

ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2013 年 1 月 18 日 第 21 卷 第 2 期 (Volume 21 Number 2)



2/2013

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》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《Chemical Abstracts》，《EMBASE/Excerpta Medica》，《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

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

总顾问

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

名誉主编

潘伯荣教授

主编

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
白岚教授
卜平教授
陈国忠主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
邓鑫教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊冬梅副主任医师
樊晓明教授
房静远教授

冯志杰主任医师

傅春彬主任医师

甘华田教授

高凌副教授

戈之铮教授

关玉盘教授

关晓辉主任医师

郭晓钟教授

郝建宇教授

郝丽萍副教授

何继满教授

何松教授

洪天配教授

黄培林教授

黄晓东主任医师

黄颖秋教授

黄缘教授

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

度必光教授

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

陈凇教授

陈汝福教授

陈亚军主任医师

陈钟教授

程爱国教授

程树群副教授

崔云甫教授

戴朝六教授

戴冬秋教授

丁义涛教授

杜顺达副教授

房林教授

傅红副教授

傅华群教授

傅思源副教授

傅晓辉副教授

傅志仁主任医师

高毅主任医师

葛海燕教授

巩鹏副教授

谷俊朝主任医师

顾国利副主任医师

顾岩教授

韩天权教授

郝纯毅主任医师

郝立强副教授

何超教授

何向辉教授

何晓顺教授

何裕隆教授

胡安斌副教授

黄志勇教授

季加孚教授

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

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
吴泰瑞教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泐副主任医师
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
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
官泳松教授
胡红杰主任医师
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐辉雄教授
严惟力副教授
杨薇副教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
李家平教授
刘杰民副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
吴沛宏教授

余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

范恒教授
唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
袁建业副研究员
张春虎副教授
朱西杰教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄国教授
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
阴赅宏研究员
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 ● 2013 年 1 月 18 日 第 21 卷 第 2 期 (总第406期)

述 评

- 109 非酒精性脂肪性肝病的研究进展
李瑜元

基础 研究

- 116 C57BL/6小鼠食管鳞状细胞癌早期病变的形态学改变
杜展, 王超, 张勇, 马继伟, 闫雍容, 王绍祥, 钟雪云
- 122 胞质转导肽-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin体外诱导HBV转基因小鼠髓源性树突状细胞成熟及在T淋巴细胞增殖中的作用
唐余燕, 余永胜, 卓萌, 臧国庆, 汤正好, 陈小华
- 130 培菲康对高脂饮食诱导脂肪肝病大鼠肠黏膜屏障的保护作用
张智, 单庆文, 王琳琳, 吕自力, 江玲, 黄永二
- 138 迷走传入神经功能异常在内脏高敏感形成中的作用
杨焱, 崔秀芳, 王美峰, 李学良, 林琳, 张红杰

临 床 研 究

- 145 蛋白组学分析胰腺癌干细胞相关差异蛋白的表达
江建新, 高珊, 潘耀振, 孙诚谊
- 153 血清 γ -谷氨酰转肽酶与多种代谢异常及其聚集的相关性
南宗焕, 熊英环, 朴鲜女, 方今女

文 献 综 述

- 160 肝硬化腹水形成机制的研究现状
邵茉莉, 刘冰熔
- 166 无线动力胶囊技术的应用
李苗苗, 叶必星, 林琳

研 究 快 报

- 171 壮药汗衣台体外抗乙型肝炎病毒的疗效
廖丹, 段雪琳

临 床 经 验

- 177 ¹³C-尿素呼气试验定量值与胃黏膜病变程度的相关性
张丽颖, 李振华, 李保双, 蔡毅东, 唐旭东
- 182 IL-28B基因多态性与丙型肝炎易感性的关系
米寅, 高英堂, 焦晓磊, 杜智
- 188 内镜辅助腹腔镜治疗胃肠道间质瘤20例
王小冬, 汪宝林, 褚朝顺, 王翔, 赵庆洪, 李昌阳

病 例 报 告

- 193 聚乙二醇干扰素联 α -2a联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎合并血友病2例
高丽英, 贾建伟, 赵洁
- 195 原发性胆汁性肝硬化合并系统性硬化症1例
高志远, 何新颖, 徐湘江, 李卫民

附 录	198 《世界华人消化杂志》投稿须知 203 2013年国内国际会议预告
志 谢	204 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	137 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.775 144 《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) 152 《世界华人消化杂志》正文要求 159 《世界华人消化杂志》栏目设置 165 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》影响因子0.873 176 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 181 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号 187 《世界华人消化杂志》出版流程 192 《世界华人消化杂志》参考文献要求 197 《世界华人消化杂志》修回稿须知
封面故事	《世界华人消化杂志》编委, 李瑜元, 教授, 510180, 广东省广州市, 广州医学院附属广州市第一人民医院
本期责任人	编务 马帅; 送审编辑 田滢, 翟欢欢; 组版编辑 闫晋利; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 田滢; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2013-01-18

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

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

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

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

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

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

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

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

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

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

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

编辑部

李军亮, 主任

《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: 010-59080035

传真: 010-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Room 1701, 17/F, Henan Building,

No.90 Jaffe Road, Wanchai, Hong Kong, China

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

制作

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: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》,《中文核心期刊要目总览(2011年版)》,《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

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

特别声明

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

定价

每期68.00元 全年36期2448.00元

© 2013年版权归Baishideng所有

World Chinese Journal of Digestology

January 2013 Contents in Brief Volume 21 Number 2

EDITORIAL	109 Recent progress in research of nonalcoholic fatty liver disease <i>Li YY</i>
BASIC RESEARCH	<p>116 Morphology of early lesions of esophageal squamous cell carcinoma in C57BL/6 mice <i>Du Z, Wang C, Zhang Y, Ma JW, Yan YR, Wang SX, Zhong XY</i></p> <p>122 Cytoplasmic transduction peptide-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin induces HBV transgenic mouse bone marrow-derived dendritic cell maturation and T lymphocyte proliferation <i>in vitro</i> <i>Tang YY, Yu YS, Zhuo M, Zang GQ, Tang ZH, Chen XH</i></p> <p>130 Effect of Bifidobacterium triple viable capsule on intestinal mucosal barrier function in rats with fatty liver induced by a high-fat diet <i>Zhang Z, Shan QW, Wang LL, Lv ZL, Jiang L, Huang YE</i></p> <p>138 Effect of vagal afferent dysfunction on visceral hypersensitivity in rats <i>Yang Y, Cui XF, Wang MF, Li XL, Li L, Zhang HJ</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>145 Quantitative proteomic analysis of differentially expressed proteins in pancreatic cancer stem cells <i>Jiang JX, Gao S, Pan YZ, Sun CY</i></p> <p>153 Relationship between serum levels of gamma-glutamyl transferase and multiple metabolic disorders and their clustering <i>Nan ZH, Xiong YH, Piao XN, Fang JN</i></p>
REVIEW	<p>160 Pathophysiology of ascites formation in liver cirrhosis <i>Shao ML, Liu BR</i></p> <p>166 Rationale for clinical use of wireless motility capsule <i>Li MM, Ye BX, Lin L</i></p>
RAPID COMMUNICATION	171 <i>In vitro</i> anti-HBV activity of the Chuang herb Hanyitai <i>Liao D, Duan XL</i>
CLINICAL PRACTICE	<p>177 Correlation between ¹³C-urea breath test value and severity of gastric mucosal lesions <i>Zhang LY, Li ZH, Li BS, Cai YD, Tang XD</i></p> <p>182 Association between an IL-28B gene polymorphism and susceptibility to hepatitis C virus infection <i>Mi Y, Gao YT, Jiao XL, Du Z</i></p> <p>188 Endoscopy-assisted laparoscopic management of gastrointestinal stromal tumors: An analysis of 20 cases <i>Wang XD, Wang BL, Chu CS, Wang X, Zhao QH, Li CY</i></p>
CASE REPORT	<p>193 Treatment of chronic hepatitis C with haemophilia with peginterferon alfa-2a and ribavirin: Report of two cases <i>Gao LY, Jia JW, Zhao J</i></p> <p>195 Primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis: A case report <i>Gao ZY, He XY, Xu XJ, Li WM</i></p>

APPENDIX	198 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 203 Meeting events calendar in 2013
ACKNOWLEDGMENT	204 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Yu-Yuan Li, Professor, Department of Gastroenterology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong Province, 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, Abstract Journals and Digital Object Identifier

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date January 18, 2013

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

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, Hang-zhou 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

EDITORIAL OFFICE

Jun-Liang Li, Director

World Chinese Journal of Digestology

Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China

Telephone: +86-10-59080035

Fax: +86-10-85381893

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Room 1701, 17/F, Henan Building,

No. 90 Jaffe Road, Wanchai,

Hong Kong, China

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: bpg@baishideng.com

<http://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited
Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue

RMB 2448 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2013 Baishideng. Articles published by this Open Access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

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.

非酒精性脂肪性肝病的研究进展

李瑜元

李瑜元, 广州医学院附属广州市第一人民医院 广东省广州市 510180

李瑜元, 教授, 博士生导师, 主要从事消化病和肝病方面的研究.

作者贡献分布: 本论文由李瑜元单独完成.

通讯作者: 李瑜元, 教授, 510180, 广东省广州市盘福路1号, 广州医学院附属广州市第一人民医院. liyyliyy@tom.com

收稿日期: 2012-09-26 修回日期: 2012-11-12

接受日期: 2012-11-15 在线出版日期: 2013-01-18

Recent progress in research of nonalcoholic fatty liver disease

Yu-Yuan Li

Yu-Yuan Li, Department of Gastroenterology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China

Correspondence to: Yu-Yuan Li, Professor, Department of Gastroenterology, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China. liyyliyy@tom.com

Received: 2012-09-26 Revised: 2012-11-12

Accepted: 2012-11-15 Published online: 2013-01-18

Abstract

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a common liver disease with a prevalence of 15%-30% in Western countries and about 15% in China. Nonalcoholic simple fatty liver (SFL) usually has a benign prognosis, whereas nonalcoholic steatohepatitis (NASH) may progress to cirrhosis and even hepatocellular carcinoma. Genetic studies show that a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of tumor necrosis factor- α (TNF- α), leptin, and adiponectin are associated with susceptibility to NAFLD. Recently, genome-wide association studies (GWASs) reveal a more important relevant SNP (adiponutrin or PNPLA3), which is located on chromosome 22 and regulates phospholipase. Epigenetic studies demonstrate that down-expression of miR-122 is involved in the pathogenesis of NAFLD. Histology remains the gold standard for the diagnosis of NAFLD. In clinical practice, the diagnosis is usually made by imaging techniques (e.g. ultrasonography), as liver biopsy is usually difficult. However, imaging techniques cannot differentiate NASH from NAFL. Modification of lifestyle factors such as diet, exercise, and weight control is important for treatment and should

be encouraged in all patients. Pharmacotherapy with weight reduction agents, insulin sensitizers, statins, or hepatoprotectors is helpful clinically, although their efficacy has not been well proved by evidence-based medicine.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Prevalence; Gene; Diagnosis; Management

Li YY. Recent progress in research of nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 109-115

摘要

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患病率高, 西方国家15%-30%, 我国约15%。单纯性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)病情稳定, 脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)是病情恶化的拐点, 可发展为肝硬化, 甚至肝癌。候选基因研究显示, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、瘦素、脂联素等基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)与其发病易感性相关。近年全基因组扫描发现, 染色体22上调节磷脂酶基因的SNP(adiponutrin或PNPLA3)更为重要。表观遗传学研究发现miR-122表达下调参与NAFLD发病机制。病理组织学是诊断的金标准, 但实施困难, 影像学检查(特别B超)是临床诊断的主要方法, 但无法鉴别NASH和NAFL。基础治疗包括纠正不良生活方式、控制饮食、运动、减肥等, 是治疗成功的基石。药物是辅助手段, 包括减肥药、胰岛素增敏剂、调脂药、保肝抗炎药物等, 尚没有循证医学验证的特效药物。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 患病率; 基因; 诊断; 治疗

李瑜元. 非酒精性脂肪性肝病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(2): 109-115

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/109.asp>

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)俗称脂肪肝, 是指以肝实质细胞脂肪变性为病理特征, 而无过量饮酒史, 又排除其他肝病的临床综合征, 其病理类型包括单纯性非酒精性脂肪肝(NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)及NASH相关肝硬化, 后者可发展为肝癌。

■同行评议者

张明辉, 副主任医师, 河北医科大学第一医院肝病中心(传染病)

■ 研发前沿

NAFLD是复杂基因关联性疾病,以往研究挑选与发病机制相关的基因(候选基因研究),由于代谢综合征(MetS)基因研究较为深入,NAFLD常与MetS并存,发病机制均与胰岛素抵抗(IR)相关,故理论上凡是和MetS及IR相关的基因都可能与NAFLD有关。

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患病率不断上升,引起关注。近年基础和临床研究均取得可喜成果,各国也先后更新指南,规范临床诊疗工作。NAFLD俗称脂肪肝,是指以肝实质细胞脂肪变性为病理特征,而无过量饮酒史,又排除其他肝病的临床综合征,其病理类型包括单纯性非酒精性脂肪肝(nonalcoholic simple fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)及NASH相关肝硬化,后者可发展为肝癌。NAFL病情稳定,而NASH是发生肝硬化的必经阶段,也是病情恶化的拐点和防治的重点。近年NAFLD患病率逐年增加,呈低龄化发病趋势,已成为全球重要的公共健康问题。在发达国家,NAFLD已成为慢性肝病及血清氨基酸转移酶(下称转氨酶)升高的首要原因,在我国仅次于病毒性肝炎排第2位。随着基础和临床研究新资料的涌现,美国、英国和欧洲肝病学会均修订了诊疗指南^[1-3],2010年我国也对旧指南进行更新^[4]。本文结合近年研究进展和指南内容作述评。

1 流行病学

NAFLD在全球广泛分布,患病率因目标人群和诊断方法的不同有很大差异,其确切患病率仍未完全清楚。病理组织学是诊断的金标准,因肝活检难于普及,用于流行病学调查存在困难。在意外死亡,病死尸解和捐肝者的报告中,NAFLD患病率在20%左右,其中NASH约5%^[5,6]。B超诊断是人群调查的常用方法,设计严格、纳入大样本普通人群的B超调查显示^[5,6],欧美等西方发达国家成人患病率多在15%-30%之间,而我国上海和广州两组调查均约15%^[7,8]。在发达国家,因病毒性肝炎少见,用血清转氨酶升高作为指标的人群调查(如美国NHANES研究)显示的患病率较低(5%-10%),这是仅部分NAFLD患者转氨酶升高所导致。文献也有用CT或磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)调查的报告,样本均较少,获得的患病率较B超稍高。以体检人群为对象的报告很多,差异很大,因其代表性差,结果难以比较。NAFLD人群患病率随年龄增长而增加,中老年后达高峰,然后下降^[5-10]。我们在广东的调查显示,男性患病率高峰期(50岁)早于女性(60岁),在50岁前男性高于女性,50岁(女性绝经期)后女性高于男性,接受雌激素替代治疗的女性NAFLD发病率显著下降,提示雌激

素是机体免受NAFLD的保护因素^[8]。发病率调查需前瞻性队列研究,资料有限。日本Hamaguchi等^[11]采用B超随访3 147例健康人414 d,年发病率10%。意大利Bedogni等^[12]用B超随访144例健康人8.5年,年发病率为1.9%。日本Suzuki等^[13]以血清转氨酶作标志物随访健康体检者,年发病率为3.1%。我们用B超随访广东省507例健康人4年,年发病率为9.1%^[14]。NAFLD发病危险因素包括:高脂肪高热量的膳食结构、多坐少动的生活方式,胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)、代谢综合征(metabolic syndrome, MetS)及其组分病(肥胖、高血压、血脂紊乱和2型糖尿病)等。患MetS人群的NAFLD危险率是正常人的4-11倍, NASH比NAFL更常合并MetS^[11,15,16]。

NAFLD的自然病程尚未完全清楚,一般认为NAFL是一个良性、可逆性疾病,进展很慢,肝硬化发生率很低,随访10-20年仅0.6%-3.0%发展为肝硬化,而NASH患者则高达15%-25%。在NAFLD漫长的进程中,NASH是发生肝硬化的必经阶段,也是病情恶化的拐点^[1-4]。NAFLD患者常合并MetS^[11,15-17],死亡原因也多为心脑血管疾病,而非肝病。因此如仅仅关注NAFLD向肝硬化和肝癌发展,则低估了NAFLD的危害性。Dam-Larsen等^[18]随访109例NAFL患者中位数16.7年,仅2例进展为NASH,其中一例进展为肝硬化。Matteoni等^[19]观察49例NAFL患者18年,仅2例(4%)进展为肝硬化。Teli等^[20]随访40例NAFL患者中位数11年,没有发现NASH及肝纤维化病例。Adams等^[17]随访血清转氨酶升高,排除其他相关疾病,诊断为NAFLD的109例11年,无1例发展为肝硬化。我们用B超随访广东省人群117例NAFLD共4年,病情不变者51例(43.6%),加重26例(22.2%),改善40例(34.2%),其中死于心脑血管疾病者10例(2.2%),显著高于对照组的0.2%($P=0.005$),无死于肝相关性疾病的病例^[14]。

近年全球儿童和青少年肥胖率快速增高,NAFLD患病率也随之明显上升,引起极大关注。美国一项研究显示,2-4岁儿童NAFLD患病率为0.7%,而15-19岁年龄组达17.3%^[21]。儿童患NAFLD预后较成人差^[22]。肝穿活检研究显示,儿童NAFLD中NASH比率较高(可达68%)^[21]。国内相关资料较少,2000年教育部、卫生部等五部委的全国学生调查结果,城市7-12岁学生肥胖率为12%,肥胖儿童脂肪肝检出率达18%,因此估计我国儿童脂肪肝的发病率在2%-4%^[23]。我们在广东的人群调查显示,7-18岁患病率为5.7%,远

低于西方国家水平^[8]。

2 遗传学和表观遗传学

NAFLD是复杂基因关联性疾病,以往研究挑选与发病机制相关的基因(候选基因研究),由于MetS基因研究较为深入,NAFLD常与MetS并存,发病机制均与IR相关,故理论上凡是和MetS及IR相关的基因都可能与NAFLD有关。这些基因包括(1)与肥胖和IR有关的基因:脂联素、胰岛素受体、过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferators-activated receptor- γ , PPAR- γ)等;(2)影响脂肪酸代谢的基因:肝脂肪酶、瘦素、脂联素、微粒体甘油三酯转运蛋白、PPAR- α 、细胞色素酶2E1和4A(CYP2E1, CYP4A)等;(3)影响相关细胞因子的基因:肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等;(4)影响NAFLD肝纤维化严重程度的基因:瘦素、脂联素、转化生长因子 β 1等。这些基因的SNPs均可能影响NAFLD的发病易感性,其中TNF- α 、PPAR- γ 、瘦素、脂联素等基因文献报告较多,由于研究对象和方法不同,各组报告的结果并不完全一致^[24,25]。我们对其中7个候选基因共9个位点SNPs的研究显示,有些因子和发病易感性正相关(即增加易感性):如TNF- α -238、脂联素-45、瘦素-2548、PPAR-161、PEMT-175;有些因子负相关(即降低易感性):如脂联素-276、肝脂肪酶-514;有些因子不相关:如TNF- α -380、PGC-1 α -48^[26]。

2008年Romeo等^[27]首先应用全基因扫描(genome-wide association studies, GWAS)研究NAFLD,他用磁共振波谱(1H-MRS)检查2 111例美国各族人群,比较NAFLD和对照组发现9229个差异SNPs,其中在染色体22上1个和磷脂酶代谢相关基因的SNP,即adiponutrin(亦称PNPLA3, SNP编码rs738409, 本文译为脂酶素)与肝脂肪含量密切相关,在易患NAFLD的白种人显著高于黑人。这结果随后被多个以肝活检为依据的GWAS所证实^[28-34]。最近有Meta分析纳入16个高质量的临床研究共2 937例,结果显示,携带脂酶素变异型纯合子(GG)者和野生型纯合子(CC)者比较,肝脂肪含量升高73%,肝炎症-坏死评分升高3.24倍,肝纤维化危险性升高3.20倍,血清谷丙转氨酶升高28%,NASH危险性升高3.49倍,然而患重症肝病的危险性并不显著增加^[35]。然而,并不是所有的研究均能重复这结果,有一组GWAS纳入236例肝活检确诊的NAFLD患者,并未检出

脂酶素的显著影响,却发现另一和胆固醇代谢相关的SNP(FDFT1, 编码rs2645424)和NAFLD组织学评分相关^[36]。GWAS给基因研究带来希望,但其结果还需进一步验证,因其发现的基因前无记载,缺乏传统病理生理学知识的支持。

表观遗传学(epigenetics)主要包括:短链非编码RNA(如微小RNA亦称microRNAs、miRNAs、miRs)、DNA甲基化作用、组蛋白修饰作用、染色质重塑、遗传印记和泛化作用等,在基因组DNA序列不发生变化的条件下,令基因表达(蛋白)发生改变,导致表型变化,其在肿瘤、心血管病、精神病等领域已有较多报告,而在NAFLD则刚刚起步^[37,38]。2008年Cheung等^[39]首先报告15例活检证实的NASH和15例正常人对比结果,有46个差异表达miRs,其中23个上调(如miR-34a和miR-146b),23个下调(如miR-122)。其结果很快被多个临床研究证实,并进一步发现,miR-122是肝脏含量最多的miRs(占全部的70%),在NASH患者表达下调63%,并促进脂肪细胞分化^[40]。在肝脂肪变的大鼠模型,用反义引物抑制miR-122表达,可显著降低血胆固醇水平,肝脏脂肪酸含量及多种脂肪酸合成酶的mRNA和蛋白表达,并伴随脂肪肝组织学改善^[41,42]。除miR-122外,尚有文献报告其他miRs和NAFLD发病相关:miR-34a和miR-146b在NASH患者表达上调(99%和80%)^[39],miR-335表达随着肝脂肪、甘油三酯、胆固醇含量以及脂肪分化水平而升高^[43],miR-181d表达上调伴随肝脏甘油三酯、胆固醇含量减少^[44],miR-10b通过PPAR- α 通道调节肝脂肪水平^[45]。

基因启动子区域CpG岛DNA甲基化可妨碍转录因子与启动子结合,导致该基因转录下降甚至沉默,在肝细胞癌已发现多种基因高甲基化^[46],然而在NAFLD领域的研究甚少。最近一组纳入63例肝活检确诊NAFLD患者和11例正常人的对照研究显示,NAFLD组PPAR- γ 共激因子1 α (PPARGC1A)和线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)的DNA甲基化显著增高,但甲基化水平与组织学的严重性却不相关^[47]。在脂肪肝大鼠模型发现表观遗传学的异常,包括基因组重复序列胞嘧啶甲基化丢失、转录物复制水平增高、组蛋白修饰异常和DNA甲基转移酶表达异常等^[48]。

3 诊断

NAFLD的诊断前需除(1)酒精性肝病,即患者无

■ 相关报道

Cheung首先报告15例活检证实的NASH和15例正常人对结果,有46个差异表达miRs,其中23个上调(如miR-34a和miR-146b),23个下调(如miR-122)。其结果很快被多个临床研究证实,并进一步发现,miR-122是肝脏含量最多的miRs(占全部的70%),在NASH患者中表达下调63%,并促进脂肪细胞分化。

■应用要点

本文综述NAFLD基础和临床研究的相关文献,报道不同观点以及创新成果,并结合国内外指南,对本领域的热点问题,进行总结和提炼,为读者提供有价值的信息,促进NAFLD临床和科研两方面的知识普及和提高。

饮酒史或饮酒折合乙醇量 $<140\text{ g/wk}$ (女性 $<70\text{ g/wk}$);(2)病毒性肝炎、药物性肝病、自身免疫性肝病等可导致肝脂肪变性的特定疾病。病理组织学是NAFLD诊断的金标准,特征为肝细胞脂肪变和气球样变、小叶内炎症细胞浸润、窦周纤维化^[1-4]。推荐用美国国立卫生研究院临床研究网病理工作组指南评估NAFLD严重性,即按肝细胞脂肪变、小叶内炎症和肝细胞气球样变的程度计算NAFLD活动度积分(NAS),肝细胞脂肪变 $>5\%$ 可诊断NAFLD, NAS >4 分则可诊断NASH^[49]。腹部B超检查无创、价廉,是诊断脂肪肝的首选方法,表现如下:(1)肝脏近场回声弥漫性增强(所谓明亮肝),回声强于肾脏;(2)肝内管道结构显示不清;(3)肝脏远场回声逐渐衰减。具备上述3项中2项者可诊断。B超诊断特异性高(可达97%),敏感性较低(64%),对轻症者(肝脂肪化 $<30\%$)会漏诊,而对肝脂肪化 $>30\%$ 患者,敏感性接近100%。换句话说B超诊断脂肪肝结果可信,而阴性者不能除外轻症脂肪肝。CT和MRI诊断肝脂肪变的准确性稍强于B超,CT诊断依据为肝脏密度普遍降低,其中肝/脾CT值降低 <1.0 但 ≥ 0.7 为轻度, <0.7 但 ≥ 0.5 为中度, <0.5 为重度脂肪肝,MRI的原理和准确性和CT接近^[1-4,50]。新技术如氙CT(xenon CT)、氢质子MRI(1HMRI)、氢质子MR波谱分析(1H-MRS)等可半定量肝内脂肪含量,但这些检查花费大,目前只用于科研,其中1HMRI技术较成熟,有较高准确性。瞬时弹性超声(fibroscan)和瞬时弹性图(transient elastography)通过检测肝脏弹性评估肝纤维化,但对肝脏脂肪变、炎症等的判断无帮助。NASH是病情转变的拐点,也是治疗的重点,但目前所有影像学检查的共同缺点是不能检测肝脏的炎症和坏死,故无法鉴别NAFL和NASH。尽管血转氨酶水平升高、伴有MetS相关组分病和IR抵抗等均提示NASH的可能性,但没有任何一项无创技术真正反映组织学改变^[1-4,50,51]。在临床工作中实施肝活检困难,为此中国指南为NAFLD制定了工作定义:(1)影像学表现符合弥漫性脂肪肝的诊断标准,且无饮酒史,除外病毒性肝炎、药物性肝病、全胃肠外营养、肝豆状核变性、自身免疫性肝病等可导致脂肪肝的特定疾病;(2)有MetS相关组分病的患者出现不明原因的血转氨酶增高持续半年以上。减肥和改善IR后,异常酶谱和影像学脂肪肝改善甚至恢复正常者,符合其中1项可临床诊断NAFLD^[4]。目前NASH并无工作定义,对疑诊者建议肝活检确诊。

4 治疗

NAFLD治疗的目标是延缓或阻止肝病进展、延缓或阻止MetS及其组分病(特别动脉硬化)的并发症发生,提高患者生活质量和延长寿命。主要方法包括基础治疗和药物治疗,极少数患者需肝移植。临床上需根据患者具体病情制定个体化诊疗方案,大多数患者处于NAFL阶段,病情稳定,基础治疗为主,而NASH患者易向肝硬化进展,还需配合药物治疗。治疗前评估代谢危险因素,特别是MetS及其组分病,常需一并处理^[1-4]。

基础治疗是治疗成功的基石,适用于所有NAFLD患者。方法是通过健康宣教,纠正不良生活方式和行为,如控制饮食、增加有氧运动、减肥等。临床医师通常只笼统地和患者讲道理,未和患者深入沟通,制定具体的治疗方式和目标,患者不会重视或无所适从,效果当然不满意。NAFLD患者需如同糖尿病患者一样在医师指导下调节生活,针对患者饮食、运动、体质量、腰围以及生活质量等不同个体情况,设置患者理解和接受的控制饮食方案(总热卡数和食谱等)、制定合理的运动量(包括运动方式和时间等),必要时请营养师和理疗师会诊,共同确定方案。治疗开始后长期随访,加强管理,对方案及时调整,才能保证疗效,这要求医师付出大量精力和时间^[1-4,52]。

药物治疗是重要的辅助手段,鉴于NAFLD通常和MetS及其相关组分病并存,许多研究显示,NAFLD也是MetS的组分病之一,故治疗NAFLD需同时兼顾防治代谢紊乱,改善IR。药物包括减肥药:西布曲明、奥利司他等;胰岛素增敏剂:二甲双胍、噻唑烷二酮类药物(吡格列酮、罗格列酮等);调脂药:他汀类、贝特类等和保肝抗炎药物,但至今尚没有任何一种得到循证医学证明的特效药物^[1-4,51]。近年发表的多个Meta分析,纳入以肝穿刺结果为依据的临床随机对照研究,显示减肥可显著改善NASH组织学的各项指标,疗效与体质量下降正相关,体质量下降3%-5%以上就可减轻肝脂肪变,但只有体质量下降高达10%才能改善肝脏炎症和坏死程度,临床有过半数患者无法达减肥目标^[2,53]。噻唑烷二酮类药物可显著改善NASH的肝细胞脂肪变、小叶内炎症和肝细胞气球样变,而对肝纤维化的疗效仅刚达到显著性,尚需更多研究证实^[54,55]。二甲双胍对NASH的疗效并不显著^[56]。他汀类药物对肝组织学的改善作用未被证实^[53,57]。保肝抗炎药物中的抗氧化剂Vit E在国外报告较

多, 结果不一, 尚没有足够资料支持或否定其疗效^[58]。其他护肝新药如己酮可可碱、L-卡尼汀等资料不足, 仅有几个小样本的临床随机对照研究认为有效^[53]。其他保肝抗炎药物(护肝药)包括多不饱和脂肪酸(易善复)、水飞蓟素(宾)、甘草酸制剂、双环醇、熊去氧胆酸、S-腺苷蛋氨酸和还原型谷胱甘肽等和中药材等, 许多在国外未上市, 或虽然上市但说明书的适应证不含NAFLD, 其作用机制涉及到抗氧化、甲基化、膜修复、抗炎、改善血脂、解毒等多方面, 在国内使用很广泛。临床研究显示, 护肝药可改善肝脏影像学 and 血生化(肝功能)指标, 但因欠缺组织学验证的临床随机对照研究, 其地位至今仍有争论。中国指南推荐, 在保证基础治疗的前提下, 下列情况使用护肝药: (1)肝组织学确诊的NASH; (2)临床、实验室以及影像学资料提示有肝损伤或进展性肝纤维化者, 例如合并血清转氨酶增高、MetS、2型糖尿病的NAFLD患者; (3)伴其他药物诱发的肝损伤, 或基础治疗中出现血清转氨酶增高者; (4)合并嗜肝病毒感染或其他肝病者, 推荐疗程6-12 mo以上^[4]。综上所述, 噻唑烷二酮类是目前循证医学证据最多的药物, 美国指南推荐可在医师指导下治疗NASH^[1], 因药品说明书的适应证并不包括NAFLD, 我国指南只建议用于有IR的NAFLD患者^[4]。对二甲双胍和调脂药, 所有指南均只推荐用于有IR或血脂紊乱的NAFLD患者^[1-4]。他汀类药物可引起部分患者转氨酶增高, 多为一过性, 如患者无症状, 转氨酶增高在1-3正常上限范围内无需处理, 如>3正常上限则需减量或停药, 如总胆红素增加及凝血酶原时间延长, 提示显著肝功能损伤需立即停药^[57]。对接受药物治疗的患者需加强随访, 主管医师至少每月随访1次, 每半年复查体质量、腰围、血压、肝功能、血脂和血糖和上腹部超声检查, 评估疗效和调整方案^[1-4, 51, 53]。

5 结论

NAFLD患病率逐年增高, 引起关注。NAFL病情稳定, NASH是发生肝硬化的必经阶段, 也是肝病恶化的拐点和防治的重点。NAFLD常和MetS并存, 死亡原因也多为心脑血管疾病, 因此需兼顾处理两病。病理组织学是诊断的金标准, B超是临床诊断的常用方法, 但无法鉴别NASH和NAFL。控制饮食和增加运动等基础疗法是治疗成功的基石。药物包括减肥药、胰岛素增敏剂、调脂药、保肝抗炎药物等, 尚没有循证医

学证实的特效药物。近年基因和表观遗传学研究为靶向诊治带来希望。

6 参考文献

- Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005-2023 [PMID: 22488764 DOI: 10.1002/hep.25762]
- Newsome PN, Allison ME, Andrews PA, Auzinger G, Day CP, Ferguson JW, Henriksen PA, Hubscher SG, Manley H, McKiernan PJ, Millson C, Mirza D, Neuberger JM, Oben J, Pollard S, Simpson KJ, Thorburn D, Tomlinson JW, Wyatt JS. Guidelines for liver transplantation for patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2012; 61: 484-500 [PMID: 22234978 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300886]
- Ratz V, Bellentani S, Cortez-Pinto H, Day C, Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol* 2010; 53: 372-384 [PMID: 20494470 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.04.014]
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版). *中华肝脏病杂志* 2010; 18: 163-170
- Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 274-285 [PMID: 21623852 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x]
- 黄春明, 李瑜元. 非酒精性脂肪肝的流行病学. *现代消化及介入诊疗* 2009; 14: 233-237
- Fan JG, Zhu J, Li XJ, Chen L, Lu YS, Li L, Dai F, Li F, Chen SY. Fatty liver and the metabolic syndrome among Shanghai adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1825-1832 [PMID: 16336439 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04724.x]
- Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Ma JX, Lu LG, Shi SL, Chen MH, Hu PJ. Prevalence of fatty liver disease and its risk factors in the population of South China. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6419-6424 [PMID: 18081233]
- Milić S, Stimac D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. *Dig Dis* 2012; 30: 158-162 [PMID: 22722431 DOI: 10.1159/000336669000336669]
- Shi L, Liu ZW, Li Y, Gong C, Zhang H, Song LJ, Huang CY, Li M. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with lifestyle/dietary habits among university faculty and staff in Chengdu. *Biomed Environ Sci* 2012; 25: 383-391 [PMID: 23026517 DOI: 10.3967/0895-3988.2012.04.00250895-3988(12)60069-5]
- Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005; 143: 722-728 [PMID: 16287793 DOI: 10.1136/annint.2004.08.002]
- Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Castiglione A, Crocè LS, Tiribelli C, Bellentani S. Incidence and natural course of fatty liver in the general population:

同行评价

近年NAFLD发病率迅速升高, 受到极大关注。本文综述NAFLD基础和临床研究文献, 报道不同观点以及创新成果, 并结合国内外指南, 对本领域的热点问题总结提炼, 为读者提供有价值的信息, 促进NAFLD临床和科研两方面知识的普及和提高。

- the Dionysos study. *Hepatology* 2007; 46: 1387-1391 [PMID: 17685472 DOI: 10.1002/hep.21827]
- 13 Suzuki A, Angulo P, Lymp J, St Sauver J, Muto A, Okada T, Lindor K. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology* 2005; 41: 64-71 [PMID: 15690483 DOI: 10.1002/hep.20543]
 - 14 Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Huang CM, Cao CY. Natural course of nonalcoholic fatty liver disease in southern China: a prospective cohort study. *J Dig Dis* 2012; 13: 153-160 [PMID: 22356310 DOI: 10.1111/j.1751-2980.2011.00571.x]
 - 15 Byrne CD. Dorothy Hodgkin Lecture 2012: non-alcoholic fatty liver disease, insulin resistance and ectopic fat: a new problem in diabetes management. *Diabet Med* 2012; 29: 1098-1107 [PMID: 22672330 DOI: 10.1111/j.1464-5491.2012.03732.x]
 - 16 Page J. Nonalcoholic fatty liver disease: the hepatic metabolic syndrome. *J Am Acad Nurse Pract* 2012; 24: 345-351 [PMID: 22672485 DOI: 10.1111/j.1745-7599.2012.00716.x]
 - 17 Adams LA, Waters OR, Knuiman MW, Elliott RR, Olynyk JK. NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 861-867 [PMID: 19293782 DOI: ajg200967]
 - 18 Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sørensen TI, Becker U, Bendtsen F. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Gut* 2004; 53: 750-755 [PMID: 15082596]
 - 19 Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419 [PMID: 10348825 DOI: S0016508599005636]
 - 20 Teli MR, James OF, Burt AD, Bennett MK, Day CP. The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995; 22: 1714-1719 [PMID: 7489979 DOI: S0270913995004289]
 - 21 Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics* 2006; 118: 1388-1393 [PMID: 17015527 DOI: 118/4/1388]
 - 22 Pacifico L, Nobili V, Anania C, Verdecchia P, Chiesa C. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3082-3091 [PMID: 21912450 DOI: 10.3748/wjg.v17.i26.3082]
 - 23 展玉涛. 儿童非酒精性脂肪性肝病研究进展. *实用肝脏病杂志* 2006; 9: 101-103
 - 24 Meirhaeghe A, Cottel D, Amouyel P, Dallongeville J. Lack of association between certain candidate gene polymorphisms and the metabolic syndrome. *Mol Genet Metab* 2005; 86: 293-299 [PMID: 15978856 DOI: S1096-7192(05)00167-8]
 - 25 Osterreicher CH, Brenner DA. The genetics of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2007; 6: 83-88 [PMID: 17519829 DOI: 482270]
 - 26 Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Yang H, Zhan Q, Huang J, Shi SL, Lai XB, Huang HL. Influence of polygenetic polymorphisms on the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease of Chinese people. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 772-777 [PMID: 20492333 DOI: JGH6144]
 - 27 Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 40: 1461-1465 [PMID: 18820647 DOI: ng.257]
 - 28 Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Königsrainer I, Königsrainer A, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes* 2009; 58: 2616-2623 [PMID: 19651814 DOI: db09-0279]
 - 29 Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, Roos C, Westerbacka J, Hamsten A, Bergholm R, Arkila P, Arola J, Kiviluoto T, Fisher RM, Ehrenborg E, Orholm-Melander M, Ridderstråle M, Groop L, Yki-Järvinen H. A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* 2009; 52: 1056-1060 [PMID: 19224197 DOI: 10.1007/s00125-009-1285-z]
 - 30 Romeo S, Sentinelli F, Cambuli VM, Incani M, Congiu T, Matta V, Pilia S, Huang-Doran I, Cossu E, Loche S, Baroni MG. The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. *J Hepatol* 2010; 53: 335-338 [PMID: 20546964 DOI: S0168-8278(10)00330-2]
 - 31 Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 52: 894-903 [PMID: 20684021 DOI: 10.1002/hep.23759]
 - 32 Santoro N, Kursawe R, D'Adamo E, Dykas DJ, Zhang CK, Bale AE, Cali AM, Narayan D, Shaw MM, Pierpont B, Savoye M, Lartaud D, Eldrich S, Cushman SW, Zhao H, Shulman GI, Caprio S. A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology* 2010; 52: 1281-1290 [PMID: 20803499 DOI: 10.1002/hep.23832]
 - 33 Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res* 2009; 50: 2111-2116 [PMID: 19738004 DOI: 50/10/2111]
 - 34 Valenti L, Alisi A, Galmozzi E, Bartuli A, Del Menico B, Alterio A, Dongiovanni P, Fargion S, Nobili V. I148M patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene variant and severity of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 52: 1274-1280 [PMID: 20648474 DOI: 10.1002/hep.23823]
 - 35 Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011; 53: 1883-1894 [PMID: 21381068 DOI: 10.1002/hep.24283]
 - 36 Chalasani N, Guo X, Loomba R, Goodarzi MO, Haritunians T, Kwon S, Cui J, Taylor KD, Wilson L, Cummings OW, Chen YD, Rotter JI. Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010; 139: 1567-176, 1567-176, [PMID: 20708005 DOI: S0016-5085(10)01166-2]
 - 37 Lakner AM, Bonkovsky HL, Schrum LW. microRNAs: fad or future of liver disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2536-2542 [PMID: 21633658 DOI: 10.3748/wjg.v17.i20.2536]
 - 38 Sookoian S, Pirola CJ. DNA methylation and he-

- patic insulin resistance and steatosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012; 15: 350-356 [PMID: 22617561 DOI: 10.1097/MCO.0b013e3283546f9f]
- 39 Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, Kellum JM, Min H, Luketic VA, Sanyal AJ. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology* 2008; 48: 1810-1820 [PMID: 19030170 DOI: 10.1002/hep.22569]
- 40 Chang J, Nicolas E, Marks D, Sander C, Lerro A, Buendia MA, Xu C, Mason WS, Moloshok T, Bort R, Zaret KS, Taylor JM. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 2004; 1: 106-113 [PMID: 17179747 DOI: 1066]
- 41 Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006; 3: 87-98 [PMID: 16459310 DOI: S1550-4131(06)00029-5]
- 42 Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-689 [PMID: 16258535 DOI: nature04303]
- 43 Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, Yahagi N, Kobayashi K, Yahoto S, Takahashi A, Suzuki H, Urayama O, Yamada N, Shimano H. The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 492-496 [PMID: 19460359 DOI: S0006-291X(09)01010-9]
- 44 Whittaker R, Loy PA, Sisman E, Suyama E, Aza-Blanc P, Ingermanson RS, Price JH, McDonough PM. Identification of MicroRNAs that control lipid droplet formation and growth in hepatocytes via high-content screening. *J Biomol Screen* 2010; 15: 798-805 [PMID: 20639500 DOI: 1087057110374991]
- 45 Zheng L, Lv GC, Sheng J, Yang YD. Effect of miRNA-10b in regulating cellular steatosis level by targeting PPAR-alpha expression, a novel mechanism for the pathogenesis of NAFLD. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 156-163 [PMID: 19780876 DOI: JGH5949]
- 46 Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, Otani S, Kasuya H, Takeda S, Kanazumi N, Sugimoto H, Nakao A. Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 97: 1260-1265 [PMID: 17968429 DOI: 6604016]
- 47 Sookoian S, Rosselli MS, Gemma C, Burgueño AL, Fernández Gianotti T, Castaño GO, Pirola CJ. Epigenetic regulation of insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease: impact of liver methylation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α promoter. *Hepatology* 2010; 52: 1992-2000 [PMID: 20890895 DOI: 10.1002/hep.23927]
- 48 Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova TV, Melnyk S, Montgomery B, Ross SA, Latendresse JR, Rusyn I, Beland FA. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J Hepatol* 2009; 51: 176-186 [PMID: 19450891 DOI: S0168-8278(09)00244-X]
- 49 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321 [PMID: 15915461 DOI: 10.1002/hep.20701]
- 50 Arienti V, Aluigi L, Pretolani S, Accogli E, Polimeni L, Domanico A, Violi F. Ultrasonography (US) and non-invasive diagnostic methods for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and early vascular damage. Possible application in a population study on the metabolic syndrome (MS). *Intern Emerg Med* 2012; 7 Suppl 3: S283-S290 [PMID: 23073869 DOI: 10.1007/s11739-012-0824-7]
- 51 Torres DM, Williams CD, Harrison SA. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 837-858 [PMID: 22446927 DOI: S1542-3565(12)00320-5]
- 52 Nobili V, Carter-Kent C, Feldstein AE. The role of lifestyle changes in the management of chronic liver disease. *BMC Med* 2011; 9: 70 [PMID: 21645344 DOI: 1741-7015-9-70]
- 53 Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 52: 79-104 [PMID: 20578268 DOI: 10.1002/hep.23623]
- 54 Boettcher E, Csako G, Pucino F, Wesley R, Loomba R. Meta-analysis: pioglitazone improves liver histology and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35: 66-75 [PMID: 22050199 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04912.x]
- 55 Mahady SE, Webster AC, Walker S, Sanyal A, George J. The role of thiazolidinediones in non-alcoholic steatohepatitis - a systematic review and meta analysis. *J Hepatol* 2011; 55: 1383-1390 [PMID: 21703200 DOI: S0168-8278(11)00290-X]
- 56 Rakoski MO, Singal AG, Rogers MA, Conjeevaram H. Meta-analysis: insulin sensitizers for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 1211-1221 [PMID: 20955440 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04467.x]
- 57 Cohen DE, Anania FA, Chalasani N. An assessment of statin safety by hepatologists. *Am J Cardiol* 2006; 97: 77C-81C [PMID: 16581333 DOI: S0002-9149(05)02147-8]
- 58 Lirussi F, Azzalini L, Orlando S, Orlando R, Angelico F. Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (1): CD004996 [PMID: 17253535 DOI: 10.1002/14651858.CD004996.pub3]

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利



C57BL/6小鼠食管鳞状细胞癌早期病变的形态学改变

杜展, 王超, 张勇, 马继伟, 闫雍容, 王绍祥, 钟雪云

■背景资料

通过建立小鼠食管癌模型, 探讨观察早期小鼠食管癌病理形态学改变的方法及肿瘤的发生过程, 对研究食管癌发生早期的分子机制及对肿瘤的预防、阻断起到桥梁作用。

杜展, 王超, 张勇, 马继伟, 闫雍容, 王绍祥, 钟雪云, 暨南大学医学院病理学教研室 广东省广州市 510630

杜展, 在读硕士, 主要从事肿瘤病理的相关研究。

国家高技术研究发展计划(863计划)课题基金资助项目, No. 2012AA02A503

作者贡献分布: 此课题由杜展、王绍祥及钟雪云共同设计; 研究过程由杜展、王超、张勇、马继伟及闫雍容共同操作完成; 数据分析由杜展与王绍祥完成; 本论文初稿写作、修改及定稿由杜展、王绍祥及钟雪云共同完成。

通讯作者: 钟雪云, 教授, 510630, 广东省广州市黄埔大道西601号, 暨南大学医学院病理学教研室. tzxy@jnu.edu.cn
电话: 020-85228363

收稿日期: 2012-11-30 修回日期: 2012-12-31

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Morphology of early lesions of esophageal squamous cell carcinoma in C57BL/6 mice

Zhan Du, Chao Wang, Yong Zhang, Ji-Wei Ma, Yong-Rong Yan, Shao-Xiang Wang, Xue-Yun Zhong

Zhan Du, Chao Wang, Yong Zhang, Ji-Wei Ma, Yong-Rong Yan, Shao-Xiang Wang, Xue-Yun Zhong, Department of Pathology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2012AA02A503

Correspondence to: Xue-Yun Zhong, Professor, Department of Pathology, Medical College of Jinan University, 601 Huangpu Dadao West, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. tzxy@jnu.edu.cn

Received: 2012-11-30 Revised: 2012-12-31

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To dynamically observe the morphology of early lesions of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in C57BL/6 mice.

METHODS: ESCC was induced in C57BL/6 mice by giving drinking water containing 100 µg/mL of 4-nitroquinoline-1-oxide. During the experiment period, the morphology of early lesions of ESCC was observed by esophageal exfoliated cytology, iodine staining, observation with naked eyes, and histological assessment at weeks 12, 16, 20 and 24 after induction of ESCC.

RESULTS: Early esophageal lesions could not

be observed by esophageal exfoliated cytology or iodine staining. Esophageal epithelial dysplasia was observed by longitudinally dissecting the esophagus at week 12. In situ carcinoma and invasive cancer were observed at weeks 16, 20, and 24. Inflammation existed during the entire process of the development of ESCC.

CONCLUSION: Histopathological techniques, not esophageal exfoliated cytology or iodine staining, are suitable for observing the morphology of early ESCC lesions in C57BL/6 mice.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Esophageal squamous carcinoma; C57BL/6; Animal model; Esophageal balloon cells smears; Iodine staining

Du Z, Wang C, Zhang Y, Ma JW, Yan YR, Wang SX, Zhong XY. Morphology of early lesions of esophageal squamous cell carcinoma in C57BL/6 mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 116-121

摘要

目的: 了解食管癌发生过程中的炎症改变。

方法: 采用100 µg/mL的4NQO通过饮水作用于C57BL/6小鼠, 分别通过食管拉网脱落细胞法、碘染色法及病理组织学观察第12、16、20、24周等时间段的C57BL/6小鼠食管鳞状细胞癌建模病理的改变。

结果: 食管拉网脱落细胞法、碘染色法均未观察到小鼠早期食管病变, 在实验第12周, 纵向解剖食管, 通过病理组织学观察到食管上皮不典型增生, 第16、20、24周分别观察到原位癌、浸润性鳞癌的发生, 在整个肿瘤的发生、发展过程中伴随炎症细胞浸润。

结论: 食管拉网脱落细胞法、碘染色法不适用于C57BL/6小鼠食管鳞癌建模形态学观察, 只能通过病理组织学才能够在不同的时间段观察到食管癌的发生、发展及其炎症改变过程。

© 2013年版权归Baishideng所有。

■同行评议者

张志坚, 教授, 福州总医院消化内科

关键词: 食管鳞状细胞癌; C57BL/6小鼠; 动物模型; 食管拉网脱落细胞涂片; 碘染色

杜展, 王超, 张勇, 马继伟, 闫雍容, 王绍祥, 钟雪云. C57BL/6小鼠食管鳞状细胞癌早期病变的形态学改变. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 116-121

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/116.asp>

0 引言

食管癌是最常见的八大恶性肿瘤之一^[1], 2008年全球新增病例482 300例, 死亡406 800例^[2,3]. 由于早期症状不明显, 大多数食管癌患者确诊时已经是中晚期, 失去最佳治疗时机, 预后极差^[4]. 因此, 食管癌的早期诊断对于改善预后非常必要. 在动物整体水平建立真实模拟人类疾病的动物模型, 对理解疾病发生发展至关重要^[5,6]. 食管癌的动物模型是研究肿瘤发生的病因、发病机制、药物新靶点发现及药物干预的重要手段^[7-10]. 已证实多种亚硝胺能诱发大鼠食管癌, 时间需1年以上, 但未能成功诱发小鼠食管癌. 有报道^[11,12]采用水溶性化合物4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline-1-oxide, 4NQO)成功诱导小鼠食管鳞状细胞癌发生, 但未能观察到食管浸润性癌发生前的早期病理改变. 食管拉网脱落细胞涂片在食管癌普查中应用广泛^[13,14]、碘染色法结合胃镜检查在食管癌早期诊断中发挥重要作用^[15,16]. 为此, 我们尝试模拟人食管癌筛查手段, 探讨能够更早期观察到小鼠食管癌病理形态学改变的方法, 同时进一步揭示肿瘤发生过程中的炎症变化情况.

1 材料和方法

1.1 材料 6周龄♀C57BL/6小鼠60只, 体质量16-20 g(广东省实验动物中心提供, 实验动物质量合格证明号: 0097337), SPF级. 在室温20℃-25℃, 湿度40%-60%, 24 h自然光暗循环条件下以标准固体饲料喂养(广东省实验动物中心提供), 自制微型棉签. 试剂4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitroquinoline-1-oxide, 4NQO)(日本TCI公司 CAS: 56-57-5); 丙二醇(propylene glycol)(天津富宇); 2.5%碘溶液(广州齐云).

1.2 方法

1.2.1 溶液配制: 4NQO溶解于丙二醇配制成5 mg/mL浓度作为储存液, 避光保存于4℃. 喂养小鼠时, 1 mL 4NQO储存液(5 mg/mL)和49 mL灭菌蒸馏水混合配制成100 μg/mL 4NQO水溶液, 置于避光饮水瓶中. 1 mL丙二醇和49 mL灭菌蒸馏

水混合配制成丙二醇水溶液, 每周一换. 对照组: 在暴露期内饮用含相同浓度的丙二醇水溶液.

1.2.2 食管癌模型建立: 参考文献[12], 60只小鼠随机分为2组, 处理组50只, 对照组10只. 处理组小鼠在致癌原暴露期内自由饮用100 μg/mL 4NQO水溶液16 wk, 之后改用普通灭菌水喂养. 于第12、16、20周处死小鼠3只, 至第24周全部处死, 对照组小鼠饮用含相同浓度的丙二醇水溶液16 wk, 之后改用普通灭菌水喂养, 于第12、16、20周各处死1只, 至第24周全部处死.

1.2.3 食管拉网脱落细胞涂片: 用灌胃器结合自制微型棉签模拟食管拉网方法, 在食管采集脱落细胞进行涂片, 滴加950 mL/L乙醇固定, 进行HE染色后镜下观察.

1.2.4 碘染色: 处死小鼠取食管纵向剖开, 2.5%碘溶液滴至全段食管1 min后流水冲洗.

1.2.5 病理组织学: 通过肉眼及镜下观察食管的病理改变.

1.2.6 一般情况: 每天观察室内温度、湿度变化, 小鼠活动度、对刺激的反应灵敏度, 进食、饮水量及毛色、粪便等情况, 每周记录小鼠的进食、饮水量、体质量.

1.2.7 脱落细胞涂片观察: 各时间点采集食管脱落细胞涂片固定, HE染色后镜下观察.

1.2.8 碘染色观察: 各时间点处死小鼠后, 分离食管, 从食管起始部位用眼科剪纵向剖开食管, 并用碘溶液对全段食管染色.

1.2.9 大体观察: 各时间点处死小鼠后, 完整分离舌、食管、胃、心、肝、脾、肺、肾等脏器, 观察食管全段外观、纵向剖开后管腔内部黏膜以及各脏器的变化.

1.2.10 组织病理学: 10%的中性甲醛溶液固定24 h, 常规脱水, 石蜡包埋, 4 μm切片, 采用HE染色, 进行组织病理学观察.

2 结果

2.1 一般情况及体质量 实验小鼠共60只, 分别于第12、16、20周处死小鼠4只, 5只小鼠实验过程中意外死亡, 余下43只小鼠于第24周全部处死. 实验进行至第12周时, 处理组与对照组在活动度、毛发光泽度、进食、饮水无明显差异. 随着时间延长, 处理组小鼠活动度逐渐弱于对照组, 毛发失去光泽, 呈微黄色(4NQO为黄色), 粪便颜色微黄, 尿液呈深黄色. 12、16、20、24 wk对照组体质量分别为21.0 g±1.2 g、22.1 g±0.8 g、21.3 g±1.7 g、23.3 g±0.9 g; 处理组体质量分别

■研究前沿

4NQO诱导的小鼠食管癌模型建模方法简单、诱导过程自然, 能模拟人食管癌发生的动态过程, 已广泛应用于食管癌发生机制及预防的研究中, 开展无创方法对肿瘤模型进行动态追踪并进行早期诊断, 在食管癌研究领域具有广阔前景.

■相关报道

Fong等利用4NQO建立小鼠食管癌模型对Zn在肿瘤发生中的作用进行了深入研究,发现充足的Zn摄入在食管癌建模过程对小鼠具有保护作用,阐明了Zn缺乏通过激活S100A8炎症通路,参与小鼠食管癌的发生发展。

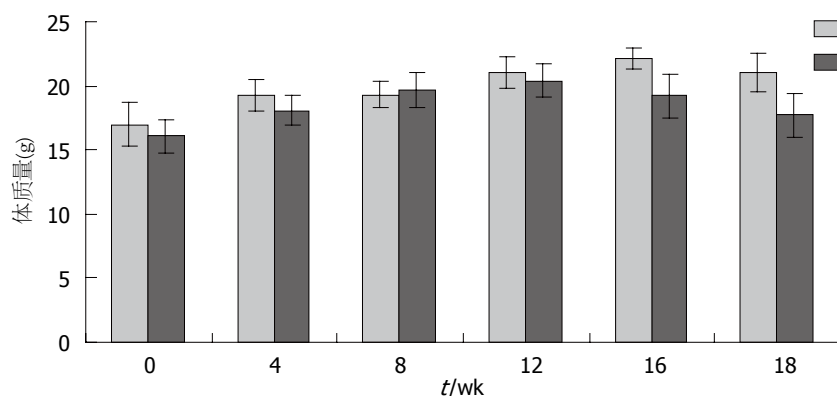


图 1 小鼠体质量的变化。

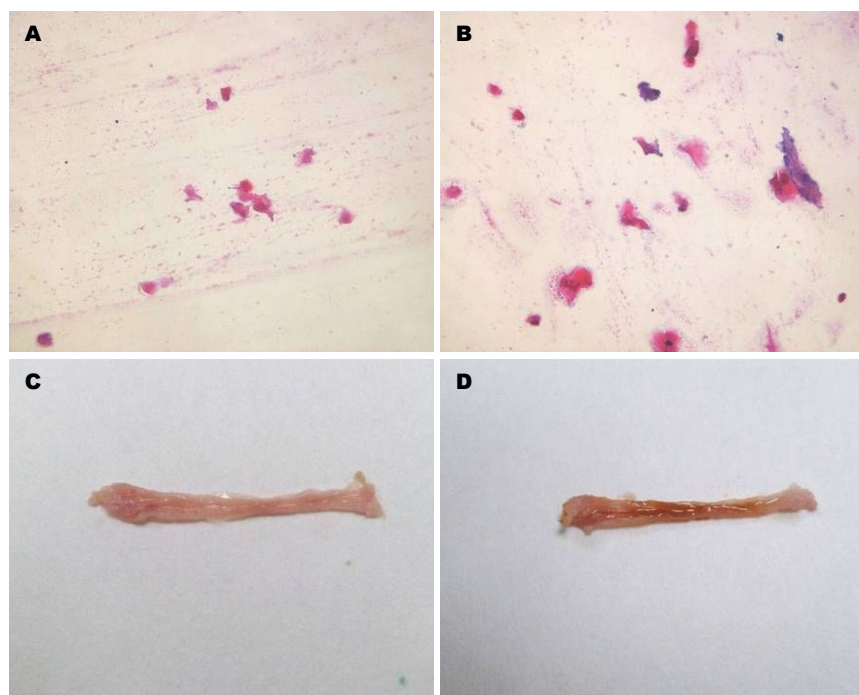


图 2 小鼠食管脱落细胞检查及碘染色。A: 第12周小鼠食管脱落细胞; B: 第24周小鼠食管脱落细胞; C: 碘染色前小鼠食管; D: 碘染色后小鼠食管。

为 20.3 ± 1.4 g; 19.4 ± 2.0 g、 16.4 ± 2.6 g、 15.2 ± 1.5 g(图1)。图中12 wk以前对照组与处理组小鼠体质量均呈增加趋势,12 wk后对照组体质量持续增加,而处理组小鼠体质量在第12周达到峰值,之后体质量下降,第16-20周体质量降幅最大。16 wk后两组小鼠体质量差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 脱落细胞涂片 镜下各个视野无细胞,见零散分布的均质、红染片状物,考虑为角化物(图2)。

2.3 碘染色 经染色、流水冲洗后,食管正常黏膜及病变部位均染色较深,无明显色差(图2)。

2.4 大体观察 对照组及处理组小鼠食管大体形态(图3)。对照组小鼠食管长2.5-3.0 cm,食管上段管径约0.1 cm,下段稍粗,管径约0.15 cm,黏膜光滑呈半透明状,无充血,皱襞无中断,食管中上部黏膜薄,近贲门处管壁略厚,第12周,处理组小鼠食管无增粗,纵向剖开可见食管下段黏

膜粗糙,少许黏膜皱襞中断,部分区域充血,管腔内无新生物生成;16 wk时,食管增粗,平均直径0.2 cm,黏膜区域性增厚、粗糙,无坏死及出血。20 wk时处理组小鼠食管明显增粗,黏膜弥漫性增厚,管腔内可见1-3个新生物散在分布,直径0.1-0.2 cm。24 wk时,食管下段管径平均0.2-0.3 cm,管壁僵硬、变形,局部可见膨隆,眼科剪不能顺利伸入管腔,管腔内充满一至数个乳头状、菜花状、突向管腔或向管壁浸润生长的灰白色新生物,质硬,触之出血,新生物直径最小0.1 cm,最大者约0.4 cm,部分小鼠管腔完全堵塞,见出血及溃疡形成。

2.5 组织学观察 小鼠食管黏膜被覆鳞状上皮,角化层厚,由浅至深依次为角化层,颗粒细胞层、棘细胞层,基底细胞层,黏膜下有少量淋巴细胞、浆细胞浸润。随着4NQO摄入时间延长,处理组小鼠食管在不同时期经历单纯性上皮增生-

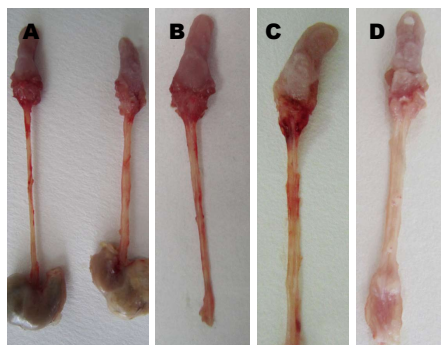


图3 小鼠对照组与处理组食管大体形态. A: 对照组(左)与处理组(右)(第24周, 未剖开); B: 对照组(第24周, 剖开后); C: 处理组(第16周, 剖开后); D: 处理组(第24周, 剖开后).

■创新盘点

本文将人食管癌筛查方法引入动物模型研究中, 对食管进行纵向解剖, 结合病理形态学, 更早期、动态观察到食管癌的发生发展, 并揭示食管癌发生过程中伴随的炎症改变。

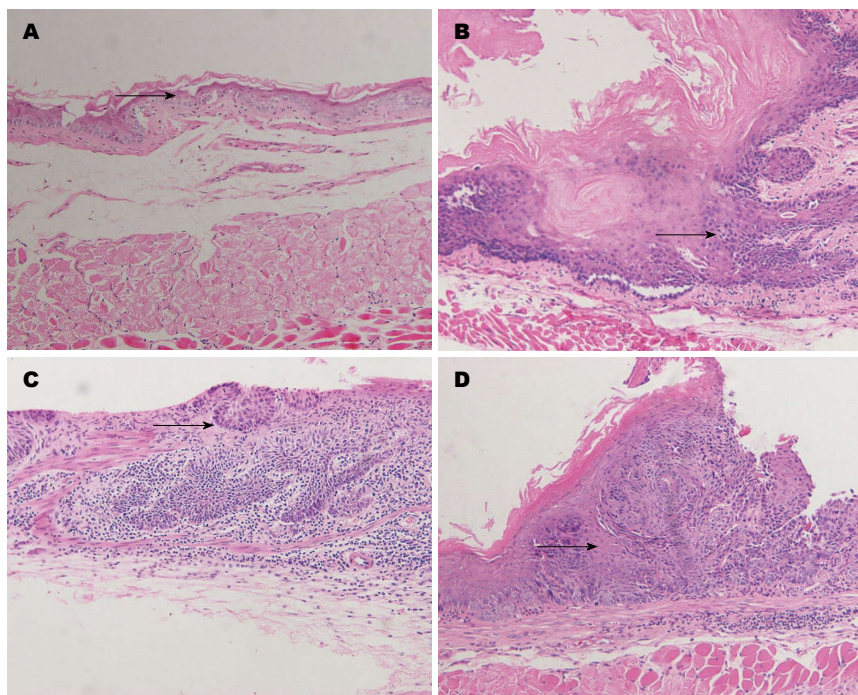


图4 不同时间点小鼠食管组织HE染色($\times 10$). A: 正常食管黏膜; B: 第12周不典型增生; C: 第16周原位癌; D: 第24周浸润性食管鳞状细胞癌。

非典型增生-原位癌-浸润性鳞癌的病理变化(图4). 12 wk时出现单纯性上皮增生, 上皮钉突延长, 表现为棘细胞层及细胞数增多, 细胞无异型性, 基底细胞单层, 排列整齐, 间质淋巴细胞增多. 16 wk时可见异常增生, 棘细胞层肥厚, 细胞大小不一、排列紊乱. 局部区域角化层中断, 基底细胞增生, 排列紊乱, 细胞异型程度加重, 胞核呈多形性, 病理性核分裂增多, 基膜尚完整, 表现为原位癌的病理改变. 间质出现中性粒细胞、浆细胞、淋巴细胞浸润. 实验进行至第24周时食管鳞状细胞癌发生率为100%. 其中3例为原位癌、30例浸润至黏膜下, 3例浸润至肌层. 肿瘤外生性和/或浸润性生长, 形成癌巢, 中心可见角化珠. 细胞重度异型, 层次紊乱, 核染色质增多、粗糙, 出现多种病理性核分裂. 间质血管丰富, 大量炎细胞浸润. 不典型增生和原位癌时期可见淋巴细胞、中性粒细胞浸润, 发展至浸润性癌时炎症细胞浸润以淋巴细胞、浆细胞为主.

2.6 其他脏器观察 对处理组小鼠其他脏器包括: 胃、胰腺、心、肝、脾、肺、肾进行大体及组织学观察, 未发现原发性肿瘤及转移病灶.

3 讨论

4NQO是一种水溶性的喹啉衍生物^[17], 摄入体内后, 在4NQO还原酶的作用下通过氧化还原反应, 形成近致癌物4-羟氨基喹啉-1-氧化物, 经脯氨酰基化作用代谢为终致癌物4-乙酰氨基喹啉-1-氧化物, 最后与靶器官DNA亲核结构结合, 形成DNA加成物, 使鼠第7号染色体上H-ras1基因第12位密码子发生G→A转换, 致组织发生癌变^[18-21]. 其中4NQO还原酶起关键作用, 该酶在舌、食管黏膜分布较多^[19], 使得4NQO具有对舌、食管的特异靶向性. 早期4NQO多用于口腔癌模型构建中^[22], Tang等^[11]利用4NQO构建了舌癌和食管癌模型, 研究4NQO对CBA和C57BL/6小鼠致癌率的差异; 我国陈慧等^[12]用类似方法建立舌

■应用要点

食管拉网脱落细胞法、碘染色法不适用于小鼠食管鳞癌的早期病变观察。通过纵向解剖食管,病理组织学,更直观、早期地观察到食管癌的发生过程,提出小鼠与人的食管在生理结构上的差别以及实验设计时需注意的问题,为以后的食管癌动物模型研究提供经验和借鉴。

癌及食管癌模型,但未能观察致癌过程中食管管腔内部的大体形态变化。我们尝试无创模拟人食管癌筛查方法,利用食管拉网脱落细胞涂片以及对小鼠离体食管纵向剖开后采用碘染色法,观察早期食管黏膜病变,从病理形态学角度对食管癌的发生过程及伴随的炎症改变进行深入研究。

食管拉网是利用网囊食管细胞采取器获得食管黏膜脱落细胞进行病理细胞学检查的一种简便可靠方法^[23],是我国食管癌高发区普查的重要手段^[24];内镜下食管黏膜碘染色,有助于发现早期食管癌^[25-28],机制为:正常人食管鳞状上皮细胞内及细胞间隙含有大量糖原,糖原遇碘后呈棕色的着色反应。若因肿瘤、炎症等造成食管黏膜细胞内的糖原丧失或减少,呈现不染色或染色不良的区域^[29,30],利用此特点可以鉴别轻微的食管黏膜病变。实验中我们拟通过模拟人食管拉网无创方式及剖开食管进行碘染色以发现小鼠早期食管病变,但由于小鼠食管上皮为很厚的角化鳞状上皮这一有别于人食管的特殊结构,导致棉签无法采集到上皮细胞,涂片结果为红染的角化物;此外,我们以自制微型棉签代替网囊食管细胞采取器进行细胞采集,操作难度较大,不利于细胞采集。在后续的研究中,如能开发动物微型内窥镜技术,更直观观察食管病变情况,将对食管癌动物模型研究具有深远意义。碘染色实验同样因为食管角化,无法通过碘的着色区分出正常黏膜和病变部位。提示食管拉网脱落细胞法、碘染色法不适用于观察小鼠食管鳞癌的早期病变过程。

我们在不同时间点处死小鼠,对食管纵向解剖,肉眼及镜下观察肿瘤的动态发生过程。实验中我们观察到第12周时处理组小鼠体质量开始下降,第16-20周降幅最为明显。第12周处死小鼠,纵向解剖食管后肉眼观察到小鼠食管黏膜粗糙、增厚,镜下可见食管上皮已经发生不典型增生,第16周和第20周我们进一步观察到了小鼠食管经历了原位癌-浸润性鳞癌逐步进展的经典上皮肿瘤发生过程,至第24周时小鼠食管出现肉眼可见的肿物,组织学诊断鳞癌发生率为100%,在整个过程中伴随炎症细胞的浸润,随着时间延长,炎症细胞浸润加剧。陈慧等^[12]仅在第24周时观察到食管早期浸润性鳞癌的发生,而我们提前4 wk观察到食管早期癌前病变的发生,这可能与我们的纵向解剖食管,更直观地观察到食管管腔内部的变化有关。结合小鼠一般情况、体质量、肉眼及组织学变化,该模型在整

体水平生动反应出小鼠体内肿瘤的发展过程,以上结果可能提示第12周之前是4NQO在体内不断诱导DNA发生突变的过程,当突变累积到一定程度时,便启动肿瘤产生,从而真实再现了食管癌发生的动态过程。

正常食管黏膜存在一定数量淋巴细胞、浆细胞等以发挥正常的免疫作用,通过该模型我们发现不典型增生和原位癌时期舌和食管病变区域出现大量炎细胞浸润,发展至浸润性癌时炎症细胞浸润以淋巴细胞为主,随着病变加重,炎症细胞浸润越明显,提示我们肿瘤发生的同时启动了机体免疫系统。大量研究表明^[31-33],炎症是肿瘤发展的重要因素,炎症细胞通过为肿瘤微环境提供多种生物活性分子促进肿瘤进程,因而成为肿瘤发生早期的证据之一。

食管癌动物模型的建立为食管癌治疗提供了重要的研究平台。给药方式的选择对药物的疗效可能会产生不同的后果。值得一提的是,我们在随后的研究中,进行了尾静脉注射给药,但成功率不高,分析其原因,可能因为C57BL/6小鼠尾部角化明显,随着鼠龄延长,角化增厚;且尾静脉行走于尾骨中间。由于其尾巴特殊的生理结构,对幼鼠尚可行尾静脉注射,而成年鼠尾静脉注射比较困难。故进行药物实验时,对需要静脉注射药物的给药方式提出了挑战,需要较高的尾静脉注射技术,这是实验设计必须考虑的问题之一。

总之,利用4NQO构建的C57BL/6小鼠食管鳞状细胞癌疾病动物模型,建模时间短、方法简单、成瘤率高。食管拉网脱落细胞法、碘染色法不适用于食管鳞癌的早期病变观察,病理组织学能更早期观察到食管癌的发生及其炎症改变,从而为以后的动物模型研究提供经验和借鉴。

4 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 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* ; 61: 69-90 [PMID: 21296855 DOI: 10.3322/caac.20107]
- 3 Wheeler JB, Reed CE. Epidemiology of esophageal cancer. *Surg Clin North Am* 2012; 92: 1077-1087 [PMID: 23026270 DOI: 10.1016/j.suc.2012.07.008]
- 4 Holmes RS, Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Semin Radiat Oncol* 2007; 17: 2-9 [PMID: 17185192]
- 5 黄裔腾,殷秀凯,钟雪云,张灏. 食管鳞癌动物模型的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1704-1710
- 6 Opitz OG, Quante M, von Werder A, Heeg S, Blum HE. A mouse model of oral-esophageal carcinogenesis. *Onkologie* 2005; 28: 44-48 [PMID: 15696643]
- 7 Miyamoto S, Yasui Y, Kim M, Sugie S, Murakami

- A, Ishigamori-Suzuki R, Tanaka T. A novel rasH2 mouse carcinogenesis model that is highly susceptible to 4-NQO-induced tongue and esophageal carcinogenesis is useful for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis* 2008; 29: 418-426 [PMID: 18174262 DOI: 10.1093/carcin/bgm225]
- 8 Fong LY, Jiang Y, Rawahneh ML, Smalley KJ, Croce CM, Farber JL, Huebner K. Zinc supplementation suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2011; 32: 554-560 [PMID: 21245412 DOI: 10.1093/carcin/bgr004]
- 9 Wan SG, Taccioli C, Jiang Y, Chen H, Smalley KJ, Huang K, Liu XP, Farber JL, Croce CM, Fong LY. Zinc deficiency activates S100A8 inflammation in the absence of COX-2 and promotes murine oral-esophageal tumor progression. *Int J Cancer* 2011; 129: 331-345 [PMID: 20857495 DOI: 10.1002/ijc.25688]
- 10 Fong LY, Zhang L, Jiang Y, Farber JL. Dietary zinc modulation of COX-2 expression and lingual and esophageal carcinogenesis in rats. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 40-50 [PMID: 15632379]
- 11 Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 301-313 [PMID: 14734483]
- 12 陈慧, 高鑫, 李刚, 王凤鸣, 孙静, 刘柳, 卢斌峰, 张学光. 4NQO诱发C57BL/6小鼠舌癌及食管鳞状细胞癌模型的建立. *苏州大学学报(自然科学版)* 2010; 30: 972-974
- 13 Greenebaum E, Schreiber K, Shu YJ, Koss LG. Use of the esophageal balloon in the diagnosis of carcinomas of the head, neck and upper gastrointestinal tract. *Acta Cytol* 1984; 28: 9-15 [PMID: 6582746]
- 14 杨观瑞. 食管癌筛查和早诊早治研究进展. *中国肿瘤* 2010; 19: 18-23
- 15 张永贞, 王新正, 张铭, 马朝辉, 曹凌, 石樱桃, 许翊. 食管癌高发区内镜碘染色筛查食管癌/贲门癌的5年结果分析. *中国肿瘤* 2012; 21: 32-34
- 16 Fukuhara T, Hiyama T, Tanaka S, Oka S, Yoshihara M, Arihiro K, Chayama K. Natural course of lugol-voiding lesions in patients with superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Digestion* 2010; 82: 60-65 [PMID: 20203512 DOI: 10.1159/000284371]
- 17 Hawkins BL, Heniford BW, Ackermann DM, Leonberger M, Martinez SA, Hendler FJ. 4NQO carcinogenesis: a mouse model of oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1994; 16: 424-432 [PMID: 7960739]
- 18 Silva RN, Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. Placental glutathione S-transferase correlates with cellular proliferation during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Exp Toxicol Pathol* 2007; 59: 61-68 [PMID: 17596925]
- 19 Booth DR. A relationship found between intra-oral sites of 4NQO reductase activity and chemical carcinogenesis. *Cell Tissue Kinet* 1990; 23: 331-340 [PMID: 2117996]
- 20 Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 2006; 42: 655-667 [PMID: 16448841]
- 21 Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A, Mori H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res* 1996; 56: 4904-4909 [PMID: 8895742 DOI: 10.1038/sj.bjc.6605126]
- 21 Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A, Mori H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res* 1996; 56: 4904-4909 [PMID: 8895742]
- 22 Ohne M, Omori K, Kobayashi A, Sakurada Y, Sekigawa K, Mochizuki A, Takaki T, Tachikawa T, Muramatsu H, Nagai Y, Kojo U. Induction of squamous cell carcinoma in the oral cavity of rats by oral administration of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) in drinking water. A preliminary report. *Bull Tokyo Dent Coll* 1981; 22: 85-98 [PMID: 6794920]
- 23 Bird-Lieberman EL, Fitzgerald RC. Early diagnosis of oesophageal cancer. *Br J Cancer* 2009; 101: 1-6 [PMID: 19513070 DOI: 10.1038/sj.bjc.6605126]
- 24 王凤荣, 张祥宏, 严霞, 王俊灵, 李绍森, 林培中, 路灵敏, 孙旭明, 杨永滨, 李月红. 食管癌高发区居民口腔细胞学状况及其与食管脱落细胞学相关性的研究. *肿瘤研究与临床* 2006; 18: 779-781
- 25 张惠晶, 罗纪, 王轶淳, 汪旭, 孙明军. 碘染色在早期食管癌及癌前病变诊治中的价值. *中国内镜杂志* 2010; 16: 459-461
- 26 McMahon J, Devine JC, McCaul JA, McLellan DR, Farrow A. Use of Lugol's iodine in the resection of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2010; 48: 84-87 [PMID: 20031284 DOI: 10.1016/j.bjoms.2009.05.007]
- 27 Tincani AJ, Brandalise N, Andreollo NA, Lopes LR, Montes CG, Altemani A, Martins AS. [Importance of upper digestive endoscopy using lugol dye solution for the diagnosis of superficial esophageal cancer and dysplasia in patients with head and neck neoplasms]. *Arq Gastroenterol* 2000; 37: 107-113 [PMID: 11144012]
- 28 王士杰, 李宏, 单保恩, 丛庆文, 刘鹿宁. 食管癌组织中的糖原和含糖物质的变化及其临床意义. *癌症* 2002; 21: 790-793
- 29 Ghotli ZA, Serra S, Chetty R. Clear cell (glycogen rich) gastric adenocarcinoma: a distinct tubulopapillary variant with a predilection for the cardia/gastro-oesophageal region. *Pathology* 2007; 39: 466-469 [PMID: 17886094]
- 30 Micev M, Cosic-Micev M. [Pathology and pathobiology of the oesophageal carcinoma]. *Acta Chir Iugosl* 2010; 57: 15-26 [PMID: 20954310]
- 31 Liu L, Wang S, Shan B, Shao L, Sato A, Kawamura K, Li Q, Ma G, Tagawa M. IL-27-mediated activation of natural killer cells and inflammation produced antitumour effects for human oesophageal carcinoma cells. *Scand J Immunol* 2008; 68: 22-29 [PMID: 18482209 DOI: 10.1111/j.1365-3083.2008.02111.x]
- 32 Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444 [PMID: 18650914 DOI: 10.1038/nature07205]
- 33 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674 [PMID: 21376230 DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013]

■同行评价

本文实验方法较科学, 结果可信, 结论客观, 具有一定指导价值。

编辑 田滢 电编 闫晋利



胞质转导肽-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin体外诱导HBV转基因小鼠髓源性树突状细胞成熟及在T淋巴细胞增殖中的作用

唐余燕, 余永胜, 卓萌, 臧国庆, 汤正好, 陈小华

■背景资料

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是严重的公共卫生问题, 全球约20亿人曾感染HBV, 其中3.5-4.0亿人为慢性HBV感染, 全球每年约100万人死于与HBV感染相关的肝病。我国属乙型肝炎高发区, 约1.1亿人为慢性HBV感染。

唐余燕, 余永胜, 卓萌, 臧国庆, 汤正好, 陈小华, 上海交通大学附属第六人民医院感染病科 上海市 200233

唐余燕, 硕士, 主要从事病毒性肝炎发病机制及免疫治疗方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 31000414

作者贡献分布: 此课题由陈小华设计; 研究过程由唐余燕与卓萌完成; 数据分析由汤正好、余永胜及臧国庆完成; 本论文写作由唐余燕与陈小华完成。

通讯作者: 陈小华, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属上海市第六人民医院感染病科。chenxiaohua2000@163.com
电话: 021-64369181-8673

收稿日期: 2012-11-30 修回日期: 2012-12-26

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Cytoplasmic transduction peptide-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin induces HBV transgenic mouse bone marrow-derived dendritic cell maturation and T lymphocyte proliferation *in vitro*

Yu-Yan Tang, Yong-Sheng Yu, Meng Zhuo, Guo-Qing Zang, Zheng-Hao Tang, Xiao-Hua Chen

Yu-Yan Tang, Yong-Sheng Yu, Meng Zhuo, Guo-Qing Zang, Zheng-Hao Tang, Xiao-Hua Chen, Department of Infectious Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 31000414

Correspondence to: Xiao-Hua Chen, Department of Infectious Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. chenxiaohua2000@163.com

Received: 2012-11-30 Revised: 2012-12-26

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To investigate the effects of cytoplasmic transduction peptide (CTP)-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin on the maturation of HBV transgenic mouse bone marrow-derived dendritic cells (DCs) and proliferation of T lymphocytes *in vitro*.

METHODS: DCs derived from bone marrow of HBV transgenic mice or C57BL/6 mice were cultured with recombinant granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor and recombinant interleukin-4 for 5 days. The fusion proteins CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin (10 µg/mL), CTP-HBcAg₁₈₋₂₇ (10 µg/mL), HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin (10 µg/mL) or PRMI 1640 were then added into culture medium to induce DC maturation. DC phenotypes were analyzed by flow cytometry. The level of IL-12p70 in supernatants was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The proliferation of T lymphocytes was assessed using cell counting kit-8, and intracellular cytokines in proliferative T cells were analyzed by flow cytometry.

RESULTS: DCs were cultured and identified successfully. DC surface molecules, such as CD80, CD83 and major histocompatibility antigen-I, were up-regulated by treatment with CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin. IL-12p70 level in cells treated with CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin was higher than those in cells treated with CTP-HBcAg₁₈₋₂₇, HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin or medium. Treatment with CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin not only significantly induced T lymphocyte proliferation, but also significantly increased the percentages of IFN-γ⁺CD8⁺ T cells compared to treatment with CTP-HBcAg₁₈₋₂₇, HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin or medium. However, the effects of CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin on DC maturation and T lymphocyte proliferation were more significant when DCs and T lymphocyte were derived from C57BL/6 mice.

CONCLUSION: Molecular chaperone tapasin-modified intracellular antigen peptide could effectively promote the differentiation and maturation of dendritic cells derived from bone marrow cells of HBV transgenic mice and enhance the ability of DCs to stimulate T lymphocyte proliferation and induce cytotoxic T lymphocytes.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Cytoplasmic transduction peptide; HBcAg₁₈₋₂₇; Tapasin; Dendritic cells; T lymphocytes

Tang YY, Yu YS, Zhuo M, Zang GQ, Tang ZH, Chen XH.

■同行评议者

白浪, 副教授, 四川大学华西医院感染性疾病中心

Cytoplasmic transduction peptide-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin induces HBV transgenic mouse bone marrow-derived dendritic cell maturation and T lymphocyte proliferation *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(2): 122-129

摘要

目的: 观察融合蛋白胞质转导肽(cytoplasmic transduction peptide, CTP)-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin体外诱导HBV转基因小鼠髓源性树突状细胞(dendritic cell, DC)成熟和对T淋巴细胞增殖的作用。

方法: 体外分离、培养HBV转基因小鼠及近交系C57BL/6小鼠髓源性DC, 加入重组粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和白介素(interleukin, IL)-4培养5 d, 再加入实验组10 μg/mL CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin、对照组10 μg/mL CTP-HBcAg₁₈₋₂₇、10 μg/mL HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin及空白组RPMI 1640完全培养液。流式细胞术测定DC表面分子CD80、CD83、MHC-1的表达, ELISA法测定DC培养上清液中的IL-12p70的水平, 细胞计数试剂盒(CCK-8)检测T淋巴细胞增殖反应, 流式细胞仪检测增殖的T淋巴细胞内的细胞因子。

结果: 体外成功诱导小鼠髓源性DC; CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin能明显上调DC表面分子CD80、CD83、MHC-1的表达; 并且CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组诱导DC分泌的IL-12p70水平及诱导DC增殖T淋巴细胞增殖能力明显高于对照组及空白组[IL-12p70转基因小鼠($F = 205.85$, $P = 0.000$); C57BL/6小鼠($F = 406.20$, $P = 0.000$)]。流式细胞仪检测实验组融合蛋白诱导的CTL水平也高于对照组[转基因小鼠($F = 155.45$, $P = 0.000$); C57BL/6小鼠($F = 392.90$, $P = 0.000$)], 同时HBV转基因小鼠DC表面分子及在T淋巴细胞增殖中的作用要比C57BL/6小鼠低。

结论: 分子伴侣Tapasin修饰胞内化抗原肽能促进HBV转基因小鼠髓源性DC的分化、成熟, 并能增强DC刺激T淋巴细胞增殖能力及诱导CTL的产生。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 胞质转导肽; HBcAg₁₈₋₂₇; Tapasin; 树突细胞; T淋巴细胞

唐余燕, 余永胜, 卓萌, 臧国庆, 汤正好, 陈小华. 胞质转导肽-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin体外诱导HBV转基因小鼠髓源性树突状细胞成熟及在T淋巴细胞增殖中的作用. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 122-129

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/122.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)感染的控制、转归及病毒清除, 主要取决于宿主的免疫状态, HBcAg₁₈₋₂₇是具有免疫优势的人类白细胞抗原(HLA)-A2限制性特异性CTL表位肽, 在HBV感染中能诱发较强的CTL反应^[1-3]。分子伴侣Tapasin是抗原提呈相关载体蛋白(transporter associated with antigen processing, TAP)的基因产物, 与人类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-I类分子同为免疫球蛋白超家族成员, Tapasin在形成抗原肽MHC/多肽复合物中有重要作用^[4,5]。胞质转导肽(cytoplasmic transduction peptide, CTP)能够有效穿透细胞膜, 高效携带外源性抗原进入细胞内部, 实现细胞亚定位^[6-9]。树突状细胞作为专职抗原递呈细胞是目前发现的激活初始T细胞功能最强的抗原提呈细胞(antigen presenting cell, APC)。研究表明机体对HBV的耐受状态并不是因为淋巴细胞功能缺陷, 而是由于抗原提呈细胞功能缺陷, 特别是DCs功能缺陷引起^[10,11]。本研究利用CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin融合蛋白对体外培养HBV转基因小鼠及C57BL/6小鼠髓源性DCs及其在T淋巴细胞增殖功能的影响进行观察, 探讨分子伴侣Tapasin在诱导免疫激活中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6-HBV ♀ SPF级转基因小鼠, 周龄6-8 wk, 体质量22-26 g, 由中国人民解放军第458医院全军传染病中心提供, ♀ SPF级C57BL/6健康小鼠, 6-8周龄, 22-26 g, 由上海生命科学研究院斯莱克实验动物有限公司提供, 在本院动物实验中心清洁级25℃-27℃条件下饲养。融合蛋白CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin、CTP-HBcAg₁₈₋₂₇及HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin由本课题组构建并保存^[12]。异硫氰酸荧光素(FITC)标志的小鼠单克隆抗体干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)及藻红蛋白(PE)标志的小鼠单克隆抗体CD8α、CD11c、CD80、CD83及MHC-1均购自eBioscience公司; 重组粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子与白介素(interleukin, IL)-4均购自PeproTech公司; IL-12p70 ELISA检测试剂盒为R&D公司产品; 佛波酯、莫能霉素、离子霉素及丝裂霉素C购自Sigma公司; 细胞固定剂和破膜剂购自Invitrogen公司; T细胞尼龙毛柱(Wako公司); 小鼠淋巴细胞分离液(北京康贝源科技有限公司); CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所)。

■ 研发前沿

经典MHC-I类分子在内质网内的装配要求有抗原肽配体和β2m的存在, 而这一过程需要伴侣分子(chaperones)如Tapasin、钙网蛋白(calreticulin, CRT)等的参与。Tapasin在形成抗原肽MHC复合物中有重要作用。

■相关报道

Thirdborough等利用CTL表位肽来免疫Tapasin^{-/-}转基因小鼠和野生型小鼠,结果发现经抗原肽刺激后Tapasin^{-/-}生成特异性CD8⁺细胞的能力明显低于野生型小鼠,提示Tapasin在诱导CTL反应中起重要作用. Boulanger等利用Tapasin^{-/-}转基因小鼠来研究由痘病毒所致的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎,发现Tapasin能促进CTL反应,在病毒免疫作用中是一个有利因素, Tapasin缺乏会造成免疫反应的变化.

1.2 方法

1.2.1 髓源性DC的分离和培养: 小鼠拉颈处死后浸入750 mL/L乙醇中5 min左右, 无菌条件下取出股骨及胫骨, PBS反复冲洗骨髓直至发白, 收集细胞悬液低速离心, 弃上清液收集骨髓细胞; RPMI 1640培养液重悬, 细胞计数, 调整细胞密度为 1×10^6 /mL, 加至6孔板中, 4 h后去除未贴壁细胞, 加含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液, 并加入rmGM-CSF和rmIL-4, 终浓度分别为20 ng/mL和10 ng/mL; 在37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中培养. 隔天半量换液, 并补充细胞因子rmGM-CSF和rmIL-4至原浓度. 倒置显微镜下观察细胞形态和数量变化.

1.2.2 DC的诱导及分组: 本实验分4组: (1)实验组CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; (2)对照组CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; (3)对照组HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; (4)空白组为RPMI 1640培养基. 分别向培养至第5天的DC中加入10 μg/mL融合蛋白和RPMI 1640培养液, 同时加入20 ng/mL rmGM-CSF和10 ng/mL rmIL-4, 37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中培养72 h后, 强力吹打收集DC及培养上清液, -80 °C保存上清液以备检测.

1.2.3 DC表面分子检测: 收集培养到第8天的细胞, 每个标本细胞数约为 1×10^6 /mL, 用PBS洗涤两次, 弃上清; 分别加PE标志的CD80、CD83、CD86及MHC-I, 并设置同型对照管, 4 °C避光作用30 min; PBS洗涤后标本用1%多聚甲醛固定30 min, 流式细胞仪检测.

1.2.4 IL-12p70水平检测: 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测, 将标准品和样本各50 μL依次加入孔中, 每孔分别加入50 μL酶联亲和物, 37 °C温育60 min后弃孔内液体, 用稀释的洗涤液反复冲洗5次后加入显色液, 室温下避光反应15 min, 每孔加入终止液50 μL酶标仪在450 nm测定吸光度(A)值. 通过标准曲线计算出IL-12p70水平.

1.2.5 脾淋巴细胞的制备: 处死C57BL/6小鼠, 无菌条件下取出小鼠脾脏, 在200目筛网中边用注射器活塞轻轻研磨, 边用PBS冲洗, 使脾细胞透过筛网到培养皿中得到脾细胞悬液, 将细胞悬液慢慢加到预先预热的淋巴细胞分离液上层离心, 吸取淋巴细胞层, 再用PBS冲洗两遍, RPMI 1640培养液重悬得到混合淋巴细胞悬液.

1.2.6 T淋巴细胞的制备: 用20 mL培养液平衡T淋巴细胞尼龙毛柱, 再加入15 mL含血清的培养基, 随后关闭弹簧夹; 加入上述制备的混合淋巴细胞悬液, 打开弹簧夹, 再加入1 mL培养基, 关

闭弹簧夹; 覆盖锡箔纸, 37 °C、50 mL/L CO₂培养箱孵育45-60 min; 用950 mL/L乙醇消毒并打开弹簧夹, 加入20 mL含血清的培养基, 收集细胞悬液约1个柱子的体积.

1.2.7 T淋巴细胞增殖反应: 培养至第8天的DC密度调整至 1×10^6 /mL, 加入丝裂霉素, 37 °C水浴30 min作为刺激细胞, T淋巴细胞密度调整至 1×10^6 /mL作为效应细胞, 按效应细胞和刺激细胞分别为5:1、10:1、20:1, 每孔加入 5×10^5 效应细胞, 每组设3复孔, 37 °C、50 mL/L CO₂培养箱孵育72 h, 每孔加CCK-8试剂10 μL, 4 h后酶标仪450 nm波长条件下检测A值.

1.2.8 T细胞内细胞因子检测: 采用流式细胞仪检测, 将分离得到的T淋巴细胞以RPMI 1640调整至 1×10^6 /mL, 25 μg/mL佛波酯、1 μg/mL离子霉素和1.7 μg/mL莫能霉素加入培养液中37 °C、50 mL/L CO₂孵育6 h; PBS洗涤2次后收集细胞, 加入PE-CD8a抗体避光孵育15 min; PBS洗涤2次, 100 μL固定剂作用15 min, PBS洗涤后加入100 μL破膜剂作用5 min, 直接加FITC-IFN-γ抗体, 室温避光孵育30 min; PBS洗涤2次后用500 μL PBS重悬, 流式细胞仪对细胞荧光强度进行检测分析.

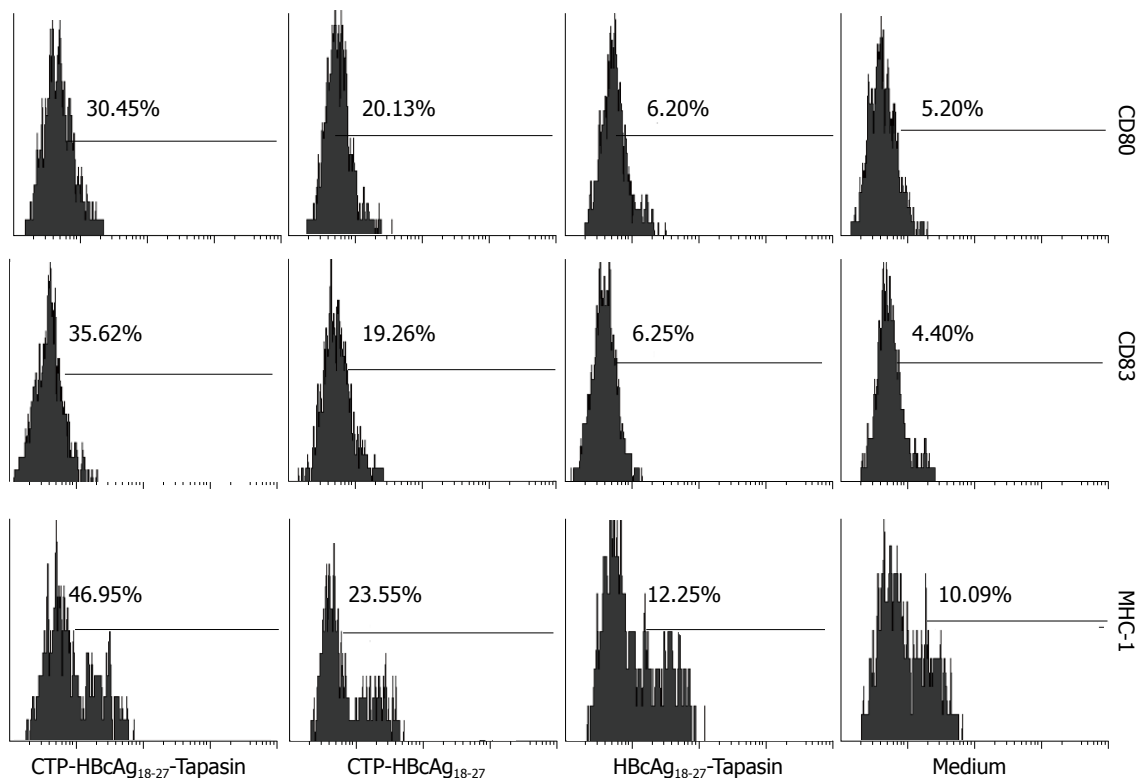
统计学处理 采用SPSS16.0软件进行分析, 数据以mean±SD表示, 多个样本均数间的比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较采用LSD法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 DC表型检测 为了解融合蛋白诱导DC后对其表面分子的影响, 采用流式细胞仪分析, 流式细胞仪显示收集的DC表面分子CD11c为70%-80%, HBV转基因小鼠及C57BL/6小鼠, 融合蛋白CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin诱导表面分子CD80、CD83及MHC-I明显高于对照组及空白组(转基因小鼠 $F = 1777.00$ 、 $F = 657.50$ 及 $F = 281.53$, 均 $P < 0.05$; C57BL/6小鼠 $F = 70.07$ 、 $F = 128.15$ 及 $F = 1052.00$, 均 $P < 0.05$) (图1, 2, 表1, 2).

2.2 DC培养上清液中IL-12p70水平检测 了解DC成熟程度还需了解其分泌IL-12p70水平, 采用ELISA法测定, HBV转基因小鼠及C57BL/6小鼠, 实验组CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin培养上清液IL-12p70水平都明显高于对照组及空白组[转基因小鼠($F = 205.85$, $P = 0.000$); C57BL/6小鼠($F = 406.20$, $P = 0.000$)] (图3, 4, 表3).

2.3 T淋巴细胞增殖反应检测 在不同效应细胞与刺激细胞比例下, C57BL/6小鼠和HBV转基



■创新盘点
本研究利用CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin融合蛋白对体外培养HBV转基因小鼠及C57BL/6小鼠髓源性DCs及其在T淋巴细胞增殖功能的影响进行观察,探讨分子伴侣Tapasin在诱导免疫激活中的作用,为慢性乙型肝炎患者的免疫治疗提供新的思路。

图1 HBV转基因小鼠树突状细胞表面分子检测。

表1 HBV转基因小鼠树突状细胞表面分子百分比检测 (%)

分组	CD80	CD83	MHC-1
1组	30.35 ± 0.75 ^{ace}	32.93 ± 1.64 ^{ace}	45.87 ± 21.03 ^{ace}
2组	20.35 ± 0.60 ^{ac}	19.38 ± 0.70 ^{ac}	23.82 ± 0.29 ^{ac}
3组	6.14 ± 0.22	6.26 ± 0.60	12.42 ± 0.63
4组	5.12 ± 0.12	4.38 ± 0.82	8.05 ± 3.26

1: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 2: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; 3: HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 4: 空白组。^a*P* < 0.05 vs 空白组; ^c*P* < 0.05 vs HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组; ^e*P* < 0.05 vs CTP-HBcAg₁₈₋₂₇组。

因小鼠, 实验组CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin对同种系小鼠T淋巴细胞增殖作用最强(转基因小鼠 $F = 29.96$ 、 $F = 90.25$ 及 $F = 103.07$, 均 $P < 0.05$; C57BL/6小鼠 $F = 11.4$ 、 $F = 10.87$ 及 $F = 15.74$, 均 $P < 0.05$), 且效应细胞与刺激细胞在5:1时增殖作用最强, 分别高于对照组CTP-HBcAg₁₈₋₂₇、HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin及空白组(均 $P < 0.05$)(图5, 6)。

2.4 T淋巴细胞内细胞因子检测 为了观察C57BL/6正常小鼠及HBV转基因小鼠的不同组蛋白致敏DC后对CD8 α /IFN- γ 双阳性细胞比例的影响, 采用流式细胞仪对细胞进行CD8 α 和IFN- γ 双标检测, 结果刺激后的T淋巴细胞中产生IFN- γ 的CTL数量在实验组CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin最高分别高于对照组及空白组[转基因小鼠($F =$

155.45, $P = 0.000$); C57BL/6小鼠($F = 392.90$, $P = 0.000$)](图7, 8, 表4)。

3 讨论

HBV慢性感染者中DC抗原提呈能力低下, 表达于DC表面的共刺激分子明显低于正常者, 刺激T淋巴细胞特异性增殖反应能力下降, 能够诱导T淋巴细胞向Th1分化的IL-12、IFN- γ 分泌减少, 因而造成细胞免疫反应低下、病毒持续感染^[13-16]。Kurose等^[10]用HBV转基因小鼠模型研究HBV感染后机体免疫耐受状态和DC的关系, 发现机体对HBV的耐受状态并不是因为淋巴细胞功能缺陷, 而是由于抗原提呈细胞功能缺陷, 特别是DCs功能缺陷引起。CTP为蛋白转

■应用要点

本文证实了分子伴侣Tapasin修饰胞内化抗原肽(HBcAg₁₈₋₂₇)能明显促进HBV转基因小鼠及C57BL/6小鼠DC表面分子上调,提高IL-12p70的水平,并有效刺激T淋巴细胞增殖及增加特异性CTL的表达的作用,证实Tapasin在免疫激活中的重要作用,为进一步研究该融合蛋白诱导特异性CTL抑制HBV复制的体内研究提供理论依据。

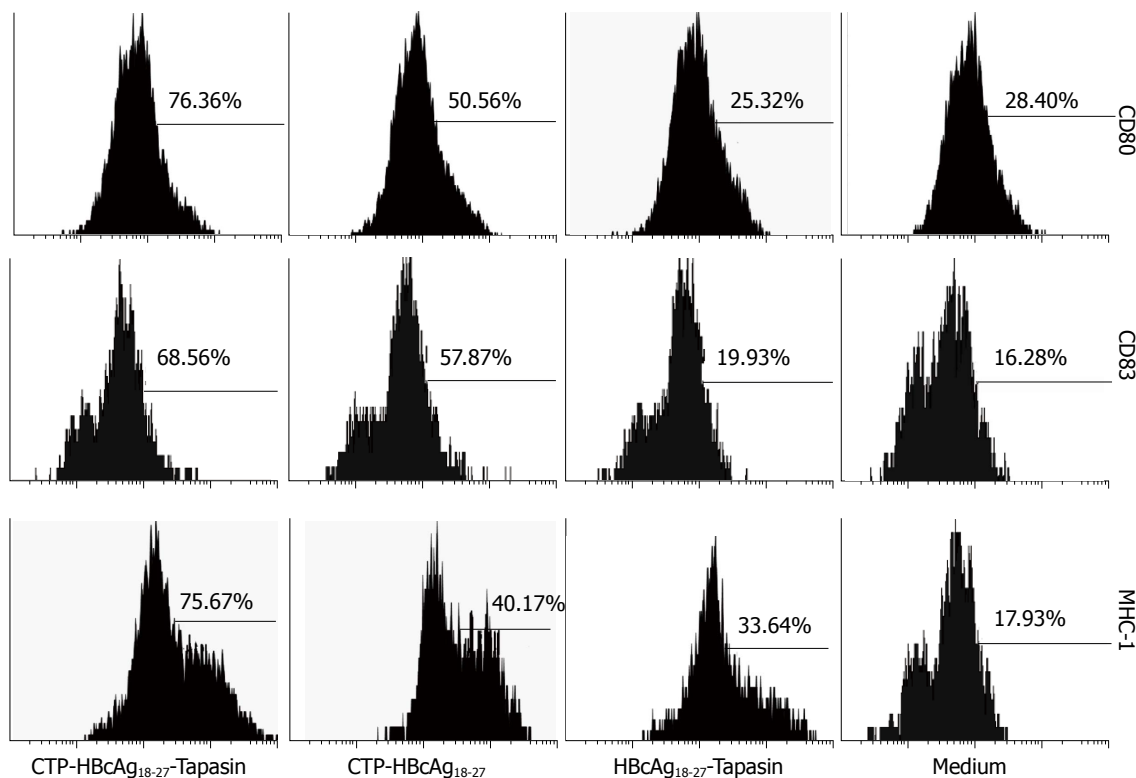


图2 C57BL/6小鼠树突状细胞表面分子检测。

表2 C57BL/6小鼠树突状细胞表面分子百分比检测 (%)

分组	CD80	CD83	MHC-I
1组	76.48 ± 0.58 ^{a,c}	68.08 ± 0.83 ^{a,c}	74.56 ± 0.97 ^{a,c}
2组	49.54 ± 0.88 ^{a,c}	55.22 ± 2.71 ^{a,c}	40.02 ± 0.41 ^{a,c}
3组	25.14 ± 0.17	19.54 ± 0.85	33.48 ± 1.28
4组	22.08 ± 10.41	20.22 ± 6.95	17.79 ± 1.95

1: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 2: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; 3: HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 4: 空白组。**P* < 0.05 vs 空白组; ^a*P* < 0.05 vs HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组; ^c*P* < 0.05 vs CTP-HBcAg₁₈₋₂₇组。

导域PTD(protein transduction domain)的衍生体, 诸多研究证实, PTD及其衍生体能够有效穿透细胞膜, 高效携带外源性抗原进入细胞内部, 实现细胞亚定位, 通过MHC-I类分子途径提呈, 诱导特异性CTL, 从而发挥抗肿瘤、抗病不良反应^[17-19]。HBcAg₁₈₋₂₇为具有免疫优势的HLA-A2限制性CTL表位肽, 在90%HLA-A2阳性的急性自限性HBV感染者中能诱发强大的CTL反应^[20-22]。经典MHC-I类分子在内质网内的装配要求有抗原肽配体和β2m的存在, 而这一过程需要伴侣分子(chaperones)如Tapasin、钙网蛋白(calreticulin, CRT)等的参与。Tapasin在形成抗原肽MHC复合物中有重要作用, 近年来一些研究发现某些肿瘤、病毒、及自身免疫性疾病的发生与Tapasin的表达下降有关^[23-25]。

前期研究中, 我们已经成功构建CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin融合基因质粒, 融合蛋白表达纯化后证明其具有DC胞膜穿透能力并有效定位于胞质。在此基础上, 为进一步探讨该融合蛋白对DC免疫功能的影响, 我们进行了体外培养HBV转基因小鼠及C57BL/6小鼠髓源性DC, 我们的实验显示, CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin能明显上调细胞表面标志物的水平及提高细胞表面标志物及IL-12p70的水平, 证实其促进DC成熟的能力, 未成熟DC表面的MHC分子及其他分子(CD80、CD83)表达水平低下, DC成熟后细胞表面的MHC分子及其刺激分子的表达明显升高, CD83是DC成熟的标志, 成熟的DC分泌高水平的IL-12, IL-12是促进T细胞活化增殖的重要细胞因子之一, IL-12p70是IL-12的家族成员。并

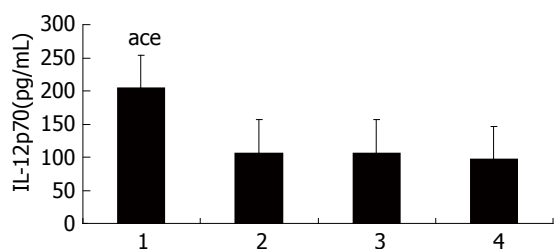


图3 HBV转基因小鼠树突状细胞上清液中IL-12p70水平的检测。1: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 2: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; 3: HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 4: 空白组。^a*P*<0.05 vs 空白组; ^c*P*<0.05 vs HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组; ^b*P*<0.05 vs CTP-HBcAg₁₈₋₂₇组。

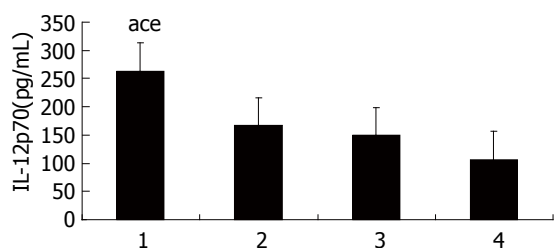


图4 C57BL/6小鼠树突状细胞上清液中IL-12p70水平的检测。1: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 2: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; 3: HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 4: 空白组。^a*P*<0.05 vs 空白组; ^c*P*<0.05 vs HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组; ^b*P*<0.05 vs CTP-HBcAg₁₈₋₂₇组。

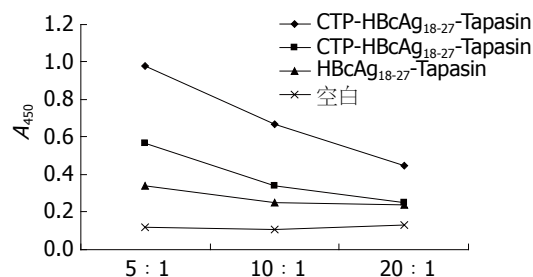


图5 HBV转基因小鼠不同培养的树突状细胞在效应细胞与刺激细胞不同比例时对T淋巴细胞的增殖作用。

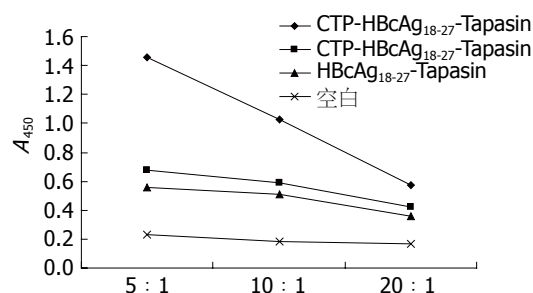


图6 C57BL/6小鼠不同培养的树突状细胞在效应细胞与刺激细胞不同比例时对T淋巴细胞的增殖作用。

采用尼龙毛柱分离法分离T淋巴细胞, 尼龙毛柱分离法利用了尼龙毛对B淋巴细胞的亲和力, 使T淋巴细胞达到足够的纯度。增殖实验中先将成熟的DC用丝裂霉素C处理, 目的是为了排除DC本身的增殖带来的干扰, 使实验测得的结果

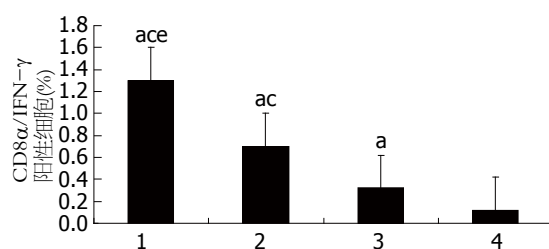


图7 流式细胞术检测HBV转基因小鼠不同组别CD8α/IFN-γ双阳性细胞数百分比(%). 1: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 2: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; 3: HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 4: 空白组。^a*P*<0.05 vs 空白组; ^c*P*<0.05 vs HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组; ^b*P*<0.05 vs CTP-HBcAg₁₈₋₂₇组。

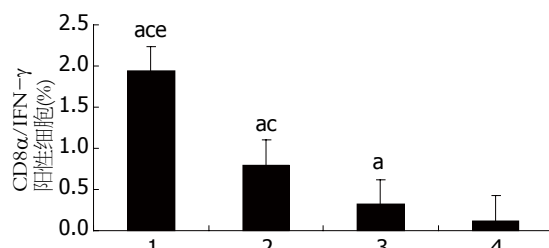


图8 流式细胞术检测C57BL/6小鼠不同组别CD8α/IFN-γ双阳性细胞数百分比(%). 1: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 2: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; 3: HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 4: 空白组。^a*P*<0.05 vs 空白组; ^c*P*<0.05 vs HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组; ^b*P*<0.05 vs CTP-HBcAg₁₈₋₂₇组。

为小鼠脾淋巴细胞的单向增殖。CCK-8法检测T淋巴细胞增殖能力也证实了CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组高于其他对照组。流式细胞仪对T淋巴细胞进行CD8α和IFN-γ双标检测, CD8α和IFN-γ双阳性的为表达IFN-γ的CTL, 结果显示CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin刺激后的淋巴细胞中产生IFN-γ的CTL数量明显高于对照组, 提示Tapasin有利于MHC-I提呈, 但CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin诱导HBV转基因小鼠DC表面分子成熟及在T淋巴细胞增殖中的作用要比C57BL/6小鼠低, 提示HBV转基因小鼠DC功能可能存在缺陷。本实验以正常小鼠为对照, 通过流式细胞仪检测HBV转基因小鼠树突状细胞表面分子表达明显低于正常小鼠, 这与HBV转基因小鼠DC刺激淋巴细胞增殖能力和诱导CTL低下相一致。Farag等^[26]利用HBVsvp和LPS来刺激C57BL/6小鼠DC然后免疫转基因小鼠, 结果显示实验组转基因小鼠CD4⁺T淋巴细胞比空白组高, 并且HBsAg和HBV DNA水平比空白组低。表明DC抗原提呈功能在清除HBV中起着至关重要的作用, Tapasin作为MHC-I类分子与TAP之间的桥梁, 可增强抗原肽与MHC-I类分子的结合能力, 并促进抗原提呈细胞(antigen presenting

同行评价

本研究实验设计合理, 试验方法正确, 结果令人鼓舞, 将会对将来应用于临床提高HBV清除率提供新的思路和途径。

表 3 DC培养上清液中IL-12p70水平检测 (pg/mL)

分组	HBV转基因小鼠	C57BL/6小鼠
1组	203.89 ± 7.19 ^{abc}	263.25 ± 6.90 ^{abc}
2组	106.59 ± 3.82	166.63 ± 7.23
3组	106.53 ± 3.19	149.23 ± 4.91
4组	96.76 ± 8.50	106.55 ± 2.35

1: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 2: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; 3: HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 4: 空白组. ^a*P*<0.05 vs 空白组; ^b*P*<0.05 vs HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组; ^c*P*<0.05 vs CTP-HBcAg₁₈₋₂₇组.

表 4 流式细胞术检测不同组别CD8α/IFN-γ双阳性细胞数百分比 (%)

分组	HBV转基因小鼠	C57BL/6小鼠
1组	1.33 ± 0.11 ^{abc}	1.84 ± 0.09 ^{abc}
2组	0.73 ± 0.05 ^{bc}	0.75 ± 0.06 ^{bc}
3组	0.32 ± 0.19 ^a	0.35 ± 0.09 ^a
4组	0.11 ± 0.24	0.12 ± 0.01

1: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 2: CTP-HBcAg₁₈₋₂₇; 3: HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin; 4: 空白组. ^a*P*<0.05 vs 空白组; ^b*P*<0.05 vs HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin组; ^c*P*<0.05 vs CTP-HBcAg₁₈₋₂₇组.

cells, APCs)表面MHC/多肽复合物的表达^[27-29]. 近来有研究人员利用Tapasin结合表位肽来增强特异性CTL反应以抑制病毒复制及肿瘤细胞生长. Thirdborough等^[30]利用CTL表位肽来免疫Tapasin^{-/-}转基因小鼠和野生型小鼠, 结果发现经抗原肽刺激后Tapasin^{-/-}生成特异性CD8⁺细胞的能力明显低于野生型小鼠, 提示Tapasin在诱导CTL反应中起重要作用. Boulanger等^[31]利用Tapasin^{-/-}转基因小鼠来研究由痘病毒所致的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎, 发现Tapasin能促进CTL反应, 在病毒免疫作用中是一个有利因素, Tapasin缺乏会造成免疫反应的变化. 我们的实验结果与上述实验一致, 分子伴侣Tapasin能明显增强抗原肽刺激DCs成熟并诱导特异性CTLs的能力.

本实验证实了分子伴侣Tapasin修饰胞内化抗原肽(HBcAg₁₈₋₂₇)能明显促进HBV转基因小鼠及C57BL/6小鼠DC表面分子上调, 提高IL-12p70的水平, 并有效刺激T淋巴细胞增殖及增加特异性CTL的表达, 证实Tapasin在免疫激活中的重要作用. 基于以上结果, 为进一步研究该融合蛋白诱导特异性CTL抑制HBV复制的体内研究提供理论依据.

4 参考文献

- Shi TD, Wu YZ, Jia ZC, Zou LY, Zhou W. Therapeutic polypeptides based on HBV core 18-27 epitope can induce CD8⁺ CTL-mediated cytotoxicity in HLA-A2⁺ human PBMCs. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1902-1906 [PMID: 15222033]
- Williams R. Global challenges in liver disease. *Hepatology* 2006; 44: 521-526 [PMID: 16941687]
- Phillips S, Chokshi S, Riva A, Evans A, Williams R, Naoumov NV. CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *J Immunol* 2010; 184: 287-295 [PMID: 19949099 DOI: 10.4049/jimmunol.0902761]
- Howarth M, Williams A, Tolstrup AB, Elliott T. Tapasin enhances MHC class I peptide presentation according to peptide half-life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11737-11742 [PMID: 15286279]
- Sadegh-Nasseri S, Chen M, Narayan K, Bouvier M. The convergent roles of tapasin and HLA-DM in antigen presentation. *Trends Immunol* 2008; 29: 141-147 [PMID: 18261958 DOI: 10.1016/j.it.2008.01.001.]
- Morón G, Dadaglio G, Leclerc C. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol* 2004; 25: 92-97 [PMID: 15102368]
- Shibagaki N, Udey MC. Dendritic cells transduced with TAT protein transduction domain-containing tyrosinase-related protein 2 vaccinate against murine melanoma. *Eur J Immunol* 2003; 33: 850-860 [PMID: 12672050]
- Chen X, Lai J, Pan Q, Tang Z, Yu Y, Zang G. The delivery of HBcAg via Tat-PTD enhances specific immune response and inhibits Hepatitis B virus replication in transgenic mice. *Vaccine* 2010; 28: 3913-3919 [PMID: 20394723 DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.03.070.]
- Kim D, Jeon C, Kim JH, Kim MS, Yoon CH, Choi IS, Kim SH, Bae YS. Cytoplasmic transduction peptide (CTP): new approach for the delivery of biomolecules into cytoplasm in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 2006; 312: 1277-1288 [PMID: 16466653]
- Kurose K, Akbar SM, Yamamoto K, Onji M. Production of antibody to hepatitis B surface antigen (anti-HBs) by murine hepatitis B virus carriers: neonatal tolerance versus antigen presentation by dendritic cells. *Immunology* 1997; 92: 494-500 [PMID: 9497491]
- Woltman AM, Op den Brouw ML, Biesta PJ, Shi CC, Janssen HL. Hepatitis B virus lacks immune activating capacity, but actively inhibits plasmacytoid dendritic cell function. *PLoS One* 2011; 6: e15324 [PMID: 21246041 DOI: 10.1371/journal.pone.0015324.]
- 刘红红, 陈小华, 周丽芹, 刘雪妮, 余永胜, 臧国庆, 汤正好. CTP-HBcAg₁₈₋₂₇-Tapasin融合蛋白胞内转导功能的检测. *中国临床药理学与治疗学* 2012; 17: 25-29
- Hasebe A, Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Onji M. Impaired functional capacities of liver dendritic cells from murine hepatitis B virus (HBV) carriers: relevance to low HBV-specific immune responses. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 35-42 [PMID: 15606611]
- Chen W, Shi M, Shi F, Mao Y, Tang Z, Zhang B, Zhang H, Chen L, Chen L, Xin S, Wang FS. HBcAg-pulsed dendritic cell vaccine induces Th1 polarization and production of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Hepatol Res* 2009; 39: 355-365 [PMID: 19889049 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2008.00468.x.]

- 15 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129 [PMID: 15014185]
- 16 Chen JH, Yu YS, Chen XH, Liu HH, Zang GQ, Tang ZH. Enhancement of CTLs induced by DCs loaded with ubiquitinated hepatitis B virus core antigen. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1319-1327 [PMID: 22493545 DOI: 10.3748/wjg.v18.i12.1319.]
- 17 Parcej D, Tampé R. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat Chem Biol* 2010; 6: 572-580 [PMID: 20644544 DOI: 10.1038/nchembio.410.]
- 18 Tey SK, Khanna R. Host immune system strikes back: Autophagy-mediated antigen presentation bypasses viral blockade of the classic MHC class I processing pathway. *Autophagy* 2012; 8: 1839-1841 [PMID: 22932396 DOI: 10.4161/auto.21860.]
- 19 Säälik P, Elmquist A, Hansen M, Padari K, Saar K, Viht K, Langel U, Pooga M. Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. A comparative study. *Bioconjug Chem* 2004; 15: 1246-1253 [PMID: 15546190]
- 20 Liu J, Chen KY, Ren EC. Structural insights into the binding of hepatitis B virus core peptide to HLA-A2 alleles: towards designing better vaccines. *Eur J Immunol* 2011; 41: 2097-2106 [PMID: 21538979 DOI: 10.1002/eji.201041370.]
- 21 Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2012; 96: 59-64 [PMID: 22884884 DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.07.011.]
- 22 Li J, Han YP, Liu B, Liu Y, Chen N, Dong L, Yan YD, Jiang LF, Huang ZH. [Dynamic changes and clinical significance of HBcAg₁₈₋₂₇ specific cytotoxic T lymphocytes in acute hepatitis B patients]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2011; 19: 38-43 [PMID: 21272457 DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2011.01.011.]
- 23 Halenius A, Hauka S, Dölken L, Stindt J, Reinhard H, Wiek C, Hanenberg H, Koszinowski UH, Momberg F, Hengel H. Human cytomegalovirus disrupts the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex and inhibits tapasin gene transcription. *J Virol* 2011; 85: 3473-3485 [PMID: 21248040 DOI: 10.1128/JVI.01923-10.]
- 24 Chen M, Bouvier M. Analysis of interactions in a tapasin/class I complex provides a mechanism for peptide selection. *EMBO J* 2007; 26: 1681-1690 [PMID: 17332746]
- 25 Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 823-836 [PMID: 22076556 DOI: 10.1038/nri3084.]
- 26 Farag MM, Tedjokusumo R, Flechtenmacher C, Asen T, Stremmel W, Müller M, Protzer U, Weigand K. Immune tolerance against HBV can be overcome in HBV transgenic mice by immunization with dendritic cells pulsed by HBVsvp. *Vaccine* 2012; 30: 6034-6039 [PMID: 22867720 DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.07.057.]
- 27 Praveen PV, Yaneva R, Kalbacher H, Springer S. Tapasin edits peptides on MHC class I molecules by accelerating peptide exchange. *Eur J Immunol* 2010; 40: 214-224 [PMID: 20017190 DOI: 10.1002/eji.200939342]
- 28 Hulpke S, Baldauf C, Tampé R. Molecular architecture of the MHC I peptide-loading complex: one tapasin molecule is essential and sufficient for antigen processing. *FASEB J* 2012; 26: 5071-5080 [PMID: 22923333 DOI: 10.1096/fj.12-217489.]
- 29 Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 1996; 5: 103-114 [PMID: 8769474]
- 30 Thirdborough SM, Roddick JS, Radcliffe JN, Howarth M, Stevenson FK, Elliott T. Tapasin shapes immunodominance hierarchies according to the kinetic stability of peptide-MHC class I complexes. *Eur J Immunol* 2008; 38: 364-369 [PMID: 18196518 DOI: 10.1002/eji.200737832.]
- 31 Boulanger DS, Oliveira R, Ayers L, Prior SH, James E, Williams AP, Elliott T. Absence of tapasin alters immunodominance against a lymphocytic choriomeningitis virus polytope. *J Immunol* 2010; 184: 73-83 [PMID: 19949070 DOI: 10.4049/jimmunol.0803489]

编辑 田滢 电编 闫晋利



培菲康对高脂饮食诱导脂肪肝病大鼠肠黏膜屏障的保护作用

张智, 单庆文, 王琳琳, 吕自力, 江玲, 黄永二

■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是目前世界上最为普遍的肝脏疾病之一, 国内外发病率呈明显上升趋势。NAFLD临床上包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(NASH)和脂肪性肝硬化3种类型。其中, NASH可能进展为肝纤维化甚至肝硬化, 发生机制尚不明确。

张智, 单庆文, 王琳琳, 江玲, 黄永二, 广西医科大学第一附属医院儿科 广西壮族自治区南宁市 530021

吕自力, 广西医科大学第一附属医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530021

张智, 主要从事儿童消化疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由单庆文指导; 张智与单庆文设计; 研究过程由张智、王琳琳、江玲及黄永二完成; 病理分析由吕自力完成; 研究经费由单庆文提供; 数据分析与论文写作由张智完成。

通讯作者: 单庆文, 主任医师, 530021, 广西南宁市双拥路6号, 广西壮族自治区南宁市广西医科大学第一附属医院儿科。shanqw333@yahoo.com.cn

电话: 0771-5356505

收稿日期: 2012-11-19 修回日期: 2012-12-31

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Effect of Bifidobacterium triple viable capsule on intestinal mucosal barrier function in rats with fatty liver induced by a high-fat diet

Zhi Zhang, Qing-Wen Shan, Lin-Lin Wang, Zi-Li Lv, Ling Jiang, Yong-Er Huang

Zhi Zhang, Qing-Wen Shan, Lin-Lin Wang, Ling Jiang, Yong-Er Huang, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Zi-Li Lv, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Qing-Wen Shan, Chief Physician, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. shanqw333@yahoo.com

Received: 2012-11-19 Revised: 2012-12-31

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To investigate the potential preventive effect of Bifidobacterium triple viable capsule (Bifico) on intestinal microflora and the expression of IL-17 and occludin proteins in ileum mucosa in rats with non-alcoholic fatty liver disease NAFLD induced by a high-fat diet.

METHODS: Thirty-four male Sprague-Dawley rats were divided into three groups and were given a high-fat diet (group I, $n = 12$), a high-

fat diet and Bifico (group II, $n = 12$), and an ordinary diet (group III, $n = 10$). Rats of group II were given Bifico gavage, while the other two groups were given the same amount of normal saline. Seventeen weeks later, the rats were killed for having a liver biopsy to confirm whether NAFLD was successfully induced. The 16S RNA method was used to detect the numbers of three main types of bacteria in the intestinal tract. The ultrastructure of ileum tissue was observed by electron microscopy, and the expression of occludin and IL-17 proteins was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared to group III, there was a significant increase in the number of *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, and *Bifidobacteria*, and expression of occludin in groups I and II (all $P < 0.05$). There was no significant difference in the number of *Lactobacillus* and expression of occludin between groups I and II. The expression of IL-17 differed significantly between the three groups (all $P < 0.05$). Electron microscopy indicated that intestinal epithelial cells in rats given a high-fat diet showed a series of pathological injuries (e.g., hydropsia and necrosis), and the use of Bifico could relieve intestinal epithelial injury.

CONCLUSION: Bifico exerts a preventive effect on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high-fat in rats possibly by protecting the intestinal mucosal barrier.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Rats; Fatty liver; Intestinal microflora

Zhang Z, Shan QW, Wang LL, Lv ZL, Jiang L, Huang YE. Effect of Bifidobacterium triple viable capsule on intestinal mucosal barrier function in rats with fatty liver induced by a high-fat diet. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 130-137

摘要

目的: 观察培菲康对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease,

■同行评议者

沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

NAFLD)肠道菌群的干预作用及紧密连接蛋白occludin、白介素(interleukin, IL)-17在回肠黏膜上表达的影响。

方法: ♂ SD大鼠34只分为高脂饮食组(I组, $n = 12$), 高脂饮食+培菲康干预组(II组, $n = 12$), 普通饮食组(III组, $n = 10$)。II组予培菲康灌胃, 余下两组分别给予相同剂量生理盐水灌胃。于喂养17 wk处死各组大鼠, 肝脏组织病理表现提示NAFLD模型成功建立。采用16S RNA方法检测3组大鼠肠道3种主要细菌数量; 采用透射电镜观察回肠组织超微结构; 免疫组织化学方法观察回肠黏膜occludin蛋白及IL-17量的表达变化。

结果: (1) I组、II组较III组: 肠道3种细菌数量及紧密连接蛋白occludin表达差异均有显著性($P < 0.05$); (2) I组较II组: 乳酸杆菌数量、蛋白occludin表达量差异无显著性; (3) IL-17表达在3组间差异有显著性(36.289 ± 30.540 vs 9.646 ± 14.530 vs 2.609 ± 5.850); 此外, 透射电镜下观察到I组大鼠肠上皮细胞水肿, 绒毛排列紊乱, 线粒体肿胀、疏松化明显, 并出现坏死细胞, 而经培菲康干预后的大鼠肠上皮损伤减轻。

结论: 培菲康对高脂饮食诱导大鼠NAFLD有一定预防作用, 其作用可能与保护高脂饮食引起的肠黏膜屏障损伤有关。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: SD大鼠; 脂肪肝; 肠道菌群

张智, 单庆文, 王琳琳, 吕自力, 江玲, 黄永二. 培菲康对高脂饮食诱导脂肪肝病大鼠肠黏膜屏障的保护作用. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 130-137

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/130.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是我国乃至世界范围内普遍的肝脏性疾病之一, 也是造成慢性肝功能异常的重要原因^[1], 其具体机制不明。大量实验研究表明, NAFLD与肠道菌群之间存在密切联系^[2]。本研究以预防为起点, 通过观察双歧杆菌三联活菌胶囊(培菲康)对NAFLD大鼠肠道菌群的调节作用及对肠道炎症变化的影响, 探讨NAFLD与肠道菌群、肠道黏膜occludin蛋白及肠道炎性因子白介素(interleukin, IL)-17表达之间的关系和相互作用, 为今后的研究提供一定思路。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SPF级SD大鼠34只, 体质量130-160 g, 由广西医科大学实验动物中心提供。高脂饲料由82.5%普通饲料、2%胆固醇、10%猪油、5%蛋黄粉、0.5%三号胆盐组成^[3]。培菲康(上海信谊制药厂)、胆固醇(上海国药集团化学试剂有限公司)、三号胆盐(北京奥博星生物技术有限公司)、猪油、蛋黄粉自制; 荧光染料SYBR Green I (美国罗氏公司)、粪便细菌基因组DNA提取试剂盒离心柱型(北京天根); 兔抗大鼠IL-17单克隆抗体、兔抗occludin多克隆抗体(美国abcam公司); SP试剂盒(北京中杉金桥)。

1.2 方法

1.2.1 脂肪肝动物模型制备: 适应性喂养1 wk后, 大鼠完全随机分成3组, 高脂饮食组(I组, $n = 12$), 高脂饮食+培菲康灌胃组(II组, $n = 12$), 普通饮食组(III组, $n = 10$)。III组继续喂予普通饲料, I、II组均予以高脂饲料喂养, 同时II组给予双歧杆菌三联活菌胶囊(商品名培菲康, 含双歧杆菌、乳酸杆菌和肠球菌, 规格每粒210 mg, 含活菌量1亿以上)灌胃, 剂量为280 mg/kg, I、III组大鼠予以相同剂量生理盐水灌胃。大鼠每周称体质量一次, 共喂养17 wk。

1.2.2 动物处理: 于造模第17 wk处死各组大鼠。大鼠隔夜禁食, 次日称体质量后, 以2%戊巴比妥钠0.5 mL/100 g腹腔注射麻醉, 迅速取出肝脏, 称质量后于肝右叶中部切取小块组织, 以10%多聚甲醛固定, 行HE染色和masson染色观察基本组织学变化, 余下组织置于液氮罐内备用。取盲肠内容物5 g置于2 mL无菌离心管内, 用于细菌定量检测; 在回肠末端2 cm处切取一段1.5 cm肠管, 分成两段, 一段1 cm置于10%多聚甲醛中固定, 用于HE染色和免疫组织化学染色, 另一段0.5 cm置于戊二醛溶液中固定, 用于电镜标本制作。

1.2.3 观察指标及方法: (1)每日观察记录大鼠基本行为学及摄食、饮水变化。麻醉后, 迅速取出肝脏, 称湿质量, 计算肝指数(肝湿质量/体质量 $\times 100\%$); (2)肝功能及血清脂质变化: 腹主动脉采血2 mL, 分离血清检测谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、胆固醇(cholesterol, CHO)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)等, 采用全自动生化分析仪测定; (3)肝、肠组织病理学检测: 将取下的肝、肠组织标本用10%多聚甲醛溶液固定后, 常规脱水, 包埋, 制作成4 μm 厚切片, 肝、肠组织行HE染色; 同时

■ 研发前沿

益生菌制剂可通过调整肠道菌群减轻肠道炎症反应, 进一步减轻肝脏炎症反应。这一发现为临床预防和治疗NAFLD提供了一种可能的途径。

■相关报道

Hawrelak等发现, 高脂饮食诱导的脂肪肝小鼠经口服8 wk的乳杆菌PL60治疗后, 小鼠表现出明显的抗肥胖效应, 同时肝脏炎症评分标准显著降低, 肝功能得到有效改善。

表 1 喂养17 wk时各组大鼠体重、血生化指标、肝指数的比较 (mean ± SD)

分组	n	体重(g)	AST(U/L)	ALT(U/L)	CHO(mmol/L)	LDL(mmol/L)	肝指数(%)
I 组	12	541.43 ± 51.03 ^a	226.00 ± 111.65 ^b	102.0 ± 66.92 ^a	2.51 ± 0.48 ^b	0.51 ± 0.14 ^b	3.98 ± 0.01 ^b
II 组	12	550.17 ± 42.95 ^a	224.33 ± 87.56 ^a	110.33 ± 77.50 ^a	2.0 ± 0.30 ^{bd}	0.41 ± 0.92 ^{bd}	3.55 ± 0.01 ^{cd}
III 组	10	490.90 ± 22.63	110.25 ± 31.32	35.78 ± 5.63	1.24 ± 0.19	0.91 ± 0.03	2.17 ± 0.01
F		5.93	5.03	4.26	29.21	21.70	39.83

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs III 组, ^dP<0.01 vs I 组. AST: 谷草转氨酶; ALT: 谷丙转氨酶; CHO: 总胆固醇; LDL: 低密度脂蛋白。

对肝脏行masson染色, 光镜下评估脂肪变性、炎症活动和纤维化情况. 肝细胞脂肪变性的程度判断标准炎症活动度计分参照Kleiner等^[4]提出的脂肪变性和脂肪肝炎评分标准; (4)肠组织超微结构观察: 取肠组织块切成约1 mm³后, 用2.5%戊二醛前固定, 1%锇酸后固定, 漂洗, 逐级脱水、浸透、固化, 超薄切片机切片70 nm, 枸橼酸铅染色, 在H-7650透射电镜下观察肠黏膜上皮细胞及细胞外基质的超微结构变化; (5)肠组织occludin蛋白、IL-17检测: 紧密连接蛋白occludin蛋白及IL-17免疫组织化学染色采用二步法: 石蜡切片常规脱蜡水化, 蛋白酶K 37 °C消化10 min, PBS冲洗, 一抗4 °C过夜, PBS冲洗, 二抗抗体37 °C 30 min, PBS冲洗. DAB显色, 镜下控制显色时间, PBS代替一抗作空白对照. 最后结果利用Image-Pro Plus 6.0病理图像分析仪, 采用光密度值法对其进行计数, 求得平均值; (6)3种细菌荧光定量检测: 粪便细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)提取大便DNA, 采用SYBR Green I 荧光染料嵌合法检测各组大鼠肠道3种主要细菌. 利用引物设计软件设计双歧杆菌引物, 大肠、乳酸杆菌序列参考国外文献[5,6]. 所选用引物序列分别与全序列在BLAST数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)进行比对, 核实其特异性后由上海生工生物工程技术服务有限公司合成. 引物序列(5'-3'): 双歧杆菌上游GGCTCGTAGGCGGTTTCGTC, 下游GCCTTCGCCATTGGTGTCTTC, 157 bp; 大肠杆菌上游GTTAATACCTTTGCTCATTGA^[5], 下游ACCAGGGTATCTAATCCTGTT, 340 bp; 乳酸杆菌上游AGCAGTAGGGAATCTTCCA^[6], 下游CACCGCTACACATGGAG, 341 bp. PCR反应体系: 荧光染料9 μL, 上、下游引物各0.5 μL, 模板1 μL, 加水至20 μL, 每次试验同时设标准品校正和阴性对照, 每管均设2个副管. 分别提取3种标准菌株(上海信谊药厂有限公司提供)DNA, 换算各标准品1 L的拷贝数, 做10倍系列稀释后分

别行实时荧光定量PCR扩增, 生成标准曲线. 每份粪便标本所含3种细菌的拷贝数可通过循环数与标准曲线比较得到, 结果以每克湿便的细菌拷贝数的对数(以10为底数)表示. 反应条件: 95 °C预变性5 min, 95 °C变性30 s, 双歧杆菌、大肠杆菌退火温度为59 °C, 乳酸杆菌61 °C退火, 72 °C延伸, 循环40次.

统计学处理 所有资料采用SPSS13.0软件分析. 结果以用mean±SD表示, 均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 两两比较采用LSD法, 线性比较采用相关分析法. 结果以P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组大鼠体重、生化指标、肝指数、肝脂肪变性及炎症程度比较 实验前3组大鼠体重无显著性差异, 喂养17 wk后, I 组、II 组大鼠体重及肝脏脂肪变性程度均较III组大鼠体重显著升高, 其中 I 组和II 组大鼠两者比较差异无显著性; 炎症程度比较, 3组之间两两比较差异均显著; 生化结果显示, 与III组相比, I、II 组大鼠血清AST、ALT、CHO、LDL、肝指数显著升高; 与II 组相比, I 组大鼠血清AST、ALT差异无显著性, 但CHO、LDL及肝指数升高, 差异显著(表1, 2).

2.2 肝组织形态学变化 肉眼观察, III组大鼠肝脏大体色泽红润, 边缘锐利, 质地柔韧; 与III组比, I 组大鼠肝体积明显增大, 边缘圆钝, 薄膜紧张, 可见大片黄色脂肪样变, 局部切面油腻; II 组大鼠肝脏与 I 组相比, 可见局部黄色脂肪样变. 光镜下, III组大鼠肝脏基本正常(图1A), I 组大鼠肝脏弥漫性大泡脂肪变性, 肝小叶和汇管区炎症变化显著(图1B). II 组大鼠肝脏同样出现脂肪变性, 但其炎症变化相比 I 组减轻, 差异显著(图1C). 其中, I 组大鼠有3例汇管区出现纤维化病变(图1D), II、III组未见.

2.3 回肠组织形态学变化 光镜下, III组大鼠小肠

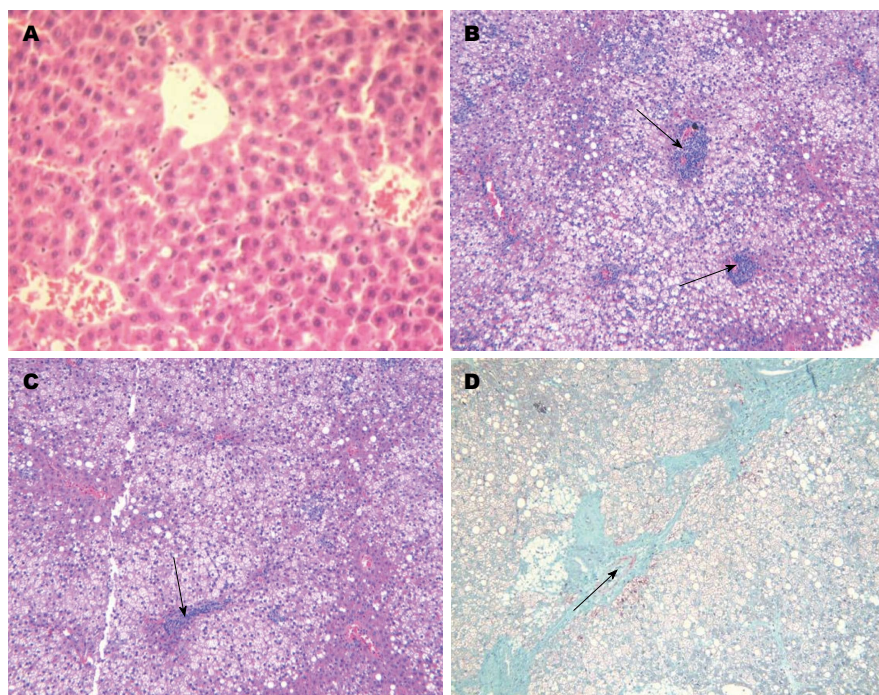


图1 各组大鼠的肝组织病理学。A: III组(HE × 200); B: I组(HE × 100); C: II组(HE × 100); D: I组(Masson × 100)。

■创新盘点

本研究中培菲康与高脂饮食造模同时进行,与既往脂肪肝造模成功后再给予益生菌处理有所不同。

表2 各组大鼠肝脏脂肪变性、炎症程度计分的比较

	<i>n</i>	脂肪变性					炎症程度计分
		0	+	++	+++	++++	
I组	12	0	0	0	1	11	2.50 ± 1.00 ^a
II组	12	0	0	0	2	10	1.83 ± 0.94 ^{ad}
III组	10	9	1	0	0	0	0.40 ± 0.52

^a $P < 0.05$ vs III组, ^d $P < 0.01$ vs I组。

黏膜绒毛细长,排列整齐,紧凑,表面结构完整,无充血、水肿等变化(图2A);I组大鼠小肠绒毛出现断裂,缺失,间隙增宽,上皮细胞坏死、脱落(图2B);而II组大鼠经培菲康干预后,绒毛排列较为整齐,缺失断裂减少(图2C)。电镜下,III组大鼠小肠黏膜绒毛排列整齐,线粒体、内质网、形态正常,上皮细胞无水肿、空泡变,细胞结构正常(图3A, D);I组大鼠小肠绒毛变短、缺失,线粒体水肿,内质网扩张,细胞正常结构破坏(图3B, E);II组在小肠绒毛、线粒体、内质网等细胞器结构方面较为完整(图3C, F)。

2.4 回肠黏膜蛋白occludin、IL-17免疫组织化学染色 III组大鼠回肠黏膜occludin蛋白主要连续分布于黏膜上皮细胞,为棕黄色染色颗粒(图4C);I组occludin蛋白染色散乱,较III组明显减少(图4A),两组比较差异显著;与I组相比,II组occludin蛋白表达差异无显著性(图4B)。IL-17表达方面,III组IL-17基本不表达(图5C);I组

IL-17主要连续分布于肠黏膜上皮细胞边缘,主要表达与细胞膜和细胞质,呈强阳性表达(图5A),与III组比,阳性表达差异呈显著性;II组IL-17呈散在分布表达,棕褐色染色强度及范围均弱于单纯高脂组(图5B),两组比较,差异无显著性(表3)。

2.5 肠道细菌定量结果 I组、II组均和III组在双歧杆菌、大肠杆菌和乳酸杆菌表达量上呈显著差异,其中I组、II组大肠杆菌数量明显增加,而双歧杆菌、乳酸杆菌数量则显著减少;同时,II组较I组,大肠杆菌数量减少,而双歧杆菌数量增加,但乳酸杆菌量的改变无明显差异。3组大鼠3种主要细菌数(拷贝数/g湿便)的对数值(表4)。

2.6 occludin蛋白及IL-17与肝脏炎症相关分析 occludin蛋白与肝脏炎症相关性不大($r = 0.089$, $P = 0.629$),差异无显著性;而炎症表达因子IL-17与肝脏炎症程度密切相关($r = 0.875$, $P = 0.000$),差异呈显著性。

3 讨论

肠黏膜屏障是存在于肠道内具有高效选择性能的屏障系统^[7]。广义的肠黏膜屏障包括机械屏障、生物屏障、免疫屏障和化学屏障,其主要作用是防止致病物质的入侵和阻止肠腔内细菌及内毒素的移位,在保持机体内环境稳定方面起重要作用^[8-10]。随着对NAFLD机制的深入探索,越来越多的研究表明,这种慢性肝脏性疾病与肠道生物屏障及机械屏障之间存在密切联系,

■应用要点

本研究中,单纯高脂饮食脂肪肝大鼠肠道益生菌减少,致病菌增多,肠上皮细胞间紧密连接蛋白occludin表达下降,同时炎症因子IL-17表达显著升高,而经培菲康干预后的高脂饮食脂肪肝大鼠体内益生菌数量增加,致病菌减少,同时炎症因子IL-17表达减少,提示NAFLD大鼠炎症表达因子IL-17与肝脏炎症程度密切相关。益生菌制剂可通过调整肠道菌群抑制或减缓NAFLD的发生及发展。



图2 各组大鼠小肠绒毛及上皮层炎性变化(H&E ×100). A: III组; B: I组; C: II组.

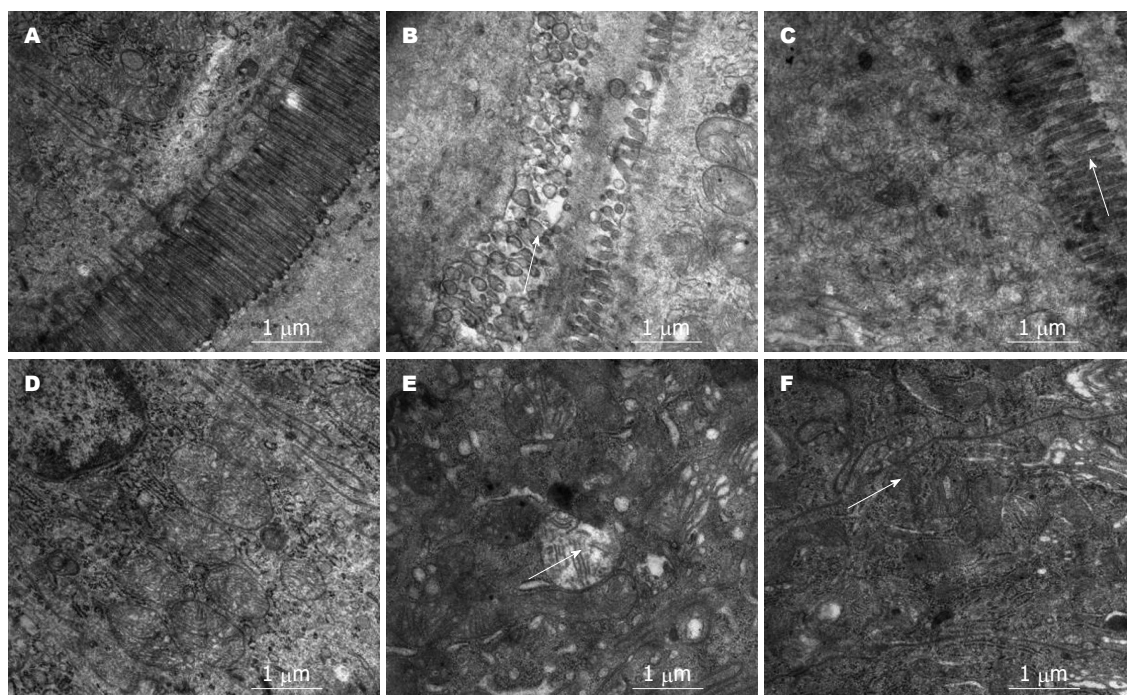


图3 各组大鼠电镜下小肠绒毛及细胞器变化. A: III组; B: I组; C: II组(×30 000); D: III组; E: I组; F: II组(×40 000).

表3 各组大鼠回肠组织黏膜occludin蛋白、IL-17表达(mean ± SD)的比较

	<i>n</i>	occludin蛋白	IL-17
I组	12	3.362 ± 2.76 ^a	36.289 ± 30.54 ^a
II组	12	3.598 ± 3.49 ^b	9.646 ± 14.53 ^c
III组	10	8.184 ± 5.78	2.609 ± 5.85
<i>F</i>		4.65	8.64

^a*P* < 0.05 vs III组; ^c*P* < 0.05 vs I组.

但其作用机制尚不明确. 本研究旨在探讨培菲康对高脂饮食诱导脂肪肝病大鼠肠黏膜屏障的影响.

肠生物屏障由肠道常驻菌群中99%左右的专性厌氧菌与其他细菌构成, 组成一个相互依赖又相互作用的微生态系统^[11]. 大量肠道细菌主要位居于结肠和远端小肠, 胃、十二直肠、空

肠及回肠上端细菌较少^[12]. 肠道内常驻菌具有吸收和分解代谢物的功能, 对维持机体生理功能发挥和新陈代谢具有关键作用^[13]. 肠道菌群功能的发挥主要包括3个方面, 即营养肠上皮细胞、分解代谢物质和抵抗外来致病菌^[14]. 一项研究^[15]显示, 肠道菌群的改变可引起肠道通透性的增加, 此时大量炎性物质释放入肠腔, 引起肠道产生炎症反应. IL-17作为一种前炎性细胞因子, 主要由一种新型的CD⁺效应T细胞Th17细胞亚群特异性产生, 且主要表达于肠道固有层, 并进一步介导肠道炎症的发展^[16-18]. 有研究显示, IL-17有强大的招募中性粒细胞及促进多种细胞因子释放的作用, 被认为参与了机体多种炎症疾病的发生^[19-21]. 本研究中, 高脂饮食喂养的两组大鼠肠黏膜上皮细胞IL-17表达均高于普通饮食组大鼠, 且肠黏膜上皮细胞IL-17表达与肝脏炎症程

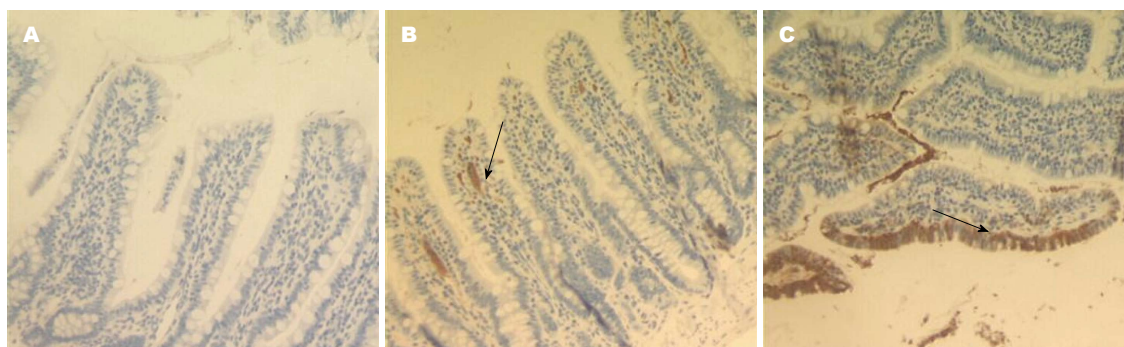


图 4 肠黏膜上皮细胞occludin蛋白表达($\times 200$). A: I组; B: II组; C: III组.

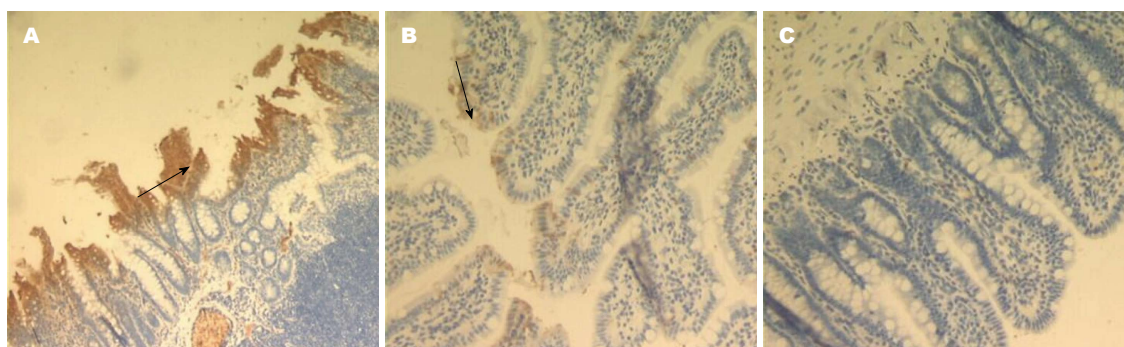


图 5 肠黏膜上皮细胞IL-17表达. A: I组($\times 100$); B: II组($\times 200$); C: III组($\times 200$).

■名词解释

紧密连接蛋白occludin: 相对分子质量为65 kDa, 由2个细胞外环和2个细胞内环组成, 相邻细胞就是通过外环以拉链状结合而封闭细胞旁间隙. 机体病理情况下可引起occludin分布异常、表达减少, 导致紧密连接结构和功能异常, 细胞间隙增宽, 从而导致内皮间通透性升高.

表 4 各组大鼠粪便3种细菌定量结果 (mean \pm SD)

	<i>n</i>	双歧杆菌	大肠杆菌	乳酸杆菌
I组	12	6.12 \pm 0.75 ^a	6.90 \pm 0.83 ^a	7.45 \pm 0.46 ^a
II组	12	7.59 \pm 1.31 ^{ac}	6.02 \pm 0.83 ^{ac}	7.70 \pm 0.65 ^a
III组	10	8.67 \pm 1.57	5.29 \pm 0.58	8.53 \pm 0.66
<i>F</i>		11.55	10.70	9.80

^a $P < 0.05$ vs III组; ^c $P < 0.05$ vs I组.

度呈正相关关系. Federico等^[22]研究同样显示, 在NAFLD中, Th17对肝脏损伤起促进作用, 同时与肝脏潜在的脂肪变性有关. 这表明IL-17可能参与了非酒精性脂肪肝炎的发病过程, 同时与肠道黏膜屏障的损伤有关; 而予培菲康干预的大鼠, 肝脏虽然同样出现脂肪炎症改变, 但其肠道黏膜IL-17表达下调, 同时肝脏炎症损伤减轻, 肝脂肪含量减少, 表明益生菌制剂培菲康可减缓大鼠肠道炎症进程, 这可能是培菲康减少嗜中性粒细胞的募集, 降低前炎症反应, 进而保护肝细胞. 机械屏障主要由肠上皮细胞及细胞间连接和黏液层组成, 是肠黏膜屏障最重要的部分. 肠上皮结构的完整能对其所围绕的细胞造成膜质的区域性差异, 使这些区域可进行专一的功能活动, 如离子的定向转运等^[23]. 机体在遭受严

重感染、炎症及营养障碍等情况时, 机械屏障将受到破坏, 主要表现为肠上皮细胞顶侧的紧密连接的中断. 目前研究认为occludin蛋白是最主要的紧密连接蛋白之一^[24], occludin作为一种整体膜蛋白, 是紧密连接的重要组成部分, 对维持肠道上皮细胞之间的连接至关重要, 而肠黏膜屏障功能的发挥则需要依赖完整的上皮细胞屏障^[25,26]. 本研究中, 采用免疫组织化学染色观察肠上皮细胞间连接, 可见普通饮食喂养组大鼠小肠上皮occludin蛋白密集表达, 而高脂饮食喂养组分布稀少; 电镜下观察, 普通饮食喂养组其肠绒毛排列紧密, 无断裂、缺失; 高脂饮食喂养组其肠绒毛出现短小、缺失. 这提示非酒精性脂肪肝状态下的大鼠其肠道黏膜机械屏障遭到破坏, 与Miele等^[27]和许腊梅等^[28]研究结果一致.

同行评价

本文设计合理, 图片翔实, 具有一定学术意义。

本研究采用的益生菌制剂培菲康是双歧杆菌、乳酸杆菌和肠球菌的三联活菌制剂, 通过磷壁酸与肠黏膜上皮细胞紧密结合形成天然的生物屏障。并定植于肠道, 与致病菌竞争上皮细胞的位点, 可刺激上皮细胞分泌黏液素在黏膜和微生物之间形成保护层, 防止栖生菌异位^[29]。本研究中, 单纯高脂饮食喂养的大鼠肠道内对宿主有益的双歧杆菌、乳酸杆菌数量较普通饮食喂养的大鼠显著性减少, 而致病性大肠杆菌数量显著增多, 同时肝指数明显升高、肝脏炎症变化显著; 经培菲康干预后的大鼠, 其肠道内双歧杆菌数量较单纯高脂饮食喂养大鼠增加, 大肠杆菌数量减少, 肝指数下降, 肝脏炎症反应减轻。表明益生菌制剂培菲康可通过黏附于肠道上皮或在肠道内形成暂时细菌集落来保护肠黏膜屏障^[30], 进而对大鼠脂肪肝起到一定的预防作用。但本研究中, 经培菲康干预后的大鼠其小肠上皮occludin蛋白表达较单纯高脂组表达量增加不显著。原因可能在于: 一方面, 培菲康并不能阻止或完全逆转NAFLD的形成, 其主要作用是调整肠道菌群来改善生物屏障; 另一方面, 可能与灌胃剂量不够且干预疗程不足有关。因此, 在今后的实验中可能要加大灌胃剂量, 同时进一步从分子水平探讨益生菌作用于肠黏膜机械屏障的机制。

参考文献

- Sanyal AJ. NASH: A global health problem. *Hepatol Res* 2011; 41: 670-674 [PMID: 21711426 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00824.x]
- Solga SF, Diehl AM. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol* 2003; 38: 681-687 [PMID: 12713883 DOI: 10.1016/S0168-8278(03)00097-7]
- 孙林林, 石军, 郝菁华, 任万华, 阎春英, 张捷, 林晓燕, 崔彬. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型的建立. *临床肝胆病杂志* 2011; 27: 254-257, 272
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321 [PMID: 15915461 DOI: 10.1002/hep.20701]
- Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T, Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 2003; 149: 269-277 [PMID: 12576600 DOI: 10.1099/mic.0.25975-0]
- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2578-2585 [PMID: 11375166 DOI: 10.1128/AEM.67.6.2578-2585.2001]
- Kraehenbuhl JP, Pringault E, Neutra MR. Review article: Intestinal epithelia and barrier functions. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11 Suppl 3: 3-8; discussion 8-9 [PMID: 9467973 DOI: 10.1111/j.1365-2036.1997.tb00803.x]
- 中华医学会消化病分会. 肠屏障功能障碍临床诊治建议. *中华消化内科杂志* 2006; 26: 620
- Harari Y, Weisbrodt NW, Moody FG. Ileal mucosal response to bacterial toxin challenge. *J Trauma* 2000; 49: 306-313 [PMID: 10963544 DOI: 10.1097/00005373-200008000-00019]
- Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T, Takahashi I. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 145-153 [PMID: 11501883 DOI: 10.1080/000163501750266738]
- Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 1: S39-S49 [PMID: 12215180 DOI: 10.1079/BJN2002628]
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4799-4807 [PMID: 10543789]
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21: 76-83 [PMID: 19915460 DOI: 10.1097/MOL.0b013e3283347ebb]
- Son G, Kremer M, Hines IN. Contribution of gut bacteria to liver pathobiology. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010 [PMID: 20706692]
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772 [PMID: 17456850 DOI: 10.2337/db06-1491]
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6: 1123-1132 [PMID: 16200070 DOI: 10.1038/ni1254]
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-1133 [PMID: 16990136 DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.035]
- Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1016-1023 [PMID: 17476678 DOI: 10.1002/ibd.20148]
- Lindén A, Laan M, Anderson GP. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J* 2005; 25: 159-172 [PMID: 15640338 DOI: 10.1183/09031936.04.00032904]
- Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthri-*

- tis Res Ther* 2005; 7: 29-37 [PMID: 15642151 DOI: 10.1186/ar1478]
- 21 Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70 [PMID: 12477762 DOI: 10.1136/gut.52.1.65]
 - 22 Federico A, D'Aiuto E, Borriello F, Barra G, Gravina AG, Romano M, De Palma R. Fat: a matter of disturbance for the immune system. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4762-4772 [PMID: 20939104 DOI: 10.3748/wjg.v16.i38.4762]
 - 23 Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, Madara JL. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci* 2000; 113: 1771-1781 [PMID: 10769208]
 - 24 Costantini TW, Deree J, Loomis W, Putnam JG, Choi S, Baird A, Eliceiri BP, Bansal V, Coimbra R. Phosphodiesterase inhibition attenuates alterations to the tight junction proteins occludin and ZO-1 in immunostimulated Caco-2 intestinal monolayers. *Life Sci* 2009; 84: 18-22 [PMID: 18992758 DOI: 10.1016/j.lfs.2008.10.007]
 - 25 Guo X, Rao JN, Liu L, Zou T, Keledjian KM, Boneva D, Marasa BS, Wang JY. Polyamines are necessary for synthesis and stability of occludin protein in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1159-G1169 [PMID: 15691870 DOI: 10.1152/ajpgi.00407.2004]
 - 26 Fava F, Danese S. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World J Gastroenterol* 2011; 17: 557-566 [PMID: 21350704 DOI: 10.3748/wjg.v17.i5.557]
 - 27 Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Mascianà R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1877-1887 [PMID: 19291785 DOI: 10.1002/hep.22848]
 - 28 许腊梅, 孙丹莉, 张予蜀, 张振玉, 李晓翠. 紧密连接蛋白occludin在非酒精性脂肪肝病大鼠肠上皮细胞中的表达及其与TNF- α 的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 981-986
 - 29 Di Caro S, Tao H, Grillo A, Elia C, Gasbarrini G, Sepulveda AR, Gasbarrini A. Effects of Lactobacillus GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 320-329 [PMID: 15843081 DOI: 10.1016/j.dld.2004.12.008]
 - 30 Teitelbaum JE, Walker WA. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 107-138 [PMID: 12055340 DOI: 10.1146/annurev.nutr.22.110901.145412]

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 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 0.775

本刊讯 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, 2011年《世界华人消化杂志》总被引频次3871次, 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第5位、第7位、第5位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第65位、第238位、第138位; 其他指标: 即年指标0.081, 他引率0.82, 引用刊数526种, 扩散因子13.59, 权威因子1260.02, 被引半衰期4.3, 来源文献量642, 文献选出率0.93, 地区分布数29, 机构分布数302, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01.

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技核心期刊”.(《世界华人消化杂志》编辑部)

迷走传入神经功能异常在内脏高敏感形成中的作用

杨焱, 崔秀芳, 王美峰, 李学良, 林琳, 张红杰

■背景资料

内脏敏感性异常目前被认为是肠易激综合征(IRS)重要的病理生理特征之一,可能涉及到胃肠道和中枢等多个环节。临床流行病学研究显示,自主神经功能障碍可能参与IRS症状的发生,迷走神经广泛分布于胃肠道,可参与腔内刺激的感觉传递和内脏痛的介导。

杨焱, 崔秀芳, 王美峰, 李学良, 林琳, 张红杰, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029

杨焱, 主要从事功能性胃肠病的研究。

江苏省兴卫工程重点人才基金资助项目, No. RC201163

作者贡献分布: 此课题主要由杨焱与张红杰设计; 研究过程由杨焱与崔秀芳操作完成; 研究用新试剂及分析工具由杨焱、崔秀芳及王美峰等提供; 数据分析由杨焱完成; 本论文写作由杨焱完成。

通讯作者: 张红杰, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化内科。hjzhang06@163.com

电话: 025-68136035 传真: 025-83674636

收稿日期: 2012-10-27 修回日期: 2012-12-25

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Effect of vagal afferent dysfunction on visceral hypersensitivity in rats

Yan Yang, Xiu-Fang Cui, Mei-Feng Wang, Xue-Liang Li, Lin Lin, Hong-Jie Zhang

Yan Yang, Xiu-Fang Cui, Mei-Feng Wang, Xue-Liang Li, Lin Lin, Hong-Jie Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Key Medical Personnel Foundation of Jiangsu Province, No. RC201163

Correspondence to: Hong-Jie Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. hjzhang06@163.com

Received: 2012-10-27 Revised: 2012-12-25

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of vagal afferents on visceral hypersensitivity in rats with neonatal colon sensitivity induced with acetic acid.

METHODS: Visceral hypersensitivity in rats at the age of 10 days was induced by intra-colonic infusion of acetic acid (AA). Visceral sensitivity was assessed by measuring abdominal withdrawal reflex (AWR) and electromyography (EMG) in response to graded colorectal distension (CRD). Spontaneous discharge of cervical vagus nerve to CRD was recorded between model rats and controls. The expression of c-fos in neurons of the nucleus of solitary tract (NST) and the myenteric nerve plexus of the colon was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Treatment with acetic acid in neonates induced visceral hypersensitivity in adult rats. No evidence of inflammation in the colon was found in both groups by H&E staining and MPO levels. The discharge of cervical vagus nerve was higher in model rats than in controls ($P < 0.05$). The expressions of c-fos in neurons of NST and the myenteric nerve plexus of the colon were increased in model rats compared with controls (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Rats with colon sensitivity induced with acetic acid have abnormal activation of the vagus nerve.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Visceral hypersensitivity; Vagal afferents; C-fos

Yang Y, Cui XF, Wang MF, Li XL, Li L, Zhang HJ. Effect of vagal afferent dysfunction on visceral hypersensitivity in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 138-144

摘要

目的: 初步探讨迷走传入神经在醋酸诱导的结肠敏感鼠模型内脏高敏感形成中的作用。

方法: 采用乳大鼠于出生第10天给予0.5%醋酸灌肠, 建立慢性内脏高敏感动物模型, 观察直肠内球囊扩张(colorectal distension, CRD)下腹壁撤离反射(withdrawal reflex, AWR)及腹外斜肌放电活动(electromyography, EMG)的变化, 评估内脏敏感性。采用电生理学方法记录大鼠颈部迷走传入神经自发放电, 观察在CRD下模型组与对照组大鼠迷走神经放电活动。免疫组织化学法观察大鼠孤束核及结肠中c-fos分布及表达情况。

结果: 与对照组相比, 模型组AWR评分及EMG幅值显著增高($P < 0.05$), HE染色及MPO水平显示两组大鼠结肠均无明显炎症表现, 结果提示内脏高敏感模型鼠建立; 给予直肠内球囊扩张后模型组迷走神经放电活动明显高于对照组($P < 0.05$); 与对照组相比, 模型组

■同行评议者

刘占举, 教授, 同济大学附属上海市第十人民医院

大鼠孤束核及结肠肌间神经丛中c-fos表达明显增加(孤束核 $15.00\% \pm 1.85\%$ vs $47.30\% \pm 2.79\%$, 近端结肠 $1.00\% \pm 0.12\%$ vs $1.90\% \pm 0.17\%$, 中端结肠 $1.10\% \pm 0.17\%$ vs $1.90\% \pm 0.18\%$, 远端结肠 $1.10\% \pm 0.12\%$ vs $2.10\% \pm 0.17\%$, 均 $P < 0.01$).

结论: 乳鼠醋酸灌肠诱导形成的内脏高敏模型大鼠迷走神经活化存在异常.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 内脏高敏感性; 迷走传入神经; C-fos

杨焱, 崔秀芳, 王美峰, 李学良, 林琳, 张红杰. 迷走传入神经功能异常在内脏高敏感形成中的作用. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 138-144
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/138.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变为主要特征的功能性胃肠病^[1]. 其发病机制目前尚未完全清楚, 内脏敏感性异常目前被认为是IBS重要的病理生理特征之一, 可能涉及到胃肠道和中枢等多个环节^[2-5]. 近年来较多临床流行病学研究显示, 自主神经功能障碍可能参与IBS症状的发生, 主要表现为交感活性增强及副交感(迷走)功能减退^[6,7]. 副交感神经广泛分布于胃肠道, 除参与胃肠道运动与分泌的调控外, 还参与腔内刺激的感觉传递^[8-10]和内脏痛的介导^[11-14]. 胃肠道感觉主要通过两条途径传入中枢: (1)经交感神经上传胃肠道伤害性感觉到后根传入脊髓; (2)通过迷走神经接受胃肠道生理性感觉上传至中枢神经系统, 主要是延髓孤束核(nucleus of solitary tract, NST)^[15].

本研究采用乳大鼠醋酸灌肠建立内脏高敏感模型, 通过观察颈部迷走神经放电活动及利用c-fos作为伤害性感觉神经元兴奋的标志物观察NTS中c-fos的表达情况, 探讨迷走神经传入通路与内脏高敏感间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 新生♂SD大鼠, 每10-12只与其母鼠共同饲养在同一笼内. 所有大鼠均在安静、室温 25°C , 昼夜控制为12 h周期下饲养. 实验所用大鼠由北京维通利华实验动物中心提供. 兔抗c-fos购自美国Abcam公司, 余试剂均为市售分析纯.

1.2 方法

1.2.1 大鼠内脏高敏感模型的建立: 参照Winston等^[16]的方法, 新生SD大鼠40只随机分为模型组和对照组, 出生第10天, 将石蜡油润滑后的硬膜外导管(直径1 mm)经肛门插入2 cm, 模型组大鼠给予0.5%醋酸0.2 mL灌肠, 建立内脏高敏感性模型, 对照组给予等体积的生理盐水灌肠, 给药后乳大鼠不再给任何处理, 至大鼠体质量达到180 g以上(第7周)开始实验. 实验前1 d禁食, 为消除生物节律对实验结果的影响, 均于8:00开始实验.

1.2.2 内脏敏感性评估: 观察大鼠在直肠扩张(colorectal distention, CRD)下, 腹部撤离反射(abdominal withdrawal reflex, AWR)及腹外斜肌放电活动(electromyographic activity of the external oblique muscle, EMG), 评估内脏敏感性. (1)AWR: 将大鼠放在特制的透明塑料笼($20\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 8\text{ cm}$)内, 清醒状态下, 将石蜡油润滑后的气囊导管经肛门插入, 气囊末端距离肛门2 cm, 用胶布将导管和大鼠尾根部固定. 待大鼠适应15 min后, 给予不同压力(20、40、60、80 mmHg)的直肠扩张, 每一压力值扩张持续30 s, 压力归0后休息2 min, 再进行下一次扩张. 分别于0、20、40、60、80 mmHg压力下, 评估大鼠AWR的分值, 上述各压力值重复扩张5次, 数据取中位数. AWR评分标准: 1分: 对扩张无反应; 2分: 腹背部肌肉轻微收缩但腹部未抬离地面; 3分: 腹背部肌肉较强收缩并把腹部抬离地面; 4分: 腹肌强烈收缩, 背部拱起, 腹部、盆部及会阴部抬离地面^[16]; (2)EMG: 0.3%的戊巴比妥钠1 mL/kg腹腔注射, 麻醉大鼠, 将其固定在手术台上, 将双极电极植入一侧腹外斜肌内, 打皮下隧道至颈后, 将双极电极游离端穿过皮下隧道, 在颈后缝合固定, 待大鼠恢复1 wk, 于第8周开始实验. 禁食12 h, 自由饮水. 大鼠乙醚浅麻醉后, 将气囊导管经肛门插入后, 大鼠固定于手术台上, 待大鼠完全清醒后, 给予球囊扩张, 压力分别为0、20、40、60、80 mmHg, 每次扩张持续2 min, 间隔5 min, 记录2 min内腹外斜肌的放电频率、肌电活动增高超过基线水平 $100\text{ }\mu\text{V}$ 以上为一次有意义的腹部收缩活动.

1.2.3 迷走神经放电记录: 乌拉坦(200 g/L)1 g/kg腹腔注射, 麻醉大鼠, 将其固定在手术台上. 在喉头与胸骨间沿颈正中中线切开, 寻找左侧颈动脉鞘(内有颈动脉及迷走神经)后, 分离出左侧迷走神经, 并用镊子夹伤神经中枢端. 用双极铂金丝电极(直径0.3 mm, 极间距2 mm)引导颈部迷

■ 研发前沿

对于IBS内脏高敏感形成机制的研究已成为目前研究的热点. 有关迷走神经与IBS的关系虽有部分文献报道, 但具体到迷走神经与IBS内脏高敏感形成之间关系的研究迄今国内外尚未有报道.

■相关报道

国内外研究表明, IBS患者存在自主神经功能障碍比例较高, 主要表现为迷走神经功能减退, 且在慢性食物过敏原引发的胃肠高敏感反应模型中, 存在迷走传入神经功能减退。

走神经的传入电活动, 神经周围用温石蜡油保温并保持电极之间的绝缘状态, 以维持迷走神经活性. 采用PowerLab多通道生理信号采集处理系统连续记录不同压力下(20、40、60、80 mmHg)直肠球囊扩张后迷走神经放电活动。

1.2.4 标本采集: 迷走神经放电检测结束后, 打开腹腔, 取大鼠结肠(近端、中端、远端)全层组织, 置于冻存管-80℃保存. 开胸经升主动脉插管, 生理盐水100 mL快速冲洗血液, 然后用4%的多聚甲醛(用0.1 mol/L PBS缓冲液配置, pH 7.4)500 mL灌注固定1 h; 灌注结束后立即取延髓, 置于上述相同的新鲜固定液中固定4 h, 再移入20%蔗糖溶液中4℃过夜, 直至组织块沉底, 次日取出组织, 按Paxinos和Watson大鼠脑图谱^[11]进行解剖定位, 在恒冷箱连续冠状切片, 片厚30 μm, 切片隔两张取1张, 分数套收集于0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中, 进行免疫组织化学染色。

1.2.5 评价肠道炎症: (1)结肠组织HE染色: 取大鼠结肠近端、中端、远端组织各一块, 40 g/L甲醛固定, 依次乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚度为4 μm, HE染色; (2)髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)测定: 取大鼠结肠近端、中端、远端组织各一块, 按试剂盒操作步骤采用ELISA法检测结肠组织中MPO水平。

1.2.6 免疫组织化学: 石蜡切片常规脱蜡至水, 加3% H₂O₂液37℃孵育30 min, 封闭内源性过氧化物酶; 用0.01 mol/L PBS漂洗3次, 98℃微波抗原修复10 min, PBS漂洗. 冰冻切片加3% H₂O₂液37℃孵育30 min, 封闭内源性过氧化物酶, PBS漂洗. 上述切片, 依次给予: (1)兔抗c-fos抗体(1:150, Abcam) 4℃孵育48 h; (2)生物素标志的羊抗兔IgG(1:500, Sigma), 室温放置3 h; (3)生物素-卵白素-HRP复合物(ABC, 1:500, Sigma)室温放置3 h; 最后用葡萄糖氧化物-DAB-硫酸镍胺法显色. 以上每一步骤后均用PBS液漂洗3次, 每次10 min. 切片漂洗后裱片, 晾干、脱水、透明、封固, 光镜下观察并摄片. 按Paxinos和Watson大鼠脑图谱^[17], 每只大鼠选取所需层面3个, 每张切片连续测定5个视野(×100), 计算每个视野中c-fos阳性细胞数占视野内所有基质细胞的百分比的均值。

统计学处理 本研究所有资料均以mean±SD表示, 用SPSS17.0统计学软件进行统计学分析. 大鼠AWR评分采用Mann-Whitney检验, EMG数值采用重复测量数据方差分析. 组间比较采用t检验. $P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

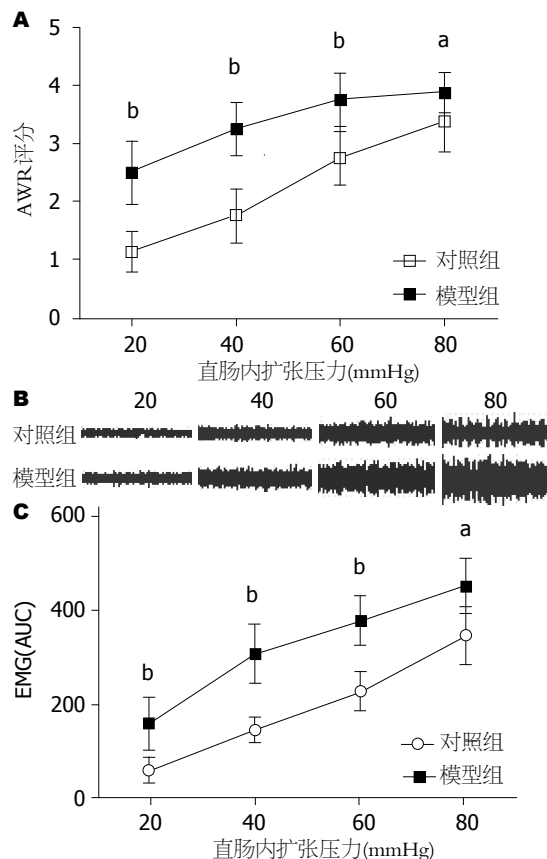


图1 两组大鼠内脏敏感性的比较. A: AWR评分, 模型组大鼠在扩张压力为20、40、60、80 mmHg时AWR评分明显增加, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ vs 对照组; B: EMG描述图; C: EMG曲线下面积, 模型组大鼠在扩张压力为20、40、60、80 mmHg时EMG曲线下面积明显增加, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ vs 对照组。

2 结果

2.1 大鼠内脏高敏感模型的建立 内脏敏感性测定结果显示, 在不同直肠扩张压力(20、40、60、80 mmHg)下, 模型组大鼠的AWR评分及EMG幅值均较对照组明显增加, 提示模型组的大鼠内脏敏感性增高($P<0.05$, 图1). 两组大鼠结肠组织HE染色切片显示均无明显组织学炎症表现(图2), 且MPO检测结果显示模型组大鼠结肠MPO水平与对照组相比无显著性差异($P>0.05$, 表1). 上述结果提示, 在大鼠幼时醋酸灌肠可引起成年后内脏高敏感, 而结肠组织无明显的炎症改变。

2.2 迷走神经放电变化 随直肠内扩张压力的增加, 两组大鼠迷走神经放电频率和峰值均逐渐增加. 与对照组相比, 在不同直肠扩张压力(20、40、60、80 mmHg)下, 模型组大鼠迷走神经自发放电活动明显增加, 呈一突发脉冲式的群集放电($P<0.05$, 图3).

2.3 孤束核及结肠组织c-fos的表达 模型组延髓NST中可发现较多c-fos阳性细胞, 而对照组c-fos

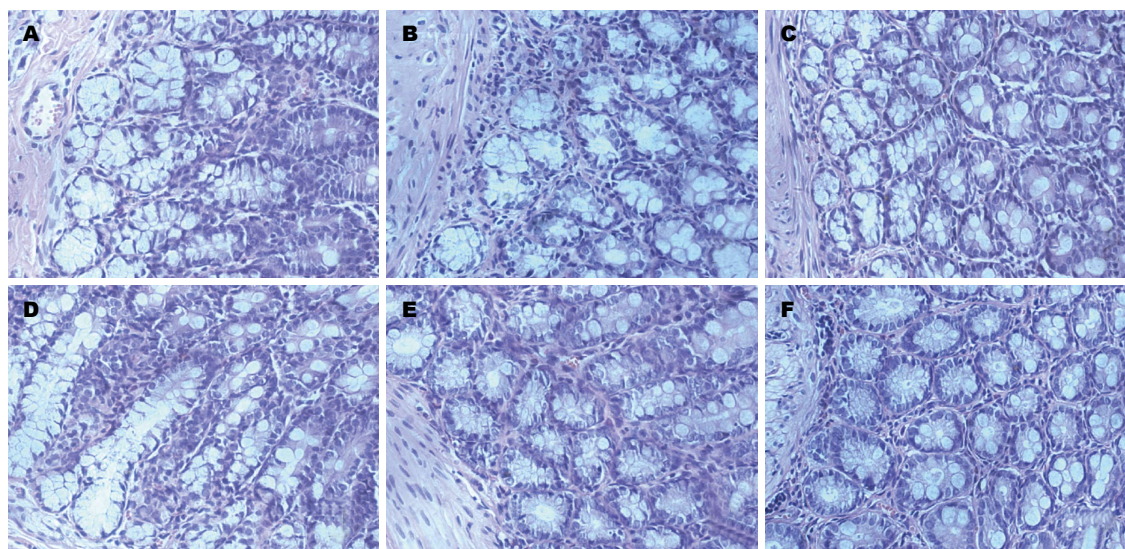


图2 两组大鼠HE染色比较($\times 400$). A, B, C: 模型组大鼠近端、中端及远端结肠; D, E, F: 对照组大鼠近端、中端及远端结肠.

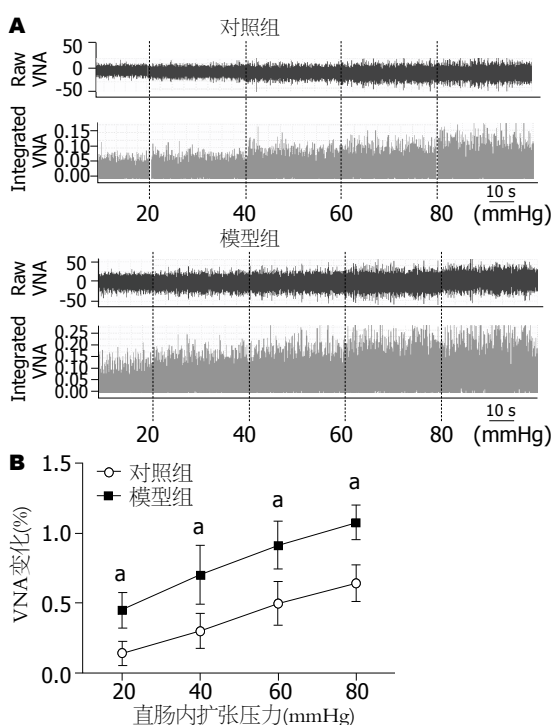


图3 两组大鼠迷走神经活性比较. A: 两组大鼠迷走神经放电幅值; B: CRD下两组大鼠迷走神经活性的变化, $^aP<0.05$ vs 对照组.

阳性细胞少, 两组间差异显著($P<0.01$, 图4, 表2). 结肠组织中c-fos阳性细胞主要在肌间神经丛, 呈梭形, 胞浆着色; 而黏膜下神经丛阳性表达较少. 模型组结肠各端组织中c-fos阳性分布与对照组大致相同, 但c-fos阳性肌间神经丛数目较对照组明显增加($P<0.01$, 图5, 表2).

3 讨论

中枢神经系统(central nervous system, CNS)与肠

神经系统(enteric nervous system, ENS)作为脑-肠轴的两个“终端”, 其结构和功能的异常是IBS内脏敏感性的重要物质基础^[18-20]. 近年临床流行病学资料显示, 自主神经功能障碍可能参与IBS症状的发生, 主要表现为交感活性增强及副交感(迷走)功能减退^[6,7,21,22], 而迷走神经作为调控胃肠道的主要神经, 在IBS内脏高敏感形成中有着怎样的作用尚不清楚.

本研究采用乳鼠醋酸灌肠法建立内脏高敏感模型, 通过AWR评分及EMG检测验证了内脏高敏感存在, 通过结肠HE染色及大鼠结肠组织中MPO水平测定, 排除了结肠组织炎症的存在. 通过神经电生理技术, 观察到在结直肠扩张压力逐步递增下, 与对照组相比, 模型组大鼠颈部迷走神经放电活动明显增强, 这表明迷走传入神经与内脏感觉传递间存在着联系.

胃肠感觉是胃肠感觉神经的活动在各级中枢内的整合结果. 胃肠道受内在感觉神经及外来感觉神经的双重支配^[23,24], 而前者不直接参与胃肠感觉的形成, 后者的活动则经过各级中枢的整合, 引起胃肠感觉和广泛的胃肠分泌与运动反应. 胃肠感觉的传入神经包括舌咽神经感觉纤维、迷走神经传入纤维以及脊神经内脏感觉纤维3种, 这些传入纤维组成胃肠感觉的第I级传入神经^[25]. 在肠道, 迷走神经传入纤维可大致分为黏膜层传入纤维及肌层传入纤维, 均为ENS的组成部分. 迷走神经胃肠感觉纤维的胞体主要位于迷走神经下神经节, 其周围突广泛分布于从食管至横结肠右半部的黏膜层、肌层及肌间神经丛. 此纤维主要传导胃肠黏膜的机

■ 创新盘点

本文首次采用乳大鼠醋酸灌肠建立内脏高敏感模型, 通过观察颈部迷走神经放电活动及观察NTS及结肠中c-fos的表达情况, 探讨迷走神经传入通路与内脏高敏感间的关系.

■应用要点

通过探讨迷走传入神经与内脏高敏感之间的关系,有助于进一步阐明IBS内脏高敏感发生发展的相关机制,为今后IBS治疗提供新的线索。

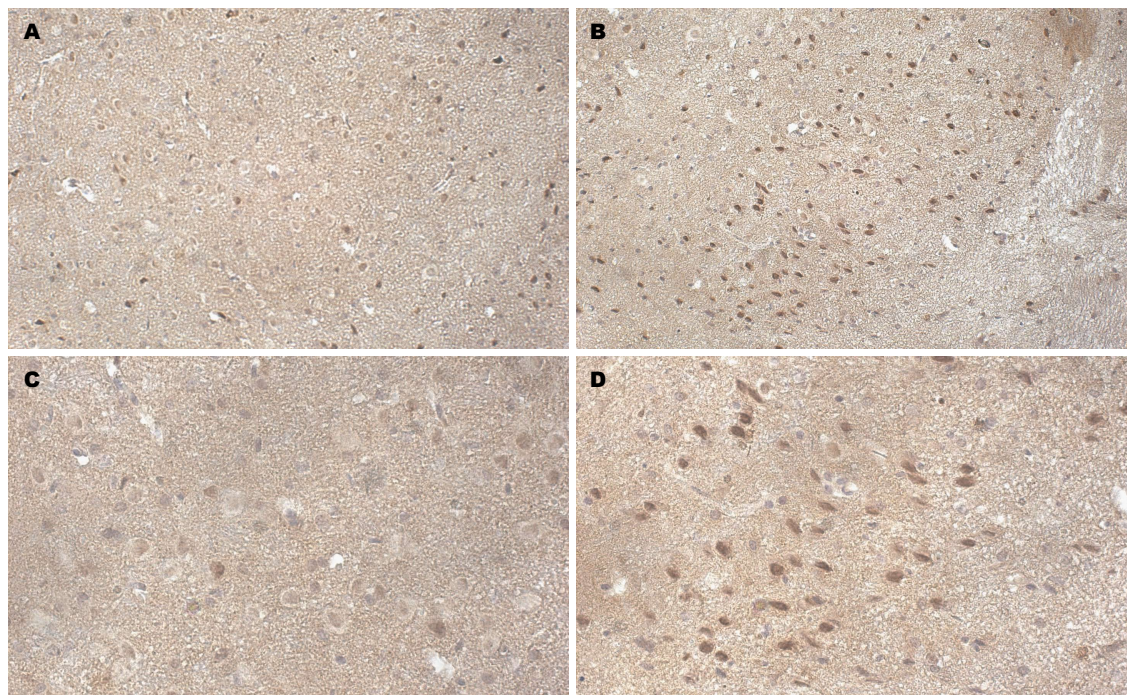


图4 两组大鼠NST c-fos表达情况。A: 对照组($\times 200$); B: 对照组($\times 400$); C: 模型组($\times 200$); D: 模型组($\times 400$)。

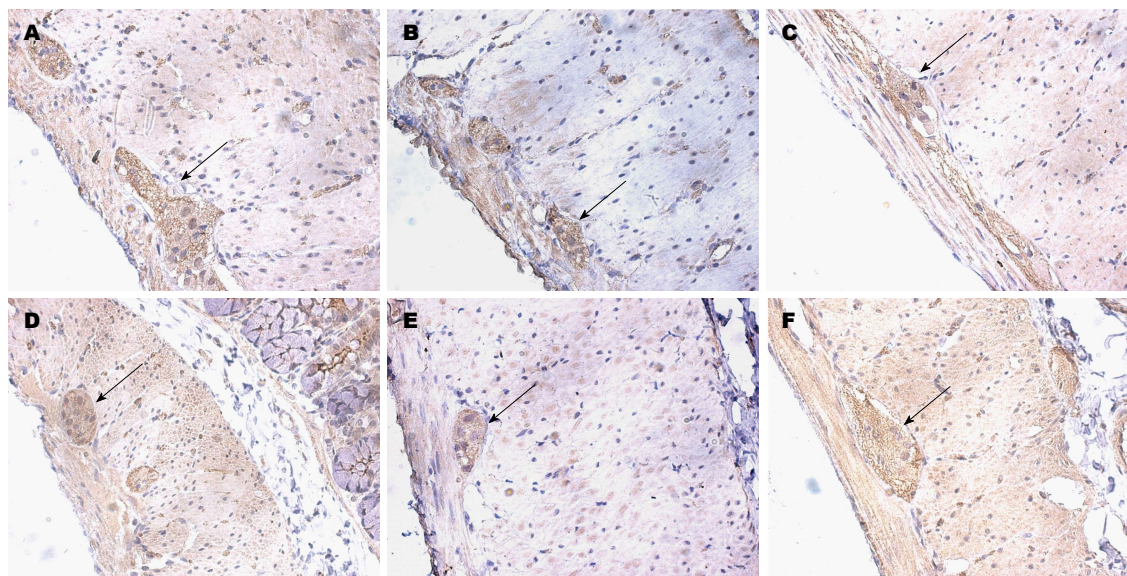


图5 两组大鼠结肠组织中c-fos表达情况($\times 400$)。A-C: 模型组大鼠近端、中端及远端结肠; D-F: 分别为对照组大鼠近端、中端及远端结肠。

械、化学感受器和肌层牵张感受器的信息。胃肠道感受器信号主要通过迷走神经中约75%的感觉传入纤维传至CNS。此外, NST是延髓重要的内脏感觉神经核, 是重要的内脏痛传入通路, 与上位中枢(下丘脑、中脑中央灰质、臂旁核等)有纤维联系^[26,27]。他集中接受来自胸腹腔脏器初级传入的迷走神经投射, 是胃肠感觉在迷走神经传入通路中的第Ⅱ级神经元所在部位^[28,29]。胃肠感觉传入到达CNS后, 是通过孤束核与脑的其他结

构联系来调节胃肠道的分泌和运动功能。

c-fos在机体受外界刺激后表达于与痛觉传递相关的神经元细胞核内, 其产物Fos可作为伤害性感受神经元兴奋的标志物^[30]。正常情况下, c-fos原癌基因表达水平很低, 但他可以在一系列生理或病理刺激作用下短时间诱导表达。我们研究结果显示, 模型组结肠组织中c-fos阳性表达明显高于对照组, 且主要位于结肠肌间神经丛, 黏膜下神经丛无明显阳性表达, 提示内脏

表 1 两组大鼠结肠髓过氧化物酶水平

	对照组	模型组	P值
近端结肠	110.38 ± 4.891	114.28 ± 3.173	0.1658
中端结肠	114.62 ± 1.842	117.82 ± 5.396	0.2381
远端结肠	123.20 ± 4.165	121.76 ± 5.932	0.5116

表 2 两组延髓孤束核及结肠组织中c-fos表达的比较 (%)

部位	对照组	模型组
孤束核	15.0 ± 1.85	47.3 ± 2.79 ^b
近端结肠	1.0 ± 0.12	1.0 ± 0.12
中端结肠	1.1 ± 0.17	1.9 ± 0.18 ^b
远端结肠	1.1 ± 0.12	2.1 ± 0.17 ^b

^bP<0.01 vs 对照组, 每×100倍视野下肌间神经丛内c-fos阳性数目占视野内所有基质细胞的百分比。

高敏感大鼠结肠肌间神经丛内c-fos阳性神经元可能参与了内脏痛觉信息传递和调控。我们的研究结果还显示, 内脏高敏大鼠NST中c-fos阳性表达明显高于对照组, 提示在内脏高敏感状态下, 迷走神经传入纤维可能由于接收较多来自ENS的伤害性信号使得自身放电增强, 从而导致NST神经元活化, 进而导致CNS整合、处理结肠感觉传入信息功能异常, 促进结肠内脏中枢敏化机制的形成, 提示NST可能是结肠内脏高敏感性中枢敏化机制形成的作用位点。以上均提示迷走传入神经功能异常可能与内脏高敏感的形成有关。

总之, IBS内脏高敏感形成的机制较为复杂, 我们研究发现迷走传入神经功能异常可能与IBS内脏高敏感的形成有关, 但两者间的具体机制仍需要进一步深入研究。

4 参考文献

- Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390 [PMID: 16678553 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.03.008]
- Camilleri M, Coulie B, Tack JF. Visceral hypersensitivity: facts, speculations, and challenges. *Gut* 2001; 48: 125-131 [PMID: 11115834 DOI: 10.1136/gut.48.1.125]
- Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganière M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002; 122: 1771-1777 [PMID: 12055583 DOI: 10.1053/gast.2002.33601]
- Mertz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995; 109: 40-52 [PMID: 7797041 DOI: 10.1016/0016-5085(95)90267-8]
- Ritchie J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* 1973; 14: 125-132 [PMID: 4696535 DOI: 10.1136/gut.14.2.125]
- Tanaka T, Manabe N, Hata J, Kusunoki H, Ishii M, Sato M, Kamada T, Shiotani A, Haruma K. Characterization of autonomic dysfunction in patients with irritable bowel syndrome using fingertip blood flow. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 498-504 [PMID: 18248583 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2007.01039.x]
- Adeyemi EO, Desai KD, Towsey M, Ghista D. Characterization of autonomic dysfunction in patients with irritable bowel syndrome by means of heart rate variability studies. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 816-823 [PMID: 10086672 DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.00861.x]
- Chen SL, Wu XY, Cao ZJ, Fan J, Wang M, Owyang C, Li Y. Subdiaphragmatic vagal afferent nerves modulate visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1441-G1449 [PMID: 18420825 DOI: 10.1152/ajpgi.00588.2007]
- Gschossman JM, Mayer EA, Miller JC, Raybould HE. Subdiaphragmatic vagal afferent innervation in activation of an opioidergic antinociceptive system in response to colorectal distension in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 403-408 [PMID: 12213108 DOI: 10.1046/j.1365-2982.2002.00345.x]
- Chen S, Li J, Zhang L, Dong X, Gao W, Mo J, Chen H, Xiao S, Li Y. 5-HT₃ receptors mediate the time-dependent vagal afferent modulation of nociception during chronic food allergen-sensitized visceral hyperalgesia in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 1222. e113 [PMID: 19558425]
- Khasar SG, Green PG, Miao FJ, Levine JD. Vagal modulation of nociception is mediated by adrenomedullary epinephrine in the rat. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 909-915 [PMID: 12603283 DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02503.x]
- Furuta S, Shimizu T, Narita M, Matsumoto K, Kuzumaki N, Horie S, Suzuki T, Narita M. Subdiaphragmatic vagotomy promotes nociceptive sensitivity of deep tissue in rats. *Neuroscience* 2009; 164: 1252-1262 [PMID: 19772896 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.09.021]
- Grundy D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i2-i5 [PMID: 12077054 DOI: 10.1136/gut.51.suppl.1.i2]
- Sedan O, Sprecher E, Yarnitsky D. Vagal stomach afferents inhibit somatic pain perception. *Pain* 2005; 113: 354-359 [PMID: 15661444 DOI: 10.1016/j.pain.2004.11.012]

■名词解释

孤束核: 延髓重要的内脏感觉神经核, 是胃肠感觉在迷走神经传入通路中的第Ⅱ级神经元所在部位。

■同行评价

本文提示迷走神经功能异常参与了内脏神经高敏性的发生,为临床上研究肠道蠕动功能紊乱(例如IBS)提供重要的动物模型和理论依据。

- 15 Grundy D. Speculations on the structure/function relationship for vagal and splanchnic afferent endings supplying the gastrointestinal tract. *J Auton Nerv Syst* 1988; 22: 175-180 [PMID: 3047201 DOI: 10.1016/0165-1838(88)90104-X]
- 16 Winston J, Shenoy M, Medley D, Naniwadekar A, Pasricha PJ. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats. *Gastroenterology* 2007; 132: 615-627 [PMID: 17258716 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.11.014]
- 17 Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods* 1980; 3: 129-149 [PMID: 6110810 DOI: 10.1016/0165-0270(80)90021-7]
- 18 Sheehan J, Gaman A, Vangel M, Kuo B. Pooled analysis of brain activity in irritable bowel syndrome and controls during rectal balloon distension. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: 336-346, e158 [PMID: 21118328]
- 19 Drossman DA, Dumitrascu DL. Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders. *J Gastrointest Liver Dis* 2006; 15: 237-241 [PMID: 17013448]
- 20 Mayer EA, Naliboff BD, Chang L, Coutinho SV. V. Stress and irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G519-G524 [PMID: 11254476]
- 21 Gupta V, Sheffield D, Verne GN. Evidence for autonomic dysregulation in the irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1716-1722 [PMID: 12184520 DOI: 10.1023/A:1016424007454]
- 22 Orr WC, Elsenbruch S, Harnish MJ. Autonomic regulation of cardiac function during sleep in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2865-2871 [PMID: 11051361 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2000.02318.x]
- 23 李在疏. 消化道运动调节研究的进展. *生理科学进展* 1984; 15: 11-17
- 24 Gebhart GF. Visceral pain-peripheral sensitisation. *Gut* 2000; 47 Suppl 4: iv54-iv55; discussion iv58 [PMID: 11076915]
- 25 周吕, 柯美云. 中枢神经系统与胃肠运动功能. *神经胃肠病学与动力-基础与临床*. 北京: 科学出版社, 2005: 143-170
- 26 Rao ZR, Ju G. Morphology of the medullary visceral zone. *Chin Sci Bull* 1999; 44: 1-10 [DOI: 10.1007/BF03182876]
- 27 陈良为, 饶志仁, 施际武. 大鼠延髓内脏带的化学神经解剖学. *解剖报* 1996; 27: 386-390
- 28 Rogers RC, McTigue DM, Hermann GE. Vagovagal reflex control of digestion: afferent modulation by neural and "endoneurocrine" factors. *Am J Physiol* 1995; 268: G1-G10 [PMID: 7840189]
- 29 Altschuler SM, Escardo J, Lynn RB, Miselis RR. The central organization of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *Gastroenterology* 1993; 104: 502-509 [PMID: 8425692]
- 30 Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988; 240: 1328-1331 [PMID: 3131879 DOI: 10.1126/science.3131879]

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 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、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)。

蛋白组学分析胰腺癌干细胞相关差异蛋白的表达

江建新, 高珊, 潘耀振, 孙诚谊

江建新, 潘耀振, 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
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
贵州省肝病疾病研究科技创新人才团队基金资助项目, 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、文章修改和审阅由孙诚谊完成; 资料分析、样本处理、生物信息学分析由高珊与潘耀振完成.

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: 2012-12-04 修回日期: 2012-12-26

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Quantitative proteomic analysis of differentially expressed proteins in pancreatic cancer stem cells

Jian-Xin Jiang, Shan Gao, Yao-Zhen Pan, Cheng-Yi Sun

Jian-Xin Jiang, Yao-Zhen Pan, Yi-Cheng 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

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160311; the Social Development Joint 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; and the Foundation for Liver and Pancreatic Disease Technological Innovation Talent Teams in Guizhou Province, No. [2010]4010

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

Received: 2012-12-04 Revised: 2012-12-26

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To screen and identify differentially expressed proteins in pancreatic cancer stem cells.

METHODS: MIA-PaCa2 (TIC^{high}) and BxPc-3 (TIC^{low}) were used in the study. Differentially expressed proteins between MIA-PaCa2 (TIC^{high}) and

BxPc-3 (TIC^{low}) cells were isolated and screened by 2D-DIGE analysis. Protein identification was performed by peptide mass fingerprinting with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). Western blot was performed to verify the differential expression of TRIM28.

RESULTS: Fluorescent differential protein expression patterns were obtained between MIA-PaCa2 (TIC^{high}) and BxPc-3 (TIC^{low}) cells. Analyses with DeCyder v6.5 software showed a total of 23 differentially expressed protein spots (>1.5 folds), and these protein spots were identified by mass spectrometry as 19 proteins, which are involved in cell communication and signal transduction, immune response, transcription and cell cycle regulation, adipocyte differentiation and lipid droplet formation, cytoskeletal formation, cell adhesion, transport, and translation. Western blot analysis revealed that TRIM28 was highly expressed in MIA-PaCa2 (TIC^{high}) cells but not expressed in BxPc-3 (TIC^{low}) cells. Among the 19 identified proteins, 8 were up-regulated and 11 down-regulated in MIA-PaCa2 (TIC^{high}) cells.

CONCLUSION: The identified differentially expressed proteins, such as TRIM28, are associated with the genesis, development and regulation of pancreatic cancer stem cells. They may become new therapeutic targets for pancreatic cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Stem cells; Electrophoresis; Gel; Two-dimensional; Proteomics

Jiang JX, Gao S, Pan YZ, Sun CY. Quantitative proteomic analysis of differentially expressed proteins in pancreatic cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 145-152

摘要

目的: 筛选与鉴定胰腺癌干细胞相关的差异表达蛋白质.

方法: 以MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})

■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. 蛋白质组学, 特别是定量蛋白质组学可以从一个细胞或组织的整体角度, 动态、定量地检测差异蛋白的变化, 从而有助于进一步研究这种差异变化的原因, 揭示其发生机制, 寻找新的治疗靶点.

■同行评议者

肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

■ 研发前沿

目前关于胰腺癌干细胞相关差异表达蛋白组学的研究未见文献报道,主要原因与蛋白质组学研究需要的细胞量大有关,该文依据新近发表的2篇高质量文献,采用差异凝胶电泳(DIGE)技术筛选、鉴定胰腺癌干细胞相关差异表达蛋白,为后续分子机制的研究奠定基础。DIGE技术在定量差异蛋白筛选方面具有独特的优势。

为研究胰腺癌干细胞的工具细胞,采用荧光差异双向凝胶电泳技术分离并筛选上述细胞差异表达蛋白,反射式基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱鉴定差异蛋白,免疫印迹验证差异表达的TRIM28。

结果:获得了MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})荧光差异蛋白表达图谱,经DeCyder v6.5软件分析,共有23个差异在1.5倍以上的蛋白质点,经质谱鉴定得到19个蛋白质,相对于BxPc-3(TIC^{low}),在MIA-PaCa2(TIC^{high})细胞组中高表达者有8个,低表达者有11个,包括参与细胞通讯和信号传导蛋白、免疫反应蛋白、转录因子与细胞周期调控蛋白、调节脂肪细胞分化和脂滴形成蛋白、细胞骨架蛋白、细胞黏附分子、差向异构酶、转运活性蛋白及参与翻译调节相关蛋白。免疫印迹结果显示TRIM28在BxPc-3(TIC^{low})没有表达,在MIA-PaCa2(TIC^{high})高表达。

结论:筛选得到的TRIM28等胰腺癌干细胞相关差异表达蛋白可能与胰腺癌干细胞的发生、发展和调控机制相关,有望成为胰腺癌新的治疗靶点。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 胰腺癌; 干细胞; 电泳; 凝胶; 双向; 蛋白质组学

江建新, 高珊, 潘耀振, 孙诚谊. 蛋白组学分析胰腺癌干细胞相关差异蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 145-152
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/145.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。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]。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(TIC^{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^[6]。近年来,许多方法学包括基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学等被用来研究肿瘤性疾病的诊断或发生机制。蛋白质是最根本的功能生物学分子,他是细胞的各种生物过程或参与调节的终端执行者。蛋白质组学,特别是定量蛋白组学可以从一个细胞或组织的整体角度,动态、定量地检测差异蛋白的变化,从而有助于进一步研究这种差异变化的原因,揭示其发生机制^[7]。本研究采用双向荧光差异蛋白组学(2-D fluorescence difference gel electrophoresis, 2-D DIGE)技术,以MIA-PaCa2(TIC^{high})和BxPc-3(TIC^{low})为研究对象,筛选胰腺癌干细胞相关差异蛋白,并对其生物学功能进行数据库分析,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(TIC^{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℃热灭活胎牛血清,25 mmol/L HEPES,2 mmol/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 蛋白提取:在上述细胞中加入1 mL蛋白裂解液(7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、4%CHAPS、30 mmol/L的Tris、蛋白酶抑制剂pH 8.5),静置15 min,冰浴超声15 s(超声0.2 s,间隔2 s)后混旋40 min,40 000 g、4℃离心30 min,取上清,Bradford蛋白定量,分装样品冻存于-70℃。

1.2.2 双向荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE):将Cy2、Cy3、Cy5用DMF溶解成1 nmol/L的母液。每个样本50 μg蛋白用400 pmol Cy3或Cy5标志,等量混合2组样本用Cy2作为内标标志,避光,冰上放置30 min,然后用1 μL 10 mol/L赖氨酸终止反应。将Cy3、Cy5标志的2组细胞蛋白两两混合成2个样本,均加入内标,再加入等体积的2×样品缓冲液(7 mol/L尿素、2 mol/L硫脲、4%CHAPS、2%IPG Buffer、2%DTT),加入水化液(8 mol/L尿素、4%CHAPS、1%IPG Buffer、0.5%DTT)混匀,分别行2D-DIGE。第一向等电

聚焦电泳温度控制在17℃. 程序设置为水化: 50V、13 h, 主动水化; S1: 200 V、线性、2 h、除盐; S2: 500 V、快速、1.5 h、除盐; S3: 1 000 V、快速、1.5 h、升压; S4: 10 000 V、线性、4 h、升压; S5: 10 000 V、快速、60 000 V/h、聚焦; S6: 500 V、快速、任意时间、保持. 聚焦结束将IPG胶条放入SDS平衡液和0.5%DTT中10 min, 再放入SDS平衡液和4.5%碘乙酰胺中10 min. 然后放于12%SDS-PAGE上方, 行第二向电泳. 待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时停止电泳.

1.2.3 图像采集分析及质谱鉴定: 在Typhoon 9410TM荧光扫描仪上用不同波长激光对凝胶内的Cy2(488/520 nm)、Cy3(532/580 nm)、Cy5(633/670 nm)进行扫描, 并采用DeCyder v6.5软件进行分析. 每一张胶扫描后得到3张扫描胶图(共6张胶图), 对每一张胶图上的所有蛋白点扫描进行胶内分析, 然后对不同胶上的同一个蛋白点与内标匹配, 进行胶间分析. 对匹配后的每个蛋白点的相对量比较(Cy3/Cy2或Cy5/Cy2)后确定差异蛋白. 用1 mg样品重新进行2D, 电泳结束后凝胶行考马斯蓝染色, 与扫描胶图匹配后手动切胶切取相匹配的蛋白质点. 参见Li等^[10]的方法进行脱色、还原、烷基化、酶解、样本回收及脱盐处理. 回收样品用反射式基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱(MALDI-TOWTOF)技术进行检测. 扫描方式: 反射式; 扫描范围: 700-3 500 kDa; 激光能量: MS 4 500, MS/MS 5 000; GPS软件检索: 误差MS 0.2 kDa, MS/MS 0.3 kDa. 获取的多肽质谱指纹图(peptide mass finger print, PMF)在人的数据库IPI HUMAN 3.23检索. 数据取舍标准: 蛋白质>61分, 置信水平>95%.

1.2.4 Western blot检测TRIM28蛋白的表达: 分别提取BxPc-3(TIC^{low})和MIA-PaCa2(TIC^{high})总蛋白; 将提取的蛋白质样本按每孔30 μg上样于12%SDS-PAGE后进行电泳. 用电转移法转移蛋白质至PVDF膜, 然后用5%脱脂奶粉封闭膜1 h. 加入兔抗人TIF1β单克隆抗体(1:200)(购自Cell Signaling公司)后4℃孵育过夜, 辣根过氧化物酶(HRP)标志的羊抗兔IgG孵育1 h. 参照免疫印迹化学发光(ECL)试剂盒说明进行化学发光法显示结果, X线胶片曝光. 实验重复3次, 条带密度采用Quantity One Program(Bio-Rad)软件进行分析. 目的蛋白的相对表达水平 = 目的蛋白的灰度值/β-actin蛋白的灰度值, 取3次平均值.

统计学处理 采用DeCyder v6.5软件自带的统计学数据处理系统, 设置 $P<0.05$, 采用 t 检验进

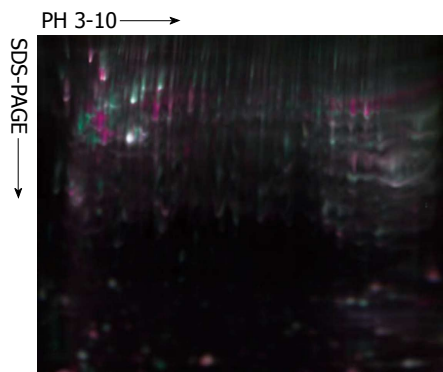


图1 BxPc-3(TIC^{low})和MIA-PaCa2(TIC^{high})的荧光差异双向电泳图. Cy2: 蓝色; Cy3: 绿色; Cy5: 红色.

行定量比较($P<0.05$).

2 结果

2.1 双向凝胶电泳分离蛋白质 分别用不同波长激光对Cy2(488/520 nm)、Cy3(532/580 nm)和Cy5(633/670 nm)进行扫描, 合并获得的扫描图见图1. 选择其中效果好, 点数多的一块胶作为参考胶, 进行胶内分析及胶间的匹配, 获得重复性较好的MIA-PaCa2(TIC^{high})和BxPc-3(TIC^{low})荧光差异蛋白表达图谱. 经DeCyder v6.5软件分析, 筛选出差异1.5倍以上、有统计学意义的差异点23个. 相对于BxPc-3(TIC^{low}), 在MIA-PaCa2(TIC^{high})细胞组中高表达者有12个, 低表达者有11个.

2.2 MALDI-TOF/TOF对差异蛋白的鉴定 对23个差异蛋白点进行鉴定, 共获得19个差异表达蛋白, 有4个蛋白点未能鉴定. 在人的数据库IPI HUMAN 3.23检索结果见表1. 差异倍数最大的蛋白点被鉴定为TRIM28, 其质谱鉴定图见图2.

2.3 Western blot验证差异蛋白TRIM28结果 显示KAP-1在BxPc-3(TIC^{low})没有表达, 在和MIA-PaCa2(TIC^{high})高表达, 与蛋白质组学实验结果基本一致(图3).

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^[11]. Kallifatidis等^[6]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-

■ 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(TIC^{low})可以直接作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞.

■ 创新盘点

目前关于采用胰腺癌细胞系MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞,采用DIGE技术筛选、鉴定胰腺癌干细胞相关差异表达蛋白尚未见报道。本研究发现新的与胰腺癌干细胞发生、发展及调控机制相关的蛋白。

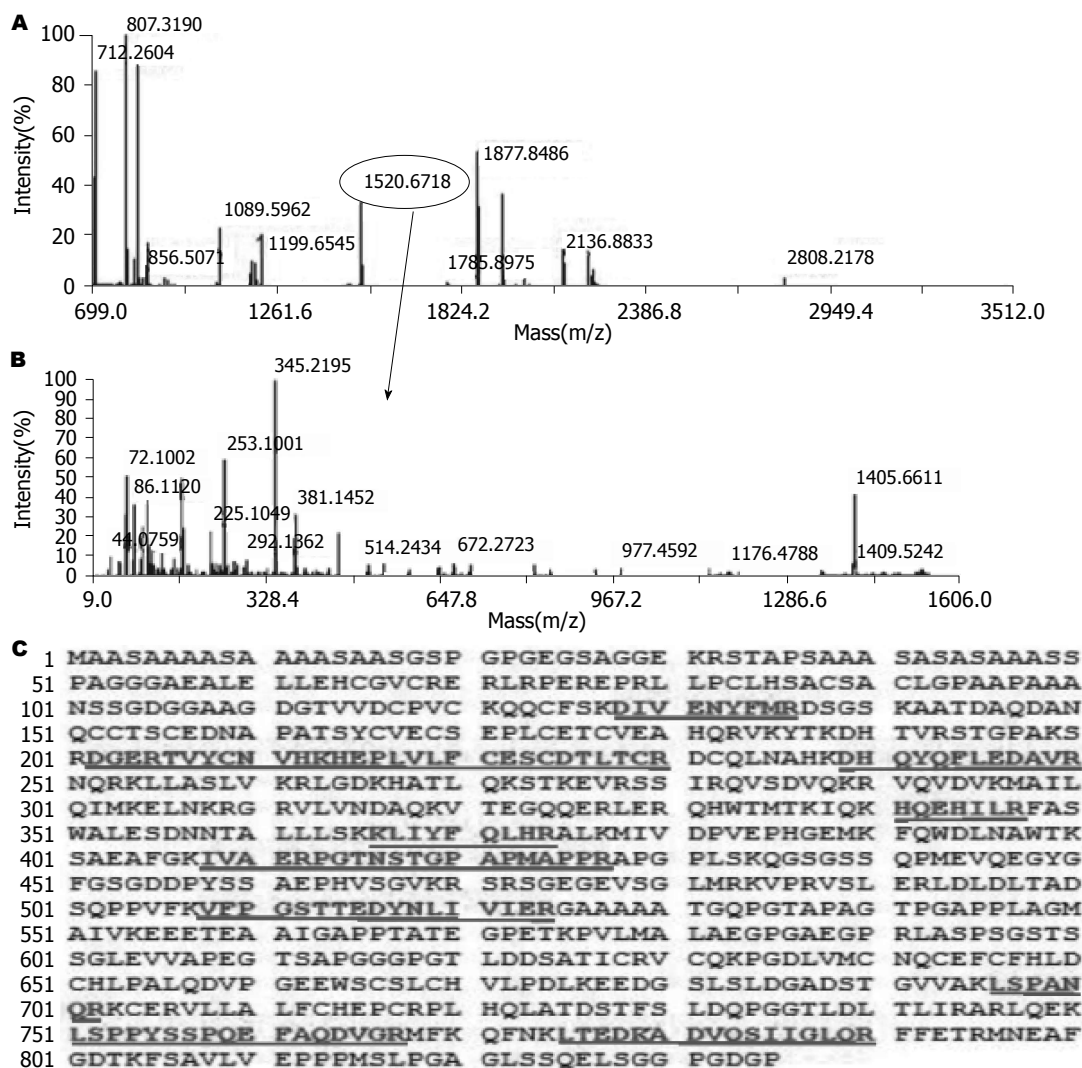


图2 MALDI-TOF MS-MS鉴定TRIM28. A: 一级肽谱图; B: m/z: 1520.67的二级肽谱图; C: TRIM28氨基酸序列及灰色划线部分肽序列匹配图。

PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{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(TIC^{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。

本实验应用2D-DIGE共筛选并经质谱鉴定出19个差异表达蛋白质。根据这些蛋白质功能的不同,可以分为9类: (1)参与细胞通讯和信号传导: ROCK2、RAB2B、YWHAQ、EEF1D、CAMK1、SORBS2、CSNK1E。其中ROCK2是细胞内一类具GTP酶活性的小分子G蛋白Rho下游的效应分子,是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的成员。ROCK2主要在心血管、脑组织中表达^[12]。近来研究发现ROCK2可以在多种肿瘤中高表达,如肝癌^[13]、肺癌^[14]、卵巢癌^[15]等。ROCK2在多种恶性肿瘤组织中高表达,提

示ROCK2在肿瘤发生发展中起重要的作用。大多数肿瘤的研究都集中在ROCK2与侵袭转移的关系方面,我们的研究表明ROCK2在MIA-PaCa2(TIC^{high})高表达,提示其可能在维持胰腺癌干细胞的“干性”方面起一定的作用。EEF1D催化氨酰基tRNA转移到核糖体上,为鸟嘌呤核苷酸交换因子,其在肿瘤中高表达,表明与肿瘤的蛋白质合成相适应。此外,研究表明,其高表达与肿瘤的淋巴结转移、分期、预后、分化相关^[16,17]。本研究提示EEF1D在MIA-PaCa2(TIC^{high})低表达,提示其可能促进胰腺癌干细胞的分化; (2)免疫反应蛋白: BST2、GLYCAM1; BST2也被称作PDCA-1, CD137和HM1.24,是细胞表面膜蛋白,在许多肿瘤中高表达,如肾癌^[18]、子宫内膜癌^[19]、肺癌^[20]以及胰腺癌等^[21]。尚未见文献报道BST2在这些肿瘤的作用报道, BST2在MIA-PaCa2(TIC^{high})低表达,其作用亦需进一步研究;

表 1 BxPc-3 (TIC^{low})和MIA-PaCa2 (TIC^{high})差异表达蛋白

IPI ID	蛋白名称	Mr ^a /pI ^b	差异倍数 ^c	分子功能 ^d
IPI00307155	ROCK2	16.09/5.75	-1.77	丝氨酸/苏氨酸激酶, 参与细胞通讯和信号传导
IPI00879279	RAB2B	24.21/6.97	3.56	GTPase活性蛋白, 参与细胞通讯和信号传导
IPI00018146	YWHAQ	27.76/4.68	-1.71	受体信号转导衔接分子, 参与细胞通讯和信号传导
IPI00981244	EEF1D	71.41/6.84	2.94	鸟嘌呤核苷酸交换因子, 参与细胞通讯和信号传导
IPI00926719	CAMK1	42.34/7.68	2.06	丝氨酸/苏氨酸激酶, 参与细胞通讯和信号传导
IPI00926953	SORBS2	124.11/10.00	-4.12	受体信号转导衔接分子, 参与细胞通讯和信号传导
IPI00385355	BST2	19.77/10.28	1.68	嵌膜蛋白质, 参与免疫应答
IPI00976345	GLYCAM1	5.02/9.56	-1.61	调节免疫应答
IPI00879037	Seipin	51.16/4.73	2.92	调节脂肪细胞分化和脂滴形成
IPI00893466	MAD1L1	83.074.92	2.70	转录调节因子, 调节细胞周期
IPI00894536	RFX5	65.32/8.51	-2.00	转录因子
IPI00908961	THG1L	34.83/5.64	2.18	细胞周期控制蛋白, 参与细胞生存和生长
IPI00977381	KRT18	48.06/9.19	3.24	细胞骨架蛋白, 参与细胞生存和生长
IPI00384120	ISM2	63.91/10.00	-2.06	细胞黏附分子
IPI00878432	CSNK1E	47.32/11.44	3.82	丝氨酸/苏氨酸激酶, 参与DNA修复和信号转导
IPI01009493	MCEE	18.75/6.81	2.08	差向异构酶, 参与能量代谢
IPI00514053	ARCNI	57.21/5.89	-1.61	转运活性蛋白, 参与细胞内物质运输
IPI00215884	SFRS1	27.75/10.37	1.76	RNA结合蛋白, 参与蛋白质代谢
IPI00438229	TRIM28	88.49/5.52	-10.73	翻译调节蛋白

Mr^a为匹配蛋白质的理论分子质量(kDa); pI^b为匹配蛋白质的理论等电; 差异倍数^c为BxPc-3(TIC^{low})/MIA-PaCa2(TIC^{high}), “-”表示下调; 分子功能^d基于人类蛋白质数据库(<http://www.hprd.org/>).



图 3 Western blot验证差异蛋白TRIM28. 1: MIA-PaCa2(TIC^{high}); 2: BxPc-3(TIC^{low}).

(3)转录因子与细胞周期调控蛋白: MAD1L1、RFX5、THG1L. MAD1L1是一种有丝分裂关卡元件, 在有丝分裂染色体赤道板对齐前, 阻止其进入有丝分裂后期. 在胃癌中, 其表达下调^[22], 推测与肿瘤细胞不对称分裂相关. 在MIA-PaCa2(TIC^{high})高表达, 推测与胰腺癌干细胞周期相对静止, 阻止进入有丝分裂后期相关; (4)调节脂肪细胞分化和脂滴形成: Seipin; (5)细胞骨架蛋白: KRT18、KRT18是上皮细胞标志蛋白, 其在肿瘤细胞中高表达提示该肿瘤细胞的侵袭转移能力弱, 裸鼠致瘤性差, 肿瘤细胞分化程度高, 外源性KRT18过表达可以使肿瘤细胞再分化, 逆转其恶性表型^[23-25]. KRT18在MIA-PaCa2(TIC^{high})表达较BxPc-3(TIC^{low})下调3.24倍, 提示其与MIA-PaCa2(TIC^{high})的侵袭转移能力强、恶性程度高、分化低相关, 也可能与胰腺癌干细胞的

特性相关, 研究KRT18在胰腺癌细胞的发生发展过程中的表达调控机制或能从一个侧面揭示胰腺癌从干细胞到癌细胞的形成; (6)细胞黏附分子: ISM2、ISM2在胎盘中高表达, 在胰腺、肝脏、脑组织等中表达^[26], ISM2是一种分泌型蛋白, 最近研究表明其作为血管生成抑制因子能抑制肿瘤生长^[27,28]. ISM2在MIA-PaCa2(TIC^{high})表达较BxPc-3(TIC^{low})上调2.06倍, 其在胰腺癌干细胞中的作用需进一步研究; (7)差向异构酶, 参与能量代谢: 甲基丙二酸单酰-coA表异构酶(MCEE)为丙酸代谢通路中的基因, 参与能量代谢, 其在肿瘤和干细胞的中的作用未见报道; (8)转运活性蛋白, 参与细胞内物质运输: ARCNI; (9)参与蛋白质代谢: SFRS1、TRIM28.

差异倍数最大TRIM28(又称TIF1 β , KAP-1等)是一种转录中介因子, 在诸多转录调控复合体中起桥梁作用^[29]. TRIM28是维持干细胞的“干性”关键基因之一. 研究表明^[30], TRIM28在胚胎干细胞(embryonic stem, ES)和胚胎组织中高表达, 在ES分化组织中表达下调, 在胰腺组织中表达极低. RNAi抑制TRIM28的表达能增加分化细胞的百分率. 采用Trim28 ChIP证实TRIM28通过靶向具有多向分化潜能性基因Cnot3、

应用要点

本文筛选的TRIM28是维持干细胞“干性”的关键基因之一, 在胚胎干细胞(ES)和胚胎组织中高表达, 且与肿瘤的侵袭转移、化疗抵抗等特性相关, 深入研究TRIM28在胰腺癌干细胞中的作用和调控机制具有一定价值.

■名词解释

2D-DIGE技术: 是经典2D(双向)电泳技术的成熟与完善, 通过三色荧光染料分别对内标和生物样本进行标记, 能够在一张2D胶上对两个样本的多种蛋白质进行分离, 并分别单独成像, 应用DeCyder 2D软件分析图像, 得到蛋白表达量的丰度变化, 根据数据分析结果准确地发现差异蛋白。

Nanog、Sox2、Tcf3、Il6st和Lefty2启动子区域调节其表达(Trim28-binding sites: GCCGCGXX), 从而维持干细胞的自我更新能力, 是ES自我更新的关键基因之一。其他研究也证实了TRIM28在ES的“干性”维持方面发挥重要作用^[31]。Wolf等^[32]研究表明: F9胚胎癌细胞(embryonal carcinoma, EC)发生分化时, KAP-1的表达水平下调, RNAi抑制TRIM28的表达, F9 EC和JM1 ES生长抑制, 细胞发生分化。Seki等^[33]研究证实: KAP-1能改变ES的多向分化潜能或是分化状态, 是这两种状态的临界关卡点。TRIM28在具有多向分化潜能的鼠ES高表达, RNAi抑制KAP-1的表达, 鼠ES显示分化状态。磷酸化的TRIM28和特异性多向分化潜能转录因子Oct3/4形成复合物, 能抑制ES的分化, 维持其多向分化潜能, 诱导iPS细胞(诱导多能干细胞iPS Cell)。Cammis等^[34]也证实了TRIM28在F9 EC分化中的作用。此外, KAP-1与肿瘤的侵袭转移、化疗耐药相关。Ho等^[35]采用蛋白质组学技术筛选TRIM28与乳腺癌的侵袭转移相关, 并在正常乳腺组织、原位乳腺癌组织以及淋巴结转移组织片中证实。Yokoe等^[36]证实TRIM28在胃癌中高表达, 且和胃癌的腹腔播散及不良预后相关。Han等^[37]比较结肠癌细胞株HCT-116(具有结肠癌干细胞特性, 对化疗药NSC 724998不敏感)和恶性黑色素瘤细胞株A375(对化疗药NSC 724998敏感)NSC 724998处理前后不同蛋白质表达的变化, 发现TRIM28在治疗后的表达上调, 且TRIM28的Ser824发生磷酸化。TRIM28参与EMT发生^[38]。我们的研究表明: 在MIA-PaCa2(TIC^{high})表达较BxPc-3(TIC^{low})上调10.73倍, Western blot检测表明前者高表达TRIM28, 而后者无表达。上述研究表明TRIM28可能也参与胰腺癌干细胞的发生, 并发挥重要作用。

总之, 定量蛋白质组学技术是研究肿瘤的一种重要手段。我们利用该技术初步筛选、鉴定了MIA-PaCa2(TIC^{high})和BxPc-3(TIC^{low})细胞部分差异蛋白, 并对其生物学功能进行数据库分析和文献复习, 这些差异蛋白, 特别是TRIM28可能与胰腺癌干细胞的发生、发展和调控机制相关, 对他们进一步深入研究, 有可能揭示胰腺癌干细胞的发生机制, 为寻找新的治疗靶点奠定基础。

4 参考文献

- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29 [PMID: 22237781 DOI: 10.3322/caac.20138]
- Tuveson DA, Neoptolemos JP. Understanding metastasis in pancreatic cancer: a call for new clinical approaches. *Cell* 2012; 148: 21-23 [PMID: 22265397 DOI: 10.1016/j.cell.2011.12.021]
- Lim KH, Chung E, Khan A, Cao D, Linehan D, Ben-Josef E, Wang-Gillam A. Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: the emerging paradigm? *Oncologist* 2012; 17: 192-200 [PMID: 22250057 DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0268]
- Rasheed ZA, Matsui W. Biological and clinical relevance of stem cells in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2: 15-18 [PMID: 22320910 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.07015.x]
- 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 [PMID: 22265420 DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.025]
- 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, Salnikov AV, Herr I. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signaling. *Gut* 2009; 58: 949-963 [PMID: 18829980 DOI: 10.1136/gut.2008.149039]
- Pan S, Brentnall TA, Kelly K, Chen R. Tissue proteomics in pancreatic cancer study: Discovery, emerging technologies, and challenges. *Proteomics* 2012; Nov 2. [Epub ahead of print] [PMID: 23125171 DOI: 10.1002/pmic.201200319]
- Rausch V, Liu L, Kallifatidis G, Baumann B, Mattern J, Gladkikh J, Wirth T, Schemmer P, Büchler MW, Zöller M, Salnikov AV, Herr I. Synergistic activity of sorafenib and sulforaphane abolishes pancreatic cancer stem cell characteristics. *Cancer Res* 2010; 70: 5004-5013 [PMID: 20530687 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0066]
- 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 [PMID: 16539710 DOI: 10.1186/1471-2407-6-61]
- Li C, Chen Z, Xiao Z, Wu X, Zhan X, Zhang X, Li M, Li J, Feng X, Liang S, Chen P, Xie JY. Comparative proteomics analysis of human lung squamous carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 253-260 [PMID: 12943690 DOI: 10.1016/S0006-291X(03)01578-X]
- Cioffi M, Dorado J, Baeuerle PA, Heeschen C. EpCAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 465-474 [PMID: 22096026 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1270]
- Bryan BA, Dennstedt E, Mitchell DC, Walshe TE, Noma K, Loureiro R, Saint-Geniez M, Campaigniac JP, Liao JK, D'Amore PA. RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB J* 2010; 24: 3186-3195 [PMID: 20400538 DOI: 10.1096/fj.09-145102]
- Wong CC, Wong CM, Tung EK, Man K, Ng IO.

- Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion. *Hepatology* 2009; 49: 1583-1594 [PMID: 19205033 DOI: 10.1002/hep.22836]
- 14 Vigil D, Kim TY, Plachco A, Garton AJ, Castaldo L, Pachter JA, Dong H, Chen X, Tokar B, Campbell SL, Der CJ. ROCK1 and ROCK2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion. *Cancer Res* 2012; 72: 5338-5347 [PMID: 22942252 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2373.]
 - 15 Ohta T, Takahashi T, Shibuya T, Amita M, Henmi N, Takahashi K, Kurachi H. Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 α in human ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2012; 13: 25-33 [PMID: 22336585 DOI: 10.4161/cbt.13.1.18440]
 - 16 Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka Y, Tanaka F, Inoue H, Murayama S, Mori M. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 91: 282-286 [PMID: 15199388 DOI: 10.1038/sj.bjc.6601941]
 - 17 Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T, Horiuchi S, Shichita M, Yamamoto N, Yamamoto M. Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 2489-2494 [PMID: 10953316]
 - 18 Kawai S, Azuma Y, Fujii E, Furugaki K, Ozaki S, Matsumoto T, Kosaka M, Yamada-Okabe H. Interferon-alpha enhances CD317 expression and the antitumor activity of anti-CD317 monoclonal antibody in renal cell carcinoma xenograft models. *Cancer Sci* 2008; 99: 2461-2466 [PMID: 19032371 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00968.x]
 - 19 Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Siu NS, Chan SC, Ho TW, Wong KW, Yu MY, Wang VW, Li C, Gardner GJ, Bonome T, Johnson WB, Smith DI, Chung TK, Birrer MJ. Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling. *Oncogene* 2007; 26: 1971-1982 [PMID: 17043662 DOI: 10.1038/sj.onc.1209986]
 - 20 Wang W, Nishioka Y, Ozaki S, Jalili A, Abe S, Kakiuchi S, Kishuku M, Minakuchi K, Matsumoto T, Sone S. HM1.24 (CD317) is a novel target against lung cancer for immunotherapy using anti-HM1.24 antibody. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 967-976 [PMID: 18979097 DOI: 10.1007/s00262-008-0612-4]
 - 21 Grützmann R, Boriss H, Ammerpohl O, Lüttges J, Kalthoff H, Schackert HK, Klöppel G, Saeger HD, Pilarsky C. Meta-analysis of microarray data on pancreatic cancer defines a set of commonly dysregulated genes. *Oncogene* 2005; 24: 5079-5088 [PMID: 15897887 DOI: 10.1038/sj.onc.1208696]
 - 22 Nishigaki R, Osaki M, Hiratsuka M, Toda T, Murakami K, Jeang KT, Ito H, Inoue T, Oshimura M. Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics* 2005; 5: 3205-3213 [PMID: 16003825 DOI: 10.1002/pmic.200401307]
 - 23 Bühler H, Schaller G. Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adhesion proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 365-371 [PMID: 16046547 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-04-0117]
 - 24 Walsh N, O'Donovan N, Kennedy S, Henry M, Meleady P, Clynes M, Dowling P. Identification of pancreatic cancer invasion-related proteins by proteomic analysis. *Proteome Sci* 2009; 7: 3 [PMID: 19216797 DOI: 10.1186/1477-5956-7-3]
 - 25 Song HY, Liu YK, Feng JT, Cui JF, Dai Z, Zhang LJ, Feng JX, Shen HL, Tang ZY. Proteomic analysis on metastasis-associated proteins of human hepatocellular carcinoma tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 92-98 [PMID: 16261346 DOI: 10.1007/s00432-005-0044-x]
 - 26 Rossi V, Beffagna G, Rampazzo A, Baucé B, Danielli GA. TAIL1: an isthmin-like gene, containing type 1 thrombospondin-repeat and AMOP domain, mapped to ARVD1 critical region. *Gene* 2004; 335: 101-108 [PMID: 15194193 DOI: 10.1016/j.gene.2004.03.008]
 - 27 Xiang W, Ke Z, Zhang Y, Cheng GH, Irwan ID, Sulochana KN, Potturi P, Wang Z, Yang H, Wang J, Zhuo L, Kini RM, Ge R. Isthmin is a novel secreted angiogenesis inhibitor that inhibits tumour growth in mice. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 359-374 [PMID: 19874420 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00961.x]
 - 28 Yuan B, Xian R, Ma J, Chen Y, Lin C, Song Y. Isthmin inhibits glioma growth through antiangiogenesis in vivo. *J Neurooncol* 2012; 109: 245-252 [PMID: 22772605 DOI: 10.1007/s11060-012-0910-8]
 - 29 Yang D, Jiang Y, He FC. [KAP-1, a scaffold protein in transcription regulation]. *Yi Chuan* 2007; 29: 131-136 [PMID: 17369165]
 - 30 Hu G, Kim J, Xu Q, Leng Y, Orkin SH, Elledge SJ. A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes Dev* 2009; 23: 837-848 [PMID: 19339689 DOI: 10.1101/gad.1769609]
 - 31 Fazio TG, Huff JT, Panning B. An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* 2008; 134: 162-174 [PMID: 18614019 DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.031]
 - 32 Wolf D, Goff SP. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 2007; 131: 46-57 [PMID: 17923087 DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.026]
 - 33 Seki Y, Kurisaki A, Watanabe-Susaki K, Nakajima Y, Nakanishi M, Arai Y, Shiota K, Sugino H, Asashima M. TIF1 β regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 10926-10931 [PMID: 20508149 DOI: 10.1073/pnas.0907601107]
 - 34 Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R. Association of the transcriptional corepressor TIF1 β with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev* 2004; 18: 2147-2160 [PMID: 15342492 DOI: 10.1101/gad.302904]
 - 35 Ho J, Kong JW, Choong LY, Loh MC, Toy W, Chong PK, Wong CH, Wong CY, Shah N, Lim YP. Novel breast cancer metastasis-associated proteins. *J Proteome Res* 2009; 8: 583-594 [PMID: 19086899 DOI: 10.1021/pr8007368]

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差异表达蛋白的探讨具有一定的创新, 有重大科研意义。

- 36 Yokoe T, Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M. KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 821-828 [PMID: 19898899 DOI: 10.1245/s10434-009-0795-8]
- 37 Han B, Stockwin LH, Hancock C, Yu SX, Hollingshead MG, Newton DL. Proteomic analysis of nuclei isolated from cancer cell lines treated with indenoloquinoline NSC 724998, a novel topoisomerase I inhibitor. *J Proteome Res* 2010; 9: 4016-4027 [PMID: 20515076 DOI: 10.1021/pr100194d]
- 38 Venkov CD, Link AJ, Jennings JL, Plieth D, Inoue T, Nagai K, Xu C, Dimitrova YN, Rauscher FJ, Neilson EG. A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007; 117: 482-491 [PMID: 17273560 DOI: 10.1172/JCI29544]

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

血清 γ -谷氨酰转肽酶与多种代谢异常及其聚集的相关性

南宗焕, 熊英环, 朴鲜女, 方今女

南宗焕, 熊英环, 朴鲜女, 方今女, 延边大学医学院预防医学教研部 吉林省延吉市 133002

南宗焕, 主要从事慢性病病因流行病学方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, Nos. 30260098, 30860244

吉林省教育厅基金资助项目, No. 2008-2

作者贡献分布: 此课题由方今女设计; 现场流行病学调查及资料分析由南宗焕、熊英环及朴鲜女完成; 论文写作由南宗焕与方今女完成.

通讯作者: 方今女, 教授, 133002, 吉林省延吉市公园路977号, 延边大学医学院预防医学教研部. jnfang@ybu.edu.cn

电话: 0433-2435167

收稿日期: 2012-10-09 修回日期: 2012-12-26

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Relationship between serum levels of gamma-glutamyl transferase and multiple metabolic disorders and their clustering

Zong-Huan Nan, Ying-Huan Xiong, Xian-Nv Piao, Jin-Nv Fang

Zong-Huan Nan, Ying-Huan Xiong, Xian-Nv Piao, Jin-Nv Fang, Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002, Jilin Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 30260098 and 30860244; and the Foundation of Education Department of Jilin Province, No. 2008-2

Correspondence to: Jin-Nv Fang, Professor, Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Yanbian University, 977 Gongyuan Road, Yanji 133000, Jilin Province, China. jnfang@ybu.edu.cn

Received: 2012-10-09 Revised: 2012-12-26

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To analyze the relationship between serum levels of gamma-glutamyl transferase (GGT) and multiple metabolic disorders and their clustering in Korean and Han men in Yanbian rural areas.

METHODS: A population-based cross-sectional study was conducted. In total, 3 416 subjects, ranging in age from 30 to 70 years, were included. The height, weight, waist circumference and blood pressure were measured. Serum levels of GGT, lipids and glucose were measured after a 12-hour fast.

RESULTS: The detection rate of elevated GGT

was 26.1% in Korean and 13.9% in Han men, and the age-adjusted detection rate was 27.2% and 13.8%, respectively, which showed a significant ethnic difference. Univariate analysis showed that elevated GGT in Korean men was correlated with age, drinking, hypertension, high TC, high TG, low HDL-C, general obesity, central obesity and MS, while elevated GGT in Han men was correlated with education level, smoking, drinking, hypertension, high TC, high TG, central obesity and MS. Multivariate logistic analysis showed that elevated GGT was closely related with age, drinking, hypertension, central obesity, high-TC, high-TG, MS and nationality, and dose-response relationship was seen between elevated GGT and age and drinking. The prevalence of elevated GGT increased with the increase in the number of metabolic disorders in both nationalities.

CONCLUSION: There was a significant difference in the prevalence of elevated GGT between Korean and Han men. Elevated GGT was closely related with multiple metabolic disorders and their clustering.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Gamma-glutamyl transferase; Metabolic disorder; Relationship; Nationality

Nan ZH, Xiong YH, Piao XN, Fang JN. Relationship between serum levels of gamma-glutamyl transferase and multiple metabolic disorders and their clustering. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 153-159

摘要

目的: 分析延边地区朝鲜族和汉族男性血清 γ -谷氨酰转肽酶(glutamyl transferase, GGT)与多种代谢异常及其聚集的相关性.

方法: 于2009-07/2010-07在延边地区安图县采取整群抽样方法选取30-70岁朝鲜族和汉族男性人群3 416例, 收集一般特征、吸烟、饮酒等信息, 测量身高、体质量、腰围、血压, 准确测定清晨空腹(禁食12 h)静脉血GGT、血脂及血糖.

■背景资料

既往认为 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)升高多系肝功能损害或过度饮酒所致, 而近年来则认为, GGT升高与MS及其组分的患病危险密切相关, 且对这些疾病的早期诊断与患病风险的预测具有重要意义.

■同行评议者

李淳, 副教授, 汕头大学医学院病理学

■ 研发前沿

由于GGT检测方便、价格低廉,他可以作为MS及心血管疾病发生风险的筛选指标,且能在疾病预防及预测中可具有广泛的应用前景。GGT升高与MS及其组分密切相关,但是GGT与MS之间的具体联系机制尚不完全明确。

结果: (1)朝鲜族和汉族男性GGT升高者的检出率分别为26.1%和13.9% ($\chi^2 = 49.004$, $P < 0.01$), 其年龄调整检出率分别为27.2%和13.8% ($U = 77.011$, $P < 0.01$); (2)单因素分析显示,朝鲜族男性的年龄、饮酒、高血压、高TC血症、高TG血症、低HDL-C血症、整体型肥胖、腹型肥胖及MS与GGT升高有关联,汉族男性的文化程度、吸烟、饮酒、高血压、高TC血症、高TG血症、腹型肥胖及MS与GGT升高有关联; (3)多因素Logistic回归分析显示,本地区男性的年龄、饮酒、高血压、腹型肥胖、高TC血症、高TG血症、MS和民族(朝鲜族)与GGT升高呈正相关,其中年龄和饮酒频率对GGT升高的影响具有剂量反应关系; (4)朝鲜族与汉族男性GGT升高者检出率均随着多种代谢异常聚集程度的增加呈增加趋势,其增加趋势有统计学意义 ($P < 0.01$)。

结论: (1)本地区朝鲜族男性GGT升高检出率明显高于汉族; (2)本地区男性GGT升高与多种代谢异常及其聚集密切相关,且随着多种代谢异常聚集程度的增加呈增加趋势。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: γ -谷氨酰转氨酶; 代谢异常; 相关性; 民族

南宗煥, 熊英环, 朴鲜女, 方今女. 血清 γ -谷氨酰转氨酶与多种代谢异常及其聚集的相关性. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 153-159

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/153.asp>

0 引言

近年来,国内的大量研究认为 γ -谷氨酰转氨酶(glutamyl transferase, GGT)升高与代谢综合征及其组分的患病危险密切相关,且对这些疾病的早期诊断与患病风险的预测具有重要意义^[1-7]。据调查^[8-12],延边地区成人高血压病、血脂异常、糖代谢异常、肥胖以及代谢综合征的患病水平均高于全国的平均水平,有些代谢异常病尚属较高发地区,而且出现明显的民族差异。另外,延边地区不同民族居民的饮酒情况^[13]及心脑血管疾病死亡水平^[14]也出现明显的差异。目前延边地区尚无关于血清GGT升高与多种代谢异常及其聚集相关性的研究,本文旨在了解汉族和朝鲜族GGT升高与多种代谢异常及其聚集的相关性,以阐明该地区高发多种代谢异常及其聚集以及其种族差异提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 于2009-07/2010-07在延边地区安图县

采取简单随机抽样的方法抽取2个镇,然后采用整群抽样的方法抽取各镇内选取30-70岁全部朝鲜族和汉族男性。本研究源人群总数应为4 012人,其中排除外出打工人员、混血民族(直系亲属无异族通婚,便于准确比较民族之间的差异)、患有严重的代谢性疾病和其他器质性疾病的人群及不愿参与本次健康调查者,最终共3 416(占源人群总数85.1%)例为本次的研究对象。本研究方案经过延边大学附属医院伦理委员会审查批准,并获得研究对象的知情同意签字。进入分析的总人群中,朝鲜族为1 848名(占53.3%),其平均年龄为53.05岁 \pm 10.08岁;汉族为1 618名(占46.7%),其平均年龄为49.64岁 \pm 10.40岁。

1.2 方法 采用家访问调查和健康体检收集本次调查相关信息。

1.2.1 问卷调查: 调查开始前,对所有调查人员进行严格的培训,规范调查内容、操作流程及方法,并按统一制定的调查表(内容包括研究对象的一般特征、吸烟、饮酒、疾病家族史及本人既往史等)进行家访问调查。

1.2.2 体格检查: 所有研究对象均在清晨空腹安静状态下进行体格检查,由统一的仪器和检查者来完成。其内容包括: (1)测量身高(height, Ht)、体重(weight, Wt)和腰围(waist circumference, WC)。要求研究对象免冠、脱鞋、穿内衣,自然站立,腰围的测量分别在肋骨下缘水平面上; (2)血压: 测量清晨空腹未服高血压药的情况下的血压,按照国际标准测量血压,选用台式血压计,休息10 min,端坐位,测量左右上臂血压,以Korotkoff第1音位收缩压,第5音(消失音)为舒张压,连续测量2次,每次间隔5 min,取2次测量结果的平均值; (3)生化指标: 现场抽取禁食12 h的静脉血,2 h以内完成血清分离,8 h以内送往延边大学附属医院检验科完成测定。血清 γ -谷氨酰转氨酶(glutamyl transferase, GGT)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及血糖(fasting blood glucose, FBG)等指标采用日立-7600-010全自动生化分析仪测定,本次检测用试剂盒批内与批间变异度均 $< 5\%$ 。

1.2.3 各种指标的判定标准: (1)吸烟指标: 按吸烟指数(平均每日吸烟支数 \times 吸烟年限)评分分为4组,即1组为不吸烟; 2组为吸烟指数 ≤ 300 ; 3组为 $300 <$ 吸烟指数 ≤ 600 ; 4组为吸烟指数 > 600 ; (2)饮酒指标: 按照饮酒的频率分为5组,即1组为不饮酒、2组为1-2次/mo、3组为1次/wk、4组为2-3次/wk、5组为4次/wk及以上; (3)文化程

表 1 朝鲜族和汉族男性人群不同年龄别GGT升高检出率

民族	n	GGT升高检出率 n(%)					χ^2 值	粗检出率 n (%)	年龄调整 检出率(%)
		30岁-	40岁-	50岁-	60岁-	70岁-			
朝鲜族	1 848	26(17.3)	168(29.1)	164(24.0)	56(17.6)	6(5.0)	18.621	420(22.7)	21.5
汉族	1 618	20(6.9)	56(9.8)	56(10.8)	18(10.1)	6(9.4)	1.498	156(9.6)	8.9
χ^2 值								106.607 ^b	
U值									81.218

度:按照接受系统教育的文化程度分为5组,即0组为文盲、1组为小学文化程度、3组为初中文化程度、4组为高中文化程度、5组为大学及以上文化程度;(4)GGT异常的诊断标准:延边大学附属医院检验科的GGT试剂盒正常值范围为8.0-58.0 U/L,且本次研究GGT>58.0为GGT升高;(5)MS诊断标准:按照2007年《中国成人血脂异常防治指南》推荐的诊断标准(GCADP标准)^[15],以下5个组分中具备3个或3个即可判定为MS:(1)腹型肥胖:WC>90 cm(男),>85 cm(女);(2)高TG血症: TG \geq 1.70 mmol/L(150 mg/dL);(3)低HDL-C血症: HDL-C<1.04 mmol/L(40 mg/dL);(4)高血压: SBP/DBP \geq 130/85 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa),将血压已被控制的和近2 wk内服用或正在服用降压药的高血压患者除外;(5)高血糖:空腹血糖 \geq 6.1 mmol/L(110 mg/dL);(6)高TC^[15]: TC \geq 6.22 mmol/L(240 mg/dL);(7)整体型肥胖:以体质指数(body mass index, BMI) \geq 24 kg/m²为整体型超质量及肥胖。

统计学处理 所有收集的资料输入计算机,建立数据库,采用SPSS17.0统计学软件进行处理及分析.计数资料计算粗患病率,以延边朝鲜族自治州2000年第5次人口普查资料中的相应年龄段的人口数作为标准人口计算标准化患病率(直接法),其粗率和标准化率的比较采用 χ^2 检验和U检验;GGT升高与多种代谢异常及其聚集现象的关系采用单因素及多因素Logistic回归分析。

2 结果

2.1 GGT异常检出率 朝鲜族和汉族男性GGT升高的粗检出率分别为26.1%和13.9%,其年龄调整率分别为27.2%和13.8%,且朝鲜族均显著高于汉族.朝鲜族男性各年龄组的GGT升高检出率比较差异有统计学意义,而汉族男性比较差异无统计学意义(表1)。

2.2 GGT升高与多种代谢异常及其聚集的单因素分析 汉族男性的GGT升高检出率随文化程度

的升高而降低,却随饮酒频率及吸烟指数的升高而升高,其降低或升高趋势均有统计学意义;朝鲜族男性的GGT升高者检出率随饮酒频率和吸烟指数的升高而升高,其升高趋势均有统计学意义(表2)。

朝鲜族和汉族男性高血压组、高血糖组、高TC血症组、高TG血症组、腹型肥胖组及MS组的GGT升高检出率均高于正常对照组,其差异均有统计学意义.朝鲜族男性低HDL-C血症组和整体型肥胖组的GGT升高检出率均高于正常对照组,而汉族不同组间比较差异无统计学意义(表3)。

2.3 GGT异常与多种代谢异常及其聚集的多因素分析 非条件多因素Logistic分析结果显示,与70岁年龄组相比,60岁组的OR值(95%CI)为2.200(0.827-5.853)、50岁为3.660(1.507-8.892)、40岁为2.916(1.203-7.072)、30岁为1.975(0.775-5.032);朝鲜族GGT升高的检出率显著高于汉族,其OR值(95%CI)为2.241(1.658-3.030);随饮酒频率的升高GGT升高的检出率呈升高趋势,与不饮酒者相比,1-2次/mo组的OR值(95%CI)为2.312(1.321-4.046)、1次/wk组为3.060(1.544-6.061)、2-3次/wk组为2.465(1.442-4.216)、 \geq 4次/wk组为4.196(2.913-6.044);吸烟指数>300以上组的GGT升高的检出率明显增高;随文化程度的增高GGT升高的检出率呈下降趋势;高血压、腹型肥胖、高TC血症、高TG血症及MS者GGT升高的检出率显著高于正常对照组,其OR值(95%CI)分别为1.625(1.169-2.257)、1.320(0.988-1.764)、2.210(1.332-3.669)、2.834(2.119-3.792)和2.671(2.020-3.531,表4)。

2.4 多种代谢异常聚集与GGT异常 朝鲜族无代谢异常、1种代谢异常、2种代谢异常、3种代谢异常和4种以上代谢异常人群GGT升高的检出率分别为8.0%、14.3%、21.3%、27.7%和40.5%,汉族分别为2.2%、7.0%、9.3%、16.5%

■ 相关报道

由于遗传背景及环境因素的影响,不同地区及不同特征人群的GGT升高者检出率不尽相同。GGT升高与MS及心血管疾病发生之间可能的联系机制是GGT通过参与IR、氧化应激、慢性炎症等过程促使MS及心血管疾病的发生。

■创新盘点

本文以较大样本及不同民族群体为研究对象,比较延边地区朝鲜族和汉族男性GGT升高的检出率,分析本地区GGT升高与多种代谢异常及其聚集现象的相关性,以此阐明本地区高发代谢异常病及其种族差异的可能原因。

表 2 朝鲜族和汉族男性GGT升高与一般特征的单因素分析

相关因素	朝鲜族				汉族			
	调查人数	升高例数(n)	检出率(%)	趋势 χ^2 值	调查人数	升高例数(n)	检出率(%)	趋势 χ^2 值
文化程度				1.527				6.313
文盲	158	34	21.5		278	38	13.7	
小学文化	282	48	17.0		284	24	8.5	
初中毕业	796	200	25.1		578	58	10.0	
高中毕业、中大专	512	112	21.9		414	34	8.2	
大学及以上	100	26	26.0		64	2	3.1	
饮酒频率				68.245				60.403
不饮	580	66	11.4		706	28	4.0	
1-2次/mo	188	42	22.3		108	6	5.6	
1次/wk	96	20	20.8		48	8	16.7	
2-3次/wk	186	48	25.8		128	8	6.3	
≥4次/wk	798	244	30.6		628	106	16.9	
吸烟支数				24.327				4.806
不吸	518	88	17.0		624	48	7.7	
≤300/d	442	86	19.5		414	38	9.2	
≤600支/d	702	190	27.1		484	62	12.8	
>600支/d	186	56	30.1		96	8	8.3	

表 3 朝鲜族和汉族GGT升高与多种代谢异常及其聚集现象的单因素分析

相关因素	朝鲜族				汉族			
	调查人数	升高例数(n)	检出率(%)	χ^2 值	调查人数	升高例数(n)	检出率(%)	χ^2 值
高血压				21.245 ^b				21.112 ^b
无	538	84	15.6		654	36	5.5	
有	1294	330	25.5		954	118	12.4	
高血糖				0.460				12.239 ^b
无	1602	358	22.3		1430	124	8.7	
有	230	56	24.3		178	30	16.9	
高TC血症				45.405 ^b				6.389
无	1732	364	21.0		1514	138	9.1	
有	100	50	50.0		94	16	17.0	
高TG血症				97.329 ^b				64.156 ^b
无	1140	172	15.1		1186	72	6.1	
有	692	242	35.0		422	82	19.4	
低HDL-C血症				0.184				0.048
无	840	186	22.1		780	76	9.7	
有	992	228	23.0		828	78	9.4	
整体型肥胖				8.790 ^b				1.095
无	1396	294	21.1		1172	118	10.1	
有	430	120	27.9		432	36	8.3	
腹型肥胖				32.169 ^b				0.494
无	1130	206	18.2		1146	106	9.2	
有	702	208	29.6		462	48	10.4	
MS				57.200 ^b				33.627 ^b
无	1260	222	17.6		1272	94	7.4	
有	572	192	33.6		336	60	17.9	

^b $P < 0.01$ vs 无代谢异常组。

表 4 GGT升高与相关因素Logistic回归分析

相关因素	β 值	S.E.	Wald χ^2 值	P值	OR值	95%CI
民族	0.838	0.114	54.125	0.000	2.311	1.849–2.889
年龄			34.085	0.000		
60岁–	0.871	0.361	5.814	0.016	2.390	1.177–4.854
50岁–	1.389	0.326	18.114	0.000	4.010	2.115–7.602
40岁–	1.090	0.324	11.318	0.001	2.974	1.576–5.612
30岁–	0.681	0.341	3.980	0.046	1.976	1.012–3.858
饮酒频率			102.763	0.000		
1–2次/mo	0.795	0.205	15.019	0.000	2.214	1.481–3.310
1次/wk	1.039	0.256	16.509	0.000	2.826	1.712–4.666
2–3次/wk	0.856	0.200	18.243	0.000	2.355	1.589–3.488
≥ 4 次/wk	1.379	0.138	100.412	0.000	3.970	3.030–5.200
吸烟支数			7.270	0.064		
≤ 300 /d	0.000	0.149	0.000	0.998	1.000	0.747–1.339
≤ 600 支/d	0.268	0.133	4.087	0.043	1.308	1.008–1.696
> 600 支/d	0.316	0.190	2.774	0.096	1.371	0.946–1.988
文化程度			9.062	0.060		
小学	-0.479	0.199	5.782	0.016	0.619	0.419–0.915
初中	-0.202	0.167	1.451	0.228	0.817	0.589–1.135
高中, 中大专	-0.435	0.183	5.666	0.017	0.647	0.453–0.926
大学及以上	-0.312	0.283	1.213	0.271	0.732	0.421–1.275
高血压	0.441	0.120	13.509	0.000	1.554	1.228–1.965
腹型肥胖	0.263	0.109	5.876	0.015	1.301	1.052–1.610
高TC血症	0.799	0.186	18.473	0.000	2.224	1.545–3.203
高TG血症	1.079	0.107	101.745	0.000	2.942	2.386–3.629
低HDL-C血症	0.181	0.102	3.153	0.076	1.199	0.981–1.464
MS	0.987	0.104	90.467	0.000	2.683	2.189–3.288

TC: 血清总胆固醇; TG: 甘油三酯; HDL-C: 高密度脂蛋白胆固醇.

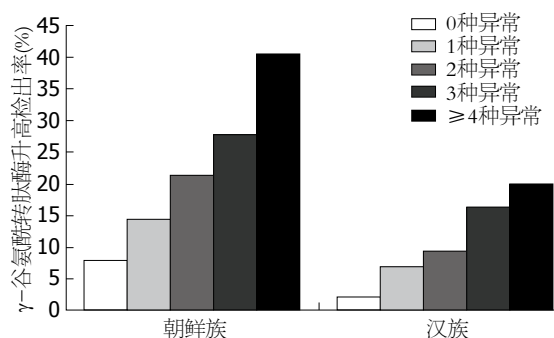


图 1 朝鲜族和汉族多种代谢异常聚集程度与GGT升高检出率(%).

和20.0%, 朝鲜族与汉族GGT升高的检出率随着多种代谢异常聚集程度的增加呈增加趋势, 其增加趋势有统计学意义($P < 0.01$, 图1).

3 讨论

一般人群的GGT升高者检出率不尽相同. 针对健康体检者进行的国外研究结果显示^[16], 男性GGT升高者检出率为18.6%. 国内的一项大样

■应用要点

在社区的疾病综合干预和临床实践工作中, 为GGT及其伴发的多种代谢心血管危险因素干预提供实验依据. 目前, GGT在预测心血管事件和MS等方面的价值已被证实, 由于GGT检测方便, 价格低廉, GGT可以作为MS发生风险的筛选指标, 且其在临床中可能有着广泛的应用前景.

本研究结果显示^[17], 男性GGT升高者检出率为7.2%; 另一项针对邮政、电信职工进行的体检结果显示^[18], 男性GGT升高者检出率为11.7%. 一项针对延边地区电力部门职工(25-74岁)进行的体检结果发现^[19], 男性GGT升高者所占比例为25.9%. 本次研究结果表明, 延边农村地区朝鲜族和汉族男性GGT升高者检出率分别为26.1%和13.9%, 且朝鲜族显著高于汉族. 本地区农村成人GGT升高检出率较其他地区高, 且出现明显的民族差异的可能原因是: (1)民族及文化风俗特点及经济因素造成. 延边地区朝鲜族仍然保留着热情好客的传统民俗特点, 群集文化娱乐活动较活跃. 还有, 由于本地地区的特殊的地理特点和语言条件的优势使本地区朝鲜族居民外出务工、出国劳务增多, 使本地区经济文化水平有了一定的提高, 人们的物质生活的大幅度提升, 势必影响及改变了人们的生活方式, 促使人们的社交及娱乐消遣活动增多. 上述这些因素均有可能改变本地区居民的饮酒和吸烟

■名词解释

γ-谷氨酰转移酶 (GGT): γ-谷氨酰循环中的关键酶,其功能为催化谷胱甘肽裂解为谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸,并且在γ-谷氨酰基连接成γ-谷氨酰缩氨酸过程中有水解及促进γ-谷氨酰基合成氨基酸和肽链的作用,他是反应肝功能异常和过量酒精摄入的传统标志;MS是高血压、血脂异常、糖尿病、肥胖等多种代谢异常的个体聚集现象。

习惯,使吸烟支数及饮酒频率明显增加。本次调查结果显示,本地区不同民族男性的吸烟率和饮酒率高于国内的其他地区^[13],且朝鲜族均高于汉族。本次研究单因素和多因素分析结果均显示,本地区不同民族男性的GGT与吸烟指数和饮酒均相关。本课题组前期小样本的分析结果也显示^[20],饮酒和吸烟与GGT异常患病危险密切相关,且饮酒频率对GGT异常的影响具有明显的剂量反应关系。国内多数研究结果均显示^[21-24],饮酒与GGT异常关系密切,其机制是酒精可使肝细胞膜上GGT释放入血引起血清GGT增高,另外微粒体诱导物可使GGT增高,而酒精有诱导微粒体酶的作用,故酒精亦可诱导GGT增高。有研究表明^[25],吸烟不仅与GGT升高有关联,而且吸烟可能影响GGT升高与MS的关联;(2)代谢异常性疾病在不同地区及民族间的患病水平差异。据前期多项研究结果显示^[8-12],延边地区成人高血压病、血脂异常、糖代谢异常、肥胖以及代谢综合征的患病水平均高于全国的平均水平,有些代谢异常病尚属较高发地区,而且出现明显的民族差异。国内多项研究结果均表明^[1-7],GGT升高与代谢综合征及其组分的患病危险密切相关,且对这些疾病的早期诊断与患病风险的预测具有重要意义;(3)据国外的研究报道^[26],GGT升高可能存在遗传易感性。至于本地区不同特征人群对GGT水平的遗传易感性的问题,到目前为止还没有可靠的证据能解释对本地区GGT升高的民族差异。还有其他一些影响GGT异常的因素在不同地区和民族间的分布特征差异,有待于今后进行系统深入的研究。

冯磊等的体检结果表明^[27],成年人GGT水平随着年龄的增长有增加的趋势,男性峰值在45-50岁年龄段,之后呈现出逐渐下降的趋势。于强^[18]的大样本健康体检结果发现,男GGT升高的高峰年龄为40岁左右;而另一项研究结果则显示^[19],男(21-85岁)GGT升高的检出率随着年龄的增长呈逐渐增加的趋势。本次研究GGT升高的年龄分布特征分析结果显示,其高峰年龄朝鲜族为40岁-年龄段,汉族为50岁-年龄段;多因素Logistic回归分析表明,本地区50岁-年龄段男性GGT升高的危险性最高(OR值高达4.010),这与其他研究结果基本一致。可能与该年龄男性人群的生活特点有关,提示应加强干预和管理该年龄人群的生活方式和监测GGT指标。

近年来的诸多研究结果均表明^[1-7],GGT升高与MS及其组分密切相关。GGT与MS之间的具

体联系机制尚不完全明确,但根据已有的研究,其可能的机制是GGT通过或参与IR^[28,29]、氧化应激^[30,31]、慢性炎症^[32-34]等过程促使MS及心血管疾病的发生。本次调查单因素和多因素分析结果均显示,GGT升高与高血压、腹型肥胖、高TC血症、高TG血症及MS密切相关,与上述研究结果基本一致。有研究表明^[6],GGT水平不仅与MS及其组分密切相关,而且与MS组分的聚集程度密切相关。本次研究结果也表明,本地区不同民族男性GGT升高检出率均随着多种代谢异常聚集程度的增加呈增加趋势。

目前,延边地区经济水平呈上升趋势,人民物质生活条件也富裕了起来,尤其农民经济收入的增加使其生活方式发生了很大的变化,由此推测不合理的膳食结构和不良生活方式导致的GGT升高与其相关多种代谢性疾病,如高血压、高血糖、高血脂、代谢综合征患病率也可能逐渐升高。提醒我们在今后社区的疾病综合干预和临床实践工作中,要重视对GGT及其危险因素的干预。目前,GGT在预测心血管事件和MS等方面的价值已被证实,由于GGT检测方便,价格低廉,GGT可以作为MS发生风险的筛选指标,且其在临床中可能有着广泛的应用前景。

4 参考文献

- 周勇,樊锦秀,江雅平,赖卫强,李招云. 代谢综合征与GHb及GGT相关性. 浙江医学 2009; 31: 1001-1002
- 焦连亨,蔡钢强. 高血清γ-谷氨酰转移酶对疾病的预示作用. 国际检验医学杂志 2009; 30: 46-48
- 吴政,杨明,黄春. 老年人谷氨酰转氨酶异常与代谢综合征危险因素及颈动脉硬化关系. 中国老年保健医学杂志 2010; 8: 41-42, 45
- 申春梅,王龙武,王妹芳. 血清GGT、ALT对2型糖尿病早期诊断价值的初步探讨. 检验医学 2010; 25: 349-351
- 李洁茹,刘伟旗. 血清谷氨酰转移酶与代谢性疾病的关系. 检验医学与临床 2009; 6: 1660-1661
- 李英秋,龙江丽,张岩,王向阳. 血清谷氨酰转氨酶与代谢综合征的相关性分析. 中国临床保健杂志 2009; 12: 526-528
- 陈秀梅,卢新政,占伊扬,许迪,郭妍,宗文纳. 血浆γ-谷氨酰转氨酶与血压水平的关系. 中华高血压杂志 2010; 18: 744-748
- 方今女,金平锡,周巍,孙男,熊英环. 延边朝鲜族自治州朝鲜族和汉族人群血脂异常情况及其相关因素. 中华预防医学杂志 2008; 42: 111-114
- 方今女,金平锡,崔兰,周巍,孙男,熊英环. 朝鲜族与汉族人群高血压亚型分布特征比较. 中国公共卫生 2008; 24: 257-259
- 许梅花,李跃,熊英环,方今女. 农村居民空腹血糖受损及糖尿病患病调查. 中国公共卫生 2011; 27: 188-190
- 金香春,方今女,黄明爱,金钟久,金平锡. 延边农村朝鲜族和汉族居民肥胖类型及相关因素的调查. 中国临床康复 2007; 11: 6908-6911
- 熊英环,南美兰,方今女. 农村居民代谢综合征不同诊断标准评价. 中国公共卫生 2010; 26: 933-934

- 13 黄明爱, 方今女, 金香春, 金永哲, 许梅花. 延边农村朝鲜族和汉族居民代谢综合征及其相关因素比较. 中国临床康复 2006; 10: 7-9
- 14 吴善玉, 方今女, 全贞玉, 崔莲花, 金昌吉. 延吉市朝鲜族和汉族居民死亡水平分析. 中国卫生统计 2004; 21: 46-47
- 15 中国成人血脂异常防治指南制定联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南. 中华心血管病杂志 2007; 35: 390-419
- 16 Poelzl G, Eberl C, Achraimer H, Doerler J, Pachinger O, Frick M, Ulmer H. Prevalence and prognostic significance of elevated gamma-glutamyltransferase in chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2009; 2: 294-302 [PMID: 19808352 DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.]
- 17 于强. 健康体检血清 γ -谷氨酰转肽酶检测分析. 实验与检验医学 2010; 28: 489-490
- 18 李洁茹, 刘伟旗. 血清谷氨酰转氨酶与代谢性疾病的关系. 检验医学与临床 2009; 19: 1660-1662
- 19 任吉娜. 1 057例健康人血脂、肝功能结果分析. 中国临床实用医学 2008; 2: 73-74
- 20 金永哲, 朴鲜女, 熊英环, 方今女. 延边农村男性居民GGT异常及其相关因素的调查. 中国公共卫生 2012; 28: 909-912
- 21 马文, 王平平, 吉增军, 马正坤. 3135例长期饮酒者血清 γ -谷氨酰转氨酶、甘油三酯、总胆固醇测定结果分析. 国际检验医学杂志 2007; 28: 87-89
- 22 金凤影. γ -谷氨酰转氨酶(GGT)的测定对酒精性肝炎的诊断价值. 中国实用医药 2009; 4: 149-150
- 23 陈晶. 长期饮酒对血清 γ -谷氨酰转氨酶检测结果的影响. 中国实用医药 2009; 4: 127-128
- 24 谭亚君, 陈瑜, 金胜航, 楼滨, 张杰. 酒精摄入量与心血管病危险因子的相关性研究. 浙江大学学报(医学版) 2009; 38: 89-94
- 25 Mason JE, Starke RD, Van Kirk JE. Gamma-glutamyl transferase: a novel cardiovascular risk biomarker. *Prev Cardiol* 2010; 13: 36-41 [PMID: 20021625 DOI: 10.1111/j.1751-7141.]
- 26 Whitfield JB, Zhu G, Nestler JE, Heath AC, Martin NG. Genetic covariation between serum gamma-glutamyltransferase activity and cardiovascular risk factors. *Clin Chem* 2002; 48: 1426-1431 [PMID: 12194918]
- 27 冯磊, 年士艳, 徐文波, 叶丹, 罗曼玲. γ -谷氨酰转氨酶随年龄及性别变化趋势分析. 临床荟萃 2011; 26: 615-617
- 28 Martins MC, Faleiro LL, Afonso B, Fonseca A. [Association of gamma glutamyltransferase, metabolic syndrome and cardiovascular risk]. *Acta Med Port* 2010; 23: 579-588 [PMID: 20687985]
- 29 Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, Whincup PH. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. *Diabetes Care* 2005; 28: 2913-2918 [PMID: 16306554]
- 30 Lee DH, Blomhoff R, Jacobs DR. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res* 2004; 38: 535-539 [PMID: 15346644]
- 31 Turgut O, Tandogan I. Gamma-glutamyltransferase to determine cardiovascular risk: shifting the paradigm forward. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18: 177-181 [PMID: 21041983]
- 32 Franzini M, Corti A, Martinelli B, Del Corso A, Emdin M, Parenti GF, Glauber M, Pompella A, Paolicchi A. Gamma-glutamyltransferase activity in human atherosclerotic plaques--biochemical similarities with the circulating enzyme. *Atherosclerosis* 2009; 202: 119-127 [PMID: 18486136 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.023]

■同行评价

本课题设计合理, 分析方法恰当, 结果可信. 研究结果对延边地区男性预防和预测心血管事件与MS有一定意义.

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 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.

肝硬化腹水形成机制的研究现状

邵茉莉, 刘冰熔

■背景资料

世界范围内肝硬化发病率保持在较高水平, 对人类生命健康具有较大的威胁。在我国, 病毒性肝炎是导致肝硬化的主要致病因素, 尤其以乙型病毒性肝炎肝硬化最常见。肝硬化腹水的形成是门静脉高压和肝功能减退共同作用的结果, 而具体的形成机制尚未明确。对于腹水形成机制的研究有助于指导临床治疗, 具有重大的意义。

邵茉莉, 刘冰熔, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150000

作者贡献分布: 本文综述由邵茉莉完成; 刘冰熔负责审校。

通讯作者: 刘冰熔, 教授, 主任医师, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。shaomoli@163.com

电话: 0451-86296562

收稿日期: 2012-11-20 修回日期: 2013-01-02

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Pathophysiology of ascites formation in liver cirrhosis

Mo-Li Shao, Bing-Rong Liu

Mo-Li Shao, Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Bing-Rong Liu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. shaomoli@163.com

Received: 2012-11-20 Revised: 2013-01-02

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

Liver cirrhosis has a high morbidity and poses a large threat to human health worldwide. In China, viral hepatitis, especially hepatitis B, is the main pathogenic factor of liver cirrhosis. Ascites formation in cirrhosis is the result of combined action of portal hypertension and liver function impairment, and it is the most prominent clinical manifestation of decompensated cirrhosis. The understanding of pathophysiology of ascites formation can help provide more accurate treatment of this condition so as to alleviate patients' mental and economic burdens.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Cirrhosis; Ascites; Pathophysiology

Shao ML, Liu BR. Pathophysiology of ascites formation in liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 160-165

摘要

目前, 世界范围内肝硬化发病率保持在较高水

平, 对人类生命健康具有较大的威胁。在我国, 病毒性肝炎是导致肝硬化的主要致病因素, 尤其以乙型病毒性肝炎肝硬化最常见。肝硬化腹水的形成是门静脉高压和肝功能减退共同作用的结果, 而腹水的形成是肝硬化发展为肝功能失代偿期最突出的临床表现。对腹水形成机制的研究有助于指导临床更为准确的用药, 以减轻患者的精神及经济压力。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 肝硬化; 腹水; 形成机制

邵茉莉, 刘冰熔. 肝硬化腹水形成机制的研究现状. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 160-165

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/160.asp>

0 引言

肝硬化腹水是肝硬化失代偿期最为突出的临床表现之一。正常人腹腔内有少量游离液体, 大约 50 mL 左右, 起到维持脏器间润滑的作用。而当腹腔内的游离液体超过 200 mL 时称为腹水^[1]。腹水的形成是慢性肝病自然病程的重要标志, 提示肝硬化肝功失代偿, 预后不佳。腹水的形成是多种因素共同作用的结果。并且所有肝硬化患者腹水形成的病理生理学是相同的以及对利尿剂反应的逐步发展最终导致利尿剂抵抗, 或者顽固性腹水的形成以及对肾功能衰竭, 都只是内脏和系统血管舒张和肾脏血管灌注不足的表现^[2]。代偿期肝硬化患者十年内约有 50% 进展为腹水形成^[3]。与无腹水形成的肝硬化失代偿期患者相比, 有腹水形成的患者死亡率明显增高, 约有 15% 的腹水患者在一年内死亡, 44% 的腹水患者在两年内死亡^[4]。同时, 肝硬化患者腹水形成之后, 患者的生活质量明显下降, 且 5 年生存率降到 50%^[5]。而假若腹水已进展为难治性腹水, 不进行肝移植的话, 预后将会更差, 2 年生存率下降到 40%-60%^[6]。对腹水进行治疗不仅改善了患者的生活质量, 同时减少了进展为肝硬化最常见的致死性并发症-自发性细菌性腹膜炎的几率^[7]。因此, 对肝硬化腹水形成机制进行研究, 从

■同行评议者

李涛, 副主任医师, 北京大学人民医院肝胆外科

而指导临床用药治疗,对改善患者的生活质量和预后有很大的意义。

目前,关于肝硬化腹水的形成机制尚未完全阐明。腹水的形成是一个复杂的过程,主要涉及肝脏、肾脏、血流动力学以及神经激素因子等。腹水形成的主要病理生理学学说包括:灌注不足学说,充盈过度学说,周围动脉扩张学说等^[8]。这理论并不是完全对立的,而是在某些水平上由相同的病生理原理相联系的,即当身体感知到有效动脉血容量下降时,刺激交感神经系统兴奋,激活精氨酸-抗利尿激素反馈系统及肾素-血管紧张素-醛固酮系统。

1 充盈不足学说

经典的灌注不足^[9]学说主要依据的是Starling液体平衡理论。Starling液体平衡理论是指:由血管内外静水压和胶体渗透压所形成的一种综合平衡。同时,充盈不足学说认为,肝结节的纤维化和再生致使肝静脉流出道梗阻使得肝窦状隙压力增加是腹水形成的始发因素^[10],他使得门静脉阻力增加,同时导致肝内及体循环流体静压增加。该学说认为在肝硬化门脉高压时,一方面,门静脉系毛细血管静水压增高和/或血浆胶体渗透压下降,导致毛细血管床的Starling平衡被打破,血管内的液体溢入腹腔。血管内液体丢失致使有效循环血容量降低,经心肺和动脉感受器感应后,导致钠水潴留,但这些潴留的液体并不能恰当的补充血容量,反而进一步潴留于腹腔,形成恶性循环;与此同时淋巴液生成增加,超过了胸导管收集淋巴液进入血液循环的能力,由此导致淋巴液淤滞,从淋巴管漏出,经腹膜脏层和/或肝表面进入腹腔形成腹水^[9]。另外,阻塞和内脏循环淤血使系统循环阻力降低,导致肾脏的有效动脉血流量降低,同时腹水形成后也使得有效循环血量减少,从而激活RAAS系统,去甲肾上腺素系统及精氨酸加压素系统,使肾小管对钠、水重吸收增加,又进一步促进腹水的形成,也就是说钠水潴留是继发性的^[10,11]。过度充盈学说假定不恰当的肾脏水钠潴留是造成腹水形成的首发异常情况^[12]。

但有学者注意到,很多现存的证据与充盈不足理论有矛盾。一方面,几乎所有相关试验均表明,肝硬化者的血容量并不降低,反而恒定高于非肝硬化者。Lieberman等^[12]应用同位素标志法测定表明,不论有无腹水,肝硬化组血容量都高于非肝硬化者,而且门腔静脉分流术后并未

减少患者血容量,这就说明了总血容量的增加,并不是由于门脉高压导致的内脏血液淤积所引起;另一方面,La Villa等^[13]的研究表明,肾钠潴留仅与门脉压力升高有关,而门脉压力增高激活RAAS系统,而与体循环动力学无关,也就是说并不是因为“灌注不足”才导致的肾钠潴留。也有相关动物实验表明肾钠潴留先于腹水形成,提示钠潴留是原因而非腹水形成的结果。从而由此提出了第二种学说:“泛滥学说”。

2 泛滥学说

泛滥学说^[11]主要阐述了腹水形成时门脉高压与低血容量的关系。认为肝硬化门脉高压患者腹水形成之前,就已经存在钠水潴留,血容量增加、淋巴液流量增加,充盈过度而“泛滥”于腹腔内,Gattoni等^[14]的研究证实,实验中肝硬化狗,钠水潴留先于低蛋白血症出现,并且不依赖于门脉高压的存在,由此得出钠水潴留是腹水形成的始动因素,紧接着出现了明显的容量增加后形成腹水。那么,又是什么导致了钠水潴留?Levy等^[15]认为,肝脏内存在低压性压力感受器,可以向肾小管发出潴钠的信号。即:在肝硬化门脉高压时,由于肝功能改变和肝窦内压增高,从而通过神经体液因素引起肾钠潴留^[16]继而出现血容量扩张,最后形成腹水。也就是说钠水潴留及血容量扩张是在腹水形成之前就存在的。

当然,也有不支持泛滥学说的证据:肝硬化存在交感神经张力增高,部分实验证明,在腹水形成之前的早期肝硬化鼠,已然存在RAAS活性的增强,而以血容量增加为基础的过度充盈学说,则会抑制交感缩血管系统和RAAS。另外,神经完好、门脉完好的狗,其血容量会扩张18.3%,而去除神经者为12.6%,这至少说明肝肾反射不是肝硬化早期腹水形成前导致钠水潴留的唯一机制。

上述理论表明在腹水形成和增加是多种因素共同作用的结果。这些因素包括肝脏本身的功能状态,肾功能异常,系统循环紊乱以及神经激素的激活。

3 周围动脉扩张学说

周围动脉扩张学说^[17]认为肝硬化时钠水潴留在先,腹水形成在后。此学说于1988年由Schrier^[17]提出,他认为在肝硬化腹水形成之前,先有周围动脉扩张,后激活缩血管物质、钠水潴留系统和交感神经、肾素-血管紧张素-醛固酮系统以

■研发前沿

近年来,研究发现,根据周围动脉扩张理论,周围和内脏血管的扩张导致了有效血容量的降低和高动力循环状态。由于周围动脉血管扩张激活了血管收缩机制,但其引起强烈的肾血管收缩,阻碍了肾脏的功能。调节血管收缩的中介物是交感神经反应,激活肾素血管紧张素醛固酮系统,增加血管加压素。而涉及全身小动脉扩张的因素,包括:NO、胰高血糖素、前列环素、钾通道、内毒素、细胞因子和腺苷。

■相关报道

近年提出的腹水形成前相学说认为肝硬化、门脉高压所引起的内脏动脉扩张是腹水形成的原因,内脏动脉扩张后,一方面直接影响内脏微循环,促进微循环毛细血管压和滤过系数增加,导致内脏淋巴液形成和回流增多;另一方面内脏动脉扩张、充盈不足则通过神经、体液因素诱导体内钠水潴留,最终导致腹水形成。

■创新盘点

本文对近年国内外对肝硬化腹水形成机制的几种学说以及详细病理生理学方面进行了综合的论述,为肝硬化腹水形成机制的进一步研究提供了一定的参考。

及血管加压素等,使肾血管收缩,钠水潴留,从而最终形成腹水。也就是说肝硬化钠水潴留发生在有效动脉血容量减少之后。根据这一理论,门脉高压是起始因素,其引起脾动脉血管扩张并导致脾动脉循环充盈不足,感应动脉血流量减少的动脉受体刺激交感神经系统、肾素-血管紧张素-醛固酮系统和抗利尿激素,引起水钠潴留。在肝硬化早期,脾动脉中度扩张且淋巴系统尚能疏通增加的淋巴液时,一过性水钠潴留维持了动脉循环,抑制了抗钠利尿系统信号和钠潴留,动脉血流量与总细胞外液容量之间维持平衡。随着肝硬化进展,脾动脉明显扩张导致更广泛的动脉充盈不足,水钠潴留日趋严重,潴留的液体从脾循环溢入腹腔和/或从体循环进入间隙组织,此时动脉血流量已不能由增加血浆容量来维持,而血管收缩系统持续激活试图维持动脉血流量,从而加重了肾脏的水钠潴留。结果动脉血流量与总细胞外液间平衡遭到破坏,细胞外液体进行性扩张,动脉血流量不断减少。

目前最为普遍接受的理论是周围动脉血管扩张是腹水形成的始动因素^[15]。窦状隙门脉压力的增加导致内脏血管舒张,极有可能是由目前尚未确定的血管活性物质所调节的^[18]。这个过程依次导致系统动脉血管充盈不足,最终增加了内脏毛细血管压及渗透系数^[19]。晚期肝硬化患者是高动力循环状态伴有系统循环阻力降低,平均动脉压降低及高心输出量^[20]。扩张的内脏血管床是扰乱系统循环的主要血管源。肝硬化患者主要提供给肾脏血流的其他血管床收缩^[21],肾血管收缩最终导致肾功能受损,钠重吸收,水潴留,腹水持续生成。

4 选择性肝肾学说

该学说于1997年提出,也称为肝肾相互作用学说^[22]。该学说把肝硬化腹水发展分成4个阶段:腹水前期、反应性腹水期、顽固性腹水期和肝肾综合征期。对于未形成腹水的肝硬化患者,即腹水前期的肝硬化患者,既无体循环动脉的扩张亦无充盈不足,但由于肝功能不全和门静脉高压通过神经反射已经影响了肾对钠的处理,而此时的钠水潴留具有自限性。反应性腹水期肾脏钠水潴留明显增加而失代偿,总血容量增加,继之大量舒血管物质释放引起全身周围动脉扩张,然后通过周围动脉扩张学说方式出现腹水。顽固性腹水期随着总血管容量的增加,有效循环血量相对不足,刺激容量感受器及肾小

球旁装置,而后激活RAAS并刺激ADH的生成。由于外周血管对血管活性物质反应敏感性低而对血管活性物质反应敏感性高导致肾血管收缩、肾血流减少、肾脏对钠水重吸收增加,以补充已经扩张的血管的血容量。肝肾综合征期肝硬化失代偿的患者为血容量的回补不足以有效的抑制交感缩血管系统激活及钠水潴留激素的进一步释放,从而导致肾血管进一步收缩、肾脏严重低灌注、严重钠水潴留和肾功能衰竭。也就是说肝功能不全和门静脉高压引起的肝肾神经反射在肝硬化腹水形成中为始动因素。

近年来, Eriksson等^[23]提出腹水和血清中的增加的细胞因子不断地参与炎症反应,从而引发持续进行的系统炎症反应。他认为,这也是导致肝硬化腹水患者肝功能障碍的发生和发展以及腹水体积持续增加的原因之一。

各种因素导致肝细胞损伤,发生变性坏死,进而肝细胞再生和纤维结缔组织增生,肝纤维化形成,最终发展为肝硬化。上述病理改变造成血管床缩小,闭塞和扭曲,血管受到再生结节挤压,肝内门静脉、肝静脉和肝动脉三者分支之间失去正常关系,并且出现交通吻合支等。肝脏血液循环紊乱是形成门静脉高压的病理基础,并且加重肝细胞的缺血缺氧,促进肝硬化病变的进一步发展。肝窦的毛细血管化在肝细胞损害和门静脉高压的发生发展中起重要的作用。早期的纤维化是可逆的,假小叶形成时即已为不可逆性。

肝脏受损的解剖学形态非常重要。由于肝静脉栓子而形成的肝后性门静脉高压时产生的腹水很难治疗,比如巴德吉亚利综合征^[24]。另一方面,由于门静脉血栓子导致的门静脉高压而形成腹水的患者,是一种晚期的临床表现,而这些患者的腹水,常较易于控制^[25]。

首先,门静脉压力增高。正常的门静脉压力为13-24 cm H₂O之间,平均值为18 cm H₂O,门静脉高压时,压力大都增至30-50 cm H₂O。(1)门静脉压力升高,腹腔内血管床静水压增高,即门静脉系统毛细血管床的滤过压增加,组织液回吸收减少而漏入腹腔;(2)门静脉高压时肝窦压升高,大量液体进入Disse间隙,造成淋巴液生成增加,超过淋巴负荷,肝窦的流体静压有利于液体从肝包膜直接漏入腹腔形成腹水^[26]。而动物实验表明,门静脉压力每升高一毫米汞柱,肝脏生成的淋巴液量增加60%。

其次,肝硬化患者,窦状小管门静脉高压导致外周动脉扩张,由此引起全身血管阻力降

低, 在内脏循环尤为明显. 根据周围动脉扩张理论, 周围和内脏血管的扩张导致了有效血容量的降低和高动力循环状态^[27]. 由于周围动脉血管扩张激活了目的在于维持血压的血管收缩的机制, 但这些引起强烈的肾血管收缩, 阻碍了肾脏的功能^[28]. 调节血管收缩的中介物是交感神经反应, 激活肾素血管紧张素醛固酮系统, 增加血管加压素^[29]. 而涉及全身小动脉扩张的因素, 包括: NO、胰高血糖素、前列环素、钾通道、内毒素、细胞因子和腺苷^[30]. 肝硬化患者高浓度的亚硝酸盐和硝酸盐提示NO生成增多, 而NO的生成对于外周血管扩张起着重要的作用^[31]. 胰高血糖素的水平也普遍升高, 这些使肠系膜循环血管对药物剂量的儿茶酚胺及血管紧张素II脱敏, 导致血管舒张^[32]. 肝硬化长期患者尿中前列腺素排泄增多, 表明其在体内的生成增加^[33]. 活化钾水平增高导致血管舒张的原因是血管平滑肌细胞的超极化, 从而证明了这些通道的激活对于肝硬化患者的血管舒张起重要作用^[34]. 内毒素导致内脏血管舒张可能是有细胞因子和NO介导的, 肝硬化失代偿期患者内毒素含量的增加可能与细菌移位及门体分流有关^[35]. 而腺苷发挥双重作用, 扩张内脏血管, 收缩肾血管^[36]. 假定NO的释放来自于3个不同的部位: 血管内皮^[37]; 血管平滑肌细胞; 内脏毛细血管内广泛分布的去甲肾上腺素能和胆碱能神经系统^[38]. 有学者提议, 在肝硬化腹水的动物模型中, NO合酶的激活是由于肠腔内的细菌移位而导致的^[39]. 因此, NO在内脏血管床释放, 并集中在发生舒张的血管, 从而逐渐出现了之前讨论的许多机制. Spahr等^[40]坚持认为, NO对于肝硬化患者的动脉血管扩张有重要的作用. 他们给肝硬化失代偿期的患者使用氮(克)-甲基-L-精氨酸阻断NO合酶, 证明可以增加系统血液循环阻力, 并且降低了心输出量, 肝血流量和血浆肾素活性. 在老鼠的肝硬化模型的研究中表明, 相对于内脏循环中过剩的NO, 在窦状隙和窦后性区域肝内生成的NO被严重地破坏, 但是在窦前性区域保存很好. Loureiro-Silva等^[41]猜测, 在肝硬化患者中, NO含量的减少, 尤其是在肝内循环的窦前性区域的减少, 促进了对于 α -肾上腺素水平增高的过度反应. 假定的窦状隙高压的加剧, 如此, 又加重了腹水的生成. 即在肝硬化腹水时, NO调节的扩血管系统被激活, 尽管激活NO生成的机制尚不明确. 但是NO的生成确实导致有效循环血量的减少^[42]. 从而导致肝硬化时机体处于高心输出量, 低外

周阻力的高动力循环状态, 此时内脏小动脉扩张^[43], 大量血液滞留于扩张的血管内, 虽然门静脉内血流量增加, 但中心血流量却是降低的, 即有效循环血容量下降, 肾小球旁系统感知低血容量, 故而激活了交感神经系统, 肾素血管紧张素醛固酮系统, 精氨酸加压素系统^[44], 从而刺激醛固酮分泌增多, 导致肾小球滤过率下降及肾钠水重吸收增加, 发生钠水潴留而加剧腹水形成. 肝硬化患者水潴留增多是多种因素导致的, 涉及过高水平的血管加压素, 减少呈递给亨氏套的肾小球滤过物和前列腺素合成受损. 而水排泄受损主要发生在进展期肝硬化患者^[8]. 以上这些表现中, 起最主要作用的是血浆中高含量的血管加压素. 肝硬化患者肾血管收缩, 与呈递给海氏祥的髓攀升支的肾小球滤过物的体积减小有关, 从而进一步减少了自由水的排泄^[45]. 第三个主要导致水潴留的因素是肾前列腺素PGI₂与PGE₂合成的相互转变. 相关实验表明PGE₁可降低们静脉高压^[46], 肝硬化患者的PGI₂和PGE₂的合成减少, 而血管加压素的作用有所增强. 在疾病的最终阶段, 严重的肾血管收缩后来甚至导致了肝肾综合征^[17].

再次, 肝硬化患者, 肝脏淋巴液的生成超过了淋巴管的引流能力, 从而形成腹水^[47]. 肝窦状隙的渗透性降低, 随着时间的进展, 肝脏淋巴液中蛋白质的含量不断降低^[48]. 肝硬化时肝脏合成蛋白减少, 导致低蛋白血症, 当白蛋白<30 g/L时, 血管内血浆胶体渗透压下降^[49], 致使血管内液体进入组织间隙, 也就是说促使血管内液体从肝脏表面及肠浆膜面等处漏入腹腔, 形成腹水.

由于各种原因导致的诸如以下这些物质的缺乏或者增多, 如心房钠尿肽相对不足及机体对其敏感性下降, 抗利尿激素分泌增加等等, 同样可能是导致钠水潴留, 腹水形成的一些相关因素.

5 结论

虽然对于肝硬化腹水形成机制已经进行了很多研究, 更加有利于对腹水的诊断和治疗, 然而预后仍然没有达到预期的效果, 目前最有效的治疗当属于肝脏移植, 而目前我国的肝源仍存在很大的问题, 所以仍然需要对腹水形成机制进行更加详细的研究, 指导临床治疗, 最终改善患者的生活质量并提高5年生存率.

6 参考文献

- 1 梁扩寰, 李绍白. 门静脉高压症. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1999: 197

■应用要点

目前, 世界范围内肝硬化发病率保持在较高水平, 而肝硬化腹水的形成是肝硬化患者病情进展的重要标志. 腹水的形成给患者及家属带来巨大的压力. 而对于腹水形成机制进行研究从而指导临床治疗, 会改善患者的生活质量. 并有可能阻止腹水的生成, 从而降低腹水的发病率, 提高肝硬化患者的生存率.

■名词解释

腹水: 正常状态下, 人体腹腔内有少量液体(一般少于200 mL), 对肠道蠕动起润滑作用。任何病理状态下导致腹腔内液体量增加超过200 mL时, 称为腹水。

- 2 Ginès P, Cárdenas A. The management of ascites and hyponatremia in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 43-58 [PMID: 18293276 DOI: 10.1055/s-2008-1040320]
- 3 Sandhu BS, Sanyal AJ. Management of ascites in cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 715-732, viii [PMID: 16207572 DOI: 10.1016/j.cld.2005.07.008]
- 4 Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology* 2009; 49: 2087-2107 [PMID: 19475696 DOI: 10.1002/hep.22853]
- 5 Planas R, Montoliu S, Ballesté B, Rivera M, Miquel M, Masnou H, Galeras JA, Giménez MD, Santos J, Cirera I, Morillas RM, Coll S, Solà R. Natural history of patients hospitalized for management of cirrhotic ascites. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1385-1394 [PMID: 17081806 DOI: 10.1016/j.cgh.2006.08.007]
- 6 Salerno F, Cammà C, Enea M, Rössle M, Wong F. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for refractory ascites: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* 2007; 133: 825-834 [PMID: 17678653 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.020]
- 7 Garcia-Tsao G. Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 2001; 120: 726-748 [PMID: 11179247 DOI: 10.1053/gast.2001.22580]
- 8 Sabri M, Saps M, Peters JM. Pathophysiology and management of pediatric ascites. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5: 240-246 [PMID: 12734047 DOI: 10.1007/s11894-003-0026-6]
- 9 Witte MH, Witte CL, Dumont AE. Progress in liver disease: physiological factors involved in the causation of cirrhotic ascites. *Gastroenterology* 1971; 61: 742-750 [PMID: 5117639]
- 10 Wongcharatrawee S, Garcia-Tsao G. Clinical management of ascites and its complications. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 833-850 [PMID: 11565143 DOI: 10.1016/S1089-3261(05)70194-X]
- 11 Schrier RW. Pathogenesis of sodium and water retention in high-output and low-output cardiac failure, nephrotic syndrome, cirrhosis, and pregnancy (2). *N Engl J Med* 1988; 319: 1127-1134 [PMID: 3050523 DOI: 10.1056/NEJM198810273191705]
- 12 Lieberman FL. Overflow theory of ascites formation. *Gastroenterology* 1989; 96: 274 [PMID: 2909434]
- 13 La Villa G, Salmerón JM, Arroyo V, Bosch J, Ginés P, García-Pagán JC, Ginés A, Asbert M, Jiménez W, Rivera F. Mineralocorticoid escape in patients with compensated cirrhosis and portal hypertension. *Gastroenterology* 1992; 102: 2114-2119 [PMID: 1587432]
- 14 Gattoni A, Marotta F, Vangieri B, Pisani G, Cristiano F. Hepatorenal syndrome. *Clin Ter* 2004; 155: 375-389 [PMID: 15700631]
- 15 Levy M, Wexler MJ. Hepatic denervation alters first-phase urinary sodium excretion in dogs with cirrhosis. *Am J Physiol* 1987; 253: F664-F671 [PMID: 3661718]
- 16 Kostreva DR, Castaner A, Kampine JP. Reflex effects of hepatic baroreceptors on renal and cardiac sympathetic nerve activity. *Am J Physiol* 1980; 238: R390-R394 [PMID: 7377377]
- 17 Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8: 1151-1157 [PMID: 2971015 DOI: 10.1002/hep.1840080532]
- 18 Fernandez-Seara J, Prieto J, Quiroga J, Zozaya JM, Cobos MA, Rodriguez-Eire JL, Garcia-Plaza A, Leal J. Systemic and regional hemodynamics in patients with liver cirrhosis and ascites with and without functional renal failure. *Gastroenterology* 1989; 97: 1304-1312 [PMID: 2676683]
- 19 Korthuis RJ, Kinden DA, Brimer GE, Slattey KA, Stogsdill P, Granger DN. Intestinal capillary filtration in acute and chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1988; 254: G339-G345 [PMID: 3348400]
- 20 Bernardi M, Fornalè L, Di Marco C, Trevisani F, Baraldini M, Gasbarrini A, De Collibus C, Zacà F, Ligabue A, Colantoni A. Hyperdynamic circulation of advanced cirrhosis: a re-appraisal based on posture-induced changes in hemodynamics. *J Hepatol* 1995; 22: 309-318 [PMID: 7608482 DOI: 10.1016/0168-8278(95)80284-3]
- 21 Maroto A, Ginès P, Arroyo V, Ginés A, Saló J, Clària J, Jiménez W, Bru C, Rivera F, Rodés J. Brachial and femoral artery blood flow in cirrhosis: relationship to kidney dysfunction. *Hepatology* 1993; 17: 788-793 [PMID: 8491446]
- 22 范开春, 程留芳. 肝硬化腹水发生机制. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 180
- 23 Eriksson AS, Gretzer C, Wallerstedt S. Elevation of cytokines in peritoneal fluid and blood in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 505-509 [PMID: 15086192]
- 24 Plessier A, Valla DC. Budd-Chiari syndrome. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 259-269 [PMID: 18814079 DOI: 10.1055/s-0028-1085094]
- 25 Garcia-Pagán JC, Hernández-Guerra M, Bosch J. Extrahepatic portal vein thrombosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 282-292 [PMID: 18814081 DOI: 10.1055/s-0028-1085096]
- 26 Kravetz D, Bildoza M, Argonz J, Romero G, Korula J, Muñoz A, Suarez A, Terg R. Patients with ascites have higher variceal pressure and wall tension than patients without ascites. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1770-1775 [PMID: 10925983 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2000.02178.x]
- 27 Schrier RW. Decreased effective blood volume in edematous disorders: what does this mean? *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2028-2031 [PMID: 17568020 DOI: 10.1681/ASN.2006111302]
- 28 Gentilini P, Vizzutti F, Gentilini A, La Villa G. Ascites and hepatorenal syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 313-316 [PMID: 11338056 DOI: 10.1097/00042737-200104000-00003]
- 29 Dagher L, Moore K. The hepatorenal syndrome. *Gut* 2001; 49: 729-737 [PMID: 11600480 DOI: 10.1136/gut.49.5.729]
- 30 Genzini T, Torricelli FC. Hepatorenal syndrome: an update. *Sao Paulo Med J* 2007; 125: 50-56 [PMID: 17505686 DOI: 10.1590/S1516-31802007000100010]
- 31 Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novel-la MT, Balanzo J, Vilardell F, Mourelle M, Moncada S. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; 18: 1139-1143 [PMID: 8225220 DOI: 10.1002/hep.1840180520]
- 32 Pak JM, Lee SS. Glucagon in portal hypertension. *J Hepatol* 1994; 20: 825-832 [PMID: 7930485]
- 33 Guarner F, Guarner C, Prieto J, Colina I, Quiroga J, Casas J, Freixa R, Rosello J, Gelpi E, Balanzo J.

- Increased synthesis of systemic prostacyclin in cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1986; 90: 687-694 [PMID: 3510938 DOI: 10.1016/0168-8278(95)80292-4]
- 34 Moreau R, Lebrec D. Endogenous factors involved in the control of arterial tone in cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 22: 370-376 [PMID: 7608490 DOI: 10.1002/hep.1840080207]
- 35 Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8: 232-236 [PMID: 3281884 DOI: 10.1002/hep.1840080207]
- 36 Lee SS, Chilton EL, Pak JM. Adenosine receptor blockade reduces splanchnic hyperemia in cirrhotic rats. *Hepatology* 1992; 15: 1107-1111 [PMID: 1592351 DOI: 10.1002/hep.1840150622]
- 37 Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1078-1087 [PMID: 10442089 DOI: 10.1007/s000180050358]
- 38 Chowdhary S, Townend JN. Role of nitric oxide in the regulation of cardiovascular autonomic control. *Clin Sci (Lond)* 1999; 97: 5-17 [PMID: 10369789 DOI: 10.1042/CS19980399]
- 39 Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995; 108: 1835-1841 [PMID: 7768390 DOI: 10.1016/0016-5085(95)90147-7]
- 40 Spahr L, Martin PY, Giostra E, Niederberger M, Lang U, Capponi A, Hadengue A. Acute effects of nitric oxide synthase inhibition on systemic, hepatic, and renal hemodynamics in patients with cirrhosis and ascites. *J Invest Med* 2002; 50: 116-124 [PMID: 11928940 DOI: 10.2310/6650.2002.31273]
- 41 Loureiro-Silva MR, Cadelina GW, Groszmann RJ. Deficit in nitric oxide production in cirrhotic rat livers is located in the sinusoidal and postsinusoidal areas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G567-G574 [PMID: 12490431]
- 42 La Villa G, Gentilini P. Hemodynamic alterations in liver cirrhosis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 112-118 [PMID: 18177931 DOI: 10.1016/j.mam.2007.09.010]
- 43 Hennenberg M, Trebicka J, Kohistani AZ, Heller J, Sauerbruch T. Vascular hyporesponsiveness to angiotensin II in rats with CCl(4)-induced liver cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 906-913 [PMID: 19522833 DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02181.x]
- 44 Leiva JG, Salgado JM, Estradas J, Torre A, Uribe M. Pathophysiology of ascites and dilutional hyponatremia: contemporary use of aquaretic agents. *Ann Hepatol* 2007; 6: 214-221 [PMID: 18007550]
- 45 Ginés P, Berl T, Bernardi M, Bichet DG, Hamon G, Jiménez W, Liard JF, Martin PY, Schrier RW. Hyponatremia in cirrhosis: from pathogenesis to treatment. *Hepatology* 1998; 28: 851-864 [PMID: 9731583 DOI: 10.1002/hep.510280337]
- 46 赵仕华. 前列腺素E1对肝硬化难治性腹水患者肾脏血流动力学的影响. *现代临床医学* 2009; 35: 97-98
- 47 Dudley FJ. Pathophysiology of ascites formation. *Gastroenterol Clin North Am* 1992; 21: 215-235 [PMID: 1568774]
- 48 Witte MH, Witte CL, Dumont AE. Estimated net transcapillary water and protein flux in the liver and intestine of patients with portal hypertension from hepatic cirrhosis. *Gastroenterology* 1981; 80: 265-272 [PMID: 7450417]
- 49 方敏. 肝硬化腹水的治疗进展. *安徽省第十二次传染病与寄生虫病学术年会论文集* 2007: 132-135

■同行评价

本文选题好, 符合当前研究热点, 思路清晰, 对肝硬化腹水形成机制的研究有一定参考意义。

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

●消息●

中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》 影响因子0.873

本刊讯 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, 2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6 979次, 影响因子0.873, 综合评价总分88.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位; 其他指标: 即年指标0.219, 他引率0.89, 引用刊数619种, 扩散因子8.84, 权威因子2 144.57, 被引半衰期4.7, 来源文献量758, 文献选出率0.94, 地区分布数26, 机构分布数1, 基金论文比0.45, 海外论文比0.71。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐, 《世界胃肠病学杂志(英文版)》再度被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。根据2011年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD 2011)统计结果, 《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获2011年“百种中国杰出学术期刊”称号。

无线动力胶囊技术的应用

李苗苗, 叶必星, 林琳

■背景资料

无线动力胶囊技术(WMC)是国外近年来兴起的一项胃肠动力检测技术,国内尚无应用,通过胶囊在消化道内运行并实时记录pH、温度、压力信息间接计算出胃肠道各区域的转运时间,其检测结果与传动力检测技术所得结果具有良好的一致性,可用于胃轻瘫、功能性便秘等动力异常疾病的诊断。

李苗苗, 叶必星, 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

李苗苗, 主要从事胃肠动力方面的研究。

作者贡献分布: 本综述由李苗苗查阅整理资料并完成写作; 叶必星进行修改; 林琳审核。

通讯作者: 林琳, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化内科。lin9100@yahoo.cn

电话: 025-68136920

收稿日期: 2012-11-01 修回日期: 2012-12-30

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Rationale for clinical use of wireless motility capsule

Miao-Miao Li, Bi-Xing Ye, Lin Lin

Miao-Miao Li, Bi-Xing Ye, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Lin Lin, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. lin9100@yahoo.com
Received: 2012-11-01 Revised: 2012-12-30
Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

The wireless motility capsule (WMC) is a recently developed technique for evaluating gastrointestinal motility. As the capsule moves through the gastrointestinal tract, it allows for real-time measurement of the pH, temperature and pressure of its surrounding environment to indirectly calculate gastric emptying time (GET), small bowel transit time (SBTT), colonic transit time (CTT) and whole gut transit time (WGTT). The WMC is especially suitable for patients suspected of dysmotility in more than one region in the gastrointestinal tract. The US FDA has approved the WMC for the evaluation of gastric emptying time in patients with suspected gastroparesis and colonic transit time in patients with suspected chronic constipation, and for the characterization of antral and duodenal pressure profiles. In addition, the WMC has been tested as an alternative to scintigraphy and radiopaque marker technology in several clinical trials. This review summarizes the rationale for clinical use of the WMC.

■同行评议者

毛高平, 教授, 中国人民解放军空军总医院

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Wireless motility capsule; Gastrointestinal motility; Gastrointestinal pressure; Gastroparesis; Constipation

Li MM, Ye BX, Lin L. Rationale for clinical use of wireless motility capsule. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 166-170

摘要

无线动力胶囊技术(wireless motility capsule, WMC)是国外近年来兴起的一项胃肠动力检测技术,通过胶囊在消化道内运行并实时记录pH、温度、压力信息间接计算出胃排空时间(gastric emptying time, GET)、小肠转运时间(small bowel transit time, SBTT)、结肠转运时间(colonic transit time, CTT)和全胃肠道转运时间(whole gut transit time, WGTT)。特别适用于可疑多区域胃肠动力异常的患者。美国食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)已批准WMC用于胃轻瘫患者胃排空时间的检测、胃窦十二指肠压力描述及慢性便秘患者结肠转运时间的检测。现对WMC技术的原理和应用作一综述。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 无线动力胶囊; 胃肠动力; 胃肠压力; 胃轻瘫; 便秘

李苗苗, 叶必星, 林琳. 无线动力胶囊技术的应用. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 166-170

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/166.asp>

0 引言

胃肠动力和功能异常疾病如胃轻瘫、肠易激综合征、功能性便秘等发病率超过了人群的1/3,胃肠动力检测有助于这类疾病的诊断和分类。传统的胃肠动力检测方法如不透X线标志物法(radiopaque markers, ROMs)和核素显像具有操作繁琐、需接受辐射等特点,且缺乏统一的操作和诊断标准。近年来,一项新的胃肠动力

检测技术: 无线动力胶囊技术(wireless motility capsule, WMC)逐渐在国外得到应用, WMC实时记录胃肠道内的pH、温度、压力信息而间接检测出胃肠道各区域的转运时间, 有利于胃肠道不同区域动力情况的综合判断. 已有多项试验证实WMC检测方法与传统动力检测方法所得结果具有良好的一致性, FDA已批准WMC用于胃轻瘫患者胃排空时间的检测、胃窦十二指肠压力描述及慢性便秘患者结肠转运时间的检测. 现对WMC技术的原理和应用作一综述.

1 WMC系统的构造和工作原理

WMC系统目前唯一的品牌为美国SmartPill公司生产的SmartPill胃肠监测系统, 该系统由WMC、便携式数据接收器及数据处理软件构成. WMC为11.7 mm×26.8 mm大小的圆柱体, 与胶囊内镜的外形类似, 包含pH、温度、压力3种感应器, 感受范围分别为0.05-9.00、25℃-49℃、0-350 mmHg. 感应器信号采集频率随时间推移而变化以节省电量, pH信号采集频率为24 h内5 s/次, 24-48 h 10 s/次, 48 h后2.5 min/次; 温度信号采集频率为24 h内20 s/次, 24 h后40 s/次; 压力信号采集频率为24 h内0.5 s/次, 24 h后1 s/次^[1]. 胶囊将感应器信息以434 MHz的频率传送至便携式数据接收器, 数据接收器可随身携带或近距离放置, 与胶囊的距离需保持在5英尺之内. 胶囊和数据接收器所含电池电量均可维持至少5 d, 检查结束后, 将数据接收器中的信息上传至电脑, 利用数据处理软件对接收器中的信息进行分析并自动生成报告.

WMC通过对pH和温度信息综合分析计算出胃排空时间(gastric emptying time, GET)、小肠转运时间(small bowel transit time, SBTT)、结肠转运时间(colonic transit time, CTT)和全胃肠道转运时间(whole gut transit time, WGTT). 温度的变化是胶囊吞入和排出的标志, 胶囊被吞入后, 温度迅速由环境温度升为人体温度(大约36℃), 排出时则迅速降为环境温度. 胶囊在胃肠道内运行时则根据不同部位pH差异进行定位, 胃内平均pH为1.0-2.5, 当胶囊由胃进入相对碱性的十二指肠时, pH值至少上升2个单位(平均3个单位). 末端回肠的平均pH为7.5, 而结肠环境相对偏酸, 胶囊由回盲瓣进入结肠时, pH下降至少1个单位^[2], Zarate等^[3]将WMC与核素显像技术结合对pH下降的区域进行准确定位, 结果显示9名受试者中, 5名受试者pH下降区域位于盲

肠, 2名位于升结肠, 另外2名位于盲肠和升结肠的移行部, 这些区域的酸性环境主要因厌氧菌对食物中不被吸收的纤维素成分进行发酵, 产生短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA)所致, SCFA在盲肠及升结肠中含量最高, 远端结肠含量逐渐减少. SCFA含量受饮食及菌群影响, 部分受试者无法识别CTT的起点, 考虑与SCFA含量较低有关^[4].

2 检查过程及结果分析

检查前停用影响胃内pH及胃肠动力的药物, 其中PPI停用至少7 d, H2RA和影响胃肠动力药物停用至少3 d, 制酸剂停用至少1 d. 空腹情况下进食260 kcal的标准餐, 随后吞入胶囊并将数据接收器束于受试者腰间, 继续禁食6 h以避免影响胃排空时间, 检查期间患者需记录睡眠、进食、排便及胃肠症状, 保持日常饮食习惯, 避免烟酒, 同时避免剧烈运动(仰卧起坐、俯卧撑及超过15 min的有氧运动).

根据温度曲线可判断胶囊吞入和排出的时间点, 根据pH曲线上两个主要pH变化标志可将WGTT分为GET、SBTT、CTT 3个部分, 少数受试者胶囊通过回盲部时pH值无明显变化, 可用全肠转运时间(small and large bowel transit time, SLBTT)替代CTT, 原因为健康人群的SBTT平均为3-6 h, 而CTT平均为24-60 h, SLBTT数值大致接近CTT, 同时有研究显示WMC测得的SLBTT与ROMs测得的CTT相关性良好($r = 0.704$)^[5].

3 WMC在胃肠动力评估中的应用

3.1 胃肠道各区域转运时间的测定

3.1.1 GET: WMC被FDA批准用于胃轻瘫、功能性消化不良等胃排空减慢疾病的诊断. 胃对液体、可消化的固体、不可消化的固体具有不同的排空形式, Cassilly等^[6]学者将WMC、核素胃排空试验、胃窦十二指肠导管测压(antroduodenal manometry, ADM)3种方法相结合明确WMC在健康人胃内的排空形式, 结果显示通常情况下WMC在III期移行复合运动(migrating motor complex, MMC)的推动下通过幽门进入十二指肠. MMC为发生在消化间期的一种周期性胃肠收缩活动, 共分4期, III期MMC表现为一组规则高振幅收缩的短期爆发, 是MMC的主要组成部分. 在WMC试验中, 胃将标准餐排空后产生MMC, 胶囊随着III期MMC进入十二指肠, 这一排空方式保证了WMC检查胃排空的准确

■研发前沿

WMC技术目前的研究热点为对已知或可疑胃肠某区域动力异常的患者进行检查, 全面评估患者的胃肠动力, 为诊断和治疗提供新的信息. 胶囊同时可进行压力测定, 但胶囊中仅有一个压力感受器, 且在消化道中不断移动, 无法测定移行波, 需要新的评判标准以进一步拓展胶囊的压力测定功能.

■相关报道

CASSILLY等学者将WMC、核素胃排空试验、胃窦十二指肠导管测压3种方法相结合, 结果显示通常情况下胶囊在健康人胃内的排空形式为III期移行复合运动, 研究不仅将WMC技术与传统的“金标准”方法相比较, 同时提示了胶囊通常在胃排空标准餐后排出幽门, 保证了WMC检查胃排空的准确性.

■创新盘点

本文在国内首次介绍了国外近年来一项新的胃动力检测技术-无线动力胶囊技术,对该系统的构造、工作原理、临床应用、优势、安全性、不足等方面一一进行阐述,使国内读者对这一新技术有较全面的了解。

性。WMC在胃动力异常患者胃内的排空形式需进一步研究,使WMC的应用价值得到进一步证实。Kuo等^[7]对核素胃排空试验和WMC这两种方法进行了对比,研究对象为87名健康人和61名胃轻瘫患者,结果显示WMC测得的GET与核素胃排空试验所测得的GES-4h(4 h核素排空率)、GES-2h(2 h核素排空率)相关系数分别为0.73和0.63,受试者工作特征曲线(the receiver operating characteristic curve, ROC曲线)提示GET的诊断准确性为0.83,而GES-4 h、GES-2 h分别为0.82和0.79,同时该研究显示WMC诊断胃轻瘫的最佳界限值为300 min,敏感性和特异性分别为0.65和0.87,以上结果提示WMC对于胃排空的检测与核素胃排空试验相比具有良好的一致性及更高的准确性。

抑酸药物的应用及慢性萎缩性胃炎、胃轻瘫等病理状态均会改变胃内pH参数。Michalek等^[8]发现应用高剂量PPI的情况下(埃索美拉唑, 40 mg, bid, 连用1 wk),胶囊通过幽门时pH变化幅度确有降低,但至少在0.5单位以上的pH变化仍可保证GET的准确判断。胃轻瘫患者胃内pH水平的变化与其程度及病因相关,糖尿病性胃轻瘫患者胃酸分泌减少,而特发性胃轻瘫患者的胃酸分泌与健康人相似,同时胃排空越差的患者胃内酸度越低,但这些情况均不影响GET判断的准确性^[9]。

3.1.2 SBTT: 目前尚无研究应用WMC检测假性肠梗阻等小肠动力障碍疾病。Maqbool等^[10]应用核素显像及WMC对10名健康人的全消化道动力进行检测,结果显示两种方法对小肠转运时间的测量具有一致性($r = 0.69$; $P = 0.05$)。Brun等^[11]对87名健康人的SBTT进行检测,结果显示SBTT正常值范围为2.5-6.0 h,平均值为4.1 h,这项研究同时发现77名具有消化道动力异常临床表现的患者中,29名(37.6%)患者SBTT延长,同时SBTT延长患者的平均GET、CTT较健康组明显延长。WMC检测SBTT的主要缺点是少数受试者PH曲线上胶囊由小肠进入大肠的标志点无法准确判别,发生率为5%-10%。

3.1.3 CTT: CTT检查主要用于以便秘为主的结肠动力障碍性疾病的诊断和分类,目前广泛采用ROMs,此方法操作方便、费用低,但患者需接受辐射,且缺乏统一的操作和诊断标准。WMC检查中CTT的正常范围为5-59 h,已有多项研究证实WMC和ROMs对于CTT的检查结果具有良好的一致性。Camilleri等^[5]对158名FC患者同

时行WMC及ROMs检查,STC诊断符合率接近80%,NTC诊断符合率接近91%,总体一致性为86%;ROMs所测得的CTT与WMC测得的CTT、SLBTT具有明显的相关性[CTT($r = 0.707$), SLBTT($r = 0.704$)]. Rao等^[12]的研究通过ROC曲线比较了WMC及ROMs诊断便秘的准确性和特异性,WMC的准确性和特异性分别为0.73和0.95,ROM的准确性和特异性分别为0.71和0.95,提示WMC可有效区别STC和NTC。

3.2 压力测定 WMC的压力测定功能在少数研究中得到初步的探索,胶囊中的压力感受器仅有单个压力感受器,且在消化道中不断移动,无法检测移行波,可记录所在部位的收缩频率和幅度,压力数据以收缩频率(frequency of contractions, Ct),压力曲线下面积(area under the curve, AUC)及动力指数[motility index, MI, Ln(压力幅度总和 \times Ct+1)]形式表示。Kloetzer等^[13]用WMC比较了71名健康人和42名胃轻瘫(gastroparesis, GP)患者的胃十二指肠动力参数,GP组的胃和十二指肠Ct值较健康对照组降低约35%,33%的GP患者胃Ct值低于正常对照值的5%,主要见于GET超过12 h的重度GP患者(发生率为75%),GET<12 h的患者Ct值中位数与健康对照组差异不明显($P>0.40$),提示胃十二指肠压力信息可协同GET区分胃轻瘫轻重程度。

正常情况下小肠收缩活动存在餐后反应(the fed response):进食后小肠的收缩幅度和频率增加。一项研究回顾性分析了144名受试者的WMC报告,其中包括63名健康人,26名胃轻瘫患者和55名便秘患者,结果显示胃轻瘫组小肠餐后反应较健康组延迟,而便秘组的小肠餐后反应迟钝且短暂,12%的健康人、15%的胃轻瘫患者及24%的便秘患者未检测出明显的餐后反应,异常的小肠餐后反应提示这些患者的餐后症状存在潜在的神经过变^[11]。

便秘患者结肠运动形式的主要改变为以HAPC(high amplitude propagating sequences, 高频率振幅波)为主的顺行推进波的减少及结肠生理反射的减弱或缺失,后者提示神经性结肠动力异常^[14]。Hasler等^[1]应用WMC比较了健康人及不同分型便秘患者结肠活动的特点,结果显示便秘各分型及健康人的Ct没有明显差异,但NTC、中度STC组及IBS-C组的平均AUC高于健康组,IBS-C组差异最为明显,重度STC组未发现差异。健康组、NTC、中度STC及IBS-C组的结肠收缩频率呈现由近端结肠向远端结肠的逐

■应用要点

胃肠动力障碍疾病的发生率逐年增加,无线动力胶囊技术是一项无辐射、非侵入性并可综合评估胃肠动力的新技术,具有良好的应用前景。本文对这一技术作了全面介绍,同时通过介绍一些应用实例使读者了解到多区域胃肠动力障碍的发生特点。

渐递增,但在重度STC组未发现这种递增,研究者推测这种异常是引起重度STC的原因之一。

3.3 全面评估胃肠动力的优势 胃肠动力障碍常累及胃肠道多个区域,WMC可以全面评估胃肠动力,避免分项进行传统动力检查,对可疑多区域动力异常的患者尤为适用。

Sarosiek等^[15]的研究显示除GET外,胃轻瘫患者的CTT及WGTT均较健康对照组明显延长,SBTT无明显差异,18%的胃轻瘫患者WGTT延长($P<0.0001$),CTT延长以糖尿病胃轻瘫患者尤为明显($P=0.0054$)。同时有研究显示便秘患者的GET、CTT及WGTT均长于健康对照组^[12],而对于选择手术治疗的顽固性便秘患者而言,存在消化道动力广泛低下将明显降低手术疗效,WMC检查有助于顽固性便秘患者更合理地选择治疗方式^[16]。

Rao等^[17]同时用WMC及传统动力检测法对86名可疑上消化道或下消化道动力异常的患者进行检测,根据症状部位分为上消化道组(upper gastrointestinal, UGI)和下消化道组(lower gastrointestinal, LGI)。结果显示WMC及传统方法在UGI组及LGI组诊断符合率分别为81%和76%,WMC为47%的UGI组和53%的LGI症状组患者提供了新的诊断信息,既而改变了30%UGI组和53%的LGI组的治疗计划:例如以便秘症状为主的患者经WMC检查发现胃排空减慢,可加用促动力剂治疗,而胃轻瘫患者经检查发现CTT延长则可加用泻剂;同时WMC提供的信息可以指导部分患者进一步检查:例如若患者腹胀明显但WMC结果正常,可行氢呼气试验明确是否有小肠细菌过度生长或乳糖不耐受,CTT结果正常的便秘患者可行肛门直肠测压评估盆底肌协调情况。

4 WMC的安全性

4.1 禁忌证 育龄期女性在检查当日晨需行尿妊娠试验排除妊娠。可能影响胶囊正常通过消化道的疾病均属禁忌证,包括吞咽困难、既往胃石病史、近3 mo内的胃肠道手术史、可疑消化道狭窄或瘘管、胃肠梗阻、克罗恩病或憩室炎等。胶囊产生的无线电信号会与人体植入或携带的电机装置相互干扰,所以心脏起搏器、输液泵植入等情况也被列为禁忌证。目前WMC的使用仅限于成人。

4.2 不良反应 WMC检查主要的并发症为胶囊滞留及滞留继发的肠梗阻,胶囊吞入2 wk后经

腹部平片证实未排出则考虑为胶囊滞留。一项样本量为6 000例的上市后调查中,胶囊滞留的发生率为20例(0.33%),5例滞留在胃内、2例在小肠、13例在结肠,胃内滞留的胶囊通过内镜取出,其余15例中14例自行排出,1例促动力药物干预后排出。发生胶囊滞留时,首先根据pH值判断胶囊的部位,若滞留部位为结肠,发生梗阻的概率很小,等待胶囊自行排出;若滞留部位为胃或小肠,需每间隔3 d行腹部平片检查直至胶囊排出或进入结肠。一旦出现恶心、呕吐、腹痛、腹胀等肠梗阻症状需内镜或手术取出胶囊,目前尚无需手术干预的案例发生。其余不良反应包括胶囊吞入困难、设备故障及腹痛、恶心、腹泻等消化道症状。

5 WMC的不足

WMC对于胃肠转运时间测定的准确性已得到多项研究的证实,但其在压力测定方面的应用仍受到较大的限制,与传统压力测定方法相比,WMC仅有一个压力感受器,且在消化道内不停移动,无法测定移行波,需要新的判断标准以进一步拓展WMC的压力测定功能。WMC检查有发生胶囊滞留的可能性,部分受试者存在未知的胃肠道憩室或狭窄可能,增加了胶囊滞留的风险。此外WMC检查价格较贵,难以在国内广泛开展。

6 结论

WMC技术是一项无辐射、非侵入性并可综合评估胃肠动力的新技术,已有多项试验证实WMC检测结果与传统方法的一致性,特别适用于可疑多区域胃肠动力异常的患者,且具有应用于药物临床试验的潜能。WMC对于胃肠压力的测定虽有一定的缺陷,但对于压力参数评判标准的改进将使WMC提供更多的压力信息。随着更多的研究提供有力证据,WMC的应用范围将会进一步拓展。

7 参考文献

- 1 Hasler WL, Saad RJ, Rao SS, Wilding GE, Parkman HP, Koch KL, McCallum RW, Kuo B, Sarosiek I, Sitrin MD, Semler JR, Chey WD. Heightened colon motor activity measured by a wireless capsule in patients with constipation: relation to colon transit and IBS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1107-G1114 [PMID: 19808653 DOI: 10.1152/ajpgi.00136.2009]
- 2 Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ, Hardcastle JD. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*

■名词解释

移行复合运动:发生在消化间期的一种周期性胃肠收缩活动,共分4期:Ⅰ期为间断蠕动期,胃肠偶尔出现间断性收缩;Ⅱ期是不规则收缩期,胃肠开始有散发的蠕动收缩波;Ⅲ期为强烈收缩期,表现为一组规则高振幅收缩的短期爆发,是MMC的主要组成部分;Ⅳ期为收缩消退期,活动渐减弱。

■同行评价

无线动力胶囊技术是国外近年来兴起的胃肠动力检测技术, 有较好的临床应用前景。本文对该系统的构造、构造原理和临床应用作了较全面的介绍, 表述清楚, 文字较流畅, 作为一项新技术介绍有一定的临床应用指导价值。

- 3 Zarate N, Mohammed SD, O'Shaughnessy E, Newell M, Yazaki E, Williams NS, Lunniss PJ, Semler JR, Scott SM. Accurate localization of a fall in pH within the ileocecal region: validation using a dual-scintigraphic technique. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299: G1276-G1286 [PMID: 20847301 DOI: 10.1152/ajpgi.00127.]
- 4 Brinkworth GD, Noakes M, Clifton PM, Bird AR. Comparative effects of very low-carbohydrate, high-fat and high-carbohydrate, low-fat weight-loss diets on bowel habit and faecal short-chain fatty acids and bacterial populations. *Br J Nutr* 2009; 101: 1493-1502 [PMID: 19224658 DOI: 10.1017/S0007114508094658.]
- 5 Camilleri M, Thorne NK, Ringel Y, Hasler WL, Kuo B, Esfandiyari T, Gupta A, Scott SM, McCallum RW, Parkman HP, Soffer E, Wilding GE, Semler JR, Rao SS. Wireless pH-motility capsule for colonic transit: prospective comparison with radiopaque markers in chronic constipation. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 874-882, e233 [PMID: 20465593 DOI: 10.1111/]
- 6 Cassilly D, Kantor S, Knight LC, Maurer AH, Fisher RS, Semler J, Parkman HP. Gastric emptying of a non-digestible solid: assessment with simultaneous SmartPill pH and pressure capsule, antroduodenal manometry, gastric emptying scintigraphy. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 311-319 [PMID: 18194154 DOI: 10.1111/j.1365-2982.]
- 7 Kuo B, McCallum RW, Koch KL, Sitrin MD, Wo JM, Chey WD, Hasler WL, Lackner JM, Katz LA, Semler JR, Wilding GE, Parkman HP. Comparison of gastric emptying of a nondigestible capsule to a radio-labelled meal in healthy and gastroparetic subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 186-196 [PMID: 17973643]
- 8 Michalek W, Semler JR, Kuo B. Impact of acid suppression on upper gastrointestinal pH and motility. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 1735-1742 [PMID: 21086166 DOI: 10.1007/s10620-010-1479-8]
- 9 Hasler WL, Coleski R, Chey WD, Koch KL, McCallum RW, Wo JM, Kuo B, Sitrin MD, Katz LA, Hwang J, Semler JR, Parkman HP. Differences in intragastric pH in diabetic vs. idiopathic gastroparesis: relation to degree of gastric retention. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1384-G1391 [PMID: 18403619 DOI: 10.1152/]
- 10 Maqbool S, Parkman HP, Friedenberg FK. Wireless capsule motility: comparison of the SmartPill GI monitoring system with scintigraphy for measuring whole gut transit. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2167-2174 [PMID: 19655250 DOI: 10.1007/s10620-009-0899-9]
- 11 Brun M, Michalek W, Surjanhata B, Kuo B. Small bowel transit time (SBTT) by wireless motility capsule (WMC): normal values and analysis of pressure profiles in different subgroups of patients with slow SBTT. *Gastroenterology* 2011; 140: S865
- 12 Rao SS, Kuo B, McCallum RW, Chey WD, DiBaise JK, Hasler WL, Koch KL, Lackner JM, Miller C, Saad R, Semler JR, Sitrin MD, Wilding GE, Parkman HP. Investigation of colonic and whole-gut transit with wireless motility capsule and radiopaque markers in constipation. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 537-544 [PMID: 19418602]
- 13 Kloetzer L, Chey WD, McCallum RW, Koch KL, Wo JM, Sitrin M, Katz LA, Lackner JM, Parkman HP, Wilding GE, Semler JR, Hasler WL, Kuo B. Motility of the antroduodenum in healthy and gastroparetics characterized by wireless motility capsule. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 527-533, e117 [PMID: 20122128]
- 14 Dinning PG, Di Lorenzo C. Colonic dysmotility in constipation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25: 89-101 [PMID: 21382581 DOI: 10.1016/j.bpg.2010.12.006]
- 15 Sarosiek I, Selover KH, Katz LA, Semler JR, Wilding GE, Lackner JM, Sitrin MD, Kuo B, Chey WD, Hasler WL, Koch KL, Parkman HP, Sarosiek J, McCallum RW. The assessment of regional gut transit times in healthy controls and patients with gastroparesis using wireless motility technology. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 313-322 [PMID: 19814743 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04162.x]
- 16 Redmond JM, Smith GW, Barofsky I, Ratych RE, Goldsborough DC, Schuster MM. Physiological tests to predict long-term outcome of total abdominal colectomy for intractable constipation. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 748-753 [PMID: 7733081]
- 17 Rao SS, Mysore K, Attaluri A, Valestin J. Diagnostic utility of wireless motility capsule in gastrointestinal dysmotility. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 684-690 [PMID: 21135705 DOI: 10.1097/MCG.0b013e3181ff0122.]

编辑 田滢 电编 闫晋利



壮药汗衣台体外抗乙型肝炎病毒的疗效

廖丹, 段雪琳

廖丹, 段雪琳, 广西中医药大学基础医学院生理教研室 广西
壮族自治区南宁市 530001

廖丹, 副教授, 主要从事感染性疾病的基础研究.

广西自然科学基金资助项目, No. 2010GXNSFA013198

广西中医药管理局中医药科技专项课题基金资助项目, No.
GZKZ09-11

广西教育厅科研基金资助项目, No. 200810LX002

作者贡献分布: 此研究由廖丹设计; 细胞培养、药物准备及指
标检测由廖丹与段雪琳操作完成; 数据分析与论文撰写由廖丹
完成.

通讯作者: 廖丹, 副教授, 530001, 广西省南宁市明秀东路179
号, 广西中医药大学基础医学院生理教研室. dan9999@126.com
电话: 0771-2244199

收稿日期: 2012-10-26 修回日期: 2012-12-27

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

In vitro anti-HBV activity of the Chuang herb Hanyitai

Dan Liao, Xue-Lin Duan

Dan Liao, Xue-lin Duan, Department of Physiology,
Guangxi Traditional Medical University, Nanning 530001,
Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangxi,
No. 2010GXNSFA013198; the Special Program of Chinese
Medical Science and Technology of Traditional Medicine
Administration of Guangxi, No.GZKZ09-11; and the Sci-
ence Research Program of Department of Education of
Guangxi, No.200810LX002

Correspondence to: Dan Liao, Associate Professor, De-
partment of Physiology, Guangxi Traditional Medical Uni-
versity, 179 Mingxiu East Road, Nanning 530001, Guangxi
Zhuang Autonomous Region, China. dan9999@126.com

Received: 2012-10-26 Revised: 2012-12-27

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To assess whether the Chuang herb Hanyitai has anti-HBV activity *in vitro*.

METHODS: XTT assay was used to detect the cytotoxicity of different concentrations of Hanyitai in HepG2215 cells to determine the safe concentration range. Cell culture medium was changed once every 3 days, and culture supernatants were collected after 9 days of culture. The contents of HBsAg and HBeAg in supernatants were measured using ELISA. Meanwhile, the secretion of HBV-DNA was detected using fluorescent quantitative PCR.

RESULTS: Hanyitai significantly inhibited

the production of HBsAg and HBeAg in a concentration-dependent manner. Hanyitai at concentrations of 500-800 $\mu\text{g/mL}$ had a stronger inhibitory effect on HBsAg and HBeAg production than the same concentration of lamivudine (HBsAg: $P = 0.002 - 0.000$; HBeAg: $P = 0.002 - 0.000$) and interferon (HBsAg: $P = 0.006 - 0.003$; HBeAg: $P = 0.003 - 0.002$). Hanyitai also inhibited the secretion of HBVDNA in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect of Hanyitai at concentrations of 500-800 $\mu\text{g/mL}$ on HBVDNA secretion exceeded the same concentration of interferon- α ($P = 0.018 - 0.031$) but was inferior to lamivudine.

CONCLUSION: The Chuang herb Hanyitai has anti-HBV activity *in vitro*.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Hanyitai; HepG2215 cells; HBV; *In vitro*

Liao D, Duan XL. *In vitro* anti-HBV activity of the Chuang herb Hanyitai. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 171-176

摘要

目的: 研究汗衣台体外抗乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的疗效.

方法: 不同浓度汗衣台与体外培养的2.2.15细胞共同孵育, 以XTT方法检测其对2.2.15细胞的不良反应, 以此决定汗衣台的安全浓度范围; 3 d更换一次含药培养液, 9 d后收集上清液; 用ELISA法测定上清液中HBsAg和HBeAg含量, 荧光定量PCR法检测上清液中HBV DNA的分泌.

结果: 各浓度汗衣台对HBsAg、HBeAg均有明显抑制作用, 抑制率呈剂量依赖性: 500-800 $\mu\text{g/mL}$ 汗衣台对HBsAg的抑制明显高于同浓度的拉米夫定 ($P = 0.002-0.000$) 及干扰素 ($P = 0.006-0.003$), 100-800 $\mu\text{g/mL}$ 浓度汗衣台对HBeAg的抑制明显高于同浓度拉米夫定 ($P = 0.002-0.000$) 及干扰素 ($P = 0.003-0.002$), 差异均有显著性. 各浓度汗衣台对HBV DNA抑制

■背景资料

临床上慢性乙型肝炎的抗病毒治疗非常关键, 很大程度上可决定慢性乙型肝炎的病程进展及预后, 所以抗病毒药物的选择是关键问题, 西药具有精准的作用机制和明确的疗效, 而中医药及民族医药的源远流长也一定有其科学性.

■同行评议者

杨钦河, 教授, 暨南大学医学院中医系

■研发前沿

目前对抗乙型肝炎病毒(HBV)中草药的研究热点主要集中在抗HBV中草药的筛选以及复方制剂抗HBV疗效的基础研究上,但是对抗HBV的有效成分、活性部位及作用机制等核心问题仍然不十分明确。

亦呈剂量依赖性, 500-800 $\mu\text{g/mL}$ 浓度汗衣台短期内抑制HBV DNA分泌的疗效优于同浓度干扰素($P=0.018-0.031$), 但不如拉米夫定。

结论: 壮药汗衣台具有一定的体外抗HBV作用。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 汗衣台; 2.2.15细胞; 乙型肝炎病毒; 体外

廖丹, 段雪琳. 壮药汗衣台体外抗乙型肝炎病毒的疗效. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 171-176

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/171.asp>

0 引言

临床上慢性乙型肝炎的抗病毒治疗非常关键, 很大程度上可以决定慢性乙型肝炎的病程进展及预后, 而两种常用的抗病毒西药[干扰素(interferon, IFN)和核苷类药物]仍然存在许多不足之处。中医药治疗慢性乙型肝炎在我国具有悠久的历史, 近几十年有学者陆续对一些中草药进行抗HBV筛查^[1,2], 发现确实存在一些高效、低毒抑制HBV的中草药。我们所研究的壮药汗衣台, 别称“千里找根”^[3], 为防己科植物皱波青牛胆的藤茎, 据文献记载汗衣台具有通关通窍通脉、通经活血、清热排毒、消炎止痛等作用, 多用于治疗跌打骨折刀伤、痢疾腹胀、痈疽肿毒等。前期研究发现该属植物具有降血糖^[4]、降血压^[5]、抗增殖^[6]等活性, 但广西壮族民间流传其对慢性乙型肝炎具有良效, 这方面作用国内外文献尚未见报道。本实验拟对汗衣台体外抗乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)不良反应与疗效进行初步研究, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 壮药汗衣台由壮族民间灵芝草药堂提供, 汗衣台生药50 g, 置于烧杯中, 加适量蒸馏水浸泡30 min后煎煮, 沸后用文火煮30 min, 滤出煎液, 共煎3次, 合并滤液, 浓缩至生药含量0.5 g/mL, 高速离心法(16 000 r/min)离心10 min, 取上清液调pH值为7.5, 一次性0.22 μm 滤器过滤分装后置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。注射用人重组干扰素 α -1b(30 μg /支, 上海生物制品研究所); 拉米夫定(0.1 g/片, 葛兰素史克); 细胞HBV DNA转染的人肝癌细胞HepG2.15细胞系购自中南大学湘雅中心实验室细胞库; 胎牛血清(美国Gibco公司); DMEM培养基(HyCone公司); 0.25%DEPC胰酶(上海吉泰科技有限公司); HBV DNA荧光定量

PCR试剂盒(上海科华生物工程有限公司, 批号20071016); HBsAg、HBeAg抗原检测试剂盒(上海科华生物工程公司); XTT检测试剂盒(碧云天); ABI7500 Fast Real-time PCR仪(美国ABI公司); CO₂孵箱(美国Thermo Forma公司); 酶标仪(Bio-Rad); 24孔板(美国Corning公司); 离心机(effend); 0.22 μm 滤器(millipore)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 2.2.15细胞以DMEM培养基(含10%胎牛血清)培养于培养瓶中, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂孵箱中生长, 待细胞生长至70%-80%时, 用0.25%胰酶消化5 min, 用吹打管将贴壁的细胞吹打成悬液, 按适当比例分瓶继续培养, 4-5 d传代1次。每次换液时, 检测上清液HBsAg、HBeAg和HBV DNA分泌情况, 待表达稳定后开始实验。

1.2.2 药物浓度的选择: 干扰素在肌肉注射或皮下注射后入血的速度较慢, 需较长时间才能在血中测到。用大白鼠进行试验^[7], 肌肉注射200 μg α -1b型干扰素, 半衰期为1.40-1.56 h, 血液中干扰素最高浓度(C_{max})为4 389-17 487 IU/mL(相当于50-100 $\mu\text{g/mL}$); 而拉米夫定口服吸收良好, 成人口服拉米夫定0.1 g约1 h左右达血药峰浓度(C_{max})1.1-1.5 $\mu\text{g/mL}$ ^[8], 据此可认为这些药物浓度范围对HBV具有有效的抑制作用。后续试验药物浓度的选择应含括干扰素及拉米夫定的有效血清浓度。

1.2.3 细胞毒性实验: 2.2.15细胞用胰酶消化后, 轻轻吹打使成单细胞悬液, 细胞计数后调节细胞浓度至 1×10^5 cell/mL, 按100 μL /孔接种于96孔板中, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂培养箱中培养过夜, 待贴壁后吸去上清, 分别加入100 μL 含终浓度为1 000、900、800、700、600、500、100、50、5、1 $\mu\text{g/mL}$ 汗衣台的DMEM培养液, 每个浓度重复5孔, 同时设无药细胞对照组及空白对照组。培养72 h后滴加新鲜配制的XTT和PMS混合应用液, 继续培养4 h, 在450 nm波长测定吸光度(A)值。按公式计算细胞存活率(细胞存活率=[(A_{实验孔}-A_{空白对照})/(A_{细胞对照}-A_{空白对照})] \times 100%)。

1.2.4 HBsAg、HBeAg的检测: 2.2.15细胞在细胞浓度被调至 1×10^6 cell/mL以后, 按1 mL/孔接种至24孔板中, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂培养箱中培养, 6 h细胞贴壁后换用含药培养液, 药物浓度根据细胞毒性实验结果, 以对细胞无明显毒性的浓度为最高浓度, 汗衣台分别设800、500、200、100、10、1 $\mu\text{g/mL}$ 6种浓度, 每种浓度重复3孔,

■相关报道

目前对抗HBV中草药的筛选以及疗效研究工作都能应用2215细胞作为研究工具, 检测包括病毒抗原和e抗原以及病毒基因在内的比较敏感和特异的指标, 结果比较可靠, 并具有说服力。

表 1 汗衣台对2.2.15细胞的毒性作用(mean ± SD)

分组	浓度(μg/mL)	A值	细胞存活率(%)
细胞对照组		1.408 ± 0.018	100.0
空白对照组		0.409 ± 0.025	
汗衣台组	1 000	1.008 ± 0.075	60.0
	900	1.222 ± 0.011	81.4
	800	1.278 ± 0.030	90.8
	700	1.347 ± 0.124	95.7
	600	1.453 ± 0.071	103.2
	500	1.520 ± 0.096	111.2
	100	1.356 ± 0.114	94.8
	50	1.354 ± 0.141	94.6
	5	1.433 ± 0.039	102.5
	1	1.378 ± 0.054	97.9

■创新盘点

本文对照组同时选用拉米夫定及干扰素两种作用机制及远近疗效均不同的西药,拟在通过比较异同,有利于发现目的药物可能的作用机制,而且两种西药疗效稳定,可使结论更可靠。

同时设不加药细胞对照3孔及培养液空白对照3孔,第3天和第6天更换新鲜的含药液培养,第9天收集各孔细胞上清液, -20℃保存备用,采用ELISA法检测上清液中HBsAg、HBeAg含量。

1.2.5 HBV DNA的检测: 取上述收集的上清液各100 μL, 分别加至0.5 mL EP管中, 按说明书上的操作要求, 加入试剂盒提供的溶液A 100 μL, 振荡混匀, 13 000 r/min离心10 min, 吸弃上清, 再加入25 μL溶液B, 剧烈震荡, 尽可能使沉淀分散, 100℃干浴10 min, 13 000 r/min离心10 min, 保留上清备用。按PCR反应液: Taq酶: UDG酶 = 37.7 μL: 0.3 μL: 0.1 μL的比例准备好PCR反应管, 分别加入已提取好的上清液标本, 对照品及标准品各2 μL, 设置反应程序进行PCR扩增: 37℃ 5 min, 94℃预变性2 min; 接着95℃ 5 s; 60℃ 40 s, 共40个循环。

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件分析数据, 组间比较采用方差分析, 各均数两两比较。P<0.05表明比较有显著意义。

2 结果

2.1 汗衣台对2.2.15细胞的不良反应 XTT实验结果显示, 1 000 μg/mL-1 μg/mL浓度范围的拉米夫定及干扰素对细胞生长均无明显不良反应(资料未显示), 而1 000 μg/mL浓度的汗衣台对2.2.15细胞的生长表现出一定的抑制作用, 浓度在800 μg/mL时, 细胞存活率超过90%, 显示对HepG2.2.15细胞无明显不良反应, 所以实验选择800 μg/mL的汗衣台药物浓度为最高浓度(表1)。

2.2 汗衣台对HBsAg、HBeAg分泌的影响 药物对病毒抗原的抑制百分率 = $[(A_{\text{细胞对照}} - A_{\text{实验孔}}) / (A_{\text{细胞对照}} - A_{\text{空白对照}})] \times 100\%$ 。计算结果见表2, 结果表明与阳性对照组比较, 各个浓度的汗衣台均可明显抑制2.2.15细胞分泌HBsAg及HBeAg抗原, 抑制率呈剂量依赖性; 500-800 μg/mL浓度的汗衣台对HBsAg分泌的抑制明显高于同浓度的拉米夫定及干扰素对HBsAg分泌的抑制, P = 0.002-0.000及P = 0.006-0.003, 差异有显著性意义; 100-800 μg/mL浓度范围的汗衣台对HBeAg分泌的抑制明显高于同浓度的拉米夫定及干扰素对HBeAg分泌的抑制, P = 0.002-0.000及P = 0.003-0.002, 差异有显著性, 低浓度差异无显著性, 显示出中高浓度的汗衣台在短期内对病毒具有强大的抑制作用。此外, 拉米夫定在短期内亦显示出比同浓度干扰素更强的病毒抑制率, 这与拉米夫定的作用机制和临床疗效是相符合的。

2.3 汗衣台对HBV DNA分泌的影响 进一步比较各组药物对HBV DNA分泌的影响, 由表3可知, 各浓度的拉米夫定对HBV DNA的抑制作用最为强烈, 细胞培养上清液未检测到HBV DNA, 这与临床上使用拉米夫定抗病毒的时间效果相符合。100-800 μg/mL浓度范围的汗衣台抑制HBV DNA复制的作用明显强于阳性对照, P = 0.05-0.017; 有趣的是, 干扰素对病毒的抑制率在浓度<200 μg/mL时(44.3%-63.5%)表现出比高浓度(≥500 μg/mL)(18.8%-29.3%)更强的病毒抑制率; 500-800 μg/mL浓度的汗衣台抗HBV DNA分泌作用明显强于同浓度的干扰素, P = 0.018-0.031, 差异有显著性意义; 而且汗衣台组的最高病毒抑制率(77.2%)亦大于干扰素组的最高病毒抑制率(63.5%), 提示汗衣台短期内对抗HBV DNA分泌的作用强于干扰素而不如拉米夫定。

■应用要点

本文首次证实汗衣台具有体外抗HBV作用,阐明了广西壮族民间流传医药用于治疗慢性乙型肝炎的科学性,提示汗衣台作为抗HBV药物具有一定的应用前景,值得进一步研究、开发和利用。

表 2 各组药物对2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg的抑制作用比较 (mean ± SD)

分组	浓度(μg/mL)	HBsAg		HBeAg	
		A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)
汗衣台组	800	1.937 ± 0.095 ^{bde}	43.3	0.663 ± 0.032 ^{bde}	80.2
	500	2.015 ± 0.187 ^{bde}	40.9	0.780 ± 0.015 ^{bde}	76.5
	200	2.813 ± 0.169 ^a	16.7	1.246 ± 0.087 ^{bce}	61.7
	100	3.019 ± 0.071 ^a	10.5	1.586 ± 0.189 ^{bde}	50.9
	10	3.158 ± 0.017 ^a	6.3	2.352 ± 0.110 ^b	26.5
	1	3.186 ± 0.023 ^a	5.4	2.542 ± 0.089 ^b	20.5
拉米夫定组	800	2.916 ± 0.124 ^a	13.6	2.429 ± 0.027 ^b	24.1
	500	2.858 ± 0.116 ^{af}	15.4	2.393 ± 0.022 ^b	25.2
	200	2.770 ± 0.137 ^{af}	18.0	2.093 ± 0.157 ^{bf}	34.8
	100	2.998 ± 0.043 ^{ag}	11.1	2.294 ± 0.041 ^{bg}	28.4
	10	3.072 ± 0.069 ^a	8.9	2.442 ± 0.036 ^b	23.7
	1	3.034 ± 0.075 ^a	10.0	2.517 ± 0.024 ^b	21.3
干扰素组	800	3.212 ± 0.021 ^a	4.6	2.532 ± 0.103 ^a	20.8
	500	3.209 ± 0.033 ^a	4.7	2.520 ± 0.131 ^a	21.2
	200	3.216 ± 0.009 ^a	4.5	2.383 ± 0.123 ^b	25.6
	100	3.225 ± 0.016 ^a	4.2	2.595 ± 0.071 ^b	18.8
	10	3.185 ± 0.018 ^a	5.4	2.547 ± 0.070 ^b	20.3
	1	3.199 ± 0.024 ^a	5.0	2.473 ± 0.064 ^b	22.7
阳性对照		3.364 ± 0.044		3.187 ± 0.012	
阴性对照		0.068 ± 0.020		0.040 ± 0.009	

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 阳性对照; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 同浓度拉米夫定组; ^eP<0.01 vs 同浓度干扰素组; ^fP<0.05, ^gP<0.01 vs 同浓度干扰素组。

表 3 各组药物对2.2.15细胞分泌HBV DNA的影响 (mean ± SD)

分组	浓度(μg/mL)	HBV DNA拷贝数(×10 ⁵)	抑制率(%)
汗衣台组	800	6.885 ± 1.352 ^{ac}	77.2
	500	7.299 ± 1.083 ^{ac}	75.8
	200	17.143 ± 3.905 ^a	43.2
	100	13.723 ± 6.494 ^a	54.5
	10	17.215 ± 5.629	42.9
	1	26.737 ± 4.268	11.4
拉米夫定组	800	<0 ^b	100.0
	500	<0 ^b	100.0
	200	<0 ^b	100.0
	100	<0 ^b	100.0
	10	<0 ^b	100.0
	1	<0 ^b	100.0
干扰素组	800	24.491 ± 5.132	18.8
	500	21.332 ± 4.894	29.3
	200	15.448 ± 3.929 ^a	48.8
	100	16.796 ± 4.437 ^a	44.3
	10	11.785 ± 4.122 ^a	60.9
	1	11.013 ± 4.007 ^a	63.5
阳性对照		30.171 ± 0.577	

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 阳性对照; ^cP<0.05 vs 同浓度干扰素组。

3 讨论

HBV感染是人类最常见的病毒性感染之一, 在中国普通人群HBV携带率为7.18%^[9]. 目前抗病毒治疗仍以国外研发的西药为主, 临床中最常用的抗HBV西药有两类, 即核苷类药物和干扰素类. 干扰素是一种广谱抗病毒剂, 并不直接杀伤或抑制病毒, 主要是通过细胞表面的干扰素受体, 引发信号转导等一系列生化过程, 激活干扰素相关基因表达多种抗病毒蛋白, 实现对病毒的抑制作用; 同时还可增强巨噬细胞、T淋巴细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)的活力, 起到免疫调节、增强抗病毒能力的作用. 干扰素的应用是慢性乙型肝炎治疗的一个重要里程碑^[10], 其抗病毒有效率可达25%-50%左右^[11-14], 但由于一些无法忍受的不良反应^[9,13,14], 使临床中真正适宜于干扰素治疗的患者并不多. 拉米呋啶是一种核苷类抗病毒新药, 他可在HBV感染细胞和正常细胞内代谢生成活性形式的拉米呋啶三磷酸盐, 可渗入到病毒DNA链中、阻断病毒DNA的合成, 是HBV DNA聚合酶的抑制剂, 能迅速抑制HBV复制且抑制作用持续整个治疗过程. 但随着越来越多的应用, 发现他仍不能完全清除HBV, 远期有效率低于干扰素(16%-35%)^[9], 停药后易出现病毒反跳, 引发肝功能异常, 甚至重型肝炎^[15,16]以及易出现耐药毒株^[17]等, 使后续治疗成为难题.

目前国内对中草药抗病毒机制的研究仍属空白, 主要原因是中草药成分多样复杂, 难于分离纯化, 妨碍其进一步的研究. 本实验拟对汗衣台体外抗HBV不良反应以及疗效进行初步研究, 并选用临床上经典的两类抗HBV西药干扰素以及拉米夫定作为对照组, 因为他们具有被世人所公认的稳定疗效, 堪称抗病毒药物研发的“金标准”.

“汗衣台(壮语)”, 别称: 千里找根《云南中草药选》, 小赖藤《云南中草药选》, 绿包藤、癩浆包藤《云南思茅中草药选》, 为防己科植物皱波青牛胆[Tinospora crispa(L.) Miers]的藤茎^[3,18,19]. 我国有青龙胆属植物11种, 中药大词典中仅收载4种, 该属植物在印度、泰国等东南亚国家被广泛药用, 是印度阿育吠陀医学中最重要的药物之一^[5,6,20]. 据文献记载汗衣台具有通关通窍通脉、通经活血、清热排毒、消炎止痛等作用, 多用于治疗跌打骨折刀伤、痢疾腹胀、痈疖肿毒等. 据广西壮族民间流传医用证实其对慢性HBV具有良效, 但国内外尚未见相关文献报道.

本实验采用HepG2.2.15细胞为体外细胞模型, 分别给予不同浓度的汗衣台与其作用, 研究其体外抗HBV的疗效. 实验结果表明, 各浓度汗衣台均可明显抑制2.2.15细胞分泌HBsAg及HBeAg抗原, 抑制率呈剂量依赖性; 500-800 $\mu\text{g/mL}$ 浓度汗衣台对HBsAg分泌的抑制明显高于同浓度的拉米夫定及干扰素, 100-800 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的汗衣台对HBeAg分泌的抑制明显高于同浓度的拉米夫定及干扰素, 提示在抑制HBsAg及HBeAg抗原分泌方面, 中高浓度的汗衣台优于干扰素和拉米夫定, 而低浓度无明显差别; 相反得, 高浓度干扰素对病毒的抑制作用不及低浓度, 推测可能与干扰素受体的饱和以及下调有关, 而拉米夫定对HBV DNA分泌的抑制作用十分显著, 各浓度抑制率均达100%. 另外, 各浓度汗衣台对HBV DNA抑制亦呈剂量依赖性, 中高浓度的汗衣台对HBV DNA的抑制作用在短期内不如拉米夫定, 但强于干扰素, 而低浓度无明显差别.

从实验结果不难看出, 汗衣台抗病毒的主流模式既不同于干扰素, 因为中高浓度的汗衣台对病毒的抑制效果优于低浓度, 说明他与细胞膜上的受体关系不大, 也不同于拉米夫定, 因为DNA聚合酶抑制剂的效果立竿见影. 推测可能是一种直接的干扰机制: 干扰HBV DNA的复制; 干扰HBV各种抗原的组装以及干扰HBV颗粒的成熟分泌等, 其具体机制有待进一步研究.

总之, 此研究首次证实汗衣台具有体外抗HBV作用, 阐明了广西壮族民间流传医用治疗慢性乙型肝炎的科学性, 提示汗衣台作为抗HBV药物具有一定的应用前景, 值得进一步研究、开发和利用.

4 参考文献

- 1 郑浩杰, 刘国强. 利用2.2.15细胞株筛选抗乙肝病毒中草药的体外实验研究进展. 陕西中医学院学报 2003; 26: 61-63
- 2 应国红, 郑民实. 800种中草药抗乙型肝炎病毒的实验研究. 江西医学院学报 2002; 42: 20-22
- 3 昆明军区后勤部卫生部. 云南中草药选. 昆明: 昆明军区后勤部卫生部, 1970: 120-121
- 4 Ruan CT, Lam SH, Chi TC, Lee SS, Su MJ. Borapetoside C from *Tinospora crispa* improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Phytomedicine* 2012; 19: 719-724 [PMID: 22579212 DOI: 10.1016/j]
- 5 Praman S, Mulvany MJ, Allenbach Y, Marston A, Hostettmann K, Sirirugsa P, Jansakul C. Effects of an n-butanol extract from the stem of *Tinospora crispa* on blood pressure and heart rate in anesthetized rats. *J Ethnopharmacol* 2011; 133: 675-686 [PMID: 21040767]

■名词解释

阿育吠陀: 印度语, 意思为生命的科学. 根据她的观点, 人类应该和自然界和谐共存, 而疾病的产生是由于这种和谐被打破. 通过利用自然界及其产物恢复这种基本平衡是阿育吠陀医学的主要目的.

■同行评价

文章有较强的科学性和特色,具有一定的创新性和较好的可读性,结论具有一定的参考意义。

- 6 Zulkhairi A, Abdah MA, M Kamal NH, Nursakinah I, Moklas MA, Hasnah B, Fazali F, Khairunnur FA, Kamilah KA, Zamree MS, Shahidan MM. Biological Properties of *Tinospora crispa* (Akar Patawali) and Its Antiproliferative Activities on Selected Human Cancer Cell Lines. *Malays J Nutr* 2008; 14: 173-187 [PMID: 22691774]
- 7 中国国家科委. 人 $\alpha 1b$ 型基因工程干扰素研究报告. 《人 $\alpha 1b$ 型基因工程干扰素研究》鉴定会资料汇编 2010. Available from: <http://www.kexing.com.cn/yidetail.aspx?NewsID=104>
- 8 拉米夫定片. Available from: <http://baike.baidu.com/view/457273.htm>
- 9 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中国临床医生 2010; 40: 66-78
- 10 亚太肝病学会慢性乙型肝炎治疗共识工作组. 亚太地区慢性乙型肝炎治疗共识(2012最新版). 临床肝胆病杂志 2012; 28: 641-661
- 11 李磊, 李宜, 高人焘. HBsAg和HBeAg定量在干扰素治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎疗效预测中的价值. 实用肝胆病杂志 2012; 15: 232-234
- 12 蔡灵芝. 干扰素与拉米夫定联用治疗慢性乙型肝炎. 药物与临床 2011; 49: 51-52
- 13 徐小平, 瞿章书, 姚茂军, 洪桥爱, 张伟, 汤丽娟. 不同国产 α -干扰素治疗慢性乙型肝炎临床对比观察. 临床和实验医学杂志 2012; 11: 1192-1194
- 14 谢东文. 大剂量干扰素 α -2b治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎疗效观察. 实用肝脏病杂志 2012; 15: 259-160
- 15 方立庆, 张振华, 梁佳佳, 杨玥, 孙丙虎, 张黄醒, 赵小苗, 张亚飞, 李旭. 拉米夫定治疗慢性乙型肝炎发生病毒反弹患者YMDD变异分析. 安徽医科大学学报 2012; 47: 1265-1267
- 16 甘建和, 赵卫峰, 邵幼林, 陈良云. 拉米夫定诱导多重耐药引起重型肝炎. 2009年第五届国际暨全国肝衰竭与人工肝学术会议论文集 2009: 225-226
- 17 孟玉丽, 张红旭, 王斌, 许红华, 张晨曦, 孟春阳. 拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者HBV多聚酶区基因突变分析. 慢性病学杂志 2010; 12: 635-637
- 18 罗献瑞, 赵素云. 中国防已科资料. 广西植物 1986; 6: 49-61
- 19 袁久志, 吴立军. 青龙胆属药用植物研究进展. 中药研究与信息 2005; 7: 14-17
- 20 Kadir FA, Othman F, Abdulla MA, Hussan F, Hassandarvish P. Effect of *Tinospora crispa* on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Indian J Pharmacol* 2011; 43: 64-68 [PMID: 21455425 DOI: 10.4103/0253-7613.75673]

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 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)

¹³C-尿素呼气试验定量值与胃黏膜病变程度的相关性

张丽颖, 李振华, 李保双, 蔡毅东, 唐旭东

张丽颖, 中国中医科学院研究生院 北京市 100700
李振华, 李保双, 蔡毅东, 唐旭东, 中国中医科学院西苑医院 北京市 100091
张丽颖, 主要从事消化系统疾病中西医结合防治方面的研究。
中医药行业科研专项基金资助项目, No. 201007006
作者贡献分布: 此课题由唐旭东、李振华、李保双及张丽颖设计; 研究过程由李振华、李保双、蔡毅东及张丽颖操作完成; 研究用材料工具由唐旭东、李振华及蔡毅东提供; 数据分析由蔡毅东与张丽颖完成; 本论文写作由唐旭东、李振华及张丽颖完成。
通讯作者: 唐旭东, 教授, 100091, 北京市海淀区西苑操场1号, 中国中医科学院西苑医院. txdlly@sina.com
收稿日期: 2012-11-29 修回日期: 2012-12-26
接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Correlation between ¹³C-urea breath test value and severity of gastric mucosal lesions

Li-Ying Zhang, Zhen-Hua Li, Bao-Shuang Li, Yi-Dong Cai, Xu-Dong Tang

Li-Ying Zhang, Graduate School of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
Zhen-Hua Li, Bao-Shuang Li, Yi-Dong Cai, Xu-Dong Tang, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China
Supported by: the Special Fund of TCM Scientific Research, No. 201007006
Correspondence to: Xu-Dong Tang, Professor, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, 1 Xiyuan Playground, Haidian District, Beijing 100091, China. txdlly@sina.com
Received: 2012-11-29 Revised: 2012-12-26
Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To explore the correlation between ¹³C-urea breath test (UBT) value and severity of gastric mucosal lesions.

METHODS: Seventy-four patients who underwent the ¹³C-UBT and gastroscopy within 1 week were included in the study. The severity of gastric mucosal lesions was graded pathologically. The correlation between ¹³C-UBT value and the score of gastric mucosal lesions was analyzed.

RESULTS: ¹³C-UBT value was positively correlated with the severity of chronic inflammation ($r = 0.9958$, $P = 0.0001$), atrophy ($r = 0.2498$, $P = 0.0318$) and intestinal metaplasia ($r = 0.2784$, $P =$

0.02) in the gastric antrum mucosa, but not positively with that of active gastritis in the same site ($r = 0.1979$, $P = 0.09$). ¹³C-UBT value was positively correlated with the severity of active inflammation ($r = 0.6223$, $P = 0.0001$), chronic inflammation ($r = 0.5480$, $P = 0.0001$) and atrophy ($r = 0.6014$, $P = 0.0001$) in the gastric angle mucosa, but not positively with that of intestinal metaplasia in the same site ($r = 0.1308$, $P = 0.27$). ¹³C-UBT value was not positively correlated with the severity of active inflammation ($r = 0.2039$, $P = 0.08$), chronic inflammation ($r = 0.0966$, $P = 0.41$), atrophy ($r = 0.1369$, $P = 0.24$), or intestinal metaplasia ($r = 0.1837$, $P = 0.12$) in the gastric body mucosa. ¹³C-UBT value was positively correlated with the severity of active inflammation ($r = 0.9958$, $P = 0.0001$), chronic inflammation ($r = 0.9843$, $P = 0.0001$), atrophy ($r = 0.9921$, $P = 0.0001$) and intestinal metaplasia ($r = 0.9934$, $P = 0.0001$) in the whole gastric mucosa.

CONCLUSION: ¹³C-UBT value positively correlates with severity of gastric mucosal lesions. ¹³C-UBT quantitative detection may be used clinically to assess the severity of gastric mucosal lesions.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: ¹³C-urea breath Test; Gastric mucosa; Pathology

Zhang LY, Li ZH, Li BS, Cai YD, Tang XD. Correlation between ¹³C-urea breath test value and severity of gastric mucosal lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 177-181

摘要

目的: 探讨¹³C-尿素呼气试验定量检测值与胃黏膜病变程度的关系。

方法: 74例患者于1 wk内分别测定¹³C-尿素呼气试验定量检测和行胃镜检查取胃黏膜, 进行组织病理学检查, 黏膜按标准予以评分。将¹³C-尿素呼气试验定量值和胃黏膜病理病变评分做相关性分析。

结果: ¹³C-尿素呼气试验定量值与胃窦黏膜

■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染是慢性胃炎的主要病因, 其与胃癌的发生关系密切, 临床诊断和治疗尤为重要。¹³C-尿素呼气试验目前应用越来越广泛。

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■研究前沿

¹³C-尿素呼气试验定量检测值与胃黏膜病变程度的关系的研究较少,文献报道也较少。目前*H. pylori*的治疗仅靠定性诊断就用药治疗,本文通过定量衡量黏膜病变程度,可以指导治疗及预后。

慢性炎症($r = 0.9958, P = 0.0001$)、萎缩($r = 0.2498, P = 0.0318$)、肠化($r = 0.2784, P = 0.02$)病变程度呈正相关,与其活动性炎症($r = 0.1979, P = 0.09$)病变程度不相关;¹³C-尿素呼气试验定量值与胃角黏膜活动性炎症($r = 0.6223, P = 0.0001$)、慢性炎症($r = 0.5480, P = 0.0001$)、萎缩($r = 0.6014, P = 0.0001$)病变程度呈正相关,与其肠化($r = 0.1308, P = 0.27$)病变程度不相关;¹³C-尿素呼气试验定量值与胃体黏膜活动性炎症($r = 0.2039, P = 0.08$)、慢性炎症($r = 0.0966, P = 0.41$)、萎缩($r = 0.1369, P = 0.24$)、肠化($r = 0.1837, P = 0.12$)程度均不相关;¹³C-尿素呼气试验定量值与全胃黏膜活动性炎症($r = 0.9958, P = 0.0001$)、慢性炎症($r = 0.9843, P = 0.0001$)、萎缩($r = 0.9921, P = 0.0001$)、肠化($r = 0.9934, P = 0.0001$)病变程度均呈正相关。

结论: ¹³C-尿素呼气试验定量值与胃黏膜病理病变程度呈正相关,临床上可以根据¹³C-尿素呼气试验定量值高低考虑黏膜病理病变程度,进而更好地指导临床诊断、用药及预后。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: ¹³C-尿素呼气试验; 胃黏膜; 病理

张丽颖, 李振华, 李保双, 蔡毅东, 唐旭东. ¹³C-尿素呼气试验定量值与胃黏膜病变程度的相关性. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 177-181

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/177.asp>

0 引言

慢性胃炎是指由于各种因素所致的慢性黏膜炎症改变。幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, *H. pylori*)是慢性胃炎的重要病因,与胃癌的发生有着密切的关系。自Marshall等^[1]在1983年发现和成功分离出*H. pylori*后,国内外学者20多年来对其进行了广泛而深入的研究,认为*H. pylori*是慢性胃炎的主要致病菌。长期*H. pylori*感染所致的炎症、免疫反应可使部分患者发生胃黏膜萎缩和肠化^[2]。我国*H. pylori*的感染率较大,在50%-70%之间,随年龄的增加而升高^[3]。

*H. pylori*的诊断方法很多,分为侵入性和非侵入性试验两种^[4]。其中¹³C-尿素呼气试验作为非侵入性试验诊断方法,于1996-09通过美国食品药品监督管理局(FDA)的评审,批准应用于临床,在临床上得到了越来越广泛的应用。

本文试图通过对¹³C-尿素呼气试验定量检测结果与胃黏膜病理检测病变评分值做相关性

分析,探讨¹³C-尿素呼气试验定量检测值的意义,以期能更好地指导临床诊断、用药及预后。

1 材料和方法

1.1 材料 选取我院脾胃病科门诊2011-07/2012-04收治的患者74例。其中男35例,女39例,年龄25-62岁,中位年龄40.5岁。排除1 mo内服用抗生素、质子泵抑制剂、H₂受体拮抗剂及铋剂的患者。所有患者均做¹³C-尿素呼气试验,定值量判断阳性,且在1 mo内行胃镜检查,且胃窦、胃角、胃体3个部位黏膜各取至少1块组织,做病理组织学检查。

中科科仪¹³C呼气质谱仪(型号ZHELICO-BACTER PYLORI-2001); TB-718生物组织包埋机; Leica RM2235组织切片机; Leica HI1220烤片机; Leica ST5020徕卡全自动组织脱水机; Olympus bx51显微镜; Anymicro DSSTM图像采集系统试剂。尿素(¹³C)胶囊呼气试验药盒(深圳市中核海得威生物科技有限公司,规格75 mg)。

1.2 方法

1.2.1 ¹³C-尿素呼气试验及定量值标准: (1)收集零时呼气,嘱受检者平静呼气至10 mL特定样品管内; (2)口服¹³C-尿素试验餐(成人75 mg),并开始计时; (3)收集服药后30 min呼气于特定样品管内; (4)将零时及30 min的2个样品管置于高精度气体同位素比值质谱仪中进行分析检测。利用¹³C-尿素呼气试验诊断*H. pylori*感染的标准通常以DOB值来表示。判定标准是DOB≥4判定阳性; DOB<4判定阴性。

1.2.2 病理组织学检查及评分标准: 活检取材及组织学分级标准均参照中国慢性胃炎共识意见^[5](2006年上海)。胃窦、胃角、胃体3个部位黏膜各取至少1块组织; 有4种组织学变化分级(慢性炎症、活动性、萎缩和肠化)分为无、轻度、中度和重度4级(分别计分为0、1、2、3)。慢性炎症: 根据黏膜层慢性炎症细胞的密集程度和浸润深度分级。轻度: 慢性炎症细胞较少并局限于黏膜浅层,不超过黏膜层的1/3; 中度: 慢性炎症细胞较密集,不超过黏膜层的2/3; 重度: 慢性炎症细胞密集,占据黏膜全层。活动性: 慢性炎症背景上有中性粒细胞浸润。轻度: 黏膜固有层有少数中性粒细胞浸润; 中度: 中性粒细胞较多存在于黏膜层,可见于表面上皮细胞、小凹上皮细胞或腺管上皮内; 重度: 中性粒细胞较密集,或除中度所见外还可见小凹脓肿。萎缩: 胃固有腺减少,分为2种类型: (1)化生性萎缩; (2)非化

表 1 ^{13}C -尿素呼气试验定量值及不同部位的胃黏膜病变评分情况 (M+QR)

项目	胃窦	胃角	胃体	全胃
^{13}C -尿素呼气 试验定量值	13.90+12.80			
活动性炎症	1.00+0.00	1.00+1.00	0.00+1.00	3.00+2.00
慢性炎症	2.00+3.00	3.00+2.00	1.50+1.00	6.00+4.00
萎缩	0.00+1.00	0.00+0.00	0.00+0.00	0.00+1.00
肠化	0.00+0.00	0.00+0.00	0.00+0.00	0.00+1.00

■ 相关报道

李冰冰等研究发现 ^{13}C -尿素呼气试验定量值可以判断患者是否感染 $H. pylori$ 以及 $H. pylori$ 在胃内的定植情况, 对于指导治疗以及判断治疗效果有一定意义。

表 2 ^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃不同部位黏膜病变的相关分析 (r)

项目	活动性炎症	慢性炎症	萎缩	肠化
胃窦	0.20	0.24 ^a	0.25 ^a	0.28 ^a
胃角	0.62 ^b	0.55 ^b	0.60 ^b	0.13
胃体	0.20	0.10	0.14	0.18
全胃	0.99 ^b	0.98 ^b	0.99 ^b	0.99 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs ^{13}C -UBT定量值。

生性萎缩。轻度: 固有腺体数减少不超过原有腺体的1/3; 中度: 固有腺体数减少介于原有腺体的1/3-2/3之间; 重度: 固有腺体数减少超过2/3, 仅残留少数腺体, 甚至完全消失。肠化: 轻度: 肠化区占腺体和表面上皮总面积1/3以下; 中度: 肠化区占腺体和表面上皮总面积的1/3-2/3; 重度: 肠化区占腺体和表面上皮总面积的2/3以上。

统计学处理 计量资料采用最大值、最小值、mean±SD, 中位数+四分位数间距(M+QR)进行统计学描述。采用SAS9.2进行统计分析。两指标间的相关性分析采用线性相关或秩相关。

2 结果

2.1 ^{13}C -尿素呼气试验定量值及不同部位的胃黏膜病变评分情况 74例患者接受 ^{13}C -尿素呼气试验检查, 定量值呈非正态分布; 胃黏膜病变评分呈非正态分布, 具体描述参见表1。

2.2 ^{13}C -尿素呼气试验定量值与不同部位的胃黏膜病变的相关分析 ^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃窦黏膜慢性炎症($r = 0.2358$, $P = 0.0001$)、萎缩($r = 0.2498$, $P = 0.0318$)、肠化($r = 0.2784$, $P = 0.02$)病变程度呈正相关, 与其活动性炎症($r = 0.1979$, $P = 0.09$)病变程度不相关; ^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃角黏膜活动性炎症($r = 0.6223$, $P = 0.0001$)、慢性炎症($r = 0.5480$, $P = 0.0001$)、萎缩($r = 0.6014$, $P = 0.0001$)病变程度呈正相关, 与其肠化($r = 0.1308$, $P = 0.27$)病变程度不相关;

^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃体黏膜活动性炎症($r = 0.2039$, $P = 0.08$)、慢性炎症($r = 0.0966$, $P = 0.41$)、萎缩($r = 0.1369$, $P = 0.24$)、肠化($r = 0.1837$, $P = 0.12$)程度均不相关; ^{13}C -尿素呼气试验定量值与全胃黏膜活动性炎症($r = 0.9938$, $P = 0.0001$)、慢性炎症($r = 0.9843$, $P = 0.0001$)、萎缩($r = 0.9921$, $P = 0.0001$)、肠化($r = 0.9934$, $P = 0.0001$)病变程度均呈正相关, 且相关系数均接近于1(表2)。

3 讨论

慢性胃炎在成人中有很高的发病率, 引起腺体的损伤, 研究证实慢性胃炎、肠上皮化生和 $H. pylori$ 感染在胃癌的发病中至关重要^[6]。1994年世界卫生组织/国际癌症研究机构将 $H. pylori$ 定为I类致癌因子。胃癌的发生是一个多因素、多步骤的复杂过程, 目前公认的 $H. pylori$ 感染后肠型胃癌的发生模式是1995年Correa提出的“ $H. pylori$ 感染-慢性胃炎-萎缩、肠化-异性增生-分化型腺癌”模式^[7]。即在 $H. pylori$ 感染基础上, 多次急慢性胃炎反复发作引发萎缩性胃炎, 萎缩性胃炎没有得到有效治疗, 胃黏膜在多次重创及修复过程中, 可造成胃黏膜的糜烂、坏死及溃疡形成并产生多种致癌物质。这种损伤与修复伴炎性坏死产生的致癌物质, 导致细胞出现异型增生及癌变^[8]。

目前, 胃镜检查是胃黏膜病变的最可靠的

■应用要点

鉴于 ^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃黏膜的相关性,临床上可以考虑应用定量来指导用药,选择合适的根除方法,减少大量长时间应用抗生素引起的耐药。

诊断方法。慢性胃炎是由于各种因素所致的慢性黏膜炎症改变。*H. pylori*感染是慢性胃炎的主要病因,90%以上的慢性胃炎有*H. pylori*感染。其致病机制与下列因素有关:*H. pylori*产生多种酶如尿素酶及其代谢产物氨、过氧化氢酶、蛋白水解酶、磷脂酶A等,对黏膜有破坏作用。*H. pylori*分泌的细胞毒素如含有细胞毒素相关基因和空泡毒素基因的菌株,可导致胃黏膜细胞空泡样变性坏死。*H. pylori*感染与慢性胃炎胃黏膜炎症活动有关^[9]。尿素酶是*H. pylori*主要的毒力致病因子,该酶以胞质和表面蛋白2种形式存在,占菌体总蛋白的6%-10%。该因子共分9部分,包括编码尿素酶A亚基(urease A subunit, UreA),尿素酶B亚基(urease B subunit, UreB)蛋白的2个结构基因和其他7个表现尿素酶活性所必需的蛋白因子。尿素酶对*H. pylori*穿过黏液层,定值在上皮细胞有保护和辅助作用^[10]。

*H. pylori*在胃中呈点状分布。如果胃内细菌定值量较少,或由于应用抗生素、PPI和H₂受体拮抗剂等导致细菌减少或活性下降,因此取胃黏膜活检有时会有假阴性结果,然而 ^{13}C -尿素呼气试验作为一种非侵入性检测*H. pylori*的方法,由于试剂在胃内均匀分布,结果不受细菌点状分布的影响,且其可靠性已经被广泛认可。其检测*H. pylori*感染的特异性达90%-99%,敏感性达89%-99%^[11]。Maastricht共识报告认可UBT作为*H. pylori*是否根除的疗后随访的最佳选择^[12]。但对于具体检测值相关的研究,对临床的诊断和治疗是否有指导意义仍是临床关注的问题。 ^{13}C -UBT优点在于:(1)采用的高精度气体同位素比值质谱仪分析精度可达十万分之一,准确性高;(2)反应是“全胃”的“实时”状态,敏感性和特异性均超过95%,在中国和欧洲的*H. pylori*共识意见中,该方法被首选推荐为确诊*H. pylori*现症感染及判断*H. pylori*根除的非侵入性方法;(3)操作简便快速,自动化程度高,30 min即可得出结果;(4) ^{13}C 为稳定性同位素,适合于各年龄的受试者;(5)呼气样品采用特制气体收集瓶收集,可通过邮寄该瓶对无此设备其他地区患者进行*H. pylori*检测^[13]。 ^{13}C -UBT检测的结果同样也受很多因素的影响,在检测时要注意把握检测前和检测过程中的质控工作,才能确保检测结果的准确性和可靠性^[14]。 ^{13}C -尿素呼气试验是通过测量尿素酶活力来检测胃内实际存在的活*H. pylori*,由于口服 ^{13}C 在胃内呈均匀分布,无局灶性影响,且与胃黏膜接触广发,只要 ^{13}C 尿素接触

部位存在*H. pylori*感染,即便是很少量的*H. pylori*也可准确、灵敏的检测出来。本研究结果显示: ^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃窦黏膜慢性炎症、萎缩、肠化病变程度呈正相关($P<0.05$),与胃角黏膜活动性炎症、慢性炎症、萎缩病变程度呈正相关($P<0.01$),与胃体黏膜病理病变程度均不相关($P>0.05$)。*H. pylori*感染的程度与胃窦和胃角黏膜病理病变的程度关系密切,感染越严重,病变程度越严重;与胃体黏膜病理病变的程度没有相关性。由于*H. pylori*主要定植于胃窦部,其对胃窦黏膜的病理损伤更为多见,因此关系更为密切。

本文结果显示 ^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃3个部位黏膜病变之和均呈正相关($P<0.01$),且相关系数接近于1。表明*H. pylori*感染和胃黏膜病变程度的关系密切,*H. pylori*感染越严重,胃黏膜病理改变程度越严重。也有研究证实,*H. pylori*感染、慢性活动性炎症和肠上皮化生之间有着显著的联系^[15]。

既往报道^[16],儿童 ^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃镜检查*H. pylori*比较,发现胃黏膜活检病理监测和*H. pylori*培养两项阳性者,其 ^{13}C -尿素呼气试验的定量值明显高于仅一项阳性者,提示, ^{13}C 尿素呼气试验定量值可以在一定程度上反应*H. pylori*在胃黏膜的定值量。本文为国内首次对成人进行此相关研究,结果与既往研究基本一致。

胃镜及病理检查对于胃黏膜及*H. pylori*感染的诊断固然是金标准。但由于其为侵入性,患者耐受差,通过本研究,我们在临床上对于症状较轻以及复查的患者,可以依靠 ^{13}C -尿素呼气试验的定量值,来判断患者是否感染*H. pylori*、*H. pylori*在胃内的定值情况以及胃黏膜的损伤程度等,进而从胃黏膜病理病变方面指导*H. pylori*根除,给予患者全面的治疗。

4 参考文献

- 1 Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315 [PMID: 6145023 DOI: 10.1016/S0140-6736(84)91816-6]
- 2 中华医学会消化病学分会. 关于幽门螺杆菌感染中医药治疗对策的思考. *中华消化杂志* 2007; 27: 45-50
- 3 王吉耀. 内科学. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 415
- 4 王春江, 葛伏林. 幽门螺杆菌诊断方法评价. *医学与哲学* 2009; 30: 8-10
- 5 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见. *胃肠病学* 2006; 11: 674-684
- 6 Dîrnu R, Secureanu FA, Neamțu C, Totolici BD, Pop

- OT, Mitruț P, Mălăescu DG, Mogoantă L. Chronic gastritis with intestinal metaplasia: clinico-statistical, histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol* 2012; 53: 293-297 [PMID: 22732798]
- 7 时昭红, 刘浩. 幽门螺杆菌感染与胃癌. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3327-3331
- 8 高泽立, 张成, 盛飞英, 金丽雯. 胃黏膜肠上皮化生-胃上皮内瘤变与胃癌的组织发生. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1981-1984
- 9 林进乾. 幽门螺杆菌感染与慢性胃炎炎症活动的关系. 中国疗养医学 2009; 18: 257
- 10 韩秀萍, 王凡, 李家奎, 刘纯杰. 幽门螺杆菌毒力致病因子研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2292-2297
- 11 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识. 现代消化及介入诊疗 2008; 13: 73-76
- 12 朱琦, 刘文忠. 幽门螺杆菌感染处理的当代概念Maas-tricht III 共识报告. 中华消化杂志 2007; 27: 257-261
- 13 闫伟, 曹建彪. 胃幽门螺杆菌检测技术进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1527-1533
- 14 龚立荣, 刘玉萍, 樊衷豆, 王伟维, 任娇娇. 尿素 ^{13}C 呼气试验检测幽门螺杆菌的操作流程. 求医问药 2012; 10: 335
- 15 Sonnenberg A, Lash RH, Genta RM. A national study of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsy specimens. *Gastroenterology* 2010; 139: 1894-1901. e2; quiz e12 [PMID: 20727889]
- 16 李冰冰, 康宏壮. ^{13}C -尿素呼气试验定量值与胃镜检测幽门螺杆菌比较. 中国当代儿科杂志 2001; 3: 705-706

编辑 田滢 电编 闫晋利

■同行评价

本文立题较好, 对临床医师针对 *H. pylori* 进行个体化治疗具有一定指导意义。



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》于 2012-12-26 获得 RCCSE 中国权威学术期刊 (A+) 称号

本刊讯 《世界华人消化杂志》在第三届中国学术期刊评价中被武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)评为“RCCSE中国权威学术期刊(A+)”。本次共有6 448种中文学术期刊参与评价, 计算出各刊的最终得分, 并将期刊最终得分按照从高到低依次排列, 按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围。其中A+(权威期刊)取前5%; A(核心期刊)取前5%-20%; A-(扩展核心期刊)取前20%-30%; B+(准核心期刊)取前30%-50%; B(一般期刊)取前50%-80%; C(较差期刊)为80%-100%。(《世界华人消化杂志》编辑部)

IL-28B基因多态性与丙型肝炎易感性的关系

米寅, 高英堂, 焦晓磊, 杜智

■背景资料

丙型肝炎病毒是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种传染病, 是导致肝硬化和肝癌的主要原因之一, 每年因HCV感染而死亡者高达35万人。HCV感染的具体机制尚不清楚, 除与病毒本身有关, 更重要的是与不同个体的遗传易感性有关。

米寅, 焦晓磊, 天津医科大学第三中心临床学院 天津市300170

高英堂, 杜智, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市300170

米寅, 硕士, 主要从事肝胆疾病的研究。

天津市卫生局攻关基金资助项目, No. 11KG112

作者贡献分布: 本研究的设计由杜智、高英堂及米寅完成; 米寅完成样本的收集、数据统计及文章的撰写工作; 实验操作由米寅与焦晓磊完成; 文章的修改由高英堂与杜智完成。

通讯作者: 杜智, 教授, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院, 天津市人工细胞重点实验室。

zhi-du@163.com

电话: 022-84112148 传真: 022-24315132

收稿日期: 2012-10-19 修回日期: 2012-12-24

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Association between an IL-28B gene polymorphism and susceptibility to hepatitis C virus infection

Yin Mi, Ying-Tang Gao, Xiao-Lei Jiao, Zhi Du

Yin Mi, Xiao-Lei Jiao, Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China

Ying-Tang Gao, Zhi Du, Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China

Supported by: the Key Research Project of Tianjin Healthy Bureau, No. 11KG112

Correspondence to: Zhi Du, Professor, Tianjin Third Central Hospital, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. zhi-du@163.com

Received: 2012-10-19 Revised: 2012-12-24

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To study the association between interleukin-28B (IL-28B) single nucleotide polymorphism (SNP) rs8099917 and susceptibility to hepatitis C virus (HCV) infection in Chinese patients.

METHODS: The IL-28B rs8099917 locus was genotyped in 263 patients infected with HCV and 244 healthy controls using TaqMan SNP genotyping assay. The differences in rs8099917 genotypes and allele frequencies between the two groups were analyzed by statistics.

RESULTS: Among 263 patients with chronic HCV, 223 (84.8%) had the TT genotype, 39

(14.8%) had the TG genotype, and 1 (0.40%) carried GG genotype. The frequency of T allele was 0.922. Of 244 healthy controls, the numbers of people who carried TT, TG and GG genotypes were 222 (91.0%), 21 (8.6%) and 1 (0.4%), respectively. T allele frequency was 0.953. TG/GG genotype frequencies differed significantly between patients with chronic HCV and healthy controls ($OR = 1.810$, 95% CI: 1.042-3.145; $P = 0.033$). Patients with HCV infection had a higher G allele frequency than healthy controls ($OR = 1.709$, 95% CI: 1.010-2.893; $P = 0.044$).

CONCLUSION: The IL-28B rs8099917 gene polymorphism correlates with susceptibility to HCV infection in Chinese patient. G allele is associated with a higher risk of HCV infection.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Interleukin-28B; Hepatitis C; Gene polymorphisms; Susceptibility

Mi Y, Gao YT, Jiao XL, Du Z. Association between an IL-28B gene polymorphism and susceptibility to hepatitis C virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 182-187

摘要

目的: 探讨白介素-28B(interleukin-28B, IL-28B)单核苷酸多态性位点rs8099917与中国丙型肝炎易感性的关系。

方法: 采用TaqMan SNP基因分型的方法检测中国天津地区263名丙型肝炎患者和244名健康人IL-28B rs8099917基因型和等位基因分布情况, 并统计分析rs8099917基因型和等位基因在2组中分布的差异。

结果: 在263名丙型肝炎患者中, TT基因型223人(84.8%), TG基因型39人(14.8%), GG基因型1人(0.4%)。T等位基因频率为92.2%。244名健康对照者中, TT基因型222人(91.0%), TG 21人(8.60%), GG 1人(0.40%), T等位基因频率为95.3%。丙型肝炎患者和健康人群TG/GG基因型频率差异有统计学意义($OR = 1.810$,

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

95%CI: 1.042-3.145; $P = 0.033$). 丙型肝炎患者G等位基因频率也高于健康人($OR = 1.709$, 95%CI: 1.010-2.893; $P = 0.044$).

结论: 中国人群IL-28B rs8099917基因多态性与丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染易感性相关联. G为HCV感染的风险等位基因.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 白介素-28B; 丙型病毒性肝炎; 基因多态性; 易感性

米寅, 高英堂, 焦晓磊, 杜智. IL-28B基因多态性与丙型肝炎易感性的关系. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 182-187
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/182.asp>

0 引言

丙型病毒性肝炎是由丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)引起的一种传染病, 主要通过静脉毒品注射、输血、器官移植和血液透析等途径传播^[1]. 目前全球丙型肝炎患者约有1.3至1.7亿人, 每年因HCV感染而死亡者高达35万人^[2]. 相对乙型肝炎, 丙型肝炎更容易慢性化, 他已经成为导致肝硬化和肝癌的主要原因之一^[3], 严重危害着人类健康, 所以对丙型肝炎进行积极预防以及有效的治疗是十分必要的. HCV感染的具体机制尚不清楚, 除与病毒本身有关, 更重要的是与不同个体的遗传易感性有关. 白细胞介素-28B(interleukin-28B, IL-28B)又称为IFN- λ 3, 属于IFN- λ s干扰素家族, 亦即III型干扰素(interferon, IFN)家族, 该家族另外2个成员是IL-29、IL-28A, 分别又称为IFN- λ 1、IFN- λ 2. 编码人IFN- λ s的基因均位于19号染色体(19q13.13), 其中rs8099917位于IL-28B基因上游约8 kb处^[4,5]. 近年研究表明, IL-28B rs8099917基因多态性与HCV自然清除以及抗病毒治疗应答密切相关, TT基因型较TG/GG更利于HCV的清除^[4-7]. 然而在中国人群中, 是否rs8099917基因多态性与HCV感染存在易感性还鲜有研究报道. 本研究检测了天津地区慢性丙型肝炎患者和健康人群IL-28B rs8099917基因型和等位基因分布情况, 以探讨IL-28B rs8099917基因多态性与丙型肝炎易感性的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 研究选取2005-2011年于天津市第三中心医院就诊的丙型肝炎患者263名. 参照《丙型肝炎防治指南》诊治标准^[8], 所有患者均确诊为

慢性丙型病毒性肝炎, 且抗HCV抗体(通过酶联免疫吸附实验测定)与HCV-RNA均为阳性. 排除有乙型病毒性肝炎、人类免疫缺陷病毒感染、精神疾病、自身免疫性肝炎、肝移植的患者. 其中男132人(50.2%), 女131人(49.8%), 平均年龄54.0岁 \pm 11.7岁. 另外选取在天津市第三中心医院预防保健科进行健康查体的健康对照者244人. 健康对照组人群均无HCV感染史. 其中男136人(55.7%), 女108人(44.3%), 平均年龄52.1岁 \pm 10.7岁. 所研究对象均为天津地区汉族人群, 一般资料来自门诊或病房的病历记录. 本研究所有血液样本的收集、处理和rs8099917基因型检测均经患者本人同意, 并经天津市第三中心医院伦理委员会批准.

1.2 方法

1.2.1 HCV-RNA检测: 采用HCV核酸定量检测试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司)检测丙型肝炎患者HCV-RNA, 最低检测值为500 IU/mL.

1.2.2 基因组DNA提取: 从患者和健康对照者外周静脉血分离出血凝块, 利用酚-氯仿-异戊醇抽提法提取基因组DNA, 并用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测提取结果^[9].

1.2.3 IL-28B rs8099917基因型检测: 首先采用ABI PRISM[®] 7000 SDS对所提取的DNA进行PCR扩增, 扩增体系为10 μ L, 含DNA模板1.5 μ L、2 \times TaqMan Genotyping Master Mix 5 μ L、40 \times TaqMan SNP Genotyping Assay Mix(rs8099917, C_11710096_10)0.25 μ L和超纯水3.25 μ L. 每96孔板设置3个空白对照(NTC). 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C热变性5 min, 92 $^{\circ}$ C变性20 s, 60 $^{\circ}$ C退火1 min, 共50个循环. 在上述PCR基础上, 利用ABI PRISM[®] 7000 SDS通过读取荧光信号进行等位基因的SNP分析, 并根据散点图的分布情况分析各样品的基因型和等位基因(图1).

统计学处理 采用SPSS17.0软件进行统计学分析. 对丙型肝炎患者组和健康对照组rs8099917基因型分布进行哈迪温伯格平衡检验. 用Mann-Whitney U 检验比较两组人群年龄的差异. 两组人群性别的差异以及IL-28B rs8099917基因型和等位基因在两组人群中的分布情况用四格表 χ^2 检验分析, 并计算比值比(odds ratio, OR)及95%可信区间(confidential interval, CI). 检验均为双侧, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 研究对象一般资料 在263名慢性丙型肝炎

■研究前沿

近年研究表明, 白介素-28B(IL-28B)rs8099917基因多态性与HCV自然清除以及抗病毒治疗应答密切相关, TT基因型较TG/GG更利于HCV的清除. 然而在中国人群中, 是否rs8099917基因多态性与HCV感染存在易感性还鲜有研究报道.

■ 相关报道

Rauch等研究了欧洲1015名慢性丙型肝炎患者和347名HCV自然清除患者,发现HCV自然清除患者TT基因型频率高于慢性丙型肝炎患者,与rs8099917 TT基因型相比, TG和GG发展为慢性丙型肝炎的风险更高。

表 1 研究对象一般资料

变量	健康人群(<i>n</i> = 244)	丙型肝炎患者(<i>n</i> = 263)	χ^2/Z 值	<i>P</i> 值
性别			1.563	0.211 ^a
男, <i>n</i> (%)	136(55.7)	132(50.2)		
女, <i>n</i> (%)	108(44.3)	131(49.8)		
年龄(mean \pm SD, 岁)	52.1 \pm 10.7	54.0 \pm 11.7	1.842	0.065 ^b

^a四格表 χ^2 检验; ^bMann-Whitney *U*检验。

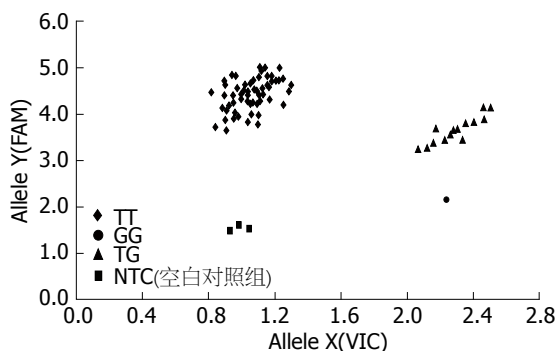


图 1 IL-28B rs8099917基因多态性散点图。

患者中,男132人(50.2%),女131人(49.8%),平均年龄54.0岁 \pm 11.7岁。在244名健康人中,男136人(55.7%),女108人(44.3%),平均年龄52.1岁 \pm 10.7岁。统计发现丙型肝炎患者组与健康对照组在性别、年龄上的差异均无统计学意义($\chi^2 = 1.563$, $P = 0.211$; $Z = 1.842$, $P = 0.065$)。两组人群之间显示良好的匹配性(表1)。

2.2 哈迪温伯格平衡检验 本研究对丙型肝炎患者组和健康对照组IL-28B rs8099917基因多态性进行遗传平衡检验。结果显示,丙型肝炎患者组和健康对照组均符合哈迪温伯格遗传平衡定律, χ^2 值分别为0.26和0.43,均 $P > 0.05$,具有人群代表性(表2)。

2.3 IL-28B rs8099917基因型和等位基因在丙型肝炎患者和健康人群中的分布 丙型肝炎患者组263人,基因型TT 223人(84.8%),TG 39人(14.8%),GG 1人(0.40%),T等位基因频率92.2%。健康对照组244人,基因型TT 222人(91.0%),TG 21人(8.60%),GG 1人(0.40%),T等位基因频率95.3%。丙型肝炎患者TG/GG基因型频率高于健康人(15.2% vs 9.0%; $OR = 1.810$, 95%CI: 1.042-3.145; $P = 0.033$),丙型肝炎患者G等位基因频率比例高于健康人(7.8% vs 4.7%; $OR = 1.709$, 95%CI: 1.010-2.893; $P = 0.044$),差异均有统计学意义(表3)。结果显示G等位基因为

表 2 Hardy-Weinberg遗传平衡检验

分组	Hardy-Weinberg	
	χ^2 值	<i>P</i> 值
丙型肝炎患者组	0.26	0.5 < P < 0.75
健康对照组	0.43	0.5 < P < 0.75

HCV感染的风险等位基因。

2.4 分析中国丙型肝炎患者rs8099917基因型频率与其他民族的差异 如表4所示,TT基因型频率从高到低依次是台湾(89.6%)、韩国(86.2%)、中国(84.8%)、日本(70.4%)、欧洲(58.0%)。中国丙型肝炎患者rs8099917基因型分布与韩国相似($P = 0.783$),亚洲国家和地区中,日本患者TT基因型频率低于中国、台湾和韩国;欧洲患者TT基因型频率则明显低于亚洲丙型肝炎患者。

3 讨论

HCV急性感染后,只有不到30%的人发生病毒自然清除,其余患者会持续感染,大大增加了发展为肝硬化和肝癌的风险^[10]。除了病毒因素,宿主因素(年龄、性别、种族、宿主基因等)与丙型肝炎的发生发展也密切相关^[11]。近年有研究发现,位于人19号染色体上编码IFN- λ 的基因IL-28B与HCV自然清除以及治疗应答密切相关。rs8099917位于IL-28B基因上游约8 kb处,研究发现TT基因型能够预测病毒自然清除和治疗应答^[4-7]。有关中国人群rs8099917与HCV感染相关性的研究还较少。本研究检测了中国慢性丙型肝炎患者和健康人群IL-28B rs8099917基因型、等位基因的分布情况,以分析rs8099917与HCV感染易感性的关系。

IFN- λ s干扰素家族亦即III型IFN家族,包括IL-29、IL-28A、IL-28B,此3种白细胞介素是由外周血单核细胞、树突状细胞和HeLa细胞等经病毒或双链RNA激活而产生的细胞因子^[12]。与

表 3 rs8099917基因型、等位基因在慢性丙型肝炎患者和健康人群中的分布 $n(\%)$

	健康人群($n = 244$)	丙型肝炎患者($n = 263$)	OR(95%CI)	χ^2 值	P 值
rs8099917基因型					
TT	222(91.0)	223(84.8)	1		
TG	21(8.6)	39(14.8)			
GG	1(0.4)	1(0.4)			
TG/GG	22(9.0)	40(15.2)	1.810(1.042-3.145)	4.522	0.033
rs8099917等位基因					
T	465(95.3)	485(92.2)	1		
G	23(4.7)	41(7.8)	1.709(1.010-2.893)	4.065	0.044

■创新盘点

本研究检测了天津地区慢性丙型肝炎患者和健康人群IL-28B rs8099917基因型和等位基因的分布情况,发现中国人群IL-28B rs8099917基因多态性与HCV感染易感性相关联,G为HCV感染的风险等位基因。

表 4 分析中国丙型肝炎患者rs8099917基因型频率与其他民族的差异 (%)

民族	Rs8099917			χ^2 值	P 值
	TT	TG	GG		
欧洲 ^[4]	58.0	37.0	5.0	64.6	0.000
日本 ^[19]	70.4	28.2	1.4	16.2	0.000
韩国 ^[18]	86.2	12.3	1.5	0.08	0.783
台湾 ^[17]	89.6	10.3	0.1	4.25	0.039
中国	84.8	14.8	0.4	—	—

IFN信号途径相似, IL-28/29与受体结合后, 启动信号级联反应, 经过多步磷酸化反应, 激活JAK-STAT信号通路, 导致干扰素激活基因因子3复合物(IFN stimulated gene factor 3 complex, ISGF3)与干扰素激活反应元件(IFN stimulated response element, ISRE)相互作用, 从而调节基因的转录, 最终发挥抗病毒效应^[10]。有实验已经证明IFN- λ s在体内体外均能发挥抗病毒的作用^[13-15]。虽然rs8099917基因多态性在抗HCV感染中的具体机制还不明确, 有研究发现rs8099917 G等位基因与IFN- λ 的低表达相关^[5,7]。

本研究选取的健康对照人群与慢性丙型肝炎患者在年龄和性别上均没有明显差异(均 $P>0.05$), 并且同为天津地区汉族人群, 因此可以排除性别、年龄、民族对HCV感染易感性的干扰。本研究发现, rs8099917基因型在两组的存在明显差异。健康人群TT基因型频率(91.0%)高于丙型肝炎患者(84.8%), 而TG/GG基因型频率(9.0%)明显低于丙型肝炎患者(15.2%)。同样, 研究还发现丙型肝炎患者G等位基因频率(7.8%)高于健康人群(4.7%)。由此可以推测, TG/GG基因型人群比TT更易发展为慢性HCV感染, G为HCV持续感染的风险等位基因。IL-28B rs8099917基因多态性与HCV感染易感性相关联。

之前的学者在研究IL-28B rs8099917基因

多态性与丙型肝炎相关性时, 多关注HCV自然清除和基于干扰素治疗的病毒清除, 较少与健康人群对照, 关注丙型肝炎易感性。Rauch等^[4]研究了欧洲1 015名慢性丙型肝炎患者和347名HCV自然清除患者, 发现与rs8099917 TT基因型相比, TG($OR = 2.24$, 95%CI: 1.63-3.07; $P = 6.63 \times 10^{-7}$)和GG($OR = 6.02$, 95%CI: 2.10-17.21; $P = 8.10 \times 10^{-4}$)发展为慢性丙型肝炎的风险更高。Ochi等^[16]研究发现, 在1b型HCV感染的日本丙型肝炎患者中, T等位基因频率明显低于健康人(86.8% vs 91.7%; $P = 2.9 \times 10^{-3}$)。然而这种差异在日本2a型HCV感染者中却不明显(89.9% vs 91.7%; $P = 0.41$)。与1型HCV感染者相比, 2型HCV丙型肝炎患者保护等位基因频率较高, 风险等位基因频率较低^[16]。由此判断, 由于亚洲2型HCV患者与健康人群基因型分布很接近, rs8099917与2型HCV感染易感性的关联可能不显著。与本研究的发现不同, Chen等^[17]在台湾人群中的研究发现, 台湾健康男性GG基因型频率是男性慢性丙型肝炎患者的21.5倍。是否存在其他作用更强的宿主基因影响HCV感染, 还需要进一步研究。

此外, 本研究还比较了中国汉族与其他民族慢性丙型肝炎患者rs8099917基因型分布的差异。本研究发现, 在亚洲一些国家或地区中, 中

■应用要点

IL-28B rs8099917 基因多态性与中国慢性丙型肝炎感染的易感性相关, G等位基因可能增加HCV持续感染的风险。这些发现可能有助于预测HCV感染的风险, 使部分易感人群在一定程度上加强对HCV的预防。IL-28B在抗HCV感染中的具体机制仍然是未来研究的重点。

国丙型肝炎患者rs8099917基因型分布与韩国相似($P = 0.783$), 保护基因型频率介于台湾和日本之间^[17-19]。日本健康人群TT基因型频率(83.7%)也低于中国健康人群(91%)。这种差异可能与遗传基因与环境的长期相互选择有关。然而在欧洲丙型肝炎患者中, TT基因型频率为58%^[4]。可见, 亚洲人群TT基因型频率高于白种人, 这种现象也许可以在某种程度上解释亚洲丙型肝炎患者抗病毒治疗应答效果好于白种人的原因^[20]。

总之, IL-28B rs8099917基因多态性与中国慢性丙型肝炎感染的易感性相关, G等位基因可能增加HCV持续感染的风险。这些发现可能有助于预测HCV感染的风险, 使部分易感人群在一定程度上加强对HCV的预防。IL-28B在抗HCV感染中的具体机制仍然是未来研究的重点。

4 参考文献

- Martins T, Narciso-Schiavon JL, Schiavon Lde L. [Epidemiology of hepatitis C virus infection]. *Rev Assoc Med Bras* 2011; 57: 107-112 [PMID: 21390467]
- World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/zh/>. (2011)
- Seeff LB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S35-S46 [PMID: 12407575]
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010; 138: 1338-1345, 1345. e1-e7 [PMID: 20060832 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.12.056]
- Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009; 41: 1100-1104 [PMID: 19749758 DOI: 10.1038/ng.447]
- Grebely J, Petoumenos K, Hellard M, Matthews GV, Suppiah V, Applegate T, Yeung B, Marks P, Rawlinson W, Lloyd AR, Booth D, Kaldor JM, George J, Dore GJ. Potential role for interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2010; 52: 1216-1224 [PMID: 20803561 DOI: 10.1002/hep.23850]
- Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009; 41: 1105-1109 [PMID: 19749757 DOI: 10.1038/ng.449]
- 中华医学会肝病学分会、中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. *中华传染病杂志* 2004; 22: 131-136
- 刘娟娟, 高英堂, 杜智, 杨斌, 经翔, 王毅军, 王凤梅, 刘彤. IL-10基因启动子区单核苷酸多态性与乙型肝炎病毒感染后疾病转归的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1656-1663
- Balagopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; 139: 1865-1876 [PMID: 20950615 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.10.004]
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49: 1335-1374 [PMID: 19330875 DOI: 10.1002/hep.22759]
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrand C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003; 4: 63-68 [PMID: 12469119]
- Melchjorsen J, Sirén J, Julkunen I, Paludan SR, Matikainen S. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. *J Gen Virol* 2006; 87: 1099-1108 [PMID: 16603509]
- Hou W, Wang X, Ye L, Zhou L, Yang ZQ, Riedel E, Ho WZ. Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J Virol* 2009; 83: 3834-3842 [PMID: 19193806 DOI: 10.1128/JVI.01773-08]
- Hong SH, Cho O, Kim K, Shin HJ, Katenko SV, Park S. Effect of interferon-lambda on replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *Virus Res* 2007; 126: 245-249 [PMID: 17451832]
- Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Imamura M, Hiraga N, Kawakami Y, Aimitsu S, Kao JH, Kubo M, Tsunoda T, Kumada H, Nakamura Y, Hayes CN, Chayama K. IL-28B predicts response to chronic hepatitis C therapy—fine-mapping and replication study in Asian populations. *J Gen Virol* 2011; 92: 1071-1081 [PMID: 21228123 DOI: 10.1099/vir.0.029124-0]
- Chen JY, Lin CY, Wang CM, Lin YT, Kuo SN, Shiu CF, Chang SW, Wu J, Sheen IS. IL28B genetic variations are associated with high sustained virological response (SVR) of interferon-α plus ribavirin therapy in Taiwanese chronic HCV infection. *Genes Immun* 2011; 12: 300-309 [PMID: 21346780 DOI: 10.1038/gene.2011.1]
- Lyoo K, Song MJ, Hur W, Choi JE, Hong SW, Kim CW, Bae SH, Choi JY, Choi SW, Shin EC, Yoon SK. Polymorphism near the IL28B gene in Korean hepatitis C virus-infected patients treated with peg-interferon plus ribavirin. *J Clin Virol* 2011; 52: 363-366 [PMID: 21907615 DOI: 10.1016/j.jcv.2011.08.006]
- Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, Sato Y, Imamura M, Murata K, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsuhashi H, Orito E, Kani S, Tanaka Y, Mizokami M. The rs8099917 polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor

for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide polymorphisms associated with interleukin-28B. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1853-1860 [PMID: 21389156 DOI: 10.1128/JCM.02139-10]

20 Imazeki F, Yokosuka O, Omata M. Impact of IL-28B SNPs on control of hepatitis C virus infection: a genome-wide association study. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 497-499 [PMID: 20455677 DOI: 10.1586/eri.10.30]

■同行评价

本研究设计合理, 资料详细, 结果可信, 有一定的参考价值。

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版。具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复。

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

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

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

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

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

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

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

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

内镜辅助腹腔镜治疗胃肠道间质瘤20例

王小冬, 汪宝林, 褚朝顺, 王翔, 赵庆洪, 李昌阳

■背景资料

胃肠道间质瘤(GISTs)是消化系统起源于中胚层组织的间叶性肿瘤, 大部分发生于胃, 最常见的症状为消化道出血、腹部隐痛、腹胀等不适。随着微创外科的发展, 其治疗方法也在不断的更新, 双镜联合技术则应运而生, 为胃肠道的间质瘤的微创治疗提供了新的思路和治疗手段。

王小冬, 汪宝林, 褚朝顺, 王翔, 赵庆洪, 李昌阳, 南京医科大学第二附属医院消化外科 江苏省南京市 210011

王小冬, 主要从事胃肠道肿瘤的相关研究。

作者贡献分布: 此课题由王小冬与汪宝林设计; 临床操作由褚朝顺、王翔及赵庆洪完成; 资料收集由王小冬与李昌阳完成; 论文由王小冬与汪宝林完成。

通讯作者: 汪宝林, 主任医师, 210011, 江苏省南京市下关区姜家园121号, 南京医科大学第二附属医院消化外科。

aag727@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-11-26 修回日期: 2012-12-24

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Endoscopy-assisted laparoscopic management of gastrointestinal stromal tumors: An analysis of 20 cases

Xiao-Dong Wang, Bao-Lin Wang, Chao-Shun Chu, Xiang Wang, Qing-Hong Zhao, Chang-Yang Li

Xiao-Dong Wang, Bao-Lin Wang, Chao-Shun Chu, Xiang Wang, Qing-Hong Zhao, Chang-Yang Li, Department of Digestive Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Bao-Lin Wang, Chief Physician, Department of Digestive Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 121 Jiangjiayuan, Xiguang District, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. aag727@yahoo.com.cn

Received: 2012-11-26 Revised: 2012-12-24

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

AIM: To explore the safety and feasibility of endoscopy-assisted laparoscopic resection of gastrointestinal stromal tumors.

METHODS: The clinical data for 95 patients who underwent resection of gastrointestinal stromal tumors by endoscopy-assisted laparoscopic technique, pure laparoscopic technique or traditional open surgery in the Digestive Medical Center of the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University from 2008 to 2012 were analyzed retrospectively. The operative time, blood loss, time to postoperative recovery of gastrointestinal function, time to ambulation and postoperative length of hospital stay were compared between different groups.

RESULTS: All surgeries were completed suc-

cessfully without death or postoperative complications. None of recurrence or metastasis was found. The operative time was $63.0 \text{ min} \pm 7.8 \text{ min}$, $81.6 \text{ min} \pm 6.0 \text{ min}$ and $134.9 \text{ min} \pm 12.9 \text{ min}$ in the endoscopy-assisted laparoscopy group, pure laparoscopy group and open surgery group, respectively; the blood loss was $24.5 \text{ mL} \pm 4.6 \text{ mL}$, $27.1 \text{ mL} \pm 7.1 \text{ mL}$ and $112.4 \text{ mL} \pm 22.5 \text{ mL}$; the time to recovery of gastrointestinal function was $33.4 \text{ h} \pm 2.7 \text{ h}$, $34.6 \text{ h} \pm 5.2 \text{ h}$ and $36.9 \text{ h} \pm 3.2 \text{ h}$; the time to ambulation was $37.1 \text{ h} \pm 4.8 \text{ h}$, $38.0 \text{ h} \pm 3.7 \text{ h}$ and $48.6 \text{ h} \pm 4.0 \text{ h}$; and the postoperative length of hospital stay was $7.8 \text{ d} \pm 1.4 \text{ d}$, $8.1 \text{ d} \pm 1.2 \text{ d}$ and $9.4 \text{ d} \pm 1.8 \text{ d}$. The operative time was significantly lower in the endoscopy-assisted laparoscopy group than in the pure laparoscopy group ($P = 0.000$). The operative time, blood loss, time to recovery of gastrointestinal function, time to ambulation and postoperative length of hospital stay were significantly lower in the endoscopy-assisted laparoscopy group than in the open surgery group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Endoscopy-assisted laparoscopy is a safe and feasible technique for treating gastrointestinal stromal tumors. It has the advantages of minimal invasiveness, accurate positioning, and rapid postoperative recovery. The short-term effect of endoscopy-assisted laparoscopy in managing gastrointestinal stromal tumors is satisfactory, while the long-term results remain to be investigated.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Endoscopy; Laparoscopy; Gastrointestinal stromal tumors; Minimally invasive

Wang XD, Wang BL, Chu CS, Wang X, Zhao QH, Li CY. Endoscopy-assisted laparoscopic management of gastrointestinal stromal tumors: An analysis of 20 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 188-192

摘要

目的: 探讨内镜辅助腹腔镜(双镜联合)下切除胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)的安全性、可行性。

■同行评议者

刘海峰, 主任医师, 北京市武警总医院消化科

方法: 回顾性分析南京医科大学第二附属医院消化医学中心2008-2012采用双镜联合、单纯腹腔镜及传统开腹手术治疗GISTs共95例, 比较3组治疗手术时间、术中出血量、术后胃肠道功能恢复时间、术后下床活动时间及术后住院日。

结果: 所有手术均顺利完成, 无死亡及并发症。随访至今无复发。其中双镜联合组、腹腔镜组及开腹组手术时间分别为 $63.0 \text{ min} \pm 7.8 \text{ min}$ 、 $81.6 \text{ min} \pm 6.0 \text{ min}$ 、 $134.9 \text{ min} \pm 12.9 \text{ min}$, 术中出血量为 $24.5 \text{ mL} \pm 4.6 \text{ mL}$ 、 $27.1 \text{ mL} \pm 7.1 \text{ mL}$ 、 $112.4 \text{ mL} \pm 22.5 \text{ mL}$, 术后胃肠道功能恢复时间 $33.4 \text{ h} \pm 2.7 \text{ h}$ 、 $34.6 \text{ h} \pm 5.2 \text{ h}$ 、 $36.9 \text{ h} \pm 3.2 \text{ h}$, 术后下床活动时间 $37.1 \text{ h} \pm 4.8 \text{ h}$ 、 $38.0 \text{ h} \pm 3.7 \text{ h}$ 、 $48.6 \text{ h} \pm 4.0 \text{ h}$, 术后住院日 $7.8 \text{ d} \pm 1.4 \text{ d}$ 、 $8.1 \text{ d} \pm 1.2 \text{ d}$ 、 $9.4 \text{ d} \pm 1.8 \text{ d}$ 。其中双镜联合组手术时间显著低于腹腔镜($P = 0.000$), 双镜联合组手术时间、术中出血量、术后胃肠道功能恢复时间、术后下床时间术后住院日显著低于开腹组(均 $P < 0.05$)。

结论: 内镜辅助腹腔镜下的双镜联合手术治疗GISTs是安全可行的, 具有定位准确、创伤小, 术后恢复快等优点, 符合微创治疗思路。近期疗效令人满意, 远期结果有待进一步观察。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 内镜; 腹腔镜; 胃肠道间质瘤; 微创

王小冬, 汪宝林, 褚朝顺, 王翔, 赵庆洪, 李昌阳. 内镜辅助腹腔镜治疗胃肠道间质瘤20例. 世界华人消化杂志 2013; 21(2): 188-192
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/188.asp>

0 引言

腹腔镜与内镜联合手术(即双镜联合)是近年来出现的微创外科技术, 该技术取长补短, 充分发挥各自的优势, 将微创外科拓展至新的领域。目前腹腔镜联合胃镜或者肠镜治疗胃肠道黏膜下病变在技术上已日趋成熟, 并取得了良好的效果。本文将我院2008-2012采用内镜辅助腹腔镜下治疗胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)与单纯的腹腔镜及传统的开腹手术治疗做一比较, 探讨双镜联合治疗GISTs的安全性及可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2008-2012共治疗胃肠道黏膜下隆



图1 胃镜下示瘤体位于胃底小弯侧。

起性病变143例。排除瘤体体积过大($>100 \text{ cm}^3$)9例, 过小者($<1 \text{ cm}^3$)12例, 另排除脂肪瘤27例, GISTs共95例, 男38例, 女57例。采用双镜联合组治疗20例, 采用单纯腹腔镜治疗34例, 传统开腹治疗41例。患者一般临床资料如年龄、性别及肿块的部位及大小等方面均具有可比性(表1, 2)。

1.2 方法 腹腔镜组与开腹组术前准备相同, 手术在全麻下进行。

1.2.1 双镜联合: 内镜定位腹腔镜胃、肠腔外部分切除术: 常规五孔法进镜, 气腹维持12-14 mmHg。术中内镜检查, 确定瘤体位置(图1), 使用美兰沿病变外缘注射1 wk。腹腔镜下病变周围浆膜可见蓝色印记, 提起肿块, 以Endo-GIA沿美兰标志处行楔形切除, 缝合加强闭合处。

1.2.2 单纯腹腔镜手术: 采用常规腹腔镜下切除手术。

1.2.3 传统开腹手术: 采用传统开腹手术。

1.2.4 观察指标: 观察(1)术中指标: 术中手术时间、术中出血量; (2)术后恢复指标: 术后胃肠道功能恢复时间、术后下床活动时间、术后住院日。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行统计分析, 均数检验采用 t 检验, 率的检验采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

双镜联合组、腹腔镜组及开腹组手术时间分别为 $63.0 \text{ min} \pm 7.8 \text{ min}$ 、 $81.6 \text{ min} \pm 6.0 \text{ min}$ 、 $134.9 \text{ min} \pm 12.9 \text{ min}$, 术中出血量为 $24.5 \text{ mL} \pm 4.6 \text{ mL}$ 、 $27.1 \text{ mL} \pm 7.1 \text{ mL}$ 、 $112.4 \text{ mL} \pm 22.5 \text{ mL}$, 术后胃肠道功能恢复时间 $33.4 \text{ h} \pm 2.7 \text{ h}$ 、 $34.6 \text{ h} \pm 5.2 \text{ h}$ 、 $36.9 \text{ h} \pm 3.2 \text{ h}$, 术后下床活动时间 $37.1 \text{ h} \pm 4.8 \text{ h}$ 、 $38.0 \text{ h} \pm 3.7 \text{ h}$ 、 $48.6 \text{ h} \pm 4.0 \text{ h}$, 术后住院日 $7.8 \text{ d} \pm 1.4 \text{ d}$ 、 $8.1 \text{ d} \pm 1.2 \text{ d}$ 、 $9.4 \text{ d} \pm 1.8 \text{ d}$ 。其中

■研发前沿

双镜联合作为一项新兴的微创外科技术, 能提高手术疗效, 保证手术安全。具有安全、准确、快速、微创等优点, 而且有着较低的术后并发症发生率及复发率。

■相关报道

目前已有内镜辅助腹腔镜下行胃腔外楔形切除术、经胃腔肿瘤外翻切除术、胃部分切除术及腹腔镜辅助下内镜下GISTs切除术等病例报道。

■创新盘点

本文研究发现双镜联合技术具有安全、准确、快速、微创等优点,为GISTs的微创治疗提供了新的思路和治疗手段。

表 1 双镜联合与单纯腹腔镜组的一般资料比较

一般情况	双镜联合组(<i>n</i> = 20)	单纯腹腔镜组(<i>n</i> = 34)	统计值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	64.4 ± 6.4	60.9 ± 12.2	<i>t</i> = 1.169	0.248
性别(<i>n</i> (%))			$\chi^2 = 0.007$	0.932
男	8(40.0)	14(41.2)		
女	12(60.0)	20(58.8)		
部位			$\chi^2 = 0.002$	0.964
胃	14(70)	24(70.6)		
肠道	6(30)	10(29.4)		
瘤体大小(<i>cm</i> ³)	35.6 ± 13.4	36.8 ± 18.4	<i>t</i> = -0.269	0.789

表 2 双镜联合与传统开腹组的一般资料比较

一般情况	双镜联合组(<i>n</i> = 20)	传统开腹组(<i>n</i> = 41)	统计值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	64.4 ± 6.4	60.4 ± 13.0	<i>t</i> = 1.222	0.226
性别(<i>n</i> (%))			$\chi^2 = 0.005$	0.942
男	8(60)	16(39.0)		
女	12(40)	25(61.0)		
部位			$\chi^2 = 0.475$	0.491
胃	14(70)	25(61.0)		
肠道	6(30)	16(39.0)		
瘤体大小(<i>cm</i> ³)	35.6 ± 13.4	37.2 ± 18.6	<i>t</i> = -0.362	0.728

双镜联合组手术时间显著低于腹腔镜($P = 0.000$, 表3), 双镜联合组手术时间、术中出血量、术后胃肠道功能恢复时间、术后下床时间术后住院日显著低于开腹组(均 $P < 0.05$, 表4)。各组术后均无死亡及并发症, 随访至今无复发。

3 讨论

GISTs是消化系起源于中胚层组织的间叶性肿瘤^[1], 具有非定向分化和潜在恶性的特点^[2], 临床较为少见, 可发生在食道至肛门的任何部位, 其中60%-70%的GISTs发生于胃, 约占全部胃肿瘤的2%^[3,4]。GISTs以中老年多见, 无性别倾向^[5], 起病隐匿, 早期通常无症状, 主要与肿瘤大小和部位有关, 最常见的症状为消化道出血、腹部隐痛、腹胀等不适^[6]等。通过普通胃镜及影像学检查诊断困难^[7], 内镜超声(endoscopic ultrasonography, EUS)检查可精确地探查肿瘤的起源层次、体积大小、边界、周围淋巴结及回声方式, 使GISTs的诊断符合率明显提升, 并且可以为手术方案的制定提供有力的保证^[8]。EUS消化道管壁显示为5层结构, 由内向外依次为黏膜界面和黏膜浅层(高回声)→黏膜肌层(低回声)→黏膜下层(高回声)→固有肌层(低回声)→浆膜层(高

回声)。胃间质瘤显示为位于第4或第2层的圆形或椭圆形低回声团块, 内部回声均匀, 边界清楚(图2)。内镜超声引导的细针穿刺活检术(EUS-FNA), 进行特征性的免疫组织化学检查, 其特点是肿瘤细胞CD117和CD34染色阳性^[9,10], 可提高诊断的准确率, 并有助于术前判定危险程度和预后。我院行EUS检查, 术前确诊27例。

因GISTs扩散途径主要是血行转移及直接侵犯, 较少发生淋巴结转移^[11,12], 且对放疗与化疗均不敏感, 所以手术治疗是首选, 且一般不需作淋巴结清扫^[12]。手术总的原则是: (1)肿瘤完整的整块切除; (2)最大限度保留正常胃壁组织; (3)最少的手术污染; (4)胃腔道狭窄。目前GISTs的手术治疗方法包括: 内镜黏膜下剥离术(endoscopic submucosal dissection, ESD)、腹腔镜下切除术、开腹手术及近年兴起的双镜联合(腹腔镜联合胃镜或肠镜)治疗^[13]。单纯内镜或者腹腔镜治疗均有其各自局限性, 单纯的内镜下治疗的局限性为: (1)对于体积较大(直径>5 cm)GIST, 内镜治疗很难进行操作; (2)由于GIST大多起源于固有肌层, 只有少数起源于黏膜肌层, 且血管丰富, 内镜下安全而完整切除肿瘤难度较大; (3)内镜治疗通常依靠能量切割完成, 但很难找到

表 3 双镜联合与单纯腹腔镜组术中及术后参数比较

分组	手术时间(min)	术中出血量(mL)	术后胃肠功能恢复时间(h)	术后下床时间(h)	术后住院日(d)
双镜联合组	63.0 ± 7.8	24.5 ± 4.6	33.4 ± 2.7	37.1 ± 4.8	7.8 ± 1.4
单纯腹腔镜组	81.6 ± 6.0	27.1 ± 7.1	34.6 ± 5.2	38.0 ± 3.7	8.1 ± 1.2
<i>t</i>	-9.281	-1.483	-0.930	-0.800	-1.071
<i>P</i> 值	0.000	0.144	0.357	0.428	0.289

表 4 双镜联合与传统开腹组术中及术后参数比较

分组	手术时间(min)	术中出血量(mL)	术后胃肠功能恢复时间(h)	术后下床时间(h)	术后住院日(d)
双镜联合组	63.0 ± 7.8	24.5 ± 4.6	33.4 ± 2.7	37.1 ± 4.8	7.8 ± 1.4
传统开腹组	134.9 ± 12.9	112.4 ± 22.5	36.9 ± 3.2	48.6 ± 4.0	9.4 ± 1.8
<i>t</i>	-22.928	-17.234	-4.212	-9.924	-3.591
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

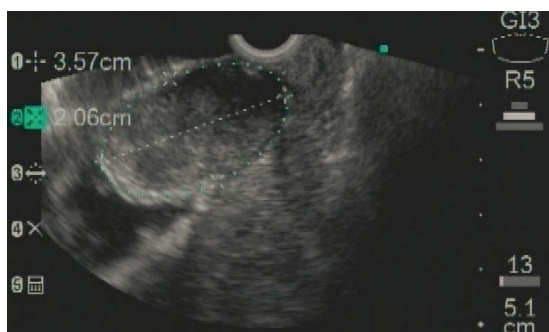


图 2 超声内镜示瘤体位于固有肌层。

能量切割的平衡点, 易造成能量过大或过小, 所以发生并发症如出血、穿孔等风险相对较高, 这也是导致中转开腹手术的主要原因^[13], 且内镜直视下难以全面判断胃GIST的浸润深度, 有切除范围不足及切缘阳性的可能。我院因内镜下治疗发生剥离不全而转为腹腔镜切除的1例, 因术中瘤体侵犯较深而转腹腔镜胃部分切除的病例3例。单纯腹腔镜手术的主要局限性为: (1) 由于腹腔镜手术缺乏手的“触觉反馈”, 对腔内型特别是瘤体较小胃GIST患者, 单独使用该技术时对肿瘤的定位比较困难; (2) 对于接近贲门处的GIST行腹腔镜切除时可能会造成术后贲门部狭窄。本文通过我院采取的内镜辅助腹腔镜治疗GISTs的分析显示, 双镜联合较单纯腹腔镜手术时间显著缩短, 余无显著差异, 这与内镜辅助腹腔镜术中定位快速、准确有关。因此毫无疑问, 双镜联合的优势明显, 是未来发展的趋势^[14]。

双镜联合治疗可分2种形式: 腹腔镜辅助内镜手术(laparoscopy-assisted endoscopic tech-

nique, LAET)和内镜辅助腹腔镜手术(endoscopic-assisted laparo-scopic technique, EALT)。本文讨论内镜辅助腹腔镜手术: 即经内镜引导对肿瘤病灶定位, 在腹腔镜下行切除术。其中EALT又可分为: 内镜辅助楔形切除(endoscopy-assisted wedge resection, EAWR)、内镜辅助经胃切除(endoscopy-assisted transgastric resection, EATR)和内镜辅助腹腔镜非切除性手术。(1)腹腔镜胃腔外胃部分切除术, 主要适用于胃底近大弯侧或胃体前壁、后壁近大弯侧的病灶, 采用楔形胃部分切除方式; 靠近幽门管及贲门部的胃壁肿瘤, 行肿瘤切除加胃壁切口缝合术; (2)腹腔镜胃腔内胃部分切除术, 适用于胃后壁近小弯侧的病灶, 特别是腔内型有亚蒂的肿瘤, 可经胃前壁造口将肿瘤切除, 或腹腔镜下胃腔内肿瘤切除; (3)腹腔镜下近端或远端胃部分切除术, 适用于贲门下方或幽门管附近的肿瘤; (4)内镜辅助腹腔镜非切除性手术: 适用于需要内镜辅助的非切除性手术, 包括腹腔镜胃底折叠术、腹腔镜袖状切除术、腹腔镜胃转流术等。本文中对于GISTs患者使用双镜联合治疗, 其突出的优点体现在术中快速定位, 手术安全、准确, 避免出现胃肠道的狭窄, 且患者手术时间有显著提高。

双镜联合能提高手术疗效, 保证手术安全。作为一项新兴的微创外科技术, 双镜联合在治疗胃肠道良性肿瘤中具有极高的应用价值, 带给患者的创伤比传统开腹手术小得多, 安全性、准确性比普通腹腔镜手术更高, 应用范围比普通消化内镜更广, 具有安全、准确、快速、微创等优点^[15], 而且有着较低的术后并发症发生率。

应用要点

本文将内镜辅助腹腔镜下切除GISTs与单纯的腹腔镜下切除GISTs进行全面系统的比较, 证实在保证安全的前提下, 双镜联合治疗具有准确、快速等优点, 而且有着较低的术后并发症发生率及复发率, 值得推广。

■同行评价

本文完成例数较多, 研究结果对临床具有较好的指导作用. 科学性较强, 有一定的创新性, 文笔流畅, 可读性较好.

及复发率^[16]. 双镜联合技术也为胃肠道的良性疾病的微创治疗提供了新的思路和治疗手段. 相信随着国内外临床外科医师的不断探索和实践, 双镜联合技术会有无比广阔的应用前景.

4 参考文献

- Miettinen M, Majidi M, Lasota J. Pathology and diagnostic criteria of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a review. *Eur J Cancer* 2002; 38 Suppl 5: S39-S51 [PMID: 12528772 DOI: 10.1016/S0959-8049(02)80602-5]
- Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519 [PMID: 6625048 DOI: 10.1097/00000478-198309000-00001]
- Marano L, Torelli F, Schettino M, Porfida R, Reda G, Grassia M, Braccio B, Petrillo M, Di Martino N. Combined laparoscopic-endoscopic "Rendez-vous" procedure for minimally invasive resection of gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Am Surg* 2011; 77: 1100-1102 [PMID: 21944535]
- Bennett JJ, Rubino MS. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Surg Oncol Clin N Am* 2012; 21: 21-33 [PMID: 22098829 DOI: 10.1016/j.soc.2011.09.008]
- Adani GL, Marcello D, Sanna A, Mazzetti J, Anania G, Donini A. Gastrointestinal stromal tumours: evaluation of biological and clinical current opinions. *Chir Ital* 2002; 54: 127-131 [PMID: 12038102]
- 李斯润, 陈永标, 林华. 胃间质瘤27例的诊治分析. *重庆医学* 2008; 37: 1974-1975
- 陈利, 郭文. 胃间质瘤的诊断和治疗进展. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 232-234
- Novitsky YW, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT. Long-term outcomes of laparoscopic resection of gastric gastrointestinal stromal tumors. *Ann Surg* 2006; 243: 738-745; discussion 745-747 [PMID: 16772777 DOI: 10.1097/01.sla.0000219739.11758.27]
- 巩丽, 赵建业, 李艳红, 张力, 韩秀娟, 刘小艳, 朱少君, 张伟. 骶骨胃间质瘤的临床病理学特点、克隆性及c-kit基因突变分析. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 316-320
- 马大烈, 白辰光. 胃肠道间质瘤的病理诊断和预后. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2367-2371
- Matthews BD, Walsh RM, Kercher KW, Sing RF, Pratt BL, Answini GA, Heniford BT. Laparoscopic vs open resection of gastric stromal tumors. *Surg Endosc* 2002; 16: 803-807 [PMID: 11997826 DOI: 10.1007/s00464-001-8319-z]
- Nishimura J, Nakajima K, Omori T, Takahashi T, Nishitani A, Ito T, Nishida T. Surgical strategy for gastric gastrointestinal stromal tumors: laparoscopic vs. open resection. *Surg Endosc* 2007; 21: 875-878 [PMID: 17180273 DOI: 10.1007/s00464-006-9065-z]
- 邱伟箐, 曾晖. 双镜联合技术在胃间质瘤治疗中的应用. *国际外科学杂志* 2011; 38: 31-33
- Kitano S, Shiraishi N. Minimally invasive surgery for gastric tumors. *Surg Clin North Am* 2005; 85: 151-164, xi [PMID: 15619536 DOI: 10.1016/j.suc.2004.09.004]
- 许文安, 汪芳裕, 施惠. 内镜下黏膜切除术治疗消化道隆起性病变的价值. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2010; 30: 1804-1805
- Wilhelm D, von Delius S, Weber L, Meining A, Schneider A, Friess H, Schmid RM, Frimberger E, Feussner H. Combined laparoscopic-endoscopic resections of colorectal polyps: 10-year experience and follow-up. *Surg Endosc* 2009; 23: 688-693 [PMID: 19169747 DOI: 10.1007/s00464-008-0282-5]

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 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; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生^[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]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献, 包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

聚乙二醇干扰素联 α -2a联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎合并血友病2例

高丽英, 贾建伟, 赵洁

高丽英, 贾建伟, 赵洁, 天津市传染病医院 天津市 300192
高丽英, 主治医师, 主要从事中西医结合防治传染病的研究。
作者贡献分布: 论文写作由高丽英完成; 贾建伟与赵洁校对。
通讯作者: 高丽英, 300192, 天津市南开区苏堤路75号, 天津市传染病医院. gaoliying020424@sohu.com
电话: 022-27468219
收稿日期: 2012-11-09 修回日期: 2013-01-02
接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Treatment of chronic hepatitis C with haemophilia with peginterferon alfa-2a and ribavirin: Report of two cases

Li-Ying Gao, Jian-Wei Jia, Jie Zhao

Li-Ying Gao, Jian-Wei Jia, Jie Zhao, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin 300192, China
Correspondence to: Li-Ying Gao, Tianjin Infectious Disease Hospital, 75 Sudi Road, Nankai District, Tianjin 300192, China. gaoliying020424@sohu.com
Received: 2012-11-09 Revised: 2013-01-02
Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

Combination therapy with peginterferon alfa-2a plus ribavirin is the most efficacious treatment for hepatitis C. There have been few reports on antiviral therapy of hepatitis C in patients with hemophilia patients. This paper reports two cases of chronic hepatitis C with haemophilia that were managed by antiviral therapy. Satisfactory therapeutic effects were achieved in both cases.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Chronic hepatitis C; Haemophilia; Peginterferon alfa-2a; Ribavirin

Gao LY, Jia JW, Zhao J. Treatment of chronic hepatitis C with haemophilia with peginterferon alfa-2a and ribavirin: Report of two cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 193-194

摘要

聚乙二醇干扰素联合利巴韦林是最有效的抗丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)治疗方

案。对于合并血友病的慢性丙型肝炎的抗病毒治疗鲜见国内文献报道。本文报道2例丙型肝炎合并血友病患者, 经给予HCV治疗疗效满意, 现报道如下。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 慢性丙型肝炎; 血友病; 干扰素 α -2a; 利巴韦林

高丽英, 贾建伟, 赵洁. 聚乙二醇干扰素 α -2a联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎合并血友病2例. *世界华人消化杂志* 2013; 21(2): 193-194
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/193.asp>

0 引言

血友病患者需要反复输注血制品防治出血, 因此感染肝炎病毒的几率较大。近年来, 随着丙型肝炎知识的普及, 越来越多的感染丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的血友病患者被发现, 我国多位学者曾对血友病患者中HCV感染情况进行调查, 结果显示血友病患者中抗-HCV阳性率为8.82%-35.60%^[1-4]。国内文献对于丙型肝炎合并血友病患者的抗病毒治疗鲜有报道, 我科对2例慢性丙型肝炎合并血友病患者进行聚乙二醇干扰素 α -2a(Peg IFN α -2a)联合利巴韦林进行治疗, 报道如下。

1 病例报告

例1: 男, 28岁, 因“查体发现抗-HCV阳性7 mo”入院。出生8 mo时确诊为血友病甲, 幼年剧烈运动后时有关节腔、皮下出血, 间断输注八因子治疗, 7 mo前查体发现抗-HCV阳性收入院。入院后体格检查: 右膝关节畸形, 活动受限, 余无异常。查血常规正常。凝血指标: PT: 15 s, 活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT): 47 s。病毒分型: 抗-HCV阳性, HBsAg、抗-HIV、抗HAV-IgM、抗HEV-IgM均阴性。HCV RNA定量为 3.6×10^5 copies/mL阳性,

■背景资料

血友病患者由于需要反复输注血制品, 有较高的丙型肝炎病毒(HCV)感染率。慢性丙型肝炎合并血友病患者及时抗病毒治疗, 可延长患者生存期, 提高生活质量。目前, 由于患者认识不够, 医患对于干扰素给药途径的顾虑, 国内有关慢性丙型肝炎合并血友病患者抗病毒治疗报道较少。

■同行评议者

范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科

■研发前沿

慢性HCV感染者需要进行及时、早期抗病毒治疗已成为共识,聚乙二醇干扰素联合利巴韦林是最有效的抗病毒治疗方案。对慢性丙型肝炎合并血友病患者进行抗病毒治疗是必要和有益的,并有待于更多临床经验的积累和总结。

HCV 2a基因型,肝功能检查:丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT): 89 U/L, 谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST): 69 U/L, 总胆红素(total bilirubin, TBIL): 8 μ mol/L。腹部彩超:肝胆脾胰未见异常。诊断: (1)慢性丙型肝炎; (2)甲型血友病。给予Peg IFN α -2a(135 μ g/wk)和利巴韦林(300 mg 3次/d)抗病毒治疗。4 wk后复查HCVRNA<500 copies/mL, 肝功能正常, 后3 mo检测HVCVRNA均阴性, 肝功能持续正常, 继续原方案治疗至1年停药。停药后随访半年, HCVRNA阴性。治疗期间, 曾因护士注射不当, 造成腹部皮下血肿, 后经对症处理, 历时2 mo余完全自行吸收。嘱护士更换注射部位, 规范操作, 未影响干扰素的应用。

例2: 男, 40岁, 因“查体发现抗-HCV阳性1 mo”入院。2岁时确诊为血友病乙, 幼年时有关节腔、皮下、肌肉出血, 成年后活动量大时可有有关节腔出血, 间断应用九因子治疗, 1 mo前查体发现抗-HCV阳性入院。入院后体格检查: 左膝关节及右肘关节畸形, 活动受限, 余无异常。血常规正常, 凝血指标PT: 18 s, APTT: 75 s, 病毒分型: 抗-HCV阳性、HBsAg、抗-HIV、抗HAV-IgM、抗HEV-IgM均阴性。HCVRNA定量为 7.6×10^7 copies/mL阳性, HCV 2a基因型, 肝功能检查: ALT: 78 U/L, AST: 43 U/L, TBIL: 11 μ mol/L。腹部彩超: 肝胆脾胰未见异常。诊断: (1)慢性丙型肝炎; (2)乙型血友病。给予Peg IFN α -2a(180 μ g/wk)和利巴韦林(300 mg, 3次/d)抗病毒治疗。4 wk后复查HCVRNA<500 copies/mL, 肝功能正常。3 mo时复查HCVRNA仍为阴性, 其粒细胞、血小板下降显著(白细胞最低降至 2.1×10^9 /L, 中性粒细胞最低为 0.9×10^9 /L, 血小板最低降至 6×10^9 /L), 予以Peg IFN α -2a调整剂量为135 μ g/wk, 利巴韦林继续原剂量。6 mo时查HCVRNA阴性停药。治疗期间, 患者间断自行输注九因子治疗, 未出现自发性出血的情况。

2 讨论

HCV的慢性感染, 可导致肝脏慢性炎症和纤维化, 部分发展为肝硬化, 甚至肝癌。因此, 对于慢性丙型肝炎合并血友病患者, 及时进行抗病毒治疗抑制病毒复制, 可延缓病情进展、延长患者生存期、提高生活质量。国外有学者报道: 干扰素治疗丙型肝炎合并血友病患者, SVR达到

14%, 而干扰素不良反应的情况发生与普通丙型肝炎患者反应是相似的^[5,6]。对于国内接受抗病毒治疗的患者较少的原因, 考虑可能与患者对于丙型肝炎的认识不足以及干扰素的给药途径给医患都带来一定的顾虑有关。

对于这2例患者的抗病毒治疗的最终疗效是令人满意的。我们临床体会如下: (1)对于有条件的慢性丙型肝炎合并血友病患者是可以应用干扰素进行抗HCV治疗的, 干扰素的反应和普通丙型肝炎患者相似, 干扰素的使用不影响血友病; (2)进行抗病毒治疗之前须进行常规检查, 还需结合血友病自身的特点需要详细询问出血病史, 对于脑出血后继发癫痫者需要慎重; (3)对医护人员, 尤其在传染科或专科医院, 需要加强对血友病知识的宣教, 提高警惕; (4)在抗病毒治疗进行中, 需要加强护理, 规范操作, 保证医疗安全, 如例1属血友病病情轻微者, 平时可从事轻体力活动而不致自发出血, 但是由于护士注射干扰素不规范, 造成了皮下血肿; (5)抗病毒治疗中, 除对临床情况和病毒学指进行标检测外, 还需要定期进行凝血因子含量和凝血时间, 并须备有一定量的凝血因子; (6)干扰素的应用能否促进HCV基因型改变和八/九因子抗体的产生尚无定论。故对于干扰素的剂量和疗程的制订, 应在保证疗效的情况下, 减小药物剂量和缩短疗程; (7)研发抗HCV的口服药将会造福丙型肝炎合并血友病患者。

3 参考文献

- 1 黄吉娥, 杨芳, 邓莲萍. 42例血友病患者丙型肝炎感染状况调查. 贵阳医学院学报 2011; 36: 508-509
- 2 李钦伟, 李信业, 张心声. 224例血友病A患者输血感染病毒状况研究. 山东医药 2007; 47: 75
- 3 朱淼勇, 陈李, 黄瑛. 血友病患者血液传播性疾病调查. 温州医学院学报 2006; 36: 280-282
- 4 丁培芳, 张心声, 李钦伟. 1992-2000年血友病甲患者HCV、HBV、HIV和梅毒感染情况调查分析. 血栓与止血学 2002; 8: 115-117
- 5 Husa P, Roznovsky L, Smejkal P, Husova L, Penka M, Dite P. Efficacy and safety of chronic hepatitis C treatment in hemophilic patients. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1541-1544 [PMID: 16201114]
- 6 Beurton I, Bertrand MA, Bresson-Hadni S, Parquet-Gernez A, Goudemand J, Paris JC, Cales P, Briquel ME, Gaucher P, Cortey ML, Trepo C, Miguet JP, Cahn JY. Interferon alpha therapy in haemophilic patients with chronic hepatitis C: a French multicentre pilot study of 58 patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 859-864 [PMID: 11474317 DOI: 10.11021/ie050608m]

编辑 田滢 电编 闫晋利

■同行评价

本文思路清晰, 结论可靠, 有一定临床参考价值。



原发性胆汁性肝硬化合并系统性硬化症1例

高志远, 何新颖, 徐湘江, 李卫民

高志远, 何新颖, 徐湘江, 李卫民, 河北省沧州中西医结合医院消化科 河北省沧州市 061000

高志远, 主治医师, 主要从事肝脏及胃肠疾病诊治方面的研究。
作者贡献分布: 徐湘江负责诊治、组织会诊; 李卫民负责写作指导; 高志远与何新颖完成论文写作。

通讯作者: 徐湘江, 教授, 061000, 河北省沧州市运河区黄河西路31号, 河北省沧州中西医结合医院消化科。gzycrystal@126.com
电话: 0317-2078924

收稿日期: 2012-10-15 修回日期: 2012-12-26

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-18

Primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis: A case report

Zhi-Yuan Gao, Xin-Ying He, Xiang-Jiang Xu, Wei-Min Li

Zhi-Yuan Gao, Xin-Ying He, Xiang-Jiang Xu, Wei-Min Li, Department of Gastroenterology, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xiang-Jiang Xu, Professor, Department of Gastroenterology, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, 31 Huanghe West Road, Yunhe District, Cangzhou 061000, Hebei Province, China. gzycrystal@126.com

Received: 2012-10-15 Revised: 2012-12-26

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-18

Abstract

Primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis is a rare clinical entity. Here we report such a case in a 58-year-old woman. She was diagnosed with localized cutaneous systemic sclerosis seven years ago. She was admitted to our hospital because of abdominal distention and fatigue and diagnosed with primary biliary cirrhosis. Our case suggests that attention should be paid to primary biliary cirrhosis-systemic sclerosis overlap syndrome.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Systemic sclerosis

Gao ZY, He XY, Xu XJ, Li WM. Primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis: A case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(2): 195-197

摘要

原发性胆汁性肝硬化合并系统性硬化症, 临床

少见。本例患者7年前诊断为局限性系统性硬化症, 现因腹胀、乏力入院后诊断为原发性胆汁性肝硬化, 现报道如下。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 系统性硬化症

高志远, 何新颖, 徐湘江, 李卫民. 原发性胆汁性肝硬化合并系统性硬化症1例. *世界华人消化杂志* 2013; 21(2): 195-197

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/195.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化合并局限性皮肤型系统性硬化症临床少见, 现将我科收治1例患者报道如下。

1 病例报告

女, 58岁, 主因“间断乏力、腹胀8 mo, 加重1 wk”入院。患者8 mo前出现乏力、腹胀, 入当地医院查B超示肝硬化、脾大、腹水(图1)。服用复方甘草酸苷片、护肝片等药物治疗, 具体不详, 症状无缓解。1 wk前腹胀加重, 为进一步诊治来我院。病程中纳差, 偶有皮肤瘙痒, 近期体质量较前增加约3 kg。7年前在天津医科大学总医院诊断为局限性皮肤型系统性硬化症, 间断使用外用药物治疗, 具体成分不详, 控制可。入院体检: 神清, 巩膜无黄染, 心肺(-), 腹膨隆, 无腹壁静脉曲张, 中上腹局部皮肤红白相间, 质硬, 轻压痛, 呈带状分布。剑突下轻压痛, 肝肋下未触及, 脾肋下3横指, 移动性浊音阳性。血常规: WBC: $2.46 \times 10^9/L$, RBC: $3.20 \times 10^{12}/L$, Hb: 101 g/L, PLT: $44 \times 10^9/L$ 。尿常规、大便常规+潜血均正常。生化: TBIL: 21.0 $\mu\text{mol/L}$, DBIL: 12.4 $\mu\text{mol/L}$, GLB: 28.8 g/L, ALB: 26.4 g/L, ALT: 50 U/L, AST: 117 U/L, ALP: 792 U/L, γ -GT: 350 U/L, ChE: 3 552 U/L, TC: 5.55 mmol/L, CA199: 162.7 U/mL, AFP、CEA、CA724、CA125均正常。ESR: 37 mm/h。hsCRP: 8.06 mg/L。甲状腺功能: 正常。ANA: 阳性(1:1 000), AMA: 阳性(1:1 000)AMA-M2(IgG): 593.50 RU/mL。抗着丝点抗体: 1:

■背景资料

原发性胆汁性肝硬化、系统性硬化症均为临床少见自身免疫系统疾病。通过本病例报道有助于临床工作者提高对此重叠综合征的重视, 做到早诊断、早治疗。

■同行评议者

英卫东, 教授, 安徽省立院肝外科

■研发前沿

原发性胆汁性肝硬化患者目前可通过肝脏病理活检或AMA-M2检查进一步明确,但本病常伴随其他自身免疫系统疾病,如干燥综合征、系统性硬化症等,对于此类重叠综合征的早期诊治,值得临床进一步研究.

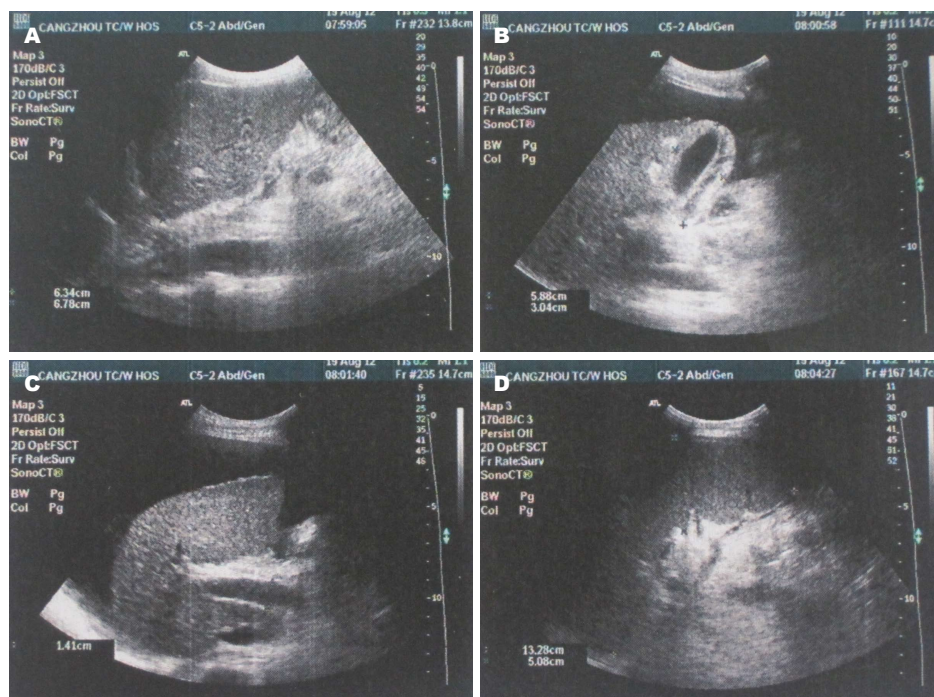


图1 B超示肝硬化、脾大、腹水.

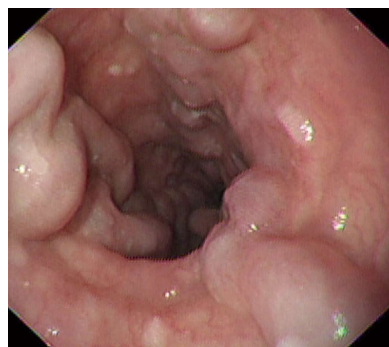


图2 胃镜示食管静脉曲张.

1 000. SMA、LKM、LSP、APCA、ANCA、Sp100、gp210、LC1、SLA/LP、抗RNP、抗SSA、抗SSB、抗Sm、抗Scl-70、抗dsDNA、抗Jo-L均阴性. 巨细胞病毒、EB病毒、乙肝、丙肝病毒学检查阴性. 肺CT: 双肺未见异常. 胃镜: 食管静脉曲张、糜烂性胃炎、十二指肠球炎(图2). 诊断原发性胆汁性肝硬化、脾功能亢进、食管静脉曲张、糜烂性胃炎、十二指肠球炎、局限性皮肤型系统性硬化症, 予熊去氧胆酸、甘草酸二胺、还原型谷胱甘肽等药物治疗, 同时住院期间予补充白蛋白、抽腹水等治疗. 3周后患者肝功能: TBIL: 17.2 $\mu\text{mol/L}$, DBIL: 10.0 $\mu\text{mol/L}$, ALB: 31.3 g/L, ALT: 24 U/L, AST: 41 U/L, ALP: 485 U/L, γ -GT: 154 U/L, ChE: 3 619 U/L. 患者症状好转出院. 嘱其定期复诊, 继续服用熊去氧胆酸等药物治疗.

■相关报道

2009年美国肝病学会(AASLD)制定了PBC新的实践指南, 进一步规范了对本病的诊治. 2011年我国制定自身免疫性肝病诊治指南中PBC部分亦具体阐述了本病的诊治要点.

2 讨论

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)属于自身免疫性肝病, 多见于中年女性, 发病隐匿, 症状期典型症状是乏力和瘙痒, 还可伴厌食、皮肤色素沉着、脂肪泻和干燥综合征. 本患者有胆汁淤积的生化证据, AMA-M2阳性, 根据2009年AASLD制定的标准诊断PBC^[1]. 系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)是一种以局限性或弥漫性皮肤增厚和纤维化为特征的结缔组织病, 可与多种自身免疫病重叠. 随着对疾病认识的提高和早期临床检查手段出现, 对于PBC合并SSc的报道逐渐增多. 国外关于PBC的两项研究显示, PBC患者中合并SSc达到7.4%-8.0%^[2,3]. 所以对于PBC患者应注意检查ACA等自身抗体, 同时仔细询问病史(雷诺现象、消化系症状)和查体(毛细血管扩张、软组织钙化、硬指), 以便于早期发现SSc. 同样相对于SSc患者应注意肝功能、AMA-M2的检查, 必要时肝穿刺活检以免漏诊无症状的早期PBC患者. 本患者7年前诊断SSc, 现入院时已处于肝功能失代偿期, 预后不良, 故本重叠综合征应引起临床医师足够的重视.

3 参考文献

- 1 Lindor KD, Gershwin ME, Poupon R, Kaplan M, Bergasa NV, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2009; 50: 291-308 [PMID: 19554543]
- 2 Rigamonti C, Shand LM, Feudjo M, Bunn CC, Black

CM, Denton CP, Burroughs AK. Clinical features and prognosis of primary biliary cirrhosis associated with systemic sclerosis. *Gut* 2006; 55: 388-394 [PMID: 16150855]

3 Assassi S, Fritzler MJ, Arnett FC, Norman GL, Shah

KR, Gourh P, Manek N, Perry M, Ganesh D, Rahbar MH, Mayes MD. Primary biliary cirrhosis (PBC), PBC autoantibodies, and hepatic parameter abnormalities in a large population of systemic sclerosis patients. *J Rheumatol* 2009; 36: 2250-2256 [PMID: 19723904]

编辑 田滢 电编 闫晋利



■同行评价

原发性胆汁性肝硬化合并系统性硬化症临床罕见, 本文报道了一例原发性胆汁性肝硬化合并局限性皮肤型系统性硬化症患者的临床诊断与治疗, 对临床有一定的参考意义。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

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

3 版权

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

《世界华人消化杂志》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期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569) 是一份同行评议和开放获取期刊(*Open Access Journal*, *OAJ*), 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版。《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、自治区和特别行政区。

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病学, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章。最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病学实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平。

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(*Baishideng Publishing Group*, *BPG*)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上。OAJ最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊。论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本。BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑。目前编辑和出版42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平。

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts

Journals》和《Digital Object Identifier》收录。《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号。《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

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, 循证医学, 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, V_{max} 不能写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 $37.6^{\circ}\text{C} \pm 1.2^{\circ}\text{C}$, $45.6\text{岁} \pm 24\text{岁}$, $56.4\text{ d} \pm 0.5\text{ d}$, $3.56 \pm 0.27\text{ pg/ml}$ 应为 $3.56\text{ ng/L} \pm 0.27\text{ ng/L}$ 。BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $1 \times 10^9/\text{L}$, 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 $1 \times 10^{-3}\text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7}\text{ g}$ 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检验用英文大写F; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

《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: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

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 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 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

《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。

《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。

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]。文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 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天。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。

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, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 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: 010-8538-1892
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2013年国内国际会议预告

2013-01-24/26

美国临床肿瘤学会胃肠肿瘤(ASCO GI)研讨会

会议地点: 美国旧金山

联系方式: www.gicasym.org

2013-02-10/15

2013年肠道微生物组: 免疫网络效应/法规Keystone Symposia 会议

会议地点: 美国

联系方式: info@keystonesymposia.org

2013-02-09/12

美国肠外与肠道营养学会(A.S.P.E.N.): 2013临床营养周(CNW 2013)

会议地点: 美国亚利桑那州凤凰城

联系方式: <http://www.nutritioncare.org/ClinicalNutritionWeek/index.aspx?id=508>

2013-02-22/23

国立压力性溃疡顾问委员会(NPUAP)全国双年会

会议地点: 美国休斯顿

联系方式: [http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11\[1\]](http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11[1])

2013-02-22/23

迈阿密大学肝胆疾病临床实践会议

会议地点: 美国

联系方式: cme.med.miami.edu/x88.xml

2013-03-01/31

2013年北京第七届疝和腹壁外科国际学术研讨会

会议地点: 北京

联系方式: zhshfbwkzz@yahoo.com.cn

2013-03-01/04

2013加拿大消化疾病周(CDDW)

会议地点: 加拿大

联系方式: www.cag-acg.org/cddw

2013-03-07/10

亚太肝脏研究协会(APASL)第23届会议

会议地点: 新加坡

联系方式: www.apaslconference.org

2013-03-15/17

2013年腹腔镜胃肠外科高峰论坛

会议地点: 深圳市

联系方式: ewancool@hotmail.com

2013-03-14/16

中部外科学会(CSA)2013年会

会议地点: 美国佛罗里达州阿米莉亚岛

联系方式: <http://www.centraalsurg.org/meeting/futuremtgs.html>

2013-04-12/14

2013中国肛肠创新论坛(CICS)

会议地点: 北京市

联系方式: www.crdinnovation.com

2013-04-19/23

2013第2届国际肿瘤学论坛

会议地点: 瑞士

联系方式: cihexpo@163.com

2013-05-23/25

2013第六届世界癌症大会

会议地点: 西安市

联系方式: bithuiyi@163.com

2013-05-20/22

2013年第三届内分泌与代谢大会

会议地点: 西安市

联系方式: nancy@bitconferences.cn

2013-05-31/06-04

2013美国临床肿瘤协会年会

会议地点: 美国芝加哥

联系方式: yangxinxue999@163.com

2013-06-07/09

中国国际肿瘤营养与支持治疗研讨会暨第一届全国肿瘤营养与支持治疗学术会议

会议地点: 武汉市

联系方式: csonsc@VIP.163.com

2013-06-21/23

中国消化科学学术论坛

会议地点: 张家界市

联系方式: casgmail@126.com

2013-07-13/14

中华医学会2013年肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 银川市

联系方式: lilyjia@163.com

2014-09-26/30

第39届欧洲临床肿瘤学会年会

会议地点: 西班牙

联系方式: <http://www.esmo.org/events/madrid-2014-esmo-congress.html>

2013-10-18/20

第二十二届亚太抗癌大会

会议地点: 天津市

联系方式: secretariat@apcc2013.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

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

傅思源 副教授
东方肝胆外科医院肝外三科

官泳松 教授
四川大学华西医院放射科

郝丽萍 副教授
华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

何向辉 教授
天津医科大学总医院普通外科

黄培林 教授
东南大学肿瘤学

金瑞 教授
首都医科大学附属北京佑安医院消化科

姜相君 主任医师
青岛市市立医院消化科

金山 教授
内蒙古医学院附属医院普通外科

李升平 教授
中山大学肿瘤医院肝胆科

李革 副教授
延边大学附属医院

李健丁 教授
山西医科大学第一医院放射科CT室

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

刘杰民 副主任医师
贵州省人民医院消化内镜科

马欣 主任医师
甘肃省人民医院消化科

倪才方 教授
苏州大学附属第一医院介入科

邱伟华 主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

宋振顺 教授
西京医院肝胆外科

孙文兵 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院肝胆外科西区

唐南洪 教授
福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

王德盛 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

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

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

于聪慧 教授
中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科

禹正杨 副教授
南华大学附属第一医院

袁建业 副研究员
上海中医药大学附属龙华医院/脾胃病研究所

张志坚 教授
福州总医院消化内科

赵刚 副教授
协和医院胰腺病研究所

周国雄 主任医师
南通大学附属医院消化内科



百世登
Baishideng®

Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**

Room 1701, 17/F, Henan Building,

No. 90 Jaffe Road, Wanchai, Hong Kong, China

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

