

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

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 12 月 8 日 第 20 卷 第 34 期 (Volume 20 Number 34)



34/2012

ISSN 1009-3079



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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《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
杜雅莉主任医师
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
李国忠教授
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
庾必光教授
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
陈凜教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云南教授
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
姜卫东教授
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
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授

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
侯风刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李媛教授
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
刘森副教授
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
阴赓宏研究员
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 12 月 8 日 第 20 卷 第 34 期 (总第402期)

述 评	3287 脾虚证与肠道微生态 彭颖, 李晓波
基 础 研 究	3292 七方胃痛颗粒对 <i>H. pylori</i> 感染的AGS细胞TFF1表达及ERK/NF- κ B信号通路的影响 莫喜晶, 曾光, 陈国忠 3299 红花注射液对溃疡性结肠炎大鼠VEGF和bFGF表达的影响 原皓, 李学兴, 王鹤鸣, 原子英, 赵雪曼, 韩雪, 董文华
临 床 研 究	3305 Klotho与 β -Catenin在食管癌中的表达及临床意义 汤小伟, 黄曙, 王敏, 季国忠, 范志宁 3310 C型、D型和E型腺管开口肠上皮化生胃黏膜组织中Ki67、CDX2的差异表达 赵燕如, 赵治国, 马军, 黄煌, 刘超, 钟亚莉, 崔静, 李振峰, 任景丽, 吴会芳, 胡桂明 3317 抑癌基因CHD5在胃癌中的表达及临床意义 游焜, 张谢夫, 赵春临, 刘涛, 郭大鹏
焦 点 论 坛	3323 肝内胆管结石 金山, 王广义, 王英超, 孙晓东, 戴朝六, 赵阳, 程红岩, 王存川, 高明, 刘军, 孟凡迎, 贾淑芹, 福泉 3324 肝内胆管结石的病因及发病机制 金山 3329 肝内胆管结石的影像学表现 程红岩 3332 肝内胆管结石的手术治疗及术式评价 戴朝六, 赵阳 3336 肝内胆管结石合并胆管癌 王广义, 王英超, 孙晓东 3340 肝内胆管结石术后复发的再处理 王存川, 高明 3344 肝内胆管结石合并胆管狭窄的处理 刘军, 孟凡迎 3349 肝内胆管结石合并胆道感染的细菌谱 贾淑芹, 福泉, 金山
研 究 快 报	3354 胰腺癌干细胞差异microRNAs的表达及生物信息学 江建新, 高珊, 王敏, 李旭, 孙诚谊 3361 miR495、miR551a靶向干扰SGC7901细胞PRL-3基因的表达 蒋蒙蒙, 曹毅, 李正荣, 揭志刚 3366 人肠道病毒71型VP1和VP4的抗原融合表达及鉴定 冷弘, 王娜, 王媛媛, 臧文巧, 李敏, 赵国强 3370 miR-106a在大肠癌中的表达及其与肠癌细胞侵袭的关系 马群英, 王新颖, 李钊, 姜泊, 许岸高
临 床 经 验	3375 体质指数、食管裂孔疝与胃食管反流的关系 叶必星, 衡定, 姜柳琴, 王颖, 张红杰, 李学良, 林琳 3380 IL-22和IL-17 mRNA在慢性HBV感染者PBMCs中的表达及其意义 杨智, 陈洪涛, 张毅, 吴诗品 3385 Piwil2基因在肝癌组织中mRNA及蛋白的表达 贾慧丽, 徐芸 3390 早期肝功能损害对急性胰腺炎病因判定的临床价值 陈勇, 曾艳凌, 林志辉 3394 保脾手术治疗外伤性脾破裂36例 詹慧春, 徐早华, 曾卫华, 丁华民, 傅华群 3397 生物蛋白胶栓塞治疗门脉高压性上消化道出血30例 原强, 白旭明, 程龙, 顾星石, 靳勇

病例报告	3403 多发性早期胃癌诊断1例 王峰, 汪灏, 王萌, 时林森, 管文贤
附录	3406 《世界华人消化杂志》投稿须知 3411 2012年国内国际会议预告
志 谢	3412 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	3291 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 3304 2011年度《世界华人消化杂志》发文情况 3309 《世界华人消化杂志》栏目设置 3316 《世界华人消化杂志》参考文献要求 3328 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694 3335 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 3343 《世界华人消化杂志》修回稿须知 3353 《世界华人消化杂志》正文要求 3365 《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》 3374 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 3379 《世界华人消化杂志》外文字符标准 3389 WJG成功通过评审被PMC收录 3393 WJG总被引频次排名位于第174名
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 金山, 教授, 010050, 内蒙古自治区呼和浩特市, 内蒙古医科大学附属医院普外科
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

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2012-12-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>期刊名称 世界华人消化杂志 主管单位 山西省科学技术厅 主办单位 太原消化病研治中心</p> <p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>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, 福建医科大学附属医院协和医院消化内科 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心 张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心</p> <p>编辑部主任 李军亮</p>	<p>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</p> <p>《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。</p> <p>《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2012年版权归世界华人消化杂志所有</p>
--	---	--

World Chinese Journal of Digestology

December 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 34

EDITORIAL	3287 Pi-deficiency and gastrointestinal microbiota <i>Peng Y, Li XB</i>
BASIC RESEARCH	3292 Qifangweitong Granules regulates the expression of TFF1 in <i>Helicobacter pylori</i> -infected AGS cells via the ERK/NF- κ B signaling pathway <i>Mo XJ, Zeng G, Chen GZ</i> 3299 Effect of treatment with safflower solution on expression of VEGF and bFGF in ulcerative colitis in rats <i>Yuan H, Li XX, Wang HM, Yuan ZY, Zhao XM, Han X, Dong WH</i>
CLINICAL RESEARCH	3305 Clinical significance of expression of Klotho and β -Catenin in esophageal squamous cell carcinoma <i>Tang XW, Huang S, Wang M, Ji GZ, Fan ZN</i> 3310 Differential expression of Ki67 and CDX2 proteins in intestinal metaplasia among gastric mucosa appearing as type C, D, or E pit pattern <i>Zhao YR, Zhao ZG, Ma J, Huang H, Liu C, Zhong YL, Cui J, Li ZF, Ren JL, Wu HF, Hu GM</i> 3317 Clinical significance of expression of CHD5 in gastric carcinoma <i>You K, Zhang XF, Zhao CL, Liu T, Guo DP</i>
TOPIC HIGHLIGHT	3323 Hepatolithiasis <i>Jin S, Wang GY, Wang YC, Sun XD, Dai CL, Zhao Y, Cheng HY, Wang CC, Gao M, Liu J, Meng FY, Jia SQ, Fu Q</i> 3324 Etiology and pathogenesis of hepatolithiasis <i>Jin S</i> 3329 Imaging features of intrahepatic stones <i>Cheng HY</i> 3332 Evaluation of surgical treatments for hepatolithiasis <i>Dai CL, Zhao Y</i> 3336 Hepatolithiasis combined with intrahepatic cholangiocarcinoma <i>Wang GY, Wang YC, Sun XD</i> 3340 Management of recurrent stones in patients with hepatolithiasis after surgery <i>Wang CC, Gao M</i> 3344 Treatment of hepatolithiasis with bile duct stenosis <i>Liu J, Meng FY</i> 3349 Bacterial spectrum of hepatolithiasis with biliary tract infection <i>Jia SQ, Fu Q, Jin S</i>
RAPID COMMUNICATION	3354 Identification of differentially expressed microRNAs in pancreatic cancer stem cells <i>Jiang JX, Gao S, Wang M, Li X, Sun CY</i> 3361 Suppressive effect of miR495 and miR551a on PRL-3 expression in gastric cancer SGC7901 cells <i>Jiang MM, Cao Y, Li ZR, Jie ZG</i> 3366 Construction of a prokaryotic expression vector containing the EV71 VP1-VP4 fusion gene and detection of its expression <i>Leng H, Wang N, Wang YY, Zang WQ, Li M, Zhao GQ</i> 3370 Expression of miR-106a in colorectal cancer and its relation with tumor cell invasion <i>Ma QY, Wang XY, Li Z, Jiang B, Xu AG</i>
CLINICAL PRACTICE	3375 Association between body mass index, hiatal hernia and gastroesophageal reflux in patients with gastroesophageal reflux disease <i>Ye BX, Heng D, Jiang LQ, Wang Y, Zhang HJ, Li XL, Lin L</i> 3380 IL-22 and IL-17 mRNA expression in PBMCs from patients with chronic hepatitis B virus infection <i>Yang Z, Chen HT, Zhang Y, Wu SP</i> 3385 Clinical significance of expression of Piwil2 in hepatocellular carcinoma <i>Jia HL, Xu Y</i> 3390 Clinical value of early liver dysfunction in diagnosis of etiology of acute pancreatitis <i>Chen Y, Zeng YL, Lin ZH</i> 3394 Spleen-preserving operation for the treatment of traumatic splenic rupture: An analysis of 36 cases <i>Zhan HC, Xu ZH, Zeng WH, Ding HM, Fu HQ</i>

	3397 Efficacy of fibrin glue in percutaneous transhepatic obliteration for the management of upper gastrointestinal bleeding in patients with portal hypertension <i>Yuan Q, Bai XM, Cheng L, Gu XS, Jin Y</i>
CASE REPORT	3403 Multiple early gastric carcinoma: Report of one case <i>Wang F, Wang H, Wang M, Shi LS, Guan WX</i>
APPENDIX	3406 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 3411 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	3412 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Shan Jin, Professor, Department of Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Shuai Ma</i> Review Editor: <i>Ying Tian, Huan-Huan Zhai</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Ying Tian</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date December 8, 2012

NAME OF JOURNAL
World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION
Department of Science and Technology
of Shanxi Province

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

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

PRINTING
Beijing Kexin Printing House

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

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

EDITOR-IN-CHIEF

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

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

CSSN

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

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

脾虚证与肠道微生态

彭颖, 李晓波

彭颖, 李晓波, 上海交通大学药学院 上海市 200240
李晓波, 教授, 博士生导师, 主要从事相关疾病与肠道菌群关系, 以及中药肠道微生态代谢等相关研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30973962
作者贡献分布: 本文由彭颖完成综述; 李晓波负责审阅.
通讯作者: 李晓波, 教授, 博士生导师, 200240, 上海市东川路 800号, 上海交通大学药学院. xbli@sjtu.edu.cn
电话: 021-34204806
收稿日期: 2012-07-27 修回日期: 2012-08-22
接受日期: 2012-11-07 在线出版日期: 2012-12-08

Pi-deficiency and gastrointestinal microbiota

Ying Peng, Xiao-Bo Li

Ying Peng, Xiao-Bo Li, School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China
Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30973962
Correspondence to: Xiao-Bo Li, Professor, School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, 800 Dongchuan Road, Shanghai 200240, China. xbli@sjtu.edu.cn
Received: 2012-07-27 Revised: 2012-08-22
Accepted: 2012-11-07 Published online: 2012-12-08

Abstract

The special relationship between microecology and traditional Chinese medicine (TCM) has attracted wide attention in recent years, which provides a new perspective for understanding syndromes in TCM. Pi-deficiency is a common syndrome in TCM. Extensive studies have demonstrated that alteration and perturbation in the intestinal flora are associated with Pi-deficiency. Molecular biological methods have greatly expanded our knowledge of microbial diversity and highlight the impact of compositional changes in bowel communities on perceptions of Pi-deficiency. In this review, we summarize recent progress in understanding the relationship between intestinal microbiota and Pi-deficiency.

Key Words: Pi-deficiency; Intestinal microbiota; Traditional Chinese medicine

Peng Y, Li XB. Pi-deficiency and gastrointestinal microbiota. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3287-3291

摘要

近年来微生态学与中医学关系引起了中医药学者的广泛关注, 为中医证候的研究开辟了新的思路. 脾虚证为祖国医学脏腑辨证之常见证型, 研究证明中医“脾”与肠道微生态间存在着十分密切的关系, 分子生物学技术和基因组学技术的迅速发展为我们深入研究肠道微生态提供了有力的工具, 对脾虚证本质和检验标准的探索产生了巨大推动作用. 本文对脾虚证检验标准化研究及其与肠道微生态关系作一综述.

关键词: 脾虚证; 肠道微生态; 中医药

彭颖, 李晓波. 脾虚证与肠道微生态. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3287-3291
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3287.asp>

0 引言

脾虚证是中医临床常见证候, 是慢性消化系统疾病的主要证型. 一般表现为食欲减退、食后或下午腹胀、大便溏薄、面色饥黄和肌瘦无力等^[1,2]. 根据中医“异病同证”, 脾虚证是慢性消化系统疾病(慢性消化性溃疡、慢性胃炎、胃下垂、胃黏膜脱垂、慢性肠炎、慢性痢疾、消化不良、胰腺炎、肝炎等)的主要证型, 亦是非消化系统多种疾病(慢性支气管炎、功能性子宫出血、慢性肾炎、各种慢性出血性疾病等)的常见证型^[3], 其可在多种疾病中表现(或与其他病征伴同出现, 或在某种疾病的某个阶段出现)^[4]. 中医理论认为脾主运化而归属于土, 为后天之本, 气血生化之源. 脾病证候分虚实两端, 其证候体系包括脾气虚证、脾虚气陷证、脾不统血证、脾阳虚证等4个虚证以及寒湿困脾证、湿热蕴脾证2个实证^[5,6]. 而临床上脾虚证以脾气虚、脾阳虚证候最为常见, 因此成为目前临床研究的热点.

1 脾虚证研究概况

近年来, 证候实质研究极大地推进了中西医结

■背景资料

近年来, 证候实质研究极大地推进了中西医结合各领域的进展, 脾虚证的实质研究则是其中的重要方面. 基于脾脏在中医脏象中所处的特殊地位, 以致脾虚证实质的研究经久不衰, 对脾虚证检测指标的探索层出不穷. 随着脾虚证动物模型的建立和现代科学技术的引入等, 使得脾虚证的实验研究从多角度、多层次、多形式的展开, 相关检测指标已达80余种, 使脾虚证的临床诊断标准由最初单纯症状、体征等主观定性指标逐渐过渡到参与部分客观定量指标.

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理室

■ 研发前沿

近年来微生物学与中医学关系引起了中医药学者的广泛关注,为中医证候的研究开辟了新的思路。

合各领域的进展,脾虚证的实质研究则是其中的重要方面。基于脾脏在中医脏象中所处的特殊地位,以致脾虚证实质的研究经久不衰,对脾虚证检测指标的探求层出不穷。随着脾虚证动物模型的建立和现代科学技术的引入等,使得脾虚证的实验研究从多角度、多层次、多形式的展开(如从胃肠道功能^[7]、血液^[8]、神经^[9]、内分泌^[10]、免疫^[11]、自由基损伤^[12]等角度进行了研究),相关检测指标已达80余种(其中包括唾液淀粉酶、D-木糖排泄率^[13]、血乳酸值^[14]、蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)活力^[15]、血清中胃泌素(gastrin, Gas)和胃动素(Motilin, Mot)的含量、胃窦中生长抑素(somatostatin, SS)的含量^[16]等,使脾虚证的临床诊断标准由最初单纯症状、体征等主观定性指标逐渐过渡到参与部分客观定量指标(唾液淀粉酶活性和木糖排泄率),体现了传统中医与现代科学技术方法相融合的特点,推动了中医药现代化、国际化。中医的证包括了病因、病位、病性和邪正等关系,五脏中的某一脏的病理变化囊括了多系统多功能的变化。因此以西医某一指标反映某一病理变化的观点,不能很好地反映中医整体观念的某一脏虚证的实质,只能从一个局部反映其实质。因此加强脾虚证检验标准化深入研究,重点是选择一组具有内在联系的指标群,从多方位多角度反映其本质,并与临床研究相结合,将是很好的思路和切入点。中医微生物学的兴起使中医与现代医学有了新的结合点^[17],微生物学一些基本观点与中医学理论,如微生物系统论/中医脏象学说^[18]、微生物与内外环境统一论/中医整体观念^[19]、微生态自溶与增殖/中医阴阳学说^[20]、微生态失调/中医邪正盛衰^[21]等存在着诸多相似之处,为中西医结合研究搭建新的桥梁,也为中医证候实质的研究开辟了新的思路。

2 肠道微生态及其重要性

人类胃肠道中栖息着大量微生物,肠道微生态是一个极其复杂的微生态系统,在维持人类的健康中起着非常重要的作用。人体肠道中细菌主要由专性厌氧菌及兼性厌氧菌组成,其各自所占的比例有着较大的差别,易受到各种因素的影响而发生变化,这些变化在一定的范围内波动并保持着相对稳定的平衡状态,即肠道微生态平衡。这个微生态系统平衡一旦被打破,失去自身原有的平衡,机体就会产生疾病。现代医学研究表明,肠道菌群的变化和许多疾病密切

相关,例如肥胖症^[22]、炎症性肠病(主要包括溃疡性结肠炎、克罗恩病)^[23]、肠应激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)^[24]、内毒素血症^[25]、消化系统癌症^[26]、败血症、肝硬化^[27]等。近年随着“微生物组”-人类第二基因组^[28]和“慢性病的肠源性学说”^[29,30]等新理论的提出使人体共生微生物在人类健康的作用引起广大学者浓厚的兴趣,也为中医微生物学研究提供了一个革命性的前景。肠道菌群结构的变化直接影响和决定着人体的健康状况,研究肠道菌群的组成变化可以从一个侧面整体上反映机体的生理功能状况。因此,加强肠道菌群组成和结构多样性研究,不仅有助于阐明肠道菌群功能和宿主间相互关系,以及肠道菌群间的相互作用,对了解和治疗脾虚证和人类健康具有积极意义。

3 脾虚证与肠道菌群的关系

中医认为脾为后天之本,气血生化之源,与机体的免疫功能和营养状况密切相关,研究证明中医脾与胃肠道正常菌群之间存在着十分密切的关系,脾虚与肠道菌群的失调密切相关。

3.1 脾主运化 中医学理论认为,脾主运化,生气血,主统血,主肌肉四肢,主思,为后天之本。脾的功能包括了消化吸收、水盐代谢、自由基损伤、血液、免疫、神经内分泌及运动等多系统功能。而在脾的功能中,主运化为其最重要的功能之一,为其他功能的基础。脾虚证是反映机体脾胃生理机能不足的综合证。当机体胃肠功能异常时,肠道的微生态系统会受到严重破坏,大肠杆菌等条件性病原菌大量增殖,双歧杆菌、乳杆菌等益生菌数量显著下降^[31];同时菌群失调又反过来影响机体对营养物质的吸收,降低机体免疫力^[32],削弱肠道的屏障功能^[33],进一步加重疾病。脾虚使机体出现消化吸收障碍,出现纳差、便溏、消瘦等症状,机体各脏器间的平衡遭到破坏进而导致菌群失调,而肠道菌群的失调又加重脾虚症状。肠道微生态平衡是肠黏膜发挥正常功能的基础,脾虚泄泻时,肠蠕动加快,肠道中常住菌大量排出,外源菌相应增加,例如类杆菌、双歧杆菌、肠杆菌数值显著减少;而有潜在致病性的梭菌、酵母菌增多,这导致肠道脂肪酸代谢紊乱和胆盐代谢障碍,促进腹泻的发生,而腹泻又导致肠道菌的进一步紊乱,形成恶性循环。因此,探讨和揭示肠道菌群结构改变与脾虚证关系不仅可以丰富完善脾虚证的本质,更为脾虚证检验标准化研究提供科学依据。

3.2 脾为之卫 中医的“脾”与机体的免疫功能密切相关。“脾为之卫”、“脾为后天之本”以及“脾气虚而四肢不用,五脏不安”等有关脾胃中医理论均反映了“脾”与机体防御机能(免疫功能)之间存在密切关系。“脾胃内伤、百病由生”,脾胃虚弱是胃部疾病发生的重要原因。近年来基础免疫学和临床免疫学大量动物实验和临床研究证明,免疫系统和免疫功能的改变是脾虚证本质研究的重要内容之一^[34-36]。脾虚证的发生涉及免疫学的非特异性免疫、体液免疫、细胞免疫、分子免疫以及免疫遗传等各方面^[37-39]。而肠道菌群与机体免疫之间的关系极为密切。肠道菌群的重要生理意义包括抵御病原体侵袭、刺激机体免疫器官的成熟、激活免疫系统及参与合成多种维生素、调节物质代谢等。肠道黏液层是免疫系统与外界的主要屏障,肠道相关的免疫系统是人体最大的淋巴免疫活性细胞库。细菌与宿主在黏膜表面的相互作用对于免疫系统的进化有着重要作用^[40,41]。正常的肠道免疫屏障能对来自黏膜表面的各种抗原作出正确反映,一旦肠道菌群和肠道免疫平衡被打破,肠道免疫就失去对正常菌群某些抗原的耐受,诱发疾病的产生。因此,中医“脾”与肠道菌群在机体防御和免疫功能方面存在密切联系,阐明肠道菌群和宿主关系以及肠道环境健康对探索脾虚证本质和发病机制研究具有重要意义。

4 脾虚证肠道菌群变化

以往关于脾虚证肠道微生态研究多采用传统培养计数的方式对菌群进行检测和定量分析,观察菌种仅为双歧杆菌、乳酸杆菌、类杆菌、肠杆菌、肠球菌等极少数常见已知菌种。随着分子生物学和基因组学的发展,大量分子生物学和基因组学新技术应用于肠道微生态的研究,对肠道中细菌的多样性研究得到加强,同时为我们认识生命和疾病的本质提供了全新的视角^[42,43]。研究表明脾虚泄泻患者双歧杆菌(B)/肠杆菌(E)比值低于正常人,厌氧菌减少,尤其是B/E值改变是脾失健运患者肠道微生态学的主要特征^[44];脾虚湿盛泄泻的患者粪便中双歧杆菌比正常健康人明显减少,并且其舌部(腻苔)的菌群构成与正常健康人(薄白苔)差异有显著性^[45];腹泻型肠易激综合征脾胃湿热证患者与脾气虚证比较,在菌群多样性上湿热证与脾气虚证组无明显差异,但在肠道细菌比例方面湿热证革兰阳性杆

菌比例明显升高,肠道菌群密集度明显高于脾气虚证^[46]。采用16S rDNA DGGE对老年脾虚证患者肠道菌群结构分析表明脾阳虚、脾气虚和脾阳虚兼脾气虚患者的肠道菌群结构具有各自明显特征,同一证型不同病症、临床表征和病程的脾虚证患者肠道菌群结构不同^[47]。

动物实验表明,醋酸胃溃疡脾虚、运动疲劳兼饮食失调脾虚模型大鼠粪便肠道菌群ERIC-PCR指纹图谱中的条带位置及亮度与健康时期相比发生明显变化^[48,49]。番泻叶与大黄煎剂致大鼠脾虚后肠道菌群多样性显著降低^[50]。在脾虚证治疗相关中药的研究报道中,脾虚证小鼠肠道厌氧菌群异常低下且部分需氧菌显著增加,而四君子汤^[51]、益元止泻颗粒^[52](四君子汤加味)、补脾益气方^[53](附子理中汤、香砂六君子汤、异功散、补中益气汤和六君子汤)和参苓白术散^[54]均可调整脾虚小鼠的肠道菌群,改善菌群失调;另外由黄芪、太子参、山药等组成的健脾止泻颗粒,通过调节脾虚泄泻小鼠肠道微生态平衡,改善小肠吸收细胞绒毛的结构而发挥治疗脾虚作用^[55]等,更进一步证明脾虚证与肠道微生态间密切关系。

5 结论

近年肠道微生态的重要性以及其与脾虚证发生发展的联系逐步引起了人们的广泛重视,在中医药研究中的应用前景受到了广泛的关注。但是,目前证候与肠道微生态学的研究尚处在探索阶段。微生态学的研究方法和中医基础理论中的整体观念的一致性使得微生态学技术尤为适合应用于中医基础理论的研究,作为中医证候中最重要也是最常见的脾虚证,此方面研究应得到更多的关注。分子生物学技术和基因组学技术的迅速发展为我们深入研究肠道微生态提供了有力的工具,为阐明肠道菌群的结构和功能提供了可能,也为探索肠道菌群和宿主关系以及肠道相关疾病和肠道环境健康奠定了基础。应用分子生物学技术建立脾虚证相关的分子指标,为临床诊断疾病提供更具代表性的标准与模式,从而为治疗提供客观可靠的依据值得期待。随着技术与方法的不断创新与发展,中医微生态学必将在中医与西医各学科中发挥越来越重要的作用,并搭建起中西医结合的交叉点。

6 参考文献

- 1 危北海.有关脾胃学说的理论探讨及临床诊治经验.

■应用要点

近年随着“微生物组”人类第二基因组和“慢性病的肠源性学说”等新理论的提出使人体共生微生物在人类健康的作用引起广大学者浓厚的兴趣,也为中医微生态学研究提供了一个革命性的前景。

■同行评价

本文内容丰富, 文献引用合理, 具有一定的可读性。

- 2 杜如竹. 脾虚证研究初探. 天津中医 1990; 5: 32-35
- 3 陈家旭. 中医脾虚证的研究进展与展望. 湖南中医药导报 1998; 4: 14-16
- 4 高秉谔, 焦爱兰. 脾虚证临床与实验研究进展. 中国中西医结合消化杂志 2001; 4: 251-253
- 5 王新华, 罗益宽. 中医学基础. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 234
- 6 朴仁范, 修宗昌. 脾病证候体系及其诊断标准浅析. 山西中医 2009; 30: 127-128
- 7 刘芳, 任平, 李月彩, 黄熙. 脾虚证大鼠胃、肠电-机械活动异常与CCK, SS含量变化的关系. 第四军医大学学报 2001; 22: 881-884
- 8 王洪海, 谢鸣. 脾虚证模型大鼠血液流变学及TXB₂、6-Keto-PGF₁的变化. 北京中医药大学学报 2007; 30: 761-768
- 9 李艳彦, 谢鸣, 陈禹, 王洪海. 肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺皮质的变化. 现代生物医学进展 2006; 6: 10-12, 15
- 10 任平, 刘芳, 黄熙, 张莉, 王骊丽, 封吉化. 脾虚大鼠生长抑素、胃动素、胆囊收缩素内分泌细胞的变化. 成都中医药大学学报 2001; 24: 35-37
- 11 王洪海, 谢鸣. 复合病因造模致脾虚证大鼠模型在免疫系统方面的变化. 中国实验方剂学杂志 2006; 12: 41-45
- 12 赵丽, 曲长江. 脾虚与自由基. 辽宁中医学院学报 2002; 4: 104-105
- 13 修宗昌, 余绍源, 黄德平. 脾虚证临床诊断标准浅识. 中医药学刊 2003; 21: 219-220
- 14 王晓明, 易杰, 廖世新, 浦田繁, 森和, 李德新. 脾虚证动物模型的客观评估. 中华中医药杂志 2006; 21: 406-408
- 15 沈华, 关崇芬. 蛋白酪氨酸激酶的ELISA测定方法及其在脾虚证研究中的应用. 中国中西医结合杂志 1998; 18: 243-245
- 16 任平, 黄熙, 李月彩, 刘芳, 张莉, 王骊丽, 封吉化. 脾虚证大鼠组织和血浆中SS, CCK, Mot含量的变化. 世界华人消化杂志 2000; 8: 436-438
- 17 张声生, 杨静. 胃肠道微生态学中西医结合研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3135-3138
- 18 杨景云, 杨继新. 中医药微生态学的研究现状. 中国微生态学杂志 2003; 15: 1-3
- 19 蔡子微, 康白. 关于中医学与微生态学在原理上的统一性. 中国微生态学杂志 1995; 7: 43-48
- 20 刘卫红. 微生物自溶现象在中医微生态学研究中的意义. 山东中医药大学学报 1998; 22: 328
- 21 李庆生, 袁嘉丽, 陈文慧. 微生态失调与免疫功能紊乱属中医“邪气”范畴. 中医药学刊 2005; 23: 199-202
- 22 Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027-1031
- 23 Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 44-54
- 24 Si JM, Yu YC, Fan YJ, Chen SJ. Intestinal microecology and quality of life in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1802-1805
- 25 冯志杰. 消化系统患的肠道菌从改变. 河北医药 1994; 16: 23-24
- 26 Umesaki Y, Setoyama H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect* 2000; 2: 1343-1351
- 27 Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519
- 28 Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Zhang Y, Shen J, Pang X, Zhang M, Wei H, Chen Y, Lu H, Zuo J, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith LM, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2117-2122
- 29 Zhao L, Shen J. Whole-body systems approaches for gut microbiota-targeted, preventive healthcare. *J Biotechnol* 2010; 149: 183-190
- 30 Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 2010; 4: 232-241
- 31 Ewaschuk JB, Dieleman LA. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5941-5950
- 32 吴仲文. 肠道屏障与肠道微生态. 中国危重病急救医学 2004; 16: 768-770
- 33 徐凯进, 李兰娟. 肠道正常菌群与肠道免疫. 国外医学·流行病学传染病学分册 2005; 32: 181-183
- 34 段永强, 成映霞, 程容, 梁玉杰, 朱立鸣. 脾虚证进程中小鼠特异性/非特异性免疫功能变化及中药的干预作用. 中国老年学杂志 2011; 31: 2874-2876
- 35 尹朋, 赵焯, 朱晓宇, 王宁, 刘凤华, 许剑琴, 胡艳欣. 实验性脾虚大鼠小肠结构与免疫功能的变化. 中国兽医杂志 2010; 46: 16-19
- 36 钱泽南, 钱会南. 脾虚证与神经-内分泌-免疫调节相关机制研究. 辽宁中医杂志 2010; 37: 401-403
- 37 杨舒, 钱会南. 中医脾虚证的免疫机制研究进展. 辽宁中医杂志 2008; 35: 1433-1435
- 38 陈学习, 张英杰, 李美霞, 吴赞. 脾虚证与免疫系统关系研究概况与思考. 中国当代医药 2010; 17: 6-8
- 39 王明明, 郁晓维. 脾虚证免疫学研究. 吉林中医药 2011; 31: 1035-1037
- 40 Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front Microbiol* 2011; 2: 180
- 41 Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franceschi C, Brigidi P. Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age (Dordr)* 2012; 34: 247-267
- 42 Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion* 2006; 73 Suppl 1: 5-12
- 43 Tannock GW. The search for disease-associated compositional shifts in bowel bacterial communities of humans. *Trends Microbiol* 2008; 16: 488-495
- 44 吴三明, 张万岱. 脾虚泄泻患者肠道微生态学的初步研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1996; 4: 203-204
- 45 卢林, 杨景云, 李丹红. 脾虚湿盛泄泻患者肠道微生态及舌部菌群变化的临床观察. 中国微生态学杂志 2007; 19: 333-334
- 46 江月斐, 劳绍贤, 邝枣园, 傅肖岩, 卞兆祥. 腹泻型肠易激综合征脾胃湿热证肠道菌群的变化. 中国中西医结合杂志 2006; 26: 218-220
- 47 刘佳, 彭颖, 张硕颖, 吴春福, 杨静玉, 李晓波. 老年脾虚患者肠道菌群16S rDNA变形梯度凝胶电泳分析. 中华中医药杂志 2010; 25: 1566-1569
- 48 郭燕文, 彭颖, 李晓波. 中药复方对醋酸胃溃疡脾虚大鼠的治疗作用比较. 现代生物医学进展 2009; 9: 410-413
- 49 彭颖, 金晶, 杨静玉, 吴春福, 李晓波. 3种健脾补气方药对脾气虚证大鼠肠道菌群的影响. 中国中药杂志 2008; 33: 2530-2534
- 50 王卓, 彭颖, 李晓波. 四君子汤对两种脾虚模型大鼠

- 肠道菌群紊乱的影响. 中国中西医结合杂志 2009; 29: 825-829
- 51 任光友, 张贵林, 卢素琳, 钟恒亮. 四君子汤对动物肠菌失调及正常胃肠功能的药理研究. 中成药 2000; 7: 504-506
- 52 李秀亮, 高永翔, 周淑芳, 钟柏松, 唐彦, 李陈, 高子平, 赵琼. 益元止泻颗粒对脾虚泄泻小鼠肠道菌群的影响. 成都中医药大学学报 2001; 3: 10, 13
- 53 严梅桢, 宋红月, 谢念祥, 刘林祥. 补脾益气方对实验性“脾虚”小鼠肠道菌群的影响. 中国实验方剂学杂志 1995; 2: 28-30
- 54 丁维俊, 周邦靖, 翟慕东, 白华. 参苓白术散对小鼠脾虚模型肠道菌群的影响. 北京中医药大学学报 2006; 8: 530-533
- 55 朱珊. 健脾止泻颗粒对脾虚泄泻小鼠肠道菌群和小肠黏膜的作用. 北京中医药大学学报 2003; 3: 28-30

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》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。

七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1表达及ERK/NF- κ B信号通路的影响

莫喜晶, 曾光, 陈国忠

■背景资料

由幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染引起的基础, *TFF1*基因作为胃肠道腔内黏膜及上皮细胞的早期关键修复因子及抑癌因子, 在胃肠道黏膜损伤修复和完整性方面起着重要作用。七方胃痛颗粒在促进黏膜上皮细胞修复再生, 减轻腺体的破坏, 逆转胃黏膜腺体萎缩及肠上皮化生方面显示了较好的效果, 但其对TFF1表达的影响和机制尚未明确。

莫喜晶, 曾光, 广西中医药大学研究生学院 广西壮族自治区南宁市 530001

陈国忠, 广西中医药大学第一附属医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530023

莫喜晶, 在读硕士, 主要从事中医药防治消化系统疾病方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30960474

广西科技开发课题基金资助项目, No. 10183011

广西教育厅科研基金资助项目, No. 桂教科研[2006]26153

作者贡献分布: 莫喜晶与陈国忠对此文所作贡献均等; 陈国忠为课题总负责人; 本课题由莫喜晶、陈国忠及曾光设计; 研究过程、数据分析由莫喜晶与曾光完成; 研究所用的新试剂及分析工具由陈国忠提供; 论文由莫喜晶完成。

通讯作者: 陈国忠, 教授, 主任医师, 530023, 广西壮族自治区南宁市东葛路89-9号, 广西中医药大学第一附属医院消化内科。cheninjp@163.com

收稿日期: 2012-10-12 修回日期: 2012-11-09

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-12-08

Qifangweitong Granules regulates the expression of TFF1 in *Helicobacter pylori*-infected AGS cells via the ERK/NF- κ B signaling pathway

Xi-Jing Mo, Guang Zeng, Guo-Zhong Chen

Xi-Jing Mo, Guang Zeng, Graduate School, Guangxi Chinese Medical University, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Guo-Zhong Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Chinese Medical University, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30960474; the Scientific and Technical Development Project of Guangxi, No. 10183011; and the Education Research Project of Guangxi, No. [2006]26153

Correspondence to: Guo-Zhong Chen, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Chinese Medical University, 89-9 Dongge Road, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. cheninjp@163.com

Received: 2012-10-12 Revised: 2012-11-09

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of Qifangweitong Granules on the expression of trefoil factor family 1 (TFF1) in human gastric cancer cell line AGS infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and the possible regulatory mechanism involved.

■同行评议者

王蔚虹, 教授, 主任医师, 北京大学第一医院消化内科

METHODS: TAGS cells infected by *H. pylori* were exposed to Qifangweitong Granules in the presence or absence of U0126, a special inhibitor of ERK1/2 pathway. After treatment, the expression of TFF1 mRNA and protein in *H. pylori*-infected AGS cells was determined using real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RFQ-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: Treatment with 10%, 20% and 30% Qifangweitong Granules drug serum significantly up-regulated the expression of TFF1 mRNA in AGS cells infected by *H. pylori* compared to control cells (271 ± 33 , 305 ± 23 , 327 ± 13 vs 187 ± 30 , all $P < 0.05$). The protein expression of TFF1, p-ERK, and NF- κ B in AGS cells treated with 10%, 20% and 30% Qifangweitong Granules drug serum was also significantly higher than that in control cells (TFF1: 271 ± 22 , 358 ± 31 , 428 ± 34 vs 210 ± 13 , all $P < 0.05$). After blocking the ERK signal transduction pathway, the protein expression of TFF1 was significantly down-regulated compared to the control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with Qifangweitong Granules regulates the expression of TFF1 in *Helicobacter pylori*-infected AGS cells possibly via the ERK/NF- κ B signal transduction pathway.

Key Words: Qifangweitong Granules; AGS cells; *Helicobacter pylori*; Trefoil factor family 1; ERK/NF- κ B signaling pathway

Mo XJ, Zeng G, Chen GZ. Qifangweitong Granules regulates the expression of TFF1 in *Helicobacter pylori*-infected AGS cells via the ERK/NF- κ B signaling pathway. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3292-3298

摘要

目的: 探讨七方胃痛颗粒对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染的人胃腺癌AGS细胞三叶因子1(trefoil factor family 1, TFF1)的表达及其细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号通路的影响。

调控机制。

方法: 采用实时荧光定量PCR(RFQ-PCR)法检测TFF1 mRNA的表达, Western blot法检测TFF1、磷酸化ERK及NF- κ B蛋白的表达水平; 同时采用U0126抑制ERK信号通路后, 观察AGS细胞TFF1蛋白表达的变化。

结果: 10%、20%、30%浓度七方胃痛颗粒药物血清作用*H. pylori*感染的AGS后, TFF1 mRNA表达量为 271 ± 33 、 305 ± 23 、 327 ± 13 , 显著高于实验对照组的 187 ± 30 , ($P < 0.05$); TFF1、p-ERK及NF- κ B蛋白表达量分别为 271 ± 22 、 358 ± 31 、 428 ± 34 ; 175 ± 9 、 141 ± 3 、 107 ± 15 ; 116.0 ± 2.6 、 83 ± 2 、 53.0 ± 6.6 ; 与实验对照组的 210 ± 13 比较, 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。加入U0126阻断ERK信号通路后, TFF1蛋白表达量为 115 ± 6 , 与实验对照组的 210 ± 13 比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 七方胃痛颗粒可能通过抑制ERK/NF- κ B信号通路参与调控*H. pylori*诱导的AGS细胞TFF1表达, 促进上皮修复, 是其防治*H. pylori*诱发胃癌可能的机制之一。

关键词: 七方胃痛颗粒; AGS细胞; 幽门螺杆菌; 三叶因子1; ERK/NF- κ B信号通路

莫喜晶, 曾光, 陈国忠. 七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1表达及ERK/NF- κ B信号通路的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3292-3298

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3292.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染与胃癌的发生密切相关, 世界卫生组织将其列为胃癌的一级致病因子^[1]。*H. pylori*感染引起的慢性持续胃黏膜损伤的基础上出现萎缩性胃炎, 伴肠上皮化生和/或异型增生, 最终导致胃癌的发生。三叶因子1(trefoil factor family 1, TFF1)作为胃肠道腔内黏膜及上皮细胞的早期关键修复因子及抑癌因子, 对胃肠道黏膜损伤的修复和胃肠道黏膜的完整性方面起着非常重要的作用, 也是防止损伤持续发展诱导胃癌的关键因子。细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是MAPK家族的重要成员, 目前大量的研究表明, ERK信号通路是多数生长因子和细胞因子调控细胞增殖的重要途径^[2]。核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种重要

的核转录调控因子, 广泛存在于各种细胞中, 参与机体免疫应答、炎症反应、细胞凋亡及肿瘤形成过程^[3]。本课题组前期的研究发现, 七方胃痛颗粒对消化性溃疡具有良好的防治作用^[4], 动物实验表明其能较好的促进黏膜上皮细胞再生, 增加黏液层厚度, 改善溃疡愈合效果^[5], 同时研究表明七方胃痛颗粒能通过改善胃黏膜血流, 减轻腺体的破坏, 逆转胃黏膜腺体萎缩及肠上皮化生^[6]。本研究旨在探讨七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染的人胃腺癌AGS细胞TFF1的表达及ERK/NF- κ B信号通路的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠, SPF级, 体质量约250 g, 30只, 由广西中医药大学实验动物中心提供。AGS细胞株购自中科院上海细胞库; *H. pylori*标准株(ATCC43504)购自广州; 七方胃痛颗粒: 红参须10 g、白术10 g、黄芪30 g、茯苓12 g、炙甘草10 g、丹参6 g、木香6 g、黄连6 g、吴茱萸3 g、白芍30 g、枳实10 g、炒鸡内金10 g, 原料药采用江阴天江药业有限公司生产的免煎中药颗粒, 由广西中医药大学第一附属医院制剂室提供, 将中药颗粒混合搅匀, 灭菌包装, 每小包含生药8 g; FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)(Roche, 德国, 以下简称Mix); 总RNA抽提试剂盒(Tiangen公司); 反转录反应试剂盒(Fermentas公司, 美国); Ham's-F12培养基、胎牛血清(Gibico公司); 哥伦比亚血琼脂、脑心浸液(北京路桥公司); 脱脂绵羊血清(广州泌特生物技术有限公司); 鼠抗TFF1单克隆抗体(美国Santa Cruz公司); 兔抗人NF- κ B p65抗体(美国Santa公司); P-ERK抗体(Promega公司); HRP标记山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥有限公司); ERK抑制剂U0126^[7](Sigma公司); BCA蛋白浓度测定试剂盒(Viagene公司); RIPA裂解液(强)碧云天生物工程有限公司。TFF1基因和GRPDH基因PCR引物由上海生工生物工程公司合成。微需氧产气袋、密闭罐(日本三菱瓦斯化学株式会社); 5804R高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司); 荧光定量PCR仪(Eppendorf Realplex, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞株与菌株培养: AGS细胞株在37℃、5%CO₂饱和湿度条件下置于含10%胎牛血清的Ham's-F12培养基中, 常规培养。将冻存的*H. pylori*菌株复苏后, 接种于含10%脱纤维绵羊血的哥伦比亚血琼脂培养基中, 于37℃、5%O₂、

■研究前沿

本研究运用实时荧光定量PCR方法, 从基因转录和蛋白水平来分析七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染胃上皮细胞TFF1表达的作用机制, 阐明该复方中药的作用机制。

■应用要点

本研究从体外活细胞着手,将*H. pylori*按100:1感染人胃黏膜上皮细胞共培养,施以七方胃痛颗粒药物血清及ERK信号通路抑制剂等因素,观察*TFF1*基因的表达情况,为阐明该复方中药治疗作用靶点提供理论依据。

10%CO₂、85%N₂微需氧条件下培养72 h,经快速尿素酶、革兰染色等证实为*H. pylori*。

1.2.2 药物血清制备:根据对大鼠用药按照动物体表面积以成人用量来折算的方法,大鼠每日用量为成人剂量的0.018倍^[8]。先将药物用生理盐水稀释,配制成浓度为2 g/mL的药物混悬溶液对大鼠灌胃,按照1 mL/100g鼠质量,2次/d,连续5 d,末次灌胃结束后禁食,1 h后无菌条件下从腹腔采集静脉血,静置3-4 h,4 ℃ 3 000 r/min离心20 min,超净台上分离血清。将分离得到的血清置于56 ℃水浴中30 min灭活,0.22 μm滤器过滤,-70 ℃冷藏备用。实验时加入Ham's-F12培养基分别配制含100、200、300 mL/L(即10%、20%、30%)药物血清的培养基。

1.2.3 *H. pylori*感染人胃腺癌AGS细胞:取增殖活跃的AGS细胞以每板1×10⁶接种于6孔板中。当细胞贴壁后,更换不含抗生素的细胞培养液,用接种环刮取培养基上的*H. pylori*活菌,悬于不含抗生素的细胞培养基中,按紫外分光光度计测得A₆₀₀值(1A = 2.5×10⁹ CFU/mL),调整*H. pylori*细菌密度,按细菌和细胞数量100:1的比例向培养于6孔板中的AGS细胞中加入菌液,继续培养24 h。

1.2.4 荧光定量PCR检测*TFF1* mRNA的表达:取对数生长期细胞分成5组,分别加入10%、20%、30%的药物血清预培养4 h,再按细菌与细胞100:1的比例加入*H. pylori*共同培养24 h,同时以常规培养的AGS细胞为正常对照,AGS细胞加*H. pylori*为实验对照,荧光定量PCR检测*TFF1* mRNA的表达。(1)细胞总RNA的提取:各组细胞分别加入细胞裂解液800 μL,用移液器吹打均匀,再加入预冷的氯仿200 μL,剧烈震荡15 s,静置3 min,4 ℃,12 000 r/min离心10 min。小心吸取上层水相,加入0.5倍体积的无水乙醇,混匀之后转入吸附柱中4 ℃,12 000 r/min离心30 s,弃废液,向吸附柱中加500 μL去蛋白液4 ℃,12 000 r/min离心30 s,弃废液,向吸附柱中加700 μL漂洗液,室温静置2 min,4 ℃,12 000 r/min离心30 s。重复漂洗一次。将吸附柱晾干后加入50 μL RNase-free ddH₂O,室温静置2 min,4 ℃,12 000 r/min离心2 min。测定RNA浓度及纯度(A_{260/280}为1.8-2.0),置于-80 ℃保存备用;(2)逆转录反应:将上述提取的总RNA按照逆转录试剂盒的说明书操作逆转录合成cDNA。取3 μg总RNA,oligo(dT)18 1 μL,加RNase-free water至总体积为12 μL,微离心,于PCR仪中65 ℃孵育

5 min,置冰上,依次加入5×buffer 4 μL, Rnasin 1 μL, dNTP Mix 2 μL, M-MLV 1 μL,混匀,微离心,PCR仪中42 ℃孵育60 min,70 ℃ 5 min终止反应。合成的cDNA于-80 ℃保存备用;(3)实时荧光定量PCR反应(RFQ-PCR)*TFF1*上游引物序列为:5'-GGAGAACAAGGTGATCTGCG-3',下游引物序列为:5'-CCCTTATTTGCACACTGGGA-3',扩增产物大小为153 bp; GAPDH上游引物序列为:5'-CTATAAATTGAGCCCGCAGC-3',下游引物序列为:5'-GACCAAATCCGTTGACTCCG-3',扩增产物大小为143 bp。反应体系(cDNA 1 μL、Mix 10 μL、10 μmol/L上、下游引物各0.6 μL、RNase-free Water 7.8 μL)反应总体积为20 μL进行PCR扩增反应,反应条件:95 ℃ 10 min预变性;95 ℃ 15 s变性;60 ℃ 1 min退火。共40个循环;(4)不同样本表达量的测定:按标准品的体系以及条件分别测定不同样本Ct值,2^{-ΔΔCt}计算基因表达的差异。

1.2.5 Western blot:取对数生长期细胞,分别加入10%、20%、30%含药药物血清,预处理2 h,再按细菌与细胞100:1的比例,与*H. pylori*共培养24 h,Western blot检测*TFF1*、p-ERK及NF-κB蛋白表达。另AGS细胞先加入10 μmol U0126培养2 h后,与*H. pylori*共同培养24 h,Western blot检测*TFF1*蛋白表达水平。以上均以常规培养的AGS细胞为正常对照,AGS细胞加*H. pylori*为实验对照。各组细胞加入细胞裂解液,冰上孵育30 min,细胞裂解物于4 ℃,14 000 r/min离心15 min,取上清。BCD分析试剂测定蛋白浓度。20 μg总蛋白质在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转移至PVDF膜,含5%脱脂奶粉的TBST液封闭,室温震荡1.5 h,加一抗4 ℃过夜,HRP标记的二抗,室温下震荡2 h后,以1:1加入AB显影液,用Bio-Rad Gel doc 2000凝胶成像分析系统进行胶片扫描并分析灰度值,以目的条带与内参灰度值的比值反映蛋白的表达。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行统计分析,计量资料以mean±SD,多组均数间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK检验,P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染的AGS细胞*TFF1* mRNA的影响 与正常对照组比较,*H. pylori*感染的AGS细胞*TFF1* mRNA表达升高(P<0.05),与实验对照组比较,10%、20%、30%

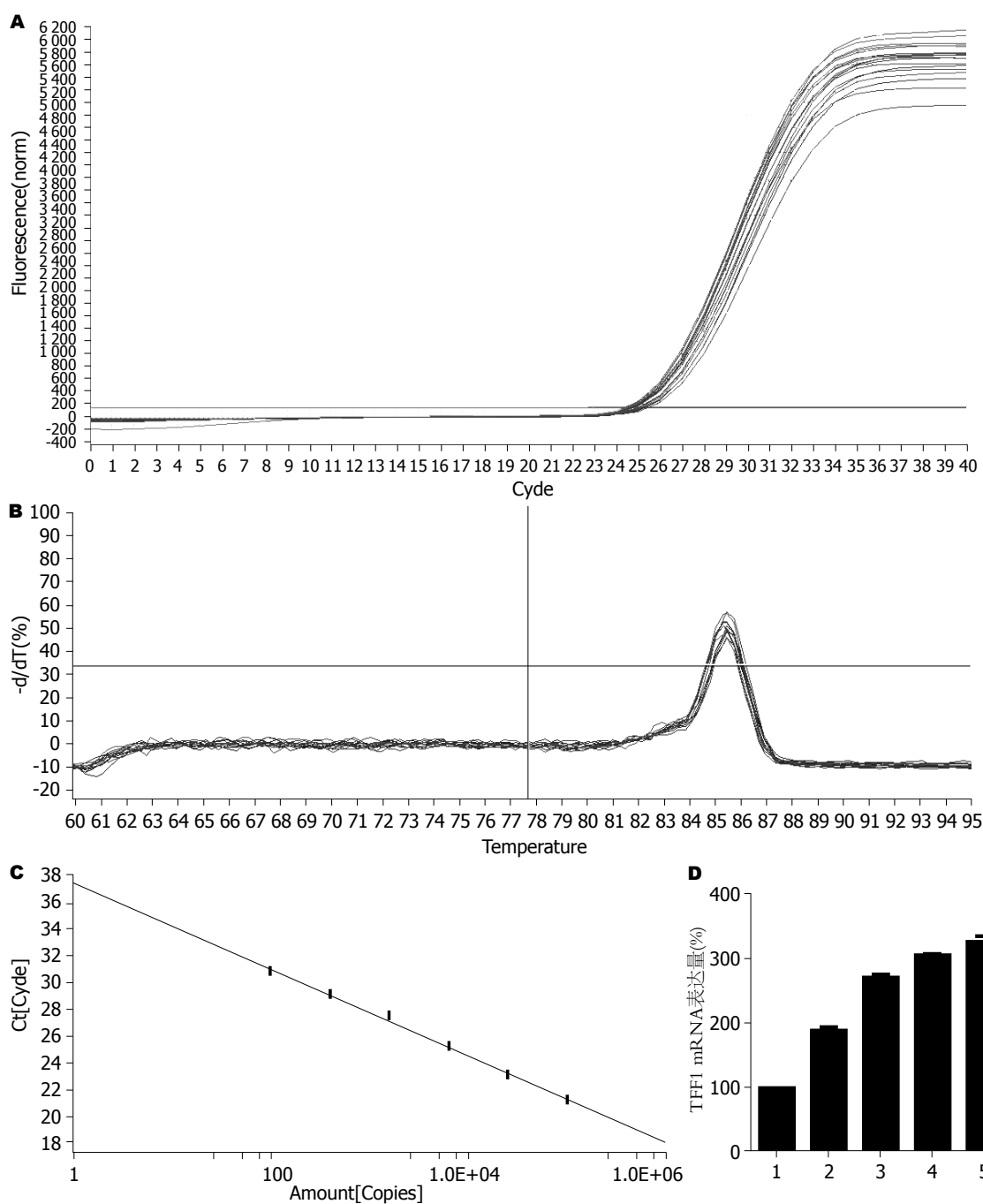


图1 各组细胞中TFF1 mRNA的表达. A: TFF1样品扩增曲线; B: TFF1样品溶解曲线; C: TFF1样品标准曲线; D: TFF1 mRNA表达量. 1: 正常对照组: AGS细胞; 2: 实验对照组: AGS+*H. pylori*; 3: AGS+10%药物血清+*H. pylori*; 4: AGS+20%药物血清+*H. pylori*; 5: AGS+30%药物血清+*H. pylori*.

药物血清可显著上调*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1 mRNA表达($P<0.05$), 且随着药物血清浓度的增加, TFF1 mRNA表达量呈递增趋势(图1).

2.2 七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1蛋白表达的影响 与正常对照组比较, *H. pylori*感染的AGS细胞TFF1蛋白表达升高($P<0.05$), 与实验对照组比较, 10%、20%、30%药物血清可显著上调*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1蛋白表达, 其表达水平随药物浓度增加而逐渐增加,

差异具有统计学意义($P<0.05$, 图2).

2.3 七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染的AGS细胞p-ERK、NF- κ B蛋白表达水平的影响 AGS细胞无*H. pylori*干预时有一定程度的ERK磷酸化水平, *H. pylori*感染AGS细胞后, p-ERK、NF- κ B蛋白表达水平明显升高, 而七方胃痛颗粒药物血清干预后, p-ERK、NF- κ B蛋白水平随药物浓度的增加而降低, 与实验对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$, 图3, 4).

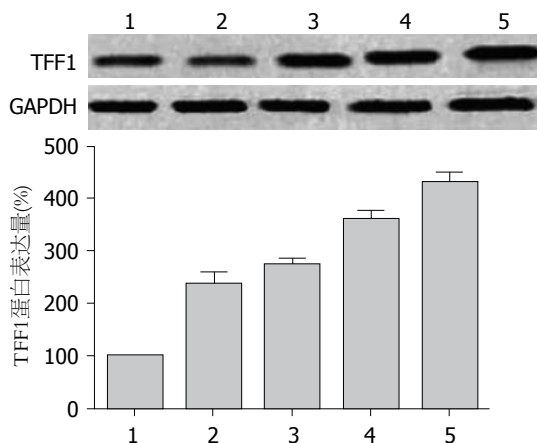


图2 各组细胞TFF1蛋白的相对表达量。1: 正常对照组: AGS细胞; 2: 实验对照组: AGS细胞+*H. pylori*; 3: AGS+10%药物血清+*H. pylori*; 4: AGS+20%药物血清+*H. pylori*; 5: AGS+30%药物血清+*H. pylori*。

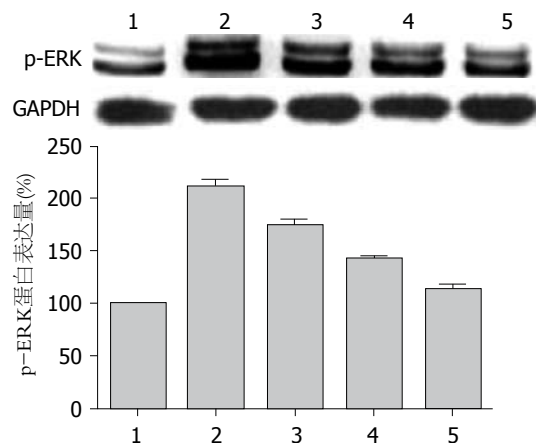


图3 各组p-ERK蛋白的相对表达量。1: 正常对照组: AGS; 2: 实验对照组: AGS+*H. pylori*; 3: AGS+10%药物血清+*H. pylori*; 4: AGS+20%药物血清+*H. pylori*; 5: AGS+30%药物血清+*H. pylori*。

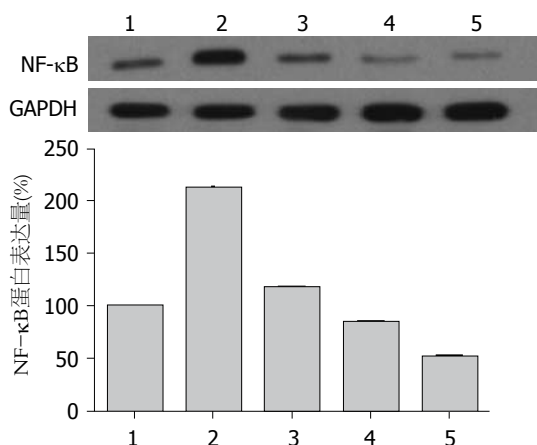


图4 各组NF-κB蛋白的相对表达量。1: 正常对照组: AGS细胞; 2: 实验对照组: AGS细胞+*H. pylori*; 3: AGS+10%药物血清+*H. pylori*; 4: AGS+20%药物血清+*H. pylori*; 5: AGS+30%药物血清+*H. pylori*。

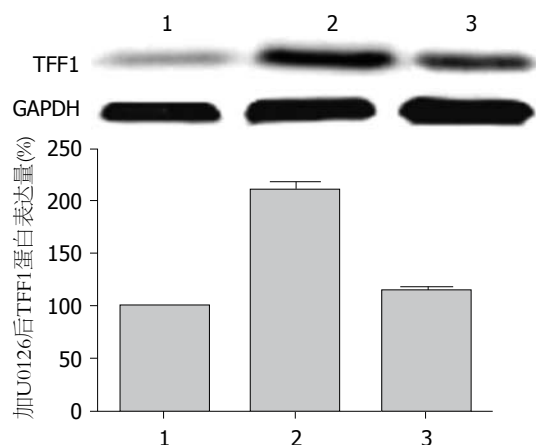


图5 加U0126后TFF1蛋白相对表达量。1: 正常对照组: AGS细胞; 2: 实验对照组: AGS细胞+*H. pylori*; 3: 10 μmol/L U0126+*H. pylori*。

2.4 U0126对*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1蛋白表达的影响 无*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1蛋白仅有少量表达, 与*H. pylori*共培养后TFF1蛋白表达水平升高, U0126干预后, TFF1蛋白水平下降, 与实验对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图5)。

3 讨论

胃癌的发生与*H. pylori*有着非常密切的关系, 这已是医疗界的共识。1994年世界卫生组织将*H. pylori*列为I类致癌因子。如何快速修复*H. pylori*感染引起的黏膜损伤是维护胃黏膜屏障、防止黏膜损伤持续发展继而导致癌变的关键。TFF1是三叶肽家族成员之一, 是一类小分子的蛋白肽, 主要在胃黏膜小凹及上皮表达。1982年由

Masiakowski等^[9]在雌激素诱导人的乳腺癌细胞系MCF-27中获得。TFF1作为胃肠道腔内黏膜及上皮细胞的早期关键修复因子, 对胃肠道黏膜损伤的修复和胃肠道黏膜的完整性方面起着非常重要的作用。有研究^[10]表明在胃炎及消化性溃疡组织中, TFF1的表达及较正常组织明显升高, 且多发/复合性溃疡TFF1表达较单发消化性溃疡表达升高, 胃黏膜损伤愈重, TFF1表达上调愈明显。Matsuda等^[11]体外用*H. pylori*感染AGS, MKN45及KATOIII细胞后研究发现, *H. pylori*感染的AGS细胞TFF1表达显著上调。任建林等^[12]研究发现, 阿司匹林诱导的兔胃应激性溃疡周围TFF1表达较正常胃黏膜升高, 说明TFF1在胃黏膜保护中发挥了重要作用。Wright等^[13]发现消化性溃疡附近区域存在一个特有的解剖结构, 称之为溃疡相关细胞系(ulcer associated cell

lineage, UACL). UACL是一种腺样结构, 直接来源于胃肠腺隐窝基部干细胞, 可以不断地产生新细胞迁移到溃疡表面, 促进溃疡修复。

目前临床上对*H. pylori*的根除治疗主要以三联疗法为主, 也有研究报道^[14]以PPI和铋剂为基础加两联抗生素的四联疗法, 但由于耐药及副作用大等问题的出现, 中医中药逐渐成为治疗消化性溃疡的焦点。消化性溃疡、萎缩性胃炎伴肠上皮化生和(或异型增生)多属中医“胃痛”“痞满”范畴, 临床主要表现为上腹不适、饱胀、烧灼痛、胀痛、隐痛、嗝气等, 其主要病机是脾胃虚弱为本, 继而出现气虚血瘀、湿热内生、肝脾不和。七方胃痛颗粒是在对上述病机的认识上, 根据多年的临床经验总结的复方制剂。方中红须参、黄芪益气健脾为君, 白术、白芍、丹参、木香、吴茱萸疏肝行气、制酸止痛为臣; 茯苓、枳实、炒鸡内金理气消食为佐。全方共奏健脾益气、活血化瘀、清热利湿、理气止痛、消化滞胀之功效。前期动物实验表明其能较好的促进黏膜上皮细胞修复再生, 减轻腺体的破坏, 逆转胃黏膜腺体萎缩及肠上皮化生。

本研究发现, 七方胃痛颗粒药物血清对*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1 mRNA和蛋白的表达具有上调的作用, 并随着药物浓度的增加, 其表达量增加越明显, 这可能是七方胃痛颗粒抑制*H. pylori*感染, 促进损伤上皮修复, 防治*H. pylori*诱发胃癌的可能机制之一。但是七方胃痛颗粒上调TFF1的表达机制还不清楚, 是否与ERK/NF- κ B信号通路的参与有关, 我们进行了进一步的研究。

ERK是MAPK家族成员中最早得到证实的转导通路途径, 是由Boulton等^[15,16]在20世纪90年代初被分离鉴定的一种蛋白激酶, 主要分为ERK1和ERK2, 统称为ERK1/2, 分子量分别为44 kDa和42 kDa。各种细胞外信号的刺激因素能促使ERK通路的激活, 活化的ERK进一步活化下游的核转录因子NF- κ B、AP-1等, 引起特定蛋白的表达和活性改变。在多种肿瘤中, ERK具有高水平的磷酸化, 抑制ERK的磷酸化水平能够抑制抑制肿瘤细胞的生长、运动和浸润并可诱导细胞的凋亡^[17-20]。有研究表明^[21], 人类胃癌组织中, ERK活性较正常组织高, CagA可以通过激活ERK1/2信号通路而促进正常胃上皮细胞的转化, 提高胃癌发生的危险性, 且ERK的活化在*H. pylori*诱导的胃癌细胞的转化过程中可能起着

重要的作用^[22]。NF- κ B是一个多功能的核转录因子, 主要由P50/P65异源二聚体构成, 广泛存在于真核细胞中, 在静息状态下存在于胞浆中, 当其受炎症因子等的刺激后背激活, 从胞浆移位进入细胞核内, 调控相应的靶基因的过度或持续表达, 而NF- κ B调节的产物又能刺激NF- κ B的活化。目前大量的研究^[23-29]表明*H. pylori*感染可以激活NF- κ B, 激活的NF- κ B诱导IL-8、TNF- α 等炎症因子基因转录而引起慢性活动性炎症。有研究^[30]证实, NF- κ B激活诱导的TNF- α 的释放, 均参与佛波酯诱导的实验性胃溃疡组织的损伤。我们的前期研究^[31]表明, 在TNF- α 等炎症因子的刺激下, 胃黏膜上皮细胞TFF1的表达增加是通过炎症因子活化NF- κ B信号通路来实现的。那么七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染人胃黏膜上皮细胞后TFF1表达增加是否由ERK及其下游转录因子NF- κ B信号通路来实现。我们的实验研究结果显示, *H. pylori*感染人胃黏膜上皮细胞后ERK磷酸化水平及NF- κ B蛋白表达水平上升, 七方胃痛颗粒干预后, 以剂量依赖的方式上调*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1蛋白及下调ERK磷酸化和NF- κ B蛋白的表达, 用ERK抑制剂U0126阻断ERK信号通路后, TFF1蛋白表达下降, 说明七方胃痛颗粒对*H. pylori*感染的AGS细胞TFF1表达的增加有可能是通过抑制ERK/NF- κ B信号通路来实现的, ERK/NF- κ B信号通路在七方胃痛颗粒调控TFF1表达的作用中起着重要的作用。

4 参考文献

- 1 Zhu Y, Jiang Q, Lou X, Ji X, Wen Z, Wu J, Tao H, Jiang T, He W, Wang C, Du Q, Zheng S, Mao J, Huang J. MicroRNAs up-regulated by CagA of *Helicobacter pylori* induce intestinal metaplasia of gastric epithelial cells. *PLoS one* 2012; 7: e35147
- 2 Vicent S, López-Picazo JM, Toledo G, Lozano MD, Torre W, García-Corchón C, Quero C, Soria JC, Martín-Algarra S, Manzano RG, Montuenga LM. ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours. *Br J Cancer* 2004; 90: 1047-1052
- 3 Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441: 431-436
- 4 唐梅文, 黄勇华, 罗伟生, 李桂贤, 王进声. 七方胃痛颗粒对消化性溃疡胃黏膜抗炎及抑制Hp感染的研究. *陕西中医* 2009; 30: 1134-1135
- 5 邓嫦, 罗伟生, 李桂贤, 唐梅文. 七方胃痛胶囊(颗粒)对大鼠乙酸胃溃疡愈合质量的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2005; 13: 179-181
- 6 唐梅文, 王伟, 李桂贤, 邓嫦, 陈国忠. 加味七方胃痛颗粒对大鼠实验性萎缩性胃炎胃黏膜组织的超微结构的影响. *新中医* 2010; 42: 105-107
- 7 Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle

- PA, Trzaskos JM. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 1998; 273: 18623-18632
- 8 徐平. 实验动物管理与使用操作技术规程. 第1版. 上海: 上海科技出版社, 2007: 201
- 9 Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 7895-7903
- 10 Ren JL, Luo JY, Lu YP, Wang L, Shi HX. Relationship between trefoil factor 1 expression and gastric mucosa injuries and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2674-2677
- 11 Matsuda K, Yamauchi K, Matsumoto T, Sano K, Yamaoka Y, Ota H. Quantitative analysis of the effect of *Helicobacter pylori* on the expressions of SOX2, CDX2, MUC2, MUC5AC, MUC6, TFF1, TFF2, and TFF3 mRNAs in human gastric carcinoma cells. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 25-33
- 12 任建林, 卢雅丕, 王琳, 陈建民, 施华秀, 叶震世, 吴艳环, 钟燕, 林逊汀, 林辉, 潘金水, 罗金燕. TFF1在正常及损伤胃黏膜中的表达改变. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1809-1810
- 13 Wright NA. Migration of the ductular elements of gut-associated glands gives clues to the histogenesis of structures associated with responses to acid hypersecretory state: the origins of "gastric metaplasia" in the duodenum of the specialized mucosa of barrett's esophagus and of pseudopyloric metaplasia. *Yale J Biol Med* 1996; 69: 147-153
- 14 薛艳, 冯璜, 周丽雅, 杨雪玲, 林三仁, 王迎春. 根除幽门螺杆菌不同疗程及方案效果分析. *中国实用内科杂志* 2012; 9: 693-695
- 15 Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1990; 249: 64-67
- 16 Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 1991; 65: 663-675
- 17 Ogunwobi OO, Beales IL. Adiponectin stimulates proliferation and cytokine secretion in colonic epithelial cells. *Regul Pept* 2006; 134: 105-113
- 18 Sawhney RS, Cookson MM, Omar Y, Hauser J, Brattain MG. Integrin $\alpha 2$ -mediated ERK and calpain activation play a critical role in cell adhesion and motility via focal adhesion kinase signaling: identification of a novel signaling pathway. *J Biol Chem* 2006; 281: 8497-8510
- 19 Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 7-17
- 20 Fortino V, Torricelli C, Capurro E, Sacchi G, Valacchi G, Maioli E. Antiproliferative and survival properties of PMA in MCF-7 breast cancer cell. *Cancer Invest* 2008; 26: 13-21
- 21 Zhu Y, Zhong X, Zheng S, Du Q, Xu W. Transformed immortalized gastric epithelial cells by virulence factor CagA of *Helicobacter pylori* through Erk mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 2005; 24: 3886-3895
- 22 Kacar F, Meteoglu I, Yasa H, Levi E. *Helicobacter pylori*-induced changes in the gastric mucosa are associated with mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15: 224-228
- 23 Ferrand J, Lehours P, Schmid-Alliana A, Mégraud F, Varon C. *Helicobacter pylori* infection of gastrointestinal epithelial cells in vitro induces mesenchymal stem cell migration through an NF- κ B-dependent pathway. *PLoS One* 2011; 6: e29007
- 24 Nozaki K, Tanaka H, Ikehara Y, Cao X, Nakanishi H, Azuma T, Yamazaki S, Yamaoka Y, Shimizu N, Mafune K, Kaminishi M, Tatematsu M. *Helicobacter pylori*-dependent NF- κ B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci* 2005; 96: 170-175
- 25 Ritter B, Kilian P, Rebol MR, Resch K, DiStefano JK, Frank R, Beil W, Nourbakhsh M. Differential effects of multiplicity of infection on *Helicobacter pylori*-induced signaling pathways and interleukin-8 gene transcription. *J Clin Immunol* 2011; 31: 60-68
- 26 Choi IJ, Fujimoto S, Yamauchi K, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* environmental interactions: effect of acidic conditions on H. *pylori*-induced gastric mucosal interleukin-8 production. *Cell Microbiol* 2007; 9: 2457-2469
- 27 Suganuma M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takahashi A, Fujiki H. Human gastric cancer development with TNF- α -inducing protein secreted from *Helicobacter pylori*. *Cancer Lett* 2012; 322: 133-138
- 28 Isomoto H, Mizuta Y, Miyazaki M, Takeshima F, Omagari K, Murase K, Nishiyama T, Inoue K, Murata I, Kohno S. Implication of NF- κ B in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2768-2776
- 29 Kim do J, Park KS, Kim JH, Yang SH, Yoon JY, Han BG, Kim HS, Lee SJ, Jang JY, Kim KH, Kim MJ, Song JS, Kim HJ, Park CM, Lee SK, Lee BI, Suh SW. *Helicobacter pylori* proinflammatory protein up-regulates NF- κ B as a cell-translocating Ser/Thr kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 21418-21423
- 30 Takeuchi T, Miura S, Wang L, Uehara K, Mizumori M, Kishikawa H, Hokari R, Higuchi H, Adachi M, Nakamizo H, Ishii H. Nuclear factor- κ B and TNF- α mediate gastric ulceration induced by phorbol myristate acetate. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2070-2078
- 31 Koike T, Shimada T, Fujii Y, Chen G, Tabei K, Namatame T, Yamagata M, Tajima A, Yoneda M, Terano A, Hiraishi H. Up-regulation of TFF1 (pS2) expression by TNF- α in gastric epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 936-942

编辑 田滢 电编 闫晋利

红花注射液对溃疡性结肠炎大鼠VEGF和bFGF表达的影响

原皓, 李学兴, 王鹤鸣, 原子英, 赵雪曼, 韩雪, 董文华

原皓, 潍坊医学院附属医院消化内科 山东省潍坊市 261031
李学兴, 安丘市人民医院消化内科 山东省安丘市 262100
王鹤鸣, 赵雪曼, 韩雪, 董文华, 潍坊医学院 山东省潍坊市 261042

原子英, 青岛大学医学院 山东省青岛市 266021

原皓, 副教授, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由原皓设计; 研究过程由李学兴、王鹤鸣、原子英、赵雪曼、韩雪及董文华共同完成; 数据分析由原子英与王鹤鸣完成; 本论文写作由原皓与王鹤鸣完成。

通讯作者: 原皓, 副教授, 261031, 山东省潍坊市虞河路465号, 潍坊医学院附属医院消化内科。91chuhan@163.com
电话: 0536-8068912

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-20

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-12-08

Effect of treatment with safflower solution on expression of VEGF and bFGF in ulcerative colitis in rats

Hao Yuan, Xue-Xing Li, He-Ming Wang, Zi-Ying Yuan, Xue-Man Zhao, Xue Han, Wen-Hua Dong

Hao Yuan, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, Shandong Province, China

Xue-Xing Li, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Anqiu City, Anqiu 262100, Shandong Province, China

He-Ming Wang, Xue-Man Zhao, Xue Han, Wen-Hua Dong, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Zi-Ying Yuan, the Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Correspondence to: Hao Yuan, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, 465 Yuhe Avenue, Weifang 261031, Shandong Province, China. 91chuhan@163.com

Received: 2012-02-20 Revised: 2012-03-20

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic effect of safflower solution on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced ulcerative colitis in rats and to explore the underlying mechanisms by observing the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basal fibroblast growth factor (bFGF).

METHODS: Thirty Wistar rats were randomly divided into normal control group, model group and safflower group. Ulcerative colitis was in-

duced in the safflower group and model group with TNBS by enema. Rats of the safflower group were intraperitoneally injected with safflower solution. After ten days, all rats were killed. Disease activity index (DAI), colon macroscopic damage score (CMDS) and histological damage score were evaluated. Pathological changes in the colonic mucosa were examined by HE staining. The expression of VEGF and bFGF in the colonic mucosa was detected by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry (IHC).

RESULTS: Compared to normal controls, the DAI, CMDS and histological damage scores in model rats were significantly increased (all $P < 0.01$). Compared to the model group, the above parameters were significantly improved in the safflower group (all $P < 0.05$). Compared to normal controls, the expression levels of VEGF and bFGF in model rats were increased significantly (all $P < 0.01$). Treatment with safflower solution significantly decreased the expression levels of VEGF mRNA and protein in ulcerative colitis (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Treatment with safflower solution could reduce inflammatory injury in a rat model of ulcerative colitis possibly by reducing the expression of VEGF and inhibiting pathological angiogenesis in the colonic mucosa.

Key Words: Ulcerative colitis; Safflower solution; Vascular endothelial growth factor; Basal fibroblast growth factor; Angiogenesis

Yuan H, Li XX, Wang HM, Yuan ZY, Zhao XM, Han X, Dong WH. Effect of treatment with safflower solution on expression of VEGF and bFGF in ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3299-3304

摘要

目的: 观察红花注射液(safflower solution, SS)对2, 4, 6-三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)诱导的大鼠溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的疗效及其对大鼠结肠组织血管内皮生长因子(vascular endothelial

■背景资料

红花注射液(SS)具有改善血液循环、抗凝、抗炎等药理作用, 目前临床上主要用于心血管疾病的治疗, 探讨其作用于溃疡性结肠炎(UC)方面的报道较少。

■同行评议者

李瑜元, 教授, 广州市第一人民医院内科

■研究前沿

UC的发病机制尚不明确,病理表现为慢性非特异性炎症反应。近年来,有研究发现病理性血管生成在UC的病理机制中起重要作用,调节UC血管生成逐渐成为研究的热点。

growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basal fibroblast growth factor, bFGF)表达的影响。

方法: 将30只Wistar大鼠随机分为正常对照组、模型组、红花组,每组10只。用TNBS灌肠法复制大鼠UC模型,红花组同时给予腹腔注射SS 2 mL/(kg·d)干预治疗,模型组与对照组给予等量生理盐水。造模10 d后,收集标本。对大鼠行疾病活动指数(disease activity index, DAI)、结肠大体形态评分及组织学损伤评分,分别用免疫组织化学法及实时荧光定量PCR(real time-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测大鼠结肠黏膜中VEGF、bFGF的表达。

结果: 与正常对照组相比,红花组、模型组DAI评分,结肠大体形态损伤评分和组织学损伤评分均显著增高($P<0.01$);而与模型组相比,红花组能显著改善UC症状($P<0.05$)。模型组大鼠VEGF、bFGF表达水平明显高于正常组($P<0.01$);与模型组相比,红花组VEGF表达显著降低($P<0.05$)。

结论: SS能够显著改善UC大鼠结肠损伤及炎症反应,这可能与有效下调VEGF的表达,抑制病理性血管生成有关。

关键词: 溃疡性结肠炎;红花注射液;血管内皮生长因子;碱性成纤维细胞生长因子;血管生成

原皓,李学兴,王鹤鸣,原子英,赵雪曼,韩雪,董文华. 红花注射液对溃疡性结肠炎大鼠VEGF和bFGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3299-3304

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3299.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的病因及发病机制尚未完全阐明,目前认为与遗传、环境及免疫等多因素有关^[1,2]。近年来,有文献报道血管生成在其病理机制及黏膜修复中起重要作用^[3-5]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前认为作用最强、特异度最高的促血管生成因子,能够促进组织修复、诱导毛细血管再生^[6]。碱性成纤维细胞生长因子(basal fibroblast growth factor, bFGF)是由内皮细胞及平滑肌细胞合成,有强烈的促组织修复及血管生成作用^[7],国外已有研究证明,VEGF在UC病理机制中起重要作用,而bFGF可以促进UC黏膜修复及愈合^[8]。中药红花有活血化瘀,消

肿止痛的功效,目前主要用于心脑血管疾病的治疗,疗效好,不良反应较少^[9,10],尚无应用于UC研究的报道。本实验旨在观察红花注射液(safflower solution, SS)对UC大鼠的疗效,并通过其对大鼠结肠VEGF及bFGF表达的影响,从影响血管生成方面研究其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SS主要成分为红花黄色素、红花甙、红花红色素等,由亚宝药业集团股份有限公司提供;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS,美国Sigma公司);兔抗大鼠VEGF、bFGF单克隆抗体(北京博奥森生物技术公司);浓缩型DAB显色剂、免疫组织化学PV超敏试剂盒(PV-6001)购自北京中杉金桥生物有限公司;TRIzol试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司);cDNA第一链合成试剂盒、SYBR Green I 嵌合荧光PCR试剂盒(Takara公司)。健康♂Wistar大鼠30只,体质量为 $200\text{ g}\pm 10\text{ g}$,由山东中医药大学动物中心提供,随机分为正常对照组、模型组和红花治疗组,每组各10只。

1.2 方法

1.2.1 造模与干预: 参照文献所述^[11],采用TNBS灌肠法制作UC大鼠模型。大鼠禁食24 h后,用10%水合氯醛4.5 mL/kg腹腔注射麻醉,TNBS与无水乙醇以1:1比例混匀,根据大鼠禁食后体质量,按照50 mg/kg计算出红花组和模型组每只大鼠所需的混合药液用量,用聚乙烯导管经肛门缓慢插入结肠约8 cm,将药液注入肠腔,正常对照组灌注等量生理盐水。红花组自造模当天起,以400 mg/(kg·d)为标准,计算出每只大鼠所需干预药量,并用生理盐水稀释至2 mL,每天腹腔注射;模型组及正常对照组每天腹腔注射2 mL生理盐水,总共10 d。

1.2.2 标本采集: 造模10 d后,观察各组大鼠的一般情况,用10%水合氯醛麻醉动物,称取质量后处死,迅速剖取距肛门约7-8 cm结肠,沿肠系膜纵轴切开,在冷生理盐水中洗净,取一部分用4%多聚甲醛固定,用于HE染色及免疫组织化学检测,另一部分在RNA-Free0.9%NS中洗净后,先保存于液氮罐中,再尽快转存于-80℃冰箱中,用于实时荧光定量PCR检测。

1.2.3 结肠炎症评价: 采用疾病活动指数(disease activity index, DAI)、结肠大体形态损伤评分及组织学损伤评分来评价结肠炎症。(1)DAI评分:造模10 d后,综合大鼠体质量下降百分率

■相关报道

研究表明,一些促血管生成因子在UC患者中明显升高,导致过度的或病理的血管生成,加重微循环障碍、淤血及炎症反应,而SS已被证实能较好的改善血液循环并具有一定的抗炎功效。

表 1 各组大鼠结肠炎症评分

分组	DAI	大体评分	组织学损伤评分
模型组	7.56 ± 0.87 ^b	6.33 ± 0.81 ^b	6.84 ± 0.93 ^b
红花组	4.13 ± 0.27 ^{bc}	3.01 ± 0.47 ^{bc}	3.29 ± 0.60 ^{bc}
正常组	0.32 ± 0.30	0.29 ± 0.26	0.27 ± 0.21

^b*P*<0.01 vs 正常组; ^c*P*<0.05 vs 模型组; DAI: 疾病活动指数.

表 2 血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子在各组大鼠结肠中的表达

分组	VEGF阳性细胞率(%)	VEGF mRNA相对表达	bFGF阳性细胞率(%)	bFGF mRNA相对表达
模型组	38.58 ± 0.42 ^b	5.19 ± 0.90 ^b	28.59 ± 0.78 ^b	8.16 ± 0.73 ^b
红花组	21.50 ± 0.92 ^{bc}	2.73 ± 0.76 ^{bc}	22.57 ± 0.76 ^b	6.90 ± 0.49 ^b
正常组	10.21 ± 0.8 ³	1.20 ± 0.16	8.36 ± 0.70	1.13 ± 0.48

^b*P*<0.01 vs 正常组; ^c*P*<0.05 vs 模型组. VEGF: 血管内皮生长因子; bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子.

(体质量不变为0, 1-5%为1分, 6%-10%为2分, 11%-20%为3分, >20%为4分), 大便形状(正常为0, 大便松散为2分, 腹泻为4分)与大便带血情况(正常为0分, 隐血阳性为2分, 显性出血为4分)进行积分^[12]; (2)大体形态损伤评分: 0分, 黏膜无损伤; 1分, 局部充血水肿, 但无溃疡; 2分, 局部溃疡但无明显水肿或肠壁增厚; 3分, 溃疡伴1个部位炎症; 4分, 2个或更多部位溃疡及炎症, 但溃疡大小<1 cm; 5分, 沿结肠纵轴超过1 cm的病损; 6-10分, 沿结肠纵轴超过2 cm的病损, 每增多1 cm积分增加1分^[13]; (3)组织学损伤评分: 选10个视野(×100)平均评分. 评分标准: 0分, 正常结肠黏膜; 1分, 隐窝缺损1/3时; 2分, 隐窝缺损2/3; 3分, 固有层覆盖单层上皮伴轻度炎性细胞浸润; 4分, 黏膜糜烂、溃疡伴显著炎性细胞浸润.

1.2.4 免疫组织化学法检测VEGF、bFGF蛋白的表达: 按照试剂说明进行操作, 结果判断: VEGF阳性表达为细胞质呈棕黄色, bFGF阳性表达为细胞质或/和细胞核呈棕黄色. 阳性表达细胞计数标准: 每张切片随机选取5个高倍视野(×400), 分别计数1 000个细胞, 计算阳性细胞百分比.

1.2.5 RT-PCR检测VEGF、bFGF mRNA的表达: 按照TRIzol试剂盒说明书提取总RNA后, 立即进行电泳, 鉴定RNA的完整性, 并于紫外分光光度计分析RNA纯度. 按照cDNA第一链合成试剂盒说明书得到cDNA. 按SYBR Green I 嵌合荧光PCR试剂盒说明书将cDNA进行扩增. 以GAPDH为内参照, 其上游引物为GGCACAGT-CAAGGCTGAGAATG, 下游引物为ATGGTG-

GTGAAGACGCCAGTA. VEGF上游引物为TCACCCTGTTCTGCTTTCTCAT, 下游引物为GAGTCCCTTTTTCTGTGACCTG; bFGF上游引物为TCCAAGCAGAAGAGAGAGGAGT, 下游引物为AGGCGTTCAAAGAAGAAACACT. 根据荧光定量PCR仪显示的CT值通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析各组相对基因表达差异.

统计学处理 数据用mean±SD表示, 用SPSS17.0软件进行统计分析, 对数据行单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 再用SNK-*q*检验进行组间比较. *P*<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠DAI、结肠大体形态损伤评分及组织学损伤评分 模型组与红花组UC大鼠体质量减轻, 轻者出现稀便, 重者可见黏液脓血便, 肉眼观察肠壁明显增厚, 黏膜充血、水肿, 有节段性环周溃疡形成, 溃疡表面附有黑褐色膜状坏死物, 光镜下见黏膜层大片缺失、脱落, 腺体破坏, 杯状细胞减少, 大量炎性细胞浸润, 主要为中性粒细胞和少量淋巴细胞, 局部见肉芽组织形成. 与正常对照组相比, 大鼠DAI评分、结肠大体形态损伤评分及组织学损伤评分显著升高(*P*<0.01). 而与模型组相比, 红花组体质量增加, 大便性状明显改善, 肠壁黏膜见不同程度的点片状或节段性充血、水肿, 糜烂或溃疡形成的严重程度明显减轻, 光镜下见上皮及溃疡得到不同程度修复, 间质水肿减轻, 上述观察指标显著降低

■创新盘点

将活血化瘀的SS用于UC的治疗并观察其对血管内皮生长因子(VEGF)及bFGF表达的影响, 从调节血管生成方面初步探讨其治疗机制.

■应用要点

研究发现, SS对大鼠UC有显著的疗效, 能明显降低VEGF的表达, 改善炎症反应, 将其用于治疗UC值得进一步研究.

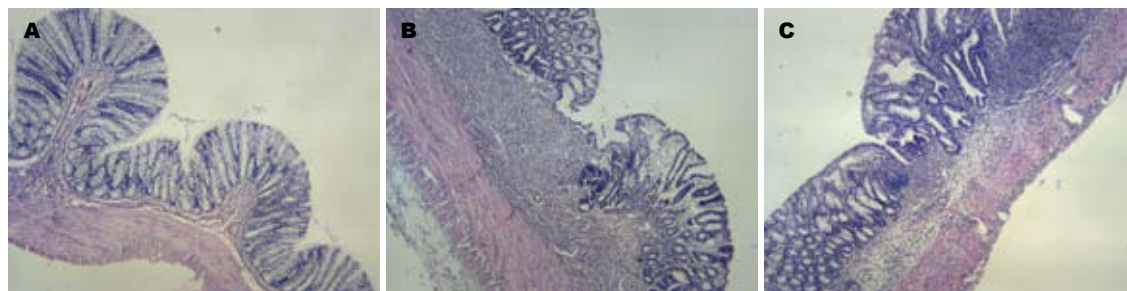


图1 各组大鼠的结肠病理组织(HE × 40). A: 正常组; B: 模型组; C: DG组.

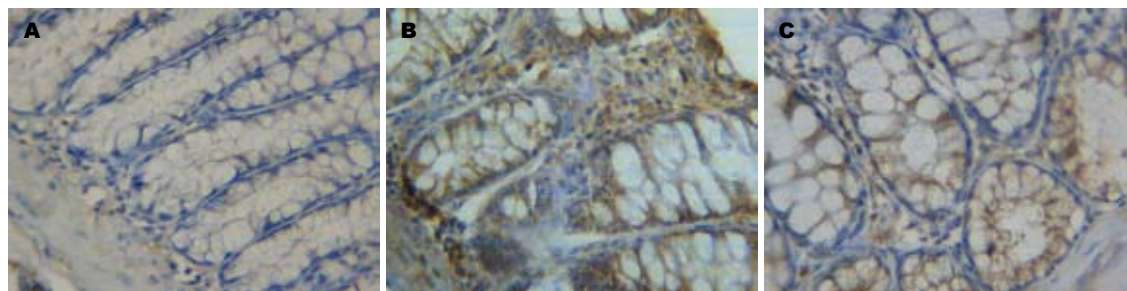


图2 免疫组织化学示各组大鼠血管内皮生长因子在结肠黏膜表达(PV × 200). A: 正常组; B: 模型组; C: DG组.

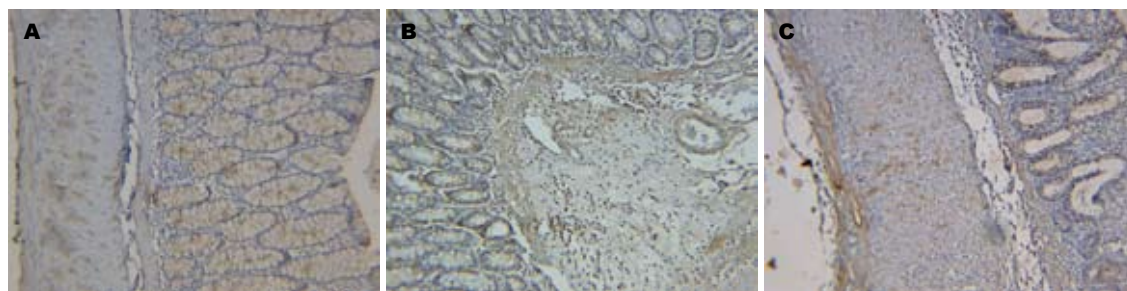


图3 免疫组织化学示各组大鼠碱性成纤维细胞生长因子在结肠黏膜表达(PV × 100). A: 正常组; B: 模型组; C: DG组.

($P < 0.05$, 表1, 图1).

2.2 免疫组织化学结果 模型组与红花组大鼠结肠黏膜上皮及固有层中均可见VEGF阳性表达, 较正常组明显升高, 而红花组较模型组相比, VEGF蛋白表达显著降低($P < 0.05$, 表2, 图2). 各组大鼠结肠黏膜固有层的内皮细胞和平滑肌细胞及胞外基质中、黏膜下层的血管内皮细胞中均可见bFGF阳性表达, 其中模型组与红花组较对照组明显升高, 红花组在肉芽组织的血管内皮细胞、成纤维细胞及胞外基质中可见bFGF阳性颗粒, 但与模型组无显著差异($P > 0.05$, 表2, 图3).

2.3 RT-PCR结果 提取RNA电泳示RNA完整性好. 根据紫外分光光度计显示的吸光度值, 求得 $A_{260/280}$ 比值在1.82-1.98之间, 说明RNA纯度较高. VEGF mRNA、bFGF mRNA相对表达结果见表2.

3 讨论

VEGF早期亦称作血管通透因子, 是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子, 可在体内诱导血管新生, 能直接作用于血管内皮细胞促进血管内皮细胞增殖, 增加血管通透性^[14,15]. 近年来, 国外许多研究发现VEGF在UC中可诱发病理性血管生成, 增加微血管密度, 导致血管收缩、微血栓形成, 同时提高血管通透性, 加重炎症细胞浸润, 在UC发病机制中起重要作用^[16-19]. Tolstanova等^[20]在大鼠动物模型中肌肉注射抗VEGF抗体治疗后, 可以明显减轻结肠黏膜损伤, 降低血管通透性, 减轻炎症细胞浸润, 直接证明了VEGF在UC发病中的致病作用.

bFGF具有强烈的血管生成作用^[21]. 在体外能刺激细胞增殖、迁移, 诱导纤溶酶原激活物及胶原酶活性, 是与肝素有高亲和力的细胞促分裂原^[22,23]. 目前已有大量研究发现b-FGF可以

促进UC黏膜修复,减轻炎症反应,并已有一些研究将bFGF应用于亚临床实验性治疗,取得了一定的效果^[24,25]。因此调节血管生成及抗血管生成成为近几年研究UC的一个热点,Tolstanova等^[26]在动物模型中通过抗血管生成治疗UC取得了较好的成果。

红花是传统活血化瘀中药,可以抑制血栓形成,对抗凝血,对缺血再灌注有保护作用^[27-29],而且能够显著改善血液循环,临床上还用于治疗血栓性疾病^[30],也用于妇科绝经后的治疗^[31]。红花还具有抑制血管内皮细胞过度增殖,稳定血管内膜的功效。在本实验中,模型组大鼠结肠炎症损伤明显,VEGF与bFGF表达较正常组明显升高,反映为免疫组织化学染色(immunohistochemistry, IHC)升高和相对mRNA表达增加。用SS对UC大鼠进行干预后,实验组大鼠症状好转,病理结果示炎症损伤明显减轻,VEGF蛋白及mRNA表达较模型组明显下降,但与模型组相比,bFGF表达差异并无统计学意义。因此,我们认为,SS通过下调VEGF的表达,保护血管内皮细胞,降低血管通透性,进而抑制病理性血管生成,减轻UC的炎症损伤,促进黏膜修复。

目前调节血管生成在UC的病理机制及治疗方面提供了新的思路,本实验通过观察SS对实验性UC大鼠VEGF及FGF表达的影响,探讨其对UC中血管生成的影响,并为其应用于UC的治疗提供了理论依据。

4 参考文献

- 1 Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO⁺ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1278-1283
- 2 Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuo K, Hibi T. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Ther* 2012 Oct 26. [Epub ahead of print]
- 3 Szabo S, Deng X, Tolstanova G, Khomenko T, Pautnovic B, Chen L, Jadus M, Sandor Z. Angiogenic and anti-angiogenic therapy for gastrointestinal ulcers: new challenges for rational therapeutic predictions and drug design. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 1633-1642
- 4 Rutella S, Fiorino G, Vetrano S, Correale C, Spinelli A, Pagano N, Arena V, Maggiano N, Repici A, Malesci A, Danese S. Infliximab therapy inhibits inflammation-induced angiogenesis in the mucosa of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 762-770
- 5 Deng X, Tolstanova G, Khomenko T, Chen L, Tarnawski A, Szabo S, Sandor Z. Mesalamine restores angiogenic balance in experimental ulcerative colitis by reducing expression of endostatin and angiostatin: novel molecular mechanism for therapeutic action of mesalamine. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 331: 1071-1078
- 6 Bianchi E, Scarinci F, Grande C, Plateroti R, Plateroti P, Plateroti AM, Fumagalli L, Capozzi P, Feher J, Artico M. Immunohistochemical profile of VEGF, TGF- β and PGE2 in human pterygium and normal conjunctiva: experimental study and review of the literature. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012; 25: 607-615
- 7 Sun D, Liu Y, Yu Q, Zhou Y, Zhang R, Chen X, Hong A, Liu J. The effects of luminescent ruthenium(II) polypyridyl functionalized selenium nanoparticles on bFGF-induced angiogenesis and AKT/ERK signaling. *Biomaterials* 2013; 34: 171-180
- 8 Deng X, Szabo S, Khomenko T, Tolstanova G, Pautnovic B, French SW, Sandor Z. Novel pharmacologic approaches to the prevention and treatment of ulcerative colitis. *Curr Pharm Des* 2012 Aug 23. [Epub ahead of print]
- 9 Wan LH, Chen J, Li L, Xiong WB, Zhou LM. Protective effects of Carthamus tinctorius injection on isoprenaline-induced myocardial injury in rats. *Pharm Biol* 2011; 49: 1204-1209
- 10 Tien YC, Lin JY, Lai CH, Kuo CH, Lin WY, Tsai CH, Tsai FJ, Cheng YC, Peng WH, Huang CY. Carthamus tinctorius L. prevents LPS-induced TNF α signaling activation and cell apoptosis through JNK1/2-NF κ B pathway inhibition in H9c2 cardiomyoblast cells. *J Ethnopharmacol* 2010; 130: 505-513
- 11 Li XL, Cai YQ, Qin H, Wu YJ. Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis. *Can J Physiol Pharmacol* 2008; 86: 841-849
- 12 Porter SN, Howarth GS, Butler RN. An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 967-974
- 13 Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391
- 14 Zhao X, You J. [Advances in study of vascular endothelial growth factor and thyroid disease]. *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2012; 29: 784-787
- 15 Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52: 108-118
- 16 Tolstanova G, Khomenko T, Deng X, Szabo S, Sandor Z. New molecular mechanisms of the unexpectedly complex role of VEGF in ulcerative colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399: 613-616
- 17 Scaldaferrri F, Vetrano S, Sans M, Arena V, Straface G, Stigliano E, Repici A, Sturm A, Malesci A, Panes J, Yla-Herttuala S, Fiocchi C, Danese S. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2009; 136: 585-595. e5
- 18 Chidlow JH, Langston W, Greer JJ, Ostanin D, Abdelbaqi M, Houghton J, Senthilkumar A, Shukla D, Mazar AP, Grisham MB, Kevil CG. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *Am J Pathol* 2006; 169: 2014-2030
- 19 Danese S, Sans M, de la Motte C, Graziani C, West G, Phillips MH, Pola R, Rutella S, Willis J, Gasbarrini A, Fiocchi C. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastro-*

■名词解释

血管生成:从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管,主要包括:激活期血管基底膜降解;血管内皮细胞的激活、增殖、迁移;重建形成新的血管和血管网,是一个涉及多种细胞的多种分子的复杂过程。血管形成是促血管形成因子和抑制因子协调作用的复杂过程,正常情况下2者处于平衡状态,一旦此平衡打破就会激活血管系统,使血管生成过度或抑制血管系统使血管退化。

■同行评价

文章设计合理, 方法较好, 显示中药红花干预疗效显著, 结果新, 为其治疗UC提供了一定的理论依据。

- 20 Tolstanova G, Khomenko T, Deng X, Chen L, Tarnawski A, Ahluwalia A, Szabo S, Sandor Z. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats: direct evidence for the pathogenic role of VEGF. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 749-757
- 21 Zhang B, Cao H, Rao GN. Fibroblast growth factor-2 is a downstream mediator of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling in 14,15-epoxyeicosatrienoic acid-induced angiogenesis. *J Biol Chem* 2006; 281: 905-914
- 22 Wang P, Zhen H, Zhang J, Zhang W, Zhang R, Cheng X, Guo G, Mao X, Wang J, Zhang X. Survivin promotes glioma angiogenesis through vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in vitro and in vivo. *Mol Carcinog* 2012; 51: 586-595
- 23 Skaletz-Rorowski A, Eschert H, Leng J, Stallmeyer B, Sindermann JR, Pulawski E, Breithardt G. PKC delta-induced activation of MAPK pathway is required for bFGF-stimulated proliferation of coronary smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 142-150
- 24 Linares PM, Gisbert JP. Role of growth factors in the development of lymphangiogenesis driven by inflammatory bowel disease: a review. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1814-1821
- 25 Krishnan K, Arnone B, Buchman A. Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 410-422
- 26 Tolstanova G, Deng X, Khomenko T, Garg P, Pautnovic B, Chen L, Sitaraman SV, Shiloach J, Szabo S, Sandor Z. Role of anti-angiogenic factor endostatin in the pathogenesis of experimental ulcerative colitis. *Life Sci* 2011; 88: 74-81
- 27 Zhu YF, Luo HM, Deng ZL, Fu DY, Yao W, Dai J. [Effects of the Chinese patent medicine, Honghua Injection, on platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in patients with acute coronary syndrome: a randomized controlled trial]. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao* 2012; 10: 318-323
- 28 Liu J, Zhang D, Li J, Feng J, Yang X, Shi D, Liang X. [Effects of Salvia miltiorrhiza and Carthamus tinctorius aqueous extracts and compatibility on rat myocardial ischemic reperfusion injury]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2011; 36: 189-194
- 29 Han SY, Li HX, Ma X, Zhang K, Ma ZZ, Tu PF. Protective effects of purified safflower extract on myocardial ischemia in vivo and in vitro. *Phytomedicine* 2009; 16: 694-702
- 30 Li Y, Wang N. Antithrombotic effects of Danggui, Honghua and potential drug interaction with clopidogrel. *J Ethnopharmacol* 2010; 128: 623-628
- 31 Choi EM, Kim GH, Lee YS. Carthamus tinctorius flower extract prevents H₂O₂-induced dysfunction and oxidative damage in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytother Res* 2010; 24: 1037-1041

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 •

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)

Klotho与 β -Catenin在食管癌中的表达及临床意义

汤小伟, 黄曙, 王敏, 季国忠, 范志宁

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

汤小伟, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的分子机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81001076

作者贡献分布: 此课题由汤小伟、黄曙及范志宁设计; 研究过程及统计分析由汤小伟、黄曙、王敏及季国忠完成; 本论文由汤小伟、黄曙及范志宁总结成文。

通讯作者: 范志宁, 教授, 主任医师, 210011, 江苏省南京市姜家园路121号, 南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 南京医科大学消化内镜研究所. fanzhining@hotmail.com

电话: 025-58509996

收稿日期: 2012-09-15 修回日期: 2012-10-27

接受日期: 2012-11-09 在线出版日期: 2012-12-08

Clinical significance of expression of Klotho and β -Catenin in esophageal squamous cell carcinoma

Xiao-Wei Tang, Shu Huang, Min Wang, Guo-Zhong Ji, Zhi-Ning Fan

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

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81001076

Correspondence to: Zhi-Ning Fan, Professor, Chief Physician, Institute of Digestive Endoscopy; Medical Center for Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. fanzhining@hotmail.com

Received: 2012-09-15 Revised: 2012-10-27

Accepted: 2012-11-09 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of expression of Klotho and β -Catenin in esophageal carcinoma.

METHODS: Tissue microarray technique and immunohistochemistry were used to examine Klotho and β -Catenin expression in 75 esophageal carcinoma tissue specimens and matched tumor-adjacent esophageal tissue. Correlations between Klotho and β -Catenin expression and clinical and pathological features were then analyzed.

RESULTS: The positive rate of Klotho expres-

sion was significantly lower in esophageal carcinoma tissue than in tumor-adjacent tissue (14.9% vs 63.4%, $P < 0.05$). The expression of Klotho was correlated with tumor invasion and clinical stage (both $P < 0.05$). The positive rate of β -Catenin expression was significantly higher in esophageal carcinoma tissue than in tumor-adjacent tissue (80.0% vs 16.4%, $P < 0.05$). The expression of Klotho was correlated with lymph node metastasis and tumor clinical stage ($r = -0.276$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The positive rates of Klotho and β -Catenin expression differed significantly between esophageal carcinoma and tumor-adjacent tissue. Klotho and β -Catenin may be used as important markers for esophageal carcinoma and are helpful for prognosis prediction in esophageal carcinoma.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Tissue microarray; Klotho; β -Catenin

Tang XW, Huang S, Wang M, Ji GZ, Fan ZN. Clinical significance of expression of Klotho and β -Catenin in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3305-3309

摘要

目的: 研究Klotho与 β -Catenin蛋白在食管癌与癌旁组织中的表达及其与临床病理特征的关系。

方法: 采用免疫组织化学EnVision二步法, 检测Klotho与 β -Catenin蛋白在75对食管鳞状细胞癌与其癌旁组织芯片中的表达情况, 并结合临床病理资料进行统计分析。

结果: Klotho在食管癌中表达的阳性率明显低于癌旁组织(14.9% vs 63.4%, $P < 0.05$), Klotho的表达与TNM分期、浸润深度明显相关(均 $P < 0.05$)。 β -Catenin在食管癌中表达的阳性率明显高于癌旁组织(80.0% vs 16.4%, $P < 0.05$), β -Catenin的表达与淋巴结转移、TNM分期明显相关(均 $P < 0.05$)。 Klotho与 β -Catenin在食管癌中的表达成负向关系($r = -0.276$, $P < 0.05$)。

■背景资料

食管癌是临床最常见的恶性肿瘤之一, 居全球癌症死亡原因的第五位。Klotho是1997年发现与衰老相关的基因。近年来, 一些学者报道了Klotho在乳腺癌、肺癌、胰腺癌与结肠癌等中具有抑制肿瘤细胞生长与转移, 促进肿瘤细胞凋亡等功能。

■同行评议者

陈洪, 副教授, 主任医师, 东南大学附属中大医院消化科

■研发前沿

目前, Wnt信号通路的激活在多种恶性肿瘤的发生发展中起重要作用。β-Catenin作为Wnt通路中重要的信号分子, 已有研究证实了他与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。但是未见Klotho与β-Catenin在食管癌中相互作用的相关报道。

结论: Klotho与β-Catenin在食管鳞状细胞癌与癌旁组织中的表达阳性率不同, 差异均具有显著性, 联合检测癌组织中Klotho与β-Catenin的表达可为食管癌的进展与预后提供重要的参考依据。

关键词: 食管鳞状细胞癌; 组织芯片; Klotho基因; β-Catenin蛋白

汤小伟, 黄曙, 王敏, 季国忠, 范志宁. Klotho与β-Catenin在食管癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3305-3309

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3305.asp>

0 引言

食管癌是临床最常见的恶性肿瘤之一, 居全球癌症死亡原因的第5位^[1]. 对食管癌发生发展的分子机制研究对阐明食管癌发生机制、筛查高风险人群、判断预后及食管癌的基因治疗均具有重要的意义. Klotho是1997年发现与衰老相关的基因^[2]. 近年来, 一些学者报道了Klotho在乳腺癌、肺癌、胰腺癌与结肠癌等中具有抑制肿瘤细胞生长与转移, 促进肿瘤细胞凋亡等功能^[3]. 而β-Catenin作为Wnt通路中重要的信号分子, 已有研究证实了他与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关^[4-8]. 但是Klotho与β-Catenin在食管癌中相互作用未见有相关报道. 本研究利用免疫组织化学EnVision二步法检测Klotho与β-Catenin在食管癌与癌旁组织芯片中的表达情况, 探讨食管癌组织中Klotho与β-Catenin的表达与食管癌临床病理特征的关系以及2者的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 食管鳞状细胞癌组织芯片为上海芯超生物技术有限公司产品(编号HEso-Squ150CS-01), 每例芯片的直径为1.5 mm, 厚度为4 μm, 10×16双芯排列, 用统一标准的方法加工^[9]. 每片芯片的完整性>95%. 在75例标本中, 男47例, 女18例; 年龄41-81岁, 中位年龄60岁. 参照2000年世界卫生组织推荐的肿瘤分化分级标准, 低分化鳞癌57例, 中、高分化鳞癌18例. 按2002年国际抗癌联盟TNM分期法, I期11例, II期27例, III期27例, IV期10例. 一抗山羊抗人Klotho与β-Catenin多克隆抗体和相应二抗均购自Santa Cruz公司(产品编号分别为sc-22218和sc-2020), -20℃保存, 一抗工作浓度为4 μg/mL. 即用型免疫组织化学EnVision二步法试剂盒购自基因有限公司。

1.2 方法 采用免疫组织化学EnVision二步法检

测Klotho与β-Catenin蛋白表达情况. 用已知阳性组织切片作阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照, 按试剂盒说明书进行操作. 结果判定: 据染色强度与阳性细胞比例综合计分, 细胞的染色强度可分为0分(染色阴性), 1分(淡黄色颗粒), 2分(棕黄色颗粒), 3分(褐色颗粒); 阳性细胞比例的评分方法为: 0分(阳性细胞比例≤5%), 1分(5%<阳性细胞比例≤25%), 2分(25%<阳性细胞比例≤50%), 3分(50%<阳性细胞比例≤75%), 4分(75%<阳性细胞比例≤100%). 根据2项乘积的分数分为4级, 分数≤4记为-, 4<分数≤8记为+, 8<分数≤12记为++, 分数>12记为+++. 其中-记为Klotho与β-Catenin表达阴性; +, ++, +++记为Klotho与β-Catenin表达阳性。

统计学处理 采用Spss13.0统计软件进行分析. Klotho与β-Catenin蛋白在食管癌与癌旁组织中表达差异, 以及Klotho与β-Catenin与临床病理特标(性别、年龄、食管癌临床分期、病理分级、淋巴结转移、浸润深度等)的关系采用 χ^2 检验. Klotho与β-Catenin表达阳性率的相互关系采用Spearman等级相关分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织芯片的质量 组织芯片经免疫组织化学染色后, 光镜下剔除染色效果差, 组织残缺不全的标本, 最后进入统计检测Klotho表达的组织芯片含74例食管癌组织与71例癌旁组织. 检测β-Catenin表达的组织芯片含75例食管癌组织与67例癌旁组织。

2.2 Klotho与β-Catenin蛋白在食管癌与癌旁组织中的表达 74例食管癌组织中11例Klotho表达阳性(14.9%), 显色部位主要为细胞浆, 63例Klotho表达阴性(85.1%, 图1A). 71例癌旁组织中45例Klotho表达阳性(63.4%, 图1B), 26例Klotho表达阴性(36.6%). 75例食管癌组织中60例β-Catenin表达阳性(80.0%, 图2A), 显色部位主要为细胞浆, 15例β-Catenin表达阴性(20.0%). 67例癌旁组织中11例β-Catenin表达阳性(16.4%), 56例β-Catenin表达阴性(83.6%, 图2B). 经分析Klotho与β-Catenin蛋白在食管癌与癌旁组织中表达差异均有统计学意义(均 $P<0.05$, 表1)。

2.3 Klotho与β-Catenin蛋白表达与食管癌临床病理特征的关系 Klotho表达阳性与食管癌患者性别、年龄、病理分级、淋巴结转移无统计学意义, 而与临床分期、浸润深度有密切关系

■相关报道

多项研究已经表明Wnt/β-Catenin信号通路的激活在多种恶性肿瘤的发生发展中起重要作用. Lee等将宫颈癌细胞成功转染Klotho基因后, 发现癌细胞的生长明显受限, 凋亡率明显增加, 细胞内的Wnt通路重要的信号分子β-Catenin含量明显减少, 促进细胞增殖的分子c-myc与CCND1明显降低。

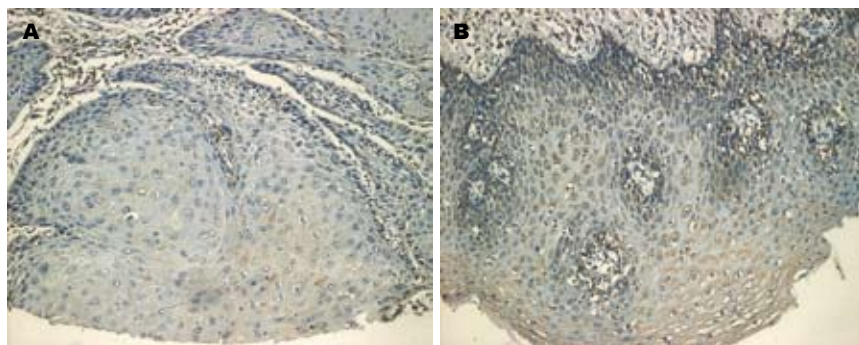


图 1 免疫组织化学 EnVision 二步法检测食管鳞癌及其癌旁组织中 Klotho 蛋白的表达($\times 200$). A: 食管癌组织中呈阴性表达; B: 癌旁组织中呈阳性表达.

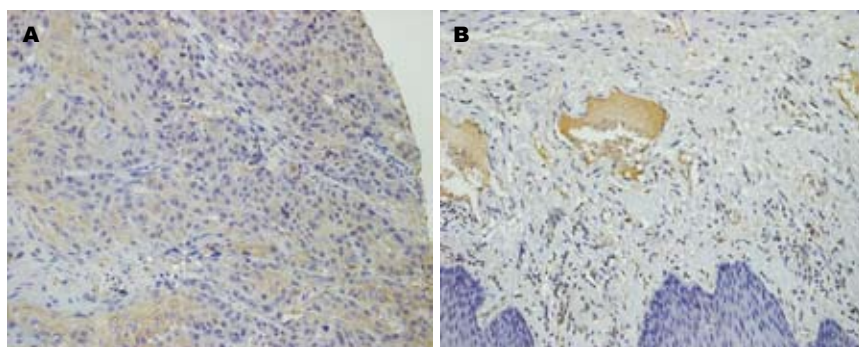


图 2 免疫组织化学 EnVision 二步法检测食管鳞癌及其癌旁组织中 β -Catenin 蛋白的表达($\times 200$). A: 食管癌组织中呈阴性表达; B: 癌旁组织中呈阳性表达.

■创新盘点

本研究报道了 Klotho 在食管癌中低表达, 与食管癌的浸润深度、临床分期密切相关. β -Catenin 蛋白在食管癌中高表达, 与食管癌的淋巴结转移、临床分期密切相关. Klotho 在食管癌的发生发展中起抑制作用, 并且在食管癌中 Klotho 的表达与 β -Catenin 的表达呈负相关.

表 1 Klotho 与 β -Catenin 在食管癌与癌旁组织中的表达

	Klotho			β -Catenin		
	阳性(%)	阴性	P值	阳性(%)	阴性	P值
癌组织	11(14.9)	63	0.000	60(80.0)	15	0.000
癌旁组织	45(63.4)	26		11(16.4)	56	

(均 $P<0.05$). β -Catenin 表达阳性与食管癌患者性别、年龄、病理分级、浸润深度无统计学意义, 而与临床分期、淋巴结转移有密切关系($P<0.05$, 表2).

2.4 Klotho 与 β -Catenin 蛋白在食管癌组织表达的相关性 Spearman 等级相关分析表明 Klotho 与 β -Catenin 之间表达存在相关性($r = -0.276$, $P<0.05$, 表3).

3 讨论

Klotho 基因于1997年被发现, 最先的研究认为他是一种抗衰老基因, Klotho 敲除的老鼠表现出一系列衰老的症状, 如骨质疏松、肺气肿、皮肤萎缩、动脉硬化等^[10-16]. 近年来对 Klotho 的功能研究提示其与恶性肿瘤的发生发展密切相关^[17-30]. Lee 等^[21]将宫颈癌细胞成功转染 Klotho 基因后, 发现癌细胞的生长明显受限, 凋亡率明显增加, 细胞内的 Wnt 通路重要的信号分子 β -Catenin 含量明显减少, c-myc 与 CCND1 明显降低. Wnt/ β -Catenin 通路已被研究证实在多种

恶性肿瘤的发生发展中起促进作用, β -Catenin 是该通路中重要的信号分子, Veeramachaneni 等^[8]研究发现下调 β -Catenin 的表达能显著抑制食管癌细胞的生长.

本实验通过组织芯片联合免疫组织化学 EnVision 二步法检测了食管鳞癌及癌旁正常组织中 Klotho 与 β -Catenin 蛋白的表达情况, 结果表明食管癌中的 Klotho 的表达低于癌旁组织, β -Catenin 的表达高于癌旁; Klotho 的表达还与食管癌的浸润深度、临床分期密切相关, 随着食管癌浸润的加深、临床分期的增高, Klotho 的表达阳性率降低. β -Catenin 蛋白的表达与食管癌的淋巴结转移、临床分期密切相关, 随着食管癌发生淋巴结转移、临床分期增高, β -Catenin 的表达阳性率升高. 这些结果提示食管癌的发生与 Klotho 的低表达有关, Klotho 可能作为一种肿瘤抑制因子参与食管癌的进展过程; 而食管癌的发生发展与 β -Catenin 的高表达有关, β -Catenin 可以作为食管癌的促进因子. 并且 Klotho 与 β -Catenin 在食管癌组织中表达阳性率的相关分

■应用要点

Klotho 与 β -Catenin 的表达量可作为判断食管癌预后的指标. 但 Klotho 与 β -Catenin 在食管癌发生发展中相互作用的具体分子机制还需进一步研究.

■名词解释

组织芯片: 也称组织微阵列(tissue microarrays), 是生物芯片技术的一个重要分支, 是将许多不同个体组织标本以规则阵列方式排布于同一载玻片上, 进行同一指标的原位组织学研究。组织芯片技术可以与其他很多常规技术如免疫组织化学(IHC)、核酸原位杂交(ISH)、荧光原位杂交(FISH)、原位PCR等结合应用, 检测一种或多种分子的表达情况等。

表 2 Klotho与 β -Catenin在癌组织中的表达与患者临床病理特征的关系

临床病理特征	Klotho			β -Catenin		
	阳性 n(%)	阴性	P值	阳性 n(%)	阴性	P值
性别						
男	7(63.4)	49	0.468	48(81.4)	8	0.055
女	4(36.4)	13		11(18.6)	7	
年龄(岁)						
>60	7(63.4)	32	0.461	31(52.5)	8	0.956
<60	4(36.4)	30		28(47.5)	7	
浸润深度						
未侵及外膜	9(81.8)	29	0.046	29(50.0)	10	0.078
侵犯到外膜	2(18.2)	30		29(50.0)	3	
病理分级						
I级, II级	10(90.9)	47	0.425	44(73.3)	14	0.190
II--III级, III级	1(9.1)	16		16(26.7)	1	
淋巴结转移						
无	8(72.7)	28	0.092	25(42.4)	11	0.032
有	3(27.3)	34		34(57.6)	4	
TNM分期						
1期+2期	9(81.8)	28	0.022	27(45.0)	11	0.050
3期+4期	2(18.2)	35		33(55.0)	4	

表 3 Klotho与 β -Catenin在食管癌组织中表达的相关性

		β -Catenin		合计
		阳性	阴性	
Klotho	阳性	4	4	8
	阴性	56	10	66
合计	60	14	74	

采用Spearman等级相关分析法: 相关系数 $r = -0.276$, $P = 0.017$ 。

析发现呈负相关, 进一步提示2者在食管癌发生中起着相反的作用, Klotho的低表达与 β -Catenin的高表达共同参与了食管癌的发生发展。

综上所述, Klotho在食管癌中低表达, 与食管癌的浸润深度、临床分期密切相关。 β -Catenin蛋白在食管癌中高表达, 与食管癌的淋巴结转移、临床分期密切相关。2者可作为判断食管癌预后的指标, 但Klotho与 β -Catenin在食管癌发生发展中相互作用的具体分子机制还需进一步研究。

4 参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90
- Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohshima Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation

of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390: 45-51

- Kuro-o M. Klotho in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21: 362-368
- Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 199-221
- Fu L, Zhang C, Zhang LY, Dong SS, Lu LH, Chen J, Dai Y, Li Y, Kong KL, Kwong DL, Guan XY. Wnt2 secreted by tumour fibroblasts promotes tumour progression in oesophageal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Gut* 2011; 60: 1635-1643
- Jones LJ, Veale RB. Redistribution of beta-catenin in response to EGF and lithium signalling in human oesophageal squamous carcinoma cell lines. *Cancer Cell Int* 2003; 3: 13
- Kiely B, O'Donovan RT, McKenna SL, O'Sullivan GC. Beta-catenin transcriptional activity is inhibited downstream of nuclear localisation and is not influenced by IGF signalling in oesophageal cancer cells. *Int J Cancer* 2007; 121: 1903-1909
- Veeramachaneni NK, Kubokura H, Lin L, Pippin JA, Patterson GA, Drebin JA, Battafarano RJ. Down-regulation of beta catenin inhibits the growth of esophageal carcinoma cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 92-98
- Sanchez-Carbayo M. Antibody microarrays as tools for biomarker discovery. *Methods Mol Biol* 2011; 785: 159-182
- Wang Y, Sun Z. Current understanding of klotho. *Ageing Res Rev* 2009; 8: 43-51
- Kuro-o M. Klotho and the aging process. *Korean J Intern Med* 2011; 26: 113-122
- Razzaque MS. The role of Klotho in energy metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 579-587
- Nabeshima Y. Toward a better understanding of Klotho. *Sci Aging Knowledge Environ* 2006; 2006: pe11

- 14 Kuro-o M. Klotho. *Pflugers Arch* 2010; 459: 333-343
- 15 Nabeshima Y. Klotho: a fundamental regulator of aging. *Ageing Res Rev* 2002; 1: 627-638
- 16 Kuro-o M. Klotho and aging. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 1049-1058
- 17 Wolf I, Levanon-Cohen S, Bose S, Ligumsky H, Sredni B, Kanety H, Kuro-o M, Karlan B, Kaufman B, Koeffler HP, Rubinek T. Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene* 2008; 27: 7094-7105
- 18 Usuda J, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Inoue T, Saji H, Kakihana M, Kajiwaru N, Uchida O, Nomura M, Ohira T, Ikeda N. Klotho predicts good clinical outcome in patients with limited-disease small cell lung cancer who received surgery. *Lung Cancer* 2011; 74: 332-337
- 19 Pan J, Zhong J, Gan LH, Chen SJ, Jin HC, Wang X, Wang LJ. Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer. *Tumour Biol* 2011; 32: 729-735
- 20 Lu L, Katsaros D, Wiley A, de la Longrais IA, Puopolo M, Yu H. Klotho expression in epithelial ovarian cancer and its association with insulin-like growth factors and disease progression. *Cancer Invest* 2008; 26: 185-192
- 21 Lee J, Jeong DJ, Kim J, Lee S, Park JH, Chang B, Jung SI, Yi L, Han Y, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Yang I, Jeon S, Bae DH, Kim CJ, Lee MS. The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma. *Mol Cancer* 2010; 9: 109
- 22 Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-o M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem* 2011; 286: 8655-8665
- 23 Camilli TC, Xu M, O'Connell MP, Chien B, Frank BP, Subaran S, Indig FE, Morin PJ, Hewitt SM, Weeraratna AT. Loss of Klotho during melanoma progression leads to increased filamin cleavage, increased Wnt5A expression, and enhanced melanoma cell motility. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 175-186
- 24 Chen B, Wang X, Zhao W, Wu J. Klotho inhibits growth and promotes apoptosis in human lung cancer cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 99
- 25 Wang X, Chen B, Xu W, Liu S, Zhao W, Wu J. Combined effects of klotho and soluble CD40 ligand on A549 lung cancer cells. *Oncol Rep* 2011; 25: 1465-1472
- 26 Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, Bose S, Barshack I, Avivi C, Kaufman B, Wolf I. KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 4254-4266
- 27 Xie B, Zhou J, Yuan L, Ren F, Liu DC, Li Q, Shu G. Epigenetic silencing of Klotho expression correlates with poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2012 Oct 31. [Epub ahead of print]
- 28 Laitman Y, Kuchenbaecker KB, Rantala J, Hogervorst F, Peock S, Godwin AK, Arason A, Kirchhoff T, Offit K, Isaacs C, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Nevanlinna H, Chen X, Chenevix-Trench G, Healey S, Couch F, Peterlongo P, Radice P, Nathanson KL, Caligo MA, Neuhausen SL, Ganz P, Sinilnikova OM, McGuffog L, Easton DF, Antoniou AC, Wolf I, Friedman E. The KL-VS sequence variant of Klotho and cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 1119-1126
- 29 Chang B, Kim J, Jeong D, Jeong Y, Jeon S, Jung SI, Yang Y, Kim KI, Lim JS, Kim C, Lee MS. Klotho inhibits the capacity of cell migration and invasion in cervical cancer. *Oncol Rep* 2012; 28: 1022-1028
- 30 Chen B, Ma X, Liu S, Zhao W, Wu J. Inhibition of lung cancer cells growth, motility and induction of apoptosis by Klotho, a novel secreted Wnt antagonist, in a dose-dependent manner. *Cancer Biol Ther* 2012; 13: 1221-1228

■同行评价

Klotho与结肠癌等肿瘤的关系已受关注, 其与 β -Catenin在食管癌发生发展中相互作用的关系未见报道. 本文具有较好的创新性.

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》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.

C型、D型和E型腺管开口肠上皮化生胃黏膜组织中Ki67、CDX2的差异表达

赵燕如, 赵治国, 马军, 黄煌, 刘超, 钟亚莉, 崔静, 李振峰, 任景丽, 吴会芳, 胡桂明

■背景资料

胃癌是中国最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁人民的身体健康, 其早期诊断极为重要, 随着内镜技术的不断提高, 窄带成像放大内镜(NBI-ME)在早期胃癌的诊断中越来越受到重视。本文通过研究NBI-ME内镜下胃黏膜细微结构改变, 试图寻找早期胃癌的特定性黏膜改变。

赵燕如, 赵治国, 马军, 黄煌, 刘超, 钟亚莉, 崔静, 李振峰, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014

任景丽, 吴会芳, 胡桂明, 郑州大学第二附属医院病理科 河南省郑州市 450014

赵燕如, 在读硕士, 主要从事胃癌癌前病变的研究。

作者贡献分布: 赵治国与赵燕如对此文所作贡献均等; 此课题由赵治国、赵燕如及马军设计; 研究过程由赵燕如、李振峰及黄煌操作完成; 病理分析由任景丽、吴会芳及胡桂明完成; 研究所用分析工具由崔静提供; 数据分析由赵燕如、刘超及钟亚莉完成; 本论文写作由赵燕如与赵治国完成。

通讯作者: 赵治国, 教授, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科。zzghappy@eyou.com

电话: 0371-63939084

收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-11-08

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Differential expression of Ki67 and CDX2 proteins in intestinal metaplasia among gastric mucosa appearing as type C, D, or E pit pattern

Yan-Ru Zhao, Zhi-Guo Zhao, Jun Ma, Huang Huang, Chao Liu, Ya-Li Zhong, Jing Cui, Zhen-Feng Li, Jing-Li Ren, Hui-Fang Wu, Gui-Ming Hu

Yan-Ru Zhao, Zhi-Guo Zhao, Jun Ma, Huang Huang, Chao Liu, Ya-Li Zhong, Jing Cui, Zhen-Feng Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Jing-Li Ren, Hui-Fang Wu, Gui-Ming Hu, Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Correspondence to: Zhi-Guo Zhao, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. zzghappy@eyou.com

Received: 2012-09-17 Revised: 2012-11-08

Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To detect the expression of Ki67 and CDX2 in intestinal metaplasia (IM) among gastric mucosa appearing as type C, D or E pit pattern, and to assess the correlation between the degree of IM and the morphology of gastric pits.

METHODS: Immunohistochemistry was used to examine the expression of Ki67 and CDX2 proteins in 452 cases of gastric mucosal lesions

with different pit patterns. The degree of IM was evaluated by hematoxylin and eosin staining.

RESULTS: The positive rates of Ki67 in non-atrophic gastritis (NAG) appearing as type B pit pattern (BG), atrophic gastritis (AG) with IM appearing as type C pit pattern (CIM), AG with IM appearing as type D pit pattern (DIM), AG with IM appearing as type E pit pattern (EIM), low intraepithelial neoplasia (LIN), and gastric antrum adenocarcinoma (GAAC) were 16.2%, 40.5%, 44.0%, 64.3%, 71.4%, and 87.1%, respectively. The positive rate of Ki67 protein in EIM was significantly different from those in CIM and DIM ($P = 0.002, 0.008$), but there was no difference between CIM and DIM. The positive rates of CDX2 protein were 21.6%, 75.0%, 78.6%, 81.0%, 80.4%, and 84.3% in the above groups, respectively. The positive rate of CDX2 protein in EIM was significantly different from that in BG ($P = 0.000$), but not different from those in CIM and DIM. The degree of IM was significantly higher in EIM than in DIM and CIM ($P = 0.000$).

CONCLUSION: CDX2 may have no relationship with micromorphology of IM in gastric mucosa. The expression of Ki67 protein and the degree of IM in EIM were higher than those in CIM and DIM.

Key Words: Intestinal metaplasia; Early gastric cancer; Gastric pits; NBI-ME

Zhao YR, Zhao ZG, Ma J, Huang H, Liu C, Zhong YL, Cui J, Li ZF, Ren JL, Wu HF, Hu GM. Differential expression of Ki67 and CDX2 proteins in intestinal metaplasia among gastric mucosa appearing as type C, D, or E pit pattern. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3310-3316

摘要

目的: 检测C型、D型和E型腺管开口肠上皮化生胃黏膜组织中Ki67、CDX2的表达情况, 评估肠上皮化生程度(intestinal metaplasia, IM)与腺管开口形态的相关性。

方法: 应用免疫组织化学EnVision二步法检测

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科

Ki67、CDX2蛋白在452例不同腺管开口胃黏膜病变中的表达情况; 苏木素-伊红染色法评估IM的程度。

结果: 在非萎缩性胃炎胃小凹腺管开口呈B型(B型腺管开口胃炎)、萎缩性胃炎伴IM胃小凹腺管开口呈C型(C型腺管IM)、萎缩性胃炎伴IM胃小凹腺管开口呈D型(D型腺管IM)、萎缩性胃炎伴IM胃小凹腺管开口呈E型(E型腺管IM)、低级别上皮内瘤变和胃窦腺癌组织中Ki67蛋白的表达阳性率分别为16.2%、40.5%、44.0%、64.3%、71.4%和87.1%, E型腺管IM组分别与C、D组之间差别有统计学意义($P = 0.002$, $= 0.008$), 而C与D组差异无统计学意义; 以上6组中CDX2蛋白的表达阳性率分别为21.6%、75.0%、78.6%、81.0%、80.4%和84.3%, E型腺管IM组与C、D组之间没有统计学上的差异, 但与B型腺管开口胃炎组的差异有统计学意义($P = 0.000$). IM程度E型>D型>C型, 差异有统计学意义($P = 0.000$).

结论: CDX2可能与胃黏膜IM组织的微形态无关; E型腺管IM黏膜比C型、D型的Ki67表达高, IM程度重, 胃镜随访检查时应重视这些黏膜改变的活检。

关键词: 肠上皮化生; 早期胃癌; 腺管开口; 窄带成像放大内镜

赵燕如, 赵治国, 马军, 黄煌, 刘超, 钟亚莉, 崔静, 李振峰, 任景丽, 吴会芳, 胡桂明. C型、D型和E型腺管开口肠上皮化生胃黏膜组织中Ki67、CDX2的差异表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3310-3316
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3310.asp>

0 引言

肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)被认为是胃癌发展过程中的关键阶段, 与肠型胃癌关系密切, 近年来随着高清晰放大胃镜及窄带成像技术(narrow band imaging, NBI)的临床应用, 胃黏膜的表面结构、黏膜表面的微细腺管开口特点及微血管形态能够清晰地显示^[1-4], 这使得内镜下诊断IM已成为可能. 本文主要针对NBI放大胃镜下IM黏膜的不同微形态对IM进行分类研究, 比较不同胃窦腺管开口的IM黏膜中增殖因子Ki67及肠化因子CDX2的表达情况, 判断哪种类型小凹的增殖活性高, 从而为临床随访、胃镜直视下靶向活检提供依据. 本文根据胃小凹腺管开口形态将IM黏膜分为: 萎缩性胃炎伴IM胃小凹腺管开口呈C型(简称C型腺管IM)、萎缩性胃炎伴IM

胃小凹腺管开口呈D型(简称D型腺管IM)和萎缩性胃炎伴IM胃小凹腺管开口呈E型(简称E型腺管IM)(图1). 其中胃黏膜小凹开口形态分型参照Sakaki标准^[5]: A型: 圆点状小凹; B型: 短小棒状或管状小凹; C型: 树枝状或条纹状小凹; D型: 斑块状或脑回状小凹; E型: 绒毛状小凹.

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性搜集、分析我院消化内镜中心2009-06/2012-06胃镜图像, 呈C型、D型和E型腺管开口的各84例, 病理诊断均为萎缩性胃炎伴IM, 并且有完整、清晰的NBI放大胃镜资料, 其中男135例, 女117例, 年龄20-80岁, 中位年龄46.3岁. 为便于比较, 我们又选择了非萎缩性胃炎74例(腺管开口呈B型), 低级别上皮内瘤变(low intraepithelial neoplasia, LIN)56例, 胃窦腺癌(gastric antrum adenocarcinoma, GAAC)70例(15例高分化腺癌, 36例中等分化腺癌, 19例高-中分化混合型). 所有胃镜图像均由3名经验丰富的胃镜医师对胃黏膜腺管开口进行分型分组, 至少2名医师分型一致才能确定为某型; 在病理科找到相应的胃黏膜活检原始组织蜡块重新切片分别做苏木素-伊红(HE)染色和免疫组织化学检查. 幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)检测结果来源于原始胃镜档案(快速尿素酶法, 检测试纸购自上海凯创生物技术有限公司). 所用胃镜设备为日本东京Olympus公司生产, 型号如下: 主机CV-260SL, 光源为CLV-260SL, 内镜为H260AZI; 兔抗人CDX2单克隆抗体(1: 450)购自英国Abcam公司; 小鼠抗人Ki67多克隆抗体(1: 100)和通用型二抗及DAB显色剂均购自丹麦Dako公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学EnVision二步法: 严格按照EnVision试剂盒标准步骤进行. 为排除实验中的假阳性和假阴性, 按照试剂说明书Ki67、CDX2均采用结肠癌标本做阳性对照, 采用PBS代替一抗做阴性对照.

1.2.2 结果判定: 采用双盲法, 由2名经验丰富的病理学专家独立观察, 在400倍光学显微镜下观察5个视野, 每个视野计数100个细胞, 计算阳性细胞百分率, 计数相差10%以上重新计数. CDX2蛋白阳性染色部位定位于细胞核, 根据染色强度和染色面积共同评分: (1)无着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分; (2)阳性面积范围: <5%为0分, 5%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分, 两项结果相加,

■研发前沿
NBI-ME内镜在胃癌诊断方面的应用价值是当前研究的热点. 通过辨别NBI-ME内镜下胃小凹腺管开口的细微差异有望早期发现胃癌.

■相关报道

目前已有大量研究证实放大内镜下肠上皮化生的胃黏膜的腺管开口可呈C型、D型和E型,且E型胃小凹的肠化程度高。

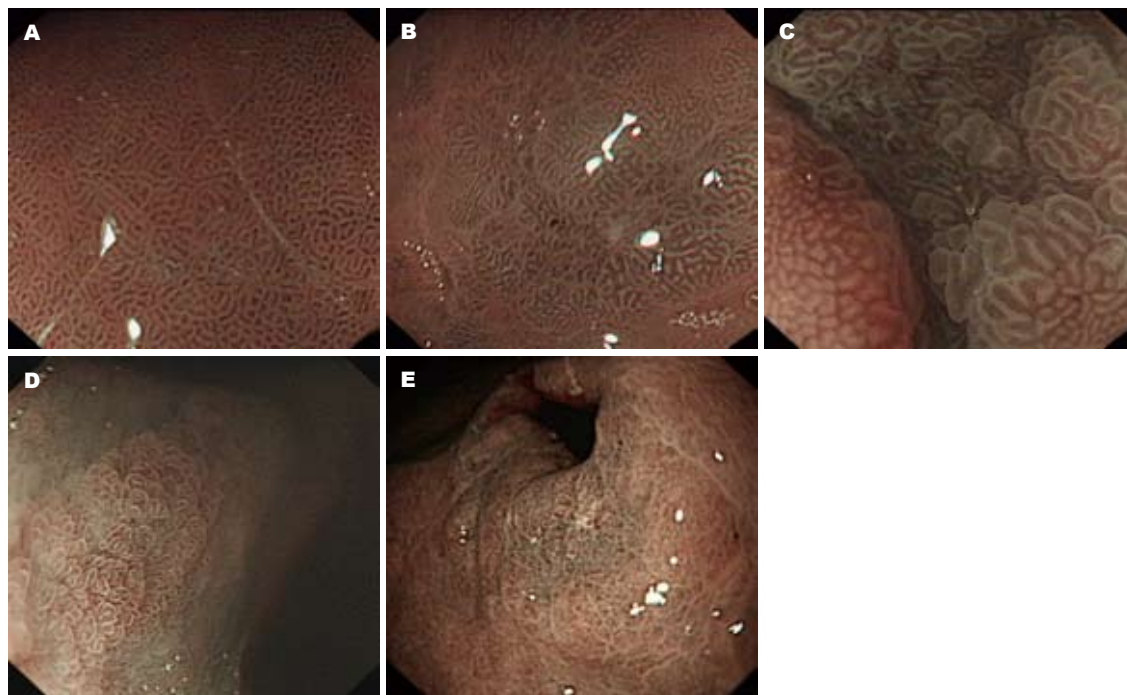


图1 窄带成像技术放大内镜下胃窦腺管开口分型. A: B型短小棒状或管状; B: C型树枝状或条纹状; C: D型斑块状或脑回状; D: E型绒毛状; E: F型不规则或模糊不清。

0-3分记为(-), ≥ 4 分记为(+). Ki67阳性表现为细胞核呈棕黄色, 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为阴性(-), 阳性细胞数 $>10\%$ 为阳性(+).

1.2.3 肠上皮化生程度分度: 参照2006年中国慢性胃炎共识意见^[6], 将IM分为无、轻、中、重4度. IM部分占腺体和表面上皮总面积1/3以下者为轻度; 1/3-2/3为中度; 2/3以上为重度. 由2名胃肠病理医师分别阅读所有萎缩性胃炎伴IM的HE玻片进行IM的分度, 意见一致者为最后结果, 有争议的送病理会诊, 以会诊结果为准.

统计学处理 所有数据采用SPSS20.0统计软件进行统计学分析, 比较胃窦不同腺管开口黏膜病变中Ki67、CDX2的表达差异以及不同腺管开口黏膜病变中*H. pylori*感染率的差别用行列表 χ^2 检验, 比较不同腺管开口IM黏膜的肠化程度分布用Kruskal-Wallis秩和检验, 以上两两比较时用四格表 χ^2 检验. 统计IM程度、*H. pylori*感染与腺管开口形态是否相关用多分类资料的关联分析, 分别计算关联系数*r*. $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胃窦不同腺管开口的黏膜病变中Ki67、CDX2蛋白的表达 6组标本中Ki67蛋白的表达阳性率分别为16.2%、40.5%、44.0%、64.3%、71.4%和87.1%, 其中E型腺管IM与LIN组差异

无统计学意义, 而与其他4组间的比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); CDX2蛋白的表达阳性率依次为21.6%、75.0%、78.6%、81.0%、80.4%和84.3%, E型腺管IM与C型腺管IM、D型腺管IM、LIN、GAAC组比较差别无统计学意义, 而仅与胃炎组比较差别有统计学意义($P < 0.05$, 图2, 表1).

2.2 胃窦不同腺管开口肠化生黏膜的肠化程度差别 结果显示(图3, 表2), C型腺管IM组有54例轻度IM, 15例中度IM和15例重度IM; D型腺管IM组有18例轻度IM, 53例中度IM和13例重度IM; 而E型腺管IM组有6例轻度IM, 18例中度IM和60例重度IM. 3组间IM程度的分布不同($H = 79.978$, $P < 0.05$), 两两比较结果差异均有统计学意义($P = 0.000$, $= 0.000$, $= 0.000$). 另外将不同腺管开口形态与IM程度进行关联分析, 结果显示 $\chi^2 = 1.273E2$, $P < 0.05$, 关联系数*r* = 0.579.

2.3 胃窦腺管开口形态变化与*H. pylori*感染的关系 表3中显示, *H. pylori*感染阳性率在以下6组中分别为47.3%、53.6%、58.3%、82.1%、76.8%和72.9%, E型腺管IM组与B型腺管开口胃炎组、C型和D型腺管IM组的表达差异有统计学意义($P < 0.05$), 而与LIN、GAAC组的差异没有统计学意义. 比较*H. pylori*感染与腺管开口形态(B、C、D、E)的相关分析结果显示 $\chi^2 = 23.757$, $P < 0.05$, $r = 0.261$.

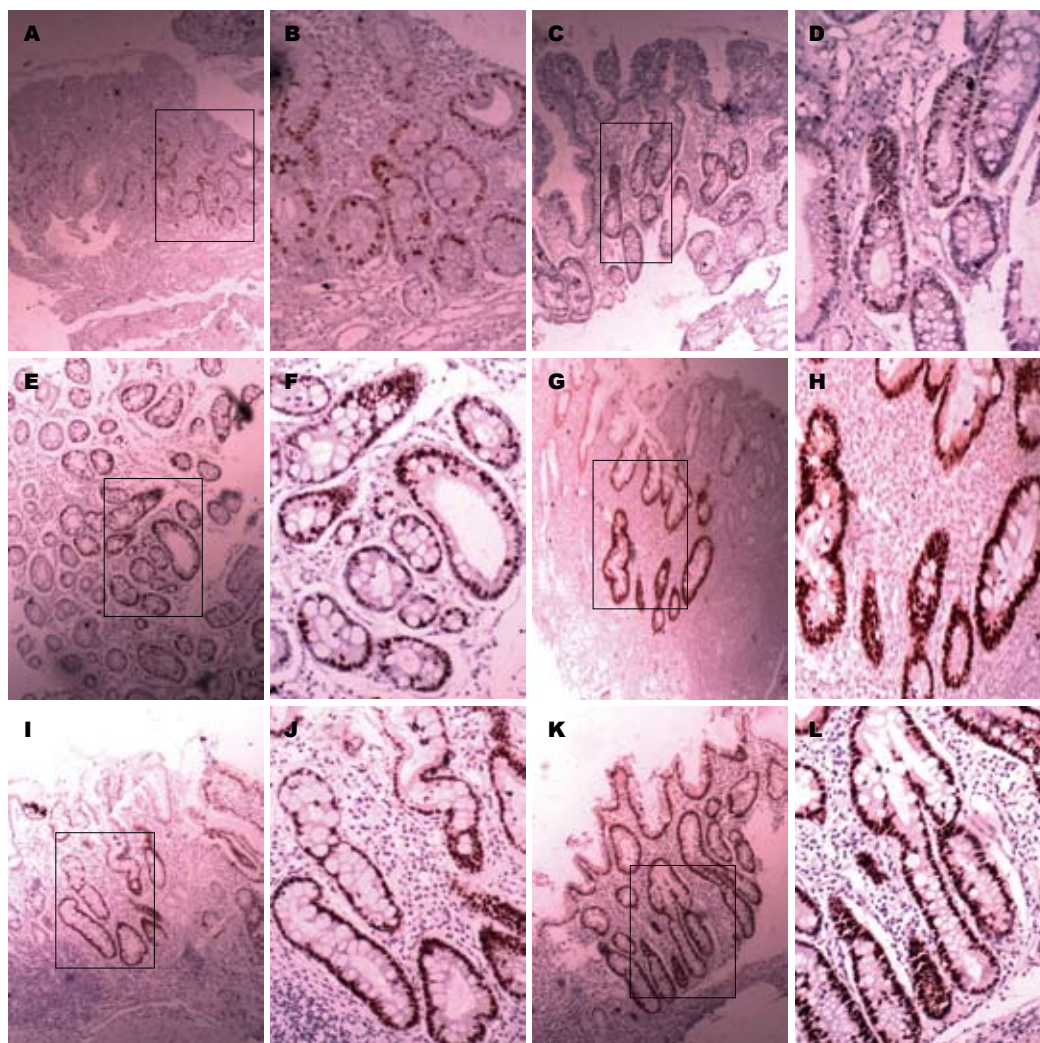


图 2 免疫组织化学法EnVision二步法检测Ki67和CDX2蛋白在不同腺管开口肠化生黏膜组织中的表达. A-F: Ki67; G-L: CDX2. A, B, G, H: C型腺管肠化生黏膜组织; C, D, I, J: D型腺管肠化生黏膜组织; E, F, K, L: E型腺管肠化生黏膜组织. B, D, F, H, J, L($\times 40$)分别为A, C, E, G, I, K($\times 100$)图中框内的部分.

■创新盘点

本实验创新之处在于将肠上皮化生的胃黏膜进行微形态的分类, 然后结合分子生物学表达的差异来评估其增殖活性及与胃癌的关系.

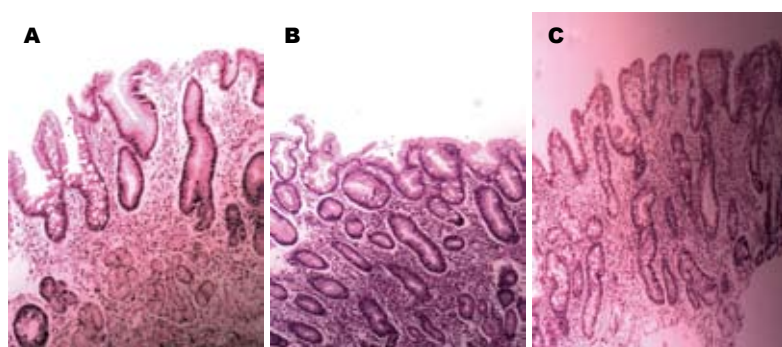


图 3 肠上皮化生程度分度(HE, $\times 40$). A: 轻度; B: 中度; C: 重度.

3 讨论

借助窄带成像放大内镜(narrow band Imaging system with magnifying endoscopy, NBI-ME)可以清晰地显示IM黏膜的腺管开口形态, 近年来越来越多的文献报道了IM黏膜的腺管开口可呈C型、D型和E型, 而不典型增生胃黏膜小凹多呈不规则或模糊不清(有研究称F型), 少部分见于

E型、D型和C型^[7-11]. 这些IM黏膜形态的细微差别是否存在分子生物学的不同, 目前尚未见研究报道.

CDX2是公认的肠化因子, 特异性地表达于小肠和结肠上皮中, 对调节正常生物体肠黏膜上皮细胞的分化和增殖起到关键作用^[12]. 目前在胃黏膜IM和胃癌方面的研究很多, 但说法不

■应用要点

本研究为临床随访、胃镜直视下靶向活检提供依据,有利于早期发现胃癌。

表 1 Ki67、CDX2在胃窦不同腺管开口的黏膜病变中的表达

分组	n	Ki67				CDX2			
		+	-	χ^2	P值	+	-	χ^2	P值
B型腺管开口胃炎	74	12	62	37.375	0.000	16	58	55.618	0.000
C型腺管IM	84	34	50	9.545	0.002	63	21	0.867	0.352
D型腺管IM	84	37	47	6.929	0.008	66	18	0.147	0.701
E型腺管IM ¹	84	54	30	-	-	68	16	-	-
LIN	56	40	16	0.777	0.378	45	11	0.008	0.930
GAAC	70	61	9	10.548	0.001	59	11	0.293	0.588

¹各组与E组比较; IM: 肠上皮化生; LIN: 低级别上皮内瘤变; GAAC: 胃窦腺癌。

表 2 胃窦不同腺管开口肠化生黏膜的肠化程度分布 (n)

分组	轻度	中度	重度	合计
C型腺管IM	54	15	15	84
D型腺管IM	18	53	13	84
E型腺管IM	6	18	60	84
合计	78	86	88	252

IM: 肠上皮化生。

表 3 胃窦不同腺管开口的黏膜病变中H. pylori感染率

分组	H. pylori阳性 n(%)	H. pylori阴性 n(%)	χ^2	P值
B型腺管开口胃炎	35(47.3)	39(52.7)	21.234	0.000
C型腺管IM	45(53.6)	39(46.4)	15.719	0.000
D型腺管IM	49(58.3)	35(41.7)	11.390	0.001
E型腺管IM ¹	69(82.1)	15(17.9)	-	-
LIN	43(76.8)	13(23.2)	0.603	0.438
GAAC	51(72.9)	19(27.1)	1.914	0.167

¹各组与E型相比较; IM: 肠上皮化生; LIN: 低级别上皮内瘤变; GAAC: 胃窦腺癌。

一. CDX2在胃IM组织中表达高, 在III型IM中的表达显著低于I型^[13,16], 因此认为其可以间接表明IM类型. CDX2在胃癌、结肠癌、食管癌的表达较IM有降低趋势, 且恶性肿瘤分化越低表达越低, 大多数学者认为CDX2有抑癌作用^[14-20], 而最近的一项研究认为CDX2的表达与IM严重程度有关, 而与IM亚型无关; 其在胃窦异型增生和胃窦癌中的表达高于对照组, 而在胃体差异无统计学意义^[21]. 本实验研究结果显示CDX2蛋白表达在B型腺管开口胃炎、C型、D型、E型腺管IM、LIN和GAAC中的阳性率分别为21.6%、75.0%、78.6%、81.0%、80.4%和84.3%, 与以往报道的胃癌组织中CDX2蛋白表达下调不相符, 有可能是在纳入研究对象的时候, 刻意将弥漫

型胃癌排除在外的原因. 其中C、D、E 3型腺管IM黏膜CDX2的表达差异无统计学意义, 我们认为他的存在可能与胃黏膜IM组织的微形态形成无关, 不参与胃小凹腺管开口形态的变化. 此外实验中发现CDX2蛋白的表达贯穿着从胃黏膜炎症-肠化生-癌变的整个过程, 提示他参与了胃窦腺癌的癌变, 与胃癌的关系密切, 因此对高表达CDX2的IM黏膜定期随访, 有可能早期发现胃癌.

Ki67是经典的反应细胞增殖的因子, 存在于除G₀期以外的细胞周期, 其表达可反映肿瘤细胞增殖活性、组织分型和核分裂指数^[22-25]. 目前一致认为他在胃癌、食管癌、乳腺癌等组织中的表达高于癌旁正常组织^[26-28], 但是Ki67蛋

白在不同IM黏膜的微形态中的表达未见报道。本研究结果显示, Ki67在B型腺管开口胃炎、C型腺管IM、D型腺管IM、E型腺管IM、LIN和GAAC组织中的表达呈渐进性增高, 与以往的研究结果大致相符^[29]。其中E型腺管IM与除LIN组外的其余4组差别有统计学意义, 而C型与D型之间差别无统计学意义。我们推测E型腺管IM黏膜比C型、D型的增殖活性高, 发生异型增生或胃癌的可能性大, 胃镜活检时, 选取E型腺管IM黏膜进行随访, 更利于早期发现胃癌。

本研究结果还显示, IM程度在C、D、E 3组中的分布各不相同, 其中71.4%的E型腺管IM黏膜表现为重度, 63.1%的D型表现为中度, C型腺管IM黏膜中轻度IM约占64.3%, 所以我们认为E型黏膜的IM程度较C型、D型重。相关分析结果提示IM程度与腺管开口形态有关, 这与黄永辉等^[30]研究结果一致。由此我们推测, 在胃黏膜发生IM过程中, 由于致病因素持续存在, 导致杯状细胞逐渐增多, 杯状细胞对其周围细胞及腺体周围间质产生影响, 从而使得正常胃黏膜腺体减少、扭曲, 最终产生一系列的腺管开口形态的变化。H. pylori感染率在C、D、E 3型IM中依次增高, 且E型与C型D型差异均有统计学意义。相关分析结果也提示2者有关联, 与文献报道一致^[1]。我们猜想H. pylori可能通过某种途径参与了胃窦小凹腺管开口形态的变化, 使得胃黏膜病变严重程度增加, 最后导致癌变, 但是具体机制仍不清楚, 仍需进一步观察研究。

同时本实验有以下局限性: (1)如果增加ki67、CDX2 mRNA定量研究与本文结果一致的话, 更具说服力; (2)该研究涉及的分子生物学指标少, 如果再纳入一些IM相关指标如MUC2、MUC5AC、MUC6等可能使其更完善。根据我们对胃镜下IM黏膜细微结构变化存在差异的初步理解设想可能存在相关分子生物学变化所设计的这项实验仅是初步探索。

4 参考文献

- 1 Zhang J, Guo SB, Duan ZJ. Application of magnifying narrow-band imaging endoscopy for diagnosis of early gastric cancer and precancerous lesion. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 135
- 2 Li HY, Ge ZZ, Fujishiro M, Li XB. Current clinical applications of magnifying endoscopy with narrow band imaging in the stomach. *Diagn Ther Endosc* 2012; 2012: 271914
- 3 Nass JP, Connolly SE. Current status of chromoendoscopy and narrow band imaging in colonoscopy. *Clin Colon Rectal Surg* 2010; 23: 21-30
- 4 Gono K, Obi T, Yamaguchi M, Ohyama N, Machida

- H, Sano Y, Yoshida S, Hamamoto Y, Endo T. Appearance of enhanced tissue features in narrow-band endoscopic imaging. *J Biomed Opt* 2004; 9: 568-577
- 5 Sakaki N, Iida Y, Okazaki Y, Kawamura S, Take-moto T. Magnifying endoscopic observation of the gastric mucosa, particularly in patients with atrophic gastritis. *Endoscopy* 1978; 10: 269-274
- 6 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见. 中华消化内镜杂志 2007; 24: 58-63
- 7 Yang JM, Chen L, Fan YL, Li XH, Yu X, Fang DC. Endoscopic patterns of gastric mucosa and its clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2552-2556
- 8 李娜, 张亚历, 刘思德, 姜泊, 潘德寿, 智发朝, 陈村龙, 李明松, 姚永莉, 陈焱, 白杨, 龚伟, 姚国和. 放大内镜下萎缩性胃炎胃窦黏膜小凹开口形态变化及其影响因素的分析. 中华消化内镜杂志 2008; 25: 201-203
- 9 严山, 凌红, 徐永成. 胃癌前病变黏膜微细结构形态变化与组织学改变相关性研究. 临床消化病杂志 2011; 23: 160-162
- 10 陈磊, 杨建民, 李向红, 余欣, 房殿春. 放大内镜下胃病患者胃黏膜微细结构改变及其临床病理意义. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 83-87
- 11 原丽莉, 陈星, 汪嵘, 康艳, 侯波. 胃小凹腺管开口分型与幽门螺杆菌及慢性胃炎相关性研究. 中国药物与临床 2008; 8: 648-650
- 12 Zhang MQ, Lin F, Hui P, Chen ZM, Ritter JH, Wang HL. Expression of mucins, SIMA, villin, and CDX2 in small-intestinal adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 808-816
- 13 Kang JM, Lee BH, Kim N, Lee HS, Lee HE, Park JH, Kim JS, Jung HC, Song IS. CDX1 and CDX2 expression in intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2011; 26: 647-653
- 14 Hayes S, Ahmed S, Clark P. Immunohistochemical assessment for Cdx2 expression in the Barrett metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *J Clin Pathol* 2011; 64: 110-113
- 15 Park do Y, Srivastava A, Kim GH, Mino-Kenudson M, Deshpande V, Zukerberg LR, Song GA, Lauwers GY. CDX2 expression in the intestinal-type gastric epithelial neoplasia: frequency and significance. *Mod Pathol* 2010; 23: 54-61
- 16 Qin R, Wang NN, Chu J, Wang X. Expression and significance of homeodomain protein Cdx2 in gastric carcinoma and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 3296-3302
- 17 王旭光, 张忠, 孙丽萍, 袁媛. 同源异形盒基因CDX2的表达与胃黏膜肠上皮化生类型的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17: 86-89
- 18 Liu Q, Teh M, Ito K, Shah N, Ito Y, Yeoh KG. CDX2 expression is progressively decreased in human gastric intestinal metaplasia, dysplasia and cancer. *Mod Pathol* 2007; 20: 1286-1297
- 19 Xiao ZY, Ru Y, Sun JT, Gao SG, Wang YF, Wang LD, Feng XS. Expression of CDX2 and villin in gastric cardiac intestinal metaplasia and the relation with gastric cardiac carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 247-250
- 20 Baba Y, Noshio K, Shima K, Freed E, Irahara N, Philips J, Meyerhardt JA, Hornick JL, Shivdasani RA, Fuchs CS, Ogino S. Relationship of CDX2 loss with molecular features and prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4665-4673
- 21 Lee BH, Kim N, Lee HS, Kang JM, Park HK, Jo HJ, Shin CM, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Jung HC, Song IS. The Role of

■名词解释

胃小凹: 整个胃黏膜表面遍布不规则的点状或线状的细小凹陷称胃小凹。胃小凹平均宽度为70 μm, 深200 μm。胃腺即开口于胃小凹的底部。一般1个胃小凹的底部有3-5条腺管相连, 胃小凹就是这些腺管的开口。

■同行评价

本文初步探讨了不同类型腺管开口肠上皮化生胃黏膜的Ki67、CDX2的表达情况,对判断胃黏膜增殖活性,胃镜直视下靶向活检有很好的参考价值。

- CDX2 in Intestinal Metaplasia Evaluated Using Immunohistochemistry. *Gut Liver* 2012; 6: 71-77
- 22 Zheng Y, Wang L, Zhang JP, Yang JY, Zhao ZM, Zhang XY. Expression of p53, c-erbB-2 and Ki67 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 339-344
- 23 Duchrow M, Schlüter C, Key G, Kubbutat MH, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1995; 43: 117-121
- 24 Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715
- 25 Preusser M, Heinzl H, Gelpi E, Höftberger R, Fischer I, Pipp I, Milenkovic I, Wöhrer A, Popovici F, Wolfsberger S, Hainfellner JA. Ki67 index in intracranial ependymoma: a promising histopathological candidate biomarker. *Histopathology* 2008; 53: 39-47
- 26 Igarashi N, Takahashi M, Ohkubo H, Omata K, Iida R, Fujimoto S. Predictive value of Ki-67, p53 protein, and DNA content in the diagnosis of gastric carcinoma. *Cancer* 1999; 86: 1449-1454
- 27 Forones NM, Carvalho AP, Giannotti-Filho O, Lourenço LG, Oshima CT. Cell proliferation and apoptosis in gastric cancer and intestinal metaplasia. *Arg Gastroenterol* 2005; 42: 30-34
- 28 Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. *Br J Cancer* 2001; 84: 270-275
- 29 郁岩杰, 赵治国, 于泳, 任景丽, 王宪远, 虎建恩, 弋晓萍, 温静, 冯常伟, 李振峰, 唐芙爱. 萎缩性胃炎伴肠上皮化生浅表隆起灶黏膜中Reg4和Ki67表达高于浅表凹陷灶黏膜. *肿瘤* 2011; 31: 937-941
- 30 黄永辉, 周丽雅, 林三仁, 金珠, 刘建军, 丁士刚, 夏志伟, 段丽萍, 常红. 放大内镜下胃小凹形态学分类及其临床病理意义. *中国内镜杂志* 2004; 10: 14-16, 19

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》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和*World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。

抑癌基因CHD5在胃癌中的表达及临床意义

游焜, 张谢夫, 赵春临, 刘涛, 郭大鹏

游焜, 张谢夫, 赵春临, 刘涛, 郭大鹏, 郑州大学第一附属医院胃肠外科 河南省郑州市 450052

游焜, 在读硕士, 主要从事胃肠道肿瘤的基础与临床研究.

作者贡献分布: 本课题由张谢夫与赵春临设计; 研究过程由游焜、刘涛及郭大鹏完成; 研究所用试剂及分析工具由张谢夫提供; 数据分析由游焜与郭大鹏完成; 本论文写作由游焜完成.

通讯作者: 张谢夫, 教授, 450052, 河南省郑州市建设路1号, 郑州大学第一附属医院胃肠外科. zhangxiefu@medmail.com.cn 电话: 0371-67967131

收稿日期: 2012-10-08 修回日期: 2012-11-05

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2012-12-08

Clinical significance of expression of CHD5 in gastric carcinoma

Kun You, Xie-Fu Zhang, Chun-Lin Zhao, Tao Liu, Da-Peng Guo

Kun You, Xie-Fu Zhang, Chun-Lin Zhao, Tao Liu, Da-Peng Guo, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Xie-Fu Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhangxiefu@medmail.com.cn

Received: 2012-10-08 Revised: 2012-11-05

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of chromodomain helicase DNA-binding protein 5 (CHD5) mRNA and protein in gastric cancer, and to investigate the correlation between CHD5 expression and the development and progression of gastric cancer.

METHODS: Reverse transcription-polymerase chain reaction and immunohistochemistry were used to detect the expression of CHD5 mRNA and protein in 63 cases of gastric cancer tissues and 63 matched tumor-adjacent gastric tissues. The relationship between CHD5 expression and clinico-pathologic characteristics of gastric cancer was analyzed.

RESULTS: The expression level of CHD5 mRNA in gastric cancer tissues was significantly lower than that in matched tumor-adjacent gastric tissues (0.06 ± 0.04 vs 0.34 ± 0.06 , $t = 59.204$, P

< 0.01). The expression of CHD5 mRNA was significantly associated with histologic differentiation, TNM stage, and lymph node metastasis (all $P < 0.05$). The positive rate of CHD5 expression in gastric cancer tissues was significantly lower than that in matched tumor-adjacent gastric tissues (36.5% vs 71.4% , $P < 0.01$). The expression of CHD5 protein was correlated with histologic differentiation, TNM stage, and lymph node metastasis (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Low expression of CHD5 mRNA and protein in gastric carcinoma is related with tumor malignancy and invasiveness, suggesting that the tumor suppressor gene CHD5 may play an important role in the tumorigenesis and progression of gastric cancer.

Key Words: CHD5; Gastric cancer; RT-PCR; Immunohistochemistry

You K, Zhang XF, Zhao CL, Liu T, Guo DP. Clinical significance of expression of CHD5 in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3317-3322

摘要

目的: 探讨染色体质域解螺旋酶DNA结合蛋白5(chromodomain helicase DNA-binding protein 5, CHD5)mRNA和蛋白的表达与胃癌发生、发展的关系.

方法: 采用RT-PCR和免疫组织化学方法(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶联结法, streptavidin-peroxidase法), 检测63例胃癌组织及相应癌旁组织(距癌5 cm)中CHD5 mRNA和蛋白的表达情况, 并分析胃癌组织中CHD5 mRNA和蛋白的表达与临床病理特征之间的关系.

结果: CHD5 mRNA在63例胃癌组织中的表达量相对值明显低于在癌旁组织中的表达相对值(0.06 ± 0.04 vs 0.34 ± 0.06 , $t = 59.204$, $P < 0.01$). 在胃癌组织中, CHD5 mRNA的表达与肿瘤的分化程度、TNM分期、淋巴结转移有关(均 $P < 0.05$). CHD5基因的蛋白在胃癌组织和相应癌旁组织中的表达阳性率分别为

■背景资料

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 在全国肿瘤登记地区统计的前10位恶性肿瘤中, 胃癌的发病率位于第2位, 死亡率位于第3位. 因此探讨胃癌发生发展的分子机制, 为临床胃癌的诊治提供分子依据就尤为重要.

■同行评议者

刘炳亚, 研究员, 上海交通大学医学院附属瑞金医院上海消化外科研究所

■ 研发前沿

目前针对染色体质域解螺旋酶DNA结合蛋白5(CHD5)基因与胃癌的肿瘤学机制的相关研究在国内外鲜有报道。

36.5%和71.4%。在胃癌组织中CHD5蛋白的表达与肿瘤的分化程度、TNM分期、淋巴结转移有关(均 $P<0.05$)。

结论: CHD5基因的低表达与胃癌的恶性程度及侵袭性关系密切,提示其可能是胃癌发生、发展过程中的一个重要的抑癌基因。

关键词: 染色体质域解螺旋酶DNA结合蛋白5; 胃癌; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组织化学SP法

游焜, 张谢夫, 赵春临, 刘涛, 郭大鹏. 抑癌基因CHD5在胃癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3317-3322

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3317.asp>

0 引言

胃癌是最常见的消化系恶性肿瘤之一,在我国乃至世界范围内都有很高的发病率和死亡率,全国肿瘤登记地区统计的前10位恶性肿瘤中,胃癌的发病率位于第2位(32.23/10万),死亡率位于第3位(23.90/10万)^[1]。近年来,虽然国内外学者对胃癌做了大量细致深入的研究,但至今其发病机制仍未阐明。在对肿瘤的研究中,人们逐渐接受这样一个观点:原癌基因的激活和抑癌基因的失活对其发生作用巨大。2007年Bagchi等^[2]运用染色体基因工程技术证明染色体质域解螺旋酶DNA结合蛋白5(chromodomain helicase DNA-binding protein 5, CHD5)是一种抑癌基因。最近国外学者在对人类神经母细胞瘤、乳腺癌、肝癌、结肠癌等的研究中均证实了CHD5在肿瘤组织中出现了低表达或不表达,揭示其具有肿瘤抑制作用。然而国内外鲜有关于CHD5基因与胃癌发生相关性的报道。本研究应用RT-PCR和免疫组织化学SP法分别检测63例胃癌组织及相应癌旁组织中CHD5 mRNA和蛋白的表达情况,并探讨其与胃癌临床病理学参数之间的关系,以期本研究结果能对胃癌的临床诊断和治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-12/2012-02郑州大学第一附属医院胃肠外科手术切除的胃癌标本63例,每例标本均采集癌组织和距肿瘤5 cm的癌旁胃组织。所有检测标本均经病理学诊断证实。患者知情同意且术前均未行放射治疗、化学治疗、生物治疗及中西医结合治疗。标本离体后迅速置入-70℃冰箱保存备用。63例患者中男34例、女

29例;年龄26-85岁,中位年龄62岁。肿瘤癌灶<5 cm 30例,≥5 cm 33例。胃癌组织按分化程度分为3组:高分化组13例,中分化组20例,低分化组30例。按美国癌症联合委员会(AJCC)胃癌TNM分期(2010年第7版)标准^[3,4]: I期7例, II期16例, III期27例, IV期13例。淋巴结转移阳性37例,阴性26例。有远处转移20例,无远处转移43例。PCR mix购自北京百泰克生物技术有限公司bioteke; TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; 琼脂糖购自西班牙Biowest公司; CHD5引物购自大连宝生物技术有限公司; β-actin引物购自大连宝生物技术有限公司; 逆转录试剂盒购自富酶泰斯生物技术有限公司Fermentas; 一抗购自Santa Cruz公司; 二抗试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 引物序列: 参考文献[5]设计β-actin扩增片段长度185 bp; CHD5上游引物: 5'-AGTTCCTGTGAGGATGAAC-3', 下游引物: 5'-TCAAGGCTGACGTGTTCAAG-3', 扩增片段长度108 bp。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应: 分别研磨组织, TRIzol提取总RNA。以2 μL总RNA作为模板,按逆转录试剂盒说明书进行反转录合成cDNA。然后进行PCR扩增,反应体系: cDNA 1 μL, PCR mix 9.5 μL, 上下游引物各1 μL, 双蒸水补足25 μL。CHD5引物序列: 上游引物: 5'-AGTTCCTGTGAGGATGAAC-3', 下游引物: 5'-TCAAGGCTGACGTGTTCAAG-3', 产物长度108 bp; β-actin: 185 bp。反应条件为: 首先95℃变性5 min后, 94℃变性30 s, 48℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共29次循环。最后72℃延伸5 min, 至4℃完成反应。2%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像分析, 然后用Gelworkal D Intermediate软件分析各条带的光密度(A)值, 以β-actin为内参照, 以CHD5与β-actin A值之比为相互间进行比较的参数, 以正常组织参数的平均值作为标准, 低于此值为基因表达下调, 大于此值为过表达, 在此值范围内为正常表达, 未出现相应条带为表达缺失或表达极低。用去离子水作阴性对照。使用Quantity-one软件, 计算各个样本CHD5表达水平, 表达量的相对值(relative expression value) = CHD5扩增条带的灰度值/GAPDH基因扩增条带的灰度值。

1.2.3 CHD5基因的蛋白表达: 所有标本均经中性福尔马林固定、常规脱水、包埋, 连续4 μm切片。3%H₂O₂-甲醇阻断内源性过氧化物酶, 微波(750 W, 95℃, 5 min×2次)抗原修复, DAB显

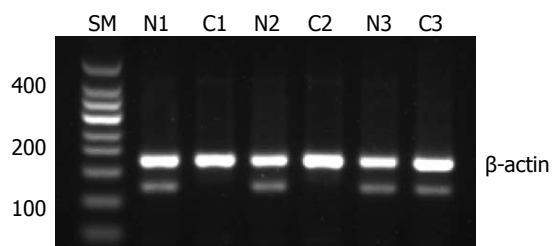


图1 RT-PCR检测CHD5 mRNA的表达情况. SM: DL-500; N: 癌旁组织; C: 癌组织.

色, 苏木素复染. 每批染色均设阳性对照和阴性对照, 严格按SP试剂盒的说明进行染色. 染色判断标准^[6]: 在显微镜下按显色程度肉眼评分: 弱染色为1分; 中等染色为2分; 强染色为3分. 在高倍镜下按阳性细胞所占百分比率计算评分: 阳性细胞数占10%-50%为2分; 50%-80%为3分; $\geq 80\%$ 为4分. 最后将肉眼一般评分与高倍镜下百分比率计算评分之和进行最终判断, 无论染色强度如何, 细胞阳性率 $<10\%$ 或 <2 分者为阴性(-); 2-3分为弱阳性(+); 4-7分为强阳性(++).

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件包进行统计学处理, 对胃癌组织和癌旁组织中的CHD5 mRNA灰度值进行配对 t 检验. 相关性分析采用配对四格表的关联性分析, 对临床病理因素间的关系进行 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 作为差异有统计学意义的检验标准.

2 结果

2.1 胃癌组织及相应癌旁组织CHD5 mRNA的表达 CHD5 mRNA在63例胃癌组织中的表达量相对值为 0.06 ± 0.04 , 明显低于在癌旁组织中的表达相对值 0.34 ± 0.06 , 经统计学分析发现, 差异有统计学意义($t = 59.204, P<0.01$, 图1). 经统计学分析发现, CHD5 mRNA的表达与患者肿瘤分化程度、淋巴结转移与否及肿瘤TNM分期有关(均 $P<0.05$), 而与患者性别、年龄、肿瘤大小、远处转移无关. 高、中、低分化的胃癌组织中CHD5 mRNA表达阳性率分别为: 84.6%、30.0%、26.7%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 8.724, P = 0.003$); 随着TNM分期的增加, 胃癌组织中的CHD5 mRNA表达阳性率呈下降趋势, I期、II期、III期、IV期表达阳性率分别为: 71.4%、50.0%、37.0%、15.4%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 6.524, P = 0.011$); 淋巴结转移阴性的胃癌组织中的CHD5 mRNA表达阳性率(51.4%)明显高于淋巴结转移阳性者(23.1%), 差异有统计学意义(χ^2

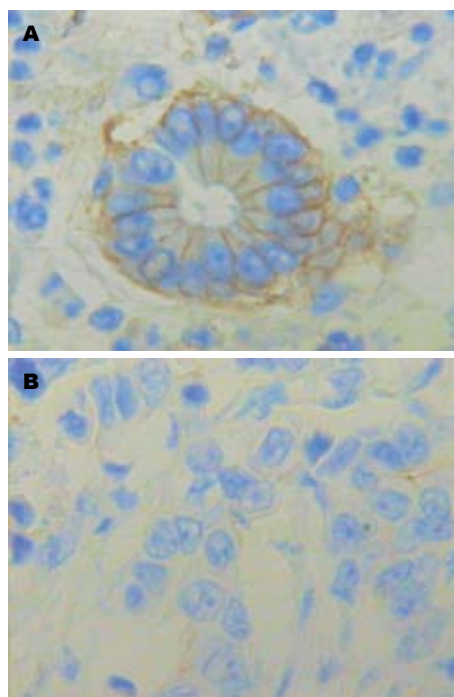


图2 CHD5蛋白的表达(SP × 400). A: 癌旁正常腺体; B: 胃腺癌.

$= 5.100, P = 0.024$, 表1).

2.2 胃癌组织及相应癌旁组织CHD5蛋白的表达 在胃癌相应的癌旁组织中CHD5基因的蛋白出现阳性表达, 其阳性表达率为71.4%; 而在胃癌组织中其阳性表达率为36.5%, 并且多为弱阳性表达(图2). 经统计学分析发现, CHD5蛋白的表达与患者肿瘤分化程度、淋巴结转移与否及肿瘤TNM分期有关(均 $P<0.05$), 而与患者性别、年龄、肿瘤大小、远处转移无关. 肿瘤细胞异型性越高, 其胃癌组织中CHD5蛋白表达阳性率越低, 高、中、低分化胃癌组织中的CHD5蛋白表达阳性率分别为: 76.9%、30.0%、23.3%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 8.236, P = 0.004$); 结果显示随着TNM分期的增加, 胃癌组织中CHD5蛋白的表达阳性率也呈现下降趋势, I期、II期、III期、IV期表达阳性率分别为: 85.7%、37.5%、37.0%、23.1%, 差异有统计学意义($\chi^2 = 4.447, P = 0.035$); 淋巴结转移阴性的胃癌组织中的CHD5蛋白表达阳性率(48.6%)明显高于淋巴结转移阳性者(19.2%), 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.701, P = 0.017$, 表2).

2.3 CHD5 mRNA与蛋白表达的相关性 经统计学分析可知, 在所研究的63例胃癌组织中, CHD5基因的mRNA的表达缺失常伴随着CHD5蛋白的表达缺失, 2者有相关性($\chi^2 = 22.524, P<0.01$, 表3).

■相关报道

近年来, 大量的实验研究证实CHD5在神经母细胞瘤、卵巢癌、结肠癌和喉鳞状细胞癌中出现了低表达或者表达缺失, 提示CHD5在肿瘤发生的过程中起重要的作用.

■创新盘点

从CHD5的基因水平和蛋白水平检测其在胃癌组织及相应癌旁组织中的表达情况, 尝试证明CHD5基因与胃癌发生发展的关系, 为胃癌的早期诊断、早期治疗以及预后预测提供新的参考指标.

■应用要点

本研究采用RT-PCR和免疫组织化学检测63例胃癌组织及其对应癌旁组织中CDH5的表达,并分析其与胃癌患者临床病理参数之间的关系。

表 1 CHD5 mRNA的表达与胃癌临床病理特点的关系

临床资料	n	CHD5 mRNA表达数		表达阳性率(%)	χ^2 值	P值
		表达	缺失			
男	34	11	23	32.4	1.618	0.198
女	29	14	15	48.3		
年龄(岁)						
<55	24	13	11	54.2	3.398	0.065
≥55	39	12	27	30.8		
肿瘤大小(cm)						
<5	30	10	20	33.3	0.965	0.326
≥5	33	15	18	45.5		
TNM分期						
I期	7	5	2	71.4	6.524	0.011
II期	16	8	8	50.0		
III期	27	10	17	37.0		
IV期	13	2	11	15.4		
病理分级						
高分化	13	11	2	84.6	8.724	0.003
中分化	20	6	14	30.0		
低分化	30	8	22	26.7		
淋巴结转移						
阴性	37	19	18	51.4	5.100	0.024
阳性	26	6	20	23.1		
远处转移						
有	20	9	11	45.0	0.346	0.556
无	43	16	27	37.2		

3 讨论

胃癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一,为东南亚国家中最常见的癌症类型^[7,8]。近年来,在对胃癌表观遗传学机制的研究中,证实了多个抑癌基因的失活与胃癌发生发展存在密切关系,这说明抑癌基因的表达沉默是一种主要的分子生物学改变^[9-12]。先前已有研究发现:抑癌基因的大型基因组片段内出现了点突变或缺失,大约30%的胃癌患者具有胃癌个体遗传倾向^[13,14]。然而,大多数胃癌患者的发病机制仍不清楚。

众所周知,传统上将DNA和染色质结合的蛋白分为2类:染色体非组蛋白和组蛋白。在DNA复制、转录和修复过程中,染色体非组蛋白和染色体组蛋白都起到了很重要的作用。组蛋白是一组高度保守的DNA结合蛋白,其经过翻译、修饰后又形成组蛋白码,在组蛋白码的介导下完成DNA的修饰和染色体的重塑^[15-18]。而多数组蛋白码是由染色体非组蛋白参与形成、维持和翻译的。研究证实,在组蛋白码的翻译过程中,染色体非组蛋白通过重塑染色体复合物发挥重要作用;不论染色体组蛋白还是非

组蛋白在基因表达的调控上都发挥着重要作用,所以2者表达的异常将导致人类多种疾病(例如癌症)的进展^[19-23]。

1977年Brodeur等^[24]在对神经母细胞瘤的研究中首次报道了人类1号染色体短臂基因的表达缺失。随后,引起了大量针对人类1号染色体短臂基因的研究,并发现很多人类恶性肿瘤组织中经常发生1号染色体短臂3区6带(1p36)的表达缺失。Bagchi等^[2]构建了1p36增益和缺失小鼠模型,证实CHD5基因位于1p36,是肿瘤抑制途径中的一个重要抑癌基因。CHD5蛋白是一组主要的染色体非组蛋白,其属于SWI2/SNF2相关的ATP酶超家族,该家族蛋白因蛋白质从氨基端开始依次含有染色质结构域(chromodomains)、类SWI2/SNF2 ATP酶/解螺旋酶域(SWI2/SNF2-like ATPase/helicase)和DNA结合域(DNA binding domain)而得名^[25]。通过调节染色体结构,CHD5可以促进*p19^{arf}*基因的表达,后者可以维持P53的表达稳定性,有超过50%的人类癌症与P53的表达缺失有关,提示CHD5基因可能是通过P19^{arf}/P53通路调控肿瘤的发生发展^[2]。

表 2 CHD5蛋白的表达与胃癌临床病理特点的关系

临床资料	n	CHD5蛋白表达数		阳性率(%)	χ^2 值	P值
		+	-			
性别						
男	34	14	20	41.2	0.695	0.405
女	29	9	20	31.0		
年龄(岁)						
<55	24	10	14	41.7	0.445	0.505
≥55	39	13	26	33.3		
肿瘤大小(cm)						
<5	30	8	22	26.7	2.393	0.122
≥5	33	15	18	45.5		
TNM分期						
I期	7	6	1	85.7	4.447	0.035
II期	16	6	10	37.5		
III期	27	10	17	37.0		
IV期	13	3	10	23.1		
病理分级						
高分化	13	10	3	76.9	8.236	0.004
中分化	20	6	14	30.0		
低分化	30	7	23	23.3		
淋巴结转移						
阴性	37	18	19	48.6	5.701	0.017
阳性	26	5	21	19.2		
远处转移						
有	20	7	13	35.0	0.029	0.865
无	43	16	27	37.2		

■名词解释

染色体质域解螺旋酶DNA结合蛋白5(CHD5): 一组主要的染色体非组蛋白, 其属于SWI2/SNF2相关的ATP酶超家族, 是近年来发现的一个重要的抑癌基因。

表 3 胃癌组织中CHD5 mRNA及蛋白表达的相关性

CHD5蛋白	CHD5 mRNA		合计
	表达	缺失	
阳性	18	5	23
阴性	7	33	40
合计	25	38	63

$$\chi^2 = 22.524, P = 0.000.$$

近年来, 大量的实验研究证实CHD5在神经母细胞瘤、卵巢癌、结肠癌和喉鳞状细胞癌中出现了低表达或者表达缺失, 提示CHD5在肿瘤发生的过程中起到了重要的作用^[26-29]。唐莹莹等^[30]在研究CHD5 mRNA的表达与肝细胞癌的关系时发现, 在肝癌组织及相应癌旁组织中CHD5 mRNA的表达缺失率分别为53.3%(16/30)和13.3%(4/30)。陈香宇等^[31]研究了CHD5基因的表观遗传学改变与食管癌发生的关系, 结果发现在其研究的食管癌组织及相应癌旁组织中CHD5基因启动子区甲基化的发生率分别为69%(50/72)和32%(23/72), 并提出CHD5基因

甲基化有可能作为食管癌诊断的一个标志物。Wang等^[5]发现在其研究的所有7种胃癌细胞株(AGS, Kato III, MKN28, MKN45, SNU1, SNU16和NCI-N87)中都出现了CHD5的表达下调, 并提出在胃癌细胞中, CHD5基因常因为启动子区的高度甲基化而出现表达下调。CHD5可以导致体外培养的胃癌细胞出现生长抑制, 说明CHD5是胃癌肿瘤发生和生长过程中的抑癌基因。

本研究结果表明, 胃癌组织中CHD5基因mRNA和蛋白的表达较癌旁胃组织均明显下降, 经统计学分析, 差异有统计学意义。我们比较CHD5 mRNA与蛋白表达的相关性发现, 63例胃癌组织中, CHD5基因mRNA的表达缺失大多伴随CHD5蛋白的表达缺失, 2者具有相关性。统计分析证实CHD5 mRNA表达与胃癌组织的分化程度、TNM分期和淋巴结转移有关, 在胃癌组织中CHD5基因的表达与肿瘤的分化程度、TNM分期和淋巴结转移有关, 提示其可能与胃癌的肿瘤学进展关系密切。CHD5基因检测及蛋白测定有可能作为胃癌诊断、治疗和临床预后评价的参考指标。值得一提的是, 在部分胃癌组

同行评价

本文采用免疫组织化学和RT-PCR检测63例胃癌组织及其对应癌旁组织中CDH5的表达情况,并分析其表达与胃癌患者临床病理参数的关系,具有一定的参考价值。

组织中,CHD5 mRNA也有表达,考虑其与CHD5的表观遗传学机制、肿瘤组织表达特异性或肿瘤取材部位有关,本课题组将在以后的研究中继续探究。

本研究发现,与相应癌旁组织相比,CHD5 mRNA和蛋白在胃癌组织中出现了明显低表达。CHD5出现的低表达与胃癌的恶性程度及侵袭性关系密切,提示其可能是胃癌发生、发展过程中的一个重要抑癌基因。

参考文献

- 1 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 李光琳, 赵平, 赫捷, 陈万青. 中国肿瘤登记地区2008年恶性肿瘤发病和死亡分析. *中国肿瘤* 2012; 21: 1-12
- 2 Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills AA. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell* 2007; 128: 459-475
- 3 Washington K. 7th edition of the AJCC cancer staging manual: stomach. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3077-3079
- 4 Santiago JM, Sasako M, Osorio J. [TNM-7th edition 2009 (UICC/AJCC) and Japanese Classification 2010 in Gastric Cancer. Towards simplicity and standardisation in the management of gastric cancer]. *Cir Esp* 2011; 89: 275-281
- 5 Wang X, Lau KK, So LK, Lam YW. CHD5 is down-regulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *J Biomed Sci* 2009; 16: 95
- 6 罗登, 赵公芳, 路明亮, 黄华, 常江, 郑梦瑶. CHD5与KLF5蛋白在胃癌组织中的表达及其与预后的关系. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 3603-3609
- 7 Wu PY, Zhang Z, Wang JM, Guo WW, Xiao N, He Q, Wang YP, Fan YM. Germline promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 70-78
- 8 林三仁. 中国消化病学科发展30年回顾与展望. *中国实用内科杂志* 2011; 31: 827
- 9 Cheng YY, Jin H, Liu X, Siu JM, Wong YP, Ng EK, Yu J, Leung WK, Sung JJ, Chan FK. Fibulin 1 is downregulated through promoter hypermethylation in gastric cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 2083-2087
- 10 Vogiatzi P, Vindigni C, Roviello F, Renieri A, Giordano A. Deciphering the underlying genetic and epigenetic events leading to gastric carcinogenesis. *J Cell Physiol* 2007; 211: 287-295
- 11 Yu J, Tao Q, Cheung KF, Jin H, Poon FF, Wang X, Li H, Cheng YY, Röcken C, Ebert MP, Chan AT, Sung JJ. Epigenetic identification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 as a functional tumor suppressor and biomarker for hepatocellular carcinoma and other digestive tumors. *Hepatology* 2008; 48: 508-518
- 12 Tamura G. Promoter methylation status of tumor suppressor and tumor-related genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Histol Histopathol* 2004; 19: 221-228
- 13 Fan Y, Liu X, Zhang H, Dai J, Zhang X, Zhu M, Gao X, Wang Y. Variations in exon 7 of the MSH2 gene and susceptibility to gastrointestinal cancer in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 170: 121-128
- 14 Zhang Y, Liu X, Fan Y, Ding J, Xu A, Zhou X, Hu X, Zhu M, Zhang X, Li S, Wu J, Cao H, Li J, Wang Y. Germline mutations and polymorphic variants in

MMR, E-cadherin and MYH genes associated with familial gastric cancer in Jiangsu of China. *Int J Cancer* 2006; 119: 2592-2596

- 15 Escargueil AE, Soares DG, Salvador M, Larsen AK, Henriques JA. What histone code for DNA repair? *Mutat Res* 2008; 658: 259-270
- 16 Razin SV, Iarovai OV, Sjakste N, Sjakste T, Bagdoniene L, Rynditch AV, Eivazova ER, Lipinski M, Vassetzky YS. Chromatin domains and regulation of transcription. *J Mol Biol* 2007; 369: 597-607
- 17 Sasaki K, Yoshida M. [Histone modification enzymes]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2006; 51: 2069-2075
- 18 van Attikum H, Gasser SM. The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 757-765
- 19 Pallos J, Bodai L, Lukacsovich T, Purcell JM, Steffan JS, Thompson LM, Marsh JL. Inhibition of specific HDACs and sirtuins suppresses pathogenesis in a Drosophila model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3767-3775
- 20 Wegener D, Deubzer HE, Oehme I, Milde T, Hildmann C, Schwienhorst A, Witt O. HKI 46F08, a novel potent histone deacetylase inhibitor, exhibits antitumoral activity against embryonic childhood cancer cells. *Anticancer Drugs* 2008; 19: 849-857
- 21 Zhou Q, Shaw PG, Davidson NE. Inhibition of histone deacetylase suppresses EGF signaling pathways by destabilizing EGFR mRNA in ER-negative human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 117: 443-451
- 22 Glaros S, Cirrincione GM, Palanca A, Metzger D, Reisman D. Targeted knockout of BRG1 potentiates lung cancer development. *Cancer Res* 2008; 68: 3689-3696
- 23 Medina PP, Sanchez-Cespedes M. Involvement of the chromatin-remodeling factor BRG1/SMARCA4 in human cancer. *Epigenetics* 2008; 3: 64-68
- 24 Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* 1977; 40: 2256-2263
- 25 Thompson PM, Gotoh T, Kok M, White PS, Brodeur GM. CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene* 2003; 22: 1002-1011
- 26 Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB, Maris JM, White PS, Brodeur GM. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 940-949
- 27 Wong RR, Chan LK, Tsang TP, Lee CW, Cheung TH, Yim SF, Siu NS, Lee SN, Yu MY, Chim SS, Wong YF, Chung TK. CHD5 Downregulation Associated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2011; 72: 203-207
- 28 Cai C, Ashktorab H, Pang X, Zhao Y, Sha W, Liu Y, Gu X. MicroRNA-211 expression promotes colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo by targeting tumor suppressor CHD5. *PLoS One* 2012; 7: e29750
- 29 Wang J, Chen H, Fu S, Xu ZM, Sun KL, Fu WN. The involvement of CHD5 hypermethylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; 47: 601-608
- 30 唐莹莹, 田德安, 晏维, 夏丽敏, 张全乐, 王伟. 一种潜在的抑癌基因-CHD5参与肝癌的发生和发展. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 12: 994-996
- 31 陈香宇, 何巧玉. CHD5基因在食管癌中的表观遗传学改变. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 323-326

肝内胆管结石

金山, 王广义, 王英超, 孙晓东, 戴朝六, 赵阳, 程红岩, 王存川, 高明, 刘军, 孟凡迎, 贾淑芹, 福泉

编者按 肝内胆管结石是肝胆外科较为常见疾病, 其发生与环境因素、营养状态、胆道感染、胆汁淤积、病毒感染、寄生虫及胆管变异等因素有关。胆道造影、超声、CT及MRCP等影像学方法仍是有效的检查手段, 合理选择并联合应用能够提高检出率和诊断准确率。有效的治疗手段仍是外科手术, “去除病灶、取尽结石、矫正狭窄、通畅引流、防治复发”为核心原则, 及时有效的抗生素治疗也至关重要。由于肝内胆管结石病情复杂、病变部位广泛、手术并发症多、术后易复发、甚至癌变, 具体治疗方案的选择应根据结石数量及分布范围、肝管狭窄部位及程度、肝脏功能状态以及病人全身状况综合考虑, 制定针对具体病例的个体化手术方案为佳。此次焦点论坛, 我们特邀国内相关专家, 结合该领域进展作一述评。尽管仍有诸多需要解决的问题, 望本次论坛对肝胆外科医疗科研人员有一定的借鉴作用。

- 1 肝内胆管结石的病因及发病机制.....3324
- 2 肝内胆管结石的影像学表现.....3329
- 3 肝内胆管结石的手术治疗及术式评价..... 3332
- 4 肝内胆管结石合并胆管癌.....3336
- 5 肝内胆管结石术后复发的再处理.....3340
- 6 肝内胆管结石合并胆管狭窄的处理.....3344
- 7 肝内胆管结石合并胆道感染的细菌谱.....3349

肝内胆管结石的病因及发病机制

金山

■背景资料

肝内胆管结石是肝胆外科较为常见的疾病,病情复杂,病变部位广泛,手术并发症多,术后易复发,对肝脏及全身损害严重。肝内胆管结石的发生与环境因素、营养状态、胆道感染、胆汁淤积、病毒感染、寄生虫及胆管变异等因素有关,但详尽的发病机制仍不甚明了。

金山, 内蒙古医科大学附属医院普外科 内蒙古自治区呼和浩特市 010050

金山, 教授, 主任医师, 研究生导师, 主要从事肝胆外科基础及临床研究。

通讯作者: 金山, 教授, 主任医师, 010050, 内蒙古自治区呼和浩特市通道北街1号, 内蒙古医科大学附属医院普外科。

jinshangood@yahoo.com.cn

电话: 0471-6636914

收稿日期: 2012-07-27 修回日期: 2012-11-20

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-08

Etiology and pathogenesis of hepatolithiasis

Shan Jin

Shan Jin, Department of Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Shan Jin, Professor, Chief Physician, Department of Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, 1 Tongdao North Street, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China. jinshangood@yahoo.com.cn

Received: 2012-07-27 Revised: 2012-11-20

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-08

Abstract

Hepatolithiasis is a relatively common disease frequently encountered in department of hepatobiliary surgery. Intrahepatic stones are a major cause of mortality in patients with non-neoplastic diseases of the biliary tract. Environmental factors, nutritional status, bile duct inflammation, biliary stasis, virus infection, parasites, and anatomic variation of the bile duct are involved in the pathogenesis of hepatolithiasis. Surgery is the main treatment for hepatolithiasis but is associated with many serious postoperative complications and relapse. Thus, it is important to fully understand the etiology of hepatolithiasis to take effective measures to prevent the disease.

Key Words: Hepatolithiasis; Etiology; Pathogenesis

Jin S. Etiology and pathogenesis of hepatolithiasis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(34): 3324-3328

摘要

肝内胆管结石是肝胆外科较为常见疾病,是非

肿瘤性胆道疾病死亡的主要原因,其发生与环境因素、营养状态、胆道感染、胆汁淤积、病毒感染、寄生虫及胆管变异等因素有关。去除病灶、取尽结石、矫正狭窄、通畅引流、防止复发是该病的核心治疗原则。但肝内胆管结石病情复杂,病变部位广泛,手术并发症多,术后易复发,对肝脏及全身损害严重。因此,充分了解肝内胆管结石发病原因,采取有效措施降低该病的发生比治疗更为重要。

关键词: 肝内胆管结石; 病因; 发病机制

金山. 肝内胆管结石的病因及发病机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3324-3328

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3324.asp>

0 引言

肝内胆管结石(intrahepatic stones hepatolithiasis)是肝胆外科较为常见的疾病,是非肿瘤性胆道疾病死亡的主要原因。1906年Vachell等^[1]首次正确描述,该病多见于东南亚地区,包括中国、日本、韩国和马来西亚等国家,其中某些国家发病率高达20%-30%^[2],在我国沿海地区、西南、香港及台湾等地区发病率也较高,达到16.1%^[3,4]。在西方国家及印度发病率较低,平均发病率只有0.6%-1.3%^[5,6]。肝内胆管结石的发生与环境因素、营养状态、胆道感染、胆汁淤积、寄生虫及胆管变异等因素有关^[7],主要以胆色素结石为主,左侧肝内胆管发生率明显多于右侧。主要病理改变有结石、胆道狭窄、胆管扩张、胆道感染、慢性肉芽肿性胆管炎、肝实质纤维化、萎缩及癌变等^[8]。去除病灶、取尽结石、矫正狭窄、通畅引流、防止复发是该病的核心治疗原则。但肝内胆管结石病情复杂,病变部位广泛,手术并发症多,术后易复发,对肝脏及全身损害严重。因此,充分了解肝内胆管结石发病原因,采取有效措施降低该病的发生比治疗更为重要。本文主要对肝内胆管结石的病因及发病机制作一综述。

1 环境因素

东方的饮食结构主要是高碳水化合物、低脂

■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

肪、低蛋白饮食,这可能是肝内胆管结石的发病原因。饱和脂肪可使胆囊收缩、Oddi括约肌松弛,因此低饱和脂肪饮食会使胆汁淤滞,导致肝内胆管结石的发生。低蛋白饮食可使糖二酸-1,4-内酯(β -葡萄糖醛酸抑制剂)水平下降,导致胆红素钙结石的形成。随着经济发展,饮食结构逐渐改变为高蛋白、高脂肪饮食,使得东亚地区肝内胆管结石发病率逐年下降。韩国Kim等^[9]的研究指出,目前40%-50%的肝内胆管结石是混合成分,有一些更是单纯胆固醇结石,支持了肝内胆管结石病因的饮食假说。另一项病例对照研究观察了2年间本院就诊的55名肝内胆管结石患者与同期就诊非胆石症患者110名进行比较,发现生活环境中饮用水性质(自来水和江河水)($OR = 5.05, P = 0.0002$)、马桶冲洗方式(自动冲洗和手洗)($OR = 2.77, P = 0.039$)、职业(农渔业和其他)($OR = 4.79, P < 0.0001$)与肝内胆管结石的发生有关^[10]。Glenn等^[11]进行了一项流行病学调查后报告,在移民美国的中国及日本人的后裔胆道疾病的发病率与美国本土居民发病率相似,提示肝内胆管结石的发生与环境有关。

2 营养状态

肝内胆管结石男女均可受累,30-40岁多发,社会低阶层多发,农村多于城市。Suzuki等^[12]从流行病学和病因学角度分析后认为,肝内胆管结石的病因可能与蛋白质缺乏所致的营养不良有关。低社会阶层人群营养不良使免疫力下降,更容易被细菌感染。在肝内胆管结石患者中经常出现细菌感染,分离出的细菌主要是革兰阴性菌,包括大肠埃希菌、克雷伯杆菌、假单胞菌,其次是革兰阳性肠球菌。大约30%分离出细菌的病例合并厌氧菌感染。八坂贵宏等^[10]研究发现从幼儿到成人人体质弱(营养状态差)($OR = 8.35-13.5, P < 0.05$)、肝功能受损($OR = 2.5, P = 0.04$)、黄疸($OR = 16.9, P < 0.0001$)与肝内胆管结石的发生有关。

3 细菌感染和胆汁淤积

胆道感染和胆汁淤积是胆色素结石形成的主要原因。正常胆汁中的胆红素大部分为葡萄糖醛酸胆红素(结合性胆红素),当细菌感染时产生 β -葡萄糖醛酸酶和磷脂酶A1, β -葡萄糖醛酸酶使结合性胆红素水解为非结合性胆红素,他与 Ga^{2+} 结合成胆红素钙沉淀。而磷脂酶A1使磷脂水解,释放出游离脂肪酸,并与 Ga^{2+} 结合生成钙棕榈酸钙和硬脂酸钙。另外,胆道感染时胆道黏膜分

泌大量糖蛋白,作为基质把上述各种沉淀物凝聚在一起形成结石。差不多所有的肝内胆管结石患者的胆汁培养均可检出细菌。分析我院近5年123例肝内胆管结石患者胆汁标本进行培养,细菌阳性率为69.1%(85/123),共获得149株病原菌。其中排在前5位的细菌分别是大肠埃希菌(32.2%)、肠球菌(20.8%)、克雷伯菌(11.4%)、假单胞菌(7.4%)、肠杆菌(6.0%)。胆汁淤积是肝内胆管结石形成的必要条件,引起胆汁淤积的原因有胆道狭窄、胆道畸形、梗阻远端胆管内压力升高、胆管扩张、细菌感染等。伴有较重炎症及胆道感染的胆汁淤积推测是由炎症细胞因子、活性氧介导的,但肝内的相关机制尚不明确。当给动物注射内毒素,像谷胱甘肽那样的非胆汁酸依赖性胆汁的分泌就会减少。细菌感染时,内毒素诱导的胆汁量减少主要是通过肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)介导,在炎症因子的作用下位于毛细胆管膜的多药耐药蛋白2(multidrug resistance associated protein 2, MRP2)的减少来完成的。这种MRP2的减少是因为毛细胆管膜上的MRP2分子向肝细胞的细胞质内移动造成的。在结合性胆红素的分泌中,MRP2起到了非常重要的作用,他与胆汁从肝窦向肝细胞内的转运及向毛细胆管的分泌有关^[13]。

除了上述细菌之外,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)可能与肝内胆管结石发生有关。Kuroki等^[14]应用组织化学及PCR的方法检测了肝内胆管结石中*H. pylori*的存在,认为*H. pylori*能够促进胆管上皮的增殖,并且对肝内胆管结石向胆管癌的发展过程起了重要作用。包文中等^[15]采用PCR方法检测胆汁及肝内胆管黏膜组织中的*H. pylori*-DNA,采用Western blot方法对胆汁中的*H. pylori*感染相关蛋白进行检测后认为,原发性肝内胆管结石患者胆汁中存在多种*H. pylori*感染相关蛋白,可能参与了肝内胆管结石的形成。

4 病毒感染

八坂贵宏等^[10]的病例对照研究发现人类T淋巴细胞白血病病毒I型(human T-lymphotropic type I, HTLV-1)抗体阳性($OR = 2.85, P = 0.0042$)与肝内胆管结石发生有关。HTLV-1属于逆转录RNA病毒科肿瘤病毒亚科哺乳类C型病毒,是第1个被发现与人类疾病相关的逆转录病毒。HTLV-1引起肝内胆管结石的发生机制目前尚不明确,认为HTLV-1的感染可能引起全身性炎症反应、毛细

■创新盘点

本文总结了国内外肝内胆管结石病的相关文章,对该病发病原因及相关机制进行了综述。

■应用要点

本文详细阐述肝内胆管结石病的发病原因及相关机制,对肝内胆管结石的预防及治疗具有指导意义。

胆管炎及硬化性胆管炎,最终导致肝内胆管的炎性改变,导致肝内胆管结石的发生^[10]。

5 寄生虫感染

肝内胆管结石发生的还可能与蛔虫、血吸虫及华支睾吸虫感染有关^[16]。他们不仅可以破坏胆囊上皮出现炎症,还可以在该处产卵、寄生,形成结石。肠道细菌可以通过门脉系统定植于肝脏,另外肠道黏膜的受损,均可导致寄生虫重复感染。古川正人等^[17]对45名肝内胆管结石患者和104名对照组进行了蛔虫特异性免疫球蛋白E(immunoglobulin E, IgE)抗体测定,发现肝内胆管结石患者阳性率为53.3%,对照组阳性率为14.4%,差异有显著性,提示肝内胆管结石的发生与蛔虫感染有关。文献报道蛔虫残片或虫卵为结石核心者占胆结石的36.5%-65.5%,可见胆道蛔虫是肝内胆管结石的重要原因之一^[18]。胆道蛔虫感染引起肝内胆管结石的可能机制有:(1)蛔虫尸体以及虫卵形成结石核心;(2)引起胆管壁的炎症反应,胆道黏膜变粗糙,易形成结石;(3)蛔虫体引起胆管阻塞、胆汁淤积以及虫体对胆管的损伤导致细菌感染,胆汁成分发生改变促进结石形成^[18]。

华支睾吸虫又名肝吸虫,人类进食含有囊蚴的生鱼而感染,囊膜被胃十二指肠消化而逸出幼虫,后经十二指肠壶腹部进入胆总管,吸附于肝内胆管,1 mo后发育为成虫,整个生活史约3 mo。华支睾吸虫从胆管上皮吸取其分泌的蛋白质和葡萄糖作为营养,而虫体被胆管上皮所分泌的稠厚黏液包绕。大量虫体、虫卵,加上胆管上皮脱落、增生和分泌大量黏液可以堵塞胆管,引起胆汁引流不畅,容易合并感染。另外代谢产物刺激胆管,使呈腺瘤或息肉样增生,胆管壁纤维增厚胆管狭窄,狭窄上方胆管可有囊性不规则扩张。门静脉周围纤维组织增生,淋巴细胞及嗜酸性细胞浸润,增加胆管梗阻,胆汁淤积。虫体和虫卵成为结石的核心,甚至引起胆管上皮癌或原发性肝癌^[19]。

血吸虫寄生于人和哺乳动物的肠系膜静脉血管中,虫卵随血流进入肝脏,或随粪便排出。血吸虫感染后虫卵在胆管壁沉积、钙化而形成局部纤维瘢痕性狭窄或血吸虫肉芽肿压迫胆管引起胆道梗阻,成虫或虫卵也可成为结石的核心^[20]。

6 胆道解剖学异常

肝脏胆道系统的先天性异常、获得性胆管狭窄

及扩张都可以促进肝内胆管胆色素结石的发生。Kayhan与Ono等^[21,22]认为术后狭窄、硬化性胆管炎、Caroli's病、先天性胆总管囊肿以及肿瘤引起的胆汁淤积与肝内胆管结石的发生密切相关。先天性胆总管囊肿患者术前肝内胆管结石的发生率较低,但切除扩张胆管、重建胆道后发生率明显升高,达到1.5%-10.7%,并且术后肝内胆管结石发生平均时间为8.4年^[23]。这可能与胆道重建后吻合口的狭窄及肝内胆管扩张有关,当胆道扩张或狭窄时,胆汁淤积,通过吻合口细菌逆行感染,对肝内胆管结石的形成起到协同作用^[23]。另外,胆道缺血、胆管内血管曲张、门静脉海绵样病变引起的胆管狭窄,胆道梗阻,均与肝内胆管结石的形成有关^[24]。

7 肝内胆管胆固醇结石形成机制

肝内胆管胆固醇结石的胆汁成分测定发现,与胆囊胆固醇结石相比较,肝内胆管胆固醇结石胆汁中胆固醇过饱和。胆汁中,胆固醇/磷脂比肝内胆管胆固醇结石中显著增高,导致胆汁中胆固醇分子的不稳定,容易析出胆固醇结晶。另外磷脂和胆固醇将表面活性强的胆汁酸通过形成微胶粒降低其功能,防止胆汁酸引起的胆管上皮的溶解。胆汁中磷脂/胆汁酸比低下引起微胶粒形成减少,胆汁酸疏水端对胆管上皮的损伤增加。重要的是,异常胆汁的生成不仅在含有结石的胆管内,没有结石的胆管中也生成。因此,不仅是存在结石部位的肝组织功能障碍,而是全肝功能出现了障碍^[25]。另外,研究发现合成胆固醇关键酶HMG-辅酶A还原酶在含有结石的胆管与没有结石的胆管内的活性比对照组、胆囊胆固醇结石明显升高,转录水平也显著增加。并且胆汁酸合成中,胆固醇7 α -羟化酶在含有结石胆管内与没有结石胆管内活性均比对照组(胆囊胆固醇结石)明显降低,转录水平也显著下降^[26]。

肝细胞膜(胆管侧)通透功能的研究中,发现肝细胞毛细胆管膜上的转运载体多耐药蛋白3(multidrug resistance protein3, MRP3)对磷脂的分泌过程中起重要作用。另外,磷脂分泌减少的进行性家族性肝内胆管淤积症3型和多耐药型蛋白2敲除的大鼠中出现了进行性非化脓性胆管炎,并且胆囊和胆管内胆固醇结石自然发生^[27]。低磷脂分泌相关胆石症中,胆固醇结石患者内高频率MRP3遗传基因变异,引起MRP3功能低下,导致磷脂分泌异常^[28]。这些提示,磷脂分泌障碍与胆管胆固醇结石的形成有关。

胆固醇合成亢进和胆汁酸生成低下,同时肝内转运和胆汁分泌功能异常以及胆管胆汁内胆固醇饱和度的上升,是肝内胆管结石形成的重要病理生理基础.这种胆汁、脂质成分的改变,胆管上皮的受损,花生四烯酸活化引起的黏蛋白分泌过剩,引起胆汁淤积,促进胆固醇结晶的析出,成为胆管内胆固醇结石或富含胆固醇结石形成的重要原因^[29,30].另外,溶解、转运脂质的血清载脂蛋白对胆固醇结晶的析出有抑制作用.肝内胆管胆固醇结石患者结石所在部位的肝组织内载脂蛋白A-I的表达减少,结果胆固醇结晶的析出亢进^[31].不论在胆管内还是胆囊内,胆固醇结晶析出的促进因子和抑制因子不平衡引起胆固醇结石的形成.综上所述,肝内胆管胆固醇结石的形成可能与全肝功能障碍有关.

8 其他

Tazuma^[32]报告溶血性疾病可以使胆红素生成增多,促进胆色素结石的形成.长期进行善得定治疗的患者出现了肝内胆管结石,提示结石形成是善得定治疗的不良反应^[33].另外,肝细胞癌接受无水乙醇注射的患者也出现了肝内胆管结石,无水乙醇注射导致胆道损伤可能是结石形成的原因^[34].另外,遗传学、免疫学、病毒性肝炎等均与肝内胆管结石的发生有关.

9 结论

肝内胆管结石的发生与诸多因素有关.环境、卫生、营养状态、细菌感染、胆汁淤积、病毒感染、寄生虫、胆管解剖学异常等均可能引起肝内胆管结石的发生.对肝内胆管结石病因学研究的深入,不断揭示新的发病机理,能够为肝内胆管结石的预防及制定恰当的个体化治疗方案提供坚实的理论基础.

10 参考文献

- Vachell HR, Stevens WM. Case of intrahepatic calculi. *Br Med J* 1906; 1: 434-436
- Lim JH. Oriental cholangiohepatitis: pathologic, clinical, and radiologic features. *AJR Am J Roentgenol* 1991; 157: 1-8
- Kusano T, Isa T, Ohtsubo M, Yasaka T, Furukawa M. Natural progression of untreated hepatolithiasis that shows no clinical signs at its initial presentation. *J Clin Gastroenterol* 2001; 33: 114-117
- Tsui WM, Chan YK, Wong CT, Lo YF, Yeung YW, Lee YW. Hepatolithiasis and the syndrome of recurrent pyogenic cholangitis: clinical, radiologic, and pathologic features. *Semin Liver Dis* 2011; 31: 33-48
- Mori T, Sugiyama M, Atomi Y. Gallstone disease: Management of intrahepatic stones. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 1117-1137
- Al-Sukhni W, Gallinger S, Pratzner A, Wei A, Ho CS, Kortan P, Taylor BR, Grant DR, McGilvray I, Cattral MS, Langer B, Greig PD. Recurrent pyogenic cholangitis with hepatolithiasis--the role of surgical therapy in North America. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 496-503
- Li F, Zhou Y, Cheng N, Mao H, Jiang L, Li N, Li Q, de Jong MC, Pawlik TM. Epidermal growth factor receptor as a target for anti-proliferative treatment of proliferative cholangitis in hepatolithiasis. *J Surg Res* 2011; 166: 87-94
- Deniz K, Torun E, Celikbilek M, Sözüer E. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma associated with hepatolithiasis: report of a case. *Surg Today* 2011; 41: 591-595
- Kim MH, Lee SS. [Current status of intrahepatic stones in Korea]. *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 89-95
- 八坂貴宏, 佐野信也. Case-Control Studyからみた肝内結石症の成因. *胆と膵* 2007; 28: 483-489
- Glenn F, MOODY FG. Intrahepatic calculi. *Ann Surg* 1961; 153: 711-724
- Suzuki Y, Mori T, Abe N, Sugiyama M, Atomi Y. Predictive factors for cholangiocarcinoma associated with hepatolithiasis determined on the basis of Japanese Multicenter study. *Hepatol Res* 2012; 42: 166-170
- 董家鸿. 胆道外科要点与盲点. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 228-229
- Kuroki T, Fukuda K, Yamanouchi K, Kitajima T, Matsuzaki S, Tajima Y, Furui J, Kanematsu T. Helicobacter pylori accelerates the biliary epithelial cell proliferation activity in hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 648-651
- 包文中, 孟翔凌. 幽门螺杆菌与原发肝内胆管结石形成的关系. *安徽医科大学学报* 2006; 41: 199-201
- Leung JW, Yu AS. Hepatolithiasis and biliary parasites. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1997; 11: 681-706
- 古川正人, 八坂貴宏, 白浜敏. 回虫感染と肝内結石. *胆と膵* 2003; 24: 753-757
- Alam S, Mustafa G, Rahman S, Kabir SA, Rashid HO, Khan M. Comparative study on presentation of biliary ascariasis with dead and living worms. *Saudi J Gastroenterol* 2010; 16: 203-206
- Jang KT, Hong SM, Lee KT, Lee JG, Choi SH, Heo JS, Choi DW, Choi D, Lim JH. Intraductal papillary neoplasm of the bile duct associated with Clonorchis sinensis infection. *Virchows Arch* 2008; 453: 589-598
- Zhou YM, Yin ZF, Yang JM, Li B, Shao WY, Xu F, Wang YL, Li DQ. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma: a case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 632-635
- Kayhan B, Akdoğan M, Parlak E, Ozarslan E, Sahin B. Hepatolithiasis: a Turkey experience. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 28-32
- Ono Y, Kaneko K, Ogura Y, Sumida W, Tainaka T, Seo T, Ando H. Endoscopic resection of intrahepatic septal stenosis: minimally invasive approach to manage hepatolithiasis after choledochal cyst excision. *Pediatr Surg Int* 2006; 22: 939-941
- 金子健一朗, 安藤久実. 先天性胆道拡張症と肝内結石. *胆と膵* 2003; 24: 769-774
- Okudaira K, Kawaguchi A, Inoue T, Hashiguchi K, Tsuzuki Y, Nagao S, Itoh K, Miura S. Endoscopically removed hepatolithiasis associated with cavernous transformation of the portal vein and antiphospholipid antibody syndrome. *Dig Dis Sci*

■名词解释

多药耐药蛋白(MRP): 是位于多种极性细胞膜表面, 依赖ATP介导其底物自细胞内转运至细胞外的一类膜糖蛋白. 人类多药耐药蛋白家族包括: MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及MRP6.

■同行评议

本文回顾大量文献,分析了肝内胆管结石发生的诸多因素及其发生机制,对于肝内胆管结石的基础与临床研究具有一定的指导意义。

- 2006; 51: 1952-1955
- 25 Shoda J, Oda K, Suzuki H, Sugiyama Y, Ito K, Cohen DE, Feng L, Kamiya J, Nimura Y, Miyazaki H, Kano M, Matsuzaki Y, Tanaka N. Etiologic significance of defects in cholesterol, phospholipid, and bile acid metabolism in the liver of patients with intrahepatic calculi. *Hepatology* 2001; 33: 1194-1205
- 26 Shoda J, He BF, Tanaka N, Matsuzaki Y, Yamamori S, Osuga T. Primary dual defect of cholesterol and bile acid metabolism in liver of patients with intrahepatic calculi. *Gastroenterology* 1995; 108: 1534-1546
- 27 Lammert F, Wang DQ, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, Matern S, Paigen B, Carey MC. Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2^{-/-} mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology* 2004; 39: 117-128
- 28 Rosmorduc O, Hermelin B, Boelle PY, Parc R, Taboury J, Poupon R. ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology* 2003; 125: 452-459
- 29 Shoda J, Ueda T, Kawamoto T, Todoroki T, Asano T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Maruyama T, Nimura Y, Tanaka N. Prostaglandin E receptors in bile ducts of hepatolithiasis patients and the pathobiological significance for cholangitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 285-296
- 30 Shoda J, Kano M, Asano T, Irimura T, Ueda T, Iwasaki R, Furukawa M, Kamiya J, Nimura Y, Todoroki T, Matsuzaki Y, Tanaka N. Secretory low-molecular-weight phospholipases A2 and their specific receptor in bile ducts of patients with intrahepatic calculi: factors of chronic proliferative cholangitis. *Hepatology* 1999; 29: 1026-1036
- 31 Ohta T, Nagakawa T, Takeda T, Fonseca L, Kanno M, Mori K, Kayahara M, Ueno K, Miyazaki I, Terada T. Histological evaluation of the intrahepatic biliary tree in intrahepatic cholesterol stones, including immunohistochemical staining against apolipoprotein A-1. *Hepatology* 1993; 17: 531-537
- 32 Tazuma S. Gallstone disease: Epidemiology, pathogenesis, and classification of biliary stones (common bile duct and intrahepatic). *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 1075-1083
- 33 Sheehan MT, Nippoldt TB. Hepatolithiasis (intrahepatic stone) during octreotide therapy for acromegaly: a case report. *Pituitary* 2000; 3: 227-230
- 34 Kwok PC. Intrahepatic ductal stone formation after percutaneous ethanol injection for residual hepatocellular carcinoma in the portal vein. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2004; 27: 299-300

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.694

本刊讯 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。(编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

肝内胆管结石的影像学表现

程红岩

程红岩, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院放射科 上海市 200438

程红岩, 教授, 主任医师, 主要从事肝胆疾病的影像诊断及肝癌的介入治疗。

通讯作者: 程红岩, 教授, 主任医师, 200438, 上海市杨浦区长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院放射科, chengys9304@yahoo.com.cn

电话: 021-81875211

收稿日期: 2012-07-27 修回日期: 2012-11-22

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-08

Imaging features of intrahepatic stones

Hong-Yan Cheng

Hong-Yan Cheng, Department of Radiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China
Correspondence to: Hong-Yan Cheng, Professor, Chief Physician, Department of Radiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Changhai Road, Yangpu District, Shanghai 200438, China. chengys9304@yahoo.com.cn
Received: 2012-07-27 Revised: 2012-11-22
Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-08

Abstract

Intrahepatic stones is a complicated disease with a high recurrence rate and often leads to serious complications or even cancer. Surgery-based comprehensive treatment is always adopted, but inaccurate diagnosis and location in preoperative imaging are partly responsible for the high rate of residual stones and numerous complications postoperatively. There are several imaging modalities available for the diagnosis of intrahepatic stones, including PTC, ERCP, B-mode ultrasound, CT, and MRCP. Therefore, a better understanding of the imaging features of intrahepatic stones and selection of a reasonable combination of effective imaging methods can help improve outcome.

Key Words: Stones; Bile ducts; Diagnostic; X-ray computed tomography; Magnetic resonance imaging

Cheng HY. Imaging features of intrahepatic stones. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3329-3331

摘要

肝内胆管结石病变复杂、复发率高,常引起严重的并发症甚至癌变,多采用以手术为主的综合治疗。但术后残石率高,并发症多,术前影像学诊断不清和定位不准是原因之一。目前有多种常用影像检查可用以诊断肝内胆管结石,如直接胆道造影、B超、CT、MRCP等。因此,需掌握肝内胆管结石的影像学特征,合理选择并联合应用最有效的检查方法,方可为临床治疗提供重要的指导作用。

关键词: 结石; 胆管; 诊断; 体层摄影术; 磁共振成像

程红岩. 肝内胆管结石的影像学表现. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3329-3331
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3329.asp>

0 引言

肝内胆管结石是指发生于左右肝管汇合部以上的肝内胆管的结石,以东方国家多见,可以单独存在,也可以与肝外胆管结石并存。病因尚不明确,但与肝内感染、胆汁淤滞、胆道蛔虫等因素相关。肝内胆管结石多为含大量胆红素钙的色素性混合结石,常多发,形状不规则,可呈泥沙样,棕黑色,质软易碎^[1]。由于其病变复杂、复发率高且常引起严重的并发症,而且结石长期刺激胆管上皮可致不典型增生甚至癌变,故宜采用以手术为主的综合治疗。但临床上,肝内胆管结石术后残石率高,并发症多,手术前诊断不清和定位不精确是很重要的原因。因此,需掌握肝内胆管结石的影像学特征,做到诊断明确、定位精确,并评估肝纤维化、萎缩程度和排除合并肝内胆管细胞癌,方可为临床治疗提供重要的指导作用。

1 病理学与解剖学基础

肝内胆管结石多继发于胆汁淤积或感染,两者常并存且互为因果,形成恶性循环,如大肠杆菌所产生的 β -葡萄糖醛酸酶可将结合性胆红素水解成非结合性胆红素,后者易聚析出与钙结

■背景资料

肝内胆管结石是一种常见病多发病,合理选择检查方法,精确全面了解结石的数量和分布,对治疗方法的选择具有重要的意义。最新的能谱CT可鉴别肾结石的性质(尿酸结石、钙化结石和胱氨酸结石),有望鉴别肝内胆管结石和胆囊结石的性质。总之,合理选择并联合应用不同的检查方法是提高检出率和诊断正确率的保证。

■同行评议者

李健丁, 教授, 山西医科大学第一医院放射科CT室

■相关报道

B型超声操作简便、无创伤,据报道对肝内胆管结石的敏感度为20%-80%,特异性为95%,多年来已经成为肝内胆管结石病首选的检查手段。

合形成胆红素钙,促发胆色素结石形成。

结石一般多发,形状不规则,质软易碎,大小数目不定,其分布往往与解剖有密切关系。肝内胆管起自毛细胆管,继而汇集成小叶间胆管,肝段、叶间胆管及肝内部分的左右肝管。他与肝内肝动脉、门静脉及其各级分支和走行大体一致,3者共同为Glisson鞘所包裹。由于左肝管细长且与肝总管呈锐角汇合,右前叶胆管与右后叶胆管汇合成右肝管时常有一转角,易引流不畅,故最常见的是左肝管与右前叶胆管结石共存或还伴有其他部位结石。此外,肝内胆管的变异,如汇合角度异常、汇合的2支胆管切面积相差过大、血管压迫等^[2],也容易增加肝内胆管结石的发生率。

肝内胆管结石基本病理改变为肝内胆管扩张和狭窄,通常多年无症状或仅有肝区和腰背部不适,易反复发作表现为慢性增生性胆管炎、肝实质萎缩、胆汁性肝硬化。如发生梗阻和合并感染则出现寒战高热,甚至急性梗阻性化脓性胆管炎、肝脓肿或胆管支气管瘘。对于病史较长,近期反复发作并伴消瘦的年老患者,需警惕合并肝内胆管细胞癌的可能。

2 直接胆道系统造影

经皮肝穿刺胆管造影(percutaneous transhepatic cholangiography, PTC)和内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)为诊断肝内胆管结石的传统方法,可直接显示病变部位的胆管。肝内胆管结石表现为数量和大小不等、形态不规则的充盈缺损,此种表现需要和气泡、血凝块和浓稠胆汁等形似结石的充盈缺损相鉴别。这2种方法同时还具治疗作用,如放置引流管引流胆汁,但他们具有一定的创伤性,且不易完整显示胆管系统,不能显示胆管壁和肝实质的病变,注射造影剂后也易引起胆管的感染,现在已经不作为肝内胆管结石的常规诊断方法。

3 B超

B型超声操作简便、无创伤,据报道^[3]对肝内胆管结石的敏感度为20%-80%,特异性为95%,多年来已经成为肝内胆管结石病首选的检查手段。此外,多普勒彩色超声检查还可检测肝脏内血流量异常及肝脏组织有无萎缩,这对外科治疗肝内胆管结石时是否切除部分肝脏组织具有参考价值。

肝内胆管结石的典型声像图表现为沿肝内胆管走形的形态不一、伴有声影的强回声,结石阻塞部位及以上的小胆管扩张并与伴行的门静脉分支形成“平行管征”。坚硬、较大的结石声影明显,对于疏松或泥沙样结石则需反复探查,尽可能使超声束垂直于结石的表面,必要时降低仪器灵敏度或使用高频率的合适深度聚焦的探头,以增加结石和声影的显示能力。但也需要同肝内其他高回声结构或病变相鉴别,如肝内小钙化灶、肝圆韧带的横断面、肝内胆管积气、慢性胆管炎、转移性肝癌、血管瘤等。如果较大结石引起长期胆汁淤滞或合并感染,则受累肝叶、段的肝组织回声粗糙,也可能肿大或硬化萎缩,使肝脏变形,严重者可感染呈现多发肝脓肿的声像图。

但是,B超对肝内胆管结石的大小、数量等判断不准确,只能提供胆管断面影像而不能直接显示胆管树全貌及狭窄病变程度,而且结石的强回声影像往往会掩盖了可能存在的肿瘤和扩张的远端肝内胆管,故可用于肝内胆管结石的初筛检查,不能只依靠B超来决定是否手术。

此外,由于肝内胆管结石的手术取石难度大,术后残石率和再次手术率较高,应注意术中超声和术中胆道造影的应用,可大大提高结石的检出率和取石的准确性,避免胆道损伤过大和降低残石率。

4 CT

CT可较全面显示肝内胆管结石的分布、胆管系统扩张和肝实质的病变,具有重要的诊断价值。结石可表现为高密度、软组织密度、低密度和混杂密度,以高密度为常见,混杂密度次之。对钙质的探测敏感性决定了CT易于显示高密度和混杂密度结石,单发或多发,大小不等,形态各异,以不规则小树枝状或星芒状多见。CT值可预测结石的性质,即以胆固醇为主还是以胆红素为主,对溶石剂的选择有指导价值。由于扫描断面的关系,左肝内胆管结石通常表现为肝内胆管柱状扩张呈“竹节样征”,右肝内胆管结石则表现为类似胆总管结石的“靶征”或“新月征”。CT对阴性结石检出率较低,软组织密度结石需要与肝内胆管细胞癌鉴别,因其增强扫描时不被强化而明确诊断;低密度结石和泥沙样结石易被漏诊或误诊,需结合B超、MRCP等其他检查。

肝内胆管结石通常长期存在,反复炎性发作

■应用要点

CT可较全面显示肝内胆管结石的分布、胆管系统扩张和肝实质的病变,具有重要的诊断价值。

可导致结石所在的肝段或肝叶的纤维化或萎缩,合并淤胆性肝硬化时可有局限性肝左叶、尾状叶增大以及门脉高压的出现。此外,还可合并有肝外胆管结石、胆囊结石、肝内胆管感染、胆源性肝脓肿及肝内胆管细胞癌等。增强CT常用以除外其他病变。扩张的肝内胆管壁增厚或环形强化及肝内胆管积气见于肝内胆管感染所致的胆管壁炎性肥厚。合并胆源性肝脓肿时,CT表现为单房状或多房状环形强化影。需特别注意排除是否合并肝内胆管细胞癌,其特征性表现为肝内胆管的扩张与结石的大小、分布不成比例,近端肝组织内见不规则软组织影,增强扫描呈轻度不均匀“花瓣”样强化及延迟强化,且沿肝内胆管蔓延。

5 MRI

因肝内胆管结石的成分不同,在T1WI/T2WI可表现为无信号、低信号、混杂信号及高信号影,以T1WI上高信号、T2WI上低信号的结石多见,在T2WI上高信号的胆汁中呈形态不一的充盈缺损,常伴发有胆管扩张。目前以磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)应用最为广泛,他利用重T2W效果,使静止或缓慢流动的液体显示高信号,而周围的实质器官显示低信号,两者形成鲜明对比,从而达到“造影”的效果。MRCP是一种无创性的技术,无需使用对比剂,可从多方位清晰显示胆管树全貌以及结石的大小、形态、数目、梗阻部位和胆管扩张的程度。据报道^[4]MRCP对胆道结石的敏感度达92%,特异性达98%。

目前较高分辨率的MRCP可发现直径2-3 mm的结石,而更小的结石或肝脏边缘部的小胆管则容易因部分容积效应难以显示,MRCP对结石图像的显示不如CT和B超清晰,对狭窄细胆管的显示不如胆管直接造影清晰、准确^[5]。当患者有大量腹水、胆肠吻合术后、重度肝硬化导致肝脏变形或缩小等,均可造成胆道系统显示不清或不完整;胆管内的气泡、血块、胆管局限性

扭曲、胆囊窝的手术银夹等均可造成类似于胆管结石的伪影,需采取结合3D原始图像和T1WI图像的方法以最大程度排除假阳性病例。“肝胆管结石病诊断治疗指南(2007)”认为,MRI结合MRCP对肝内胆管结石的诊断价值优于CT和胆道直接造影等方法。

6 结论

随着医学影像成像技术和成像设备的不断进步,我们拥有越来越多的检查方法,对于肝内胆管结石,不同的检查方法各有所长、各有不足,但他们共同的影像学特征在于:数目不一、形态不一的胆管腔内占位或充盈缺损,多伴有胆管扩张,好发于肝左叶和右前叶,也可多个部位共存。一般以B超行初步筛查和定期随访,可观察到结石及其引起的肝内胆管扩张、增厚或钙化,肝实质萎缩,胆汁性肝硬化等,如当结石致肝内胆管梗阻或合并急性炎症、胆管外软组织占位怀疑胆管癌时,增强CT或MR在诊断与鉴别诊断中起到重要作用。总之,要结合各自条件,既满足诊断明确,又要经济实用,真正遵循“以患者为中心”的原则,合理选择并联合应用不同的检查方法是提高检出率和诊断正确率的保证。

7 参考文献

- 1 程红岩. 肝胆良性疾病影像图谱. 第1版. 第二军医大学出版社, 2011: 312
- 2 陈晓理, 胥楠, 芦灵军, 冉瑞图. 变异右肝管横跨与左肝管汇合的解剖学特点和临床意义. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 431-433, 436
- 3 Kim MJ, Mitchell DG, Ito K, Outwater EK. Biliary dilatation: differentiation of benign from malignant causes-value of adding conventional MR imaging to MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2000; 214: 173-181
- 4 Romagnuolo J, Bardou M, Rahme E, Joseph L, Reinhold C, Barkun AN. Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Ann Intern Med* 2003; 139: 547-557
- 5 中华医学会外科学分会胆道外科学组. 肝胆管结石病诊断治疗指南. 中华消化外科杂志 2007; 6: 156-160, F0003

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

■同行评价
本文选题实用, 综述合理, 具有一定的可读性。

肝内胆管结石的手术治疗及术式评价

戴朝六, 赵阳

■背景资料

用于治疗肝内胆管结石的手术方式是多样的, 本文阐述肝内胆管结石治疗过程中, 手术治疗方案的选择, 并针对相应术式进行评价。

戴朝六, 赵阳, 中国医科大学附属盛京医院肝胆脾外科 辽宁省沈阳市 110004

戴朝六, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肝胆外科基础及临床研究。

作者贡献分布: 本文综述由戴朝六与赵阳共同完成。

通讯作者: 戴朝六, 教授, 主任医师, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院肝胆脾外科。

daicl@sj-hospital.org

电话: 024-96615-31511

收稿日期: 2012-07-27 修回日期: 2012-11-20

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-08

Evaluation of surgical treatments for hepatolithiasis

Chao-Liu Dai, Yang Zhao

Chao-Liu Dai, Yang Zhao, Department of Hepatobiliary and Splenic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Chao-Liu Dai, Professor, Chief Physician, Department of Hepatobiliary and Splenic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. daicl@sj-hospital.org

Received: 2012-07-27 Revised: 2012-11-20

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-08

Abstract

Hepatolithiasis is a common and refractory disease, for which the effective treatment method is surgery for removing the lesion, depleting stones, correcting stenosis, unobstructive drainage, and preventing recurrence. There are many surgical treatments available for hepatolithiasis, including bile duct exploration, bile duct drainage, bile duct reconstruction, hepatectomy, and liver transplantation. In clinical practice, combination therapies are often performed in a large number of patients. Here we discuss the choice of surgical treatments for hepatolithiasis and evaluate their respective therapeutic effects.

Key Words: Hepatolithiasis; Surgical treatment

Dai CL, Zhao Y. Evaluation of surgical treatments for hepatolithiasis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3332-3335

摘要

肝内胆管结石是胆道外科中难治的常见病之一。

而肝胆管结石的治疗主要靠外科手术, 原则是“去除病灶, 取尽结石, 矫正狭窄, 通畅引流, 防止复发”。目前用于治疗肝内胆管结石的手术方式是多样的, 归结为胆管探查取石引流、肝切除、胆管狭窄修复重建、肝移植4种主要类型, 在实际应用中, 此类手术方法常常是联合应用。本文阐述肝内胆管结石治疗过程中, 手术治疗方案的选择, 并针对相应术式进行评价。

关键词: 肝内胆管结石; 手术治疗

戴朝六, 赵阳. 肝内胆管结石的手术治疗及术式评价. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3332-3335

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3332.asp>

0 引言

肝内胆管结石是指原发于肝管汇合部以上的胆管内的结石, 是胆道外科中复杂难治的常见病之一。肝内胆管结石的治疗主要靠外科手术, 原则是“去除病灶, 取尽结石, 矫正狭窄, 通畅引流, 防止复发”^[1]。目前用于治疗肝内胆管结石的手术方式是多样的, 但可以归结成胆管切开取石引流手术、胆管狭窄修复重建手术、肝切除术、肝移植术4种主要类型, 临床实际工作中常为此4类手术方法的序贯、联合应用。

1 胆管切开取石术

针对肝内胆管结石的胆管切开取石术是通过一个高达肝门的肝总管切口, 直视下对各主要肝管和尾状叶肝管以及二级肝管开口逐一进行探查, 弄清结石、狭窄等因素和肝管病变; 还包括经肝实质切开肝内胆管取石。该手术方法是肝内胆管结石系统手术最为基本的术式。多数应用于急症和重症病例, 旨在暂时通畅胆流、控制胆道感染、改善肝功能以挽救患者生命或者为之后的二期确定性手术做准备。合并急性胆管炎时, 不宜在急性炎症期作肝切除术。有研究表明, 胆管炎控制不足1 mo内切肝, 患者术中残余结石发生率、术后感染并发症和胆漏发生率明显升高。因此, 急性胆管炎发作期间, 宜待胆

■同行评议者

智绪亭, 教授, 山东大学齐鲁医院普外科

道引流减压后胆管炎症缓解1 mo, 最好3 mo后再行计划性的肝切除术^[2]. 对少数结石数量较少且受累的肝管及肝脏病变轻微、取尽结石后肝内外无残留病灶、胆管无狭窄的病例, 该术式才有可能作为确定性手术方式. 随着术中胆道造影、术中超声、术中胆道镜的广泛应用, 直视下探查结合上述手段能够更加全面了解胆道结石的部位、数量、胆管狭窄梗阻及胆管下端的通畅情况, 为最终手术方案的制订提供有力证据. 在手术过程中使用器械对肝内胆管结石进行取石操作应该轻柔, 避免暴力, 以免引起胆道损伤、出血. 术中使用器械盲目取石往往难以取尽肝内胆管结石, 很容易造成术后残留结石. 向肝内胆管置入导(尿)管冲洗时, 一定要掌握正确的方法, 切忌高压注水冲洗胆道, 否则容易造成肝管内压力过高, 感染的胆汁反流入血窦, 引起感染扩散, 发展为脓毒血症、休克, 甚至死亡.

2 肝切除术

切除病变肝段以最大限度地清除含有结石、狭窄及扩张胆管的肝脏病灶, 是治疗肝内胆管结石的最有效的手段, 这一方法已被广泛采用并取得了优良的疗效^[3]. 肝内胆管结石好发于肝左外叶和右后叶, 而肝切除是治疗肝内胆管结石最好的办法, 术后残石率低而且远期效果较好^[4].

2.1 肝左外叶切除术 肝内胆管结石好发于肝左外叶, 而肝左外叶切除也是肝切除术中比较简单的术式, 很多基层医院亦能开展, 是肝切除治疗肝内胆管结石中最常用的术式. 但是该术式主要针对单纯左外叶结石而不合并左肝管及横部的狭窄和胆管壁增厚等情况. 对于非局限在肝左外叶的结石, 切除左外叶往往是不够的, 尽管可以通过肝断面胆管对左内叶进行取石, 但是对于S4a的结石, 取石比较困难, 往往取不净结石, 导致术后结石残留^[5].

2.2 左半肝切除术 左半肝切除主要用于左肝管开口狭窄或结石嵌顿等长时间的肝管梗阻所致左半肝的纤维化、萎缩. 当左侧肝管有结石、狭窄但尚未造成肝实质改变时, 目前有2种方法: 一种是切除左外叶并通过肝断面胆管进行探查, 清除左肝管及左内叶支的结石; 另外一种则主张进行左半肝切除. 董家鸿等^[6]提出对左肝管的区域性结石, 应首选规则性左半肝切除, 而不应只行肝左外叶切除并联合胆管空肠吻合术. 也有学者证实局限于左内叶的肝内胆管结石, 在肝功能耐受的情况下, 亦应行左半肝切除, 避免

行左外叶切除, 因为左半肝切除者术后结石复发率低, 远期效果明显优于左外叶切除. 作者认为, 只要明确存在左肝管开口处狭窄、远侧胆管扩张等病理改变, 则无论左肝实质有无损害宜积极切除左半肝, 而病变确实仅局限于肝左内叶胆管(S4), 尤其左外叶代偿肥大者, 则应考虑行解剖性肝左内叶切除术(S4段切除术), 没必要无谓牺牲左外叶正常肝组织.

2.3 右半肝切除术 肝右叶内胆管结石的发生率比左叶低, 因而应用右半肝切除的机会亦相应减少. 肝内胆管结石施行右半肝切除时, 对手术适应证的选择需要严格把握, 从多方面考虑和衡量, 力求手术安全顺利, 争取良好的近远期效果. 通常是右肝管或其分支的梗阻和复发性感染导致右肝大范围损害, 门管区纤维化, 右肝萎缩, 同时左叶肝代偿性增大, 使左、右叶比例失衡, 并逐渐发生以下腔静脉为轴心的顺时针方向的旋转变化, 从而使有病变的肝右叶被推挤至右后方, 使手术显露和操作较为困难. 切除肝胆管结石病的右肝病灶时, 需要采取右外侧进路显露移位的肝门及右半肝, 充分游离右半肝与腹后壁及下腔静脉间的粘连, 使整个右半肝完全游离以便于病灶的完整切除. 应用术中超声准确判定肝中静脉的走向, 选择恰当的切肝平面进行右半肝的规则切除. 尾状叶的右侧部分(尾状突)如受累需一并切除. 但若尾状叶胆管未受累并有代偿性增生, 原则上应予以保留.

2.4 肝内胆管结石的规则性肝段切除术 规则性肝段切除是指从解剖肝门开始, 严格地按照肝管的解剖学范围切除肝组织. 肝内胆管结石的分布一般以肝叶和/或肝段为基础, 尤其是在早期多是局限于肝内某一亚肝段或肝段的局限型病变^[7]. 其病理改变是按病变胆树呈严格的节段性分布, 按解剖学分界切除肝段, 可以完整地切除病变胆树及其所引流的肝脏区域. 对于右侧肝内胆管结石, 近年来则更多地施行规则性的右前、右后区(段)切除甚至选择性的规则性肝段、亚肝段或局部胆管树切除, 这样进一步减少了肝切除的范围, 更利于肝、胆道生理状态的恢复, 效果也更好^[8]. 在进行规则性肝区段切除时, 应最大限度地保存正常胆管和肝组织, 彻底切除病患胆管及病灶, 从而达到根治性切除的目的. 如果肝脏切除不够, 遗留病变, 常常会导致症状复发, 影响手术效果.

2.5 腹腔镜肝切除术 随着腹腔镜下肝切除应用

■研发前沿

以手术为主的肝内胆管结石的综合治疗还存在着许多难题, 诸如手术的彻底性、结石复发的预防与处理等还有待深入研究与探讨.

■相关报道

不同范围的肝切除术仍然是肝内胆管结石外科治疗上的重要手段, 但是手术的范围、途径、方法均应随着病情而个体化, 目的是保存正常的肝组织, 但要彻底处理已病变的胆管结构并要根据每位患者的具体情况做出决策.

■创新盘点

本文系统介绍了有关肝胆管结石的各种外科手术术式,并对各种术式进行评价。

■应用要点

对肝内胆管结石的外科治疗,应是在早期去除病变,及时有效恢复胆道的生理功能。具体手术治疗方案的选择都应根据肝内胆管结石数量及分布范围、肝管狭窄的部位和程度、肝脏的病理改变、肝脏功能状态及患者的全身状况综合考虑。

范围的拓展,其针对规则性肝切除以及半肝切除呈现出良好的发展前景及态势。有研究表明腹腔镜手术治疗区域型肝胆管结石病安全可行,可达到与开腹手术相同的治疗效果,且能在很大程度上体现微创的特点和优势。但是也有其相对的禁忌证:(1)弥漫型肝胆管结石病,尤其合并胆汁性肝硬化和胆源性门静脉高压症,肝门严重转位,显露困难;(2)肝门部胆管重度狭窄;(3)既往多次胆道手术史^[9]。需要强调的是腹腔镜肝切除术需要有良好的专业训练,并有丰富的开腹肝切除手术经验为铺垫,否则可能事与愿违,效果不佳。

3 肝门部胆管狭窄修复重建术

肝胆管狭窄是肝内胆管结石外科治疗的障碍,80%的外科治疗失败是由由此引起。肝内胆管结石患者约30%-40%合并有肝胆管狭窄,在再次手术者中,其比例更高^[10]。因此肝内胆管结石手术中解除肝胆管狭窄是外科手术治疗的重要组成部分。对于肝内胆管高位狭窄,特别是三级分支以上肝胆管狭窄,通过肝叶或肝段切除就能够达到消除狭窄的目的。而对于肝门部一、二级胆管狭窄,行狭窄切开与整形吻合成为肝胆管结石手术中的典型术式。由于肝门部胆管狭窄的病变类型比较复杂,常常需要结合多种手术方法进行治疗:(1)胆管狭窄成形、组织补片修复术。适用于肝内病灶及上游肝管狭窄已去除,结石已取尽且无复发可能,而只存在肝门部胆管轻度狭窄的病例。充分切开狭窄段及其两端的胆管,切除瘢痕化的胆管组织,缝合肝胆管瓣形成胆管的后壁,胆管前壁的缺损用带血运的肝圆韧带瓣、胆囊瓣、胃瓣、空肠瓣或其他自体组织补片修复;(2)胆管狭窄成形、空肠Roux-en-Y吻合术。是将肝门部狭窄胆管充分切开,并进行原位整形,胆管切口与空肠襻行Roux-en-Y侧侧或端侧吻合。由于胆肠侧侧吻合术后可能出现经胆管下端的反流性胆管炎与肝外胆管结石等情况,因此尽量横断肝外胆管行胆肠端侧吻合,尤其对伴肝外胆管扩张、Oddi括约肌松弛、曾作Oddi括约肌成形术者更应如此。对有结石残留或复发可能的病例,可将空肠襻残端顺位埋置于腹壁皮下作为术后取石的通路。值得注意的是在上游肝管狭窄未纠正和肝内结石未取净的情况下,行胆肠吻合可能会引发或加重胆道感染等严重并发症。因此该术式适用于肝内病灶和上游肝管狭窄已去除的肝门部胆管

狭窄病例。

4 合并门静脉高压症的肝内胆管结石患者手术方案的选择

肝内胆管结石患者因长期反复发作的胆管炎症和机械性梗阻导致继发性胆汁性肝硬化,甚至出现胆源性门静脉高压症。此时外科治疗方式的选择常常十分困难。一方面患者对重大手术的耐受力极差,手术并发症发生率和死亡率较高;另一方面是门静脉高压症时肝门区存在许多扩张的侧支循环血管,手术常因大量的出血而更为艰难。是先解决门静脉高压症还是先处理胆道梗阻,是一次手术同时处理还是分期手术治疗,有时候难以抉择,考验着肝胆外科医生对复杂病例的综合判断与处理能力。一般认为,如果胆管狭窄及肝内病变比较简单、门静脉高压明显而肝脏代偿功能尚好者,可在一期手术同时处理胆道及门静脉高压的问题。如果胆道及肝脏的病变复杂、门静脉高压症明显、肝功能损害严重,则以分期手术为宜。胆管梗阻严重及肝功能损害者,特别是合并感染时,应先行胆管引流,待肝功能改善后择期进行确定性胆道手术。若门静脉高压显著,肝十二指肠韧带曲张血管阻碍胆道手术,则先作门腔静脉分流术,待门静脉高压缓解后择期进行确定性胆道手术。然而不可否认的是,在临床面对此类具体患者时,常让我们陷入两难境地,此时必须进行个体化的分析与处理,必要时应组织诸如介入科、消化内科、内镜中心等进行全面会诊,制定切实可行的治疗方案,再决定具体手术方法。

5 肝脏移植术

肝内广泛性结石伴终末期肝硬化而肝功能陷入失代偿状态时,肝移植手术是较好的选择,但因供体短缺、排斥反应、治疗费昂贵等问题限制了其在临床的应用。

6 结论

总之,对肝内胆管结石的外科治疗,应是在早期去除病变,及时有效恢复胆道的生理功能,使疾病得到治愈,而不是等待迁延成为慢性胆道系统感染和更广泛的肝内结石时再行治疗。具体手术治疗方案的选择都应根据肝内胆管结石数量及分布范围、肝管狭窄的部位和程度、肝脏的病理改变、肝脏功能状态及患者的全身状况综合考虑,并针对具体病例制定个体化的手术

治疗方案. 近年来随着影像学、数字医学、医疗器械等相关学科与技术的飞速发展, 以及微创理念的进一步确立与拓展, 尤其是精准肝脏外科理论体系的建立, 均深刻影响着肝内胆管结石治疗理念的变革与进步, 但不可否认目前以手术为主的肝内胆管结石的综合治疗还需解决许多难题, 诸如手术的彻底性、结石复发的预防与处理等还有待深入研究与探讨. 而病因学、分子生物学、病理学等相关基础研究的进一步深入, 或许可为最终解决肝内胆管结石这一临床难题提供重要启迪.

7 参考文献

- 1 董家鸿, 郑树国, 陈平. 肝胆管结石病诊断治疗指南. 中华消化外科杂志 2007; 6: 156-160, F0003
- 2 陈伟, 梁力建. 规则性肝叶切除治疗肝胆管结石. 肝胆外科杂志 2010; 18: 83-84
- 3 Chijiwa K, Kameoka N, Komura M, Yamasaki T, Noshiro H, Nakano K. Hepatic resection for hepatolithiasis and long term results. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 43-48
- 4 Chen DW, Tung-Ping Poon R, Liu CL, Fan ST, Wong J. Immediate and long-term outcomes of hepatectomy for hepatolithiasis. *Surgery* 2004; 135: 386-393
- 5 李绍强, 梁力建, 彭宝岗, 赖佳明. 左半肝切除与肝左外叶切除治疗左侧肝内结石的效果比较. 肝胆外科杂志 2006; 14: 11-13
- 6 董家鸿, 黄志强, 蔡景修, 韩本立, 何振平, 别平, 王曙光, 李智华, 陈平, 马宽生, 冯晓彬. 规则性肝段切除术治疗肝内胆管结石病. 中华普通外科杂志 2002; 17: 418-420
- 7 黄志强, 黄晓强. 肝胆胰外科聚焦. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2005: 305
- 8 Uenishi T, Hamba H, Takemura S, Oba K, Ogawa M, Yamamoto T, Tanaka S, Kubo S. Outcomes of hepatic resection for hepatolithiasis. *Am J Surg* 2009; 198: 199-202
- 9 李大江, 夏锋, 王曙光. 肝内胆管结石的肝叶切除技术. 肝胆外科杂志 2012; 20: 7-8
- 10 黄志强. 肝内胆管结石治疗的现状与展望. 中国普外基础与临床杂志 2001; 8: 65-66

■同行评论

本文对当前有关肝胆管结石的外科手术术式进行系统的介绍, 并对各术式的优缺点进行了剖析. 总体很有力度, 对从事本专业的医生来说是一篇高质量的综述性论文, 值得细读并借鉴.

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

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

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法. 定量评价指标体系采用了被引量、被引量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种. 参加核心期刊评审的学科专家达8200多位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊.

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

肝内胆管结石合并胆管癌

王广义, 王英超, 孙晓东

■背景资料

肝内胆管结石合并胆管癌术前诊断率低, 手术切除率低, 5年生存率低, 是困扰外科医生的临床难题。针对肝内胆管结石合并胆管癌的临床报道很多, 但是还没有一种办法可以在早期确诊肝内胆管结石。

王广义, 王英超, 孙晓东, 吉林大学白求恩第一医院肝胆胰外科 吉林省长春市 130021

王广义, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肝脏肿瘤术后预防方面的研究。

作者贡献分布: 本文综述由王广义完成; 王英超与孙晓负责审核。

通讯作者: 王英超, 副教授, 130021, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林大学白求恩第一医院. yingchao111@yahoo.com.cn

电话: 0431-88783421

发稿日期: 2012-07-27 修回日期: 2012-11-20

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-08

Hepatolithiasis combined with intrahepatic cholangiocarcinoma

Guang-Yi Wang, Ying-Chao Wang, Xiao-Dong Sun

Guang-Yi Wang, Ying-Chao Wang, Xiao-Dong Sun, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Ying-Chao Wang, Professor, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, First Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Street, Changchun 130021, Jilin Province, China. yingchao111@yahoo.com.cn
Received: 2012-07-27 Revised: 2012-11-20
Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-08

Abstract

Hepatolithiasis is a relatively common disease in East Asian countries. It is one of the leading causes of intrahepatic cholangiocarcinoma. The long-term stimulation of bile duct stones and hepatolithiasis-induced bile duct stricture or obstruction cause chronic irritation of cholestasis. In the presence of bacterial infection and other etiological factors, chronic proliferative inflammation of bile ducts will be caused. Eventually, biliary epithelial dysplasia, metaplasia, and even malignant transformation develop. In this paper, we describe the etiology, clinical manifestations, pathological characteristics, imaging diagnosis, and treatment of hepatolithiasis with intrahepatic cholangiocarcinoma. Diagnosis and treatment of hepatolithiasis with intrahepatic cholangiocarcinoma represent a great challenge to surgeons.

Key Words: Hepatolithiasis; Intrahepatic cholangiocarcinoma

Wang GY, Wang YC, Sun XD. Hepatolithiasis combined with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3336-3339

摘要

肝内胆管结石在东亚地区是较为常见的疾病, 是肝内胆管癌最主要的病因之一。胆管内结石对胆管壁的长期刺激, 结石引起的胆管狭窄梗阻造成胆汁滞留及同时伴发的细菌感染等生物因素的慢性刺激, 导致胆管壁的慢性增生性炎症, 进而引起胆管上皮的不典型增生和上皮化生, 发生癌变。本文主要对肝内胆管结石合并胆管癌的病因、临床表现、影像学诊断和病理特点、治疗方式等方面进行阐述。肝内胆管结石合并胆管癌的诊断和治疗均是对外科医生的巨大挑战。

关键词: 肝内胆管结石; 肝内胆管癌

王广义, 王英超, 孙晓东. 肝内胆管结石合并胆管癌. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3336-3339

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3336.asp>

0 引言

肝内胆管癌是指源于二级及二级以上肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤。肝内胆管结石合并反复发作的化脓性胆管炎常导致肝内胆管狭窄、肝脓肿形成。此病多发生在东亚国家, 常见的感染是细菌和寄生虫。病理因素也可能是发病原因, 如营养不良、菌血症等。反复发作的胆管炎病程超过6年, 是胆管癌发生的高危因素。其发生率是1.5%-11.0%^[1-4]。但胆管结石合并胆管癌, 临床上早期无特殊表现, 且往往合并肝脓肿存在, 影像学上诊断较为困难, 以致早期诊断率较低, 为临床治疗带来很大困难。

1 病因

在西方, 硬化性胆管炎是肝内胆管癌的主要病因; 在东亚地区, 肝内胆管结石是其主要发病原因之一。肝内胆管结石主要发生在东亚地区, 在我国多发生于东南地区和沿海一带。随着

■同行评议者

张宗明, 教授, 清华大学第一附属医院消化医学中心

亚洲移民的不断涌入, 西方国家肝内胆管结石发病率也呈增加趋势. 肝内胆管结石最常见的发病原因是感染, 最常见病原体是细菌和寄生虫. 细菌感染最常见的是大肠埃希菌, 寄生虫最常见的是华支睾吸虫和蛔虫. 病理因素也可成为发病原因, 如营养不良、菌血症等. 肝内胆管结石合并感染反复发作是导致胆管癌的最常见因素. 反复的感染、结石的慢性刺激、胆汁淤积导致胆管黏膜的腺瘤样增生、不典型增生, 最后发展为胆管癌. 国外报道, 有胆管结石导致的胆管癌占2%-10%左右^[4-6]; 国内报道占0.36%-10.00%^[7,8]. 但其发病率与地域、年龄、性别、生活习惯以及诊断方法有关.

2 临床特点

肝内胆管结石的主要临床表现是反复发作的胆管炎, 患者反复的高热、寒战. 肝内胆管结石合并胆管癌早期与肝内胆管结石在临床表现上无特殊区别, 术前早期诊断率较低. 但如肝内胆管结石的病程较长, 伴有肝脓肿形成, 近期伴有进行性消瘦、顽固性疼痛的、难以控制的感染, 进行性加重的黄疸者应考虑可能合并胆管癌存在. 合并胆管癌在晚期可以出现腹腔的播散转移、肺转移、进行性消瘦、黄疸、腹水等恶液质的表现.

3 影像学检查方式

肝内胆管结石合并胆管癌在诊断上极为困难, 其影像学检查的诊断率仅为0%-42%. 由于反复发作的胆管炎形成脓肿、胆汁瘤、肝叶萎缩等原因, 很难与胆管癌相鉴别.

3.1 超声检查 超声对胆管结石合并胆管癌的诊断率较低. 肝内胆管结石合并胆管癌由于胆管增生含有较多的纤维组织, 因此大部分表现为高回声. 结石失去了沿肝内胆管排列的典型声像图表现, 出现结石强回声团的声像图, 并且相关区域门静脉分支消失, 考虑可能合并胆管癌存在, 但超声受胆管的炎症、脓肿形成、周围组织纤维化及超声仪器的档次、操作者的水平、肿瘤的生长方式影响较大. 但Neumaier等^[9]报道当胆管癌合并胆道扩张并且出现门静脉癌栓时, 超声可以发现100%的胆道梗阻和门静脉癌栓, 并且可以发现37.1%的胆管癌. 此外超声还可以穿刺活检诊断胆管癌.

3.2 CT检查 增强CT对胆管结石合并胆管癌是最常用的检查方式, 但由于常合并肝脓肿和胆汁

瘤经常很难与胆管癌区分开. Kubo等^[10]报道在增强CT上胆管癌的特点, 动脉期轻中度强化, 门静脉期进一步强化, 延迟期病灶渐进性延迟强化. 但密度低于肝实质, 这是由于在胆管癌周围富含肿瘤细胞, 而中心富含纤维组织, 成活的肿瘤细胞是肿瘤早期强化的病理学基础, 而纤维组织是产生延迟强化的病理学基础. 一般合并肝叶萎缩, 门脉属支消失, 胆管癌管周软组织密度较周围正常肝组织密度高, 淋巴结肿大超过1 cm和胆管壁增厚静脉期强化是胆管结石合并肝内胆管癌的特点.

3.3 MRI检查 增强磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)结合磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)对诊断胆管结石合并胆管癌, 尤其是胆管癌的腔内生长型相对有优势. 其T1为低信号, 而T2为相对高信号. 增强早期病灶边缘不规则轻中度强化, 延迟期中心逐渐强化, 呈星芒征、结节状、网格状、条纹状不均匀强化. MRCP通过重建胆道树, 胆管呈软藤状扩张, 如腔内见结节状, 可以发现梗阻的部位^[11]. 通过增强MRI通过T1和T2结合动脉期、静脉期、延迟期的变化, 对胆管癌的更易发现.

3.4 PET 正电子发射计算机断层扫描(positron emission tomography, PET)对诊断胆管结石合并胆管癌的诊断有帮助, 尤其对有淋巴结转移的胆管癌的诊断率较高, 可以发现直径在1 cm左右的胆管癌^[12,13]. 对其他影像学没有发现的胆管癌, PET可以提高30%的诊断率^[14], 但是由于其价格昂贵, 还未作为常规检查手段.

4 血清学标志

胆管结石合并肝内胆管癌没有特异的血清学标志物, 针对诊断没有特异性, 但结合影像学对诊断有一定帮助. CA19-9、CEA、CA-125是最常用的胆管癌的血清学标志物. 85%的胆管癌合并CA19-9升高. 当出现梗阻性黄疸时CA19-9升高, 若梗阻解除后CA19-9仍然升高, 往往提示存在胆管癌^[15,16]. 约30%的胆管癌CEA升高. 40%-50%的胆管癌CA-125升高. 此外还有一些肿瘤标志物如CA-195、CA-242、DU-PAN-2、IL-6和trypsinogen-2也会改变.

5 病理特点

肝内胆管结石合并细菌感染、反复发作的胆管炎、结石和炎症形成恶性循环, 造成胆管狭窄,

■研究前沿

目前临床影像学的发展非常迅速, MRI、PET等对肝内胆管结石合并胆管癌的诊断都非常有帮助, 对肿瘤的标志物研究的深入, 对胆管癌的发现可能会有更大帮助.

■相关报道

针对肝内胆管结石合并胆管癌的临床报道很多, 但是还没有一种办法可以在早期对此病确诊, 提高5年生存率.

■创新盘点

本文总结了各种影像学针对肝内胆管结石合并胆管癌的特点,并指出外科手术目前仍是此病有可能的治愈手段。

胆汁淤积和机械性刺激可能导致黏膜上皮增生和增生性胆管炎。增生性胆管炎能导致非典型上皮增生、腺瘤样增生、继而发生癌变。肝内胆管癌还可以发生在已经手术不含结石的肝内胆管。肝内胆管癌常见的病理类型一般有肿块形成型、周围浸润型和腔内生长型。癌变大部分发生在结石附近,胆管癌全部为腺癌。组织病理学特点:肿瘤细胞呈低柱状、立方形排成脉管状、腺泡状等,伴有大片坏死,浸润纤维脂肪组织,侵犯胞膜、癌旁组织,呈现慢性胆管炎,受累的胆管狭窄,充满结石。

6 治疗方式

肝内胆管结石的治疗方式随着外科医师对疾病的认识发生巨大变化。传统术式采用胆道探查T管引流。由于肝内的结石反复排入胆总管内,因此进行反复的开腹手术治疗,很多患者在经历数次胆道手术,作者最多见过7次的胆道探查患者,患者身心受到巨大伤害。为了解决反复发作的胆道结石,外科医师开展了胆肠吻合术、皮下肠襻术等术式,但都不能从根本上解决肝内胆管狭窄、胆汁淤积的病理学基础,从而为胆管癌变打下伏笔。

6.1 根治性治疗 在术中发现:(1)肝脏表面有苍白质硬结;(2)肝门部有肿大淋巴结;(3)胆管切开后较多的黏液性物质;(4)胆管切开后局部明显增厚,应高度怀疑癌变。肝内胆管结石合并胆管癌一旦确诊,要尽量保证切缘阴性,术中行切缘的快速病理检查是非常必要的。为保证切缘阴性,多数要行肝叶切除,半肝切除,扩大半肝切除,联合尾状叶切除,被认为是目前唯一可能获得较长生存率的方式^[17-19]。有时术前评估,剩余肝脏不足,可以考虑行门静脉栓塞,扩大预留肝的体积,保证剩余肝功能。但如果术前发现腹腔内有中等量腹水,应考虑到腹腔内有可能广泛种植转移,应查腹水脱落细胞,或者腹腔镜探查。对于是否采取淋巴结清扫,国内外学者争议较大。日本学者建议清扫淋巴结,他们认为胆管细胞癌主要是淋巴转移,因此肝十二指肠韧带、腹腔干、胰腺后方的淋巴结清扫对提高5年生存率有意义。但欧美国家学者^[20,21]认为清扫淋巴结对提高5年生存率无意义。

6.2 姑息治疗

6.2.1 放疗: 外科切除后,最常见的复发形式是局部复发。很多医师建议术后放疗或放疗,结合化疗对局部控制肿瘤复发可能起作用,小样本

研究表明如果切缘阴性,结合术后放疗,术后5年生存率可达33.9%;对比不放疗的明显增加13.5%^[22]。但也有其他学者持反对意见,认为放疗对5年生存期无明显改善^[23]。

6.2.2 化疗: 化疗对胆管癌没有明显的效果,Todoroki等^[24]对139个日本多中心胆管癌患者采取丝裂霉素加5FU联合化疗证实化疗无任何疗效。但也有学者报道,化疗联合支持治疗能提高4 mo的生存期,但无论如何化疗的效果不够理想^[25]。

6.2.3 光敏治疗: 给患者注射一种光敏剂,通过特殊光波的垂直照射肿瘤位置,激活光敏剂,产生氧自由基杀死肿瘤细胞。有一小样本实验^[26],不可切除的胆管癌光敏治疗降低了胆红素水平,改善了生活质量,提高了生存期。但是,另外一组实验却没有取得相同的效果^[27],但治疗中发现光敏治疗可以导致肿瘤坏死。

6.2.4 对症治疗: 大约50%-90%的胆管癌是无法切除的^[28],无法切除的胆管癌治疗目的不是为了提高生存期,而是为了改善生活质量、解决疼痛、黄疸、瘙痒。术前影像学检查评估确定不能手术切除,并且经过穿刺活检证实,可以采取姑息性放疗,采取经皮肝穿刺胆道引流解决黄疸等对症治疗手段。

7 结论

肝内胆管结石是导致肝内胆管癌的主要原因之一,但由于肝内胆管结石合并胆管癌无特殊临床表现,在病理上反复的炎症刺激,胆管纤维化,合并肝脓肿形成,胆汁瘤形成,影像学很难鉴别,因此早期诊断率较低,手术切除也较低。5年生存率在5%-10%^[29]目前在诊断和治疗上都是外科医生所面临的巨大挑战。

8 参考文献

- 1 Koga A, Ichimiya H, Yamaguchi K, Miyazaki K, Nakayama F. Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. Possible etiologic significance. *Cancer* 1985; 55: 2826-2829
- 2 Li HY, Zhou SJ, Li M, Xiong D, Singh A, Guo QX, Liu CA, Gong JP. Diagnosis and cure experience of hepatolithiasis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma in 66 patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 725-729
- 3 Chen MF, Jan YY, Wang CS, Hwang TL, Jeng LB, Chen SC, Chen TJ. A reappraisal of cholangiocarcinoma in patient with hepatolithiasis. *Cancer* 1993; 71: 2461-2465
- 4 Su CH, Shyr YM, Lui WY, P'Eng FK. Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *Br J Surg* 1997; 84: 969-973
- 5 Chijiwa K, Ichimiya H, Kuroki S, Koga A, Nakayama F. Late development of cholangiocarcinoma

- after the treatment of hepatolithiasis. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 177: 279-282
- 6 Ohta T, Nagakawa T, Ueda N, Nakamura T, Akiyama T, Ueno K, Miyazaki I. Mucosal dysplasia of the liver and the intraductal variant of peripheral cholangiocarcinoma in hepatolithiasis. *Cancer* 1991; 68: 2217-2223
 - 7 田成武, 朱华文, 于永山, 曲明, 姜田军. 肝胆管结石并发胆管癌. 中国普通外科杂志 2001; 10: 21-23
 - 8 陈晓理, 方晓东, 黎志辉, 冉瑞图. 继发于肝内胆管结石症的肝胆恶性肿瘤27例分析. 中华普通外科杂志 2002; 17: 232-233
 - 9 Neumaier CE, Bertolotto M, Perrone R, Martinoli C, Loria F, Silvestri E. Staging of hilar cholangiocarcinoma with ultrasound. *J Clin Ultrasound* 1995; 23: 173-178
 - 10 Kubo S, Kinoshita H, Hirohashi K, Hamba H. Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma. *World J Surg* 1995; 19: 637-641
 - 11 Schwartz LH, Coakley FV, Sun Y, Blumgart LH, Fong Y, Panicek DM. Neoplastic pancreaticobiliary duct obstruction: evaluation with breath-hold MR cholangiopancreatography. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 1491-1495
 - 12 Kluge R, Schmidt F, Caca K, Barthel H, Hesse S, Georgi P, Seese A, Huster D, Berr F. Positron emission tomography with [(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose for diagnosis and staging of bile duct cancer. *Hepatology* 2001; 33: 1029-1035
 - 13 Delbeke D, Martin WH, Sandler MP, Chapman WC, Wright JK, Pinson CW. Evaluation of benign vs malignant hepatic lesions with positron emission tomography. *Arch Surg* 1998; 133: 510-515; discussion 515-516
 - 14 Anderson CD, Rice MH, Pinson CW, Chapman WC, Chari RS, Delbeke D. Fluorodeoxyglucose PET imaging in the evaluation of gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 90-97
 - 15 Patel AH, Harnois DM, Klee GG, LaRusso NF, Gores GJ. The utility of CA 19-9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 204-207
 - 16 Hultcrantz R, Olsson R, Danielsson A, Järnerot G, Lööf L, Ryden BO, Wahren B, Broomé U. A 3-year prospective study on serum tumor markers used for detecting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1999; 30: 669-673
 - 17 Figueras J, Llado L, Valls C, Serrano T, Ramos E, Fabregat J, Rafecas A, Torras J, Jaurrieta E. Changing strategies in diagnosis and management of hilar cholangiocarcinoma. *Liver Transpl* 2000; 6: 786-794
 - 18 Madariaga JR, Iwatsuki S, Todo S, Lee RG, Irish W, Starzl TE. Liver resection for hilar and peripheral cholangiocarcinomas: a study of 62 cases. *Ann Surg* 1998; 227: 70-79
 - 19 Washburn WK, Lewis WD, Jenkins RL. Aggressive surgical resection for cholangiocarcinoma. *Arch Surg* 1995; 130: 270-276
 - 20 Grobmyer SR, Wang L, Gonen M, Fong Y, Klimstra D, D'Angelica M, DeMatteo RP, Schwartz L, Blumgart LH, Jarnagin WR. Perihepatic lymph node assessment in patients undergoing partial hepatectomy for malignancy. *Ann Surg* 2006; 244: 260-264
 - 21 Kitagawa Y, Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, Sano T, Yamamoto H, Hayakawa N, Nimura Y. Lymph node metastasis from hilar cholangiocarcinoma: audit of 110 patients who underwent regional and paraaortic node dissection. *Ann Surg* 2001; 233: 385-392
 - 22 Todoroki T, Ohara K, Kawamoto T, Koike N, Yoshida S, Kashiwagi H, Otsuka M, Fukao K. Benefits of adjuvant radiotherapy after radical resection of locally advanced main hepatic duct carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 581-587
 - 23 González González D, Gouma DJ, Rauws EA, van Gulik TM, Bosma A, Koedooder C. Role of radiotherapy, in particular intraluminal brachytherapy, in the treatment of proximal bile duct carcinoma. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 4: 215-220
 - 24 Todoroki T. Chemotherapy for bile duct carcinoma in the light of adjuvant chemotherapy to surgery. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 644-649
 - 25 Hejna M, Pruckmayer M, Raderer M. The role of chemotherapy and radiation in the management of biliary cancer: a review of the literature. *Eur J Cancer* 1998; 34: 977-986
 - 26 Ortner MA, Liebetruht J, Schreiber S, Hanft M, Wruck U, Fusco V, Müller JM, Hörtnagl H, Lochs H. Photodynamic therapy of nonresectable cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* 1998; 114: 536-542
 - 27 Zöpf T, Rosenbaum A, Apel D, Jakobs R, Arnold JC, Riemann JF. [Photodynamic therapy of dysplasias and early carcinomas in Barrett esophagus with a diode laser system--a pilot study]. *Med Klin (Munich)* 2001; 96: 212-216
 - 28 Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, Chari RS. Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Oncologist* 2004; 9: 43-57
 - 29 Lee CC, Wu CY, Chen GH. Cholangiocarcinoma and hepatolithiasis: what is the impact of coexistence of hepatolithiasis on cholangiocarcinoma? *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1015-1020

同行评价

本文通过对肝内胆管结石合并胆管癌的病因、临床表现、影像学诊断、病理特点、治疗方式等进行较为详细的描述,能够对肝内胆管结石合并胆管癌的诊断和治疗提供一定的指导和帮助。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

肝内胆管结石术后复发的再处理

王存川, 高明

■背景资料

肝内胆管结石术后复发是肝内胆管结石手术后最常见的并发症, 再处理方法是当今胆道外科最为棘手的问题之一。目前临床上处理方式很多, 但大部分患者远期效果并不能令人满意, 本课题组认为应该根据每个患者的具体情况选择个体化的治疗方法。

王存川, 高明, 暨南大学附属第一医院普通外科 广东省广州市 510630

王存川, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事普通外科疾病的基础与临床研究, 尤其是腹腔镜下普通外科疾病的治疗。

作者贡献分布: 此课题由王存川与高明设计; 王存川统筹指导; 论文写作由高明完成。

通讯作者: 王存川, 教授, 主任医师, 510630, 广东省广州市天河区黄埔大道西613号, 暨南大学附属第一医院普通外科。

wangcunchuan@tom.com

电话: 020-38688573

收稿日期: 2012-07-27 修回日期: 2012-11-20

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-08

Management of recurrent stones in patients with hepatolithiasis after surgery

Cun-Chuan Wang, Ming Gao

Cun-Chuan Wang, Ming Gao, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Correspondence to: Cun-Chuan Wang, Professor, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China. wangcunchuan@tom.com

Received: 2012-07-27 Revised: 2012-11-20

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-08

Abstract

Recurrent stones is a common postoperative complication in patients with hepatolithiasis and is hard to treat. There are many treatments available to treat recurrent stones, but satisfactory results can be achieved in few patients. Nonsurgical treatments include the dissolution of stones, extrahepatic lithotripsy, and stone removal without surgery. Surgical treatments include hepaticolithectomy, hepatic resection, hepatico-jejunostomy, and liver transplantation. Hepatic resection and liver transplantation are radical surgery for recurrent stones. Personalized retreatment should be adopted for recurrent stones according to the conditions of each patient.

Key Words: Hepatolithiasis; Surgery; Recurrent stones; Retreatment

Wang CC, Gao M. Management of recurrent stones in patients with hepatolithiasis after surgery. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3340-3343

摘要

肝内胆管结石术后复发是肝内胆管结石手术后最常见的并发症, 其再处理方法是当今胆道外科最为棘手的问题之一。目前临床上处理方式很多但大部分患者远期效果并不能令人满意。非手术方法包括溶石、碎石、取石等。手术方法有肝实质切开取石、肝叶(段)切除、胆肠吻合术及肝移植等。其中肝叶(段)切除及肝移植能一次手术完成肝胆管结石外科治疗原则要求的彻底的根治性手术。应该根据每个患者的具体情况制定个体化的治疗方法。

关键词: 肝内胆管结石; 手术; 术后复发; 再处理

王存川, 高明. 肝内胆管结石术后复发的再处理. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3340-3343

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3340.asp>

0 引言

肝内胆管结石的发病与胆道感染等多种因素有关, 在亚洲国家高发而在西方国家发病相对较低^[1]。我国肝内胆管结石是肝胆外科最常遇到的问题, 有病变广泛、病情复杂、手术并发症发生率高、术后易复发等特点^[2]。国内报道肝内胆管结石术后残石率为20%-40%^[3]。而肝内胆管结石术后复发需要再手术者占再诊患者的半数以上^[4], 成为胆道外科中最复杂和最难治的非恶性疾病之一。肝内胆管结石术后复发分为两种情况, 一种是首次手术中取净结石后再发, 另一种情况是首次手术结石没有取净, 残余结石继续生长引起临床症状。凡肝内胆管结石首次手术两年后, 患者出现相关的临床症状, 通过影像学检查又发现肝内胆管结石者称为肝内胆管结石术后复发。由于肝内胆管结石术后复发的患者往往存在病情复杂多变、伴有肝内胆管狭窄及癌变、术后再发残石等特点, 处理上比较棘手。目前临床上的处理方式很多, 但大部分患者远期效果不能令人满意。我们主张根据每个患者的具体情况制定个体化的治疗原则。

■同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

1 肝内胆管结石术后复发再处理前的准备

对于肝内胆管结石术后复发的问题应予以高度的重视, 根据患者既往手术情况选择系统的肝胆道检查方法. 如果患者还保留T管或其他胆道引流管等要利用这些现有的管道进行造影对比, 否则应该在肝胆B超的基础上选用其他影像学检查如CT、MRI、PTC、ERCP检查或MRCP检查等, 了解术后肝内复发结石的分布情况、胆道狭窄部位、畸形的部位、肝叶(段)萎缩情况或有无癌变等情况, 同时参照患者的肝功能及全身耐受治疗情况制定详细的个体化的治疗方案.

2 肝内胆管结石术后复发再处理方法的选择

2.1 非手术治疗

2.1.1 溶石: 溶石治疗是从胆道引流管(T管或PTC管等)注入能溶解结石的药物, 理论上能够使残余结石溶解. 溶石药物的种类很多, 主要有辛酸甘油酯、甲基叔丁醚、复方三乙醇胺及中医中药等, 早些年有报道^[5-7], 近来这些方法逐渐被废弃. 溶石治疗效果差的原因可能与在体内很难做到溶石药物较长时间充分作用于结石本身. 并且至今也没有找到一种适合胆色素结石的溶解药物.

2.1.2 碎石: 碎石首先需要一定的途径到达残余结石部位, 然后在体外通过一定的脉冲水压或直接通过光纤发射激光, 使残余结石松动和破裂, 然后通过管道协助排出残石. 对于肝外胆管残余结石有一定的效果, 近年也有处理肝内胆管结石术后复发的患者的报道. Kow等^[8]对4例经历过复杂肝内胆管结石术后复发的患者通过经皮经肝胆道镜碎石术(percutaneous transhepatic cholangioscopic lithotomy, PTCSL)治疗残余结石, 均碎石成功并排出, 4位患者平均随访18 mo, 均无胆管结石复发及胆管炎等其他并发症出现. 许传波等^[9]在胆道镜下使用U-100双频激光碎石治疗难取性胆管残余结石42例, 对肝内胆管结石术后复发的患者拔出T管后经原窦道置入胆道镜, 首先用取石篮、冲洗器等清除结石, 难取结石自胆道镜置入光导纤维, 找到结石后发射激光碎石. 1次碎石成功率为69.0%, 3次以上碎石成功率100%. 多次结石取净率95.2%. 黎辉等^[10]报道通过T管窦道置入胆道镜, 插入等离子体冲击波电极对准结石击发, 将结石击碎后取净结石. 对46例复杂肝内胆管残余结石取石成功45例, 成功率97.8%, 治疗期间胆道少量出血3例, 发热1例, 均经过保守治疗痊愈. 经过腹腔镜及胆道

镜辅助应用激光碎石治疗肝内胆管结石术后复发的方法国外也有报道^[11,12].

2.1.3 取石: 对于肝内胆管结石术后复发的患者通过一定的途径取石是最直接的方法, 临床上应用的也比较多. 纤维胆道镜经T管窦道取石目前开展的比较广泛^[13], 但只限于少数位于主要肝内胆管残留结石的患者. 罗亚桐等^[14]报道经T管窦道治疗287例单纯肝内胆管残余结石患者, 经过1-5次(平均2.2次)胆道镜取石, 取净结石或主要肝胆管残石取尽者为成功, 共计211例, 成功率73.1%. 对伴有胆管狭窄的肝内胆管残石患者152例中取石失败率44.1%. 而对于其中无胆管狭窄的135例患者失败率仅为6.7%. 经皮经肝胆道镜(percutaneous transhepatic cholangioscopy, PTCS)取石对于不带T管的患者是一个选择. 对于残余结石比较大、肝胆管扩张比较明显又靠近肝脏膈面的患者较适宜, 但容易发生胆漏、出血, 因此应该严格掌握适应证. Cheung等^[15]对79例肝内胆管结石患者应用PTCS取石, 取石成功率是76.8%, 其中并发症发生率是21.5%, 由于右侧肝内胆管的解剖特点与左侧不同, 右侧肝内胆管结石取石困难. 同时随访还发现结石并伴有肝内胆管狭窄的患者取石后容易出现胆管炎. 胆道镜取石配合碎石可以互补其长, Cheng等^[16]研究190例肝内胆管结石术后复发的患者, 这些患者残留结石的部位均位于胆管狭窄部. 他们通过对狭窄部位扩张后置入胆道镜并配合电动液压碎石, 肝内胆管残留结石的清除率达88.4%, 但同时也发现右侧肝内胆管残留结石取石失败率较高. 有些作者^[17]报告做胆管-空肠吻合时将引流肠襻的近端置于皮下, 术后如发现残余或复发结石, 可切开皮肤及肠壁, 插入胆道镜取石. 通过留置的Roux-en-Y吻合引流肠襻盲端切开取石也是一种可以选择的方法. 我院大部分患者采用纤维胆道镜经T肝窦道取石的方法. 经皮经肝胆道镜取石也有开展. 由于创伤小, 对机体的总体影响不大, 我们认为各种经窦道或经皮经肝途径的微创方法取石应该积极加以推广. 但鉴于医生的实践经验与所在单位具备的医疗条件不同, 每个患者的具体状况及残余结石特点部位也存在差异, 目前尚没有统一的治疗模式, 针对某一具体患者的具体微创治疗方法尚待进一步规范.

2.2 手术治疗

2.2.1 肝实质切开创石术: 对于肝内胆管结石术后复发局限于肝脏表面的结石, 如果患者不适合

■ 研究前沿

由于肝内胆管结石术后复发的患者往往存在病情复杂多变、伴有肝内胆管狭窄及癌变、术后再发残石等特点, 处理上比较棘手.

■相关报道

Kow等对4例经历过复杂肝内胆管结石术后复发的患者通过经皮经肝胆道镜碎石术(PTCSL)治疗残余结石,均碎石成功并排出,4位患者平均随访18 mo,均胆管结石复发及胆管炎等其他并发症出现。

非手术治疗,可以采用直接游离肝脏表面然后切开取石的方法。但由于单纯局限于肝实质表面的结石不多,所以有这类适应证的患者有限。

2.2.2 肝叶/段切除术:对于肝内胆管残余结石术后复发后残余结石累计多个部位,同时伴有胆道狭窄、感染、癌变及畸形等患者,往往需要再次手术解决问题。对于局限于肝脏一段、一叶或半肝的结石,将病肝连同其中的结石和其他病变一并切除,可达到“根除病灶”的目的。肝内胆管结石术后复发手术再处理的总体原则仍然是“尽可能取尽残余或新生结石,清除病灶,纠正胆管病变,通畅引流及为术后辅助治疗提供条件”^[18]。其中部分肝叶及肝段切除仍然是再处理中行之有效的办法,但再次手术较首次手术情况更复杂,难度更大。手术过程中病肝切除,胆管狭窄段切开整形,肝门部宽敞的胆肠吻合是提高手术治疗效果的关键。经过几十年的应用经验及随着肝脏外科技术的进展,临床证实部分肝叶、肝段切除是唯一能一次手术完成肝胆管结石外科治疗原则要求的彻底的根治性手术。但再次手术难度更大,并发症发生率较高,故应采取个体化治疗的方案,结合术前检查和术中探查情况,选择性地在双侧肝内胆管结石的治疗中加以应用。

2.2.3 胆肠吻合术:胆肠吻合术长期以来就是胆石症治疗的一种重要手术方式。肝管空肠Roux-en-Y吻合及肝门胆管空肠盆式吻合对胆石症的治疗起到了一定的作用。但由于肝胆管病理改变长期存在,术中结石难以取净及逆行感染等原因,胆肠吻合术后效果并不理想。目前更多的利用取石或肝叶(段)切除术的方法取代。

2.2.4 肝移植:肝内胆管结石出现严重并发症到达终末期也是肝移植的适应证之一^[19]。对于肝内胆管结石术后复发并继发胆汁性肝硬化,肝功能衰竭进入终末期的患者,如果条件允许,可以考虑行肝移植。

2.2.5 关于手术的几点说明:再次手术根据首次手术方式的不同而情况各异。对于首次手术采用腹腔镜的患者由于腹腔镜本身对于腹腔内器官组织之间的影响相对较小,所以再次手术进腹的路径受腹腔内粘连等因素的影响比较小。我们遇到的几例采用完全腹腔镜下施行肝内胆管结石手术的患者再次开放手术腹腔内粘连的情况均较轻,类似初次开腹的情况。而首次采用开放胆道手术的患者腹腔内粘连一般均较严重,再次手术进腹本身就是一个挑战。再次手术的

切口入路我们推荐右侧肋缘下斜切口(可以经过原切口,但可适当两侧延长),可以方便直接显露肝脏各病变部位。进腹后如果粘连比较严重,从原切口两侧延长的(粘连相对较少)疏松部位进腹,首先仔细游离找到肝脏的外缘,然后沿外缘再行游离找到相应的病变部位。手术者在术前提要有充分的思想准备,细心操作不能急躁,以免带来不必要的副损伤。

3 结论

肝内胆管结石术后复发的处理方法很多,但一般认为肝叶(段)切除是最有效的方法。但由于患者的具体情况受到许多的限制,各种经窦道或经皮经肝途径取石是目前应用最多的方法,但目前尚没有针对所有残余结石患者统一的治疗模式。对于久治未愈,肝功能衰竭的患者肝移植也是一种好的治疗选择。

4 参考文献

- Shoda J, Tanaka N, Osuga T. Hepatolithiasis--epidemiology and pathogenesis update. *Front Biosci* 2003; 8: e398-e409
- 陈积圣. 肝胆管结石的微创治疗的进展. *中国微创外科杂志* 2007; 7: 93-94
- 田伏洲, 张炳印, 赵铁军, 胡兵, 黄大熔, 胡建中. 纤维胆道镜治疗肝内胆管结石19年回顾. *中华肝胆外科杂志* 2000; 6: 187-189
- 崔乃强, 李忠廉, 邱奇, 赵二鹏. 10年胆道再手术的临床分析. *中华肝胆外科杂志* 2002; 8: 464-468
- Allen MJ, Borody TJ, Thistle JL. In vitro dissolution of cholesterol gallstones. A study of factors influencing rate and a comparison of solvents. *Gastroenterology* 1985; 89: 1097-1103
- 章建东, 李兆申. 胆石症的直接灌注溶解疗法. *世界华人消化杂志* 1997; 5: 60-61
- 董国民, 王振福, 魏茂华, 郭明兴, 曾庆旺. 经皮经肝胆管引流术注药溶石联合体外冲击波碎石术治疗肝外胆管结石32例报告. *中华普通外科杂志* 1999; 14: 46-47
- Kow AW, Wang B, Wong D, Sundeep PJ, Chan CY, Ho CK, Liao KH. Using percutaneous transhepatic cholangioscopic lithotripsy for intrahepatic calculus in hostile abdomen. *Surgeon* 2011; 9: 88-94
- 许传波, 刘春林, 张少强. 胆道镜下U-100双频激光碎石治疗难取性胆管残余结石的体会. *腹腔镜外科杂志* 2010; 15: 761-762
- 黎辉, 张扬, 黎有典, 陈能志, 张克兰, 彭剑波. 冲击波碎石内镜治疗复杂型胆管残余结石. *中国内镜杂志* 2010; 6: 600-601
- Varban O, Assimios D, Passman C, Westcott C. Video. Laparoscopic common bile duct exploration and holmium laser lithotripsy: a novel approach to the management of common bile duct stones. *Surg Endosc* 2010; 24: 1759-1764
- Rimon U, Kleinmann N, Bensaid P, Golan G, Garniek A, Khaitovich B, Winkler H. Percutaneous transhepatic endoscopic holmium laser lithotripsy for intrahepatic and choledochal biliary stones. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2011; 34: 1262-1266

- 13 冯秋实, 张宝善, 魏九九, 黄廷庭. 疑难肝内结石的胆镜治疗. 中华肝胆外科杂志 2000; 6: 168-169
- 14 罗亚桐, 黄飞舟, 任树平. 胆道镜治疗肝内胆管残余结石. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 55-56
- 15 Cheung MT, Wai SH, Kwok PC. Percutaneous transhepatic choledochoscopic removal of intrahepatic stones. *Br J Surg* 2003; 90: 1409-1415
- 16 Cheng YF, Lee TY, Sheen-Chen SM, Huang TL, Chen TY. Treatment of complicated hepatolithiasis with intrahepatic biliary stricture by ductal dilatation and stenting: long-term results. *World J Surg* 2000; 24: 712-716
- 17 杨聪. 皮下盲襻式胆管-空肠Roux-en-Y吻合术治疗肝内外胆管结石: 附14例报告. 中国普通外科杂志 2008; 17: 826-827
- 18 黄志强. 黄志强胆道外科手术学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 84-88
- 19 Strong RW, Chew SP, Wall DR, Fawcett J, Lynch SV. Liver transplantation for hepatolithiasis. *Asian J Surg* 2002; 25: 180-183

■同行评价

本文选题准确, 思路清楚, 分析比较透彻, 观点明确, 具有比较重要的学术价值和临床指导意义。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 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。

肝内胆管结石合并胆管狭窄的处理

刘军, 孟凡迎

■背景资料

肝内胆管结石在东亚及东南亚一些国家和地区发病率很高, 治疗困难, 结石、炎症及狭窄三者互为因果, 由于其反复发作的炎症、胆管狭窄及手术后残留的结石, 肝内胆管结石合并狭窄一直是临床治疗的难点之一。因病变部位不同, 其临床表现也因人而异。一般而言, 其临床表现往往不如肝外胆管结石那样严重, 但治疗难度却明显高于肝外胆管结石。

刘军, 孟凡迎, 山东省立医院肝胆外科 山东省济南市 250021

刘军, 教授, 博士生导师, 主要从事肝移植、肝胆胰脾外科的基础与临床研究。

作者贡献分布: 本文由孟凡迎撰写; 刘军负责审核。

通讯作者: 刘军, 教授, 博士生导师, 250021, 山东省济南市经五路324号, 山东省立医院肝胆外科, dr_liujun@hotmail.com

收稿日期: 2012-09-20 修回日期: 2012-11-20

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-08

Treatment of hepatolithiasis with bile duct stenosis

Jun Liu, Fan-Ying Meng

Jun Liu, Fan-Ying Meng, Institute of Organ Transplantation, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Correspondence to: Jun Liu, Professor, Institute of Organ Transplantation, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. dr_liujun@hotmail.com

Received: 2012-09-20 Revised: 2012-11-20

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-08

Abstract

Hepatolithiasis is a disease prevalent in South-east Asian countries that is characterized by the presence of stones in the intrahepatic bile ducts proximal to the confluence of the right and left hepatic ducts. The goals of management include efficient elimination of stones and stasis, relief of strictures, total biliary drainage, maximum protection of functional liver tissue, and reduction of surgical complications. The diagnosis can be best established by direct cholangiography such as percutaneous transhepatic cholangiography or endoscopic retrograde cholangiography. Magnetic resonance cholangiography can delineate detailed information on the bile ducts, which is useful in the planning of treatment for hepatolithiasis. Though non-operative biliary decompression by endoscopy and interventional radiology is effective in controlling infection, surgery by multiple methods remains the mainstay for the treatment of stones and strictures. The bile duct stricture carries a high risk for postsurgical intrahepatic calculi; hence, permanent relief of stricture in hepatobiliary

surgery is mandatory. The aggressive resection strategy is recommended for an atrophic segment resulting from hepatolithiasis to achieve complete clearance of the stones and relief of bile stasis. For therapeutic purposes, we recommend a combination of multimodal treatments to improve results. It is necessary to choose the most suitable and optimal therapeutic approaches in selective cases in the treatment of complicated hepatolithiasis.

Key Words: Hepatolithiasis complicating stenosis; Bile ducts

Liu J, Meng FY. Treatment of hepatolithiasis with bile duct stenosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3344-3348

摘要

肝内胆管结石是指肝总管分叉以上的胆管结石。在东亚及东南亚一些国家和地区发病率很高, 而在欧美国家发病率低。肝内胆管结石合并胆管狭窄发病率高, 据报道国内胆管狭窄的发生率为24.80%-41.94%, 肝内胆管狭窄是肝内胆管结石的主要病理改变, 两者互为因果。长期存在的结石, 合并肝内胆管感染、狭窄及胆汁淤积, 常导致胆石存在肝段实质萎缩, 甚至恶变。结石、炎症及狭窄三者互为因果, 由于其反复发作的炎症、胆管狭窄及手术后残留的结石, 肝内胆管结石合并狭窄一直是临床治疗的难点之一。因病变部位不同, 其临床表现也因人而异。一般而言, 其临床表现往往不如肝外胆管结石那样严重, 但治疗难度却明显高于肝外胆管结石。B超诊断肝内胆管结石的准确率很高, 近年来随着经皮肝穿刺胆管造影(percutaneous transhepatic cholangiography, PTC)、经内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangio-pancreatography, ERCP)、磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)等先进诊断技术手段的应用, 肝内胆管结石及狭窄得以更及时更清晰的诊断, 其治疗方法也取得一定进展。术前进行详尽的影像学检查, 明确结石及胆管狭窄所处的具体位置, 针对不同患者的病情, 制定恰当的个体化治疗方案尤为重要。本文结合

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科

我们的治疗体会探讨肝内胆管结石合并胆管狭窄的诊断和治疗问题。

关键词: 肝内胆管结石; 胆管狭窄

刘军, 孟凡迎. 肝内胆管结石合并胆管狭窄的处理. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3344-3348

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3344.asp>

0 引言

考古学发掘证实古埃及青年妇女存在胆结石, 这证明胆石症折磨人类已经有2000年以上的历史。胆石症的流行病学有很明显的地域特点, 在欧美人种发病率很低, 而在我们国内、香港地区则发病率高^[1]。一般将肝内胆管定义为左右肝管汇合部近端的所有胆管。肝内胆管结石即指存在于肝内胆管的结石。肝内胆管结石的成因与胆道寄生虫、胆道感染、胆汁淤积、胆管变异及胆汁引流不畅等因素有关^[2], 左侧肝内胆管结石明显多于右侧。从流行病学和病因学角度分析, 肝内胆管结石的病因可能与蛋白质缺乏所致的营养不良有关^[3]。以高蛋白饮食为主的欧美国家肝内胆管结石非常罕见, 国内农村人口发病率远高于城市人口亦可能与营养不良有关。肝内胆管结石的常见病理改变包括结石、狭窄及扩张、慢性增殖性胆管炎与肝实质纤维化与萎缩, 甚至恶变^[4]。肝内胆管结石常合并胆管狭窄, 以左侧胆管最明显, 呈节段性分布, 狭窄远端胆管扩张, 其内存在或充满结石。肝内胆管结石合并狭窄临床发病率较高, 国内的发生率为24.80%-41.94%^[5]。结石、炎症及狭窄三者互为因果。狭窄是肝内胆管结石的主要病理改变, 也是导致结石复发和外科治疗失败的常见原因^[6]。因此, 对该类患者的治疗, 在尽量取尽结石的基础上, 如何彻底解除胆管狭窄是关系患者远期疗效的关键。

1 肝内胆管结石的类型

以前认为肝胆管结石几乎全是胆红素钙结石, 现在已经明确约20%是胆固醇结石^[7], 肝内胆红素钙结石的形成主要与胆汁淤滞和细菌感染有关, 而肝内胆固醇结石的形成则主要与过饱和胆固醇胆汁的产生有关。载脂蛋白A-1有防止胆固醇析出的作用, 载脂蛋白A-1活性降低等代谢因素的改变是胆固醇结石形成的重要原因。两种结石患者的临床表现差别很大, 治疗方案也不同。肝内胆红素钙结石临床常见, 常合并胆管

狭窄。对该类患者判断结石所在的肝脏区域有无萎缩和局部胆管有无狭窄非常重要。如果局部胆管有狭窄, 但肝脏区域没有萎缩, 则可首先考虑经皮经肝胆道镜(percutaneous transhepatic cholangioscopy, PTCS)取石并扩张狭窄, 这种狭窄往往也是可逆性的。但如果影像学检查[如CT、磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)等]提示结石所在的肝脏区域已有萎缩, 尤其存在胆管狭窄, 则有行肝段或肝叶切除的指征。肝内胆固醇结石则往往表现为肝内多个孤立性病变, 常位于肝脏的外围, 患者基本无症状。若结石进入胆总管, 患者会出现腹痛、黄疸、发热, 但程度较胆红素钙结石引起者轻微, 患者往往未经处理症状可自行缓解。B超检查可见肝内孤立性强回声, 后伴声影。胆道造影检查往往也无明显胆道扩张或狭窄表现。与肝内胆红素钙结石不同, 胆固醇结石局部无明显炎症反应, 罕见合并胆管癌。对该类患者, 若无症状, 我们的建议是随访观察, 可暂不予处理。有症状者, 可考虑行PTCS取石。另外也有报道称, 体外冲击波碎石(extracorporeal shock wave lithotripsy, ESWL)对治疗肝内胆固醇结石有效。

2 肝内胆管结石合并狭窄的影像学检查

术前明确肝内胆管结石及狭窄的位置和分布, 是手术成败的关键^[8]。肝内胆管结石的检查首选B超, 其特点为无损伤性、快速、简便、安全。B超能显示肝内胆管扩张的程度及结石光团和声影, 诊断的准确率可达85%-90%, 但B超不能提供胆管树的整体情况, 而且对胆管狭窄具体部位往往显示欠清晰, 对手术指导意义有限。CT可全面显示肝内结石的分布情况、胆管有无扩张及扩张的部位、肝实质有无病理性改变等, 临床上常与B超联合应用。但CT往往难以直接显示胆管狭窄的具体部位, 经内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangio-pancreatography, ERCP)则能提供胆管树的整体情况, 对肝内胆管结石有无狭窄等情况提供最直观的证据。ERCP在胆肠吻合术后及结石合并狭窄的上端则显示不清。经皮肝穿刺胆管造影(percutaneous transhepatic cholangiography, PTC)也是直接胆道显影, 他在胆管扩张时穿刺成功率高, 可以明确显示胆管狭窄部位, 但在胆管无扩张、胆管梗阻的患者往往显影欠清晰。磁共振胰胆管造影(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)能获得与直接胆道造影, 如ERCP及PTC

■ 研发前沿

近年来随着PTC, ERCP, MRCP等先进诊断技术手段的应用, 肝内胆管结石及狭窄得以更及时更清晰的诊断, 其治疗方法也取得一定进展。术前进行详尽的影像学检查, 明确结石及胆管狭窄所处的具体位置, 针对不同患者的病情, 制定恰当的个体化治疗方案仍是治疗的重点及难点。

■创新盘点

术前进行详尽的影像学检查,明确结石及胆管狭窄所处的具体位置,针对不同患者的病情,制定恰当的个体化治疗方案尤为重要。

等影像学检查一样完整直观的胆管树三维图像。MRCP无创伤性,患者更易接受。MRCP不仅能清晰的显示结石的部位、胆管狭窄及扩张、胆胰管的形态,同时还能提供肝脏实质有无病理性改变等形态资料,对于胆肠内引流术后及复合性胆管狭窄等患者同样适用^[9,10]。采用术中B超检查,术者能根据术中实际情况修订手术方案,避免术中盲目探查操作。术中纤维胆道镜的应用还能弥补常规手术器械的某些缺陷,使部分病例结石的取除变得容易。总而言之,针对不同病例个体,术前及术中选择性应用B超、CT、ERCP、PTC、MRCP等影像学检查,明晰胆管结石和狭窄详细信息,制定完善的手术方案,然后术中结合胆道造影、B超及纤维胆道镜检查,进一步调整手术方案,从而达到彻底根治的目的^[11]。

3 肝内胆管结石合并狭窄的治疗

肝内胆管结石的治疗手段既有手术方法,又有非手术方法。各种治疗方法,其结果尚不能完全满意,关键问题是残余结石率高,再手术率高。我们认为,针对不同的患者,制定恰当的个体化治疗方案尤为重要。目前公认的肝内胆管结石的治疗原则是:清除病灶、取净结石、去除狭窄、通畅引流,这是肝内胆管结石治疗的实践指导原则^[12]。结石机械性梗阻-胆道感染-胆道狭窄-肝实质的相应改变,这是肝内胆管结石病发展过程的基本模式。病理组织学和微血管灌注扫描电镜证实,肝内门静脉小分支的破坏、闭塞及门管区纤维化,是肝内胆管结石肝脏组织改变的基本原因,而这种改变有明显的节段性分布^[13]。胆管炎性狭窄及梗阻以上部位胆管扩张、感染,继之受累肝叶段纤维化萎缩,长期炎性刺激胆管癌变率高,且病变区呈明显的节段性分布,这些是肝叶段切除治疗肝内胆管结石合并狭窄的病理解剖学基础^[14,15]。肝内胆管结石合并狭窄时,肝脏的病变范围是沿病变胆管树呈较明显的节段性分布。因此,与治疗肝肿瘤时以肿瘤为中心的不规则肝切除术不同,肝内胆管结石患者的肝叶切除是以肝段为单位的规则性切除,从而完整切除病变胆管及所引流的肝脏区域,治疗的关键是不能残留可能导致结石复发的明显狭窄或扩张的胆管^[16]。肝胆管结石病的手术方式较多,其中肝切除术可以最大限度地清除含有结石、狭窄及扩张胆管的病灶,最大优点即在于去除了结石及病变的胆管、减少

了术后复发及病变胆管恶变的危险,已被越来越多的学者所接受^[7]。

3.1 肝左叶胆管结石合并胆管狭窄 左肝内胆管结石合并狭窄的治疗相对简单,尤其是二级以上左肝内胆管狭窄更为简单。宜施行肝左叶叶切除术^[17],保护并显露左叶胆管汇合部,经汇合部切开取出其内残余胆管结石,再用无损伤线缝合汇合部胆管。既取净了左肝内胆管结石,又解决了胆管狭窄问题。由于绝大多数门静脉左干在左肝管的深面走行,肝左动脉在左肝管浅面下方走行,因此经肝断面的胆管支用探条与肝门胆管会师,并在此引导下在肝断面切开左肝管一般不会损伤门静脉左干,手术操作相对简单安全。肝左叶或肝左外叶切除治疗肝左叶或肝左外叶结石已成为常规的定型手术^[18]。

3.2 右半肝内胆管结石合并狭窄 尤其合并肝叶段的萎缩,而左半肝和肝尾状叶正常或代偿增大,可切除萎缩的右半肝^[19]。肝内胆管结石的规则性右半肝切除,较其他肝脏疾病[如肝血管瘤、原发性肝癌等]的不规则性肝切除往往存在更大的风险。因这类患者往往同时存在胆汁性肝硬化、门脉高压甚至严重胆道感染等情况,肝功能差,规则性肝切除可能引起患者术后肝功能衰竭等严重并发症。因肝组织的不对称萎缩及增生,患者肝叶或肝段往往存在变形移位,术中准确判定肝中裂的走向常有一定困难,术中切断每一支肝内大的血管分支时应特别小心,避免损伤左肝静脉及左肝门静脉主干^[20]。术者需有丰富的经验和娴熟的技巧。若术前评估患者肝功能差,则应制定简单的术式,如仅行胆道探查取石、置管引流术,并辅以术中术后胆道镜取石,以防止术后肝功能衰竭等并发症的发生。

3.3 合并肝门部(I级)胆管狭窄 肝内胆管结石合并肝门部胆管狭窄的患者临床亦较常见,该类患者处理往往较为棘手,手术的关键是完整暴露肝门部狭窄胆管的近远端。应充分显露左右肝管,切开狭窄环,彻底清除狭窄近端的结石,然后将狭窄的左右肝管重新塑形,行胆管空肠Roux-en-Y吻合术^[21]。若左右肝管主干狭窄,同时伴有肝总管上端狭窄,应逐一切开狭窄,直达狭窄以上扩张的肝胆管,最后重塑管道结构。对右后叶胆管内结石不易取净或者伴有胆管狭窄的病例,应行肝右后叶部分切除。对孤立的右后叶胆管结石,经肝门胆管处无法取出时,可经肝实质表面切开取出结石。有些病例由于肝门位置

高或肝方叶肥大使肝门显露困难,则可采用肝门板分离使肝门下降或肝方叶切除、部分切除或切开而显露左肝管起始部。在充分的显露条件下完成狭窄段胆管完全切开、整形及胆肠吻合术^[22]。行Roux-en-Y胆管空肠吻合时^[23],狭窄胆管均应切开,强调解决胆管狭窄,将胆管狭窄处切开、整形或切除胆管狭窄段,不能在吻合口上下遗留未经纠正的狭窄,上方梗阻也应彻底解除,并取尽结石。

3.4 合并胆总管结石者 合并胆总管结石者应切开胆总管探查取石,术中胆道镜取出肝内胆管结石^[24],并放置T管引流,以利于术后再用胆道镜取出肝内残余结石。

3.5 全肝内胆管广泛结石 全肝内胆管广泛结石的病例可选用多方位、多区段肝部分切除^[25]。对病变较轻的一侧,可仅行肝部分切除或肝实质切开取石,经肝断面和切开胆管取石。而对于结石集中、肝纤维化严重,尤其是Ⅱ级以上胆管狭窄的患者,则应实施肝部分切除。多方位、多区段肝部分切除术有利于复杂病例多处病灶的清除,同时切除肝实质相对较少,能有效的保护肝脏功能。全肝内胆管充满结石,无法取净,且肝功能严重受损,可考虑施行肝移植^[26]。

4 纤维胆道镜在肝内胆管结石合并狭窄中的应用

纤维胆道镜取石术的临床开展,大大丰富了肝内胆管结石的治疗方法,而纤维胆道镜也成为一种重要的术中、术后胆道检查及治疗方法^[27],对肝内结石合并狭窄的诊断和治疗具有重要的辅助作用^[28]。B超引导下纤维胆道镜取石,由于纤维胆道镜的镜身具有自由可曲性和取石网篮的特殊结构,使那些难取的肝内结石被清除^[29]。目前胆道镜治疗肝内胆管狭窄主要是扩张和扩张后支撑,扩张的成功率不高,狭窄有一定的复发率^[30]。临床上根据狭窄的程度分为两类,一类称为膜状狭窄,即为一层薄膜附于胆管壁,中央有狭窄开口,临床最为常见,该类狭窄影响胆汁排泄并将结石阻于上方;另一类胆管狭窄较少见,管腔细长,往往超过0.5 cm,称管状狭窄。解除狭窄是肝内胆管结石的治疗的关键,只有解除狭窄,才能取净结石、通畅引流,从而达到根治的目的。解除胆道狭窄方面,纤维胆道镜可直视、能弯曲、创伤小、安全易行,有得天独厚的优势,能全面了解狭窄的程度并进行相应治疗,大大弥补了手术的缺陷^[31]。目前胆道镜下胆管狭窄的治疗方法主要有以下几种:通过活检

钳扩张、胆道镜反复通过或套取小结石拉取扩张狭窄胆管、导管扩张和气囊扩张。术中胆道镜的应用弥补了常视手术器械不能随意弯曲的缺点,手术亦为胆道镜治疗创建了通入深部胆道的捷径,联合使用常达事半功倍的作用^[32]。总之,术中胆道镜是一种非常直观的诊断方法,不增加手术创伤,能明视胆管内病理状况,确定胆管扩张或狭窄的范围与程度,胆管黏膜的改变、肝胆管分支开口结石的分布等,同时能辨别胆管结石、肿瘤和异物,对制订合适的手术方案有重要的参考价值。

5 结论

肝胆管结石治疗基本原则是“清除病灶、取净结石、去除狭窄、通畅引流”,“清除病灶”是手术治疗的核心。肝叶(段)切除、狭窄胆管切开整形、肝胆管空肠吻合、术中及术后纤维胆道镜取石等措施的综合应用是治疗肝内胆管结石合并胆管狭窄的理想途径,其中以肝叶(段)切除应用最为广泛。左肝叶切除术目前已成为治疗肝内胆管结石最常用的肝部分切除手术类型,能够集中切除病灶,并同时解决胆道结石和胆管狭窄等问题。总之,术前进行详尽的影像学检查,明确结石及胆管狭窄所处的具体位置,针对不同患者的病情,制定恰当的个体化治疗方案尤为重要。当然,术中或术后配合使用纤维胆道镜取石也具有重要的治疗价值,常可起到事半功倍的作用。

6 参考文献

- 1 Sheen-Chen SM, Cheng YF, Chen FC, Chou FF, Lee TY. Ductal dilatation and stenting for residual hepatolithiasis: a promising treatment strategy. *Gut* 1998; 42: 708-710
- 2 Suzuki Y, Mori T, Abe N, Sugiyama M, Atomi Y. Predictive factors for cholangiocarcinoma associated with hepatolithiasis determined on the basis of Japanese Multicenter study. *Hepatol Res* 2012; 42: 166-170
- 3 Li F, Zhou Y, Cheng N, Mao H, Jiang L, Li N, Li Q, de Jong MC, Pawlik TM. Epidermal growth factor receptor as a target for anti-proliferative treatment of proliferative cholangitis in hepatolithiasis. *J Surg Res* 2011; 166: 87-94
- 4 Deniz K, Torun E, Celikbilek M, Sözüer E. Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma associated with hepatolithiasis: report of a case. *Surg Today* 2011; 41: 591-595
- 5 Sheen-Chen SM. Hepatolithiasis. *Ann Surg* 1995; 222: 758-760
- 6 Tsui WM, Chan YK, Wong CT, Lo YF, Yeung YW, Lee YW. Hepatolithiasis and the syndrome of recurrent pyogenic cholangitis: clinical, radiologic, and

■应用要点

认识到肝内胆管结石治疗的复杂性,术前进行详尽的影像学检查,并据此制定恰当的个体化治疗方案。

■同行评议

本文结合治疗体会探讨肝内胆管结石合并胆管狭窄的诊断和治疗问题,认为术前进行详尽的影像学检查,明确结石及胆管狭窄所处的具体位置,针对不同患者的病情,制定恰当的个体化治疗方案尤为重要,具有一定的临床意义。

- 7 Yang T, Lau WY, Lai EC, Yang LQ, Zhang J, Yang GS, Lu JH, Wu MC. Hepatectomy for bilateral primary hepatolithiasis: a cohort study. *Ann Surg* 2010; 251: 84-90
- 8 Chen Z, Gong R, Luo Y, Yan L, Wen T, Cheng N, Hu B, Shu Z, Liu X, Hu W, Pen B, Wu H, Tian B, Mai G, Zeng Y. Surgical procedures for hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 134-137
- 9 Liu ZY, Zhou YM, Shi LH, Yin ZF. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with hepatolithiasis: a case-control study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011; 10: 626-631
- 10 He XX, Chang Y, Meng FY, Wang MY, Xie QH, Tang F, Li PY, Song YH, Lin JS. MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncogene* 2012; 31: 3357-3369
- 11 Li HY, Zhou SJ, Li M, Xiong D, Singh A, Guo QX, Liu CA, Gong JP. Diagnosis and cure experience of hepatolithiasis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma in 66 patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 725-729
- 12 黄志强. 胆道外科手术学. 北京: 人民军医出版社, 1993: 20-40
- 13 Meng FY, Chen ZS, Han M, Hu XP, Zhou P. An improved purification approach with high cell viability and low cell loss for cryopreserved hepatocytes. *Cryobiology* 2010; 60: 238-239
- 14 Jiang H, Wu H, Xu YL, Wang JZ, Zeng Y. An appraisal of anatomical and limited hepatectomy for regional hepatolithiasis. *HPB Surg* 2010; 2010: 791625
- 15 Meng FY, Chen ZS, Han M, Hu XP, He XX, Liu Y, He WT, Huang W, Guo H, Zhou P. Porcine hepatocyte isolation and reversible immortalization mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1660-1664
- 16 Senda Y, Nishio H, Ebata T, Yokoyama Y, Igami T, Sugawara G, Nagino M. Hepatolithiasis in the hepatic hilum mimicking hilar cholangiocarcinoma: report of a case. *Surg Today* 2011; 41: 1243-1246
- 17 Mou Y, Zhou H, Xu B. Single gigantic calculus of common bile duct and multiple hepatolithiasis. *Am J Surg* 2011; 202: e38-e40
- 18 董家鸿, 郑树国, 陈平, 韩殿冰. 肝胆管结石病诊断治疗指南. *中华消化外科杂志* 2007; 6: 156-161
- 19 Balandraud P, Gregoire E, Cazeres C, Le Treut YP. Right hepatolithiasis and abnormal hepatic duct pathologic features. *Semin Liver Dis* 2011; 31: 33-48
- 20 卢军华, 杨田, 杨广顺, 吴孟超. 右半肝切除治疗右侧及双侧肝内胆管结石. *第二军医大学学报* 2008; 29: 609-613
- 21 Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Furukawa K, Mitsuhashi N, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Miyazaki M. Intrahepatic cholangiojejunostomy (Longmire procedure) for recurrent bilioenteric anastomotic stricture with hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 1023-1025
- 22 Ling XF, Xu Z, Wang LX, Hou CS, Xiu DR, Zhang TL, Zhou XS. Long-term outcomes of choledochoduodenostomy for hepatolithiasis. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 137-141
- 23 Zhang XJ, Jiang Y, Wang X, Tian FZ, Lv LZ. Comparatively lower postoperative hepatolithiasis risk with hepaticocholedochostomy versus hepaticojejunostomy. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 38-43
- 24 黄志强. 在微创外科时代对肝内胆管结石外科治疗的再认识. *中国普外基础与临床杂志* 2006; 13: 371-372
- 25 黄志强. 肝内胆管结石治疗演变和发展. *中国实用外科杂志* 2009; 29: 537-539
- 26 Chen ZS, Meng FY, Chen XP, Liu DG, Wei L, Jiang JP, Du DF, Zhang WJ, Ming CS, Gong NQ. Combined en bloc liver/pancreas transplantation in two different patients. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2552-2555
- 27 黄志强. 当代胆道外科学. 上海: 科学技术文献出版社, 1998: 214
- 28 Pan W, Xu E, Fang H, Deng M, Xu R. Surgical treatment of complicated hepatolithiasis using the ultrasound-guided fiberoptic choledochoscope. *Surg Endosc* 2011; 25: 497-502
- 29 Tu JF, Jiang FZ, Zhu HL, Hu RY, Zhang WJ, Zhou ZX. Laparoscopic vs open left hepatectomy for hepatolithiasis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2818-2823
- 30 Lai EC, Ngai TC, Yang GP, Li MK. Laparoscopic approach of surgical treatment for primary hepatolithiasis: a cohort study. *Am J Surg* 2010; 199: 716-721
- 31 麻树人, 高峰, 官照洁, 杨琳, 常莉雅, 胡馨予, 袁爱娇, 孙亚男, 金晓龙, 孟威宏, 张宁, 杨卓, 赵云峰, 赵志峰, 张迎春, 潘汝明, 韩笑. 经十二指肠镜治疗肝内胆管结石283例临床研究. *中国实用内科杂志* 2009; 29: 735-737
- 32 文剑波, 文萍, 龚敏, 韩明, 李兴, 刘立玺. 内镜下肝内外胆管结石同步治疗方法探讨. *中国内镜杂志* 2009; 15: 736-737

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

肝内胆管结石合并胆道感染的细菌谱

贾淑芹, 福泉, 金山

贾淑芹, 内蒙古医科大学附属医院外科实验室 内蒙古自治区呼和浩特市 010050

福泉, 内蒙古医科大学附属医院检验科 内蒙古自治区呼和浩特市 010050

金山, 内蒙古医科大学附属医院普外科 内蒙古自治区呼和浩特市 010050

贾淑芹, 副教授, 研究生导师, 主要从事消化道肿瘤及其他消化系统疾病的基础与临床研究。

作者贡献分布: 由金山指导写作方向; 贾淑芹与福泉查询资料, 由贾淑芹完成文章写作。

通讯作者: 金山, 教授, 主任医师, 010050, 呼和浩特市通道北街1号, 内蒙古医科大学附属医院普外科, jinshangood@yahoo.com.cn
电话: 0471-6636914

收稿日期: 2012-07-27 修回日期: 2012-11-20

接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2012-12-08

Bacterial spectrum of hepatolithiasis with biliary tract infection

Shu-Qin Jia, Quan Fu, Shan Jin

Shu-Qin Jia, Department of Surgery Laboratory, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China
Quan Fu, Department of Clinical Laboratory Center, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Shan Jin, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Shan Jin, Professor, Chief Physician, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, 1 Tongdao North Street, Hohhot 010050, Inner Mongolia Autonomous Region, China. jinshangood@yahoo.com.cn

Received: 2012-07-27 Revised: 2012-11-20

Accepted: 2012-12-03 Published online: 2012-12-08

Abstract

Hepatolithiasis is prevalent in Far East and Southeast Asian countries, and it is usually associated with cholestasis and bacterial infection and causes repeated episodes of acute cholangitis. If not properly treated, hepatolithiasis can cause serious complications and even death. In addition to removal of stones and management of cholestasis by surgery or interventional radiological treatment, timely and effective antibiotic treatment also plays a crucial role in the treatment of hepatolithiasis. This paper aims to clarify the bacterial spectrum of hepatolithiasis with biliary tract

infection. By reviewing relevant papers published over the past 30 years, we discovered that both gram-negative bacteria, in which *E. coli* was most frequent, followed by *Klebsiella* sp and *Pseudomonas* sp, and gram-positive bacteria, mainly *Enterococcus* sp, were responsible for biliary tract infection. *Bacteroides* sp and *Clostridium* were most frequently found anaerobes. Sometimes, anaerobes were found together with aerobes. The purpose of this article is to elaborate the bacterial spectrum of hepatolithiasis with biliary tract infection and provide the appropriate choice of antibiotic therapy.

Key Words: Bacterial spectrum; Hepatolithiasis; Biliary tract infection; Antibiotics

Jia SQ, Fu Q, Jin S. Bacterial spectrum of hepatolithiasis with biliary tract infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3349-3353

摘要

肝内胆管结石(hepatolithiasis, HL)是远东及东南亚地区盛行的疾病,通常伴有胆汁淤积和细菌感染、引起急性反复发作的胆管炎。除清除病灶、取净结石、通畅引流等核心治疗外,及时有效的抗生素应用至关重要。为阐述HL合并胆道感染的细菌谱、为临床治疗提供理论依据,我们总结了30年间国内外相关研究及我院结果,发现胆道感染主要与大肠埃希氏菌、克雷伯菌、假单胞菌等革兰氏阴性菌及粪肠球菌等革兰氏阳性菌有关,有时厌氧菌和需氧菌合并感染。

关键词: 细菌谱; 肝内胆管结石; 胆道感染; 抗生素

贾淑芹, 福泉, 金山. 肝内胆管结石合并胆道感染的细菌谱. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3349-3353

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3349.asp>

0 引言

肝内胆管结石(hepatolithiasis, HL)是指左右肝管汇合部以上各胆管内的结石,成分主要是胆红素钙结石^[1]。他可以单独存在,也可以与肝外胆管结石并存。HL急性期并发症主要是胆道感染,

■背景资料

肝内胆管结石急性期常合并胆道感染,如不经正确治疗,患者将发生严重的感染性并发症,继而发生胆管坏死、门静脉高压症,或者死于肝功能衰竭或败血症。因此,了解其细菌谱并提供适当的抗生素治疗选择尤为重要。

■同行评议者

王德盛, 副主任医师, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

■研发前沿

肝内胆管结石合并胆道感染的细菌谱在过去的30年来虽然没有较大变化,但是在不同地域,由于抗生素应用的规范程度不同,细菌的耐药性却不甚明了。

感染可能来源于细菌,还包括真菌、寄生虫、病毒等。如不经正确治疗,患者将发生重症肝胆管炎、胆源性肝脓肿及伴随的感染性并发症^[2],继而发生胆管坏死、门静脉高压症,或者死于肝功能衰竭或败血症^[1,3]。清除病灶、取净结石、去除狭窄、通畅引流及介入治疗是HL最有效的治疗方法。然而及时有效的抗生素治疗也至关重要,但HL合并胆道感染的细菌谱较为复杂。本文追溯过去30年间的国内外相关文献,结合我院细菌培养结果,旨在阐述HL合并胆道感染的细菌学信息并提供适当的抗生素治疗选择。

1 HL合并胆道感染的细菌学检测

根据细菌培养结果选用正确的抗生素是治疗的关键。在术中,切开肝内胆管之前,应用细针穿刺法,从胆总管中吸取胆汁5 mL,针头立即加帽,随即送实验室进行常规需氧和厌氧培养^[4]。需氧菌培养72 h、厌氧菌培养5 d后,如果在两种培养基中检测不到细菌克隆,结果定为阴性,如果任何一个培养基中有一个克隆的话,即为培养阳性。继续分离阳性培养基中的单个克隆培养,应用化学检测法鉴定细菌的种类。应用经内镜逆行胆管造影或经皮肝穿刺胆管造影过程中亦可收集胆汁进行常规培养,但是穿刺过程中污染在所难免^[5]。血培养是较新的创伤较小的一种检测方式,但是Sahu等^[6]研究发现,同一组标本相比胆汁中细菌的阳性检出率为92.6%、单个标本的多菌种检出率为69.5%,而血培养相应两个指标仅为26.4%和2.2%,其阳性率较胆汁培养要低得多。对于难于检测的厌氧菌,有学者应用PCR-SSCP的方法检测,结果准确、迅速^[7]。此外,术中取出结石,以生理盐水反复冲洗掉表面的污染物之后,将结石研碎成粉末后平铺于培养瓶表面进行培养,其他的步骤与细菌培养相同^[8]。扫描电镜、透射电镜也应用到胆石细菌的检测中^[8]。

2 HL合并胆道感染的细菌谱

HL在欧美国家的发病率逐渐增高,并且该病手术治疗及并发症方面的处理也日臻成熟^[9-11]。但在细菌谱方面的研究不多见。早在20世纪80年代,美国学者Tabata研究发现,当时与日本及东亚国家的情况相似,美国HL患者并发胆道感染的发生率非常高,达96.3%(52/54),在胆汁培养的细菌中,检出频率最高的依次为:大肠埃希杆菌、克雷伯菌、链球菌、绿脓杆菌^[1]。由于在胆

红素钙结石病例中能够频繁地分离出大肠杆菌,因此大肠杆菌被认为是导致胆红素钙结石形成的罪魁祸首。

在日本、韩国及中国香港,HL分别以原发性HL、复发性化脓性胆管炎及东方肝胆结石病,即同一疾病的不同方面来称谓。原发性HL指病理变化,复发性化脓性胆管炎强调临床表现和化脓性炎症,东方肝胆结石病突出其民族偏好和神秘性。20世纪80年代末,亚洲的学者也开始了本病的细菌谱研究,Fu等^[12]在74.0%的病例中均检测到厌氧菌,以杆菌为主,而98.0%的病例都为需氧菌感染。针对厌氧菌感染,当时的抗生素以甲硝唑为首选。日本学者指出在所分离出来的需氧菌中,主要为大肠杆菌和克雷伯菌,还包括混合感染。而厌氧菌不多见,一般都与需氧菌混合出现,并强调胆汁应在经皮肝穿刺胆管造影中吸取出来后立即培养^[13]。对于一些对培养条件比较挑剔的病原体,如难于培养的厌氧菌中的梭菌和脆弱拟杆菌,可用PCR及SSCP法检测,Liu等^[7]发现分别有83%和42%的阳性率,而且这种检测方法较培养法更方便快捷。对我院近5年123例肝内胆管结石患者胆汁标本进行培养,细菌阳性率为69.1%(85/123),共获得149株病原菌。其中排在第5位的细菌分别是大肠埃希菌(32.2%)、肠球菌(20.8%)、克雷伯菌(11.4%)、假单胞菌(7.4%)、肠杆菌(6.0%)。台湾Chang等^[14]总结了10年的病例,对1394例胆道感染患者的细菌谱进行了分析,其中肝内结石患者的胆汁细菌阳性培养率为67%,是入组所有胆道疾病,包括胆囊结石、胆总管结石中阳性率最高的。其中合并胆管炎的细菌培养阳性率远远高于无胆管炎者(75% vs 51%, $P=0.011$)。细菌谱以革兰氏阴性菌(74%)为主,主要为大肠埃希杆菌(36%)、克雷伯氏菌(15%),革兰氏阳性菌(15%)中,主要为肠球菌(6%)、葡萄球菌、链球菌。偶尔发现的厌氧菌以类杆菌和梭菌为主。混合型需氧菌、混合型厌氧菌及混合厌氧需氧菌的发生频率分别为7%、12%和9%。李绍强等^[15]在胆汁标本中共获得141株细菌,分别归属于18个菌属,革兰氏阴性菌共87株(61.7%),革兰氏阳性菌共54株(38.3%)。检出细菌中构成比最高的前4位菌属分别是大肠埃希杆菌属43株(30.5%)、粪肠球菌属42株(29.8%)、单胞菌属21株(14.9%)、克雷伯菌属12株(8.5%)。Wu等^[8]分别应用胆汁及结石的细菌培养,鉴定了两者检测的阳性率相近,细菌谱排在前三位的分别是球菌、大肠埃希

■创新盘点

本文总结了国内外肝内胆管结石合并胆道感染的相关文章,对该并发病的细菌谱及其抗生素应用进行了述评。

表 1 肝内胆管结石合并胆道感染的细菌谱

细菌	胆汁内阳性率(%)
<i>Aerobes</i>	
<i>Escherichia coli</i>	30.5–36.0
<i>Klebsiella</i>	8.5–15.0
<i>Enterobacter</i>	5.0–9.1
<i>Pseudomonas</i>	0.5–14.9
<i>Streptococcus spp.</i>	3.0–10.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.6–29.8
<i>Anaerobes</i>	
<i>Clostridium</i>	3.0–12.7
<i>Bacteroides</i>	0.5–8.0

氏菌及克雷伯氏菌。2000年, Sheen-Chen等^[4]做了一项150例HL患者的胆汁细菌分析, 结果发现, 所有患者的胆汁中均有细菌感染, 主要为革兰氏阴性菌, 如克雷伯氏菌、大肠埃希杆菌、假单胞菌; 革兰氏阳性菌主要为肠球菌, 类杆菌是厌氧菌中最多的。由于发现的肠道菌群居多, 因此一旦HL患者出现急性胆管炎的症状时, 首先要应用抗肠道菌群的抗生素控制症状, 然后再逐渐根据细菌培养的结果及相应的临床症状调整治疗方案。现将细菌谱归纳如下(表1)。

总体来讲, 30年来, 胆道感染的细菌谱在时间和地域上没有较大变化, 需氧菌中大肠埃希氏菌、克雷伯氏菌、肠球菌、链球菌、肠杆菌较为常见, 而厌氧菌以梭菌和类杆菌为常见, 一般厌氧菌都是伴随着需氧菌存在的。一旦多种细菌联合感染者, 患者容易爆发急性胆管炎^[16]。另外, 对于继发急性胆管炎的患者还要考虑是社区获得还是院内继发感染。当患者为社区获得, 一般的致病菌为大肠杆菌、肺炎克雷伯菌和肠球菌, 如果是院内感染, 通常都是术后引流或者留置支架的患者, 这时要考虑的一般是多药耐药的菌群: 如甲氧西林耐药菌的金黄色葡萄球菌、万古霉素耐药的肠球菌和假单胞菌等。

3 HL合并胆道感染的抗生素应用

临床上, 一旦诊断HL合并胆道感染, 先凭经验选择广谱的抗菌剂, 另一方面做细菌培养及药敏实验, 而且要认真考虑以下几种因素^[16]: (1)药物对于致病菌的抗菌活性; (2)胆道感染的严重程度; (3)是否同时存在肝肾疾病; (4)近一年来使用抗生素的病史; (5)当地的抗菌谱; (6)抗菌药物的胆道渗透性。使用当地经验性抗菌药物时, 应将抗菌谱缩到最窄, 尽量避免因“超级感染”或

者细菌耐药导致治疗失败。根据胆汁和血液中细菌培养及药敏实验结果, 认真选择抗菌药物是进一步治疗的关键。中到重度急性胆道感染的患者应该接受至少5-7 d的治疗, 治疗过程中, 根据疾病的解剖学特点、有无细菌培养阳性以及临床反应, 需要适当地延长治疗周期, 而对于大多数患者来说, 一般程度的胆道感染仅需要2-3 d的抗生素治疗, 长时间抗炎治疗会增加细菌耐药的风险。

对于HL合并胆道感染又有胆管梗阻的患者, 要考虑到胆管梗阻会影响抗菌药物的吸收。因此, 一旦发生胆道梗阻, 经胆管吸收的药物都无法进入胆道, 需要给药同时行胆道引流, 解除梗阻, 一旦引流畅通, 药物会立即充分吸收^[17]。

那么, 药物的剂量该如何调节? 药物剂量应调整至对患者肝功、肾功能的影响最小。关于药物剂量的调整, 可参考“桑福德的抗生素治疗指导”和“古德曼、吉尔曼的药物治疗基础^[18]”, 现将总结的参考药物做一归纳^[16,19](表2)。

但是在治疗方案的选择上, 由于各种原因不可能完全遵照以上进行。近30年来, 细菌耐药的情况在一些抗生素应用普遍及滥用的国家和地区逐渐变得严重。2000年, Sheen-Chen等^[4]认为大多数的需氧革兰氏阴性菌对氨基糖甙类药物均敏感、变形杆菌、大肠杆菌、克雷伯菌对头孢噻吩、头孢孟多均敏感; 肠球菌、链球菌对氨苄西林、青霉素敏感; 大多数厌氧菌对哌拉西林、替卡西林敏感。随着临床常用抗菌药物的耐药性明显增加, 单一的抗生素治疗胆道感染往往不够有效^[5]。2002年, 美国仍然应用经典的治疗方案, 使用青霉素类如氨苄西林, β -内酰胺酶抑制剂舒巴坦及氨基糖苷类药物^[9], 在我国已经发现细菌对青霉素类、头孢类、喹诺酮类、大环内酯类抗生素敏感性普遍下降, 对 β -内酰胺类抗生素亚胺培南、美罗培南、万古霉素类、新糖肽类抗生素替考拉宁仍保持相当高的敏感性。万古霉素已是所谓的最后一线药物, 由于抗生素过于滥用, 甚至已出现了可抵抗万古霉素的细菌, 如万古霉素抗药性肠球菌, 造成传染病及感染性疾病防治的隐患。在印度, 近年来对抗生素的使用情况亦与中国相仿, 第3代头孢菌素和喹诺酮类的环丙沙星也已成为治疗HL合并胆道感染的无效药物^[6]。

一般来说, 血培养出的细菌种属与胆汁培养的种属大致相同, 血液中细菌培养阳性率为21%-71%, 患有菌血症的患者通常对治疗方案

■应用要点

本文详细阐述了肝内胆管结石合并胆道感染的细菌谱及不同地域的抗生素选择, 对该并发症的治疗具有指导意义。

■名词解释

耐药性: 又称抗药性, 指微生物、寄生虫以及肿瘤细胞对于化疗药物作用的耐受性, 耐药性一旦产生, 药物的化学作用就明显下降。

表 2 肝内胆管结石合并轻到中度胆道感染推荐用药

代表药物	
合并轻中度胆道感染	
第一代头孢菌素	头孢唑林钠
第二代头孢菌素	头孢美唑、头孢替安、拉氧头孢钠、氧氟头孢钠
青霉素/ β -内酰胺酶抑制剂	氨苄西林/舒巴坦
合并中重度感染	
首选	
广谱青霉素/ β -内酰胺酶抑制剂(作为单剂使用)	氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦
第三、四代头孢菌素	头孢哌酮/舒巴坦、头孢三嗪、头孢他啶
单酰胺环类	氨基南
上面任一种+甲硝唑(治疗厌氧菌)	
次选	
氟喹诺酮类	环丙沙星、左氧氟沙星、帕珠沙星
上面任一种+甲硝唑(治疗厌氧菌)	
碳青霉烯类	美罗培南、亚胺培南/西拉司丁钠、多尼培南

耐药, 也是患者住院周期长、术后肾衰竭、死亡率高的主要原因, 这些发现都着重强调了抗败血症、菌血症治疗的重要性。另外合并多种细菌感染, 尤其是厌氧菌合并需氧菌感染的情况下, 如不及时治疗, 患者的预后较差。

4 结论

随着居民生活环境、生活方式及饮食习惯改变, HL的发病率在逐年降低, 但是HL合并感染的临床凶险是不容忽视的。HL合并胆道感染的细菌谱, 需氧菌中大肠埃希氏菌、克雷伯氏菌、肠球菌、链球菌、肠杆菌较为常见, 而厌氧菌以梭菌和类杆菌为常见, 一般厌氧菌都是伴随着需氧菌存在。临床经验性给药时, 由于致病菌多为革兰氏阴性菌, 故而一般首先考虑应用革兰氏阴性菌敏感的抗生素, 同时进行胆汁、血液样本检测, 明确感染病菌。针对性抗菌药物的治疗, 避免进一步耐药菌株的产生^[20]。如给药3-5 d后, 临床症状改善不明显的患者, 应考虑到合并有革兰氏阳性菌感染, 此时可改用或加用针对革兰氏阳性菌敏感的抗生素。需要指出的是, 如果临床经验性抗生素治疗效果较好, 细菌培养结果不明确时, 可在严密观察下继续原方案进行处理, 也能取得较好的结果。

5 参考文献

- 1 Tabata M, Nakayama F. Bacteriology of hepatolithiasis. *Prog Clin Biol Res* 1984; 152: 163-174
- 2 李秉路, 郑朝纪, 刘卫, 洪涛, 徐协群, 何小东, 张震寰, 张建希, 赵玉沛. 结石性急性胆管炎的治疗. *中国医学科学院学报* 2011; 33: 88-91

- 3 Nakanuma Y. Tutorial review for understanding of cholangiopathy. *Int J Hepatol* 2012; 2012: 547840
- 4 Sheen-Chen S, Chen W, Eng H, Sheen C, Chou F, Cheng Y, Lee T. Bacteriology and antimicrobial choice in hepatolithiasis. *Am J Infect Control* 2000; 28: 298-301
- 5 Negm AA, Schott A, Vonberg RP, Weismueller TJ, Schneider AS, Kubicka S, Strassburg CP, Manns MP, Suerbaum S, Wedemeyer J, Lankisch TO. Routine bile collection for microbiological analysis during cholangiography and its impact on the management of cholangitis. *Gastrointest Endosc* 2010; 72: 284-291
- 6 Sahu MK, Chacko A, Dutta AK, Prakash JA. Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in acute bacterial cholangitis. *Indian J Gastroenterol* 2011; 30: 204-208
- 7 Liu Y, Lam K, Tang YJ, Gumerlock PH, Lee DK, Kim MH, Lee SP, Silva J, Leung JW. Anaerobic bacteria and intrahepatic stones: detections of *Clostridium* sp. and *Bacteroides fragilis*. *Chin Med J (Engl)* 2000; 113: 858-861
- 8 Wu SD, Yu H, Sun JM. Bacteriological and electron microscopic examination of primary intrahepatic stones. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 228-231
- 9 Al-Sukhni W, Gallinger S, Pratz A, Wei A, Ho CS, Kortan P, Taylor BR, Grant DR, McGilvray I, Catral MS, Langer B, Greig PD. Recurrent pyogenic cholangitis with hepatolithiasis--the role of surgical therapy in North America. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 496-503
- 10 Catena M, Aldrighetti L, Finazzi R, Arzu G, Arru M, Pulitanò C, Ferla G. Treatment of non-endemic hepatolithiasis in a Western country. The role of hepatic resection. *Ann R Coll Surg Engl* 2006; 88: 383-389
- 11 Kayhan B, Akdoğan M, Parlak E, Ozarslan E, Sahin B. Hepatolithiasis: a Turkey experience. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 28-32
- 12 Fu HQ. Anaerobes in biliary tract infection. *Zhonghua Waike Zazhi* 1989; 27: 454-456, 507
- 13 Suzuki Y, Kobayashi A, Ohto M, Tsuchiya Y, Saisho H, Kimura K, Ono T, Okuda K. Bacteriological study of transhepatically aspirated bile. Relation to cholangiographic findings in 295 patients. *Dig Dis*

- Sci 1984; 29: 109-115
- 14 Chang WT, Lee KT, Wang SR, Chuang SC, Kuo KK, Chen JS, Sheen PC. Bacteriology and antimicrobial susceptibility in biliary tract disease: an audit of 10-year's experience. *Kaohsiung J Med Sci* 2002; 18: 221-228
- 15 李绍强, 梁力建, 华赞鹏, 彭宝岗, 付顺军, 汪谦. 肝内胆管结石患者胆汁的细菌谱及临床意义. *中华普通外科学文献(电子版)* 2009; 3: 313-316
- 16 Tanaka A, Takada T, Kwarada Y, Nimura Y, Yoshida M, Miura F, Hirota M, Wada K, Mayumi T, Gomi H, Solomkin JS, Strasberg SM, Pitt HA, Belghiti J, de Santibanes E, Padbury R, Chen MF, Belli G, Ker CG, Hilvano SC, Fan ST, Liau KH. Antimicrobial therapy for acute cholangitis: Tokyo Guidelines. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 59-67
- 17 Sales JE, Sutcliffe M, O'Grady F. Excretion of clindamycin in the bile of patients with biliary tract disease. *Chemotherapy* 1973; 19: 11-15
- 18 Gilbert DN, Moellering RC, Sande MA. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy, 2003. 33rd ed. Hyde Park, Vt Antimicrobial Therapy Inc. 2003; 123-124
- 19 蔡秀军, 刘金钢, 张学文. 胆道感染及其处理原则. *中国实用外科杂志* 2011; 31: 877-879
- 20 Cai XJ, Wang YF, Liang YL, Yu H, Liang X. Laparoscopic left hemihepatectomy: a safety and feasibility study of 19 cases. *Surg Endosc* 2009; 23: 2556-2562

■同行评议

本文总结30年间国内外相关研究及作者所在医院胆道感染的细菌谱, 对临床医师有一定的参考价值。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$; 第3套为³ $P<0.05$, ⁴ $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应在表的右上方, 表内个数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

胰腺癌干细胞差异microRNAs的表达及生物信息学

江建新, 高珊, 王敏, 李旭, 孙诚谊

■背景资料

胰腺癌进展快、预后差的主要原因 是其早期转移、对传统的治疗抵抗以及较易复发。当前的研究表明胰腺癌干细胞是上述现象的理论基础。microRNA/miRNA在肿瘤干细胞的“干性”相关基因调控方面发挥重要作用, 被称为干细胞miRNAs。研究胰腺癌干细胞相关microRNAs可能有助于揭示胰腺癌干细胞发生的部分分子机制, 寻找新的治疗靶点。

江建新, 孙诚谊, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550001

高珊, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550001
王敏, 李旭, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科中心 湖北省武汉市 430030

江建新, 副主任医师, 主要从事肝胆胰脾疾病的基础与临床研究。国家自然科学基金资助项目, No. 81160311

贵州省科技厅贵阳医学院社发联合基金资助项目, No. 黔科合[2010]3171

贵阳市科技局基金资助项目, No. 筑科合[2011103]22号

贵州省肝胆疾病研究科技创新人才团队全资助项目, No. 黔科合人才团队[2010]4010

作者贡献分布: 主要实验、资料分析、统计及文章撰写由江建新完成; 研究设计、文章修改及审阅由孙诚谊完成; 资料分析、样本处理及生物信息学分析由王敏、李旭及高珊完成。

通讯作者: 孙诚谊, 教授, 550001, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院肝胆外科。chengyisun@medmail.com.cn
电话: 0851-6773083

收稿日期: 2012-09-13 修回日期: 2012-11-11

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Identification of differentially expressed microRNAs in pancreatic cancer stem cells

Jian-Xin Jiang, Shan Gao, Min Wang, Xu Li, Cheng-Yi Sun

Jian-Xin Jiang, Cheng-Yi Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Shan Gao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Min Wang, Xu Li, Department of Biliary-Pancreatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160311; the Joint Social Development Foundation of Science and Technology Department of Guizhou Province and Guiyang Medical College, No. [2010]3171; the Foundation of Guiyang City Science and Technology Bureau, No. [2011103]22; the Project of Liver and Pancreatic Diseases Technological Innovation Talent Team of Guizhou Province, No. [2010]4010

Correspondence to: Cheng-Yi Sun, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 28 Guiyi Street, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. chengyisun@medmail.com.cn

Received: 2012-09-13 Revised: 2012-11-11

Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To screen and identify differentially expressed miRNAs in pancreatic cancer stem cells and to analyze them by bioinformatics.

METHODS: Total RNA was prepared from MIA-PaCa2 (TIC^{high}) and BxPc-3 (TI^{low}) cells. After quality identification and fluorescent labeling, the RNA samples were hybridized with Agilent human miRNA microarrays. Raw data were normalized using Quantile algorithm and Gene Spring Software 11.0. Part of differentially expressed miRNAs were validated by SYBR Green real-time PCR. Sanger database was used to predict target genes for differentially expressed miRNAs. Gene Ontology database and KEGG database were used for GO annotations and Pathway annotations of target genes, respectively.

RESULTS: A total of 940 miRNAs were identified and among them 91 were differentially expressed ($P < 0.05$, fold change ≥ 2), including 45 up-regulated and 46 down-regulated ones in MIA-PaCa2 (TIC^{high}). Twenty-one miRNAs were validated by real-time PCR, and the results for 19 miRNAs were consistent with those of chip detection. 2 895 target genes were predicted for 91 differentially expressed miRNAs, and these genes were mainly involved in events, such as axon guidance, angiogenesis, and post-translational protein modification, and in pathways such as cancer, focal adhesion, Hedgehog signaling pathway, and MAPK signaling pathway.

CONCLUSION: Many differentially expressed miRNAs in pancreatic cancer stem cells have been identified, and their target genes are involved in a variety of biological events and in multiple signal pathways. These differentially expressed miRNAs may become new therapeutic targets for pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Stem cell; microRNA; Bioinformatics

Jiang JX, Gao S, Wang M, Li X, Sun CY. Identification of differentially expressed microRNAs in pancreatic cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3354-3360

摘要

目的: 筛选与胰腺癌干细胞相关的差异表达

■同行评议者

高国全, 教授, 中山大学中山医学院生物化学教研室

miRNAs, 并进行生物信息学分析.

方法: 以MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TI^{low})为研究胰腺癌干细胞的工具细胞制备总RNA, 经质量鉴定后进行荧光标记; 采用Agilent人类miRNA芯片进行杂交实验, 获得miRNA表达谱; 以Gene Spring Software 11.0软件和Quantile算法分析芯片实验数据, 筛选与胰腺癌干细胞相关的差异miRNAs; 荧光定量PCR验证部分差异表达miRNAs; 基于Sanger数据库预测差异miRNA靶基因, 基于Gene Ontology数据库进行GO注释, 基于KEGG数据库进行Pathway注释.

结果: 获得符合基因芯片实验质量标准的RNA样品, 基因芯片杂交及数据分析共鉴定到940个miRNAs, 得到91个差异表达miRNAs($P < 0.05$, fold change ≥ 2), 其中MIA-PaCa2(TIC^{high})中下调表达45个, 上调表达46个. 荧光定量PCR验证21条差异miRNAs, 其中19条均与芯片结果相符. TargetScan 6.0数据库靶基因预测共得到2 895条靶基因, GO注释显示他们主要涉及轴突导向、血管生成、转录后蛋白修饰等功能. Pathway注释显示主要涉及癌症途径、细胞-基质黏附途径、Hedgehog信号途径、MAPK信号途径等信号通路.

结论: 筛选出的胰腺癌干细胞相关差异表达miRNAs调控多种具有不同细胞功能和参与不同信号通路的基因, 有可能成为胰腺癌新的治疗靶点.

关键词: 胰腺癌; 干细胞; microRNA; 生物学信息

江建新, 高珊, 王敏, 李旭, 孙诚宜. 胰腺癌干细胞差异microRNAs的表达及生物信息学. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3354-3360

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3354.asp>

0 引言

胰腺癌是高度恶性、预后最差的恶性肿瘤之一, 5年生存率不到5%^[1]. 大多数患者因确诊时伴有局部和/或远处的侵袭、转移而丧失手术时机^[2], 即使临床手术根治性切除的胰腺癌患者术后也大多数因出现复发和远处转移预后极差, 其原因为术前就有微转移灶形成及其化疗抵抗^[3]; 胰腺癌的早期转移、对传统的治疗抵抗以及较易复发是其致死的关键因素. 肿瘤干细胞理论解释了上述现象. 胰腺癌干细胞研究表明^[4]: 在原发肿瘤里存在一个亚群细胞, 这群细胞具有

自我更新、分化潜能以及在异位重新成瘤能力; 同时, 这群细胞还具有侵袭转移和化疗抵抗特性. 最新的研究表明: 胰腺癌在形成之前通过上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)形成胰腺癌干细胞, 是其早期发生转移, 治疗抵抗, 复发的根本原因^[5]. microRNA/miRNA在肿瘤干细胞的“干性”相关基因调控方面发挥重要作用, 被称为干细胞miRNAs(stem cells miRNAs)^[6]. 已有的研究表明: 具有CD44⁺/CD24⁻表型的胰腺癌细胞具有肿瘤干细胞特性, 胰腺癌细胞系MIA-PaCa2的CD44⁺/CD24⁻表达率95.5%, 而BxPc-3的表达率17.5%. 因此, MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TI^{low})可以直接作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞, 不需要进一步富集^[7]. 本研究采用miRNA芯片技术, 以MIA-PaCa2(TIC^{high})和BxPc-3(TI^{low})为研究对象, 筛选胰腺癌干细胞相关的miRNAs, 并对其生物信息学分析, 为进一步研究胰腺癌干细胞的发生和调控机制, 寻找新的治疗靶点奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株BxPc-3(TI^{low})和MIA-PaCa2(TIC^{high})由本室保存; 细胞培养按照文献[8,9]采用DMEM培养基(Gibico公司), 含10%的56 °C热灭活胎牛血清, 25 mmol/L HEPES, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 青霉素50 U/mL及链霉素50 µg/mL.

1.2 方法

1.2.1 RNA抽提、纯化和质检: 采用mirVanaTM miRNA Isolation Kit(Ambion, Austin, TX, USA)(专用于抽提普通组织、细胞的miRNA)并且根据生产厂商提供的标准操作流程进行样品总的RNA抽提, 抽提所得总RNA经Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)电泳质检合格后备用.

1.2.2 miRNA芯片杂交、清洗、扫描及数据提取(由上海生物芯片工程有限公司完成): 按Agilent公司建议的方法与程序操作. 将符合芯片分析质量标准的总RNA样品用Cy3标记(miRNA Complete Labeling and Hyb Kit), 然后与Agilent人类miRNA芯片[Agilent human miRNA (8*15K) V12 Kit]55 °C, 20 r/min, 滚动杂交20 h. 杂交后的芯片清洗扫描, 洗片所用的试剂为Gene Expression Wash Buffer Kit(Agilent technologies, USA), 芯片结果采用Agilent Microarray Scanner(Agilent technologies, USA)进行扫描, 用Feature Extrac-

■ 研发前沿

目前关于胰腺癌干细胞相关microRNAs可见部分文献报道, 该文依据新近发表的2篇高质量文献, 采用芯片技术从一个方面来探讨胰腺癌干细胞相关microRNAs, 为后续分子机制研究奠定基础. 芯片技术在差异microRNAs筛选方面具有独特的优势.

■相关报道

Kallifatidis等研究,认为具有CD44⁺/CD24⁻表型的胰腺癌细胞具有肿瘤干细胞特性;胰腺癌细胞系MIA-PaCa2的CD44⁺/CD24⁻表达率为95.5%,而BxPc-3的表达率为17.5%;并认为MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TI^{low})可以直接作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞。

表1 部分差异miRNAs SYBR Green 荧光定量PCR引物设计

miRNAs	引物
U6	ttcgtgaagcgttccatatttt
hsa-miR-125b	tcctgagaccctaactgtga
hsa-miR-126	tcgtaccgtgagtaataatgcg
hsa-miR-1290	tggatttttgatcagggga
hsa-miR-140-3p	taccacagggtagaaccacgg
hsa-miR-140-5p	cagtggttttaccctatgtag
hsa-miR-148a	tcagtgcactacagaactttgt
hsa-miR-181a	acattcaacgctgtcggtgagt
hsa-miR-181b	aacattcattgtctgcggtgg
hsa-miR-195	tagcagcacagaaatattggc
hsa-miR-23b	atcacattgccagggtattacc
hsa-miR-27b	ttcacagtggctaagtctgc
hsa-miR-30a*	ctttcagtcggtatgttgcag
hsa-miR-362-5p	aatccttgaacctagggtgagt
hsa-miR-455-3p	gcagtcctaggccatatacac
hsa-miR-532-5p	catgccttgagtgtaggacc
hsa-miR-584	ttatggtttgcctgggactgag
hsa-miR-625	gcagggggaaagtctatagtc
hsa-miR-660	taccattgcatacggagttg
hsa-miR-744	tgcggggctagggctaac
hsa-miR-10a	taccctgtagatccgaattgtg
hsa-miR-10b	taccctgtagaaccgaattgtg

tion software 10.7(Agilent technologies, USA)读取数据, 软件设置Scan resolution = 5 μ m, PMT 100%, 5%采用Gene Spring Software 11.0(Agilent technologies, USA)进行归一化处理, 所用的算法为Quantile, 杂交信号以数据形式输出. 差异miRNA使用了limma进行显著性水平的计算, 设置参数 $P < 0.05$, fold change ≥ 2 [fold change = Signal MIA-PaCa2(TIC^{high})/Signal BxPc-3(TI^{low})].

1.2.3 SYBR Green荧光定量PCR验证部分差异microRNAs: 引物设计(由上海生物芯片工程有限公司设计)(表1), U6作为单拷贝基因对照, 引物序列由上海英骏生物技术有限公司合成. 总RNA提取如上述所示, miScript Reverse Transcription Kit和miScript SYBR[®] Green PCR Kit(Qiagen, Hilden, Germany)按试剂盒操作说明书在ABI Prism 7900 Real-Time PCR system(Applied Biosystems)进行.

1.2.4 生物信息学分析: (1)差异microRNA靶基因预测: 基于Sanger数据库对差异microRNA进行靶基因预测; (2)功能分析(GO-Analysis): 将上述差异microRNA预测的靶基因基于Gene Ontology数据库进行GO注释, 得到基因参与的所有的GO; (3)信号转导通路分析(Pathway-Analysis):

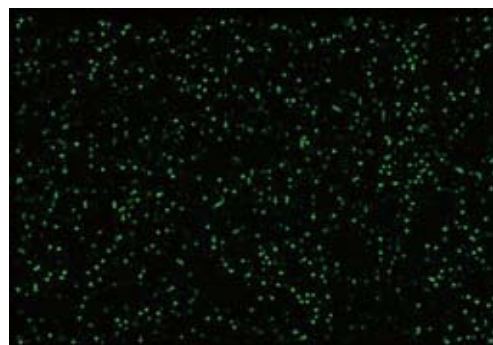


图1 miRNA芯片杂交代表性图像.

将上述差异microRNA预测的靶基因基于KEGG数据库进行Pathway注释, 得到差异基因所参与的所有的Pathway.

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 应用SPSS17.0统计软件分析, 基因芯片分析进行t检验.

2 结果

2.1 基因芯片样品总RNA的质量鉴定 所抽提的总RNA, 经分光光度计检测 $A_{260/280}$ 的吸光度, 确定样品的浓度和纯度; 运用Agilent 2100系统进行电泳质检. 经测定, RNA的 $A_{260/280}$ 比值介于2.03-2.09, 18S、28S电泳条带清晰, 28S条带无明显降解; RNA完整性评分(RNA integrity number)介于8.7-9.3, RNA样品平均浓度 >60 mg/L, 总RNA质量完好, 结果合格, 可以进行芯片实验.

2.2 基因芯片检测结果及验证 miRNA芯片杂交代表性图像显示荧光信号分布均匀, 信号点饱满, 背景较低, 杂交效果理想(图1). 将芯片扫描图像导入Feature Extraction software 10.7读取数据, 从中共鉴定到940个miRNAs, 将数据导入Gene Spring Software 11.0分析, 得到差异表达miRNAs 91个($P < 0.05$, fold change ≥ 2), 其中MIA-PaCa2(TIC^{high})中下调表达45个, 上调表达46个. 聚类分析MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TI^{low})差异表达miRNAs(图2). 荧光定量PCR验证21条差异microRNAs, 其中hsa-miR-195、hsa-miR-1290与芯片结果不相符, 其余19条均与芯片结果相符(表2).

2.3 生物信息学分析 基于Sanger数据库对差异microRNAs进行靶基因预测, 共得到2 895个靶基因; 将上述差异microRNA预测的靶基因基于Gene Ontology数据库进行GO注释, 并进行了生物学功能分类与整合, 其中主要涉及轴突导向(axon guidance)、血管发生(angiogenesis)、转录后蛋白修饰、小分子代谢过程、O-连寡糖过程

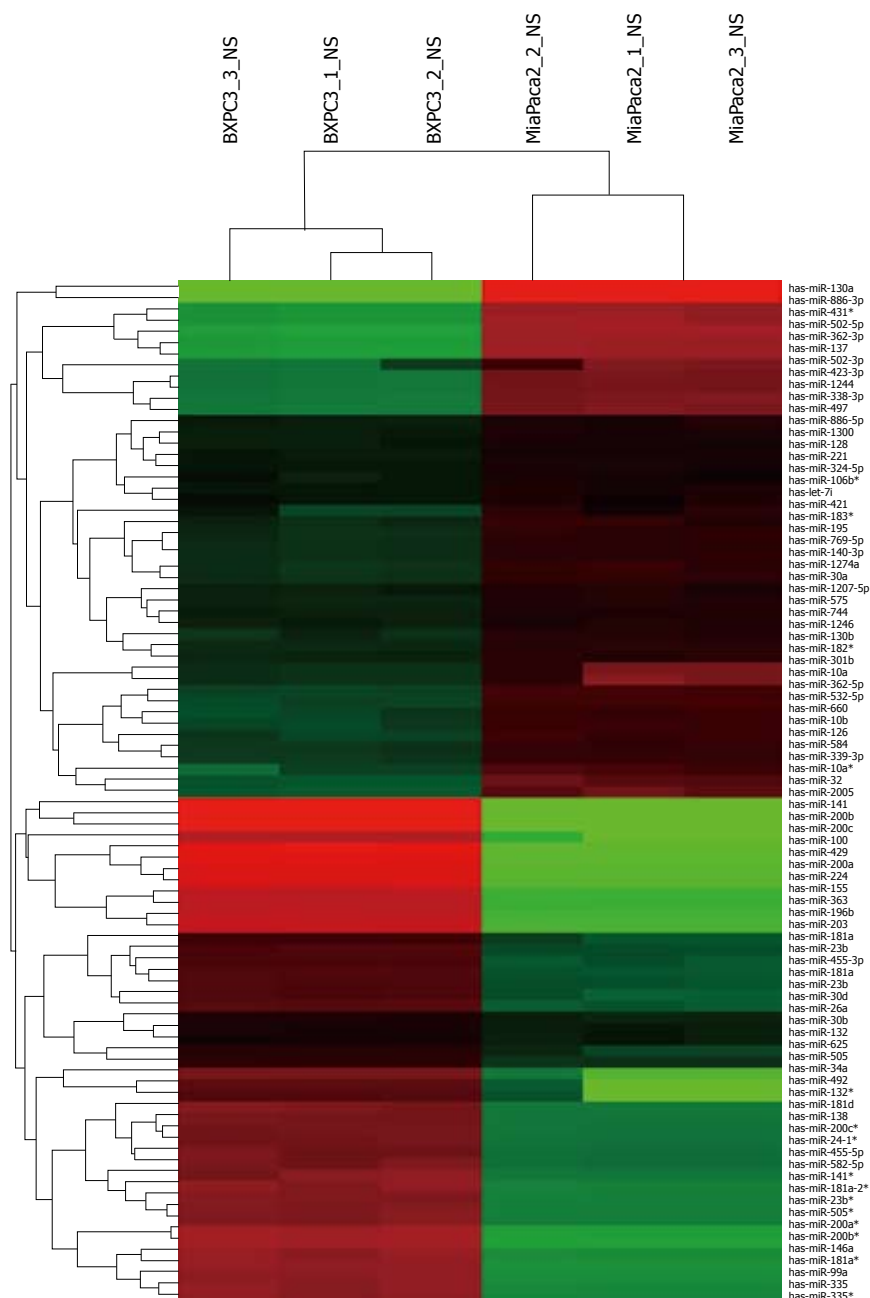


图 2 MIA-PaCa2 (TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})差异表达miRNAs聚类分析图.

■创新盘点

目前关于采用胰腺癌细胞系TIC^{high}与TIC^{low}作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞,采用miRNA芯片分析胰腺癌干细胞相关的miRNA尚未见报道.本研究结合文献研究有助于发现新的胰腺癌干细胞相关的miRNA.

(O-glycan processing)、胰岛素受体信号转导途径、对缺氧的反应、信号转导、对药物反应等.将上述差异microRNA预测的靶基因基于KEGG数据库进行Pathway注释,其中主要涉及癌症途径(pathways in cancer)、细胞-基质黏附途径(focal adhesion)、Hedgehog信号途径、MAPK信号途径、O-连寡糖生物合成、胰岛素信号通路、胞吞作用、黏附连接、细胞外基质受体相互作用、类固醇激素生物合成等信号通路.

3 讨论

肿瘤发起细胞,又称肿瘤干细胞,具有成瘤、侵

袭转移及治疗抵抗作用^[10].新近的研究表明:胰腺癌在形成之前,源于具有潜在癌变分子基础的上皮细胞(如:PanIN2和3级中胰腺上皮细胞),在各种因素的作用(如慢性胰腺炎)下发生EMT,导致细胞内相关基因发生重新编程,获得侵袭转移能力和肿瘤干细胞的特性,形成胰腺癌干细胞^[5].Kallifatidis等^[7]从胰腺癌细胞标志分子CD44(+)/CD24(-),CD44(+)/CD24(+)或CD44(+)/CD133(+)的表达与裸鼠成瘤能力、分化程度、克隆性生长、肿瘤微球体形成、ALDH活性以及治疗抵抗等肿瘤干细胞特性的关系进行系列研究,认为具有CD44⁺/CD24⁻表型的胰腺癌细胞

■应用要点

本研究筛选的miR-100在许多恶性肿瘤,包括胰腺癌的发生和维持胰腺癌的“无限增殖分化的癌性”方面可能起重要作用。通过生物信息学分析,miR-100可负性调控“干性”mTOR基因,深入研究miR-100靶向“干性”mTOR基因在胰腺癌干细胞中的作用机制具有一定价值。

表 2 荧光定量PCR验证21条差异microRNAs

Sample Name	Average Ct		ΔCt		$2^{-\Delta Ct*}$	
	BXPC3	Miapaca2	BXPC3	Miapaca2	BXPC3	Miapaca2
U6	24.54	23.59				
hsa-miR-126	26.85	24.38	2.31	0.78	0.20	0.58
hsa-miR-140-3p	27.76	25.68	3.22	2.09	0.11	0.24
hsa-miR-140-5p	31.90	29.81	7.36	6.22	0.006	0.013
hsa-miR-30a*	23.99	22.54	-0.60	-1.06	1.46	2.08
hsa-miR-532-5p	29.01	26.33	4.46	2.74	0.05	0.15
hsa-miR-584	29.33	26.92	4.79	3.33	0.04	0.10
hsa-miR-660	27.25	24.67	2.71	1.07	0.15	0.48
hsa-miR-744	24.34	22.98	-0.20	-0.61	1.15	1.53
hsa-miR362-5p	28.11	24.76	3.57	1.17	0.08	0.45
hsa-mir-10a	25.62	23.67	1.08	0.08	0.47	0.95
hsa-mir-10b	27.03	24.03	2.47	0.43	0.18	0.74
hsa-miR1290	20.61	20.22	-3.93	-3.37	15.24	10.35
hsa-miR455-3p	23.42	27.15	-1.12	3.56	2.17	0.08
hsa-mir-125b	24.00	28.22	-0.55	4.63	1.46	0.04
hsa-miR-148a	25.64	29.18	1.09	5.59	0.47	0.02
hsa-miR-181a	22.08	25.29	-2.46	1.70	5.51	0.31
hsa-miR-181b	21.84	24.72	-2.71	1.13	6.53	0.45
hsa-miR-195	23.47	23.20	-1.07	-0.39	2.10	1.31
hsa-miR-23b	19.05	21.07	-5.50	-2.52	45.20	5.74
hsa-miR-27b	21.64	25.95	-2.90	2.35	7.47	0.20
hsa-miR-625	25.35	27.51	0.80	3.92	0.57	0.07

$2^{-\Delta Ct*}$ 表示Miapaca2组目的基因的表达相对于BXPC3组的变化倍数。

具有肿瘤干细胞特性;胰腺癌细胞系MIA-PaCa2的CD44⁺/CD24⁻表达率95.5%,而BxPc-3的表达率17.5%;并认为MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TI^{low})可以直接作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞,不需要进一步富集。因此,本研究基于上述研究基础,直接以MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TI^{low})作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞,未做CD44(+)/CD24(-)标志物筛选。

microRNA/miRNA为22个左右核苷酸的小分子RNA,具有强大的调节功能,成为当前研究的热点。miRNA与目的基因3'非编码区(3'UTR)结合降解mRNA和抑制其翻译,控制着细胞的分化、增殖和凋亡等生命活动,与肿瘤的发生、发展密切相关^[11];miRNA在肿瘤干细胞的“干性”相关基因和信号通路调控方面发挥重要作用,被称为Stem Cells miRNAs^[6]。例如:miR-135a和miR-135b在结肠腺瘤和腺癌中表达上调,他们调控APC基因的表达,参与Wnt信号通路的激活,在结肠癌干细胞中发挥重要作用^[12]。let-7在乳腺癌干细胞中表达缺失,导致他负性调控的HMGA2基因高表达,而后者对于乳腺

癌干细胞的自我更新发挥重要作用^[13]。miR-34族在胰腺癌中低表达,他们通过靶向Bcl-2、HMGA2和Notch信号通路在胰腺癌干细胞中起抑制作用^[14]。我们的研究基于上述研究观点,采用miRNA芯片技术分析MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TI^{low})之间的显著性差异miRNAs,这些miRNAs可能从一个侧面反映其与胰腺癌干细胞“干性”的关系。

Jung等^[15]采用无血清培养法,获得来源于人胰腺癌细胞系Capan-1和HPAC的胰腺癌干细胞微球体,以及来源于人正常胰腺导管上皮细胞系hYGIC6的胰腺导管上皮细胞微球体,采用miRNA芯片分析与胰腺导管上皮细胞微球体、胰腺癌干细胞微球体形成相关miRNA(与黏附培养细胞相比较),其中14个miRNAs(包括hsa-miR-155)与胰腺癌和胰腺导管上皮细胞的微球体形成均相关,22个miRNAs只与胰腺癌的微球体形成相关。我们的芯片研究显示:与BxPc-3(TI^{low})比较,在MIA-PaCa2(TIC^{high})中,具有显著性差异且差异倍数在2倍及以上的miRNAs 91个,其中上调表达46个,下调表达45个。我们进

一步采用荧光定量PCR验证21条差异microRNAs, 其中hsa-miR-195、hsa-miR-1290与芯片结果不相符, 其余19条均与芯片结果相符, 表明实验芯片结果基本可靠. 我们结果与Jung等研究比较发现, 与胰腺癌干细胞相关的hsa-miR-155、hsa-miR-100、hsa-miR-99a、hsa-miR-125b、hsa-miR-625、hsa-miR-195均下调, 检测结果一致, 这表明他们在不同细胞系来源的胰腺癌干细胞中均发挥调控作用, 更有研究价值. 此外, Ji等^[14]研究表明, hsa-miR-34a在BxPc-3(TI^{low})和MIA-PaCa2(TIC^{high})中表达均较低, 但在后者比前表达更低, 几乎无表达, 再表达miR-34a能抑制MIA-PaCa2的肿瘤干细胞系列功能, 包括显著抑制其克隆性生长, 诱导凋亡, 抑制细胞周期G₁和G₂/M, 抑制细胞侵袭转移能力, 增加放化疗敏感性. 我们的芯片结果与上述检测一致, 这也从一个侧面表明, 我们的芯片结果检测可靠性和研究的重要意义, 因此, 对这些显著性差异miRNAs在胰腺癌干细胞中的调控功能研究是接下来我们的研究重点. 文献报道表明: miR-100在大多数肿瘤中表达下调. 在宫颈癌、卵巢癌中miR-100表达下调与其分期、淋巴结转移、较差的预后相关^[16,17], 他通过转录后调控Polo样激酶1(polo-like kinase 1, PLK1)的表达在卵巢癌中起肿瘤抑制作用. 在头颈部鳞癌中表达下调, 外源性导入miR-100到HNSCC细胞系, 能抑制细胞的增殖和侵袭转移能力, 促进细胞凋亡, 其机制是负性调控胰岛素样生长因子受体1(Insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)和mTOR基因^[18]; 在肝癌发生的多阶段分析中发现, miR-100的表达下调和其靶基因PLK1的表达上调是肝癌发生的早期事件^[19]; miR-100通过靶向PLK1基因能增敏多西他赛耐药肺腺癌细胞的化疗^[20]; 然而, 在胃癌中miR-100表达上调^[21]; 在胰腺癌^[22-24]miR-100较癌旁的正常胰腺组织显著高表达, 经治疗后, 其血浆表达水平显著下调, 这些研究表明: miR-100在许多恶性肿瘤, 包括胰腺癌的发生和维持胰腺癌的“无限增殖分化的癌性”方面可能起重要作用. Mueller等^[25]发现, 胰腺癌干细胞的mTOR信号通道异常活跃, 雷帕霉素是mTOR的抑制物, 阻断该信号通道可以抑制部分胰腺癌干细胞. 因此, miR-100负性调控“干性”mTOR基因可能与胰腺癌干细胞的发生机制相关, 其在胰腺癌中的表达下调, 导致mTOR信号通道异常激活, 虽然抑制了胰腺癌的肿瘤性生长, 但也选择性的维持了胰腺癌干

细胞的生存, 导致胰腺癌患者的放化疗抵抗、复发和远处转移. 此外, 我们还采用Agilent人全基因4×44K芯片检测了MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TI^{low})之间的显著性差异mRNAs也发现, miR-100靶向负性调控的mTOR在后者表达上调(数据未显示). 这些研究表明上述筛选的差异miR-100与胰腺癌干细胞的“干性”相关, 也从一个侧面提示上述筛选的差异miRNAs可能参与胰腺癌干细胞的“干性”, 有深入研究的价值.

miRNAs作为新的治疗靶点主要优点就是调控多个基因和信号通路^[26], 而siRNA则是通过特异的序列作用于单个靶基因. 因此, 对miRNAs调控靶基因及其信号通路的生物信息学分析尤为重要. 基于Sanger数据库对差异microRNA进行靶基因预测是常用的预测microRNA靶基因方法, Sanger数据库即miRBase, 他是整合了microCosm、TargetScan和Pictar 3个数据库, 我们选用了TargetScan 6.0数据库进行靶基因预测共得到2 895条靶基因, 将上述差异microRNA预测的靶基因基于Gene Ontology数据库进行GO注释, 并进行了生物学功能分类与整合, 使我们了解这些microRNA在整体水平发挥的主要生物学功能, 我们的分析结果显示他们主要涉及轴突导向、血管发生、转录后蛋白修饰等. 信号通路的研究一直是研究生物学功能的机制及设计药物治疗靶点的主要方法, 我们将上述差异microRNA预测的靶基因基于KEGG数据库进行Pathway注释, 其中主要涉及癌症途径、细胞-基质黏附途径、Hedgehog信号途径、MAPK信号途径等, 对这些信号通路在胰腺癌干细胞的“干性”中的作用深入研究, 有望发现新的胰腺癌干细胞发生机制.

总之, 我们通过芯片技术筛选了91条与胰腺癌干细胞相关的miRNAs, 并对他们进行了生物信息学分析, 这些miRNAs及其靶向的基因和信号通路可能涉及调控胰腺癌干细胞的各种生物学特性, 进一步对它们的生物学功能和调控机制进行研究, 并结合全基因组学及蛋白组学方法, 有助于从整体上分析胰腺癌干细胞的发生机制, 寻找并设计新的治疗靶点.

4 参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29
- 2 Tuveson DA, Neoptolemos JP. Understanding metastasis in pancreatic cancer: a call for new clinical approaches. *Cell* 2012; 148: 21-23
- 3 Lim KH, Chung E, Khan A, Cao D, Linehan D, Ben-

■同行评价

本文选题较为新颖, 研究方法合理, 对胰腺癌干细胞相关microRNAs的探讨具有一定的意义.

- Josef E, Wang-Gillam A. Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: the emerging paradigm? *Oncologist* 2012; 17: 192-200
- 4 Rasheed ZA, Matsui W. Biological and clinical relevance of stem cells in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2: 15-18
- 5 Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012; 148: 349-361
- 6 DeSano JT, Xu L. MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications. *AAPS J* 2009; 11: 682-692
- 7 Kallifatidis G, Rausch V, Baumann B, Apel A, Beckermann BM, Groth A, Mattern J, Li Z, Kolb A, Moldenhauer G, Altevogt P, Wirth T, Werner J, Schemmer P, Büchler MW, Salnikow AV, Herr I. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signaling. *Gut* 2009; 58: 949-963
- 8 Rausch V, Liu L, Kallifatidis G, Baumann B, Mattern J, Gladkich J, Wirth T, Schemmer P, Büchler MW, Zöller M, Salnikow AV, Herr I. Synergistic activity of sorafenib and sulforaphane abolishes pancreatic cancer stem cell characteristics. *Cancer Res* 2010; 70: 5004-5013
- 9 Zhang C, Kolb A, Büchler P, Cato AC, Mattern J, Rittgen W, Edler L, Debatin KM, Büchler MW, Friess H, Herr I. Corticosteroid co-treatment induces resistance to chemotherapy in surgical resections, xenografts and established cell lines of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 61
- 10 Cioffi M, Dorado J, Baeuerle PA, Heeschen C. Ep-CAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 465-474
- 11 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- 12 Nagel R, le Sage C, Diosdado B, van der Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 5795-5802
- 13 Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007; 131: 1109-1123
- 14 Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Yang M, Li L, Xiang D, Desano JT, Bommer GT, Fan D, Fearon ER, Lawrence TS, Xu L. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 2009; 4: e6816
- 15 Jung DE, Wen J, Oh T, Song SY. Differentially expressed microRNAs in pancreatic cancer stem cells. *Pancreas* 2011; 40: 1180-1187
- 16 Huang L, Lin JX, Yu YH, Zhang MY, Wang HY, Zheng M. Downregulation of six microRNAs is associated with advanced stage, lymph node metastasis and poor prognosis in small cell carcinoma of the cervix. *PLoS One* 2012; 7: e33762
- 17 Peng DX, Luo M, Qiu LW, He YL, Wang XF. Prognostic implications of microRNA-100 and its functional roles in human epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep* 2012; 27: 1238-1244
- 18 Chen Z, Jin Y, Yu D, Wang A, Mahjabeen I, Wang C, Liu X, Zhou X. Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2012; 48: 686-691
- 19 Petrelli A, Perra A, Schernhuber K, Cargnelutti M, Salvi A, Migliore C, Ghiso E, Benetti A, Barlati S, Ledda-Columbano GM, Portolani N, De Petro G, Columbano A, Giordano S. Sequential analysis of multistage hepatocarcinogenesis reveals that miR-100 and PLK1 dysregulation is an early event maintained along tumor progression. *Oncogene* 2012; 31: 4517-4526
- 20 Feng B, Wang R, Chen LB. MiR-100 resensitizes docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cells (SPC-A1) to docetaxel by targeting Plk1. *Cancer Lett* 2012; 317: 184-191
- 21 Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA, Croce CM. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol* 2010; 11: 136-146
- 22 Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901-1908
- 23 LaConti JJ, Shivapurkar N, Preet A, Deslattes Mays A, Peran I, Kim SE, Marshall JL, Riegel AT, Wellstein A. Tissue and serum microRNAs in the Kras(G12D) transgenic animal model and in patients with pancreatic cancer. *PLoS One* 2011; 6: e20687
- 24 Panarelli NC, Chen YT, Zhou XK, Kitabayashi N, Yantiss RK. MicroRNA expression aids the preoperative diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2012; 41: 685-690
- 25 Mueller MT, Hermann PC, Witthauer J, Rubio-Viqueira B, Leicht SF, Huber S, Ellwart JW, Mustafa M, Bartenstein P, D'Haese JG, Schoenberg MH, Berger F, Jauch KW, Hidalgo M, Heeschen C. Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 137: 1102-1113
- 26 Ji Q, Hao X, Meng Y, Zhang M, Desano J, Fan D, Xu L. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer* 2008; 8: 266

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

miR495、miR551a靶向干扰SGC7901细胞PRL-3基因的 表达

蒋蒙蒙, 曹毅, 李正荣, 揭志刚

蒋蒙蒙, 南昌大学研究生院医学部, 南昌大学第一附属医院
胃肠外科 江西省南昌市 330006

曹毅, 李正荣, 揭志刚, 南昌大学第一附属医院胃肠外科 江
西省南昌市 330006

蒋蒙蒙, 硕士, 主要从事胃肠肿瘤基础及临床研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30901429

作者贡献分布: 本课题由蒋蒙蒙与曹毅设计; 研究过程由李正荣
与揭志刚指导; 蒋蒙蒙与曹毅共同操作完成; 论文写作、数据分
析由蒋蒙蒙与曹毅完成.

通讯作者: 李正荣, 副教授, 330006, 江西省南昌市永外正街17
号, 南昌大学第一附属医院胃肠外科.

lizhengrong08@yahoo.com.cn

电话: 0791-88692522

收稿日期: 2012-10-04 修回日期: 2012-11-11

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Suppressive effect of miR495 and miR551a on PRL-3 expression in gastric cancer SGC7901 cells

Meng-Meng Jiang, Yi Cao, Zheng-Rong Li, Zhi-Gang Jie

Meng-Meng Jiang, Department of Gastrointestinal Sur-
gery, the First Affiliated Hospital of Nanchang University,
Nanchang University Graduate School of Medicine, Nan-
chang 330006, Jiangxi Province, China

Yi Cao, Zheng-Rong Li, Zhi-Gang Jie, Department of
Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of
Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province,
China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 30901429

Correspondence to: Zheng-Rong Li, Associate Professor,
the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17
Yongwai Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province,
China. lizhengrong08@yahoo.com.cn

Received: 2012-10-04 Revised: 2012-11-11

Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To construct miRNA495 and miRNA551a
expression vectors targeting the PRL-3 gene, and
to observe the effect of vector transfection on the
expression of PRL-3 in gastric cancer SGC7901
cells.

METHODS: Specific pre-miRNA495 and pre-
miRNA551a sequences targeting the PRL-3 gene
were designed, synthesized, and ligated with the
pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR vector. After se-

quencing to confirm correct insertion, the recom-
binant vectors were transfected into SGC7901
cells with Lipofectamine™ 2000. The expression
of PRL-3 in transfected cells was detected by
real-time PCR and Western blot.

RESULTS: The PRL-3 pre-miRNA495 and pre-
miRNA551a recombinant plasmids were suc-
cessfully constructed, and they could effectively
promote the expression of miRNA495 and miR-
NA551a and inhibit PRL-3 mRNA and protein
expression in SGC7901 cells.

CONCLUSION: The miRNA495 and miRN-
A551a expression vectors for silencing the PRL-3
gene have been constructed successfully, which
could effectively promote the expression of
miRNA495 and miRNA551a and inhibit PRL-3
mRNA and protein expression in SGC7901 cells.

Key Words: PRL-3; MiRNA495; MiRNA551a; RNA
interference; Gastric cancer

Jiang MM, Cao Y, Li ZR, Jie ZG. Suppressive effect of
miR495 and miR551a on PRL-3 expression in gastric
cancer SGC7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012;
20(34): 3361-3365

摘要

目的: 构建靶向PRL-3基因的miRNA495和
miRNA551a真核表达载体, 观察其转染胃癌
SGC7901细胞后对胃癌细胞PRL-3基因表达
的影响.

方法: 设计并合成两条针对PRL-3基因的
特异性miRNA495和miRNA551a干扰序
列, 分别与pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR载
体连接, 转化大肠杆菌, 纯化并鉴定后利用
Lipofectamine™2000转染胃癌SGC7901细胞,
实时定量PCR及Western blot技术鉴定重组体
对PRL-3基因表达的干扰效果.

结果: 针对PRL-3基因的miRNA495和miRNA
551a干扰质粒构建成功, 胃癌SGC7901细胞分
别转染两种质粒后miRNA495及miRNA551a

■背景资料

成熟的miRNA是
由较长的初级转
录物经过一系列
核酸酶的剪切加
工而产生的, 随
后组装进RNA诱
导的沉默复合体,
通过碱基互补配
对的方式识别靶
mRNA, 并根据互
补程度的不同指
导沉默复合体降
解靶mRNA或者
阻遏靶mRNA的
翻译, 达到调控基
因表达的目的.

■同行评议者

刘海林, 主任医
师, 上海交通大学
医学院附属第九
人民医院消化科

■ 研发前沿

近年来的研究表明, miRNA参与各种各样的调节途径, 包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等。

的表达明显升高, 并且明显抑制了PRL-3基因mRNA及蛋白的表达。

结论: 靶向PRL-3基因的miRNA495和miRNA551a真核表达载体构建成功, 其可有效提高胃癌SGC7901细胞miRNA495和miRNA551a的表达, 并抑制PRL-3 mRNA及PRL-3蛋白的表达。

关键词: PRL-3; miRNA495; miRNA551a; RNA干扰; 胃癌

蒋蒙蒙, 曹毅, 李正荣, 揭志刚. miR495、miR551a靶向干扰SGC7901细胞PRL-3基因的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3361-3365

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3361.asp>

0 引言

MicroRNA(miRNA)是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码单链RNA分子, 其大小长约20-25个核苷酸. 成熟的miRNA是由较长的初级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工而产生的, 随后组装进RNA诱导的沉默复合体, 通过碱基互补配对的方式识别靶mRNA, 并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶mRNA或者阻遏靶mRNA的翻译, 达到调控基因表达的目的. 近年来的研究表明, miRNA参与各种各样的调节途径, 包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等. miRNA既可作为促癌基因参与恶性肿瘤的发生和发育过程^[1,2], 又可作为抑癌基因控制恶性肿瘤的形成^[3,4], 在肿瘤的发生和发展中起着重要的作用. 肝再生磷酸酶(phosphatase of regenerating liver-3, PRL-3)属于蛋白酪氨酸磷酸酶家族, PRL-3在胃癌组织中高表达^[5], miRNA495(miR495)和miRNA551a(miR551a)这两条miRNA分子在胃癌组织及胃癌细胞中呈明显低表达^[6]. 我们构建了miR495和miR551a的真核表达载体, 稳定转染胃癌SGC7901细胞后, 观察了其对胃癌SGC7901细胞PRL-3基因表达的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR载体、大肠杆菌菌株DH5 α 、LipofectamineTM2000购自Invitrogen公司; 兔抗人一抗购自美国Sigma公司; 鼠抗兔二抗购自美国Santa Cruz公司; BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with

EmGFP(invitrogen, Catalog No. K4936-00)购自Invitrogen公司; Pure Midi Plasmid Kit、 λ DNA/Hind III购自TIANGEN BIOTECH公司; 普通质粒小抽试剂盒, pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR的反向测序引物5'-CTCTAGATCAACCACTTTGT-3'购自Invitrogen公司; U6 SnRNA由上海闪晶分子生物科技有限公司合成, β -actin PCR引物由广州锐博生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 miR495和miR551a表达载体的构建: (1)目的基因: >hsa-miR-495: AAACAAACAUGGUG-CACUUCUU, >hsa-miR-551a: GCGACCCA-CUCUUGGUUCCA; (2)寡聚单链DNA的合成: 以miR495和miR551a基因为目的基因合成2对miRNA寡聚单链DNA, 序列见表1; (3)双链DNA的退火和装载: 将2对寡聚单链DNA退火成双链, 然后用载体构建试剂盒BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP(invitrogen, Catalog no. K4936-00)进行重组克隆, 将2对双链的miRNA oligo分别插入到miRNA表达载体pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR中(invitrogen, Catalog No. K4936-00, 载体图谱见图1), 构建2个miRNA表达质粒, 并转化至感受态细胞DH5 α . 退火和连接的具体方法如下: 将2对合成好的寡聚单链DNA用ddH₂O溶解成100 μ mol/L, 互补单链各取5 μ L两两混合, 按20 μ L体系进行退火. 然后将2份oligo混合物在95 $^{\circ}$ C加热5 min, 然后放置室温自然冷却20 min, 形成双链DNA. 将退火的双链DNA继续稀释成10 nmol/L浓度, 取5 \times ligation buffer 4 μ L, pcDNA6.2-GW/EmGFP 2 μ L, ds oligo(10 nmol/L) 4 μ L, T4 DNA ligase(1 U/ μ L)1 μ L, ddH₂O 9 μ L, 配成20 μ L酶连接体系在室温连接30 min。

1.2.2 质粒抽提与测序: 将连接产物转化DH5 α , 将含有重组体的菌液涂在含壮观霉素LB平板上, 每个转化平板分别挑取4个克隆, 用普通质粒小抽试剂盒摇菌抽提质粒后送上海英俊生物工程技术有限公司进行插入片段测序。

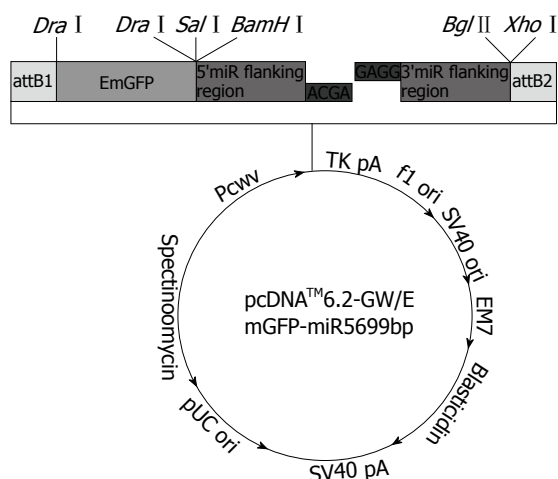
1.2.3 细胞培养及转染: 人胃癌SGC7901细胞于含10%胎牛血清、37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂环境下培养、传代, 获得稳定转染细胞系, 历时58 d. 选择生长状态良好的细胞接种于6孔培养板, 加入不含双抗培养基, 待细胞生长密度达到70%左右时随机分为4组: 空白对照组不加任何处理, 阴性对照组加入转染无关序列的质粒, miR495组加入miR495质粒, miR551a组加入miR551a质粒。

表 1 miRNA 寡聚单链DNA序列(附阴性对照序列)

oligo名称	寡聚单链DNA序列5'-3'
miR495-F	TGCTGAAACAAACAtGGtGCACttCttGTTTTGGCCACTGACTGACaaGaaGTGCCaTGTTTGTTT
miR495-R	CCTGAAACAAACAtGGCActtCttGTCAGTCAGTGGCCAAAACaaGaaGTGCaCaTGTTTGTTTC
miR551a-F	TGCTGGCGACCCACtCttGGttCCAGTTTTGGCCACTGACTGACTGaaCCGaGTGGGTCGC
miR551a-R	CCTGGCGACCCACtCGGttCCAGTCAGTCAGTGGCCAAAACtTGaaCCaaGaGTGGGTCGCC
Negative control	
Negative-F	tgctgAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT
Negative-R	cctgAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTTc

■相关报道

肝再生磷酸酶(PRL-3)属于蛋白酪氨酸磷酸酶家族, PRL-3在胃癌组织中高表达, miRNA495(miR495)和miRNA551(miR551a)这两条miRNA分子在胃癌组织及胃癌细胞中呈明显低表达。

图 1 miRNA表达载体pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR.

1.2.4 实时定量PCR检测miR495、miR551a及PRL-3 mRNA的表达: 采用qRT-PCR法转染24 h后抽提各组细胞总RNA, 然后反转录合成cDNA. 将PCR产物从60 °C缓慢均匀提升到97 °C, 进行DNA扩增, 共35个循环. 利用样本miR495、miR551a与U6 snRNA含量的比值以及PRL-3 mRNA与 β -actin含量的比值, 来评价miR495、miR551a及PRL-3 mRNA相对表达水平. 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法来分析荧光实时定量PCR检测结果.

1.2.5 Western blot技术鉴定重组体对PRL-3蛋白表达的干扰: 转染48 h后提取各组细胞总蛋白, 用10%SDS-PAGE进行凝胶电泳, 样品分离后电转至PVDF膜, TBS冲洗后室温封闭2 h, 漂洗后加入1:100兔抗人一抗, 4 °C过夜, 洗膜后加入1:5 000鼠抗兔二抗, 37 °C孵育2 h, 洗膜30 min后行ECL显影并压片, 将图片用凝胶图像处理系统分析目标条带的分子量和净光密度值.

统计学处理 实验检测结果均采用SPSS15.0软件分析, 各组实验各设3个复孔, 每组实验重复3次. 最终数据以3组数据mean \pm SD表示, 检测的结果对照组与实验组间比较采用方差分析. 以 $P<0.05$ 认为具有统计学意义.

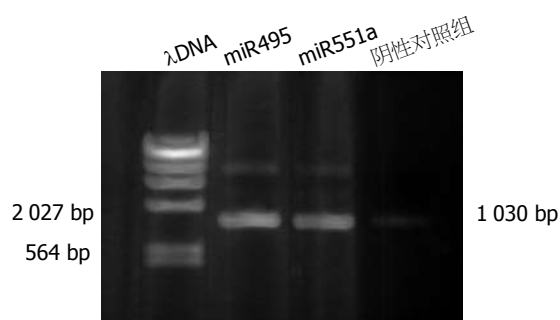


图 2 凝胶电泳检测结果. miR495、miR551a前体片段大小分别为1 032 bp和1 035 bp, 所显示的条带约为1 030 bp.

2 结果

2.1 miRNA真核表达载体的测序 通过上海英骏生物公司结果表明, 所获得的重组干扰质粒目的片段与预期完全相符. 表明退火形成的干扰寡核苷酸成功连接入pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR载体.

2.2 重组体PCR鉴定及测序凝胶电泳 重组体PCR扩增miR495、miR551a前体片段大小为1 032 bp和1 035 bp, 所显示的条带约为1 030 bp, 符合目的条带大小(图2), 初步证明pre-miRNA片段已正确定向插入到载体中. 同时测序结果显示所插入的序列完全正确, 表明已成功构建了针对人PRL-3基因的miR495、miR551a表达质粒.

2.3 miR495、miR551a、PRL-3 mRNA及PRL-3蛋白的表达 转染miR495组SGC7901细胞中, miR495表达量显著高于空白对照组、阴性对照组及miR551a组(图3A); 转染miR551a组SGC7901细胞中, miR551a表达量显著高于其余各组(图3B); miR495组和miR551a组中PRL-3 mRNA及PRL-3蛋白表达量显著低于空白对照组和阴性对照组(图3C, 图4).

3 讨论

胃癌是一种常见的严重威胁人类生命健康的

■应用要点

靶向PRL-3基因的miR495和miR551a干扰质粒可显著抑制人胃癌SGC7901细胞中PRL-3 mRNA及蛋白的表达, 由于PRL-3在人胃癌的发生、发展过程中发挥着重要作用。

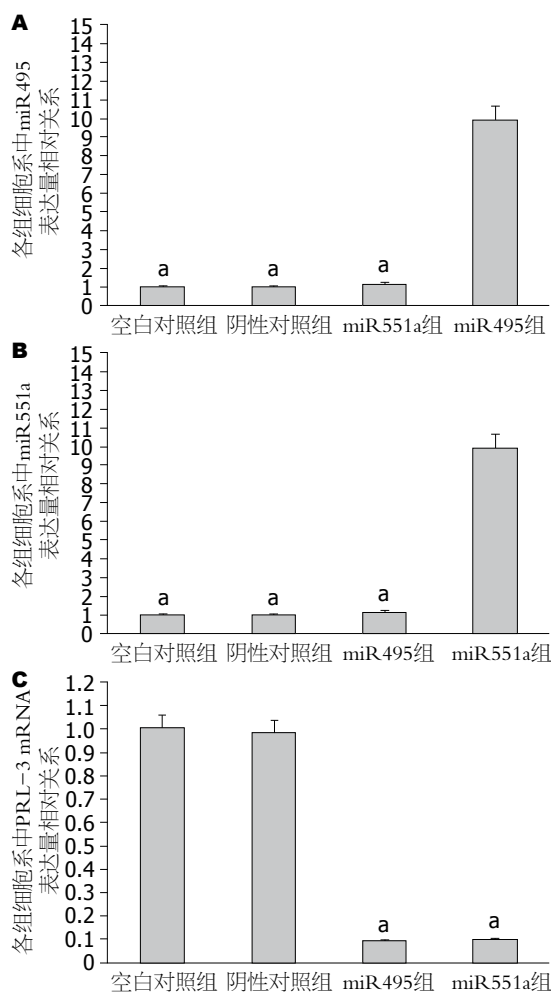


图3 各组细胞系中miR495、miR551a、PRL-3 mRNA及PRL-3蛋白的表达量相对关系。A: miR495表达量; $P < 0.05$ vs miR495组; B: miR551a表达量; $P < 0.05$ vs miR551a组; C: PRL-3 mRNA表达量; $P < 0.05$ vs 空白对照组、阴性对照组。

恶性肿瘤, 占胃恶性肿瘤的95%^[7], 居男性癌症死亡的第2位, 女性癌症死亡的第3位^[8]。在中国, 胃癌发病率很高, 每年有40万新病例, 30万人死亡^[9]。近年来的研究表明, miRNA的异常表达与肿瘤发生、发展和侵袭转移密切相关, 成为近几年的研究热点。已有学者证明很多miRNA与胃癌的发病有关^[10-12], 有部分miRNA与胃癌SGC7901细胞的凋亡密切相关^[13,14], PRL-3的低表达能抑制胃癌细胞的增殖和转移^[15-19], 我们的前期研究已证明miR495和miR551a在胃癌SGC7901细胞中低表达^[6]。

为了探索能抑制胃癌SGC7901细胞增殖和迁移的miRNA与PRL-3之间的关系, 我们选择miR495和miR551a为研究对象, 构建miR495和miR551a的真核表达载体, 载体构建成功后稳定转染胃癌SGC7901细胞, 通过荧光定量PCR法分别计算各组中miR495和miR551a的相对表达量, 提取总蛋白, 利用Western blot方法进行PRL-3

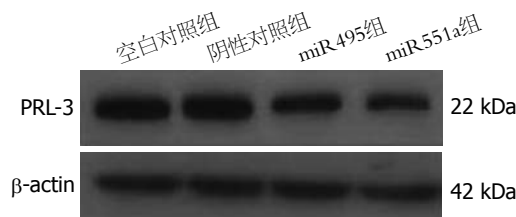


图4 各组细胞系中PRL-3蛋白表达量相对关系。miR495组和miR551a组PRL-3蛋白表达显著低于空白对照组和阴性对照β-actin为内参。

蛋白表达分析, 结果显示, 实验组细胞miR495和miR551a显著高于空白对照组细胞和阴性对照组细胞, PRL-3 mRNA及蛋白的表达显著低于空白对照组细胞和阴性对照组细胞。

综上所述, 靶向PRL-3基因的miR495和miR551a干扰质粒可显著抑制人胃癌SGC7901细胞中PRL-3 mRNA及蛋白的表达, 由于PRL-3在人胃癌的发生、发展过程中发挥着重要作用。因此, 利用miR495及miR551a对PRL-3基因的表达调控作用, 可能抑制胃癌的侵袭转移。下一步我们将研究PRL-3在胃癌细胞侵袭转移中的作用机制, 并探讨应用基因干扰技术抑制胃癌转移的可行性, 为寻求新的胃癌治疗方案提供理论基础。

4 参考文献

- Zhang BG, Li JF, Yu BQ, Zhu ZG, Liu BY, Yan M. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. *Oncol Rep* 2012; 27: 1019-1026
- Li X, Zhang Y, Shi Y, Dong G, Liang J, Han Y, Wang X, Zhao Q, Ding J, Wu K, Fan D. MicroRNA-107, an oncogene microRNA that regulates tumour invasion and metastasis by targeting DICER1 in gastric cancer. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 1887-1895
- Xu Y, Zhao F, Wang Z, Song Y, Luo Y, Zhang X, Jiang L, Sun Z, Miao Z, Xu H. MicroRNA-335 acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting Bcl-w and specificity protein 1. *Oncogene* 2012; 31: 1398-1407
- Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res* 2010; 70: 2339-2349
- 蔡世荣, 陈创奇, 王昭, 何裕隆, 崔冀, 吴文辉, 吴晖, 詹文华. 促肝再生磷酸酶-3在胃癌患者组织中的表达及其对胃癌细胞生长的影响. *中华医学杂志* 2008; 88: 2326-2330
- Li Z, Cao Y, Jie Z, Liu Y, Li Y, Li J, Zhu G, Liu Z, Tu Y, Peng G, Lee DW, Park SS. miR-495 and miR-551a inhibit the migration and invasion of human gastric cancer cells by directly interacting with PRL-3. *Cancer Lett* 2012; 323: 41-47
- 苏娟, 张庆瑜, 康春生, 张安玲, 王涛, 张洁. miR-200a通过β-catenin/TCF-4信号通路抑制胃癌细胞系生长

- 侵袭能力的体外研究. 中国肿瘤临床 2012; 39: 65-69
- 8 Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 633-649
- 9 Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 17-20
- 10 Yu BQ, Su LP, Li JF, Cai Q, Yan M, Chen XH, Yu YY, Gu QL, Zhu ZG, Liu BY. microRNA expression signature of gastric cancer cells relative to normal gastric mucosa. *Mol Med Report* 2012; 6: 821-826
- 11 Li BS, Zhao YL, Guo G, Li W, Zhu ED, Luo X, Mao XH, Zou QM, Yu PW, Zuo QF, Li N, Tang B, Liu KY, Xiao B. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. *PLoS One* 2012; 7: e41629
- 12 Guo JX, Tao QS, Lou PR, Chen XC, Chen J, Yuan GB. miR-181b as a potential molecular target for anticancer therapy of gastric neoplasms. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 2263-2267
- 13 Li Z, Zhan W, Wang Z, Zhu B, He Y, Peng J, Cai S, Ma J. Inhibition of PRL-3 gene expression in gastric cancer cell line SGC7901 via microRNA suppressed reduces peritoneal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 229-237
- 14 Chen Y, Zuo J, Liu Y, Gao H, Liu W. Inhibitory effects of miRNA-200c on chemotherapy-resistance and cell proliferation of gastric cancer SGC7901/DDP cells. *Chin J Cancer* 2010; 29: 1006-1011
- 15 Wang Z, He YL, Cai SR, Zhan WH, Li ZR, Zhu BH, Chen CQ, Ma JP, Chen ZX, Li W, Zhang LJ. Expression and prognostic impact of PRL-3 in lymph node metastasis of gastric cancer: its molecular mechanism was investigated using artificial microRNA interference. *Int J Cancer* 2008; 123: 1439-1447
- 16 Cai SR, Wang Z, Chen CQ, Cui J, Zhang CH, He YL, Zhan WH. [Role of silencing PRL-3 expression by miRNA interference in the growth of gastric cancer]. *Zhonghua Waike Zazhi* 2008; 46: 618-621
- 17 Wang Z, Cai SR, He YL, Zhan WH, Chen CQ, Cui J, Wu WH, Wu H, Song W, Zhang CH, Peng JJ, Huang XH. High expression of PRL-3 can promote growth of gastric cancer and exhibits a poor prognostic impact on patients. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 208-219
- 18 Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Koma Y, Yanagihara K, Yokozaki H. Constitutive suppression of PRL-3 inhibits invasion and proliferation of gastric cancer cell in vitro and in vivo. *Pathobiology* 2010; 77: 155-162
- 19 Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Chang XJ, Kiśluk J, Kemon A. PTP4A3 (PRL-3) expression correlate with lymphatic metastases in gastric cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 48: 632-636

■同行评价

本文以miR495和miR551a为研究对象, 构建miR495和miR551a的真核表达载体, 稳定转染胃癌SGC7901细胞后, 显著抑制PRL-3 mRNA及蛋白的表达, 实验设计合理, 具有一定的科学意义。

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)

人肠道病毒71型VP1和VP4的抗原融合表达及鉴定

冷 弘, 王 娜, 王媛媛, 臧文巧, 李 敏, 赵国强

■背景资料

人肠道病毒71型(EV71)主要引起手足口病、疱疹性咽峡炎等多种疾病。世界各国EV71爆发流行日趋严重, 传染性强, 传播速度快。在疾病流行早期对病原的检测尤为重要。

冷弘, 洛阳职业技术学院免疫学与病原生物学教研室 河南省洛阳市 471000

王娜, 王媛媛, 臧文巧, 李敏, 赵国强, 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450001

冷弘, 高级讲师, 主要从事病原生物学诊断方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由赵国强设计; 冷弘、王娜、王媛媛、臧文巧及李敏操作完成; 数据分析由冷弘与王娜完成; 论文写作由冷弘、王娜及赵国强完成。

通讯作者: 赵国强, 教授, 450001, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学基础医学院. zhaogq@zzu.edu.cn

收稿日期: 2012-09-26 修回日期: 2012-11-09

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Construction of a prokaryotic expression vector containing the EV71 VP1-VP4 fusion gene and detection of its expression

Hong Leng, Na Wang, Yuan-Yuan Wang, Wen-Qiao Zang, Min Li, Guo-Qiang Zhao

Hong Leng, Department of Immunology and Pathogen Biology, Luoyang Vocational & Technical College, Luoyang 471000, Henan Province, China

Na Wang, Yuan-Yuan Wang, Wen-Qiao Zang, Min Li, Guo-Qiang Zhao, Department of Microbiology and Immunology, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Correspondence to: Guo-Qiang Zhao, Professor, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. zhaogq@zzu.edu.cn

Received: 2012-09-26 Revised: 2012-11-09

Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To construct a prokaryotic vector expressing human enterovirus 71 (EV71) VP1-VP4 fusion antigen.

METHODS: A prokaryotic expression plasmid carrying the VP1-VP4 fusion gene was constructed and transformed into *E. coli* DH5 α . VP1-VP4 fusion protein was induced to express with IPTG. SDS-PAGE and Western blot were performed to detect VP1-VP4 fusion protein. Purified VP1-VP4 fusion protein was coated onto ELISA plates to detect 41 serum samples for screening EV71 positive serum samples.

RESULTS: The sequence of recombinant VP1-VP4 fragment was the same as the expected

sequence, indicating that the recombinant vector was successfully constructed. SDS-PAGE showed that the fusion protein had a molecular weight of 42.8 kDa. Western blot showed that fusion protein can be specifically recognized by VP1 antibody and VP4 antibody. Fusion protein coated onto ELISA plates could accurately detect 16 EV71 positive serum samples from 41 serum samples without cross-reactivity with coxsackievirus16 (CA16).

CONCLUSION: The VP1-VP4 fusion protein has good antigenicity and can be used as a diagnostic antigen to detect EV71 infection. Our results provide a experimental basis for development of EV71 diagnostic kits.

Key Words: EV71; VP1; VP4; Fusion antigen; Fusion PCR

Leng H, Wang N, Wang YY, Zang WQ, Li M, Zhao GQ. Construction of a prokaryotic expression vector containing the EV71 VP1-VP4 fusion gene and detection of its expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3366-3369

摘要

目的: 构建人肠道病毒71型(human enterovirus 71, EV71)VP1-VP4重组融合蛋白表达体系。

方法: 构建EV71 VP1-VP4重组融合蛋白原核表达载体转化大肠杆菌DH5 α , 诱导表达融合蛋白VP1-VP4、SDS-PAGE和Western blot法进行鉴定。用融合蛋白包被ELISA板检测41例已知血清。

结果: 重组片段VP1-VP4测序结果与设计目的片段序列相符, 重组载体构建成功; SDS-PAGE显示融合蛋白约42.8 kDa, 与预期值一致; Western blot提示该融合蛋白可以和EV71 VP1、VP4抗体特异性结合。融合蛋白包被ELISA板能准确检测出41例血清中16例EV71阳性血清, 与CA16无交叉反应。

结论: 表达的EV71 VP1-VP4融合蛋白具有良好的抗原性, 可作为EV71感染检测抗原, 为

■同行评议者

任晓峰, 教授, 东北农业大学动物医学学院微生物室

EV71诊断试剂和疫苗的研究奠定实验基础.

关键词: EV71; VP1, VP4; 融合抗原; 融合PCR

冷弘, 王娜, 王媛媛, 臧文巧, 李敏, 赵国强. 人肠道病毒71型VP1和VP4的抗原融合表达及鉴定. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3366-3369

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3366.asp>

0 引言

人肠道病毒71型(human enterovirus 71, EV71)属于小RNA病毒科肠道病毒属, 于1974年由Schmidt首次从一些患有中枢神经系统疾病的患者标本中分离并报道^[1,2]. EV71主要引起手足口病、疱疹性咽峡炎、无菌性脑炎、脑膜炎以及脊髓灰质炎等多种疾病^[3,4]. 近年来, 世界各国EV71爆发流行日趋严重, 传染性强, 传播速度快, 引起科学家们的日益关注. 对EV71所引起的疾病, 目前尚无有效的药物来进行治疗, 疫苗也处于研究阶段^[5,6]. 因此, 对EV71的快速检测显得尤为迫切, EV71血清学检测方法的研究受到相关领域科学家的关注. EV71病毒由4种结构蛋白构成其衣壳, 分别为VP1、VP2、VP3、VP4, 其中VP1、VP2、VP3位于衣壳的外表面, VP4位于病毒衣壳的内表面. 研究报道VP2、VP3无明显的免疫原性, VP1和VP4蛋白具有良好的免疫原性^[7-9], 因此本文拟采用融合PCR技术将EV71 VP1和VP4基因连接, 导入质粒载体, 并在大肠杆菌中诱导表达VP1-VP4融合蛋白, 预期为EV71诊断试剂的开发和疫苗研制奠定试验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 原核表达载体pQE-80L、质粒DNA提取纯化试剂盒、Ni-NTE His-Bind Resin亲和层析树脂(QIAGEN公司); 大肠杆菌DH5 α 、DNA凝胶回收试剂盒、限制性内切酶*Kpn* I、*Hind* III, T4 DNA连接酶、DL2000 DNA Marker(大连宝生物公司); Prestained Protein Molecular Weight Marker(Fermentas公司); EV71 VP1和VP4 cDNA克隆来源于本课题组前期工作; EV71 VP1抗体、EV71 VP4抗体(Uniformed Services University of the Health Sciences职慧军博士惠赠); HRP标记的羊抗人IgG(Sigma公司); EV71阳性血清16例, 柯萨奇病毒A16(coxsachie virus 16, CA16)阳性血清5例, 阴性血清20例由洛阳市疾控中心提供.

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成: 参考本课题组前期工作所获得的EV71全基因组序列(Accession No. JN020147)及其他登记序列^[10-12], 依据融合PCR技术方法要领, 分别设计2对引物扩增VP1、VP4基因片段, 并在VP4F 5'端引入*Kpn* I 酶切位点, 在VP4R、VP1F 5'端分别加上互补的柔性肽(GGGGSG)DNA序列, 在VP1R引入终止密码子和*Hind* III酶切位点. VP4F(5'-GTAGGTACCATGGGGTCACAAGTCTCTACTC-3'); VP4R(5'-ACCCGATCCACCTCCGCCCTTGAGCGGTGAGCCATCTCA-3'); VP1F(5'-AAGGGCGGAGGTGGATCGGGT GGAGATAGGGTGGCAGATGT-3'); VP1R(5'-CCTAAGCTT AAGAGTGTGTATCGCTGTGCG -3'), 引物由上海生工生物工程有限公司合成.

1.2.2 目的基因融合扩增: 常规PCR从EV71 VP1、VP4 cDNA克隆分别扩增VP1、VP4目的序列. 再混合VP1、VP4 PCR产物为模板, 用引物VP4F和VP1R进行融合PCR, 获得由柔性肽基因连接的融合基因片段VP1-VP4, 电泳鉴定.

1.2.3 重组表达载体的构建: *Kpn* I 和*Hind* III双酶切融合片段VP1-VP4和pQE-80L原核表达载体, 电泳, 胶回收纯化. 载体pQE-80L和融合片段在T4连接酶作用下, 16 °C过夜连接后转化大肠埃希菌DH5 α , 挑取阳性克隆抽提质粒, *Kpn* I 和*Hind* III双酶切电泳鉴定. 重组质粒送上海生工生物工程有限公司测序.

1.2.4 融合蛋白的诱导表达及纯化: 取对数生长期转化菌, 加入异丙基硫代D半乳糖(IPTG)至终浓度1 mmol/L, 37 °C诱导表达6 h, 离心收集菌体, 超声破碎后取上清12%SDS-PAGE电泳, 检测融合蛋白表达情况. 同时将收集的上清液用0.45 μ m滤膜过滤, 利用Ni-NTE His-Bind Resin亲和层析纯化融合蛋白, SDS-PAGE电泳.

1.2.5 Western blot检测融合蛋白: 取未诱导转化菌裂解产物、诱导转化菌裂解产物进行12% SDS-PAGE后转移至PVDF膜上, PBS洗膜3次, 每次5 min, 放入含有5%脱脂奶粉的PBS中封闭2 h. 洗膜后与EV71 VP1、VP4抗体37 °C孵育1 h, 洗膜, 加入HRP标记的羊抗人IgG孵育1 h, 显色.

1.2.6 包被融合蛋白抗原ELISA法检测待检血清: 调整纯化的融合蛋白浓度为3 μ g/mL, 按100 μ L/孔4 °C过夜包被酶标板. 洗板后2%BSA 37 °C封闭1 h. 用上述包被板检测EV71阳性血

■研发前沿

对病原进行检测, 血清学为一种重要的方法, 但单一抗原作为诊断抗原, 极易造成漏检. 融合几种特异性抗原来检测可以提高检测准确性和灵敏性.

■相关报道

本文采用融合PCR技术将EV71 VP1和VP4基因通过柔性肽基因序列连接起来, 导入质粒载体, 并在大肠杆菌中诱导表达VP1-VP4融合蛋白, 为EV71诊断试剂的开发和疫苗研制提供基础.

■应用要点

EV71病毒VP1、VP4结构蛋白具有良好的抗原性,利用融合PCR将VP1、VP4基因片段连接后导入pQE-80L质粒,重组质粒在大肠杆菌中得到良好表达。

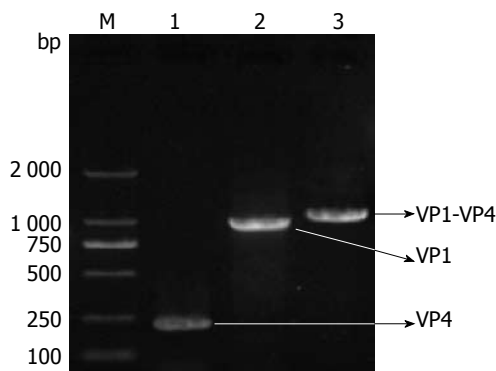


图1 VP4、VP1和融合基因VP4-VP1的PCR扩增产物电泳结果。M: 2 000 bp DNA分子质量标准; 1: VP4扩增产物; 2: VP1扩增产物; 3: VP4和VP1连接扩增产物。

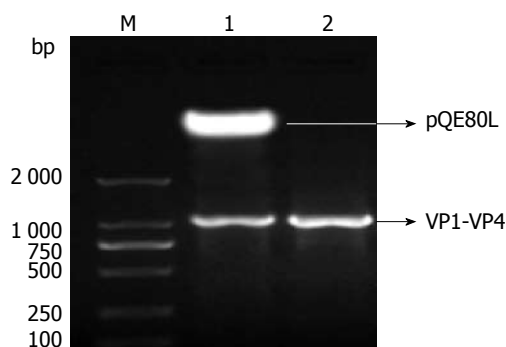


图2 重组质粒pQE-80L-VP4-VP1双酶切产物的电泳结果。M: 2000 bp分子质量标准; 1: pQE-80L-VP1-VP4重组质粒KpnI、HindIII双酶切产物; 2: VP4和VP1连接PCR扩增产物。

清16例, CA阳性血清5例, 阴性血清20例。方法: 在180 μ L PBS中加入待检血清20 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C反应45 min; 洗涤3次后加入1:5 000 HRP标记的羊抗人IgG (100 μ L/孔), 反应30 min; 洗涤后加入TMB底物(100 μ L/孔), 反应15 min, 加终止液终止反应, 450 nm波长测量各孔的吸光度, 换算出个样品抗体浓度, 以>5 ng/L为阳性。

2 结果

2.1 目的基因的扩增及融合 以EV71 VP1、VP4 cDNA克隆为模板分别对VP1、VP4基因进行PCR扩增, 获得长度分别为234 bp、921 bp片段。对目的基因进行融合扩增后, 获得1 128 bp片段, 电泳结果均与预期相符(图1)。

2.2 重组质粒的双酶切鉴定 重组质粒pQE-80L-VP1-VP4经KpnI和HindIII双酶切后, 电泳出现4.8 kb的载体条带和1 128 bp的融合基因条带(VP1-VP4), 与预期相符(图2), 测序结果与设计目的片段序列相符, 重组载体成功构建。

2.3 融合蛋白的表达与纯化 将所构建的重组质粒在最佳诱导条件下进行诱导表达, SDS-PAGE

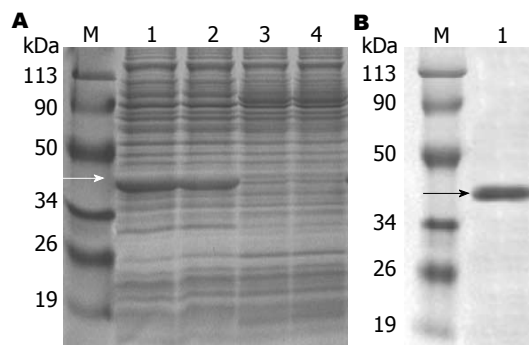


图3 融合蛋白SDS-PAGE分析。A: M: 蛋白分子质量标准; 1, 2: 诱导的pQE-80L-VP1-VP4转化菌裂解产物; 3, 4: 未诱导的pQE-80L-VP1-VP4转化菌裂解产物; B: M: 蛋白分子质量标准; 1: 亲和层析纯化的融合蛋白。箭头代表VP1-VP4。

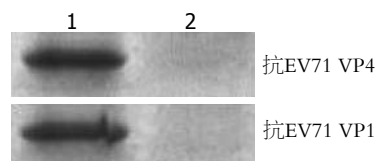


图4 融合蛋白的Western blot结果。1: 诱导转化菌裂解产物蛋白印迹; 2: 未诱导转化菌裂解产物蛋白印迹。

检测表达情况。结果显示目的蛋白于37 $^{\circ}$ C经IPTG诱导呈现高效表达(图3A)。表达产物经Ni柱亲和和层析纯化后得到较纯的目的片段, 融合蛋白大小约42.8 kDa左右(图3B)。

2.4 Western blot检测结果 Western blot结果显示, 诱导转化菌裂解产物SDS-PAGE电泳转膜后, 能与EV71 VP1、VP4抗体发生特异性结合而显色, 而未诱导转化菌裂解产物不能与EV71 VP1、VP4抗体发生反应呈融合抗原表达阴性(图4)。

2.5 包被融合蛋白抗原ELISA法检测待检血清结果 用本文所包被融合蛋白抗原ELISA法检测已知EV71阳性血清16例、CA16阳性血清5例, 阴性血清20例(洛阳市疾病预防控制中心提供)。结果显示, 融合蛋白和16例EV71阳性血清反应阳性, 而不与CA16阳性血清及阴性血清反应。证明本文所包被融合蛋白抗原ELISA法可以用来作为检测人群EV71感染情况。

3 讨论

EV71感染尚无有效的药物, 疫苗也处于试验阶段, 因此对EV71病原的检测就显得尤其重要, 流行早期快速及时的检测病原, 可以及早发现疫情, 为病源的隔离、切断传播途径、避免病原的扩散赢得时间。

EV71传统的检测方法是对病原体的直接检测, 利用敏感细胞培养病毒, 然后通过中和试验

进一步进行病毒型别鉴定. 传统检测方法操作复杂, 周期长, 不适合疫情早期快速诊断. 现代检测方法包括以PCR技术为基础的病毒特异性片段的检测以及血清学检测2种方法^[13-15]. PCR相关技术是目前最为快速有效的方法, 但该方法具有较高的灵敏性和特异性的同时又具有标本易污染而产生假阳性等缺点, 且需要专业的仪器设备, 不利于基层医务人员开展工作.

血清学检测的重点在于检测抗原的选取. 由于病毒在感染的不同阶段释放的抗原种类及数量均不相同, 且因侵入机体的差异, 也会导致病毒抗原种类释放的差异, 若采用单一抗原进行检测准确率低, 极易造成漏检; 若构建几种特异性融合抗原进行检测则可以提高检测的准确性和灵敏性. 融合PCR技术采用具有互补末端的引物, 形成具有重叠链的PCR产物, 通过PCR产物重叠链的延伸将不同来源的任意DNA片段连接起来, 为基因重组片段的构建提供了快速简捷的途径.

EV71病毒基因组为单股正链RNA, 具一个开放阅读框, 编码一个多聚蛋白, 该多聚蛋白可进一步加工为VP1、VP2、VP3、VP4 4个结构蛋白及其他功能蛋白质. 其中VP1、VP2和VP3 3个结构蛋白暴露在病毒外壳的表面, VP4结构蛋白包埋在病毒外壳的内部与病毒核心紧密相连^[16]. 研究报道VP2、VP3无明显的免疫原性, VP1和VP4蛋白具有良好的免疫原性, 产生高抗体滴度. 故本文以VP1、VP4为目的基因, 利用融合PCR扩增了VP1-VP4融合基因, 载入表达载体pQE-80L后在大肠杆菌细胞中得到表达.

利用所构建的融合蛋白包被酶标板能从41例待检血清中准确检测出16例EV71阳性血清, 提示所构建的融合蛋白可以作为检测EV71的备选抗原. 本文为下一步利用融合蛋白建立有效的EV71血清学检测方法, 并对其特异性和灵敏性进行实验比较奠定试验基础, 也为后续观察VP1、VP4抗原的免疫保护作用、EV71疫苗的开发提供理论支持.

4 参考文献

- 1 Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardosa MJ, McMinn P, Ooi MH. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 778-790
- 2 McMinn PC. Recent advances in the molecular epidemiology and control of human enterovirus 71 infection. *Curr Opin Virol* 2012; 2: 199-205
- 3 Lee TC, Guo HR, Su HJ, Yang YC, Chang HL, Chen KT. Diseases caused by enterovirus 71 infection. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 904-910
- 4 Bek EJ, McMinn PC. The Pathogenesis and Prevention of Encephalitis due to Human Enterovirus 71. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14: 397-407
- 5 Zhang D, Lu J, Lu J. Enterovirus 71 vaccine: close but still far. *Int J Infect Dis* 2010; 14: e739-e743
- 6 Lee MS, Chang LY. Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2010; 9: 149-156
- 7 Xu J, Wang S, Gan W, Zhang W, Ju L, Huang Z, Lu S. Expression and immunogenicity of novel subunit enterovirus 71 VP1 antigens. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420: 755-761
- 8 Kolpe AB, Kiener TK, Grotenbreg GM, Kwang J. Display of enterovirus 71 VP1 on baculovirus as a type II transmembrane protein elicits protective B and T cell responses in immunized mice. *Virus Res* 2012; 168: 64-72
- 9 Kiener TK, Jia Q, Lim XF, He F, Meng T, Chow VT, Kwang J. Characterization and specificity of the linear epitope of the enterovirus 71 VP2 protein. *Virol J* 2012; 9: 55
- 10 冷弘, 卢欣, 刘慧涛, 马云云, 王媛媛, 马晶, 郭茂峰, 李敏, 赵国强. 肠道病毒71型河南分离株2株全基因组序列分析. *郑州大学学报(医学版)* 2012; 47: 170-174
- 11 Wang X, Zhu C, Bao W, Zhao K, Niu J, Yu XF, Zhang W. Characterization of full-length enterovirus 71 strains from severe and mild disease patients in northeastern China. *PLoS One* 2012; 7: e32405
- 12 Chang SC, Li WC, Chen GW, Tsao KC, Huang CG, Huang YC, Chiu CH, Kuo CY, Tsai KN, Shih SR, Lin TY. Genetic characterization of enterovirus 71 isolated from patients with severe disease by comparative analysis of complete genomes. *J Med Virol* 2012; 84: 931-939
- 13 于贺娟, 许汴利, 黄学勇, 卫海燕, 李幸乐, 杜燕华. EV71 TaqMan PCR检测方法的建立及初步应用. *现代预防医学* 2010; 37: 1517-1523
- 14 马洪滨, 侯俊, 李鲁平, 杨静, 李静霞, 刘爱霞, 徐军, 聂为民, 李伯安, 毛远丽. 肠道病毒71型血清学检测方法的建立及应用. *解放军医学杂志* 2010; 35: 239-240
- 15 Wu S, Duan N, Ma X, Xia Y, Yu Y, Wang Z, Wang H. Simultaneous detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using dual-colour upconversion luminescent nanoparticles as labels. *Chem Commun (Camb)* 2012; 48: 4866-4868
- 16 高爽, 龙健儿. 肠道病毒71型的功能基因组学研究进展. *生命科学* 2012; 24: 43-49

■同行评价

本文选题新颖, 为EV71的检测提供新的方法和思路, 具有一定的学术价值和应用前景.

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

miR-106a在大肠癌中的表达及其与肠癌细胞侵袭的关系

马群英, 王新颖, 李钊, 姜泊, 许岸高

■背景资料

microRNAs是一种21-25 nt长的单链RNA, 在进化上具有高度的保守性, 可抑制蛋白翻译, 调节内源基因表达, 且在基因表达调控中扮演重要角色, 也为癌症的早期筛查、诊断、治疗等方面提供新的理论基础及方法。

马群英, 王新颖, 李钊, 姜泊, 南方医科大学南方医院 广东省广州市 510515

许岸高, 惠州市医学研究所 惠州市第一人民医院 广东省惠州市 516001

马群英, 博士, 主要从事大肠癌临床及分子方面的研究。

作者贡献分布: 马群英、姜泊及许岸高对此文贡献均等; 此课题由马群英、姜泊及许岸高作者设计; 研究过程由马群英、王新颖、李钊、姜泊及许岸高操作完成; 数据分析、论文写作由马群英、姜泊及许岸高完成。

通讯作者: 许岸高, 教授, 博士生导师, 516001, 广东省惠州市江北三新南路20号, 惠州市医学研究所, 惠州市第一人民医院。 angao62@21cn.com

电话: 020-62787385

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-20

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-12-08

Expression of miR-106a in colorectal cancer and its relation with tumor cell invasion

Qun-Ying Ma, Xin-Ying Wang, Zhao Li, Bo Jiang, An-Gao Xu

Qun-Ying Ma, Xin-Ying Wang, Zhao Li, Jiang Bo, Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

An-Gao Xu, Huizhou Medicine Institute, Huizhou First Hospital, Huizhou 516001, Guangdong Province, China

Correspondence to: An-Gao Xu, Professor, Huizhou Medicine Institute, Huizhou First Hospital, 20 Jiangbei Sanxin South Road, Huizhou 516001, Guangdong Province, China. angao62@21cn.com

Received: 2012-02-20 Revised: 2012-03-20

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To assess the clinical significance of expression of miR-106a in colorectal cancer (CRC), and to investigate the effect of miR-106a overexpression on CRC cell invasion.

METHODS: Total RNA was extracted from 52 surgical CRC specimens and matched tumor-adjacent tissue specimens. MiR-106a expression was detected by real-time PCR, and its clinical significance was analyzed. Cell invasion assay was used to study the effect of miR-106a overexpression on CRC cell invasion.

RESULTS: The mean level of miR-106a in CRC

tissues, as revealed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, was 2.50 (0.017-14.269), which was significant higher than that in tumor-adjacent tissues ($Z = -3.597, P < 0.01$). The expression of miR-106a was correlated with TNM stag ($t = 2.813, P = 0.003$) and lymph node metastasis ($Z = -2.635, P = 0.008$). Overexpression of miR-106a induced cell invasion ($P = 0.000$).

CONCLUSION: Up-regulation of miR-106a may play a role in tumorigenesis and metastasis of colorectal cancer.

Key Words: MiR-106a; Colorectal cancer; TNM stage; Cell migration

Ma QY, Wang XY, Li Z, Jiang B, Xu AG. Expression of miR-106a in colorectal cancer and its relation with tumor cell invasion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3370-3374

摘要

目的: 分析miR-106a在肠癌中的表达并研究其在肠癌细胞侵袭中的作用。

方法: 提取52例肠癌手术标本及其癌旁组织中总RNA, PCR法检测miR-106a在肠癌及其癌旁正常组织中的表达量, 分析其与临床病理特征关系, 并进一步采用Transwell侵袭小室检测其在大肠癌细胞侵袭中的作用。

结果: 经 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算, 肠癌组织miR-106a表达量为2.50(0.017-14.269), 其中73%(38/52)大肠癌组织miR-106a高表达($Z = -3.748, P = 0.000$), miR-106a的高表达与TNM分期($t = 2.813, P = 0.003$)和淋巴结转移($t = -2.635, P = 0.008$)有关, TNM分期较高和有淋巴结转移者, miR-106a表达较高。Transwell侵袭小室检测表明, 过表达miR-106a可促进肠癌细胞侵袭作用(均 $P = 0.000$)。

结论: miR-106a表达上调可能与大肠癌的发生及其转移相关。

关键词: miR-106a; 大肠癌; TNM分期; 细胞侵袭

马群英, 王新颖, 李钊, 姜泊, 许岸高. miR-106a在大肠癌中的

■同行评议者

李革, 副教授, 延边大学附属医院

表达及其与肠癌细胞侵袭的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3370-3374
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3370.asp>

0 引言

microRNAs(miRNAs)是一种长为21-25 nt的单链RNA, 在进化上具有高度的保守性. 在动物中, 他们通过与靶标mRNA不完全互补配对抑制蛋白翻译, 调节内源基因表达, 且在基因表达调控中扮演重要角色. 动物中miRNA与靶标mRNA不完全配对结合, 同一miRNA可调控不同mRNA而不影响其完整性. 因而一种miRNA改变, 可影响多种蛋白翻译和信号通道, 参与细胞生长、增殖、分化、凋亡等过程的调控^[1-3]. Calin等^[4]于2002年首次发表文章, 将miRNAs与癌症联系起来. 随后, 大量研究证实miRNAs可能作为一种新的方法, 应用于肿瘤的筛查、诊断、预后和化疗反应预测等各个方面^[5-7]. 本文通过探针法逆转、实时定量PCR检测52例肠癌中miR-106a的表达, 分析其与分期及其他临床病理特征的关系, 研究其在肠癌细胞侵袭中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 惠州中心医院外科手术切除的新鲜肠癌组织及其相应癌旁正常组织52对, 术后经病理检查确诊. 组织获得后立即置于-80℃超低温冰箱. 所有患者术前均未行放疗、化疗与免疫治疗. TNM分期以美国癌症联合委员会(American joint committee on cancer, AJCC)/国际抗癌联盟(international union against cancer, UICC)结直肠癌TNM分期系统(第六版)为标准. TRIzol试剂、Lipofactmine 2000、OPTI-MEM均购自Invitrogen; miR106a RT Primer、miR106a Real time、U6 RT Primer、U6 Real time、2×PCR TaqMan Universal PCR, TaqManMicroRNA Reverse Transcription kit均购自ABI公司; Matrigel基质胶和8 μm Transwell小室均购自美国BD公司; HCT116和LoVo细胞系购自上海细胞库, 为南方医院消化病实验室细胞培养室保存; 阴性对照和miR-106 mimics购自上海吉玛公司.

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA提取: -80℃超低温冰箱保存组织称取30 mg, 于冰上碾磨器磨碎, 加入1 mL TRIzol试剂, 按说明书操作提取总RNA, Nanodrip(ND-1000, USA)检测RNA溶液 $A_{260/280}$ 比

值及浓度, 取 $A_{260/280}$ 在1.8-2.1者用于进一步试验.

1.2.2 cDNA合成及Real-time PCR: 取100 ng总RNA按试剂说明书操作逆转录cDNA, 反应条件: 16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min. 然后按2×PCR TaqManUniversal PCR试剂盒说明, 以miR-106a和U6第一链为模板, 用miR-106a和U6荧光探针为引物扩增. 以上荧光PCR检测均在ABI PRISM 7500(Applied Biosystems, USA)型荧光定量PCR仪操作完成, 所有反应设立3个复孔, 检测方法为相对定量分析 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法.

1.2.3 细胞培养: HCT116和LoVo细胞培养于10%胎牛血清、双抗的RPMI 1640培养基中. 细胞均接种于12孔板中, 细胞密度约30%-50%. 按转染试剂Lipo2000说明书分空白转染组、阴性对照组和miR-106 mimics组3组分别转染. 转染后24 h消化细胞备用.

1.2.4 Transwell小室侵袭实验: 冰上融化Matrigel和不含血清的RPMI 1640培养基按1:7混合, 均匀铺于8 μm的Transwell上室面, 不同处理组别细胞培养24 h后消化, 重悬, 接种200 μL无血清培养基稀释的细胞(5×10^5 个/mL), 下室加入含10%FBS的RPMI 1640培养基. 细胞培养36 h后终止培养. 医用棉签擦掉上室内细胞, 重复2次, 4%多聚甲醛固定, 0.1%结晶紫染色, PBS洗净后显微镜下低倍视野观察细胞数, 每小室随机取5个视野, 并记录每个视野细胞数.

统计学处理 用SPSS13.0软件进行. 组织miR-106a数据不符合正态分布, 均采用非参数检验. 配对资料采用配对资料的wilcoxon符号秩和检验(wilcoxon signed-rank test), miRNAs与其他临床病理资料的检验2组之间比较采用Mann-whitney检验, 分析miRNAs与等级变量相关关系采用Jonchheere-Terpstra检验. 细胞实验中多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 如方差齐, 多组间两两比较采用Bonferroni法; 如方差不齐, 多组间两两比较采用Tamhane's T2检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 miR-106a在肠癌组织中高表达 我们采用TaqMan^R探针法RT-PCR检测miR-106a表达, 以U6为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析肠癌组织相对癌旁正常组织的相对表达量. miR-106a在73%(38/52)的肠癌组织中高表达; 与癌旁正常组织比较, miR-106a在肠癌组织中的相对表达量为2.50, 高于癌

■研发前沿

2003年Michael等首先发现了大肠癌中新的miRNAs: miR-143和miR-145, 现在大肠癌中研究较多的有100多种miRNAs, 与大肠癌的发生发展及诊治等密切相关. miR-106a在大肠癌中高表达. 但其具体作用机制不详.

■相关报道

Schetter等分析2个队列共197例大肠癌组织miR-106a表达, 发现与癌旁正常组织相比, 肠癌组织中miR-106a的表达增高. Xiao等分析55例胃癌组织和17例非癌组织发现miR-106a在胃癌组织中高表达(1.625倍), 而且其表达水平与肿瘤分期、大小、分化及淋巴结和远处转移相关.

■ 创新盘点

miR-106a在大肠癌中过表达的报道较多,但其在肠癌中的临床分析及细胞功能学研究较少。本研究采用RT-PCR、Western blot、Transwell小室侵袭实验检测其在肠癌组织中的表达,分析其与分期和淋巴结转移的关系,探索其在细胞侵袭中作用,具有一定创新性。

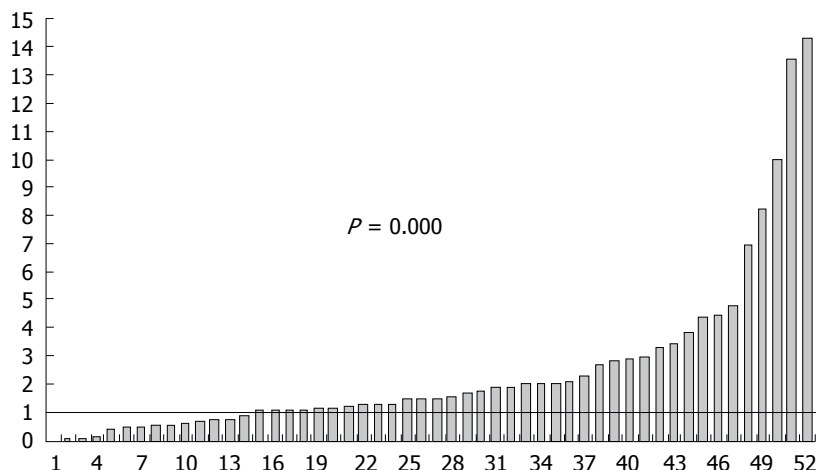


图1 miR-106a在大肠癌中的表达。

旁正常组织(图1), 差异有统计学意义($Z = -3.748$, $P = 0.000$).

2.2 miR-106a表达水平与TNM分期和淋巴结转移相关 miR-106a的表达在TNM不同分期中表达差异有显著性($t = 2.813$, $P = 0.003$)和淋巴结转移($t = -2.635$, $P = 0.008$). 随着TNM分期越高, miR-106a表达越高. 有淋巴结转移肠癌组织中miR-106a表达明显高于无淋巴结转移标本. miR-106a表达和性别、年龄、肿块位置及组织分化程度无关.

2.3 过表达miR-106a促进肠癌细胞的侵袭 以上结果表明miR-106a表达可能与肠癌的转移有关, 因而进一步采用Transwell小室验证其在细胞侵袭中的作用. 瞬时转染HCT116和LoVo细胞, 转染浓度为50 nmol/L, 转染后24 h进行PCR验证. 结果表明转染miR-106a mimics后miR-106a表达明显增加(均为 $P < 0.01$). 转染后细胞侵袭改变(图2, 3)差异有显著性(F 值分别为120.631和196.611, P 值均为0.000). 进一步行组间比较, 结果显示: 与阴性对照组相比, miR-106a组可促进细胞侵袭, 差异有显著性(均为 $P = 0.000$).

3 讨论

miRNAs是一种广泛存在的调控基因表达的小分子RNA, 可通过调控下游靶基因一癌基因和/或抑癌基因的表达, 参与肿瘤发生、发展, 决定肿瘤细胞的恶性特征, 在肿瘤发生、发展、转归中的起着重要作用. miRNAs的发现及其与肿瘤相关性的初步揭示、补充并丰富了肿瘤的发生机制, 为肿瘤的分子机制学研究提供了新的思路.

microRNA的研究方法有microarray、Northern blot、原位杂交和Real-time PCR. 一般mi-

croarray被用于miRNA表达谱的筛选. Northern blot也可检测miRNAs表达及大小, 但存在探针敏感性问题. 原位杂交可以还原特定microRNA的细胞定位及相对定量, 但也存在敏感性问题. 而Real-time PCR具有高度的敏感性和特异性. Real-time PCR的化学原理分为探针型和非探针型, 探针型荧光定量PCR是与模板特异性结合的荧光探针反应扩增产物的增加, 特异性更高. 本研究采用Taqman MGB探针检测大肠癌及癌旁组织中miR-106a的表达, 而且以U6为内参, 进一步减少因加样量不齐而带来的结果差异, 以期得到准确的结果.

miRNAs与肠癌的发生发展密切相关. 首先, miRNAs与大肠癌的诊断相关. Ng等^[8]发现miR-17-3p和miR-92a可作为肠癌的循环靶标, 其中后者的ROC曲线下面积可达88.5%, 敏感性和特异性分别为: 89%和70%; 更为重要的是, 其可区分胃癌和炎症性肠病. 类似结果在Huang等^[7]的研究中得到证实. 该研究中证实miR-92a和miR-29a可把肠癌、腺瘤从正常受试者中区分出来; 其次, miRNAs也与肠癌的预后相关. 其中miR-143与miR-145肿瘤大小呈负相关^[9], 被认为是抑癌基因; 另一研究却证实miR-143高表达与差的无疾病进展生存期有关^[10]. miR-21的高表达与高TNM分期、淋巴结转移、远处转移、短的无疾病生存期和差的治疗结果有关^[9,10].

miR106a的研究较多, 其中胃癌中miR-106a表达增加, 其表达与肿瘤分期、大小、分化、淋巴结及远处转移相关^[11]. miR-106a还与肿瘤的预后密切相关. Díaz等^[12]分析110例肠癌患者, 发现miR-106a的低表达与短的无疾病生存期和总生存期有关, 而且这种相关关系与分期无关; 星

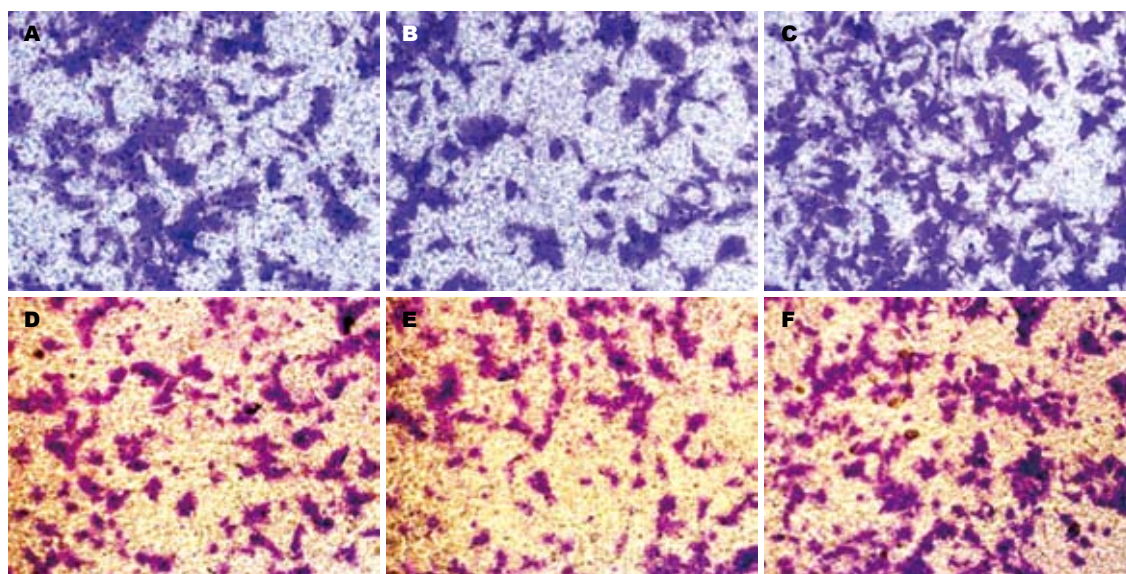


图2 miR-106a促进肠癌细胞侵袭。A, B, C: HCT116; D, E, F: LoVo; A, D: 空白组; B, E: 阴性对照组; C, F: miR-106a mimics组。

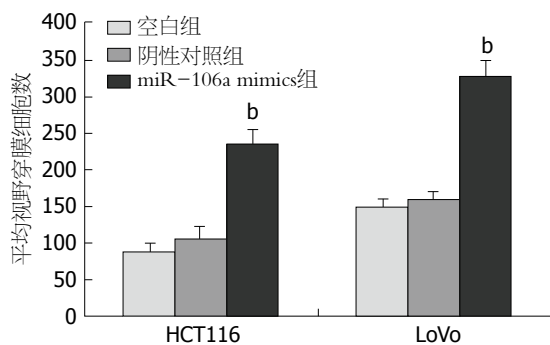


图3 miR-106a促进肠癌细胞侵袭。^b $P < 0.01$ 。

形细胞瘤中miR-106a低表达也与差的患者生存相关^[13,14]。食管鳞状细胞瘤中miR-106a在复发患者及肿瘤性死亡患者中表达较低^[15]。可见, miR-106a虽然在大多数肿瘤中高表达, 但其高表达在所研究的肿瘤中均与较长的生存期相关, 可能具有肿瘤抑制作用。

本研究证实miR-106a在大肠癌中高表达, 差别有统计学意义, 且miR-106a的表达与分期正相关, 与淋巴结转移相关; 进一步细胞实验证实miR-106a可促进细胞侵袭, 提示miR-106a可能在大肠癌的发生及转移中具有一定作用。本研究结果与最近发表的一篇论文类似^[16]。该论文也提示miR-106a高表达与肠癌侵袭转移增加相关; 但文章提示miR-106a高表达与差的生存期相关, 与上述文献结果矛盾, 可能与其生存分析中只分析28例未发生转移的肠癌患者组织有关。

总之, miR-106a在肠癌中高表达, 与分期和细胞侵袭正相关, 似乎具有促癌作用, 而大样本

■创新盘点

miR-106a在肠癌组织中表达高, 与肿瘤组织的分期和淋巴结转移相关, 且过表达miR-106a可促进肠癌细胞的侵袭。因而miR-106a的表达可能与大肠癌的转移相关, miR-106a可能成为肠癌的分子治疗的靶标之一。

相关生存分析证实其具有肿瘤保护作用, 因而其在肠癌中的作用需进一步研究以确认其具体的作用机制, 以期为将来的临床治疗提供理论基础。

4 参考文献

- Feng S, Cong S, Zhang X, Bao X, Wang W, Li H, Wang Z, Wang G, Xu J, Du B, Qu D, Xiong W, Yin M, Ren X, Wang F, He J, Zhang B. MicroRNA-192 targeting retinoblastoma 1 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in lung cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 6669-6678
- Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat Immunol* 2010; 11: 799-805
- Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins JF, Patrawala L, Cheng A, Ford L, Weidhaas JB, Brown D, Bader AG, Slack FJ. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 2008; 7: 759-764
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rasenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-15529
- Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, Nykter M, Harris CC, Chen K, Hamilton SR, Zhang W. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One* 2011; 6: e17745
- Cortez MA, Ivan C, Zhou P, Wu X, Ivan M, Calin GA. microRNAs in cancer: from bench to bedside. *Adv Cancer Res* 2010; 108: 113-157
- Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomark-

■同行评价

本文设计合理, 有一定的创新性, 结论可信, 论据充分, 具有较高的学术价值.

- ers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 118-126
- 8 Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375-1381
- 9 Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007; 72: 397-402
- 10 Kulda V, Pesta M, Topolcan O, Liska V, Treska V, Sutnar A, Rupert K, Ludvikova M, Babuska V, Holubec L, Cerny R. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 200: 154-160
- 11 Xiao B, Guo J, Miao Y, Jiang Z, Huan R, Zhang Y, Li D, Zhong J. Detection of miR-106a in gastric carcinoma and its clinical significance. *Clin Chim Acta* 2009; 400: 97-102
- 12 Díaz R, Silva J, García JM, Lorenzo Y, García V, Peña C, Rodríguez R, Muñoz C, García F, Bonilla F, Domínguez G. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47: 794-802
- 13 Zhi F, Chen X, Wang S, Xia X, Shi Y, Guan W, Shao N, Qu H, Yang C, Zhang Y, Wang Q, Wang R, Zen K, Zhang CY, Zhang J, Yang Y. The use of hsa-miR-21, hsa-miR-181b and hsa-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma. *Eur J Cancer* 2010; 46: 1640-1649
- 14 林三仁. 中国消化病学科发展30年回顾与展望. *中国实用内科杂志* 2011; 31: 827
- 15 Hummel R, Hussey DJ, Michael MZ, Haier J, Bruewer M, Senninger N, Watson DI. MiRNAs and their association with locoregional staging and survival following surgery for esophageal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 253-260
- 16 Feng B, Dong TT, Wang LL, Zhou HM, Zhao HC, Dong F, Zheng MH. Colorectal cancer migration and invasion initiated by microRNA-106a. *PLoS One* 2012; 7: e43452

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》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)

体质量指数、食管裂孔疝与胃食管反流的关系

叶必星, 衡定, 姜柳琴, 王颖, 张红杰, 李学良, 林琳

叶必星, 衡定, 姜柳琴, 王颖, 张红杰, 李学良, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029

叶必星, 硕士, 主要从事消化系疾病的临床研究.

作者贡献分布: 此课题由叶必星与林琳设计; 研究过程由叶必星、衡定、姜柳琴、王颖、张红杰及李学良操作完成; 数据分析由叶必星与衡定完成; 本论文写作由叶必星与林琳完成.

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

收稿日期: 2012-10-09 修回日期: 2012-11-11

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Association between body mass index, hiatal hernia and gastroesophageal reflux in patients with gastroesophageal reflux disease

Bi-Xing Ye, Ding Heng, Liu-Qin Jiang, Ying Wang, Hong-Jie Zhang, Xue-Liang Li, Lin Lin

Bi-Xing Ye, Ding Heng, Liu-Qin Jiang, Ying Wang, Hong-Jie Zhang, Xue-Liang Li, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Lin Lin, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com.cn

Received: 2012-10-09 Revised: 2012-11-11

Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To analyze the relationship between body mass index (BMI), hiatal hernia (HH) and gastroesophageal reflux (including symptoms and esophagitis) in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD).

METHODS: Five hundred and ninety patients diagnosed with GERD at our hospital from June 2008 to Oct 2011 were included in the study. Gastroesophageal reflux symptoms were assessed using the Reflux Disease Questionnaire (RDQ). Erosive esophagitis (EE), non-erosive reflux disease (NERD), and hiatal hernia (HH) were diagnosed by gastroscopy. Patients were categorized into four groups according to BMI: underweight (BMI < 18.5 kg/m²), normal weight (18.5-22.9 kg/m²), overweight (23.0-24.9 kg/m²),

and obesity (≥ 25 kg/m²). The clinical characteristics of GERD, relationship between HH and BMI, between BMI/HH and symptoms, and between BMI/HH and EE were analyzed.

RESULTS: RDQ score was 13.33 ± 5.66 . EE accounted for 52.2% (308/590). BMI was (23.64 ± 3.10) kg/m². The percentages of underweight, normal, overweight and obese patients were 3.7% (22/590), 37.0% (218/590), 23.7% (140/590) and 35.6% (210/590), respectively. The incidences of HH were 0, 6.0% (13/218), 12.9% (18/140), and 16.7% (35/210) in underweight, normal, overweight and obese patients, respectively, with a significant difference among these patients ($P = 0.001$). RDQ scores of underweight, normal, overweight, and obese patients were 11.95 ± 5.86 , 13.33 ± 5.50 , 13.45 ± 5.22 and 13.40 ± 6.07 , respectively ($F = 0.465$, $P = 0.707$). RDQ scores were significantly higher in the HH group (17.36 ± 6.66) than in the non-HH group (17.36 ± 6.66 vs 12.83 ± 5.31 , $P = 0.005$, and multivariate analysis showed a significant difference ($P = 0.000$). The percentage of overweight and obese patients in the EE group was significantly higher than that in the NERD group ($P = 0.000$). The number of HH patients who suffered from EE was more than that of patients without HH ($P = 0.000$). Multivariate analysis showed that BMI and HH were important risk factors for EE.

CONCLUSION: HH may be an important mechanism responsible for EE in obese patients. HH has a more important significant association with GERD symptoms than BMI. BMI and HH are risk factors for EE.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Body mass index; Hiatal hernia

Ye BX, Heng D, Jiang LQ, Wang Y, Zhang HJ, Li XL, Lin L. Association between body mass index, hiatal hernia and gastroesophageal reflux in patients with gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3375-3379

摘要

目的: 分析胃食管反流病(gastroesophageal

■背景资料

胃食管反流病(GERD)的临床症状严重影响患者的生活质量,且造成精神压力和经济负担.近40年,GERD和肥胖的发病率呈平行上升的趋势,尤其在欧美国家,提示两者可能具有相关性,且有研究证实肥胖是GERD的危险因素,但肥胖与GERD症状、与食管炎的关系仍有较多争议;另外食管裂孔疝(HH)是增加胃食管反流的重要病因,与肥胖有一定关系.

■同行评议者

袁红霞, 研究员, 天津中医药大学

■研究前沿

英国一项研究发现GERD症状的频率与BMI呈显著正相关,在肥胖者中每周至少发生1次烧心和反酸的OR值为2.91,正常体质量人群OR值为2.23;德国一项研究同样发现随着BMI的增加,症状严重程度随之增加;而瑞典一项以人群为基础的横断面研究却提示,GERD症状和BMI之间无相关性,甚至发现,曾经肥胖或超质量者与从未肥胖或超质量者比较,前者发生GERD症状的OR值为0.99.

reflux disease, GERD)患者的体质量指数(body mass index, BMI)、食管裂孔疝(hiatal hernia, HH)与胃食管反流(包括症状、食管炎)的关系.

方法:收集2008-06/2011-10期间我院就诊的GERD患者590例.反流性疾病问卷(reflux disease questionnaire, RDQ)评价患者的胃食管反流症状,胃镜诊断糜烂性食管炎(erosive esophagitis, EE)、非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)、HH.根据BMI将患者分为4组:体质量过轻($BMI < 18.5 \text{ kg/m}^2$)、正常体质量($18.5-22.9 \text{ kg/m}^2$)、超质量($23.0-24.9 \text{ kg/m}^2$)、肥胖($\geq 25 \text{ kg/m}^2$).分析GERD患者的临床特点、HH与BMI的关系、BMI及HH与GERD症状及EE的关系.

结果:(1)临床特征:590例患者RDQ积分 13.33 ± 5.66 , EE占52.2%(308/590),平均BMI为($23.64 \pm 3.10 \text{ kg/m}^2$),体质量过轻、正常、超质量及肥胖组患者所占的比例分别为3.7%(22/590)、37.0%(218/590)、23.7%(140/590)、35.6%(210/590);(2)BMI与HH:体质量过轻、正常、超质量及肥胖组HH的检出率分别为0、6.0%(13/218)、12.9%(18/140)、16.7%(35/210),差异有统计学意义($P = 0.001$);(3)BMI、HH与GERD症状:体质量过轻、正常、超质量、肥胖4组的RDQ积分依次为 11.95 ± 5.86 、 13.33 ± 5.50 、 13.45 ± 5.22 、 13.40 ± 6.07 ($F = 0.465$, $P = 0.707$);HH组RDQ积分平均值高于无HH组(17.36 ± 6.66 vs 12.83 ± 5.31 , $P = 0.005$),且多元线性回归分析后差异仍有统计学意义($P = 0.000$);(4)BMI、HH与EE:EE组超质量、肥胖患者的比例明显高于NERD组($P = 0.000$);HH组EE的检出率高于无HH组($P = 0.000$).多因素分析后发现BMI、HH是EE发生危险因素.

结论:HH可能是肥胖患者发生EE的重要机制之一.GERD患者的症状严重程度与HH相关,而与BMI无关,BMI和HH均是EE发生的危险因素.

关键词:胃食管反流病;体质量指数;食管裂孔疝

叶必星, 衡定, 姜柳琴, 王颖, 张红杰, 李学良, 林琳. 体质量指数、食管裂孔疝与胃食管反流的关系. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3375-3379

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3375.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease,

GERD)的临床症状严重影响患者的生活质量,且造成精神压力和经济负担.流行病学研究显示,西欧和北美国家中,10%-20%的人群至少1次/wk出现烧心和/或反酸症状^[1].亚洲国家患病率较国外低,但随着生活方式及饮食的西方化,GERD的患病率亦有增加^[2,3].近40年,GERD和肥胖的发病率呈平行上升的趋势,尤其在欧美国家,提示二者可能具有相关性^[4],且有研究证实肥胖是GERD的危险因素^[5-7],但肥胖与GERD症状、与食管炎的关系仍有较多争议^[8-10];另外食管裂孔疝(hiatal hernia, HH)是增加胃食管反流的重要病因,与肥胖有一定关系^[11-13].目前关于肥胖、HH与GERD的研究主要来自欧美国家,国内少有报道.本调查选取糜烂性食管炎(erosive esophagitis, EE)和非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)作为调查内容,对GERD患者的体质量指数(body mass index, BMI)、HH与反流(症状、EE)之间的关系进行分析.

1 材料和方法

1.1 材料 根据蒙特利尔定义^[14]及中国胃食管反流病共识意见^[7],将符合以下条件者纳入研究:(1)年龄18岁以上;(2)有反酸(食)、烧心、胸骨后疼痛等GERD症状;(3)排除肿瘤、糖尿病、重要脏器功能衰竭等引起胃食管反流症状的全身疾病;(4)无消化性溃疡、贲门失弛缓症、幽门梗阻、高位肠梗阻及胃肠手术史;(5)无服用可引起烧心和/或反酸症状的药物.共收集我院2008-06/2011-10诊断为GERD的患者共590例,其中NERD患者282例,EE患者308例.分组:根据2000年国际肥胖特别工作组提出的亚太地区成人质量分级建议^[15]: $BMI < 18.5 \text{ kg/m}^2$ 为体质量过轻、 $18.5-22.9 \text{ kg/m}^2$ 为正常体质量、 $23.0-24.9 \text{ kg/m}^2$ 为超质量、 $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ 为肥胖,本研究根据BMI将纳入的GERD患者分为4组.

1.2 方法 调查内容包括问卷调查和内镜检查.(1)一般资料问卷:包括姓名、年龄、性别、诊断、体质量、身高、病程等,并计算BMI. $BMI = \text{体质量}(\text{kg})/[\text{身高}(\text{m})]^2$;(2)症状积分:依据反流性疾病问卷(reflux disease questionnaire, RDQ)症状积分标准进行计分^[16],RDQ评价4 wk中GERD的典型症状即反酸、反食、胸骨后烧灼感和胸骨后疼痛的严重程度及其频率.症状严重程度:采用5分评级:1分为无症状;2分为轻微症状,不影响正常生活和活动;3分为症状明显,偶尔影响生活和工作;4分介于3分和5分之间;5分为症

表 1 胃食管反流病的临床特点 ($n = 590$)

临床特点	GERD
平均年龄(岁)	47.6 ± 13.1
男性 $n(\%)$	305(51.7)
<i>H. pylori</i> 感染阳性者 $n(\%)$	165(28.0)
内镜诊断 $n(\%)$	
NERD	282(47.8)
EE(LA A+B)	288(48.8)
EE(LA C+D)	20(3.4)
病程 ≥ 2年 $n(\%)$	205(34.7)
HH $n(\%)$	66(11.2)
RDQ积分	13.33 ± 5.66
BMI(kg/m ²)	23.64 ± 3.10
BMI $n(\%)$	
体质量过轻	22(3.7)
正常体质量	218(37.0)
超质量	140(23.7)
肥胖	210(35.6)

GERD: 胃食管反流病; EE: 糜烂性食管炎; NERD: 非糜烂性反流病; BMI: 体质量指数; HH: 食管裂孔疝; RDQ: 反流性疾病问卷。

状严重, 影响生活和活动。症状的频率: 采用5分评级: 0分为无发作; 1分为<1 d/wk; 2分为1 d/wk; 3分为2-3 d/wk; 4分为4-5 d/wk; 5分为6-7 d/wk。总评分: 症状严重程度和频率积分之和; (3)胃镜: 确定食管炎、HH、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染等。食管炎内镜下分级依据洛杉矶标准(los angeles, LA): 内镜下存在食管黏膜破损者为EE; HH的内镜诊断标准: 为胃食管上皮交界线上移, 其下方可见裂孔压迹环及疝囊。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件。计数资料采用率或构成比以百分率(%)表示, 采用 χ^2 检验。计量资料用mean ± SD表示, 两组之间的比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)中的LSD进行显著性检验。采用多元线性回归分析BMI、HH与症状积分的关系, logistic回归分析BMI、HH与EE的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GERD的临床特点 590例患者年龄18-78岁, 平均年龄(47.6 ± 13.1)岁, 男患者占51.7%(305/590), EE占52.2%(308/590), RDQ积分13.33 ± 5.66; 平均BMI为23.64 kg/m² ± 3.10 kg/m², 体质量过轻、正常、超质量及肥胖组患者所占的比例分别为3.7%(22/590)、37.0%(218/590)、

23.7%(140/590)、35.6%(210/590)(表1)。

2.2 BMI与HH的关系 HH组的平均BMI值显著高于无HH组(24.96 kg/m² ± 2.41 kg/m² vs 23.47 kg/m² ± 3.22 kg/m², $t = 9.39$, $P = 0.002$)。体质量过轻、正常、超质量及肥胖组HH的检出率分别为0%(0/22)、6.0%(13/218)、12.9%(18/140)、16.7%(35/210), 4组之间的检出率差异有统计学意义($\chi^2 = 15.50$, $P = 0.001$)。

2.3 BMI、HH和GERD症状 体质量过轻、正常、超质量、肥胖4组的RDQ积分依次为11.95 ± 5.86、13.33 ± 5.50、13.45 ± 5.22、13.40 ± 6.07, 各组之间的差异无统计学意义($F = 0.465$, $P = 0.707$)。HH组RDQ积分明显高于无HH组, 差异有统计学意义(17.36 ± 6.66 vs 12.83 ± 5.31, $t = 6.339$, $P = 0.005$), 将年龄、性别、病程、*H. pylori*感染、BMI作为调整变量, 多元线性回归分析后差异仍有统计学意义($\beta = 4.836$, $P = 0.000$)。

2.4 BMI、HH和EE EE组、NERD组平均BMI差异无统计学意义(24.62 kg/m² ± 3.10 kg/m² vs 22.56 kg/m² ± 2.90 kg/m², $t = 8.308$, $P = 0.60$); NERD、EE组中体质量过轻、正常、超质量、肥胖患者所占的比例分别为5.3%(15/282)、51.4%(145/282)、22.0%(62/282)、21.3%(60/282); 2.3%(7/308)、23.7%(73/308)、25.3%(78/308)、48.7%(150/308), EE组超质量、肥胖患者的比例明显高于NERD组($\chi^2 = 66.07$, $P = 0.000$)。HH组、无HH组中EE的检出率分别为74.2%(49/66), 49.4%(259/524), 2者差异有统计学意义($\chi^2 = 13.47$, $P = 0.000$)。将年龄、性别、病程、*H. pylori*感染、BMI、HH作为变量, logistic回归分析发现, 随着BMI增加, EE发生的风险增加; HH组EE发生的风险明显增加(表2)。

3 讨论

国内外有关GERD的指南/共识均将肥胖列为GERD发病的危险因素之一^[7,14], 肥胖者易患GERD的机制可能是: 胃内压增加^[12]、下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)压力下降^[17]、一过性下食管括约肌松弛(transient lower esophageal sphincter relaxation, tLESR)次数增加^[18]、对酸敏感度的增加^[19]、促进HH发生^[20]。但关于肥胖与GERD症状严重程度之间的争议较多, 英国一项研究发现GERD症状的频率与BMI呈显著正相关, 在肥胖者中每周至少发生一次烧心和反酸的OR值为2.91, 正常体质量人群OR值为2.23^[8]; 德国一项研究同样发现随着

■相关报道

Pandolfino等证实, HH的形成是肥胖者胃-食管连接处的压力形态学改变, 随着BMI的增加, 患者胃内压和胃-食管压力梯度逐渐增加, HH严重程度随之加重。

■应用要点

本研究发现BMI与反流症状无直接关系,但与EE发生相关,提示减肥对改善食管黏膜破损可能有效,但如果减肥目的仅仅为了改善GERD的症状,需谨慎使用药物或手术减肥。

表 2 BMI、HH与EE的关系

变量	OR	95%CI	P值
BMI分组			
正常体质量	1		
体质量过轻	0.894	0.33-2.42	0.826
超质量	2.475	1.55-3.94	0.000
肥胖	5.416	3.47-8.44	0.000
HH分组			
无HH	1		
HH	2.107	1.10-4.03	0.024

年龄、性别、病程、H.pylori感染、BMI、HH作为变量。BMI: 体质量指数; HH: 食管裂孔疝。

BMI的增加,症状严重程度随之增加^[9];而瑞典一项以人群为基础的横断面研究却提示,GERD症状和BMI之间无相关性,甚至发现:曾经肥胖或超质量者与从未肥胖或超质量者比较,前者发生GERD症状的OR值为0.99^[10]。本研究发现,虽然超质量和肥胖组的反流症状积分均高于体质量正常和体质量过轻组,但无统计学差异。目前亦有学者提出,对于GERD症状,腹型肥胖比BMI增加更重要,因为内脏脂肪具有代谢活性,可产生众多细胞因子,如TNF- α 、IL-6等,进而影响食管的动力^[11],但该结论尚需更多研究证实。

HH是GERD发病的重要病理生理基础,HH与肥胖密切相关,肥胖增加腹腔内压、导致LES和外部膈角的轴向分离移位、引起HH^[20]。Pandoifino等^[22]证实,HH的形成是肥胖者胃-食管连接处的压力形态学改变,随着BMI的增加,患者胃内压和胃-食管压力梯度逐渐增加,HH严重程度随之加重。本研究同样发现,随着GERD患者BMI值的增加,HH发生率随之增加,且HH患者的BMI明显高于无HH患者,与文献报道一致^[23]。本研究中,虽未发现BMI与GERD症状直接相关,但发现HH患者的反流严重程度明显高于无HH者,且经过多因素分析仍有统计学意义,提示HH对GERD症状的影响比BMI更大,这对GERD的治疗可能有一定意义。因为HH造成胃食管交界处发生了不可逆的改变,若超质量或肥胖者合并HH,体质量减轻并不能逆转HH(减肥后症状改善不明显),所以这些患者可能需外科手术干预HH、进而改善症状,这一假设仍需进一步证实。

本研究发现随着BMI的增加,EE的风险显著增加,与Nocon等^[9]研究结果相同;而Lundell等^[24]研究却提示,过度超质量与异常酸反流及EE无相关性。另外Nocon等^[9]报道,BMI与食管炎的严

重程度相关;本调查中重度食管炎(LAC+D)的病例数较少,所以未能分层分析BMI与EE内镜下严重程度关系。另外我们还发现,HH者发生EE的风险明显升高,与多数研究结果一致^[12,25]。

总之,虽然多个GERD指南/共识均将减肥作为GERD治疗手段之一,但对于体质量减轻后是否改善反流症状的结论尚不统一,本研究发现BMI与反流症状无直接关系,但BMI与EE发生相关,提示减肥对改善食管黏膜破损可能有效,但如果减肥目的仅仅为了改善GERD的症状,需谨慎使用药物或手术减肥。另外,BMI与HH密切相关、HH与GERD症状严重程度更相关,提示合并HH的肥胖患者,单纯减肥不能直接改善反流症状,全面评估后可考虑手术治疗HH。

4 参考文献

- 1 Delaney BC. Review article: prevalence and epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 8: 2-4
- 2 Song HJ, Shim KN, Yoon SJ, Kim SE, Oh HJ, Ryu KH, Ha CY, Yeom HJ, Song JH, Jung SA, Yoo K. The prevalence and clinical characteristics of reflux esophagitis in Koreans and its possible relation to metabolic syndrome. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 197-202
- 3 中国胃食管反流病共识意见专家组. 中国胃食管反流病共识意见. *中华内科杂志* 2007; 46: 170-173
- 4 El-Serag HB. Time trends of gastroesophageal reflux disease: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 17-26
- 5 Locke GR, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ. Risk factors associated with symptoms of gastroesophageal reflux. *Am J Med* 1999; 106: 642-649
- 6 Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005; 143: 199-211
- 7 Watanabe S, Hojo M, Nagahara A. Metabolic syndrome and gastrointestinal diseases. *J Gastroenterol* 2007; 42: 267-274
- 8 Murray L, Johnston B, Lane A, Harvey I, Donovan J, Nair P, Harvey R. Relationship between body mass and gastro-oesophageal reflux symptoms: The Bristol Helicobacter Project. *Int J Epidemiol* 2003; 32: 645-650
- 9 Nocon M, Labenz J, Jaspersen D, Meyer-Sabellek W, Stolte M, Lind T, Malfertheiner P, Willich SN. Association of body mass index with heartburn, regurgitation and esophagitis: results of the Progression of Gastroesophageal Reflux Disease study. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1728-1731
- 10 Lagergren J, Bergström R, Nyrén O. No relation between body mass and gastro-oesophageal reflux symptoms in a Swedish population based study. *Gut* 2000; 47: 26-29
- 11 Dent J, Brun J, Fendrick AM, Fennerty MB, Janssens J, Kahrilas PJ, Lauritsen K, Reynolds JC, Shaw M, Talley NJ. An evidence-based appraisal of reflux disease management--the Genval Workshop Re-

- port. *Gut* 1999; 44 Suppl 2: S1-S16
- 12 Iovino P, Angrisani L, Galloro G, Consalvo D, Tremolaterra F, Pascariello A, Ciacci C. Proximal stomach function in obesity with normal or abnormal oesophageal acid exposure. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 425-432
 - 13 Kim HJ, Yoo TW, Park DI, Park JH, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI. Influence of overweight and obesity on upper endoscopic findings. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 477-481
 - 14 Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920; quiz 1943
 - 15 傅祖植. 开展与肥胖症相关课题的研究是新世纪的迫切任务. *中华内分泌代谢杂志* 2000; 4: 65-66
 - 16 中国胃食管反流病研究协作组. 反流性疾病问卷在胃食管反流病诊断中的价值. *中华消化杂志* 2003; 23: 651-654
 - 17 Ayazi S, Hagen JA, Chan LS, DeMeester SR, Lin MW, Ayazi A, Leers JM, Oezcelik A, Banki F, Lipham JC, DeMeester TR, Crookes PF. Obesity and gastroesophageal reflux: quantifying the association between body mass index, esophageal acid exposure, and lower esophageal sphincter status in a large series of patients with reflux symptoms. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1440-1447
 - 18 Wu JC, Mui LM, Cheung CM, Chan Y, Sung JJ. Obesity is associated with increased transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology* 2007; 132: 883-889
 - 19 Anand G, Katz PO. Gastroesophageal reflux disease and obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39: 39-46
 - 20 Dutta SK, Arora M, Kireet A, Bashandy H, Gandsas A. Upper gastrointestinal symptoms and associated disorders in morbidly obese patients: a prospective study. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1243-1246
 - 21 El-Serag HB, Ergun GA, Pandolfino J, Fitzgerald S, Tran T, Kramer JR. Obesity increases oesophageal acid exposure. *Gut* 2007; 56: 749-755
 - 22 Pandolfino JE, El-Serag HB, Zhang Q, Shah N, Ghosh SK, Kahrilas PJ. Obesity: a challenge to esophagogastric junction integrity. *Gastroenterology* 2006; 130: 639-649
 - 23 高炳霞, 段丽萍, 王琨, 夏志伟. 体质量指数与食管裂孔疝及反流性食管炎关系的研究. *中华消化内镜杂志* 2011; 28: 316-319
 - 24 Lundell L, Ruth M, Sandberg N, Bove-Nielsen M. Does massive obesity promote abnormal gastroesophageal reflux? *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1632-1635
 - 25 Suter M, Dorta G, Giusti V, Calmes JM. Gastroesophageal reflux and esophageal motility disorders in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2004; 14: 959-966

■同行评价

本文构思新颖, 设计合理, 具有一定的临床参考价值。

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》外文字符标准

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

IL-22和IL-17 mRNA在慢性HBV感染者PBMCs中的表达及其意义

杨智, 陈洪涛, 张毅, 吴诗品

■背景资料

大量资料表明, 乙型肝炎病毒(HBV)本身并不引起肝细胞的损害, 肝细胞破坏的主要机制在于机体的免疫学损伤。IL-22和IL-17可同时由Th17细胞分泌, 在各种慢性炎症性患者的损害部位都会上调, 可能在炎症过程中起着相似的作用。本研究探讨慢性HBV感染者外周血单个核细胞IL-22和IL-17 mRNA的表达及其对病情转归的影响。

杨智, 陈洪涛, 吴诗品, 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院感染内科 广东省深圳市 518020

张毅, 暨南大学生命科学技术学院 广东省广州市 510632
杨智, 主治医师, 主要从事感染内科方面的研究和工作。

作者贡献分布: 本文由杨智完成; 陈洪涛、张毅及吴诗品共同协助。

通讯作者: 吴诗品, 主任医师, 518020, 广东省深圳市罗湖区东门北路1017号, 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院感染内科。wupoem@126.com

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-20

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-12-08

IL-22 and IL-17 mRNA expression in PBMCs from patients with chronic hepatitis B virus infection

Zhi Yang, Hong-Tao Chen, Yi Zhang, Shi-Pin Wu

Zhi Yang, Hong-Tao Chen, Shi-Pin Wu, Department of Infectious Diseases, Shenzhen People's Hospital, the 2nd Clinical College of Jinan University, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China

Yi Zhang, School of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Correspondence to: Shi-Pin Wu, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Shenzhen People's Hospital, the 2nd Clinical College of Jinan University, Shenzhen 518020, Guangdong Province, China. wupoem@126.com
Received: 2012-02-20 Revised: 2012-03-20
Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To detect the expression of IL-22 and IL-17 mRNAs in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with chronic hepatitis B (CHB) infection and to analyze their significance in the pathogenesis of CHB.

METHODS: Thirty-three patients with moderate CHB, 21 patients with severe CHB, 16 patients with liver failure, and 16 cirrhotic patients were enrolled in the study. Ten healthy volunteers were used as controls. RT-PCR method was used to detect the expression of IL-22 and IL-17 mRNAs in PBMCs from these subjects.

RESULTS: IL-22 expression in PBMCs from patients with moderate CHB, severe CHB, or cir-

rhosis was comparable, but all was higher than that from controls ($P = 0.000$). IL-22 expression in PBMCs from patients with liver failure was significantly lower than that from other three groups of patients ($P = 0.000$). IL-17 expression in PBMCs from four groups of patients was higher than that from controls ($P = 0.000$). IL-17 expression in PBMCs from patients with liver failure was slightly lower than that from other three groups of patients, although no statistical difference was found.

CONCLUSION: Down-regulation of IL-22 is unfavorable to repair of hepatic cells after liver injury. Up-regulation of IL-22 expression may be important in alleviating liver damage. IL-17 levels in patients infected with HBV are increased significantly. IL-17 may participate in the inflammatory process in chronic HBV infection and play an important role in development of liver fibrosis.

Key Words: Hepatitis B; Immunity; IL-22; IL-17

Yang Z, Chen HT, Zhang Y, Wu SP. IL-22 and IL-17 mRNA expression in PBMCs from patients with chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3380-3384

摘要

目的: 探讨慢性HBV感染者外周血单个核细胞IL-22和IL-17 mRNA表达及其对病情转归的影响。

方法: 以慢性乙型肝炎中度患者33例、重度患者21例、重型肝炎患者16例、乙型肝炎肝硬化患者16例和健康对照10例为研究对象, 采用RT-PCR方法检测患者外周血单个核细胞IL-22和IL-17 mRNA的表达。

结果: CHB中度、CHB重度和肝硬化患者IL-22表达水平无统计学意义, 但均高于健康对照组, 差异有统计学意义($P = 0.000$); 而重型肝炎患者IL-22表达水平低于该3组患者, 高于健康对照组, 但差异无统计学意义($P =$

■同行评议者

朱传武, 主任医师, 第五人民医院传染科

0.064). 各组IL-17表达水平相似但均高于健康对照组, 差异有统计学意义($P = 0.000$); 重型肝炎患者IL-17表达水平均低于其他3组患者, 与CHB中度患者比较差异有统计学意义($P = 0.014$), 与CHB重度和肝硬化患者比较差异无统计学意义($P = 0.172, 0.968$).

结论: IL-22的下调不利于肝细胞损伤后的修复, IL-22分泌的增加对减轻肝组织的损伤特别是重型肝炎的恢复可能是有意义的. 慢性HBV感染患者IL-17均明显升高, 提示其可能参与慢性HBV感染肝组织炎症的发生, 且对慢性肝病纤维化起一定作用.

关键词: 慢性HBV感染; 免疫; 白介素-22; 白介素-17

杨智, 陈洪涛, 张毅, 吴诗品. IL-22和IL-17 mRNA在慢性HBV感染者PBMCs中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3380-3384
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3380.asp>

0 引言

大量资料表明^[1,2], 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)本身并不引起肝细胞的损害, 肝细胞破坏的主要机制在于机体的免疫学损伤. IL-22和IL-17可同时由Th17细胞分泌, 在各种慢性炎症性患者的损害部位都会上调, 可能在炎症过程中起着相似的作用. IL-22是一种特殊的免疫调节因子, 同IL-10、IL-19、IL-20、IL-24等白介素类似, 具有22%的同源氨基酸序列, 同归为IL-10家族成员^[3,4]. 其具有一异源性二聚体受体, 分别由IL-10受体 β 链(IL-10R2)和IL-22R1两条链组成^[3-7], 而IL-22结合的特异性仅由IL-22R1决定. IL-22主要由Th22、Th1和Th17细胞分泌, 作用对象不是免疫细胞, 而是胰腺、皮肤等表达IL-22R1的组织细胞^[3,4]. IL-22也作用于肝脏细胞, 但是IL-22对肝脏作用的分子机制到目前为止仍不清楚.

IL-17是一种强大的前炎症细胞因子, 也是炎症反应的微调因子(fine-tuning cytokine), 能够与多种细胞因子产生协同作用以放大炎症反应. IL-17不仅可以诱导多种细胞因子的产生, 同时可以促进多种细胞的成熟与分化. 已有研究^[8]证实转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-6、IL-1、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等细胞因子在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)中有重要的促进纤维化作用. IL-17与这几种细胞因子之间存

在着密切的生物学关系. IL-17具有强大的免疫致病性, 可以促进T细胞的激活和刺激成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞、上皮细胞产生多种致炎因素(包括IL-1、IL-6、TNF- α 、NOS-2、金属蛋白酶和化学增殖素), 导致炎症的发生^[9,10]. 研究发现CHB患者IL-17水平升高, 提示其参与了CHB炎症的发生, 本研究探讨慢性HBV感染者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)IL-22和IL-17 mRNA的表达及其对病情转归的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 86例慢性HBV感染者均来自2011-04/10暨南大学医学院附属深圳市人民医院感染内科病房住院患者, 诊断均符合2000年西安全国第十次病毒性肝炎及肝病学术会议修订的“病毒性肝炎防治方案”标准^[11]. 所有患者均除外其他病毒性肝炎、HIV感染、自身免疫性肝炎等. 其中CHB中度患者33例, CHB重度患者21例, 重型肝炎患者16例, 乙型肝炎肝硬化患者16例. 同时以年龄和性别均匹配的健康对照10例, 为来自本科室的健康人群. 淋巴细胞分离液购自天津市GBD公司; RT试剂盒、PCR试剂盒、DNA Marker均购自美国Fermentas公司; 引物由天津金斯瑞公司合成; PCR仪由德国EPPENDORF公司提供; 电泳仪、凝胶成像分析系统由美国BIO-RAD公司提供.

1.2 方法

1.2.1 标本采集和处理: 抽取患者和健康对照人群外周静脉血3-4 mL, 用常规淋巴细胞分层液密度梯度离心法分离PBMCs. 用总RNA提取试剂盒提取总RNA, -20 °C保存.

1.2.2 PCR引物设计: 根据GeneBank检索的基因序列, 利用Premier 5软件分别设计IL-22、IL-17和 β -actin引物(本实验使用 β -actin为内部参照系统), 所有引物由天津金斯瑞公司合成. IL-22的上游引物序列为: 5'-TCTTGG-TACAGGGAGGAGC-3', 下游引物序列为: 5'-CCTATCAGATTGAGGGAAC-3', 扩增片段长度为254 bp. IL-17的上游引物序列为: 5'-GCAG-GCACAACTCATCCAT-3', 下游引物序列为: 5'-GGGCGAAAATGGTTACGAT-3', 扩增片段长度为366 bp. β -actin的上游引物序列为: 5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3', 下游引物序列为: 5'-CAGGAAGCAAGGCTGGAAGA-3', 扩增片段长度为186 bp.

■ 研发前沿

IL-22和IL-17可由相同的T细胞(Th17细胞)分泌, 且在各种慢性炎症性疾病患者的损害部位都会上调, 其对慢性HBV感染者的病情转归的作用尚待进一步深入研究.

■ 相关报道

目前除了IL-22对角质化细胞及其他上皮细胞的影响外,其对肝细胞的影响也逐渐被证明。有研究证明,IL-22在肝损伤中具有直接的保护作用。何波等研究发现IL-17在自身免疫性肝炎患者肝组织中的表达有明显升高。

表 1 患者及健康对照组入组时一般情况

	中度CHB	重度CHB	重型肝炎	乙型肝炎肝硬化	健康对照
<i>n</i>	33	21	16	16	10
年龄(岁)	31(16–65)	32(18–61)	41(26–64)	48(27–73)	35(25–55)
性别(男/女)	22/11	15/6	16/0	13/3	4/6
ALT(U/L)	260(45–673)	823(156–1894)	913(66–2093)	98(25–464)	–
HBV-DNA(copies/mL)	2.54×10^7	2.92×10^7	6.45×10^7	9.77×10^6	–
HBeAg阳性(<i>n</i>)	22	16	9	6	–

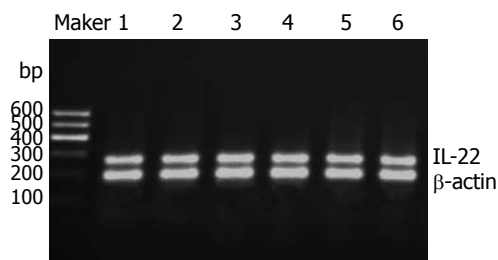


图 1 各组患者和健康对照组IL-22表达的电泳条带。1: 中度CHB组; 2: 重度CHB组; 3: 重型肝炎组; 4: 肝硬化组; 5: HCC组; 6: 健康对照组。

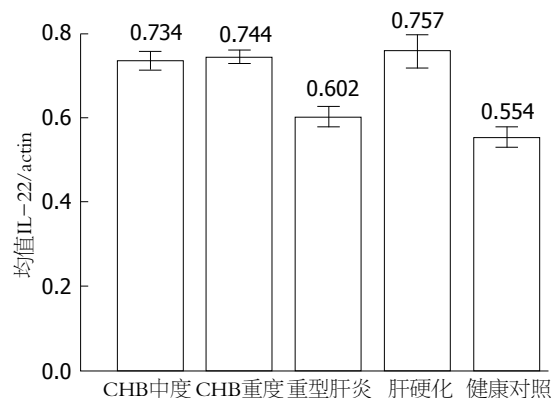


图 2 各组患者和健康对照组IL-22 mRNA的表达。

1.2.3 IL-22和IL-17的检测: RT-PCR方法, 以提取的总RNA 12 μ L为模板合成cDNA, 以cDNA为模板分别扩增IL-22和IL-17基因片段, 并以 β -actin作为内部参照系统。PCR采用同管扩增法, 反应步骤: 每管先加入目的基因上下游引物各1 μ L, 加入内参 β -actin的上下游引物各0.1 μ mol(1 μ L), 进行PCR反应30个循环, 即得PCR产物。PCR反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 2 min(启动); 94 $^{\circ}$ C, 30 s(变性); 57 $^{\circ}$ C, 30 s(退火); 72 $^{\circ}$ C, 45 s(延伸); 再从变性开始循环共30次。72 $^{\circ}$ C, 最后一循环延伸5 min。PCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶中电泳, 在凝胶成像系统中拍照分析。

统计学处理 所有资料均采用SPSS19.0统计软件分析。结果的表达采用mean \pm SD, 2组间均数的比较采用两样本 t 检验, 多组间的均数比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA), 并进一步行基于方差分析的多重比较(Tamhane's T2法), 相关关系采用Pearson相关性分析。检测水准为 $\alpha = 0.05$, 采用双侧检验。

2 结果

研究对象的临床资料见表1。

2.1 各组患者及健康对照组PBMCs IL-22 mRNA的表达 中度、重度CHB患者及肝硬化患者IL-22表达无统计学意义, 但均高于健康对照组($P = 0.000$); 而重型肝炎患者IL-22表达水平低于

该3组患者, 差异有统计学意义($P = 0.000$); 重型肝炎患者IL-22表达水平高于健康对照组, 但差异无统计学意义($P = 0.064$, 图1, 2, 表2)。

2.2 各组患者及健康对照组PBMCs IL-17 mRNA的表达 各组IL-17表达水平无统计学意义, 但均高于健康对照组($P = 0.000$); 重型肝炎患者IL-17表达水平均低于其他3组患者, CHB中度患者比较差异有统计学意义($P = 0.014$), 与CHB重度和肝硬化患者比较差异无统计学意义($P = 0.172$, 0.968 , 图3, 4, 表2)。

3 讨论

肝脏是一重要的消化器官, 但同时也具有淋巴样器官的功能^[12]。目前除了IL-22对角质化细胞及其他上皮细胞的影响外, 其对肝细胞的影响也逐渐被证明^[3-5]。有研究证明, IL-22在肝损伤中具有直接的保护作用。Radaeva等^[13]运用Con-A诱导的肝炎模型(这一模型与大量激活T细胞渗透及IL-22产生相关联), 发现用IL-22预处理可减轻Con-A的效应, 而一起注射Con-A和IL-22中和抗体, 则增强Con-A的效应。Zenewicz等^[4]通过缺乏IL-22的小鼠模型, 证实了在急性肝脏炎症时IL-22对肝细胞提供保护作用。Brand等^[6]在研究经IL-22刺激后肝细胞内信号传导变化时发现, IL-22在体外试验中促进了肝细胞分泌IL-6及

表 2 各组患者及健康对照IL-22和IL-17的表达

	<i>n</i>	IL-22	IL-17
CHB中度	33	0.734 ± 0.062	0.696 ± 0.049
CHB重度	21	0.744 ± 0.036	0.687 ± 0.043
重型肝炎	16	0.602 ± 0.041	0.657 ± 0.026
肝硬化	16	0.757 ± 0.064	0.674 ± 0.039
健康对照	10	0.554 ± 0.033	0.533 ± 0.036
<i>F</i> 值(Welch校正)		248.033	23.982
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

因方差不齐, One-Way ANOVA采用Welch法校正, 多重比较采用Tamhane's T2法。

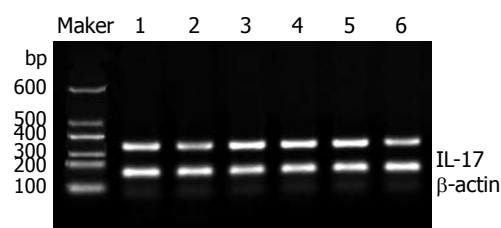


图 3 各组患者和健康对照组IL-17表达的电泳条带. 1: 中度CHB组; 2: 重度CHB组; 3: 重型肝炎组; 4: 肝硬化组; 5: HCC组; 6: 健康对照组。

TNF- α , 而IL-6和TNF- α 是肝部分切除后启动、促进肝细胞再生最为主要的细胞因子之一^[14-17]。这些研究均得出类似的实验结果: 在急性肝脏炎症时, IL-22对肝细胞提供保护作用, 有利于肝脏炎症的恢复。本试验发现, 在慢性HBV感染时, IL-22分泌增加, 表明在慢性HBV感染时IL-22参与肝脏的免疫病理过程。肝炎急性加重期, 特别是重型肝炎时, IL-22的表达水平明显低于中重度慢性乙型肝炎, 表明IL-22分泌减少可能不利于肝细胞损伤后的修复, 而其分泌的增加对减轻肝组织的损伤特别是重型肝炎的恢复可能是非常有意义的, 在众多影响乙型肝炎的免疫因素中起着一定的作用。

何波等^[18]研究发现IL-17在自身免疫性肝炎患者肝组织中的表达有明显升高。邢直直等^[19]研究发现, 与正常对照组相比, 慢性HBV感染者外周血IL-17表达水平升高, 肝硬化组尤其明显。唐永明等^[20]研究发现, 在各种慢性肝病的发病过程中, IL-17均有明显升高, 肝纤维化患者血清中IL-17表达水平与肝纤维化程度及透明质酸、层粘连蛋白、IV型胶原蛋白水平存在密切关系。众多研究发现IL-17广泛参与了慢性肝病的发病及抗病毒免疫。IL-17属促炎因子, 在炎症反应、自免疾病、肿瘤和移植排斥中发挥重要作用。他

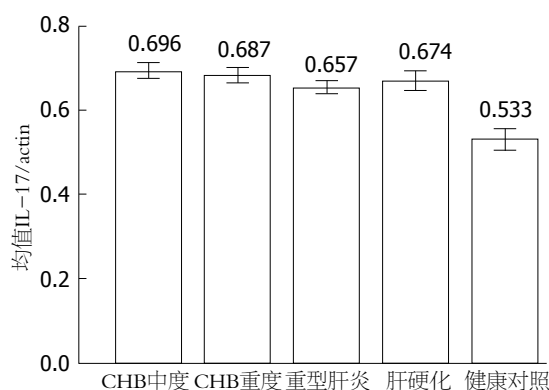


图 4 各组患者和健康对照组IL-17 mRNA的表达水平。

■同行评价

本文探讨了慢性乙肝不同临床诊断患者间PBMCs中IL-22和IL-17 mRNA的水平与肝脏损害程度间的关系, 有一定的临床意义。

是一种前炎性细胞因子, 具有强大的招募中性粒细胞, 促进多种细胞释放炎症因子等多种生物学作用。传统免疫学认为, IFN- γ 主要是Th1细胞分泌, 而Th17和Th1是互相拮抗的Th细胞亚群^[21,22]。本研究发现慢性HBV感染患者IL-17均明显升高, 提示其可能参与慢性HBV感染炎症的发生及促进肝纤维化的发展。其中重型肝炎IL-17的表达较其他组低, 可能重型肝炎患者Th1细胞反应增强, IFN- γ 表达增加, IFN- γ 对Th17有强烈的抑制作用, 使得Th17不能大量繁殖。

研究显示, IL-22和IL-17在各种慢性炎症性疾病的损害部位都会上调, 如银屑病、炎症性肠病和类风湿性关节炎等, 他们可能在炎症过程中起着相似的作用。IL-22和IL-17能同时被Th17细胞分泌, 有研究显示, IL-22与IL-17有协同作用促进炎症反应造成组织的损伤, 2者共同表达可以认为是自身攻击性T细胞的标志^[23]。Aujla等^[24]发现尽管IL-22和IL-17在肺部都调节CXC趋化因子和粒细胞克隆刺激因子的产生, 但仅IL-22能增加肺部上皮细胞的增殖和增加对损伤上皮的抵抗能力。另有研究^[25,26]发现尽管IL-17如同IL-22一样, 在conA诱导的肝脏炎症中被诱导, 但IL-17在疾病的发病机理中未起到可观察到的保护作用, 只有产生IL-22的Th17细胞, 而不是缺乏表达IL-22的Th17细胞具有肝细胞的保护作用。因此, 尽管IL-22和IL-17被炎症T细胞同时表达, 但他们并非都在慢性HBV感染中起着保护作用: 本研究发现, IL-22和IL-17在慢性肝炎中重度及重型肝炎患者中表达水平均升高, 且在重型肝炎患者的表达水平比其他2组都偏低, 但IL-22的表达与其他2组差别有显著统计学意义, 而IL-17的表达水平与其他2组比较差别无明显统计学意义。我们推论, IL-22分泌的增加对肝细胞的修复起着一定的作用, 而IL-17未起到

明确的肝细胞保护作用。而IL-22和IL-17在肝硬化患者中的表达水平均升高,因此2者对肝纤维化的发展均有一定作用:IL-22的作用体现在肝脏炎症急性加重时,对肝细胞起到保护作用,使肝脏炎症得以缓解,但同时使患者清除病毒的能力下降,从而使病情进入慢性迁延期;IL-17的作用体现在与IFN- γ 的相互拮抗作用,使Th1细胞反应减弱,病情进入慢性迁延期。

总之,IL-22的下调不利于肝细胞损伤后的修复,IL-22分泌的增加对减轻肝组织的损伤特别是重型肝炎的恢复可能是有意义的。慢性HBV感染患者IL-17均明显升高,提示其可能参与慢性HBV感染肝组织炎症的发生,且对肝病慢性纤维化起着一定作用,但未起到明确的肝细胞保护作用。IL-22和IL-17可由相同的T细胞(Th17细胞)分泌,且在各种慢性炎症性疾病患者的损害部位都会上调,其对慢性HBV感染者的病情转归的作用尚待进一步深入研究。

4 参考文献

- Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-1745
- Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229
- Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 17-31
- Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007; 27: 647-659
- Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2009; 10: 864-871
- Brand S, Dambacher J, Beigel F, Zitzmann K, Heeg MH, Weiss TS, Prüfer T, Olszak T, Steib CJ, Storr M, Göke B, Diepolder H, Bilzer M, Thasler WE, Auernhammer CJ. IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1019-G1028
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009; 119: 3573-3585
- Casini A, Pinzani M, Milani S, Grappone C, Galli G, Jezequel AM, Schuppan D, Rotella CM, Surrenti C. Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor beta 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology* 1993; 105: 245-253
- Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476
- Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5986-5990
- 中华医学会传染病与寄生虫病分会、肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 147-163
- Radaeva S, Sun R, Pan HN, Hong F, Gao B. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 2004; 39: 1332-1342
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996; 274: 1379-1383
- Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487
- Trautwein C, Rakemann T, Niehof M, Rose-John S, Manns MP. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology* 1996; 110: 1854-1862
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1441-1446
- 何波, 高闻达, 宋桂芹, 王琛琛, 杨明理, 刘全胜. 24p3及白细胞介素17A在自身免疫性肝炎中的表达. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 709-710
- 邢直直, 杜文军, 陈士俊. 辅助性T淋巴细胞1、2、17在慢性乙型肝炎病毒感染状态中的变化. *中华传染病杂志* 2008; 26: 158-162
- 唐永明, 梁立敏, 余建华, 胡峻. 检测IL-17和IL-18水平在纤维增生性疾病中的意义. *检验医学与临床* 2007; 4: 88-90
- Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148: 32-46
- Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 337-348
- Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445: 648-651
- Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, Husain S, Kreindler JL, Dubin PJ, Pilewski JM, Myerburg MM, Mason CA, Iwakura Y, Kolls JK. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008; 14: 275-281
- Li J, Qiu SJ, She WM, Wang FP, Gao H, Li L, Tu CT, Wang JY, Shen XZ, Jiang W. Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis. *PLoS One* 2012; 7: e39307
- Zhang Y, Cobleigh MA, Lian JQ, Huang CX, Booth CJ, Bai XF, Robek MD. A proinflammatory role for interleukin-22 in the immune response to hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2011; 141: 1897-1906

Piwi2基因在肝癌组织中mRNA及蛋白的表达

贾慧丽, 徐芸

贾慧丽, 徐芸, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 本文文献检索、实验设计、实验操作、资料分析及论文撰写由贾慧丽完成; 选题、指导及审校由徐芸完成。

通讯作者: 徐芸, 教授, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院消化内科. xuyun@medmail.com.cn

收稿日期: 2012-07-23 修回日期: 2012-11-06

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Clinical significance of expression of Piwi2 in hepatocellular carcinoma

Hui-Li Jia, Yun Xu

Hui-Li Jia, Yun Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Yun Xu, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. xuyun@medmail.com.cn

Received: 2012-07-23 Revised: 2012-11-06

Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To investigate the mRNA and protein expression of Piwi2 in hepatocellular carcinoma (HCC), and to analyze their clinical significance.

METHODS: Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of Piwi2 mRNA and protein in 70 surgical HCC specimens and matched tumor-adjacent non-cancerous specimens.

RESULTS: The relative expression level of Piwi2 mRNA was significantly higher in HCC than in tumor-adjacent non-cancerous tissue (0.91 ± 0.04 vs 0.32 ± 0.04 , $t = 37.240$, $P < 0.05$). Piwi2 mRNA expression in HCC was correlated with tumor differentiation, intrahepatic invasion and metastasis. The protein expression of Piwi2 in HCC was also significantly higher than that in tumor-adjacent non-cancerous tissues. Piwi2 protein expression in HCC was correlated with intrahepatic invasion and metastasis. There was a significant correlation between the mRNA and protein expression of Piwi2 ($\chi^2 = 13.113$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Piwi2 may be used as a novel biomarker for detection and therapy of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Piwi2; RT-PCR; Western blot

Jia HL, Xu Y. Clinical significance of expression of Piwi2 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3385-3389

摘要

目的: 检测肝癌组织中Piwi2基因mRNA和蛋白的表达, 进而探讨Piwi2基因在临床诊断中的意义。

方法: 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot印迹技术, 检测了70例肝癌及其对应癌旁组织中Piwi2基因mRNA及其蛋白的表达并结合临床资料进行分析。

结果: Piwi2 mRNA在肝癌中的表达量相对值高于癌旁的肝脏组织的表达量(0.91 ± 0.04 vs 0.32 ± 0.04 , $P < 0.05$)。Piwi2基因mRNA的表达与患者的肝内转移、分化程度及癌栓等病理因素方面的差异有统计学意义($P < 0.05$)。蛋白在肝癌中的表达均高于对应的癌旁组织。Piwi2的蛋白质表达与患者的肝内转移及癌栓等病理因素方面的差异有统计学意义($P < 0.05$)。Piwi2基因mRNA的表达与Piwi2的蛋白质的表达有相关性($P < 0.05$)。

结论: Piwi2有可能成为肝癌的检测及治疗的一种分子标志物。

关键词: 肝癌; Piwi2基因; RT-PCR; 免疫印迹法

贾慧丽, 徐芸. Piwi2基因在肝癌组织中mRNA及蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2012; 20(34): 3385-3389

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3385.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一, 其发病机制与癌基因的激活有关。Piwi2属于PIWI家族, 为一候选癌基因, 在

■背景资料

肝细胞癌(HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一。在我国, 每年约有300 000人死于HCC, 约占全世界HCC年死亡率的50%。HCC的发生与癌基因的激活有关, 寻找肝细胞癌分子靶点, 为临床有效治疗提供分子基础, 成为本研究领域的热点问题。Piwi2属于PIWI家族, 为一候选癌基因, 在人类的许多肿瘤中表达, 而在HCC中的研究, 国内外尚未见文献报道。

■同行评议者

李刚, 教授, 北京大学医学部生物化学与分子生物学系

■ 相关报道

有研究报道Piwil2在结肠癌的发生、发展中起重要的作用。

人类的许多恶性肿瘤中高表达^[1-4]。而在HCC组织中, Piwil2基因mRNA及蛋白的表达及其相关性, 文献鲜见报道。我们采用反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和Western blot印迹技术, 对70例HCC及其对应的癌旁组织中Piwil2基因mRNA及蛋白的表达进行检测与分析, 并探讨其与HCC发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 70例HCC及其癌灶旁(>2 cm)的非癌组织, 均经病理学证实, 分别来自2011-01/2012-03郑州大学第一附属医院手术切除标本。所用患者术前均未实施过其他治疗。70例患者中男53例, 女17例, 年龄22-78岁, 中位年龄45岁; 54(54/70)例为乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者。

1.2 方法

1.2.1 组织总RNA及组织蛋白的提取: 取100 mg组织在研钵中, 加入液氮研磨成粉末, 加入1 mL的TRIzol, 按照说明书提取样本总RNA。紫外分光光度仪测定其吸光度(A)值, 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。取100 mg组织在研钵中, 加入液氮, 研磨至粉末, 将粉末转入EP管, 加入1 mL的RIPA(组织/细胞裂解液)和10 μ L的苯甲基硫酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF), 之后按照RIPA裂解液说明书提取组织蛋白, Bradford法测蛋白浓度。

1.2.2 反转录-聚合酶链反应: 取 $A_{260/280}$ 为1.8-2.0的2 μ g总RNA, 按照TIANScript试剂盒说明, 合成cDNA。以 β -肌动蛋白(actin)作为内参照, 进行PCR扩增。引物设计参考文献[5], Piwil2引物序列: 上游5'ATCTATATCTGGCTGCTCCTC3', 下游5'GATGCAAGATGTGTCCTGAC3', 扩增长度303 bp。 β -actin引物序列: 上游5'CACGATGGAGGGGCCGACTCATC3', 下游5'TA-AAGACCTCTATGCCAGT3'。 RT-PCR反应体系为25 μ L: TakaRa Taq HS 0.25 μ L, 10 \times PCR缓冲液5 μ L, dNTP Mixture 4 μ L, 上下游引物各0.5 μ L, 模板2 μ L, 其余补水至25 μ L。循环参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 46 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C终延伸7 min。取PCR产物5 μ L, 2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察并照相。用去离子水作阴性对照。使用Quantity-one软件, 计算各个样本Piwil2表达水平, 表达量的相对值(relative expression value) = 待测基因扩增条带的灰度值/

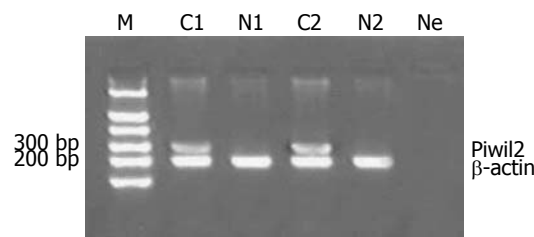


图1 RT-PCR分析Piwil2在肝癌及其对应癌旁组织中的表达。M: marker DL-600; C: 肝癌; N: 肝癌对应的癌旁组织; Ne: 阴性对照(去离子水)。

β -actin基因扩增条带的灰度值。

1.2.3 Western blot免疫印迹: 取30 μ g的组织总蛋白, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 半干法转膜, 5%的脱脂奶粉封闭1 h。加入1:100的1 \times TBST稀释的Piwil2一抗(美国Santa Cruz公司羊抗人多克隆抗体), 4 $^{\circ}$ C过夜。1 \times TBST洗膜3次, 每次10 min。加入1:400的1 \times TBST稀释的二抗(北京索莱宝公司兔抗羊IgG-HRP), 室温1 h。1 \times TBST洗膜3次, 每次10 min。暗室加入ECL发光剂曝光, 显影。使用Quantity-one软件计算各个样本Piwil2蛋白表达水平。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行统计学处理, 数据采用表示mean \pm SD, 对HCC和对应的癌旁组织中的mRNA和蛋白表达量进行配对 t 检验。对临床病理因素间的关系进行 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC及对应的癌旁组织中Piwil2基因mRNA及蛋白的表达 在HCC中均可检测到Piwil2基因mRNA的表达, 而在对应的癌旁组织中基本不表达, 其表达量的相对值为 0.32 ± 0.04 , 低于HCC中 0.91 ± 0.04 , 两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。RT-PCR结果见图1。在HCC中均可检测到Piwil2的表达, 而在在对应的癌旁组织中基本不表达。两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。Western blot印迹结果见图2。在70例肝癌标本中14例对应的癌旁组织中出现Piwil2基因的表达。

2.2 HCC中Piwil2基因mRNA及蛋白表达与临床病理特征的关系 Piwil2基因mRNA的表达与患者的肝内转移、分化程度及癌栓等病理因素有关($P<0.05$); Piwil2蛋白表达与患者的肝内转移及癌栓等病理因素有关($P<0.05$); 两者均与患者的年龄、性别、肿瘤大小无关($P>0.05$, 表1, 2)。

2.3 HCC中Piwil2基因mRNA与蛋白表达的相关性 在70例HCC中, Piwil2 mRNA阳性表达大多

表 1 HCC中Piwil2中mRNA表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Piwil2		阳性率(%)	χ^2 值	P值
		表达	缺失			
性别						
男	53	40	13	75.4	1.748	0.186
女	17	10	7	58.8		
年龄(岁)						
<45	50	35	15	70.0	0.175	0.676
≥45	20	15	5	75.0		
肿瘤直径(cm)						
≥10	20	13	7	65.0	0.567	0.451
<10	50	37	13	74.0		
乙型肝炎表面抗原						
+	54	40	14	74.1	0.810	0.368
-	16	10	6	62.5		
组织分型						
肝细胞型	49	32	17	65.3	3.000	0.083
非肝细胞型	21	18	3	85.7		
门静脉癌栓						
有	55	43	12	78.2	5.736	0.017
无	15	7	8	46.7		
肝内转移						
有	53	42	11	79.2	6.534	0.011
无	17	8	9	47.1		
分化程度						
低分化	52	41	11	78.8	5.452	0.020
中高分化	18	9	9	50.0		

■创新盘点

本研究采用RT-PCR及Western blot方法检测Piwil2在HCC中的表达, 分析其与临床病理参数的关系, 以期为肝细胞癌的诊断、治疗及预后提供参考依据。

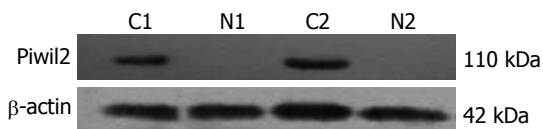


图 2 Western blot印迹分析Piwil2在肝癌及其对应癌旁组织中的表达. C: 肝癌; N: 肝癌对应的癌旁组织.

伴蛋白阳性表达, 两者具有相关性($\chi^2 = 13.113$, $P < 0.01$, 表3).

3 讨论

肿瘤的发生发展是多因素、多阶段、多基因改变的病理过程, 其中抑癌基因功能的丧失和癌基因激活是癌变的分子基础^[6-8]. Piwil2属于Argonaute家族的PIWI亚家族, 位于染色体8p21.3, 大约有23个外显子编码973个氨基酸^[9]. Lee等^[10]研究发现, Piwil2通过激活内源性RNAi机制, 作用于Stat3/Bcl-XL和Stt3/CyclinD1两个重要的细胞信号通路, 抑制细胞凋亡, 调控细胞周期, 在肿瘤发生、发展中起着重要的作用.

国内外许多研究表明, Piwil2基因在人类多种肿瘤中表达. 而在肝癌组织表达鲜见报道. 刘

巧等^[11]通过研究发现Piwil2在宫颈癌和宫颈上皮内瘤变的阳性表达率显著高于正常宫颈组织. 殷德涛等^[12]通过研究60例甲状腺乳头状发现, Piwil2参与了甲状腺乳头状癌的发生发展、与甲状腺乳头状癌的浸润和颈淋巴转移有关. 曹正国等^[13]研究发现Piwil2与膀胱癌的发生发展有关. Liu等^[14]发现Piwil2在乳腺中表达, 可望成为一个分子标志物. Li与Oh等^[15,16]发现Piwil2在结肠癌的发生、发展中起着重要的作用.

我们采用RT-PCR及Western blot法检测了70例HCC及其对应的癌旁非癌组织中Piwil2基因的表达, 发现在HCC组织中Piwil2基因的表达明显高于对应的非癌组织($P < 0.05$). 我们还发现在患者的肝内转移、分化程度及癌栓等病理因面的差异有统计学意义($P < 0.05$). 提示Piwil2基因的mRNA表达与HCC的恶性程度及预后有关. 另外, 70例HCC中均出现Piwil2蛋白的表达, 而在对应的非癌组织中, 56例蛋白表达明显下降或缺失($P < 0.05$). 后续的实验将进一步揭示其Piwil2基因在肝癌中的生物学作用及发生机制.

本研究表明, Piwil2在HCC中具有类似癌基

■同行评价

本文研究了肝癌组织中Piwil2基因mRNA和蛋白质水平的表达,并对其与肿瘤发生的相关性进行了分析,具有一定理论价值。

表 2 HCC中Piwil2中蛋白表达与临床病理特征的关系

临床病理特征	n	Piwil2		阳性率(%)	χ^2 值	P值
		表达	缺失			
性别						
男	53	38	15	71.7	2.053	0.152
女	17	9	8	53.0		
年龄(岁)						
<45	50	37	13	74.0	3.370	0.053
≥45	20	10	10	50.0		
肿瘤直径(cm)						
≥10	20	11	9	55.0	1.871	0.171
<10	50	36	14	72.0		
乙型肝炎表面抗原						
+	54	34	20	63.0	1.871	0.171
-	16	13	3	81.3		
组织分型						
肝细胞型	49	32	17	65.3	0.250	0.617
非肝细胞型	21	15	6	71.4		
门静脉癌栓						
有	55	41	14	74.5	6.375	0.012
无	15	6	9	40.0		
肝内转移						
有	53	40	13	75.5	6.862	0.009
无	17	7	10	41.2		
分化程度						
低分化	52	36	16	69.2	0.400	0.527
中高分化	18	11	7	61.1		

表 3 HCC中Piwil2 mRNA和蛋白表达的相关性

蛋白	mRNA		合计
	表达	缺失	
表达	40	10	50
缺失	7	13	20
合计	47	23	70

$$\chi^2 = 13.113, P < 0.01.$$

因的作用。检测Piwil2的表达,对HCC的早期诊断和预后的判定,提供一定的依据和新的思路。

4 参考文献

- Liu X, Sun Y, Guo J, Ma H, Li J, Dong B, Jin G, Zhang J, Wu J, Meng L, Shou C. Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int J Cancer* 2006; 118: 1922-1929
- Qiao D, Zeeman AM, Deng W, Looijenga LH, Lin H. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 2002; 21: 3988-3999
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell
- MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 2006; 442: 199-202
- Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol* 2006; 17: 143-153
- Nikpour P, Forouzandeh-Moghaddam M, Ziaee SA, Dokun OY, Schulz WA, Mowla SJ. Absence of PIWIL2 (HILI) expression in human bladder cancer cell lines and tissues. *Cancer Epidemiol* 2009; 33: 271-275
- Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- Riley LB, Desai DC. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy. *Surg Clin North Am* 2009; 89: 1-15, vii
- 樊嘉, 邱双健. 肿瘤微环境的研究动态与展望. *中华医学杂志* 2008; 88: 505-507
- Ye Y, Yin DT, Chen L, Zhou Q, Shen R, He G, Yan Q, Tong Z, Issekutz AC, Shapiro CL, Barsky SH, Lin H, Li JJ, Gao JX. Identification of Piwil2-like (PL2L) proteins that promote tumorigenesis. *PLoS One* 2010; 5: e13406
- Lee JH, Schütte D, Wulf G, Füzesi L, Radzun HJ, Schweyer S, Engel W, Nayernia K. Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 201-211
- 刘巧, 雷蕾, 冯定庆, 周颖, 曹振平, 徐嵘嵘, 凌斌. Pi-

- wil2在宫颈癌组织中的表达和意义. 中国临床保健杂志 2010; 13: 366-368
- 12 殷德涛, 李红强, 王勇飞, 曹胜利, 周玉冰, 郑立运, 江金花, 王庆端. PiWil2在甲状腺乳头状癌中的表达及其与侵袭转移的关系. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志 2011; 46: 237-239
- 13 曹正国, 田超, 蒋茂林, 董晓程, 吴宝国, 黎建欣, 黄洪才. PIWIL2在人膀胱移行细胞癌肿瘤干细胞样细胞中的表达及意义. 国际泌尿系统杂志 2011; 31: 722-726
- 14 Liu JJ, Shen R, Chen L, Ye Y, He G, Hua K, Jarjoura D, Nakano T, Ramesh GK, Shapiro CL, Barsky SH, Gao JX. Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker. *Int J Clin Exp Pathol* 2010; 3: 328-337
- 15 Li D, Sun X, Yan D, Huang J, Luo Q, Tang H, Peng Z. Piwil2 modulates the proliferation and metastasis of colon cancer via regulation of matrix metalloproteinase 9 transcriptional activity. *Exp Biol Med* (Maywood) 2012; 237: 1231-1240
- 16 Oh SJ, Kim SM, Kim YO, Chang HK. Clinicopathologic Implications of PIWIL2 Expression in Colorectal Cancer. *Korean J Pathol* 2012; 46: 318-323

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 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库. 此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录. 《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊. 《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)

早期肝功能损害对急性胰腺炎病因判定的临床价值

陈勇, 曾艳凌, 林志辉

■背景资料

急性胰腺炎(AP)是临床常见病和多发病,重症有并发症多及死亡率高的特点,及早明确病因至关重要。国内以急性胆石性胰腺炎最常见,文献也报道较多并发现肝损害,而早期肝功能损害对胆石性胰腺炎的病因判定更有说服力。

陈勇, 曾艳凌, 林志辉, 福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院消化内科 福建省福州市 350001

陈勇, 副主任医师, 主要从事消化系疾病的临床工作、教学与ERCP的操作。

作者贡献分布: 本文由陈勇构思; 研究过程由陈勇与曾艳凌完成; 数据分析由陈勇完成; 论文写作由陈勇、曾艳凌及林志辉完成。

通讯作者: 陈勇, 副主任医师, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院消化内科。13959137896@139.com

电话: 0591-87525985

收稿日期: 2012-09-25 修回日期: 2012-11-10

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Clinical value of early liver dysfunction in diagnosis of etiology of acute pancreatitis

Yong Chen, Yan-Ling Zeng, Zhi-Hui Lin

Yong Chen, Yan-Ling Zeng, Zhi-Hui Lin, Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Yong Chen, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, 134 East Street, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. 13959137896@139.com

Received: 2012-09-25 Revised: 2012-11-10

Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical significance of early liver dysfunction in diagnosis of the etiology of acute pancreatitis.

METHODS: The clinical data for 153 patients with acute pancreatitis were retrospectively analyzed. These patients were divided into three group based on the etiology of the disease: biliary pancreatitis ($n = 80$), non-biliary pancreatitis ($n = 44$) and unexplained pancreatitis ($n = 29$). The markers of early liver function were compared between the biliary pancreatitis group ($n = 61$) and non-biliary pancreatitis group ($n = 33$), including serum alanine amino transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), gamma-glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (AKP). The sensitivity and specificity of early liver dysfunction in the diagnosis of biliary pancreatitis were calculated.

RESULTS: Early liver dysfunction in patients with biliary pancreatitis was more serious than that in patients with non-biliary pancreatitis (ALT: $214.16 \text{ U/L} \pm 146.92 \text{ U/L}$ vs $30.82 \text{ U/L} \pm 25.59 \text{ U/L}$; AST: $212.72 \text{ U/L} \pm 210.50 \text{ U/L}$ vs $28.24 \text{ U/L} \pm 22.16 \text{ U/L}$; GGT: $438.34 \text{ U/L} \pm 286.69 \text{ U/L}$ vs $60.48 \text{ U/L} \pm 68.32 \text{ U/L}$; AKP: $202.81 \text{ U/L} \pm 147.77 \text{ U/L}$ vs $72.06 \text{ U/L} \pm 36.70 \text{ U/L}$; TBIL: $56.52 \mu\text{mol/L} \pm 46.01 \mu\text{mol/L}$ vs $18.25 \mu\text{mol/L} \pm 9.56 \mu\text{mol/L}$; DBIL: $36.81 \mu\text{mol/L} \pm 32.50 \mu\text{mol/L}$ vs $5.17 \mu\text{mol/L} \pm 4.65 \mu\text{mol/L}$; all $P < 0.001$). Early liver dysfunction manifested mainly as abnormal ALT, AST, GGT, AKP, TBIL, DBIL, or a combination of several of them. The sensitivity and specificity of early liver dysfunction in the diagnosis of biliary pancreatitis were 95.1% and 90.9%, respectively.

CONCLUSION: Early liver dysfunction can be used to predict the etiology of acute pancreatitis. Early liver function tests should be included in routine emergency laboratory tests.

Key Words: Early liver dysfunction; Acute pancreatitis; Etiology; Liver function markers; Laboratory tests

Chen Y, Zeng YL, Lin ZH. Clinical value of early liver dysfunction in diagnosis of etiology of acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3390-3393

摘要

目的: 观察急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)患者发病48 h内肝功能改变, 探讨早期肝功能损害对AP病因判定的临床意义。

方法: 对153例AP患者临床资料回顾性分析, 按病因分为胆源性、非胆源性及不明原因3组。胆源性组($n = 80$); 非胆源性组($n = 44$); 不明原因组($n = 29$)。早期肝功能检测指标: 胆源性组($n = 61$); 非胆源性组($n = 33$)。比较胆源性组和非胆源性组早期肝功能指标血清丙氨酸氨基转氨酶(amino transaminase, ALT)、门冬氨酸氨基转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红(direct bilirubin, DBIL)、谷氨酰转氨

■同行评议者

陆云飞, 教授, 广西医科大学第一附属医院

酶(glutamyl transferase, GGT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP), 观察其早期肝功能损害的临床类型, 并计算胆源性组早期肝功能损害的敏感性和特异性。

结果: 胆源性组患者早期肝功能损害较非胆源性组严重, ALT($214.16 \text{ U/L} \pm 146.92 \text{ U/L}$ vs $30.82 \text{ U/L} \pm 25.59 \text{ U/L}$), AST($212.72 \text{ U/L} \pm 210.50 \text{ U/L}$ vs $28.24 \text{ U/L} \pm 22.16 \text{ U/L}$), GGT($438.34 \text{ U/L} \pm 286.69 \text{ U/L}$ vs $60.48 \text{ U/L} \pm 68.32 \text{ U/L}$), AKP($202.81 \text{ U/L} \pm 147.77 \text{ U/L}$ vs $72.06 \text{ U/L} \pm 36.70 \text{ U/L}$), TBIL($56.52 \mu\text{mol/L} \pm 46.01 \mu\text{mol/L}$ vs $18.25 \mu\text{mol/L} \pm 9.56 \mu\text{mol/L}$), DBIL($36.81 \mu\text{mol/L} \pm 32.50 \mu\text{mol/L}$ vs $5.17 \mu\text{mol/L} \pm 4.65 \mu\text{mol/L}$, 均 $P < 0.001$); 早期肝功能损害临床类型以ALT、AST、GGT、AKP、TBIL及DBIL混合损害为主, 占88.6%; 其敏感性为95.1%, 特异性为90.9%。

结论: 早期肝功能损害可预测AP病因为胆石(源)性。早期肝功能检测应作为急诊的常规实验室检查项目, 更适合于基层医院。

关键词: 早期肝功能损害; 急性胰腺炎; 病因; 肝功能检测指标; 实验室检查

陈勇, 曾艳凌, 林志辉. 早期肝功能损害对急性胰腺炎病因判定的临床价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3390-3393
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3390.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见病、多发病, 重症者易造成多脏器功能衰竭, 危及生命。因此及时明确病因至关重要。本文分析153例AP住院病例早期肝功能损害(指胰腺炎发病48 h内肝功能检测异常)对病因判断的临床价值。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院2011-01/2012-03期间AP住院患者153例。男88例, 女65例, 年龄15-95岁(平均52.5岁), 病因: 胆源性80例, 占52.3%; 其中胆石性78例, 非胆源性(饮食、饮酒及高脂血症)44例, 占28.7%; 不明原因29例, 占19.0%。做早期肝功能检测: 胆源性61例, 占76.3%; 非胆源性33例, 占76.7%, 不明原因18例, 占62.1%。

1.2 方法

1.2.1 疾病及病因判断: 本组中AP的诊断均符合中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组编写的中国AP诊治指南(草案)的标准^[1]。经B超、CT、

胰胆管水成像(magnetic resonance, MRCP)或逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cannulation of the pancreatic, ERCP)检查证实为胆源性。

1.2.2 观测指标: 检测发病48 h内肝功能, 包血清丙氨酸氨基转氨酶(amino transaminase, ALT)、门冬氨酸氨基转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红(direct bilirubin, DBIL)、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -glutamyl transferase, γ -GGT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)。

统计学处理 利用SPSS13.0统计软件分析, 所有计量资料均采用mean \pm SD表示, 各指标差异用 t 检验, $P < 0.05$ 为统计学有意义。敏感性 & 特异性计算: 以超过各指标正常上限值为阳性, 敏感性: 真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) \times 100%; 特异性: 真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数) \times 100%。

2 结果

胆源性AP早期肝功能损害较非胆源性的常见, 其差异具有非常显著性($P < 0.001$, 表1)。以超过各单项指标正常上限值为阳性计算出其真阳性58例, 假阴性3例, 真阴性30例, 假阳性3例。早期肝功能损害对AP胆源性病因判断的敏感性为95.1%, 特异性为90.9%。

早期肝功能检测指标包括肝酶(ALT和AST)、胆酶GGT和AKP及胆红素TBIL和DBIL。胆源性病例中单项肝酶异常1例; 单项胆酶异常1例; 胆酶和胆红素均异常2例; 肝酶和胆酶均异常17例, 占27.9%; 肝酶、胆酶和胆红素均异常37例, 占60.7%。

153例AP发生肝功能损害84例, 占54.9%; 而早期肝功能损害65例, 占肝功能损害77.4%; 80例胆源性AP出现早期肝功能损害58例, 占72.5%, 胆源性的占早期肝功能损害的89.2%。

3 讨论

AP中最常见的病因为胆源性。急性胆源性胰腺炎又以胆道结石为最常见病因。胆石引起的AP称为急性胆石性胰腺炎(acute gallstone pancreatitis, AGP), 本组胆源性病因占52.3%, 胆石病因(78例)占胆源性病因中97.5%。胆石中以胆囊内小结石或微小胆石(直径 $< 3 \text{ mm}$)的下移最为常见, 70%胰腺炎患者的粪便中可找到结石^[2]。胆石症引起AP的发病机制是众所周知的。“共同通道学说”在AGP的发病中起了关键性作用。

■研发前沿

早期肝功能损害可预测AP病因为胆石性, 为尽快针对胆总管下段结石相关检查的选择如MRCP提供有力的佐证, 但早期肝功能损害的时间界定是否更早甚至几小时内, 有待于今后进一步观察。

■创新盘点

本文通过观察发病48 h内肝功能检测结果来判定AP的病因, 急性胆石性胰腺炎早期肝功能损害的敏感性和特异性都超过90%。

■应用要点

肝功能的实验室检测是一个简便、快速和敏感的方法,基层医院都能开展。

表 1 胆源性和非胆源性胰腺炎早期肝功能指标比较

肝功能指标	胆源性(<i>n</i> = 61)	非胆源性(<i>n</i> = 33)	<i>P</i> 值
ALT	214.16 ± 146.92	30.82 ± 25.59	<0.001
AST	212.72 ± 210.50	28.24 ± 22.16	<0.001
GGT	438.34 ± 286.69	60.48 ± 68.32	<0.001
AKP	202.81 ± 147.77	72.06 ± 36.70	<0.001
TBIL	56.52 ± 46.01	18.25 ± 9.56	<0.001
DBIL	36.81 ± 32.50	5.17 ± 4.65	<0.001

AKP: 碱性磷酸酶; ALT: 丙氨酸氨基转氨酶; AST: 门冬氨酸氨基转氨酶; DBIL: 直接胆红素; GGT: 谷氨酰转氨酶; TBIL: 总胆红素。

还有与梗阻、Oddi括约肌功能不全、胆道炎症时细菌毒素、游离胆酸、非结合胆红素参与激活胰酶等因素相关^[3]。胆石症同时导致胆汁排出受阻,胆管内压升高而增加肝细胞膜的通透性是AGP致肝功能损害起主要作用。另外,与胆汁酸的毒性作用和胆道感染的参与有关。Cohen等^[4]报道,AGP患者入院24-48 h内,肝功能指标持续异常者罹患胆管结石的风险增加了4倍。

AGP的诊断方法很多,B超虽然是一项简便、无创伤性检查,但敏感性低,仅60%-70%^[2],对胆总管下段结石的诊断因受肠道气体的干扰,尤其对微小结石更难发现。CT和MRCP对胆总管下段结石诊断的敏感性较高,但属于大型仪器及价格昂贵,在基层和时间外常无法开展检查。基于上述条件的限制,实验室检查提供了简单、快速、敏感的方法,其中肝功能异常是诊断AGP的可靠指标^[2]。我们认为发病48 h内肝功能损害(早期肝功能损害)对AGP诊断的预测更可靠。AGP的早期肝功能损害敏感性高达95.1%,特异性为90.9%。本组在早期肝功能检测指标(ALT、AST、GGT、AKP、TBIL及DBIL)上AGP较非胆源性AP的明显异常,差异具有非常显著意义。其原因可能^[5]:(1)胆道感染时胆管压力上升促使细菌反流入血,细菌产生的内毒素激活肝细胞膜上的磷脂酶,导致肝细胞变性坏死;(2)炎症沿着胆囊扩散并引起胆总管充血水肿、不同程度的梗阻;(3)炎症波及胆囊周围组织加上胆囊扩张,引起肝管和胆管受压,胆汁淤积。而病程超过48 h后其肝功能损害可能加重或减轻;其发病机制有:(1)胰腺水肿或重症胰腺炎周围炎性渗出、坏死组织或囊肿的压迫而加重肝功能损害;(2)各种炎性细胞因子(IL-6、IL-8、IL-10、TNF- α 、血小板活化因子、内毒素等)、核因子-JB(nuclear factor-JB, NF-JB)、

氧自由基等对AP继发肝损害的作用已成为研究热点^[6-9];苏娟等^[10]报道Ghrelin在AP并肝损伤时表达可能与病变的严重程度有关,NF- κ B在病变发展过程中起了重要作用;(3)AP时可通过上调Kupffer细胞内FasL生成的信号使FasL表达增加,FasL激活Fas相关的死亡域和暴露死亡效应结构域,随后活化Caspase级联反应和下游的效应Caspases,最终导致DNA裂解和肝细胞凋亡,从而介导肝损伤^[11];(4)肠道细菌和内毒素易位,是导致脏器损害包括肝功能损害的“第二次打击”^[12]。白黎智等^[13]给AP患者肠内免疫微生态营养,补充肠道正常菌群,减少细菌易位,减少内毒素血症及炎症因子的发生,从而减轻AP肝损害;(5)可能是重症AP伴休克的一种并发症:当肝脏血流减少,肝细胞也可发生缺血坏死,甚至出现肝功能衰竭;(6)因结石造成胆总管梗阻,胆总管扩张到一定程度时,经治疗后梗阻在“共同通道”的小结石因通道相应的增大而松动上浮至扩张的胆总管内,可使肝功能损害暂时减轻;(7)经解痉止痛处理后的小结石或微结石因胆总管内压力增加随较大的胆汁流排入十二指肠内,胆内压下降或胆道梗阻解除可使肝功能损害减轻甚至恢复正常。本组有2例经MRCP检查证实胆总管下段泥沙样结石,在ERCP检查前一天短时间内腹痛突然缓解,肝功能复查恢复正常,ERCP显示选择性胆道造影胆总管内未见充盈缺损,经松弛的乳头口送入网篮及球囊均未见结石,考虑结石已排入肠道。

张金华^[14]报道73%AP有肝功能损害,陈畅等^[15]认为胆源性AP合并肝功能损害明显,AP肝损害越重,重症的可能性越大;郝波等^[16]观察到通过检测AP患者入院24 h肝功能指标,就已经出现肝功能损害。然而,入院时患者的病程可能已经超过48 h,因此不能反映早期损害。本研究

■名词解释

早期肝功能损害:指的是发病48 h内肝功能常用指标(ALT、AST、GGT、AKP、TBIL及DBIL)一项或多项超过正常上线值。

显示AP出现早期肝功能损害以AGP居多, 本组AGP出现早期肝功能损害72.5%, 占总的早期肝功能损害高达89.2%。肝功能损害表现不一, 以混合损害为主, 60.7%表现为肝酶、胆酶及胆红素均异常, 20.9%表现肝酶和胆酶均异常, 与文献报道单项肝酶或胆酶异常占50%有出入^[17], 可能是本文提出早期肝功能损害的概念有关, 超过48 h的肝功能损害有更多的影响因素, 暂不列入统计范畴。

总之, 早期肝功能损害可预测AGP的病因, 与文献报道一致^[18]。但要强调的是需要进一步做B超、CT或MRCP辅助检查才能最终明确其病因。早期肝功能检测应作为急诊的常规实验室检查项目, 更适合于基层医院, 同时为AP后续的检查和治疗的选择提供依据, 避免盲目检查, 增加费用。

4 参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案). 中国消化内镜杂志 2007; 1: 30-33
- 2 赵玉沛. 胆源性胰腺炎诊断标准与处理原则的探讨. 中华肝胆外科杂志 2002; 8: 95-96
- 3 陆再英, 钟南山. 内科学. 第七版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 379-384
- 4 Cohen ME, Slezak L, Wells CK, Andersen DK, Topazian M. Prediction of bile duct stones and complications in gallstone pancreatitis using early laboratory trends. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3305-3311
- 5 张启宇. 实用胆道病学. 南京: 江苏科学技术出版社, 1997: 195
- 6 Pooran N, Indaram A, Singh P, Bank S. Cytokines (IL-6, IL-8, TNF): early and reliable predictors of severe acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37: 263-266
- 7 谷俊朝, 秦兆寅, 王宇. 大鼠急性坏死性胰腺炎时肝脏损害与门静脉血中自细胞介素6水平的变化. 中华普通外科杂志 1998; 13: 365
- 8 Van Laethem JL, Eskinazi R, Louis H, Rickaert F, Robberecht P, Devière J. Multisystemic production of interleukin 10 limits the severity of acute pancreatitis in mice. *Gut* 1998; 43: 408-413
- 9 于洪海, 冯志杰. 急性胰腺炎肝损伤的发病机制和治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 385-391
- 10 苏娟, 唐国都, 杨慧莹, 覃蒙斌, 梁志海. Ghrelin及NF- κ B在急性坏死性胰腺炎并肝损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19: 568-574
- 11 张晓华, 袁柏思, 朱人敏. Fas/FasL在急性胰腺炎肝损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1661-1665
- 12 王兴鹏. 中国胰腺疾病研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2000; 8: 843-846
- 13 白黎智, 康利民, 路小光, 康新, 范治伟, 纪春阳. 肠内免疫微生态营养对重症急性胰腺炎肝损伤的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 616-620
- 14 张金华. 急性胰腺炎并肝损伤52例临床分析. 中国综合临床 2003; 19: 708-709
- 15 陈畅, 张文俊, 刘岩, 李兆申. 270例急性胰腺炎合并肝损伤的临床观察. 胰腺病学 2006; 6: 259-261
- 16 郝波, 宋萧逸, 任清华, 程秀莲, 王丙信. 急性胰腺炎肝损伤临床意义. 实用诊断和治疗杂志 2008; 2: 422-423
- 17 张喜平, 张杰, 杨萍. 急性胰腺炎并发肝损伤机制及治疗研究现状. 医学研究杂志 2007; 36: 88-91
- 18 徐克成, 孟宪镛, 沈洪薰. 血清酶实验对胆石性胰腺炎的早期预测意义. 中华消化杂志 1988; 8: 277

■同行评价

本文病例诊断标准明确, 统计学处理得当, 对基层医院AP的诊治有一定参考意义。

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 •

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)

保脾手术治疗外伤性脾破裂36例

詹慧春, 徐早华, 曾卫华, 丁华民, 傅华群

■背景资料

外伤性脾破裂的发生率逐年增加, 占各种腹部损伤的40%-50%。随着医学的发展和脾脏功能重要性认识的不断提高, 加之人们对生活质量的追求, 保脾理念越来越被临床医师重视, 尤其对低龄人群更为重要。

詹慧春, 徐早华, 曾卫华, 丁华民, 乐安县第二人民医院 江西省乐安县 344301

傅华群, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 詹慧春为本文负责人; 徐早华、曾卫华及丁华民参加手术并搜集、整理资料; 傅华群指导手术及审阅文章。

通讯作者: 詹慧春, 副主任医师, 344301, 江西省乐安县古城街39号, 乐安县第二人民医院。zhanhuichun@163.com

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-20

接受日期: 2012-04-19 在线出版日期: 2012-12-08

Spleen-preserving operation for the treatment of traumatic splenic rupture: An analysis of 36 cases

Hui-Chun Zhan, Zao-Hua Xu, Wei-Hua Zeng, Hua-Min Ding, Hua-Qun Fu

Hui-Chun Zhan, Zao-Hua Xu, Wei-Hua Zeng, Hua-Min Ding, the Second People's Hospital of Le'an County, Fuzhou 344301, Jiangxi Province, China

Hua-Qun Fu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Hui-Chun Zhan, Associate Chief Physician, the Second People's Hospital of Le'an County, Fuzhou 344301, Jiangxi Province, China. zhanhuichun@163.com

Received: 2012-02-20 Revised: 2012-03-20

Accepted: 2012-04-19 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To discuss our experience in managing traumatic splenic rupture by spleen-preserving operation.

METHODS: Eighty-five cases of splenic traumatic rupture were selected, and 36 of them were retrospectively analyzed.

RESULTS: Twelve patients was treated by hot compress, application of biological glue to injury tissue surface, and coverage using the greater omentum flap. Nineteen patients were treated by irregular splenectomy and splenic wound repair. Five patients underwent subtotal splenectomy. Complications occurred in 8 patients and were cured after proper treatments. The median length of hospital stay was 22.6 d \pm 19.0 d. All patients were satisfactory for the treatment.

■同行评议者

张宏伟, 教授, 河南省人民医院肝胆胰脾外科; 王铮, 副研究员, 西安交通大学医学院第一附属医院肝胆病肝胆外科

CONCLUSION: For patients with traumatic splenic rupture, saving life is more important than preserving the spleen. For children patients, spleen-preserving operation is preferred. An appropriate treatment should be selected based on the patient's condition.

Key Words: Spleen-preserving; Traumatic splenic rupture; Splenectomy

Zhan HC, Xu ZH, Zeng WH, Ding HM, Fu HQ. Spleen-preserving operation for the treatment of traumatic splenic rupture: An analysis of 36 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3394-3396

摘要

目的: 总结外伤性脾破裂进行保脾手术治疗的临床经验。

方法: 收集我院2003-01/2012-06收治的外伤性脾破裂患者85例, 回顾性分析其中36例行保脾手术治疗的临床资料。

结果: 12例患者先经热敷压迫, 再用生物胶涂在损伤组织表面, 后用大网膜片覆盖; 19例患者行脾下部不规则切除, 再行修补; 5例患者行大部分脾切除后保留有边缘血供的残留脾。全部患者获得治愈, 住院平均时间为22.6 d \pm 19.0 d, 发生并发症8例, 经对症处理后均痊愈出院。随访效果均较为满意。

结论: 外伤性脾破裂治疗原则: (1)抢救生命第一, 保留脾脏第二; (2)儿童优先选择脾保留手术, 且首选非手术治疗; (3)根据脾脏损伤程度、类型选择最佳术式, 实施个体化治疗, 可取得满意疗效。

关键词: 保脾; 外伤性脾破裂; 脾切除

詹慧春, 徐早华, 曾卫华, 丁华民, 傅华群. 保脾手术治疗外伤性脾破裂36例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(34): 3394-3396
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3394.asp>

0 引言

脾脏是人体最大的外周淋巴器官, 含有丰富的T

淋巴细胞、B淋巴细胞、树突状细胞及巨噬细胞等,具有重要的免疫功能和储血等功能。由于质地脆弱,脾脏极易受外力影响而损伤,一旦受损,出血常较剧烈,易危及生命,需切除脾脏^[1]。脾脏切除后机体可发生明显的免疫功能改变,甚者出现爆发性感染,基于对脾脏功能的认识,近年来保脾手术越来越受到重视^[2-5]。1978年中国人民解放军第三军医大学以脾修补处理脾外伤作为先导,脾保留性手术开始在全国真正开展起来。随后,同济医科大学、哈尔滨医科大学第一附属医院等相继作了脾保留性手术的报道^[1];脾保留性手术已发展广泛应用,也逐步被各级医院采纳。本研究收集我院2003-01/2012-06收治的外伤性脾破裂患者85例,重点回顾性分析其中36例行保脾手术患者的临床资料,以期为临床医师提供一定的帮助,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003-01/2012-06共收治外伤性脾破裂患者85例,手术治疗71例,其中,行保脾手术者36例,占同期脾外伤的42.35%。36例保脾患者中,男30例,女6例,平均年龄33.2岁±11.2岁,开发性损伤8例,闭合性损伤28例;患者单纯性脾破裂患者19例,合并其他损伤17例,其中合并肝胰损伤3例、颅脑损伤1例、肾挫裂伤6例、肠系膜裂伤9例、骨折12例。受伤原因:交通事故伤18例,钝器伤6例,坠落伤5例,挤压伤2例,拳脚击伤7例。

1.2 方法

1.2.1 诊断: 36例患者均有腹部或左下胸创伤史,受伤到入院时间1 h-10 d,平均18.6-49.0 h;其中,30例患者有不同程度的左上腹痛和左季肋区及左上腹叩击痛,3例患者腹痛伴头晕,2例单纯头晕,1例无明显症状。入院时8例患者收缩压<90 mmHg,14例患者心率>100次/min。8例有较明显的腹膜刺激征,6例有左肩部放射痛。36例患者均行B超检查,提示脾脏有裂伤20例,脾区有液性暗区及脾包膜血肿和腹腔积血16例;6例行CT检查,均提示脾脏密度不均、脾周血肿。

1.2.2 损伤分级: 患者脾脏损伤程度分级标准采用姜洪池等^[6]报道的分级标准。I级:脾被膜下破裂或被膜及实质轻度损伤,手术所见脾损伤长度≤5.0 cm,深度≤1.0 cm;II级:脾裂伤总长度≥5.0 cm,深度≥1.0 cm,但脾门未累及,或脾段血管受损;III级:脾破裂伤及脾门或脾脏部分离断,或脾叶血管受损;IV级:脾广泛破裂,或脾

蒂、脾动静脉主干受损。本组患者中I级2例,II级14例,III级15例,IV级5例。

1.2.3 治疗: B超提示腹腔有中等量积液800-1 200 mL 30例,直接送手术室手术治疗;B超提示少量积液,且生命体征暂时稳定者6例,行CT检查进一步明确诊断。本组患者中,30例手术切口选择右侧经腹直肌,6例手术切口选择左肋缘下,具体手术方案进腹后根据脾脏损伤程度和患者病情具体制定。其中:12例患者先经热敷压迫,再用生物胶涂在损伤组织表面,后用大网膜片覆盖。黏合剂如止血估计效果不理想,可以U形缝合,进针应超过创底下0.5-1.0 cm,用带蒂大网膜或可吸收明胶海绵填于裂口内打结,以消灭死腔、防止出血及积血感染,19例患者行脾下部不规则切除或修补:迅速托脾控制脾蒂,判断脾脏严重损伤主要局限于上极或下极,距损伤平面约1 cm处的正常脾组织切开脾包膜,钝性分离脾实质,遇到血管结扎后切断,脾脏断面予肝针缝合止血;5例患者行脾大部分切除后保留有边缘血供的残留脾:脾广泛破裂,脾蒂、脾动静脉主干受损,部分离断的残存脾血供良好,此时手术予切除脾脏,保留残存脾脏,创面缝合止血^[7]。

2 结果

全部患者获得治疗痊愈出院,住院平均时间为22.6 d±19.0 d。手术过程中34例患者进行输血,输血量平均1 132.4-468.5 mL。发生并发症8例,其中肠梗阻4例,膈下感染3例,胃痿1例,经对症处理后均痊愈出院。36例患者中术后获得随访26例,随访时间3 mo-6年,检测免疫球蛋白、B超、CT、ECT等,并白细胞吞噬试验,效果均较为满意。

3 讨论

外伤性脾破裂的发生率逐年增加,占各种腹部损伤的40%-50%^[8]。随着医学的发展和脾脏功能重要性认识的不断提高,加之人们对生活质量的追求,保脾理念越来越被临床医师重视,尤其对低龄人群更为重要^[9]。1983年Kap证明脾破裂后,可以自身修复^[9]。1984年夏穗生采用带血管自体半脾移植治疗外伤性脾破裂获得成功^[10]。我国保脾手术起步晚,但在术式改进创新上却早于或优于国外。姜洪池等^[11,12]报道,自20世纪80年代初至2000-01共行脾保留性手术211例,全部病例均获治愈。邓忠南等^[13]回顾性分析外伤性脾破裂患者62例,其中35例分别行脾脏部分切除、修补术治疗,结果显示35例患者中一期完

■研究前沿

刘强等回顾性分析进行保脾治疗的46例外伤性脾破裂患者的临床资料,非手术治疗成功率79.3%,非手术治疗占同期脾外伤的20%。手术保脾治疗17例,效果较好。

■应用要点

脾脏切除后机体可发生明显的免疫功能改变,甚者出现爆发性感染,基于对脾脏功能的认识,近年来保脾手术越来越受到重视。

■同行评价

本文通过对外伤性脾破裂保脾资料的回顾性分析, 复习目前国内外文献, 讨论保脾的可行性与安全性, 文章书写流畅, 逻辑性较强, 对临床有一定的指导意义。

成手术保脾治疗31例, 行部分切除患者术后再次行残脾切除自体脾片移植术4例, 术后19例发生脾血肿、膈下感染或胃痿, 经积极对症处理后均痊愈出院。李晓春等^[14]回顾性分析110例选择性手术保脾治疗患者临床资料, 其中黏合胶加大网膜填压修补28例, 脾动脉结扎脾修补24例, 脾部分切除26例, 脾切除自体脾片移植22例, 腹腔镜脾修补10例; 手术治疗过程中虽然并发症17例, 但全部治愈出院。由此得出结论: 只要遵循保脾治疗的基本原则, 脾保留性手术在临床中应用安全、可行, 值得推广。

保脾手术发展到今天, 开展的单位有日益增多, 术式也不断创新^[15-18]: 有脾单纯缝合修补、脾破裂生物胶黏合、物理凝固止血、脾部分切除、脾动脉结扎、脾动脉栓塞、脾破裂捆扎、网罩止血术等, 以及多种术式的不同组合, 而且非手术治疗脾外伤也常规化。本组患者治疗方案均是进腹后根据脾脏损伤程度和患者病情个体化实施, 其中: 12例先经热敷压迫, 再用胶涂在损伤组织表面, 后用大网膜片覆盖; 19例行脾下部不规则切除或修补; 5例患者行脾切除后保留有边缘血供的残留脾。同期, 我们进行非手术治疗49例, 患者经补液后血压正常并能维持, 绝对卧床住院治疗3 wk, 在监护下进行活动3 mo。刘强等^[7]回顾性分析进行保脾治疗的46例外伤性脾破裂患者的临床资料, 非手术治疗成功率79.3%, 非手术治疗占同期脾外伤的20%。手术保脾治疗17例, 其中单纯修补缝合3例, 脾修补缝合加大网膜填塞3例, 脾部分切除加大网膜填塞修补3例, 全脾切除加脾组织大网膜移植8例。血管介入脾动脉栓塞治疗6例, 均一次脾动脉栓塞成功。46例均无并发症发生。痊愈45例, 1例因合并颅脑损伤呈植物人状态。我们得出以下经验: 脾脏 I 级损伤以非手术治疗为主, II 级损伤以脾动脉栓塞或手术修补保脾为主, III 级以上的损伤只能手术保脾, 同时结合实际情况进行个体化和综合治疗。这就要求临床医师要根据脾脏损伤程度、类型选择最佳术式, 并根据实际情况联合应用几种术式。

基于脾脏的特殊性, 尤其对于儿童和青少年患者优先选择脾保留手术更为重要。1952年 King 和 Schumacker 报道5例儿童发生全脾切除后

凶险性感染, 此后越来越多的研究发现全脾切除后凶险性感染的发生率显著高于成人^[10-16], 这才真正唤起临床医生对儿童和青少年保脾手术的充分重视。本组患者中, ≤ 13 岁患者6例, 保脾手术效果非常满意, 这可能与儿童脾脏包膜肥厚, 出血易受限等因素有关。我们对脾损伤患者治疗的体会是: (1)抢救生命第一, 保留脾脏第二, 即先保命后保脾; (2)少数儿童与青少年优先选择脾保留手术, 且首选非手术治疗; (3)根据脾脏损伤程度、类型选择最佳术式; (4)联合应用几种术式更为安全实际。由于条件限制, 我们尚未开展介入治疗, 以后将在实践中不断地探索新手术和积累更多的经验。

4 参考文献

- 1 姜洪池, 乔海泉, 代文杰. 脾脏外科: 近20年的进展与展望. 中华肝胆外科杂志 2002; 8: 3-6
- 2 吴占徽. 外科性脾破裂33例手术治疗体会. 中国基层医药 2002; 9: 246-247
- 3 黄杰群, 彭俊杰, 吕宇思, 施立斌, 吴文校. 保脾手术治疗外伤性脾破裂112例报告. 中国基层医药 2003; 10: 412-413
- 4 Uranüs S, Pfeifer J. Nonoperative treatment of blunt splenic injury. *World J Surg* 2001; 25: 1405-1407
- 5 张亚军, 张文军. 自发性脾破裂9例临床分析. 中国基层医药 2004; 11: 1364
- 6 姜洪池, 代文杰. 脾损伤分级和外科治疗方式的选择. 临床外科杂志 2006; 14: 404-405
- 7 刘强, 李铎, 刘家峰, 王亚军, 孙家邦. 外伤性脾破裂保脾方法的选择(附46例报告). 中国综合临床 2005; 21: 254-256
- 8 孙保国, 陈泽雄, 张诗军, 项婷, 陈肖霖, 罗纯. 有机阴离子转运肽oatp4a1与脾主运化本质的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3154-3158
- 9 Szendrői T, Hajdu Z, Mikó I, Bagyó J, Bokk A, Barnák G, Furka I. Autologous spleen transplantation. *Oro Hetil* 1993; 134: 125-128
- 10 张裕华, 杨良, 谢辉, 谢烽, 刘水根, 陶秀平. 选择性保脾治疗脾外伤的体会肝胆外科杂志 2012; 20: 120-122
- 11 姜洪池, 乔海泉, 夏穗生. 我国脾脏外科五十年进展. 中华外科杂志 1999; 37: 587-588
- 12 姜洪池, 乔海泉, 孙备. 脾保留性手术在临床中的应用. 中国实用外科杂志 2000; 20: 724-726
- 13 邓忠南, 叶开华, 蒙勤, 利仕文. 外伤性脾破裂行保脾手术治疗的临床分析. 中国医药指南 2011; 20: 273-274
- 14 李晓春, 赵国, 宋家琨, 兰孟东, 夏成青. 大鼠肝表面移植脾片细胞免疫学研究. 肝胆胰外科杂志 2001; 13: 29-39
- 15 夏穗生, 刘和欣, 高炎明. 带血管自体半脾移植2例报告. 中华医学杂志 1985; 65: 764
- 16 王昆华, 陈孝平, 廖吉勋, 李达科. 外伤性脾破裂保脾治疗的临床研究. 肝胆外科杂志 1998; 5: 104-105
- 17 吴阶平, 裘法祖, 黄家驷. 外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1026-1027
- 18 陆民浩, 杨培民, 茅安伟. 外伤性脾破裂非手术治疗的体会. 腹部外科杂志 2009; 22: 295-296

编辑 田滢 电编 闫晋利

生物蛋白胶栓塞治疗门脉高压性上消化道出血30例

原强, 白旭明, 程龙, 顾星石, 靳勇

原强, 白旭明, 程龙, 顾星石, 靳勇, 苏州大学附属第二医院介入科 江苏省苏州市 215000

原强, 在读研究生, 主要从事消化系统出血性疾病及恶性肿瘤的介入治疗。

作者贡献分布: 此课题由靳勇设计; 研究过程主要由靳勇、原强、白旭明、程龙及顾星石完成; 数据分析及论文写作由靳勇与原强完成。

通讯作者: 靳勇, 副教授, 副主任医师, 215004, 江苏省苏州市金阊区三香路1055号, 苏州大学附属第二医院介入科。

jyct@163.com

电话: 0512-67784229

收稿日期: 2012-09-08 修回日期: 2012-11-07

接受日期: 2012-11-23 在线出版日期: 2012-12-08

Efficacy of fibrin glue in percutaneous transhepatic obliteration for the management of upper gastrointestinal bleeding in patients with portal hypertension

Qiang Yuan, Xu-Ming Bai, Long Cheng, Xing-Shi Gu, Yong Jin

Qiang Yuan, Xu-Ming Bai, Long Cheng, Xing-Shi Gu, Yong Jin, Department of Interventional Radiology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Jin Yong, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Interventional Radiology, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. jyct@163.com
Received: 2012-09-08 Revised: 2012-11-07
Accepted: 2012-11-23 Published online: 2012-12-08

Abstract

AIM: To evaluate the feasibility and clinical value of fibrin glue in percutaneous transhepatic obliteration (PTO) for acute variceal bleeding in patients with cirrhosis.

METHODS: Thirty cirrhotic patients with acute variceal bleeding underwent fluoroscopy-guided PTO. Esophageal and/or gastric varices were embolized with fibrin glue and stainless steel coils. The rate of emergency hemostasis and postoperative cumulative non-bleeding rate in patients treated with PTO were compared with those in patients undergoing esophageal varices ligation (EVL).

RESULTS: PTO therapy was technically successful in 96.6% (28/29) of patients. Cavernous transformation of the portal vein was revealed by portography in one case, and it was difficult to enter the vessel responsible for varices. No obvious varices could be seen by portography in another patient. In the EVL group, the emergency hemostasis rate was 93.3% (28/30). During a follow-up period of 12-50 mo, rebleeding was observed in 10 patients in the PTO group and 17 patients in the EVL group. The 6- and 12-mo cumulative non-bleeding rates for the PTO group and the EVL group were 89.3% vs 80% and 85.7% vs 56.7%, respectively. The postoperative cumulative non-bleeding rate for the PTO group was significantly higher than that for the EVL group ($\chi^2 = 5.314, P < 0.05$).

CONCLUSION: The use of fibrin glue in percutaneous transhepatic variceal obliteration is a safe, minimally invasive and effective treatment for upper gastrointestinal bleeding and may be the first choice in patients with acute variceal hemorrhage.

Key Words: Cirrhosis; Portal hypertension; Bleeding; Esophageal and gastric varices; Fibrin glue

Q Yuan, Bai XM, Cheng L, Gu XS, Jin Y. Efficacy of fibrin glue in percutaneous transhepatic obliteration for the management of upper gastrointestinal bleeding in patients with portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(34): 3397-3402

摘要

目的: 评价生物蛋白胶在经皮经肝食管胃底曲张静脉栓塞术治疗胃底食管静脉曲张破裂出血中的可行性和临床价值。

方法: 60例肝硬化、食管静脉曲张破裂出血的患者, 分为经皮经肝胃底曲张静脉栓塞组(percutaneous transhepatic obliteration, PTO)30例和食管曲张静脉套扎组(esophageal varices ligation, EVL)30例, PTO组是在X线透视下经皮经肝穿刺进入上消化道出血责任血管, 用弹簧钢圈和生物蛋白胶栓塞曲张的食管和胃底静脉, 比较两组治疗方法的急诊止血率和术后

■背景资料

食管胃底静脉曲张破裂出血是肝硬化最严重的并发症之一, 死亡率较高。行外科手术风险大且病死率较高, 尤其对于急诊出血患者, 临床应用常常受到很大限制, 食管曲张静脉套扎术和胃底曲张静脉栓塞术(PTO)均因其微创、止血率高而应用于急诊止血治疗, 对比两者在急诊止血方面的疗效, 探索急诊治疗胃底曲张静脉曲张破裂出血更好的方法有重要的临床意义。

■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

■研究前沿

既往PTO术中应用无水乙醇、5%鱼肝油酸钠等为主要栓塞材料,并发症较多,术后静脉曲张复发率很高。随着新的栓塞材料的出现,以生物蛋白胶作为栓塞剂操作简单、使用安全、栓塞效果好,无明显术中术后的不良反应的发生,有效地解决了这一问题。

累计无出血率。

结果: PTO组中28例门脉穿刺及曲张静脉栓塞手术均获成功,1例造影示为门静脉海绵样变,进入责任血管困难,无法进行栓塞治疗,1例行门静脉造影未见明显胃底静脉曲张,栓塞成功率为96.6%(28/29),其余病例术后48 h止血率达100%。EVL组急诊止血率为93.3%(28/30)。在12-50 mo随访期内的患者中,PTO组再出血10例,EVL组再出血17例,PTO组和EVL组的6 mo累计无出血率分别为89.3% vs 80%,1年累计无出血率为85.7% vs 56.7%,PTO组术后累计无出血率明显高于EVL组($\chi^2 = 5.314$, $P < 0.05$)。

结论: 经皮经肝食管胃底静脉曲张中应用生物蛋白胶治疗上消化道出血安全有效,创伤小、止血效果肯定,在急诊止血方面更具优势,值得推广应用。

关键词: 肝硬化; 门脉高压; 出血; 食管胃底静脉曲张, 生物蛋白胶

原强, 白旭明, 程龙, 顾星石, 靳勇. 生物蛋白胶栓塞治疗门脉高压性上消化道出血30例. 世界华人消化杂志 2012; 20(34): 3397-3402

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3397.asp>

0 引言

食管胃底静脉曲张出血是消化内科的常见急症,来势凶猛,初次出血死亡率高达48%-62%,生存患者中2年内再发生出血的危险性高达60%-70%,经皮经肝食管胃底静脉曲张栓塞术(percutaneous transhepatic variceal obliteration, PTO)由于其止血效果肯定、简便、价廉,已在介入治疗门脉高压所致消化道出血中广泛应用^[1]。食管静脉曲张套扎(esophageal varices ligation, EVL)由于具有创伤小、适应证宽及可以反复多次进行操作等优点,也受到越来越多的临床应用。本研究收集了2007-03/2011-06因肝硬化致食管胃底静脉曲张破裂出血入院治疗的患者资料,分为PTO组和EVL组,进行回顾性的对照研究,重点比较两组术后的急诊止血率和术后累计无出血率,探索急诊治疗胃底静脉曲张破裂出血的方法。

1 材料和方法

1.1 材料 回顾分析了2007-03/2011-06因不同原因肝硬化失代偿合并食管胃底静脉曲张破裂出血急诊入院的60例患者资料。患者入院时黑

表 1 两组患者的临床特点 ($n = 30$)

项目	栓塞组	套扎组
男/女	22/8	26/4
平均年龄(岁)	62 ± 8	59 ± 9
平均出血次数	1-4	1-5
肝功能Child-pugh分级		
A	1	2
B	17	20
C	12	8

便约200-300 g,呕血200-1 000 mL不等,经药物治疗仍不能控制出血者行EVL,内镜治疗困难又无法耐受外科手术或拒绝手术者行PTO手术治疗,两组情况见表1,两组间相关参数的比较未发现明显差异。PTO手术所需器械:穿刺用美国COOK公司生产的专用PTCD穿刺套装(型号为NPAS-100-RH-NT,包括1个4F的穿刺鞘管,1个21G穿刺针和1根0.018in的超硬导丝)、纤毛弹簧圈;日本Terumo公司生产的普通超滑导丝(GA35153M)、全程超滑单弯导管(ZV9410GM)、猪尾导管(4SP0061M);法国加柏公司生产超液化碘油及广州倍绣生物制药有限公司生产的生物蛋白胶。另美国强生公司生产的4F Cobra导管, Terumo公司生产的同轴显微导管(Progreat)备用。套扎所用仪器为FujinonEG-450HR电子内镜和Cook 6环套扎器。

1.2 方法

1.2.1 术前准备: 所有患者术前均完善生化及凝血指标等检查,CT或MRI了解门静脉系统情况及穿刺道上有无占位性病变等,术前胃镜或CT检查,确诊食管胃底静脉曲张伴出血(图1),急症患者,在病情允许情况下,积极支持治疗,尽可能完善各项检查。

1.2.2 治疗方法: PTO操作过程: 患者仰卧位,取右腋中线第7-9肋间为进针点,局部消毒,用2%利多卡因5 mL做局部浸润麻醉,21G穿刺针在X线透视下向肝门方向穿刺,然后边退针边打造影剂,进入门静脉分支后将0.018in金属导丝经21G套管针送达门静脉主干,沿导丝进入鞘后造影明确位于门静脉后,经鞘进入4F超滑导管选择进入脾静脉和/或肠系膜上静脉造影,观察门静脉形态,走行及侧支循环情况,观察胃冠状静脉、胃短静脉、胃后静脉有无异常增粗,及食管、胃底静脉曲张有无静脉曲张、曲张程度、及各分支血管内血流方向等情况。然后根据造影的结果,根据需要选择不同形态的导管,并予导

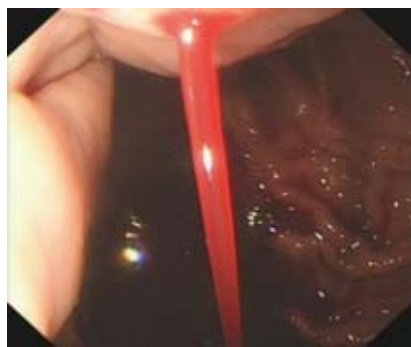


图1 胃镜可见曲张静脉破裂出血。

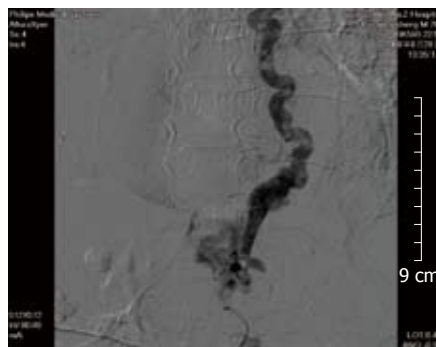


图2 术中造影显示食管胃底曲张静脉。

丝配合选择到食管胃底静脉曲张的责任血管进行栓塞(图2, 3)。注意根据造影时的血流速度、曲张静脉的粗细配制不同浓度的生物蛋白胶, 为了X线下显影, 胶内加入少量超液化碘油, 常规比例为主体胶: 副胶: 碘油 = 1:1:1, 由远到近逐支栓塞各曲张静脉之后再造影, 观察血管闭塞或血流减少情况, 直到血管闭塞, 然后在曲张静脉近端放置纤毛钢圈, 以加固栓塞, 再将导管插至脾静脉近端造影了解有无其他重新开放的侧枝血管, 如有则继续分次栓塞其他可能存在的责任血管, 对于小的责任血管, 只注入生物蛋白胶即可, 对于大的责任血管, 则要用蛋白胶结合钢圈栓塞, 结束退管时也用生物蛋白胶封闭肝内门静脉穿刺道, 以防术后腹腔内出血。EVL操作过程: 套扎前先行内镜检查, 然后拔镜装上套扎器, 再次入镜自食管齿状线上35-40 cm开始套扎, 每根曲张静脉的相邻套扎点距离约2-3 cm, 呈螺旋式套扎, 直至所有曲张静脉套扎后未见活动性出血为止。两组治疗结束后均回病房继续予降门压、抑酸、止血、扩容及保护肝功能等内科治疗, 出血量大的患者, 可适当输血。

统计学处理 统计学分析采用SPSS17.0分析软件, 术后累计无出血率用Kaplan-Meier法做统计描述, X轴为术后首次出血时间, Y轴为累计无出血率, 两组间率的比较用 χ^2 检验, 均值比较用t检验。

2 结果

2.1 临床疗效 PTO组中2例未成功栓塞, 其中1例进入门静脉造影未见明显曲张静脉, 另1例术中造影确诊为门静脉海绵样变, 无法进入门静脉主干, 放弃栓塞。栓塞手术成功率为96.6%(28/29), 栓塞后病例术后48 h均无再出血, 急诊止血成功率100%; EVL组术后48 h内有2例仍有出血, 行外科手术, 急诊止血成功率为

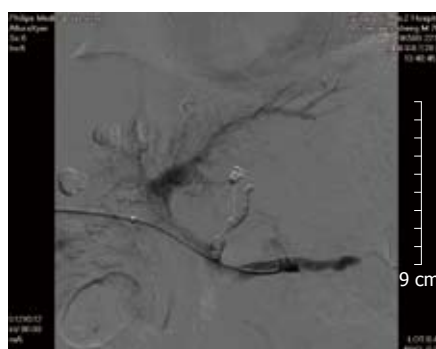


图3 生物蛋白胶栓塞后造影。

93.3%(28/30)。58例接受12-50 mo随访的患者中, PTO组术后累计无出血率明显高于EVL组($\chi^2 = 5.314, P < 0.05$, 表2, 图4)

2.2 并发症 PTO术后所有患者均未出现腹腔内出血、胆汁性腹膜炎、肺栓塞等文献报道的并发症, 栓塞后9例患者均有不同程度低热、腹痛; 出现腹水3例, 其中2例伴腹水感染, 均经积极治疗后痊愈。EVL术后7例出现轻度腹痛伴低热, 4例出现门脉高压性胃病, 5例出现溃疡。两组术后并发症差异无显著性。

3 讨论

门静脉高压食管胃底静脉曲张破裂出血是临床上难治性疾病之一, 对他的治疗与预防包括药物治疗、内镜治疗、气囊填塞、外科治疗和介入治疗。经内镜硬化和套扎治疗虽然推荐作为首选治疗方法^[2], 但因其难以充分闭塞所有的曲张静脉, 尤其对于胃底静脉及食管周围黏膜下的侧枝循环疗效不佳, 术后再出血率仍不令人满意。而对于外科治疗方面, 传统有2种基本手术类型: (1)门脉系统分流减压术; (2)非分流性或断流术, 到底哪一种手术止血及预防出血效果更好? 长期以来如下观点被普遍认可: (1)手术治疗的主要目的是防治胃食管静脉曲张出血; (2)

■ 相关报道

以生物蛋白胶作为食管胃底静脉曲张栓塞术的栓塞材料的文献报道很少, 有应用于静脉曲张硬化治疗的报道, 安全性及止血率均较高, 此外有报道使用NCBA、TH胶作为栓塞材料, 并联合部分脾动脉栓塞术治疗门脉高压性出血, 术后再出血率降低。

■创新盘点

本文通过回顾性对照研究发现PTO在急诊治疗门脉高压性出血方面更具优势,尤其是对于Child C级肝硬化急性消化道出血的患者及尚不具备外科断流术、内镜下治疗困难及TIPS技术条件的医院,PTO无疑是一种值得推广应用的治疗方法。生物蛋白胶在PTO栓塞中作用直接、栓塞彻底、疗效稳定、可控性好、安全无毒,是一种值得推广的血管内栓塞材料。

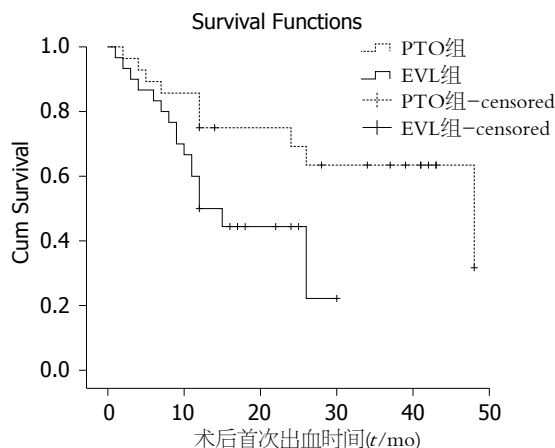


图4 PTO与EVL PTO组术后累计无出血率曲线图。PTO:胃底曲张静脉栓塞术; EVL:食管曲张静脉套扎。

表2 病例随访结果

随访时间(mo)	分组	再出血例数(n)	累计无出血率(%)
6	PTO组	3	89.3
	EVL组	6	80
12	PTO组	4	85.7
	EVL组	13	56.7

PTO: 胃底曲张静脉栓塞术; EVL: 食管曲张静脉套扎。

理想的术式选择应保持足够的门静脉血流量和门静脉对肝脏的血流灌注; (3)手术损伤小, 又能有效防治出血; (4)这些手术不改善肝脏本身病变, 而要求有足够的肝功能储备。综合以上观点, 长期的临床实践工作中, 断流术已成为急诊手术术式的首选术式^[3], 但是由于门脉高压出血的患者行外科手术风险大且病死率较高, 尤其对于急诊出血患者, 临床应用常常受到很大限制。介入治疗由于其微创且止血率高, 尤其急诊止血方面更具优势而被更广泛的应用, 包括经颈静脉肝内门静脉分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)、球囊阻塞的逆行胃底静脉曲张、PTO、部分脾动脉栓塞术(partial splenic embolization, PSE)等, 其中TIPS手术后肝性脑病发生率高, 分流道易发生再狭窄或堵塞, 特别是昂贵的费用并未带来满意的长期疗效, 不易广泛开展^[4-6]。在目前外科断流手术仍然作为一种主要术式的情况下, 对于门静脉高压症患者介入性断流是一种可供选择的较好的治疗措施。

PTO是由Landerquist在1974年首先应用于临床, 在以后的临床研究证明此方法在控制急性出血、降低病死率等方面有显著疗效, 近期

止血效果肯定、费用较低。此介入术式吸收外科断流术的理论, 通过同时阻断门奇静脉间的反常血流, 达到止血的目的, 优点是即时止血率高, 手术操作简单, 术后能保持门静脉向肝性血流, 肝功能维持好, 肝性脑病发生率低。而对于EVL, 也有报道指出EVL后食管静脉曲张复发出出现早, 复发率高^[7], 我们这组患者套扎后1年内再出血率为43.3%, 与其相似。主要原因可能是: (1)由于胃底曲张静脉较粗大, 套扎难以将曲张静脉完全套入皮圈中; (2)应用EVL治疗时由于只能结扎黏膜及黏膜下层的曲张静脉而留有深层静脉及交通静脉。因此, 静脉曲张复发率高, 且在紧急止血治疗方面因内镜安装了皮圈结扎器后视野较小, 寻找合适结扎处较为困难, 因此杨云生等^[8]也曾不主张套扎作为胃底静脉曲张破裂出血的止血方法。而更多的文献倾向于联合套扎和硬化治疗, 因其较单纯套扎根除率更高, 治疗次数明显减少^[9]。同比之下胃冠状静脉栓塞术则同时阻塞了食管下段及贲门周围所有血管, 包括高位食管支, 使术后再出血的发生率大大减低, 具有更广的适应证, 尤其在急诊手术时, 对部分不能耐受外科手术的肝功能Child-C级患者也能适用, 本组患者中肝功能Child-C级患者选择PTO治疗的也更多(PTO:EVL=12:8)。

既往PTO手术以无水乙醇、明胶海绵、高渗糖或鱼肝油酸钠为主要栓塞材料, 曲张静脉的血供只是暂时阻断, 虽然急诊止血效果确切, 但术后复发出血率高, 预防再出血效果不佳^[10]。我们选用生物蛋白胶栓塞曲张静脉, 取得了不错的临床效果, 生物蛋白胶即猪源纤维蛋白黏合剂, 经导管注射的流动性良好, 注入后沿胃冠状静脉食管支和胃支向远端流动, 最终充填于食管下端、贲门和胃底的曲张静脉丛内。对于存有反常血流的胃短及胃后静脉宜同时行蛋白胶栓塞, 以达到完全断流的目的, 使曲张静脉的来源血管被彻底、永久性栓塞, 阻断了曲张静脉的再发根源。此生物蛋白胶由主体胶和催化剂组成, 纤维蛋白原和凝血酶为主要活性成分, 进入血管中后快速凝固, 形成稳定的纤维蛋白多聚体, 与组织永远镶嵌在一起, 达到永久栓塞管腔之目的, 且使用时可根据靶血管的粗细和流速配制不同浓度的生物蛋白胶, 保证了曲张静脉丛和责任血管的完全栓塞。我们在工作中采用生物蛋白胶与少量超液体碘油混合, 其X线显影性良好, 栓塞全过程均在X线透视下完成, 保证了栓塞治疗的安全性和可控性。此生物蛋白

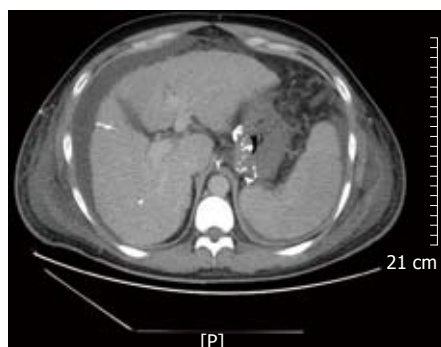


图5 术后1 mo CT复查结果. 食管胃底曲张静脉丛消失, 生物蛋白胶分布如初, 未出现移位。

胶的另一特性是不粘连导管和显微导管, 可反复多次多支插入不同曲张静脉的远端实现栓塞治疗和栓塞后的造影确认, 明确曲张静脉来源血管的全程及其胃底和贲门的交通支被彻底、永久性灌注栓塞, 从而达到最大限度的预防血管再通和交通支的再形成。与其他类似治疗方法相比此蛋白胶具有作用直接、栓塞彻底、疗效稳定、可控性好、安全无毒的特性, 另外此胶用于食管胃底曲张静脉硬化治疗也取得较好的疗效^[11]。

本组临床观察结果显示: 经皮经肝食管胃底静脉曲张应用生物蛋白胶近期止血效果肯定, 术后累计无出血率明显优于食管套扎。但1年内再出血率仍有14.3%, 术后再出血的原因大致有: (1)断流术区域发生新的侧枝循环, 静脉曲张复发再出血; (2)其他病变出血: (1)门静脉高压性胃病出血; (2)胃、十二指肠溃疡出血(包括肝源性溃疡); (3)应激性溃疡出血; (4)异位曲张静脉出血等。术后再出血中, 最常见的是曲张静脉的再次破裂, 原因系栓塞曲张静脉后, 门静脉向肝血流增多, 继而门脉压力升高, 门脉高压没有解除, 仍然会有新的曲张静脉复发^[12], 我科治疗的患者中, 1例患者术后间断出现鼻出血及黑便、便血, 行胃镜复查未见明显出血曲张静脉, 肠镜检查可见痔疮明显红肿, 后我们考虑因术后门静脉压力明显增高, 腹壁静脉、痔静脉丛等侧支循环压力升高, 可引发痔静脉丛破裂出血, 此患者经积极治疗后出血停止, 术后1 mo复查CT示曲张静脉较前明显好转, 且生物蛋白胶未出现移位(图5)。因此, 对于术后再次出现黑便、便血等患者, 除考虑曲张静脉再次破裂出血外, 仍需注意与其他原因鉴别, 重点是纤维内镜检查曲张静脉的情况, 内镜复查还能明确是否合并有胃溃疡、门静脉高压性胃病等其他出血原因。门

静脉高压性胃黏膜病变出血较常见于断流术后患者^[13], 胃壁血液回流阻力增加, 胃壁内动、静脉短路大量开放, 造成胃黏膜缺血、缺氧, 微循环血流减少及胃黏膜屏障受损, 导致门静脉高压性胃病的发生和加重, 出血一般较曲张静脉出血量少、较缓, 术后联合应用心得安通过降低门压力可减少门脉高压性胃病和食管、胃底曲张静脉的发生^[14]。

我们失败的2例患者中, 1例是由于门静脉海绵样变性, 未能进入门静脉主干, 这一例给我们的经验教训是一定要做好术前影像学的准备, 通过B超或CT检查解门静脉的畅通情况, 对于肝前型及部分肝后型的门静脉高压患者不能行此类手术, 如门静脉海绵样变性、门静脉癌栓完全闭塞等。另外, 肝脏严重萎缩、大量腹水以及穿刺路径上有占位性病变的患者也是相对禁忌证。另1例患者虽经胃镜检查可见胃底血管成团, 但门静脉造影未见明显曲张血管, 随即行胃左动脉及脾动脉造影可见曲张血管显影, 考虑动静脉畸形, 患者急诊行近端胃大部切除术, 术后标本检查提示: (次胃)血管畸形, (恒径)破裂出血, 黏膜下层见扩张畸形血管, 术后患者虽出血停止但因出现严重肺部感染而死亡。对于上消化道出血的患者, 不应忽视其他病因, 胃恒径动脉综合症系一种先天性血管畸形, 破裂后大多数出血量大, 病情凶险, 由于对本病缺乏认识, 误诊为门脉高压引起的食管胃底静脉曲张破裂出血, 应引以为戒。

栓塞术的最严重的并发症在于异位“栓塞”非责任血管, 尤其是门静脉主干, 手术时应注意所配备的栓塞用生物蛋白胶的浓度, 术中连续透视密切注意所注射蛋白胶的流速及是否出现返流, 一旦栓塞完全出现返流立即停止注射避免出现非责任血管的栓塞。总之, 规范、细致的操作是减少合并症的最好方法。此外, 假如患者门静脉高压征象明显, 可配合部分性脾栓塞术, 可取得止血和降低门静脉压力的双重疗效^[15,16]; 再出血时有条件也可选择TIPS治疗^[17]。我们两例患者PTO术后行部分脾动脉栓塞术, 术后脾功能亢进得到明显缓解, 血细胞减少尤其是血小板减少得以改善, 使患者的出血倾向得到恢复, 对患者的免疫力也起到一定的保护。有1例因PTO术后多次出血行了TIPS手术, 术后随访期内仍未再出血。据魏波等^[18]有关文献报道, TIPS联合胃冠状静脉栓塞术较单纯TIPS可降低术后1年内的再出血率。再出血可导致肝功

■名词解释

经颈静脉肝内门静脉分流术(TIPS): 是采用介入放射方法, 经颈静脉途径在肝内肝静脉和门静脉主要分支间建立通道, 置入支架以实现门体分流。

■同行评价

经皮经肝食管胃底静脉曲张栓塞术治疗胃底食管静脉曲张破裂出血是目前临床常用的一种治疗方法,以生物蛋白胶作为栓塞剂操作简单、使用安全、栓塞效果好,在急诊止血方面与食管套扎相比,是该文章的一个特点。

进一步能恶化,而肝功能的进一步恶化使患者预后更加不良。因此,对于最初控制出血失败或早期复发出血的患者,接受补救性TIPS治疗仍可作为控制出血的有效措施。

总之,经皮经肝食管胃底静脉曲张栓塞术简便易行,技术成功率接近100%,与食管静脉曲张套扎相比近期止血效果较好,尤其是对于Child C级肝硬化急性消化道出血的患者,PTO无疑是一种值得推广应用的治疗方法。以生物蛋白胶作为栓塞剂操作简单、使用安全、栓塞效果好,无明显术中术后的不良反应的发生,是栓塞胃静脉曲张、控制消化道大出血安全、实用的治疗方法,扩大了介入治疗的适应证及生物蛋白胶的使用范围。随着介入技术的发展,联合各种断流术、分流技术及栓塞材料,PTO会越来越多地应用在食道胃底静脉曲张的治疗上。

4 参考文献

- Lunderquist A, Vang J. Transhepatic catheterization and obliteration of the coronary vein in patients with portal hypertension and esophageal varices. *N Engl J Med* 1974; 291: 646-649
- 刘诗, 许军英, 侯晓华. 内镜结扎治疗食管静脉曲张破裂出血的长期疗效观察. *中华消化内镜杂志* 2000; 17: 205-207
- 金洪永, 姜洪伟, 姜天明, 赵德新, 于磊, 齐德祥. 脾切除联合贲门围血管离断术与分流术治疗门脉高压症的疗效分析. *中国老年学杂志* 2008; 28: 1402-1403
- Somberg KA. TIPS: safe, effective, better? *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1412-1416
- Yoon CJ, Chung JW, Park JH. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for acute variceal bleeding in patients with viral liver cirrhosis: predictors of early mortality. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185: 885-889
- van Buuren HR, ter Borg PC. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS): indications and long-term patency. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2003; (239): 100-104
- Masumoto H, Toyonaga A, Oho K, Iwao T, Tanikawa K. Ligation plus low-volume sclerotherapy for high-risk esophageal varices: comparisons with ligation therapy or sclerotherapy alone. *J Gastroenterol* 1998; 33: 1-5
- 杨云生, 令狐恩强. 食管胃静脉曲张破裂出血的内镜治疗. *中华消化内镜杂志* 2004; 2: 152-153
- 程留芳, 令狐恩强, 王志强, 黄启阳, 毛永平. 食管静脉曲张硬化与结扎加硬化治疗食管静脉曲张的对照研究. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 213-215
- 钱林学, 王宝恩. 联合导向下经皮经肝胃冠状静脉栓塞治疗食管胃底静脉曲张出血. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 667-668
- 李坪, 成军, 毛羽, 胡居龙, 蒋煜. 急诊内镜治疗食管贲门胃底静脉曲张活动出血200例. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 90-93
- Yamagami T, Kato T, Iida S, Tanaka O, Nishimura T. Change in the hemodynamics of the portal venous system after retrograde transvenous balloon occlusion of a gastroduodenal shunt. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 1011-1015
- Baik GH, Kim DJ, Lee HG, Min SK, Kong SJ, Kim JB, Lee JY, Hahn TH, Baek IH, Kim JH, Kim BS, Hwang WC. [Therapeutic efficacy of balloon-occluded retrograde transvenous obliteration in the treatment of gastric varices in cirrhotic patients with gastroduodenal shunt]. *Korean J Gastroenterol* 2004; 43: 196-203
- 程文芳, 施瑞华, 陈晓星, 丁静. 心得安对食管静脉曲张套扎后再出血的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 83-85
- 申麒, 蒋忠仆, 任丽军. 门静脉高压症介入治疗术式的临床选择. *中华放射学杂志* 2004; 38: 1019-1024
- 宫卫东, 薛克, 褚延魁, 王青, 阳威, 权辉, 杨鹏, 王执民, 吴智群. 胃冠状静脉栓塞联合部分脾栓塞治疗食管静脉曲张出血和脾功能亢进症: 与外科手术比较. *介入放射学杂志* 2010; 19: 105-109
- 崔进国, 梁志会, 周桂芬, 潘新元, 田惠琴. 经颈静脉肝内门-体静脉分流术同时行胃冠状静脉及胃短静脉栓塞术治疗肝硬化门脉高压并消化道出血. *临床放射学杂志* 2003; 22: 501-503
- 魏波, 陈爽, 李肖, 唐承薇. 经颈静脉肝内门体分流术联合胃冠状静脉栓塞术降低曲张静脉再出血率的研究. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 494-497

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

多发性早期胃癌诊断1例

王峰, 汪灏, 王萌, 时林森, 管文贤

王峰, 时林森, 南京医科大学鼓楼临床医学院普通外科 江苏省南京市 210008

汪灏, 王萌, 管文贤, 南京市鼓楼医院普通外科 江苏省南京市 210008

王峰, 硕士, 主要从事胃肠道肿瘤方向的研究。

作者贡献分布: 本文涉及的病例手术由管文贤主刀, 汪灏、王萌、王峰及时林森协助手术; 王峰负责收集和整理资料、查阅文献及文章撰写; 管文贤、汪灏、王萌及时林森负责对文章的后期指导和修改。

通讯作者: 管文贤, 主任医师, 210008, 江苏省南京市中山路321号, 南京鼓楼医院普通外科. guan-wx@163.com

电话: 0258-3105114

收稿日期: 2012-07-14 修回日期: 2012-09-06

接受日期: 2012-10-16 在线出版日期: 2012-12-08

Multiple early gastric carcinoma: Report of one case

Feng Wang, Hao Wang, Meng Wang, Lin-Sen Shi, Wen-Xian Guan

Feng Wang, Lin-Sen Shi, Department of General Surgery, Drum Tower Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Hao Wang, Meng Wang, Wen-Xian Guan, Department of General Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wen-Xian Guan, Chief Physician, Department of General Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital, 321 Zhongshan Road, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. guan-wx@163.com

Received: 2012-07-14 Revised: 2012-09-06

Accepted: 2012-10-16 Published online: 2012-12-08

Abstract

Multiple early gastric carcinoma is a relatively rare clinical entity and is easy to be misdiagnosed for missing tumor lesions. Here we report such a case in a patient who was diagnosed with this rare disease by postoperative pathology after two surgeries. Major causes of misdiagnosis of this disease include the lack of experience with multiple early gastric carcinoma, limitations of medical examinations, and poor patient compliance. To increase the detection rate of multiple early gastric carcinoma, clinicians should increase knowledge about this disease to raise awareness. Chromoendoscopy and magnifying endoscopy should be used when conventional endoscopy is not enough to help establish a diagnosis. Careful intraoperative examination should also be guaranteed. Moreover,

pathological examination of continuous sections of surgical specimens is necessary for a definite diagnosis.

Key Words: Multiple; Gastric carcinoma; Early; Diagnosis

Wang F, Wang H, Wang M, Shi LS, Guan WX. Multiple early gastric carcinoma: Report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(30): 3403-3405

摘要

多发性早期胃癌在临床上比较少见, 胃镜检查及诊断上容易遗漏病灶而误诊。本病例患者行两次外科手术, 术后病理均证实为多发性早期胃癌。分析误诊原因为临床医师对该病认识不足, 很多检查措施存在自身局限性, 患者不配合医师检查。临床医生应拓宽思路, 完善疾病知识, 主观上重视疾病, 术前必要时行染色内镜或放大内镜检查, 术中探查全面仔细, 术后病理行连续切片, 提高多发性早期胃癌的检出率。

关键词: 多发性; 胃癌; 早期; 诊断

王峰, 汪灏, 王萌, 时林森, 管文贤. 多发性早期胃癌诊断1例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(30): 3403-3405

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/3403.asp>

0 引言

胃癌是常见的消化道肿瘤, 而亚洲又是其高发地区, 胃癌患者5年生存率也比较低^[1]。胃癌常见的大多以单发形式出现, 部分可以多中心形式发生。胃内同时存在2个或2个以上独立的癌灶者为多发性胃癌又称多原发胃癌(multiple primary gastric carcinomas, MPGC)^[2]。MPGC多见于早期胃癌, 约占全部胃癌患者的9.0%^[3]。多发性早期胃癌的发病率近年来有逐步增高的趋势, MPGC在可切除胃癌中的比例为0.8%-10.7%, 各学者报道的结果也不一致, 并且MPGC在早期胃癌中的发生率较其在进展期胃癌中的发生率高^[4]。目前比较公认的多发性早期胃癌的诊断标准^[5]:

■背景资料

胃癌常见的大多以单发形式出现, 部分可以多中心形式发生。胃内同时存在2个或2个以上独立的癌灶者为多发性胃癌又称多原发胃癌(MPGC)。公认的多发性早期胃癌的诊断标准: 各病灶在病理组织学上有恶性表现; 从组织学角度上各病灶之间存在正常的胃黏膜而彼此隔离; 1个病灶并不是从其他病灶的局部进展或转移而来的。

■同行评议者

傅春彬, 主任医师, 吉化集团公司总医院一院消化内科

■研究前沿

该病例发病率虽逐年上升,但总体发病率还是较低,还需要内镜医师、外科、手术医师、病理医师三方合作,增加对疾病的重视程度,从而减少误诊,真正使患者受益。

■相关报道

研究认为,胃癌属于多中心起源即在早期阶段,肿瘤呈多中心发生,且大多数癌灶间距离较近;随着肿瘤不断生长,癌灶逐渐靠近并融合为单个较大癌灶。至肿瘤进展期时已难以分辨癌灶是单发还是多发融合。因此,MPGC在早期胃癌中的比例往往高于进展期胃癌。国内报道早期胃癌中MPGC占14%-30%,而进展期MPGC仅占2.29%。MPGC的预后与单发肿瘤没有显著差异。MPGC的复发率为18%,单发肿瘤为10%;MPGC的5年生存率为90%,单发肿瘤为94%。

各病灶在病理组织学上有恶性表现;从组织学角度上各病灶之间存在正常的胃黏膜而彼此隔离;1个病灶并不是从其他病灶的局部进展或转移而来的。本文就2011-11于我院术后诊断为多发性早期胃癌的1例病例作报道并阅读相关文献,分析总结多发性早期胃癌术前、术中与术后临床诊断的注意事项。

1 病例报告

患者,女,55岁,因“进食哽噎感半年”入院。入院查体腹部无阳性体征,门诊胃镜:浅表性胃炎,贲门炎;病理:(贲门)黏膜固有层见小凹上皮生长紊乱,上皮具有轻度异型性,倾向为黏膜内癌;超声内镜:贲门黏膜异型增生。入院诊断:贲门黏膜异型增生。查肿瘤标志物均正常。完善术前诊断行内镜下黏膜剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD),术中胃镜所见:贲门下胃底可见大小约1 cm×2 cm增生黏膜,表面充血粗糙,形态不规则。术后病理(贲门大黏膜切除标本)示:腺癌,部分为印戒细胞癌,癌组织位于黏膜浅层固有层内。脉管内未见明确癌栓,切缘未见癌组织残留。免疫组织化学(2个蜡块):癌细胞表达CK(+),外科会诊后行“根治性近端胃大部切除术”,术中探查胃周未触及肿大淋巴结,术中标本胃黏膜未见明显病灶。术后病理示:胃多灶性低-中分化腺癌,部分为印戒细胞癌,癌组织局限于黏膜固有层内(黏膜内癌),小灶区食管黏膜固有层内见癌组织浸润,未见明确神经及脉管侵犯。病灶位于贲门前壁、胃体小弯及前后壁。标本上切缘及送检“吻合圈”2枚均未见癌组织残留,癌组织紧靠标本下切缘(约2 mm),胃周淋巴结未见癌组织转移。病理分期:ⅠA(T1, No, cMo)。临床结合病理,考虑癌灶为多发的,全院多科室(普外科、消化科、肿瘤科、病理科)会诊后,行“残胃切除术”,术中标本胃黏膜肉眼观未见明显异常,术中病理快速报:未见明显恶性;术后常规病理示(远端胃):胃浅表平坦型多灶性黏膜内癌(中低分化腺癌,部分为印戒细胞癌),脉管内未见明确癌栓,神经未见明确癌组织侵犯。标本上下切缘均未见癌组织浸润。胃周查见淋巴结1枚未见癌组织转移。癌周胃黏膜示轻度慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生。胃残端,食道切缘原吻合口,第6组淋巴结未见癌组织转移。食管空肠吻合圈未见明确癌组织浸润。患者术后半年随访未见肿瘤复发转移。

2 讨论

MPGC在临床上不多见,未引起临床医师的重视。随着现在早期胃癌诊断率的增加,MPGC亦逐渐增加。但其术前漏诊率较高(14.5%-61.4%)^[6]。多发性早期胃癌特点:癌组织浸润深度多在黏膜层,大小多数在0.5 cm左右,病变部位多数在胃体上部、幽门部及小弯处,与首先发现病灶的部位和病灶间的距离无关^[6]。本病例患者病灶累及贲门、胃体、胃窦多部位,癌组织局限于黏膜固有层内(黏膜内癌)。通过对本病例的分析及结合相关文献,我们发现MPGC尤其是早期胃癌的漏诊率高^[7],原因在于:(1)临床医师及辅助人员对病例的认识不足,警惕性不高,满足于单个病灶的发现、切除,主观认为已经确诊并医治,却忽略可能存在的其他多发癌灶,另外临床医生术前对患者的术前检查未做详细全面的分析,遗漏一些重要的影像学检查结果,导致术中、术后诊断与术前诊断不符,目前检查手段多样,但各有局限性,胃镜主要通过肉眼直接形态学观察诊断胃内腔黏膜病变、病变部位、形态及病变范围,并可行活组织检查明确病变性质。但普通胃镜对多发性早期胃癌,特别是微小胃癌极易漏诊,多为肿瘤直径较小、周围无黏膜皱襞集中的平坦型及凹陷型早期病灶。消化道钡餐检查虽可以对全胃作检查。但有时钡剂附着不良,尤其是早期胃癌,从而影响诊断结果;(2)患者对检查抱有抵触情绪,尤其是一些有创检查如胃镜活检等。内镜操作时患者配合差,临床医生不能顺利全面的观察胃壁黏膜的情况,也会对最后诊断的结果产生影响^[8,9]。

术前MPGC的明确诊断,对手术适应证判断、手术部位及手术方式的决定均有重要意义,使患者能够早期诊断,早期治疗,延长患者生存时间。通过对本病例的学习分析及结合相关文献,降低MPGC尤其是早期胃癌漏诊率,我们总结出一些经验:(1)我们临床医师首先要掌握MPGC的特点:MPGC大多数为早期胃癌,胃黏膜高度萎缩、广泛肠上皮化生、异形性增生的60岁以上的高龄男性为MPGC的高危人群^[10],对高危患者在诊断及检查过程中要充分意识到有MPGC的存在可能,不能满足于发现一处病灶而忽略对其他部位的详细检查,胃镜操作的技术亦与胃癌病灶检出率有密切的关系^[11],操作内镜医师如经验不足,操作困难,可及时请教上级医师协助,只有熟练的操作技术、轻柔的手法,才能有充足的时间细微观察,尽可能减少病灶的

遗漏; (2)从MPGC的诊断技术方面分析胃镜检查相比较X线而言有较高的确诊率, 有关文献报道多发性早期胃癌内镜检查诊断率为63.0%, X线造影检查诊断率为46.6%^[10]. 现在胃镜检查已普及, 胃镜检查时应以远镜大视野观察全貌与近镜逐步寻找相结合, 如近距离发现黏膜有色泽的改变、小颗粒隆起、粗糙、小糜烂、小凹陷、边缘不整齐的小溃疡等改变, 要及时钳取组织, 始终要考虑到有可能为多发性病变, 这样才能不至于漏掉每一个可疑之处. 对可疑早期胃癌用色素法和多点活检法联合检查, 这样能有效提高MPGC漏诊病灶的检出率. 内镜医师在内镜操作时对有怀疑的部位可以行染色内镜处理, 国外报道用刚果红-美蓝双色素胃镜检查对II型早期胃癌检出率达89%, 而一般胃镜仅28%; 对微小胃癌检出率达75%, 而一般胃镜仅25%. 国内早期胃癌的常规内镜检出率较低, 色素内镜下的检出率目前尚无大样本报道^[12]. 目前而言, 通过染色内镜可以增强内镜医生的诊断能力, 并且用于染色内镜的各种染料是安全便宜的, 能被传统内镜使用; 但是他们也受主观影响, 同时也没有统一的衡量标准, 其应用范围有待进一步发掘. 另外在医疗条件许可的医院可行放大内镜检查. Tajiri等^[13]通过对胃黏膜类型和毛细血管形态观察, 并与实体显微镜和组织病理学检查对照, 发现放大内镜对早期胃癌的诊断敏感性和特异性分别是96.0%和95.5%, 明显高于普通内镜; (3)术前检查除了胃镜和活检以外, 完善的影像学检查也能提高多发性早期胃癌的检出率. 如术前CT尤其是螺旋CT的检查, 不仅能发现胃周和远处淋巴结及脏器的转移, 同时能发现一些漏诊的病灶, 尤其是侵及肌层以上的病灶. 胃钡餐造影尤其是低张气钡双重造影检查, 不仅能全面连贯的观察整个胃壁的情况, 更能清楚地显示胃黏膜的细微结构, 对早期胃癌的诊断有独特的效果; (4)术中应仔细行全胃的探查, 不能满足于找到一个病灶, 术中应及时剖视标本, 如见胃黏膜病变范围广泛, 建议立即术中活检, 以免漏诊. 术中发现多发性病变, 涉及贲门和胃窦, 建议全胃切除; 如第1次术中未行活检, 术后病理提示MPGC, 建议行2次手

术行残胃切除; 如患者及家属拒绝手术则需定期胃镜检查残胃, 密切观察残胃黏膜的变化情况^[14]; (5)术中快速未见明确恶性, 术后标本需行连续病理切片检查以降低漏诊率. 不能满足于单做肉眼发现的病灶的病理切片. Kosaka等^[15]研究发现, 只对肉眼发现异常的病变进行病理切片检查, 发现多发癌的概率仅为5.9%, 而对全胃标本进行连续病理切片检查, 其发现多发癌的概率为13.2%.

通过本例病例及相关文献的学习, 希望能增加我们对MPGC尤其是早期胃癌的认识, 减少尤其是早期胃癌肉眼观未见异常的病例的误诊, 提高多发性早期胃癌的检出率, 为临床医生的诊断提供帮助.

3 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 叶振, 刘文天, 王邦茂, 吕宗舜, 张庆瑜, 姜葵, 杨玉龙. 国人多原发胃癌荟萃分析. *国际消化病杂志* 2009; 29: 216-219
- 3 单吉贤, 梁洪伟, 陈峻青, 吴焯秋, 晋庆波. 多发早期胃癌的临床特点. *中华外科杂志* 1999; 37: 378
- 4 陈吉彩, 施红旗. 16例多发性胃癌临床分析. *中华胃肠外科杂志* 2002; 5: 206
- 5 MOERTEL CG, BARGEN JA, SOULE EH. Multiple gastric cancers; review of the literature and study of 42 cases. *Gastroenterology* 1957; 32: 1095-1103
- 6 史向军, 汪昱. 多发性胃癌83例诊断分析. *山东医药* 2008; 48: 51-52
- 7 谭戈文, 王志刚. 多发性胃癌的诊治进展. *中国现代普通外科进展* 2010; 13: 228-230
- 8 凌伟, 卞育海, 陈治平. 多发胃癌的诊断和处理. *外科理论与实践* 2005; 10: 258-261
- 9 孙备, 许军, 周尊强, 刘昶, 姜洪池. 多发性胃癌合并胃结核一例. *中华胃肠外科杂志* 2003; 6: 313
- 10 赵明芳, 刘云鹏. 产甲胎蛋白老年晚期胃癌多学科综合处理. *中国实用内科杂志* 2012; 32: 182-184
- 11 莫红楠, 韩潇, 吴东, 朱峰. 腹痛呕吐腹腔积液. *中国实用内科杂志* 2012; 31: 644-645
- 12 孙文, 蔡洪培. 早期胃癌研究进展. *中华国际医学杂志* 2003; 3: 259-261
- 13 Tajiri H, Doi T, Endo H, Nishina T, Terao T, Hyodo I, Matsuda K, Yagi K. Routine endoscopy using a magnifying endoscope for gastric cancer diagnosis. *Endoscopy* 2002; 34: 772-777
- 14 左国文. 多发性胃癌5例报告. *广西医科大学学报* 1998; 15: 77
- 15 Kosaka T, Miwa K, Yonemura Y, Urade M, Ishida T, Takegawa S, Kamata T, Ooyama S, Maeda K, Sugiyama K. A clinicopathologic study on multiple gastric cancers with special reference to distal gastrectomy. *Cancer* 1990; 65: 2602-2605

■创新盘点

本文介绍的病例发病率低, 癌灶分布广泛, 散布在贲门、胃体、胃窦等各个部位, 病灶小, 癌组织局限于黏膜固有层内(黏膜内癌). 综合国内外文献, 阐述疾病特点, 并从内镜医师、外科手术医师、病理医师3个角度增加对疾病的认识程度, 提高疾病的检出率.

■同行评价

多发早期胃癌临床不常见, 通过本文描述, 对内镜医师今后工作有一定指导意义.

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利

《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价68.00元, 全年2448.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2011年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》

和中国知识资源总库收录。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学术名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或 $T_{1/2}^1$, Vmax不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{\max} , C_{\max} , Vd, $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$, WBC数用 $1 \times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2011年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如 $3614.5 \text{ g} \pm 420.8 \text{ g}$, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 $3.6 \text{ kg} \pm 0.4 \text{ kg}$, 过多的位数并无意义. 又如 $8.4 \text{ cm} \pm 0.27 \text{ cm}$, 其 $\text{SD}/3 = 0.09 \text{ cm}$, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿

号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾

病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

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/lcyj.asp>

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来

稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

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

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2012年国内国际会议预告

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-08-30/09-02

2012年中华医学会全国麻醉学术年会

会议地点: 重庆市

联系方式: csa2012@live.cn

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会

会议地点: 济南市

联系方式: doclf@163.com

2012-09-06/09

第七届中国肿瘤学术大会暨第十一届海峡两岸肿瘤学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: shengwangyan@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-20/23

2012中国消化病学大会

会议地点: 上海市

联系方式: abstract@ccdd2012.org

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛

会议地点: 长春市

联系方式: ting@dxyer.com

2012-09-28/10-02

第37届欧洲临床肿瘤学会年会(ESMO2012)

会议地点: 奥地利维也纳

lhgj_jihcc@163.com

2012-10-11/14

第三届国际肿瘤表观遗传学研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: epigeneticmeeting2012@gmail.com

2012-10-12/15

国腹腔镜技术新进展与改良后手术治疗2型糖尿病手术教学研讨会

会议地点: 齐齐哈尔市

联系方式: bjgzgt@163.com

2012-10-19/21

中欧胰腺外科专业新技术、新进展学术研讨会

会议地点: 长沙市

联系方式: yu198610@163.com

2012-10-19/21

2012年(第二届)中日国际消化疾病论坛暨挑战直肠癌-战略与艺术综合研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: cjds@htbr.cn

2012-10-19/21

中日友好医院国际肠胃外科高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: lckyhy@126.com

2012-10-19/21

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-10-21/11-10

第十四次全国中医肛肠学术交流大会

会议地点: 长沙市

联系方式: gcfh2012@163.com

2012-10-31/11-03

第十届中国介入放射学学术大会(2012CSIR)暨2012国际栓塞会议

会议地点: 南京市

联系方式: liufang@cyberzone.cn

2012-11-09/11

2012中国结直肠肛门外科学术会议暨中华医学会外科学分会结直肠肛门外科学组学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 15813300382

2012-11-16/18

2012中华消化病学年度讲坛

会议地点: 北京市

联系方式: cma_spa@163.com

2012-12-07/11

第12届全国消化道恶性病变介入诊疗研讨会暨2012内镜/介入/放射及肿瘤微创外科新技术国际论坛

会议地点: 昆明市

联系方式: 283409817@qq.com或7420hjh@sohu.com

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡开琳 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

倪才方 教授
苏州大学附属第一医院介入科

樊冬梅 副主任医师
广州中医药大学第一附属医院消化内科

孙星 副教授
上海交通大学附属第一人民医院普外科

樊红 教授
东南大学基础医学院遗传与发育生物学系

唐南洪 教授
福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

傅思源 副教授
东方肝胆外科医院肝外三科

王德盛 副主任医师
中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

傅晓辉 副教授
东方肝胆外科医院

王文跃 主任医师
中日友好医院普通外科

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

王铮 副研究员
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

官泳松 教授
四川大学华西医院放射科

魏睦新 教授
南京医科大学第一附属医院

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

杨江华 副教授
皖南医学院弋矶山医院感染科

何晓顺 教授
中山大学附属第一医院

殷正丰 教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

姜相君 主任医师
青岛市市立医院消化科

于聪慧 教授
中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科

金山 教授
内蒙古医学院附属医院普通外科

禹正杨 副教授
南华大学附属第一医院

刘丽江 教授
江汉大学肿瘤研究所

袁友红 副教授
湖南省人民医院科研部(放射与介入科)

刘平 教授
南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肿瘤科

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

刘占举 教授
同济大学附属上海市第十人民医院

赵刚 副教授
协和医院胰腺病研究所

龙学颖 副主任医师
中南大学湘雅医院放射科

张志坚 教授
福州总医院消化内科