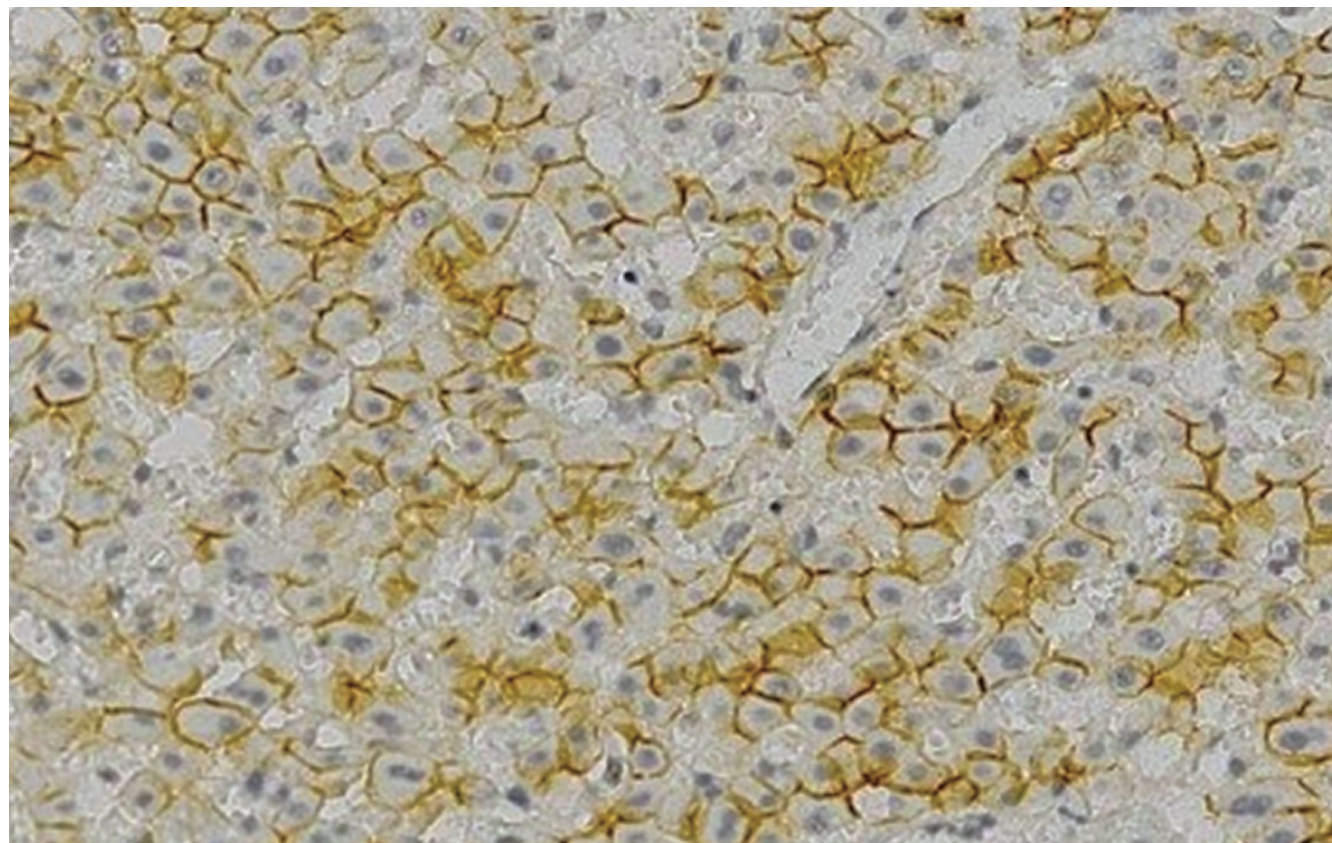


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2013 年 8 月 8 日 第 21 卷 第 22 期 (Volume 21 Number 22)



22 / 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485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71位、广东省40位、江苏省39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
陈洪刚教授
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

康春博副主任医师

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
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
俞继卫副主任医师
于则利教授
禹正杨副教授
喻春钊教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
邹小明教授

消化感染病学

白浪副教授
陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师

丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
方今女教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郭永红副主任医师
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
林潮双副教授
刘正稳教授
彭亮副主任医师
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王建明副教授
王凯教授
王怡主任医师
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
姚鹏副教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵秀英副教授
周陶友副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

陈治水主任医师
杜群副研究员
扈晓宇主任医师
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘绍能主任医师
鲁玉辉副教授
南极星教授
牛英才研究员
谭周进教授
王富春教授
王来友副教授
王笑民主任医师

邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
侯风刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李苏宜教授
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
阴赓宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
曾柱教授
张红教授
张淑坤副研究员
赵平教授
赵铁建教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
朱益民教授
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
邓昊副教授
杜祥教授
樊祥山副主任医师
郭炜教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
门秀丽教授
莫发荣副教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2013年8月8日 第21卷 第22期 (总第426期)

述 评	2121 硫唑嘌呤治疗炎症性肠病诱发淋巴瘤 罗凤燕, 白爱平
基础研究	2128 <i>PLK1</i> 基因RNAi慢病毒载体的构建及对食管鳞癌细胞侵袭转移的影响 于文静, 张宝刚, 陈丽梅, 王守训, 冯卫国, 杜长青, 刘顺梅, 赵春玲 2136 PTD-NBD多肽对大鼠胰腺腺泡细胞炎症损伤中NF- κ B表达的影响 谢文瑞, 杨元生, 杨新魁, 陈垦, 陈婧华, 崔淑兰, 王晖 2143 miR-30d反义核苷酸对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响 张善忠, 周毅, 刘芬, 汪志飞, 万冰
文献综述	2151 肾素-血管紧张素系统在肝纤维化中作用的研究进展 李爽 2158 细胞周期素依赖性激酶、细胞周期调控与肝纤维化 吴丹, 谷秋红, 李智伟 2164 尾加压素在肝硬化中的研究进展 梁冬雨, 侯彦强, 姜晓丽, 叶长根 2169 T细胞免疫球蛋白黏蛋白3与消化系统炎症疾病的关系 余婧, 谢勇
研究快报	2176 通过测定不同途径5-FU化疗后家兔门静脉血及组织中的药物浓度比较各途径的化疗效果 杨建武, 姜福全, 江文俊, 黄玉玲, 崔彦 2181 脂多糖对肝内胆管上皮细胞MUC5AC表达的影响 李敏, 田雨, 吴硕东, 李勇男 2185 原发性肝细胞癌中EGFR、Connexin43和E-cadherin的表达及意义 蒋艳霞, 于文娟, 林东亮, 李宏, 李玉军 2192 抗TNF α 单链抗体复制缺陷型腺病毒载体的构建及表达 卓萌, 唐余燕, 余永胜, 周丽芹, 潘庆春, 王鹏, 臧国庆, 汤正好
临床经验	2198 <i>SASH1</i> 基因在食管鳞癌中的表达及临床意义 刘秋菊, 贺远龙, 刘红云, 卫红军, 许琳, 王青 2202 胃左动脉灌注化疗/栓塞治疗晚期贲门癌70例 李玉红, 杨宏, 艾建中, 丁君超, 闫玉川 2206 <i>HLA-DP</i> 基因多态性与乙型肝炎重症化的关联性 姚津剑, 余金玲, 里进, 陈曼, 杨红, 宋起龙, 林菊生 2212 胆囊区肝癌射频治疗联合LC手术安全性评估 赵希学, 由法平, 袁庆忠, 潘国政, 卜庆教, 郝龙, 张建 2217 床边急诊ERCP在重症急性胆源性胰腺炎治疗中的应用16例 袁帅, 孙大勇 2221 英夫利昔单抗联合肠内营养在治疗中重度克罗恩病中的临床优势 吴高珏, 龚镭, 胥明, 朱颖炜 2228 SLP-2在结肠癌中的表达 张剑, 吴敏, 王利娟, 张红巧, 师广勇, 巴楠, 张自森, 闫琳, 郑晓珂, 邢鑫 2232 两种穿刺置管术治疗消化系统肿瘤患者并发症的比较 王晓龙, 张成武, 缪巍, 刘宁, 王成, 马晓明, 马新福
病例报告	2237 肺肉瘤样癌回肠转移并出血坏死1例 荣万水, 王云帆, 于明川

附 录	I - V 《世界华人消化杂志》投稿须知 I 2013年国内国际会议预告
志 谢	I 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	2127 《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 2135 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 2150 《世界华人消化杂志》出版流程 2157 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 2163 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 2175 《世界华人消化杂志》参考文献要求 2180 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 2205 《世界华人消化杂志》外文字符标准 2211 WJG成功通过评审被PMC收录 2216 《世界华人消化杂志》栏目设置 2227 《世界华人消化杂志》修回稿须知 2236 《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) 2240 《世界华人消化杂志》正文要求
封面故事	蒋艳霞, 于文娟, 林东亮, 李 宏, 李玉军. 原发性肝细胞癌中EGFR、Connexin43和E-cadherin的表达及意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2185-2191 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2185.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2185
本期责任人	编务 车新鑫; 送审编辑 闫晋利, 鲁亚静; 组版编辑 闫晋利; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 黄新珍; 形式规范审核编辑部主任 田滢; 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 2013-08-08

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

党双锐, 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

田滢, 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

Flat C, 23/F., Lucky Plaza, 315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

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

August 2013 Contents in Brief Volume 21 Number 22

EDITORIAL	2121 Risk of lymphoma after treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine <i>Luo FY, Bai AP</i>
BASIC RESEARCH	<p>2128 Lentiviral-mediated RNA interference targeting the <i>PLK1</i> gene inhibits invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma cells <i>Yu WJ, Zhang BG, Chen LM, Wang SX, Feng WG, Du CQ, Liu SM, Zhao CL</i></p> <p>2136 PTD-NBD polypeptide down-regulates expression of NF-κB p65 in inflammatory pancreatic acinar cell injury in rats <i>Xie WR, Yang YS, Yang XK, Chen K, Chen JH, Cui SL, Wang H</i></p> <p>2143 A miR-30d antisense oligonucleotide inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cells <i>Zhang SZ, Zhou Y, Liu Q, Wang ZF, Wan B</i></p>
REVIEW	<p>2151 Role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis <i>Li S</i></p> <p>2158 Cyclin-dependent kinases, control of cell cycle and hepatic fibrosis <i>Wu D, Gu QH, Li ZW</i></p> <p>2164 Progress in understanding role of urotensin II in hepatic cirrhosis <i>Liang DY, Hou YQ, Lou XL, Ye CG</i></p> <p>2169 Role of Tim-3 in pathogenesis of inflammatory diseases of the digestive system <i>Yu J, Xie Y</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>2176 Different chemotherapy effects of 5-FU given via different routes of administration <i>Yang JW, Jiang FQ, Jiang WJ, Huang YL, Cui Y</i></p> <p>2181 LPS induces MUC5AC expression in human biliary epithelial cells <i>Li M, Tian Y, Wu SD, Li YN</i></p> <p>2185 Significance of expression of EGFR, Connexin43 and E-cadherin in primary hepatocellular carcinoma <i>Jiang YX, Yu WJ, Lin DL, Li H, Li YJ</i></p> <p>2192 Construction and identification of recombinant replication-defective adenovirus vector Ad/CMV/V5-DEST-TNFα-scFv <i>Zhuo M, Tang YY, Yu YS, Zhou LQ, Pan QC, Wang P, Zang GQ, Tang ZH</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>2198 Clinical significance of expression of <i>SASH1</i> in esophageal squamous cell carcinoma <i>Liu QJ, He YL, Liu HY, Wei HJ, Xu L, Wang Q</i></p> <p>2202 Left gastric arterial infusion chemotherapy and embolization for treatment of advanced gastric cancer: An analysis of 70 cases <i>Li YH, Yang H, Ai JZ, Ding JC, Yan YC</i></p> <p>2206 Association of a <i>HLA-DP</i> gene polymorphism with progression of HBV infection <i>Yao JJ, Yu JL, Li J, Chen M, Yang H, Song QL, Lin JS</i></p> <p>2212 Safety and effectiveness of radiofrequency combined with laparoscopic cholecystectomy in management of liver cancer near the gallbladder <i>Zhao XX, You FP, Yuan QZ, Pan GZ, Bu QA, Hao L, Zhang J</i></p> <p>2217 Application of bedside emergency ERCP in the treatment of severe acute biliary pancreatitis <i>Yuan S, Sun DY</i></p> <p>2221 Infliximab combined with enteral nutrition for management of moderate to severe Crohn's disease <i>Wu GJ, Gong L, Xu M, Zhu YW</i></p> <p>2228 Expression of SLP-2 in colorectal cancer <i>Zhang J, Wu M, Wang LJ, Zhang HQ, Shi GY, Ba N, Zhang ZS, Yan L, Zheng XK, Xing X</i></p> <p>2232 Clinical effect of improved subclavian vein catheterization versus internal jugular vein catheterization in patients with alimentary canal neoplasms <i>Wang XL, Zhang CW, Miu W, Liu N, Wang C, Ma XM, Ma XF</i></p>
CASE REPORT	2237 Ileal metastasis of pulmonary sarcomatoid carcinoma with hemorrhagic necrosis: A case report <i>Rong WS, Wang YF, Yu MC</i>

APPENDIX	I – V Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> I Meeting events calendar in 2013
ACKNOWLEDGMENT	I Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	<i>Jiang YX, Yu WJ, Lin DL, Li H, Li YJ.</i> Significance of expression of EGFR, Connexin43 and E-cadherin in primary hepatocellular carcinoma. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2013; 21(22): 2185-2191 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2185.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2185
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xin-Xin Che</i> Review Editor: <i>Jin-Li Yan, Ya-Jing Lu</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Xin-Zhen Huang</i> Proof Editor: <i>Ying Tian</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 August 8, 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

Ying Tian, 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: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza,

315-321 Lockhart Road, Wan Chai,

Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

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.

硫唑嘌呤治疗炎症性肠病诱发淋巴瘤

罗凤燕, 白爱平

罗凤燕, 白爱平, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

罗凤燕, 主要从事炎症性肠病的相关研究。

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81270472, 81070310

作者贡献分布: 本文综述由罗凤燕与白爱平完成; 白爱平负责审校。

通讯作者: 白爱平, 副教授, 330006, 江西省南昌市东湖区永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科, baiap@163.com

收稿日期: 2013-05-15 修回日期: 2013-07-08

接受日期: 2013-07-15 在线出版日期: 2013-08-08

Risk of lymphoma after treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine

Feng-Yan Luo, Ai-Ping Bai

Feng-Yan Luo, Ai-Ping Bai, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81270472, 81070310

Correspondence to: Ai-Ping Bai, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. baiap@163.com
Received: 2013-05-15 Revised: 2013-07-08

Accepted: 2013-07-15 Published online: 2013-08-08

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic, non-specific inflammatory disease of the intestine, characterized by excessive activation of the immune system. Immunosuppressive therapy has been widely and effectively used in IBD patients. However, the occurrence of lymphoma after immunosuppressive therapy for IBD, especially azathioprine, has been recently reported. This article reviews the clinical application of azathioprine in IBD, the possible mechanisms responsible for lymphoma induction by azathioprine, and the assessment of benefit and risk of immunosuppressive therapy for IBD.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Azathioprine; Lymphoma

Luo FY, Bai AP. Risk of lymphoma after treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine. *Shijie*

Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(22): 2121-2127 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2121.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2121>

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类肠道免疫系统过度激活引起的慢性非特异性炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD)。免疫抑制剂在IBD患者中广泛应用, 且对于IBD治疗有效, 但是这些药物诱发淋巴瘤的发生报道越来越多, 尤其以硫唑嘌呤(azathioprine, AZA)为甚。AZA治疗IBD是否使淋巴瘤风险增加引起越来越多的关注。本文主要对于AZA在IBD临床应用、诱发淋巴瘤发生的可能机制、风险评估等进行讲述。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 炎症性肠病; 硫唑嘌呤; 淋巴瘤

核心提示: 硫唑嘌呤(azathioprine, AZA)诱导可使淋巴瘤发生风险增加, 但应用AZA治疗炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)利大于弊, 其诱导淋巴瘤发生的绝对风险低, 且可有效地维持缓解IBD患者, 降低IBD复发率及外科手术率。

罗凤燕, 白爱平. 硫唑嘌呤治疗炎症性肠病诱发淋巴瘤. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2121-2127 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2121.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2121>

0 引言

淋巴瘤是最早发现的血液系统恶性肿瘤之一, 其起源于淋巴结及淋巴组织, 可分为霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤两大类。硫唑嘌呤(azathioprine, AZA), 作为免疫抑制剂, 主要通过抑制T淋巴细胞来抑制免疫反应^[1,2], 因此可用于预防器官移植排斥反应^[3], 也可用于类风湿性关节炎^[4]、自身免疫性肝炎^[5]、炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)^[6]等自身免疫性疾病的治疗。2000年国际IBD研究组织(International Organization for the Study of Inflammation)

■背景资料

近年来炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病率逐渐升高, 其药物治疗的不良后果已成为国内外学者及患者关注的热点之一。硫唑嘌呤(azathioprine, AZA)治疗IBD后诱导淋巴瘤发生的临床报道越来越多, 评估AZA治疗后淋巴瘤发生风险及在IBD临床应用的利与弊, 对于该药在临床上应用有着重要的指导作用。

■同行评议者

万军, 教授, 中国人民解放军总医院南楼老年消化科

■研究前沿

AZA诱导淋巴瘤报道逐年增多,而AZA诱导淋巴瘤发生风险及具体机制,如何预防及监测淋巴瘤发生,合并淋巴瘤发生后治疗等问题仍未完全阐明,需进一步研究。

表 1 硫唑嘌呤在炎症性肠病治疗适应证^[22]

分组	适应证
克罗恩病	维持缓解中重度克罗恩病(任何部位的疾病,特别是广泛的疾病) 维持缓解克罗恩病早期复发(经治疗后进入缓解期<3 mo)或频繁复发(每年2次以上) 瘘管克罗恩病(与抗生素合用,如果没有尽早抗TNF治疗或手术必要) 术后预防克罗恩病复发(除非高风险的情况下,如反复手术或当前吸烟者) 结合抗TNF制剂治疗严重克罗恩病(快速升阶梯或降阶梯治疗)
溃疡性结肠炎 (可联合5-氨基水杨酸治疗)	激素依赖性溃疡性结肠炎维持缓解治疗 需类固醇治疗的溃疡性结肠炎早期复发维持缓解治疗 需类固醇治疗的溃疡性结肠炎频繁复发维持缓解治疗 环孢素,他克莫司,或静脉注射类固醇激素诱导缓解溃疡性结肠炎的维持缓解治疗 急性或慢性难治性憩室炎

tory Bowel Disease, IOIBD)发起一项大规模对于免疫抑制剂在IBD的临床应用的研究^[7],报道了AZA治疗IBD患者所产生的不良反应,如诱发胰腺炎、淋巴瘤、白血病、结肠癌、肾癌等。近年来AZA治疗IBD诱导淋巴瘤发生的临床报道越来越多,IBD患者服用AZA是否可使淋巴瘤发生风险增加受到广泛关注。本文主要讨论AZA在IBD临床应用、代谢过程、药理学作用、是否增加淋巴瘤发生风险以及评估其在IBD应用的利与弊。

1 硫唑嘌呤的IBD临床应用及指征

AZA是否可诱导缓解溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD),不同的研究组有不一样的意见。一项基于AZA诱导缓解急性CD的5个随机对照试验^[8-12]和急性UC的2个随机对照试验^[13,14]的荟萃分析指出单独应用AZA能够成功诱导急性CD和UC的缓解仍缺乏足够的证据。而一项荟萃分析^[15]认为AZA可诱导缓解急性CD,其中指出AZA或6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine, 6-MP)诱导缓解急性CD与安慰剂治疗比较,其OR值为2.43(95%CI: 1.62-3.64),需要治疗的人数(number needed to treat, NNT)大约为5,如果剔除6-MP治疗CD数,其OR值为2.06(95%CI: 1.25-3.39),但是过敏、白细胞减少症、胰腺炎和恶心等不良反应发生增加,OR值为3.44(95%CI: 1.52-7.77),NTT为14。然而其最近更新荟萃分析认为与安慰剂相比,AZA或6-MP对于活动性CD的诱导缓解或临床症状改善没有任何优势^[16]。Gisbert等^[17]进行一项荟萃分析,其中纳入30项非对照试验,AZA/MP诱导缓解UC平均疗效率为65%;而4项AZA/MP诱导缓解UC对照试验研究表明,平均疗效达

73%,对照组为64%,其OR值为1.59(95%CI: 0.59-4.29),故与对照组相比,仍不能认为AZA/MP可以有效地诱导缓解UC。因此大多数学者认为单独应用AZA不能有效地诱导缓解急性CD和UC患者。

一般认为AZA可有效地维持缓解CD和UC患者。最近一项更新荟萃分析^[18]指出AZA有效地维持缓解CD治疗,其Peto OR值为2.32(95%CI: 1.55-3.49),NNT为6,且高剂量AZA能够更好地维持缓解;同时报告对于类固醇依赖的CD患者,应用AZA并撤退类固醇激素可有效地维持缓解CD患者,Peto OR值为5.22(95%CI: 1.06-25.68),NNT为3。根据一项随机双盲对照试验^[19],建议AZA维持治疗CD持续时间应>3.5年。一项关于AZA治疗UC疗效的荟萃分析^[17]指出与安慰剂或5-ASA组相比,AZA可以有效地维持缓解UC,OR值为2.56(95%CI: 1.51-4.34)。Peyrin-Biroulet等^[20]意大利学者发起一项多中心观察性回顾研究,其中建议AZA维持缓解UC持续时间应>6 mo,而也有研究指出其持续时间应>18 mo^[21],故AZA治疗持续多久才能有效地维持缓解UC仍需进一步研究。AZA在IBD临床应用如表1所示^[22]。

2 硫唑嘌呤的代谢途径及药理作用

AZA发挥各种生物学效应,主要通过转变为有活性的6-巯鸟嘌呤核苷酸(6-Thioguanine nucleotide, 6-TGN)实现的。AZA代谢途径^[23]如图1所示,大约90%AZA在肝脏非酶作用下快速裂解转变为6-MP,6-MP经过以下复杂的生物转化转变为有活性或无活性的代谢产物:(1)6-MP经黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)催化形成6-巯尿酸(6-thiouric acid, 6-TU),最后由肾脏排出体外;(2)6-MP在巯基嘌呤甲基转移酶(thiopurine

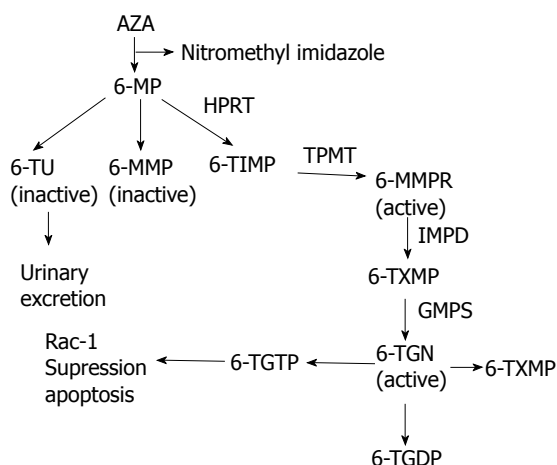


图1 硫唑嘌呤的代谢途径。AZA: 硫唑嘌呤; 6-MP: 6-巯基嘌呤; 6-TU: 6-硫尿酸; 6-MMP: 6-甲基巯基嘌呤; TIMP: 硫唑嘌呤甲基转移酶; 6-MMPR: 6-甲基-巯基嘌呤核苷; 6-TXMP: 6-巯基-黄嘌呤核苷-单磷酸盐; 6-TGN: 6-硫鸟嘌呤核苷酸; 6-TGDP: 6-硫代鸟嘌呤三磷酸; 6-TGTP: 6-硫代鸟嘌呤三磷酸; XO: 黄嘌呤氧化酶; TPMT: 巯基嘌呤甲基转移酶; HPRT: 次黄嘌呤磷酸核糖转移酶。

methytransferase, TPMT)甲基化作用变为非活性代谢物6-MMP; (3)此外, 6-MP可经次黄嘌呤磷酸酶(hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT)催化, 形成的第一个有活性的中间代谢产物单磷酸硫肌苷, 进一步催化形成6-TGN, 还可转变为6-硫代鸟嘌呤三磷酸(6-thioguanine triphosphate, 6-TGTP)和6-硫代鸟嘌呤二磷酸(6-thioguanine diphosphate, 6-TGDP)等。

一项前瞻性横断面研究^[24]指出6-TGN推荐治疗阈值 ≥ 235 pmol/ 8×10^8 红细胞, 且6-TGN水平低于或高于治疗阈值更可能分别与IBD活动期和缓解期有关。然而6-TGN溶度过高可使骨髓抑制风险增高^[25]。活性代谢6-TGN在细胞中缓慢累积, 发挥抗炎作用至少可能需10-12 wk, 故AZA一般不单独应用于急性UC和CD患者诱导缓解治疗^[26]。然而, 其具体药理作用机制仍未完全阐明。细胞内6-TGN可通过抑制DNA的合成和下游的T细胞增殖来抑制免疫反应^[27-29]。运用全基因组表达谱的方法^[30], 6-TGN被发现能抑制多种免疫和炎症相关的基因, 包括抑制活化T淋巴细胞肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体、肿瘤坏死因子受体超家族成员7、 $\alpha 4$ -整合素。另一份报告发现, AZA发挥免疫抑制作用部分是由于其代谢物6-TGTP抑制Rac1的蛋白质, Rac1参与T细胞的成熟和增殖, 从而诱导T淋巴细胞凋亡^[2]。

AZA诱导淋巴瘤、白血病、皮肤癌等恶性肿瘤发生, 其机制可能是: 6-TGN结构相似鸟嘌呤, 可掺入核糖核苷酸, 可能造成碱基的不稳

定、错配, 暴露于致突变因素如紫外线、氧自由基等后可能诱发基因突变, 他们也可能直接抑制细胞毒性T细胞和天然杀伤细胞的功能, 抑制细胞介导的免疫监视, 使得EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)、人乳头瘤病毒等潜在感染的淋巴细胞大量增殖, 这将有助于发展淋巴组织增生性疾病及淋巴瘤^[31-33]。

3 硫唑嘌呤诱发IBD患者淋巴瘤的证据

3.1 IBD本身与淋巴瘤风险关系 一般认为IBD患者淋巴瘤的发病率与其他对照人群的发病率大致相同或略为增高^[34,35]。Lewis等^[34]进行回顾性队列研究, 其成功纳入了6605例CD患者和10391例UC患者, 对照组60506例, 与普通人群相比, 其相对危险度(relative risk, RR)为1.2, 95%CI: 0.67-2.06。Askling等^[35]开展大型群体前瞻性研究研究发现UC中淋巴瘤的标准化发病率为1.0(95%CI: 0.8-1.3), 而CD为1.3(95%CI: 1.0-1.6), 只在随访第一年呈边缘升高。最近一个荷兰研究小组报告进一步证实IBD患者淋巴瘤发病率与同地域的其他人群没有差别^[36]。目前只有一个研究指出IBD与淋巴瘤发生有关, 且限于男性CD患者, 其可能与参照偏移、非霍奇金淋巴瘤及霍奇金淋巴瘤在人群中发病率不同有关^[37]。

3.2 硫唑嘌呤诱导IBD病情缓解治疗 最近一项对于AZA诱导缓解急性CD患者疗效的荟萃分析^[16], 其中指出其主要不良反应为过敏反应, 白细胞减少症、胰腺炎和恶心, 但没有淋巴瘤报道, 这可能与AZA服用时间较短有关。由于AZA治疗4-6 mo可能也不能获得最大抗炎作用^[38], AZA一般较少单独用于急性UC和CD诱导缓解治疗, 因此对于AZA诱导缓解IBD患者是否可使淋巴瘤风险增加研究较少。

3.3 硫唑嘌呤维持IBD病情缓解治疗 一般认为AZA长时间维持缓解治疗IBD患者可使淋巴瘤发生风险增加。一项大型前瞻性研究^[39], 成功纳入IBD患者19486例, 其中CD 11759例、UC或未分型的IBD 7727例, 随访中位期为35 mo(29-40 mo), 其中连续接受AZA治疗的IBD患者5867例(30.1%), 间断接受AZA治疗2809例(14.4%), 未接受AZA治疗18810例(55.5%), 共确诊淋巴瘤23例, 其中22例为非霍奇金淋巴瘤, 对于连续接受AZA治疗的IBD患者, 每1000人年的淋巴瘤发生率为0.9(95%CI: 0.50-1.49), 间断接受AZA治疗每1000人年的淋巴瘤发生率为0.2(0.02-0.72), 而未接受AZA治疗每1000人年的淋巴瘤发生

■相关报道

国际IBD研究组织报道AZA可能诱发淋巴瘤, 但有研究报道其绝对风险低, AZA应用于临床利大于弊。

■创新盘点

本文以硫唑嘌呤治疗IBD患者中最危险的不良反应淋巴瘤着手,从硫唑嘌呤在IBD临床应用、诱发淋巴瘤发生的可能机制、风险评估及其在IBD临床应用的利与弊等方面进行了综述。

率为0.26(0.10-0.57),上述3组间存在显著差异($P<0.05$),且AZA治疗诱发淋巴瘤发生整体多元变量危险比为5.28(95%CI: 2.01-13.9);对于服用AZA, <50岁年龄组每1000人年淋巴瘤发生率为0.37%,而>65岁年龄组为5.41。前期研究结果表明AZA治疗IBD患者可使淋巴瘤发生风险增加,且如果患者不再服用AZA,淋巴瘤的发病率与从来没有AZA治疗的患者相比没有明显增高,淋巴瘤发生风险增加可能还与年龄有关。

包括6个队列研究的荟萃分析^[40]认为长期服用AZA治疗使得淋巴瘤风险增加,且年龄对于淋巴瘤发生率有影响,研究中发现淋巴瘤11例,而预期数为2.63例,因此集中标准化率(standardized incidence ratios, SIR)为4.18(95%CI: 2.07-7.51);其中敏感性分析指出排除对于集中相对危险度影响较小的研究,重新计算得出SIR(3.49-5.21);且发现年龄对于淋巴瘤发生率有影响,年龄越大,淋巴瘤发生率越高,从20-29岁大约为1/4357至70-79岁为1/355。

研究指出长期服用AZA维持缓解治疗IBD诱导淋巴瘤发生,大部分病例病理组织学上与移植术后淋巴瘤表现一致,主要来源于B细胞,且60%-70%的病例是EB病毒阳性^[39],约5%移植术后淋巴瘤来源于T细胞和T/NK细胞^[41],这可能与AZA抑制免疫监视功能,使得潜在EBV感染细胞克隆性增殖有关。EBV阳性淋巴瘤和AZA明显相关性在荷兰最近的一项全国性研究中也观察到^[36]。这都为AZA使淋巴瘤风险增加提供了证据。

3.4 硫唑嘌呤治疗后停药 有报道指出长期服用AZA治疗IBD并发淋巴瘤后停药4 wk后淋巴瘤明显好转,1年后淋巴瘤完全消退^[42]。在系统性红斑狼疮合并淋巴瘤患者也发现停用AZA后淋巴瘤消退^[43]。一项法国多中心的荟萃分析指出患者不再服用AZA,淋巴瘤的发病率与从来没有AZA治疗的患者相比没有明显增高^[39]。停止AZA后淋巴瘤消退这一现象可能与停药后免疫功能得以恢复有关。然而,IBD合并淋巴瘤患者停用AZA后淋巴瘤消退临床报道较少,故仍需进一步研究。

4 硫唑嘌呤临床应用利与弊

AZA虽有众多不良反应,如急性胰腺炎、白细胞减少、白血病、皮肤癌,然而,与未服用者相比,整体恶性肿瘤发生率并没有增高^[44]。AZA可能使淋巴瘤发生风险增加约4倍^[40],但早期长期

AZA治疗IBD有着较大有益作用,能够有效地维持缓解及预防IBD复发,并可降低外科手术率。

有报告指出对于儿童IBD患者,早期更系统的AZA治疗可以使得缓解时间延长2倍^[45]。来自匈牙利的成人IBD患者队列研究报告AZA治疗长期疗效与疾病行为的变化和切除手术风险降低是独立相关的。他还防止吸烟的有害影响^[46,47]。这也在美国一项回顾性队列研究中得到证实^[48],非穿通性非炎症性CD患者使用AZA时间超过6 mo,其外科手术风险危险比(hazard ratio, HR)为0.41(95%CI: 0.21-0.81)。为了研究停用AZA后IBD复发,有一项研究纳入缓解期CD患者66例,发现停用AZA后在36 mo内32例患者疾病复发,且复发患者中23例重新给予AZA治疗仅1例获得临床缓解^[49]。一项多中心回顾研究^[50]进一步证实维持缓解及预防UC复发,并可降低外科手术率,127例缓解期UC患者,随访中位数为55 mo,发现停用AZA后1年复发率为1/3,2年为1/2,而5年疾病均复发,疾病复发预测因素与缺乏AZA维持缓解治疗(HR: 2.350, 95%CI: 1.434-3.852)及治疗持续时间(3-6 mo短期治疗比>48 mo治疗更不利, HR: 2.783, 95%CI: 1.267-6.114)有关;停用AZA后结肠切除率为10%,且其预测因素与停用AZA引起的药物相关不良反应有关,而与服用AZA后不良反应和持续时间无关。使用马尔可夫模型的一项决策分析表明AZA用于维持缓解CD患者治疗利大于弊,整体调整质量寿命期望值增加,这种增长在年轻患者中尤为明显^[51]。

5 结论

AZA一般需10-12 wk才能发挥其治疗效应,故一般不用于急性UC和CD治疗,但能够有效地维持缓解、预防IBD复发及降低外科手术率。AZA可诱发皮肤癌、直肠癌、白血病等致死性恶性肿瘤发生,但与未服用者相比,其整体风险并未增加。AZA虽可使淋巴瘤发生率增加4倍,但停药后淋巴瘤可能消退,且AZA诱导淋巴瘤增加的绝对风险较低,使用马尔可夫模型的一项决策分析表明AZA治疗利大于弊的,因此AZA使淋巴瘤风险增加4倍不能阻止AZA用于IBD患者治疗。然而, AZA诱导淋巴瘤发生具体机制,如何预防及监测淋巴瘤发生, AZA停药后淋巴瘤的消退及转归,合并淋巴瘤发生后治疗等问题仍需进一步研究。

6 参考文献

- 1 Poppe D, Tiede I, Fritz G, Becker C, Bartsch B, Wirtz

- S, Strand D, Tanaka S, Galle PR, Bustelo XR, Neurath MF. Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav guanosine exchange activity on Rac proteins. *J Immunol* 2006; 176: 640-651 [PMID: 16365460]
- 2 Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003; 111: 1133-1145 [PMID: 12697733 DOI: 10.1172/JCI16432]
- 3 Kurzawski M, Dziewanowski K, Safranow K, Drozdziak M. Polymorphism of genes involved in purine metabolism (XDH, AOX1, MOCOS) in kidney transplant recipients receiving azathioprine. *Ther Drug Monit* 2012; 34: 266-274 [PMID: 22495427 DOI: 10.1097/FTD.0b013e31824aa681]
- 4 da Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, de Freitas MV, da Silva NA, Louzada-Júnior P, Giorgi RD, Lima RA, da Rocha Castelar Pinheiro G. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol* 2012; 52: 152-174 [PMID: 22460407]
- 5 Czaja AJ. Advances in the current treatment of autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 1996-2010 [PMID: 22476586 DOI: 10.1007/s10620-012-2151-2]
- 6 Bourrier A, Seksik P, Cosnes J. Is There Still A Room For Azathioprine Monotherapy In Inflammatory Bowel Disease? *Curr Drug Targets* 2013 Apr 8. [Epub ahead of print] [PMID: 23574282]
- 7 Meuwissen SG, Ewe K, Gassull MA, Geboes K, Jewell D, Pallone F, Rachmilewitz D, Rask-Madsen J, Riddell BH, Sandborn BJ, Schmuck ML. IOIBD questionnaire on the clinical use of azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporin A and methotrexate in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 13-18 [PMID: 10656204 DOI: 10.1097/00042737-200012010-00004]
- 8 Candy S, Wright J, Gerber M, Adams G, Gerig M, Goodman R. A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut* 1995; 37: 674-678 [PMID: 8549944 DOI: 10.1136/gut.37.5.674]
- 9 Ewe K, Press AG, Singe CC, Stufler M, Ueberschaer B, Hommel G, Meyer zum Büschenfelde KH. Azathioprine combined with prednisolone or monotherapy with prednisolone in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1993; 105: 367-372 [PMID: 8335191]
- 10 Oren R, Moshkowitz M, Odes S, Becker S, Keter D, Pomeranz I, Shirin C, Reisfeld I, Broide E, Lavy A, Fich A, Eliakim R, Patz J, Villa Y, Arber N, Gilat T. Methotrexate in chronic active Crohn's disease: a double-blind, randomized, Israeli multicenter trial. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 2203-2209 [PMID: 9399753]
- 11 Reinisch W, Panés J, Lémann M, Schreiber S, Feagan B, Schmidt S, Sturniolo GC, Mikhailova T, Alexeeva O, Sanna L, Haas T, Korom S, Mayer H. A multicenter, randomized, double-blind trial of everolimus versus azathioprine and placebo to maintain steroid-induced remission in patients with moderate-to-severe active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2284-2292 [PMID: 18671816 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2008.02024.x]
- 12 Tremaine WJ, Schroeder KW, Harrison JM, Zinsmeister AR. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the oral mesalamine (5-ASA) preparation, Asacol, in the treatment of symptomatic Crohn's colitis and ileocolitis. *J Clin Gastroenterol* 1994; 19: 278-282 [PMID: 7876505 DOI: 10.1097/0004836-199412000-00003]
- 13 Jewell DP, Truelove SC. Azathioprine in ulcerative colitis: final report on controlled therapeutic trial. *Br Med J* 1974; 4: 627-630 [PMID: 4441827 DOI: 10.1136/bmj.4.5945.627]
- 14 Sood A, Midha V, Sood N, Kaushal V. Role of azathioprine in severe ulcerative colitis: one-year, placebo-controlled, randomized trial. *Indian J Gastroenterol* 2000; 19: 14-16 [PMID: 10659481]
- 15 Prefontaine E, Macdonald JK, Sutherland LR. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (6): CD000545 [PMID: 20556747 DOI: 10.1002/14651858.CD000545.pub3]
- 16 Chande N, Tsoulis DJ, MacDonald JK. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 4: CD000545 [PMID: 23633304 DOI: 10.1002/14651858.CD000545.pub4]
- 17 Gisbert JP, Linares PM, McNicholl AG, Maté J, Gómollón F. Meta-analysis: the efficacy of azathioprine and mercaptopurine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 126-137 [PMID: 19392869 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2009.04023.x]
- 18 Prefontaine E, Sutherland LR, Macdonald JK, Cepoiu M. Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (1): CD000067 [PMID: 19160175 DOI: 10.1002/14651858.CD000067.pub2]
- 19 Lémann M, Mary JY, Colombel JF, Duclos B, Soule JC, Lerebours E, Modigliani R, Bouhnik Y. A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterology* 2005; 128: 1812-1818 [PMID: 15940616 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.03.031]
- 20 Peyrin-Biroulet L, Lémann M. Review article: remission rates achievable by current therapies for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33: 870-879 [PMID: 21323689 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04599.x]
- 21 Clarke K, Regueiro M. Stopping immunomodulators and biologics in inflammatory bowel disease patients in remission. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 174-179 [PMID: 21674731 DOI: 10.1002/ibd.21792]
- 22 Frei P, Biedermann L, Nielsen OH, Rogler G. Use of thiopurines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 1040-1048 [PMID: 23467510 DOI: 10.3748/wjg.v19.i7.1040]
- 23 Bradford K, Shih DQ. Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4166-4173 [PMID: 22072847 DOI: 10.3748/wjg.v17.i37.4166]
- 24 Gilissen LP, Wong DR, Engels LG, Bierau J, Bakker JA, Paulussen AD, Romberg-Camps MJ, Stronkhorst A, Bus P, Bos LP, Hooymans PM, Stockbrügger RW, Neef C, Masclee AA. Therapeutic drug monitoring of thiopurine metabolites in adult thiopurine tolerant IBD patients on maintenance therapy. *J Crohns Colitis* 2012; 6: 698-707 [PMID: 22398098 DOI: 10.1016/j.crohns.2011.12.003]

■应用要点

AZA可广泛应用于治疗IBD患者,其价格合理,可有效地维持缓解IBD患者,降低IBD复发及外科手术率。

■同行评价

本文选题新颖,在国内综述中类似文章少见,引用文献充分,有大量的证据支持AZA用于IBD患者治疗利大于弊,相信对临床上该种药物的应用有较好的指导作用。

- 25 Dubinsky MC. Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 731-743 [PMID: 15354273 DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00344-1]
- 26 Su C, Lichtenstein GR. Treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33: 209-234, viii [PMID: 15177535 DOI: 10.1016/j.gtc.2004.02.004]
- 27 Lennard L, Singleton HJ. High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994; 661: 25-33 [PMID: 7866549 DOI: 10.1016/0378-4347(94)00327-0]
- 28 Derijks LJ, Gilissen LP, Hooymans PM, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 715-729 [PMID: 16918876 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.02980.x]
- 29 Deshpande AR, Abreu MT. Optimizing therapy with 6-mercaptopurine and azathioprine: to measure or not to measure? *Therap Adv Gastroenterol* 2010; 3: 275-279 [PMID: 21180608 DOI: 10.1177/1756283X10376121]
- 30 Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ, Egan LJ. Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 537-545 [PMID: 15388785 DOI: 10.1124/jpet.104.074815]
- 31 Smith MA, Irving PM, Marinaki AM, Sanderson JD. Review article: malignancy on thiopurine treatment with special reference to inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 119-130 [PMID: 20412066 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04330.x]
- 32 Beaugerie L. Immunosuppression-related lymphomas and cancers in IBD: how can they be prevented? *Dig Dis* 2012; 30: 415-419 [PMID: 22796808 DOI: 10.1159/000338144]
- 33 Kotlyar DS, Osterman MT, Diamond RH, Porter D, Blonski WC, Wasik M, Sampat S, Mendizabal M, Lin MV, Lichtenstein GR. A systematic review of factors that contribute to hepatosplenic T-cell lymphoma in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9: 36-41.e1 [PMID: 20888436 DOI: 10.1016/j.cgh.2010.09.016]
- 34 Lewis JD, Bilker WB, Brensinger C, Deren JJ, Vaughn DJ, Strom BL. Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma. *Gastroenterology* 2001; 121: 1080-1087 [PMID: 11677199 DOI: 10.1053/gast.2001.28703]
- 35 Askling J, Brandt L, Lapidus A, Karlén P, Björkholm M, Löfberg R, Ekbom A. Risk of haematopoietic cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2005; 54: 617-622 [PMID: 15831904 DOI: 10.1136/gut.2004.051771]
- 36 Vos AC, Bakkal N, Minnee RC, Casparie MK, de Jong DJ, Dijkstra G, Stokkers P, van Bodegraven AA, Pierik M, van der Woude CJ, Oldenburg B, Hommes DW. Risk of malignant lymphoma in patients with inflammatory bowel diseases: a Dutch nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1837-1845 [PMID: 21830262 DOI: 10.1002/ibd.21582]
- 37 Bernstein CN, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 2001; 91: 854-862 [PMID: 11241255]
- 38 Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002; 50: 485-489 [PMID: 11889067 DOI: 10.1136/gut.50.4.485]
- 39 Beaugerie L, Brousse N, Bouvier AM, Colombel JF, Lémann M, Cosnes J, Hébuterne X, Cortot A, Bouhnik Y, Gendre JP, Simon T, Maynadié M, Hermine O, Faivre J, Carrat F. Lymphoproliferative disorders in patients receiving thiopurines for inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study. *Lancet* 2009; 374: 1617-1625 [PMID: 19837455 DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61302-7]
- 40 Kandiel A, Fraser AG, Korelitz BI, Brensinger C, Lewis JD. Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 2005; 54: 1121-1125 [PMID: 16009685 DOI: 10.1136/gut.2004.049460]
- 41 Swerdlow SH. T-cell and NK-cell posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 887-895 [PMID: 17509986 DOI: 10.1309/LYNX3RGF7D7KPYG0]
- 42 Larvol L, Soule JC, Le Tourneau A. Reversible lymphoma in the setting of azathioprine therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1994; 331: 883-884 [PMID: 8078549 DOI: 10.1056/NEJM199409293311321]
- 43 Evans SJ, Watson DK, O'Sullivan M. Reversible Hodgkin's lymphoma associated with Epstein-Barr virus occurring during azathioprine therapy for SLE. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47: 1103-1104 [PMID: 18469023 DOI: 10.1093/rheumatology/ken188]
- 44 Armstrong RG, West J, Card TR. Risk of cancer in inflammatory bowel disease treated with azathioprine: a UK population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1604-1609 [PMID: 20104215 DOI: 10.1038/ajg.2009.745]
- 45 Jaspers GJ, Verkade HJ, Escher JC, de Ridder L, Taminiau JA, Rings EH. Azathioprine maintains first remission in newly diagnosed pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 831-836 [PMID: 16954801]
- 46 Lakatos PL, Czegledi Z, Szamosi T, Banai J, David G, Zsigmond F, Pandur T, Erdelyi Z, Gemela O, Papp J, Lakatos L. Perianal disease, small bowel disease, smoking, prior steroid or early azathioprine/biological therapy are predictors of disease behavior change in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3504-3510 [PMID: 19630105 DOI: 10.3748/wjg.15.3504]
- 47 Szamosi T, Banai J, Lakatos L, Czegledi Z, David G, Zsigmond F, Pandur T, Erdelyi Z, Gemela O, Papp M, Papp J, Lakatos PL. Early azathioprine/biological therapy is associated with decreased risk for first surgery and delays time to surgery but not reoperation in both smokers and nonsmokers with Crohn's disease, while smoking decreases the risk of colectomy in ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22: 872-879 [PMID: 19648821 DOI: 10.1097/MEG.0b013e32833036d9]
- 48 Picco MF, Zubiaurre I, Adluni M, Cangemi JR, Shelton D. Immunomodulators are associated with a lower risk of first surgery among patients with non-penetrating non-stricturing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2754-2759 [PMID: 19584832 DOI: 10.1038/ajg.2009.387]

- 49 Treton X, Bouhnik Y, Mary JY, Colombel JF, Duclos B, Soule JC, Lerebours E, Cosnes J, Lemann M. Azathioprine withdrawal in patients with Crohn's disease maintained on prolonged remission: a high risk of relapse. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 80-85 [PMID: 18849016 DOI: 10.1016/j.cgh.2008.08.028]
- 50 Cassinotti A, Actis GC, Duca P, Massari A, Colombo E, Gai E, Annese V, D'Albasio G, Manes G, Travis S, Porro GB, Ardizzone S. Maintenance treatment with azathioprine in ulcerative colitis: outcome and predictive factors after drug withdrawal. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2760-2767 [PMID: 19623172 DOI: 10.1038/ajg.2009.410]
- 51 Lewis JD, Schwartz JS, Lichtenstein GR. Azathioprine for maintenance of remission in Crohn's disease: benefits outweigh the risk of lymphoma. *Gastroenterology* 2000; 118: 1018-1024 [PMID: 10833475 DOI: 10.1016/S0016-5085(00)70353-2]

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》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%。

PLK1基因RNAi慢病毒载体的构建及对食管鳞癌细胞侵袭转移的影响

于文静, 张宝刚, 陈丽梅, 王守训, 冯卫国, 杜长青, 刘顺梅, 赵春玲

■背景资料

PLK1(Polo-like kinase 1)是哺乳动物细胞内一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,在细胞有丝分裂的不同时期均起到十分重要的作用,对中心体成熟、胞质分裂等均有重要影响。但目前关于PLK1影响肿瘤的发生发展,尤其迁移和侵袭的研究报道较少。

于文静, 陈丽梅, 冯卫国, 杜长青, 刘顺梅, 赵春玲, 潍坊医学院细胞生物学教研室 山东省潍坊市 261053

张宝刚, 潍坊医学院病理学教研室 山东省潍坊市 261053

王守训, 潍坊医学院生物化学教研室 山东省潍坊市 261053

于文静, 讲师, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

国家自然科学基金资助项目, Nos. 30901779, 81072608

山东省自然科学基金资助项目, No. ZR2010HM065

山东省高等学校科技计划基金资助项目, No. J10LC20

作者贡献分布: 此课题由赵春玲与刘顺梅设计; 研究过程由于文静、陈丽梅及杜长青操作完成; 研究所用部分试剂与分析工具由张宝刚与王守训提供; 数据分析由于文静与冯卫国完成; 本文写作由于文静与赵春玲完成。

通讯作者: 赵春玲, 副教授, 硕士生导师, 261053, 山东省潍坊市宝通西街7166号, 潍坊医学院细胞生物学教研室。

zhaochunlingbj@163.com

电话: 0536-8462053

收稿日期: 2013-05-27 修回日期: 2013-06-13

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Lentiviral-mediated RNA interference targeting the PLK1 gene inhibits invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma cells

Wen-Jing Yu, Bao-Gang Zhang, Li-Mei Chen, Shou-Xun Wang, Wei-Guo Feng, Chang-Qing Du, Shun-Mei Liu, Chun-Ling Zhao

Wen-Jing Yu, Li-Mei Chen, Wei-Guo Feng, Chang-Qing Du, Shun-Mei Liu, Chun-Ling Zhao, Department of Cell Biology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Bao-Gang Zhang, Department of Biochemistry, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Shou-Xun Wang, Department of Pathology, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30901779 and 81072608; the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2010HM065; the Higher Education Science and Technology Program of Shandong Province, China, No. J10LC20

Correspondence to: Chun-Ling Zhao, Associate Professor, Department of Cell Biology, Weifang Medical University, 7166 Baotong West Road, Weifang 261053, Shandong Province, China. zhaochunlingbj@163.com

Received: 2013-05-27 Revised: 2013-06-13

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

Aim: To investigate the inhibitory effect of lentiviral-mediated RNA interference targeting the PLK1 gene on invasion and metastasis of esoph-

ageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells.

METHODS: RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of PLK1 mRNA and protein in different ESCC cells. Based on the mRNA sequence of human PLK1 gene, interference fragments were designed, and interference efficiency was detected by Western blot. The *in vitro* effect of PLK1 siRNA on migration and invasion of ESCC cells was assessed by wound-healing assay and Matrigel chemoinvasion assay. The most efficient interference fragment was cloned into the lentiviral vector pGLV/H1/GFP+Puro and sequenced. The resulting recombinant lentiviral vector and packaging plasmids were transfected into 293T cells, and packaged virus particles were used to infect ESCC cells. Interference efficiency was assessed using fluorescence quantitative PCR and Western blot. The *in vivo* effect of recombinant lentiviral vector on invasion and metastasis of ESCC cells was studied using a nude mouse model of pulmonary metastasis.

RESULTS: The ESCC cell line TE-8 overexpressed PLK1, and the most efficient PLK1 siRNA could obviously inhibit migration and invasion of TE-8 cells *in vitro*. The lentiviral vector for RNA interference targeting the PLK1 gene was successfully constructed. The prepared recombinant virus particles could infect TE-8 cells and significantly inhibit the metastasis of ESCC cells *in vivo*.

CONCLUSION: Lentiviral-mediated RNA interference targeting PLK1 could obviously inhibit invasion and metastasis of ESCC cells. PLK1 may promote the malignant development of ESCC.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Polo-like kinase 1; Invasion; Metastasis; Lentiviral vector; RNA interference; Esophageal squamous cell carcinoma

Yu WJ, Zhang BG, Chen LM, Wang SX, Feng WG, Du CQ,

■同行评议者
肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室



Liu SM, Zhao CL. Lentiviral-mediated RNA interference targeting the *PLK1* gene inhibits invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2128-2135 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2128.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2128>

摘要

目的: 研究慢病毒介导的*PLK1* (Polo-like kinase 1) 基因RNAi对食管鳞癌细胞侵袭转移的影响。

方法: 利用RT-PCR和Western blot检测不同食管鳞癌细胞中*PLK1*的表达。根据人*PLK1* mRNA序列设计干扰片段, Western blot检测干扰效率; 利用划痕愈合实验及Transwell实验研究靶向*PLK1*的RNAi对食管鳞癌细胞体外侵袭转移能力的影响。将有效干扰序列构建至慢病毒干扰载体pGLV/H1/GFP+Puro中, 测序鉴定。重组慢病毒载体与包装质粒共转染293T细胞包装病毒, 制备的重组病毒感染食管鳞癌细胞, 利用荧光定量PCR和Western blot检测干扰效率; 利用裸鼠肺转移模型实验研究慢病毒介导的*PLK1*基因RNAi对食管鳞癌细胞在体内侵袭转移能力的影响。

结果: 筛选出一种高表达*PLK1*的食管鳞癌细胞株TE-8用于实验研究; 筛选出有效的干扰片段, 并成功构建靶向干扰*PLK1*基因的慢病毒载体, 制备重组病毒颗粒用于感染食管鳞癌细胞; 靶向*PLK1*的RNAi在体内外均能明显抑制食管鳞癌细胞的侵袭与转移。

结论: 靶向干扰*PLK1*基因的重组慢病毒能够抑制食管鳞癌细胞的侵袭与转移, *PLK1*基因影响着食管鳞癌的恶性进展。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: *PLK1*; 侵袭; 转移; 慢病毒载体; RNAi; 食管鳞癌

核心提示: *PLK1* (Polo-like kinase 1) 在鳞状食管癌组织中呈高表达, 且表达程度与食管鳞癌的分化程度及淋巴结转移密切相关, 筛选有效的干扰片段, 成功构建靶向干扰*PLK1*基因的慢病毒载体, 靶向*PLK1*的RNAi在体内外均能明显抑制食管鳞癌细胞的侵袭与转移, *PLK1*基因影响着食管鳞癌的恶性进展。

于文静, 张宝刚, 陈丽梅, 王守训, 冯卫国, 杜长青, 刘顺梅, 赵春玲. *PLK1* 基因RNAi慢病毒载体的构建及对食管鳞癌细胞侵袭转移的影响. *世界华人消化杂志* 2013; 21(22): 2128-2135

URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2128.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2128>

0 引言

PLK1 (Polo-like kinase 1) 是哺乳动物细胞内一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶, 在细胞有丝分裂的不同时期均起到十分重要的作用, 对中心体成熟、细胞周期的正常进行、胞质分裂等均有重要影响^[1-4]。研究发现, 在大多数人类肿瘤中*PLK1*均表现为高表达, 且*PLK1*的过高表达在非小细胞性肺癌、黑色素瘤患者均提示预后不良^[5-8]。但目前关于*PLK1*如何影响肿瘤的发生发展的报道较少, *PLK1*能否成为肿瘤治疗的靶点也成为新的研究热点。

目前对于*PLK1*与食管癌关系的研究正处于起步阶段, 我们的前期工作表明*PLK1*在鳞状食管癌组织中呈高表达, 且*PLK1*的表达程度与食管鳞癌的分化程度及淋巴结转移密切相关^[9]。但*PLK1*是否在食管鳞癌的侵袭转移中发挥作用及其作用机制尚未见相关报道。本研究通过构建针对人*PLK1*基因RNAi的重组慢病毒载体LV-*PLK1*, 制备靶向*PLK1*基因的RNAi慢病毒, 用慢病毒感染食管鳞癌细胞, 研究靶向*PLK1*基因的RNAi慢病毒对食管鳞癌细胞侵袭转移能力的影响, 为靶向*PLK1*基因抗食管鳞癌转移的基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 食管鳞癌细胞株TE-8、TE-10、TE-15和Eca-109购自中国科学院上海细胞库; 293T细胞本实验室保存; 两个*PLK1* siRNA的寡核苷酸序列siRNA-*PLK1*-1和siRNA-*PLK1*-2、非特异性siRNA (siRNA-NC)、DNA-shRNA-*PLK1*和DNA-shRNA-NC由Takara公司合成(表1); pGLV/H1/GFP+Puro载体和包装质粒Helper Vector均购自上海吉玛制药技术有限公司; RPMI 1640培养基和DMEM培养液购自Gibco公司; RNAiso Plus、PrimeScript® RT reagent Kit、SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit、*Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶及T4 DNA连接酶均购自Takara公司; RIPA细胞裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒均购自Beyotime公司; 兔抗人*PLK1*单抗、兔抗人actin单抗和HRP标记的羊抗兔二抗购自Santa Cruz公司; Matrigel购自Sigma公司; Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent和

■ 研发前沿

以慢病毒为载体, 以慢病毒为载体的*PLK1*基因RNAi, 为开发抗食管鳞癌转移的新型生物基因药物提供新思路, 具有重要的临床意义。

■ 相关报道

PLK1在多数人类肿瘤中均表现为高表达,且PLK1的过表达在非小细胞性肺癌、黑色素瘤患者中均提示预后不良;siRNA干扰PLK1的表达可对肿瘤细胞凋亡产生影响。

表 1 本研究中的siRNA及DNA-shRNA序列

名称	序列(5'-3')
siRNA-PLK1-1	正义链: GCGUGACGGCACUGAGUCCUATT 反义链: UAGGACUCAGUGCCGUCACGCTT
siRNA-PLK1-2	正义链: GGGCGGCUUUGCCAAGUGCUTT 反义链: AGCACUUGGCAAAGCCGCCCTT
siRNA-NC	正义链: UUCUCCGAACGUGUCACGU 反义链: ACGUGACACGUUCGGAGAA
DNA-shRNA-PLK1	正义链: GATCCGGGCGGCTTTGCCAAGTGCTTCAAGAGAAGCACTTGGCAAAGCCGCCCTTTTT 反义链: AATTCAAAAAAGGGCGGCTTTGCCAAGTGCTTCTCTTGAAAGCACTTGGCAAAGCCGCC
DNA-shRNA-NC	正义链: GATCCTTCTCCGAACGTGTACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCTGGAGAA TTTTT 反义链: AATTCAAAAAATTCTCCGAACGTGTACGTTCTCTTGAAACGTGACACGTTCTGGAGAA

Lipofectamine RNAiMax Transfection Reagent购自Invitrogen公司; Transwell小室(24孔, 0.8 μ m)购自Corning公司; 本研究所用引物由赛百胜公司合成. PLK1上游引物: 5'-TGACGAGTTCTT-TACTTCTGGC-3', 下游引物: 5'-CAGGCTGT-CACCATCATTGTAG-3', 退火温度是60 $^{\circ}$ C, 扩增片断长度是451 bp; actin上游引物: 5'-TGAC-GTGGACATCCGCAAAG-3', 下游引物: 5'-CT-GGAAGGTGGACAGCGAGG-3', 退火温度是55 $^{\circ}$ C, 扩增片断长度是206 bp.

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测食管鳞癌细胞株中PLK mRNA水平的表达: 利用RNAiso Plus和PrimeScript[®] RT reagent Kit从体外培养的食管鳞癌细胞株中提取总RNA并反转录为cDNA. 利用Taq[™]进行PCR扩增, 具体步骤参考试剂盒说明书. 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min.

1.2.2 Western blot检测食管鳞癌细胞株中PLK1基因在蛋白质水平的表达: 取对数生长期的食管鳞癌细胞株, 利用RIPA细胞裂解液试剂盒进行蛋白质样品制备, 并参照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书对蛋白质进行定量, 每孔上样30 μ g蛋白样品进行SDS-PAGE电泳, 电泳后利用半干法转膜将凝胶中的蛋白质转移到PVDF膜上, 封闭后分别加入一抗(兔抗人PLK1单抗1:1000稀释; 兔抗人actin单抗1:2000稀释)和HRP标记的羊抗兔二抗(1:2000稀释), 洗涤后, 与ECL试剂反应处理曝光, 对蛋白质条带进行分析.

1.2.3 人PLK1基因siRNA靶序列的设计及重

组慢病毒载体的构建: 基于人PLK1 mRNA序列(NM-005030.0), 利用在线设计软件http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html设计两段用于干扰人PLK1的干扰序列siRNA-PLK1-1和siRNA-PLK1-2及对照序列siRNA-NC, 委托Takara公司合成. 根据Lipofectamine RNAiMax Transfection Reagent说明书转染合成的siRNA至食管鳞癌细胞, Western blot检测干扰效率. 根据慢病毒载体特点设计有效干扰片段的DNA片段DNA-shRNA-PLK1及对照序列DNA-shRNA-NC, 并根据载体特点上下游分别引入BamH I和EcoR I酶切位点, 序列见表1, 委托Takara公司合成正反链并退火形成双链. 用BamH I和EcoR I双酶切慢病毒干扰载体pGLV/H1/GFP+Puro, 使其线性化, 割胶纯化回收, 用T4 DNA连接酶将上述合成的片段与线性化的载体于16 $^{\circ}$ C连接过夜. 经转化获得单克隆, 送Takara公司测序分析, 测序正确的重组载体命名为LV-PLK1.

1.2.4 重组慢病毒颗粒的包装、滴度检测及感染食管鳞癌细胞: (1)病毒的包装: 上述重组慢病毒质粒LV-PLK1(LV-NC为对照)与包装质粒 Helper Vector, 按照Invitrogen Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent使用说明书共转染293T细胞, 转染8 h后换为完全培养基; (2)病毒的收集与浓缩: 转染后48 h收集293T细胞上清液. 4 $^{\circ}$ C, 4000 g离心10 min, 收集上清, 用0.45 μ m滤器过滤后分装于小管中, -80 $^{\circ}$ C长期保存; (3)慢病毒滴度检测: 准备5个无菌Ep管, 每管中加入90 μ L的无血清培养基; 取待测定的病毒原液10 μ L加

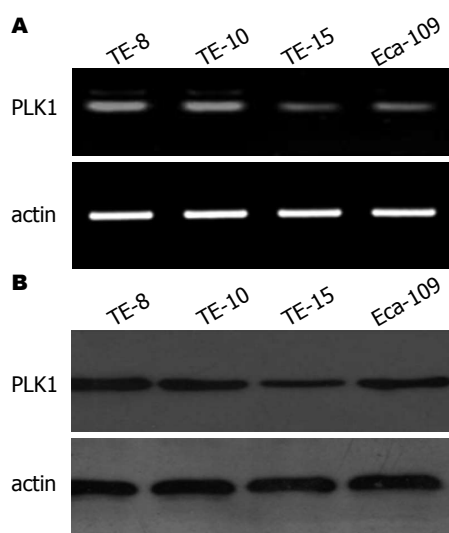


图1 筛选高表达PLK1的食管鳞癌细胞. A: RT-PCR检测; B: Western blot检测.

入到第一个管中, 混匀后, 从第1管取10 μ L加入第2管中, 继续相同的操作直到第5管; 除去培养的293T细胞的DMEM培养液, 加入稀释好的90 μ L病毒溶液, 继续培养24 h后换成100 μ L的完全培养基, 48 h后观察荧光表达情况; (4)感染食管鳞癌细胞: 在细胞培养瓶(75 cm^2)中, 接种 1×10^6 个食管鳞癌细胞, 加入病毒上清稀释液(10 MOI)混合均匀后放入 CO_2 培养箱(37 $^\circ\text{C}$, 50 mL/L CO_2)24 h后移去病毒上清稀释液, 加入RPMI 1640培养基(10%FBS), 继续培养24 h后用于下游实验.

1.2.5 划痕愈合实验检测食管鳞癌细胞体外迁移能力: 将食管鳞癌细胞接种于6孔板, 当细胞密度达到90%时, 瞬时转染化学合成的siRNA-PLK1和对照siRNA-NC 48 h, 用200 μ L的枪头尖以均匀的力度在六孔板上划线. 用无抗生素、无胎牛血清的培养基洗细胞3次, 换用含2%FBS的培养基培养24 h, 拍照.

1.2.6 Transwell实验检测食管鳞癌细胞体外侵袭能力: 瞬时转染化学合成的siRNA-PLK1和对照siRNA-NC至食管鳞癌细胞48 h, 胰酶消化细胞, 以 5×10^4 个细胞/孔的密度接种于Transwell(Matrigel包被)中, 静置1 h; 在下层中加入无抗生素、无胎牛血清的培养基; 培养16 h后取出WELL, 4%多聚甲醛固定10 min, PBS洗两次, 结晶紫染色30 min; 用棉签小心擦拭WELL内部, 擦掉内表面的细胞, PBS洗3次, 显微镜下观察照相; 随机取10个视野计数, 统计数值, 绘制柱形图.

1.2.7 裸鼠肺转移模型实验检测食管鳞癌细胞的

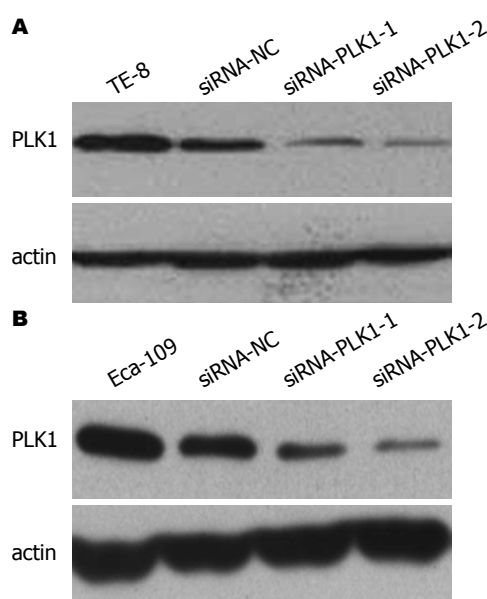


图2 靶向PLK1的siRNA序列的干扰效率比较. A: TE-8细胞株; B: Eca-109细胞株.

肺转移能力: 选取5-8 wk的裸鼠分成4组. 消化对数生长期的食管鳞癌细胞, 用无血清无抗生素培养基洗细胞2次, 将细胞配成 4×10^5 个/100 μ L的浓度. 通过尾静脉注射的方式接种于裸鼠, 接种量约为 4×10^5 个细胞/只. 在接种后2 h, 开始通过尾静脉注射慢病毒的方式治疗. 每次每只裸鼠注射 2×10^6 TU的慢病毒, 每3 d治疗1次, 共计治疗6次. 待空白组裸鼠出现明显呼吸急促, 行动迟缓的现象后, 统一处死裸鼠取肺脏, 计数肺部肿瘤转移结节的数目并拍照.

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS16.0软件进行统计学处理, 两组间均数比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 不同食管鳞癌细胞株中PLK1的表达量的检测 通过RT-PCR(图1A)和Western blot(图1B)的方法分别检测在mRNA和蛋白质水平PLK1在不同的食管鳞癌细胞株中的表达量. 在mRNA和蛋白质水平的检测结果一致, 以actin为内参, 结果均显示TE-8为高表达PLK1的细胞株. 故选用TE-8为后续研究的实验细胞.

2.2 筛选有效的PLK1基因siRNA片段 将合成的siRNA正反链退火形成双链后, 转染TE-8(图2A)和Eca-109(图2B). 以Western blot方法检测干扰效果, 发现在两种细胞株中的干扰效果一致, 与对照组(未转染的空白细胞和siRNA-NC组)相比, siRNA-PLK1-2转染的两株细胞中PLK1的蛋白表达水平均明显降低, 故选择该序列设计并构

■ 创新盘点

本研究通过构建针对人PLK1基因RNAi的重组慢病毒载体LV-PLK1, 制备靶向PLK1基因的RNAi慢病毒, 用慢病毒感染食管鳞癌细胞, 体内外实验结合研究靶向PLK1基因的RNAi慢病毒对食管鳞癌细胞侵袭转移能力的影响.

■应用要点

为靶向 $PLK1$ 基因
抗食管鳞癌转移
的基因治疗提供
实验依据。

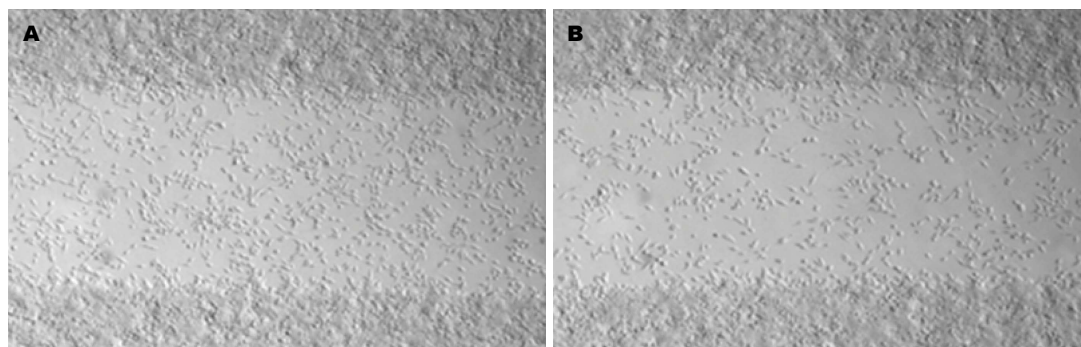


图3 划痕愈合实验结果. A: siRNA-NC; B: siRNA-PLK1.

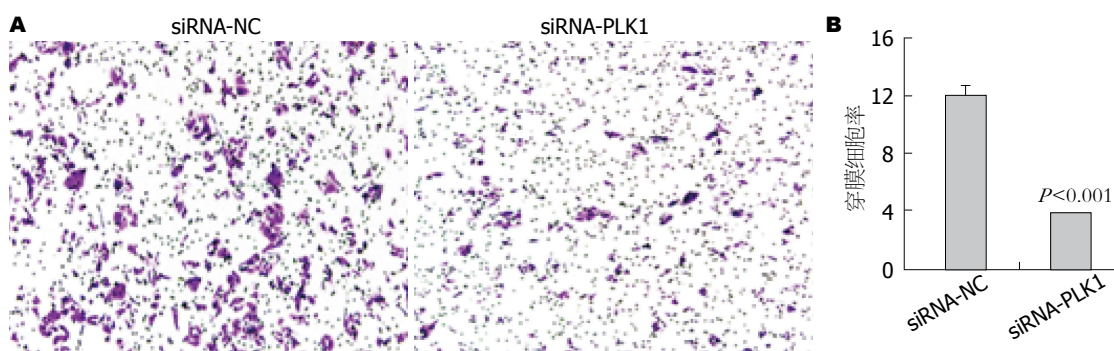


图4 Transwell实验结果. A: siRNA-PLK1组和siRNA-NC组; B: 穿膜细胞率对比. $P < 0.001$.

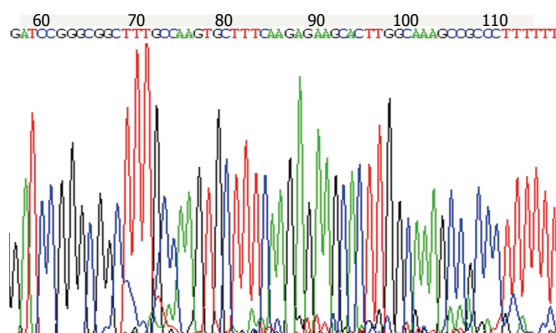


图5 重组慢病毒载体LV-PLK1插入片段测序结果.

建至慢病毒载体中的DNA-shRNA-PLK1, 并进行体外的细胞生物学实验.

2.3 靶向人 $PLK1$ 的RNAi对食管鳞癌细胞体外迁移能力有明显抑制作用 划痕愈合实验结果显示, 实验组(转染siRNA-PLK1)与对照组(siRNA-NC)相比, 划痕处细胞迁移的数目明显减少(图3), 表明靶向 $PLK1$ 的RNAi对食管鳞癌细胞的迁移能力有明显抑制作用.

2.4 靶向人 $PLK1$ 的RNAi对食管鳞癌细胞体外侵袭能力有明显抑制作用 Transwell实验结果显示, 实验组(siRNA-PLK1)穿膜细胞数明显比siRNA-NC组少(图4A), 差异明显($P < 0.001$)(图4B), 表明 $PLK1$ 基因表达沉默能明显抑制食管鳞癌细胞在

体外的侵袭能力.

2.5 重组慢病毒载体的测序鉴定 对插入慢病毒载体中的序列进行测序, 测序结果与理论预测序列完全一致(图5), 该序列能够转录靶向人 $PLK1$ 基因的shRNA. 构建成功的慢病毒载体命名为LV-PLK1.

2.6 $PLK1$ 基因干扰效率的检测 TE-8分别被LV-NC和LV-PLK1重组病毒感染, 72 h后利用荧光定量PCR检测 $PLK1$ 在转录水平上的表达. 结果显示, 与阴性对照相比, LV-PLK1在转录水平上产生明显的干扰效应; 与LV-NC相比, 其干扰效率约为73%(图6A). Western blot检测结果显示在蛋白质水平上 $PLK1$ 的表达同样低于阴性对照组(图6B).

2.7 慢病毒介导的 $PLK1$ 基因RNAi能明显抑制食管鳞癌细胞体内肺转移能力 裸鼠肺转移实验发现, LV-PLK1治疗组肺部肿瘤结节数明显少于LV-NC组(图7A), 差异有统计学意义($P < 0.01$)(图7B). 表明靶向 $PLK1$ 的RNAi能明显抑制食管鳞癌细胞的肺转移.

3 讨论

侵袭与转移是恶性肿瘤的重要特征, 也是肿瘤患者死亡的主要原因. 研究表明^[10-13]肿瘤细胞的

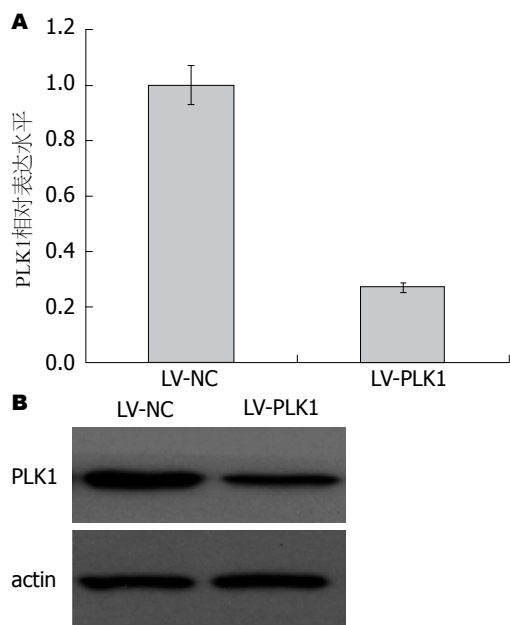


图6 *PLK1* 基因干扰效率的检测. A: 干扰效率对比; B: Western blot检测.

迁移和侵袭能力是肿瘤转移的限速环节, 而肿瘤的迁移和侵袭过程是一个多步骤、多阶段、多因素的复杂过程.

作为调控细胞周期的重要的丝氨酸/苏氨酸激酶, *PLK1* 在许多肿瘤中表现为高表达^[14-17]; 少量的研究表明 *PLK1* 的高表达参与了肿瘤的侵袭转移^[18-20] 或凋亡^[21]. Wang等^[22] 研究表明在转移的肝细胞癌中异常的 *Plk1*-*Cdc25A* 信号通路起了重要作用. Lu等^[23] 研究发现 *PLK1* 表达在早期胚胎发育和抑制肿瘤生长方面均有作用. 在对侵袭性乳腺癌的研究中发现^[24], *PLK1* 通过磷酸化波形蛋白82位的丝氨酸, 进而调节细胞表面的 $\beta 1$ 整合素的蛋白水平, 从而诱导了乳腺癌细胞侵袭穿过富含粘连蛋白的细胞外基质, 但 *PLK1* 是否在食管鳞癌侵袭转移中发挥作用尚未见研究报道.

RNA干扰技术^[25-29] 的出现为我们提供了新的基因功能研究与基因治疗手段. 本研究首先筛选出高表达 *PLK1* 的食管鳞癌细胞 TE-8 及能明显降低食管鳞癌细胞中 *PLK1* 表达的 siRNA 干扰片段, 细胞划痕及 Transwell 实验证实该靶向 *PLK1* 的 siRNA 能明显抑制食管鳞癌细胞 TE-8 的迁移与侵袭能力. 为进一步在动物整体水平观察靶向 *PLK1* 的 RNA 干扰效果, 我们构建了能够干扰人 *PLK1* 基因表达的慢病毒载体. 慢病毒是一种逆转录病毒载体, 可以感染体内体外分裂细胞与非分裂细胞, 并整合到其基因组中长时间表达外源基因. 目前慢病毒作为 siRNA 载体使

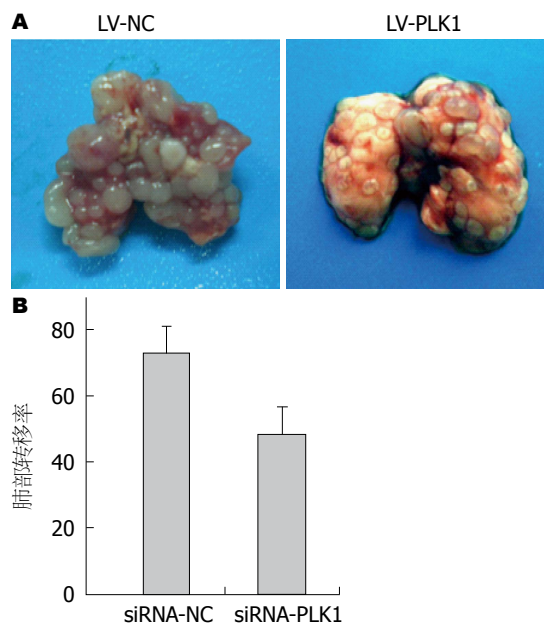


图7 裸鼠肺转移模型实验结果. A: LV-PLK1组和LV-NC组肺部肿瘤; B: 肺部转移率对比.

■同行评价
本文选题新颖, 有良好的临床应用前景, 有一定的创新性.

RNA干扰技术已广泛的应用于基因治疗领域^[30]. 根据慢病毒质粒 pGLV/H1/GFP+Puro 的特点, 将设计合成的 DNA-shRNA-*PLK1* 插入到载体的 *BamH* I 和 *EcoR* I 之间, 测序正确. 成功构建的慢病毒载体能明显干扰食管鳞癌细胞中 *PLK1* 基因表达, 导致 *PLK1* 在转录和蛋白表达水平均下调. 体内实验裸鼠肺转移模型实验证明慢病毒介导的 *PLK1* 基因 RNAi 能明显抑制食管鳞癌细胞在体内的转移与生长, 这同时也表明 *PLK1* 在食管鳞癌的侵袭转移中发挥重要作用, 其机制还有待深入研究, 这将是我们的下一步的研究重点.

总之, *PLK1* 基因能促进食管鳞癌细胞的侵袭与转移, 在食管鳞癌的恶性进展中发挥重要作用, 以慢病毒为载体的 *PLK1* 基因 RNAi 能明显抑制其功能. 这为开发抗食管鳞癌转移的新型生物基因药物提供新思路, 具有重要的临床意义.

4 参考文献

- 1 Liu X, Erikson RL. Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8672-8676 [PMID: 12077309]
- 2 Schmit TL, Nihal M, Ndiaye M, Setaluri V, Spiegelman VS, Ahmad N. Numb regulates stability and localization of the mitotic kinase PLK1 and is required for transit through mitosis. *Cancer Res* 2012; 72: 3864-3872 [PMID: 22593191]
- 3 Zhang L, Shao H, Huang Y, Yan F, Chu Y, Hou H, Zhu M, Fu C, Aikhionbare F, Fang G, Ding X, Yao X. PLK1 phosphorylates mitotic centromere-associated kinesin and promotes its depolymerase activity.

- J Biol Chem* 2011; 286: 3033-3046 [PMID: 21078677 DOI: 10.1074/jbc.M110.165340]
- 4 Beck J, Maerki S, Posch M, Metzger T, Persaud A, Scheel H, Hofmann K, Rotin D, Pedrioli P, Swedlow JR, Peter M, Sumara I. Ubiquitylation-dependent localization of PLK1 in mitosis. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 430-439 [PMID: 23455478 DOI: 10.1038/ncb2695]
 - 5 Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94: 148-152 [PMID: 12708489]
 - 6 Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Expression of polo-like kinase in ovarian cancer is associated with histological grade and clinical stage. *Cancer Lett* 2001; 164: 41-49 [PMID: 11166914]
 - 7 Strebhardt K, Kneisel L, Linhart C, Bernd A, Kaufmann R. Prognostic value of pololike kinase expression in melanomas. *JAMA* 2000; 283: 479-480 [PMID: 10659871]
 - 8 Wolf G, Elez R, Doermer A, Holtrich U, Ackermann H, Stutte HJ, Altmannsberger HM, Rübsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997; 14: 543-549 [PMID: 9053852]
 - 9 Zhao C, Gong L, Li W, Chen L. Overexpression of Plk1 promotes malignant progress in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 9-16 [PMID: 19572149 DOI: 10.1007/s00432-009-0630-4]
 - 10 Xu Y, Chen Q, Yu X, Zhou X, Zheng X, Mao W. Factors influencing the risk of recurrence in patients with esophageal carcinoma treated with surgery: A single institution analysis consisting of 1002 cases. *Oncol Lett* 2013; 5: 185-190 [PMID: 23255917]
 - 11 Ni Y, Meng L, Wang L, Dong W, Shen H, Wang G, Liu Q, Du J. MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Gene* 2013; 517: 197-204 [PMID: 23276710 DOI: doi: 10.1016/j.gene]
 - 12 Xia J, Wang F, Wang L, Fan Q. Elevated serine protease HtrA1 inhibits cell proliferation, reduces invasion, and induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by blocking the nuclear factor- κ B signaling pathway. *Tumour Biol* 2013; 34: 317-328 [PMID: 23079781 DOI: 10.1007/s13277-012-0553-6]
 - 13 Li C, Li Z, Zhu M, Zhao T, Chen L, Ji W, Chen H, Su C. Clinicopathological and prognostic significance of survivin over-expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *PLoS One* 2012; 7: e44764 [PMID: 23028610 DOI: 10.1371/journal.pone.0044764]
 - 14 Zhang XG, Lu XF, Jiao XM, Chen B, Wu JX. PLK1 gene suppresses cell invasion of undifferentiated thyroid carcinoma through the inhibition of CD44v6, MMP-2 and MMP-9. *Exp Ther Med* 2012; 4: 1005-1009 [PMID: 23226764]
 - 15 Zhao XY, Nie CL, Liang SF, Yuan Z, Deng HX, Wei YQ. Enhanced gemcitabine-mediated cell killing of human lung adenocarcinoma by vector-based RNA interference against PLK1. *Biomed Pharmacother* 2012; 66: 597-602 [PMID: 23153503 DOI: 10.1016/j.biopha]
 - 16 Kawata E, Ashihara E, Kimura S, Takenaka K, Sato K, Tanaka R, Yokota A, Kamitsuji Y, Takeuchi M, Kuroda J, Tanaka F, Yoshikawa T, Maekawa T. Administration of PLK-1 small interfering RNA with atelocollagen prevents the growth of liver metastases of lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2904-2912 [PMID: 18790771 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0473]
 - 17 Liu X, Erikson RL. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5789-5794 [PMID: 12732729]
 - 18 Han DP, Zhu QL, Cui JT, Wang PX, Qu S, Cao QF, Zong YP, Feng B, Zheng MH, Lu AG. Polo-like kinase 1 is overexpressed in colorectal cancer and participates in the migration and invasion of colorectal cancer cells. *Med Sci Monit* 2012; 18: BR237-BR246 [PMID: 22648245]
 - 19 Fristrup N, Ulhøi BP, Birkenkamp-Demtröder K, Mansilla F, Sanchez-Carbayo M, Segersten U, Malmström PU, Hartmann A, Palou J, Alvarez-Múgica M, Zieger K, Borre M, Ørntoft TF, Dyrskjot L. Cathepsin E, maspin, Plk1, and survivin are promising prognostic protein markers for progression in non-muscle invasive bladder cancer. *Am J Pathol* 2012; 180: 1824-1834 [PMID: 22449953 DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.01.023]
 - 20 Mross K, Frost A, Steinbild S, Hedbom S, Rentschler J, Kaiser R, Rouyre N, Trommeshauser D, Hoels CE, Munzert G. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of BI 2536, a novel Polo-like kinase 1 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5511-5517 [PMID: 18955456 DOI: 10.1200/JCO.2008.16.1547]
 - 21 Feng YB, Lin DC, Shi ZZ, Wang XC, Shen XM, Zhang Y, Du XL, Luo ML, Xu X, Han YL, Cai Y, Zhang ZQ, Zhan QM, Wang MR. Overexpression of PLK1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis via enhancement of survivin level in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 124: 578-588 [PMID: 19004025 DOI: 10.1002/ijc.23990]
 - 22 Wang XQ, Zhu YQ, Lui KS, Cai Q, Lu P, Poon RT. Aberrant Polo-like kinase 1-Cdc25A pathway in metastatic hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6813-6820 [PMID: 18980975 DOI: 10.1158/1078-0432]
 - 23 Lu LY, Wood JL, Minter-Dykhouse K, Ye L, Saunders TL, Yu X, Chen J. Polo-like kinase 1 is essential for early embryonic development and tumor suppression. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 6870-6876 [PMID: 18794363 DOI: 10.1128/MCB.00392-08]
 - 24 Rizki A, Mott JD, Bissell MJ. Polo-like kinase 1 is involved in invasion through extracellular matrix. *Cancer Res* 2007; 67: 11106-11110 [PMID: 18056432]
 - 25 Tan FL, Yin JQ. Application of RNAi to cancer research and therapy. *Front Biosci* 2005; 10: 1946-1960 [PMID: 15769676]
 - 26 Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S, Yoshiki T, Okada Y, Maekawa T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 2005; 115: 978-985 [PMID: 15761500]
 - 27 Santamaria A, Neef R, Eberspächer U, Eis K, Husemann M, Mumberg D, Prechtel S, Schulze V, Siemeister G, Wortmann L, Barr FA, Nigg EA. Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4024-4036 [PMID: 17671160]
 - 28 Lénárt P, Petronczki M, Steegmaier M, Di Fiore B,

- Lipp JJ, Hoffmann M, Rettig WJ, Kraut N, Peters JM. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* 2007; 17: 304-315 [PMID: 17291761]
- 29 Bu Y, Yang Z, Li Q, Song F. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes inhibition of growth and induction of apoptosis in human esophageal cancer cells. *Oncology* 2008; 74: 198-206 [PMID: 18714168 DOI: 10.1159/000151367]
- 30 Sumimoto H, Kawakami Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research. *Future Oncol* 2007; 3: 655-664 [PMID: 18041918]

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2012-12-07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)。

PTD-NBD多肽对大鼠胰腺腺泡细胞炎症损伤中NF- κ B表达的影响

谢文瑞, 杨元生, 杨新魁, 陈 垦, 陈婧华, 崔淑兰, 王 晖

■背景资料

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)为临床常见的急腹症,起病急、病情重、病死率较高,且其发病机制目前尚未完全阐明,对AP的早期事件认识不够深入,诱导体外AP模型是研究的关键点。目前科研使用较多的胰腺腺泡细胞株为ARJ45细胞,与正常胰腺腺泡细胞存在一定差异,脂多糖和鱼蛙肽可用于诱导体外AP模型,体外胰腺腺泡细胞的获得是研究的关键。研究体外AP模型并予药物干预可为疾病的防治研究提供新的视窗。

谢文瑞, 广东药学院附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080

杨元生, 广东药学院附属第二医院/新海医院消化内科 广东省广州市 510300

杨新魁, 广东医学院附属陈星海医院消化内科 广东省中山市 528415

陈 垦, 陈婧华, 广东药学院护理医学院 广东省广州市 510310

崔淑兰, 广东药学院附属门诊部 广东省广州市 510224

王 晖, 广东药学院中药学院药理学教研室 广东省广州市 510006

谢文瑞, 主治医师, 主要从事急性胰腺炎的治疗与发病机制的研究。广东省科技计划基金资助项目, No. 2007A060305007, No. 2007B031405004, No. 2012B060300029

广东省医学科研基金资助项目, No. B2012187

广东省中山市科技计划基金资助项目, No. 20102A124

作者贡献分布: 本论文由杨新魁与陈垦设计; 谢文瑞、杨元生及陈婧华完成实验; 数据统计分析与撰写论文; 崔淑兰与王晖负责审校。

通讯作者: 杨新魁, 教授, 主任医师, 528415, 广东省中山市高塘一街1号, 广东医学院附属陈星海医院消化内科。

cxhyy-hospital@163.com

电话: 0756-22287609

收稿日期: 2013-05-11 修回日期: 2013-06-02

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

PTD-NBD polypeptide down-regulates expression of NF- κ B p65 in inflammatory pancreatic acinar cell injury in rats

Wen-Rui Xie, Yuan-Sheng Yang, Xin-Kui Yang, Ken Chen, Jing-Hua Chen, Shu-Lan Cui, Hui Wang

Wen-Rui Xie, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Yuan-Sheng Yang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University/Xinhai Hospital, Guangzhou 510300, Guangdong Province, China

Xin-Kui Yang, Department of Gastroenterology, Chenxinghai Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China

Ken Chen, Jing-Hua Chen, Nursing School, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510310, Guangdong Province, China

Shu-Lan Cui, Department of Subsidiary Out-Patient, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, Guangdong Province, China

Hui Wang, Department of Pharmacology, College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Supported by: the Science and Technology Project of Guangdong Province, Nos. 2007A060305007, 2007B031405004 and 2012B060300029; the Medical Science Project of Guangdong Province, No. B2012187; the

Science and Technology Project of Zhongshan of Guangdong Province, No. 20102A124

Correspondence to: Xin-Kui Yang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Chenxinghai Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China. cxhyy-hospital@163.com

Received: 2013-05-11 Revised: 2013-06-02

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To examine the effect of PTD-NBD polypeptide on the expression of nuclear factor κ B (NF- κ B) p65 in inflammatory pancreatic acinar cell injury in rats.

METHODS: Rat pancreatic acinar cells were isolated, cultured, and divided into a normal control group, an acute pancreatitis (AP) group and a PTD-NBD polypeptides group. An *in vitro* model of AP was induced by treating rat pancreatic acinar cells with lipopolysaccharide (10 mg/L). Cell morphological changes were observed, and the contents of amylase, superoxide dismutase (SOD) and IL-1 β in culture medium were tested. Expression of NF- κ B p65 mRNA and protein in cells was detected by RT-PCR and Western blot 6 and 12 h after modeling, respectively.

RESULTS: Compared to the control group, pancreatic acinar cell swelling and death were increased (6 h: 8.9 ± 0.34 vs 1.1 ± 0.13 ; 12 h: 9.4 ± 0.26 vs 1.2 ± 0.15 , both $P < 0.05$), the contents of amylase (6 h: 2135.8 ± 347.2 vs 873.5 ± 91.6 ; 12 h: 3299.6 ± 217.7 vs 917.7 ± 101.9 , both $P < 0.05$) and IL-1 β (6 h: 84.9 ± 15.7 vs 39.3 ± 7.9 ; 12 h: 95.6 ± 17.1 vs 38.9 ± 5.2 , both $P < 0.05$) were increased and the contents of SOD were decreased in culture medium (6 h: 116.3 ± 30.3 vs 176.2 ± 21.6 ; 12 h: 101.5 ± 25.6 vs 173.6 ± 27.9 , $P < 0.05$), and the expression of NF- κ B p65 in pancreatic acinar cells was increased ($P < 0.05$) in the AP group at 6 and 12 h after modeling. Compared to the AP group, pancreatic acinar cell swelling and death were lessened (6 h: 6.8 ± 0.23 vs 8.9 ± 0.34 ; 12 h: 7.5 ± 0.19 vs 9.4 ± 0.26 , both $P < 0.05$), the contents of SOD were raised (6 h: 137.6 ± 27.4 vs 116.3 ± 30.3 ;

■同行评议者

谭晓冬, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

12 h: 144.3 ± 23.6 vs 101.5 ± 25.6 , both $P < 0.05$) and the contents of amylase (6 h: 1951.5 ± 211.7 vs 2135.8 ± 347.2 ; 12 h: 1761.3 ± 231.5 vs 3299.6 ± 217.7 , both $P < 0.05$) and IL-1 β (6 h: 66.8 ± 11.6 vs 84.9 ± 15.7 ; 12 h: 54.8 ± 21.2 vs 95.6 ± 17.1 , both $P < 0.05$) were decreased in culture medium, and the expression of NF- κ B p65 mRNA and protein was down-regulated in the PAT-NBD polypeptide group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: PTD-NBD polypeptide can inhibit LPS-induced activation of NF- κ B p65, down-regulate IL-1 β expression and up-regulate SOD content, thereby reducing inflammatory pancreatic acinar cell injury.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Acute pancreatitis; Pancreatic acinar cells; Nuclear factor κ B; NBD polypeptide

Xie WR, Yang YS, Yang XK, Chen K, Chen JH, Cui SL, Wang H. PTD-NBD polypeptide down-regulates expression of NF- κ B p65 in inflammatory pancreatic acinar cell injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2136-2142 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2136.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2136>

摘要

目的: 探讨PTD-NBD多肽对体外大鼠胰腺腺泡细胞核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B) p65的表达影响。

方法: 分离培养大鼠胰腺腺泡细胞, 分为正常对照组、急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)组和PTD-NBD多肽组, 用脂多糖(10 mg/L)诱导体外细胞AP模型, 分别于建模6和12 h观察细胞形态学变化, 培养液中淀粉酶(amylase, AMY)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和白介素(interleukin, IL)-1 β 含量, RT-PCR和免疫印迹法检测细胞中NF- κ B p65 RNA及其蛋白表达。

结果: 与对照组相比, AP组各时间点腺泡细胞发生肿胀和死亡增多(细胞形态学评分: 6 h: 8.90 ± 0.34 vs 1.10 ± 0.13 ; 12 h: 9.40 ± 0.26 vs 1.20 ± 0.15 , $P < 0.05$), 培养液中AMY升高(6 h: 2135.8 ± 347.2 vs 873.5 ± 91.6 ; 12 h: 3299.6 ± 217.7 vs 917.7 ± 101.9 , $P < 0.05$), IL-1 β 含量升高(6 h: 84.9 ± 15.7 vs 39.3 ± 7.9 ; 12 h: 95.6 ± 17.1 vs 38.9 ± 5.2 , $P < 0.05$), SOD含量降低(6 h: 116.3 ± 30.3 vs 176.2 ± 21.6 ; 12 h: 101.5 ± 25.6 vs 173.6 ± 27.9 , $P < 0.05$), 细胞中NF- κ B p65 RNA及其蛋白表达量增多($P < 0.05$); 与AP组

比较, 经PAT-NBD多肽预处理后腺泡细胞出现肿胀和死亡减少(细胞形态学评分: 6 h: 8.80 ± 0.23 vs 8.90 ± 0.34 ; 12 h: 7.50 ± 0.19 vs 9.40 ± 0.26 , $P < 0.05$), 培养液中SOD上升(6 h: 137.6 ± 27.4 vs 116.3 ± 30.3 ; 12 h: 144.3 ± 23.6 vs 101.5 ± 25.6 , $P < 0.05$), AMY下降(6 h: 1951.5 ± 211.7 vs 2135.8 ± 347.2 ; 12 h: 1761.3 ± 231.5 vs 3299.6 ± 217.7 , $P < 0.05$), IL-1 β 含量明显下降(6 h: 66.8 ± 11.6 vs 84.9 ± 15.7 ; 12 h: 54.8 ± 21.2 vs 95.6 ± 17.1 , $P < 0.05$), NF- κ B p65蛋白表达降低($P < 0.05$)。

结论: PTD-NBD多肽透过大鼠胰腺腺泡细胞膜抑制脂多糖刺激的NF- κ B p65活化及其活性, 下调IL-1 β 表达, 上调SOD含量, 从而减轻胰腺腺泡细胞的炎症损伤。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 急性胰腺炎; 胰腺腺泡细胞; 核因子- κ B; NBD多肽

核心提示: 核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)参与胰腺腺泡细胞炎症损伤是急性胰腺炎(acute pancreatitis)的早期事件, PTD-NBD多肽可有效透过大鼠胰腺腺泡细胞膜, 并与细胞中NF- κ B活化通路上游I κ B激酶抑制物(inhibition of I κ B kinase)复合物中NBD区域结合, 减少下游炎症介质的生成和释放, 减轻胰腺腺泡细胞炎症损伤。

谢文瑞, 杨元生, 杨新魁, 陈垦, 陈婧华, 崔淑兰, 王晖. PTD-NBD多肽对大鼠胰腺腺泡细胞炎症损伤中NF- κ B表达的影响. *世界华人消化杂志* 2013; 21(22): 2136-2142 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2136.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2136>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是以胰腺腺泡细胞内的胰酶被激活、并发炎症反应介导腺泡细胞损伤为特征的临床常见急腹症, 左上腹痛是其临床特征, 早期全身炎症反应综合征和晚期感染并发的多器官功能衰竭是AP主要死因^[1-4]。核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)在各种炎症反应过程中均有重要作用, NF- κ B被过度活化导致炎症扩大, 产生大量促炎因子并释放入血, 导致胰腺组织损伤加剧, 但最直接的细胞学证据尚未见有报道^[5]。NBD多肽可与I κ B激酶抑制物(inhibition of I κ B kinase, IKK)NBD区域结合, 从而抑制其磷酸化, 最终抑制NF- κ B活化及其介导的炎症损伤^[6]。本文基于以上理论观察

■研究前沿

AP的研究多使用动物模型, 体外研究较少, 体外AP模型的建立依赖于胰腺腺泡细胞的成功分离培养, 而胰腺腺泡细胞与间质和胰岛细胞紧密相连, 分离提取胰腺腺泡细胞的方法有很多种, 但腺泡细胞易自身消化, 应用脂多糖诱导胰腺腺泡细胞体外AP模型存在一定难度。

■ 相关报道

已有研究表明 NBD 多肽的氨基酸序列可有效结合到 NF- κ B 上游 IKK 复合物的 NBD 区域, 抑制 I κ B α 的磷酸化及被降解, 从而阻止了 NF- κ B 的活化及其通路的激活, 减少下游炎症介质的产生和释放, 最终减轻了细胞的炎症损伤, 减少 AP 并发症和改善预后。

表 1 胰腺腺泡细胞形态学评分标准 (%)

细胞形态/评分标准	0分	1分	2分	3分	4分
细胞水肿、变形	< 1	1-10	11-25	26-50	> 51
细胞死亡、固缩裂解	< 1	1-5	6-10	11-25	> 26
细胞传代分布密度	> 51	26-50	11-25	6-10	< 5

PTD-NBD多肽对体外大鼠胰腺腺泡细胞炎症损伤及其NF- κ B表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 激光共聚焦显微细胞仪和Image-pro PLUS6.0(Meridian In. USA), 倒置相差显微镜(Olympus, In. Japan), CO₂培养箱(Biotech In. British), H-2050R-1低温超速离心机(California In. USA), 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和 I 型胶原酶(Sigma In. USA), Nikon Spot图像采集处理系统(Nikon & Spot In. USA), 琼脂糖(西班牙), DMEM/F12细胞培养基和小牛血清(Gibico In. USA), TRIzol kit(Invitrogen In.), RT-PCR kits、胰蛋白酶抑制剂、链霉素、青霉素、Percoll细胞分离液和山羊抗兔二抗(鼎国)、一抗NF- κ B P65(兔抗大鼠、Santa cruz), 内参 β -actin(兔抗大鼠、博奥森)细胞裂解液, 胰蛋白酶和IL-1 β Elisa kits(威佳)、AMS和SOD kits(南京建成), PAT-NBD多肽(西安美联生物), 其余设备和试剂均为国产。

1.2 方法

1.2.1 胰腺腺泡细胞的制备与培养: SD大鼠[购自广东省医学实验动物中心, 合格证号: SCXK(粤)2008-2002]术前禁食12 h, 不禁水。戊巴比妥钠麻醉大鼠后开腹取胰腺组织用D-Hanks液(37 °C)洗去血液, 剃除血管、脂肪及淋巴组织, 移入细胞分离液(37 °C, 5 mL)中, 剪碎(0.5-1.0 mm), CO₂孵箱(37 °C, 50 mL/L)中孵育30 min, 依次过100和200目尼龙筛网, D-Hanks液洗涤2-3次收集细胞悬液, 1000 r/min离心5 min, 弃去上清液, 重复洗涤2次, 利用差速黏附法(Percoll液)分离纯化胰腺腺泡细胞, 加入D-MEM/F12组织培养液(5 mL, pH 7.35-7.45), 重悬细胞后移入培养基(200 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素), 调整细胞密度为 1×10^7 至 5×10^7 , 置入CO₂孵箱(37 °C、50 mL/L)中培养, 每3 d换1次液, 用0.125%胰酶+0.02%EDTA消化, 以1:3-1:4传代1次^[7]。

1.2.2 实验分组: 实验使用第20-25代对数生长期

细胞, 以 1×10^7 - 2×10^7 细胞/孔(1.8 mL)接种至6孔培养板, CO₂培养箱(50 mL/L, 37 °C)孵育6 h, 细胞贴壁后, 细胞随机分成3组: 正常对照组、AP组和PTD-NBD组。胰腺腺泡细胞炎症(AP)模型的诱导参照文献[8]: 即向正常胰腺腺泡细胞培养孔中分别加入0.2 mL的无血清无双抗的培养基F12及100 mg/L浓度(终浓度10 mg/L)的LPS溶液, 刺激诱导胰腺腺泡细胞炎症模型(AP)。PTD-NBD多肽为蛋白转导多肽PTD与NBD多肽的融合性多肽其序列参考文献设计^[8]为YGRK-KRRQR-RR-G-TTLDWSWLQME, 由西安美联生物合成(编号: 1311450137)。PTD-NBD组腺泡细胞在被诱导AP模型之前先予PTD-NBD多肽(10 mg/L)预处理2 h后再分别加入0.2 mL的无血清无双抗的培养基F12及100 mg/L浓度(终浓度10 mg/L)的LPS溶液建模。模型组细胞加入LPS后再与正常组一起放入CO₂培养箱(50 mL/L, 37 °C)分别孵育6和12 h后, 收集细胞和培养液上清备用, 提取细胞总蛋白, 置-20 °C备用, 每组设3个平行孔。

1.2.3 培养液淀粉酶、SOD和IL-1 β 含量测定: 收集齐各组细胞培养基上清液后统一按淀粉酶(amyase, AMY)和SOD检测参照试剂盒说明书操作进行, 上清液IL-1 β 含量测定严格按照双抗体夹心ELISA法试剂盒说明书操作进行, 所有实验操作均重复2次。

1.2.4 胰腺腺泡细胞活力测定与形态学观察: 观察3组大鼠胰腺腺泡细胞在不同培养条件下其形态学变化及其生长情况, 具体观察细胞水肿、变形、死亡、固缩、裂解、细胞密度等方面进行评分, 每份标本分别取3个视野观察, 由两个实验员进行双盲评分取均值进行统计分析(表1)。

1.2.5 RT-PCR检测NF- κ B p65 RNA表达: 将细胞培养基转移至10 mL离心管中, 低温低速(4 °C, 800 r/min)离心收集细胞(20 μ L PCV = 10^7 cells), 将细胞转移至玻璃匀浆器中匀浆, 每20 μ L PCV加入1000 μ L细胞裂解液, 常温反应5 min, 离心(4 °C, 12000 r/min)10 min后去上清液, 具体操

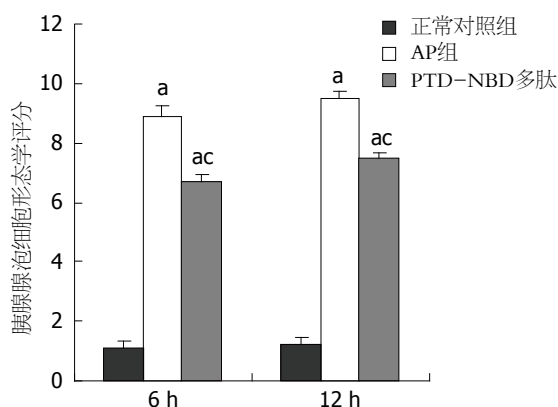


图1 胰腺腺泡细胞形态学评分。^a $P < 0.05$ vs 正常对照组；^{ac} $P < 0.05$ vs AP组。AP: 急性胰腺炎。

作按TRIzol试剂盒说明书提取细胞总RNA, 紫外分光光度计测定样品 A_{260} 值和 A_{280} 值, 计算RNA的纯度和含量, 1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA完整性。引物设计参考文献[9], NF- κ B p65: 上游5'-CAAAGACCCACCTCACCG-3', 下游5'-ATCAGAAGGCCGCCGAA-3'(Gene Number: 40538869), 产物长度598 bp; β -actin: 上游5'-GCCAACCGTGAAAAGATGA-3', 下游5'-GC-CAGGATAGAGCCACCAAT-3'(Gene Number: 424759362), 产物701 bp。采用两步法进行反转录扩增目的基因, 具体操作按照RT-PCR试剂盒说明书进行, RT反应条件: 30 °C, 10 min, 42 °C RT 60 min, 95 °C(变性) 5 min, 4 °C终止RT反应5 min, -20 °C冰箱冻存备用或立即PCR; PCR反应条件: NF- κ B p65: 94 °C, 5 min, 94 °C, 35 s, 56 °C, 45 s, 72 °C, 50 s共35个循环, 72 °C延长10 min; β -actin: 94 °C, 5 min, 94 °C, 35 s, 55 °C, 50 s, 72 °C, 55 s共35个循环, 72 °C延长10 min, PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离。Quantity 4.5.1软件分析, 结果以待测样品及其对应内参的相对值表示。

1.2.6 Western blot检测NF- κ B p65蛋白表达: 将细胞培养基转移至10 mL离心管中, 低温低速(4 °C, 800 r/min)离心收集细胞(20 μ L PCV = 10^7 cells), 将细胞转移至玻璃匀浆器中匀浆, 每50 μ L PCV加入400 μ L细胞裂解液, 冰上反应10 min, 离心(4 °C, 12000 r/min)10 min后取上清液, 具体操作按蛋白提取试剂盒说明书进行。BCA法蛋白定量并计算出样品蛋白浓度, 取40 μ g蛋白为上样量, 6%浓缩胶和10%分离胶电泳分离蛋白质, 湿胶电转移凝胶蛋白至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉液封闭PVDF膜(RT, 2 h), 一抗NF- κ B p65(1 : 300), 孵育(RT, 2 h), TBST洗膜3次, 二抗(1 : 8000)孵育(RT, 1.5 h), TBST洗膜3次, ECL法发光, 暗盒

表2 胰腺腺泡细胞形态学评分结果

分组	正常对照组	AP组	PTD-NBD组
6 h	1.1 \pm 0.13	8.9 \pm 0.34 ^a	6.8 \pm 0.23 ^{ac}
12 h	1.2 \pm 0.15	9.4 \pm 0.26 ^a	7.5 \pm 0.19 ^b

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^{ac} $P < 0.05$ vs AP组。AP: 急性胰腺炎。

曝光、显影、定影, 采用美国Nikon Spot图像采集处理系统, 用Image-pro PLUS6.0专业图像工具进行图像灰度分析, 计算平均光密度(A)值。内参 β -actin(1 : 500)Western blot步骤同上, 以上操作均重复2次。

统计学处理 实验数据用SPSS16.0统计软件处理分析, 计量资料分析采用 t 检验, 数据用mean \pm SD表示; 采用单因素方差分析(ANOVA), 预先进行正态性检验和方差齐性检验, 如方差齐用LSD检验, 非正态分布或方差不齐者, 以lg(X+1)进行变量代换, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺腺泡细胞变化比较 正常胰腺腺泡细胞多呈圆形或椭圆形, 悬浮生长较旺盛, 细胞密度高, 培养液中可见散在少许细胞凋亡固缩、裂解成碎片(图2A); 而AP组见多数胰腺腺泡细胞肿胀、变大, 呈球形, 可见大量细胞肿胀坏死而裂解成碎片, 部分细胞核固缩, 细胞生长传代差, 正常细胞密度低(图2B); 经PTD-NBD预处理后细胞肿胀较AP组细胞减轻, 细胞坏死裂解数量和核固缩现象减少, 细胞生长呈串珠状较AP组好, 细胞密度较AP组高(图2C), 与AP组比较有显著差异(表2, 图1, 2, $P < 0.05$)。

2.2 培养液淀粉酶、SOD和IL-1 β 含量变化 正常组培养液中AMY和IL-1 β 含量较低, 而SOD水平较高, 但在AP组和PTD-NBD多肽组各时间点培养液中AMY和IL-1 β 含量均明显升高, 同组12 h点的AMY水平均较6 h点高($P < 0.05$), 而培养液中SOD含量在AP组和PTD-NBD组均明显下降, AP组下降更显著, 与正常组比较有统计学差异($P < 0.05$); 胰腺腺泡细胞经PTD-NBD预处理后大鼠腺泡细胞损伤减轻, 与AP组比较, 培养液中AMY和IL-1 β 含量下降, 而SOD水平上升, 12 h点结果较6 h更明显($P < 0.05$, 表3)。

2.3 胰腺腺泡细胞NF- κ B p65 RNA及其蛋白表达 正常组胰腺腺泡细胞中可见有极少量NF- κ B p65 RNA和蛋白表达, 随着培养时间延长, 其表

■创新盘点

本文应用脂多糖诱导体外分离培养的大鼠胰腺腺泡细胞AP模型进行AP早期事件研究具有一定的创新性; 构建体外AP模型对AP治疗药物的研发有重要意义。

■同行评价

本文成功建立体外AP模型对研究AP发病机制有重要作用,应用PTD-NBD多肽透过细胞膜选择性抑制I κ B的磷酸化从而为抑制NF- κ B的活化,减轻炎症反应和减少细胞损伤具有一定的现实意义,为临床治疗AP药物的研发提供了思路。

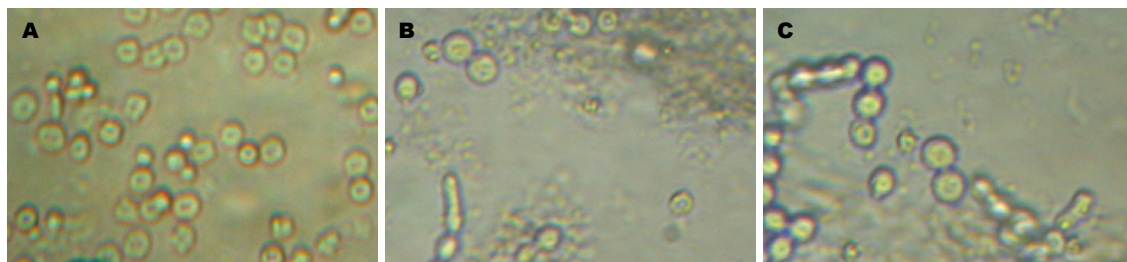


图2 3组胰腺腺泡细胞培养12 h的结果比较. A: 正常对照组; B: AP组; C: PTD-NBD多肽组. AP: 急性胰腺炎。

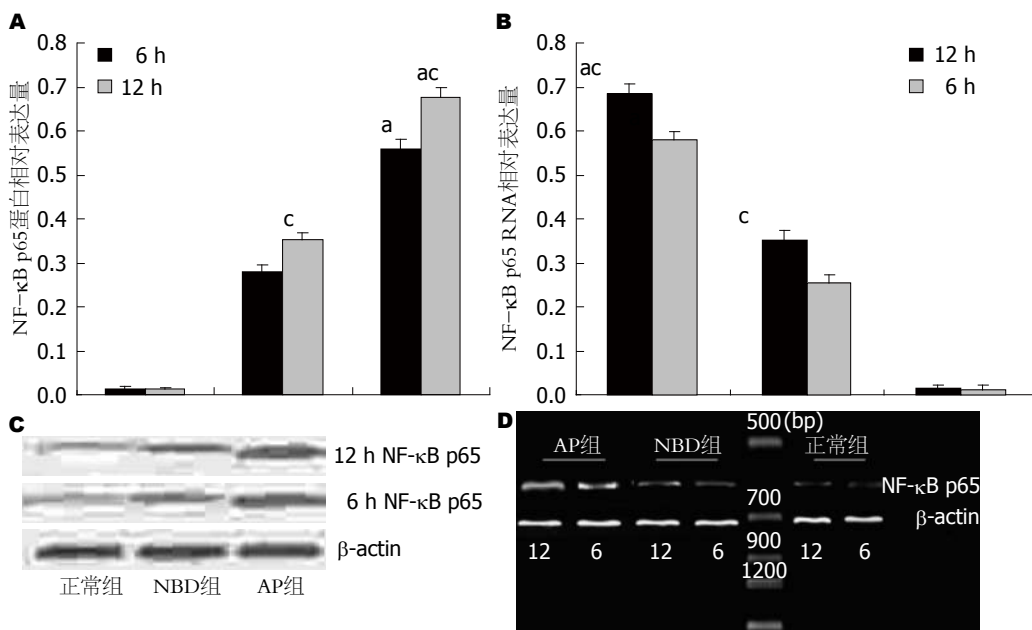


图3 NF- κ B p65蛋白及其RNA在3组细胞中的表达变化比较. A: NF- κ B p65蛋白变化统计图; B: NF- κ B p65 RNA表达变化统计图; C: NF- κ B p65蛋白变化; D: NF- κ B p65 RNA表达变化. NF- κ B: 核因子- κ B. AP: 急性胰腺炎。

表3 各组培养液中AMY、SOD和IL-1 β 水平变化情况 (mean \pm SD)

分组	AMY (U/L)		SOD (μ mol/L)		IL-1 β (ng/L)	
	6 h	12 h	6 h	12 h	6 h	12 h
正常组	873.5 \pm 91.6	917.7 \pm 101.9	176.2 \pm 21.6	173.6 \pm 27.9	39.3 \pm 7.9	38.9 \pm 5.2
AP组	2135.8 \pm 347.2 ^a	3299.6 \pm 217.7 ^{ac}	116.3 \pm 30.3	101.5 \pm 25.6 ^{ac}	84.9 \pm 15.7	95.6 \pm 17.1 ^{ac}
PTD-NBD组	1951.5 \pm 211.7 ^a	1761.3 \pm 231.5 ^{ac}	137.6 \pm 27.4	144.3 \pm 23.6 ^{ac}	66.8 \pm 11.6	54.8 \pm 21.2 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 同组6 h点. AMY: 淀粉酶; SOD: 超氧化物歧化酶; AP: 急性胰腺炎; IL: 白介素。

达量稍有增多,但两个时间点间无统计学差异;AP组和PTD-NBD多肽组胰腺腺泡细胞受LPS刺激后NF- κ B p65 RNA和蛋白表达水平均有不同程度上调,而且12 h点比6 h点升高明显($P < 0.05$);与AP组比较,PTD-NBD处理后胰腺腺泡细胞中NF- κ B p65 RNA和蛋白表达被抑制,二者表达量下降,在12 h时最为明显($P < 0.05$,图3)。

3 讨论

AP是以各种胰酶被激活引起胰腺局部炎症反应

为特征的炎症性疾病^[10]。炎症损伤胰腺腺泡细胞是AP的早期事件,细胞死亡解体后释放出各种消化酶和更多炎症因子、氧化应激因子及氧自由基等,最终使疾病恶化发展^[11]。大约10%-15%可能进展为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP),并且其中有约10%-30%可能死于SAP相关并发症,如胰腺出血、坏死,伴发全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征^[12,13]。炎症损伤是引起其严重并发症和高死亡率的重要因素,早期控制炎症反应是治疗的关键。

NF- κ B参与众多炎症性疾病的发生发展, NF- κ B参与调节众多炎症因子[肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-1 β 及ICAM-1等]的基因转录、分泌^[14-17]. LPS可直接作用于胰腺腺泡细胞使细胞水肿, 出现膜空泡化及胞质膜的断裂, 核改变, 腺细胞和溶酶体的破坏, 使胰腺炎相关蛋白、炎症因子和AMY表达增加, 可触发全身炎症反应和多器官功能衰竭的发生. 随着胰腺腺泡细胞炎症的加重, NF- κ B被激活逐渐增多, 我们的前期实验表明LPS刺激肿瘤株胰腺腺泡细胞(AR42J)后, NF- κ B被活化上调ICAM-1表达, 而ICAM-1的表达又正反馈调节继续激活NF- κ B, 使炎症信号和细胞因子反应得以持续放大, 导致病情加重^[9]. 我们将LPS(10 mg/L)加入培养基中诱导大鼠胰腺腺泡细胞体外AP模型, 显微镜下观察发现加入LPS 6 h后腺泡细胞出现肿胀、空泡化, 12 h时大量腺泡细胞出现肿胀, 部分出现死亡裂解, 细胞传代明显减少, 检测培养液发现AMS和IL-1 β 升高明显, 而SOD下降显著, 进一步检测发现腺泡细胞中NF- κ B p65表达量增多, 与正常对照组比较有统计学差异, 结果提示胰腺腺泡细胞出现了严重的损伤(图1, 3, 表2, 3).

在NF- κ B活化通路上游的激酶IKK复合物中存在一个氨基酸序列调节亚基即NBD区, 是ATP水解部位, 能与NBD多肽氨基酸序列相结合, 从而干扰细胞内IKK复合物的形成, 抑制IKK复合物对I κ B α 的磷酸化降解, 选择性负性调控NF- κ B激活及其下游细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1等)的表达^[18-20]. PTD是一类能将其其他生物大分子导入多种哺乳动物细胞的小分子阳离子多肽, 能够将与之共价连接的多肽、蛋白、核酸等生物大分子快速而高效地转入细胞内部, 且对细胞无不良反应, 在药物转运及疾病治疗等领域有着广阔的应用前景^[21-23]. 通过PTD介导转运一种IL-1 β 诱导的I κ B酶(IKK)多肽抑制剂, 即IKK β (NBD), 并完全阻断IL-1 β 对胰岛功能的有害作用和NF- κ B的活性^[24]. 导入外源性NBD多肽封闭IKK复合物NBD区, 抑制催化亚基IKK α 和IKK β 的 κ B位点激活, 使IKK激酶的活性下降, 从而阻断炎症性疾病的发展, NBD多肽可轻度上调NF- κ B的基础生理功能^[25]. 我们前期的研究显示NBD多肽经PTD修饰后(PTD-NBD, 0.1 mg/L)可直接作用肿瘤株胰腺腺泡细胞(AR42J)呈疗效依赖性抑制LPS诱导的IL-1 β 和ICAM-1升高介导的细胞炎症损伤, 而NBD多肽突变型经PTD修饰后仍无此作用^[8], 表明NBD

多肽发挥抗炎作用依赖其特异的氨基酸序列, 这为AP早期细胞事件的研究及治疗药物的研发开启了新的思路. 氧自由基(oxygen free radical, OFR)促进胰腺腺泡细胞凋亡, 然而抑制OFR产生又导致ATP减少并发胰腺坏死增加^[26], 大鼠SAP胰腺组织中NF- κ B过度激活, OFR生成增加, NBD多肽预处理可抑制NF- κ B过度活化, 减少OFR产生, 从而减轻胰腺局部炎症和氧化损伤^[27-29], 抗氧化应激治疗对AP是有益的, 但目前尚无充足的临床数据可以证明^[30]. 本实验结果显示NBD多肽可有效提高细胞抗氧化应激能力, 稳定细胞膜, 减轻细胞损伤. 由于AR42J为肿瘤株与正常细胞株存在差异, 本实验应用大鼠胰腺腺泡细胞, 经过PTD-NBD多肽预处理后再与LPS诱导AP模型, 结果显示培养液中AMS、IL-1 β 含量下降, SOD含量升高, 细胞中NF- κ B p65蛋白表达减少, 细胞的炎症和氧化损伤减轻, 细胞肿胀和坏死数量减少, 细胞传代成活率较AP组好, 与AP组比较有统计学差异.

总之, 预先给予PTD-NBD多肽干预可有效透过大鼠胰腺腺泡细胞膜, 并与细胞中NF- κ B活化通路上游IKK复合物中NBD区域结合, 从而抑制I κ B α 的磷酸化及NF- κ B的活化, 减少下游炎症介质IL-1 β 的生成和释放, 从而减轻细胞炎症损伤, 降低SOD的消耗和减少AMS的释放, 最终缩短病程和减少并发症, 然而PTD-NBD多肽对AP事后效应及其远期疗效尚需进一步实验研究.

4 参考文献

- 1 Boone B, Zureikat A, Hughes SJ, Moser AJ, Yaddav D, Zeh HJ, Lee KK. Abdominal compartment syndrome is an early, lethal complication of acute pancreatitis. *Am Surg* 2013; 79: 601-607 [PMID: 23711270]
- 2 Bollen TL, Singh VK, Maurer R, Repas K, van Es HW, Banks PA, Mortele KJ. A comparative evaluation of radiologic and clinical scoring systems in the early prediction of severity in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 612-619 [PMID: 22186977 DOI: 10.1038/ajg.2011.438]
- 3 Arabul M, Celik M, Aslan O, Torun S, Beyazit Y, Alper E, Kandemir A, Densal B. Hepcidin as a predictor of disease severity in acute pancreatitis: a single center prospective study. *Hepatogastroenterology* 2013; 60: 595-600 [PMID: 23665668 DOI: 10.5754/hge12770]
- 4 Pavlidis P, Crichton S, Lemmich Smith J, Morrison D, Atkinson S, Wyncoll D, Ostermann M. Improved outcome of severe acute pancreatitis in the intensive care unit. *Crit Care Res Pract* 2013; 2013: 897107 [PMID: 23662207 DOI: 10.1155/2013/897107]
- 5 Rakonczay Z, Hegyi P, Takács T, McCarroll J, Saluja

■同行评价

本文有助于进一步明确大鼠胰腺腺泡细胞炎症损伤的调控机制, 具有一定的科学价值.

- AK. The role of NF-kappaB activation in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Gut* 2008; 57: 259-267 [PMID: 17675325]
- 6 Long YM, Chen K, Liu XJ, Xie WR, Wang H. Cell-permeable Tat-NBD peptide attenuates rat pancreatitis and acinus cell inflammation response. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 561-569 [PMID: 19195057]
- 7 葛全兴, 陈垦. 一种简便高效的大鼠胰腺腺泡细胞的体外分离培养方法及其对细胞功能的影响. 广东药学院, 2010: 1-39
- 8 刘学进, 龙友明, 陈垦, 谢文瑞, 王晖. PTD-NBD多肽对大鼠胰腺腺泡细胞炎症反应的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 19: 1931-1935
- 9 刘学进, 陈垦, 龙友明, 林振河, 谢文瑞. 核因子- κ B在脂多糖诱导的大鼠胰腺腺泡细胞AR42J炎症效应中的作用. 胰腺病学 2006; 4: 204-207
- 10 Ma B, Wu L, Lu M, Gao B, Qiao X, Sun B, Xue D, Zhang W. Differentially expressed kinase genes associated with trypsinogen activation in rat pancreatic acinar cells treated with tauro lithocholic acid 3-sulfate. *Mol Med Rep* 2013; 7: 1591-1596 [PMID: 23467886 DOI: 10.3892/mmr.2013.1355]
- 11 Yenicerioglu A, Cetinkaya Z, Girgin M, Ustundag B, Ozercan IH, Ayten R, Kanat BH. Effects of trimetazidine in acute pancreatitis induced by L-arginine. *Can J Surg* 2013; 56: 175-179 [PMID: 23484468 DOI: 10.1503/cjs.032811]
- 12 Vaz J, Akbarshahi H, Andersson R. Controversial role of toll-like receptors in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 616-630 [PMID: 23431068 DOI: 10.3748/wjg.v19.i5.616]
- 13 Zhao G, Zhang JG, Wu HS, Tao J, Qin Q, Deng SC, Liu Y, Liu L, Wang B, Tian K, Li X, Zhu S, Wang CY. Effects of different resuscitation fluid on severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 2044-2052 [PMID: 23599623 DOI: 10.3748/wjg.v19.i13.2044]
- 14 Wen CL, Chang CC, Huang SS, Kuo CL, Hsu SL, Deng JS, Huang GJ. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Antrrodia cinnamomea* mycelia both in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 575-584 [PMID: 21704694 DOI: 10.1016/j.jep.2011.06.009]
- 15 Santos SH, Andrade JM, Fernandes LR, Sinisterra RD, Sousa FB, Feltenberger JD, Alvarez-Leite JL, Santos RA. Oral Angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF- κ B in rats fed with high-fat diet. *Peptides* 2013; 46C: 47-52 [PMID: 23714175 DOI: 10.1016/j.peptides.2013.05.010]
- 16 Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* 2011; 21: 146-158 [PMID: 21151201 DOI: 10.1038/cr.2010.175]
- 17 Tieri P, Termanini A, Bellavista E, Salvioli S, Capri M, Franceschi C. Charting the NF- κ B pathway interactome map. *PLoS One* 2012; 7: e32678 [PMID: 22403694 DOI: 10.1371/journal.pone.0032678]
- 18 Baima ET, Guzova JA, Mathialagan S, Nagiec EE, Hardy MM, Song LR, Bonar SL, Weinberg RA, Selness SR, Woodard SS, Chrencik J, Hood WF, Schindler JF, Kishore N, Mbalaviele G. Novel insights into the cellular mechanisms of the anti-inflammatory effects of NF-kappaB essential modulator binding domain peptides. *J Biol Chem* 2010; 285: 13498-13506 [PMID: 20167598 DOI: 10.1074/jbc.M109.099895]
- 19 Madge LA, May MJ. Inhibiting proinflammatory NF-kappaB signaling using cell-penetrating NEMO binding domain peptides. *Methods Mol Biol* 2009; 512: 209-232 [PMID: 19347279 DOI: 10.1007/978-1-60327-530-9_11]
- 20 Desai A, Singh N, Raghubir R. Neuroprotective potential of the NF- κ B inhibitor peptide IKK-NBD in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurochem Int* 2010; 57: 876-883 [PMID: 20868715 DOI: 10.1016/j.neuint.2010.09.006]
- 21 Trabulo S, Cardoso AL, Cardoso AM, Morais CM, Jurado AS, Pedroso de Lima MC. Cell-penetrating peptides as nucleic acid delivery systems: from biophysics to biological applications. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 2895-2923 [PMID: 23140453]
- 22 Nasrollahi SA, Taghibiglu C, Azizi E, Farboud ES. Cell-penetrating peptides as a novel transdermal drug delivery system. *Chem Biol Drug Des* 2012; 80: 639-646 [PMID: 22846609 DOI: 10.1111/cbdd.12008]
- 23 吴永红, 张成岗. HIV-1TAT蛋白转导肽的研究进展. 中国生物工程杂志 2010; 30: 66-73
- 24 Rehman KK, Bertera S, Bottino R, Balamurugan AN, Mai JC, Mi Z, Trucco M, Robbins PD. Protection of islets by in situ peptide-mediated transduction of the Ikappa B kinase inhibitor Nemo-binding domain peptide. *J Biol Chem* 2003; 278: 9862-9868 [PMID: 12524423]
- 25 Solt LA, Madge LA, May MJ. NEMO-binding domains of both IKKalpha and IKKbeta regulate IkappaB kinase complex assembly and classical NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2009; 284: 27596-27608 [PMID: 19666475 DOI: 10.1074/jbc.M109.047563]
- 26 Booth DM, Murphy JA, Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Criddle DN. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 2011; 140: 2116-2125 [PMID: 21354148 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.054]
- 27 谢文瑞, 陈垦, 阳小雅, 龙友明, 王晖, 刘君君, 杨剑. 核因子- κ B在急性胰腺炎中的激活及NBD多肽的干预作用. 世界华人消化杂志 2008; 18: 1980-1984
- 28 Giakoustidis A, Mudan SS, Giakoustidis D. Dissecting the stress activating signaling pathways in acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 653-656 [PMID: 20698244]
- 29 Hackert T, Werner J. Antioxidant therapy in acute pancreatitis: experimental and clinical evidence. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2767-2777 [PMID: 21834688 DOI: 10.1089/ars.2011.4076]
- 30 Esrefoglu M. Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 5533-5541 [PMID: 23112545 DOI: 10.3748/wjg.v18.i39.5533]

编辑 田滢 电编 闫晋利



miR-30d反义核苷酸对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响

张善忠, 周毅, 刘芩, 汪志飞, 万冰

张善忠, 周毅, 刘芩, 汪志飞, 万冰, 景德镇市第一人民医院
胃肠外科 江西省景德镇市 333000

张善忠, 主治医师, 主要从事结肠癌的临床及基础研究.

作者贡献分布: 此课题由张善忠设计; 研究过程由周毅、刘芩、汪志飞及万冰操作完成; 研究所需标本由刘芩收集; 荧光定量PCR和Western blot由周毅完成; 流式细胞术由汪志飞完成; 细胞生长与克隆形成实验由万冰完成; 数据分析由张善忠完成; 本论文写作由张善忠完成.

通讯作者: 张善忠, 主治医师, 333000, 江西省景德镇市中华北路317号, 景德镇市第一人民医院胃肠外科. luolaibin6677@163.com
收稿日期: 2013-05-07 修回日期: 2013-05-31
接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

A miR-30d antisense oligonucleotide inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cells

Shan-Zhong Zhang, Yi Zhou, Qin Liu, Zhi-Fei Wang, Bing Wan

Shan-Zhong Zhang, Yi Zhou, Qin Liu, Zhi-Fei Wang, Bing Wan, Department of Gastrointestinal Surgery, the First People's Hospital of Jingdezhen, Jingdezhen 333000, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Shan-Zhong Zhang, Attending Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the First People's Hospital of Jingdezhen, 317 Zhonghua North Road, Jingdezhen 333000, Jiangxi Province, China. luolaibin6677@163.com

Received: 2013-05-07 Revised: 2013-05-31

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of miR-30d in colon cancer tissues and the effect of a miR-30d antisense oligonucleotide (ASO) on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells.

METHODS: The expression of miR-30d in 102 colon cancer tissues and matched tumor-adjacent tissues was detected by real-time quantitative PCR. After colon cancer cells were transfected with a miR-30d ASO, cell proliferation and apoptosis were measured by MTT assay, colony formation assay and flow cytometry.

RESULTS: miR-30d was overexpressed in 52.94% (54/102) of colon cancer tissues, and the positive rate of miR-30d overexpression was sig-

nificantly higher in colon cancer tissues than in tumor-adjacent colon tissues ($P < 0.05$). Transfection of miR-30d ASO significantly reduced the expression of miR-30d ($P < 0.05$), decreased cell survival at 24, 48 and 96 h (all $P < 0.05$), inhibited colony formation ($P < 0.05$), and increased apoptosis ($P < 0.05$) compared with control cells. In addition, the expression of Bcl-2 mRNA and protein was significantly decreased after the expression of miR-30d was down-regulated.

CONCLUSION: MiR-30d is overexpressed in human colon cancer. Inhibition of the expression of miR-30d can effectively inhibit growth and promotes apoptosis of colon cancer cells. MiR-30d may become a new target for the regulation of gene expression in colon cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: miR-30d; Antisense oligonucleotide; colon cancer; Cell proliferation; Apoptosis

Zhang SZ, Zhou Y, Liu Q, Wang ZF, Wan B. A miR-30d antisense oligonucleotide inhibits proliferation and promotes apoptosis of colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2143-2150 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2143.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2143>

摘要

目的: 研究miR-30d在结直肠癌组织中的表达情况, 并分析miR-30d反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响.

方法: 运用荧光定量PCR定量检测102例结直肠癌组织及对应癌旁组织中miR-30d的表达; 通过miR-30d ASO降低结肠癌细胞中miR-30d的表达, 利用MTT、细胞克隆形成实验、流式细胞技术观察miR-30d ASO对结肠癌细胞产生的生物学效应.

结果: 在102例结直肠癌病例中, 52.94% (54/102)的结直肠癌组织miR-30d表达明显高于对癌旁组织($P < 0.05$); miR-30d ASO可

■背景资料

微小RNA分子(microRNA, miRNA)是一种内源性的非编码小分子RNA, 广泛分布于动植物细胞体内, 大量研究发现miRNA在恶性肿瘤细胞的发生、发展中发挥重要的作用, 其中包括调控细胞的增殖、分化和凋亡.

■同行评议者

李淑德, 教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科; 刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

■ 研发前沿

近年随着miR-NAs研究的不断深入,发现大量异常表达的miR-NAs通过调控靶基因的表达而调节包括结肠癌在内的多种恶性肿瘤的发生发展,大规模的筛选肿瘤发生发展过程中异常表达的miR-NAs将为人们全面认识肿瘤的生物学特性发挥重要作用,也为结肠癌的早期诊治提供了新的希望。

以显著降低miR-30d的表达($P<0.05$); MTT实验结果显示结肠癌细胞转染miR-30d ASO后,24、48和96 h的细胞存活数量均明显低于空白对照组和转染无义干扰组($P<0.05$);克隆形成实验结果显示miR-30d ASO组克隆形成率比空白对照组和转染无义干扰组显著降低($P<0.05$);流式细胞仪检测结果显示转染miR-30d ASO组较两个对照组细胞凋亡指数明显增加($P<0.05$);另外,降低miR-30d的表达后发现Bcl-2 mRNA和蛋白均明显下降($P<0.05$)。

结论: miR-30d在结肠癌组织中表达上调,降低miR-30d的表达可有效抑制结肠癌细胞生长、促进细胞凋亡。miR-30d有可能成为结肠癌基因表达调控的新靶点。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: miR-30d; 反义单核苷酸; 结肠癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

核心提示: miR-30d在结肠癌组织中表达上调,降低miR-30d的表达可有效抑制结肠癌细胞生长、促进细胞凋亡。miR-30d有可能成为结肠癌基因表达调控的新靶点。

张善忠, 周毅, 刘芩, 汪志飞, 万冰. miR-30d反义核苷酸对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2143-2150 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2143.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2143>

0 引言

微小RNA分子(microRNA, miRNA)是一种内源性的非编码小分子RNA,广泛分布于动植物细胞体内,大量研究发现miRNA在恶性肿瘤细胞的发生、发展中发挥重要作用,其中包括调控细胞的增殖、分化和凋亡^[1-8]。研究报道miR-30d在前列腺癌、肾细胞癌以及肝癌等恶性肿瘤中表达上调^[9-11]。过表达的miR-30d可以促进肝癌细胞发生发展^[11]。然而miR-30d在结肠癌中的表达及功能研究尚未见报道。本实验采用荧光定量PCR的方法检测miR-30d在结直肠癌组织中的表达情况,同时设计并利用miR-30d的反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)抑制miR-30d在结肠癌细胞中的表达,研究抑制miR-30d对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响,同时分析其调控的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 经景德镇市第一人民医院医学伦理委员会批准及患者知情同意,收集2008-01/2012-12

景德镇市第一人民医院胃肠外科肠癌及对应癌旁组织手术标本($n = 102$)。所有标本均经病理学检查确诊,其中男68例,女34例,年龄26-71岁。所有患者术前均未接受放化疗。结肠癌SW480和LoVo细胞购自中国科学院上海细胞库; Taq-Man miRNA分析试剂盒(美国ABI公司); DMEM高糖培养基(美国Gibco公司)、胎牛血清(美国Hyclone公司)、脂质体Lipfectamine 2000(美国Invitrogen公司); 反义miR-30d寡核苷酸(miR-30d ASO)(大连宝生物公司); Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(南京凯基公司); 总蛋白提取试剂盒(北京普利莱); 鼠抗人Bcl-2单克隆抗体(美国Santa cruz公司), β -actin二抗(北京中杉金桥公司); 实时荧光定量PCR分析仪(美国ABI公司); 流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量PCR检测miR-30d的表达: 采用RNA提取试剂提取癌组织及癌旁组织中总RNA,测定浓度, -80°C 保存。运用miRNA分析试剂盒检测miR-30d的表达。首先取2 μg 总RNA为反应模板与3 μL 逆转录酶相互混合,反应体系为20 μL ,反应条件为: 16°C 30 min, 45°C 30 min, 85°C 5min。反应结束后,收集cDNA。采用SYBR Green法定量检测,将质粒稀释品分别梯度稀释为 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-8} ,用于建立标准曲线。反应条件: 95°C 15 min; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s,共45个循环,最后 72°C 延伸7 min。在每个循环的最后增加溶解曲线。阈值定义为基础荧光信号的10个标准差,即时循环数为Ct,依据标准曲线计算目的基因的mRNA量。实验重复3次。

1.2.2 反义miR-30d单核苷酸的设计: 获取人miR-30d的序列(<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam/mirna>),设计其反义寡核苷酸序列,运用NCBI BLAST索程序以排除其他的同源序列。另外,同时设计一条随机阴性对照序列,如下所示: 反义miR-30d sense: 5'-CAUUGCCAGUC-GUUACGUGUC-3', antisense: 5'-GACACGTA-ACGACTGGCAATG-3', 随机序列: sense: 5'-UC-CUCUGAACGUGGCACGUUT-3'; antisense: 5'-AGCUCACCTCGUCCGCAGTATT-3',送上海英骏生物技术公司合成。

1.2.3 细胞培养和反义寡核苷酸转染: 将SW480和LoVo结肠癌细胞接种于DMEM培养基(含10%FBS),50 mL/L CO_2 、 37°C 条件下培养。运

用Lipfectamine™ 2000转染试剂盒进行转染, 反义miR-30d寡核苷酸终浓度分别为: 100、150、200和250 nmol/L. 本实验组筛选出最佳终干扰浓度为150 nmol/L. 转染后培养时间分别为24、48、72 h初步筛选出最佳作用时间为48 h. 上述操作重复3次.

1.2.4 转染miR-30d ASO后对miR-30d表达的影响: 转染终浓度为150 nmol/L的miR-30d ASO 48 h后, 提取总RNA, 测定浓度, 逆转录为cDNA(反应条件同1.2.1), 测定cDNA浓度. 运用microRNA检测试剂盒检测miR-30d的表达(具体条件同1.2.1). 上述操作重复3次.

1.2.5 克隆形成实验检测结肠癌细胞的增殖: 实验分为3组: 空白对照组、转染无义干扰组和miR-30d ASO组. 转染结肠癌SW480和LoVo细胞后, 取对数生长期的细胞接种于6孔培养板中, 约400-500个/孔, 置37℃、50 mL/LCO₂, 培养2-3 wk. 期间观察培养细胞的生长情况, 当出现肉眼可见的克隆细胞团时, 终止细胞培养. 去上清, PBS漂洗2次. 固定20 min, 去固定液, 加Giemsa染色液染色30 min, 之后利用ddH₂O清洗染色液, 干燥后在普通光学显微镜下计算>50个细胞的克隆数, 克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 × 100%. 上述操作重复3次.

1.2.6 MTT检测结肠癌细胞生长情况: 实验分组同1.2.5, 收集各组SW480和LoVo细胞, 将细胞充分打匀, 接种于96孔培养板(6 × 10³/孔), 24 h后换液. 每组设有6个复孔. 转染后第1天至第4天, 每孔加入MTT试剂(浓度为5 mg/mL)20 μL, 在50 mL/LCO₂、37℃条件下继续孵育4 h. 去各孔上清, 滴入DMSO每孔150 μL, 在室温摇10 min, 以完全溶解MTT结晶. 测定各孔吸光度(A)值(波长490 nm). 每组重复3次. 按下列公式计算细胞生长抑制率(%): 细胞生长抑制率 = (实验组平均A₄₉₀ - 对照组平均A₄₉₀) / 对照组平均A₄₉₀ × 100% 上述操作重复3次.

1.2.7 流式细胞术分析细胞早期凋亡: 实验分组同1.2.5, 将结肠癌细胞接种于6孔板中, 转染反义miR-30d ASO. 48 h后收集细胞, PBS漂洗2次, 离心、弃上清. 最后运用Annexin V-FITC早期凋亡试剂盒和流式细胞仪检测各组细胞的早期凋亡情况. 上述操作重复3次.

1.2.8 检测各组细胞Bcl-2 mRNA的表达水平: 实验分组同1.2.5, 各组细胞加入裂解液, 提取总RNA, 逆转录为cDNA, 运用SYBR Green Real

Time PCR Master Mix通过荧光定量PCR方法检测Bcl-2 mRNA表达. Bcl-2的引物序列为上游: 5'-AACTGGGGGAGGATTGTGGC-3'; 下游: 5'-GATCCAGGTGTGCAGGTGCC-3'. 反应条件: 95℃变性45 s, 58℃退火45 s, 72℃延伸30 s, 40个循环. 以GAPDH作为内参. 在ABI7500反应平台上进行PCR反应.

1.2.9 检测各组细胞Bcl-2蛋白的表达水平: 实验分组同1.2.5, 收集各组结肠癌细胞, 运用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白, 经10%SDS-PAGE电泳后转膜, 将膜放在含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液中37℃封闭2 h, 加一抗稀释液1:600稀释鼠抗人Bcl-2单克隆抗体, 4℃过夜, 1 × TBST缓冲液洗3次(每次10 min), 加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:5000稀释), 置于37℃孵育2 h, 1 × TBST缓冲液洗3次(每次10 min), 运用ECL化学发光法检测目的蛋白条带. 以β-actin作为内参.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件包进行分析. 计量资料以mean ± SD表示, 癌及癌旁组织比较采用配对样本t检验, 多组均数之间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD-t检验, P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 结肠癌组织miR-30d的表达情况 利用荧光定量PCR检测102例结直肠癌患者癌及癌旁组织中miR-30d的表达, 结果发现: 52.94%(54/102)例结直肠癌组织miR-30d的表达明显高于相对应的正常癌旁组织, 结果有统计学意义($t = 26.57$, $P < 0.05$)(图1).

2.2 转染miR-30d ASO后对miR-30d表达的影响 荧光定量PCR方法检测结果发现: SW480细胞转染miR-30d ASO组miR-30d的相对表达量较空白对照组和转染无义干扰组明显降低(组间 $F = 292.43$, $P < 0.05$); LoVo细胞同样发现miR-30d ASO组miR-30d的相对表达量较空白对照组和转染无义干扰组明显下调(组间 $F = 341.32$, $P < 0.05$)(图2).

2.3 降低miR-30d的表达对结肠癌细胞存活率的影响 MTT检查结果发现: SW480细胞转染miR-30d ASO组的生长较空白对照组和转染无义干扰组明显降低($P < 0.05$), 而空白对照组和转染无义干扰组细胞生长情况无明显差别($P > 0.05$). LoVo细胞与SW480细胞结果一致(图3).

2.4 降低miR-30d的表达结肠癌细胞增殖的影响

■ 相关报道

研究报道miR-30d在前列腺癌、成神经管细胞瘤以及肝癌等恶性肿瘤中表达上调. 过表达miR-30d的表达可以促进在肝癌细胞中的发生发展. 然而miR-30d在结肠癌中的表达及功能研究尚未见报道.

■创新盘点

本研究首次检测miR-30d在结肠癌中呈过表达,同时发现miR-30d在结肠癌细胞的生长中发挥着非常重要的作用。

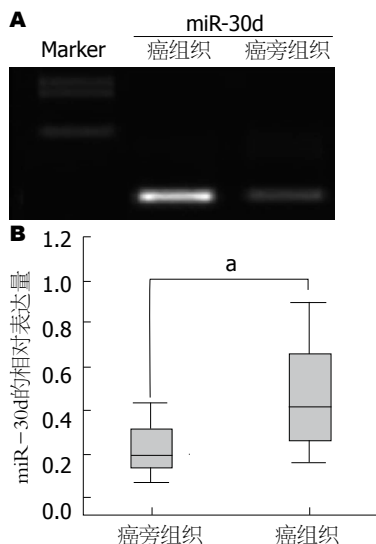


图1 PCR检测102例患者结肠癌及对应的癌旁组织miR-30d的表达。A: miR-30d的PCR扩增图; B: 盒状图, $P < 0.05$ 。

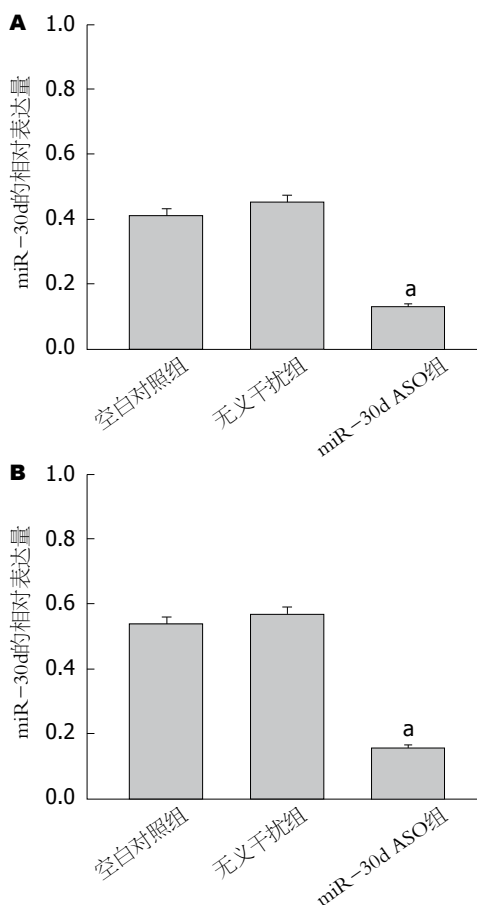


图2 转染miR-30d ASO后SW480和LoVo细胞miR-30d的表达变化。A: SW480细胞; B: LoVo细胞, $P < 0.05$ vs 空白对照组、无义干扰组。ASO: 反义寡核苷酸。

克隆形成实验结果提示: miR-30d ASO转染SW480细胞后, 克隆形成率比空白对照组和转染无义干扰组明显降低($P < 0.05$)。LoVo细胞与SW480细胞结果一致(图4)。

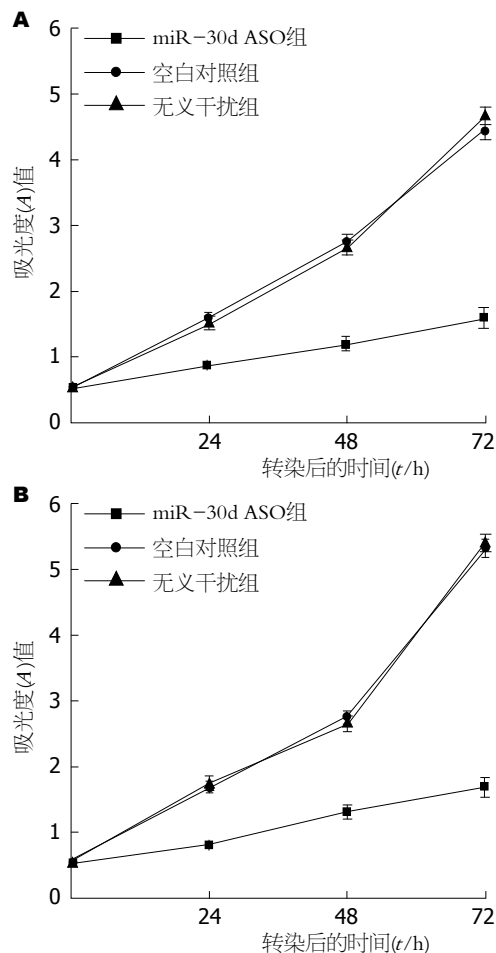


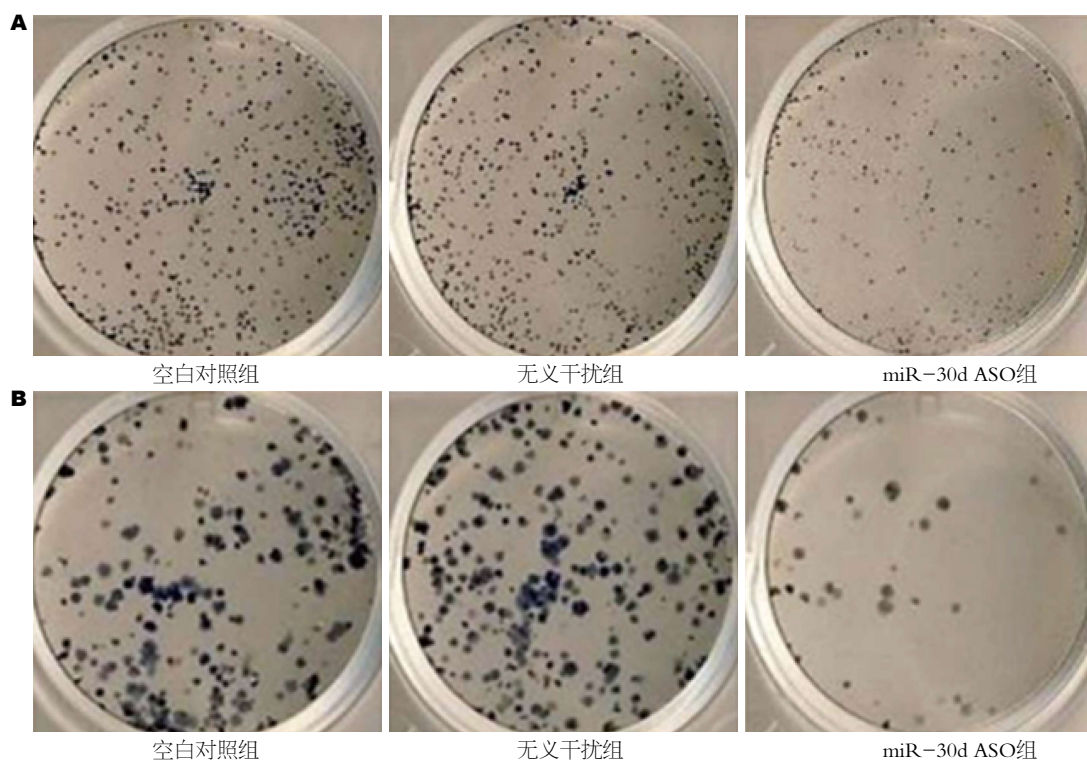
图3 转染miR-30d ASO后, SW480和LoVo细胞的生长情况变化。A: SW480细胞; B: LoVo细胞。ASO: 反义寡核苷酸。

2.5 降低miR-30d的表达对结肠癌细胞凋亡的影响 结肠癌细胞SW480转染miR-30d ASO后, 流式细胞仪检测细胞凋亡的结果显示: miR-30d ASO组的凋亡指数增加明显($P < 0.05$)。LoVo细胞与SW480细胞结果一致(图5)。

2.6 降低miR-30d的表达对Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达的影响 miR-30d ASO转染SW480和LoVo细胞后, 利用荧光定量PCR和Western blot检查各组细胞中Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白表达水平, 结果发现miR-30d ASO组Bcl-2 mRNA和Bcl-2蛋白的相对表达水平明显低于空白对照组和转染无义干扰组($P < 0.05$)(图6, 7)。

3 讨论

研究已经证实miRNAs是一类新的基因调节子, 其在控制细胞的生长、发育、分化、新生血管形成和凋亡等生物学过程中发挥着非常重要的作用^[12,13]。随着miRNA的发现以及逐渐深入的研究, 研究发现miRNAs与癌症的发生及侵袭转移关联紧密^[14,15]。因此miRNAs有可能成为诊断



■应用要点
miR-30d在调控结肠癌细胞的增殖和凋亡方面发挥重要作用, 其很可能成为一个结肠癌新的癌前标志物, 为结肠癌临床基因治疗提供新的靶点。

图 4 转染miR-30d ASO后, SW480和LoVo细胞克隆形成率明显降低. A: SW480细胞; B: LoVo细胞. ASO: 反义寡核酸.

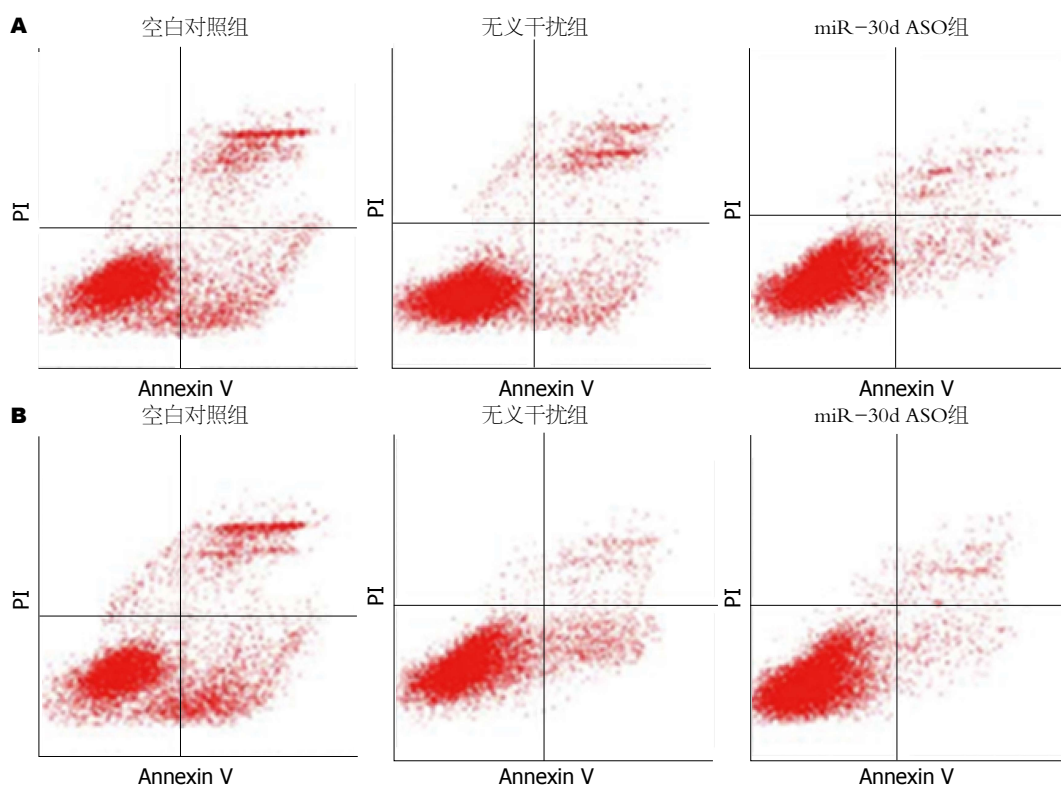


图 5 流式细胞仪检测miR-30d ASO转染后的SW480和LoVo细胞凋亡情况. A: SW480细胞; B: LoVo细胞. ASO: 反义寡核酸.

恶性肿瘤的分子标志和判断肿瘤侵袭转移及预后的分子靶点, 此外miRNAs在转录后水平调节其靶基因的表达, 这将更有助于癌症的早期发现、早期诊断和早期治疗, 其必将具有非常广

阔的临床应用前景.

结直肠癌是世界上我国乃至世界上最常见的恶性肿瘤之一, 尤其常见于西方发达国家^[16-27], 在中国结直肠癌发病率的增长速度是全世界平

■ 名词解释

反义寡核苷酸: 人工合成的, 与靶基因或mRNA某一区段互补的核酸片段, 可以通过碱基互补原则结合于靶基因/mRNA上, 从而封闭基因的表达。

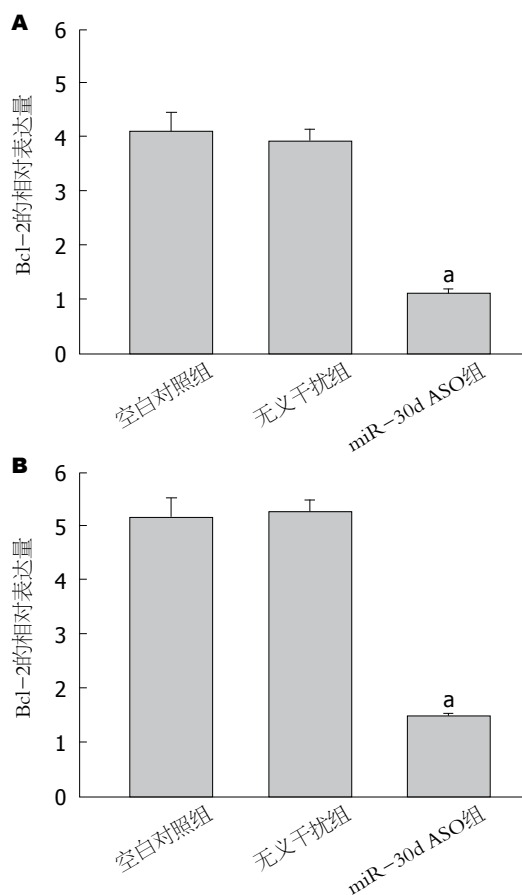


图 6 Bcl-2 mRNA在转染miR-30d ASO的SW480和LoVo细胞中的表达变化. A: SW480细胞; B: LoVo细胞. ^a $P < 0.05$ vs 空白对照组、无义干扰组. ASO: 反义寡核苷酸。

均增长水平的2倍^[16]。结直肠癌的发生过程比较缓慢, 多数是由于结直肠黏膜发生病变然后逐渐发展为腺瘤状息肉, 最后演变成具有侵袭转移特性的恶性肿瘤。如果早期诊断和治疗, 结直肠患者生存率可高达90%。但由于结直肠早期临床表现并无特异性, 几乎所发现的结直肠患者大约50%以上属于临床晚期, 治疗效果不理想。因此, 我们迫切的需要找到新的肿瘤标志物来进一步提高结直肠癌的早期诊疗效果。近年随着miRNAs研究的不断深入, 发现大量异常表达的miRNAs通过调控靶基因的表达而调节包括结肠癌在内的多种恶性肿瘤的发生发展, 大规模的筛选肿瘤发生发展过程中异常表达的miRNAs将为人们全面认识肿瘤的生物学特性发挥重要作用, 也为结肠癌的早期诊治提供了新的希望。最近研究发现miR-30d在前列腺癌及肝癌等恶性肿瘤中的表达上调^[9-11], 但miR-301在结直肠癌中的表达及其作用目前还不清楚。

本实验首先利用实时荧光定量PCR检测临床结直肠癌标本和对应的正常癌旁组织, 结果

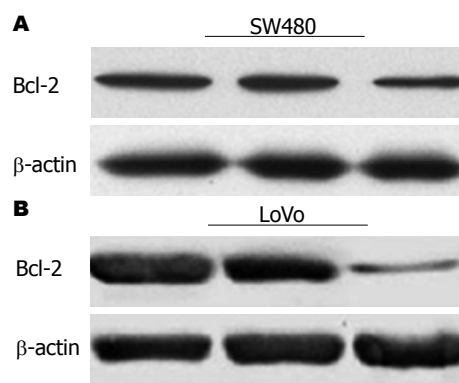


图 7 Bcl-2蛋白在转染miR-30d ASO的SW480和LoVo细胞中的表达变化. A: SW480细胞; B: LoVo细胞. ASO: 反义寡核苷酸。

发现miR-30d在肿瘤组织中呈明显高表达, 两者差异具有统计学意义。这表明miR-30d在结直肠癌发生发展中发挥重要作用。目前有大量研究针对目的miRNA设计相应的ASO来研究miRNA在细胞中的生物学功能^[28-30]。为了进一步分析miR-30d对结肠癌细胞功能的影响, 本实验首先通过转染miR-30d ASO降低结肠癌细胞中miR-30d的表达, 同时利用MTT方法检测降低miR-30d的表达后结肠癌细胞生长情况, 结果发现转染miR-30d ASO的结肠癌细胞存活率明显降低。此外我们运用克隆形成实验还观察到转染miR-30d ASO后, 结肠癌细胞克隆形成率比空白对照组和无义干扰组明显减少。表明miR-30d在结肠癌细胞的生长中发挥着非常重要的作用。

为了进一步分析降低miR-30d表达对结肠癌细胞凋亡情况的影响, 本实验运用流式细胞技术检测细胞凋亡情况, 结果发现转染miR-30d ASO组细胞凋亡较对照组明显增加。因为Bcl-2与细胞凋亡的关系密切。为证实miR-30d对结肠癌细胞凋亡的影响是否与Bcl-2相关, 本实验通过检测miR-30d ASO组和对照组Bcl-2 mRNA和蛋白变化, 结果发现转染miR-30d ASO组Bcl-2 mRNA和蛋白水平明显降低。这表明miR-30d可能通过调节Bcl-2的表达而影响细胞的凋亡, 从而进一步达到对肿瘤细胞增殖能力的调控。

总之, miR-30d在调控结肠癌细胞的增殖和凋亡方面发挥重要作用, 其很可能成为一个结肠癌新的癌前标志物, 为结肠癌临床基因治疗提供新的靶点。

4 参考文献

- 1 Raisch J, Darfeuille-Michaud A, Nguyen HT. Role of microRNAs in the immune system, inflammation

- and cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 2985-2996 [PMID: 23716978 DOI: 10.3748/wjg.v19.i20.2985]
- 2 Soga D, Yoshida S, Shiogama S, Miyazaki H, Kondo S, Shintani S. microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013; 30: 579-583 [PMID: 23708842 DOI: 10.3892/or.2013.2488]
- 3 Luo W, Nie Q, Zhang X. MicroRNAs involved in skeletal muscle differentiation. *J Genet Genomics* 2013; 40: 107-116 [PMID: 23522383 DOI: 10.1016/j.jgg.2013.02.002]
- 4 Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 2011; 91: 827-887 [PMID: 21742789 DOI: 10.1152/physrev.00006.2010]
- 5 Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 704-714 [PMID: 19763153 DOI: 10.1038/nrg2634]
- 6 Munker R, Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121: 141-158 [PMID: 21526983 DOI: 10.1042/CS20110005]
- 7 Vejnar CE, Blum M, Zdobnov EM. miRmap web: comprehensive microRNA target prediction online. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: W165-W168 [PMID: 23716633 DOI: 10.1093/nar/gkt430]
- 8 Yu DC, Li QG, Ding XW, Ding YT. Circulating MicroRNAs: Potential Biomarkers for Cancer. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 2055-2063 [PMID: 21673939 DOI: 10.3390/ijms12032055]
- 9 Wu C, Jin B, Chen L, Zhuo D, Zhang Z, Gong K, Mao Z. MiR-30d induces apoptosis and is regulated by the Akt/FOXO pathway in renal cell carcinoma. *Cell Signal* 2013; 25: 1212-1221 [PMID: 23416459 DOI: 10.1016/j.cellsig]
- 10 Kobayashi N, Uemura H, Nagahama K, Okudela K, Furuya M, Ino Y, Ito Y, Hirano H, Inayama Y, Aoki I, Nagashima Y, Kubota Y, Ishiguro H. Identification of miR-30d as a novel prognostic marker of prostate cancer. *Oncotarget* 2012; 3: 1455-1471 [PMID: 23231923]
- 11 Yao J, Liang L, Huang S, Ding J, Tan N, Zhao Y, Yan M, Ge C, Zhang Z, Chen T, Wan D, Yao M, Li J, Gu J, He X. MicroRNA-30d promotes tumor invasion and metastasis by targeting Galphai2 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 51: 846-856 [PMID: 20054866 DOI: 10.1002/hep.23443]
- 12 Sarver AL, French AJ, Borralho PM, Thayanithy V, Oberg AL, Silverstein KA, Morlan BW, Riska SM, Boardman LA, Cunningham JM, Subramanian S, Wang L, Smyrk TC, Rodrigues CM, Thibodeau SN, Steer CJ. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC Cancer* 2009; 9: 401 [PMID: 19922656 DOI: 10.1186/1471-2407-9-401]
- 13 Marchi S, Pinton P. Mitochondrial calcium uniporter, MiRNA and cancer: Live and let die. *Commun Integr Biol* 2013; 6: e23818 [PMID: 23713134 DOI: 10.4161/cib.23818]
- 14 Yi B, Piazza GA, Su X, Xi Y. MicroRNA and cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; 6: 401-409 [PMID: 23531448 DOI: 10.1158/1940-6207]
- 15 Harquail J, Benzina S, Robichaud GA. MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer Biomark* 2012; 11: 269-280 [PMID: 23248185 DOI: 10.3233/CBM-120291]
- 16 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu JQ, Thum MJ. Cancer statistics 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; 57: 43-66 [PMID: 17237035 DOI: 10.3322/canjclin.57.1.43]
- 17 Sameer AS. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Front Oncol* 2013; 3: 114 [PMID: 23717813 DOI: 10.3389/fonc.2013.00114]
- 18 Wu Q, Shi Y, Chen L, Xiao X, Dai G. Effect and safety of bevacizumab-containing chemotherapy treatment in Chinese patients with metastatic colorectal cancer. *Onco Targets Ther* 2013; 6: 485-490 [PMID: 23671391 DOI: 10.2147/OTT.S41449]
- 19 Mohan HM, Evans MD, Larkin JO, Beynon J, Winter DC. Multivisceral Resection in Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Ann Surg Oncol* 2013 May 11. [Epub ahead of print] [PMID: 23666095 DOI: 10.1245/s10434-013-2967-9]
- 20 Gomez D, De Rosa A, Addison A, Brooks A, Malik HZ, Cameron IC. Cetuximab therapy in the treatment of metastatic colorectal cancer: The future frontier? *Int J Surg* 2013; 11: 507-513 [PMID: 23660586 DOI: 10.1016/j.jisu.2013.04.014]
- 21 Voorham QJ, Rondagh EJ, Knol DL, van Engeland M, Carvalho B, Meijer GA, Sanduleanu S. Tracking the molecular features of nonpolypoid colorectal neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 1042-1056 [PMID: 23649184 DOI: 10.1038/ajg.2013.126]
- 22 Serra-Sutton V, Serrano CB, Carreras ME. Quality indicators to assess a colorectal cancer prevention program. *Int J Technol Assess Health Care* 2013; 29: 166-173 [PMID: 23587309 DOI: 10.1017/S0266462313000020]
- 23 Di Lena M, Travaglio E, Altomare DF. New strategies for colorectal cancer screening. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 1855-1860 [PMID: 23569331 DOI: 10.3748/wjg.v19.i12.1855]
- 24 Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control* 2013; 24: 1207-1222 [PMID: 23563998 DOI: 10.1007/s10552-013-0201-5]
- 25 Xiang H, Wang Y, Nie S. Meta-analysis of the association between insulin-like growth factor binding protein 3 genetic polymorphisms and colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* 2013; 8: e59665 [PMID: 23527244 DOI: 10.1371/journal.pone.0059665]
- 26 Tanis PJ, Doeksen A, van Lanschot JJ. Intentionally curative treatment of locally recurrent rectal cancer: a systematic review. *Can J Surg* 2013; 56: 135-144 [PMID: 23517634 DOI: 10.1503/cjs.025911]
- 27 Yang TX, Morris DL, Chua TC. Pelvic exenteration for rectal cancer: a systematic review. *Dis Colon Rectum* 2013; 56: 519-531 [PMID: 23478621 DOI: 10.1097/DCR.0b013e31827a7868]
- 28 Nielsen TO, Sorensen S, Dagnæs-Hansen F, Kjems J, Sorensen BS. Directing HER4 mRNA expression towards the CYT2 isoform by antisense oligonucleotide decreases growth of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2013; 108: 2291-2298 [PMID: 23695025 DOI: 10.1038/bjc.2013.247]
- 29 Mitropant C, Porensky P, Zhou H, Price L, Muntoni F, Fletcher S, Wilton SD, Burghes AH. Improved antisense oligonucleotide design to suppress aberrant SMN2 gene transcript processing: towards a treatment for spinal muscular atrophy. *PLoS One* 2013; 8: e62114 [PMID: 23630626 DOI: 10.1371/

同行评价

本文检测miR-30d mRNA在结肠癌组织中的表达, miR-30d反义核苷酸对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响, 对结肠癌的治疗有重要理论指导意义。

journal.pone.0062114]
30 Sypniewski D, Bednarek I, Gałka S, Loch T,
Błaszczak D, Sołtysik D. Cytotoxicity of etoposide

in cancer cell lines in vitro after BCL-2 and C-RF
gene silencing with antisense oligonucleotides. *Acta
Pol Pharm* 2013; 70: 87-97 [PMID: 23610963]

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. 编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿.

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

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

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

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

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

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

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

肾素-血管紧张素系统在肝纤维化中作用的研究进展

李爽

李爽, 天津市第二人民医院肝病II科 天津市 300192
李爽, 主治医师, 主要从事慢性肝炎、肝硬化诊断及治疗的研究。
作者贡献分布: 本文由李爽独立完成。
通讯作者: 李爽, 主治医师, 天津市南开区苏堤路75号, 天津市第二人民医院肝病II科. ronnie112233@163.com
收稿日期: 2013-04-21 修回日期: 2013-06-26
接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis

Shuang Li

Shuang Li, Hepatic Disease Department of Hepatology (Division II), Tianjin Second People's Hospital, Tianjin 300192, China

Correspondence to: Shuang Li, Attending Physician, Hepatic Disease Department of Hepatology (Division II), Tianjin Second People's Hospital, Tianjin 300192, China. ronnie112233@163.com

Received: 2013-04-21 Revised: 2013-06-26

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

Hepatic fibrosis is characterized by progressive inflammation and deposition of extracellular matrix components. Several recent studies have demonstrated that the rennin-angiotensin system (RAS) plays a key role in hepatic fibrosis. In this review, we provide a comprehensive update of the role of the RAS in the pathogenesis of hepatic fibrosis. We will discuss the profibrotic mechanisms activated by the RAS. Studies that have utilized angiotensin receptor blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors to modulate the RAS to ameliorate hepatic fibrosis will also be discussed.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Fibrosis; Cholangiocytes; Hepatic stellate cells; Renin-angiotensin system

Li S. Role of the renin-angiotensin system in liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2151-2157
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2151.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2151>

摘要

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是继发于各种

慢性肝损伤之后组织修复过程中的代偿反应,其特征是进行性炎症和细胞外基质成分的沉积。近年来研究显示,肾素-血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)在HF中发挥着重要作用。本综述提供了目前最新的关于RAS在肝纤维化发病机制中作用的研究结论。同时也讨论了血管紧张素受体阻断剂和血管紧张素转换酶类药物在通过调节RAS以改善肝纤维化水平中的作用。旨在为HF的预防和治疗提供一个新思路。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 肝纤维化; 胆管细胞; 肝星状细胞; 肾素-血管紧张素系统

核心提示: 肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是慢性肝炎向肝硬化发展的重要病理过程。肾素-血管紧张素系统在其进展中起主要作用。除对肝星状细胞、kuffer细胞有调节作用外,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)同样对胆管上皮细胞产生影响,并参与了胆管纤维化的进展。而针对RAS系统进行治疗也许会为HF的预防和治疗提供一个新思路。

李爽. 肾素-血管紧张素系统在肝纤维化中作用的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(22): 2151-2157 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2151.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2151>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是继发于各种慢性肝损伤之后组织修复过程中的代偿反应,涉及多种细胞因子、炎症趋化因子、生长因子,打破了肝脏内的稳态平衡,表现为肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)大量活化增殖、形态转变肌成纤维细胞,细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)过度沉积等^[1-3]。如无有效的治疗措施,随着病情的发展将破坏正常的肝脏结构与功能,最终发展成为肝硬化而出现肝脏功能的衰退, HF是慢性肝炎向肝硬化发展的重要病理过程^[4]。最新的动物模型和临床研究表明,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)

■背景资料

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是继发于各种慢性肝损伤之后组织修复过程中的代偿反应,是慢性肝炎向肝硬化发展的重要病理过程。在众多影响HF的因素中,肾素-血管紧张素系统在HF的进展中起主要作用。

■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; 许戈良, 教授, 安徽省立医院

■研究前沿

肾素-血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)在HF的进展中起主要作用,而动物实验表明血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素受体阻断剂的应用都可减轻HF。那么上述药物是否可用于临床抗HF的治疗,成为目前的研究热点。

在HF的进展中起主要作用^[5,6]。在动物研究中显示,作为RAS系统主要活性肽的血管紧张素II(angiotensin II, ANG II)可促进在HF中其重要作用的星状细胞的活化与增殖^[7,8]。动物实验表明,血管紧张素II型受体(angiotensin type 1 receptor, AT1)的缺乏,以及血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制剂或血管紧张素受体阻断剂(angiotensin receptor blockers, ARBs)的应用都可减轻HF^[9,10]。在这篇综述中,我们将讨论RAS系统的研究现状及其在HF过程中所起的作用。此外我们也将讨论通过调节RAS系统来改善HF程度的治疗方案。

1 HF机制

HF的特征改变是肝脏内细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积。目前的研究证实,肝星形细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的激活是HF发生的中心环节。HF链式反应是一个多因素参与的过程:(1)HSCs和Kf细胞的活化;(2)HSCs的移行和增殖;(3)细胞外基质的合成和沉积;(4)瘢痕收缩;(5)HSCs的凋亡^[11]。研究显示有一系列的细胞因子和生长因子在HSCs活化过程中扮演着重要的角色,如血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β),肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α),胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF-I)和内皮素-1(endothelin-1, ET-1)以及活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)^[12]。然而,众所周知PDGF和TGF- β 是HSCs增殖和纤维化的最有力的刺激因子^[3]。HSCs的活化及纤维化机制已被多篇文章所提及,在这里就不再一一赘述了。

然而,越来越多的证据表明,胆管上皮细胞的增殖在以胆管纤维化为特征的胆汁淤积性慢性肝病中发挥着重要作用^[13]。最新的证据表明,增殖的胆管上皮细胞通过神经内分泌调节在肝病进展过程中发挥作用,如其可分泌并接受激素、神经递质及神经肽的调节,通过自分泌和旁分泌的形式对肝脏的炎症、纤维化及胆管癌的发生进行正负调节^[14]。这些神经内分泌表型细胞的激活,类似于HSCs在HF中的作用,在胆汁淤积性肝病(如PBC、PSC)的胆管纤维化中发挥着重要作用,在这些疾病过程中,作为靶细胞的胆管上皮细胞的增殖和/或凋亡都会增加^[15,16]。许多研究显示,胆管上皮细胞会分泌促纤维化因子,如结缔组织生长因子(connective tissue

growth factor, CTGF), TGF- β 2和肝内皮素,这表明增殖的胆管上皮细胞在胆管纤维化中发挥着重要的作用^[17,18]。

最近研究表明,RAS系统在包括肝脏在内的多脏器纤维化过程中发挥多因素作用^[19,20]。而HSCs和胆管上皮细胞都可以分泌RAS成分,促进HF发展的进程^[21]。而通过调节RAS系统来抑制HSCs及胆管上皮细胞从而延缓纤维化的发展。

2 内分泌(经典的)RAS和局部RAS

内分泌(经典的)RAS系统在调节血压、电解质及体液平衡中发挥着重要作用。血管紧张素原在肾素的作用下水解生成十肽的血管紧张素I(Angiotensin I, ANG I),ANG I没有活性在ACE的作用下水解为有活性的ANG II,ANG II是RAS系统的主要生理活性成分^[22]。

近年来许多研究显示,很多器官如心、肾、肝、胰腺等都具有局部RAS系统^[23]。而某些器官的局部RAS系统并不表达所有的经典RAS系统的成分^[24]。有几种不同的酶途径用于ANG II的合成,其中包括血管紧张素II产生酶(chymotrypsin-sensitive ANG II-generating enzyme, CAGE),组织蛋白酶G(cathepsin G)和糜蛋白酶(chymase)。局部RAS的一个作用循环中ANG II的作用,尤其在受心血管调控的组织中。局部RAS的分泌有助于RAS抑制剂多效性的解释^[24]。

ANG II的生物学效应受2个7次跨膜G蛋白偶联受体调节(AT1和AT2),其中AT1广泛分布于肝脏、肾上腺、脑、肺、肾、心脏和血管系统,ANG II的大部分生物学效应都与之有关^[25]。激活AT1受体的结果动脉张力增加,肾上腺醛固酮分泌,肾钠重吸收增加,交感神经递质和细胞生长。近期研究显示,ANG II是炎症进展的重要影响因素。AT1和AT2作为ANG II的受体据有相反的作用。例如,激活AT1可刺激血管收缩和细胞增殖,而AT2受体则可介导血管舒张,抑制细胞生长和激活细胞凋亡。

经典的RAS模式在1980年ANG(1-7)被发现时受到了挑战,他被证明据有多样化的生物学作用^[26,27]。随后的研究确定了几个新的RAS成分,如ACE2催化生成的Ang II(1-7)和G蛋白偶联血管紧张素(1-7)受体, MAS受体。这些新的成分,与ANG(1-7)一起,被作为RAS的旁路途径。在这个途径中,ACE2可直接催化ANG II产生ANG(1-7),还可通过ANG I间接产生ANG(1-7)。活化的MAS受体在许多类型的细胞中已触发血

管舒张和抗增殖的信号转导机制^[28,29].

3 肝组织中RAS成分的表达

许多研究显示在不同HF动物模型及人组织样本中可以检测到经典的RAS成分. Bataller等^[30]已证明HSCs会表达AT1受体, ANG II与细胞内钙水平、细胞收缩及增殖呈剂量依赖性. Paizis等^[31]研究表明在胆道结扎的患者肝内的ACE及AT1受体的基因表达会明显增加, 尤其是在HF活跃的地方. 然而, AT2在普通及病变肝组织中均未检测到. 除了HSCs, Kuffer细胞也表达AT1受体和ANG II, 以刺激TGF- β 1和纤连蛋白的表达^[32]. 在人体组织样本中, 通过免疫组织化学的方法证明了AT1受体在普通肝组织细胞中低表达, 而在HSCs、血管上皮和胆管内皮细胞中表达增加^[33]. 对于旁路途径ACE2/ANG(1-7)/Mas受体轴, 在大鼠的HF模型中ACE2、ANG(1-7)、Mas受体表达均有所增加^[34,35]. 在健康人体肝脏, ACE2的表达仅限于内皮细胞, 某些胆管和静脉周围的肝细胞. 而在胆管结扎模型和人肝硬化组织样本中, ACE2在肝组织中广泛表达^[36]. 另有研究观察到应用ANG II治疗的HSCs细胞中ACE2表达明显增加. ANG II的前体血管紧张素原主要来自于肝细胞. 然而, 低水平的血管紧张素原也被发现在枯否细胞和胆管上皮细胞. Bataller等^[30]研究显示, 在人体内激活的HSCs和培养激活的HSCs均会表达肾素、ACE, 并会分泌ANG II到培养基中. 众所周知, 在肝硬化, 特别是肝肾综合征患者中血浆肾素活性和醛固酮水平会升高. Vilas-Boas等^[37,38]的两项研究显示ANG(1-7)存在于晚期肝病患者的外周、内脏循环中. 他们报道与轻-中度肝病相比, 晚期肝病患者的血浆肾素活性及血管紧张素会增加. 而ANG(1-7)/ANG II比率也在轻-中度肝病患者中会增高. 内脏循环中ANG(1-7)/ANG II的比率要高于外周循环, 这也许意味着ANG(1-7)/ANG II比率在肝硬化患者的血流动力学改变中发挥重要作用. 总之, 上述发现清楚地表明激活的局部RAS在HF进展中起关键作用^[38]. 而ANG(1-7)与ANG II之间的平衡在肝脏疾病发病机制中也扮演者重要角色.

4 在HF动物模型中RAS的作用

无数的研究结果显示在动物模型中RAS对于HF进展发挥着重要的作用. 通过对普通大鼠皮下植入渗透微泵, 4 wk缓慢泵入ANG II, 会诱

导HSCs活化并且胶原沉积会轻度增加^[39]. 此外, ANG II输注会诱导氧化应激, 引起炎症细胞因子浓度的增加, 使炎症蛋白的表达上调, 如诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)^[39]. 在另一个通过胆管结扎导致胆管扩张的肝损害大鼠模型中, 用类似的方法泵入ANG II, 肝脏炎症蛋白、TNF- α 和白细胞介素(interleukins, IL)-1 β 的水平具有所增加^[21]. ANG II输注也增加肝脏TGF- β 浓度, 胶原沉积以及 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)阳性细胞和脂过氧化产物的沉积. 作者还报告说, 输注ANG II可激活c-Jun和细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulating kinase, ERK)-1/2的磷酸化, 并促进胆管增生. 在体外培养的HSCs中, 血管紧张素II会促进活性氧的产生, 细胞增殖和分泌炎症细胞因子^[21].

许多研究人员已利用基因和药理学方法阐明信号传导机制在ANG II诱导的HF中的调节作用. 通过对胆管结扎及CCl₄诱导的大鼠HF模型进行了初步研究, 显示ACE抑制剂可减少ANG II的产生, 显著延缓了HF的进展. 在两个不同的大鼠肝癌模型中, 应用ACE抑制剂-培哚普利, 可显著的抑制HF标志物, 如肝羟脯氨酸含量, 血清HF标志物, α -SMA阳性细胞和III型胶原mRNA的表达. 激活的AT1可促进肾、心的纤维化, 类似的结论在HF中也可见到, 通过药理学抑制或基因敲除AT1, 可减轻HF^[40]. 应用AT1的拮抗剂可减轻HF模型中的纤维化程度^[41]. 一项研究比较了ARBs和ACEI在胆管结扎诱导的HF模型中抑制作用, ARBs要优于ACEI^[42]. 许多研究均证实HF的动物模型中应用ARBs或ACEI类药物, 可阻止纤维化的进展. 此外, 近期一研究显示将AT1拮抗剂氯沙坦应用于动物模型仅3 d就可减少胶原沉积、肌纤维母细胞的积累以及前胶原 α 2(I)基因的表达^[43]. 在动物非酒精性脂肪肝病模型中应用氯沙坦可减少被激活的HSCs数量, 并抑制TGF- β 的表达, 减轻HF^[44]. 这一结果提示ARBs有望成为治疗非酒精性脂肪肝患者HF的药物^[44]. 在对AT1 α 缺陷小鼠的实验表明, AT1是HF进展的关键. 而AT2缺陷小鼠的HF会加重, 这提示活化的AT2可能在氧化应激诱导的HF过程中有抗纤维化和/或细胞保护作用^[45]. 但尚缺乏AT2在人肝组织样本中的研究.

也有相当多的证据支持, 在HF动物模型中, ANG(1-7)具有抗HF作用^[46]. 其中一个证据是

■ 相关报道

动物实验显示血管紧张素II(angiotensin II, ANG II)可促进在HF中其重要作用的星状细胞的活化与增殖, 而ANG II 1型受体的缺乏, 以及血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素受体阻断剂的应用都可减轻HF.

■创新盘点

本文提供了最新的关于肾素-血管紧张素系统在HF发病机制中作用的研究结论。除对肝星状细胞、Kuffer细胞有调节作用外, RAS系统同样对胆管上皮细胞产生影响, 并参与了胆管纤维化的进展。

Paizis等^[47]研究发现在胆管结扎诱导的大鼠HF模型及人丙肝后肝硬化组织样本中, ACE2广泛表达。Herath等^[34]也报道了在胆管结扎诱导的大鼠HF模型中, ACE2及ANG(1-7)呈现高表达。同样在CCl₄诱导的大鼠HF模型中, 也存在ACE2表达上调的情况^[35]。另有实验表明ANG(1-7)对HF具有潜在的保护性, 在胆管结扎诱导的大鼠HF模型中, Mas抑制剂可通过增加胶原含量及促进TGF- β 1的表达进而加速HF的发展。近期Lubel等^[46]也证实了先前的研究结论-ANG(1-7)具有抗HF作用。在动物模型中, ANG(1-7)不仅可改善组织学纤维化分期, 还可降低羟脯氨酸含量、降低胶原1A1, α -SMA, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), CTGF, ACE和MAS的表达。此外, 培养的肝细胞会表达AT1和MAS, 当加入ANG(1-7)或MAS受体激动剂后, 会减少 α -SMA和羟脯氨酸的产生。

在对ACE2基因敲除的小鼠应用CCl₄处理或进行胆管结扎后, 其HF程度会明显加重。肝硬化患者血浆中ANG(1-7)和ANG II浓度会明显升高。然而, 丙型肝炎患者与对照组相比, ANG(1-7)的水平有所升高, 但ANG II的浓度却没有增加。上述研究结果提示我们, ANG(1-7)/Mas轴对RAS介导的肝损伤可起到调节作用, 有望成为一个治疗HF的有效靶点。

5 在肝病患者中ARBs和ACEI的应用研究

RAS抑制剂广泛用于肾衰和心衰的治疗, 众多临床研究都提示其可改善肾、心纤维化^[48]。目前有许多应用ARBs和ACEI治疗HF的研究。这些研究主要应用的是ARBs中的氯沙坦。比较早期的一个研究是Terui等^[49]应用氯沙坦治疗处于慢性丙型肝炎早期阶段的患者, 结果显示氯沙坦可降低IV型胶原沉积和TGF- β 1的表达。在一个小规模研究中, 应用氯沙坦治疗14例慢性丙型肝炎, 其HF程度得到改善^[50]。此外2个回顾性研究也证明了ACEI和ARBs对HF的治疗作用^[51,52]。其中一个研究是128例肝移植后丙肝复发的患者, 应用ACEI和ARBs治疗后, HF有所改善^[51]。另一个较大的回顾性研究, 对284例合并高血压的慢性丙型肝炎患者应用ARBs或ACEI治疗高血压时, 有了一些意外的发现^[52]。合并高血压的慢丙肝患者, 其纤维化程度较无高血压的丙肝患者要重^[52]。其中, 应用血管紧张素阻断剂治疗的高血压患者比没有接受治疗的患者纤维化程度轻^[52]。此外, 应注意肝硬化腹水的患者, 使用RAS抑制

剂, 如卡托普利降低门静脉压力的结果并不理想, 因其具有非常显著的不良副反应如肾功能损害和全身性低血压。显然, ARBs和ACEI关于改善HF的有效性是可以肯定的, 但尚需大量患者的对照试验。

一些实验数据表明, RAS抑制剂对于肝癌的治疗有帮助。已有研究发现, ACE抑制剂培哚普利在体外试验中可抑制肝癌血管生成^[53]。一个小型研究发现, 维生素K联合培哚普利可通过抑制VEGF而抑制血管生成, 从而抑制经治疗后原发性肝癌的复发^[53]。这些研究表明ACEI可通过抑制VEGF来治疗肝癌。但仍需进一步的临床研究来证实其有效性及安全性。

6 RAS触发下游信号转导机制来激活HSCs

通过RAS成分激活下游信号转导机制来调节HF尚未被充分研究。然而, 几个研究表明, 通过ANG II活化HSC、AT1受体刺激分泌TGF- β 1可加剧HF^[54]。接下来我们总结了一下已被阐明的信号转导机制。ANG II可诱导HSCs的增殖并可产生TGF- β 1。激活的HSCs可分泌ANG II, 通过激活NADPH氧化酶诱导纤维化的产生^[55]。Bataller等^[55]证明ANG II可诱导NADPH氧化酶调节亚基p47phox磷酸化, 激活NADPH氧化酶诱导ROS的产生。此外, ANG II可使AKT和MAPKs磷酸化, 增加AP-1 DNA的合成。另一个研究显示, ANG II可刺激DNA合成, 细胞迁移, 胶原 α 1(I) mRNA的表达, 并分泌TGF- β 1和炎症细胞因子^[55]。其他的研究表明ACEI和ARBs通过抑制肝脏NF- κ B的活化来发挥抗纤维化作用。ANG II可增加NF- κ B活性以及NF- κ B靶基因TNF- α 的表达^[56]。此外, ANG II可明显的增加HSC AP-1的活性和AP-1的靶基因 α 1(I)前胶原mRNA的表达^[56]。最后, ANG II可刺激HSCs产生单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)来调节肝脏炎症^[57]。通过对比ANG II的纤维化作用, 证明活化的ANG(1-7)/MAS轴具有抗纤维化作用。

7 结论

RAS对慢性肝病HF具有重要的调节作用。动物模型的研究, 显示了ARBs和ACEI具有有效的抗纤维化作用。对慢性肝病患者抗纤维化的治疗也显示出了良好的前景。此外, 某些研究显示ACEI可能对肝癌的治疗有帮助。然而, 尚需对慢性肝病患者群进行大量的、对照实验研究。

未来的研究应评估RAS在其他类型细胞中

的作用,如胆管上皮细胞,他也可以分泌RAS成分,有可能对以胆管纤维化为特征的慢性肝病具有抗纤维化作用。有趣的是,最近的研究表明,ANG II可通过HSCs的自分泌和旁分泌机制刺激胆管癌生长,诱导肿瘤的纤维化^[58]。这些研究结果表明,在胆汁淤积类疾病的发病机制中,胆管上皮细胞可能与HSCs及门静脉成纤维细胞相互作用。未来的研究需要评估RAS治疗慢性肝病(如PSC)HF的机制。

8 参考文献

- 1 Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 223-229 [PMID: 19396960 DOI: 10.1097/MOG.0b013e3283279668]
- 2 韩硬海,李树桐主编. 临床肝脏病学. 山东: 山东科学技术出版社, 2005: 174
- 3 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]
- 4 Lim YS, Kim WR. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 733-746, vii [PMID: 18984463]
- 5 Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 1346-1355 [PMID: 16115040 DOI: 10.1089/ars.2005.7.1346]
- 6 Pereira RM, dos Santos RA, da Costa Dias FL, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2579-2586 [PMID: 19496186 DOI: 10.3748/wjg.15.2579]
- 7 龚浩,王宇,张忠涛,李建设,周延忠. 血管紧张素 II 及其受体拮抗剂对肝星状细胞收缩的影响. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 695-698
- 8 Osterreicher CH, Taura K, De Minicis S, Seki E, Penz-Osterreicher M, Kodama Y, Kluwe J, Schuster M, Oudit GY, Penninger JM, Brenner DA. Angiotensin-converting-enzyme 2 inhibits liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2009; 50: 929-938 [PMID: 19650157 DOI: 10.1002/hep.23104]
- 9 Yi ET, Liu RX, Wen Y, Yin CH. Telmisartan attenuates hepatic fibrosis in bile duct-ligated rats. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33: 1518-1524 [PMID: 23103625 DOI: 10.1038/aps.2012.115]
- 10 Kato J, Koda M, Kishina M, Tokunaga S, Matono T, Sugihara T, Ueki M, Murawaki Y. Therapeutic effects of angiotensin II type 1 receptor blocker, irbesartan, on non-alcoholic steatohepatitis using FLS-ob/ob male mice. *Int J Mol Med* 2012; 30: 107-113 [PMID: 22469867 DOI: 10.3892/ijmm.2012.958]
- 11 Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008; 134: 1641-1654 [PMID: 18471544 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.002]
- 12 Acquaviva A, Vecchio D, Arezzini B, Comporti M, Gardi C. Signaling pathways involved in isoprostone-mediated fibrogenic effects in rat hepatic stellate cells. *Free Radic Biol Med* 2013; 65C: 201-207 [PMID: 23792773 DOI: 10.2741/887]
- 13 Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med* 2009; 11: e7 [PMID: 19239726 DOI: 10.1017/S1462399409000994]
- 14 Alvaro D, Mancino MG, Glaser S, Gaudio E, Marziani M, Francis H, Alpini G. Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology* 2007; 132: 415-431 [PMID: 17241889 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.07.023]
- 15 Olteanu D, Nagy A, Dudea M, Filip A, Muresan A, Catoi C, Mircea PA, Clichici S. Hepatic and systemic effects of rosuvastatin on an experimental model of bile duct ligation in rats. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63: 483-496 [PMID: 23211302]
- 16 Ebrahimkhani MR, Elsharkawy AM, Mann DA. Wound healing and local neuroendocrine regulation in the injured liver. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10: e11 [PMID: 18442446 DOI: 10.1017/S146239940800063X]
- 17 Schmitt-Graeff A, Jing R, Nitschke R, Desmoulière A, Skalli O. Synemin expression is widespread in liver fibrosis and is induced in proliferating and malignant biliary epithelial cells. *Hum Pathol* 2006; 37: 1200-1210 [PMID: 16938526]
- 18 Luo B, Tang L, Wang Z, Zhang J, Ling Y, Feng W, Sun JZ, Stockard CR, Frost AR, Chen YF, Grizzle WE, Fallon MB. Cholangiocyte endothelin 1 and transforming growth factor beta1 production in rat experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2005; 129: 682-695 [PMID: 16083721 DOI: 10.1016/j.gastro.2005.05.050]
- 19 Higashi K, Oda T, Kushiya T, Hyodo T, Yamada M, Suzuki S, Sakurai Y, Miura S, Kumagai H. Additive antifibrotic effects of pioglitazone and candesartan on experimental renal fibrosis in mice. *Nephrology (Carlton)* 2010; 15: 327-335 [PMID: 20470302 DOI: 10.1111/j.1440-1797.2009.01253.x]
- 20 He X, Gao X, Peng L, Wang S, Zhu Y, Ma H, Lin J, Duan DD. Atrial fibrillation induces myocardial fibrosis through angiotensin II type 1 receptor-specific Arkadia-mediated downregulation of Smad7. *Circ Res* 2011; 108: 164-175 [PMID: 21127293 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.234369]
- 21 Bataller R, Gäbele E, Parsons CJ, Morris T, Yang L, Schoonhoven R, Brenner DA, Rippe RA. Systemic infusion of angiotensin II exacerbates liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Hepatology* 2005; 41: 1046-1055 [PMID: 15841463 DOI: 10.1002/hep.20665]
- 22 Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003; 144: 2179-2183 [PMID: 12746271 DOI: 10.1210/en.2003-0150]
- 23 Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; 86: 747-803 [PMID: 16816138 DOI: 10.1152/physrev.00036.2005]
- 24 Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86: 615-621 [PMID: 18414822 DOI: 10.1007/s00109-008-0336-0]
- 25 Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C82-C97 [PMID: 16870827 DOI: 10.1152/ajpcell.00287.2006]
- 26 Brown CA, Zusman RM, Haber E. Identification of an angiotensin receptor in rabbit renomedullary interstitial cells in tissue culture. Correlation with prostaglandin biosynthesis. *Circ Res* 1980; 46: 802-807 [PMID: 6247080 DOI: 10.1161/01.RES.46.6.802]

■应用要点

本文为临床抗纤维化治疗提供了一个新思路-针对RAS系统进行治疗也许会成为HF的预防和治疗的新方法。

■同行评价

本文表述清晰, 层次清楚, 重点突出, 语句顺畅, 能够反映有关研究进展。

- 27 Kramkowski K, Mogielnicki A, Buczek W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 529-539 [PMID: 17229979]
- 28 Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res* 2009; 32: 533-536 [PMID: 19461648]
- 29 Castro-Chaves P, Cerqueira R, Pinalhao M, Leite-Moreira AF. New pathways of the renin-angiotensin system: the role of ACE2 in cardiovascular pathophysiology and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 485-496 [PMID: 20392165 DOI: 10.1517/14728221003709784]
- 30 Bataller R, Ginès P, Nicolás JM, Görbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodés J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156 [PMID: 10833490 DOI: 10.1016/S0016-5085(00)70368-4]
- 31 Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1667-1676 [PMID: 12404241 DOI: 10.1053/gast.2002.36561]
- 32 Leung PS, Suen PM, Ip SP, Yip CK, Chen G, Lai PB. Expression and localization of AT1 receptors in hepatic Kupffer cells: its potential role in regulating a fibrogenic response. *Regul Pept* 2003; 116: 61-69 [PMID: 14599716 DOI: 10.1016/S0167-0115(03)00192-7]
- 33 Schulte S, Oidtman A, Kociok N, Demir M, Odenthal M, Drebber U, Dienes HP, Nierhoff D, Goeser T, Toex U, Steffen HM. Hepatocyte expression of angiotensin II type 1 receptor is downregulated in advanced human liver fibrosis. *Liver Int* 2009; 29: 384-391 [PMID: 19040540 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2008.01902.x]
- 34 Herath CB, Warner FJ, Lubel JS, Dean RG, Jia Z, Lew RA, Smith AI, Burrell LM, Angus PW. Upregulation of hepatic angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin-(1-7) levels in experimental biliary fibrosis. *J Hepatol* 2007; 47: 387-395 [PMID: 17532087 DOI: 10.1016/j.jhep.2007.03.008]
- 35 Huang Q, Shi CC, Lin LY, Wang H, Yu H, Guo Q, Xie Q. [Expression and correlation of angiotensin-converting enzyme 2 in CCl4-induced rat liver fibrosis]. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2013; 21: 47-52 [PMID: 23663763 DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418]
- 36 Huang ML, Li X, Meng Y, Xiao B, Ma Q, Ying SS, Wu PS, Zhang ZS. Upregulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) 2 in hepatic fibrosis by ACE inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37: e1-e6 [PMID: 19793108 DOI: 10.1111/j.1440-1681.2009.05302.x]
- 37 Vilas-Boas WW, Ribeiro-Oliveira A, Ribeiro Rda C, Vieira RL, Almeida J, Nadu AP, Simões e Silva AC, Santos RA. Effect of propranolol on the splanchnic and peripheral renin angiotensin system in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6824-6830 [PMID: 19058308 DOI: 10.3748/wjg.14.6824]
- 38 Vilas-Boas WW, Ribeiro-Oliveira A, Pereira RM, Ribeiro Rda C, Almeida J, Nadu AP, Simões e Silva AC, dos Santos RA. Relationship between angiotensin-(1-7) and angiotensin II correlates with hemodynamic changes in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2512-2519 [PMID: 19469002 DOI: 10.3748/wjg.15.2512]
- 39 Bataller R, Gäbele E, Schoonhoven R, Morris T, Lehnert M, Yang L, Brenner DA, Rippe RA. Prolonged infusion of angiotensin II into normal rats induces stellate cell activation and proinflammatory events in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G642-G651 [PMID: 12773299]
- 40 Seeland U, Schäffer A, Selejan S, Hohl M, Reil JC, Müller P, Rosenkranz S, Böhm M. Effects of AT1- and beta-adrenergic receptor antagonists on TGF-beta1-induced fibrosis in transgenic mice. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 851-859 [PMID: 19522835 DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02183.x]
- 41 El-Demerdash E, Salam OM, El-Batran SA, Abdallah HM, Shaffie NM. Inhibition of the renin-angiotensin system attenuates the development of liver fibrosis and oxidative stress in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35: 159-167 [PMID: 17900296 DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04797.x]
- 42 Kim MY, Baik SK, Park DH, Jang YO, Suk KT, Yea CJ, Lee IY, Kim JW, Kim HS, Kwon SO, Cho MY, Ko SB, Chang SJ, Um SH, Han KH. Angiotensin receptor blockers are superior to angiotensin-converting enzyme inhibitors in the suppression of hepatic fibrosis in a bile duct-ligated rat model. *J Gastroenterol* 2008; 43: 889-896 [PMID: 19012043]
- 43 Moreno M, Gonzalo T, Kok RJ, Sancho-Bru P, van Beuge M, Swart J, Prakash J, Temming K, Fondevila C, Beljaars L, Lacombe M, van der Hoeven P, Arroyo V, Poelstra K, Brenner DA, Ginès P, Bataller R. Reduction of advanced liver fibrosis by short-term targeted delivery of an angiotensin receptor blocker to hepatic stellate cells in rats. *Hepatology* 2010; 51: 942-952 [PMID: 20044807 DOI: 10.1002/hep.23419]
- 44 Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, Shirai Y, Yoshii J, Yanase K, Yamazaki M, Tsujimoto T, Kawaratani H, Akahane T, Aihara Y, Fukui H. Losartan, an angiotensin-II type 1 receptor blocker, attenuates the liver fibrosis development of non-alcoholic steatohepatitis in the rat. *BMC Res Notes* 2009; 2: 70 [PMID: 19416517 DOI: 10.1186/1756-0500-2-70]
- 45 Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Iwai M, Horiuchi M, Chayama K. Anti-fibrogenic function of angiotensin II type 2 receptor in CCl4-induced liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 658-664 [PMID: 16774739 DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.05.183]
- 46 Lubel JS, Herath CB, Tchongue J, Grace J, Jia Z, Spencer K, Casley D, Crowley P, Sievert W, Burrell LM, Angus PW. Angiotensin-(1-7), an alternative metabolite of the renin-angiotensin system, is up-regulated in human liver disease and has antifibrotic activity in the bile-duct-ligated rat. *Clin Sci (Lond)* 2009; 117: 375-386 [PMID: 19371232 DOI: 10.1042/CS20080647]
- 47 Paizis G, Tikellis C, Cooper ME, Schembri JM, Lew RA, Smith AI, Shaw T, Warner FJ, Zuilli A, Burrell LM, Angus PW. Chronic liver injury in rats and humans upregulates the novel enzyme angiotensin converting enzyme 2. *Gut* 2005; 54: 1790-1796 [PMID: 16166274 DOI: 10.1136/gut.2004.062398]
- 48 Perret-Guillaume C, Joly L, Jankowski P, Benetos A. Benefits of the RAS blockade: clinical evidence before the ONTARGET study. *J Hypertens Suppl* 2009; 27: S3-S7 [PMID: 19491620 DOI: 10.1097/01.hjh.0000354511.14086.f1]
- 49 Terui Y, Saito T, Watanabe H, Togashi H, Kawata

- S, Kamada Y, Sakuta S. Effect of angiotensin receptor antagonist on liver fibrosis in early stages of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 1022 [PMID: 12297856 DOI: 10.1053/jhep.2002.32679]
- 50 Sookoian S, Fernández MA, Castaño G. Effects of six months losartan administration on liver fibrosis in chronic hepatitis C patients: a pilot study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7560-7563 [PMID: 16437678]
- 51 Rimola A, Londoño MC, Guevara G, Bruguera M, Navasa M, Fornis X, García-Retortillo M, García-Valdecasas JC, Rodes J. Beneficial effect of angiotensin-blocking agents on graft fibrosis in hepatitis C recurrence after liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 686-691 [PMID: 15371669 DOI: 10.1097/01.TP.0000128913.09774.CE]
- 52 Corey KE, Shah N, Misdraji J, Abu Dayyeh BK, Zheng H, Bhan AK, Chung RT. The effect of angiotensin-blocking agents on liver fibrosis in patients with hepatitis C. *Liver Int* 2009; 29: 748-753 [PMID: 19220742 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.01973.x]
- 53 Yoshiji H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H. Suppression of the renin-angiotensin system attenuates vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis in murine hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol* 2002; 20: 1227-1231 [PMID: 12012003]
- 54 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102: 538-549 [PMID: 9691091]
- 55 Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383-1394 [PMID: 14597764]
- 56 Li X, Meng Y, Wu P, Zhang Z, Yang X. Angiotensin II and Aldosterone stimulating NF-kappaB and AP-1 activation in hepatic fibrosis of rat. *Regul Pept* 2007; 138: 15-25 [PMID: 16971004 DOI: 10.1016/j.regpep.2006.07.011]
- 57 Kanno K, Tazuma S, Nishioka T, Hyogo H, Chayama K. Angiotensin II participates in hepatic inflammation and fibrosis through MCP-1 expression. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 942-948 [PMID: 15906773 DOI: 10.1007/s10620-005-2669-7]
- 58 Okamoto K, Tajima H, Ohta T, Nakanuma S, Hayashi H, Nakagawara H, Onishi I, Takamura H, Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Tani T, Fujimura T, Kayahara M, Harada S, Wakayama T, Iseki S. Angiotensin II induces tumor progression and fibrosis in intrahepatic cholangiocarcinoma through an interaction with hepatic stellate cells. *Int J Oncol* 2010; 37: 1251-1259 [PMID: 20878072 DOI: 10.3892/ijo_00000776]

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. (《世界华人消化杂志》编辑部)

细胞周期素依赖性激酶、细胞周期调控与肝纤维化

吴丹, 谷秋红, 李智伟

■背景资料

目前认为肝纤维化发生的最终共同途径均是肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化。HSCs活化和增殖是肝纤维化的细胞学基础。细胞周期的调控异常与HSCs过度增殖密切相关;而细胞周期进程的实现在依赖于细胞周期的内源性调控,主要是通过磷酸化和去磷酸化为基础的周期素-周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)抑制途径实现的。

吴丹, 谷秋红, 李智伟, 中国医科大学附属盛京医院感染科辽宁省沈阳市 110022

吴丹, 讲师, 主治医师, 主要从事肝炎、肝硬化及其他传染性疾病的临床、教学及科研工作。

作者贡献分布: 本文综述由吴丹与谷秋红完成; 吴丹贡献较多; 李智伟负责审核。

通讯作者: 李智伟, 教授, 主任医师, 博士生导师, 110022, 辽宁省沈阳市铁西区滑翔路39号, 中国医科大学附属盛京医院感染科。lizw@sj-hospital.org

收稿日期: 2013-03-15 修回日期: 2013-06-03

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Cyclin-dependent kinases, control of cell cycle and hepatic fibrosis

Dan Wu, Qiu-Hong Gu, Zhi-Wei Li

Dan Wu, Qiu-Hong Gu, Zhi-Wei Li, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, Liaoning Province, China
Correspondence to: Zhi-Wei Li, Professor, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Shengjing Hospital of China Medical University, 39 Huaxiang Road, Tiexi District, Shenyang 110022, Liaoning Province, China. lizw@sj-hospital.org

Received: 2013-03-15 Revised: 2013-06-03

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

Multiple etiologies of liver disease lead to liver fibrosis by driving the activation of hepatic stellate cells (HSCs) into a myofibroblast-like phenotype that is contractile, proliferative and fibrogenic. Liver fibrosis is associated with the proliferation of HSCs, and the cell cycle of activated HSCs is abnormal. Cyclin-dependent kinases (CDKs) play essential roles in cell proliferation. However, the molecular mechanisms responsible for the abnormal proliferation of activated HSCs during hepatic fibrogenesis remain to be defined. Here we will review recent progress in understanding the associations among CDKs, the control of cell cycle and hepatic fibrosis, with an aim to reveal the potential mechanisms of hepatic fibrosis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Cyclin-dependent kinases; Control of cell cycle; Hepatic fibrosis

Wu D, Gu QH, Li ZW. Cyclin-dependent kinases, control of cell cycle and hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2158-2163 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2158.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2158>

摘要

肝纤维化是多种肝脏疾病的共同病理学结局。在肝纤维化过程中,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)发生活化,表型发生改变,使其具有收缩性、再生性,并能生成胶原成分。肝纤维化的发生发展与活化的HSCs的增殖情况有关;而细胞增殖情况则与细胞周期素依赖性激酶、细胞周期调控密切相关。但是,目前对与此相关的分子机制尚未明确。此综述就近年来与肝纤维化过程中细胞周期素依赖性激酶及细胞周期调控方面的研究加以总结,以揭示可能存在的引起肝纤维化的部分机制。

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

关键词: 细胞周期素依赖性激酶; 细胞周期调控; 肝纤维化

核心提示: 通过对周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)的结构、生物学功能、CDK与细胞周期调控,以及CDK与肝纤维化发生、发展的关系进行总结,阐明细胞周期调控及与之相关的信号转导途径对肝星状细胞激活、增殖、转化、凋亡的复制调控途径以及潜在的生物学功能,进一步了解与肝纤维化有关的分子学机制,助于寻找抗纤维化治疗的新途径。

吴丹, 谷秋红, 李智伟. 细胞周期素依赖性激酶、细胞周期调控与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2013; 21(22): 2158-2163 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2158.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2158>

0 引言

肝纤维化的发生是各种原因导致的肝细胞损伤后肝脏内胶原活动性沉积的结果。近年来的研究表明,尽管不同病因质肝病的发病机制不同,但肝纤维化发生的最终共同途径均是肝星状细

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝胆胰内科; 鲁玉辉, 副教授, 福建中医药大学中医学院

胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化. HSCs活化和增殖是肝纤维化的细胞学基础, 是各种病因肝纤维化发生的中心环节. 而细胞周期的调控异常与HSCs过度增殖密切相关. 细胞周期进程的实现依赖于细胞周期的内源性调控, 主要是通过磷酸化和去磷酸化为基础的周期素-周期素依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)抑制途径实现的. 现将CDK的结构、生物学功能及其与细胞周期调控及肝纤维化发生、发展的关系进行总结, 以助于进一步了解与肝纤维化有关的分子学机制.

1 细胞周期素依赖性激酶

真核细胞的细胞(体细胞)分裂周期(cell division cycle, Cdc)是由S期(DNA合成期)、M期(有丝分裂期)以及两个间期-G₁期(DNA合成前期)和G₂期(DNA合成后期)这4个阶段组成. 细胞周期的循环运转是受一系列磷酸化/去磷酸化事件调控, 参与调控的分子成员由一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶组成催化亚单位和属于细胞周期素家族成员的调节亚单位细胞周期素组成. 由于这些激酶需要与细胞周期素结合才具有激酶活性, 因此被称为CDK^[1,2].

目前已发现在单核真核细胞生物中, 负责细胞内蛋白质磷酸化的CDK通常只有一种, 在芽殖酵母中是CDC28, 在裂殖酵母中是CDC2^[2-4]. 在多细胞真核生物中参与细胞周期的CDK有7个成员, 即CDK1-7, 他们分别调控着细胞周期中不同阶段及细胞周期的进程^[1,2,5-8]. 目前研究已证实, 7种CDK分子彼此在DNA序列上的同源性超过40%, 其蛋白产物相对分子量为 30×10^3 - 40×10^3 , 有一个催化核心, 均属丝氨酸和苏氨酸激酶^[9]. 其中: (1)CDK1是CDC基因(CDC2)编码的蛋白, 相对分子量为 34×10^3 , 是一种丝氨酸蛋白激酶, 主要与cyclinA和B结合构成细胞M期促进因子, 推动细胞进入M期; (2)CDK2的DNA全长879个碱基, 编码298个氨基酸的蛋白质, 可分别与周期素E、周期素A和周期素D结合, 分别在G₁/S期、S期和G₂期发挥作用; (3)CDK4基因位于12q13-14, 编码分子量为 33×10^3 kDa的蛋白质, CDK6基因定位于7q21-22, 编码分子量为 38×10^3 kDa的蛋白质, 二者结构及功能相似, 是G₁期运行的重要分子, 可与周期素D结合, 通过周期素D-CDK4/CDK6通路调控细胞越过G₁期限制点; (4)CDK5主要存在于脑内. CDK5蛋白由292个氨基酸组成, 相对分子量为分子量为 $33 \times$

10^3 , 与人CDC2和CDK2的同源性分别为58%和62%; (5)CDK7能与周期素H相互作用, 结合形成活性复合物, 也被称为CDK活化激酶, 他能够使细胞周期调控中的所有主要的CDK磷酸化.

2 CDK与细胞周期调控

目前认为, CDK在细胞周期调控网络中处于中心地位, 主要生物学作用是调控细胞周期的不同时期, 从G₁、S、G₂到M期, 完成循环^[10-12]. CDK激活有赖于与cyclin的结合和其分子中某些氨基酸残基的磷酸化状态. 含催化亚基的CDK需要cyclin提供调节亚基才能显示活性, 只有cyclin浓度升高达到阈值时, 才能与相应的CDK结合形成cyclin-CDK复合体, 这时CDK才能被激活; CDK分子中含有活化部位和抑制部位, 只有前者处于磷酸化而后者处于去磷酸化状态, CDK才显活性^[13]. CDK的活性还受其上游的CDK活化激酶(CDK-activating kinase, CAK)的影响. CAK正是通过使CDK分子中的活化部位的氨基酸残基磷酸化来参与调控CDK的活性的^[14].

细胞周期的不同时期, 会有不同CDK发生活化, 来调控细胞周期的运行. 活化的CDK呈现出蛋白激酶的活性, 使不同的底物蛋白磷酸化, 从而启动或调控细胞周期的主要事件. CDK激活的底物主要有视网膜神经胶质瘤蛋白、抑癌基因p107、p103等, 具有促进细胞周期时相转变、启动DNA合成、运行细胞分裂、推进细胞周期运行的重要功能^[9,11,12].

研究发现, CDK1是及其调节亚基-周期素构成的细胞M期促进因子, 推动细胞进入M期, 在细胞周期的调控中其决定性作用. CDC2是细胞中唯一能够在细胞周期由G₁期→S期和由G₂期→M期转变中的两个调控点均起作用的基因. CDK1激酶的激活是细胞分裂、增殖的信号, 有启动DNA复制和诱导细胞有丝分裂的双重作用. 有研究发现, 对于某些物种, CDK1是其生存所必需的CDK分子^[15-18].

CDK2可分别与周期素E、周期素A和周期素D结合, 分别在G₁/S期、S期和G₂期发挥作用. CDK2是启动DNA复制的关键激酶, 也是G₂期运行的必要条件^[16,19-23]. CDK4和CDK6是G₁期运行的重要分子, 可与周期素D结合, 通过周期素D-CDK4/CDK6通路调控细胞越过G₁期限制点^[24-27]. 既往研究已证实, 尽管CDK2/CDK4与CDK6不是小鼠细胞所必需的, 但他们对于某些

■研究前沿

现在已发现很多肿瘤都存在CDK表达异常. 在肿瘤中往往存在一种或多种CDK的扩增和过表达现象. 相对而言, 我们对肝纤维化过程中CDK的基因及其表达产物生物学作用的了解还比较少, 对于与HSCs增殖相关的准确机制目前还不十分明确.

■相关报道

目前CDK及细胞周期调控方面的研究大多针对于肿瘤的发生机制及治疗,肝纤维化的研究涉及到CDK及细胞调控方面的还比较少,希望本篇综述能在肝纤维化机制及治疗方面带给我们更多提示。

特殊类型的细胞还是非常重要的。例如,CDK2参与调控生殖细胞的增殖、CDK4参与调控胰岛 β 细胞和脑垂体泌乳细胞的增殖;而CDK6则与血液细胞的增殖密切相关^[26-31]。

CDK5主要存在于脑内,可与Cdc激酶有高度同源性,也可以与周期素D1、D2结合,但结合后没有激酶活性,与Cdc也没有关系,但参与神经系统发育^[32]。

CDK7与周期素H相互作用结合所形成的CDK活化激酶,能够使细胞周期调控中的所有主要的CDK-周期素底物磷酸化而被激活,能引起的某一种CDK周期底物的磷酸化,与周期素的时相起伏相平行。已有实验结果证实,细胞周期阻滞以及凋亡程度与CDK7的蛋白表达水平有一定的关系^[33,34]。

CDK的灭活,除了泛素介导的蛋白水解体系外,CDI即CDK抑制物(CDK inhibitor, CDI)也可特异性抑制CDK的活性。哺乳类动物的CDI主要包括Ink4和Kip或称Cip或Waf1。前者是一组CDK4的抑制蛋白,其成员包括P16Ink4a、P15Ink4b、P18Ink4c、P19Ink4d,可特异性地与CDK4/6结合,阻止其与cyclin再结合,抑制其激酶活性,在S期达高峰,是G₁/S限制点负调控机制的重要组成部分。后者成员包括P21Kip1、P27Kip1、P57Kip2,他们可特异性抑制几种cyclinD/CDK的蛋白激酶活性,主要调控细胞周期确保遗传物质精确地传递给下一代^[33,35,36]。

细胞要想在细胞周期过程中通过G₁/S检查点,CDK2、CDK4和CDK6必须发生活化。CDK4和CDK6与细胞周期素D结合后可以被活化,而CDK2则需要与细胞周期素E结合才能被活化。CDK4、CDK6和细胞周期素D的表达在G₁期早期就开始增加,并对G₁期晚期CDK2和周期素E的合成进行调控。Rb蛋白在G₁期可被活化的CDK持续磷酸化,并释放核转录因子E2F,这就使细胞对DNA合成的抑制作用消失,DNA合成启动,促进细胞由G₁期向S期转化^[2,11,14,18,22]。

3 肝纤维化过程中的HSCs细胞周期调控

肝纤维化是多种肝脏疾病的共同病理学结局^[37]。目前认为,肝纤维化发生的中心事件是:由损伤引起的HSCs激活并转化为肌成纤维样细胞,通过旁分泌与自分泌作用,使HSCs增殖,合成大量的细胞外基质。细胞外基质的分泌增加,降解减少,以致其在肝脏内大量沉积,最终导致肝纤维

化。Yuan等^[38]将这一过程归纳为4个连续又部分重叠的阶段:(1)炎症反应的发生和HSCs激活启动;(2)局部ECM的改变;(3)损伤部位肌成纤维细胞的迁移、聚集和增殖,随后出现血管的生成和上皮增殖;(4)损伤愈合后瘢痕的收缩。

在肝纤维化发生、发展的过程中,活化的HSCs发生了角色转换,这也是肝纤维化得以不断进展的关键步骤。活化的HSCs不再是正常肝脏中的贮脂细胞,而成为了肝脏中细胞外基质成分的主要细胞来源^[39-45]。除了在功能上的改变,在肝纤维化过程中,HSCs还出现大量增殖的情况,以致其细胞数量明显增加,这意味着其细胞周期的调控出现了异常;也可以说,在HSCs活化后,调节其细胞周期运行的相关的cyclin、CDK及CDI可能在表达及功能等方面出现了异常^[42,44-46]。

目前认为,活化的HSCs出现了不同于正常生理状态下的增殖异常活跃的状态。有研究表明,受到乙醛刺激的HSCs增殖活跃,其细胞周期素D1与CDK4的mRNA的表达都有所增加,而有丝分裂原信号调节激酶-1的特异性抑制物能够明显抑制HSCs内这两种mRNA的表达,同时HSCs的增殖被明显抑制了,说明cyclinD1与CDK4参与了HSCs的增殖,而ERK通路可能参与了对cyclinD1与CDK4 mRNA表达的调节^[47,48]。而在对小鼠肝纤维化的研究中发现, cyclinE参与调控小鼠HSCs的增殖,对小鼠肝纤维化的形成非常重要^[49]。

而在对某些具有转录因子抑制作用的药物的研究中(如curcumin)发现,这类药物可以抑制HSCs表达cyclinD1,而HSCs的增殖也被抑制,并发生凋亡^[50-52]。还有一些药物,如川芎嗪可以通过对体外HSCs内ERK/P53信号转导的调节来阻止G₀/G₁期细胞进入细胞周期的下一时相,并能诱导HSCs的凋亡^[53]。而某些CDK的抑制物则与人非肿大性肝炎或肝硬化向肝细胞癌转化有关^[54]。此外还有研究发现,多种肽类及信号转导分子,诸如核因子- κ B、转化生长因子- β 、肿瘤坏死因子- α 等都参与了对HSCs增殖的调控^[55-57]。

4 结论

我们已经知道,细胞周期的调控主要是通过CDK的一系列磷酸化和去磷酸化反应来完成的。细胞周期素能使CDK发生磷酸化,在这一过程起到正调节作用,而CKI则使CDK去磷酸化,抑制CDK的活性。因此,可以说细胞周期的内源

性调控的核心机制是CDK活性的表达与调控。*CDK*基因及其表达产物的异常改变可使细胞出现增殖过度。而目前对于因*CDK*基因及其表达产物异常的研究多数都致力于肿瘤发生、发展等研究领域, 现已发现很多肿瘤都存在CDK表达异常, 在肿瘤中往往存在一种或多种CDK的扩增和过表达现象。相对而言, 我们对肝纤维化过程中*CDK*基因及其表达产物生物学作用的了解还比较少, 对于与HSCs增殖相关的准确机制目前还不十分明确, 相关的研究也比较少, 而HSCs活化、增殖或凋亡是肝纤维化发生、发展或恢复的决定因素, 进一步阐明细胞周期调控及与之相关的信号转导途径对HSCs激活、增殖、转化、凋亡的调控以及潜在的生物学功能将有助于寻找抗纤维化治疗的新途径。

5 参考文献

- 1 Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 153-166 [PMID: 19238148 DOI: 10.1038/nrc2602]
- 2 Merrick KA, Fisher RP. A virtual cycle: theory and experiment converge on the exit from mitosis. *F1000 Biol Rep* 2010; 2: 33 [PMID: 20948801 DOI: 10.3410/B2-33]
- 3 Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 1974; 183: 46-51 [PMID: 4587263 DOI: 10.1126/science.183.4120.46]
- 4 Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 1976; 146: 167-178 [PMID: 958201 DOI: 10.1007/BF00268085]
- 5 Nurse P. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (nobel lecture). *ChemBiochem* 2002; 3: 596-603 [PMID: 12324993 DOI: 10.1002/1439-7633(20020703)3:7<596::AID-CBIC596>3.0.CO;2-U]
- 6 Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004; 116: 221-234 [PMID: 14744433 DOI: 10.1016/S0092-8647(03)01080-8]
- 7 Gong L, Jiang C, Zhang B, Hu H, Wang W, Liu X. Adenovirus-mediated expression of both antisense ornithine decarboxylase and s-adenosylmethionine decarboxylase induces G1 arrest in HT-29 cells. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 730-736 [PMID: 17129409]
- 8 Larochelle S, Merrick KA, Terret ME, Wohlbold L, Barboza NM, Zhang C, Shokat KM, Jallepalli PV, Fisher RP. Requirements for Cdk7 in the assembly of Cdk1/cyclin B and activation of Cdk2 revealed by chemical genetics in human cells. *Mol Cell* 2007; 25: 839-850 [PMID: 17386261 DOI: 10.1016/j.molcel.2007.02.003]
- 9 Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602: 73-87 [PMID: 11960696 DOI: 10.1016/S0304-419X(02)00037-9]
- 10 Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-348 [PMID: 11357141 DOI: 10.1038/35077213]
- 11 Wohlbold L, Fisher RP. Behind the wheel and under the hood: functions of cyclin-dependent kinases in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2009; 8: 1018-1024 [PMID: 19464967 DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.04.009]
- 12 Yata K, Esashi F. Dual role of CDKs in DNA repair: to be, or not to be. *DNA Repair (Amst)* 2009; 8: 6-18 [PMID: 18832049 DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.09.002]
- 13 Buratowski S. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell* 2009; 36: 541-546 [PMID: 19941815 DOI: 10.1016/j.molcel.2009.10.019]
- 14 Larochelle S, Amat R, Glover-Cutter K, Sansó M, Zhang C, Allen JJ, Shokat KM, Bentley DL, Fisher RP. Cyclin-dependent kinase control of the initiation-to-elongation switch of RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 1108-1115 [PMID: 23064645 DOI: 10.1038/nsmb.2399]
- 15 Santamaria D, Barrière C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, Newton K, Cáceres JF, Dubus P, Malumbres M, Barbacid M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 2007; 448: 811-815 [PMID: 17700700 DOI: 10.1038/nature06046]
- 16 Merrick KA, Fisher RP. Putting one step before the other: distinct activation pathways for Cdk1 and Cdk2 bring order to the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 2010; 9: 706-714 [PMID: 20139727 DOI: 10.4161/cc.9.4.10732]
- 17 Katsuno Y, Suzuki A, Sugimura K, Okumura K, Zineldeen DH, Shimada M, Niida H, Mizuno T, Hanaoka F, Nakanishi M. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3184-3189 [PMID: 19221029 DOI: 10.1073/pnas.0809350106]
- 18 Merrick KA, Fisher RP. Why minimal is not optimal: driving the mammalian cell cycle--and drug discovery--with a physiologic CDK control network. *Cell Cycle* 2012; 11: 2600-2605 [PMID: 22732498 DOI: 10.4161/cc.20758]
- 19 Jablonska B, Aguirre A, Vandenbosch R, Belachew S, Berthet C, Kaldis P, Gallo V. Cdk2 is critical for proliferation and self-renewal of neural progenitor cells in the adult subventricular zone. *J Cell Biol* 2007; 179: 1231-1245 [PMID: 18086919 DOI: 10.1083/jcb.200702031]
- 20 Li X, Kim JW, Grønborg M, Urlaub H, Lane MD, Tang QQ. Role of cdk2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBPβ during adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 11597-11602 [PMID: 17601773 DOI: 10.1073/pnas.0703771104]
- 21 Neganova I, Zhang X, Atkinson S, Lako M. Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene* 2009; 28: 20-30 [PMID: 18806832 DOI: 10.1038/ONC.2008.358.Epub]
- 22 Chung JH, Bunz F. Cdk2 is required for p53-independent G2/M checkpoint control. *PLoS Genet* 2010; 6: e1000863 [PMID: 20195506 DOI: 10.1371/journal.pgen.1000863]
- 23 Wohlbold L, Merrick KA, De S, Amat R, Kim JH, Larochelle S, Allen JJ, Zhang C, Shokat KM, Petrini JH, Fisher RP. Chemical genetics reveals a specific requirement for Cdk2 activity in the DNA damage response and identifies Nbs1 as a Cdk2 substrate in human cells. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002935 [PMID: 22927831 DOI: 10.1371/journal.pgen.1002935]
- 24 Day PJ, Cleasby A, Tickle IJ, O'Reilly M, Coyle JE,

■创新盘点

CDK及其抑制剂的作用与肿瘤细胞增殖有密切关系, 但他与肝纤维化关系的研究较少。

■同行评价

CDK及其抑制剂的作用与肿瘤细胞增殖有密切关系, CDK抑制剂是近年研究热点, 但他与肝纤维化的研究较少, 本文对此进行探讨有一定的创新性和研究价值。

- 25 Takaki T, Echalié A, Brown NR, Hunt T, Endicott JA, Noble ME. The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 4171-4176 [PMID: 19237555 DOI: 10.1073/pnas.0809674106]
- 26 Bockstaele L, Bisteau X, Paternot S, Roger PP. Differential regulation of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK6, evidence that CDK4 might not be activated by CDK7, and design of a CDK6 activating mutation. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 4188-4200 [PMID: 19487459 DOI: 10.1128/MCB.01823-08]
- 27 Merrick KA, Wohlbald L, Zhang C, Allen JJ, Horiuchi D, Huskey NE, Goga A, Shokat KM, Fisher RP. Switching Cdk2 on or off with small molecules to reveal requirements in human cell proliferation. *Mol Cell* 2011; 42: 624-636 [PMID: 21658603 DOI: 10.1016/j.molcel.2011.03.031]
- 28 Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 2003; 13: 1775-1785 [PMID: 14561402 DOI: 10.1016/j.cub.2003.09.024]
- 29 Malumbres M, Sotillo R, Santamaría D, Galán J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 2004; 118: 493-504 [PMID: 15315761 DOI: 10.1016/j.cell.2004.08.002]
- 30 Martín J, Hunt SL, Dubus P, Sotillo R, Néhémé-Pelluard F, Magnuson MA, Parlow AF, Malumbres M, Ortega S, Barbacid M. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* 2003; 22: 5261-5269 [PMID: 12917627 DOI: 10.1038/sj.onc.1206506]
- 31 Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martín A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 2003; 35: 25-31 [PMID: 12923533 DOI: 10.1038/ng1232]
- 32 Connell-Crowley L, Le Gall M, Vo DJ, Giniger E. The cyclin-dependent kinase Cdk5 controls multiple aspects of axon patterning in vivo. *Curr Biol* 2000; 10: 599-602 [PMID: 10837225 DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00487-5]
- 33 Ali S, Heathcote DA, Kroll SH, Jogalekar AS, Scheiper B, Patel H, Brackow J, Siwicki A, Fuchter MJ, Periyasamy M, Tolhurst RS, Kanneganti SK, Snyder JP, Liotta DC, Aboagye EO, Barrett AG, Coombes RC. The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows anti-tumor activity. *Cancer Res* 2009; 69: 6208-6215 [PMID: 19638587 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0301]
- 34 Ganuza M, Santamaría D. Cdk7: open questions beyond the prevailing model. *Cell Cycle* 2012; 11: 3519-3520 [PMID: 22935708 DOI: 10.4161/cc.21888]
- 35 Ganuza M, Sáiz-Ladera C, Cañamero M, Gómez G, Schneider R, Blasco MA, Pisano D, Paramio JM, Santamaría D, Barbacid M. Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *EMBO J* 2012; 31: 2498-2510 [PMID: 22505032 DOI: 10.1038/emboj.2012.94]
- 36 Ray A, James MK, Larochelle S, Fisher RP, Blain SW. p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 986-999 [PMID: 19075005 DOI: 10.1128/MCB.00898-08]
- 37 Lotersztajn S, Julien B, Teixeira-Clerc F, Grenard P, Mallat A. Hepatic fibrosis: molecular mechanisms and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 605-628 [PMID: 15471534 DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095906]
- 38 Yuan LP, Chen FH, Ling L, Bo H, Chen ZW, Li F, Zhong MM, Xia LJ. Protective effects of total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60: 1393-1402 [PMID: 18812033 DOI: 10.1211/jpp.60.10.0016]
- 39 Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998; 292: 447-452 [PMID: 9582401 DOI: 10.1007/s004410051073]
- 40 Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, Temming K, van Loenen AM, Reker-Smit C, Meijer DK, Lacombe M, Opdam F, Kéri G, Orfi L, Poelstra K, Kok RJ. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 856-865 [PMID: 17369283 DOI: 10.1124/jpet.106.114496]
- 41 Xu XB, He ZP, Liang ZQ, Leng XS. [Obstruction of TGF-beta1 signal transduction by anti-Smad4 gene can therapy experimental liver fibrosis in the rat]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 263-266 [PMID: 15161498]
- 42 Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S79-S84 [PMID: 17567474 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04659.x]
- 43 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105 [PMID: 16265071 DOI: 10.1038/ncgasthep0055]
- 44 Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S73-S78 [PMID: 17567473 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04658.x]
- 45 Rockey DC. Antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 95-107 [PMID: 15704042 DOI: 10.1016/S1542-3565(04)00445-8]
- 46 Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 30: 196-202 [PMID: 10385656 DOI: 10/S0270913999003262]
- 47 Jiang MD, Zheng SM, Xu H, Zeng WZ, Zhang Y, Sun HP, Wang YX, Qin JP, Wu XL. An experimental study of extracellular signal-regulated kinase and its interventional treatments in hepatic fibrosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 51-57 [PMID: 18234639]
- 48 Ussar S, Voss T. MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition. *J Biol Chem* 2004; 279: 43861-43869 [PMID: 15284233 DOI: 10.1074/jbc.M406240200]
- 49 Nevzorova YA, Bangen JM, Hu W, Haas U,

- Weiskirchen R, Gassler N, Huss S, Tacke F, Sicinski P, Trautwein C, Liedtke C. Cyclin E1 controls proliferation of hepatic stellate cells and is essential for liver fibrogenesis in mice. *Hepatology* 2012; 56: 1140-1149 [PMID: 22454377 DOI: 10.1002/hep.25736]
- 50 Cheng Y, Ping J, Xu LM. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 794-801 [PMID: 17531121]
- 51 Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A. Curcumin protects the rat liver from CCl4-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 399-409 [PMID: 18006644 DOI: 10.1124/mol.107.039818]
- 52 Yao QY, Xu BL, Wang JY, Liu HC, Zhang SC, Tu CT. Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor-beta1 signalling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12: 156 [PMID: 22978413 DOI: 10.1186/1472-6882-12-156]
- 53 Zhang F, Kong DS, Zhang ZL, Lei N, Zhu XJ, Zhang XP, Chen L, Lu Y, Zheng SZ. Tetramethylpyrazine induces G0/G1 cell cycle arrest and stimulates mitochondrial-mediated and caspase-dependent apoptosis through modulating ERK/p53 signaling in hepatic stellate cells in vitro. *Apoptosis* 2013; 18: 135-149 [PMID: 23247439 DOI: 10.1007/s10495-012-0791-5]
- 54 Wang L, Sun L, Huang J, Jiang M. Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3) novel cell cycle computational network between human non-malignancy associated hepatitis/cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) transformation. *Cell Prolif* 2011; 44: 291-299 [PMID: 21535270 DOI: 10.1111/j.1365-2184.2011.00752.x]
- 55 Elsharkawy AM, Wright MC, Hay RT, Arthur MJ, Hughes T, Bahr MJ, Degitz K, Mann DA. Persistent activation of nuclear factor-kappaB in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IkappaB family proteins. *Hepatology* 1999; 30: 761-769 [PMID: 10462383 DOI: 10/S0270913999004139]
- 56 Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998; 18: 2-13 [PMID: 9548261 DOI: 10.111/.1600-0676.1998.tb00120.x]
- 57 Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 33: 49-58 [PMID: 10905586 DOI: 10.1016/S0168-8278(00)80159-2]

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2012-12-07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。

尾加压素在肝硬化中的研究进展

梁冬雨, 侯彦强, 姜晓丽, 叶长根

■背景资料

肝硬化是一种常见的慢性肝病, 发病率和病死率很高。尾加压素(urotensin II, U II)是新发现的一种血管活性肽, 研究发现U II在肝硬化患者血浆和组织中表达升高, 提示U II可能与肝硬化的发病有关。

梁冬雨, 侯彦强, 姜晓丽, 叶长根, 上海市交通大学附属第一人民医院松江分院, 上海市松江区中心医院检验科中心实验室 上海市 201600

梁冬雨, 初级技师, 主要从事肝病的研究。

作者贡献分布: 本文综述由梁冬雨、姜晓丽及叶长根完成; 侯彦强负责审校。

通讯作者: 侯彦强, 副主任检验师, 201600, 上海市松江区中山中路748号, 上海市松江区中心医院检验科中心实验室。

houyanqiang@aliyun.com

电话: 021-67720472

收稿日期: 2013-04-07 修回日期: 2013-06-27

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Progress in understanding role of urotensin II in hepatic cirrhosis

Dong-Yu Liang, Yan-Qiang Hou, Xiao-Li Lou, Chang-Gen Ye

Dong-Yu Liang, Yan-Qiang Hou, Xiao-Li Lou, Chang-Gen Ye, Department of Central Laboratory, Songjiang Branch of Affiliated First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201600, China

Correspondence to: Yan-Qiang Hou, Associate Chief Technician, Department of Central Laboratory, Songjiang Branch of Affiliated First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, 748 Zhongshanzhong Road, Songjiang District, Shanghai 201600, China. houyanqiang@aliyun.com

Received: 2013-04-07 Revised: 2013-06-27

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

Urotensin II (U II) is a potent vasoactive substance that can result in vasoactive response through interaction with its specific orphan G-protein-coupled receptor GPR-14. In addition to the role of vasoactivity, U II can promote mitosis and fibrosis. The vascular role of U II is to some degree both species- and disease-specific. Studies have found that plasma levels of U II are elevated in patients with cirrhosis, but the relationship between plasma levels of U II and the development of chronic liver disease and portal hypertension has yet to be fully elucidated. This review focuses on the potential relevance of U II as vasoactive substance in chronic liver disease and the site where U II is overproduced.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Urotensin II; Hepatic cirrhosis; Vasoactive effect

Liang DY, Hou YQ, Lou XL, Ye CG. Progress in understanding role of urotensin II in hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2164-2168
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2164.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2164>

摘要

尾加压素(urotensin II, U II)是一种有效的血管活性物质。U II通过与其特异性孤儿G-蛋白耦联受体GPR-14结合发挥血管活性作用。U II的血管活性作用具有种族特异性和疾病特异性。随着对U II进一步深入的研究, 发现其除具有血管活性作用以外, 还具有促有丝分裂和促纤维化作用。有研究发现U II在肝硬化患者血浆中表达升高, 但其在慢性肝病以及门脉高压发生发展中的作用机制尚不明确。这篇综述主要介绍了U II作为血管活性物质在慢性肝病发生发展中的潜在作用以及探讨肝脏中表达U II的位点。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 尾加压素; 肝硬化; 血管活性效应

核心提示: 尾加压素在肝硬化患者中表达升高, 提示其在慢性肝病发生发展中的潜在作用, 其受体拮抗剂的研究可能为肝硬化门脉高压症的治疗提供新的思路。

梁冬雨, 侯彦强, 姜晓丽, 叶长根. 尾加压素在肝硬化中的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2164-2168 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2164.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2164>

0 引言

肝硬化是一种常见的慢性肝病, 发病率和病死率很高, 目前认为其形成的机制主要是肝内阻力增加和门脉血流量增多, 但多种因素均可能参与其发病过程^[1,2]。近年来, 不断发现新的因素参与了肝硬化的发生、发展。尾加压素(urotensin II, U II)是一种有效的血管活性肽, U II通过

■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科; 庄林, 主任医师, 昆明市第三人民医院肝病科

与其特异性孤儿G-蛋白耦联受体GPR-14结合发挥血管活性作用^[3,4]。最近研究发现U II在肝硬化患者血浆和组织中表达升高,提示U II可能与肝硬化的发生、发展及预后密切相关^[5]。U II拮抗剂的研究也许可揭示肝硬化的发病机制,为肝硬化的治疗提供新的方向。

1 U II 与生长抑素

上消化道出血是肝硬化门脉高压症最严重的并发症之一,严重威胁着肝硬化患者的生命。生长抑素(somatostatin, SST)及其类似物奥曲肽(octreotide, OCT)是目前治疗门脉高压引起上消化道出血的有效药物,然而SST和OCT降低门静脉压力控制静脉曲张出血的机制尚未明确,众多研究认为, SST和OCT通过抑制内脏血管收缩来降低门静脉压力^[6,7]。人尾加压素 II(human urotensin II, hU II)是一种由11个氨基酸组成的多肽,一级结构为Glu-Thr-Pro-Asp-cyclo[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val,是迄今所知体内最强的缩血管肽,其C末端高度保守的六肽结构Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys与SST和OCT非常相似^[8]。U II通过与其特异性受体GPR14结合发挥血管活性作用,研究发现SST和OCT在高浓度条件下也能竞争结合GPR14受体,抑制U II的缩血管活性^[9]。Pomier-Layrargues等^[10]通过尾静脉注射OCT,发现其能对抗U II引起的大鼠主动脉环的收缩,而且这种现象在肝硬化老鼠模型中更为明显,这一发现说明OCT可以通过与U II受体结合抑制U II引起的缩血管作用。另外, U II除具有缩血管活性外,对大鼠肠系膜血管、人腹部阻力血管具有舒张作用^[11,12]。肝硬化门脉高压发生上消化道出血的原因之一是由于肠系膜血管舒张,导致内脏血流增加^[13]。因此,我们推测奥曲肽治疗上消化道出血的机制可能是通过竞争结合U II受体,从而拮抗U II的血管活性作用。U II的发现及研究为肝硬化门脉高压的发生发展机制提供新的视野。U II拮抗剂在治疗肝硬化方面的研究目前已成为国内外的热点,希望在不久的将来, U II受体拮抗剂将为这种疾病的治疗提供新的选择。

2 U II 及其受体在肝脏中的表达

在以往的研究中,由于所选患者不同,方法和敏感度不同, U II及其受体在肝脏中的表达量有所差异,但总的来说,在正常情况下, U II及其受体在肝脏中呈低水平表达^[14-18]。Charles等^[19]通过同

时收集已麻醉羊的动脉和静脉样本来检测U II在肝脏中的分布,结果发现肝静脉中U II表达量明显高于同时收集的颈动脉标本,这说明U II可能来源于肝脏,当然也不排除U II可能来自内脏循环或门静脉系统。为了进一步证明U II的来源, Heller等^[20]检测了30例经颈静脉肝内门体支架分流术肝硬化患者肝静脉和门静脉中U II的表达水平,结果发现U II在肝静脉中表达显著高于门静脉,由此推断U II是通过肝脏释放出来的。有学者研究发现在胆管结扎的肝硬化大鼠肝脏中U II/UT的表达显著高于正常大鼠,免疫组织化学染色显示U II、UT在肝脏表达定位于动静脉及胆管的内皮细胞、库普弗细胞,而这些细胞在肝硬化门脉高压中发挥重要作用, U II/UT可能通过调节这些细胞而在肝硬化门脉高压中发挥重要作用^[21,22]。

3 U II /UT在慢性肝病患者中的表达

血浆U II水平在多种疾病中表达升高,如高血压、糖尿病、肾衰竭等^[23-29],但目前对于U II是否通过改变体内平衡参与这些疾病的发生发展及临床意义目前尚不完全清楚。肝硬化患者的主要特征之一是存在着明显的高动力循环状态,表现为“血管阻力下降,血压降低,心输出量增加,局部脏器血流增加及明显的门体分流”。Heller等^[20]发现肝硬化门脉高压患者肝脏U II/UT基因水平较正常人群明显升高,血U II/UT水平也显著升高,然而由于患者群体多样化及其他潜在的影响因素如肝肾综合征,血流动力不稳定等,这一发现无法说明U II在肝硬化发病中的作用。为了进一步揭示U II/UT系统在肝硬化门脉高压发生发展中的作用, Kemp等^[30]收集了80例经过血流动力学评估的肝硬化患者及年龄相匹配的健康人的血清, ELISA法检测了U II的表达水平,结果显示肝硬化患者血清中U II表达水平较健康人显著升高,且按Child-Pugh分级评分系统评估后,发现U II水平与疾病的严重程度呈正相关^[31]。但Kemp等^[32]的研究发现U II在股静脉中的表达显著高于肝静脉,这与Heller的研究结果不一致,这种差异的可能原因是两组患者的疾病程度不同, Kemp等^[30]组收集的60%是Child-Pugh分级A级的患者,而Heller组收集的60%是Child-Pugh分级C级的患者,这也间接说明了只有在疾病严重的情况下,肝脏才过表达U II。

U II及其受体在人体多种器官组织中均有表达^[33-37],但通常认为循环中的U II多来自于心

■研究前沿

肝硬化及其并发症严重危害着人类健康,目前对其发病机制尚不完全明确,多种因素可能参与其发病过程,近年来,不断发现新的因素参与肝硬化的发病,因此揭示肝硬化的发病机制及寻找新的治疗肝硬化的药物是目前亟待解决的问题。

■相关报道

目前认为肝硬化的发生机制是肝内阻力增加和门脉血流量增多。U II具有强血管活性。Leifeld等在2010年发现U II在肝硬化患者血浆和组织中表达升高。

■创新盘点

本文分别通过U II与生长抑素、U II及其受体在肝脏中的表达、U II/UT在慢性肝病患者的表达和U II受体拮抗剂的全面阐述,完整、系统、较全面的介绍了U II在肝硬化中的研究。

脏组织和肾组织^[38]。肝硬化门脉高压的高动力循环对全身器官的功能改变有显著影响,其中对心脏有很大的影响,而血浆U II水平在缺血及非缺血性心衰中均表达升高^[39,40]。另外,肝硬化尤其是晚期肝硬化患者常由于肾素血管紧张素醛固酮的激活,引起钠水储留,发生功能性肾衰竭。在动物体内的研究表明,U II可以作为一种渗透调节剂引起钠水储留,应用U II受体拮抗剂urantide可引起大鼠肾小球滤过率增加,尿量增加以及尿钠排出增多,这些结果与Heller和Kemp的研究结果一致,肝硬化伴腹水患者血浆U II水平明显高于无腹水的肝硬化患者^[41]。当然,肝硬化患者U II升高的机制也可能是由于肝清除减少所致,但Kemp通过在一个比较恒定的浓度范围内比较外周血和肝内血U II的表达发现肝硬化时U II的升高与肝清除无关。总之,目前研究提示肝硬化门脉高压时U II/UT表达升高,但升高的具体机制尚不明确。

4 U II受体拮抗剂

U II受体拮抗剂的研究对理解U II/UT在各种疾病中的生理作用及揭示其治疗潜力方面非常重要,如血管紧张素II受体拮抗剂和内皮素受体拮抗剂能用于治疗门脉高压。U II受体拮抗剂的研究可能为治疗该病提供新的选择。

Behm等^[42]在2002年首次发现生长激素释放抑制因子(somatostatin, SST)拮抗剂SB-710411, 10 μmol/L的SB-710411能显著地抑制hU II引起的离体大鼠主动脉的收缩反应。随后Patacchini等^[43]又发现一种新的hU II受体拮抗剂-Urantide,在离体的大鼠主动脉研究中发现,该拮抗剂可以与hU II受体高选择性结合,极低水平即可产生激动效能,其拮抗hU II的作用是其他任何化学物的50-100倍。Palosuran(ACT-058362)是新合成的一种非肽类U II受体拮抗剂,具有高度特异性,Clozel等^[44]发现其能以剂量依赖的方式拮抗U II引起的兔主动脉环收缩,且与hU II受体的结合能力明显高于兔U II受体。

U II受体拮抗剂在疾病中的治疗作用已成为国内外研究的热点,叶向或等^[45]在糖尿病大鼠动物模型中,通过比较对照组和Palosuran治疗组视网膜周细胞和基底膜的改变发现,Palosuran能有效抑制糖尿病的早期微血管病变。Clozel等^[46]发现U II受体拮抗剂的应用可以提高糖尿病小鼠生存率,增加胰岛素分泌,延缓血糖、糖化血红蛋白和血脂的升高,增加肾血流,延缓蛋白尿

和肾损伤的发展。在对肾脏的研究中发现,Palosuran可以选择性舒张肾脏血管,在增加缺血后肾血流量的同时不合并任何全身血管舒张效应,静脉注射Palosuran治疗缺血性急性肾衰竭大鼠,可明显减轻肾小球和肾小管的结构损伤及功能障碍^[47,48]。在对肺损伤的研究中,赖荣德等^[49]发现U II受体拮抗剂能减轻肺泡细胞损害,增多肺泡合成表面活性物质,减轻肺泡萎陷,改善透氧血流值,提高氧合功能,表现出对的肺保护作用。

关于UT拮抗剂在肝硬化门脉高压症中的作用目前也有一些研究,Trebicka等^[50]在肝硬化大鼠模型中研究发现,UT拮抗剂SB-710411预防给药可以改善肝硬化大鼠的高动力循环状态,降低肝硬化大鼠的肝纤维化评分、肝组织中羟脯氨酸含量、血肝纤维化指标,下调大鼠肝脏I型胶原、III型胶原以及TIMP-1 mRNA的表达,改善肝脏纤维化。Trebecka等^[50]发现Palosuran可以增加胆管结扎肝硬化大鼠的内脏血管阻力,降低门脉血流,而降低门脉压力。此外Palosuran可以增加胆管结扎肝硬化大鼠的肾小球率过滤,促进水钠排泄。上述研究提示UT拮抗剂可以降低肝硬化门脉高压患者的门脉压力,预防肝纤维化,促进水钠排泄,在肝硬化门脉高压症方面具有潜在的治疗作用。

5 结论

U II及其受体UT在肝硬化门脉中的表达升高,且与疾病的严重程度和并发症如腹水密切相关,但U II/UT系统在肝硬化门脉症发生发展中的具体作用机制尚不清楚。U II受体拮抗剂的应用可以改善门脉高压的血流动力学紊乱,预防肝纤维化,提示U II受体拮抗剂可能成为防治肝硬化门脉高压的重要工具,进一步研究U II在肝硬化门脉高压中的作用,可为肝硬化门脉高压症的治疗提供新的思路。

6 参考文献

- 1 Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2013; 144: 512-527 [PMID: 23313965 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.002]
- 2 Seo YS, Shah VH. The role of gut-liver axis in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension. *Clin Mol Hepatol* 2012; 18: 337-346 [PMID: 23323248 DOI: 10.3350/cmh.2012.18.4.337]
- 3 Romanova EV, Sasaki K, Alexeeva V, Vilim FS, Jing J, Richmond TA, Weiss KR, Sweedler JV. Urotensin II in invertebrates: from structure to function in *Aplysia californica*. *PLoS One* 2012; 7: e48764 [PMID: 23313965]

■应用要点

U II是一种有效的血管活性肽,该文章阐述了U II可能与肝硬化的发生、发展及预后密切相关。U II拮抗剂的研究也许可揭示肝硬化的发病机制,为肝硬化的治疗提供新的方向。

- 23144960 DOI: 10.1371/journal.pone.0048764]
- 4 Gao S, Oh YB, Park BM, Park WH, Kim SH. Urotensin II protects ischemic reperfusion injury of hearts through ROS and antioxidant pathway. *Peptides* 2012; 36: 199-205 [PMID: 22609449 DOI: 10.1016/j.peptides.2012.05.004]
- 5 Newby DE, Jalan R. UROTENSIN II: BETTER THAN SOMATOSTATIN FOR PORTAL HYPERTENSION? *Hepatology* 2000; 31: 1201-1202 [PMID: 10796899]
- 6 Carreras C, Kulkarni HR, Baum RP. Rare metastases detected by (68)Ga-somatostatin receptor PET/CT in patients with neuroendocrine tumors. *Recent Results Cancer Res* 2013; 194: 379-384 [PMID: 22918770 DOI: 10.1007/978-3-642-27994-2_20]
- 7 Koren I, Riskin A, Barthlen W, Gillis D. Hepatitis in an infant treated with octreotide for congenital hyperinsulinism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2013; 26: 183-185 [PMID: 23327817 DOI: 10.1515/jpem-2012-0372]
- 8 Kemp W, Roberts S, Krum H. Urotensin II: a vascular mediator in health and disease. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 159-168 [PMID: 15853635]
- 9 Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP, Civelli O. Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 383-385 [PMID: 10559967]
- 10 Pomier-Layrargues G, Paquin SC, Hassoun Z, Lafortune M, Tran A. Octreotide in hepatorenal syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Hepatology* 2003; 38: 238-243 [PMID: 12830007 DOI: 10.1053/jhep.2003.50276]
- 11 Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R. Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1865-1870 [PMID: 10952676]
- 12 Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP, Bennett T. Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1625-1629 [PMID: 11309232]
- 13 Trebicka J, Hennenberg M, Eckhardt A, Biecker E, Sauerbruch T, Heller J. Urotensin II receptor antagonist Palosuran lowers portal pressure and improves renal perfusion in cirrhotic rats. *Hepatology* 2006; 44: 202A
- 14 Chai SB, Li XM, Pang YZ, Qi YF, Tang CS. Increased plasma levels of endothelin-1 and urotensin-II in patients with coronary heart disease. *Heart Vessels* 2010; 25: 138-143 [PMID: 20339975 DOI: 10.1007/s00380-009-1178-6]
- 15 Romanelli RG, Laffi G, Vizzutti F, Del Bene R, Marra F, Caini P, Guerra CT, La Villa G, Barletta G. Elevated plasma levels of urotensin II do not correlate with systemic haemodynamics in patients with cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 314-318 [PMID: 20943446 DOI: 10.1016/j.dld.2010.08.012]
- 16 Liao Y, Du JB, Tang CS, Jin HF. [Change and significance in the levels of plasma urotensin II and catestatin in children with postural orthostatic tachycardia syndrome]. *Beijing Daxue Xuebao* 2011; 43: 436-439 [PMID: 21681278]
- 17 Pawar R, Kemp W, Roberts S, Krum H, Yandle T, Hardikar W. Urotensin II levels are an important marker for the severity of portal hypertension in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 53: 88-92 [PMID: 21694541 DOI: 10.1097/MPG.0b013e3182153900]
- 18 Hursitoglu M, Tukek T, Cikrikcioglu MA, Kara O, Kazancioglu R, Ozkan O, Cakirca M, Akdogan F, Gundogan E, Aydin S, Beycan I, Gursu M, Dogan S, Ereke A. Urotensin II levels in patients with chronic kidney disease and kidney transplants. *Ups J Med Sci* 2012; 117: 22-27 [PMID: 22098077 DOI: 10.3109/03009734.2011.626541]
- 19 Charles CJ, Rademaker MT, Richards AM, Yandle TG. Urotensin II: evidence for cardiac, hepatic and renal production. *Peptides* 2005; 26: 2211-2214 [PMID: 16269352]
- 20 Heller J, Schepke M, Neef M, Woitas R, Rabe C, Sauerbruch T. Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol* 2002; 37: 767-772 [PMID: 12445417 DOI: 10.1016/S0168-8278(02)00295-7]
- 21 Liu D, Chen J, Wang J, Zhang Z, Ma X, Jia J, Wang Y. Increased expression of urotensin II and GPR14 in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Int J Mol Med* 2010; 25: 845-851 [PMID: 20428787 DOI: 10.3892/ijmm.00000413]
- 22 Leifeld L, Clemens C, Heller J, Trebicka J, Sauerbruch T, Spengler U. Expression of urotensin II and its receptor in human liver cirrhosis and fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1458-1464 [PMID: 19582578 DOI: 10.1007/s10620-009-0875-4]
- 23 Okumus S, Igci YZ, Taskin T, Oztuzcu S, Gurler B, Eslik Z, Gogebakan B, Coskun E, Erbagci I, Demiryurek S, Cengiz B, Demiryurek AT. Association between Thr21Met and Ser89Asn polymorphisms of the urotensin-II (UTS2) gene, diabetes mellitus, and diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 2012; 37: 921-929 [PMID: 22587369 DOI: 10.3109/02713683.2012.688181]
- 24 Jani PP, Narayan H, Ng LL. The differential extraction and immunoluminometric assay of Urotensin II and Urotensin-related peptide in heart failure. *Peptides* 2013; 40: 72-76 [PMID: 23270674 DOI: 10.1016/j.peptides.2012.12.014]
- 25 Tran L, Kompa AR, Wang BH, Krum H. Evaluation of the effects of urotensin II and soluble epoxide hydrolase inhibitor on skin microvessel tone in healthy controls and heart failure patients. *Cardiovasc Ther* 2012; 30: 295-300 [PMID: 21884016 DOI: 10.1111/j.1755-5922.2011.00282.x]
- 26 Mori N, Hirose T, Nakayama T, Ito O, Kanazawa M, Imai Y, Kohzuki M, Takahashi K, Totsune K. Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides* 2009; 30: 400-408 [PMID: 18955095 DOI: 10.1016/j.peptides.2008.09.021]
- 27 Mosenkis A, Kallem RR, Danoff TM, Aiyar N, Bazeley J, Townsend RR. Renal impairment, hypertension and plasma urotensin II. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 609-614 [PMID: 20621933 DOI: 10.1093/ndt/gfq416]
- 28 Barrette PO, Schwertani AG. A closer look at the role of urotensin II in the metabolic syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 165 [PMID: 23293629 DOI: 10.3389/fendo.2012.00165]
- 29 Ng LL, Loke I, O'Brien RJ, Squire IB, Davies JE. Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation* 2002; 106: 2877-2880 [PMID: 12460864]
- 30 Kemp W, Krum H, Colman J, Bailey M, Richards

■名词解释

尾加压素: 一种血管活性肽, 具有强缩血管活性, 但在特定组织, 特定情况下如大鼠肠系膜血管、人腹部阻力血管中具有舒张作用。

■同行评价

本文对U II与生长抑素的可能作用, U II及其受体在实验动物及肝硬化患者中的表达水平变化, 以及受体拮抗剂的作用进行综述, 对肝硬化发病机制的认识及可能的治疗作用提供了新的思路。

- SR. Serum urotensin II elevation in chronic liver disease-relationship to severity of cirrhosis and portal hypertension. *J Gastro Hepatol* 2005; 20(Suppl 1): A86
- 31 Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 60: 646-649 [PMID: 4541913]
- 32 Kemp W, Krum H, Colman J, Yandle T, Richards M, Roberts S. Urotensin II is a relevant vasoactive mediator of cirrhotic portal hypertension in humans. *Hepatology* 2006; 44: 202A
- 33 Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; 401: 282-286 [PMID: 10499587]
- 34 Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A. Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* 2002; 359: 1990-1997 [PMID: 12076554]
- 35 Dschietzig T, Bartsch C, Pregla R, Zurbrugg HR, Armbruster FP, Richter C, Laule M, Romeyke E, Neubert C, Voelter W, Baumann G, Stangl K. Plasma levels and cardiovascular gene expression of urotensin-II in human heart failure. *Regul Pept* 2002; 110: 33-38 [PMID: 12468107]
- 36 Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S, Murakami O. Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104: 1-5 [PMID: 12519081]
- 37 Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL, Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT. Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 174-178 [PMID: 10581185]
- 38 Zhu YC, Zhu YZ, Moore PK. The role of urotensin II in cardiovascular and renal physiology and diseases. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 884-901 [PMID: 16783414 DOI: 10.1038/sj.bjp.0706800]
- 39 Leonard AD, Thompson JP, Hutchinson EL, Young SP, McDonald J, Swanevelde J, Lambert DG. Urotensin II receptor expression in human right atrium and aorta: effects of ischaemic heart disease. *Br J Anaesth* 2009; 102: 477-484 [PMID: 19258379 DOI: 10.1093/bja/aep011]
- 40 Russell FD, Meyers D, Galbraith AJ, Bett N, Toth I, Kearns P, Molenaar P. Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1576-H1581 [PMID: 12791592]
- 41 Douglas SA, Dhanak D, Johns DG. From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 76-85 [PMID: 15102493]
- 42 Behm DJ, Herold CL, Ohlstein EH, Knight SD, Dhanak D, Douglas SA. Pharmacological characterization of SB-710411 (Cpa-c[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Cpa-amide), a novel peptidic urotensin-II receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 449-458 [PMID: 12359626]
- 43 Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, Maggi CA. Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1155-1158 [PMID: 14645137 DOI: 10.1038/sj.bjp.0705555]
- 44 Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Müller C, Müller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P. Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 204-212 [PMID: 15146030 DOI: 10.1124/jpet.104.068320]
- 45 叶向或, 盛耀华, 邱长斌, 王于蓝, 丁爽爽. Urotensin •II受体拮抗剂对DR微血管病变的影响. *眼科研究* 2006; 24: 160-164
- 46 Clozel M, Hess P, Qiu C, Ding SS, Rey M. The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 1115-1121 [PMID: 16267137 DOI: 10.1124/jpet.105.094821]
- 47 Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, Sasano H, Murakami O. Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* 2001; 358: 810-811 [PMID: 11564491]
- 48 Cosenzi A. Non peptidic urotensin II antagonists: perspectives for a new class of drugs. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008; 6: 80-91 [PMID: 18473773]
- 49 赖荣德, 梁子敬. 急性肺损伤大鼠血浆及支气管肺泡灌洗液中尾加压素 II 的变化及意义. *中国危重病急救医学* 2006; 18: 501-502
- 50 Trebicka J, Leifeld L, Hennenberg M, Biecker E, Eckhardt A, Fischer N, Pröbsting AS, Clemens C, Lammert F, Sauerbruch T, Heller J. Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology* 2008; 47: 1264-1276 [PMID: 18318439 DOI: 10.1002/hep.22170]

编辑 黄新珍 电编 闫晋利



T细胞免疫球蛋白黏蛋白3与消化系统炎症疾病的关系

余婧, 谢勇

余婧, 谢勇, 南昌大学第一附属医院消化内科, 江西省消化系疾病研究所, 江西省消化病研究重点实验室 江西省南昌市 330006

余婧, 主要从事Tim-3信号通路在小鼠实验性结肠炎中作用及机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30960144

作者贡献分布: 本文综述由余婧完成; 谢勇负责审校。

通讯作者: 谢勇, 教授, 主任医师, 博士生导师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科。xieyong_med@163.com

电话: 0791-888692507 传真: 0791-888692507

收稿日期: 2013-03-06 修回日期: 2013-03-29

接受日期: 2013-06-05 在线出版日期: 2013-08-08

Role of Tim-3 in pathogenesis of inflammatory diseases of the digestive system

Jing Yu, Yong Xie

Jing Yu, Yong Xie, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University; Gastroenterology Institute of Jiangxi Province; Key Laboratory of Digestive Diseases of Jiangxi Province, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30960144

Correspondence to: Yong Xie, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University; Gastroenterology Institute of Jiangxi Province; Key Laboratory of Digestive Diseases of Jiangxi Province, 17 Yongwaizheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. xieyong_med@163.com

Received: 2013-03-06 Revised: 2013-03-29

Accepted: 2013-06-05 Published online: 2013-08-08

Abstract

T cell immunoglobulin mucin domain-containing molecules (Tim)-3 is a type I cell membrane glycoprotein that is expressed on the surface of cells involved in innate and adaptive immunity. As the first discovered member of Tim family, Tim-3 participates in T cell-induced immune responses. By interacting with its ligands galectin-9 or Ptd-Ser, Tim-3 induces cell apoptosis and clearance of apoptotic cells in autoimmune disorders, allergic diseases and virus infection-associated diseases. Tim-3 can act as a negative regulator of Th1/Th17 immune responses. Current research has shown that Tim-3 is involved in the pathogenesis of inflammatory diseases of the digestive system. Here we will review the progress in understanding the

role of Tim-3 in the pathogenesis of inflammatory diseases of the digestive system.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Tim-3; Galectin-9; Immune; Inflammation; Digestive system diseases

Yu J, Xie Y. Role of Tim-3 in pathogenesis of inflammatory diseases of the digestive system. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2169-2175 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2169.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2169>

摘要

T细胞免疫球蛋白黏蛋白(T cell immunoglobulin mucin domain containing molecules, Tim)-3是一种I型细胞表面糖蛋白, 表达于多种固有及适应性免疫应答细胞表面。Tim-3作为Tim家族中参与T细胞免疫应答的首位成员, 他通过与配体半乳糖凝集素(galectin-9, Gal-9)及磷脂酰丝氨酸(PtdSer)相互作用, 介导细胞凋亡及清除凋亡细胞, 负性调控Th1/Th17细胞免疫应答, 参与自身免疫性疾病、过敏性疾病、病毒感染相关性等多种疾病。目前研究表明Tim-3与消化系统炎症疾病密切相关, 本文将就相关文献报道进行综述。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3; 半乳糖凝集素-9; 免疫; 炎症; 消化系统疾病

核心提示: Tim-3负性调控Th1/Th17细胞免疫应答, Tim-3与配体gal-9结合介导细胞凋亡, 两者及其相关调控因子表达异常参与消化系统疾病的发生发展。

余婧, 谢勇. T细胞免疫球蛋白黏蛋白3与消化系统炎症疾病的关系. *世界华人消化杂志* 2013; 21(22): 2169-2175 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2169.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2169>

0 引言

T细胞免疫球蛋白黏蛋白家族(T cell immuno-

■背景资料

早期研究认为Tim-3特异性表达于Th1细胞表面, 他可作为区分Th1和Th2细胞的表面标志物, 并参与Th免疫调控。近年来研究显示Tim-3在多种类型细胞表面均有表达, Tim-3与配体结合可调控免疫反应的多个环节, 并诱导细胞凋亡及清除凋亡细胞。

■同行评议者

卢晓梅, 教授, 研究员, 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院; 秦建民, 主任医师, 上海中医药大学附属普陀医院普外科

■ 研发前沿

Tim-3信号通路异常参与消化系统疾病的发生发展,激活或阻断此通路可改善或治愈相关疾病,何种因素或机制导致Tim-3信号通路异常,目前尚不清楚,这是当前乃至今后的研究热点。

globulin mucin domain containing molecules, Tim)最初于2001年由McIntire等^[1]在鼠的气道高反应调控位点区(Tapr)被发现,该家族包含8个成员,定位于鼠染色体11B1.1上,在人类染色体上已鉴定表达的Tim家族成员是Tim-1、Tim-3和Tim-4,定位于染色体5q33.2。Tim家族与T细胞免疫应答密切相关,T细胞免疫球蛋白黏蛋白(T cell immunoglobulin mucin domain containing molecules, Tim)-3作为Tim家族中的重要一员,大量研究显示Tim-3参与以T细胞应答异常为主的多种疾病。目前研究表明Tim-3与消化系统炎症疾病密切相关,包括肝炎病毒及幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)、炎症性肠病、食物过敏所致肠道炎症浸润等,现将Tim-3与他们的关系综述如下。

1 Tim-3的生物学性能及配体

人Tim-3分子由301个氨基酸组成,其基因长约23 kb^[2],与鼠Tim-3具有63%的同源性,表达在终末分化的CD4⁺Th1, CD8⁺Tc1细胞及Th17表面^[3-5]。此外, Tim-3也表达在人固有免疫细胞上,如树突状细胞^[6]、自然杀伤细胞^[7]、单核巨噬细胞表面^[8]。Tim-3是一种I型细胞表面糖蛋白,他由信号肽、胞外免疫球蛋白结构域、黏蛋白结构域、跨膜结构域及胞质尾区组成^[2]。其免疫球蛋白晶体结构分析显示,该结构域的4个保守半胱氨酸之间形成的2个独特袋状结构,为Tim-3与其配体结合及发挥效应提供了作用位点^[9]。现已明确Tim-3负性调控Th1免疫应答,他通过与配体半乳糖凝集素(galectin-9, Gal-9)相互作用介导细胞凋亡,参与自身免疫性疾病^[10]、过敏性疾病^[11]、病毒感染相关性等多种疾病^[12]。而在固有免疫应答中, Tim-3可与Toll样受体(toll-like receptor, TLR)协同作用启动固有免疫应答,通过刺激巨噬细胞活化参与自身免疫性^[13]及感染性疾病^[14]。Tim-3在固有及适应性免疫应答中发挥不同作用的现象,是与树突状细胞(dendritic cells, DC)和Th1细胞表面Tim-3胞内段去酪氨酸磷酸化形式不同相关^[6]。

Gal-9作为Tim-3的天然配体^[15],他是一种大小约36 kDa的S型凝集素,属于半乳糖凝集素家族中的一员,1997年首次从霍奇金淋巴瘤中克隆出来^[16],广泛分布在肝脏、小肠、脾脏、心脏、胸腺、骨骼肌等处^[17],表达于多种类型细胞表面。Th1细胞通过分泌干扰素(interferon- γ , IFN- γ)上调Gal-9的表达^[18],后者与Tim-3相互作

用介导抑制性信号,促进钙内流,选择性诱导Th1细胞凋亡^[15,18,19]。此外, Gal-9可促进T细胞分化成调节性T(regulatory T cells, Treg)细胞,抑制其分化成Th17细胞^[20],同时可与Tim-3相互作用诱导Th17细胞凋亡^[21]。DeKruyff等^[22]发现Tim-3与其另一个配体磷脂酰丝氨酸(PtdSer)之间具有高达50%的亲合力,两者相互作用可介导凋亡细胞吞噬,维持内环境稳定,参与自身免疫调节及免疫耐受诱导^[23]。

2 Tim-3与消化系统炎症疾病

2.1 Tim-3与肝脏疾病

2.1.1 Tim-3与病毒感染相关性肝病:病毒持续感染以适应性免疫应答受损为特征,尤以CD8⁺T细胞功能受损明显^[24],而有效的病毒特异性CD8⁺T细胞应答在病毒清除中起重要作用^[25]。

Wu等^[26]研究发现,慢性乙肝病毒(chronic hepatitis B, CHB)感染患者外周血CD4⁺和CD8⁺T细胞表面高表达Tim-3,其水平与传统肝脏损伤标志物丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT), 门冬氨酸转氨酶(aspartate transferase, AST), 总胆红素(total bilirubin, TB)和国际标准化比率(International Normalized Ratio, INR)呈正相关,经有效抗病毒治疗Tim-3表达下调,提示Tim-3过表达参与持续乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染, Tim-3可作为评估肝脏损伤程度的一个有效指标。Tim-3⁺CD8⁺T细胞数目与转录因子T-bet mRNA及细胞因子IFN- γ 水平呈负相关,与病毒载量无关,故研究者推测Tim-3通过下调Th1/Tc1细胞应答,负性调控宿主免疫系统,最终导致HBV持续感染。此外,有研究显示自然杀伤(natural killer, NK)细胞表面上调的Tim-3可与Gal-9相互作用,抑制NK细胞的免疫活性,导致HBV持续感染^[27]。Wu等^[28]进一步研究发现,封闭Tim-3信号通路可修复部分分泌、增殖功能受损的Tim-3⁺CD8⁺T细胞,提示Tim-3信号通路负性调控病毒特异性CD8⁺T细胞介导的免疫应答,推测细胞功能修复与否受细胞本身损伤程度及抑制分子如PD-1、CTLA-4和CD244等影响,具体机制尚不清楚。此外,急性乙肝病毒(acute hepatitis B, AHB)感染患者外周血CD8⁺T细胞表面Tim-3呈一过性上调,其表达水平与肝损伤标志物、转录因子及细胞因子水平无明显相关^[26],提示Tim-3在AHB和CHB感染致病中发挥效应不同,导致了HBV感染结局的多样性。与CHB感染类似, Tim-3在丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,

HCV)特异性CD8⁺ T细胞表面呈高表达^[29,30], 慢性HCV感染患者肝内PD-1⁺Tim-3⁺CD8⁺ T细胞占肝总CD8⁺ T细胞比例远高于正常人群^[29], 而大部分Tim-3在缓解晚期才降至正常水平^[30], 提示PD-1⁺Tim-3⁺CD8⁺ T细胞可作为慢性HCV感染的一种主要肝内细胞显型^[30], 同时Tim-3表达水平可作为感染转归的一个预测指标. 虽然封闭PD-1/Tim-3均可改善HCV特异性CD8⁺ T细胞的增殖功能^[29-31], 但只有封闭Tim-3才能杀死HCV感染肝细胞^[30], 提示Tim-3和PD-1在T细胞功能衰竭介导的不同阶段发挥作用. Zhang等^[32]研究推测, Tim-3/Gal-9与PD-1和细胞因子信号传导抑制因子-1(suppressor of cytokine signaling-1, SOCS-1)相互作用, 限制STAT-1磷酸化, 负性调控TLR介导的白介素(interleukin, IL)-12分泌, 使固有免疫应答失调, 进而诱导适应性Th1/Tc1功能失调, 最终导致HCV持续感染. 此外, Mengshol等^[33]研究显示, HCV感染患者肝枯否细胞表面高表达Gal-9, Gal-9可通过活化caspase8途径诱导HCV特异性CD8⁺ T细胞凋亡.

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)与HBV及HCV感染密切相关^[34]. Li等^[35]采用流式细胞术检测150例临床确诊HCC患者的癌及癌旁组织发现, Tim-3主要表达在肿瘤浸润T细胞表面, Gal-9主要在HBV相关HCC的枯否细胞表面呈高表达, Tim-3/Gal-9相互作用可介导HBV相关HCC的T细胞衰竭. HBV阳性HCC患者Tim-3⁺ T细胞在T细胞中所占比例远高于HBV阴性HCC患者, 提示Tim-3表达水平在一定程度上与肿瘤微环境相关. 此外, Tim-3⁺ T细胞数与肿瘤大小呈正相关, 与患者生存期呈负相关, 提示Tim-3⁺细胞数可作为判断HCC患者生存预后的一个指标.

此外, Li等^[36]对789例中国汉族人口Tim-3基因启动子区-1541C/T, -1516G/T, -882C/T, -574G/T及外显子3区进行基因分型发现, -1516G/T位点与HBV易感性及HBV相关HCC特性(肿瘤分级、淋巴细胞转移)相关. 另一项相关性分析显示-1516基因型GT/TT可能参与HCC的发展及转归^[37].

总之, Tim-3在病毒感染相关肝病的发展、转归中发挥重要作用. 虽然大量研究已证明, Tim-3负性调控Th免疫应答, 但病毒感染相关肝病中高表达Tim-3的功能衰竭CD8⁺ T细胞是否发生凋亡, 发生凋亡又跟何种因素相关, 目前尚不清楚, 仍有待于进一步研究.

2.1.2 Tim-3与自身免疫性肝炎: 自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种慢性进行性肝脏炎症性疾病. 他主要由CD4⁺ T细胞通过识别自身抗原介导免疫应答. AIH与Treg功能缺陷及CD4⁺ T细胞低应答相关^[38,39]. Liberal等^[39]研究发现, AIH患者外周血Tim-3⁺CD4⁺ T细胞和Gal-9⁺ Treg细胞较健康人群少, 疾病复发组Tim-3⁺细胞数较缓解组少, 提示Tim-3⁺与Gal-9⁺细胞数与AIH相关. Tim-3⁺T细胞较Tim-3⁻ T细胞而言, 前者对Treg细胞的负性调控作用更易感, 尤其是CD127-Treg细胞, 表明Tim-3参与CD4⁺T细胞与Treg细胞介导的免疫调节. 而用siRNA封闭Treg细胞表面Gal-9可使Treg细胞对CD4⁺ CD25⁻ T细胞的抑制能力显著下调, 推测Gal-9低表达可能是Treg功能受损的一个机制. 据此推断, AIH中CD4⁺ CD25⁻ T效应细胞表面Tim-3与Treg细胞表面Gal-9可能是通过降低免疫易感性和损伤Treg细胞功能, 参与免疫调节受损.

2.1.3 Tim-3与原发性胆汁性肝硬变及硬化性胆管炎: 原发性胆汁性肝硬变(primary biliary cirrhosis, PBC)是一类以T细胞介导为主的慢性肝脏损害性疾病^[40]. Lv等^[41]建立小鼠肝损伤模型发现大量肝细胞凋亡, 大块肝组织出血坏死, CD4⁺ T细胞数目多, 且Tim-3表达上调. 用抗Tim-3单克隆抗体封闭Tim-3信号通路可加重肝脏损伤的病理学程度, 伴Tim-3⁺CD4⁺ T细胞数目显著增多, 提示Tim-3信号通路参与慢性肝损伤. 而用Gal-9预处理可显著改善肝脏病理学特征, 伴CD4⁺ T细胞数目及炎症因子分泌减少, 推测Tim-3与Gal-9结合可诱导CD4⁺ T细胞凋亡, 从而减少肝脏炎症因子浸润, 改善肝脏受损程度.

2.1.4 Tim-3与肝移植: 肝移植是治疗终末期肝病的一种有效治疗手段, 缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)可致约10%的早期肝移植失败, 而Toll样受体4(toll-like receptor4, TLR4)信号是诱发肝IRI的关键因素^[42]. Uchida等^[43]研究显示Tim-3/Gal-9信号通路可通过减少IFN- γ 的分泌来抑制TLR4表达, 负性调控肝IRI. Tim-3/TLR4信号互为调节决定肝IRI的严重程度, 故调节Tim-3/Gal-9信号通路有望提高肝移植成功率.

2.2 Tim-3与*H. pylori*感染相关胃疾病 *H. pylori*是与慢性胃炎、胃溃疡、胃癌发病密切相关的病原微生物. Hu等^[44]建立*H. pylori*感染Balb/c小鼠模型后发现, *H. pylori*感染组Tim-3 mRNA水平显著上调, 其表达与胃黏膜内Th1细胞因子

■相关报道

大量研究证实, Tim-3负性调控Th1/Th17细胞免疫应答, Tim-3表达失调参与自身免疫性疾病、过敏性疾病、病毒及细菌感染相关疾病等多种疾病.

■创新盘点

本文较系统体现了Tim-3在消化系统疾病发生发展中的表现及功能,指出Tim-3与TLR4信号通路相关。

IFN- γ 和IL-12水平呈显著正相关,而根除后小鼠脾脏Tim-3 mRNA的表达显著下降;体外实验通过*H. pylori*活菌与Balb/c小鼠原代淋巴细胞共培养发现,实验组Tim-3⁺ T细胞所占比例远高于对照组,提示*H. pylori*感染可诱导Th1优势免疫反应,而Tim-3的表达可反映Th1免疫反应,因此可以通过调控Tim-3信号来防治*H. pylori*相关性疾病。Xie等^[45-47]进一步用Tim-3单抗阻断Tim-3信号通路发现, Tim-3阻断对*H. pylori*疫苗接种小鼠和*H. pylori*感染小鼠免疫反应调控最终导致的结局不同,前者在加剧炎症反应的同时,有利于*H. pylori*的清除,后者加剧炎症反应,却不能清除*H. pylori*感染,同时还发现Tim-3阻断可上调TLR4、髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)的表达和核因子- κ B p65(nuclear factor- κ B, NF- κ B p65)活化,降低CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg的数量,增强了Th1免疫反应,抑制了Th2免疫反应,这可能是他增强*H. pylori*疫苗的免疫保护作用的机制,但并不影响*H. pylori*自然感染小鼠胃黏膜内*H. pylori*定植密度,以上研究证实Tim-3信号通路可通过调控TLR信号通路、Treg和Th免疫反应来影响*H. pylori*疫苗的免疫保护和*H. pylori*感染的免疫致病作用。

2.3 Tim-3与肠道炎症性疾病

2.3.1 Tim-3与炎症性肠病:炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD),主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),目前其病因和确切的发病机制并不明确,一般认为是环境、遗传、免疫等因素共同作用于遗传易感个体,产生过度免疫反应,最终导致持续性肠道炎症。Morimoto等^[48]研究发现, CD患者Th细胞表面Tim-3表达失调,推测改变Th细胞表面Tim-3的表达可减轻IBD所致的炎性浸润。Li等^[49]用重组Tim-3胞外蛋白封闭Tim-3预处理小鼠实验性结肠炎模型,发现结肠炎症程度加重, Tim-3⁺CD4⁺ T细胞数量增多, Treg细胞数量减少,促炎因子IFN- γ 、IL-17、IL-23水平增高, IL-4水平下降,提示Tim-3信号封闭加重结肠炎症可能与Treg细胞相关,且Tim-3封闭启动Th1/Th17优势免疫应答。同时,淋巴细胞表面CD80/CD86和胞内CTLA-4表达下调,推测Tim-3信号封闭介导的Th1优势免疫应答通过下调CD80和CTLA-4的表达,活化Th1细胞功能,进而抑制Treg细胞功能,这些结果表明Tim-3可影响效应T细胞分化,负性调控IBD的发展。虽然大量

研究表明Tim-3信号通路封闭可减少Gal-9/Tim-3介导的Th1细胞凋亡,但是此研究并未发现这一现象,具体原因尚不清楚。钟玫君^[50]用Tim-3单抗预处理小鼠实验性结肠炎模型,证实了Li等的研究结果,但与上述研究结果不同的是,小鼠结肠炎症程度减轻。进一步检测发现肠黏膜中MyD88、NF- κ B p65蛋白表达下降,而TLRs信号通路的负性调控因子单免疫球蛋白IL-1受体相关分子(single immunoglobulin IL-1R-related molecule, SIGIRR)蛋白表达上升。结合前人研究, Tim-3信号通路在固有应答中可激活免疫应答,推测该研究中Tim-3抗体通过增强对固有免疫应答TLRs/NF- κ B信号通路的负性调控,抑制TLRs/NF- κ B信号通路激活,从而减轻肠道炎症程度。

2.3.2 Tim-3与食物过敏所致肠道炎症浸润:食物过敏在全世界范围内有高达2%-8%的发生率^[51]。Chen等^[52]研究显示,食物过敏患者腹泻次数增多,以肠道肥大细胞、嗜酸性粒细胞大量浸润,抗原特异性CD4⁺ T细胞大量增殖, CD4⁺IL-4⁺ T细胞数目显著增多为特征,且肠上皮细胞Galec-tin-9表达上调。体外研究发现,用RNA干扰技术敲除髓系未成熟树突状细胞的Tim-3基因,可消除Gal-9诱导的促髓系树突状细胞成熟的效应,显著减少Tim-4的分泌,推测Gal-9通过与Tim-3相互作用活化肠道树突状细胞,诱导Tim-4分泌,介导Th2优势免疫应答,最终导致肠道长期处于高敏状态。

3 结论

近年来随着对Tim-3基因研究的深入,已经发现Tim-3与众多疾病相关,如自身免疫性疾病、过敏性疾病、炎症性疾病、病毒感染相关疾病、肿瘤等,用Tim-3抗体或融合蛋白封闭Tim-3,在一定程度上可改善或加重疾病程度,提示Tim-3有望用于相关疾病的治疗,但是其具体的分子机制目前尚不清楚。是何种因素导致Tim-3在不同疾病中的表达水平及功能不同?如多发性硬化患者脑脊液及外周血中T淋巴细胞低表达Tim-3,病毒感染特异性CD8⁺ T细胞高表达Tim-3。Tim-3/Gal-9信通路在调控疾病的过程中是否与其他负性调控因子如PD-1、CTLA-4相关,两者又是如何发挥效应的;表达于固有免疫细胞表面的Tim-3是如何协调固有及适应性免疫应答反应的,这些问题都有待今后进一步研究。

4 参考文献

- 1 McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2001; 2: 1109-1116 [PMID: 11725301 DOI: 10.1038/ni739]
- 2 Chae SC, Song JH, Pounsambath P, Yuan HY, Lee JH, Kim JJ, Lee YC, Chung HT. Molecular variations in Th1-specific cell surface gene Tim-3. *Exp Mol Med* 2004; 36: 274-278 [PMID: 15272240 DOI: 10.1038/emm.2004.37]
- 3 Khademi M, Illés Z, Gielen AW, Marta M, Takazawa N, Baecher-Allan C, Brundin L, Hannerz J, Martin C, Harris RA, Hafler DA, Kuchroo VK, Olsson T, Piehl F, Wallström E. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 2004; 172: 7169-7176 [PMID: 15153541]
- 4 Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1258-1268 [PMID: 17307864 DOI: 10.1189/jlb.1006610]
- 5 Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schweneker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hyrcza MD, Yue FY, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht FM, Chun TW, McCune JM, Kaul R, Rini JM, Nixon DF, Ostrowski MA. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 2008; 205: 2763-2779 [PMID: 19001139 DOI: 10.1084/jem.20081398]
- 6 Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, Hastings WD, Kassam N, Lei C, Chandwaskar R, Karman J, Su EW, Hirashima M, Bruce JN, Kane LP, Kuchroo VK, Hafler DA. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 2007; 318: 1141-1143 [PMID: 18006747 DOI: 10.1126/science.1148536]
- 7 Hou N, Zhao D, Liu Y, Gao L, Liang X, Liu X, Gai X, Zhang X, Zhu F, Ni M, Zhang Y, Sun W, Ma C. Increased expression of T cell immunoglobulin- and mucin domain-containing molecule-3 on natural killer cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012; 222: 67-73 [PMID: 22387059 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.009]
- 8 Zhang Y, Ma CJ, Wang JM, Ji XJ, Wu XY, Moorman JP, Yao ZQ. Tim-3 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14⁺ monocytes. *J Leukoc Biol* 2012; 91: 189-196 [PMID: 21844165 DOI: 10.1189/jlb.1010591]
- 9 Cao E, Zang X, Ramagopal UA, Mukhopadhyaya A, Fedorov A, Fedorov E, Zenccheck WD, Lary JW, Cole JL, Deng H, Xiao H, Diloranzo TP, Allison JP, Nathenson SG, Almo SC. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity* 2007; 26: 311-321 [PMID: 17363302 DOI: 10.1016/j.immuni.2007.01.016]
- 10 Lee J, Oh JM, Hwang JW, Ahn JK, Bae EK, Won J, Koh EM, Cha HS. Expression of human TIM-3 and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2011; 40: 334-340 [PMID: 21446887 DOI: 10.3109/03009742.2010.547871]
- 11 Kearley J, McMillan SJ, Lloyd CM. Th2-driven, allergen-induced airway inflammation is reduced after treatment with anti-Tim-3 antibody in vivo. *J Exp Med* 2007; 204: 1289-1294 [PMID: 17517968 DOI: 10.1084/jem.20062093]
- 12 Sharma S, Sundararajan A, Suryawanshi A, Kumar N, Veiga-Parga T, Kuchroo VK, Thomas PG, Sangster MY, Rouse BT. T cell immunoglobulin and mucin protein-3 (Tim-3)/Galectin-9 interaction regulates influenza A virus-specific humoral and CD8 T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 19001-19006 [PMID: 22052881 DOI: 10.1073/pnas.1107087108]
- 13 Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, Manning S, Greenfield EA, Coyle AJ, Sobel RA, Freeman GJ, Kuchroo VK. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002; 415: 536-541 [PMID: 11823861 DOI: 10.1038/415536a]
- 14 Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Beladi S, Anderson AC, Dardalhon V, Hotta C, Kuchroo VK, Behar SM. Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J Exp Med* 2010; 207: 2343-2354 [PMID: 20937702 DOI: 10.1084/jem.20100687]
- 15 Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005; 6: 1245-1252 [PMID: 16286920 DOI: 10.1038/ni1271]
- 16 Türeci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem* 1997; 272: 6416-6422 [PMID: 9045665 DOI: 10.1074/jbc.272.10.6416]
- 17 Wada J, Kanwar YS. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem* 1997; 272: 6078-6086 [PMID: 9038233 DOI: 10.1074/jbc.272.9.6078]
- 18 Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 665-669 [PMID: 17011764 DOI: 10.1016/j.coi.2006.09.009]
- 19 Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, Nakamura T, Hirashima M. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol* 2003; 170: 3631-3636 [PMID: 12646627]
- 20 Seki M, Oomizu S, Sakata KM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, Ito K, Takeshita K, Niki T, Saita N, Nishi N, Yamauchi A, Katoh S, Matsukawa A, Kuchroo V, Hirashima M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 2008; 127: 78-88 [PMID: 18282810 DOI: 10.1016/j.clim.2008.01.006]
- 21 Bi S, Earl LA, Jacobs L, Baum LG. Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *J Biol Chem* 2008; 283: 12248-12258 [PMID: 18258591 DOI: 10.1074/jbc.M800523200]
- 22 DeKruyff RH, Bu X, Ballesteros A, Santiago C, Chim YL, Lee HH, Karisola P, Pichavant M, Kaplan GG, Umetsu DT, Freeman GJ, Casasnovas JM. T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Im-*

■应用要点

Tim-3与配体及其相关调控因子在消化系统疾病中表达失调或功能异常, 有望通过改变其表达或修复其功能, 指导临床疗效评估及药物的靶向治疗。

■同行评价

本文就Tim-3在肝病病毒性肝炎、胃炎、炎症性肠病、消化系统肿瘤等疾病发生、发展中生物学作用进行阐述,具有一定的新颖性和临床参考价值。

- 23 Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* 2009; 113: 3821-3830 [PMID: 19224762 DOI: 10.1182/blood-2008-10-185884]
- 24 Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL, Williams R, Dusheiko G, Bertolotti A. Longitudinal analysis of CD8⁺ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 2004; 78: 5707-5719 [PMID: 15140968 DOI: 10.1128/JVI.78.11.5707-5719.2004]
- 25 Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58: 258-266 [PMID: 20116937 DOI: 10.1016/j.patbio.2009.11.001]
- 26 Wu W, Shi Y, Li J, Chen F, Chen Z, Zheng M. Tim-3 expression on peripheral T cell subsets correlates with disease progression in hepatitis B infection. *Virol J* 2011; 8: 113 [PMID: 21392402 DOI: 10.1186/1743-422X-8-113]
- 27 Ju Y, Hou N, Meng J, Wang X, Zhang X, Zhao D, Liu Y, Zhu F, Zhang L, Sun W, Liang X, Gao L, Ma C. T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2010; 52: 322-329 [PMID: 20133006 DOI: 10.1016/j.jhep.2009.12.005]
- 28 Wu W, Shi Y, Li S, Zhang Y, Liu Y, Wu Y, Chen Z. Blockade of Tim-3 signaling restores the virus-specific CD8⁺ T-cell response in patients with chronic hepatitis B. *Eur J Immunol* 2012; 42: 1180-1191 [PMID: 22539292 DOI: 10.1002/eji.201141852]
- 29 Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, Castellblanco N, Kuchroo V, Gretch DR, Rosen HR. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Virol* 2009; 83: 9122-9130 [PMID: 19587053 DOI: 10.1128/JVI.00639-09]
- 30 McMahon RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahon BJ, Kemper M, Allen TM, Gretch DR, Rosen HR. Tim-3 expression on PD-1⁺ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* 2010; 120: 4546-4557 [PMID: 21084749 DOI: 10.1172/JCI43127]
- 31 Vali B, Jones RB, Sakhdari A, Sheth PM, Clayton K, Yue FY, Gyenes G, Wong D, Klein MB, Saeed S, Benko E, Kovacs C, Kaul R, Ostrowski MA. HCV-specific T cells in HCV/HIV co-infection show elevated frequencies of dual Tim-3/PD-1 expression that correlate with liver disease progression. *Eur J Immunol* 2010; 40: 2493-2505 [PMID: 20623550 DOI: 10.1002/eji.201040340]
- 32 Zhang Y, Ma CJ, Wang JM, Ji XJ, Wu XY, Jia ZS, Moorman JP, Yao ZQ. Tim-3 negatively regulates IL-12 expression by monocytes in HCV infection. *PLoS One* 2011; 6: e19664 [PMID: 21637332 DOI: 10.1371/journal.pone.0019664]
- 33 Mengshol JA, Golden-Mason L, Arikawa T, Smith M, Niki T, McWilliams R, Randall JA, McMahon R, Zimmerman MA, Rangachari M, Dobrinskikh E, Busson P, Polyak SJ, Hirashima M, Rosen HR. A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. *PLoS One* 2010; 5: e9504 [PMID: 20209097 DOI: 10.1371/journal.pone.0009504]
- 34 Hu S, Xie Y, Zhou N, Jin L, Tan Y, Liu D, Gong Y, Liu L, Liu J, Liu W, Chen Y, Zhang Y, Lv N. Expression of T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecules-1 and -3 (Tim-1 and Tim-3) in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2011; 16: 373-381 [PMID: 21923683 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00855.x]
- 35 Li H, Wu K, Tao K, Chen L, Zheng Q, Lu X, Liu J, Shi L, Liu C, Wang G, Zou W. Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012; 56: 1342-1351 [PMID: 22505239 DOI: 10.1002/hep.25777]
- 36 Li Z, Liu Z, Zhang G, Han Q, Li N, Zhu Q, Lv Y, Chen J, Xing F, Wang Y, Li F. TIM3 gene polymorphisms in patients with chronic hepatitis B virus infection: impact on disease susceptibility and hepatocellular carcinoma traits. *Tissue Antigens* 2012; 80: 151-157 [PMID: 22587604 DOI: 10.1111/j.1399-0039.2012.01898.x]
- 37 Li Z, Li N, Zhu Q, Zhang G, Han Q, Zhang P, Xun M, Wang Y, Zeng X, Yang C, Liu Z. Genetic variations of PD1 and TIM3 are differentially and interactively associated with the development of cirrhosis and HCC in patients with chronic HBV infection. *Infect Genet Evol* 2013; 14: 240-246 [PMID: 23291409 DOI: 10.1016/j.meegid.2012.12.008]
- 38 Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y. Functional study of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176: 4484-4491 [PMID: 16547287]
- 39 Liberal R, Grant CR, Holder BS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D, Longhi MS. The impaired immune regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective galectin-9/tim-3 pathway. *Hepatology* 2012; 56: 677-686 [PMID: 22371007 DOI: 10.1002/hep.25682]
- 40 Hirschfield GM, Gershwin ME. The immunobiology and pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *Annu Rev Pathol* 2013; 8: 303-330 [PMID: 23347352 DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164014]
- 41 Lv K, Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q. Galectin-9 ameliorates Con A-induced hepatitis by inducing CD4⁺CD25^{low/int} effector T-Cell apoptosis and increasing regulatory T cell number. *PLoS One* 2012; 7: e48379 [PMID: 23118999 DOI: 10.1371/journal.pone.0048379]
- 42 Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004; 173: 7115-7119 [PMID: 15585830]
- 43 Uchida Y, Ke B, Freitas MC, Yagita H, Akiba H, Busuttil RW, Najafian N, Kupiec-Weglinski JW. T-cell immunoglobulin mucin-3 determines severity of liver ischemia/reperfusion injury in mice in a TLR4-dependent manner. *Gastroenterology* 2010; 139: 2195-2206 [PMID: 20637206 DOI: 10.1053/

- j.gastro.2010.07.003]
- 44 Hu S, Xie Y, Zhou N, Jin L, Tan Y, Liu D, Gong Y, Liu L, Liu J, Liu W, Chen Y, Zhang Y, Lv N. Expression of T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecules-1 and -3 (Tim-1 and Tim-3) in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2011; 16: 373-381 [PMID: 21923683 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2011.00855.x]
- 45 Xie Y. The influence of blocking Tim-3 signal pathway on immune pathopoiesis of *H. pylori* infection and TLRs signal pathway. *J. Gastroenterol. Hepatol* 2011; 26: 268-268
- 46 Xie Y. The influence of blocking Tim-3 signal pathway on immune pathopoiesis of *H. pylori* infection and Th immune respond. *J. Gastroenterol. Hepatol* 2011; 26: 17
- 47 Xie Y. The influence of blocking Tim-3 signal pathway on immune protection of *H. pylori* vaccine and Th immune respond. *J. Gastroenterol. Hepatol* 2011; 26: 93
- 48 Morimoto K, Hosomi S, Yamagami H, Watanabe K, Kamata N, Sogawa M, Machida H, Okazaki H, Tanigawa T, Nagahara H, Noda E, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Maeda K, Hirakawa K, Arakawa T. Dysregulated upregulation of T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 on mucosal T helper 1 cells in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 701-709 [PMID: 21463244 DOI: 10.3109/00365521.2011.568518]
- 49 Li X, Chen G, Li Y, Wang R, Wang L, Lin Z, Gao X, Feng J, Ma Y, Shen B, Li Y, Han G. Involvement of T cell Ig Mucin-3 (Tim-3) in the negative regulation of inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2010; 134: 169-177 [PMID: 19913460 DOI: 10.1016/j.clim.2009.09.012]
- 50 钟玖君. Tim-3信号通路在小鼠实验性结肠炎中的作用. 南昌大学, 2012
- 51 Obeng BB, Amoah AS, Larbi IA, Yazdanbakhsh M, van Ree R, Boakye DA, Hartgers FC. Food allergy in Ghanaian schoolchildren: data on sensitization and reported food allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155: 63-73 [PMID: 21109750 DOI: 10.1159/000318704]
- 52 Chen X, Song CH, Liu ZQ, Feng BS, Zheng PY, Li P, In SH, Tang SG, Yang PC. Intestinal epithelial cells express galectin-9 in patients with food allergy that plays a critical role in sustaining allergic status in mouse intestine. *Allergy* 2011; 66: 1038-1046 [PMID: 21426359 DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02585.x]

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”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-3]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。

通过测定不同途径5-FU化疗后家兔门静脉血及组织中的药物浓度比较各途径的化疗效果

杨建武, 姜福全, 江文俊, 黄玉玲, 崔彦

■背景资料

腹腔内化疗最早应用于控制卵巢癌患者腹水, 因其较静脉给药能够显著提高腹腔药物浓度, 现已广泛应用于多种腹腔内肿瘤或转移灶的治疗, 但此种给药方式往往造成血药浓度迅速达到峰值而后快速衰减, 不良反应较大且不利于持续杀灭肿瘤, 本文利用缓释剂使药物缓慢释放, 观察血药浓度的达峰和衰减情况。

杨建武, 姜福全, 江文俊, 黄玉玲, 崔彦, 中国人民解放军306医院普通外科 北京市 100101

杨建武, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤的研究。

作者贡献分布: 杨建武与姜福全对此文贡献均等; 此课题由杨建武与姜福全设计、组织实施; 江文俊与黄玉玲负责实验实施; 崔彦负责审核。

通讯作者: 姜福全, 主治医师, 100101, 北京市朝阳区安翔北里9号, 中国人民解放军306医院普通外科。

yangjianwuandhuang@163.com

收稿日期: 2013-07-09 修回日期: 2013-07-19

接受日期: 2013-07-20 在线出版日期: 2013-08-08

Different chemotherapy effects of 5-FU given via different routes of administration

Jian-Wu Yang, Fu-Quan Jiang, Wen-Jun Jiang, Yu-Ling Huang, Yan Cui

Jian-Wu Yang, Fu-Quan Jiang, Wen-Jun Jiang, Yu-Ling Huang, Yan Cui, Department of General Surgery, the 306th Hospital of PLA, Beijing 100101, China

Correspondence to: Fu-Quan Jiang, Attending Physician, Department of General Surgery, the 306th Hospital of PLA, 9 Anxiang Beili, Chaoyang District, Beijing 100101, China. yangjianwuandhuang@163.com

Received: 2013-07-09 Revised: 2013-07-19

Accepted: 2013-07-20 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To determine the concentration of 5-fluorouracil (5-FU) in the portal vein blood and liver in a rabbit model after chemotherapy with 5-FU given via different routes of administration.

METHODS: The portal vein blood and liver biopsy were collected at different time points after intravenous chemotherapy, intraperitoneal chemotherapy or intraperitoneal sustained-releasing chemotherapy with 5-FU. The concentration of 5-FU was measured by HPLC. The area under the concentration-time curve (AUC) was calculated based on the concentration-time curve.

RESULTS: The concentration of 5-FU in the portal vein reached the peak (0.82 $\mu\text{g/mL}$) two hours after intraperitoneal administration of sustained-releasing agents. The concentration of

5-FU in the portal vein was stable and the drug could be detected until day 16 after treatment. In contrast, the average concentration of 5-FU in the portal vein of animals receiving intraperitoneal injection of 5-FU was 20.67 $\mu\text{g/mL}$ 15 minutes after injection and the drug was undetectable 24 h later. 5-FU in the portal vein of animals receiving intravenous chemotherapy was undetectable 4 h later. AUC in the intravenous, intraperitoneal and sustained-releasing groups was 21.57 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$, 42.85 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$ and 70.08 $\mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})$, respectively. 5-FU in liver biopsy could be detected until day 12 after intraperitoneal administration of sustained-releasing agents. In contrast, 5-FU in liver biopsy was undetectable 24 h later in animals receiving intraperitoneal injection of 5-FU.

CONCLUSION: Intraperitoneal sustained-releasing chemotherapy may prolong the effective exposure time of 5-FU in the portal vein and enhance chemotherapeutic effects in the liver.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: 5-Fluorouracil; Delayed-action preparations; Chromatography

Yang JW, Jiang FQ, Jiang WJ, Huang YL, Cui Y. Different chemotherapy effects of 5-FU given via different routes of administration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2176-2180 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2176.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2176>

摘要

目的: 测定不同途径5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)化疗后家兔门静脉血及肝脏组织中的药物浓度。

方法: 以家兔为模型动物分别进行5-FU静脉化疗、腹腔化疗和缓释化疗, 用高效液相色谱法测定门静脉血及组织中5-FU浓度。根据各组门静脉血药浓度-时间曲线, 计算曲线下面积 (area under the concentration-time curve, AUC)。

■同行评议者

刘克辛, 教授, 大连医科大学临床药理学教研室; 俞继卫, 副主任医师, 上海交通大学医学院附属第三人民医院普外科(胃肠外科)

结果: 静脉组血药浓度在给药后即刻达到峰值, 15 min仍高达47.89 $\mu\text{g/mL}$, 但仅能维持4 h; 腹腔组给药后15 min达到血药浓度峰值(20.67 $\mu\text{g/mL}$), 维持时间较静脉组稍长, 可达到24 h; 缓释组在给药后2 h达到最高值0.82 $\mu\text{g/mL}$, 且持续时间较长, 16 d后仍可在检测到. 3组血药浓度AUC依次升高, 分别为21.57 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$ 、42.85 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$ 和70.08 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$. 同时, 缓释组各组织5-FU浓度消除显著减慢, 给药12 d后肝组织中仍可测到, 腹腔组组织药物浓度仅维持至给药后24 h.

结论: 5-FU腹腔内缓释化疗可显著延长门静脉血及肝脏组织中5-FU持续时间, 有助于增强化疗效果.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 5-氟尿嘧啶; 缓释剂; 色谱法

核心提示: 腹腔注射5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)缓释剂能够显著延缓血药浓度上升, 延长有效药物浓度维持时间, 增加肝转移癌局部药物浓度, 有利于提高治疗效果.

杨建武, 姜福全, 江文俊, 黄玉玲, 崔彦. 通过测定不同途径5-FU化疗后家兔门静脉血及组织中的药物浓度比较各途径的化疗效果. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2176-2180 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2176.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2176>

0 引言

腹腔内化疗最早应用于控制卵巢癌患者腹水^[1], 因其较静脉给药能够显著提高腹腔药物浓度, 现已广泛应用于多种腹腔内肿瘤或转移灶的治疗, 但此种给药方式往往瞬间达到血药峰值, 而后迅速衰减, 不良反应较大且不利于持续杀灭肿瘤. 因此, 本研究将以家兔为模型动物, 探讨腹腔内缓释化疗方案对腹腔内化疗的改进作用.

1 材料和方法

1.1 材料 家兔56只, 雌雄各半, 平均体质量2.5 kg \pm 0.1 kg, 由中国人民解放军第二军医大学实验动物中心提供, 清洁级动物实验室条件下饲养.

1.2 方法

1.2.1 分组方法: 56只家兔按照雌雄配对的原则随机分为静脉组($n = 8$): 股静脉注入5-FU(60 mg/kg), 同时腹腔内注入100 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水; 腹腔组($n = 20$): 腹腔内注入5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)(60 mg/kg)+100 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水; 缓释

组($n = 28$): 腹腔内注入5-FU缓释剂5-FU(60 mg/kg)+100 mL 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水. 5-FU: 上海海普制药厂; 5-FU缓释剂(sustained released fluorouracil): 芜湖中人药业有限责任公司.

1.2.2 标本采集: 分别于给药后15、30 min、1、2、4、24 h、2、4、8、12和16 d取门静脉血3 mL, 并对腹腔组和缓释组取肝、胃、结肠、肾、肺各3 g.

1.2.3 检测方法: 采用高效液相色谱法测定样本中5-FU浓度, 条件如下: 流动相: 甲醇-水(5: 95), 比例可根据需要进行微调, 微调范围4: 96-7: 93(甲醇-水), 流动相流速: 0.8-1.0 mL/min. 检测器: 紫外分光光度计, 测定波长: 266 nm. 经色谱适用性试验研究, 5-FU出峰时间($t_{\text{R}}5\text{-FU}$)约6 min附近, 5-Bru出峰时间($t_{\text{R}}5\text{-Bru}$)约12 min附近. 仪器的基线噪声为 $\text{RN} = 0.05 \text{ mV}$, 按3 RN计算的血浆及腹腔液5-FU最小检出浓度为0.02 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为0.06 $\mu\text{g/mL}$. 组织样的5-FU最小检出浓度为0.03 $\mu\text{g/g}$, 定量限为0.06 $\mu\text{g/g}$.

2 结果

5-FU色谱质量血浆和组织中5-FU色谱图均显示5-FU峰和内标物峰均能达到良好分离(图1).

静脉组、腹腔组和缓释组达峰时间依次推迟, 静脉组在给药即刻达到血药浓度峰值, 并随时间推移逐渐衰减, 腹腔组在给药后15 min达到血药浓度峰值, 缓释组在给药后2 h达到血药浓度峰值; 3组药物浓度持续时间依次延长, 静脉组仅能维持至给药后4 h, 腹腔组可延长至24 h, 缓释组在给药后16 d仍可测到少量5-FU(图2). 根据以上数据绘制门静脉血药浓度-时间曲线, 静脉组、腹腔组和缓释组依次增加, 分别为21.57 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$ 、42.85 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$ 和70.08 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$.

除了静脉组外, 腹腔组和缓释组均对肝、胃、结肠、肾、肺进行组织药物浓度测定. 从组织角度来看, 两组均以肝组织中的药物浓度最高, 其次是胃和结肠, 以肺和肾中的药物浓度最低; 从时间角度来看, 缓释组较腹腔组药物浓度消除显著减缓, 甚至在给药后12 d仍可测得(图3, 4).

3 讨论

消化系统肿瘤晚期常见肝脏转移, 对于部分丧失手术机会的患者而言, 化疗是唯一能够改善症状、延长生命的治疗方法^[2], 尤其是提高肝脏内

■ 研发前沿

为了提高化疗药物治疗消化系统肿瘤肝转移的效果, 大量研究从给药方式、药物配伍等方面给出了建议, 但如何在降低疗效的前提下减少化疗药物的剂量, 从而减轻化疗药物的不良反应一直是亟待解决的问题.

■应用要点

消化系统肿瘤肝转移可以选择采用5-FU腹腔注射缓释制剂的办法,有利于减少血药浓度波动,长期维持有效药物浓度。

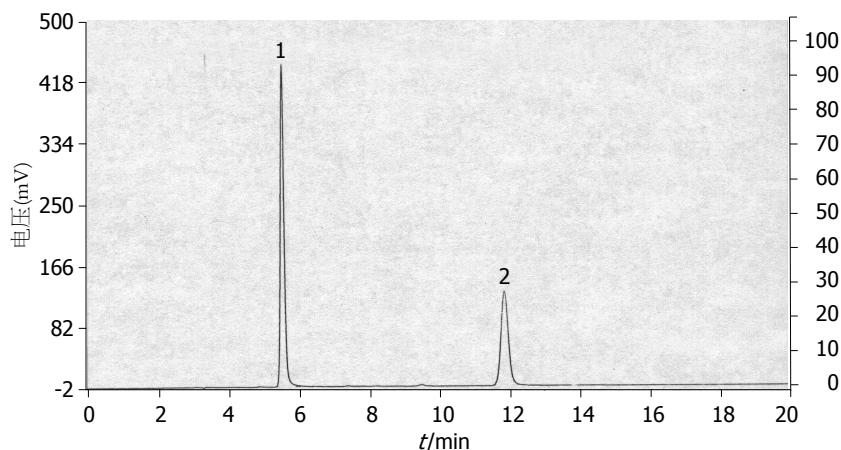


图1 血浆中提取的5-氟尿嘧啶色谱图。

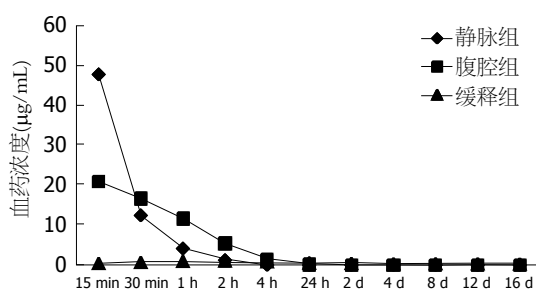


图2 3组血药浓度变化。

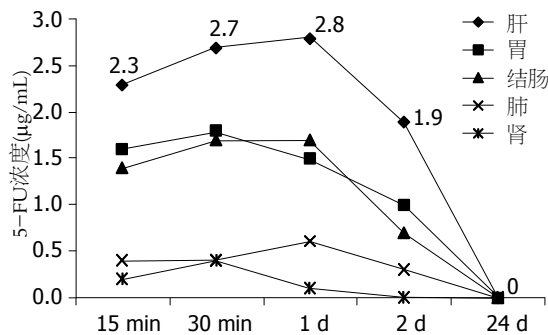


图3 腹腔组家兔不同时间组织中5-FU平均浓度。5-FU: 5-氟尿嘧啶。

化疗药物浓度,对于抑制肿瘤细胞生长繁殖,具有预防和治疗的双重意义^[3];门静脉是肝脏最主要的血运管道,门静脉药物浓度越高,药物维持有效浓度时间越长,对肝脏转移灶的预防和治疗效果越好^[4]。本实验通过对3组实验动物门静脉血中药物浓度的测定,旨在比较不同化疗方式对肝脏转移灶的治疗作用。

大剂量腹腔化疗方法治疗中晚期消化系统恶性肿瘤已经成为国内外共识,某些抗肿瘤药物经腹腔直接注入可显著提高腹腔药物浓度,腹腔内药物的代谢主要是通过门静脉循环入肝,也有部分通腹膜吸收,因此作为腹腔液体主要

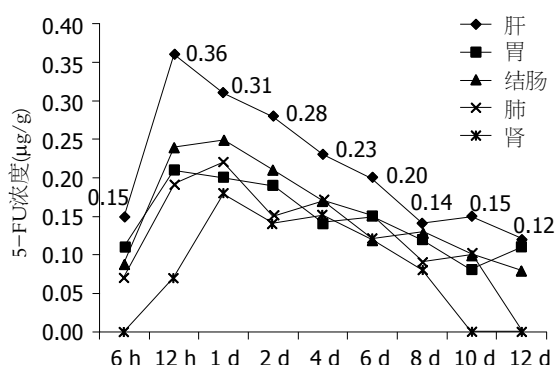


图4 缓释组家兔不同时间组织中5-FU平均浓度。5-FU: 5-氟尿嘧啶。

回流血管,腹腔给药时门静脉的血药浓度也较静脉给药大幅增加,有助于控制肝脏肿瘤细胞增殖^[5,6];有学者分别采用大剂量5-FU对家兔进行腹腔化疗、静脉化疗和口服化疗,发现腹腔化疗的腹腔液5-FU浓度最高,其次是门静脉,分别达到了股静脉的206倍和6.7倍,而静脉化疗组的门静脉血药浓度和股静脉十分接近,腹腔液的血药浓度还要低于门静脉和股静脉的血药浓度^[7]。而也有学者发现腹腔内接种结肠癌细胞的裸鼠在经过腹腔化疗后,致瘤率较静脉化疗显著降低,且裸鼠存活时间也更长^[8],这些均证实了腹腔内化疗的优越性。Archer等^[9]进一步对比了不同给药方式对大鼠门静脉和腹腔结肠癌种植的治疗效果,结果显示,静脉给药和腹腔给药对于肝脏肿瘤的抑制作用接近,但后者对腹腔内转移的抑制作用更显著。不仅是5-FU,其他部分化疗药物也具有类似特点,如奥沙利铂,腹腔给药时其腹腔液曲线下面积(area under the concentration-time curve, AUC)是血浆AUC的15倍^[10],腹膜的药物峰值浓度是血浆的25倍^[11];此外, Hofstra等^[12]还证实,拓扑替康腹腔化疗的平

均腹腔液AUC是血浆的54倍±34倍, 此外还包括伊利替康等, 均有实验显示腹腔给药能够使药物在肝脏和腹腔内保持较长时间; 与静脉给药相比更有利于控制腹膜转移和肝脏转移^[13].

我们在本实验中观察到静脉组动物给药后门静脉血中5-FU浓度最高, 但持续时间较短, 给药4 h后门静脉血中已经无法检测到5-FU; 腹腔组动物给药后15 min门静脉中5-FU达20.67 μg/mL, 但浓度下降十分迅速, 在给药4 h后已降至1.27 μg/mL, 24 h后降至0.09 μg/mL, 与以往研究结果相近. 有研究显示, 大剂量5-FU(100 mg/kg)腹腔化疗后腹腔内5-FU的半衰期约为3.8 h^[4]. 虽然腹腔化疗已经比静脉化疗延长了门静脉血药物持续时间, 并增大了药物浓度时间曲线中的AUC, 但其维持时间仍不足24 h. 同时我们还发现缓释组动物约在给药后2 h门静脉血药浓度最高, 且持续时间较长, 其最大的优势在于随时间延长门静脉血药浓度变化较小, 在给药后16 d仍可测出, 并且药物浓度-时间曲线中的AUC更大, 提示腹腔缓释化疗更加有利于延长化疗药物对肝脏组织作用的时间, 进而提高其对消化系统肿瘤肝脏转移的治疗效果. 而对肝脏组织的药物浓度测定也得出了相似的结果, 腹腔组动物组织内药物仅能维持24 h, 而缓释组各组织中药物浓度维持时间均均较长, 其中肝在给药后12 d仍可测出5-FU. 梁寒等^[14]用活性炭吸附丝裂霉素行裸鼠模型的腹腔内缓释化疗, 其结果表明腹腔液、大网膜和腹腔淋巴结等均可达到较高的药物浓度, 并可维持24 h以上, 其浓度比静脉化疗组和常规腹腔注射丝裂霉素组均高, 且差异均有统计学意义.

化疗药物疗效除与肿瘤细胞对药物的敏感性有关外, 还取决于作用于靶组织的化疗药物浓度(C)以及药物与肿瘤细胞的作用持续时间(T)等^[15]. 多数化疗药物在一定范围内呈浓度依赖性和时间依赖性, 即局部组织药物浓度越高, 药物与肿瘤相互作用时间的越长, 则肿瘤杀灭效果越好. 5-FU也是一种时间依赖性抗化疗药, 通过比较AUC面积, 即门静脉5-FU的C×T值, 可以发现缓释组对肿瘤杀灭的作用优于腹腔组, 而腹腔组的疗效又优于静脉组, 提示5-FU腹腔内缓释化疗方案与腹腔化疗相比, 对预防恶性肿瘤的肝脏转移有更好的疗效.

本实验证实了腹腔内缓释化疗较腹腔化疗具有增加靶组织药物浓度和作用时间的双重优势, 同时还能够延长门静脉血中药物的维持时

间, 增强对肝脏的化疗效果, 进一步放大了腹腔内化疗的优势, 由于其血药浓度缓慢升高且始终处于较低水平因此也可减少全身不良反应, 为临床上腹腔内肿瘤转移的患者提供更为合理的治疗方式. 同时, 考虑临床实际情况, 术中可将该药物在剥离创面和可能的肿瘤残余部位选择性应用, 更有助于提高对腹腔内残留肿瘤治疗的针对性.

4 参考文献

- 1 Gaillard S, Armstrong D. Intraperitoneal chemotherapy for advanced epithelial ovarian cancer: many questions, much promise. *Oncology* (Williston Park) 2011; 25: 176, 178, 180 [PMID: 21456389]
- 2 Rammohan A, Sathyanesan J, Rajendran K, Pitchaimuthu A, Perumal SK, Srinivasan U, Ramasamy R, Palaniappan R, Govindan M. A gist of gastrointestinal stromal tumors: A review. *World J Gastrointest Oncol* 2013; 5: 102-112 [PMID: 23847717 DOI: 10.4251/wjgo.v5.i6.102]
- 3 Haraldsdottir S, Wu C, Bloomston M, Goldberg RM. What is the optimal neo-adjuvant treatment for liver metastasis? *Ther Adv Med Oncol* 2013; 5: 221-234 [PMID: 23858331 DOI: 10.1177/1758834013485111]
- 4 Yu DS, Li Y, Huang XE, Lu YY, Wu XY, Liu J, Cao J, Xu X, Xiang J, Wang GP. Effect of portal vein chemotherapy on liver metastasis after surgical resection of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 4699-4701 [PMID: 23167405]
- 5 Speyer JL. The rationale behind intraperitoneal chemotherapy in gastrointestinal malignancies. *Semin Oncol* 1985; 12: 23-28 [PMID: 4048973]
- 6 Gyves J. Pharmacology of intraperitoneal infusion 5-fluorouracil and mitomycin-C. *Semin Oncol* 1985; 12: 29-32 [PMID: 3931225]
- 7 韩晓燕, 卫洪波, 连建学, 张练, 娄朝轩, 汪雁明. 5-氟尿嘧啶不同给药途径的药代动力学研究和临床应用. *中国新药杂志* 1999; 8: 20-23
- 8 卿三华, 周锡庚, 周正端, 丁长因, 姚明. 高剂量大容积5-FU腹腔化疗药代动力学和疗效实验观察. *中国肿瘤临床* 1996; 23: 2-5
- 9 Archer S, Gray B. Intraperitoneal 5-fluorouracil infusion for treatment of both peritoneal and liver micrometastases. *Surgery* 1990; 108: 502-507 [PMID: 2396194]
- 10 Pestieau SR, Belliveau JF, Griffin H, Stuart OA, Sugarbaker PH. Pharmacokinetics of intraperitoneal oxaliplatin: experimental studies. *J Surg Oncol* 2001; 76: 106-114 [PMID: 11223836]
- 11 Elias D, Bonnay M, Puizillou JM, Antoun S, Demirdjian S, El OA, Pignon JP, Drouard-Troalen L, Ouellet JF, Ducreux M. Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution. *Ann Oncol* 2002; 13: 267-272 [PMID: 11886004]
- 12 Hofstra LS, Bos AM, de Vries EG, van der Zee AG, Beijnen JH, Rosing H, Mulder NH, Aalders JG, Willemse PH. A phase I and pharmacokinetic study of intraperitoneal topotecan. *Br J Cancer* 2001; 85: 1627-1633 [PMID: 11742479]
- 13 Maruyama M, Nagahama T, Ebuchi M, Yuasa Y.

■名词解释

缓释剂: 能够使药物缓慢释放入血, 延长药物作用时间的制剂, 通常是采用胶囊包裹的方式.

■同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 结论可信, 对临床工作者有很好的参考价值.

[Experimental study on intraperitoneal versus intravenous CPT-11 for peritoneal seeding and liver metastasis]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000; 27: 1855-1857 [PMID: 11086429]

14 梁寒, 唐贺文, 郝希山, 孙慧, 李雯. 活性炭吸附丝裂霉

素C腹腔化疗的药代动力学研究. *中华肿瘤杂志* 2005; 27: 412-415

15 Clive Page. Principles of cell proliferation and chemotherapy. *Integrated Pharmacology*. 2nd ed. London: Mosby, UK, 2002: 167

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》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内30个省、市、自治区、特别行政区的483位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

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

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

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

脂多糖对肝内胆管上皮细胞MUC5AC表达的影响

李敏, 田雨, 吴硕东, 李勇男

李敏, 田雨, 吴硕东, 李勇男, 中国医科大学附属盛京医院胆道血管外科 辽宁省沈阳市 110004

李敏, 在读硕士, 主要从事胆石成因和微创外科的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81070365

盛京自由研究者基金资助项目, No. 201001

作者贡献分布: 本课题由田雨与吴硕东设计; 研究过程由李敏与李勇男完成; 数据分析由李敏完成; 论文写作由李敏与田雨共同完成。

通讯作者: 吴硕东, 教授, 主任医师, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院胆道血管外科。

wushuodong@yahoo.com

收稿日期: 2013-05-02 修回日期: 2013-06-27

接受日期: 2013-07-15 在线出版日期: 2013-08-08

LPS induces MUC5AC expression in human biliary epithelial cells

Min Li, Yu Tian, Shuo-Dong Wu, Yong-Nan Li

Min Li, Yu Tian, Shuo-Dong Wu, Yong-Nan Li, Department of Biliary and Vascular Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070365; the Outstanding Scientific Fund of Shengjing Hospital, No. 201001

Correspondence to: Shuo-Dong Wu, Professor, Chief Physician, Department of Biliary and Vascular Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. wushuodong@yahoo.cn

Received: 2013-05-02 Revised: 2013-06-27

Accepted: 2013-07-15 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To examine whether lipopolysaccharide (LPS) stimulates MUC5AC expression in human biliary epithelial cells.

METHODS: Human biliary epithelial cells were treated with LPS, and MUC5AC mRNA and protein expression was detected by real time-PCR, Western blot and immunohistochemistry 12 and 24 h after LPS treatment.

RESULTS: LPS stimulation significantly increased MUC5AC mRNA expression (3.67 ± 0.22 vs 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$). MUC5AC protein expression was also increased after LPS treatment (0.26 vs 0.59 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: LPS can induce MUC5AC ex-

pression in human biliary epithelial cells.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Lipopolysaccharide; Mucin

Li M, Tian Y, Wu SD, Li YN. LPS induces MUC5AC expression in human biliary epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2181-2184 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2181.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2181>

摘要

目的: 研究体外条件下脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激是否引起黏蛋白MUC5AC表达上调。

方法: 体外培养人肝内胆管上皮细胞, 并加入LPS干预, 分别于12和24 h检测MUC5AC mRNA和蛋白含量变化。

结果: LPS刺激导致MUC5AC mRNA表达。Ct值以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算分别为正常细胞组 1.00 ± 0.05 , LPS组 3.67 ± 0.22 ($P < 0.05$)。同时, LPS可刺激MUC5AC蛋白表达, Western blot灰度分析相对比分别为正常细胞组0.26, LPS干预组0.59。

结论: LPS可以诱导黏蛋白MUC5AC的高表达。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 脂多糖; 黏蛋白

核心提示: 本文由临床常见的两个现象入手, 旨在发现脂多糖(lipopolysaccharide)与黏蛋白表达增高之间的关系, 近而希望发现肝内胆管结石治疗的新靶点。

李敏, 田雨, 吴硕东, 李勇男. 脂多糖对肝内胆管上皮细胞MUC5AC表达的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2181-2184 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2181.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2181>

0 引言

肝胆管结石是严重威胁国人健康的常见病。在肝胆管结石形成过程中, 分泌黏液的肝内胆

■背景资料

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)导致黏蛋白表达增加在呼吸道中研究较多, 目前认为在肺泡纤维化、支气管哮喘等疾病过程中起重要作用, 但在胆道中研究甚少。本研究采取体外环境下以LPS干预肝内胆管上皮细胞研究LPS在胆道系统中是否同样增加黏蛋白表达。

■研发前沿

目前呼吸道中关于LPS与黏蛋白研究集中于离子通路、细胞因子等方面。



图1 肝内胆管上皮细胞生长状态。

管的慢性增生性胆管炎是其病变的关键病变。正常人胆汁是无菌的,而在胆石症患者胆汁中产脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的G杆菌,尤其是大肠杆菌和克雷伯杆菌非常常见^[1]。黏蛋白MUC5AC是一种分泌型蛋白,在正常肝内胆管中几乎不表达或仅少量表达,而在肝胆管结石患者的胆汁中却大量表达^[2]。近年来关于LPS致黏蛋白表达上调的研究多集中于呼吸道上皮的研究,而在胆道上皮鲜有报道。本研究通过对正常肝内胆管上皮细胞予以LPS刺激,初步探讨胆道系统中LPS与黏蛋白表达上调的关系,为研究胆系感染与肝胆管结石关系的研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝内胆管上皮细胞(HIBEpiC)及上皮细胞专用培养基购自Sciencell公司,置于37℃、50 mL/L CO₂孵箱中培养,细胞隔天更换培养基,生长至融合度90%时以1:2-1:3比例传代。以脂多糖(LPS,提取自大肠杆菌,血清型O55: B5, Sigma公司)以1 μg/mL^[3]干预HIBEpiC(图1)。

1.2 方法

1.2.1 Real time-PCR: TRIzol法(购自Takara公司)抽提总RNA,并用分光光度仪测定RNA浓度, PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara公司)将RNA反转录为cDNA, SYBR Premix Ex Taq(Takara公司)进行荧光定量反应,引物序列MUC5AC: F'-TGGACACCAAATAC-GCCAACAAG, R'-CTGCTCACAGATGC-CAAAGCC; β-actin: F'-CTTAGTTGCGTTA-CACCCTTTCTTG, R'-CTGTACCTTCACCGTTCCAGTTT, 反应体系如下: 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 72℃ 30 s, 共40个循环,所得Ct值用2^{-ΔΔCt}计算,其中β-actin为内参。

1.2.2 Western blot检测细胞MUC5AC蛋白含量: 细胞以0.25%胰酶消化后PBS洗3遍,加入细胞

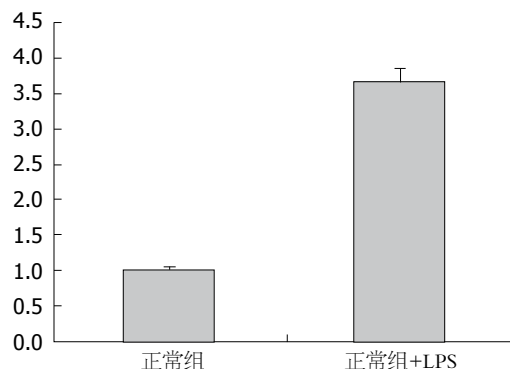


图2 MUC5AC mRNA的表达。以LPS(1 μg/mL)干预HIBEpiC, 12 h后检测细胞MUC5AC mRNA水平,将所得Ct值以2^{-ΔΔCt}计算,正常细胞组为1.00 ± 0.05, LPS干预组为3.67 ± 0.22,可见LPS干预组mRNA表达水平明显上调。LPS: 脂多糖。

裂解液(碧云天)充分吹打细胞,冰浴30 min, 4℃ 12000 g离心30 min,取上清测定蛋白浓度。取各组细胞蛋白20 μg, 8%SDS-PAGE电泳分离,转膜至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗(Santa)1:400倍稀释4℃封闭过夜,二抗1:5000倍稀释,室温孵育45 min后显色,β-actin为内参。

1.2.3 细胞免疫组织化学: 4%多聚甲醛固定细胞并以0.5% Triton X-100增加细胞膜通透性, 3% H₂O₂室温孵育15 min,山羊血清室温孵育15 min,一抗(Santa公司)1:400倍稀释,4℃过夜,二抗1:200倍稀释,室温孵育30 min,辣根酶标记室温孵育30 min后DAB显色,苏木素复染,镜下观察染色效果。

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件进行统计学分析,各组检测结果均以mean ± SD表示,数据进行方差齐性检验,若符合正态方差齐性,则应用两独立样本t检验,若不满足则先进行数据转换,使之满足正态方差齐性。P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS诱导人肝内胆管上皮细胞(HIBEpiC)MUC5AC mRNA表达上调 以LPS(1 μg/mL)刺激HIBEpiC, 12 h后检测细胞MUC5AC mRNA表达水平,并将所得Ct值用2^{-ΔΔCt}计算,正常细胞组为1.00 ± 0.05, LPS干预组为3.67 ± 0.22,可见LPS干预组mRNA表达水平明显上调(图2)。

2.2 LPS上调HIBEpiC蛋白表达水平 以LPS(1 μg/mL)刺激HIBEpiC,既往研究报道, LPS干预细胞24 h后,蛋白含量达到峰值^[4], 24 h后应用Western blot及细胞免疫化学方法检测细胞MUC5AC蛋白表达水平,可见LPS干预组蛋白表达水平明显上调(图3, 4)。

■相关报道

本文应用人肝内胆管上皮细胞进行体外干预,研究LPS是否可增加胆道细胞黏蛋白表达。

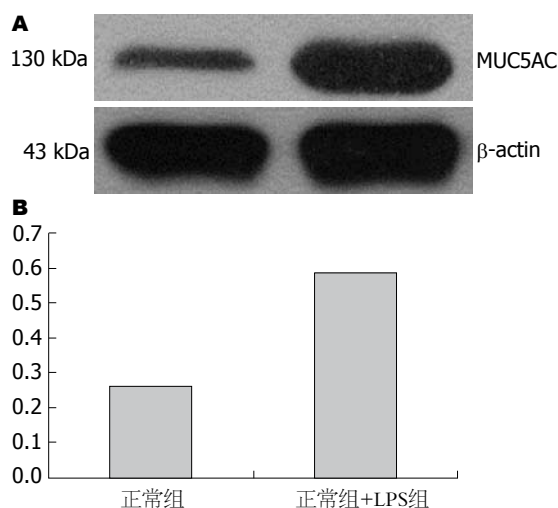


图3 Western blot检测细胞MUC5AC蛋白的表达. A: 电泳发光所见; B: 灰度分析相对比值, 正常细胞组0.26, LPS干预组0.59. LPS: 脂多糖.

3 讨论

肝内胆管结石是目前威胁我国人民群众健康的常见疾病, 治疗方法局限于结石所致萎缩肝段或叶的切除. 在组织学上, 肝胆管结石病中的胆管壁内和胆管周围腺体均呈现明显的伴有炎症和纤维化的增生性病理改变.

细菌LPS是革兰氏阴性菌的内毒素, 位于细胞壁的最外层, 覆盖于细胞壁的黏肽上, 在革兰氏阴性细菌感染及疾病演化中有重要作用, 其毒性成分主要为类脂质A. 正常人胆汁是无菌的, 而在胆石症患者的胆管胆汁中大都检出细菌, 且大都是革兰氏阴性菌, 其中最多见的是大肠杆菌, 其次是克雷伯杆菌^[1]. 关于胆石症患者胆汁中细菌的来源目前有以下几种观点, 一种观点认为胆汁中的细菌来源于十二指肠大乳头的逆流, 另一种观点认为胆汁中的细菌是肠道菌群移位进入门静脉从而进入胆汁, 还有人认为肠道菌群可以透过肠壁进入肠道淋巴结从而进入胆道.

黏蛋白广泛分布于机体各组织黏膜上皮表面, 对黏膜起保护和润滑作用, 目前已检测出20余种类型, 分布于机体不同器官, 具有组织学和细胞学特异性. 目前已经报道, 肝内胆管黏膜及周围腺体可表达6种黏蛋白(MUC1、MUC2、MUC3、MUC5AC、MUC5AB、MUC6). 其中MUC5AC是一种分泌型黏蛋白, 其基因位于染色体11p5.5^[5]. 在正常肝内胆管组织中MUC5AC很少表达, 或仅在大胆管黏膜上皮细胞中灶状表达, 但在含结石的肝内胆管中其表达显著增高^[2]. 随着胆汁黏蛋白中MUC5AC含量的增多,

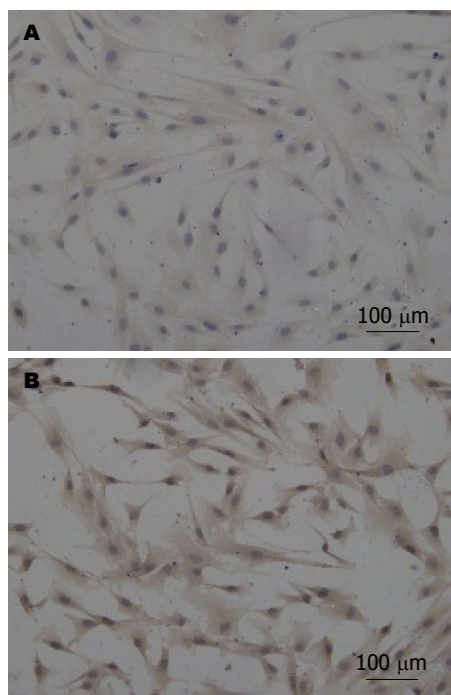


图4 细胞免疫化学方法检测细胞MUC5AC蛋白的表达. A: 正常; B: 正常+LPS. LPS: 脂多糖.

胆汁变黏稠, 研究认为MUC5AC不仅参与的结石成核过程, 同时参与了结石增大的过程^[6-8].

目前关于LPS刺激黏蛋白MUC5AC表达上调的研究大多集中于呼吸道, 另外在胃肠道和鼻上皮中偶有报道^[9,10]. 研究表明黏蛋白的过量表达在肺泡纤维化、支气管哮喘、慢性阻塞性肺疾病的疾病过程中起重要作用. 目前认为, 呼吸道中可能存在EGFR-p38/JNK途径、PKC-NADPH-ROS-TGF- α 途径调节LPS诱导的黏蛋白过表达. 同时, 细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-8等也参与了此过程, 导致细胞和组织的损害^[11-15]. 然而, 尽管在临床中可以在胆石症患者胆汁中检测到以大肠杆菌、克雷伯杆菌等为主的革兰氏阴性菌, 也发现胆石症患者胆管上皮黏蛋白MUC5AC表达升高, 但对于细菌刺激与MUC5AC表达上调是否存在因果关系目前在胆道中尚鲜有研究. 由于呼吸道上皮与肝内胆管上皮在胚胎学上具有同源性, 而本研究通过体外细胞培养的方法发现LPS刺激可导致MUC5AC在mRNA和蛋白水平表达均增高, 在胆道中是否存在相同或相似的分子通路或机制, 介导LPS上调黏蛋白MUC5AC的表达, 值得进一步探讨.

总之, LPS可以在体外诱导MUC5AC的高表达, 提示胆石症患者胆汁中细菌感染与黏蛋白

■创新盘点

本文由胆石症患者胆汁中检测到以大肠杆菌、克雷伯杆菌等为主的革兰氏阴性菌, 也发现胆石症患者胆管上皮黏蛋白MUC5AC表达升高这两个临床现象入手, 体外进行LPS干预, 希望能够发现细菌感染与黏蛋白表达升高, 甚至肝内胆管结石之间是否存在因果关系.

■应用要点

LPS可以增加肝内胆管上皮细胞MUC5AC表达, 说明在肝内胆管结石形成过程中, LPS感染可能是一个驱动因素.

■同行评价

本文研究结果将对肝内胆管结石的防止提供新的思路,具有一定指导意义。

MUC5AC表达增高可能存在因果关系,研究LPS诱导MUC5AC高表达的分子机制,可能对肝内胆管结石的防止提供新的思路。

4 参考文献

- 1 Wu SD, Yu H, Sun JM. Bacteriological and electron microscopic examination of primary intrahepatic stones. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 228-231 [PMID: 16698581]
- 2 Kim HJ, Kim SH, Chae GB, Lee SJ, Kang CD. Increased expression of mucin 5AC mRNA and decreased expression of epidermal growth-factor receptor mRNA in gallstone patients. *Tohoku J Exp Med* 2008; 214: 139-144 [PMID: 18285671]
- 3 Yang L, Junmin S, Hong Y, Shuodong W. PGE(2) induces MUC2 and MUC5AC expression in human intrahepatic biliary epithelial cells via EP4/p38MAPK activation. *Ann Hepatol* 2013; 12: 479-486 [PMID: 23619266]
- 4 Wang Y, Shen Y, Li K, Zhang P, Wang G, Gao L, Bai C. Role of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-induced mucin production in human airway epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 2009; 486: 111-118 [PMID: 19389382 DOI: 10.1016/j.abb.2009.04.006]
- 5 Gosalia N, Leir SH, Harris A. Coordinate regulation of the gel-forming mucin genes at chromosome 11p15.5. *J Biol Chem* 2013; 288: 6717-6725 [PMID: 23303185 DOI: 10.1074/jbc.M112.437400]
- 6 Sasaki M, Nakanuma Y, Kim YS. Expression of apomucins in the intrahepatic biliary tree in hepatolithiasis differs from that in normal liver and extrahepatic biliary obstruction. *Hepatology* 1998; 27: 54-61 [PMID: 9425917]
- 7 Kim YS, Gum J, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J* 1996; 13: 693-707 [PMID: 8909996]
- 8 Shoda J, Kano M, Asano T, Irimura T, Ueda T, Iwasaki R, Furukawa M, Kamiya J, Nimura Y, Todoroki T, Matsuzaki Y, Tanaka N. Secretory low-molecular-weight phospholipases A2 and their specific receptor in bile ducts of patients with intrahepatic calculi: factors of chronic proliferative cholangitis. *Hepatology* 1999; 29: 1026-1036 [PMID: 10094942]
- 9 Wang W, Xu X, Zheng M, Wan L. Lipopolysaccharides induces MUC5AC overproduction in human nasal epithelium. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; 270: 541-547 [PMID: 22576247 DOI: 10.1007/s00405-012-2037-0]
- 10 Kim ST, Ye MK, Shin SH. Effects of Asian sand dust on mucin gene expression and activation of nasal polyp epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy* 2011; 25: 303-306 [PMID: 22186242 DOI: 10.2500/ajra.2011.25.3627]
- 11 Shen Y, Chen Z, Wang Y, Song Z, Zhang Z, Jin M, Wang X, Bai C. Aquaporin 5 expression inhibited by LPS via p38/JNK signaling pathways in SPC-A1 cells. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; 171: 212-217 [PMID: 20362698 DOI: 10.1016/j.resp.2010.03.021]
- 12 Ou XM, Wang BD, Wen FQ, Feng YL, Huang XY, Xiao J. Simvastatin attenuates lipopolysaccharide-induced airway mucus hypersecretion in rats. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 1680-1687 [PMID: 19024099]
- 13 Li W, Yan F, Zhou H, Lin X, Wu Y, Chen C, Zhou N, Chen Z, Li JD, Shen H. P. aeruginosa lipopolysaccharide-induced MUC5AC and CLCA3 expression is partly through Duox1 in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013; 8: e63945 [PMID: 23691121 DOI: 10.1371/journal.pone.0063945]
- 14 Silva MA, Bercik P. Macrophages are related to goblet cell hyperplasia and induce MUC5B but not MUC5AC in human bronchus epithelial cells. *Lab Invest* 2012; 92: 937-948 [PMID: 22391959 DOI: 10.1038/labinvest]
- 15 Chand HS, Woldegiorgis Z, Schwalm K, McDonald J, Tesfaigzi Y. Acute inflammation induces insulin-like growth factor-1 to mediate Bcl-2 and Muc5ac expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47: 784-791 [PMID: 22878411 DOI: 10.1165/rcmb.2012-0079OC]

编辑 田滢 电编 闫晋利



原发性肝细胞癌中EGFR、Connexin43和E-cadherin的表达及意义

蒋艳霞, 于文娟, 林东亮, 李宏, 李玉军

蒋艳霞, 于文娟, 林东亮, 李宏, 李玉军, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青岛市 266003

蒋艳霞, 副主任医师, 主要从事外科病理诊断及消化系统肿瘤的基础及临床研究。

作者贡献分布: 此课题由李玉军与蒋艳霞设计; 研究过程由李玉军、蒋艳霞及于文娟完成; 免疫组织化学部分由李宏完成; 数据处理由于文娟与林东亮完成; 论文写作由蒋艳霞、于文娟及林东亮共同完成。

通讯作者: 李玉军, 教授, 主任医师, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院病理科. liyujun.66@163.com
收稿日期: 2013-05-12 修回日期: 2013-07-08
接受日期: 2013-07-15 在线出版日期: 2013-08-08

Significance of expression of EGFR, Connexin43 and E-cadherin in primary hepatocellular carcinoma

Yan-Xia Jiang, Wen-Juan Yu, Dong-Liang Lin, Hong Li, Yu-Jun Li

Yan-Xia Jiang, Wen-Juan Yu, Dong-Liang Lin, Hong Li, Yu-Jun Li, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Yu-Jun Li, Professor, Chief Physician, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liyujun.66@163.com

Received: 2013-05-12 Revised: 2013-07-08

Accepted: 2013-07-15 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of EGFR, Connexin43 (Cx43) and E-cadherin in primary hepatocellular carcinoma (HCC) and to analyze their relationship with clinicopathological characteristics of HCC.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of EGFR, Cx43 and E-cadherin in 74 HCC tissue specimens, 25 liver cirrhosis tissue specimens and 20 normal liver tissue specimens.

RESULTS: The positive rates of EGFR, Cx43 and E-cadherin protein expression were 66.22%, 27.03% and 40.54% in HCC, 44.00%, 68.00% and

52.00% in liver cirrhosis, and 10.00%, 95.00% and 80.00% in normal liver tissues. Expression of EGFR was significantly higher in HCC than in liver cirrhosis ($P < 0.05$) and normal liver tissue (both $P < 0.01$). Expression of Cx43 was significantly lower in HCC than in liver cirrhosis ($P < 0.05$) and normal liver tissue ($P < 0.01$). Expression of E-cadherin differed significantly between HCC and normal liver tissue ($P < 0.01$). Expression of EGFR, Cx43 and E-cadherin was associated with tumor size, differentiation grade, TNM stage, presence of intravascular cancer embolus, capsule involvement and infiltrative growth pattern (all $P < 0.05$), but not with age, gender, cirrhosis background, cancer embolus in the portal vein or serum level of alpha-fetal protein (all $P > 0.05$). In HCC, expression of EGFR was up-regulated, while that of Cx43 and E-cadherin was down-regulated. Expression of EGFR was negatively correlated with expression of Cx43 ($r = -0.3123$, $P = 0.0068$) and E-cadherin ($r = -0.2962$, $P = 0.0104$).

CONCLUSION: Combined detection of EGFR, Cx43 and E-cadherin expression can help reveal the carcinogenic mechanisms of HCC. EGFR, Cx43 and E-cadherin might be used as novel and useful markers for predicting the invasion, metastasis and prognosis of HCC and guiding the clinical therapy of this malignancy.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; EGFR; Cx43; E-cadherin; Immunohistochemistry

Jiang YX, Yu WJ, Lin DL, Li H, Li YJ. Significance of expression of EGFR, Connexin43 and E-cadherin in primary hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2185-2191 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2185.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2185>

摘要

目的: 探讨原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中表皮生长因子受体

■背景资料

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤之一, 发病率有逐年上升趋势, 且死亡率高。HCC发生和演进受多因素影响和多基因控制, 本文联合检测EGFR、Connexin43(Cx43)和E-cadherin与HCC的关系, 进一步探讨其发生发展、浸润转移机制及预测预后, 为临床早期发现HCC和寻求更好的合理有效的基因靶向治疗方法提供理论依据。

■同行评议者

单云峰, 副主任医师, 温州医学院第一附属医院肝胆外科

■研究前沿

本文联合检测EGFR、Cx43和E-cadherin在正常肝组织、肝硬化组织和HCC中表达情况,进一步综合探讨HCC发生机制;HCC 3种蛋白存在异常表达,相应的3个基因可能成为抗肿瘤药物的潜在靶点,有望为HCC的基因治疗找到新的途径。3种蛋白在HCC发生发展中具有反向调节作用,具体作用机制有待进一步明确。

(epidermal growth factor receptor, EGFR)、细胞间隙连接蛋白(connexin43, Cx43)和E-cadherin蛋白的表达及其与临床病理特征的关系。

方法:采用免疫组织化学PV 6000法检测74例原发性HCC, 25例肝硬化组织和20例正常肝组织中EGFR、Cx43和E-cadherin的表达情况。

结果:EGFR、Cx43和E-cadherin HCC组织中阳性率分别为66.22%、27.03%和40.54%, 肝硬化组织阳性率分别为44.00%、68.00%和52.00%, 正常肝组织阳性率分别为10.00%、95.00%和80.00%。EGFR在HCC组织中阳性率明显高于肝硬化和正常肝组织阳性率, 差异有显著性($P<0.05$, $P<0.01$); Cx43在HCC组织中阳性率明显低于肝硬化和正常肝组织阳性率, 差异有显著性($P<0.01$, $P<0.01$); E-cadherin在HCC组织中阳性率明显低于正常肝组织阳性率, 差异有显著性($P<0.01$)。EGFR、Cx43和E-cadherin表达与肿瘤的大小、分化程度、TNM分期、肝内血管癌栓、浸润性生长方式及累及肝被膜具有相关性(均 $P<0.05$), 与患者年龄、性别、是否伴有肝硬化、门静脉癌栓及术前血清甲胎蛋白水平无相关性(均 $P>0.05$)。HCC组织中Cx43和E-cadherin表达降低, EGFR表达增加, EGFR表达和Cx43($rs' = -0.3123$, $P = 0.0068$)及E-cadherin($rs' = -0.2962$, $P = 0.0104$)间呈负相关性。

结论:联合检测HCC组织中EGFR、Cx43和E-cadherin的表达, 有助于综合探讨HCC的发生机制。EGFR、Cx43和E-cadherin可以作为新的预测HCC浸润、转移、判断预后和指导临床靶向治疗的重要因子。我们的研究为肝癌的基因治疗提供理论依据。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词:肝肿瘤; 表皮生长因子受体; Cx43; E-cadherin; 免疫组织化学

核心提示:本文联合检测表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、Cx43和E-cadherin在正常肝组织、肝硬化组织和原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中表达, EGFR在HCC中呈高表达, 与HCC的分化程度、临床分期、侵袭浸润、转移和判断预后有关; Cx43和E-cadherin在HCC中呈低表达, 与HCC的恶性生物学行为和预后有关。同时检测3种蛋白的表达, 发现他们在HCC发生发展中具有反向调节作用, 三者协同参与HCC的发生和发展。3种

蛋白相应的基因位点, 有望成为HCC新的基因治疗药物的靶点, 为HCC临床基因治疗提供可靠的理论依据。

蒋艳霞, 于文娟, 林东亮, 李宏, 李玉军. 原发性肝细胞癌中EGFR、Connexin43和E-cadherin的表达及意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2185-2191 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2185.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2185>

0 引言

肿瘤的发生发展和演进是涉及多因素、多步骤和多基因调控的复杂病理过程, 原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤, 其死亡率占恶性肿瘤的第2位^[1], 其发生和演进亦受多因素影响和多基因调控, 为进一步探讨其发生、浸润和转移机制, 寻求更好的合理有效的治疗方法选做本实验。本研究采用免疫组织化学技术, 观察表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、细胞间隙连接蛋白(connexin43, Cx43)和E-cadherin蛋白在HCC组织中的表达及其与HCC的发生机制、作用靶点、临床病理特征、浸润和转移的关系, 为临床采用新思路诊断治疗HCC提供一定的理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料 收集青岛大学医学院附属医院手术切除存档蜡块标本, 经病理科确诊的原发性HCC 74例, 术前均未行放化疗。其中男56例, 女18例; 年龄35-79岁, 中位54.4岁; 每例均有详细的临床资料及手术记录。按国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)制定的HCC TNM分期标准: I期25例、II期19例、III期22例、IV期8例; 病理学分级按WHO分级法划分为4型^[2], 即高分化、中分化、低分化和未分化。其中高分化(I级)14例、中分化(II级)34例、低分化(III级)26例; 瘤结节直径2.5-12.0 cm, 肿瘤直径 ≤ 5 cm 46例, 肿瘤直径 > 5 cm 28例; 伴有肝硬化背景63例, 无肝硬化背景11例。经临床检查及手术记录发现有门静脉癌栓8例, 无癌栓66例。经病理镜下观察并免疫组织化学证实有血管内癌栓33例, 无血管内癌栓41例; 浸润性生长方式53例, 膨胀性生长方式21例; 累及肝被膜56例, 未累及肝被膜18例。术前检测血液中甲胎蛋白(alpha-fetal protein, AFP)含量, ≤ 400 $\mu\text{g/L}$ 53例, > 400 $\mu\text{g/L}$ 21例。取25例肝硬化组织; 另取20例正常肝组织(肝内良性病变手术患

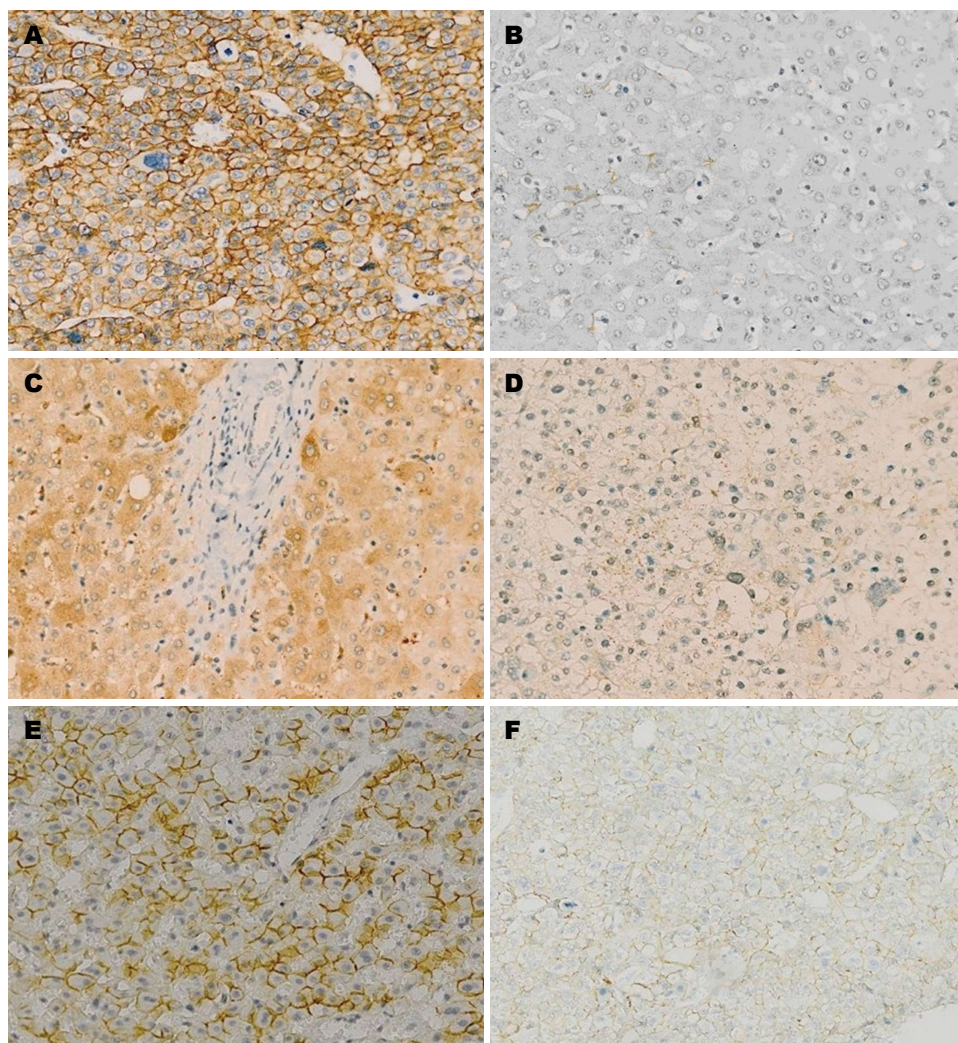


图1 EGFR、Cx43及E-cadherin在HCC及正常肝组织中的表达(PV6000法 $\times 200$)。A: HCC(低分化)EGFR细胞膜/细胞质弥漫强阳性表达; B: 正常肝组织EGFR细胞膜/细胞质散在弱阳性表达; C: 正常肝组织Cx43细胞质颗粒状弥漫强阳性表达; D: HCC(低分化)Cx43细胞质颗粒状弱阳性表达; E: 正常肝组织E-cadherin细胞膜/细胞质弥漫强阳性表达; F: HCC(低分化)E-cadherin细胞膜/细胞质强阳性表达。HCC: 原发性肝细胞癌; EGFR: 表皮生长因子受体。

■ 相关报道

Laskin等研究EGFR在多种肿瘤中呈高表达, 可作为肿瘤治疗的一个新的靶点。Berasain等研究HCC中针对阻断EGFR的靶向治疗药物已经应用于临床试验Ⅱ和Ⅲ期, 并取得较好的疗效。

者周边的正常肝组织)作为对照。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 所有标本均经40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 3 μ m厚切片。采用免疫组织化学PV 6000法染色, 具体步骤严格按说明书操作。EGFR和E-cadherin抗体均为鼠抗人单克隆抗体(即用型); Cx43抗体为兔抗人多克隆抗体(即用型), 购自北京中杉公司; PV 6000通用型试剂盒购自Zymed公司, 并设阴性及阳性对照。

1.2.2 结果判断: 采用双盲法, 由两位有经验的高年资病理医师共同进行。EGFR、Cx43和E-cadherin阳性表达均表现为棕黄色颗粒状。EGFR和E-cadherin主要定位于细胞膜, 少量定位于细胞质, Cx43定位于细胞质。根据阳性细胞染色范围(面积: $\leq 4\%$ 为0分, 5%-24%为1分, 25%-49%为2分, 50%-74%为3分, $\geq 75\%$ 为4分)和染色强度

(根据染色强弱分为0分、1分、2分、3分)乘积进行计分并进行结果判断: 0-3分为阴性(-), 4-8分为阳性(+), 9-12分为强阳性(++)。

统计学处理 采用JMTJFX简明统计分析13.0, 应用 χ^2 检验和Spearman等级相关性分析, 若 χ^2 检验条件不符合则采用确切概率法。以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 为差异有显著性, 具有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR、Cx43和E-cadherin在HCC、肝硬化及正常肝组织中的表达 EGFR、Cx43和E-cadherin在HCC及正常肝组织中的表达(图1): EGFR在HCC组织中呈强阳性表达(图1A), 正常肝组织中呈弱阳性表达(图1B); Cx43在正常肝组织中呈强阳性表达(图1C), HCC组织中呈弱阳性表达(图1D)。E-cadherin在正常肝组织中呈

■创新盘点

本文联合检测EGFR、Cx43和E-cadherin在正常肝组织、肝硬化组织和HCC中表达情况,进一步探讨HCC发生和演进过程,寻求基因靶向治疗的新位点.3种蛋白在HCC发生发展中具有反向调节作用及其与肝硬化发病机制的相关性,目前尚未见报道.

表 1 EGFR、Cx43和E-cadherin在肝细胞癌中的表达

分组	n	EGFR			Cx43			E-cadherin		
		-	+++	P值	-	+++	P值	-	+++	P值
HCC	74	25	49	<0.05 ^a	54	20	<0.01 ^a	44	30	>0.05 ^a
肝硬化组织	25	14	11	<0.05 ^c	8	17	>0.05 ^c	12	13	>0.05 ^c
正常肝组织	20	18	2	<0.01 ^b	1	19	<0.01 ^b	4	16	<0.01 ^b

^a $P < 0.05$ vs 肝硬化组织; ^b $P < 0.05$ vs 正常肝组织; ^c $P < 0.01$ vs HCC. HCC: 原发性肝细胞癌. EGFR: 表皮生长因子受体.

强阳性表达(图1E), HCC组织中呈弱阳性表达(图1F).

EGFR、Cx43和E-cadherin在HCC、肝硬化及正常肝组织中阳性表达不同(表1). EGFR在HCC组织中阳性率明显高于肝硬化和正常肝组织中阳性率, 差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$); Cx43在HCC中阳性率明显低于肝硬化和正常肝组织中阳性率, 差异有显著性($P < 0.01$, $P < 0.01$); E-cadherin在HCC中阳性率明显低于肝硬化和正常肝组织中阳性率, 与正常肝组织间差异有显著性($P < 0.01$).

2.2 EGFR、Cx43和E-cadherin表达与HCC临床病理特征的关系 EGFR阳性率随着肿瘤分化程度降低表达升高(42.86%、64.71%、80.77%), 低分化HCC阳性率明显高于高分化, 差异有显著性($P < 0.05$). Cx43在HCC中随着肿瘤分化程度降低阳性率降低(57.14%、23.53%、15.38%), 高分化HCC Cx43阳性率明显高于低分化, 差异有显著性($P < 0.05$); E-cadherin在HCC中随着肿瘤分化程度降低阳性率降低(64.29%、47.06%、19.23%), 高分化与低分化间差异有显著性($P < 0.05$), 中分化与低分化间差异有显著性($P < 0.05$). EGFR、Cx43和E-cadherin表达与肿瘤大小, TNM分期, 血管内癌栓, 浸润性生长方式和是否累及肝被膜间有相关性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与患者年龄、性别、有无伴肝硬化背景、门静脉癌栓、术前血清AFP水平均无相关性(均 $P > 0.05$, 表2).

2.3 EGFR和Cx43、E-cadherin在HCC中表达的相互关系 本组研究结果显示, 在HCC中EGFR表达增加, Cx43和E-cadherin表达减少, 经Spearman等级相关性分析, EGFR和Cx43、E-cadherin表达间呈负相关性($rs' = -0.3123$, $P = 0.0068$; $rs' = -0.2962$, $P = 0.0104$, 表3).

3 讨论

EGFR是生长因子受体家族的重要成员之一, 广

泛表达于人体血管组织和多种正常细胞表面, 如上皮细胞、肝细胞、成纤维细胞、神经胶质细胞等^[3]. 在多种上皮来源的恶性肿瘤, 如乳腺癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌等细胞表面都有异常表达^[4], 而且与肿瘤的组织学类型和侵袭力有关.

EGFR与HCC的关系目前尚未明确, 其作用机制可能为: (1)肝癌细胞可以通过自分泌EGF, 直接作用于细胞膜上的EGFR, 加速肿瘤细胞无抑制性生长; (2)EGFR的氨基酸排列和组成与某些癌基因的产物具有高度同源性, 使EGFR不依赖于EGF也能被激活, 受体的持续性激活可导致细胞不断性生长, 可能导致细胞恶性转化; (3)HCC组织中EGFR过表达, 加速肿瘤细胞生长. EGFR可能主要通过Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK信号通路传递信号参与调节肝癌细胞的增殖与分化^[5], 使肿瘤细胞过度增殖和表型恶性转化, 促进HCC的发生和发展.

本实验结果显示, EGFR在HCC组织中阳性率明显高于肝硬化组织与正常肝组织, 并且随着肿瘤分化程度降低, 恶性程度增高, 阳性率增加. EGFR高表达与HCC TNM分期、瘤体大小、伴有血管内癌栓、浸润性生长方式和累及肝被膜间有关. 该结果提示: EGFR高表达可能参与HCC的恶性转化, 与HCC的恶性程度、侵袭和转移有密切关系, 可作为判断HCC预后不良的一项重要指标.

目前研究发现: EGFR在多种实体瘤中均可呈高表达, 已经作为肿瘤治疗的一个新的靶点^[6]. 在HCC中, 针对阻断EGFR的靶向治疗药物(抗EGFR单克隆抗体和小分子EGFR酪氨酸激酶抑制剂)已经应用于HCC临床试验II期和III期, 并取得一定的疗效^[7]. 联合应用gemcitabine加oxaliplatin和erlotinib药物对控制晚期HCC患者疾病的进展有一定疗效, 并能适当延长患者无进展生存期^[8].

Cx是存在于细胞间负责物质及信息交换的

表 2 EGFR、Cx43和E-cadherin表达与肝细胞癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	EGFR			Cx43			E-cadherin		
		-	+++	P值	-	+++	P值	-	+++	P值
性别										
男	56	19	37	>0.05	38	18	>0.05	34	22	>0.05
女	18	6	12		16	2		10	8	
年龄(岁)										
≤50	26	12	14	>0.05	20	6	>0.05	17	9	>0.05
>50	48	13	35		34	14		27	21	
分化程度										
高分化	14	8	6	<0.05 ^a	6	8	<0.05 ^a	5	9	<0.05 ^a
中分化	34	12	22	>0.05 ^c	26	8	>0.05 ^c	18	16	>0.05 ^c
低分化	26	5	21	>0.05 ^e	22	4	>0.05 ^e	21	5	<0.05 ^e
TNM分期										
I-II	44	19	25	<0.05	28	16	<0.05	23	21	<0.05
III-IV	30	6	24		26	4		24	6	
肝硬化										
有	63	20	43	>0.05	48	15	>0.05	37	26	>0.05
无	11	5	6		6	5		6	5	
瘤体直径(cm)										
≤5	46	20	26	<0.05	29	17	<0.05	21	25	<0.01
>5	28	5	23		25	3		23	5	
血管内癌栓										
有	33	5	28	<0.05	28	5	<0.05	24	9	<0.05
无	41	20	21		26	15		20	21	
门静脉癌栓										
有	8	3	5	>0.05	5	3	>0.05	4	4	>0.05
无	66	22	44		49	17		40	26	
术前AFP(μg/L)										
≤400	53	20	33	>0.05	36	17	>0.05	33	20	>0.05
>400	21	5	16		18	3		11	10	
生长方式										
浸润性	53	14	39	<0.05	44	9	<0.01	38	15	<0.01
膨胀性	21	11	10		10	11		6	15	
累及肝被膜										
累及	56	13	43	<0.01	47	9	<0.01	40	16	<0.01
未累及	18	12	6		7	11		4	14	

^aP<0.05 vs 低分化; ^cP<0.05 vs 高分化; ^eP<0.05 vs 中分化. EGFR: 表皮生长因子受体; AFP: 甲胎蛋白; Cx: 细胞间隙连接蛋白.

应用要点

检测HCC中3种蛋白的表达, 可以预测HCC的恶性生物学行为和判断预后. 阻断EGFR基因的靶向治疗药物已经应用于临床试验, 并取得较好的效果; 针对Cx43和E-cadherin基因治疗有望成为新的靶向治疗位点.

通道蛋白, 其正常表达对细胞增殖、分化、凋亡及机体的生长发育至关重要. 这种由间隙连接(gap junction, GJ)介导的细胞间物质、能量及信息的交换活动称为间隙连接细胞间通讯(gap junction intercellular communication, GJIC). Cx属于多基因家族, Cx43是间隙连接家族中分布最广的分子, 对组织细胞具有生长调控的作用, 连接蛋白基因水平升高可促进间隙连接的组装, 增加细胞间信号的交流, 使细胞之间的生长相互控制^[9]. 近年来研究表明, Cx43表达异常(减少或缺失)与多种肿瘤的发生、发展及转移密切相

关^[10], 而表达异常主要是表达水平的下调, 而非基因的丢失或突变^[11].

本研究结果显示, Cx43蛋白在正常肝组织、肝硬化和HCC中阳性率逐渐降低, HCC中阳性率明显低于肝硬化和正常肝组织, 与二者间比较有统计学意义; Cx43阳性表达随着HCC的分化程度降低, 恶性程度增高, 阳性率降低, 且与肿瘤大小、TNM分期及伴有血管内癌栓、浸润性生长方式和累及肝被膜有关. 本研究结果与以往报道有一致性^[12], Cx43表达与HCC的浸润性生长方式和是否累及肝被膜间的关系尚

■同行评价

本文选题新颖, 研究方法科学, 结果可靠, 对临床肝癌的防治有重要的指导意义。

表 3 肝细胞癌组织中EGFR和Cx43、E-cadherin表达的相关性分析 ($n = 74$)

		Cx43				E-cadherin			
		-	+	++	rs'	-	+	++	rs'
EGFR	-	14	4	7	-0.3123	12	3	10	-0.2962
	+	18	4	2		12	8	3	
	++	22	2	1		20	4	2	

$P = 0.0068$, $P < 0.01$ vs Cx43; $P = 0.0104$, $P < 0.05$ vs E-cadherin. EGFR: 表皮生长因子受体。

未见报道。HCC中Cx43表达降低, 提示癌细胞GJIC异常, 机体对细胞的监视和调控能力减弱, 使细胞之间的生长相互控制减弱, 促进细胞过度克隆生长, 同时细胞凋亡功能减弱, 可导致肿瘤的发生和发展; GJIC功能降低, 影响细胞间的黏附, 黏附机制减弱, 使细胞彼此分离, 是导致肿瘤细胞浸润和转移的重要机制之一。Lin等^[9]研究结果支持这一观点。针对HCC组织中Cx43表达减少, 提示Cx43可能成为抗肿瘤药物的潜在靶点, 提高癌组织中Cx43表达, 恢复GJIC功能, 抑制癌细胞的增殖, 降低癌细胞侵袭和转移, 有望为HCC的基因靶向治疗找到一条新的途径。

E-cadherin是一种钙离子依赖性细胞间黏附分子, 是调节细胞与细胞之间, 细胞与基质之间黏附反应的重要媒介, 对维持细胞的形态和极性、组织结构的完整性有重要作用^[13]。E-cadherin在结肠癌、泌尿系统肿瘤、口腔上皮癌等多种肿瘤中呈低表达或表达缺失, 与多种肿瘤的发生发展和浸润转移及预后有关^[14,15]。E-cadherin表达下降或缺失, 一方面, 可使肿瘤细胞间黏附力下降, 细胞间接触抑制功能下降, 促使细胞增殖增加, 同时还能抑制细胞凋亡; 另一方面, 肿瘤细胞容易离散而呈浸润性生长, 促进肿瘤扩散和转移, 而且可以诱导上皮细胞向间质细胞转化, 增强肿瘤细胞的侵袭力和抗凋亡能力^[16]。

本研究中, E-cadherin蛋白在HCC中阳性率明显低于肝硬化和正常肝组织, 随着HCC分化程度降低, 恶性程度升高, 表达减少; 且与肿瘤大小、TNM分期, 伴有血管内癌栓、累及肝被膜和浸润性生长方式有关, 且随着肿瘤临床病程进展, 侵袭性加强, E-cadherin表达下降。该结果同Armeanu-Ebinger等^[17]研究基本一致。HCC中E-cadherin表达下降, 肿瘤细胞间黏附力下降, 细胞接触抑制功能减弱, 促进细胞增殖, 导致HCC发生, 同时肿瘤细胞获得高侵袭性, 促进肝癌细胞扩散和转移。E-cadherin异常表达与HCC

的恶性生物学行为密切相关, 表达减弱可促进癌细胞的浸润和转移, 提示E-cadherin是反映HCC恶性生物学行为和预后的重要标志物。

本研究显示, HCC组织中, EGFR表达增加, Cx43和E-cadherin表达减少, EGFR与Cx43、E-cadherin在HCC发生发展中具有反向调节作用, 三者协同作用共同参与HCC的发生和演进过程。

EGFR和Cx43在HCC中具有反向调节作用, 王凤翔等^[18]研究EGF对人视网膜色素上皮细胞间通讯功能和Cx43表达关系的影响发现, 经EGF处理后的人视网膜色素上皮细胞Cx43表达明显降低, 并且与EGF的浓度呈正相关性。该结果提示, EGF可以降低细胞间隙连接通讯功能, 减少Cx43蛋白的表达, 降低细胞间接触抑制, 刺激细胞的生长; 而EGF发挥其功能必须通过与其受体(EGFR)结合才能完成, 则EGFR的表达可以影响EGF的功能。本实验结果表明, HCC组织中EGFR高表达, Cx43低表达, 高表达的EGFR可以通过EGF作用, 使Cx43蛋白在HCC组织中表达下调, 降低肝癌细胞间缝隙连接功能, 降低细胞间接触性抑制, 刺激细胞过度增殖分化, 降低细胞的凋亡, 促进HCC的发生和发展。

EGFR和E-cadherin在HCC组织中表达具有负相关性, 其具体作用机制尚不清楚。Jones等^[19]对乳腺癌中EGFR和E-cadherin表达关系的研究发现, E-cadherin表达下降与EGFR表达呈明显相关性, 在细胞水平上, EGFR和E-cadherin共存于细胞间的粘着小带处与 β -catenin相连, 当EGFR结合配体, 受体自身酪氨酸磷酸化, 使得E-cadherin从肌动蛋白丝上解离下来, 使细胞的黏附功能破坏, 促进肿瘤细胞的生长与转移。

肝硬化是一个长期持续慢性肝损伤后的复杂病理过程, 导致肝硬化的原因很多, 在我国最重要的原因是病毒性肝炎, 尤其是乙型肝炎和丙型肝炎。但肝硬化的发生发展是一个多因素、多步骤的复杂过程, 受多方面因素的影响,

本实验结果显示, 肝硬化增生结节内EGFR阳性率明显高于正常肝组织, 二者间有显著性差异 ($P<0.01$), 提示EGFR可能参与了肝硬化的发病过程; 且伴有肝硬化背景组(68.25%)HCC组织中EGFR阳性率高于无肝硬化背景组(54.55%), 提示EGFR可能参与了肝硬化向HCC转化的过程, 并与肝硬化最终发展成为HCC的过程有一定的相关性. 而Cx43、E-cadherin在肝硬化组织中阳性率低于正常肝组织, 同时发现伴有肝硬化背景组HCC组织中Cx43、E-cadherin阳性率低于无肝硬化背景组, 提示Cx43、E-cadherin缺失可能参与了肝硬化的发病过程, 且在肝硬化向HCC转化过程中发挥一定的作用, 其之间详细的作用机制尚未见报道, 有待于进一步探讨.

4 参考文献

- 1 汤钊猷. 从肝癌看癌症临床研究. 肿瘤 2009; 29: 1-4
- 2 Bosman F H, Carneiro F, Hruban R H. WHO classification of tumors of the digestive system. 4th ed, Lyon: IARC, 2010: 196-261
- 3 Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 168-172 [PMID: 10707088 DOI: 10.1038/35004044]
- 4 朱严冰, 张怡梅, 耿淑美. 表皮生长因子及受体与肿瘤的研究进展. 临床误诊误治 2006; 19: 17-19
- 5 Okano J, Nagahara T, Matsumoto K, Murawaki Y. Caffeine inhibits the proliferation of liver cancer cells and activates the MEK/ERK/EGFR signalling pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 102: 543-551 [PMID: 18346049 DOI: 10.1111/j.1742-7843.2008.00231.x]
- 6 Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 1-17 [PMID: 14766123 DOI: 10.1016/j.ctrv.2003.10.002]
- 7 Berasain C, Perugorria MJ, Latasa MU, Castillo J, Goñi S, Santamaría M, Prieto J, Avila MA. The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Exp Biol Med* (Maywood) 2009; 234: 713-725 [PMID: 19429859 DOI: 10.3181/0901-MR-12]
- 8 Asnacios A, Fartoux L, Romano O, Tesmoingt C, Louafi S S, Mansoubakht T, Artru P, Poynard T, Rosmorduc O, Hebbbar M, Taieb J. Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) combined with cetuximab in patients with progressive advanced stage hepatocellular carcinoma: results of a multicenter phase 2 study. *Cancer* 2008; 112: 2733-2739 [PMID: 18412149 DOI: 10.1002/cncr.23489]
- 9 Lin FL, Chang CI, Chuang KP, Wang CY, Liu HJ. Advanced glycation end products down-regulate gap junctions in human hepatoma SKHep 1 cells via the activation of Src-dependent ERK1/2 and JNK/SAPK/AP1 signaling pathways. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 8636-8642 [PMID: 20681653 DOI: 10.1021/jf904240c]
- 10 Chen JT, Cheng YW, Chou MC, Sen-Lin T, Lai WW, Ho WL, Lee H. The correlation between aberrant connexin 43 mRNA expression induced by promoter methylation and nodal micrometastasis in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4200-4204 [PMID: 14519646]
- 11 Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene* 2000; 19: 505-513 [PMID: 10698520 DOI: 10.1038/sj.onc.1203340]
- 12 王海琴, 霍继荣, 胡继雄, 王赛. Cx43基因在肝细胞癌中的表达及意义. 中国老年学杂志 2008; 28: 35-36
- 13 Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 11-26 [PMID: 8199193 DOI: 10.1016/0304-419X(94)90003-5]
- 14 Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, Wheelock MJ, Park JU. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *J Craniomaxillofac Surg* 2007; 35: 1-9 [PMID: 17296306 DOI: 10.1016/j.jcms.2006.11.004]
- 15 Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Kantelip B, Bittard H. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2780-2787 [PMID: 16675571 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2387]
- 16 Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res* 2008; 68: 3645-3654 [PMID: 18483246 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2938]
- 17 Armeanu-Ebinger S, Wenz J, Seitz G, Leuschner I, Handgretinger R, Mau-Holzmann UA, Bonin M, Sipos B, Fuchs J, Warmann SW. Characterisation of the cell line HC-AFW1 derived from a pediatric hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012; 7: e38223 [PMID: 22666492 DOI: 10.1371/journal.pone.0038223]
- 18 王凤翔, 何守志, 顾峥, 陈兵. EGFR对人视网膜色素上皮细胞胞间通讯功能和Cx43表达的影响. 眼科新进展 2005; 25: 301-303
- 19 Jones JL, Royall JE, Walker RA. E-cadherin relates to EGFR expression and lymph node metastasis in primary breast carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 1237-1241 [PMID: 8883410 DOI: 10.1038/bjc.1996.522]

编辑 黄新珍 电编 闫晋利



抗TNF α 单链抗体复制缺陷型腺病毒载体的构建及表达

卓萌, 唐余燕, 余永胜, 周丽芹, 潘庆春, 王鹏, 臧国庆, 汤正好

■背景资料

重型肝炎是病毒性肝炎中病死率极高的一种临床类型, 主要病理特点为急剧发生的大面积肝细胞坏死, 预后极差。目前, 重型肝炎的治疗尚无特效方法, 而常规内科治疗病死率极高, 达70%以上。因此, 研究和探索一种有效和实用的治疗重型肝炎的新方法是目前亟待解决的问题。

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

卓萌, 硕士, 主要从事病毒性肝炎的基础与临床研究。

上海市科委医学引导类基金资助项目, No. 114119a1200

作者贡献分布: 实验设计及论文修改由汤正好完成; 研究过程由卓萌操作, 唐余燕与周丽芹协助完成; 本实验由臧国庆、余永胜、潘庆春及王鹏指导完成; 本论文写作由卓萌完成。

通讯作者: 汤正好, 主任医师, 博士生导师, 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。tzhhao@163.com

电话: 021-64369181-58673

收稿日期: 2013-04-07 修回日期: 2013-05-27

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Construction and identification of recombinant replication-defective adenovirus vector Ad/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv

Meng Zhuo, Yu-Yan Tang, Yong-Sheng Yu, Li-Qin Zhou, Qing-Chun Pan, Peng Wang, Guo-Qing Zang, Zheng-Hao Tang

Meng Zhuo, Yu-Yan Tang, Yong-Sheng Yu, Li-Qin Zhou, Qing-Chun Pan, Peng Wang, Guo-Qing Zang, Zheng-Hao Tang, Department of Infectious Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Shanghai, No. 114119a1200

Correspondence to: Zheng-Hao Tang, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. tzhhao@163.com

Received: 2013-04-07 Revised: 2013-05-27

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To construct a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying TNF α -scFv and to obtain high-purity virus solution by viral packaging, purification and titration.

METHODS: The TNF α -scFv gene was amplified from the PUC57-Amp vector and cloned into the shuttle plasmid pDONR221. The resulting pDONR221-TNF α -scFv was identified by DNA sequencing and then co-transfected into bacteria carrying the adenoviral backbone plasmid pAd-CMV-V5-DEST to generate an adenoviral plasmid carrying TNF α -scFv (pAd/CMV/V5-

DEST-TNF α -ScFv) by homologous recombination in bacteria. After the pAd/CMV/V5-DEST-TNF α -ScFv vector was transfected into 293 cells, the transfected 293 cells were infected with adenoviruses. The expression of TNF α -ScFv was detected by cytopathic effect and Western blot.

RESULTS: PCR amplification, restriction analysis and DNA sequencing verified that both the recombinant shuttle plasmid pDONR221-TNF α -scFv and the recombinant adenovirus vector pAd/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv were correctly constructed. After amplification and purification, the titer of recombinant adenovirus was 2.5×10^{11} TCID₅₀/mL after proliferation in 293 cells. Western blot analysis demonstrated that TNF α -scFv was expressed efficiently in 293 cells after infection.

CONCLUSION: The recombinant adenovirus vector Ad/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv has been successfully constructed, which lays a foundation for further study of gene function and therapy.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Tumor necrosis factor- α ; TNF α -scFv; Replication-defective adenovirus vector

Zhuo M, Tang YY, Yu YS, Zhou LQ, Pan QC, Wang P, Zang GQ, Tang ZH. Construction and identification of recombinant replication-defective adenovirus vector Ad/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2192-2197 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2192.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2192>

摘要

目的: 构建pAd/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv重组腺病毒载体, 通过病毒包装、纯化及滴定, 获得高纯度高感染性的病毒液, 并对TNF α -scFv进行表达、鉴定。

方法: 以携带TNF α -scFv基因的载体PUC57-Amp为模板, 扩增TNF α -scFv目的基因, 构建穿梭质粒pDONR221-TNF α -scFv, 测序证实质粒含有目的基因。与骨架质粒pAd-CMV-V5-

■同行评议者
周陶友, 副教授, 四川大学华西医院感染性疾病中心

DEST腺病毒骨架载体进行同源重组, 形成表达克隆pAd/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv. 表达克隆转染293细胞, 包装重组腺病毒, 并鉴定和病毒滴定.

结果: TNF α -scFv基因成功克隆到腺病毒载体中, 转染293细胞后成功包装出重组腺病毒, 病毒滴度为 2.5×10^{11} TCID₅₀/mL, Western blot检测到TNF α -scFv基因在293细胞中高水平表达.

结论: 成功构建了带有TNF α -scFv基因的重组腺病毒载体, 为进一步研究提供实验基础.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 抗TNF α 单链抗体; 复制缺陷型腺病毒载体

核心提示: 以TNF α 为核心的炎症反应, 在重型肝炎患者肝细胞继发性损伤中的作用早已引起人们高度重视. 近年来, scFv已越来越多地被研究和应用于医学各个领域, 为多种疾病的诊断、治疗和预防提供基础. 本研究成功构建pAd/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv重组腺病毒, 可在一定程度上阻止TNF α 引起的重型肝炎, 旨在为重型肝炎的治疗提供一种新的方法和实验基础.

卓萌, 唐余燕, 余永胜, 周丽芹, 潘庆春, 王鹏, 臧国庆, 汤正好. 抗TNF α 单链抗体复制缺陷型腺病毒载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2192-2197 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2192.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2192>

0 引言

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)属于TNF家族, 主要由巨噬细胞和活化的T细胞分泌产生. 近年来研究发现, TNF α 在许多炎症性疾病、恶性肿瘤和自身免疫性疾病的发生发展过程中起着非常重要的作用^[1,2]. TNF α 作为一种多效细胞因子, 在维持肝脏组织稳态中起着举足轻重作用. 已有研究^[3,4]证实, 在重型肝炎患者血清中TNF α 含量明显升高, 且与病情轻重呈正相关, 提示TNF α 参与了重型肝炎的发病过程. 其机制为高浓度的TNF α 可作用于肝细胞表面的肿瘤坏死因子受体(TNF α receptor, TNFR), 引起大量肝细胞炎性坏死^[5]. 鉴于高浓度TNF α 对机体的有害作用, 多年来人们一直致力于研制与开发能够阻断TNF α 效应的生物制剂^[6-10]. 其中包括单链抗体(single chain variable fragment,

scFv), scFv是利用基因工程原理将抗体的轻链(VL)和重链(VH)可变区片段(Fv)用一条较短的连接肽(linker)连接在一起的小分子抗体. 近年来, scFv已越来越多地被研究和应用于医学各个领域, 尤其是肿瘤、艾滋病等疾病的诊断、治疗和预防^[11-14]. 为探讨抗TNF α 的生物制剂对机体的保护作用, 本实验构建了抗TNF α 单链抗体复制缺陷型腺病毒载体, 为开展重型肝炎的基因治疗提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 带有TNF α -scFv目的基因载体pUC57-Amp由上海瑞赛公司提供; 中间载体pDONR221、腺病毒表达载体pAd/CMV/V5-DEST和包装细胞株293购自加拿大Mircrobix-Biosystems公司; Taq酶为美国Invitrogen公司产品; 限制性内切酶、DNA连接酶为加拿大Fermentas公司产品; 质粒抽提试剂盒、基因组DNA抽提试剂盒为Axygen公司产品; 蛋白提取试剂盒为美国Bio-Rad公司产品; *Pac* I 酶为美国NEB公司产品; 感受态大肠杆菌DH5 α 购自美国Stratagene公司; 细胞培养基DMEM、胎牛血清FBS为美国Gibco公司产品.

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增: 参照TNF α -scFv基因片段序列, 设计BP重组引物, 上下游引物的5'端分别加上ATTB1和ATTB2重组序列, 引物序列如下. 下划线标记分别为ATTB1和ATTB2重组序列. TNF α -scFv-ATTB1: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCCACCATGC-CATCTTCTGTCTCGTG-3' TNF α -scFv-ATTB2: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACTTGTTCATCGTCATCCTTGTA-ATC-3', 以携带TNF α -scFv基因的载体PUC57-Amp为模板, TNF α -scFv-ATTB1/ TNF α -scFv-ATTB2为引物, PCR扩增TNF α -scFv基因片段, 使目的片段两端分别带上ATTB1和ATTB2序列. PCR反应参数为: 95 °C 预变性3 min, 再进行30个PCR循环(94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 68 °C 90 s), 最后68 °C 延伸10 min. 1%琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物, 并回收目的片段.

1.2.2 腺病毒穿梭质粒pDONR221-TNF α -scFv和骨架质粒pAd/CMV/V5-DEST同源重组构建pAd-TNF α -scFv: 将目的片段TNF α -scFv重组到中间载体pDONR221上, 转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆, 以菌液为模

■ 研发前沿

为探讨抗TNF α 的生物制剂对重型肝炎机体的保护作用, 本研究选用目前广泛应用的第二代复制缺陷型病毒, 通过病毒包装、纯化及滴定, 成功获得了较高滴度的pAd/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv重组腺病毒.

■ 相关报道

Fong等研究表明, 有效地阻断机体早期快速释放的TNF α , 可显著地抑制机体内其他一些炎性介质(如IL-1和IL-6)的进一步释放, 从而有效地阻止疾病的进展. 在重型肝炎患者血清中TNF α 含量也明显升高, 且与病情轻重呈正相关, 提示TNF α 参与了重型肝炎的发病过程.

■创新盘点

利用非复制型腺病毒载体构建抗TNF α -ScFv的真核表达载体,介导抗TNF α -ScFv表达,提高目的基因的表达效率,并增加了应用的安全性;将抗TNF α -ScFv研究与临床应用相结合,研究其阻断内毒素诱导的肝细胞坏死作用,以探索治疗重型肝炎、肝衰竭的新方法。

板, TNF α -scFv-ATTB1/TNF α -scFv-ATTB2为引物进行菌落PCR, 将鉴定呈阳性的克隆接到LB液体培养基中, 摇菌过夜, 次日抽提质粒, 分别进行聚合酶链反应及测序鉴定。将测序正确的pDONR221-TNF α -scFv穿梭质粒上携带的目的片段, 在LR克隆II混合物作用下, 重组到骨架质粒pAd/CMV/V5-DEST上(目的基因在重组位点attR1和attR2之间), PCR参数为: 94 °C 预变性 3 min, 再进行35个PCR循环(94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s), 最后72 °C延伸5 min。取测序正确的携带目的基因的腺病毒载体菌液, 用含氨苄青霉素LB琼脂选择性平板筛选。挑取平板上生长的单克隆, 增殖细菌, 提取质粒。Thermo Nano-Drop测定质粒浓度。

1.2.3 重组腺病毒TNF α -scFv的包装: 转染前1 d, 在6孔板内接入 5×10^5 个293细胞, 至转染时细胞融合度约50%-60%。取质粒pAd/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv 3.2 μ g用Pac I酶切, 酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于250 μ L Opti-MEM中, 再加Lipofectamine-2000 8 μ L与250 μ L Opti-MEM, 室温静置5 min, 轻轻混匀, 室温孵育15-20 min。将其均匀滴加入293细胞中, 轻轻摇匀细胞培养板, 使加入的混合物均匀分布于培养液中, 转染8 h后, 弃去含Lipofectamine-DNA混合物的培养液上清, 换成新鲜DMEM+10%FBS培养基, 37 °C培养箱中孵育过夜。转染36-48 h后观察细胞状态, 将细胞传到10 cm细胞培养板, 此后每2-3 d换新鲜的培养基, 5-7 d可看到明显的病毒斑出现, 直到大量细胞崩解脱落, 收获病毒液。

1.2.4 重组腺病毒的扩增与滴度检测: 将293细胞均匀铺于10 cm培养瓶, 培养至细胞密度达到80%-90%时, 加入100 μ L病毒初液进行病毒感染, 轻轻混匀, 继续培养箱中培养, 直至80%-90%细胞变圆并漂浮(约感染后2-3 d), 感染48 h后收样; 将收获的装有细胞培养上清及细胞碎片的离心管, -80 °C/37 °C反复冻融2次, 3000 r/min离心15 min, 除去细胞碎片, 保留上清(含重组腺病毒)。取病毒上清, 在96孔板中以不同稀释梯度的病毒感染293细胞, 显微镜下观察细胞(约10 d), 记数每排出现(细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)的孔数, 阴性对照组不得有CPE出现。

1.2.5 重组腺病毒中TNF α -scFv的Western blot鉴定: 用蛋白提取试剂盒提取经重组腺病毒感染的293A细胞的蛋白, 使用BCA蛋白测定试剂盒测定上清液中的蛋白浓度, 进行免疫印迹实验。即加入2 \times SDS-PAGE上样缓冲液, 100 °C

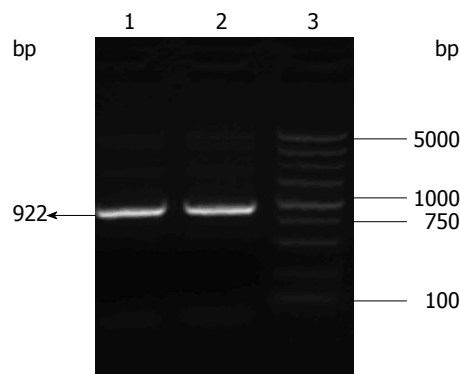


图1 DNA凝胶电泳图显示PCR结果。泳道1-2: TNF α -scFv重组片段PCR产物; 3: Marker DL5000(从上至下分别5000、3000、2000、1500、1000、750、500、250、100 bp)。TNF α : 肿瘤坏死因子 α 。

煮沸3 min, 10%SDS-PAGE电泳, 考马氏亮蓝染色; 电泳转印100 V 2 h, PBS洗涤3次, TTBS(0.1%Tween-20的PBS)+3%BSA封闭1 h, 加入TTBS+1%BSA稀释的一抗(1:1000), 4 °C过夜, TTBS洗涤3次, 加入酶标二抗(1:2000), 室温孵育2 h, TTBS洗涤3次, 加入底物DAB/H₂O₂显色。

2 结果

2.1 目的基因重组片段的PCR扩增 以携带TNF α -scFv基因的载体PUC57-Amp为模板, PCR扩增TNF α -scFv目的片段, 所扩增出的片段与预期922 bp(箭头所示)大小相符(图1)。

2.2 穿梭载体pDONR221-TNF α -scFv的菌落PCR鉴定 目的片段TNF α -scFv重组到中间载体pDONR221上, 转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞, 挑选阳性克隆, 提取质粒, 以质粒为模板, TNF α -scFv-ATTB1/TNF α -scFv-ATTB2为引物进行菌落PCR鉴定(图2)。阳性质粒送测序, PCR鉴定为阳性的克隆经质粒提取纯化后测序, 获得的序列完全正确。TNF α -scFv基因序列如下: ATGCCATCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCT-GCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTATGGCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAAGTATTTCTTCTACTGGTGCTTCTACAACCTTACGCAGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG-

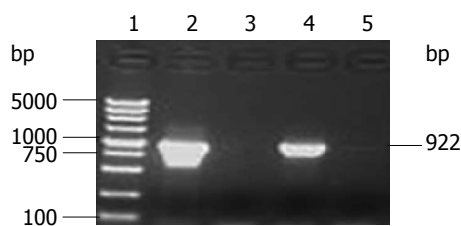


图2 穿梭载体pDONR221-TNF α -scFv的菌落PCR鉴定。泳道1: Marker DL5000(从上至下分别为5000、3000、2000、1500、1000、750、500、250、100 bp); 2: 阳性对照(以PUC57-Amp为模板); 3、5: 阴性克隆PCR扩增结果; 4: 阳性克隆PCR扩增结果。TNF α : 肿瘤坏死因子 α 。

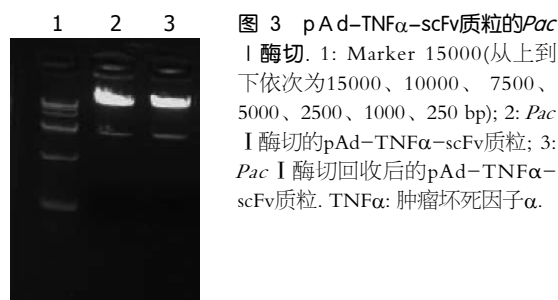


图3 pAd-TNF α -scFv质粒的Pac I 酶切。1: Marker 15000(从上到下依次为15000、10000、7500、5000、2500、1000、250 bp); 2: Pac I 酶切的pAd-TNF α -scFv质粒; 3: Pac I 酶切回收后的pAd-TNF α -scFv质粒。TNF α : 肿瘤坏死因子 α 。

GACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGTGGTGCTGCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGGTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTG-CATCCTATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGGCTAATAATGCTCCTACTACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTACAAGGATGACGATGACAAG.

2.3 pAd-TNF α -scFv质粒Pac I 酶切电泳图 重组腺病毒质粒pAd/CMV/V5-DEST-TNF α -scFv用Pac I 酶切, 获得条带与预期大小一致(图3)。

2.4 pAd-TNF α -scFv在293细胞中的包装及其滴度的测定 重组腺病毒质粒pAd-TNF α -scFv转染293细胞, 获得重组腺病毒Ad-TNF α -scFv, 进一步感染293细胞扩增纯化后, 测得重组腺病毒滴度为 2.5×10^{11} TCID₅₀/mL(图4)。

2.5 TNF α -scFv过表达Western blot结果 含目的

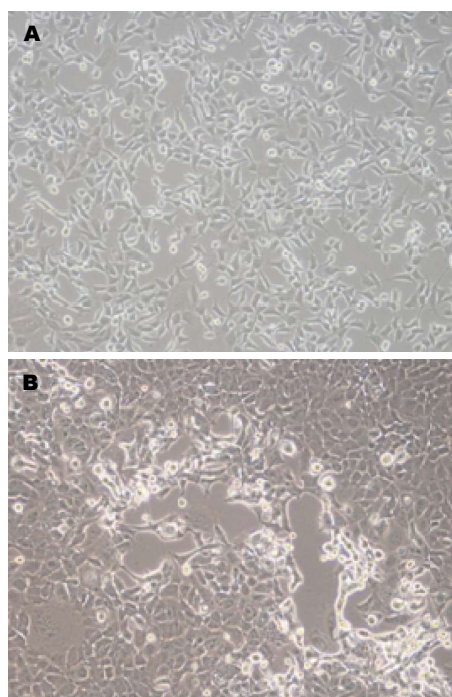


图4 pAd-TNF α -scFv在293细胞中的包装($\times 100$)。A: 转染前293细胞; B: pAd-TNF α -scFv在293细胞中包装转染7 d。TNF α : 肿瘤坏死因子 α 。

基因TNF α -scFv的重组腺病毒Ad-TNF α -scFv感染293细胞24 h后, 其目的蛋白在该细胞中得到了高表达(图5)。

3 讨论

正常生理状况下, 体内TNF α 活性极低, 对肝细胞不但无损伤作用, 反而会促进细胞的增殖及分化^[15,16]。然而, 在某些病理条件下, TNF α 持续或大量释放至局部组织体液中, 与其他细胞因子关系失调, 可介导致病因素对肝细胞的损伤, 从而引起不同程度的肝脏疾病^[17,18]。在病理生理状态下, TNF是机体最早释放的促炎性细胞因子, 在动物小鼠血清中大约30 min能够检测出^[19]。Fong等^[20]研究表明, 有效地阻断机体早期快速释放的TNF α , 可显著地抑制机体内其他一些炎性介质[如白介素-1(interleukin-1, IL-1)和IL-6]的进一步释放, 从而有效地阻止疾病的进展。近年来, 用中和性TNF α 单克隆抗体可阻止TNF α 引起的许多疾病和炎症反应^[21,22], 因此, 抗TNF α 抗体具有非常广阔的临床应用前景。然而抗TNF α 单克隆抗体对人有很强的免疫原性, 临床长期反复多次给药时, 会使人体内产生较强的人抗鼠抗体反应, 使其临床疗效减弱甚至消失。而本研究选用的scFv仅含有完整抗体的可变区, 不含天然抗体的恒定区, 因而其免疫原性较单克隆抗

■应用要点

本文成功构建了抗TNF α 单链抗体复制缺陷型腺病毒载体, 为进一步研究抗TNF α -scFv对内毒素诱导的肝细胞坏死的阻断效果奠定了良好的基础。

■名词解释

单链抗体：利用基因工程原理将抗体的轻链(VL)和重链(VH)可变区片段(Fv)用一条较短的连接肽(linker)连接在一起的小分子抗体。其基本结构为VH-linker-VL或VL-linker-VH。由于其具有与抗原结合的活性区域，因而保留了天然抗体的特异性和相似的亲和力。

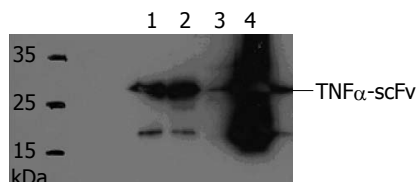


图5 Western blot检测重组腺病毒转染的293A细胞中TNF α -scFv的表达。1: 重组腺病毒转染293细胞培养上清; 2: 重组腺病毒转染293细胞培养上清(浓缩); 3: 空白蛋白对照; 4: 重组腺病毒转染293细胞蛋白提取物。TNF α : 肿瘤坏死因子 α 。

体明显减低，从而最大限度地减轻了异种蛋白质引起的免疫变态反应。由于scFv仍具有与抗原结合的活性区域，因而保留了天然抗体的特异性和相似的亲和力^[23]。同时，由于不含完整抗体的恒定区，因而不与非靶细胞的Fc受体结合，从而减少了抗体的非特异性结合，更易于到达目标部位并可获得较高浓度的聚集^[24]。

基因治疗可将外源的目的基因片段插入合适的表达载体中，再以载体导入机体靶细胞，使目的基因在机体内高效表达，达到临床治疗的效果。肝脏作为基因治疗的主要靶器官，目前其已被广泛应用各种肝脏疾病的研究^[25]。同时，腺病毒载体因其宿主范围广、感染效率高、高性质稳定、包装容量大、繁殖滴度高等优点，使其在基因治疗领域得到了广泛应用^[26-28]。然而仍具备复制能力的重组腺病毒对靶细胞可产生一定的损伤，课题组为了增加病毒转染的安全性，在这次研究中选用设计更加合理的第二代重组腺病毒作为合适的载体。第二代腺病毒载体已被不同程度的删除了E1、E2和/或E4基因，这些基因编码的相关病毒蛋白可诱导大多数机体的免疫反应^[28]，另外，Barry等^[29]也研究表明，E1区基因可编码多种与病毒免疫逃避有关的蛋白质，因而去除了相关的基因，从而大大降低了腺病毒载体的免疫原性。在第二代腺病毒载体中，pAd/CMV/V5-DEST为E1区和E3区缺失的复制缺陷型重组腺病毒载体，由于E1区基因为腺病毒复制所必需，因此需要一个能够产生E1蛋白(E1A和E1B)的293A细胞来提供反式补偿，从而使得重组腺病毒能够复制和大量扩增。同时他可以用两种抗生素筛选成功转化的质粒，且带有V5表位标签，表达出目的基因蛋白同时也携带V5融合蛋白，便于检测。这种复制缺陷型重组腺病毒仍具有感染靶细胞的能力但不可复制，因而不会对靶细胞造成直接的损害，有利于其在基因治疗研究中的应用^[30]。

鉴于既往传统的腺病毒载体构建过程繁琐，费时费力，稳定性差，阻碍了实验的进展。我们采用了He等^[31]研究的质粒间同源重组方法，即将外源基因整合进入腺病毒基因组中，不仅可避免重组过程中目的基因产生突变，而且可防止野生型病毒的混入，因而显得安全可靠，方法简便易行，而且成功率高，并大大简化并加快了重组腺病毒产生过程。本次研究，我们先把携带有目的基因(TNF α -scFv)的PUC57-Amp装入一个带有腺病毒基因组同源序列的穿梭质粒pDONR221中，构建成转移质粒pDONR221-TNF α -scFv，再将其与克隆了腺病毒基因组的质粒pAd/CMV/V5-DEST共转染293细胞，通过转移质粒与腺病毒基因组的同源序列间发生同源重组，目的基因便被转移到腺病毒基因组中，形成一个在E1或E3缺失区带有目的基因的重组体腺病毒，并在293细胞中复制和包装成病毒颗粒。最终Western blot分析证实，重组腺病毒能有效的携带TNF α -scFv基因在靶细胞中高水平表达。这一初步研究结果为我们今后继续开展重型肝炎的基因治疗研究提供了实验基础。

4 参考文献

- Jadali Z, Amiri MM, Ravanbakhsh M. Apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with sepsis. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53: 646-650 [PMID: 21045385 DOI: 10.4103/0377-4929.72013]
- Pérez-Fuentes R, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos J, Torres-Rasgado E, Salgado-Rosas H, Romero-Díaz M, Pulido-Pérez P, Sánchez-Guillén MC. Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2007; 101: 123-132 [PMID: 17316498 DOI: 10.1179/136485907X154593]
- Xing T, Li L, Cao H, Huang J. Altered immune function of monocytes in different stages of patients with acute on chronic liver failure. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 184-188 [PMID: 17177978]
- Singhal S, Chakravarty A, Das BC, Kar P. Tumour necrosis factor-alpha and soluble Fas ligand as biomarkers in non-acetaminophen-induced acute liver failure. *Biomarkers* 2009; 14: 347-353 [PMID: 19505222 DOI: 10.1080/13547500903013664]
- Papa S, Bubici C, Zazzeroni F, Franzoso G. Mechanisms of liver disease: cross-talk between the NF-kappaB and JNK pathways. *Biol Chem* 2009; 390: 965-976 [PMID: 19642868 DOI: 10.1515/BC.2009.111]
- Lee TW, Fedorak RN. Tumor necrosis factor- α monoclonal antibodies in the treatment of inflammatory bowel disease: clinical practice pharmacology. *Gastroenterol Clin North Am* 2010; 39: 543-557 [PMID: 20951917 DOI: 10.1016/j.gtc.2010.08.018]
- Brunasso AM, Puntoni M, Gulia A, Massone C. Safety of anti-tumour necrosis factor agents in patients with chronic hepatitis C infection: a sys-

- tematic review. *Rheumatology* (Oxford) 2011; 50: 1700-1711 [PMID: 21690185 DOI: 10.1093/rheumatology/ker190]
- 8 Coffin CS, Fraser HF, Panaccione R, Ghosh S. Liver diseases associated with anti-tumor necrosis factor- α (TNF- α) use for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 479-484 [PMID: 20848520 DOI: 10.1002/ibd.21336]
 - 9 Khokhar OS, Lewis JH. Hepatotoxicity of agents used in the management of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2010; 28: 508-518 [PMID: 20926880 DOI: 10.1159/000320410]
 - 10 Coffin CS, Fraser HF, Panaccione R, Ghosh S. Liver diseases associated with anti-tumor necrosis factor- α (TNF- α) use for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 479-484 [PMID: 20848520 DOI: 10.1002/ibd.21336]
 - 11 Zhang MY, Borges AR, Ptak RG, Wang Y, Dimitrov AS, Alam SM, Wiecezorek L, Bouma P, Fouts T, Jiang S, Polonis VR, Haynes BF, Quinnan GV, Montefiori DC, Dimitrov DS. Potent and broad neutralizing activity of a single chain antibody fragment against cell-free and cell-associated HIV-1. *MAbs* 2010; 2: 266-274 [PMID: 20305395]
 - 12 Koh WW, Steffensen S, Gonzalez-Pajuelo M, Hoorlbeke B, Gorlani A, Szyndol A, Forsman A, Aasa-Chapman MM, de Haard H, Verrips T, Weiss RA. Generation of a family-specific phage library of llama single chain antibody fragments that neutralize HIV-1. *J Biol Chem* 2010; 285: 19116-19124 [PMID: 20400507 DOI: 10.1074/jbc.M110.116699]
 - 13 Jafari R, Holm P, Sandegren J, Stigbrand T, Sundström BE. Localization of complexed anticytokeratin 8 scFv TS1-218 to HeLa HEp-2 multicellular tumor spheroids and experimental tumors. *Cancer Biother Radiopharm* 2010; 25: 455-463 [PMID: 20707717 DOI: 10.1089/cbr.2010.0785]
 - 14 Pérez-Martínez D, Tanaka T, Rabbitts TH. Intracellular antibodies and cancer: new technologies offer therapeutic opportunities. *Bioessays* 2010; 32: 589-598 [PMID: 20544739 DOI: 10.1002/bies.201000009]
 - 15 Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1441-1446 [PMID: 9037072 DOI: 10.1073/pnas.94.4.1441]
 - 16 Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998; 28: 1226-1234 [PMID: 9794905 DOI: 10.1002/hep.510280509]
 - 17 Bradham CA, Plumpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein CI. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 1998; 275: G387-G392
 - 18 Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev* 2000; 174: 160-171 [PMID: 10807515 DOI: 10.1034/j.1600-0528.2002.017411.x]
 - 19 Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; 330: 662-664 [PMID: 3317066 DOI: 10.1038/330662a0]
 - 20 Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 1989; 170: 1627-1633 [PMID: 2809510 DOI: 10.1084/jem.170.5.1627]
 - 21 Brenndörfer ED, Weiland M, Frelin L, Derk E, Ahlén G, Jiao J, Bode JG, Sällberg M. Anti-tumor necrosis factor α treatment promotes apoptosis and prevents liver regeneration in a transgenic mouse model of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010; 52: 1553-1563 [PMID: 20886569 DOI: 10.1002/hep.23870]
 - 22 Bragagni G, Lari F, Magenta G, Brogna R, Zoli G. [Echocardiographic evaluation of anti-tumor necrosis factor- α therapy with infliximab in patients without cardiac pathologies]. *Recenti Prog Med* 2010; 101: 289-292 [PMID: 20842955]
 - 23 Ohshima M, Inoue K, Hayashi H, Tsuji D, Mizugaki M, Itoh K. Generation of AcGFP fusion with single-chain Fv selected from a phage display library constructed from mice hyperimmunized against 5-methyl 2'-deoxycytidine. *Protein Eng Des Sel* 2010; 23: 881-888 [PMID: 20876190 DOI: 10.1093/protein/gzq066]
 - 24 Bühler P, Wetterauer D, Gierschner D, Wetterauer U, Beile UE, Wolf P. Influence of structural variations on biological activity of anti-PSMA scFv and immunotoxins targeting prostate cancer. *Anticancer Res* 2010; 30: 3373-3379 [PMID: 20944111]
 - 25 Domvri K, Zarogoulidis P, Porpodis K, Koffa M, Lambropoulou M, Kakolyris S, Kolios G, Zarogoulidis K, Chatzaki E. Gene therapy in liver diseases: state-of-the-art and future perspectives. *Curr Gene Ther* 2012; 12: 463-483 [PMID: 22845887 DOI: 10.2174/156652312803519788]
 - 26 Wang L, Qi X, Sun Y, Liang L, Ju D. Adenovirus-mediated combined P16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 819-824 [PMID: 12224022 DOI: 10.1038/sj.cgt.7700502]
 - 27 周智, 张定凤, 任红. HBsAg及B7-2抗原重组腺病毒载体感染免疫研究 2001; 9: 111-113
 - 28 Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 2002; 7: 46-59 [PMID: 11854546 DOI: 10.1634/theoncologist.7-1-46]
 - 29 Barry M, McFadden G. Apoptosis regulators from DNA viruses. *Current opinion in immunology* 1998; 10: 422-30 [DOI: 10.1016/S0952-7915(98)80116-7]
 - 30 Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8802-8806 [PMID: 8090727 DOI: 10.1073/pnas.91.19.8802]
 - 31 He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 2509-2514 [PMID: 9482916 DOI: 10.1073/pnas.95.5.2509]

同行评价

本研究实验设计合理, 试验方法正确, 具有一定的学术价值, 为将来应用于临床重型肝炎的治疗提供新的思路和途径。

编辑 黄新珍 电编 闫晋利



SASH1基因在食管鳞癌中的表达及临床意义

刘秋菊, 贺远龙, 刘红云, 卫红军, 许琳, 王青

■背景资料

SASH1基因是2003年发现的一种新的候选抑癌基因。该基因在多种肿瘤中表达缺失或下调, 此现象与肿瘤临床病理特征的关系日益受到关注。本研究旨在揭示SASH1基因在食管癌中的表达及与肿瘤生物学行为的关系。

刘秋菊, 贺远龙, 许琳, 王青, 青岛大学医学院附属青岛市市立医院消化科 山东省青岛市 266071

刘红云, 卫红军, 青岛大学医学院附属青岛市市立医院病理科 山东省青岛市 266071

刘秋菊, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究。

国家自然科学基金青年科学基金资助项目, No. 81101813

作者贡献分布: 此课题由贺远龙设计; 研究过程由刘秋菊、刘红云、卫红军及许琳操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王青与贺远龙提供; 数据分析由刘秋菊完成; 本论文的写作由刘秋菊、贺远龙及王青完成。

通讯作者: 王青, 主任医师, 266071, 山东省青岛市东海中路5号, 青岛大学医学院附属青岛市市立医院东区消化内科。

qingwangqingdao@yahoo.com.cn

电话: 0532-88905630

收稿日期: 2013-05-24 修回日期: 2013-06-25

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Clinical significance of expression of SASH1 in esophageal squamous cell carcinoma

Qiu-Ju Liu, Yuan-Long He, Hong-Yun Liu, Hong-Jun Wei, Lin Xu, Qing Wang

Qiu-Ju Liu, Yuan-Long He, Lin-Xu, Qing Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Hong-Yun Liu, Hong-Jun Wei, Department of Pathology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81101813

Correspondence to: Qing Wang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, 5 Donghai Middle Road, Qingdao 266071, Shandong Province, China. qingwangqingdao@yahoo.com.cn

Received: 2013-05-24 Revised: 2013-06-25

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To detect the expression of SAM- and SH3-domain containing 1 (SASH1) in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and to analyze the relationship between SASH1 expression and clinical and pathological parameters of ESCC.

METHODS: The expression of SASH1 was detected by immunohistochemistry in 72 ESCC

specimens and 40 tumor-adjacent specimens.

RESULTS: The positive rate of SASH1 protein expression in ESCC was significantly lower than that in tumor-adjacent non-carcinoma tissue (41.67% vs 80.00%, $P < 0.001$). The positive rate of SASH1 protein expression was significantly higher in patients without lymph node metastasis than in those with lymph node metastasis ($\chi^2 = 6.583$, $P < 0.05$). Expression of SASH1 was associated with tumor differentiation and TNM stage in ESCC (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Down-regulation of SASH1 expression occurs in ESCC. SASH1 may be a novel tumor suppressor in ESCC and can be used as a molecular marker for the diagnosis and treatment of ESCC.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; SASH1; Immunohistochemistry

Liu QJ, He YL, Liu HY, Wei HJ, Xu L, Wang Q. Clinical significance of expression of SASH1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2198-2201 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2198.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2198>

摘要

目的: 探讨候选抑癌基因SASH1在食管鳞状细胞癌中的表达及与肿瘤相关的临床病理特征的关系。

方法: 应用免疫组织化学SP法检测72例食管鳞癌组织及40例癌旁组织中SASH1蛋白的表达。

结果: SASH1蛋白在癌组织阳性表达率显著低于癌旁组织, 统计学分析表明两者差异有显著意义(41.67% vs 80.00%, $P < 0.001$)。其表达率在食管鳞癌伴淋巴结转移组中较不伴淋巴结转移组明显降低($\chi^2 = 6.583$, $P < 0.05$)。其在食管鳞癌组织中的表达水平与肿瘤分化程度及TNM分期相关($P < 0.05$)。

■同行评议者

王建明, 副教授, 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系

结论: *SASH1*基因在食管鳞癌中表达下调, 该基因可能是食管鳞癌的肿瘤抑制基因, 可能作为分子标记而用于食管鳞癌的诊断和治疗。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 食管鳞癌; *SASH1*基因; 免疫组织化学

核心提示: *SASH1*基因在食管鳞癌中的表达下调, 并与肿瘤的分化程度、临床分期、淋巴结转移有关。 *SASH1*基因可能作为候选抑癌基因, 用于肿瘤的诊断、治疗及预后判断。

刘秋菊, 贺远龙, 刘红云, 卫红军, 许琳, 王青. *SASH1*基因在食管鳞癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2198-2201 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2198.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2198>

0 引言

*SASH1*基因是进化保守的SLY(SH3-domain containing expressed in lymphocytes)基因家族的一员, 广泛表达于人体多种正常组织(淋巴样干细胞除外)^[1]。近年来*SASH1*基因作为候选抑癌基因, 在肿瘤中的表达受到越来越多的重视。研究表明, *SASH1*基因在结肠癌^[2]、肺癌^[3]、骨肉瘤^[4]、黑色素瘤^[5]、神经胶质瘤^[6]等多种肿瘤中表达下降, 并与肿瘤侵袭性生长、转移灶的形成及预后有关。但迄今为止, 国内外尚未见*SASH1*基因在食管鳞癌中表达的有关报道。本研究分析了*SASH1*基因在食管鳞癌中的表达情况, 并探讨其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选取青岛市立医院2009-02/2013-02手术切除的食管癌标本72例。病理诊断确诊为食管鳞状细胞癌, 为原发性, 且病灶位于齿状线上方。其中男55例, 女17例, 年龄35岁-84岁, 平均57.4岁±6.1岁。食管鳞癌组无淋巴结转移者40例, 伴淋巴结转移者32例。所有病例根据国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)2009年修订的食管癌TNM分期标准进行分期, 其中I期12例, II期34例, III期26例。另取癌旁组织(距瘤块组织5 cm以上)40例。患者术前均未经放、化疗及免疫治疗。标本经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋后, 进行4 μm连续切片。兔抗人*SASH1*多克隆抗体(浓缩型)购自ABGENT公司。快捷型酶标羊抗鼠/兔IgG复合物(二抗)、非免疫动物血清(牛)、DAB显色试剂盒、柠檬

酸组织抗原修复液均购自福州迈新生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学: 切片逐级脱蜡、水化至水。置于1:100柠檬酸溶液(pH 6.0)中, 高压修复5 min。自然冷却至室温。3%过氧化氢(灭内源过氧化物酶)10 min。非免疫动物血清(牛)封闭10 min。滴加一抗(浓缩液1:300稀释), 4℃冰箱过夜。复温20 min后, 滴加二抗工作液, 静置10 min。DAB显色。苏木素复染20 s。脱水、透明、封片。用PBS代替一抗作空白对照。

1.2.2 结果判定: 采用双盲法统计实验结果。以细胞核中出现明显的棕黄色颗粒为*SASH1*蛋白表达阳性。400倍视野下每张切片选择5个代表区。分别进行细胞计数, 按照阳性细胞百分数评分, 阳性细胞百分数5%以下为0分, 5%-24%为1分, 25%-49%为2分, 50%-74%为3分, 75%以上为4分。按染色强度评分, 无着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。最后以阳性细胞百分数计分和染色强度计分相乘所得的总分进行结果判定。0-4分作为阴性, 5分以上作为阳性。

统计学处理 应用SPSS19.0软件进行统计分析。*SASH1*的表达与食管鳞癌临床病理特征的关系采用 χ^2 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *SASH1*蛋白在食管鳞癌及癌旁组织中的表达 *SASH1*蛋白阳性表达主要表现在细胞核出现明显棕黄色颗粒(图1)。本实验中, *SASH1*蛋白在癌组织阳性表达率(41.67%)较癌旁组织(80.00%)明显下降, 差异有统计学意义($P < 0.001$, 表1)。

2.2 *SASH1*蛋白的表达与食管鳞癌临床病理特征之间的关系 *SASH1*蛋白在中-高分化食管鳞癌组织阳性率高于低分化组织($P < 0.05$), 食管鳞癌伴淋巴结转移组阳性表达率低于无淋巴结转移组($P < 0.05$), TNM分期III期*SASH1*蛋白的阳性表达率低于I-II期病例($P < 0.05$)。结果表明: *SASH1*蛋白在食管鳞癌组织中的表达水平与肿瘤分化程度、淋巴结转移情况及食管鳞癌的进展程度有关, 而其表达与患者年龄、性别无关($P > 0.05$, 表2)。

3 讨论

*SASH1*基因是编码衔接蛋白的SLY基因家族的一员^[7]。该基因是2003年德国学者Zeller等^[1]研究人染色体6q23-25的杂合性缺失时发现的。

■研发前沿

目前, *SASH1*基因与恶性肿瘤关系的研究已成为热点。然而, *SASH1*基因的作用机制尚不清楚, 还有不少问题需要进一步阐明: (1)*SASH1*与肿瘤相关信号转导通路的关系; (2)微卫星状态和*SASH1*基因之间的关系; (3)*SASH1*表达水平变化是否与表观遗传学有关, 比如启动子的过甲基化。

■相关报道

Chen等通过转染*SASH1*进入人肺腺癌细胞系A549发现, 转染的A549细胞其*SASH1*蛋白表达升高, 而细胞周期蛋白D1、MMP-2/9的表达均下降, 且细胞活力降低; 并用PI法证明*SASH1*基因的表达升高导致A549细胞系的细胞周期阻滞在G₀/G₁期。这表明*SASH1*基因可能抑制癌细胞的生长、增殖、转移, 促进凋亡。

■创新亮点

本研究首次采用免疫组织化学技术检测*SASH1*基因在食管鳞癌组织、癌旁组织中的表达情况,并探讨其与食管鳞癌临床病理特征之间的关系。

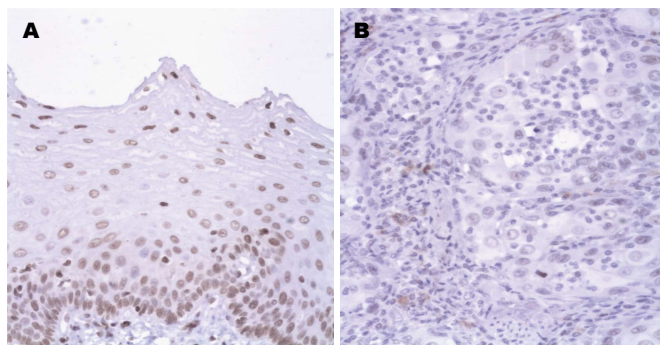


图 1 *SASH1*蛋白的表达(SP×200). A: 癌旁组织*SASH1*阳性表达; B: 癌组织*SASH1*阴性表达.

表 1 *SASH1*蛋白在人食管鳞癌组织及癌旁组织中的表达

	<i>n</i>	<i>SASH1</i> 的表达		阳性率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
		阳性	阴性			
癌组织	72	30	42	41.7	24.464	0.000
癌旁组织	40	32	8	80.0		

表 2 *SASH1*与食管鳞癌临床病理特征的关系

临床病理特征	<i>n</i>	<i>SASH1</i> 的表达		阳性率(%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
		阳性	阴性			
年龄(岁)					0.411	0.521
≥60	32	12	20	37.5		
<60	40	18	22	45.0		
性别					1.164	0.281
女	17	9	8	52.9		
男	55	21	34	38.2		
分化程度					8.102	0.004
高-中	52	27	25	51.9		
低	20	3	17	15.0		
淋巴结转移					6.583	0.010
无	40	22	18	55.0		
有	32	8	24	25.0		
TNM分期					8.428	0.004
I-II	46	25	21	54.4		
III	26	5	21	19.2		

*SASH1*蛋白的结构包括两种介导蛋白间相互作用的基序: 一个Src同源结构域3(Src homology domain 3, SH3)结构域, 两个不育 α 基序(sterile α -module, SAM)结构域. SH3结构域能够识别富含脯氨酸和疏水残基的序列而介导蛋白之间的相互作用^[8], SAM结构域可与含相同结构域的蛋白发生同源和异源的寡聚化作用^[9,10]. 自从Zeller等^[1]研究发现乳腺癌中*SASH1*基因表达下调后, 大量研究证明其在多种肿瘤组织中存在表达下调现象. 本试验通过免疫组织化学的方法检测*SASH1*基因在食管鳞癌中的表达, 分析*SASH1*基因与食管鳞癌分化程度等临床病理特征之间的

关系, 探讨其在食管癌发生发展中的作用.

Zeller等^[1]报道, 在其研究的65例乳腺癌样本中, *SASH1*基因30%缺失, 70%表达下调. 而在Rimkus等^[2]研究的113例结肠癌组织中, *SASH1*基因48例呈阳性表达, 表达率为42.5%. 本研究结果中, *SASH1*蛋白在食管鳞癌组织阳性表达率41.7%, 与上述报道相近. *SASH1*基因在肿瘤组织中出现表达缺失或下调的机制及其意义尚不清楚, 可能与以下因素有关: (1)影响信号转导通路. Lindvall等^[11]研究发现*SASH1*基因可能是Bruton酪氨酸激酶相关信号转导途径的调节者. Dubois等^[12]研究发现信号接头蛋白*SASH1*结合14-3-3

■应用要点

*SASH1*基因的表达可作为食管鳞癌诊断的生物学标志, 并对食管鳞癌的临床治疗及预后判断有一定指导意义.

蛋白应答于磷脂酰肌醇3-激酶相关信号转导途径。而磷脂酰肌醇3-激酶是Bruton酪氨酸激酶的上游信号分子; (2)调节微丝骨架及促进细胞基质的黏附作用。Martini等^[13]证明SASH1蛋白可能通过与皮动蛋白结合来调节细胞伪足的活动, 且SASH1的表达导致细胞黏附于纤维连接蛋白和层黏连蛋白的增多, 因而抑制了细胞转移。黏附功能下降是恶性肿瘤细胞发生转移的关键步骤之一, 而皮动蛋白与细胞基质的黏附有关^[14]。少数已知的皮动蛋白结合伴侣富含脯氨酸序列, 可与SASH1所含脯氨酸序列结合而发挥作用^[15,16]。Rimkus等^[2]研究表明, 随着结肠癌TNM分期的升高, SASH1的表达明显下降, 同时证明, 结肠癌伴肝转移组与不伴肝转移组相比, 其表达下降。本实验研究证明, 食管鳞癌伴淋巴结转移组的阳性表达率(25.0%)明显低于无淋巴结转移组(55.0%), 且SASH1的表达与食管鳞癌的进展程度密切相关。因而, *SASH1* 基因表达缺失或下调可能与食管鳞癌的侵袭和转移密切相关($P<0.05$), 是预后不良的因素。此外, 还有证据表明, *SASH1* 基因可影响肿瘤细胞的成瘤能力及通过核质穿梭而影响肿瘤的发生、发展^[6,13]。

本研究结果显示, SASH1蛋白在食管鳞癌组织中表达明显低于癌旁组织, 并与肿瘤分化程度、淋巴结转移情况及临床分期相关。SASH1基因的表达下调可能是食管鳞癌发生的重要分子事件。SASH1基因在食管癌中的异常表达及其机制值得进一步深入研究, 以期对食管癌的诊断、临床治疗及预后判断等探寻新的思路和策略。

4 参考文献

- Zeller C, Hinzmann B, Seitz S, Prokoph H, Burkhard-Goettges E, Fischer J, Jandrig B, Schwarz LE, Rosenthal A, Scherneck S. SASH1: a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q24.3 is downregulated in breast cancer. *Oncogene* 2003; 22: 2972-2983 [PMID: 12771949 DOI: 10.1038/sj.onc.1206474]
- Rimkus C, Martini M, Friederichs J, Rosenberg R, Doll D, Siewert JR, Holzmann B, Janssen KP. Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer. *Br J Cancer* 2006; 95: 1419-1423 [PMID: 17088907 DOI: 10.1038/sj.bjc.6603452]
- Chen EG, Chen Y, Dong LL, Zhang JS. Effects of SASH1 on lung cancer cell proliferation, apoptosis, and invasion in vitro. *Tumour Biol* 2012; 33: 1393-1401 [PMID: 22488244 DOI: 10.1007/s13277-012-0387-2]
- Meng Q, Zheng M, Liu H, Song C, Zhang W, Yan J, Qin L, Liu X. SASH1 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of osteosarcoma cell. *Mol Cell Biochem* 2013; 373: 201-210 [PMID: 23108792 DOI: 10.1007/s11010-012-1491-8]
- Lin S, Zhang J, Xu J, Wang H, Sang Q, Xing Q, He L. Effects of SASH1 on melanoma cell proliferation and apoptosis in vitro. *Mol Med Rep* 2012; 6: 1243-1248 [PMID: 23023727 DOI: 10.3892/mmr.2012.1099]
- Yang L, Liu M, Gu Z, Chen J, Yan Y, Li J. Overexpression of SASH1 related to the decreased invasion ability of human glioma U251 cells. *Tumour Biol* 2012; 33: 2255-2263 [PMID: 22915266 DOI: 10.1007/s13277-012-0487-z]
- Beer S, Scheikl T, Reis B, Hüser N, Pfeffer K, Holzmann B. Impaired immune responses and prolonged allograft survival in Sly1 mutant mice. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 9646-9660 [PMID: 16227612 DOI: 10.1128/MCB.25.21.9646-9660.2005]
- Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995; 373: 573-580 [PMID: 7531822 DOI: 10.1038/373573a0]
- Kim CA, Gingery M, Pilpa RM, Bowie JU. The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 453-457 [PMID: 11992127]
- Kim CA, Phillips ML, Kim W, Gingery M, Tran HH, Robinson MA, Faham S, Bowie JU. Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *EMBO J* 2001; 20: 4173-4182 [PMID: 11483520 DOI: 10.1093/emboj/20.15.4173]
- Lindvall JM, Blomberg KE, Wennborg A, Smith CI. Differential expression and molecular characterisation of Lmo7, Myo1e, Sash1, and Mcoln2 genes in Btk-defective B-cells. *Cell Immunol* 2005; 235: 46-55 [PMID: 16137664 DOI: 10.1016/j.cellimm.2005.07.001]
- Dubois F, Vandermoere F, Gernez A, Murphy J, Toth R, Chen S, Geraghty KM, Morrice NA, MacKintosh C. Differential 14-3-3 affinity capture reveals new downstream targets of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8: 2487-2499 [PMID: 19648646 DOI: 10.1074/mcp.M800544-MCP200]
- Martini M, Gnann A, Scheikl D, Holzmann B, Janssen KP. The candidate tumor suppressor SASH1 interacts with the actin cytoskeleton and stimulates cell-matrix adhesion. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43: 1630-1640 [PMID: 21820526 DOI: 10.1016/j.biocel.2011.07.012]
- Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, Currie JD, Webb DJ, Weaver AM. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol* 2005; 15: 1276-1285 [PMID: 16051170 DOI: 10.1016/j.cub.2005.06.043]
- Buday L, Downward J. Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 263-273 [PMID: 17292556]
- van Rossum AG, Moolenaar WH, Schuuring E. Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. *Exp Cell Res* 2006; 312: 1658-1670 [PMID: 16527272 DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.01.033]

同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 结果可靠, 具有一定的意义。

编辑 田滢 电编 闫晋利



胃左动脉灌注化疗/栓塞治疗晚期贲门癌70例

李玉红, 杨宏, 艾建中, 丁君超, 闫玉川

■背景资料

胃癌是我国常见的消化系恶性肿瘤之一,起源于贲门区的胃癌称为贲门癌。贲门癌因其部位特殊、早期缺乏特异性症状,所以就诊时中晚期患者较多。对于失去手术切除机会的患者,临床上一直在探索一种切实可行的非手术疗法。随着介入放射学的发展,插管技术的不断提高,已能行超选择胃左动脉插管。

李玉红, 杨宏, 艾建中, 丁君超, 闫玉川, 唐山工人医院 河北省唐山市 063000

李玉红, 副主任护师, 主要从事肿瘤外科护理及造口、伤口及失禁领域的临床工作和研究。

作者贡献分布: 此课题由李玉红设计; 研究过程由杨宏、艾建中、丁君超及闫玉川协助完成; 研究所用分析工具由杨宏提供; 数据分析由杨宏、艾建中、丁君超及闫玉川等协助完成; 本文写作由李玉红完成。

通讯作者: 李玉红, 副主任护师, 063000, 河北省唐山市路北区文化路27号, 唐山工人医院肿瘤外科。scorpion_ts@126.com

收稿日期: 2013-05-24 修回日期: 2013-06-19

接受日期: 2013-07-18 在线出版日期: 2013-08-08

Left gastric arterial infusion chemotherapy and embolization for treatment of advanced gastric cancer: An analysis of 70 cases

Yu-Hong Li, Hong Yang, Jian-Zhong Ai, Jun-Chao Ding, Yu-Chuan Yan

Yu-Hong Li, Hong Yang, Jian-Zhong Ai, Jun-Chao Ding, Yu-Chuan Yan, Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Correspondence to: Yu-Hong Li, Associate Chief Nurse, Department of Surgical Oncology, Tangshan Worker's Hospital, 27 Wenhua Road, Tangshan 063000, Hebei Province, China. scorpion_ts@126.com

Received: 2013-05-24 Revised: 2013-06-19

Accepted: 2013-07-18 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To observe the efficacy of left gastric arterial infusion chemotherapy in the treatment of advanced cardia cancer.

METHODS: Seventy patients with pathologically proven cardia cancer who underwent left gastric artery cannula infusion chemotherapy and/or embolization at our hospital from November 2010 to November 2012 were included in this study. The short-term curative effect and adverse reactions were observed.

RESULTS: After interventional therapy, 32 (45.7%) patients achieved complete remission, 20 (28.6%) patients achieved partial remission, 10 (14.3%) patients had stable disease, and 8 (11.4%) patients had progressive disease. The total effective rate was 74.3%.

CONCLUSION: Interventional chemotherapy and embolization can effectively reduce tumor size, relieve symptoms and prolong survival in patients with advanced cardia cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Left gastric arterial infusion chemotherapy; Embolization; Therapeutic; Advanced gastric cancer; Clinical analysis

Li YH, Yang H, Ai JZ, Ding JC, Yan YC. Left gastric arterial infusion chemotherapy and embolization for treatment of advanced gastric cancer: An analysis of 70 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2202-2205 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2202.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2202>

摘要

目的: 观察胃左动脉灌注化疗药物/栓塞治疗晚期贲门癌的疗效。

方法: 2010-11/2012-11唐山工人医院收治的、并经病理活检确诊的贲门癌患者70例,进行胃左动脉插管灌注化疗药物/栓塞治疗,观察近期疗效和不良反应。

结果: 70例患者经介入治疗后,完全缓解: 32例,占45.7%;部分缓解: 20例,占28.6%;稳定: 10例,占14.3%;进展: 8例,占11.4%;总有效率74.3%;中位生存期9.6 mo, 1年生存率为24.3%;主要不良反应为骨髓抑制和胃肠道反应。

结论: 介入化疗及栓塞能有效缩小肿瘤,缓解症状,延长患者生存期。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 胃左动脉灌注化疗; 栓塞; 治疗; 晚期贲门癌; 临床分析

核心提示: 本组研究表明,经胃左动脉灌注或联合栓塞治疗晚期贲门癌,可使明显减轻或消除吞咽困难,增加食欲和进食量,能改善患者的生存质量或延长其存活时间,而且发生严重并发症者减少。因此,此方法不失为一种安全有效的治疗方法。

■同行评议者

姜相君, 主任医师, 青岛市市立医院消化科

李玉红, 杨宏, 艾建中, 丁君超, 闫玉川. 胃左动脉灌注化疗/栓塞治疗晚期贲门癌70例. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2202-2205 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2202.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2202>

0 引言

胃癌是我国常见的消化系恶性肿瘤之一, 起源于贲门区的胃癌称为贲门癌. 贲门癌因其部位特殊、早期缺乏特异性症状, 所以就诊时中晚期患者较多. 对于失去手术切除机会的患者, 临床上一直在探索一种切实可行的非手术疗法. 随着介入放射学的发展, 插管技术的不断提高, 已能行超选择胃左动脉插管. 经血管造影证实贲门癌的肿瘤供血动脉主要来自胃左动脉, 经胃左动脉灌注抗肿瘤药物进行局部化疗/栓塞, 在介入治疗恶性肿瘤的理论上和实践上都是切实可行的有效方法. 胃左动脉化疗/栓塞既可阻断肿瘤血供, 又可发挥抗癌化疗作用, 同时减轻化疗药物的全身不良反应, 甚至于通过局部介入治疗还可获得二次手术切除的机会. 近年来胃左动脉灌注化疗/栓塞的实验研究及临床应用研究已有报道.

本文对唐山工人医院2010-11/2012-11收治的70例贲门癌患者采用经皮股动脉穿刺插管方法, 向胃左动脉内注入一定剂量的抗癌药物治疗, 其中30例并给予胃左动脉栓塞治疗. 临床分析结果表明, 经胃左动脉灌注或联合栓塞治疗晚期贲门癌, 可使明显减轻或消除吞咽困难, 增加食欲和进食量, 能改善患者的生存质量或延长其存活时间, 而且发生严重并发症者减少.

1 材料和方法

1.1 材料 唐山工人医院2010-11/2012-11收治的、并经病理活检确诊为贲门癌患者70例, 其中男38例, 女32例, 年龄31-73岁, 平均年龄51.7岁. 其中低分化腺癌46例, 黏液腺癌16例, 管状腺癌6例, 未分化癌4例. KPS评分>70分30例, 40例为60-70分, 所有患者均有明显进食困难、上腹部疼痛等症状.

1.2 方法

1.2.1 胃左动脉灌注化疗/栓塞: 局麻下采用Seldinger法经右侧股动脉穿刺插管, 先将胃左动脉导管在DSA下主动脉弓成祥, 继将导管插至胃左动脉造影, 并将导管置于肝固有动脉造影. 经导管灌注稀释的化疗药物, 化疗方案: (1)氟尿嘧啶 1.0 g/m^2 、阿霉素(表阿霉素) 35 mg/m^2 、丝裂霉

素 10 mg/m^2 、亚叶酸钙 0.2 g ; (2)艾恒 130 mg/m^2 、氟尿嘧啶 1.0 g/m^2 、亚叶酸钙 0.2 g . 对于术后化疗不良反应较轻的患者给予氟尿嘧啶 0.5 g/m^2 静脉滴注4 d, 并加用亚叶酸钙增效 0.2 g . 每3-4 wk介入灌注1次, 2次为1疗程. 70例患者共行插管灌注术230次. 用化疗方案(1)者168例, 用化疗方案(2)者62例. 对本组一般状况较好的30例行明胶海绵胃左动脉栓塞, 明胶海绵颗粒用量约20颗. 18例肝内转移灶染色明显, 用适量5-氟尿嘧啶+超液态碘油栓塞, 碘油的用量为2-10 mL. 如患者病情进展, 即中止原治疗方案.

1.2.2 疗效的评价: 疗效的主观评价方法: 患者进食通畅性及KPS评分. 疗效的客观评价标准: (1)病变进展时间: 从治疗开始到疾病进展或死亡, 或有效患者因病变恶化停止治疗日期为止; (2)治疗失败时间: 从治疗开始到任何原因中断治疗日期为止; (3)显效时间: 从治疗开始到病灶疗效初次评价为PR的时间; (4)缓解期: 完全缓解或部分缓解患者从治疗开始到病变进展时间; (5)生存时间, 并分别计算两组1、2年生存率及中位生存时间. 对所有被研究对象, 每6-8 wk行上消化道造影检查1次, 测量可评价的病灶. 完全缓解, 所有可见病灶完全消失不少于4 wk; 部分缓解, 病灶至少缩小50%不少于4 wk, 并不需要每个病灶都有缩小, 但一定没有任何一个病灶有进展或有新病灶的出现; 稳定, 病灶的缩小<50%, 或增大<25%; 进展, 病灶增大>25%, 或出现新病灶. 所有的影像学资料的观察由两名高级放射学专业医师进行.

1.2.3 化疗不良反应评价: 按WHO急性及亚急性标准为0-IV度共5个级别进行评价.

2 结果

2.1 疗效主观评价 70例患者共230次介入治疗中, 共54例患者进食困难较术前有不同程度改善, 占77.1%, 50例患者KPS评分较术前增加.

2.2 疗效客观评价 本组患者经灌注化疗或联合栓塞后, 显效时间为6-16 wk, 平均8.3 wk; 病变进展时间为24-75 wk, 平均52.4 wk; 70例患者经介入治疗后, 治疗2次评价疗效, 完全缓解: 32例, 占45.7%; 部分缓解: 20例, 占28.6%; 稳定: 10例, 占14.3%; 进展: 8例, 占11.4%; 总有效率74.3%.

2.3 生存期观察 随访时间最短8 mo, 最长29 mo, 中位16 mo. 生存期6-29 mo, 中位9.6 mo, 12 mo年生存率为24.3%.

2.4 化疗不良反应 血液学不良反应中, 白细胞下

■应用要点

经血管造影证实贲门癌的肿瘤供血动脉主要来自胃左动脉, 经胃左动脉灌注抗肿瘤药物进行局部化疗/栓塞, 在介入治疗恶性肿瘤的理论上和实践上都是切实可行的有效方法.

■相关报道

胃左动脉化疗/栓塞既可阻断肿瘤血供,又可发挥抗癌化疗作用,同时减轻化疗药物的全身不良反应,甚至于通过局部介入治疗还可获得第二步手术切除的机会。近年来胃左动脉灌注化疗/栓塞的实验研究及临床应用研究已有报道。

降发生率为52.9%(37/70),其中 I - II 度白细胞下降发生率为25.7%(18/70), III 度白细胞下降发生率为14.3%(10/70); I - II 度血小板下降发生率为10%(7/70); I - II 度血红蛋白下降发生率为18.6%(13/70)。非血液学不良反应中, 56 例患者一周内出现恶心、呕吐、上腹部烧灼感, 给予制酸药物、胃黏膜保护剂以及对症处理后, 症状均得到缓解及消失; 6 例患者曾出现上消化道出血, 给予制酸药物、止血后 1-3 d 症状消失; 6 例患者出现轻度肾功能损害, 数日后自行恢复正常。

3 讨论

3.1 晚期贲门癌介入治疗的价值 贲门癌多为腺癌, 部分患者已失去手术治疗机会, 因此以往将全身静脉化疗与放疗作为其治疗的主要手段^[1-3], 但贲门癌放疗不敏感, 周围静脉化疗, 尽管其治疗药物同灌注药物相同, 但病灶区域的药物浓度达不到治疗量, 临床症状不易缓解, 总体有效缓解效在20%-52%, 且药物不良反应较重, 患者往往难以坚持^[4]。贲门癌的主要供养动脉是胃左动脉, 经胃左动脉灌注化疗药物无疑是最佳途径^[5,6]。他使药物直接进入病灶的供血动脉, 可显著提高局部的药物浓度, 增强药物的首过效应, 从而充分发挥抗癌药物的作用, 同时也降低了药物的全身不良反应。与静脉法相比, 不仅消除了静脉中药物尚未到病灶就被肝、肾等器官代谢, 排泄的因素, 同时消除了治疗药物在静脉血液中被某些成分结合而失去药效的可能, 其不良反应也比静脉法低。对于一般状况较好的患者的联合应用胃左动脉栓塞, 使癌灶的供血明显受损, 从而进一步控制病情。

3.2 胃左动脉解剖及插管技术 正常胃左动脉是腹腔动脉最小分支, 为胃的主要供血动脉之一, 但其管腔细小。胃左动脉起于腹腔动脉上壁或左上壁, 向左行到贲门, 与主动脉的食管动脉吻合。同时分发出分支供应贲门部, 与脾动脉的胃短动脉吻合。主干沿胃小弯右行, 沿途发出分支供应胃的前、后壁, 同胃右动脉吻合, 形成动脉弓。胃左动脉可直接起自腹主动脉, 脾动脉或肝总动脉^[7,8]。熟悉胃左动脉的开口、走行及其变异, 对于超选成功至关重要, 胃左动脉的起始变异较多, 若术中不能正确认识这些变异, 必然给超选插管带来很大的盲目性。

对于胃左动脉开口在腹腔干近端者, 可直接用胃左动脉进行超选, 对于开口较远者, 可先在

导丝的配合下先将胃左动脉导管送入肝动脉或脾动脉, 拔出导丝后边注射造影剂, 边将胃左导管缓慢后退, 胃左动脉导管在后退的过程中常可弹入胃左动脉, “冒烟” 确认导管头的位置^[9]。对于拟行栓塞的患者, 当导管头嵌入不甚牢靠时, 并在导丝的配合下无法进入胃左动脉远端时, 可考虑使用微导管^[10-14]。

3.3 介入治疗不良反应及对策 胃左动脉灌注化疗药物的全身化疗反应是轻的, 本组患者经对症支持处理, 仅有1例因化疗不良反应而中止后续化疗。化疗药物的骨髓抑制现象在处理后, 常能在短时期的恢复正常, 本组66例患者曾出现白细胞及/或血小板的下降, 经升白及升血小板处理后, 1-5 d 恢复正常^[15-19]。在灌注前30 min 肌注胃复安20 mg, 术中及术后用5-HT₃能明显降低术后胃肠道反应, 对于术后食欲受影响的患者可加用吗叮琳和甲孕酮, 能明显改善化疗后胃肠道反应。常见的灌注后不良应有左上腹不适、疼痛等一般无需治疗可自行缓解消失。有研究说明胃左动脉内化疗灌注对胃组织损伤程度较轻, 恢复较快, 在1 wk 内即恢复正常, 一般不会出现消化系出血和胃穿孔等严重并发症, 但本组共有6例患者曾出现上消化系出血, 灌注后发生消化系出血的原因推测可能由于肿瘤的坏死、脱落, 或由于灌注或加以栓塞后血管变细/闭塞, 造成胃黏膜下血管网的广泛缺血性梗塞、坏死, 随后发生出血, 所以作者认为在术后常规使用强效制酸制尤为为重要, 本组共6例患者出现上消化道出血, 经制酸、止血后无一例出现大出血现象^[20, 21]。

总之, 经胃左动脉灌注或联合栓塞治疗晚期贲门癌, 可使明显减轻或消除吞咽困难, 增加食欲和进食量, 能改善患者的生存质量或延长其存活时间, 而且发生严重并发症者减少。因此, 此方法不失为一种安全有效的治疗方法。

4 参考文献

- 1 郭猛. 胃左动脉灌注化疗/栓塞治疗47例晚期贲门癌的临床分析. 重庆医学 2012; 41: 284-286
- 2 张维浩, 王绍奎, 高磊. 经胃左动脉灌注化疗联合 FOLFOX 方案治疗晚期贲门癌临床观察. 中华肿瘤防治杂志 2008; 15: 1907-1908
- 3 鄂有国, 曹德华, 钱月红, 赵枫. 放射治疗与动脉插管化疗联合应用治疗晚期贲门癌的疗效观察. 中国肿瘤临床与康复 2009; 16: 71-74
- 4 张雪云. 卡培他滨联合放疗治疗老年人进展期胃底贲门癌疗效观察. 实用肿瘤杂志 2011; 26: 53-55
- 5 杨小强, 车明, 周明, 肖春泽, 王秀兰, 胡宜莲, 孟晓玲. 进展期贲门癌双介入治疗的临床观察. 当代医学 2010; 16: 711-712

- 6 王焕英, 吴华清. 贲门癌介入治疗现状. 中国实用医药 2010; 5: 248-250
- 7 Yu W, Whang I, Chung HY, Averbach A, Sugarbaker PH. Indications for early postoperative intraperitoneal chemotherapy of advanced gastric cancer: results of a prospective randomized trial. *World J Surg* 2001; 25: 985-990 [PMID: 11571980 DOI: 10.1007/s00268-001-0067-7]
- 8 Noh SH, Yoo CH, Chung HC, Roh JK, Shin DW, Min JS. Early postoperative intraperitoneal chemotherapy with mitomycin C, 5-fluorouracil and cisplatin for advanced gastric cancer. *Oncology* 2001; 60: 24-30 [PMID: 11150904 DOI: 10.1159/000055292]
- 9 张再军, 李江. 胃底贲门癌介入治疗的疗效观察. 四川解剖学杂志 2011; 19: 18-19
- 10 李书印. 复方氟尿嘧啶联合介入治疗晚期贲门胃底癌67例临床分析. 中国乡村医生 2009; 11: 69
- 11 母存富, 张文林, 向家勇, 杨晋平, 谢光贵. 动脉灌注化疗后手术治疗Ⅲ期贲门癌23例. 西南军医 2008; 10: 28-29
- 12 李建东, 张进荣. 中晚期贲门胃底癌介入治疗的临床体会. 中国民族民间医药 2012; 21: 80-81
- 13 殷建林, 刘海日, 黄海, 顾友梅. 介入治疗贲门癌伴肝转移24例临床观察. 实用癌症杂志 2009; 24: 621-623
- 14 李长凤. 介入治疗贲门癌伴肝转移24例临床观察. 中国社区医师(医学专业) 2010; 12: 47-48
- 15 朱明德, 张子敬, 季洪胜, 郝刚, 葛成林, 魏孔朋, 袁玉厚, 赵秀萍. 进展期胃癌介入治疗疗效分析. 介入放射学杂志 2008; 17: 136-139
- 16 刘福忠, 杨军, 钟志贵. 动脉灌注和栓塞治疗贲门癌(附21例报告). 当代医学 2009; 15: 697-698
- 17 晏志保, 尚云生, 王旭. 晚期贲门癌动脉灌注化疗的研究. 中国医药导报 2010; 7: 188-189
- 18 章俊, 谢亚敏, 武翠玲, 吴润琳, 吴克伟. 动脉化疗栓塞治疗晚期贲门癌临床观察. 中国临床药理学与治疗学 2012; 17: 562-565
- 19 郭猛. FOLFOX4方案经胃动脉灌注化疗治疗晚期贲门癌32例. 中国老年学杂志 2012; 32: 2191-2192
- 20 张维浩, 王绍奎, 高磊. 经胃左动脉灌注化疗联合FOLFOX方案治疗晚期贲门癌临床观察. 中华肿瘤防治杂志 2008; 15: 1907-1908
- 21 王国林, 张崇高, 王秀玲. 胃左动脉介入化疗栓塞联合根治术治疗贲门癌. 包头医学院学报 2012; 28: 50-52

■同行评价

本文具有一定的临床参考价值.

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》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写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.

HLA-*DP*基因多态性与乙型肝炎重症化的关联性

姚津剑, 余金玲, 里进, 陈曼, 杨红, 宋起龙, 林菊生

■背景资料

HLA-*DP*参与机体免疫反应重要分子, 其基因多态性目前认为参与乙型肝炎病毒感染临床转归。本研究通过分析慢性乙型肝炎不同临床转归rs6457617遗传关联性, 发现rs6457617-CC基因具有明显肝病易感性, 进一步拓宽了HLA-*DP*遗传易感性区域, 深入了解HLA-*DP*在乙型肝炎临床转归遗传意义。

姚津剑, 海南省人民医院急诊中心 海南省海口市 570000
余金玲, 里进, 陈曼, 杨红, 宋起龙, 林菊生, 华中科技大学医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
姚津剑, 主治医师, 主要从事肝病及危急重症的研究。

国家重点基础研究发展计划(973项目)基金资助项目, No. 2007CB512900

作者贡献分布: 姚津剑负责课题设计、数据分析及文章撰写; 姚津剑、余金玲、里进、陈曼、杨红及宋起龙从事样本收集及基因组DNA提取; 余金玲、陈曼、杨红及宋起龙完成基因分析; 林菊生全程提供指导与样本收集的协调。

通讯作者: 林菊生, 教授, 主任医师, 430030, 湖北省武汉市硚口区解放大道1095号, 华中科技大学医学院附属同济医院肝病研究所. jslin@tjh.tjmu.edu

电话: 027-83662578

收稿日期: 2013-04-20 修回日期: 2013-07-05

接受日期: 2013-07-15 在线出版日期: 2013-08-08

Association of a HLA-*DP* gene polymorphism with progression of HBV infection

Jin-Jian Yao, Jin-Ling Yu, Jin Li, Man Chen, Hong Yang, Qi-Long Song, Ju-Sheng Lin

Jin-Jian Yao, Emergency Center, People's Hospital of Hainan Province, Hainan 570000, Hainan Province, China
Jin-Ling Yu, Jin Li, Man Chen, Hong Yang, Qi-Long Song, Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (HUST), Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: the National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2007CB512900

Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Professor, Chief Physician, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology (HUST), 1095 Jiefang Dadao, Qiaokou District, Wuhan 430030, Hubei Province, China. jslin@tjh.tjmu.edu

Received: 2013-04-20 Revised: 2013-07-05

Accepted: 2013-07-15 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To explore the association of a HLA-*DP* gene polymorphism (rs6457617) with progression of hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: A total of 1009 subjects were enrolled in this study, including 234 asymptomatic chronic HBV carriers (ASC), 300 patients with HBV-related liver cirrhosis (LC), 300 patients with HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC), and 175 patients with HBV-related acute liver failure (ALF). The differences in alleles and

genotype between the control (ASC) group and case groups (LC, HCC and ALF) were identified using the Taqman assay.

RESULTS: The frequencies of TT, CT and CC genotypes at the rs6457617 locus were 20%, 49.6% and 30% in the case HCC group, which were statistically different from those in the control group (TT: 26%; CT: 51.2%; CC: 22.6%) ($\chi^2 = 3.94$, $P = 0.047$, OR = 1.49). The frequency of the C allele differed significantly between the HCC group and ASC group ($\chi^2 = 4.98$, $P = 0.025$, OR = 1.21). There were no significant differences in allele frequencies and genotype distributions between the LC and ASC groups, and between the ALF and ASC groups.

CONCLUSION: The C allele at the rs6457617 locus is associated with risk of HCC, and the CC genotype confers susceptibility to HCC. The rs6457617 polymorphism might be involved in the development of HCC.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: HLA-*DP*; Polymorphism; Hepatitis B; Genetic susceptibility

Yao JJ, Yu JL, Li J, Chen M, Yang H, Song QL, Lin JS. Association of a HLA-*DP* gene polymorphism with progression of HBV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2206-2211 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2206.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2206>

摘要

目的: 探讨HLA-*DP*基因区域中rs6457617多态性位点与乙型肝炎重症化遗传易感性的关系。

方法: 收集武汉地区多家医院慢性乙型肝炎无症状携带者234例、乙型肝炎源性肝硬化者300例、乙型肝炎源性肝癌者300例及乙型肝炎重症患者175例, 共1009例, 应用Taqman基因分析技术, 分析rs6457617位点基因型及等位基因在各组中的分布差异。

结果: 乙型肝炎源性肝癌者中rs6457617位点TT/

■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

CT/CC基因型频率分别为20%/49.6%/30%, 与无症状慢性乙型肝炎携带者(26%/51.2%/22.6%)比较, 基因型差异有统计学差异($\chi^2 = 3.94$, $P = 0.047$, $OR = 1.49$), 等位基因C/T频率分布频率分别为55.1%和44.8%, 而慢性乙型肝炎携带者C/T频率分别为51.7%和48.2%, 其等位基因频率同样具有明显差异($\chi^2 = 4.98$, $P = 0.025$, $OR = 1.21$). 而对比慢性乙型肝炎无症状携带者与乙型肝炎源性肝硬化患者及慢性乙型肝炎无症状携带者与乙型肝炎重型肝炎患者, 在该位点基因型及等位基因分布无统计学差异。

结论: *HLA-DP*(rs6457617)中C等位基因是增加慢性乙型肝炎患者患癌风险, *HLA-DP*(rs6457617)CC基因型是乙型肝炎源性肝癌者易感基因型. *HLA-DP*基因多态性可能参与慢性乙型肝炎患者发展成肝癌的过程。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: *HLA-DP*; 多态性; 乙型肝炎; 遗传易感性

核心提示: *HLA-DP*参与机体免疫反应重要分子, 其遗传背景遗传在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)感染临床转归中扮演重要作用. 本研究通过分析*HLA-DP*(rs6457617)基因型与乙型肝炎源性肝硬化、乙型肝炎源性肝癌、乙型肝炎重型肝炎遗传易感性, 发现rs6457617-CC与乙型肝炎源性肝癌遗传相关。

姚津剑, 余金玲, 里进, 陈曼, 杨红, 宋起龙, 林菊生. *HLA-DP*基因多态性与乙型肝炎重症化的关联性. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2206-2211 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2206.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2206>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个全球公共卫生安全问题, 严重危害人类健康. 全球约有20亿人曾感染过HBV, 其中3.5-4亿例为慢性HBV感染^[1]. 慢性乙型肝炎患者存在机体免疫力和病毒因素相互作用, 在临床表现为病情是反复的动态过程和临床转归的多样化^[2,3]. 慢性乙型肝炎患者可以终生病毒携带不发病, 部分患者可以进展为乙型肝炎源性肝硬化、乙型肝炎源性肝癌、乙型肝炎重型肝炎. 研究发现不仅病毒因素在慢性乙型肝炎进展过程中起作用, 同时宿主的基因遗传易感性也参与乙型肝炎慢性化和乙型肝炎源性肝硬化、乙型肝炎源性肝癌、乙型肝炎重型肝炎这样复杂疾病的发展过程^[4,5].

*HLA-DP*分子是MHC II类抗原, 为人类的主

要组织相容性复合体中一种蛋白质/肽抗原受体, *HLA-DP*在抗原提呈和免疫应答中发挥着重要作用, *HLA-DP*分子在宿主清除HBV过程中导致肝组织免疫炎症损伤, 提示*HLA-DP*基因型可能在HBV感染的慢性化和临床过程中扮演重要角色^[6,7].

鉴于*HLA-DP*基因多态性与慢性乙型肝炎的感染密切相关, 本研究进一步探讨*HLA-DP*基因多态位点rs6457617与乙型肝炎重症化表型(乙型肝炎源性肝癌、乙型肝炎源性肝硬化、乙型肝炎重型肝炎)遗传易感性的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-06/2009-07在武汉地区, 同济医院、协和医院和武汉中医院按标准(表1)进行样本收集慢性乙型肝炎无症状携带组、乙型肝炎源性肝硬化组、乙型肝炎源性肝癌组和乙型肝炎重型肝炎组病例外周血样本, 共搜集乙型肝炎相关不同临床转归患者外周血样本共1009例, 其中乙型肝炎重型肝炎175例、乙型肝炎源性肝癌300例、乙型肝炎源性肝硬化300例、慢性乙型肝炎无症状携带者234例。

1.2 方法

1.2.1 位点的遴选: 本研究选取位点rs6457617, 位于*HLA-DP*下游和*HLA-DQA2*及*HLA-DQB1*基因之间区域, rs6457617位于6号染色体正链32771829等位基因, 等位基因C/T(C<T)。

1.2.2 全基因组DNA提取: 全基因组DNA提取, 采用Tiangen全基因组提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京)按说明书进行提取基因组DNA, 应用Nanodrop1000进行DNA进行定量, 确保DNA纯度 $A_{260/280}$ 在1.6-1.8之间。

1.2.3 基因分析: 订购rs6457617位点Taqman genotyping assays(applied biosystems, ABI)C_30051540_30探针, 其基因分型的探针中C等位基因探针为CATATGCACAGATCTTTGTTAGTCA[C-VIC]ATCTGCTCATGGACTCAACAAACAG与T等位基因探针为ATATGCACAGATCTTTGTTAGTCA[T-FAM]ATCTGCTCATGGACTCAACAAACAG。

统计学处理 以慢性乙型肝炎无症状携带者为对照组, 分别与乙型肝炎源性肝硬化组、乙型肝炎源性肝癌组和乙型肝炎重型肝炎组比较, 比较组间等位基因频率及基因型频率, 进行 χ^2 检验. 将主要等位基因作为对照等位基因, 应用3种不同的遗传模型对遗传易感性进行发掘, 分别计算 χ^2 值、OR值以及95%CI可信区间. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

■ 研发前沿

本文分析*HLA-DP*-rs6457617基因多态性在慢性乙型肝炎感染遗传意义, 拓宽了*HLA-DP*遗传背景在慢性乙型肝炎感染转归的意义, 亟待研究的问题主要是对已发现的阳性位点进行多中心验证, 并进一步探讨其多态性位点与生物学功能的关系。

■创新盘点

本研究的重点是研究的样本覆盖了慢性乙型肝炎不同的临床转归为分析对象,更加全面的认识HLA-DP(rs6457617)位点在慢性乙型肝炎重症倾向的遗传易感性。

表 1 慢性乙型肝炎无症状携带组、乙型肝炎后肝硬化组、乙型肝炎相关性肝癌组和乙型肝炎重型肝炎组的诊断标准

慢性乙型肝炎无症状携带组

1. 既往有乙型肝炎病史或HBsAg和anti-HBc阳性持续至少6 mo;
2. 排除其他嗜肝性病毒的感染;
3. 肝功能指标正常值,既往无因乙型肝炎住院病史,在随访的过程中无乙型肝炎相关症状
4. 无肝硬化和肝癌的临床证据和影像学证据
5. 年龄在35岁以上

乙型肝炎源性肝硬化

1. 既往有乙型肝炎病史或HBsAg和anti-HBc阳性持续至少6 mo;
2. anti-HCV和HIV阴性;
3. 有肝硬化的临床证据: 胃食管静脉曲张或有出血、腹水;
4. 影像学(B超、CT、MRI)证实无肝占位病变

乙型肝炎源性肝癌

1. 既往有乙型肝炎病史或HBsAg和anti-HBc阳性持续至少6 mo;
2. 组织活检证明有肝癌; 或AFP上升且影像学检查(超声或CT或MRI)提示肝癌

乙型肝炎重型肝炎

1. 既往有乙型肝炎病史或HBsAg和anti-HBc阳性持续至少6 mo;
2. 凝血国际化标准比值INR>1.5, 胆红素大于正常值上限10倍. B超提示无硬化, 肝癌和药物性肝损伤、酗酒、遗传代谢性疾病;
3. 排除合并其他嗜肝病毒和HIV感染. 同时排除Wilson、Budd-Chiari综合征;
4. 影像学提示无肝硬化肝癌;
5. 病程<12 wk

HBsAg: 乙肝表面抗原; HIV: 艾滋病; HCV: 丙型肝炎病毒; CT: 计算机断层成像; MRI: 磁共振成像。

表 2 样本流行病学特征

	<i>n</i>	年龄 (岁)	男性 <i>n</i> (%)	吸烟 (从不: 从前: 现在)	饮酒 (从不: 从前: 现在)
慢性乙型肝炎无症状携带者	234	47.8 ± 7.9	156(66.6)		
乙型肝炎源性肝硬化	300	46.5 ± 10.1	248(82.6)	185 : 67 : 48	193 : 73 : 34
乙型肝炎源性肝癌	300	47.0 ± 10.0	268(89.3)	175 : 69 : 56	207 : 54 : 38
乙型肝炎重型肝炎	175	38.6 ± 11.3	154(88.0)	122 : 19 : 34	132 : 22 : 21

2 结果

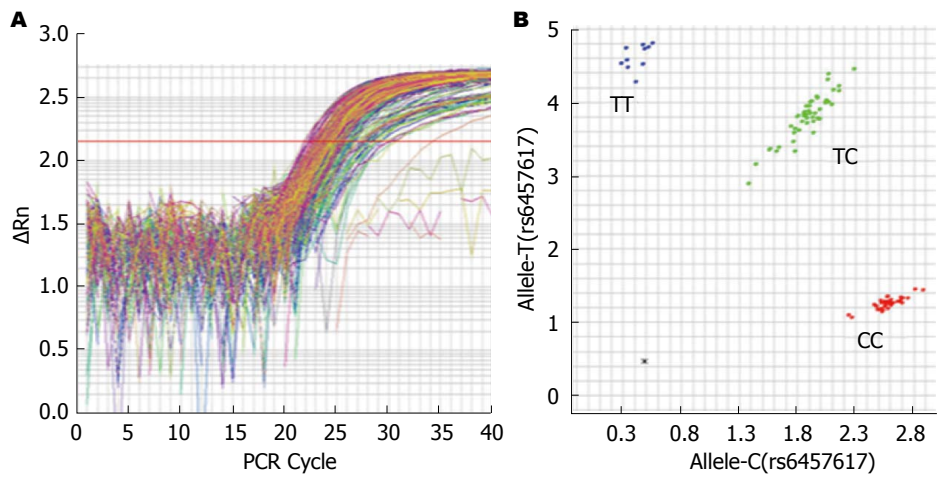
2.1 流行病学特征 通过拟定的标准进行样本收集,发现样本中急性肝功能衰竭患者中,患者年龄38.6岁±11.3岁,较肝硬化及肝癌发病年龄较早,而肝硬化患者的发病年龄46.5岁±10.1岁与肝癌发病年龄47.0岁±10.0岁无明显差别. 与其他相关研究相同,男性在乙型肝炎重型肝炎占比例为88%、乙型肝炎源性肝硬化占82.6%、乙型肝炎源性肝癌占89%. 男性为乙型肝炎重症化的独立危险因素(表2).

2.2 rs6457617中亚裔人群分布的频率 在亚裔人群中中等位基因及基因型分布(表3), CC基因型在中国北京人群中频率最高,而C等位基因在中国北京人及丹佛中国裔较高.

2.3 rs6457617基因分析结果 设置反应的条件如下,

2×Taqman genotyping master mix(ABI)2.5 μL, 20×SNP genotyping assay mix(ABI)0.25 μL, 模板DNA 2.25 μL. PCR反应条件95℃ 10 min, 95℃变性15 s, 60℃延长90 s. 共40个循环,完成后读取荧光信号完成基因分型(图1).

2.4 rs6457617与乙型肝炎重症化遗传易感性 对比慢性乙型肝炎无症状携带者与各病例组中rs6457617等位基因及基因型频率的差异,发现rs6457617在显性遗传模型(dominant model)中CC基因型与乙型肝炎源性肝细胞癌明显相关性($\chi^2 = 3.94, P = 0.047, OR = 1.49$)(表4). C等位基因是慢性乙型肝炎发展成肝癌的易感性基因($\chi^2 = 4.98, P = 0.025, OR = 1.21$)(表5). 同时分析慢性乙型肝炎无症状携带与乙型肝炎源性肝硬化和慢性乙型肝炎无症状携带与乙型肝炎重型肝炎的



应用要点
本研究结果将应用于慢性乙型肝炎高危人群进行遗传背景筛查, 同时对HLA-DP(rs6457617)功能学研究及治疗靶点开发, 将有利于本研究结果进一步应用。

图 1 rs6457617位点Taqman基因分型图. A: PCR基因扩增图; B: 基因分型图, 蓝色为TT基因型; 红色为CC基因型; 绿色为TC基因型.

表 3 亚洲人群分布的rs6457617位点基因型及等位基因频率 (hapmap)

人群	Genotype-CC	Genotype-CT	Genotype-TT	Allele C	Allele-T
中国北京人群	0.241	0.460	0.299	0.471	0.529
丹佛中国裔	0.138	0.578	0.284	0.427	0.573
日本人群	0.150	0.469	0.381	0.385	0.615

表 4 各组中rs6457617基因型频率

	基因型(n)			P_{dominant} 值	OR(95%CI)
	TT	TC	CC		
慢性乙型肝炎无症状携带者	61	120	53		
乙型肝炎源性肝硬化	69	155	76	0.472	1.16[0.76-1.77]
乙型肝炎源性肝癌	60	149	91	0.047	1.49[0.99-2.25]
乙型重型肝炎	55	89	31	0.221	0.74[0.43-1.23]

表 5 各组中rs6457617等位基因频率

	等位基因(n)		P 值	OR[95%CI]
	T	C		
慢性乙型肝炎无症状携带者	242	226		
乙型肝炎源性肝硬化	293	307	0.231	1.12[0.87-1.44]
乙型肝炎源性肝癌	269	331	0.025	1.21[1.03-1.69]
乙型重型肝炎	199	151	0.143	1.23[0.92-1.64]

遗传相关性, 未发现明显的遗传易感性.

3 讨论

HBV感染的结局在很大程度上取决于个体的对于病毒的免疫过程. 免疫反应不同进而出现不同的临床过程和表型(慢性乙型肝炎无症状携带组、乙型肝炎源性肝硬化组、乙型肝炎源性肝

癌组和乙型重型肝炎组), 其中乙型肝炎源性肝癌和乙型重型肝炎死亡率高^[8,9].

现有的研究提示宿主的免疫遗传背景在乙型肝炎重症化过程中起着重要作用^[10-12]. HLA是迄今所知最复杂、多态性最高的免疫相关遗传系统^[13,14], 在人类的免疫应答反应中起着十分重要的作用. HLA-II类基因分为经典HLA-DP、

■同行评价

本文对临床上的一个很重要的问题进行研究,收集了大量的乙型肝炎不同临床进展资料,数据真实可信,结论可靠,具有一定的指导意义。

-DQ、-DR和非经典的HLA-DM、-DO两类。HLA-DP由组成2个亚基, DP α 和DP β 的抗原. α 链和 β 链的远膜区有一个抗原结合槽(antigen binding cleft), 因此可以推测HLA-DP基因的多态性可导致了抗原结合槽的构象、结合及递呈抗原肽给T细胞的效率不同, 从而影响着HBV感染的慢性化和免疫反应的强弱, 免疫反应强弱影响肝细胞损害的范围及程度, 因而其多态性明显影响着HBV感染后的免疫应答过程中的个体差异^[15-17]。

目前国内外大量研究表明HLA-DRB1、HLA-DQB1基因区域的某些多态性位点与个体更易导致感染HBV慢性化。Kamatani等在全基因组关联分析联合阳性位点的跨地域的多中心验证发现亚洲人群中, HLA-DP(rs3077、rs9277535)位点的变异与慢性乙型肝炎感染密切相关^[6,7], 其遗传易感性在后续的样本验证中得到了证实。也发现HLA-DP/DQ区域多态性位点与肝细胞癌具有相关性^[18,19]。由于rs6457617位于HLA-DP下游, 推测其功能可能是通过调节HLA-DP转录后的修饰改变其功能, 从而影响慢性乙型肝炎患者成癌风险。

本研究中在研究设计阶段, 对研究对象选择条件严加限制, 确保被研究对象间基因型与表型(genotype-phenotype)有直接关系, 主要通过控制了病例和对照的年龄范围, 在人群筛选上选择了祖籍湖北地区人群, 其中主要的研究对象来自湖北地区, 气候因素、饮食、文化及生活习俗均相近, 调研相关流行病学资料来看, 健康人群的吸烟率和饮酒率较相似, 生活习惯也较接近, 排除了已知的混杂因素, 在流行病学调查的材料统计分析中可以看到, 吸烟和饮酒在是与否的频率分布上没有显著的差异, 由于本研究选用对照为慢性无症状乙型肝炎患者, 该群体可能是在一个特定的人群, 具有特定遗传背景, 因而在遗传背景可能存在不平衡的可能, 不能单用hardy-Weinberg检验分析对照组是否来源同一群体。该不研究不足地方未完成多中心的验证, 未来对于HLA-DP乙型肝炎重症化易感性位点和疾病表型的机制研究将有利于全方位的阐述其功能在慢性乙型肝炎临床转归的意义。为评估慢性乙型肝炎患者的预后提供理论依据, 并为开辟新的治疗方法提供可能的作用靶点。

4 参考文献

- Lai CL, Yuen MF. Chronic hepatitis B--new goals, new treatment. *N Engl J Med* 2008; 359: 2488-2491 [PMID: 19052131 DOI: 10.1056/NEJMe0808185]

- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-539 [PMID: 17256718 DOI: 10.1002/hep.21513]
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009; 50: 661-662 [PMID: 19714720 DOI: 10.1002/hep.23190]
- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129 [PMID: 15014185 DOI: 10.1056/NEJMra031087]
- McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009; 49: S45-S55 [PMID: 19399792 DOI: 10.1002/hep.22898]
- Kamatani Y, Watanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Kumada H, Puseenam A, Sura T, Daigo Y, Chayama K, Chantratita W, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 2009; 41: 591-595 [PMID: 19349983 DOI: 10.1038/ng.348]
- Guo X, Zhang Y, Li J, Ma J, Wei Z, Tan W, O'Brien SJ. Strong influence of human leukocyte antigen (HLA)-DP gene variants on development of persistent chronic hepatitis B virus carriers in the Han Chinese population. *Hepatology* 2011; 53: 422-428 [PMID: 21274863 DOI: 10.1002/hep.24048]
- El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2012; 142: 1264-1273.e1 [PMID: 22537432]
- Liu C, Wang YM, Fan K. Epidemiological and clinical features of hepatitis B virus related liver failure in China. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3054-3059 [PMID: 21799653 DOI: 10.3748/wjg.v17.i25.3054]
- Deng G, Zhou G, Zhang R, Zhai Y, Zhao W, Yan Z, Deng C, Yuan X, Xu B, Dong X, Zhang X, Zhang X, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Wang Y, He F. Regulatory polymorphisms in the promoter of CXCL10 gene and disease progression in male hepatitis B virus carriers. *Gastroenterology* 2008; 134: 716-726 [PMID: 18325387 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.12.044]
- Dong X, Zhou G, Zhai Y, Zhang H, Yang H, Zhi L, Zhang X, Chu J, He F. Association of DLC1 gene polymorphism with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese hepatitis B virus carriers. *Cancer Epidemiol* 2009; 33: 265-270 [PMID: 19766077 DOI: 10.1016/j.canep.2009.08.011]
- Lei RX, Shi H, Peng XM, Zhu YH, Cheng J, Chen GH. Influence of a single nucleotide polymorphism in the P1 promoter of the furin gene on transcription activity and hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009; 50: 763-771 [PMID: 19492430 DOI: 10.1002/hep.23062]
- [2nd International Cancer Symposium. Beijing, 18-20 May 1990]. *Internist (Berl)* 1990; 31: 1-16 [PMID: 1976607]
- de Bakker PI, McVean G, Sabeti PC, Miretti MM, Green T, Marchini J, Ke X, Monsuur AJ, Whittaker P, Delgado M, Morrison J, Richardson A, Walsh EC, Gao X, Galver L, Hart J, Hafler DA, Pericak-Vance M, Todd JA, Daly MJ, Trowsdale J, Wijmenga C, Vyse TJ, Beck S, Murray SS, Carrington M, Gregory S, Deloukas P, Rioux JD. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet* 2006; 38: 1166-1172 [PMID: 16998491 DOI: 10.1038/ng1885]

- 15 Lin ZH, Xin YN, Dong QJ, Wang Q, Jiang XJ, Zhan SH, Sun Y, Xuan SY. Association between HLA-DRB1 alleles polymorphism and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 145 [PMID: 21172035 DOI: 10.1186/1471-230X-10-145]
- 16 Liu C, Cheng B. Association of polymorphisms of human leukocyte antigen-DQA1 and DQB1 alleles with chronic hepatitis B virus infection, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Chinese. *Int J Immunogenet* 2007; 34: 373-378 [PMID: 17845309 DOI: 10.1111/j.1744-313X.2007.00702.x]
- 17 Wang C, Tang J, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Kaslow RA. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. *Hepatology* 2004; 39: 978-988 [PMID: 15057902 DOI: 10.1002/hep.20142]
- 18 Hu L, Zhai X, Liu J, Chu M, Pan S, Jiang J, Zhang Y, Wang H, Chen J, Shen H, Hu Z. Genetic variants in human leukocyte antigen/DP-DQ influence both hepatitis B virus clearance and hepatocellular carcinoma development. *Hepatology* 2012; 55: 1426-1431 [PMID: 22105689 DOI: 10.1002/hep.24799]
- 19 Jiang DK, Sun J, Cao G, Liu Y, Lin D, Gao YZ, Ren WH, Long XD, Zhang H, Ma XP, Wang Z, Jiang W, Chen TY, Gao Y, Sun LD, Long JR, Huang HX, Wang D, Yu H, Zhang P, Tang LS, Peng B, Cai H, Liu TT, Zhou P, Liu F, Lin X, Tao S, Wan B, Sai-Yin HX, Qin LX, Yin J, Liu L, Wu C, Pei Y, Zhou YF, Zhai Y, Lu PX, Tan A, Zuo XB, Fan J, Chang J, Gu X, Wang NJ, Li Y, Liu YK, Zhai K, Zhang H, Hu Z, Liu J, Yi Q, Xiang Y, Shi R, Ding Q, Zheng W, Shu XO, Mo Z, Shugart YY, Zhang XJ, Zhou G, Shen H, Zheng SL, Xu J, Yu L. Genetic variants in STAT4 and HLA-DQ genes confer risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2013; 45: 72-75 [PMID: 23242368 DOI: 10.1038/ng.2483]

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 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任:程剑侠 2009-03-26)

胆囊区肝癌射频治疗联合LC手术安全性评估

赵希学, 由法平, 袁庆忠, 潘国政, 卜庆敖, 郝龙, 张建

■背景资料

手术切除一直是肝细胞肝癌的首选治疗手段,在我国肝癌患者多为高龄,常伴有高血压、心脏病等慢性疾病,耐受手术能力差,微创治疗显得尤为重要,由于射频消融热效率高,升温快,凝固坏死彻底,受血流影响较小,且对于小肝癌,射频消融与手术切除可取得相同的治疗效果,逐渐成为肝癌的另一种重要治疗手段,但对于毗邻胆囊、肝门部、大血管等特殊部位的肝癌,其安全性及有效性一直存在较大争议。

赵希学, 由法平, 袁庆忠, 潘国政, 卜庆敖, 郝龙, 张建, 胜利油田中心医院 山东省东营市 257034

赵希学, 主任医师, 主要从事肝癌的诊断和治疗。

作者贡献分布: 由法平负责数据统计与文章撰写; 潘国政、卜庆敖、郝龙及张建负责文章数据的收集; 赵希学与袁庆忠负责文章的审阅和修改。

通讯作者: 袁庆忠, 主任医师, 257034, 山东省东营市济南路31号, 胜利油田中心医院, dyqz@126.com

收稿日期: 2013-05-24 修回日期: 2013-06-06

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Safety and effectiveness of radiofrequency combined with laparoscopic cholecystectomy in management of liver cancer near the gallbladder

Xi-Xue Zhao, Fa-Ping You, Qing-Zhong Yuan,
Guo-Zheng Pan, Qing-Ao Bu, Long Hao, Jian Zhang

Xi-Xue Zhao, Fa-Ping You, Qing-Zhong Yuan, Guo-Zheng Pan, Qing-Ao Bu, Long Hao, Jian Zhang, Shengli Oilfield Central Hospital, Dongying 257034, Shandong Province, China

Correspondence to: Qing-Zhong Yuan, Chief Physician, Shengli Oilfield Central Hospital, 31 Jinan Road, Dongying 257034, Shandong Province, China. dyqz@126.com

Received: 2013-05-24 Revised: 2013-06-06

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

Aim: To assess the safety and effectiveness of radiofrequency in combination with laparoscopic cholecystectomy (LC) in the management of liver cancer near the gallbladder.

METHODS: Twelve patients with liver cancer near the gallbladder and 27 patients with liver cancer far from the gallbladder, who were treated at our hospital from January 2006 to May 2011, were included in this retrospective study. Patients with liver cancer near the gallbladder underwent laparoscopic resection of gallbladder before ultrasound-guided radiofrequency ablation (combination group), while patients with liver cancer far from the gallbladder underwent ultrasound-guided radiofrequency ablation directly (control group). Preoperative clinical data, postoperative hospital stay, complication rate and overall survival were compared between the two groups.

RESULTS: The changes in liver function parameters between before and after surgery had no significant difference between the two groups of patients (all $P > 0.05$). There were also no statistically significant differences in hospitalization time and incidence of postoperative complications between the two groups (both $P > 0.05$). The difference in operative time was statistically significant between the two groups ($P < 0.01$). The tumor necrosis rate after radiofrequency was 91.7% (11/12) in the combination group and 86.4% (19/22) in the latter group. The 5-year survival rate was similar between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Radiofrequency combined with laparoscopic gallbladder excision is a safe and effective treatment for liver cancer near the gallbladder.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Liver cancer; Radiofrequency treatment; Laparoscopic cholecystectomy

Zhao XX, You FP, Yuan QZ, Pan GZ, Bu QA, Hao L, Zhang J. Safety and effectiveness of radiofrequency combined with laparoscopic cholecystectomy in management of liver cancer near the gallbladder. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2212-2216 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2212.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2212>

摘要

目的: 探讨胆囊区肝癌射频治疗联合腹腔镜胆囊切除(laparoscopic cholecystectomy, LC)手术安全性及有效性。

方法: 选取我院2006-01/2011-05, 12例胆囊区的肝癌和27例非胆囊区的肝癌, 前者行腹腔镜胆囊切除后再行B超引导或直视下射频消融治疗, 后者行B超引导射频消融治疗, 进行回顾性分析两组患者术前术后的临床资料, 住院时间、并发症发生率和总体生存率情况。

结果: 通过统计分析患者手术前后的肝功能结果发现, 两组患者术前、术后肝功能变化差

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 主任医师, 郑州大学第二附属医院消化科

异无统计学意义(均 $P>0.05$), 两组患者在住院时间及术后并发症的发生率上差异无统计学意义(均 $P>0.05$), 在手术时间上差异有统计学意义($P<0.01$), 射频后肿瘤的坏死率, 胆囊旁组91.7%(11/12), 非胆囊旁组86.4%(19/22), 随访5年, 排除删失数据对结果的影响后发现两组5年生存率差异无统计学意义($P>0.05$).

结论: 对于胆囊区的肝癌, 肝癌射频治疗联合腹腔镜下胆囊切除, 有效避免了因射频消融引起的迟发型胆囊坏死穿孔, 手术安全, 长期随访疗效可靠.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 肝癌; 射频治疗; 腹腔镜胆囊切除术

核心提示: 腹腔镜下操作, 可发现术前影像学未发现肿物, 避免损伤空腔脏器, 全麻下治疗, 患者痛苦减少, 治疗彻底; 腹腔镜胆囊切除术应用广泛, 射频消融治疗肝癌, 风险小, 操作方便, 两者有机结合, 手术安全, 疗效可靠, 该技术可推广至基层医院开展.

赵希学, 由法平, 袁庆忠, 潘国政, 卜庆敖, 郝龙, 张建. 胆囊区肝癌射频治疗联合LC手术安全性评估. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2212-2216 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2212.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2212>

0 引言

原发性肝癌是世界上第5大常见恶性肿瘤, 其死亡率居世界第3位^[1], 随着人寿命的延长肝癌的发病率也呈逐年上升的趋势^[2]. 手术切除一直是肝细胞肝癌的首选治疗手段^[3,4], 在我国肝癌患者多为高龄, 常伴有高血压、心脏病等慢性疾病, 耐受手术能力差. 因此, 微创治疗显得尤为重要, 由于射频消融热效率高, 升温快, 凝固坏死彻底, 受血流影响较小, 且对于小肝癌, 射频消融与手术切除可取得相同的治疗效果^[5-7], 逐渐成为肝癌的另一种重要治疗手段. 但对于毗邻胆囊、肝门部、大血管等特殊部位的肝癌, 其安全性及有效性一直存在争议^[8,9]. 近年来, 对于毗邻胆囊的肝癌报道逐渐增多^[10,11], 但其治疗方法不一, 疗效及安全性无统一论, 手术技巧要求高, 临床上开展存在一定难度. 本课题通过回顾性分析比较胆囊区和非胆囊区的肝癌患者的临床资料、住院时间、并发症发生率和总体生存率情况, 来评估肝癌射频治疗联合腹腔镜胆囊切除(laparoscopic cholecystectomy, LC)手

术安全性及有效性.

1 材料和方法

1.1 材料 采用回顾性分析研究, 选取我院肝胆外科2006-01/2011-06收治的200余例肝癌患者中选取12例毗邻胆囊区, 27例非胆囊区的肝癌. 术前诊断标准依据欧洲肝脏研究协会(EASL)指南. 病例纳入标准: (1)患者术前未接受其他抗癌治疗; (2)直径 ≤ 5 cm的单发肿瘤或最大直径 ≤ 3 cm的3个以内的多发肿瘤; (3)无癌栓; (4)肝功能Child-Pugh A或B级的患者, 或为C级, 但经积极保肝治疗后转为B或A级; (5)无严重心、脑、肾等严重器官功能障碍; (6)不愿意接受手术治疗的, 自愿接受微创治疗的患者. 射频治疗仪为美国Tyco Healthcare公司生产, 型号为CTRF-220, 治疗系统的输出功率为1-220 W \pm 15%, 其射频频率为: 480 kHz \pm 3%, 温度检测范围为10 $^{\circ}$ C-99 $^{\circ}$ C, 系统的阻抗检测范围为: 10-1000 ohms, 专用电极包括单束射频电极和集束射频电极, 电极内部冷循环水流动, 有效地减少了临近组织的损伤, 该系统单次治疗的直径 >5 cm, 消融时间为12 min.

1.2 方法

1.2.1 手术: (1)腹腔镜联合B超引导下肝脏肿瘤射频消融组(A组): 仰卧位, 力月西+罗库溴胺+丙泊酚+舒芬太尼诱导麻醉, 气管插管全麻后丙泊酚+瑞芬太尼+罗库溴胺维持麻醉(具体药物计量根据患者身高体重调整), 全麻成功后建立CO₂气腹, 腔镜下探查肝脏及腹腔情况, 三孔法行腹腔镜胆囊切除术, 若肿瘤位于胆囊床表面则直视下行射频消融治疗, 若切除胆囊后不能显示肿瘤, 则去除气腹, B超引导选取肿瘤最大切面, 决定进针路线, 射频针植入肿瘤内部, 功率设定在100 W, 治疗时间为12 min, 超声下见目标区域被高回声覆盖, 治疗结束, 复温60 s至90 $^{\circ}$ C, 拔除射频针, 记录手术时间; (2)B超引导下射频消融组(B组): 仰卧位, 力月西+罗库溴胺+丙泊酚+舒芬太尼诱导麻醉, 气管插管全麻后丙泊酚+瑞芬太尼+罗库溴胺维持麻醉(具体药物计量根据患者身高体重调整). 麻醉成功后, B超定位, 选取肿瘤最大切面, 决定进针路线, 射频仪功率设定在100 W, 治疗时间为12 min, 超声下见目标区域被高回声覆盖后治疗结束, 复温60 s至90 $^{\circ}$ C, 拔除射频针, 记录手术时间.

A、B两组患者术后统一去麻醉恢复室复苏清醒后回病房, 整个治疗期间患者无痛苦, 心电图监护心率血压均较平稳.

■ 研发前沿

对于毗邻胆囊的肝癌治疗方法不一, 疗效及安全性无统一论, 手术技巧要求高, 临床上开展存在一定难度.

■ 相关报道

刘建勇等, 超声引导下经皮微波消融治疗邻近危险区域肝癌临床观察; 田虎等, 腹腔镜辅助射频消融术治疗特殊部位肝癌的研究; 方和平等, 腹腔镜下胆囊旁肝癌的微波消融治疗; Chopra等, 对于毗邻胆囊的肝癌射频治疗的安全性及可行性研究; 霍苓等, 胆囊旁肝肿瘤射频消融治疗附加方法及疗效.

■创新盘点

对于胆囊区的肝癌, 肝癌射频治疗联合腹腔镜下胆囊切除, 手术安全, 疗效可靠。

表 1 患者临床病例资料

	胆囊旁组(A组)	非胆囊旁组(B组)	P值
性别(男/女)	9/3	15/7	0.688
年龄(岁)	64.4(58-77)	62.9(42-79)	0.566
HBsAg(+)	7	11	-
HCVAb(+)	2	3	-
△总胆红素(μmol/L)	13.17 ± 8.93	9.90 ± 10.06	0.354
△白蛋白(g/L)	5.68 ± 5.09	5.25 ± 3.25	0.322
△ALT(U/L)	162.25 ± 86.95	160.41 ± 94.19	0.956
△AST(U/L)	157.58 ± 103.97	205.23 ± 149.12	0.334
肿瘤数目			
单发	9	17	-
多发	3	5	-
肿瘤大小(cm)			
<2	1	4	-
2-5	14	23	-
AFP(μg/L)			
<20	6	7	-
>20	6	15	-

△总胆红素 = 术前总胆红素-术后24 h总胆红素; △白蛋白 = 术前白蛋白-术后24 h白蛋白;
△ALT = 术前ALT-术后24 h ALT; △AST = 术前AST-术后24 h AST; “-”: 未统计两组差异。
ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; AFP: 甲胎蛋白。

1.2.2 观察项目及疗效评价: 术前及术后24 h白蛋白、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic-oxalacetic transaminase, AST)、总胆红素变化; 术后住院时间; 术后并发症情况, 术后1 mo复查肝脏增强CT, 动脉期无增强表示肿瘤毁损完全, 无复发; 以后第1年每3 mo复查一次, 以后每半年复查1次, 内容包括肝功能、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)、肝脏增强CT, 如复发记录继续治疗情况。记录患者1、2、3、5年总体生存率情况。

统计学处理 计量资料采用mean ± SD表示, 组间计量资料采用t检验 (one-way ANOVA, LSD method), 用Kaplan-Meier曲线评估事件的累计发生率, Log-rank test比较总体生存率。应用SPSS18.0软件统计分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床病历资料 A、B两组患者临床病例资料如表1, 两组患者在性别、年龄上差别无统计学差异, 在手术前后胆红素、白蛋白、ALT、AST的变化差异上差别无统计学差异。

2.2 手术时间、住院天数及术后并发症情况 A、B两组在手术时间分别为137.50 min ± 20.17 min

和81.95 min ± 38.14 min, 差别有统计学意义($P < 0.01$)(图1A), 考虑与手术切除胆囊所增加的时间有关; A、B两组患者住院天数分别为8.42 d ± 2.11 d和8.36 d ± 3.39 d, 差异无明显统计学意义($P = 0.961$)(图1B)。

在并发症发生例数上差异无统计学意义($P = 0.675$)。其中A组患者中有4例患者出现发热, 3例患者出现腹痛, 1例出现大量腹水, 均对症处理后好转, 1例患者术后20 d胆道感染, 经保守治疗后好转出院, 所有患者均无严重并发症出现; B组患者中有6例患者出现发热, 2例出现大量腹水伴发热, 1例出现腹痛伴发热, 1例患者术后7 d为预防复发行介入治疗, 1例患者出院3 d后因上消化道大出血再次入院, 经保守治疗后好转出院。

2.3 复发情况及生存分析 术后1 mo行增强CT扫描检查, 肿瘤坏死率为: A组91.7%(11/12), B组86.4%(19/22), 两组患者治疗坏死率相差较大。1 mo后复查AFP, A组中术前阳性者6例, 有5例降至正常, 1例明显下降, B组中术前阳性者15例, 有13例降至正常, 2例明显下降。复发的患者有1例行介入治疗, 3例再次行射频治疗。随访5年, 其中A组中位生存时间为29.00 mo ± 3.46 mo, B组中位生存时间为30.00 mo ± 4.51 mo, 两组患者在5年内总体生存率上差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2)。

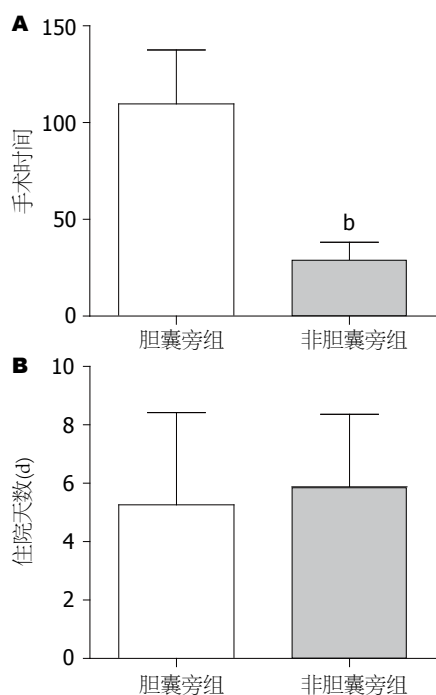


图 1 胆囊旁组与非胆囊旁组患者在手术时间和住院天数的比较. A: 手术时间; B: 住院天数. ^b $P < 0.01$ vs 胆囊旁组.

3 讨论

射频消融治疗肝癌, 热效率高, 容易控制, 可直接作用于肿瘤, 安全、微创、可反复使用, 现在已成为一种微创的肝脏肿瘤的主要治疗方法, 近十几年来在国内外发展迅速. 有报道^[12-15], 可行腹腔镜辅助射频消融, 对于临近胆囊的肝癌可直视下控制进针方向和角度, 进行射频治疗; 陈敏华报告通过在胆囊床注水后, 再行射频治疗; 也可先行腹腔镜切除胆囊后再行肝癌射频消融, 治疗效果相差不大. 由于我国大部分肝癌患者均合并乙型肝炎肝硬化, 肝脏储备功能较差, 部分患者虽然术前评估为Child-Pugh A或B级, 但手术创伤可能对肝脏造成巨大的打击, 射频消融作为一种微创肝癌治疗方法, 创伤小, 对患者肝功能几乎无影响, 在临床上已应用十几年, 事实证明其安全可靠, 但对于腹腔镜切除胆囊后再行肝癌射频治疗, 其手术安全性尚未见系统报道, 本研究就腹腔镜胆囊切除联合肝癌射频治疗的安全性进行进一步阐述.

本研究将入选病例分为胆囊区组和非胆囊区组, 通过统计分析患者手术前后的肝功能结果发现, 两组患者术前、术后肝功能变化差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 两组患者在住院时间上及术后并发症的发生率上差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 在手术时间上差异有统计学意义($P < 0.01$), 考虑为腹腔镜切除胆囊增加的手术时

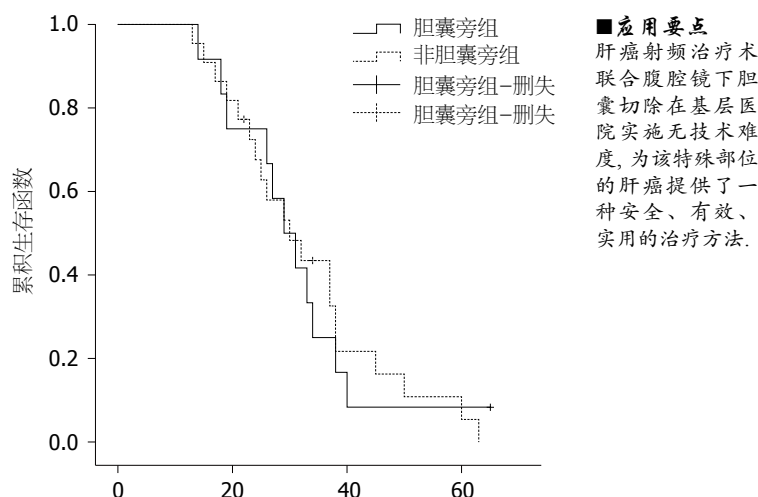


图 2 胆囊旁组、非胆囊旁组两组患者在生存时间的比较.

间, 但增加手术的时间对患者肝功能、住院时间及术后并发症的发生率无影响. 射频后肿瘤的坏死率, 胆囊旁组91.7%(11/12), 非胆囊旁组86.4%(19/22), 两组患者治疗坏死率相差较大其原因可能为: (1)腹腔镜切除胆囊后, 消除射频对胆囊损伤的顾虑, 直视下销毁癌灶, 治疗更彻底, 效果更可靠; (2)可能与胆囊旁组患者样本较少有关, 若增加样本统计量两组患者差异可能会减小. 随访5年, 排除删失数据对结果的影响后发现两组5年生存率差异无统计学意义($P > 0.05$). 对于毗邻胆囊的肝脏恶性肿瘤, 我们治疗体会是: (1)直视下, 视野更加清晰, 可发现术前影像学检查无法发现的肿物; 同时避免损伤其他空腔脏器如结肠、胃、十二指肠; (2)全麻下治疗, 减轻了患者手术的痛苦, 治疗更加彻底; (3)腹腔镜下胆囊切除术已在基层医院开展, 射频消融治疗肝癌, 风险小, 操作方便, 两者有机结合, 可将该技术的使用范围扩展到基层医院.

总之, 对于胆囊区的肝癌, 肝癌射频治疗联合腹腔镜下胆囊切除, 手术安全, 疗效可靠, 在基层医院实施无技术难度, 为该特殊部位的肝癌提供了一种安全、有效、实用的治疗方法. 但对于年龄大、体质差、不能耐受手术毗邻大血管、肝门区的等特殊部位的肝癌, 如何有效的进行射频治疗是我们进一步探索的方向.

4 参考文献

- Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917 [PMID: 14667750]
- McKenna RJ. Clinical aspects of cancer in the elderly. Treatment decisions, treatment choices, and follow-up. *Cancer* 1994; 74: 2107-2117 [PMID: 8087778]

应用要点
肝癌射频治疗联合腹腔镜下胆囊切除在基层医院实施无技术难度, 为该特殊部位的肝癌提供了一种安全、有效、实用的治疗方法.

■同行评价

本文立足临床,有一定的临床应用价值。

- 3 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会, 中华医学会肝病学会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治专家共识. 临床肿瘤学杂志 2009; 14: 259-269
- 4 Müller C. Hepatocellular carcinoma--rising incidence, changing therapeutic strategies. *Wien Med Wochenschr* 2006; 156: 404-409 [PMID: 16937043]
- 5 Kobayashi M, Ikeda K, Kawamura Y, Hosaka T, Sezaki H, Yatsuji H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Randomized controlled trial for the efficacy of hepatic arterial occlusion during radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinoma--direct ablative effects and a long-term outcome. *Liver Int* 2007; 27: 353-359 [PMID: 17355457]
- 6 Ohmoto K, Yoshioka N, Tomiyama Y, Shibata N, Kawase T, Yoshida K, Kuboki M, Yamamoto S. Thermal ablation therapy for hepatocellular carcinoma: comparison between radiofrequency ablation and percutaneous microwave coagulation therapy. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 651-654 [PMID: 17086861]
- 7 Lencioni R, Crocetti L. Radiofrequency ablation of liver cancer. *Tech Vasc Interv Radiol* 2007; 10: 38-46 [PMID: 17980317]
- 8 Ohmoto K, Yoshioka N, Tomiyama Y, Shibata N, Kawase T, Yoshida K, Kuboki M, Yamamoto S. Radiofrequency ablation versus percutaneous microwave coagulation therapy for small hepatocellular carcinomas: a retrospective comparative study. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 985-989 [PMID: 17629022]
- 9 Wang ZL, Liang P, Dong BW, Yu XL, Yu de J. Prognostic factors and recurrence of small hepatocellular carcinoma after hepatic resection or microwave ablation: a retrospective study. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 327-337 [PMID: 17943391]
- 10 李猛, 于晓玲, 梁萍, 曹晓林, 范瑾, 刘方义. 超声引导下经皮微波消融对紧邻胆囊肝癌的临床研究. 癌症进展杂志 2008; 6: 172-176
- 11 刘建勇, 陆伟, 周永和, 曹弘波, 周国强, 曹智. 超声引导下经皮微波消融治疗邻近危险区域肝癌临床观察. 临床肝胆病杂志 2011; 27: 27-29
- 12 田虎, 付真, 刘竞芳, 李杰, 徐宗珍, 刘锋, 王兴国. 腹腔镜辅助射频消融术治疗特殊部位肝癌的研究. 腹腔镜外科杂志 2011; 16: 901-904
- 13 方和平, 邓美海, 潘卫东, 任杰, 郑荣琴, 许瑞云. 腹腔镜下胆囊旁肝癌的微波消融治疗. 岭南现代临床外科 2007; 7: 401-403
- 14 Chopra S, Dodd GD, Chanin MP, Chintapalli KN. Radiofrequency ablation of hepatic tumors adjacent to the gallbladder: feasibility and safety. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 697-701 [PMID: 12591677]
- 15 霍苓, 陈敏华, 严昆, 张晖, 高文, 杨薇, 戴莹, 黄信孚. 胆囊旁肝肿瘤射频消融治疗附加方法及疗效. 中华超声影像学杂志 2005; 14: 437-440

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。

床边急诊ERCP在重症急性胆源性胰腺炎治疗中的应用16例

袁帅, 孙大勇

袁帅, 南方医科大学附属小榄医院消化科 广东省中山市 528415

孙大勇, 中国人民解放军广州军区广州总医院消化科 广东省广州市 510010

袁帅, 副主任医师, 主要从事胃肠与胆胰疾病内镜下的诊断与治疗。

作者贡献分布: 本研究由孙大勇与袁帅设计; 研究过程由孙大勇与袁帅完成; 数据分析与论文写作由袁帅完成。

通讯作者: 袁帅, 副主任医师, 528415, 广东省中山市小榄镇菊城大道中65号, 南方医科大学附属小榄医院消化科。

yuanshuaishuai888@126.com

电话: 0760-22252532

收稿日期: 2013-04-21 修回日期: 2013-06-16

接受日期: 2013-07-15 在线出版日期: 2013-08-08

Application of bedside emergency ERCP in the treatment of severe acute biliary pancreatitis

Shuai Yuan, Da-Yong Sun

Shuai Yuan, Department of Gastroenterology, Xiaolan Hospital Affiliated to Southern Medical University, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China

Da-Yong Sun, Department of Gastroenterology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Correspondence to: Shuai Yuan, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Xiaolan Hospital Affiliated to Southern Medical University, 65 Xiaolanzen Jucheng Dadao, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China. yuanshuaishuai888@126.com

Received: 2013-04-21 Revised: 2013-06-16

Accepted: 2013-07-15 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To investigate the reliability and validity of bedside emergency endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) without X-ray guidance in the treatment of severe acute biliary pancreatitis.

METHODS: Thirty-four patients with severe acute biliary pancreatitis in intensive care unit were enrolled into this prospective study. These patients were divided into either a treatment group ($n = 14$) or a control group ($n = 18$). The control group underwent routine comprehensive medical treatment. The treatment group was treated by bedside emergency ERCP without X-ray guidance. Selective bile duct cannulation

was performed, and the success of intubation was confirmed by pumping back bile through ducts. Duodenal papilla sphincterotomy lithotomy, routine indwelling nose bile drainage, and secondary ERCP were conducted in case of necessity. Clinical effectiveness and costs were compared between the two groups.

RESULTS: All patients in the treatment group received successful selective bile duct intubation, and six of them needed secondary ERCP. Average time of abdominal pain relief was significantly less in the treatment group than in the control group ($4.38 \text{ d} \pm 1.31 \text{ d}$ vs $11.72 \text{ d} \pm 2.76 \text{ d}$, $P < 0.05$). The average hospitalization time was significantly shorter ($12.69 \text{ d} \pm 3.09 \text{ d}$ vs $25.61 \text{ d} \pm 7.41 \text{ d}$, $P < 0.05$) and the cost of hospitalization was significantly lower ($4.77 \times 10^4 \text{ RMB} \pm 0.97 \times 10^4 \text{ RMB}$ vs $10.04 \times 10^4 \text{ RMB} \pm 2.29 \times 10^4 \text{ RMB}$, $P < 0.05$) in the treatment group than in the control group. Incidence of complications was significantly lower in the treatment group than in the control group (6.25% vs 44.44% , $P < 0.05$). No statistic difference in mortality was found between the two groups.

CONCLUSION: Bedside emergency ERCP without X-ray guidance is a safe and effective treatment for severe acute biliary pancreatitis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Severe acute biliary pancreatitis; Bedside emergency endoscopic retrograde cholangiopancreatography

Yuan S, Sun DY. Application of bedside emergency ERCP in the treatment of severe acute biliary pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2217-2220 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2217.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2217>

摘要

目的: 探讨床边非X线引导下急诊逆行性胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)在重症急性胆源性胰腺炎治疗中的价值。

方法: 34例重症监护室(intensive care unit,

■背景资料

急性胰腺炎是临床上常见的疾病,在我国急性胆源性胰腺炎占急性胰腺炎的50%-70%,其中重症急性胆源性胰腺炎病情凶险、死亡率高,以往常需外科手术,但是手术风险大,急诊内镜介入治疗已成为重症急性胆源性胰腺炎的一种重要治疗手段。而在实际临床工作中,此类患者病情危重,常伴通气功能障碍、心功能不全等严重影响内镜治疗的危险因素,脱离重症监护室(intensive care unit, ICU)监护环境或呼吸机辅助呼吸的逆行性胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)常难以顺利进行,若能在无透视设备的ICU环境下安全有效实施ERCP诊疗,则可能是一种理想的治疗手段。

■同行评议者

周翔宇, 副主任医师, 泸州医学院附属医院血管甲状腺外科

■研发前沿

在重症胆源性胰腺炎患者的内镜治疗中,尽早解除胆道梗阻是缓解病情的关键。而采取何种方式才可既能保证患者治疗安全性,又能取得有效的治疗效果,是此类患者内镜治疗的难点。

ICU)住院重症急性胆源性胰腺炎患者,治疗组16例行急诊床边非X线引导下ERCP术,选择性胆管插管回抽胆汁证实胆管插管成功,必要时行十二指肠乳头括约肌切开取石,常规留置鼻胆引流管引流,病情稳定后必要时行2次ERCP诊疗。对照组18例接受常规内科综合治疗。对照两组患者临床效果与医疗费用。

结果: 治疗组选择性胆管插管成功率为100%, 2次ERCP术共4例,全部患者治愈出院。治疗组腹痛缓解时间 $4.38 \text{ d} \pm 1.31 \text{ d}$ 快于对照组 $11.72 \text{ d} \pm 2.76 \text{ d}$ ($P < 0.05$), 住院时间 $12.69 \text{ d} \pm 3.09 \text{ d}$ 较对照组 $25.61 \text{ d} \pm 7.41 \text{ d}$ 明显缩短 ($P < 0.05$), 治疗费用 $4.77 \text{ 万元} \pm 0.97 \text{ 万元}$ 明显低于对照组 $10.04 \text{ 万元} \pm 2.29 \text{ 万元}$ ($P < 0.05$), 并发症发生率(6.25%)低于对照组(44.44%) ($P < 0.05$), 死亡率(0%)与对照组(11.11%)无显著差异 ($P > 0.05$)。

结论: 床边非X线引导下急诊ERCP治疗是重症胆源性胰腺炎救治的安全有效方法。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 重症急性胆源性胰腺炎; 床边急诊逆行性胰胆管造影

核心提示: 急诊内镜介入治疗已成为重症急性胆源性胰腺炎的一种重要治疗手段,而脱离重症监护室(intensive care unit, ICU)监护环境或呼吸机辅助呼吸的逆行性胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)常难以在此类患者中顺利实施。作者对16例急性重症胆源性胰腺炎在ICU监护条件下实施非X线引导下急诊ERCP治疗,取得良好临床效果,结果提示非X线引导下选择性胆管插管成功率为100%,并可明显缩短缓解腹痛所需时间、减轻并发症发生率、缩短平均住院时间和降低平均住院医疗费用,而非X线引导下成功实施急诊ERCP治疗的前提是具备丰富的ERCP操作经验与操作技巧。

袁帅, 孙大勇. 床边急诊ERCP在重症急性胆源性胰腺炎治疗中的应用16例. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2217-2220
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2217.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2217>

0 引言

急性胰腺炎是临床上常见的疾病,在我国急性胆源性胰腺炎占急性胰腺炎的50%-70%^[1],其中重症急性胆源性胰腺炎病情凶险、死亡率高,以往常需外科干预,但是手术风险大,急诊内镜

介入治疗已成为重症急性胆源性胰腺炎的一种重要治疗手段。而在实际临床工作中,因该类患者病情危重,常常无法及时顺利实施逆行性胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)治疗,错失有效救治时机。若此类患者能在重症监护室(intensive care unit, ICU)监护条件下实施床边急诊ERCP术,将有可能提高ERCP诊疗的安全性,本研究探讨重症急性胆源性胰腺炎在ICU监护条件下,实施非X线引导下急诊ERCP治疗,取得良好临床效果,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2007-01/2013-04广州军区广州总医院与南方大学附属小榄医院ICU住院诊断为重症急性胆源性胰腺炎的患者共34例,重症急性胰腺炎诊断标准参照中华医学会外科学分会胰腺外科学组2007年公布的《重症急性胰腺炎诊治指南》^[2]。所有患者均为发病24 h内入院,腹部B超或CT发现胆囊或胆总管结石,并排除其他病因引起的胰腺炎,所有患者均无毕Ⅱ式胃大部切除术病史。将34例患者分成行急诊床边非X线引导下ERCP术的治疗组(16例),和经内科保守治疗的对照组(18例)。两组在性别、年龄、APACHE II评分方面无统计学差异 ($P > 0.05$), 两组资料具有可比性(表1)。Olympus TJF260型十二指肠镜, Olympus PSD-20型高频电发生器, 各种ERCP治疗配件, 包括斑马导丝、聪明刀、针状切开刀、取石网篮、气囊导管、鼻胆引流管等。

1.2 方法 治疗组: 患者取左侧卧位, 呼吸功能障碍者气管插管辅助呼吸, 十二指肠镜常规进镜达十二指肠降段, 取直镜身, 寻找到十二指肠乳头后, 在非X线引导下用聪明刀插管(导管内常规留置导丝), 插管时阻力突然降低或消失提示进入胰胆管, 回抽插管导管见胆汁流出提示进入胆总管, 将导丝送进胆总管, 若术前B超等提示胆总管结石, 则行十二指肠乳头切开, 根据结石大小、数目、部位等选择是否用网篮或取石气囊取出, 对壶腹部结石嵌顿者, 用针状切开刀切开乳头括约肌后取石, 最后常规留置鼻胆引流管, 术后禁食、胃肠减压、液体复苏、胃肠外营养、抗炎、抑制胰酶分泌等治疗同对照组, 病情稳定后复查B超或CT, 必要时行2次ERCP术。

对照组: 仅给予内科保守治疗, 包括禁食、胃肠减压、液体复苏、胃肠外营养、抗炎、抑制胰酶分泌、维持水电解质与酸碱平衡、保护

■相关报道

国内马应杰等报道了早期内镜下鼻胆引流术在急性重症胆源性胰腺炎治疗中的价值,认为早期内镜下解除胆道梗阻可降低此类患者的死亡率并缩短住院时间。谢子英等探讨了内镜治疗急诊高龄急性重症胆源性胰腺炎的可行性,结果提示早期ERCP治疗急性重症胆源性胰腺炎是安全有效的方法,特别是对高龄患者,能迅速缓解病情,有效缩短患者腹痛缓解时间以及住院时间。

表 1 两组性别、年龄、APACHE II 评分的比较

分组	n	性别(男/女)	年龄(岁)	APACHE II 评分
治疗组	16	7/9	55.88 ± 16.48	13.21 ± 1.57
对照组	18	8/10	56.83 ± 14.23	12.49 ± 1.45

表 2 两组临床效果与住院费用的对比

分组	n	腹痛缓解时间(d)	住院时间(d)	并发症发生率(%)	死亡率(%)	住院费用(万元)
治疗组	16	4.38 ± 1.31	12.69 ± 3.09	6.25	0	4.77 ± 0.97
对照组	18	11.72 ± 2.76	25.61 ± 7.41	44.44	11.11	10.04 ± 2.29

脏器功能与严密监护等。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行资料统计, 计量资料以mean±SD表示, 组间比较采用t检验, 计数资料采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法, 按 $\alpha = 0.05$ 标准, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 急诊非X线引导下ERCP完成情况 全部患者成功选择性胆管插管与留置鼻胆引流管, 12例患者一次取石成功, 4例行2次ERCP术清除残留结石, 所有患者均无出血、穿孔等ERCP相关并发症发生。

2.2 两组临床效果与住院费用对比 治疗组患者全部治愈出院, 对照组死亡1例。治疗组在腹痛缓解时间、平均住院时间、并发症发生率、平均住院费用等方面均明显低于对照组($P < 0.05$)。治疗组并发上消化道出血1例, 对照组发生并发症患者共8例, 其中包括急性呼吸窘迫综合征、休克、急性肾损伤、急性心功能衰竭、胰腺脓肿、消化系出血、胰腺假性囊肿和上消化道出血等, 治疗组并发症发生率低于对照组($P < 0.05$, 表2)。

3 讨论

重症急性胆源性胰腺炎是临床上常见的急症, 病情凶险, 病死率高。随着治疗理念的更新与微创技术的进步, 重症急性胆源性胰腺炎救治成功率已有较大幅度的提高^[3], 但针对其治疗的争议从未停止过^[4], 尤其是早期是否行ERCP治疗仍存在争议^[5]。有些学者认为, 早期的ERCP及EST往往不能终止或缓解急性重症胰腺炎的发展, 反而为随后的感染提供了途径, 故对其持怀疑态度。但更多的临床研究结果表明重症胆源性胰腺炎行ERCP和EST治疗是必要和有效的^[6-8]。

中华医学会外科学分会胰腺外科学组2007年公布的《重症急性胰腺炎诊治指南》^[2]推荐胆源性急性胰腺炎患者凡伴有胆道梗阻者一定要及时解除梗阻, 首选作经纤维十二指肠镜下行Oddi括约肌切开取石及鼻胆管引流。然而此类患者常伴通气功能障碍、心功能不全等严重影响内镜治疗的危险因素^[9], 脱离ICU监护环境或呼吸机辅助呼吸的ERCP常难以顺利进行, 若能在无透视设备的ICU环境下安全有效实施ERCP诊疗, 则可能是一种理想的治疗手段。

本研究治疗组16例患者均成功实行非X线引导下ERCP术并常规留置鼻胆引流管, 未发生出血、穿孔等严重并发症, 说明非X线引导下ERCP术是可行的。在重症胆源性胰腺炎患者早期治疗中, 解除胆道梗阻是缓解病情的关键, 有研究表明, 壶腹部持续梗阻时间与ABP的严重程度呈正比, 梗阻在24 h内解除胰腺病变是可逆的, 超过48 h则出现胰腺出血、坏死, 病变严重, 难恢复、预后差^[10,11], 故提倡早期解除梗阻, 在发病24-48 h内行内镜下介入治疗。治疗组患者均能通过取石或留置鼻胆引流管解除胆道梗阻, 在缓解腹痛、减轻并发症、缩短住院时间、减少医疗费用等方面效果均优于单纯内科保守治疗组, 而本组研究并未发现早期内镜下治疗能明显降低患者死亡率, 与相关报道^[12-16]结果一致。

床边非X光引导ERCP术与常规X光引导下ERCP诊疗的最大区别是具有一定的“盲目性”, 即便术者有更好的操作技巧与手感, 仍需承担更大的操作风险与失败率, 在操作上需根据实际情况量力而行, 在重症胆源性胰腺炎患者ERCP诊疗上以达到解除胆道梗阻为基本目标(通常为成功留置鼻胆引流管), 不必因强求取出胆道所有结石而增加出血、穿孔等并发症

■创新盘点

本研究探讨了非X线引导下急诊ERCP治疗急性重症胆源性胰腺炎的可行性与价值, 同时与读者分享了实施非X线引导下急诊ERCP治疗的操作技巧与心得。

■应用要点

床边急诊非X线引导ERCP在重症胆源性胰腺炎诊治是安全可行的, 可明显缩短缓解腹痛所需时间、减轻并发症发生率、缩短平均住院时间和降低平均住院医疗费用, 但相关操作需基于丰富的ERCP操作经验与操作技巧。

■同行评价

本文选题较新, 具有一定的临床实用性。

的风险或明显延长操作时间。对于条件允许的医疗单位, 若床边非X光引导ERCP术操作失败, 可考虑气管插管辅助通气下行常规X光引导下ERCP诊治。

研究表明, 床边非X光引导ERCP术是一种可行的方法, 但成功的操作有赖于操作者的经验与必要的操作技巧。笔者认为此类患者实施ERCP需注意以下几个环节: (1)操作者需有丰富的ERCP实践经验, 有应对困难胆管插管、术中出血等复杂情况的能力; (2)此类患者十二指肠乳头多明显充血水肿, 在胆管插管与乳头切开过程中容易出现出血, 娴熟应用导丝辅助插管技术有助于减少胆管插管引发的黏膜出血并可提高胆管插管成功率, 并应尽量避免乳头预切开; (3)选择性胆管插管与取石过程中导管、导丝、取石网篮或取石气囊进入胆管的深度多需凭借经验与对前端阻力感的判断, 过浅或过深均不利于治疗; (4)内镜下表现提示壶腹部结石嵌顿者, 首选针状刀切开术; (5)胆道结石不必强求一次性取出, 而鼻胆管引流是解除胆道梗阻的必需项目。

总之, 床边急诊非X线引导ERCP在重症胆源性胰腺炎诊治是安全可行的, 可明显缩短缓解腹痛所需时间、减轻并发症发生率、缩短平均住院时间和降低平均住院医疗费用, 但相关操作需基于丰富的ERCP操作经验与操作技巧。

4 参考文献

- 王建球, 杨廷燕, 王建平, 陈跃宇. 急性胆源性胰腺炎72例诊治体会. 肝胆外科杂志 2011; 19: 200-202
- 中华外科学会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治指南. 中华外科杂志 2007; 45: 727-729
- Bai Y, Liu Y, Jia L, Jiang H, Ji M, Lv N, Huang K, Zou X, Li Y, Tang C, Guo X, Peng X, Fang D, Wang B, Yang B, Wang L, Li Z. Severe acute pancreatitis in China: etiology and mortality in 1976 patients.

Pancreas 2007; 35: 232-237 [PMID: 17895843 DOI: 10.1097/MPA.0b013e3180654d20]

- 黄志强, 宋青, 刘志伟, 蔡守旺, 董家鸿. 论重症急性胰腺炎治疗观念的转变. 中华消化外科杂志 2010; 9: 321-325
- 孙备, 贾光. 重症急性胰腺炎治疗的争议与共识. 中华消化外科杂志 2012; 11: 314-317
- Lee JK, Kwak KK, Park JK, Yoon WJ, Lee SH, Ryu JK, Kim YT, Yoon YB. The efficacy of nonsurgical treatment of infected pancreatic necrosis. *Pancreas* 2007; 34: 399-404 [PMID: 17446837 DOI: 10.1097/MPA.0b013e318043c0b1]
- Forsmark CE, Baillie J. AGA Institute technical review on acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2022-2044 [PMID: 17484894 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.065]
- Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2379-2400 [PMID: 17032204 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00856.x]
- 杜奕奇, 湛先保, 谢沛, 董元航, 陈燕, 于齐宏, 郭晓榕, 郭杰芳, 张文俊, 施新岗, 李建萍, 蔡晔, 张圣道, 李兆申. 以内科综合治疗为特色的重症急性胰腺炎1064例次临床总结. 中华胰腺病杂志 2012; 12: 366-370
- Kapetanios DJ. ERCP in acute biliary pancreatitis. *World J Gastrointest Endosc* 2010; 2: 25-28 [PMID: 21160675 DOI: 10.4253/wjge.v2.i1.25]
- Tse F, Yuan Y. Early routine endoscopic retrograde cholangiopancreatography strategy versus early conservative management strategy in acute gallstone pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 5: CD009779 [PMID: 22592743]
- 马应杰, 姜海波, 王俊梅, 冯素萍. 早期内镜下鼻胆引流术在急性重症胆源性胰腺炎治疗中的作用. 临床消化病杂志 2010; 22: 144-146
- 王强, 王祥, 沈菁华. 老年急性重症胆源性胰腺炎70例诊治体会. 中华老年医学杂志 2012; 31: 704-706
- Sharma VK, Howden CW. Metaanalysis of randomized controlled trials of endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic sphincterotomy for the treatment of acute biliary pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3211-3214 [PMID: 10566716 DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01520.x]
- Ayub K, Imada R, Slavin J. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography in gallstone-associated acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; (4): CD003630 [PMID: 15495060]
- White JD. Emergency medicine as primary care? *Am J Emerg Med* 1993; 11: 427-428 [PMID: 8216529]

编辑 田滢 电编 闫晋利



英夫利昔单抗联合肠内营养在治疗中重度克罗恩病中的临床优势

吴高珏, 龚 镭, 胥 明, 朱颖炜

吴高珏, 龚镭, 胥明, 朱颖炜, 南京医科大学附属无锡第二医院消化内科 江苏省无锡市 214002
吴高珏, 主治医师, 主要从事炎症性肠病及胃肠动力方面的研究。
作者贡献分布: 此课题由龚镭与吴高珏设计; 研究过程由吴高珏、胥明及朱颖炜完成; 数据处理与论文写作由吴高珏完成。
通讯作者: 龚镭, 副教授, 主任医师, 硕士生导师, 214002, 江苏省无锡市中山路68号, 南京医科大学附属无锡第二医院消化内科。gonglei0520@yahoo.com.cn
电话: 0510-66681222-3329
收稿日期: 2013-05-23 修回日期: 2013-06-24
接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Infliximab combined with enteral nutrition for management of moderate to severe Crohn's disease

Gao-Jue Wu, Lei Gong, Ming Xu, Ying-Wei Zhu

Gao-Jue Wu, Lei Gong, Ming Xu, Ying-Wei Zhu, Department of Gastroenterology, Wuxi No. 2 Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi 214002, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Lei Gong, Associate Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Wuxi No. 2 Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 68 Zhongshan Road, Wuxi 214002, Jiangsu Province, China. gonglei0520@yahoo.com.cn
Received: 2013-05-23 Revised: 2013-06-24
Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical efficacy of infliximab combined with enteral nutrition (EN) in the management of moderate to severe Crohn's disease (CD).

METHODS: Twelve patients with moderate to severe CD which showed no response to traditional treatment were treated with infliximab 6 times, EN for 2 mo and azathioprine for maintenance therapy.

RESULTS: After the treatment, the body weight, body mass index (BMI), hemoglobin and albumin were significantly improved in CD patients (all $P < 0.05$), and the Crohn's disease activity index (CDAI), erythrocyte sedimentation (ESR) and C-reaction protein (CRP) were significantly

lower than pre-treatment values (all $P < 0.05$). All of the 12 patients showed clinical response to the treatment, of whom two achieved clinical remission and seven achieved mucosal healing. After 2 to 30 mo of follow-up, 1 patient developed lymphadenoma, and one patient developed recurrence after stopping taking azathioprine for 2 mo. The rest patients showed no relapse until now.

CONCLUSION: Infliximab combined with EN, together with maintenance therapy with azathioprine, is effective in the management of moderate to severe CD in terms of improving clinical efficacy, mucosal healing and prognosis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Infliximab; Enteral nutrition; Azathioprine; Crohn's Disease

Wu GJ, Gong L, Xu M, Zhu YW. Infliximab combined with enteral nutrition for management of moderate to severe Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2221-2227 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2221.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2221>

摘要

目的: 观察克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者应用英夫利昔单抗(类克)联合肠内营养(enteral nutrition, EN)为主的治疗方案的疗效。

方法: 选择12例中重度传统治疗无效的CD患者, 以类克5 mg/(kg·次)的剂量静脉输注6次, 同时加用EN治疗2 mo, 服用硫唑嘌呤作为维持治疗。

结果: (1)治疗后, 患者的体质量、体质量指数、血红蛋白及血清白蛋白均较治疗前显著提高($P < 0.05$); (2)治疗后, 患者的CD活动指数、血沉、C反应蛋白较前明显下降($P < 0.05$); 12例患者均治疗有效, 且其中10例患者达到临床缓解, 7例患者达到黏膜愈合; (3)随访2-30 mo, 1例患者发生恶性淋巴瘤, 1例患者自

■背景资料

我国克罗恩病(Crohn's disease, CD)的发病率呈逐年上升趋势, 该疾病临床表现多样化, 并发症多。以氨基水杨酸类、激素、免疫抑制剂为主的传统治疗, 对于一些中重度难治性CD的疗效不理想。近年来, 英夫利昔单抗及肠内营养的应用在CD治疗中的作用受到重视, 与传统治疗的联合应用为CD的治疗带来了新的曙光。

■同行评议者

冯志杰, 主任医师, 河北医科大学第二医院消化内科

■ 研发前沿

近年来, 英夫利昔单抗在中重度、传统治疗无效、或有瘻管等并发症的CD患者治疗中的应用得到肯定。同时, 肠内营养支持治疗可改善CD患者营养状态、促进病情缓解、改善生活质量。两者在难治性CD的治疗中的联合应用方面的优势仍有待进一步大规模临床试验探讨。

行停药硫唑嘌呤后复发, 其余10例患者无复发。

结论: 对于中重度CD, 采取类克、联合EN诱导缓解, 后期予硫唑嘌呤维持治疗, 可能更多地达到临床有效和/或黏膜愈合, 改善CD患者的预后。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 英夫利昔单抗; 肠内营养; 硫唑嘌呤; 克罗恩病

核心提示: 本研究对于12例中重度难治性克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者, 应用英夫利昔单抗联合肠内营养进行治疗, 并应用硫唑嘌呤作为维持治疗, 分析了患者营养状况、症状、CD活动指数、内镜表现、并发症、复发情况等详细资料, 提示该治疗方法可能更多地达到临床有效和/或黏膜愈合, 改善CD患者的预后, 在CD治疗中具有较好的临床优势。

吴高珏, 龚镭, 胥明, 朱颖炜. 英夫利昔单抗联合肠内营养在治疗中重度克罗恩病中的临床优势探讨. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2221-2227 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2221.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2221>

0 引言

近年来, 我国克罗恩病(Crohn's disease, CD)的发病率呈逐年上升趋势, 该疾病临床表现多样化, 包括腹泻、腹痛、血便等消化系表现, 体质量减轻、发热、贫血等全身性表现, 瘻管、肠腔狭窄及梗阻、肛周病变等并发症, 病程迁延, 易反复发作。该疾病的药物治疗以诱导缓解和维持缓解, 防治并发症, 改善生存质量为目的。常用的药物有氨基水杨酸类、糖皮质激素及免疫抑制剂等。但近年来, 激素依赖及激素抵抗的CD病例日益增多^[1], 部分中重度CD患者对硫唑嘌呤等免疫抑制剂治疗无效或复发率高, 传统治疗对于许多难治性CD的疗效均不理想。

目前的研究提示, 许多细胞因子, 尤其是肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)以旁分泌或自分泌的方式在CD患者中发挥作用, 增强、放大炎症连锁反应, 最终导致一系列组织损伤和坏死。英夫利昔单抗(infliximab, 商品名类克, Remicade)是一种人-鼠嵌合型单克隆抗TNF- α 抗体, 可有效地促进产TNF- α 的炎症细胞凋亡, 从而抑制炎症反应^[2]。近年来, 英夫利昔单抗在中重度、传统治疗无效或有瘻管等并发症的CD患者治疗中的应用得到重视^[3]。同时, 许多

中重度CD患者存在体质量下降、贫血、低蛋白血症等营养不良的表现, 肠内营养(enteral nutrition, EN)支持治疗可改善CD患者营养状态、促进病情缓解、改善生活质量。本文观察了12例中重度传统治疗无效的CD患者应用英夫利昔单抗联合肠内营养为主的治疗方案的疗效。

1 材料与方法

1.1 材料 以2010-12/2012-08在南京医科大学附属无锡第二医院消化内科住院治疗的传统治疗(美沙拉嗪、糖皮质激素、硫唑嘌呤)无效的12例中重度CD患者为研究对象。

1.2 方法

1.2.1 传统治无效的CD患者的诊断: 所有患者依据2007年我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见^[4], 具有典型的临床表现、结肠镜检查及黏膜组织学检查结果, 部分患者有手术病理结果。病情严重程度评价根据患者的CD活动指数(Crohn's disease activity index, CDAI)指数, 220-450为中度、>450为重度。该12例患者均予美沙拉嗪1.0 qid+泼尼松(起始剂量0.75 mg/(kg·d), 症状缓解后逐渐减量)+硫唑嘌呤1.0-1.5mg/(kg·d)治疗3 mo以上(其中有2例患者分别由于合并慢性再生障碍性贫血及白细胞减少未使用硫唑嘌呤, 仅应用美沙拉嗪+泼尼松治疗2 mo), 治疗后患者CDAI下降<100, 或出现激素依赖或抵抗, 或复查肠镜无明显好转。

1.2.2 给药剂量及途径: 传统治疗治疗无效的患者按照每周减5 mg泼尼松的剂量逐渐减量并停用激素, 停用美沙拉嗪, 继续服用硫唑嘌呤1 mg/(kg·d)(合并慢性再生障碍性贫血及白细胞减少的2例患者除外), 并改用类克治疗。类克以5 mg/(kg·次)的剂量静脉输注, 于0、2、6 wk作为诱导期治疗, 其后每8 wk给药一次巩固治疗×3次。同时, 从第一次应用类克治疗起加用EN治疗, 其中3例置入螺旋式鼻肠管, 予百普力(荷兰Nutricia公司)1000 kcal/d(1000 mL/d)夜间鼻饲×2 mo, 另9例患者口服百普素(荷兰Nutricia公司)1005 kcal/d(250 g/d)×2 mo; 本研究所有应用类克和硫唑嘌呤治疗均签署知情同意书。

1.2.3 疗效观察: 患者于治疗前及每次类克治疗后都予以临床症状的评价, 并比较体质量、体质量指数(body mass index, BMI)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、白蛋白(albumin, ALB)、血沉(erythrocyte sedimentation, ESR)及C反应蛋白(C reaction protein, CRP)的变化, 同时计算CD活

动指数(Crohn's disease activity index, CDAI), 并至少在治疗前及第3、4、6次类克治疗后内镜检查观察黏膜愈合情况. 以CDAI作为疗效评价标准, CDAI<150分为临床缓解, CDAI下降 ≥ 100 分作为治疗有效, 治疗后内镜下溃疡消失为黏膜愈合; 经药物治疗进入缓解期后, CD相关临床症状再次出现, 并有实验室炎症指标、内镜检查及影像学检查的疾病活动证据, 且CDAI>150分且较前升高100分则为复发.

统计学处理 采用SPSS17.0软件进行分析, 应用配对 t 检验比较治疗前后患者体质量、BMI、Hb、ALB、ESR、CRP及CDAI的变化. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 治疗前患者的临床特征 本研究中的12例CD患者, 男5例, 女7例, 平均年龄 40.5 ± 13.02 岁(20-62岁), 平均病程 $25.08 \text{ mo} \pm 35.60 \text{ mo}$ (2-124 mo). 症状表现有腹痛的10例, 腹泻的7例, 血便的2例, 胸骨后疼痛的1例(该例病变部位为食道). 病情严重程度评价根据CDAI指数, 中度9例, 重度3例. 病变范围为结肠型的2例, 回肠型的3例, 回结肠型的5例, 食道的1例, 累及十二指肠、回肠、结肠的1例. 接受本方案治疗前, 由于克罗恩病导致肠梗阻或穿孔接受过手术的患者3例, 合并腹壁肠瘘的1例, 腹壁窦道的1例(该患者肠穿孔行手术后腹壁手术瘢痕处反复由于线结反应形成多发的窦道), 合并肠外表现的合并关节炎或关节痛2例, 口腔溃疡2例.

2.2 疗效

2.2.1 治疗前后患者营养情况评价: 治疗前12例患者中, BMI<18.5 kg/m²的患者7例, BMI在18.5-21.0 kg/m²的患者5例, 合并贫血的患者7例, 低蛋白血症的患者5例. EN治疗结束后及类克治疗结束后, 患者的体质量、BMI、Hb及ALB均较治疗前显著提高($P<0.05$). 其中EN治疗结束后, 有3例患者BMI<18.5 kg/m², 4例患者贫血, 2例患者低蛋白血症; 类克治疗结束后, 仅有2例患者BMI<18.5 kg/m², 3例患者贫血, 所有患者均无低蛋白血症; EN治疗结束后与类克治疗结束后相比, 患者的体质量、BMI无显著差异($P>0.05$), 而Hb及ALB在类克治疗结束后较EN治疗结束后显著升高($P<0.05$, 表1).

2.2.2 治疗前后临床及内镜评价: 本组12例患者, 在3次类克治疗后, CDAI较治疗前显著下降(144.75 ± 77.29 vs 34.33 ± 83.18 , $t = -12.49$,

$P<0.05$). 12例患者中, 11例患者治疗有效, 且其中6例患者达到临床缓解; 6次类克治疗后, CDAI较3次类克治疗后进一步显著下降(92.33 ± 47.08 vs 144.75 ± 77.29 , $t = -3.88$, $P<0.05$), 12例患者均治疗有效, 且其中10例患者达到临床缓解.

经3次类克治疗后, ESR较治疗前显著下降(15.92 ± 10.66 vs 49.00 ± 29.74 , $t = -4.72$, $P<0.05$), 经6次类克治疗后, ESR较3次类克治疗后进一步显著下降(10.08 ± 4.17 vs 15.92 ± 10.66 , $t = -2.54$, $P<0.05$).

经3次类克治疗后, CRP较治疗前显著下降(6.43 ± 3.98 vs 34.18 ± 29.49 , $t = -3.13$, $P<0.05$), 经6次类克治疗后, ESR较3次类克治疗后无显著差异(6.06 ± 2.86 vs 6.43 ± 3.98 , $t = -0.45$, $P>0.05$).

3次类克治疗后, 2例患者症状完全缓解, 10例患者症状部分缓解. 6次类克治疗后, 3例患者症状完全缓解, 9例患者症状部分缓解; 其中1例合并腹壁肠瘘的患者在3次类克治疗后瘘管明显缩小, 6次类克治疗后瘘管进一步缩小(治疗前腹壁瘘口 $50 \text{ mm} \times 39 \text{ mm}$, 3次类克治疗后瘘口 $23 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$, 6次类克治疗后瘘口 $20 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$); 另1例合并腹壁窦道的患者在3次类克治疗后窦道明显变浅、部分愈合, 6次类克治疗后窦道完全愈合; 2例合并关节炎及2例口腔溃疡的患者在3次类克治疗后关节疼痛、活动受限、口腔反复溃疡的症状缓解, 6次类克治疗后上述症状进一步缓解.

3次类克治疗后, 2例患者达到黏膜愈合; 6次类克治疗后, 7例患者达到黏膜愈合(图1). 尤其是其中1例病变部位在食道的CD患者, 在类克治疗前, 予埃索美拉唑+美沙拉嗪+糖皮质激素治疗2 mo(该患者白细胞计数低, 未予硫唑嘌呤治疗), 食道溃疡虽略有变浅, 病理见周边肉芽组织生成, 但溃疡大小无明显变化, 吞咽后胸骨后疼痛加剧, 遂接受类克治疗, 激素减量后逐渐撤除, 在第3次类克治疗前复查胃镜, 已达黏膜愈合(图2).

2.3 随访 12例患者在本次治疗结束后, 继续服用硫唑嘌呤 $1.0-1.5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ (合并慢性再生障碍性贫血及白细胞减少的2例患者除外)至少2-4年后停药, 随访至今(2-30 mo). 其中1例患者在本次治疗结束后约6 mo(仍在继续服用硫唑嘌呤)再次出现腹痛症状、出现明显消瘦, 血沉、CRP明显升高, 腹部平片提示肠梗阻, 腹部B超及CT均提示腹腔多发淋巴结肿大, 予禁食、补液支持等治疗后腹痛缓解; 随访1 mo后

■相关报道

早在1997年, Targan等的一项纳入108例CD患者的双盲对照研究显示, 在给药2 wk后观察到疗效, 在第4周, 英夫利昔单抗组有81%的患者被判为有效, 好转48%. 12 wk后, 仍有近半数的患者维持疗效. 近年来, 英夫利昔单抗在CD治疗中, 诱导缓解、维持治疗、降低并发症及手术率的作用得到进一步肯定.

■创新盘点

肠内营养在CD治疗中切实可行,疗效也得到多项研究的验证,但目前仍缺乏可靠有据的临床实践指南,临床普及率较低;而英夫利昔单抗由于价格昂贵,在临床应用中受到限制;所以,两者在难治性CD中的联合应用仍有待进一步临床大规模的研究。

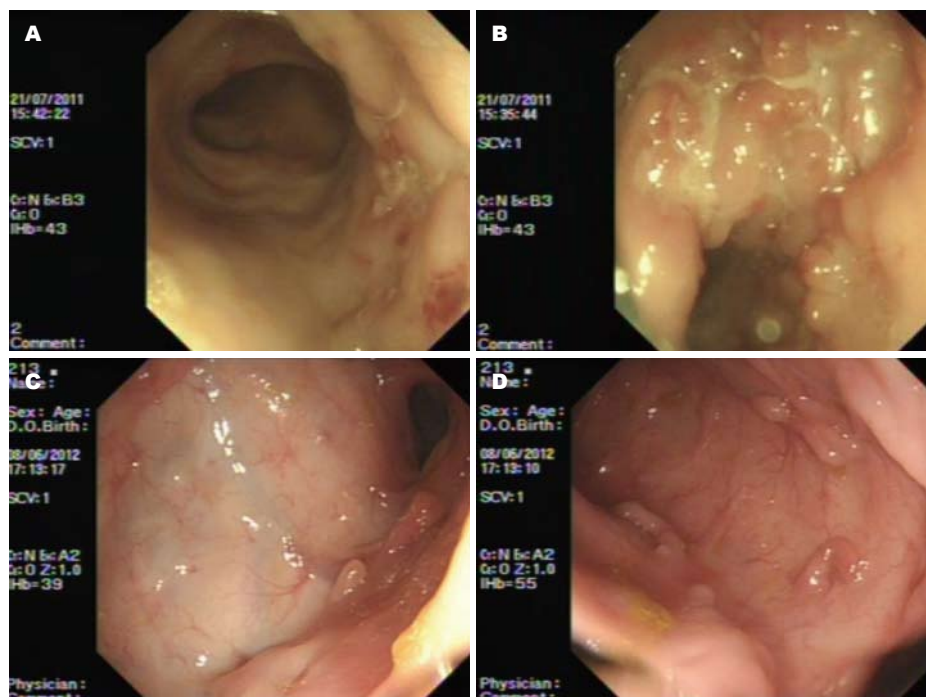


图1 CD患者治疗前后肠镜比较。

A, B: 为患者行类克+EN治疗前,仅用传统治疗无效,肠镜见结肠黏膜溃疡,铺路石样改变; C, D: 为患者行6次类克+EN治疗后,溃疡愈合,有假息肉形成。CD: 克罗恩病; EN: 肠内营养。

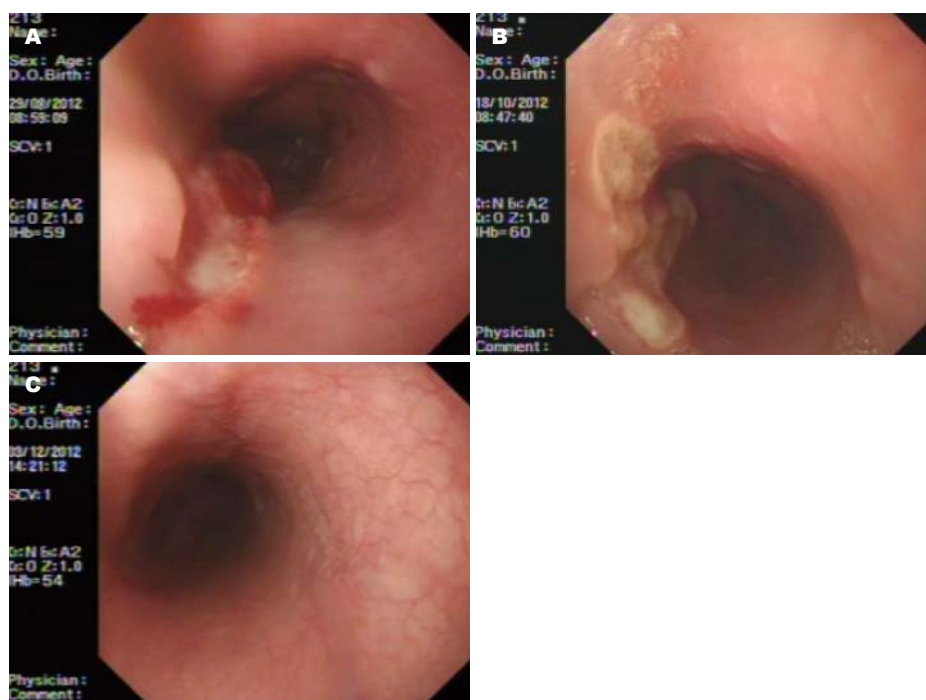


图2 病变位于食道的CD患者治疗前后胃镜比较。

A: 治疗前患者胃镜是食道见纵行深大溃疡; B: 患者经埃索美拉唑+美沙拉唑+激素治疗后复查胃镜见食道溃疡略有变浅,但溃疡无明显缩小; C: 患者接受类克+EN治疗,第3次应用类克前复查胃镜,已达到黏膜愈合。CD: 克罗恩病; EN: 肠内营养。

腹痛又复加剧,出现回肠穿孔,予急诊手术治疗。术中见距回盲部40 cm处回肠穿孔,近端肠腔扩张,远端肠腔水肿;切除病变肠管见肠腔内一溃疡,大小6 cm×4 cm×3 cm,溃疡周边隆起,少量黏膜成鹅卵石样改变,切面灰白色,溃疡中央见一穿孔3 cm×1 cm;病理示肠壁全层炎细胞浸润,溃疡中央大片肿瘤性坏死,边缘区见肿瘤细胞呈圆形和多角形,体积中等,部分呈免疫母细胞样大细胞,核扭曲、畸形;瘤细胞免疫酶标: LCA(+), CD56(-), CD57(-), CD30(间

质+), CD20(-), CD79a(-), CD3(+), CD45RO(+), CD43(-), CD5(+), Bcl-6(少数散在+), MUM-1(+), Ki67(+, >70%), PAX-5(-), EMA(-), 病理诊断为(回肠)恶性淋巴瘤, T细胞性, 非特殊型, 浸润肠壁全层;术中切除2枚淋巴结未见转移;该患者术后予ECHOP方案化疗, 目前仍在化疗中。另一例患者在治疗结束后约4 mo后, 自行停药硫唑嘌呤, 在治疗结束后约6 mo, 腹痛加重, 瘘管较前扩大, 肠镜见右半结肠裂隙样溃疡, 诊断为CD复发, 患者考虑经济原因, 拒绝再次应用类克,

表 1 治疗前后患者BMI、Hb、ALB变化

	体质量(kg)	BMI(kg/m ²)	Hb(g/L)	ALB(g/L)
治疗前	52.04 ± 7.64	18.44 ± 1.98	105.42 ± 20.62	35.70 ± 5.90
EN治疗结束后	56.00 ± 8.27 ^a	19.83 ± 2.06 ^a	119.00 ± 15.97 ^a	40.05 ± 4.86 ^a
类克治疗结束后	58.00 ± 6.51 ^a	20.55 ± 1.25 ^a	128.17 ± 15.75 ^{ac}	42.67 ± 4.08 ^{ac}

^a*P*<0.05 vs 治疗前, ^c*P*<0.05 vs 肠内营养治疗结束后. BMI: 体质量指数; Hb: 血红蛋白; ALB: 白蛋白; EN: 肠内营养.

予环磷酰胺治疗5次后治疗有效,但未达临床缓解,但瘘管较前无明显缩小,结肠裂隙样溃疡较前变浅.其余10例患者随访至今尚未见复发.

3 讨论

CD的发病机制并不十分明确,近年来的研究表明,以细胞中介免疫反应为主的免疫应答异常在CD的发病中起重要作用.硫唑嘌呤是一种非特异的免疫抑制剂,可抑制DNA、RNA及蛋白质合成,从而抑制基因复制和T细胞活化,近年来成为了治疗CD的一线用药.然而,在临床CD的治疗中,传统的应用硫唑嘌呤或联合应用糖皮质激素、美沙拉嗪,仍有许多难治性CD病例无法得到缓解,或反复发作,手术及死亡率高.

英夫利昔单抗是一种合成的嵌合体单克隆抗TNF- α 抗体,可与单核巨噬细胞和活化的T细胞膜结合型TNF- α 结合或与血浆中游离的TNF- α 结合,并将其中和,可阻断免疫级联链的多个环节,对CD有诱导缓解,促进瘘管闭合等治疗作用.类克是最早被美国FDA批准治疗瘘管型CD及常规治疗无效的中重度活动期CD的英夫利昔单抗,2002年FDA将其适应证扩大至作为缓解期CD的维持治疗.但由于类克价格昂贵,作为维持治疗,经济负担过重,故本研究应用于传统治疗无效的中重度CD,并用硫唑嘌呤作为维持治疗.临床研究认为硫唑嘌呤在服用3 mo以上才可完全发挥作用,从而早期使用英夫利昔单抗可更好地诱导缓解,并降低激素用量,减少其不良反应,也降低了肠梗阻等并发症发生率.本研究中12例患者中,在治疗结束后,58.3%(7例/12例)达到黏膜愈合;其中有5例患者病程 \leq 1年,其治疗结束后,其中4例患者达到黏膜愈合;除1例由于出现T细胞性恶性淋巴瘤并发肠穿孔接受手术外,无一例出现需要手术的并发症.且对于肠外并发症,其中1例合并腹壁肠瘘的患者治疗后瘘管明显缩小;另1例合并腹壁窦道的患者治疗后窦道完全愈合;2例合并关节炎及2例口腔溃疡的患者在3次类克治疗后关节疼痛、活动

受限、口腔反复溃疡的症状缓解.故早期应用包括类克在内的强有力的治疗方案(Top-down方案),并以硫唑嘌呤维持治疗,对于更快地诱导缓解及维持治疗具有良好的临床价值.黏膜愈合是CD取得远期治疗效果的关键因素^[5].有研究显示^[6],在第0、2、6周静注类克5 mg/kg后,29%的患者达到黏膜愈合,其中系统接受8 wk/次的静注类克5-10 mg/kg的患者,1年后黏膜修复率达44%.本研究中在6次类克治疗后,黏膜愈合率达58.3%,略高于上述报道,除本研究的患者例数较少,可能导致统计学的偏倚外,与本研究的患者还同时接受肠内营养及硫唑嘌呤治疗可能有关.

在类克的不良反应方面,最常见的为急性输液反应^[7-9],如头痛、胸闷、恶心、风疹、荨麻疹、气促,在应用类克前应用糖皮质激素或免疫抑制剂可降低急性输液反应及类血清病样反应^[10,11];本研究中,有3例患者在前2-3次输液过程中出现胸闷气促,予减慢滴速后可耐受,部分患者予激素治疗后症状缓解.此外,由于在应用类克治疗前,本研究组均对患者进行严格的检查,排除结核、病毒性肝炎、艾滋病、肿瘤,故在此12例患者中,未出现严重感染.但是,由于TNF- α 对肿瘤的生长有一定抑制作用,所以抗TNF- α 药物是否增加癌变是一个值得注意的问题.从临床研究结果来看,在最长长达102 wk的观察中,接受类克治疗的1678例患者中有18例发生肿瘤,与每年的基础流行病学资料相比无统计学差异^[12],但是仍有待更长的随访研究予以证实.本研究组的12例患者中,最早应用类克治疗的一例,证实在随访6 mo后证实发生小肠恶性淋巴瘤(T细胞性),但该患者除接受类克治疗外,在接受类克治疗前后均接受免疫抑制剂-硫唑嘌呤的治疗5年以上,其发生淋巴瘤是否与类克和/或免疫抑制剂治疗有关,尚有待进一步研究.

CD患者由于摄入不足、吸收不良、肠道丢失、代谢率增高及药物的影响,多数会出现不同程度的营养不良.目前的研究认为,EN可有

■应用要点

对于中重度难治性CD患者而言,采取包括英夫利昔单抗、肠内营养、免疫抑制剂等在内的强有力的治疗手段(Top-down方案)诱导缓解,后期予硫唑嘌呤维持治疗,可能更多地达到临床有效和/或黏膜愈合,改善CD患者的预后.但是,本研究的研究数量及随访期限仍有限,英夫利昔单抗联合肠内营养的远期疗效及不良反应仍有待进一步观察.

■名词解释

英夫利昔单抗: 一种人鼠嵌合体抗肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的单克隆抗体, 可以诱导表达TNF- α 的炎症细胞凋亡, 阻断免疫级联链的多个环节, 从而抑制炎症过程。目前主要应用于炎症性肠病、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎的患者治疗。

效改善CD患者的营养状态^[13,14]、诱导CD的缓解^[15]、延长缓解期^[16], 减少并发症的发生。EN治疗CD的机制尚不十分明确, 目前主要认为与肠屏障功能相关。EN改善患者的营养状态, 促进肠上皮受损细胞愈合, 减少肠道通透性, 对抗促炎细胞因子的作用, 使肠道休息, 加强肠屏障功能。本研究的12例患者在治疗前, CDAI指数均>220, 活动性较强, 因此, 选择了半要素膳-百普力或百普素作为EN的制剂, 由于百普力口感相对较差, 所以3例患者采用鼻肠管留置, 鼻饲百普力; 百普素口感相对较好, 对于能耐受百普素口感的另9例患者则采用口服百普素进行EN治疗。百普力及百普素采用短肽及氨基酸预消化配方, 更快补充蛋白质和减少胃肠道负担, 且短肽刺激肠黏膜上皮生长, 促进肠道屏障结构及功能的恢复, 残渣极少, 其中的短肽成分不但不会作为抗原致敏肠道, 反而更接近于正常人的生理性蛋白吸收模式。本研究的12例患者中, 在2 mo的EN治疗结束后, BMI、Hb、ALB均较治疗前明显升高, 且患者内镜下的黏膜溃疡较前变浅、减少或愈合, 提示在疾病活动期, 患者的消化系统屏障功能受损的情况下, 应用类克为主的药物治疗联合肠内营养, 更有助于CD的缓解。而2 mo后停止EN治疗, 继续类克为主的药物治疗后, 患者的体质量、BMI较EN治疗结束后无显著差异($P>0.05$), 而Hb及ALB在类克治疗结束后较EN治疗结束后进一步显著升高, 提示随着CD的缓解, 患者的消化系统屏障功能的恢复, 饮食摄入的增加, 吸收能力的改善, 即使停用了EN, 营养状况亦可随着CD的缓解进一步好转。

总之, 对于中重度CD患者而言, 采取包括类克、EN、免疫抑制剂等在内的强有力的治疗手段(Top-down方案)诱导缓解, 后期予硫唑嘌呤维持治疗, 可能更多地达到临床有效和/或黏膜愈合, 改善CD患者的预后。但是, 本研究的研究数量及随访期限仍有限, 类克联合EN的远期疗效及不良反应仍有待进一步观察。

4 参考文献

- 1 Faubion WA, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 2001; 121: 255-260 [PMID: 11487534]
- 2 Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2009; 136: 1182-1197 [PMID: 19249397 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.001]
- 3 Riis A, Martinsen TC, Waldum HL, Fossmark R.

Clinical experience with infliximab and adalimumab in a single-center cohort of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47: 649-657 [PMID: 22472026 DOI: 10.3109/00365521.2012.672591]

- 4 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见(2007年, 济南). *中华消化杂志* 2007; 27: 545-550
- 5 Frøslie KF, Jahnsen J, Moum BA, Vatn MH. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 2007; 133: 412-422 [PMID: 17681162 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.05.051]
- 6 Rutgeerts P, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Hanauer SB. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 402-413 [PMID: 14762776 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.11.014]
- 7 Colombel JF, Loftus EV, Tremaine WJ, Egan LJ, Harmsen WS, Schleck CD, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: the Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology* 2004; 126: 19-31 [PMID: 14699483 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.10.047]
- 8 Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Diamond RH, Chen DM, Pritchard ML, Sandborn WJ. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 621-630 [PMID: 16678077 DOI: 10.1016/j.cgh.2006.03.002]
- 9 Hamzaoglu H, Cooper J, Alsahli M, Falchuk KR, Peppercorn MA, Farrell RJ. Safety of infliximab in Crohn's disease: a large single-center experience. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 2109-2116 [PMID: 20848473 DOI: 10.1002/ibd.21290]
- 10 Clark M, Colombel JF, Feagan BC, Fedorak RN, Hanauer SB, Kamm MA, Mayer L, Regueiro C, Rutgeerts P, Sandborn WJ, Sands BE, Schreiber S, Targan S, Travis S, Vermeire S. American gastroenterological association consensus development conference on the use of biologics in the treatment of inflammatory bowel disease, June 21-23, 2006. *Gastroenterology* 2007; 133: 312-339 [PMID: 17631151 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.05.006]
- 11 Fidler H, Schnitzler F, Ferrante M, Noman M, Katsanos K, Segar S, Henckaerts L, Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P. Long-term safety of infliximab for the treatment of inflammatory bowel disease: a single-centre cohort study. *Gut* 2009; 58: 501-508 [PMID: 18832524 DOI: 10.1136/gut.2008.163642]
- 12 Han PD, Cohen RD. Managing immunogenic responses to infliximab: treatment implications for patients with Crohn's disease. *Drugs* 2004; 64: 1767-1777 [PMID: 15301561]
- 13 Lee JJ, Escher JC, Shuman MJ, Forbes PW, Delemarre LC, Harr BW, Kruijer M, Moret M, Allende-Richter S, Grand RJ. Final adult height of children with inflammatory bowel disease is predicted by parental height and patient minimum height Z-score. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1669-1677 [PMID: 20127995 DOI: 10.1002/ibd.21214]
- 14 Wiese DM, Lashner BA, Lerner E, DeMichele SJ, Seidner DL. The effects of an oral supplement enriched with fish oil, prebiotics, and antioxidants on

- nutrition status in Crohn's disease patients. *Nutr Clin Pract* 2011; 26: 463-473 [PMID: 21775642 DOI: 10.1177/0884533611413778]
- 15 Nguyen GC, Laveist TA, Brant SR. The utilization of parenteral nutrition during the in-patient management of inflammatory bowel disease in the United States: a national survey. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1499-1507 [PMID: 17931346]
- 16 Esaki M, Matsumoto T, Hizawa K, Nakamura S, Jo Y, Mibu R, Iida M. Preventive effect of nutritional therapy against postoperative recurrence of Crohn disease, with reference to findings determined by intra-operative enteroscopy. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 1431-1437 [PMID: 16316891]

编辑 黄新珍 电编 闫晋利

■同行评价

本文总结了12例英夫利昔联合肠内营养治疗CD的病例, 资料较齐全, 对难治型CD患者治疗方案的选择, 具有一定临床应用价值。



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。

SLP-2在结肠癌中的表达

张剑, 吴敏, 王利娟, 张红巧, 师广勇, 巴楠, 张自森, 闫琳, 郑晓珂, 邢鑫

■背景资料

SLP-2基因是2000年发现并命名的一个新基因。研究表明, SLP-2基因在食管癌、肺癌、子宫内膜癌、前列腺癌等恶性肿瘤中高表达。推测其可能是一个新的癌基因。

张剑, 吴敏, 王利娟, 张红巧, 师广勇, 巴楠, 张自森, 闫琳, 郑晓珂, 邢鑫, 郑州大学第五附属医院肿瘤科 河南省郑州市450052

张剑, 主要从事消化系统肿瘤的相关研究。

作者贡献分布: 课题由张剑、吴敏及王利娟设计; 张剑完成课题的主要工作; 张红巧、师广勇、巴楠、张自森、闫琳、郑晓珂及邢鑫参与课题研究。

通讯作者: 张剑, 主治医师, 450052, 河南省郑州市康复前街3号, 郑州大学第五附属医院肿瘤科。bluemoon630@163.com

收稿日期: 2013-05-20 修回日期: 2013-06-02

接受日期: 2013-07-03 在线出版日期: 2013-08-08

Expression of SLP-2 in colorectal cancer

Jian Zhang, Min Wu, Li-Juan Wang, Hong-Qiao Zhang, Guang-Yong Shi, Nan Ba, Zi-Sen Zhang, Lin Yan, Xiao-Ke Zheng, Xin Xing

Jian Zhang, Min Wu, Li-Juan Wang, Hong-Qiao Zhang, Guang-Yong Shi, Nan Ba, Zi-Sen Zhang, Lin Yan, Xiao-Ke Zheng, Xin Xing, Department of Oncology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Jian Zhang, Attending Physician, Department of Oncology, the Fifth affiliated Hospital of Zhengzhou University, 3 Kangfu Qianjie, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. bluemoon630@163.com

Received: 2013-05-20 Revised: 2013-06-02

Accepted: 2013-07-03 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of stomatin like protein 2 (SLP-2) in colorectal cancer.

METHODS: The mRNA and protein expression of SLP-2 was detected by RT-PCR in 40 cases and by immunohistochemistry in 50 cases of human colorectal cancer and matched tumor-adjacent tissue. The relationship between SLP-2 protein expression and clinical and pathologic characteristics of colorectal cancer was analyzed.

RESULTS: The expression level of SLP-2 mRNA was significantly higher in colorectal cancer than in tumor-adjacent tissue (1.31 ± 0.28 vs 0.74 ± 0.16 , $P < 0.05$). The positive rate of SLP-2 protein expression was also significantly higher in colorectal cancer than in tumor-adjacent tissue (70.0% vs 22%, $P < 0.05$). Expression of SLP-2 protein in colorectal cancer was associated with lymph

nodes metastasis and TNM stage (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of SLP-2 is increased in colorectal cancer. SLP-2 may play important roles in the occurrence, development and metastasis of colorectal cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Stomatin like protein 2; Colorectal cancer; Lymph nodes metastasis; TNM stage

Zhang J, Wu M, Wang LJ, Zhang HQ, Shi GY, Ba N, Zhang ZS, Yan L, Zheng XK, Xing X. Expression of SLP-2 in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2228-2231 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2228.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2228>

摘要

目的: 研究SLP-2(stomatin like protein 2)基因在结肠癌及正常结肠黏膜中的表达情况。

方法: 应用RT-PCR法及免疫组织化学法分别检测40例和50例结肠癌及其癌旁正常结肠黏膜中SLP-2 mRNA和蛋白的表达, 并结合免疫组织化学结果及结肠癌患者的临床病理资料进行分析。

结果: RT-PCR结果显示, 结肠癌及配对癌旁正常组织中SLP-2 mRNA的表达水平分别为 1.31 ± 0.28 和 0.74 ± 0.16 , 前者较后者明显升高 ($P < 0.05$)。免疫组织化学结果显示, SLP-2蛋白在结肠癌及配对癌旁正常组织中的高表达率分别为70.0%(35/50)和22%(11/50), 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。且SLP-2蛋白的表达与有无淋巴结转移及TNM分期相关(均 $P < 0.05$)。

结论: SLP-2基因在结肠癌组织中高表达, 可能参与结肠癌的发生发展和转移。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: SLP-2; 结肠癌; 淋巴结转移; TNM分期

核心提示: 本实验检测了结肠癌及其癌旁正常结

■同行评议者

卢宁, 副主任医师, 兰州军区乌鲁木齐总医院肿瘤科

肠组织中SLP-2(stomatin like protein 2)的表达,并结合免疫组织化学结果及结肠癌患者的临床病理资料进行分析。结果发现,SLP-2基因在结肠癌组织中高表达,并与有无淋巴结转移及临床分期相关,提示SLP-2可能参与结肠癌的发生发展和转移。

张剑, 吴敏, 王利娟, 张红巧, 师广勇, 巴楠, 张自森, 闫琳, 郑晓珂, 邢鑫. SLP-2在结肠癌中的表达. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2228-2231 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2228.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2228>

0 引言

结肠癌是常见的消化系恶性肿瘤,其在欧美国家发病率较高,在发展中国家发病率较低,但近30年来,随着生活水平及饮食习惯的改变,我国结肠癌的发病率和死亡率明显升高^[1]。癌基因的激活和抑癌基因的失活是恶性肿瘤发生发展过程中的重要事件,寻找并研究新的癌基因有助于揭示恶性肿瘤的发生机制,并能为恶性肿瘤的基因治疗提供线索。SLP-2(stomatin like protein 2)基因是2000年发现的一个新基因,属于stomatin基因超家族的一个新成员^[2]。近年来的研究显示,SLP-2基因在多种恶性肿瘤中高表达^[3-8],推测SLP-2可能是一个新的癌基因。目前SLP-2在消化系肿瘤中的研究较少,本实验采用RT-PCR和免疫组织化学法检测SLP-2在人结肠癌组织中的表达情况,并分析SLP-2蛋白的表达水平与临床病理资料的关系,旨在研究SLP-2在结肠癌中的表达特点及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集郑州大学第五附属医院2010-01/2011-06手术切除结肠癌标本50例,取癌组织及癌旁正常组织(距离癌组织边缘>5 cm)。所有标本均经病理学检查确诊为结肠癌,术前未接受过放、化疗。其中男27例,女23例;年龄40-72岁,中位年龄63岁。临床分期按TNM分期标准(AJCC 2010年第7版)。

1.2 方法

1.2.1 SLP-2蛋白表达的免疫组织化学检测: 所有组织均用40 g/L甲醛溶液固定,经脱水、包埋、3 μm厚连续切片。鼠抗人SLP-2单克隆抗体购自美国proteintech公司,稀释度为1:200。即用型一步法(非生物素)检测试剂盒购自迈新公司。操作步骤按试剂盒说明书进行。用PBS代替一抗作阴性对照,用已知阳性片作阳性对照。

1.2.2 免疫组织化学结果判定: 免疫组织化学染色由两位高年资病理科医师在双盲条件下进行评定,判定标准参照文献[9],每张切片根据阳性细胞染色程度及细胞阳性百分数的多少进行分级。计数阳性细胞百分数: 没有阳性细胞赋值为0, 1%-25%为1, 26%-50%为2, 51%-75%为3, >75%为4。染色程度根据每张切片的大多数细胞染色特征决定: 细胞膜及细胞浆无着色赋值为0, 浅黄色为1, 黄色为2, 棕黄色为3。最终评分由两者分数相乘得到,总值≥8分为高表达, <8分为阴性或低表达。

1.2.3 SLP-2 mRNA表达的RT-PCR检测: 细胞总RNA的提取及cDNA第一链合成按照TRIzol试剂盒及逆转录试剂盒(美国Invitrogen公司产品)说明书进行。

用于扩增SLP-2基因的上游引物5'-CTG-GAGCCTGGTTTGAACAT-3'; 下游引物为5'-AGGATCTGGGCCTGTTTCTT-3', 扩增片段长度为500 bp。以β-actin为内对照,上游引物为5'-ACACTGTGCCCATCTACGACC-3'; 下游引物为5'-AGGGGCCGGACTCGTCATAGA-3', 扩增片段长度为242 bp。PCR反应体系: 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL, β-actin上、下游引物各1 μL, SLP-2上、下游引物各1 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O补至25 μL。PCR反应在2400型PCR仪(美国PE公司产品)上进行,预变性: 94℃, 5 min, 进入循环: 94℃, 30 s, 55℃, 30 s, 72℃, 50 s, 共30个循环,最后延伸72℃, 7 min, 获取扩增片段。

1.2.4 RT-PCR结果判定: 扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳后,电泳条带图像用Fluor-S MultiImager凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司产品)扫描,用Multi-Analyst软件包(美国Bio-Rad公司产品)定量分析电泳分离的各特异扩增条带的原始A值,以SLP-2与β-actin的A值的比值表示SLP-2 mRNA的相对表达水平。

统计学处理 应用SPSS16.0统计软件进行统计分析。采用 χ^2 检验及t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠癌及癌旁正常结肠黏膜中SLP-2蛋白的表达 在50例结肠癌中有35例SLP-2蛋白高表达,在50例癌旁正常结肠黏膜中有11例SLP-2蛋白高表达,高表达率分别为70.0%(35/50)和22%(11/50),差异有统计学意义($\chi^2 = 23.188$, $P = 0.000$)(图1)。

■研发前沿

目前SLP-2与恶性肿瘤的关系及其作用机制是研究的热点。

■相关报道

研究显示,SLP-2基因在食管癌、肺癌、子宫内膜癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌等恶性肿瘤中存在高表达。将SLP-2正义核酸和反义核酸导入食管癌、肺癌和子宫内膜癌细胞系,发现SLP-2正义核酸可促进癌细胞增殖、抑制细胞凋亡,并能提高癌细胞的转移能力,而反义核酸的作用相反。

■创新盘点

目前关于SLP-2基因在消化系统肿瘤中表达情况的研究较少,本实验应用RT-PCR法及免疫组织化学法检测了结肠癌及其癌旁正常结肠组织中SLP-2的表达,并结合免疫组织化学结果及结肠癌患者的临床病理资料进行分析。结果提示,SLP-2 mRNA及蛋白在结肠癌组织中均表达升高,且SLP-2蛋白的表达与有无淋巴结转移及TNM分期相关。

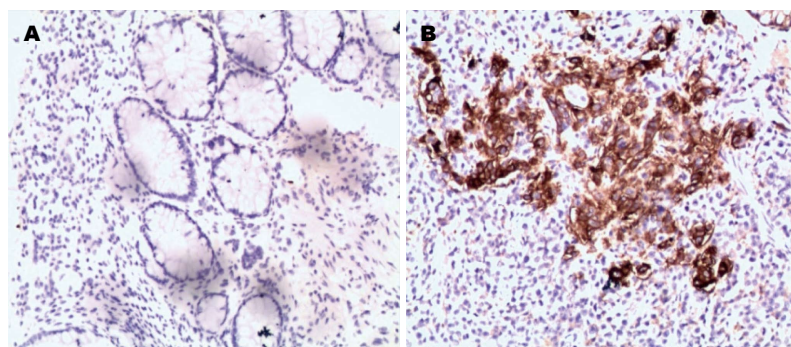


图1 结肠癌配对组织中SLP-2蛋白的表达($\times 100$)。A: 癌旁正常结肠组织; B: 结肠癌组织。

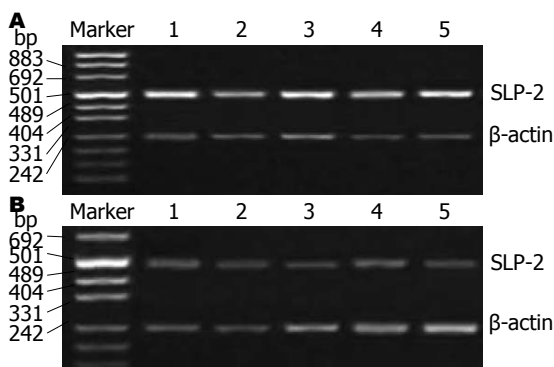


图2 SLP-2 mRNA的表达。A: 结肠癌组织; B: 正常结肠组织。

2.2 结肠癌及癌旁正常结肠黏膜中SLP-2 mRNA的表达 40例结肠癌组织及正常结肠黏膜组织中SLP-2 mRNA表达水平分别为 1.31 ± 0.28 和 0.74 ± 0.16 ,前者较后者明显升高,差异有统计学意义($t = 4.36, P = 0.012$)(图2)。

2.3 SLP-2蛋白表达与结肠癌临床病理参数的关系 收集整理50例结肠癌患者的临床病理资料,分析SLP-2蛋白在不同性别、年龄、分化程度、肿瘤大小、TNM分期、转移情况的结肠癌病例中的表达。结果显示,SLP-2蛋白在有淋巴结转移及TNM较晚期病例的结肠癌中表达较高($P = 0.000$ 及 $P = 0.001$),而与其他临床病理特征无明显相关(均 $P > 0.05$)(表1)。

3 讨论

SLP-2基因定位于染色体9p13.1,长约3250 bp,2000年由美国耶鲁大学病理科首次发现,是stomatin家族的一个新成员^[2]。研究推测,SLP-2蛋白是一种细胞质膜相关蛋白,可能作为外周膜蛋白起作用,调控离子通道和脂筏结构^[2,10]。SLP-2还存在于细胞的线粒体中^[11],可能通过与线粒体内膜相关蛋白结合,调节线粒体膜相关蛋白的稳定性^[12,13]。

本实验从mRNA及蛋白水平检测了人结肠癌及癌旁正常结肠黏膜组织中SLP-2基因的表达。结果显示,SLP-2基因在结肠癌中的表达高

表1 SLP-2的表达与结肠癌临床病理参数的关系(n)

分组	n	SLP-2蛋白表达		χ^2 值	P 值
		高	低		
性别				0.004	0.951
男	27	19	8		
女	23	16	7		
年龄(岁)				0.192	0.662
≤ 50	21	14	7		
> 50	29	21	8		
肿瘤大小(cm)				0.066	0.797
≤ 5	32	22	10		
> 5	18	13	5		
分化程度				0.000	1.000
高-中分化	35	24	11		
低分化	15	11	4		
淋巴结转移				19.647	0.000
有	34	31	3		
无	16	4	12		
临床分期				10.474	0.001
I + II	13	4	9		
III + IV	37	31	6		

于正常结肠黏膜组织(均 $P < 0.05$)。且较晚期病例的结肠癌组织中SLP-2蛋白表达高于较早期病例的结肠癌组织,有淋巴结转移的病例中SLP-2蛋白高于无淋巴结转移的病例;而与患者性别、年龄、肿瘤大小、分化程度等因素无明显相关(均 $P > 0.05$)。提示SLP-2可能参与结肠癌的发展和转移。

SLP-2在恶性肿瘤发生发展中的作用机制尚未明确,推测可能与调节细胞信号传导通路及线粒体能量代谢有关。有文献报道,SLP-2蛋白可能通过与Rho家族蛋白的相互作用,参与细胞信号传导通路来调节肿瘤细胞的侵袭转移能力^[14]。祁代华等^[15]的研究也显示,结直肠癌组织中SLP-2和Rho家族CDC42蛋白表达呈正相关,且与结直肠癌的Dukes分期、淋巴结转移相关。此外,转染siRNA降低Hela细胞中SLP-2的表达,可引起线粒体膜电势的降低^[11];转染siRNA降低

■应用要点

本实验结果提示SLP-2可指导结肠癌患者的预后生存,并有可能作为一个新的肿瘤靶向治疗的靶点。

食管癌KYSE150细胞中SLP-2表达后, 细胞线粒体膜电势和ATP水平均降低, 同时伴细胞运动能力和增殖能力减弱^[8], 推测SLP-2可能通过影响细胞的能量代谢参与肿瘤细胞的增殖和转移。

本研究发现SLP-2在结肠癌组织中表达高于正常结肠黏膜组织, 且SLP-2蛋白表达与结肠癌的淋巴结转移和TNM分期相关。TNM分期及淋巴结转移情况是恶性肿瘤预后的相关指标。提示SLP-2可指导结肠癌患者的预后生存, 并有可能作为一个新的肿瘤靶向治疗的靶点。

4 参考文献

- 1 孙燕, 石远凯. 临床肿瘤内科手册. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 491-492
- 2 Wang Y, Morrow JS. Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin (band 7.2b) present in erythrocytes and other tissues. *J Biol Chem* 2000; 275: 8062-8071 [PMID: 10713127 DOI: 10.1074/jbc.275.11.8062]
- 3 苏雷, 张建, 魏秀琴, 支修益, 许庆生, 刘芝华. slp2基因的差异表达与肺癌的分化和转移. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 678-680
- 4 Chang D, Ma K, Gong M, Cui Y, Liu ZH, Zhou XG, Zhou CN, Wang TY. SLP-2 overexpression is associated with tumour distant metastasis and poor prognosis in pulmonary squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2010; 15: 104-110 [PMID: 19839737 DOI: 10.3109/13547500903311910]
- 5 冯旺琴, 崔竹梅, 冯凤芝, 祈秀娟, 丁芳, 李文东, 刘芝华. SLP-2 mRNA在子宫内膜癌中的表达及其意义. *中华妇产科杂志* 2005; 40: 553-557
- 6 曹文枫, 张立勇, 张斌, 王跃琦, 刘芝华, 孙保存. SLP-2蛋白在食管鳞状细胞癌中的表达及其与肿瘤侵袭转移的关系. *中华肿瘤杂志* 2010; 32: 830-833
- 7 Cao W, Zhang B, Liu Y, Li H, Zhang S, Fu L, Niu Y, Ning L, Cao X, Liu Z, Sun B. High-level SLP-2 expression and HER-2/neu protein expression are associated with decreased breast cancer patient survival. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 430-436 [PMID: 17709317 DOI: 10.1309/C6X54HRB580EP2NQ]
- 8 张剑, 李建生, 吴敏, 赵晔. SLP-2在胃癌中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1778-1781
- 9 Wang Y, Cao W, Yu Z, Liu Z. Downregulation of a mitochondria associated protein SLP-2 inhibits tumor cell motility, proliferation and enhances cell sensitivity to chemotherapeutic reagents. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1651-1658 [PMID: 19597348 DOI: 10.4161/cbt.8.17.9283]
- 10 Sprenger RR, Speijer D, Back JW, De Koster CG, Pannekoek H, Horrevoets AJ. Comparative proteomics of human endothelial cell caveolae and rafts using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* 2004; 25: 156-172 [PMID: 14730580 DOI: 10.1002/elps.200305675]
- 11 Chevallet M, Lescuyer P, Diemer H, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T. Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: A proteomic view. *Electrophoresis* 2006; 27: 1574-1583 [PMID: 16548050 DOI: 10.1002/elps.200500704]
- 12 Hájek P, Chomyn A, Attardi G. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem* 2007; 282: 5670-5681 [PMID: 17121834 DOI: 10.1074/jbc.M608168200]
- 13 Da Cruz S, Parone PA, Gonzalo P, Bienvenut WV, Tondera D, Jourdain A, Quadroni M, Martinou JC. SLP-2 interacts with prohibitins in the mitochondrial inner membrane and contributes to their stability. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 904-911 [PMID: 18339324]
- 14 Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaïdo T, Konishi I. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest* 2003; 83: 861-870 [PMID: 12808121]
- 15 祁代华, 李建生, 王康康. SLP-2和CDC42蛋白在结肠癌组织中的表达及临床意义. *中华消化杂志* 2009; 29: 191-192

同行评价

本文目标明确, 设计尚合理, 实验数据可靠, 具有一定的创新性, 有一定的科学意义。

编辑 田滢 电编 闫晋利



两种穿刺置管术治疗消化系肿瘤患者并发症的比较

王晓龙, 张成武, 缪巍, 刘宁, 王成, 马晓明, 马新福

■背景资料

目前, 临床上供中心静脉置管术选择的静脉较多, 但以颈静脉与锁骨下静脉较为多见。传统的置管术在操作时, 往往要求患者取平卧位, 仅在肩背部放置一个薄枕, 使得穿刺时患者的肩部外展。但解剖结构提示, 锁骨下静脉壁与第一肋骨膜、锁骨下肌以及前斜角肌表面的筋膜紧密结合。因此, 加大了置管术的操作难度, 且易引发气胸。

王晓龙, 张成武, 缪巍, 刘宁, 王成, 马晓明, 马新福, 青海大学附属医院胃肠肿瘤外科 青海省西宁市 810001

王晓龙, 主治医师, 主要从事胃肠肿瘤外科的研究。

作者贡献分布: 主要课题设计、数据分析和文章起草由王晓龙完成; 病例选择、临床资料收集和穿刺操作由王晓龙、缪巍、刘宁、王成、马晓明及马新福完成; 文章修改和审阅由张成武完成。

通讯作者: 王晓龙, 主治医师, 810001, 青海省西宁市同仁路29号, 青海大学附属医院胃肠肿瘤外科。13437833@qq.com

收稿日期: 2013-05-24 修回日期: 2013-07-05

接受日期: 2013-07-15 在线出版日期: 2013-08-08

Clinical effect of improved subclavian vein catheterization versus internal jugular vein catheterization in patients with alimentary canal neoplasms

Xiao-Long Wang, Cheng-Wu Zhang, Wei Miu, Ning Liu, Cheng Wang, Xiao-Ming Ma, Xin-Fu Ma

Xiao-Long Wang, Cheng-Wu Zhang, Wei Miu, Ning Liu, Cheng Wang, Xiao-Ming Ma, Xin-Fu Ma, Department of Gastrointestinal Surgical Oncology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Correspondence to: Xiao-Long Wang, Attending Physician, Department of Gastrointestinal Surgical Oncology, Affiliated Hospital of Qinghai University, 29 Tongren Road, Xining 810001, Qinghai Province, China. 13437833@qq.com

Received: 2013-05-24 Revised: 2013-07-05

Accepted: 2013-07-15 Published online: 2013-08-08

Abstract

AIM: To evaluate the clinical effect and application value of improved subclavian vein catheterization in patients with alimentary canal neoplasms.

METHODS: One hundred and thirty patients with alimentary canal neoplasms who required deep vein catheterization were divided into either an observation group or a control group. The observation group underwent improved subclavian vein catheterization, while the control group underwent internal jugular vein catheterization. The success rate of catheterization, catheterization time, applicator replacement times, patient discomfort, patient preference, catheterization-related infections, catheter mi-

gration, and inadvertent arterial puncture were compared between the two groups.

RESULTS: Both groups had a high success rate of catheterization, and there was no significant difference in the success rate of catheterization between the two groups (98% vs 100%, $P > 0.05$). The average catheterization time ($19.7 \text{ d} \pm 5.2 \text{ d}$ vs $11.5 \text{ d} \pm 4.2 \text{ d}$, $P < 0.05$), average applicator replacement times ($2.6 \text{ times/wk} \pm 0.7 \text{ times/wk}$ vs $3.7 \text{ times/wk} \pm 1.1 \text{ times/wk}$, $P < 0.05$), and the number of patients developing treatment discomfort (13 vs 65 , $P < 0.05$) differed significantly between the observation group and control group. In addition, the incidences of catheter-related infections, catheter migration, inadvertent arterial puncture, cardiac arrhythmia, pneumothorax, puncture site bleeding or exudate were better in the observation group than in the control group (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Compared to internal jugular vein catheterization, improved subclavian vein catheterization is associated with longer catheterization time and fewer complications in patients with alimentary canal neoplasms.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Alimentary canal neoplasms; Improved subclavian vein catheterization; Internal jugular vein catheterization

Wang XL, Zhang CW, Miu W, Liu N, Wang C, Ma XM, Ma XF. Clinical effect of improved subclavian vein catheterization versus internal jugular vein catheterization in patients with alimentary canal neoplasms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2232-2236 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2232.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2232>

摘要

目的: 观察改良式锁骨下静脉置管术在消化系统肿瘤患者临床治疗中的效果及应用价值。

方法: 对130例需要进行深静脉置管的消化系统肿瘤患者进行不同置管术的临床观察, 观察组给予改良式锁骨下静脉置管术, 对照组给予颈

■同行评议者

秦环龙, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院外科; 喻春钊, 教授, 主任医师, 南京医科大学第二附属医院普通外科九区

内静脉置管术. 观察比较两组置管成功率、导管留置时间、敷贴更换次数、患者不适感、患者偏爱、导管相关性感染、导管异位、误穿动脉等情况.

结果: 两组置管术均有较高的成功率, 观察组为98%, 对照组为100%, 两组差异无统计学意义($P>0.05$). 观察组置管成功64例, 平均导管留置时间 $19.7\text{ d}\pm 5.2\text{ d}$, 更换敷贴平均次数 $2.6\text{ 次/wk}\pm 0.7\text{ 次/wk}$, 13例患者治疗期间发生不适; 对照组置管成功65例, 平均导管留置时间 $11.5\text{ d}\pm 4.2\text{ d}$, 更换敷贴平均次数 $3.7\text{ 次/wk}\pm 1.1\text{ 次/wk}$, 49例患者治疗期间发生不适. 上述资料除置管成功例数外, 差异均有统计学意义($P<0.05$). 此外, 在比较导管相关性感染、导管异位、误穿动脉、心率失常、气胸、穿刺点渗血或渗液等并发症方面, 观察组均优于对照组($P<0.05$).

结论: 对消化系肿瘤临床治疗中采用改良式锁骨下静脉置管术, 具有留置时间长、并发症少等特点, 值得临床推广.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 消化系肿瘤; 改良式锁骨下静脉置管术; 颈内静脉置管术

核心提示: 本研究显示, 改良式锁骨下静脉置管术与颈静脉置管术均有较高的置管成功率. 说明现有操作技术下, 两种置管术均技术成熟. 但是, 通过对置管一般情况进行分析, 可以发现, 采用改良式锁骨下静脉置管术, 可以提高导管的留置时间, 从而减少更换敷贴的次数, 大大减少患者的痛苦. 充分说明改良式锁骨下静脉置管术对患者造成的不良影响较小, 且长期留置时, 更为安全可靠.

王晓龙, 张成武, 缪巍, 刘宁, 王成, 马晓明, 马新福. 两种穿刺置管术治疗消化系肿瘤患者并发症的比较. 世界华人消化杂志 2013; 21(22): 2232-2236 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2232.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i22.2232>

0 引言

静脉置管是目前临床上常用的一种输液及相关急救治疗的手段, 其目的是给予需要长期输液治疗或血管条件不佳的患者建立可以长期使用的输液通道, 避免了长期多次进行静脉扎针的痛苦^[1]. 由于静脉置管放置的时间较长, 容易引发静脉置管相关性血液感染, 有研究显示^[2,3], 其

引发的相关性血液感染是目前院内三大感染之一, 约占总感染数的60%. 因此, 如何有效控制静脉置管相关性血液感染是目前重要的临床任务. 锁骨下静脉置管以及颈内静脉置管是目前临床上应用最多的两种置管术, 但长期的临床经验提示, 两种置管术都具有明显的缺点. 其中颈内静脉置管容易发生脱落, 而锁骨下静脉置管易引发气胸^[4,5]. 我院通过改进锁骨下静脉置管, 创立了改良式锁骨下静脉置管术, 在消化道肿瘤置管患者中取得了良好的临床效果, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究共纳入研究病例130例, 均为2012-01/2012-12我科(胃肠肿瘤外科)住院患者. 所有患者均为已经病理检测, 诊断为消化系统恶性肿瘤. 根据数字随机分组原则进行临床分组, 其中观察组65例, 采用改良式锁骨下静脉置管术; 对照组65例, 采用颈内静脉置管术. 观察组中, 男性8例, 女27例, 年龄27-79岁, 平均年龄 $51.2\text{ 岁}\pm 14.2\text{ 岁}$; 对照组中, 男37例, 女28例, 年龄31-81岁, 平均年龄 $51.0\text{ 岁}\pm 14.4\text{ 岁}$. 对两组患者的性别、年龄等资料进行统计学分析, 差异并无统计学意义($P>0.05$), 具有可比性.

1.2 方法

1.2.1 操作: 本研究中心静脉导管均为美国Arrow公司生产, 为16 Ga一次性单腔中心静脉导管. (1)改良式锁骨下静脉置管术: 穿刺位置选为右侧锁骨下静脉, 嘱咐患者取去枕平卧位, 头高脚低, 头颈向右靠拢并转向左侧. 穿刺前进行常规碘伏消毒、铺巾, 麻醉采用局部麻醉. 先找到锁骨中外1/3处, 并沿着该处下移3 cm, 此处即为锁骨下静脉穿刺点. 取出中心静脉导管, 针头与胸壁呈15度进针, 进针长度约为8 cm左右, 当导管内见到回血时提示穿刺成功. 穿刺后回抽一定量的血液, 检测回抽是否顺畅. 如顺畅, 置入20 cm左右长的导丝进入上腔静脉, 并置入中心静脉导管, 长度约为15 cm左右. 完毕后使用肝素盐水通管, 肝素帽封管, 接补液顺畅, 固定导管. 若穿刺不顺, 连续3次未能置入导管, 或回血不畅时, 应停止穿刺, 改用其他方式进行置管; (2)颈内静脉置管术: 置管采用右侧中间径路法, 嘱咐患者取去枕平卧位, 头高脚低, 头转向左侧. 首先找到胸锁乳突肌三角顶点, 并进行标记, 触摸颈内动脉明确其与标记点的关系. 穿刺前进行常规碘伏消毒、铺巾, 麻醉采用局部浸润麻醉. 取出

■ 研究前沿

中心静脉置管相关性血液感染是目前国内外备受关注的院内感染, 感染的发生常常与人为因素相关. 不规范的操作和错误的后续处理是当前引发感染的重要原因.

■相关报道

研究表明,中心静脉置管装置上的肝素帽是引发感染主要原因之一,长期的使用中心静脉置管,细菌容易从外部沿肝素帽的接头处进入导管并且在导管内得到繁殖,最终细菌随血液进入体内,引发感染。

表 1 两组患者置管留置情况比较 ($n = 65$, mean \pm SD)

分组	置管成功 (n)	导管平均留置时间 (d)	更换敷贴平均次数 (次/wk)	患者不适 (n)
观察组	64	19.7 \pm 5.2	2.6 \pm 0.7	13
对照组	65	11.5 \pm 4.2	3.7 \pm 1.1	49
t/χ^2	1.01	9.89	6.80	39.96
P 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 两组患者治疗期间主要置管并发症比较 (n)

分组	n	感染	异位	误穿动脉	堵塞	脱出	气胸	渗血或渗液
观察组	64	12	4	1	9	3	1	11
对照组	65	25	0	7	10	4	0	21
χ^2 值		6.38	4.13	4.80	0.06	0.15	0.97	4.15
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05

中心静脉导管,针头与穿刺部位皮肤呈30度进针,进针时小心谨慎,避免误穿刺到动脉。穿刺时,边进针,边回抽,当导管内见到回血时提示穿刺成功。穿刺后回抽一定量的血液,检测回抽是否顺畅。如顺畅,置入20 cm左右长的导丝进入颈静脉,并置入中心静脉导管,长度约为12 cm左右。完毕后使用肝素盐水通管,肝素帽封管,接补液顺畅,固定导管。

1.2.2 观察指标:对两组患者住院期间置管成功率、导管留置时间、更换敷贴次数、患者不适度、导管相关性感染、导管异位、误穿动脉等进行观察,并记录。

1.2.3 此次置管不适度评价:0度:穿刺时无任何不适感;I度:穿刺时有轻微不适,但对睡眠无影响;II度:穿刺时存在严重不适感及恐惧感,穿刺后严重影响睡眠。

1.2.4 更换敷贴原则:置管后24-48 h更换第1次敷贴,而后应每7 d更换1次。在敷贴被污染(或可疑污染)、过多血迹、潮湿、脱落时给予更换。

统计学处理 应用SPSS15.0软件,计量资料以mean \pm SD表示,均数比较采用 t 检验、方差因素分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者置管留置情况比较 观察组置管成功率为98%,对照组为100%,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。而在导管留置平均时间、更换服帖平均次数、患者不适度等方面,观察组均优于对照组,两组比较差异有统计学意义

($P<0.05$)(表1)。观察组置管成功64例,平均导管留置时间19.7 d \pm 5.2 d,更换敷贴平均次数2.6次/wk \pm 0.7次/wk,13例患者治疗期间发生不适;对照组置管成功65例,平均导管留置时间11.5 d \pm 4.2 d,更换敷贴平均次数3.7次/wk \pm 1.1次/wk,49例患者治疗期间发生不适。上述资料除置管成功例数外,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 两组患者治疗期间主要置管并发症比较 本研究统计了两组患者导管相关性感染、导管异位、误穿动脉、导管堵塞、导管脱出以及穿刺点渗血或渗液等置管相关性并发症,发现两组患者除导管堵塞、导管脱出差异无统计学意义($P>0.05$)外,其他置管相关并发症,观察组均明显少于对照组,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)(表2)。

3 讨论

目前,临床上供中心静脉置管术选择的静脉较多,但以颈静脉与锁骨下静脉较为多见^[6]。传统的置管术在操作时,往往要求患者取平卧位,仅在肩背部放置一个薄枕,使得穿刺时患者的肩部外展。但解剖结构提示,锁骨下静脉壁与第一肋骨膜、锁骨下肌以及前斜角肌表面的筋膜紧密结合。因此,加大了置管术的操作难度,且易引发气胸^[7,8]。因此,我们对锁骨下静脉置管术进行了一定程度的改良,其主要变化在于保持患者的后枕部与背部在同一平面,并使患者头颈稍稍向右侧靠拢并转向左侧。在临床操作中,我们发现这样能够使得颈内静脉与锁骨下静脉的夹角变小,从而较大程度上预防导管异位,进入

同侧颈内静脉内。此外,改良式锁骨下静脉置管术将穿刺地点选择在了锁骨中外1/3下3 cm左右处,不但能够减少因第一前肋与锁骨之间夹角过小而误穿动脉等并发症。而且,确保穿刺针在第二肋、第一肋和胸膜顶组成的胸廓额面上方平行进针,较少损伤锁骨下动脉。改良式锁骨下静脉置管术与传统锁骨下静脉置管术相比,改良了穿刺的部位以及进针方向,根据锁骨和第一肋的夹角的具体情况选择进针点,以锁骨后缘为支点,强调穿刺针紧贴锁骨后缘,有利于使穿刺针与胸廓额面保持平行和控制穿刺角度,且穿刺针入锁骨下静脉点明确。改良式锁穿不强调“点”的概念,而是以“面”代“点”,便于临床准确操作^[9,10]。

中心静脉置管相关性血液感染是目前国内外备受关注的院内感染,感染的发生常常与人为因素相关^[11]。不规范的操作和错误的后续处理是当前引发感染的重要原因。研究表明^[12],中心静脉置管装置上的肝素帽是引发感染主要原因之一,长期的使用中心静脉置管,细菌容易从外部沿肝素帽的接头处进入导管并且在导管内得到繁殖,最终细菌随血液进入体内,引发感染。此外,中心静脉置管相关性血液感染还与环境、置管时无菌操作不严格、技术不熟练、术后护理不当和置管时间过长等有关^[13]。

本研究显示,改良式锁骨下静脉置管术与颈静脉置管术均有较高的置管成功率。说明现有操作技术下,两种置管术均技术成熟。但是,通过对置管一般情况进行分析,可以发现,观察组置管成功64例,平均导管留置时间 $19.7 \text{ d} \pm 5.2 \text{ d}$,更换敷贴平均次数 $2.6 \text{ 次/wk} \pm 0.7 \text{ 次/wk}$,13例患者治疗期间发生不适;对照组置管成功65例,平均导管留置时间 $11.5 \text{ d} \pm 4.2 \text{ d}$,更换敷贴平均次数 $3.7 \text{ 次/wk} \pm 1.1 \text{ 次/wk}$,49例患者治疗期间发生不适。上述资料除置管成功例数外,差异均有统计学意义。说明采用改良式锁骨下静脉置管术,可以提高导管的留置时间,从而减少更换敷贴的次数,大大减少患者的痛苦。充分说明改良式锁骨下静脉置管术对患者造成的不良影响较小,且长期留置时,更为安全可靠。感染、导管异位、堵塞、脱出、误穿动脉、心率失常、气胸、穿刺点渗血或渗液等是2组患者置管过程中主要出现的并发症。通过比较,可以发现,在比较导管相关性感染、导管异位、误穿动脉、心率失常、气胸、穿刺点渗血或渗液等并发症方面,观察组均优于对照组。传统锁骨下静脉置

管术,穿刺深度一般在2.5-4.0 cm左右,而改良锁骨下静脉置管术,穿刺深度则为5.0-8.0 cm左右。延长了皮肤穿刺点与静脉进针点的距离,能够防止细菌从皮肤进入深静脉,从而减少了感染的出现。改良锁骨下静脉置管术将穿刺点选择下移,不但远离锁骨下静脉与颈内静脉汇合处,又缩小穿刺针尾与颈内静脉的夹角,可减少导管异位入颈内静脉的可能。导丝或导管置入过长可导致心律失常等并发症。本研究中,对于发生胸闷、心慌、气促等不良反应的患者,处理时可将导管外拔1-2 cm,均可以起到缓解症状的作用。此外,通过临床观察,我们还发现当导丝控制在20 cm及导管在15 cm以内一般不会引起心率失常等症状。因此,在掌握解剖结构和操作手法熟练的前提下,改良式锁穿术操作容易、置管成功率高、并发症少、导管留置时间长,尤其在预防导管相关性感染中具有显著作用,在普通病房操作安全易行。

此外,临床上还应建立中心静脉置管的合理制度^[14,15]:(1)对所有能够操作中心静脉置管的医务人员进行资格考核,对申请资格考试的医务人员分别进行理论和操作的考核,通过考核的医务人员才具备相应的中心静脉置管操作资格;(2)查阅国内外最新的文献,规范中心静脉置管的操作流程,对实际操作中的适应证、禁忌证、注意事项等逐一进行归纳;(3)科学的进行中心静脉置管部位以及导管规格的选择,而不是选择省事、方便的部位和导管;(4)严格执行无菌操作,如因患者无法自行行动或搬动,所有的操作均应该于消毒的换药室内进行;(5)中心静脉置管放置后,应注意每次使用后的消毒,当辅料出现明显的湿润或者被污物污染,应该做到及时的更换;(6)如果患者出现不明原因的发热,并出现感染征象时,应该及早拔管。

总之,改良式锁骨下静脉置管术在消化道肿瘤的静脉置管中具有置管成功率高、留置时间长、并发症少等特点,值得在消化系肿瘤外科临床上推广应用。

4 参考文献

- 1 陈俊,赵劲懂,葛许华,喻文亮.危重病患儿中心静脉置管65例.实用儿科临床杂志 2012; 27: 1421-1423
- 2 Ruesch S, Walder B, Tramèr MR. Complications of central venous catheters: internal jugular versus subclavian access--a systematic review. *Crit Care Med* 2002; 30: 454-460 [PMID: 11889329 DOI: 10.1097/00003246-200202000-00031]
- 3 孙大为,陈赛,周晓红.锁骨下静脉置管术385例.贵阳医学院学报 2012; 37: 296-297

■创新盘点

有研究显示,静脉置管引发的相关性血液感染是目前院内三大感染之一,约占总感染数的60%。因此,如何有效控制静脉置管相关性血液感染是目前重要的临床任务。

■同行评价

本文报道了消化系统肿瘤临床治疗中改良式锁骨下静脉置管术效果分析,对基层医院普及此项技术有一定作用。

- 4 Boon JM, van Schoor AN, Abrahams PH, Meiring JH, Welch T, Shanahan D. Central venous catheterization -- an anatomical review of a clinical skill -- Part 1: subclavian vein via the infraclavicular approach. *Clin Anat* 2007; 20: 602-611 [PMID: 17415720 DOI: 10.1002/ca.20486]
- 5 邹丽娟. 经外周中心静脉置管术与经锁骨下静脉置管术在老年肿瘤患者中的应用比较. *中国基层医药* 2011; 18: 62-64
- 6 黄世容, 李永平, 禹猛, 王春生, 王文赋. 优选锁骨下静脉穿刺置管术. *中国危重病急救医学* 2012; 24: 67
- 7 Kline AM. Pediatric catheter-related bloodstream infections: latest strategies to decrease risk. *AACN Clin Issues* 2005; 16: 185-198; quiz 272-274 [PMID: 15876887 DOI: 10.1097/00044067-200504000-00010]
- 8 苏明华, 冯璇璘, 邓磊, 李依, 李俊英, 宋孟龙, 董芸. 简易三指定位法在锁骨下静脉穿刺置管术中的应用. *中华急诊医学杂志* 2012; 21: 760-762
- 9 余水, 刘云兴. 颈内、锁骨下静脉穿刺中心静脉置管术在急诊患者中的应用. *现代中西医结合杂志* 2012; 21: 1090, 1094
- 10 Bacuzzi A, Cecchin A, Del Bosco A, Cantone G, Cuffari S. Recommendations and reports about central venous catheter-related infection. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; 7 Suppl 2: S65-S67 [PMID: 16895510 DOI: 10.1089/sur.2006.7.s2-65]
- 11 胡占升, 于学江. 三种不同途径经皮深静脉置管术临床应用分析. *中国全科医学* 2010; 13: 642-643
- 12 Al-Hwiesh AK, Abdul-Rahaman IS. Tunneled femoral vein catheterization for long term hemodialysis: a single center experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2007; 18: 37-42 [PMID: 17237889]
- 13 Ambesh SP, Dubey PK, Matreja P, Tripathi M, Singh S. Manual occlusion of the internal jugular vein during subclavian vein catheterization: a maneuver to prevent misplacement of catheter into internal jugular vein. *Anesthesiology* 2002; 97: 528-529 [PMID: 12151957 DOI: 10.1097/00000542-200208000-00050]
- 14 秦春妮, 黑飞龙. 体外循环心脏术后消化系统并发症的防治进展. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1318-1322
- 15 谢正勇, 程黎阳, 张玉新, 康慧鑫. 快速康复外科对胃癌手术患者临床指标及术后并发症的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 327-331

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!(《世界华人消化杂志》编辑部)

肺肉瘤样癌回肠转移并出血坏死1例

荣万水, 王云帆, 于明川

荣万水, 北京大学首钢医院普通外科 北京市 100144
王云帆, 北京大学首钢医院病理科 北京市 100144
于明川, 北京大学首钢医院影像中心 北京市 100144
荣万水, 主要从事胃肠道、乳腺及肝、胆、胰、脾等系统疾病的治疗。
北京市自然科学基金资助项目, No. 7132081
北京市科学技术委员会基金资助项目, No. z131107002213103
作者贡献分布: 本文由荣万水负责病案整理及论文撰写; 王云帆负责病理资料的采集; 于明川负责影像学资料的采集
通讯作者: 荣万水, 主任医师, 100144, 北京市石景山区晋元庄路9号, 北京大学首钢医院普通外科。
rongwanshui1968@sina.com
电话: 010-57830366
收稿日期: 2013-05-29 修回日期: 2013-07-15
接受日期: 2013-07-18 在线出版日期: 2013-08-08

Ileal metastasis of pulmonary sarcomatoid carcinoma with hemorrhagic necrosis: A case report

Wan-Shui Rong, Yun-Fan Wang, Ming-Chuan Yu

Wan-Shui Rong, Department of General Surgery, Peking University Shougang Hospital, Beijing 100144, China
Yun-Fan Wang, Department of Pathology, Peking University Shougang Hospital, Beijing 100144, China
Ming-Chuan Yu, Medical Imaging Center, Peking University Shougang Hospital, Beijing 100144, China
Supported by: Beijing Municipal Natural Science Foundation, No. 7132081; Beijing Municipal Science and Technology Commission, No. z131107002213103
Correspondence to: Wan-Shui Rong, Chief Physician, Department of General Surgery, Peking University Shougang Hospital, 9 Jinyuanzhuang Road, 9 Shijingshan District, Beijing 100144, China. rongwanshui1968@sina.com
Received: 2013-05-29 Revised: 2013-07-15
Accepted: 2013-07-18 Published online: 2013-08-08

Abstract

Pulmonary sarcomatoid carcinoma (PSC) is a rare clinical entity, and small intestine metastases of PSC are even rarer. Here we report a case of ileal metastasis of PSC with hemorrhage and necrosis. The surgeon should raise their awareness of this rare tumor. Lung cancer can transfer to various tissues and organs, and digestive tract metastases of lung cancer are not rare. Clinical manifestations of PSC are not specific, and small intestine metastases of PSC can cause intestinal obstruction, intussusceptions, intestinal necrosis and perforation.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Lung; Sarcomatoid carcinoma; Ileal metastasis; Diagnosis; Treatment

Rong WS, Wang YF, Yu MC. Ileal metastasis of pulmonary sarcomatoid carcinoma with hemorrhagic necrosis: A case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(22): 2237-2240
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2237.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2237>

摘要

肺肉瘤样癌(lung sarcomatoid carcinoma, LSC)临床少见, LSC小肠转移临床报道罕见, 本例患者为LSC回肠转移伴出血坏死, 外科医师要拓宽思路, 肺癌可以转移至全身各个组织、器官, 肺癌消化系转移并非罕见。LSC临床表现无特异性, 发生小肠转移时同样可以引起肠梗阻、肠套叠甚至肠坏死、穿孔。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 肺; 肉瘤样癌; 回肠转移; 诊断; 治疗

核心提示: 肺癌可以转移至全身各处组织、器官, 肿瘤的转移可以是肿瘤结构内任何组织成分的转移。肺癌小肠转移的发生率比我们想象的高。当肺癌患者出现一些非特异性的症状如腹胀、腹痛、腹泻以及进行性的贫血等症状时, 应高度怀疑胃肠道转移的可能。

荣万水, 王云帆, 于明川. 肺肉瘤样癌回肠转移并出血坏死1例. *世界华人消化杂志* 2013; 21(22): 2237-2240 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2237.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i22.2237>

0 引言

肺肉瘤样癌(lung sarcomatoid carcinoma, LSC)是一种含有肉瘤样成分的低分化非小细胞肺癌, 临床少见, 原发于肺部的肉瘤样癌(sarcomatoid carcinoma, SC)占肺部恶性肿瘤的0.3%-4.7%^[1,2]。转移性小肠肿瘤临床罕见, 来源于LSC的小肠转移性SC就更为罕见, 我们检索文献, 至今报道LSC小肠转移仅6例^[3-6], 国内尚无相关报道。本

■背景资料

作者在临床上遇到一例肺肉瘤样癌(lung sarcomatoid carcinoma, LSC)回肠转移并出血坏死患者, 检索文献, 肺癌可以转移至全身任何组织、脏器, 肺癌小肠转移临床少见, 完全以肉瘤样癌成分转移至小肠的病例更为罕见, 本文提示临床医师注意肺癌所有病理类型均可发生小肠转移。

■同行评议者

侯风刚, 副教授, 副主任医师, 上海中医药大学附属市中医院肿瘤科

■相关报道

Hsu等报道一例LSC小肠转移并套叠的患者。Bal-dassarre等报道3例LSC空肠转移并穿孔患者,指出治疗措施需要包括放疗在内的综合治疗,但预后差。Felsher等报道1例LSC空肠转移并梗阻患者,对该患者实施了腹腔镜肠切除肠吻合术。

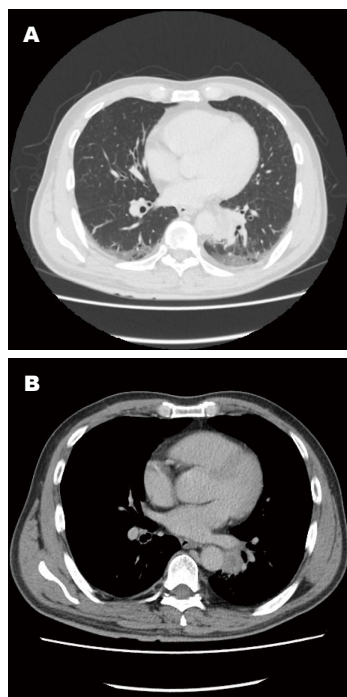


图1 左肺下叶肺癌。A: 肺窗影像; B: 纵膈窗影像。

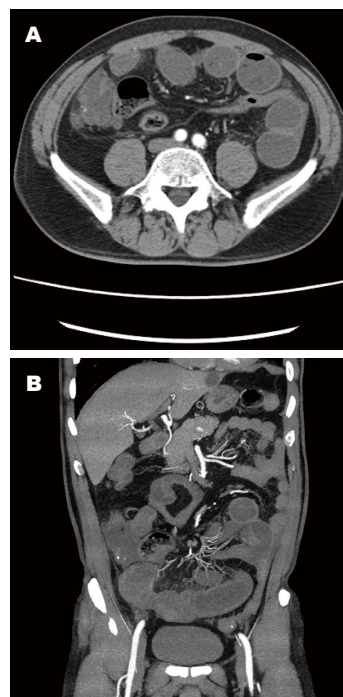


图3 小肠梗阻、肠管扩张、水肿。A: 横断面影像; B: 冠状位影像。

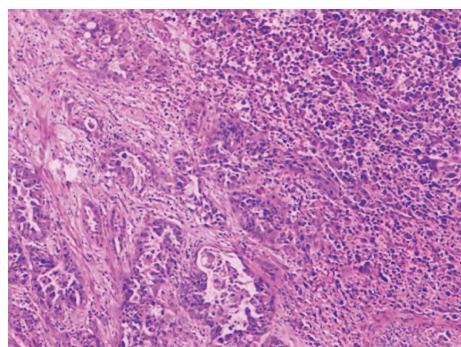


图2 肺部占位, 病理可见肉瘤样癌成分(H&E × 40)。



图4 回肠肠壁出血、坏死。

文报道LSC小肠转移1例。

1 病例报告

男, 57岁, 慢性起病。既往吸烟约40年, 40支/d。患者于2012-06因刺激性咳嗽、咳痰1 mo, 痰中带血1 wk入院。胸部CT扫描示: 左肺下叶结节, 考虑肺癌可能, 间隔旁肺气肿、局部肺大泡, 右肺胸膜下小结节(图1)。入院体检: 全身浅表淋巴结无肿大, 双肺听诊呼吸音清, 查体无特殊。血常规、尿便常规、肿瘤标志物等实验室检查无明显异常。于2012-06行左肺下叶切除、系统淋巴结清扫术。术后病理: 左下肺结节型腺鳞癌, 部分区域呈SC分化; 肿瘤大小约3.5 cm × 3.0 cm × 3.0 cm, 癌侵至肺被膜; 支气管断端未见癌; 支气管旁淋巴结可见癌转移。NUT-1免疫组织化学染色结果: CK7(部分+), P63(部分+), CK8和CK18(部分+), CD56(-), CD34(-), Ki-67(80%+),

TTF1(部分+)(图2)。手术前后腹、盆部CT扫描未见占位性病变。手术后化疗: 紫杉醇+卡铂方案化疗3个疗程。复查CT疗效评价为病情进展。2012-09患者无明显诱因出现右侧腹部疼痛, 伴恶心、频繁呕吐, 急查腹部CT(图3)提示“急性肠梗阻”并收入院。当日急诊行剖腹探查, 术中见回肠末段距回盲部约30 cm肠管对系膜缘肠壁红肿, 局部有一约2 cm破溃, 肠壁肿胀, 周围肠管粘连聚集, 肿物浸润浆肌层及小肠系膜(图4)。行回肠肿物切除术、端端吻合术, 将切除标本剪开, 黏膜未见明显浸润。病理会诊示: 回肠溃疡型SC, 癌从肠系膜及浆膜浸润肠壁至外肌层, 癌未侵及浅肌层、黏膜下层及黏膜层, 脉管内未见明显癌栓, 癌未见侵及神经, 肠周淋巴结未见癌转移。免疫组织化学示CK(-), EMA(+), CK5(-), CK8(-), CK18(-), TTF1(-), P63(-), CK7(-), NapsinA(-), Vimentin(+), LCA(-), CD34(血管+)(图5)。

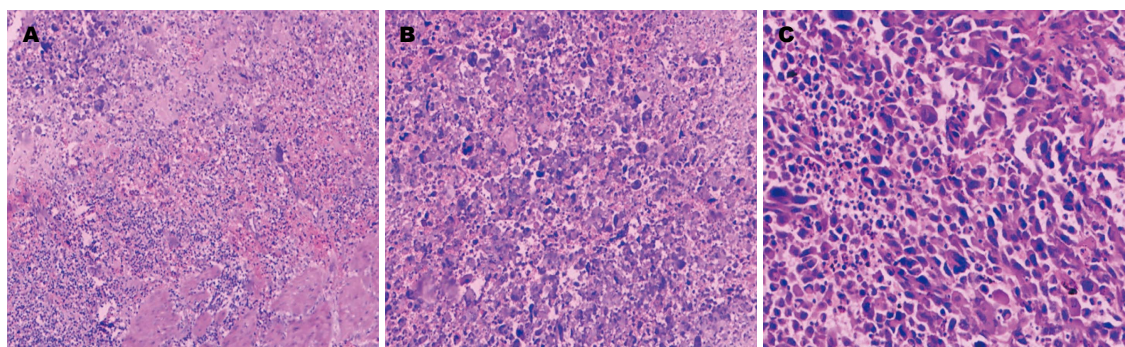


图 5 免疫组织化学结果. A: 小肠占位, 病理可见高度异型的肿瘤细胞浸润肠壁肌层(HE × 40). B, C: 肺部和小肠占位的肿瘤细胞形态一致, 均为肉瘤样癌(HE × 60).

■应用要点

临床医师要高度重视肺癌小肠转移情况, 肺癌患者一旦出现腹痛、恶心、呕吐、便血等症, 及早进行影像学检查, 以明确诊断. 非手术治疗无效时, 应及时手术.

(复习前次肿瘤切片, 本次肠肿瘤细胞形态学与肺肿瘤相像, 结合病史, 符合肺癌转移至回肠; 本次标本肿瘤细胞从肠壁外向内累及外肌层, 未见鳞状细胞及腺样结构, 全部为SC). 术后6 wk, 患者全身多处转移, 死亡.

2 结果

SC是一种癌和肉瘤样形态混合于一个瘤体内的恶性肿瘤, 发生在全身许多部位, 以上呼吸道、肺、乳腺和肾常见. 2004年WHO肺肿瘤分类将肺癌分为鳞状细胞癌、小细胞癌、腺癌、大细胞癌、腺鳞癌、肉瘤样癌即SC、类癌、唾液腺型肿瘤8个类型, 其中SC被定义为含有肉瘤样成分的低分化非小细胞肺癌^[7].

LSC多为中老年男性, 平均年龄60岁左右, 男女比例约7.25:1, LSC的临床表现无特异性, 也主要表现为咳嗽、咳痰、痰中带血、胸痛等, 症状与发生部位有关. 肿瘤大小在确诊时平均约为7 cm, 且往往已有转移^[8]. LSC的首选治疗方法是手术, 术后可辅助化疗, 但预后极差, Vidal Losada等^[9]研究认为, 发生转移的LSC的6 mo生存率仅为27%左右.

转移性小肠肿瘤主要为原发恶性肿瘤细胞通过腹腔种植、血行播散和淋巴管播散至小肠肠壁形成转移, 临床少见, 原发病灶可来源于宫颈癌、恶性黑色素瘤、大肠癌、卵巢癌、肾癌、胃癌、肺癌及皮肤癌等, 转移灶多见于回肠, 尤其是末端回肠, 其次为空肠, 十二指肠较少见^[10].

肺癌患者中, 所有的病理类型均可发生小肠转移, 但LSC小肠转移的报道非常罕见, 国内尚无相关报道. Yoshimoto等^[11]认为, 肺癌小肠转移其实并不少见, 近年来临床报道病例增多的主要原因可能为: (1)肺癌治疗的进步, 尤其是化疗的发展, 患者长期带瘤生存; (2)内镜和CT扫描日

益普及; (3)免疫组织化学技术在病理中的应用. 就目前而言, 腹部增强CT扫描和内镜是发现肺癌消化系统转移的有效方法.

总之, 临床医师要提高对LSC和小肠转移性肿瘤的认识, 做到早诊断、早治疗. 此病例给予临床医师的启示: (1)肿瘤的转移可以是肿瘤结构任何组织成分的转移, 本例中转移成分未见到鳞状细胞及腺样结构, 全部为肉瘤样结构; (2)肺癌小肠转移的发生率比我们想象的高. 当肺癌患者出现一些非特异性的症状如腹胀、腹痛、腹泻, 以及进行性的贫血等症状时, 应高度怀疑胃肠道转移的可能; (3)对切除的肿瘤组织应常规做免疫组织化学检查; (4)对于肺癌小肠转移的患者, 可行小肠姑息性切除手术.

3 参考文献

- Pelosi G, Sonzogni A, De Pas T, Galetta D, Veronesi G, Spaggiari L, Manzotti M, Fumagalli C, Bresola E, Nappi O, Viale G, Rosai J. Review article: pulmonary sarcomatoid carcinomas: a practical overview. *Int J Surg Pathol* 2010; 18: 103-120 [PMID: 19124452 DOI: 10.1177/1066896908330049]
- Koss MN, Hochholzer L, Frommelt RA. Carcinosarcomas of the lung: a clinicopathologic study of 66 patients. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 1514-1526 [PMID: 10584705 DOI: 10.1097/00000478-199912000-00009]
- Hsu YF, Huang CY, Chen TJ, Chou YH. Small bowel intussusception due to metastatic intestinal carcinosarcoma from a pulmonary primary. *Int Med Case Rep J* 2011; 4: 1-5 [PMID: 23754896]
- Baldassarre E, Maggi P, Ramieri MT, Torino G, Graziano P, Barone M, Siani A. Jejunal perforation secondary to metastatic sarcomatoid carcinoma of the lung. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2008; 54: 225-228 [PMID: 18319694]
- Eng J, Sabanathan S. Carcinosarcoma of the lung with gastrointestinal metastasis. Case report. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 26: 161-162 [PMID: 1439648 DOI: 10.3109/1401743920909072]
- Felsher J, Brodsky J, Brody F. Laparoscopic small bowel resection of metastatic pulmonary carcinosarcoma. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2003; 13:

■同行评价

LSC小肠转移临床罕见, 临床医师需要提高对LSC及转移性小肠肿瘤的认识。肺癌小肠转移并非临床罕见, 但报道较少, 说明这是临床易忽略的问题。本文选题新颖, 对肺癌小肠转移在诊断、治疗上具有指导意义。

- 397-400 [PMID: 14733704 DOI: 10.1089/109264203322656478]
- 7 Richard SM, Vinary K, Abul KA. Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia: Saunders Inc, 2007: 174-182
 - 8 Yang CJ, Hwang JJ, Kang WY, Chong IW, Wang TH, Sheu CC, Tsai JR, Huang MS. Gastro-intestinal metastasis of primary lung carcinoma: clinical presentations and outcome. *Lung Cancer* 2006; 54: 319-323 [PMID: 17010474 DOI: 10.1016/j.lungcan.2006.08.007]
 - 9 Vidal Losada MJ, Bernal Monterde V, Amores Arriaga B, Ferrer Pérez AI, Serrano Solares S, Tobeña

- 10 Puyal M. Lung carcinosarcoma. *Clin Transl Oncol* 2010; 12: 303-305 [PMID: 20462841 DOI: 10.1007/s12094-010-0508-6]
- 11 McNeill PM, Wagman LD, Neifeld JP. Small bowel metastases from primary carcinoma of the lung. *Cancer* 1987; 59: 1486-1489 [PMID: 3028602 DOI: 10.1002/1097-0142(19870415)59:8<1486::AID-CNCR2820590815>3.0.CO;2-W]
- 11 Yoshimoto A, Kasahara K, Kawashima A. Gastro-intestinal metastases from primary lung cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 3157-3160 [PMID: 17079136 DOI: 10.1016/j.ejca.2006.08.030]

编辑 黄新珍 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。

《世界华人消化杂志》投稿须知

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, 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

《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。

《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。

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*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸)。拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), T_{max} , C_{max} , V_d , $T_{1/2}$, *CI*等。基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白。

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位。原来的“分子

量”应改为物质的相对分子质量。如30 kD改为*M_r* 30 000或30 kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体)。计量单位在+、-及-后列出。在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/mL应改为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L。明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的

相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其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 $\leq 1\,000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用

于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 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.

《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

《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。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度, 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准, 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参

考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上

角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>. 审稿过程平均时间需要14-28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: 010-5908-0035

传真: 010-8538-1893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

《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.

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: 北京市

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!

陈国忠 主任医师
广西医科大学消化内科

程树群 副教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院

樊红 教授
东南大学基础医学院遗传与发育生物学系

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

何敏 教授
广西医科大学医学科学实验中心

黄缘 教授
南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室

江建新 副主任医师
贵阳医学院附属医院肝胆胰脾外科

李革 副教授
延边大学附属医院

刘丽江 教授
江汉大学医学院

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院

禄韶英 副教授
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

吕凌 副教授
江苏省人民医院肝脏外科

彭亮 副主任医师
中山大学附属第三医院感染科

倪才方 教授
苏州大学附属第一医院介入科

任粉玉 教授
吉林省延边大学附属医院消化内科

邵先玉 教授
泰山医学院附属医院消化内科

石毓君 副研究员
四川大学华西医院

孙文兵 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院肝胆胰脾外科

汤华 研究员
重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室

唐必光 教授
遵义医学院附属医院

王刚 副研究员
哈尔滨医科大学附属第一医院

王阁 教授
中国人民解放军第三军医大学第三附属医院

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

魏睦新 教授
南京医科大学第一附属医院

吴君 主任医师
贵阳医学院附属医院感染科

薛东波 教授
哈尔滨医科大学附属第一医院

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

张明辉 副主任医师
河北医科大学第一医院肝病中心

张占卿 主任医师
上海市复旦大学公共卫生中心肝脏病学、传染病学

《中文核心期刊要目总览》收录证书

《中文核心期刊要目总览》入编通知

尊敬的主编先生/女士：

我们谨此郑重通知：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、统计和分析，以及学科专家评审，贵刊《世界华人消化杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2011年版（即第六版）之临床医学/特种医学类的核心期刊。该书由北京大学出版社出版。书中按《中国图书馆分类法》的学科体系，列出了73个学科的核心期刊表，并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括：题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN号、CN号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。

评选核心期刊的工作，是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动，研究工作量浩大。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

课题组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究，进一步改进了核心期刊评价方法，使之更趋科学合理，力求使评价结果符合客观实际。对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标，选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种，统计到的文献数量共计221177余万篇次，涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

需要特别指出的是，该研究成果只是一种参考工具书，主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考，例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等，不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂
撰安

《中文核心期刊要目总览》2011年版编委会
代章：





百世登
Baishideng®

Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**

Flat C, 23/F., Lucky Plaza,

315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

