员, 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海消化外科研究所

**Key Words:** Pancreatic cancer; Ribosomal protein L31; Xenograft tumors; RNA interference

Li CD, Liu CL, Xia YY, Ge M, Chen DJ. SiRNA-mediated *RPL31* gene silencing inhibits the growth of xenograft tumors derived from human pancreatic cancer BxPC-3 cells in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2782-2788

## 摘要

**目的:** 研究siRNA沉默核糖体蛋白L31(ribosomal protein L31, *RPL31*)对人胰腺癌BxPC-3细胞裸鼠皮下移植瘤的抑制作用, 探讨*RPL31*基因在胰腺癌中可能的作用机制。

**方法:** 设计合成靶向人*RPL31*基因的siRNA及阴性对照siRNA; 建立人胰腺癌BxPC-3细胞的Balb/c裸鼠皮下移植瘤模型, 按照移植瘤体积随机化分为3组: 溶剂对照组、阴性对照组及*RPL31*-siRNA干预组; 使用RNAi-Mate转染试剂将*RPL31*-siRNA进行移植瘤内注射, 观察各组裸鼠体内瘤体生长速度, 绘制肿瘤生长曲线; 采用实时定量PCR及Western blot的方法检测移植瘤组织*RPL31*基因的表达; 免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)检测裸鼠皮下移植瘤Ki-67及CD31的表达; 原位末端标记技术(TUNEL)检测移植瘤组织的细胞凋亡。

**结果:** 与溶剂对照组和阴性对照组相比, *RPL31*-siRNA注射组裸鼠皮下移植瘤生长缓慢, 移植瘤体积明显缩小, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 移植瘤组织中*RPL31*基因的mRNA水平和蛋白水平表达下调; 另外, *RPL31*-siRNA注射组裸鼠移植瘤中Ki-67表达下调( $55.78\% \pm 4.63\%$ 、 $51.37\% \pm 5.05\%$  vs  $11.08\% \pm 1.31\%$ ), CD31的表达下调( $56.53\% \pm 6.03\%$ 、 $44.84\% \pm 5.24\%$  vs  $9.67\% \pm 1.39\%$ ); *RPL31*-siRNA注射组裸鼠移植瘤细胞凋亡增加( $2.92\% \pm 0.54\%$ 、 $3.85\% \pm 0.87\%$  vs  $39.58\% \pm 4.02\%$ )。

**结论:** *RPL31*-siRNA可以下调胰腺癌BxPC-3细胞裸鼠皮下移植瘤中*RPL31*基因的表达, 抑制移植瘤的生长, 并且还可以抑制移植瘤中Ki-67及CD31的表达, 诱导移植瘤细胞的凋亡。以*RPL31*为靶点的基因治疗有潜在临床应用前景。

**关键词:** 胰腺癌; 核糖体蛋白L31; 裸鼠移植瘤; RNA干扰

李朝东, 刘春亮, 夏玉叶, 戈梅, 陈代杰. *RPL31*-siRNA对人胰腺癌BxPC-3细胞裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2782-2788

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2782.asp>

## 0 引言

全球胰腺癌发病率逐年上升, 其恶性程度极高, 临床表现无特异性, 早期诊断及手术治疗困难, 死亡率在所有癌症死亡中排名第4位, 总体5年生存率低于3%<sup>[1,2]</sup>。随着对胰腺癌分子生物学特性和病理生理特性的深入研究, 基因治疗逐渐成为继手术、放疗和化疗等传统疗法之后的胰腺癌治疗新模式<sup>[3,4]</sup>。RNA干扰(RNA interference, RNAi)可以快速、高效、特异性的抑制靶基因的表达, 这种特点使其在包括胰腺癌在内的多种疾病中应用前景广阔<sup>[5-8]</sup>。核糖体蛋白L31(ribosomal protein L31, *RPL31*)基因属于核糖体蛋白L31E家族, 其编码的蛋白质是构成核糖体60S亚基成员之一。*RPL31*在结直肠癌中是过表达的, 而在转移性的结直肠癌内, *RPL31*的表达下调<sup>[9]</sup>。*RPL31*在结直肠癌的发生、发展中具有促增殖及致癌性的作用<sup>[10,11]</sup>。我们前期的体外研究发现, 利用siRNA沉默*RPL31*基因表达可以抑制胰腺癌细胞的生长, 为了进一步明确*RPL31*基因在胰腺癌中的作用, 本文进一步在体内探讨*RPL31*-siRNA对胰腺癌BxPC-3细胞裸鼠皮下移植瘤的生长影响, 为*RPL31*基因应用于胰腺癌治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胰腺癌细胞株BxPC-3(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库), DMEM培养基(美国Gibco), 胎牛血清(Hyclone), RNAi-Mate(上海吉玛制药有限公司), TRIzol<sup>TM</sup> (TIANGEN), cDNA反转录试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix(Fermentas), *RPL31*兔抗人单克隆一抗(Abgent),  $\beta$ -Actin兔抗人单克隆一抗(Cell Signaling), HRP标记的山羊抗兔二抗(北京中杉金桥), ECL发光试剂盒(Thermo Scientific), BCA蛋白浓度检测试剂盒、RIPA裂解液(碧云天), 各种规格培养皿(corning costar), Ki-67兔抗人一抗、CD31兔抗人一抗、原位细胞凋亡检测(TUNEL)试剂盒及SP免疫组织化学检测试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA的设计及合成:** 通过Ambion网站<sup>[12]</sup>, 根据人*RPL31*基因(Genbank NM\_000993.4)的编码序列设计siRNA, *RPL31*-siRNA: 5'-AUUCG-GUAUGGCACAUUCCTT-3', 5'-GGAAUGUGC-

## ■ 研发前沿

近年来发现许多核糖体蛋白具有独立于蛋白质生物合成之外的生物学效应, 例如核糖体蛋白可能在肿瘤的发生、发展、转移和肿瘤抑制中发挥重要的作用。探讨某些核糖体蛋白与肿瘤的关系成为研究肿瘤发病机制及治疗的新热点。

## ■相关报道

糖体蛋白L31(*RPL31*)基因属于核糖体蛋白L31E家族,他在结直肠癌的发生、发展中具有促增殖及致癌性的作用,我们前期的体外研究表明,*RPL31*基因在维持胰腺癌PANC-1细胞生物学特性方面发挥了重要的作用。

CAUACCGAAUTT-3'。同时设计阴性对照siRNA: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。所有siRNA均进行末端2'Ome修饰以提高其在体内的半衰期,并由上海吉玛制药有限公司合成提供。

1.2.2 细胞培养及动物模型建立: 4周龄Balb/c裸鼠, 体重16-18 g, 共18只(SCXK2007-0005), 雌雄各半, 均购自上海斯莱克实验动物有限公司, 在SPF级动物饲养室喂养。复苏BxPC-3胰腺癌细胞, 待细胞传代3次后, 生长至对数生长期时, 收集细胞, 计数, 调整细胞浓度至 $5 \times 10^7$ 个/mL, 将细胞悬液按照每只0.1 mL的接种量接种至小鼠腋窝处皮下, 每日观察裸鼠生存状况和肿瘤大小情况。

1.2.3 实验动物分组、给药及瘤体测量: BxPC-3接种后10 d, 瘤子体积生长至约50 mm<sup>3</sup>时, 基于肿瘤体积随机化分为3组: 溶剂对照组、阴性对照组、干预组。每组6只, 雌雄各半。以转染试剂混合液溶解各个siRNA粉末, 转染试剂混合液由RNAi-Mate转染试剂+DEPC水+OPTI-MEM培养基组成, 添加比例为1:1.25:1.5。分组当日记为d0。分组次日采用瘤内注射的方式开始注射小分子RNA: 干预组注射*RPL31*-siRNA, 阴性对照组注射相同量的阴性对照siRNA, 溶剂对照组注射相同体积的转染试剂混合液。每3日1次, 每只裸鼠每次注射10  $\mu$ g siRNA, 连续5次。每3日测量瘤块长径(a)和短径(b), 计算瘤体积, 计算公式为:  $V(\text{mm}^3) = 1/2 \times a \times b^2$ , 绘制裸鼠的移植瘤生长曲线。开始给药后16 d采用颈椎脱臼法处死所有裸鼠, 取瘤组织待测。

1.2.4 实时定量PCR及Western blot检测瘤组织*RPL31*表达: 取新鲜的肿瘤组织按照操作说明提取细胞总RNA, 紫外分光光度计检测样品纯度和浓度, 逆转录合成cDNA。实时定量PCR检测引物序列如下: *RPL31*-F: 5'-CGACCCGGAAGTTGTACTTG-3'; *RPL31*-R: 5'-TCTCGC-CACCCTTCTTTG-3'; *GAPDH*-F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; *GAPDH*-R: 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'。反应程序为: (1)94  $^{\circ}\text{C}$  10 min; (2)94  $^{\circ}\text{C}$  30 s; (3)60  $^{\circ}\text{C}$  30 s; (4)72  $^{\circ}\text{C}$  30 s; (2)-(4)40个循环。用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>分析法进行数值分析<sup>[13]</sup>。同样取新鲜的肿瘤组织按照RIPA裂解液说明提取总蛋白, 取上清进行BCA法蛋白定量<sup>[14]</sup>, 取30  $\mu$ g蛋白进行SDS-PAGE电泳, 转膜, 封闭, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育RPL31抗体及 $\beta$ -actin抗体过夜, 二抗室温震荡孵育1 h, TBST洗膜后用

ECL试剂盒暗室显影。

1.2.5 免疫组织化学法检测移植瘤组织中Ki-67及CD31的表达: 取新鲜瘤块PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)清洗, 40 g/L甲醛固定后石蜡包埋, 切片后按照SP试剂盒说明书进行免疫组织化学染色: 二甲苯脱蜡、抗原修复、内源性过氧化物酶封闭及非特异性抗原封闭, Ki-67及CD31(1:100)一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, DAB显色, 苏木素复染细胞核1 min, 氨水反蓝, 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片后于显微镜下观察并拍照。采用阳性细胞百分比的计算方法分析Ki-67及CD31的表达: 400倍显微镜下随机选择10个视野进行计数, 计算阳性细胞占总细胞数的百分比<sup>[15]</sup>。

1.2.6 原位末端标记技术检测肿瘤组织原位细胞凋亡: 取新鲜移植瘤组织, 严格根据TUNEL试剂盒说明进行操作, 以阳性细胞百分比为凋亡指数分析各个处理组细胞的凋亡情况<sup>[15]</sup>。

**统计学处理** 用SPSS12.0软件进行数据分析, 数据以mean $\pm$ SD表示。两组数据之间进行t检验, 多组均数间的显著性检验用方差分析,  $P < 0.05$ 代表差异具有显著性。

## 2 结果

2.1 裸鼠皮下移植肿瘤生长曲线 本实验中, 注射siRNA后荷瘤裸鼠生命活动正常, 无一死亡。3组移植瘤生长曲线显示: 从注射siRNA第1天开始, *RPL31*-siRNA干预组皮下移植瘤生长较缓慢, 肿瘤体积相对较小; 溶剂对照组及阴性对照组皮下移植瘤生长较迅速, 肿瘤体积较大, *RPL31*-siRNA干预组皮下移植瘤体积的增长明显滞后于溶剂对照组及阴性对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。测量给药结束后解剖的肿瘤终体积, *RPL31*-siRNA干预组( $336.54 \text{ mm}^3 \pm 175.03 \text{ mm}^3$ )显著小于溶剂对照组( $881 \text{ mm}^3 \pm 372.83 \text{ mm}^3$ )和阴性对照组( $846.44 \text{ mm}^3 \pm 263.96 \text{ mm}^3$ , 图1, 2)。

2.2 皮下移植瘤组织中*RPL31*基因的表达 与溶剂对照组和阴性对照组相比, 注射*RPL31*-siRNA的移植瘤组织中的*RPL31*基因mRNA及蛋白水平表达明显下降。实时定量PCR结果显示, 与溶剂对照组相比, *RPL31*-siRNA干预组移植瘤组织的mRNA下降了 $77.31\% \pm 5.28\%$  ( $P < 0.05$ , 图3), 而溶剂对照组与阴性对照组相比差异无统计学意义。Western blot实验分析得出, *RPL31*-siRNA干预组皮下移植瘤组织中RPL31蛋白表达水平

表 1 各组裸鼠移植瘤免疫组化结果的统计 (%)

分组	Ki-67	CD31	凋亡指数
溶剂对照组	55.78 ± 4.63	56.53 ± 6.03	2.92 ± 0.54
阴性对照组	51.37 ± 5.05	44.84 ± 5.24	3.85 ± 0.87
<i>RPL31</i> -siRNA干预组	11.08 ± 1.31 <sup>a</sup>	9.67 ± 1.39 <sup>a</sup>	39.58 ± 4.02 <sup>a</sup>

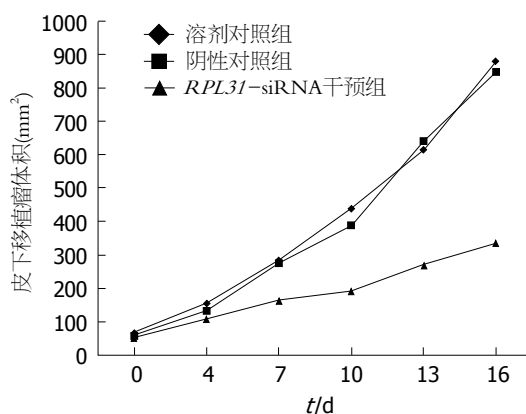
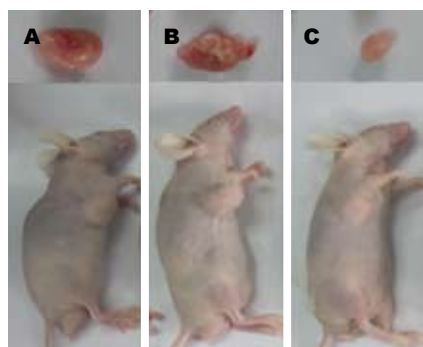
<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 溶剂对照组.

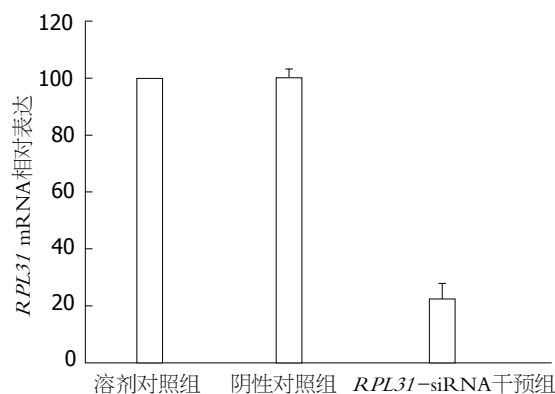
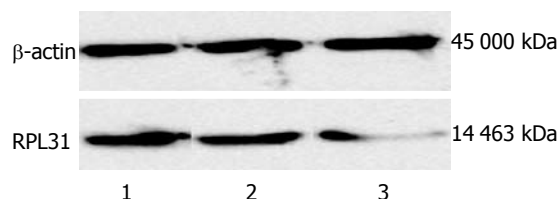
图 1 3组裸鼠胰腺癌皮下移植瘤模型的生长曲线.

图 2 注射siRNA 15 d后3组裸鼠胰腺癌皮下移植瘤的大小. A: 溶剂对照组; B: 阴性对照组; C: *RPL31*-siRNA干预组.

明显低于溶剂对照组和阴性对照组, 而溶剂对照组与阴性对照组相比差异不大(图4).

**2.3 皮下移植瘤组织Ki-67蛋白的表达** Ki-67阳性染色定位于胞细胞核, 溶剂对照组和阴性对照组阳性细胞染色较深, 分布较广, 而*RPL31*-siRNA干预组阳性细胞染色较淡, 分布较散(图5). 对图像进行分析, 统计各处理组移植瘤中Ki-67阳性细胞的百分比, 溶剂对照组为55.78% ± 4.63%, 阴性对照组为51.37% ± 5.05%, 而*RPL31*-siRNA干预组为11.08% ± 1.31% (*P* < 0.05, 表1). 因此, 裸鼠移植瘤组织中注射*RPL31*-siRNA关闭*RPL31*的表达后Ki-67的表达明显降低.

**2.4 皮下移植瘤组织CD31的表达** CD31蛋白可用于评价新生血管的能力. 免疫组织化学结果显

图 3 实时定量PCR法检测3组裸鼠皮下移植瘤中*RPL31*的mRNA表达水平. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 溶剂对照组.图 4 Western blot法检测3组裸鼠皮下移植瘤中RPL31蛋白表达水平. 1: 溶剂对照组; 2: 阴性对照组; 3: *RPL31*-siRNA干预组.

示, 溶剂对照组及阴性对照组CD31阳性细胞较多, 染色较深, 而*RPL31*-siRNA干预组CD31阳性细胞较少, 染色较浅(图6). 对图像进行分析, 统计各个处理组移植瘤中CD31阳性细胞的百分比, 溶剂对照组为56.53% ± 6.03%, 阴性对照组为44.84% ± 5.24%, 而*RPL31*-siRNA干预组为9.67% ± 1.39% (*P* < 0.05, 表1). 因此, 裸鼠移植瘤组织中注射*RPL31*-siRNA关闭*RPL31*的表达后CD31的表达明显降低.

**2.5 *RPL31*-siRNA对裸鼠人胰腺癌移植瘤凋亡的影响** TUNEL反应后显微镜下观察, 阳性细胞(凋亡)细胞核呈黄褐色, 核质浓缩, 细胞形态不规则, 阴性(非凋亡细胞)则无细胞形态学变化, 不着色或轻微染色(图7). 对图像进行分析, 统计各个处理组移植瘤组织中的凋亡指数, 溶剂对照组为2.92% ± 0.54%, 阴性对照组为3.85%

## ■创新盘点

国内外关于*RPL31*基因与胰腺癌的关系的研究报道较少, 本实验以人胰腺癌BxPC-3细胞构建了胰腺癌裸鼠移植瘤模型, 采用瘤内注射siRNA的方式探讨了在裸鼠移植瘤内关闭*RPL31*基因的表达对胰腺癌裸鼠移植瘤的抑制作用.



### ■应用要点

使用siRNA关闭 *RPL31* 表达可以显著抑制裸鼠移植瘤的生长。进一步研究显示, *RPL31* 下调后, 移植瘤组织中的Ki-67表达下降, CD31表达下降, 凋亡增加。以 *RPL31* 为靶基因的胰腺癌基因治疗具有良好的应用前景。

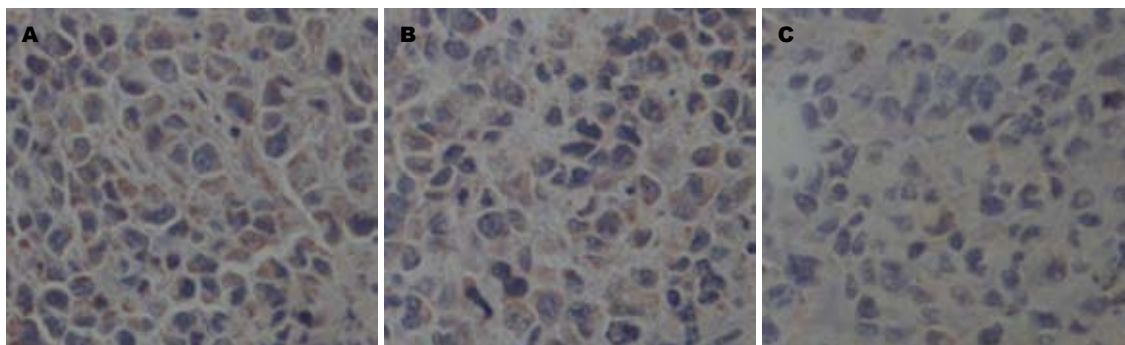


图 5 IHC法示3组皮下移植瘤组织中Ki-67蛋白的表达( $\times 400$ )。A: 溶剂对照组; B: 阴性对照组; C: *RPL31*-siRNA干预组。

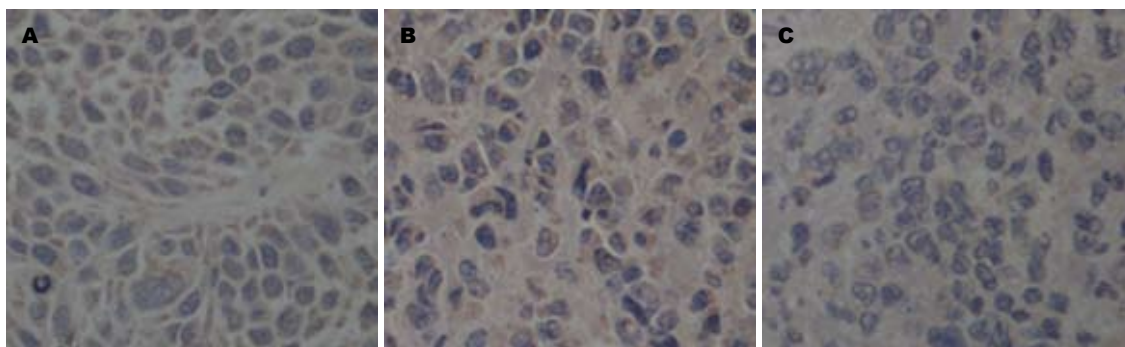


图 6 IHC法示3组皮下移植瘤组织中CD31蛋白的表达( $\times 400$ )。A: 溶剂对照组; B: 阴性对照组; C: *RPL31*-siRNA干预组。

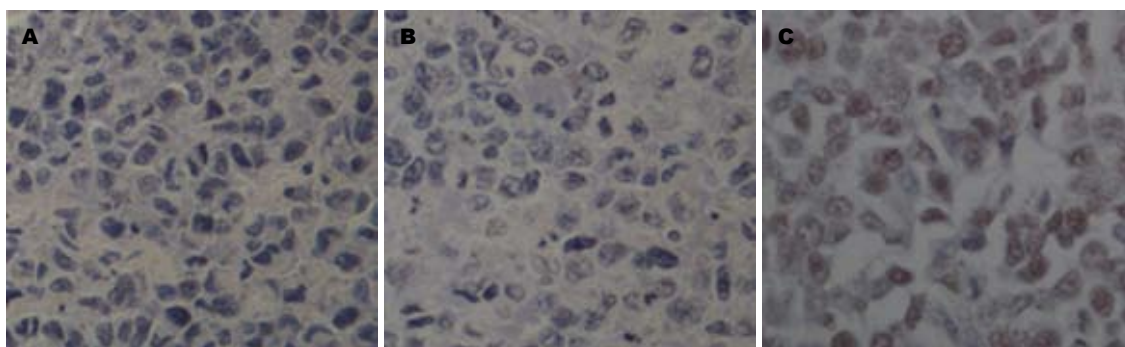


图 7 TUNEL法示3组皮下移植瘤组织中细胞凋亡情况( $\times 400$ )。A: 溶剂对照组; B: 阴性对照组; C: *RPL31*-siRNA干预组。

$\pm 0.87\%$ , 而*RPL31*-siRNA干预组为 $39.58\% \pm 4.02\%$  ( $P < 0.05$ , 表1)。这些结果表明, 注射*RPL31*-siRNA关闭*RPL31*的表达后可以诱导移植瘤组织的细胞发生凋亡。

### 3 讨论

胰腺癌是常见的消化系恶性肿瘤, 约占人类全部恶性肿瘤的2%。其早期缺乏特异症状诊断困难, 死亡率极高<sup>[16]</sup>。胰腺癌的最初发生一般需要多个基因突变连续性积累, 在这个过程中, 控制细胞分化、增殖和凋亡的多个基因出现了异常改变<sup>[17,18]</sup>。基因治疗是当前公认的新的治疗方向, 相对于传统的手术及放疗化疗, 基因治疗具有靶向性强、细胞毒性小、不良反应小、对正常

组织损伤较小、耐受性好等优点<sup>[19]</sup>。然而, 在胰腺癌中针对目前公认的癌症治疗靶点进行的基因治疗效果都不理想, 这就需要寻找更加有效的治疗靶点<sup>[20,21]</sup>。

核糖体蛋白(ribosomal protein, RP)是组成核糖体(ribosome)的主要成分, 他们在细胞内蛋白质合成过程中发挥重要的作用<sup>[22]</sup>。越来越多的研究表明, 许多核糖体蛋白还有独立于蛋白质生物合成之外的其他功能, 比如核糖体蛋白可能在肿瘤的发生、发展、转移和肿瘤抑制中发挥重要的作用。许多核糖体蛋白的表达量在肿瘤中发生改变<sup>[23-25]</sup>。此外, 有的肿瘤中存在多种核糖体蛋白的突变<sup>[26]</sup>。*RPL31*基因属于核糖体蛋白L31E家族, 其编码的蛋白质是构成核糖体60S亚



基的成员之一。*RPL31*研究较多的主要是探讨其与结直肠癌(colorectal carcinomas, CRC)的关系。*RPL31*与胰腺癌的关系目前未见国内外报道。我们的前期体外研究表明,在胰腺癌PANC-1细胞中利用siRNA关闭*RPL31*的表达,PANC-1细胞的增殖受到抑制,细胞周期阻遏于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,细胞迁移能力降低,VEGF表达降低,说明了*RPL31*基因在维持胰腺癌PANC-1细胞生物学特性方面的重要性。为了深入研究*RPL31*与胰腺癌的关系,我们首先以人胰腺癌BxPC-3细胞构建了胰腺癌裸鼠移植瘤模型,以探讨*RPL31*-siRNA对胰腺癌裸鼠移植瘤的抑制作用。结果表明,*RPL31*-siRNA在降低胰腺癌移植瘤*RPL31*表达的同时可以显著抑制移植瘤的生长。进一步对移植瘤组织进行IHC和TUNEL分析发现:*RPL31*下调后,移植瘤组织中的Ki-67表达下降,CD31表达下降,凋亡增加。

增殖细胞核抗原(Ki-67)是一种核增殖标志物,开始表达于细胞周期的G<sub>1</sub>期,在S期及G<sub>2</sub>期表达增加,细胞有丝分裂后迅速减少<sup>[27]</sup>。Ki-67在多数肿瘤中过表达。他的表达水平可以反应肿瘤细胞的增殖状态及肿瘤的生物行为,与肿瘤的发展、转移和预后高度相关<sup>[28,29]</sup>。因此我们推测*RPL31*基因可能通过下调Ki-67的表达来抑制胰腺癌细胞的增殖。CD31是一种分子量为130 kDa的跨膜糖蛋白,在非成熟及成熟的肿瘤血管中均有表达<sup>[30]</sup>。CD31的特异性和敏感性较高,可以作为微血管密度(microvessel density, MVD)的定量指标,用于评价肿瘤的血管生成<sup>[31]</sup>。CD31的表达降低表明关闭*RPL31*基因的表达可以降低胰腺癌细胞的血管生成能力。除此之外,TUNEL实验表明关闭*RPL31*基因的表达可以诱导胰腺癌移植瘤组织细胞发生凋亡。这些研究结果充分说明了*RPL31*基因在胰腺癌发生发展中的重要作用。但是,*RPL31*基因在胰腺癌中具体作用的分子生物学机制及信号传导途径尚需深入研究。总之,本研究通过荷瘤裸鼠体内实验探讨了沉默*RPL31*基因的表达对人胰腺癌裸鼠移植瘤的抑制作用,为以*RPL31*为靶基因的胰腺癌基因治疗奠定了良好的理论基础。

**志谢:** 感谢毛文伟、殷瑜及杨天同志在本实验中给予的大力帮助。

#### 4 参考文献

- Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1605-1617
- Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic

- and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 212-236
- Egami T, Ohuchida K, Miyoshi K, Mizumoto K, Onimaru M, Toma H, Sato N, Matsumoto K, Tanaka M. Chemotherapeutic agents potentiate adenoviral gene therapy for pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2009; 100: 722-729
- Matthaios D, Zarogoulidis P, Balgouranidou I, Chatzaki E, Kakolyris S. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer and clinical perspectives. *Oncology* 2011; 81: 259-272
- Zhong YQ, Xia ZS, Fu YR, Zhu ZH. Knockdown of hTERT by SiRNA suppresses growth of Capan-2 human pancreatic cancer cell via the inhibition of expressions of Bcl-2 and COX-2. *J Dig Dis* 2010; 11: 176-184
- Shi XH, Liang ZY, Ren XY, Liu TH. Combined silencing of K-ras and Akt2 oncogenes achieves synergistic effects in inhibiting pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 227-236
- Nishikura K. A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 2001; 107: 415-418
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Lloriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004; 23: 1377-1391
- Lai MD, Xu J. Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Curr Genomics* 2007; 8: 43-49
- Chester KA, Robson L, Begent RH, Talbot IC, Pringle JH, Primrose L, Macpherson AJ, Boxer G, Southall P, Malcolm AD. Identification of a human ribosomal protein mRNA with increased expression in colorectal tumours. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1009: 297-300
- Schotte R, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, Blom B. The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J Exp Med* 2004; 200: 1503-1509
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- Liu MJ, Wang Z, Li HX, Wu RC, Liu YZ, Wu QY. Mitochondrial dysfunction as an early event in the process of apoptosis induced by woodfordin I in human leukemia K562 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 194: 141-155
- Kong R, Sun B, Jiang H, Pan S, Chen H, Wang S, Krissansen GW, Sun X. Downregulation of nuclear factor-kappaB p65 subunit by small interfering RNA synergizes with gemcitabine to inhibit the growth of pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2010; 291: 90-98
- Gudjonsson B. Pancreatic cancer: survival, errors and evidence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 1379-1382
- Sakorafas GH, Smyrniotis V. Molecular biology of pancreatic cancer: how useful is it in clinical practice? *JOP* 2012; 13: 332-337

#### ■同行评价

本文选用靶向*RPL31*基因的siRNA进行荷瘤鼠体内实验,探索了siRNA应用于胰腺癌基因治疗的新途径,具有一定的学术价值。

- 18 Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 412-422
- 19 El-Anead A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* 2004; 94: 1-14
- 20 Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8: 3-9
- 21 Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W, Maitra A. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res* 2007; 67: 2187-2196
- 22 Ramakrishnan V. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 2002; 108: 557-572
- 23 Wang Y, Cheong D, Chan S, Hooi SC. Ribosomal protein L7a gene is up-regulated but not fused to the tyrosine kinase receptor as chimeric trk oncogene in human colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2000; 16: 757-762
- 24 Sahin F, Qiu W, Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Grosmark A, Su GH. RPL38, FOSL1, and UPP1 are predominantly expressed in the pancreatic ductal epithelium. *Pancreas* 2005; 30: 158-167
- 25 Kasai H, Nadano D, Hidaka E, Higuchi K, Kawakubo M, Sato TA, Nakayama J. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 567-574
- 26 Amsterdam A, Sadler KC, Lai K, Farrington S, Bronson RT, Lees JA, Hopkins N. Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol* 2004; 2: E139
- 27 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322
- 28 Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7212-7220
- 29 Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol* 2003; 21: 241-250
- 30 Miettinen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens--evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod Pathol* 1994; 7: 82-90
- 31 de la Taille A, Katz AE, Bagiella E, Buttyan R, Sharir S, Olsson CA, Burchardt T, Ennis RD, Rubin MA. Microvessel density as a predictor of PSA recurrence after radical prostatectomy. A comparison of CD34 and CD31. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 555-562

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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》再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

**本刊讯** 依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、计算和分析,以及学科专家评审,《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、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到60余种,统计到的文献数量共计221177余万篇次,涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下,期刊学术水平稳步提升,编校质量稳定,再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此,向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者,表示衷心的感谢!(编辑部主任:李军亮 2012-03-08)。

# 基于iTRAQ结合质谱筛选HBV肝纤维化的差异表达蛋白

张维维, 何晓, 吕小平, 李茵, 李洪涛, 罗蓉, 李翠萍, 何敏

张维维, 吕小平, 广西医科大学第一附属医院西院消化内科  
广西壮族自治区南宁市 530021

何晓, 李茵, 李翠萍, 广西医科大学公共卫生学院 广西壮  
族自治区南宁市 530021

李洪涛, 罗蓉, 何敏, 广西医科大学医学科学实验中心 广西  
壮族自治区南宁市 530021

张维维, 在读硕士, 主要从事肝纤维化疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30960332

广西医科大学医学科学实验中心开放基金资助项目, No. KF  
JJ2010-45

作者贡献分布: 张维维、何敏及吕小平对此文所做贡献均等; 此  
课题由张维维、何敏及吕小平共同设计; 研究过程由张维维、  
何晓、李茵及李翠萍操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由  
李洪涛与罗蓉提供; 数据分析由张维维与何晓完成; 本文写作由  
张维维与何敏共同完成。

通讯作者: 何敏, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路  
22号, 广西医科大学实验中心. m\_h\_m868@sina.com

电话: 0771-5358634 传真: 0771-5350975

收稿日期: 2012-08-09 修回日期: 2012-09-26

接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-18

## Screening of differentially expressed serum proteins in patients with HBV-related liver fibrosis by iTRAQ combined with mass spectrometry

Wei-Wei Zhang, Xiao He, Xiao-Ping Lv, Yin Li,  
Hong-Tao Li, Rong Luo, Cui-Ping Li, Min He

Wei-Wei Zhang, Xiao-Ping Lv, Department of Gastroen-  
terology, the Western Branch of First Affiliated Hospital of  
Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi  
Zhuang Autonomous Region, China

Xiao He, Yin Li, Cui-Ping Li, School of Public Health,  
Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi  
Zhuang Autonomous Region, China

Hong-Tao Li, Rong Luo, Min He, Medical Scientific Re-  
search Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021,  
Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of  
China, No. 30960332; and the Open Foundation of Medical  
Scientific Research Center of Guangxi Medical University,  
No. KFJJ2010-45

Correspondence to: Min He, Professor, Medical Scientific  
Research Center, Guangxi Medical University, Nanning  
530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region,  
China. m\_h\_m868@sina.com

Received: 2012-08-09 Revised: 2012-09-26

Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To screen differentially expressed serum  
proteins in patients with hepatitis B virus (HBV)-  
related liver fibrosis using isobaric tags for rela-

tive and absolute quantitation (iTRAQ) combined  
with mass spectrometry.

**METHODS:** Thirty patients with HBV-related  
liver fibrosis and 30 healthy volunteers were se-  
lected, and their serum samples, after removal of  
14 kinds of high-abundant proteins, were used  
for screening serum differentially expressed se-  
rum proteins using iTRAQ labeling and MALDI-  
TOF-MS. Differentially expressed serum proteins  
were then analyzed using biological methods.

**RESULTS:** A total of 274 serum proteins were  
identified in both healthy volunteers and patients  
with HBV-related liver fibrosis by mass spectrom-  
etry, of which 20 were differentially expressed be-  
tween the two groups of subjects. Of the 20 differ-  
entially expressed serum proteins, 13 were up-reg-  
ulated and 7 down-regulated. These differentially  
expressed proteins are involved in 48 biological  
processes, 8 cellular components, and 12 molecular  
pathways. APOC3, CLU, C4B, CRP, and APOE  
were found to be located in the connected nodes of  
the protein functional interaction network.

**CONCLUSION:** Serum proteins of APOC3, CLU,  
C4B, CRP and APOE may play an important role  
in the development and progression of HBV-  
related liver fibrosis.

**Key Words:** Liver fibrosis; HBV; Isobaric tags for  
relative and absolute quantitation; Serum marker;  
Mass spectrometry

Zhang WW, He X, Lv XP, Li Y, Li HT, Luo R, Li CP, He M.  
Screening of differentially expressed serum proteins in  
patients with HBV-related liver fibrosis by iTRAQ combined  
with mass spectrometry. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012;  
20(29): 2789-2794

## 摘要

**目的:** 采用核素标记相对和绝对定量(isobaric  
tags for relative and absolute quantitation,  
iTRAQ)蛋白组学技术分析乙型肝炎病毒  
(hepatitis B virus, HBV)肝纤维化患者和健康  
人血清中的差异表达蛋白。

**方法:** 肝纤维患者与正常人血清各30例, 去除

## ■背景资料

肝纤维化是慢性  
乙型肝炎进展的  
主要结果, 其早期  
诊断仍是临床上  
的一个难题。迄今  
为止, 肝纤维诊断  
最可靠的方法为  
肝活检, 但因其为  
有创检查, 不便常  
规随访及动态评  
估而难以开展。其  
他辅助诊断如血  
液生化和影像学  
检查由于准确性  
等原因, 不能如实  
反映肝纤维化实  
际情况。临床上迫  
切需要找到更易  
推广、特异性及  
敏感性更高的肝  
纤维化诊断指标。

## ■同行评议者

张小晋, 主任医  
师, 北京积水潭医  
院消化科

## ■ 研发前沿

核素标记相对和绝对定量(iTRAQ)联合液相色谱基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱技术是近年来最新开发的一种新的蛋白质组学定量研究技术,用于检测样品中低丰度蛋白,有灵敏度高,蛋白覆盖率高,重复性好等优势。通过iTRAQ技术可能为无创诊断乙型肝炎病毒肝纤维提供更多有价值的标志物。

血清中14种高丰度蛋白,运用液相色谱基质辅助激光解析/电离-飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)筛选并鉴定差异表达蛋白,并对差异表达蛋白进行生物学分析。

**结果:**共鉴定血清蛋白274个,符合条件的差异蛋白20个。其中,在肝纤维患者血清中有11个蛋白表达上调,7个蛋白表达下调。20种差异表达蛋白参与48种生物学过程、8种细胞组分和12种分子途径;蛋白功能交互网图显示APOC3、CLU、C4B、CRP和APOE在网图中处于功能网络交叉点。

**结论:**处于差异蛋白功能交互网中交叉点位置的载脂蛋白C-III(apolipoprotein C-III, APOC3)、聚集素(clusterin, CLU)、补体C4B(complement C4-B, C4B)、C-反应蛋白(c-reactive protein, CRP)、载脂蛋白E(apolipoprotein E, APOE),可能在HBV肝纤维化的发生发展过程中发挥重要作用。

**关键词:**肝纤维化; HBV; iTRAQ; 血清标志物; 蛋白质组学

张维维, 何晓, 吕小平, 李茵, 李洪涛, 罗蓉, 李翠萍, 何敏. 基于iTRAQ结合质谱筛选HBV肝纤维化的差异表达蛋白. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2789-2794  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2789.asp>

## 0 引言

中国是病毒性肝炎的高发区,约25%慢性乙型肝炎患者将最终发展为肝硬化,甚至肝癌<sup>[1]</sup>。肝硬化发展过程中必然经历肝纤维化<sup>[2]</sup>。目前,肝纤维化诊断的“金标准”仍是肝穿刺肝组织活检,但由于肝穿刺组织活检有诸多明显不足因而限制了其应用和普及<sup>[3]</sup>。临床肝纤维化涉及的主要血清标志蛋白包括:透明质酸(hyaluronic acid, HA)、III型前胶原(type III procollagen, PCIII)、IV型胶原(type IV collagen, CIV)、层粘连蛋白(laminin, LN)和转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ),但这些标志物对肝纤维化的诊断的特异性、敏感性、准确性皆不尽如人意,不能真实的反映肝纤维化的实际情况<sup>[4]</sup>。

蛋白质组学的质谱技术为疾病过程的分子鉴定提供了一个丰富的信息来源,该方法在癌症生物标志物的发现中已经证明了其潜力。血清蛋白质组学以研究血清整体蛋白质成分和数量的变化为对象,其高通量、高效率的特性为研究

肝纤维化过程提供了新思路,通过质谱全面动态的分析血清样品中的差异蛋白,有助于发现与疾病诊断及预后相关的生物标志物及治疗靶点<sup>[5]</sup>。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取2010-12/2011-12广西医科大学第一附属医院消化内科经肝穿刺活检证实为肝纤维化的患者30例,肝组织的病理诊断符合2000年病毒性肝炎防治方案中肝纤维化的诊断标准<sup>[6]</sup>,排除丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染史、长期大量饮酒史及全身性疾病。正常对照组来自同时期广西医科大学第一附属医院的健康体检者,既往无肝脏相关病史,肝功能及B超未见异常,全身体检中未发现患有其他疾病。将30例乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)肝纤维化患者血清随机10例等量混合为一组,分为肝纤维化1、2、3组;根据例数、性别、年龄匹配原则,将健康人血清分为对照1、2、3组。标本采集经医院伦理委员会批准和患者本人或家属知情同意。本研究所用乙腈、氯化钾、乙醇、三氟乙酸、磷酸二氢钾等均购自Sigma公司;多重亲和MARS human 14色谱柱购自Aglient公司;强阳离子交换柱(strong cation exchange column, SCX)购自PolyLC公司;Magic C18AQ液相色谱柱购自Michrom公司;Nano-dropt2000点靶仪为Thermo scientific公司产品;C18 spin column除盐柱购自The Nest Group公司; iTRAQ试剂、5800Plus MALDI-TOF/TOF质谱仪和ProteinPilot 2.0软件均购自ABI公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 样本处理:**清晨空腹采集2 mL全血,4℃静置1-2 h待血液凝固析出血清,3 000 g离心10 min,收集上清液,冰上分装后存至-80℃备用。

**1.2.2 去除高丰度蛋白:**按照多重亲和和去除系统human14色谱柱操作说明,去除高丰度蛋白,将收集到的馏分用冻干机浓缩。

**1.2.3 脱盐和蛋白含量检测:**用3000 MWCO超滤离心管,加入50 mmol/L pH 8.5三乙胺碳酸氢缓冲液,反复3次,脱盐和收集蛋白片段;采用BCA法测定蛋白含量,每组低丰度蛋白取100  $\mu$ g/管,冻干。

**1.2.4 蛋白酶解和标记iTRAQ:**将干燥样品加入胰蛋白酶,37℃消化过夜;将酶解样品真空干燥后,溶于iTRAQ溶液缓冲液中; iTRAQ试剂113、115分别标记样品健康对照组和肝纤维化组,3组

表 1 肝纤维化组与健康对照组的分组 ( $n = 10$ )

分组	性别(男/女)	年龄(岁)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
1组 肝纤维化	10/0	55.70 ± 10.22	58.63 ± 46.07	93.38 ± 93.76
对照组	10/0	55.30 ± 10.25		
2组 肝纤维化	8/2	48.40 ± 10.56	38.71 ± 16.72	55.57 ± 32.92
对照组	8/2	47.70 ± 11.35		
3组 肝纤维化	10/2	47.50 ± 8.46	29.30 ± 3.47	42.40 ± 14.14
对照组	10/2	47.50 ± 8.36		

ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶.

试验标记一致; 标记后的样品经过C18 spin column除盐柱除盐, 冻干.

1.2.5 离线二位液相色谱分离与点靶: 干燥的标记样品用上样缓冲液A(10 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25% CAN, pH 2.7)复溶并稀释10倍, 上样到SCX预装柱(5  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm×200 mm), 经上样缓冲液A洗涤后, 用含有KCl浓度分别为35、50、75、100、125、150、175、200、250和300 mmol/L的缓冲液B分布洗脱, 收集不同梯度浓度条件下洗脱的多肽. 收集到的各组份样品稀释后进行反相C18柱(5  $\mu\text{m}$ , 77  $\mu\text{m}$ ×150 mm)梯度淋洗和点靶.

1.2.6 质谱分析与数据处理: 标记肽段的串联质谱鉴定和相对定量分析采用ABI公司的5800 MALDI-TOF/TOF蛋白分析仪. 质谱分析数据用Protein Pilot 2.0对SWISSPROT数据库进行检索鉴定蛋白, 报告置信度高于95%的蛋白, 同时用113、115试剂报告离子的峰面积积分进行相对定量分析, 以113为对照, 按照115:113的比值, 选择 $P \leq 0.05$ 的结果进行报告. 运用富集分析算法对初步鉴定的蛋白数据进行分组, 鉴定的蛋白与数据库进行对比, 选择GO的生物过程、细胞成分和分子功能注释对蛋白进行分类和富集分析.

**统计学处理** 应用SPSS14.0软件进行统计学分析. 计量数据以mean±SD表示, 两样本均属间的比较采用 $t$ 检验. 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 分组情况分析 各组标本详情见表1. 肝纤维化1组与对照1组之间, 肝纤维化2组与对照2组之间, 肝纤维化3组与对照3组之间, 在例数、年龄分布和性别比例方面经比较后, 差异均无统计学意义.

2.2 质谱鉴定结果 质谱数据用Protein Pilot 2.0对SWISSPROT数据库进行检索鉴定蛋白, 质谱分析结果显示在HBV肝纤维化血清和健康对照人群血清筛选和鉴定出274个蛋白. 剔除了所有多重亲和MARS human14色谱柱应该去除的14种高丰度蛋白, 同时满足如下条件的结果进入统计分析: peptides>2, Unused>1.3, Pval<0.05, 115:113>1.2和115:113<0.8. 经分析肝纤维化患者血清和正常人血清差异表达蛋白20个, 与对照组对比, 在HBV肝纤维化血清中表达上调的蛋白有13个, 表达下调的蛋白有7个. HBV肝纤维化组比健康对照组上调>1.2倍的蛋白, 肝纤维化组比健康对照组下调<0.8倍的蛋白质见表2; 其中APOE和CLU这两个蛋白的肽段相对定量信息见图1A和图1B.

2.3 生物信息学分析 通过DAVID富集分析系统对本实验获得的20种差异表达蛋白进行GO分析和Pathway分析. 这些蛋白主要参与48种生物学过程、8种细胞组分和12种分子途径, 主要涉及3大生物代谢途径: 脂代谢途径、补体调节途径和信号转导途径. 运用STRING 9.0检索蛋白质相互作用(图2); 蛋白: 载脂蛋白C-III (apolipoprotein C-III, APOC3)、聚集素(clusterin, CLU)、补体C4B(complement C4-B, C4B)、C-反应蛋白(c-reactive protein, CRP)、载脂蛋白E(apolipoprotein E, APOE)在网图中处于功能网络交叉点, 他们可能在蛋白相互作用及肝纤维化的发生发展过程中扮演重要角色.

## 3 讨论

采用比较蛋白质组学的方法寻找差异表达蛋白是当今蛋白质组学研究的一个热点. 与ICAT-MS/MS和2D电泳相比, iTRAQ标记偶联MALDI-MS/MS的方法是发现蛋白标志物的强有力工具, 该方法对低丰度蛋白检测的灵敏度高, 蛋白覆盖

### ■相关报道

Yang等利用2-DE和iTRAQ-LC-ESI-MS技术对比研究HCV相关肝纤维化患者和正常人血清, 发现13个差异表达蛋白, 其中载脂蛋白A-IV在HCV相关肝纤维化患者差异明显.



### ■创新盘点

本研究运用血清蛋白质组学对HBV肝纤维化患者与健康人血清进行差异蛋白的筛选与鉴定,结合生物信息学分析发现APOC3、CLU、C4B、CRP、APOE可以作为HBV肝纤维化的血清候选标志物。

表 2 肝纤维化组与健康对照组比较的血清差异表达蛋白

编号	蛋白名称	115 : 113	生物学过程	细胞成分	分子功能
P01011	$\alpha$ -1抗糜蛋白酶	7.1779	炎症反应、脂质代谢	细胞外区	丝氨酸型内肽酶抑制剂的活性
P06727	载脂蛋白A-IV	1.2942	脂代谢过程	细胞外区	脂质转运活动
P04114	载脂蛋白B-100	4.3251	脂代谢和转运	细胞外区	胆固醇转运活动
P02649	载脂蛋白E	3.0200	胆固醇代谢过程	内涵体	脂质转运活性
P00450	铜蓝蛋白	4.3251	铜离子转运	细胞外区	铜离子结合
P02747	补体C1q子组件亚基C	2.2909	补体活化途径	细胞外途	结合免疫复合物
P10643	补体C7	12.942	补体活化途径	细胞外区	膜攻击复合物
P02748	补体C9	2.3121	补体活化途径	细胞外区	膜攻击复合物
P02741	C-反应蛋白	15.417	急性时相反应	细胞外区	低密度脂蛋白粒子结合
P02671	纤维蛋白原 $\alpha$ 链	2.2699	血液凝固、血小板活化	细胞外区	受体结合
P01880	免疫球蛋白三角链C区	5.4450	免疫反应	膜的组成成分	抗原结合
B9A064	免疫球蛋白 $\lambda$ 样多肽5	5.2000	免疫反应	细胞外区	
P51884	光蛋白聚糖	2.0893	软骨发育	细胞外基质	胶原蛋白结合
P02656	载脂蛋白 C-III	0.3133	脂质代谢过程	细胞外区	磷脂结合
P10909	聚集素	0.4446	细胞凋亡过程	细胞膜	错误折叠的蛋白结合
POC0L5	补体C4-B	0.2582	补体活化	细胞外区	肽链内切酶抑制剂活性
P05546	肝素辅因子2	0.4966	肽链内切酶活性负调控	细胞外区	丝氨酸型内肽酶抑制剂的活性
P35858	胰岛素样生长因子结合蛋白复合物的酸不稳定亚基	0.3221	细胞粘附、信号转导	细胞外区	胰岛素样生长因子结合
P19827	间 $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂重链H1	0.5495	肽酶活性的负调控	细胞外区	丝氨酸型内肽酶抑制剂活性
P19823	间 $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂重链H2	0.1019	肽酶活性的负调控	细胞外区	丝氨酸型内肽酶抑制剂活性

率高,重复性好,最多可对8种不同样本同时进行定量分析<sup>[7]</sup>。iTRAQ技术结合多维液相色谱和串联质谱分析,可采用多种标本来源,如细胞、组织、血浆、脑脊液、唾液、泪液和鼻分泌物等,同时分离和鉴定成百上千蛋白质,最大化的获得蛋白质的“全组信息”<sup>[8]</sup>;该技术已被应用于乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌等血清标志物的研究<sup>[9-11]</sup>。本研究中,通过iTRAQ-MS/MS技术成功筛选出HBV肝纤维化患者与健康人血清中的20种差异表达蛋白,其中上调超过1.2倍的蛋白13种,下调超过0.8倍的蛋白7种,这些蛋白的生物学功能主要包括脂类代谢、补体调节、分子转运和细胞信号转导等。

通过生物信息学分析发现APOC3、CLU、C4B、CRP和APOE位于差异蛋白交互网图作用交汇点,他们的相互作用及与HBV肝纤维化的发生发展过程中的关系值得关注。

APOC3是由肝脏合成的一种水溶性低分子量蛋白质,主要存在于富含甘油三酯(triglyceride, TG)的超低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)和乳糜微粒(chylomicrons, CM)中<sup>[12]</sup>。有报告显示,在HCV相关的肝纤维化患者中, APOC3表达下降与肝纤维化程度进展有高度相关性<sup>[13]</sup>, APOC3的转运可能受到HCV核心

蛋白和HCV相关炎症细胞因子的直接或间接影响<sup>[14,15]</sup>;另外, APOC3的降低也可能是HCV引起的VLDL代谢紊乱所致。本研究显示HBV肝纤维化血清中APOC3的表达下降,推测HBV对APOC3的影响可能类似于HCV,患者血清APOC3表达水平检测可能有助于对肝纤维化的诊断。

CLU是Fritz等<sup>[16]</sup>于1983年发现的一种糖蛋白,几乎表达于所有的组织和体液中。他参与包括细胞凋亡、细胞周期调控、DNA修复、细胞黏附、组织重塑、脂质运输和免疫调节等生理功能。有文献报道<sup>[17]</sup>, HBV相关肝硬化血清中的CLU低于正常人,也低于HCC和普通HBV感染者,而HCC患者CLU低于正常人和HBV患者,本研究结果与该报道一致。同时, CLU在细胞膜表面表达时对同源补体有抑制作用,从而保护细胞免于补体介导的损伤<sup>[18]</sup>。所以当肝纤维化发生时,细胞外基质过度沉积,可能影响肝细胞分泌从而导致CLU表达下降。

肝脏是合成补体成分的主要器官, 90%的补体成分及其调节因子来自于肝脏。C4由 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 通过二硫键链接组成, C4B是补体激活经典途径中C3重要组成部分,参与微生物膜的攻击复合物的组装,能清除致病性免疫复合物、凋亡和坏死细胞<sup>[19]</sup>。Gangadharan等<sup>[20]</sup>和White等<sup>[21]</sup>的研

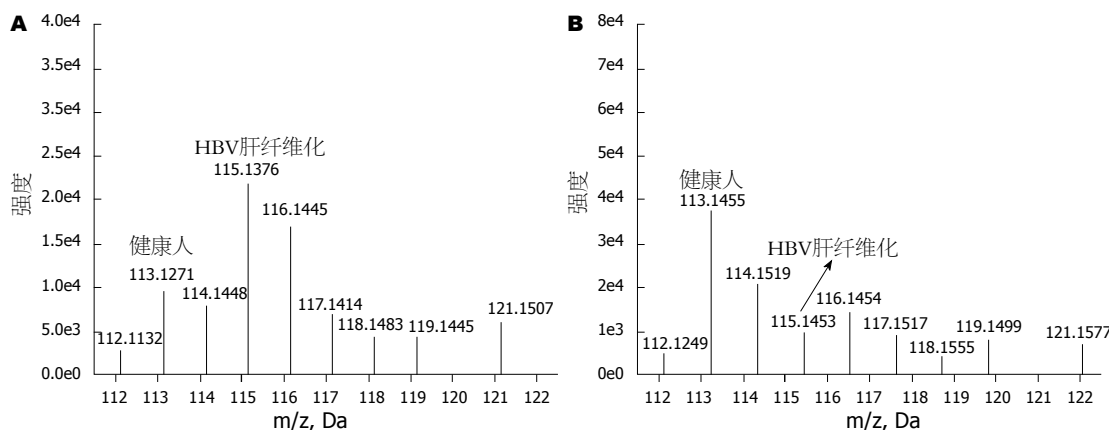


图 1 载脂蛋白C-Ⅲ和聚集素肽段定量信息图. A: 载脂蛋白C-Ⅲ; B: 聚集素.

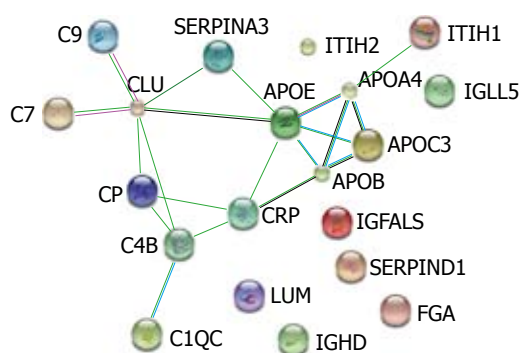


图 2 20种蛋差异蛋白相互作用图.

究发现, 在HCV相关肝纤维化患者血清中C4 $\beta$ 链下降; 张占卿等<sup>[22]</sup>的研究显示血清C4水平下调对HBV肝纤维化有预测价值; Ali等<sup>[23]</sup>研究认为, HCV肝炎在出现肝硬化之前, 血清C4水平有一定程度地升高, 在出现肝硬化后则显著下降. 虽然补体系统在保护机体抵抗病毒感染中起一定作用, 但C4B在HBV、HCV相关的肝纤维化的发病机制中的作用尚不清楚. 本研究显示C4B表达下调可能是由于病毒侵袭所致的持续性肝脏损害与炎症反应, 从而引起纤维结缔组织大量增生、降解不足, 同时肝组织免疫系统被激活, 补体激活经典途径消耗C4B, 最终导致其在HBV肝纤维化血清中表达下调.

CRP属于Pentraxin蛋白家族成员, 是由肝脏产生的一种急性期非特异性反应蛋白<sup>[24]</sup>. Liu等<sup>[25]</sup>在肝纤维化大鼠模型中发现, CRP作为标志物在早期酒精性脂肪肝、肝纤维化血清中表达上调; Yoneda等<sup>[26]</sup>研究提示血浆CPR水平可以用于区分普通脂肪肝和非酒精性脂肪变性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), 高表达的CRP与广泛肝纤维化有相关性, 这与本研究结果一致, 但CRP在肝纤维中升高机制尚未清楚. 可

能在肝纤维化时, 肝成纤维细胞和活化的肝星状细胞分泌IL-6升高<sup>[27]</sup>, 而血液循环中IL-6的升高可诱导CRP的大量生成<sup>[28]</sup>.

APOE主要在肝脏合成、分泌和代谢, 参与脂质的运输、储存及排泄过程, 有组织修复、抑制血小板积聚及免疫调节等作用<sup>[29]</sup>. 有研究显示, 在不同肝病发生过程中, APOE在血清中的含量有明显变化, 在肝功能衰竭中, APOE和低密度脂蛋白表达下降, 然而在肝组织再生的过程中APOE表达却与之相反<sup>[30]</sup>. Wozniak等<sup>[31]</sup>的研究提示APOE对HCV病毒引起的肝损伤有一定保护作用, 可以竞争性抑制病毒与肝细胞的结合, 减少病毒的侵入与扩散, 从而降低肝损害. APOE可以通过免疫调节抑制IL-2和影响自然杀伤NK细胞产生干扰素, 从而使HBV持续复制并且难以清除<sup>[32]</sup>. 由此推测, 本研究中APOE在HBV肝纤维化血清中上调可能是由于病毒致肝损伤因素的存在, 从而引起APOE的反应性升高. 总之, 本研究通过iTRAQ技术联合质谱初步筛选得到一系列HBV肝纤维化血清差异表达蛋白, 表明该技术用于肝病相关生物标志物的血清蛋白质组学研究具有良好的前景. 但这些蛋白在肝纤维化发生、发展中的作用尚未完全清楚, 需要进一步评价这些血清差异蛋白作为诊断肝纤维化的候选标志物的可靠性.

#### 4 参考文献

- 1 孙爱武, 李黎. 乙型病毒性肝炎和原发性肝细胞癌. 中国疫苗和免疫 2010; 2: 173-177
- 2 Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009; 373: 582-592
- 3 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 4 Jarcuska P, Janicko M, Veseliny E, Jarcuska P, Skladany L. Circulating markers of liver fibrosis progression. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1009-1017

#### ■应用要点

深入研究HBV肝纤维化的候选血清标志物在HBV肝纤维化发生发展过程的作用, 将为肝纤维的无创诊断提供新的思路.

## ■同行评价

本文对研究对象的选择较科学, 结果有可比性, 对HBV肝纤维化临床研究很有意义。

- 5 Petricoin EF, Rajapaske V, Herman EH, Arekani AM, Ross S, Johann D, Knapton A, Zhang J, Hitt BA, Conrads TP, Veenstra TD, Liotta LA, Sistiare FD. Toxicoproteomics: serum proteomic pattern diagnostics for early detection of drug induced cardiac toxicities and cardioprotection. *Toxicol Pathol* 2004; 32 Suppl 1: 122-130
- 6 卫生部. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 7 Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen RF. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res* 2006; 5: 651-658
- 8 王林纤, 戴勇, 涂植光. iTRAQ标记技术与差异蛋白质组学的生物标志物研究. 生命的化学 2010; 1: 135-140
- 9 Bouchal P, Roumeliotis T, Hrstka R, Nenutil R, Vojtesek B, Garbis SD. Biomarker discovery in low-grade breast cancer using isobaric stable isotope tags and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry (iTRAQ-2DLC-MS/MS) based quantitative proteomic analysis. *J Proteome Res* 2009; 8: 362-373
- 10 DeSouza L, Diehl G, Rodrigues MJ, Guo J, Romaschin AD, Colgan TJ, Siu KW. Search for cancer markers from endometrial tissues using differentially labeled tags iTRAQ and cICAT with multi-dimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4: 377-386
- 11 Glen A, Gan CS, Hamdy FC, Eaton CL, Cross SS, Catto JW, Wright PC, Rehman I. iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression. *J Proteome Res* 2008; 7: 897-907
- 12 Hernandez C, Molusky M, Li Y, Li S, Lin JD. Regulation of hepatic ApoC3 expression by PGC-1 $\beta$  mediates hypolipidemic effect of nicotinic acid. *Cell Metab* 2010; 12: 411-419
- 13 Rowell J, Thompson AJ, Guyton JR, Lao XQ, McHutchison JG, McCarthy JJ, Patel K. Serum apolipoprotein C-III is independently associated with chronic hepatitis C infection and advanced fibrosis. *Hepatol Int* 2011 Jul 7. [Epub ahead of print]
- 14 Ooi EM, Barrett PH, Chan DC, Watts GF. Apolipoprotein C-III: understanding an emerging cardiovascular risk factor. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 611-624
- 15 Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008; 122: 124-131
- 16 Fritz IB, Burdzy K, Setchell B, Blaschuk O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod* 1983; 28: 1173-1188
- 17 Wang Y, Liu YH, Mai SJ, He LJ, Liao YJ, Deng HX, Guan XY, Zeng YX, Kung HF, Xie D. Evaluation of serum clusterin as a surveillance tool for human hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus related cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1123-1128
- 18 Qin X, Gao B. The complement system in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 333-340
- 19 Soto K, Wu YL, Ortiz A, Aparicio SR, Yu CY. Familial C4B deficiency and immune complex glomerulonephritis. *Clin Immunol* 2010; 137: 166-175
- 20 Gangadharan B, Antrobus R, Chittenden D, Rossa J, Bapat M, Klenerman P, Barnes E, Dwek RA, Zitzmann N. New approaches for biomarker discovery: the search for liver fibrosis markers in hepatitis C patients. *J Proteome Res* 2011; 10: 2643-2650
- 21 White IR, Patel K, Symonds WT, Dev A, Griffin P, Tsokanas N, Skehel M, Liu C, Zekry A, Cutler P, Gattu M, Rockey DC, Berrey MM, McHutchison JG. Serum proteomic analysis focused on fibrosis in patients with hepatitis C virus infection. *J Transl Med* 2007; 5: 33
- 22 张占卿, 陆伟, 王雁冰, 饶敏, 冯洁, 冯艳玲, 沈芳. 血清补体C3和C4在预测慢性乙型肝炎肝纤维化程度中的价值. 中华临床感染病杂志 2011; 4: 292-295
- 23 Ali OS, Abo-Shadi MA, Hammad LN. The biological significance of serum complements C3 and C4 in HCV-related chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Egypt J Immunol* 2005; 12: 91-99
- 24 Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111: 1805-1812
- 25 Liu SL, Cheng CC, Chang CC, Mai FD, Wang CC, Lee SC, Ho AS, Chen LY, Chang J. Discovery of serum biomarkers of alcoholic fatty liver in a rodent model: C-reactive protein. *J Biomed Sci* 2011; 18: 52
- 26 Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, Kato S, Takahashi H, Kirikoshi H, Inamori M, Nozaki Y, Abe Y, Kubota K, Saito S, Iwasaki T, Terauchi Y, Togo S, Maeyama S, Nakajima A. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007; 42: 573-582
- 27 Moshage H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* 1997; 181: 257-266
- 28 Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999; 22: 1971-1977
- 29 Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res* 2011; 50: 62-74
- 30 Schiefermeier M, Kollegger H, Madl C, Polli C, Oder W, Kühn H, Berr F, Ferenci P. The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease. *Brain* 2000; 123 Pt 3: 585-590
- 31 Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. *Hepatology* 2002; 36: 456-463
- 32 王启娟, 万谟彬, 李成忠, 张迁, 刘建涌, 陈姬秀. 慢性乙型肝炎病人可溶性白细胞介素2受体的检测. 青岛大学医学院学报 2002; 38: 62-63

编辑 田滢 电编 鲁亚静

# 食管静脉曲张出血套扎术后再出血的预防及治疗

常菲菲, 杜雅菊

常菲菲, 杜雅菊, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

常菲菲, 在读硕士, 主要从事消化病学研究.

作者贡献分布: 本文综述由常菲菲完成; 杜雅菊审校.

通讯作者: 杜雅菊, 教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科.

duyaju@medmail.com.cn

收稿日期: 2012-07-20 修回日期: 2012-08-22

接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-18

## Progress in prevention and treatment of rebleeding after endoscopic band ligation for esophageal variceal bleeding

Fei-Fei Chang, Ya-Ju Du

Fei-Fei Chang, Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Ya-Ju Du, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. duyaju@medmail.com.cn

Received: 2012-07-20 Revised: 2012-08-22

Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-18

### Abstract

Hemorrhage from esophageal varices is a serious and common complication of decompensated cirrhosis and carries a significant rate of morbidity and mortality. Endoscopic variceal ligation (EVL) is an effective treatment for esophageal varices; however, there is a very high rate of rebleeding. Prevention and treatment of rebleeding after EVL are important for improving survival in patients with liver cirrhosis. Currently, many measures, including endoscopy, surgery, medication, and a combination of them, have been developed to prevent the occurrence of rebleeding after EVL. Many clinical trials have been done to evaluate the effectiveness of various treatments, alone or in combination, for rebleeding.

**Key Words:** Band ligation; Rebleeding; Esophageal varices

Chang FF, Du YJ. Progress in prevention and treatment of rebleeding after endoscopic band ligation for esophageal variceal bleeding. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2795-2799

www.wjgnet.com

### 摘要

食管静脉曲张出血是肝硬化失代偿期最常见也是最严重的并发症, 发病率和病死率较高. 套扎术能有效治疗食管静脉曲张, 但术后的再出血率很高. 因此, 预防套扎术后的再出血, 是提高肝硬化患者生存率的重要措施. 随着人们对套扎术后患者再出血的预防及治疗研究的不断进展, 有助于改善肝硬化这一严重并发症的结局. 目前已经开展了许多预防再出血的治疗方法, 包括内镜或手术治疗、药物治疗, 以及联合治疗方法. 关于单一方法治疗或联合治疗的效果, 已有多项试验进行了研究, 本文将对以上研究成果进行综述, 以指导临床选择适宜的预防和治疗策略.

**关键词:** 套扎术; 再出血; 食管静脉曲张

常菲菲, 杜雅菊. 食管静脉曲张出血套扎术后再出血的预防及治疗. *世界华人消化杂志* 2012; 20(29): 2795-2799

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2795.asp>

### 0 引言

门脉高压症是导致肝硬化严重并发症的主要原因, 由此导致的食管静脉曲张出血是肝硬化失代偿期最常见也是最严重并发症, 有较高的发病率和病死率. 随着临床治疗水平的提高, 其导致的死亡率已由1981年的42%降至近期的14%-20%. 在早期死亡率中, 再出血所占比例<sup>[1]</sup>约为50%. 因此预防套扎术后的再出血, 是提高肝硬化患者生存率的重要措施. 本文对近期关于食管静脉曲张出血套扎术后再出血的预防和治疗进展进行综述, 以指导临床选择适宜的预防和治疗策略, 提高生存率, 改善肝硬化患者的预后.

### 1 再出血的诊断及套扎术

依据Baveno IV标准, 早期出血时间定义为6 wk. 食管静脉曲张出血占到肝硬化患者出血的70%, 因此内镜检查是诊断食管静脉曲张出血的金标准. 食管静脉曲张出血的患者一般在内镜下可见渗血或喷射状出血, 套扎处附有红色或白色血栓, 并且没有消化道其他部位出血的证据. 还可以通过临床表现来辅助判断出血: 呕血、黑

### ■背景资料

食管静脉曲张出血是导致肝硬化患者死亡的主要原因, 内镜套扎术是首选的治疗方法. 然而套扎术后的再出血率仍很高, 如何预防再出血引起了广泛关注.

### ■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科



## ■ 研发前沿

套扎术后再出血的预防性治疗方法较多,单独或联合治疗的效果不一,总结分析以上治疗方法的疗效,有助于完善目前预防性治疗的策略。

便、心率加快、血压下降以及积极输血后血红蛋白无明显升高或下降。

套扎术1986年由研究者<sup>[1-3]</sup>提出,被广泛应用于食管静脉曲张出血的治疗,其对再出血的预防治疗作用在多项研究中得到证实。有研究表明,套扎环数多的患者早期再出血率高,原因可能有两点:首先,需要套扎的曲张静脉数目多,对应的有出血征象的血管就多,这间接反映了门脉压力高以及将来再出血的可能性大;更重要的是,多点套扎使受损伤黏膜和套扎后溃疡的面积增大,也增加了再出血的风险。该研究中再出血患者中,由于套扎后溃疡引起的出血占到58.3%<sup>[1]</sup>。同样,在Petrascch等<sup>[2]</sup>的研究中,套扎后溃疡引起的再出血也占到46.7%。由此可见,积极预防或治疗套扎术后溃疡对于预防再出血至关重要,尤其是对于套扎环数较多的患者。红色征常作为预测静脉曲张出血风险的可靠指标,Okamoto等<sup>[3]</sup>的研究指出,重度静脉曲张患者食管下段右后壁的红色征最明显,而破裂出血最常发生于右前壁,可能与此处血管跨壁压最大有关。因此在进行初次套扎治疗时,无论食管下段右前壁的红色征是否明显都应对其进行结扎。

## 2 二次预防治疗

2.1 内镜及手术预防 首次套扎的早期再出血率为7.8%<sup>[4]</sup>,2年的再出血率为27%-34%<sup>[5,6]</sup>。由于初次套扎后的再出血率高,因此在初次止血成功后,要通过药物或内镜治疗来预防再次出血。然而,这些措施仅能显著降低再出血率却不能降低死亡率<sup>[7]</sup>。

通过反复套扎达到根除曲张静脉来有效预防再出血的研究,已在多项试验<sup>[7-9]</sup>中开展。与硬化术相比能显著改善再出血率,与药物预防相比<sup>[7]</sup>能减少严重并发症的发生。然而,上述试验的套扎治疗间期却各不相同。关于适宜的套扎治疗间期,仅有一项回顾性研究,表明预防性套扎的治疗间期长于3 wk可明显降低再出血率<sup>[9]</sup>。由于是回顾性的研究,这一结论的可靠性有限,还需要更多随机对照研究证实。

关于套扎术后易于再出血的时间, Lee等<sup>[1]</sup>的研究表明,入院2 wk内的再出血率最高。另一回顾性研究指出,急诊套扎患者的再出血多发生于11 d内,而择期套扎患者的再出血多发生于4 d内<sup>[2]</sup>。同样, Xu等<sup>[4]</sup>的研究显示,套扎后的早期出血80.8%发生于7-13 d内。由此可见,套扎术后再出血的高峰期是在2 wk内,在此期间应注意积极

防护,避免再出血的发生,尤其是对于合并有肝硬化其他并发症的患者。

对于肝功Child A级和B级的食管静脉曲张出血的患者<sup>[10]</sup>,若合并胃底静脉曲张,其再出血的风险是单纯食管静脉曲张患者的4倍。该试验表明应用电凝法治疗套扎术后的微小曲张静脉是安全有效的,电凝后无一例发生再出血,而应用注射法的患者中有8.3%出现再出血,但注射法的优势是静脉曲张的再发生率低。

一项Meta分析<sup>[11]</sup>指出,预防再出血中联合应用套扎及硬化术并不能改善患者的预后,没有降低再出血率,也没有缩短静脉曲张消失所需要的治疗时间。同时,联合治疗时发生食管狭窄的风险明显增加。而另一Meta分析则认为联合治疗效果更优<sup>[12]</sup>。Grgov等<sup>[13]</sup>的研究表明,应用硬化术处理套扎后剩余的小曲张静脉并不能改善再出血率,还会增加吞咽困难及胸痛等并发症。因此,不推荐应用硬化治疗预防再出血。

Baveno V会议<sup>[14]</sup>根据非对照研究结果推荐覆膜金属自膨胀支架可应用于难控制性静脉曲张的止血。难治性出血指经过药物和内镜治疗仍持续出血,不包括因大量出血妨碍内镜治疗的患者。在这种情况下,内镜支架成为可替代气囊填塞的另一选择<sup>[15]</sup>。其可能的并发症如加重出血,食管纵膈穿孔,支架取出后再出血等,在多项研究<sup>[16,17]</sup>中均未发生。在Zehetner等<sup>[16]</sup>的研究中有7个患者支架脱落至胃中,但未引起再出血,并于48 h内成功将支架再次回放入食管。在另一研究<sup>[17]</sup>中,3/9的患者止血失败,其中2例是胃溃疡,并且发生支架相关小溃疡1例,但未引起再出血。而Dechêne等<sup>[5]</sup>的研究指出,虽然支架可以成功止血,但取出支架后仅应用保守治疗再出血率高,建议将支架作为应用其他治疗方法的过渡治疗。但由于该研究的病历数少,其统计学意义有限。上述研究中的支架放置时间1-14 d,但止血效果相似,可能跟研究的样本量少有关。因此,关于支架在急性止血中的作用还需要将来大量样本随机对照试验进行验证。

此外,经颈静脉肝内门体分流术<sup>[18]</sup>(transjugular intrahepatic portosystemic stent, TIPS)通过降低门静脉系统的压力来降低患者再出血的风险。TIPS与套扎相比<sup>[6,19]</sup>能降低再出血率,但不能改善死亡率,还会增加患者发生肝性脑病以及形成门静脉血栓<sup>[20]</sup>的风险,因此不推荐作为预防出血的首选治疗方法,可作为患者进行肝移植的过渡治疗,也可用于治疗难治性出血<sup>[21-23]</sup>。选择



性分流术<sup>[20]</sup>与完全分流术相比, 止血率相同, 但并发肝性脑病比例低, 为目前推荐的治疗方法. 选择性TIPS<sup>[24]</sup>与静脉曲张硬化术相比能有效降低再出血率及死亡率, 并且二者诱发肝性脑病的比率相同. 肝移植是终末期肝病的选择, 并不适用于预防出血的治疗.

**2.2 药物预防** 一项关于雷贝拉唑服用2年的随机对照试验<sup>[25]</sup>表明, 长期服用质子泵抑制剂能显著降低静脉曲张出血率及套扎相关的严重并发症, 但并不能降低静脉曲张的再发生率. 因此, 单独应用质子泵抑制剂不能明显改善肝硬化出血患者的预后, 还需要联合其他治疗方法.

门静脉压力梯度(hepatic venous pressure gradient, HVPG) $>12$  mmHg<sup>[26-28]</sup>预示患者静脉曲张出血的风险增加, 非选择性 $\beta$ 受体阻滞剂被普遍应用于降低HVPG, 以降低再出血率. 最近的一项前瞻性研究<sup>[7]</sup>表明, 持续使用非选择性 $\beta$ 受体阻滞剂预防首次出血和再出血的患者, 与未预防用药的患者相比, 其套扎后的远期再出血率和死亡率都增加. 提示我们对这类患者应采用套扎的替代治疗, 以改变这一结局. 另一研究<sup>[29]</sup>指出, 止血成功后大剂量使用 $\beta$ 受体阻滞剂能改善患者6 wk内的再出血率及死亡率. 这一结论在多项研究<sup>[30-33]</sup>中得到证实. 一项Meta分析<sup>[34]</sup>表明, 应用 $\beta$ 受体阻滞剂与套扎预防再出血的效果相同. 而Kumar等<sup>[35]</sup>及Ahmad等<sup>[36]</sup>的研究指出预防性应用 $\beta$ 受体阻滞剂并不能降低再出血率. 因此, 关于 $\beta$ 受体阻滞剂能否降低再出血率仍存争议, 需要随机对照试验的验证. 单独应用非选择性 $\beta$ 受体阻滞剂<sup>[37]</sup>的患者应答率低, 即不能使HVPG降至12 mmHg以下, 或比基础值降低小于20%, 联合应用哌唑嗪能显著改善其应答率, 但并不能降低再出血率. 此外, 套扎术是 $\beta$ 受体阻滞剂应答率低患者预防止血的可行方法<sup>[38]</sup>.

### 3 预防并发症

多项随机对照实验研究了引起食管静脉曲张再出血的独立危险因素, 包括较差的Child-pugh分数<sup>[39]</sup>或分级<sup>[2,4,40,41]</sup>、 $\beta$ 受体阻滞剂的应用<sup>[7]</sup>及剂量<sup>[25]</sup>、输血<sup>[42-44]</sup>、血肌酐水平<sup>[43,44]</sup>、血胆红素水平<sup>[43,44]</sup>、感染<sup>[1,39]</sup>、低白蛋白血症<sup>[6,39,42]</sup>、HVPG $\geq 18$  mmHg<sup>[6,45]</sup>、腹水<sup>[4,6]</sup>、肝癌<sup>[8]</sup>、凝血酶原时间<sup>[4]</sup> $>18$  s及套扎环数<sup>[4]</sup>等. 由于研究方法及指标不同, 研究所得再出血的独立影响因素也各不相同. 但如果患者同时有上述多项危险因素, 则预示其再出血可能性大. 在总的死亡事件中, 出血

所引起的只占到34.2%, 大多数的死亡由肝硬化的其他并发症引起<sup>[46]</sup>. 因此预防这些并发症对于改善肝硬化患者的预后十分重要. 感染是评估急性食管静脉曲张出血患者早期再出血及死亡率可靠指标. 除出血外, 感染<sup>[47-49]</sup>所致的败血症是患者早期死亡的另一主要原因, 肠内需氧的革兰阴性菌是肝硬化静脉曲张患者最常见的致病菌<sup>[1]</sup>. 目前推荐<sup>[50]</sup>肝硬化出血患者入院即开始使用抗生素, 并持续使用7 d, 具体抗生素的选择可依据当地微生物的耐药情况<sup>[51]</sup>来选择. 同时还应避免应用肾毒性药物如氨基糖苷类和非甾体抗炎药, 并应避免低血容量以减少对肾功的损害. 肝硬化患者经常合并营养失调, 因此一旦患者病情稳定应积极经口进食. 此外, 肝功衰竭是套扎患者死亡的主要原因, 因此预防和治疗肝功衰竭是改善患者生存率的主要方法.

### 4 结论

肝硬化患者出血的诱因是多方面的, 其治疗也要综合其各项指标选择最合适的治疗方法. 随着人们对这一并发症的认识及治疗水平不断提高, 以及对可能的并发症及预后的准确评估, 有助于降低肝硬化的发生率.

### 5 参考文献

- 1 Lee SW, Lee TY, Chang CS. Independent factors associated with recurrent bleeding in cirrhotic patients with esophageal variceal hemorrhage. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1128-1134
- 2 Petrasch F, Grothaus J, Mössner J, Schiefke I, Hoffmeister A. Differences in bleeding behavior after endoscopic band ligation: a retrospective analysis. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 5
- 3 Okamoto E, Amano Y, Fukuhara H, Furuta K, Miyake T, Sato S, Ishihara S, Kinoshita Y. Does gastroesophageal reflux have an influence on bleeding from esophageal varices? *J Gastroenterol* 2008; 43: 803-808
- 4 Xu L, Ji F, Xu QW, Zhang MQ. Risk factors for predicting early variceal rebleeding after endoscopic variceal ligation. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3347-3352
- 5 Dechène A, El Fouly AH, Bechmann LP, Jochum C, Saner FH, Gerken G, Canbay A. Acute management of refractory variceal bleeding in liver cirrhosis by self-expanding metal stents. *Digestion* 2012; 85: 185-191
- 6 Papatheodoridis GV, Goulis J, Leandro G, Patch D, Burroughs AK. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt compared with endoscopic treatment for prevention of variceal rebleeding: A meta-analysis. *Hepatology* 1999; 30: 612-622
- 7 de Souza AR, La Mura V, Reverter E, Seijo S, Berzigotti A, Askenazhi E, García-Pagán JC, Abraldes JG, Bosch J. Patients whose first episode of bleeding occurs while taking a  $\beta$ -blocker have high long-

### ■相关报道

Augustin等认为, 套扎术后再出血病情复杂, 需要多学科协作, 选取最优方案, 建议尽早应用血管活性药物, 随后根据情况采取补救治疗措施: 包括内镜、气囊、食道支架、断流或分流手术等.

## ■应用要点

套扎术后再出血问题已得到临床重视,但尚未形成统一的治疗方案,预防性治疗的方法多样,对最新的研究成果进行总结有助于指导临床选择最有效的治疗方案。

- term risks of rebleeding and death. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 670-676; quiz e58
- 8 Vu Van Khien, Mai Hong Bang, Bui Van Lac, Masa Yuki Uemura, Kazuhiro Nouse and Kazuhisa Taketa. Endoscopic variceal ligation of patients with liver cirrhosis and cirrhosis accompanied by hepatocellular carcinoma. *Digestive Endoscopy* 2005; 17: 143-147
- 9 Harewood GC, Baron TH, Song LM. Factors predicting success of endoscopic variceal ligation for secondary prophylaxis of esophageal variceal bleeding. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 237-241
- 10 Monici LT, Meirelles-Santos JO, Soares EC, Mesquita MA, Zeitune JM, Montes CG, Almeida JR, Yamanaka A, Magna LA. Microwave coagulation versus sclerotherapy after band ligation to prevent recurrence of high risk of bleeding esophageal varices in Child-Pugh's A and B patients. *J Gastroenterol* 2010; 45: 204-210
- 11 Karsan HA, Morton SC, Shekelle PG, Spiegel BM, Suttorp MJ, Edelstein MA, Gralnek IM. Combination endoscopic band ligation and sclerotherapy compared with endoscopic band ligation alone for the secondary prophylaxis of esophageal variceal hemorrhage: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 399-406
- 12 Funakoshi N, Ségalas-Largey F, Duny Y, Oberti F, Valats JC, Bismuth M, Daurès JP, Blanc P. Benefit of combination  $\beta$ -blocker and endoscopic treatment to prevent variceal rebleeding: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5982-5992
- 13 Grgov S, Stamenković P. Does sclerotherapy of remnant little oesophageal varices after endoscopic ligation have impact on the reduction of recurrent varices? Prospective study. *Srp Arh Celok Lek* 2011; 139: 328-332
- 14 De Franchis, Roberto. Treatment of acute bleeding. Portal Hypertension V: Proceedings of the Fifth Baveno International Consensus Workshop. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2011: 103-115
- 15 Escorsell A, Bosch J. Self-expandable metal stents in the treatment of acute esophageal variceal bleeding. *Gastroenterol Res Pract* 2011; 2011: 910986
- 16 Zehetner J, Shamiyeh A, Wayand W, Hubmann R. Results of a new method to stop acute bleeding from esophageal varices: implantation of a self-expanding stent. *Surg Endosc* 2008; 22: 2149-2152
- 17 Wright G, Lewis H, Hogan B, Burroughs A, Patch D, O'Beirne J. A self-expanding metal stent for complicated variceal hemorrhage: experience at a single center. *Gastrointest Endosc* 2010; 71: 71-78
- 18 Corbett C, Mangat K, Olliff S, Tripathi D. The role of Transjugular Intrahepatic Portosystemic Stent-Shunt (TIPSS) in the management of variceal hemorrhage. *Liver Int* 2012; 32: 1493-1504
- 19 Harrison P, Karani J. Secondary prophylaxis of oesophageal variceal haemorrhage: a role for transjugular intrahepatic portosystemic shunt? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 591-593
- 20 Hermann RE, Henderson JM, Vogt DP, Mayes JT, Geisinger MA, Agnor C. Fifty years of surgery for portal hypertension at the Cleveland Clinic Foundation. Lessons and prospects. *Ann Surg* 1995; 221: 459-466; discussion 466-468
- 21 Thabut D, Rudler M, Lebrec D. Early TIPS with covered stents in high-risk patients with cirrhosis presenting with variceal bleeding: are we ready to dive into the deep end of the pool? *J Hepatol* 2011; 55: 1148-1149
- 22 Pomier-Layrargues G, Bouchard L, Lafortune M, Bissonnette J, Guérette D, Perreault P. The transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the treatment of portal hypertension: current status. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 167868
- 23 García-Pagán JC, Reverter E, Abalades JG, Bosch J. Acute variceal bleeding. *Semin Respir Crit Care Med* 2012; 33: 46-54
- 24 Popovic P, Stabuc B, Skok P, Surlan M. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus endoscopic sclerotherapy in the elective treatment of recurrent variceal bleeding. *J Int Med Res* 2010; 38: 1121-1133
- 25 Hidaka H, Nakazawa T, Wang G, Kokubu S, Minamoto T, Takada J, Tanaka Y, Okuwaki Y, Watanabe M, Tanabe S, Shibuya A, Koizumi W. Long-term administration of PPI reduces treatment failures after esophageal variceal band ligation: a randomized, controlled trial. *J Gastroenterol* 2012; 47: 118-126
- 26 Addley J, Tham TC, Cash WJ. Use of portal pressure studies in the management of variceal haemorrhage. *World J Gastrointest Endosc* 2012; 4: 281-289
- 27 Thalheimer U, Bellis L, Puoti C, Burroughs AK. Should we routinely measure portal pressure in patients with cirrhosis, using hepatic venous pressure gradient (HVPG) as a guide for prophylaxis and therapy of bleeding and rebleeding? *No. Eur J Intern Med* 2011; 22: 5-7
- 28 Bosch J, Abalades JG, Berzigotti A, García-Pagan JC. The clinical use of HVPG measurements in chronic liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 573-582
- 29 Muntaner L, Altamirano JT, Augustin S, González A, Esteban R, Guardia J, Genescà J. High doses of beta-blockers and alcohol abstinence improve long-term rebleeding and mortality in cirrhotic patients after an acute variceal bleeding. *Liver Int* 2010; 30: 1123-1130
- 30 Lo GH. The role of endoscopy in secondary prophylaxis of esophageal varices. *Clin Liver Dis* 2010; 14: 307-323
- 31 Ravipati M, Katragadda S, Swaminathan PD, Molnar J, Zarling E. Pharmacotherapy plus endoscopic intervention is more effective than pharmacotherapy or endoscopy alone in the secondary prevention of esophageal variceal bleeding: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 658-664. e5
- 32 Ayoub WS, Nguyen MH. Combination of pharmacologic and endoscopic therapy for the secondary prevention of esophageal variceal bleeding. *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 665-667
- 33 Thiele M, Krag A, Rohde U, Gluud LL. Meta-analysis: banding ligation and medical interventions for the prevention of rebleeding from oesophageal varices. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 1155-1165
- 34 Ding SH, Liu J, Wang JP. Efficacy of beta-adrenergic blocker plus 5-isosorbide mononitrate and endoscopic band ligation for prophylaxis of esophageal variceal rebleeding: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2151-2155
- 35 Kumar A, Jha SK, Sharma P, Dubey S, Tyagi P, Sharma BC, Sarin SK. Addition of propranolol and isosorbide mononitrate to endoscopic variceal ligation does not reduce variceal rebleeding incidence. *Gastroenterology* 2009; 137: 892-901, 901. e1
- 36 Ahmad I, Khan AA, Alam A, Butt AK, Shafqat

- F, Sarwar S. Propranolol, isosorbide mononitrate and endoscopic band ligation - alone or in varying combinations for the prevention of esophageal variceal rebleeding. *J Coll Physicians Surg Pak* 2009; 19: 283-286
- 37 Villanueva C, Aracil C, Colomo A, Lopez-Balaguer JM, Piqueras M, Gonzalez B, Torras X, Guarner C, Balanzo J. Clinical trial: a randomized controlled study on prevention of variceal rebleeding comparing nadolol + ligation vs. hepatic venous pressure gradient-guided pharmacological therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 397-408
- 38 González A, Augustin S, Dot J, Pérez M, Abu-Suboh M, Romero A, Segarra A, Armengol JR, Esteban R, Guardia J, Genescà J. Adding banding ligation is effective as rescue therapy to prevent variceal rebleeding in haemodynamic non-responders to pharmacological therapy. *Dig Liver Dis* 2012; 44: 55-60
- 39 Grothaus J, Petrasch F, Zeynalova S, Mössner J, Schiefke I, Hoffmeister A. Risk factors for bleeding complications after endoscopic variceal ligation therapy. *Z Gastroenterol* 2010; 48: 1200-1206
- 40 Yang MT, Chen HS, Lee HC, Lin CL. Risk factors and survival of early bleeding after esophageal variceal ligation. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1705-1709
- 41 Benedeto-Stojanov D, Nagorni A, Mladenović B, Stojanov D, Denić N. [Risk and causes of gastroesophageal bleeding in patients with liver cirrhosis]. *Vojnosanit Pregl* 2007; 64: 585-589
- 42 Altamirano J, Augustin S, Muntaner L, Zapata L, González-Angulo A, Martínez B, Flores-Arroyo A, Camargo L, Genescà J. [Predicting very early rebleeding after acute variceal bleeding based in classification and regression tree analysis (CARTA)]. *Rev Gastroenterol Mex* 2010; 75: 12-21
- 43 Krige JE, Kotze UK, Distiller G, Shaw JM, Bornman PC. Predictive factors for rebleeding and death in alcoholic cirrhotic patients with acute variceal bleeding: a multivariate analysis. *World J Surg* 2009; 33: 2127-2135
- 44 Wang MT, Liu T, Ma XQ, He J. Prognostic factors associated with rebleeding in cirrhotic inpatients complicated with esophageal variceal bleeding. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 1493-1497
- 45 Silkauskaitė V, Pranculis A, Mitraite D, Jonaitis L, Petrenkiene V, Kupcinskis L. Hepatic venous pressure gradient measurement in patients with liver cirrhosis: a correlation with disease severity and variceal bleeding. *Medicina (Kaunas)* 2009; 45: 8-13
- 46 Khuroo MS, Khuroo NS, Farahat KL, Khuroo YS, Sofi AA, Dahab ST. Meta-analysis: endoscopic variceal ligation for primary prophylaxis of oesophageal variceal bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 347-361
- 47 Brown MR, Jones G, Nash KL, Wright M, Guha IN. Antibiotic prophylaxis in variceal hemorrhage: timing, effectiveness and *Clostridium difficile* rates. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5317-5323
- 48 Ouakaa-Kchaou A, Kharrat J, Mir K, Houda B, Abdelli N, Ajmi S, Azzouz M, Ben Abdallah H, Ben Mami N, Bouzaidi S, Chouaib S, Golli L, Melki W, Najjar T, Safar H, Belhadj N, Ghorbel A. Variceal band ligation in the prevention of variceal bleeding: a multicenter trial. *Saudi J Gastroenterol* 2011; 17: 105-109
- 49 Bellot P, Jara Pérez López N, Martínez Moreno B, Such J. [Current problems in the prevention and treatment of infections in patients with cirrhosis]. *Gastroenterol Hepatol* 2010; 33: 729-740
- 50 Augustin S, González A, Genescà J. Acute esophageal variceal bleeding: Current strategies and new perspectives. *World J Hepatol* 2010; 2: 261-274
- 51 Chavez-Tapia NC, Barrientos-Gutierrez T, Tellez-Avila FI, Soares-Weiser K, Uribe M. Antibiotic prophylaxis for cirrhotic patients with upper gastrointestinal bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (9): CD002907

#### ■同行评价

本文结合近年来的文献,总结了食管静脉曲张套扎后再出血发生的原因、预防手段和治疗进展,对临床有一定指导意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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 •

### WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 被 Science Citation Index Expanded (SCIE) 和 MEDLINE 等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力。WJG 在 PubMed Central (PMC) 统计, 单月独立 IP 地址访问 58 257 次, 全文网络版 (HTML Full Text) 下载 94 888 次, 全文 PDF 下载 59 694 次。另外根据基本科学指标库 (essential science indicators) 统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE 检索的临床医学 (clinical medicine) 期刊有 1 105 种, 总被引频次排名, WJG 位于第 174 名。 (2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

# 全身 $\gamma$ 刀治疗中晚期胰腺癌的研究进展

刘智慧, 孙大庆

## ■背景资料

胰腺癌是恶性程度极高的消化系统肿瘤, 受解剖位置和胰腺癌生物学特性的影响, 发现时多数已有周围组织器官侵犯和远处转移, 15%-20%的患者有机会行早期切除, 术后局部复发率高, 并且手术后生存率低。虽然手术、放疗和化疗等手段不断改进, 但其预后仍旧很差, 因此对多数胰腺癌患者治疗的目的为缓解症状, 包括疼痛、疲劳、消化不良、梗阻、血栓栓塞和恶病质等。目前国内外针对不可切除的中晚期胰腺癌的治疗手段有单纯放疗、放疗化疗结合、单纯5-FU/吉西他滨化疗等, 但是这些方法对生存期无明显延长, 因此对于中晚期胰腺癌的治疗还需要继续探索新的治疗方案。

## ■同行评议者

李革, 副教授, 延边大学附属医院

刘智慧, 孙大庆, 中国人民解放军第八十九中心医院放疗科  
山东省潍坊市 261021

刘智慧, 副主任医师, 主要从事肿瘤精确放射治疗方面的研究。

作者贡献分布: 刘智慧设计此论文; 论述过程主要由刘智慧与孙大庆完成。

通讯作者: 刘智慧, 副主任医师, 261021, 山东省潍坊市北宫西街256号, 中国人民解放军第八十九中心医院放疗科。

lzh6699@hotmail.com

电话: 0536-8439240

收稿日期: 2012-08-14 修回日期: 2012-08-31

接受日期: 2012-09-20 在线出版日期: 2012-10-18

## Overview of whole body gamma knife for locally advanced pancreatic cancer

Zhi-Hui Liu, Da-Qing Sun

Zhi-Hui Liu, Da-Qing Sun, Department of Radiation Oncology, the 89th Hospital of Chinese PLA, Weifang 261021, Shandong Province, China

Correspondence to: Zhi-Hui Liu, Associate Chief Physician, Department of Radiation Oncology, the 89th Hospital of Chinese PLA, 256 Beigong West Road, Weifang 261021, Shandong Province, China. lzh6699@hotmail.com

Received: 2012-08-14 Revised: 2012-08-31

Accepted: 2012-09-20 Published online: 2012-10-18

## Abstract

Pancreatic cancer is a disease that seriously threatens the health of human beings. The treatment options currently available for pancreatic cancer are still limited. In this article, we describe the principle of whole body gamma knife and SBRT (a treatment similar to whole body gamma knife) for the treatment of advanced pancreatic cancer. By improving the absorbed dose in the lesion, whole body gamma knife can control tumor progression and improve survival in patients with pancreatic cancer with low side effects. Despite that controversy still exists, the advantages of SBRT in the treatment of pancreatic cancer have been gradually recognized in foreign countries.

Key Words: Whole body gamma knife; Pancreatic cancer; Stereotactic body radiation therapy

Liu ZH, Sun DQ. Overview of whole body gamma knife for locally advanced pancreatic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2800-2805

## 摘要

胰腺癌是严重威胁人类健康的疾病之一, 但是针对其的有效治疗方法依然非常有限。本文概述了国内全身伽玛刀治疗中晚期胰腺癌的原理和疗效等, 简要描述了国外类似的体部立体定向放射治疗(stereotactic body radiation therapy, SBRT)中晚期胰腺癌的情况。总之, 国内用全身伽玛刀治疗胰腺癌提高了患者的生存率, 不良反应小, 对肿瘤进展有较好的控制, 这主要是根据伽玛刀的原理提高了病灶区的吸收剂量。尽管国外对与全身伽玛刀作用类似的SBRT治疗的优势仍存在争议, 但是他们也逐渐认识到了使用SBRT治疗胰腺癌的一些优点。

关键词: 全身伽玛刀; 胰腺癌; 体部立体定向放射治疗

刘智慧, 孙大庆. 全身 $\gamma$ 刀治疗中晚期胰腺癌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(29): 2800-2805

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2800.asp>

## 0 引言

胰腺癌被称为癌中之王, 是恶性程度极高的消化系统肿瘤, 受解剖位置深和胰腺癌生物学特性的影响, 发现时多数已有周围组织器官侵犯和远处转移。进展期胰腺癌的中位生存期 $<6$  mo, 诊断后1年存活率18%<sup>[1-4]</sup>, 且仅有15%-20%的患者有机会行早期切除<sup>[5]</sup>。术后局部复发率可达50%-75%<sup>[6,7]</sup>, 而且手术后患者的5年生存率也只有10%-25%<sup>[8]</sup>。各期患者诊断后1年、3年和5年生存率分别为16%、5%和4%<sup>[9]</sup>。80%以上的胰腺癌不能被切除<sup>[10,11]</sup>。虽然手术、放疗和化疗等手段的不断改进, 但其预后仍旧很差。因此对多数胰腺癌患者治疗的目的为缓解症状, 包括疼痛、疲劳、消化不良、梗阻、血栓栓塞和恶病质等。目前国内外针对不可切除的中晚期胰腺癌的治疗手段有单纯放疗(3D-CRT、IMRT和SBRT)<sup>[12-15]</sup>、放疗化疗结合<sup>[16,17]</sup>和单纯5-FU/吉西他滨化疗等<sup>[18,19]</sup>, 但是这些方法对生存期无明显延长, 单纯化疗的患者平均生存期为4.6-10.0 mo, 单纯三维适形放疗的患者平均生存期为

4.0-12.6 mo<sup>[20]</sup>. 因此对于中晚期胰腺癌的治疗还需要继续探索新的治疗方案.

## 1 全身 $\gamma$ 刀及其剂量分布特点

**1.1 设备简介** 全身 $\gamma$ 刀是立体定向伽玛射线全身治疗系统的简称, 是我国科技人员在头部旋转式基础上研发的新技术, 是一类可以对全身各部位肿瘤实施立体定向放射治疗的唯一拥有完整自主知识产权的国产大型医疗设备. 从1998年10月OUR-QGD型全身开始试用于临床, 至今已有多机种在全国各地100多家医院广泛使用, 治疗数万例, 已成为我国重要的放疗手段之一. 目前国内主要机型有: 1999年国家批准临床应用的OUR-QGD型全身; 2003年准入的SGS-1型超级; 2004年准入的KLF-A型OPEN式全身; 2004年投入临床应用的月亮神全身以及陀螺旋转式Co60放射外科治疗系统(陀螺刀)等.

**1.2 全身 $\gamma$ 刀的剂量分布特点** 体部治疗过程中源体旋转形成非共面旋转照射, 这种多源旋转聚焦形成的剂量分布具有很好的剂量聚焦特性, 采用50%等剂量线作为处方剂量具有靶区内剂量高, 靶区外低剂量区较小的特点, 具有“刀”的特征, 尤其适用于胰腺癌病灶周围有不能耐受高剂量照射且重要的组织和器官. 这种剂量分布与加速器有限射野形成的剂量分布有很大差别: (1)类似于质子线的Bragg峰<sup>[21]</sup>: 体部采用多源多束射线旋转聚焦, 剂量高度集中, 焦点处剂量最大, 周边剂量下降陡峭, 剂量分布类似于质子线的Bragg峰; (2)有粒子植入的剂量分布特点: 通过静态和动态2次聚焦后形成的高剂量点在肿瘤内叠加形成一个高剂量区, 剂量线分布呈同心圆状密集排列, 高剂量范围较小, 类似于粒子植入的剂量分布. 小肿瘤用一个焦点形成的峰值剂量就能很好包绕肿瘤, 大肿瘤采用多个焦点填充可获得理想的剂量分布, 根据治疗需要和周围正常组织的剂量耐受, 选择适当的剂量线给予剂量; (3)适形度相对差、剂量分布不均匀: 中心和边缘剂量相差1倍左右, 但高剂量区均在靶区内, 且向靶区内层层递增, 越是在肿瘤内部, 剂量越高, 对肿瘤细胞的杀伤作用也越强. 一般情况下, 靶区中心肿瘤细胞密度大, 乏氧细胞集中, 这种向靶区内层层递增的同心圆状剂量分布(夏廷毅教授形象地称之为洋葱皮样剂量曲线)是优势而不是劣势<sup>[22]</sup>.

## 2 全身 $\gamma$ 刀治疗胰腺癌的机制、优点和适应症

胰腺位于腹膜后, 受呼吸等生理活动的影响小,

有接受高剂量照射的条件, 胰腺组织本身可以接受高剂量照射, 有文献报道, 在保证正常组织处于安全剂量的前提下胰腺癌的最高耐受剂量为64.8 Gy<sup>[23]</sup>, 与胰头相邻的十二指肠和胰体尾相邻的胃有50 Gy的放疗耐受量<sup>[24]</sup>, 在小范围受照射时剂量还可以提升. 因此, 对小体积胰腺癌实施高剂量照射是完全可行的.

月亮神全身 $\gamma$ 刀是精确放射治疗的一种设备, 利用几何立体聚焦的原理, 将扇面分布的42颗Co60源产生的多束伽玛射线沿固定轴线做360度旋转聚焦(即实现静态、动态2次聚焦), 进行多靶点、多角度的旋转拉弧照射, 达到断层填充式三维适形放疗的目的, 可根据治疗需要实现一定程度的调强放射治疗. 其高度聚焦的特点提高了靶区精确性和靶区剂量, 使胰腺癌病灶得到根治剂量的照射, 而周围正常组织仅受到可耐受的小剂量照射, 从而有效提高局部控制率, 降低并发症的发生. 治疗过程由计算机控制, 可同时治疗多个病灶, 治疗不受胰腺癌病灶大小、形状、部位、临床分期和是否有邻近器官转移的限制, 尤其是年龄较大或有其他疾病不能耐受手术者, 均可给予治疗. 治疗过程中患者无痛、无创、无出血、无需麻醉, 治疗简便、安全、可靠, 在清醒状态下完成, 有些患者甚至可以一边治疗一边工作. 所以, 胰腺各部位实体肿瘤不论大小均可实施治疗, 但有重要脏器功能严重损害、恶液质等情况者不适合该方法.

## 3 全身 $\gamma$ 刀治疗胰腺癌疗效分析

随着放疗和影像设备的不断发展, 立体定向放射治疗已在国内外广泛开展, 国外利用改良的直线加速器、射波刀、医用直线加速器、体部伽玛刀、螺旋断层放疗系统等开展的此类治疗方法称为SBRT, 即体部立体定向放射治疗. 但是具体SBRT的最多分割次数, 每次的最小照射剂量、照射区的最大直径目前都还没有统一的标准<sup>[25]</sup>. 与其他外照射放射治疗相比, 理论上, SBRT的最主要的特征和优势是高剂量照射, 小分割(1-5次), 治疗时间缩短, 治疗反应改善<sup>[16]</sup>. 在国内主要利用 $\gamma$ 刀开展SBRT治疗, 且目前已有许多肿瘤放射治疗中心利用体部 $\gamma$ 刀展开了对中晚期胰腺癌的治疗和研究. 空军总医院的常东姝等<sup>[26]</sup>报道了一组局部晚期胰腺癌伽玛刀治疗的临床研究结果. 他们以50%等剂量线为处方剂量, 胰头癌3-4 Gy/次、胰体尾癌4-5 Gy/次分割模式, 5次/w, PTV边缘总剂量40-50 Gy, GTV

### ■研究前沿

胰腺位于腹膜后, 受呼吸等生理运动的影响小, 有接受高剂量照射的条件, 胰腺组织本身可以接受高剂量照射, 在保证正常组织处于安全剂量的前提下胰腺癌的最高耐受剂量为64.8 Gy, 与胰头相邻的十二指肠和胰体尾相邻的胃有50 Gy的放疗耐受量, 在小范围受照射时剂量还可以提升.



## ■应用要点

高度聚焦的特点提高了靶区精确性和靶区剂量,使胰腺癌病灶得到根治剂量的照射,提高了局部控制率,而周围正常组织仅受到可耐受的小剂量照射,从而降低并发症的发生。因此,体部 $\gamma$ 刀是失去手术机会或因其他原因不能手术以及不愿手术治疗的胰腺癌患者的良好治疗方法。

边缘60-70 Gy,结果显示原发灶完全缓解率为29.7%,部分缓解率为42.3%,总有效率为72.1%。1、2、3年总生存率分别为49.3%、24.5%、18.1%。I+II期1、2、3、4、5年总生存率分别为68%、34%、30%、21%、17%;III期1、2、3年总生存率分别为28%、14%、4%,治疗不良反应主要是急性胃肠道反应,如恶心、呕吐和腹泻,但是多数耐受。武警上海总医院徐周敏等<sup>[27]</sup>采用SGS-I型立体定向伽玛射线体部治疗系统治疗了79例晚期胰腺癌患者,他们采取在CTV边缘外放5-10 mm形成PTV,等剂量线为50%-60%,肿瘤 $\leq 5$  cm的单次周边剂量3.5-4.5 Gy,肿瘤 $> 5$  cm的单次周边剂量3.0-4.0 Gy,治疗总剂量35-48 Gy,治疗次数9-11次,5次/w,结果显示治疗过程中88.9%的患者上腹部及腰部疼痛明显减轻,66.7%的患者黄疸指数下降,总有效率(CR+PR)为32.9%。中国人民解放军363医院肿瘤科虞晓林等<sup>[28]</sup>采用OUR-QGD型立体定向旋转式伽玛射线全身治疗系统治疗中晚期胰腺癌156例,他们根据病灶的形状、大小及患者的身体状况,确定治疗次数和分次剂量,取50%-60%的等剂量线,单次剂量3.0-4.5 Gy,治疗10-14次,1次/d,总剂量40-45 Gy,治疗结束后2-6 mo CT复查,完全缓解率为12.8%,部分缓解率73.1%,病情稳定者占10.3%,病情进展者占11.5%,治疗后6 mo生存138例占88.5%,1年生存率40.4%,2年生存率11.5%,而不良反应未见穿孔、大出血和持续高热等严重并发症。

国内还有部分肿瘤放疗中心采用体部联合化疗的方案治疗中晚期胰腺癌,也取得了不错的疗效。例如解放军82医院采用体部联合GP方案化疗中晚期胰腺癌<sup>[29]</sup>,海军总医院夏念信等<sup>[30]</sup>采用双途径化疗(区域动脉灌注和全身静脉化疗)联合治疗局部晚期胰腺癌,解放军第452医院采用全身伽玛刀配合卡莫氟治疗晚期胰腺癌<sup>[31]</sup>,结果显示这些方法均能不同程度提高患者的临床客观疗效,缓解疼痛,降低肿瘤标志物CA199和CEA的表达,提高累积生存率,延长中位生存期。需要指出的是放化疗同步虽然能增加局部疗效而且可以减少或消灭远处转移灶,但是会增加全身毒性或增加局部毒性反应。

国内多家肿瘤治疗中心在采用治疗胰腺癌的过程中还进行了其他探索。比如武警山西总队医院采用联合复方苦参注射液的方案治疗局部晚期胰腺癌,他们认为联合复方苦参注射液的治疗方案可以减轻不良反应,增强疗效<sup>[32]</sup>。第

二炮兵总医院将其与DC免疫治疗结合起来治疗中晚期胰腺癌,他们发现患者的放疗敏感性和耐受性均有提高,同时患者的生存质量也得到了改善<sup>[33]</sup>。大连大学医学院附属医院采用金龙胶囊联合方案治疗晚期胰腺癌,发现胰腺癌的治疗有效率从52.6%提高到76.3%,他们认为此联合治疗方案可以提高患者临床收益率,改善晚期患者的生活质量<sup>[34]</sup>。

综合国内报道发现,总体上治疗中晚期胰腺癌的近期疗效乐观。国内放疗中心大多采用50%-60%的等剂量曲线,最大等剂量曲线为90%<sup>[35]</sup>,95%等剂量线覆盖PTV;平均治疗剂量为300-500 cGy/次,最高者达800 cGy/次<sup>[36]</sup>;治疗分次数从5次到17次不等,但多采用10-12分次;治疗次数为3-6次/w,部分单位采用隔日治疗方式<sup>[36,37]</sup>;总治疗剂量从30 Gy到52 Gy不等;观察患者例数从16例到156例不等;观察时间从6 mo到24 mo不等。治疗后止痛率几乎均在85%以上,个别报道甚至高达98.7%;退黄率约为65%,个别报道达95%以上<sup>[38]</sup>;部分缓解率为31.6%-73.1%;治疗后1年生存率为37.5%-76.8%。对于胰腺癌这一能够迅速致死的疾病,一般采取姑息治疗,提高晚期患者的生活质量是根本的治疗目的。通过上述统计数据,体部治疗胰腺癌能够达到早中期胰腺癌的术后1年生存率,在止痛、退黄方面的作用尤其明显。另外值得注意的是,统计结果差异较大,这主要是因为目前国内统计的治疗中晚期胰腺癌患者病例数偏少、入组分期标准不统一、胰腺癌的具体部位、侵犯范围、转移范围及治疗完成后复查时间等不一致所致。

## 4 全身 $\gamma$ 刀治疗胰腺癌并发症与处理

治疗胰腺癌的不良反应主要是消化道反应和造血系统毒性反应。消化道反应可分为早期反应和晚期反应。早期反应主要是治疗期间出现胃肠反应,约占60%左右,表现为上腹部不适、恶心、呕吐和返酸等情况,少数伴轻度腹痛、腹泻和肠蠕动亢进。但多数可耐受,经给予胃复安等药物对症处理,症状减轻后均能继续治疗。晚期反应在治疗后1 mo左右出现上腹痛,胃镜下可见胃或十二指肠小溃疡,发生率仅占5%左右,用强抑酸剂(如洛塞克)治疗有效,2-3 mo溃疡愈合,疼痛消失。造血系统毒性反应主要是轻度骨髓抑制如白细胞和血小板减少,未见出血和穿孔报道。

## 5 国外SBRT治疗不可切除胰腺癌的现状

国外SBRT治疗中晚期胰腺癌与国内相比在采

用的仪器、治疗次数、照射剂量方面略有不同. 他们多在图像引导下将处方剂量分割1-5次进行<sup>[39]</sup>, Chang等<sup>[40]</sup>认为SBRT的优势在于减少了治疗时间, 增加了治疗剂量, 极少因毒性反应等中断系统的胰腺癌治疗. Koong等<sup>[41,42]</sup>在SBRT治疗不可切除胰腺癌的I期临床试验中发现患者可以耐受单次25 Gy的照射, 全部6名受试患者局部控制率达到100%, 中位生存率提高4.5 mo. 随后的II期试验采用5-FU为主的放化疗结合+25 Gy SBRT照射, 结果显示局部控制率提高到94%左右, 但远处转移并未明显改善, 且19名受试者中有2名出现三级毒性反应, 16名受试者出现十二指肠溃疡. Hoyer等<sup>[43]</sup>也进行了一项22例患者的SBRT II期临床试验, 照射区域为病灶及周围水肿区, 剂量45 Gy, 分3次, 结果显示局部控制率57%, 少数患者出现急性和慢性毒性反应. Schellenberg等<sup>[44]</sup>对16例患者采用吉西他滨化疗+单次25 Gy SBRT方案治疗, 结果显示3例局部控制失败, 15例出现远处转移, 总的平均存活时间为11 mo. Mahadevan等<sup>[45]</sup>亦用吉西他滨+SBRT的方法对36例不可切除且没有转移的患者进行了治疗, 小肠区域照射剂量每次<10 Gy, 病灶区剂量24-36 Gy, 分3次, 结果示局部控制率为78%, 中位生存期14.3 mo. 随后该小组又进行了一项47例不可切除胰腺癌患者的治疗研究<sup>[46]</sup>, 47例患者在吉西他滨化疗2个疗程后8例出现转移, 剩余的39例患者在第3和第4疗程化疗中间接受SBRT治疗(24-36 Gy, 分3次, 不中断化疗), 中位随访期21 mo(6-36 mo), 结果示所有接受SBRT治疗患者的中位生存期为20 mo, 局部控制率85%, 54%的患者出现远处转移, 晚期毒性反应出现率9%. 匹兹堡大学<sup>[47]</sup>近期又报道了一项71例胰腺癌患者的SBRT治疗结果, 患者中包括局部不可切除者40例、局部复发者11例、转移者8例、切除后边缘阳性者12例, 67例患者予18-25 Gy单次照射, 其余患者行分次照射, 结果显示总的局部控制率为65%, 中位生存期为10 mo. Seo等<sup>[48]</sup>回顾性报道了最大的一组SBRT结果: 40 Gy, 20次照射后予15-17 Gy的SBRT单次照射, 结果显示1年后局部无进展生存率为70%. Lomin-ska等<sup>[49]</sup>对28例胰腺癌患者采用常规放疗+SBRT治疗, 常规放疗中位剂量50.4 Gy, SBRT剂量20-30 Gy, 分3-5次, 其中14例可评估的患者中有12例局部无进展, 控制率达85.7%, 3例患者出现部分毒性反应, 9例患者病情稳定, 总的中位生

存期5.9 mo, 1年存活率18%. Goyal等<sup>[50]</sup>也报道了一组不可切除胰腺癌的SBRT治疗结果, 平均剂量25 Gy(22-30 Gy), 分1-3次, 其中68%的患者接受过化疗, 结果示SBRT后3、6 mo, 病灶体积分别缩小21%、38%; SBRT治疗后6、12 mo的局部无进展率分别为88%、65%; 6、12 mo存活率分别为89%和56%; 1、2级毒性反应率为11%; 3级毒性反应率为16%. 日本学者Kurahara等<sup>[51]</sup>认为联合立体定向放射治疗和相对敏感的化疗治疗对已广泛转移的胰腺癌患者是一种有效的方法. 因此, SBRT治疗中晚期胰腺癌局部控制率可观, 毒性反应较小, 疗程短, 是治疗中晚期胰腺癌的一种不可或缺的方法.

## 6 结论

国外学者一直认为SBRT由于呼吸及身体的运动而很难严格执行, 并且不能确定预设剂量的传递及肿瘤轮廓的不可控性, 因此对与这方面的研究并不是很广泛. 但是如前所述, SBRT治疗恶性肿瘤的优越性正被逐步认可. 一直以来, 中晚期胰腺癌治疗失败多因肿瘤局部复发引起, 其次为远处转移, 因此局部控制非常重要, 不能把过多的注意力放在远处转移上, 但是一般传统放疗剂量为45-50 Gy, 这并不利于局部控制病灶<sup>[11,52,53]</sup>. 因此我们认为寻找一种更好的技术使作用于病灶的辐射剂量更高将极大提高中晚期胰腺癌的疗效, 而体部 $\gamma$ 刀就是一种合适的手段. 这从国内研究的统计数据可以看出: 胰腺癌由于受解剖位置深和独特生物学特性的影响, 早期易侵犯周围组织器官和远处转移, 手术难度大、切除率低、并发症发生率高, 化疗和普通放疗效果不佳, 所以探讨胰腺癌的有效治疗方法就成了提高其治疗效果、延长寿命、提高生存质量的关键. 高度聚焦的特点提高了靶区精确性和靶区剂量, 使胰腺癌病灶得到根治剂量的照射, 提高了局部控制率, 而周围正常组织仅受到可耐受的小剂量照射, 从而降低并发症的发生<sup>[54]</sup>. 因此, 体部 $\gamma$ 刀是失去手术机会或因其他原因不能手术以及不愿手术治疗的胰腺癌患者的良好治疗方法. 使用体部 $\gamma$ 刀治疗胰腺癌可以有效地控制肿瘤, 使肿瘤退缩, 解除梗阻, 消退黄疸. 由于患者症状缓解迅速, 食欲增加, 有效地提高了患者的生存质量. 其安全性高, 无显著不良反应.

我们采用体部 $\gamma$ 刀已治疗多例胰腺癌病例, 取得了良好的治疗效果<sup>[55]</sup>. 国内已有多家医院开

## ■同行评价

本文较详细地介绍了体部伽玛刀在国内的应用情况和取得的良好效果, 论文条理清晰, 有一定的可读性, 对临床治疗胰腺癌有一定的参考价值.

展此治疗,但因取得胰腺癌肿瘤组织困难,故未见有与病理变化联系密切的研究,多数研究仅限于胰腺癌治疗的临床观察、疗效分析等。结合组织病理学的个体化治疗有待探索。

## 7 参考文献

- Berlin JD, Catalano P, Thomas JP, Kugler JW, Haller DG, Benson AB. Phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2297. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3270-3275
- Burriss HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403-2413
- Colucci G, Labianca R, Di Costanzo F, Gebbia V, Carteni G, Massidda B, Dapretto E, Manzione L, Piazza E, Sannicolò M, Ciaparrone M, Cavanna L, Giuliani F, Maiello E, Testa A, Pederzoli P, Falconi M, Gallo C, Di Maio M, Perrone F. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1645-1651
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasiński M, Parulekar W. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960-1966
- Loos M, Kleeff J, Friess H, Büchler MW. Surgical treatment of pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1138: 169-180
- Griffin JF, Smalley SR, Jewell W, Paradelo JC, Raymond RD, Hassanein RE, Evans RG. Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer* 1990; 66: 56-61
- Tepper J, Nardi G, Sutt H. Carcinoma of the pancreas: review of MGH experience from 1963 to 1973. Analysis of surgical failure and implications for radiation therapy. *Cancer* 1976; 37: 1519-1524
- Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sitzmann JV, Hruban RH, Goodman SN, Dooley WC, Coleman J, Pitt HA. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg* 1995; 221: 721-731; discussion 731-733
- Faivre J, Forman D, Estève J, Obradovic M, Sant M. Survival of patients with primary liver cancer, pancreatic cancer and biliary tract cancer in Europe. EUROCARE Working Group. *Eur J Cancer* 1998; 34: 2184-2190
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011; 378: 607-620
- Philip PA. Locally advanced pancreatic cancer: where should we go from here? *J Clin Oncol* 2011; 29: 4066-4068
- 黄巍, 赵玲, 刘士新. 三维适形放射治疗中晚期胰腺癌的近期疗效观察. *实用肿瘤学杂志* 2007; 21: 35-36
- Wang F, Kumar P. The role of radiotherapy in management of pancreatic cancer. *J Gastrointest Oncol* 2011; 2: 157-167
- Yovino S, Maidment BW, Herman JM, Pandya N, Goloubeva O, Wolfgang C, Schulick R, Laheru D, Hanna N, Alexander R, Regine WF. Analysis of local control in patients receiving IMRT for resected pancreatic cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 83: 916-920
- Scorsetti M, Bignardi M, Alongi F, Fogliata A, Mancosu P, Navarria P, Castiglioni S, Pentimalli S, Tozzi A, Cozzi L. Stereotactic body radiation therapy for abdominal targets using volumetric intensity modulated arc therapy with RapidArc: feasibility and clinical preliminary results. *Acta Oncol* 2011; 50: 528-538
- Klautke G, Brunner TB. Radiotherapy in pancreatic cancer. *Strahlenther Onkol* 2008; 184: 557-564
- Wang BH, Cao WM, Yu J, Wang XL. Gemcitabine-based Concurrent Chemoradiotherapy Versus Chemotherapy Alone in Patients with Locally Advanced Pancreatic Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 2129-2132
- Inal A, Ciltas A, Yildiz R, Berk V, Kos FT, Dane F, Unek IT, Colak D, Ozdemir NY, Buyukberber S, Gumus M, Ozkan M, Isikdogan A. Long term survivors with metastatic pancreatic cancer treated with gemcitabine alone or plus Cisplatin: a retrospective analysis of an anatolian society of medical oncology multicenter study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 1841-1844
- Xie DR, Liang HL, Wang Y, Guo SS, Yang Q. Meta-analysis on inoperable pancreatic cancer: a comparison between gemcitabine-based combination therapy and gemcitabine alone. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6973-6981
- 朱广迎. 放射肿瘤学. 第2版. 北京: 科学技术文献出版社, 2009: 389-390
- 夏廷毅, 李宏奇, 王颖杰, 李平, 孙庆选, 范乃斌, 于勇. 全身伽玛刀治疗不能手术I和II期非小细胞肺癌的临床效果. *中华放射肿瘤杂志* 2007; 1: 91-97
- 吴伟章, 李宏奇, 王颖杰, 王进, 王勇, 夏廷毅. 胰腺癌和加速器治疗计划剂量学比较. *中国医学物理学杂志* 2010; 27: 1984-1986
- Brown MW, Ning H, Arora B, Albert PS, Poggi M, Camphausen K, Citrin D. A dosimetric analysis of dose escalation using two intensity-modulated radiation therapy techniques in locally advanced pancreatic carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 274-283
- Oberdiac P, Mineur L. [Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: the stomach]. *Cancer Radiother* 2010; 14: 336-339
- Fuss M, Thomas CR. Stereotactic body radiation therapy: an ablative treatment option for primary and secondary liver tumors. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 130-138
- 常冬姝, 夏廷毅, 李平, 孙庆选, 王颖杰, 李宏奇, 范乃斌, 吴伟章. 全身γ刀治疗局限期胰腺癌临床结果分析. *中华放射肿瘤学* 2009; 18: 470-473
- 徐周敏, 陈焱, 裴峰, 陈坚, 高巍然, 瞿琴, 孔祥军. 体部伽玛刀治疗晚期胰腺癌的临床分析. *现代肿瘤医学* 2011; 19: 1164-1166
- 虞晓林, 罗卫华, 李昌林, 蒙荣钦, 张光宇, 王阳, 周国懿. 体部伽玛刀治疗中晚期胰腺癌156例临床疗效观察. *现代肿瘤医学* 2011; 19: 1379-1380
- 刘永新, 张建宇, 马震宇, 山顺林. 体部伽玛刀联合GP

- 方案治疗中晚期胰腺癌33例近期疗效观察. 现代肿瘤医学 2009; 17: 709-711
- 30 夏念信, 邱宝安, 温居一, 祝建勇, 刘澎. 双途径化疗联合伽玛刀治疗局部晚期胰腺癌12例. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1888-1893
- 31 李迎春, 李宏斌, 陈成宏, 张小玉, 苏皓, 陈波. 立体定向放射配合卡莫氟治疗晚期胰腺癌近期疗效观察. 四川医学 2008; 29: 834-835
- 32 袁慧欣, 张永亮, 刘占伟, 李惠媛, 张娜. 联合复方苦参注射液治疗局部晚期胰腺癌疗效观察. 武警医学 2011; 22: 237-239
- 33 陈舒, 马威, 江其生. DC肿瘤疫苗联合体部三维立体定向伽玛刀治疗中晚期胰腺癌的展望. 放射免疫学杂志 2010; 23: 166-168
- 34 尹立杰, 赵国华, 丁田贵, 彭兆祥, 侯秀芬. 金龙胶囊联合全身伽玛刀治疗晚期胰腺癌临床观察. 中国肿瘤临床 2004; 31: 1129-1131
- 35 季洪兵, 吕光明, 钟南保, 陈忠华. 立体定向放射治疗胰腺癌的疗效分析. 实用肝脏病杂志 2010; 13: 436-440
- 36 孙新东, 于金明, 杨新华, 卢洁, 范晓丽. 体部伽玛刀治疗不能手术的胰腺癌28例疗效分析. 实用癌症杂志 2001; 16: 413-414
- 37 张丽萍, 聂青, 康静波, 李建国, 齐文杰. 伽玛刀治疗晚期胰腺癌的临床研究. 海军总医院学报 2004; 17: 93-94, 102
- 38 高宏, 张虹, 邵秋菊, 吴淑娟, 梁军. 立体定向放射治疗胰腺癌112例疗效观察. 现代肿瘤医学 2010; 18: 112-113
- 39 Martin A, Gaya A. Stereotactic body radiotherapy: a review. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; 22: 157-172
- 40 Chang DT, Schellenberg D, Shen J, Kim J, Goodman KA, Fisher GA, Ford JM, Desser T, Quon A, Koong AC. Stereotactic radiotherapy for unresectable adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer* 2009; 115: 665-672
- 41 Koong AC, Le QT, Ho A, Fong B, Fisher G, Cho C, Ford J, Poen J, Gibbs IC, Mehta VK, Kee S, Trueblood W, Yang G, Bastidas JA. Phase I study of stereotactic radiosurgery in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 1017-1021
- 42 Koong AC, Christofferson E, Le QT, Goodman KA, Ho A, Kuo T, Ford JM, Fisher GA, Greco R, Norton J, Yang GP. Phase II study to assess the efficacy of conventionally fractionated radiotherapy followed by a stereotactic radiosurgery boost in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 320-323
- 43 Hoyer M, Roed H, Sengelov L, Traberg A, Ohlhuis L, Pedersen J, Nellesmann H, Kiil Berthelsen A, Eberholst F, Engelholm SA, von der Maase H. Phase-II study on stereotactic radiotherapy of locally advanced pancreatic carcinoma. *Radiother Oncol* 2005; 76: 48-53
- 44 Schellenberg D, Goodman KA, Lee F, Chang S, Kuo T, Ford JM, Fisher GA, Quon A, Desser TS, Norton J, Greco R, Yang GP, Koong AC. Gemcitabine chemotherapy and single-fraction stereotactic body radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72: 678-686
- 45 Mahadevan A, Jain S, Goldstein M, Miksad R, Pleskow D, Sawhney M, Brennan D, Callery M, Vollmer C. Stereotactic body radiotherapy and gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 78: 735-742
- 46 Mahadevan A, Miksad R, Goldstein M, Sullivan R, Bullock A, Buchbinder E, Pleskow D, Sawhney M, Kent T, Vollmer C, Callery M. Induction gemcitabine and stereotactic body radiotherapy for locally advanced nonmetastatic pancreas cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81: e615-e622
- 47 Rwigema JC, Parikh SD, Heron DE, Howell M, Zeh H, Moser AJ, Bahary N, Quinn A, Burton SA. Stereotactic body radiotherapy in the treatment of advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Oncol* 2011; 34: 63-69
- 48 Seo Y, Kim MS, Yoo S, Cho C, Yang K, Yoo H, Choi C, Lee D, Kim J, Kim MS, Kang H, Kim Y. Stereotactic body radiation therapy boost in locally advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75: 1456-1461
- 49 Lominska CE, Unger K, Nasr NM, Haddad N, Gagnon G. Stereotactic body radiation therapy for reirradiation of localized adenocarcinoma of the pancreas. *Radiat Oncol* 2012; 7: 74
- 50 Goyal K, Einstein D, Ibarra RA, Yao M, Kunos C, Ellis R, Brindle J, Singh D, Hardacre J, Zhang Y, Fabians J, Funkhouser G, Machtay M, Sanabria JR. Stereotactic body radiation therapy for nonresectable tumors of the pancreas. *J Surg Res* 2012; 174: 319-325
- 51 Kurahara H, Shintchi H, Maemura K, Mataka Y, Sakoda M, Iino S, Ueno S, Hiraki Y, Takao S, Natsugoe S. [A case of pancreatic cancer with liver metastasis controlled effectively by chemotherapy based on chemosensitivity test and stereotactic body radiotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2012; 39: 481-483
- 52 Loehrer PJ, Feng Y, Cardenes H, Wagner L, Brell JM, Cella D, Flynn P, Ramanathan RK, Crane CH, Alberts SR, Benson AB. Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 4105-4112
- 53 Iacobuzio-Donahue CA, Fu B, Yachida S, Luo M, Abe H, Henderson CM, Vilardell F, Wang Z, Keller JW, Banerjee P, Herman JM, Cameron JL, Yeo CJ, Halushka MK, Eshleman JR, Raben M, Klein AP, Hruban RH, Hidalgo M, Laheru D. DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1806-1813
- 54 徐周敏, 裴峰, 陈坚, 李娜, 高巍然, 瞿琴, 孔祥军. 高强度聚焦超声与伽玛刀治疗晚期胰腺癌的对比观察. 中国肿瘤临床 2010; 37: 689-691
- 55 刘智慧, 钟守斌, 王春亮, 杨建伟, 刘泉, 孙大庆, 刘金宝. 伽玛刀治疗胰腺癌40例近期疗效. 实用医药杂志 2012; 29: 339-340

编辑 田滢 电编 鲁亚静

# 遗传性非息肉病性结直肠癌临床分子诊断的研究进展

陈红锦, 林秋, 曾莉, 杨柏霖

## ■背景资料

遗传性非息肉病性结直肠癌是一种由于错配修复基因突变导致的常染色体显性遗传性疾病。研究显示与HNPCC发生相关的错配修复基因有hMSH2、hMLH1、hMSH6、hPSM1和hPSM2。到目前为止, HNPCC的诊断主要依赖病史及相关遗传检测结果。对于符合Amsterdam或Bethesda标准的结直肠癌患者应进行微卫星不稳定(MSI)和免疫组织化学错配修复蛋白的检测, 继而进行错配修复基因等种系突变检测。

陈红锦, 林秋, 曾莉, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210029

杨柏霖, 南京中医药大学附属医院 江苏省南京市 210029

陈红锦, 副教授, 主要从事结直肠癌外科方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30873272

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK200845

江苏省普通高校研究生科研创新计划基金资助项目, No. C

XZZ12-0607

作者贡献分布: 本论文由曾莉设计; 由陈红锦与林秋共同完成综述; 杨柏霖审核。

通讯作者: 陈红锦, 副教授, 210029, 江苏省南京市汉中路上155号, 南京中医药大学第一临床医学院。chjtp@163.com

收稿日期: 2012-08-17 修回日期: 2012-09-15

接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-18

## Recent advances in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer

Hong-Jin Chen, Qiu Lin, Li Zeng, Bo-Lin Yang

Hong-Jin Chen, Qiu Lin, Li Zeng, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Bo-Lin Yang, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30873272; the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2008457; Program for Postgraduates Research Innovation in University of Jiangsu Province, No. CXZZ12-0607

Correspondence to: Hong-Jin Chen, Nanjing University of Chinese Medicine, 155 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. chjtp@163.com

Received: 2012-08-17 Revised: 2012-09-15

Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-18

## Abstract

Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is a dominant autosomal genetic syndrome, accounting for 5%-10% of all colorectal cancers. It is caused by inactivating germ-line mutations of DNA mismatch repair (MMR) genes, including hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2, and hPMS1. HNPCC shows a tendency towards early age at onset, multiplicity of tumors, right-sided colon involvement, characteristic tumor pathology, and spectrum of extracolonic tumors. The diagnosis of HNPCC mainly relies on history and genetic linkage analysis. Patients meeting the Amsterdam criteria or Bethesda guidelines should undergo detection of microsatellite instability and immunohistochemistry analysis of hMSH2 and

hMLH1 expression. If one of the two detections yields a positive result, molecular genetic testing for germline mutations of MMR genes should be taken into consideration.

**Key Words:** Hereditary nonpolyposis colorectal cancer; Microsatellite instability; Immunohistochemistry; Mismatch repair gene

Chen HJ, Lin Q, Zeng L, Yang BL. Recent advances in molecular diagnostics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2806-2811

## 摘要

遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)是一种由于错配修复基因(mismatch repair gene, MMR)突变导致的常染色体显性遗传性疾病, 占结直肠癌的5%-15%。研究显示, 与HNPCC发生相关的错配修复基因有hMSH2、hMLH1、hMSH6、hPSM1和hPSM2。HNPCC肿瘤具有发病早、近段结肠多见、原发性多见、肠外肿瘤多见、病理以黏液腺癌为主的特点。到目前为止, HNPCC的诊断主要依赖病史及相关遗传检测结果。对于符合Amsterdam II或Bethesda标准的结直肠癌患者应进行微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)和免疫组织化学错配修复蛋白的检测, 继而进行错配修复基因等种系突变检测。

**关键词:** 遗传性非息肉性结直肠癌; 微卫星不稳定; 免疫组织化学; 错配修复基因

陈红锦, 林秋, 曾莉, 杨柏霖. 遗传性非息肉病性结直肠癌临床分子诊断的研究进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20(29): 2806-2811  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2806.asp>

## 0 引言

2008年全球新发结直肠癌(colorectal cancer, CRC)约120例, 大约有60.87万人因CRC死亡, 男性发病率处于恶性肿瘤的第2位, 女性为第3位<sup>[1]</sup>。研究表明, 约有20%的CRC患者具有遗传性或遗传易感性, 其中遗传性非息肉病性CRC是最常见的, 是一种区别于家族性腺瘤息肉病(family

## ■同行评议者

许剑民, 教授, 上海市复旦大学附属中山医院普外科



adenoma polyposis, FAP)的遗传性肿瘤, 占结肠肿瘤的5%-15%, 其外显率为90%<sup>[2]</sup>. 遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)具有发病年龄早(平均45岁)、近端结肠多见、同时性或异时性癌多见, 以及家族成员常有子宫内膜癌、胃癌和泌尿生殖系肿瘤等肠外肿瘤发生的典型特征<sup>[3,4]</sup>. 1991年成立了HNPCC国际合作组织(HNPCC-ICG), 并制定了HNPCC临床诊断标准(Amsterdam I标准)<sup>[5]</sup>, 并于1999年重新修订了Amsterdam标准(Amsterdam II标准)<sup>[6]</sup>, 内容如下: (1)家族中至少有3个成员确诊患HNPCC相关肿瘤包括结肠癌、子宫内膜癌、小肠癌、泌尿系统肿瘤; (2)其中1例为其他2例的一级亲属; (3)至少有连续2代患病; (4)至少1例在50岁前发病; (5)排除家族性腺瘤性息肉病及其他遗传性结肠癌综合征. 然而, 随着HNPCC肿瘤的分子生物学发展, Amsterdam标准已不能包含所有的HNPCC患者. 错配修复基因种系突变是HNPCC肿瘤发生的遗传学基础, 依据遗传学特征进行HNPCC肿瘤确定和家族成员筛选, 并进行正确的治疗和预防能够有效降低CRC的发生<sup>[7-9]</sup>.

## 1 HNPCC遗传学基础

HNPCC是错配修复基因(mismatch match repair genes, MMR)种系突变导致的常染色体显性遗传性疾病, 目前确定与HNPCC肿瘤发生相关的MMR包括: hMSH2、hMLH1、hMSH6、hPSM1和hPSM2, 其中以hMSH2、hMLH1突变为主, 占71%-90%<sup>[10,11]</sup>. 微卫星(microsatellite)是广泛存在于原核生物及真核生物基因组中具有高度多态性的短的串联重复核苷酸序列. 微卫星序列多位于编码区附近, 亦可位于内含子、启动子Alu序列中, 其重复单位一般为1-6 bp, 重复次数可达10-50次. MMR基因突变或表达缺失, 导致错配修复功能下降, 细胞在增殖过程中的错误掺入和缺失不能修复而产生了微卫星序列的延长、缩短等, 表现出广泛的微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI), 引起基因组不稳定, 随机突变率增高, 导致一系列涉及细胞生长、分化、凋亡及癌转移的相关靶基因改变, 进而导致结直肠肿瘤及其他肠外肿瘤的发生<sup>[12,13]</sup>. 研究表明MSI是HNPCC CRC发生的早期分子事件<sup>[14]</sup>, 可能是通过TGF- $\beta$ 和PTEN等信号传导途径而导致肿瘤的发生, 促使良性息肉迅速向高度不典型增生发展<sup>[15,16]</sup>. 从腺瘤到癌的发展规律在

HNPCC个体中仍然适用. 研究证实MMR缺失的携带者腺瘤形成速度明显快于正常人群, 由腺瘤发展成癌所需时间常<3年, 这与正常人群中腺瘤发展到癌的10-15年早了近10年<sup>[17,18]</sup>.

## 2 HNPCC肿瘤微卫星不稳定分析

由于错配修复基因的种系突变, 其功能下降或缺失, 细胞在增殖过程中表现为广泛的MSI, 导致重复编码的突变和非编码区域的基因(癌基因或抑癌基因)突变. 为获得临床研究资料和诊断的统一性, 1997年NCI(National Cancer Institution)推荐采用BAT-26、BAT-25、D2S123、D5S346、D17S250作为CRC MSI检测的标准位点, 即Bethesda标准. 若5个中有2个及以上标记显示不稳定, 称为MSI-high(MSI-H); 仅一个标记显示不稳定, 称为MSI-low(MSI-L); 所有标记均显示稳定, 则称为MS-stable(MSS)<sup>[19]</sup>. 研究表明90%以上的HNPCC患者表现为MSI-H, 因此检测患者MSI的情况有助于筛选出HNPCC家系和高危人群. Aaltonen等<sup>[20]</sup>检测了连续的500余例CRC患者MSI情况, 12%的患者微卫星不稳定, 2%的患者存在hMLH1或hMSH2基因的种系突变, 10例存在种系突变的患者中9例符合Amsterdam诊断标准; 在MSS的患者中均未检测到hMLH1基因的突变, 我们认为在进行错配修复基因测序之前应先确定MSI状态.

2004年NCI又对该标准进行了修订, 称为修订Bethesda标准, 目前已成为HNPCC最重要的临床筛查标准<sup>[21]</sup>. 具体内容如下: (1)50岁以下的CRC患者; (2)任何年龄诊断的同时和异时性多原发CRC及HNPCC相关肿瘤(包括CRC、子宫内膜癌、胃癌、卵巢癌、胰腺癌、输尿管及肾盂癌、胆管癌、脑肿瘤、皮脂腺瘤和角化棘皮瘤); (3)60岁以下MSI-H CRC、组织学诊断发现有肿瘤浸润淋巴细胞、Crohn's病样淋巴细胞增生、黏液癌/印戒细胞癌或髓样癌; (4)1个或1个以上一级亲属发生HNPCC相关肿瘤且有一个肿瘤发生于50岁前; (5)任何年龄2个或2个以上一级或二级亲属发生HNPCC相关肿瘤. 只要患者符合该标准中的任意一条, 就应进行MSI检查和错配修复蛋白的免疫组织化学分析. 金黑鹰等<sup>[22]</sup>应用修订Bethesda标准筛查了连续110例CRC患者, MSI CRC检出率为20.9%, HNPCC检出率6.4%. 多项研究证实对所有的符合修订Bethesda标准的CRC患者进行MSI检测, 能够有效地筛查HNPCC家系或可疑HNPCC患者, 以便进行早期

## ■相关报道

de-Jong认为免疫组织化学分析是利用MMR表达的蛋白特异性抗体进行的, 因此其敏感性与MSI相似, 分析的结果可以提示突变基因的类型. 只要其他关于该综合征错配修复基因作用的推测没有明确, 对于错配修复蛋白的免疫组织化学分析不能完全替代MSI的分析. 因此常选择MSI检测作为对于符合修订Bethesda标准患者筛查的第一步, 在MSI-H和MSI-L情况下, 进行第二步筛查即免疫组织化学分析. 另一方面, 由于符合Amsterdam II标准的家系MMR可能发生突变概率>50%. 因此, 推荐对此进行免疫组织化学分析作为诊断的第一步, 如果免疫组织化学染色阴性, 则应该进行相关基因的突变分析.

## ■创新盘点

本文从遗传性非息肉病性结直肠癌临床分子诊断研究现状出发,系统阐述了临床检测HNPCC的相关方法。

治疗及随访<sup>[23-25]</sup>。

### 3 HNPCC肿瘤错配修复蛋白的免疫组织化学分析

另一个用来区分错配修复功能缺陷的快捷并且廉价的技术是对于肿瘤组织的错配修复蛋白的免疫组织化学分析。由于HNPCC是MMR突变导致,通常存在MSI或错配修复蛋白的免疫组织化学染色表达缺失的情况,使用特殊的抗体能够发现错配修复蛋白表达缺失或存在<sup>[26]</sup>。Engel等<sup>[27]</sup>研究认为MSI对于区别hMSH2突变和hMLH1突变其敏感性大于免疫组织化学分析。但是,de Jong等<sup>[28]</sup>认为免疫组织化学分析是利用MMR表达的蛋白特异性抗体进行的,因此其敏感性与MSI相似,分析的结果可以提示突变基因的类型。理论上来说,只要其他的关于该综合症的错配修复基因作用的推测没有明确,对于错配修复蛋白的免疫组织化学分析不能完全替代MSI的分析。因此,常选择MSI检测作为对于符合修订Bethesda标准患者筛查的第1步,在MSI-H和MSI-L情况下,应进行第2步筛查即免疫组织化学分析。另一方面,由于符合Amsterdam II标准的家系MMR可能发生突变概率>50%,因此,推荐对此进行免疫组织化学分析作为诊断的第一步,如果免疫组织化学染色阴性,则应该进行相关基因的突变分析。

在HNPCC肿瘤中hMSH2和hMLH1突变大约占80%<sup>[29-31]</sup>,免疫组织化学检测显示hMSH2阴性对于预测错配修复基因hMSH2突变具有较好的作用,但hMLH1阴性结果却未能很好地预测错配修复基因hMLH1的突变<sup>[31]</sup>。导致这种情况的主要原因是部分散发性CRC的体细胞hMLH1启动子甲基化,错配修复基因hMLH1转录沉默导致MSI,散发性MSI CRC中hMLH1突变的发生率低于10%,而该基因启动子区域的甲基化发生率大于90%<sup>[32]</sup>。最近的研究显示, hMLH1基因与错配修复基因PMS2同时存在形成异二聚体。HNPCC肿瘤中一旦hMLH1基因种系突变,异二聚体变得不稳定, hPMS2功能下降或缺失,免疫组织化学显示hMLH1和hPMS2蛋白表达缺失<sup>[33,34]</sup>。因此,同时进行hMLH1和hPMS2的免疫组织化学检测,有利于确定错配修复基因hMLH1的缺失。

### 4 HNPCC的遗传测序

错配修复基因的种系突变是HNPCC肿瘤发生的根本原因,因此错配修复基因的种系突变测序常作为HNPCC诊断的“金标准”。对CRC患者进行错配修复基因种系突变的遗传学检测来确

定HNPCC肿瘤能够降低家族成员内突变基因携带者的肿瘤发生率和病死率<sup>[35,36]</sup>。遗传测序连锁分析显示大约80%的HNPCC肿瘤与hMLH1和hMSH2基因的种系突变相关,7%的患者MSH6突变, PMS2的突变<5%,多数突变为微小突变(点突变)、小片段插入或缺失,少部分可能出现hMLH1或hMSH2基因大片段缺失<sup>[37,38]</sup>。国际胃肠遗传性肿瘤协会建立的InSIGHT数据库中共收集了6 079例MHL1基因突变, 4 428例hMSH2基因突变患者(<http://www.insight-group.org/mutations/2010.5.1>)。但是,MSH6基因的突变越来越受到关注<sup>[39]</sup>, Nilbert等<sup>[40]</sup>报道了一组荷兰的家系中,22%的患者种系突变显示MSH6的种系突变。Okkels筛查了818例HNPCC患者,56例(7%)存在pMSH6突变,其中23例(3%)确定为病理性突变<sup>[38]</sup>。同时多项研究显示,MSH6突变患者子宫内膜癌高发、且发病年龄较散发性子宫内膜癌患者提前,但是CRC发病年龄却较高<sup>[41-45]</sup>。然而,研究表明在临床高度符合Amsterdam II标准的家系中有近50%的患者未能检测到错配修复基因的突变,目前将这些家系称为“家族性结肠癌X”(familial colon cancer X)<sup>[31]</sup>。Morak等<sup>[46]</sup>报道了81例微卫星稳定的家族性结肠癌X,免疫组织化学显示错配修复基因DNA MLH1、MSH2和MSH6为阳性,测序显示不存在APC、MLH1、MSH2和MSH6种系突变,继而作者检测到10例(12%)存在MTH1、OGG1和MUTYH的单等位基因的错义突变。Wei等<sup>[47]</sup>检测了98个临床疑诊的HNPCC家系,10例患者中共发现11个突变位点,6例hMLH1突变(54.5%),5例hMSH2突变(45.5%);其中4个家系符合Amsterdam II标准,6个家系符合Bethesda指南标准。Sheng等<sup>[48]</sup>研究了30个HNPCC家系,25个家系显示为MSI-H(83.3%),88%的MSI患者免疫组织化学无hMLH1和hMSH2蛋白表达,其中14例患者出现病理性的错配修复基因点突变,3例hMSH2基因大片段缺失,3例hMLH1基因的启动子甲基化。上述研究结果显示MSL-L和MSS患者标本免疫组织化学没有错配修复蛋白的表达缺失,我们认为MSI检测与错配修复基因蛋白免疫组织化学表达具有高度的一致性,是对HNPCC肿瘤进行基因检测前的一种简单、经济的有效方法。

随着表观遗传学的发展,DNA甲基化逐渐成为新的研究热点。在人类基因组中,50%基因在5'端启动子存在CpG岛,正常状态下CpG岛不存在甲基化,hMLH1基因5'端CpG岛异常甲

基化会导致hMLH1基因的表达沉默. 按照修订Bethesda标准进行MSI检测阳性的患者, 即使其免疫组织化学显示hMLH1蛋白表达阴性, hMLH1种系突变的发生率低于10%, 而该基因启动子区域的甲基化发生率>90%<sup>[46]</sup>. 倪敏等<sup>[49]</sup>对34例MSI CRC进行了错配修复基因种系突变和hMLH1基因甲基化检测, 结果显示8例hMSH2和hMSH6种系突变, 19例为hMLH1基因甲基化, 提示在MSI只能作为HNPCC肿瘤初筛的手段, 最终确定仍需要进行错配修复基因种系突变测序. 然而, Goel等<sup>[50]</sup>研究了符合Amsterdam标准但微卫星稳定的CRC患者(MSS HNPCC)的多个基因的甲基化情况, 181例CRC被分为4组: 符合Amsterdam标准但微卫星稳定的CRC( $n = 22$ ); 确定有错配修复基因种系突变的HNPCC( $n = 21$ ); 微卫星稳定的散发性CRC( $n = 92$ ); 微卫星不稳定的散发性CRC( $n = 46$ ), 同时检测CCANAG1、SOCS1、RUNX3、NEUROG1、MLH1、KRAS和BRAF等基因的甲基化状态, 结果显示尽管MSS HNPCC肿瘤存在不同程度的CpG岛甲基化, 但没有表现为高甲基化状态, 我们认为MSS HNPCC肿瘤的潜在发生机制仍需进一步研究.

## 5 结论

目前, 在我国HNPCC已引起越来越多的临床医师的重视, 随着HNPCC临床与分子诊断研究的不断深入, 对HNPCC发病特点、遗传学特征的进一步认识, 以及分子基因水平诊断方法的正确开展, 对CRC的有效防治具有十分重要的意义.

## 6 参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
- Müller A, Fishel R. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 2002; 20: 102-109
- Barrow E, Alduaij W, Robinson L, Shenton A, Clancy T, Lalloo F, Hill J, Evans DG. Colorectal cancer in HNPCC: cumulative lifetime incidence, survival and tumour distribution. A report of 121 families with proven mutations. *Clin Genet* 2008; 74: 233-242
- ten Kate GL, Kleibeuker JH, Nagengast FM, Craanen M, Cats A, Menko FH, Vasen HF. Is surveillance of the small bowel indicated for Lynch syndrome families. *Gut* 2007; 56: 1198-1201
- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 424-425
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116: 1453-1456
- US Preventive Services Task Force. Screening for colorectal cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2008; 149: 627-637
- Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB, Vriends AH, Cartwright NR, Barnetson RA, Farrington SM, Tenesa A, Hampel H, Buchanan D, Arnold S, Young J, Walsh MD, Jass J, Macrae F, Antill Y, Winship IM, Giles GG, Goldblatt J, Parry S, Suthers G, Leggett B, Butz M, Aronson M, Poynter JN, Baron JA, Le Marchand L, Haile R, Gallinger S, Hopper JL, Potter J, de la Chapelle A, Vasen HF, Dunlop MG, Thibodeau SN, Jenkins MA. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 193-201
- Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, Wang F, Bandipalliam P, Syngal S, Gruber SB. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2009; 137: 1621-1627
- Wagner A, Tops C, Wijnen JT, Zwinderman K, van der Meer C, Kets M, Niermeijer MF, Klijn JG, Tiben A, Vasen HF, Meijers-Heijboer H. Genetic testing in hereditary non-polyposis colorectal cancer families with a MSH2, MLH1, or MSH6 mutation. *J Med Genet* 2002; 39: 833-837
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 919-932
- 崔龙. 遗传性非息肉病性大肠癌的诊治进展. 中国实用外科杂志 2005; 25: 189-192
- 杨柏林. 微卫星不稳定性结直肠癌分子病理特征及hMLH1基因甲基化. 结直肠肛门外科 2005; 11: 312-314
- Fidalgo P, Almeida MR, West S, Gaspar C, Maia L, Wijnen J, Albuquerque C, Curtis A, Cravo M, Fodde R, Leita CN, Burn J. Detection of mutations in mismatch repair genes in Portuguese families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) by a multi-method approach. *Eur J Hum Genet* 2000; 8: 49-53
- Rijcken FE, Hollema H, Kleibeuker JH. Proximal adenomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer are prone to rapid malignant transformation. *Gut* 2002; 50: 382-386
- Rijcken FE, Koornstra JJ, van der Sluis T, Boersma-van EW, Kleibeuker JH, Hollema H. Early carcinogenic events in HNPCC adenomas: differences with sporadic adenomas. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1660-1668
- Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Lancet* 1995; 345: 1183-1184
- De Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, Griffioen G, Cats A, Menko FH, Kleibeuker JH, Vasen HF. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology* 2004; 126: 42-48
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in

## ■同行评价

该文为遗传性非息肉病性结直肠癌临床分子诊断研究提供了总体的思路与方法, 并为以后该病的临床治疗和研究提供了理论依据.

- colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-5257
- 20 Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kääriäinen H, Eskelinen M, Järvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1481-1487
  - 21 Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burt LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 261-268
  - 22 金黑鹰, 丁义江, 刘秀芳, 杨柏林, 赖仁胜, 倪敏, 葛永盛. 修订 Bethesda 标准筛选遗传性非息肉病性结直肠癌患者的队列研究. *中华医学杂志* 2007; 87: 1445-1447
  - 23 Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Rodríguez-Moranta F, Payá A, Jover R, Bessa X. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293: 1986-1994
  - 24 Mueller J, Gazzoli I, Bandipalliam P, Garber JE, Syngal S, Kolodner RD. Comprehensive molecular analysis of mismatch repair gene defects in suspected Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) cases. *Cancer Res* 2009; 69: 7053-7061
  - 25 Coolbaugh-Murphy MI, Xu JP, Ramagli LS, Ramagli BC, Brown BW, Lynch PM, Hamilton SR, Frazier ML, Siciliano MJ. Microsatellite instability in the peripheral blood leukocytes of HNPCC patients. *Hum Mutat* 2010; 31: 317-324
  - 26 Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, Tops C, Breuning M, Bröcker-Vriends A, Vasen H, Fodde R, Morreau H. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol* 2003; 162: 469-477
  - 27 Engel C, Forberg J, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Plaschke J, Kloor M, Poremba C, Pox CP, Rüschoff J, Keller G, Dietmaier W, Rümmele P, Friedrichs N, Mangold E, Buettner R, Schackert HK, Kienle P, Stemmler S, Moeslein G, Loeffler M. Novel strategy for optimal sequential application of clinical criteria, immunohistochemistry and microsatellite analysis in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 115-122
  - 28 de Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MG, Meijers-Heijboer H, Wagner A, van Os TA, Bröcker-Vriends AH, Vasen HF, Morreau H. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 972-980
  - 29 Shia J, Klimstra DS, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, Gerald WL, Ellis NA. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germline mutation in hereditary colorectal neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 96-104
  - 30 Shia J, Ellis NA, Klimstra DS. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchows Arch* 2004; 445: 431-441
  - 31 Lynch PM. The hMSH2 and hMLH1 genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2009; 18: 611-624
  - 32 杨柏霖, 谷云飞, 赖仁胜, 谢玲, 金黑鹰. 散发性结直肠癌微卫星不稳定性与其临床病理生物学的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1160-1164
  - 33 Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7: 41-52
  - 34 Shia J, Tang LH, Vakiani E, Guillem JG, Stadler ZK, Soslow RA, Katabi N, Weiser MR, Paty PB, Temple LK, Nash GM, Wong WD, Offit K, Klimstra DS. Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 1639-1645
  - 35 Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med* 2009; 11: 35-41
  - 36 Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, Hampel HL, Thibodeau SN. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med* 2009; 11: 42-65
  - 37 Peltomäki P, Gao X, Mecklin JP. Genotype and phenotype in hereditary nonpolyposis colon cancer: a study of families with different vs. shared predisposing mutations. *Fam Cancer* 2001; 1: 9-15
  - 38 Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, Propping P, Mangold E. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer* 2003; 103: 636-641
  - 39 Okkels H, Lindorff-Larsen K, Thorlasius-Ussing O, Vyberg M, Lindebjerg J, Sunde L, Bernstein I, Klar-skov L, Holck S, Krarup HB. MSH6 Mutations are Frequent in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Families With Normal pMSH6 Expression as Detected by Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20: 470-477
  - 40 Nilbert M, Wikman FP, Hansen TV, Krarup HB, Orntoft TF, Nielsen FC, Sunde L, Gerdes AM, Cruger D, Timshel S, Bisgaard ML, Bernstein I, Okkels H. Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. *Fam Cancer* 2009; 8: 75-83
  - 41 Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Møller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S, Möslein G, Tops C, Bröcker-Vriends A, Wu Y, Hofstra R, Sijmons R, Cornelisse C, Morreau H, Fodde R. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* 1999; 23: 142-144
  - 42 Schweizer P, Moio AL, Kuismanen SA, Truninger K, Vierumäki R, Salovaara R, Arola J, Butzow R, Jiricny J, Peltomäki P, Nyström-Lahti M. Lack of MSH2 and MSH6 characterizes endometrial but

- not colon carcinomas in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 2813-2815
- 43 Suchy J, Kurzawski G, Jakubowska A, Lubiński J. Ovarian cancer of endometrioid type as part of the MSH6 gene mutation phenotype. *J Hum Genet* 2002; 47: 529-531
- 44 Goodfellow PJ, Buttin BM, Herzog TJ, Rader JS, Gibb RK, Swisher E, Look K, Walls KC, Fan MY, Mutch DG. Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5908-5913
- 45 Devlin LA, Graham CA, Price JH, Morrison PJ. Germline MSH6 mutations are more prevalent in endometrial cancer patient cohorts than hereditary non polyposis colorectal cancer cohorts. *Ulster Med J* 2008; 77: 25-30
- 46 Morak M, Massdorf T, Sykora H, Kerscher M, Holinski-Feder E. First evidence for digenic inheritance in hereditary colorectal cancer by mutations in the base excision repair genes. *Eur J Cancer* 2011; 47: 1046-1055
- 47 Wei W, Liu F, Liu L, Li Z, Zhang X, Jiang F, Shi Q, Zhou X, Sheng W, Cai S, Li X, Xu Y, Nan P. Distinct mutations in MLH1 and MSH2 genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families from China. *BMB Rep* 2011; 44: 317-322
- 48 Sheng JQ, Zhang H, Ji M, Fu L, Mu H, Zhang MZ, Huang JS, Han M, Li AQ, Wei Z, Sun ZQ, Wu ZT, Xia CH, Li SR. Genetic diagnosis strategy of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 983-989
- 49 倪敏, 金黑鹰, 丁义江, 刘飞, 丁曙晴, 樊志敏, 王业皇. 微卫星不稳定结直肠癌hMLH1和hMSH2及hMSH6种系突变与hMLH1启动子甲基化检测. *中华胃肠外科杂志* 2008; 11: 358-361
- 50 Goel A, Xicola RM, Nguyen TP, Doyle BJ, Sohn VR, Bandipalliam P, Rozek LS, Reyes J, Cordero C, Balaguer F, Castells A, Jover R, Andreu M, Syngal S, Boland CR, Llor X. Aberrant DNA methylation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency. *Gastroenterology* 2010; 138: 1854-1862

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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.



# SFRP基因甲基化与消化系肿瘤相关性的研究进展

戴结, 刘畅, 汪芳裕

## ■背景资料

随着表观遗传学的发展, 越来越多的研究证实DNA甲基化与肿瘤的发生发展关系密切。

戴结, 刘畅, 汪芳裕, 南京大学医学院临床学院(中国人民解放军南京军区南京总医院)消化内科 江苏省南京市 210002

作者贡献分布: 本综述由戴结与刘畅完成; 汪芳裕负责审校。

通讯作者: 汪芳裕, 教授, 主任医师, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 南京大学医学院临床学院(中国人民解放军南京军区南京总医院)消化内科. wangfangyu65@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-08-05 修回日期: 2012-09-14

接受日期: 2012-09-20 在线出版日期: 2012-10-18

## Progress in understanding the relationship between SFRP gene methylation and gastrointestinal tumors

Jie Dai, Chang Liu, Fang-Yu Wang

Jie Dai, Chang Liu, Fang-Yu Wang, School of Medicine, Nanjing University; Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Fang-Yu Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. wangfangyu65@yahoo.com.cn  
Received: 2012-08-05 Revised: 2012-09-14  
Accepted: 2012-09-20 Published online: 2012-10-18

## Abstract

Promoter DNA hypermethylation is the most common epigenetic modification in the human genome and is closely related with tumor progression and prognosis. Secreted frizzled-related proteins (SFRPs) act as antagonists of the Wnt signaling pathway, and their expression is frequently silenced as a result of promoter hypermethylation in a variety of tumors, which weakens the inhibition of the Wnt signaling pathway, leads to aberrant activation of this signaling pathway, and thereby promotes tumorigenesis and development. In this paper, we review the recent advances in understanding the relationship between SFRP gene methylation and gastrointestinal tumors.

Key Words: Secreted frizzled-related proteins; Methylation; Wnt signaling pathway; Gastrointestinal tumors

## ■同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科

Dai J, Liu C, Wang FY. Progress in understanding the relationship between SFRP gene methylation and gastrointestinal tumors. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(29): 2812-2817

## 摘要

DNA启动子异常甲基化是人类基因组一种最常见的表观遗传学修饰改变, 与肿瘤的发生发展及预后密切相关。分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related proteins, SFRPs)作为Wnt信号通路的拮抗因子, 在多种肿瘤中常由于其启动子的高甲基化而致该基因的表达沉默, 从而减弱对Wnt信号通路的抑制作用, 使得Wnt信号通路异常激活, 促进了肿瘤的发生与发展。本文就SFRP基因甲基化在消化系肿瘤中的研究作一综述。

关键词: 分泌型卷曲相关蛋白; 甲基化; Wnt信号通路; 消化系肿瘤

戴结, 刘畅, 汪芳裕. SFRP基因甲基化与消化系肿瘤相关性的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2812-2817

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2812.asp>

## 0 引言

近年来研究表明肿瘤的发生发展是基因组学和表观遗传学两者共同作用的结果, 表观遗传是指在基因的DNA序列不发生改变的情况下, 通过DNA甲基化、组蛋白修饰、组蛋白变体并入、核小体重新定位以及RNA干扰等机制<sup>[1]</sup>使基因功能发生可遗传的变化并最终导致表型的变化。其中, DNA甲基化是表观遗传修饰的一种主要形式。Wnt蛋白是一组分泌型糖蛋白家族, 通过与细胞表面基质及特异性Fz受体结合从而激活下游信号转导途径, 与细胞的生长、发育和分化密切相关, 在多种消化系肿瘤中均存在Wnt信号通路的异常激活。大量研究表明启动子甲基化导致的Wnt拮抗因子分泌型卷曲相关蛋白(secreted frizzled-related proteins, SFRPs)(无CpG岛启动子的SFRP3除外)表达沉默在此过程中发挥重要作用。

## 1 DNA甲基化、SFRPs与Wnt

1.1 DNA甲基化 DNA甲基化是由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化S-腺苷甲硫氨酸(SAM)作为甲基供体, 将胞嘧啶转变为5-

甲基胞嘧啶(mC)的一种反应<sup>[2]</sup>. 在真核生物中, 5-甲基胞嘧啶是唯一存在的化学性修饰碱基, CpG二核苷酸是最主要的甲基化位点. 肿瘤组织DNA频发启动子区域的异常甲基化, 一方面可激活癌基因, 另一方面可使抑癌基因由于5'端启动子调控区CpG岛异常高甲基化而抑制mRNA转录, 导致该基因失活. 存在一个或多个肿瘤抑制基因CpG岛甲基化是除基因缺失与突变外导致恶性肿瘤发生发展的又一重要机制.

**1.2 Wnt信号转导途径** Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的异常活化在肿瘤发生中具有重要作用<sup>[3]</sup>. Wnt信号通路主要由以下几种蛋白构成: Wnt蛋白、特异性Fz受体、辅助性低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(LRP5/6)、散乱蛋白(Dvl)、APC复合物(Axin蛋白、APC蛋白和糖原合成酶激酶GSK-3 $\beta$ )、 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)和TCF/LEF等. 该通路有3条主要分支: (1)经典的Wnt- $\beta$ -catenin-TCF/LEF通路; (2)细胞极性通路, 调控细胞骨架的重排; (3)Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 通路, 通过钙依赖性激酶、钙调蛋白和转录因子NF-AT发挥作用. 在经典通路中, Wnt蛋白与特异性Fz受体及LRP5/6发生特异性结合, 激活Dvl, 防止胞内游离 $\beta$ -catenin降解并使其在胞浆内大量积聚, 进而被转运到胞核内, 与TCF/LEF家族成员如c-myc、Cyclin D1等典型转录因子形成复合物, 激活靶基因的转录系统; 在没有Wnt信号刺激时,  $\beta$ -catenin与Axin-APC-GSK-3 $\beta$ 形成降解复合物, 结合后的 $\beta$ -catenin发生磷酸化, 并被泛素化而降解, 从而维持胞浆内 $\beta$ -catenin的低水平状态.

**1.3 SFRPs及其与Wnt信号通路的关系** SFRPs是一类能直接结合Wnt的拮抗物, 属分泌型糖蛋白家族, 目前发现人类有5种SFRP基因, 按序列的同源性分为2组, 第一组包括SFRP1、2、5, 第二组包括SFRP3、4. SFRP大小约30 kDa, 每个成员包含一个信号序列、一个N-端的卷曲样半胱氨酸富集区(CRD)和一个与轴突指导蛋白netrin同源的亲水C-端区域(NTR). SFRP蛋白的CRD与Fz受体有30%-50%序列相似, 包含10个保守的半胱氨酸残基, SFRP通过CRD区域与Wnt配体结合, 或与Fz受体相互作用形成无功能的复合物, 从而封闭Wnt信号通路. SFRP基因沉默引起Wnt信号的持续存在, 导致 $\beta$ -catenin不能被降解而在胞浆内大量聚积, 聚积的游离 $\beta$ -catenin可转移至胞核与TCF/LEF转录因子发生作用, 激活Wnt相关靶基因, 导致细胞过度增殖而诱发癌变.

## 2 SFRP甲基化与消化系统肿瘤的关系

**2.1 食管癌** Zou等<sup>[4]</sup>发现在40例食管腺癌中SFRP1、2、4、5基因高甲基化率分别为93%、83%、73%和85%( $P<0.001$ ), SFRPs在食管腺癌中的表达普遍下调, 并且与肿瘤的分期分级及发育异常呈负相关. SFRP基因高甲基化在食管腺癌的发展中是普遍早期事件, SFRP1、4、5甲基化可作为Barrett食管腺癌的生物标志. 马传香等<sup>[5]</sup>应用免疫组织化学法检测60例食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中SFRP1的表达, 结果阳性表达率为25.0%, 显著低于癌旁正常组织黏膜中的比例, 并且SFRP1的表达与临床病理因素无相关性, 提示SFRP1在ESCC的发生发展中起一定作用. Liu等<sup>[6]</sup>检测了81例ESCC患者血浆中的SFRP1启动子超甲基化并分析其与ESCC术后两年复发率的关系, 结果SFRP1超甲基化与增加ESCC复发风险呈显著相关性( $P=0.001$ ), 提示血浆中Wnt拮抗剂SFRP1启动子超甲基化状态可作为ESCC的一个非侵袭性生物预测标志. Hao等<sup>[7]</sup>发现启动子超甲基化沉默SFRP2的表达, 丧失其肿瘤抑制活性, 可能是ESCC发生过程中的一个因素. 郭艳丽等<sup>[8]</sup>应用MSP法分析了78例ESCC及相应癌旁非肿瘤组织中SFRP1、2、4、5基因的甲基化状态, 结果这4个基因的甲基化率均明显高于癌旁非肿瘤组织( $P<0.01$ ), 且与肿瘤的组织学分级及临床分期无关, 但共同发生甲基化的频率则与临床分期显著相关, 在发生甲基化的食管癌组织中,  $\beta$ -catenin蛋白的异质表达率明显低于未发生甲基化的癌组织, 提示SFRP1、2、4、5基因高甲基化状态可能通过Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导通路参与食管癌的发生.

**2.2 胃癌** 胃癌中SFRPs失活已是普遍的早期现象. Nojima等<sup>[9]</sup>发现CpG岛甲基化所致的SFRP1、2、5沉默在胃癌细胞株(100%、100%、81%)和原发性胃癌(91%、96%、65%)中频繁发生. 经5-氮杂-2'-脱氧胞苷(DAC)处理癌细胞后SFRP表达迅速恢复. SFRPs的异常表达下调TCF/LEF转录活性, 抑制细胞生长并诱导胃癌细胞凋亡. 推测异常的SFRP甲基化是胃癌Wnt信号转导失活的主要机制之一. 赵成海等<sup>[10-12]</sup>报道在多个胃癌细胞系中SFRP1、2、5均发生甲基化, SFRP1、2、5 mRNA表达缺失, 经DAC处理后mRNA表达恢复, 同时发现在原发性胃癌中, SFRP1、2、5甲基化率分别为

### ■ 研发前沿

消化系统肿瘤的病因及相关致病危险因素复杂多样, 有效的抗肿瘤分子靶向治疗药物缺乏, 研究寻找一种阻断SFRP参与Wnt信号通路途径的新型抗肿瘤靶向药物有望为肿瘤患者的治疗及预后带来新的福音.

### ■相关报道

目前尚未发现肿瘤中存在Wnt拮抗基因突变,而SFRP1、2、4、5基因启动子都含有CpG岛,Esteller等报道多种胃肠肿瘤表现出高频率的基因甲基化,在其早期阶段,表观遗传机制导致的基因失活起着尤为重要的作用。

44.0%、65.0%和72.5%,较相应癌旁对照组织(15.0%、7.5%和10.0%)差异显著,提示胃癌中SFRP1、2、5表达下调主要由基因发生甲基化所致,SFRP1、2、5甲基化及表达下调参与了部分胃癌的发病过程。Kinoshita等<sup>[13]</sup>发现在35例胃癌组织和7个胃癌细胞系中,SFRP1基因均发生高甲基化,而SFRP2基因在癌组织和正常黏膜中甲基化率分别为83%和69%,SFRP5则分别为43%和54%。尽管SFRP基因表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、病理类型、浸润深度及TNM分期无关,但SFRP1表达的显著下降与肿瘤发生淋巴结转移相关。提示下调作为肿瘤抑制基因的SFRP1、5,不但促进癌发生,而且在一定程度上与癌细胞的转移潜能相关。Cheng等<sup>[14]</sup>研究发现在胃癌和癌旁正常组织比较中,仅SFRP2显著下调( $P<0.01$ ),原发性胃癌、肠化的胃组织和正常胃组织中SFRP2启动子超甲基化检出率分别为73.3%、37.5%和20.0%,去甲基化处理SFRP2的表达恢复,在裸鼠体内SFRP2强表达诱导细胞凋亡,抑制胃癌细胞增殖和肿瘤生长。并且66.7%胃癌患者血浆中检出了甲基化的SFRP2,而正常对照组则未检出。提示SFRP2的后天失活是胃癌发生的普遍早期事件,可能成为胃癌的一个潜在生物标记。Shin等<sup>[15]</sup>研究发现在人胃癌细胞中存在核 $\beta$ -catenin积聚和SFRP启动子甲基化状态,用丁酸钠诱导SFRP1/2启动子区域去甲基化和组蛋白修饰能恢复SFRP在胃癌细胞中的表达,提示SFRP基因的异常后天修饰是激活人胃癌细胞Wnt信号的一个重要机制,丁酸钠可通过组蛋白修饰或启动子甲基化作用调节SFRP1/2表达而具有抗癌效应。王馥丽等<sup>[16]</sup>发现57例贲门腺癌组织中SFRP4和SFRP5同时发生甲基化者,高、中分化18例,低分化39例,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示SFRP4、5基因高甲基化状态与贲门腺癌的恶性行为有关。Guo等<sup>[17]</sup>研究显示在胃贲门腺癌组织中,SFRP1、2、4、5启动子甲基化频率分别78.7%(74/94),76.6%(72/94),70.2%(66/94)和77.1%(73/94),显著高于癌旁正常组织。相应的mRNA表达沉默频率显著高于对照组,这些基因甲基化水平与其mRNA表达缺失相关。同时发现癌组织中 $\beta$ -catenin(Wnt信号通路的关键因子)和Cyclin D1(Wnt通路的靶向基因)的异位表达较对照组更频繁,并且与每一Wnt拮抗基因超甲基化状态密切相关。通过启动子超甲基化后天沉默Wnt拮抗基因表达可能在胃贲门腺癌中起重要作用。

2.3 结直肠癌 SFRPs转录失活与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)关系密切。对SFRPs基因甲基化的相关研究将对CRC的筛查、诊断和治疗提供有效帮助。Qi等<sup>[18]</sup>在结直肠腺癌、腺瘤和异常隐窝病灶(ACF)中检出SFRP1、2、5甲基化频率均高于50%,远高于周围正常黏膜。SFRPs在腺癌和腺瘤中表达下降与其启动子高甲基化关系密切。用5-氮杂-2'-脱氧胞苷(DAC)/曲古霉素A(TSA)联合去甲基化处理结直肠癌细胞株后,沉默的SFRP mRNA重新恢复有效表达。Suzuki等<sup>[19]</sup>发现在结直肠癌细胞中存在SFRPs基因的甲基化,而SFRP1、2、5外源性的过表达可抑制下游Wnt信号,SFRP4同样具有类似作用,但效应较弱,随后证实表观修饰所致的SFRPs表达下调与CRC进展有关。Tanaka等<sup>[20]</sup>发现在51例散发性CRC中,无论是高度微卫星不稳定者(MSI-H)还是低度微卫星不稳定(MSI-L)或稳定者(MSS),SFRP1基因均存在甲基化,且MSI-H中SFRP2、5高甲基化较MSI-L/MSS更频繁。Katoh等<sup>[21]</sup>从CRC的起源角度对人SFRP启动子GLI结合位点与黑猩猩、大鼠、小鼠的同源性进行比较后,发现SFRP1启动子CpG岛高甲基化导致慢性顽固性炎症演变为胃肠肿瘤。翟国栋等<sup>[22]</sup>发现SFRP1表达缺失或下调在大肠侧向发育型肿瘤(LSTs)中比隆起型腺瘤(PAs)更常见,且该基因高甲基化发生频率在LSTs中也比PAs高,提示两者发病机制可能有所不同。董丽钧等<sup>[23]</sup>检测了72例CRC患者术前血清和40例肠道良病变血清中SFRP1基因启动子区域甲基化状态,前者甲基化比例为55.6%,后者为10.0%,差异显著( $P<0.01$ ),且SFRP1基因甲基化与患者临床病理特征及CEA、CA199水平无相关性。联合检测血清SFRP1甲基化及CEA、CA199水平可显著提高CRC检出率。粪便中超甲基化的SFRPs基因是筛查CRC及癌前病变的一个新的潜在指标。Zhang等<sup>[24]</sup>发现粪便DNA中SFRP1启动子超甲基化检测结直肠肿瘤(腺瘤和癌)的敏感性和特异性达89%和86%,且腺瘤和早期肿瘤(国际防癌联盟I期)显示有未甲基化和甲基化的SFRP1启动子序列,而进展期肿瘤则仅显示有甲基化的SFRP1。Oberwalder等<sup>[25]</sup>首次报道甲基化的SFRP2在结肠腺瘤、增生性息肉和正常对照组的粪便DNA中发生率分别为46%、33%和0%。Tang等<sup>[26]</sup>研究表明CRC患者肿瘤实体组织、粪便和血清标本中,SFRP2发生超甲基化者较未发生甲基化者总生存期明显缩短。血清中基因甲

基化水平识别CRC的特异性显著高于实体瘤组织和粪便样本, 且血清SFRP2甲基化与肿瘤低分化、浆膜或浆膜下浸润、淋巴结转移及TNM分期显著相关, 提示血浆中SFRP2甲基化状态有望成为一种对CRC检查和分期的非侵袭性指标. 其高甲基化可预测CRC病人的预后关联性. Huang等<sup>[27]</sup>研究显示SFRP1和SFRP4是结直肠损害的候选标志物, 但不同于SFRP家族其他成员对CRC发生过程中的负性调节作用, SFRP4在CRC组织中表达上调, 可能在CRC中有完全不同的生物学作用.

**2.4 肝细胞癌** SFRPs启动子甲基化在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中频发, 并对SFRPs表达下调起重要作用. 吴龙等<sup>[28]</sup>发现在HCC、癌旁组织及正常对照组中SFRP1基因启动子甲基化比例分别为11/30、4/30和0/10, 差异有显著性, 且与临床病理资料无关. SFRP1的mRNA表达明显低于癌旁及正常对照组, 表明该基因的甲基化是HCC形成的早期事件. 王丰等<sup>[29]</sup>检测了72例HCC, 37例肝良性病变和41例健康对照者的血浆标本中SFRP1基因甲基化水平, 结果3组阳性率分别为27.8%、5.4%和2.4%, 差异显著( $P<0.001$ ), 且联合血清AFP分析可进一步提高HCC诊断率. Shih等<sup>[30]</sup>研究发现SFRP1启动子甲基化率在肝癌细胞系、原发性HCC、肝硬化、慢性肝炎和正常对照组中分别为75.0%、48.2%、21.4%、14.3%和0%. 所有甲基化的标本伴随有SFRP1表达下调, DAC去甲基处理的肝癌细胞SFRP1表达恢复. 且SFRP1基因附近的微卫星位点D8S505、D8S1722的杂合性缺失(LOH)分别达25.0%和27.6%, 从而认为除甲基化介导下调SFRP1基因外, LOH也起了一定作用. Wu等<sup>[31]</sup>研究发现恢复SFRP1在HepG2癌细胞中的表达明显损害癌细胞的侵袭潜力, 且外源性SFRP1造成 $\beta$ -catenin/T细胞因子依赖的转录活性显著下降, 表明SFRP1可通过抑制经典Wnt信号途径抑制HCC的转移行为. Jiang等<sup>[32]</sup>发现在MHCC97-H细胞中过表达SFRP1, 明显减少细胞增殖和侵袭潜能, 显著抑制MHCC97-H移植瘤的生长和体内转移, 同时伴随血管生成减少和肿瘤细胞凋亡增加, 且SFRP1过表达造成 $\beta$ -catenin和其下游效应基因Cyclin D1以及MMP-2表达下降, 表明这种效应可能与 $\beta$ -catenin信号失活相关. Takagi等<sup>[33]</sup>发现在12种肝癌细胞系中, SFRP1、2、4、5甲基化比例分别为75%(9/12), 58%(7/12), 25%(3/12)和58%(7/12).

而在原发性肝癌中, SFRP1、2、5甲基化比例分别为47%(9/19), 63%(12/19)和42%(8/19), 但SFRP4未发现甲基化. 在乙型和丙型肝炎病毒所致的慢性肝炎和肝硬化中, SFRP1、2、5也均有较高比例的甲基化, 进一步提示上述基因的甲基化是肝癌发生中的早期事件. Liu等<sup>[34]</sup>评估了血浆中CpG岛甲基化表型(CIMP)的临床意义及其与HCC进展之间的联系, 结果发现在HCC肿瘤组织和血浆标本中CIMP+( $\geq 3$ 个甲基化的基因)检出率为60.2%和57.4%, 非新生物的肝组织或正常人血浆中未检测出CIMP. 肿瘤组织和血浆标本中, CIMP状态在性别、乙肝表面抗原、甲胎蛋白和TNM分期上显著不同( $P<0.05$ ), 而在年龄、存在丙肝抗体、肝硬化、淋巴结数量、肿瘤数量、肿瘤大小或Edmondson-Steiner分级上无差异. 1年后经血浆评估, CIMP+组肿瘤转移率和复发率显著高于CIMP-组( $P<0.05$ ). 提示血浆中CIMP可作为HCC晚期和预后不良的一个分子标志.

**2.5 其他肿瘤** Bu等<sup>[35]</sup>报道了60例胰腺癌标本中, SFRP1、2、4、5甲基化频率分别为70.0%、48.3%、60.0%和76.7%; 相应基因表达下降的比例为65.0%、40.0%、55.0%和71.7%, 均高于配对的癌旁正常组织, 提示SFRPs基因的高甲基化和异常表达在胰腺癌中较普遍, 可能与其发生发展有关. Uhm等<sup>[36]</sup>报道了胆管癌组织中SFRP1基因甲基化的频率为63.4%(26/41), 非肿瘤组织中仅有低频的甲基化, 且直径 $>5$  cm的肿瘤中, SFRP1基因甲基化显著增加; 在3种胆管癌细胞系中均有甲基化存在, RT-PCR显示基因表达沉默, 经DAC处理后恢复表达, 提示异常的SFRP1基因甲基化可促进胆管细胞癌的发生. Lee等<sup>[37]</sup>报道在原发性恶性间皮瘤组织中, SFRP1、4、5基因启动子高甲基化频繁发生( $>80\%$ ). He等<sup>[38]</sup>亦报道SFRP4基因甲基化致表达沉默时可能促进间皮瘤细胞的进展, 且可能与不依赖 $\beta$ -catenin的非经典Wnt信号途径异常激活所致抑制凋亡有关.

### 3 结论

由于SFRPs基因家族的表现遗传学改变及其表达下调与消化系统肿瘤发生发展关系密切, 阻断SFRPs参与的Wnt通路途径将为研发新型抗肿瘤药物提供一个新的靶向. 尽管现有证据表明SFRPs通过启动子甲基化而致其表达沉默, 发挥着抑癌基因的功能, 然而要深入研究各种SFRP

### ■创新盘点

本文对Wnt通路拮抗因子SFRP家族基因甲基化与食管癌、胃癌、结直肠癌、肝癌等消化系统肿瘤的相关性作了详细阐述.

## ■应用要点

本文较为系统的总结了SFRP基因甲基化与消化系统肿瘤的相关性,并对其进行梳理,为指导消化系统肿瘤的筛查和新型抗肿瘤药物研发提供了一个新的靶点。

在肿瘤中的具体机制,将因其蛋白质多样性而在短期内难于揭示。正如Wnt信号通路在发育和随环境自我平衡中的特殊而复杂的机能,SFRP对消化系统肿瘤发生发展的影响,将依赖于组织、细胞和分子水平的整体揭示。

## 4 参考文献

- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31: 27-36
- 王震凯, 汪芳裕. DNA甲基化与肿瘤. 医学研究生学报 2011; 24: 641-645
- 王震凯, 朱人敏. Wnt信号转导通路在肿瘤中的研究进展. 医学研究生学报 2007; 20: 1294-1297, 1301
- Zou H, Molina JR, Harrington JJ, Osborn NK, Klatt KK, Romero Y, Burgart LJ, Ahlquist DA. Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int J Cancer* 2005; 116: 584-591
- 马传香, 王美红, 张式暖, 刘慧荣. 食管鳞状细胞癌中SFRP1、Wnt-1的表达及临床意义. 实用医学杂志 2011; 27: 1959-1961
- Liu JB, Qiang FL, Dong J, Cai J, Zhou SH, Shi MX, Chen KP, Hu ZB. Plasma DNA methylation of Wnt antagonists predicts recurrence of esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4917-4921
- Hao XW, Zhu ST, He YL, Li P, Wang YJ, Zhang ST. Epigenetic inactivation of secreted frizzled-related protein 2 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 532-540
- 郭艳丽, 郭伟, 郭钢, 杨植彬, 董稚明. 食管鳞状细胞癌中SFRP基因家族启动子区甲基化状态的检测. 中国病理生理杂志 2011; 27: 278-283
- Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y, Maruyama R, Sasaki S, Sasaki Y, Mita H, Nishikawa N, Yamaguchi K, Hirata K, Itoh F, Tokino T, Mori M, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene* 2007; 26: 4699-4713
- Zhao CH, Bu XM, Zhang N. Hypermethylation and aberrant expression of Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 1 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2214-2217
- 赵成海, 卜献民, 张宁, 张海鹏. Wnt拮抗因子SFRP2在胃癌中的甲基化和异常表达. 中国病理生理杂志 2009; 25: 1617-1620
- 赵成海, 尚超, 徐彦金, 卜献民, 张宁, 王巍. Wnt拮抗因子SFRP5在胃癌中的甲基化和异常表达. 中国医科大学学报 2008; 37: 745-747
- Kinoshita T, Nomoto S, Koderia Y, Koike M, Fujiwara M, Nakao A. Decreased expression and aberrant hypermethylation of the SFRP genes in human gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 1051-1056
- Cheng YY, Yu J, Wong YP, Man EP, To KF, Jin VX, Li J, Tao Q, Sung JJ, Chan FK, Leung WK. Frequent epigenetic inactivation of secreted frizzled-related protein 2 (SFRP2) by promoter methylation in human gastric cancer. *Br J Cancer* 2007; 97: 895-901
- Shin H, Kim JH, Lee YS, Lee YC. Change in gene expression profiles of secreted frizzled-related proteins (SFRPs) by sodium butyrate in gastric cancers: induction of promoter demethylation and histone modification causing inhibition of Wnt signaling. *Int J Oncol* 2012; 40: 1533-1542
- 王馥丽, 靳国梁, 郭伟, 郭艳丽, 董稚明. 贲门腺癌中分泌型卷曲相关蛋白4、5基因启动子区甲基化状态研究. 癌变·畸变·突变 2010; 22: 14-18
- Guo Y, Guo W, Chen Z, Kuang G, Yang Z, Dong Z. Hypermethylation and aberrant expression of Wnt-antagonist family genes in gastric cardia adenocarcinoma. *Neoplasia* 2011; 58: 110-117
- Qi J, Zhu YQ, Luo J, Tao WH. Hypermethylation and expression regulation of secreted frizzled-related protein genes in colorectal tumor. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7113-7117
- Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Chen WD, Pretlow TP, Yang B, Akiyama Y, Van Engeland M, Toyota M, Tokino T, Hinoda Y, Imai K, Herman JG, Baylin SB. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 417-422
- Tanaka J, Watanabe T, Kanazawa T, Tada T, Kazama Y, Tanaka T, Nagawa H. Silencing of secreted frizzled-related protein genes in MSI colorectal carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1265-1268
- Katoh Y, Katoh M. WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target. *Int J Mol Med* 2006; 17: 171-175
- 翟国栋, 王新颖, 龚伟, 姜泊. 大肠侧向发育型肿瘤中sfrp1基因存在高甲基化. 现代消化及介入诊疗 2011; 16: 105-108
- 董丽钧, 顾晓怡, 姜藻. 结直肠癌患者血清SFRP1基因甲基化的检测及临床意义. 江苏医药 2010; 36: 2153-2155
- Zhang W, Bauer M, Croner RS, Pelz JO, Lodygin D, Hermeking H, Stürzl M, Hohenberger W, Matzel KE. DNA stool test for colorectal cancer: hypermethylation of the secreted frizzled-related protein-1 gene. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1618-1626; discussion 1618-1626
- Oberwalder M, Zitt M, Wöntner C, Fiegl H, Goebel G, Zitt M, Köhle O, Mühlmann G, Ofner D, Margreiter R, Müller HM. SFRP2 methylation in fecal DNA--a marker for colorectal polyps. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 15-19
- Tang D, Liu J, Wang DR, Yu HF, Li YK, Zhang JQ. Diagnostic and prognostic value of the methylation status of secreted frizzled-related protein 2 in colorectal cancer. *Clin Invest Med* 2011; 34: E88-E95
- Huang D, Yu B, Deng Y, Sheng W, Peng Z, Qin W, Du X. SFRP4 was overexpressed in colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 395-401
- 吴龙, 钱叶本, 朱立新, 耿小平, 熊奇如. 肝细胞癌中SFRP1和APC基因启动子甲基化与其mRNA的表达. 中国普通外科杂志 2008; 17: 29-33
- 王丰, 华东, 吴玉玉, 程之红, 胡瑜, 谢其根, 王琼瑶, 杜祥, 黄朝晖. 血浆GSTP1和SFRP1基因甲基化分析在肝细胞癌早期诊断中的价值. 中国癌症杂志 2011; 21: 12-16
- Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, Lai HC, Liu KY, Chu TY, Lin YW. Promoter methylation of the secreted frizzled-related protein 1 gene SFRP1 is frequent in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2006; 107: 579-590
- Wu Y, Li J, Sun CY, Zhou Y, Zhao YF, Zhang SJ. Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist secreted frizzled-related protein 1 in hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasia* 2012; 59: 326-332
- Jiang GX, Liu W, Cui YF, Zhong XY, Tai S, Wang



- ZD, Shi YG, Li CL, Zhao SY. Reconstitution of secreted frizzled-related protein 1 suppresses tumor growth and lung metastasis in an orthotopic model of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 2838-2843
- 33 Takagi H, Sasaki S, Suzuki H, Toyota M, Maruyama R, Nojima M, Yamamoto H, Omata M, Tokino T, Imai K, Shinomura Y. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2008; 43: 378-389
- 34 Liu JB, Zhang YX, Zhou SH, Shi MX, Cai J, Liu Y, Chen KP, Qiang FL. CpG island methylator phenotype in plasma is associated with hepatocellular carcinoma prognosis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4718-4724
- 35 Bu XM, Zhao CH, Zhang N, Gao F, Lin S, Dai XW. Hypermethylation and aberrant expression of secreted frizzled-related protein genes in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3421-3424
- 36 Uhm KO, Lee ES, Lee YM, Kim HS, Park YN, Park SH. Aberrant promoter CpG islands methylation of tumor suppressor genes in cholangiocarcinoma. *Oncol Res* 2008; 17: 151-157
- 37 Lee AY, He B, You L, Dadfarmay S, Xu Z, Mazieres J, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* 2004; 23: 6672-6676
- 38 He B, Lee AY, Dadfarmay S, You L, Xu Z, Reguart N, Mazieres J, Mikami I, McCormick F, Jablons DM. Secreted frizzled-related protein 4 is silenced by hypermethylation and induces apoptosis in beta-catenin-deficient human mesothelioma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 743-748

#### ■同行评价

本文内容详实, 表述清晰, 结论可信, 有利于对消化系统肿瘤的表观遗传学机制有更深入的认识, 对肿瘤的监测和靶向治疗有一定的指导意义。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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》性质、刊登内容及目标

**本刊讯** 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

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

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

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

# 成年患者食管异物临床特点分析256例

路国涛, 王玉欣, 梁钰, 丁岩冰, 肖炜明, 李玉瑋

## ■背景资料

食管异物为临床常见急症之一, 可发生于任何年龄, 患者多有吞咽困难、胸痛、消化道出血等上消化道症状, 食管异物一旦出现需尽早处理, 严重时可出现食管穿孔、食管气管瘘、纵隔感染等并发症。随着内镜技术的不断进步完善, 内镜下治疗食管异物已经取代外科手术已成为食管异物治疗的首选方案。

路国涛, 王玉欣, 梁钰, 丁岩冰, 肖炜明, 扬州市第一人民医院消化内科 江苏省扬州市 225001

李玉瑋, 山东大学医学院病原生物学研究所 山东省济南市 250001

路国涛, 博士, 主治医师, 主要从事消化系常见基础疾病及内镜诊治方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由丁岩冰、路国涛及肖炜明设计; 研究过程由路国涛、王玉欣及梁钰操作完成; 数据分析由路国涛与李玉瑋完成; 本论文写作由路国涛与丁岩冰完成。

通讯作者: 丁岩冰, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 225001, 江苏省扬州市邗江区邗江中路368号, 扬州市第一人民医院消化科。chinadyb@vip.sina.com

收稿日期: 2012-08-14 修回日期: 2012-09-12

接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-18

## Clinical features of adult patients with esophageal foreign bodies: An analysis of 256 cases

Guo-Tao Lu, Yu-Xin Wang, Yu Liang, Yan-Bing Ding, Wei-Ming Xiao, Yu-Tang Li

Guo-Tao Lu, Yu-Xin Wang, Yu Liang, Yan-Bing Ding, Wei-Ming Xiao, Department of Gastroenterology, Yangzhou No.1 People's Hospital, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China  
Yu-Tang Li, Institute of Pathogenic Biology, School of Medicine Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China

Correspondence to: Yan-Bing Ding, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Yangzhou No. 1 Peoples' Hospital, 368 Hanjiang Middle Road, Hanjiang District, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. chinadyb@vip.sina.com

Received: 2012-08-14 Revised: 2012-09-12

Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To summarize and analyze the clinical features of adult patients with esophageal foreign bodies.

**METHODS:** Adult patients with esophageal foreign bodies who underwent endoscopy from January 2004 to January 2012 were analyzed retrospectively and their clinical characteristics were statistically analyzed.

**RESULTS:** A total of 256 patients were enrolled in this study. Food bolus is the main type of foreign body (95.7%). The top three symptoms were sensation of obstruction, dysphagia, and swallowing pain. Elderly patients ( $\geq 65$  years

old) were more likely to be associated with underlying esophageal diseases than patients between 18-65 years old (27.6% and 14.8%,  $P < 0.05$ ). The major foreign body type was food boluses in patients with underlying esophageal diseases (65.3%) and bones (fish or chicken) in patients without underlying diseases (68.5%). The success rate for foreign body removal by endoscopic management was 98.4% (252/256).

**CONCLUSION:** Esophageal foreign body is a clinically common disease. More attention should be paid to elderly patients or/and patients with underlying esophageal diseases. Endoscopic management of esophageal foreign bodies is safe and effective.

**Key Words:** Esophageal foreign bodies; Clinical characteristics; Adult; Endoscopic management

Lu GT, Wang YX, Liang Y, Ding YB, Xiao WM, Li YT. Clinical features of adult patients with esophageal foreign bodies: An analysis of 256 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2818-2821

## 摘要

**目的:** 总结分析食管异物患者临床特点。

**方法:** 对2004-01/2012-01消化内镜中心诊治的食管异物成年患者进行回顾性分析, 并对其临床资料特点进行统计分析。

**结果:** 共纳入256例患者, 食管异物以食源性异物为主(95.7%), 常见临床症状为异物梗阻感、吞咽困难、吞咽疼痛。老年患者( $\geq 65$ 岁)伴有食管基础疾病的比例明显高于18-65岁患者(27.6%、14.8%,  $P < 0.05$ )。有食管基础疾病的患者, 异物以食糜为主(65.3%)。而无食管基础疾病的患者异物以鱼骨、鸡骨等骨头为主(68.5%), 对比有统计学差异( $P < 0.05$ )。252例患者(98.4%)经内镜下治疗成功。

**结论:** 食管异物为临床常见疾病之一, 治疗过程中需注意老年患者和/或有食管基础疾病的患者。内镜下治疗食管异物安全有效。

**关键词:** 食管异物; 临床特点; 成人; 内镜治疗

## ■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

路国涛, 王玉欣, 梁钰, 丁岩冰, 肖炜明, 李玉璐. 成年患者食管异物临床特点分析256例. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2818-2821

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2818.asp

## 0 引言

食管异物为临床常见急症之一, 多有吞咽困难、胸痛、消化道出血等症状, 严重时可能出现食管气管瘘、食管动静脉瘘、食管穿孔等并发症, 危及生命<sup>[1-4]</sup>, 锐性异物尤甚<sup>[5]</sup>. 随着内镜技术的不断进步完善, 内镜下治疗食管异物已经取代外科手术已成为食管异物治疗的首选方案<sup>[6-8]</sup>. 目前关于食管异物内镜下诊治的临床报道甚多, 而关于食管异物患者自身临床特点的文章较少. 鉴于此, 本研究对我院2004-01/2012-01消化内镜中心诊治的256例患者进行回顾性分析, 以期进一步探讨食管异物患者的临床特点.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 将2004-01/2012-01因食管异物就诊于扬州市第一人民医院并行内镜诊治的256例患者纳入研究. 入选标准为: 内镜下明确提示存在食管异物的患者. 排除标准: 诊治资料记录欠详细的患者.

**1.2 方法** 通过查阅内镜下诊治病历, 记录如下资料: (1)患者的基本资料: 性别、年龄等; (2)就诊症状病因; (3)内镜下食管异物性质; (4)是否合并食管损伤或食管狭窄、食管癌等基础疾病; (5)内镜治疗方案; (6)治疗是否成功等, 并对上述因素进行统计分析.

**统计学处理** 计数资料间比较采用 $\chi^2$ 检验, 计量资料间采用 $t$ 检验. 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义. 所有数据应用SPSS16.0系统进行统计学处理.

## 2 结果

**2.1 基本资料** 共纳入256例食管异物患者, 年龄19-89岁, 平均年龄 $56.4 \pm 1.0$ 岁, 中位年龄57岁. 18-65岁患者169例(66.0%),  $\geq 65$ 岁患者87例(34.0%). 男136例, 女120例.

**2.2 食管基础疾病** 256例食管异物患者中合并有食管基础疾病者共49例(19.1%), 其中食管癌23例(其中3例因食管异物首次诊断为食管癌), 吻合口狭窄22例, 食管静脉曲张3例, 贲门失弛缓综合征1例, 食管憩室1例. 老年患者( $\geq 65$ 岁)中合并食管基础疾病比例为27.6%, 而18-65岁患者仅为14.8%, 2组患者相比有统计学差异( $P<0.05$ , 表1).

**2.3 食管异物性质** 256例食管异物患者中, 衣

表 1 不同年龄阶段食管异物患者基础疾病状况对比  $n(\%)$

	18-65岁	$\geq 65$ 岁	$P$ 值
食管癌	13(7.7)	10(11.5)	0.258
吻合口狭窄	9(7.5)	13(4.9)	0.675
食管静脉曲张	3(1.8)	0	0.500
贲门失弛缓综合征	0	1(1.1)	1.000
食管憩室	0	1(1.1)	1.000
总计	25(14.8)	24(27.6)	0.037

表 2 有无食管基础疾病患者间食管异物性质对比  $n(\%)$

	无食管基础疾病者	有食管基础疾病者	$P$ 值
衣扣	1(0.5)	0	1.000
义齿	4(2.0)	0	0.497
金属性物质	6(3.0)	0	0.246
豆类	3(1.4)	2(4.1)	0.369
食糜	51(24.6)	32(65.3)	0.011
各类骨头	142(68.5)	15(30.6)	0.000

扣1例, 义齿4例, 金属物质6例(硬币1例, 吻合口缝合钉1例, 金属铁丝或硬条4例), 食源性异物245例(豆类5例, 猪骨6例, 鸡骨48例, 食糜83例, 鱼骨103例). 49例合并食管基础疾病患者食糜类食管异物明显高于无食管基础疾病患者(65.3%、24.6%,  $P<0.05$ ), 而鸡骨、鱼骨等骨头类食管异物比例明显低于无食管基础疾病的患者(30.6%、68.5%,  $P<0.05$ , 表2).

**2.4 临床症状** 食管异物患者临床表现主要为异物梗阻感108例(42.2%)、吞咽困难67例(26.2%)、吞咽疼痛46例(17.9%)、胸骨后疼痛26例(10.2%)、上腹痛6例(2.3%)、恶心呕吐2例(0.8%)、呕血1例(0.4%)(图1).

**2.5 食管异物滞留位置** 对于食管癌或吻合口狭窄的患者, 食管异物多位于食管病变部位或吻合口处. 而对于无食管基础疾病的患者, 食管异物易发生在食管的生理狭窄处, 211例患者中, 异物滞留于食管距门齿 $\leq 25$  cm 157例、 $>25-32$  cm 29例、 $>32-40$  cm 21例.

**2.6 内镜下治疗** 按常规胃镜检查对患者进行诊治, 诊治过程中注意异物形态并需要高度重视有无食管黏膜损伤、出血、溃疡和内嵌顿等情况发生. 操作过程中可使用透明帽、异物钳、网篮等器械辅助. 本研究中共124例患者出现食管黏膜损伤等并发症, 主要表现为食管黏膜充血、食管溃疡等. 操作过程中对于黏膜出血患者可予以冰去甲肾上腺素反复冲洗. 对于食源性异物, 若

## ■研究前沿

内镜治疗过程中如何选择合理的器械和操作方式, 为目前食管异物临床研究关注重点, 诸如透明帽等器械对食管异物取出成功率的影响尚无定论, 需进一步研究. 此外, 关于食管异物患者的临床特点等问题, 尚缺少详实的临床资料报道.

## ■创新盘点

目前食管异物内镜下治疗文章报道较多, 而关于食管异物患者自身临床特点的文章较少. 本文结合食管异物治疗等方面进展, 回顾性分析了8年来256名食管异物患者的基本资料、异物性质、治疗措施及疾病转归等, 同时介绍了内镜下食管异物治疗方法.

### ■应用要点

该文总结分析食管异物患者临床特点,包括不同年龄段患者异物种类及患者食管基础病的特点,并介绍内镜治疗方法,对临床诊疗有一定参考价值。

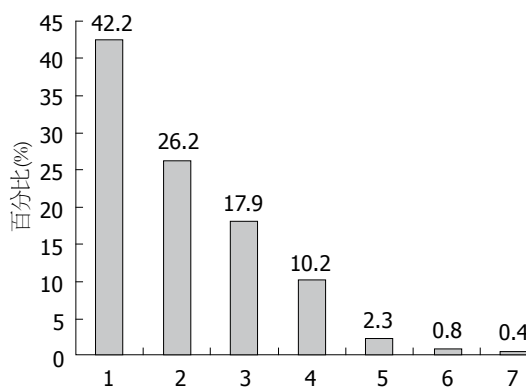


图1 食管异物患者临床症状分布。1: 异物梗阻感; 2: 吞咽困难; 3: 吞咽疼痛; 4: 胸骨后疼痛; 5: 上腹痛; 6: 恶心呕吐; 7: 呕血。

取出困难,可考虑推入胃腔。256例患者中,252例患者(98.4%)治疗成功,其中231例通过异物钳、网篮等取出异物,21例通过胃镜将食源性异物推入胃腔。4例患者内镜下治疗失败,均为锐性食管异物发生食管黏膜内嵌顿难以取出异物的患者,请外科会诊后并转外科手术治疗。

### 3 讨论

食管异物是临床常见急症之一,多见于儿童<sup>[9]</sup>,成人中亦较为常见。本研究256例患者中,食管异物以食源性为主(95.7%),其中以鱼骨为著,同其他地区相关研究不同<sup>[1,10,11]</sup>,与本地居民喜食黑鱼有一定关系。除食源性异物外,尚有衣扣、金属物质等异物,此类异物多见于服刑人员或短期内情绪波动剧烈患者<sup>[12]</sup>,对此类患者,针对食管异物治疗同时需高度重视调整患者心理因素。

国外研究<sup>[13]</sup>提示,食管异物患者中嗜酸粒细胞性食管炎发病率较高,考虑同嗜酸粒细胞性食管炎患者多有吞咽困难等症状相关,目前国内暂无相关研究报道。本研究中,食管癌术后吻合口狭窄22例,食管静脉曲张3例,贲门失弛缓综合症1例,食管憩室1例,食管癌23例。合并基础病患者以老年患者( $\geq 65$ 岁)为著,明显高于18-60岁患者,且有基础病患者的食管异物以食糜为主,而无平素体健患者的食管异物以鱼骨、鸡骨为主( $P < 0.05$ )。因此,在临床工作中,对于老年、食糜类异物的食管异物患者,需额外关注有无合并食管基础疾病可能。此外,内镜检查同时发现食管异物可造成食管黏膜糜烂、食管溃疡等黏膜损伤,对于此类患者,建议取出异物后予以抑酸药等治疗并择期复查内镜。

随着内镜技术的进步,内镜下治疗食管异物已成为临床常用治疗手段。内镜下治疗较以往

外科手术治疗具有花费低、痛苦少、患者接受度高等优点。对于多数食管异物患者,通过内镜能够安全取出<sup>[6-8]</sup>,但仍有部分患者因食管穿孔等并发症行外科手术治疗<sup>[14]</sup>。赵晋波等<sup>[15]</sup>研究提示异物类型(锐性异物)是食管异物需手术干预的独立危险因素。本研究256例患者中,252例患者(98.4%)治疗成功,4例(1.56%)患者内镜下治疗失败。内镜治疗失败患者均为鱼刺类锐性异物发生食管嵌顿且与食管黏膜明显黏连,若通过内镜下强取异物,患者有大出血、食管撕裂等危险,病死率高,对于此类患者,需充分与患者沟通,完善胸部CT等检查明确有无食管动脉瘘、食管气管瘘、食管脓肿等并发症可能,并请外科会诊协助诊治。本研究中4例患者经外科手术治疗后愈合良好。此外,部分患者发生食管异物后可有食管黏膜充血、食管溃疡、上消化道出血等常见并发症出现,在进行内镜下诊治取出异物后,可予以去甲肾上腺素等进行内镜下治疗,最大程度降低严重并发症发生。

总之,食管异物为临床常见疾病之一,以食源性异物为主,老年患者多有食管癌等食管基础疾病,且以食糜类异物为主。通过内镜下治疗食管异物安全有效。

### 4 参考文献

- 1 刘晖,王建刚,张晓彤,许珉,汪立,梁建民,吴保俊,任晓勇. 食管异物1252例临床分析. 中国临床医学 2005; 12: 669-671
- 2 Taylor RB. Esophageal foreign bodies. *Emerg Med Clin North Am* 1987; 5: 301-311
- 3 Lai AT, Chow TL, Lee DT, Kwok SP. Risk factors predicting the development of complications after foreign body ingestion. *Br J Surg* 2003; 90: 1531-1535
- 4 Li ZS, Sun ZX, Zou DW, Xu GM, Wu RP, Liao Z. Endoscopic management of foreign bodies in the upper-GI tract: experience with 1088 cases in China. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 485-492
- 5 Sung SH, Jeon SW, Son HS, Kim SK, Jung MK, Cho CM, Tak WY, Kweon YO. Factors predictive of risk for complications in patients with oesophageal foreign bodies. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 632-635
- 6 Orji FT, Akpeh JO, Okolugbo NE. Management of esophageal foreign bodies: experience in a developing country. *World J Surg* 2012; 36: 1083-1088
- 7 Wu WT, Chiu CT, Kuo CJ, Lin CJ, Chu YY, Tsou YK, Su MY. Endoscopic management of suspected esophageal foreign body in adults. *Dis Esophagus* 2011; 24: 131-137
- 8 刘靖正,周平红,姚礼庆,徐美东,秦文政,胡健卫,蔡明琰. 上消化道异物714例胃镜治疗体会. 中华消化内镜杂志 2012; 29: 46-47
- 9 Hachimi-Idrissi S, Corne L, Vandenplas Y. Management of ingested foreign bodies in childhood: our experience and review of the literature. *Eur J Emerg Med* 1998; 5: 319-323
- 10 贾淑萍. 食管异物608例临床分析. 中华全科医师杂志



- 2011; 10: 444-445
- 11 智发朝, 王春萍, 朱建新, 陈村龙, 潘德寿, 万田莫, 周丹, 冯福才, 周殿元. 消化道异物132例内镜诊治. 世界华人消化杂志 2001; 9: 242-243
- 12 毛果伟, 陆芹, 朱俊义, 陈志荣, 郑丽华, 任伯良. 处理故意摄入消化道异物45例. 世界华人消化杂志 2000; 8: 11
- 13 Sperry SL, Crockett SD, Miller CB, Shaheen NJ, Dellon ES. Esophageal foreign-body impactions: epidemiology, time trends, and the impact of the increasing prevalence of eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endosc* 2011; 74: 985-991
- 14 陈宽冰, 石文君, 宣莹. 食管异物的手术治疗. 山东医药 2011; 51: 62-63
- 15 赵晋波, 田丰, 汪健, 闫小龙, 卢强, 姜涛, 韩勇, 周勇安, 李小飞. 食管异物需手术干预的危险因素分析. 中华胃肠外科杂志 2011; 14: 709-710

## ■同行评价

该文为8余年数据的回顾性总结, 数据较详实, 有代表性, 对临床诊疗有一定参考价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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, 包括原创文章、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》保证每篇文章四月内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)



# 凋亡调节因子Smac、Cyt C在食管癌中的表达及与预后的关系

高凤兰, 宋文刚, 李维山, 王宪远, 刘国良, 郭宝强

## ■背景资料

肿瘤细胞凋亡是近年来研究的热点, 很多肿瘤的发生和发展都和肿瘤细胞的凋亡紊乱有密切关系。Smac是新近发现的重要凋亡调节因子, 细胞色素C从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤, 研究食管癌中凋亡调节因子Smac和细胞色素C的凋亡紊乱情况对进一步了解食管癌中凋亡紊乱机制有重要作用, 从而为食管癌的治疗及预后判断提供重要的理论依据。

高凤兰, 宋文刚, 李维山, 刘国良, 漯河医学高等专科学校 河南省漯河市 462002

王宪远, 郑州大学第二附属医院病理科 河南省郑州市 450014

郭宝强, 临颖县人民医院病理科 河南省漯河市 462600

高凤兰, 教授, 主要从事肿瘤病理的研究。

教育厅自然科学基金资助项目, No. 2008C31004

作者贡献分布: 高凤兰、宋文刚及李维山对此文献均等; 此课题由高凤兰、宋文刚及李维山设计; 研究过程、实验操作、数据统计、论文撰写由高凤兰、宋文刚及李维山共同完成; 数据分析由刘国良完成; 王宪远指导本课题实验设计、实验操作, 提供病理标本等、指导论文撰写; 郭宝强参与本课题部分指标的实验观察、论文撰写, 提供病理标本等。

通讯作者: 高凤兰, 教授, 462002, 河南省漯河市大学路148号, 漯河医学高等专科学校病理检验研究中心。lhyzgao@126.com  
电话: 0395-2964847

收稿日期: 2012-06-06 修回日期: 2012-08-02

接受日期: 2012-09-20 在线出版日期: 2012-10-18

## Correlation between expression of apoptosis modulators Smac and Cyt C and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma

Feng-Lan Gao, Wen-Gang Song, Wei-Shan Li, Xian-Yuan Wang, Guo-Liang Liu, Bao-Qiang Guo

Feng-Lan Gao, Wen-Gang Song, Wei-Shan Li, Guo-Liang Liu, Pathological Examination and Research Center, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China

Xian-Yuan Wang, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Bao-Qiang Guo, Department of Pathology, People's Hospital of Linying County, Luohe 462600, Henan Province, China

Supported by: the Nature Science Foundation of Education Department of Henan Province, No. 2008C31004

Correspondence to: Feng-Lan Gao, Professor, Pathological Examination and Research Center, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China. lhyzgao@126.com

Received: 2012-06-06 Revised: 2012-08-02

Accepted: 2012-09-20 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) and cytochrome C (Cyt C) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and to analyze their prognostic significance.

**METHODS:** Semiquantitative immunochemistry was performed to detect the expression of Smac and Cyt proteins in 85 cases of ESCC, matched tumor-adjacent esophageal tissue, and normal esophageal tissue.

**RESULTS:** The positive rates of Smac expression in ESCC, tumor-adjacent esophageal tissue and normal esophageal tissue were 63.75%, 92.50% and 77.50%, respectively, with a significant difference among the three groups ( $H_c = 28.703, P < 0.05$ ). The positive rates of Cyt C expression also differed significantly among ESCC, tumor-adjacent esophageal tissue and normal esophageal tissue (61.25% vs 90.00% vs 72.50%;  $H_c = 24.720, P < 0.05$ ). The expression of Smac/Diablo and Cyt C was not correlated with tumor histological differentiation and infiltration depth in ESCC (both  $P > 0.05$ ), but was correlated with lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). Expression of Cyt C protein was positively correlated with that of Smac protein in ESCC ( $r = 0.806, P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** The expression of Smac/Diablo and Cyt C protein closely correlates with lymph node metastasis in ESCC. Smac/Diablo is lowly expressed in ESCC, and expression of Smac/Diablo positively correlates with that of Cyt C.

**Key Words:** Esophageal carcinoma; Immunohistochemistry; Smac/Diablo; Cytochrome C

Gao FL, Song WG, Li WS, Wang XY, Liu GL, Guo BQ. Correlation between expression of apoptosis modulators Smac and Cyt C and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2822-2826

## 摘要

**目的:** 探讨第二个线粒体激活因子(the second mitochondria-derived activator of caspase, Smac)和细胞色素C(Cycytochrome C, Cyt C)在食管鳞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)中的表达及其临床意义。

**方法:** 选择临床资料完整的存档蜡块, 应用免

## ■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

疫组织化学SP法对85例经病理确诊为食管鳞癌病例的癌组织、正常组织及癌旁组织进行Smac和Cyt C蛋白半定量免疫组织化学分析。

**结果:** (1)Smac在食管鳞癌组织、正常组织、癌旁组织的阳性表达率分别为63.75%、92.50%、77.50%, 有显著性差异( $H_c = 28.703$ ,  $P < 0.05$ ). Cyt C在食管鳞癌组织、正常组织、癌旁组织的阳性表达率分别为61.25%、90.0%、72.50%, 有显著性差异( $H_c = 24.720$ ,  $P < 0.05$ ); (2)Smac/Diablo和Cyt C表达与患者的组织分化程度、浸浸润度均无明显关系( $P > 0.05$ ); 但与淋巴结转移相关( $P < 0.05$ ); (3)Smac表达阳性的51例中, Cyt C蛋白阳性表达45例, 占88.24%(45/51), 两者表达的相关性, 经统计学分析, 两者有极强的关联性, 呈明显的正相关( $r = 0.806$ ,  $P < 0.01$ ).

**结论:** Smac/Diablo在食管鳞癌组织中呈低表达, 与Cyt C表达呈明显的正关, Smac/Diablo和Cyt C蛋白表达与食管癌淋巴结转移有关。

**关键词:** 食管肿瘤; 免疫组织化学; Smac/Diablo; 细胞色素C

高凤兰, 宋文刚, 李维山, 王宪远, 刘国良, 郭宝强. 凋亡调节因子Smac、Cyt C在食管癌中的表达及与预后的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2822-2826  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2822.asp>

## 0 引言

肿瘤细胞凋亡是近年来研究的热点, 研究发现很多肿瘤的发生发展都与肿瘤细胞的凋亡紊乱有密切关系. 细胞凋亡调节蛋白第二个线粒体激活因子(the second mitochondria-derived activator of caspase, Smac)是新近发现的又一种重要凋亡调节因子, 是一种由线粒体释放到细胞浆的重要凋亡调节因子. Smac蛋白能与已发现所有的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)结合, 使其丧失抑制Caspase活性. 因此, Smac蛋白在细胞凋亡途径中有着极其重要的作用<sup>[1,2]</sup>, 可通过消除IAPs对Caspase蛋白抑制作用促进细胞凋亡. 细胞色素C(Cytochrome C, Cyt C)是第一种被发现由线粒体释放的促凋亡蛋白. 有研究表明, Cyt C的释放在内源性途径的细胞凋亡过程中占有核心地位<sup>[3-5]</sup>. 食管癌在我国的发病率居世界首位, 全世界每年死于食管癌约30万人, 我国占半数以上<sup>[6]</sup>. 本课题旨在研究食管癌中凋亡调节因子Smac和Cyt C的凋亡紊乱

情况及其相关性, 探讨其对食管癌发生、发展的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2008-2010年漯河医学高等专科学校病理检验研究中心、郑州大学第二附属医院、漯河市临颖县人民医院手术切除标本80例, 其中男47例, 女33例, 年龄37-78岁. 根据2009年第7版国际抗癌联盟(UICC)食管癌分期对T、N、M的划分标准<sup>[7]</sup>: T1 18例, T2 24例, T3 38例, N0 11例, N1 41例、N2 33例, 80例均无远处转移. 80例标本组织学类型经两名以上病理医师确诊, 均为鳞状细胞癌, 其中高分化33例, 中分化38例, 低分化19例. 选择其中同期食管癌切除标本断端(距肿瘤 $< 2$  cm)40例, 作为癌旁组织组; 另取同期食管癌患者残端阴性组织(距癌灶边缘 $> 5$  cm)40例作为正常组织组. 80例患者临床资料完整, 术前均未接受任何治疗. 鼠抗人Smac/Diablo单克隆抗体(Cell Signaling Technology, 美国), 鼠抗人Cyt C单克隆抗体(北京中山公司), 即用型SP试剂盒(北京博奥森生物公司), DAB染色试剂盒(北京博奥森生物公司)等。

**1.2 方法** 采用SP免疫组织化学方法检测Smac和Cyt C的表达. 用已知阳性切片做阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照. 方法及操作步骤: (1)脱蜡、水化: 所有被检标本石蜡4  $\mu$ m连续切片, 常规脱蜡水化; (2)修复抗原: 入30 mL/L过氧化氢室温孵育5 min, PBS(pH 7.0)洗5 min, 重复3次. 微波中火煮沸10 min, 自然冷却, PBS洗5 min重复3次, 1:50正常羊血清封闭20 min; (3)加入1:100 PBS稀释的一抗Smac和Cyt C, 37  $^{\circ}$ C温育2 h, PBS洗5 min, 重复3次. 加入1:100稀释的生物素化二抗37  $^{\circ}$ C温育30 min, PBS洗5 min, 重复3次, 加DAB室温显色3 min, 自来水冲洗后放入苏木素复染30 s, 用自来水冲洗返蓝, 常规脱水、透明、中性树胶封片镜检. 对照实验除用PBS代替一抗作阴性对照外, 其他实验步骤不变。

Smac和Cyt C阳性染色均为淡黄色、棕黄色或棕褐色, Smac和Cyt C均定位于细胞浆. 参照文献<sup>[7]</sup>评分方法, 将染色强度分为4级: 0分为无色; 1分为黄色; 2分为棕黄色; 3分为棕褐色. 再计算阳性细胞所占的百分比: 1分为阳性细胞 $\leq 25\%$ ; 2分为阳性细胞26%-50%; 3分为51%-75%; 4分为 $> 76\%$ . 计算染色强度得分与阳性细胞所占百分比得分之和: 0-2定为阴性(-), 3-4分为弱阳性(+), 5-7分为强阳性(++), 弱阳性和强阳性均确

## ■ 相关报道

Yoo等用免疫组织化学分析Smac在肿瘤中表达率为62%, 表明Smac在不同癌组织中表达不同. 在Smac表达阳性的51例中, Cyt C蛋白阳性表达45例, 占88.24%(45/51), 两者表达具有高度相关性, 呈明显正相关, 说明Smac和Cyt C蛋白表达在食管癌细胞的凋亡中具有协同作用, 且均与肿瘤的转移密切相关。

## ■创新盘点

本文研究了食管癌组织Smac和Cyt C蛋白表达的相关性及其与肿瘤分期与转移的关系,为食管癌的基因治疗及预后判断提供理论依据。

表 1 Smac和Cyt C蛋白在食管正常组织、癌组织及癌旁组织中的表达

分组	n	Smac				Cyt C			
		-	+	++	阳性率(%)	-	+	++	阳性率(%)
正常组织	40	3	8	29	92.50	4	8	28	90.00
癌旁组织	40	9	11	20	77.50	11	7	22	72.50
癌组织	80	29	34	17	63.75 <sup>a</sup>	31	31	18	61.25 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 其他组。

表 2 Smac和Cyt C蛋白表达与食管癌分期及组织分化程度的关系

分组	n	Smac阳性			Cyt C阳性		
		n	$\chi^2$ 值	P值	n	$\chi^2$ 值	P值
T分期	80	51	0.088	0.957	49	1.145	0.564
T1	18	12			10		
T2	24	15				17	
T3	38	24			23		
N分期	80	51	34.991	0.000	49	27.596	0.000
N0	48	43			41		
N1	21	6			7		
N2	11	2			2		
分化程度	80	51	0.007	0.997	49	0.603	0.740
G1	28	18			17		
G2	33	21			19		
G3	19	12			13		

定为表达阳性。

**统计学处理** 结果采用SPSS11.0软件进行分析。Smac和Cyt C蛋白在多组间的比较采用Kruskal-Wallis Test检验,两两组间比较采用Willcoxon秩和检验,Smac和Cyt C蛋白表达与食管癌分期的关系采用 $\chi^2$ 检验,Smac和Cyt C蛋白表达的相关性采用Spearman等级相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Smac和Cyt C蛋白在食管正常组织、癌组织及癌旁组织中的表达情况** Smac和Cyt C均表达于癌组织细胞的胞浆中。Smac在食管鳞癌组织、正常组织、癌旁组织的阳性表达率分别为63.75%、92.50%、77.50%,经Kruskal-Wallis Test有显著性差异( $H_c = 28.703, P < 0.05$ )。Cyt C在食管鳞癌组织、正常组织、癌旁组织的阳性表达率分别为61.25%、90.0%、72.50%,有显著性差异( $H_c = 24.720, P < 0.05$ ),进一步对Smac和Cyt C蛋白在不同组织中的表达情况进行两两比较(Willcoxon秩和检验),发现癌组织与正常组织、癌旁组织在Smac和Cyt C蛋白的阳性率比较上

均有显著性统计学差异( $P$ 值均 $< 0.017$ ),正常组织与癌旁组织在两种蛋白的阳性率比较上未见有显著性统计学差异(表1)。

**2.2 Smac和Cyt C蛋白表达与食管癌分期的关系** Smac/Diablo和Cyt C表达与患者的组织分化程度、浸深润度均无明显关系( $P > 0.05$ )。但与淋巴结转移相关( $P < 0.05$ ,表2)。

**2.3 Smac和Cyt C蛋白表达的相关性及意义** 在Smac表达阴性的29例中,Cyt C蛋白阴性表达25例,占86.21%(25/29),弱阳性表达3例,占10.34%(3/29),强阳性表达1例,占3.45%(1/29);在Smac表达弱阳性的34例中,Cyt C蛋白阴性表达6例,占17.65%(6/34),弱阳性表达26例,占76.47%(26/34),强阳性表达2例,占5.88%(2/34);在Smac表达强阳性的17例中,Cyt C蛋白阴性表达0例,弱阳性表达2例,占11.76%(2/17),强阳性表达15例,占88.24%(15/17);在Smac表达阳性的51例中,Cyt C蛋白阳性表达45例,占88.24%(45/51),两者表达的相关性,采用Spearman等级相关分析,经统计学分析, $r = 0.806, P < 0.01$ ,两者有极强的关联性,呈明显的正相关(表3)。

表 3 食管癌组织Smac和Cyt C蛋白表达的相关性  $n(\%)$ 

Smac		Cyt C		
蛋白表达	<i>n</i>	-	+	++
-	29	25(86.21)	3(10.34)	1(3.45)
+	34	6(17.65)	26(76.47)	2(5.88)
++	17	0(0)	2(11.76)	15(88.24)
合计	80	31	31	18

### 3 讨论

机体内环境的相对稳定受多种因素的调节, 他不仅依赖于细胞增殖和分化的平衡, 还受细胞凋亡的调节, 而细胞凋亡又受诸多凋亡相关基因的调控. 近年来, 大量的研究表明, 凋亡相关基因调控失调, 与肿瘤的发生发展密切相关. 食管癌是我国发病率较高的恶性肿瘤之一, 目前研究表明食管癌的发生、发展也与许多凋亡调节因子紊乱有关<sup>[8-10]</sup>. Smac是2000年美国Du等<sup>[11]</sup>发现的一种新型线粒体膜间隙蛋白, Smac基因位于12号染色体长臂上, 有7个外显子组成, 是目前发现的唯一广泛存在于哺乳动物细胞中直接抑制IAP的蛋白, 可解除IAP家族对Caspase的抑制作用, 进而通过常规抗癌药物或靶向死亡的受体介导, 发出细胞凋亡信号, 从而激活肿瘤细胞的凋亡机制. 但其在肿瘤细胞中表达降低或缺失. Yoo等<sup>[12]</sup>用免疫组织化学分析Smac的表达, 结果显示: 肿瘤中表达率为62%, 包括7/10结肠癌, 42/60胃癌, 4/10肺癌, 2/10前列腺癌, 7/10卵巢癌. 在肉瘤中表达率为22%, 包括5/11横纹肌肉瘤, 2/8恶性神经鞘瘤, 1/6平滑肌肉瘤, 2/7恶性皮肤纤维瘤, 1/2尤因肉瘤, 8例血管肉瘤和8例脂肪肉瘤中无表达. 表明Smac在不同癌组织中表达不同, 提示Smac低表达可能抑制细胞凋亡. 本研究结果显示: Smac在食管正常组织癌旁组织、鳞癌组织的阳性表达率分别为92.50%、77.50%、63.75%, 在正常组织、癌旁组织、癌组织中表达依次降低, 以癌组织中表达最低, 经统计学分析, 有显著性差异( $P<0.05$ ). 在研究Smac蛋白表达与食管癌的分期及淋巴结转移中显示, Smac蛋白表达与淋巴结转移呈负相关, 由此说明, Smac表达降低确与食管癌的发生、发展密切相关.

Cyt C是第一种被发现由线粒体释放的促凋亡蛋白. 到目前为止, 其释放机制尚未完全阐明, 但有研究结果显示<sup>[12]</sup>, 线粒体中细胞色素C的释放分为两步: 首先, 当细胞受到凋亡因素刺激时, 细胞色素C与线粒体内膜的松散或紧密结合

状态受到破坏, 使细胞色素C成为游离状态, 释放入胞质; 其次, 通过Bcl-2家族促凋亡成员Bax/Bak造成线粒体外膜中断, 使线粒体外膜的通透性增加, 促使游离的细胞色素C释放. 有关实验结果证明<sup>[13]</sup>, CytC是一个线粒体起源普遍存在的细胞凋亡信号分子, 线粒体释放细胞色素C的同时, 还释放另一种促细胞凋亡因子Smac. 实验证明细胞色素C从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤, 细胞色素C在dATP存在的条件下能与凋亡相关因子1(Apaf-1)结合, 使其形成多聚体, 并促使Caspase-9与其结合形成凋亡小体, Caspase-9被激活, 被激活的Caspase-9能激活其他的Caspase如Caspase-3等, 从而诱导细胞凋亡. 本研究结果提示: 在Smac表达阴性组(29例), Cyt C蛋白阴性表达25例, 占86.21%(25/29), 在Smac表达弱阳性组(34例), Cyt C蛋白弱阳性表达26例, 占76.47%(26/34), 在Smac表达强阳性的17例中, Cyt C蛋白强阳性表达15例, 占88.24%(15/17); 在Smac表达阳性的51例中, Cyt C蛋白阳性表达45例, 占88.24%(45/51), 两者表达具有高度相关性, 呈明显正相关, 经统计学分析,  $r = 0.806$ ,  $P<0.01$ . 说明Smac和Cyt C蛋白表达在食管癌细胞的凋亡中具有协同作用, 且均与肿瘤的转移密切相关.

总之, 本实验结果显示: 在食管癌组织中Smac和Cyt C蛋白质的表达与正常食管组织中的表达具有明显的差异性( $P<0.05$ ), 同时与食管癌的病理分期, 淋巴结转移均有密切的关系, 说明这两种蛋白在一定程度上参与了食管癌的发生与发展. 通过基因技术外源性导入融合表达Smac的质粒可以诱发细胞凋亡<sup>[2]</sup>, 或者Smac的表达增高可以增强肿瘤患者化疗和放疗的效果<sup>[4]</sup>, 从而为治疗肿瘤提供了一个广阔的前景.

### 4 参考文献

- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-2933
- Jia L, Patwari Y, Kelsey SM, Srinivasula SM, Agrawal SG, Alnemri ES, Newland AC. Role of Smac in human leukaemic cell apoptosis and proliferation. *Oncogene* 2003; 22: 1589-1599
- Graham SH, Chen J. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 99-109
- Li P, He QP, Ouyang YB, Liu CL, Hu BR, Siesjö BK. Early release of cytochrome C and activation of caspase-3 in hyperglycemic rats subjected to transient forebrain ischemia. *Brain Res* 2001; 896: 69-76
- Volbracht C, Leist M, Kolb SA, Nicotera P. Apoptosis in caspase-inhibited neurons. *Mol Med* 2001; 7: 36-48
- 张汝刚. 当今食管癌的若干问题. *继续医学教育* 2006; 20: 79-83
- 方文涛. 第7版国际抗癌联盟食管鳞癌TNM分期解读. *上海交通大学学报(医学版)* 2011; 31: 265

### ■应用要点

本文研究结果表明, 食管癌的发生发展与凋亡调节因子Smac和Cyt C的凋亡紊乱情况密切相关, 对食管癌的生物治疗具有重要的指导作用.

## ■同行评价

本文研究结果有一定科学意义,对食管癌的治疗具有一定指导意义。

- 8 Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 401-410
- 9 刘丽萍, 涂响安, 赵志毅, 张明, 左连富. 食管癌Fas、bc1-2蛋白和DNA含量的流式细胞定量研究. *中国医师杂志* 2002; 4: 621-623
- 10 Güner D, Sturm I, Hemmati P, Hermann S, Hauptmann S, Wurm R, Budach V, Dörken B, Lorenz M, Daniel PT. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Cancer* 2003; 103: 445-454
- 11 Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; 102: 33-42
- 12 Yoo NJ, Kim HS, Kim SY, Park WS, Park CH, Jeon HM, Jung ES, Lee JY, Lee SH. Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *APMIS* 2003; 111: 382-388
- 13 Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1259-1263

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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》正文要求

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



# 甘草酸苷对乙型肝炎疫苗无应答者PBMC细胞因子mRNA表达的影响

李旭华, 陈月, 吴文苑, 陈玲玲, 费筠

李旭华, 陈月, 吴文苑, 陈玲玲, 费筠, 暨南大学第二临床医学院 深圳市人民医院检验科 广东省深圳市 518020

李旭华, 硕士, 主要从事临床免疫检验方面的研究.

广东省自然科学基金资助项目, No. 07300964

作者贡献分布: 此课题由陈月与李旭华设计; 研究过程由李旭华、陈月、吴文苑、陈玲玲及费筠操作完成; 数据分析由李旭华完成; 本论文写作由李旭华完成.

通讯作者: 陈月, 518020, 广东省深圳市东门北路1017号, 深圳市人民医院检验科. chen Yue\_dr@163.com.

电话: 0755-25533018

收稿日期: 2012-08-07 接受日期: 2012-09-19

接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-18

## Effect of glycyrrhizin on mRNA expression of cytokines in PBMCs from non-responders to hepatitis B vaccine

Xu-Hua Li, Yue Chen, Wen-Yuan Wu, Ling-Ling Chen, Yun Fei

Xu-Hua Li, Yue Chen, Wen-Yuan Wu, Ling-Ling Chen, Yun Fei, Department of Medical Laboratory, Shenzhen People's Hospital, the Second Affiliated Hospital of Jinan University Medical College, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 07300964

Correspondence to: Yue Chen, Department of Medical Laboratory, Shenzhen People's Hospital, the Second Affiliated Hospital of Jinan University Medical College, 1017 Dongmen North Road, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. chen Yue\_dr@163.com

Received: 2012-08-07 Revised: 2012-09-19

Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of glycyrrhizin (GL) on the mRNA expression of cytokines in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from non-responders to hepatitis B vaccine and to explore the mechanism by which GL regulates immune function.

**METHODS:** PBMCs were isolated from non-responders to hepatitis B vaccine and incubated with GL and (or) HBsAg. The abilities of GL and (or) HBsAg to stimulate the proliferation of PBMCs were evaluated by CCK-8 assay. The mRNA expression levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, and

IL-10 were determined by real-time PCR.

**RESULTS:** GL enhanced the proliferation of PBMCs from non-responders to hepatitis B vaccine and made it comparable to that of PBMCs from responders ( $F = 3.104$ ,  $P = 0.138$ ). The mRNA expression levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 in PBMCs from non-responders that were incubated with HBsAg and GL were significantly higher than those incubated with HBsAg alone ( $q = 34.93$ ,  $26.18$ , both  $P < 0.05$ ), and tend to reach the levels in PBMCs from responders. The mRNA expression levels of IFN- $\gamma$  and IL-10 in PBMCs from non-responders that were incubated with GL were higher than those incubated with HBsAg ( $q = 10.18$ ,  $9.19$ , both  $P < 0.05$ ), but lower than those incubated with HBsAg and GL ( $q = 24.75$ ,  $16.98$ , both  $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of IL-4 had no obvious difference among the three groups ( $P = 0.304$ ).

**CONCLUSION:** GL can regulate the immune status of non-responders to hepatitis B vaccine and create an environment conducive to the generation of protective antibodies.

**Key Words:** Non-responders to hepatitis B vaccine; Glycyrrhizin; Peripheral blood mononuclear cells; Cytokines

Li XH, Chen Y, Wu WY, Chen LL, Fei Y. Effect of glycyrrhizin on mRNA expression of cytokines in PBMCs from non-responders to hepatitis B vaccine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2827-2831

## 摘要

**目的:** 观察甘草酸苷(Glycyrrhizin, GL)对乙型肝炎疫苗无应答者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)细胞因子mRNA表达的影响, 探讨GL增强机体免疫功能的作用机制.

**方法:** 分离乙型肝炎疫苗无应答者的PBMC, 加入HBsAg和/或GL的条件下体外培养, CCK-8法测定PBMC的增殖能力, real-time

## ■背景资料

HBV感染是困扰当今世界的一个严重的公共卫生问题. 正常人接种乙型肝炎疫苗后仍有5%-10%的抗体滴度不能达到保护性阈值. 如何增强机体的免疫应答以提高人群对乙型肝炎疫苗的应答率是亟待解决的问题. 抗原特异性T细胞增殖能力低下和Th1/Th2类细胞因子的失衡状态是导致机体发生无/弱应答的重要因素.

## ■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

## ■研究前沿

乙型肝炎疫苗的有效应答有赖于机体完善的免疫应答能力,包括特异性免疫细胞的增殖和相应细胞因子的分泌。无/弱应答的发生受多种因素的影响, T细胞接触HBsAg后特异性增殖能力低下导致的机体免疫反应不足,及Th1/Th2类细胞因子比例失衡导致的对乙型肝炎疫苗的免疫耐受状态是其中的重要因素。因此通过免疫调节打破这一特殊的免疫耐受状态对于提高机体对乙型肝炎疫苗的应答能力作用关键。

PCR测定刺激后IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 mRNA的表达水平,并与应答组比较。

**结果:** GL可刺激提高乙型肝炎疫苗无应答者PBMC的增殖能力,使之与应答者无显著性差异( $F = 3.104, P = 0.138$ )。HBsAg+GL+无应答组PBMC的IFN- $\gamma$ 、IL-10 mRNA表达水平均高于HBsAg+无应答组,差异有统计学意义( $q$ 分别为34.93和26.18, 均 $P < 0.05$ ),趋向于应答者分泌水平, GL+无应答组IFN- $\gamma$ 与IL-10的表达均高于HBsAg+无应答组( $q$ 分别为10.18和9.19, 均 $P < 0.05$ ),但低于HBsAg+GL+无应答组( $q$ 分别为24.75和16.98, 均 $P < 0.05$ );而IL-4 mRNA变化在无应答者3组间无统计学意义( $P = 0.304$ )。

**结论:** GL可以调节乙型肝炎疫苗无应答者的免疫状态,创造有利于保护性抗体产生的环境。

**关键词:** 乙型肝炎疫苗无应答; 甘草酸苷; 外周血单个核细胞; 细胞因子

李旭华, 陈月, 吴文苑, 陈玲玲, 费筠. 甘草酸苷对乙型肝炎疫苗无应答者PBMC细胞因子mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2827-2831  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2827.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是当今世界一个严重的公共卫生问题。正常人接种乙型肝炎疫苗后仍有5%-10%的抗体滴度不能达到保护性阈值,从而成为HBV的易感者,甚至成为慢性携带者<sup>[1]</sup>。研究发现,抗原特异性T细胞增殖能力低下和Th1/Th2类细胞因子的失衡状态是导致机体发生无/弱应答的重要因素<sup>[2]</sup>。甘草酸苷(glycyrrhizin, GL)为甘草的主要成分,是一种良好的免疫调节剂。本研究通过体外检测GL和HBsAg联合刺激对乙型肝炎疫苗无应答者PBMC细胞因子(IFN- $\gamma$ 、IL-4和IL-10)mRNA表达水平,以及淋巴细胞特异性增殖反应的影响,探讨GL对乙型肝炎疫苗无应答者免疫功能的调节作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择我院体检的乙型肝炎疫苗无应答者50例为无应答组,年龄18-45岁,其中男27例,女23例,均为常规0、1、6三针接种乙型肝炎基因工程疫苗,于第三针接种后1 mo检测乙型肝炎两对半结果全阴而后加强一针后1 mo检测仍

为5项全阴者。应答组50例为接种乙型肝炎疫苗后HBsAb检测阳性(>100 mIU/mL)的健康人群。各组均于接种最后一针疫苗1 mo后采血。全部研究对象均排除HAV、HCV和HBV-DNA(+)隐性感染及心脑血管和其他器官疾病。荧光定量PCR仪购自美国ABI公司;台式离心机、紫外分光光度计购自Eppendorf公司;电泳仪购自瑞士AM-ERSHAM公司;凝胶成像系统、酶标仪购自美国Bio-Rad公司;RNA提取试剂TRIzol购自Invitrogen公司;RT-PCR和SYBR Green real-time PCR试剂盒购自Takara公司;淋巴细胞分离液购自北京鼎国生物公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8试剂盒)购自日本同仁化学研究所;甘草酸苷购自日本米诺发源制药株式会社;HBV表面抗原购自大连高新生物制药有限公司;引物设计使用Primer 5.0,由Takara公司合成见表1。

### 1.2 方法

**1.2.1 外周血单个核细胞的获取:** 取研究对象的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),肝素抗凝后,与等量的RPMI 1640液混匀, Ficoll密度梯度离心法分离PBMC;台盼蓝染色,证实活细胞达95%以上;用PBS洗去血小板,然后再用含10%人AB血清的RPMI 1640液悬浮PBMC。

**1.2.2 甘草酸苷对乙型肝炎疫苗无应答者外周血单个核细胞的免疫刺激作用:** 取乙型肝炎疫苗应答组和无应答组PBMC悬液分别按 $1 \times 10^6$ /mL浓度加入96孔板,100  $\mu$ L/孔,所有孔均给予5  $\mu$ g/mL终浓度的HBsAg刺激,然后再于各孔中分别加入终浓度为1、5、10、20和50  $\mu$ g/mL的GL,每个GL浓度设3个复孔,并设不加GL的对照孔和空白对照孔。于37  $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内培养48 h,每孔加入CCK-8溶液10  $\mu$ L,继续培养4 h后,测A<sub>450</sub>值,结果以3孔均值表示。

**1.2.3 real-time PCR分析细胞因子的表达:** 实验分组:(1)应答组:乙型肝炎疫苗应答者PBMC+HBsAg;(2)GL+HBsAg+无应答组:乙型肝炎疫苗无应答者PBMC+HBsAg+GL;(3)HBsAg+无应答组:乙型肝炎疫苗无应答者PBMC+HBsAg;(4)GL+无应答组:乙型肝炎疫苗无应答者PBMC+GL。应答组给予终浓度10  $\mu$ g/mL的GL刺激,其余3组均给予5  $\mu$ g/mL终浓度的HBsAg刺激, GL+HBsAg+无应答组同时给予终浓度10  $\mu$ g/mL的GL刺激,于37  $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱内培养48 h后收集细胞至1.5 mL的EP管中。每管分别加入1 mL TRIzol, 氯仿/异丙醇法

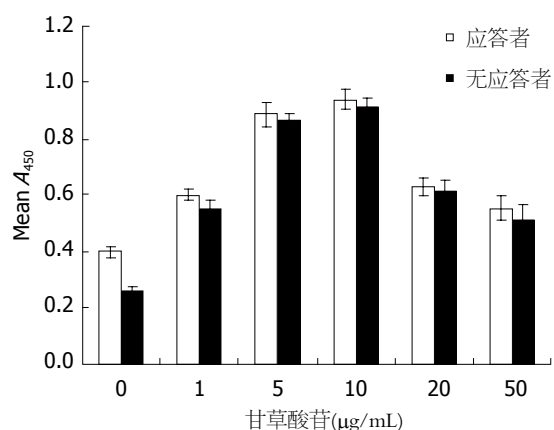


图1 不同浓度甘草酸苷对乙型肝炎疫苗应答者和无应答者外周血单个核细胞增殖的影响( $n=3$ ).

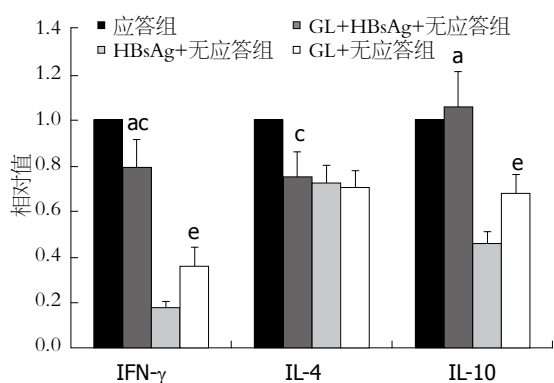


图2 不同组PBMC的IFN-γ、IL-4、IL-10 mRNA表达的相对量( $n=3$ ). <sup>a</sup> $P<0.05$  vs HBsAg+无应答组; <sup>b</sup> $P<0.05$  vs 应答组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs HBsAg+无应答组.

提取总RNA, 紫外分光光度计测定提取的RNA浓度和纯度, 1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性. RT-PCR逆转录试剂盒进行逆转录, 并对逆转录的cDNA在ABI7500实时荧光定量基因扩增仪上进行实时荧光定量PCR反应. 反应总体积25 μL. Real-time PCR扩增条件为95 °C 30 s预变性, 95 °C变性5 s, 60 °C退火和延伸34 s, 40个循环. 每个样品3个重复, 同时设无模板对照. 将IFN-γ、IL-4及IL-10的mRNA与GAPDH的(Ct值)换算为基因的相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , 将应答组归一化处理, 比较各组间的表达差异.

1.2.4 标准曲线的制备: 取1 μL cDNA加入9 μL去离子水中, 按1:10倍比稀释得到不同浓度的模板. 将起始拷贝数分别设定为 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10. 进行Real-time PCR反应. 以起始拷贝数的对数为横坐标, 以循环阈值(Ct)为纵坐标, 分别绘制IFN-γ、IL-4、IL-10及GAPDH的标准曲线, 标准曲线E值为95%-105%,  $r^2>0.95$ 为符合模板要求.

统计学处理 全部数据采用SPSS18.0软件进

表1 实时定量PCR引物序列

引物名称	序列(5'-3')	产物(bp)
GAPDH	F: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC R: TGGTGAAGACGCCAGTGGA	138
IFN-γ	F: CTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAA R: GGCGACAGTTCAGCCATCAC	189
IL-4	F: AGCAGCTGATCCGATTCTCTGA R: TCCAACGTACTCTGGTTGGCTTC	100
IL-10	F: GAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGA R: AGTTCACATGCGCCTTGATGTC	198

F: 上游引物; R: 下游引物.

行统计, 计量资料以mean±SD表示, 多组间统计分析采用F分析, 两两比较采用q检验.  $P<0.05$ 认为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 甘草酸苷对乙型肝炎疫苗无应答者外周血单个核细胞增殖的影响 本研究结果显示, 各浓度的GL均能刺激提高乙型肝炎疫苗无应答者PBMC增殖, 与应答者比较差异无显著性( $F=3.104$ ,  $P=0.138$ ), 而且在1-10 μg/mL范围内, 促进增殖的作用逐渐增强, 但随着浓度再增加, 其促进增殖的作用反而减弱. 仅用HBsAg刺激时乙型肝炎疫苗应答者PBMC增殖能力强于无应答者( $P<0.05$ , 图1).

2.2 PCR产物特异性验证 GAPDH、IFN-γ、IL-4及IL-10溶解曲线分别为85.0 °C、81.7 °C、84.0 °C和84.5 °C, 溶解曲线较锐利, 峰单一, 显示引物的特异性较好. 扩增效率分别102.9%、100.7%、102.7%、99.6%, 都在95%-105%之间, 说明反应属于特异性扩增.

2.3 GL对乙型肝炎疫苗无应答者外周血单个核细胞细胞因子mRNA表达的影响 应用Real-time PCR检测结果如图2所示, HBsAg+GL+无应答组PBMC的IFN-γ、IL-4 mRNA表达水平低于应答组( $P<0.05$ ), IL-10 mRNA表达无明显差异( $P>0.05$ ); GL+无应答组IFN-γ与IL-10的表达均高于HBsAg+无应答组( $q$ 分别为10.18和9.19, 均 $P<0.05$ )但低于HBsAg+GL+无应答组( $q$ 分别为24.75和16.98, 均 $P<0.05$ ); 但与HBsAg+无应答组比较, HBsAg+GL+无应答组PBMC的IFN-γ、IL-10 mRNA表达水平明显提高( $q$ 分别为34.93和26.18, 均 $P<0.05$ ), 而IL-4 mRNA变化在无应答者的3组间无统计学意义( $P>0.05$ ).

## ■ 相关报道

王大南等通过实验发现甘草酸苷(GL)具有增强巨噬细胞的功能; 陆富永等利用GL治疗因细胞因子分泌失衡导致的斑秃. 近年来国外有研究发现通过有效地刺激免疫细胞, 改变其应答低下的状态, 有利于机体免疫平衡的恢复及抗体的产生. 提示GL如果能有效地调节乙型肝炎疫苗无应答人群的免疫失衡状态, 对于提高乙型肝炎疫苗的应答率意义重大.

### ■创新盘点

本实验首次以不同浓度的GL联合HBsAg刺激乙型肝炎疫苗无应答者的PBMC,通过一系列的指标检测来观察GL对该类人群免疫功能的影响。为从免疫调节的角度合理应用GL来有效提高乙型肝炎疫苗接种人群的应答率提供科学依据。

### 3 讨论

GL是一种有效的免疫调节剂,其免疫调节作用表现在对免疫活性细胞、细胞因子、补体等多方面。近年研究还发现GL并非单纯地影响某一种或几种细胞因子的升高或降低,而是可以打破机体Th1和Th2类细胞因子的失衡状态,对于机体免疫功能失调的修正意义重大<sup>[3,4]</sup>。有学者尝试利用其免疫调节功能治疗溃疡性结肠炎、斑秃等免疫失衡引起的疾病,均取得了良好的效果<sup>[5,6]</sup>。现已临床证实GL治疗慢性乙型肝炎具有一定的优势且疗效确定<sup>[7,8]</sup>,但其与乙型肝炎疫苗的无/弱应答关系方面鲜有报道。因此,我们设想GL与乙型肝炎疫苗联合应用是否可打破机体免疫耐受或低下状态,诱导机体选择性增强和调节免疫系统,从而有效地提高机体对乙型肝炎疫苗的免疫应答能力。

乙型肝炎疫苗无/弱应答的发生受多种因素的影响。研究发现无/弱应答者体内PBMC受HBsAg刺激后增殖能力低下, Th1/Th2类细胞因子分泌水平变化而导致的机体免疫状态失衡是保护性抗体不能产生的重要因素<sup>[2]</sup>。其机制是Th细胞数量上的减少可能导致相关细胞因子下降,进而影响B细胞活化、增殖、分化为浆细胞,使其合成和分泌的抗体减少,最终影响乙型肝炎疫苗的免疫效果。Chedid等<sup>[9]</sup>研究认为,乙型肝炎疫苗无/弱应答者体内特异性识别HBsAg表位TCR的T淋巴细胞在胸腺分化成熟过程中受到了阴性选择从而发生了类似于自身抗原的免疫耐受。如果增强PBMC这一类混合免疫细胞的增殖,可打破这一漏洞,进而有望实现HBsAg特异性T淋巴细胞的频数与抗-HBsAg应答水平的正相关性。我们研究结果显示,与HBsAg单独刺激导致无应答者PBMC增殖明显低于应答者相比, GL+HBsAg联合刺激在体外能明显促进提高乙型肝炎疫苗无应答者PBMC的增殖( $P<0.05$ ),与应答者比较无显著性差异,且在1-10  $\mu\text{g/mL}$ 范围内,促增殖作用逐渐增强。

IFN- $\gamma$ 是典型的Th1类细胞因子,同时对IL-2具有促进作用<sup>[10]</sup>,而IL-2被称为T细胞分化因子,促进T、B淋巴细胞的增殖,其缺乏意味着机体对抗原特异性的无能,即不能正确识别特异性抗原。IL-10最初被认为是一种Th2类细胞因子,具有抑制单核巨噬细胞抗原提呈,减少MHC-II类分子和共刺激分子表达,诱导产生免疫耐受的作用<sup>[11]</sup>。然而新近研究发现<sup>[12]</sup>, Th1类细胞在IL-12的辅助下亦可分泌IL-10,阻止B细

胞凋亡,促进其增殖、分化及MHC-II类分子表达<sup>[13]</sup>,并在免疫球蛋白类别转换中起促进作用,还可以抑制IL-4产生,说明IL-10的增加在维持Th1/Th2类细胞因子平衡中发挥了重要的作用,提高机体的体液免疫水平。现已证明, GL可以促进巨噬细胞产生IL-12<sup>[14]</sup>。在本研究中,通过Real-time PCR检测分析显示: GL单独刺激无应答者PBMC亦可比HBsAg单独刺激无应答者PBMC时IFN- $\gamma$ 、IL-10 mRNA表达水平有所提高,但与HBsAg+GL+无应答组仍有差距( $P<0.05$ )。与HBsAg+无应答组比较, HBsAg+GL+无应答组的IFN- $\gamma$ 、IL-10 mRNA表达水平明显提高( $P<0.05$ ),尤其是IL-10 mRNA表达水平可达到应答组比较无显著差异( $P>0.05$ ),说明GL可调整乙型肝炎疫苗无应答者的免疫状态,对于机体产生达到保护作用的抗体具有积极地促进作用。IL-4主要由Th2类细胞产生,抑制Th1细胞增殖及其应答。在本研究中IL-4的表达并未有明显变化( $P>0.05$ ),推测与GL对Th1类细胞因子影响作用更有关。

目前,尚无十分有效的方法能使对乙型肝炎疫苗无/弱应答者产生足够的免疫力,这一部分人群仍将成为HBV的易感者。Takahara等<sup>[15]</sup>报道, GL可阻碍HBsAg颗粒上的唾液酸的补充,同时清除HBsAg颗粒上的唾液酸,使其抗原性提高,机体的原发性免疫增强。本研究结果提示, GL促进IFN- $\gamma$ 和IL-10的增加不仅使得乙型肝炎疫苗无应答者细胞因子分泌水平有所变化,亦使得机体的免疫状态重新向Th1方向漂移,从而有望打破乙型肝炎疫苗无/弱应答者体内的免疫异常状态。因此,我们认为GL可能成为一种潜在的有前途的疫苗佐剂用于提高乙型肝炎疫苗接种人群的应答率。

### 4 参考文献

- 1 Coates T, Wilson R, Patrick G, André F, Watson V. Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther* 2001; 23: 392-403
- 2 Goncalves L, Albarran B, Salmen S, Borges L, Fields H, Montes H, Soyano A, Diaz Y, Berrueta L. The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology* 2004; 326: 20-28
- 3 陈观尚. 复方甘草酸苷治疗慢性乙型肝炎的疗效观察及对IL-8和IL-10的影响. *湛江医学院学报* 2010; 28: 143-144
- 4 王大南, 于淼, 冯永辉, 吕昌龙. 甘草酸苷调节小鼠腹腔巨噬细胞活性的研究. *中国免疫学杂志* 2009; 25: 805-807
- 5 Kudo T, Okamura S, Zhang Y, Masuo T, Mori M.

- Topical application of glycyrrhizin preparation ameliorates experimentally induced colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2223-2228
- 6 陆富永, 明海霞, 刘懿, 马兰, 李艳芸. 复方甘草酸苷联合光化学疗法治疗斑秃30例疗效观察. *中国皮肤性病学杂志* 2011; 25: 163-164
- 7 Matsuo K, Takenaka K, Shimomura H, Fujii N, Shinagawa K, Kiura K, Harada M. Lamivudine and glycyrrhizin for treatment of chemotherapy-induced hepatitis B virus (HBV) hepatitis in a chronic HBV carrier with non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 41: 191-195
- 8 周永安. 复方甘草酸苷联合IFN- $\alpha$ 对慢性乙型肝炎患者肝纤维化指标的影响. *山东医药* 2009; 49: 51-52
- 9 Chedid MG, Deulofeut H, Yunis DE, Lara-Marquez ML, Salazar M, Deulofeut R, Awdeh Z, Alper CA, Yunis EJ. Defect in Th1-like cells of nonresponders to hepatitis B vaccine. *Hum Immunol* 1997; 58: 42-51
- 10 Sharma SK, Pichichero ME. Functional deficits of pertussis-specific CD4<sup>+</sup> T cells in infants compared to adults following DTaP vaccination. *Clin Exp Immunol* 2012; 169: 281-291
- 11 Adurthi S, Mukherjee G, Krishnamurthy H, Sudhir K, Bafna UD, Umadevi K, Jayshree RS. Functional Tumor Infiltrating TH1 and TH2 Effectors in Large Early-Stage Cervical Cancer Are Suppressed by Regulatory T Cells. *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22: 1130-1137
- 12 Kemp KL, Levin SD, Stein PL. Lck regulates IL-10 expression in memory-like Th1 cells. *Eur J Immunol* 2010; 40: 3210-3219
- 13 Wang RX, Yu CR, Mahdi RM, Egwuagu CE. Novel IL27p28/IL12p40 cytokine suppressed experimental autoimmune uveitis (EAU) by inhibiting autoreactive Th1/Th17 cells and promoting expansion of regulatory T cells. *J Biol Chem* 2012 Aug 30. [Epub ahead of print]
- 14 Dai JH, Iwatani Y, Ishida T, Terunuma H, Kasai H, Iwakura Y, Fujiwara H, Ito M. Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology* 2001; 103: 235-243
- 15 Takahara T, Watanabe A, Shiraki K. Effects of glycyrrhizin on hepatitis B surface antigen: a biochemical and morphological study. *J Hepatol* 1994; 21: 601-609

## ■同行评价

本文创新性较强, 成果对于提高乙型肝炎疫苗接种的应答有一定参考价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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tl/2或T<sub>1/2</sub><sup>1</sup>, 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n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\varphi$ (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.



# 原发性肝癌合并肝动脉-门静脉瘘的相关因素及临床特点

徐国斌, 熊斌

## ■背景资料

肝动静脉瘘在临床上较为常见, 很多中晚期肝癌患者因伴发动门脉瘘出现严重临床症状而放弃积极治疗, 正确诊断并积极介入治疗可取得较好的临床疗效。

徐国斌, 武汉大学中南医院放射介入科 湖北省武汉市 430071

熊斌, 武汉大学中南医院肿瘤科 湖北省武汉市 430071  
徐国斌, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤影像诊断及介入治疗方面的研究。

作者贡献分布: 本研究由熊斌进行设计、论文修改; 徐国斌完成资料收集整理、数据分析、论文撰写。

通讯作者: 熊斌, 教授, 主任医师, 博士生导师, 430071, 湖北省武汉市武昌东湖路169号, 武汉大学中南医院肿瘤科。

lzhoney@hotmail.com

电话: 027-67813192

收稿日期: 2012-08-02 修回日期: 2012-09-07

接受日期: 2012-09-20 在线出版日期: 2012-10-18

## Primary liver cancer complicated with hepatic arterioportal fistula: Clinical characteristics and risk factors

Guo-Bin Xu, Bin Xiong

Bin-Guo Xu, Department of Interventional Radiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Bin Xiong, Department of Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Bin Xiong, Professor, Chief Physician, Department of Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Wuchang Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. lzhoney@hotmail.com

Received: 2012-08-02 Revised: 2012-09-07

Accepted: 2012-09-20 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the clinical characteristics of and risk factors for primary liver cancer (PLC) complicated with hepatic arterioportal fistula (HAPF).

**METHODS:** Clinical and imaging data for 152 patients with PLC who underwent transcatheter arterial chemoembolization (TACE) were analyzed retrospectively. These patients were divided into HAPF group and control group to analyze the clinical characteristics of and risk factors for PLC with HAPF.

**RESULTS:** The percentages of patients with liver function grade (B+C), upper tract hemorrhage, ascites, or portal vein thrombosis were significantly higher in the HAPF group than in the control group ( $t = 4.858, 4.522, 4.496, 6.024$ , all

$P < 0.05$ ). No statistical differences were noted in liver cirrhosis, disseminated lesions in the liver, and abnormal AFP between two groups (all  $P > 0.05$ ). HAPF was prone to be present in patients with massive PLC that has rich feeding vessels. Approximately 89.9% of patients had improvement of HAPF and 22.2% had remission of portal hypertension shortly after TACE treatment.

**CONCLUSION:** PLC complicated with HAPF is possibly associated with factors including massive tumors with rich tumor feeding vessel and portal vein thrombosis, which tend to impair liver function and aggravate portal vein hypertension symptoms. Proper TACE treatment can improve HAPF and portal hypertension symptoms in a short term.

**Key Words:** Arteriovenous fistula; Primary liver cancer; Portal vein hypertension; Interventional

Xu GB, Xiong B. Primary liver carcinoma complicated with hepatic arterioportal fistula: Clinical characteristics and risk factors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2832-2835

## 摘要

**目的:** 探讨原发性肝癌合并肝动脉-门静脉瘘 (hepatic arterioportal fistula, HAPF) 发生的部分相关因素及临床特点。

**方法:** 152例行肝动脉化疗栓塞术的原发性肝癌患者按血管造影是否合并HAPF分为观察组和对照组, 对比分析临床及影像学资料, 探讨影响HAPF发生的部分相关因素及临床特点。计量资料采用两样本均数 $t$ 检验, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确概率法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

**结果:** 观察组在肝功能B级及C级、腹水、上消化道出血及门脉瘤栓发生率高于对照组( $t = 4.858, 4.522, 4.496, 6.024$ , 均 $P < 0.05$ ), HAPF容易出现于巨块型血供丰富肝癌( $P < 0.05$ ), 两组在合并肝硬化、肝内子灶及甲胎蛋白异常无显著性差异( $P > 0.05$ )。观察组介入治疗短期内瘘口改善率89.9%, 22.2%患者门脉高压症状明显缓解。

## ■同行评议者

程树群, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

**结论:** 原发性肝癌合并HAPF产生与肝癌血供丰富、肿瘤巨大及门脉癌栓关系密切, 容易损害患者肝功能并加重门脉高压症状. 介入栓塞治疗可短期内改善分流并部分缓解临床症状.

**关键词:** 动静脉瘘; 原发性肝癌; 门脉高压; 介入性

徐国斌, 熊斌. 原发性肝癌合并肝动脉-门静脉瘘的相关因素及临床特点. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2832-2835  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2832.asp>

## 0 引言

肝动脉-门静脉瘘(hepatic arterioportal fistula, HAPF)是中晚期原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)常见合并症, 患者就诊时常因严重临床症状而影响治疗方式的选择及预后<sup>[1,2]</sup>. 随着影像检查设备和诊疗技术的不断进步, HAPF的准确诊断率和有效治疗率均呈上升趋势. 充分认识PLC合并HAPF的临床及影像学特点, 有助于进一步了解其发生机制, 选择合适的治疗手段.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2010-01/2011-06在我院首次接受肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)介入治疗的PLC患者152例, 其中男123例, 女29例, 年龄22-76岁. 患者肝癌诊断符合中国抗癌协会肝癌专业委员会2001年标准, 术前具备完整的临床及影像学检查资料(常规CT平扫及增强和/或MRI或超声).

### 1.2 方法

**1.2.1 分组:** 根据常规腹腔动脉及选择性肝动脉造影(DSA)出现动脉期门静脉主干或分支即显影诊断合并HAPF. 将本组病例分为伴发HAPF组(研究组)和不伴HAPF组(对照组).

**1.2.2 患者临床资料及相关影像学检查:** 对比分析2组患者主要临床资料(包括肝功能分级、合并肝硬化、腹水、发生上消化道出血、甲胎蛋白定量异常)及相关影像学表现(肿瘤大体分型、门脉瘤栓、肝内子灶或转移及肿瘤血供方式).

**1.2.3 随访:** 观察PLC合并HAPF患者介入栓塞治疗后短期内主要临床症状改善情况并随访6 mo及12 mo生存率.

**统计学处理** 应用SPSS18.0软件包, 计量资料采用两样本均数 $t$ 检验, 计数资料采用卡方检验或四格表确切概率法, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 患者临床资料及相关影像学** DSA明确45例合并HAPF, 包括中心型较高流量19例, 周围型较低流量26例, 6例同时伴肝动脉-肝静脉瘘. 两组患者在平均年龄和性别分布无统计学差异( $P>0.05$ ), 主要临床及影像资料分析结果见表1. HAPF患者在肝功能B级及C级、腹水、上消化道出血及门脉瘤栓发生率高于非HAPF组( $P<0.05$ ), HAPF容易出现于巨块型血供丰富肝癌( $P<0.05$ ), 两组在合并肝硬化、肝内子灶及甲胎蛋白异常无显著性差异( $P>0.05$ ).

**2.2 随访结果** 合并HAPF组患者随访5-14 mo, 共行介入治疗102次(平均2.3次). 首次介入治疗HAPF实时封堵或分流量明显减少40例(89.9%), 肿瘤区见不同程度碘油乳剂沉积, 36例短期内肿瘤稳定或缩小, 10例患者术后1 mo内临床症状明显减轻或消失, 未见介入治疗相关急性肝功能衰竭等严重并发症发生. 患者6 mo及12 mo生存率分别为91.1%、66.7%, 死亡原因主要为上消化道大出血、肝功能衰竭、肿瘤广泛转移.

## 3 讨论

PLC早期缺乏特异性的临床表现, 多数患者就诊时已属中晚期, 失去手术治疗机会. 部分因存在慢性肝病病史, 发生肝癌时肝功能差、合并中大量腹水或反复上消化道出血而放弃进一步治疗. 肝癌合并动静脉瘘具有较高的发生率<sup>[3,4]</sup>, 是影响治疗选择和患者预后的重要因素之一, 包括肝动脉-门静脉瘘和肝动脉-肝静脉瘘两种, 主要为前者. 多普勒超声、螺旋CT增强扫描及MRI可以发现并初步诊断动静脉瘘, 但以DSA检查最为直观准确, 可以在充分了解瘘的类型、部位、数目等信息的同时指导进一步栓塞治疗<sup>[3-8]</sup>. 通过本组病例分析初步显示PLC合并HAPF患者肝功能分级差于无HAPF组, 发生上消化道出血、合并腹水及门脉瘤栓比率高于无HAPF组, 两组在存在肝硬化、肝内子灶及AFP定量异常方面无显著性差异.

通常根据DSA显示瘘口部位将HAPF分为中心型(门脉主干或一级分支)和周围型(门脉二级分支以下), 按分流量大小分为高、中、低流量3型. 对于中心型或高流量型HAPF, 大量高压力的动脉血流入门静脉, 显著增加门脉压力而快速出现门脉高压, 并且易导致肿瘤沿门脉系统播散及远处转移; 同时因富含营养的动脉血

## ■研究前沿

肝癌形成动静脉瘘具有多方面机制, 肝动脉门脉瘘出现对患者治疗及预后极其不利, 如何针对其高危因素预防其发生及进展亟待研究.

## ■应用要点

对于存在门脉高压症状的中晚期原发性肝癌患者应重视筛查其发病原因, 如果其发病原因为感动门脉瘘, 恰当的介入栓塞治疗可取得较好的近期疗效。

表 1 PLC合并HAPF与对照组资料对比

参数	HAPF组( <i>n</i> = 45)	非HAPF组( <i>n</i> = 107)	统计值	<i>P</i> 值
性别(男/女)	35/10	88/19	0.409	0.529
年龄(岁)	51.9 ± 12.1	48.8 ± 12.2	0.825	0.418
肝功能child-pugh				
分级(A/B+C)	33/12	94/13	4.858	0.028 <sup>a</sup>
合并肝硬化	38	89	1.277	0.263
合并腹水	14	17	4.522	0.036 <sup>a</sup>
术前上消化道出血	8	5	4.496	0.036 <sup>a</sup>
合并门脉瘤栓	27	41	6.024	0.016 <sup>a</sup>
合并肝内子灶或转移	14	28	0.309	0.601
肝癌类型				
(巨块/结节/弥漫)	38/5/2	60/41/6	11.784	0.005 <sup>b</sup>
肿瘤血供(丰富/少)	39/6	71/36	6.536	0.011 <sup>a</sup>
AFP定量异常	37	86	0.070	0.806

<sup>a</sup>*P* < 0.05; <sup>b</sup>*P* < 0.01.

流入肝实质减少, 导致肝功能进一步损害。因此, 合并HAPF的PLC患者除了肝癌的一般表现外, 容易出现肝性脑病、严重门脉高压症状如难治性腹水和顽固性上消化道出血等<sup>[2,9,10]</sup>。对于肝硬化伴肝癌患者来说, 门脉高压和肝功能失代偿表现可以非常严重, 这些患者通常排除在介入治疗之外。尸检或影像学检查报告提示PLC 20%-70%合并门静脉癌栓, 这也是导致患者门脉高压和肿瘤转移的重要病理因素<sup>[11]</sup>。本组HAPF患者, DSA及增强CT显示60%(27/45)合并一二级分支以上瘤栓, 但无门脉主干完全闭塞, 门脉瘤栓与肿瘤及HAPF基本位于同侧肝叶, 说明HAPF与门脉瘤栓发生明显关联。通过对中大量腹水及消化道出血或反复腹泻患者DSA表现分析, HAPF多表现为中心型或高分流量, 尤其对于没有明显肝硬化病史的肝癌患者, 出现门脉高压的临床症状时要首先考虑存在HAPF可能, 此类患者通过介入封堵分流道后可快速缓解相应的临床症状, 改善生存质量和预后<sup>[10,12-15]</sup>。本组介入治疗瘘口处理成功的病例其临床症状亦在短期内明显改善。由于多数患者原发肿瘤巨大, 化疗栓塞并不能使肿块完全缺血坏死, 因此随诊过程中可能新发HAPF或原闭塞瘘口再通致使症状复发或加重, 序贯介入治疗时仍需积极处理瘘口, 但中远期疗效不理想<sup>[16]</sup>。

对于肝癌合并动静脉瘘的发生机理, 可能存在诸多因素<sup>[3,17,18]</sup>。(1)肝动脉与门静脉之间解剖上存在多种形式的吻合, 由于PLC多数在不同程度肝硬化基础之上演变而成, 患者正常肝小叶

结构破坏, 纤维结缔组织增生及假小叶形成容易导致肝内动静脉吻合支开放而形成动静脉瘘。本研究显示HAPF组与非HAPF组在存在肝硬化比率上无统计学意义, 并不说明HAPF发生与肝硬化无明显相关性, 考虑与PLC患者本身存在很高比例的肝硬化及总病例数偏少有关; (2)大多数PLC血供丰富, 侵袭性强, 特别是巨块型及弥漫型肝癌, 容易直接侵犯肝内血管形成动静脉瘘。由于弥漫型肝癌患者介入治疗适应证少, 因此通过DSA检查发现巨块型肝癌成为合并动静脉瘘的主要类型; (3)门脉癌栓的滋养动脉来自肝动脉分支, 门静脉充当其引流血管, 因此合并门脉瘤栓患者易通过该途径形成HAPF。本组HAPF患者具有很高的门脉瘤栓比率, 提示二者在病理发生机制上存在明显关联; (4)肿瘤产生血管内皮生长因子, 造成肝动脉与门脉间杂乱新生血管网形成, 进而形成HAPF。

总之, PLC合并HAPF发生与肿瘤巨大侵袭性强、血供丰富及门脉瘤栓关系密切, 患者容易出现肝功能损害、腹水及反复上消化道出血等症状, 积极介入封堵瘘口及肿瘤栓塞可以短期内缓解或减轻部分临床症状。由于本组HAPF诊断来自接受介入治疗患者, 在探讨PLC伴HAPF临床特征及发生机制方面具有局限性, 在今后研究中有待进一步完善。

## 4 参考文献

- 1 Rahbari NN, Mehrabi A, Mollberg NM, Müller SA, Koch M, Büchler MW, Weitz J. Hepatocellular carcinoma: current management and perspectives for the future. *Ann Surg* 2011; 253: 453-469

- 2 Ratti F, Cipriani F, Paganelli M, Ferla G, Aldrighetti LA. Surgical approach to multifocal hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis and arterioportal shunt leading to portal hypertension and bleeding: a case report. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 34
- 3 Okuda K, Musha H, Yamasaki T, Jinnouchi S, Nagasaki Y, Kubo Y, Shimokawa Y, Nakayama T, Kojiro M, Sakamoto K, Nakashima T. Angiographic demonstration of intrahepatic arterio-portal anastomoses in hepatocellular carcinoma. *Radiology* 1977; 122: 53-58
- 4 Ngan H, Peh WC. Arteriovenous shunting in hepatocellular carcinoma: its prevalence and clinical significance. *Clin Radiol* 1997; 52: 36-40
- 5 Li YY, Duan YY, Yan GZ, Lv FQ, Cao W, Cao TS, Yuan LJ. Application of ultrasonography in the diagnosis and treatment tracing of hepatocellular carcinoma-associated arteriovenous fistulas. *Liver Int* 2007; 27: 869-875
- 6 Choi BI, Lee KH, Han JK, Lee JM. Hepatic arterioportal shunts: dynamic CT and MR features. *Korean J Radiol* 2002; 3: 1-15
- 7 Luo MY, Shan H, Jiang ZB, Liang WW, Zhang JS, Li LF. Capability of multidetector CT to diagnose hepatocellular carcinoma-associated arterioportal shunt. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2666-2669
- 8 丁汇清, 张海军, 张名忠, 陈岩, 黄小明, 朱云伟, 乔乃春. 肝癌伴肝动脉-门静脉瘘的螺旋CT和数字减影血管造影类型及介入治疗. *北京大学学报(医学版)* 2008; 40: 135-138
- 9 郭卫平, 张洪新, 王执民, 王义清, 倪代会, 李文献, 关彦. 肝癌合并肝动-静脉瘘DSA表现及其与门脉高压间的关系. *第四军医大学学报* 2000; 21: 1410-1414
- 10 罗鹏飞, 陈晓明, 陆骊工, 胡宝山, 李勇. 肝癌合并肝动脉门静脉瘘导致顽固性上消化道出血的诊断和治疗. *中华放射学杂志* 2007; 41: 401-404
- 11 Furuse J, Iwasaki M, Yoshino M, Konishi M, Kawano N, Kinoshita T, Ryu M, Satake M, Moriyama N. Hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus: embolization of arterioportal shunts. *Radiology* 1997; 204: 787-790
- 12 郑爱民, 王潍博, 崔言刚, 王彩霞, 舒晓莉, 宋伟, 申蓉, 李兆沛. 肝癌合并高流量肝动脉-门静脉瘘及大量腹腔积液的介入治疗. *实用癌症杂志* 2006; 21: 167-169
- 13 李继军, 尚建强, 刘作勤, 唐军, 孙增涛, 陈颀, 张垒, 刘洪军, 周召海. 肝癌合并肝动脉-门静脉瘘并消化道出血的介入治疗. *介入放射学杂志* 2011; 20: 120-122
- 14 Murata S, Tajima H, Nakazawa K, Onozawa S, Kumita S, Nomura K. Initial experience of transcatheter arterial chemoembolization during portal vein occlusion for unresectable hepatocellular carcinoma with marked arterioportal shunts. *Eur Radiol* 2009; 19: 2016-2023
- 15 Hiyoshi Y, Beppu T, Okabe K, Hayashi H, Masuda T, Okabe H, Mizumoto T, Komori H, Tanaka H, Horino K, Ishiko T, Takamori H, Hirota M, Baba H. [The efficacy of transcatheter embolization of severe arterioportal shunts in hepatocellular carcinoma]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34: 2093-2095
- 16 徐国斌, 熊斌, 刘骏方, 龙清云. 原发性肝癌合并肝动静脉瘘的介入栓塞治疗策略及疗效探讨. *临床放射学杂志* 2011; 30: 82-85
- 17 Vauthey JN, Tomczak RJ, Helmberger T, Gertsch P, Forsmark C, Caridi J, Reed A, Langham MR, Lauwers GY, Goffette P, Lerut J. The arterioportal fistula syndrome: clinicopathologic features, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* 1997; 113: 1390-1401
- 18 孙磊, 施海彬, 刘圣, 杨正强, 周春高, 冯耀良, 王杰, 夏金国, 赵林波, 周卫忠, 李麟荪. 肝细胞癌肝动脉门静脉分流形成的相关因素分析. *介入放射学杂志* 2012; 21: 206-210

## ■同行评价

本文设计合理, 方法正确, 结论可靠, 有一定的学术价值和临床意义。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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)



# 急性轻症胆源性胰腺炎患者胆汁病原菌的分布及耐药性

黄曙, 季国忠, 范志宁, 林洁, 王敏

## ■背景资料

对于早期轻症胆源性胰腺炎, 选择正确的抗生素非常重要, 可以避免其重症化, 缩短病程。遗憾的是, 目前国内外对胆源性胰腺炎胆道感染研究相对较少, 胆汁细菌培养之阳性率、病原菌药物敏感性等的报道差异较大, 且未对轻症、重症胰腺炎抗感染之间的差异进行分析, 对轻症胆源性胰腺炎的抗感染治疗临床上多为经验用药。

黄曙, 季国忠, 范志宁, 林洁, 王敏, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心 南京医科大学消化内镜研究所 江苏省南京市 210011

作者贡献分布: 此课题由季国忠、范志宁及王敏设计; 研究过程与统计分析由黄曙与林洁完成; 本论文由黄曙与王敏总结成文。江苏省卫生国际交流支撑计划基金资助项目, No. 苏卫国合[2011]143号

南京医科大学基金资助项目, No. 08NMUM031

通讯作者: 王敏, 副主任医师, 210011, 江苏省南京市姜家园路121号, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 南京医科大学消化内镜研究所。beautywang@yeah.net

电话: 025-58509881

收稿日期: 2012-08-01 修回日期: 2012-08-29

接受日期: 2012-09-20 在线出版日期: 2012-10-18

## Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in bile cultures from patients with acute mild biliary pancreatitis

Shu Huang, Guo-Zhong Ji, Zhi-Ning Fan, Jie Lin, Min Wang

Shu Huang, Guo-Zhong Ji, Zhi-Ning Fan, Jie Lin, Min Wang, Institute of Digestive Endoscopy & Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China

Supported by: the Jiangsu Health International Exchange Program, No. JSH-2011-060; and the Natural Science Foundation of Nanjing Medical University, No. 08NMUM031

Correspondence to: Min Wang, Associate Chief Physician, Institute of Digestive Endoscopy & Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. beautywang@yeah.net

Received: 2012-08-01 Revised: 2012-08-29

Accepted: 2012-09-20 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To study the profile of pathogen strains from bile of patients with acute mild biliary pancreatitis and their resistance to antimicrobial agents.

**METHODS:** Bile samples from 96 patients with acute mild biliary pancreatitis were cultured and tested for antibiotic susceptibility.

**RESULTS:** The most common organism was enterococci (27%), followed by *Escherichia coli* (19.2%), *Pseudomonas aeruginosa* (11.5%), and *Klebsiella pneumoniae* (10.3%). None of Gram-positive strains were resistant to telicoplanin and

vancomycin. The percentage of Gram-negative strains that were sensitive to amikacin was highest (85.7%), followed by imipenem (81%), piperacillin and tazobactam (57.1%), cefepime hydrochloride (28.6%), and levofloxacin (19.0%). The percentage of ESBLs-producing bacteria in Gram-negative strains was 66.7%.

**CONCLUSION:** Enterococci have been found more commonly in patients with acute mild biliary pancreatitis. Combined antibiotic treatment with biliary decompression as early as possible is suggested for biliary obstructive infection. After biliary decompression, antibiotics will be selected according to the results of susceptibility test.

**Key Words:** Acute mild biliary pancreatitis; Biliary tract infection; Pathogens; Antibiotic sensitivity

Huang S, Ji GZ, Fan ZN, Lin J, Wang M. Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in bile cultures from patients with acute mild biliary pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2836-2839

## 摘要

**目的:** 分析急性轻症胆源性胰腺炎患者胆汁病原菌的菌群分布、临床常用抗菌药物的敏感性及有关因素, 为急性胆源性胰腺炎患者抗菌药物的合理应用提供参考。

**方法:** 2002-01/2012-02, 96例行逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)或手术治疗的急性轻症胆源性胰腺炎患者, 取胆汁进行细菌学培养和抗菌药物敏感性检测。

**结果:** 96例急性轻症胆源性胰腺炎患者中69例胆汁培养阳性, 阳性率为71.9%; 主要病原菌为肠球菌属和大肠埃希菌属, 检出率分别为27.0%和19.2%, 其次为肺炎克雷伯杆菌(占11.5%)、铜绿假单胞菌(占10.3%), 真菌检出率为3.8%。其中, 革兰阳性球菌对替考拉宁、万古霉素的敏感率均为100%; 革兰阴性杆菌对阿米卡星、亚胺培南较为敏感, 敏感率分别为85.7%、81.0%; 对哌拉西林/他唑巴坦敏感率为57.1%; 对头孢他定、头孢吡肟和左氧氟沙

## ■同行评议者

夏时海, 副教授, 副主任医师, 武警后勤学院附属医院肝胆胰脾科



星的敏感较低. 革兰阴性杆菌的超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(extended spectrum B-lactamase, ESBLs)的阳性率为66.7%.

**结论:**急性轻症胆源性胰腺炎患者的胆道感染以肠球菌属占首位, 对急性轻症胆源性胰腺炎合并胆道感染的治疗, 应尽早解除胆道梗阻, 并根据药物敏感性选择合适的抗生素, 尤其要注意考虑到覆盖肠球菌属.

**关键词:**急性轻型胆源性胰腺炎; 胆道感染; 病原菌; 耐药性

黄曙, 季国忠, 范志宁, 林洁, 王敏. 急性轻症胆源性胰腺炎患者胆汁病原菌的分布及耐药性. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2836-2839  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2836.asp>

## 0 引言

急性胆源性胰腺炎是胆道结石病的严重并发症, 有较高的病死率<sup>[1]</sup>. 感染是胆源性胰腺炎患者面临的不可避免的问题<sup>[2]</sup>, 但是目前已有的研究多针对重症患者, 而对轻症胆源性胰腺炎的抗感染研究甚少, 其治疗仍多为经验用药. 特别地, 选择正确的抗生素对早期轻症胆源性胰腺炎而言尤为重要, 可以避免其重症化, 缩短病程, 减少患者痛苦. 为此, 我们收集了我院2002年来急性轻症胆源性胰腺炎住院患者的临床资料及胆汁培养病原学结果, 进行统计分析, 为临床抗感染治疗提供依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2002-01/2012-02南京医科大学第二附属医院轻症胆源性胰腺炎住院患者96例, 男54例, 女42例, 年龄28-79岁, 中位年龄60.9岁. 按照以下急性轻症胆源性胰腺炎诊断标准入选: (1)急性胰腺炎的临床表现, 血、尿淀粉酶增高; (2)经影像学检查或胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)证实有胆道疾病; (3)参照APACHE-II (acute physiology and chronic health evaluation-II)评分标准, 入院24 h内APACHE-II  $\leq 8$ 为轻症急性胆源性胰腺炎. 患者临床表现呈多样化, 所有患者均有腹痛, 主要为上腹部疼痛, 呈持续性钝痛; 18例有皮肤巩膜黄染. 12例患者发热, 其中6例为高热, 体温超过39℃. 6例患者有腹痛、发热及黄疸, 考虑合并急性化脓性胆管炎.

### 1.2 方法

**1.2.1 胆汁收集与培养:**对于行治疗性ERCP的患者, 当镜身到达十二指肠乳头后, 插管并经导丝确认进入胆道, 抽取胆汁5 mL注入已备好的无菌试管内. 对于行胆总管切开探查T管引流术的患者, 术中一次性无菌注射器穿刺胆总管, 抽取胆汁5 mL. 过程中严格按无菌操作进行, 送往本院检验科细菌室行细菌培养和药物敏感试验.

**1.2.2 细菌分离鉴定及药敏试验:**细菌分离鉴定按《全国临床检验操作规程》进行, 菌株鉴定及药敏试验用法国生物梅里埃公司生产的ATB微生物半自动分析仪培养鉴定, K-B纸片法进行药物敏感试验, 标准参照美国临床和实验室标准协会(NCCLS)标准, 抗菌药物纸片均系英国Oxoid公司药敏纸片. 质控菌株: 大肠埃希菌ATCC25922, 铜绿假单胞菌ATCC2785, 肺炎克雷伯菌ATCC35218, 均购自中国药品生物制品检定所.

**1.2.3 超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(extended spectrum B-lactamase, ESBLs)检测鉴定:**参照文献[3]并加以改进. ESBLs初筛试验: 以头孢他啶、头孢噻肟任一纸片与阿莫西林/克拉维酸之间出现齿孔状或协同抑菌斑为ESBLs初筛阳性. ESBLs确证采用纸片扩散确证试验: 头孢噻肟和头孢噻肟/克拉维酸组合、头孢他啶和头孢他啶/克拉维酸组合中任一组抑菌环的直径相差 $\geq 5$  mm时, 判为ESBLs阳性株.

**统计学处理** 采用SPSS17.0进行统计学分析.

## 2 结果

**2.1 胆汁培养结果** 96例急性轻症胆源性胰腺炎患者中69例胆汁培养阳性, 阳性率为71.9%(69/96), 其中9例系双重细菌感染, 占9.4%(9/96). 69例胆汁中共分离出17种病原菌, 如表1所示, 主要病原菌为肠球菌属(21例)和大肠埃希菌(15例), 其中检出真菌3例, 其他少见菌种5例, 即聚团泛菌、液化沙雷菌、洋葱伯克霍尔德菌、奇异变形杆菌和草绿色链球菌各一例.

**2.2 病原菌的药敏试验结果** 96例急性轻症胆源性胰腺炎患者胆汁中检出革兰阴性菌46份, 检出率为47.9%. 分别为大肠埃希菌(15例)、肺炎克雷伯菌(9例)、铜绿假单胞菌(8例)、鲍氏不动杆菌(6例)和嗜麦芽寡养单胞菌(4份), 以及其他少见菌种如聚团泛菌、液化沙雷菌、洋葱伯克霍尔德菌、奇异变形杆菌各1例. 嗜麦芽寡养单胞菌仅对复方新诺明敏感, 其他革兰阴性杆菌对抗生素的敏感性如表2所示, 对阿米卡星、

### ■研发前沿

重症胰腺炎并发感染一直是目前国内外研究的热点, 研究涉及了病理机制、危险因素、抗生药的药理学研究等多方面. 但是, 对合并感染因素的轻症胰腺炎, 尤其是对发病率高的轻症胆源性胰腺炎的关注度不够, 其临床抗感染仍多为经验治疗, 导致病原菌的菌谱发生变化、耐药性增加、抗感染效果不佳甚至病情重症化.

### ■相关报道

目前国内外对胆源性胰腺炎胆道感染的研究中, 胆汁细菌培养的阳性率、病原菌分布及药物敏感性等各地报道差异较大, 这可能与所选病例、病情的轻重及采样方法、培养技术等有关.

## ■创新盘点

目前胰腺炎抗感染研究多集中于重症病例,对轻症胰腺炎研究较少;另一方面,对胆道感染的病原学研究多集中于胆石症患者,针对胆源性胰腺炎胆道感染的病原学研究仍较少。本研究首次较为系统地对比急性轻症胆源性胰腺炎患者胆汁病原菌的菌群分布、药敏及有关因素进行分析,进一步指导临床抗菌药物的选择。

表 1 78份培养阳性的胆汁中病原菌分布

分离主要菌群	n	检出率(%)
肠球菌属	21	27.0
大肠埃希菌	15	19.2
肺炎克雷伯杆菌	9	11.5
铜绿假单胞菌	8	10.3
鲍氏不动杆菌	6	7.7
嗜麦芽寡养单胞菌	4	5.1
表皮葡萄球菌	4	5.1
牛链球菌	3	3.8
真菌	3	3.8
其他临床少见菌种	5	6.4

亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、头孢他啶和左氧氟沙星的敏感率分别为85.7%、81.0%、57.1%、28.6%、23.8%、19.0%。

除嗜麦芽寡养单胞菌外的革兰阴性杆菌ESBLs阳性率为66.7%(28/42), ESBLs阳性菌对阿米卡星、亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟和左氧氟沙星的敏感率分别为89.3%(25/28)、64.3%(18/28)、32.1%(9/28)、10.7%(3/28)和21.4%(6/28)。

96例急性轻症胆源性胰腺炎患者胆汁中检出革兰阳性球菌29份,检出率为30.2%。分别为肠球菌属(21例)、表皮葡萄球菌(4例)、牛链球菌(3例)和草绿色链球菌(1例)。主要革兰阳性球菌对抗生素的敏感性如表3所示,对万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺的敏感率分别为100%、100%和89.7%,对青霉素、夫西地酸和左氧氟沙星的敏感率分别为79.3%、44.9%和34.5%,对克林霉素的耐药率达100%。

3例急性轻症胆源性胰腺炎患者胆汁培养结果示真菌感染,分别为白假丝酵母菌2例和热带假丝酵母菌1例,对5-氟尿嘧啶、两性霉素B、氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑等均敏感。

### 3 讨论

胆源性胰腺炎约占急性胰腺炎总数的75%左右,其发病机制与其他胰腺炎不同,目前比较公认的是与胆胰管共同通道有关,各种胆道原因引起Vater壶腹部梗阻导致胆胰管排空不畅,致胆胰管内压力升高,胆汁向胰管返流,激活胰酶从而引起胰腺自身消化而发生急性胰腺炎。正常情况下胆汁是无菌的<sup>[4]</sup>,当胆道梗阻时会影响胆汁的正常排出,导致肠道细菌上行侵入,经Vater壶腹逆行入胆道,或经门静脉或淋巴系统进入引起感染。无菌的胆汁对胰腺组织没有损害,而

感染的胆汁可以引起急性胰腺炎,表明胆道感染是胆源性胰腺炎的重要因素<sup>[4]</sup>。因此,感染是急性胆源性胰腺炎患者不可避免的问题。但是,现有的胰腺炎抗感染研究多集中于重症<sup>[5]</sup>,对轻症胆源性胰腺炎的抗感染研究较少。另外,重症胰腺炎患者病情危重、免疫功能低下,伴随多脏器功能障碍,胰腺坏死组织继发细菌感染、深部真菌感染或双重感染<sup>[6]</sup>,感染的主要部位有腹腔、胰周、呼吸道、血行感染,因此感染情况非常复杂。而轻症胆源性胰腺炎与重症者不同,患者全身状况较好,且其感染主要是胆道感染,故不能简单的借鉴重症胰腺炎抗感染治疗的研究结果。

就治疗而言,除尽早解除梗阻和通畅引流胆汁外<sup>[7]</sup>,尽早进行胆汁培养,在细菌培养和药敏试验的基础上选择敏感的抗生素对于轻症胆源性胰腺炎是必要的。我们的研究表明,轻症胆源性胰腺炎患者胆道感染的主要病原菌是革兰阴性菌,以大肠埃希菌属比例最高,且ESBLs检出率较高,对普通的三代、四代头孢均不甚敏感。这与单纯的胆石症患者胆汁培养的研究结果一致<sup>[8,9]</sup>,但是,与单纯的胆石症不同的是,本研究中轻症胆源性胰腺炎胆道感染的首位病原菌不再是大肠埃希菌,而是肠球菌属。肠球菌属的感染率明显升高,且对夫西地酸、左氧氟沙星的敏感率较低,对克林霉素的耐药率达100%。这些菌谱的变化可能与近年抗菌药物种类迅速增加及抗菌药物尤其头孢类抗生素广泛应用,导致敏感菌死亡、耐药菌增加有关。

本研究的药敏结果显示,革兰阴性菌对碳氢酶烯类药物如亚胺培南和氨基糖苷类药物如阿米卡星敏感性高;肠球菌属对替考拉宁、万古霉素、利奈唑胺有较高的敏感率,在轻症胆源性胰腺炎患者的胆汁中尚未发现耐万古霉素的肠球菌(VRE)。这些结果提示我们可根据病情需要选择带酶抑制剂的药物或是碳氢酶烯类、替考拉宁或是万古霉素进行抗感染治疗,但是应注意使用碳氢酶烯类广谱抗菌药物所引发的二重感染。鉴于氨基糖苷类药物的耳肾毒性,阿米卡星可能存在“假敏感”现象<sup>[10]</sup>,故不推荐常规使用阿米卡星。虽然革兰阳性球菌和革兰阴性菌对头孢类和喹诺酮类的敏感度均不高。但是根据药代动力学显示,环丙沙星等喹诺酮类以及头孢曲松具有在胆汁中的浓度较高的优势<sup>[11,12]</sup>,提示我们抗菌治疗时仍可联合选用含有头孢曲松和喹诺酮类的药物。

表 2 胆汁中主要革兰阴性杆菌对抗生素的敏感性分析  $n(\%)$ 

革兰阴性杆菌	<i>n</i>	阿米卡星	亚胺培南	哌拉西林/他唑巴坦	庆大霉素	头孢吡肟	头孢他啶	左氧氟沙星	复方新诺明
大肠埃希菌	15	15(100.0)	15(100.0)	9(60.0)	6(40.0)	2(13.3)	2(13.3)	3(20.0)	3(20.0)
肺炎克雷伯菌	9	8(88.9)	8(88.9)	5(55.6)	5(55.6)	4(44.4)	3(33.3)	3(33.3)	0
铜绿假单胞菌	8	5(62.5)	5(62.5)	5(62.5)	0	0	0	0	0
鲍氏不动杆菌	6	5(83.3)	3(50.0)	3(50.0)	3(50.0)	3(50.0)	3(50.0)	0	2(33.3)
其他少见杆菌	4	3(75.0)	3(75.0)	2(50.0)	0	3(75.0)	2(50.0)	2(50.0)	2(50.0)
合计	42	36(85.7)	34(81.0)	24(57.1)	14(33.3)	12(28.6)	10(23.8)	8(19.0)	7(16.7)

表 3 胆汁中主要革兰阳性球菌对抗生素的敏感性分析  $n(\%)$ 

革兰阳性球菌	<i>n</i>	万古霉素	替考拉宁	利奈唑胺	青霉素	夫西地酸	左氧氟沙星	哌拉西林/他唑巴坦	红霉素
肠球菌属	21	21(100.0)	21(100.0)	18(85.7)	15(71.4)	6(28.6)	6(28.6)	3(14.3)	6(28.6)
表皮葡萄球菌	4	4(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	4(100.0)	4(100.0)
牛链球菌	3	3(100.0)	3(100.0)	3(100.0)	3(100.0)	3(100.0)	0	3(100.0)	0
草绿色链球菌	1	1	1	1	1	0	0	0	0
合计	29	29(100.0)	29(100.0)	26(89.7)	23(79.3)	13(44.9)	10(34.5)	10(34.5)	10(34.5)

由于培养技术、鉴定分离方法及培养周期较长等多方面因, 本组未做厌氧菌培养, 而胆道感染中有较高的厌氧菌感染率<sup>[13]</sup>。但厌氧菌一般并不单独引起胆道感染, 而总是与需氧菌共同存在引起混合感染, 故在胆源性胰腺炎患者的抗菌治疗时可常规加抗厌氧菌药物如奥硝唑、替硝唑等。

本组胆汁培养中真菌所占比例极低, 均为假丝酵母菌。且对常用抗真菌药物均敏感, 临床中一般使用氟康唑即可达到良好疗效。

总之, 轻症胆源性胰腺炎患者应争取条件尽早解除胆道梗阻, 在解除梗阻的同时行胆汁培养, 切实做好病原学检查, 做到“有样必采”, 在得到细菌培养和药敏结果后, 应马上改用窄谱、针对性强的抗菌药物, 实行抗菌药物的个体化原则, 提高轻症胆源性胰腺炎的治疗效果, 防止重症化, 同时保护体内正常菌群, 避免二重感染, 降低细菌耐药株的出现。但是本研究中病例数仍较少, 结果可能存在一定的偏差。为此, 我们将进一步增加样本量继续深入研究。

#### 4 参考文献

- Wada K, Takada T, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, Yokoe M, Kiriyaama S, Hirota M, Kimura Y, Takeda K, Arata S, Hirota M, Sekimoto M, Isaji S, Takeyama Y, Gabata T, Kitamura N, Amano H. Treatment strategy for acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010; 17: 79-86

- Beger HG, Gansauge F, Poch B, Schwarz M. The use of antibiotics for acute pancreatitis: is there a role? *Curr Infect Dis Rep* 2009; 11: 101-107
- 罗燕萍, 张秀菊, 徐雅萍, 田芳, 沈定霞. 产超广谱B-内酰胺酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌的分布及其耐药性研究. *中华医院感染学杂志* 2006; 16: 101-104
- Arendt T, Nizze H, Stüber E, Mönig H, Kloehn S, Fölsch UR. Infected bile-induced acute pancreatitis in rabbits. The role of bacteria. *Int J Pancreatol* 1998; 24: 111-116
- Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis. *Lancet* 2008; 371: 143-152
- 张第, 曹锋, 李非, 孙家邦. 重症急性胰腺炎预防性应用抗生素的Meta分析. *中华肝胆外科杂志* 2011; 17: 466-470
- 张俊旺, 李素平, 师水生, 毓珊, 齐莹. 逆行胆胰管造影对急性胰腺炎的疗效和转归的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2381-2385
- 叶国良, 陈会松, 盛红, 程德希. 胆石症并胆道感染患者胆汁与血细菌培养比较及药敏分析. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 805-807
- 李佳俊, 何江, 李国刚, 周扬霄, 万汝根. 胆石症患者胆汁病原菌培养结果及耐药性分析. *中华医院感染学杂志* 2007; 17: 746-748
- 黎沾良. 外科患者革兰阳性球菌感染的抗菌药物治疗. *中华外科杂志* 2006; 44: 146-148
- van den Hazel SJ, de Vries XH, Speelman P, Dankert J, Tytgat GN, Huibregtse K, van Leeuwen DJ. Biliary excretion of ciprofloxacin and piperacillin in the obstructed biliary tract. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2658-2660
- 郑惊雷, 王在国, 梁力建, 陈东, 林志强, 何润沛. 胆道结石患者胆汁中头孢曲松钠的浓度分布研究. *医学研究杂志* 2009; 38: 64-65
- Kaya M, Beştaş R, Bacalan F, Bacaksız F, Arslan EG, Kaplan MA. Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in bile cultures from endoscopic retrograde cholangiography patients. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 3585-3589

#### 同行评价

本研究针对轻症胆源性胰腺炎胆道感染的病原学资料进行了系统的回顾性分析, 数据统计及分析方法正确, 对临床上轻症胆源性胰腺炎患者的抗感染治疗具有重要的参考价值。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

# 失眠及其相关精神因素对女性肠易激综合征患者的影响

杨微微, 汤玉蓉, 徐新寓, 王一琳, 林琳

## ■背景资料

女性肠易激综合征(IBS)患者中失眠症状普遍存在, 而失眠可影响胃肠道症状, 是焦虑和/或抑郁形成的一个危险因素, 另外焦虑、抑郁等精神因素又可以诱发或影响IBS症状。因此, 本研究通过分析失眠与IBS症状以及精神症状间的关系, 旨在揭示失眠及失眠相关精神因素对IBS的影响, 并为IBS的治疗提供新的思路。

杨微微, 汤玉蓉, 徐新寓, 王一琳, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

杨微微, 在读硕士, 主要从事功能性胃肠疾病方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30971354

江苏省国际科技合作计划基金资助项目, No. BZ2011044

作者贡献分布: 该课题由杨微微、汤玉蓉及林琳共同设计; 资料收集由王一琳完成; 数据整理、分析及论文撰写由杨微微完成; 汤玉蓉、徐新寓及林琳协助修改论文。

通讯作者: 林琳, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. lin9100@yahoo.com.cn  
电话: 025-68136920

收稿日期: 2012-08-13 修回日期: 2012-09-04

接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-18

## Influence of insomnia and insomnia-related psychological factors on symptoms of female patients with irritable bowel syndrome

Wei-Wei Yang, Yu-Rong Tang, Xin-Yu Xu, Yi-Lin Wang, Lin Lin

Wei-Wei Yang, Yu-Rong Tang, Xin-Yu Xu, Yi-Lin Wang, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30971354; the International Science and Technology Cooperation Program of Jiangsu Province, No. BZ2011044

Correspondence to: Lin Lin, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2012-08-13 Revised: 2012-09-04

Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the influence of insomnia and insomnia-related psychological factors on the symptoms of female patients with irritable bowel syndrome (IBS).

**METHODS:** Two hundred and forty-five adult female outpatients with IBS who were treated at the Department of Gastroenterology of the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University were included in this study. A questionnaire survey was conducted using a demographic information questionnaire, a symptom questionnaire, athens insomnia scale (AIS), self-rating

anxiety scale (SAS), and self-rating depression scale (SDS). According to AIS scores, female patients with IBS were divided into insomnia group and non-insomnia group. The influence of insomnia on typical symptoms, somatic symptoms and psychological symptoms of IBS, and the relationship between psychological factors and IBS were analyzed.

**RESULTS:** The insomnia and non-insomnia groups differed significantly in their rating of abdominal pain/discomfort in terms of severity and duration ( $P < 0.05$ ), but there was no difference in attack frequency between the two groups. The incidence of somatic symptoms, scores of SAS and SDS, and scores of SAS' and SDS' (sleep-related entries were removed) were all significantly higher in the insomnia group than in the non-insomnia group (all  $P < 0.01$ ). Severity, attack frequency and duration of abdominal pain/discomfort were all positively correlated with SAS and SDS scores (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Insomnia and insomnia-related psychological factors (anxiety, depression) can aggravate the symptoms of female patients with IBS.

**Key Words:** Irritable bowel syndrome; Insomnia; Psychological factors; Symptoms; Female

Yang WW, Tang YR, Xu XY, Wang YL, Lin L. Influence of insomnia and insomnia-related psychological factors on symptoms of female patients with irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2840-2844

## 摘要

**目的:** 探讨失眠和失眠相关精神因素对女性肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者症状的影响。

**方法:** 收集2009-01/10就诊于南京医科大学第一附属医院消化科门诊的成年女性IBS患者245例, 对其进行问卷调查: 一般人口学资料、症状问卷、阿森斯失眠量表(athens insomnia scale, AIS)、焦虑自评量表(self-rating anxiety scale, SAS)和抑郁自评量表(self-

## ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科



rating depression scale, SDS). 根据AIS评分将IBS患者分为失眠组和非失眠组, 分别分析失眠对IBS典型症状、躯体症状、精神症状的影响及相关精神因素与IBS典型症状的关系。

**结果:** (1)女性IBS患者中, 失眠组典型症状的严重程度及每次发作的持续时间均高于非失眠组( $P<0.05$ ), 而两组间的发作频率则无差异; (2)女性IBS患者失眠组躯体症状的发生率显著高于非失眠组( $P<0.01$ ); (3)失眠组女性IBS患者的SAS、SDS以及剔除睡眠相关条目后的SAS'、SDS'评分均显著高于非失眠组( $P<0.01$ ); (4)女性IBS患者典型症状的严重程度、发作频率及每次发作的持续时间均与SAS、SDS评分呈正相关( $P<0.05$ )。

**结论:** 失眠和失眠相关的焦虑、抑郁精神因素可加重女性IBS患者症状。

**关键词:** 肠易激综合征; 失眠; 精神因素; 症状; 女性

杨微微, 汤玉蓉, 徐新寓, 王一琳, 林琳. 失眠及其相关精神因素对女性肠易激综合征患者的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2840-2844

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2840.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的功能性肠病, 亚洲人群患病率约2.9%-15.6%<sup>[1]</sup>, 近年来有上升趋势. 女性IBS发病率显著高于男性<sup>[2]</sup>, 同时女性患者也较男性患者存在更多、更严重的临床症状. 女性IBS患者中失眠症状普遍存在<sup>[3]</sup>. 研究发现失眠等睡眠障碍可导致胃肠道症状发生率增加<sup>[4]</sup>, 那么在已发生IBS的患者, 失眠是否可能影响IBS患者的症状表现; 另一方面长期失眠是焦虑和/或抑郁形成的一个危险因子<sup>[5]</sup>, 而焦虑、抑郁等精神因素可以诱发或影响IBS症状<sup>[6,7]</sup>, 那么失眠是否可能引起IBS患者的焦虑、抑郁等精神因素差异, 从而影响IBS症状? 因此, 本研究通过分析失眠与IBS症状以及精神症状间的关系, 旨在揭示失眠及失眠相关精神因素对IBS的影响, 并为IBS的治疗提供新的思考。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取2009-01/10就诊于南京医科大学第一附属医院消化科门诊的患者. 纳入标准: 符合罗马III诊断标准<sup>[8]</sup>的成年女性IBS患者. 排除标准: (1)行肠镜、钡剂灌肠X线检查以及常规实验室检查除外可引起腹痛、腹泻、便秘的各种

器质性疾病者; (2)>45岁患者新近出现持续大便习惯改变、症状发作形式改变或逐步加重, 有大肠癌家族史、体质量下降、便血或黑便、贫血、腹部包块、发热等报警症状者; (3)原有精神疾病者。

### 1.2 方法

**1.2.1 调查问卷:** 包括一般人口学资料、症状问卷量表、阿森斯失眠量表(athens insomnia scale, AIS)、焦虑自评量表(self-rating anxiety scale, SAS)和抑郁自评量表(self-rating depression scale, SDS). (1)症状问卷: IBS典型症状, 与排便相关的腹痛或腹部不适症状的严重程度、发作频率以及每次持续时间; 其中, 严重程度分为轻度(不注意时可以忽略)、中度(不可忽略, 但不影响生活方式)、重度(影响生活方式)<sup>[9]</sup>; 发作频率分为<2 d/wk、2-4 d/wk、几乎每天; 每次持续时间分为<1 h、1-8 h、>8 h; 均按3级评分(1-3分), 得分越高说明相应状况越重. IBS躯体症状, 包括头痛、头晕、腰背痛、肌肉酸痛、食欲减退、疲劳、盆腔痛; (2)AIS<sup>[10]</sup>: AIS主要用于睡眠质量的自我评估. 若在过去1 mo内每周至少发生3次, 则选择相应条目的选项. 该量表共有8个条目, 每个条目按影响的严重程度分4级评分(0-3分), 各条目累积得分为AIS评分; (3)SAS和SDS<sup>[11]</sup>: SAS及SDS量表各有20个条目, 每个条目按症状出现的频度分4级评分(1-4分), 各项目累积得分为SAS粗分或SDS粗分, 再将各粗分乘以1.25为最后标准分. 得分越高说明症状越严重. 其中SAS量表的第19、20条目以及SDS量表的第4条目为睡眠相关, 为排除睡眠因素对评分的影响, 分别再计算减去各自睡眠条目评分后的标准分, 记为SAS'或SDS'。

**1.2.2 分组:** AIS评分 $\geq 6$ 分诊断为失眠, 0-5分为非失眠<sup>[12]</sup>. 因此根据AIS评分, 将收集的成年女性IBS患者分为失眠组和非失眠组。

**统计学处理** 采用SPSS17.0统计软件进行统计分析. 女性IBS失眠组与非失眠组的典型症状比较采用秩和检验; 两组间SAS、SDS及SAS'、SDS'评分比较采用独立样本 $t$ 检验, 数值以mean $\pm$ SD表示; 失眠与躯体症状的关系分析采用 $\chi^2$ 检验; IBS典型症状与SAS、SDS评分间的相关性分析采用Spearman相关分析.  $P<0.05$ 为差异有统计学意义,  $P<0.01$ 为差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 总体资料分析** 本研究根据罗马III标准共收集成年女性IBS患者245例. 其中失眠组151例,

### ■研究前沿

目前IBS的病因及发病机制尚不清楚, 神经精神因素是其中之一. 本研究提示失眠及失眠相关的精神因素与IBS症状密切相关, 但失眠、精神因素以及IBS孰因孰果并不清楚, 仍需进一步研究。



## ■ 相关报道

Jarrett等报道, 女性IBS患者睡眠质量低下可导致次日胃肠道症状的高发; Fass等提出睡眠中的觉醒增加可能是导致功能性胃肠病患者内脏躯体敏感性改变的原因之一; Rotem等发现觉醒增加也是IBS伴失眠患者的主要睡眠障碍表现; Elsenbruch等认为IBS患者存在的精神症状似乎是主观睡眠质量下降所致; Cho等指出焦虑、抑郁等精神因素可影响IBS症状, 其机制可能与自主神经系统以及肠道敏感性的改变有关。

表 1 失眠组与非失眠组女性IBS患者的基本情况 (mean  $\pm$  SD)

	失眠组	非失眠组	F值	P值
平均年龄	48.5 $\pm$ 12.8	45.8 $\pm$ 14.5	2.077	0.151
体质量指数	22.6 $\pm$ 3.0	22.6 $\pm$ 2.8	0.017	0.895

IBS: 肠易激综合征。

非失眠组94例, 失眠发生率为61.63%(151/245例); 失眠组与非失眠组患者的IBS中位病程均为3年, 且年龄、体质量指数均具同质性(表1)。

## 2.2 失眠对女性IBS患者症状的影响

2.2.1 失眠与IBS典型症状: 与排便相关的腹痛或腹部不适是IBS的典型症状, 失眠组典型症状的严重程度及每次持续时间均高于非失眠组(分别为 $Z = -2.665$ ,  $P < 0.01$ ;  $Z = -2.215$ ,  $P < 0.05$ ); 而2组间典型症状的发作频率则无差异(表2)。

2.2.2 失眠与IBS躯体症状: 失眠组的躯体症状发生率为100%(151/151例), 非失眠组为45.74%(43/94例), 两者之间差别有统计学意义( $\chi^2 = 103.46$ ,  $P = 0.000$ ), 即失眠组的躯体症状发生率显著高于非失眠组。主要表现为头痛、头晕、腰背痛、肌肉酸痛以及疲劳的症状在失眠组患者中更为高发( $P < 0.05$ , 表3)。

2.3 失眠对女性IBS患者精神因素的影响 IBS失眠组的SAS、SDS评分以及剔除睡眠相关条目后的SAS'、SDS'评分均显著高于非失眠组, 两组间存在统计学差异( $P < 0.01$ , 表4)。

2.4 女性IBS患者典型症状与精神因素的关系 女性IBS患者典型症状的严重程度、发作频率及每次持续时间均与SAS、SDS评分呈正相关( $P < 0.05$ , 表5)。

## 3 讨论

IBS是一种常见的功能性肠病, 以反复发作的腹痛或腹部不适、排便习惯或粪便性状的改变为主要特征, 并常伴有疲劳、头痛、纤维肌痛等肠外躯体症状。近年来, 不少研究发现失眠在IBS患者中普遍存在, 尤以女性患者为主。我们前期的研究亦发现, 女性IBS患者中失眠者占60.62%, 显著高于男性34.20%的比例<sup>[3]</sup>。

Jarrett等<sup>[13]</sup>报道, 在女性IBS患者, 睡眠质量低下可导致次日胃肠道症状的高发。本研究发现, 在女性IBS患者中, 与非失眠者相比, 失眠者的典型症状评分(包括严重程度与每次发作的持续时间)和躯体症状发生率均高。提示在已发生

IBS的女性患者, 失眠可能加重IBS的肠道和躯体症状。Zhang等<sup>[14]</sup>发现失眠可能影响人体的内脏敏感性; 同时Fass等<sup>[15]</sup>提出睡眠中的觉醒增加可能是导致功能性胃肠病患者内脏躯体敏感性改变的原因之一, 而觉醒增加也是IBS伴失眠患者的主要睡眠障碍表现<sup>[16]</sup>。以上可以部分解释本研究中发现: 伴失眠的女性IBS患者典型症状、躯体症状更为严重。

有文献报道, 长期失眠是焦虑和/或抑郁形成的一个危险因子<sup>[5]</sup>。Elsenbruch等<sup>[17]</sup>发现精神症状的严重程度与主观的睡眠质量下降紧密相关, 认为IBS患者存在的精神症状似乎是主观睡眠质量下降所致。本研究结果显示女性IBS患者中失眠组SAS、SDS评分高于非失眠组; 且为排除失眠本身对SAS、SDS自评评分的影响, 在剔除量表中相关睡眠条目后的SAS'、SDS'评分也均高于非失眠组, 提示失眠可能影响女性IBS患者的焦虑和抑郁症状。

焦虑、抑郁等精神因素可影响IBS症状<sup>[7]</sup>。其机制可能与自主神经系统以及肠道敏感性的改变有关。精神症状可以改变自主神经系统传入到胃肠系统<sup>[18]</sup>, 使功能性肠病患者的肠道敏感性增强, 进而诱发IBS症状<sup>[6]</sup>。本研究在女性IBS患者中亦发现: IBS典型症状的严重程度、发作频率及每次发作的持续时间均与患者SAS、SDS评分呈正相关。证实了在本研究纳入的女性IBS患者中, 其典型症状与精神因素密切相关。因此也说明失眠相关的焦虑、抑郁精神因素可影响IBS症状。

总之, 伴失眠的女性IBS患者典型症状、躯体症状、焦虑、抑郁情况均更为严重, 患者的典型症状与焦虑、抑郁状况具有相关性。提示失眠和失眠相关的焦虑、抑郁精神因素可加重女性IBS患者症状。因此, 注意区分伴有失眠的IBS患者, 特异性缓解此类患者的失眠症状, 可能有助于其改善肠内外症状和精神症状。

本研究的主要局限性在于: (1)本研究为回顾性研究, 对失眠的诊断依据阿森斯失眠自评量表, 未对失眠这一睡眠障碍进行客观鉴定并具体描述睡眠特征, 如采用多道睡眠描记术; 失眠可能是IBS和/或焦虑、抑郁的一个症状表现, 亦可能是他们的致病因素, 因此在IBS的疾病过程中其因果关系并不清楚, 需进一步研究; (2)为排除性别混杂因素对结果的影响, 研究范围仅限于女性IBS患者; (3)本研究患者资料来自于单个医疗机构, 结果可能存在地区人群差异。

表 2 失眠组与非失眠组女性IBS患者的典型症状比较

	<i>n</i>	严重程度			发作频率			持续时间		
		轻	中	重	<2 d/wk	2-4 d/wk	几乎每天	<1 h	1-8 h	>8 h
失眠组	151	110	29	12	16	59	76	107	37	7
非失眠组	94	82	9	3	13	45	36	78	15	1
Z值		-2.665			-1.790			-2.215		
P值		0.008			0.074			0.027		

IBS: 肠易激综合征.

## ■应用要点

该研究发现失眠及失眠相关的焦虑、抑郁可加重IBS患者的症状,提示特异性缓解此类患者的失眠症状,可能有助于改善其肠内外症状及精神症状。

表 3 失眠组与非失眠组女性IBS患者躯体症状的发生情况 *n*(%)

	失眠组	非失眠组	$\chi^2$ 值	P值
头痛	38(25.17)	10(11.90)	7.761	0.005
头晕	49(32.45)	12(12.77)	12.005	0.001
腰背痛	50(33.11)	14(14.89)	9.965	0.002
肌肉酸痛	43(28.48)	14(14.89)	5.987	0.014
食欲减退	28(18.54)	11(11.70)	2.026	0.155
疲劳	105(69.54)	26(27.66)	40.836	0.000
盆腔痛	3(1.99)	1(1.06)	-	1.000

IBS: 肠易激综合征.

表 4 失眠组与非失眠组女性IBS患者的SAS、SDS以及SAS'、SDS'评分比较 (mean  $\pm$  SD)

	失眠组	非失眠组	<i>t</i> 值	P值
SAS	43.70 $\pm$ 6.53	36.17 $\pm$ 5.83	-9.1	0.000
SDS	55.58 $\pm$ 6.09	50.40 $\pm$ 6.46	-6.3	0.000
SAS'	37.90 $\pm$ 6.28	32.11 $\pm$ 5.24	-7.5	0.000
SDS'	51.92 $\pm$ 5.94	48.08 $\pm$ 6.39	-4.8	0.000

IBS: 肠易激综合征; SAS: 焦虑自评量表; SDS: 抑郁自评量表; SAS': 删去睡眠相关条目的焦虑自评量表; SDS': 删去睡眠相关条目的抑郁自评量表。

## 4 参考文献

- Gwee KA, Bak YT, Ghoshal UC, Gonlachanvit S, Lee OY, Fock KM, Chua AS, Lu CL, Goh KL, Kositchaiwat C, Makharia G, Park HJ, Chang FY, Fukudo S, Choi MG, Bhatia S, Ke M, Hou X, Hongo M. Asian consensus on irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 1189-1205
- Chang FY, Lu CL, Chen TS. The current prevalence of irritable bowel syndrome in Asia. *J Neurogastroenterol Motil* 2010; 16: 389-400
- Tang YR, Yang WW, Wang YL, Lin L. Sex differences in the symptoms and psychological factors that influence quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 702-707
- Cremonini F, Camilleri M, Zinsmeister AR, Herrick LM, Beebe T, Talley NJ. Sleep disturbances are

表 5 女性IBS患者典型症状与SAS、SDS评分的相关性分析

	SAS		SDS	
	<i>t</i> 值	P值	<i>t</i> 值	P值
严重程度	0.201	0.002	0.214	0.001
发作频率	0.173	0.007	0.152	0.018
持续时间	0.220	0.001	0.244	0.000

IBS: 肠易激综合征; SAS: 焦虑自评量表; SDS: 抑郁自评量表.

linked to both upper and lower gastrointestinal symptoms in the general population. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 128-135

- Neckelmann D, Mykletun A, Dahl AA. Chronic insomnia as a risk factor for developing anxiety and depression. *Sleep* 2007; 30: 873-880
- Guthrie E, Barlow J, Fernandes L, Ratcliffe J, Read N, Thompson DG, Tomenson B, Creed F. Changes in tolerance to rectal distension correlate with changes in psychological state in patients with severe irritable bowel syndrome. *Psychosom Med* 2004; 66: 578-582
- Cho HS, Park JM, Lim CH, Cho YK, Lee IS, Kim SW, Choi MG, Chung IS, Chung YK. Anxiety, depression and quality of life in patients with irritable bowel syndrome. *Gut Liver* 2011; 5: 29-36
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480-1491
- Weinryb RM, Osterberg E, Blomquist L, Hultcrantz R, Krakau I, Asberg M. Psychological factors in irritable bowel syndrome: a population-based study of patients, non-patients and controls. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 503-510
- Soldatos CR, Dikeos DG, Paparrigopoulos TJ. Athens Insomnia Scale: validation of an instrument based on ICD-10 criteria. *J Psychosom Res* 2000; 48: 555-560
- Zhao Y, Ke M, Wang Z, Wei J, Zhu L, Sun X, Zhang J. Pathophysiological and psychosocial study in patients with functional vomiting. *J Neurogastroenterol Motil* 2010; 16: 274-280
- Soldatos CR, Dikeos DG, Paparrigopoulos TJ. The diagnostic validity of the Athens Insomnia Scale. *J Psychosom Res* 2003; 55: 263-267
- Jarrett M, Heitkemper M, Cain KC, Burr RL, Hertig V. Sleep disturbance influences gastrointestinal symptoms in women with irritable bowel syn-

## ■同行评价

IBS是常见的功能性肠病,尤以女性明显,其病因、发病机制尚不十分清楚,该文研究结果有利于说明失眠及失眠相关精神因素与IBS密切相关,对探讨IBS的发病机制和临床防治有一定参考价值。

- drome. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 952-959
- 14 Zhang J, Lam SP, Li SX, Tang NL, Yu MW, Li AM, Wing YK. Insomnia, sleep quality, pain, and somatic symptoms: sex differences and shared genetic components. *Pain* 2012; 153: 666-673
- 15 Fass R, Fullerton S, Tung S, Mayer EA. Sleep disturbances in clinic patients with functional bowel disorders. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1195-2000
- 16 Rotem AY, Sperber AD, Krugliak P, Freidman B, Tal A, Tarasiuk A. Polysomnographic and actigraphic evidence of sleep fragmentation in patients with irritable bowel syndrome. *Sleep* 2003; 26: 747-752
- 17 Elsenbruch S, Thompson JJ, Hamish MJ, Exton MS, Orr WC. Behavioral and physiological sleep characteristics in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2306-2314
- 18 Kearney DJ, Brown-Chang J. Complementary and alternative medicine for IBS in adults: mind-body interventions. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 624-636

编辑 田滢 电编 鲁亚静

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出版权转让给本刊编辑部。

### 2 稿件修改

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

### 3 版权

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

# 脂联素受体在结直肠癌和结直肠腺瘤组织中表达

宋敏, 畅婕, 孟宇, 李磊

宋敏, 畅婕, 孟宇, 李磊, 郑州大学第一附属医院肿瘤内科 河南省郑州市 450052

畅婕, 郑州大学肿瘤病理学实验室 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 此课题由畅婕与宋敏设计; 研究过程由畅婕、孟宇及李磊完成; 数据分析与论文写作由畅婕与宋敏完成。

通讯作者: 宋敏, 教授, 研究生导师, 450052, 河南省郑州市二七区建设东路1号, 郑州大学第一附属医院肿瘤内科。

minsong2011@163.com

收稿日期: 2012-07-17 修回日期: 2012-09-10

接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-18

## Expression of adiponectin receptors R1 and R2 in colorectal carcinoma and colorectal adenoma

Min Song, Jie Chang, Yu Meng, Lei Li

Min Song, Jie Chang, Yu Meng, Lei Li, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China  
Jie Chang, Tumor Pathology Laboratory Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Min Song, Professor, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 East Jianshe Street, Erqi District, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. minsong2011@163.com  
Received: 2012-07-17 Revised: 2012-09-10

Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between expression of adiponectin receptors R1 and R2 and clinicopathological parameters in colorectal cancer and colorectal adenomas.

**METHODS:** Expression of adiponectin receptors R1 and R2 in surgical specimens of colorectal carcinoma ( $n = 51$ ), colorectal adenomas ( $n = 42$ ), and normal colorectal mucosa ( $n = 35$ ) was detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** The expression of adiponectin receptors R1 and R2 was significantly higher in colorectal carcinoma than in colorectal adenomas ( $P = 0.047, 0.035$ ), and in colorectal adenomas than in normal colorectal mucosa ( $P = 0.042, 0.046$ ). Expression of adiponectin receptors was significantly correlated with histological differentiation, lymph node metastasis, and TNM stages (all  $P <$

0.05), but not with other clinicopathological features including sex, age, tumor size.

**CONCLUSION:** Adiponectin receptors R1 and R2 are expressed in both colorectal carcinoma and normal colorectal mucosa. Expression of adiponectin receptors R1 and R2 is enhanced in colorectal cancer and adenomas. Adiponectin receptor expression closely correlates with tumor differentiation, lymph node metastasis and TNM stage in patients with colorectal cancer. Adiponectin receptors may become new targets for colorectal cancer treatment.

**Key Words:** Adiponectin receptor; Colorectal cancer; Colorectal adenoma; Immunohistochemistry

Song M, Chang J, Meng Y, Li L. Expression of adiponectin receptors R1 and R2 in colorectal carcinoma and colorectal adenoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2845-2850

## 摘要

**目的:** 检测脂联素受体1(adiponectin receptors 1, R1)和R2在人结直肠癌组织、腺瘤组织、癌旁组织中的表达情况与临床病理特征的关系及3种组织中R1和R2的关联性。

**方法:** 采用免疫组织化学SP法检测51例新鲜结直肠癌组织, 42例结直肠腺瘤组织, 35例癌旁组织中脂联素受体R1和R2的表达。

**结果:** 免疫组织化学结果显示R1在人结直肠癌组织中表达高于腺瘤组织( $P = 0.047$ ), 结直肠癌组织中表达高于癌旁组织( $P = 0.002$ ), 腺瘤组织中的表达高于癌旁组织( $P = 0.042$ )。R2在人结直肠癌组织中表达高于腺瘤组织( $P = 0.035$ ), 结直肠癌组织中表达高于癌旁组织( $P = 0.002$ ), 腺瘤组织中表达高于癌旁组织( $P = 0.046$ )。在3种组织中, R1与R2的表达无关联性( $P > 0.05$ )。在51例结直肠癌组织中脂联素受体表达与分化程度、淋巴结转移、TNM分期相关(均 $P < 0.05$ ), 与性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型无明显相关( $P > 0.05$ )。

**结论:** 脂联素受体在人结直肠癌组织、腺瘤组

## ■背景资料

脂联素是一种由脂肪细胞特异分泌的内源性生物活性分子, 与冠心病、糖尿病、高血压、肿瘤等多种疾病密切相关。具有调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗、抗炎、抗动脉粥样硬化及抗肿瘤的作用。

## ■同行评议者

赵春玲, 副教授, 潍坊医学院细胞生物学教研室

## ■ 研发前沿

近几年关于脂联素及其受体与结肠直肠癌、乳腺癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、前列腺癌、肾细胞癌等几种恶性肿瘤的相关关系及其作用机制的研究取得了较大的进展,但在癌前病变方面的研究应用有待进一步加强。

组织、癌旁组织中普遍表达,且在结直肠癌组织中的表达最高,腺瘤次之。脂联素受体表达与分化程度、淋巴结转移、TNM(tumor regional lymph node and metastasis)分期有关。脂联素受体有可能成为结直肠癌治疗的一个新靶点。

**关键词:** 脂联素受体; 结直肠癌; 结直肠腺瘤; 免疫组织化学

宋敏, 畅婕, 孟宇, 李磊. 脂联素受体在结直肠癌和结直肠腺瘤组织中表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2845-2850  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2845.asp>

## 0 引言

恶性肿瘤已经严重危害人类健康,致死率在我国占据首位。肿瘤的发生发展是一个多基因改变和多步骤致癌的复杂过程。一般认为,正常细胞从增生发展到恶性肿瘤是个逐渐演变的过程:一般增生→不典型增生→癌变。以结直肠癌为例,由于结直肠癌大多数来自原先存在的腺瘤,即所谓的腺瘤腺癌顺序(adenoma-carcinoma sequence)。此过程需要较长的时间,所以早期阻断结直肠癌发展成为治疗的有效方法。相关流行病学显示,肥胖是结直肠癌这种肥胖相关性肿瘤的危险因子。脂联素是一种由脂肪细胞特异分泌的内源性生物活性因子,广泛分布于人体多种组织细胞中,与冠心病、糖尿病、高血压、肿瘤等多种疾病密切相关<sup>[1-3]</sup>。具有调节糖脂代谢、改善胰岛素抵抗<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[6]</sup>及抗肿瘤的作用。脂联素通过与脂联素受体结合而发挥作用。脂联素受体(adiponectin receptors)由Yamauchi等<sup>[7]</sup>在人类和小鼠体内首次克隆出来的。其抗肿瘤机制可能与其直接作用于肿瘤细胞,同时抗血管生成,诱导肿瘤细胞凋亡相关。近几年关于脂联素及其受体与结直肠癌<sup>[8]</sup>、乳腺癌<sup>[9]</sup>、子宫内膜癌<sup>[10]</sup>、食管癌<sup>[11]</sup>、胃癌<sup>[12]</sup>、前列腺癌<sup>[13]</sup>、肾细胞癌<sup>[14]</sup>等几种恶性肿瘤的相关关系及其作用机制的研究取得了较大的进展,但对结直肠癌癌前病变的研究甚少。本实验通过分析脂联素受体在结直肠癌及结直肠腺瘤伴不典型增生组织中表达的情况及其与临床病理学联系,初步探讨脂联素受体在结直肠癌发生发展中的作用,为诊断及治疗结直肠癌提供新的思路和理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料 收集郑州大学第一附属医院2012-03/2012

-06期间手术切除并经病理证实的人结直肠癌标本51例,其中结肠癌28例,直肠癌23例;男30例,女21例,平均年龄47.8岁±11.9岁(24岁-82岁);组织学类型:管状腺癌15例、乳头状腺癌13例、黏液腺癌13例、印戒细胞癌10例;分化程度:高分化10例、中分化13例、低分化26例;TNM分期:I期9例、II期24例、III期16例、IV期2例;淋巴结转移14例,无淋巴结转移37例;术前未经过放、化疗,并且排除高血压、糖尿病、冠心病等;人结直肠腺瘤42例,其中管状腺瘤19例、绒毛状腺瘤16例、管状绒毛腺瘤7例;同时选取35例人结直肠癌旁组织作为正常对照,平均年龄39.0岁±8.7岁(24-57岁)。

### 1.2 方法

**1.2.1 脂联素受体R1和R2的检测:** 3组新鲜结直肠组织标本均经40 g/L甲醛固定后石蜡包埋,5 μm厚度连续切片用于免疫组织化学。兔抗人脂联素受体1(adiponectin receptors1, R1)和R2多克隆抗体购自上海生物工程有限公司,SP试剂盒和DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。切片常规脱蜡,高压抗原修复,血清封闭,滴加一抗,R1抗体按1:300稀释,R2抗体按1:250稀释,4℃过夜,滴加二抗,显色封片,用已知的结直肠癌阳性切片做阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。

**1.2.2 结果判断:** 脂联素受体阳性表达即在细胞浆内可出现棕黄色颗粒。结果判读采用半定量积分分级,积分=染色细胞比例×染色强度。染色细胞比例:<5%为阴性,0分;6-20%为弱阳性,1分;21-50%为阳性,2分;>50%为强阳性,3分;染色强度:无色为阴性0分;淡黄色为弱阳性1分;棕黄色为阳性2分;棕褐色为强阳性3分;2种计分相乘,0分阴性,1-3分弱阳性,4-6阳性,7-9强阳性。

**统计学处理** 采用SPSS17.0统计软件包进行数据处理。应用 $\chi^2$ 检验比较3组患者结直肠组织中R1和R2表达的差异及与临床病理特征的关系,应用列联系数分析3组患者结直肠组织中R1和R2表达的关联性,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 3组结直肠组织中R1的表达** R1在所有结直肠癌、结直肠腺瘤以及正常直肠腺体上皮细胞中均有表达,主要定位于细胞质,呈淡黄色、棕黄色、棕褐色颗粒状(图1A-I)。3组结直肠组织



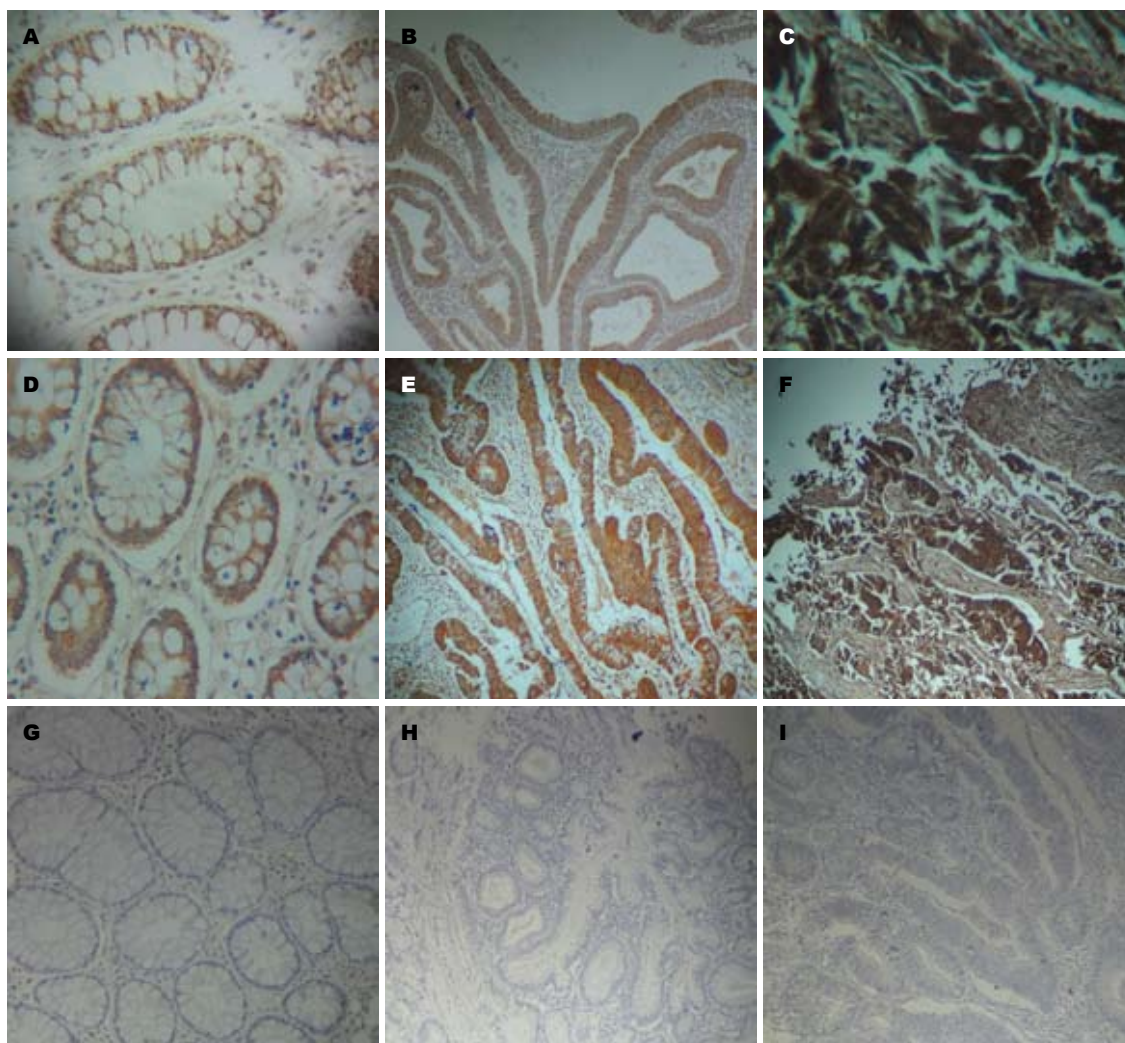


图1 脂联素受体R1和R2在结直肠癌组织和结直肠腺瘤组织中的表达( $\times 200$ )。A: R1癌旁组织弱阳性染色; B: R1结直肠腺瘤组织阳性染色; C: 结直肠癌组织强阳性染色; D: R2癌旁组织弱阳性染色; E: 结直肠腺瘤组织阳性染色; F: R2结直肠癌组织强阳性染色; G: 癌旁组织阴性对照; H: 结直肠腺瘤阴性对照; I: 结直肠癌组织阴性对照。

#### ■ 相关报道

在既往研究中, Yoneda等应用免疫组织化学的方法、RT-PCR和Western blot等检测正常结肠组织和结肠癌组织黏膜中脂联素受体的表达,发现脂联素受体R1和R2的表达同时存在于正常结肠上皮细胞和结肠癌细胞中。同样Williams等用RT-PCR法和免疫组织化学的方法检测收集的40例结直肠癌组织标本和12例癌旁组织标本,发现脂联素受体在正常组织中的表达显著低于结肠癌组织中的表达。

中R1的表达(图1A-F)。其中51例结直肠癌组织中R1强阳性表达率是49.0%(25/51), 阳性表达率是19.6%(10/51), 弱阳性表达率是15.7%(8/51), 阴性表达率是15.7%(8/51); 42例结直肠腺瘤组织中R1强阳性表达率是21.4%(9/42), 阳性表达率是35.7%(15/42), 弱阳性表达率是19.0%(8/42), 阴性表达率是23.8%(10/42); 35例正常黏膜组织中R1强阳性表达率是14.3%(5/35), 阳性表达率是17.1%(6/35), 弱阳性表达率是48.6%(17/35), 阴性表达率是20.0%(7/35), 3组结直肠组织差异有统计学意义( $P = 0.002$ , 表1)。

2.2 3组结直肠组织中R2的表达 3组结直肠组织中R2的表达(图1D-F), 其中51例结直肠癌组织中R2的强阳性表达率是45.1%(23/51), 阳性表达率是21.6%(11/51), 弱阳性表达率是19.6%(10/51), 阴性表达率是13.7%(7/51); 42例结直肠腺瘤组织中R2强阳性表达率是16.7%(7/42), 阳性表达

率是40.5%(17/42), 弱阳性表达率是21.4%(9/42), 阴性表达率是21.4%(9/42); 35例正常黏膜组织中R1强阳性表达率是17.1%(6/35), 阳性表达率是20.0%(7/35), 弱阳性表达率是40.0%(14/35), 阴性表达率是22.9%(8/35), 3组结直肠组织差异有统计学意义( $P = 0.039$ , 表2)。

2.3 R1和R2表达与结直肠癌临床病理参数的关系 R1和R2表达与结直肠癌的分化程度( $P = 0.005$ )、淋巴结转移情况( $P = 0.001$ )及临床TNM分期( $P = 0.001$ )相关, 与性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型无关( $P > 0.05$ , 表3)。并分析3种组织中R1和R2表达的关联性无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

脂联素作为一种由脂肪细胞特异分泌的内源性生物活性分子, 其受体分为两种结构: AdipoR1和AdipoR2, 分布于许多组织细胞中, 由于脂联素的

## ■创新盘点

本研究得出脂联素受体在结直肠腺瘤腺癌发展过程中,表达随组织的不同呈现渐进性的反应增高,推测此为循环中脂联素水平下降的一种应激表现,为机体的一种保护机制,这种保护机制对癌前病变的诊断和癌症早期治疗都有重要的作用。

表 1 免疫组织化学法检测脂联素受体R1在不同组织中的表达

分组	n	阳性(%)			P值
		+	++	+++	
结直肠癌	44	3(6.8)	16(36.4)	23(52.3)	0.002
结直肠腺瘤	36	9(25.0)	17(47.2)	9(25.0)	
正常组织	26	12(46.2)	10(38.5)	3(11.5)	

表 2 免疫组织化学法检测脂联素受体R2在不同组织中的表达

分组	n	阳性(%)			P值
		+	++	+++	
结直肠癌	44	7(15.9)	16(36.4)	20(45.5)	0.039
结直肠腺瘤	36	11(30.6)	15(41.7)	6(16.7)	
正常组织	26	10(38.5)	6(23.1)	7(26.9)	

表 3 脂联素受体R1和R2与结直肠癌临床病理参数的关系

临床病理因素	n	R1		$\chi^2$ 值	P值	R2		$\chi^2$ 值	P值
		阳性	阴性			阳性	阴性		
年龄(岁)									
<60	27	23	4	0.033	0.085	18	4	0.649	0.421
>60	24	20	4			26	3		
性别									
男	30	25	5	0.053	0.818	27	3	1.781	1.182
女	21	18	3			16	5		
组织学分型									
管状腺癌	15	13	2	5.789	0.122	12	3	0.457	0.928
乳头状癌	13	12	1			11	2		
黏液腺癌	13	12	1			11	2		
印戒细胞癌	10	6	4			9	1		
分化程度									
高分化	10	4	6	17.636	0.001	5	5	10.429	0.005
中分化	13	12	1			12	1		
低分化	26	25	1			24	2		
有无淋巴结转移									
有	14	9	5	5.853	0.016	8	6	10.772	0.001
无	37	34	3			35	2		
肿瘤大小									
<5 cm	22	21	1	3.631	0.057	18	4	0.182	0.670
>5 cm	29	22	7			25	4		
TNM分期									
I 期和 II 期	33	31	2	10.886	0.001	32	1	11.324	0.001
III 期和 IV 期	18	10	8			11	7		

R1: 脂联素受体1; R2: 脂联素受体2.

敏感性不同,所以不同的脂联素与不同的脂联素受体结合以发挥相应的功能.这种结合不仅与糖和脂肪的代谢过程相关,而且与结直肠癌的发生和进展有密切联系.在既往研究中,Yoneda等<sup>[15]</sup>应用免疫组织化学的方法、RT-PCR和Western blot检测正常结肠组织和结肠癌组织黏膜中脂联素受体的表达,发现脂联素受体R1和R2的表达同时存在于正常结肠上皮细胞和结肠癌细胞中.同样Williams等<sup>[12]</sup>用RT-PCR法和免疫组织化学的方法检测收集的40例结直肠癌组织标本和12例癌旁

组织标本,发现脂联素受体在正常组织中的表达显著低于结肠癌组织中的表达.本实验设计用免疫组化方法检测51例新鲜结直肠癌组织,42例结直肠腺瘤伴不典型增生组织,35例癌旁组织中脂联素受体R1和R2的表达,创新点在于研究结直肠癌癌前病变中脂联素受体的表达,监测结直肠癌的腺瘤腺癌顺序中脂联素受体的表达并做一连续性分析.结果发现3种组织中均有不同程度的脂联素受体表达,其中R1在人结直肠癌组织中表达高于腺瘤组织,结直肠癌组织中表达高于癌旁

组织,腺瘤组织中的表达高于癌旁组织. R2在人结直肠癌组织中表达高于腺瘤组织,结直肠癌组织中表达高于癌旁组织,腺瘤组织中表达高于癌旁组织. 此次研究结果和既往研究结果部分一致,但在癌前病变中的研究具体更加重要的意义,脂联素受体在结直肠腺瘤腺癌发展过程中,表达随组织的不同呈现渐进性的反应增高,推测此为循环中脂联素水平下降的一种应激表现,为机体的一种保护机制,这种保护机制对癌前病变的诊断和癌症早期治疗都有重要的作用. 本实验的缺陷在于没有具体量化脂联素受体的表达水平,为诊断结直肠癌和结直肠腺瘤提供依据.

通过进一步统计学比较脂联素受体与结直肠癌临床病理参数关系发现,其与肿瘤分化程度、淋巴结转移、TNM分期相关,与性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型无明显相关. 这一结果与免疫组织化学实验结果相一致,说明淋巴结转移和肿瘤分化程度决定了肿瘤的TNM分期,决定了患者的5年生存率. 期别越高,脂联素受体的表达水平越高. 这种反应性的增高,有助于刺激机体分泌脂联素,那么脂联素与脂联素受体结合是怎么对结直肠组织起到保护作用的呢? 生理浓度的脂联素(5-30  $\mu\text{g/mL}$ )与脂联素受体结合后,可以活化细胞内信号转导通路从而抑制细胞的增殖和促进细胞的凋亡,包括ERK1/2(extracellular signal regulated protein kinase)、腺苷酸活化激酶(AMPK)和C-jun氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinases, JNK)的磷酸化<sup>[12]</sup>. ERK1/2是由ras和raf激活的一种丝裂原激活蛋白激酶(MAPK). ERK1/2的磷酸化激活能促进细胞的增殖和细胞的迁移<sup>[16]</sup>. 由于乳腺癌细胞ERK1/2的磷酸化被脂联素抑制,从而促进细胞凋亡和抑制细胞增殖<sup>[17,18]</sup>. 激活的AMPK主要通过增加细胞ATP的消耗和抑制其产生参与细胞代谢,从而对特异酶和转录调节有直接效应. 结肠HT-29细胞被活化的AMPK诱导凋亡<sup>[19]</sup>. JNK是MAPK家族成员之一,能被各种细胞因子激活,同时也能够磷酸化和激活转录因子C-jun. 在各种生理病理条件下, JNK参与细胞增生和凋亡调控,同时在肿瘤的发展中也发挥着作用. 最近研究发现在乳腺癌中脂联素阻断JNK的激活,促进其细胞凋亡<sup>[20]</sup>. 通过现有的研究发现,脂联素可以通过脂联素受体活化ERK1/2、AMPK、JNK的磷酸化,激活下游的信号转导,参与结直肠癌及其他肥胖相关肿瘤的发生. 另外脂联素还能够抑制新生血管的形成. Man等<sup>[21]</sup>发现脂联

素与其受体结合后能够有效的抑制肿瘤血管生成,同时下调其下的信号通路. Bråkenhielm等<sup>[22]</sup>在试验中发现线粒体凋亡反应被脂联素激活后,导致血管内皮细胞凋亡,明显抑制了小鸡的绒毛膜尿囊膜和小鼠角膜中新生血管的形成. 同时在动物实验中,通过给T241有纤维肉瘤的小鼠模型瘤内注射脂联素,数周后发现肿瘤的体质量、体积明显减少60%. 通过利用乳腺癌细胞MDA-MB-231传染雌性裸鼠从而诱导乳腺癌模型,在此过程中的前7-14 d,给予脂联素重组体或腺病毒介导表达的脂联素,发现肿瘤细胞的数目、大小明显下降<sup>[23]</sup>. 用裸鼠皮下接种胃癌细胞AZ521,并且局部注射脂联素可以明显抑制胃癌细胞AZ521的生长. 同样腹腔内注射脂联素可以抑制AZ521细胞的腹腔内转移<sup>[24]</sup>. 通过现有研究发现在结直肠腺瘤腺癌的发展中,脂联素通过与受体结合能够有效的抑制新生血管的生成,在抗肿瘤的治疗中也起到了至关重要的作用.

总之,脂联素及其受体具有抑制细胞增殖,促进细胞凋亡及抗血管生成的作用,可能会成为一种新的有效的抗肿瘤因子. 但是目前抗肿瘤机制还不是完全清楚,有待进一步的研究. 由于脂联素及其受体在各个肿瘤中的作用,我们可以大胆想象,是否可以研究以脂联素为基础的短肽,通过模仿脂联素及其受体的行为做适当的临床开发应用于癌症治疗,并且将癌症的治疗提前到癌前病变. 由于其在多种肿瘤发病和治疗中的潜在作用将为癌症的预防与早期诊断提供新的思路,为临床治疗提供理论基础.

#### 4 参考文献

- 1 Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003; 278: 40352-40363
- 2 Xia K, Guo L, Zhao Z, Md Sayed AS, Li F, Yang T. [Plasma level of adiponectin in coronary heart disease patients combined with abnormal glucose metabolism]. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2012; 37: 179-184
- 3 Summer R, Walsh K, Medoff B D. Obesity and pulmonary arterial hypertension: Is adiponectin the molecular link between these conditions? *Pulm Circ* 2011; 1: 440-447
- 4 Ashwal R, Hemi R, Tirosh A, Gordin R, Yissachar E, Cohen-Dayag A, Rosenberg A, Karasik A, Blüher M, Kanety H. Differential expression of novel adiponectin receptor-1 transcripts in skeletal muscle of subjects with normal glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2011; 60: 936-946
- 5 Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P,

#### ■同行评价

该研究通过分析脂联素受体在大肠癌及大肠腺瘤伴不典型增生组织中表达的情况及其与临床病理学联系,初步探讨脂联素受体在大肠癌发生发展中的作用,研究内容较新颖. 为后续研究以脂联素为基础的短肽用于治疗大肠癌打下良好基础.

- Romero JR, Li J, Williams GH, Adler GK. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, and pro-inflammatory adipokines. *Circulation* 2008; 117: 2253-2261
- 6 Ueno H, Koyama H, Shoji T, Monden M, Fukumoto S, Tanaka S, Otsuka Y, Mima Y, Morioka T, Mori K, Shioi A, Yamamoto H, Inaba M, Nishizawa Y. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) regulation of adiposity and adiponectin is associated with atherogenesis in apoE-deficient mouse. *Atherosclerosis* 2010; 211: 431-436
- 7 Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769
- 8 Byeon JS, Jeong JY, Kim MJ, Lee SM, Nam WH, Myung SJ, Kim JG, Yang SK, Kim JH, Suh DJ. Adiponectin and adiponectin receptor in relation to colorectal cancer progression. *Int J Cancer* 2010; 127: 2758-2767
- 9 Jeong YJ, Bong J G, Park S H, Choi JH, Oh HK. Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin, and adiponectin receptor in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Breast Cancer* 2011; 14: 96-103
- 10 丛丽, 王薇, 李强, 赵子健, 张巾超. 脂联素对子宫内膜癌细胞生长抑制和细胞凋亡的影响. *中华内分泌代谢杂志* 2010; 26: 148-149
- 11 Howard JM, Beddy P, Ennis D, Keogan M, Pidgeon GP, Reynolds JV. Associations between leptin and adiponectin receptor upregulation, visceral obesity and tumour stage in oesophageal and junctional adenocarcinoma. *Br J Surg* 2010; 97: 1020-1027
- 12 Williams CJ, Mitsiades N, Sozopoulos E, Hsi A, Wolk A, Nifli AP, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS. Adiponectin receptor expression is elevated in colorectal carcinomas but not in gastrointestinal stromal tumors. *Endocr Relat Cancer* 2008; 15: 289-299
- 13 Beebe-Dimmer JL, Zuhlke KA, Ray AM, Lange EM, Cooney KA. Genetic variation in adiponectin (ADIPOQ) and the type 1 receptor (ADIPOR1), obesity and prostate cancer in African Americans. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13: 362-368
- 14 Chou SH, Tseleni-Balafouta S, Moon HS, Chamberland JP, Liu X, Kavantzias N, Mantzoros CS. Adiponectin receptor expression in human malignant tissues. *Horm Cancer* 2010; 1: 136-145
- 15 Yoneda K, Tomimoto A, Endo H, Iida H, Sugiyama M, Takahashi H, Mawatari H, Nozaki Y, Fujita K, Yoneda M, Inamori M, Nakajima N, Wada K, Nagashima Y, Nakagama H, Uozaki H, Fukayama M, Nakajima A. Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue. *Oncol Rep* 2008; 20: 479-483
- 16 Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3291-3310
- 17 Cong L, Gasser J, Zhao J, Yang B, Li F, Zhao AZ. Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95 2. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14: 713-720
- 18 Dos Santos E, Benaitreau D, Dieudonne MN, Leneveu MC, Serazin V, Giudicelli Y, Pecquery R. Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. *Oncol Rep* 2008; 20: 971-977
- 19 Kim YM, Hwang JT, Kwak DW, Lee YK, Park OJ. Involvement of AMPK signaling cascade in capsaicin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1095: 496-503
- 20 Grossmann ME, Nkhata KJ, Mizuno NK, Ray A, Cleary MP. Effects of adiponectin on breast cancer cell growth and signaling. *Br J Cancer* 2008; 98: 370-379
- 21 Man K, Ng KT, Xu A, Cheng Q, Lo CM, Xiao JW, Sun BS, Lim ZX, Cheung JS, Wu EX, Sun CK, Poon RT, Fan ST. Suppression of liver tumor growth and metastasis by adiponectin in nude mice through inhibition of tumor angiogenesis and downregulation of Rho kinase/IFN-inducible protein 10/matrix metalloproteinase 9 signaling. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 967-977
- 22 Bräkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T, Cao Y. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2476-2481
- 23 Wang Y, Lam JB, Lam KS, Liu J, Lam MC, Hoo RL, Wu D, Cooper GJ, Xu A. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. *Cancer Res* 2006; 66: 11462-11470
- 24 Ishikawa M, Kitayama J, Yamauchi T, Kadowaki T, Maki T, Miyato H, Yamashita H, Nagawa H. Adiponectin inhibits the growth and peritoneal metastasis of gastric cancer through its specific membrane receptors AdipoR1 and AdipoR2. *Cancer Sci* 2007; 98: 1120-1127

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静



# 康莱特注射液联合FOLFOX4方案治疗晚期大肠癌20例

丁蓉, 霍介格, 张玉, 樊敏

丁蓉, 樊敏, 南京中医药大学 江苏省南京市 210029  
丁蓉, 霍介格, 张玉, 江苏省中西医结合医院 江苏省南京市 210028  
丁蓉, 在读博士, 主治中医师, 主要从事肿瘤的中西医结合临床与科研工作。  
江苏省卫生厅医学科技发展基金资助项目, No. P200921  
作者贡献分布: 本课题由霍介格立项设计; 霍介格指导完成; 丁蓉、张玉及樊敏负责收集病例; 数据统计与论文写作由丁蓉完成。  
通讯作者: 霍介格, 副教授, 210028, 江苏省南京市十字街100号, 江苏省中西医结合医院肿瘤科. hjg1668@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2012-08-12 修回日期: 2012-09-04  
接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-18

## Kanglaite injection combined with FOLFOX4 regimen for the treatment of advanced colorectal cancer: An analysis of 20 cases

Rong Ding, Jie-Ge Huo, Yu Zhang, Min Fan

Rong Ding, Min Fan, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
Rong Ding, Jie-Ge Huo, Yu Zhang, Jiangsu Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China  
Supported by: the Medical Science and Technology Development Foundation of the Health Department of Jiangsu Province, No. P200921  
Correspondence to: Jie-Ge Huo, Associate Professor, Jiangsu Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, 100 Shizi Street, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China. hjg1668@yahoo.com.cn  
Received: 2012-08-12 Revised: 2012-09-04  
Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and toxicity of Kanglaite injection combined with FOLFOX4 regimen in the treatment of advanced colorectal cancer.

**METHODS:** In total, 40 patients with advanced colorectal cancer were randomly divided into treatment group and control group. The control group was treated using the FOLFOX4 regimen, and the treatment group were treated using the FOLFOX4 regimen combined with intravenous infusion of Kanglaite injection. After two cycles of therapy, the efficacy and toxicity were evaluated.

**RESULTS:** The objective response rate and disease control rate were higher in the treatment

group than in the control group, but the differences were not significant (25.0% vs 20.0%,  $P > 0.05$ ; 85.0% vs 75.0%,  $P > 0.05$ ). The stable rate of TCM syndromes after chemotherapy was 85.0% for the treatment group and 50.0% for the control group ( $P < 0.05$ ). KPS score and body weight increased significantly in the treatment group after therapy (both  $P < 0.05$ ). QOL score did not differ significantly between the two groups. After therapy, the numbers of T lymphocytes (CD3+), T-assisted, induced lymphocytes (CD3+CD4+) and NK cells (CD16+CD56+) increased in the treatment group, but decreased in the control group (all  $P < 0.05$ ). Leucopenia incidence in the treatment group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The incidences of other adverse reactions showed no significant differences between the two groups.

**CONCLUSION:** Kanglaite injection combined with FOLFOX4 regimen can improve physical condition, enhance immune function, and reduce chemotherapy toxicity in the treatment of advanced colorectal cancer.

**Key Words:** Kanglaite; Advanced colorectal cancer; Immune function

Ding R, Huo JG, Zhang Y, Fan M. Kanglaite injection combined with FOLFOX4 regimen for the treatment of advanced colorectal cancer: An analysis of 20 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2851-2854

## 摘要

**目的:** 评价康莱特注射液联合FOLFOX4方案治疗晚期大肠癌的疗效及不良反应。

**方法:** 将40例符合入选标准的晚期大肠癌患者分为治疗组和对照组。对照组仅以FOLFOX4方案化疗, 治疗组在化疗同时静脉滴注康莱特注射液。2个周期结束后评价疗效及不良反应。

**结果:** 治疗组和对照组有效率(CR+PR)分别为25.0%和20.0%( $P > 0.05$ ), 疾病控制率(CR+PR+SD)分别为80.0%和75.0%( $P > 0.05$ ); 治疗组和对照组中医证候评定的显效+有效

## ■背景资料

大肠癌的发病率和死亡率在我国呈逐年上升趋势。对其治疗采用以手术为基础的综合治疗方法。化疗药物及分子靶向药物带来的不良反应, 使患者往往无法耐受, 影响生存质量。

## ■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科



## ■研发前沿

实验药理学及临床应用研究表明,康莱特对体内各种肿瘤细胞,具有显著的抑制和杀伤作用,同时具有促进机体的免疫功能和抗恶病质的作用。其确切机制仍需进一步研究。

率分别为85.0%和50.0%( $P<0.05$ );治疗组治疗后Karnofsky评分及体质量改变较对照组升高( $P<0.05$ );治疗组及对照组生活质量评分改变未见明显差异;两组T抑制、杀伤细胞(CD3+CD8+)治疗前后变化无统计学差异。治疗组的T淋巴细胞(CD3+)、T辅助、诱导细胞(CD3+CD4+)、NK细胞(CD16+CD56+)水平较治疗前提高,而对照组则下降,且两组相比有统计学意义( $P<0.05$ )。治疗组的白细胞减少发生率低于对照组( $P<0.05$ ),其余不良反应未见显著差异。

**结论:** 康莱特注射液联合FOLFOX4方案治疗晚期大肠癌能够有效改善患者体力状况,提高免疫功能,减轻化疗不良反应。

**关键词:** 康莱特; 晚期大肠癌; 免疫功能

丁蓉, 霍介格, 张玉, 樊敏. 康莱特注射液联合FOLFOX4方案治疗晚期大肠癌20例. 世界华人消化杂志 2012; 20(29): 2851-2854

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2851.asp>

## 0 引言

随着生活水平的提高和膳食结构的改变,大肠癌的发病率和死亡率在我国呈逐年上升趋势。据世界卫生组织国际癌症研究署GLOBOCAN2008年估计,我国2008年新发大肠癌22.1万,死亡11.0万,均居恶性肿瘤顺位第5位<sup>[1]</sup>。且预测数据表明,在今后的20年中,发病数和死亡数将持续上升<sup>[2]</sup>。手术是目前唯一可以根治大肠癌的方法,但大多数患者就诊时已处于晚期<sup>[3]</sup>。近年来新的药物和治疗方案的出现,如贝伐单抗、西妥昔单抗等分子靶向药物与化疗药物的联合应用,使得晚期大肠癌的治疗效果得到了一定提高,但药物所带来的不良反应使许多患者不能耐受,综合治疗已经成为大肠癌的治疗指导原则。近年来我们应用康莱特注射液联合化疗治疗晚期大肠癌40例,取得了较好的疗效。本文重点介绍其降低晚期大肠癌化疗不良反应,提高免疫功能及改善体力状况的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集我院晚期大肠癌患者40例,分为治疗组(康莱特注射液+化疗)和对照组(单纯化疗)各20例。均由病理组织学检查确诊,有可测量病灶,均为失去手术机会或术后局部复发或远处转移的晚期患者,预计生存期>3 mo,血常规、肝肾功能和心电图基本正常。两组性别、年

龄、病理分型、体质量、卡氏评分等差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。两组患者一般情况见表1。

### 1.2 方法

**1.2.1 治疗组** 采用康莱特注射液联合FOLFOX4方案: FOLFOX4方案(第1天,奥沙利铂: 85 mg/m<sup>2</sup>,静滴2 h;第1、2天,亚叶酸钙200 mg/m<sup>2</sup>,静滴2 h;第1、2天氟尿嘧啶400 mg/m<sup>2</sup>,静脉推注,然后600 mg/m<sup>2</sup>持续静脉滴注22 h,每2 wk重复,疗程2个周期,并于化疗第1天开始给予康莱特注射液,100 mL/d,连用28 d。对照组: 仅选用FOLFOX4方案(同治疗组),连用2个周期。

**1.2.2 观察指标:** (1)近期疗效评价: 按RECIST1.1疗效评价标准,分为完全缓解(complete response, CR)、部分缓解(partial response, PR)、稳定(stable disease, SD)及进展(progressive disease, PD),以CR+PR计算有效率(RR),以CR+PR+SD为疾病控制率(disease control rate, DCR)<sup>[4]</sup>。评价结果待4周期后行影像学检查再确认; (2)中医证候积分: 针对腹痛、腹胀、便秘、腹泻、乏力、纳差、便血、消瘦和里急后重等晚期大肠癌常见症状发生的不同程度,依次计0、2、4、6分计算,积分比 = (治疗前总积分-治疗后总积分)/治疗前总积分×100%。显效: 积分比≥70%,有效: 积分比≥30%,无效: 达不到有效标准者; (3)体力状况Karnofsky评分: 在治疗前后评分。改善: 治疗后KPS评分增加≥10分,稳定: 治疗后KPS评分增加<10分,降低: 治疗后KPS评分降低≥10分; (4)体质量变化: 改善: 治疗后体质量增加≥1 kg,稳定: 治疗后体质量增加或减少<1 kg,降低: 治疗后体质量降低≥1 kg; (5)生活质量(QOL)评分: 采用我国1990年制定的肿瘤患者生活质量评分试行草案<sup>[5]</sup>; (6)免疫指标采用流式细胞仪测定; (7)不良反应按美国国立癌症研究所常见毒性标准,NCI-CTC分级标准(分0-IV级)。

**统计学处理** 计数资料采用 $\chi^2$ 检验,计量资料以mean±SD表示,采用 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 近期疗效** 治疗组治疗后疗效评价为PR者5例,SD11例,对照组则为PR者4例,SD11例,治疗组和对照组有效率(CR+PR)分别为25.0%和20.0%( $P>0.05$ ),DCR分别为80.0%和75.0%( $P>0.05$ );两组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.2 中医证候疗效** 治疗后对照组显效7例,有效10例,总有效率85.0%;对照组显效3例,有效

## ■相关报道

康莱特注射液是我国自行开发研制的抗肿瘤中药,是使用中药薏苡仁中提取的有效活性物质制成的天然抗癌药物。目前在非小细胞肺癌、肝癌、胰腺癌、乳腺癌等多种肿瘤的治疗当中,已显示了良好的治疗效果及较好的耐受性。

表 1 两组患者的一般情况 (n)

	治疗组(n = 20)	对照组(n = 20)
性别		
男	14	12
女	6	8
年龄		
≥60岁	9	8
<60岁	11	12
原发部位		
直肠	8	11
结肠	12	9
分化程度		
低度恶性	2	3
中度恶性	5	3
高度恶性	13	14
转移部位		
肝脏	9	10
腹腔或盆腔淋巴结	6	7
肺	2	1
腹膜	2	1
骨	1	1
病理类型		
管状腺癌	5	7
黏液腺癌	5	3
乳头状腺癌	7	10
未分化癌	2	0
印戒细胞癌	1	0

7例, 总有效率50.0%。两组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.3 体力状况 治疗后对照组改善4例, 稳定12例, 总稳定率80.0%; 对照组改善1例, 稳定9例, 总稳定率50.0%。两组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.4 体质量 治疗后对照组改善4例, 稳定12例, 总稳定率80.0%; 对照组稳定9例, 总稳定率45.0%。两组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.5 生活质量评分 治疗组治疗前QOL评分为 $47.85\pm 3.71$ , 治疗后评分为 $55.10\pm 3.25$ , 对照组治疗前QOL评分为 $47.7\pm 4.01$ , 治疗后评分为 $47.0\pm 3.36$ 。两组差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.6 免疫指标 两组T抑制、杀伤细胞(CD3+CD8+)治疗前后变化无统计学差异( $P<0.05$ )。治疗组的T淋巴细胞(CD3+)、T辅助、诱导细胞(CD3+CD4+)、NK细胞(CD16+CD56+)水平较治疗前提高, 而对照组则下降, 且两组相比有统计学意义( $P<0.05$ , 表2)。

2.7 化疗不良反应 治疗组发生4例白细胞减少, 其中I级3例, II级1例, 对照组发生13例白细胞减少, 其中I级7例, II级5例, III级1例, 两组差

异有统计学意义( $P<0.05$ ); 治疗组发生1例恶心呕吐、6例周围神经感觉异常, 对照组发生1例腹泻、2例腹痛, 8例周围神经感觉异常, 均无统计学差异( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

大肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 手术是目前唯一可以根治的方法, 早期大肠癌的5年生存率为90%, 但多数患者就诊时已处于晚期, 失去手术机会, 且仍有50%-60%的大肠癌在根治术后有复发转移的可能<sup>[6]</sup>。对于晚期的大肠癌, 五年生存率仅为12.8%<sup>[7]</sup>。因此对于大肠癌的治疗仍采用以手术为基础的综合治疗方法。近年来, 化疗药物如奥沙利铂、伊立替康、卡培他滨等, 及贝伐单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗等分子靶向药物与化疗药物的联合应用, 为大肠癌的治疗带来生机<sup>[8]</sup>。但化疗带来的不良反应, 诸如胃肠道反应、骨髓抑制及神经毒性等, 使患者往往无法耐受化疗, 影响生存质量。分子靶向药物同样也有诸如高血压、蛋白尿、出血、伤口延迟愈合、动脉栓塞及肠穿孔等不良反应<sup>[9]</sup>。中成药在治疗结直肠癌的临床研究和实验研究方面都取得了研究成果, 尤其是一些以健脾为主的复方配合化疗显示了一定的抗癌和抗转移作用, 并具有明显的减毒增效的作用<sup>[10]</sup>。

我们运用抗肿瘤中药康莱特注射液联合化疗治疗晚期大肠癌, 在临床上取得了一定的疗效。康莱特注射液是我国自行开发研制的新型抗肿瘤中药, 是使用中药薏苡仁中提取的有效活性物质制成的天然抗癌药物。薏苡仁性味甘平, 无毒, 入肺脾经, 具有健脾益气、消痰散结之功。目前在非小细胞肺癌<sup>[11]</sup>、肝癌<sup>[12]</sup>、乳腺癌<sup>[13]</sup>、胰腺癌<sup>[14]</sup>等多种肿瘤的治疗当中, 已显示了良好的治疗效果及较好的耐受性。现代实验药效学表明, 康莱特对体外各种肿瘤细胞, 包括消化系统肿瘤细胞具有显著的抑制和杀伤作用, 同时具有促进机体的免疫功能和抗恶病质的作用。康莱特能使癌细胞停滞在G<sub>2</sub>-M期, 具有抑制癌细胞增殖并导致癌细胞凋亡, 影响癌基因表达, 抑制肿瘤新生血管生成, 调节细胞因子以及逆转耐药等作用<sup>[15]</sup>。康莱特作为一种双向广谱抗癌药物, 同时还可激活NK细胞、IL-2和T淋巴细胞活性<sup>[16]</sup>, 促进淋巴细胞增殖, 促进吞噬细胞功能, 提高机体免疫功能, 改善生存质量<sup>[17]</sup>。

本研究显示, 联合应用康莱特注射液后, 以RECIST标准评价患者近期疗效无明显差异,

### ■创新盘点

该研究发现, 化疗联合应用康莱特注射液后, 患者T淋巴细胞(CD3+)、T辅助、诱导细胞(CD3+CD4+)、NK细胞(CD16+CD56+)水平较治疗前提高, 而单纯化疗组则下降, 且两组相比有统计学意义, 表明康莱特注射液可提高免疫功能, 有效改善患者体力状况。

### ■应用要点

康莱特注射液联合化疗治疗晚期大肠癌, 可提高患者对化疗的耐受性, 改善生活质量, 为大肠癌的治疗提供了一个较好的手段, 值得临床进一步推广。

## ■同行评价

本研究具有一定的临床意义,结果可望为康莱特注射液在晚期大肠癌的临床应用奠定理论基础。

表 2 两组治疗前后免疫指标变化情况比较

免疫指标	治疗组			对照组		
	治疗前	治疗后	变化	治疗前	治疗后	变化
T淋巴细胞(CD3+)	66.80 ± 7.25	72.43 ± 8.68	5.63 ± 1.42 <sup>a</sup>	66.45 ± 7.15	55.17 ± 10.25	-11.28 ± 3.18
T辅助、诱导细胞(CD3+CD4+)	39.83 ± 6.69	42.92 ± 9.13	3.09 ± 3.21 <sup>c</sup>	40.68 ± 3.91	34.51 ± 4.32	-6.18 ± 1.36
T抑制、杀伤细胞(CD3+CD8+)	28.25 ± 2.89	29.28 ± 2.84	1.04 ± 0.33	29.18 ± 3.65	30.08 ± 3.39	-0.89 ± 0.70
NK细胞(CD16+CD56+)	9.29 ± 0.93	11.36 ± 1.73	2.07 ± 1.03 <sup>e</sup>	9.31 ± 1.47	6.31 ± 1.26	-2.94 ± 0.46

T淋巴细胞(CD3+): <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; T辅助、诱导细胞(CD3+CD4+): <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; NK细胞(CD16+CD56+): <sup>e</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

但患者T淋巴细胞(CD3+)、T辅助、诱导细胞(CD3+CD4+)、NK细胞(CD16+CD56+)水平较治疗前提高,而单纯化疗组则下降,且两组相比有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明康莱特注射液可提高免疫功能,与文献报道一致。由于本研究涉及病例较少,康莱特注射液可否提高近期疗效尚需商榷,有待于进一步扩大样本数进行深入研究。

## 4 参考文献

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F. GLOBOCAN 2008 v1.2, cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Available from: URL: <http://globocan.iarc.fr>
- 2 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917
- 3 Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 220-241
- 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 孙燕, 周际昌. 临床肿瘤内科手册. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 53-54
- 6 陈卫彬, 诸葛晋. FOLFOX方案在中晚期大肠癌治疗中的安全性观察. *当代医学* 2012; 18: 92-93
- 7 Lan YT, Yang SH, Chang SC, Liang WY, Li AF, Wang HS, Jiang JK, Chen WS, Lin TC, Lin JK. Analysis of the seventh edition of American Joint Committee on colon cancer staging. *Int J Colorectal Dis* 2012; 27: 657-663
- 8 Monga DK, O'Connell MJ. Surgical adjuvant therapy for colorectal cancer: current approaches and future directions. *Ann Surg Oncol* 2006; 13: 1021-1034
- 9 Ortega J, Vigil CE, Chodkiewicz C. Current progress in targeted therapy for colorectal cancer. *Cancer Control* 2010; 17: 7-15
- 10 李佳, 王文海. 中医药防治大肠癌复发转移的研究进展. *中医杂志* 2012; 53: 255-257
- 11 Zhu L, Yang Z, Wang S, Tang Y. [Kanglaite for Treating Advanced Non-small-cell Lung Cancer: A Systematic Review.]. *Zhongguo Feiai Zazhi* 2009; 12: 208-215
- 12 许新华, 苏进, 付向阳. 康莱特注射液联合卡培他滨治疗中晚期原发性肝癌临床观察. *时珍国医国药* 2010; 21: 1479-1480
- 13 Guo HY, Cai Y, Yang XM, Wang ZH, Wang JL, Zhao XM, Li J, Hu XC. Randomized phase II trial on mitomycin-C/cisplatin +/- KLT in heavily pretreated advanced breast cancer. *Am J Chin Med* 2008; 36: 665-674
- 14 李玉升. 康莱特注射液治疗晚期胰腺癌新进展. *中国肿瘤临床* 2012; 39: 1158-1160
- 15 张宇明, 韩正祥, 冯守信. 康莱特注射液对提高晚期消化道肿瘤患者生存质量的效果观察. *临床合理用药杂志* 2011; 4: 63-64
- 16 王越华, 李兆元, 龚先奇. 康莱特注射液联合化疗治疗晚期结直肠癌. *肿瘤* 2006; 26: 1137-1138
- 17 Lu Y, Li CS, Dong Q. Chinese herb related molecules of cancer-cell-apoptosis: a minireview of progress between Kanglaite injection and related genes. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 31

编辑 田滢 电编 鲁亚静

# 慢性便秘患者报告临床结局评估量表条目池的建立和筛选

金 洵, 丁义江, 丁曙晴, 王玲玲, 倪 敏, 张 华, 王丽雯, 刘妮妮, 王 静

金洵, 王玲玲, 王丽雯, 刘妮妮, 南京中医药大学中医学一级学科 江苏省南京市 210046  
丁义江, 丁曙晴, 倪敏, 王静, 南京中医药大学第三附属医院肛肠科 江苏省南京市 210001  
张华, 东南大学公共卫生学院 江苏省南京市 210009  
金洵, 主要从事盆底障碍性疾病的中医药治疗的研究。  
江苏高校优势学科建设工程基金资助项目, No. YS2012ZYX412  
南京中医药大学中医学一级学科开放课题基金资助项目, No. 210046  
南京市卫生局青年启动基金资助项目, No. QYK11134  
作者贡献分布: 此课题由金洵、丁义江、丁曙晴及王玲玲设计; 临床数据采集由倪敏、王丽雯、刘妮妮及王静操作完成; 统计分析由金洵与张华完成; 论文撰写由金洵完成。  
通讯作者: 丁义江, 主任医师, 210001, 江苏省南京市金陵路1号, 南京中医药大学第三附属医院肛肠科。jinxun917@sina.com  
电话: 025-52276742  
收稿日期: 2012-07-19 修回日期: 2012-09-10  
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-18

## Construction and screening of the item pool for the Patient-Reported Outcome of Chronic Constipation rating scale

Xun Jin, Yi-Jiang Ding, Shu-Qing Ding,  
Ling-Ling Wang, Min Ni, Hua Zhang, Li-Wen Wang,  
Ni-Ni Liu, Jing Wang

Xun Jin, Ling-Ling Wang, Li-Wen Wang, Ni-Ni Liu,  
Department of Traditional Chinese Medicine, Nanjing  
University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu  
Province, China  
Yi-Jiang Ding, Shu-Qing Ding, Min Ni, Jing Wang,  
Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing  
210001, Jiangsu Province, China  
Hua Zhang, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu  
Province, China  
Supported by: the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, No. YS2012ZYX412; the Open Project of Department of Traditional Chinese Medicine of Nanjing University of Chinese Medicine, No. 210046; and the Youth Fund of Nanjing Municipal Health Bureau, No. QYK11134  
Correspondence to: Yi-Jiang Ding, Chief Physician, Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, 1 Jinling Road, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. jinxun917@sina.com  
Received: 2012-07-19 Revised: 2012-09-10  
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-18

## Abstract

**AIM:** To construct and screen the item pool for the Patient-Reported Outcome of Chronic Constipation rating scale (CC-PRO).

**METHODS:** Following the FDA guidelines on

PRO, the synthetic index system combining symptom with syndrome was developed under the guidance of TCM theory. The theoretical mode of the questionnaire was established, including four domains: physiology (specific symptom of chronic constipation and effect index of syndrome), psychological, society and satisfaction. Through literature search and interview, typical feelings of patients with chronic constipation, which included 96 items, were collected to establish the first draft of item pool. After screening the items using the first expert and patient questionnaire, 63 items were retained. The item pool was then optimized by combining, deleting and revising the items according to the setting request of the questionnaire. The item pool containing 45 items, including physiology domain (29 items), psychological domain (9 items), society domain (3 items), and satisfaction domain (4 items), was obtained, and quantification of the item was performed. The presentation and quantification of the item were then modified using the second expert questionnaire, and 43 items were retained. After accomplishing language polishing and consummating the important elements of the questionnaire, the first draft of the questionnaire was obtained. Pre-investigation was then performed to screen the items for the second time on item distribution, dispersion degree, coefficient correlation, factor analysis, discriminating analysis and Cronbach  $\alpha$ . The scoring method of the questionnaire was then determined, and the Patient-Reported Outcome of Chronic Constipation rating scale V2.0 was finally developed.

**RESULTS:** The item pool was composed of 96 items. After the preliminary screening, there were 32 items remained, which consisted of 10 items on specific symptom of chronic constipation, 9 for effect index of syndrome, 9 for psychological domain, 2 for society domain and 2 for satisfaction domain.

**CONCLUSION:** The establishment and screening of CC-PRO were implemented through a variety of ways. The preliminary items completely cover the body function, psychological function,

## ■背景资料

目前中医药对慢性便秘的疗效评价标准不统一, 主要存在以下问题: (1)缺乏统一标准, 研究结果无可比性; (2)缺乏量化指标, 疗效评价模糊; (3)引用西医疗效评价标准, 不能体现中医药治疗的优势; (4)出现很多自拟标准, 假阳性较高, 缺乏合理性, 难被国际公认。因此有必要研制符合中国文化背景、反映中医药有效作用点、关注患者生存质量的慢性便秘PRO评估量表。

## ■同行评议者

任粉玉, 教授, 主任医师, 延边大学附属医院消化内科



## ■研发前沿

慢性便秘PRO和生存质量测评量表国内尚无研制,国外已开发4篇,其中CAS和NBD尚未有中文版;PAC-SYM虽经翻译和文化调适,但尚未进行新量表的科学性考评;PAC-QOL中文版经Mapi Research Trust授权,已完成效度、信度和反应度考评,但不能体现中国文化背景和中医关注的内容,其条目选择与量化方法亦存在一定问题,尚不能准确反映中国慢性便秘患者的生存质量。

## ■相关报道

Mapi Research Trust授权的便秘患者生存质量自评量表PAC-QOL中文版必须经过效度、信度及反应度等专业检测才可在国内使用。但引进量表反映西方文化及价值观,虽经文化调适,仍不一定适用于中国患者,且不能体现中医药治疗的优势,所以尚有一定局限性。

and society function of patients and systematically reflect the connotation of chronic constipation, and the easy-to-understand language also contributes to good content-related validity.

**Key Words:** Chronic constipation; Rating scale; Patient-reported outcome; Item pool; Item screening

Jin X, Ding YJ, Ding SQ, Wang LL, Ni M, Zhang H, Wang LW, Liu NN, Wang J. Construction and screening of the item pool for the Patient-Reported Outcome of Chronic Constipation rating scale. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(29): 2855-2859

## 摘要

**目的:** 建立慢性便秘报告临床结局(patient-reported outcome, PRO)评估量表(patient-reported outcome of chronic constipation rating scale, CC-PRO)条目池,对条目池进行初步筛选。

**方法:** 以患者为中心,遵循PRO量表制作指南(FDA, 2009),在中医理论指导下建立病证结合的综合指标体系,具体研究方法如下: (1)提出量表理论模型,包括4个维度:生理(慢性便秘特有症状和证候效应指标)、心理、社会和满意度; (2)通过文献法和访谈法,对慢性便秘患者自觉感受的相关描述进行典型收集,共96个条目,建立条目池初稿; (3)通过第一轮专家问卷和患者问卷对条目进行初次筛选,剩余63个条目; (4)按照量表条目设定要求对条目进行合并、删除和修改,实现条目池优化; (5)建立条目池,含45个条目,包括生理维度29项、心理维度9项、社会维度3项和满意度4项,并对条目量化; (6)进行第二轮专家问卷,根据专家意见修改条目及量化方法,剩余43个条目; (7)量表语言调适和要素完善,建立量表初稿; (8)量表初稿预调查,通过条目分布法、离散程度法、相关系数法、因子分析法、判别分析法和克朗巴赫 $\alpha$ 系数法对条目二次筛选; (9)确定量表评分方法; (10)建立CC-PRO V2.0。

**结果:** 量表条目池由96条削减为32条。CC-PRO V2.0最终含32个条目,其中生理维度慢性便秘特有症状指标10条,生理维度证候效应指标9条,心理维度指标9条,社会维度指标2条,满意度指标2条。

**结论:** 量表条目池的建立和筛选按照多种方法进行,全面反映慢性便秘的内涵,且语言通俗易懂,具有较好的内容效度,为CC-PRO正式版的制定奠定基础。

**关键词:** 慢性便秘; 量表; 报告临床结局; 条目池; 条目筛选

金洵, 丁义江, 丁曙晴, 王玲玲, 倪敏, 张华, 王丽雯, 刘妮妮, 王静. 慢性便秘患者报告临床结局评估量表条目池的建立和筛选. *世界华人消化杂志* 2012; 20(29): 2855-2859  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2855.asp>

## 0 引言

慢性便秘发病率较高,给患者造成巨大的精神和经济负担。中医药在预防和治疗该疾病方面有一定优势,且经济成本较低。但目前中医药治疗慢性便秘的疗效评估缺乏公认标准,且不能体现中医药治疗的有效作用点。随着医学模式的改变,综合评价患者主观感受、功能状态和生存质量的报告临床结局(patient-reported outcome, PRO)<sup>[1]</sup>指标成为疗效评价的热点,慢性便秘适合运用PRO疗效评估方法。但慢性便秘PRO和生存质量测评量表国内尚无研制,国外量表经翻译引进,尚需进行科学性考评和文化调适,且有文化依赖性。因此有必要研制符合中国文化背景、反映中医药治疗有效作用点、关注患者生存质量的慢性便秘PRO评估量表(patient-reported outcome of chronic constipation rating scale, CC-PRO)。条目是构成量表的重要元素,条目的建立对构建量表具有非常重要的意义,现将CC-PRO条目池的建立和筛选过程报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 研究工作组分为核心小组和议题小组。核心小组主要由肛肠病学、公共卫生学、心理学等方面的7名专家组成,负责具体的研究设计与实施工作;议题小组由肛肠科、消化科和心理科高年资医师、临床流行病学人员、临床研究生、肛肠科护士、慢性便秘患者及家属、正常人群组成,负责条目搜集和提出。

### 1.2 方法

**1.2.1 备选指标的确定和条目池的形成** 初步建立的条目池要求条目尽量全面,研究方法包括: (1)文献法:以“便秘”为关键词查阅1999/2009中国知识资源总库(CNKI)和PubMed上的相关文献;查阅《结肠与直肠外科学》、《Constipation》等书籍的相关章节。查阅患者报告临床结局和生存质量测评工具数据库<sup>[2]</sup>(patient-reported outcome and quality of life instrument database, ProQolid)中关于便秘的量表,包括CAS(constipation assessment scale, CAS)<sup>[3]</sup>、NBD score(neurogenic bowel dysfunction score, NBD)<sup>[4]</sup>、PAC-QOL(patient assessment of constipation quality of life questionnaire, PAC-QOL)<sup>[5]</sup>



和PAC-SYM(patient assessment of constipation symptoms, PAC-SYM)<sup>[6,7]</sup>. 将文献中报道的关于慢性便秘的所有症状纳入条目池; (2)访谈法: 采用半结构化深度访谈, 从生理、心理、社会和满意度4个方面对慢性便秘患者自觉感受的相关描述进行典型收集. 访谈共涉及51例慢性便秘患者、10名慢性便秘患者家属和10名肛肠科医护人员, 每次访谈时间最短20 min, 最长1 h主要在门诊和病房进行. 结合临床实际, 经核心小组反复逐条讨论, 形成CC-PRO最初的条目池.

1.2.2 条目筛选方法: (1)专家问卷调查对象: 遴选条件为长期从事中医、中西医结合、西医肛肠专业的临床医师, 具有中级以上职称、经验丰富并有一定知名度. 遴选专家的地域分布包括东北、华北、华东、中南、西北, 具有广泛的地域代表性. 调查内容: 专家问卷为自填方式, 采用半封闭型, 请专家对相关条目在慢性便秘临床结局评估中的重要性作出判断. 分为3个等级: 不重要、重要、非常重要, 对应分值为1、2、3分. 问卷设计附加栏, 让专家充分发表自己的意见和提出建议; (2)患者问卷调查对象: 符合RomeIII诊断标准的慢性便秘患者, 病程>6 mo, 近3 mo有症状发作, 经肠镜、钡灌肠等检查排除肠道器质性疾病; 患者能理解并回答问题, 可表达自主意愿, 具备一定文字阅读能力; 患者知情同意并自愿参加本研究. 调查内容: 参照心理测量学研究方法<sup>[8]</sup>, 设计半开放式问卷, 请患者对相关症状的出现频率作出判断. 分为3个等级: 没有、有时、经常, 对应分值为1、2、3分. 问卷设计附加栏, 让患者充分发表自己的意见; (3)核心小组专家讨论, 根据量表条目设定要求, 参考患者和专家反馈意见, 将条目归类、合并和删除, 使之代表性好、独立性强、敏感性高, 通俗易懂, 便于理解和操作, 形成条目池初稿. 对条目池进行量化, 采用频率和程度相结合的多参数综合量化, 包括: (1)以症状出现频繁, 反复发作者为重; 偶尔出现者为轻; (2)如果症状不是偶尔出现, 则结合考察症状的性质和程度. 难忍或明显者为重, 可耐受或隐作者为轻. 频率和程度所赋分值的总和即该指标的积分值. 具体量化方法以Likert 5点分级法为主, 辅以视觉模拟刻度法, 指标分级尽可能借鉴已有的公认标准. 完善量表基本要素, 如题目、卷首语、填写说明和条目编号等; 完成语言调适, 对难以理解或不同患者理解相差较大的条目进行修改, 整理形成《CC-PRO V1.0》, 用于临床预调查, 以进

一步筛选条目; (3)《CC-PRO V1.0》预调查对象: 2010-05/2010-08南京市中医院、厦门市中医院、湖州市中医院肛肠科和沈阳市肛肠医院门诊及住院的慢性便秘初诊患者, 纳入标准同患者问卷. 调查方法采用《CC-PRO V1.0》进行临床调查, 删除条目的步骤包括: 首先用条目分布法、离散程度法、相关系数法、因子分析法、判别分析法和克郎巴赫 $\alpha$ 系数法进行条目筛选; 6种方法均选入的条目为必选条目, 入选5次的条目应用专家经验法进一步筛选. 具体如下: 条目分布法删除任一答案的选择率超过80%的条目; 离散程度法删除标准差<0.8的条目<sup>[9]</sup>; 相关系数法删除Pearson相关系数<0.3的条目<sup>[10]</sup>; 因子分析法: 删除各因子负荷系数<0.4的条目及因子负荷系数相近而无特异性的条目<sup>[9]</sup>; 判别分析法删除无统计学差异的条目( $P>0.05$ ). 再由课题组专家根据上述所有条目的分析与筛选结果, 结合专业意义进行综合判定.

**统计学处理** 调查资料进行整理和编码, 采用Epidata3.1软件进行资料数据的双录入, 采用SPSS16.0软件进行分析. 剔除数据缺失在5%以上的问卷.

## 2 结果

2.1 条目池建立结果 通过文献法和访谈法, 课题组综合归纳所有研究对象提供的信息, 形成CC-PRO最初的条目池, 含条目96条.

### 2.2 条目筛选结果

2.2.1 专家问卷: (1)一般情况: 共发放问卷120份, 回收98份, 其中合格问卷72份. 72位专家涉及8个省、直辖市, 平均年龄44.13岁 $\pm$ 8.37岁, 副主任医师以上职称52位, 占72.2%; (2)条目筛选情况: 条目得分均数<2, 满分比<0.5, 变异系数>0.4, 将该指标删除, 包括大便带有黏液、排便时或排便后肛门出血.

2.2.2 患者问卷: (1)一般情况: 共发放问卷107份, 回收102份, 其中合格问卷93份. 93位患者中男30例, 女63例; 年龄19-73岁, 平均48.83岁 $\pm$ 17.17岁; 病程0.6-35年, 平均7.99年 $\pm$ 8.04年; (2)条目筛选情况: 条目均数<2, 满分比<0.5, 则将该指标删除, 如需要用手挤压阴道或直肠部位帮助排便、感到肛门疼痛和身体沉重像灌满了东西等. 患者问卷中均数接近2或满分比接近50.0%的条目交付课题组外肛肠科或消化科高年资医师, 每个条目征询3位专家意见, 如建议保留的专家数<2, 则将该指标删除, 如上完厕所后觉得全身

### ■创新盘点

以患者为中心, 遵循PRO量表制作指南(FDA 2009), 在中医理论指导下建立病证结合的综合指标体系. 量表条目池的建立和筛选按照多种方法进行, 如文献法、访谈法、专家问卷、患者问卷及临床预调查等, 全面反映慢性便秘的内涵, 且语言通俗易懂, 具有较好的内容效度, 为CC-PRO正式版制定奠定基础.

### ■名词解释

患者报告临床结局(PRO): 由患者报告反映其健康状况的临床结局指标, 所有信息均直接来源于患者, 而不受临床医生和研究者的影响。

表 1 CC-PRO V2.0的指标筛选

筛选次数	方法	意义	筛选后条目数
1	文献法、访谈法	建立最初的条目池	96
2	专家问卷、患者问卷	删除意见集中程度和协调程度较差的指标	63
3	核心小组专家讨论	修改理解困难或有歧义的条目;将测量内容类似的条目合并或删除;根据专业理论和实践, 删除非特异性指标	45
4	CC-PRO V1.0预调查	分别从敏感性、代表性、独立性、区分能力和内部一致性角度筛选指标	32
5	CC-PRO V2.0性能评价	信度、效度和反应度等科学性考评	

CC-PRO: 慢性便秘患者报告临床结局评估量表条目池。

无力手脚发软和对生活没有积极的态度等。根据专家问卷和患者问卷结果, 从普遍性、代表性和重要性角度筛选指标, 量表剩余条目63项。

2.2.3 核心小组专家讨论: 根据量表条目设定要求, 参考专家和患者反馈意见, 经议题小组综合、分析、讨论, 量表条目优化如下: (1)修改条目: 如部分患者对排便存在错误认识, 认为必须每天排便, 否则就对排便频率不满意。因此用“大便的次数太少”作为评估指标各患者尺度不同, 不能准确反映疗效, 改为“您的排便频率是多少?”; 部分患者对“频率”一次不能理解, 故改为“您的排便次数是多少?”; (2)合并条目: 如“排便费力, 需要用力挤出”和“越用力越解不出大便”均属排便费力, 只是对费力的程度描述不同, 故可合并为“您排便费力吗?”; (3)删除条目: 如“排便没有畅快感”和“排便不规律”是对诸多排便困难症状的总体描述, 有重复之嫌, 故可删除; (4)补充条目: 如部分充盈性溢粪或粪嵌塞实质是慢性便秘, 但表现为大便难控制, 故增加条目“您会控制不住大便而出现大便漏出的情况吗?”。

经上述步骤, 量表剩余45个条目, 分为4个维度, 包括生理维度29项、心理维度9项、社会维度3项及满意度4项。量表要素和语言调适完成后, 对条目及其量化方法进一步分析、比较、讨论、修改, 最终整理形成《CC-PRO V1.0》。

2.3 《CC-PRO V1.0》预调查 共发放问卷433份, 回收433份, 其中合格问卷421份。421位患者男114例, 女307例; 年龄18-75岁, 平均47.5岁 $\pm$ 15.01岁; 病程1-30年, 平均7.5岁 $\pm$ 7.36年。条目筛选情况如下: (1)条目分布法: 从答案选择来看, 3项的任一答案选择率超过80%, 答案呈偏态分布, 故删除条目; (2)离散程度法: 利用离散程度法删除标准差 $<0.8$ 的条目7项; (3)相关系数法: 每个条目与量表总分进行相关性分析, 删除

Pearson相关系数 $<0.3$ 的条目9项。每个条目与其所在维度总分进行相关性分析, 删除Pearson相关系数 $<0.3$ 的条目, 按此法无删除条目; (4)因子分析法: 删除各因子负荷系数 $<0.4$ 的条目及因子负荷系数相近而无特异性的条目5项; (5)判别分析法: 对便秘患者和正常人群的量表条目进行 $t$ 检验, 删除无统计学差异的条目17项( $P>0.05$ )。将量表总分高低排序, 得分最高的27%为高分组, 得分最低的27%为低分组, 对两组的量表条目进行 $t$ 检验, 以考察量表条目的敏感性。删除无统计学差异的条目3项( $P>0.05$ ); (6)克郎巴赫 $\alpha$ 系数法: 去掉条目后 $\alpha$ 系数上升, 说明此条目存在有降低该维度内部一致性的作用, 故予删除条目7项。

6种方法均选入的条目为必选条目, 入选5次的条目经研究小组及专家讨论保留5项; 2项治疗满意度评估条目, 部分患者填写时理解错误, 故测评存在误差, 但考虑其在患者问卷和第2轮专家问卷中权重较大, 故暂予保留。以上入选条目共同组成CC-PRO V2.0。

2.4 《CC-PRO V2.0》 CC-PRO V2.0经上述方法指标筛选(表1), 最终含32个条目, 由4个维度、7个方面构成。4个维度包括: 生理维度(19条)、心理维度(9条)、社会维度(2条)和满意度(2条)。其中生理维度分为慢性便秘特有症状和证候效应指标2方面; 心理维度分为对疾病的调适、情绪和心境2方面; 满意度分为健康自我评价和治疗满意度2方面。《CC-PRO V2.0》尚需进行信度、效度和反应度等科学性考评。

### 3 讨论

CC-PRO是辨证与辨病相结合, 以患者为中心, 从多个侧面进行的综合评价指标体系, 其条目池由以下几方面构成: (1)“病”公认的常规疗效评定指标; (2)证候效应指标<sup>[11]</sup>; (3)生存质量评

定指标. CC-PRO条目池的建立和筛选过程按照FDA规定的PRO量表制作标准化进程完成. 条目池的筛选以患者为中心, 在既往文献和临床研究的基础上, 参考目前公认并广泛应用的疾病专用量表和普通性量表条目, 广泛听取研究小组意见, 保证量表条目的有效性和全面性. CC-PRO的条目均是通过医生观察采集或患者自我报告而得, 无法用仪器或其他手段直接进行精确测量, 属于软指标, 具有主观性、非线性、多维性、动态性和模糊性, 因此软指标的筛选和设计是课题研究的关键问题和难点, 宜根据指标初筛和优化的不同阶段采用适宜的方法进行. 所选指标必须具备以下特征<sup>[12]</sup>: (1)代表性: 各层次指标对所选各层次特征能较好表达; (2)确定性: 指标值确定, 且在评价中有确切含义; (3)区别能力: 指标值有一定波动范围, 不同评价等级间有差距; (4)互相独立: 选入的指标各有其用, 相互不能代替. 软指标筛选过程中需注意, 证候相关指标包括效应指标和属性指标两大类. 属性指标与辨证诊断相关, 但不适宜参与疗效评价, 如体胖臃肿与痰湿证、齿落发脱与肾虚证等; 效应指标能敏感反映该疾病对患者生存质量的影响. 因此CC-PRO中的证候相关指标必须是证候效应指标, 才能体现中医疗效评估的客观性和真实性.

本研究通过专家问卷、患者问卷、核心小组专家讨论和量表初稿预调查条目分析法对量表条目进行综合筛选, 最终由96条削减为32条. 由于严格按照条目筛选步骤和统计学分析, 某些难于取舍的条目亦作出稳定、可靠的选择,

保证了条目筛选的科学性和合理性, 为《CC-PRO V2.0》的科学性考评奠定基础.

#### 4 参考文献

- 1 Guidance for industry: patient-reported outcome measures: use in medical product development to support labeling claims: draft guidance. *Health Qual Life Outcomes* 2006; 4: 79
- 2 Emery MP, Perrier LL, Acquadro C. Patient-reported outcome and quality of life instruments database (PROQOLID): frequently asked questions. *Health Qual Life Outcomes* 2005; 3: 12
- 3 McMillan SC, Williams FA. Validity and reliability of the Constipation Assessment Scale. *Cancer Nurs* 1989; 12: 183-188
- 4 Krogh K, Christensen P, Sabroe S, Laurberg S. Neurogenic bowel dysfunction score. *Spinal Cord* 2006; 44: 625-631
- 5 Wang JP, Duan LP, Ye HJ, Wu ZG, Zou B. [Assessment of psychological status and quality of life in patients with functional constipation]. *Zhonghua Neike Zazhi* 2008; 47: 460-463
- 6 Wicks P, Keininger DL, Massagli MP, de la Loge C, Brownstein C, Isojärvi J, Heywood J. Perceived benefits of sharing health data between people with epilepsy on an online platform. *Epilepsy Behav* 2012; 23: 16-23
- 7 Frank L, Kleinman L, Farup C, Taylor L, Miner P. Psychometric validation of a constipation symptom assessment questionnaire. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 870-877
- 8 吴键, 石凤妍, 臧传丽, Marta Fulop, 白学军. 当代大学生对竞争认识的调查研究. *心理科学* 2007; 30: 293-296
- 9 何庆勇, 王阶, 张允岭, 王师鹺, 杨戈. 基于患者报告的临床结局评价量表的条目筛选方法. *中华中医药杂志* 2011; 26: 112-114
- 10 Kaplan RM. 心理测验原理应用和问题. 北京: 机械工业出版社, 2010: 149-150
- 11 熊宁宁, 罗玫, 蒋萌, 刘芳, 邹建东, 符为民. 中药临床试验的适应证候设计与疗效评价. *中国临床药理学与治疗学* 2003; 6: 715-716.
- 12 刘建平. 循证中医药临床研究方法. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 125-138

#### ■同行评价

本研究目的明确, 方法可行, 具有一定的临床参考价值及使用价值.

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静

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》栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

# 《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》(2011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。《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3 458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17 963, 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《生理学术名词》、《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 $T_{1/2}^1$ ,  $V_{max}$ 不能写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),  $\rho$ (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( $M_r$ 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 $A_r$ ( $A_r$ 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.  $M_r$ 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、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γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% 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.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《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, 2011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

文大写字 $F$ ; (3)卡方检验用希文小写字 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写字 $r$ ; (5)自由度用希文小写字 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写字 $n$ ; (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±标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数±标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 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> $P < 0.01$ ; 第三套为<sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如 $3614.5 \text{ g} \pm 420.8 \text{ g}$ , SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \text{ kg} \pm 0.4 \text{ kg}$ , 过多的位数并无意义. 又如 $8.4 \text{ cm} \pm 0.27 \text{ cm}$ , 其 $\text{SD}/3 = 0.09 \text{ cm}$ , 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;  $101 \leq \text{分母} \leq 1000$ , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 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

《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。

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

## 6 修回稿须知

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

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2012年国内国际会议预告

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

2012-08-30/09-02

2012年中华医学会全国麻醉学术年会

会议地点: 重庆市

联系方式: csa2012@live.cn

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会

会议地点: 济南市

联系方式: doclf@163.com

2012-09-06/09

第七届中国肿瘤学术大会暨第十一届海峡两岸肿瘤学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: shengwangyan@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

2012-09-20/23

2012中国消化病学大会

会议地点: 上海市

联系方式: abstract@ccdd2012.org

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛

会议地点: 长春市

联系方式: ting@dxyer.com

2012-09-28/10-02

第37届欧洲临床肿瘤学会年会(ESMO2012)

会议地点: 奥地利维也纳

lhgj\_jihcc@163.com

2012-10-11/14

第三届国际肿瘤表观遗传学研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: epigeneticmeeting2012@gmail.com

2012-10-12/15

国腹腔镜技术新进展与改良后手术治疗2型糖尿病手术教学研讨会

会议地点: 齐齐哈尔市

联系方式: bjgzgt@163.com

2012-10-19/21

中欧胰腺外科专业新技术、新进展学术研讨会

会议地点: 长沙市

联系方式: yu198610@163.com

2012-10-19/21

2012年(第二届)中日国际消化疾病论坛暨挑战直肠癌-战略与艺术综合研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: cjds@htbr.cn

2012-10-19/21

中日友好医院国际肠胃外科高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: lckyhy@126.com

2012-10-19/21

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-10-21/11-10

第十四次全国中医肛肠学术交流大会

会议地点: 长沙市

联系方式: gcfh2012@163.com

2012-10-31/11-03

第十届中国介入放射学学术大会(2012CSIR)暨2012国际栓塞会议

会议地点: 南京市

联系方式: liufang@cyberzone.cn

2012-11-09/11

2012中国结直肠肛门外科学术会议暨中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 15813300382

2012-11-16/18

2012中华消化病学年度讲坛

会议地点: 北京市

联系方式: cma\_spa@163.com

2012-12-07/11

第12届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2012内镜/介入/放射及肿瘤微创外科新技术国际论坛

会议地点: 昆明市

联系方式: 283409817@qq.com或7420hjh@sohu.com

## 志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈其奎 教授  
中山大学附属第二医院消化内科

陈贻胜 教授  
福建省立医院

丁惠国 教授  
首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

杜雅菊 教授  
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

杜奕奇 副教授  
中国人民解放军第二军医大学长海医院

樊红 教授  
东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 东南大学基础医学院遗传与发育生物学系

范学工 教授  
中南大学湘雅医院感染病科

冯志杰 主任医师  
河北医科大学第二医院消化内科

谷俊朝 主任医师  
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

洪天配 教授  
北京大学第三医院内分泌科

黄昆 教授  
华中科技大学同济药学院

黄缘 教授  
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

姜卫东 教授  
安徽省立院肝脏外科

姜慧卿 教授  
河北医科大学第二医院消化科

李健丁 教授  
山西医科大学第一医院放射科CT室

林志辉 教授  
福建省立医院消化内科

刘宝林 教授  
中国医科大学附属盛京医院

卢晓梅 教授  
新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院

倪润洲 教授  
南通大学附属医院消化内科

任超世 研究员  
中国医学科学院, 中国协和医科大学生物医学工程研究所

邵先玉 教授  
泰山医学院附属医院消化内科

孙星 副教授  
上海交通大学附属第一人民医院普外科

谭晓冬 教授  
中国医科大学附属盛京医院

唐文富 副教授  
四川大学华西医院中西医结合科

王阁 教授  
中国人民解放军第三军医大学第三附属医院

王江滨 教授  
吉林大学中日联谊医院

王凯 教授  
山东大学齐鲁医院肝病科

王正康 教授  
中日友好医院普外科

肖恩华 教授  
中南大学湘雅二医院放射教研室

徐泱 副主任医师  
上海复旦大学附属中山医院