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

世界华人消化杂志

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 10 月 28 日　第 20 卷　第 30 期　(Volume 20 Number 30)

www.wjgnet.com

二零一二年十月二十八日　第二十卷　第三十期

30/2012

ISSN 1009-3079
30>
9 771009 307056

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员，由483位专家组成，分布在30个省市，自治区，特别行政区．其中，上海市81位、北京市70位、广东省40位、江苏省38位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位．

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
白岚教授
卜平教授
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
邓鑫教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊冬梅副主任医师
樊晓明教授
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
甘华田教授
高凌副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
郝丽萍副教授
何继满教授
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
刘亮明副教授
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛恩强教授
毛高平教授
孟庆华教授
缪应雷主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
潘阳林副教授
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
庹必光教授
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
徐灿霞教授
徐可树教授
杨建民教授
张国主任医师
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
郑培永教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
郑勇教授
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

白雪副主任医师
白雪巍副主任医师
白玉作教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈炳官教授
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈凛教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅思源副教授
傅晓辉副教授
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
何向辉教授
何晓顺教授
何裕隆教授
胡安斌副教授
黄志勇教授
季加孚教授
英卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
孔静副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李升平教授
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔教授
李正荣副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘宏鸣副教授
刘建教授
刘亮副主任医师
刘颖斌主任医师
卢军华教授
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕凌副教授
吕云福教授
麻勇副研究员
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
崔清波副教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋新明教授
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙文兵教授
孙星副教授
孙学英教授
邰升副教授
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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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
喻春钊教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
邹小明教授

消化感染病学

白浪副教授
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
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
郭永红副主任医师
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
林潮双副教授
刘正稳教授
彭亮副主任医师
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
周陶友副教授
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
扈晓宇主任医师
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
鲁玉辉副教授
南极星教授
牛英才研究员
谭周进教授
王富春教授
王来友副教授
王笑民主任医师
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
侯凤刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
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
杨薇副教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
李家平教授
刘杰民副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
吴沛宏教授
余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

范恒教授
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
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
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
李孟森教授
李文贵副教授
李焱副研究员
李增山副教授
刘长征副教授
刘克辛教授
刘淼副教授
宁钧宇副研究员
彭宗根副研究员
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
邵华副主任药师
沈东炎副教授
沈涛副教授
斯坎德尔·白克力教授
台桂香教授
谭学瑞教授
汤静主管药师
滕旭副教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
王书奎教授
魏继福研究员
文彬研究员
吴道澄教授
吴江锋副教授
吴军研究员
吴俊华副教授
吴志强副教授
夏敏教授
徐健副主任医师
徐宁志研究员
许文燮教授
杨晓明教授
阴赖宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
曾柱教授
张红教授
张淑坤副研究员
赵平教授
赵铁建教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
朱益民教授
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
邓昊副教授
杜祥教授
樊祥山副主任医师
郭炜教授
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
莫发荣副教授
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 28 日　第 20 卷　第 30 期　(总第398期)

述　评

2867 蛋白激酶-急性胰腺炎治疗的新靶标
吴林, 薛东波

基础研究

2873 加味四逆散对身心应激大鼠胃黏膜形态学的作用机制
谢慧臣, 刘芬, 杨强, 熊常初

2882 益生菌对阿司匹林致大鼠急性胃黏膜损伤的作用机制
高欣, 张振玉, 吴海露, 陈菲菲, 杨小兵, 王劲松

2888 ETV1转录因子在胃肠道间质瘤中的作用
李强, 徐龙

2895 siRNA沉默*rpl31*表达对胰腺癌PANC-1细胞增殖的抑制作用
李朝东, 戈梅, 罗敏玉, 陈代杰

2902 葫芦巴提取物对营养性肥胖大鼠糖脂的调节效应
卢芙蓉, 杨胜兰, 沈霖, 秦铀, 蔡亚玲, 熊鹏程

文献综述

2907 肿瘤相关巨噬细胞在肝癌细胞生长和转移中的作用
郑乔丹, 吴文苑, 陈月

2913 胆管癌相关信号通路的研究进展
祝珊珊, 李文岗

2920 miRNA单核苷酸多态性与大肠癌的研究进展
颜红柱, 许蜜蝶, 李彬彬, 余宏宇

2926 RNA干扰在大肠癌多药耐药中的研究进展
余文燕, 许建华, 王国娟, 张瑞娟, 孙珏, 范忠泽

2931 盆底超声对女性盆底功能障碍所致便秘的诊断价值
徐辰一, 丁曙晴, 薛雅红, 丁义江

2937 幽门螺杆菌不同感染阶段的相关毒力因子及其致病性
陈莫耶, 袁媛

临床经验

2944 内镜干预及联合普萘洛尔预防食管静脉曲张破裂再出血的疗效
王进广, 孔德润

2951 根除幽门螺杆菌对慢性胃炎患者生长激素调素水平的影响
张颖, 齐凤祥, 张志广, 江勇

2956 2型糖尿病在慢性乙型肝炎进展到肝硬化中的作用
吴群, 高春, 房龙, 张辉

2961 慢性丙型肝炎血脂变化与抗病毒疗效的关系
李磊, 罗明, 杨二娜, 王瑞, 王会清, 曹武奎

附　　录	2966 《世界华人消化杂志》投稿须知 2971 2012年国内国际会议预告
志　　谢	2972 志谢世界华人消化杂志编委
消　　息	2872 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 2881 《世界华人消化杂志》出版流程 2887 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2894 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2901 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 2919 《世界华人消化杂志》栏目设置 2925 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2936 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 2955 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 2960 *WJG*总被引频次排名位于第174名 2965 《世界华人消化杂志》正文要求
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 薛东波, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科
本期责任人	编务 马帅; 送审编辑 田滢, 翟欢欢; 组版编辑 闫晋利; 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

世界華人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名

(旬刊)

创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2012-10-28
原刊名 新消化病学杂志

期刊名称 世界华人消化杂志
主管单位 山西省科学技术厅
主办单位 太原消化病研治中心

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

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

主编
程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心
党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科
江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科
刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科
刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科
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, 福建医科大学附属协和医院消化内科
姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心
张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编辑部主任 李军亮

印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局

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

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

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

2012年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号	ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
		82-262	M 4481	每期68.00元 全年2448.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

October 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 30

EDITORIAL

2867 Protein kinases - new targets for treatment of acute pancreatitis
Wu L, Xue DB

BASIC RESEARCH

2873 Effect of Jiaweisinisan on morphology of the gastric mucosa of rats following chronic psychological stress
Xie HC, Liu F, Yang Q, Xiong CC

2882 Protective effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions in rats
Gao X, Zhang ZY, Wu HL, Chen FF, Yang XB, Wang JS

2888 ShRNA-mediated down-regulation of the ETV1 transcription factor gene reduces invasive ability of gastrointestinal stromal tumor-T1 (GIST-T1) cells
Li Q, Xu L

2895 SiRNA-mediated silencing of the *rpl31* gene inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells
Li CD, Ge M, Luo MY, Chen DJ

2902 Therapeutic effect of *trigonella foenum-graecum* L. total saponins on diet-induced obesity in rats
Lu FR, Yang SL, Shen L, Qin Y, Cai YL, Xiong PC

REVIEW

2907 Role of tumor-associated macrophages in the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma
Zheng QD, Wu WY, Chen Y

2913 Advances in research of signaling pathways in cholangiocarcinoma
Zhu SS, Li WG

2920 Advances in understanding relationship between miRNA single nucleotide polymorphisms and colorectal cancer
Yan HZ, Xu MD, Li BB, Yu HY

2926 Application of RNA interference in research of multidrug resistance in colorectal cancer: Recent progress
Yu WY, Xu JH, Wang GJ, Zhang RJ, Sun J, Fan ZZ

2931 Diagnostic value of pelvic floor ultrasound in constipation due to female pelvic floor dysfunction
Xu CY, Ding SQ, Xue YH, Ding YJ

2937 *Helicobacter pylori* virulence factors that act at different stages of infection
Chen MY, Yuan Y

CLINICAL PRACTICE

2944 Efficacy of endoscopic intervention alone versus endoscopic intervention plus propranolol in the prophylaxis of esophageal variceal rebleeding
Wang JG, Kong DR

2951 Influence of *Helicobacter pylori* eradication on ghrelin levels in patients with chronic gastritis
Zhang Y, Qi FX, Zhang ZG, Jiang Y

2956 Role of type 2 diabetes mellitus in the progression of chronic hepatitis B to cirrhosis
Wu Q, Gao C, Fang L, Zhang H

2961 Relationship between efficacy of antiviral treatment and changes in blood lipid metabolism in patients with chronic hepatitis C
Li L, Luo M, Yang EN, Wang R, Wang HQ, Cao WK

APPENDIX	2966 Instructions to authors of *World Chinese Journal of Digestology* 2971 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	2972 Acknowledgments to reviewers of *World Chinese Journal of Digestology*
COVER	Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Dong-Bo Xue, Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: *Shuai Ma* Review Editor: *Ying Tian*, *Huan-Huan Zhai* Electronic Page Editor: *Jin-Li Yan* English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Ying Tian* Proof Editor: *Jun-Liang Li* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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 28, 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

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
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. If you do not have web access please contact the editorial office.

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2867-2872
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

述评 EDITORIAL

蛋白激酶–急性胰腺炎治疗的新靶标

吴 林, 薛东波

吴林, 薛东波, 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150001
薛东波, 教授, 研究生导师, 主要从事微创外科、胆胰疾病的基础与临床研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81170397
作者贡献分布: 本文由吴林完成写作; 薛东波负责设计和审校.
通讯作者: 薛东波, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科.
xue9971@sina.com
电话: 0451-85555184
收稿日期: 2012-07-03 修回日期: 2012-08-22
接受日期: 2012-10-26 在线出版日期: 2012-10-28

Protein kinases - new targets for treatment of acute pancreatitis

Lin Wu, Dong-Bo Xue

Lin Wu, Dong-Bo Xue, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81170397
Correspondence to: Dong-Bo Xue, Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 23 Youzheng Street, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. xue9971@sina.com
Received: 2012-07-03 Revised: 2012-08-22
Accepted: 2012-10-26 Published online: 2012-10-28

Abstract
Acute pancreatitis (AP) is a common acute abdomen. Although most cases of AP are self-limited, severe AP is still associated with a higher mortality rate. Protein kinases are involved in almost all intracellular signal transduction pathways, and AP-related protein kinases may be good targets for treatment of AP. Numerous studies have investigated the protein kinases and their specific inhibitors involved in AP in recent years. Here we utilized the data mining method to summarize protein kinases and kinase inhibitors that correlate with AP and highlight several important protein kinases, with an aim to provide new clues to the treatment of AP.

Key Words: Acute pancreatitis; Treatment; Protein kinase; Data mining

Wu L, Xue DB. Protein kinases - new targets for treatment of acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2867-2872

摘要
急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是普外科常见的急腹症, 虽然大多数AP具有自限性, 但重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)的死亡率仍然较高, 蛋白激酶参与了几乎所有的细胞内信号转导过程, 所以AP相关性蛋白激酶作为潜在治疗靶标的研究是十分有价值的. 近年来有越来越多的研究证明某些蛋白激酶及其抑制剂与AP有着明确的相关性, 本文归纳和总结了AP相关蛋白激酶及其抑制剂, 并对其中几个重要的蛋白激酶进行了深入阐述, 以期为AP治疗方法的研究提供有益的启示.

关键词: 急性胰腺炎; 治疗; 蛋白激酶; 文献挖掘

吴林, 薛东波. 蛋白激酶–急性胰腺炎治疗的新靶标. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2867-2872
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2867.asp

0 引言
急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是常见病、多发病, 尤其突发性AP尚无有效治疗方法. 随着我国人民生活水平的提高, AP发病率有逐渐升高的趋势. 特别是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患病急、变化快、病情重, 死亡率居高不下. 所以寻找AP治疗的新靶点迫在眉睫. 本文总结了蛋白激酶近年来的研究概况, 可能帮助读者开辟治疗AP的新思路. AP的病理过程主要是外部刺激信号(返流的胆汁、酒精代谢产物、高钙血症、外伤等)作用于胰腺腺泡细胞后, 导致胰腺腺泡细胞内的酶原激活和促炎性分子的大量分泌, 进而引发了胰腺的自身消化和大量炎性细胞的渗入, 随后渗入的炎性细胞加重胰腺局部及全身的炎症反应, 从而引发并加重AP的症状. 在此过程中胰腺腺泡细胞内Ca^{+}浓度异常、蛋白激酶水平的异常、ATP水平的降低、氧化应激等作用都促进了AP的发生和

■背景资料
急性胰腺炎(AP)是常见病、多发病, 尤其突发性AP尚无有效治疗方法. 随着我国人民生活水平的提高, AP发病率有逐渐升高的趋势. 特别是重症急性胰腺炎(SAP)患病急、变化快、病情重, 死亡率依然居高不下. 所以寻找治疗AP的新靶点可能对治疗AP有所突破, 具有重要意义.

■同行评议者
齐清会, 教授, 大连医科大学附属第一医院

■研发前沿
以疾病相关蛋白激酶为靶标对相关疾病的预防和治疗进行研究具有重要意义, 蛋白激酶已成为继G-蛋白偶联受体之后的第二大类潜在的治疗靶标而成为研究的热点.

发展. 上述机制都离不开蛋白激酶所介导的细胞内信号转导, 所以以相关蛋白激酶作为靶标对AP的预防和治疗进行研究, 可能可以系统的抑制AP的发生和发展.

1 蛋白激酶及其与疾病发生

蛋白激酶(protein kinase)又称蛋白质磷酸化酶, 控制着约30%细胞蛋白的活性, 几乎与所有的细胞功能都有关联, 对于细胞间的信号转导、复杂细胞功能的执行, 如细胞分裂等尤为重要. 由于蛋白激酶在控制细胞行为中的核心作用, 使其被作为治疗多种疾病的靶标, 包括肿瘤、糖尿病、骨质疏松症、炎症以及眼病等[1]. 蛋白激酶的生物效应是通过蛋白质磷酸化, 即将磷酸基加到氨基酸的侧链上来实现的, 而脱磷酸化(去除磷酸基团)是蛋白质通过蛋白磷酸酶的作用实现的. 这两类酶协同作用使细胞内通道“打开”或“关闭”. 这对于细胞对外界刺激应答有着极其重要的作用, 同时在很多疾病过程中也伴随着蛋白激酶的活性异常. 所以, 对疾病相关蛋白激酶进行研究具有重要意义, 蛋白激酶已成为继G-蛋白偶联受体之后的第2类潜在治疗靶标的研究热点.

2 蛋白激酶与AP的研究现状

近年来, 对信号转导通路和激酶抑制剂的研究受到广泛的重视. 我们采用文献挖掘的方法检索近年来有关AP相关蛋白激酶及其抑制物的文献. 在此过程中, 以AP和每个蛋白激酶名(近500种)为并列关键词, 在PubMed中进行检索, 同时再配以辅助人工筛选, 最终得到了39篇与AP相关蛋白激酶有关的文献.

2.1 MAPK 有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号级联可以被促炎性分子和应激所诱导, 参与这些促炎性分子所引起的免疫和细胞凋亡等方面的大多数过程[2]. MAPK家族的3个主要亚群为p38、细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)和c-Jun氨基端激酶(c-Jun NH2-terminal protein kinase, JNK), 这3个亚群的丝氨酸和苏氨酸残基可以被上游的MAPKs磷酸化. 其中p38被证实与AP的严重程度及AP引起的肺部损伤密切相关, 通过抑制p38的活性可以降低SAP时的胰腺局部和肺部的损伤[3]. 还有报道指出炎症过程中氧化应激和促炎性分子是通过启动信号转导通路参与炎症级联过程实现的, 在这个过程中MAPK(p38、ERK1/2、JNK)的激活是十分重要的. Pereda等[4]在研究中发现同时用oxypurinol(一种p38抑制物)和pentoxifylline(一种ERK1/2和JNK抑制物)作用于AP动物模型, 减弱了AP时炎症反应, 并且实验组动物的死亡率降低, 而分别抑制p38、ERK1/2及JNK信号通路效果不明显. 在研究中还发现p38信号通路主要与氧化应激有明确的相关性而ERK1/2及JNK通路主要和促炎性分子的表达密切相关, p38和ERK1/2及JNK在AP发病过程中具有相对独立的作用, 因此同时抑制以上3条信号通路对减轻AP的症状有明确的效果. 过去也有报道指出氧化应激导致了MAPK的激活并且可以诱导肿瘤坏死因子-α(necrosis factor-α, TNF-α)的产生[5], 而在AP过程中, TNF-α可能是细胞因子级联反应的启动者. Williard等[6]也发现p38参与了促炎性核转录因子NF-κB等的激活, 从而上调了促炎性因子的表达而加重AP. Samuel等[7]发现应用ERK1/2特异性抑制物(PD98059)、p38特异性抑制物(SB203580)和JNK特异性抑制物(SP600125)抑制其活性(在通过结扎胆胰共同通路胆源性AP模型中)AP时胰腺组织内促炎性细胞因子的表达能够明显降低. Liu等[8]通过检测SAP和轻型AP时鼠模型血清和腹水内的细胞因子变化, 也支持以上的结论. Yubero等[9]发现地塞米松是通过减弱相关MAPK、NF-κB和STAT3的活性, 下调相关促炎性分子的表达从而减轻AP炎症损伤的[10]. Samuel等[7]还发现在胆源性AP模型中, 胆碱M3受体的诱导和JNK的活化是持续的、快速的和进行性的. 很多报道指出CCK-A、p38的诱导和激活(在结扎共同通路建模中)也是持续的、快速的和进行性的. 而激活的JNK和p38可以潜在诱导促炎性分子的产生而加重AP. 过去的报道中还指出纤维生长因子-2(fibroblast growth factors-2, FGF-2, 一种促炎性分子)能快速诱导ERK1/2、p38的磷酸化和IL-6的释放而加重AP. 但是用PD98059和U0216(ERK1/2特异性抑制物)和SB203580(p38特异性抑制物)可以抑制FGF-2的促炎症作用, 所以FGF-2所介导的促炎性机制也是由ERK1/2和p38所介导的. 之后Andoh等[11]也指出腺泡旁肌成纤维细胞分泌的FGF-2的促炎性机制(如促IL-6的生成等)也是通过ERK1/2和p38所介导的. 所以以p38、ERK1/2、JNK为靶向对AP进行治疗和药物开发可能是十分有价值的.

表 1 目前已用于疾病治疗的部分激酶抑制剂及其作用靶点

靶点名称	抑制剂名称	治疗疾病名称
Bcr–Abl酪氨酸激酶	Imatinib(伊马替尼)	慢性粒细胞白血病, 急性淋巴细胞白血病
EGFR酪氨酸激酶	Gefitinib(吉非替尼)	晚期或转移性非小细胞肺癌
EGFR酪氨酸激酶	Erlotinib(埃罗替尼)	非小细胞肺癌
Bcr–Abl, SRC激酶家族	Dasatinib(达沙替尼)	伊马替尼耐受的慢性粒细胞白血病(CML)
HER–2/neu(ErbB2)	Herceptin(赫赛汀)	HER–2/neu阳性卵巢癌
雷帕霉素靶蛋白(mTOR)	Everolimus(依维莫司)	肾细胞癌
Rho激酶	Fasudil(法舒地尔)	脑出血后的血管痉挛
PKCβ	LY333531	糖尿病
GSK–3β	SB216763	阿尔茨海默病、中风、炎症
p38 MAPK	SD–282	心血管疾病

■同行评价
寻找治疗AP的新靶点可能对治疗AP有所突破, 本文总结了蛋白激酶近年来的研究概况, 对于帮助读者开辟治疗AP的新思路, 具有一定指导意义.

2.2 PKC 除了MAPK外蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)在AP的发生和发展过程中也发挥着关键的作用. Cosen-Binker等[12]指出PKC α介导的Munc18c磷酸化以及Syn4、SNAP23、VAMP2/8复合体的形成是AP胰腺组织内胰蛋白酶原异位分泌(酶原颗粒从顶端分泌转变为基底部分泌)的主要原因, 而胰蛋白酶原的异位分泌也是AP的早期发病机制之一. 近年还发现应用PKC δ(一个PKC新的亚型)的特异性抑制物δ V1-1能明显减低AP动物模型的血清淀粉酶水平和减轻胰腺水肿, 且可以通过降低肺内髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的水平而减轻AP所造成的肺损伤, 上述积极的效果是由δ V1-1下调了PKC δ的表达, 从而抑制了其下游的NF-κB而减少了相关炎性分子的产生而发挥作用的. Koh等[13]提出PKC α和PKC δ是MAPK和核转录因子(nuclear factor kappa, NF-κB和AP-1)的上游分子, 而在雨蛙素诱导的AP细胞模型中SP/NK1R升高也是由以上蛋白激酶所介导的. 而P物质(substance P, SP)是AP时神经源性炎症的介质, 而NK1R是SP的高亲和力受体, 他可以促进SP的促炎性作用. SP能上调促炎性分子的产生而介导胰腺局部的炎症, 抑制SP和NK1R活性能明显缓解AP的症状, 也证实了以上的结论[14]. Thrower等[15]还发现PKC δ和PKC ε在胰腺酶原的激活中也有一定的作用, 从实验和过去的报道中还得出PKC可能是通过使钙通道磷酸化而改变胰腺腺泡细胞内的Ca^{2+}浓度或是磷酸化ATPase而降低了酶原储藏部件内的pH值而促进胰腺酶原激活的. 还有实验发现在敲除了TLR-4的小鼠AP模型中, 肝内的NF-κB、PKC ζ、ERK1/2被明显的下调从而减轻了AP引起的肝损伤[16]. Satoh等[17]发现PKC δ和PKC ε可以通过细胞凋亡、炎症应答和细胞骨架的破坏而介导TNF-α所致AP时的胰腺损伤, 而其中细胞骨架的破坏是通过非受体酪氨酸激酶(proline-rich tyrosine kinase, Pyk2)所介导的, 这证明了Pyk2、PKC δ和PKC ε三种蛋白激酶在AP进展中发挥着重要的作用, 并且认为Pyk2类似于一个PKC和Src的信号集合, 他引发了TNF-α所介导的细胞骨架破坏. 有文献指出PKC ζ可以通过激活库普费细胞内的核转录因子NF-κB而介导促炎性分子的产生, 支持了上述实验结果[18]. 有实验证实, 胆汁刺激胰腺淀粉酶的释放, 激活了膜效应器(PLC, PLA2), 进而激活了PKC和酪氨酸激酶(tyrosine kinase, TK)信号通路, 而在AP发生和发展过程中淀粉酶的分泌起着重要的作用. 以上这些充分说明了PKC在AP的发生发展中发挥着十分重要的作用.

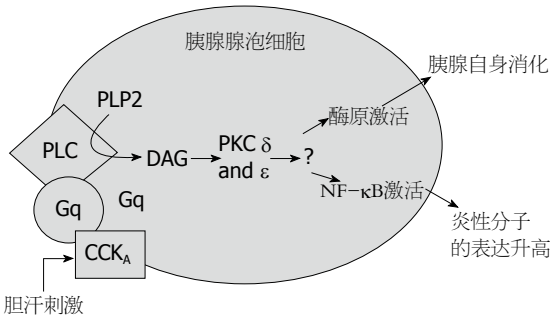


图 1 胆源性AP发病过程中蛋白激酶作用示意图.

在AP过程中PKC是怎样发挥其促炎性作用的呢? 我们以胆源性AP(AP最主要的发病形式)为例, 以模式图的形式说明PKC在胆源性AP中的促炎性机制. PKC在AP最重要的两种发生机制中起着非常重要的作用(图1). 所以在药学上我们可以新的PKC亚型PKC δ, PKC ε为靶点进行药物设计.

2.3 PI3K Eaton等[19]发现H_2S在AP胰腺组织中的

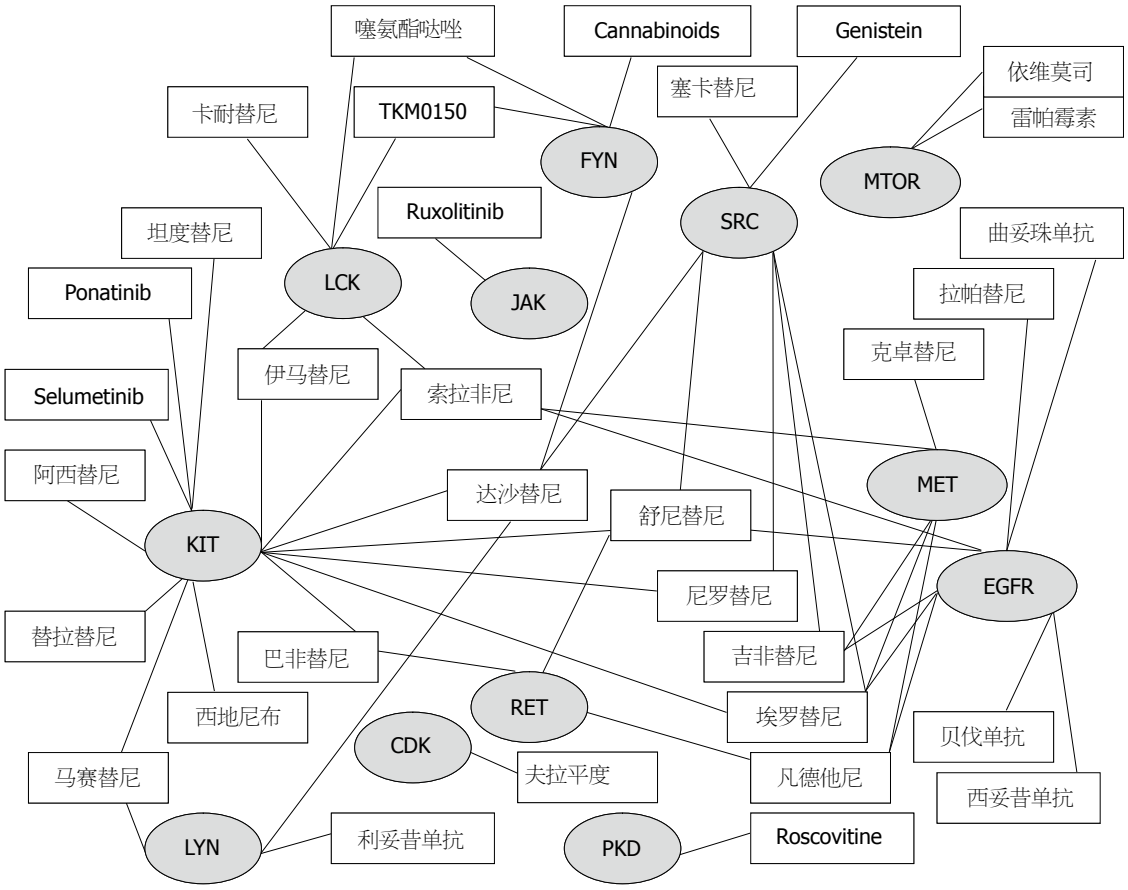


图 2 AP相关的蛋白激酶抑制剂可视化关系图.

抑制炎症作用是通过激活了磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/AKT信号通路, 从而下调了炎性分子的表达, 而用PI3K抑制物LY294002抑制PI3K/AKT通路的活性能够减弱这种保护机制. 所以H_2S在AP中的积极作用也是由蛋白激酶介导的. Singh等[20]发现用PI3K抑制物wortmannin和LY294002抑制PI3K的活性能明显的减轻AP, 提示PI3K在AP的发展中发挥一定的作用.

2.4 AKT Yang等[21]证实, 应用E2(17b-estradiol)对AP模型进行处理, 能明显的降低MPO活性和IL-6、TNF-α、CINC-1、CINC-3的水平, 从而减轻了胰腺局部及肺部的炎症, 这些积极的作用均是来源于E2增加了丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase, AKT)的磷酸化水平和减少了相关促炎性介质的产生. 说明除了起到促炎性作用的蛋白激酶外, 还有很多蛋白激酶是抑制炎症反应的, 如果加强这些蛋白激酶的作用可能对AP有积极的治疗作用. Hu等[22]在实验中发现Reg4(是近期发现的再生基因家族成员, 在AP时有高表达)可以保护AP时的胰腺腺泡细胞防止其死亡, 这是由Reg4激活EGFR/Akt信号通路而促进了Bcl-2, Bcl-xL的表达而介导的(Bcl2, Bcl-xL是线粒体膜上的跨膜分子, 过去被指出有明显的抑制细胞死亡的作用). 而Samuel等通过实验又证实了AKT信号通路在AP时的促炎性因子表达中的作用.

2.5 JAK Satoh等[17]在实验中发现, 抑制NADOH氧化酶活性对AP具有一定的预防和治疗作用, 这是由通过抑制胰腺腺泡细胞内的Jak2/Stat3、MAPKs和转录生长因子-β1(transcription growth factor-β1, TGF-β1)的表达而介导的. Gallmeier等[23]发现胰腺腺泡细胞可以通过细胞因子的分泌而作用于免疫细胞, 而其又反过来通过JAK2和STAT1去应答IFN-γ, 这个机制在AP的发展中发挥了一定的作用.

3 蛋白激酶活性的调节–激酶抑制剂的研发现状

近年来, 随着蛋白激酶作为疾病治疗靶标的研究的不断升温, 激酶抑制剂的开发亦取得了突飞猛进的发展(表1). 许多国外大医药公司已把以蛋白激酶为靶标的新药开发作为了首要任务, 目前已有多于30种激酶抑制剂被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于临床治疗或临床

试验, 包括第1代商品, 如诺华公司的格列卫®(Gleevec®, Imatinib, 伊马替尼), 阿斯利康公司的易瑞沙®(Iressa®, Gefitinib, 吉非替尼)和罗氏公司的他赛瓦®(Tarceva®, Erlotinib, 埃罗替尼); 第2代AbL激酶抑制剂, 如百时美施贵宝公司的扑瑞赛®(Sprycel®, Dasatinib, 达沙替尼); 目前第3代Aurora激酶抑制剂正在开发研制中[24].

本课题组利用这些AP相关蛋白激酶继续进行深度挖掘并以可视化关系图(图2)展示相关的激酶抑制剂. 共发现33种对上述蛋白激酶有抑制作用的化合物(包括已知的激酶抑制剂), 提示这些化合物潜在的AP治疗作用. 尤其可喜的是, 作者在文献挖掘过程中发现了一些植物药单体激酶抑制剂, 如Cannabinoids(一种大麻素提取物)[25], Genistein(金雀异黄酮, 酪氨酸蛋白激酶抑制剂)[26]等, 提示我们某些中药有效成分可能通过抑制蛋白激酶活性而在AP治疗中发挥作用.

4 结论

AP相关蛋白激酶在AP发生和发展过程中发挥着十分重要的作用, 他几乎和AP发生和发展的所有机制都紧密相关, 所以以蛋白激酶为靶标治疗AP可能是传统治疗之外的一个新的选择, 或者将其与传统治疗联合可能会带来更好的疗效, 这些都有待我们去证实. 尽管过去基因治疗、RNA干扰等分子生物学方法在AP治疗的实验室研究中取得了大量成果, 但这些分子生物学方法应用于临床仍有较大局限性. 而以蛋白激酶为靶标则可很快将实验室成果转化到临床实践中. 因此, 弄清蛋白激酶在AP发生发展中的作用, 进而将其特异性激酶抑制剂引入AP的治疗中, 特别是开发具有独立知识产权的中药单体激酶抑制剂, 具有良好潜在的应用前景.

5 参考文献

1 Namkung W, Yoon JS, Kim KH, Lee MG. PAR2 exerts local protection against acute pancreatitis via modulation of MAP kinase and MAP kinase phosphatase signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G886-G894

2 Conze D, Krahl T, Kennedy N, Weiss L, Lumsden J, Hess P, Flavell RA, Le Gros G, Davis RJ, Rincón M. c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation. *J Exp Med* 2002; 195: 811-823

3 Yang J, Murphy C, Denham W, Botchkina G, Tracey KJ, Norman J. Evidence of a central role for p38 map kinase induction of tumor necrosis factor alpha in pancreatitis-associated pulmonary injury. *Surgery* 1999; 126: 216-222

4 Pereda J, Sabater L, Cassinello N, Gómez-Cambronero L, Closa D, Folch-Puy E, Aparisi L, Calvete J, Cerdá M, Lledó S, Viña J, Sastre J. Effect of simultaneous inhibition of TNF-alpha production and xanthine oxidase in experimental acute pancreatitis: the role of mitogen activated protein kinases. *Ann Surg* 2004; 240: 108-116

5 Mayer J, Rau B, Gansauge F, Beger HG. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications. *Gut* 2000; 47: 546-552

6 Williard DE, Twait E, Yuan Z, Carter AB, Samuel I. Nuclear factor kappa B-dependent gene transcription in cholecystokinin- and tumor necrosis factor-alpha-stimulated isolated acinar cells is regulated by p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Surg* 2010; 200: 283-290

7 Samuel I, Zaheer S, Fisher RA, Zaheer A. Cholinergic receptor induction and JNK activation in acute pancreatitis. *Am J Surg* 2003; 186: 569-574

8 Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2513-2518

9 Yubero S, Ramudo L, Manso MA, De Dios I. Mechanisms of dexamethasone-mediated chemokine down-regulation in mild and severe acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792: 1205-1211

10 Ramudo L, Yubero S, Manso MA, Vicente S, De Dios I. Signal transduction of MCP-1 expression induced by pancreatitis-associated ascitic fluid in pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 1314-1320

11 Andoh A, Bamba S, Fujino S, Inatomi O, Zhang Z, Kim S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Fibroblast growth factor-2 stimulates interleukin-6 secretion in human pancreatic periacinar myofibroblasts. *Pancreas* 2004; 29: 278-283

12 Cosen-Binker LI, Lam PP, Binker MG, Gaisano HY. Alcohol-induced protein kinase Calpha phosphorylation of Munc18c in carbachol-stimulated acini causes basolateral exocytosis. *Gastroenterology* 2007; 132: 1527-1545

13 Koh YH, Tamizhselvi R, Moochhala S, Bian JS, Bhatia M. Role of protein kinase C in caerulein induced expression of substance P and neurokinin-1-receptors in murine pancreatic acinar cells. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 2139-2149

14 Koh YH, Tamizhselvi R, Bhatia M. Extracellular signal-regulated kinase1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase, through nuclear factor-kappaB and activator protein-1, contribute to caerulein-induced expression of substance P and neurokinin-1 receptors in pancreatic acinar cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 940-948

15 Thrower EC, Osgood S, Shugrue CA, Kolodecik TR, Chaudhuri AM, Reeve JR, Pandol SJ, Gorelick FS. The novel protein kinase C isoforms -delta and -epsilon modulate caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1344-G1353

16 Shi C, Zhao X, Wang X, Andersson R. Role of nuclear factor-kappaB, reactive oxygen species and cellular signaling in the early phase of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 103-108

17 Satoh A, Gukovskaya AS, Edderkaoui M, Daghighian MS, Reeve JR, Shimosegawa T, Pandol SJ. Tumor necrosis factor-alpha mediates pancreatitis responses

in acinar cells via protein kinase C and proline-rich tyrosine kinase 2. *Gastroenterology* 2005; 129: 639-651
18 Peng Y, Sigua CA, Gallagher SF, Murr MM. Protein kinase C-zeta is critical in pancreatitis-induced apoptosis of Kupffer cells. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 1253-1261
19 Eaton CL, Davies P, Harper M, France T, Rushmere N, Griffiths K. Steroids and the prostate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40: 175-183
20 Singh VP, Saluja AK, Bhagat L, van Acker GJ, Song AM, Soltoff SP, Cantley LC, Steer ML. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1387-1395
21 Yang SJ, Chen HM, Hsieh CH, Hsu JT, Yeh CN, Yeh TS, Hwang TL, Jan YY, Chen MF. Akt pathway is required for oestrogen-mediated attenuation of lung injury in a rodent model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Injury* 2011; 42: 638-642
22 Hu G, Shen J, Cheng L, Guo C, Xu X, Wang F, Huang L, Yang L, He M, Xiang D, Zhu S, Wu M, Yu Y, Han W, Wang X. Reg4 protects against acinar cell necrosis in experimental pancreatitis. *Gut* 2011; 60: 820-828
23 Gallmeier E, Schäfer C, Moubarak P, Tietz A, Plössl I, Huss R, Göke B, Wagner AC. JAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN-gamma in rat pancreatic acinar cells. *J Cell Physiol* 2005; 203: 209-216
24 Cheung CH, Coumar MS, Chang JY, Hsieh HP. Aurora kinase inhibitor patents and agents in clinical testing: an update (2009-10). *Expert Opin Ther Pat* 2011; 21: 857-884
25 Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 2003; 23: 2371-2382
26 Zhang DY, Wu W, Deng XL, Lau CP, Li GR. Genistein and tyrphostin AG556 inhibit inwardly-rectifying Kir2.1 channels expressed in HEK 293 cells via protein tyrosine kinase inhibition. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808: 1993-1999

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

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

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2873-2881
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

加味四逆散对身心应激大鼠胃黏膜形态学的作用机制

谢慧臣, 刘 芬, 杨 强, 熊常初

谢慧臣, 刘芬, 熊常初, 湖北中医药大学 湖北省武汉市 430065
谢慧臣, 刘芬, 湖北民族学院医学院中医教研室 湖北省恩施市 445000
杨强, 湖北民族学院医学院附属医院中医部 湖北省恩施市 445000
湖北省教育厅科学研究计划重大基金资助项目, No. Z20092901
作者贡献分布: 此课题由谢慧臣与刘芬共同设计; 研究过程由谢慧臣、刘芬、杨强及熊常初操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由谢慧臣提供; 数据分析由刘芬、杨强及熊常初完成; 文章撰写由谢慧臣与刘芬共同完成.
通讯作者: 谢慧臣, 副教授, 445000, 湖北省恩施市学院路39号, 湖北民族学院医学院中医系. xiehc_2004@yeah.net
收稿日期: 2012-08-02 修回日期: 2012-09-10
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-28

Effect of Jiaweisinisan on morphology of the gastric mucosa of rats following chronic psychological stress

Hui-Chen Xie, Fen Liu, Qiang Yang, Chang-Chu Xiong

Hui-Chen Xie, Fen Liu, Chang-Chu Xiong, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, Hubei Province, China
Hui-Chen Xie, Fen Liu, Medical College of Hubei University for Nationalities, Ensh 445000, Hubei Province, China
Qiang Yang, Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Medical College, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, Hubei Province, China
Supported by: the Major Science Research Project of Education Department of Hubei Province, No. Z20092901
Correspondence to: Hui-Chen Xie, Associate Professor, Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College of Hubei University for Nationalities, 39 Xueyuan Road, Enshi 445000, Hubei Province, China. xiehc_2004@yeah.net
Received: 2012-08-02 Revised: 2012-09-10
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-28

Abstract

AIM: To study the protective effect of Jiaweisinisan (JWSNS) on the gastric mucosa of rats following physical and mental stress and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Rats were randomly divided into normal group, model group, low-, medium-, and high-dose JWSNS groups, and omeprazole group. Gastric ulcer was induced in rats using a chronic psychological stress method. After JWSNS intervention, gastric juice pH value was measured, mucosal ulcer index (UI) was evaluated, morphological and ultrastructural changes in gastric tissue were observed by light microscopy and transmission electron microscopy. The levels of gastrin (GAS) and vasoactive intestinal peptide (VIP) in gastric tissue were determined by immunoradiometric assay, and mRNA expression of GASR in gastric and VIPR2 in jejunal tissue was detected by RT-PCR.

RESULTS: Compared to the model group, gastric UI was significantly lower in the normal group, low-, medium-, and high-dose JWSNS groups, and omeprazole group (0.32 ± 1.58, 13.70 ± 2.26, 8.50 ± 3.88, 4.67 ± 3.08, 12.00 ± 2.73 *vs* 25.33 ± 4.33, all $P < 0.05$). Compared to the omeprazole group, gastric UI was significantly lower in the medium- and high-dose JWSNS groups (both $P < 0.05$). The gastric mucosa of rats in the model group showed obvious injury compared to the normal group. Varying degrees of relief of gastric mucosa injury was observed in the JWSNS groups. Treatment with JWSNS also significantly improved ultrastructural changes in gastric tissue. Compared to the model group, levels of GAS in the gastric antrum were significantly higher in the normal group, low-, medium-, and high-dose JWSNS groups, and omeprazole group (39.23 ± 5.54, 15.74 ± 4.56, 27.52 ± 4.28, 38.27 ± 4.18, 28.30 ± 5.53 *vs* 8.33 ± 4.63, all $P < 0.05$). Compared to the omeprazole group, levels of GAS in the gastric antrum were significantly higher in the high-dose JWSNS group ($P < 0.05$). Compared to the model group, levels of VIP in the gastric antrum were significantly lower in the normal group, medium-, and high-dose JWSNS groups, and omeprazole group (36.32 ± 1.68, 60.50 ± 3.85, 39.67 ± 2.98, 59.00 ± 2.89 *vs* 89.33 ± 4.43, all $P < 0.05$). Compared to the omeprazole group, levels of VIP in the gastric antrum were significantly lower in the high-dose JWSNS group ($P < 0.05$). Compared to the model group, expression of GASR mRNA in gastric tissue increased significantly (1.00 ± 0.10, 0.25 ± 0.02, 0.53 ± 0.03, 0.62 ± 0.05, 0.43 ± 0.03 *vs* 0.19 ± 0.05, all $P < 0.05$) and that of VIPR2 mRNA in jejunal tissue decreased significantly (1.00 ± 0.20, 1.83 ± 0.30, 2.39 ± 0.36, 1.15 ± 0.33, 1.79 ± 0.35 *vs* 3.40 ± 0.57, all $P < 0.05$)

■背景资料
随着社会环境和生活方式的改变, 工作生活压力的增加, 心理应激参与疾病的发生、发展得到广泛重视. 应激性胃黏膜损伤是一种临床常见的以胃黏膜糜烂、溃疡、出血为特征的身心应激并发症. 近年来对于其发病机制的探讨日渐深入, 研究表明应激性胃黏膜损伤是由多因素共同作用的结果.

■同行评议者
曹志成, 英国生物医学科学研究所院士, 香港伊利沙伯医院临床肿瘤部、肿瘤研究科

■研发前沿
应激性胃黏膜损伤是由于各种急慢性应激致胃黏膜保护与损伤机制失衡引起的,以溃疡或糜烂为特征的严重并发症.目前中西医相关研究多集中在神经内分泌失调、胃黏膜屏障保护、保护及损伤因子失衡、细胞凋亡等方面,但因其发病机制复杂,故尚未完全阐明.

in the normal group, low-, medium-, and high-dose JWSNS groups, and omeprazole group. Compared to the omeprazole group, expression of GASR mRNA in gastric tissue increased significantly ($P < 0.05$) and that of VIPR2 mRNA in jejunal tissue decreased significantly ($P < 0.01$) in the high-dose JWSNS group.

CONCLUSION: JWSNS has a good protective effect on the gastric mucosa of rats following physical and mental stress.

Key Words: Jwsns; Stress; Ultrastructural pathology; GASR; VIPR2

Xie HC, Liu F, Yang Q, Xiong CC. Effect of Jiaweisinisan on morphology of the gastric mucosa of rats following chronic psychological stress. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2873-2881

摘要

目的: 探讨加味四逆散(jiaweisinisan, JWSNS)对身心应激大鼠胃黏膜的保护作用及其机制.

方法: 大鼠随机分为正常组、模型组、JWSNS大、中、小剂量组及奥美拉唑组, 采用慢性心理性应激方法建立应激性胃溃疡大鼠模型, 经JWSNS等干预后评估胃黏膜溃疡指数(ulcer index, UI), 常规HE(hematoxylin and eosin stain, HE)染色镜下观察胃黏膜形态学改变, 透射电镜法观察腺胃区胃黏膜组织细胞及细胞间连接的超微结构改变, 放射免疫法检测大鼠胃组织中胃泌素(gastrin, GAS)及血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)水平并用RT-PCR法检测胃组织GASR、空肠组织VIPR2 mRNA表达变化.

结果: 与模型组比较, 正常组、JWSNS中、大、小剂量组及奥美拉唑组大鼠胃黏膜溃疡指数(分)明显减小(0.32±1.58、8.50±3.88、4.67±3.08 *vs* 25.33±4.33, $P<0.01$; 13.70±2.26、12.00±2.73 *vs* 25.33±4.33, $P<0.05$); 与奥美拉唑组比较, JWSNS中、大剂量组胃黏膜溃疡指数明显减小($P<0.05$, $P<0.01$); 胃黏膜HE染色结果显示模型组大鼠胃黏膜弥漫出血、溃疡糜烂, 较正常组损伤明显, JWSNS大、中、小剂量组大鼠胃黏膜损伤较模型组不同程度减轻. 电镜观察显示正常组大鼠胃黏膜上皮细胞间连接紧凑, 胞膜完整, 胞核形态及大小正常; 模型组大鼠胃黏膜上皮细胞间连接松解, 胞质中细胞器及胞核受损严重, 染色质明显边集、浓缩或均一化分布; 其余治疗组均较模型组不同程度好转. 与模型组比较, 正常组、JWSNS中、大剂量组、奥美拉唑组、JWSNS小剂量组大鼠胃窦组织中GAS含量显著增高(39.23±5.54、27.52±4.28、38.27±4.18、28.30±5.53 *vs* 8.33±4.63, $P<0.01$; 15.74±4.56 *vs* 8.33±4.63, $P<0.05$), 与奥美拉唑组比较, JWSNS大剂量组胃窦组织中GAS含量增高($P<0.05$); 与模型组比较, 正常组、JWSNS大、中剂量组及奥美拉唑组大鼠胃窦组织中VIP含量降低(36.32±1.68、39.67±2.98 *vs* 89.33±4.43, $P<0.01$; 60.50±3.85、59.00±2.89 *vs* 89.33±4.43, $P<0.05$), 与奥美拉唑组比较, JWSNS大剂量组胃窦组织中VIP含量降低($P<0.05$); 与模型组比较, 正常组、JWSNS中、大、小剂量组及奥美拉唑组胃组织GASR mRNA表达均升高(1.00±0.10、0.53±0.03、0.62±0.05 *vs* 0.19±0.05, $P<0.01$; 0.25±0.02、0.43±0.03 *vs* 0.19±0.05, $P<0.05$), 正常组、JWSNS大、中、小剂量组及奥美拉唑组空肠组织VIPR2 mRNA表达则降低(1.00±0.20、1.15±0.33 *vs* 3.40±0.57, $P<0.01$; 1.83±0.30、2.39±0.36、1.79±0.35 *vs* 3.40±0.57, $P<0.05$); 与奥美拉唑组比较, JWSNS大剂量组胃组织GASR mRNA表达明显升高($P<0.05$), 而JWSNS大剂量组空肠组织VIPR2 mRNA表达则明显降低($P<0.01$).

结论: JWSNS对身心应激大鼠胃黏膜有较好的保护作用.

关键词: 加味四逆散; 应激; 超微病理; 胃泌素受体; 血管活性肠肽受体2

谢慧臣, 刘芬, 杨强, 熊常初. 加味四逆散对身心应激大鼠胃黏膜形态学的作用机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2873-2881
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2873.asp

0 引言

随着社会发展, 人们的生活节奏也越来越快, 伴随各种社会问题不断出现, 且渐趋复杂化, 导致人群弥漫焦虑、急躁, 甚至无所适从感. 应激性心理、生理反应因人们心理情感上的种种变化而不断积累, 导致各种身心疾病的发生, 其中尤以与胃肠道疾病起病及病情的发展关系密切[1], 而应激致病和中医病因学中的情志所伤内在含义是一致的. 通过查阅文献[2], 我们认为中医疏肝理气法的治病机制与该方法对胃肠道黏膜形态结构及胃肠激素水平施加了有益的影响有关, 而胃肠激素的作用效果又与表达的受体的数目关系密切, 即受体水平的高低可很好地反映该

激素的作用强度, 但目前相关研究报道较少[3]. 加味四逆散(jiaweisinisan, JWSNS)来源于中医疏肝理气法之经典方四逆散, 前期大量临床观察[4]已证明其对调节患者胃肠功能具有积极作用. 本研究首次从实验角度进一步探索该方对慢性身心应激模型大鼠胃肠激素和相应受体表达及胃黏膜细胞超微结构的影响, 从脑肠肽受体角度探讨了JWSNS调治身心应激相关性胃肠疾病的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 10-12 wk SPF级♀Wistar大鼠60只, 体质量200 g±20 g, 购自湖北中医药大学动物实验室, 动物使用许可证号SRST(鄂)20110018. JWSNS(柴胡8 g、枳实15 g、白芍15 g、郁金6 g、白芨6 g、砂仁12 g、炙甘草6 g)购自湖北中医药大学附属医院中药房. 按照中药常规煎法制成相当于生药1 g/mL的药液, 4 ℃冰箱保存备用. 给药前, 将药液配制成所需浓度. 奥美拉唑片, 山东齐鲁药业有限公司生产, 给药前蒸馏水配制成0.3 mg/mL浓度. GAS、VIP放免试剂盒由南京建成生物工程公司提供, 批号100809、100902. GASR mRNA、VIPR2 mRNA实时荧光定量PCR试剂盒、引物(Invitrogen Biotechnology Co., LTD中国公司), PCR引物序列、产物长度和退火温度见表1. XSP-300型-双目显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司); 日立H-600型透射电镜(日本日立公司); LKB-V型超薄切片机(瑞典BROMMA公司); Neofuge15R-台式高速冷冻离心机(Heal Force); DFM-96型多管放射免疫计数器(北京核仪器厂); Life express Thermal Cycler-PCR仪(Hangzhou Bioer Teechnology Co. LTD); SLAN荧光定量PCR检测系统(上海宏石医疗科技有限公司); SW-CJ-1FD-超净工作台(苏净安泰公司).

1.2 方法

1.2.1 模型制备: 按文献[5]采用不可预知慢性应激方法制备大鼠模型, 选10种不可预知刺激因素刺激大鼠. (1)潮湿垫料加倾斜饲养: 以倾斜鼠笼后底部浸水设为垫料的标准潮湿程度, 将鼠笼倾斜至30度以上, 持续24 h; (2)热水泳: 将大鼠放入水温48 ℃左右, 水深35 cm的热水中10 min; (3)禁食24 h; (4)电击: 电刺激的参数以生物机能系统进行调控, 电流控制在0.1 mA、3次/min, 连续刺激15 min; (5)行为束缚2 h: 大鼠以1%戊巴比妥钠(15 mg/kg)腹腔内注射麻醉后仰位捆绑于专用鼠板上, 等待大鼠清醒后计时开始; (6)陌生物品: 随机选择发声的收音机、烧杯、铁丝网等, 放入鼠笼24 h; (7)昼夜交替: 白昼以黑布罩着鼠笼持续12 h, 天黑后拿掉并用白炽灯照射并持续12 h; (8)陌生气味: 将医用棉花蘸取冰醋酸放入玻璃瓶, 瓶口开放, 放入鼠笼并持续24 h; (9)冰水泳: 将受试大鼠放入水温4 ℃, 水深35 cm水中10 min; (10)禁水24 h. 每日于10种刺激方法中随机取一种, 特别注意相邻两天不能重复同一种刺激; 每天上午9:00将刺激更换, 刺激2 wk. 从第15天起, 开始给大鼠灌胃药物, 连续2 wk, 给药同时继续进行刺激.

1.2.2 分组与给药: 大鼠随机分为6组: 正常组、模型组、奥美拉唑组、JWSNS大、中、小剂量组. 实验总耗时共4 wk, 前2 wk除正常组外统一进行造模, 从第3周开始灌胃.

1.2.3 药物配制剂量: 大鼠每日JWSNS用药剂量(中剂量)按等效临床剂量和体表面积公式计算出为5 g/kg, 小剂量为其1/2(2.5 g/kg)浓度和大剂量为其2倍浓度(10 g/kg). 小、中、大剂量组的中药复方药物浓度分别设定为0.25、0.5、1.0 g/mL, 每日将配置好的中药煎剂2 mL灌胃大鼠. 奥美拉唑组灌胃0.3 mg/mL的奥美拉唑混悬液2 mL, 以上药物均用蒸馏水配制. 空白组及模型组灌胃生理盐水2 mL, 均为1次/次直至实验结束, 共灌胃2 wk.

1.2.4 指标检测: (1)胃黏膜溃疡指数(ulcer index, UI)检测: 末次给药后禁食不禁水24 h, 脱颈椎处死大鼠, 开腹取胃洗去胃表面血迹, 将胃壁大弯剪开并外翻黏膜面, 冲洗黏膜面上及胃腔内的污物及血迹, 内面向上平展胃黏膜于洁净纱布上, 用10倍放大镜仔细观察胃黏膜损伤情况, 并仔细记录, 在腺胃区就黏膜出血情况, 点线状糜烂等进行计数, 累积积分评估胃黏膜UI(按Guth标准)[6], 评分标准如下: 1分: 斑点糜烂; 2分: 糜烂长度<1 mm; 3分: 糜烂长度1-2 mm; 4分: 糜烂长度2-3 mm; 5分: 糜烂长度>4 mm; 如病灶宽于2 mm, 以上分数×2, 溃疡指数等于全胃各病灶分数的总和; (2)胃黏膜光镜观察: 于腺胃区黏膜损伤明显处无菌条件下取1块0.5 cm×1.0 cm组织洗净, 用40 g/L甲醛溶液将标本固定48 h, 常规石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜观察胃黏膜组织病变; (3)电镜标本制作及观察: 于腺胃区剪取0.1 cm×0.1 cm大小黏膜组织1块, 2.5%戊二醛前固定, 0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3次, 锇酸(O_3O_4, 1%)后固定, 0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗3

■**相关报道**
相关文献中提到应激性胃黏膜损伤与下丘脑-垂体-肾上腺、HPA轴、交感-肾上腺髓质系统失调, 胃黏膜血流量异常, 胃黏膜屏障受损, 胃黏膜保护性物质前列腺素、表皮生长因子等减少, 胃酸异常分泌, 应激抑制免疫系统, 氧自由基损伤, 凋亡等因素均有关系.

■创新盘点
本研究首次从实验角度探索加味四逆散(JWSNS)验方对慢性身心应激模型大鼠胃肠激素及相应受体表达和胃黏膜细胞超微结构的影响, 以期从脑肠肽受体角度探讨JWSNS调治身心应激相关性胃肠疾病的作用机制.

表 1 PCR引物序列、产物长度和退火温度

引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)	退火温度(℃)
R-actin-S	CGTTGACATCCGTAAAGACCTC	110	58
R-actin-A	TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT		
R-GASR-S	GCGAATGCTGCTAGTGATTGT	112	58
R-GASR-A	CCCTGAGAGTGCTCGTTGTG		
R-Vipr2-S	TACAAGAGGCTCGCCAAGTCC	195	58
R-Vipr2-A	TTTCAGTTCACGCTGTACCTCAC		

次, 梯度乙醇脱水(500、700、800、950、1 000 mL/L)2次, 每次15 min, 环氧树脂包埋, 纯丙酮脱水2次(15 min), EPON812∶丙酮(1∶1)浸透30 min, 纯包埋液浸透1 h, 纯包埋液固化37 ℃ 24 h后60 ℃ 48 h, 超薄切片机切片, 铀、铅染色(醋酸双氧铀, 枸橼酸铅), 透射电镜观察胃黏膜组织细胞超微病理改变; (4)胃组织中Gas及VIP水平检测: 取1块胃窦组织0.5 cm×1.0 cm, 生理盐水洗净, 称取质量后于1 mL、100 ℃生理盐水煮沸3 min, 后置于匀浆器中加0.1 mol/L盐酸0.5 mL匀浆, 4 ℃置1 h , 0.1 mol/L的NaOH 0.5 mL中和, 4 ℃, 3 000 r/min离心30 min, 取上清-20 ℃保存, 放射免疫法检测大鼠胃组织中胃泌素(gastrin, GAS)及血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)水平, 具体按各试剂盒说明书操作; (5)RT-PCR法测定胃组织GASR、空肠组织VIPR2两种受体mRNA的表达及定量分析: 于胃窦区(距幽门0.5 cm)、空肠区(距幽门2-3 cm)取适量组织, 迅速投入液氮中, 后转入-80 ℃冰箱, RT-PCR法测定胃组织GASR、空肠组织VIPR2两种受体mRNA的表达及定量分析. 按试剂盒说明书进行操作. PCR反应体系为2×qPCR Mix 12.5 μL, 2.5 μmol/L基因引物2.0 μL, 反转录产物2.0 μL, ddH_2O 8.5 μL; PCR扩增: 预变性95 ℃, 1 min, 循环(40次)95 ℃, 15 s→58 ℃, 20 s→72 ℃, 20 s, 末段延伸72 ℃, 5 min, 溶解曲线72 ℃→95 ℃, 每20 s升温1 ℃. 结果处理: △△CT法: A = CT(目的基因, 待测样本)-CT(内标基因, 待测样本); B = CT(目的基因, 对照样本)-CT(内标基因, 对照样本); K = A-B, 表达倍数 = 2^{-K}.

统计学处理 用SPSS17.0软件进行统计学分析, 资料数据以mean±SD表示, 采用单因素方差分析, $P<0.05$为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 加味四逆散作用下各组大鼠胃黏膜大体形态及光镜下变化 肉眼观察正常对照组大鼠胃壁平整光滑几乎无损伤, 镜下可见大鼠胃黏膜层次清楚, 结构正常, 腺体整齐排列, 黏膜下层毛细血管无扩张淤血(图1A). 模型组大鼠胃黏膜水肿充血严重, 并伴糜烂, 溃疡, 点线状出血, 说明慢性应激性胃溃疡大鼠模型成功. 镜下见胃黏膜大片状脱落及坏死, 红细胞渗出, 淋巴细胞浸润, 连续性黏膜中断, 形成溃疡, 黏膜下层血管明显淤滞(图1B), 其病变与正常对照组相比差异明显. 奥美拉唑组大鼠胃壁平整, 糜烂减轻明显. 镜下见大鼠胃黏膜腺体排列较整齐, 损黏膜表浅局限, 出血较少, 偶见表层小片状脱落上皮(图1C). JWSNS小剂量组大鼠胃壁稍显凸凹不平, 微小溃疡或点线状出血较多见. 镜下见大鼠黏膜层红细胞少量渗出, 腺体排列较紊乱(图1D). JWSNS中剂量组大鼠胃壁欠光滑, 瘀血较轻, 糜烂尚不明显, 镜下见大鼠胃黏膜完整性较好, 腺体排列较整齐, 受损黏膜表浅局限(图1E). JWSNS大剂量组大鼠胃壁光整, 糜烂不明显; 镜下见大鼠胃黏膜腺体整齐排列, 受损部位局限和表浅(图1F).

2.2 加味四逆散作用下各组大鼠胃黏膜溃疡指数的变化 与模型组比较, 正常组、JWSNS中、大、小剂量组及奥美拉唑组大鼠胃黏膜溃疡指数(ulcer index, UI)明显减小(0.32±1.58、8.50±3.88、4.67±3.08 *vs* 25.33±4.33, $P<0.01$; 13.70±2.26、12.00±2.73 *vs* 25.33±4.33, $P<0.05$); 与奥美拉唑组比较, JWSNS中, 大剂量组胃黏膜UI明显减小(8.50±3.88 *vs* 12.00±2.73, $P<0.05$; 4.67±3.08 *vs* 12.00±2.73, $P<0.01$); 与JWSNS小剂量组比较, JWSNS中、大剂量组大鼠胃黏膜UI均显著下降(8.50±3.88 *vs* 13.70±2.26, $P<0.05$; 4.67±3.08 *vs* 13.70±2.26, $P<0.01$)(表2).

2.3 加味四逆散作用下大鼠胃黏膜组织细胞超微病理学变化 正常组大鼠胃黏膜上皮细胞间连接紧凑, 胞膜完整, 细胞器均匀分布, 线粒体呈静息状态, 内质网无扩张, 胞核形态及大小正常,

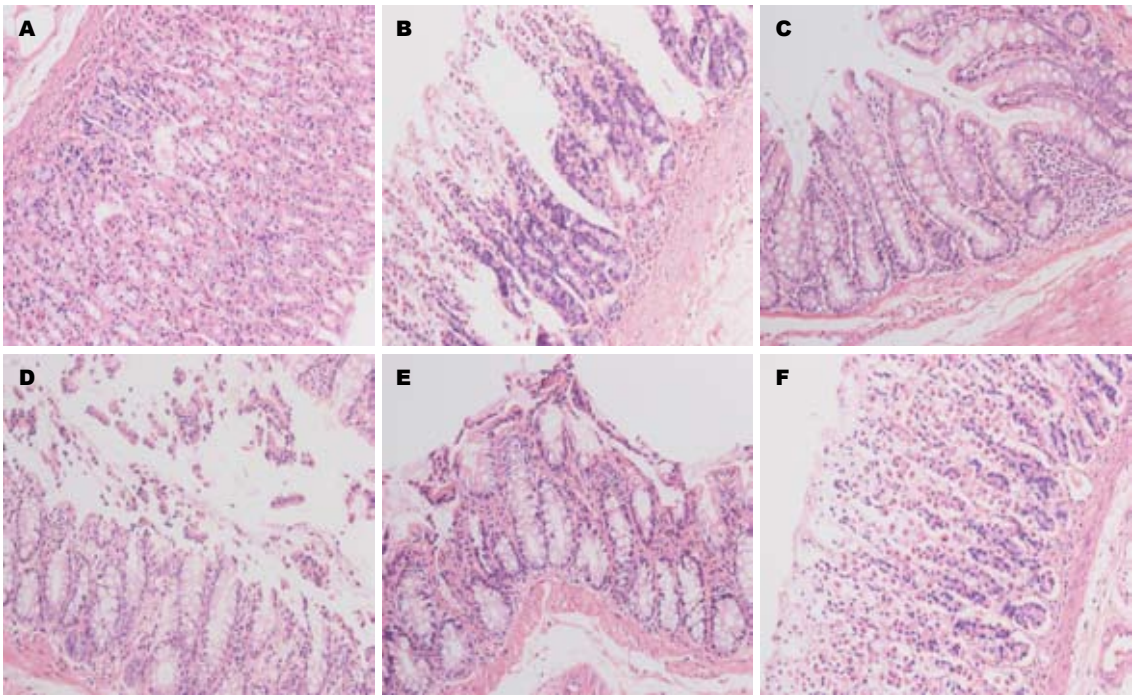


图 1 加味四逆散作用下各组大鼠胃黏膜光镜下变化(HE染色, ×200). A: 正常组; B: 模型组; C: 奥美拉唑组; D: 加味四逆散小剂量组; E: 加味四逆散中剂量组; F: 加味四逆散大剂量组.

■**应用要点**

中医学中, 应激性胃溃疡归属胃痞范畴, 其表在胃, 但其本在肝脾. 根据目前临床实践, 在原方四逆散调畅气机法基础上辅以祛湿活血之药组成加味四逆散. 该方对胃黏膜组织细胞超微结构及脑肠肽受体有较好干预作用, 组方真正体现了中医身心兼顾、标本同治的理念.

核膜完整, 无染色质浓缩、边集等异常(图2A); 模型组大鼠胃黏膜上皮细胞间连接松解, 胞膜结构部分缺失, 胞质中细胞器崩解, 基质透明, 内质网扩张, 线粒体肿胀, 胞核形态极不规则, 大量畸形核, 部分核溶解, 染色质明显边集、浓缩或均一化分布(图2B); 奥美拉唑组大鼠胃黏膜上皮细胞间连接较紧密, 胞膜结构基本完整, 胞浆中细胞器分布欠均匀, 无明显肿胀, 胞核核膜完整, 形态基本正常, 染色质部分边集(图2C); JWSNS小剂量组大鼠胃黏膜上皮细胞部分连接较松散, 胞浆线粒体部分肿胀, 基粒减少, 内质网扩张明显, 核膜尚完整, 部分染色质边集或均一分布, 部分核溶解(图2D); JWSNS中剂量组大鼠胃黏膜上皮细胞间连接较紧密, 胞膜结构基本完整, 胞浆细胞器分布尚均匀, 无明显肿胀, 胞核形态基本正常, 核染色质部分边集, 核表面欠光整(图2E); JWSNS大剂量组大鼠胃黏膜上皮细胞间连接紧密, 胞膜结构完整, 胞浆细胞器结构基本恢复正常, 胞核形态正常, 核膜完整, 染色质无明显浓缩、边集等异常(图2F).

2.4 加味四逆散作用下大鼠胃黏膜组织中GAS、VIP含量的变化 与模型组比较, 正常组、JWSNS中、大剂量组、奥美拉唑组、JWSNS小剂量组大鼠胃窦组织中GAS含量显著增高(39.23±5.54、27.52±4.28、38.27±4.18、28.30±5.53 *vs* 8.33±4.63, $P<0.01$; 15.74±4.56 *vs* 8.33±4.63, $P<0.05$), 与奥美拉唑组比较, JWSNS大剂量组胃窦组织中GAS含量增高(38.27±4.18 *vs* 28.30±5.53, $P<0.05$); 与中药小剂量组比较, 中药中、大剂量组胃窦组织中GAS含量明显升高(27.52±4.28 *vs* 8.33±4.63, $P<0.05$, 38.27±4.18 *vs* 8.33±4.63, $P<0.01$), 与模型组比较, 正常组、JWSNS大、中剂量组及奥美拉唑组大鼠胃窦组织中VIP含量降低(36.32±1.68、39.67±2.98 *vs* 89.33±4.43, $P<0.01$; 60.50±3.85、59.00±2.89 *vs* 89.33±4.43, $P<0.05$), 与奥美拉唑组比较, JWSNS大剂量组胃窦组织中VIP含量降低(39.67±2.98 *vs* 59.00±2.89, $P<0.05$); 与中药小剂量组比较, 中药中、大剂

表 2 加味四逆散作用下各组大鼠胃黏膜溃疡指数的变化 (n = 10, mean ± SD)

分组	给药剂量(g/kg)	胃黏膜溃疡指数(分)
正常组	–	0.32 ± 1.58^{b}
模型组	–	25.33 ± 4.33
加味四逆散组	2.5	13.70 ± 2.26^{a}
加味四逆散组	5.0	8.50 ± 3.88^{bce}
加味四逆散组	10.0	4.67 ± 3.08^{bdf}
奥美拉唑组	3×10^{-3}	12.00 ± 2.73^{a}

$^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$ *vs* 模型组; $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 奥美拉唑组; $^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$ *vs* 小剂量组.

■名词解释
脑肠肽：在胃肠和神经系统双重分布，调节胆囊和胆管运动的激素，包括胃动素、胆囊收缩素和促胰液素等. 脑肠肽不仅在外周广泛地调节着胃肠道的各种功能，而且在中枢也参与对胃肠道生理活动的调节.

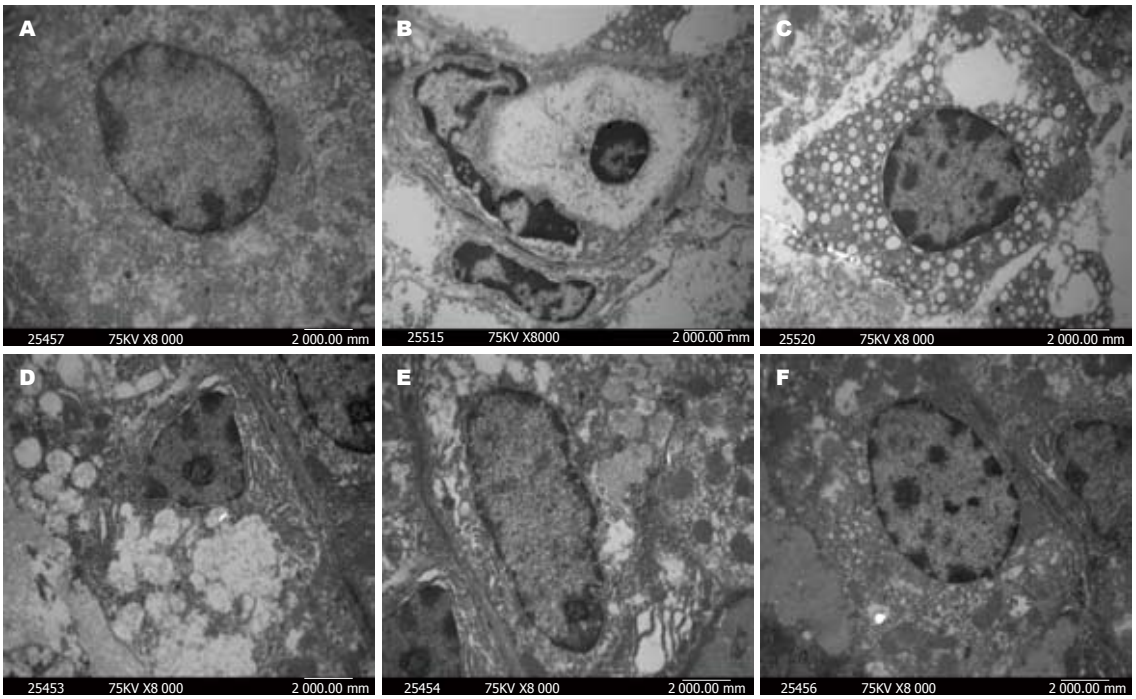


图 2 各组大鼠胃黏膜组织细胞超微病理学改变(×8 000). A: 正常组; B: 模型组; C: 奥美拉唑组; D: 加味四逆散小剂量组; E: 加味四逆散中剂量组; F: 加味四逆散大剂量组.

表 3 加味四逆散作用下各组大鼠胃组织中GAS、VIP含量的变化 (n = 10, mean ± SD)

分组	给药剂量(g/kg)	GAS(pg/mL)	VIP(pg/mL)
正常组	–	39.23 ± 5.54^{b}	36.32 ± 1.68^{b}
模型组	–	8.33 ± 4.63	89.33 ± 4.43
加味四逆散组	2.5	15.74 ± 4.56^{a}	81.70 ± 2.56
加味四逆散组	5.0	27.52 ± 4.28^{be}	60.50 ± 3.85^{ae}
加味四逆散组	10.0	38.27 ± 4.18^{bcf}	39.67 ± 2.98^{bcf}
奥美拉唑组	3×10^{-3}	28.30 ± 5.53^{b}	59.00 ± 2.89^{a}

$^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$ *vs* 模型组; $^{c}P<0.05$ *vs* 奥美拉唑组; $^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$ *vs* 小剂量组; GAS: 胃泌素; VIP: 血管活性肠肽.

量组胃窦组织中VIP含量降低(60.50±3.85 *vs* 89.33±4.43, $P<0.05$, 39.67±2.98 *vs* 89.33±4.43, $P<0.01$)(表3).

2.5 加味四逆散作用下大鼠胃肠GASR mRNA、VIPR2基因产物相对表达量变化 实时定量PCR结果显示，与模型组比较，正常组、JWSNS中、大、小剂量组及奥美拉唑组胃组织GASR mRNA表达均升高(1.00±0.10、0.53±0.03、0.62±0.05 *vs* 0.19±0.05, $P<0.01$; 0.25±0.02、0.43±0.03 *vs* 0.19±0.05, $P<0.05$)，正常组、JWSNS大、中、小剂量组及奥美拉唑组空肠组织VIPR2 mRNA表达则降低(1.00±0.20、1.15±0.33 *vs* 3.40±0.57, $P<0.01$; 1.83±0.30、2.39±0.36、1.79±0.35 *vs* 3.40±0.57, $P<0.05$)；与奥美拉唑组比较，JWSNS大剂量组胃组织GASR mRNA表达明显升高(0.62±0.05 *vs* 0.43±0.03, $P<0.05$)，而JWSNS大剂量空肠组织VIPR2 mRNA表达则明显降低(1.15±0.33 *vs* 1.79±0.35, $P<0.01$). 与中药小剂量组比较，中药中、大剂量组胃组织GASR mRNA相对表达量明显升高(0.53±0.03 *vs* 0.25±0.02, $P<0.05$; 0.62±0.05 *vs* 0.25±0.02, $P<0.01$)，空肠组织VIPR2 mRNA相对表达量明显降低(1.83±0.30 *vs* 2.39±0.36, $P<0.05$; 1.15±0.33 *vs* 2.39±0.36, $P<0.01$)(表4).

3 讨论

心理应激引发机体产生的生理学效应包括神经内分泌激活、炎症反应和自主神经功能不全等，最常见的就是急慢性胃炎及消化性溃疡. 有研究表明[7]，急、慢性精神应激导致机体内脏

表 4 加味四逆散作用下各组大鼠胃GASR mRNA和空肠VIPR2 mRNA基因相对表达量变化 (n = 10, mean ± SD)

分组	给药剂量(g/kg)	GASR mRNA	VIPR2 mRNA
正常组	–	1.00 ± 0.10^{b}	1.00 ± 0.20^{b}
模型组	–	0.19 ± 0.05	3.40 ± 0.57
加味四逆散组	2.5	0.25 ± 0.02^{a}	2.39 ± 0.36^{a}
加味四逆散组	5.0	0.53 ± 0.03^{be}	1.83 ± 0.30^{ae}
加味四逆散组	10.0	0.62 ± 0.05^{bcf}	1.15 ± 0.33^{bdf}
奥美拉唑组	3×10^{3}	0.43 ± 0.03^{a}	1.79 ± 0.35^{a}

$^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$ *vs* 模型组; $^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$ *vs* 奥美拉唑组; $^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$ *vs* 小剂量组.

■**同行评价**
本研究建立和发展了应激性动物模型, 从中医药与现代医学相结合的角度对身心应激致病进行了综合、多系统的研究, 对临床应用具有一定的指导意义.

对伤害性刺激的高反应性, 同时伴胃黏膜上皮细胞间隙增宽, 黏膜肥大细胞活化、脱颗粒和黏膜炎性反应. 应激还可致下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenocortical, HPA)轴活化, 炎性细胞因子水平增加, 诱发消化道急慢性炎性反应、黏膜屏障功能障碍和胃肠神经系统重塑, 从而使患者产生内脏高动力状态或持久疼痛, 肠易激综合征患者可以观察到类似的改变[8]. 而动物应激模型在某种程度上模拟了目前人群越来艰难的生存状况, 在应激研究领域发挥着越来越重要的作用, 对临床药物的筛选和评价, 临床疾病的发生、发展机制以及预后评估都有不可替代的作用. 本实验中, 慢性应激模型大鼠胃黏膜均发生了程度不同的溃疡, 说明应激原的作用对消化系统的影响是确切的, 也说明应激模型是成功的. 有相关研究[9]表明, 应激后大鼠胃酸异常增高, 胃液pH值降低与应激性溃疡发病关系极为密切, 本实验研究发现身心应激模型大鼠肉眼及镜下胃黏膜损伤明显, 另外, 实验结果还发现除一般的病理损伤外, 慢性应激模型大鼠胃黏膜细胞受损, 细胞水肿, 细胞膜破坏, 线粒体肿胀变性, 内质网扩张, 细胞骨架破坏, 核固缩、碎裂、溶解等, 而JWSNS可改善应激大鼠胃黏膜所处的内环境, 减轻胃黏膜损伤状况, 使大鼠受损的胃黏膜细胞超微结构得到修护, 全方表现出较好的胃黏膜细胞保护与修复作用.

脑肠肽存在于中枢神经系统、胃肠道内分泌细胞、肠道神经系统, 具有调节胃肠运动、分泌吸收等复杂的功能, 并受情绪影响[10]. 生理情况下, 脑肠肽调节胃肠运动是通过中枢神经系统及胃肠平滑肌细胞系统完成的. 根据脑肠肽效应的不同, 可将其分为兴奋和抑制两类, 前者常见的有GAS、肠内P物质(substance P, SP)及胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)等, 可致胃肠平滑肌细胞收缩; 后者以VIP、促胰液素及生长抑制素等多见, 可致胃肠平滑肌细胞舒张, 两类肽类物质共同调控胃肠运动[11]. GAS是典型的兴奋性脑肠肽, 分泌自胃窦、十二指肠黏膜开放G细胞, 主要分布于胃肠道, 通过受体介导调节和刺激胃肠运动, 可抑制自发和胃动素(motilin, MTN)等诱发的MMCⅢ(migrating myoelectrical complex, MMC)相活动. VIP主要分布于胃肠道黏膜下、肌间神经丛. 对胃肠道平滑肌运动和消化道内外分泌腺功能都有重要作用. 但需与受体结合才可产生偶联放大效应作用于平滑肌使之舒张[12]. 在应用放射配体结合的研究中发现[13], VIP可引起大鼠胃肠平滑肌细胞呈剂量依赖性舒张. 本实验表明, JWSNS可分别增加和降低应激模型大鼠胃组织中GAS和VIP含量, 增强大鼠的胃蠕动功能, 说明该方具有较好的调节胃组织中脑肠肽含量以及改善胃肠功能的作用.

脑肠肽的作用靶点为细胞表面的特异性受体, 除脑肠肽外, 胃肠功能障碍与脑肠肽受体mRNA的表达水平亦有密切关系. 脑肠肽受体分布于胃肠平滑肌细胞膜上, 亦有兴奋性和抑制性两类. 兴奋性和抑制性脑肠肽分别与相应受体结合, 可使胃肠平滑肌细胞收缩或舒张. GASR、 VIPR2分属于兴奋性和抑制性脑肠肽受体. 现已证实许多疾病的发生与GASR有关[14], 如常见的胃肠动力障碍性疾病、肿瘤、帕金森综合征及精神分裂症疾病等, 而临床研究发现[15]VIPR2与胃肠动力障碍及肿瘤的发生有密切关系. 研究发现[16], GASR可与GAS和CCKB(胆囊收缩素-B)结合调节胃酸分泌和胃肠平滑肌细胞收缩, VIP可与胃肠平滑肌细胞上特异性VIPR结合, 引起胃肠平滑肌细胞的舒张. VIPR分为VIPR1和VIPR2两型, 通过原位杂交和免疫组织化学方法发现VIPR2仅表达在胃

和十二指肠且含量较高[17]. 本实验结果显示, 身心应激方法可使GASR mRNA和VIPR2 mRNA基因相对表达量分别降低和升高. 这与脑肠肽含量变化基本一致, 进一步证实了用心身应激方法复制胃肠功能障碍大鼠模型的客观性和可行性. JWSNS可使身心应激模型大鼠胃窦组织中GASR mRNA基因相对表达量升高, VIPR2 mRNA基因相对表达量降低, 说明该方可提高胃窦组织中GASR mRNA阳性细胞表达率, 同时可降低VIPR2 mRNA阳性细胞表达率. 本研究结果JWSNS对脑肠肽和脑肠肽受体都有较好的调节作用, 提示JWSNS在胃肠道运动中具有多靶点的整体调治作用, 但是JWSNS调节脑肠肽及相关受体mRNA表达的详细途径还需进一步探讨.

中医学中, 应激性胃溃疡归属于胃痞范畴, 其机制多是由于禀赋、情志、饮食等失常致使脾胃气机不畅, 升降失司所致. 其表在胃, 但其本在肝脾. JWSNS源于张仲景的经典名方四逆散, 原方四逆散由枳实、芍药、柴胡、炙甘草组成, 主治肝气内郁、气机不畅之气逆证. 经后世医家的不断发展, 使该方的应用范围逐渐扩大, 成为调畅气机法的中医代表方剂, 凡外感或内伤杂病, 有气机不畅之病机, 即可加减化裁而用之. 而应激性胃肠功能紊乱和胃黏膜损伤除有气机郁滞的基本病机外, 湿滞血瘀, 脾胃受损也是常见的病机[18]. 因此, 我们根据目前的临床实际, 在原方调畅气机法的基础上辅以祛湿活血之药组成JWSNS. 方中以疏肝理气之柴胡、枳实为君, 臣以白芍、砂仁、白芨柔肝健脾和胃、行气调中祛湿、兼以收敛, 佐以郁金行气活血解郁, 使以炙甘草调和诸药、补脾益气. 近年来, 许多研究证明[19,20]白芍、砂仁等能明显促进胃排空、小肠推进, 如白芍甘草汤, 有研究表明其有很好的胃黏膜保护作用并可调节胃肠功能. 而其中的甘草是最广泛应用的一味中药, 甘草中所含的许多成分具有抑酸, 缓解痉挛, 预防或修复溃疡等的作用. 从上述JWSNS对慢性应激胃溃疡模型大鼠胃黏膜组织细胞超微结构及脑肠肽受体的干预作用可推测, JWSNS可使肝气正常升发, 津血能正常地输布五脏六腑, 使脾有所充、脑有所养, 中枢神经系统和局部脑肠肽调节平衡, 从而施治于相关应激性胃肠疾病, 组方真正体现了中医身心兼顾、标本同治的理念. 该实验研究的结果为JWSNS的临床推广提供了理论依据, 下一步将结合药理实验对该方进行中药化学成分及分子生物学领域的细致研究, 力争知晓有效化学成分的具体结构及作用机制, 从基因水平上探讨该方抗应激的作用机制, 这也是未来研究的主要方向之一.

4 参考文献

1 陈雅慧, 兰忠平, 惠起源. 胃肠动力障碍性疾病实验研究现状. 延安大学学报 2007; 5: 7-8

2 王晓燕, 孙建宁, 林海, 董力, 畅洪异, 王静怡. 养心开郁片对抑郁症模型大鼠行为活动的影响. 中国实验方剂学杂志 2011; 17: 200-202

3 Andersen BL, Cyranowski JM, Espindle D. Men's sexual self-schema. *J Pers Soc Psychol* 1999; 76: 645-661

4 余欣. 邱明义妙用四逆散临床经验举隅. 湖北中医杂志 2008; 30: 18-19

5 王寅, 王洪巨. 慢性心理应激大鼠模型的建立及评价研究进展. 蚌埠医学院学报 2010; 35: 206-208

6 张磊, 刘芳娥, 胡文治, 王冠, 崔洪勇, 帅世炜. 褪黑素对噪声应激大鼠胃肠传输功能的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2008; 16: 208-211

7 Pateder DB, Eliseev RA, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Okunieff P, Constine LS, Puzas JE, Rosier RN. The role of autocrine growth factors in radiation damage to the epiphyseal growth plate. *Radiat Res* 2001; 155: 847-857

8 Videlock EJ, Adeyemo M, Licudine A, Hirano M, Ohning G, Mayer M, Mayer EA, Chang L. Childhood trauma is associated with hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009; 137: 1954-1962

9 张爽, 刘海峰, 张成岗. 应激性胃黏膜损伤发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1697-1071

10 Taché Y, Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest* 2007; 117: 33-40

11 Elsenbruch S, Lucas A, Holtmann G, Haag S, Gerken G, Riemenschneider N, Langhorst J, Kavelaars A, Heijnen CJ, Schedlowski M. Public speaking stress-induced neuroendocrine responses and circulating immune cell redistribution in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2300-2307

12 King D. Why changing the guard is bracing break with tradition. *Health Soc Serv J* 1979; 89: 974-976

13 Duff GC, Galyean ML. Board-invited review: recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *J Anim Sci* 2007; 85: 823-840

14 陈苏宁, 梁靓靓, 史业东. 胃痛消痞方对脾胃虚寒型功能性消化不良大鼠胃肠动力和胃动素的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 699-702

15 Jones MP, Crowell MD, Olden KW, Creed F. Functional gastrointestinal disorders: an update for the psychiatrist. *Psychosomatics* 2007; 48: 93-102

16 Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, Scully P, O'Brien S, O'Mahony L, O'Mahony S, Shanahan F, Keeling PW. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 2006; 130: 304-311

17 高瑞梅, 许琳, 孟欣颖, 王青. 原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜胃动素、血管活性肠肽的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18: 722-725

18 刘洁莹, 张莉华, 方步武, 王成, 吴咸中. 理气开郁法板块方对慢性应激大鼠胃及下丘脑胃动素的影响. 中国中西医结合外科杂志 2009; 15: 166-169
19 卢健, 范颖, 马骥, 王丽娜, 林蔗茹, 徐丹. 四逆散及不同配伍干预溃疡性结肠炎的研究. 中国实验方剂学杂志 2010; 16: 109-112
20 张洪峰, 薛英威. 应激状态下胃黏膜损伤与胃排空及胃酸分泌的关系. 中华胃肠外科杂志 2008; 11: 472-476

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

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咨询, 编务将在1个工作日内回复.

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

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

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

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

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

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

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

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一. 为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章四月内完成. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2882-2887
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

益生菌对阿司匹林致大鼠急性胃黏膜损伤的作用机制

高 欣, 张振玉, 吴海露, 陈菲菲, 杨小兵, 王劲松

■背景资料
人体的胃腔由于酸性内环境和胃蠕动, 不利于大多数微生物的定植, 但仍有部分耐酸的菌群能够定植于胃腔, 对维持胃内微生态平衡起重要作用.

高欣, 张振玉, 吴海露, 陈菲菲, 南京医科大学附属南京医院消化科 江苏省南京市 210006
杨小兵, 王劲松, 南京医科大学附属南京医院病理科 江苏省南京市 210006
高欣, 硕士, 主要从事胃黏膜损伤与保护的研究.
作者贡献分布: 此课题由高欣与张振玉设计; 研究操作过程及论文撰写由高欣完成; 资金提供、课题申请由张振玉完成; 数据分析由吴海露与陈菲菲完成; 病理及免疫组织化学染色操作由杨小兵与王劲松完成.
通讯作者: 张振玉, 主任医师, 210006, 江苏省南京市长乐路68号, 南京医科大学附属南京医院消化科.
ahwangzhibing776@163. com
电话: 025-87726246
收稿日期: 2012-08-23 修回日期: 2012-09-16
接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-28

Protective effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions in rats

Xin Gao, Zhen-Yu Zhang, Hai-Lu Wu, Fei-Fei Chen, Xiao-Bing Yang, Jin-Song Wang

Xin Gao, Zhen-Yu Zhang, Hai-Lu Wu, Fei-fei Chen, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Xiao-Bing Yang, Jin-Song Wang, Department of Pathology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Zhen-Yu Zhang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 68 Changle Road, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. ahwangzhibing776@163. com
Received: 2012-08-23 Revised: 2012-09-16
Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-28

Abstract

AIM: To determine the protective effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions in rats.

METHODS: Forty healthy male SD rats were randomly and equally divided into four groups: normal group, injury group, and two probiotics groups (bifico group and bioflor group). Gastric mucosal lesions were induced by gastric gavage of aspirin (150 mg/kg). Rats of probiotics groups were pretreated with probiotics before induction of gastric mucosal lesions. Gastric histological changes were evaluated under a microscope. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the distribution and expression of gastric epithelial tight junction protein occludin. The expression of phosphorylated-p38 (p-p38) was determined by Western blot.

RESULTS: Compared to the injury group, lesion indices were significantly decreased in the probiotics groups (18.4 ± 3.69, 17.1 ± 3.84 *vs* 25.8 ± 4.94, both $P < 0.05$). The expression level of occludin in the injury group was decreased significantly compared to the normal group ($P < 0.05$). However, the expression levels of occludin in the two probiotics groups were significantly higher than that in the injury group (both $P < 0.05$). Phosphorylation of p38 was more obvious in the injury group than in the normal group ($P < 0.05$). Pretreatment with probiotics significantly inhibited the phosphorylation of p38 ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Probiotics have a protective effect on aspirin-induced gastric mucosal lesions in rats probably by increasing the expression of tight junction protein occludin via the p38 signaling pathway.

Key Words: Probiotics; Aspirin; Gastric mucosal lesions; Occludin; MAPK

Gao X, Zhang ZY, Wu HL, Chen FF, Yang XB, Wang JS. Protective effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2882-2887

摘要

目的: 研究益生菌对阿司匹林引起的大鼠急性胃黏膜损伤的影响及其机制.

方法: 40只健康♂SD大鼠随机分为4组, 每组10只: 对照组、损伤组、培菲康组和亿活组. 培菲康和亿活组的大鼠分别用相应益生菌制剂灌胃进行预处理, 然后将除对照组以外所有大鼠以150 mg/kg阿司匹林灌胃造成急性胃黏膜损伤; 分别测定各组大鼠的胃黏膜损伤指数(lesion index, LI); 观察大鼠胃黏膜组织学变化; 免疫组织化学法检测各组胃黏膜上皮紧密连接蛋白Occludin的表达情况; 免疫蛋白印迹法(Western blot)检测紧密连接蛋白Occludin和

■同行评议者
唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

MAPK信号通路中磷酸化p38蛋白的表达量.

结果: 与损伤组相比, 两组益生菌组(培菲康组和亿活组)胃黏膜损伤较损伤组均减轻(18.4±3.69、17.1±3.84 *vs* 25.8±4.94, $P<0.05$); 大鼠胃黏膜中的紧密连接蛋白Occludin在损伤组的表达与对照组相比下降($P<0.05$), 而在两组益生菌组中的表达则较损伤组增加($P<0.05$); 大鼠胃黏膜中磷酸化p38蛋白在损伤组的表达与对照组相比增加($P<0.05$), 而在两组益生菌组中的表达则较损伤组下降($P<0.05$).

结论: 益生菌制剂培菲康和亿活对阿司匹林引起的大鼠急性胃黏膜损伤均具有明显保护作用, 其机制可能与通过MAPK中的p38信号通路上调胃黏膜上皮黏膜紧密连接蛋白Occludin的表达进而增强了大鼠胃黏膜的物理屏障功能有关.

关键词: 益生菌; 阿司匹林; 胃黏膜损伤; Occludin蛋白; MAPK信号通路

高欣, 张振玉, 吴海露, 陈菲菲, 杨小兵, 王劲松. 益生菌对阿司匹林致大鼠急性胃黏膜损伤的作用机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2882–2887

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2882.asp

0 引言

阿司匹林为常见的非甾体类抗炎药(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs), 具有抗血小板凝集的作用, 广泛用于心脑血管疾病的预防. 在长期使用阿司匹林的患者中, 消化性溃疡、消化道出血等胃肠道不良反应发生率明显升高, 已引起了临床医师的关注[1-3]. 临床多用质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)预防, 有研究显示联合质子泵抑制剂有增加急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者死亡率和再住院风险[4-8]. 相关研究已经证实, 益生菌对各种原因引起的肠道黏膜损伤具有预防保护作用, 而关于益生菌对胃黏膜损伤尤其是NSAIDs相关性胃黏膜损伤影响的报道较少. 培菲康和亿活均为临床广泛使用的益生菌制剂, 本实验研究培菲康和亿活对阿司匹林引起的大鼠急性胃黏膜损伤的影响, 并初步探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康♂SD大鼠40只, 体质量200 g±15 g, 由南京医科大学附属南京医院动物实验中心提供, 每日光照12 h, 22 ℃恒温环境下常规饲料喂养. 阿司匹林原料药(批号0702285), 购自山东新华制药股份有限公司; 双歧杆菌三联活菌散(商品名: 培菲康, 批号: 20110726)由上海信谊药厂有限公司馈赠, 每1 g药粉含活菌数不低于5×10^7 CFU; 布拉氏酵母菌散(商品名: 亿活, 产品批号: 1269)由法国百科达制药厂(BIOCODEX)制造, 深圳市康哲药业有限公司馈赠, 每1 g药粉含活菌数不低于1.3×10^9 CFU; 临用前阿司匹林、培菲康和亿活分别按每0.03 g、0.21 g和0.25 g溶于2 mL 0.5%羧甲基纤维素钠(carboxyl methyl cellulose, CMC)溶液中, 制成悬浊液. β-actin抗体购自Santa Cruz公司, Occludin、磷酸化p38(p-p38)抗体购自cell signal公司.

1.2 方法

1.2.1 动物分组: 将40只大鼠适应性饲养1 wk后, 随机分为对照组、损伤组、培菲康干预组和亿活干预组4组, 每组10只.

1.2.2 动物实验: 实验第1-10天, 对照组、损伤组予2 mL 0.5%CMC溶液进行灌胃, 培菲康干预组和亿活干预组分别予培菲康和亿活溶液2 mL进行灌胃, 2次/d; 第10天灌胃后, 所有大鼠禁食不禁水18 h. 禁食结束后, 对照组予以CMC溶液2 mL灌胃, 其他所有大鼠予阿司匹林溶液2 mL灌胃1次. 阿司匹林灌胃4 h后, 以10%水合氯醛行腹腔注射麻醉处死大鼠, 取胃组织标本.

1.2.3 胃黏膜损伤指数判定: 将大鼠胃组织沿大弯侧剪开后, 以生理盐水洗净展平, 在解剖显微镜(×10)下将所有损伤按Guth[9]标准累积计算损伤指数(Lesion index, LI): 斑点样损伤 = 1分, 损伤直径(长度)<1 mm为2分, 损伤直径(长度)1-2 mm为3分, 损伤直径(长度)2-4 mm为4分, 损伤直径(长度)>4 mm为5分, 宽度>2 mm的损伤积分值×2.

1.2.4 组织学观察: 胃组织经4%中性甲醛固定24 h, 经常规脱水、透明、石蜡包埋切片, HE染色, 光镜下观察.

1.2.5 Occludin免疫组织化学染色: 采用Envision法进行免疫组织化学染色, 观察根据阳性细胞的百分比进行综合判定: 阳性细胞数<10%为阴性(-), 10%-20%为弱阳性(+), 20%-50%为中等阳性(++), >50%为强阳性(+++).

1.2.6 Western blot检测胃组织Occludin和p-p38蛋白表达水平: 取约100 mg胃黏膜层组织, 加入蛋白裂解液, 4 ℃裂解, 10 000 r/min离心15 min, 取上清为全蛋白提取物. 将蛋白提取物与蛋白上样缓冲液混合, 煮沸5 min, 分装保存于-80 ℃冰箱. 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜, 封闭后加入一抗4 ℃过夜. 再加入辣根过氧化物酶标记的二

■研发前沿
相关研究已经证实, 益生菌对各种原因引起的肠道黏膜损伤具有预防保护作用, 而关于益生菌对胃黏膜损伤尤其是非甾体类抗炎药(NSAIDs)相关性胃黏膜损伤影响的报道较少.

■相关报道
Lam等多位研究者已经通过动物实验发现, 益生菌对大鼠胃黏膜损伤具有一定的保护作用.

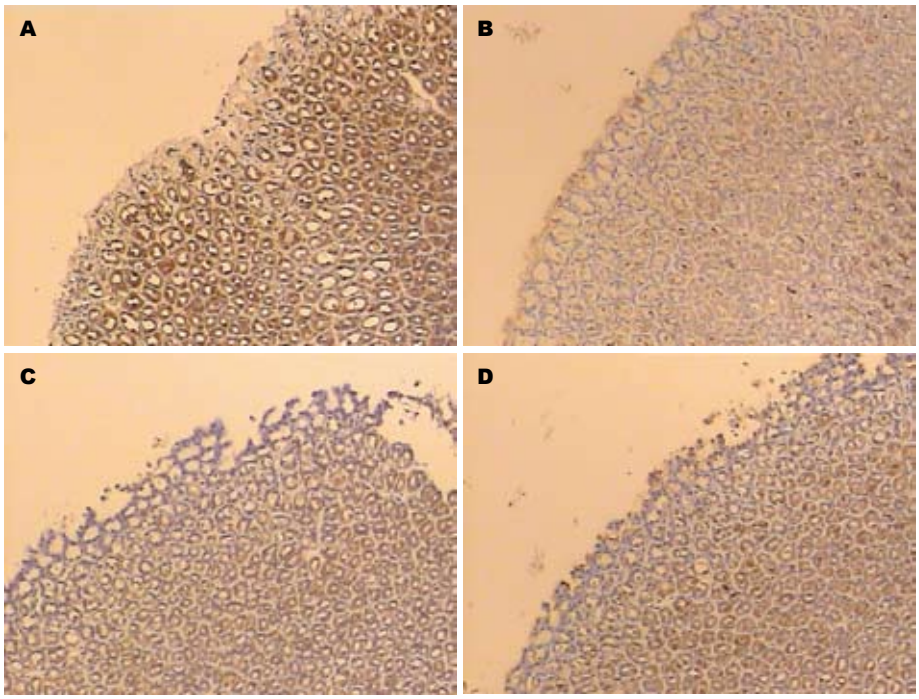


图 1 各组胃黏膜上皮细胞Occludin蛋白表达(×100). A: 阴性对照组; B: 阿司匹林损伤组; C: 培菲康组; D: 亿活组.

抗, 孵育后ECL法显色于X光片后照相, 以β-actin作为内参, 使用Image J 1.44p软件分析处理. 各组蛋白表达水平均以实际灰度值/β-actin灰度值的比值来表示.

统计学处理 采用SPSSv17.0软件进行处理及分析, 实验数据用mean±SD表示, 多组间比较采用One-way ANOVA分析, 两组间比较采用*t*检验, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组大鼠胃组织大体和病理变化 实验中未出现大鼠死亡的情况. 通过胃组织大体和病理切片观察, 对照组大鼠均呈正常胃黏膜表现, 而其他经阿司匹林灌胃的大鼠胃黏膜则观察到不同程度的急性胃黏膜病变, 实验造模成功. 损伤组胃腺部黏膜充血水肿明显, 可见多处条状、点状出血及糜烂形成; 培菲康组和亿活组损伤程度和损伤面积均较损伤组减轻, 胃黏膜呈轻度充血水肿, 仅可见少数小片状及点状出血. 各组大鼠胃黏膜LI见表1. 损伤组可见黏膜结构失去完整性及连续性, 可见大片状坏死病灶, 且深入黏膜深层, 腺体结构破坏, 并可见炎性细胞浸润; 培菲康组和亿活组病变较损伤组减轻, 只在黏膜浅层可见部分小片状坏死病灶, 各层结构排列基本整齐, 未见明显的炎性细胞浸润.

2.2 胃组织Occludin蛋白免疫组织化学染色 Occludin蛋白连续分布于胃黏膜上皮细胞的边缘, 主要定位于细胞膜和细胞质. 对照组强阳性表达率为90%(9/10); 损伤组蛋白分布不均, 染色较弱, 强阳性表达率均显著低于对照组, 为10%(1/10); 培菲康组和亿活组强阳性表达率较损伤组均增加, 分别为40%(4/10)和50%(5/10)(图1, 表2).

表 1 各组大鼠胃黏膜损伤指数变化 (n = 10)

分组	损伤指数
对照组	0
损伤组	25.8 ± 4.94
培菲康组	18.4 ± 3.69[a]
亿活组	17.1 ± 3.84[c]

[a]$P<0.01$ *vs* 损伤组; [c]$P<0.01$ *vs* 损伤组.

表 2 免疫组织化学胃黏膜组织Occludin蛋白表达水平 (n = 10)

分组	阳性率分级			
	−	+	+ +	+ + +
对照组	0	1	0	9
损伤组	1	6	2	1
培菲康组	0	2	4	4
亿活组	0	2	3	5

2.3 Western blot结果分析 以β-actin为内参, Occludin蛋白条带出现在65 kDa, p-p38蛋白条带出现在38 kDa, 对各条带进行灰度分析发现: Occludin蛋白的Western blot检测结果与免疫组织化学结果一致, 对照组蛋白表达较对照组明显下降($P<0.05$), 而两组益生菌组蛋白表达与对照

表 3 各组大鼠胃黏膜中Occludin/β-actin和p-p38/β-actin平均灰度值

	对照组	损伤组	培菲康组	亿活组
Occludin	1.16 ± 0.22	0.19 ± 0.05[a]	0.66 ± 0.13[c]	0.71 ± 0.12[e]
p-p38	0.16 ± 0.04	1.51 ± 0.33[a]	0.79 ± 0.22[c]	0.64 ± 0.13[e]

[a]P<0.05 *vs* 对照组; [c]P<0.05 *vs* 对照组; [e]P<0.05 *vs* 对照组.

■**创新盘点**
目前国内关于益生菌对胃黏膜保护的相关报道较少, 该文通过动物实验进行证实, 并对其可能机制进行了初步研究.

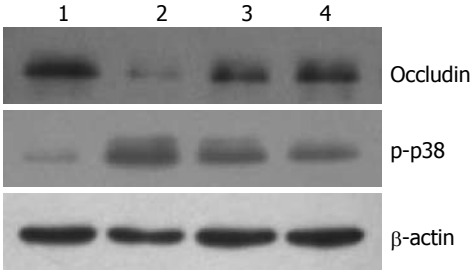


图 2 Western blot检测各组胃黏膜中Occludin和p-p38蛋白的表达. 1: 对照组; 2: 损伤组; 3: 培菲康组; 4: 亿活组.

组相比均增加(P<0.05); p-p38蛋白在对照组弱表达, 而在损伤组明显表达增加(P<0.05), 两组益生菌组的表达情况较损伤组均下降(P<0.05, 图2, 表3).

3 讨论

胃肠道黏膜屏障包括物理屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障. 由包含益生菌在内的微生态系统形成了胃肠道第一道非特异性的生物屏障, 能够控制消化道各种内源性条件致病菌的定植, 同时具有局部和全身的免疫调节作用, 对胃肠道黏膜屏障功能起重要作用.

人体的胃腔由于酸性内环境和胃蠕动, 不利于大多数微生物的定植, 但仍有部分耐酸的菌群能够定植于胃腔, 对维持胃内微生态平衡起重要作用. 在本研究中使用的培菲康为双歧杆菌三联活菌散, 乳酸杆菌为其主要成分之一; 而亿活则是以布拉氏酵母菌为主的活菌散剂. 研究已证实, 乳酸杆菌和酵母菌为胃内的主要常住菌, 是维持胃内微生态平衡的重要力量[10]. 本实验通过大剂量阿司匹林制造大鼠急性胃黏膜损伤的模型, 分别以培菲康和亿活对大鼠进行损伤前预处理, 结果发现经过培菲康或亿活预处理的大鼠胃黏膜损伤程度较损伤组明显减轻.

其他研究者采用不同的菌株, 也证实益生菌对胃黏膜具有保护作用[11-16], 其中Lam等[12]的研究发现, 益生菌能够增强胃黏膜的跨黏膜电阻(transmucosal resistance, TMR), 即益生菌具有直接增强胃黏膜上皮的屏障功能的作用.

胃黏膜物理屏障是构成胃黏膜屏障功能的结构基础, 而紧密连接是物理屏障中重要的组成. 紧密连接复合体包括紧密连接蛋白、黏附因子和桥粒, 紧密连接蛋白Occludin为其中重要的组成之一[17-20]. 我们这前的研究已经证实当人胃黏膜上皮细胞间的紧密连接受到破坏时, Occludin蛋白的表达明显下降[21,22]; 国外学者已经证实益生菌对肠道黏膜屏障功能, 尤其是紧密连接结构具有促进作用[23-25]. 而本实验中的免疫组织化学和Western blot结果提示了益生菌对大鼠胃黏膜组织紧密连接蛋白Occludin的表达具有促进恢复的作用: 胃黏膜被阿司匹林损伤后, Occludin蛋白的表达下降; 而益生菌处理组的下降程度则明显减轻. Occludin蛋白的正常表达对维持的黏膜正常屏障功能具有重要意义, 其表达水平下降可致紧密连接结构和功能异常, 进而影响黏膜物理屏障功能[26]. 因此我们认为, 在胃黏膜损伤过程中益生菌能减轻紧密连接损伤并促进其修复.

p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)是细胞内分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)3条主要信号通路之一. 磷酸化p38(p-p38)是p38蛋白的磷酸化形式, 其表达水平反映了p38蛋白的磷酸化水平. 本研究通过Western blot方法对各组大鼠胃黏膜中p-p38蛋白进行检测, 实验结果提示了p38蛋白磷酸化水平与益生菌胃黏膜保护作用之间存在关联, 胃黏膜损伤时p38蛋白磷酸化增强; 而益生菌的预处理则使p38蛋白磷酸化的程度有所降低. 相关研究也同样证实, p38 MAPK信号通路在调控胃黏膜上皮的损伤及修复过程中起重要作用[27-30], 而且这样的作用与调节黏膜上皮紧密连接蛋白的表达存在密切关系. Oshima等[28]和Kevil等[29]的研究均发现p38 MAPK信号通路调节上皮黏膜细胞间紧密连接蛋白的表达. 结合实验结果, p38 MAPK信号通路参与了本实验中胃黏膜损伤和保护的过程, 具体可能是通过调节紧密连接蛋白Occludin蛋白表达水平而实现的.

■应用要点
本文为益生菌制剂提供了新的的临床应用领域, 为NSAIDs相关性胃黏膜损伤治疗提供了新的思路.

总之, 益生菌对胃黏膜损伤的保护作用, 不仅由于其生物屏障的功能, 而且与其增强胃黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白Occludin的表达, 从而增强胃黏膜物理屏障功能有关, 可能是通过抑制MAPK中的p38蛋白的磷酸化水平实现的. 本实验只是对益生菌与胃黏膜物理屏障之间的关系进行了初步探索, 两者之间的关联仍需进一步研究证实.

4 参考文献

1 Lanas A, García-Rodríguez LA, Arroyo MT, Gomollón F, Feu F, González-Pérez A, Zapata E, Bástida G, Rodrigo L, Santolaria S, Güell M, de Argila CM, Quintero E, Borda F, Piqué JM. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut* 2006; 55: 1731-1738

2 de Abajo FJ, García Rodríguez LA. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with low-dose aspirin as plain and enteric-coated formulations. *BMC Clin Pharmacol* 2001; 1: 1

3 Taha AS, Angerson WJ, Prasad R, McCloskey C, Gilmour D, Morran CG. Clinical trial: the incidence and early mortality after peptic ulcer perforation, and the use of low-dose aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 878-885

4 Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, Szmitko PE, Austin PC, Tu JV, Henry DA, Kopp A, Mamdani MM. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ* 2009; 180: 713-718

5 Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED, Rumsfeld JS. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA* 2009; 301: 937-944

6 Gilard M, Arnaud B, Le Gal G, Abgrall JF, Boschat J. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2508-2509

7 Small DS, Farid NA, Payne CD, Weerakkody GJ, Li YG, Brandt JT, Salazar DE, Winters KJ. Effects of the proton pump inhibitor lansoprazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel. *J Clin Pharmacol* 2008; 48: 475-484

8 Fontana P, Senouf D, Mach F. Biological effect of increased maintenance dose of clopidogrel in cardiovascular outpatients and influence of the cytochrome P450 2C19*2 allele on clopidogrel responsiveness. *Thromb Res* 2008; 121: 463-468

9 Guth PH, Paulsen G. Aspirin-induced gastric injury in the rat: histologic changes and sucralfate cytoprotection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987; 184: 423-428

10 Coconnier MH, Liévin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin AL. Antibacterial effect of the adhering human Lactobacillus acidophilus strain LB. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1046-1052

11 Gotteland M, Cruchet S, Verbeke S. Effect of Lactobacillus ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 11-17

12 Lam EK, Tai EK, Koo MW, Wong HP, Wu WK, Yu L, So WH, Woo PC, Cho CH. Enhancement of gastric mucosal integrity by Lactobacillus rhamnosus GG. *Life Sci* 2007; 80: 2128-2136

13 Lam EK, Yu L, Wong HP, Wu WK, Shin VY, Tai EK, So WH, Woo PC, Cho CH. Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG enhances gastric ulcer healing in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 565: 171-179

14 Senol A, Isler M, Karahan AG, Kilic GB, Kuleasan H, Kaya S, Keskin M, Goren I, Saritas U, Aridogan BC, Delibas N. Preventive effect of probiotics and α-tocopherol on ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *J Med Food* 2011; 14: 173-179

15 Senol A, Işler M, Karahan AG, Kiliç GB, Kuleaşan H, Gören I, Saritaş U, Kaya S, Cırış M, Aktürk O, Aridoğan BC, Demırın H, Cakmakçi LM. Effect of probiotics on aspirin-induced gastric mucosal lesions. *Turk J Gastroenterol* 2011; 22: 18-26

16 Akama F, Nishino R, Makino S, Kobayashi K, Kamikaseda K, Nagano J, Koga Y. The effect of probiotics on gastric mucosal permeability in humans administered with aspirin. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 831-836

17 Jankowski JA, Bedford FK, Boulton RA, Cruickshank N, Hall C, Elder J, Allan R, Forbes A, Kim YS, Wright NA, Sanders DS. Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis. *Lab Invest* 1998; 78: 1155-1167

18 Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000; 118: 1001-1011

19 North AJ, Bardsley WG, Hyam J, Bornslaeger EA, Cordingley HC, Trinnaman B, Hatzfeld M, Green KJ, Magee AI, Garrod DR. Molecular map of the desmosomal plaque. *J Cell Sci* 1999; 112: 4325-4336

20 Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 301-309

21 张弓羽, 张振玉, 姜宗丹, 何邦顺, 胡可伟. 阿司匹林对人胃黏膜上皮细胞生长和Occludin蛋白表达的影响及其机制研究. 胃肠病学 2011; 16: 400-403

22 高欣, 吴海露, 张振玉, 胡可伟, 姜宗丹, 杨小兵, 王劲松. 氯吡格雷对大鼠急性胃黏膜损伤愈合的影响及机制. 世界华人消化杂志 2012; 20: 861-865

23 Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruewer M. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1140-G1149

24 Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC. Lactobacillus plantarum MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* 2010; 10: 316

25 Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of Escherichia coli Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* 2007; 9: 804-816

26 Schulzke JD, Fromm M. Tight junctions: molecular structure meets function. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 1-6

27 Jia YT, Wei W, Ma B, Xu Y, Liu WJ, Wang Y, Lv KY, Tang HT, Wei D, Xia ZF. Activation of p38 MAPK by reactive oxygen species is essential in a rat model of stress-induced gastric mucosal injury. *J Immunol* 2007; 179: 7808-7819
28 Oshima T, Miwa H, Joh T. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C800-C806
29 Kevil CG, Oshima T, Alexander JS. The role of p38 MAP kinase in hydrogen peroxide mediated endothelial solute permeability. *Endothelium* 2001; 8: 107-116
30 Dai C, Zhao DH, Jiang M. VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier in vivo and in vitro via the p38 and ERK signaling pathways. *Int J Mol Med* 2012; 29: 202-208

■同行评价
该文设计合理, 实验方法较为经典, 证据可靠, 为活菌制剂在临床应用中提供了客观的实验依据.

编辑 田滢 电编 闫晋利

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2888-2894
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

ETV1转录因子在胃肠道间质瘤中的作用

李强, 徐龙

■背景资料
胃肠道间质瘤(GIST)是胃肠道最常见的间叶组织肿瘤, 主要由*kit*或*pdgfra*基因突变(*kit*或*pdgfra*是酪氨酸激酶受体)导致的酪氨酸激酶持续活化引起.

李强, 徐龙, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
李强, 主要从事胃肠动力学的研究.
江西省卫生厅科技计划基金资助项目, No. 20081028
江西省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. GTT09114
作者贡献分布: 本课题由徐龙设计; 研究过程由李强与徐龙共同操作完成; 数据分析和论文写作由李强完成.
通讯作者: 徐龙, 副教授, 330006, 江西省南昌市东湖区永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科.
dlxulong@yahoo.com.cn
收稿日期: 2012-08-06 修回日期: 2012-08-24
接受日期: 2012-09-20 在线出版日期: 2012-10-28

ShRNA-mediated down-regulation of the ETV1 transcription factor gene reduces invasive ability of gastrointestinal stromal tumor-T1 (GIST-T1) cells

Qiang Li, Long Xu

Qiang Li, Long Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Supported by: the Scientific and Technological Project of Jiangxi Health Department, No. 20081028; and the Scientific and Technological Research Project of Jiangxi Education Department, No. GTT09114
Correspondence to: Long Xu, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Street, Donghu District, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. dlxulong@yahoo.com.cn
Received: 2012-08-06 Revised: 2012-08-24
Accepted: 2012-09-20 Published online: 2012-10-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of shRNA-mediated knockdown of the ETV1 transcription factor gene on the invasive ability of gastrointestinal stromal tumors-T1 (GIST-T1) cells.

METHODS: A recombinant lentiviral vector carrying a shRNA targeting the *etv1* gene (PLVX-shRNA-ETV1) was constructed and used to infect GIST-T1 cells. GIST-T1 cells were divided into three groups: blank control group, negative control group (PLVX-shRNA), and experimental group (PLVX-shRNA-ETV1). After infection, expression of ETV1 protein was detected by Western blot, cell invasion was detected by Transwell assay, and expression of C-kit and MMP-2 proteins was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Expression of ETV1 protein was significantly decreased in cells infected with the PLVX-shRNA-ETV1 vector compared to other groups. The number of cells passing through the martrigel-coated Transwell membrane was significantly lower in the experimental group than in the blank control group and negative control group (60.2000 ± 4.8503 *vs* 166.2000 ± 14.4201, 142.2000 ± 4.3787, both $P < 0.05$). Expression of C-kit and MMP-2 proteins was significantly lower in the experimental group than in the blank control group and negative control group (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: ShRNA-mediated knockdown of the ETV1 transcription factor significantly reduces invasive ability of GIST-T1 cells.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumors; ETV1; C-kit; MMP-2

Li Q, Xu L. ShRNA-mediated down-regulation of the ETV1 transcription factor gene reduces invasive ability of gastrointestinal stromal tumor-T1 (GIST-T1) cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2888-2894

摘要

目的: 探讨在胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)细胞中, 通过体外构建干扰*etv1*基因的shRNA载体, 干扰ETV1表达, 观察对其侵袭力的影响.

方法: 体外构建干扰*hetv1*基因的shRNA慢病毒载体, 感染GIST-T1细胞. 设立空白组, 阴性对照组(PLVX-shRNA组)和实验组(PLVX-shRNA-ETV1组), 用Western blot对合成的靶点进行筛选, 采用体外侵袭力试验(Transwell法)和细胞免疫组织化学法检测感染前后细胞侵袭力和蛋白表达的影响.

结果: 实验组中PLVX-shRNA-ETV1-3亚组hETV1蛋白表达与其他组相比, 其表达量最少.

■同行评议者
王文跃, 主任医师, 中日友好医院普通外科

在体外侵袭力实验中, 实验组穿过滤膜微孔细胞数明显少与空白组及阴性对照组, 有显著性差异(P<0.05); 同时在细胞免疫组织化学试验中, 实验组c-Kit蛋白及MMP-2蛋白表达比空白组及阴性对照组少, 有显著性差异(P<0.05).

结论: 通过体外干扰ETV1转录因子, GIST-T1细胞的体外侵袭力明显减弱, 从而影响GIST的发展和转移.

关键词: 胃肠道间质瘤; ETV1; c-Kit; MMP-2

李强, 徐龙. ETV1转录因子在胃肠道间质瘤中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2888-2894
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2888.asp

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是胃肠道最常见的间叶组织肿瘤, 主要由*kit*或*pdgfra*基因突变(*kit*或*pdgfra*是酪氨酸激酶受体), 导致酪氨酸激酶持续的活化引起细胞增殖分化失控导致GIST. 目前, 临床针对突变的*kit*或*pdgfra*基因为干扰靶点研发的药物, 比如: 伊马替尼等抗肿瘤药物, 但是由于突变的*kit*或*pdgfra*基因存在多位点和二次突变的现象, 从而导致抗肿瘤药物的耐药, 这就需要我们寻找新的GIST干预靶点, 从而改善GIST的治疗和预后. ETV1是转录因子ETS家族的成员之一, 高表达于GIST, 在调节GIST的基因转录中, ETV1是一个很主要的调节因子. 本研究体外构建干扰*etv1*基因的shRNA载体, 干扰ETV1表达, 观察对GIST的侵袭力的影响, 以期找到新的GIST治疗靶点.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃肠道间质瘤细胞株GIST-T1由上海拜力生物科技有限公司提供; 高糖的DMEM培养基、胎牛血清(美国Hyclone公司); 兔抗人的ER81单克隆抗体(英国ABCAM公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(北京中杉生物公司), β-Actin抗体(英国ABCAM公司); Transwell小室(8.0 μm孔径PC膜, 美国Corning公司), 基质胶(Matrigel, 美国BD公司), 趋化因子(FN, 美国BD公司), 牛血清白蛋白(BSA, 美国AMRESCO公司); c-Kit及MPP-2抗体(北京中杉生物公司); CO_2培养箱(Sanyo公司), 超净工作台(苏州半导体设备厂), Olympus倒置显微镜及成像系统IX71(日本Olympus公司), Bio-Rad DNA电泳系统Sub-Cell GT Cell电泳槽(美国Bio-Rad公司), Bio-Rad蛋白电泳系统Mini-PROTEAN3电泳槽(美国Bio-Rad公司), Bio-Rad半干转膜仪(美国Bio-Rad公司), Bio-Rad凝胶成像系统Gel Imager, Gel-Doc(美国Bio-Rad公司), MicroChemi化学发光成像仪(以色列DNR公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: GIST-T1用含10%胎牛血清的高糖的DMEM培养基置于37 ℃恒温、50 mL/L CO_2的饱和湿度培养箱中培养.

1.2.2 *hetv1*基因沉默慢病毒质粒的构建: 根据*hetv1*基因序列设计4条shRNA, 从invitrogen公司合成shRNA片段如下: shRNA-hETV1-1: 5'-GGAAACATGGCTTGCAGAAGC-3'; shRNA-hETV1-2: 5'-GCAGTCAAGAACAGCCCTT-TA-3'; shRNA-hETV1-3: 5'-GCAGAACAGAAGG CTGTATGT-3'; shRNA-HetV1-4: 5'-GCTCTTCT-GGATGACCCTTCA-3'. 分别用100 μL退火Buffer(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0)充分溶解合成DNA片段. 分别对应各取2 mL DNA引物片段(如hAQP8-1-F与hAQP8-1-R)+16 μL退火Buffer, 充分混匀, 100 ℃退火自然冷却至室温. 各取1 μL退火产物+99 μL无菌水稀释100倍. 载体PLVX-shRNA2-m用限制性内切酶*Pst* Ⅰ酶切, 然后用Klenow酶补平, 限制性内切酶*BamH* Ⅰ第二次酶切. 琼脂糖凝胶回收酶切大片段. 质粒PLVX-shRNA2-m回收大片段与hETV1的shRNA稀释退火产物的连接, 22 ℃水浴反应过夜. 各取10 μL过夜连接产物转化100 μL JM109感受态细胞, 将连接产物与感受态细胞混匀后冰浴30 min, 42 ℃热激45 s, 立即置冰上放置2 min, 加入预热至室温的400 μL LB培养基, 200 r/min, 37 ℃恒温摇床培养1 h, 4 000 r/min离心1 min, 弃去400 μL培养上清, 剩余100 μL用移液器混匀后均匀涂布于含100 μg/mL Ampicillin抗性的LB平板上, 37 ℃恒温培养箱倒置培养过夜. 分别挑取4-6个单菌落接种于含5 mL 100 μg/mL Ampicillin抗性的LB培养液中, 250 r/min, 37 ℃恒温摇床培养过夜, 用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒, 并分别用*Xho* Ⅰ酶切鉴定, 挑取酶切鉴定正确的菌液测序, 测序引物为U6-F: 5'-TACGATACAAGGCT-GTTAGAGAG-3'. 用Qiagen大规模质粒抽提试剂盒提取测序结果正确的质粒PLVX-shRNA2-hETV1-1、PLVX-shRNA2-hETV1-2、PLVX-shRNA2-hETV1-3和PLVX-shRNA2-hETV1-4.

1.2.3 转染: 病毒感染前24 h将细胞置于12孔板.

■研发前沿

目前临床针对突变的*kit*或*pdgfra*基因为干扰靶点研发的抗肿瘤药物有伊马替尼等, 但是由于突变的*kit*或*pdgfra*基因存在多位点和二次突变的现象, 从而导致抗肿瘤药物的耐药, 这就需要我们寻找新的GIST干预靶点, 从而改善GIST的治疗和预后.

■相关报道
Chi等研究发现, ETV1在胃肠道间质瘤和伊马替尼的敏感和耐药的GIST细胞株中普遍高表达, 促进其生长和增殖.

加入1 mL适当的完全培养基(含有血清和抗生素)孵育过夜. 在转染当天细胞应该达到约50%, 准备完全培养基和Polybrene混合物, Polybrene终浓度为: 8 μg/mL. 移去培养基并添加1 mL Polybrene/培养基混合物于每孔中, 在室温下溶化慢病毒颗粒, 使用前轻轻混匀. 培养液中加入shRNA慢病毒颗粒以感染细胞, 轻轻振动培养板使其混匀并孵育过夜. 8 h(<12 h)后移去培养液并添加1 mL完全培养基(不含Polybrene). 孵育细胞过夜. 48-72 h在免疫荧光显微镜下观察转染情况.

1.2.4 Western blot筛选hETV1-shRNA: 接种GIST细胞到六孔板中, 每个孔接种5×10^5个细胞, 37 ℃、50 mL/L CO_2培养箱培养过夜. 用脂质体转染Lipofectamine 2000分别转染质粒PLVX-shRNA2-hETV1-1、PLVX-shRNA2-hETV1-2、PLVX-shRNA2-hETV1-3和PLVX-shRNA2-hETV1-4到GIST细胞中, 6 h后换液, 37 ℃、50 mL/L CO_2, 培养箱培养过夜. 培养48 h后收集细胞, 各用100 μL RIPA Buffer消化30 min, 100 ℃孵育10 min, 于4 ℃, 15 000 r/min离心10 min弃去沉淀, 保留上清于EP管中, -20 ℃冰箱保存. 为确保每个蛋白样品的上样量一致, 用Brandford蛋白浓度测定试剂盒测定每个蛋白样品的蛋白浓度, 15%的凝胶配置, 在收集的蛋白样品中加入5×SDS-PAGE缓冲液, 沸水浴中加热5-10 min, 以充分变性蛋白, 冷却到室温后, 12 000 r/min离心5 min, 把蛋白样品上样到SDS-PAGE胶加样孔内, 100V, 120 min电泳. 到预计的蛋白已经被适当分离后即可停止电泳, 转至PVDF膜上, 加入5%的脱脂奶粉, 室温封闭60 min, 分别进行一抗和二抗孵育, 在化学发光成像系统显色拍照.

1.2.5 Transwell侵袭实验: GIST-T1细胞转染后48 h用无血清高糖的DMEM培养基饥饿12 h. 调整细胞浓度为1×10^6个细胞/mL, 每个侵袭小室上室加含0.1%BSA细胞悬液(不含胎牛血清的培养基)100 μL. 每个侵袭小室下室加600 μL含10%胎牛血清培养基. 其中侵袭小室接种前一晚在小室滤膜内表面涂40 μL的FN(125 μg/mL)作为趋化因子, 内表面涂40 μL Matrigel(500 μg/mL), 置于37 ℃恒温、50 mL/L CO_2的培养箱孵育12 h, 用棉签轻轻擦去滤膜上层的细胞, 取下滤膜, 900 mL/L乙醇固定, 0.1%结晶紫溶液染色, 置于显微镜下观察并拍照, 每膜计算上下左右中5个低倍视野(×100) 进行细胞计数, 计算平均值, 每组设3个平行孔.

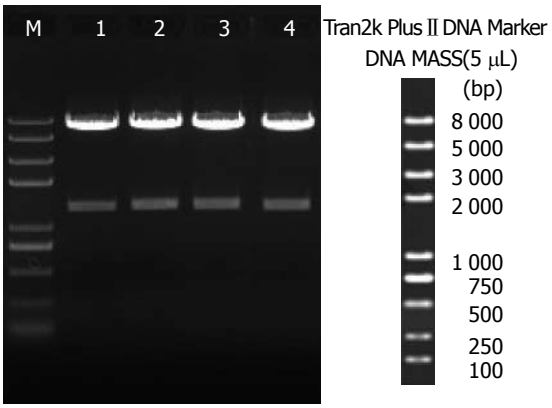


图 1 PLVX-shRNA-hETV1酶切鉴定结果. M: Tran2k Plus Ⅱ DNA Marker; 1: PLVX-shRNA-hETV1-1; 2: PLVX-shRNA-hETV1-2; 3: PLVX-shRNA-hETV1-3; 4: PLVX-shRNA-hETV1-4 *Xho* Ⅰ单酶切.

1.2.6 细胞免疫组织化学: 用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基培养细胞, 待细胞基本铺满培养瓶的底部时, 分别加入干扰后的慢病毒(包括空质粒的慢病毒), 共培养24 h, 经0.25%的胰酶消化3-5 min, 常温下离心1 000 r/min, 离心5 min, 弃上清, 在6孔板中加入预先包被多聚赖氨酸的盖玻片, 将已经消化好的单细胞悬在培养基中, 浓度调整为1×10^5个细胞/mL, 每孔加入2 mL细胞悬液, 过夜后取出盖玻片. 用950 mL/L乙醇脱水固定, PBS冲洗3次, 3%H_2O_2去离子水孵育5 min, PBS冲洗3次, 分别滴加c-Kit及MMP-2抗体, 4 ℃过夜, PBS冲洗3次, 滴加通用型IgG抗体-HRP多聚体, 37 ℃孵育15 min, PBS冲洗3次, 应用DAB溶液显色. 蒸馏水冲洗、复染、脱水. 透明封片.

统计学处理 采用mean±SD表示, 组间比较用SPSS13.0统计软件进行方差分析.

2 结果

2.1 PLVX-shRNA-hETV1载体构建 合成的4个靶点干扰序列分别经过*Xho* Ⅰ单酶切鉴定和测序结果证明, *hetv1*基因已正确插入到原核表达载体PLVX-shRNA中, PLVX-shRNA-hETV1构建成功(图1, 2).

2.2 Western blot筛选hETV1-shRNA 分别用合成的4个靶点序列包装慢病毒, 转染GIST-T1细胞, 用Western blot方法检测各组干扰靶点hETV1蛋白的表达情况. 根据图3, 4所示, 其各组阳性对照蛋白β-Actin条带灰度基本相一致, 空白组hETV1蛋白表达量较高, 质粒PLVX-shRNA2-hETV1-3 hETV1蛋白表达与其他各组相比, 其灰

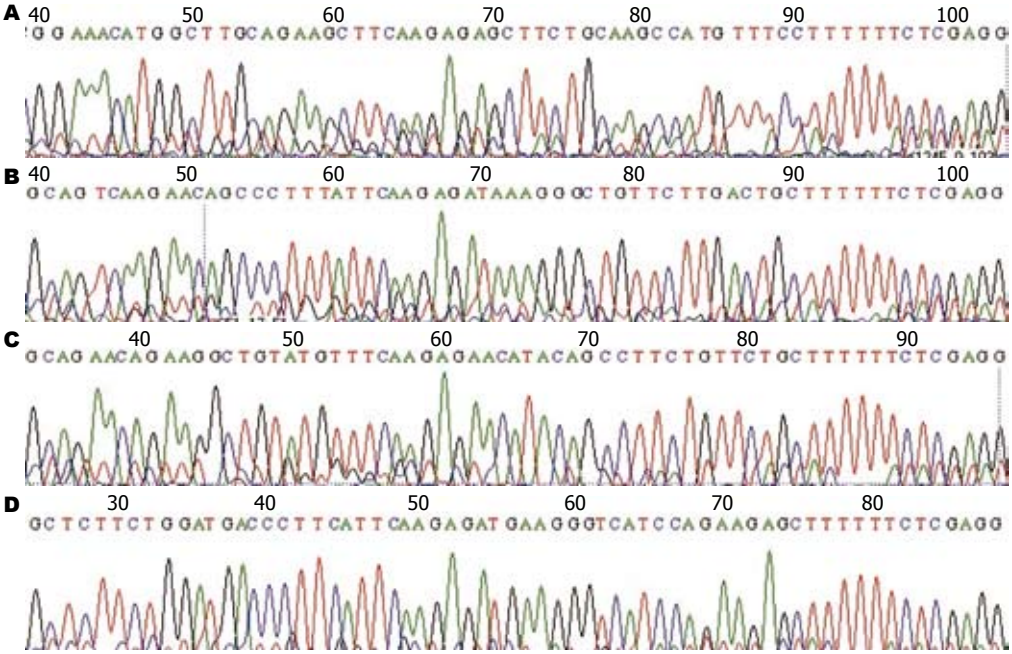


图 2 4个干扰靶点合成序列的测序结果. A: PLVX-shRNA-hETV1-1; B: PLVX-shRNA-hETV1-2; C: PLVX-shRNA-hETV1-3; D: PLVX-shRNA-hETV1-4.

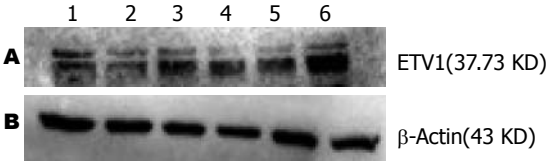


图 3 Western blot检测hETV1 shRNA干扰结果. A: 目的蛋白hETV1; B: 阳性对照蛋白β-Actin; 1: PLVX-shRNA-hETV1-4; 2: PLVX-shRNA-hETV1-3; 3: PLVX-shRNA-hETV1-2; 4: PLVX-shRNA-hETV1-1; 5: 阴性对照组; 6: 空白组.

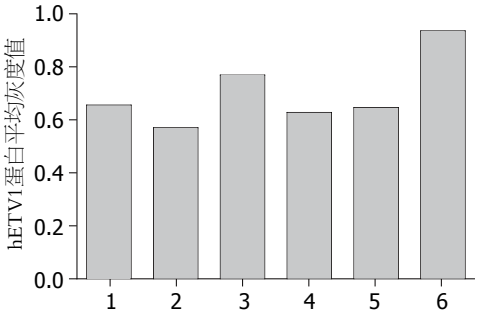


图 4 hETV1蛋白的灰度值. 1: PLVX-shRNA-hETV1-4; 2: PLVX-shRNA-hETV1-3; 3: PLVX-shRNA-hETV1-2; 4: PLVX-shRNA-hETV1-1; 5: 阴性对照组; 6: 空白组.

度最低, 通过条带灰度检测软件Quantity One测得的灰度值也最低. 所以最终选择沉默效果最好的质粒PLVX-shRNA2-hETV1-3进行大量包装慢病毒, 进行后续实验.

2.3 shRNA-hETV1慢病毒转染GIST-T1细胞 经PLVX-shRNA2-hETV1-3慢病毒转染的GIST-T1细胞, 转染率达90%以上, 表明已合成的干扰序列90%以上转入GIST-T1细胞核中, 从而为合成的干扰*etv1*基因序列在细胞核内沉默*etv1*基因奠定了前期理论基础(图5).

2.4 体外干扰hETV1转录因子对GIST-T1细胞体外侵袭力的影响 空白组(166.2000±14.4201), 阴性对照组(142.2000±4.3787), 实验组(60.2000±4.8503), 阴性对照组与空白组穿透滤膜的平均细胞数相比较, 无明显差异(P>0.05), 无统计学意义; 实验组与空白组、阴性对照组穿透滤膜的平均细胞数相比较, 均有显著性差异(P<0.05), 有统计学意义(图6).

2.5 观察干扰前后细胞蛋白表达的影响 空白组、阴性对照组和实验组分别行c-Kit及MMP-2抗体染色, 实验组与空白组、阴性对照组相比较, 其染色度明显下降; 通过免疫组织化学吸光度分析软件ipwin32分析示, 在c-Kit及MMP-2抗体染色中阴性对照组与空白组相比较, 其吸光度无明显差异(P>0.05), 无统计学意义; 实验组与空白组、阴性对照组相比, 吸光度(A)值均有显著下降, 有显著性差异(P<0.05), 有统计学意义(图7, 8).

3 讨论

GIST是人类常见的肉瘤, 他们大多发生在胃、小肠和结肠, 食管、直肠及其他位置较为少见[1,2], 其临床表现不典型, 生长缓慢和隐匿[3]. 原癌基因*c-kit*参与细胞生存、增生、黏附、分化

■**创新盘点**
通过干扰*etv1*基因, 能够抑制胃肠道间质瘤体内*c-kit*及*mmp-2*基因的表达, 最终抑制其肿瘤的侵袭与转移, 但是*etv1*基因通过何种信号途径影响*c-kit*与*mmp-2*基因, 还有待进一步研究.

■同行评价
本文选题新颖独特、设计缜密、逻辑性强、记录数据真实可靠，为今后该领域的研究和发展提供了珍贵的循证医学证据.

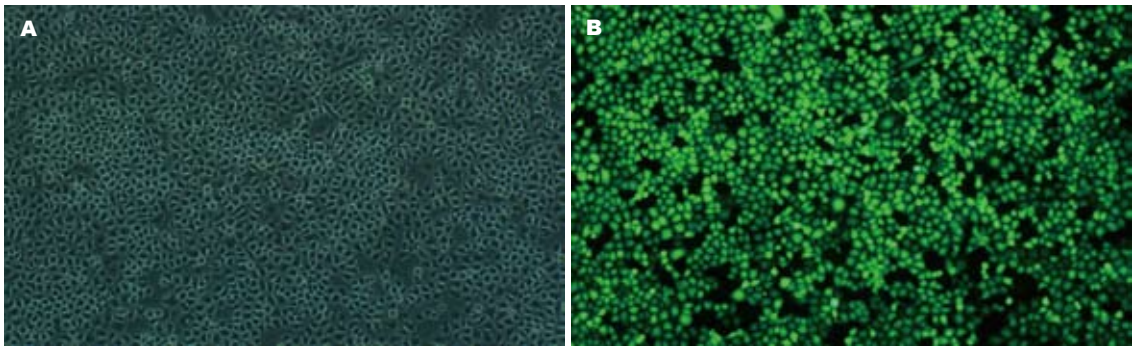


图 5 慢病毒转染GIST-T1细胞72 h的荧光表达情况(200×). A: 经慢病毒转染GIST-T1细胞72 h倒置显微镜下结果; B: 经慢病毒转染GIST-T1细胞72 h荧光倒置显微镜下结果.

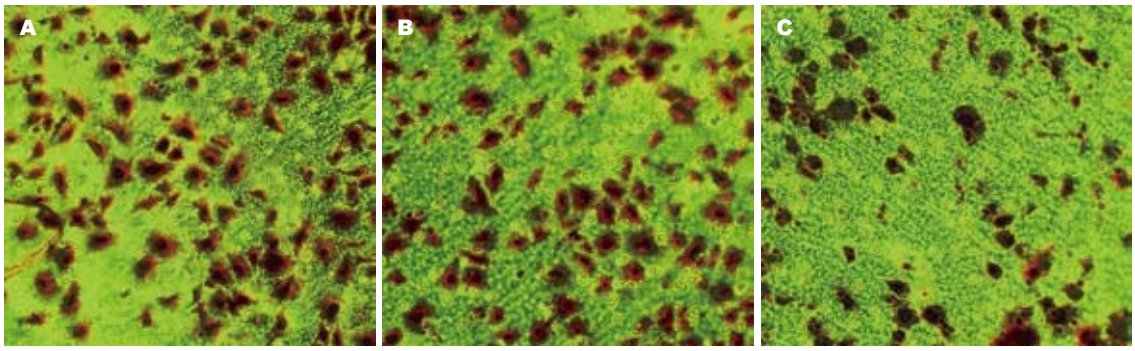


图 6 慢病毒转染GIST-T1细胞前后穿过滤膜微孔的结果(200×). A: 空白组; B: 阴性对照组; C: 实验组.

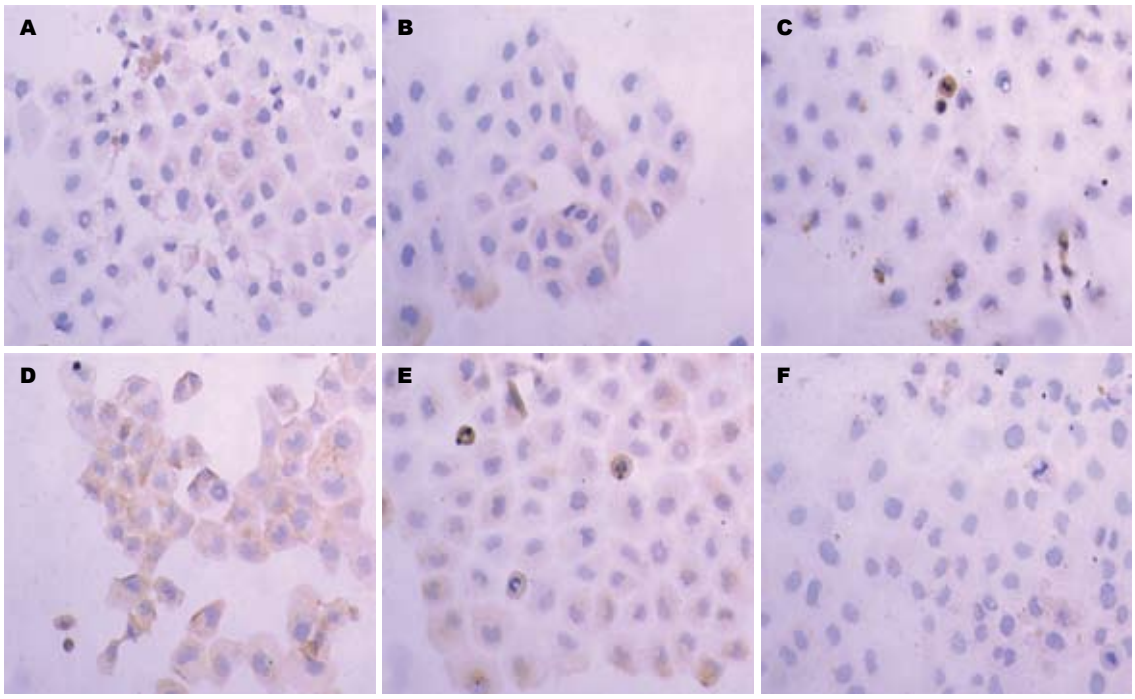


图 7 慢病毒转染GIST-T1细胞前后细胞免疫组织化学的结果(200×). c-Kit: A: 空白组; B: 阴性对照组; C: 实验组; MMP-2: D: 空白组; E: 阴性对照组; F: 实验组.

和凋亡等. 间质瘤中*c-kit*原癌基因突变可导致Kit酪氨酸激酶在没有配体时持续活化，细胞增殖分化失控. 因此，抑制Kit酪氨酸激酶成为治疗和控制GIST的药物研究靶标[4]. 临床诊断时，25%-30%已有明显的恶性表现，转移或侵入邻近器官，失去手术根除的时机. 仅有大约70%GIST手术可完全切除. 甲磺酸伊马替尼等一些靶向治疗药可以有效地阻止Kit受体的持续

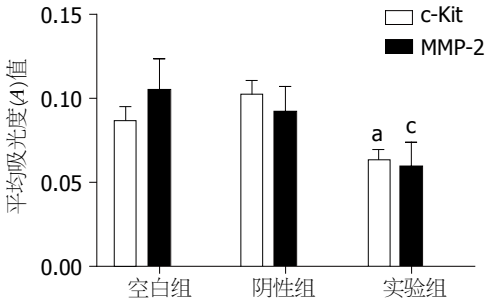


图 8 细胞免疫化学的平均吸光度值. $^{a}P<0.05$ *vs* 空白组; $^{c}P<0.05$ *vs* 阴性对照组.

激活, 抑制肿瘤的生长, 对GIST转移和复发均有显著疗效[5,6]. 因此, 胃肠道间质瘤的非手术治疗的研究非常具有临床意义. 因长期服用甲磺酸伊马替尼等一些靶向治疗药, 有一部分在临床出现耐药现象, 对出现耐药的患者进行基因分析发现, 耐药患者的*kit*基因存在二次或多次突变的现象, 从而解释了甲磺酸伊马替尼等一些靶向治疗药在临床上出现耐药的现象. 为了进一步解决对于临床耐药患者的治疗, 我们必须寻找新的靶点, 进行靶向干预治疗.

人类ETS域的转录因子家族包括27种蛋白质, 他们都包含保守的ETS DNA结合结构域和共有一个DNA结合特异性的核心, 都集中在序列GGAA/T周围, 参与调节细胞的增殖分化, 与肿瘤的侵袭和迁移关系十分密切[7,8]. PEA3亚科包括3个转录因子, PEA3(也称为ETV4或者E1AF)、ER81(也称为ETV1)和ERM(也作为ETV5). 这些转录因子可识别结合DNA核心序列区域所占的比例分别为95%、85%和50%[9], 这些转录因子与致癌、肿瘤转移存在密切关系[10], PEA3与多种癌症相关, 包括结肠癌[9,11]、乳腺癌[12]、卵巢癌[13]、前列腺癌[14]和食道癌[15]. 与癌症相关的ER81, 其mRNA和蛋白在癌组织中表达量较正常组织高得多. ETV1与前列腺癌[16], 食管和胃肠道肿瘤[7]密切相关. 大量研究证实, ETV1标靶包括合成神经递质多巴胺所需的基因, 以及在细胞迁移和癌症转移有关的基因[17]. Chi等[17]研究发现, ETV1普遍高表达在胃肠道间质瘤和伊马替尼的敏感和耐药的GIST细胞株中, 促进的生长和增殖. 另外基质金属蛋白酶是一个大家族, 目前MMPs家族已分离鉴别出26个成员, 编号分别为MMP1-26, 主要功能是降解细胞外基质作用, 其过度表达与恶性肿瘤的侵袭和转移存在密切的关系. MMP家族的亚族MMP-2与卵巢癌[18,19]、肺癌[20]和肝癌[21]等肿瘤的浸润、转移和血管生成相关.

我们使用基因干扰技术, 沉默GIST-T1细胞株的ETV1转录因子, 对胃肠道间质瘤的恶性行为进行研究, 我们通过模拟人工基底膜的方法, 对GIST-T1细胞进行体外侵袭力实验发现, 实验组较空白及阴性对照组, 其体外细胞穿过滤膜的细胞数明显减少, 说明ETV1转录因子在胃肠道间质瘤侵袭与转移中发挥重要作用, 抑制ETV1转录因子的表达, 对胃肠道间质瘤的侵袭与转移存在明显的抑制作用. 那么, ETV1转录因子通过什么途径调节胃肠道间质瘤侵袭与转移作用? 我们查阅大量文献发现, 金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)与很多肿瘤的侵袭与转移存在密切的关系, 同时*c-kit*基因的突变也导致其GIST的侵袭行为发生. 由此, 我们选取了已经证实的MMP-2蛋白, 他在许多肿瘤的侵袭与转移扮演着重要的角色. 我们对沉默*etv1*基因的GIST-T1细胞进行免疫组织化学染色. 结果发现, 沉默*etv1*基因的实验组较空白及阴性对照组, 染色度明显变浅, 说明沉默*etv1*基因的GIST-T1细胞体外c-Kit及MMP-2蛋白表达明显降低. 由此, 我们推断, 通过干扰*etv1*基因, 抑制胃肠道间质瘤体内*c-kit*及*mmp-2*基因的表达, 最终抑制其肿瘤的侵袭与转移, 但是*etv1*基因通过何种信号途径去影响*c-kit*与*mmp-2*基因, 还有待进一步研究.

4 参考文献

1 Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1109-1118

2 Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW. Extragastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol* 2000; 13: 577-585

3 贺慧颖, 方伟岗, 钟镐镐, 李燕, 郑杰, 杜娟, 衡万杰, 吴秉铨. 165例胃肠道间质瘤中c-kit和PDGFRA基因突变的检测和临床诊断意义. 中华病理学杂志 2006; 35: 262-266

4 林苏, 刘懿. 胃肠道间质瘤. 国外医学: 消化系疾病分册 2005; 25: 25-28

5 Li Y, Jiang Z, Xu L, Yao H, Guo J, Ding X. Stability analysis of liver cancer-related microRNAs. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) 2011; 43: 69-78

6 Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C, Lin D. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog* 2011; 50: 136-142

7 Keld R, Guo B, Downey P, Gulmann C, Ang YS, Sharrocks AD. The ERK MAP kinase-PEA3/ETV4-

MMP-1 axis is operative in oesophageal adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 313
8 Keld R, Guo B, Downey P, Cummins R, Gulmann C, Ang YS, Sharrocks AD. PEA3/ETV4-related transcription factors coupled with active ERK signalling are associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105: 124-130
9 de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S, Firlej V, Degerny C, Verreman K. The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1766: 79-87
10 Oikawa T. ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004; 95: 626-633
11 de Launoit Y, Chotteau-Lelievre A, Beaudoin C, Coutte L, Netzer S, Brenner C, Huvent I, Baert JL. The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* 2000; 480: 107-116
12 Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K. Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* 2003; 200: 568-576
13 Cowden Dahl KD, Zeineldin R, Hudson LG. PEA3 is necessary for optimal epidermal growth factor receptor-stimulated matrix metalloproteinase expression and invasion of ovarian tumor cells. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 413-421
14 Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, Menon A, Jing X, Cao Q, Han B, Yu J, Wang L, Montie JE, Rubin MA, Pienta KJ, Roulston D, Shah RB, Varambally S, Mehra R, Chinnaiyan AM. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 2007; 448: 595-599
15 Cai C, Hsieh CL, Omwancha J, Zheng Z, Chen SY, Baert JL, Shemshedini L. ETV1 is a novel androgen receptor-regulated gene that mediates prostate cancer cell invasion. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1835-1846
16 Dissanayake K, Toth R, Blakey J, Olsson O, Campbell DG, Prescott AR, MacKintosh C. ERK/p90(RSK)/14-3-3 signalling has an impact on expression of PEA3 Ets transcription factors via the transcriptional repressor capicúa. *Biochem J* 2011; 433: 515-525
17 Chi P, Chen Y, Zhang L, Guo X, Wongvipat J, Shamu T, Fletcher JA, Dewell S, Maki RG, Zheng D, Antonescu CR, Allis CD, Sawyers CL. ETV1 is a lineage survival factor that cooperates with KIT in gastrointestinal stromal tumours. *Nature* 2010; 467: 849-853
18 孙红, 燕霞, 李如月, 王献华, 张玉强. CXCR4和MMP-2在卵巢上皮性肿瘤中的表达及意义. 肿瘤防治研究 2009; 36: 747-749
19 刘奕, 吕杰强, 陈一喆, 林明. Claudin-4和MMP-2在卵巢上皮性肿瘤中的表达及其意义. 癌症进展杂 2009; 7: 563-569
20 赵斌斌, 朱运奎, 李记东, 王舒, 刘卫. 肿瘤和间质细胞相互作用对肺癌MMP-2和MMP-9表达的影响. 肿瘤防治研究 2009; 36: 737-740
21 钟崇, 苏小康, 韦玮, 李惠东, 郭荣平. 肝癌患者血清及肿瘤组织MMP-2/9的表达及意义. 临床医学工程 2010; 17: 4-5

编辑 田滢 电编 闫晋利

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^H, *H pylori*不能写成HP, T1/2不能写成tl/2或$T_{\frac{1}{2}}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *Cl*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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2895-2901
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

siRNA沉默*RPL31*表达对胰腺癌PANC-1细胞增殖的抑制作用

李朝东, 戈 梅, 罗敏玉, 陈代杰

李朝东, 陈代杰, 华东理工大学生物工程学院 上海市 200237
戈梅, 上海交通大学药学院 上海市 200240
戈梅, 罗敏玉, 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; 研究过程及本文撰写由李朝东操作完成; 数据分析由李朝东完成; 罗敏玉提供了实验指导和分析工具; 陈代杰与戈梅审阅论文、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: 2012-08-09 修回日期: 2012-09-05
接受日期: 2012-09-25 在线出版日期: 2012-10-28

SiRNA-mediated silencing of the *RPL31* gene inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells

Chao-Dong Li, Mei Ge, Min-Yu Luo, Dai-Jie Chen

Chao-Dong Li, Dai-Jie Chen, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China
Mei Ge, School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China
Mei Ge, Min-Yu Luo, 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, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, 130 Meilong Road, Shanghai 200237, China. hccbred@gmail.com
Received: 2012-08-09 Revised: 2012-09-05
Accepted: 2012-09-25 Published online: 2012-10-28

Abstract

AIM: To investigate the impact of small interfering RNA (siRNA)-mediated *RPL31* gene silencing on biological behavior of human pancreatic cancer PANC-1 cells, and to explore the feasibility of using the human *RPL31* gene as a therapeutic target for pancreatic cancer.

METHODS: Three *RPL31*-specific siRNAs were designed and transfected into PANC-1 cells using Lipofectamine™ 2000. Blank control and negative control groups were run at the same time. After PANC-1 cells were transfected with *RPL31*-specific siRNA, the levels of *RPL31* mRNA and protein were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot, respectively. Cell proliferation was detected by MTT assay. Cell cycle progression was determined by flow cytometry. Cell migration was determined by Transwell chamber assay. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in cells was detected by ELISA.

RESULTS: All three *RPL31*-specific siRNAs could silence the expression of *RPL31* at the mRNA and protein levels 48 hours after transfection. MTT assay showed that cell proliferation was significantly inhibited. Flow cytometry analysis revealed that PANC-1 cells transfected with *RPL31* siRNA had a more significant cell cycle arrest (G_0/G_1 phase: 59.85% ± 5.47% *vs* 45.71% ± 3.44%; S phase: 28.63% ± 4.52% *vs* 45.13% ± 2.64%, both $P < 0.05$). *RPL31* knockdown significantly suppressed VEGF expression (1563.45 ± 24.95 pg/10^6 cells/24 h *vs* 2804.6 ± 40.46 pg/10^6 cells/24 h, 2791.5 ± 44.77 pg/10^6 cells/24 h, both $P < 0.05$) and the migration of PANC-1 cells (178.6 ± 30.3 *vs* 470.5 ± 22.8, 474.2 ± 20.4, both $P < 0.05$) compared to the blank control and negative control groups.

CONCLUSION: Transfection of *RPL31*-specific siRNAs could effectively inhibit *RPL31* expression, significantly suppress cell proliferation, and reduce cell migration and *VEGF* expression. *RPL31* might serve as a target for gene therapy of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic cancer; Ribosomal protein L31; SiRNA; Cell proliferation; Cell migration

Li CD, Ge M, Luo MY, Chen DJ. SiRNA-mediated silencing of the *RPL31* gene inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2895-2901

摘要

目的: 观察siRNA沉默核糖体蛋白L31(ribosomal

■背景资料
胰腺癌与其他恶性肿瘤一样是一种基因疾病, *KRAS*基因与胰腺癌关系密切, 是重要的胰腺癌治疗靶点, 然而利用RNA干扰技术特异性的抑制*KRAS*基因可能会导致细胞内其他基因的表达发生变化对其进行补偿. 研究这些补偿机制有可能会发现新的治疗靶点.

■同行评议者
江建新, 副主任医师, 贵阳医学院附属医院肝胆外科; 高英堂, 研究员, 天津市第三中心医院

■研发前沿
目前关于核糖体蛋白与肿瘤关系的研究成为肿瘤发病机制及治疗研究的新热点，RNA干扰(RNAi)可以特异性关闭某个基因的表达，在肿瘤治疗及发病机制研究方面具有独特的优势.

protein L31, *RPL31*)基因表达对人胰腺癌PANC-1细胞的影响.

方法: 针对*RPL31*基因设计了3条siRNA, 使用脂质体Lipofectamine™2000转染人胰腺癌PANC-1细胞, 同时设立空白对照组和阴性对照组, 转染成功后通过实时定量PCR及Western blot分别从mRNA和蛋白水平检测RNA干扰沉默*RPL31*基因的效果, 四氮唑盐比色法(MTT)检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞周期分布, Transwell小室检测细胞迁移, ELISA检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达.

结果: 转染48 h后, 3条siRNA能显著抑制*RPL31*基因mRNA和蛋白的表达; MTT结果显示, PANC-1细胞增殖明显受到抑制; 细胞周期分布中G_0/G_1期明显增加、S期减少(G_0/G_1: 59.85%±5.47% *vs* 45.71%±3.44%; S: 28.63%±4.52% *vs* 45.13%±2.64%, 均$P<0.05$); 转染后细胞迁移数目(178.6个±30.3个)较空白对照组(470.5个±22.8个)与阴性对照组(474.2个±20.4个)明显减少, 差异显著($P<0.05$); 转染后PANC-1细胞的VEGF表达量也明显减少[1563.45 pg/(10^6 cell·24 h)±24.95 pg/(10^6 cell·24 h) *vs* 2804.6 pg/(10^6 cell·24 h)±40.46 pg/(10^6 cell·24 h), 2791.5 pg/(10^6 cell·24 h)±44.77 pg/(10^6 cell·24 h)].

结论: *RPL31* siRNA能明显抑制PANC-1细胞*RPL31*的表达, 抑制细胞增殖, 降低细胞迁移及VEGF表达, *RPL31*基因有可能成为胰腺癌基因治疗的新靶点.

关键词: 胰腺癌; 核糖体蛋白L31; 小干扰RNA; 细胞增殖; 细胞迁移

李朝东, 戈梅, 罗敏玉, 陈代杰. siRNA沉默*RPL31*表达对胰腺癌PANC-1细胞增殖的抑制作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2895-2901
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2895.asp

0 引言

胰腺癌是常见的消化系恶性肿瘤, 其恶性程度极高, 早期缺乏特异症状, 进展迅速, 在发现时多是晚期, 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%[1,2]. 胰腺癌的发生是多个基因突变连续性积累的结果[3,4]. RNA干扰(RNA interference, RNAi)可以特异性关闭某个基因的表达, 在肿瘤治疗及发病机制研究方面有着独特的优势. *KRAS*基因是与胰腺癌关系最为密切的原癌基因之一, 是胰腺癌治疗的重要靶点[5,6]. 利用RNA干扰技术特异性的抑制*KRAS*基因可能会导致细胞内其他基因的表达发生变化对其进行补偿[7]. 我们之前的研究证实, 通过慢病毒介导的RNAi长期抑制胰腺癌PANC-1细胞*KRAS*基因的表达, 可以导致糖体蛋白L31(ribosomal protein L31, *RPL31*)基因的表达上调[8], 推测*RPL31*基因可能参与*KRAS*沉默的补偿, 可能是胰腺癌细胞中的一个重要的基因. 因此, 本文设计特异性针对*RPL31*基因的小干扰RNA(siRNA), 分析*RPL31*基因沉默后对胰腺癌细胞PANC-1生物学特性的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株PANC-1(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), Lipofectamine™2000(Invitrogen), TRNzol™(TIANGEN), cDNA反转录试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix(Fermentas), *RPL31*兔抗人单克隆抗体(Abgent), β-actin兔抗人单克隆抗体(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), 细胞周期检测试剂盒、BCA蛋白浓度检测试剂盒、RIPA裂解液(碧云天), Transwell小室、各种规格培养皿(corning costar), DAPI荧光染料、MTT(sigma), 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)ELISA检测试剂盒(深圳晶美).

1.2 方法

1.2.1 siRNA的设计及合成: 通过Ambion网站, 根据人*RPL31*基因(Genbank NM_000993.4)的编码序列设计3条不同的siRNA序列, siRNA-1: 5'-UCAAUGCGCACAUCUGGAGTT-3', 5'-CUCCAGAUGUGCGCAUUGATT-3'; siRNA-2: 5'-AUUCGGUAUGGCACAUUCCTT-3', 5'-GGAAUGUGCCAUACCGAAUTT-3'; siRNA-3: 5'-CACAUUGACUGUCUGUAGATT-3', 5'-UCUACAGACAGUCAAUGUGTT-3'. 同时设计阴性对照siRNA, 序列为: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'. 所有siRNA由上海吉玛制药由限公司合成提供.

1.2.2 细胞培养及转染: PANC-1细胞培养于100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养液中, 置于37 ℃、含50 mL/L CO_2、饱和湿度的培养箱中. 培养48-72 h时使用2.5 g/L的胰酶+0.02%的

EDTA按1∶3进行传代. 取对数生长期的细胞用于实验. 转染前24 h将细胞计数, 约1.5×10^5/孔接种至6孔板, 转染时细胞融合达到50%. 转染完全按照Invitrogen的Lipofectamine™2000产品使用说明书操作, 每孔siRNA浓度40 nmol/L, 转染6 h后换液. 实验分为空白对照组、阴性对照组及干预组.

1.2.3 实时定量PCR: 收集转染48 h后的细胞, 使用TRNzol™试剂提取细胞总RNA, 具体操作按照TIANGEN公司的TRNzol™操作说明进行. 紫外分光光度计检测样品纯度和浓度, $A_{260/280}$ = 1.8-2.0. 按照Fermentas公司的First Strand cDNA Synthesis Kit说明书进行逆转录合成cDNA, 逆转录2 μg RNA, 体系为20 μL, 反转录程序为: 65 ℃ 5 min, 42 ℃ 60 min, 70 ℃ 5 min灭活反转录酶. 分别设计*RPL31*及GAPDH的检测引物, 序列如下: *RPL31*-F: 5'-CGACCCG-GAAGTTGTACTTG-3'; *RPL31*-R: 5'-TCTCGC-CACCCTTCTTTG-3'; GAPDH-F: 5'-GCACC-GTCAAGGCTGAGAAC-3'; GAPDH-R: 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'. 实时定量PCR反应体系为20 μL, 其中SYBR Green/ROX qPCR Master Mix为12.5 μL, 10 μmol/L的上下游引物各1 μL, cDNA为1 μL, ddH_2O为9.5 μL. 反应程序为: (1)94 ℃ 10 min, (2)94 ℃ 30 s, (3)60 ℃ 30 s, (4)72 ℃ 30 s. (2)-(4)40个循环, 用$2^{-\triangle\triangle Ct}$分析法进行数值分析[9].

1.2.4 Western blot检测RPL31蛋白的表达: 细胞转染siRNA 48 h后, 用预冷的PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗涤细胞3次, 加入RIPA裂解液, 置冰浴中作用30 min, 4 ℃、12 000 g×15 min, 提取细胞总蛋白, 取上清进行BCA法蛋白定量. 制备10%的SDS-PAGE分离胶, 5%的SDS-PAGE浓缩胶, 取等量蛋白30 μg进行电泳, 将蛋白于200 mA恒电流下转膜1 h至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h, 4 ℃孵育RPL31抗体及β-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 MTT法[10]检测细胞增殖: 细胞转染24 h后, 胰酶消化, 2 000/孔接种96孔板(200 μL培养液), 连续培养5 d, 每天进行MTT检测: 用PBS配制5 g/L的MTT溶液, 每孔加入20 μL, 37 ℃孵育4 h, 小心弃上清, 每孔加入200 μL DMSO, 震荡溶解, 使用酶标仪(美国Bio-Rad公司)测定490 nm下的*A*值. 分别以转染时间为横坐标、*A*值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线.

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期[11]: 收集转染48 h后的各组细胞, 用预冷的PBS洗涤细胞一次, 加入预冷的700 mL/L乙醇4 ℃固定过夜, 按照细胞周期检测试剂盒(碧云天)说明进行PI染色液, 37 ℃避光孵育30 min, 用流式细胞仪检测各个细胞周期的分布.

1.2.7 细胞迁移实验[12]: 收集转染48 h后的细胞2×10^4个, 用100 μL无血清培养液稀释后接种到Transwell小室的上室中, 24孔板每孔加入600 μL含100 mL/L胎牛血清DMEM培养液, 将小室置于24孔板内, 放入37 ℃、50 mL/L CO_2的培养箱孵育12 h. 小心擦掉上室细胞, PBS洗3次, 5%多聚甲醛固定10 min, 10 μg/mL的DAPI溶液染色5 min, 荧光显微镜下拍照计数5个视野穿过微孔的细胞数. 每组3个小室, 实验重复3次.

1.2.8 ELISA检测血管内皮生长因子表达[13]: 在6孔板中进行转染, 转染24 h后, 吸弃上清, 用无血清的DMEM培养液洗涤细胞3次, 再加入2 mL无血清的DMEM培养液培养24 h. 吸取培养液上清, 离心后-80 ℃冻存备测. 细胞用胰酶消化进行计数. 采用人VEGF ELISA检测试剂盒, 严格按照说明书进行操作. 最后用酶标仪测定450 nm下的*A*值, 通过标准曲线计算细胞每10^6个细胞、每24 h的VEGF表达量.

统计学处理 数据计量采用均数±标准差(mean±SD)表示. 用SPSS12.0软件进行数据统计分析, 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 *RPL31* siRNA转染对*RPL31*基因表达的影响 与空白对照组和阴性对照组相比, 3个干预组siRNA转染PANC-1细胞后都能使*RPL31*基因在mRNA和蛋白水平表达明显下调($P<0.05$). 实时定量PCR分析得出, RPL31-1、RPL31-2、RPL31-3 3个干预组处理后*RPL31*的mRNA分别下降83.16%±5.53%、86.10%±3.78%、83.04%±6.27%, 空白对照组及阴性对照组并未明显改变(图1). Western blot实验分析得出, 3个干预组都能降低RPL31蛋白的表达(图2). 选择干扰效果最好的RPL31-2进行后续实验.

2.2 *RPL31* siRNA转染对胰腺癌PANC-1细胞增殖的影响 MTT检测结果显示, 转染*RPL31* siRNA-2的细胞生长速度较空白对照组及阴性对照组明显减慢, 差异有统计学意义($P<0.05$).

■相关报道
核糖体蛋白L31(*RPL31*)在结直肠癌的发生、发展中具有促增殖及致癌性的作用, 我们前期的研究发现, 利用慢病毒介导的RNAi在胰腺癌PANC-1细胞中长期关闭*KRAS*基因的表达可以导致*RPL31*的显著上调, 推测*RPL31*可能是胰腺癌中一个重要的基因.

■**创新盘点**
目前国内外关于*RPL31*基因在胰腺癌中功能的研究报道很少，本研究设计特异性针对*RPL31*基因的siRNA，分析了*RPL31*基因沉默后对胰腺癌PANC-1细胞生物学特性的影响，国内外未见报道.

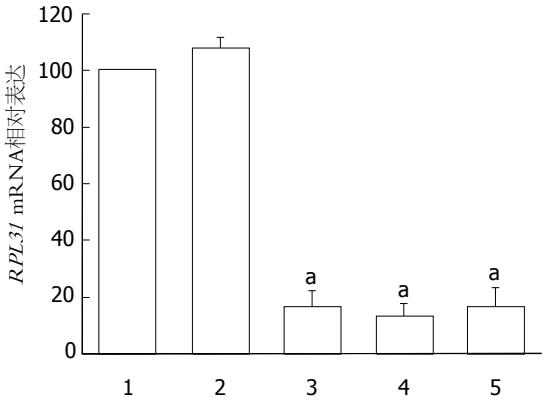


图 1 实时定量PCR检测转染48 h后*RPL31*基因mRNA的表达水平. 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: siRNA−1干预组; 4: siRNA−2干预组; 5: siRNA−3干预组. $^aP<0.05$ *vs* 空白对照组.

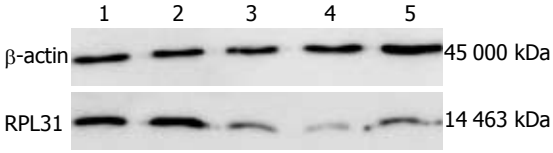


图 2 Western blot检测转染48 h后RPL31蛋白的表达水平. 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: siRNA−1干预组; 4: siRNA−2干预组; 5: siRNA−3干预组.

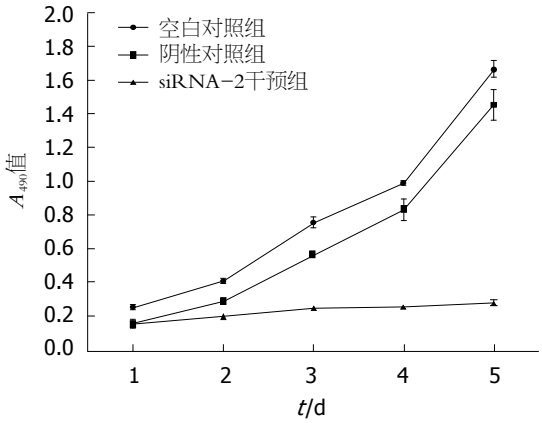


图 3 *RPL31* siRNA−2对胰腺癌细胞PANC−1增殖的影响.

表 1 *RPL31* siRNA−2对PANC−1细胞周期分布的影响 (%)

分组	G_0/G_1期	S期	G_2期
空白对照组	45.71 ± 3.44	45.13 ± 2.64	9.16 ± 2.17
阴性对照组	45.42 ± 2.98	45.89 ± 3.89	8.69 ± 1.93
siRNA−2	59.85 ± 5.47^a	28.63 ± 4.52^a	11.52 ± 1.67

$^aP<0.05$ *vs* 空白对照组.

转染后48 h为测定的1 d, 从1 d到5 d干预组的抑制率分别为35.90%、51.21%、67.43%、74.25%和83.22%(图3).

2.3 *RPL31* siRNA对胰腺癌PANC-1细胞周期的影响 流式细胞仪分析显示, 转染siRNA-2 48 h后, PANC-1细胞周期发生明显改变, G_0/G_1期细胞明显增加(由45.71%±3.44%增至59.85%±5.47%), S期细胞明显减少(由45.13%±2.64%降至28.63%±4.52%), G_2期细胞无明显改变, 与空白对照组和阴性对照组相比有显著性统计学差异($P<0.05$, 图4, 表1).

2.4 *RPL31* siRNA对胰腺癌PANC-1细胞迁移的影响 空白对照组迁移细胞数目为470.5个±22.8个, 转染阴性对照组为474.2个±20.4个, 而转染*RPL31* siRNA-2组迁移的数目为178.6个±30.3个, 与空白对照组和阴性对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$, 图5, 6).

2.5 *RPL31* siRNA对胰腺癌PANC-1细胞血管内皮生长因子表达的影响 VEGF是促血管生长因子, 癌细胞的增殖、转移依赖于新生血管的生成. ELISA实验结果显示, 培养24 h, 空白对照组培养液上清中VEGF的表达量是2804.6 pg/10^6 cell±40.46 pg/10^6 cell, 转染阴性对照组为2791.5 pg/10^6 cell±44.77 pg/10^6 cell, 而转染*RPL31* siRNA-2组培养液上清中VEGF的表达量是1563.45 pg/10^6 cell±24.95 pg/10^6 cell, 与空白对照组和阴性对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$, 图7).

3 讨论

胰腺癌是威胁人类健康的主要致死疾病之一. 手术是目前唯一可能治愈胰腺癌的方法, 然而仅10%-15%的胰腺癌患者有手术治疗机会, 患者术后5年生存率仅为15%-25%[14]. *KRAS*基因与胰腺癌关系极为密切, 其编码的P21蛋白一旦发生突变, 可诱导胰腺导管上皮细胞发生化生及瘤变[15]. *KRAS*基因在胰腺癌中突变频率几乎达到100%, 他在胰腺癌的发生、持续生长、浸润转移的各个阶段都有非常重要的作用[16], 已经成为公认的治疗靶点. 分子靶向治疗是目前胰腺癌内科治疗发展的方向[17]. 然而, 不管是针对*KRAS*基因的基因治疗还是针对P21蛋白的分子靶向治疗, 最终的治疗效果都不显著[18,19]. 这提示我们, 需要深层次的理解胰腺癌致病的分子机制, 并且开发一些更加有效的治疗靶点.

RNAi是指通过内源性或外源性双链RNA的介导, 特异性降解相应序列的mRNA, 导致靶基因的表达沉默, 产生相应的功能型缺失的现象[20]. 利用RNA干扰技术针对*KRAS*基因治疗是一种有效的胰腺癌治疗策略, 国内外也进行了许多研究[21,22]. 然而, 特异性的抑制某一基因可

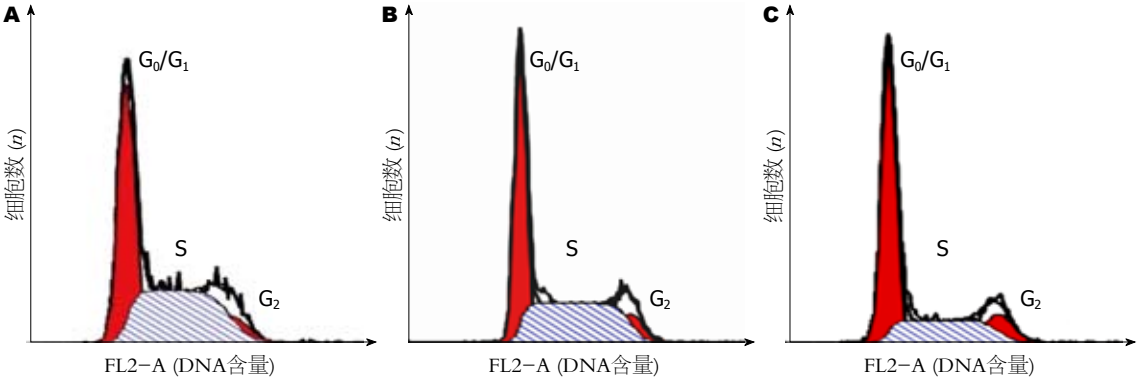


图 4 流式细胞仪检测*RPL31* siRNA-2对PANC-1细胞周期分布的影响. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: *RPL31* siRNA-2干预组.

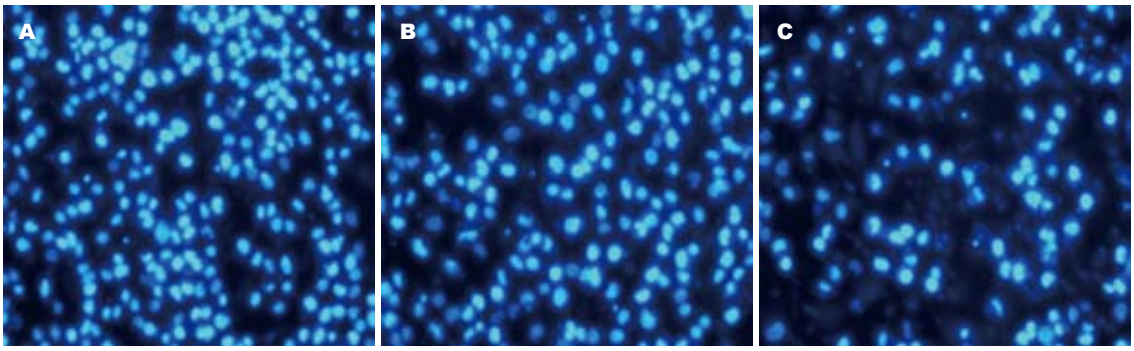


图 5 *RPL31*沉默后对PANC-1细胞迁移的影响. A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: *RPL31* siRNA-2干预组.

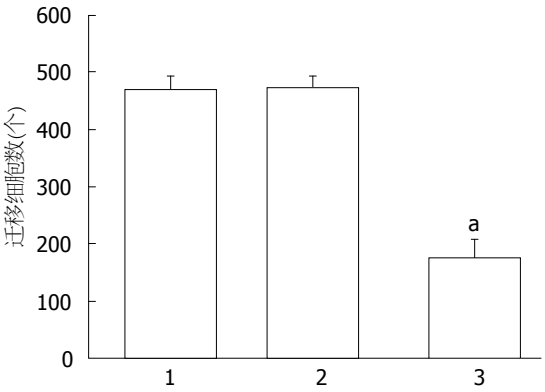


图 6 转染*RPL31* siRNA-2后各组迁移细胞数. 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: *RPL31* siRNA-2干预组. $^aP<0.05$ *vs* 空白对照组.

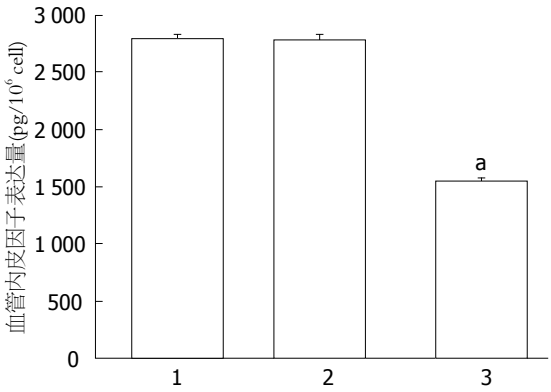


图 7 转染*RPL31* siRNA-2后各组培养基上清中VEGF表达量. 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: *RPL31* siRNA-2干预组. $^aP<0.05$ *vs* 空白对照组.

能会导致细胞内其他基因的表达发生变化对其进行补偿. 例如, Zhao等[7]发现利用siRNA沉默肝癌细胞中原癌基因*NRAS*的表达后, *epiregulin*基因对*NRAS*沉默后产生了补偿现象, 因此*epiregulin*基因是一个潜在的治疗靶点. 我们前期的研究利用了慢病毒介导的RNAi这一策略在胰腺癌PANC-1细胞中关闭*KRAS*基因的表达, 之后通过基因芯片研究胞内其他基因的表达变化. 值得一提的是, 若干个核糖体蛋白基因在*KRAS*沉默后表达上调, 本研究中的*RPL31*就是其中显著上调的一个基因[8].

*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. 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作用之外的功能, 比如参与调控基因的转录翻译、参与DNA修复、调控细胞的增殖分化凋亡等, 另外, 核糖体蛋白在肿瘤的发生、发展、转移和肿瘤抑制中可能发

■应用要点

使用siRNA关闭胰腺癌PANC-1细胞的*RPL31*表达, 发现细胞的增殖受到抑制, 周期阻遏于G_0/G_1期, 迁移能力及VEGF表达都降低. 这些研究结果显示了*RPL31*基因在维持PANC-1细胞生物学特性方面的重要性. 因此, 该基因是否能够成为一个新的治疗靶点值得进一步研究.

■同行评价
本文选题较为新颖，研究方法合理，对胰腺癌的发生和治疗靶点的探讨具有一定的意义.

挥重要的作用[23-25]. 目前RPL31的研究主要是探讨其与结直肠癌(colorectal carcinomas, CRC)的关系. 研究表明, RPL31在结直肠癌的发生、发展中具有促增殖及致癌性的作用[26,27]. 另外, 在转移性的结直肠癌肿瘤内, RPL31的表达是下调的[28]. *RPL31*基因与胰腺癌的关系目前未见国内外报道.

本研究中, 我们利用siRNA考察了中关闭RPL31表达后胰腺癌PANC-1细胞生物学特性的变化: 增殖特性、周期变化、迁移特性和血管生成. 胰腺癌细胞的显著特是具有恶性增生能力点, 因此在治疗时一个重要的措施就是抑制胰腺癌细胞的恶性增殖能力[29]; 从另外一个角度来, 肿瘤的发生是由于细胞周期的调节失控引起的周期性疾病, 胰腺癌也不例外; 此外, 细胞的迁移运动是肿瘤病理过程中的重要步骤和关键环节, 胰腺癌的另一个显著的特点是具有很强的转移性, 控制胰腺癌的恶性转移是治疗的一个重要的方向[30]; 最后, 癌细胞的增殖、转移依赖于新生血管的生成, 胰腺癌的发生、发展及转移的整个过程中, VEGF发挥了重要的作用[31]. 如果能改变胰腺癌细胞的上述生物学特性, 就能对胰腺癌的治疗产生积极的作用. 在实验中我们通过转染siRNA关闭胰腺癌PANC-1细胞中RPL31的表达, 发现细胞的增殖受到抑制, 细胞周期阻遏于G_0/G_1期, 除此之外, *RPL31*被沉默后PANC-1细胞的迁移能力及VEGF表达都降低. 这些研究结果显示了*RPL31*基因在维持PANC-1细胞生物学特性方面的重要性. 因此, *RPL31*基因是否可能成为一个新的治疗靶点值得进一步研究. 本研究为将*RPL31*基因作为胰腺癌治疗靶点的基因治疗提供了新的思路.

志谢: 感谢北京大学席建忠教授在RNAi方面的指导, 感谢毛文伟、殷瑜及杨天同志在实验中给予的大力帮助.

4 参考文献

1 Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2010; 362: 1605-1617
2 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
3 Matthaios D, Zarogoulidis P, Balgouranidou I, Chatzaki E, Kakolyris S. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer and clinical perspectives. *Oncology* 2011; 81: 259-272
4 Sakorafas GH, Smyrniotis V. Molecular biology of pancreatic cancer: how useful is it in clinical practice? *JOP* 2012; 13: 332-337
5 Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1177-1195
6 Wong HH, Lemoine NR. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 412-422
7 Zhao M, He HW, Sun HX, Ren KH, Shao RG. Dual knockdown of N-ras and epiregulin synergistically suppressed the growth of human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387: 239-244
8 Li C, Ge M, Yin Y, Luo M, Chen D. Silencing expression of ribosomal protein L26 and L29 by RNA interfering inhibits proliferation of human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Mol Cell Biochem* 2012 Aug 7. *[Epub ahead of print]*
9 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
10 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63
11 Chen HY, Tang NH, Lin N, Chen ZX, Wang XZ. Hepatitis B virus X protein induces apoptosis and cell cycle deregulation through interfering with DNA repair and checkpoint responses. *Hepatol Res* 2008; 38: 174-182
12 Luftman K, Hasan N, Day P, Hardee D, Hu C. Silencing of VAMP3 inhibits cell migration and integrin-mediated adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 65-70
13 Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, Gallick GE. HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* 2005; 24: 3110-3120
14 Gudjonsson B. Pancreatic cancer: survival, errors and evidence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21: 1379-1382
15 Ji B, Tsou L, Wang H, Gaiser S, Chang DZ, Daniluk J, Bi Y, Grote T, Longnecker DS, Logsdon CD. Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. *Gastroenterology* 2009; 137: 1072-1082, 1082. e1-e6
16 Collins MA, Bednar F, Zhang Y, Brisset JC, Galbán S, Galbán CJ, Rakshit S, Flannagan KS, Adsay NV, Pasca di Magliano M. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J Clin Invest* 2012; 122: 639-653
17 Rivera F, López-Tarruella S, Vega-Villegas ME, Salcedo M. Treatment of advanced pancreatic cancer: from gemcitabine single agent to combinations and targeted therapy. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 335-339
18 Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, Schoffski P, Post S, Verslype C, Neumann H, Safran H, Humblet Y, Perez Ruixo J, Ma Y, Von Hoff D. Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1430-1438
19 Macdonald JS, McCoy S, Whitehead RP, Iqbal S, Wade JL, Giguere JK, Abbruzzese JL. A phase II study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in pancreatic cancer: a Southwest oncology group (SWOG 9924) study. *Invest New Drugs* 2005; 23: 485-487

20 Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature* 2000; 404: 293-296
21 Réjiba S, Wack S, Aprahamian M, Hajri A. K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment. *Cancer Sci* 2007; 98: 1128-1136
22 李冬斌, 郑志刚, 许香梅, 郭华, 赵雪莲, 黄林凤, 蔡建辉. 短发夹RNA对胰腺癌细胞PANC-1突变型K-ras基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3941-3945
23 Warner JR, McIntosh KB. How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* 2009; 34: 3-11
24 Ogle JM, Carter AP, Ramakrishnan V. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 259-266
25 Stoneley M, Willis AE. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 2004; 23: 3200-3207
26 Lai MD, Xu J. Ribosomal proteins and colorectal cancer. *Curr Genomics* 2007; 8: 43-49
27 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
28 Bertucci F, Salas S, Eysteries S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod 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
29 Kunnumakkara AB, Guha S, Krishnan S, Diagaradjane P, Gelovani J, Aggarwal BB. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Res* 2007; 67: 3853-3861
30 Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2213-2236
31 Korc M. Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 8

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 •

2011年度《世界华人消化杂志》发文情况

本刊讯 2011-01-01/2011-12-31,《世界华人消化杂志》共收到稿件1576篇, 退稿932篇, 退稿率59.13%, 发表文章644篇, 所有文章均经过编委专家同行评议. 其中, 发表述评35篇(5.43%), 基础研究135篇(20.96%), 临床研究71篇(11.02%), 焦点论坛17篇(2.64%), 文献综述111篇(17.24%), 研究快报58篇(9.01%), 临床经验189篇(29.35%), 病例报告24篇(3.73%); 文章作者分布遍及全国各地, 绝大多数来自高等院校及附属医院. 在此, 特别感谢为《世界华人消化杂志》进行同行评议的各位编委专家, 你们的同行评价对文章发表质量做出了重要贡献; 也希望各位编委踊跃为《世界华人消化杂志》继续撰写高质量的评论性文章, 为科学知识的传播做出贡献! (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2902-2906
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

基础研究 BASIC RESEARCH

葫芦巴提取物对营养性肥胖大鼠糖脂的调节效应

卢芙蓉, 杨胜兰, 沈 霖, 秦 铀, 蔡亚玲, 熊鹏程

■背景资料
肥胖表现为脂质代谢紊乱, 可导致2型糖尿病(T2DM), 已成为当前世界性健康问题之一. 胰岛素抵抗是肥胖与T2DM发生过程中共同的病理现象, 也是评判肥胖是否向T2DM发展的指标之一.

卢芙蓉, 杨胜兰, 沈霖, 熊鹏程, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科 湖北省武汉市 430022
秦铀, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心 湖北省武汉市 430022
蔡亚玲, 华中科技大学同济药学院 湖北省武汉市430000
卢芙蓉, 博士, 主要从事中西医结合治疗肥胖、糖尿病等方面研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 81001670
华中科技大学同济医学院附属协和医院院内基金资助项目, No. 2010-17
作者贡献分布: 此课题由卢芙蓉、杨胜兰及沈霖共同设计; 研究过程由卢芙蓉、蔡亚玲、熊鹏程及秦铀共同完成; 数据分析由卢芙蓉与杨胜兰完成; 论文写作由卢芙蓉完成.
通讯作者: 杨胜兰, 副教授, 副主任医师, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科. yangshenglan@126.com
电话: 027-85726395
收稿日期: 2012-08-27 修回日期: 2012-09-28
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-28

Therapeutic effect of *trigonella foenum-graecum* L. total saponins on diet-induced obesity in rats

Fu-Rong Lu, Sheng-Lan Yang, Lin Shen, You Qin, Ya-Ling Cai, Peng-Cheng Xiong

Fu-Rong Lu, Sheng-Lan Yang, Lin Shen, Peng-Cheng Xiong, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
You Qin, Cancer Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Ya-Ling Cai, Tongji School of Pharmacy, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81001670; the Foundation of Union Hospital of Huazhong University of Science and Technology, No. 2010-17
Correspondence to: Sheng-Lan Yang, Associate Professor, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. yangshenglan@126.com
Received: 2012-08-27 Revised: 2012-09-28
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-28

■同行评议者
王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室; 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(中心)

Abstract

AIM: To observe the therapeutic effect of *trigonella foenum-graecum L.* total saponins (TFGs) on high-sugar and high-fat-sucrose (HFS) diet-induced nutritional obesity in rats.

METHODS: A rat model of nutritional obesity was established by feeding rats a high-sugar and HFS diet. Obese rats were treated with TFGs for 8 weeks. During treatment, the weight of rats was recorded. At the end of treatment, the weight of epididymal fat pads was also measured and fat tissue was taken for HE staining. Meanwhile, the levels of blood lipids, including serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), as well as fasting blood glucose (FBG) and fasting insulin (FINS), were determined. Homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) was calculated.

RESULTS: Compared to rats fed a normal diet, rats fed a HFS diet had heavier body weight (495.5 g ± 69.2 g *vs* 388.7 g ± 60.2 g, $P < 0.01$) and epididymal fat pads (8.6 g ± 0.6 g *vs* 5.3 g ± 0.5 g, $P < 0.01$), larger adipocytes, increased levels of TG (0.9 mmol/L ± 0.3 mmol/L *vs* 0.3 mmol/L ± 0.2 mmol/L, $P < 0.01$), TC (2.7 mmol/L ± 0.4 mmol/L *vs* 1.5 mmol/L ± 0.1 mmol/L, $P < 0.01$), LDL-C (1.2 mmol/L ± 0.2 mmol/L *vs* 0.5 ± 0.2 mmol/L, $P < 0.01$), FINS (27.8 ± 4.8 *vs* 13.6 ± 3.6 mIU/L, $P < 0.01$), and HOMA-IR (8.0 ± 1.1 *vs* 3.5 ± 1.1, $P < 0.01$), and decreased HDL-C level (0.5 mmol/L ± 0.1 mmol/L *vs* 0.7 mmol/L ± 0.2 mmol/L, $P < 0.01$). Treatment with TFGs caused a significant reduction in weight gain (462.5 g ± 55.2 g *vs* 495.5 g ± 69.2 g, $P < 0.01$), fat tissue accumulation (6.9 g ± 0.3 g *vs* 8.6 g ± 0.6 g, $P < 0.01$), TG (0.7 mmol/L ± 0.2 mmol/L *vs* 0.9 mmol/L ± 0.3 mmol/L, $P < 0.01$), TC (2.1 mmol/L ± 0.3 mmol/L *vs* 2.7 mmol/L ± 0.4 mmol/L, $P < 0.05$), LDL-C (0.9 mmol/L ± 0.1 mmol/L *vs* 1.2 mmol/L ± 0.2 mmol/L, $P < 0.01$), and HOMA-IR (4.9 ± 1.4 *vs* 8.0 ± 1.1, $P < 0.01$).

CONCLUSION: TFGs have a favorable therapeutic effect on nutritional obesity in rats and might be an effective treatment for obesity.

Key Words: Trigonella; Obesity; Insulin resistance

Lu FR, Yang SL, Shen L, Qin Y, Cai YL, Xiong PC. Therapeutic effect of *trigonella foenum-graecum* L. total saponins on diet-induced obesity in rats. Shijie Huaren

Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2902-2906

摘要

目的: 观察葫芦巴总皂苷(*trigonella foenum-graecum L.* total saponin, TFGs)对高糖高脂饮食诱导的营养性肥胖大鼠的治疗作用.

方法: 采用高糖高脂饮食建立营养性肥胖大鼠模型, TFGs干预8 wk. 观察大鼠体质量, 附睾周围脂肪组织质量, HE染色观察形态学. 检测甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、空腹血糖(Fasting blood glucose, FBG)和空腹胰岛素(fasting insulin, FINS), 计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR).

结果: 与普通饮食大鼠相比, 高糖高脂喂养肥胖大鼠体质量明显增加(495.5 g±69.2 g *vs* 388.7 g±60.2 g, $P<0.01$), 附睾周围脂肪显著增多(8.6 g±0.6 g *vs* 5.3 g±0.5 g, $P<0.01$), 脂肪细胞肥大, TG、TC和LDL-C水平明显升高(0.9 mmol/L±0.3 mmol/L *vs* 0.3 mmol/L±0.2 mmol/L, 2.7 mmol/L±0.4 mmol/L *vs* 1.5 mmol/L±0.1 mmol/L, 1.2 mmol/L±0.2 mmol/L *vs* 0.5 mmol/L±0.2 mmol/L, 均$P<0.01$), HDL-C水平降低(0.5 mmol/L±0.1 mmol/L *vs* 0.7 mmol/L±0.2 mmol/L, $P<0.01$), FINS和HOMA-IR水平显著增高(27.8 mIU/L±4.8 mIU/L *vs* 13.6 mIU/L±3.6 mIU/L, 8.0±1.1 *vs* 3.5±1.1, 均$P<0.01$). 与肥胖大鼠相比, TFGs治疗组大鼠体质量和附睾周围脂肪沉积显著减轻(462.5 g±55.2 g *vs* 495.5 g±69.2 g, $P<0.01$; 6.9 g±0.3 g *vs* 8.6 g±0.6 g, $P<0.01$), 脂肪细胞增生肥大受到抑制. 同时, TG、TC、LDL-C和HOMA-IR水平显著降低(0.7 mmol/L±0.2 mmol/L *vs* 0.9 mmol/L±0.3 mmol/L, $P<0.01$; 2.1 mmol/L±0.3 mmol/L *vs* 2.7 mmol/L±0.4 mmol/L, $P<0.05$; 0.9 mmol/L±0.1 mmol/L *vs* 1.2 mmol/L±0.2 mmol/L, $P<0.01$; 4.9±1.4 *vs* 8.0±1.1, $P<0.01$).

结论: TFGs对营养性肥胖大鼠具有良好的糖脂调节作用, 可能是治疗肥胖的有效药物.

关键词: 葫芦巴属; 肥胖; 胰岛素抵抗

卢芙蓉, 杨胜兰, 沈霖, 秦铀, 蔡亚玲, 熊鹏程. 葫芦巴提取物对营养性肥胖大鼠糖脂的调节效应. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2902-2906

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2902.asp

0 引言

肥胖可导致2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)以及多种心血管疾病, 已成为当前世界性的健康问题之一[1,2]. 因此, 如何有效预防和治疗肥胖及相关并发症, 已成为当前研究的热点之一[3,4]. 从中药中提取降脂、改善胰岛素抵抗的活性成分, 成为一个重要的研究方向[5-7]. 以往有研究报道, 中药葫芦巴及其有效成分具有多种生物学功效[8]. 我们在前期临床研究中发现[9], 中药葫芦巴种子提取物葫芦巴总皂苷(*trigonella foenum-graecum L.* total saponin, TFGs), 联合磺脲药治疗继发性失效T2DM患者, 显示出较好的降糖作用和安全性, 治疗后患者的胰岛素抵抗水平明显下降. Annida等[10]报道, 葫芦巴同时还具有明显的降脂作用. 因此, 中药葫芦巴的活性成分TFGs可能是一种潜在的治疗肥胖的药物, 在本研究中我们采用营养性肥胖大鼠模型为研究对象, 探讨TFGs对肥胖及其糖脂代谢的调节作用.

■研发前沿

改善肥胖相关的胰岛素抵抗成为防治T2DM的关键所在. 传统中药往往具有多靶点、多效应、多功能的综合作用, 而且价格低廉, 来源广泛, 近年来越来越受到重视. 从中草药中筛选安全有效的改善胰岛素抵抗的药物, 已经成为当前研究的热点之一.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂4周龄Wistar大鼠[SCXK(鄂)2010-0007] 30只, 体质量120 g±10 g, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心. 动物房光照时间固定, 昼夜各12 h, 自由摄取水和食物. TFGs由我院药剂科采用水提醇沉-树脂吸附脱糖脱色法制备, 高效液相色谱测得纯度>90%; 胰岛素(Sigma); 血糖试纸(美国强生); 胰岛素放免试剂盒(北京科美东雅生物技术有限公司); 胆固醇和胆酸盐(南京生化制药厂); 高糖高脂饮食由华中科技大学同济医学院实验动物中心制作, 采用66.5%基础饲料、20%蔗糖、10%炼猪油、2.5%胆固醇和1%胆酸盐混合均匀加工成形后烘干而成.

1.2 方法

1.2.1 造模和分组: 30只大鼠基础饲料适应性喂养1 wk后, 随机分成高糖高脂组(20只)和对照组(10只). 高糖高脂组改为高糖高脂饲料喂养, 对照组继续采用基础饲料喂养. 16 wk后, 将高糖高脂饮食大鼠按体质量随机分为治疗组(10只)和肥胖组(10只), 治疗组给予TFGs 100 mg/kg灌胃, 对照组和肥胖组给予等量生理盐水灌胃, 1次/d, 共治疗8 wk.

1.2.2 大鼠体质量的动态测量: 分别在治疗后0、8、16和24 wk测量各组大鼠体质量.

1.2.3 HOMA-IR: 所有大鼠断头取血, 采用葡萄糖氧化酶法检测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG), 采用放射免疫分析法检测空腹胰岛素

■相关报道
葫芦巴作为传统中药之一, 近年来受到国内外广泛关注. 据报道葫芦巴种子具有降低血糖、调节血脂代谢的作用.

表 1 各组大鼠血脂的变化 (mean ± SD, mmol/L, n = 10)

分组	TG	TC	HDL-C	LDL-C
对照组	0.3 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.2
肥胖组	0.9 ± 0.3[b]	2.7 ± 0.4[b]	0.5 ± 0.1[b]	1.2 ± 0.2[b]
治疗组	0.7 ± 0.2[ad]	2.1 ± 0.3[ac]	0.5 ± 0.1[b]	0.9 ± 0.1[ad]

TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; LDL-C低密度脂蛋白胆固醇. [a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 对照组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 肥胖组.

(fasting insulin, FINS), 计算自我稳态模型胰岛素抵抗指数HOMA-IR = (FBG×FINS)/22.5, 用来判断胰岛素抵抗程度[11].

1.2.4 血脂检测: 包括甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 均在本院检验科采用全自动生化分析仪(Hitachi, 7600-020)检测.

统计学处理 采用SPSS13.0软件包进行统计学分析. 组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用LSD法. 所有检验均采用双侧检验, P<0.05认为有统计学意义.

2 结果

2.1 肥胖模型的建立及TFGs对大鼠体质量的影响 图1显示, 经高糖高脂饮食喂养, Wistar大鼠在第8周体质量明显高于正常饮食大鼠(P<0.05), 在第16周时这一趋势更加明显(P<0.01), 表明成功建立肥胖大鼠模型.

从第17周开始肥胖组大鼠采用TFGs治疗8 wk, 在第24周治疗结束时, 肥胖组和治疗组大鼠体质量均明显高于对照组大鼠(均P<0.01), 但是治疗组大鼠体质量明显低于肥胖组大鼠(P<0.01) .

2.2 TFGs对血脂的影响 表1显示, 肥胖组大鼠TG、TC和LDL-C均明显增高(均P<0.01), HDL-C降低(P<0.01); 经TFGs治疗后, TG、TC和LDL-C均明显下降(均P<0.05), 但HDL-C无明显变化(P>0.05).

2.3 TFGs对附睾周围脂肪组织质量的影响 附睾周围脂肪组织边界清晰, 可较完整剥离, 能客观准确称取质量, 新药药效学研究指南推荐研究肥胖大鼠, 取附睾周围脂肪组织称取质量. 因此, 本实验我们选取附睾周围脂肪组织进行质量比较. 结果显示, 肥胖组大鼠附睾周围脂肪质量明显高于正常大鼠(P<0.001), TFGs治疗后, 附睾周围脂肪增加受到明显抑制, 明显少于肥胖组(P<0.01), 但仍多于对照组(P<0.01)(图2).

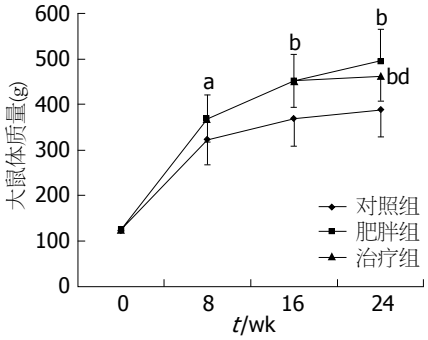


图 1 TFGs对各组大鼠体质量的影响. [a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 对照组; [d]P<0.01.

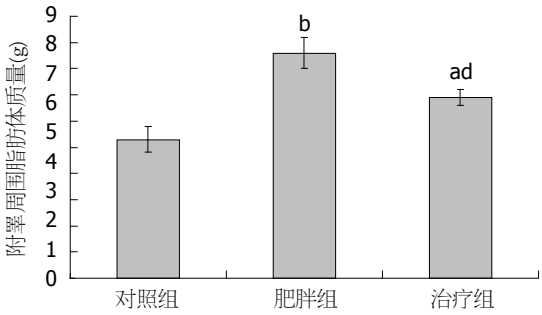


图 2 各组大鼠附睾周围脂肪组织质量. [a]P<0.01, [b]P<0.001 *vs* 对照组; [d]P<0.01 *vs* 肥胖组.

2.4 TFGs对附睾周围脂肪组织形态的影响 由图3可见, 脂肪组织HE染色, 高糖高脂饮食可诱导附睾周围脂肪细胞体积变大, TFGs则可抑制由于饮食造成的细胞体积变大, 这可能是总体水平上脂肪沉积减少及体质量减轻的原因.

2.5 TFGs对血糖和胰岛素抵抗的影响 表2显示, 各组血糖无明显变化, 但肥胖组大鼠FINS明显增高(P<0.01), HOMA-IR明显增高(P<0.01), 提示其发生了明显的胰岛素抵抗; TFGs治疗后, FINS和HOMA-IR明显降低(均P<0.01), 提示TFGs可改善肥胖大鼠胰岛素抵抗.

3 讨论

当人体能量摄入长期超过能量消耗, 大多数多

■创新盘点
本研究采用高脂饮食诱导的大鼠模型, 发现葫芦巴皂苷活性成分具有良好的糖脂调节效应.

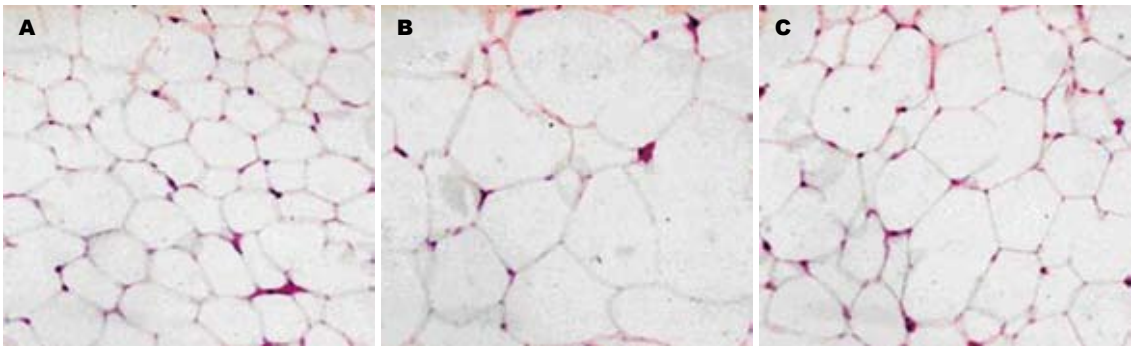


图 3 各组大鼠脂肪组织形态学(HE染色, ×400). A: 对照组; B: 肥胖组; C: 治疗组.

■应用要点
本研究为葫芦巴总皂苷的进一步临床开发打下了坚实的基础. 下一步还需研究该成分的作用机制以及更为明确的单体成分.

表 2 各组大鼠血糖、胰岛素及HOMA-IR的变化 (mean ± SD, n = 10)

分组	FBG(mmol/L)	FINS(mIU/L)	HOMA-IR
对照组	5.7 ± 0.5	13.6 ± 3.6	3.5 ± 1.1
肥胖组	6.5 ± 0.4	27.8 ± 4.8[b]	8.0 ± 1.1[b]
治疗组	6.2 ± 0.6	17.7 ± 4.4[ad]	4.9 ± 1.4[d]

FBG: 空腹血糖; FINS: 空腹胰岛素. HOMA-IR: 胰岛素抵抗指数. [a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 对照组; [c]P<0.05, [d]P<0.01 *vs* 肥胖组.

余能量以TG的形式储存在脂肪细胞内, 从而导致脂肪细胞增生及糖脂代谢障碍, 进而发展为肥胖[12]. 本研究采用高糖高脂饮食喂养16 wk, 成功建立了肥胖大鼠模型. 主要表现为体质量增加, 脂肪沉积增多, 脂肪细胞增生肥大, 空腹胰岛素水平升高近3倍, 才能将血糖维持在正常水平, 胰岛素抵抗指数增加3倍多, 提示肥胖大鼠发生胰岛素敏抵抗, 这与余上斌等[13]的研究结果类似. 本研究高糖高脂喂养16 wk大鼠发展为明显肥胖后, 我们才开始进行干预治疗, 评价TFGs的治疗效果. 而临床上, 患者亦往往先发现肥胖或糖尿病, 而后才就诊, 我们的研究更符合此临床实际情况[14].

中药葫芦巴系豆科植物葫芦巴*Trigonella foenum-graecum*的干燥成熟种子, 药典记载葫芦巴种子有“温润阳, 逐寒湿”的功效. 胡芦巴包含多种活性成分[15], 包括皂苷类[16]、黄酮类[17]、三萜类[18]、生物碱类[19]、香豆素类[20]等. 现代药理研究显示葫芦巴粗提物及其主要成分有多种生物学功效[21-23], 而报道最多的是其降糖功效[24]. 我们在前期临床研究中, 评价了葫芦巴的活性成分TFGs联合磺脲类降糖药治疗继发性失效T2DM患者的临床疗效, 发现TFGs具有良好的降糖作用, 同时初步显示其具有改善胰岛素抵抗的作用[25]. 本研究选用饮食诱导的肥胖模型, 首先动态观察TFGs对肥胖大鼠体质量的影响, 结果显示TFGs可以显著抑制高糖高脂饮食诱导的体质量增加. 同时, TFGs明显减少肥胖大鼠附睾周围脂肪沉积, 减轻脂肪细胞增生肥大. 并且, 能够显著降低肥胖大鼠TG、TC和LDL-C的水平, 对血脂紊乱具有明显的调节作用. 我们又通过观察FINS和HOMA-IR的变化, 进一步证实TFGs对肥胖相关的胰岛素抵抗具有明显的改善作用. 这与Srichamroen等[26]的研究结果类似, 但是在Srichamroen的研究当中, 观察的是葫芦巴半乳甘露聚糖对糖脂调节代谢的作用. 因此, 我们考虑葫芦巴种子中可能不只一种成分具有降糖的作用, 如文献报道葫芦巴的另一种活性成分4-羟基异亮氨酸同样具有良好的糖脂调节作用[27-30].

总之, 本研究观察到TFGs对高糖高脂饮食诱导的肥胖大鼠, 具有良好的治疗作用, 初步研究提示TFGs可能是治疗肥胖的有效药物之一, 为肥胖的治疗提供了新思路.

4 参考文献

1 Hossain P, Kawar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med* 2007; 356: 213-215
2 Nguyen T, Lau DC. The obesity epidemic and its impact on hypertension. *Can J Cardiol* 2012; 28: 326-333
3 Bray GA, Ryan DH. Medical therapy for the patient with obesity. *Circulation* 2012; 125: 1695-1703
4 Onat A. Metabolic syndrome: nature, therapeutic

■同行评价
本研究方法可靠，数据可信，作为临床前研究，有一定指导意义.

solutions and options. *Expert Opin Pharmacother* 2011; 12: 1887-1900

5 高志强, 陆付耳, 冷三华, 谢美娟, 徐丽君, 王开富, 邹欣. 小檗碱对高果糖饲养诱导胰岛素抵抗大鼠肝组织HNF-4α表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1681-1684

6 陈璿瑛, 彭小平, 王琳, 魏筱华, 李文娟, 何明. 肉桂油对胰岛素抵抗小鼠糖脂代谢的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3441-3445

7 王彩冰, 黄彦峰, 黄丽娟, 何显教, 晋玲, 赵善民. 茴香提取液对地塞米松诱导大鼠胰岛素抵抗的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20: 224-228

8 Roberts KT. The potential of fenugreek (Trigonella foenum-graecum) as a functional food and nutraceutical and its effects on glycemia and lipidemia. *J Med Food* 2011; 14: 1485-1489

9 Lu FR, Shen L, Qin Y, Gao L, Li H, Dai Y. Clinical observation on trigonella foenum-graecum L. total saponins in combination with sulfonylureas in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Chin J Integr Med* 2008; 14: 56-60

10 Annida B, Stanely Mainzen Prince P. Supplementation of fenugreek leaves lower lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 2004; 7: 153-156

11 Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C, Stern MP, Miettinen H. A prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care* 1996; 19: 1138-1141

12 Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117: 175-184

13 余上斌, 刘声远. 复方茯苓制剂对营养性肥胖大鼠体质量, 血糖, 血脂及小肠肠系膜微循环的影响. 中国病理生理杂志 2005; 21: 808-810

14 Gidding SS, Nehgme R, Heise C, Muscar C, Linton A, Hassink S. Severe obesity associated with cardiovascular deconditioning, high prevalence of cardiovascular risk factors, diabetes mellitus/hyperinsulinemia, and respiratory compromise. *J Pediatr* 2004; 144: 766-769

15 荆宇, 赵余庆. 胡芦巴化学成分和药理作用研究进展. 中草药 2003; 34: 1146-1149

16 Pang X, Kang L, Yu H, Zhao Y, Xiong C, Zhang J, Shan J, Ma B. Rapid isolation of new furostanol saponins from fenugreek seeds based on ultra-performance liquid chromatography coupled with a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 2012; 35: 1538-1550

17 Prati S, Baravelli V, Fabbri D, Schwarzinger C, Brandolini V, Maietti A, Tedeschi P, Benvenuti S, Macchia M, Marotti I, Bonetti A, Catizone P, Dinelli G. Composition and content of seed flavonoids in forage and grain legume crops. *J Sep Sci* 2007; 30: 491-501

18 Sauvaire Y, Ribes G, Baccou JC, Loubatieères-Mariani MM. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. *Lipids* 1991; 26: 191-197

19 Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1203-1218

20 Lambert JP, Cormier J. Potential interaction between warfarin and boldo-fenugreek. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 509-512

21 卢芙蓉, 秦铀, 沈霖, 熊鹏程, 朱闽, 刘建国, 范恒, 唐庆. 葫芦巴总皂苷对STZ糖尿病大鼠血小板活化的调节作用. 中国医院药学杂志 2010; 30: 18-21

22 卢芙蓉, 秦铀, 熊鹏程, 沈霖. 葫芦巴粗提物对链脲佐霉素诱导的糖尿病大鼠骨密度的作用. 中国中医骨伤科杂志 2009; 17: 17-18

23 卢芙蓉, 秦铀, 沈霖, 刘建国, 熊鹏程. 葫芦巴提取物对肾病综合征大鼠肾损伤的保护作用. 中西医结合研究 2009; 1: 281-284

24 Srichamroen A, Thomson AB, Field CJ, Basu TK. In vitro intestinal glucose uptake is inhibited by galactomannan from Canadian fenugreek seed (Trigonella foenum graecum L) in genetically lean and obese rats. *Nutr Res* 2009; 29: 49-54

25 卢芙蓉, 沈霖, 秦铀, 高兰. 葫芦巴总皂苷联合磺脲类降糖药治疗2型糖尿病36例临床观察. 中国中药杂志 2008; 33: 184-187

26 Srichamroen A, Field CJ, Thomson AB, Basu TK. The Modifying Effects of Galactomannan from Canadian-Grown Fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) on the Glycemic and Lipidemic Status in Rats. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43: 167-174

27 Jetté L, Harvey L, Eugeni K, Levens N. 4-Hydroxyisoleucine: a plant-derived treatment for metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 353-358

28 Jaiswal N, Maurya CK, Venkateswarlu K, Sukanya P, Srivastava AK, Narender T, Tamrakar AK. 4-Hydroxyisoleucine stimulates glucose uptake by increasing surface GLUT4 level in skeletal muscle cells via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *Eur J Nutr* 2012; 51: 893-898

29 Haeri MR, Limaki HK, White CJ, White KN. Non-insulin dependent anti-diabetic activity of (2S, 3R, 4S) 4-hydroxyisoleucine of fenugreek (Trigonella foenum graecum) in streptozotocin-induced type I diabetic rats. *Phytomedicine* 2012; 19: 571-574

30 Ogawa J, Kodera T, Smirnov SV, Hibi M, Samsonova NN, Koyama R, Yamanaka H, Mano J, Kawashima T, Yokozeki K, Shimizu S. A novel L-isoleucine metabolism in Bacillus thuringiensis generating (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine, a potential insulinotropic and anti-obesity amino acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 89: 1929-1938

编辑 田滢 电编 闫晋利

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2907-2912
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

肿瘤相关巨噬细胞在肝癌细胞生长和转移中的作用

郑乔丹, 吴文苑, 陈 月

郑乔丹, 吴文苑, 陈月, 深圳市人民医院(暨南大学第二临床医学院)检验科 广东省深圳市 518020
郑乔丹, 硕士, 主要从事肿瘤免疫和分子靶向治疗方面的研究.
深圳市科技计划基金资助项目, No. 200802102
作者贡献分布: 本文综述由郑乔丹撰写完成; 陈月对部分内容提出修改意见; 吴文苑审校.
通讯作者: 吴文苑, 主任技师, 518020, 广东省深圳市东门北路1017号, 深圳市人民医院(暨南大学第二临床医学院)检验科.
wuy_193@yahoo.com
电话: 0755-25533018-2048
收稿日期: 2012-08-22 修回日期: 2012-09-21
接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-28

Role of tumor-associated macrophages in the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma

Qiao-Dan Zheng, Wen-Yuan Wu, Yue Chen

Qiao-Dan Zheng, Wen-Yuan Wu, Yue Chen, Department of Laboratory Medicine, Shenzhen People's Hospital (the Second Clinical Medical College of Jinan University), Shenzhen 518020, Guangdong Province, China
Supported by: the Scientific and Technological Project of Shenzhen City, No. 200802102
Correspondence to: Wen-Yuan Wu, Chief Technician, Department of Laboratory Medicine, Shenzhen People's Hospital (the Second Clinical Medical College of Jinan University), 1017 North Dongmen Road, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. wuy_193@yahoo.com
Received: 2012-08-22 Revised: 2012-09-21
Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-28

Abstract
The relationship between tumor-associated macrophages (TAMs) and tumors has become a hot research topic in recent years. New evidence suggests that macrophages play a dual role in tumorigenesis and metastasis. Besides anti-tumor effects, macrophages in the tumor microenvironment can facilitate angiogenesis and extracellular matrix breakdown and remodeling and promote tumor cell mobility. In this article we summarize the role of TAMs in the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma in terms of TAM recruitment, inflammation, angiogenesis, and epithelial-mesenchymal transition (EMT).

Key Words: Tumor-associated macrophages; Hepatocellular carcinoma; Cancer progression

Zheng QD, Wu WY, Chen Y. Role of tumor-associated macrophages in the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2907-2912

摘要
肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM)与肿瘤的关系是近年来的研究热点. 既往的研究表明, 巨噬细胞是肿瘤发生和转移过程中的双刃剑, 巨噬细胞除了抗肿瘤作用外, 还可通过血管形成、细胞外基质降解和重构、增强肿瘤细胞的移动性等机制促进肿瘤的发生发展. 本文将从TAM的招募、炎症、血管生成以及上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymaltransitions, EMT)等方面对TAM在肝细胞肝癌的发生、肝癌细胞的转移和浸润的等方面的作用进行综述, 探讨临床肝细胞癌诊断治疗的新靶点.

关键词: 肿瘤相关巨噬细胞; 肝癌; 癌症进展

郑乔丹, 吴文苑, 陈月. 肿瘤相关巨噬细胞在肝癌细胞生长和转移中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2907-2912
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2907.asp

0 引言
肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是人类常见的恶性肿瘤之一, 在全球癌症发病率排行榜上列第5位. 自2008年以来, 全球每年约有750 000例新增病例, 死亡人数高达70万, 我国每年死于肝癌的患者占全球肝癌患者死亡数的53%[1,2].

肿瘤细胞通常处于一个由炎症免疫细胞、基质细胞、血管内皮细胞、细胞因子及趋化因子等共同组成的复杂环境中, 这种微观环境被称为“肿瘤微环境”[3]. 大量的研究表明, 肿瘤组织的微环境对于肿瘤的进展有十分重要的作用, 而“炎症破坏-组织修复”的恶性循环是促进肿瘤发生发展的重要原因[4]. 在恶性肿瘤组织中, 有大量的巨噬细胞浸润, 这些巨噬细胞被称为肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macro-

■背景资料
既往的研究表明, 巨噬细胞在肿瘤发生和转移过程中具有双向作用, 除了抗肿瘤作用外, 还可通过血管形成、细胞外基质的降解和重构、增强肿瘤细胞的移动性等机制促进肿瘤的发生发展. 肿瘤相关巨噬细胞(TAM)与肿瘤的关系是近年来的研究热点.

■同行评议者
唐南洪, 教授, 福建医科大学附属协和医院省肝胆外科研究所

■研发前沿
TAM在肝癌进展中的作用及其机制，以及针对TAM的靶向药物，如脂质体、索拉非尼等的研究是该研究领域中的重点和热点问题.

phages, TAM), 约占炎症细胞总数的10%-65%[5]. TAM参与了肿瘤发生、生长、侵袭和转移的过程, 他的高度浸润与肿瘤的不良预后密切相关[6-8]. 最近的免疫学研究[9,10]显示, 到达肿瘤环境的单核细胞在不同的肿瘤微环境刺激下发生2种不同性质的极化, 即经典活化型巨噬细胞(M1)和替代性活化型巨噬细胞(M2). TAM被认为是M2型巨噬细胞, 其主要特点是诱导宿主免疫抑制, 刺激血管生成, 分泌肿瘤生长因子和诱导Ⅱ型炎症反应. 肿瘤微环境的信号及其机制可能在TAM的极化和功能维持中发挥了重要作用. 本文就目前国内外有关TAM在肝癌发生发展中作用机制的研究作一综述, 为寻找肝细胞癌诊断和治疗的新靶点提供线索.

1 肿瘤相关巨噬细胞的招募和极化

TAM与定位在机体组织中的成熟巨噬细胞不同, 他来源于外周血循环中不成熟的单核细胞[11]. 骨髓中的原始单核细胞与前单核细胞转变成不成熟的单核细胞, 在骨髓中短暂逗留后进入血循环并移行进入全身组织分化为相应的巨噬细胞, 包括肝脏中的Kupffer细胞、肺组织中的肺泡细胞、骨组织中的破骨细胞、脑部小胶质细胞等. 而外周血中不成熟的单核细胞趋化因子CCL2、CCL5、CXCL8和细胞因子[12]的作用下, 浸润至肿瘤组织并与肿瘤微环境相互作用, 发育、分化为TAM, 在某些肿瘤组织中TAM可占全部浸润白细胞的50%以上[13]. 大量的研究已经证明, CCL2是巨噬细胞在肿瘤中含量的主要决定因素, 而其他招募TAM的信号分子还包括巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF或CSF-1)、巨噬细胞炎性蛋白1α(macrophage inflammatory protein 1 Alpha, MIP-1α)、巨噬细胞转移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、CCL3、CCL4、CCL5、CCL8及血管生成素-2(angiopoietin 2, Ang-2)等[14]. Takai等[15]研究表明TAM的招募涉及到HCC细胞膜上磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican 3, GPC3)的表达, 并且glypican-3特异地与HCV感染引起的肝癌患者的不良预后有关[16]. 虽然TAM的招募机制尚未完全明了, 但肝癌组织中各种细胞因子组成的微环境对巨噬细胞的招募和M2表型的极化具有重要作用.

尽管有证据表明慢性炎症在多种肿瘤的启动、进展及转移中起着病原学作用, 但其具体机制尚未被完全阐明[17]. 在一些类型肿瘤中, 已发现癌症与感染具有相关性, 如乙型病毒肝炎(hepatitis B virus, HBV)、丙型病毒肝炎(hepatitis C virus, HCV)和幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)等[18]. 临床上大部分肝癌患者有乙型或/和丙型肝炎肝硬化背景. 炎症和肝硬化导致的细胞增殖异常可以促进肿瘤的发生和进展[19], 其理论主要有2方面: (1)肿瘤细胞募集炎症细胞到肿瘤局部形成炎症微环境. 这个微环境由肿瘤细胞、肿瘤相关的反应性成纤维细胞、浸润性的非肿瘤细胞、可溶性细胞因子以及非细胞的支持物构成; (2)巨噬细胞可受肿瘤微环境因素诱导分化和极化, 成为M2表型巨噬细胞(也就是TAM). 单核细胞向TAM分化的具体机制还未得到完全阐明, Chen等[20]在LPS存在的状态下, 利用雷帕霉素(rapamycin)阻断或者利用RNA干扰技术敲除降低mTOR受体TSC2以激活mTOR通路, 前者可促进单核细胞分化为M1型巨噬细胞, 后者则促进单核细胞分化为M2型巨噬细胞, IL-12、IL-10的分泌减少. 由此得出结论: TSC2-mTOR通路是单核细胞向M2型巨噬细胞分化至关重要的因素. TAM的分子结构和功能特征为低表达的巨噬细胞分化相关抗原, 如羧肽酶M和CD51, 高表达精氨酸酶Ⅰ(arginase Ⅰ)、IL-1、IL-1ra、IL-6、IL-10, 以及表达肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和IL-12. TAMs还表达趋化因子, 包括CCL17和CCL22[21]. HCC中TAM的极化尚未完全阐明, 之前的研究均直接将泛巨噬细胞CD68作为识别组织中TAM标志. 通过免疫组织化学实验发现, HCC存在于肝窦处, 流式细胞术单色标记CD68检测巨噬细胞的存在和分布, 结果表明癌组织中的巨噬细胞数目少于癌旁组织[22], 并据此推测巨噬细胞在癌组织中减少, 即CD68表达量降低, 可能与肝小叶结构破坏较多, 不能更多维持正常肝窦环境有关, 这就导致细胞表面共刺激信号缺乏, 不能为T细胞活化提供足够的第二信号, 从而无法诱导抗肿瘤免疫应答, 使肿瘤细胞易于免疫逃逸, 最终导致肿瘤生长加快.

2 肿瘤相关巨噬细胞与免疫

巨噬细胞是介导炎症反应的关键介质, 在固有免疫和适应性免疫应答中都发挥着十分重要的作用. 肿瘤组织中有大量肿瘤相关的炎症免疫细胞浸润, 包括多种T细胞、B细胞、自然杀

伤细胞以及巨噬细胞, 其中巨噬细胞尤其突出. TAM作为肿瘤基质中的主要炎性成分, 对肿瘤环境中的适应性免疫调节可产生多方面的影响. 首先, TAM可降低肿瘤相关的抗原呈递, 降低T细胞的抗肿瘤作用[23]. 同时还可产生细胞因子和趋化因子招募其他免疫细胞并起协调作用. 有研究发现, 肝癌组织周围的TAM与调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)的密度呈正相关[24]. Treg能强烈抑制效应T细胞及单核细胞等炎症细胞的活性[25,26]. 最新的研究[27]进一步指出肝癌细胞和TAM相互作用并通过TLR4信号通路来介导Treg抑制肿瘤免疫. 还有研究表明TAM可诱导Treg的分化. 例如, 胞浆中的转录因子Foxp3$^+$是自然调节T细胞(naturally occurring regulatory T cell, nTreg)的主要标志, 并参与此类细胞的分化以及肿瘤的发生. Zhou等[28]指出广泛存在于肿瘤内的Foxp3$^+$Treg与高密度的TAM相关, 在小鼠肝癌模型中, 巨噬细胞的清除可减少肝脏内Foxp3$^+$Treg的数目, 并与HCC患者的不良预后有关. 程序性死亡配体1(B7 homolog 1, B7-H1)是B7家族中的一个T细胞共刺激分子, 能促进T细胞的增殖和IL-10的产生, 与表达在T细胞表面的受体PD-1分子结合后, 通过B7-H1/PD-1通路传递抑制性信号. 研究表明肝癌患者癌组织周围的TAM和Kupffer细胞表面表达B7-H1, 从而抑制T细胞、B细胞功能, 介导肝癌细胞的免疫逃逸, 促进肿瘤生长[29,30]. 此外, 还有研究揭示TAM通过与记忆Th17细胞的相互作用可促进记忆性Th17细胞的增殖[31,32]. Th17细胞(效应/记忆Th17细胞)可通过分泌IL-17参与固有免疫和某些炎症的发生. Zhang等[33]指出肿瘤组织内的IL-17生成细胞与HCC的不良预后有关. 还有一项研究也表明[34], 肝癌患者中的IL-17可抑制细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)的功能. 除分泌细胞因子和趋化因子外, TAM还可通过分泌前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2), IL-10, 转化生长因子β(transforming Growth Factorβ, TGF-β)及吲哚胺2, 3-双加氧酶(indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO)等代谢产物调节T细胞的作用[8,35]. 例如: TGF-β是目前已知最强的一种免疫抑制因子, 可作用于参与天然免疫和获得性免疫细胞的增殖、活化与分化过程. 他可以抑制免疫调节性细胞因子如IL-12的产生, 还可以影响肿瘤反应性CTL的发育, 从而减弱CTL对肝癌细胞的杀伤作用, 参与抗肿瘤免疫反应, 有研究报道[36]肝癌患者血清中TGF-β水平显著增高. 以上研究反映出了肝癌中TAM对抗肿瘤免疫的抑制作用.

3 肿瘤相关巨噬细胞在肝癌转移中的作用

肿瘤的浸润和转移是复杂的、多步骤的肿瘤细胞与宿主细胞相互作用的连续过程, 包括肿瘤细胞增殖、血管生成、运动、黏附、基底膜(basement membrane, BM)降解、穿透细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和侵袭到远处组织器官并增殖形成转移灶. 许多研究已经证实TAM可促进肿瘤细胞的外周转移, TAM可通过促进肿瘤细胞生长, 诱导血管生成, 增强肿瘤细胞的转移性等方面促进肿瘤细胞转移和侵袭. Gouon-Evans等[37]的研究发现, 全身清除单核-巨噬细胞的乳腺癌小鼠模型中肿瘤转移受到抑制. 而Rolny等[38]的研究证明, 采用抗体中和单核细胞招募因子能抑制TAM在肿瘤组织中的浸润从而抑制肿瘤转移. 此外, TAM分泌的IL-1、TNF及IL-6等细胞因子被认为具有辅助转移的作用. 在肝癌患者的血清中, IL-6水平远远高于正常人[39], 并且有报道在人肝癌细胞中的IL-6通过STAT3信号通路发挥了抗凋亡的作用[40], 这些现象可能与能产生IL-6的TAM有关, 但其具体机制需要进一步的研究.

肿瘤细胞与巨噬细胞之间通过旁分泌相互作用可诱导两种细胞都产生侵入性伪足, 增强了其细胞外基质重构活性、侵袭力以及迁移能力, 这对肿瘤细胞突破血管壁的基底膜至关重要[41]. 由此我们推断巨噬细胞可能增强肿瘤细胞进入血管的能力, 即内渗的能力. 相应的EGFR信号阻滞药物可抑制肿瘤细胞血管内渗的效力, 这就进一步证明了肿瘤细胞与巨噬细胞之间的这个旁分泌回路在肿瘤细胞转移中的作用[42].

肿瘤细胞迅速生长使供氧需求增加, 必然导致局部低氧、低血糖和血液供应不足甚至坏死, 而低氧和低血糖可以诱导多种促血管内皮细胞生长因子的分泌及炎症分子的表达, 使TAM增加, 引发TAM的促血管生成作用[14]. Peng等[43]通过临床研究指出HCC中TAM数量与微血管密度间有高度相关性. 并且肿瘤组织中的TAM被基质中刺激物激活时还可表达一系列促血管生成因子, 如: 生长因子如酸性成纤维生长因子(acidic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor 1, aFGF/FGF1)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor 2, bFGF/FGF2)、VEGF、粒细胞

■创新盘点

一直以来, 由于肝癌中巨噬细胞的特异性标记抗原尚不明确, 在肝癌发展中的作用争议较多, 所以对于巨噬细胞在肝癌进展中作用的文献综述较少, 本文综述了多篇最新研究报道, 从多个方面探讨TAM在肝癌进展中的作用及机制, 使读者对此有更加全面的了解.

■应用要点
本文对TAM在肝癌中的作用的相关报道作一综述，从TAM的招募、免疫抑制、血管生成与肿瘤转移以及上皮细胞间质转化等方面探讨了TAM在肝癌发生发展过程中的作用及其机制，为TAM靶向的肝癌治疗及术后预防复发的方针研究提供理论指导.

集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、转化生长因子-α(transforming growth factor-α, TGF-α)、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)、血小板衍生生长因子(platelet-derivedgrowthfactor, PDGF)、表皮生成因子(epidermal growth factor, EGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其他单核细胞因子如: 肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、IL-6、IL-8、P物质、前列腺素、干扰素以及胸苷磷酸化酶等酶类[44], 这些与血管形成有关的细胞因子也可由肿瘤细胞、内皮细胞释放, 共同促进肿瘤组织的血管生成.

细胞外基质降解是血管生成的必要条件, 肿瘤组织中的TAM除产生促血管生成因子外还可通过释放相关蛋白水解酶来促进血管生成. 金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是其中的一类, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一类以锌为辅助因子的蛋白酶家族, MMP产生的调节主要发生在转录水平, 他们通过对BM、ECM的降解和增强肿瘤血管生成的作用而促进肿瘤细胞的侵袭和转移, 其活性受到特异性抑制剂TIMP的调节[45,46]. TAM被证明是MMP-9的主要来源, 与多种人类癌症的转移潜能相关, 肿瘤细胞外周的酸性微环境可以上调细胞MMP-2的分泌及激活, 并促进肝癌细胞HCCLM3的体外侵袭和迁移能力, 提示肿瘤外周酸性微环境对肝癌细胞HCCLM3的转移具有促进作用[47]. 此外, TAM还可表达CXCL8刺激血管生成[48]. TAM还能分泌半胱氨酸型溶酶体蛋白酶及多种生长因子刺激肿瘤细胞的生长, TAM正是通过以上的机制影响着血管生成的各个阶段.

4 TAMs在肝癌EMT中的作用

上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymaltransitions, EMT)是具有极性的上皮细胞通过特定程序转换成为具有活动能力的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的过程, 他存在于人体多个生理和病理过程中. EMT在胚胎发育、慢性炎症、组织重建、多种纤维化疾病中发挥了重要作用, 与肿瘤细胞的局部浸润和远处迁移更是关系密切. 肿瘤微环境中的间质信号作用于肿瘤细胞表面特异性受体, 通过信号通路的逐级传递, 引起基因表达的改变, 这就导致细胞表型转化, 使上皮细胞极性消失, 并失去紧密连接和黏附连接, 从而增强了肿瘤细胞的浸润性和迁移能力, 促进了肿瘤的侵袭和转移. 研究表明EMT存在于包括肝脏在内的不同类型癌细胞, EMT的发生涉及到多个信号转导通路和复杂的分子机制, 与钙连接素、生长因子、转录因子和微环境等密切相关. 目前关于TAM对肿瘤细胞EMT的机制研究主要集中在TAM所分泌的炎症因子, 细胞因子及蛋白酶上. 例如, TAM产生的炎症因子TNF-α与受体TNFR结合后, 通过NF-kB及Akt信号通路抑制GSK-3β的表达, 从而引起锌指蛋白转录因子Snail上调, Snail可以在转录水平抑制钙黏附蛋白E(E-cadherin)的表达, 介导EMT, 促进肿瘤的侵袭和复发转移, 研究发现[49]16%-23%的肝细胞肝癌组织中Snail表达过度且肝癌组织分化程度低. 此外, TAM分泌的炎性细胞因子IL-6也对肿瘤细胞的EMT起着十分重要的作用[50], IL-6与IL-6相应受体结合后, 与gp130发生同二聚体化, 激活胞质内Jak激酶, 使STAT3磷酸化并转入核内诱导Snail, 并下调E-cadherin的表达. 此外, TAM分泌的细胞因子如TGF-β、EGF及VEGF等也可促进EMT的发生. 有研究表明TGF-β对于HCC的EMT的十分必要[51], TGF-主要通过β-整合素信号传导途径发挥作用, 促进Smad3分子依赖的细胞转录过程, 也可通过非Smad分子依赖的P38MAP激酶途径及GTP酶介导的信号传导途径发挥作用, 参与EMT的诱导机制. 同时EGF[52]及IL-1β[53]也可协同TGF-β诱导肿瘤细胞发生EMT, 而TAM分泌的VEGF可以下调Smad7, 使E-cadherin下调[54]并上调波形蛋白(vimentin)使肿瘤细胞发生转化. 此外, TAM分泌的MMP-9和MMP-2可降解E-cadherin, 促进肿瘤EMT的发生[55]. 根据以上研究我们认为TAM可能有助于肝癌细胞的EMT.

5 结论

TAM在包括肿瘤血管生成、抗肿瘤的免疫抑制、肿瘤细胞外渗及EMT在内的肿瘤的发生、发展、侵袭及转移的各个阶段都具有十分重要的作用. 肿瘤组织中TAM水平与癌的侵袭密切相关. 因此, TAM及其相关细胞因子的研究有望成为判断肝癌侵袭性的指标之一.

6 参考文献

1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*

2011; 61: 69-90
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 Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008; 27: 5904-5912
4 Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 727-739
5 Whitworth PW, Pak CC, Esgro J, Kleinerman ES, Fidler IJ. Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 8: 319-351
6 Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42: 717-727
7 Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444
8 Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23: 549-555
9 Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13: 453-461
10 Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010; 11: 889-896
11 Mantovani A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest* 1994; 71: 5-16
12 Mantovani A, Schioppa T, Porta C, Allavena P, Sica A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 315-322
13 Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 71-78
14 Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004; 104: 2224-2234
15 Takai H, Kato A, Kato C, Watanabe T, Matsubara K, Suzuki M, Kataoka H. The expression profile of glypican-3 and its relation to macrophage population in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2009; 29: 1056-1064
16 Yorita K, Takahashi N, Takai H, Kato A, Suzuki M, Ishiguro T, Ohtomo T, Nagaike K, Kondo K, Chijiiwa K, Kataoka H. Prognostic significance of circumferential cell surface immunoreactivity of glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2011; 31: 120-131
17 Hold GL, El-Omar EM. Genetic aspects of inflammation and cancer. *Biochem J* 2008; 410: 225-235
18 Quante M, Wang TC. Inflammation and stem cells in gastrointestinal carcinogenesis. *Physiology* (Bethesda) 2008; 23: 350-359
19 Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006; 57: 1-18
20 Chen W, Ma T, Shen XN, Xia XF, Xu GD, Bai XL, Liang TB. Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2-mTOR pathway. *Cancer Res* 2012; 72: 1363-1372
21 Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* 2009; 30: 475-487
22 Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, Werneburg N, Grambihler A, Bronk SF, Gores GJ. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 2003; 38: 1188-1198
23 Sica A. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol* 2010; 32: 153-158
24 Ju MJ, Qiu SJ, Fan J, Xiao YS, Gao Q, Zhou J, Li YW, Tang ZY. Peritumoral activated hepatic stellate cells predict poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma after curative resection. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 498-510
25 Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352
26 Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 2006; 176: 1582-1587
27 Yang J, Zhang JX, Wang H, Wang GL, Hu QG, Zheng QC. Hepatocellular carcinoma and macrophage interaction induced tumor immunosuppression via Treg requires TLR4 signaling. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2938-2947
28 Zhou J, Ding T, Pan W, Zhu LY, Li L, Zheng L. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 2009; 125: 1640-1648
29 Wu K, Kryczek I, Chen L, Zou W, Welling TH. Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions. *Cancer Res* 2009; 69: 8067-8075
30 Kuang DM, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang JP, Wu C, Zheng L. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med* 2009; 206: 1327-1337
31 Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH, Chang A, Coukos G, Liu R, Zou W. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009; 114: 1141-1149
32 Kuang DM, Peng C, Zhao Q, Wu Y, Chen MS, Zheng L. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells. *Hepatology* 2010; 51: 154-164
33 Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol* 2009; 50: 980-989
34 Zhao Q, Xiao X, Wu Y, Wei Y, Zhu LY, Zhou J, Kuang DM. Interleukin-17-educated monocytes suppress cytotoxic T-cell function through B7-H1 in hepatocellular carcinoma patients. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2314-2322
35 Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992; 13: 265-270
36 Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S,

■名词解释

上皮细胞间质转化(EMT): 具有极性的上皮细胞通过特定程序转换成为具有活动能力的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的过程, 他存在于人体多个生理和病理过程中.

■同行评价
该综述选题较新颖，参考文献的选取较全面，对临床有一定指导作用.

Gibbs P, Morris LS, Coleman N, Alexander GJ. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 2005; 41: 722-730
37 Gouon-Evans V, Lin EY, Pollard JW. Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development. *Breast Cancer Res* 2002; 4: 155-164
38 Rolny C, Capparuccia L, Casazza A, Mazzone M, Vallario A, Cignetti A, Medico E, Carmeliet P, Comoglio PM, Tamagnone L. The tumor suppressor semaphorin 3B triggers a prometastatic program mediated by interleukin 8 and the tumor microenvironment. *J Exp Med* 2008; 205: 1155-1171
39 Hsia CY, Huo TI, Chiang SY, Lu MF, Sun CL, Wu JC, Lee PC, Chi CW, Lui WY, Lee SD. Evaluation of interleukin-6, interleukin-10 and human hepatocyte growth factor as tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 208-212
40 Liu Y, Fuchs J, Li C, Lin J. IL-6, a risk factor for hepatocellular carcinoma: FLLL32 inhibits IL-6-induced STAT3 phosphorylation in human hepatocellular cancer cells. *Cell Cycle* 2010; 9: 3423-3427
41 Yamaguchi H, Pixley F, Condeelis J. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol* 2006; 85: 213-218
42 Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J. A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 7022-7029
43 Peng SH, Deng H, Yang JF, Xie PP, Li C, Li H, Feng DY. Significance and relationship between infiltrating inflammatory cell and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma tissues. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6521-6524
44 Marconi C, Bianchini F, Mannini A, Mugnai G, Ruggieri S, Calorini L. Tumoral and macrophage uPAR and MMP-9 contribute to the invasiveness of B16 murine melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 225-231
45 Naylor MS, Stamp GW, Davies BD, Balkwill FR. Expression and activity of MMPS and their regulators in ovarian cancer. *Int J Cancer* 1994; 58: 50-56
46 Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA. Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. *Int J Cancer* 2005; 114: 19-31
47 Raghunand N, Gatenby RA, Gillies RJ. Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours. *Br J Radiol* 2003; 76 Spec No 1: S11-S22
48 Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992; 258: 1798-1801
49 Olmeda D, Jordá M, Peinado H, Fabra A, Cano A. Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. *Oncogene* 2007; 26: 1862-1874
50 Tang Y, Kitisin K, Jogunoori W, Li C, Deng CX, Mueller SC, Ressom HW, Rashid A, He AR, Mendelson JS, Jessup JM, Shetty K, Zasloff M, Mishra B, Reddy EP, Johnson L, Mishra L. Progenitor/stem cells give rise to liver cancer due to aberrant TGF-beta and IL-6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2445-2450
51 Hotz B, Visekruna A, Buhr HJ, Hotz HG. Beyond epithelial to mesenchymal transition: a novel role for the transcription factor Snail in inflammation and wound healing. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 388-397
52 Xu Z, Jiang Y, Steed H, Davidge S, Fu Y. TGFβ and EGF synergistically induce a more invasive phenotype of epithelial ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 401: 376-381
53 Doerner AM, Zuraw BL. TGF-beta1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1beta but not abrogated by corticosteroids. *Respir Res* 2009; 10: 100
54 Gonzalez-Moreno O, Lecanda J, Green JE, Segura V, Catena R, Serrano D, Calvo A. VEGF elicits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate intraepithelial neoplasia (PIN)-like cells via an autocrine loop. *Exp Cell Res* 2010; 316: 554-567
55 Zuo JH, Zhu W, Li MY, Li XH, Yi H, Zeng GQ, Wan XX, He QY, Li JH, Qu JQ, Chen Y, Xiao ZQ. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem* 2011; 112: 2508-2517

编辑 田滢 电编 闫晋利

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2913-2919
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

胆管癌相关信号通路的研究进展

祝珊珊, 李文岗

祝珊珊, 厦门大学附属成功医院肝胆外科实验室 福建省厦门市 361003
李文岗, 厦门大学附属成功医院肝胆外科 福建省厦门市 361003
国家自然科学基金资助项目, No. 81072014
作者贡献分布: 本文综述由祝珊珊完稿; 李文岗负责审校.
通讯作者: 李文岗, 教授, 博士生导师, 361003, 福建省厦门市, 厦门大学附属成功医院肝胆外科. lwg11861@163.com
电话: 0592-6335699
收稿日期: 2012-07-16 修回日期: 2012-09-22
接受日期: 2012-10-10 在线出版日期: 2012-10-28

Advances in research of signaling pathways in cholangiocarcinoma

Shan-Shan Zhu, Wen-Gang Li

Shan-Shan Zhu, Department of Hepatobiliary Surgery, Chenggong Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China
Wen-Gang Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Chenggong Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072014
Correspondence to: Wen-Gang Li, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Chenggong Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China. lwg11861@163.com
Received: 2012-07-16 Revised: 2012-09-22
Accepted: 2012-10-10 Published online: 2012-10-28

Abstract
Epidemiological data indicate that the incidence and mortality of cholangiocarcinoma (CC) show an increasing trend worldwide over the past several years. Many pathophysiologic aspects of this neoplasia are still unknown and need to be fully discovered. However, progress has been recently made in understanding molecular mechanisms involved in the transformation and growth of malignant cholangiocytes. It is found that cholangiocarcinogenesis is a multistep cellular process evolving from a normal condition of the epithelial biliary cells and ending with malignant transformation through a chronic inflammation status. The bad prognosis related to CC justifies why a better identification of the molecular mechanisms involved in the growth and progression of this cancer is required for the development of effective preventive measures and valid treatment regimens. Signaling pathways can regulate substance and energy metabolism in organisms and are closely related to biological growth and development. This paper mainly introduces signaling pathways which occur in cholangiocarcinoma and their roles in cholangiocarcinoma cells.

Key Words: Cholangiocarcinoma; Molecular mechanism; Signaling pathway

Zhu SS, Li WG. Advances in research of signaling pathways in cholangiocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2913-2919

摘要
过去几年的流行病学数据显示, 全世界胆管癌的发生率及致死率呈上升趋势. 对于这种疾病的病理学原因目前尚不明确. 然而, 最近对胆管癌的研究进展为我们从分子机制着手了解胆管癌发生和转化提供了一些思路. 这些研究结果至少可以总结为胆管癌发生是一个多步骤的细胞进程, 通常从正常状态的胆道上皮细胞经慢性炎症最终走向恶性胆管癌. 胆管癌的不良预后使得寻找与该肿瘤相关的分子机制及预防措施成为首要任务. 信号通路作为生物体内调节物质和能量代谢的信号系统与生物的生长、发育等密切相关. 本文主要以发生在胆管癌中的信号通路为重点, 介绍不同信号通路及其分子机制在胆管癌细胞中的生物学作用.

关键词: 胆管癌; 分子机制; 信号通路

祝珊珊, 李文岗. 胆管癌相关信号通路的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2913-2919
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2913.asp

0 引言
胆管癌因其在世界范围内的高发生率及其易致死性而被认为是死亡性癌症, 他主要起源于分化的胆管上皮细胞[1], 部分也可起源于未分化的肝干细胞, 是仅次于肝细胞癌的肝胆恶性肿瘤,

■背景资料
目前国内外对胆管癌的研究较少, 胆管癌发生和发展中相关信号通路的分子机制仍不清晰. 因此, 介绍胆管癌发展进程中的信号通路将为今后的研究提供信息支持, 以便研究者了解目前的趋势和成果.

■同行评议者
刘超, 教授, 主任医师, 中山大学孙逸仙纪念医院(附属第二医院)肝胆胰外科

■相关报道
胆管癌的发生是一个多步骤、多因素参与的过程, 国内外相关研究已经证实在胆管癌的发生中有大量信号通路被激活. 例如, 生长因子信号通路c-Met、ErbB2、Notch、TGF-β以及各类激酶信号系统, 这些信号通路系统大部分诱导胆管癌细胞抵抗凋亡, 从而逃脱死亡的命运, 最终导致不同程度的恶性侵袭胆管癌细胞的产生.

流行病学研究显示其在西方国家的发病率正逐年上升[2]. 由于胆管癌预后较差使其存活率一般<2年[3]. 治疗胆管癌唯一的方法是采用外科手术切除或肝移植. 由于大多数能检查出的胆管癌的患者已到癌症晚期, 即使能手术治疗, 预后也差, 效果不明显. 更严重的是, 传统的化学疗法和放射治疗对晚期胆管癌的治疗作用有限, 无法有效延长患者的生命[4]. 胆管癌的发生与胆道慢性感染、溃疡性结肠炎及胆汁积聚等关系密切, 是一个由多分子、多因素、多信号通路参与构成的多步骤疾病. 其发病机制十分复杂, 近年来对胆管癌的研究已日趋成熟. 胆管癌发生及进展过程中相关的信号通路也较为明朗. 本文以信号通路为切入点, 着重阐述胆管癌发生及发展中相关信号通路的研究进展.

1 胆管癌发生及发展中的信号通路

1.1 Ras信号通路 许多研究证实Ras信号转导通路在真核细胞的生长过程中处于中枢地位. 在人类的许多癌症中都有*ras*基因的突变, 其突变后持续活化的生长信号导致细胞的恶性增殖. 研究表明, 激活Ras的表达能增强血管生长因子[例如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)/(vascular permeability factor, VPF)]的表达提示Ras在血管生成中发挥作用. 抑制Ras活性能抑制依赖Ras的肿瘤细胞的增生, 并且也能干扰血管生成[5]. 而在胆管肿瘤发生中有*k-ras*基因的点突变的报道. 这种点突变主要是编码*ras*的基因序列上12号密码子甘氨酸突变成天冬氨酸, 也有少许突变为缬氨酸[6-8]. 另外, 突变还会发生在密码子13上和密码子61上. 这些在*k-ras*上的不同突变主要是由肿瘤类型、人种以及地域差异, 或者采取不同的分析技术造成的[6]. 另外, Ras信号通路还有多个磷酸激酶信号通路偶联, 如Raf激酶磷酸化有丝分裂原活化蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK, 也称MEK), MAPKK激活有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK, 也称ERK)等. 这些激酶被激活后, 转至细胞核内, 可直接激活转录因子的转录和表达, 从而诱导一系列极限反应, 最终发生细胞信号通路的异常激活或紊乱.

1.2 IL-6信号通路 白介素-6(interleukin-6, IL-6)是参与调节胆管癌细胞生长的一个主要的细胞因子. Meng等[9]的研究显示IL-6能促进胆管癌细胞的增殖并诱导其抵抗化疗进而存活. IL-6是肝细胞在不同病理状态如胆管细胞发生炎症状态时分泌的细胞因子. 这种细胞因子有2种功能: (1)免疫应答; (2)刺激正常细胞及肿瘤细胞的生长能力. 有研究证实IL-6对胆管癌细胞的发病和生长具有根本性作用[9]. 许多数据显示炎症介导的IL-6可作为在胆管癌细胞抗凋亡的直接信号机制, 并指出激活转录因子-3(signal transducers and activators of transcription, STAT-3)在胆管癌恶性转化过程中有重要功能, 并且在胆管癌患者中其胆汁和血清中可检测到高水平的IL-6[10]. 说明IL-6或许可作为检测胆管癌疾病的指标之一. IL-6可通过旁分泌/自分泌机制及特殊的促进子P44/P42和P38 MAPK通路刺激细胞的增殖[11].

另外, IL-6已被证实在胆管癌以及其他癌症的发生中扮演着促进因子和存活因子的作用[12-14]. IL-6促进胆管癌细胞的增殖和分化[15]是通过激活Akt信号通路上调Mcl-1(抗凋亡Bcl-2家族的一员)抵抗TRAIL诱导的细胞凋亡作用而发生[14,16-18]. 当抑制IL-6诱导Mcl-1的表达可恢复癌细胞对TRAIL的敏感性[14]. 还有研究发现在胆管癌细胞内IL-6通过磷酸化信号转导途径和STAT-3诱导抗凋亡蛋白Mcl-1的表达, 从而增强胆管癌细胞抵抗凋亡的能力. 也有研究发现IL-6还可通过激活MAPK信号通路上调Mcl-1的表达[19]. 并且, 这种效应也依赖于IL-6诱导激活STAT-3(特别是在侵袭性高的恶性胆管癌中)[16]. 也有研究发现细胞因子信号抑制物-3(suppressor of cytokine signaling, SOCS-3)可通过经典的反馈环控制IL-6/STAT-3信号通路实现对胆管癌细胞的负调节作用[19]. 也许, SOCS-3可作为这一信号通路的靶点治疗胆管癌.

1.3 NF-κB信号通路 大量研究表明NF-κB信号通路在多种人类癌症中存在异常表达的现象[20]. 在一些癌症中, NF-κB信号通路主要存在于细胞核内[21-23]. NF-κB的激活不仅可保护肿瘤细胞免受凋亡, 还能增强肿瘤细胞的生存能力[24]. 抑制NF-κB的激活能诱导肿瘤细胞的凋亡, 暗示肿瘤细胞的生存与死亡之间的对抗平衡与NF-κB信号水平相关. 在胆管癌的NF-κB信号通路研究中, 有结果显示咖啡酸苯乙烯酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)能作为NF-κB信号通路的抑制剂, 抑制胆管癌细胞的生长[25].

1.4 生长因子信号通路 多类生长因子如肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、c-Met以及ErbB2已被证实参与胆管癌细胞的生命进程[26]. c-Met的含量与胆管癌细胞的分化程度相

关, 高分化的胆管癌细胞中c-Met的水平比低分化的胆管癌细胞高[27,28]. 研究发现c-Met作为一个酪氨酸激酶受体在许多癌症中有过量表达或调控紊乱的现象, 并证实c-Met与胆管癌的生长相关[27-30]. 特别是与侵袭性和迁移性肿瘤的生长密切相关[31]. c-Met是定位在7号染色体上的原癌基因, 能在胆管癌细胞表面的高表达酪氨酸激酶生长因子受体[32,33]. c-Met的亚基为HGF/SF. HGF/SF-Met通路可参与胚胎发育进程. 然而相关研究结果也显示胆管癌细胞中的HGF的表达水平升高, 同时有c-Met(HGF的细胞表面受体)的上调和过度磷酸化, 并存在调节恶性胆管癌生长的自分泌环[34]. 胆管癌细胞过表达c-Met与其增强细胞迁移和侵袭有关. 相反的, 抑制c-Met的表达伴随着细胞生长和侵袭的减缓[35]. HGF与c-Met结合诱导细胞内酪氨酸激酶在受体β-亚基的自磷酸化[33]. 这一过程伴随一系列信号网络如Src、PI3K、Gab1、SOS、Grb2和MEK1/2的激活, 所有这些信号网络都参与调节细胞侵袭, 血管形成, 肿瘤分化及增殖[36,37]. HGF/Met信号通路通过调节如细胞分布、侵袭、增殖和细胞存活等参与多种生物学进程[37-39]. 已有研究证实HGF/Met是通过激活胆管癌细胞中的ERK1/2, 以及PI3K/Akt等信号通路调节细胞的侵袭和迁移[40].

1.5 JAK/STAT信号通路 JAK/STAT信号通路是调节胆管癌细胞抵抗凋亡的一条关键信号通路. 在最近的一项研究中, Blechacz等[41]表明JAK/STAT信号通路能被多重激酶抑制剂-索拉菲尼抑制, 这可以作为降低胆管癌生长的治疗物. 索拉菲尼通过刺激磷酸激酶SHP-2的激活诱导STAT-3去磷酸化, 最终导致胆管癌细胞对TRAIL介导的凋亡敏感而发生细胞凋亡.

1.6 Fas凋亡信号通路 Fas/Fas L信号通路最早证明在细胞凋亡中起着重要的作用. Fas介导的肿瘤细胞凋亡被认为是一个潜在的肿瘤治疗靶点, 包括胆管癌. Chen等[42]的研究发现有Fas抗性的胆管癌细胞比Fas敏感性细胞展示出更高的Akt的磷酸化作用. 而过高的Akt磷酸化已被证实正与胆管癌的形成有关. 蛋白激酶B/Akt信号通路在调节胆管癌凋亡进程中发挥重要的作用[4,43]. 研究人员还发现3, 3'-二吲哚甲烷可促进Fas介导的胆管癌细胞凋亡, 原因是二吲哚甲烷可抑制Akt的磷酸化并激活FLICE-类似的-抑制蛋白抑制磷脂酰肌醇3-激酶/Akt从而减少FLICE-类似的-抑制蛋白的活性最终促进Fas介导的凋亡[42]. 这一系列结果提示Akt和FLICE-类似的-抑制蛋白也许可作为治疗胆管癌潜在的分子靶点, 而二吲哚甲烷可作为在胆管癌治疗中的有效药物.

1.7 TGF-β信号通路 转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)信号通路是一个由细胞因子参与的与细胞生长, 分化, 迁移, 凋亡, 黏附, 存活和免疫等细胞学作用相关的信号因子. TGF-β大部分由肝细胞合成, 而胆管细胞只有在病理状态如胆汁郁积时才合成TGF-β[44]. 一般来说, TGF-β的作用是抑制效应. 例如, 他通过调节细胞周期蛋白P21依赖性激酶抑制子而降低胆管癌细胞增殖[45]. 然而, 由于TGF-β的受体(TβR1)突变以及细胞内信号介质改变(如Smad4), 或者细胞内周期蛋白CyclinD1的过表达使得在胆管癌细胞中这种抗增殖作用被隐藏[46,47]. 另外, TGF-β信号通路通过下游分子Smads家族介导胆管癌细胞的上皮-间质转化(epithelial–mesenchymal transitions, EMT)进程. Sato等[48]的研究还发现TGF-β可通过降低上皮标记基因E-钙粘蛋白(E-cadherin)和细胞角蛋白19, 并增加间质标记基因*vimentin*和*s100a4*, 通过下游分子Snail激活胆管癌细胞的上皮-间质转化进程. 即TGF-β信号能刺激胆管癌细胞纤维化[49]. 总之, 在胆管癌中TGF-β信号的异常激活可导致细胞增殖, 形成纤维样并发EMT[47]. 将TGF-β信号通路作为抑制靶点也许可以作为治疗侵袭性胆管癌或其他侵袭性癌症的方法.

1.8 ErbB-2信号通路 许多研究表明胆管癌细胞表达大量的ErbB-2蛋白. 这个分子参与胆管癌的发生和发展[29], 且其过表达能维持胆管癌细胞的生长和存活. 另外, 其对肿瘤细胞的直接作用还与其刺激环氧酶-2(cyclo oxyge nase, COX-2)的形成有关. COX-2形成的复合物又可作为IL-6受体的亚基[50]. 这一作用暗示IL-6和ErbB-2信号之间的密切联系[48,50]. Lai等[51]在正常胆管细胞中转染大鼠同源的ErbB-2后细胞经历类似人类胆管癌细胞的恶性转化过程, 暗示ErbB-2对胆管细胞成癌的密切作用. Treekitkarnmongkol等[52]证实ErbB2能通过PI3K/AKT/p70S6K途径诱导胆管癌细胞的侵袭和增殖. 在ErbB2高表达的胆管癌细胞中, ErbB2及其作用的效应分子或许可作为今后在胆管癌诊断和治疗的靶位点.

1.9 Notch信号通路 在哺乳类动物中Notch信号通路包含4个Notch受体(Notch1-4)和5个亚基(Jagged1、Jagged2、DLL1、DLL3和DLL4). 从生理学方向看, Notch信号通路在多细胞生物发育

■创新盘点
此文章的主要创新之处在于将目前对胆管癌分子机制的研究成果进行总结, 是目前国内首篇关于胆管癌信号通路的综述性文章. 这篇文章可为胆管癌的进一步研究提供信息参考.

■名词解释
胆管癌: 是指原发于左右肝管汇合部至胆总管下端的肝外胆管恶性肿瘤.

过程中发挥着调节细胞的分化、增殖、凋亡、干细胞形态的维持以及决定多种细胞命运[53]的作用. 许多研究发现, *notch*基因紊乱与血液系统恶性肿瘤有关[54,55]. 另外, Notch信号通路异常与大多数实体瘤形成, 如乳腺癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌、宫颈癌、脑癌、肺癌、肝癌和皮肤癌等相关[56]. DLL4是Notch信号通路的内皮细胞特异性亚基, 在血管发生及血管再生时表达升高[57,58], 可由VEGF诱导产生并作为VEGF的下游调节分子, 使VEGF失活, 最终导致微血管的成熟和稳定[57]. 最近一项研究发现, Notch信号通路的受体(notch1-4)及其亚基DLL4与人类肝外胆管癌进程有关, 在不同分化程度的胆管癌组织中存在Notch蛋白1-4的较高表达, 而DLL4在细胞质中水平较高. 在肝外胆管癌上调DLL4与组织的低分化相关, 而DLL4定位于细胞质中也与胆管肿瘤发生有一定的联系[59].

另外, γ-分泌酶素(γ-secretase)能在多种肿瘤中激活Notch信号通路. 当Notch与其亚基DLL或Jagged结合后在特殊的位点进行两个连贯的分裂. 第一个分裂发生在细胞膜外, 由ADAM-类似蛋白酶介导[60]; 另一个则由γ-分泌酶素复合物[含有早衰蛋白增强子-2(Pen-2), APH-1等]介导, 最终导致细胞核内靶基因的转录和表达. Frampton等[61]研究发现内源性大麻素(anandamide, AEA)能够促进早衰蛋白1的表达从而募集γ-分泌酶素复合物调节Notch1的活性; 而2-花生酰甘油基增强早衰蛋白-2的表达募集γ-分泌酶素复合物激活Notch2的活性, 最终抑制胆管癌细胞的增殖和分化. 这些研究结果表明Notch信号通路也许也可以作为潜在的治疗胆管癌的靶点, 反转其对肿瘤的正向活性而导致肿瘤凋亡.

1.10 Wnt信号通路 Wnt信号转导途径参与细胞多种复杂的生化反应过程. Wnt信通路中关键作用的分子即β-连环蛋白(β-catenin). Wnt信号通路通过下游多个信号通路控制细胞行为. 主要包含3种途径: β-catenin依赖的Wnt级联反应、β-catenin非依赖的平面细胞极性Wnt/PCP(planar cell polarity pathway)和Wnt/Ca^{2+}信号通路[62-64]. Wnt信号通路的异常激活与多种肿瘤发生有关. DeMorrow等[65]在研究AEA对胆管癌生长的调节中发现AEA能通过活化非经典的Wnt/Ca^{2+}信号通路抑制体外培养的胆管癌细胞的生长. 相反, Abuetabh等[66]的研究发现经典Wnt信号通路能参与激活胆管癌细胞的生长进程. 他们的研究发现经典Wnt信号通路关键因子β-catenin的表达与侵袭程度不同的胆管癌细胞相关, 且其表达后在细胞内的定位根据胆管癌侵袭程度不同而不同. 另外, Tokumoto等[67]对24例肝内胆管癌患者样品进行分析后发现Wnt靶基因β-catenin过表达且可分布在细胞膜和细胞核内, Wnt信号通路下游靶基因*c-myc*、*cyclind1*等也发生明显的过表达现象, 而CyclinD1的表达量出现不同程度的升高; 序列分析结果显示腺瘤息肉病毒(adenomatous polyposis coli, APC), *axin1*等基因发生不同程度的突变. 这些结果都暗示经典Wnt信号通路靶基因的过量表达在胆管癌的发生中发挥重要的作用.

系统研究Wnt信号通路在胆管癌中的相关分子机制的信息相对较少, 这也可能是由于Wnt信号通路在其他肿瘤的研究中投入过多, 另外, 在胆管癌内的预后低, 造成发现该病症时已是癌症晚期, 因此较难发现早期的治病机制, 而Wnt信号的激活一般发生于早期.

1.11 PTEN和mTOR信号通路 作为在多种恶性肿瘤中起着关键调控作用的信号通路, PI3K/PTEN/Akt/mTOR信号通路可介导肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡等. *pten*是一个抑癌基因, 在多种肿瘤中具有较高的突变率, 是PI3K/Akt/PTEN信号通路的重要调节因子[68]. mTOR是一种蛋白激酶, 能被PI3K/Akt磷酸化而激活, 从而通过下游分子影响细胞周期, 调节细胞凋亡[69]. Chung等[70]在对221例肝外胆管癌的研究中发现在胆管癌细胞内PTEN的表达明显低于正常胆管组织, 而mTOR和Akt的表达明显增高. PTEN的表达降低同样导致PTEN/p-AKT和PTEN/p-mTOR信号减弱, 导致患者的存活率下降. 这一结果提示这条信号通路在介导胆管癌的发生及凋亡进程中可能发挥着重要的作用. 最近还有发现Smad4能与PTEN结合调节细胞周期. 当Smad4和PTEN在胆管癌模型老鼠体内被敲除后, 小鼠胆道出现大规模增生. 另外, 研究人员还发现胆管癌的形成还伴随着多步骤与多个信号通路转变的组织病理学变化, 包括Akt的磷酸化、FOXO1、GSK-3B、mTOR和ERK信号水平增加, 以及细胞核内的CyclinD1的水平升高[71].

2 结论

尽管现阶段对肿瘤发生和发展的的研究已越来越深入, 对其发生和发展的机制也越来越明确, 但是参与胆管癌发生和发展的分子机制仍未阐

明. 并且, 由于胆管癌发病机制难以明细, 且预后差, 因此明确胆管癌发病相关信号通路之间的关系尤为重要. 多细胞生物体细胞内的信号传递是高度复杂的网络过程. 不同的外界或内在刺激会引发不同的信号传导和信号偶联, 从而对生物的生命活动进程进行调控. 信号通路的异常往往与肿瘤发生相关. 由于胆管癌发生率呈现世界范围内的递增又缺乏有效的治疗手段, 因此找到治疗胆管癌的关键靶位点以及靶向药物成为目前研究热点之一. 由于信号通路的网络效应, 在众多的信号通路中发现他们的关联分子也许可为胆管癌的治疗提供新的视点. 现阶段对信号通路的研究已经取得了不少的进展, 但还有许多路要走. 通过对胆管癌内信号通路的分析, 可以知道胆管癌的各种信号通路之间有一定相似性, 单一分子作用可能会被信号偶联作用放大, 如蛋白激酶信号系统(AKE/MAPK/JAK/PI3K), 以及细胞因子信号系统等, 也有许多信号系统通过激活抗凋亡基因Mcl-1等而使胆管癌细胞逃脱衰老与凋亡的程序而继续增殖分化、侵袭和迁移. 由于胆管癌预后较差, 找到引发胆管癌发生和发展中的关键调节子并将其作为治疗胆管癌的有效靶分子, 或找出诊断胆管癌发生的关键因子都将为胆管癌的治疗提供新的思路.

3 参考文献

1 Fava G, Lorenzini I. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 630543

2 Matull WR, Khan SA, Pereira SP. Re: Impact of classification of hilar cholangiocarcinomas (Klatskin tumors) on incidence of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 407; author reply 407-408

3 Blechacz BR, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 131-150, ix

4 Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* 2005; 41: 5-15

5 Zhao L, Lobo S, Dong X, Ault AD, Deschenes RJ. Erf4p and Erf2p form an endoplasmic reticulum-associated complex involved in the plasma membrane localization of yeast Ras proteins. *J Biol Chem* 2002; 277: 49352-49359

6 Sandhu DS, Shire AM, Roberts LR. Epigenetic DNA hypermethylation in cholangiocarcinoma: potential roles in pathogenesis, diagnosis and identification of treatment targets. *Liver Int* 2008; 28: 12-27

7 Sturm PD, Baas IO, Clement MJ, Nakeeb A, Johan G, Offerhaus A, Hruban RH, Pitt HA. Alterations of the p53 tumor-suppressor gene and K-ras oncogene in perihilar cholangiocarcinomas from a high-incidence area. *Int J Cancer* 1998; 78: 695-698

8 Wattanasirichaigoon S, Tasanakhajorn U, Jesadapatarakul S. The incidence of K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinoma detected by polymerase chain reaction technique. *J Med Assoc Thai* 1998; 81: 316-323

9 Meng F, Yamagiwa Y, Ueno Y, Patel T. Over-expression of interleukin-6 enhances cell survival and transformed cell growth in human malignant cholangiocytes. *J Hepatol* 2006; 44: 1055-1065

10 Akiyama T, Hasegawa T, Sejima T, Sahara H, Seto K, Saito H, Takashima S. Serum and bile interleukin 6 after percutaneous transhepatic cholangio-drainage. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 665-671

11 Park J, Tadlock L, Gores GJ, Patel T. Inhibition of interleukin 6-mediated mitogen-activated protein kinase activation attenuates growth of a cholangiocarcinoma cell line. *Hepatology* 1999; 30: 1128-1133

12 Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18: 509-524

13 Goydos JS, Brumfield AM, Frezza E, Booth A, Lotze MT, Carty SE. Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker. *Ann Surg* 1998; 227: 398-404

14 Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 2005; 128: 2054-2065

15 Sugawara H, Yasoshima M, Katayanagi K, Kono N, Watanabe Y, Harada K, Nakanuma Y. Relationship between interleukin-6 and proliferation and differentiation in cholangiocarcinoma. *Histopathology* 1998; 33: 145-153

16 Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA, Gores GJ. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2005; 42: 1329-1338

17 Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology* 2002; 122: 985-993

18 Taniai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, Kaufmann SH, Gores GJ. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 2004; 64: 3517-3524

19 Isomoto H, Mott JL, Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Haan S, Gores GJ. Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing. *Gastroenterology* 2007; 132: 384-396

20 Zhang X, Jin B, Huang C. The PI3K/Akt pathway and its downstream transcriptional factors as targets for chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 305-316

21 Lu T, Stark GR. Cytokine overexpression and constitutive NFkappaB in cancer. *Cell Cycle* 2004; 3: 1114-1117

22 Weisz L, Damalas A, Liontos M, Karakaidos P, Fontemaggi G, Maor-Aloni R, Kalis M, Levrero M, Strano S, Gorgoulis VG, Rotter V, Blandino G, Oren M. Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 2396-2401

23 Fabre C, Grosjean J, Tailler M, Boehrer S, Adès L,

■同行评价

本文较全面的总结了信号通路在胆管癌发生、发展中的作用.

Perfettini JL, de Botton S, Fenaux P, Kroemer G. A novel effect of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors: NFkappaB inhibition in malignant myeloblasts. *Cell Cycle* 2008; 7: 2139-2145
24 Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-784
25 Onori P, DeMorrow S, Gaudio E, Franchitto A, Mancinelli R, Venter J, Kopriva S, Ueno Y, Alvaro D, Savage J, Alpini G, Francis H. Caffeic acid phenethyl ester decreases cholangiocarcinoma growth by inhibition of NF-kappaB and induction of apoptosis. *Int J Cancer* 2009; 125: 565-576
26 Sirica AE, Lai GH, Zhang Z. Biliary cancer growth factor pathways, cyclo-oxygenase-2 and potential therapeutic strategies. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 363-372
27 Endo K, Yoon BI, Pairojkul C, Demetris AJ, Sirica AE. ERBB-2 overexpression and cyclooxygenase-2 up-regulation in human cholangiocarcinoma and risk conditions. *Hepatology* 2002; 36: 439-450
28 Terada T, Nakanuma Y, Sirica AE. Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis. *Hum Pathol* 1998; 29: 175-180
29 Aishima SI, Taguchi KI, Sugimachi K, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. c-erbB-2 and c-Met expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Histopathology* 2002; 40: 269-278
30 Varnholt H, Asayama Y, Aishima S, Taguchi K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. C-met and hepatocyte growth factor expression in combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* 2002; 9: 35-41
31 Terada T, Okada Y, Nakanuma Y. Expression of immunoreactive matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human normal livers and primary liver tumors. *Hepatology* 1996; 23: 1341-1344
32 Radaeva S, Ferreira-Gonzalez A, Sirica AE. Overexpression of C-NEU and C-MET during rat liver cholangiocarcinogenesis: A link between biliary intestinal metaplasia and mucin-producing cholangiocarcinoma. *Hepatology* 1999; 29: 1453-1462
33 Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF. Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* 2000; 19: 5582-5589
34 Lai GH, Radaeva S, Nakamura T, Sirica AE. Unique epithelial cell production of hepatocyte growth factor/scatter factor by putative precancerous intestinal metaplasias and associated "intestinal-type" biliary cancer chemically induced in rat liver. *Hepatology* 2000; 31: 1257-1265
35 Ishimura N, Bronk SF, Gores GJ. Inducible nitric oxide synthase upregulates cyclooxygenase-2 in mouse cholangiocytes promoting cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G88-G95
36 Gao CF, Vande Woude GF. HGF/SF-Met signaling in tumor progression. *Cell Res* 2005; 15: 49-51
37 Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 915-925
38 Hammond DE, Carter S, Clague MJ. Met receptor dynamics and signalling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 286: 21-44
39 Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 289-300
40 Menakongka A, Suthiphongchai T. Involvement of PI3K and ERK1/2 pathways in hepatocyte growth factor-induced cholangiocarcinoma cell invasion. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 713-722
41 Blechacz BR, Smoot RL, Bronk SF, Werneburg NW, Sirica AE, Gores GJ. Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2. *Hepatology* 2009; 50: 1861-1870
42 Chen Y, Xu J, Jhala N, Pawar P, Zhu ZB, Ma L, Byon CH, McDonald JM. Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells is enhanced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of AKT signaling and FLICE-like inhibitory protein. *Am J Pathol* 2006; 169: 1833-1842
43 Wu T, Leng J, Han C, Demetris AJ. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib blocks phosphorylation of Akt and induces apoptosis in human cholangiocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 299-307
44 Saperstein LA, Jirtle RL, Farouk M, Thompson HJ, Chung KS, Meyers WC. Transforming growth factor-beta 1 and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression during intrahepatic bile duct hyperplasia and biliary fibrosis in the rat. *Hepatology* 1994; 19: 412-417
45 Miyazaki M, Ohashi R, Tsuji T, Mihara K, Gohda E, Namba M. Transforming growth factor-beta 1 stimulates or inhibits cell growth via down- or up-regulation of p21/Waf1. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246: 873-880
46 Zen Y, Harada K, Sasaki M, Chen TC, Chen MF, Yeh TS, Jan YY, Huang SF, Nimura Y, Nakanuma Y. Intrahepatic cholangiocarcinoma escapes from growth inhibitory effect of transforming growth factor-beta1 by overexpression of cyclin D1. *Lab Invest* 2005; 85: 572-581
47 Yazumi S, Ko K, Watanabe N, Shinohara H, Yoshikawa K, Chiba T, Takahashi R. Disrupted transforming growth factor-beta signaling and deregulated growth in human biliary tract cancer cells. *Int J Cancer* 2000; 86: 782-789
48 Sato Y, Harada K, Itatsu K, Ikeda H, Kakuda Y, Shimomura S, Shan Ren X, Yoneda N, Sasaki M, Nakanuma Y. Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-{beta}1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 2010; 177: 141-152
49 Lazaridis KN, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 2005; 128: 1655-1667
50 Qiu Y, Ravi L, Kung HJ. Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature* 1998; 393: 83-85
51 Lai GH, Zhang Z, Shen XN, Ward DJ, Dewitt JL, Holt SE, Rozich RA, Hixson DC, Sirica AE. erbB-2/neu transformed rat cholangiocytes recapitulate key cellular and molecular features of human bile duct cancer. *Gastroenterology* 2005; 129: 2047-2057
52 Treekitkarnmongkol W, Suthiphongchai T. High expression of ErbB2 contributes to cholangiocarcinoma cell invasion and proliferation through AKT/p70S6K. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4047-4054
53 Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-776
54 Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog

of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 1991; 66: 649-661
55 Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004; 306: 269-271
56 Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 2006; 107: 2223-2233
57 Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, Betsholtz C. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007; 445: 776-780
58 Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chanthery Y, Kowalski J, Watts RJ, Callahan C, Kasman I, Singh M, Chien M, Tan C, Hongo JA, de Sauvage F, Plowman G, Yan M. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006; 444: 1083-1087
59 Yoon HA, Noh MH, Kim BG, Han JS, Jang JS, Choi SR, Jeong JS, Chun JH. Clinicopathological significance of altered Notch signaling in extrahepatic cholangiocarcinoma and gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4023-4030
60 Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lübke T, Lena Illert A, von Figura K, Saftig P. The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2615-2624
61 Frampton G, Coufal M, Li H, Ramirez J, DeMorrow S. Opposing actions of endocannabinoids on cholangiocarcinoma growth is via the differential activation of Notch signaling. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1465-1478
62 MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17: 9-26
63 Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 2005; 38: 439-446
64 Seifert JR, Mlodzik M. Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 126-138
65 DeMorrow S, Francis H, Gaudio E, Venter J, Franchitto A, Kopriva S, Onori P, Mancinelli R, Frampton G, Coufal M, Mitchell B, Vaculin B, Alpini G. The endocannabinoid anandamide inhibits cholangiocarcinoma growth via activation of the noncanonical Wnt signaling pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G1150-G1158
66 Abuetabh Y, Persad S, Nagamori S, Huggins J, Al-Bahrani R, Sergi C. Expression of E-cadherin and β-catenin in two cholangiocarcinoma cell lines (OZ and HuCCT1) with different degree of invasiveness of the primary tumor. *Ann Clin Lab Sci* 2011; 41: 217-223
67 Tokumoto N, Ikeda S, Ishizaki Y, Kurihara T, Ozaki S, Iseki M, Shimizu Y, Itamoto T, Arihiro K, Okajima M, Asahara T. Immunohistochemical and mutational analyses of Wnt signaling components and target genes in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Int J Oncol* 2005; 27: 973-980
68 Martelli AM, Evangelisti C, Chappell W, Abrams SL, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo V, Ruvolo P, Kempf CR, Steelman LS, McCubrey JA. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. *Leukemia* 2011; 25: 1064-1079
69 Wang D, Li Y, Yu D, Song SS, Kandimalla ER, Agrawal S. Immunopharmacological and antitumor effects of second-generation immunomodulatory oligonucleotides containing synthetic CpR motifs. *Int J Oncol* 2004; 24: 901-908
70 Chung JY, Hong SM, Choi BY, Cho H, Yu E, Hewitt SM. The expression of phospho-AKT, phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 660-667
71 Xu X, Kobayashi S, Qiao W, Li C, Xiao C, Radaeva S, Stiles B, Wang RH, Ohara N, Yoshino T, LeRoith D, Torbenson MS, Gores GJ, Wu H, Gao B, Deng CX. Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *J Clin Invest* 2006; 116: 1843-1852

编辑 李军亮 电编 闫晋利

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®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2920-2925
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

miRNA单核苷酸多态性与大肠癌的研究进展

颜红柱, 许蜜蝶, 李彬彬, 余宏宇

■背景资料
miRNA是一类可参与多种生命进程的调控分子, 而miRNA相关单核苷酸多态性(SNP)不仅可影响个体的正常发育, 参与多种疾病的形成, 更可影响肿瘤发病的风险, 是miRNA调节多种生命进程的重要决定因素, 对其深入研究将为认识和治疗肿瘤提供新的思路.

颜红柱, 许蜜蝶, 李彬彬, 余宏宇, 中国人民解放军第二军医大学长征医院病理科 上海市 200003
颜红柱, 主治医师, 主要从事miRNA单核苷酸多态性与大肠癌患癌风险相关研究.
作者贡献分布: 本文综述由颜红柱与许蜜蝶完成; 资料收集由颜红柱、许蜜蝶及李彬彬共同完成; 余宏宇审校.
通讯作者: 余宏宇, 教授, 主任医师, 200003, 上海市黄浦区凤阳路415号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院病理科. yuhongyu795@hotmail.com
电话: 021-81886121
收稿日期: 2012-08-14 修回日期: 2012-09-19
接受日期: 2012-10-08 在线出版日期: 2012-10-28

Advances in understanding relationship between miRNA single nucleotide polymorphisms and colorectal cancer

Hong-Zhu Yan, Mi-Die Xu, Bin-Bin Li, Hong-Yu Yu

Hong-Zhu Yan, Mi-Die Xu, Bin-Bin Li, Hong-Yu Yu, Department of Pathology, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
Correspondence to: Hong-Yu Yu, Professor, Chief Physician, Department of Pathology, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China. yuhongyu795@hotmail.com
Received: 2012-08-14 Revised: 2012-09-19
Accepted: 2012-10-08 Published online: 2012-10-28

Abstract
The occurrence and development of colorectal cancer (CRC) are a multifactorial, multi-step evolutionary process. Gene polymorphisms are often involved in tumor development and prognosis. Recent studies have found that certain microRNA (miRNA) single nucleotide polymorphisms were associated with genetic susceptibility to and prognosis of CRC. Understanding the relationship between miRNA single nucleotide polymorphisms and CRC can provide new clues to the detection, prevention, and prognostic evaluation of CRC.

Key Words: MiRNA; Single nucleotide polymorphism; Colorectal cancer; Cancer susceptibility; Prognosis

Yan HZ, Xu MD, Li BB, Yu HY. Advances in understanding relationship between miRNA single nucleotide polymorphisms and colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2920-2925

■同行评议者
王娅兰, 教授, 重庆医科大学基础医学院病理教研室

摘要
大肠癌(colorectal cancer, CRC)的发生、发展是一个多因素多步骤的演进过程, 基因多态性是决定肿瘤发生、发展及预后的一个重要因素. 近年研究发现某些microRNA(miRNA)的单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)与CRC遗传易感性及预后相关, 阐明相关改变机制可为CRC的早期筛查、预防及预后监测提供新线索. 本文就相关研究进展作一综述.

关键词: miRNA; 单核苷酸多态性; 大肠癌; 肿瘤易感性; 预后

颜红柱, 许蜜蝶, 李彬彬, 余宏宇. miRNA单核苷酸多态性与大肠癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2920-2925
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2920.asp

0 引言
大肠癌(colorectal cancer, CRC)是临床常见恶性肿瘤之一, 截至2008年全球约有60万患者死于CRC, 居于肿瘤相关死亡率第2位[1], 而在我国其发病率和死亡率均呈逐年上升趋势[2]. 既往研究表明, CRC的发生、发展是一个多因素多机制多步骤的演进过程, 基因多态性是决定个体易感性和临床转归的一个重要因素[3]. microRNA(miRNA)是重要的表观遗传学水平调控分子, 其可通过与靶基因3'-UTR(非编码区)序列特异性结合对基因进行转录后水平负性调控进而参与肿瘤的发生发展[4]. 分子生物学研究表明多种miRNA存在单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP), 并通过调控miRNA与靶基因结合进而影响靶基因表达, 这些基因多态性与CRC之间的关系已成为国内外研究热点[5,6]. 本文就相关研究进展作一综述.

1 miRNA的生物合成及其作用机制
miRNA是一类长度约21-25 nt的小分子非编码RNA, 可调控人体内约30%的蛋白编码基因表达[7]. 在细胞核内, miRNA首先转录为前体分子, 或为单个基因, 或形成基因簇[8]. miRNA经由

RNA集合酶Ⅱ转录形成发卡结构pri-miRNA, 并被核内Rnase Ⅲ酶家族成员Drosha加工成为长约70 nt的茎环结构pre-miRNA, 后者则由exportin-5在Ran-/GTP模式下转运至细胞质中[9]. 最后, 细胞质中另一Rnase Ⅲ酶家族成员Dicer将pre-miRNA剪切成长约22 nt的双链miRNA[10,11], 与互补序列结合, 形成基因诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)[12]. 在RISC的引导下, 成熟miRNA与靶mRNA的3'-UTR互补配对(若结合区域位于种子区域外, 可为不完全配对), 沉默或降解靶基因, 影响靶基因的翻译和稳定性, 进而调控基因表达[13]. 由于miRNA可与靶基因不完全配对, 其对靶mRNA表达的调控模式可为一对多, 也可为多对一, miRNA几乎参与所有细胞进程[14]. 近年研究表明, 多种miRNA可在CRC等恶性肿瘤中作为癌基因或抑癌基因发挥重要调控作用[15-18].

2 miRNA的单核苷酸多态性

既往针对miRNA的研究多集中于其差异性表达对靶基因及蛋白水平的影响, 对其本身基因多态性及突变的研究极少. 而鉴于结合位点的序列互补性及相关热力学在miRNA与其靶点相互结合中的重要性, SNP等受到越来越多学者的关注[19]. SNP是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的DNA序列多态性, 是人类最常见的一种可遗传变异, 占所有已知多态性类型的90%以上[20]. 通常由单个碱基的转换(C←→T, 在其互补链上则为G←→A)或颠换(C←→A, G←→T, C←→G, A←→T)所引起, 也可由碱基的插入、缺失或框移突变所致[21]. 人体内存在3种形式miRNA相关SNP: miRNA核酸序列SNP, miRNA生物合成基因SNP和miRNA结合位点SNP[22]. 这些SNP可通过调控pri-miRNA转录, 影响pri-miRNA加工为pre-miRNA, 改变miRNA生成量甚至产生新的miRNA, 影响miRNA与靶基因结合, 对多种细胞信号通路产生影响. 而由于miRNA水平的些微改变即可对靶基因的表达产生巨大影响, miRNA相关基因的SNP对细胞内蛋白质翻译的调控作用极具意义[23]. 研究表明, miRNA相关SNP不仅可影响个体的正常发育, 参与多种疾病的形成, 更可影响肿瘤发病风险, 是miRNA调节多种生命进程的重要决定因素[24,25]. 此外, miRNA相关SNP还有望成为肿瘤预后监测和临床治疗结果预测的重要分子标志[26,27].

3 miRNA相关单核苷酸多态性与大肠癌

miRNA相关SNP与CRC的发生、发展以及预后有密切关系. 目前已有多种方法应用于检测和鉴定功能性miRNA相关SNP, 由于临床样本量的相对限制, 运用病例对照研究对这些SNP生物学意义的评估还处于初始阶段, 目前已证实与CRC显著相关的miRNA相关SNP共有21个(表1).

3.1 与大肠癌相关的miRNA生物合成基因单核苷酸多态性 参与miRNA生物合成的蛋白包括RNA集合酶Ⅱ、Drosha/Pasha、核孔复合体、Exportin/Ran-GTP、Dicer酶以及argonau蛋白复合体/RISC复合体. 这些蛋白编码基因的SNP可影响成熟miRNA的生物合成和表达, 继而影响miRNA介导的细胞内生命进程[28]. 对高加索人7个miRNA合成相关蛋白的SNP进行分析发现, CRC患者XPO5基因3'-UTR的SNP(rs11077) 的A等位基因可预测CRC患者的预后及临床转归, A携带者(AA+AC)与CRC的肿瘤进展时间(time to progression, TTP)和疾病控制率(disease control rate, DCR)的相关性显著高于CC基因型[23]. AGO1、AGO2、TARBP2、TNRC6A、TNRC6C和EXPORTIN5这6个miRNA合成基因的编码序列都存在7个以上的单核苷酸重复, 相关区域在微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)的肿瘤中易发生框移突变. 除*AGO1*基因外, 27%的CRC样本中存在这一突变, 而高MSI、低MSI和微卫星稳定(stable microsatellite instability, MSS)样本的突变频率分别为19/58、0/32和0/90, 提示该突变可能为高MSI特异性. 这些基因的框移突变可能影响miRNA的合成并导致CRC患者发展为高MSI表型[29]. 高MSI状态的肿瘤预后较好, 但化疗反应不佳, 运用相关技术检测CRC患者的微卫星稳定状态可能用于指导临床治疗.

3.2 与大肠癌相关的miRNA核酸序列的单核苷酸多态性 位于miRNA 5'-UTR的2-7个核苷酸为miRNA的种子区域, 这一区域主要功能为参与miRNA对靶基因的特异识别, 因此相关区域的SNP可影响miRNA与靶基因的结合[30]. miR-26a-1的预测靶基因*smad1*是TGF-β/SMAD信号通路成员之一, 可参与调控细胞的增殖、分化和凋亡[31], miR-100的预测靶基因IGF1R在多数恶性肿瘤中都高表达, 是重要的抗凋亡分子及肿瘤治疗耐药的关键调控因子[32], 这两种miRNA的SNP有可能直接影响多个肿瘤生物学行为相关调控信号通路. 相关研究表明接受5-FU和伊立替康联合化疗的高加索人群转移性CRC患

■研发前沿
近年研究发现, miRNA相关SNP既是大肠癌(CRC)患癌风险重要决定因素, 又能影响患者的预后转归, 其与CRC之间的关系错综复杂. 但目前相关研究尚处于起始阶段, 其具体功能和作用机制尚不完全清楚, 需深入研究和探讨.

■相关报道
miR-219-1基因T/C多态(rs213210)和miR-608基因C/G多态(rs4919510)两者任一发生即可使CRC患者死亡率增加2.51倍,而当两种SNP共存的情况下,CRC患者死亡率增加了5.6倍,提示多重SNP可能会对接受联合化疗的进展期CRC患者预后产生叠加影响.

表 1 与大肠癌miRNA相关的单核苷酸多态性

多态性(基因)	SNP ID	突变	可能相关miRNA	相关性	人群
miRNA结合位点					
RPA2	rs7356	A/G	miR-3149, miR-1188	患癌风险	捷克[46]
GTF2H1	rs4596	G/C	miR-518a-5p	患癌风险	捷克[46]
MBL2	rs10082466	C/T	miR-27a	患癌风险	美国[47]
KIAA0182	rs709805	G/A	miR-324-3p	患癌风险	捷克[48]
NUP210	rs354476	T/C	miR-125a, miR-125b	患癌风险	捷克[48]
CD86	rs17281995	G/C	miR-337,miR-582, miR-200a*,miR-184, miR-212	患癌风险	捷克[41]
INSR	rs1051690	G/A	miR-612, miR-618	患癌风险	捷克[41]
IC53	rs2737	T/C	miR-379	迟发	中国[49]
DHFR	/	C/T	miR-24	miR-24的肿瘤抑制活性	德国[50]
KRAS-LCS6	rs61764370	T/G	let-7	预后	多人群[43-45]
pri-miRNA					
miR-100	rs1834306	C/T	miR-100	预后	高加索[23]
miR-26a-1	rs7372209	C/T	miR-26a-1	预后	高加索[23]
pre-miRNA					
miR-149	rs2292832	C/T	miR-149	患癌风险	中国[51]
miR-423	rs6505162	C/A	miR-423	预后	中国[33]
miR-608	rs4919510	C/G	miR-608	预后	中国[33]
miR-492	rs2289030	C/G	miR-492	预后	韩国[52]
miR-605	rs2043556	A/G	miR-605	患癌风险	中国[51]
成熟miRNA					
miR-196a2	Rs11614913	C/T	miR-196a2	患癌风险	中国, 韩国[37, 38]
miR-219-1	rs213210	C/T	miR-219-1	患癌风险	美国[40]
miR-608	rs4919510	C/G	miR-608	预后	美国[40]
miRNA合成基因					
AGO2		框移		微卫星稳定性	韩国[29]
TNRC6A		框移		微卫星稳定性	韩国[29]
XPO5	rs11077	A/C		预后	高加索[23]

者体内pri-miR26a-1的种子区域(rs7372209)存在C-T突变, 且与肿瘤整体反应率(overall response rate, ORR)和TTP相关, pri-miR-100的种子区域(rs1834306)发生C→T突变的患者TTP显著延长[23], 这两种miRNA的多态性突变或可应用于预测转移性CRC患者对联合化疗的临床转归.

pre-miRNA茎环结构的SNP可影响miRNA的加工过程从而影响成熟miRNA的表达水平. 国内学者[33]利用iPLEX平台对408个CRC样本中10个已知的位于pre-miRNA的SNP进行分析, 发现与野生型纯合子相比, pre-miR-423(rs6505162)和pre-miR-608(rs4919510)的突变型都与汉族人群CRC总生存期(overall survival, OS)和无复发生存期(recurrence-free survival, RFS)相关, 突变型患者复发/死亡风险均显著高于野生型患者. 而在接受化疗的CRC患者中, 这种相关性更为显著, 具一定提示意义, 但还需要扩大临床样本量进行证实.

成熟miRNA的SNP也与肿瘤的肿瘤易感性和预后转归密切相关. 既往的研究表明, miRNA-196a2基因C/T多态(rs11614913)与多种恶性肿瘤患癌风险增加显著相关[34-36]. 在CRC患者中, 该多态的C等位基因是肿瘤风险因子, 相关SNP在韩国人和中国人群中均与CRC肿瘤易感性增加有关, CC基因型的韩国人群患癌风险显著高于TT/CT型人群, 这一相关性在非糖尿病患者和直肠癌患者中尤为显著[37]; 在中国人群中则表现为CT/CC基因型人群的患癌风险显著高于TT基因型人群, 在进展期(Dukes C和D)CRC患者中这一风险因子作用尤为显著[38]; 而在CRC发病率极高的高加索人群中, 这一多态位点并不与该人群的患癌风险具有显著相关性[39]. Lin等[40]针对1 097例CRC患者进行回顾性分析, 发现miR-219-1和miR-608基因多态均与接受过

联合化疗的TNM Ⅲ期CRC患者的死亡率显著相关, 其中miR-219-1基因T/C多态(rs213210)和miR-608基因C/G多态(rs4919510)两者任一发生即可使CRC患者死亡率增加2.51倍, 而当两种SNP共存的情况下, CRC患者死亡率增加了5.6倍, 提示多重SNP可能会对接受联合化疗的进展期CRC患者预后产生叠加影响, 相关联系的具体分子机制还有待于功能学实验的进一步探索.

3.3 与大肠癌相关miRNA结合位点的单核苷酸多态性 与miRNA生物合成基因SNP和miRNA核酸序列SNP相比, miRNA结合位点SNP更加丰富多变, 这些多态可引起成熟miRNA与靶基因结合障碍, 或产生新的miRNA结合位点, 抑制基因表达, 继而改变细胞内蛋白翻译水平. 由于相关SNP仅影响靶基因及下游效应分子表达, 而miRNA水平并未发生改变, 因此这一效应可用于解释一些miRNA表达无差异而蛋白翻译发生改变的生物学现象.

运用基因分析网站(PicTar, DianaMicroT, miRBase, miRanda, TargetScan和microInspector), Landi等[41]对104个基因的3'-UTR末端的miRNA结合位点进行分析, 共检测出57个miRNA结合位点SNP, 其中*cd86*(rs17281995)和*insr*(rs1051690)基因与捷克人群的散发性CRC发生显著相关. 进一步分析发现, CD86可对5个不同的miRNA结合位点产生影响: G→C突变时, miR-337、miR-582和miR-200a*与其3'-UTR亲和力显著降低, 而miR-184和miR-212的亲和力则上调, 这一现象很好阐释了miRNA与靶mRNA之间的多对一调控模式.

let-7是CRC发生发展重要调控因子, 其可通过抑制细胞生长促进细胞凋亡发挥抑癌基因的作用[42]. let-7靶基因KRAS 3'-UTR存在一多态位点KRAS-LCS6(rs61764370), 这一SNP并不会提高人们患CRC的风险, 但他能引起KRAS的过表达, 携带*kras-lcs6*的CRC患者生存时间明显延长, 且携带不同基因型的CRC患者临床治疗效果也存在差异[43-45].

4 结论

miRNA在CRC的发生发展及预后治疗中发挥重要作用, 分子机制复杂多变, 而其多基因多通路参与特征使得这方面的研究极具意义. 随着生物学技术发展, miRNA相关SNP的发现进一步补充和丰富了miRNA参与CRC的分子生物学和遗传学机制, 并可能作为CRC早期筛查、诊断及预后监测的分子标志物. 但目前相关研究尚处于起始阶段, 除需继续寻找与CRC miRNA相关的SNP外, 原已发现的SNP的具体功能及临床意义也有待于进一步研究. 相关问题的解决可为阐明CRC的发生发展、临床诊断、治疗和预后监测提供新的切入点.

■**创新盘点**
本文综述了CRC相关miRNA的SNP, 并探讨了这些miRNA相关SNP在CRC患癌风险及预后转归中的作用及意义, 旨在为阐明CRC的发生发展、临床诊断、治疗和预后监测提供新的切入点.

5 参考文献

1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
2 Zhang S, Cui Y, Weng Z, Gong X, Chen M, Zhong B. Changes on the disease pattern of primary colorectal cancers in Southern China: a retrospective study of 20 years. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24: 943-949
3 Demant P. The genetic factors in cancer development and their implications for cancer prevention and detection. *Radiat Res* 2005; 164: 462-466
4 Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 175-205
5 Landi D, Gemignani F, Landi S. Role of variations within microRNA-binding sites in cancer. *Mutagenesis* 2012; 27: 205-210
6 Dong Y, Wu WK, Wu CW, Sung JJ, Yu J, Ng SS. MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: a clinical perspective. *Br J Cancer* 2011; 104: 893-898
7 Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 597-610
8 Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. *Cancer J* 2008; 14: 1-6
9 Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10: 185-191
10 Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004; 16: 861-865
11 Murphy D, Dancis B, Brown JR. The evolution of core proteins involved in microRNA biogenesis. *BMC Evol Biol* 2008; 8: 92
12 Parker JS, Roe SM, Barford D. Molecular mechanism of target RNA transcript recognition by Argonaute-guide complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 45-50
13 Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4: 143-159
14 Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 271-282
15 Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5848-5856
16 Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 775-789
17 Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol* 2012; 13: e249-e258
18 Osman A. MicroRNAs in health and disease--basic science and clinical applications. *Clin Lab* 2012; 58: 393-402

■**应用要点**
本文为从事大肠癌相关miRNA的研究者提供了借鉴和指导. 如能深入研究并阐明miRNA本身基因多态性及突变对大肠癌的具体功能及临床意义, 将为大肠癌早期诊断及治疗开拓新的视野.

19 Schetter AJ, Harris CC. Alterations of microRNAs contribute to colon carcinogenesis. *Semin Oncol* 2011; 38: 734-742
20 Carlson CS, Newman TL, Nickerson DA. SNPing in the human genome. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5: 78-85
21 Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 235-258
22 Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 8-21
23 Boni V, Zarate R, Villa JC, Bandrés E, Gomez MA, Maiello E, Garcia-Foncillas J, Aranda E. Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5-fluorouracil and irinotecan. *Pharmacogenomics J* 2011; 11: 429-436
24 Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 399-416
25 Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 389-402
26 Bandiera S, Hatem E, Lyonnet S, Henrion-Caude A. microRNAs in diseases: from candidate to modifier genes. *Clin Genet* 2010; 77: 306-313
27 Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 849-864
28 Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb Haemost* 2012; 107: 605-610
29 Kim MS, Oh JE, Kim YR, Park SW, Kang MR, Kim SS, Ahn CH, Yoo NJ, Lee SH. Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers. *J Pathol* 2010; 221: 139-146
30 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102-114
31 Korchynskyi O, Landström M, Stoika R, Funa K, Heldin CH, ten Dijke P, Souchelnytskyi S. Expression of Smad proteins in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 1999; 82: 197-202
32 Casa AJ, Dearth RK, Litzenburger BC, Lee AV, Cui X. The type I insulin-like growth factor receptor pathway: a key player in cancer therapeutic resistance. *Front Biosci* 2008; 13: 3273-3287
33 Xing J, Wan S, Zhou F, Qu F, Li B, Myers RE, Fu X, Palazzo JP, He X, Chen Z, Yang H. Genetic polymorphisms in pre-microRNA genes as prognostic markers of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21: 217-227
34 Li XD, Li ZG, Song XX, Liu CF. A variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis. *Pathology* 2010; 42: 669-673
35 Dou T, Wu Q, Chen X, Ribas J, Ni X, Tang C, Huang F, Zhou L, Lu D. A polymorphism of microRNA196a genome region was associated with decreased risk of glioma in Chinese population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1853-1859
36 Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, Jin G, Liang J, Liu P, Zhou X, Miao R, Ma H, Chen Y, Shen H. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1183-1187
37 Min KT, Kim JW, Jeon YJ, Jang MJ, Chong SY, Oh D, Kim NK. Association of the miR-146aC& gt; G, 149C& gt; T, 196a2C& gt; T, and 499A& gt; G polymorphisms with colorectal cancer in the Korean population. *Mol Carcinog* 2012; 51 Suppl 1: E65-E73
38 Zhu L, Chu H, Gu D, Ma L, Shi D, Zhong D, Tong N, Zhang Z, Wang M. A functional polymorphism in miRNA-196a2 is associated with colorectal cancer risk in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2012; 31: 350-354
39 Hezova R, Kovarikova A, Bienertova-Vasku J, Sachlova M, Redova M, Vasku A, Svoboda M, Radova L, Kiss I, Vyzula R, Slaby O. Evaluation of SNPs in miR-196-a2, miR-27a and miR-146a as risk factors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2827-2831
40 Lin M, Gu J, Eng C, Ellis LM, Hildebrandt MA, Lin J, Huang M, Calin GA, Wang D, Dubois RN, Hawk ET, Wu X. Genetic polymorphisms in MicroRNA-related genes as predictors of clinical outcomes in colorectal adenocarcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3982-3991
41 Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P, Vodickova L, Novotny J, Försti A, Hemminki K, Canzian F, Landi S. Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 579-584
42 Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: F19-F36
43 Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller RU, Straka E, Su L, Burki EA, Crowell RE, Patel R, Kulkarni T, Homer R, Zelterman D, Kidd KK, Zhu Y, Christiani DC, Belinsky SA, Slack FJ, Weidhaas JB. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 2008; 68: 8535-8540
44 Zhang W, Winder T, Ning Y, Pohl A, Yang D, Kahn M, Lurje G, Labonte MJ, Wilson PM, Gordon MA, Hu-Lieskovan S, Mauro DJ, Langer C, Rowinsky EK, Lenz HJ. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Ann Oncol* 2011; 22: 104-109
45 Ruzzo A, Graziano F, Vincenzi B, Canestrari E, Perrone G, Galluccio N, Catalano V, Loupakis F, Rabitti C, Santini D, Tonini G, Fiorentini G, Rossi D, Falcone A, Magnani M. High let-7a microRNA levels in KRAS-mutated colorectal carcinomas may rescue anti-EGFR therapy effects in patients with chemotherapy-refractory metastatic disease. *Oncologist* 2012; 17: 823-829
46 Naccarati A, Pardini B, Stefano L, Landi D, Slyskova J, Novotny J, Levy M, Polakova V, Lipska L, Vodicka P. Polymorphisms in miRNA-binding sites of nucleotide excision repair genes and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1346-1351
47 Zanetti KA, Haznadar M, Welsh JA, Robles AI, Ryan BM, McClary AC, Bowman ED, Goodman JE, Bernig T, Chanock SJ, Harris CC. 3'-UTR and

functional secretor haplotypes in mannose-binding lectin 2 are associated with increased colon cancer risk in African Americans. *Cancer Res* 2012; 72: 1467-1477

48 Landi D, Gemignani F, Pardini B, Naccarati A, Garritano S, Vodicka P, Vodickova L, Canzian F, Novotny J, Barale R, Landi S. Identification of candidate genes carrying polymorphisms associated with the risk of colorectal cancer by analyzing the colorectal mutome and microRNAome. *Cancer* 2012; 118: 4670-4680

49 Chen J, Shi Y, Li Z, Yu H, Han Y, Wang X, Sun K, Yang T, Lou K, Song Y, Zhang Y, Zhen Y, Zhang G, Hu Y, Ji J, Hui R. A functional variant of IC53 correlates with the late onset of colorectal cancer. *Mol Med* 2011; 17: 607-618

50 Mishra PJ, Song B, Mishra PJ, Wang Y, Humeniuk R, Banerjee D, Merlino G, Ju J, Bertino JR. MiR-24 tumor suppressor activity is regulated independent of p53 and through a target site polymorphism. *PLoS One* 2009; 4: e8445

51 Mw Z, Mj J, Yx Y, Sc Z, B L, X J, Yf P, Ql L, Xy M, K C. Associations of lifestyle-related factors, hsa-miR-149 and hsa-miR-605 gene polymorphisms with gastrointestinal cancer risk. *Mol Carcinog* 2012; 51 Suppl 1: E21-E31

52 Lee HC, Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Kang BW, Moon JH, Jeon SW, Lee MH, Lim KH, Park JY, Choi GS, Jun SH. Prognostic impact of microRNA-related gene polymorphisms on survival of patients with colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1073-1078

■同行评价
本文对miRNA的SNP在大肠癌中的研究进展进行了综述, 对于进一步认识miRNA的SNP与肿瘤的关系, 尤其是在大肠癌中的作用, 有一定的参考价值.

编辑 田滢 电编 闫晋利

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.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2926-2930
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

RNA干扰在大肠癌多药耐药中的研究进展

余文燕, 许建华, 王国娟, 张瑞娟, 孙 珏, 范忠泽

■背景资料
大肠癌是人类常见的消化系肿瘤之一, 发病率呈逐年上升趋势, 化疗是治疗该病的主要方法, 但大肠癌细胞的多药耐药性严重阻碍了化疗的进程, 限制了抗肿瘤药物疗效的发挥, 影响了患者的生存质量, 如何逆转大肠癌的多药耐药已成为当下该研究领域探讨的焦点.

余文燕, 许建华, 王国娟, 张瑞娟, 孙珏, 范忠泽, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科 上海市 200062
国家自然科学基金资助项目, No. 30873404, No. 81073105
上海市科委中药现代化专项基金资助项目, No. 09dZ1975500, No. 10DZ1975500
上海市普陀区科技创新基金资助项目
作者贡献分布: 本文文献检索、文章撰写由余文燕完成; 选题、指导、审校由范忠泽、许建华、孙珏、王国娟及张瑞娟完成.
通讯作者: 范忠泽, 教授, 主任医师, 博士生导师, 200062, 上海市兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科.
henrie09@163. com
电话：021-62572723-4308
收稿日期: 2012-07-10 修回日期: 2012-09-28
接受日期: 2012-10-23 在线出版日期: 2012-10-28

Application of RNA interference in research of multidrug resistance in colorectal cancer: Recent progress

Wen-Yan Yu, Jian-Hua Xu, Guo-Juan Wang, Rui-Juan Zhang, Jue Sun, Zhong-Ze Fan

Wen-Yan Yu, Jian-Hua Xu, Guo-Juan Wang, Rui-Juan Zhang, Jue Sun, Zhong-Ze Fan, Department of Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30873404 and 81073105; the Special Fund for Modernization of Traditional Chinese Medicine of Shanghai Municipal Science and Technology Commission, Nos. 09dZ1975500 and 10DZ1975500; the Scientific and Technological Innovation Foundation of Putuo District of Shanghai
Correspondence to: Zhong-Ze Fan, Professor, Chief Physician, Department of Oncology, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200062, China. henrie09@163.com
Received: 2012-07-10 Revised: 2012-09-28
Accepted: 2012-10-23 Published online: 2012-10-28

Abstract
Colorectal cancer is one of the most common malignant digestive tract tumors in the world. Chemotherapy is the main treatment for colorectal cancer. However, multidrug resistance of tumor cells hinders its treatment. RNA interference, which allows specifically inhibiting the expression of multidrug genes, has been gradually applied to gene treatment for multidrug resistance. This paper aims to summarize the progress of application of RNA interference in research of multidrug resistance in colorectal cancer.

Key Words: RNA interference; Colorectal cancer; Multidrug resistance

Yu WY, Xu JH, Wang GJ, Zhang RJ, Sun J, Fan ZZ. Application of RNA interference in research of multidrug resistance in colorectal cancer: Recent progress. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2926-2930

摘要
大肠癌是人类常见的消化系恶性肿瘤, 化疗是治疗该病的主要手段之一, 但大肠癌细胞对化疗药物的多药耐药性阻碍了该病的治疗进程. RNA干扰能特异性阻断耐药靶基因表达, 近年来已逐渐应用于大肠癌多药耐药的基因治疗, 并取得了一些突破性的进展. 本文就近年RNA干扰在大肠癌多药耐药研究中的应用概况予以综述, 以冀对临床治疗有所提示.

关键词: RNA干扰; 大肠癌; 多药耐药

余文燕, 许建华, 王国娟, 张瑞娟, 孙珏, 范忠泽. RNA干扰在大肠癌多药耐药中的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2926-2930
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2926.asp

0 引言
随着人类社会的不断进步, 环境污染、外界压力、不规律的生活习惯、饮食失调等不良因素诱发了恶性肿瘤的发生. 大肠癌是人类常见的消化系肿瘤, 发病率呈逐年上升趋势, 化疗是治疗该病的主要方法, 但大肠癌细胞的多药耐药性严重阻碍了化疗进程, 限制了抗肿瘤药物疗效的发挥, 影响了患者的生存质量, 如何逆转大肠癌的多药耐药已成为当下该研究领域探讨的焦点. RNA干扰技术(RNA interference, RNAi)是Fire等[1]于1998年首次提出, 他是一种由双链RNA在mRNA水平诱导的特异性转录后基因沉默现象, 能特异性地阻断靶基因的表达, 与其他基因敲除的方法相比, 具有普遍、高效、特异、操作简单等突出优点. 目前已广泛应用于探索基因功能与恶性肿瘤的基因治疗等领域.

■同行评议者
李康, 副教授, 广东药学院药科学院药物分析教研室

近年来, 许多学者采用该技术针对大肠癌耐药的各个环节设计小干扰RNA, 通过基因沉默技术逆转肠癌耐药, 取得了一定成效. 现将RNA干扰技术在大肠癌多药耐药研究中的应用作一综述.

1 RNA干扰技术原理

内源或外源性双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)通过细胞膜进入细胞后, 首先被dsRNA特异性核酸内切酶加工裂解成核苷酸小片段, 即小干扰RNA(small interference RNA, siRNA), 他启动了细胞内RNA干扰反应, 是RNA干扰的中间效应分子[2]. siRNA同Agonaute2等一些蛋白酶结合, 形成一种核蛋白体, 即RNA诱导的静寂复合体(RNA-induced silencing complex, RISC). RISC在细胞内RNA解旋酶及三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)作用下, siRNA解螺旋, 激活RISC. 活化的RISC随后在解螺旋的反义链siRNA引导下与目标RNA的同源序列结合, 切断序列特异性的mRNA, 这些断裂的RNA小分子在核酸酶的作用下被降解, 从而导致目的基因的沉默[3].

2 RNA干扰在大肠癌多药耐药研究中的应用

大肠癌是多因素、多阶段、多基因表达失控的个体化疾病, 多种基因参与了其发生发展. 肿瘤多药耐药(multidrug resistance, MDR)指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物出现耐药的同时, 对其他结构各异、作用机制不同的抗肿瘤药物亦产生交叉耐药现象. 自1970年Biedler发现肿瘤多药耐药现象以来, 已对该机制进行了探讨, 涉及药物的外排增加和亚细胞分布改变、药物作用靶标如拓扑异构酶改变、代谢转化改变、损伤修复增强、凋亡相关通路改变、细胞增殖速率变化、体内药代动力学因素等方面[4]. RNA干扰在大肠癌多药耐药研究中的应用具体表现在耐药相关跨膜转运蛋白、耐药相关酶、乳腺癌耐药蛋白、肺耐药蛋白、转录调控因子、细胞凋亡调控基因等方面.

2.1 在耐药相关跨膜转运蛋白中的应用

2.1.1 细胞膜糖蛋白MDR1/P-gp: 大肠癌是MDR1/P-gp表达水平及频率最高的肿瘤之一. *mdr1*是*mdr*基因组成员, 其编码的产物P-gp是ATP结合盒(ATP binding cassette, ABC)家族的转运因子. 抗肿瘤药物与大肠癌细胞膜上过表达的P-gp结合, 活化了ATP结合区, 使得ATP水解释放能量, 此时, P-gp在Mg^{2+}作用下将尚未发生细胞毒作用的药物泵出细胞外, 导致细胞内药物浓度降低, 从而减免了细胞内化疗药物的毒性, 最终形成多药耐药.

Ramachandran等[5]将MDR1反义寡核苷酸作用于人结肠癌多药耐药细胞的体内外实验, 结果表明P-gp过度表达的耐药细胞系SW620/Ad300中阿霉素IC_{50}下降9倍. Ahn等[6]将RNA干扰MDR1与人类NIS射碘基因治疗相结合, 认为该基因联合法能有效逆转结肠癌耐药. Xiao等[7]通过RNA干扰下调MDR1的表达, 并用电穿孔局部注入裸鼠NCI-H460荷瘤, 成功地抑制了MDR1在基因和蛋白水平的表达, 并于靶向MDR1转染后注射长春瑞滨, 结果对裸鼠荷瘤的抑制率显著提高了9倍. Xia等[8]采用RNA干扰技术成功逆转了COLO 320 DM细胞系中MDR1和P-gp的表达. 孔帅[9]通过沉默*mdr1*基因, 成功逆转了LoVo/5-FU的耐药性. 王开雷等[10]将靶向MDR1的shRNAi质粒转染人大肠癌多药耐药株LoVo/5-FU中, 与粉防己碱的逆转作用相比更强. 陈刚等[11]通过转染Pc-MDR1质粒, 直肠癌细胞8348R在5-FU作用下活性明显下降, 细胞凋亡比例显著升高. Takakura等[12]发现沉默*cdx2*能有效下调MDR1引起的结肠癌细胞多药耐药.

2.1.2 多药耐药相关蛋白: 多药耐药相关蛋白(multidrug resistance associated protein, MRP)是继P-gp之后发现的第2个ABC跨膜转运蛋白超家族成员, 也是一种ATP依赖的多药耐药相关的药物泵[13], 具有广泛的组织分布, 需谷胱甘肽(glutathione, GSH)与药物的共价结合来实现转运, 从而导致肿瘤细胞的多药耐药. 杨毅等[14]将*mrp2*基因的真核表达载体pGenSil-1-MRP2-siRNA转染入人结肠癌耐长春新碱细胞株HCT-8/V, 发现能明显抑制MRP2表达. Shen等[15]发现RNA干扰沉默IGF-IR表达后, 能显著抑制MRP-2表达, 增强细胞内药物浓度并成功逆转耐药.

2.2 在耐药相关酶中的应用

2.2.1 蛋白激酶C: 蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是一种细胞质酶, 正常情况下, 呈非活性构象. 他能激活细胞质中的酶, 参与生化反应的调控, 同时也能作用于细胞核中的转录因子, 参与基因表达的调控. 近年研究发现, PKC可通过磷酸化过程激活耐药蛋白(P-gp或MRP), 从而产生耐药性[16]. 因此, PKC可能是通过诱导*mdr1*基因过度表达和加速P-gp的磷酸化参与多药耐药的发生和发展. 所以抑制PKC活性已成为备受关注的逆转多药耐药的新途径.

■**相关报道**
近年来, 许多学者采用RNA干扰技术针对大肠癌耐药的各个环节设计小干扰RNA, 通过基因沉默技术逆转肠癌耐药, 取得了一定成效.

■**应用要点**
肿瘤多药耐药机制异常复杂, RNA干扰可高度特异性地抑制靶基因表达, 尽管目前研究距临床应用仍有很大距离, 但作为一项极富潜力和应用前景的技术, 必将给大肠癌多药耐药研究带来新的希望.

2.2.2 谷胱甘肽转移酶-π: 谷胱甘肽转移酶-π(glutathione s-transferases π, GST-π) 是肿瘤细胞系中分布最广泛的GST同工酶, 最初作为肿瘤标志物被发现, 现已证明参与肿瘤耐药机制, 他的高表达会导致肿瘤多药耐药. GST-π能催化许多亲电子物质包括抗癌药物与GSH结合, 消除药物对肿瘤细胞的作用, 也可与亲脂性药物结合变成亲水性分子, 从而降低抗癌药物的细胞毒作用, 加速药物排出肿瘤细胞. 此外, 还具有过氧化物酶活性, 能有力地减少抗癌药的损害, 导致细胞对化疗药物耐药. 有研究表明, 在GST-π过量表达的大肠癌细胞中, 选择性抑制GST-π会提高化疗药物的疗效[17].

2.2.3 DNA拓扑异构酶Ⅱ: DNA拓扑异构酶Ⅱ(DNA TOPOⅡ)是真核细胞生存所必需的核酶, 在基因的复制、转录、修复及重组中发挥着重要作用, 其引起肿瘤细胞耐药机制是通过干扰基因正常的断裂重接过程, 从而破坏基因及促进靶细胞的死亡. TOPOⅡ活性的下降是肿瘤细胞产生多药耐药的机制之一[18].

2.3 在乳腺癌耐药蛋白中的应用 乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)由ABCG2基因编码, 与传统的ABC膜转运蛋白不同的是BCRP由两个同源部分组成, 每个部分含1个ATP结合结构域和1个跨膜疏水区域, 故又称为半转运蛋白[16]. 有研究显示, BCRP在结肠癌耐药细胞系中有表达, 其耐药的机制及药物逆转有待进一步研究. 冉志华等[19]发现转染BCRP后, 人结肠癌耐羟基喜树碱的细胞敏感性增强, 细胞周期分布有明显改变; 转染细胞体外成瘤性下降, 形成克隆体积减小.

2.4 在肺耐药蛋白中的应用 肺耐药蛋白(lung resistance protein, LRP)介导的多药耐药与细胞核、细胞质运输有关, 其控制药物从细胞核向胞浆转运, 一方面阻止细胞核为靶点的药物通过核孔进入胞核, 起到中间关卡的作用; 另一方面可通过囊泡转运和胞吐机制将胞质内药物排出细胞外, 降低药物的绝对浓度产生耐药[20]. 有研究表明[21], LRP在大肠癌组织中高表达, 其表达差异与其临床病理学特点具有相关性.

2.5 在转录因子中的应用 乏氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)是乏氧应答中起重要作用的转录因子, 由α亚基和β亚基组成. Ding等[22]提出HIF-1α的表达可能与MDR1/P-gp和肿瘤多药耐药相关基因有关. Kendziorra等[23]通过RNA干扰技术沉默Wnt信号通路转导因子TCF4的表达, 增强了直肠癌细胞对化疗的敏感性. Ao等[24]发现沉默HIF-1α能显著降低缺氧诱导的结肠癌细胞SW480中ARC表达. Hong等[25]通过该技术靶向抑制信号传导与转录活化因子STAT5a, 有效促进了顺铂和5-FU诱导的结肠癌细胞的凋亡及敏感性.

2.6 在细胞凋亡调控基因中的应用 凋亡途经受阻往往导致化疗药物的失效, 因此, 调控凋亡基因是肿瘤多药耐药的机制之一. 研究证实[16], 导入外源性的野生型*p53*基因可增加化疗药物的敏感性. *bcl-2*过表达亦与肿瘤的耐药性密切相关. 朱洪波等[26]通过*bcl-x1*基因发现能有效下调人结肠癌细胞株DLDl-TRAIL/R中BCL-XL的蛋白表达水平, 逆转其对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)蛋白的耐药; 能显著抑制5-FU耐药细胞增长, 并促进其凋亡[27]. SURVIVIN是人类凋亡抑制蛋白, 与肿瘤耐药密切相关, 郑欣等[28]发现SURVIVIN siRNA可显著增强5-FU对LoVo细胞增殖的抑制, 提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 克服耐药性的产生. 周保国等[29]发现抑制XIAP表达后, 能够增强结肠癌细胞HCT-8和HCT-116对5-FU化疗的敏感性及结肠癌细胞SWl116对TRAIL的敏感性[30]. 裴莉等[31]应用RNA干扰BNIP3, 证实其表达下调会导致结肠癌LoVo细胞对5-FU化疗敏感性降低. Zhang等[32]通过RNA沉默CIAPIN1, 发现能够增强LoVo/Adr对化疗药物的敏感性. 彭晶晶等[33]通过转染PIDD(*p53*-induced protein with a death domain)后给予HT-29细胞药物刺激, 发现细胞核中表达下降, 核因子NF-κB活性明显降低, 细胞对5-FU的敏感性增加, 提示此作用可能与细胞核PIDD复合体减少、核因子NF-κB活性减低及细胞凋亡增多有关. 神经酰胺合酶6能调节凋亡素2配体(TRAIL)的敏感性、特异性的抑制TRAIL诱导的凋亡及结肠癌细胞中活化的casepase 3的核易位, White-Gilbertson等[34]用RNAi干扰神经酰胺合酶6, 使其特异性的低表达, 能有效增强耐TRAIL的结肠癌细胞株SW620的敏感性.

2.7 在其他蛋白中的应用 Klampfer等[35]通过RNA干扰技术沉默钙结合微丝蛋白的表达, 增强了结肠癌细胞对5-FU诱导凋亡的敏感性. Patsos等[36]证实RNA干扰沉默COX-2的表达会抑制安南得迈诱导的结肠癌细胞系HCA7死亡. Lai等[37]通过RNA干扰技术鉴定了一系列的小RNA编码的基因嵌入体, 有望克服对5-Fu或肿瘤坏死因子TNF-α诱导的结肠癌细胞死亡的耐

药. 泛素融合降解1样蛋白(ubiquitin fusion degradation protein 1, UFD1)在蛋白质逆向转运中发挥一定作用, Chen等[38]发现通过RNA干扰耐羟喜树碱的结肠癌细胞株SW1116/HCPT中的UFD1蛋白表达, 能增强该细胞对羟喜树碱的敏感性[39]. 磷脂爬行酶1(phospholipid scramblase 1, PLSCR1)属于Ca^{2+}结合的棕榈酰化Ⅱ型膜蛋白, 在肿瘤的发病发生过程中发挥着重要的作用, 研究发现该蛋白在结肠癌LoVo细胞中呈高表达, 通过RNA技术将其沉默能显著提高LoVo细胞的敏感性[40]. Fan等[41]通过短发夹RNA干扰重组人Polo-样激酶1(Polo-like kinase 1, PLK1), 能显著提高CPT-11对结肠癌异位移植的化疗敏感性. Galimov等[42]发现沉默结肠癌RKO细胞内P66SHC蛋白表达后提高了细胞对氧化性应激的耐受, 证实了该蛋白参与线粒体内ROS蓄积并由此诱导的细胞凋亡. Song等[43]运用该法抑制GCS蛋白表达, 恢复了结肠癌多药耐药细胞对药物的敏感性. 蔡艳玲等[44]通过RNA沉默*htert*基因发现能有效抑制结肠癌SW480细胞生长, 降低端粒酶活性, 诱导肿瘤细胞凋亡. 有研究报道[45], 通过短发夹特异性阻断*p38*MAPK信号通路会降低结肠癌细胞HaCaT和HCT-116的化疗敏感性及5-FU诱导的细胞凋亡. Wang等[46]发现特异性地沉默*livin*基因能增强结肠癌细胞的敏感性. 可溶性抗药性相关钙结合蛋白通过调节Ca^{2+}稳态能诱导人结肠癌耐药表型, Maddalena等[47]通过RNA干扰下调该蛋白的表达, 增强了结肠癌细胞对化疗药的敏感性. Allen等[48]研究表明肿瘤排斥抗原SART1参与大肠癌多药耐药, 沉默该蛋白能增强大肠癌细胞对5-FU或SN38治疗的敏感性, 诱导肠癌细胞凋亡. 江恒等[49]证实沉默孕烷X受体的表达可增强结肠癌LS174T细胞对奥沙利铂化疗敏感性, 并认为可能与SP1、MRP3表达下调相关. He等[50]利用siRNA干扰的逆转录病毒下调αv整合蛋白, 有效降低了HT-29细胞的耐药性.

3 结论

分析RNA干扰应用于大肠癌多药耐药, 主要包括以下几方面: (1)通过干扰跨膜转运蛋白的药泵作用, 提高多药耐药细胞内的抗肿瘤药物水平; (2)灭活细胞氧化及谷胱甘肽相关的解毒酶系统, 从而降低抗肿瘤药物的排泄; (3)通过调控*p53*基因、增强促凋亡因子基因及蛋白表达, 降低抗凋亡因子的蛋白及基因表达, 尽可能避免MDR细胞抵抗及逃逸抗肿瘤药物诱导的凋亡.

肿瘤多药耐药机制异常复杂, RNA干扰可高度特异性地抑制靶基因表达, 尽管目前研究距临床应用仍有很长一段距离, 但作为一项极富潜力和应用前景的技术, 必将给大肠癌多药耐药研究带来新的希望.

■**同行评价**
本文对近年RNA干扰在大肠癌多药耐药研究中的应用概况予以综述, 对临床有一定的指导意义.

4 参考文献

1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* 1998; 391: 806-811
2 Lv W, Zhang C, Hao J. RNAi technology: a revolutionary tool for the colorectal cancer therapeutics. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4636-4639
3 孙海波, 李静. RNA干扰技术及其在大肠癌研究中的应用. 辽宁医学院学报 2009; 4: 359-362
4 孔帅, 李乐平, 靖昌庆. 消化道恶性肿瘤多药耐药机制的研究进展. 中国现代普通外科进展 2009; 8: 706-709
5 Ramachandran C, Wellham LL. Effect of MDR1 phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in multidrug-resistant human tumor cell lines and xenografts. *Anticancer Res* 2003; 23: 2681-2690
6 Ahn SJ, Jeon YH, Lee YJ, Lee YL, Lee SW, Ahn BC, Ha JH, Lee J. Enhanced anti-tumor effects of combined MDR1 RNA interference and human sodium/iodide symporter (NIS) radioiodine gene therapy using an adenoviral system in a colon cancer model. *Cancer Gene Ther* 2010; 17: 492-500
7 Xiao H, Wu Z, Shen H, Luo AL, Yang YF, Li XB, Zhu DY. In vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by efficient delivery of stealth RNAi. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 342-348
8 Xia Z, Zhu Z, Zhang L, Royal C, Liu Z, Chen Q, Adam BL. Specific reversal of MDR1/P-gp-dependent multidrug resistance by RNA interference in colon cancer cells. *Oncol Rep* 2008; 20: 1433-1439
9 孔帅, 李乐平, 靖昌庆, 王峰. RNA干扰技术沉默MDR1基因逆转大肠癌耐药细胞株LoVo/5-Fu的耐药性. 山东大学学报(医学版) 2010; 48: 80-83
10 王开雷, 李乐平, 靖昌庆. 短发夹RNA干扰表达质粒逆转人大肠癌细胞LOVO/5-FU多药耐药的研究. 中国现代普通外科进展 2010; 13: 844-848
11 陈纲, 李世拥, 于波, 安平, 蔡慧芸. 草酸铂、5-氟尿嘧啶联合多药耐药基因反义RNA对耐药直肠癌细胞杀伤作用的研究. 中华外科杂志 2006; 44: 770-773
12 Takakura Y, Hinoi T, Oue N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W, Ohdan H. CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. *Cancer Res* 2010; 70: 6767-6778
13 Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1859-1876
14 杨毅, 姜习新, 王继见, 周洪伟. RNA干扰MRP2表达逆转结肠癌细胞对长春新碱的耐药性. 第三军医大学学报 2008; 30: 1179-1182
15 Shen K, Cui D, Sun L, Lu Y, Han M, Liu J. Inhibition of IGF-IR increases chemosensitivity in human colorectal cancer cells through MRP-2 promoter suppression. *J Cell Biochem* 2012; 113: 2086-2097
16 秦岭, 纪春岩. 肿瘤耐药机制及RNA干扰技术在逆转肿瘤耐药中的应用. 山东医药 2006; 46: 80-81
17 Morgan AS, Ciaccio PJ, Tew KD, Kauvar LM. Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 37: 363-370

18 史浩, 揭志刚. 大肠癌多药耐药机制及中药逆转的研究进展. 实用临床医学 2008; 3: 126-128
19 冉志华, 邹健, 萧树东. 小干扰RNA表达质粒转导逆转人结肠癌羟基喜树碱耐药表型的研究. 中华消化杂志 2007; 27: 7-11
20 陆海, 范忠泽. 肿瘤多药耐药机制及中医药逆转作用研究概况. 中医杂志 2011; 12: 1068-1072
21 吴淑华, 李扬扬, 刘鲁英, 赵大华, 朱玉红. 多药耐药基因产物LRP、GST-π、TopoⅡ在大肠癌中的表达及临床意义. 滨州医学院学报 2009; 32: 331-334
22 Ding Z, Yang L, Xie X, Xie F, Pan F, Li J, He J, Liang H. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1697-1707
23 Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M, Rave-Fränk M, Emons G, Gaedcke J, Kramer F, Wolff HA, Becker H, Beissbarth T, Ebner R, Ghadimi BM, Pukrop T, Ried T, Grade M. Silencing of the Wnt transcription factor TCF4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1824-1831
24 Ao JE, Kuang LH, Zhou Y, Zhao R, Yang CM. Hypoxia-inducible factor 1 regulated ARC expression mediated hypoxia induced inactivation of the intrinsic death pathway in p53 deficient human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420: 913-917
25 Hong X, Chen G, Wang M, Lou C, Mao Y, Li Z, Zhang Y. STAT5a-targeting miRNA enhances chemosensitivity to cisplatin and 5-fluorouracil in human colorectal cancer cells. *Mol Med Report* 2012; 5: 1215-1219
26 朱洪波, 黄学锋, 胡静姿, 周玮, 陈薇, 陈琳琳, 何超. Bcl-XL小分子干扰RNA逆转人结肠癌获得性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的耐药. 中华肿瘤杂志 2008; 30: 245-249
27 朱洪波, 朱玉萍, 黄学锋, 何超, 毛伟芳. Bcl-XL小分子干扰RNA在结肠癌氟尿嘧啶耐药细胞中的治疗作用. 中华消化杂志 2006; 26: 272-274
28 郑欣, 郭文. RNA干扰沉默survivin基因提高大肠癌LOVO细胞对5-FU敏感性的研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2008; 17: 475-477
29 周保国, 魏争, 孙学溥, 乔海泉. 下调X连锁凋亡抑制蛋白基因表达增强结肠癌细胞对5-氟尿嘧啶敏感性的研究. 中华普通外科杂志 2011; 26: 45-47
30 周保国, 魏征, 宋志, 乔海泉. 靶向抑制XIAP基因后结肠癌细胞对凋亡诱导配体耐药性的变化. 中华实验外科杂志 2010; 27: 1029-1031
31 裴莉, 边志衡, 江恒, 陈克力, 陈建芳, 梁后杰. RNA干扰BNIP3表达对LoVo细胞5-氟脲嘧啶化疗敏感性的影响. 肿瘤预防与治疗 2009; 22: 367-370
32 Zhang YF, Li XH, Shi YQ, Wu YY, Li N, He Q, Ji Q, Wang RQ, Yang SM, Fang DC. CIAPIN1 confers multidrug resistance through up-regulation of MDR-1 and Bcl-L in LoVo/Adr cells and is independent of p53. *Oncol Rep* 2011; 25: 1091-1098
33 彭晶晶, 李建军, 梁后杰, 边志衡, 江恒. 结肠癌HT-29细胞中PIDD蛋白的表达及其对细胞耐药性的影响. 肿瘤 2009; 29: 341-344
34 White-Gilbertson S, Mullen T, Senkal C, Lu P, Ogretmen B, Obeid L, Voelkel-Johnson C. Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. *Oncogene* 2009; 28: 1132-1141
35 Klampfer L, Swaby LA, Huang J, Sasazuki T, Shirasawa S, Augenlicht L. Oncogenic Ras increases sensitivity of colon cancer cells to 5-FU-induced apoptosis. *Oncogene* 2005; 24: 3932-3941
36 Patsos HA, Greenhough A, Hicks DJ, Al Kharusi M, Collard TJ, Lane JD, Paraskeva C, Williams AC. The endogenous cannabinoid, anandamide, induces COX-2-dependent cell death in apoptosis-resistant colon cancer cells. *Int J Oncol* 2010; 37: 187-193
37 Lai A, Cairns MJ, Tran N, Zhang HP, Cullen L, Arndt GM. RNA modulators of complex phenotypes in mammalian cells. *PLoS One* 2009; 4: e4758
38 Chen X, Ran ZH, Tong JL, Nie F, Zhu MM, Xu XT, Xiao SD. RNA interference (RNAi) of Ufd1 protein can sensitize a hydroxycamptothecin-resistant colon cancer cell line SW1116/HCPT to hydroxycamptothecin. *J Dig Dis* 2011; 12: 110-116
39 陈翔, 聂芳, 冉志华, 童锦禄, 朱明明, 徐锡涛, 萧树东. Ufd1基因沉默逆转SW1116/HCPT细胞株对羟基喜树碱耐药的研究. 胃肠病学 2011; 16: 580-584
40 Cui W, Li SY, Du JF, Zhu ZM, An P. Silencing phospholipid scramblase 1 expression by RNA interference in colorectal cancer and metastatic liver cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012; 11: 393-400
41 Fan P, Zhang S, Tian H, Yan N, Dai L, Zhang X, Cheng L, Li C, Li Y, Chen X, Shi G, Yang Y, Wei Y, Deng H. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 in colorectal carcinoma xenografts by small hairpin RNA interference targeting PLK1. *Neoplasma* 2012; 59: 676-684
42 Galimov ER, Sidorenko AS, Tereshkova AV, Pletiushkina OIu, Cherniak BV, Chumakov PM. [P66shc action on resistance of colon carcinoma RKO cells to oxidative stress]. *Mol Biol* (Mosk) 2012; 46: 139-146
43 Song M, Zang W, Zhang B, Cao J, Yang G. GCS overexpression is associated with multidrug resistance of human HCT-8 colon cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 23
44 蔡艳玲, 罗小玲, 葛连英, 刘爱群, 谢裕安. RNAi沉默hTERT基因诱导大肠癌SW480细胞凋亡. 中国肿瘤生物治疗杂志 2011; 18: 46-50
45 de la Cruz-Morcillo MA, Valero ML, Callejas-Valera JL, Arias-González L, Melgar-Rojas P, Galán-Moya EM, García-Gil E, García-Cano J, Sánchez-Prieto R. P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. *Oncogene* 2012; 31: 1073-1085
46 Wang X, Xu J, Ju S, Ni H, Zhu J, Wang H. Livin gene plays a role in drug resistance of colon cancer cells. *Clin Biochem* 2010; 43: 655-660
47 Maddalena F, Laudiero G, Piscazzi A, Secondo A, Scorziello A, Lombardi V, Matassa DS, Fersini A, Neri V, Esposito F, Landriscina M. Sorcin induces a drug-resistant phenotype in human colorectal cancer by modulating Ca(2+) homeostasis. *Cancer Res* 2011; 71: 7659-7669
48 Allen WL, Stevenson L, Coyle VM, Jithesh PV, Proutski I, Carson G, Gordon MA, Lenz HJ, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. A systems biology approach identifies SART1 as a novel determinant of both 5-fluorouracil and SN38 drug resistance in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 119-131
49 江恒, 陈健, 陈克力, 李建军, 潘凤, 梁后杰. 沉默孕烷X受体增强结肠癌LS174T细胞对奥沙利铂敏感性的影响. 第三军医大学学报 2012; 34: 5-8
50 He JM, Wang FC, Qi HB, Li Y, Liang HJ. Downregulation of alphav integrin by retroviral delivery of small interfering RNA reduces multicellular resistance of HT29. *Cancer Lett* 2009; 284: 182-188

编辑 李军亮 电编 闫晋利

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2931-2936
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

盆底超声对女性盆底功能障碍所致便秘的诊断价值

徐辰一, 丁曙晴, 薛雅红, 丁义江

徐辰一, 南京中医药大学 江苏省南京市 210029
丁曙晴, 薛雅红, 丁义江, 南京中医药大学第三附属医院 全国中医肛肠医疗中心 江苏省南京市 210001
徐辰一, 硕士, 主要从事肛肠病学方面的研究.
作者贡献分布: 文献检索, 资料分析及论文撰写由徐辰一完成; 选题和审校由丁曙晴与丁义江完成; 论文修改由薛雅红完成.
通讯作者: 丁义江, 教授, 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. njgczx@gmail.com
电话: 025-52276742
收稿日期: 2012-07-17 修回日期: 2012-09-13
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-28

Diagnostic value of pelvic floor ultrasound in constipation due to female pelvic floor dysfunction

Chen-Yi Xu, Shu-Qing Ding, Ya-Hong Xue, Yi-Jiang Ding

Chen-Yi Xu, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Shu-Qing Ding, Ya-Hong Xue, Yi-Jiang Ding, National Chinese Medical Center for Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Yi-Jiang Ding, Professor, Chief Physician, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, 1 Jinling Road, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. njgczx@gmail.com
Received: 2012-07-17 Revised: 2012-09-13
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-28

Abstract
Constipation caused by female pelvic floor dysfunction (FPFD) is closely related to pathological changes in the front, middle and back basins. Constipation caused by pathological changes in the back basin manifests itself as rectocele, internal rectal intussusception, enterocele, descending perineum, and pelvic floor dyssynergia. Constipation due to the pathological changes in the front and middle basins not only manifests the above symptoms but also exhibits the symptoms of uterine and bladder prolapse. Pelvic floor ultrasound allows observing pathological changes in the front, middle and back basins in patients with constipation caused by FPFD, analyzing the changes in structure and function of static and dynamic pelvic floors, and making a more systematic assessment of female pelvic floor lesions, which is conducive to guiding constipation treatment. Therefore, pelvic floor ultrasound has great value in constipation caused by FPFD. In this paper, we review the diagnostic value of pelvic floor ultrasound in constipation due to female pelvic floor dysfunction.

Key Words: Pelvic floor ultrasound; Transperineal ultrasound; Transvaginal ultrasound; Transrectal ultrasound; Pelvic floor dysfunction; Constipation

Xu CY, Ding SQ, Xue YH, Ding YJ. Diagnostic value of pelvic floor ultrasound in constipation due to female pelvic floor dysfunction. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2931-2936

摘要
女性盆底功能障碍(female pelvic floor dysfunction, FPFD)所致便秘与前、中及后盆病变密切相关, 后盆病变所致便秘常表现为直肠前突(rectocele, RC)、直肠内套叠(internal rectal intussusception, IRI)、肠疝(enterocele, EC)、会阴下降(descending perineum, DP)及盆底失弛缓综合征(pelvic floor dyssynergia, PFD)等, 而中、前盆病变所致便秘不仅会出现后盆的特征性改变, 还会伴见子宫脱垂(uterine prolapse, UP)、膀胱脱垂(bladder prolapse, BP)等症状. 使用盆底超声不仅可以观察FPFD所致便秘的前、中及后盆影像学的改变, 分析盆底静动态结构及功能的变化, 还能对女性盆底病变作出较为完整的系统评估, 有利于指导便秘的后期治疗. 故研究盆底超声对FPFD所致便秘有较大应用价值. 本文就盆底超声对FPFD所致便秘的诊断价值进行阐述.

关键词: 盆底超声; 经会阴超声; 经阴道超声; 经肛管直肠超声; 盆底功能障碍; 便秘

徐辰一, 丁曙晴, 薛雅红, 丁义江. 盆底超声对女性盆底功能障碍所致便秘的诊断价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2931-2936
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2931.asp

0 引言
我国慢性便秘的发病率为3.0%-17.6%[1-4], 其中

■背景资料
随着现代社会生活水平的提高和老龄化的加重, 女性盆底功能障碍(FPFD)所致便秘已经受到广泛重视, 如何全面地评估盆底结构改变已成为急需解决的问题, 盆底超声提供了一种简单、快速的诊断方法, 有利于针对病因, 系统地进行治疗.

■同行评议者
徐雄辉, 教授, 主任医师, 同济大学附属第十人民医院超声科

■研发前沿
运用动态三维超声技术，在静息及力排状态下立体成像，根据患者提供的信息，选择相应区域进行定向的图像切割处理，可以发现引起盆底功能改变的异常结构是目前国外研究的趋势.

女性盆底功能障碍(female pelvic floor dysfunction, FPFD)所致便秘的发病率较高. 大多数主诉为排便困难的FPFD患者不仅会出现排便费力、排便不尽感、出口梗阻感以及肛门坠胀感等后盆症状, 同时也有腰骶部酸痛、月经失调及张力性尿失禁等表现, 甚至会有抑郁、焦虑、躁狂等严重的精神心理障碍. 目前诊断盆底功能障碍的方法有排粪造影、肌电评估和腔内测压. 盆底超声作为一种新的诊断方法, 因其具备花费低、痛苦小、无辐射、诊断迅速, 并且不需要肠道准备, 仅需保持适当的膀胱充盈度而逐渐应用于临床. 盆底超声常联合使用经会阴(2D凸阵, 3-6 MHZ), 经阴道(2D凸阵和线阵, 5-12 MHZ)和经肛管直肠(3D 360度视野, 6-16 MHZ)超声, 同时对冠状面、矢状面、横截面进行成像, 根据采集的数据重建完整的盆底结构, 为诊断盆底形态学异常提供准确的影像学信息, 从而让医务人员更好地了解盆底结构改变的细节, 全面的评估女性盆底的功能异常[5].

1 后盆病变所致便秘及超声诊断

后盆病变所致便秘可以分为盆底松弛型和盆底失弛缓型. 盆底松弛型患者多由于长期慢性腹压增高, 超过肛提肌生理极限, 肛提肌损伤或萎缩, 提肌裂孔扩大, 盆底支持组织薄弱, 出现排便困难[6-9], 临床上可见: 直肠前突(rectocele, RC)、直肠内套叠(internal rectal intussusception, IRI)、肠疝(enterocele, EC)和会阴下降(descending perineum, DP); 盆底失弛缓型(pelvic floor dyssynergia, PFD)患者大多由于排便时盆底肌反射性或随意性异常收缩而出现排便困难, 主要临床症状为排便费时费力、有肛门梗阻感和排便不尽感[10].

1.1 直肠前突 RC被定义为直肠前壁疝入阴道[11], 在模拟排便时(valsalva动作)比较明显, 出现如排便不尽感, 排便费力及需手助排便等症状[12-15]. 有研究发现便秘的严重度与RC的深度和大小有关, 前突囊袋深而大者排便困难症状更重[16].

诊断RC的金标准为排粪造影[17,18]. Murad-Regadas等[19]将造影剂打入直肠, 使用经肛管直肠超声三维成像后矢状位纵切立体图像, 测量最初及力排时突出端与阴道后壁相平行的两条切线的垂直距离, 同时发现经肛管直肠超声和排粪造影诊断RC的一致性较高, 并且制定了RC经肛管直肠三维动态超声标准, 即Ⅰ度<0.6 cm; Ⅱ度: 0.7-1.3 cm; Ⅲ度>1.3 cm, RC的分度有利于选择适当的治疗方案. 经会阴超声矢状位平扫可以测量突出顶点距离突出起始端两点连线的垂直距离[20], 当突出深度超过1 cm即可诊断为RC[21]. 其诊断价值与排粪造影相一致[21-24]. 经阴道超声常因测量易被伪影干扰, 临床较少用来诊断RC. 使用盆底超声诊断RC不仅依赖于操作者的技术水平, 而且受到检查体位的约束(检查时, 患者需要仰卧位做valsalva动作, 这并不能代表生理状态下的排便动作), 再加上探头的压迫可能会阻碍突出充分暴露, 因此可能低估RC的程度.

1.2 直肠内套叠 IRI可以被定义为排便过程中近侧直肠壁全层或单纯直肠黏膜层折入远侧肠腔或肛管内, 不超过肛门外缘, 并在粪便排出后持续存在[25-28]. 临床主要表现为排便困难、有排便不尽感、肛门坠胀感、里急后重感, 少数患者需手指伸入直肠协助排便, 并可伴见大便带血[29]. 其中排便不尽感是IRI的典型临床表现[30]. 临床研究发现多次经阴道生产的妇女发病率较高[31].

排粪造影是诊断IRI的主要方法[32]. 但排粪造影很难区分IRI和正常的黏膜下降, 经阴道超声线阵扫后盆和经会阴超声可以发现患者做valsalva动作时矢状位直肠壁内陷入直肠腔内, 从而可以诊断IRI[22,33,34]. 有报道认为经会阴超声与排粪造影诊断IRI一致性较高[33,35]. 经会阴超声和经阴道超声均未直接挤压直肠腔, 因此在不需要造影剂的情况下仍可以获得较好的诊断结果. Murad-Regadas等[36]将造影剂打入肛管直肠, 利用三维成像技术, 选择观测直肠壁突出肠腔的最佳切面(以直肠纵轴为轴心)来诊断IRI, 同时与排粪造影比较, 发现两者诊断IRI的一致性也同样非常高.

1.3 肠疝 EC是指发生在阴道和直肠之间的腹膜囊症[37,38], 被定义为腹膜或腹膜内容物脱出于阴道, 可能会出现类似阴道脱垂以及出口梗阻性排便障碍等症状[39], 常伴有盆腔疼痛、盆底脱垂感或坠胀感等[40-42]. 发生在乙状结肠处的EC, 是导致排便障碍的一个根本原因[43,44]. 这类患者大多抱怨排便次数增多, 一方面是由于粪便残留[45], 一方面是由于EC导致感觉敏感[46].

有研究认为动态经会阴超声和经阴道超声是可以替代排粪造影和MRI用于诊断EC或其他形式的盆腔器官脱垂[21,22,47]. Valsalva动作时利用经会阴超声矢状位平扫及经阴道超声线阵扫后盆可发现下垂的肠道疝入阴道壁后方, 大量临床研究发现经会阴超声和排粪造影诊断EC的一

致性较高[23,24,33], 其诊断EC的标准为在valsalva动作时腹腔内容物的下降, 当疝内容物下降到上1/3阴道高度时为一度EC; 当下降到中1/3阴道高度时为二度EC; 当下降到下1/3阴道高度时为三度EC[20], 影像学的分类能让医务人员更好地了解EC的严重程度, 选择适当的治疗方案, 并有效评估预后转归. 使用经肛管直肠超声诊断EC其可靠性已被排粪造影证实[48], Karaus等[48]发现经肛管直肠超声诊断EC的特异性和灵敏性均非常高, 并提出经肛管直肠超声可以作为诊断EC的一线筛选方法.

1.4 会阴下降 DP是一种复杂的盆底功能障碍[49], 是指患者在安静状态下肛管位于较低水平, 做valsalva动作时, 会阴部可出现气球样膨出, 肛管下降程度超过2 cm, 并有明显的肛管黏膜或痔外翻. DP是功能性排便障碍的重要原因之一[50], 常表现为排便障碍、尿或粪便失禁及其他不同类型的器官脱垂等症状[51]. 其发病机制多由于盆底肌肉松弛, 因此易合并RC、EC及IRI等症状[52].

DP常被排粪造影确诊. 排粪造影可以测量valsalva动作时肛管直肠连接处至耻尾线的垂直距离, 正常值范围为1-3 cm, 若>3 cm即可诊断为DP[36,53]. 而经会阴超声矢状位成像涉及的范围与排粪造影相当, 均可以观察到后盆、中盆、前盆, 因此选择适当的骨性标志, 能非常有效地评估盆腔器官脱垂的程度. 经肛管直肠超声和排粪造影诊断DP被发现有较高的一致性[54]. Murad-Regadas等[36]使用经肛管直肠超声三维成像后矢状位观察耻骨直肠肌的移动度, 并与排粪造影相比, 建立了超声诊断DP的标准, 即当静息至valsalva动作时耻骨直肠肌下降的距离>2.5 cm时便可诊断为DP. 研究还发现排粪造影的平均DP距离要远大于经肛管直肠, 分析原因可能与受检者体位有关[36,54]. 而使用经阴道超声诊断DP的报道较少.

1.5 盆底失弛缓综合征 PFD是出口梗阻型便秘的一种, 其特点是排便时耻直肌不能正常松弛, 甚至异常收缩[55]. PFD的患者常有排便梗阻感和排便不尽感[56,57], 一般建议患者做肌电图[58]和肛门直肠测压[59,60]来明确诊断.

经会阴超声可以在矢状位观测静息和valsalva动作时肛直角的变化, 因而比临床指诊更加直观敏感, 并且避免了指压限制肛管直肠活动的干扰[22]. 不少文献报道使用经肛管直肠超声三维成像来评估PFD, 发现在valsalva动作时耻直肌的水平切线和肛管中轴垂线的夹角角度变小[19,61]、耻直肌夹角增大[62]、耻骨直肠肌内侧缘至探头的距离差值≤0.5 mm[12,32]均可以诊断PFD. Van Outryve等[63]通过经肛管直肠超声测量静息状态和valsalva动作时括约肌的长度和厚度来评价PFD, 发现PFD的患者肛管括约肌、耻骨直肠肌长度明显小于正常人, 耻骨直肠肌的厚度明显大于正常人. Beer-Gabel等[23]使用经会阴超声、Barthet等[54]使用经肛管直肠超声分别与排粪造影相比均得出他们各自使用的技术是一种非常准确的检测方法. 也有报道称经阴道超声线阵扫后盆也可以观察肛直角的变化[5]. 因而诊断PFD便秘的超声参数较多, 选择灵敏度和特异度较高的参数有助于制定适当的治疗方案和评估后期的疗效.

■相关报道
2011年Santoro报道了盆底的复杂的解剖结构不能仅靠单一类型的超声进行诊断, 选择性地联合运用经会阴, 经阴道和经肛管直肠超声, 实现多盆扫描才能更精准的评价盆底功能性疾病.

2 中盆病变所致便秘及超声诊断

中盆病变中子宫脱垂(uterine prolapse, UP)导致的便秘除了有排便费力、排便不尽感等后盆症状, 同时也有腰骶部酸痛、月经失调、甚至难产等表现. UP是功能性便秘的主要危险因素[64], 一方面, 由于矢状位子宫位于直肠前方, 严重的UP及后倾可直接压迫直肠而引起便秘; 另一方面, UP还可能通过损害盆底整体功能而间接引起便秘[65]. UP症状的缓解, 在一定程度上可以改善便秘[66]. 相反, 不少文献同时指出长期便秘也会导致UP[67-69]. 这可能与长期排便困难损伤盆腔神经, 使其末梢神经传导潜期延长, 造成支持子宫的肌肉韧带无力有关.

中盆病变所致便秘, 不仅有便秘等后盆特征性的影像学改变(如RC、IRI等, 前已叙述), 还会出现UP等超声表现. 评估中盆病变主要依赖于经会阴超声[21]. 经会阴超声可以在正中矢状面观测子宫体, 并判断子宫是否有扩张、前倾或者后倾, 评价UP的程度. 而经阴道超声常因探头阻碍子宫或阴道穹隆的下移而很少被用于评估UP. 经肛管直肠超声常无法直观评估UP, 不能像经会阴超声一样实时成像, 临床较少用来评估UP.

3 前盆病变所致便秘及超声诊断

前盆病变中膀胱脱垂(bladder prolapse, BP)不仅可以伴发便秘, 也有报道称BP可以导致便秘[70]. BP导致的便秘除了有排便困难, 排便不尽感等后盆症状, 大多数患者还有有盆腔坠胀、排尿困难等前盆疾病表现[71,72], 而有关BD直接引起便秘的报道较少, 这可能与前盆、后盆并没有紧密连接有关. 前盆病变即使确实累及后盆, 但

■**创新盘点**
本文分别从后盆、中盆、前盆的角度论述导致女性盆底功能障碍所致便秘的超声表现, 阐述了盆底超声诊断疾病的价值.

由于中间腔隙(中盆)的存在, 前盆对后盆的直接影响也会受到一定程度的质疑. Baessler等[70]报道了1名65岁女性膀胱向后膨出致使阴道后壁向肛管直肠内移动, 形成直肠脱垂后引起排便障碍的案例. 证实前盆病变可以通过引起直肠脱垂而导致便秘. 从解剖位置来看, BP既然可以通过形成直肠脱垂引起便秘, 亦有可能向后挤压使肛直角变小, 导致排便困难. 宏观来看, BP是PFD的一种类型, 即出现了BP, 在一定程度上也反映出盆底支持结构松弛, 根据“整体理论”, 肛提肌、肌肉、筋膜等支持结构松弛的情况如果并未得到及时纠正, 继而会影响后盆病变, 出现排便费力等症状.

前盆病变所致便秘的超声诊断, 除了可以看到伴发的后盆病变(如RC、IRI等,前文已述), 还能发现BD的影像学改变. BD的诊断主要依赖经会阴超声和经阴道超声. 经会阴超声证实膀胱膨出患者在valsalva动作时在正中矢状面膀胱颈、尿道向下和向后移位, 膀胱后壁弧形下降至耻骨联合下缘甚至脱到阴道外口, 尿道-膀胱后角消失[73]. 经肛管直肠超声因解剖位置等原因, 尚不能直观评估BD, 利用其重建三维成像还有待进一步研究.

总之, 我们认为经会阴超声适合评估全盆病变所致便秘, 而经阴道超声更有利于评估后盆、前盆病变所致便秘, 经肛管直肠超声因其具备三维成像等特点, 可以根据患者的主诉选择相应区域进行图像的切割处理, 更适合于评估后盆病变.

4 结论

20世纪90年代初Petros等[74]提出盆底整体理论, 指出前盆、中盆的病变在一定程度上会影响后盆的功能, 就后盆病变而言, 可以表现出便秘的症状, 因此有必要结合前、中、后盆作出全面的评估, 然而临床上不同的专家(泌尿科, 妇科和肛肠科医生)仍局限各自的专科领域, 尚未全面考察盆底. Santoro等[5]盆底的复杂的解剖和功能不能仅靠单一类型的超声, 经会阴, 经阴道和经肛管直肠超声之间可以互补, 多盆扫描才能更精准的评价盆底功能性疾病. 对有排便障碍患者来说, Perniola等[34]建议超声应该被作为一线筛选方法, 这样可以避免一些侵入式的检查, 一旦出现异常的超声改变, 可以再行排粪造影来证实判断.

对于患有排便障碍疾病的患者, 仅根据患者的主诉、症状以及肛门指检的结果, 很难具体判定盆底结构或功能的某一部分发生异常改变, 使用盆底超声不仅可以了解局部改变, 还可以整体评估盆底, 准确发现合并症和并发症, 及时调整患者的治疗方案, 改善患者的生活质量. 综合来看, 盆底超声可以反映整个盆底在静息状态和valsalva动作时复杂的结构改变, 对FPFD所致便秘的有重要的诊断价值.

5 参考文献

1 尉秀清, 陈湖. 广州市居民功能性便秘流行病学调查. 胃肠病学和肝病学杂志 2001; 10: 150-151, 155

2 郭晓峰, 柯美云, 潘国宗, 韩少梅, 方秀才, 鲁素彩, 郭慧平. 北京地区成人慢性便秘整群、分层、随机流行病学调查及其相关因素分析. 中华消化杂志 2002; 22: 637-638

3 刘智勇, 杨关根, 沈忠, 何文英, 何芳, 袁玥旻. 杭州市城区便秘流行病学调查. 中华消化杂志 2004; 24: 435-436

4 阚志超, 姚宏昌, 龙治平, 刘之武, 韩玉山, 张志广, 王东旭, 杨强, 丁刚. 天津市成年人慢性便秘调查及相关因素分析. 中华消化杂志 2004; 24: 612-614

5 Santoro GA, Wieczorek AP, Dietz HP, Mellgren A, Sultan AH, Shobeiri SA, Stankiewicz A, Bartram C. State of the art: an integrated approach to pelvic floor ultrasonography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 37: 381-396

6 Delancey JO, Hurd WW. Size of the urogenital hiatus in the levator ani muscles in normal women and women with pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 364-368

7 DeLancey JO, Morgan DM, Fenner DE, Kearney R, Guire K, Miller JM, Hussain H, Umek W, Hsu Y, Ashton-Miller JA. Comparison of levator ani muscle defects and function in women with and without pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 295-302

8 Dietz HP, Shek C, De Leon J, Steensma AB. Ballooning of the levator hiatus. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 676-680

9 Majida M, Braekken IH, Umek W, Bø K, Saltyte Benth J, Ellstrøm Engh M. Interobserver repeatability of three- and four-dimensional transperineal ultrasound assessment of pelvic floor muscle anatomy and function. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009; 33: 567-573

10 丁曙晴. 盆底失弛缓综合征所致便秘的诊治难点和策略. 临床外科杂志 2011; 19: 220-222

11 Sloots CE, Meulen AJ, Felt-Bersma RJ. Rectocele repair improves evacuation and prolapse complaints independent of anorectal function and colonic transit time. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 342-348

12 Siproudhis L, Dautrème S, Ropert A, Bretagne JF, Heresbach D, Raoul JL, Gosselin M. Dyschezia and rectocele--a marriage of convenience? Physiologic evaluation of the rectocele in a group of 52 women complaining of difficulty in evacuation. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 1030-1036

13 罗金燕. 慢性便秘诊治的新概念. 中华内科杂志 2003; 42: 75-76

14 Dietz HP, Korda A. Which bowel symptoms are most strongly associated with a true rectocele? *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005; 45: 505-508

15 胡石腾, 陈德平, 刘仕佑, 蒋国雄, 陈林凯, 陈和清, 蒋玲, 娄辉, 彭华保. 直肠前突与出口梗阻性便秘的关系. 中国现代医生 2009; 47: 16-18
16 郭建平, 张永军, 焦旅忠, 赵文召. 排粪造影对直肠前突的诊断价值. 上海医学影像 2005; 14: 145-146
17 Harvey CJ, Halligan S, Bartram CI, Hollings N, Sahdev A, Kingston K. Evacuation proctography: a prospective study of diagnostic and therapeutic effects. *Radiology* 1999; 211: 223-227
18 Kenton K, Shott S, Brubaker L. The anatomic and functional variability of rectoceles in women. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1999; 10: 96-99
19 Murad-Regadas SM, Regadas FS, Rodrigues LV, Silva FR, Soares FA, Escalante RD. A novel three-dimensional dynamic anorectal ultrasonography technique (echodefecography) to assess obstructed defecation, a comparison with defecography. *Surg Endosc* 2008; 22: 974-979
20 Martellucci J, Naldini G. Clinical relevance of transperineal ultrasound compared with evacuation proctography for the evaluation of patients with obstructed defaecation. *Colorectal Dis* 2011; 13: 1167-1172
21 Dietz HP, Steensma AB. Posterior compartment prolapse on two-dimensional and three-dimensional pelvic floor ultrasound: the distinction between true rectocele, perineal hypermobility and enterocele. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 26: 73-77
22 Beer-Gabel M, Teshler M, Barzilai N, Lurie Y, Malnick S, Bass D, Zbar A. Dynamic transperineal ultrasound in the diagnosis of pelvic floor disorders: pilot study. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 239-245; discussion 245-248
23 Beer-Gabel M, Teshler M, Schechtman E, Zbar AP. Dynamic transperineal ultrasound vs. defecography in patients with evacuatory difficulty: a pilot study. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 60-67
24 Beer-Gabel M, Assoulin Y, Amitai M, Bardan E. A comparison of dynamic transperineal ultrasound (DTP-US) with dynamic evacuation proctography (DEP) in the diagnosis of cul de sac hernia (enterocele) in patients with evacuatory dysfunction. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 513-519
25 Theuerkauf FJ, Beahrs OH, Hill JR. Rectal prolapse. Causation and surgical treatment. *Ann Surg* 1970; 171: 819-835
26 Ripstein CB. Symposium: Procidentia of the rectum: internal intussusception of the rectum (Stage I rectal prolapse). *Dis Colon Rectum* 1975; 18: 458-460
27 White CM, Findlay JM, Price JJ. The occult rectal prolapse syndrome. *Br J Surg* 1980; 67: 528-530
28 Hausammann R, Steffen T, Weishaupt D, Beutner U, Hetzer FH. Rectocele and intussusception: is there any coherence in symptoms or additional pelvic floor disorders? *Tech Coloproctol* 2009; 13: 17-25; discussion 25-26
29 黄显凯, 张胜本, 张连阳. 直肠内套叠手术方式的探讨. 中国实用外科杂志 1993; 13: 733-733
30 Dvorkin LS, Knowles CH, Scott SM, Williams NS, Lunniss PJ. Rectal intussusception: characterization of symptomatology. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 824-831
31 Adams E, Thomson A, Maher C, Hagen S. Mechanical devices for pelvic organ prolapse in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (2): CD004010.
32 Brusciano L, Limongelli P, Pescatori M, Napolitano V, Gagliardi G, Maffettone V, Rossetti G, del Genio G, Russo G, Pizza F, del Genio A. Ultrasonographic patterns in patients with obstructed defaecation. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 969-977
33 Steensma AB, Oom DM, Burger CW, Schouten WR. Assessment of posterior compartment prolapse: a comparison of evacuation proctography and 3D transperineal ultrasound. *Colorectal Dis* 2010; 12: 533-539
34 Perniola G, Shek C, Chong CC, Chew S, Cartmill J, Dietz HP. Defecation proctography and translabial ultrasound in the investigation of defecatory disorders. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 31: 567-571
35 Grasso RF, Piciucchi S, Quattrocchi CC, Sammarra M, Ripetti V, Zobel BB. Posterior pelvic floor disorders: a prospective comparison using introital ultrasound and colpocystodefecography. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30: 86-94
36 Murad-Regadas SM, dos Santos D, Soares G, Regadas FS, Rodrigues LV, Buchen G, Kenmoti VT, Surimã WS, Fernandes GO. A novel three-dimensional dynamic anorectal ultrasonography technique for the assessment of perineal descent, compared with defaecography. *Colorectal Dis* 2012; 14: 740-747
37 Oom DM, van Dijl VR, Gosselink MP, van Wijk JJ, Schouten WR. Enterocele repair by abdominal obliteration of the pelvic inlet: long-term outcome on obstructed defaecation and symptoms of pelvic discomfort. *Colorectal Dis* 2007; 9: 845-850
38 Oom DM, Gosselink MP, Schouten WR. Enterocele--diagnosis and treatment. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: 135-137
39 Dietz HP, Haylen BT, Vancaillie TG. Female pelvic organ prolapse and voiding function. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2002; 13: 284-288
40 Gosselink MJ, van Dam JH, Huisman WM, Ginai AZ, Schouten WR. Treatment of enterocele by obliteration of the pelvic inlet. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 940-944
41 Jean F, Tanneau Y, Le Blanc-Louvry I, Leroi AM, Denis P, Michot F. Treatment of enterocele by abdominal colporectosacropexy - efficacy on pelvic pressure. *Colorectal Dis* 2002; 4: 321-325
42 Takahashi T, Yamana T, Sahara R, Iwadare J. Enterocele: what is the clinical implication? *Dis Colon Rectum* 2006; 49: S75-S81
43 Jorge JM, Yang YK, Wexner SD. Incidence and clinical significance of sigmoidoceles as determined by a new classification system. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 1112-1117
44 van der Plas-de Koning YW, Vierhout ME. [Low rate of recurrence at a follow-up study of vaginal repair of enterocele]. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2001; 145: 366-370
45 Wallden L. Defecation block in cases of deep rectogenital pouch; a surgical roentgenological and embryological study with special reference to morphological conditions. *Acta Chir Scand Suppl* 1952; 165: 1-122
46 Halligan S, Bartram C, Hall C, Wingate J. Enterocele revealed by simultaneous evacuation proctography and peritoneography: does "defecation block" exist? *AJR Am J Roentgenol* 1996; 167: 461-466
47 Steensma A, Oom D, Burger C, Schouten W. OC261: Comparison of defecography and 3D/4D translabial ultrasound in patients with pelvic organ prolapse and/or evacuation disorders. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007; 30: 447-447
48 Karaus M, Neuhaus P, Wiedenmann TB. Diagnosis of enteroceles by dynamic anorectal endosonogra-

■**应用要点**
本文系统地论述了女性盆底功能障碍所致便秘的盆底超声表现及应用价值, 为临床诊断提供了一种新的检查方法.

■同行评价
本文列举了超声在女性盆底功能障碍相关疾病的诊断应用，进一步拓展了超声临床诊断的应用范围. 盆底超声可作为一种新的、安全、准确的诊断工具，在对女性盆底功能障碍相关疾病或类似胃肠道疾病检查时可以提供更多的诊断信息.

phy. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1683-1688
49 Pucciani F, Boni D, Perna F, Bassotti G, Bellini M. Descending perineum syndrome: are abdominal hysterectomy and bowel habits linked? *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 2094-2099
50 卢简言. 排粪造影6张摄片法的临床应用和效果(附265例报告). 福建医药杂志 2001; 23: 113-114
51 Schwandner O, Poschenrieder F, Gehl HB, Bruch HP. [Differential diagnosis in descending perineum syndrome]. *Chirurg* 2004; 75: 850-860
52 肖葵, 徐德福, 黄永清, 新泉, 杨建平, 赵志成, 卢简言. 排粪造影的影像学表现及临床研究综合分析. 中华现代影像学杂志 2007; 4: 1-4
53 张东铭. 盆底与肛门病学. 贵阳: 贵州科技出版社, 2000: 1-2
54 Barthet M, Portier F, Heyries L, Orsoni P, Bouvier M, Houtin D, Barriere N, Mambrini P, Salducci J, Grimaud JC. Dynamic anal endosonography may challenge defecography for assessing dynamic anorectal disorders: results of a prospective pilot study. *Endoscopy* 2000; 32: 300-305
55 Pucciani F, Rottoli ML, Bologna A, Cianchi F, Forconi S, Cutellè M, Cortesini C. Pelvic floor dyssynergia and bimodal rehabilitation: results of combined pelviperineal kinesitherapy and biofeedback training. *Int J Colorectal Dis* 1998; 13: 124-130
56 Kuijpers HC. Application of the colorectal laboratory in diagnosis and treatment of functional constipation. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 35-39
57 Wiesel PH, Dorta G, Cuypers P, Herranz M, Kreis ME, Schnegg JF, Jornod P. Patient satisfaction after biofeedback for constipation and pelvic floor dyssynergia. *Swiss Med Wkly* 2001; 131: 152-156
58 薛雅红, 丁曙晴, 丁义江, 张勇, 曾宪东, 钱雄杰, 刘峰, 王静. 盆底失弛缓综合征患者盆底表面肌电的改变及临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1025-1029
59 Kreis ME, Jehle EC, Starlinger MJ, Cuypers P, Herranz M, Wiesel P, Blum AL. The Favre system for anorectal manometry: comparison with other manometry systems in vitro and in healthy volunteers. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 888-893
60 丁曙晴, 丁义江, 余苏萍. 盆底失弛缓综合征70例临床分析. 江苏医药杂志 2001; 27: 515-516
61 Murad-Regadas SM, Regadas FS, Rodrigues LV, Souza MH, Lima DM, Silva FR, Filho FS. A novel procedure to assess anismus using three-dimensional dynamic anal ultrasonography. *Colorectal Dis* 2007; 9: 159-165
62 Pregazzi R, Sartore A, Bortoli P, Grimaldi E, Troiano L, Guaschino S. Perineal ultrasound evaluation of urethral angle and bladder neck mobility in women with stress urinary incontinence. *BJOG* 2002; 109: 821-827
63 Van Outryve SM, Van Outryve MJ, De Winter BY, Pelckmans PA. Is anorectal endosonography valuable in dyschesia? *Gut* 2002; 51: 695-700
64 Ng SC, Chen YC, Lin LY, Chen GD. Anorectal dysfunction in women with urinary incontinence or lower urinary tract symptoms. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 77: 139-145
65 柯美云. 慢性便秘的诊治指南. 中华内科杂志 2004; 43: 73-74
66 Roovers JP, van der Bom JG, van der Vaart CH. Hysterectomy does not cause constipation. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1068-1072; discussion 1073
67 Spence-Jones C, Kamm MA, Henry MM, Hudson CN. Bowel dysfunction: a pathogenic factor in uterovaginal prolapse and urinary stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 147-152
68 Arya LA, Novi JM, Shaunik A, Morgan MA, Bradley CS. Pelvic organ prolapse, constipation, and dietary fiber intake in women: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1687-1691
69 Rortveit G, Brown JS, Thom DH, Van Den Eeden SK, Creasman JM, Subak LL. Symptomatic pelvic organ prolapse: prevalence and risk factors in a population-based, racially diverse cohort. *Obstet Gynecol* 2007; 109: 1396-1403
70 Baessler K, Schuessler B. Obstructed defecation caused by a cystourethrocele and mobile posterior vaginal wall: a case report. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001; 12: 349-351
71 Mellgren A, Bremmer S, Johansson C, Dolk A, Udén R, Ahlbäck SO, Holmström B. Defecography. Results of investigations in 2,816 patients. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 1133-1141
72 Maglinte DD, Kelvin FM, Fitzgerald K, Hale DS, Benson JT. Association of compartment defects in pelvic floor dysfunction. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 172: 439-444
73 Dietz HP, Haylen BT, Broome J. Ultrasound in the quantification of female pelvic organ prolapse. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18: 511-514
74 Petros PE, Ulmsten UI. An integral theory and its method for the diagnosis and management of female urinary incontinence. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 1993; 153: 1-93

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2937-2943
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

文献综述 REVIEW

幽门螺杆菌不同感染阶段的相关毒力因子及其致病性

陈莫耶, 袁 媛

陈莫耶, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所暨普通外科研究所肿瘤病因与筛查研究室 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室 辽宁省沈阳市 110001
陈莫耶, 硕士, 主要从事消化系肿瘤病因学的研究.
作者贡献分布: 本文综述由陈莫耶完成; 袁媛负责审校.
通讯作者: 袁媛, 教授, 博士生导师, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京街155号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所暨普通外科研究所肿瘤病因与筛查研究室, 辽宁省高校肿瘤病因与预防重点实验室. yyuan3@hotmail.com
电话: 024-83282153
收稿日期: 2012-08-20 修回日期: 2012-09-27
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-28

Helicobacter pylori virulence factors that act at different stages of infection

Mo-Ye Chen, Yuan Yuan

Mo-Ye Chen, Yuan Yuan, Department of Tumor Etiology and Screening, Institute of Cancer and General Surgery, the First Hospital of China Medical University; Key Laboratory of Cancer Control in Liaoning Province, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Yuan Yuan, Professor, Department of Tumor Etiology and Screening, Institute of Cancer and General Surgery, the First Hospital of China Medical University; Key Laboratory of University in Liaoning Province, 155 Nanjing Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yyuan3@hotmail.com
Received: 2012-08-20 Revised: 2012-09-27
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-28

Abstract

Helicobacter pylori (*H. pylori*) plays an essential role in the development of various gastroduodenal diseases, such as chronic superficial gastritis, peptic ulcer, gastric mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma, and gastric adenocarcinoma. The diverse clinical outcomes after *H. pylori* infection are partly attributable to various *H. pylori* virulence factors. These virulence factors can act at different stages of infection, including (1) establishing successful colonization; (2) evading the host's immune system and (3) invading the gastric mucosa. In this paper, we review the recent advances in research of *H. pylori* virulence factors associated with the pathogenic process of *H. pylori* infection.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Virulence factors; Gastroduodenal diseases; Pathogenic mechanism

Chen MY, Yuan Y. *Helicobacter pylori* virulence factors that act at different stages of infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2937-2943

摘要

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染可以诱发浅表性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴瘤, 甚至胃癌等多种疾病. 其毒力因子的差异是导致不同临床结局发生的重要因素之一. *H. pylori*致病过程主要分为3个阶段: (1)稳定定植于胃黏膜上皮细胞; (2)逃避宿主免疫系统攻击; (3)释放毒素损伤胃黏膜. 本文对*H. pylori*参与的致病过程中, 不同阶段的重要毒力因子, 包括黏附定植相关因子、免疫逃逸相关因子、黏膜效应相关因子等与疾病的相关性及其可能致病机制予以综述.

关键词: 幽门螺杆菌; 毒力因子; 胃十二指肠疾病; 致病机制

陈莫耶, 袁媛. 幽门螺杆菌不同感染阶段的相关毒力因子及其致病性. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2937-2943
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2937.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种具有高感染率及严重致病性的常见细菌, 其致病过程有多种毒力因子参与, 如CagA、VacA、SabA、BabA、LPS和HtrA等[1]. 由于*H. pylori*在宿主体内定植及适应的过程中会通过自然转化、遗传重组或变异等方式使其遗传背景发生改变, 因此不同菌株携带的毒力因子存在人种和地域差异, 这种差异是导致不同临床结局发生的重要原因, 但不同毒力因子与胃十二指肠疾病的相关性及其致病机制尚不清楚[2]. 寻找能够提示疾病结局、具有预警作用的毒力因子标志物并明确其致病机制对于严重胃十二指肠疾病高风险个体识别、疾病诊断及预后判断具有重要意义. *H. pylori*从进入宿主胃内到导致不同

■背景资料
幽门螺杆菌(*H. pylori*)作为常见的环境致病因素, 因其高感染率和严重致病性备受关注, 可以诱发浅表性胃炎、消化性溃疡以及胃癌等消化系疾病. 早在1994年, 国际癌症研究机构(IARC)就已将*H. pylori*列为Ⅰ类致癌原.

■同行评议者
沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科; 陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研发前沿
*H. pylori*毒力因子是导致消化系统疾病发生的重要原因之一，但是目前对于毒力因子及其亚型的发现尚不完全，其与临床结局的相关性及致病机制尚不清楚，以上问题的解决对于胃十二指肠疾病的预防、诊断及预后的预测大有裨益.

临床结局发生主要经历3个重要阶段[3]: (1)稳定定植于胃黏膜上皮细胞; (2)逃避宿主免疫系统攻击; (3)释放毒素损伤胃黏膜. 明确参与*H. pylori*致病过程不同阶段的主要毒力因子及其致病机制可以指导疾病防控工作的开展, 如*H. pylori*感染的预防、新疫苗的研制以及在确定感染后制定有针对性的治疗策略, 即在*H. pylori*感染的不同阶段特异性阻断其主要致病因子的功能以达到控制疾病发生发展的目的. 据此, 本文就*H. pylori*参与致病过程的重要毒力因子, 包括黏附定植相关因子、免疫逃逸相关因子、黏膜效应相关因子等与疾病的相关性及其可能致病机制的研究进展作一综述.

1 黏附定植相关因子

黏附定植是*H. pylori*感染致病的前提条件. 此过程至少包括2个步骤: (1)*H. pylori*在pH缓冲机制的保护下穿过黏液层快速移动到pH相对中性的胃黏膜表面; (2)通过外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)牢固黏附于胃黏膜上皮细胞. 参与pH缓冲的毒力因子主要包括尿素酶系统, 目前已知的OMP主要有BabA、SabA和OipA等.

1.1 尿素酶系统 *H. pylori*一个重要特征是可以分泌大量尿素酶, 该系统是*H. pylori*抵抗胃内酸环境变化的重要工具. 尿素酶系统至少涉及7个基因: *ureA*和*ureB*编码尿素酶的两个亚单位; *ureE*、*ureF*、*ureG*及*ureH*编码酶活性相关的辅助蛋白; *ureI*编码尿素通道蛋白, 可以将尿素运输到细胞质内[4]. *H. pylori*通过质子门控通道摄取尿素, 水解后将氨和二氧化碳释放到胞液和周质, 在*H. pylori*表面形成中性微环境, 使其免受胃酸的侵蚀[5]. 氨对*H. pylori*的保护作用可以使细菌在pH为2.5的高酸环境下仍保持50%-60%的代谢活性, 而尿素酶缺失的*H. pylori*适应能力显著下降[6]. 另外, 氨可以直接导致胃上皮细胞的损伤和炎症反应, 干扰正常的氢离子代谢, 使之反向扩散入胃上皮细胞[7]. 近年来研究发现, 尿素酶可以结合胃上皮细胞表面Ⅱ型MHC分子并且诱导细胞凋亡, 这种靶向黏附特性和定植的发现揭示了*H. pylori*致病的新机制, 开发抗ⅡMHC抗体可能有效阻断*H. pylori*的靶向黏附和定植, 减少细胞损伤[8].

1.2 外膜蛋白家族

1.2.1 血型抗原结合黏附素: 血型抗原结合黏附素(blood-group antigen binding adhesion, BabA)是目前研究较为深入的OMP家族中的一员, 由*babA2*基因编码, 可以与胃黏膜上皮细胞表面的Lewis^{b}抗原以及ABO抗原结合, 是*H. pylori*最具特征性的黏附因子, 在定植过程中起重要作用[9]. 在西方人群中, *babA2*与严重的胃黏膜炎症、十二指肠溃疡及胃癌的发生密切相关, 且*babA2*与其他毒力基因连锁存在时, 如在*cagA*+/*vacAs1*+/*babA2*+的*H. pylori*菌株感染的患者中严重胃疾病发生的风险明显升高[10]. BabA能否成为预测临床结局的毒力因子标志物还存在争议: 在台湾和巴西的人群中并没有发现BabA与疾病的相关性[11,12], 而在伊朗和土耳其人群中发现BabA的存在可以增加胃癌的发病风险, 可能成为严重胃损伤发生的预警标志物[13,14].

1.2.2 唾液酸结合黏附素: 唾液酸结合黏附素(sialic acid-binding adhesion, SabA)与胃黏膜上皮细胞表面的鞘糖脂唾液酸化Lewis^{x}抗原结合, 曾有研究认为SabA具有增加胃癌发生风险和降低十二指肠溃疡发病风险的双重作用, SabA阳性菌株可使胃体胃窦中性粒细胞浸润减弱并诱发胃窦部严重肠上皮化生以及萎缩性胃炎[15]. SabA可刺激细菌利用损伤细胞所释放的营养物质, 当胃内微环境发生改变或炎症反应过强, *sabA*将发生时相变化, 基因表达处于关闭状态, 使*H. pylori*远离发生强炎症反应的上皮细胞, 以确保长期定植和感染同时*H. pylori*黏附定植能力、细菌密度以及诱导炎症反应能力均明显下降[16].

1.2.3 前炎性外膜蛋白: 前炎性外膜蛋白(outer inflammatory protein A, OipA)在胃黏膜上皮细胞表面的结合受体尚不清楚. 目前, OipA与疾病相关性存在争议, 可能与*H. pylori*感染的地域性及人种有关. 在欧洲东南部人群中, 感染OipA阳性菌株提示消化性溃疡的发生[17]; 而在意大利, 没有发现OipA与疾病的相关性[18]. *oipA*基因存在功能性(on)和非功能性(off)两种状态, 只有处于功能性状态才能表达OipA蛋白, 这种相变受*oipA*基因5'末端CT双核苷酸数目这一滑链修复机制的调节, 使*H. pylori*可以快速适应胃内微环境的改变[19], 且*oipA*基因的功能状态与CagA、VacAs1、BabA2的存在密切相关[20]. Yamaoka[21]认为OipA可以导致严重的中性粒细胞浸润, 诱导白介素8(interleukin-8, IL-8)释放, 使胃十二指肠溃疡以及胃癌的发病风险升高.

2 免疫逃逸相关因子

免疫逃逸是*H. pylori*长期感染宿主的关键策略. *H. pylori*感染可以引发宿主固有免疫和适应性

免疫应答, 导致大量中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞浸润, 但是强炎症反应却无法彻底清除*H. pylori*, 这与其免疫逃逸策略有关, 相关因子主要包括肽聚糖的结构修饰、脂多糖抗原表位变化等.

2.1 肽聚糖 肽聚糖(peptidoglycan, PG)是*H. pylori*细胞壁中的一道主要保护屏障, 其进入宿主细胞的方式包括Ⅳ型分泌系统的协助以及外膜囊泡的传递[22]. PG与宿主细胞受体Nod1相互作用启动NF-κB依赖性炎症应答机制, 促进IL-8等细胞因子的释放[23]. 进入细胞的PG还可以激活P13K-AKT信号通路, 导致细胞凋亡减少迁移增加[24], 通过与Nod1相互作用触发细胞内信号级联反应诱导Ⅰ型干扰素产生, 从而激活下游转录因子ISGF3引起Th1应答[25], 这些信号传导途径的激活都与增加胃癌的发病风险密切相关. PG的结构性修饰是病原微生物逃避宿主固有免疫的机制之一, 但*H. pylori*是否通过PG结构修饰来逃避或改变宿主免疫应答并不十分清楚. 近年来发现PgdA(HP310)在氧化应激的条件下显著高表达, 具有PG-N-脱乙酰酶活性, 可以催化PG结构修饰. *pgdA*突变的*H. pylori*菌株与野生株相比, 能够诱导更强的炎症反应, 对溶菌酶的耐受性明显下降, 因此认为PG脱乙酰基后能够增强对溶菌酶的抗性, 减弱炎症反应, 有效逃避宿主免疫监视[26]. PG结构修饰可以使Nod受体对PG敏感性减弱从而改变宿主的免疫应答; 也有研究认为PG结构修饰可以通过防止溶菌酶降解以及释放Nod配体来改变Nod信号转导通路, 同时细菌片段以及易被宿主受体识别的细胞壁成分的释放减少, 这都是PG通过脱乙酰化来逃避宿主免疫防御的有力证据[27].

2.2 脂多糖 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌内毒素, 在细菌裂解后被释放出来, *H. pylori*的LPS与其他细菌相比具有较低的内毒素活性和较弱的刺激巨噬细胞产生细胞因子的能力, 且能负向调节宿主巨噬细胞TRL4介导的信号转导途径[28]. 纯化的LPS与TLR4相互作用的实验中发现, *H. pylori* LPS不能被TLR4敏感的识别, 可能导致细胞表面的TLR4受体表达下降, 细胞因子产生减少, 从而逃避宿主免疫监视[29]. 研究证实, LPS可以减弱宿主吞噬细胞活性, 降低宿主对细菌的清除能力, 这种能力可以被LPS结合蛋白(rLBP)抑制[30]. Ramarao等[31]的研究数据表明, *H. pylori*抑制吞噬细胞活性对其在宿主的持续感染及免疫逃逸过程中至关重要. *H. pylori* LPS另一个重要特征是能够表达O-抗原Lewis, $Le^{x/y}$不稳定存在并且可以产生可逆性的相位变化, 其与人细胞表面的Lewis血型抗原相似, 这种分子模仿机制使细菌可以逃避宿主免疫识别, 获得更强的适应能力, 同时这种结构相似性也可能诱导宿主产生自身抗体, 间接造成损伤[32].

3 黏膜效应相关因子

黏膜效应是*H. pylori*致病的决定因素. *H. pylori*成功定植于宿主胃黏膜上皮细胞后, 产生大量毒力因子, 如CagA、VacA以及DupA、Tipα等, 这些毒力因子在宿主细胞增殖、凋亡、转化等生物学效应的改变过程中起重要作用, 导致不同临床结局的发生.

3.1 细胞毒素相关蛋白 细胞毒素相关蛋白(cytotoxin-assosiated geng A, CagA)由*H. pylori*致病岛CagPAI上的*cagA*基因编码, 通过Ⅳ型分泌系统进入宿主细胞, 是一种免疫原性蛋白, 分子量为120-140 kDa, 根据CagA表达情况通常将*H. pylori*分为CagA阳性及CagA阴性菌株, 感染CagA阳性菌株的人群胃癌发病风险明显升高[33]. 然而CagA与疾病相关性存在明显的地域差异, 在西方国家感染携带CagA阳性菌株的人群更容易罹患消化性溃疡和胃癌[34]; 而在东亚地区, 大部分*H. pylori*菌株都为CagA阳性, 不能建立其与疾病结局的联系[35]. 因此, *H. pylori*的致病性不能简单的由CagA的有无来解释. *cagA*基因具有明显多态性, 来源于3'端可变区重复序列, 在蛋白水平上表现为羧基端EPIYA(谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸)基序重复序列的差异. 依据EPIYA基序差异, *H. pylori*被划分为西方型和东亚型菌株; 西方型菌株包含EPIYA-A、EPIYA-B、EPIYA-C基序, 东亚型菌株中包含EPIYA-A、EPIYA-B、EPIYA-D基序[36]. 感染东亚型菌株的人群发生胃黏膜萎缩和胃癌的风险增加[37].

CagA可以通过磷酸化和非磷酸化依赖性效应诱导疾病的发生. EPIYA基序被Ab1和Src激酶磷酸化, 磷酸化CagA激活SHP-2, 从而持续激活细胞内ERK1/2, Crk以及C端Src激酶, 导致细胞骨架重建和细胞伸长. 东亚型与西方型菌株相比, 表现出更强的SHP-2结合活性, 这可能解释了东亚型菌株致病性更强的原因[38]. 非磷酸化CagA靶向作用于细胞黏附蛋白E-cadherin, 肝细胞生长因子受体c-Met, 以及PAR1b/MAPK, 从而诱导炎症反应发生以及破坏细胞连接, 使细胞

■**创新盘点**
本文根据*H. pylori*致病过程的不同阶段将重要毒力因子划分为3种类型, 包括黏附定植相关因子、免疫逃逸相关因子、黏膜效应相关因子, 针对参与不同致病阶段的特征性毒力因子与疾病的相关性及其可能的致病机制予以综述.

■应用要点
将*H. pylori*毒力因子与不同的致病阶段联系起来，在感染的不同时期特异性阻断主要的致病因子的功能以达到控制疾病发生发展的目的，为临床*H. pylori*感染防控工作的开展提供新的思路。

失去极性[39-41]. 非磷酸化CagA还可以通过调节支架蛋白ZO-1和紧密连接蛋白JAM的募集, 将细菌的附件结合在宿主细胞膜上, 导致紧密连接和黏附连接的装配和功能被破坏[42].

3.2 空泡毒素 空泡毒素(vacuolating cytotoxin, VacA)存在于所有*H. pylori*菌株中. *vacA*基因编码的前毒素在分泌中裂解为成熟的88 kDa的毒素单体, 作为可溶性蛋白通过Ⅴ型分泌系统释放到细胞外区域. *vacA*基因多态性导致了VacA蛋白的不同毒性水平, *vacA*基因信号区S及中间区m分别存在两个等位基因s1、s2、m1、m2, 细胞毒性最强的是s1m1^{+}菌株, s2m2没有细胞毒活性, 而s2m1的基因型非常罕见[43]. 在西方国家, 感染vacA s1m1^{+}菌株的个体罹患消化性溃疡和胃癌的风险明显升高, 但是在东亚地区, 几乎所有的*H. pylori*菌株都为s1m1型, 与临床结局没有相关性[44]. *vacA*基因的中间体区i区也存在两个等位基因i1和i2[45]. s1/m1菌株都被划分为i1型, s2/m2都被划分为i2型, s1/m2既可以划为i1也可以划分为i2型, i1型致病性更强, 在该研究中指出, 伊朗人群中i区比s区m区甚至CagA更能有效地决定胃癌发生的风险[45]. 然而, 在东亚和东南亚等胃癌高发区却没有发现*vacA* i区亚型与疾病发病风险的相关性[46]. *vacA*基因上还存在一个与疾病相关的区域—缺失区d区, 存在于i区和m区之间, 分为d1(无缺失)和d2(存在69-81 bp缺失). 西方人群中d1是胃黏膜萎缩发生的高风险因素; 然而, 几乎所有的东亚菌株都被划分为s1/i1/d1[47]. 目前i区和d区功能及其与疾病相关性尚不清楚, 有待进一步探讨. VacA可以参与氯离子通道形成、减弱上皮细胞紧密连接、诱导线粒体细胞色素C释放致上皮细胞及白细胞凋亡、与细胞膜表面受体结合诱发炎症反应等造成黏膜细胞严重损伤.

3.3 十二指肠溃疡启动基因 Lu等[48]于2005年发现了一个具有疾病特异性的毒力因子, 具有增加十二指肠溃疡的发生风险并且降低萎缩性胃炎及胃癌发病风险的双重功能, 命名为十二指肠溃疡启动基因, 即DupA. 但是, 目前对于*dupA*基因与胃疾病相关性的研究结论存在争议, 来自于中国[49]、印度[50]的研究支持Lu的结论, 认为DupA是十二指肠溃疡发生的生物标志物; 而在比利时、南非、北美地区[51]以及日本[52]都没有发现DupA的疾病特异性. DupA与VirB4 ATPase高度同源, DupA与其周围多个*vir*基因共同组成*dupA*基因簇, 即第3种T4SS系统, 命名为tfs3a, 感染含有tfs3a的*H. pylori*明显增加了十二指肠溃疡的发病风险[53]. Hussein发现*dupA*基因具有多态性, 在该基因3'端可能存在一个腺嘌呤的插入使终止密码子改变, 从而使开放阅读框延伸至1 884 bp, 形成了*dupA1*等位基因, 而非延伸形式称为*dupA2*, *dupA1*是该基因活化形式, 可以诱导细胞因子的产生, 可能作为十二指肠溃疡的标志基因, 部分的解释了*dupA*基因与疾病相关性存在人群差异的原因[54]. *dupA*基因可以通过活化NF-κB及AP-1激活IL-8基因启动子的转录, 诱导IL-8产生, 引发胃窦为主的炎症反应[55]; 而最近研究指出携带有完整*dupA*基因的*H. pylori*菌株还可以诱导单核细胞大量释放IL-12、IL-23等细胞因子[54], 导致十二指肠溃疡发生.

3.4 肿瘤坏死因子诱导蛋白 Suganuma等[56]在*H. pylori*中发现了一个新的基因(*H. pylori*0596), 命名为肿瘤坏死因子α诱导蛋白(tumor necrosisfactorα-inducing protein, Tipα)基因, Tipα分子量为19 kDa, 以同型二聚体的形式分泌, 是一个与肿瘤启动激活有关的毒力因子[57]. Tipα与*H. pylori*其他毒力因子没有相似性, 其分泌方式并不依赖于Ⅳ型分泌系统, 可能通过特异结合蛋白与宿主作用[58]. Tipα可以诱导TNF-α、IL-1等炎症因子及多种趋化因子高表达, 诱发炎症, 该基因缺失突变体诱导TNF-α表达及细胞转化能力明显下降[59]. 同时该蛋白可以在Ras蛋白的协同作用下发挥强大的肿瘤启动激活作用, 其机制与核因子κB相关[59]. 近年来研究进一步发现Tipα与细胞表面的核仁素靶向结合, 通过穿梭机制将Tipα蛋白从细胞膜转移入细胞核激活NF-κB信号转导通路, 从而调控TNF-α的表达及诱导细胞转化[60]. 根据Tipα的存在, *H. pylori*形成了新的分类方法: CagPAI+Tipα+; CagPAI+Tipα-; CagPAI-Tipα+; CagPAI-Tipα-[61]. Tipα以及核仁素可能成为胃癌预防和治疗的潜在分子靶标.

4 其他

Pathak等[62]发现*H. pylori*0175是*H. pylori*分泌的蛋白, 具有PPIase活性, 属于Pin1家族, 通过与TLR-4以及ASK-1相互作用, 诱导胃上皮细胞凋亡[61], 促使巨噬细胞释放IL-6, 引发胃炎[62], 还可以诱导VGFR产生, 增加罹患消化性溃疡及胃癌的发病风险[63]. Gong等[64]在浅表性胃炎-胃癌来源*H. pylori*菌株的差异基因筛选中发现*slyD*是胃癌来源菌株高拷贝基因, 其编码蛋白属于PPIase FK506

家族, 可能与胃癌的发生密切相关. Hoy等[65]发现HtrA可以裂解细胞黏附蛋白E-cadherin, 从而扰乱上皮的屏障功能, 为其他因子侵入细胞提供有利条件, 可能与CagA具有协同作用, 这可能为*H. pylori*长期定植和致病的机制提供了一个新思路, 有可能成为干预治疗的靶点.

5 结论

近年来, *H. pylori*毒力因子的研究取得了长足进步, 对已知毒力因子CagA、VacA等进行了更加细致的分型, 同时侧重于如Tipα、PPIase家族相关蛋白、HtrA等新的毒力因子的发现, 这些都为进一步揭示*H. pylori*不同毒力因子与胃疾病的相关性、阐明其致病机制提供了新的思路. 本文根据*H. pylori*致病的3个阶段将重要的毒力因子按照其主要生物学功能分为黏附定植相关因子、免疫逃逸相关因子以及黏膜效应相关因子, 但其中某些毒力因子也可能参与了*H. pylori*致病的多个阶段, 如VacA主要参与胃黏膜损伤的同时可以通过诱导巨噬细胞凋亡以及抑制T细胞增殖来逃避宿主免疫系统攻击[66], SabA主要参与细菌黏附定植的过程, 但是其“on”和“off”的时相变化也可以使细菌远离强烈炎症反应的胃黏膜, 部分的参与免疫逃逸的过程[16]. 由此可见, *H. pylori*致病是一个多阶段, 机制复杂的过程, 目前已经明确的毒力因子及其生物学功能还不能完全解读*H. pylori*导致严重胃十二指肠疾病发生的机制, 单一毒力因子与疾病的相关性仍然存在较大争议, 还没有明确的毒力因子可以作为疾病的生物标志. 多种毒力因子联合检测, 发掘其是否具有内在联系及协同作用可为临床发病风险的预测及判断预后提供良好的实验诊断基础, 成为未来研究的趋势.

6 参考文献

1 Backert S, Clyne M. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2011; 16 Suppl 1: 19-25

2 Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of Helicobacter pylori. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 203-213

3 Sheu BS, Yang HB, Yeh YC, Wu JJ. Helicobacter pylori colonization of the human gastric epithelium: a bug's first step is a novel target for us. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 26-32

4 Zanotti G, Cendron L. Functional and structural aspects of Helicobacter pylori acidic stress response factors. *IUBMB Life* 2010; 62: 715-723

5 Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H+-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization. *Science* 2000; 287: 482-485

6 Follmer C. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J Clin Pathol* 2010; 63: 424-430

7 Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH. Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 1990; 58: 1992-1994

8 Fan X, Gunasena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE. Helicobacter pylori urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol* 2000; 165: 1918-1924

9 Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279: 373-377

10 Fujimoto S, Olaniyi Ojo O, Arnqvist A, Wu JY, Odenbreit S, Haas R, Graham DY, Yamaoka Y. Helicobacter pylori BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 49-58

11 Gatti LL, Módena JL, Payão SL, Smith Mde A, Fukuhara Y, Módena JL, de Oliveira RB, Brocchi M. Prevalence of Helicobacter pylori cagA, iceA and babA2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. *Acta Trop* 2006; 100: 232-240

12 Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone RK. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 30-36

13 Talebi Bezmin Abadi A, Taghvaei T, Mohabbati Mobarez A, Vaira G, Vaira D.. High correlation of babA (2)-positive strains of Helicobacter pylori with the presence of gastric cancer. *Intern Emerg Med* 2011 May 22. *[Epub ahead of print]*

14 Erzin Y, Koksal V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter* 2006; 11: 574-580

15 Yamaoka Y, Ojo O, Fujimoto S, Odenbreit S, Haas R, Gutierrez O, El-Zimaity HM, Reddy R, Arnqvist A, Graham DY. Helicobacter pylori outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut* 2006; 55: 775-781

16 Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angstrom J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Petersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 2002; 297: 573-578

17 Markovska R, Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Mitov I. Helicobacter pylori oipA genetic diversity and its associations with both disease and cagA, vacA s, m, and i alleles among Bulgarian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71: 335-340

18 Chiarini A, Calà C, Bonura C, Gullo A, Giuliana G, Peralta S, D'Arpa F, Giammanco A. Prevalence of virulence-associated genotypes of Helicobacter pylori and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 437-446

■同行评价

本文思路清晰、结构完整、内容丰富, 总体上有较好的可读性、科学性及创新性.

19 Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7533-7538

20 Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH, Reindl W, Backert S, Saur D, Schmid RM, Rad R. Helicobacter pylori HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis* 2006; 194: 1346-1355

21 Yamaoka Y. Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 629-641

22 Kaparakis M, Turnbull L, Carneiro L, Firth S, Coleman HA, Parkington HC, Le Bourhis L, Karrar A, Viala J, Mak J, Hutton ML, Davies JK, Crack PJ, Hertzog PJ, Philpott DJ, Girardin SE, Whitchurch CB, Ferrero RL. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol* 2010; 12: 372-385

23 Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004; 5: 1166-1174

24 Nagy TA, Frey MR, Yan F, Israel DA, Polk DB, Peek RM. Helicobacter pylori regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Infect Dis* 2009; 199: 641-651

25 Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, Gorelick PL, Tsuji Y, Matsumoto Y, Chiba T, Fuss IJ, Kitani A, Strober W. NOD1 contributes to mouse host defense against Helicobacter pylori via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest* 2010; 120: 1645-1662

26 Wang G, Maier SE, Lo LF, Maier G, Dosi S, Maier RJ. Peptidoglycan deacetylation in Helicobacter pylori contributes to bacterial survival by mitigating host immune responses. *Infect Immun* 2010; 78: 4660-4666

27 Davis KM, Weiser JN. Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect Immun* 2011; 79: 562-570

28 Butchar JP, Parsa KV, Marsh CB, Tridandapani S. Negative regulators of toll-like receptor 4-mediated macrophage inflammatory response. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 4143-4153

29 Ferrero RL. Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, Helicobacter pylori. *Mol Immunol* 2005; 42: 879-885

30 Grebowska A, Moran AP, Matusiak A, Bak-Romaniszyn L, Czkwianianc E, Rechciński T, Walencka M, Płaneta-Małecka I, Rudnicka W, Chmiela M. Antiphagocytic activity of Helicobacter pylori lipopolysaccharide (LPS)--possible modulation of the innate immune response to these bacteria. *Pol J Microbiol* 2008; 57: 185-192

31 Ramarao N, Meyer TF. Helicobacter pylori resists phagocytosis by macrophages: quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting. *Infect Immun* 2001; 69: 2604-2611

32 Sun HY, Lin SW, Ko TP, Pan JF, Liu CL, Lin CN, Wang AH, Lin CH. Structure and mechanism of Helicobacter pylori fucosyltransferase. A basis for lipopolysaccharide variation and inhibitor design. *J Biol Chem* 2007; 282: 9973-9982

33 Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between Helicobacter pylori strains. *Intern Med* 2008; 47: 1077-1083

34 Peleteiro B, Lunet N, Barros R, La Vecchia C, Barros H. Factors contributing to the underestimation of Helicobacter pylori-associated gastric cancer risk in a high-prevalence population. *Cancer Causes Control* 2010; 21: 1257-1264

35 Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between Helicobacter pylori iceA, cagA, and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2274-2279

36 Nguyen LT, Uchida T, Murakami K, Fujioka T, Moriyama M. Helicobacter pylori virulence and the diversity of gastric cancer in Asia. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1445-1453

37 Abe T, Kodama M, Murakami K, Matsunari O, Mizukami K, Inoue K, Uchida M, Okimoto T, Fujioka T, Uchida T, Moriyama M, Yamaoka Y. Impact of Helicobacter pylori CagA diversity on gastric mucosal damage: an immunohistochemical study of East-Asian-type CagA. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26: 688-693

38 Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. *Science* 2002; 295: 683-686

39 Churin Y, Al-Ghoul L, Kepp O, Meyer TF, Birchmeier W, Naumann M. Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J Cell Biol* 2003; 161: 249-255

40 Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM, Azuma T, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 2007; 26: 4617-4626

41 Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M. Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 2007; 447: 330-333

42 Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. *Science* 2003; 300: 1430–1434

43 Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777

44 Yamaoka Y. Helicobacter pylori typing as a tool for tracking human migration. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 829-834

45 Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 926-936

46 Ogiwara H, Graham DY, Yamaoka Y. vacA i-region subtyping. *Gastroenterology* 2008; 134: 1267; author reply 1268

47 Ogiwara H, Sugimoto M, Ohno T, Vilaichone RK, Mahachai V, Graham DY, Yamaoka Y. Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the Helicobacter pylori vacA gene in cases of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3493-3500
48 Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2005; 128: 833-848
49 Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, Liu W, Lu H. The Helicobacter pylori duodenal ulcer promoting gene, dupA in China. *BMC Gastroenterol* 2008; 25; 49
50 Alam J, Maiti S, Ghosh P, De R, Chowdhury A, Das S, Macaden R, Devarbhavi H, Ramamurthy T, Mukhopadhyay AK. Significant association of the dupA gene of Helicobacter pylori with duodenal ulcer development in a South-east Indian population. *J Med Microbiol* 2012; 61: 1295-1302
51 Argent RH, Burette A, Miendje Deyi VY, Atherton JC. The presence of dupA in Helicobacter pylori is not significantly associated with duodenal ulceration in Belgium, South Africa, China, or North America. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1204-1206
52 Nguyen LT, Uchida T, Tsukamoto Y, Kuroda A, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Fujioka T, Moriyama M. Helicobacter pylori dupA gene is not associated with clinical outcomes in the Japanese population. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1264-1269
53 Kersulyte D, Lee W, Subramaniam D, Anant S, Herrera P, Cabrera L, Balqui J, Barabas O, Kalia A, Gilman RH, Berg DE. Helicobacter Pylori's plasticity zones are novel transposable elements. *PLoS One* 2009; 4: e6859
54 Hussein NR, Argent RH, Marx CK, Patel SR, Robinson K, Atherton JC. Helicobacter pylori dupA is polymorphic, and its active form induces proinflammatory cytokine secretion by mononuclear cells. *J Infect Dis* 2010; 202: 261-269
55 Yamaoka Y. Pathogenesis of Helicobacter pylori-Related Gastroduodenal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. *Gastroenterol Res Pract* 2012; 2012: 371503
56 Suganuma M, Kurusu M, Suzuki K, Nishizono A, Murakami K, Fujioka T, Fujiki H. New tumor necrosis factor-alpha-inducing protein released from Helicobacter pylori for gastric cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 305-313
57 Tsuge H, Tsurumura T, Utsunomiya H, Kise D, Kuzuhara T, Watanabe T, Fujiki H, Suganuma M. Structural basis for the Helicobacter pylori-carcinogenic TNF-alpha-inducing protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 193-198
58 Kuzuhara T, Suganuma M, Kurusu M, Fujiki H. Helicobacter pylori-secreting protein Tipalpha is a potent inducer of chemokine gene expressions in stomach cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 287-296
59 Suganuma M, Kuzuhara T, Yamaguchi K, Fujiki H. Carcinogenic role of tumor necrosis factor-alpha inducing protein of Helicobacter pylori in human stomach. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 1-8
60 Watanabe T, Tsuge H, Imagawa T, Kise D, Hirano K, Beppu M, Takahashi A, Yamaguchi K, Fujiki H, Suganuma M. Nucleolin as cell surface receptor for tumor necrosis factor-alpha inducing protein: a carcinogenic factor of Helicobacter pylori. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 911-921
61 Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, Pathak S, Basu J, Kundu M. The secreted peptidyl prolyl cis,trans-isomerase HP0175 of Helicobacter pylori induces apoptosis of gastric epithelial cells in a TLR4- and apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent manner. *J Immunol* 2005; 174: 5672-5680
62 Pathak SK, Basu S, Bhattacharyya A, Pathak S, Banerjee A, Basu J, Kundu M. TLR4-dependent NF-kappaB activation and mitogen- and stress-activated protein kinase 1-triggered phosphorylation events are central to Helicobacter pylori peptidyl prolyl cis-, trans-isomerase (HP0175)-mediated induction of IL-6 release from macrophages. *J Immunol* 2006; 177: 7950-7958
63 Basu S, Pathak SK, Chatterjee G, Pathak S, Basu J, Kundu M. Helicobacter pylori protein HP0175 transactivates epidermal growth factor receptor through TLR4 in gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 32369-32376
64 Gong YH, Chen M, Xu Y, Dong N, Sang Z, Liu J, Yuan Y. Subtractive hybridization analysis of gastric diseases-associated Helicobacter pylori identifies peptidyl-prolyl isomerase as a potential marker for gastric cancer. *FEMS Microbiol Lett* 2011; 320: 103-109
65 Hoy B, Löwer M, Weydig C, Carra G, Tegtmeyer N, Geppert T, Schröder P, Sewald N, Backert S, Schneider G, Wessler S. Helicobacter pylori HtrA is a new secreted virulence factor that cleaves E-cadherin to disrupt intercellular adhesion. *EMBO Rep* 2010; 11: 798-804
66 Rassow J, Meinecke M. Helicobacter pylori VacA: a new perspective on an invasive chloride channel. *Microbes Infect* 2012; 14: 1026-1033

编辑 田滢 电编 闫晋利

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2944-2950
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

内镜干预及联合普萘洛尔预防食管静脉曲张破裂再出血的疗效

王进广, 孔德润

■背景资料
食管静脉曲张破裂出血是肝硬化门脉高压的一个严重并发症. 内镜下套扎或硬化剂治疗是预防出血的重要措施, 可以达到短期内快捷止血的效果. 普萘洛尔用于止血效果确切, 但药效发挥缓慢, 二者结合应用预防出血可能会达到更佳的效果.

王进广, 孔德润, 安徽医科大学第一附属医院消化内科 安徽省合肥市 230022
王进广, 主要从事门脉高压症及其防治方面的研究.
安徽省高校省级自然科学研究基金资助项目, No. KJ2010A158; No. KJ2012Z189
安徽省卫生厅医学科研课题基金资助项目, No. 2010B018
作者贡献分布: 此课题由孔德润设计, 同时参与临床操作治疗以及文章审校; 病例收集、随访、数据分析及文章撰写由王进广完成.
通讯作者: 孔德润, 副教授, 硕士生导师, 230022, 安徽省合肥市蜀山区绩溪路218号, 安徽医科大学第一附属医院消化内科. kdr168@sohu.com
电话: 0551-2922039
收稿日期: 2012-06-27 修回日期: 2012-08-24
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-28

Efficacy of endoscopic intervention alone versus endoscopic intervention plus propranolol in the prophylaxis of esophageal variceal rebleeding

Jin-Guang Wang, De-Run Kong

Jin-Guang Wang, De-Run Kong, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China
Supported by: the High School Research Project of Anhui Provincial Natural Science Foundation, Nos. KJ2010A158 and 2012Z189; the Medical Research Project of Anhui Provincial Health Department, No. 2010B018
Correspondence to: De-Run Kong, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, 218 Jixi Road, Shushan District, Hefei 230022, Anhui Province, China. kdr168@sohu.com
Received: 2012-06-27 Revised: 2012-08-24
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-28

Abstract

AIM: To compar e the efficacy of endoscopic variceal ligation (EVL) or endoscopic injection sclerotherapy (EIS) alone versus EVL or EIS plus propranolol in the prophylaxis of esophageal variceal rebleeding.

METHODS: Sixty-nine cirrhotic patients were divided randomly into endoscopic intervention group (EIG, n = 40; EVL or EIS) and combination intervention group (CIG, n = 29; EVL or EIS plus propranolol). The mortality, mortality due to rebleeding, and rate of rebleeding were compared between the two groups. All patients were followed for more than one year. In addition, changes in endoscopic characteristics of esophageal varices were evaluated according to the criterion of the Japan Society for Portal Hypertension.

RESULTS: There were no significantly differences in liver function, routine blood parameters, and serum electrolytes between the two groups. After intervention, the diameter of varices decreased significantly in the EIG group (10.92 ± 2.91 *vs* 8.45 ± 2.26, $P < 0.05$), but showed no significance in the CIG group (10.14 ± 2.46 *vs* 8.95 ± 2.21, $P > 0.05$). The distance from the proximal end of varices to the fore-tooth (22.79 ± 2.83 *vs* 24.85 ± 3.96, $P < 0.05$) and the rate of recurrence of red signs in varices (100% *vs* 76.19%, $P < 0.05$) decreased significantly after intervention in the CIG group. The morbidity of gastric varices and portal hypertensive gastropathy were both higher after intervention in the CIG group (10.34% *vs* 28.10%, $P < 0.05$; 10.34% *vs* 42.86%, $P < 0.05$). The appearance of varices in both groups changed from rosary-like to earthworm-like pattern. The rate of rebleeding between two groups displayed no significant difference (50.00% *vs* 51.71%, $P > 0.05$). However, the mortality in the CIG group was significantly lower than that in the EIG group (27.50% *vs* 7.41%, $P < 0.05$), and the main cause of death in both groups was upper gastrointestinal bleeding.

CONCLUSION: Endoscopic intervention combined with propranolol can decrease the risk of death and reduce endoscopic re-bleeding in the prevention of esophageal variceal re-bleeding.

Key Words: Esophageal varices; Endoscopic variceal ligation; Endoscopic injection sclerotherapy; Propranolol; Rebleeding; Mortality; Endoscopy

Wang JG, Kong DR. Efficacy of endoscopic intervention

■同行评议者
黄晓东, 主任医师, 武汉市中心医院消化内科

alone versus endoscopic intervention plus propranolol in the prophylaxis of esophageal variceal rebleeding. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2944-2950

摘要

目的: 对比评估内镜下套扎或硬化剂治疗与内镜治疗联合普萘洛尔对预防食管静脉曲张破裂再出血的疗效.

方法: 将69例肝硬化患者随机分为2组, 即单纯内镜治疗组(套扎或硬化剂治疗)40例和联合治疗组(套扎或硬化剂治疗后服用普萘洛尔)29例. 随访1年以上并评估治疗后再出血情况、死亡率及再出血相关死亡率, 并根据日本门脉高压协会诊断标准评估两种治疗方法对内镜下食管曲张静脉外观特征的影响.

结果: 治疗前后2组患者肝功能、血常规、电解质无显著差异. 单纯内镜治疗后食管曲张静脉的直径显著减小(治疗前 *vs* 治疗后, 10.92±2.91 *vs* 8.45±2.26, $P<0.05$), 联合治疗组曲张静脉直径虽减小但不具有统计学意义(治疗前 *vs* 治疗后, 10.14±2.46 *vs* 8.95±2.21, $P>0.05$). 治疗后联合治疗组曲张静脉近端距门齿距离明显下移(治疗前 *vs* 治疗后, 22.79±2.83 *vs* 24.85±3.96, $P<0.05$), 且曲张静脉表面红色征较治疗前明显减少(治疗前 *vs* 治疗后, 100% *vs* 76.19%, $P<0.05$). 与单纯内镜治疗组相比, 联合治疗组胃底静脉曲张(治疗前 *vs* 治疗后, 10.34% *vs* 28.10%, $P<0.05$)及门脉高压性胃病的发生率均高于治疗前(治疗前 *vs* 治疗后, 10.34% *vs* 42.86%, $P<0.05$). 2组曲张静脉形态均主要由串珠状转变为蚯蚓状, 且均具有统计学意义($P<0.05$). 2组间再出血率(单纯内镜治疗组 *vs* 联合治疗组, 50.00% *vs* 51.71%, $P>0.05$)无统计学差异, 但联合治疗组患者死亡率显著低于单纯内镜治疗组(联合治疗组 *vs* 单纯内镜治疗组, 7.41% *vs* 27.50%, $P<0.05$), 且2组患者主要的死因为上消化道再出血.

结论: 内镜治疗后联合普萘洛尔预防食管静脉曲张破裂再出血在一定程度上可以降低患者死亡风险、减少内镜下曲张静脉高危再出血因素.

关键词: 食管静脉曲张; 套扎; 硬化剂; 普萘洛尔; 再出血; 死亡率; 内镜

王进广, 孔德润. 内镜干预及联合普萘洛尔预防食管静脉曲张破裂再出血的疗效. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2944-2950

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2944.asp

0 引言

食管静脉曲张是肝硬化失代偿期的严重并发症, 常导致患者因上消化道出血而致病情加重或死亡. 目前, 国内外针对食管静脉曲张破裂出血的预防和治疗有多种临床干预措施, 均具有一定的疗效[1-3]. 与其他干预措施相比, 内镜下套扎或硬化剂治疗具有创伤小、恢复快、费用低、患者易接受等优点, 已在临床广泛开展. 目前国内外研究表明, 内镜下治疗可以有效地预防出血, 降低患者因出血而导致的死亡率[4]. 此外, 临床上开展通过药物预防出血也收到一定的成效, 特别是对非选择性β-肾上腺素受体阻滞剂普萘洛尔的研究和临床应用较普遍, 且多与内镜治疗联合预防食管曲张静脉破裂出血[5]. 国内外众多研究者已经开展了多项研究以评估普萘洛尔预防出血时患者血流动力学的变化, 但很少涉及到内镜或药物治疗后食管曲张静脉内镜下直观表现的变化情况[6,7]. 本研究旨在评估内镜及联合药物治疗后对曲张静脉的影响, 同时比较两种治疗方式用于预防再出血疗效的长期随访情况.

■研发前沿

Sarin等研究发现, 单纯套扎和套扎后服用普萘洛尔预防首次出血效果相似, 且后者曲张静脉再发率降低. 但Kumar等发现, 套扎治疗后服用普萘洛尔并不能降低患者的再出血率, 再出血相关的危险因素为腹水、低白蛋白和较高的肝静脉压力梯度.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2005-2012年在我院消化内科住院且经临床资料、影像学或肝穿刺活检明确诊断肝硬化的患者69例, 其中男50例, 女19例, 最小年龄19岁, 最大82岁, 平均年龄50岁. 肝硬化病因为: 乙肝后肝硬化49例, 隐源性肝硬化7例, 酒精性肝硬化5例, 原发性胆汁性肝硬化3例, 特发性门脉高压2例, 血吸虫性肝硬化2例, 布加综合征1例. 所有患者既往均有消化道出血史, 活动性出血停止1 wk后接受内镜治疗或药物治疗. 其中套扎治疗36例, 硬化剂治疗33例. 将患者随机分为单纯内镜治疗组(40例)与联合治疗组(29例). 本研究排除有服用普萘洛尔禁忌的患者, 排除标准如下: 哮喘病史或有支气管痉挛病史者; 静息基础心率低于55次/min或静息基础血压低于90/60 mmHg; 伴有Ⅲ度或ⅡB房室传导阻滞; 严重或急性心衰的患者; 肝功能Child-Pugh C级的患者; 伴有肝性脑病或门静脉血栓; 年龄<18岁或>85岁. 本研究同时排除不愿合作者或服药后不耐受者.

1.2 方法

1.2.1 内镜处置及评估项目: 患者入院后经内科保守治疗, 待活动性出血停止1 wk后行内镜下套扎或硬化剂治疗. 同时根据日本门脉高压研究协会食管静脉曲张内镜所见记录标准[8]评估

■**创新盘点**
本文采用前瞻性随机对照研究方法，对内镜下套扎或硬化剂治疗以及内镜治疗后服用普萘洛尔后食管曲张静脉外观特征的改变及疗效进行了对比分析.

表 1 单纯内镜治疗组与混合组患者治疗前后基础指标变化情况

	单纯内镜治疗组		联合治疗组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
白蛋白(g/L)	30.16 ± 5.66	30.84 ± 5.95	33.13 ± 8.09	34.84 ± 6.78
胆红素(μmol/L)	20.64 ± 9.94	21.60 ± 13.07	23.92 ± 17.54	19.07 ± 11.13
ALT(U/L)	37.38 ± 24.22	26.50 ± 13.25	43.54 ± 37.25	27.41 ± 15.11
AST(U/L)	44.16 ± 19.74	33.00 ± 10.59	45.64 ± 33.70	34.18 ± 12.13
PT(s)	17.21 ± 5.30	17.12 ± 2.37	16.09 ± 2.64	15.62 ± 2.41
PT延长时间(s)	1.95 ± 3.70	1.92 ± 1.56	1.21 ± 2.15	0.99 ± 1.22
肝功能评分(n)	7.67 ± 2.03	7.78 ± 2.33	7.35 ± 1.44	6.22 ± 1.52
血红蛋白(g/L)	73.68 ± 22.15	89.20 ± 31.33	82.14 ± 24.33	85.79 ± 30.81
白细胞($\times 10^9$/L)	4.38 ± 2.13	4.30 ± 3.04	5.03 ± 3.90	4.70 ± 3.13
血小板($\times 10^9$/L)	121.32 ± 113.24	82.20 ± 61.03	93.57 ± 60.70	131.21 ± 91.93
血钠(mmol/L)	136.86 ± 6.79	141.07 ± 2.60	136.91 ± 8.36	128.71 ± 36.50
血氯(mmol/L)	102.75 ± 7.52	105.78 ± 1.65	104.75 ± 3.21	106.21 ± 3.17
腹水量(cm)	4.39 ± 2.90	1.79 ± 2.99	2.83 ± 3.37	0.92 ± 1.62

内镜下曲张静脉的外观表现, 包括食管曲张静脉起始端距门齿距离、曲张静脉数量、曲张静脉直径及外观形态, 有无红色征、血栓头、血泡、血管间交通支, 同时评估曲张静脉严重程度. 患者于每次治疗2 mo后再次进行内镜治疗, 或于再发出血后行内镜治疗, 并同时记录上述曲张静脉特征. 服用普萘洛尔的患者在再次出血时同时行内镜检查或治疗, 记录内镜下曲张静脉表现. 出院后继续服用普萘洛尔, 起始量为10 mg, tid, 并根据患者的血压、心率变异情况调整用量, 直至心率降至55次/min, 或降至基础心率的75%以下, 或患者最大耐受量, 同时患者血压不得低于90/60 mmHg, 否则予以排除. 本实验中患者服用普萘洛尔最小量为40 mg, 最大为80 mg, 最长服药时间36 mo, 最短12.5 mo, 平均15.5 mo.

1.2.2 *内镜评估*: 采用日本Olympus公司GIF-XQ260电子胃镜评估患者食管曲张静脉特征. 所有患者在接受首次套扎或硬化剂治疗时记录食管曲张静脉直径、曲张静脉近端距门齿距离、曲张静脉数量、形态及严重程度, 同时评估有无红色征、血栓头、血泡、静脉间交通支. 患者在接受最后一次内镜治疗或检查时再次记录上述曲张静脉特征. 内镜下曲张静脉特征的评估由固定人员操作.

1.2.3 *随访*: 患者经内科治疗好转后出院, 长期随访患者服药情况及再发出血率、死亡情况. 重点记录患者服药后血压、心率变异情况、再发出血率、死亡率以及再出血相关死亡率. 同时定期通知患者复查肝功能、血常规、止凝血及电解质, 并记录检查结果. 本研究中最长随访时间为95.5 mo, 最短为12.5 mo, 平均21.5 mo, 直至患者行脾切除、分流/断流术、肝移植的临床干预, 或直至患者死亡.

统计学处理 采用SPSS13.0软件包处理实验数据. 计量资料采用mean±SD表示, 计数资料采用率表示. 计量资料的组内差异性比较采用方差齐性检验(F检验)及独立样本资料的t检验方法分析. 计数资料间率的比较采用四格表Fisher确切概率法检验. 采用Cox回归模型及Log-Rank检验法分析两组间的出血差异性, 两组间组间死亡率的比较用Fisher确切概率法分析. 两组出血峰值分布采用中位数M及四分位数间距Q表示. 检验水准$P = 0.05$.

2 结果

2.1 *基本状况* 比较患者经治疗后肝功能、血常规、电解质及凝血状况, 具体结果见表1.

2.2 *内镜下表现对比* 每位研究对象在最初都接受内镜治疗, 同时至少再接受一次内镜检查或治疗以评估患者曲张静脉内镜下的变化. 结果如表2所示.

2.3 *再出血及死亡情况*

2.3.1 *再出血情况*: 根据随访时限将随访记录划分为14个时间段, 分别为首次内镜治疗后1、3、6、6、12、15、18、21、24、27、30、33、36 mo及36 mo以上, 以统计分析患者再出血、死亡情况. 单纯内镜治疗组患者再出血例数为20例, 共计34人次, 平均0.85次/人±1.17次/人; 而联合治疗组患者再出血例数为15例, 共计31

表 2 单纯内镜治疗组和混合组治疗前后内镜下特征变化情况

	单纯内镜治疗组		联合治疗组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
曲张静脉位置(cm)	23.69 ± 3.53	24.55 ± 4.06	22.79 ± 2.83	24.85 ± 3.96
曲张静脉数量	3.79 ± 0.61	3.91 ± 0.29	3.46 ± 0.79	3.70 ± 0.73
曲张静脉直径(mm)	10.92 ± 2.91	8.45 ± 2.26	10.14 ± 2.46	8.95 ± 2.21
曲张静脉形态(*n*, 串珠状/蚯蚓状/蔓状/结节状/扁平状/其他)(%)	87.18/5.12/2.56/2.56/2.56/0	27.27/59.10/0/0/13.63/0	93.10/6.90/0/0/0/0	38.10/42.85/4.76/4.76/9.52/0
红色征(%)	94.87	81.82	100	76.19
静脉间交通支(%)	12.82	0	0	4.76
血泡(%)	10.26	4.35	6.90	9.52
血栓头(%)	2.56	4.55	10.34	4.76
曲张静脉严重程度(轻/中/重)(%)	0/2.56/97.44	0/13.64/86.36	0/0/100	0/14.29/85.71
血管破口(%)	5.13	13.64	10.34	4.76
胃底静脉曲张(%)	20.08	13.64	10.34[a]	38.10[a]
门脉高压性胃病(%)	7.69	13.64	10.34[a]	42.86[a]
心率(次/min)	–	–	76.70 ± 4.89	64.00 ± 6.62
平均内镜治疗次数	1.68 ± 0.80		1.90 ± 0.90	

■应用要点
本文表明, 内镜治疗后服用普萘洛尔可以显著改善食管曲张静脉高危出血因素, 同时降低患者死亡率及再出血相关死亡率, 但仍需多样本的严格对照研究.

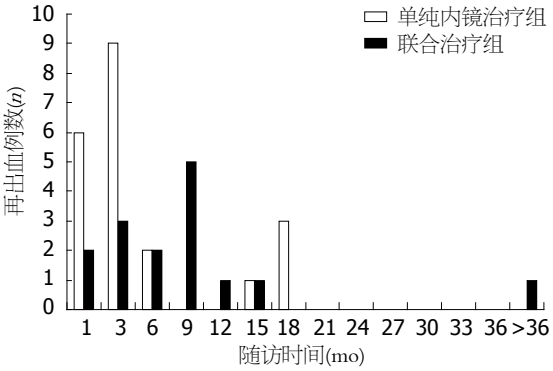


图 1 单纯内镜治疗组和联合治疗组再出血情况分布.

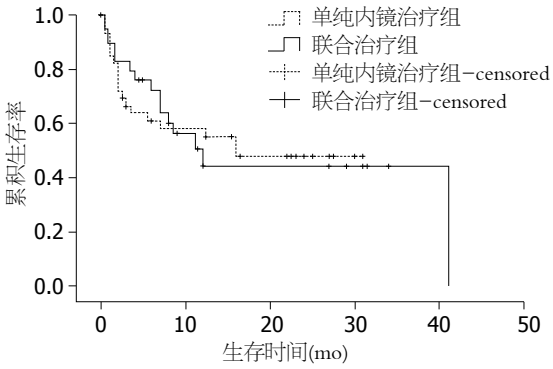


图 2 2组再出血情况差异性比较.

人次, 平均为1.07次/人±1.25次/人. 2组间再出血情况无统计学意义(P>0.05). 本研究中2组患者再出血随时间分布情况及2组间再出血率差异见图1, 2.

2.3.2 两组患者死亡率情况比较: 随访过程的终点为患者采取外科手术、TIPS、肝移植或死亡. 本研究中所有患者在接受其他预防出血措施干预前均有消化道出血史, 且无患者因不能耐受服药而排除出研究组. 本研究中共有13例患者发生死亡, 其中单独内镜治疗组死亡11例, 死亡率为27.5%(11/40); 联合治疗组死亡2例, 死亡率为6.9%(2/29), 2组间死亡率比较具有统计学意义(P<0.05). 与单纯内镜治疗相比, 经过内镜联合普萘洛尔治疗后患者死亡率明显降低(图3).

2.3.3 两组患者死因分布情况: 2组患者在接受不同的处理后死亡相关因素分布情况见图4. 图中对导致患者死亡的因素进行拆分归类, 如将死因“消化道出血伴SBP”拆分为“消化道出血”和“SBP”分别统计, 依次类推.

3 讨论

普萘洛尔用于预防食管静脉曲张破裂出血已有多年, 且临床对比观察发现其预防食管曲张静脉破裂导致消化道出血疗效确切. 本研究采用随机对照法评估内镜治疗后服用普萘洛尔预防曲张静脉再出血的疗效.

本研究中共有患者69例, 所有患者均接受内镜套扎或硬化剂治疗, 将内镜治疗后患者随机分为单纯内镜治疗组和内镜治疗后服用普萘洛尔的联合治疗组. 从表1中可以看出, 经过干预后的长期随访发现, 虽然2种治疗方法对患者肝功能、血常规、电解质的生化指标均无显著影响, 但联合治疗组患者在接受治疗后反映肝功能的生化指标, 如血清白蛋白水平(治疗前 *vs* 治

■同行评价
本文的科学性、创新性和可读性均能较好地反映我国胃肠病学和肝病学临床研究的先进水平.

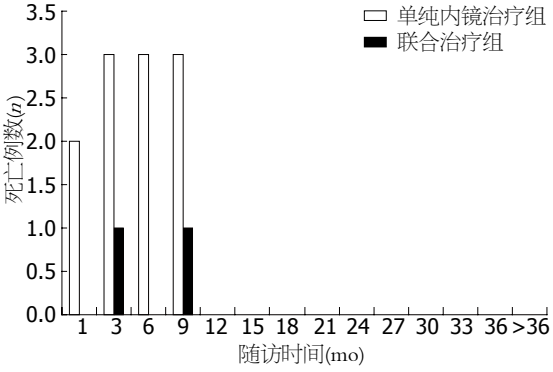


图 3 单纯内镜治疗组和联合治疗组患者死亡情况随时间分布.

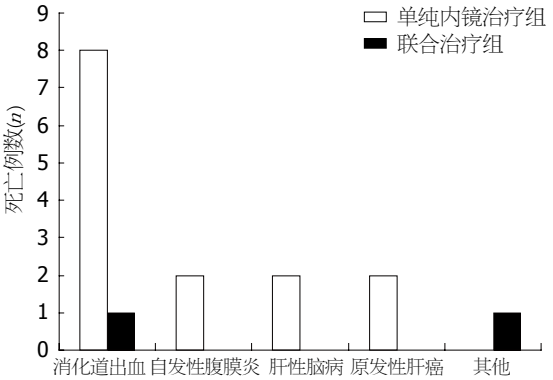


图 4 患者死亡因素分布情况.

疗后, 33.13±8.09 *vs* 34.84±6.78, P>0.05)较治疗前有所增加, 总血清胆红素水平(治疗前 *vs* 治疗后, 23.92±17.54 *vs* 19.07±11.13, P>0.05)、PT(治疗前 *vs* 治疗后, 16.09±2.64 *vs* 15.62±2.41, P>0.05)、PT延长时间(治疗前 *vs* 治疗后, 1.21±2.15 *vs* 0.99±1.22, P>0.05)、腹水量(治疗前 *vs* 治疗后, 2.83±3.37 *vs* 0.92±1.62, P>0.05)均较治疗前有所降低, 总体肝功能Child-Pugh评分(治疗前 *vs* 治疗后, 7.35±1.44 *vs* 6.22±1.52, P>0.05)较前减小, 而单纯内镜治疗组上述指标变化不明显. 这在一定程度上也反映了普萘洛尔预防食管曲张静脉破裂出血的效应与肝功能状态改善的相关性. 有研究表明[9,10], 肝功能状态是食管曲张静脉破裂出血的危险因素, 特别是血清白蛋白水平与腹水的存在情况, 但普萘洛尔预防曲张静脉出血的效应与肝功能改善之间的具体机制尚不明确. 我们同时观察到, 联合治疗组患者血小板计数较治疗前升高(治疗前 *vs* 治疗后, 93.57±60.70 *vs* 131.21±91.92, P>0.05), 这提示, 联合普萘洛尔治疗可能在一定程度上改善脾功能亢进、减少血小板的消耗从而降低再出血风险. 这与既往许多研究报道的结果相一致[11,12]. 另外, 服用普萘洛尔治疗后, 内镜下所见患者食管曲张静脉近端距门齿距离(治疗前 *vs* 治疗后, 22.79±2.83 *vs* 24.85±3.96, P<0.05)明显下移, 且红色征(治疗前 *vs* 治疗后, 100% *vs* 76.19%, P<0.05)显著减少, 这在一定程度上提示门脉压力的降低及再出血风险的减小, 而单纯内镜治疗组患者中曲张静脉近端距门齿的距离虽下移、红色征发生率减少, 但均不具有统计学意义. 研究发现, 联合治疗组患者胃底静脉曲张(治疗前 *vs* 治疗后, 10.34% *vs* 38.10%, P<0.05)及门脉高压性胃病(治疗前 *vs* 治疗后, 10.34% *vs* 42.86%, P<0.05)的发生率较治疗前显著地升高. 与单纯内镜治疗组(治疗前 *vs* 治疗后, 10.92±2.91 *vs* 8.45±2.26, P<0.05)相比, 联合治疗组患者食管曲张静脉直径没有明显改善(治疗前 *vs* 治疗后, 10.14±2.46 *vs* 8.95±2.21, P>0.05). 这种差异性可能与内镜治疗的方式及次数有关. 本研究中, 联合治疗组患者平均内镜治疗次数多于单纯内镜治疗组(单纯内镜治疗组 *vs* 联合治疗组, 1.68±0.80 *vs* 1.90±0.90, P>0.05), 可能由此引起的侧支循环开放的效应超过加用普萘洛尔后降低门脉压的效应, 从而导致联合治疗组门脉高压性胃病及胃底静脉曲张的发生率较治疗前升高的差异, 但这并不能代表两组患者药物疗效的差异. 有研究表明[13], 内镜下食管曲张静脉套扎及硬化剂治疗对食管曲张静脉侧支循环的再次形成及门脉高压性胃病的发病率有明显影响, 且两种治疗方式之间存在差异. 食管曲张静脉内镜下套扎或硬化剂治疗后门静脉压力的变化与治疗次数及治疗前有无其他的侧支循环开放有关[14,15], 行内镜下食管曲张静脉套扎或硬化剂治疗后, 治疗次数越多、脐静脉或胃底静脉侧支未形成或侧支较少可能会加重门脉血流动力学紊乱, 增加胃底静脉等侧支循环负荷. 正常情况下, 胃左静脉为向肝型血流, 但门脉高压发生后胃左静脉成为食管曲张静脉的主要血供来源. 在此情况下, 该静脉通路血流方向可以转变为离肝型从而促进食管曲张静脉的形成. Pereira等[16]研究发现, 经过内镜下套扎或硬化剂治疗后, 门脉高压状态下的胃左静脉离肝型血流可以转变为向肝型或双向型, 从而减少曲张静脉内血流量并降低食管静脉压, 但同时可能会由于食管曲张静脉分流受阻增加门静脉压力并促进其他侧支循环开放. 另外, 采用两种不同方法治疗后, 食管串珠状曲张静脉数均明显减少, 且主要转变为蚯蚓状, 两组患者均具

有统计学意义(P<0.05). 这说明, 经过单纯内镜治疗或加服普萘洛尔治疗后, 2组患者再出血风险均明显降低. 此外, 两组患者经不同的治疗后曲张静脉严重程度均有好转, 但不具有统计学意义(P>0.05). 且单纯内镜治疗组食管曲张静脉红色征[治疗前 *vs* 治疗后, 94.87%(37/39) *vs* 81.82%(18/22), P>0.05]的表现没有得到显著的改善. 另需注意的是, 虽然两组在血栓头、血管破口、曲张静脉数量上的变化均无统计学意义(P>0.05), 但单纯内镜治疗组患者在经过治疗后, 上述内镜下曲张静脉特征的发生率较治疗前有所升高. 以上资料均表明, 在本研究中, 单纯内镜治疗组的疗效稍逊于联合治疗治疗组, 且前者再出血风险较后者高.

本研究发现, 在单纯内镜治疗组随访期间共20例患者发生消化道再出血, 共计34人次, 其中最少再出血次数为1次, 最多4次, 大多数再出血发生在初次内镜治疗后9 mo内, 以最初的3 mo内最高, 达9例; 且从图1中可以看出, 治疗后15-18 mo患者再出血率再次升高. 混合组患者共发生消化道再出血15例, 共计31人次, 最少出血1次, 最多3次, 出血集中发生在3-12 mo, 以9-12 mo最高. 再出血率在2组间均无统计学意义[单纯内镜治疗组 *vs* 联合治疗组, 20/40(50%) *vs* 15/29(51.72%), P>0.05]. 这说明, 从治疗后再出血情况看, 加服普萘洛尔并不能够显著的降低再出血率, 但可以延迟患者首次再出血峰值时间[单纯内镜治疗组: M = 2.00; Q(0.25, 12.75); 联合治疗组: M = 3.50; Q(1.50-6.25)]. 这种再出血率的差异与目前关于内镜联合普萘洛尔预防出血的研究结果相似. 有研究表明[17], 单纯套扎治疗及套扎后加用普萘洛尔均能够有效地预防高危静脉首次出血、降低曲张静脉再发率, 但并不能降低套扎患者首次出血及死亡风险. 这种差异性可能与本研究中所有患者既往均有出血史相关. De等[18]通过研究表明, 普萘洛尔预防出血的疗效与既往出血史及患者的年龄呈负相关. 同时, 也有研究发现[9], 内镜下套扎治疗后联合普萘洛尔与单硝酸异山梨酯治疗并不能降低患者的再出血风险, 再出血风险因素可能与肝功能(腹水、低蛋白血症)以及肝静脉压力梯度相关, 且Avgerinos等[10]研究发现, 与单纯服用普萘洛尔相比, 硬化剂治疗后加用普萘洛尔的患者再出血率、相关性胃病的发生率以及肝硬化相关并发症的发生率均升高, 独立的相关危险因素为血清白蛋白水平. 本研究中纳入的肝硬化患者全部为失代偿期肝硬化, 治疗前后腹水没有得到明显的改善, 且均存在低蛋白血症. 另外, 所有患者首次胃镜检查发现食管静脉曲张均为重度, 红色征明显, 出血风险极高. 既往研究表明[13,14], 食管曲张静脉套扎后门静脉压力的变化与治疗次数及有无其他的侧支循环开放有关. 虽然内镜下治疗可以破坏存在高危出血风险的曲张静脉, 但反复的内镜下套扎或硬化剂治疗及其他侧支循环的开放可能会促使门脉高压继续发展, 新生血管会再次形成并导致再出血[19]; 而联合治疗组患者在内镜治疗后加服普萘洛尔可以在一定程度上减少门静脉血流量, 相对而言从门脉高压发生发展的机制中延缓了食管静脉曲张的形成、延迟再出血的发生, 但并不能阻止门脉高压的发展.

由于联合治疗组患者死亡率较低, 无法进行Cox回归模型分析, 我们采用χ^2检验分析2组间死亡率的差异. 通过对比2组患者的死亡率我们可以发现, 单纯内镜治疗组患者死亡率明显高于联合治疗组患者, 且两组患者间死亡率[单纯内镜治疗组 *vs* 联合治疗组, 11/40(27.5%) *vs* 2/29(6.90%), P<0.05]具有统计学意义. 在随访期间, 前者有11例发生死亡, 而后者仅2例死亡. 单纯内镜治疗组患者死亡主要发生在最初6 mo内, 且该组患者发生的死亡时间主要与我们观察到的消化道再出血的特征相一致. 这提示单纯内镜治疗后早期再出血应引起我们的高度重视. 而联合治疗组患者死亡总体风险较小. 本研究中, 联合治疗组患者共发生2例死亡, 其中1例发生在9-12 mo, 也与消化道再出血发生的高危时期相一致. 另一例死亡原因为心肌梗死, 与消化道出血无关. 通过两组对比我们猜测, 普萘洛尔不仅可以通过直接降低门脉压力降低患者死亡率及再出血相关的死亡率, 且可能还通过其他机制改善患者的一般状况及肝功能, 如降低肠道细菌移位和肠黏膜通透性、降低内毒素血症及自发性腹膜炎(SBP)的发生率[20-22], 这从死因分析中可以看出, 单纯内镜治疗组有2例发生SBP, 而联合治疗组无病例发生. 且有研究表明[22,23], 上述病理生理状态可能与患者的出血风险及死亡率相关.

因此, 我们需要高度重视患者在接受内镜治疗后早期的再出血、死亡情况及再出血相关的死亡. 对于单纯内镜治疗早期的患者, 仍需要采取内镜强化治疗或药物干预预防再出血, 这可以在很大程度上降低患者再出血率及再出血相

关的死亡率, 但同时需注意, 反复多次内镜下治疗可能会促使其他侧支循环的开放, 特别是胃底静脉曲张的形成.

4 参考文献

1 Chen YI, Ghali P. Prevention and management of gastroesophageal varices in cirrhosis. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 750150

2 Sarin SK, Gupta N, Jha SK, Agrawal A, Mishra SR, Sharma BC, Kumar A. Equal efficacy of endoscopic variceal ligation and propranolol in preventing variceal bleeding in patients with noncirrhotic portal hypertension. *Gastroenterology* 2010; 139: 1238-1245

3 朱永强, 汪涛, 张生. 门静脉高压症并发上消化道出血138例手术治疗分析. 临床外科杂志 2011; 19: 711-712

4 Hsu YC, Chung CS, Wang HP. Application of endoscopy in improving survival of cirrhotic patients with acute variceal hemorrhage. *Int J Hepatol* 2011; 2011: 893973

5 Drastich P, Lata J, Petrtyl J, Bruha R, Prochazka V, Vanasek T, Zdenek P, Skibova J, Hucl T, Spicak J. Endoscopic variceal band ligation compared with propranolol for prophylaxis of first variceal bleeding. *Ann Hepatol* 2011; 10: 142-149

6 Rivet C, Robles-Medranda C, Dumortier J, Le Gall C, Ponchon T, Lachaux A. Endoscopic treatment of gastroesophageal varices in young infants with cyanoacrylate glue: a pilot study. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 1034-1038

7 Jutabha R, Jensen DM, Martin P, Savides T, Han SH, Gornbein J. Randomized study comparing banding and propranolol to prevent initial variceal hemorrhage in cirrhotics with high-risk esophageal varices. *Gastroenterology* 2005; 128: 870-881

8 Tajiri T, Yoshida H, Obara K, Onji M, Kage M, Kitano S, Kokudo N, Kokubu S, Sakaida I, Sata M, Tajiri H, Tsukada K, Nonami T, Hashizume M, Hirota S, Murashima N, Moriyasu F, Saigenji K, Makuuchi H, Oho K, Yoshida T, Suzuki H, Hasumi A, Okita K, Futagawa S, Idezuki Y. General rules for recording endoscopic findings of esophagogastric varices (2nd edition). *Dig Endosc* 2010; 22: 1-9

9 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

10 Avgerinos A, Armonis A, Manolakopoulos S, Rekoumis G, Argirakis G, Viazis N, Vlachogiannakos J, Adamopoulos A, Kanaghinis T, Raptis SA. Endoscopic sclerotherapy plus propranolol versus propranolol alone in the primary prevention of bleeding in high risk cirrhotic patients with esophageal varices: a prospective multicenter randomized trial. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 652-658

11 Sakai K, Iwao T, Oho K, Toyonaga A, Sata M. Propranolol ameliorates thrombocytopenia in patients with cirrhosis. *J Gastroenterol* 2002; 37: 112-118

12 江泳, 王少峰, 方军初, 张晓慧. 普萘洛尔治疗肝硬化血小板减少症的临床意义. 实用肝脏病杂志 2007; 10: 102-104

13 Sarin SK, Govil A, Jain AK, Guptan RC, Issar SK, Jain M, Murthy NS. Prospective randomized trial of endoscopic sclerotherapy versus variceal band ligation for esophageal varices: influence on gastropathy, gastric varices and variceal recurrence. *J Hepatol* 1997; 26: 826-832

14 Lo GH, Liang HL, Lai KH, Chang CF, Hwu JH, Chen SM, Lin CK, Chiang HT. The impact of endoscopic variceal ligation on the pressure of the portal venous system. *J Hepatol* 1996; 24: 74-80

15 Kanke K, Ishida M, Yajima N, Saito M, Suzuki Y, Masuyama H, Hiraishi H, Terano A. [Gastric mucosal congestion following endoscopic variceal ligation--analysis using reflectance spectrophotometry]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1996; 93: 701-706

16 Pereira SP, Wilkinson ML. Prospective randomized trial of endoscopic sclerotherapy versus variceal band ligation for esophageal varices: influence on gastropathy, gastric varices and variceal recurrence. *Gastrointest Endosc* 1997; 46: 384-385

17 Sarin SK, Wadhawan M, Agarwal SR, Tyagi P, Sharma BC. Endoscopic variceal ligation plus propranolol versus endoscopic variceal ligation alone in primary prophylaxis of variceal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 797-804

18 De BK, Sen S, Biswas PK, Sengupta D, Biswas J, Santra A, Hazra B, Maity AK. Propranolol in primary and secondary prophylaxis of variceal bleeding among cirrhotics in India: a hemodynamic evaluation. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2023-2028

19 权启镇, 齐风, 王要军, 孙自勤, 江学良. 内镜下食管静脉曲张结扎加硬化剂疗法评价. 中华消化内镜杂志 1997; 14: 311-312

20 Senzolo M, Cholongitas E, Burra P, Leandro G, Thalheimer U, Patch D, Burroughs AK. beta-Blockers protect against spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a meta-analysis. *Liver Int* 2009; 29: 1189-1193

21 Turnes J, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG, Hernandez-Guerra M, Dell'Era A, Bosch J. Pharmacological reduction of portal pressure and long-term risk of first variceal bleeding in patients with cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 506-512

22 Senzolo M, Fries W, Buda A, Pizzuti D, Nadal E, Sturniolo GC, Burroughs AK, D'Incà R. Oral propranolol decreases intestinal permeability in patients with cirrhosis: another protective mechanism against bleeding? *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 3115-3116

23 Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005; 54: 556-563

编辑 田滢 电编 闫晋利

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2951-2955
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

根除幽门螺杆菌对慢性胃炎患者生长激素调素水平的影响

张 颖, 齐凤祥, 张志广, 江 勇

张颖, 齐凤祥, 张志广, 江勇, 天津医科大学第二医院消化科 天津市 300070
张颖, 硕士, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病临床研究.
天津市卫生局科技基金资助项目, No. 2011KZ93
作者贡献分布: 此课题由张颖、齐凤祥及张志广设计; 研究过程由张颖与江勇操作完成; 数据分析由张颖与江勇完成; 本论文写作由张颖与张志广完成.
通讯作者: 张颖, 副主任医师, 300211, 天津市河西区平江道23号, 天津医科大学消化内科. zhangying5095@sina.com
电话: 022-88328821
收稿日期: 2012-07-12 修回日期: 2012-09-17
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-28

Influence of *Helicobacter pylori* eradication on ghrelin levels in patients with chronic gastritis

Ying Zhang, Feng-Xiang Qi, Zhi-Guang Zhang, Yong Jiang

Ying Zhang, Feng-Xiang Qi, Zhi-Guang Zhang, Yong Jiang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Supported by: the Science and Technology Foundation of Tianjin Health Bureau, No. 2011KZ93
Correspondence to: Ying Zhang, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University, 151 Pingjiangdao Road, Hexi District, Tianjin 300070, China. zhangying5095@sina.com
Received: 2012-07-12 Revised: 2012-09-17
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradication on the levels of ghrelin in serum and gastric mucosa in patients with chronic gastritis.

METHODS: Forty-two patients with chronic atrophic gastritis (CAG), 40 patients with chronic superficial gastritis (CSG), and 40 normal controls were included in the study. Serum ghrelin levels were measured by ELISA and expression of ghrelin in gastric muscosa was detected by RT-PCR in these patients before and after *H. pylori* eradication.

RESULTS: Serum ghrelin levels in *H. pylori*-infected patients with CSG or CAG were significantly lower than those in normal controls (25.58 μg/L ± 8.17 μg/L, 18.59 μg/L ± 8.19 μg/L *vs* 29.27 μg/L ± 7.58 μg/L; both $P < 0.01$). The expression of gastric mucosa-associated ghrelin in the two patient groups was also lower than that in the control group (0.86 ± 0.26, 0.75 ± 0.22 *vs* 1.06 ± 0.31, both $P < 0.01$). Four weeks after *H. pylori* eradication treatment, serum ghrelin level (29.10 μg/L ± 8.79 μg/L) and expression of gastric mucosa-associated ghrelin (1.10 ± 0.32) were significantly increased in the CSG group (both $P < 0.01$). However, there was no obvious difference in ghrelin levels in the CAG group between before and after *H. pylori* eradication treatment.

CONCLUSION: *H. pylori*-infected patients with chronic gastritis have decreased ghrelin levels. *H. pylori* eradication treatment increases ghrelin levels in patients with CSG, but not in those with CAG.

Key Words: Chronic atrophic gastritis; Chronic superficial gastritis; Ghrelin; *Helicobacter pylori*

Zhang Y, Qi FX, Zhang ZG, Jiang Y. Influence of *Helicobacter pylori* eradication on ghrelin levels in patients with chronic gastritis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2951-2955

摘要

目的: 检测慢性胃炎患者根除幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)前后血清生长激素调素水平及胃黏膜生长激素调素表达水平变化, 探讨根除*H. pylori*对慢性胃炎患者生长激素调素水平的影响.

方法: 在*H. pylori*根除前后应用酶联免疫法测定血清生长激素调素的水平, 应用RT-PCR方法检测胃黏膜生长激素调素表达水平, 对结果进行统计学分析.

结果: *H. pylori*感染的慢性浅表胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)及萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)组其血清生长激素调素的水平分别为25.58 μg/L±8.17 μg/L和18.59 μg/L±8.19 μg/L, 低于正常对照组(均$P<0.01$), 胃黏膜生长激素调素表达水平分别

■背景资料
近年来有研究显示*H. pylori*感染和*H. pylori*的根除治疗会影响血清及胃黏膜ghrelin的水平; 同时*H. pylori*根除后胃黏膜及血浆的ghrelin水平是动态变化的. 这种变化是由于根除*H. pylori*所致, 还是由于症状改善及体质量变化所致, 目前尚无定论, 且发生上述变化的机制尚不明确.

■同行评议者
马欣, 主任医师, 甘肃省人民医院消化科

■研发前沿
目前多项研究认为ghrelin与胃黏膜萎缩程度有关，可以作为萎缩性胃炎黏膜损伤的标志物之一. 但对于生长激素调素对于萎缩性胃炎诊断价值的报道国内并不多见. 其对于萎缩性胃炎的诊断临界值尚没有大样本研究的数据支持.

■相关报道
目前多项研究显示*H. pylori*感染会影响血清ghrelin的水平，但是关于根除*H. pylori*对*H. pylori*相关上消化道疾病中ghrelin水平的影响，目前的研究结果并不一致，其影响机制涉及炎性因子白介素8(IL-8)、IL-1等. 但*H. pylori*根除后ghrelin的变化是由于根除*H. pylori*所致，还是由于症状改善及体质量变化所致，目前各项研究尚无一致的结论.

为0.86±0.26和0.75±0.22，低于正常对照组(均$P<0.01$). 根除*H. pylori*治疗4 wk后CSG组患者血清及胃黏膜生长激素调素表达水平较治疗前升高分别为29.35 μg/L±8.83 μg/L和1.10±0.32(均$P<0.01$)；而CAG组根除治疗前后生长激素调素水平无明显变化($P>0.05$).

结论：*H. pylori*感染的慢性胃炎患者生长激素调素水平下降，根除*H. pylori*治疗可以使CSG患者生长激素调素水平升高，改善其消化不良症状. CAG患者根除*H. pylori*治疗后生长激素调素水平无明显变化，生长激素调素水平的变化可作为胃黏膜膜损伤程度的检测指标之一.

关键词：慢性萎缩性胃炎；慢性浅表性胃炎；生长激素调素；幽门螺杆菌

张颖，齐凤祥，张志广，江勇. 根除幽门螺杆菌对慢性胃炎患者生长激素调素水平的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2951-2955
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2951.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是慢性活动性胃炎的主要病源，同时在胃溃疡、十二指肠溃疡及胃癌、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤(MALT淋巴瘤)等许多疾病的致病中起重要作用[1]. *H. pylori*的根除可以改善组织学上的胃的炎症，降低胃及十二指肠溃疡的复发，也可能阻止胃癌的发生. 目前，已有研究表明在*H. pylori*根除治疗后，不仅在那些有胃炎及溃疡被治愈的患者中出现食欲增加，而且在正常对照组中也出现了食欲改善、体质量增加[2]，这就提示了除了去除病因可能还有其他因素参与作用. 本研究通过检测*H. pylori*根除前后血清生长激素调素(ghrelin)水平及胃黏膜组织中ghrelin表达水平的变化，来探讨根除*H. pylori*对慢性胃炎患者ghrelin分泌的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2011-06/2011-12于我院就诊的*H. pylori*阳性慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)患者42例，慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)患者40例，胃镜检查未见明显异常且*H. pylori*阴性者40例，为正常对照组，所有病例均经胃镜检查，同时取活体组织做组织学病理学检查确诊，胃炎患者均符合《中国慢性胃炎共识意见》诊断标准[3]. 所有患者的体质量指数(body mass index, BMI)均在正常范围(18.5-23.5)之内，除外糖尿病、糖耐量受损者及自身免疫性疾病患者，各组患者一般情况见表1. 慢性胃炎患者应用四联疗法(质子泵抑制剂+铋剂+克拉霉素+替硝唑)14 d，进行*H. pylori*根除治疗. 停药4 wk后复查.

1.2 方法

1.2.1 血清ghrelin的检测方法：在*H. pylori*根除前及*H. pylori*根除治疗停药4 wk后检测血清ghrelin水平. 应用酶联免疫法检测生长激素调素. 抽取受检对象空腹7:00-8:00肘静脉血3 mL，离心5 min，3 000 r/min，血清分离后放-70 ℃冰箱保存备用. Ghrelin检测使用iMark型BIO-RAD Model680全自动免疫分析仪(美国)检测及原装配套试剂，ghrelin检测试剂盒由天津志卓生物科技有限公司提供，各标本的测定均由专业人员严格按照试剂盒说明进行操作.

1.2.2 胃黏膜ghrelin表达水平的检测方法：在*H. pylori*根除前及*H. pylori*根除治疗停药4 wk后行胃镜检查，在胃窦和胃体黏膜完整处各取1块组织应用RT-PCR方法检测胃黏膜ghrelin表达水平. 引物合成及DNA-marker购自上海生工生物工程公司. 选用100 bp DNA ladder. 引物序列：ghrelin上游5-GAGAGTCCAGCAGAGAAAGGAG-3，下游5-CAGCTTGATTCCAACATCAAAG-3. PCR反应条件：94 ℃预变性5 min，94 ℃变性30 s，57 ℃退火60 s，72 ℃延伸60 s，35个循环，最后72 ℃再延伸5 min. RT-PCR结果经计算机成像系统扫描成像后，读取各条带灰度值，计算各个目的条带的灰度值与管家基因β-actin灰度值的比值，即为目的蛋白/基因的相对定量结果，每个样本重复测定3次.

1.2.3 *H. pylori*检测方法：所有患者均经^{13}C呼气试验及快速尿素酶检测检测，二者均为阳性者判定为*H. pylori*阳性. 应用四联疗法(质子泵抑制剂+铋剂+克拉霉素+替硝唑)14 d进行*H. pylori*根除治疗. 停药4 wk后复查，2者均为阴性者为*H. pylori*根除.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行检验，计量资料用mean±SD表示，各组之间ghrelin的比较用单因素方差分析. *H. pylori*根除前后ghrelin水平的比较应用配对t检验，血清和胃黏膜ghrelin表达的相关性应用双变量相关分析. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组根除治疗前血清ghrelin及胃黏膜ghrelin表达水平 CSG组、CAG组及对照组根除治疗前血清ghrelin水平分别25.58 μg/L±8.17 μg/L、

表 1 各组患者一般情况的比较

分组	*n*	性别		BMI	年龄(岁)
		男	女		
CSG组	40	22	18	21.49 ± 1.55	51.50 ± 14.11
CAG组	42	26	16	21.65 ± 1.29	54.57 ± 12.84
正常对照组	40	24	16	21.50 ± 1.56	52.92 ± 14.17
P				0.855	0.116

CSG: 浅表性胃炎, CAG: 萎缩性胃炎, BMI:体质量指数.

表 2 各组根除治疗前血清ghrelin及胃黏膜ghrelin表达水平 (μg/L)

分组	*n*	血清ghrelin	胃黏膜ghrelin
CSG组	40	25.58 ± 8.17[b]	0.86 ± 0.26[b]
CAG组	42	18.59 ± 8.19[bd]	0.75 ± 0.22[bd]
对照组	40	29.27 ± 7.58	1.06 ± 0.31

CSG: 浅表性胃炎, CAG: 萎缩性胃炎; [b]*P*<0.01 *vs* 对照组; [d]*P*<0.01 *vs* CSG组.

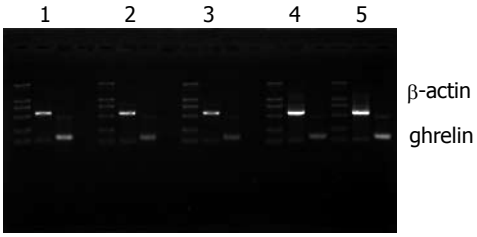


图 1 RT-PCR法检测慢性胃炎患者标本中ghrelin的结果. 1: 1.32; 2: 0.91; 3: 0.84; 4: 0.51; 5: 0.63.

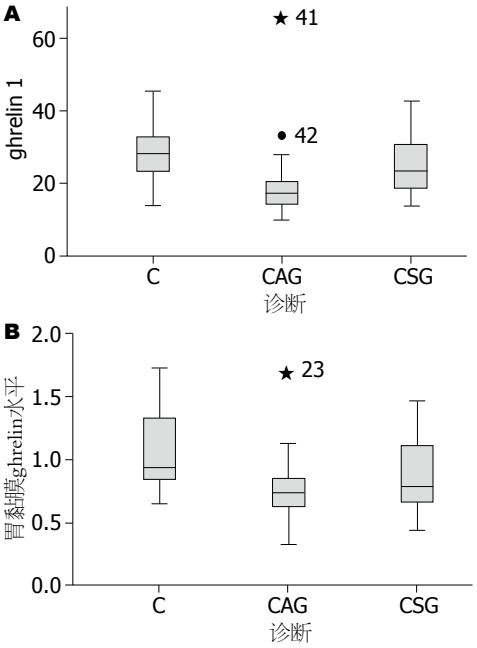


图 2 各组根除治疗前ghrelin表达水平. A: 血清ghrelin; B: 胃黏膜ghrelin; CSG: 浅表性胃炎; CAG: 萎缩性胃炎.

18.59 μg/L±8.1 9 μg/L及29.27 μg/L±7.58 μg/L. 对照组分别与CAG和CSG组间以及CAG组与CSG组间差别均有统计学意义(均*P*<0.01, 图1, 2, 表2); 胃黏膜ghrelin表达水平分别为0.86±0.26、0.75±0.22及1.06±0.31. 对照组分别与CAG及CSG组间以及CAG组与CSG组间差别均有统计学意义(均*P*<0.01, 图1, 2, 表2).

2.2 CSG组根除*H. pylori*前后血清及胃黏膜ghrelin表达水平 CSG根除治疗后, 有35例复查*H. pylori*阴性. 根除治疗前后血清ghrelin水平分别为25.58 μg/L±9.13 μg/L和29.35 μg/L±8.83 μg/L; 胃黏膜ghrelin表达水平为0.86±0.27和1.10±0.32. *H. pylori*根除前后ghrelin水平变化差别有统计学意义(*P*<0.01, 图3, 表3).

2.3 CAG组根除*H. pylori*前后血清及胃黏膜ghrelin表达水平 CAG组患者根除治疗后, 有33例复查*H. pylori*阴性. 根除治疗前后血清ghrelin水平分别为17.34 μg/L±4.70 μg/L和18.62 μg/L±4.96 μg/L;胃黏膜ghrelin表达水平为0.75±0.24和0.77±0.17. *H. pylori*根除前后ghrelin水平变化差别没有学意义(*P*>0.05, 表4).

2.4 血清ghrelin水平与胃黏膜ghrelin表达水平的相关性 血清ghrelin水平与胃黏膜ghrelin表达水平呈正相关. *H. pylori*根除前血清ghrelin水平与胃黏膜ghrelin表达水平的相关系数 r = 0.635(*P*<0.01); *H. pylori*根除后血清ghrelin水平与胃黏膜ghrelin表达水平的相关系数r = 0.713(*P*<0.01).

3 讨论

生长激素调素是一个由28个氨基酸组成的多肽, 他是针对生长激素分泌类似物受体(GHS-R)的配体, 其在体内外均可刺激生长激素的释放. 生长激素调素的mRNA在胃内有较高的表达, 在

■**创新盘点**

目前很多研究提示生长激素调素与胃黏膜萎缩程度有关, 可以作为萎缩性胃炎黏膜损伤的标志物之一. 但对于生长激素调素对于萎缩性胃炎诊断价值的报道国内并不多见, 同时本研究还提示CAG患者中血清生长激素调素的水平明显下降, 且生长激素调素水平的变化与PGⅠ/PGⅡ的变化呈正相关, 这在以往的研究中尚无报道.

■名词解释
生长激素调素(ghrelin): 一个由28个氨基酸组成的多肽, 他是针对生长激素分泌类似物受体(GHS-R)的配体, 其在体内外均可刺激生长激素的释放.

表 3 浅表性胃炎组*H. pylori*根除治疗前后血清ghrelin及胃黏膜ghrelin表达水平 (μg/L, n = 35)

分组	血清ghrelin	胃黏膜ghrelin
根除治疗前	25.58 ± 9.13	0.86 ± 0.27
根除治疗后	29.35 ± 8.83[b]	1.10 ± 0.32[b]

[b]P<0.01 *vs* 根除治疗前.

表 4 萎缩性胃炎组*H. pylori*根除治疗前后血清ghrelin及胃黏膜ghrelin表达水平 (n = 33)

分组	血清ghrelin	胃黏膜ghrelin
根除治疗前	17.34 ± 4.70	0.75 ± 0.24
根除治疗后	18.62 ± 4.96	0.77 ± 0.17

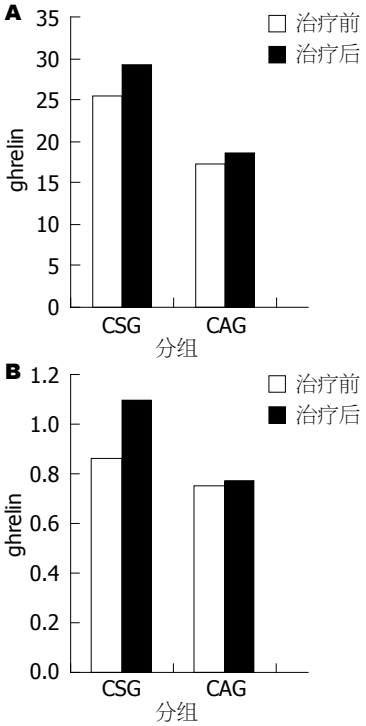


图 3 幽门螺杆菌根除治疗前后ghrelin水平变化. A: 血清ghrelin; B: 胃黏膜ghrelin; CSG: 浅表性胃炎; CAG: 萎缩性胃炎.

循环中也有一定的浓度, 目前的研究表明生长激素调素是与胃动素结构类似的食欲刺激信号, 可以影响胃的动力和分泌; 可以控制食物的摄入和能量代谢, 对刺激食欲和增加体质量有明显的作用[4].

目前有研究显示*H. pylori*感染会影响血清ghrelin的水平[5,6], 在*H. pylori*感染的儿童血浆中ghrelin浓度相对较低, 可能会导致发育迟滞[2]. 而根除*H. pylori*治疗后ghrelin水平升高, 儿童的身高和BMI有明显增长[7]. 但是关于根除*H. pylori*对慢性胃炎患者ghrelin水平的影响, 目前的研究结果并不一致. Tatsuguchi等[8]的研究显示*H. pylori*阳性的病人比*H. pylori*阴性者ghrelin表达水平明显降低, 而在*H. pylori*根除后ghrelin表达明显增加. Cindoruk等[9]的研究则认为*H. pylori*感染对萎缩性胃炎患者血清ghrelin水平没有明显影响; 而Suzuki等[10]用蒙古沙鼠制作的*H. pylori*感染的动物模型的研究中, 在*H. pylori*感染后17、23 wk后ghrelin mRNA的表达和循环中ghrelin总水平明显下降, 这提示胃及血浆的生长激素释放肽水平对*H. pylori*感染的反应是动态变化的. 但*H. pylori*根除后ghrelin的变化是由于根除*H. pylori*所致, 还是由于症状改善及体质量变化所致, 目前尚无定论[11-13].

本研究结果显示在*H. pylori*感染的慢性胃炎患者其循环中的ghrelin水平较非*H. pylori*感染者降低, 在根除4 wk后浅表性胃炎患者循环及胃黏膜ghrelin表达水平均有升高, 其差别具有统计学意义, 提示*H. pylori*感染对ghrelin的分泌有影响, 在*H. pylori*根除治疗的早期由于胃黏膜炎症的改善ghrelin分泌水平升高, 这也可以解释了浅表性胃炎患者在进行*H. pylori*根除后可以改善其消化不良症状, 促进食欲, 使体质量增加. 由于ghrelin的分泌受体质量和胰岛素分泌影响随着患者体质量增加可能反馈抑制ghrelin的分泌, 因此可能造成在*H. pylori*根除治疗的远期循环中的ghrelin水平下降.

目前有研究认为ghrelin与胃黏膜萎缩程度有关, 可以作为萎缩性胃炎黏膜损伤的标志物之一[14-16]. Tatsuguchi等[8]研究显示胃黏膜腺体的萎缩在成功的根除*H. pylori*一年后无论是在内镜下还是在组织学上都没有恢复的表现. 本研究的结果也显示在慢性萎缩性胃炎患者中, 其循环ghrelin水平及胃黏膜的ghrelin表达均低于正常对照组及浅表胃炎组; 根除*H. pylori*前后血清及胃黏膜ghrelin的水平没有明显变化. 其原因考虑可能与胃黏膜萎缩使胃内分泌生长激素调素的X/A样细胞含数目减少导致生长激素调素分泌减少有关. 提示ghrelin可以作为慢性萎缩性胃炎黏膜损伤程度的检测指标之一.

由于ghrelin可以影响胃的动力和分泌, 刺激食欲和增加体质量有明显的作用, 所以ghrelin水平的下降可能是慢性胃炎患者存在胃肠动力异常及功能性消化不良等症状的原因之一. 目

前浅表胃炎在*H. pylori*根除的共识意见中并未列为*H. pylori*的绝对根除指征, 但在合并食欲不振、体质量减轻的浅表胃炎患者中, 根除*H. pylori*可以提高循环中ghrelin的水平, 对改善消化不良的临床症状, 促进食欲, 增加体质量有治疗意义. 同时在慢性萎缩性胃炎患者中, ghrelin水平的变化可作为胃黏膜损伤程度的检测指标之一, 其对萎缩性胃炎的诊断临界值尚需大样本研究的数据支持.

4 参考文献

1 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 1999: 38-39

2 Nwokolo CU, Freshwater DA, O'Hare P, Randeva HS. Plasma ghrelin following cure of Helicobacter pylori. *Gut* 2003; 52: 637-640

3 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见. 胃肠学 2006; 11: 674-684

4 张颖, 张志广. 胃肠道疾病对生长激素释放肽表达的影响. 医学综述 2007; 13: 125-127

5 Osawa H. Ghrelin and Helicobacter pylori infection. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6327-6333

6 Chuang CH, Sheu BS, Yang HB, Lee SC, Kao AW, Cheng HC, Chang WL, Yao WJ. Gender difference of circulating ghrelin and leptin concentrations in chronic Helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2009; 14: 54-60

7 Pacifico L, Anania C, Osborn JF, Ferrara E, Schiavo E, Bonamico M, Chiesa C. Long-term effects of Helicobacter pylori eradication on circulating ghrelin and leptin concentrations and body composition in prepubertal children. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 323-332

8 Tatsuguchi A, Miyake K, Gudis K, Futagami S, Tsukui T, Wada K, Kishida T, Fukuda Y, Sugisaki Y, Sakamoto C. Effect of Helicobacter pylori infection on ghrelin expression in human gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2121-2127

9 Cindoruk M, Yetkin I, Deger SM, Karakan T, Kan E, Unal S. Influence of H pylori on plasma ghrelin in patients without atrophic gastritis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1595-1598

10 Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nomura S, Kangawa K, Ishii H. Helicobacter pylori infection modifies gastric and plasma ghrelin dynamics in Mongolian gerbils. *Gut* 2004; 53: 187-194

11 张静, 丁士刚, 杨雪玲, 王晔, 张贺军. 胃黏膜病理学改变、体质量指数与血清ghrelin和瘦素关系的研究. 北京大学学报 2010; 42: 1671-1675

12 Zub-Pokrowiecka A, Rembiasz K, Konturek SJ, Budzynski A, Konturek PC, Budzynski P. Ghrelin in diseases of the gastric mucosa associated with Helicobacter pylori infection. *Med Sci Monit* 2010; 16: CR493-CR500

13 Stec-Michalska K, Malicki S, Michalski B, Peczek L, Wisniewska-Jarosinska M, Nawrot B. Gastric ghrelin in relation to gender, stomach topography and Helicobacter pylori in dyspeptic patients. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5409-5417

14 Kawashima J, Ohno S, Sakurada T, Takabayashi H, Kudo M, Ro S, Kato S, Yakabi K. Circulating acylated ghrelin level decreases in accordance with the extent of atrophic gastritis. *J Gastroenterol* 2009; 44: 1046-1054

15 Checchi S, Montanaro A, Pasqui L, Ciuoli C, Cevenini G, Sestini F, Fioravanti C, Pacini F. Serum ghrelin as a marker of atrophic body gastritis in patients with parietal cell antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4346-4351

16 Campana D, Nori F, Pagotto U, De Iasio R, Morselli-Labate AM, Pasquali R, Corinaldesi R, Tomassetti P. Plasma acylated ghrelin levels are higher in patients with chronic atrophic gastritis. *Clin Endocrinol* (Oxf) 2007; 67: 761-766

■同行评价

本文研究表明明根除*H. pylori*治疗可以使慢性浅表胃炎患者生长激素调素水平升高, 改善其消化不良症状. 生长激素调素水平的变化可作为胃黏膜膜损伤程度的检测指标之一. 得出结论依据充分, 真实可信.

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告 – RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2956-2960
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

2型糖尿病在慢性乙型肝炎进展到肝硬化中的作用

吴群, 高春, 房龙, 张辉

■背景资料
国内外有研究提示糖尿病可能是原发性肝癌潜在的危险因素, 但是研究结果表现出高度的不一致性和不稳定性, 也有研究提示糖尿病与乙型肝炎、肝硬化和肝细胞癌之间存在着某种联系.

吴群, 四川省绵阳市科学城医院 四川省绵阳市 621900
高春, 房龙, 张辉, 卫生部中日友好医院消化内科 北京市 100029
吴群, 副主任医师, 主要从事慢性肝病发病机制及防治的研究.
卫生部中日友好医院院级青年课题基金资助项目, No. 2010-QN-01
作者贡献分布: 此课题由高春与房龙设计; 研究过程由吴群、房龙及张辉实施完成; 数据分析由高春与吴群完成; 论文写作由吴群、高春、房龙及张辉共同完成.
通讯作者: 高春, 医学博士, 主治医师, 100029, 北京市朝阳区樱花东街2号, 卫生部中日友好医院消化内科.
gaochun@bjmu.edu.cn
电话: 010-84205313
收稿日期: 2012-07-20 修回日期: 2012-10-09
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-28

Role of type 2 diabetes mellitus in the progression of chronic hepatitis B to cirrhosis

Qun Wu, Chun Gao, Long Fang, Hui Zhang

Qun Wu, Sichuan Science City Hospital, Mianyang 621900, Sichuan Province, China
Chun Gao, Long Fang, Hui Zhang, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Ministry of Health, Beijing 100029, China
Supported by: the Research Fund of the China-Japan Friendship Hospital, Ministry of Health, No. 2010-QN-01
Correspondence to: Chun Gao, Doctor, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Ministry of Health, 2 Yinghua East Road, Beijing 100029, China. gaochun@bjmu.edu.cn
Received: 2012-07-20 Revised: 2012-10-09
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-28

Abstract

AIM: To determine the potential role of type 2 diabetes mellitus (DM) in the progression of chronic hepatitis B (CHB) to cirrhosis in Chinese patients.

METHODS: A total of 292 patients with CHB and/or CHB-related cirrhosis treated at the China-Japan Friendship Hospital and Sichuan Science City Hospital from January 2007 to December 2011 were studied. Demographic, clinical, biochemical, and metabolic features/data were analyzed and multivariate logistic regression model was used to determine the role of type 2 DM in the progression of CHB to cirrhosis.

RESULTS: Of the 292 patients, 91 were diagnosed with simple CHB and 201 with CHB-related cirrhosis. Seventy-eight patients were diagnosed with type 2 DM, including 10 in the CHB group and 68 in the cirrhosis group (11.0% *vs* 33.8%, $P < 0.001$). In the multivariate analysis, compared with patients with simple CHB, after controlled by gender, age, body mass index (weight), smoking, drinking and Child score, type-2 DM was shown to be an independent risk factor for CHB-related cirrhosis (odds ratio, 4.434, 95% confidence interval, 2.049-9.591, $P < 0.001$).

CONCLUSION: Our findings suggest that type 2 DM may play an important role in the progression of CHB to cirrhosis and may be a newly identified risk factor for CHB-related cirrhosis.

Key Words: Type 2 diabetes mellitus; Chronic hepatitis B; Cirrhosis

Wu Q, Gao C, Fang L, Zhang H. Role of type 2 diabetes mellitus in the progression of chronic hepatitis B to cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2956-2960

摘要

目的: 探讨2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)在慢性乙肝进展到肝硬化中的作用.

方法: 本研究纳入2007-01/2011-12在北京卫生部中日友好医院和四川省绵阳市科学城医院住院, 符合诊断标准和纳入标准, 不符合排除标准的慢性乙型肝炎和乙肝肝硬化患者. 分析入选患者的人口统计学、临床、生化和代谢等相关资料, 单因素分析比较两组人群在入选参数上的差异, 二元非条件Logistic回归分析研究T2DM在慢性乙肝进展到肝硬化中的作用.

结果: 研究纳入符合条件的Child A/B级的慢性乙肝患者91例和乙肝肝硬化患者201例, T2DM在两组人群中的发病率分别为11.0%(10/91)和33.8%(68/201), 单因素分析提示二者存在明显统计学差异(P<0.001). 二元非条件Logistic回归分析的结果发现, 与慢

■同行评议者
范建高, 教授, 上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

性乙肝患者相比较, 在控制了性别、年龄、体质量指数(体质量)、吸烟、饮酒和Child得分的情况下, T2DM是影响乙肝肝硬化独立的相关因素, *OR*值为4.434, 95%可信区间为2.049-9.591(P<0.001).

结论: T2DM在慢性乙型肝炎进展到肝硬化中发挥着重要的作用, 可能促进慢性乙肝向肝硬化进展, 但是仍需大规模前瞻性的研究进一步验证.

关键词: 2型糖尿病; 慢性乙型肝炎; 肝硬化

吴群, 高春, 房龙, 张辉. 2型糖尿病在慢性乙型肝炎进展到肝硬化中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2956–2960
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2956.asp

0 引言

近年来, 国外有研究提示糖尿病可能是原发性肝癌潜在的危险因素, 但是研究结果表现出高度的不一致性和不稳定性[1-4]. 我们前面的一项研究结果发现[5], 在慢性乙型肝炎感染人群中, 与肝细胞癌不合并肝硬化的患者相比较, 除了凝血酶原时间国际标准化比值、血小板计数和白蛋白水平3个与肝硬化本身相关的因素外, 糖尿病是原发性肝癌合并肝硬化患者唯一的独立相关因素, 糖尿病在原发性肝癌的发生和发展中可能发挥着重要的作用[5]. 上述研究提示了糖尿病与乙型肝炎、肝硬化和肝细胞癌之间的关系, 但是对于2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)在慢性乙肝肝炎进展到肝硬化过程中的作用, 目前却研究极少[6], 国内文献尚未见报道. 本研究的目的在于以慢性乙肝患者作为对照组, 乙肝肝硬化患者作为病例组, 探讨T2DM在我国人群中从慢性乙肝进展到肝硬化过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 *材料* 研究纳入2007-01/2011-12在北京卫生部中日友好医院和四川省绵阳市科学城医院住院, 符合诊断标准和纳入标准, 不符合排除标准的患者. 研究获得我院伦理委员会的批准, 做到每位患者知情同意, 研究实施过程遵照赫尔辛基宣言, 注意保护每位患者的个人隐私, 对所有研究资料注意保密.

1.2 *方法*

1.2.1 *排除标准包括*: (1)合并原发性肝癌; (2)纳入研究之前经过手术、介入、免疫等可能影响结果的相关治疗; (3)明确的HCV、HDV和HIV感染; (4)长期大量嗜酒; (5)明确的黄曲霉毒素暴露史, 或者明确的药物及毒物引起的肝脏损伤病史; (6)存在消化系统的其他原发性恶性肿瘤; 存在其他各个系统的原发性恶性肿瘤, 包括血液系统的白血病和淋巴瘤; (7)外籍患者; (8)存在血色病、肝豆状核变性、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎; 存在风湿免疫性和/或变态反应性疾病; (9)严重的心、脑、肺、肾脏疾病.

1.2.2 *纳入标准包括*: (1)符合慢性乙型肝炎和/或乙肝肝硬化的诊断标准, 诊断标准参考我国诊治指南规定; (2)年龄在18-75岁, 性别不限; (3)Child分级为A及和B级; (4)第一次住院的资料齐全, 能够满足研究需要.

1.2.3 *慢性乙型肝炎、肝硬化和2型糖尿病的诊断标准*[5]: 有乙型肝炎或HBsAg阳性史超过6 mo, 现HBsAg和/或HBV DNA仍为阳性, 血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)持续或反复升高, 或肝组织学检查有肝炎病变. 满足以下条件之一的诊断肝硬化[3]: (1)手术或者肝脏穿刺标本的病理诊断明确提示为肝硬化; (2)两项以上的影像学检查结果均提示有典型的肝硬化特征; (3)一项影像学检查结果提示有典型的肝硬化特征, 同时伴有肝功能失代偿和门静脉高压的典型临床表现. T2DM的诊断参考1997-07由美国糖尿病协会提出的糖尿病诊断和分类标准.

1.2.4 *研究参数的选择*: 研究纳入以下可能相关的指标进行分析, 包括: 性别、年龄、是否合并T2DM、身高、体质量、体质量指数、高血压、收缩压、舒张压、吸烟、饮酒, HBeAg阳性率、乙肝病毒载量、乙肝病毒感染时间、Child得分、Child分级、中性粒细胞计数、血红蛋白定量、血小板计数、ALT、γ-谷氨酰转肽酶、总胆红素、白蛋白定量、凝血酶原时间、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、肌酐、血尿素氮、血钠及血钾.

统计学处理 统计学分析采用SPSS17.0软件包. 对于符合正态分布的计量资料, 采用mean±SD来表示, 单因素分析采用独立样本的t检验; 对于偏态分布(不符合正态分布)的计量资料, 采用中位数(四分位数间距)来表示, 单因素分析采用独立样本的非参数检验(mann-whitney non-parametric U-test); 对于计数资料, 采用患者的例数及百分比来表示, 根据不同的条件单因素分析分别采用Pearson χ^2检验、连续校正χ^2检验和Fisher精确检验. 多因素分析采用二元非条件Lo-

■**研发前沿**
对于2型糖尿病(T2DM)在慢性乙型肝炎进展到肝硬化过程中的作用, 目前却研究极少, 国内文献尚未见报道.

■**创新盘点**
研究首次以慢性乙肝患者作为对照组，乙肝肝硬化患者作为病例组，探讨T2DM在我国人群中从慢性乙肝进展到肝硬化过程中的作用.

表 1 两组研究人群的基线资料和单因素分析的结果

参数	慢性乙型肝炎(n = 91)	乙肝肝硬化(n = 201)	P值
性别, 男性n(%)	77(84.6)	148(73.6)	0.039
年龄(岁)	48 ± 16	53 ± 11	0.014
2型糖尿病n(%)	10(11.0)	68(33.8)	<0.001
身高(cm)	167.5 ± 5.9	167.2 ± 7.2	0.735
体质量(kg)	69.7 ± 5.5	67.5 ± 11.6	0.027
体质量指数(g/m^2)	24.89 ± 1.97	24.06 ± 3.60	0.022
高血压n(%)	11(12.1)	35(17.4)	0.247
收缩压(mmHg)	126 ± 13	125 ± 19	0.878
舒张压(mmHg)	76 ± 9	75 ± 11	0.400
吸烟n(%)	18(19.8)	69(34.3)	0.012
饮酒n(%)	10(11.0)	55(27.4)	0.002
HBeAg阳性率n(%)	27(29.7)	63(31.3)	0.774
乙肝病毒载量Log10	5.68 ± 1.36	5.52 ± 1.45	0.443
乙肝病毒感染时间(年)	10(5–15)	10(2–20)	0.621
Child得分	5.9 ± 1.4	6.7 ± 1.3	<0.001
Child 分级n(%)			
A级	67(73.6)	101(50.2)	<0.001
B级	24(26.4)	100(49.8)	<0.001
中性粒细胞计数(×10^9/L)	3.10(2.56–3.78)	2.41(1.44–3.75)	<0.001
血红蛋白定量(g/L)	135 ± 23	110 ± 28	<0.001
血小板计数(×10^9/L)	112(87–141)	76(49–108)	<0.001
谷丙转氨酶(U/L)	186(103–322)	38(25–55)	<0.001
γ-谷氨酰转肽酶(U/L)	69(38–113)	38(22–76)	<0.001
总胆红素(mg/L)	25.6(17.9–38.9)	11.0(8.0–16.5)	<0.001
白蛋白定量(g/L)	37.2 ± 4.7	33.5 ± 6.2	<0.001
凝血酶原时间(s)	13.4 ± 2.4	16.3 ± 2.3	<0.001
总胆固醇(mmol/L)	3.87 ± 1.21	3.80 ± 1.39	0.696
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.39 ± 0.37	1.09 ± 0.49	<0.001
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.30 ± 0.62	2.08 ± 1.06	0.053
肌酐(μmol/L)	73.5(65.2–88.7)	79.6(70.7–88.4)	0.088
血尿素氮(mmol/L)	4.57(3.59–5.78)	5.24(4.26–6.95)	0.001
血钠(mmol/L)	139 ± 3	140 ± 4	0.035
血钾(mmol/L)	3.93 ± 0.42	3.94 ± 0.51	0.883

gistic回归分析. 控制的因素包括: 性别、年龄、体质量指数(体质量)、吸烟、饮酒和Child得分. 非条件Logistic回归分析计算修正后的OR值、95%CI和P值(Wald χ^2). 上述分析以P>0.05为存在显著统计学差异, P值均取双侧检验的结果.

2 结果

2.1 患者的基线资料 研究纳入符合条件的Child A/B级的慢性乙肝患者91例和乙肝肝硬化患者201例, 表1详细列出了纳入人群的人口统计学、临床、生化及代谢等相关资料. 91例慢性乙肝患者中, 10例诊断有T2DM, 占总数的11.0%, 男77例(84.6%), 平均年龄48岁(标准差16), 平均体质量指数24.89 kg/m^2, 高血压患者11例(12.1%), 平均感染乙型肝炎时间为10年, 肝功能分级Child A级为67例(73.6%), Child B级为24例(26.4%).

201例乙肝肝硬化患者中, 68例诊断有T2DM, 占总数的33.8%, 男148例(73.6%), 平均年龄53岁(标准差11), 平均体质量指数24.06 kg/m^2, 高血压患者35例(17.4%), 平均感染乙型肝炎时间为10年, 肝功能分级Child A级为101例(50.2%), Child B级为100例(49.8%).

2.2 单因素分析的结果 如表1所示, T2DM的发病率在两组人群中存在显著统计学差异[11.0%(10/91) *vs* 33.8%(68/201), P<0.001], 提示乙肝肝硬化人群合并T2DM的比例明显高于单纯慢性乙肝患者. 尽管我们已经预定了严格

表 2 多因素Logistic回归分析的结果

参数	单因素分析	多因素Logistic回归分析		
	*P*值	*OR*值	95%可信区间	*P*值
性别, 男性*n*(%)	0.039	2.134	1.023–4.450	0.043
年龄(岁)	0.014	–	–	–
2型糖尿病*n*(%)	<0.001	4.434	2.049–9.591	<0.001
体质量(kg)	0.027	0.957	0.927–0.988	0.007
吸烟*n*(%)	0.012	–	–	–
饮酒*n*(%)	0.002	4.491	1.995–10.114	<0.001
Child得分	<0.001	1.494	1.204–1.853	<0.001

■应用要点
T2DM在慢性乙型肝炎进展到肝硬化中发挥着重要的作用, 可能促进慢性乙肝向肝硬化进展, 但是仍需大规模前瞻性的研究进一步验证.

的纳入和排除标准, 两组人群在绝大多数的纳入指标中均存在显著统计学差异, 其中大多数因素与乙肝肝硬化本身相关, 尤其是临床生化各研究指标, 如中性粒细胞计数(乙肝组中位数3.10×10^9/L *vs* 肝硬化组2.41×10^9/L, *P*<0.001), 血红蛋白定量(135 g/L±23 g/L *vs* 110 g/L±28 g/L, *P*<0.001), 血小板计数(112×10^9/L *vs* 76×10^9/L, *P*< 0.001), 白蛋白(37.2 g/L±4.7 g/L *vs* 33.5 g/L ±6.2 g/L, *P*<0.001)等. 考虑到肝硬化本身对各指标的可能影响, 我们提前限定研究人群为Child A级和B级的患者, 但最终两组人群中, Child A级的患者在乙肝肝硬化组还是低于慢性乙肝组[73.6%(67/91) *vs* 50.2%(101/201), *P*<0.001), 其影响将进一步通过二元非条件Logistic回归分析去调整和控制.

2.3 二元非条件Logistic回归分析的结果 根据现有的理论知识, 前期的研究成果和本研究设计的特殊性, 我们采用二元非条件Logistic回归的分析方法, 控制性别、年龄、体质量指数(体质量)、吸烟、饮酒和Child得分等6个影响因素, 研究T2DM在慢性乙肝进展到肝硬化中的作用. 多因素回归分析的结果发现(表2), 与慢性乙肝患者相比较, 在控制了性别、年龄、体质量、吸烟、饮酒和Child得分的情况下, T2DM是影响乙肝肝硬化独立的相关因素, *OR*值为4.434, 95%可信区间为2.049-9.591(*P*<0.001). 同时, 饮酒(*OR* = 4.491, 95%CI: 1.995-10.114, *P*<0.001)和Child得分(*OR* = 1.494, 95%CI: 1.204-1.853, *P*<0.001)等指标也保留为独立的相关因素.

3 讨论

本研究发现, 与慢性乙肝患者相比较, 在控制了性别、年龄、体质量、吸烟、饮酒和Child得分的情况下, T2DM是影响乙肝肝硬化独立的相关因素(*OR* = 4.434, 95%CI: 2.049-9.591, *P*<0.001). 研究结果提示T2DM可能是慢性乙肝进展到肝硬化的促进因素, 在慢性乙肝到肝硬化的进程中发挥着重要的作用.

我国是乙肝大国, 对该问题却几乎没有研究, 查阅国内外文献, 仅有的一篇报道来自台湾地区[6]. 该研究纳入了500例乙型肝炎病毒携带者, 随访时间平均为5.8年. 研究结果发现, 21.1%的患者在确诊肝硬化之前就已明确诊断患有糖尿病, 糖尿病在慢性乙肝病毒携带者进展到肝硬化过程中可能发挥重要作用[6].

与上一研究相比, 本研究纳入的是慢性乙肝患者, 而非单纯乙肝病毒携带者, 首次向世界呈现我国乙肝感染人群在该问题上的研究结果. 尽管本研究在设计上存在部分缺陷, 但本研究依然是目前第一篇有关糖尿病在慢性乙肝进展到肝硬化过程中有关作用的报道. 另外, 考虑到我国大陆和台湾地区在乙肝基因型方面存在差异, 台湾地区的研究结果并不能直接套用, 加强对大陆人群的研究非常必要.

本研究最大的设计缺陷在于其研究性质是观察性的横截面和病例对照研究, 而非采用大规模、多中心的前瞻性的队列研究. 与队列研究相比较, 病例对照研究和横截面研究确实提供的依据不是很强, 尤其是在因果关系上缺乏较强的说服力, 也就是说可能存在一定程度的选择偏倚. 但是, 在研究设计和实施过程中, 我们已经通过设定严格的纳入和排除标准, 借助北京、四川两个研究中心等措施尽可能的避免选择偏倚, 保证研究结果的准确性.

关于其机制, 首先, 肥胖、糖尿病和非酒精性脂肪性肝病之间可能存在协同作用[7-9], 从而影响慢性肝病的发生和发展. 肥胖可以导致胰岛素抵抗和脂肪变性, 引起炎症介质的释放和细胞因子的产生增加; 非酒精性脂肪性肝炎能够导致一些典型的组织学改变[10]. 糖尿病和肥胖

■同行评价
本课题设计新颖，研究结论对临床有一定指导意义.

能够引起肝脏炎症，导致氧化应激和脂质过氧化，接着引起肝细胞损伤和坏死，最终可以进展到肝纤维化、肝硬化，甚至肝细胞癌[11,12]；其次，胰岛素抵抗会导致高胰岛素血症，胰岛素与相应受体结合，促进磷酸化并活化相应的下游通路[13-15]. 大量研究已经证实胰岛素通路在肝纤维化及肝硬化进程中的作用. 因此，糖尿病在慢性乙肝进展到肝硬化过程中的作用可能是多因素，多途径共同作用的结果.

总之，T2DM在慢性乙型肝炎进展到肝硬化中发挥着重要的作用，可能促进慢性乙肝向肝硬化进展，但是仍需大规模前瞻性的研究进一步验证.

4 参考文献

1 Gao C, Yao SK. Diabetes mellitus: a "true" independent risk factor for hepatocellular carcinoma? *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 465-473
2 Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut* 2005; 54: 533-539
3 Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371: 838-851
4 Tung HD, Wang JH, Tseng PL, Hung CH, Kee KM, Chen CH, Chang KC, Lee CM, Changchien CS, Chen YD, Lu SN. Neither diabetes mellitus nor overweight is a risk factor for hepatocellular carcinoma in a dual HBV and HCV endemic area: community cross-sectional and case-control studies. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 624-631
5 Gao C, Zhao HC, Li JT, Yao SK. Diabetes mellitus and hepatocellular carcinoma: comparison of Chinese patients with and without HBV-related cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4467-4475
6 Huo TI, Wu JC, Lee PC, Tsay SH, Chang FY, Lee SD. Diabetes mellitus as a risk factor of liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Gastroenterol* 2000; 30: 250-254
7 Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112
8 Salomao M, Yu WM, Brown RS, Emond JC, Lefkowitch JH. Steatohepatitic hepatocellular carcinoma (SH-HCC): a distinctive histological variant of HCC in hepatitis C virus-related cirrhosis with associated NAFLD/NASH. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1630-1636
9 Jain D, Nayak NC, Saigal S. Hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver cirrhosis and alcoholic cirrhosis: risk factor analysis in liver transplant recipients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 840-848
10 Yuan JM, Govindarajan S, Arakawa K, Yu MC. Synergism of alcohol, diabetes, and viral hepatitis on the risk of hepatocellular carcinoma in blacks and whites in the U.S. *Cancer* 2004; 101: 1009-1017
11 Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-Garza H. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 280-288
12 Pazhanivel M, Jayanthi V. Diabetes mellitus and cirrhosis liver. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010; 56: 7-11
13 Erice E, Llop E, Berzigotti A, Abraldes JG, Conget I, Seijo S, Reverter E, Albillos A, Bosch J, García-Pagán JC. Insulin resistance in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G1458-G1465
14 Nkontchou G, Bastard JP, Ziol M, Aout M, Cosson E, Ganne-Carrie N, Grando-Lemaire V, Roulot D, Capeau J, Trinchet JC, Vicaut E, Beaugrand M. Insulin resistance, serum leptin, and adiponectin levels and outcomes of viral hepatitis C cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 53: 827-833
15 Goral V, Atalay R, Kucukoner M. Insulin resistance in liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 309-315

编辑 田滢 电编 闫晋利

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)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2961-2965
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

慢性丙型肝炎血脂变化与抗病毒疗效的关系

李 磊, 罗 明, 杨二娜, 王 瑞, 王会清, 曹武奎

李磊, 罗明, 天津医科大学研究生院 天津市 300070
杨二娜, 天津中医药大学研究生院 天津市 300070
王瑞, 王会清, 曹武奎, 天津市传染病医院 天津市 300070
李磊, 硕士, 主要从事病毒性肝炎的研究.
作者贡献分布: 主要数据分析和文章起草由李磊完成; 病例选择、临床资料整理收集由李磊、罗明及杨二娜完成; 课题设计、文章修改和审阅由王瑞、王会清及曹武奎完成.
通讯作者: 曹武奎, 教授, 300070, 天津市南开区苏堤路75号, 天津市传染病医院. tjcaowk@sina.com
电话: 022-27468236
收稿日期: 2012-07-13 修回日期: 2012-09-10
接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-10-28

Relationship between efficacy of antiviral treatment and changes in blood lipid metabolism in patients with chronic hepatitis C

Lei Li, Ming Luo, Er-Na Yang, Rui Wang, Hui-Qing Wang, Wu-Kui Cao

Lei Li, Ming Luo, Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Er-Na Yang, Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300070, China
Rui Wang, Hui-Qing Wang, Wu-Kui Cao, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin 300070, China
Correspondence to: Wu-Kui Cao, Professor, Tianjin Infectious Disease Hospital, 75 Sudi Road, Nankai District, Tianjin 300070, China. tjcaowk@sina.com
Received: 2012-07-13 Revised: 2012-09-10
Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-10-28

Abstract

AIM: To observe changes in blood lipid metabolism in patients with chronic hepatitis C (CHC) who have received antiretroviral treatment, and to investigate the relationship between efficacy of antiviral treatment and changes in blood lipid metabolism.

METHODS: Seventy-four patients with CHC who have received pegylated interferon α-2α and ribavirin for 48 wk were followed. HCV-RNA quantification and serum levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) at 0, 12, 24, and 48 wk were detected and analyzed.

RESULTS: Sustained virological response (SVR) was found in 43 (58%) patients with CHC, and 31 (42%) patients had non-sustained virological response (Non-SVR). Although the SVR group had lower serum levels of TG, TC, HDL-C and higher serum levels of LDL-C before antiviral treatment, there were no significant differences in these parameters between the two groups. The changes in serum levels of different parameters showed different trends during the treatment. TG levels showed an increasing trend in both groups. Serum levels of HDL-C decreased more visibly in the SVR group than in the non-SVR group, but there was no significant difference between them. The decreasing trend of LDL-C levels was the same between the two groups at the early stage of treatment; however, serum levels of LDL-C gradually increased after 12 wk in the non-SVR group, although serum levels of LDL-C at 48 wk were still lower than baseline level, and HCV-RNA was still detectable. Serum LDL-C was maintained at low levels in the SVR group until the end of treatment, although HCV-RNA was undetectable at this time. After 12 weeks of treatment, serum levels of TC significantly decreased in the SVR group compared to those in the non-SVR group.

CONCLUSION: Efficacy of antiviral treatment is closely associated with changes in blood lipid metabolism in patients with CHC. Our finding that serum levels of LDL-C were low before treatment and rebounded during treatment indicates that the efficacy was not good. Lower serum levels of TC are beneficial to the efficacy of antiviral treatment.

Key Words: Chronic hepatitis C virus; Pegylated interferon α-2α; Ribavirin; Serum lipids

Li L, Luo M, Yang EN, Wang R, Wang HQ, Cao WK. Relationship between efficacy of antiviral treatment and changes in blood lipid metabolism in patients with chronic hepatitis C. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(30): 2961-2965

摘要

目的: 分析比较慢性丙型病毒性肝炎(chronic

■背景资料
聚乙二醇干扰素联合利巴韦林是目前抗丙型肝炎病毒(HCV)标准治疗方案, 但治愈率不高, 既往对抗HCV疗效的预测多集中在病毒本身如病毒的基因型、病毒载量等, 近年来宿主因素对抗病毒疗效的影响也受到很大的关注,其中包括脂代谢、糖代谢等,但是究竟产生什么样的影响有待进一步探讨.

■同行评议者
王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

■研发前沿
基础研究证实HCV的感染与脂代谢密切相关, 本文通过观察干扰素对抗HCV的疗效与血脂变化的关系证明HCV的清除过程亦影响脂代谢.

hepatitis C, HCV)抗病毒治疗前、后血脂变化与治疗疗效的关系, 为评估预后、及时调整治疗方案提供依据.

方法: 选择74例慢性HCV, 给予聚乙二醇干扰素a-2a联合利巴韦林抗病毒治疗, 对其治疗前、治疗12、24、48 wk的HCV-RNA定量和甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)的检测数据进行比较分析.

结果: 74例患者中获得持续病毒学应答(sustained virological response, SVR)者43例(58%), 非持续病毒学应答(non sustained virological response, Non-SVR)组31例(42%). 治疗前SVR组TG、TC、HDL-C、均低于Non-SVR组, LDL-C高于Non-SVR组, 但差异均无显著性. 治疗期间两组的TG、TC、HDL-C、LDL-C的变化趋势各有不同, 两组TG升高趋势基本相同; SVR组比Non-SVR组治疗前有较低的HDL-C水平, 治疗期间降低的程度明显增加, 但差异无显著性; 治疗初期两组患者LDL-C降低趋势基本相同, 治疗至12 wk后 Non-SVR组患者LDL-C出现回升, HCV-RNA检测值仍在检测线以上, 而SVR组LDL-C持续低水平直至治疗结束, 并伴有 HCV-RNA阴转; SVR组TC在治疗12、24、48 wk均处于低下水平, 与Non-SVR组相应指标比较, 差异均有显著性(P = 0.01, 0.01, 0.03).

结论: 慢性丙型肝炎抗病毒治疗疗效与机体血脂水平密切相关, 但相关程度不尽相同, LDL-C在抗病毒治疗前处低水平, 治疗期间出现回升, 预示着HCV清除效果不佳. TC在抗病毒治疗前、后持续低水平, 是获得SVR的明确信号.

关键词: 慢性丙型肝炎; 聚乙二醇干扰素α-2α; 利巴韦林; 血脂

李磊, 罗明, 杨二娜, 王瑞, 王会清, 曹武奎. 慢性丙型肝炎血脂变化与抗病毒疗效的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(30): 2961-2965
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/2961.asp

■相关报道
Negro等详细的报道了HCV的感染扰乱机体的脂代谢, Kuo等报道抗HCV治疗可使患者的低脂血症等得到改善.

0 引言

丙型病毒性肝炎(chronic hepatitis C, HCV)感染会导致脂代谢紊乱, 为了探讨血脂的变化与抗病毒疗效的关系, 我们分析了74例慢性丙型肝炎患者在给予聚乙二醇干扰素α-2α联合利巴韦林抗病毒治疗过程中血脂的变化, 现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-01/2011-01于天津市传染病医院住院确诊为慢性丙型肝炎并接受聚乙二醇干扰素α-2α联合利巴韦林治疗的患者74例, 年龄(49.39岁±10.42岁), 男性34例(45.95%), 体质量指数(body mass index, BMI)(24.29 kg/m^2 ±2.68 kg/m^2), 基因型均为1b型, 除外合并高血压、糖尿病、脂肪肝等其他并发症, 诊断治疗标准参照《丙型肝炎防治指南》[1].

1.2 方法 治疗结束至随访24 wk时, 定性检测HCV-RNA阴性, 分别监测患者治疗0、12、24、48 wk及治疗结束后24 wk的HCV-RNA定量(或定量检测小于最低检测下限)以评价疗效, 依据疗效将其分为持续病毒学应答(sustained virological response, SVR)组和Non-SVR(non sustained virological response, Non-SVR)组, Non-SVR指未达到SVR者包括复发和治疗无效者; 同时检测血脂血清甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 血常规, 生化等相关项目. 患者均给予乙二醇干扰素α-2α联合利巴韦林180 μg皮下注射, 1次/wk, 中性粒细胞计数<1.0×10^9/L或血小板者<50×10^9/L给予135 μg, 口服利巴韦林1 200 mg/d, 疗程48 wk, 白细胞计数<0.75×10^9/L临时给予粒细胞集落刺激因子肌肉注射治疗, 血红蛋白低于100 g/L时利巴韦林减量, 低于80 g/L时停药.

统计学处理 应用SPSS17.0处理所得数据, 两样本间的比较采用两独立样本t检验, 计数资料采用χ^2检验, 血脂的变化采用重复测量方差分析, 以P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 SVR组与Non-SVR组治疗前的相关指标 治疗前两组数据包括TG、TC、LDL-C、HDL-C等的相关指标比较均无统计学差异(P>0.05, 表1).

2.2 甘油三酯水平在治疗过程中的变化 通过重复测量数据的方差分析可见两组患者在抗病毒治疗过程中TG水平的变化是逐渐升高, 并且SVR组的升高较为明显, 从治疗前的1.00 mmol/L ±0.45 mmol/L逐渐升高到48 wk时的1.71 mmol/L

■创新盘点
本文观察了抗HCV治疗的疗效与血脂变化的关系, 为临床预测抗病毒疗效提供依据, 并为进一步研究提高抗病毒疗效提出了新的研究方向和思路.

表 1 SVR组与Non-SVR组起始治疗时的基本情况比较

	SVR	Non-SVR	*P*值
n(男/女)	43(20/23)	31(14/17)	
年龄(岁)	48.84 ± 11.07	50.16 ± 9.55	0.59
BMI(kg/m^2)	24.34 ± 2.89	24.23 ± 2.40	0.87
起始RNA(× 10^5 copies/mL)	18.23 ± 76.16	8.18 ± 11.84	0.47
炎症反应程度(0-2/3-4)	33/10	27/4	1.00
纤维化程度(0-2/3-4)	39/4	21/10	1.00
血糖(mmol/L)	5.13 ± 0.42	5.10 ± 0.60	0.78
白蛋白(g/L)	41.64 ± 5.75	41.30 ± 3.00	0.77
谷丙转氨酶(μ/L)	89.54 ± 72.36	84.68 ± 71.18	0.78
谷草转氨酶(μ/L)	72.97 ± 41.00	59.28 ± 36.71	0.14
总胆红素(μmol/L)	20.11 ± 7.19	19.96 ± 10.91	0.95
白细胞(× 10^9/L)	4.87 ± 1.23	4.45 ± 1.23	0.15
中性粒细胞(× 10^9/L)	2.90 ± 0.67	3.03 ± 1.00	0.54
血小板(× 10^9/L)	150.95 ± 47.19	163.81 ± 44.80	0.24
甘油三酯(mmol/L)	1.00 ± 0.45	1.14 ± 0.42	0.17
总胆固醇(mmol/L)	4.46 ± 1.00	4.66 ± 0.77	0.35
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.06 ± 0.29	1.08 ± 0.21	0.74

SVR: 持续病毒学应答; Non-SVR: 非持续病毒学应答; BMI: 体质量指数.

表 2 丙型肝炎患者联合抗病毒治疗期间血脂变化的比较 (mmol/L)

检测时间	TG			TC			LDL-C			HDL-C		
	SVR	Non-SVR	*P*值	SVR	Non-SVR	*P*值	SVR	Non-SVR	*P*值	SVR	Non-SVR	*P*值
治疗起始	1.00 ± 0.45	1.14 ± 0.42	0.17	4.46 ± 1.00	4.66 ± 0.77	0.35	2.47 ± 0.57	2.28 ± 0.48	0.13	1.06 ± 0.29	1.08 ± 0.21	0.74
12 wk	1.41 ± 0.53	1.43 ± 0.45	0.85	3.91 ± 0.79	4.39 ± 0.73	0.01[a]	2.12 ± 0.46	2.10 ± 0.44	0.85	0.91 ± 0.21	0.97 ± 0.20	0.22
24 wk	1.62 ± 0.53	1.55 ± 0.47	0.57	3.91 ± 0.79	4.35 ± 0.65	0.01[a]	2.05 ± 0.44	2.15 ± 0.42	0.34	0.87 ± 0.21	0.92 ± 0.18	0.24
48 wk	1.71 ± 0.47	1.62 ± 0.43	0.41	3.96 ± 0.91	4.41 ± 0.75	0.03[a]	2.03 ± 0.41	2.23 ± 0.53	0.08	0.87 ± 0.17	0.94 ± 0.31	0.21

TG: 甘油三酯; TC: 总胆固醇; LDL-C: 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇; SVR: 持续病毒学应答; Non-SVR: 非持续病毒学应答.

±0.47 mmol/L. Non-SVR组的TG升高不明显, SVR组和Non-SVR组的升高趋势相同, 两组间比较无统计学差异(P = 0.98, 表2).

2.3 总胆固醇水平在治疗过程中的变化 两组患者在抗病毒治疗过程中TC水平较治疗前均降低, SVR组从治疗前的4.46 mmol/L±1.00 mmol/L逐渐降低到治疗48 wk的3.96 mmol/L±0.91 mmol/L, Non-SVR组从治疗前的4.66 mmol/L±0.77 mmol/L逐渐降低到治疗48 wk的4.41 mmol/L±0.75 mmol/L, 两组间TC水平从治疗开始约12 wk至治疗结束相比有统计学差异(P = 0.01, 0.01, 0.03, 表2).

2.4 低密度脂蛋白胆固醇水平在治疗过程中的变化 SVR组患者LDL-C水平在治疗过程中逐渐降低, 从治疗前的2.47 mmol/L±0.57 mmol/L逐渐降低至治疗48 wk的2.04 mmol/L±0.41 mmol/L; Non-SVR组在抗病毒治疗起始阶段降低即由治疗前的2.28 mmol/L±0.48 mmol/L降低至治疗12 wk的2.10 mmol/L±0.44 mmol/L, 然后又逐渐回升至48 wk的2.23 mmol/L±0.53 mmol/L, 两组间LDL-C的变化趋势不同, 但比较两组间LDL-C的水平变化无统计学差异(P = 0.84, 表2).

2.5 高密度脂蛋白胆固醇水平在治疗过程中的变化 两组患者在抗病毒治疗后HDL-C水平均

■名词解释
低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C): 富含胆固醇的脂蛋白, 亦是动脉粥样硬化的危险因素之一, 基础研究证实他与HCV感染肝细胞相关.

较治疗前降低, SVR组从治疗前的1.06 mmol/L±0.29 mmol/L逐渐降低到治疗48 wk的0.87 mmol/L±0.17 mmol/L, Non-SVR组从治疗前的1.08 mmol/L±0.21 mmol/L逐渐降低到治疗48 wk的0.94 mmol/L±0.31 mmol/L, 两组间HDL-C的变化趋势相同, 比较两组间HDL-C水平变化无统计学差异(P = 0.27, 表2).

3 讨论

近来大量研究证明丙型肝炎病毒(hepatits C virus, HCV)的感染会导致脂代谢紊乱, 基础研究证实HCV感染肝细胞的过程如进入、复制、分泌与机体的脂代谢密切相关从而扰乱机体的脂代谢引起低脂血症、肝细胞脂肪变、胰岛素抵抗[2]. 抗病毒治疗可使低脂血症等得到改善[3]. 一些研究认为治疗前LDL-C和TC较高的患者有较好的病毒学应答率[4]. 但也有学者认为血脂变化多发生在抗病毒治疗期间, 其报道结果不尽相同[5,6].

本文对74例慢性丙型肝炎患者给以聚乙二醇干扰素α-2α联合利巴韦林治疗, 并于治疗前、治疗12、24、48 wk进行TG、TC、HDL-C、LDL-C和HCVRNA的检测. 经对治疗满48 wk后SVR和Non-SVR两组检测数据比较显示, 治疗前SVR组TG、TC、HDL-C、均低于Non-SVR组, LDL-C高于Non-SVR组, 但统计学处理差异均无显著性, 因此推测治疗前患者TG、TC、HDL-C、LDL-C的水平高低与抗病毒疗效关系不紧密. 但在抗病毒治疗过程中SVR和Non-SVR两组患者的TG、TC、HDL-C、LDL-C的变化趋势各有不同, 两组TG水平均逐渐升高, 随着治疗时间的延长TG升高趋势基本相同, 差异无显著性. 有研究发现应用干扰素治疗可以导致患者TG水平升高[6,7], 亦有用干扰素治疗其他疾病导致TG水平升高的报道[8,9]. 综合分析TG升高可能与干扰素药物本身可以抑制脂蛋白脂肪酶和甘油三酯脂酶的活性有关[10,11], 而与抗病毒疗效无明显的相关性.

Ramcharran等[12]发现抗病毒疗效与HDL-C水平相关, Harrison等[13]也发现治疗前较低的HDL-C水平的患者临床上易获得SVR, 推测HDL-C可以调节HCV进入肝细胞的途径, HDL-C水平的降低有利于获得更好的抗病毒疗效[14]. 但本研究结果显示, 两组患者HDL-C水平在治疗期间逐渐降低的变化趋势相同, SVR组比Non-SVR组治疗前有较低的HDL-C水平, 并且在治疗过程中SVR组降低的程度也明显于Non-SVR组, 但统计学处理差异均无显著性, 即不能证明HDL-C水平与治疗疗效的相关关系, 需扩大观察病例进一步验证.

在抗病毒治疗初期SVR、Non-SVR两组患者LDL-C逐渐降低趋势相似, 但随着治疗时间延长至12 wk后, LDL-C变化趋势显示不同, 即Non-SVR组患者LDL-C出现回升, 此时HCV-RNA定量检测值仍在检测线以上; 而SVR组LDL-C持续低水平直至治疗结束, 并伴有HCV-RNA阴转. 提示LDL-C的动态变化与病毒的清除有关, 这可能与HCV在血液中是以脂病毒样颗粒(lipoviroparticles, LVP)的形式存在有关, 即HCV被清除的同时与之结合的LDL-C随之减低.

在抗病毒治疗过程中TC的变化与其他指标不同, 与Non-SVR组相比SVR组在治疗前TC即处于低水平, 治疗至12、24、48 wk时持续低下, 在相同的时间截点与Non-SVR组相应指标比较, 差异均有显著性. 这种血脂变化趋势与Christian等报道相一致[15]. 表明在抗病毒治疗前及治疗期间TC始终处于低水平, 是易获得SVR的预测指标之一.

总之, 通过观察74例慢性丙型肝炎抗病毒治疗前、后血脂变化提示, 抗病毒治疗疗效与机体血脂水平密切相关, 但各监测指标的相关程度不尽相同: 与TG、HDL-C关系不甚明显; LDL-C在抗病毒治疗前处低水平, 治疗期间出现回升, 预示着HCV清除效果不佳; TC在抗病毒治疗前、后持续低水平, 是获得SVR的明确信号. 如果在抗病毒治疗前、后人为控制血脂变化是否能促进SVR的提高, 有待进一步观察.

4 参考文献

1 中华医学会肝病学分会, 传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 194-198
2 Negro F. Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut* 2010; 59: 1279-1287
3 Kuo YH, Chuang TW, Hung CH, Chen CH, Wang JH, Hu TH, Lu SN, Lee CM. Reversal of hypolipidemia in chronic hepatitis C patients after successful antiviral therapy. *J Formos Med Assoc* 2011; 110: 363-371
4 Backus LI, Boothroyd DB, Phillips BR, Mole LA. Predictors of response of US veterans to treatment for the hepatitis C virus. *Hepatology* 2007; 46: 37-47
5 Hamamoto S, Uchida Y, Wada T, Moritani M, Sato S, Hamamoto N, Ishihara S, Watanabe M, Kinoshita Y. Changes in serum lipid concentrations in patients with chronic hepatitis C virus positive hepatitis responsive or non-responsive to interferon therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 204-208
6 Naeem M, Bacon BR, Mistry B, Britton RS, Di Bisce-

glie AM. Changes in serum lipoprotein profile during interferon therapy in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2468-2472
7 Ruiz-Moreno M, Carreño V, Rúa MJ, Cotonat T, Serrano B, Santos M, Marriott E. Increase in triglycerides during alpha-interferon treatment of chronic viral hepatitis. *J Hepatol* 1992; 16: 384
8 Peñarrubia MJ, Steegmann JL, Lavilla E, Casado F, Requena MJ, Picó M, Arranz R, Fernández-Rañada JM. Hypertriglyceridemia may be severe in CML patients treated with interferon-alpha. *Am J Hematol* 1995; 49: 240-241
9 Olsen EA, Lichtenstein GR, Wilkinson WE. Changes in serum lipids in patients with condylomata acuminata treated with interferon alfa-n1 (Wellferon). *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 286-289
10 Shinohara E, Yamashita S, Kihara S, Hirano K, Ishigami M, Arai T, Nozaki S, Kameda-Takemura K, Kawata S, Matsuzawa Y. Interferon alpha induces disorder of lipid metabolism by lowering postheparin lipases and cholesteryl ester transfer protein activities in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997; 25: 1502-1506
11 Grunfeld C, Dinarello CA, Feingold KR. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and interferon alpha stimulate triglyceride synthesis in HepG2 cells. *Metabolism* 1991; 40: 894-898
12 Ramcharran D, Wahed AS, Conjeevaram HS, Evans RW, Wang T, Belle SH, Yee LJ. Associations between serum lipids and hepatitis C antiviral treatment efficacy. *Hepatology* 2010; 52: 854-863
13 Harrison SA, Rossaro L, Hu KQ, Patel K, Tillmann H, Dhaliwal S, Torres DM, Koury K, Goteti VS, Noviello S, Brass CA, Albrecht JK, McHutchison JG, Sulkowski MS. Serum cholesterol and statin use predict virological response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatology* 2010; 52: 864-874
14 Dreux M, Pietschmann T, Granier C, Voisset C, Ricard-Blum S, Mangeot PE, Keck Z, Foung S, Vu-Dac N, Dubuisson J, Bartenschlager R, Lavillette D, Cosset FL. High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 2006; 281: 18285-18295
15 Lange CM, von Wagner M, Bojunga J, Berg T, Farnik H, Hassler A, Sarrazin C, Herrmann E, Zeuzem S. Serum lipids in European chronic HCV genotype 1 patients during and after treatment with pegylated interferon-α-2a and ribavirin. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 1303-1307

■同行评价
本文研究了抗HCV疗效与甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇的关系, 发现丙型肝炎抗病毒疗效与血脂水平密切相关, 并为临床预测抗病毒疗效提供了依据, 学术价值较好.

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

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: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. P值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, t = 4.56 *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐.“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃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 cm×4.5 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.

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2966-2970
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

《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《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服*po*, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$不能写成tl/2或$T\frac{1}{2}$, *V*max不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et* Arn.*var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; Ibid, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), S(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, ℃), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max}, C_{max}, *V*d, $T_{1/2}$ *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kD改为M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、－及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 ℃±1.2 ℃, 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1×10^{12}/L, WBC数用1×10^{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_2结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10^{-3} g与5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg•d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO_2, 50 mL/L CO_2; 1∶1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6}; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

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: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ^2; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写υ; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用$^aP<0.05$, $^bP<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第三套为$^eP<0.05$, $^fP<0.01$等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L±0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean±SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g±420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48→23.5→24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母≤100, 百分数到个位; 101≤分母≤1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名，按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 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: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. *P*值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, $t = 4.56$ *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. "空白"表示无此项或未测, "-"代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用*t*/min, *c*/(mol/L), *p*/kPa, *V*/mL, *t*/℃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[1]报告……, 潘伯荣等[2-5]认为……; PCR方法敏感性高[6-7]. 文献序号作正

《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/lcjy.asp

4.7 病例报告写作格式实例

http://www.wjgnet.com/1009-3079/blbg.asp

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf. 审稿过程平均时间需要14-28 d. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 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、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

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
http: //www.wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年10月28日; 20(30): 2971
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

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: lijiuyi@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: lijiuyi@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•

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!

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

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

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

高英堂 研究员
天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

何裕隆 教授
中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科

黄志勇 教授
华中科技大学同济医院普外科

姜波健 教授
上海交通大学医学院附属第三人民医院普通外科

姜慧卿 教授
河北医科大学第二医院消化科

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李涛 副主任医师
北京大学人民医院肝胆外科

李志霞 教授
首都医科大学附属北京同仁医院普外科

禄韶英 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

毛高平 教授
中国人民解放军空军总医院

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

汤华 研究员
重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室

王炳元 教授
中国医科大学附属第一医院消化内科

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王悦华 副主任医师
首都医科大学附属宣武医院外科

徐辉雄 教授
同济大学附属第十人民医院暨上海市第十人民医院超声科

徐泱 副主任医师
复旦大学附属中山医院肝外科复旦大学肝癌研究所

杨江华 副教授
皖南医学院弋矶山医院感染科

杨钦河 教授
暨南大学医学院中医系

姚树坤 教授
卫生部中日友好医院消化内科

于颖彦 教授
上海市瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

张占卿 主任医师
上海市复旦大学公共卫生中心肝脏病学、传染病学

赵刚 副教授
协和医院胰腺病研究所

智绪亭 教授
山东大学齐鲁医院普外科

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年11月18日; 20(32): 3130-3134
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

研究快报 RAPID COMMUNICATION

hCTB006联合伊立替康对胃癌细胞BGC823、SGC7901协同杀伤的作用机制

王 晓, 宁守斌, 沈恩允, 郭雷鸣

■背景资料
化疗在胃癌的研究中占重要的地位, 但目前有效的治疗方案并不多, 因此寻找安全有效的治疗方案成为临床研究的热点.

王晓, 河北北方学院病理与病理生理学专业 河北省张家口市 075000
宁守斌, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100142
沈恩允, 郭雷鸣, 北京同为时代生物技术有限公司 北京市 100176
作者贡献分布: 此课题由王晓与宁守斌设计; ELISA和Western blot检测由王晓、沈恩允及郭雷鸣完成; 数据分析及论文写作由王晓与宁守斌完成.
通讯作者: 宁守斌, 副主任医师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院消化内科.
ning-shoubin@163.com
收稿日期: 2012-07-30 修回日期: 2012-09-12
接受日期: 2012-11-02 在线出版日期: 2012-11-18

Synergistic cytotoxic effect of anti-human DR5 monoclonal antibody hCTB006 and irinotecan on gastric cancer BGC823 and SGC7901 cells

Xiao Wang, Shou-Bin Ning, En-Yun Shen, Lei-Ming Guo

Xiao Wang, Department of Pathology and Pathophysiology, Hebei North College, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China
Shou-Bin Ning, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China
En-Yun Shen, Lei-Ming Guo, Cotimes Biotech, Beijing 100142, China
Correspondence to: Shou-Bin Ning, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China. ning-shoubin@163.com
Received: 2012-07-30 Revised: 2012-09-12
Accepted: 2012-11-02 Published online: 2012-11-18

Abstract

AIM: To explore the cytotoxic effect of combined anti-human DR5 monoclonal antibody hCTB006 and irinotecan on human gastric cancer BGC823 and SGC7901 cells *in vitro*.

METHODS: The cytotoxic effect of hCTB006 and irinotecan, alone or in combination, was evaluated using ATP lite assay. DR5 expression in tumor cells was examined using ELISA. The level of cytoplasmic XIAP was detected by Western blot.

RESULTS: Irinotecan exerted a cytotoxic effect on gastric cancer cells in a concentration-dependent manner, while the effect of hCTB006 on gastric cancer cells was not concentration-dependent. hCTB006 combined with irinotecan resulted in a synergistic cytotoxic effect on BGC823 cells, but not on SGC7901 cells. Irinotecan treatment did not significantly alter DR5 expression. Combined irinotecan and hCTB006 down-regulated XIAP expression in BGC823 cells, but not in SGC7901 cells.

CONCLUSION: Irinotecan can inhibit the growth of gastric cancer dose-dependently. Anti-human DR5 monoclonal antibody hCTB006 and irinotecan exert a synergistic cytotoxic effect on gastric cancer cells possibly by regulating the expression of XIAP.

Key Words: Gastric cancer; TRAIL; Death receptor 5; XIAP; Irinotecan; Synergism

Wang X, Ning SB, Shen EY, Guo LM. Synergistic cytotoxic effect of anti-human DR5 monoclonal antibody hCTB006 and irinotecan on gastric cancer BGC823 and SGC7901 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(32): 3130-3134

摘要

目的: 研究人死亡受体(death receptor5, DR5)激动型抗体hCTB006联合伊立替康对不同分化程度胃癌细胞BGC823、SGC7901的体外抑瘤作用, 并对其诱导胃癌细胞凋亡的机制进行初步探讨.

方法: 实验将BGC823、SGC7901细胞分为伊立替康组、hCTB006组和两者联合应用组, 应用ATPlite法研究各组药物的体外抑瘤作用; 采用ELISA法研究伊立替康处理胃癌细胞前后DR5表达的变化. 采用Western blot技术检测药物处理前后BGC823、SGC7901细胞X-联锁凋亡抑制蛋白(X-chromosome-linked inhibitory of apoptosis protein, XIAP)的表达变化情况.

结果: BGC823对hCTB006中度敏感, 对SGC7901不敏感, 伊立替康对胃癌细胞的增殖抑制作

■同行评议者
陈国忠, 主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科

用呈浓度依赖性, 与hCTB006联合用药后对BGC823具有良好的协同抑制作用, 但对SGC7901协同作用不明显. ELISA测得伊立替康处理后胃癌细胞DR5的表达量无明显变化. 但伊立替康和hCTB006联合用药可使胃癌细胞BGC823内XIAP水平明显降低, 而对SGC7901细胞内XIAP没有明显作用.

结论: 伊立替康联合hCTB006后对低分化胃癌细胞BGC823的增殖有明显协同抑制作用, 而对中度分化的SGC7901细胞呈拮抗作用, 这种诱导胃癌细胞凋亡的机制可能与其DR5的表达无关, 而与联合作用后细胞抑凋亡蛋白XIAP的表达水平有关.

关键词: 胃癌细胞; 肿瘤坏死因子相关诱导配体受体; 死亡受体5; X-联锁凋亡抑制蛋白; 伊立替康; 协同增效

王晓, 宁守斌, 沈恩允, 郭雷鸣. hCTB006联合伊立替康对胃癌细胞BGC823、SGC7901协同杀伤的作用机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(32): 3130-3134

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3130.asp

0 引言

胃癌是最常见的肿瘤之一. 据统计, 全球每年新发胃癌80余万例, 占所有新发癌症的9%, 每年约有60余万人因胃癌死亡, 居癌症死因的第2位[1]. 手术治疗仍是可能治愈胃癌的唯一手段, 但是即使是早期胃癌的根治手术, 其复发及转移率也较高. 因此化疗在胃癌的治疗中仍占有很重要的位置. 目前临床上常用的化疗方案对胃癌的疗效仍不能令人满意, 需要寻找更加有效、安全的化疗方案. 伊立替康是从天然植物喜树的果实中提取分离的一种微量生物碱, 他主要作用于细胞分裂的S期, 并可选择性地抑制拓扑异构酶Ⅰ, 从而干扰DNA的复制, 达到抗癌的目的[2]. 近年来, 因其作用机制独特, 不易与其他化疗药物产生交叉耐药性而成为临床研究的焦点之一. 分子靶向治疗药物因其对肿瘤细胞的专一选择性及低不良反应成为肿瘤治疗的热点, 而人死亡受体5(death receptor5, DR5)是近年来肿瘤治疗的热点, 与其配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L)或激动型抗体结合后, 能在体内诱导肿瘤细胞凋亡[3]. X-联锁凋亡抑制蛋白(X-chromosome-linked inhibitory of apoptosis protein, XIAP)是凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis, IAPs)家族中的抑凋亡蛋白, 近年来有研究[4]指出, 敲除XIAP可以增加肿瘤细胞对TRAIL的敏感性, 本文旨在探讨联合应用伊立替康与抗人DR5单克隆抗体hCTB006对不同分化程度胃癌细胞的增殖抑制作用, 并初步探讨其作用机制.

■**研发前沿**
目前国内外的研究发现, TRAIL与某些化疗药联合使用后, 可以促进肿瘤细胞凋亡. 也有文献报道, TRAIL联合XIAP的抑制剂后可协同增效, 但目前引起这种现象的机制并不明确.

1 材料和方法

1.1 材料 人死亡受体激动型抗体hCTB006由北京同为时代生物技术有限公司提供; 人胃癌细胞BGC823(低分化细胞)、SGC7901(中分化细胞)购自美国模式菌种收藏所(ATCC); 细胞培养相关材料、胎牛血清购自GIBCO公司; ATPlite试剂盒购自美国PerkinElmer公司(批号: 0RD00694); Goat_anti human IgG(H+L)RPE(批号: 1031-09)、Goat_anti human RPE(批号: A0808-PB59)为Southern Biotech公司产品; 伊立替康为江苏恒瑞药业有限公司产品(批号: 090807). 微孔板发光分析仪(BHP9504-2)为北京滨松光子技术有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将胃癌细胞BGC823、SGC7901培养于含10%胎牛血清、0.1%的青霉素+链霉素DMEM培养液中. 在37 ℃、50 mL/L CO_2的孵箱中, 培养2-5 d后, 用0.25%胰蛋白酶消化, 以1∶2传代, 收集对数生长期且生长状态良好的细胞进行实验.

1.2.2 ATPlite法检测hCTB006与伊立替康合用对胃细胞抑制增殖的影响: (1)实验分组及药物剂量: 把每种胃癌细胞均分为伊立替康、hCTB006组、hCTB006+伊立替康合用组. hCTB006组给予剂量为500.0、250.0、125.0、62.5 μg/mL, 1 h后加入Goat_anti human RPE二抗, 浓度为1 μg/mL; 伊立替康组分别为100.0、50.0、25.0、12.5 μmol/L; hCTB006+伊立替康合用组为50 μmol/L的伊立替康联合以上浓度的hCTB006. 各组均设阴性对照; (2)ATPlite法检测细胞存活率[5]: 用0.25%胰蛋白酶消化胃癌细胞, 用DMEM培养液配成1×10^5/L单个细胞悬液, 按每孔50 μL即5 000细胞/孔接种于96孔板, 37 ℃、50 mL/L CO_2, 培养24 h后加上述各组药物, 每组3个复孔, 终体积为100 μL. 48 h后按ATPlite试剂盒说明检测细胞活率. 数据使用Microplate Manager 5.2.1 软件处理. 细胞存活率(Survival Rate)% = (样品发光值平均值/对照组发光值的平均值)×100%, 3次实验后取平均值. 采用两种药物联合作用系数(combination index, CI)来评价联合用药对肿瘤细胞是否有协同作用, CI = AB/(A×B), 根据细胞发

■相关报道
研究指出，紫花牡荆素、五味子酯、盐酸阿柔比星等抗肿瘤药物均可上调DR5表达，从而增强TRAIL诱导的外源性凋亡通路. 一些报道也指出，TRAIL联合XIAP的抑制剂后，对胰腺癌、神经胶质细胞瘤的生长均有抑制作用.

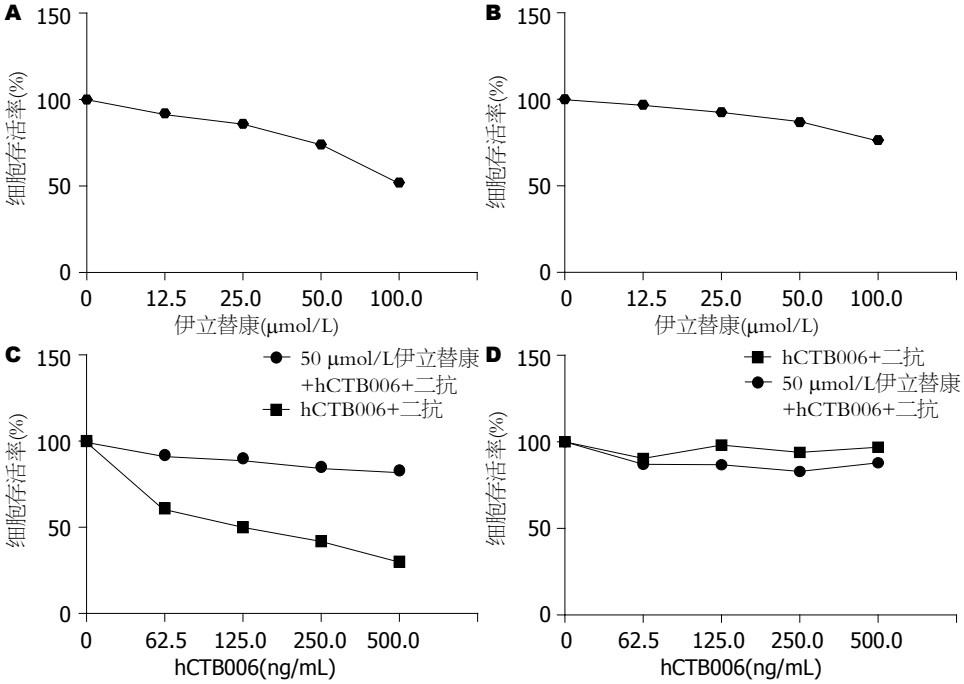


图 1 人源DR5单抗hCTB006、伊立替康以及两者联合作用对BGC823、SGC7901细胞增殖的影响. A: 伊立替康对BGC823增殖影响; B: 伊立替康对SGC7901的增殖影响; C: hCTB006联合伊立替康对BGC823的增殖影响; D: hCTB006联合伊立替康对SGC7901的增殖影响.

光值进行计算, AB为两药联合组发光值与对照组的发光值的比值, A或B是两药单独使用组与对照组发光值的比值. 若CI<1, 则两药作用为协同性质; 如CI = 1, 则两药作用为相加性质; 如CI >1, 则两药作用性质为拮抗性质[6].

1.2.3 ELISA法测定细胞DR5的表达量: 采用CLEIA双抗体夹心法, 将待检样本稀释到同一蛋白浓度, 取包被好的96孔酶标板, 每孔加25 μL校准品或待检样本, 校准品为DR5-rFC, 37 ℃孵育1 h; 用1×PBS洗板5次, 加50 μL酶标抗体, 酶标抗体为HRP anti-DR5, 37 ℃孵育 0.5 h, 1×PBS洗板5次, 加50 μL发光底物, 避光反应3 min检测发光值.

1.2.4 Western blot检测胃癌细胞系BGC823、SGC7901细胞XIAP的变化: 将胃癌细胞BGC823、SGC7901按每孔接种5×10^5个细胞于6孔板中培养过夜. 加药组为伊立替康5 μmol/L; hCTB006: 1 000 ng/mL, 联合用药组为hCTB006(1 000 ng/mL)+伊立替康(50 μmol/L); 设阴性对照组; 总体积为1 mL, 培养24 h. 收集胃癌细胞BGC823、SGC7901, 3 000 r/min; 冰上裂解后, 12 000 r/min, 离心5 min, 取上清, BCA法蛋白定量. 电泳, 配制10%的分离胶和5%浓缩胶, 蛋白上样量均为20 μg, 恒流至预染的maker充分分离. 转膜, 100 V电压转膜1 h. 封闭, 5%的脱脂牛奶封闭过夜. XIAP: β-actin按1∶3 000稀释, 室温孵育1 h后, 用TBST洗膜3次, 10 min/次. 加入山羊抗小鼠二抗, 按1∶3 000稀释, 室温孵育1 h, TBST洗3遍, ECL显影曝光.

统计学处理 用SPSS13.0软件进行统计学分析, 组间比较采用ANOVA方差分析和t检验, P<0.05存在统计学意义.

2 结果

2.1 人源DR5单抗hCTB006与伊立替康联合应用对不同分化程度胃癌细胞的作用 伊立替康、hCTB006单药以及两者联合用药对两种胃癌细胞存活率的影响各不相同(图1). 伊立替康单药对胃癌细胞的抑制增殖作用呈浓度依赖性, 浓度越高抑制作用越明显; hCTB006单药对胃癌细胞SGC7901的抑制增殖作用较弱, 而对BGC823增殖有一定的抑制作用(P<0.05). 研究表明50 μmol/L伊立替康单独作用于BGC823、SGC7901细胞48 h, 细胞存活率分别为74%、87%, 250 ng/mL hCTB006单独作用BGC823、SGC7901细胞48 h, 细胞的存活率分别为85%、94%, 然而当50 μmol/L伊立替康与250 ng/mL的hCTB006联合用药时, BGC823细胞的存活率降低到42%, 而SGC7901的存活率为83%. 根据两种药物联合作用CI来评价联合用药对肿瘤细胞是否有协同作用, 可见两者联合作用后, 对BGC823有协同作用(CI = 0.67<1), 但对

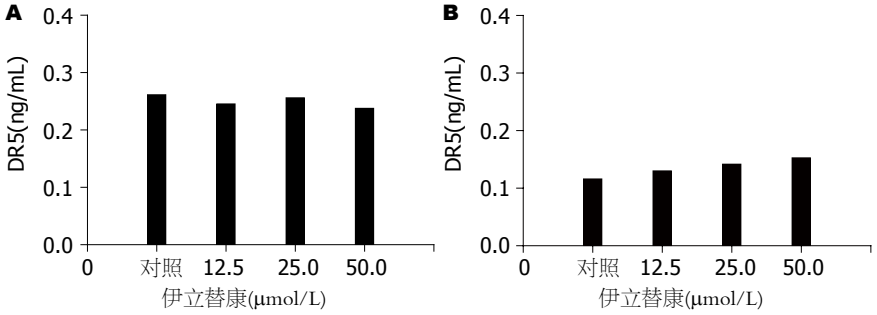


图 2 不同浓度伊立替康对两种胃癌细胞DR5表达水平的影响. A: 伊立替康对BGC823DR5表达的影响; B: 伊立替康对7901DR5表达的影响.

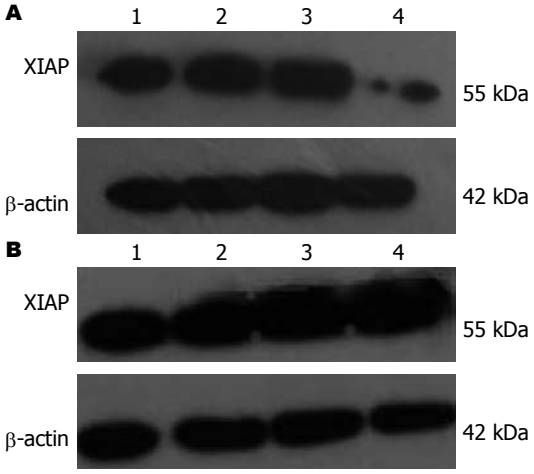


图 3 Western blot检测结果. A: BGC823为Western blot检测结果; B: SG7901为Western blot检测结果; 1: 空白对照; 2: 伊立替康(50 μmol/L); 3: HCTB006(con: 500 ng/mL); 4: HCTB006(500 ng/mL)+伊立替康(50 μmol/L).

SGC7901表现为拮抗作用(CI = 1.01>1).

2.2 ELSA法检测伊立替康对两种胃癌细胞DR5表达的影响 不同浓度的伊立替康作用于胃癌细胞BGC823、SGC7901后, 两者DR5的表达量均没有明显变化(图2).

2.3 Western blot 检测hCTB006及伊立替康单用及联合作用对胃癌细胞BGC823、SGC7901细胞内凋亡相关蛋XIAP表达的影响 Western blot检测结果表明: 联合用药24 h后, 胃癌细胞BGC823细胞内凋亡相关蛋白XIAP表达下降(图3A), 而对SGC7901细胞内XIAP的表达并无明显影响(图3B).

3 讨论

TRAIL又名凋亡素2配体(Apo2L), 是TNF超家族中的一员, 目前发现其有5个受体能与TRAIL进行特异性结合, 其中DR5和DR4与其配体结合后可传导TRAIL凋亡信号, 其他3个受体诱骗受体1、诱骗受体2和OPG能够阻止TRAIL凋亡信号的传导而抵抗TRAIL诱导的细胞凋亡. TRAIL与DR4或DR5结合后, 将通过带有死亡结构域的Fas相关蛋白(Fas-associated death domain, FADD)活化caspase-8和caspase-10, 并与之形成死亡诱导信号复合体(DISC), 从而激活下游caspase-3、caspase-6和caspase-7, 最终执行细胞的凋亡程序[7]. TRAIL在肿瘤治疗中有良好的效果, 但是和其他抗肿瘤药物一样, 某些恶性肿瘤对TRAIL并不敏感. 有文章报道[8-10]某些化疗药可以提高肿瘤细胞DR5的表达从而增加TRAIL的敏感性, 如紫花牡荆素、五味子酯、盐酸阿柔比星均可以通过上调细胞DR5的表达从而增强TRAIL的敏感性诱导细胞凋亡. 但TRAIL对人正常肝细胞有不良反应作用. 因此, 如何避免在解决TRAIL耐药性后对正常组织造成损伤仍有待研究. 实验表明抗人DR5单克隆抗体能模拟TRAIL诱导肿瘤细胞凋亡, 且对人正常肝细胞没有不良反应作用[11,12].

我们采用ATPlite法检测伊立替康, hCTB006及其两者联合对胃癌细胞BGC823、SGC7901的杀伤作用, 结果显示50 μmol/L伊立替康单独作用BGC823、SGC7901细胞48 h, 细胞存活率分别为74%、87%, 250 ng/mL hCTB006单独作用BGC823、SGC7901细胞48 h, 细胞的存活率分别为85%、94%, 并没有明显抑制细胞的生长; 然而当50 μmol/L伊立替康与250 ng/mL的hCTB006联合作用时, BGC823细胞的存活率降低到42%, 而SGC7901的存活率为83%. 对BGC823有明显的协同作用, 对SGC7901则表现为拮抗作用. 实验结果显示hCTB006与伊立替康联合作用于BGC823、SGC7901效果是不一样的, 对于低分化的BGC823作用较中分化的SGC7901要显著. 这说明不同分化程度的胃癌细胞对化疗药物联合作用敏感性不同. 组间比较采用单因素的方差分析, 联合用药组与单独用

■创新盘点
本文采用ELISA方法检测细胞DR5的表达, 这种方法不但可以反映细胞整体DR5的动态变化, 亦可作为DR5的定量检测指标.

■应用要点
本文为化疗药物伊立替康与分子靶向药物hCTB006联合作用于胃癌机制的研究, 为临床治疗方案的选择及个体化治疗提供一定的参考价值.

■同行评价
该研究选题新颖,实验设计尚合理,具有一定的科学意义.

药组比较,有显著性差异.

我们采用ELISA方法检测细胞DR5的表达量,这种方法不仅可以检测细胞膜表面DR5的表达量, 而且反映膜内膜外DR5的动态变化, 其可作为DR5的定量检测. ELISA结果表明用伊立替康处理胃癌细胞BGC823、SGC7901 48 h后, DR5的表达量无明显变化, 伊立替康可能未上调DR5的表达.

Vogler等[13]研究发现, TRAIL联合使用XIAP的抑制剂后, 体内体外实验均可以抑制胰腺癌的进展. Siegelin等[14]也发现TRAIL与XIAP的抑制剂恩倍素联合作用于神经胶质瘤细胞后可协同增效. 因此我们采用Western blot方法检测细胞内XIAP的表达, 进一步探讨两者之间的关系. 从Western blot结果来看, 伊立替康与hCTB006联合作用于BGC823后, 细胞内抑制凋亡蛋白XIAP水平明显降低, 而在SGC7901细胞中XIAP的表达有上调的趋势. 由此可见, 伊立替康联合作用hCTB006对低分化的胃癌细胞BGC823的协同作用可能与XIAP的下调有关, 而对中分化胃癌细胞SGC7901的拮抗作用可能XIAP的上调有关. XIAP是抑凋亡蛋白家族IAP中最有效的caspase抑制物, 可以通过抑制caspase-3和caspase-7的活性来抑制细胞凋亡[15]. 本实验通过研究伊立替康与hCTB006联合作用于低分化的BGC823细胞和中分化的SGC7901, 发现TRAIL介导的细胞凋亡途径可能与细胞内XIAP的表达有关. 其作用机制可能是: 在低分化BGC823细胞中联合用药可使肿瘤细胞内XIAP的表达下降, 从而对caspase的抑制作用减弱, 促进了TRAIL介导的细胞凋亡通路, 而在SGC7901细胞中XIAP的表达升高, 对caspase的抑制作用增加, 阻碍了TRAIL介导的凋亡通路. 联合用药对于不同分化程度的胃癌细胞存在差异, 其作用机制需进一步深入研究. 本文为抗肿瘤药物的开发提供了一个新方向, 也对以后临床联合使用化疗药物提供了参考.

4 参考文献

1 徐飚, 王建明. 胃癌流行病学研究. 中华肿瘤防治杂 2006; 13: 1
2 张天泽. 肿瘤学. 天津: 天津科技出版社, 1996: 1464-1465
3 Holoch PA, Griffith TS. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 63-72
4 Sensintaffar J, Scott FL, Peach R, Hager JH. XIAP is not required for human tumor cell survival in the absence of an exogenous death signal. *BMC Cancer* 2010; 10: 11
5 Cree IA, Andreotti PE. Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. *Toxicol In Vitro* 1997; 11: 553-556
6 Chou TC. Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 2059-2080
7 Wiezorek J, Holland P, Graves J. Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1701-1708
8 Yang J, Yang Y, Tian L, Sheng XF, Liu F, Cao JG. Casticin-induced apoptosis involves death receptor 5 upregulation in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4298-4307
9 Inoue H, Waiwut P, Saiki I, Shimada Y, Sakurai H. Gomisin N enhances TRAIL-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptors 4 and 5. *Int J Oncol* 2012; 40: 1058-1065
10 Horinaka M, Yoshida T, Nakata S, Shiraishi T, Tomosugi M, Yoshikawa S, Wakada M, Sakai T. Aclarubicin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis through death receptor 5 upregulation. *Cancer Sci* 2012; 103: 282-287
11 Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; 6: 564-567
12 Kari JA. Pregnancy outcome in connective tissue diseases. *Saudi Med J* 2001; 22: 590-594
13 Vogler M, Walczak H, Stadel D, Haas TL, Genze F, Jovanovic M, Gschwend JE, Simmet T, Debatin KM, Fulda S. Targeting XIAP bypasses Bcl-2-mediated resistance to TRAIL and cooperates with TRAIL to suppress pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2008; 68: 7956-7965
14 Siegelin MD, Gaiser T, Siegelin Y. The XIAP inhibitor Embelin enhances TRAIL-mediated apoptosis in malignant glioma cells by down-regulation of the short isoform of FLIP. *Neurochem Int* 2009; 55: 423-430
15 Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; 14: 231-243

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年11月18日; 20(32): 3140-3153
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

术前放化疗与单纯手术治疗可切除食管癌的Meta分析

王亚梅, 王 峰, 何 炜, 樊青霞

■背景资料
中国食管癌粗发病率和死亡率均居世界第1位. CRTS治疗可切除食管癌得到越来越多的关注, 已进行大量的临床研究, 但研究结果不一致.

王亚梅, 王峰, 何炜, 樊青霞, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052
王亚梅, 主要从事食管恶性肿瘤综合治疗方面的研究.
河南省科技厅科技攻关基金资助项目, No. 072102310054
作者贡献分布: 此课题由王峰与樊青霞设计; 研究过程由王亚梅、王峰及何炜操作完成; 文献筛选和质量评价由王峰与何炜完成; 数据的提取由王亚梅与何炜完成; 统计方法由王亚梅、王峰及何炜完成, 本论文写作由王亚梅与王峰完成.
通讯作者: 樊青霞, 教授, 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科.
fxq2243@yahoo.com.cn
收稿日期: 2012-08-06 修回日期: 2012-09-01
接受日期: 2012-10-29 在线出版日期: 2012-11-18

Preoperative chemoradiotherapy followed by surgery versus surgery alone for resectable oesophageal carcinoma: A meta-analysis

Ya-Mei Wang, Feng Wang, Wei He, Qing-Xia Fan

Ya-Mei Wang, Feng Wang, Wei He, Qing-Xia Fan, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: the Key Science and Technology Project of Science and Technology Department of Henan Province, No. 072102310054
Correspondence to: Qing-Xia Fan, Professor, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Erqi District, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. fxq2243@yahoo.com.cn
Received: 2012-08-06 Revised: 2012-09-01
Accepted: 2012-10-29 Published online: 2012-11-18

Abstract

AIM: To assess the efficacy of preoperative chemoradiotherapy followed by surgery (CRTS) in the management of resectable esophageal carcinoma.

METHODS: Randomized controlled trials (RCTs) comparing the efficacy of preoperative chemoradiotherapy versus surgery alone (SA) in the treatment of resectable oesophageal carcinoma were searched in PubMed, China National Knowledge Infrastructure (CNKI) and Wan Fang databases. The RevMan 5.1 software was used for meta-analysis.

RESULTS: This meta-analysis included 21 RCTs. Compared to the SA group, the 1-, 3-, and 5-year survival rates were significantly higher in the CRTS group (all $P < 0.05$). The 3- and 5-year survival rates for the Eastern patients, Western patients, patients undergoing concurrent chemoradiotherapy, and patients with squamous cell carcinoma were significantly higher in the CRTS group (all $P < 0.05$). There were no statistical significances in the 3- and 5-year survival rates for patients undergoing sequential chemoradiotherapy or patients with adenocarcinoma between the two groups (all $P > 0.05$). Compared to the RCTS group, the surgery rate in the SA group was higher ($P < 0.05$), while the CRTS group had significantly higher radical resection rate, R0 resection rate and lower postoperative local recurrence rate (all $P < 0.05$). The differences in post-operative complication incidence, post-operative distant metastasis and postoperative mortality rate were not statistically significant between the two groups (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: CRTS can significantly improve the survival and surgical conditions of patients with resectable esophageal carcinoma.

Key Words: Esophageal carcinoma; Chemoradiotherapy followed by surgery; Surgery alone; Randomized controlled trials; Meta-analysis

Wang YM, Wang F, He W, Fan QX. Preoperative chemoradiotherapy followed by surgery versus surgery alone for resectable oesophageal carcinoma: A meta-analysis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(32): 3140-3153

摘要

目的: 探讨术前放化疗(chemoradiotherapy followed by surgery, CRTS)与单纯手术治疗对可切除食管癌患者生存及手术的影响.

方法: 检索PubMed、中国知网和万方数据资源系统中所有CRTS与单纯手术(surgery alone, SA)治疗可切除食管癌的随机对照研究(randomized controlled trial, RCT), 应用RevMan 5.1软件进行Meta分析.

结果: 共21篇文献. CRTS组比SA组提高了1、

■同行评议者
张力为, 副教授, 新疆医科大学第一附属医院胸外科

3、5年生存率, 差异均有统计学意义(P<0.05); 提高了东方、西方、同步放化疗和鳞癌患者3、5年生存率, 差异均有统计学意义(P<0.05). 两组序贯放化疗、腺癌患者3、5年生存率相比差异均无统计学意义(P>0.05). SA组比CRTS组有较高的手术率, 差异有统计学意义(P<0.05); 而CRTS组比SA组有更显著的根治切除率、R0切除率和较低的术后局部复发率, 差异均有统计学意义(P<0.05). 两组术后并发症发生率、远处转移率及死亡率比较，差异均无统计学意义(P>0.05).

结论: CRTS比SA明显改善了可切除食管癌患者的生存预后及手术情况.

关键词: 食管癌; 术前放化疗; 单纯手术; 随机对照研究; Meta分析

王亚梅, 王峰, 何炜, 樊青霞. 术前放化疗与单纯手术治疗可切除食管癌的Meta分析. 世界华人消化杂志 2012; 20(32): 3140-3153

http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3140.asp

0 引言

食管癌是原发于食管黏膜上皮的恶性肿瘤, 全球年新发病约为482 300例, 每年年死亡约406 800例[1], 术后5年总生存率2001年和2005年间保持在30.5%[2]. 目前认为与单一外科手术相比较, 术前放疗对延长总体远期生存作用有限, 化疗增加患者的不良反应, 对提高切除率和完全性切除率不明显[3]. 因此, 近年来食管癌术前放化疗(chemoradiotherapy followed by surgery, CRTS)得到越来越多的关注, 已进行了大量临床研究, 但其是否能改善可切除食管癌患者生存预后及手术情况的研究结果不一致. 为此我们选择关于CRTS对比单纯手术(surgery alone, SA)治疗可切除食管癌的前瞻性临床随机对照研究(randomized controlled trial, RCT)进行Meta分析, 以期为临床决策提供有价值的循证依据.

1 材料和方法

1.1 材料 检索PubMed、中国知网和万方数据资源系统, 检索文献起止时间均为1992-01/2012-04. 所有检索均采用主题词与自由词相结合的方式, 检索词主要包括“neoadjuvant therapy、chemoradiotherapy followed by surgery、chemoradiotherapy、surgery or operation or esophagectomy、esophagus or esophageal cancer or carcinoma”等及对应的中文检索词, 检索语种不限, 同时运用搜索引擎在互联网上查找相关文献, 以期扩大检索范围.

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: (1)研究设计: CRTS与SA治疗可切除食管癌的前瞻性RCT, 无论是否采用盲法; (2)研究对象: 经组织或细胞病理学确诊的未治疗过的可切除食管癌, 且对患者的血常规、肝肾心肺等进行评估, 确认患者能否耐受手术. 原始文献中有明确的随访截止日期的存活例数或有清晰的生存曲线, 随访率>95%.

1.2.2 排除标准: 研究对象为曾接受单独化疗或单独放疗的食管癌患者, 剔除重复报道、信息太少以及数据描述不详的文献.

1.2.3 结局指标: 主要指标为两组1、3和5年生存率, 次要指标为两组手术率、手术根治率、R0切除率、术后局部复发率、术后并发症、术后死亡率和术后远处转移率.

1.2.4 数据提取: 所有数据均由2位评价者提取, 分歧通过协商解决.

统计学处理 采用RevMan 5.1(从Cochrane图书馆下载)软件进行Meta分析. 其结局变量为接受CRTS和SA的患者生存率、术后根治率等发生率之比, 即治疗相对危险度(relative risk, RR). 各纳入研究结果之间的异质性采用χ^2检验, 若纳入研究具有足够一致性(P>0.1)时, 采用固定效应模型计算合并RR及95%可信区间(95%CI); 否则采用随机效应模型. 以P<0.05为差异有统计学意义. 对主要结果进一步行亚组、漏斗图和/或敏感性分析.

2 结果

2.1 文献特征 初检314篇相关文献, 阅读文献标题和摘要后初步纳入RCT59篇, 进一步阅读全文后排除文献38篇(不符合纳入标准11篇, 非随机对照15篇, 回顾性研究10篇, 未发表全文2篇). 最终纳入RCT 21篇, 患者2 755例, 其中CRTS组1 366例, SA组1 389例(表1).

2.2 生存分析 21篇RCT提供1年生存率、20篇提供3年生存率、13篇提供5年生存率, 异质性分析P值分别为0.11、0.38和0.80, 采用固定效应模型分析, 结果两组1、3、5年生存率相比RR(95%CI, P值)分别为1.08(1.03-1.12, P = 0.001)、1.38(1.26-1.50, P<0.00001)、1.41(1.25-1.60, P<0.00001), 差异均有统计学意义(图1).

2.3 亚组分析 对两组种族、放化疗顺序及病理

■**研发前沿**
CRTS与SA相比, 能否明显改善可切除食管癌患者的生存预后及手术情况？迫切需要允许个体化的多学科综合治疗局部晚期食管癌的预测指标, 及更为有效、安全的CRTS方案.

■**创新盘点**
本文提示与SA治疗可切除食管癌相比，CRTS降低了肿瘤术后局部复发率，提高了患者的生存率、肿瘤根治率、R0切除率；提高了东西方、同步放化疗、鳞癌患者3、5年生存率，且不增加术后并发症发生率、死亡率和远处转移率.

表 1 文献检索结果概述和纳入研究的一般特征

作者	年份	国家	放疗方案	化疗方案	放化疗顺序	病例类型	手术前分期	分组	人数(*n*)	男/女(*n*)	中位年龄	中位生存期(mo)	中位随访期(mo)	Jadad评分[4]
Nygaard等[5]	1992	Norway	35 Gy, 1.75 Gy per fraction over 4 wk	Two cycles: cisplatin 20 mg/m^2 d1–5; bleomycin 5 mg/m^2 1–5 d	Sequential	SCC	T1 or T2, Nx, M0	CRTS	47	33/14	60.1	7	18	2
								SA	41	31/10	61.4	7		
Apinop等[6]	1994	Thailand	40Gy, 2 Gy per fraction over 4 wk	Two cycles: cisplatin 100 mg/m^2 1 d; fluorouracil 1000 mg/m^2 1–4 d	Concurrent	SCC	IIb(11); III(57)	CRTS	35	28/7	59.6	9.7	12	1
								SA	34	26/8	59.8	7.4		
Le Prise等[7]	1994	France	40 Gy, 20 Gy in 10 fractions over 12 d	Two cycles: cisplatin 100 mg/m^2 d1, 21; fluorouracil 600 mg/m^2 2–5 d, 22–25 d	Sequential	SCC	I(23); II(63)	CRTS	41	80/6	56	10.2	16	2
								SA	45		59	11		
Walsh[等[8]	1996	Ireland	40 Gy in 15 fractions over 3 wk	Two cycles: cisplatin 75 mg/m^2 d1; fluorouracil 15 mg/kg 1–5 d	Concurrent	AC	not distant metastases	CRTS	58	39/19	65	16	10	2
								SA	55	44/11	65	11		
Bosset等[9]	1997	France	37 Gy, 3.7 Gy per fraction over 2 wk	Two cycles: cisplatin 80 mg/m^2 0–2 d	Sequential	SCC	T1N0(49); T2N0(92); T3N0(76); T1N1 or T2N1(65)	CRTS	143	129/14	56.7	18.6	55.2	3
								SA	139	134/5	56.6	18.6		
Urba等[10]	2001	USA	45 Gy; 1.5 Gy per fraction over 3 wk	Two cycles: cisplatin 20 mg/m^2 1–5 d; fluorouracil 300 mg/m^2 1–21 d; vinblastine 1 mg/m^2 1–4 d	Concurrent	SCC(25%); AC(75%)	not distant metastases	CRTS	50	42/8	62	16.9	98.4	2
								SA	50	43/7	64	17.6		
安丰山等[11]	2003	China	36Gy, 1.2Gy per fraction over 17 d	First cycle: 5–fluorouracil 1 mg/m^2, 5–6 h, 1–5 d; cisplatin 25 mg/m^2.	Sequential	SCC	II, III	CRTS	48	31/17	58.4	42	34.12	3
								SA	50	47/3	63	27.3		

■ **应用要点**
CRTS比SA明显改善了可切除食管癌患者的生存预后及手术情况，而对序贯放化疗和鳞癌患者的3、5年生存率无改善，且最佳用药剂量尚未明确.

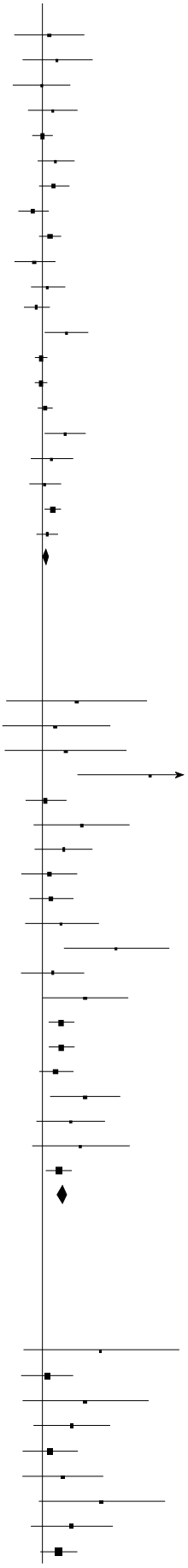
				Second cycle: 5–fluoro–uracil 0.5 g/m^2, 21–25 d; cisplatin 25 mg/m^2, 22–25 d				SA	49	30/19	57.6	28		
Lee等[12]	2004	Korea	45.6 Gy, 1.2 Gy per fraction over 28 d	Two cycles: cisplatin 60 mg/m^2 d1; fluorouracil 1000 mg/m^2 3–5 d	Concurrent	SCC	IIA(36); IIB(22); III(43); N0(36); N1(65)	CRTS	51	46/5	63	28.2	25	2
Burmeister等[13]	2005	Australia	35Gy in 15 fractions over 3 wk	One cycles: cisplatin 80 mg/m^2 d1; fluorouracil 800 mg/m^2 1–4 d	Concurrent	SCC(37%); AC(62%)	T1–3, N0–1	CRTS	128	106/22	61	22.2	65	3
								SA	128	100/28	62	19.3		
Natsugoe等[14]	2006	Japan	40 Gy, 2 Gy per fraction over 4 wk	cisplatin 7 mg over 2 h; 5–fluorouracil 350 mg over 24 h	Concurrent	SCC	II(9); III(24); IV(12)	CRTS	22	–	–	–	24	2
								SA	23	–	–	–		
Tepper等[15]	2008	USA	50.4 Gy, 1.8 Gy per fraction over 5.6 wk	Two cycles: cisplatin 100 mg/m^2 1 d; fluorouracil 1 000 mg/(m^2 · d) 1–4 d	Concurrent	SCC(25%); AC(75%)	T1–3, Nx	CRTS	30	28/2	59.9	53.76	72	2
								SA	26	23/3	62.2	21.48		
彭林等[16]	2008	China	40 Gy, 2 Gy per fraction over 4 wk	Two cycles: cisplatin 75 mg/m^2 1 d; 5–fluorouracil 500 mg/m^2 over 5d	Concurrent	SCC	IIB; III	CRTS	40	30/40	58.4	30	37.5	3
								SA	40	32/8	57.5	24		
金明根等[17]	2008	China	38–44 Gy, 2 Gy per fraction, total 19–22 fractions	Paclitaxe 135 mg/m^2, 1 d,22; cisplatin 20–30 mg/m^2, dl–5, 22–26 d	Concurrent	SCC(92%); AC(8%)	II(26); III(36)	CRTS	30	22/8	49	–	–	3
								SA	30	20/10		–		
Cao等[18]	2009	China	40 Gy, 2 Gy per fraction over 4 wk	cisplatin 20 mg/(m^2 · d) ds1–5; fluorouracil 500 mg/(m^2 · d) 1–5 d; mitomycin 10 mg/(m^2 · d) 1 d	Concurrent	SCC	II(15); III(211); IV(10)	CRTS	118	60/58	–	59	–	2
								SA	118	67/51	–	43		

■同行评价
本文选题较好，文章内容能从多方面进行比较，相对全面，具有一定的临床参考价值.

吕进等[19]	2009	China	40 Gy, 2 Gy/d, d1–5, 8–12, 15–19, 22–26	Two cycles: Paclitaxe 125 mg/m^2, l d;	Concurrent	SCC	IIb(15); III(213); IV(10)	CRTS	119	61/58	–	30.5	–	2
				cisplatin 20 mg/m^2, 1–3 d				SA	119	68/51	–	18.3		
Lv等[20]	2010	China	40 Gy, 2 Gy per fraction over 4 wk	Two cycles: cisplatin 20 mg/(m^2 · d), 1–3 d, 22–25; paclitaxel 135 mg/m^2 starting on 1 d,22 of radiotherapy	Concurrent	SCC	II(71); III(89)	CRTS	80	52/28	–	53	45	2
								SA	80	50/30	–	36		
谢军等[21]	2010	China	45–5l Gy, 2 Gy per faction, d1–5/ week, total 2l–25 fractions	5–fluorouracil 2.4 g/m^2 dl–3, 22–24; cisplatin 75 mg/m^2, 1 d,22	Concurrent	SCC	II(22); III(47); IVa(1)	CRTS	35	27/8	50	–	–	3
								SA	35	25/10		–		
张文山等[22]	2011	China	40 Gy, 1.8–2.0 Gy per fraction over 4 wk	Two cycles 5–fluorouracil 500 mg/m^2, 1–5 d; cisplatin 30 mg/(m^2 · d)	Concurrent	–	III	CRTS	29	18/11	50.4	40	–	3
								SA	40	26/14	52.2	29		
金芳玲等[23]	2011	China	50 Gy, 2 Gy per fraction over 5 wk mg/ (m^2 · d), d1–5	Two cycles: cisplatin 75 mg/ (m^2 · d), d1; 5–fluorouracil 500 mg/(m^2 · d), 1–5 d	Concurrent	SCC(92%); AC(8%)	IIa(10); IIb(9); III(41)	CRTS	30	18/12	54	34	–	2
								SA	30	21/9		22		
van Hagen 等[24]	2012	Netherlands	41.4 Gy, 1.8 Gy per fraction over 4.6 wk	5 wk chemotherapy; carboplatin area under curve = 2 and paclitaxel 50 mg/m^2 on 1 d weekly	Concurrent	SCC(23%); AC(75%)	T1N1 or T2–3N0–1M0	CRTS	178	134/44	60	49.4	45.4	2
								SA	188	152/26	60	24		
杨弘等[25]	2012	China	40Gy, 2Gy per fraction over 4 wk	Two cycles: navelbine 25mg/m^2 1,8,22,29 d;cisplatin 75mg/m^2 1,22 d	Concurrent	SCC	IIB(20) III(113)	CRTS	54	46/8	54	–	–	3

SCC: 鳞癌; AC: 腺癌; CRTS: 术前放化疗; SA: 单纯手术; –: 文中未提及.

Study or Subgroup	CRTS Events	CRTS Total	SA Events	SA Total	Weight	Risk Ratio M-H, Fixed, 95%CI
1.1.1 1年生存率						
(1992)Nygaard等[5]	18	47	14	41	1.60%	1.12 [0l64, 1.96]
(1994)Apinop等[6]	17	35	13	34	1.40%	1.27 [0.74, 2.19]
(1994)Le Prise等[7]	19	41	21	45	2.10%	0.99 [0.63, 1.56]
(1996)Walsh等[8]	30	58	24	55	2.60%	1.19 [0.80, 1.75]
(1997)Bosset等[9]	97	143	94	139	9.90%	1.00 [0.85, 1.18]
(2001)Urba等[10]	36	50	29	50	3.00%	1.24 [0.93, 1.66]
(2003)安丰山等[11]	39	48	33	49	3.40%	1.21 [0.95, 1.53]
(2004)Lee等[12]	35	51	40	50	4.20%	0.86 [0.68, 1.08]
(2005)Burmeister等[13]	93	128	82	128	8.50%	1.13 [0.96, 1.34]
(2006)Natsugoe等[14]	16	22	19	23	1.90%	0.88 [0.64, 1.21]
(2008)Tepper等[15]	25	30	17	30	1.80%	1.47 [1.03, 2.09]
(2008)彭林等[16]	32	40	35	40	3.60%	0.91 [0.75, 1.11]
(2008)金明根[17]	25	30	17	30	1.80%	1.47 [1.03, 2.09]
(2009)Cao等[18]	103	118	105	118	10.90%	0.98 [0.89, 1.08]
(2009)吕进等[19]	103	119	105	119	10.90%	0.98 [0.89, 1.08]
(2010)Lv等[20]		73	80	70	7.30%	1.04 [0.94, 1.16]
(2010)谢军等[21]	29	35	20	35	2.10%	1.45 [1.05, 2.00]
(2011)张文山等[22]	21	29	25	40	2.20%	1.16 [0.83, 1.61]
(2011)金芳玲等[23]	25	30	24	30	2.50%	1.04 [0.82, 1.32]
(2012)van Hagen等[24]	146	178	131	188	13.20%	1.18 [1.05, 1.32]
(2012)杨弘等[25]	46	54	54	69	4.90%	1.09 [0.92, 1.29]
Subtotal(95%CI)		1 366		1 389	100.0%	1.08 [1.03, 1.12]
Total events	1 028		975			
Heterogeneity: Chi^2 = 27.95, df = 20(P = 0.11); I^2 = 28%						
Test for over all effect: Z = 3.26 (P = 0.001)						
1.1.2 3年生存率						
(1992)Nygaard等[5]	8	47	4	41	0.90%	1.74 [0.57, 5.37]
(1994)Apinop等[6]	9	35	7	34	1.50%	1.25 [0.52, 2.97]
(1994)Le Prise等[7]	8	41	6	45	1.20%	1.46 [0.55, 3.86]
(1996)Walsh等[8]	18	58	3	55	0.70%	5.69 [1.77, 18.25]
(1997)Bosset等[9]	51	143	47	139	10.10%	1.05 [0.77, 1.45]
(2001)Urba等[10]	15	50	8	50	1.70%	1.88 [0.87, 4.02]
(2003)安丰山等[11]	25	48	18	49	3.80%	1.42 [0.90, 2.24]
(2004)Lee等[12]	24	51	21	50	4.50%	1.12 [0.72, 1.73]
(2005)Burmeister等[13]	47	128	41	128	8.70%	1.15 [0.82, 1.61]
(2006)Natsugoe等[14]	13	22	10	23	2.10%	1.36 [0.76, 2.43]
(2008)Tepper等[15]	19	30	5	26	1.10%	3.29 [1.43, 7.58]
(2008)彭林等[16]	19	40	16	40	3.40%	1.19 [0.72, 1.96]
(2008)金明根[17]	16	30	8	30	1.70%	2.00 [1.01, 3.95]
(2009)Cao等[18]	86	118	63	118	13.30%	1.37 [1.12, 1.67]
(2009)吕进等[19]	86	119	63	119	13.30%	1.37 [1.11, 1.67]
(2010)Lv等[20]	51	80	41	80	8.70%	1.24 [0.95, 1.63]
(2010)谢军等[21]	22	35	11	35	2.30%	2.00 [1.15, 3.47]
(2011)张文山等[22]	16	29	14	40	2.50%	1.58 [0.92, 2.69]
(2011)金芳玲等[23]	13	30	7	30	1.50%	1.86 [0.86, 4.00]
(2012)van Hagen等[24]	103	178	83	188	17.10%	1.31 [1.07, 1.61]
Subtotal(95%CI)		1 312		1 320	100.00%	1.38 [1.26, 1.50]
Total events	649		476			
Heterogeneity: Chi^2 = 20.32, df = 19 (P = 0.38); I^2 = 6%						
Test for overall effect: Z = 7.27 (P<0.00001)						
1.1.3 5年生存率						
(1994)Apinop等[6]	8	35	3	34	1.10%	2.59 [0.75, 8.95]
(1997)Bosset等[9]	37	143	33	139	11.80%	1.09 [0.73, 1.64]
(2001)Urba等[10]	10	50	5	50	1.80%	2.00 [0.74, 5.43]
(2003)安丰山等[11]	19	48	12	49	4.20%	1.62 [0.88, 2.95]
(2005)Burmeister等[13]	34	128	30	128	10.60%	1.13 [0.74, 1.73]
(2006)Natsugoe等[14]	12	22	9	23	3.10%	1.39 [0.74, 2.63]
(2008)Tepper等[15]	12	30	4	26	1.50%	2.60 [0.95, 7.08]
(2008)彭林等[16]	16	40	10	40	3.50%	1.60 [0.83, 3.09]
(2009)Cao等[18]	59	118	45	118	15.90%	1.31 [0.98, 1.76]



(2009)吕进等[19]	60	119	36	119	12.70%	1.67 [1.20, 2.31]
(2010)Lv等[20]	35	80	27	80	9.60%	1.30 [0.87, 1.92]
(2011)张文山等[22]	10	29	7	40	2.10%	1.97 [0.85, 4.56]
(2012)van Hagen等[24]	84	178	64	188	22.00%	1.39 [1.08, 1.78]
Subtotal(95%CI)		1 020		1 034	100.00%	1.41 [1.25, 1.60]
Total events	396		285			

Heterogeneity: Chi^2 = 7.77, df = 12 (P = 0.80); I^2 = 0%

Test for overall effect: Z = 5.48 (P<0.00001)

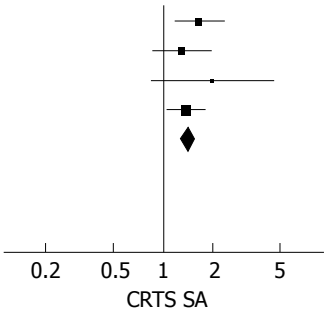


图 1 CRTS组与SA组的1年、3年、5年生存率的比较(固定效应模型). CRTS: 术前放化疗; SA: 单纯手术.

Study or Subgroup	CRTS Events	CRTS Total	SA Events	SA Total	Weight	Risk Ratio M-H, Random, 95%CI
3.1.1 西方患者3年生存率						
(1992)Nygaard等[5]	8	47	4	41	4.80%	1.74 [0.57, 5.37]
(1994)Le Prise等[7]	8	41	6	45	6.10%	1.46 [0.55, 3.86]
(1996)Walsh等[8]	18	58	3	55	4.50%	5.69 [1.77, 18.25]
(1997)Bosset等[9]	51	143	47	139	21.30%	1.05 [0.77, 1.45]
(2001)Urba等[10]	15	50	8	50	8.80%	1.88 [0.87, 4.02]
(2005)Burmeister等[13]	47	128	41	128	20.60%	1.15 [0.82, 1.61]
(2008)Tepper等[15]	19	30	5	26	7.80%	3.29 [1.43, 7.58]
(2012)van Hagen等[24]	103	178	83	188	26.00%	1.31 [1.07, 1.61]
Subtotal(95%CI)		675		672	100.00%	1.47 [1.13, 1.93]
Total events	269		197			
Heterogeneity: Tau^2 = 0.06; Chi^2 = 14.68, df = 7 (P = 0.04); I^2 = 52%						
Test for overall effect: Z = 2.82 (P = 0.005)						
3.1.2 腺癌患者3年生存率						
(1996)Walsh等[8]	18	58	3	55	15.80%	5.69 [1.77, 18.25]
(2005)Burmeister等[13]	23	78	22	80	36.50%	1.07 [0.65, 1.76]
(2012)van Hagen等[24]	90	134	65	141	47.70%	1.46 [1.18, 1.80]
Subtotal(95%CI)		270		276	100.00%	1.62 [0.93, 2.82]
Total events	131		90			
Heterogeneity: Tau^2 = 0.16; Chi^2 = 6.93, df = 2 (P = 0.03); I^2 = 71%						
Test for overall effect: Z = 1.69 (P = 0.09)						
Test for subgroup differences: Chi^2 = 0.09, df = 1 (P = 0.77), I^2 = 0%						

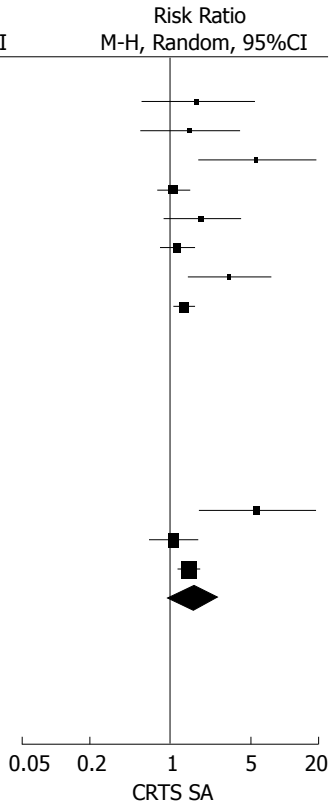
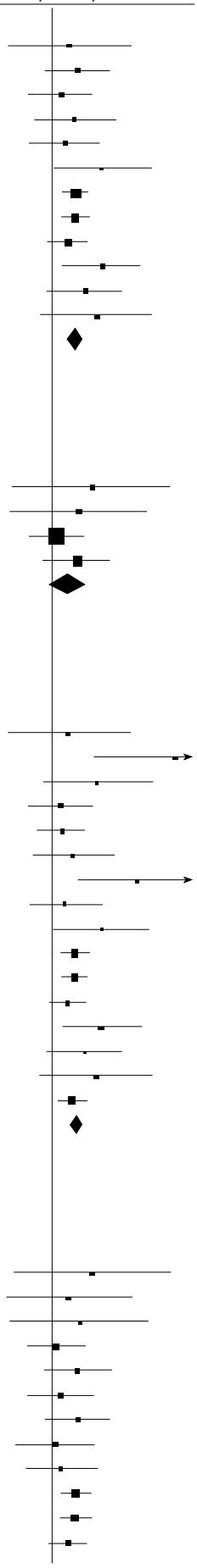


图 2 CRTS组与SA组中西方、腺癌亚组3年生存率的比较(随机效应模型). CRTS: 术前放化疗; SA: 单纯手术.

类型不同的患者3、5年生存率行亚组分析(图2-4). CRTS组比SA组提高了东方、西方、同步放化疗和鳞癌患者3、5年生存率, 其3年生存率相比RR(95%CI, P值)分别为1.38(1.24-1.54, P<0.00001)、1.47(1.13-1.93, P = 0.005)、1.41(1.29-1.55, P<0.00001)、1.34(1.21-1.48, P<0.00001); 其5年生存率相比RR(95%CI, P值)分别为1.50(1.27-1.78, P<0.00001)、1.32(1.11-1.58, P = 0.002)、1.45(1.27-1.65, P<0.00001)、1.37(1.17-1.59, P<0.0001), 差异均有统计学意义. 两组序贯放化疗、腺癌患者3年生存率相比RR(95%CI, P值)分别为1.24(0.94-1.64, P = 0.13)、1.62(0.93-2.82, P = 0.09); 5年生存率相比RR(95%CI, P值)分别为1.23(0.88-1.72, P = 0.23)、1.17(0.90-1.52, P = 0.24), 差异均无统计学意义.

2.4 术后分析 均以实际手术人数进行分析. 12篇RCT报道了手术率、11篇报道了手术根治率、4篇报道了R0切除率(图5), 18篇RCT报道了术后并发症发生率、9篇报道了术后远处转移率、17篇报道了术后死亡率(图6), 各RCT间均有异质性, 均采用随机效应模型进行Meta分析; 9篇RCT报道了术后局部复发率(图7), 各RCT间无异质性, 采用固定效应模型分析. 结果显示: SA组比CRTS组有较高的手术率, 差异有统计学意义, RR(95%CI, P值)为0.89(0.84-0.94, P<0.0001); 而CRTS组比SA组有更显著的治切除率、R0切除率和较低的术后局部复发率, 差

Study or Subgroup	CRTS Events	CRTS Total	SA Events	SA Total	Weight	Risk Ratio M-H, Fixed, 95%CI
3.2.1 东方患者3年生存率						
(1994)Apinop等[6]	9	35	7	34	2.60%	1.25 [0.52, 2.97]
(2003)安丰山等[11]	25	48	18	49	6.40%	1.42 [0.90, 2.24]
(2004)Lee等[12]	24	51	21	50	7.70%	1.12 [0.72, 1.73]
(2006)Natsugoe等[14]	13	22	10	23	3.50%	1.36 [0.76, 2.43]
(2008)彭林等[16]	19	40	16	40	5.80%	1.19 [0.72, 1.96]
(2008)金明根[17]	16	30	8	30	2.90%	2.00 [1.01, 3.95]
(2009)Cao等[18]	86	118	63	118	22.80%	1.37 [1.12, 1.67]
(2009)吕进等[19]	86	119	63	119	22.80%	1.37 [1.11, 1.67]
(2010)Lv等[20]	51	80	41	80	14.80%	1.24 [0.95, 1.63]
(2010)谢军等[21]	22	35	11	35	4.00%	2.00 [1.15, 3.47]
(2011)张文山等[22]	16	29	14	40	4.30%	1.58 [0.92, 2.69]
(2011)金芳玲等[23]	13	30	7	30	2.50%	1.86 [0.86, 4.00]
Subtotal(95%CI)		637		648	100.00%	1.38 [1.24, 1.54]
Total events	380		279			
Heterogeneity: Ch^2 = 5.58, df = 11 (P = 0.90); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 5.97 (P<0.00001)						
3.2.2 序贯放化疗患者3年生存率						
(1992)Nygaard等[5]	8	47	4	41	6.70%	1.74 [0.57, 5.37]
(1994)Le Prise等[7]	8	41	6	45	9.00%	1.46 [0.55, 3.86]
(1997)Bosset等[9]	38	143	35	139	56.10%	1.06 [0.71, 1.57]
(2003)安丰山等[11]	25	48	18	49	28.10%	1.42 [0.90, 2.24]
Subtotal(95%CI)		279		274	100.00%	1.24 [0.94, 1.64]
Total events	79		63			
Heterogeneity: Ch^2 = 1.44, df = 3 (P = 0.70); I^2 = 0%						
Test for overall effect: Z = 1.52 (P = 0.13)						
3.2.3 同步放化疗患者3年生存率						
(1994)Apinop等[6]	9	35	7	34	1.80%	1.25 [0.52, 2.97]
(1996)Walsh等[8]	18	58	3	55	0.80%	5.69 [1.77, 18.25]
(2001)Urba等[10]	15	50	8	50	2.00%	1.88 [0.87, 4.02]
(2004)Lee等[12]	24	51	21	50	5.30%	1.12 [0.72, 1.73]
(2005)Burmeister等[13]	47	128	41	128	10.30%	1.15 [0.82, 1.61]
(2006)Natsugoe等[14]	13	22	10	23	2.50%	1.36 [0.76, 2.43]
(2008)Tepper等[15]	19	30	5	26	1.30%	3.29 [1.43, 7.58]
(2008)彭林等[16]	19	40	16	40	4.00%	1.19 [0.72, 1.96]
(2008)金明根[17]	16	30	8	30	2.00%	2.00 [1.01, 3.95]
(2009)Cao等[18]	86	118	63	118	15.90%	1.37 [1.12, 1.67]
(2009)吕进等[19]	86	119	63	119	15.90%	1.37 [1.11, 1.67]
(2010)Lv等[20]	51	80	41	80	10.30%	1.24 [0.95, 1.63]
(2010)谢军等[21]	22	35	11	35	2.80%	2.00 [1.15, 3.47]
(2011)张文山等[22]	16	29	14	40	3.00%	1.58 [0.92, 2.69]
(2011)金芳玲等[23]	13	30	7	30	1.80%	1.86 [0.86, 4.00]
(2012)van Hagen等[24]	103	178	83	188	20.30%	1.31 [1.07, 1.61]
Subtotal(95%CI)		1 033		1 046	100.00%	1.41 [1.29, 1.55]
Total events	557		401			
Heterogeneity: Ch^2 = 17.82, df = 15 (P = 0.27); I^2 = 16%						
Test for overall effect: Z = 7.32 (P<0.00001)						
3.2.4 鳞癌患者3年生存率						
(1992)Nygaard等[5]	8	47	4	41	1.30%	1.74 [0.57, 5.37]
(1994)Apinop等[6]	9	35	7	34	2.20%	1.25 [0.52, 2.97]
(1994)Le Prise等[7]	8	41	6	45	1.70%	1.46 [0.55, 3.86]
(1997)Bosset等[9]	38	143	35	139	10.80%	1.06 [0.71, 1.57]
(2003)安丰山等[11]	25	48	18	49	5.40%	1.42 [0.90, 2.24]
(2004)Lee等[12]	24	51	21	50	6.40%	1.12 [0.72, 1.73]
(2005)Burmeister等[13]	23	45	18	50	5.20%	1.42 [0.89, 2.27]
(2006)Natsugoe等[14]	12	22	12	23	3.60%	1.05 [0.61, 1.81]
(2008)彭林等[16]	19	40	17	40	5.20%	1.12 [0.69, 1.82]
(2009)Cao等[18]	87	118	63	118	19.10%	1.38 [1.13, 1.69]
(2009)吕进等[19]	86	119	63	119	19.10%	1.37 [1.11, 1.67]
(2010)Lv等[20]	51	80	41	80	12.40%	1.24 [0.95, 1.63]



(2010)谢军等[21]	22	35	11	35	3.30%	2.00 [1.15, 3.47]
(2012)van Hagen等[24]	28	41	15	43	4.40%	1.96 [1.24, 3.10]
Subtotal(95%CI)		865		866	100.00%	1.34 [1.21, 1.48]
Total events	440		331			

Heterogeneity: Chi^2 = 8.82, df = 13 (P = 0.79); I^2 = 0%

Test for overall effect: Z = 5.62 (P<0.00001)

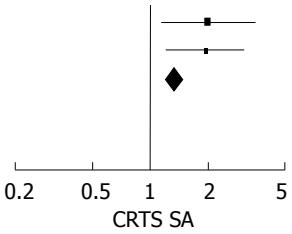


图 3 CRTS组与SA组中东方、序贯放化疗、同步放化疗、鳞癌亚组3年生存率的比较(固定效应模型). CRTS: 术前放化疗; SA: 单纯手术.

Study or Subgroup	CRTS Events	CRTS Total	RS Events	RS Total	Weight	Risk Ratio M-H, Fixed, 95%CI
5.2.1 东方患者5年生存率						
(1994)Apinop等[6]	8	35	3	34	2.20%	2.59 [0.75, 8.95]
(2003)安丰山等[11]	19	48	12	49	8.60%	1.62 [0.88, 2.95]
(2008)彭林等[16]	16	40	10	40	7.20%	1.60 [0.83, 3.09]
(2009)Cao等[18]	59	118	45	118	32.40%	1.31 [0.98, 1.76]
(2009)吕进等[19]	60	119	36	119	25.90%	1.67 [1.20, 2.31]
(2010)Lv等[20]	35	80	27	80	19.50%	1.30 [0.87, 1.92]
(2011)张文山等[22]	10	29	7	40	4.20%	1.97 [0.85, 4.56]
Subtotal(95%CI)		469		480	100.00%	1.50 [1.27, 1.78]
Total events	207		140			

Heterogeneity: Chi^2 = 3.00, df = 6 (P = 0.81); I^2 = 0%

Test for overall effect: Z = 4.69 (P<0.00001)

5.2.2 西方患者5年生存率						
(1997)Bosset等[9]	37	143	33	139	23.30%	1.09 [0.73, 1.64]
(2001)Urba等[10]	10	50	5	50	3.50%	2.00 [0.74, 5.43]
(2005)Burmeister等[13]	34	128	30	128	20.90%	1.13 [0.74, 1.73]
(2006)Natsugoe等[14]	12	22	9	23	6.10%	1.39 [0.74, 2.63]
(2008)Tepper等[15]	12	30	4	26	3.00%	2.60 [0.95, 7.08]
(2012)van Hagen等[24]	84	178	64	188	43.30%	1.39 [1.08, 1.78]
Subtotal(95%CI)		551		554	100.00%	1.32 [1.11, 1.58]
Total events	189		145			

Heterogeneity: Chi^2 = 3.94, df = 5 (P = 0.56); I^2 = 0%

Test for overall effect: Z = 3.07 (P = 0.002)

5.2.3 同步放化疗患者5年生存率						
(1994)Apinop等[6]	8	35	3	34	1.30%	2.59 [0.75, 8.95]
(2001)Urba等[10]	10	50	5	50	2.10%	2.00 [0.74, 5.43]
(2005)Burmeister等[13]	34	128	30	128	12.60%	1.13 [0.74, 1.73]
(2006)Natsugoe等[14]	12	22	9	23	3.70%	1.39 [0.74, 2.63]
(2008)Tepper等[15]	12	30	4	26	1.80%	2.60 [0.95, 7.08]
(2008)彭林等[16]	16	40	10	40	4.20%	1.60 [0.83, 3.09]
(2009)Cao等[18]	59	118	45	118	19.00%	1.31 [0.98, 1.76]
(2009)吕进等[19]	60	119	36	119	15.20%	1.67 [1.20, 2.31]
(2010)Lv等[20]	35	80	27	80	11.40%	1.30 [0.87, 1.92]
(2011)张文山等[22]	10	29	7	40	2.50%	1.97 [0.85, 4.56]
(2012)van Hagen等[24]	84	178	64	188	26.20%	1.39 [1.08, 1.78]
Subtotal(95%CI)		829		846	100.00%	1.45 [1.27, 1.65]
Total events	340		240			

Heterogeneity: Chi^2 = 6.02, df = 10 (P = 0.81); I^2 = 0%

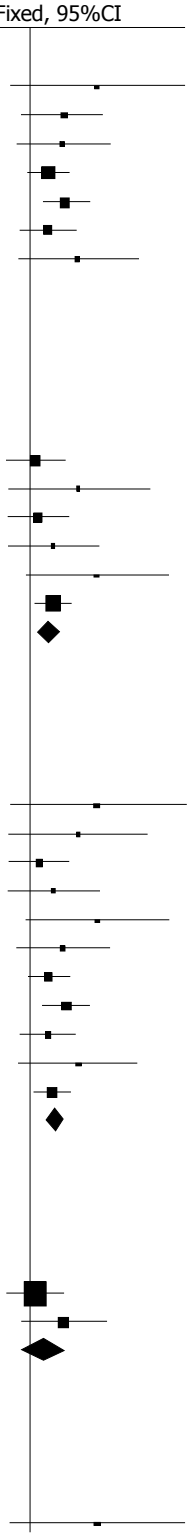
Test for overall effect: Z = 5.47 (P<0.00001)

5.2.4 序贯放化疗患者5年生存率						
(1997)Bosset等[9]	37	143	33	139	73.80%	1.09 [0.73, 1.64]
(2003)安丰山等[11]	19	48	12	49	26.20%	1.62 [0.88, 2.95]
Subtotal(95%CI)		191		188	100.00%	1.23 [0.88, 1.72]
Total events	56		45			

Heterogeneity: Chi^2 = 1.13, df = 1 (P = 0.29); I^2 = 11%

Test for overall effect: Z = 1.20 (P = 0.23)

5.2.5 鳞癌患者5年生存率						
(1994)Apinop等[6]	8	35	3	34	1.60%	2.59 [0.75, 8.95]



(1997)Bosset等[9]	10	143	12	139	6.50%	0.81 [0.36, 1.81]
(2003)安丰山等[11]	19	48	12	49	6.30%	1.62 [0.88, 2.95]
(2005)Burmeister等[13]	15	50	19	45	10.70%	0.71 [0.41, 1.22]
(2006)Natsugoe等[14]	12	22	10	23	5.20%	1.25 [0.69, 2.29]
(2008)彭林等[16]	16	40	10	40	5.30%	1.60 [0.83, 3.09]
(2009)Cao等[18]	58	118	43	118	22.90%	1.35 [1.00, 1.82]
(2009)吕进等[19]	60	119	36	119	19.20%	1.67 [1.20, 2.31]
(2010)Lv等[20]	35	80	27	80	14.40%	1.30 [0.87, 1.92]
(2012)van Hagen等[24]	23	41	15	43	7.80%	1.61 [0.99, 2.62]
Subtotal(95%CI)		696		690	100.00%	1.37 [1.17, 1.59]
Total events	256		187			

Heterogeneity: Chi^2 = 10.71, df = 9 (P = 0.30); I^2 = 16%

Test for overall effect: Z = 4.07 (P < 0.0001)

5.2.6 腺癌患者5年生存率

(2005)Burmeister等[13]	16	78	14	80	20.80%	1.17 [0.61, 2.24]
(2012)van Hagen等[24]	60	134	54	141	79.20%	1.17 [0.88, 1.55]
Subtotal(95%CI)		212		221	100.00%	1.17 [0.90, 1.52]
Total events	76		68			

Heterogeneity: Chi^2 = 0.00, df = 1 (P = 0.99); I^2 = 0%

Test for overall effect: Z = 1.18 (P = 0.24)

Test for subgroup differences: Chi^2 = 3.70, df = 5 (P = 0.59), I^2 = 0%

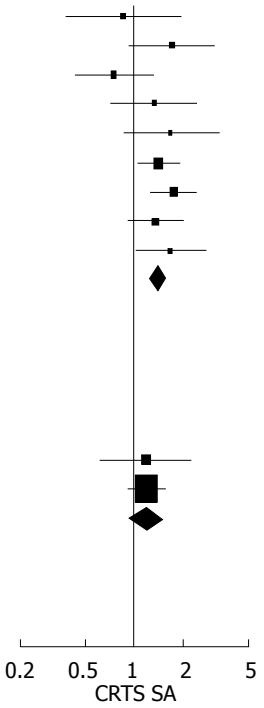


图 4 CRTS组与SA组中种族、放化疗顺序、病理类型不同亚组5年生存率的比较(固定效应模型). CRTS: 术前放化疗; SA: 单纯手术.

Study or Subgroup	CRTS Events	CRTS Total	SA Events	SA Total	Weight	Risk Ratio M-H, Random, 95%CI
4.1.1 手术率						
(1992)Nygaard等[5]	34	47	38	41	5.20%	0.78 [0.64, 0.95]
(1994)Apinop等[6]	26	35	34	34	5.10%	0.75 [0.61, 0.91]
(1994)Le Prise等[7]	35	41	42	45	7.20%	0.91 [0.79, 1.06]
(1997)Bosset等[9]	138	143	137	139	13.70%	0.98 [0.94, 1.02]
(2001)Urba等[10]	47	50	50	50	11.30%	0.94 [0.87, 1.02]
(2004)Lee等[12]	35	51	48	50	5.30%	0.71 [0.59, 0.87]
(2005)Burmeister等[13]	105	128	110	128	9.50%	0.95 [0.86, 1.06]
(2006)Natsugoe等[14]	20	22	23	23	6.90%	0.91 [0.78, 1.06]
(2008)Tepper等[15]	26	30	26	26	6.90%	0.87 [0.75, 1.02]
(2010)谢军等[21]	25	35	35	35	4.70%	0.72 [0.58, 0.89]
(2012)van Hagen等[24]	168	178	186	188	13.60%	0.95 [0.92, 0.99]
(2012)杨弘等[25]	49	54	69	69	10.60%	0.91 [0.83, 0.99]
Subtotal(95%CI)		814		828	100.00%	0.89 [0.84, 0.94]
Total events	708		798			

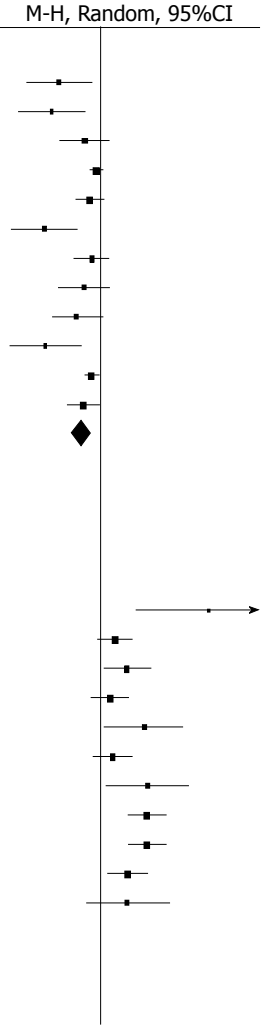
Heterogeneity: Tau^2 = 0.01; Chi^2 = 42.78, df = 11 (P<0.0001); I^2 = 74%

Test for overall effect: Z = 4.01 (P<0.0001)

4.1.2 手术根治率						
(1992)Nygaard等[5]	26	34	15	38	2.40%	1.94 [1.25, 2.99]
(1994)Le Prise等[7]	35	35	38	42	11.90%	1.10 [0.99, 1.23]
(1997)Bosset等[9]	112	138	94	137	10.20%	1.18 [1.03, 1.36]
(2001)Urba等[10]	45	47	45	50	11.80%	1.06 [0.95, 1.19]
(2003)安丰山等[11]	41	48	32	49	6.00%	1.31 [1.03, 1.65]
(2008)彭林等[16]	39	40	36	40	11.60%	1.08 [0.97, 1.21]
(2008)金明根[17]	28	30	21	30	5.50%	1.33 [1.04, 1.72]
(2009)Cao等[18]	116	118	87	118	11.80%	1.33 [1.19, 1.49]
(2009)吕进等[19]	117	119	88	119	11.90%	1.33 [1.19, 1.48]
(2010)Lv等[20]	76	80	64	80	11.20%	1.19 [1.05, 1.34]
(2010)谢军等[21]	22	25	26	35	5.80%	1.18 [0.93, 1.51]
Subtotal(95%CI)		714		738	100.00%	1.21 [1.12, 1.30]
Total events	657		546			

Heterogeneity: Tau^2 = 0.01; Chi^2 = 26.62, df = 10 (P = 0.003); I^2 = 62%

Test for overall effect: Z = 5.12 (P<0.00001)



4.1.3 R0 切除率

(2004)Lee等[12]	35	35	42	48	25.30%	1.14 [1.01, 1.28]
(2005)Burmeister等[13]	103	105	76	110	24.70%	1.42 [1.25, 1.61]
(2012)van Hagen等[24]	148	168	111	186	24.50%	1.48 [1.30, 1.68]
(2012)杨弘等[25]	47	49	59	69	25.50%	1.12 [1.00, 1.26]
Subtotal(95%CI)		357		413	100.00%	1.28 [1.09, 1.50]
Total events	333		288			

Heterogeneity: Tau^2 = 0.02; Chi^2 = 20.96, df = 3 (P = 0.0001); I^2 = 86%

Test for overall effect: Z = 2.97 (P = 0.003)

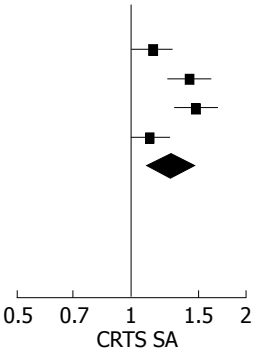


图 5 CRTS组与SA组手术率、手术根治率、R0切除率的比较(随机效应模型). CRTS: 术前放化疗; SA: 单纯手术.

Study or Subgroup	CRST Events	CRST Total	SA Events	SA Total	Weight	Risk Ratio M-H, Random, 95%CI
4.2.1 术后并发症发生率						
(1992)Nygaard等[5]	16	34	13	38	4.80%	1.38 [0.78, 2.43]
(1994)Apinop等[6]	8	26	5	34	1.90%	2.09 [0.77, 5.65]
(1994)Le Prise等[7]	14	35	18	42	5.20%	0.93 [0.55, 1.59]
(1996)Walsh等[8]	47	58	50	55	15.70%	0.89 [0.77, 1.04]
(1997)Bosset等[9]	45	138	36	137	8.40%	1.24 [0.86, 1.79]
(2001)Urba等[10]	8	47	7	50	2.10%	1.22 [0.48, 3.09]
(2003)安丰山等[11]	16	48	16	49	4.80%	1.02 [0.58, 1.80]
(2004)Lee等[12]	13	35	19	48	4.90%	0.94 [0.54, 1.63]
(2005)Burmeister等[13]	63	105	70	110	13.40%	0.94 [0.76, 1.16]
(2006)Natsugoe等[14]	7	20	7	23	2.40%	1.15 [0.49, 2.72]
(2008)Tepper等[15]	24	26	24	26	15.40%	1.00 [0.85, 1.17]
(2008)彭林等[16]	20	40	15	40	5.60%	1.33 [0.80, 2.21]
(2008)金明根[17]	11	30	6	30	2.40%	1.83 [0.78, 4.32]
(2009)Cao等[18]	6	118	4	118	1.30%	1.50 [0.43, 5.18]
(2009)吕进等[19]	6	119	4	119	1.30%	1.50 [0.43, 5.18]
(2010)Lv等[20]	27	80	18	80	5.60%	1.50 [0.90, 2.50]
(2010)谢军等[21]	10	35	8	35	2.70%	1.25 [0.56, 2.79]
(2011)金芳玲等[23]	16	30	4	30	2.00%	4.00 [1.51, 10.57]
Subtotal(95%CI)		1 024		1 064	100.00%	1.13 [0.98, 1.30]
Total events	357		324			

Heterogeneity: Tau^2 = 0.03; Chi^2 = 29.54, df = 17 (P = 0.03); I^2 = 42%

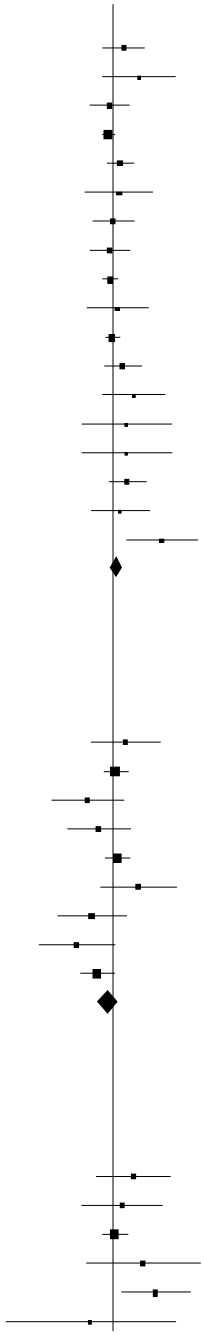
Test for overall effect: Z = 1.64 (P = 0.10)

4.2.2 术后远处转移率						
(1994)Le Prise等[7]	8	41	6	45	6.80%	1.46 [0.55, 3.86]
(2001)Urba等[10]	28	43	27	45	21.60%	1.09 [0.79, 1.50]
(2003)安丰山等[11]	5	46	10	46	6.50%	0.50 [0.19, 1.35]
(2004)Lee等[12]	6	35	12	48	7.90%	0.69 [0.29, 1.65]
(2005)Burmeister等[13]	46	105	42	110	21.70%	1.15 [0.83, 1.58]
(2006)Natsugoe等[14]	8	22	4	23	6.00%	2.09 [0.73, 5.96]
(2008)Tepper等[15]	5	26	9	26	7.00%	0.56 [0.22, 1.43]
(2008)彭林等[16]	4	40	11	40	5.90%	0.36 [0.13, 1.05]
(2010)Lv等[20]	20	80	31	80	16.60%	0.65 [0.40, 1.03]
Subtotal(95%CI)		438		463	100.00%	0.88 [0.66, 1.17]
Total events	130		152			

Heterogeneity: Tau^2 = 0.07; Chi^2 = 14.40, df = 8 (P = 0.07); I^2 = 44%

Test for overall effect: Z = 0.90 (P = 0.37)

4.2.3 术后死亡率						
(1992)Nygaard等[5]	8	34	5	38	9.40%	1.79 [0.65, 4.94]
(1994)Apinop等[6]	5	26	5	34	8.20%	1.31 [0.42, 4.05]
(1994)Le Prise等[7]	26	41	27	45	19.50%	1.06 [0.76, 1.47]
(1996)Walsh等[8]	5	58	2	55	5.00%	2.37 [0.48, 11.72]
(1997)Bosset等[9]	17	138	5	137	9.90%	3.38 [1.28, 8.89]
(2001)Urba等[10]	1	47	2	50	2.60%	0.53 [0.05, 5.67]



(2003)安丰山等[11]	0	48	0	49		Not estimable
(2004)Lee等[12]	1	35	1	48	2.00%	1.37 [0.09, 21.18]
(2005)Burmeister等[13]	5	105	6	110	8.00%	0.87 [0.27, 2.77]
(2006)Natsugoe等[14]	1	20	0	23	1.60%	3.43 [0.15, 79.74]
(2008)Tepper等[15]	0	26	1	26	1.50%	0.33 [0.01, 7.82]
(2008)彭林等[16]	0	40	0	40		Not estimable
(2008)金明根[17]	0	30	0	30		Not estimable
(2009)Cao等[18]	0	118	0	118		Not estimable
(2009)吕进等[19]	0	119	0	119		Not estimable
(2010)Lv等[20]	33	80	60	80	20.20%	0.55 [0.41, 0.74]
(2012)van Hagen等[24]	10	168	13	186	12.10%	0.85 [0.38, 1.89]
Subtotal(95%CI)		1 133		1 188	100.00%	1.10 [0.73, 1.65]
Total events	112		127			

Heterogeneity: Tau^2 = 0.19; Chi^2 = 24.59, df = 11 (P = 0.01); I^2 = 55%
Test for overall effect: Z = 0.44 (P = 0.66)

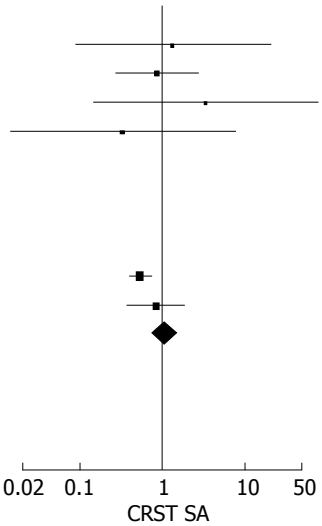


图 6 CRTS组与SA组术后并发症发生率、远处转移率、死亡率的比较(随机效应模型). CRTS: 术前放化疗; SA: 单纯手术.

Study or Subgroup	CRTS Events	CRTS Total	SA Events	SA Total	Weight	Risk Ratio M-H, Fixed, 95%CI
4.3.1 术后局部复发率						
(1994)Le Prise等[7]	7	41	9	45	9.10%	0.85 [0.35, 2.08]
(2001)Urba等[10]	8	43	19	45	19.70%	0.44 [0.22, 0.90]
(2003)安丰山等[11]	4	46	8	46	8.50%	0.50 [0.16, 1.55]
(2004)Lee等[12]	8	35	5	48	4.50%	2.19 [0.78, 6.14]
(2005)Burmeister等[13]	11	105	14	110	14.50%	0.82 [0.39, 1.73]
(2006)Natsugoe等[14]	1	22	1	23	1.00%	1.05 [0.07, 15.70]
(2008)Tepper等[15]	1	26	3	26	3.20%	0.33 [0.04, 3.00]
(2008)彭林等[16]	5	40	9	40	9.60%	0.56 [0.20, 1.51]
(2010)Lv等[20]	9	80	28	80	29.80%	0.32 [0.16, 0.64]
Subtotal(95%CI)		438		463	100.00%	0.60 [0.44, 0.81]
Total events	54		96			

Heterogeneity: Chi^2 = 11.88, df = 8 (P = 0.16); I^2 = 33%
Test for overall effect: Z = 3.36 (P = 0.0008)

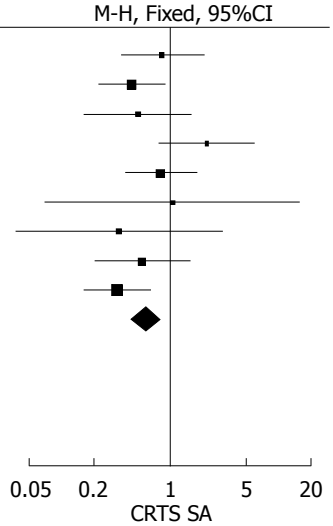


图 7 CRTS组与SA组术后局部复发率的比较(固定效应模型). CRTS: 术前放化疗; SA: 单纯手术.

异均有统计学意义, RR(95%CI, P值)分别为1.21(1.12-1.30, P<0.00001)、1.28(1.09-1.50, P = 0.003)和0.60(0.44-0.81, P = 0.0008). 两组术后并发症发生率、远处转移率及死亡率比较, RR(95%CI, P值)分别为1.13(0.98-1.30, P = 0.10)、0.88(0.66-1.17, P = 0.37)及1.10(0.73-1.65, P = 0.66), 差异均无统计学意义.

2.5 敏感性分析及发表偏倚 剔除任意一篇文献前后, 两组3年生存率、5年生存率、手术率、手术根治率、R0切除率、术后死亡率、术后局部复发率及术后远处转移率Meta分析均未发生明显变化, 结论的性质没有改变. 剔除Jadad质量记分为1和2的研究后, 两组1年生存率Meta分析未发生明显变化; 剔除Burmeister等[13]研究后, 两组术后并发症发生率差异有统计学意义(RR = 1.19, 95%CI = 1.001.41; P = 0.05), 结论的性质改变, 但处在统计学意义的边缘, 稳健性较低, 尚待更进一步验证. 以RR值为横坐标, SE[log(RR)]为纵坐标绘制漏斗图均基本对称, 纳入本研究的文献没有发表偏倚.

3 讨论

食管癌早期诊断较困难, 远处转移是食管癌远期生存的重要影响因素. 目前, 任何单一治疗方式都难以大幅度提高食管癌患者的生存率, 而研究显示多学科综合治疗能显著提高食管癌治疗效果[26]. 与传统术后辅助放化疗相比, 理论上术前放化疗具有一定优势[23]. 本文对21篇RCT行Meta分析, 收集文献较齐全, 行生存率和手术情况发生率详细分类比较, 并对远期生存率给予

亚组、敏感性和漏斗图分析, 综合评估了CRTS与SA治疗可切除食管癌的优缺点. 本Meta分析结果显示: 与SA治疗可切除食管癌相比, CRTS降低了肿瘤术后局部复发率, 提高了患者生存率、肿瘤根治率、R0切除率, 提高了东西方、同步放化疗、鳞癌患者远期生存率, 且未增加术后并发症发生率、死亡率和远处转移率, 但术后并发症发生率稳健性较低. 有报道证明CRTS治疗食管癌可降低远处转移率, 部分不良反应增加, 但患者能够耐受, 可提高局部晚期食管癌的有效率、总生存率[27]. 一项更新的荟萃分析[28]显示: CRTS较SA改善了可切除食管癌患者的生存, 可能成为标准治疗措施; 这种治疗方案应用之所以在增加, 是因为其没有表现重大的不良并发症导致死亡率的增加, 可在患者中安全应用[29]; 且适当的营养支持可增加患者获得充分放化疗剂量和根治手术的可能性[30]. 本Meta分析显示CRTS对序贯放化疗及腺癌患者远期生存率未改善(P>0.05), 间接提示食管同步放化疗及鳞癌患者是CRTS的真正受益者, 也许术后放化疗能够使序贯放化疗及腺癌获益, 结果尚未明确. 同时本文还显示SA较CRTS有更高的手术率(P<0.05), 这可能跟有些术前放化疗的不良反应导致患者体质耐受较差有关. 目前CRTS的最佳方案与最佳用药剂量均未明确, 新药应用相对较少, 每项研究的化疗剂量也各不相同, 本项Meta所纳入研究中多采用“5-fluorouracil+cisplatin”方案, 因此下一步应研究术后放化疗及不同化疗方案、剂量联合术前放疗治疗可切除食管癌的差异, 期待进一步提高临床疗效.

食管癌综合治疗新辅助策略的管理是复杂的, 并和现有证据冲突, 试验设计已经取得初步建议并试图解决, 但这仍是开放的讨论和审议[31]. CRTS较术前化疗间尚未建立明显优势. 迫切需要允许个体化的多学科综合治疗局部晚期食管癌的预测指标[32]. 到目前为止, 治疗食管癌尚无公认的标准治疗方案, 但多数临床研究显示, 局部晚期食管癌CRTS并手术是一个可提高临床有效率和长期生存率较为现实可行的、有发展前景的、值得进一步研究的三联综合治疗模式, 可能会成为标准治疗方案.

总之, 与SA治疗可切除食管癌相比, CRTS降低了肿瘤术后局部复发率, 提高了患者生存率、肿瘤根治率、R0切除率, 提高了东西方、同步放化疗、鳞癌患者远期生存率, 且未增加患者术后并发症发生率、死亡率和远处转移率, 但其手术率较低. 然而, 序贯放化疗及腺癌患者的远期生存率未能从CRTS中受益. 本Meta分析来自不同种族人群, 病理类型不同; 各研究在放化疗剂量、方法及手术方式有差异, 时间跨度大等方面存在一定的局限性, 尚需更多更高质量的大型临床研究来进一步明确RCTS的作用, 并探索更为有效、安全的RCTS治疗方案.

4 参考文献

1 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90

2 Rutegård M, Charonis K, Lu Y, Lagergren P, Lagergren J, Rouvelas I. Population-based esophageal cancer survival after resection without neoadjuvant therapy: An update. *Surgery* 2012; 152: 903-910

3 毛友生, 赫捷, 程贵余, 张汝刚. 食管癌分期与治疗的共识、争议和建议. 中国癌症杂志 2011; 21: 511-517

4 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12

5 Nygaard K, Hagen S, Hansen HS, Hatlevoll R, Hultborn R, Jakobsen A, Mäntyla M, Modig H, Munck-Wikland E, Rosengren B. Pre-operative radiotherapy prolongs survival in operable esophageal carcinoma: a randomized, multicenter study of pre-operative radiotherapy and chemotherapy. The second Scandinavian trial in esophageal cancer. *World J Surg* 1992; 16: 1104-1109; discussion 1110

6 Apinop C, Puttisak P, Preecha N. A prospective study of combined therapy in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 391-393

7 Le Prise E, Etienne PL, Meunier B, Maddern G, Ben Hassel M, Gedouin D, Boutin D, Campion JP, Launois B. A randomized study of chemotherapy, radiation therapy, and surgery versus surgery for localized squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1994; 73: 1779-1784

8 Walsh TN, Noonan N, Hollywood D, Kelly A, Keeling N, Hennessy TP. A comparison of multimodal therapy and surgery for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 1996; 335: 462-467

9 Bosset JF, Gignoux M, Triboulet JP, Tiret E, Mantion G, Elias D, Lozach P, Ollier JC, Pavy JJ, Mercier M, Sahmoud T. Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus. *N Engl J Med* 1997; 337: 161-167

10 Urba SG, Orringer MB, Turrisi A, Iannettoni M, Forastiere A, Strawderman M. Randomized trial of preoperative chemoradiation versus surgery alone in patients with locoregional esophageal carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 305-313

11 安丰山, 黄金球, 谢映涛, 陈少湖, 戎铁华. 食管癌新辅助放化疗的前瞻性临床研究. 中华肿瘤杂志 2003; 25: 376-379

12 Lee JL, Park SI, Kim SB, Jung HY, Lee GH, Kim JH, Song HY, Cho KJ, Kim WK, Lee JS, Kim SH, Min YI. A single institutional phase III trial of preoperative chemotherapy with hyperfractionation radiotherapy plus surgery versus surgery alone for resectable

esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2004; 15: 947-954
13 Burmeister BH, Smithers BM, Gebski V, Fitzgerald L, Simes RJ, Devitt P, Ackland S, Gotley DC, Joseph D, Millar J, North J, Walpole ET, Denham JW. Surgery alone versus chemoradiotherapy followed by surgery for resectable cancer of the oesophagus: a randomised controlled phase III trial. *Lancet Oncol* 2005; 6: 659-668
14 Natsugoe S, Okumura H, Matsumoto M, Uchikado Y, Setoyama T, Yokomakura N, Ishigami S, Owaki T, Aikou T. Randomized controlled study on preoperative chemoradiotherapy followed by surgery versus surgery alone for esophageal squamous cell cancer in a single institution. *Dis Esophagus* 2006; 19: 468-472
15 Tepper J, Krasna MJ, Niedzwiecki D, Hollis D, Reed CE, Goldberg R, Kiel K, Willett C, Sugarbaker D, Mayer R. Phase III trial of trimodality therapy with cisplatin, fluorouracil, radiotherapy, and surgery compared with surgery alone for esophageal cancer: CALGB 9781. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1086-1092
16 彭林, 谢天鹏, 韩泳涛, 郎锦义, 李涛, 付彬玉, 陈利华, 方强. 术前放化疗与单纯手术治疗食管鳞癌的随机对照研究. 肿瘤 2008; 28: 620-622
17 金明根, 姜盛春, 陈智文, 王致全. 术前同步放化疗与单纯手术治疗食管癌的临床对比观察. 中华肿瘤防治杂志 2008; 15: 1815-1817
18 Cao XF, He XT, Ji L, Xiao J, Lv J. Effects of neoadjuvant radiochemotherapy on pathological staging and prognosis for locally advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2009; 22: 477-481
19 吕进, 曹秀峰, 朱斌, 纪律, 陶磊, 王冬冬. 手术联合术前放化疗治疗食管鳞癌. 中华实验外科杂志 2009; 26: 1378-1380
20 Lv J, Cao XF, Zhu B, Ji L, Tao L, Wang DD. Long-term efficacy of perioperative chemoradiotherapy on esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1649-1654
21 谢军, 崔继承, 王根彩. 新辅助放化疗在局部晚期食管癌治疗中的价值. 南通大学学报(医学版) 2010; 30: 488, 490
22 张文山, 潘开云, 蔡志仕, 林涌. 术前同期放化疗并手术治疗局部晚期食管癌的前瞻性临床研究. 中国肿瘤外科杂志 2011; 3: 266-268
23 金芳玲, 胡祖良, 马海锋, 杜锦跃. 新辅助放化疗联合手术与单纯手术治疗局部晚期食管癌的疗效比较. 实用肿瘤杂志 2011; 26: 523-526
24 van Hagen P, Hulshof MC, van Lanschot JJ, Steyerberg EW, van Berge Henegouwen MI, Wijnhoven BP, Richel DJ, Nieuwenhuijzen GA, Hospers GA, Bonenkamp JJ, Cuesta MA, Blaisse RJ, Busch OR, ten Kate FJ, Creemers GJ, Punt CJ, Plukker JT, Verheul HM, Spillenaar Bilgen EJ, van Dekken H, van der Sangen MJ, Rozema T, Biermann K, Beukema JC, Piet AH, van Rij CM, Reinders JG, Tilanus HW, van der Gaast A. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2074-2084
25 杨弘, 傅剑华, 刘孟忠, 方文涛, 王家明, 陈于平, 陈志坚, 相加庆, 杨焕军, 毛伟敏, 郑晓, 朱成楚, 孔敏, 韩泳涛, 李涛. 术前放化疗并手术治疗局部晚期食管鳞癌的多中心随机对照临床研究. 中华医学杂志 2012; 92: 1028-1032
26 Kelly P, Appleyard V, Murray K, Paulin F, Lamont D, Baker L, Suttie S, Exon D, Thompson A. Detection of oesophageal cancer biomarkers by plasma proteomic profiling of human cell line xenografts in response to chemotherapy. *Br J Cancer* 2010; 103: 232-238
27 李峰, 周远, 张立成, 魏红梅, 郭双双, 马文静. 紫杉醇联合放疗同步治疗中晚期食管癌的临床观察. 中华肿瘤防治杂志 2011; 18: 1635-1638
28 Sjoquist KM, Burmeister BH, Smithers BM, Zalcberg JR, Simes RJ, Barbour A, Gebski V. Survival after neoadjuvant chemotherapy or chemoradiotherapy for resectable oesophageal carcinoma: an updated meta-analysis. *Lancet Oncol* 2011; 12: 681-692
29 Bagheri R, RajabiMashhadi MT, Ghazvini K, Asnaashari A, Zahediyan A, Sahebi MA. The effect of neoadjuvant chemoradiotherapy on airway colonization and postoperative respiratory complications in patients undergoing oesophagectomy for oesophageal cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2012; 14: 725-728
30 Zemanova M, Novak F, Vitek P, Pazdro A, Smejkal M, Pazdrova G, Petruzelka L. Outcomes of patients with oesophageal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy, followed by tumor resection: influence of nutritional factors. *J BUON* 2012; 17: 310-316
31 Hingorani M, Crosby T, Maraveyas A, Dixit S, Bateman A, Roy R. Neoadjuvant chemoradiotherapy for resectable oesophageal and gastro-oesophageal junction cancer--do we need another randomised trial? *Clin Oncol* (R Coll Radiol) 2011; 23: 696-705
32 Vallböhmer D, Schröder W, Brabender J, Hölscher AH. [Oesophageal cancer: current status of multimodality therapy]. *Zentralbl Chir* 2011; 136: 312-316

编辑 田滢 电编 闫晋利

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2012年11月18日; 20(32): 3164-3166
ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

临床经验 CLINICAL PRACTICE

老年上消化道出血210例

雷天霞, 史美娜, 雷晓毅, 徐桂华, 黄玉林

■背景资料
上消化道出血可发生在各年龄阶段, 由于患者的生理、心理以及病理的不同, 在临床上, 老年患者与中青年患者就上消化道出血的特点存在着许多差异.

雷天霞, 史美娜, 雷晓毅, 徐桂华, 黄玉林, 厦门大学附属第一医院 福建省厦门市 361003
雷天霞, 主治医师, 主要从事消化内科及内镜方面的研究.
作者贡献分布: 此课题由雷天霞设计; 研究过程由雷天霞与史美娜实施完成; 数据分析由雷晓毅、徐桂华及黄玉林完成; 本论文写作由雷天霞、史美娜、雷晓毅、徐桂华及黄玉林共同完成.
通讯作者: 雷天霞, 主治医师, 361003, 福建省厦门市思明区镇海路55号, 厦门大学附属第一医院. leitianxia@163.com
收稿日期: 2012-09-23 修回日期: 2012-10-23
接受日期: 2012-11-09 在线出版日期: 2012-11-18

Upper gastrointestinal bleeding in elderly patients: An analysis of 210 cases

Tian-Xia Lei, Mei-Na Shi, Xiao-Yi Lei, Gui-Hua Xu, Yu-Lin Huang

Tian-Xia Lei, Mei-Na Shi, Xiao-Yi Lei, Gui-Hua Xu, Yu-Lin Huang, the First Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China
Correspondence to: Tian-Xia Lei, Attending Physician, the First Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China. leitianxia@163.com
Received: 2012-09-23 Revised: 2012-10-23
Accepted: 2012-11-09 Published online: 2012-11-18

Abstract
AIM: To summarize the clinical features of upper gastrointestinal bleeding in elderly patients.

METHODS: The clinical data for 420 patients with upper gastrointestinal bleeding who were treated at our hospital from January 2010 to January 2012 were retrospectively analyzed. These patients were divided into two groups based on their age: elderly patients and young patients.

RESULTS: The rates of hematemesis and other diseases were significantly higher in the elderly patient group than in the young patient group ($P < 0.01$). The major cause of upper gastrointestinal bleeding was peptic ulcer in both elderly and young patient group. The incidence of gastric ulcer and that of duodenal ulcer showed no significant difference in elderly patients ($P > 0.05$); however, the incidence of gastric ulcer was significantly lower than that of duodenal ulcer in young patients ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Upper gastrointestinal bleeding in elderly patients is associated with a higher risk of hematemesis, more complications, and a higher mortality rate.

Key Words: Upper gastrointestinal bleeding; Gastric ulcer; Duodenal ulcer; Elderly patients

Lei TX, Shi MN, Lei XY, Xu GH, Huang YL. Upper gastrointestinal bleeding in elderly patients: An analysis of 210 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(32): 3164-3166

摘要
目的: 总结老年上消化道出血的临床特点.

方法: 收集我院2010-01/2012-01收治并确诊为上消化道出血的患者432例, 其中老年组210例, 非老年组222例, 比较并分析两组患者的临床资料.

结果: 老年组患者呕血率与伴随疾病率均高于非老年组, 两组差异具有统计学意义($P<0.01$). 从发病原因来看, 无论是老年组还是非老年组, 引起上消化道出血最主要的原因均为消化性溃疡, 其中老年组患者以胃溃疡多见, 而非老年组中以十二指肠溃疡为主, 两组间的差异具有统计学意义($P<0.05$); 老年组中胃癌的发生率明显高于非老年组, 而食管静脉曲张的发生率低于非老年组, 两组间差异均有统计学意义($P<0.05$).

结论: 非老年上消化道出血患者以十二直肠溃疡和食管静脉曲张多见; 老年上消化道出血患者, 以胃溃疡和胃癌多见, 同时伴有较多的并发症, 死亡率较高.

关键词: 上消化道出血; 胃溃疡; 十二指肠溃疡; 老年

雷天霞, 史美娜, 雷晓毅, 徐桂华, 黄玉林. 老年上消化道出血210例. 世界华人消化杂志 2012; 20(32): 3164-3166
http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3164.asp

■同行评议者
邵先玉, 教授, 泰山医学院附属医院消化内科; 林志辉, 教授, 福建省立医院消化内科

0 引言
上消化道出血是临床常见急诊之一, 指屈氏韧

表 1 老年组与非老年组患者出血原因比较 n(%)

分组	胃溃疡	十二指肠溃疡	急性胃黏膜病变	食管静脉曲张	胃癌	其他
老年组	65(30.95)[a]	53(25.24)[a]	29(13.81)	20(9.52)[a]	32(15.24)[a]	11(5.24)
非老年组	57(25.68)	73(32.88)	34(15.32)	35(15.76)	15(6.76)	8(3.60)

[a]P<0.05 *vs* 非老年组.

带以上的食管、胃、十二指肠、胰腺和胆囊等病变以及胃空肠吻合术后空肠上段病变引起的出血[1]. 上消化道出血可发生在各年龄阶段, 由于患者的生理、心理以及病理的不同, 在临床上, 老年患者与中青年患者就上消化道出血的特点存在着诸多差异[2,3]. 为了更好地掌握老年上消化道出血的临床特点, 本文回顾性比较老年组和非老年组上消化道出血患者的临床特点, 以期对临床医师特别是基层临床医师起到借鉴作用, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 收集我院2010-01/2012-01收治并确诊为上消化道出血的患者432例, 根据年龄分组, ≥60岁为老年组, <60岁为非老年组. 其中老年组210例, 男140例, 女70例, 年龄62-89岁, 平均年龄72.0岁±2.9岁; 非老年组222例, 男162例, 女60例, 年龄16-58岁, 平均年龄38.0岁±4.6岁.

1.2 *方法* 根据患者不同的临床表现, 如呕血和便血等进行初次判定, 再对其进行大便潜血试验以及胃镜检查, 排除患者为下消化道出血的可能, 从而确诊为上消化道出血.

统计学处理 两组患者间的显著性差异的处理均使用χ^2检验, P<0.05表示差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 *出血原因* 老年组患者出血原因从高到低分别是: 消化性溃疡118例(56.19%), 胃癌32例(15.24%), 急性胃黏膜病变29例(13.81%), 食管静脉曲张20例(9.52%), 其他11例(5.24%); 非老年组中消化性溃疡130例(58.56%), 急性胃黏膜病变34例(15.32%), 食管静脉曲张35例(15.76%), 胃癌15例(6.76%), 其他8例(3.60%). 两组患者中出血的首要原因均为消化性溃疡, 无显著差异(P>0.05), 但老年组患者以胃溃疡多见, 而非老年组中以十二指肠溃疡为主, 两组间的差异具有统计学意义(P<0.05); 老年组中胃癌的发生率也明显高于非老年组, 而食管静脉曲张的发生率低于非老年组, 两组间差异均有统计学意义(P<0.05); 其他原因则无统计学意义(P<0.01, 表1).

2.3 *并发症* 老年组患者中出现肺部感染26例, 心血管疾病21例, 多器官功能衰竭8例, 肝性脑病6例; 非老年组患者中出现肺部感染11例, 多器官功能衰竭7例, 肝性脑病4例. 经过对两组患者的并发症情况进行分析, 可知老年组的并发症明显高过非老年组, 其结果具有统计学意义(P<0.01).

2.4 *再出血率* 老年组患者再出血38例, 再出血发生率18.1%, 其中消化性溃疡18例, 胃癌10例, 食管静脉曲张7例, 其他3例; 非老年组患者中再出血39例, 再出血发生率17.57%, 其中消化性溃疡24例, 胃癌4例, 食管静脉曲张8例, 其他3例. 经过比较分析两组间的差异具有统计学意义(P<0.01).

2.5 *死亡率* 老年组患者死亡24例, 死亡率为11.43%, 死亡原因中: 失血性休克20例, 多器官功能衰竭6例; 非老年组死亡11例, 死亡率为4.95%, 死亡原因中: 失血性休克9例, 多器官功能衰竭2例, 两组患者间的死亡率差异具有统计学意义(χ^2 = 4.852, P<0.05).

2.6 *治疗* 两组患者的用药和治疗方式基本相同. 急性出血时以内科保守治疗为主, 同时积极配合胃镜下治疗出血, 必要时行手术止血治疗.

3 讨论

急性上消化道出血是临床实践中最常见威胁生命, 需要紧急处理的内科急症. 流行病学研究显示年发病率为50/10万-150/10万, 且发病率随年龄增长而增加, 病死率为6%-10%[4,5]. 国外的成本分析显示每年为急性上消化道出血患者进行诊治的费用为750万美元[6-8], 为卫生医疗事业造成极大的经济负担. 上消化道如果短期内大量出血可导致休克, 所以一旦出血应及时就诊, 尽快进行胃镜检查并有效处置. 有些患者认识不够, 再加上地域差别, 交通不便, 经济困难等因素, 就医行为和条件均较差, 常常延误病情[9].

俞开敏等[10]回顾性分析经胃镜检查确诊的

■**相关报道**
俞开敏等回顾性分析经胃镜检查确诊的95例老年上消化道出血患者的临床资料, 并与同期139例非老年患者进行对比研究, 结果显示老年组上消化道出血病因依次为消化性溃疡、急性胃黏膜病变、食管胃底静脉曲张、胃癌, 其中因急性胃黏膜病变或胃癌出血的老年患者多于非老年组.

■同行评价
本研究结果可靠，对临床医师有一定的参考意义.

95例老年上消化道出血患者的临床资料, 并与同期139例非老年患者进行对比研究, 结果显示老年组上消化道出血病因依次为消化性溃疡(45.26%)、急性胃黏膜病变(21.05%)、食管胃底静脉曲张(16.84%)、胃癌(9.47%), 其中因急性胃黏膜病变或胃癌出血的老年患者多于非老年组(P<0.05). 老年组合并症、死亡率显著高于中非老年组(P<0.05). 本研究结果显示, 老年患者在上消化道出血中, 其发病的主要原因是消化性溃疡, 其中最常见是胃溃疡, 而十二指肠溃疡的比例则呈现出明显的下降趋势, 在非老年组中则刚好相反, 其发病的首位原因是十二指肠溃疡, 其次才是胃溃疡, 两组差异非常明显. 对于胃溃疡在老年患者组出现较多的原因, 与老年患者的身体因素有关, 如胃黏膜功能退化、分泌功能降低以及胃黏膜营养因子的流失等. 此外, 老年患者常有血管动脉硬化的情况, 会使胃黏膜的血流量受到影响, 从而成为其再生修复的一大障碍. 同时, 老年患者因其他疾病的困扰, 常需要服用如非甾体类药物, 此类药物对于胃黏膜的损害非常严重, 会使患者形成或加重消化性溃疡, 这是导致老年人患者消化道出血的重要原因之一, 所以老年人患者在用药方面要特别注意, 以免影响胃黏膜的正常保护功能[11-13].

另外, 老年患者因其自身的免疫功能不断降低, 使其吞噬细胞的功能也随之减弱, 导致恶性肿瘤的发生率较中青年有明显的增高, 其具有不易察觉、出血量较少及早期诊断困难等, 所以, 临床医生应给予其足够的重视, 利用各种有力手段对患者进行早期确诊[14,15].

本研究发现食管静脉曲张破裂出血的发生率非老年组高于老年组患者, 这与我国食管静脉曲张破裂出血主要由肝炎后肝硬化引起, 而肝硬化的发病高峰年龄在35-48岁有关. 目前我国的乙型肝炎的感染率和发病率逐年增加, 且发病的年龄年轻化, 加上酗酒、吸烟、精神压力大和生活不规律等因素影响, 乙型肝炎发展成肝硬化的时间缩短, 出现食管静脉曲张破裂出血的时间较早[12].

总之, 老年人上消化道出血仍以消化性溃疡和胃癌为多见, 其中因胃溃疡、胃癌导致出血的比例较中青年人高, 合并症多, 病情复杂, 病死率高, 必须引起临床医生的重视, 以免延误诊治.

4 参考文献

1 谭华斌, 边至慰. 老年人上消化道出血198例临床分析. 临床消化病杂志 2007; 19: 318-320
2 王玉玲, 周永宁, 王沁, 姬瑞, 张宏玲, 赵越, 郭庆红, 路红. 老年人上消化道出血临床分析. 临床消化病杂志 2010; 22: 267-269
3 杨卓. 老年人上消化道出血396例临床分析. 中国老年学杂志 2008; 28: 2483-2485
4 张守华, 王文丽. 老年人上消化道出血296例临床分析. 实用老年医学 2004; 18: 46
5 Frossard JL, Spahr L, Queneau PE, Giostra E, Burckhardt B, Ory G, De Saussure P, Armenian B, De Peyer R, Hadengue A. Erythromycin intravenous bolus infusion in acute upper gastrointestinal bleeding: a randomized, controlled, double-blind trial. *Gastroenterology* 2002; 123: 17-23
6 Coffin B, Pocard M, Panis Y, Riche F, Lainé MJ, Bitoun A, Lémann M, Bouhnik Y, Valleur P. Erythromycin improves the quality of EGD in patients with acute upper GI bleeding: a randomized controlled study. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 174-179
7 Carbonell N, Pauwels A, Serfaty L, Boelle PY, Becquemont L, Poupon R. Erythromycin infusion prior to endoscopy for acute upper gastrointestinal bleeding: a randomized, controlled, double-blind trial. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1211-1215
8 Jenkins RL, Gedaly R, Pomposelli JJ, Pomfret EA, Gordon F, Lewis WD. Distal splenorenal shunt: role, indications, and utility in the era of liver transplantation. *Arch Surg* 1999; 134: 416-420
9 Henderson JM, Boyer TD, Kutner MH, Galloway JR, Rikkers LF, Jeffers LJ, Abu-Elmagd K, Connor J. Distal splenorenal shunt versus transjugular intrahepatic portal systematic shunt for variceal bleeding: a randomized trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 1643-1651
10 俞开敏. 老年患者上消化道出血95例的临床分析. 广西医学 2012; 34: 1365-1368
11 Sezgın O, Altintas E, Tombak A. Effects of seasonal variations on acute upper gastrointestinal bleeding and its etiology. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 172-176
12 汪春莲, 任海英, 欧阳春晖, 卢放根. 198例老年人急性上消化道出血的病因探讨. 中国内镜杂志 2006; 12: 648-649
13 周隽, 何继东, 欧阳晓波, 王一平. 红霉素在急性上消化道出血紧急内镜检查中应用的系统评价. 世界华人消化杂志 2009; 17: 3273-3277
14 赵作成, 秦鸣放. 胃镜在腹腔镜治疗上消化道良性疾病中的应用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3800-3803
15 陈文科, 邹兵, 王成文, 郭海, 郑爱萍. 活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样病变56例. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1847-1850

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利