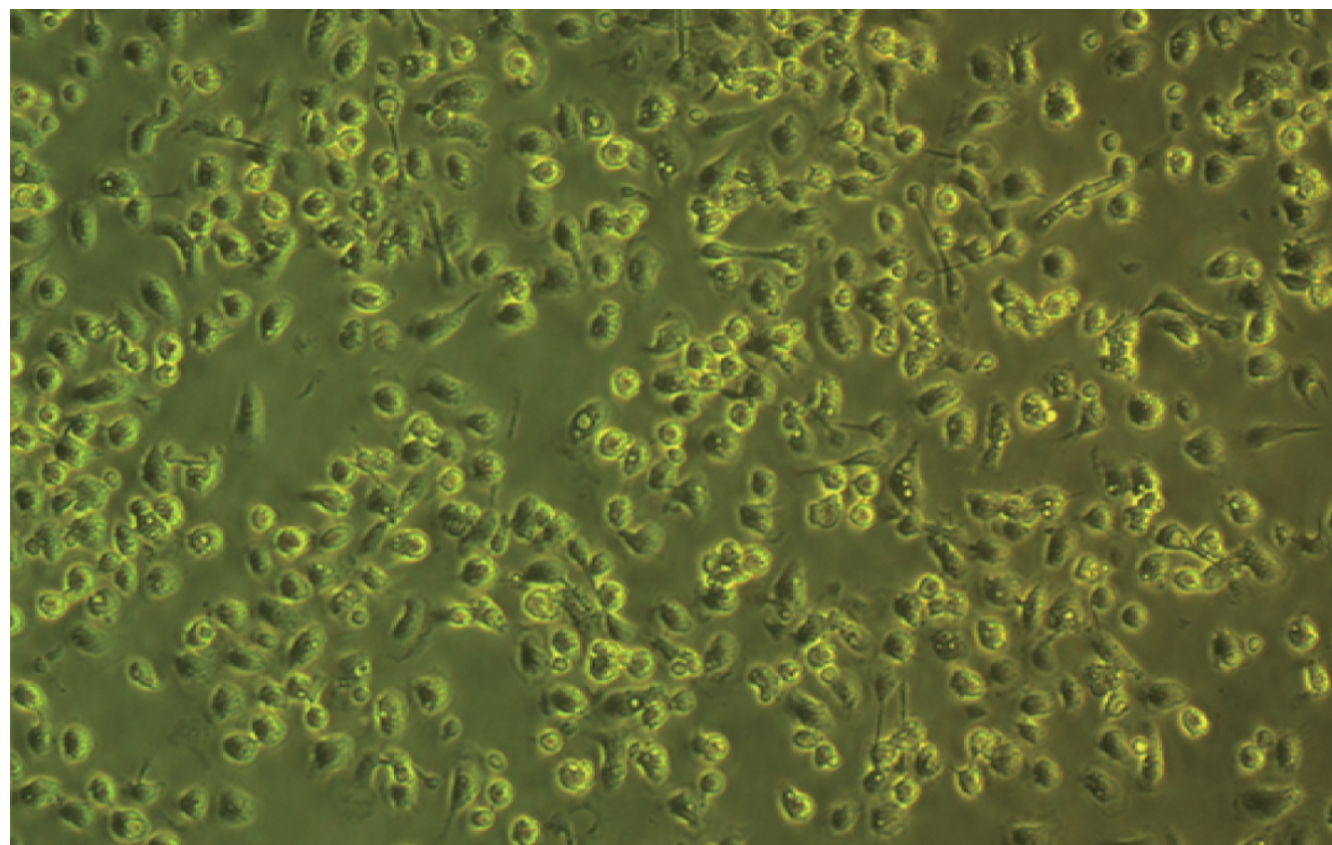


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2013年2月8日 第21卷 第4期 (Volume 21 Number 4)



4/2013

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被《Chemical Abstracts》，《EMBASE/Excerpta Medica》，《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

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

总顾问

陈可冀教授
黄志强教授
纪小龙教授
王小恩教授
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
陈凜教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅思源副教授
傅晓辉副教授
傅志仁主任医师
高毅主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何向辉教授
何晓顺教授
何裕隆教授
胡安斌副教授
黄志勇教授
季加孚教授
姜卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
孔静副教授
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李升平教授

李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李小荣教授
李旭副教授
李永翔教授
李正荣副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘宏鸣副教授
刘建教授
刘亮副主任医师
刘颖斌主任医师
卢军华教授
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕凌副教授
吕云福教授
麻勇副研究员
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民主任医师
邱伟华主任医师
仇毓东教授
崔清波副教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君副研究员
宋新明教授
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙文兵教授
孙星副教授
孙学英教授
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授

世界华人消化杂志®

编辑委员会

汪波主任医师
汪根树副教授
王道荣主任医师
王德盛副主任医师
王凤山教授
王刚副教授
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
王铮副教授
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
徐泱副教授
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
张俊副教授
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
杜群研究员
扈晓宇主任医师
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘绍能主任医师
鲁玉辉副教授
南极星教授
牛英才研究员
谭周进教授
王富春教授
王来友副教授
王笑民主任医师

邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
侯风刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

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

余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

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

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
洪艳教授
李刚教授
李君文研究员
李孟森教授
李文贵副教授
李焱副研究员
李增山副教授
刘长征副教授
刘克辛教授
刘森副教授
宁钧宇副研究员
彭宗根副研究员
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
邵华副主任药师
沈东炎副教授
沈涛副教授
斯坎德尔·白克力教授
台桂香教授
谭学瑞教授
汤静主管药师

滕旭副教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
王书奎教授
魏继福研究员
文彬研究员
吴道澄教授
吴江锋副教授
吴军研究员
吴俊华副教授
吴志强副教授
夏敏教授
徐健副主任医师
徐宁志研究员
许文燮教授
杨晓明教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
曾柱教授
张红教授
张淑坤副研究员
赵平教授
赵铁建教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
朱益民教授
竺亚斌研究员

消化病理学

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2013年2月8日 第21卷 第4期 (总第408期)

基础研究

- 293 常氧与低氧下CagA⁺幽门螺杆菌对人胃癌SGC7901细胞系HIF-2 α 、ABCG2表达的影响
张金花, 冯玉光, 高桂鹏, 陶元勇, 张小茜, 张红梅, 焦建新
- 300 硫化氢对肝纤维化大鼠肝脏 I、III型胶原表达的影响
赵强, 陈卫刚, 赵瑾, 李睿, 宋丽秀, 任婧, 杨新疆, 郑勇
- 307 大鼠枯否细胞的分离、鉴定以及LPS刺激诱导TNF- α 的表达
叶长根, 梁冬雨, 赵亮, 于芳芳, 孙水林, 张吉翔, 刘亮明
- 313 1,25(OH)₂D₃在实验性溃疡性结肠炎中的作用机制
李月芹, 叶建新, 邹玲婷, 张光波, 高楠, 陈卫昌
- 320 NUCB2/nesfatin-1在肥胖大鼠胃肠道组织中的表达
李伟娜, 田宇彬, 魏良洲, 孙桂荣, 张翠萍, 葛银林, 徐珞

临床研究

- 327 TGF- β 1、TIEG1和Stathmin蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义
庞霞, 李晟磊, 赵志华, 张红新, 高冬玲
- 332 表皮生长因子及其受体在糜烂胃黏膜中的表达
郝正魁, 刘希双, 王秀娟

文献综述

- 336 TIPS术后支架功能障碍的研究现状
梁艳平, 唐映梅, 杨晋辉, 尤丽英

研究快报

- 341 RASAL1基因启动子甲基化及RAS活性与结肠癌临床病理的关系
袁纯, 陆枫林, 陈洪

临床经验

- 346 HLA-DRB1*03/04等位基因与广西原发性肝癌家族聚集性的相关性
马莎莎, 吴继周, 吴健林, 刘芳, 胡蝶飞, 宁秋悦, 庞裕
- 352 肝叶切除术在胆道再次手术中的应用
吴军卫, 柴新群, 李潼, 李锦锦, 孟元普
- 357 MRCP对ERCP胆管插管难度预测的价值
朱恒, 赵清喜, 孙学国, 王小玮, 鞠辉, 毛涛, 田宇彬
- 362 ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在结肠癌组织中的表达及相关性
杨万广, 王万鹏, 张谢夫
- 367 局部进展期直肠癌术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞的疗效评价
郝永顺, 钱国武, 张云飞, 吴刚, 李甸源, 李文才, 赵武干, 赵阳阳

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	299 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.775 306 《世界华人消化杂志》出版流程 319 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0.873 326 《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 340 《世界华人消化杂志》栏目设置 345 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 351 《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) 361 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 366 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
封面故事	叶长根, 梁冬雨, 赵亮, 于芳芳, 孙水林, 张吉翔, 刘亮明. 大鼠枯否细胞的分离、鉴定以及LPS刺激诱导TNF- α 的表达. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 307-312 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/307.asp DOI: http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.307
本期责任人	编务 马帅; 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 田滢; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2013-02-08

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

编辑部

李军亮, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-59080035

传真: 010-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Room 1701, 17/F, Henan Building,

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

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

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

《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心期刊)》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

February 2013 Contents in Brief Volume 21 Number 4

BASIC RESEARCH	<p>293 Effects of CagA⁺ <i>Helicobacter pylori</i> infection on expression of HIF-2α and ABCG2 in human gastric cancer cell line SGC7901 under normoxia and hypoxia conditions <i>Zhang JH, Feng YG, Gao GP, Tao YY, Zhang XQ, Zhang HM, Jiao JX</i></p> <p>300 Hydrogen sulfide decreases collagen I and collagen III expression in the liver of rats with experimental hepatic fibrosis <i>Zhao Q, Chen WG, Zhao J, Li R, Song LX, Ren Q, Yang XJ, Zheng Y</i></p> <p>307 Rat Kupffer cells: Isolation, identification and LPS-stimulated TNF-α expression and secretion <i>Ye CG, Liang DY, Zhao L, Yu FP, Sun SL, Zhang JX, Liu LM</i></p> <p>313 Mechanisms underlying therapeutic effects of 1,25(OH)₂D₃ against experimental ulcerative colitis in mice <i>Li YQ, Ye JX, Zou LT, Zhang GB, Gao N, Chen WC</i></p> <p>320 Expression of nucleobindin-2/hesfatin-1 in gastrointestinal tissues of high-fat diet-induced obese rats <i>Li WN, Tian ZB, Wei LZ, Sun GR, Zhang CP, Ge YL, Xu L</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>327 Clinical significance of expression of TGF-β1, TIEG1 and stathmin proteins in esophageal squamous cell carcinoma <i>Pang X, Li SL, Zhao ZH, Zhang HX, Gao DL</i></p> <p>332 Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric mucosal erosion <i>Hao ZK, Liu XS, Wang XJ</i></p>
REVIEW	<p>336 Transjugular intrahepatic portosystemic shunt dysfunction <i>Liang YP, Tang YM, Yang JH, You LY</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>341 Clinical significance of RASAL1 promoter methylation and ras activity in colorectal carcinoma <i>Yuan C, Lu FL, Chen H</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>346 Relationship between HLA-DRB1*03/04 alleles and familial clustering of hepatocellular carcinoma in Guangxi <i>Ma SS, Wu JZ, Wu JL, Liu F, Hu DF, Ning QY, Pang Y</i></p> <p>352 Application of hepatic lobectomy in bile duct reoperation <i>Wu JW, Chai XQ, Li T, Li JJ, Meng YP</i></p> <p>357 Role of MRCP in predicting difficulty of bile duct intubation during ERCP <i>Zhu H, Zhao QX, Sun XG, Wang XW, Ju H, Mao T, Tian ZB</i></p> <p>362 Significance of ALDH1A2, MMP2 and E-cadherin expression in colonic cancer <i>Yang WG, Wang WP, Zhang XF</i></p> <p>367 Efficacy of preoperative systemic vein chemotherapy combined with regional intra-arterial chemoembolization in the management of locally advanced rectal cancer <i>Gao YS, Qian GW, Zhang YF, Wu G, Li DY, Li WC, Zhao WG, Zhao YY</i></p>

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>Ye CG, Liang DY, Zhao L, Yu FP, Sun SL, Zhang JX, Liu LM.</i> Rat Kupffer cells: Isolation, identification and LPS-stimulated TNF- α expression and secretion. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2013; 21(4): 307-312 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/307.asp DOI: http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.307
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Shuai Ma</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>Ying Tian</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date February 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

Jun-Liang Li, Director

World Chinese Journal of Digestology

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

Telephone: +86-10-59080035

Fax: +86-10-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Room 1701, 17/F, Henan Building,

No. 90 Jaffe Road, Wanchai,

Hong Kong, China

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: bpg@baishideng.com

<http://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

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

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue

RMB 2448 Yuan for one year

COPYRIGHT

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

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

常氧与低氧下CagA⁺幽门螺杆菌对人胃癌SGC7901细胞系HIF-2 α 、ABCG2表达的影响

张金花, 冯玉光, 高桂鹏, 陶元勇, 张小茜, 张红梅, 焦建新

张金花, 高桂鹏, 潍坊医学院研究生部 山东省潍坊市 261042
冯玉光, 张小茜, 张红梅, 焦建新, 潍坊医学院附属医院消化内科 山东省潍坊市 261031

陶元勇, 潍坊医学院附属医院检验科 山东省潍坊市 261031
张金花, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的临床和基础研究.

作者贡献分布: 本课题由冯玉光与张金花设计; 研究过程由张金花、冯玉光、高桂鹏、陶元勇、张小茜、张红梅及焦建新共同完成; 数据分析由张金花、冯玉光及高桂鹏完成; 本论文写作由张金花与冯玉光完成.

通讯作者: 冯玉光, 副教授, 硕士生导师, 261031, 山东省潍坊市虞河路465号, 潍坊医学院附属医院消化内科.

f-yg2008@163.com

电话: 0536-8068912

收稿日期: 2012-12-02 修回日期: 2013-01-14

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Effects of CagA⁺ *Helicobacter pylori* infection on expression of HIF-2 α and ABCG2 in human gastric cancer cell line SGC7901 under normoxia and hypoxia conditions

Jin-Hua Zhang, Yu-Guang Feng, Gui-Peng Gao, Yuan-Yong Tao, Xiao-Qian Zhang, Hong-Mei Zhang, Jian-Xin Jiao

Jin-Hua Zhang, Gui-Peng Gao, Graduate School, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Yu-Guang Feng, Xiao-Qian Zhang, Hong-Mei Zhang, Jian-Xin Jiao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, Shandong Province, China

Yuan-Yong Tao, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261031, Shandong Province, China

Correspondence to: Yu-Guang Feng, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, 465 Yuhe Road, Weifang 261031, Shandong Province, China. f-yg2008@163.com

Received: 2012-12-02 Revised: 2013-01-14

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To observe the effect of CagA⁺ *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) on the expression of HIF-2 α and ABCG2 in human gastric cancer cell line SGC7901 under normoxia and hypoxia conditions to investigate whether *H. pylori* infection and the tumor microenvironment have a syner-

gistic effect in the initiation and development of gastric cancer.

METHODS: Gastric mucosal biopsy specimens collected by endoscopy were cultured under microaerophilic conditions and *H. pylori* isolates were identified. CagA⁺ *H. pylori* strains were confirmed by PCR. Gastric cancer cell line SGC7901 was co-cultured with a CagA⁺ *H. pylori* strain for 48 h under either normoxia or hypoxia condition (cells were divided into a normoxia control group, a hypoxia control group, a normoxia plus CagA⁺ *H. pylori* group, and a hypoxia plus CagA⁺ *H. pylori* group). Immunocytochemistry was used to detect the expression of HIF-2 α and ABCG2 proteins, and RT-PCR was used to detect the expression of ABCG2 mRNA.

RESULTS: Immunocytochemistry results showed that HIF-2 α and ABCG2 proteins were expressed at low levels under normoxia, while both hypoxia and CagA⁺ *H. pylori* could significantly induce the expression of HIF-2 α and ABCG2 proteins compared to the normoxia control group (all $P < 0.01$). Compared to the hypoxia control group and normoxia plus CagA⁺ *H. pylori* group, the expression of HIF-2 α and ABCG2 proteins was further elevated in the hypoxia plus CagA⁺ *H. pylori* group (all $P < 0.01$). There was a positive correlation between the expression of HIF-2 α and that of ABCG2 ($r = 0.976$, $P < 0.05$). Similar results were obtained for ABCG2 mRNA expression by RT-PCR.

CONCLUSION: CagA⁺ *H. pylori* can stimulate the expression of HIF-2 α and ABCG2 in gastric cancer cells under normoxia condition, and their expression can be further up-regulated under hypoxia condition. CagA⁺ *H. pylori* and hypoxia have a synergistic effect on the expression of HIF-2 α and ABCG2, suggesting that CagA⁺ *H. pylori* and hypoxia may play an important role in inducing gastric cancer cell de-differentiation and chemotherapy resistance.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)是胃癌的I类致癌因子, CagA是*H. pylori*的主要毒力因子之一, CagA⁺ *H. pylori*菌株与胃癌的关系更密切. 低氧微环境是多种实体肿瘤包括胃癌的特征之一, 其通过诱导HIF-2 α 来维持干细胞的表型, 与肿瘤的干细胞化及化疗抵抗有关. *H. pylori*和低氧是胃癌的两种重要环境因子, 可能对胃癌的发生发展起重要的协同作用.

■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

■ 研发前沿

随着肿瘤干细胞学说的提出, *H. pylori* 致胃癌的干细胞机制研究成为热点. 低氧是多种实体肿瘤的特征之一, 但 *H. pylori* 在胃癌发生发展中的干细胞机制及其与肿瘤微环境低氧是否具有协同作用尚不清楚.

Key Words: Gastric cancer cells; *Helicobacter pylori*; Cytotoxin-associated protein A; Hypoxia; ABCG2; Hypoxia inducible factor-2alpha

Zhang JH, Feng YG, Gao GP, Tao YY, Zhang XQ, Zhang HM, Jiao JX. Effects of CagA⁺ *Helicobacter pylori* infection on expression of HIF-2 α and ABCG2 in human gastric cancer cell line SGC7901 under normoxia and hypoxia conditions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 293-299 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/293.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.293>

摘要

目的: 观察常氧与低氧下 CagA⁺ 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 对人胃癌 SGC7901 细胞系低氧诱导因子-2 α (hypoxia inducible factor-2alpha, HIF-2 α)、ABCG2 表达的影响, 初步探讨 *H. pylori* 在胃癌发生发展中的干细胞机制, 及其与肿瘤微环境低氧的协同作用.

方法: 内镜下采集胃黏膜标本, 行 *H. pylori* 培养并鉴定, PCR 方法检测 *H. pylori* CagA⁺ 基因. CagA⁺ *H. pylori* 与胃癌 SGC7901 细胞于常氧和低氧环境下共培养 48 h (分常氧对照组、低氧对照组、常氧 CagA⁺ *H. pylori* 组、低氧 CagA⁺ *H. pylori* 组). 免疫细胞化学法检测 HIF-2 α 和 ABCG2 蛋白的表达, RT-PCR 法检测 ABCG2 mRNA 的表达.

结果: 免疫细胞化学结果显示: 常氧下胃癌 SGC7901 细胞 HIF-2 α 、ABCG2 蛋白呈低水平表达, 低氧和 CagA⁺ *H. pylori* 均能显著诱导 HIF-2 α 、ABCG2 蛋白表达 (与常氧对照组相比, 均 $P < 0.01$), 与低氧对照组和常氧 CagA⁺ *H. pylori* 组相比, 低氧 CagA⁺ *H. pylori* 组表达进一步升高 (均 $P < 0.01$). 相关分析显示 HIF-2 α 与 ABCG2 表达呈正相关 ($r = 0.976$, $P < 0.05$). RT-PCR 检测 ABCG2 mRNA 表达结果与免疫细胞化学一致.

结论: CagA⁺ *H. pylori* 可刺激胃癌细胞 HIF-2 α 、ABCG2 表达, 低氧环境下其表达进一步增加, 表明 CagA⁺ *H. pylori* 和低氧对 HIF-2 α 、ABCG2 的表达有协同作用. 提示 CagA⁺ *H. pylori* 和低氧可能是诱导胃癌细胞干细胞化及化疗抵抗的重要原因.

© 2013 年版权归 Baishideng 所有.

关键词: 胃癌细胞; 幽门螺杆菌; 细胞毒素相关蛋白 A; 低氧; ABCG2; 低氧诱导因子-2 α

张金花, 冯玉光, 高桂鹏, 陶元勇, 张小茜, 张红梅, 焦建新. 常

氧与低氧下 CagA⁺ 幽门螺杆菌对人胃癌 SGC7901 细胞系 HIF-2 α 、ABCG2 表达的影响. *世界华人消化杂志* 2013; 21(4): 293-299 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/293.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.293>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 是定植于胃黏膜的一种革兰氏阴性微需氧菌, 目前已确认为胃癌的 I 类致癌因子, 其长期定植于胃黏膜上皮, 并可进入细胞内生存, 引起胃黏膜的慢性炎症及胃黏膜上皮细胞的基因及表遗传学改变, 经过萎缩、肠化、不典型增生等阶段, 最终导致胃癌的发生, 是人类慢性炎症导致肿瘤的代表模型之一^[1-4]. 细胞毒素相关蛋白 A (cytotoxin-associated protein A, CagA) 是 *H. pylori* 最主要毒力因子之一, CagA⁺ *H. pylori* 菌株与胃癌的关系更密切^[2-5]. *H. pylori* 致胃癌的分子机制取得了很大进展, 但确切机制仍需深入探索. 近年来, 随着肿瘤起源于肿瘤干细胞学说的提出, *H. pylori* 致胃癌的干细胞机制研究成为热点^[6-9]. 近年来, 肿瘤干细胞学说认为肿瘤起源于正常成体干细胞或成熟体细胞的干细胞化, 是肿瘤发生、发展、侵袭、转移、耐药及复发的根源^[6]. 许多证据已显示肿瘤基因突变、环境因素及表遗传学改变可导致非干细胞的干细胞化^[6]. 多项研究表明^[10-13], 在胃癌的发生发展过程中, *H. pylori* 可引起多条干细胞通路异常. 低氧微环境是多种实体肿瘤包括胃癌的特征之一, 是肿瘤发生发展、浸润转移、放疗抵抗及复发的重要原因^[14]. 肿瘤低氧与肿瘤干细胞的关系也是近年热点^[15-19]. 研究表明, 低氧通过诱导低氧诱导因子-2 α (hypoxia inducible factor-2alpha, HIF-2 α) 调控相关干细胞信号通路来维持干细胞的表型, 与肿瘤的干细胞化及化疗抵抗有关^[20,21]. 作者推测, *H. pylori* 和低氧作为胃癌的两种重要的环境因子, 可能对胃癌的发生发展起重要协同作用. ABCG2 是新近发现的 ABC 半转运体超家族中的成员之一, 具有外排泵的作用, 是肿瘤干细胞的通用分子标志物, 其过表达是肿瘤复发、转移及产生耐药的重要原因^[22-25]. 有研究表明^[24,25], ABCG2 是 HIF-2 α 的靶基因之一, 可能是低氧下肿瘤干细胞化及化疗抵抗的重要原因. 本实验通过常氧与低氧下 CagA⁺ *H. pylori* 与胃癌细胞共培养, 观察常氧与低氧下 CagA⁺ *H. pylori* 对人胃癌 SGC7901 细胞系 HIF-2 α 、ABCG2 表达的影响, 初步探讨 *H. pylori* 在胃癌发生发展中的

干细胞机制, 及其与肿瘤微环境低氧的协同作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌SGC7901细胞系购自山东省医学科学院; CagA⁺ *H. pylori*菌株为本院一例慢性萎缩性胃炎患者胃黏膜标本培养所得; RPMI 1640培养基购自杭州四季青公司; 哥伦比亚琼脂购自英国Oxoid公司; 微需氧产气袋、厌氧培养罐购自日本三菱公司; 兔抗人ABCG2、HIF-2 α 多克隆抗体、SP-9000免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; PCR扩增试剂盒、M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒购自上海生物技术有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养及鉴定: 内镜下收集快速尿素酶试验阳性患者的胃黏膜组织, 研磨后接种于哥伦比亚血琼脂平板上, 置于厌氧培养罐微需氧条件(80 mL/L CO₂, 70 mL/L O₂, 850 mL/L N₂)、37 °C环境中培养3-5 d, 观察细菌菌落形态、进行革兰染色、并经尿素酶、过氧化氢酶、氧化酶等进行鉴定, PCR检测CagA基因。

1.2.2 细胞培养: 胃癌SGC7901细胞接种于RPMI 1640培养基(含10%小牛血清、青链霉素各100 U/mL), 置于37 °C、50 mL/L CO₂孵箱中常规培养及传代。

1.2.3 RT-PCR检测CagA⁺ *H. pylori*对常氧与低氧下胃癌SGC7901细胞ABCG2 mRNA表达的影响: 胃癌SGC7901细胞置37 °C、50 mL/L CO₂培养箱内常规培养, 取对数生长期的细胞接种于6孔板中, 待细胞贴壁后换液, 按细菌和细胞100:1的比例将CagA⁺ *H. pylori*加入到不含抗生素的培养基中。设常氧对照组、常氧CagA⁺ *H. pylori*组、低氧对照组、低氧CagA⁺ *H. pylori*组。分别于常氧下或厌氧培养罐(80 mL/L CO₂, 70 mL/L O₂, 850 mL/L N₂)培养48 h收集细胞, TRIzol提取总RNA, 用M-MuLV逆转录酶试剂盒首先将mRNA逆转录成cDNA。取反转录产物2 μ L进行PCR扩增。引物设计: 扩增ABCG2及 β -actin mRNA部分片段的引物, 产物片段分别为311 bp与539 bp, 引物序列如下: ABCG2: 上游5'-GCGACCTGCCAATTTCAA AT-3', 下游5'-AGCCAGTTGTAGGCTCATCCA-3'; β -actin: 上游5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 下游5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。反应

条件: 预变性94 °C 5 min; 变性94 °C 30 s, 退火 β -actin 56.5 °C、ABCG2 62 °C 30 s, 延伸72 °C 30 s, 扩增35个循环; 72 °C总延伸10 min; 4 °C保存。1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。应用Image J图像分析软件计算条带灰度值, 目的条带灰度值分别与相应 β -actin灰度值相比, 即为其表达量。

1.2.4 免疫细胞化学SP法检测CagA⁺ *H. pylori*对常氧与低氧下胃癌SGC7901细胞HIF-2 α 及ABCG2蛋白表达的影响: 取对数生长期的SGC7901制成2 \times 10⁸/L的细胞悬液, 加入放有盖玻片的6孔板内, 待细胞贴壁后换液, 按细菌和细胞100:1的比例将CagA⁺ *H. pylori*加入到不含抗生素的培养基中。设常氧对照组、常氧CagA⁺ *H. pylori*组、低氧对照组、低氧CagA⁺ *H. pylori*组。分别于常氧下或厌氧培养罐(80 mL/L CO₂, 70 mL/L O₂, 850 mL/L N₂)培养48 h后取出细胞爬片, PBS冲洗, 冷丙酮固定15 min。按SP-9000试剂盒步骤检测HIF-2 α 、ABCG2。用已知阳性的乳腺癌切片作阳性对照, 以PBS代替一抗作阴性对照。结果判定: HIF-2 α 的阳性结果为棕黄色颗粒, 主要位于细胞质, 细胞核中也有少量表达。ABCG2的阳性结果为细胞质内有棕黄色颗粒出现。采用Image pro plus图像分析软件, 检测HIF-2 α 、ABCG2阳性细胞的平均吸光度(A)值, 以间接反映HIF-2 α 、ABCG2蛋白的表达量, 并取其均值。

统计学处理 定量资料的统计学描述采用mean \pm SD表示, 用统计学软件SPSS18.0进行数据处理。组间比较用 t 检验, 两变量相关性用Pearson线性相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌鉴定及CagA基因检测 胃黏膜标本经培养、鉴定及CagA基因检测证实为CagA⁺ *H. pylori*菌株。

2.2 RT-PCR检测ABCG2 mRNA的表达变化 常氧下胃癌SGC7901细胞ABCG2 mRNA呈低水平表达, 与单纯常氧对照组相比, 单纯低氧或CagA⁺ *H. pylori*均能促进其表达, 差异具有统计学意义($t = 8.1914, 12.318$, 均 $P < 0.01$); 与低氧对照组和常氧CagA⁺ *H. pylori*组相比, 低氧CagA⁺ *H. pylori*组表达进一步升高($t = 8.889, 10.518$, 均 $P < 0.01$, 表1, 图1)。

2.3 免疫细胞化学SP法检测HIF-2 α 、ABCG2蛋白的表达变化 常氧下胃癌SGC7901细胞HIF-

■ 相关报道

ABCG2是HIF-2 α 的直接靶基因之一。低氧条件下通过诱导HIF-2 α -ABCG2通路维持肿瘤的干细胞化及化疗抵抗。近年来, *H. pylori*致胃癌的干细胞机制也成为研究的热点。有研究表明, *H. pylori*在胃癌发生发展过程中可引起多条干细胞通路异常。

■ 创新盘点

本研究通过探讨常氧与低氧下CagA⁺ *H. pylori*对人胃癌SGC7901细胞系HIF-2 α 、ABCG2表达的影响,证明CagA⁺ *H. pylori*可诱导胃癌细胞HIF-2 α 、ABCG2表达,并且CagA⁺ *H. pylori*和低氧对HIF-2 α 、ABCG2的表达有协同作用,提示CagA⁺ *H. pylori*和低氧可能是诱导胃癌细胞干细胞化及化疗抵抗的重要原因。

表 1 不同处理组中ABCG2 mRNA及HIF-2 α 、ABCG2蛋白的表达

分组	ABCG2 mRNA	HIF-2 α 蛋白	ABCG2蛋白
常氧对照组	0.1815 \pm 0.032	0.1572 \pm 0.002	0.2071 \pm 0.005
常氧CagA ⁺ <i>H. pylori</i> 组	0.4052 \pm 0.025 ^d	0.4369 \pm 0.007 ^d	0.3910 \pm 0.003 ^d
低氧对照组	0.4083 \pm 0.053 ^d	0.4478 \pm 0.008 ^d	0.4075 \pm 0.027 ^d
低氧CagA ⁺ <i>H. pylori</i> 组	0.7637 \pm 0.072 ^{bd}	0.6911 \pm 0.015 ^{bd}	0.7121 \pm 0.040 ^{bd}

^b*P*<0.01 vs 常氧CagA⁺ *H. pylori*组、低氧对照组; ^d*P*<0.01 vs 常氧对照组。

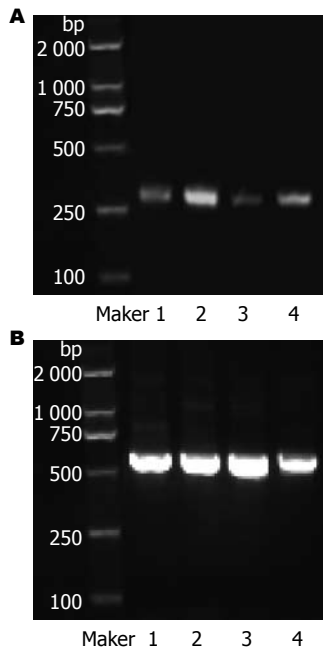


图 1 RT-PCR法检测胃癌SGC7901细胞ABCG2、 β -actin mRNA的表达. A: ABCG2; B: β -actin. 1: 低氧对照组; 2: 低氧CagA⁺ *H. pylori*组; 3: 常氧对照组; 4: 常氧CagA⁺ *H. pylori*组。

*H. pylori*最主要毒力因子之一,其通过cag PAI编码的IV型分泌系统(T4SS)进入宿主细胞,被Src蛋白家族酪氨酸激酶酪氨酸磷酸化后与酪氨酸磷酸酶SHP-2结合后,刺激细胞分裂和增殖^[2-4],CagA还可诱导胃癌细胞中钙调蛋白基因启动子区去甲基化修饰,从而上调其表达,与胃癌的发生密切相关^[5]。*H. pylori*与胃癌干细胞关系的研究表明^[6-9,10-13],慢性*H. pylori*感染激活多条干细胞相关通路Wnt/ β -catenin、Notch、FGF、Hedgehog和BMP表达增加。

肿瘤微环境低氧是多种实体瘤包括胃癌的特征之一,低氧诱导因子家族(hypoxia inducible factors, HIFs)是低氧效应的关键分子。HIFs是一组由结构同源的 α 亚基和共同的 β 亚基组成的异源二聚体转录因子,包括HIF-1、HIF-2和HIF-3。其中 α 亚单位在蛋白水平受氧分压的密切调节,低氧下稳定而常氧下迅速被泛素蛋白酶系统降解^[14]。已有研究证实,低氧是正常干细胞壁龛(niche)的重要特征之一,低氧通过诱导干细胞产生HIFs调控Notch、OCT-4、c-Myc、Nanog和Wnt/ β -catenin等多条干细胞信号通路的表达,维持干细胞未分化特征^[15]。近年研究发现^[16-19],低氧不但可以维持肿瘤干细胞的未分化状态,还可以诱导非肿瘤干细胞的去分化,可能是低氧下肿瘤化疗抵抗和复发的根源。既往对HIF-1 α 与肿瘤的关系研究较多,最近研究发现^[20,21],HIF-2 α 与肿瘤干细胞关系更密切。Pietras等^[20]研究发现,HIF-2 α 能使神经嵴样神经母细胞瘤起始细胞维持在未分化状态。Seidel等^[21]发现,HIF-2 α 能调节胶质母细胞瘤干细胞表型。ABCG2是ABC转运蛋白超家族成员之一,可外排多种化疗药物,其高表达是肿瘤多药耐药的重要原因之一。研究发现^[22,23],多种干细胞均高表达ABCG2,其功能可能与保护干细胞免遭外源及内源毒素的侵害以维持干细胞的稳定性有关。有研究发现^[24,25],ABCG2是HIF-2 α 的直接靶基因,可能是低氧诱导肿瘤细胞去分化的原因

2 α 、ABCG2蛋白呈低水平表达,与单纯常氧对照组相比,低氧可显著促进HIF-2 α 、ABCG2表达(HIF-2 α : *t* = 78.800; ABCG2: *t* = 16.319; 均*P*<0.01),CagA⁺ *H. pylori*也能显著促进HIF-2 α 、ABCG2表达(HIF-2 α : *t* = 85.909; ABCG2: *t* = 70.522; 均*P*<0.01);与低氧对照组和常氧CagA⁺ *H. pylori*组相比,低氧CagA⁺ *H. pylori*组表达进一步升高,具有统计学差异(HIF-2 α : *t* = 32.002、34.339; ABCG2: *t* = 14.113、17.900; 均*P*<0.01)。HIF-2 α 与ABCG2表达呈正相关(*r* = 0.976, *P*<0.05,表1,图2,3)。

3 讨论

胃癌是消化系常见的恶性肿瘤之一,*H. pylori*长期感染引起胃黏膜慢性炎症,是胃癌的重要病因之一^[1-4]。*H. pylori*感染胃上皮细胞后,激活核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)、AP-1、PI3K、STAT 3、Wnt/ β -catenin和COX-2等肿瘤相关信号通路,*H. pylori*还诱导DNA甲基化和组蛋白乙酰化等表遗传学改变^[2-4]。CagA蛋白是

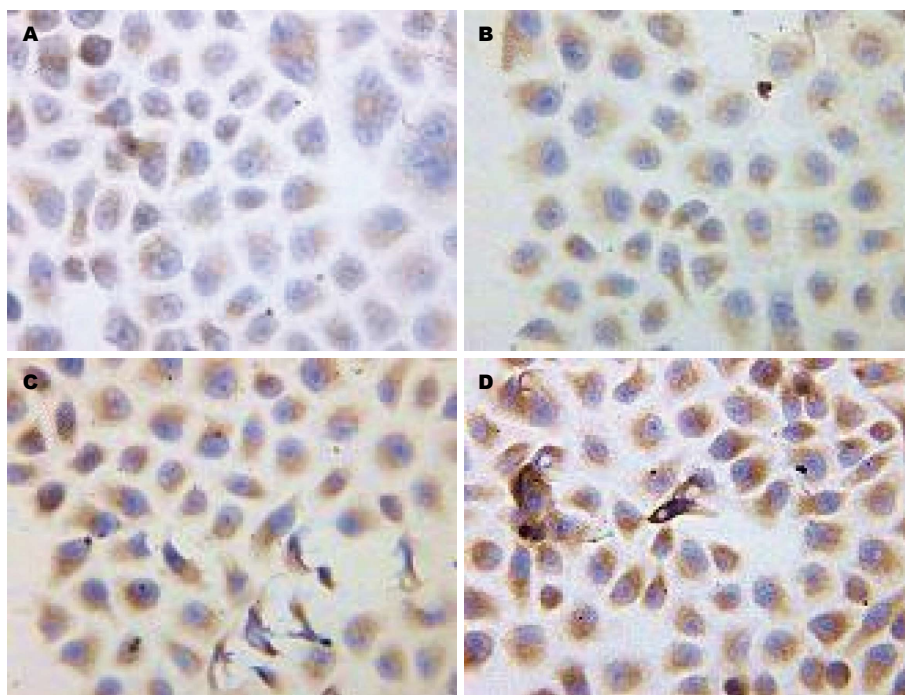


图 2 免疫细胞化学法检测SGC7901细胞HIF-2 α 蛋白的表达($\times 400$)。A: 常氧对照组; B: 常氧CagA⁺*H. pylori*组; C: 低氧对照组; D: 低氧CagA⁺*H. pylori*组。

■应用要点
本研究结果说明*H. pylori*和低氧可能是导致胃癌细胞干细胞化的重要原因, 提示根除*H. pylori*在防止胃癌的发生发展、侵袭转移、耐药及复发中具有重要作用, 值得进一步深入研究。

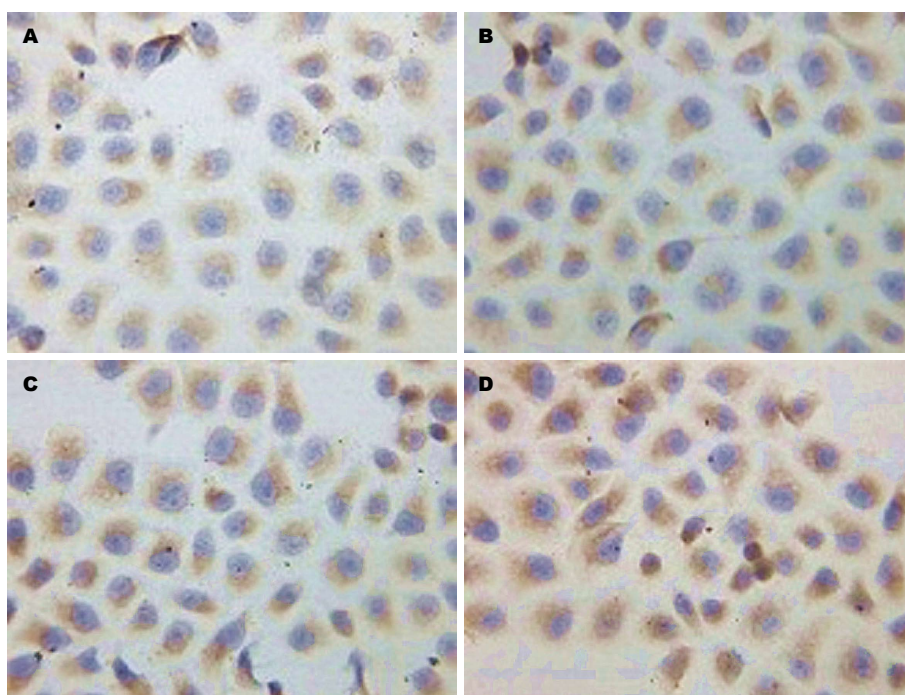


图 3 免疫细胞化学法检测SGC7901细胞ABCG2蛋白的表达($\times 400$)。A: 常氧对照组; B: 常氧CagA⁺*H. pylori*组; C: 低氧对照组; D: 低氧CagA⁺*H. pylori*组。

之一。

本实验通过常氧与低氧下CagA⁺*H. pylori*与胃癌细胞共培养, 观察常氧与低氧下CagA⁺*H. pylori*对人胃癌SGC7901细胞系HIF-2 α 、ABCG2表达的影响。免疫细胞化学结果显示: 常氧下胃癌SGC7901细胞HIF-2 α 、ABCG2蛋白呈低水平表达, 低氧和CagA⁺*H. pylori*均能显著诱导HIF-2 α 、ABCG2蛋白表达, 与低氧对照组和常氧CagA⁺*H. pylori*组相比, 低氧CagA⁺*H. pylori*组表达进一步升高。相关分析显示HIF-2 α 与

ABCG2表达呈正相关。RT-PCR检测各组ABCG2 mRNA表达结果显示与免疫细胞化学结果一致。说明CagA⁺*H. pylori*与低氧均可刺激胃癌细胞HIF-2 α 、ABCG2表达, 且二者有协同作用, 提示CagA⁺*H. pylori*和低氧可能通过激活HIF-2 α -ABCG2通路诱导胃癌细胞干细胞化及化疗抵抗。先前研究发现^[26], *H. pylori*感染胃黏膜上皮可诱导氧自由基产生, 与胃癌的发生和发展有关。Park等^[27]进一步研究发现常氧下*H. pylori*感染胃癌细胞后HIF-1 α 表达增加, 与氧自由基活

■同行评价

本文设计合理, 方法得当, 结果可信, 分析条理清晰, 结论具有基础研究价值和临床研究价值。

性增加平行, 而氧自由基抑制剂则可在抑制氧自由基活性的同时抑制HIF-1 α 的表达。本研究首次发现体外常氧下CagA⁺ *H. pylori*可促进胃癌细胞HIF-2 α 蛋白表达, 可能与氧自由基的作用有关, 有待进一步研究证实。该结果与Griffiths等^[28]的体内研究一致, 其在*H. pylori*致胃癌发生的动物模型中发现HIF-2 α 在*H. pylori*相关性胃炎、肠化、不典型增生、肠型、弥漫型胃癌中均表达增高。几项研究发现^[29-31], 在*H. pylori*诱导胃癌过程中, 胃癌干细胞候选标志物Msi-1、CD44、Cytokeratin-7表达增加。本研究首次发现常氧下CagA⁺ *H. pylori*与胃癌细胞共培养后干细胞通用标志物ABCG2表达增加, 推测可能是通过HIF-2 α -ABCG2通路促进其表达。本研究结果提示: *H. pylori*通过HIF-2 α -ABCG2途径促进胃癌干细胞化和多药耐药, 并与肿瘤低氧有协同作用, 是*H. pylori*促进胃癌发生发展的机制之一, 值得深入研究。

4 参考文献

- Houghton J, Wang TC. Helicobacter pylori and gastric cancer: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. *Gastroenterology* 2005; 128: 1567-1578 [PMID: 15887152 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.03.037]
- Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 1003-1008 [PMID: 18192401 DOI: 10.1073/pnas.0711183105]
- Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of Helicobacter pylori. *Gastroenterology* 2007; 133: 659-672 [PMID: 17681184 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.06.026]
- Ding SZ, Goldberg JB, Hatakeyama M. Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis. *Future Oncol* 2010; 6: 851-862 [PMID: 20465395 DOI: 10.2217/fon.10.37]
- 周建奖, 王妍, 谢渊, 赵艳, 谷颖. 幽门螺杆菌对胃癌细胞中钙调蛋白基因启动子区去甲基化的诱导作用. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 1838-1842
- Wu XZ. Origin of cancer stem cells: the role of self-renewal and differentiation. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 407-414 [PMID: 18043974 DOI: 10.1245/s10434-007-9695-y]
- Pilpilidis I, Kountouras J, Zavos C, Katsinelos P. Upper gastrointestinal carcinogenesis: H. pylori and stem cell cross-talk. *J Surg Res* 2011; 166: 255-264 [PMID: 20452613 DOI: 10.1016/j.jss.2010.02.012]
- Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. *Gastric Cancer* 2010; 13: 11-24 [PMID: 20373071 DOI: 10.1007/s10120-009-0537-4]
- Sell S. Infection, stem cells and cancer signals. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12: 182-188 [PMID: 21044009 DOI: 10.2174/138920111794295675]
- Katoh M. Dysregulation of stem cell signaling network due to germline mutation, SNP, Helicobacter pylori infection, epigenetic change and genetic alteration in gastric cancer. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 832-839 [PMID: 17568183 DOI: 10.4161/cbt.6.6.4196]
- Martin J, Donnelly JM, Houghton J, Zavros Y. The role of sonic hedgehog reemergence during gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 1516-1524 [PMID: 20437100 DOI: 10.1007/s10620-010-1252-z]
- Gnad T, Feoktistova M, Leverkus M, Lendeckel U, Naumann M. Helicobacter pylori-induced activation of beta-catenin involves low density lipoprotein receptor-related protein 6 and Dishevelled. *Mol Cancer* 2010; 9: 31 [PMID: 20137080 DOI: 10.1186/1476-4598-9-31]
- Hung KH, Wu JJ, Yang HB, Su LJ, Sheu BS. Host Wnt/beta-catenin pathway triggered by Helicobacter pylori correlates with regression of gastric intestinal metaplasia after H. pylori eradication. *J Med Microbiol* 2009; 58: 567-576 [PMID: 19369517 DOI: 10.1099/jmm.0.007310-0]
- Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O2 availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 967-975 [PMID: 18987634 DOI: 10.1038/nrc2540]
- Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem* 2008; 283: 9499-9503 [PMID: 18272517 DOI: 10.1074/jbc.R700043200]
- Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 789-795 [PMID: 20104230 DOI: 10.1038/sj.bjc.6605551]
- Axelsson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pählman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells—a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 554-563 [PMID: 16144692 DOI: 10.1016/j.semcdb.2005.03.007]
- Das B, Tsuchida R, Malkin D, Koren G, Baruchel S, Yeger H. Hypoxia enhances tumor stemness by increasing the invasive and tumorigenic side population fraction. *Stem Cells* 2008; 26: 1818-1830 [PMID: 18467664 DOI: 10.1634/stemcells.2007-0724]
- Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 2009; 8: 3274-3284 [PMID: 19770585 DOI: 10.4161/cc.8.20.9701]
- Pietras A, Hansford LM, Johnsson AS, Bridges E, Sjölund J, Gisselsson D, Rehn M, Beckman S, Noguera R, Navarro S, Cammenga J, Fredlund E, Kaplan DR, Pählman S. HIF-2 α maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 16805-16810 [PMID: 19805377 DOI: 10.1073/pnas.0904606106]
- Seidel S, Garvalov BK, Wirta V, von Stechow L, Schänzer A, Meletis K, Wolter M, Sommerlad D, Henze AT, Nistér M, Reifenberger G, Lundeberg J, Frisén J, Acker T. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* 2010; 133: 983-995 [PMID: 20375133 DOI: 10.1093/brain/awq042]
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osa-

- wa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7: 1028-1034 [PMID: 11533706 DOI: 10.1038/nm0901-1028]
- 23 Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002; 99: 507-512 [PMID: 11781231 DOI: 10.1182/blood.V99.2.507]
- 24 Martin CM, Ferdous A, Gallardo T, Humphries C, Sadek H, Caprioli A, Garcia JA, Szeweda LL, Garry MG, Garry DJ. Hypoxia-inducible factor-2 α transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circ Res* 2008; 102: 1075-1081 [PMID: 18356544 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.161729]
- 25 Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* 2004; 279: 24218-24225 [PMID: 15044468 DOI: .1074/jbc.M313599200]
- 26 Bagchi D, Bhattacharya G, Stohs SJ. Production of reactive oxygen species by gastric cells in association with *Helicobacter pylori*. *Free Radic Res* 1996; 24: 439-450 [PMID: 8804987 DOI: 10.3109/10715769609088043]
- 27 Park JH, Kim TY, Jong HS, Kim TY, Chun YS, Park JW, Lee CT, Jung HC, Kim NK, Bang YJ. Gastric epithelial reactive oxygen species prevent normoxic degradation of hypoxia-inducible factor-1 α in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 433-440 [PMID: 12538497]
- 28 Griffiths EA, Pritchard SA, McGrath SM, Valentine HR, Price PM, Welch IM, West CM. Hypoxia-associated markers in gastric carcinogenesis and HIF-2 α in gastric and gastro-oesophageal cancer prognosis. *Br J Cancer* 2008; 98: 965-973 [PMID: 18283323 DOI: 10.1038/sj.bjc.6604210]
- 29 Murata H, Tsuji S, Tsujii M, Nakamura T, Fu HY, Eguchi H, Asahi K, Okano H, Kawano S, Hayashi N. *Helicobacter pylori* infection induces candidate stem cell marker Musashi-1 in the human gastric epithelium. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 363-369 [PMID: 17549630 DOI: 10.1007/s10620-007-9858-5]
- 30 Jang BI, Li Y, Graham DY, Cen P. The Role of CD44 in the Pathogenesis, Diagnosis, and Therapy of Gastric Cancer. *Gut Liver* 2011; 5: 397-405 [PMID: 22195236 DOI: 10.5009/gnl.2011.5.4.397]
- 31 Kirchner T, Müller S, Hattori T, Mukaisyo K, Papadopoulos T, Brabletz T, Jung A. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. *Virchows Arch* 2001; 439: 512-522 [PMID: 11710638 DOI: 10.1007/s004280100477]

编辑 李军亮 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)

硫化氢对肝纤维化大鼠肝脏 I、III 型胶原表达的影响

赵强, 陈卫刚, 赵瑾, 李睿, 宋丽秀, 任嫱, 杨新疆, 郑勇

■背景资料

硫化氢(H₂S)是新型的气体信号传导分子,具有多种生物学功能,如抗氧化、抗炎、细胞保护、调节细胞增殖与凋亡等作用。本课题组的前期研究证实其在肝纤维化的发展及门脉高压的调节过程中具有重要的意义。

赵强,任嫱,杨新疆,石河子大学医学院 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

陈卫刚,李睿,宋丽秀,郑勇,石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

赵瑾,石河子大学医学院第一附属医院病理科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

赵强,在读硕士,主要从事肝纤维化与门脉高压症的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81170402

作者贡献分布: 本课题由赵强、郑勇、陈卫刚、李睿及宋丽秀设计; 研究过程由赵强、赵瑾、任嫱及杨新疆完成; 研究所用试剂由郑勇与陈卫刚提供; 数据分析由赵强完成; 本论文写作由赵强、郑勇及陈卫刚完成。

通讯作者: 郑勇, 教授, 主任医师, 832008, 新疆维吾尔自治区石河子市北二路, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科。zy2850@126.com

收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2012-12-31

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-02-08

Hydrogen sulfide decreases collagen I and collagen III expression in the liver of rats with experimental hepatic fibrosis

Qiang Zhao, Wei-Gang Chen, Jin Zhao, Rui Li, Li-Xiu Song, Qiang Ren, Xin-Jiang Yang, Yong Zheng

Qiang Zhao, Qiang Ren, Xin-Jiang Yang, College of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Wei-Gang Chen, Rui Li, Li-Xiu Song, Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of College of Medicine of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jin Zhao, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of College of Medicine of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81170402

Correspondence to: Yong Zheng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medicine of College of Shihezi University, Beier Road, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zy2850@126.com

Received: 2012-11-14 Revised: 2012-12-31

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of hydrogen sulfide on collagen I and collagen III expression in the liver of rats with experimental hepatic fibrosis.

METHODS: Thirty-two female SD rats were randomly divided into three groups: normal

control group, hepatic fibrosis group, and hydrogen sulfide group. Rats in the hepatic fibrosis group and hydrogen sulfide group were subcutaneously injected with carbon tetrachloride to induce hepatic fibrosis. Rats in the hydrogen sulfide group were intraperitoneally injected with sodium hydrosulfide (56 μmol/kg·d; the donor of hydrogen sulfide). Fibrosis was staged using histopathological methods. The expression of collagen I and collagen III was detected by immunohistochemistry and RT-PCR.

RESULTS: Compared to the normal control group, the stage of fibrosis was elevated ($P < 0.01$) and the expression of collagen I and collagen III was increased (both $P < 0.01$) in the hepatic fibrosis group. Compared to the hepatic fibrosis group, the stage of fibrosis declined ($P < 0.05$) and the expression of collagen I and collagen III was decreased (both $P < 0.01$) in the hydrogen sulfide group.

CONCLUSION: Hydrogen sulfide can decrease the expression of collagen I and collagen III and inhibit the progression of hepatic fibrosis in rats.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Hydrogen sulfide; Hepatic fibrosis; Rats; Collagen I; Collagen III

Zhao Q, Chen WG, Zhao J, Li R, Song LX, Ren Q, Yang XJ, Zheng Y. Hydrogen sulfide decreases collagen I and collagen III expression in the liver of rats with experimental hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 300-306 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/300.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.300>

摘要

目的: 探讨硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)对肝纤维化大鼠肝脏 I 型胶原(COL-I)和 III 型胶原(COL-III)的影响。

方法: 选择硫化氢(sodium hydrosulfide, NaHS)作为 H₂S 的供体, 将 32 只 SD 大鼠分为 3 组: 正常组(N组)8 只、肝纤维化组(hepatic

■同行评议者

杜雅菊, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

fibrosis, HF组)13只、NaHS干预组(S组)11只, 采用四氯化碳复合因素法复制肝纤维化模型, S组自造模第6周始给予NaHS 56 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 腹腔注射12 d, N组和HF组给予同等剂量的生理盐水腹腔注射. 干预结束后, 宰杀大鼠留取肝脏行肝组织病理切片HE染色评价肝纤维化分期, 行Masson染色观察胶原纤维沉积情况, 应用RT-PCR法检测肝脏中COL-I、COL-III mRNA表达, 采用SP免疫组织化学法检测肝脏COL-I、COL-III表达.

结果: HF组与N组相比, COL-I、COL-III及其mRNA表达升高(均 $P = 0.000$), 与肝纤维化分期结果一致($P = 0.000$); S组与HF组相比, COL-I和COL-III表达降低(均 $P = 0.000$); COL-I mRNA表达降低($P = 0.009$), 同时COL-III mRNA表达亦降低($P = 0.003$), 肝纤维化分期下降($P = 0.047$).

结论: H_2S 具有降低肝脏 I、III型胶原表达的作用, 能够延缓肝纤维化的发生发展.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 硫化氢; 肝纤维化; I型胶原; III型胶原

赵强, 陈卫刚, 赵瑾, 李睿, 宋丽秀, 任嫄, 杨新疆, 郑勇. 硫化氢对肝纤维化大鼠肝脏 I、III型胶原表达的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 300-306 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/300.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjcd.v21.i4.300>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是肝脏对各种慢性刺激进行损伤修复反应时, 以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝内大量沉积的病理过程. 因其发生机制尚未完全明确, 故已成为目前国内外学者研究的热点.

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是新近发现的存在于体内的气体信号分子, 具有广泛的生物学效应. 近年来, 国内外学者研究发现 H_2S 能缓解心肌纤维化^[1]、减轻肺内皮细胞屏障损害^[2]、拮抗神经退行性变^[3]、改善肾缺血再灌注损伤^[4]从而在心血管、呼吸、神经、泌尿等多系统疾病中发挥重要的保护作用. 本课题组前期对肝硬化的研究发现: 肝硬化大鼠门静脉血中 H_2S 降低, 并且随着肝硬化程度加重逐渐降低^[5]; 肝硬化时大鼠门静脉压力明显升高, 而给予 H_2S 供体-硫氢化钠(sodium hydrosulfide, NaHS)干预后则明显降低^[6], 但 H_2S 对肝纤维化进程的影响仍不确切.

因此, 本实验复制肝纤维化模型, 通过NaHS的干预, 观察肝脏组织病理学变化, 检测与肝纤维化进程中关系最为密切的 I、III型胶原沉积情况, 探讨其对肝纤维化的影响, 为进一步研究 H_2S 与肝纤维化的关系提供理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 32只实验大鼠购自新疆医科大学实验动物中心, 均为同期出生、纯种系、SPF级4-5周龄的健康♀SD大鼠, 体质量约180-220 g. NaHS为美国Sigma公司产品; 兔抗大鼠I型胶原蛋白多克隆抗体、兔抗大鼠III型胶原蛋白多克隆抗体为美国Abcam公司产品; 免疫组织化学染色SP试剂盒为北京中杉公司产品; DAB显色剂为DAKO公司产品; RNA提取试剂TRIzol为美国Invitrogen公司产品; 逆转录酶试剂盒为美国Fermentas公司产品; 四氯化碳、无水乙醇、胆固醇粉均为国产分析纯. PCR引物由上海生物工程公司合成, COL-I mRNA引物序列^[7]: Forward: 5'-GGTCCCAAAGGTGCTGATGG-3', Reverse: 5'-GACCAGCCTCACCACGGTCT-3', 扩增长度为182 bp; COL-III mRNA引物序列^[7]: Forward: 5'-CGAGGTGACAGAGGTGAAAGA-3', Reverse: 5'-AACCCAGTATTCTCCGCTCTT-3', 扩增长度为336 bp; GAPDH引物序列: Forward: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3', Reverse: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3', 扩增长度为496 bp.

1.2 方法

1.2.1 制备模型及实施干预: 根据本课题组前期实验经验, 采用四氯化碳复合因素法复制肝纤维化大鼠模型. 将32只大鼠随机分为3组: N组(正常对照组)8只, HF组(肝纤维化组)13只和S组(NaHS干预组)11只. 给予HF组和S组大鼠背部皮下注射40%四氯化碳棉籽油溶液, 首剂5 mL/kg体质量, 后每隔4 d注射一次, 剂量为3 mL/kg体质量, 共注射12次; 以100 mL/L乙醇溶液为唯一饮用液体; 前2 wk喂以20%猪油高脂肪饲料, 以后喂以0.5%高胆固醇饲料; N组同期给予相同剂量的生理盐水背部皮下注射, 喂正常复合饲料, 饮清洁饮用水. 自造模第6周开始, S组大鼠给予腹腔注射NaHS溶液[56 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{d})$], 共注射12 d, 其余两组腹腔注射相同剂量生理盐水.

1.2.2 标本留取: 模型复制及干预剂实施结束后, 乙醚麻醉后处死大鼠, 取大鼠肝左叶以10%中性甲醛溶液固定, 其余肝脏投入液氮速冻后置于

■ 研发前沿

H_2S 能通过其抗氧化、抗炎、细胞保护、抗纤维化等多种生物学作用减轻和保护四氯化碳诱导的肝毒性、肝硬化以及门脉高压症, 这意味着他可能为预防和治疗慢性肝病提供新方向.

■ 相关报道

H₂S能够增加肺动脉胶原的降解,减少胶原的含量.肝脏中, H₂S能抑制肝细胞凋亡,亦可抑制肝星状细胞(HSC)的增殖,提示H₂S能够减少胶原的合成.

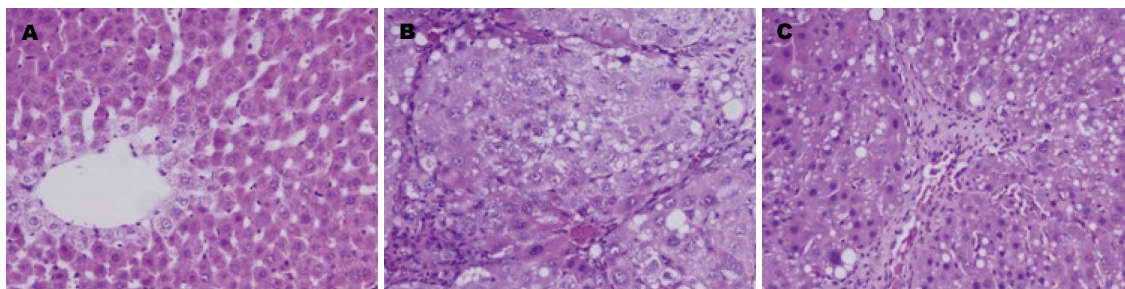


图1 HE染色观察各组大鼠肝纤维化分期($\times 200$). A: N组; B: HF组; C: S组.

-80 °C 备用.

1.2.3 肝组织形态学观察: 石蜡包埋组织制作切片(4 μ m), 行HE染色观察肝纤维化分期, 分期标准符合《病毒性肝炎防治方案》^[8]; 行Masson染色观察肝组织胶原沉积情况, 评价标准依照《肝纤维化诊断及疗效评估共识》^[9]中纤维化半定量评分系统(SSS).

1.2.4 SP免疫组织化学法检测肝组织COL- I、COL- III 表达: 石蜡切片常规脱蜡至水; 3% H₂O₂甲醇溶液室温孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶; PBS浸洗3遍, 0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)高温修复8 min; 自然冷却至室温后PBS浸洗5 min \times 3次, 滴加适量山羊血清工作液, 37 °C封闭20 min; 甩去多余血清, 滴加COL- I 一抗(1 : 200)或COL- III一抗(1 : 200), 4 °C过夜. 次日PBS浸洗5 min \times 3次, 滴加生物素化山羊抗兔二抗工作液, 37 °C孵育20 min; PBS浸洗5 min \times 3次, 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37 °C孵育20 min后PBS浸洗5 min \times 3次. DAB显色, 镜下观察以控制显色时间. 显色满意后, 自来水冲去DAB, 苏木素复染, 0.1%盐酸乙醇分化, 自来水中返蓝, 脱水、透明、中性树脂封片. 选取人正常皮肤组织作为阳性对照; 阴性对照为N组大鼠肝脏, 以滴加PBS代替一抗. COL- I、COL- III结果以细胞外基质着棕黄色为阳性染色. 采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统进行分析, 每张切片随机观察5个高倍视野($\times 200$), 以光密度(A)值代表目的蛋白的表达水平, A值越大则目的蛋白越多, 反之则越少.

1.2.5 RT-PCR法检测肝组织中COL- I mRNA和COL- III mRNA的表达: 使用TRIzol法提取肝脏总RNA, 用紫外分光光度仪行RNA浓度及纯度测定, A_{260/280}均在1.9-2.0之间, 说明RNA纯度较高, 并将总RNA调至相同浓度. 使用RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis kit试剂盒将总RNA逆转录为cDNA, 然后进行PCR扩增. COL- I mRNA扩增条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s,

58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共36个循环; 72 °C延伸10 min. COL- III mRNA扩增条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共36个循环; 72 °C延伸10 min. GAPDH扩增条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共36个循环; 72 °C延伸10 min. 反应结束后, PCR产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳分析, 采用Quantity one凝胶成像分析系统测定各相应条带的灰度值, 选取GAPDH作为内参照, 以COL- I /GAPDH和COL- III/GAPDH的比值作为目的基因的相对表达水平.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行分析. 计量资料数据以mean \pm SD表示, 选择单因素方差分析进行均数差异性比较, 多样本两两比较选择Bonferroni法; 肝纤维化分期半定量资料的比较采用多样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis法), 多样本间两两比较时选择Nemenyi法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肝组织形态学观察结果 肝组织HE染色可见(图1): N组肝小叶结构清晰, 小叶内肝细胞无脂肪变性、坏死, 无炎症细胞浸润及纤维组织增生. HF组肝小叶结构紊乱, 纤维组织增生、假小叶形成, 肝细胞变性、坏死明显, 部分细胞可见气球样变, 有大量炎细胞浸润. S组肝组织仍可见假小叶结构, 但部分区假小叶纤维间隔变窄或局灶模糊不清, 肝细胞脂肪变性、坏死较HF组为轻. HF组肝纤维化分期较N组明显升高($P = 0.000$), 给予NaHS干预的S组其肝纤维化分期较HF组降低($P = 0.047$), 差异均具有统计学意义(表1).

肝组织Masson染色可见(图2): N组肝小叶结构完整, 仅中央静脉和汇管区有少量胶原纤维; HF组肝小叶结构破坏, 胶原纤维增多增粗, 呈弥漫分布; S组仍可见部分假小叶结构, 但胶原纤维沉积减少, 纤维间隔纤细菲薄. HF组SSS评分较N组明显升高($P = 0.000$), S组其SSS评分较HF组降低($P = 0.006$), 差异均具有统计学意义(表2).

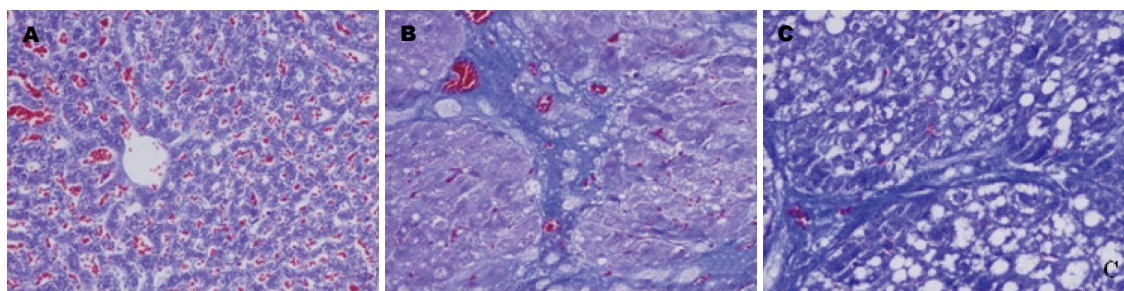


图 2 Masson染色观察各组大鼠肝脏胶原沉积($\times 200$)。A: N组; B: HF组; C: S组。

■ 创新盘点

本研究结果表明 H_2S 能够减少肝内 I、III 型胶原表达, 延缓肝纤维化的发展, 这可能与它能够直接或间接地减少胶原合成以及增加胶原降解有关。因此关于 H_2S 保护作用详尽机制的研究以及如何将其应用于临床是目前的研究热点。

表 1 各组大鼠肝脏纤维化分期结果 ($n = 8$)

分组	肝纤维化分期					平均秩
	0	1	2	3	4	
N组	7	1	0	0	0	5.25
HF组	0	0	0	2	6	20.38 ^a
S组	1	3	3	1	0	11.88 ^c

^a $P = 0.000$ vs N组; ^c $P = 0.047$ vs HF组。

表 2 各组大鼠肝脏SSS评分及COL-I、COL-III表达量 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	SSS评分	COL-I A值	COL-III A值
N组	2.625 \pm 2.264	0.136 \pm 0.020	0.107 \pm 0.019
HF组	23.375 \pm 3.962 ^a	0.384 \pm 0.043 ^e	0.277 \pm 0.025 ^e
S组	17.625 \pm 3.249 ^c	0.300 \pm 0.022 ^d	0.219 \pm 0.016 ^d

^a $P = 0.000$ vs N组; ^b $P = 0.006$ vs HF组; ^c $P = 0.000$ vs N组; ^d $P = 0.000$ vs HF组。

2.2 免疫组织化学染色法检测COL-I、COL-III表达 免疫组织化学染色示: N组肝组织中央静脉、汇管区中可见少量I型(图3)、III型(图4)胶原表达。HF组肝组织I型、III型胶原成条索状或小片状广泛分布, 主要表达于中央静脉、汇管区以及肝窦Disse间隙中, A值均较N组显著升高(均 $P = 0.000$)。NaHS干预的S组I型、III型胶原表达部位基本同HF组, 但着色面积减少、染色强度降低, 且A值较HF组降低(均 $P = 0.000$)。差异均具有统计学意义(表2)。

2.3 肝组织COL-I mRNA和COL-III mRNA的表达 与N组相比, HF组肝脏COL-I mRNA及COL-III mRNA表达均明显升高(均 $P = 0.000$), 而S组肝脏COL-I mRNA及COL-III mRNA表达均较HF组降低(分别 $P = 0.009$ 、 0.003)。差异均具有统计学意义(表3, 图5)。

3 讨论

肝硬化是由多种原因引起以肝功能减退、门静

脉高压为主要表现的疾病, 严重影响人们的健康及生活质量, 而且已成为主要的医疗保健负担。目前尚无特效药物能将肝硬化治愈, 但肝纤维化作为各种慢性肝病进展为肝硬化的一个必经阶段, 已被证实是可逆的^[10]。肝纤维化的发生发展是一个复杂的全身病理生理过程, 涉及多种细胞因子及细胞内信号分子网络。他的特征改变是肝脏内ECM沉积, 发生的主要机制是肝脏内的胶原过度生成、沉着和ECM重分布, 导致ECM合成与降解失衡而引起的。肝纤维化时ECM以胶原蛋白为主, 尤以I、III型胶原蛋白为其主要成分。

H_2S 与CO、NO一样, 具有类似的生物学功能, 在肝纤维化发展过程中起着重要的调节作用。在哺乳动物体内, H_2S 大部分来源于肝脏, 主要在胱硫醚- β -合成酶(CBS)和胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)的催化下产生, Kabil等^[11]发现在肝脏内由CBS催化产生的 H_2S 仅占3%, 而97%的 H_2S 由CSE催化产生。本课题组前期研究表明^[5,6,12], 肝

■应用要点

本文为H₂S的基础研究提供数据,同时为H₂S应用于临床防治肝纤维化提供理论支持.

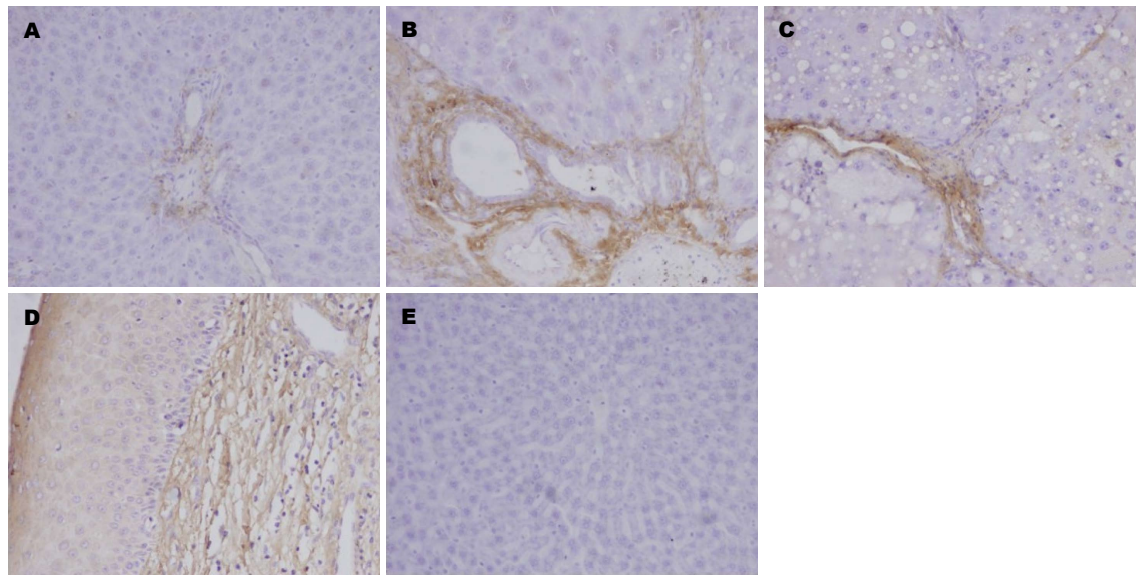


图 3 免疫组织化学法观察大鼠肝脏COL-I 表达(DAB × 200). A: N组; B: HF组; C: S组; D: 阳性对照(人正常皮肤); E: 阴性对照.

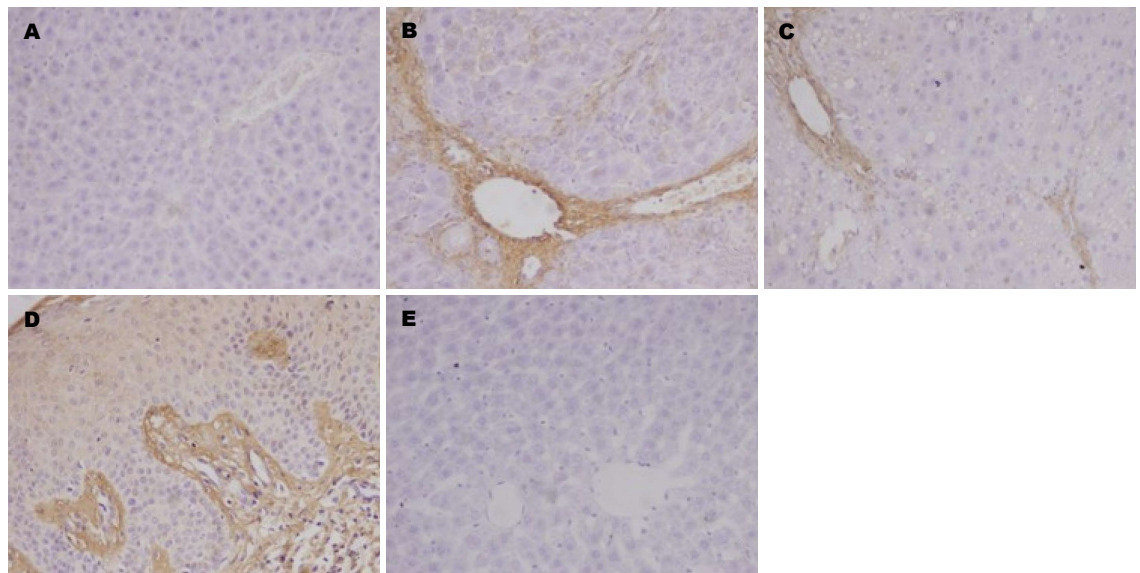


图 4 免疫组织化学法观察大鼠肝脏COL-III 表达(DAB × 200). A: N组; B: HF组; C: S组; D: 阳性对照(人正常皮肤); E: 阴性对照.

硬化大鼠CSE-H₂S系统表达下调,肝硬化程度越重CSE-H₂S系统表达下调越明显,给予NaHS后则可改善这一现象,故H₂S对肝纤维的发生发展具有延缓作用,并对肝硬化门脉高压具有一定的保护性调节作用.

本实验表明:正常大鼠肝脏内I、III型胶原表达很少,肝纤维化组大鼠肝脏纤维化分期及I、III型胶原的表达较正常组明显升高,说明肝纤维化模型复制成功;肝纤维化大鼠在给予NaHS后肝内I、III型胶原的表达降低,同时从组织病理学观察肝纤维化分期下降,表明H₂S能够减少胶原沉积,改善肝脏损害.

肝脏内ECM最主要来源于肝星状细胞(he-

patic stellate cell, HSC)^[13],目前认为HSC的活化在肝纤维化发展中起着关键作用,激活的HSC能够转化成肌成纤维母细胞,分泌大量的ECM^[14],而H₂S发挥其生物学效应的重要机制是参与调控细胞增殖与凋亡和细胞保护作用.肝细胞作为肝脏的主体细胞,当其受损时就能够启动HSC的激活.当H₂S缺乏时,肝硬化大鼠肝细胞的凋亡增加,进而促进肝纤维化启动与发生^[15].在肝缺血再灌注损伤中,外源性H₂S可减轻肝细胞损伤、抑制肝细胞凋亡而发挥保护性作用^[16].可见,H₂S可能通过保护肝细胞间接抑制HSC的激活,而减少胶原的生成.阎继攀等^[17]报道H₂S能够抑制实验性肝纤维化大鼠肝组织内细胞的增殖,

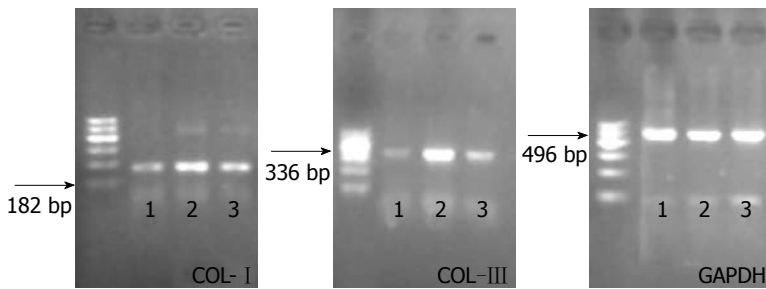


图 5 RT-PCR法检测各组大鼠肝脏 COL- I mRNA、COL- III mRNA的表达。1: N组; 2: HF组; 3: S组。

同行评价
本文设计合理, 数据准确, 结论可靠, 为H₂S与肝纤维化的进一步研究提供了理论基础, 具有一定的实际意义。

表 3 各组大鼠肝脏COL- I mRNA、COL- III mRNA的表达量 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	COL- I /GAPDH	COL- III /GAPDH
N组	0.419 \pm 0.171	0.311 \pm 0.118
HF组	1.085 \pm 0.114 ^a	0.896 \pm 0.094 ^e
S组	0.874 \pm 0.076 ^c	0.699 \pm 0.089 ^d

^a $P = 0.000$ vs N组; ^b $P = 0.009$ vs HF组; ^c $P = 0.000$ vs N组; ^d $P = 0.003$ vs HF组。

推测最可能是HSC和肝脏门静脉汇管区血管平滑肌细胞。在细胞水平复制肝纤维化模型的研究中, 证实H₂S能够抑制HSC的增殖, 抑制细胞进入合成期^[18]。这些说明H₂S可能直接抑制HSC生成胶原, 对肝纤维起到保护作用。

肝纤维化的ECM沉积另一原因是ECM的降解减少, 这在肝纤维化后期比ECM生成增多对肝纤维化形成的意义更为突出。ECM降解有赖于基质金属蛋白酶(MMPs), 而基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)可抑制MMPs的活性, TIMPs与MMPs比例失衡对ECM降解和肝纤维化发生发展有着重要的作用^[19]。H₂S能够调节TIMPs与MMPs的比例, 他可使高肺血流肺动脉高压大鼠肺动脉MMP-13及TIMP-1的表达增多, 同时以MMP-13/TIMP-1比值升高更加明显, 而使肺动脉I、III型胶原的降解增加^[20]。

综上所述, H₂S可能通过减少肝细胞的损伤和凋亡而间接抑制HSC的激活, 或者直接抑制HSC增殖, 使I、III型胶原的合成来源减少; 亦通过增加I、III型胶原的降解, 使ECM的沉积减少。我们的研究表明, H₂S能够减少肝内I、III型胶原表达, 延缓肝纤维化的进程, 这可能会为防治肝纤维化及肝纤维化的研究提供理论依据。

4 参考文献

1 Shi YX, Chen Y, Zhu YZ, Huang GY, Moore PK, Huang SH, Yao T, Zhu YC. Chronic sodium hydrosulfide treatment decreases medial thickening of intramyocardial coronary arterioles, interstitial fibrosis, and ROS production in spontaneously hy-

pertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2093-H2100 [PMID: 17630351 DOI: 10.1152/ajpheart.00088.2007]

2 Wang T, Wang L, Zaidi SR, Sammani S, Siegler J, Moreno-Vinasco L, Mathew B, Natarajan V, Garcia JG. Hydrogen sulfide attenuates particulate matter-induced human lung endothelial barrier disruption via combined reactive oxygen species scavenging and Akt activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47: 491-496 [PMID: 22592920 DOI: 10.1165/rcmb.2011-0248OC]

3 Hu LF, Lu M, Tiong CX, Dawe GS, Hu G, Bian JS. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging Cell* 2010; 9: 135-146 [PMID: 20041858 DOI: 10.1111/j.1474-9726.2009.00543.x]

4 Hunter JP, Hosgood SA, Patel M, Rose R, Read K, Nicholson ML. Effects of hydrogen sulphide in an experimental model of renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2012; 99: 1665-1671 [PMID: 23132416 DOI: 10.1002/bjs.8956]

5 张宁, 郑勇, 王于理, 李睿, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵瑾, 李洪安. 内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 307-311

6 陈卫刚, 郑勇, 宋丽秀, 刘维国, 李文娟, 刘清华, 张宁, 齐翠花. 内源性H₂S对大鼠实验性肝硬化门脉高压的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 467-471

7 Fang HL, Lai JJ, Lin WL, Lin WC. A fermented substance from *Aspergillus phoenicis* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 1154-1161 [PMID: 17485851 DOI: 10.1271/bbb.60604]

8 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329

9 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 327-328

10 Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Ann Hepatol* 2009; 8: 283-291 [PMID: 20009126]

11 Kabil O, Vitvitsky V, Xie P, Banerjee R. The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 363-372 [PMID: 21254839 DOI: 10.1089/ars.2010.3781]

12 李文娟, 郑勇, 陈卫刚, 刘清华, 张宁, 宋丽秀, 刘维国. 内源性硫化氢对实验性肝硬化门静脉高压调节作用. *中华实用诊断与治疗杂志* 2010; 24: 429-432

13 Gäbele E, Brenner DA, Rippe RA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front Biosci* 2003; 8: d69-d77 [PMID: 12456323 DOI: 10.2741/887]

14 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46: 443-446 [PMID: 10716665 DOI: 10.1136/gut.46.4.443]

15 刘浩, 郑勇, 陈卫刚, 赵瑾, 李睿, 张宁, 刘芳, 阎继攀. 内源性硫化氢对肝硬化大鼠肝细胞凋亡的影响. *世界*

- 华人消化杂志 2012; 20: 670-674
- 16 康凯, 姜洪池, 赵鸣雁, 孙学英, 潘尚哈. 胱硫醚- γ -裂解酶/硫化氢系统在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的保护作用. 中华外科杂志 2010; 48: 924-928
- 17 阎继攀, 郑勇, 刘浩, 李睿, 张宁, 齐翠花, 宋丽秀, 陈卫刚. 实验性肝硬化大鼠肝组织中CSE和Ki-67的表达及其意义. 胃肠病学和肝病学杂志 2012; 21: 232-235
- 18 阳丹才让, 邓勇, 任利, 王聪, 樊海宁. 硫化氢在大鼠肝星状细胞氧应激中对 α -SMA与细胞周期影响的实验研究. 现代生物医学进展 2010; 10: 2205-2208
- 19 Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515 [PMID: 16489661]
- 20 李晓惠, 杜军保, 唐朝枢. 硫化氢供体对高肺血流性肺动脉高压大鼠肺动脉胶原含量及代谢的影响. 中国药理学通报 2007; 23: 760-764

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.

大鼠枯否细胞的分离、鉴定以及LPS刺激诱导TNF- α 的表达

叶长根, 梁冬雨, 赵亮, 于芳苹, 孙水林, 张吉翔, 刘亮明

叶长根, 梁冬雨, 赵亮, 于芳苹, 刘亮明, 上海交通大学附属
第一人民医院松江分院 上海市 201600
叶长根, 孙水林, 张吉翔, 南昌大学第二附属医院 江西省南
昌市 330000
叶长根, 硕士, 主要从事肝衰竭和肝损伤方面的研究。
国家自然科学基金资助项目, Nos. 81070357, 30660066
作者贡献分布: 研究经费、实验设计与论文修改由刘亮明负责;
叶长根负责实验研究与论文撰写; 梁冬雨、赵亮、于芳苹及孙
水林参与实验研究; 张吉翔负责实验质量控制。
通讯作者: 刘亮明, 副教授, 201600, 上海市松江区中山中路746
号, 上海交通大学附属第一人民医院松江分院肝病科。
liuliangming@hotmail.com
电话: 021-67720053
收稿日期: 2012-10-29 修回日期: 2013-01-10
接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Rat Kupffer cells: Isolation, identification and LPS-stimulated TNF- α expression and secretion

Chang-Gen Ye, Dong-Yu Liang, Liang Zhao,
Fang-Ping Yu, Shui-Lin Sun, Ji-Xiang Zhang,
Liang-Ming Liu

Chang-Gen Ye, Dong-Yu Liang, Liang Zhao, Fang-Ping
Yu, Liang-Ming Liu, Songjiang Branch Hospital of Shang-
hai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University,
Shanghai 201600, China
Chang-Gen Ye, Shui-Lin Sun, Ji-Xiang Zhang, Second
Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang
330006, Jingxi Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of
China, Nos. 81070357 and 30660066
Correspondence to: Liang-Ming Liu, Associate Professor,
Department of Hepatology, Songjiang Branch Hospital of
Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong Uni-
versity, 746 Zhongshan Middle Road, Songjiang District,
Shanghai 201600, China. liuliangming@hotmail.com
Received: 2012-10-29 Revised: 2013-01-10
Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To isolate, culture and identify rat Kupffer cells, and to investigate the effect of LPS on TNF- α expression and secretion in rat Kupffer cells.

METHODS: Rat liver Kupffer cells (KCs) were isolated and purified by means of in situ perfusion, density gradient centrifugation and early

medium change. Isolated cells were identified by ink phagocytosis and ED2 staining test. The expression and secretion of TNF- α was detected by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: Rat liver KCs were successfully isolated, purified, and confirmed by ink phagocytosis and ED2 staining test. Compared with non-stimulated KCs, LPS-stimulated cells had a significantly higher level of TNF- α mRNA expression (1.10 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.01 , $P < 0.001$). TNF- α protein levels in cell supernatants were also significantly increased in LPS-stimulated cells than in non-stimulated cells (487.10 pg/mL ± 5.56 pg/mL vs 39.41 pg/mL ± 15.30 pg/mL, $P < 0.001$).

CONCLUSION: Rat KCs have been successfully isolated and purified by means of in situ perfusion and density gradient centrifugation, and LPS can stimulate the expression and secretion of TNF- α .

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Kupffer cells; Culture; LPS; Tumor necrosis factor- α

Ye CG, Liang DY, Zhao L, Yu FP, Sun SL, Zhang JX, Liu LM. Rat Kupffer cells: Isolation, identification and LPS-stimulated TNF- α expression and secretion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 307-312 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/307.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.307>

摘要

目的: 分离、培养和鉴定枯否细胞, 并探讨LPS刺激对细胞肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达和分泌的影响。

方法: 采用在体原位灌注、密度梯度离心和早期细胞换液等方法分离纯化大鼠肝枯否细胞(kupffer cell, KC), 并采用墨汁吞噬和ED2染色试验对分离培养的细胞进行鉴定。TNF- α

■背景资料

枯否细胞(KC)是肝脏最重要的非实质细胞之一, 是机体固有免疫的重要组成部分, 在肝脏炎性反应、缺血再灌注损伤、胆汁淤积性肝损伤等方面发挥着重要作用。分离及培养高纯度的KC可为免疫炎症肝损伤病理生理机制的研究提供实验和物质基础。

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心

■ 相关报道

Kitani等报道, 采用密度梯度离心法可获得较高纯度的KC.

表达和分泌采用RT-PCR和酶联免疫技术(enzyme-linked immunosorbent, ELISA)检测.

结果: 成功分离和纯化大鼠肝KC, 并经墨汁吞噬和ED2染色试验鉴定证实; LPS刺激KC细胞内TNF- α mRNA的表达较非刺激细胞(PBS处理细胞)显著升高(1.10 ± 0.02 vs 0.09 ± 0.01 , $P < 0.001$). 另外, LPS刺激较非刺激KC培养上清液TNF- α 蛋白的水平也显著升高(487.10 pg/mL \pm 5.56 pg/mL vs 39.41 pg/mL \pm 15.30 pg/mL, $P < 0.001$).

结论: 原位灌注和密度梯度离心法能有效分离纯化大鼠KC, LPS刺激可诱导其表达和分泌大量TNF- α .

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 枯否细胞; 培养; 脂多糖; 肿瘤坏死因子- α

叶长根, 梁冬雨, 赵亮, 于芳苹, 孙水林, 张吉翔, 刘亮明. 大鼠枯否细胞的分离、鉴定以及LPS刺激诱导TNF- α 的表达. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 307-312 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/307.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.307>

0 引言

枯否细胞(kupffer cell, KC)是一种非实质性肝细胞, 其数量约占肝细胞总数的15%和体内组织驻留巨噬细胞总数的80%-90%^[1]. KC被覆于肝窦内壁, 在稳定或生理情况下, 可作为“专业化”的吞噬细胞^[2], 以清除衰老的红细胞、免疫复合物和来自门脉循环的肠源性细菌产物^[1]. 在功能上, KC可作为抗原呈递细胞, 参与肝移植免疫, 并通过可溶性介质的表达和分泌, 在固有免疫和宿主防御反应方面起重要作用^[3]. 近年的研究表明, KC参与了各种炎症性肝病^[4-8]及缺血再灌注肝损伤^[9]的发病过程. 并在胆汁淤积性肝损伤中调节炎性单核吞噬细胞的流入和活化^[10]. 已证实, KC可通过分泌多种前炎细胞因子, 在肝免疫炎症性损伤性疾病(包括急性肝衰竭)的发生发展中起关键作用^[11]. 因此, 本项目拟进行原代大鼠KC的分离、培养和鉴定, 并拟采用LPS刺激, 以观察该细胞对TNF- α 的表达和分泌情况, 以期将来进行急性肝衰竭等肝免疫炎症损伤疾病的病理生理机制研究提供实验和物质基础.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠由上海交通大学附属第一人民医院动物中心提供, 鼠龄5 wk, 体质量

180-200 g. 动物合格证号: SYXK(沪)2009-0086, 清洁级饲养. 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、链霉菌蛋白酶E和DNase I酶购自美国Sigma公司; IV型胶原酶购自美国Invitrogen公司; RPMI 1640培养基和胎牛血清均购自美国Gibco公司; 青链霉素混合液、HBSS液(无Ca²⁺, Mg²⁺)购自德国Hyclone公司; Percoll细胞分离液购自瑞典Pharmacia公司; 抗CD163 mAb(又名ED2)购自美国Santa cruz公司; PCR反应试剂盒购自北京天根公司; Elisa试剂盒购自上海欣博盛公司; 细胞免疫化学试剂盒购自武汉博士德公司.

1.2 方法

1.2.1 动物饲养方法: 实验前, 大鼠置清洁级动物房饲养1 wk, 饲养方法参考文献[12]. 动物自由进食和饮水, 每12 h开灯或关灯. 环境温度: 20 °C -23 °C, 湿度: 40%-80%. 设施内换气次数为8-15次, 噪声<50 dB, 滤过后空气洁净度10 000级. 实验动物的使用符合国家动物保护法. 实验前12 h禁食.

1.2.2 原代枯否细胞分离: 采用文献[13,14]分离培养大鼠肝枯否细胞并稍加改进. 简要操作方法如下: 大鼠采用腹腔内注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉, 同时腹腔注入肝素1 mL. 750 mL/L乙醇浸泡消毒, 开腹并显露门静脉. 结扎肝上下腔静脉后, 室温下经门静脉缓慢注入D-Hanks'液, 并剪破肝下下腔静脉, 让血液和灌注液自行流出. 待肝脏体积膨大各部位颜色逐渐变白后, 改用5%IV型胶原酶消化液(采用HBSS配制)继续灌注消化肝组织. 剪取肝脏, 置IV型胶原酶消化液(含0.1%链霉菌蛋白酶E、0.005%DNase I)中, 小心撕碎肝组织, 200目筛网过滤. 滤液离心后, 沉淀用不连续Percoll密度梯度离心. 小心吸取30%Percoll与60%Percoll液界面间的膜状细胞层. 细胞用HBSS液洗涤后, 加入RPMI 1640培养液(含胎牛血清、青霉素和链霉素)重悬. 培养1-2 h后, 洗去未贴壁细胞, 即可获得纯化KC.

1.2.3 细胞鉴定(墨汁吞噬试验): 在细胞培养液中加入数滴灭菌后的碳素墨水, 6-12 h观察细胞吞噬墨汁的情况^[13].

1.2.4 细胞免疫化学染色: 按试剂盒操作说明书进行. 简要步骤如下: 细胞经福尔马林固定后, 加冰乙酸灭活内源性酶. 采用BSA封闭非特异性结合位点. 随后, 滴加特异性CD163抗体, 室温孵育1-2 h. TBS洗细胞3次后, 加入生物素化的IgG, 继续室温孵育20 min. 细胞经TBS清洗后, 采用BCIP/NBT工作液显色.

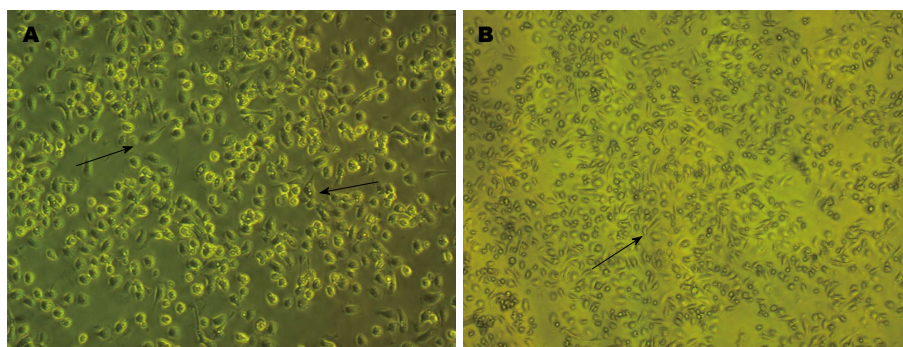


图1 大鼠枯否细胞显微镜下表现: A: 分离后4 h的枯否细胞($\times 200$); B: 分离后4 h的枯否细胞($\times 100$). 图中箭头示枯否细胞伸出伪足.

■创新亮点
采用在体灌注, 一次消化和不连续密度梯度离心方法, 分离获得高纯度的KC; 在此基础上, 进行了LPS刺激实验, 对KC的TNF- α 表达水平进行了检测.

表1 不同基因检测引物序列和产物长度

基因	引物序列5'-3'	产物长度(bp)
TNF- α	上游: GCGTGGAGCTGAGAGATAAC	92
	下游: GGTGTGGGTGAGGAGCACAT	
β -actin	上游: TGTTACAGGAAGTCCCTTGCC	101
	下游: AATGCTATCACCTCCCCTGTG	

1.2.5 细胞LPS刺激方法: 参考文献[12,15]并稍加以改进. 分离纯化的枯否细胞培养4 h后, 洗去未贴壁细胞, 并重新接种于6孔板, 每孔细胞数为 4×10^6 . 24 h后, 用磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)洗细胞3次, 每孔各加入500 μ L无血清培养液, 并按文献[16]的方法, 在各孔细胞中随机加入LPS(终浓度20 μ g/mL, 以PBS配制)或PBS液10 μ L. 每种处置方法各3孔细胞. 处理6 h后分别收集培养上清液及细胞.

1.2.6 RT-PCR分析方法: 用TRIzol处理培养的KC, 以抽提细胞总RNA. 抽提方法按说明书进行. 2 mg总RNA作为模板用于第一链cDNA的合成. 引物设计借助Primer Premier 6.0软件设计, 基因检测引物序列和产物长度见表1. 引物由上海生工生物公司合成. TNF- α 基因的反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 51 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共32个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸10 min. 所得PCR产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳, β -actin作为内参照. 电泳结果经BIO-RAD Quantity-One 4.7成像分析软件检测并计算待测基因灰度相对相应 β -actin的表达量.

1.2.7 酶联免疫技术: 细胞培养上清液TNF- α 测定采用双抗体夹心酶联免疫技术, 按照试剂盒说明书操作进行. 简单操作如下: (1)加入样本或标准品(100 μ L/孔), 36 $^{\circ}$ C 孵育90 min; (2)洗板5次, 加入生物素化抗体工作液(100 μ L/孔), 36 $^{\circ}$ C 孵育60 min; (3)洗板5次, 加入酶结合物工作液(100 μ L/孔), 36 $^{\circ}$ C 避光孵育30 min; (4)洗板5次, 加入显色底物(100 μ L/孔), 36 $^{\circ}$ C 避光孵育15 min;

(5)加入终止液(100 μ L/孔), 混匀后测 A_{450} 值. LPS或PBS处理各取3复孔, 结果取三者均值.

统计学处理 结果用mean \pm SD表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异.

2 结果

2.1 细胞分离培养结果 原代分离培养的KC形态可随培养时间延长, 出现明显变化. 这一点与原代肝实质细胞有明显不同. 初分离的KC镜下呈折光性很强的圆球形, 培养30 min后即逐渐贴壁, 呈扁圆形(图1). 培养4 h的KC已牢固贴壁, 并呈不规则形状, 部分已伸出伪足. 随着培养时间的延长, 细胞伸出的伪足会逐渐增多. 24 h后, 细胞形态将完全舒展, 大小基本一致, 但形态不规则, 多呈星形、多角形或十字型等.

2.2 细胞吞噬墨汁后的表现 由图2可见KC吞噬墨汁后的情况. 图中可见细胞胞浆中含有大量被吞噬的墨汁, 将细胞核衬托得更加清晰. 这表明我们分离的KC存在正常的吞噬能力.

2.3 ED2染色结果 图3为KC免疫细胞化学染色结果. 图中可见许多细胞被染成了黄褐色. 由于大部分KC表达CD163, 经ED2染色后, 细胞可被染成黄褐色. 通过该项染色方法, 可十分准确地将KC鉴定出来. 该结果提示我们已成功分离出了原代KC. 通过本染色技术, 也可对KC的纯度进行准确评估. 在本项实验中, 我们分离的KC纯度均超过90%. 这表明, 采用原位灌注加密度梯度离心的方法, 不仅简便而且十分高效的KC分离方法.

应用要点

可应用于肝组织免疫炎症损伤及肝纤维化机制的研究等方面。

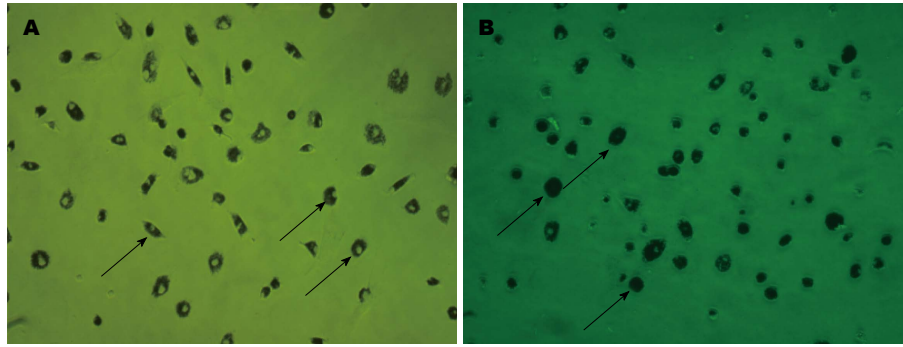


图 2 枯否细胞吞噬墨汁后的表现。A: 枯否细胞吞噬墨汁4 h后的表现($\times 200$); B: 枯否细胞吞噬墨汁6 h后的表现($\times 200$)。图中箭头示枯否细胞吞噬了大量墨汁。

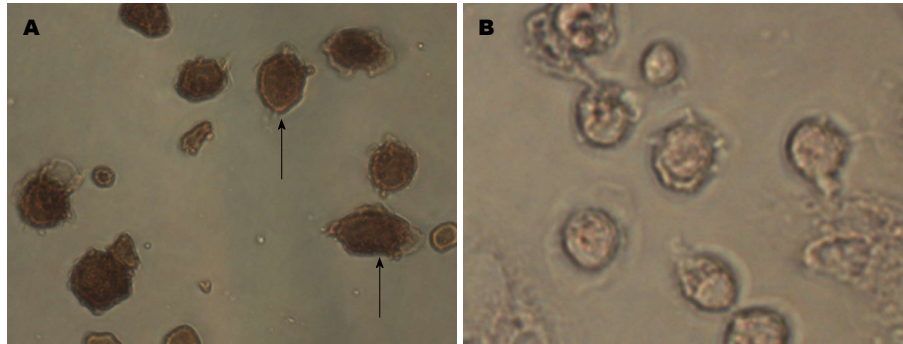


图 3 KC免疫细胞化学染色表现(ED2染色)。A: ED2染色($\times 400$), 阳性细胞被染成黄褐色(如箭头所示); B: 阴性对照($\times 400$)。

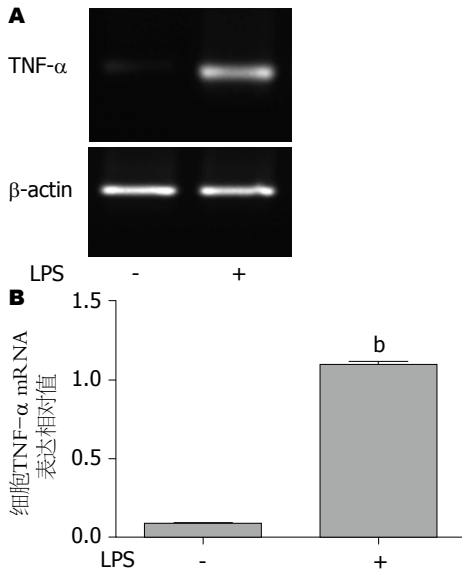


图 4 枯否细胞TNF- α mRNA表达情况。A: RT-PCR凝胶电泳图; B: TNF- α mRNA相对表达水平, $^b P < 0.01$ 。

2.4 KC前炎细胞因子TNF- α mRNA的表达情况
大鼠枯否细胞前炎细胞因子TNF- α mRNA表达结果如图4。LPS刺激后, 枯否细胞TNF- α mRNA的表达显著增高。加入LPS或PBS后, 枯否细胞TNF- α mRNA的相对表达量分别为 1.10 ± 0.02 和 0.09 ± 0.01 。经统计学处理, 两组间存在显著统计学差异($P < 0.001$)。这说明, LPS可以诱导枯否细胞TNF- α mRNA表达。

2.5 细胞培养上清液前炎细胞因子TNF- α 蛋白的分泌情况
大鼠KC细胞培养上清液中TNF- α

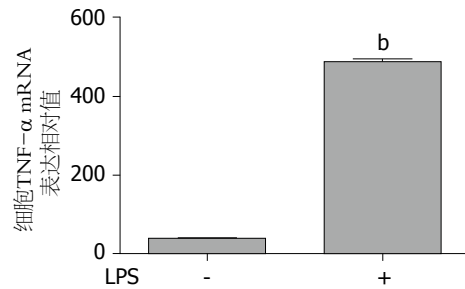


图 5 细胞培养上清液TNF- α 蛋白分泌水平。 $^b P < 0.01$ 。

蛋白分泌水平如图5。LPS或PBS刺激细胞后, 其TNF- α 蛋白的分泌水平分别为 $487.10 \text{ pg/mL} \pm 5.56 \text{ pg/mL}$ 和 $39.41 \text{ pg/mL} \pm 15.30 \text{ pg/mL}$ 。经统计学处理, 两组间存在显著性差异($P < 0.001$)。这表明, LPS可刺激KC表达和分泌TNF- α 。

3 讨论

枯否细胞是机体固有免疫的重要组成部分, 对枯否细胞功能研究显得极其重要。但枯否细胞的提取和培养是一大难题, 提取分离得到高纯度的KC更加困难。目前国内外主要有密度梯度离心法^[17,18]、离心淘析法^[19]及流式细胞术^[20,21]来提取枯否细胞, 但使用得最多的是密度梯度离心法。该方法操作简单、经济实用, 对器械要求也不高。

在本实验中, 我们采用了肝脏在体原位灌注消化法分离KC。该方法需经门静脉插管。在此基础上, 采用PBS反复冲洗肝脏, 以使肝内血液

冲净. 因为肝脏内如残留较多血液, 将影响后面的离心纯化, 并可能影响KC贴壁和吞噬作用的发挥. 用IV型胶原酶灌注时, 速度宜偏慢, 以使IV型胶原酶充分消化肝组织. 将松散的肝组织撕碎后, 可移入培养瓶中振荡消化, 但时间不宜过长, 一般10 min左右即可. 时间过长, 可能造成KC消化损毁. DNA酶I的加入, 主要是防止肝细胞破坏后释放大量DNA, 以免形成黏连、聚集的絮状物, 影响细胞的分离效率和产率. 在密度梯度离心的过程中, 可采用多种浓度的Percoll细胞分离液, 但以30%和60%两种浓度较佳. 密度梯度离心后, 需要十分小心地吸取KC细胞层. 培养过程中, KC在30 min内即开始贴壁, 1 h后KC已贴壁牢靠, 而其他细胞贴壁时间相对较长. 利用该特点, 可以通过换液, 将其他细胞特别是肝细胞去除, 以获得较高纯度的KC. 当然, 在整个过程中, 无菌操作也是十分重要的.

在进行下一步实验之前, 需要对所提取的细胞进行鉴定. 我们采用了两种方法对KC进行鉴定, 包括墨汁吞噬试验和ED2染色试验^[22]. ED2染色对KC的鉴别具有特异性. ED2(又称CD163)是单核吞噬细胞系统细胞膜上的一种跨膜糖蛋白, 其在细胞内的阳性表达是巨噬细胞活化的重要标志^[23], 而肝内其他实质和非实质细胞均不表达CD163分子. 因此, ED2染色后, KC呈现阳性反应, 而其他细胞均呈阴性反应, 从而能十分有效地将KC与肝内其他细胞区分出来. 墨汁吞噬试验主要反映的是KC的吞噬功能. KC是机体内重要的吞噬细胞, 具有吞噬多种异物包括墨汁中的炭素的能力. 上述两项试验证实, 我们已获得了高纯度且有良好吞噬功能的KC, 这为下一步细胞学研究提供了实验物质基础.

KC是机体固有免疫的重要组成部分, 炎症或损伤性刺激, 特别是来自肠道内的细菌代谢产物LPS, 可激活KC并使其分泌大量生物活性分子^[24-26]. 在本项研究中, 我们发现, LPS可刺激KC表达和分泌TNF- α . 已知, TNF- α 是KC激活后产生并分泌的最重要的前炎细胞因子之一^[3]. TNF- α 可诱导肝细胞凋亡和坏死, 并促进PMNs等炎症细胞在炎症损伤部位聚集. 在肝损伤动物模型中, TNF- α 升高水平与肝损伤程度呈密切正相关关系^[27-29]. KC清除后, TNF- α 释放明显减少, 肝细胞损伤显著减轻^[30,31]. 因此, KC在免疫炎症性肝损伤的发病中起着关键作用. 以原代KC作为研究对象, 有望能够更加深入地阐明急

性肝损伤或肝衰竭的病理生理机制. 我们下一阶段将进一步借助原代KC, 研究LPS对TNF- α 产生和分泌的细胞分子通路的影响, 以期最终达到抑制肝内级联性炎症反应和阻断急性肝损伤发生发展的目的.

4 参考文献

- 1 Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev* 2009; 89: 1269-1339 [PMID: 19789382 DOI: 10.1152/physrev.00027.2008]
- 2 Movita D, Kreefft K, Biesta P, van Oudenaren A, Leenen PJ, Janssen HL, Boonstra A. Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2012; 92: 723-733 [PMID: 22685319 DOI: 10.1189/jlb.1111566]
- 3 Huang HF, Zeng Z, Chen MQ. Roles of Kupffer cells in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 1251-1257 [PMID: 22440189]
- 4 Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7413-7420 [PMID: 17167827]
- 5 Roberts RA, Ganey PE, Ju C, Kamendulis LM, Rusyn I, Klaunig JE. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Sci* 2007; 96: 2-15 [PMID: 17122412 DOI: 10.1093/toxsci/klf173]
- 6 Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 2002; 65: 166-176 [PMID: 11812920 DOI: 10.1093/toxsci/65.2.166]
- 7 Duwaerts CC, Gehring S, Cheng CW, van Rooijen N, Gregory SH. Contrasting responses of Kupffer cells and inflammatory mononuclear phagocytes to biliary obstruction in a mouse model of cholestatic liver injury. *Liver Int* 2013; 33: 255-265 [PMID: 23240869 DOI: 10.1111/liv.12048]
- 8 Chatterjee S, Ganini D, Tokar EJ, Kumar A, Das S, Corbett J, Kadiiska MB, Waalkes MP, Diehl AM, Mason RP. Leptin is key to peroxynitrite-mediated oxidative stress and Kupffer cell activation in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2012 Dec 1. [Epub ahead of print] [PMID: 23207144 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.035]
- 9 Kitagawa T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Nagino M. Protective effects of branched-chain amino acids on hepatic ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats: a direct attenuation of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012 Dec 28. [Epub ahead of print] [PMID: 23275614 DOI: 10.1152/ajpgi.00391.2012]
- 10 Lotowska JM, Sobaniec-Lotowska ME, Lebensztejn DM. The role of Kupffer cells in the morphogenesis of nonalcoholic steatohepatitis - ultrastructural findings. The first report in pediatric patients. *Scand J Gastroenterol* 2012 Dec 27. [Epub ahead of print] [PMID: 23268566 DOI: 10.3109/00365521.2012.746390]
- 11 Yang Q, Shi Y, He J, Chen Z. The evolving story of macrophages in acute liver failure. *Immunol Lett* 2012; 147: 1-9 [PMID: 22820147 DOI: 10.1016/j.imlet.2012.07.002]
- 12 Liu C, Tao Q, Sun M, Wu JZ, Yang W, Jian P, Peng J, Hu Y, Liu C, Liu P. Kupffer cells are associated

■名词解释

固有免疫: 又称非特异性免疫或天然免疫, 是生物体在长期种系进化过程中形成的一系列防御机制. 固有免疫在个体出生时就具备, 可产生非特异抗感染免疫和清除体内损伤衰老或畸变的细胞, 并对特异性免疫应答过程也起重要作用; 枯否细胞(KC): 固定于肝血窦内的一群巨噬细胞, 在肝固有免疫应答中起关键作用.

同行评价

本文对研究肝脏免疫及肝纤维化等有一定技术参考价值。

- with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest* 2010; 90: 1805-1816 [PMID: 20921949 DOI: 10.1038/labinvest.2010.123]
- 13 曾仲, 黄汉飞, 宋飞, 段键. 体外灌注法分离大鼠肝脏 Kupffer 细胞及原代培养. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2550-2554
 - 14 Kitani H, Takenouchi T, Sato M, Yoshioka M, Yamanaka N. A simple and efficient method to isolate macrophages from mixed primary cultures of adult liver cells. *J Vis Exp* 2011; 24: 2757 [PMID: 21654622]
 - 15 张磊, 黄成, 李俊, 吕雄文, 朱鹏里, 王建青, 李增, 贺晓昕. 大鼠肝星状细胞和枯否细胞的分离与培养方法. *安徽医科大学学报* 2007; 42: 692-695
 - 16 贡克明, 韩德五, 许瑞玲, 赵元昌. LPS 对体外枯否细胞吞噬功能的影响. *中国病理生理杂志* 2003; 19: 795-798
 - 17 Liu H, Cao H, Wu ZY. Isolation of Kupffer cells and their suppressive effects on T lymphocyte growth in rat orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3133-3136 [PMID: 17589933]
 - 18 Hirsch J, Hansen KC, Choi S, Noh J, Hirose R, Roberts JP, Matthay MA, Burlingame AL, Maher JJ, Niemann CU. Warm ischemia-induced alterations in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffer cells in rats. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 979-986 [PMID: 16500929 DOI: 10.1074/mcp.M500320-MCP200]
 - 19 Murthi P, Kalionis B, Ghabrial H, Dunlop ME, Smallwood RA, Sewell RB. Kupffer cell function during the erythrocytic stage of malaria. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 313-318 [PMID: 16460493 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04192.x]
 - 20 Tomiyama K, Ikeda A, Ueki S, Nakao A, Stolz DB, Koike Y, Afrazi A, Gandhi C, Tokita D, Geller DA, Murase N. Inhibition of Kupffer cell-mediated early proinflammatory response with carbon monoxide in transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology* 2008; 48: 1608-1620 [PMID: 18972563 DOI: 10.1002/hep.22482]
 - 21 You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology* 2008; 48: 978-990 [PMID: 18712788 DOI: 10.1002/hep.22395]
 - 22 Polfliet MM, Fabriek BO, Daniëls WP, Dijkstra CD, van den Berg TK. The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production. *Immunobiology* 2006; 211: 419-425 [PMID: 16920481 DOI: 10.1016/j.imbio.2006.05.015]
 - 23 崔云, 张育才. 可溶性 CD163 与严重感染及脓毒症的关系研究进展. *中国小儿急救医学* 2011; 18: 175-177
 - 24 Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Krux F, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology* 2010; 129: 363-374 [PMID: 19922426 DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03179.x]
 - 25 Seki E, Tsutsui H, Nakano H, Tsuji N, Hoshino K, Adachi O, Adachi K, Futatsugi S, Kuida K, Takeuchi O, Okamura H, Fujimoto J, Akira S, Nakanishi K. Lipopolysaccharide-induced IL-18 secretion from murine Kupffer cells independently of myeloid differentiation factor 88 that is critically involved in induction of production of IL-12 and IL-1beta. *J Immunol* 2001; 166: 2651-2657 [PMID: 11160328]
 - 26 Kinoshita M, Uchida T, Sato A, Nakashima M, Nakashima H, Shono S, Habu Y, Miyazaki H, Hiroi S, Seki S. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol* 2010; 53: 903-910 [PMID: 20739085 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.04.037]
 - 27 Cazanave S, Vadrot N, Tinel M, Berson A, Lettèron P, Larosche I, Descatoire V, Feldmann G, Robin MA, Pessayre D. Ibuprofen administration attenuates serum TNF-alpha levels, hepatic glutathione depletion, hepatic apoptosis and mouse mortality after Fas stimulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 231: 336-343 [PMID: 18572215 DOI: 10.1016/j.taap.2008.05.010]
 - 28 Eipel C, Kidess E, Abshagen K, Leminh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoprotease protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 406-413 [PMID: 17420780 DOI: 10.1038/sj.bjp.0707230]
 - 29 Langdale LA, Hoagland V, Benz W, Riehle KJ, Campbell JS, Liggitt DH, Fausto N. Suppressor of cytokine signaling expression with increasing severity of murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Hepatol* 2008; 49: 198-206 [PMID: 18471922 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.03.014]
 - 30 Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfusion rat liver. *Hepatology* 1997; 26: 113-120 [PMID: 9214459 DOI: 10.1002/hep.510260115]
 - 31 Owumi SE, Corthals SM, Uwaifo AO, Kamendulis LM, Klaunig JE. Depletion of Kupffer cells modulates ethanol-induced hepatocyte DNA synthesis in C57Bl/6 mice. *Environ Toxicol* 2012 Sep 20. [Epub ahead of print][PMID: 22996800]

编辑 田滢 电编 闫晋利



1,25(OH)₂D₃在实验性溃疡性结肠炎中的作用机制

李月芹, 叶建新, 邹玲婷, 张光波, 高楠, 陈卫昌

李月芹, 叶建新, 邹玲婷, 张光波, 高楠, 陈卫昌, 苏州大学附属第一医院消化科 江苏省苏州市 215006

李月芹, 硕士, 主要从事消化系疾病的基础与临床研究.

苏州市卫生局科教卫基金资助项目, No. KJXW2011001

作者贡献分布: 本研究由李月芹、叶建新、邹玲婷、张光波、高楠及陈卫昌共同完成.

通讯作者: 陈卫昌, 教授, 博士生导师, 215006, 江苏省苏州市十梓街188号, 苏州大学附属第一医院消化科.

weichangchen@126.com

收稿日期: 2012-12-20 修回日期: 2012-01-13

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Mechanisms underlying therapeutic effects of 1,25(OH)₂D₃ against experimental ulcerative colitis in mice

Yue-Qin Li, Jian-Xin Ye, Ling-Ting Zou,
Guang-Bo Zhang, Nan Gao, Wei-Chang Chen

Yue-Qin Li, Jian-Xin Ye, Ling-Ting Zou, Guang-Bo Zhang, Nan Gao, Wei-Chang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Supported by: the Project of Suzhou City Health Bureau, No. KJXW2011001

Correspondence to: Wei-Chang Chen, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, 188 Shizi Street, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China. weichangchen@126.com

Received: 2012-12-20 Revised: 2012-01-13

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To explore the mechanisms underlying the therapeutic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] against experimental ulcerative colitis (UC).

METHODS: Thirty Balb/c mice were randomly assigned to groups A to E: control group, model group, low-, medium-, and high-dose intervention groups. Groups B-E were given 5% DSS solution for seven days to induce UC, while group A was given equal volume of distilled water. On days 1, 3, 5, and 7, groups C-E were intraperitoneally injected with 50, 100 and 200 ng of 1,25(OH)₂D₃, respectively. Disease activity index (DAI) and histopathological score (HPS) were calculated. The protein expression of interferon-γ (IFN-γ), inter-

leukin (IL)-17 and IL-4 in colonic tissues was measured by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared to the control group, the DAI and HPS were significantly higher in the model group (7.33 ± 1.03 vs 0.33 ± 0.52, 12.00 ± 0.63 vs 0.17 ± 0.41, both *P* < 0.01). Compared to the model group, the DAI (2.83 ± 0.40, 2.83 ± 0.75, 2.33 ± 0.52) and HPS (10.83 ± 0.98, 7.50 ± 0.84, 6.67 ± 0.52) significantly decreased in the three intervention groups (all *P* < 0.01). The expression of IFN-γ and IL-17 was significantly higher in the model group than in the control group (both *P* < 0.01), and was significantly lower in the intervention groups than in the model group (all *P* < 0.01). IL-4 expression was significantly lower in the model group than in the control group (*P* < 0.01), and was significantly higher in the intervention group than in the model group (*P* < 0.01).

CONCLUSION: 1,25(OH)₂D₃ can maintain local immune balance in the colonic mucosa and reduce inflammation in ulcerative colitis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: 1,25-dihydroxyvitamin D₃; Ulcerative colitis; Interferon-γ; Interleukin-17; Interleukin-4

Li YQ, Ye JX, Zou LT, Zhang GB, Gao N, Chen WC. Mechanisms underlying therapeutic effects of 1,25(OH)₂D₃ against experimental ulcerative colitis in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 313-319 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/313.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.313>

摘要

目的: 探讨1,25-二羟维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]在葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)中的作用机制.

方法: 将30只Balb/c小鼠按随机数字表分为A-E组: 对照组、UC组及低、中、高剂量1,25(OH)₂D₃干预组. A组小鼠饮用蒸馏水7 d; B-E组小鼠自由饮用5%DSS溶液7 d以制成UC

■背景资料

1,25-二羟维生素D₃[1,25(OH)₂D₃], 是维生素D的活性形式, 相关研究证实1,25(OH)₂D₃具有调节免疫系统的作用, 认为其可作为一种新型的免疫调节剂, 运用到多种免疫相关性疾病的治疗中. 1,25(OH)₂D₃作为维生素D受体(VDR)的配体发挥生物效应, VDR属于核受体超家族, 免疫系统的大多数细胞类型中都有VDR存在, 尤其是抗原呈递细胞(APC)和T细胞. 本文针对1,25(OH)₂D₃在溃疡性结肠炎中的应用进行了研究.

■同行评议者

杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院

■ 研发前沿

由于多种细胞内均存在特异性维生素D受体(SVDR),因此1,25(OH)₂D₃对免疫系统的影响是多方面的。

模型. 于造模第1、3、5及7天分别给C-E组小鼠以低、中、高剂量1,25(OH)₂D₃(50、100、200 ng/只)腹腔内注射, A-B组予腹腔注射溶药载体无菌大豆油作为对照. 观察指标包括疾病活动指数(disease activity index, DAI)和结肠组织病理学评分(histopathological score, HPS). 于造模第8天, 处死所有小鼠. 应用免疫组织化学方法测定小鼠结肠干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白介素(interleukin, IL)-17和IL-4蛋白水平的表达.

结果: (1)与对照组DAI和HPS相比, 模型组小鼠DAI和HPS明显增高(7.33±1.03 vs 0.33±0.52, 12.00±0.63 vs 0.17±0.41, $P<0.01$); 与模型组相比, 经1,25(OH)₂D₃干预后C-E组DAI(2.83±0.40、2.83±0.75、2.33±0.52)和HPS(10.83±0.98、7.50±0.84、6.67±0.52)均有不同程度的下降($P<0.01$); (2)模型组小鼠结肠IFN- γ (548.00±36.25)和IL-17(121.48±12.34)的表达显著高于对照组IFN- γ (76.68±14.19)和IL-17(31.89±4.19)($P<0.01$), 干预组IFN- γ (252.82±32.06、141.72±21.07、171.70±17.12)和IL-17(76.86±4.48、47.00±6.64、37.54±5.36)的表达明显低于模型组($P<0.01$); 模型组IL-4(49.72±11.08)的表达则显著低于对照组(89.83±6.97)($P<0.01$), 干预组IL-4(127.23±11.04、303.82±78.14、185.31±19.01)的表达明显高于模型组($P<0.01$).

结论: 1,25(OH)₂D₃有助于维持结肠黏膜的局部免疫平衡机制, 减轻溃疡性结肠炎的炎症.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 1,25-二羟维生素D₃; 溃疡性结肠炎; 干扰素- γ ; 白介素17; 白介素4

李月芹, 叶建新, 邹玲婷, 张光波, 高楠, 陈卫昌. 1,25(OH)₂D₃在实验性溃疡性结肠炎中的作用机制. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 313-319 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/313.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.313>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的发病机制尚未完全阐明^[1], 目前认为, 可能与一系列的易感基因、环境因素、感染及免疫系统异常的相互作用有关, 换句话说, 即环境因素作用于遗传易感者, 在肠道菌丛(或者目前尚未明确的特异性微生物)的参与下, 启动肠道免疫及非免疫系统, 而且导致的免疫炎症反应表现为过度亢进

和难于自限^[2]. 而同时, 溃疡性结肠炎的发病率正在上升^[3]. 近年来研究发现, 当1,25-二羟维生素D₃[1,25(OH)₂D₃]缺乏时, Th1细胞活动会增强, 而Th2细胞和调节性T细胞活动减弱, 由此可诱导出Th1优势免疫应答^[4], 从而引起自身免疫性疾病的发生. 已有研究证实1,25(OH)₂D₃具有调节免疫系统的作用, 认为其可作为一种新型的免疫调节剂, 运用到类风湿关节炎、多发性硬化症、2型糖尿病等多种免疫相关性疾病的治疗中^[5-12]. 目前, 1,25(OH)₂D₃在UC中的研究报道较少, 因此本研究探讨1,25(OH)₂D₃在UC模型中可能的免疫作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 30只10-12周龄Balb/c清洁级 δ 小鼠, 体质量25 g±3 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2007-0005]. DSS(MW = 36 000-50 000)购自MP Bio medicals, LLC, 1,25(OH)₂D₃(罗盖全胶囊)为瑞士上海罗氏制药有限公司生产, 0.25 μ g/粒, 将1,25(OH)₂D₃液体稀释于无菌大豆油中, 配成浓度为1 μ g/mL(0.1 mL大豆油中含1,25(OH)₂D₃ 0.1 μ g)成品. Rabbit Anti-IFN gamma(mouse, rat)、Rabbit Anti-IL-17(mouse, rat)和Rabbit Anti-IL-4(mouse, rat)均购自北京博奥森生物技术有限公司; GTVision™抗鼠/兔通用型免疫组织化学检测试剂盒[A: HRP标记聚合物(抗兔/鼠); B: DAB缓冲稀释液; C: DAB原液]由Gene Tech (Shanghai) Company limited提供.

1.2 方法

1.2.1 造模: 按照Cooper的经典方法, 将30只Balb/c小鼠按随机数字表分为A-E组: 对照组、UC组及低、中、高剂量1,25(OH)₂D₃干预组. 除外对照组, 其余组小鼠自由饮用5%DSS溶液连续7 d, 建立小鼠溃疡性结肠炎模型^[13,14]. 相关研究采用1,25(OH)₂D₃隔天应用一次, 剂量为5 μ g/kg^[15,16]. 且已有研究证明, 经腹腔注射或者口服给药方式对疾病指标或相关因子的影响程度相似, 无显著性差异^[17,18]. 因此, 参照Gysemans CA, Fournier C提出的用药剂量和时间, 设定3个剂量组, 于造模第1、3、5及7天分别给3个干预组小鼠以低、中、高剂量1,25(OH)₂D₃(50、100、200 ng/只)腹腔内注射^[15,16], 对照组与模型组予腹腔注射溶药载体无菌大豆油作为对照. 于造模第8天, 处死所有小鼠, 采集小鼠结肠标本备检.

1.2.2 DAI与HPS: 造模过程每日观察小鼠的体质

表 1 5组小鼠的DAI和HPS ($n = 6$, mean \pm SD)

分组	DAI(第7天)	HPS(DC)
对照组	0.33 \pm 0.52	0.17 \pm 0.41
模型组	7.33 \pm 1.03 ^b	12.00 \pm 0.63 ^b
低剂量组	2.83 \pm 0.40 ^d	10.83 \pm 0.98 ^d
中剂量组	2.83 \pm 0.75 ^d	7.50 \pm 0.84 ^d
高剂量组	2.33 \pm 0.52 ^d	6.67 \pm 0.52 ^d

DC: 远端结肠; DAI: 疾病活动指数; HPS: 结肠组织病理学评分。
^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组。

量、大便性状和隐血情况, 计算疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 评分^[14]。每只小鼠在远端结肠、中端结肠和近端结肠各取1块组织标本(2 mm \times 10 mm), 常规石蜡包埋、连续4 μ m 病理切片(HE染色), 光镜下按结肠组织病理学评分(histopathological score, HPS)评分评估UC小鼠的结肠黏膜损伤情况^[14]。

1.2.3 免疫组织化学检测小鼠结肠IFN- γ 、IL-17和IL-4蛋白表达: 采集的小鼠结肠组织经包埋、切片、烤片、脱蜡、水化、高温高压抗原修复后, 按试剂说明书步骤进行染色。用PBS代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性组织作为阳性对照。加一抗工作液50-100 μ L于组织上, 37 $^{\circ}$ C孵育60 min。孵育完毕, 用PBS洗3次, 3 min/次。加A液50-100 μ L, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min。孵育完毕, 用PBS洗3次, 3 min/次。滴加DAB显色, 用蒸馏水冲洗终止显色。复染后, 乙醇由低至高浓度逐级脱水, 再入二甲苯, 封片。镜检, 干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白介素(interleukin, IL)-17和IL-4为胞浆阳性, 应用Image-pro plus 6.0图像分析软件, IFN- γ 、IL-17和IL-4蛋白表达量用累计吸光度(I4)表示。

统计学处理 使用统计软件SPSS17.0, Levene法进行方差齐性检验, 应用方差分析, 组间比较用LSD- t (方差齐)或Tamhane(方差不齐), 各组数据以mean \pm SD表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DAI与HPS 模型组于第5-7天均出现肉眼黏液血便, 体质量下降明显, 而对照组小鼠大便正常, 体质量增加。不同剂量的1,25(OH)₂D₃干预后, 黏液血便、消瘦等症状有不同程度的缓解。对各组小鼠进行DAI定量评分, 模型组较对照组明显升高($P < 0.01$); 各干预组跟模型组相比差异均

有统计学意义($P < 0.01$, 表1)。模型组4只小鼠结肠黏膜可见点状出血灶, 但均未见明显糜烂、溃疡, 2只小鼠黏膜未见明显异常。其余组小鼠结肠黏膜无明显异常。与对照组相比, 模型组小鼠光镜下全结肠黏膜出现多灶浅溃疡, 大部分隐窝被完全破坏, 少数残留腺体排列紊乱, 杯状细胞明显减少; 黏膜和黏膜下层广泛存在炎性细胞浸润。各干预组小鼠结肠黏膜较完整, 隐窝结构基本正常, 炎性细胞少量浸润。HPS评分显示模型组明显高于对照组($P < 0.01$); 各干预组较模型组均有显著下降($P < 0.01$, 表1, 图1)。

2.2 小鼠结肠IFN- γ 、IL-17和IL-4的蛋白表达变化 对照组小鼠结肠结构完整; 上皮及肠腺中可观察到IFN- γ 棕黄色阳性颗粒, 免疫反应物均匀分布于胞浆中, 检测IFN- γ 在小鼠结肠中的表达为76.68 \pm 14.19; 上皮及肠腺中可观察到IL-17少量棕色阳性颗粒, 免疫反应物散在分布于胞浆中, 表达量为31.89 \pm 4.19; 上皮及肠腺中可观察到IL-4棕黄色阳性颗粒, 免疫反应物均匀分布于胞浆中, 表达量为89.83 \pm 6.97。模型组小鼠结肠大部分隐窝被破坏; IFN- γ 、IL-17的表达量明显升高(548.33 \pm 36.25、121.48 \pm 12.34); IL-4的表达量下降(49.72 \pm 11.08)。经1,25(OH)₂D₃治疗后, 干预组小鼠结肠黏膜基本完整; IFN- γ 的表达量显著下降(252.82 \pm 32.06、141.72 \pm 21.07、171.70 \pm 17.12); IL-17的表达量亦下降(76.86 \pm 4.48、47.00 \pm 6.64、37.54 \pm 5.36); IL-4的表达量则显著升高(127.23 \pm 11.04、303.82 \pm 78.14、185.31 \pm 19.01)。这提示UC结肠黏膜中IFN- γ 、IL-17的含量增加, IL-4的含量下降; 1,25(OH)₂D₃干预后, IFN- γ 、IL-17的含量下降, IL-4的含量升高。各组IFN- γ 、IL-17和IL-4的I4值不满足方差齐性, 故采用Tamhane检验(图2)。

3 讨论

在我国, UC是较常见的消化系疾病和慢性腹泻的主要病因, 并且正逐渐引起消化界的高度关注^[1]。继1997年Sartor提出免疫调节异常在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发病中占有中心地位的假说发表并被广泛接受后, 越来越多的学者认为IBD是一种自身免疫性疾病。UC患者体内存在免疫功能紊乱, 经1,25(OH)₂D₃治疗后T淋巴细胞在植物凝集素的刺激下, 增殖明显低于正常对照组, 并呈剂量依赖性特点^[19]。IBD的发病过程中, 1,25(OH)₂D₃的缺乏较为常见^[20,21]。Cantorna等^[22]亦报道了维生

■ 相关报道

大多数实验表明, 1,25(OH)₂D₃可以抑制T细胞向Th1及Th17分化, 促进及调节调节性T细胞(Treg)向Th2分化。

■应用要点

对1,25(OH)₂D₃与自身免疫性疾病的相关性深入研究, 将为从基因水平认识自身免疫性疾病的发病机制提供重要的线索, 并且可为疾病的治疗和预防提供新的途径.

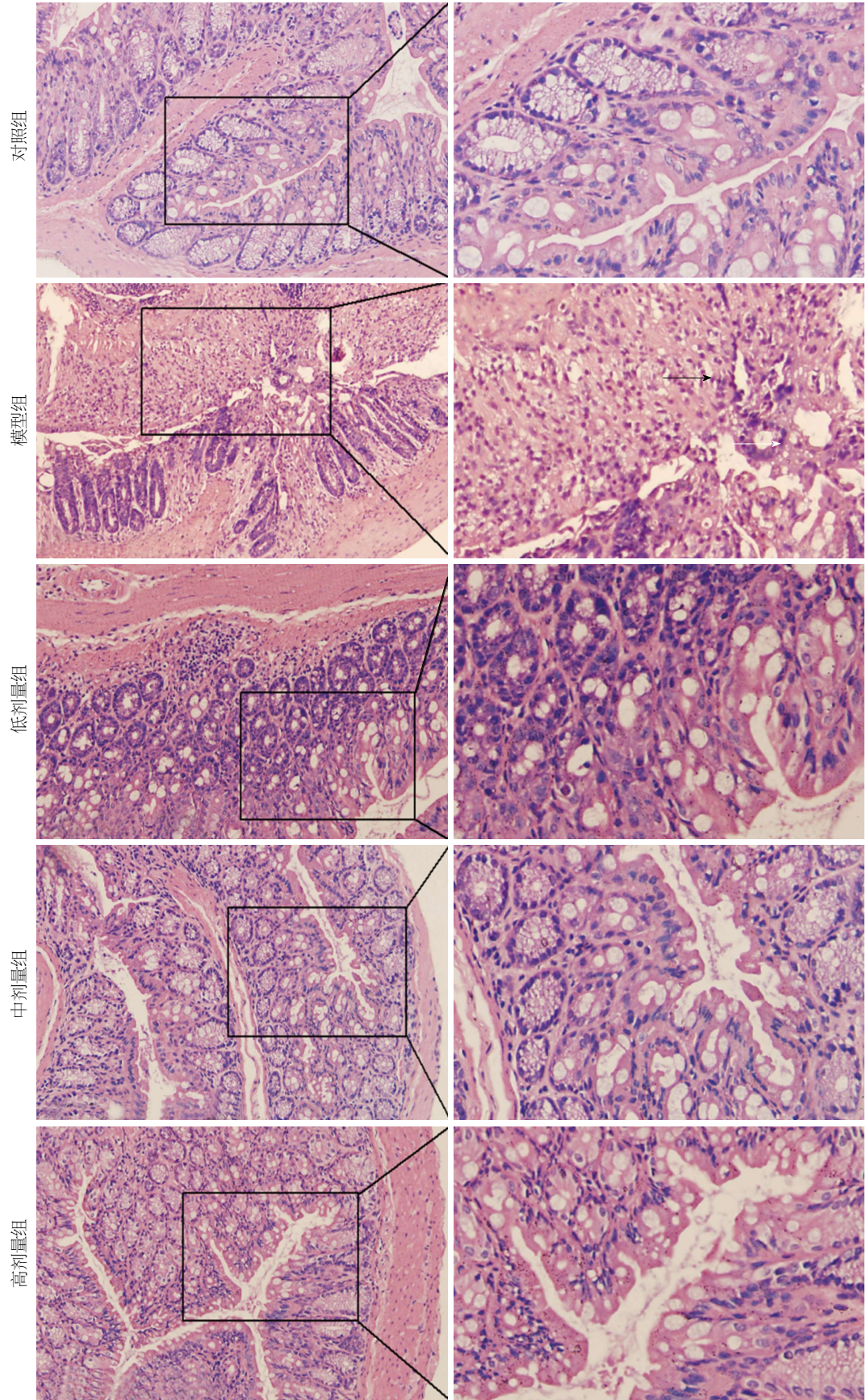
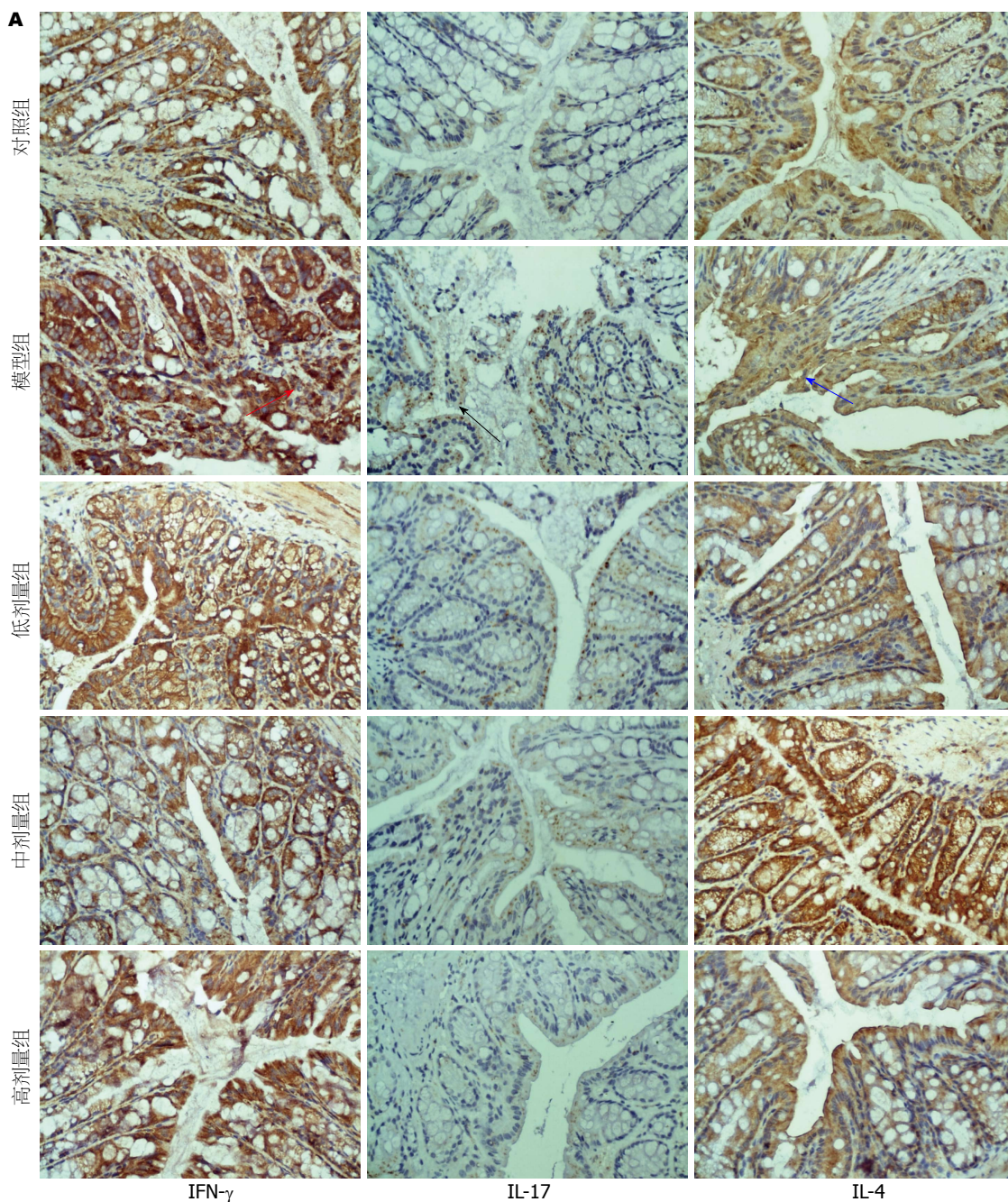


图 1 5组小鼠病理图示(×200). 对照组: 结肠结构: 黏膜层、黏膜下层、肌层、浆膜层. 模型组: 可见大部分隐窝被完全破坏, 部分病灶可有少许腺体残留(白色箭头); 广泛存在炎性细胞浸润(黑色箭头). 低、中、高剂量组: 结肠黏膜基本完整, 隐窝结构正常且清楚, 少量炎性细胞浸润, 未见明显溃疡.



■名词解释
 系统性红斑狼疮(SLE): 是一种具有广泛临床和免疫学异常的自身免疫性疾病, 其病因学尚不明确. 遗传对SLE的重的影响已在大量的流行病学研究中得到验证. 除了遗传易感因素以外, 环境因素也与自身免疫性疾病的发生发展密切相关, 维生素D可能就是一个重要的环境因素. 在光照少的地区, 如北美、北欧地区, 自身免疫性疾病的患病率较高. 另外, 维生素D摄入较少也可能是患病原因. SLE患者体内DCs数量及功能的异常改变在其发病及病情进展中具有很重要的作用.

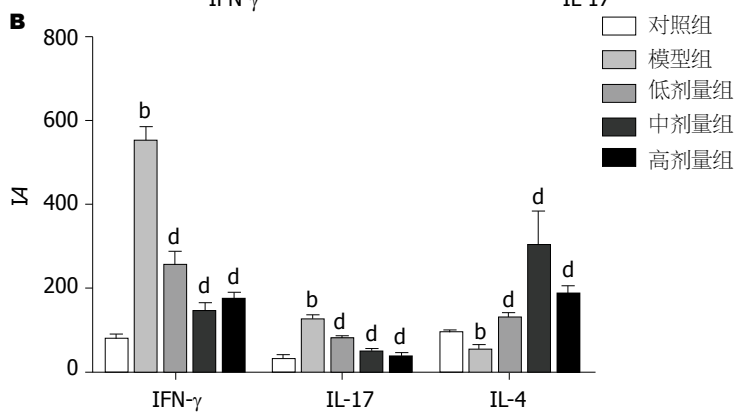


图 2 5周小鼠结肠IFN- γ 、IL-17和IL-4的蛋白表达变化. A: 模型组小鼠结肠结构完整; 上皮及肠腺中均可观察到IFN- γ 棕黄色阳性颗粒, 免疫反应物均匀分布于胞浆中; 上皮及肠腺中可观察到IL-17少量棕色阳性颗粒, 免疫反应物散在分布于胞浆中; 上皮及肠腺中可观察到IL-4棕黄色阳性颗粒, 免疫反应物均匀分布于胞浆中. Model组小鼠结肠可见大部分隐窝被破坏; IFN- γ 的表达量明显升高(红色箭头); IL-17的表达量明显升高(黑色箭头); IL-4的表达量显著下降(蓝色箭头). 三个干预组结肠黏膜基本完整; IFN- γ 、IL-17的表达量显著下降; IL-4的表达量显著升高($\times 400$); B: ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 模型组.

同行评价

本文创新性较强, 结果可靠, 有较高的学术价值。

素D可能的治疗和预防IBD的作用, 敲除IL-10小鼠, 维生素D缺乏会加剧IBD的症状和病情。

由于多种细胞内均存在特异性维生素D受体(specific vitamin D receptor, SVDR), 因此1,25(OH)₂D₃对免疫系统的影响是多方面的。大多数实验表明, 1,25(OH)₂D₃可以抑制T细胞向Th1及Th17分化, 促进及调节调节性T细胞(Treg)向Th2分化^[9]。1,25(OH)₂D₃可抑制白介素(interleukin)-12(IL-12)及Th1分泌的IFN- γ 、IL-5等相关细胞因子, 而IL-12在Th1的分化过程中起重要作用, 因此1,25(OH)₂D₃可以抑制Th1细胞的分化, 但也有研究者认为, 1,25(OH)₂D₃并不能抑制Th1的分化^[23,24], 相关研究表明, 1,25(OH)₂D₃可直接作用于T细胞亚型如Th1细胞、Th17细胞等, 下调促炎因子IFN- γ 、IL-17等, 同时亦能上调Th2型细胞因子IL-4等^[6,25]。本实验用1,25(OH)₂D₃干预UC模型可以缓解UC小鼠的黏液血便、消瘦等症状, 亦能减轻UC小鼠肠黏膜病理学上的炎症改变, 这也提示一定剂量的1,25(OH)₂D₃可能对UC小鼠有治疗效应。

研究证实, IFN- γ 主要由Th1淋巴细胞产生, 他的免疫调节活性强, 是典型的促炎因子。研究表明, Th17细胞产生的IL-17在炎症性疾病和自身免疫性疾病中起着关键的作用^[26-29]。而IL-4主要由活化T细胞合成, 可以抑制细胞因子包括IL-1、IL-6等的产生, UC患者的IL-4 mRNA表达及蛋白分泌明显减少, 提示IL-4与UC的发病有关^[17]。本实验应用免疫组织化学方法测定小鼠病变结肠组织中IFN- γ 、IL-17和IL-4蛋白水平的表达, 研究结果提示, UC小鼠结肠组织IFN- γ 和IL-17蛋白表达量高于对照组, IL-4的蛋白表达量明显下降, 这与王婷等学者的观点是相符的^[2]; 经1,25(OH)₂D₃干预后IFN- γ 和IL-17的表达则有不同程度的下降, 而IL-4的表达明显升高。这提示, 1,25(OH)₂D₃抑制肠道炎症因子IFN- γ 和IL-17的表达, 上调抑炎因子IL-4是成立的。

本实验着手UC小鼠模型的免疫机制方面进行了探讨, 发现UC小鼠IFN- γ 、IL-17的蛋白表达量均显著升高, 而IL-4的蛋白表达量明显下降, 这提示Th1细胞、Th17细胞在UC中可能是活跃的, Th2反应则被抑制。1,25(OH)₂D₃干预后IFN- γ 和IL-17的表达水平明显下降, IL-4的表达水平显著上升, 这表明1,25(OH)₂D₃可以抑制过度的免疫反应, 减少促炎因子的过度表达, 上调抑炎因子, 促进促炎、抑炎因子的平衡, 从而缓解肠道炎症。后续我们将进一步探索

1,25(OH)₂D₃对免疫系统的具体作用机制。

4 参考文献

- 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
- 王婷, 郑长青. 细胞因子在炎症性肠病发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 72-75
- Bernstein CN, Fried M, Krabshuis JH, Cohen H, Eliakim R, Fedail S, Gearry R, Goh KL, Hamid S, Khan AG, LeMair AW, Malfetheriner, Ouyang Q, Rey JF, Sood A, Steinwurz F, Thomsen OO, Thomson A, Watermeyer G, 杨钊斌, 杨川华, 钱本余. 2010年世界胃肠病学组织关于炎症性肠病诊断和治疗的实践指南. 胃肠病学 2010; 15: 548-558
- Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med* (Maywood) 2004; 229: 1136-1142 [PMID: 15564440]
- Baroni E, Biffi M, Benigni F, Monno A, Carlucci D, Carmeliet G, Bouillon R, D'Ambrosio D. VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 250-262 [PMID: 17035339 DOI: 10.1189/jlb.0506322.]
- Jeffery LE, Burke F, Mura M, Zheng Y, Qureshi OS, Hewison M, Walker LS, Lammass DA, Raza K, Sansom DM. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009; 183: 5458-5467 [PMID: 19843932]
- Yan X, Zhao Y, Pan J, Fang K, Wang Y, Li Z, Chang X. Vitamin D-binding protein (group-specific component) has decreased expression in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30: 525-533 [PMID: 22704802]
- Cantorna MT, Zhao J, Yang L. Vitamin D, invariant natural killer T-cells and experimental autoimmune disease. *Proc Nutr Soc* 2012; 71: 62-66 [PMID: 21996367 DOI: 10.1017/S0029665111003193.]
- Correale J, Ysraelit MC, Gaitán MI. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132: 1146-1160 [PMID: 19321461 DOI: 10.1093/brain/awp033.]
- Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002; 8: 174-179 [PMID: 11927275]
- Xuan Y, Zhao HY, Liu JM. Vitamin D and Type 2 Diabetes. *J Diabetes* 2013 Jan 10. [Epub ahead of print] [PMID: 23302127 DOI: 10.1111/1753-0407.12024]
- Cantorna MT. Vitamin D and its role in immunology: multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 60-64 [PMID: 16563470]
- Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 1993; 69: 238-249 [PMID: 8350599]
- 胡仁伟, 欧阳钦, 陈代云. 右旋葡聚糖硫酸钠小鼠溃疡性结肠炎动物模型建立方法探讨. 胃肠病学 2002; 7: 331-334
- Fournier C, Gepner P, Sadouk M, Charreire J. In vivo beneficial effects of cyclosporin A and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Clin Immunol Immun-*

- pathol* 1990; 54: 53-63 [PMID: 2293907]
- 16 Gysemans CA, Cardozo AK, Callewaert H, Giulietti A, Hulshagen L, Bouillon R, Eizirik DL, Mathieu C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology* 2005; 146: 1956-1964 [PMID: 15637289 DOI: 10.1210/en.2004-1322.]
 - 17 Lemire JM, Archer DC. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1991; 87: 1103-1107 [PMID: 1705564 DOI: 10.1172/JCI115072.]
 - 18 刘杉. 1,25(OH)₂D₃干预EAT大鼠Th1细胞活性的研究. 重庆医科大学, 2007
 - 19 Stio M, Bonanomi AG, d'Albasio G, Treves C. Suppressive effect of 1,25(OH)₂D₃ and its analogues EB 1089 and KH 1060 on T lymphocyte proliferation in active ulcerative colitis. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 365-371
 - 20 Ulitsky A, Ananthakrishnan AN, Naik A, Skaros S, Zadornova Y, Binion DG, Issa M. Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2011; 35: 308-316 [PMID: 21527593 DOI: 10.1177/0148607110381267.]
 - 21 Chatu S, Chhaya V, Holmes R, Neild P, Kang JY, Pollok RC, Poullis A. Factors associated with vitamin D deficiency in a multicultural inflammatory bowel disease cohort. *Frontline Gastroenterol* 2013; 4: 51-56 [DOI: 10.1136/flgastro-2012-100231]
 - 22 Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1717S-1720S [PMID: 15585793]
 - 23 Chang JH, Cha HR, Lee DS, Seo KY, Kweon MN. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 2010; 5: e12925 [PMID: 20886077 DOI: 10.1371/journal.pone.0012925]
 - 24 Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, Oliver JR, Bikle DD, Jetten AM, Weaver CT. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the development of effector CD4 T cells. *J Biol Chem* 2011; 286:997-1004 [PMID: 21047796 DOI: 10.1074/jbc.M110.163790]
 - 25 Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Mus AM, van Driel M, Hazes JM, van Leeuwen JP, Lubberts E. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 132-142 [PMID: 20039421 DOI: 10.1002/art.25043.]
 - 26 Seguin P, Béziat JL, Achard R, Momège B. [Clinical and therapeutic aspects of maxillofacial lesions of Paget's disease]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1988; 89: 80-86 [PMID: 3165548 DOI: 10.1128/MCB.05020-11.]
 - 27 Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 23-33 [PMID: 17911375 DOI: 10.1124/jpet.107.127209.]
 - 28 Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007; 8: 345-350 [PMID: 17375096 DOI: 10.1038/ni0407-345.]
 - 29 Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 43-53 [PMID: 20127485 DOI: 10.1007/s00281-009-0189-9.]

编辑 李军亮 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。

NUCB2/nesfatin-1在肥胖大鼠胃肠道组织中的表达

李伟娜, 田字彬, 魏良洲, 孙桂荣, 张翠萍, 葛银林, 徐璐

■背景资料

目前, 肥胖已成为严重影响人类健康的世界公共卫生问题, 各种引起食欲增强或降低的摄食调节肽在肥胖调控过程中具有重要意义. nesfatin-1是新发现的摄食调节肽, 在中枢及外周分布广泛, 具有降低食欲、减少摄食等生理作用.

李伟娜, 田字彬, 魏良洲, 孙桂荣, 张翠萍, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003

葛银林, 徐璐, 青岛大学医学院 山东省青岛市 266021

李伟娜, 硕士, 主要从事消化系胃动力方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81070305, 30470642

山东省自然科学基金资助项目, No. zr2010hm066

作者贡献分布: 李伟娜与田字彬对本文所作贡献均等; 此课题由李伟娜、田字彬、孙桂荣、魏良洲及徐璐设计; 研究过程、数据分析由李伟娜完成; 研究所用工具由葛银林提供; 论文写作由李伟娜、田字彬及张翠萍完成.

通讯作者: 田字彬, 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消化内科.

tianzb@qdmh.qd.sd.cn

电话: 0532-82911302

收稿日期: 2012-12-13 修回日期: 2013-01-11

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Expression of nucleobindin-2/nesfatin-1 in gastrointestinal tissues of high-fat diet-induced obese rats

Wei-Na Li, Zi-Bin Tian, Liang-Zhou Wei, Gui-Rong Sun, Cui-Ping Zhang, Yin-Lin Ge, Luo Xu

Wei-Na Li, Zi-Bin Tian, Liang-Zhou Wei, Gui-Rong Sun, Cui-Ping Zhang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Yin-Lin Ge, Luo Xu, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81070305 and 30470642; the Natural Science Foundation of Shandong Province, No. zr2010hm066

Correspondence to: Zi-Bin Tian, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdmh.qd.sd.cn

Received: 2012-12-13 Revised: 2013-01-11

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of the NUCB2 gene and NUCB2/nesfatin-1 protein in gastrointestinal tissues of obese and normal rats.

METHODS: Thirty male Wistar rats were randomly divided into two groups to be fed a high-fat diet or a normal diet. At the end of eight weeks, gastric, duodenal, small intestinal and colonic tissues were collected to detect the expression of NUCB2 mRNA and NUCB2/nesfa-

tin-1 protein by real-time RT-PCR and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: The expression levels of NUCB2 mRNA in gastric, duodenal, and small intestinal tissues of obese rats were 2.02, 1.49 and 1.23 times higher than those in corresponding tissues of normal controls ($t = 4.256, 3.455, 2.402$; $P = 0.000, 0.002, 0.026$), showing a significant positive correlation with Lee's index ($r = 0.677, 0.561, 0.538$; $P = 0.006, 0.030, 0.039$); however, the expression level of NUCB2 mRNA in colonic tissue showed no significant difference between the two groups ($t = 1.835, P = 0.077$). NUCB2/nesfatin-1 protein was localized in the lower 2/3 of gastric mucosal glands, Brunner's glands and Paneth cells of the duodenum, and Paneth cells of the small intestine. The expression level of NUCB2/nesfatin-1 protein in gastric tissues was significantly increased in obese rats compared with normal controls ($Z = -2.955, P = 0.003$), and was positively correlated with Lee's index ($r = 0.677, P = 0.008$). The expression level of NUCB2/nesfatin-1 protein in Paneth cells of the duodenum and small intestine in obese rats significantly decreased compared with normal controls ($Z = -2.026, -2.648$; $P = 0.043, 0.008$), showing a significant negative correlation with Lee's index ($r = -0.557, -0.617$; $P = 0.031, 0.014$).

CONCLUSION: NUCB2/nesfatin-1 is widely expressed in gastrointestinal tissues of rats, and the expression of NUCB2 mRNA and NUCB2/nesfatin-1 protein is up-regulated in gastric tissues of obese rats, while NUCB2/nesfatin-1 protein is down-regulated in Paneth cells in obese rats.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: NUCB2; Nesfatin-1; Obesity; Gastrointestinal tract; Paneth cells

Li WN, Tian ZB, Wei LZ, Sun GR, Zhang CP, Ge YL, Xu L. Expression of nucleobindin-2/nesfatin-1 in gastrointestinal tissues of high-fat diet-induced obese rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 320-326 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/320.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.320>

■同行评议者

汤华, 研究员, 重庆医科大学感染性疾病分子生物学重点实验室

摘要

目的: 研究肥胖与正常大鼠胃组织NUCB2 mRNA及NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达。

方法: 30只健康♂Wistar大鼠随机均分为高脂高营养性肥胖组和正常对照组, 8 wk后取其胃、十二指肠、小肠、结肠组织, 分别采用实时荧光定量RT-PCR及免疫组织化学的方法检测NUCB2 mRNA及NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达。

结果: (1)肥胖组大鼠胃、十二指肠、小肠NUCB2 mRNA表达量分别是对照组的2.02、1.49、1.23倍($t = 4.256, P = 0.000; t = 3.455, P = 0.002; t = 2.402, P = 0.026$), 且NUCB2 mRNA表达量与大鼠Lee's指数均呈正相关($r = 0.677, P = 0.006; r = 0.561, P = 0.030; r = 0.538, P = 0.039$); 两组大鼠结肠组织NUCB2 mRNA表达差异无统计学意义($t = 1.835, P = 0.077$); (2)两组大鼠胃黏膜中下2/3、十二指肠布氏腺及潘氏细胞、小肠潘氏细胞中均检测到NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达; 肥胖组大鼠胃NUCB2/nesfatin-1蛋白表达较对照组增多($Z = -2.955, P = 0.003$), 表达量与大鼠Lee's指数呈正相关($r = 0.677, P = 0.008$); 肥胖组大鼠十二指肠及小肠潘氏细胞中NUCB2/nesfatin-1蛋白表达较对照组减少($Z = -2.026, P = 0.043; Z = -2.648, P = 0.008$), 表达量与大鼠Lee's指数均呈负相关($r = -0.557, P = 0.031; r = -0.617, P = 0.014$)。

结论: NUCB2/nesfatin-1在大鼠胃肠道中分布广泛, 肥胖大鼠胃组织NUCB2 mRNA及NUCB2/nesfatin-1蛋白表达上调、潘氏细胞NUCB2/nesfatin-1蛋白表达下调。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: NUCB2; Nesfatin-1; 肥胖; 胃肠道; 潘氏细胞

李伟娜, 田宇彬, 魏良洲, 孙桂荣, 张翠萍, 葛银林, 徐珞. NUCB2/nesfatin-1在肥胖大鼠胃肠道组织中的表达. 世界华人消化杂志. 2013; 21(4): 320-326 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/320.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjcd.v21.i4.320>

0 引言

肥胖是由于食欲及胃动力等的异常造成体质量过度增长并引起人体生理、病理改变的慢性代谢性疾病, 严重影响人类健康^[1-4]. 引起食欲改变的摄食调节肽在肥胖调控过程中具有重要意义. nesfatin-1是Oh-I等近年来新发现的来源于核组蛋白(nucleobindin II, 简称NUCB2)

的厌食肽^[5], 在外周, 主要分布于胃、十二指肠、胰腺、小肠、结肠、食管、肝及脂肪组织等^[6-8], 外源性给予nesfatin-1可明显降低食欲、减少摄食、减少皮下脂肪, 抑制胃动力及胃酸分泌^[5,9-12]. 因此推测肥胖与正常大鼠胃肠道中NUCB2/nesfatin-1的表达可能存在差异. 本实验通过分子生物学及免疫组织化学的方法检测正常及肥胖大鼠胃组织NUCB2 mRNA及NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达分布特点, 探讨nesfatin-1对机体体质量及能量平衡的调节, 从而为肥胖的控制和能量失衡相关疾病的诊治提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 逆转录试剂盒(DRR047A)、荧光染料试剂盒(DRR081A)及引物的设计合成(大连Takara公司); 兔抗大鼠nesfatin-1多克隆抗体(H-003-22, Phoenix Pharmaceuticals); 二步法免疫组织化学检测试剂(PV-6001, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 实时荧光定量PCR仪(Rotor Gene 3000, 澳大利亚Corbett Research公司); 紫外线分光光度仪(NanoDrop 2000c, 美国Thermo公司); 凝胶成像分析系统(美国UVP公司); 多功能真彩色细胞图象分析系统(Image-Pro Plus, 美国Media Cybernetics公司); 显微镜(BX51T-PHD-J11型, 日本Olympus公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物准备: 30只健康♂Wistar大鼠(青岛市药品检验所提供), 体质量 $110 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$, 适应性饲养3 d后, 随机均分为正常对照组和高脂饮食诱导的肥胖组, 高脂配方为: 100 g基础饲料中加入全脂奶15 g、猪油5 g、鸡蛋黄50 g、黄豆15 g、鱼肝油10滴^[13], 大鼠在造模期间自由摄食和饮水, 昼夜周期为12/12 h, 饲喂环境温度 $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 $50\% \pm 5\%$. 每周定期观察大鼠进食量、饮水量, 测定体质量及身长, 8 wk末内眦取血检测甘油三酯, 高脂饮食组大鼠体质量高于对照组20%作为肥胖的标准^[14]. 所有实验操作均遵循青岛大学动物饲养道德规范指导方针. 肥胖大鼠造模成功后, 经颈椎脱臼处死后快速取其相对固定部位的胃、十二指肠、小肠、结肠组织, 分为2部分: 装至盛有RNA样本保存液的EP管中, 并存入 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱以备总RNA的提取, 另一部分浸入10%甲醛固定24 h, 常规石蜡包埋、切片, 以备免疫组织化学实验。

1.2.2 实时荧光定量RT-PCR检测NUCB2 mRNA

■研究前沿
nesfatin-1在肥胖大鼠胃肠道表达分布的研究较少, 尤其是在小肠组织潘氏细胞中的表达, 其与正常大鼠胃肠道表达差异的原因及其外周的作用机制有待进一步研究。

■ 相关报道

Li等研究表明在高脂饮食介导的肥胖小鼠胃黏膜中NUCB2 mRNA及NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达显著增加; Ramanjaneya等实验显示肥胖小鼠及人循环中的nesfatin-1水平升高。

表 1 高脂饲料对大鼠体质量、身长、Lee's指数及甘油三酯的影响 (mean ± SD)

分组	体质量(g)	身长(cm)	Lee's指数	甘油三酯(mmol/L)
对照组	346.67 ± 22.17	21.87 ± 0.52	321.19 ± 5.89	0.91 ± 0.14
肥胖组	432.33 ± 25.42 ^b	22.43 ± 0.80 ^a	337.23 ± 10.20 ^b	1.09 ± 0.17 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

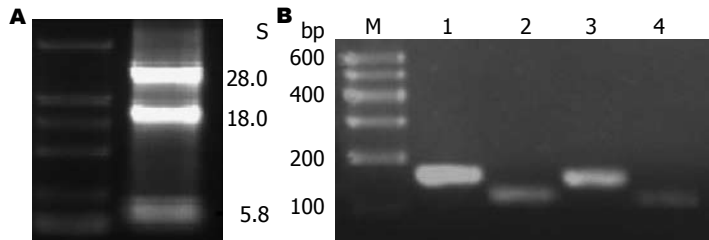


图 1 RNA电泳条带(A)及PCR产物电泳条带(B). M: DNA marker; 1: 正常大鼠胃组织 β -actin; 2: 正常大鼠胃组织NUCB2; 3: 肥胖大鼠胃组织 β -actin; 4: 肥胖大鼠胃组织NUCB2.

的表达: 按照TRIzol常规方法分别从100 mg胃、十二指肠、小肠、结肠组织中提取总RNA, 于紫外分光光度仪测定RNA浓度及纯度, 并于1%的凝胶进行电泳以鉴定RNA的完整性. 取1 μ g总RNA按说明书进行逆转录获取cDNA, 并在Rotor Gene 3000上进行实时荧光定量PCR, 以 β -actin为内参照. 引物序列如下: β -actin: 5'-GGAGAT-TACTGCC TGGCTCCTA-3'(上游); 5'-GACT-CATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'(下游), 扩增片段长度为150 bp; NUCB2: 5'-CAGTTTGAA-CACCTGAACCACCA-3'(上游); 5'-TCATGCC-GAGTCCGGTCATA-3'(下游), 扩增片段长度为113 bp. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s, 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共40个循环. 每个部位取3个样本重复上述步骤. 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示样本中NUCB2 mRNA的相对表达量.

1.2.3 免疫组织化学检测NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达: 大鼠胃、十二指肠、小肠、结肠组织的石蜡切片经脱蜡、水化后, 置于0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中加热进行抗原修复, 经3%过氧化氢孵育以消除内源性的过氧化物酶, 一抗为1:2 000稀释的兔抗大鼠nesfatin-1多克隆抗体, 同时用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照, 用已知的NUCB2/nesfatin-1阳性表达的下丘脑组织做阳性对照. 滴加山羊抗兔二抗, DAB显色后经苏木素复染, 脱水, 中性树脂封片, 于光学显微镜下观察结果. 在组织切片中, NUCB2/nesfatin-1阳性细胞表现为胞浆染为棕黄色. 结果判断标准: 在40 \times 10的显微镜下, 每张切片随机选取5个互不重叠有代表性的视野, 结果由阳性细胞的百分比和染色强度两方

面确定: (1)按Image-Pro Plus图象分析系统计数阳性细胞的百分比记分: 阳性细胞数<5%为0分, 6%-24%为1分, 25%-49%为2分, 50%-74%为3分, $\geq 75\%$ 为4分; (2)按染色强度记分: 未染色或染色不清为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 深棕色或褐色为3分. 每张切片记分等于以上两项记分的乘积: 0分为阴性(-), 1-3分为弱阳性(+), 4-7分为阳性(++), 8-12分为强阳性(+++).

统计学处理 采用SPSS17.0统计学软件进行数据分析. 计量资料均经正态性及方差齐性检验, 采用两个独立样本均数的 t 检验; 计数资料采用等级秩和检验(Mann-Whitney法); NUCB2 mRNA及NUCB2/nesfatin-1蛋白与大鼠Lee's指数的相关性分别采用Pearson及Spearman相关分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 高脂饲料对大鼠各项指标的影响 肥胖模型组大鼠在造模过程中摄食及饮水量较对照组明显增多, 体质量、身长、Lee's指数[(体质量)/ $1/3 \times 10^3$ /身长(cm)]及甘油三酯均高于对照组($t = 9.837, P = 0.000; t = 2.307, P = 0.029; t = 5.276, P = 0.000; t = 3.192, P = 0.003$, 表1).

2.2 NUCB2 mRNA在大鼠胃肠道的表达

2.2.1 总RNA质量的检测: 各样本总RNA的浓度为200-2 000 ng/ μ L, $A_{260/280}$ 的比值为1.8-2.0, 提示RNA样本无蛋白质和DNA污染, 浓度及纯度较理想; 总RNA电泳条带出现核糖体RNA(rRNA)28S、18S及5.8S 3条亮度依次递减的条带, 且28S与18S两条带亮度之比为2:1, 说明提取的RNA较完整(图1A).

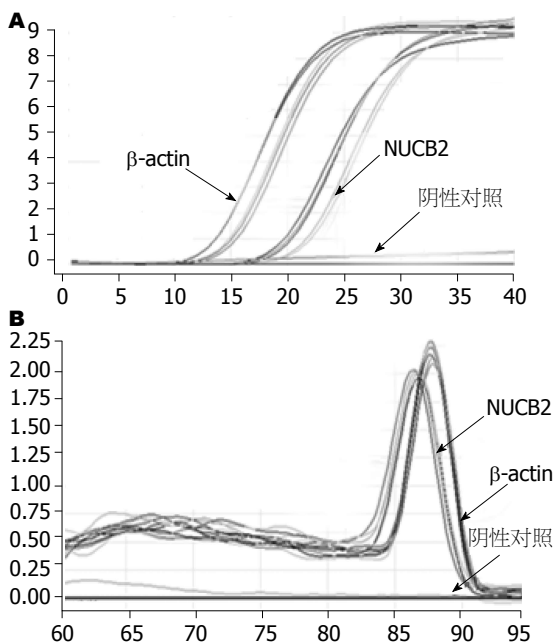


图 2 NUCB2 mRNA实时荧光定量扩增曲线(A)和融解曲线(B).

2.2.2 实时荧光定量PCR检测结果: NUCB2/ β -actin基因表达阳性的标本, 荧光定量扩增呈现典型的S型曲线, 阴性对照标本则呈不规则波浪线(图2A); 每个扩增产物的融解曲线均为单峰, 提示无非特异性扩增及引物二聚体的形成(图2B). 将PCR产物于1.5%凝胶进行电泳, 提示扩增片段长度与设计一致, 各条带清晰无杂带(图1B). 肥胖组大鼠胃、十二指肠、小肠NUCB2 mRNA的表达量均高于对照组($t = 4.256, P = 0.000; t = 3.455, P = 0.002; t = 2.402, P = 0.026$), 分别是对照组的2.02(0.88-3.69)倍、1.49(0.85-2.60)倍、1.23(0.95-1.60)倍; 两组大鼠结肠NUCB2 mRNA表达差异无统计学意义($t = 1.835, P = 0.077$, 图3).

2.2.3 肥胖大鼠胃肠道NUCB2 mRNA表达量与Lee's指数的相关性分析: 以肥胖大鼠Lee's指数为因变量的Pearson相关分析显示, 胃、十二指肠及小肠组织NUCB2 mRNA相对表达量与大鼠Lee's指数均呈正相关($r = 0.677, P = 0.006; r = 0.561, P = 0.030; r = 0.538, P = 0.039$).

2.3 NUCB2/nesfatin-1蛋白在大鼠胃肠道的表达

2.3.1 NUCB2/nesfatin-1蛋白在胃组织中的表达: NUCB2/nesfatin-1免疫阳性细胞分布于大鼠胃黏膜中下2/3, 且肥胖组胃NUCB2/nesfatin-1蛋白表达较对照组增多, 差异有统计学意义($Z = -2.955, P = 0.003$, 图4A, B).

2.3.2 NUCB2/nesfatin-1蛋白在肠道组织中的表达: 在十二指肠, NUCB2/nesfatin-1免疫阳性细

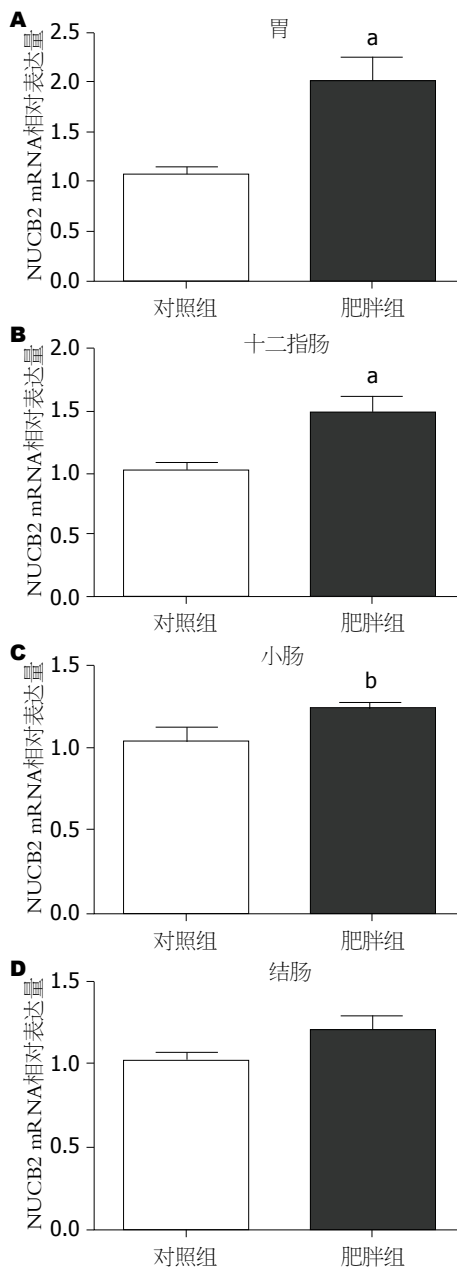


图 3 NUCB2 mRNA在正常及肥胖大鼠胃肠道组织中的表达。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

胞分布于黏膜下布氏腺(图4E), 两组大鼠布氏腺中NUCB2/nesfatin-1蛋白表达差异无统计学意义($Z = -0.727, P = 0.467$); NUCB2/nesfatin-1蛋白表达于十二指肠及小肠腺窝部的潘氏细胞, 并经连续切片HE染色证实, 肥胖大鼠十二指肠及小肠潘氏细胞数量并未减少($t = 0.384, P = 0.704; t = 1.047, P = 0.304$, 图4C, D), 而NUCB2/nesfatin-1蛋白表达量减少($Z = -2.026, P = 0.043; Z = -2.648, P = 0.008$, 图4F-I).

2.3.3 肥胖大鼠胃肠道NUCB2/nesfatin-1蛋白表达量与Lee's指数的相关性分析: 以肥胖大鼠Lee's指数为因变量的Spearman等级相关分析显

■ 创新盘点
本实验首次在十二指肠及小肠潘氏细胞中检测到NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达, 且在肥胖大鼠体内表达下调, 提示潘氏细胞中的NUCB2/nesfatin-1可能参与摄食、能量调节等过程.

应用要点

本文通过研究正常与肥胖大鼠胃肠道nesfatin-1在基因及蛋白水平的表达差异,为肥胖相关的食欲异常、胃肠动力性疾病临床诊治提供理论依据。

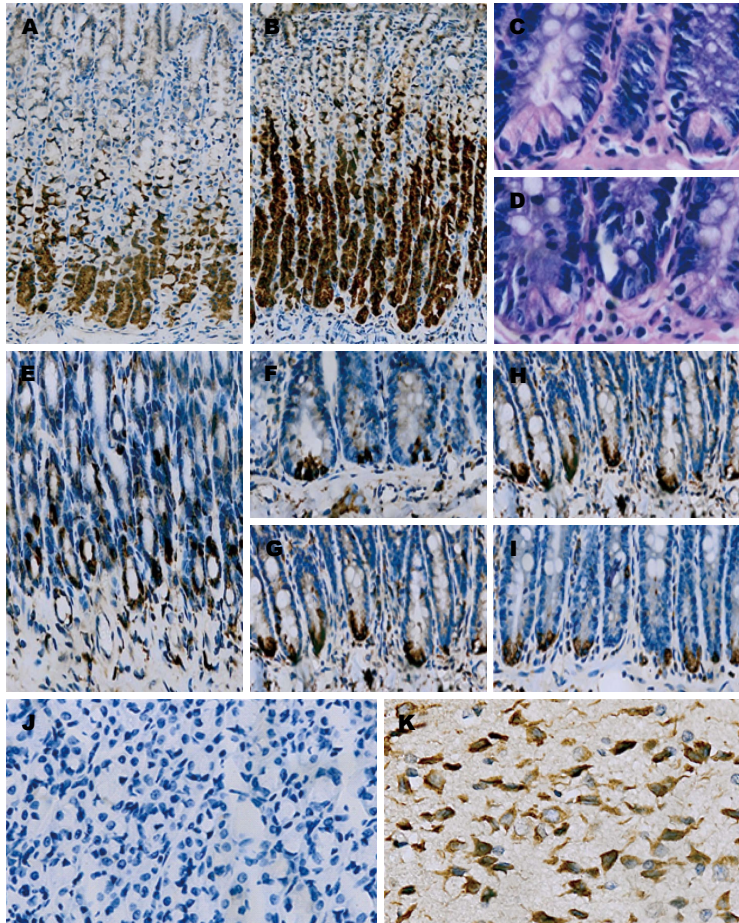


图4 NUCB2/nesfatin-1蛋白在正常及肥胖大鼠胃肠组织中的表达。A: 正常胃($\times 100$); B: 肥胖胃($\times 100$); C: 正常潘氏细胞(HE $\times 400$); D: 肥胖潘氏细胞(HE $\times 400$); E: 布氏腺($\times 200$); F: 正常十二指肠潘氏细胞($\times 200$); G: 肥胖十二指肠潘氏细胞($\times 200$); H: 正常小肠潘氏细胞($\times 200$); I: 肥胖小肠潘氏细胞($\times 200$); J: 结肠阴性对照($\times 200$); K: 下丘脑阳性对照($\times 200$)。

示,胃组织NUCB2/nesfatin-1蛋白表达量与大鼠Lee's指数呈正相关($r = 0.677, P = 0.008$);十二指肠及小肠潘氏细胞中NUCB2/nesfatin-1蛋白表达量与大鼠Lee's指数均呈负相关($r = -0.557, P = 0.031; r = -0.617, P = 0.014$)。

3 讨论

nesfatin-1是新发现的摄食调节肽,由其前体NUCB2在激素原转化酶(prohormone convertases, PC)作用下裂解而来。在中枢,nesfatin-1广泛分布于与摄食调节相关的核团,如室旁核(PVN)、视上核(SON)、弓状核(ARC)及孤束核(NTS)等^[15,16]。在外周,胃组织中主要分布于黏膜分泌腺内分泌细胞,与Ghrelin共存于X/A样细胞,与组氨酸脱羧酶(HDC)、生长抑素共存于胃黏膜腺基底部分;在十二指肠,NUCB2/nesfatin-1免疫活性细胞主要分布于布氏腺;另外,胰腺、小肠、结肠、食管、肝等部位也有NUCB2/nesfatin-1的表达^[6,7]。NUCB2/nesfatin-1在消化系的表达特点提示其可能具有调节摄食、胃肠动力、胃酸分泌及营养物质的消化吸收等作用。

中枢及外周NUCB2/nesfatin-1的表达因代谢状态不同而异:大鼠禁食24 h后,室旁核(PVN)、

视上核(SON)^[17]以及胃黏膜^[6]的NUCB2 mRNA的表达均下降,再进食后表达上调。另外,通过等渗泵持续向大鼠脑室内灌注nesfatin-1,可导致长期的摄食减少、体质量减轻,表明NUCB2/nesfatin-1具有慢性、长期调节摄食的作用^[5]。大鼠脑室内注射nesfatin-1,在引起摄食减少的同时能降低体质量,减少皮下、附睾、肠系膜等部位的脂肪含量^[5]。神经性厌食症患者血浆中的nesfatin-1水平较低,并与BMI呈正相关^[18],提示外周nesfatin-1表达水平受营养状态调节。Ramanjaneya等^[8]也证实,循环中NUCB2/nesfatin-1的水平与BMI呈正相关,禁食24 h后脂肪细胞NUCB2/nesfatin-1表达减少,高脂饮食小鼠的脂肪组织及循环中的NUCB2/nesfatin-1水平升高,提示外周nesfatin-1可能参与体质量的调节。小鼠脑室内注射nesfatin-1,能降低胃窦部的胃动力指数,延长十二指肠第三期收缩的启动时间^[9],nesfatin-1还能抑制正常及肥胖大鼠在体及离体胃平滑肌的收缩,提示其参与胃动力调节^[11,20]。

本实验证实肥胖大鼠胃组织NUCB2 mRNA及NUCB2/nesfatin-1蛋白表达均增加,且与大鼠Lee's指数呈正相关,推测nesfatin-1在胃组织的表达受不同营养状态的调控,高脂饮食介导

的肥胖大鼠营养过度, 由于机体负反馈机制的存在, 使内源性的厌食肽表达上调, 表现出抑制摄食的趋势, 但肥胖大鼠的食欲并无下降, 反而增加, 考虑可能与肥胖大鼠nesfatin-1受体表达下降或敏感性降低有关. 因此, 需进一步研究nesfatin-1的受体及其在中枢与外周的表达特点, 从而明确nesfatin-1的作用机制. 研究显示, 在高脂饮食介导的肥胖小鼠胃黏膜中NUCB2 mRNA及NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达显著增加, 并受mTOR(哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)信号通路调节^[21]. 而血浆中的nesfatin-1可能来源于胃肠道的内分泌细胞, 高脂饮食的人及小鼠循环中的nesfatin-1升高, 且人血浆nesfatin-1水平与BMI呈正相关^[5,8]. 这与肥胖大鼠胃组织中表达上调的趋势相一致, 从而进一步证实胃组织NUCB2/nesfatin-1作为血浆中的nesfatin-1来源的推测. 而NUCB2/nesfatin-1能以双向不饱和方式通过血脑屏障^[22,23], 提示外周及中枢产生释放NUCB2/nesfatin-1可能同时具有降低食欲、抑制摄食从而达到调节体质量及能量平衡的作用.

肥胖大鼠十二指肠及小肠NUCB2 mRNA表达上调, 且与大鼠Lee's指数呈正相关, 而免疫组织化学方法并未检测到布氏腺中NUCB2/nesfatin-1蛋白表达上调, 提示nesfatin-1在基因转录水平的调控与胃组织类似, 经负反馈机制使其表达上调, 而在布氏腺中的蛋白翻译并无明显差异, 推测十二指肠中NUCB2/nesfatin-1蛋白可能参与营养物质吸收、肠黏膜保护等, 但并不直接参与体质量及能量平衡的调节.

潘氏细胞内含有防御素、溶菌酶、IgA等, 具有调节肠道菌群、保护肠黏膜等功能, 而防御素、溶菌酶等的表达与炎症性肠病的发生、发展密切相关; 潘氏细胞颗粒的积聚和释放受禁食及摄食的影响, 禁食后颗粒积聚, 再进食可使其颗粒释放^[24-26]. 肥胖大鼠潘氏细胞中的防御素及溶菌酶在基因水平表达上调, 而受翻译拮抗剂的作用使二者在蛋白水平表达下调, 从而推测潘氏细胞分泌颗粒的异常导致肥胖相关疾病的发生^[27]. 本实验首次在十二指肠及小肠潘氏细胞中检测到NUCB2/nesfatin-1蛋白的表达, 且在肥胖大鼠表达下调, 并与大鼠Lee's指数呈负相关, 提示潘氏细胞中的NUCB2/nesfatin-1可能参与摄食、能量调节等有关, 其详细机制有待进一步研究.

总之, 本实验提示肥胖大鼠外周NUCB2/nesfatin-1表达可能对摄食、能量代谢、胃肠动

力等具有重要调节作用, 为进一步揭示肥胖相关的食欲异常、胃肠动力性疾病及炎症性肠病的发生机制提供了理论依据.

4 参考文献

- 1 Djärv T, Wikman A, Nordenstedt H, Johar A, Lagergren J, Lagergren P. Physical activity, obesity and gastroesophageal reflux disease in the general population. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 3710-3714 [PMID: 22851863 DOI: 10.3748/wjg.v18.i28.371]
- 2 Chin CC, Kuo YH, Yeh CY, Chen JS, Tang R, Changchien CR, Wang JY, Huang WS. Role of body mass index in colon cancer patients in Taiwan. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4191-4198 [PMID: 22919253 DOI: 10.3748/wjg.v18.i31.4191]
- 3 Atabek ME. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in obese children. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4445-4446 [PMID: 22110273 DOI: 10.3748/wjg.v17.i39.4445.]
- 4 Kim MC, Kim CS, Chung TH, Park HO, Yoo CI. Metabolic syndrome, lifestyle risk factors, and distal colon adenoma: a retrospective cohort study. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4031-4037 [PMID: 22046093 DOI: 10.3748/wjg.v17.i35.4031.]
- 5 Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443: 709-712 [PMID: 17036007 DOI: 10.1038/nature05162]
- 6 Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 2009; 150: 232-238 [PMID: 18818289 DOI: 10.1210/en.2008-0747]
- 7 Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1735-1741 [PMID: 20380005 DOI: 10.3748/wjg.v16.i14.1735]
- 8 Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeve HS. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* 2010; 151: 3169-3180 [PMID: 20427481 DOI: 10.1210/en.2009-1358]
- 9 Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009; 150: 662-671 [PMID: 19176321 DOI: 10.1210/en.2008-0598.]
- 10 Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, Ataka K, Tsai M, Koyama K, Sato Y, Kato I, Fujimiya M, Inui A. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport* 2010; 21: 1008-1011 [PMID: 20827224 DOI: 10.1097/WNR.0b013e32833f7b96.]
- 11 王百惠, 田宇彬, 孙桂荣, 徐璐, 李娜, 魏良洲, 孔心涓. Nesfatin-1对大鼠胃平滑肌收缩活动及胃排空的影响. *中华消化杂志* 2012; 32: 417-419
- 12 Xia ZF, Fritze DM, Li JY, Chai B, Zhang C, Zhang

■同行评价
本文的先进性和科学性均好, 结果结论可靠.

- W, Mulholland MW. Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion via a central vagal mechanism in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G570-G577 [PMID: 22723266 DOI: 10.1152/ajpgi.00178.2012.]
- 13 管玉玺, 王天云, 董卫华, 赵长安. 高脂饲料诱发大鼠肥胖模型的实验研究. *现代预防医学* 2008; 35: 3131-3132
- 14 Chandler PC, Viana JB, Oswald KD, Wauford PK, Boggiano MM. Feeding response to melanocortin agonist predicts preference for and obesity from a high-fat diet. *Physiol Behav* 2005; 85: 221-230 [PMID: 15893778]
- 15 Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 2008; 156: 563-579 [PMID: 18761059 DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.054.]
- 16 Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NW, Taché Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 2009; 452: 241-246 [PMID: 19348732 DOI: 10.1016/j.neulet.2009.01.064.]
- 17 Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sed-bazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 2008; 149: 1295-1301 [PMID: 18048495 DOI: 10.1210/en.2007-1276]
- 18 Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, Nakahara T, Ushikai M, Haruta I, Koyama K, Amitani M, Harada T, Yasuhara D, Inui A. Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa. *Peptides* 2011; 32: 150-153 [PMID: 20937336 DOI: 10.1016/j.peptides]
- 19 Tanaka R, Inui A, Asakawa A, Atsuchi K, Ataka K, Fujimiya M. New method of manometric measurement of gastroduodenal motility in conscious mice: effects of ghrelin and Y2 depletion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G1028-G1034 [PMID: 20501433]
- 20 李娜, 田字彬, 孙桂荣, 魏良洲, 徐璐, 王百惠, 孔心涓, 丁雪丽, 崔铭娟. Nesfatin-1对肥胖大鼠胃排空及胃平滑肌条收缩性的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 631-637
- 21 Li Z, Xu G, Li Y, Zhao J, Mulholland MW, Zhang W. mTOR-dependent modulation of gastric nesfatin-1/NUCB2. *Cell Physiol Biochem* 2012; 29: 493-500 [PMID: 22508056 DOI: 10.1159/000338503.]
- 22 Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides* 2007; 28: 2223-2228 [PMID: 17950952 DOI: 10.1016/j.peptides.2007.09.005.]
- 23 Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007; 28: 2372-2381 [PMID: 18006117 DOI: 10.1016/j.peptides.2007.10.008.]
- 24 Thomson AB, Chopra A, Clandinin MT, Freeman H. Recent advances in small bowel diseases: Part I. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 3336-3352 [PMID: 22807604 DOI: 10.3748/wjg.v18.i26.3336.]
- 25 Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 356-368 [PMID: 21423246 DOI: 10.1038/nrmicro2546.]
- 26 Grassia R, Bodini P, Dizioli P, Staiano T, Iiritano E, Bianchi G, Buffoli F. Neuroendocrine carcinomas arising in ulcerative colitis: coincidences or possible correlations? *World J Gastroenterol* 2009; 15: 4193-4195 [PMID: 19725156]
- 27 Hodin CM, Verdam FJ, Grootjans J, Rensen SS, Verheyen FK, Dejong CH, Buurman WA, Greve JW, Lenaerts K. Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *J Pathol* 2011; 225: 276-284 [PMID: 21630271 DOI: 10.1002/path.2917.]

编辑 李军亮 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6448种中文学术期刊参与评价,计算出各刊的最终得分,并将期刊最终得分按照从高到低依次排列,按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围.其中A+(权威期刊)取前5%;A(核心期刊)取前5%-20%;A-(扩展核心期刊)取前20%-30%;B+(准核心期刊)取前30%-50%;B(一般期刊)取前50%-80%;C(较差期刊)为80%-100%。(《世界华人消化杂志》编辑部)

TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义

庞霞, 李晟磊, 赵志华, 张红新, 高冬玲

庞霞, 李晟磊, 赵志华, 张红新, 高冬玲, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市450052

庞霞, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。

河南省自然科学基金资助项目, No. 112300413215

作者贡献分布: 此课题由高冬玲与庞霞设计; 研究过程由高冬玲、庞霞、李晟磊、赵志华及张红新操作完成; 研究所用试剂及分析工具由高冬玲提供; 数据分析由高冬玲与庞霞完成; 本文写作由高冬玲与庞霞完成。

通讯作者: 高冬玲, 主任技师, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学第一附属医院病理科, 河南省肿瘤病理重点实验室. gaodlxq@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-12-18 修回日期: 2013-01-18

接受日期: 2013-01-20 在线出版日期: 2013-02-08

Clinical significance of expression of TGF-β1, TIEG1 and stathmin proteins in esophageal squamous cell carcinoma

Xia Pang, Sheng-Lei Li, Zhi-Hua Zhao, Hong-Xin Zhang, Dong-Ling Gao

Xia Pang, Sheng-Lei Li, Zhi-Hua Zhao, Hong-Xin Zhang, Dong-Ling Gao, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: Natural Science Foundation of Henan Province, No. 112300413215

Correspondence to: Dong-Ling Gao, Chief Technician, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University; Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. gaodlxq@yahoo.com.cn

Received: 2012-12-18 Revised: 2013-01-18

Accepted: 2013-01-20 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To analyze the clinical significance of expression of transforming growth factor-β1 (TGF-β1), transforming growth factor β-inducible early gene 1 (TIEG1) and stathmin in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of TGF-β1, TIEG1 and stathmin in 62 cases of ESCC, 31 cases of tumor-adjacent atypical hyperplasia epithelium and 62 cases of normal esophageal epithelium.

RESULTS: The positive rates of TGF-β1 and TIEG1 proteins in normal esophageal epithelium were significantly higher than those in tumor-adjacent atypical hyperplasia epithelium and ESCC [TGF-β1: 62 (100.0) vs 22 (71.0), 41 (66.1), $P < 0.05$]. The expression of stathmin was also noted in ESCC and tumor-adjacent atypical hyperplasia epithelium, but its expression was not as wide as that of TGF-β1 and TIEG1. In normal esophageal epithelium, the expression of stathmin was not detected. Expression of stathmin in ESCC had a negative correlation with TGF-β1 and TIEG1 expression ($r = -0.609, -0.459$, both $P < 0.05$). The expression of TGF-β1, TIEG1 and stathmin proteins was closely correlated with clinical grade and lymph node metastasis in ESCC (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: TGF-β1 and TIEG1 may bind to stathmin, down-regulate stathmin expression and inhibit the metastasis of ESCC.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Transforming growth factor-β1; Transforming growth factor-β1 inducible early gene 1; Stathmin (OP18); Infiltration; Metastasis; Immunohistochemistry

Pang X, Li SL, Zhao ZH, Zhang HX, Gao DL. Clinical significance of expression of TGF-β1, TIEG1 and stathmin proteins in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 327-331 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/327.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.327>

摘要

目的: 探讨转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、早期基因1(transforming growth factor β-inducible early gene 1, TIEG1)和Stathmin蛋白在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)组织中的表达及临床意义。

方法: 应用免疫组织化学法检测62例ESCC、31例癌旁不典型增生组织及62例正常食管黏膜组织中TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白的

背景资料

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一,我国河南省更为常见。食管癌的发生发展及侵袭转移是一个多因素参与的复杂过程,因此研究食管癌发病及转移机制,并寻找新的治疗靶点具有重要的意义。

同行评议者

樊祥山, 副主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院病理科

■研发前沿

迄今为止,国内外尚未见食管癌中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、TIEG1和Stathmin的研究报道,故研究TGF- $\beta 1$ 、早期基因1(TIEG1)和Stathmin蛋白在食管癌中的表达,并分析三者表达的相关性,以期为食管癌分子诊断及临床治疗提供理论依据。

表达情况。

结果: 正常食管黏膜组织中TGF- $\beta 1$ 和TIEG1蛋白表达的阳性率显著高于非典型增生组织和食管癌组织[TGF- $\beta 1$: 62(100.0%) vs 22(71.0%), 41(66.1%), $P < 0.05$]. 食管鳞癌组织和癌旁不典型增生组织中也检测到Stathmin蛋白表达,但较TGF- $\beta 1$ 和TIEG1表达范围窄。正常食管黏膜组织中未检测到Stathmin的表达。进一步统计分析表明Stathmin与TGF- $\beta 1$ 、TIEG1在食管鳞癌的表达呈负相关[TGF- $\beta 1$: $r = -0.609$, $r = -0.459$; TIEG1: $P < 0.05$]; 高表达Stathmin的病例中TGF- $\beta 1$ 和TIEG1低表达或不表达。统计结果还表明TGF- $\beta 1$ 、TIEG1和Stathmin蛋白表达与癌的临床分级及淋巴结转移密切相关($P < 0.05$)。

结论: TGF- $\beta 1$ 和TIEG1蛋白可能结合Stathmin结合位点,负性调节Stathmin蛋白,抑制食管癌的转移。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 食管肿瘤; 鳞状细胞癌; 转化生长因子 $\beta 1$; 早期基因1; Stathmin(OP18); 浸润; 转移; 免疫组织化学

庞霞, 李晟磊, 赵志华, 张红新, 高冬玲. TGF- $\beta 1$ 、TIEG1和Stathmin蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 327-331 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/327.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.327>

0 引言

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一,食管癌的形成是一个复杂的过程,其发生、发展存在着多种途径,包括细胞的增殖、凋亡的抑制、肿瘤基质和肿瘤周围血管的形成等多个方面,而这些方面又受到多种因素的调控,其中细胞因子对肿瘤的作用越来越受到关注^[1]。目前的研究显示,转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)能够抑制肿瘤细胞的增殖,但又有促进肿瘤生长和浸润的作用^[2]。TIEG1为TGF- β 诱导的早期反应基因,目前研究者认为TIEG1主要的生物学功能是抑制细胞增殖、诱导凋亡,与TGF- β 的诱导相似, TIEG1表达水平的降低与乳腺癌、胃癌和胰腺癌等多种肿瘤的发生、发展有关^[3,4]。Stathmin为一种高度保守的胞质磷酸蛋白,在多种肿瘤细胞中过表达^[5]。另有报道显示, TGF- β 和TIEG1可以下调Stathmin的表达^[6],提示三者肿瘤的发生发展中可能具有极其重

要的内在联系。然而,迄今为止,国内外尚未见食管癌中TGF- $\beta 1$ 、TIEG1和Stathmin的研究报道,本研究通过免疫组织化学技术检测食管癌组织、不典型增生组织和正常食管黏膜组织中TGF- $\beta 1$ 、TIEG1和Stathmin蛋白的表达,并分析三者表达的相关性,以期为食管癌分子诊断及临床治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集河南省安阳市肿瘤医院2006-02-26/2006-03-16食管癌新鲜切除的手术标本62例,其中男36例,女26例,年龄在38-75岁之间,所有患者术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。62例标本分别在无坏死区癌组织、癌旁3 cm以内及远端正常黏膜组织3处取材,经40 g/L甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚度4-6 μm ,分别用于HE和免疫组织化学染色。经HE染色病理组织学证实,癌灶组织均证实为鳞状细胞癌。按WHO分类标准(1996)进行组织学分级:高分化15例,中分化25例,低分化22例。浸润深度:深肌层55例,浅肌层7例。伴淋巴结转移者20例,无淋巴结转移者42例。癌旁组织中31例是不典型增生。远端正常黏膜组织均为正常食管黏膜。鼠抗人单克隆抗体TGF- $\beta 1$ 、Stathmin工作液及S-P免疫组织化学试剂盒和DAB显色剂均购自北京中杉金桥生物技术开发公司;兔抗人多克隆抗体TIEG1购自美国Santa Cruz公司,稀释倍数为1:300。

1.2 方法 采用SP法, DAB显色,苏木素复染。详细步骤严格按S-P试剂盒说明操作,每批染色均用试剂公司提供的TGF- $\beta 1$ 、TIEG1和Stathmin阳性切片作为阳性对照;用PBS代替一抗作为阴性对照。由两位病理医师对食管鳞癌、癌旁不典型增生及正常食管黏膜切片进行观察。每张切片随机取5个($\times 400$)高倍视野,每个视野观察细胞数不少于100个。(1)按切片中TGF- $\beta 1$ 、TIEG1和Stathmin染色程度评分:0分,基本不着色;1分,着色呈浅黄色;2分,着色呈棕黄色;3分,着色呈棕褐色;(2)按TGF- β 、TIEG1和Stathmin阳性细胞数占同类细胞数的百分比, <30%为1分,30%-70%为2分, >70%为3分;(3)阳性结果判断:取(1)、(2)两项评分的乘积作为总积分,0-1分为阴性(-), ≥ 2 分为阳性(+)^[7]。

统计学处理 应用SPSS11.0统计学软件进行数据分析,阳性率的比较采用 χ^2 检验,相关性检验用Spearman相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

■相关报道

TGF- $\beta 1$ 具有双重性,扮演着肿瘤抑制基因和癌基因的双重角色。TIEG1为TGF- β 诱导的早期反应基因,目前研究者认为TIEG1表达水平的降低与乳腺癌、胃癌和胰腺癌等多种肿瘤的发生、发展有关。Stathmin为一种高度保守的胞质磷酸蛋白,在多种肿瘤细胞中过表达。

表 1 食管鳞癌组织、非典型增生及正常黏膜组织中TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白表达 n(%)

组织类型	n	TGF-β1	χ ² 值	P值	TIEG1	χ ² 值	P值	Stathmin	χ ² 值	P值
正常黏膜上皮	62	62(100.0)			62(100.0)			0(0.0)		
非典型增生	31	22(71.0)	35.578	0.000	19(61.3)	32.593	0.000	5(16.1)	45.550	0.000
鳞癌	62	41(66.1)			48(77.4)			27(43.5)		

表 2 食管癌组织中TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白的表达与临床病理学特征的关系 n(%)

病理学指标	n	TGF-β1	χ ² 值	P值	TIEG1	χ ² 值	P值	Stathmin	χ ² 值	P值
组织学分级										
高分化	15	13(86.7)			14(93.3)			4(26.7)		
中分化	25	18(72.0)	7.638	0.022	19(76.0)	15.639	0.000	8(32.0)	8.653	0.013
低分化	22	10(45.5)			8(36.4)			15(68.2)		
浸润深度										
浅层	7	4(57.1)	0.012	0.913	5(71.4)	0.000	1.000	2(28.6)	0.197	0.657
深层	55	37(67.3)			43(78.2)			25(45.5)		
淋巴结转移										
无	42	32(76.2)	4.574	0.032	38(90.5)	10.487	0.001	12(28.6)	10.066	0.002
有	20	9(45.0)			10(50.0)			15(75.0)		

■创新亮点
 本文首次应用免疫组织化学SP法检测62例ESCC、31例癌旁不典型增生组织及62例正常食管黏膜组织中TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白的表达,探讨三者食管癌的发生发展及浸润转移中的作用机制。

2 结果

2.1 TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白在食管上皮不同病变中的表达 TGF-β1和TIEG1蛋白阳性表达主要位于细胞胞质及胞膜上,呈浅黄色至深黄色(图1A-D)。TGF-β1和TIEG1蛋白在正常黏膜组织中棘细胞层表达最强,基底细胞层呈低表达;而在食管癌组织中,TGF-β1和TIEG1蛋白在高分化的癌细胞中着色明显。正常食管组织中TGF-β1和TIEG1蛋白的表达率高于不典型增生和食管癌的表达率,3组间比较,差异均具有统计学意义(均P<0.05,表1)。此外,Stathmin蛋白阳性表达主要位于肿瘤细胞的胞质内,呈棕黄色颗粒(图1E、F)。Stathmin蛋白在食管癌组织中的表达率显著高于不典型增生组织和正常黏膜组织,3组间比较,差异具有统计学意义(P<0.05,表1)。

2.2 TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白表达与食管癌临床病理学特征的关系 利用SPSS10.0软件分析TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白的表达与食管癌临床病理参数之间的关系,结果表明,TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白的表达与食管癌的分化程度及淋巴结转移之间均有显著的相关性(均P<0.05,表2),提示TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白可能与食管癌的发生发展关系密切。

2.3 食管癌组织中TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白表达的相关性 TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白表达的相关性结果显示,高表达Stathmin的病

例中TGF-β1和TIEG1低表达或不表达。Stathmin蛋白表达与TGF-β1及TIEG1蛋白表达呈负相关关系,差异均有统计学意义(P<0.05,表3)。

3 讨论

TGF-β是由2个结构相同或相近多肽生长因子,TGF-β主要通过受体介导的Smad蛋白激活来调控下游基因转录,发挥细胞的增殖和分化及肿瘤发生与进展等生物学功能^[8,9]。TGF-β诱导的早期反应基因(TGF-β inducible early gene, TIEG)最早从人成骨细胞中得到的^[10],TIEG1具有Sp1样蛋白家族的典型特征,羧基末端有3个锌指DNA结合元件,能够直接调控其他基因的启动子中富含GC的DNA序列(SPI样结合位点),从而参与细胞增生、凋亡、分化和肿瘤形成^[11]。很多研究者表明,TIEG1基因过表达可以促进TGF-β1诱导Smad2的磷酸化,抑制Smad7基因表达水平,在肿瘤的发生发展中起重要的作用^[12]。Stathmin(又称OP18)是一种高度保守的细胞内磷酸化蛋白,存在多个Sp1结合位点,并受TIEG1基因直接调控,由于其特有解聚活性,在细胞的增殖和分化及肿瘤发生中有十分重要的作用^[13]。Stathmin基因在多种恶性肿瘤中高度表达,如白血病、神经胶质瘤、淋巴瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、骨肉瘤及消化系统恶性肿瘤^[14-16]。以上研究提示:TGF-β1、TIEG1和Stathmin蛋白

应用要点

TGF- β 1和TIEG1基因可能结合Stathmin结合位点, 负性调节Stathmin基因, 抑制食管癌增殖. 本实验结果可能为探讨食管癌发病机制, 寻找新的治疗靶点提供了实验依据.

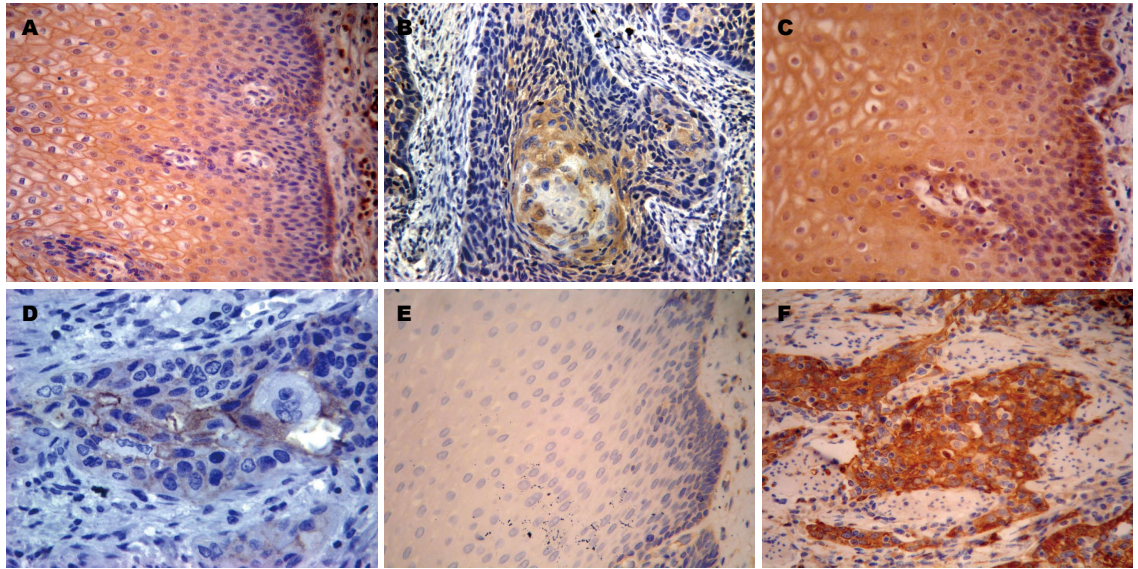


图1 正常食管黏膜及癌组织中TGF- β 1、TIEG1和Stathmin蛋白的表达(SP \times 200). A, B: TGF- β 1; C, D: TIEG1; E, F: Stathmin.

表3 食管鳞癌组织中Stathmin与TGF- β 1及TIEG1蛋白表达的相关性分析 (n)

指标	n	TGF- β 1		值	P 值	TIEG1		值	P 值
		+	-			+	-		
Stathmin									
+	27	9	18	-0.609	0.000	15	12	-0.459	0.000
-	35	32	3			33	2		

的联合检测可能在肿瘤细胞中具有重要的价值.

目前在食管癌研究中, 王辉等^[17]报道, 48例食管癌病例中仅发现有30例TGF- β 1基因的高表达, 而10例正常黏膜组织中都表达; 此外王峰等^[18]对Stathmin的研究发现, 在75例食管癌患者中Stathmin的表达阳性率为81.3%, 明显高于正常食管黏膜组织; 结果还显示, Stathmin表达与食管癌的分化程度、浸润深度及淋巴结转移均密切相关; 并且研究发现TIEG1表达低与乳腺癌、胃癌和胰腺癌等多种肿瘤的发生、发展密切相关^[3,4]. 然而这些研究尚未同时在食管癌中检测TGF- β 1、TIEG1和Stathmin蛋白的表达及分析三者可能的关系. 在本实验中发现正常食管黏膜中TGF- β 1和TIEG1蛋白表达均显著高于癌旁及食管癌, 具有显著性差异(均 $P = 0.000$). 提示高表达TGF- β 1和TIEG1蛋白可能是抑制肿瘤增殖, Stathmin蛋白在食管癌组织中的阳性率为43.5%, 明显高于不典型增生组织和正常黏膜组织中的阳性率(分别为16.1%、0%)($\chi^2 = 45.550$, $P = 0.000$), 提示Stathmin蛋白在食管癌的发生发展中起重要的作用. Jiang等^[6]利用染色质免疫共沉淀实验发现: TIEG1可能直接结合

Stathmin启动子的Sp1样DNA结合位点, 抑制启动子活性, 下调Stathmin的表达. 我们进一步经相关分析表明, 高表达Stathmin的病例中TGF- β 1和TIEG1低表达或不表达. Stathmin与TGF- β 1和TIEG1蛋白表达均呈负相关关系, 我们假想: TGF- β 1和TIEG1基因可能结合Stathmin启动子的Sp1样DNA结合位点, 抑制启动子活性, 从而负性调节Stathmin基因, 抑制肿瘤增殖. 此外, 我们进一步分析TGF- β 1、TIEG1及Stathmin蛋白的表达与临床病理学参数之间的关系, 发现TGF- β 1、TIEG1及Stathmin蛋白与食管癌的分化程度及淋巴结转移之间均有显著的相关性(均 $P < 0.05$), 提示TGF- β 1、TIEG1及Stathmin蛋白的表达可能与食管癌的浸润转移关系密切.

总之, 肿瘤的发生发展及侵袭转移是一个多因素参与的复杂过程. 本实验研究了TGF- β 1、TIEG1及Stathmin蛋白在食管癌中的表达并探讨了三者之间的相关性. 结果提示, TGF- β 1、TIEG1及Stathmin蛋白在食管癌的发生发展及转移中起重要的作用, TGF- β 1和TIEG1基因可能结合Stathmin结合位点, 负性调节Stathmin基因, 抑制食管癌增殖. 本实验结果可能为探讨食管癌

发病机制, 寻找新的治疗靶点提供实验依据。

4 参考文献

- Lu TY, Li WC, Chen RY, Fan QX, Wang LX, Wang RL, Lu SX, Meng H. Inhibition effects of all trans-retinoic acid on the growth and angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma in nude mice. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 2708-2714 [PMID: 22040429]
- Miyazono K. Molecular mechanisms of transforming growth factor- β signaling and disease: The 59th Fujihara International Seminar, 2010. *Cancer Sci* 2011; 102: 1242-1244 [PMID: 21595800 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01806.x]
- Jin W, Chen BB, Li JY, Zhu H, Huang M, Gu SM, Wang QQ, Chen JY, Yu S, Wu J, Shao ZM. TIEG1 inhibits breast cancer invasion and metastasis by inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) transcription and the EGFR signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 50-63 [PMID: 22025675 DOI: 10.1128/MCB.06152-11]
- Antonello D, Moore PS, Zamboni G, Falconi M, Scarpa A. Absence of mutations in the transforming growth factor-beta inducible early gene 1, TIEG1, in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2002; 183: 179-183 [PMID: 12065093 DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00802-3]
- Wang F, Wang LX, He W, Li K, Wang RL, Zhao PR, Fan QX. [Up-regulation of stathmin induces growth arrest of esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cell]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2010; 90: 2140-2144 [PMID: 21029632]
- Jiang L, Chen Y, Chan CY, Wang X, Lin L, He ML, Lin MC, Yew DT, Sung JJ, Li JC, Kung HF. Down-regulation of stathmin is required for TGF-beta inducible early gene 1 induced growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 274: 101-108 [PMID: 18930345 DOI: 10.1016/j.canlet.2008.09.017]
- 陈明勇, 庞霞, 郑湘予, 李晟磊, 赵志华, 张红新, 陈奎生. VEGF-C、VEGFR-3、CD105及CD68蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 578-583
- Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res* 2009; 19: 103-115 [PMID: 19114993 DOI: 10.1038/cr.2008.323]
- Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, Tang Y, Shetty K, Mishra B, Mishra L. Tgf-Beta signaling in development. *Sci STKE* 2007; 2007: cm1 [PMID: 17699101]
- Subramaniam M, Harris SA, Oursler MJ, Rasmussen K, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 4907-4912 [PMID: 8532536 DOI: 10.1093/nar/23.23.4907]
- Subramaniam M, Hawse JR, Johnsen SA, Spelsberg TC. Role of TIEG1 in biological processes and disease states. *J Cell Biochem* 2007; 102: 539-548 [PMID: 17729309 DOI: 10.1002/jcb.21492]
- Johnsen SA, Subramaniam M, Janknecht R, Spelsberg TC. TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene* 2002; 21: 5783-5790 [PMID: 12173049 DOI: 10.1038/sj.onc.1205681]
- Missimer JH, Steinmetz MO, van Gunsteren WF, Dolenc J. Influence of 63Ser phosphorylation and dephosphorylation on the structure of the stathmin helical nucleation sequence: a molecular dynamics study. *Biochemistry* 2012; 51: 8455-8463 [PMID: 22978582 DOI: 10.1021/bi300885y]
- Baquero MT, Hanna JA, Neumeister V, Cheng H, Molinaro AM, Harris LN, Rimm DL. Stathmin expression and its relationship to microtubule-associated protein tau and outcome in breast cancer. *Cancer* 2012; 118: 4660-4669 [PMID: 22359235 DOI: 10.1002/cncr.27453]
- Singer S, Malz M, Herpel E, Warth A, Bissinger M, Keith M, Muley T, Meister M, Hoffmann H, Penzel R, Gdynia G, Ehemann V, Schnabel PA, Kuner R, Huber P, Schirmacher P, Breuhahn K. Coordinated expression of stathmin family members by far upstream sequence element-binding protein-1 increases motility in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 2234-2243 [PMID: 19258502 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3338]
- Ghosh R, Gu G, Tillman E, Yuan J, Wang Y, Fazli L, Rennie PS, Kasper S. Increased expression and differential phosphorylation of stathmin may promote prostate cancer progression. *Prostate* 2007; 67: 1038-1052 [PMID: 17455228 DOI: 10.1002/pros.20601]
- 王辉, 刘会英, 齐凤英. TGF- β 1、p15在食管鳞癌中的表达及其生物学意义. *山东医药* 2006; 46: 4-6
- 王峰, 王留兴, 何伟, 朱利楠, 赵培荣, 樊青霞. Stathmin基因在食管鳞癌中的表达及生物学意义. *南方医科大学学报* 2010; 30: 1552-1557

■同行评价
本文为探讨食管癌发病机制, 寻找新的治疗靶点提供了重要的参考价值。

编辑 田滢 电编 闫晋利



表皮生长因子及其受体在糜烂胃黏膜中的表达

郝正魁, 刘希双, 王秀娟

■背景资料

慢性萎缩性胃炎及胃黏膜糜烂是一种常见的病理现象, 既往研究大多以胃酸、胃蛋白酶等损伤因素较多, 近年来关于表皮生长因子(EGF)及其受体(EGFR)与胃黏膜病变关系受到重视, EGF及EGFR在维护胃黏膜完整性、促进组织修复、防止损伤因子侵袭中起着重要作用。

郝正魁, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科 山东省青岛市 266003

王秀娟, 青岛市第八人民医院消化内科 山东省青岛市 266100

郝正魁, 硕士, 主要从事消化内镜诊治技术工作。

青岛市公共领域科技支撑计划基金资助项目, No. 2012-1-3-2-(3)-nsh

作者贡献分布: 刘希双设计及组织课题; 郝正魁负责病例收集、实验及论文撰写; 刘希双指导论文撰写; 王秀娟协助实验与论文撰写。

通讯作者: 刘希双, 教授, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内镜诊治科。

liuxishuang1@sina.com

电话: 0532-82911525

收稿日期: 2012-11-21 修回日期: 2013-01-06

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric mucosal erosion

Zheng-Kui Hao, Xi-Shuang Liu, Xiu-Juan Wang

Zheng-Kui Hao, Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Xiu-Juan Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Eighth People's Hospital, Qingdao 266100, Shandong Province, China

Supported by: the Public Science and Technology Program of Qingdao, No. 2012-1-3-2-(3)-nsh

Correspondence to: Xi-Shuang Liu, Professor, Department of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com

Received: 2012-11-21 Revised: 2013-01-06

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To detect the expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in antral mucosal erosion, erosion-adjacent gastric mucosa and chronic atrophic gastritis (CAG) and to analyze their significance in the repair of damaged gastric mucosa.

METHODS: The expression of EGF and EGFR was detected by immunohistochemistry in 50 cases of CAG with antral mucosal erosion, 40 cases of gastric mucosa 3 cm from mucosal erosion and 40 cases of CAG without mucosal erosion.

RESULTS: The positive rates of EGF and EGFR expression in the antral mucosal erosion were 40% and 30%, respectively, which were significantly higher than those in erosion-adjacent gastric mucosa (15%, 10%) and CAG without mucosal erosion (20%, 12.5%) (all $P < 0.05$). There was no statistical significance in the positive rates of EGF and EGFR expression between erosion-adjacent gastric mucosa and CAG without mucosal erosion.

CONCLUSION: High expression of EGF and EGFR in damaged gastric mucosa may be important for the repair of gastric mucosa.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Epidermal growth factor; Epidermal growth factor receptor; Gastric mucosa erosion; Chronic atrophic gastritis

Hao ZK, Liu XS, Wang XJ. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in gastric mucosal erosion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 332-335 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/332.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.332>

摘要

目的: 观察胃窦黏膜糜烂区与糜烂旁胃黏膜、慢性萎缩性胃炎中表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达, 探讨其在胃黏膜损伤修复中的意义。

方法: 选择经胃镜及病理确诊的慢性萎缩性胃炎伴胃窦黏膜糜烂患者50例, 距糜烂区3 cm处40例, 无糜烂慢性萎缩性胃炎40例, 采用免疫组织化学染色法测EGF及EGFR的表达。

结果: 胃窦黏膜糜烂区EGF、EGFR阳性表达率分别为40%和30%, 明显高于糜烂旁胃黏膜15%和10%及无糜烂慢性萎缩性胃炎20%和12.5%的阳性表达率($P < 0.05$), 有统计学意义, 无糜烂慢性萎缩性胃炎组略高于糜烂旁胃黏膜组, 但无统计学差异。

结论: EGF、EGFR在胃黏膜损伤后高表达, 对

■同行评议者
潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

促进胃黏膜修复有着重要意义。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 表皮生长因子; 表皮生长因子受体; 胃黏膜糜烂; 慢性萎缩性胃炎

郝正魁, 刘希双, 王秀娟. 表皮生长因子及其受体在糜烂胃黏膜中的表达. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 332-335 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/332.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.332>

0 引言

胃黏膜糜烂是慢性胃炎和胃黏膜损伤的一种常见病理现象, 由外界侵袭因素与胃黏膜自身防御因素失衡导致胃黏膜损伤, 病变深度未超出黏膜肌层. 既往研究多以胃酸、胃蛋白酶、胆汁反流、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)等侵袭因素较多, 当胃黏膜防御机制下降时, 上述攻击因子便破坏黏膜保护屏障, 造成胃黏膜损伤. 近年来随着消化系免疫作为维护消化系防御系统的提出, 尤其是细胞因子在胃肠道黏膜损伤、发展、修复过程中的作用更受到重视. 其中表皮生长因子及其受体与胃黏膜病变关系密切, 研究证实其具有细胞保护、促进组织修复、保护黏膜完整性防御外界损伤因子侵袭、促进溃疡愈合方面起着重要作用^[1,2], 既往研究以动物实验为主, 人类活体研究较少. 本研究旨在通过观察表皮生长因子及其受体在人活体胃窦黏膜糜烂区与糜烂旁胃黏膜、无糜烂慢性萎缩性胃炎之间表达的差异, 进而探讨其在胃黏膜损伤修复中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2011-11/2012-06经我院内镜诊治科胃镜下及病理确诊的50例慢性萎缩性胃炎伴胃窦黏膜多发糜烂患者为实验组, 40例无糜烂慢性萎缩性胃炎患者为对照组, 年龄40-60岁, 无胃癌、胃溃疡、胃大部切除、肝硬化、妊娠等其他并发症, 近1 mo不服用其他治疗胃病药物及其他疾病的药物. 病程3 mo-10年不等. 免疫组织化学染色试剂盒、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)兔抗人单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司), 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)兔抗人单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司).

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色方法: 在胃镜直视下于胃窦黏膜糜烂处取活检组织2-3块, 远离糜烂区3 cm

以上非糜烂区胃窦黏膜组织2-3块, 萎缩性胃炎胃窦黏膜组织2-3块, 10%甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度2 μm , 切片进行HE染色及PV6000二步法免疫组织化学染色, 免疫组织化学染色方法及步骤严格按照试剂盒说明进行, 以PBS代替一抗作阴性对照. 所有切片在同一实验室、用同一技术、同一批号试剂由经验丰富的技师分批完成.

1.2.2 评判标准: 以细胞染色程度及范围做以下评分^[3,4]: (1)染色程度: 无着色为0分, 细胞浅着色为1分, 深着色为2分; (2)染色范围 切片中阳性细胞着色范围无着色为0分, 着色细胞 $<1/3$ 为1分, $1/3-2/3$ 为2分, $>2/3$ 为3分. 两项得分之和 ≥ 3 为阳性.

统计学处理 采用统计学软件SPSS17.0数据包进行数据分析, EGF和EGFR表达阳性率采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 EGF、EGFR的表达 EGF阳性表达主要表达于黏液细胞及部分壁细胞胞浆中, 部分腺腔有阳性表达. EGFR主要表达于胞浆和胞膜, 以胞膜为主, 部分腺腔有着色. EGF、EGFR在糜烂组胃黏膜中的着色较糜烂旁胃黏膜组及萎缩性胃炎组颜色深(图1).

2.2 各组中EGF、EGFR的表达 糜烂组胃黏膜EGF、EGFR阳性表达率均显著高于糜烂旁及萎缩性胃炎组, 具有统计学意义($P < 0.05$, 表1), 萎缩性胃炎EGF、EGFR阳性表达率高于糜烂旁胃黏膜组, 但两者无统计学差异.

3 讨论

EGF是一种由53个氨基酸组成的重要的生物活性肽, 由美国著名生物学家Cohen在雌小鼠颌下腺分离出的一种蛋白质, 该因子广泛分布于消化系内, 主要由颌下腺、唾液腺、十二指肠腺分泌^[5]. EGFR是一种属于酪氨酸蛋白激酶家族的细胞表面受体, 含有1 186个氨基酸残基, 是原癌基因C-erbB的蛋白产物, 分子量为170 kDa, 对EGF具有高度亲和性, 分布于包括胃肠道上皮在内的多种上皮细胞的细胞膜上, 其结构分细胞外区、跨膜区和细胞内区3部分^[6,7]. EGFR是EGF的特异性受体, 两者结合后产生持续分裂信号转导到细胞内, 引起细胞的代谢、增殖、分化、黏附、迁移等生命现象, 并能抑制胃酸分泌和促进组织、细胞内DNA和RNA以及蛋白质的合成, 在促进胃黏膜修复、保护胃肠道黏膜免受外界攻击因子破坏、维

■研究前沿

EGF及EGFR具有广泛的生物学活性. 目前的研究大多数集中在其在消化系统肿瘤、溃疡中的表达, 在萎缩性胃炎亦有研究, 并且其在萎缩性胃炎黏膜中过度表达可导致黏膜过度增殖, 从而引起细胞异型性改变导致胃癌的发生. 关于这一点众多学者说法不一, 为目前研究热点. 胃黏膜糜烂长期不愈合, 是否会进一步癌变, 有待进一步研究.

应用要点

本研究示EGF及EGFR在胃黏膜损伤的修复过程中起着重要作用,在以后药物研发领域,可以研发EGF类似物,在临床治疗胃黏膜损伤时即可以在胃镜直视下喷洒或局部注射也可以静脉应用,从而更好的治疗胃黏膜损伤。

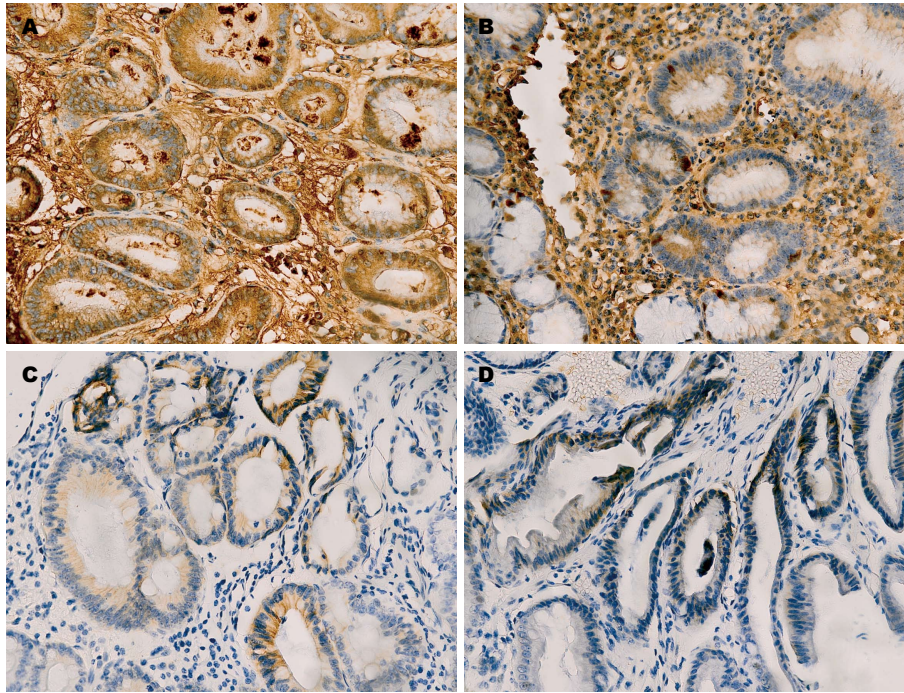


图1 表皮生长因子及其受体免疫组织化学染色结果($\times 200$)。A, C: 糜烂胃黏膜; B, D: 糜烂旁胃黏膜。

表1 EGF和EGFR在3组中的阳性表达率比较 $n(\%)$

分组	n	EGF		EGFR	
		+	-	+	-
糜烂胃黏膜组	50	20(40)	30	15(30)	35
糜烂旁胃黏膜组	40	6(15)	34	4(10)	36
萎缩性胃炎组	40	8(20)	32	5(12.5)	35
合计	130	34	96	24	106

EGF: 表皮生长因子; EGFR: 表皮生长因子受体。

护胃肠道黏膜完整性方面起着重要作用^[5-9]。

胃黏膜糜烂与胃溃疡发病及病理特点既有相似性,又各有特点。胃黏膜糜烂长期不愈合,或愈合糜烂交替发生,治疗效果差;而胃溃疡的治疗效果相对较好。研究证实在胃溃疡的愈合过程中EGF、EGFR起着重要作用,实验证实^[10]小鼠胃溃疡发生的2-4 d,即有EGF mRNA表达,4 d后EGF呈过度表达。动物实验显示^[11]大鼠造模3 d胃溃疡形成时,溃疡边缘组织EGF与EGFR的表达明显高于正常组织,6、9、14、21 d阳性细胞表达逐渐增加,28 d阳性细胞数少于21 d,溃疡完全愈合时则下降。资料表明^[12],切除颌下腺的大鼠,胃液中EGF含量明显下降,胃黏膜易受到致溃疡因子侵袭,大鼠胃溃疡愈合明显减慢,给予外源性EGF后溃疡愈合速度加快。据报道^[13]给予外源性EGF能促进胃肠道黏膜生长,鼠皮下微量泵注射EGF后,观察胃十二指肠黏膜增厚,绒毛高度增高。*H. pylori*是胃黏膜损伤的独立因

素,近年来研究^[14,15]显示*H. pylori*能抑制EGF的分泌,根除*H. pylori*后,血中EGF含量增加,另外*H. pylori* (+)的患者胃窦黏膜的EGF含量明显高于*H. pylori* (-)的患者。胃黏膜损伤后细胞基底膜上的EGFR暴露,腔内的EGF与EGFR结合发挥效应,损伤局部开始修^[16]。另外动物实验发现^[17]在大鼠皮肤损伤后早中期EGF与EGFR表达逐渐升高,创面愈合后表达降低,EGF与EGFR在皮肤创伤修复中亦起着重要作用。既往研究证实^[18]EGF能减轻乙醇对胃黏膜的损伤,外源性EGF对胃黏膜的保护作用,可能通过增加胃黏膜血流量促进黏液分泌保护胃黏膜的。Shimamoto等^[19]研究发现EGF能促进荷兰猪胃黏膜的黏蛋白及PGF的合成,预先给予EGF处理可防止乙醇对胃黏膜的损伤。近年来发现^[20,21]许多药物治疗胃溃疡的作用机制可能是通过激活EGF、EGFR系统或促进其表达,从而促进上皮修复、溃疡愈合。由此可得出黏膜损伤后EGF与EGFR表达均增加,无论内源性还是外

源性EGF对保护胃黏膜, 促进黏膜损伤修复均起着重要作用. 本研究显示, EGF与EGFR在糜烂组呈阳性表达, 阳性表达率均明显高于糜烂旁黏膜组及萎缩性胃炎组, 糜烂旁黏膜及萎缩性胃炎组亦有阳性表达, 但两组无统计学意义. 由此推测胃黏膜损伤后通过机体的调节, EGF与EGFR的表达均增加, EGF与EGFR结合促进局部胃黏膜细胞的再生、增殖、分化, 进而促进损伤黏膜修复, 在维护胃黏膜的完整性起着重要作用, 此与以往研究报道一致. 另外本研究亦显示, 不同病变的胃黏膜, EGF与EGFR表达各不相同, 同一机体不同病理状态下的胃黏膜中的表达也具有差异性, 且随着黏膜损伤程度加重, 表达逐步增加.

慢性萎缩性胃炎目前已被列为胃癌的癌前病变之一, 特别是其伴有肠上皮化生或不典型增生时, 更与胃癌的发生关系密切. EGF与EGFR结合可促进黏膜上皮增值, 促进DNA和RNA以及蛋白质的合成, EGF与EGFR的正常表达在慢性萎缩性胃炎及胃溃疡愈合过程中起重要作用. 一旦其过度表达, 可促进细胞过度增殖, 向恶性程度发展. 已有研究证实^[3,22]EGF与EGFR在慢性萎缩性胃炎伴肠上皮化生及不典型增生中的表达明显高于单纯性慢性萎缩性胃炎, 差别具有统计学意义, 与慢性浅表性胃炎相比EGF与EGFR在慢性萎缩性胃炎中的表达有所增加, 但两者无统计学差异. 既往研究已发现EGF及EGFR的表达与胃癌的生物学行为有一定的相关性, 在胃癌组织中呈高表达. 本研究显示, EGF与EGFR在糜烂胃黏膜组高表达, 显著高于其他两组, 在损伤因素不解除情况下, 胃黏膜糜烂面持续存在, 长期不愈合, 愈合后易复发, EGF及EGFR处于持续高表达状态, 促进细胞不断增殖、分化, 胃黏膜增殖到一定程度是否可发生癌变, 胃黏膜糜烂与胃癌的发生是否具有相关性, 需对患者进一步密切随访动态观察胃黏膜糜烂发展变化, 因此胃黏膜糜烂及慢性萎缩性胃炎的EGF及EGFR的表达应给予高度重视, 对胃黏膜糜烂患者病情随访亦有必要.

4 参考文献

- 1 陈圣兴, 李邦库, 胡乃中, 刘功传. 慢性浅表性胃炎和消化性溃疡患者表皮生长因子含量的检测意义初探. 临床消化病杂志 2000; 12: 166-167
- 2 叶盛英, 王世玲. 表皮生长因子在消化性溃疡应用方面研究进展. 中国医院药学杂志 2002; 22: 622-623
- 3 孙永红, 孙良华, 黄文波, 乔艳春, 张圆圆. 慢性萎缩性

- 4 胃炎患者胃黏膜上皮细胞中PCNA、EGF、VEGF的表达及意义. 山东医药 2008; 48: 4-6
- 5 Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues. *Hum Pathol* 1990; 21: 607-612 [PMID: 2161789]
- 6 梅彦, 姒健敏. 表皮生长因子与慢性萎缩性胃炎研究进展. 国外医学·消化系疾病分册 2005; 25: 149-151
- 7 Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1S-13S [PMID: 12235219]
- 8 钟艳, 严洁. 表皮生长因子受体与胃黏膜损伤修复的研究进展. 临床研究 2008; 5: 175-177
- 9 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970 [PMID: 11595683]
- 10 林寿宁, 张继波, 张建军. 表皮生长因子及其受体与胃溃疡愈合关系. 山西中医 2011; 27: 58-60
- 11 Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Ernst H, Drozdowicz D, Pajdo R, Hahn EG. Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha during ulcer healing. Time sequence study. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 6-15 [PMID: 9018760 DOI: 10.3109/00365529709025056.]
- 12 刘建平, 卜涛, 白建乐, 侯仙明, 李志更, 韩燕, 宗全和, 陈志强, 牛兵站. EGF、TGF- α 及EGFR在大鼠胃溃疡自愈过程中的表达及意义. 中国药理学通报 2003; 19: 1185-1188
- 13 Tepperman BL, Soper BD. Effect of sialoadenectomy on gastric mucosal integrity and growth in the rat. A time-course study. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 943-949 [PMID: 2166652 DOI: 10.1007/BF01537241]
- 14 Jansen C, Ihse I. Epidermal growth factor induces increased mucosal thickness of the small intestine in mouse. *Eur Surg Res* 1997; 29: 447-454 [PMID: 9405967 DOI: 10.1159/000129556]
- 15 吴杰, 郭秋惠, 李红艳. 消化性溃疡根除幽门螺杆菌前后血中前列腺素E2和表皮生长因子变化的临床研究. 临床消化病杂志 1997; 9: 148-149
- 16 马强, 张方信, 张振书. 幽门螺杆菌相关性胃炎活动性与TNF- α , EGF的相关性. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2190-2192
- 17 何秋兰, 杨拯, 徐艳, 陈建敏, 张晓. 表皮生长因子及其受体在胃溃疡愈合中的作用. 重庆医学 2008; 37: 2239-3342
- 18 陈东明, 牛星焘, 谷庭敏, 王雪. 大鼠皮肤创面愈合过程中内源性EGF、EGFR、TGF β 1蛋白和基因的变化. 解剖学杂志 2001; 24: 206-211
- 19 杨春敏, 陈寿波. 表皮生长因子对大鼠胃黏膜的保护作用及机制探讨. 中华消化杂志 1996; 16: 200-203
- 20 Shimamoto C, Hirata I, Umegaki E, Takiuchi H, Hiraike Y, Fujiwara S, Katsu K. Gastric mucosal cell protection by epidermal growth factor in primary monolayer culture of guinea pig gastric mucous cells. *J Gastroenterol* 2003; 38: 727-733 [PMID: 14505125]
- 21 刘建平, 宗全和, 王景然, 韩燕, 李媛媛, 王秀兰, 赵秀丽. 胃喜康对胃溃疡大鼠胃黏膜EGF含量及EGFRm-RNA的影响. 中药药理与临床 2004; 20: 30-31
- 22 时昭红, 张介眉, 周慧芳, 杨海芳, 冯云霞, 陈洲. 促愈颗粒对胃溃疡实验大鼠胃黏膜表皮生长因子及其受体表达的影响. 中国中西医结合消化杂志 2007; 15: 25-28
- 23 王莉, 季万胜, 孙良华, 霰爱兰, 高志星, 张红梅. 慢性萎缩性胃炎PCNA、EGFR表达的研究. 潍坊医学院学报 2007; 29: 61-62

同行评价

本文立意有依据, 研究内容集中, 病例诊断明确, 胃黏膜取材和对照合理, 实验方法规范, 结果可信, 观点明确, 对临床慢性糜烂性胃炎的防治有参考意义.

编辑 翟欢欢 电编 闫晋利



TIPS术后支架功能障碍的研究现状

梁艳平, 唐映梅, 杨晋辉, 尤丽英

■背景资料

经颈静脉肝内门体分流术(TIPS)目前已经成为治疗门脉高压并发症的有效方法,特别是门静脉高压导致的急性食管胃底静脉曲张破裂出血的患者,可以起到立竿见影的止血效果,而维持手术疗效的关键是保持支架通畅。随着手术的日渐成熟和覆膜支架的应用,支架内血栓导致的TIPS功能障碍日益突出,因此术后的抗凝治疗尤为重要。

梁艳平, 唐映梅, 杨晋辉, 尤丽英, 昆明医科大学第二附属医院肝胆胰内科 云南省肝病中心 云南省昆明市 650101

云南省自然科学基金资助项目, Nos. 2011FB199, 2010CD171

梁艳平, 主要从事肝脏疾病的研究。

作者贡献分布: 本文综述由梁艳平完成; 唐映梅、杨晋辉及尤丽英审核。

通讯作者: 尤丽英, 主任医师, 650101, 云南省昆明市昆瑞路112号, 昆明医科大学第二附属医院肝胆胰内科云南省肝病中心。lyp696969@163.com

电话: 0871-5351281-2288

收稿日期: 2012-11-02 修回日期: 2013-01-05

接受日期: 2013-01-11 在线出版日期: 2013-02-08

Transjugular intrahepatic portosystemic shunt dysfunction

Yan-Ping Liang, Ying-Mei Tang, Jing-Hui Yang, Li-Ying You

Yan-Ping Liang, Ying-Mei Tang, Jing-Hui Yang, Li-Ying You, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Medicine, Center for Liver Diseases, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Correspondence to: Li-Ying You, Chief Physician, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Medicine, Center for Liver Diseases, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, 112 Kunrui Road, Kunming 650101, Yunnan Province, China. lyp696969@163.com

Received: 2012-11-02 Revised: 2013-01-05

Accepted: 2013-01-11 Published online: 2013-02-08

Abstract

Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) is an effective method for the management of complications of portal hypertension, and it should be considered the first-line treatment for acute hemorrhage due to ruptured esophageal varices caused by portal hypertension. Keeping the stent unobstructed is key to the success of TIPS. Stent thrombosis is one of the main reasons for TIPS dysfunction. There has been no mention of TIPS postoperative anticoagulation in both domestic and foreign anticoagulation guidelines, because the consensus has not been reached yet. This paper reviews recent advances in research of TIPS dysfunction.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Transjugular intrahepatic portosystemic

shunt; Shunt dysfunction; Anticoagulation

Liang YP, Tang YM, Yang JH, You LY. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt dysfunction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 336-340 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/336.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.336>

摘要

经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)目前已经成为治疗门脉高压并发症的有效方法,特别是门静脉高压导致的急性食管胃底静脉曲张破裂出血的患者,TIPS应作为一线治疗方案。而维持手术疗效的关键是保持支架通畅。支架内血栓形成是TIPS功能障碍主要原因之一。目前国内外相关的抗凝指南中均未提到TIPS术后抗凝治疗,也没有达成共识。本文就TIPS支架功能障碍作一综述。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 经颈静脉肝内门体分流术; 支架功能障碍; 抗凝治疗

梁艳平, 唐映梅, 杨晋辉, 尤丽英. TIPS术后支架功能障碍的研究现状. *世界华人消化杂志* 2013; 21(4): 336-340 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/336.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.336>

0 引言

我国是肝病大国,各种肝病最终可能发展为肝硬化甚至肝癌。终末期肝病给患者家庭和社会造成很大的经济负担和社会负担。肝硬化的年发生率17/10万,主要累及20-50岁男性,城市男性50-60岁肝硬化患者的病死率高达112/10万,肝硬化造成门脉高压引起的食管胃底静脉曲张破裂出血是主要死因之一。经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS),目前已经成为治疗门脉高压并发症的有效方法^[1-9],特别是门静脉高压导致的急性食管胃底静脉曲张破裂出血的患者优于内镜治疗^[10,11],TIPS应作为一线治疗方案^[12]。而维持

■同行评议者

钱林学, 主任医师, 首都医科大学附属北京友谊医院

手术疗效的关键是保持支架通畅, TIPS术中, 在穿刺过程中对血管造成创伤, 启动凝血机制, 植入的支架为异物等, 血栓形成风险明显增加. 支架内血栓形成是TIPS功能障碍主要原因之一, 抗凝治疗是预防和治疗支架内血栓形成的主要方法, 但目前国内外相关的抗凝治疗指南中, 没有明确的提出TIPS术后抗凝方案, 也没有查找到的研究报道. 但是随着TIPS术的成熟及推广, 迫切需要对TIPS围手术期及术后患者的抗凝治疗进行研究, 为TIPS患者的抗凝治疗提供更客观的依据.

支架功能障碍是由于TIPS支架或者分流道的闭塞和/或狭窄引起的门静脉系统减压失败导致TIPS术前的症状体征再出现. 判断标准以支架狭窄度50%^[13-15]最为常用, 此外还有肝静脉压力梯度上升至>12 mmHg^[15-17]、TIPS术后门脉高压并发症的复发^[18-21]等, 如: 静脉曲张破裂出血、腹水或胸腔积液等. 临床上, 部分支架再狭窄的患者, 心理负担明显加重, 影响病情发展, 对治疗失去耐心和信心, 患者的生活质量明显受影响.

1 TIPS术不同时期影响因素

1.1 早期狭窄闭塞的因素 早期支架障碍一般是手术过程中支架释放时未完全支撑肝实质部分分流道、支架释放后扭曲成角^[22,23], 可能胆汁渗漏至支架内^[24,25], 血液处于高凝状态, 使分流道内急性血栓形成^[23,26]. 手术过程造成血管组织损伤激活外源性凝血途径, 植入支架激活了内源性凝血机制, 造成急性血栓形成.

1.2 中远期狭窄闭塞的因素 支架内假性内膜过度增生^[2,23,27-30], 分流道损伤后纤维性愈合, 支架内慢性血栓形成等.

2 不同术式对支架内血流的影响

TIPS术+断流(胃冠状静脉栓塞术), 理论上, 支架内血流增加, 血栓形成几率降低; 单纯TIPS术, 理论上血栓形成几率高于断流+分流, 但研究结果显示两组不同术式的支架通常率无统计学差异^[13].

3 TIPS术支架狭窄的影响因素

3.1 术前因素 患者的基本情况, 包括肝功能情况、凝血功能情况、是否脾切除、门静脉血流的特殊性、肝静脉门静脉是否形成血栓、是否合并其他疾病等.

3.2 术中因素 手术过程, 涉及到血管穿刺成功率、支架的选择、支架的位置、放置的角度、门静脉左右支的选择、术中肝素的应用等. 其中穿刺针在肝内的穿刺对肝脏是一种机械性损伤^[31], 血管穿刺成功率越低, 对组织血管的损伤就越高, 外源性凝血途径就越强烈, 血栓形成几率就会越高. TIPS采用覆膜支架可较裸支架明显减少术后分流道狭窄^[14,18,26,32-35], Clark等^[26]在膜支架与裸支架通畅率的研究中, 指出膜支架可以降低支架功能障碍的发生率但对患者的生存率没有影响, 但研究中没有提及术后患者是否服用抗凝药物, 而抗凝药物的应用在TIPS术后占非常重要的地位, 特别是在围手术期. 选择性门静脉左支作为门腔静脉分流道, 可以显著降低肝性脑病发生率, 对保护肝功能、提高分流道远期开通率具有重要的临床意义^[36].

3.3 术后因素 围手术期及术后抗凝治疗. 而目前报道的相关文献中, 都没有统一的抗凝方案. Fanelli等^[4]在门脉海绵样变性导致的门脉高压行TIPS的研究中指出需抗凝保证支架通畅, 并参考肝硬化后TIPS术的抗凝方案, 但文章中没有具体介绍抗凝方案. Eldorrry等^[37]在布加氏综合征行TIPS的研究中提到术后的抗凝治疗, 低分子肝素24 h或普通肝素6 h后口服华法林, 使国际标准化比率(international normalized ratio, INR)值在2-3之间, 但没有说明不同患者凝血功能不同时肝素和华法林的具体用量及检测指标. 国内的研究报道^[38], 只涉及到患者的肝功能分级, 没有具体到凝血功能的情况以及患者的裸支架或膜支架不同情况时的抗凝治疗. TIPS术后支架内血栓形成溶栓治疗的个案报道, 没有具体介绍TIPS术后的抗凝方案^[39]. Siewert等^[40]的个案报道, 酒精性肝硬化患者TIPS术后抗凝治疗, 随访中支架内血栓形成, 使用氯吡格雷联合低分子肝素加强抗凝治疗, 随访至一年支架保持通畅, 但该个案报道中没提及术后是否先使用低分子肝素治疗.

4 TIPS抗凝的现状

2010年AASLD实践指南中关于TIPS治疗门脉高压症, 未提出TIPS术后常规使用抗凝剂的建议^[41]. 2008年美国胸科医师协会(ACCP)的抗凝治疗指南中也没有对TIPS术后的抗凝给予相应建议^[42]. 英国血液学标准委员会血栓与止血分会的第三版《口服抗凝剂指南》^[43]未就TIPS术后的抗凝问题进行说明. 英国血液学标准委员

■应用要点

本文从TIPS术过程及支架情况、患者自身情况和术后干预等方面阐述影响支架功能障碍的因素以及术后抗凝治疗面临的问题, 对临床研究TIPS术后支架功能障碍有重要的指导作用.

■ 创新盘点

本文从TIPS术的提出、临床应用日趋成熟, 引用大量文献, 特别是近年的研究结果以阐述引起支架功能障碍的因素和近年TIPS术后抗凝治疗的现状, 提供了大量有价值的信息。

会《肝素使用及监控指南》^[24]中对腹腔内静脉血栓形成的病人应考虑使用肝素治疗。如果用普通肝素, 可以用小剂量, 也可以用足以延长活化部分凝血激酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)两倍于正常对照的治疗, 如果用低分子肝素, 可以给常规预防剂量或治疗剂量^[24], 但没指出TIPS术后围手术期及随访中支架内血栓形成时肝素的使用情况。

5 现有方案来源

5.1 借鉴肺血栓栓塞 相同点: 都是静脉血栓。不同点: 肺栓塞时其患者凝血功能、血小板(platelet, PLT)、白蛋白大多是正常的, 目的是以治疗为主, 抗凝药物主要是肝素加华法林, 时间为3 mo^[44,45], 伴有癌症、抗心磷脂抗体、抗凝血酶缺乏或复发的易栓症患者, 抗凝治疗至少6 mo, 部分患者需要长期抗凝^[45], 检测INR使其在2-3之间^[46]。而行TIPS术的患者其凝血功能异常, PLT、白蛋白大多是降低, 目的是以预防为主。

5.2 借鉴经皮冠状动脉介入治疗术后抗凝 相同点: 都是血管内支架, 都是预防支架狭窄闭塞。不同点: 冠脉支架内形成的血栓为动脉血栓, 其患者凝血功能、PLT、白蛋白一般正常, 支架位置在动脉血管内, 抗凝药物一般是肝素^[23]加双抗, 终身服药^[27,47]。TIPS术支架内形成的是静脉血栓, 患者的凝血功能异常, PLT、白蛋白一般都低于正常值, 支架位于静脉血管及肝实质内。

TIPS术后现有的方案: 低分子肝素加硫酸氢氯吡格雷; 低分子肝素加阿司匹林; 低分子肝素加华法林等, 而抗凝药物的选择及维持时间, 目前没有达成共识。

6 肝硬化患者TIPS术抗凝治疗的特殊性

肝硬化患者凝血功能紊乱; 肝功能减退, 白蛋白降低, 药物与白蛋白结合率降低, 药物的代谢受到影响; 同期使用药物的影响(如: 质子泵抑制剂可以延长凝血酶原时间^[48], 抑酸药可增加抗凝药自尿中排泄, 使血药浓度下降); 支架内为静脉血栓^[49], 但门静脉血流具有自己的特殊性(血液的成分、血流速度等^[50]); 支架内压力及血流方向等, 均可能影响抗凝药物的疗效。

7 结论

TIPS术后抗凝治疗借鉴于肺血栓溶栓和PCI术后抗凝治疗, 上述患者的肝功、凝血功能一般正常, 而肝硬化TIPS术患者的肝功、凝血功能紊乱、术前门静脉血栓情况以及是否合并高风险

血栓形成疾病等均对抗凝药物的选着、剂量、维持时间都有明显的影响, 如: PLT、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、INR、APTT哪个或哪几个组合才是抗凝疗效的最佳检测指标; 不同术式(单纯分流、分流+断流术)的各自的抗凝方案是否相同; 裸、覆膜支架的抗凝方案是否有区别等都需相应深入研究。希望多中心合作研究, 对于已经行TIPS术的患者需要加强随访, 从个体治疗中摸索总结经验, 为TIPS围手术期及术后规范化抗凝治疗提供依据。

8 参考文献

- 1 Heinzow HS, Lenz P, Köhler M, Reinecke F, Ullrich H, Domschke W, Domagk D, Meister T. Clinical outcome and predictors of survival after TIPS insertion in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 5211-5218 [PMID: 23066315]
- 2 Rössle M, Gerbes AL. TIPS for the treatment of refractory ascites, hepatorenal syndrome and hepatic hydrothorax: a critical update. *Gut* 2010; 59: 988-1000 [PMID: 20581246 DOI: 10.1136/gut.2009.193227]
- 3 LaBerge JM, Somberg KA, Lake JR, Gordon RL, Kerlan RK, Ascher NL, Roberts JP, Simor MM, Doherty CA, Hahn J. Two-year outcome following transjugular intrahepatic portosystemic shunt for variceal bleeding: results in 90 patients. *Gastroenterology* 1995; 108: 1143-1151 [PMID: 7698582 DOI: 10.1016/0016-5085(95)90213-9]
- 4 Fanelli F, Angeloni S, Salvatori FM, Marzano C, Boatta E, Merli M, Rossi P, Attili AF, Ridola L, Cerini F, Riggio O. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt with expanded-polytetrafluoroethylene-covered stents in non-cirrhotic patients with portal cavernoma. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 78-84 [PMID: 20637712 DOI: 10.1016/j.dld.2010.06.001]
- 5 Rössle M, Deibert P, Haag K, Ochs A, Olschewski M, Siegerstetter V, Hauenstein KH, Geiger R, Stiepak C, Keller W, Blum HE. Randomised trial of transjugular-intrahepatic-portosystemic shunt versus endoscopy plus propranolol for prevention of variceal rebleeding. *Lancet* 1997; 349: 1043-1049 [PMID: 9107241 DOI: 10.1016/S0140-6736(96)08189-5]
- 6 Merli M, Salerno F, Riggio O, de Franchis R, Fiaccadori F, Meddi P, Primignani M, Pedretti G, Maggi A, Capocaccia L, Lovaria A, Ugolotti U, Salvatori F, Bezzi M, Rossi P. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus endoscopic sclerotherapy for the prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a randomized multicenter trial. Gruppo Italiano Studio TIPS (G.I.S.T.). *Hepatology* 1998; 27: 48-53 [PMID: 9425916 DOI: 10.1002/hep.510270109]
- 7 Ginès P, Uriz J, Calahorra B, Garcia-Tsao G, Kamath PS, Del Arbol LR, Planas R, Bosch J, Arroyo V, Rodés J. Transjugular intrahepatic portosystemic shunting versus paracentesis plus albumin for refractory ascites in cirrhosis. *Gastroenterology* 2002; 123: 1839-1847 [PMID: 12454841 DOI: 10.1053/gast.2002.37073]
- 8 Narahara Y, Kanazawa H, Fukuda T, Matsushita Y, Harimoto H, Kidokoro H, Katakura T, Atsukawa M, Taki Y, Kimura Y, Nakatsuka K, Sakamoto C.

- Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus paracentesis plus albumin in patients with refractory ascites who have good hepatic and renal function: a prospective randomized trial. *J Gastroenterol* 2011; 46: 78-85 [PMID: 20632194 DOI: 10.1007/s00535-010-0282-9]
- 9 Salerno F, Merli M, Riggio O, Cazzaniga M, Valeriano V, Pozzi M, Nicolini A, Salvatori F. Randomized controlled study of TIPS versus paracentesis plus albumin in cirrhosis with severe ascites. *Hepatology* 2004; 40: 629-635 [PMID: 15349901 DOI: 10.1002/hep.20364]
 - 10 Luca A, D'Amico G, La Galla R, Midiri M, Morabito A, Pagliaro L. TIPS for prevention of recurrent bleeding in patients with cirrhosis: meta-analysis of randomized clinical trials. *Radiology* 1999; 212: 411-421 [PMID: 10429698]
 - 11 Burroughs AK, Vangeli M. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus endoscopic therapy: randomized trials for secondary prophylaxis of variceal bleeding: an updated meta-analysis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 249-252 [PMID: 11916185 DOI: 10.1080/003655202317284138]
 - 12 徐克, 韩国宏. 正确认识经颈静脉肝内门体分流术治疗肝硬化门静脉高压并发症的地位. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 481-482
 - 13 魏波, 陈爽, 李肖, 唐承薇. 经颈静脉肝内门体分流术联合胃冠状静脉栓塞术降低曲张静脉再出血率的研究. *中华肝脏病杂志* 2011; 19: 494-497
 - 14 Bureau C, Garcia-Pagan JC, Otal P, Pomier-Layrargues G, Chabbert V, Cortez C, Perreault P, Péron JM, Abraldes JG, Bouchard L, Bilbao JL, Bosch J, Rousseau H, Vinel JP. Improved clinical outcome using polytetrafluoroethylene-coated stents for TIPS: results of a randomized study. *Gastroenterology* 2004; 126: 469-475 [PMID: 14762784 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.11.016]
 - 15 Pan JJ, Chen C, Geller B, Firpi R, Machicao VI, Caridi JG, Nelson DR, Morelli G. Is sonographic surveillance of polytetrafluoroethylene-covered transjugular intrahepatic portosystemic shunts (TIPS) necessary? A single centre experience comparing both types of stents. *Clin Radiol* 2008; 63: 1142-1148 [PMID: 18774362 DOI: 10.1016/j.crad.2008.04.016]
 - 16 Casado M, Bosch J, García-Pagán JC, Bru C, Bañares R, Bandi JC, Escorsell A, Rodríguez-Láiz JM, Gilabert R, Feu F, Schorlemer C, Echenagusia A, Rodés J. Clinical events after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: correlation with hemodynamic findings. *Gastroenterology* 1998; 114: 1296-1303 [PMID: 9609767 DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70436-6]
 - 17 Groszmann RJ, Wongcharatrawee S. The hepatic venous pressure gradient: anything worth doing should be done right. *Hepatology* 2004; 39: 280-282 [PMID: 14767976 DOI: 10.1002/hep.20062]
 - 18 Bureau C, Pagan JC, Layrargues GP, Metivier S, Bellot P, Perreault P, Otal P, Abraldes JG, Peron JM, Rousseau H, Bosch J, Vinel JP. Patency of stents covered with polytetrafluoroethylene in patients treated by transjugular intrahepatic portosystemic shunts: long-term results of a randomized multicentre study. *Liver Int* 2007; 27: 742-747 [PMID: 17617116 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2007.01522.x]
 - 19 Barrio J, Ripoll C, Bañares R, Echenagusia A, Catalina MV, Camúñez F, Simó G, Santos L. Comparison of transjugular intrahepatic portosystemic shunt dysfunction in PTFE-covered stent-grafts versus bare stents. *Eur J Radiol* 2005; 55: 120-124 [PMID: 15950109 DOI: 10.1016/j.ejrad.2004.10.007]
 - 20 Angeloni S, Merli M, Salvatori FM, De Santis A, Fanelli F, Pepino D, Attili AF, Rossi P, Riggio O. Polytetrafluoroethylene-covered stent grafts for TIPS procedure: 1-year patency and clinical results. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 280-285 [PMID: 15046218 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2004.04056.x]
 - 21 Angermayr B, Cejna M, Koenig F, Karnel F, Hackl F, Gangl A, Peck-Radosavljevic M. Survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt: ePTFE-covered stentgrafts versus bare stents. *Hepatology* 2003; 38: 1043-1050 [PMID: 14512892]
 - 22 Menzel J, Vestring T, Foerster EC, Haag K, Roessle M, Domschke W. Arterio-biliary fistula after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: a life-threatening complication of the new technique for therapy of portal hypertension. *Z Gastroenterol* 1995; 33: 255-259 [PMID: 7610693]
 - 23 Cura M, Cura A, Suri R, El-Merhi F, Lopera J, Kroma G. Causes of TIPS dysfunction. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 191: 1751-1757 [PMID: 19020247 DOI: 10.2214/AJR.07.3534]
 - 24 Baglin T, Barrowcliffe TW, Cohen A, Greaves M. Guidelines on the use and monitoring of heparin. *Br J Haematol* 2006; 133: 19-34 [PMID: 16512825 DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05953.x]
 - 25 Saxon RR, Mendel-Hartvig J, Corless CL, Rabkin J, Uchida BT, Nishimine K, Keller FS. Bile duct injury as a major cause of stenosis and occlusion in transjugular intrahepatic portosystemic shunts: comparative histopathologic analysis in humans and swine. *J Vasc Interv Radiol* 1996; 7: 487-497 [PMID: 8855524 DOI: 10.1016/S1051-0443(96)70789-3]
 - 26 Clark W, Golkar F, Luberic K, Toomey P, Paul H, Marcadis A, Okpaleke C, Vice M, Hernandez J, Alsina A, Rosemurgy AS. Uncovering the truth about covered stents: is there a difference between covered versus uncovered stents with transjugular intrahepatic portosystemic shunts? *Am J Surg* 2011; 202: 561-564 [PMID: 21944293 DOI: 10.1016/j.amjsurg.2011.06.021]
 - 27 Uchida Y, Mori F, Ogawa H, Takagi A, Hagiwara N. Impact of anticoagulant therapy with dual antiplatelet therapy on prognosis after treatment with drug-eluting coronary stents. *J Cardiol* 2010; 55: 362-369 [PMID: 20350510 DOI: 10.1016/j.jcc.2009.12.014]
 - 28 Boyer TD. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt: current status. *Gastroenterology* 2003; 124: 1700-1710 [PMID: 12761727 DOI: 10.1016/S0016-5085(03)00377-9]
 - 29 Rosado B, Kamath PS. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts: an update. *Liver Transpl* 2003; 9: 207-217 [PMID: 12619016 DOI: 10.1053/jlts.2003.50045]
 - 30 van Buuren HR, ter Borg PC. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS): indications and long-term patency. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2003; (239): 100-104 [PMID: 14743891 DOI: 10.1080/00855920310002771]
 - 31 毕向军, 杨冬华, 农玉新, 黄纯焯, 徐明符, 肖玉梅. 经颈静脉肝内门体分流术对肝功能的影响. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 594-595

■同行评价

本文综述了TIPS术后支架功能障碍的研究现状, 对临床有一定指导意义。

- 32 向谦, 李肖, 张铭光, 唐承薇. 采用覆膜支架经颈静脉肝内门体分流对改善术后分流道狭窄及门静脉高压的系统评价. *中国实用内科杂志* 2008; 28: 190-193
- 33 Han G, Qi X, He C, Yin Z, Wang J, Xia J, Yang Z, Bai M, Meng X, Niu J, Wu K, Fan D. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for portal vein thrombosis with symptomatic portal hypertension in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2011; 54: 78-88 [PMID: 20932597 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.06.029]
- 34 Riggio O, Angeloni S, Salvatori FM, De Santis A, Cerini F, Farcomeni A, Attili AF, Merli M. Incidence, natural history, and risk factors of hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt with polytetrafluoroethylene-covered stent grafts. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2738-2746 [PMID: 18775022 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2008.02102.x]
- 35 Rossi P, Salvatori FM, Fanelli F, Bezzi M, Rossi M, Marcelli G, Pepino D, Riggio O, Passariello R. Polytetrafluoroethylene-covered nitinol stent-graft for transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation: 3-year experience. *Radiology* 2004; 231: 820-830 [PMID: 15118117 DOI: 10.1148/radiol.2313030349]
- 36 褚建国, 陈肇一, 陈学忠, 徐晓明, 徐家兴. 经颈静脉肝内门脉左支-体静脉分流术的临床意义. *空军总医院学报* 2002; 18: 1-4
- 37 Eldorriy A, Barakat E, Abdella H, Abdelhakam S, Shaker M, Hamed A, Sakr M. Outcome of non surgical hepatic decompression procedures in Egyptian patients with Budd-Chiari. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 906-913 [PMID: 21412499 DOI: 10.3748/wjg.v17.i7.906]
- 38 赵洪伟, 刘福全, 岳振东, 王磊. 抗凝药物在预防TIPSS术后分流道狭窄治疗中的临床应用和选择. *实用医学杂志* 2011; 27: 1365-1367
- 39 Dumortier J, Walter T, Guillaud O, Pietu F, Vallin M, Henry L, Pilleul F. Transcatheter local thrombolysis in patients with extensive TIPS thrombosis. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34: 721-725 [PMID: 20934290 DOI:10.1016/j.gcb.2010.07.011]
- 40 Siewert E, Salzmann J, Purucker E, Schürmann K, Matern S. Recurrent thrombotic occlusion of a transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt due to activated protein C resistance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5064-5067 [PMID: 16124068]
- 41 Boyer TD, Haskal ZJ. The Role of Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt (TIPS) in the Management of Portal Hypertension: update 2009. *Hepatology* 2010; 51: 306 [PMID: 19902484 DOI: 0.1002/hep.23383]
- 42 Kearon C, Kahn SR, Agnelli G, Goldhaber S, Raskob GE, Comerota AJ. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133: 454S-545S [PMID: 18574272]
- 43 Gallus AS, Baker RI, Chong BH, Ockelford PA, Street AM. Consensus guidelines for warfarin therapy. Recommendations from the Australasian Society of Thrombosis and Haemostasis. *Med J Aust* 2000; 172: 600-605 [PMID: 10914107]
- 44 Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S, Agnelli G, Galie N, Pruszczyk P, Bengel F, Brady AJ, Ferreira D, Janssens U, Klepetko W, Mayer E, Remy-Jardin M, Bassand JP. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2008; 29: 2276-2315 [PMID: 18757870 DOI: 10.1093/eurheartj/ehn310]
- 45 中华医学会心血管病学分会肺血管病学组, 中国医师协会心血管内科医师分会. 急性肺血栓栓塞症诊断治疗中国专家共识. *中华内科杂志* 2010; 49: 74-81
- 46 Palla A, Ribas C, Rossi G, Pepe P, Marconi L, Prandoni P. The clinical course of pulmonary embolism patients anticoagulated for 1 year: results of a prospective, observational, cohort study. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 68-74 [PMID: 19817998 DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03647.x]
- 47 Coons JC, Battistone S. 2007 Guideline update for unstable angina/non-ST-segment elevation myocardial infarction: focus on antiplatelet and anticoagulant therapies. *Ann Pharmacother* 2008; 42: 989-1001 [PMID: 18577763 DOI: 10.1345/aph.1L063]
- 48 Jung JW, Kang HR, Kwon JW, Kim TE, Lee SH, Hong KS, Yu KS, Cho SH. The potential inhibitory effect of revaprazan, an acid pump antagonist, on anticoagulation with warfarin. *Tohoku J Exp Med* 2011; 224: 293-300 [PMID: 21799301 DOI: 10.1620/tjem.224.293]
- 49 史旭波, 胡大一. 凝血机制与抗凝治疗新观念. *临床荟萃* 2008; 23: 1597-1599
- 50 徐晤, 祖茂衡, 王志荣, 李国均. 多普勒导丝评价TIPS术门腔分流道血流特点. *医学影像学杂志* 2012; 22: 771-773

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.

RASAL1基因启动子甲基化及RAS活性与结肠癌临床病理的关系

袁纯, 陆枫林, 陈洪

袁纯, 东南大学临床医学院 江苏省南京市 210009
陆枫林, 陈洪, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
袁纯, 硕士, 主要从事胃肠道疾病的基础及临床研究.
江苏省自然科学基金资助项目, No. 2008301
作者贡献分布: 实验操作、数据整理及论文撰写由袁纯与陆枫林完成; 实验经费由陆枫林提供; 陆枫林审核; 陈洪合作.
通讯作者: 陆枫林, 教授, 210009, 江苏省南京市鼓楼区丁家桥87号, 东南大学附属中大医院消化科. lufenglinmytutor@163.com
电话: 025-83262283
收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-01-06
接受日期: 2013-01-11 在线出版日期: 2013-02-08

Clinical significance of RASAL1 promoter methylation and ras activity in colorectal carcinoma

Chun Yuan, Feng-Lin Lu, Hong Chen

Chun Yuan, College of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Feng-Lin Lu, Hong Chen, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Supported by: Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. 2008301
Correspondence to: Feng-Lin Lu, Professor, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, 87 Dingjiaqiao, Gulou District, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. lufenglinmytutor@163.com
Received: 2012-12-08 Revised: 2013-01-06
Accepted: 2013-01-11 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To detect RASAL1 (ras GTPase-activating-like protein 1) promoter methylation and ras activity in colorectal carcinoma (CRC) and to analyze their correlation with clinical and pathological parameters.

METHODS: Methylation-specific PCR (MSP) was used to detect RASAL1 promoter methylation in forty CRC specimens and matched normal colorectal tissue specimens. Co-immunoprecipitation was used to detect ras activity in tumor and normal tissues. The correlation of RASAL1 promoter methylation and ras activity with clinical and pathological param-

eters was analyzed.

RESULTS: RASAL1 promoter methylation was detected in 67.5% (26/40) of colorectal cancer tissues and in 30% (12/40) of normal tissues, and the positive rate of RASAL1 promoter methylation in tumor tissues was significantly higher than that in normal tissues ($P = 0.0017$). The median ras activity was significantly higher in colorectal cancer tissues than in normal tissues (1.07 vs 0.52, $P < 0.001$). RASAL1 promoter methylation and ras activity were both positively correlated with degree of tumor differentiation, invasion depth, lymph node metastasis, and TNM stage (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: High ras activity is related to RASAL1 promoter methylation, which may play an important role in the oncogenesis of CRC. RASAL1 methylation and ras activity may be novel therapeutic targets for CRC.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Ras GTPase-activating-like protein 1; Colorectal cancer; Methylation-specific PCR; Co-Immunoprecipitation; Ras activity

Yuan C, Lu FL, Chen H. Clinical significance of RASAL1 promoter methylation and ras activity in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 341-345
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/341.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.341>

摘要

目的: 检测RASAL1(ras GTPase-activating-like protein 1)基因甲基化率及RAS活性在结肠癌组织中的表达, 探讨其与临床病理资料间的关系。

方法: 以40例结肠癌标本为研究对象, 相应的正常组织标本为对照。甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR, MSP)检测RASAL1启动子CpG岛甲基化状态, 免疫共沉淀法检测RAS活性, 分析肿瘤组织中RASAL1

背景资料

我国恶性肿瘤的发生率及死亡率逐年上升, 结肠癌即为3大恶性肿瘤之一, 已严重威胁我国居民健康。对结肠癌的分子水平的研究成为热点, 有关研究发现与结肠癌相关的抑癌基因RASAL1, 在结肠癌组织中表达下降, 导致RAS蛋白活性增高, 从而激活相应的下游信号通路, 细胞过度增殖分化, 引起肿瘤发生发展。

同行评议者

崔莲花, 副教授, 266021, 山东省青岛市, 青岛大学医学院公共卫生系

■ 研究前沿

RASAL1基因是近期新发现的抑癌基因,可致多种肿瘤的发生,与结肠癌密切相关。引起RASAL1基因表达下调的分子生物学机制成为结肠癌研究的重点及热点,如何干预RASAL1基因功能沉默可能为结肠癌治疗提供新的思路。

基因甲基化率及RAS活性与临床病理参数间的关系。

结果: 40例肿瘤组织中有26例检测出RASAL1基因甲基化(26/40, 67.5%), 对照组40例中有12例出现甲基化(12/40, 30%), 肿瘤组织甲基化率明显高于正常组织($P = 0.0017$)。肿瘤组织中RAS活性的中位数为1.07, 正常组织中RAS活性的中位数为0.52, $P < 0.001$, 差异有统计学意义。结肠癌组织中RASAL1基因的甲基化率、RAS活性与患者肿瘤分化程度、侵袭深度、淋巴结转移、TNM分期有统计学差异(均 $P < 0.05$)。

结论: RASAL1甲基化状态与RAS活性增加有关,可能在结肠癌的发生发展中起重要作用。抑制RASAL1甲基化及RAS活性,可能成为治疗结肠癌的新靶点。

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

关键词: RASAL1; 结肠癌; 甲基化特异性PCR; 免疫共沉淀; RAS活性

袁纯, 陆枫林, 陈洪. RASAL1基因启动子甲基化及RAS活性与结肠癌临床病理的关系. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 341-345 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/341.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.341>

0 引言

恶性肿瘤是当前除心血管疾病外主要死亡原因之一。在美国,结直肠癌在各种癌症中发病率和死亡率均居第3位^[1],在我国,结肠癌发病率逐年上升,其病因与饮食、环境密切相关,死亡率居高不下。现代肿瘤学认为肿瘤是由基因点突变、小片段缺失或插入引起的遗传性改变和DNA甲基化等表观遗传学改变而导致的。RASAL1基因是近年发现的参与结肠癌发生发展的新基因^[2],目前国外已有研究表明,结肠癌组织中存在RASAL1基因甲基化改变,国内研究只针对RASAL1基因mRNA及RASAL1蛋白进行检测,尚未对导致RASAL1基因表达变化的机制进行研究。本实验拟采用甲基化特异性PCR、免疫共沉淀检测结肠癌组织及正常组织中RASAL1甲基化状态及RAS活性改变,并探讨与结肠癌临床病理指标间的关系,为结肠癌的临床诊断治疗、预后判断提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-05/2010-05于东南大学附属

中大医院接受外科手术切除的结肠癌患者的结肠癌组织标本40例作为研究组,术前未接受放疗、化疗或其他针对肿瘤的治疗,肿瘤组织取自肿瘤中心非坏死部位,正常组织为距肿瘤边缘5 cm以上的组织。诊断经术后病理检查证实,并确定病理类型和分化程度。其中男24例,女16例;年龄为40-83岁,平均65.1岁±12.7岁。癌组织和正常组织标本经4%中性缓冲甲醇固定、石蜡包埋。Taq Mix酶为美国ABI公司产品;DNA提取试剂盒为北京碧云天生物公司产品;Wizard DNA Clean-Up System试剂盒为美国Promega公司产品;PCR引物为上海生工生物技术有限公司合成;RIPA细胞裂解液和聚乙烯二氟(PVDF)膜为英国Whatman公司产品;蛋白提取试剂盒为南京凯基生物公司产品;K-RAS活性检测试剂盒(包含磁珠)为英国Abcam公司;K-RAS一抗(鼠抗人单克隆抗体)为英国Abcam公司;二抗[山羊抗鼠Ig(H+L)-HRP]为晶美生物公司产品。

1.2 方法

1.2.1 MSP方法: 石蜡切片,用二甲苯脱蜡,从石蜡包埋组织中提取DNA充分去除二甲苯,按Zymo DNA CpG岛甲基化修饰盒进行亚硫酸氢盐修饰。PCR反应体系: 50 μL反应体系: 5×扩增缓冲液10 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 4种dNTP各1 μL, Taq酶0.25 μL, 上下游引物各0.5 μL, cDNA 10 μL, 余体积以无菌蒸馏水补齐。反应条件: 94 °C预变性2 min, 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C 1 min, 40个循环后, 72 °C延伸7 min。根据文献, MSP甲基化引物序列为5'-GTGTATTTT-GTTTTTCGTCGTTTC-3'和5'-CAACGAACTCT-TACCGAAACG-3', 非甲基化引物为5'-AATT-TATTAGGAGTTAGTGGTTAT-3'和5'-CACAA-CAAACCTCTTACCAAAACA-3', 长度均为221 bp。

PCR判断标准: 甲基化阳性为能扩增出甲基化产物,包括同时扩增出非甲基化产物;甲基化阴性为只出现非甲基化条带^[3]。

1.2.2 免疫共沉淀方法: 磷酸盐缓冲液冲洗后,按照组织蛋白提取试剂盒的要求提取蛋白,用Western免疫印记法检测目的蛋白。各条带灰度值结果以有活性的RAS和总RAS灰度值之比表示。

统计学处理 应用SPSS18.0统计软件,定量数据满足正态性的采用mean±SD描述,不满足正态性的采用中位数来描述。两组相关样本采用配对t检验或者配对秩和检验分析。分类资料采用频数描述原始资料,采用 χ^2 或者Fisher's精确概率检验进行组间比较,所有检验均以显著水



图1 结肠癌组织及相应正常组织MSP结果. Marker: 标准; M: 甲基化引物; U: 非甲基化引物; T: 肿瘤组织标本; N: 正常组织标本; 1、2: 病例编号, 1T/1N、2T/2N: 来自同一个病例的肿瘤组织及正常组织.

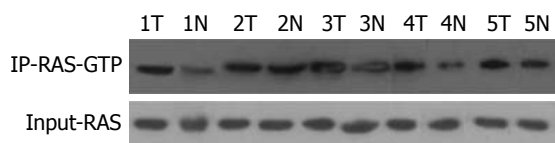


图2 免疫共沉淀测得各标本灰度值. T: 肿瘤组织; N: 正常组织; 1、2、3、4: 标本编号; IP-RAS-GTP: 有活性的RAS蛋白; Input-RAS: 总RAS蛋白.

平 $P < 0.05$ 为具有统计学意义.

2 结果

2.1 MSP检测RASAL1甲基化状态 根据MSP结果(图1), 40例肿瘤组织中有26例(67.5%)发生RASAL1基因甲基化, 对照组40例正常组织中有12例(30%)正常组织中出现甲基化, 肿瘤组织、正常组织间RASAL1基因甲基化差异有统计学意义($P = 0.0017$, 表1).

2.2 免疫共沉淀检测RAS活性 根据各标本灰度值(图2), 检测得出肿瘤组织中RAS活性的中位数为1.07, 正常组织中RAS活性的中位数为0.52, $P < 0.001$, 差异有统计学意义.

2.3 RASAL1甲基化状态及RAS活性与临床病理资料间关系 本组40例结肠癌组织中RASAL1基因的甲基化率、RAS活性与患者肿瘤分化程度、侵袭深度、淋巴结转移、TNM分期有统计学差异(均 $P < 0.05$), 与患者性别、年龄、肿瘤大小间差异无显著性(均 $P > 0.05$, 表2).

3 讨论

Ras基因是存在于人体多种细胞中的原癌基因, 其编码的Ras蛋白参与细胞的增殖、分化、细胞骨架的构建. Ras蛋白可与GTP、GDP结合, 前者为活化状态, 后者为非活化状态, 调控GTP/GDP间转化的因素主要有Ras GTP酶活化蛋白(GTPase activating protein, Ras GAP)及Ras鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange fac-

表1 RASAL1在不同组织中的甲基化率 ($n = 40$)

分组	甲基化	非甲基化	P 值
肿瘤组织	27	13	0.0017
正常组织	12	28	

tor, Ras GEF)^[4]. 在正常细胞中, RAS蛋白几乎全部和GDP结合, 处于非活化状态, 故细胞呈现正常生长增殖. 当RAS蛋白与GTP结合, 处于活化状态时, 能激活下游信号分子, 从而导致增殖信号过度传入, 细胞增殖失控导致肿瘤发生发展^[5]. RASAL1是近年新发现的一种抑癌基因, 位于人类第12号染色体(12q24.13), 其编码的RASAL1蛋白是Ras GAP家族一员, 即具有GTP酶活性, 可以水解GTP为GDP, 从而RAS活性降低^[6]. 研究表明, 肿瘤组织中RASAL1基因表达下降, 主要机制有以下方面: RASAL1基因启动子CpG岛高甲基化、细胞内钙离子调节异常、上游基因PITX1(pituitary homeobox 1)功能缺失, 而RASAL1基因启动子甲基化是该基因表达下调的主要机制^[7]. RASAL1基因的甲基化与RAS活性的关系即是本课题研究的主要内容.

本课题前期实验^[8]已证明RASAL1蛋白在结肠癌组织中的表达较正常组织明显下降, RASAL1 mRNA在结肠癌组织中表达较正常组织下降, 与RASAL1蛋白表达正相关, 说明了RASAL1基因对于RASAL1蛋白的调控作用, 验证了文献报道的结肠癌中都存在RASAL1表达下调的情况. 有关研究表明, 肿瘤组织中, RASAL1基因表达下降的主要原因与基因启动子CpG岛甲基化有关^[9,10].

本实验采用MSP方法检测组织中基因的甲基化情况, 结果显示肿瘤组织中有27例(67.55%)发生RASAL1基因甲基化, 12例(30%)正常组织中出现甲基化, 肿瘤组织、正常组织间RASAL1基因甲基化差异有统计学意义($P = 0.0017$). 国外文献中, Jin等^[11]发现在结肠癌细胞中RASAL1基因外显子中存在CpG岛, 并证明肿瘤细胞株存在甲基化现象. Ohta等^[12]也在结肠癌细胞株RASAL1的CpG岛发现了甲基化位点, 并发生甲基化. 本实验和国外研究相符合, 验证了RASAL1基因甲基化是结肠癌组织中的高频事件. 本研究中有12例正常组织中出现甲基化, 标本经病理证实未发生病理学改变, 考虑原因为基因甲基化是早期分子事件, 早于病理改变分子水平已有表观遗传学的改变. 同时, MSP只需

■ 创新盘点

国内研究只针对RASAL1基因mRNA及RASAL1蛋白进行检测, 尚未对导致RASAL1基因表达变化的机制进行研究. 本文深入研究了结肠癌组织中RAS活性及甲基化状态与临床病理资料的关系, 不仅发现RASAL1基因可导致结肠癌发生, 还研究在结肠癌发展过程中基因甲基化状态和RAS活性变化的规律, 有助于临床病情的评估及预后判断.

■应用要点

本文检测了RAS-AL1基因甲基化状态及RAS活性在正常结肠组织及结肠癌组织中的表达情况,并分析其与结肠癌组织的临床病理资料间的关系,为研究结肠癌的分子机制提供理论依据,抑制甲基化及RAS活性可成为结肠癌治疗的新靶点。

表 2 40例结肠癌组织中RASAL1甲基化状态及RAS活性与临床病理参数间的比较

临床病理参数	n	甲基化例数(n)	χ^2 值	P值	RAS活性	χ^2 值	P值
性别							
男	24	14	2.2982	0.1295	0.97(0.7,1.65)	-0.4003	0.6889
女	16	13			1.07(0.87,1.19)		
年龄(岁)							
<70	20	11	2.8490	0.0914	0.88(0.65,1.15)	1.6365	0.1017
≥70	20	16			1.16(0.8,1.35)		
大小(cm)							
<4	26	18	0.1014	0.7501	1.09(0.74,1.21)	-0.3545	0.7230
≥4	14	9			0.98(0.77,1.41)		
分化程度							
低	21	18	19.5513	<0.001	1.20(1.12,1.46)	-4.2522	<.0001
高、中	19	9			0.77(0.46,0.81)		
侵袭程度							
T1, T2	25	11	6.8249	0.0090	0.98(0.66,1.19)	1.7321	0.0433
T3, T4	15	11			1.17(0.8,2.02)		
淋巴结转移							
无转移	20	8	13.7892	0.0002	0.80(0.66,1.04)	3.2325	0.0012
有转移	20	19			1.20(1.08,2.01)		
TNM分期							
I、II	16	7	12.2121	0.0005	0.80(0.66,1.04)	-2.3881	0.0169
III、IV	24	20			1.15(0.88,1.73)		

少量的DNA,对CpG岛等位基因甲基化有高敏感性.因此,可通过检测甲基化水平为评价术后复发提供相对早期的分子生物学参考依据。

同时本实验也出现半甲基化情况^[13],即肿瘤组织中既有甲基化特异性引物的扩增,又有非甲基化引物的扩增,也称为杂合甲基化.考虑原因有以下几点:(1)Bai等^[14]认为可能是两个等位基因的异质性有关,即两个等位基因一个甲基化一个非甲基化;(2)可能肿瘤细胞的异质性有关,一部分细胞甲基化,而另一部分非甲基化;(3)肿瘤组织中可能混有炎性细胞或纤维组织.半甲基化也提示这甲基化过程可能是一个量的积累的过程.综上所述,结肠癌组织中RASAL1基因甲基化是一高频事件,是抑癌基因RASAL1表达下调的重要因素,进而激活下游信号通路,引起肿瘤发生发展.因此,检测RASAL1基因甲基化水平对结肠癌的诊断有积极的意义。

免疫共沉淀利用抗原和抗体之间专一作用,研究蛋白质之间相互作用,确定两种蛋白质在生物组织中相互作用^[15],可以检测与GTP结合的RAS蛋白的量,根据其占总RAS蛋白的比例,测出RAS活性.本实验中,肿瘤组RAS活性中位数为1.07,正常组RAS活性中位数0.52,差异有统计学意义.表明肿瘤组织中与GTP结合的RAS蛋白

的量占总RAS蛋白的比例高,RAS活性高.与已有的研究表明的肿瘤组织中RASAL1表达下降,即RAS GTP酶活性降低,导致RAS-GTP灭活减少,RAS活性增加的观点符合^[6].

Ohta等^[12]曾收集不同组织学分期的结直肠癌标本,发现RASAL1在结肠早期腺瘤(直径<1 cm)中表达正常,结肠腺癌组织中表达较后期腺瘤(直径>1 cm)降低.这一结果表明,RASAL1表达下降在结直肠癌中早期即发生,并与进展有关系,在结肠癌的发展过程中,RASAL1表达下调频率越高,表明RASAL1的低表达与结肠癌的发展有着密切关系.本实验研究显示,随着患者肿瘤分化程度减低、侵袭程度增加、淋巴转移数增加、TNM分期增大,结肠癌组织中RASAL1甲基化率越高(均 $P<0.05$),RAS活性越高(均 $P<0.05$).由此可见,RASAL1甲基化及RAS活性与患者疾病进展、TNM分期呈正相关,与患者性别、年龄及肿瘤大小间差异无统计学意义.也验证了RASAL1基因甲基化是引起RASAL1表达下降的重要机制的理论,同时证实了RASAL1表达下降会导致RAS-GTP灭活减少,即RAS活性升高,故RASAL1可作为结肠癌早期诊断的指标,亦可联合其他临床分子生物学指标,行多基因联合检测,以提高灵敏度与特

异性. 同时, 由于肿瘤分化程度、侵袭程度、淋巴转移、TNM分期是结肠癌预后的评估参数, RASAL1也可作为结肠癌预后评估的重要指标, 指导临床治疗方案. 综上所述, RASAL1通过活化GTP酶, 使有活性的RAS-GTP转化为无活性的RAS-GDP, 调控着细胞正常的生长、分化、增殖, 发挥抑癌基因的作用. RASAL1基因发生甲基化后, 功能静默, RASAL1蛋白表达下降, 即RAS-GTP酶活性降低, 导致RAS-GTP灭活减少, 即有活性的RAS增加^[14], 因此能激活下游信号通路, 导致肿瘤发生. 甲基化在肿瘤的发展过程中持续存在, 但甲基化的过程也是可逆的, 可通过5-氮杂-2'-脱氧胞苷将其逆转, 称为去甲基化. 甲基化是目前肿瘤研究的重要方向, 抑制甲基化及RAS活性可成为结肠癌诊断治疗的新靶点, 进一步研究去甲基化, 可为肿瘤的治疗提供新的思路.

4 参考文献

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300 [PMID: 20610543 DOI: 10.3322/caac.20073]
- Westbrook TF, Martin ES, Schlabach MR, Leng Y, Liang AC, Feng B, Zhao JJ, Roberts TM, Mandel G, Hannon GJ, Depinho RA, Chin L, Elledge SJ. A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell* 2005; 121: 837-848 [PMID: 15960972 DOI: 10.1016/j.cell.2005.03.033]
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9700-9704 [PMID: 7937876 DOI: 10.1073/pnas.91.21.9700]
- Vigil D, Cherfils J, Rossman KL, Der CJ. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 842-857 [PMID: 21102635 DOI: 10.1038/nrc2960]
- Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, Davies LC, Tsuboi T, Bivona TG, Cozier GE, Lockyer PJ, Buckler A, Rutter GA, Allen MJ, Philips MR, Cullen PJ. Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca²⁺ oscillations. *EMBO J* 2004; 23: 1749-1760 [PMID: 15057271 DOI: 10.1038/sj.emboj.7600197]
- Györfy B, Schäfer R. Biomarkers downstream of RAS: a search for robust transcriptional targets. *Curr Cancer Drug Targets* 2010; 10: 858-868 [PMID: 20718707 DOI: 10.2174/156800910793357916]
- Yashiro M, Nishioka N, Hirakawa K. K-ras mutation influences macroscopic features of gastric carcinoma. *J Surg Res* 2005; 124: 74-78 [PMID: 15734482 DOI: 10.1016/j.jss.2004.09.020]
- Bernards A, Settleman J. Loss of the Ras regulator RASAL1: another route to Ras activation in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2009; 136: 46-48 [PMID: 19041648 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.11.024]
- 程桂丹, 陈洪, 陆枫林. 肿瘤相关基因RASAL1在结肠癌中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 488-493
- Aytekin T, Ozaslan M, Cengiz B. Deletion mapping of chromosome region 12q13-24 in colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 201: 32-38 [PMID: 20633766 DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2010.05.005]
- Jin H, Wang X, Ying J, Wong AH, Cui Y, Srivastava G, Shen ZY, Li EM, Zhang Q, Jin J, Kupzig S, Chan AT, Cullen PJ, Tao Q. Epigenetic silencing of a Ca(2+)-regulated Ras GTPase-activating protein RASAL defines a new mechanism of Ras activation in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 12353-12358 [PMID: 17640920 DOI: 10.1073/pnas.0700153104]
- Ohta M, Seto M, Ijichi H, Miyabayashi K, Kudo Y, Mohri D, Asaoka Y, Tada M, Tanaka Y, Ikenoue T, Kanai F, Kawabe T, Omata M. Decreased expression of the RAS-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression. *Gastroenterology* 2009; 136: 206-216 [PMID: 18992247 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.09.063]
- Glickman JF, Flynn J, Reich NO. Purification and characterization of recombinant baculovirus-expressed mouse DNA methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230: 280-284 [PMID: 9016766 DOI: 10.1006/bbrc.1996.5943]
- Bai T, Tanaka T, Yukawa K, Maeda M, Umesaki N. Reduced expression of death-associated protein kinase in human uterine and ovarian carcinoma cells. *Oncol Rep* 2004; 11: 661-665 [PMID: 14767518]
- Lee C. Coimmunoprecipitation assay. *Methods Mol Biol* 2007; 362: 401-406 [PMID: 17417028 DOI: 10.1007/978-1-59745-257-1_31]

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》2011年开始不再收取审稿费

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

HLA-DRB1*03/04等位基因与广西原发性肝癌家族聚集性的相关性

马莎莎, 吴继周, 吴健林, 刘芳, 胡蝶飞, 宁秋悦, 庞裕

■背景资料

广西是全国肝癌的高发区, 存在着非常显著的肝癌家庭聚集现象, 其发病是环境因素和遗传因素相互作用的结果, 在众多遗传因素中HLA被认为与肝癌的发生、发展有密切关系。

马莎莎, 吴继周, 吴健林, 刘芳, 胡蝶飞, 宁秋悦, 庞裕, 广西医科大学第一附属医院感染性疾病科 广西壮族自治区南宁市 530021

马莎莎, 硕士, 主要从事肝脏病的发病机制及诊疗方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30960170

广西卫生厅重点科研课题基金资助项目, No. 桂卫重200924

作者贡献分布: 此课题由吴继周与马莎莎共同设计; 研究过程和数据分析由马莎莎、吴健林、刘芳及庞裕操作完成; 研究标本由胡蝶飞与宁秋悦协助提供; 论文写作由马莎莎、吴继周及吴健林共同完成; 由吴继周审核。

通讯作者: 吴继周, 教授, 530021, 广西壮族自治区南宁市青秀区双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院感染性疾病科。wjz925@163.com

收稿日期: 2012-12-06 修回日期: 2013-01-09

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Relationship between HLA-DRB1*03/04 alleles and familial clustering of hepatocellular carcinoma in Guangxi

Sha-Sha Ma, Ji-Zhou Wu, Jian-Lin Wu, Fang Liu, Die-Fei Hu, Qiu-Yue Ning, Yu Pang

Sha-Sha Ma, Ji-Zhou Wu, Jian-Lin Wu, Fang Liu, Die-Fei Hu, Qiu-Yue Ning, Yu Pang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30960170; and the Science Foundation of Health Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. 200924

Correspondence to: Ji-Zhou Wu, Professor, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, 6 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. wjz925@163.com

Received: 2012-12-06 Revised: 2013-01-09

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between HLA-DRB1*03/04 alleles and familial clustering of hepatocellular carcinoma (HCC) to identify genes related to susceptibility to HCC in Guangxi, China.

METHODS: One hundred and fifty members whose families have had two or more HCC patients were selected as the case group, and 150 members whose families have had only

one HCC case and 150 members from families without any cancer were selected as controls. Peripheral blood samples were collected to extract DNA for testing HLA-DRB1*03/04 alleles by PCR-SSP.

RESULTS: The frequency of the HLA-DRB1*03/04 alleles were all slightly higher in the case group than those in the two control groups. The difference in HLA-DRB1*03 allele distribution among the three groups was not statistically significant ($\chi^2 = 1.074, P = 0.584$), but the difference in HLA-DRB1*04 allele distribution was significant ($\chi^2 = 8.748, P = 0.013$).

CONCLUSION: HLA-DRB1*04 allele, not HLA-DRB1*03 allele, might be associated with familial clustering of hepatocellular carcinoma in Guangxi, China.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: HLA-DRB1*03/04; Allele; Hepatocellular carcinoma; Familial clustering

Ma SS, Wu JZ, Wu JL, Liu F, Hu DF, Ning QY, Pang Y. Relationship between HLA-DRB1*03/04 alleles and familial clustering of hepatocellular carcinoma in Guangxi. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 346-351 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/346.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.346>

摘要

目的: 探讨HLA-DRB1*03/04等位基因与广西原发性肝癌家族聚集性的相关性, 为寻找原发性肝癌的遗传易感基因或抗病基因提供线索。

方法: 采取性别、年龄±5岁配对方法, 在广西肝癌高发区选取肝癌高发家族成员、肝癌单发家族成员和无癌家族成员各150例作为研究对象, 采集研究对象外周全血提取DNA, 应用PCR-SSP方法对HLA-DRB1*03/04等位基因进行检测。

结果: HLA-DRB1*03在肝癌高发家族组的表

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科; 肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

达频率(16.7%)稍高于肝癌单发家族组(12.7%)及无癌家族组(16.0%), 该等位基因在3组间的分布无显著性差异($\chi^2 = 1.074, P = 0.584$); HLA-DRB1*04在肝癌高发家族组的表达频率(14.7%)稍高于肝癌单发家族组(5.3%)及无癌家族组(7.3%), 其在3组间的分布有显著性差异($\chi^2 = 8.748, P = 0.013$).

结论: HLA-DRB1*04等位基因可能与广西肝癌高发区原发性肝癌的家族聚集性存在相关性; 而HLA-DRB1*03等位基因则与之无明显相关.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: HLA-DRB1*03/04; 等位基因; 原发性肝癌; 家族聚集性

马莎莎, 吴继周, 吴健林, 刘芳, 胡蝶飞, 宁秋悦, 庞裕. HLA-DRB1*03/04等位基因与广西原发性肝癌家族聚集性的相关性. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 346-351 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/346.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.346>

0 引言

据我国癌症登记的资料分析结果表明, 肝癌的发病率及死亡率均居我国癌症的前4位, 严重威胁着人类的健康和生命. 广西是全国肝癌的高发区, 既往研究发现广西肝癌高发区存在着非常显著的肝癌家庭聚集现象, 且肝癌的发生逐渐呈年轻化, 使得探索肝癌家族聚集性的危险因素和预测指标显得意义重大. 现已证实肝癌的发病是环境因素和遗传因素相互作用的结果, 在众多遗传因素中人类主要组织相容性复合体(human leukocyte antigen, HLA)被认为是与遗传密切相关的基因, 不仅决定着个体间基因组间的主要差异, 而且其高度的多态性与机体的免疫状态密切相关, 被认为与肝癌的发生、发展有密切的关系. 为了探讨HLA-DRB1等位基因型与广西肝癌家庭聚集性的关系, 研究其是否可作为广西肝癌家族聚集性发生的预测指标, 本研究采用PCR-SSP技术探讨HLA-DRB1*03/04等位基因与广西肝癌高发区肝癌家族聚集性之间的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究选择广西肝癌高发区肝癌高发家族成员150例作为实验组, 采取配对方法选择与高发家族成员生活条件、生活环境、生活习

惯以及生活水平相同的同一村屯、相同性别、年龄 ± 5 岁的肝癌单发家族成员和无癌家族成员各150例作为对照. 肝癌高发家族的定义: 有血缘关系的家族成员中发生过2例及2例以上的原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)病例(HCC诊断按照第四届全国肝病学术会议修订的肝癌诊断标准)的家族; 肝癌单发家族的定义: 有血缘关系的家族成员中仅发生过1例HCC病例的家族; 无癌家族定义: 直系亲属中未发生过任何恶性肿瘤病例的家族. 3组研究对象, 男90例, 女60例, 瑶族111例、壮族228例和汉族111例, 其中HBsAg阳性为112例(3组分别为36例、42例、34例), HBsAg阴性为338例, 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)抗体均为阴性, 肝癌高发家族组、肝癌单发家族组及无癌家族组间年龄、性别、肝功能、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染情况比较, 3组间的差异均无统计学意义($P > 0.05$). Premix Taq酶购自Takara公司; 引物序列均由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 采集受检者空腹时外周静脉血4 mL, 分别注入有盖普通无菌干燥管和依地酸二钠(EDTA)管各2 mL, 混匀后进行300 μ L/管分装, 并保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中, 用于提取外周血白细胞DNA. 自凝血离心后留取血清进行乙型肝炎病毒血清学标志物(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb)、肝功能、抗HCV和HBV-DNA的检测.

1.2.2 DNA提取及质控: 采用美国promega试剂盒严格按照说明书的步骤进行提取, 提取后的DNA使用凝胶电泳及紫外分光光度仪Nano Drop 2000检测其浓度和纯度, 选取DNA纯度: $A_{260/280}$ 值在1.6-1.8之间, 电泳条带单一、清晰的样品保存于-20 $^{\circ}$ C待用.

1.2.3 HLA-DRB1*03/04等位基因的检测: (1)引物制备: 参照Olerup等^[1]的文献设计HLA-DRB1*03/04等位基因特异性引物序列各一对(表1), 以人类生长因子(human growth factor, HGF)基因片段作为内参照来检测PCR反应体系是否正常; (2)25 μ L PCR反应体系的组成: Premix Taq酶12.5 μ L, 引物上下游各0.5 μ L, 内参上下游各0.3 μ L, 8.9 μ L ddH₂O, 2.0 μ L DNA模板; (3)PCR反应条件: 预变性94 $^{\circ}$ C 3 min, 变性94 $^{\circ}$ C 30 s, 退火59 $^{\circ}$ C/58 $^{\circ}$ C 40 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行35个循环, 末次延伸72 $^{\circ}$ C 5 min; (4)PCR产

■ 相关报道

HLA等位基因的多态性与肝癌、宫颈癌、肾细胞癌、甲状腺乳头状癌及鼻咽癌等的遗传易感性密切相关.

■ 创新盘点

本文把肝癌家族中非癌症成员作为研究对象,研究HLA-DRB1等位基因在广西肝癌高发区原发性肝癌的家族聚集中的作用。

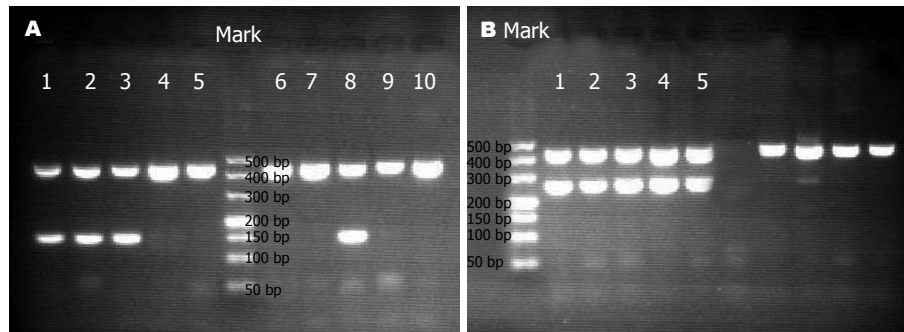


图1 HLA-DRB1*03/04等位基因的PCR扩增电泳图。A: 泳道1-3、8为DRB1*03等位基因阳性扩增标本, 4-7、9、10为DRB1*03等位基因阴性扩增产物, 151 bp的条带为目的条带; B: 1-5为DRB1*04等位基因阳性扩增标本, 7-10为DRB1*04等位基因阴性扩增标本, 250 bp的条带为目的条带, 图A、B中432 bp条带为内参照(HGF)。

表1 各等位基因特异性引物序列

基因	引物序列5'-3'	长度(bp)	基因长度(bp)
*03	上游TACTTCCATAACCAGGAGGAGA	22	151
	下游TGCAGTAGTTGTCCACCCG	19	
*04	上游GTTTCTGGAGCAGGTAAACA	22	260
	下游CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	20	
人类生	上游CAGTGCCTCCCAACCATTCCCTTA	25	432
长因子	下游ATCCACTCACGGATTCTGTTGTGTTTC	28	

物的确定: 3%琼脂糖凝胶进行电泳, 在凝胶电泳成像系统上观看结果。阳性产物送上海生物工程技术有限公司进行测序, 测序结果与NCBI GeneBank的HLA-DRB1*03/04等位基因核苷酸序列进行比对(BLAST)相似性达95%-99%, 结合电泳结果确定产物为目的基因片段(图1, 2)。

统计学处理 采用SPSS16.0统计学软件进行统计分析, 各组HLA-DRB1*03/04等位基因频率比较用行×列表 χ^2 检验, 关联强度用比值比(odds ratio, $OR = ad/bc$)反映, 并计算其95%可信区间(95%CI); 统计学显著性检测均为双侧, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 HLA-DRB1*03/04等位基因的频率表达在各组间的分布及比较 HLA-DRB1*04等位基因在肝癌高发家族组、肝癌单发家族组及无癌家族组中的阳性率分别为14.7%、5.3%和7.3%, 3组间比较存在显著性差异($\chi^2 = 8.748, P = 0.013$), HLA-DRB1*04等位基因在高发家族组的表达频率显著高于单发家族组及无癌家族组, 其 OR 值分别为3.051和2.172, 而HLA-DRB1*03等位基因的表达频率在肝癌高发家族组、肝癌单发家族组及无癌家族组中分别为16.7%、12.7%和

16%, 经统计学分析, 3组间HLA-DRB1*03等位基因的表达频率分布无显著性差异($\chi^2 = 1.074, P = 0.584$, 表2)。

2.2 HLA-DRB1*03/04等位基因的表达与HBV感染、民族及性别的相关性 经统计学分析后HLA-DRB1*04等位基因与HBV感染、民族及性别均无明显相关性, HLA-DRB1*03等位基因与HBV感染、性别也均无明显相关性, 但其在壮族、汉族和瑶族中的表达频率分布为15.8%、21.6%和7.2%, 经统计学分析, 3个民族间的表达频率存在显著性差异($\chi^2 = 9.155, P = 0.010$), 瑶族人群中HLA-DRB1*03等位基因的表达率显著低于壮族及汉族人群, 其 OR 值分别为0.414和0.282(表2)。

3 讨论

HLA基因复合体是迄今所知的人类最具多态性的基因系统, 依据编码分子的不同特性而分成3类基因区, 分别称为I、II、III类基因。其中II类基因的等位基因的多态性导致了抗原结合槽及提呈抗原肽给T细胞的效率不同而决定着不同个体对免疫应答的差异。在II类区域中又以HLA-DRB1等位基因多态性最复杂, 且是机体免疫基因(Ir)所在区域, 故与免疫应答关系最为密切, 并与许多疾病的遗传易感性^[2-6]相关。迄

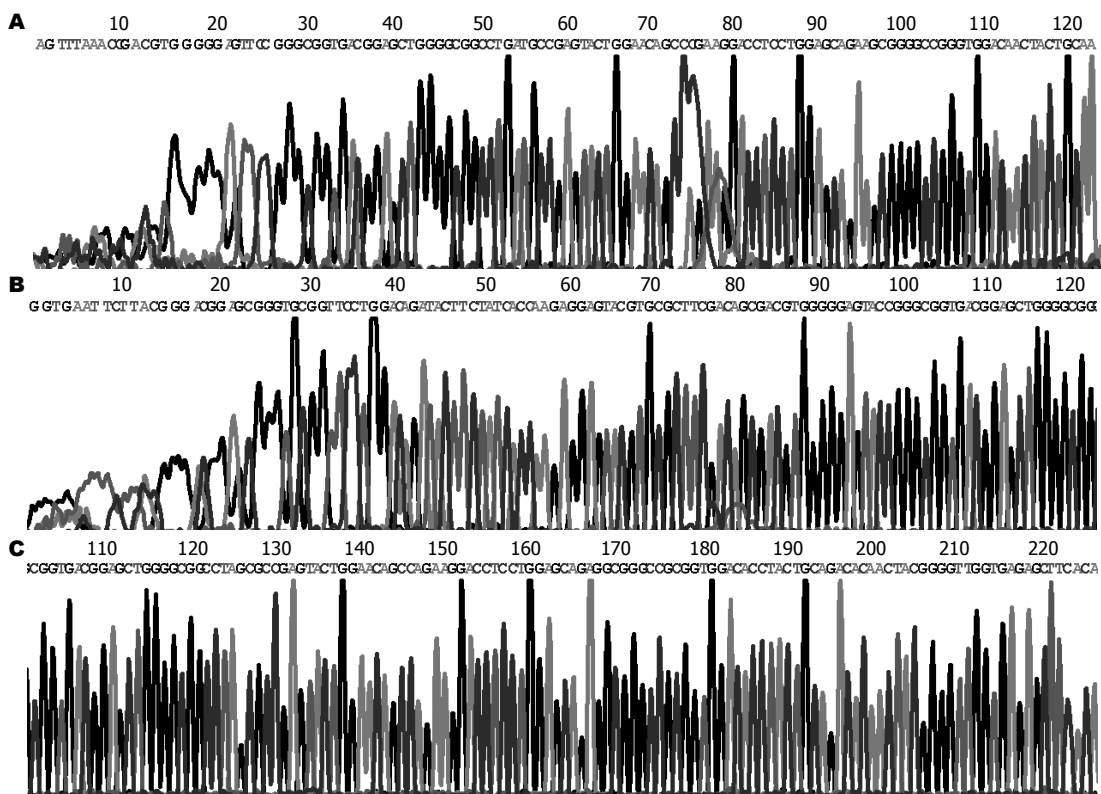


图 2 HLA-DRB1*03和HLA-DRB1*04等位基因测序结果. A: HLA-DRB1*03等位基因; B, C: HLA-DRB1*04等位基因.

应用要点

本研究通过PCR-SSP技术检测HLA-DRB1等位基因多态性,以期找到肝癌家族聚集的易感基因,进一步研究肝癌高发家庭的高发原因.

今HLA-II类等位基因与肝癌病理以及遗传易感性的关系已有较多的阐明,蒋业贵等^[7]检测了HLA-DR在肝癌组织中的表达情况,发现肝癌组织表达HLA-DR,而癌旁的非癌组织HLA-DR表达则为阴性,且在肝癌中表达的阳性率随肝癌的分化程度的下降而降低,提示HLA-DR可作为肝癌的发生、发展不同时期的一个标志物. Donaldson等^[8]对中国肝癌病人HLA-DRB1等位基因进行的研究结果表明DRB1*1501是中国肝癌发生的危险基因. El-Chennawi等^[9]对埃及肝癌病人HLA-DRB1等位基因进行的研究表明DRB1*07、DRB1*04为埃及肝癌发生的危险因子,而DRB1*15为保护性因子. 罗双艳等^[10]、黄爱春等^[11]对广西地区肝癌患者的研究发现DRB1*07、13、14可能是原发性肝癌的易感基因. Lin等^[12]进行的Meta分析证实了DRB1*07、12是所有人原发肝癌的易感基因,而DRB1*15等位基因可能是亚洲人群肝癌的易感基因. 最近也有文献^[13]证明HLA-DRB1*14可能是慢性乙型肝炎患者发展为肝癌的危险因素. 上述文献均说明HLA-DRB1等位基因与肝癌的发生密切相关,但其与肝癌家庭聚集性的关系如何,在国内外鲜有研究报道. 本课题之前进行的实验部分已证明HLA-DRB1的部分常见等位

基因可能与肝癌家族聚集性相关,本实验选择与慢性乙型肝炎易感性^[14-16]以及与肝癌发生相关的HLA-DRB1*03、04等位基因进行研究,以观察肝癌高发是因为遗传了对HBV感染的易感性还是遗传了家族本身的某些遗传特质所致.

本研究对HLA-DRB1*03/04等位基因在高发家族组、单发家族组及无癌家族组中的表达频率进行的分析结果发现,HLA-DRB1*04等位基因的表达频率在肝癌高发家族成员、肝癌单发家族成员及无癌家族成员分别为14.7%、5.3%和7.3%,经统计学分析,HLA-DRB1*04表达频率的分布在3组间存在显著性差异($\chi^2 = 8.748, P = 0.013$),HLA-DRB1*04等位基因在高发家族组的表达频率显著高于单发家族组及无癌家族组,其OR值分别为3.051和2.172. 研究结果表明,HLA-DRB1*04等位基因表达的家族成员发生原发肝癌的几率是无HLA-DRB1*04等位基因表达的家族成员的2.172倍以上. 以往的研究^[17]结果已证明,广西肝癌高发区的肝癌家族聚集性与HBV感染密切相关,但本研究中HLA-DRB1*03/04等位基因的表达频率在HBV感染者与非HBV感染者间比较均无显著性差异($\chi^2 = 1.539, P = 0.215; \chi^2 = 0.006, P = 0.938$),提示广西肝癌高发区肝癌的家族聚集性可能不是由于

■名词解释

肝癌高发家族: 有血缘关系的家族成员中发生过2例及2例以上的原发性肝癌(HCC)病例(HCC诊断按照第四届全国肝病学术会议修订的肝癌诊断标准)的家族。

表 2 各组HLA-DRB1等位基因频率分布比较 %/n

分组	n	HLA-DRB1*03	HLA-DRB1*04
实验组			
高发家族组	150	16.7(25/150)	14.7(22/150)
单发家族组	150	12.7(19/150)	5.3(8/150)
无癌家族组	150	16.0(24/150)	7.3(11/150)
χ^2 值		1.074	8.748
P值		0.584	0.013 ^a
民族			
壮族	228	15.8 (36/228)	8.3 (19/228)
瑶族	111	7.2 (8/111)	7.2 (8/111)
汉族	111	21.6 (24/111)	12.6 (14/111)
χ^2 值		9.155	2.296
P值		0.010 ^b	0.317
HBV感染			
HBV感染者	112	18.8(21/112)	8.9(10/112)
非HBV感染者	338	13.9(47/338)	9.2(31/338)
χ^2 值		1.539	0.006
P值		0.215	0.938
性别			
男	270	16.3(44/270)	8.9(24/270)
女	180	13.3(24/180)	9.4(17/180)
χ^2 值		0.739	0.040
P值		0.390	0.841

^a高发家族组与单发家族组间的比较($\chi^2 = 7.259, P = 0.007; OR = 3.051; 95\%CI: 1.312-7.093$); 高发家族组与无癌家族组间的比较($\chi^2 = 4.120, P = 0.042; OR = 2.172; 95\%CI: 1.013-4.656$); ^b瑶族与壮族间的比较($\chi^2 = 4.868, P = 0.027; OR = 0.414; 95\%CI: 0.186-0.924$); 瑶族与汉族间的比较($\chi^2 = 9.347, P = 0.002; OR = 0.282; 95\%CI: 0.120-0.658$).

HLA-DRB1*04等位基因造成机体对HBV感染的遗传易感性所致。由此可见, HLA-DRB1*04等位基因本身可能是导致广西肝癌高发区原发性肝癌家族聚集的危险基因。本研究结果还表明, HLA-DRB1*03等位基因在肝癌高发家族组、单发家族组及无癌家族组的表达频率分别为16.7%、12.7%和16.0%, 经统计学分析, 其表达频率的分布在3组间均无显著性差异($\chi^2 = 1.074, P = 0.584$)。提示HLA-DRB1*03等位基因可能不是广西肝癌家族聚集性的危险因素。对HLA-DRB1*03/04等位基因在3个民族中的表达频率的进一步分析发现, HLA-DRB1*03等位基因在壮族、汉族和瑶族中的阳性率分布为15.8%、21.6%和7.2%, 经统计学分析, 3个民族的HLA-DRB1*03表达频率存在显著性差异($\chi^2 = 9.155, P = 0.010$)。研究结果显示, 瑶族人群中HLA-DRB1*03等位基因的表达率显著低于壮族及汉族人群, 其OR值分别为0.414和0.282。综合HLA-DRB1*03等位基因在肝癌高发家族组、单发家

族组及无癌家族组的表达频率分布在3组间均无显著性差异($\chi^2 = 1.074, P = 0.584$)结果表明, HLA-DRB1*03等位基因的缺省可能只是广西瑶族人群的遗传特征之一, 与原发性肝癌的遗传易感性无明显相关。

4 参考文献

- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-235 [PMID: 1357775 DOI: 10.1111/j.1399-0039.1992.tb01940.x]
- Xin YN, Lin ZH, Jiang XJ, Zhan SH, Dong QJ, Wang Q, Xuan SY. Specific HLA-DQB1 alleles associated with risk for development of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 2248-2254 [PMID: 21633537 DOI: 10.3748/wjg.v17.i17.2248.]
- Yilmaz E, Çekmen A, Akkuş E, Önal B, Özalp AU, Solok V, Erdoğan E, Eren B. The relationship between human leukocyte antigens (HLA) and renal cell carcinoma. *Bosn J Basic Med Sci* 2010; 10: 282-286 [PMID: 21108609]

- 4 Hu Y, Zhang SH, Huang YG, Zhu H, Shuai CX. [Polymorphism of HLA-DRB1 and -DQB1 alleles among young women with cervical squamous cell carcinoma and its relation with human papilloma-virus type 16 infection]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2010; 90: 2193-2197 [PMID: 21029659]
- 5 Amoli MM, Yazdani N, Amiri P, Sayahzadeh F, Haghpanah V, Tavangar SM, Amirzargar A, Ghaf-fari H, Nikbin B, Larijani B, Mostaan LV, Bazzaz JT. HLA-DR association in papillary thyroid carci-noma. *Dis Markers* 2010; 28: 49-53 [PMID: 20164547 DOI: 10.3233/DMA-2010-0683.]
- 6 Zhao M, Cai H, Li X, Zheng H, Yang X, Fang W, Zhang L, Wei G, Li M, Yao K, Li X. Further evi-dence for the existence of major susceptibility of na-sopharyngeal carcinoma in the region near HLA-A locus in Southern Chinese. *J Transl Med* 2012; 10: 57 [PMID: 22440091 DOI: 10.1186/1479-5876-10-57]
- 7 蒋业贵, 王宇明, 李奇芬. HLA-DR抗原在肝细胞癌中的表达及意义. *免疫学杂志* 2001; 17: 556-561
- 8 Donaldson PT, Ho S, Williams R, Johnson PJ. HLA class II alleles in Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *Liver* 2001; 21: 143-148 [PMID: 11318984]
- 9 El-Chennawi FA, Auf FA, Metwally SS, Mosaad YM, El-Wahab MA, Tawhid ZE. HLA-class II alleles in Egyptian patients with hepatocellular carcinoma. *Immunol Invest* 2008; 37: 661-674 [PMID: 18821214 DOI: 10.1080/08820130802111605]
- 10 罗双艳, 李国坚, 吴健林, 吴继周, 韦颖华, 万裴琦, 黄爱春, 李兰兰. HLA-DRB1*7及*13等位基因与原发-性肝癌的相关性研究. *中国现代医学杂志* 2010; 20: 2000-2003
- 11 黄爱春, 吴继周, 吴健林, 陈务卿, 韦颖华, 罗双艳, 宁秋悦, 李兰兰. HLA-DRB1*14和*15等位基因与肝癌的相关性. *临床肝胆病杂志* 2010; 26: 420-422
- 12 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.]
- 13 Jin YJ, Shim JH, Chung YH, Kim JA, Choi JG, Park WH, Lee D, Lee YS, Kim SE, Kim SH, Yang SH. Relationship of HLA-DRB1 alleles with hepatocel-lular carcinoma development in chronic hepatitis B patients. *J Clin Gastroenterol* 2012; 46: 420-426 [PMID: 22499074 DOI: 10.1097/MCG.0b013e318239f9cc.]
- 14 骆峻, 金安娜, 吴旭东, 喻荣彬. 中国人群HLA-DRB1基因多态性与慢性乙型肝炎关系的META分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3050-3054
- 15 蒋业贵, 王宇明. 人类白细胞抗原-DRB1*1001与慢性乙型肝炎重型化密切相关. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 256
- 16 孔建新, 王保龙. 慢性乙型肝炎与HLA-DRB1等位基因的相关性研究. *安徽医学* 2004; 25: 358-360
- 17 吴继周, 汤国园. HBV感染及复制状态在HCC家庭聚-集性中的作用研究. *广西预防医学* 1997; 3: 264-266

同行评价

本研究有创新性, 首次发现HLA-DRB1*04等位基因可能与广西肝癌高发区原发性肝癌的家族聚集性存在相关性, 对进一步认识肝癌家族聚集性的遗传易感性以及肝癌的预防、诊治具有一定指导意义。

编辑 田滢 电编 闫晋利



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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

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

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

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

肝叶切除术在胆道再次手术中的应用

吴军卫, 柴新群, 李潼, 李锦锦, 孟元普

■背景资料

胆道再次手术是胆道外科的难题之一, 肝叶切除在胆道再次手术中的应用也相当广泛。术前评估和手术方式的合理选择是减少胆道再次手术次数的关键。特别是磁共振胰胆管成像(MRCP)在胆道再次手术需行肝叶切除患者术前评估中的应用极为重要, 可以帮助术者选择更为合理的手术方式。由于各级医疗单位水平和术者水平不同, 有相当多的胆道再次手术需行肝叶切除的患者因首次胆道手术方式不合理而导致, 因此建立一个相对统一的治疗模式, 作好胆道再次手术尤为重要。

■同行评议者

陈进宏, 副主任医师, 复旦大学附属华山医院普外科

吴军卫, 柴新群, 李潼, 李锦锦, 孟元普, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022

吴军卫, 主要从事肝胆疾病的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81070059

作者贡献分布: 此论题由柴新群与吴军卫设计; 手术由柴新群、吴军卫及李潼等操作完成; 数据分析由柴新群、李锦锦及孟元普完成; 本论文写作由吴军卫与柴新群完成。

通讯作者: 柴新群, 教授, 主任医师, 430022, 湖北省武汉市解放大道1227号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科。xinqunc@hotmail.com

电话: 027-85351623

收稿日期: 2012-12-10 修回日期: 2013-01-08

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Application of hepatic lobectomy in bile duct reoperation

Jun-Wei Wu, Xin-Qun Chai, Tong Li, Jin-Jin Li, Yuan-Pu Meng

Jun-Wei Wu, Xin-Qun Chai, Tong Li, Jin-Jin Li, Yuan-Pu Meng, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81070059

Correspondence to: Xin-Qun Chai, Professor, Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, 1227 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xinqunc@hotmail.com

Received: 2012-12-10 Revised: 2013-01-08

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To investigate the application of hepatic lobectomy in bile duct reoperation and preoperative evaluation and management.

METHODS: The clinical data for 105 patients who underwent bile duct reoperation and hepatic lobectomy from November 2005 to February 2012 were retrospectively analyzed.

RESULTS: Left lateral hepatic lobectomy was performed in 69 patients, left hepatectomy in 18 patients, quadrate lobe resection in 8 patients (the Kasai procedure), and partial right lobe resection in 4 patients (including 1 undergoing right hepatectomy). Anatomic hepatectomy of bilateral lobes was implemented in 4 patients, includ-

ing 2 undergoing resection of gallbladder bed for gallbladder carcinoma, 1 undergoing right hepatectomy with left lateral lobectomy and 1 undergoing partial right hepatic lobe resection with left lateral lobectomy. Left medial hepatic resection was performed in 2 patients. Postoperative complications included incision infection, bile leakage, pneumonia, and pleural effusion. One patient died of liver failure perioperatively.

CONCLUSION: For recurrence of intrahepatic bile duct stones and/or residual stones, lobes with stones and stenosis should be resected completely in hepatic lobectomy so as to reduce the frequency of biliary tract reoperation.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Bile duct reoperation; Hepatic lobectomy; Hepatolithiasis; Cholangiocarcinoma

Wu JW, Chai XQ, Li T, Li JJ, Meng YP. Application of hepatic lobectomy in bile duct reoperation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 352-356 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/352.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.352>

摘要

目的: 探讨肝叶切除在胆道再次手术中的应用及术前评估与处理。

方法: 回顾性分析2005-11/2012-2我院收治的胆道再次手术中行肝叶切除的105例患者的临床资料。

结果: 肝左外叶切除69例; 左半肝切除18例; 肝方叶切除8例; 肝右叶部分切除4例, 其中1例为右半肝切除; 双侧肝叶规则性切除4例, 包括2例胆囊床切除, 1例右半肝及左外叶切除, 1例部分肝右叶及左外叶切除; 左内叶切除2例。术后主要并发症: 切口感染、胆漏、肺部感染、胸腔积液。围手术期因肝功能衰竭死亡1例。

结论: 对于肝内胆管复发和/或残余结石, 应该彻底切除存在胆管结石和狭窄的肝叶或肝段, 努力减少胆道再次手术次数。

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 胆道再次手术, 肝叶切除, 肝石病, 胆管癌

吴军卫, 柴新群, 李潼, 李锦锦, 孟元普. 肝叶切除术在胆道再次手术中的应用. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 352-356
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/352.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.352>

0 引言

随着外科技术的发展, 肝叶切除术在胆道再次手术中的应用越来越广泛, 特别是对于肝内胆管复发和/或残余结石的患者. 但是, 应提高其应用的规范性, 否则不但难以解决根本问题, 反而会造成新的损伤, 导致严重的后果. 本文回顾性分析了本院2005-11/2012-2收治的胆道再次手术中行肝叶切除的105例患者的临床资料, 探讨其手术方式的合理应用及围手术期的术前评估与处理措施, 以提高手术的成功率, 减少胆道再次手术的次数.

1 材料和方法

1.1 材料 收集本院胆道再次手术行肝叶切除的患者105例, 男38例, 女67例. 年龄21-80岁, 平均54.6岁±11.4岁. 本次手术距前次手术时间为14 d至39年. 既往1次手术史72例, 2次28例, 3次及以上5例. 临床表现: 腹部不适(腹痛、腹胀)24例, 发热5例, 黄疸5例, 同时有腹部不适和发热36例, 同时有腹部不适和黄疸11例, 同时黄疸和发热3例, Charcot三联征18例, 无症状3例.

1.2 方法 对105例患者的临床资料进行回顾性分析, 就再次手术的原因、术前评估、手术方式的选择等进行分析.

2 结果

105患者上次手术的原因: 单纯胆囊结石或息肉40例, 胆总管结石或伴胆囊结石40例, 肝内外胆管多发结石20例, 胆管损伤修复3例, 胆总管囊肿2例. 上次手术的方式见表1. 本组患者再次手术的原因: 肝外胆管结石或狭窄并肝左叶结石或萎缩者35例, 胆管癌伴或不伴胆管结石者23例, 肝左叶结石伴脓肿或萎缩者22例, 左右肝内胆管多发结石并胆总管结石11例, 胆道高位损伤并胆道狭窄5例, 肝右叶结石伴脓肿或萎缩者2例, 胆囊癌侵及肝脏2例, 胆总管结石并肝左外叶血管瘤2例, 肝内胆管黏液性囊腺瘤伴胆管阻塞2例(其中1例为良性, 1例为交界性), Caroli病1例. 再次手术的方式见表2. 本组患者同时合并

肝硬化13例, 按Child-Pugh分级, 其中Child A级者10例, Child B级者3例. 术后主要并发症有单纯切口感染5例, 切口感染合并肺部感染1例, 切口感染合并胆漏1例, 胸腔积液4例, 单纯肺部感染1例, 单纯胆漏1例, 胆漏合并肺部感染1例, 围手术期因肝衰竭死亡1例, 并发症发生率为14.7%.

3 讨论

3.1 胆道再次手术时需要行肝叶切除的原因及术前评估 结合本组资料, 在胆道再次手术中有以下情况需行肝叶切除术: (1)肝内胆管结石残余或复发; (2)肝内或肝门部胆管癌; (3)IVa型及V型先天性胆总管囊肿; (4)高位胆管损伤; (5)合并胆道疾病的肝脏其他良恶性占位.

胆道再次手术一定要做好术前准备工作, 对患者进行全面评估. (1)合并肝硬化的胆道再次手术患者, 要评估患者的肝功能. 有关研究报道肝功能Child-Pugh分级标准不适合胆道再次手术合并肝硬化门静脉高压症患者的评估要求^[1], 因为有些患者由于胆道阻塞, 总胆红素增高很明显, 但是患者的血浆白蛋白、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)在可接受水平, 没有明显腹水和肝性脑病, 同样可以接受手术治疗; (2)对于胆道再次手术的患者一定常规行胆道磁共振胰胆管成像(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)检查, 以了解病变的部位和范围, 明确可否行肝叶切除及切除范围. 有报道MRCP对梗阻性黄疸部位确诊率达100%, 梗阻原因诊断正确率达95.8%^[2]. 本组资料中有16例患者因上次手术未行MRCP, 而没有切肝、或切肝不彻底. 本次手术有65例患者行MRCP, 且检查结果均与术中所见相同; (3)关于明显黄疸的患者是否需要术前减黄、多大程度的黄疸需要减黄一直是肝胆外科讨论的热点, 国内外较一致的观点是胆红素>170 μmol/L必须术前减黄^[3]. 一般严重黄疸的病人对麻醉及手术的耐受能力降低, 术中渗血增加, 术后组织愈合不良. 文献报告, 在严重的梗阻性黄疸情况下术后各吻合口愈合不佳, 易发生吻合口漏^[4], 易发生肝、肾功衰竭及消化道大出血等严重的术后并发症^[5], 且术后并发症及院内病死率增加^[6].

3.2 肝叶切除在胆道再次手术中的应用

3.2.1 肝叶切除在再次胆道肝石病中的应用: 肝内胆管结石残余或复发患者占胆道再次手术须行肝叶切除者的绝大多数, 本组资料因肝石病

■ 相关报道

目前许多报道分析了胆道再次手术的常见原因, 亦提出相应的手术方法. 关键是要把握黄志强院士倡导的“解除狭窄, 清除结石, 矫治畸形, 切除病灶, 通畅引流”的原则, 使首次胆道手术成为“最后一次”手术.

■ 创新盘点

本文重点对胆道再次手术需行肝叶切除的原因进行分类, 并对每种分类下手术方式的合理选择作了重点探讨; 并强调了胆道再次手术合并肝硬化或严重胆管狭窄患者的术前评估及处理及MRCP在胆道再次手术需行肝叶切除患者中的应用.

■应用要点

建立一个相对统一的治疗模式。术前全面评估及选择合理术式可以减少胆道再次手术的次数。

表 1 105例胆道再次手术肝叶切除患者的首次手术方式

首次手术方式	n
胆囊切除术	40
再次胆道探查+T管引流术	21
胆囊切除+胆道探查+T管引流术	19
胆囊切除+胆道探查+胆总管空肠吻合术	11
再次胆道探查+胆总管空肠吻合术	3
胆囊切除+胆道探查+胆总管十二指肠吻合术	3
胆总管修复+T管引流术	3
胆总管囊肿切除+胆总管空肠吻合术	2
胆囊切除+胆道探查+肝左外叶切除术+T管引流术	2
再次胆道探查+肝左叶部分切除+左肝管空肠吻合术	1

表 2 105例胆道再次手术肝叶切除患者的再次手术方式

再次手术方式	n
肝叶切除术+胆道探查术 (肝左外叶切除54例, 左半肝切除 15例, 肝右叶不规则切除3例, 右半肝+左外叶切除1例, 右半肝切除1例)	74
肝叶切除+胆道探查+肝门部胆管(胆总管)空肠吻合术 (肝左外叶切除11例, 肝方叶部分切除例+肝管支撑管引流术5例, 肝方叶部分及肝左叶切除+支架植入3例, 左半肝切除3例, 右叶部分切除+左外叶切除1例)	23
单纯肝左外叶切除术	4
肝左外叶切除+胆道探查+肝左叶胆管空肠吻合术	2
胆囊癌根治术(伴胆囊床切除)	2

行肝叶切除者有70例, 占总数的66.7%, 其中肝左叶切除者66例, 右叶切除者4例, 这是由于肝脏解剖的原因致肝左叶比右叶更易形成结石。由于肝内胆管结石导致胆汁引流不畅, 容易引起胆管内感染, 患者多伴有胆管炎症状: 腹痛、发热寒战, 若有肝外胆管阻塞还伴有黄疸, 所以去除病灶尤为关键。造成肝内胆管结石残余或复发的原因归结起来有以下几点: (1)上次手术前检查未完善, 未发现肝内胆管结石; (2)手术方式选择错误。如肝左内及左外叶均存在结石及狭窄, 只行肝左外叶切除, 本组此类患者2例; 对于肝内胆管结石仅行胆总管切开取石+T管引流或胆肠吻合术, 希望术后胆道镜取净结石, 或结石自然掉落入肠管, 由于肝内胆管狭窄未解除, 结石必然复发; (3)上次手术胆肠吻合口狭窄, 胆汁引流不畅致肝内结石复发。肝叶切除在肝石病的手术适应证如下: (1)区域型肝内胆管结石; (2)弥漫性肝内胆管结石有区域性的毁损病灶, 这些病灶包括: 肝叶或肝段的纤维化或萎缩; 难以取净的多发性结石; 难以纠治的肝管狭窄或囊性扩张; 合并慢性肝脓肿; 合并肝内胆管癌^[7]。

对于严重的肝硬化门脉高压症、急性化脓性胆管炎和一般状况差者均不宜行肝叶切除术。

对于左肝内胆管结石, 现在一致认为应行规则性的左半肝切除(或加尾叶切除)替代原来的左外叶切除。Sun等^[8]发现仅切除肝左外叶其残石发生率为22%, 左肝管再狭窄发生率为43%, 而行左半肝切除者残石发生率仅为4%, 且残石均存在于肝外胆管。因为通过肝外胆管及肝断面左肝管残端取石几乎不可能完全清除散布于左内叶胆管结石, 更难以清除左内叶狭窄或扩张的胆管, 术后结石残留或复发难以避免。左半肝切除能够完全切除左肝内结石及狭窄或扩张的胆管, 减少了远期结石复发、胆汁性肝硬化、门脉高压及发生胆管癌的危险性。本组资料有2例患者上次手术因左肝结石行左外叶切除而致左内叶结石残余或复发, 不得已再次行左内叶切除, 其中一例已恶变为胆管癌。一般认为对只存在左肝管结石, 左外叶及左内叶胆管均无结石及狭窄, 且左肝形态正常, 嵌入的结石可以通过胆道探查或胆道重建取出, 所有的胆管狭窄可以不用通过规则性肝叶切除完全清除,

则可不行肝叶切除. 右肝结石的发生率较左肝小, 也建议行规则性右半肝切除^[9]. 对于分布于双侧肝叶的区域型结石伴相应肝段萎缩或脓肿者, 在预计残肝可以满足机体需要的情况下, 可行双侧肝叶的规则性切除. 对于肝石病, 我们应以黄志强院士倡导的“解除狭窄, 清除结石, 矫治畸形, 切除病灶, 通畅引流”为原则, 又以去除病灶(包括狭窄或扩张的胆管和萎缩或毁损的肝组织)为治疗的核心, 认真负责的做好每一例肝石病手术.

3.2.2 肝叶切除在再次胆道胆管癌中的应用: 胆管癌在胆道再次手术中也较常见, 肝门部胆管癌或者肝内胆管癌累及肝门部的患者一般均有较严重的黄疸, 行根治术时为彻底切除癌灶也需行相应的肝叶切除. 本组资料中因胆管癌行肝叶切除者有23例, 均为肝内或肝门部胆管癌, 占总数的21.9%. 其发生与上次手术方式有关的原因一般有: 肝石病患者上次手术病灶未完全切除致肝内结石残余或复发、胆肠吻合术后肠液返流致反流性胆管炎和胆总管囊肿上次手术未切除. 若上述病症长期存在, 未行规范治疗均可诱发胆管癌.

一般而言肝内胆管癌及肝门部胆管癌行根治术时均须行肝叶切除. 肝内末梢胆管癌具有最高的手术切除率, 手术方式同肝细胞癌的类型, 即把癌变的肝内胆管所在的肝叶或肝段切除. 然而, 肝门胆管癌一直是肝胆外科非常棘手的问题, 治疗原则以手术切除为主, 最重要的是达到显微镜下的无瘤边缘(R0切除). Bismuth等^[10]报道9例患者行R0切除术后在长达1-11年的随访期有7例达到无瘤生存, 而10例仅达到肉眼无瘤边缘(R1切除)者均于术后3年内死于肿瘤复发. 对于肝门胆管癌患者存在以下因素可作为手术的相对或绝对禁忌证: (1)癌组织累积双侧二级肝内胆管; (2)癌组织阻塞或包裹门静脉主干; (3)一侧肝叶萎缩同时伴有对侧门静脉的分支的包裹; (4)一侧肝叶萎缩同时伴有对侧二级胆管侵犯; (5)AJCC癌症分级III-IV级; (6)肝硬化伴有门静脉高压; (7)不适合手术的其他合并症^[11]. 一般认为较为有临床指导意义手术方式的是Bismuth分型. 对于I型可只行局部肿块切除; II型行局部肿块切除+肝尾叶切除, 这是因为肿瘤浸润至左右肝管汇合处时几乎不可避免会侵犯肝尾叶胆管^[12], 若肿瘤还侵犯第IV肝段, 还应行肝方叶切除; IIIa型可行局部肿块切除+右半肝或右三叶切除+肝尾叶切除; IIIb型行局

部肿块切除+左半肝或左三叶切除+肝尾叶切除; IV型一般建议行肝移植术. 本组资料有3例IV型肝门胆管癌患者行改良Kasai术式(其手术原理是把肝门部受累肝组织切除使肝内胆管打开, 空肠吻合到被切除肝门部肝组织周围让胆汁流入空肠)也取得了良好的手术效果, 我们先前文章已有报道^[13]. 国内崔培元等^[14]亦报道了IV型肝门胆管癌应用Kasai术式取得满意效果. 此外肝门胆管癌的患者一般均有严重的梗阻性黄疸, 我们建议均应术前常规行PTCD减黄, 以防行半肝或扩大的半肝切除后剩余肝脏肝细胞功能较差, 不能代偿机体需要, 发生肝衰.

3.2.3 肝叶切除在再次胆道胆总管囊肿中的应用: 相当一部分胆总管囊肿患者因上次手术方式不当, 致使肝内囊肿残留, 多因囊肿生长出现压迫症状或感染出现胆管炎症状, 而需再次手术切除囊肿, 究其原因有: (1)对胆总管囊肿分型认识不足, 没有针对不同的分型采取不同的手术方式. 如对于IVa型没有行肝内囊肿所在肝叶的规则性切除; (2)胆总管囊肿仅行单纯囊肿十二指肠或空肠吻合, 囊肿未切除, 胰液、肠液返流仍存在, 导致长期胆管炎、肝内胆管狭窄及结石形成; (3)对于V胆总管囊肿误认为肝囊肿, 仅行“肝囊肿”开窗引流术. 本组有1例IVa型胆总管囊肿患者, 因首次手术仅行肝外囊肿切除致肝内囊肿残留, 于5年后因肝内囊肿化脓而再次行肝叶切除术.

对于IVa型(胆总管囊肿伴肝内胆管囊肿)应行肝外胆管切除+扩张相对严重一侧肝叶切除, 对于不适宜行半肝切除单发肝内囊肿患者, 也可切除覆盖在囊肿表面的少量肝组织, 打开肝内囊肿壁, 行肝管空肠+肝内囊肿空肠吻合术, 这可以避免切除过多的肝组织, 减少创伤. Uru-shihara等^[15]应用此方法取得良好的效果. 对于V型即Caroli病, 病变局限于某一肝段或一侧病变时, 首选规则性肝段切除或半肝切除, 部分累及双侧肝叶者应通过扩大的半肝切除达到完整切除肝内囊肿获得根治的目的. 对于全肝病变者若伴严重门脉高压症应行肝移植.

3.2.4 肝叶切除在再次胆道胆管损伤中的应用: 胆管损伤特别是高位胆管损伤再次手术行胆管修复时也需行肝叶切除, 这是因为电刀灼烧伤、反复胆漏、腹腔感染致高位胆管狭窄, 行肝门部胆管整形术后肝外胆管所剩甚少或没有, 行常规胆肠吻合已不可行, 为保证足够大的吻合口, 防止术后肝门空肠吻合口再狭窄, 须切除

■名词解释

胆道再次手术: 指胆道手术后因为并发症、原有疾病未治愈或者再次复发而施行的手术, 不包括其他腹部手术后再次针对胆道疾病所施行的手术.

同行评价

本文选题较好, 材料也充实, 对临床有一定指导意义。

部分IV或V肝段, 暴露肝门部, 获得足够大的吻合口, 行肝肠吻合, 这需要术者具备很高的胆道修复手术经验与技巧。本组资料中有5例为高位胆管损伤患者, 均通过Kasai术式取得非常好的手术效果, 具体手术程序我们研究小组已作过报道^[13]。胆道损伤再次手术争议较多的是手术时机的选择, 我们认为只要患者无胆管炎和腹腔感染表现, 且损伤部位近端胆管扩张, 应积极早期实施手术, 因为此时手术可以获得正常柔软的胆管, 与晚期修复相比死亡率及胆道再狭窄的比例并未增加^[16], 但可以尽早的解决患者的病痛。国外报道1例行腹腔镜胆囊切除术时横断了右肝管, 致使术后胆漏2 mo, 长期的腹腔感染使得患者肝右叶的胆管树弥漫性炎性狭窄, 但是肝左叶胆管造影显示良好, 采取右半肝切除+左肝管空肠Roux-en-Y吻合术, 术后随访5年恢复良好, 没有复发胆管炎及胆管结石^[17]。这说明胆管损伤修复时合理并灵活的运用肝叶切除可以很好的解决患者的病痛, 并免受再次手术之苦。

总之, 胆道再次手术中肝叶切除应用广泛, 肝胆外科医生应针对不同的胆道再次手术原因, 按相应手术原则规范行肝叶切除术。对再次胆道手术, 一定要精心设计、充分准备, 不轻易执行手术, 且努力做好本次手术, 力争成功。

4 参考文献

- 1 柏立山, 柴新群, 胡志坚, 冯贤松. 胆道多次手术同时合并肝硬化门静脉高压症的评估及处理. 肝胆外科杂志 2011; 23: 202-204
- 2 柴新群, 冯贤松, 张寿熙. 胆道再次手术的术前评估及处理. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1128-1131
- 3 李继光. 恶性梗阻性黄疸与术前减黄. 中国实用外科杂志 2001; 21: 498-502
- 4 Cherqui D, Benoist S, Malassagne B, Humeres R, Rodriguez V, Fagniez PL. Major liver resection for carcinoma in jaundiced patients without preoperative biliary drainage. *Arch Surg* 2000; 135: 302-308 [PMID: 10722032 DOI: 10.1001/archsurg.135.3.302]
- 5 Dixon JM, Armstrong CP, Duffy SW, Elton RA, Davies GC. Upper gastrointestinal bleeding. A significant complication after surgery for relief of obstructive jaundice. *Ann Surg* 1984; 199: 271-275 [PMID: 6608323 DOI: 10.1097/0000658-198403000-00004]
- 6 Greig JD, Krukowski ZH, Matheson NA. Surgical morbidity and mortality in one hundred and twenty-nine patients with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1988; 75: 216-219 [PMID: 3349328 DOI: 10.1002/bjs.1800750309]
- 7 中华医学会外科学分会胆道外科学组. 肝胆管结石病诊断治疗指南. 中华消化外科杂志 2007; 6: 156-160
- 8 Sun WB, Han BL, Cai JX. The surgical treatment of isolated left-sided hepatolithiasis: a 22-year experience. *Surgery* 2000; 127: 493-497 [PMID: 10819056 DOI: 10.1067/msy.2000.104663]
- 9 Hung CJ, Lin PW. Role of right hepatic lobectomy in the treatment of isolated right-sided hepatolithiasis. *Surgery* 1997; 121: 130-134 [PMID: 9037223 DOI: 10.1016/S0039-6060(97)90281-6]
- 10 Bismuth H, Nakache R, Diamond T. Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1992; 215: 31-38 [PMID: 1309988 DOI: 10.1097/0000658-199201000-00005]
- 11 Weber SM, DeMatteo RP, Fong Y, Blumgart LH, Jarnagin WR. Staging laparoscopy in patients with extrahepatic biliary carcinoma. Analysis of 100 patients. *Ann Surg* 2002; 235: 392-399 [PMID: 11882761 DOI: 10.1097/0000658-200203000-00011]
- 12 Nimura Y, Hayakawa N, Kamiya J, Kondo S, Shionoya S. Hepatic segmentectomy with caudate lobe resection for bile duct carcinoma of the hepatic hilus. *World J Surg* 1990; 14: 535-543; discussion 544 [PMID: 2166381 DOI: 10.1007/BF01658686]
- 13 Gao JB, Bai LS, Hu ZJ, Wu JW, Chai XQ. Role of Kasai procedure in surgery of hilar bile duct strictures. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4231-4234 [PMID: 22072856 DOI: 10.3748/wjg.v17.i37.4231]
- 14 崔培元, 范恒伟, 吴维, 吴斌全, 邱兆磊. Kasai术式在 III、IV型肝门胆管癌切除术中应用. 肝胆外科杂志 2012; 20: 292-294
- 15 Urushihara N, Fukumoto K, Fukuzawa H, Tani M, Matsuoka T, Suzuki K, Kawashima S, Hasegawa S. Hepaticojejunosotomy and intrahepatic cystojejunostomy for type IV-A choledochal cyst. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 1753-1756 [PMID: 17923209 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2007.06.012]
- 16 Thomson BN, Parks RW, Madhavan KK, Wigmore SJ, Garden OJ. Early specialist repair of biliary injury. *Br J Surg* 2006; 93: 216-220 [PMID: 16329079 DOI: 10.1002/bjs.5194]
- 17 Ota T, Hirai R, Tsukuda K, Murakami M, Naitou M, Shimizu N. Biliary reconstruction with right hepatic lobectomy due to delayed management of laparoscopic bile duct injuries: a case report. *Acta Med Okayama* 2004; 58: 163-167 [PMID: 15471439]

编辑 田滢 电编 闫晋利



MRCP对ERCP胆管插管难度预测的价值

朱恒, 赵清喜, 孙学国, 王小玮, 鞠辉, 毛涛, 田字彬

朱恒, 赵清喜, 孙学国, 王小玮, 鞠辉, 毛涛, 田字彬, 青岛大学医学院附属医院消化科 山东省青岛市 266003

朱恒, 在读硕士, 主要从事胆胰疾病的研究。

作者贡献分布: 朱恒与赵清喜对此文所作贡献均等; 此课题由朱恒与赵清喜设计; 研究过程由朱恒、孙学国、毛涛及鞠辉操作完成; 研究所用工具由赵清喜与田字彬提供; 数据分析由朱恒与王小玮操作完成; 论文写作由朱恒、赵清喜及王小玮完成。

通讯作者: 赵清喜, 教授, 主任医师, 266003, 山东省青岛市市南区江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化科。

qxzhao007@163.com

电话: 0532-82911304

收稿日期: 2012-12-20 修回日期: 2013-01-17

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Role of MRCP in predicting difficulty of bile duct intubation during ERCP

Heng Zhu, Qing-Xi Zhao, Xue-Guo Sun, Xiao-Wei Wang, Hui Ju, Tao Mao, Zi-Bin Tian

Heng Zhu, Qing-Xi Zhao, Xue-Guo Sun, Xiao-Wei Wang, Hui Ju, Tao Mao, Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Qing-Xi Zhao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. qxzhao007@163.com

Received: 2012-12-20 Revised: 2013-01-17

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the value of some anatomical indexes on MRCP images in the prediction of difficulty of bile duct intubation during ERCP.

METHODS: Clinical data for 93 patients who had undergone MRCP before ERCP treatment from November 2011 to June 2012 at the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College were retrospectively analyzed. The patients were classified into two groups, group A ($n = 30$), in which bile duct intubation during ERCP was difficult, and group B ($n = 60$), in which bile duct intubation was easy. Five main indexes, including common bile duct diameter, pancreatic duct diameter, separation angle between the common bile duct and the pancreatic duct, the distance between the duodenal wall and the con-

fluence of the common bile duct and the pancreatic duct, and the distance between the openings of the common bile duct and the pancreatic duct in the duodenum, were measured on MRCP images and compared between the two groups to find indexes which can forecast difficulty of bile duct intubation during ERCP.

RESULTS: The success rate of ERCP was 98.92%. There were significant differences between the two groups in the common bile duct diameter and separation angle between the common bile duct and the pancreatic duct (4.48 ± 1.27 vs 6.73 ± 2.32 ; 25.89 ± 14.40 vs 43.37 ± 24.88 , both $P < 0.05$).

CONCLUSION: MRCP may be helpful to predict difficulty of bile duct intubation during ERCP and to choose the best treatment for patients with biliary tract disease.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Magnetic resonance cholangiopancreatography; Pancreaticobiliary disease; Pancreaticobiliary tract anatomy; Difficult intubation

Zhu H, Zhao QX, Sun XG, Wang XW, Ju H, Mao T, Tian ZB. Role of MRCP in predicting difficulty of bile duct intubation during ERCP. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 357-361 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/357.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.357>

摘要

目的: 探讨磁共振胰胆管成像(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)对内窥镜下逆行胆胰管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)胆管插管难度预测的价值。

方法: 采用回顾性分析方法, 收集93例术前行MRCP检查的ERCP患者, 根据ERCP胆管插管难易程度将患者分为ERCP胆管插管困难组(A组, 30例)和非困难组(B组, 63例)。对两组患者MRCP图像上相关解剖学指标(包括胆总管直径、胰管直径、胆胰管汇合角度、胆

■背景资料

磁共振胰胆管成像(MRCP)是一种无创性胆道造影技术, 能够获得一幅完整的胆道树图像, 更清晰地显示胆道和胰管的病变等情况。内镜下逆行胰胆管造影术(ERCP)能够直接发现病灶、取材活检、行胆道造影或进行取石、放置支架等治疗。胆胰管汇合处的解剖结构对ERCP中胆管插管的成败有重要影响。

■同行评议者

陈钟, 教授, 南通大学附属医院普外科, 南通大学肝胆外科研究所

■ 研发前沿

在临床上寻找一种客观、方便、实用、准确率高的预测方法以便清楚了解患者胆胰系统解剖结构特点、在术前预测ERCP胆管插管难易程度,从而制定最佳治疗方案、将患者的痛苦降低到最小限度、提高ERCP的成功率。

胰管汇合点与十二指肠内壁间距、胆胰管末端间距)进行观察和测量,比较分析两组患者MRCP图像上述解剖指标数据的差别,探讨其对ERCP胆管插管难度预测的价值。

结果: ERCP胆管插管成功率为98.92%。两组患者MRCP上胆总管直径、胆胰管汇合角度存在差异(4.48 ± 1.27 vs 6.73 ± 2.32 ; 25.89 ± 14.40 vs 43.37 ± 24.88 , $P < 0.05$),而两组患者性别、年龄、胰管直径、胆胰管汇合点与十二指肠内壁间距、胆胰管末端间距的差异无统计学意义。ERCP胆管插管难度与MRCP图像上胆总管直径、胆胰管汇合角度有相关性($P < 0.05$),而与胰管直径、胆胰管汇合点与十二指肠内壁间距、胆胰管末端间距无相关性。

结论: ERCP术前常规行MRCP检查对判定ERCP胆管插管难易程度有一定指导意义。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 内镜下逆行胆胰管造影术; 磁共振胰胆管成像; 胆胰疾病; 胆胰管解剖; 困难插管

朱恒, 赵清喜, 孙学国, 王小玮, 鞠辉, 毛涛, 田宇彬. MRCP对ERCP胆管插管难度预测的价值. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 357-361 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/357.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.357>

0 引言

内镜下逆行胆胰管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)是由McCune等^[1]在1968年首次提出的,他为胆胰疾病的诊断和治疗开辟了一条崭新的道路^[2]。通过提高技术、改良器械等,磁共振胰胆管成像(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)胆管插管成功率在90%以上,但仍有患者因胆胰系统尤其胆胰管汇合部位的诸多解剖变异情况如胆管狭窄等会使ERCP常规胆管插管失败^[3],因此胆胰管汇合处的解剖结构对ERCP胆管插管难度和ERCP的成败均可能有重要影响。MRCP是一种非侵入性的胆胰管成像技术,他可以直观地显示胆胰管系统的解剖结构,具有安全、无创、快捷、图像清晰等特点^[4]。本研究通过测量比较MRCP图像上相关解剖学指标的差别,来探讨其对ERCP胆管插管难易程度的预测价值。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2011-11/2012-06青岛大学医学院

附属医院收治的术前行MRCP检查的ERCP患者93例,其中男51例,女42例,男女比例为1.21:1.00,年龄36-86(61.94 ± 13.32)岁。该临床资料入选标准为:有胆胰系统疾病而住院行ERCP的患者;排除标准为:(1)有ERCP和MRCP禁忌证者;(2)既往因手术、外伤等原因导致胆胰系统解剖结构改变者,如既往行ERCP、EST者;(3)因病变导致壶腹部解剖结构改变者,如胆总管结石嵌顿在胆胰管开口处、壶腹部恶性肿瘤侵及十二指肠乳头处等。本研究将ERCP操作中十二指肠乳头处胆管插管时间或总插管次数作为量化ERCP胆管插管难易程度的指标。

将十二指肠镜到达乳头处至胆总管插管成功所用时间记为ERCP插管时间。所有ERCP操作者均为同一人,采用切开刀/导管、导丝插管,每例均全程录像,术后回放记录。不能顺利进入胆管,反复尝试5次以上或插管操作>15 min视为困难胆管插管^[5],即归为困难组,反之归为非困难组。根据上述标准将患者分为ERCP胆管插管困难组(A组)和非困难组(B组)。A组30例,包括男19例、女11例,平均年龄(59.50 ± 13.30)岁,诊断为胆总管结石14例(其中9例合并十二指肠降部憩室)、胆总管狭窄11例、肝管狭窄5例。B组63例,包括男32例、女31例,平均年龄(63.10 ± 13.49)岁,诊断为胆总管结石36例(其中2例合并十二指肠降部憩室)、胆总管狭窄14例、肝管狭窄9例、胆管扩张4例。

MRCP使用Siemens Sonata 3.0T超导MR扫描仪;ERCP使用日本Olympus JF 240或TJF 240型十二指肠镜、Olympus KD-211Q-0720型切开刀以及黄色斑马导丝、导管等。MRCP和ERCP均分别由同一操作者完成,且2人均均为高年资医生。

1.2 方法

1.2.1 MRCP及图像上相关解剖指标测量:所有患者在ERCP前2-7 d行MRCP检查,并对图像上胆胰系统相关解剖指标进行测量记录,测量方法分述如下:(1)胆总管直径:距胆总管显影末端1 cm处胆总管直径;(2)胰管直径:距胰管显影末端1 cm处胰管直径;(3)胆胰管汇合角度:胆总管起始端到显影近段1 cm处连线与胰管起始端到显影近段1 cm处连线之间夹角;(4)胆胰管汇合点与十二指肠内壁间距:指胆胰管汇合处到十二指肠降段内侧壁的距离,若胆胰管恰好汇合于十二指肠内侧壁,该指标记为0 mm;(5)胆管末端和胰管末端间距:简称为胆胰管末端间距,指胆胰管两者末端之间的距离,若胆胰管末端

■ 相关报道

相关研究结果显示,MRCP对胆胰系统疾病如胆管结石、胆胰管扩张和解剖变异等具有高敏感性和高特异性。

表 1 MRCP图像上相关解剖指标测量情况 (mean ± SD)

指标	A组	B组	P值
性别 ¹	1.40 ± 0.52	1.48 ± 0.51	0.702
年龄(岁)	59.50 ± 13.30	61.94 ± 13.32	0.492
胆总管直径(mm)	4.48 ± 1.27	6.73 ± 2.32	0.008
胰管直径(mm)	2.27 ± 0.47	2.60 ± 0.71	0.188
胆胰管汇合点与十二指肠 肠内壁间距(mm)	4.19 ± 5.45	2.57 ± 4.92	0.415
胆胰管末端间距(mm)	0.87 ± 1.85	0.59 ± 1.50	0.657
胆胰管汇合角度(度)	25.89 ± 14.40	43.37 ± 24.88	0.049

¹参数先予以赋值再进行统计学处理: 性别(男 = 1, 女 = 2).

表 2 Logistic回归分析结果

影响因素	B	SE	Wald	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	P值
胆总管直径(X ₁)	1.699	0.848	4.017	5.469	1.038 - 28.807	0.045
胰胆管汇合角度(X ₅)	0.434	0.220	3.899	1.543	1.003 - 2.373	0.048

汇合于一点, 该指标记为0 mm.

1.2.2 ERCP: 所有患者术前均签署ERCP知情同意书. ERCP术前禁饮食至少8 h, 术前30 min口服10%盐酸利多卡因胶浆20 mL, 并建立一条留置针静脉通道. 术前15 min常规静脉注射地西洋(安定)5-10 mg、山莨菪碱(6-542)10 mg, 肌肉注射杜冷丁50 mg. 造影剂为碘普罗胺(优维显). 术中持续吸氧, 并行持续心率、血氧饱和度监护. 对于ERCP插管困难患者主要采用以下3种方法完成胆管插管^[6,7]: (1)导丝先占据胰管再行胆管插管; (2)乳头括约肌预切开后插管; (3)先置放胰管支架后行胆管插管.

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件包进行统计学处理, 计量资料用mean ± SD表示. 进行t检验和Logistic回归分析, P < 0.05认为差异有统计学意义.

2 结果

ERCP胆管插管成功率为98.92%(A组中1人因插管困难而放弃进一步ERCP诊治). A、B两组的性别、年龄以及MRCP图像上相关指标测量情况(表1): A组和B组相比得出, 胆总管直径、胆胰管汇合角度两方面的差异有统计学意义(P < 0.05). 而在性别、年龄、胆胰管汇合点与十二指肠内壁间距、胆胰管末端间距等方面无显著性差异. 进行Logistic回归分析, 自变量为MRCP图像上所测的5个上述指标(记为

X₁-X₅), 因变量为ERCP胆管插管难度, 得出以下结果(表2): ERCP胆管插管难度与胆总管直径、胆胰管汇合角度相关(P < 0.05), 而与胰管直径、胆胰管汇合点与十二指肠内壁间距、胆胰管末端间距无相关性. 术前MRCP对ERCP胆管插管难易程度的回归方程为: $\text{Logit } P = -7.635 + 1.699X_1 + 0.434X_5$.

3 讨论

随着内镜微创治疗技术的进步, ERCP发展成为较为成熟的微创介入技术, 是临床治疗胆胰疾病的重要手段. 对于有经验的操作者来讲, 经乳头胆管插管成功率在95%以上, 缓解梗阻性黄疸成功率在85%以上^[8]. ERCP具有手术创伤小、痛苦少、患者易耐受、恢复快等优点. ERCP胆管插管难易程度高低与多方面因素有关, 除了手术设备的优劣、操作者水平高低等因素外, 主要与胆胰系统解剖结构相关.

虽然ERCP手法不断改良、器械不断进步, 但是即使在大型医疗机构仍然存在部分困难插管的患者, 仍有5%-10%的患者ERCP选择性胆管插管失败^[9-14]. 即便最终插管造影成功, 可能因反复插管导致十二指肠乳头处水肿痉挛、导丝多次入胰管导致术后高淀粉酶血症或胰腺炎等^[15], 从而给患者带来极大危害.

所以在临床上寻找一种客观、方便、实用、准确率高的预测方法以便清楚了解患者胆

■ 创新盘点

随着磁共振内镜的应用, MRCP与MR其他技术如血管成像的联合应用, MRCP必将成为胆胰系统疾病的一项重要影像学检查方法, 但是MRCP预测ERCP胆管插管难易程度并未见文献报道. 正由于目前临床上能较为清晰准确获得胆胰管解剖结构且速度最快、痛苦最小的检查当属MRCP. 因此, 作者推测ERCP术前常规行MRCP检查对ERCP操作难度可能有一定预测价值, 从而为患者制订最佳诊疗方案有一定积极意义.

■应用要点

术前常规行MRCP检查,根据MRCP检查结果及测量相关解剖指标如胆总管直径、胆胰管汇合角度等对预测ERCP胆管插管难易程度有一定的指导意义,值得临床上推广应用。

胰系统解剖结构特点、在术前预测ERCP胆管插管难易程度,从而制定最佳治疗方案、将患者的痛苦降低到最小限度、提高ERCP成功率是临床医生亟待解决的问题。

到目前为止,B超检查是检查胆道系统疾病尤其是胆石病较为主要的影像学检查方法^[16],超声检查对于胆囊结石有较高确诊率,但由于肠腔气体干扰、较小结石无法产生声影等因素的存在,对于胆总管结石尤其胆总管下端结石诊断率低^[17]。CT也是胆道疾病重要的影像学检查方法,但是由于很大部分胆道系统结石密度与胆汁密度接近,加之CT仅提供横断面图像,无法得到胆道系统的整体图像,同时由于断层原因可能会导致漏检,CT诊断结石的准确率仅为50%-90%^[18]。由于以上检查各自缺陷的存在,往往无法获得胆胰系统尤其胆道系统较完整较全面的信息。MRCP检查由于可以显示胆胰管走行和汇合部解剖结构^[19],则恰好避免了上述检查的弊端。

MRCP最早于20世纪90年代初由Wallner等^[20]首先提出,目前为临床较为常用的磁共振水成像技术之一。MRCP无需任何口服和静脉造影剂,利用胆汁中水分有极高的质子密度呈现长T2弛豫而胆道周围组织为短T2弛豫的特点即可获得胆胰系统的直接图像,经进一步处理如多平面重建、旋转、分割等可得到较理想的三维胆胰系统图像^[21]。同时MRCP也不受电离辐射影响,可用于所有病人,因此,它是一种新型的、安全的检查手段。相关研究^[22,23]结果显示,MRCP对胆胰系统疾病如胆管结石、胆胰管扩张和解剖变异等具有高敏感性和高特异性。而且随着磁共振内镜的应用、MRCP与MR其他技术如血管成像的联合应用,MRCP必将成为胆胰系统疾病的一项重要影像学检查方法,但是MRCP预测ERCP胆管插管难易程度并未见相关文献报道。正由于目前临床上能较为清晰准确获得胆胰管解剖结构且速度最快、痛苦最小的检查当属MRCP。因此,作者推测ERCP术前常规行MRCP检查对ERCP胆管插管难度可能有一定预测价值,从而为患者制订最佳诊疗方案有一定积极意义。

本研究发现,ERCP胆管插管难易程度与性别、年龄、胆胰管汇合点与十二指肠内壁间距、胆胰管末端间距等无相关性,而与患者胆总管直径、胆胰管汇合角度两方面相关联。胆总管直径越小、胆胰管汇合角度越小,导致

ERCP胆管插管越困难,此时ERCP术前应与患者和家属做好充分沟通、反复交代ERCP的风险性,同时操作时应更加小心谨慎,不易强行ERCP,以避免不必要的术后并发症甚至死亡。另外,对于明显导致ERCP胆管插管困难的因素如壶腹部结石嵌顿等不在本研究范围内,而且由于本研究样本量较小,如增大样本量,有可能得出相似结论或者新结论,此有待进一步研究和发现。

总之,术前常规行MRCP检查对预测ERCP胆管插管难易程度有一定的指导意义,值得临床上推广应用。另外,目前临床上诊断胆胰疾病,MRCP尚不能完全取代诊断性ERCP。若患者超声检查提示异常,一般可先做MRCP检查,如能诊断明确则行进一步相应治疗;若无法明确诊断,则可以根据MRCP检查结果及测量相关解剖指标如胆总管直径、胆胰管汇合角度等来预测ERCP胆管插管难易程度,从而可为患者制定最优良、最合理的诊疗方案,尽可能避免ERCP失败或术后胰腺炎等并发症发生,进一步提高胆胰系统疾病的诊断治疗水平。

4 参考文献

- McCune WS. ERCP at thirty years: an interview with Dr. William S. McCune (1909-1998). *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 643-644 [PMID: 9852462 DOI: 10.1016/S0016-5107(98)70054-9]
- 李兆申. 中国ERCP研究现状. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 446-448
- 贾国法, 朱良松, 王美玲, 李祥兵, 王秀侠, 单红, 吴丽颖. 几种乳头预切开方法在ERCP胆管插管困难时的选择应用. *中华消化内镜杂志* 2007; 24: 209-212
- 万苹, 郭强, 范红, 李娅琳. MRCP对胆胰疾病的诊断价值. *医学综述* 2005; 11: 285-287
- Kaffes AJ, Sriram PVJ, 赵萌. 内镜下胆管插管困难时十二指肠乳头括约肌预切开的早期应用: 一项传统技术与改良技术比较的前瞻性研究. *世界核心医学期刊文摘(胃肠病学分册)* 2006; 2: 38-39
- 唐采白, 胡兵, 郭召军. 导丝技术在ERCP操作中的应用技巧. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1027-1029
- 侯森林, 高永平, 乔娜, 乔占英, 康建省, 张立超. 导丝在降低逆行胰胆管造影并发症中的意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3347-3350
- 中华医学会消化内镜分会ERCP学组. 内镜下逆行胆胰管造影术(ERCP)诊治指南(2010版). *中国继续医学教育* 2010; 6: 1-20
- 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜. 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1782-1784
- 邹永军, 曹杰, 张晓云, 张丽荣, 王波, 禹佳. 胆胰间小切口在困难胆道插管中的临床应用. *中国实用医药* 2011; 6: 34-35
- Schwacha H, Allgaier HP, Deibert P, Olschewski M, Allgaier U, Blum HE. A sphincterotome-based technique for selective transpapillary common bile duct cannulation. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 387-391

- [PMID: 10968855 DOI: 10.1067/mge.2000.107909]
- 12 Lee TH, Park do H, Park JY, Kim EO, Lee YS, Park JH, Lee SH, Chung IK, Kim HS, Park SH, Kim SJ. Can wire-guided cannulation prevent post-ERCP pancreatitis? A prospective randomized trial. *Gastrointest Endosc* 2009; 69: 444-449 [PMID: 19007927 DOI: 10.1016/j.gie.2008.04.064]
- 13 Lo SK. Intramural incision during ERCP: turning a complication into a positive experience? *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 634-635 [PMID: 18279863 DOI: 10.1016/j.gie.2007.08.045]
- 14 陈凤媛, 陈世耀. 内镜逆行胰胆管造影术中选择性胆管插管困难的循证处理. *中国循证医学杂志* 2010; 10: 1345-1349
- 15 朱季军, 朱美玲, 刘加宁, 蔡奉娟, 黄红梅. 经内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的高危因素分析及防治. *中国医药导刊* 2011; 13: 2048-2052
- 16 苏东路, 韦景秋. 超声对胆石症的诊断价值. *中国实用医药* 2010; 5: 73-74
- 17 兰莉, 戴珂珂, 胡元平, 李建策, 陈斌, 吴琪, 赵亮, 梅丽. 磁共振胰胆管成像与B超检查诊断胆系结石的对照研究. *实用医学杂志* 2008; 24: 3393-3394
- 18 孟令辉. 腹部CT、B超与核磁共振胆管成像检查诊断肝外胆管结石分析. *中国医药指南* 2012; 10: 226-227
- 19 周伏强, 付飞先. MSCT和MRCP常规MR在胆道梗阻中的应用对比研究. *中国CT和MRI杂志* 2010; 8: 37-40
- 20 Wallner BK, Schumacher KA, Weidenmaier W, Friedrich JM. Dilated biliary tract: evaluation with MR cholangiography with a T2-weighted contrast-enhanced fast sequence. *Radiology* 1991; 181: 805-808 [PMID: 1947101]
- 21 彭卫军, 周康荣, 陈财忠, 王炳生, 刘厚宝. 磁共振胆道造影在胆道梗阻定位和定性诊断中的价值. *中华放射学杂志* 1997; 31: 668-672
- 22 Maurea S, Caleo O, Mollica C, Imbriaco M, Mainenti PP, Palumbo C, Mancini M, Camera L, Salvatore M. Comparative diagnostic evaluation with MR cholangiopancreatography, ultrasonography and CT in patients with pancreatobiliary disease. *Radiol Med* 2009; 114: 390-402 [PMID: 19266258 DOI: 10.1007/s11547-009-0374-x]
- 23 Shanmugam V, Beattie GC, Yule SR, Reid W, Loudon MA. Is magnetic resonance cholangiopancreatography the new gold standard in biliary imaging? *Br J Radiol* 2005; 78: 888-893 [PMID: 16177010 DOI: 10.1259/bjr/51075444]

■同行评价

本文通过测量的方法研究MRCP的预测价值, 有一定的临床指导意义。

编辑 李军亮 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 2012-01-01)

ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在结肠癌组织中的表达及相关性

杨万广, 王万鹏, 张谢夫

■背景资料

研究结果显示: ALDH1与肿瘤的发生、发展密切相关。ALDH1A2是催化视黄醛氧化成维甲酸的的关键酶, 维甲酸与维甲酸受体(RAR)以及维甲酸X受体(RXR)通过配体结合区域结合, 直接作用于靶基因, 调节不同靶基因的表达, 进而调控正常和肿瘤细胞的生长和分化。

杨万广, 王万鹏, 郑州大学第一附属医院急诊外科 河南省郑州市 450052

张谢夫, 郑州大学第一附属医院胃肠外科 河南省郑州市 450052

杨万广, 副教授, 副主任医师, 主要从事胃肠肿瘤的研究。

作者贡献分布: 此课题由杨万广与张谢夫设计; 实验检测分析由杨万广与王万鹏操作完成; 论文写作由杨万广与王万鹏完成。

通讯作者: 张谢夫, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院胃肠外科。kfywg@eyou.com
收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-01-07

接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Significance of ALDH1A2, MMP2 and E-cadherin expression in colonic cancer

Wan-Guang Yang, Wan-Peng Wang, Xie-Fu Zhang

Wan-Guang Yang, Wan-Peng Wang, Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Xie-Fu Zhang, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Xie-Fu Zhang, Professor, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. kfywg@eyou.com

Received: 2012-12-08 Revised: 2013-01-07

Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of ALDH1A2, E-cadherin and MMP2 in colonic cancer and to analyze their clinical significance.

METHODS: RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry were used to examine the expression and distribution of ALDH1A2, E-cadherin and MMP2 in 52 surgically resected specimens of colonic cancer and matched tumor-adjacent colonic mucosal tissue. The correlations among them and their relationship to the clinicopathologic characteristics of colonic cancer were analyzed.

RESULTS: The positive rates of ALDH1A2 and E-cadherin in tumor-adjacent colonic mucosal tissue were 67.31% and 90.38%, respectively,

which were significantly higher than that in colonic cancer tissue. The positive rate of MMP2 in colonic cancer was 86.54%, significantly higher than that in tumor-adjacent colonic mucosal ($P < 0.05$). RT-PCR and Western blot analyses revealed similar results. There were significant correlations among ALDH1A2, MMP2 and E-cadherin expression in colorectal carcinoma.

CONCLUSION: Expression of ALDH1A2 and E-cadherin in colonic cancer is lower than in tumor-adjacent colonic mucosal tissue, while MMP2 expression in colonic cancer is higher than that in tumor-adjacent colonic mucosal tissue. ALDH1A2 expression was correlated with MMP2 and E-cadherin expression in colonic cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: ALDH1A2; MMP2; E-cadherin; Colonic cancer

Yang WG, Wang WP, Zhang XF. Significance of ALDH1A2, MMP2 and E-cadherin expression in colonic cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 362-366
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/362.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.362>

摘要

目的: 研究结肠癌组织中ALDH1A2、E-cadherin和MMP2的表达及与临床病理特征之间的关系。

方法: 应用免疫组织化学SP法、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、免疫印迹(Western blot)检测52例结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、E-cadherin和MMP2蛋白的表达, 分析其间的相关性以及肿瘤临床病理特征之间的关系。

结果: 免疫组织化学测定显示ALDH1A2在52例结肠癌癌旁组织阳性率为67.31%; E-cadherin在52例结肠癌癌旁组织阳性率为90.38%; 癌旁组织ALDH1A2、E-cadherin的表达率高于癌组织。MMP2在52例结肠癌组织

■同行评议者

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

中阳性率占86.54%, 高于癌旁组织($P<0.05$). 逆转录-PCR及免疫印迹技术显示同样结果. ALDH1A2、MMP2及E-cadherin在结肠癌中的表达具有相关性.

结论: 结肠癌中ALDH1A2、E-cadherin表达低于癌旁组织, MMP2表达高于癌旁组织, ALDH1A2、MMP2及E-cadherin三者密切相关.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: ALDH1A2; 金属基质蛋白酶2; 上皮钙黏蛋白; 结肠癌

杨万广, 王万鹏, 张谢夫. ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在结肠癌组织中的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2013; 21(4): 362-366 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/362.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.362>

0 引言

ALDH1A2是乙醛脱氢酶家族中17个基因之一, 乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH1)是负责各种细胞内醛氧化羧酸的细胞质酶^[1]. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是一类具有降解细胞外基质和基底膜能力的蛋白水解酶, 在肿瘤细胞突破基底膜屏障而浸润转移中起重要作用. 上皮钙黏蛋白(E-cadherin)是介导上皮细胞间黏附的主要黏附分子, 主要介导同质性细胞黏附. 本研究中, 我们利用免疫组织化学、RT-PCR法及免疫印迹技术测定ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在人结肠癌及癌旁组织中mRNA及蛋白的表达, 探讨其与结肠癌病理分期的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 ALDH1A2、MMP2和E-cadherin抗体购自Santa cruz公司; 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 逆转录和PCR扩增试剂盒均购自北京全式金生物公司. 病理标本来自2008-2009我院病理科存档52例结肠癌术后的石蜡标本, 男、女各半, 经病理诊断证实, 并且术前未经化疗、放疗, 术后均给予以化疗为主的综合治疗, 并有完整的随访资料. 组织标本从2009-09/2010-04在我院手术治疗, 且经病理诊断为结肠癌的患者中选取.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学法: 免疫组织化学SP染色按说明书进行, 采用双评分半定量积分法, 对ALDH1A2、MMP2和E-cadherin的IHC结果进行

分析. 以出现棕黄色或棕色颗粒的细胞作为阳性细胞, ALDH1A2、MMP2阳性部位在细胞浆, E-cadherin的阳性部位在胞膜, 部分细胞浆也呈阳性.

1.2.2 逆转录-PCR法测定结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin mRNA的表达: 采用用TRIzol提取组织中mRNA; 反转录成cDNA, 反应条件为离心、混匀后42℃孵育30 min, 然后85℃加热5 min用来灭活逆转录酶. 取2 μL进行后续扩增, 其余-84℃保存. PCR扩增目的基因(ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin); 扩增结束后, 产物经1.5%(w/v)琼脂糖凝胶溶液电泳, 当溴酚蓝电泳至适当位置, 在紫外灯下观察结果和拍照.

1.2.3 Western blot检测组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin蛋白的表达: 组织标本冰上匀浆充分裂解, 取20 μg蛋白样品于10%SDS-PAGE电泳分离并转膜. 膜在室温下封闭1 h, 4℃一抗孵育过夜. 辣根过氧化物酶标记二抗室温下孵育1 h. ECL试剂检测蛋白条带. 将胶片扫描后用Bandscan5.0软件进行灰度分析.

统计学处理 所有数据采用mean±SD表示, 多均数的比较采用方差分析. $P<0.05$ 表示有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组织化学测定ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在结肠癌及癌旁组织中的表达 ALDH1A2、MMP2表达于细胞胞浆, 呈淡黄至棕黄、棕褐色. ALDH1A2在52例结肠癌癌旁中35例阳性表达, 17例阴性表达, 阳性率占67.31%. MMP2在52例结肠癌组织中45例阳性表达, 7例阴性表达, 阳性率占86.54%. E-cadherin表达于细胞胞膜/浆, 呈淡黄至棕黄、棕褐色. E-cadherin在52例结肠癌癌旁中47例阳性表达, 5例阴性表达, 阳性率占90.38%. 差异均有统计学意义(表1). RT-PCR测定结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin mRNA的表达: RT-PCR结果显示ALDH1A2 mRNA含量在癌旁组织中高于结肠癌; MMP2 mRNA含量在癌组织中高于癌旁组织; E-cadherin mRNA含量在癌旁组织中高于结肠癌, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 表2, 图1). Western blot测定结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin蛋白的表达: 免疫印迹结果显示ALDH1A2蛋白含量在癌旁组织中高于结肠癌; MMP2蛋白含量在癌组织中高于

■ 研发前沿
本文最先利用免疫组织化学技术、逆转录-PCR技术及免疫印迹技术测定人结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP2和E-cadherin mRNA及蛋白的表达情况, 探讨ALDH1A2在体内对结肠癌的影响, 以期找到ALDH1A2在结肠癌中的作用机制.

■ 相关报道

Dahiya发现13-cis-RA除了能抑制人前列腺癌细胞株LNCaP生长、使其裸鼠致瘤性及软琼脂克隆形成能力下降外,还能使IV型胶原酶的活性下降50%. RA使胃癌细胞株MKN45H对基底膜胶(Matrigel)的黏附能力下降,明胶酶的分泌能力降低. 以上研究显示ALDH1A2催化生成的维甲酸具有抑制肿瘤细胞生长、增殖、侵袭转移及黏附的作用.

表 1 ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin在结肠癌及癌旁组织中的表达 (n = 52)

分组	阴性		阳性		阳性率(%)	χ ² 值	P值
	(-)	(+)	(++)	(+++)			
ALDH1A2							
结肠癌组织	32	13	6	1	38.46	5.34	<0.05
癌旁组织	17	13	10	12	67.31		
E-cadherin							
结肠癌组织	37	11	3	1	28.85	9.47	<0.05
癌旁组织	5	17	22	8	90.38		
MMP2表达强度							
结肠癌组织	7	7	25	13	86.54	7.19	<0.05
癌旁组织	35	10	5	2	32.69		

表 2 结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin mRNA及蛋白的表达 (mean ± SD)

	ALDH1A2	MMP2	E-cadherin
RT-PCR			
结肠癌	0.136 ± 0.021	0.529 ± 0.063	0.159 ± 0.022
癌旁组织	0.675 ± 0.074 ^a	0.172 ± 0.024 ^a	0.572 ± 0.077 ^a
Wb			
结肠癌	0.094 ± 0.013	0.634 ± 0.068	0.115 ± 0.014
癌旁组织	0.528 ± 0.065 ^a	0.325 ± 0.043 ^a	0.483 ± 0.068 ^a

^aP<0.05 vs 结肠癌组织.

表 3 ALDH1A2与MMP2在结肠癌组织中表达的相互关系 (n)

ALDH1A2	MMP-2		Kappa	P值
	阳性	阴性		
阳性	14	6	0.532	<0.05
阴性	31	1		

表 4 ALDH1A2与E-cadherin在结肠癌组织中表达的相互关系 (n)

ALDH1A2	E-cadherin		Kappa	P值
	阳性	阴性		
阳性	12	8	0.532	<0.05
阴性	3	29		

于癌旁组织; E-cadherin蛋白含量在癌旁组织中高于结肠癌, 差异均有统计学意义(P<0.05, 表5, 图2).

2.2 ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在大肠癌组织中表达的相关性 ALDH1A2、MMP2和E-cadherin在大肠癌组织中表达的相互关系分别见表3-5. 表中显示的相互关系三者具有密切相关性(P<0.05).

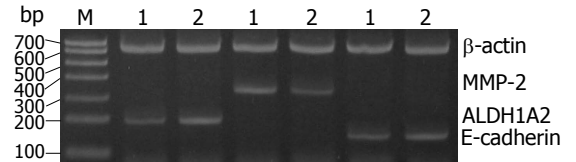


图 1 结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin mRNA的表达.

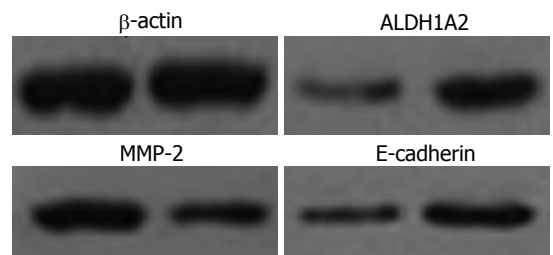


图 2 结肠癌及癌旁组织中ALDH1A2、MMP-2、E-cadherin蛋白的表达.

3 讨论

结肠癌患者5年生存率近十年来徘徊在50%左右. 在西方国家进展也差别不大^[1]. 日本结肠癌术后5年生存率60年代是45%, 到80年代上升的78%^[2]. ALDH是负责各种细胞内醛氧化羧酸的细胞质酶^[3]. 到目前为止, 已经发现17种ALDH

表 5 MMP2与E-cadherin在结肠癌组织中表达的相互关系(n)

ALDH1A2	MMP-2		Kappa	P值
	阳性	阴性		
阳性	13	32	0.646	<0.05
阴性	2	5		

的亚型. 2010年宾夕法尼亚大学Deng等^[4]发现, ALDH1在正常人体组织的表达和分布差异显著. 正常组织细胞中, 维生素A代谢的中间产物为视黄醛, ALDH1A2不可逆氧化视黄醛为维甲酸^[5]. ALDH1A2是催化视黄醛的氧化成维甲酸的关键酶^[6], 维甲酸正常的生理浓度很低, 与维甲酸受体(retinoic acid receptor, RAR)和维甲酸X受体(retinoic X receptor, RXR)通过配体结合区域结合, 直接作用于靶基因, 调节不同靶基因的表达, 进而调控正常和肿瘤细胞的生长和分化^[7-9]. Dahiya等^[10]发现ALDH1A2催化生成的维甲酸具有抑制肿瘤细胞生长、增殖、侵袭转移及黏附的作用. RA使胃癌细胞株MKN45H对基底膜胶(Matrigel)的黏附能力下降, 明胶酶的分泌能力降低^[11,12], 也有研究证明该基因可能参与癌细胞增殖的负性调控^[13]. 本研究发现, 在结肠癌旁组织中, ALDH1A2表达于细胞胞浆, 并证明癌旁组织中ALDH1A2酶高表达, 而结肠癌组织中低表达. 这一结果证实ALDH1A2与结肠癌的生物行为相关.

肿瘤转移的前提是突破原位基底膜屏障迁移入血或远处器官, 黏附是肿瘤迁徙和转移的始动因素^[14]. 而MMP在肿瘤细胞突破基底膜屏障而浸润、转移中起重要作用. 本研究中结果表明: MMP2表达于细胞胞浆, MMP2蛋白在癌组织远高于癌旁组织. 这一结果证实了MMP2蛋白可能影响了结肠癌的生物行为. 本研究还证实E-cadherin在癌组织中表达高于对照组, 这一结果也与国内的研究结果一致^[15], 表明E-cadherin表达减弱是肿瘤细胞低分化的重要因素.

我们对ALDH1A2、MMP2及E-cadherin在结肠癌中的表达进行了相关性分析, 结果显示ALDH1A2与MMP2及E-cadherin具有密切的相关性. 我们可以设想ALDH1A2在癌组织中的低表达可能导致ATRA合成的减少, 进而通过MMP2的高表达来水解结肠癌细胞浸润扩散过程中的一道天然屏障-基底膜, 导致结肠癌细胞侵袭转移能力大大加强, 同时结肠癌中E-cad-

herin的低表达, 细胞间黏附力下降, 肿瘤细胞易于从肿瘤团块上脱落下来, 进入浸润转移进程, 为我们进一步的研究奠定了基础.

4 参考文献

- Li HY, Ge X, Huang GM, Li KY, Zhao JQ, Yu XM, Bi WS, Wang YL. GSTP1, ERCC1 and ERCC2 polymorphisms, expression and clinical outcome of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer in Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3465-3469 [PMID: 22994779]
- Wen F, Zhou Y, Wang W, Hu QC, Liu YT, Zhang PF, Du ZD, Dai J, Li Q. Ca/Mg infusions for the prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with colorectal cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol* 2013; 24: 171-178 [PMID: 22898039 DOI: 10.1093/annonc/mds211]
- Vasiliou V, Nebert DW. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2005; 2: 138-143 [PMID: 16004729]
- Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Bützow R, Coukos G, Zhang L. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One* 2010; 5: e10277 [PMID: 20422001 DOI: 10.1371/journal.pone.0010277]
- Xiao T, Shoeb M, Siddiqui MS, Zhang M, Ramana KV, Srivastava SK, Vasiliou V, Ansari NH. Molecular cloning and oxidative modification of human lens ALDH1A1: implication in impaired detoxification of lipid aldehydes. *J Toxicol Environ Health A* 2009; 72: 577-584 [PMID: 19296407 DOI: 10.1080/15287390802706371]
- Seritrakul P, Samarut E, Lama TT, Gibert Y, Laudet V, Jackman WR. Retinoic acid expands the evolutionarily reduced dentition of zebrafish. *FASEB J* 2012; 26: 5014-5024 [PMID: 22942074 DOI: 10.1096/fj.12-209304]
- Yanagawa Y, Chen JC, Hsu LC, Yoshida A. The transcriptional regulation of human aldehyde dehydrogenase I gene. The structural and functional analysis of the promoter. *J Biol Chem* 1995; 270: 17521-17527 [PMID: 7615557 DOI: 10.1074/jbc.270.29.17521]
- Patel M, Lu L, Zander DS, Sreerama L, Coco D, Moreb JS. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors. *Lung Cancer* 2008; 59: 340-349 [PMID: 17920722 DOI: 10.1016/j.lungcan.2007.08.033]
- Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009; 69: 3382-3389 [PMID: 19336570 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4418]
- Dahiya A, Thavendiranathan P, Thomas JD, Flamm SD. Apical hypertrophic cardiomyopathy with and without aneurysm. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1709 [PMID: 23079118 DOI: 10.1016/j.jacc.2012.05.055]
- Chang B, Liu G, Xue F, Rosen DG, Xiao L, Wang X, Liu J. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod Pathol* 2009; 22: 817-823 [PMID: 19329942]

■创新盘点

经检索查新发现国内有ALDH1A2基因影响膀胱癌细胞株的生物行为研究, 但均未涉及ALDH1A2基因在结肠癌组织中的表达. 通过本研究结果, 可以设想ALDH1A2在癌组织中的低表达可能导致ATRA合成的减少, 进而影响到MMP2及E-cadherin的表达, 通过上调MMP2的表达来水解结肠癌细胞浸润扩散过程中的一道天然屏障-基底膜, 导致结肠癌细胞侵袭转移能力大大加强, 同时下调结肠癌中E-cadherin的表达, 引起细胞间黏附力下降, 使结肠癌细胞易于从肿瘤团块上脱落下来, 进入浸润转移进程.

■同行评价

本文实验设计科学、合理,数据完整,分析问题逻辑性强,结合临床工作,有一定的指导意义。

- 12 Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 45-55 [PMID: 20028757 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1630]
- 13 杨万广, 张谢夫, 张善峰. ALDH1A2基因过表达对结肠癌LoVo细胞增殖、侵袭及黏附能力的影响. *中华实验外科杂志* 2012; 29: 1747-1749
- 14 许天文, 陈道达, 陈剑英, 郑勇斌, 连彦军. 血管内皮生长因子C在大肠癌中的表达及其与淋巴结转移的关系. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 598-599
- 15 肖胜军, 张小玲, 容明智, 方宇, 曾思恩. 转录辅抑制因子CtBP1与其靶基因E-cadherin在结肠腺癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3756-3759

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, 以及胃肠运动对神经的影响、传递、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。

局部进展期直肠癌术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞的疗效评价

郜永顺, 钱国武, 张云飞, 吴刚, 李甸源, 李文才, 赵武干, 赵阳阳

郜永顺, 钱国武, 张云飞, 郑州大学第一附属医院胃肠外科 河南省郑州市 450052
吴刚, 郑州大学第一附属医院介入科 河南省郑州市 450052
李甸源, 郑州大学第一附属医院放疗科 河南省郑州市 450052
李文才, 赵武干, 赵阳阳, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省郑州市 450052
作者贡献分布: 此课题设计、文章修改与审阅由郜永顺完成; 材料整理由钱国武与张云飞完成; 数据分析与文章起草由钱国武完成; 研究过程由所有作者共同完成。
通讯作者: 郜永顺, 副教授, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院胃肠外科. gaoy999@yahoo.com.cn
电话: 0371-67967131
收稿日期: 2012-12-12 修回日期: 2013-01-10
接受日期: 2013-01-18 在线出版日期: 2013-02-08

Efficacy of preoperative systemic vein chemotherapy combined with regional intra-arterial chemoembolization in the management of locally advanced rectal cancer

Yong-Shun Gao, Guo-Wu Qian, Yun-Fei Zhang, Gang Wu, Dian-Yuan Li, Wen-Cai Li, Wu-Gan Zhao, Yang-Yang Zhao

Yong-Shun Gao, Guo-Wu Qian, Yun-Fei Zhang, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Gang Wu, Department of Interventional Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Dian-Yuan Li, Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Wen-Cai Li, Wu-Gan Zhao, Yang-Yang Zhao, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Correspondence to: Yong-Shun Gao, Associate Professor, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. gaoy999@yahoo.com.cn
Received: 2012-12-12 Revised: 2013-01-10
Accepted: 2013-01-18 Published online: 2013-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the effectiveness and safety of preoperative systemic vein chemotherapy combined with regional intra-arterial chemoembo-

lization in the management of locally advanced rectal cancer.

METHODS: Clinical data for 320 patients with locally advanced rectal cancer treated at the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University from January 2008 to July 2012 were retrospective. The patients were divided into two groups, patients who received preoperative systemic vein chemotherapy combined with regional intra-arterial chemoembolization (group A, $n = 148$) and those who received preoperative radiotherapy combined with chemotherapy (group B, $n = 172$). All cases involved in this study were treated with neoadjuvant therapy followed by anterior resection 3 to 4 weeks later. The overall effective rate, the incidence of adverse reactions and postoperative complications were compared between the two groups.

RESULTS: All patients had surgical specimens eligible for histopathological assessment. The overall satisfaction rate was significantly higher in group A than in group B (57.6% vs 44.8%, $P < 0.05$). The incidence of adverse reactions (except nausea) and postoperative complications such as anastomotic leakage, intestinal obstruction and poor wound healing were all lower in group A than in group B (all $P < 0.05$), while the incidence of nausea was higher in group A ($\chi^2 = 31.16$, $P < 0.001$). There was no perioperative mortality related to neoadjuvant therapy in both groups.

CONCLUSION: Preoperative systemic vein chemotherapy combined with regional intra-arterial chemoembolization is associated with better efficacy and fewer adverse reactions and postoperative complications in the management of locally advanced rectal cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Rectal neoplasms; Chemoradiotherapy; Neoadjuvant therapy; Chemotherapy; Cancer; Regional perfusion

■背景资料

目前,对局部进展期直肠癌的新辅助治疗可有效实现肿瘤降期,提高R0切除率、手术保肛率,降低局部复发率,受到广泛重视和认可,但缺乏统一的治疗方案,不同方案的疗效也参差不齐。

■同行评议者

高泽立, 副教授, 周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院

■ 研究前沿

术前放化疗已成为局部进展期直肠癌综合治疗标准模式,但未能提高其5年总生存率和无病生存率,且增加了治疗的不良反应和术后并发症发生的危险性;如何提高临床疗效,降低治疗的不良反应和术后并发症成为肿瘤外科医生关注的焦点。

Gao YS, Qian GW, Zhang YF, Wu G, Li DY, Li WC, Zhao WG, Zhao YY. Efficacy of preoperative systemic vein chemotherapy combined with regional intra-arterial chemoembolization in the management of locally advanced rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(4): 367-372 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/367.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.367>

摘要

目的: 评价局部进展期直肠癌术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞的有效性和安全性。

方法: 对郑州大学第一附属医院自2008-01/2012-07收治的320例接受新辅助治疗后行经腹手术切除的局部进展期直肠癌的临床资料进行回顾性分析。其中术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞者148例(A组),术前放疗+化疗者组172例(B组),休息3-4 wk后手术。比较分析两组术后组织病理学疗效、不良反应发生率及术后并发症发生率。

结果: 所有术后标本组织病理学评估均有效,A组的疗效满意率高于B组(60.81% vs 45.35%, $P < 0.05$);不良反应(除外恶心反应)和术后吻合口瘘、肠梗阻及切口愈合不良等并发症发生率均低于B组(均 $P < 0.05$),而恶心反应发生率高于B组($\chi^2 = 31.16, P < 0.001$);两组均无新辅助治疗相关死亡病例。

结论: 局部进展期直肠癌术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗并栓塞的疗效确切,可降低不良反应、术后并发症发生率。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 直肠肿瘤; 放化疗; 新辅助疗法; 化学疗法; 肿瘤; 局部灌注

邵永顺, 钱国武, 张云飞, 吴刚, 李甸源, 李文才, 赵武干, 赵阳阳. 局部进展期直肠癌术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞的疗效评价. *世界华人消化杂志* 2013; 21(4): 367-372 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/367.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wcjd.v21.i4.367>

0 引言

目前,对局部进展期直肠癌的新辅助治疗受到广泛重视和认可,但缺乏统一的治疗方案,不同方案的疗效也参差不齐。我们回顾分析2008-01/2012-07我院收治的320例术前接受全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞和放疗联合化疗后行经腹手术切除的局部进展期直肠癌的临

床资料,比较两者术后组织病理学疗效、不良反应及术后并发症发生率,评价其有效性和安全性。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-01/2012-07郑州大学第一附属医院收治的经病理证实的接受新辅助治疗的局部进展期直肠癌患者404例,剔除84例未行肿瘤切除手术及行经腹会阴联合切除术(Mile's术)(其中43例未行手术,18例行Hartmann术,23例行Mile's术),余320例作为研究对象。其中术前接受全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞者148例(A组),术前接受放疗+化疗者组172例(B组),两组患者一般临床资料均具有可比性(表1)。所有入组患者行新辅助治疗前影像学检查提示无远处转移;经直肠腔内超声、CT或MRI提示:肿瘤浸润程度为T3-4期;行肠镜或直肠指诊提示:肿瘤下缘距肛门缘 < 12 cm; Karnofsky评分 ≥ 70 ;治疗前血常规、肝肾功能正常,无严重心、肺疾病,无肠梗阻、大出血表现;既往未接受过放疗或化疗;无碘剂及化疗药物过敏史;本研究经我院道德伦理委员会批准。患者接受新辅助治疗前均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 治疗: A组行全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞:氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)370 mg/m²,静脉滴注3 h, 1-5 d;亚叶酸钙(leucovorin, LV)30 mg/m²,静脉滴注3 h, 1-5 d;于6 d行区域动脉灌注化疗栓塞,采用Seldinger法经右侧股动脉插管,经肠系膜下动脉行超选择至直肠上动脉或经双侧髂内动脉行超选择性直肠中、下动脉,采用DSA技术进行动脉造影,根据肿瘤供血动脉迂曲、紊乱血管团的特点定位后,将奥沙利铂(Oxaliplatin, OXA)25 mg溶解于280 mmol/L葡萄糖100 mL中,注入肿瘤直肠上动脉,或分别以2/3-3/4、1/4-1/3量注入直肠中、下动脉的肿瘤富血供侧和乏血供侧,然后以OXA 25mg与40%碘化油乳液共10 mL进行栓塞,栓塞程度以肿瘤直肠动脉主干呈残根状未再见异常染色为止(图1);每间隔2 wk重复,2周期为1个疗程。B组行放疗+化疗:放疗第1天与化疗第1天同步;放疗方案为:放疗总剂量为50 Gy, 2 Gy/次, 5次/周,共25次,为1个周期;采用常规二维放疗技术,照射野为:包括直肠原发病灶及盆腔淋巴引流区域,上界:L5-S1;下界:肿瘤下缘3 cm;左右界超出骨盆缘外1 cm。化疗方案(FOLFOX4)为:OXA 85 mg/m²,静脉滴注2 h, 1 d, LV 200 mg/m²,静脉

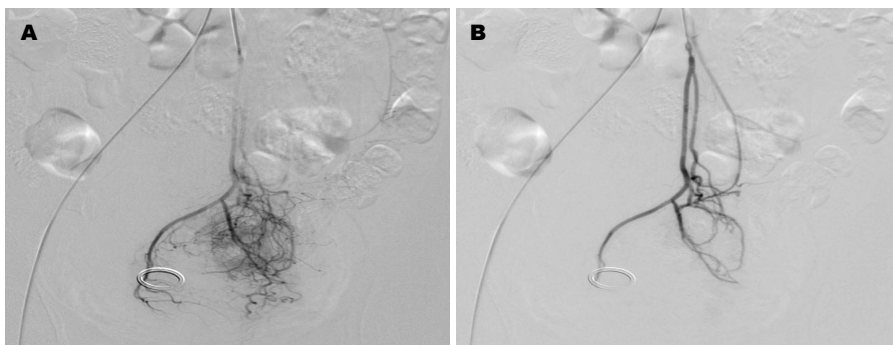


图 1 肠系膜下动脉造影化疗+栓塞前后变化. A: 化疗+栓塞前; B: 化疗+栓塞后.

■相关报道
术前区域动脉灌注化疗可提高局部进展期直肠癌的手术切除率、降低术后复发、转移的发生率, 提高患者远期疗效, 联合栓塞治疗可进一步提高疗效, 越来越受到重视和推广.

表 1 两组患者一般临床资料 (n)

临床资料	n	男/女	年龄/岁	T分期		N分期			TNM分期		病理组织学类型 ^a				
				T3	T4	N0	N1	N2	II	III	1	2	3	4	5
A组	148	96/52	58 ± 14	42	106	64	40	44	31	117	9	28	76	16	19
B组	172	104/68	56 ± 15	51	121	80	44	48	40	132	11	24	95	18	24
t或χ ² 值		0.657	0.672	0.063		0.344			0.246		1.526				
P值		0.418	0.502	0.803		0.842			0.620		0.822				

^a1: 高分化腺癌; 2: 中分化腺癌; 3: 低分化腺癌; 4: 黏液腺癌; 5: 印戒细胞癌.

滴注2 h, 1 d、2 d, 5-FU 400 mg/m², iv, 1 d、2 d, 5-FU 600 mg/m², 静脉滴注22 h, 1 d、2 d; 每间隔2 wk重复一次; 以1周期放疗+3周期化疗为1个疗程. 每疗程新辅助治疗结束后2 wk行CT评价其疗效, 按RECIST标准(2009年1.1版), 以靶病灶直径之和与基线水平对比的变化情况, 分为完全缓解(complete remission, CR): 全部肿瘤病灶消失; 部分缓解(partial remission, PR): 肿瘤病灶缩小30%以上; 疾病进展(progressive disease, PD): 肿瘤病灶增加至少20%或出现新的病灶; 疾病稳定(stable disease, SD): 介于PR和PD之间. 以CR+ PR为治疗有效. 治疗有效者, 如能手术切除则行手术治疗, 不能手术切除则继续原治疗方案; 呈SD者, 如能手术切除则行手术治疗, 如不能手术切除则根据病情继续原治疗方案或改行其他治疗; 呈PD者立即停止治疗, 改行其他治疗; 所有患者均于新辅助治疗结束后3-4 wk依据全直肠系膜切除原则行直肠癌根治术, 术中根据肿瘤浸润程度决定手术方式.

1.2.2 术后组织病理学评定: 参照胃癌化疗组织学疗效评定标准分为: 0级: 无效, 未见癌细胞和组织因治疗引起的变性坏死损害; I级: 轻效, 其中 I 1级为最轻效, 变性的癌细胞在1/3以下, I 2级为轻效, 1/3-2/3的癌细胞发生变性坏死和溶解; II级: 轻显效, 2/3以上的癌细胞发生变性、坏死和溶解; III级: 显效, 癌细胞全部变

性、坏死、溶解或消失, 有时可见癌组织为肉芽组织或纤维组织所代替. 以 I 级及以上为治疗有效, II级及以上为疗效满意.

1.2.3 不良反应: 按美国国家癌症研究所(NCI)通用不良反应术语标准(4.0版)分为1-5级, 记录其级别最高的不良反应. 1、2级反应为低级反应, 3、4级反应为严重反应. 低级反应时, 给予对症处理后继续原治疗方案; 严重反应时, 应立即停止相关治疗, 待降至1级以下时, 适当降低药物剂量并重新开始治疗.

1.2.4 术后并发症: 吻合口瘘、肠梗阻、切口愈合不良.

统计学处理 采用SPSS17.0进行统计分析, 连续性变量资料采用mean ± SD表示, 应用Student's t检验; 分类资料采用率比较, 应用χ²检验; 以P<0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 组织病理学评估 两组所有手术标本病理学评估均有效, A组疗效满意率高于B组, 其疗效满意率分别是60.81%和45.35%, 其差异均有统计学意义(P<0.05, 表2).

2.2 不良反应 A组不良反应均为低级反应(1、2级), 而B组出现较多严重反应(3、4级), A组不良反应发生率(除外恶心反应)均明显低于B组, 恶心反应高于B组, 两组均无治疗相关死亡

■ 创新盘点

本研究将细胞周期特异性药物(5-FU)和细胞周期非特异性药物(OXA),分别经静脉、动脉联合、序贯用药,在多个环节上杀灭肿瘤细胞;同时对肿瘤滋养血管进行化疗栓塞,有效阻断了肿瘤的血供,提高了肿瘤部位药物浓度,延长药物与肿瘤的接触时间,显著提高临床疗效。

表 2 两组患者术后组织病理学评定 (n)

组织病理学评定 ^a	n	0	I ₁	I ₂	II	III
A组	148	0	18	40	68	22
B组	172	0	37	57	58	20
χ^2 值		8.681				
P值		0.034				

^a0级: 无效; I₁级: 最轻效; I₂级: 轻效; II级: 轻显效; III级: 显效。

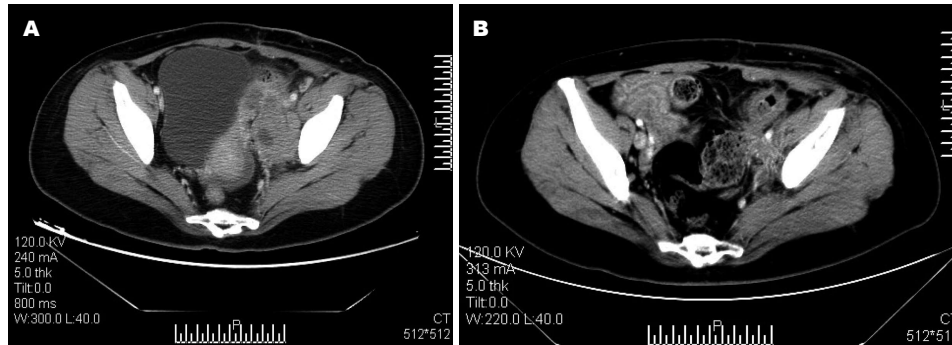


图 2 全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞前后CT变化. A: 化疗+栓塞前; B: 化疗+栓塞后.

病例, 其不良反应发生的差异有统计学意义(均 $P < 0.05$, 表3).

2.3 术后并发症 A、B组两组发生吻合口瘘、肠梗阻、切口愈合不良的情况分别为5例(3.38%) vs 20例(11.63%), ($\chi^2 = 7.517, P = 0.006$); 4例(2.70%) vs 16例(9.30%), ($\chi^2 = 5.913, P = 0.015$); 7例(4.73%) vs 21例(12.21%), ($\chi^2 = 5.574, P = 0.018$), 其差异均有统计学意义。

典型病例: 女, 36岁, 因“左下腹痛伴左下肢水肿20 d余”入院, 行CT检查提示: 左侧盆腔囊实性占位, 与左侧髂血管关系密切(图2A). 行电子肠镜示: 距肛门缘10-15 cm可见一环状狭窄, 黏膜表面糜烂、坏死, 内镜尚可通过. 取病理活检诊断: (直肠)中分化腺癌. 给予2个疗程全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞后, 复查CT提示肿瘤较前明显缩小, 与左侧髂血管和左侧盆腔侧壁组织之间可见明显脂肪间隙(图2B), 行“直肠癌根治性切除术”, 术后剖开标本见直肠肠腔局部环形缩窄, 黏膜坏死、瘢痕样改变, 而肿瘤滋养血管直肠支供血以外的直肠黏膜是正常的(图3). 术后病理镜下见坏死断裂达肠壁肌层, 肌层间可见大量炎性细胞浸润, 未见癌细胞(图4).

3 讨论

局部进展期直肠癌术前放化疗可降低肿瘤分期, 提高R0切除率、手术保肛率, 降低局部复发率^[1],

已成为其综合治疗标准模式^[2], 但未能提高其5年总生存率和无病生存率^[3], 且增加了术后吻合口瘘、肠梗阻、切口愈合不良等并发症和不良反应发生率的危险性^[2,4]. Swellengrebel等^[5]报道: 放化疗导致直肠癌术后吻合口瘘发生率高达27.6%. Ceelen等^[6]报道: 术前放化疗的3、4级不良反应发生率高达14.9%. 为降低这些不良反应的发生, Garcia-Aguilar等^[7]通过减少放化疗的剂量, 实现了降低不良反应的目的, 但同时也降低了临床疗效。

术前区域动脉灌注化疗可提高局部进展期直肠癌的手术切除率、降低术后复发、转移的发生率, 提高患者远期疗效, 联合栓塞治疗可进一步提高疗效, 越来越受到重视和推广^[8-11]. 鉴于此, 我们对局部进展期直肠癌术A组和B组对比性研究, 结果表明: 全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞的疗效明显占优势. 两组所有手术病理标本组织病理学评估均有效, A组的疗效满意率高于B组($\chi^2 = 8.681, P < 0.05$); A组的不良反应(除外恶心反应)均低于B组(均 $P < 0.05$), 并表现出较少的3、4级反应, 恶心反应发生率高于B组($P < 0.05$), 但多为一过性的低级反应(1、2级), 给予止吐药物后可逐渐缓解, 患者均可耐受; A组术后吻合口瘘、肠梗阻及切口愈合不良的发生率均较B组明显降低(均 $P < 0.05$). 其优势在于: 我们采用了动静脉联合给药并化疗栓塞的治疗方法. 5-FU为细胞周期特异性药物, 对癌细胞的

表 3 两组患者急性不良反应发生情况 (n)

不良反应	A 组						B 组						χ^2 值	P值
	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5		
白细胞减少	56	64	28	0	0	0	28	48	56	36	4	0	51.96	<0.001
粒细胞减少	52	72	24	0	0	0	12	52	64	40	4	0	87.70	<0.001
血小板减少	130	13	5	0	0	0	133	20	11	6	2	0	10.03	0.040
恶心	4	120	24	0	0	0	16	64	80	12	0	0	31.16	<0.001
呕吐	132	16	0	0	0	0	112	24	20	12	4	0	29.76	<0.001
腹泻	140	8	0	0	0	0	132	12	16	8	4	0	21.65	<0.001
皮肤/黏膜	88	48	12	0	0	0	64	36	32	24	16	0	35.40	<0.001
疲惫	124	24	0	0	0	0	96	76	0	0	0	0	28.97	<0.001
感觉异常	132	16	0	0	0	0	12	120	40	0	0	0	5.147	0.023
浅表静脉炎	132	16	0	0	0	0	16	104	52	0	0	0	7.60	0.006

■应用要点

本研究对比观察局部进展期直肠癌术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞和术前放疗+化疗的术后组织病理学疗效、不良反应发生率及术后并发症发生率, 结果表明: 全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞的疗效明显占优势. 应用于临床安全、有效, 可作为一种新的新辅助治疗方案.

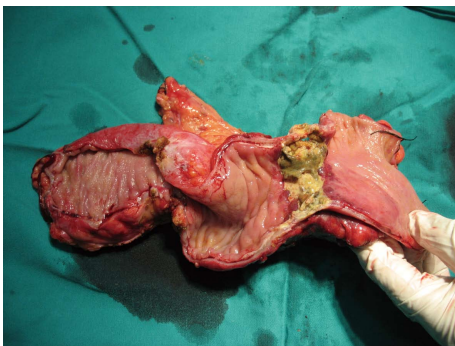


图 3 全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞后手术切除之直肠癌标本.

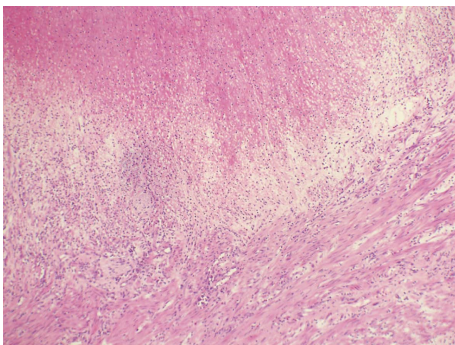


图 4 病理提示坏死断裂达肠壁肌层, 肌层间可见大量炎性细胞浸润, 未见癌细胞(苏木精-伊红染色 $\times 100$).

周围的各级血管未受到损伤, 区域动脉灌注化疗可使高浓度化疗药物直接接触肿瘤滋养动脉血管, 抑制血管内皮生长因子表达水平, 减少新生血管的形成, 降低微血管密度^[14], 促使肿瘤滋养血管发生变性、坏死、纤维化增生; 同时, 对肿瘤滋养血管进行化疗栓塞, 有效阻断了肿瘤的血供, 提高了肿瘤部位药物浓度, 延长药物与肿瘤的接触时间, 造成肿瘤的缺血、坏死^[15]. 区域动脉灌注化疗药物经肝脏代谢后进入体循环系统, 大大降低药物对全身的不良反应^[16]. 超选择性区域动脉灌注化疗栓塞直接作用于肿瘤滋养血管直肠支, 引起直肠动脉供血区直肠黏膜出现糜烂、坏死、瘢痕样改变, 而肿瘤滋养血管直肠支供血以外的直肠黏膜是正常的, 有效提高了对靶病灶的治疗效果, 减少了对周围组织、器官的影响. 不但提高了肿瘤治疗效果, 而且降低了不良反应和术后吻合口瘘、肠梗阻及切口愈合不良等并发症发生率.

然而, 局部进展期直肠癌术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞还存在一些其他不良反应和并发症发生的可能性: 在造影剂及化疗药物短时间注入动脉有引起恶心、呕吐、肝肾功能损害的可能, 动脉灌注化疗栓塞后肿瘤细胞坏死引起发热、疼痛等不适, 但这些症状较轻, 给予对症处理后可逐渐消失. 由于直肠上动脉与乙状结肠动脉最下一支之间一般无吻合^[17], 需仔细分辨直肠肿瘤滋养血管进行超选择动脉灌注化疗栓塞, 以预防肠管缺血坏死. 股动脉穿刺拔管后需局部压迫、右下肢制动, 预防局部血肿的形成; 观察患者肢体浅表血管搏动, 有无肢体麻木、背痛等症状, 发现血栓形成和栓塞及时给予处理; 本研究中所有患者均未发生肠坏

■名词解释

新辅助治疗: 又称为术前辅助治疗, 是恶性肿瘤患者在手术治疗前采用的一些治疗方法. 主要有新辅助化疗、新辅助放疗、新辅助放疗等.

杀伤作用具有时间依赖性, 我们将其静脉滴注. OXA为细胞周期非特异性药物, 其药物浓度是影响对肿瘤细胞杀伤作用的主要原因, 我们通过动脉介入途径将化疗药物直接作用于肿瘤, 可使其于肿瘤边缘药物浓度是全身化疗的9-68倍^[12], 同时由于药物的首过效应, 可显著提高药物对肿瘤细胞的杀灭作用. 这种动静联合、序贯用药的治疗方案, 可有效抑制肿瘤细胞的增殖、在多个环节上杀灭肿瘤细胞^[13]. 术前肿瘤

同行评价

本文密切结合肿瘤治疗的热点, 选题得当, 实验设计合理, 文笔流畅, 统计分析正确, 参考文献较新, 值得广大临床医师及肿瘤科医师阅读。

死和肢体血栓栓塞并发症。

术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞对局部进展期直肠癌疗效确切, 可有效降低不良反应、术后并发症发生率。另外, 有文献[11]报告: 区域动脉灌注化疗药物经门静脉直接进入肝脏, 可杀灭临床、亚临床的肝转移灶, 预防门脉系统引起的肝转移, 提高生存率; 但术前全身静脉联合区域动脉灌注化疗栓塞的远期疗效、总生存率、无病生存率是否更优于放化疗, 尚需进一步观察。

4 参考文献

- Vonk DT, Hazard LJ. Do all locally advanced rectal cancers require radiation? A review of literature in the modern era. *J Gastrointest Oncol* 2010; 1: 45-54 [PMID: 22811804 DOI: 10.3978/j.issn.2078-]
- Pucciarelli S, Del Bianco P, Efficace F, Serpentine S, Capirci C, De Paoli A, Amato A, Cuicchi D, Nitti D. Patient-reported outcomes after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer: a multicenter prospective observational study. *Ann Surg* 2011; 253: 71-77 [PMID: 21135694 DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181fcb856]
- Bonnetain F, Bosset JF, Gerard JP, Calais G, Conroy T, Mineur L, Bouché O, Maingon P, Chapet O, Radosevic-Jelic L, Methy N, Collette L. What is the clinical benefit of preoperative chemoradiotherapy with 5FU/leucovorin for T3-4 rectal cancer in a pooled analysis of EORTC 22921 and FFCD 9203 trials: surrogacy in question? *Eur J Cancer* 2012; 48: 1781-1790 [PMID: 22507892 DOI: 10.1016/j.ejca.2012.03.016]
- Kerr SF, Norton S, Glynne-Jones R. Delaying surgery after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer may reduce postoperative morbidity without compromising prognosis. *Br J Surg* 2008; 95: 1534-1540 [PMID: 18942057 DOI: 10.1002/bjs.6377]
- Swelengrebel HA, Marijnen CA, Verwaal VJ, Vincent A, Heuff G, Gerhards MF, van Geloven AA, van Tets WF, Verheij M, Cats A. Toxicity and complications of preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Br J Surg* 2011; 98:

- 418-426 [PMID: 21254020 DOI: 10.1002/bjs.7315]
- Ceelen W, Fierens K, Van Nieuwenhove Y, Pattyn P. Preoperative chemoradiation versus radiation alone for stage II and III resectable rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* 2009; 124: 2966-2972 [PMID: 19253365 DOI: 10.1002/ijc.24247]
- Garcia-Aguilar J, Shi Q, Thomas CR, Chan E, Cataldo P, Marcet J, Medich D, Pigazzi A, Oommen S, Posner MC. A phase II trial of neoadjuvant chemoradiation and local excision for T2N0 rectal cancer: preliminary results of the ACOSOG Z6041 trial. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 384-391 [PMID: 21755378 DOI: 10.1245/s10434-011-1933-7]
- 唐云强, 谭志明, 王嘉康, 汤日杰, 王俊, 赵宏宇, 麦聪, 张相良, 崔书中. 术前区域动脉灌注化疗治疗进展期低位直肠癌的临床研究. *南方医科大学学报* 2008; 28: 1247-1248, 1253
- 夏泽锋, 袁野, 陶凯雄, 韩高雄, 帅晓明, 蔡开琳, 王继亮, 杜寒松, 邓美洲, 王国斌. 结直肠癌术前区域动脉灌注化疗疗效的组织学评价. *中华普通外科杂志* 2010; 25: 353-356
- 袁建华. 结直肠癌术前区域动脉灌注化疗的临床价值. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 497-499
- Xu J, Zhong Y, Weixin N, Xinyu Q, Yanhan L, Li R, Jianhua W, Zhiping Y, Jiemin C. Preoperative hepatic and regional arterial chemotherapy in the prevention of liver metastasis after colorectal cancer surgery. *Ann Surg* 2007; 245: 583-590 [PMID: 17414607]
- Maurer CA, Borner MM, Läufer J, Friess H, Z'graggen K, Triller J, Büchler MW. Celiac axis infusion chemotherapy in advanced nonresectable pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 1998; 23: 181-186 [PMID: 9629517]
- 王革芳, 程永德. 动脉灌注化疗的药物选择原则. *介入放射学杂志* 2009; 10: 797-800
- 王荣江, 邵四海, 石麒麟, 赵红星, 郑银元, 李辉, 陈晓农. 化疗栓塞对膀胱肿瘤新生血管生成及血管内皮细胞生长因子表达的影响. *中华泌尿外科杂志* 2008; 29: 470-474
- 王平, 崔彦, 李成林, 吉敏, 周立艳, 赵燕, 段育忠. 结直肠癌肝转移新辅助化疗疗效分析. *中华肝胆外科杂志* 2009; 15: 898-901
- 李国立, 范朝刚, 鲍阳, 姜军, 李宁, 黎介寿. 动静脉结合给药的FLEEOX方案对以淋巴结转移为主晚期胃癌的新辅助化疗. *中华外科杂志* 2009; 47: 1171-1174
- 张启瑜. 钱礼腹部外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 435-435

编辑 李军亮 电编 闫晋利



《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》,《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569)》是一份同行评议和开放获取期刊(Open Access Journal, OAJ), 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版。《世界华人消化杂志》编辑委员会成员, 由483位专家组成, 分布在30个省市、自治区和特别行政区。

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病, 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, 分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 循证医学, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T, V_{max} 不能写Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max} , C_{max} , Vd, $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子

量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如 $37.6\text{ }^\circ\text{C} \pm 1.2\text{ }^\circ\text{C}$, $45.6\text{ 岁} \pm 24\text{ 岁}$, $56.4\text{ d} \pm 0.5\text{ d}$. $3.56 \pm 0.27\text{ pg/ml}$ 应为 $3.56\text{ ng/L} \pm 0.27\text{ ng/L}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $1 \times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}\text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7}\text{ g}$ 之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英文大写F; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wcyj@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数±标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 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“-”号线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用

于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参

考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>. 审稿过程平均时间需要14-28天. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审.

6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-8538-1892
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2013年国内国际会议预告

2013-01-24/26

美国临床肿瘤学会胃肠肿瘤(ASCO GI)研讨会
会议地点: 美国旧金山
联系方式: www.gicasym.org

2013-02-10/15

2013年肠道微生物组: 免疫网络效应/法规Keystone Symposia
会议地点: 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]

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.centra surg.org/meeting/futuremtgs.html

2013-04-12/14

2013中国肛肠创新论坛(CICS)
会议地点: 北京市
联系方式: www.crdinnovation.com

2013-04-19/23

2013第2届国际肿瘤学论坛
会议地点: 瑞士
联系方式: cihexpo@163.com

2013-05-23/25

2013第六届世界癌症大会
会议地点: 西安市
联系方式: bithuiyi@163.com

2013-05-20/22

2013年第三届内分泌与代谢大会
会议地点: 西安市
联系方式: nancy@bitconferences.cn

2013-05-31/06-04

2013美国临床肿瘤协会年会
会议地点: 美国芝加哥
联系方式: yangxinxue999@163.com

2013-06-07/09

中国国际肿瘤营养与支持治疗研讨会暨第一届全国肿瘤
营养与支持治疗学术会议
会议地点: 武汉市
联系方式: csonsc@VIP.163.com

2013-06-21/23

中国消化科学学术论坛
会议地点: 张家界市
联系方式: casgmail@126.com

2013-07-13/14

中华医学会2013年肝病与代谢学术研讨会
会议地点: 银川市
联系方式: lilyjia@163.com

2014-09-26/30

第39届欧洲临床肿瘤学会年会
会议地点: 西班牙
联系方式: http://www.esmo.org/events/madrid-2014-esmo-congress.html

2013-10-18/20

第二十二届亚太抗癌大会
会议地点: 天津市
联系方式: secretariat@apcc2013.com

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

白岚 教授
南方医科大学南方医院惠侨科

蔡开琳 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院

高英堂 研究员
天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

管世鹤 副教授
安徽医科大学第一附属医院检验科

郭永红 副主任医师
西安交通大学医学院第二附属医院传染病学

郝立强 副教授
上海长海医院普外二科

何向辉 教授
天津医科大学总医院普通外科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

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

孔静 副教授
中国医科大学附属盛京医院普外科

李升平 教授
中山大学肿瘤医院肝胆科

李晓波 教授
上海交通大学药学院

李瑜元 教授
广州市第一人民医院内科

刘宝林 教授
中国医科大学附属盛京医院

刘杰民 副主任医师
苏州大学附属第一医院介入科

门秀丽 教授
河北联合大学(原华北煤炭医学院)病理生理学教研室

彭亮 副主任医师
中山大学附属第三医院感染病学

秦春宏 副主任医师
南华大学附属第二医院普外科

沈柏用 副教授
瑞金医院肝胆胰外科中心

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

汤静 主管药师
上海交通大学附属第一人民医院

王道荣 主任医师
江苏省苏北人民医院胃肠外科

王蔚虹 教授
北京大学第一医院消化内科

杨薇 副教授
南华大学附属第一医院

袁红霞 研究员
天津中医药大学

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

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科

周晓武 副主任医师
中国人民解放军空军总医院普通外科

《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:

2012年1月





百世登

Baishideng®

Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**

Room 1701, 17/F, Henan Building,

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

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

