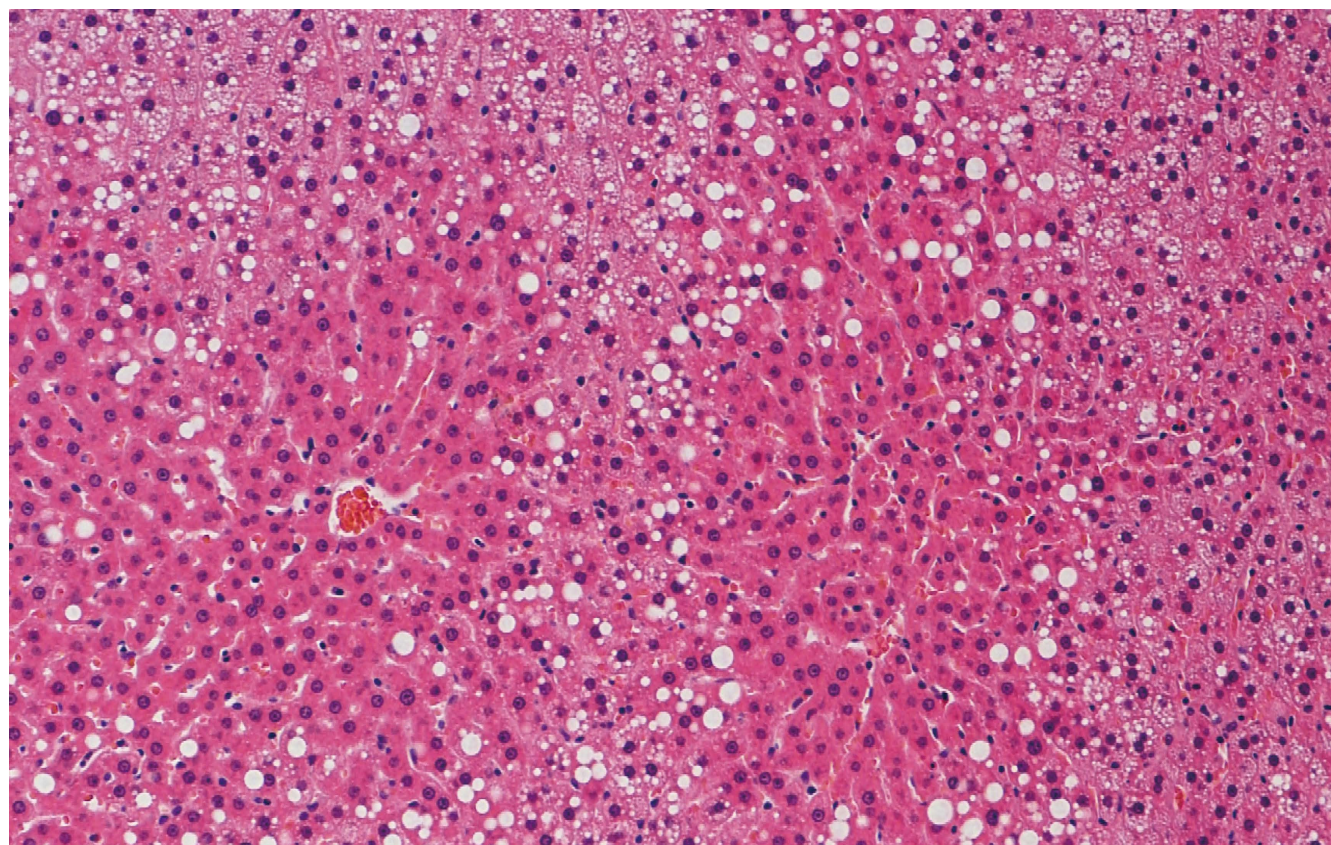


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2014 年 2 月 8 日 第 22 卷 第 4 期 (Volume 22 Number 4)



4/2014

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员,由485位专家组成,分布在30个省市,自治区,特别行政区。其中,上海市81位、北京市71位、广东省40位、江苏省39位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位。

总顾问

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

名誉主编

潘伯荣教授

主编

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

编委

消化内科学

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

冯志杰主任医师

傅春彬主任医师

甘华田教授

高凌副教授

戈之铮教授

关玉盘教授

关晓辉主任医师

郭晓钟教授

郝建宇教授

郝丽萍副教授

何继满教授

何松教授

洪天配教授

黄培林教授

黄晓东主任医师

黄颖秋教授

黄缘教授

李国忠教授

江米足教授

姜春萌教授

姜慧卿教授

姜相君主任医师

金瑞教授

蓝宇教授

李淑德教授

李瑜元教授

李玉民教授

廖家智副主任医师

林志辉教授

刘冰熔教授

刘凤斌教授

刘改芳主任医师

刘海峰主任医师

刘海林主任医师

刘亮明副教授

陆伦根教授

马红主任医师

马欣主任医师

毛恩强教授

毛高平教授

孟庆华教授

缪应雷主任医师

倪润洲教授

欧希龙副教授

潘秀珍教授

潘阳林副教授

朴云峰教授

秦成勇教授

任粉玉教授

任建林教授

邵先玉教授

沈琳主任医师

沈薇教授

施瑞华教授

宋军副教授

唐世刚教授

田宇彬教授

度必光教授

宛新建副教授

王邦茂教授

王炳元教授

王承党教授

王江滨教授

王俊平教授

王蔚虹教授

王晓艳副教授

夏冰教授

夏时海副教授

徐灿霞教授

徐可树教授

杨建民教授

张国主任医师

姚树坤教授

张国梁主任医师

张军教授

张庆瑜教授

张小晋主任医师

张筱茵副教授

张志强教授

郑培永教授

郑鹏远教授

郑素军副主任医师

郑勇教授

周国雄主任医师

周宇教授

邹晓平主任医师

诸琦教授

于珮主任医师

消化外科学

白雪副主任医师

白雪巍副主任医师

白玉作教授

蔡开琳副教授

蔡三军主任医师

曹杰主任医师

陈炳官教授

陈光教授

陈海龙教授

陈积圣教授

陈进宏副主任医师

陈凇教授

陈汝福教授

陈亚军主任医师

陈钟教授

程爱国教授

程树群副教授

崔云甫教授

戴朝六教授

戴冬秋教授

丁义涛教授

杜顺达副教授

房林教授

傅红副教授

傅华群教授

傅思源副教授

傅晓辉副教授

傅志仁主任医师

高毅主任医师

葛海燕教授

巩鹏副教授

谷俊朝主任医师

顾国利副主任医师

顾岩教授

韩天权教授

郝纯毅主任医师

郝立强副教授

何超教授

何向辉教授

何晓顺教授

何裕隆教授

胡安斌副教授

黄志勇教授

季加孚教授

姜卫东教授

姜波健教授

金山主任医师

康春博副主任医师

孔静副教授

黎乐群教授

李革副教授

李国威教授

李华副教授

李华山主任医师

李升平教授

李胜研究员

李涛副主任医师

李文岗教授

李小荣教授

李旭副教授

李永翔教授

李正荣副教授

李志霞教授

李宗芳教授

梁力建教授

刘宝林教授

刘超教授

刘宏鸣副教授

刘建教授

刘亮副主任医师

刘颖斌主任医师

卢军华教授

陆云飞教授

禄韶英副教授

吕凌副教授

吕云福教授

麻勇研究员

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

石毓君研究员

宋新明教授

宋振顺教授

孙诚谊教授

孙文兵教授

孙星副教授

孙学英教授

邵升副教授

谭晓冬教授

汤朝晖副主任医师

汤绍涛教授

唐南洪教授

田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
王道荣主任医师
王德盛副主任医师
王凤山教授
王刚副研究员
王健生教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王铮副研究员
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
俞继卫副主任医师
于则利教授
禹正杨副教授
喻春钊教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
邹小明教授

消化感染病学

白浪副教授
陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师

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

消化中医药学

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

邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

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

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

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

吴沛宏教授
余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

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

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
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 ● 2014 年 2 月 8 日 第 22 卷 第 4 期 (总第444期)

述 评	453 基于电-机复合机制实现胃动力学的检测与评价 赵舒, 任超世
基础研究	461 P162通过抑制Chk1/2表达增加食管癌细胞株Eca109的放射敏感性 张红, 吴清明, 龙辉, 陈洁, 陈建华 469 shRNA maspin/ pGenesil-1.1表达载体的构建及意义 倪江涛, 杨紫汐, 易永芬 476 藤黄对人结肠癌HCT116细胞裸鼠原位移植模型的作用 竺平, 谷云飞, 杨柏霖, 林秋, 丁义江
临床研究	483 不同剂量咪唑安定在肥胖患者无痛胃肠镜麻醉中的作用 李红培, 李皓, 刘毅, 张宏
文献综述	488 胃食管反流病中西医治疗的进展 汪晓奕, 朱凌云 494 肿瘤干细胞相关信号通路在胃癌发生发展中的研究进展 席小龙, 姜波健, 俞继卫 501 长链非编码RNA在胃癌中的研究进展 胡谦, 胡小云 508 锌指蛋白A20对炎症反应和细胞凋亡的调控作用及其在炎症性肠病中的影响 季蓉, 吴煥淦, 施茵 515 半乳糖凝集素-9与炎症性肠病关系的研究进展 朱丽萍, 王鹏举, 刘静, 李林静, 李治国, 江红艳, 冯百岁 521 炎症性肠病与间充质干细胞的研究进展 林艳, 郑长青 527 IGRA及TB-PCR在肠结核与克罗恩病鉴别诊断中的价值 张俊, 高峰 533 潜在可切除结直肠癌肝转移转化治疗的研究进展 吴斌, 杨金坤, 朱莹杰
研究快报	541 肝内型门脉高压大鼠门静脉超微结构及生物力学特性的改变 文彬, 邓鑫, 陈然, 彭佩纯 546 葛根芩连汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎的影响 续畅, 王允亮, 张慧芹, 刘泽洲, 郝钰, 牛建昭, 李军祥 553 RNA干扰技术沉默MCM7基因对人肝癌SMMC-7721细胞生物学行为的影响 孙雯, 曹骥, 卢晓旭, 朱伶群, 杨春, 欧超, 骆成飘, 李媛, 苏建家 563 As ₂ O ₃ 对体外肠癌细胞HCT116生长和增殖周期的影响 蔡朋朋, 冯越, 王东红, 周艳, 孙丽慧, 李晶
临床经验	568 α体甘草酸制剂对早期自身免疫性肝炎炎症活动的控制作用 司常云, 徐芸, 保洁 573 IL-18与肝癌家族聚集性的相关性 莫金英, 吴继周, 吴健林, 韦颖华, 张鹭, 宁秋悦, 胡蝶飞, 万裴琦 578 ENBD与ERBD治疗急性梗阻性胆管炎56例 谢宏民, 杨新魁, 李佳璇 583 两种亚型FD患者的口盲传递时间 付遥鑫, 刘诗 588 普芦卡必利治疗慢性便秘的系统评价 侯毅, 谷云飞, 朱秉宜 596 RT-PCR技术定量检测新疆溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化 蒋曼, 高鸿亮, 姚萍 601 注水法与注气法在老年患者结肠镜检查中的比较 王文静, 高建新, 钱晶瑶, 齐艳荣, 孙明昊, 韩海英, 刘文天

病例报告	606 回盲部病变1例 王玉珍, 胡义亭, 杨晶, 苏少慧
附录	I-V 《世界华人消化杂志》投稿须知 I 2014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	460 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 475 《世界华人消化杂志》出版流程 493 《世界华人消化杂志》栏目设置 500 《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 514 《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) 540 《世界华人消化杂志》外文字符标准 552 《世界华人消化杂志》修回稿须知 572 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 577 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0.873 582 《世界华人消化杂志》正文要求 587 《世界华人消化杂志》参考文献要求 595 WJG总被引频次排名位于第174名
封面故事	续畅, 王允亮, 张慧芹, 刘泽洲, 郝钰, 牛建昭, 李军祥. 葛根芩连汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 546-552 http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/546.asp http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.546
本期责任人	编务 车新鑫; 送审编辑 闫晋利, 鲁亚静; 组版编辑 闫晋利; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 郭鹏; 形式规范 审核编辑部主任 田滢; 最终清样审核总编 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 2014-02-08

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, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

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

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

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

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

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

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

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

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

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

编辑部

田滢, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-59080035

传真: 010-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza, 315-321 Lockhart

Road, Wan Chai, Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

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

《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学研究领域类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。

《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90.67元 全年36期3264.00元

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

World Chinese Journal of Digestology

February 2014 Contents in Brief Volume 22 Number 4

EDITORIAL	453 Gastric motility measurement and evaluation based on electrical-mechanical composite mechanism <i>Zhao S, Ren CS</i>
BASIC RESEARCH	461 P162 increases radiosensitivity of esophageal cancer cell line Eca109 by inhibiting Chk1/2 expression <i>Zhang H, Wu QM, Long H, Chen J, Chen JH</i> 469 Construction of a eukaryotic expression vector containing shRNA targeting maspin <i>Ni JT, Yang ZX, Yi YF</i> 476 Effects of gamboge in an orthotopic mouse model of colon cancer <i>Zhu P, Gu YF, Yang BL, Lin Q, Ding YJ</i>
CLINICAL RESEARCH	483 Midazolam for painless gastrointestinal endoscopy in obese patients <i>Li HP, Li H, Liu Y, Zhang H</i>
REVIEW	488 Progress in treatment of gastroesophageal reflux disease by traditional Chinese medicine and Western <i>Wang XY, Zhu LY</i> 494 Cancer stem cell-related signaling pathways in development of gastric cancer <i>Xi XL, Jiang BJ, Yu JW</i> 501 Long non-coding RNAs and gastric carcinoma <i>Hu Q, Hu XY</i> 508 Regulatory effect of zinc finger protein A20 on inflammation and apoptosis: Implications for inflammatory bowel disease <i>Ji R, Wu HG, Shi Y</i> 515 Galectin-9 and inflammatory bowel disease <i>Zhu LP, Wang PJ, Liu J, Li LJ, Li ZG, Jiang HY, Feng BS</i> 521 Inflammatory bowel disease and mesenchymal stem cells <i>Lin Y, Zheng CQ</i> 527 Value of interferon- γ release assay and polymerase chain reaction for <i>Mycobacterium tuberculosis</i> in differentiation of intestinal tuberculosis from Crohn's disease <i>Zhang J, Gao F</i> 533 Conversion therapy for colorectal cancer patients with potentially resectable liver metastases <i>Wu B, Yang JK, Zhu YJ</i>
RAPID COMMUNICATION	541 Changes in ultrastructure and biomechanical properties of the portal vein in rats with intrahepatic portal hypertension <i>Wen B, Deng X, Chen R, Peng PC</i> 546 Effects of Gegen Qinglian Tang on high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats <i>Xu C, Wang YL, Zhang HQ, Liu ZZ, Hao Y, Niu JZ, Li JX</i> 553 Effects of RNA interference-mediated <i>MCM7</i> knockdown on biological behavior of human liver cancer SMMC-7721 cells <i>Sun W, Cao J, Lu XX, Zhu LQ, Yang C, Ou C, Luo CP, Li Y, Su JJ</i> 563 Effect of arsenic trioxide on growth and cell cycle progression in colon cancer cell line HCT116 <i>Cai PP, Feng Y, Wang DH, Zhou Y, Sun LH, Li J</i>
CLINICAL PRACTICE	568 Efficacy of α -glycyrrhizic acid in management of early autoimmune hepatitis <i>Si CY, Xu Y, Bao J</i> 573 Correlation between IL-18 and familial aggregation of hepatocellular carcinoma <i>Mo JY, Wu JZ, Wu JL, Wei YH, Zhang L, Ning QY, Hu DF, Wan PQ</i> 578 Treatment of acute obstructive cholangitis by ENBD and ERBD: Analysis of 56 cases <i>Xie HM, Yang XK, Li JX</i> 583 Assessment of orocecal transit time by breath hydrogen test in two subtypes of functional dyspepsia <i>Fu YY, Liu S</i> 588 Prucalopride for treatment of chronic constipation: A systematic review <i>Hou Y, Gu YF, Zhu BY</i> 596 Quantification of intestinal microflora in ulcerative colitis patients using real-time PCR <i>Jiang M, Gao HL, Yao P</i> 601 Water injection versus air insufflation for colonoscopy in elderly patients <i>Wang WJ, Gao JX, Qian JY, Qi YR, Sun MH, Han HY, Liu WT</i>

CASE REPORT	606 A case of ileocecal lesion <i>Wang YZ, Hu YT, Yang J, Su SH</i>
APPENDIX	I – V Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> I Meeting events calendar in 2014
ACKNOWLEDGMENT	I Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	<i>Xu C, Wang YL, Zhang HQ, Liu ZZ, Hao Y, Niu JZ, Li JX.</i> Effects of Gegen Qinglian Tang on high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2014; 22(4): 546-552 http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/546.asp http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.546
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xin-Xin Che</i> Review Editor: <i>Jin-Li Yan, Ya-Jing Lu</i> Electronic Page Editor: <i>Jin-Li Yan</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Peng Guo</i> Proof Editor: <i>Ying Tian</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date February 8, 2014

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

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

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

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

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

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

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

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

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology,

Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

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

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

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

EDITORIAL OFFICE

Ying Tian, Director

World Chinese Journal of Digestology

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

Telephone: +86-10-59080035

Fax: +86-10-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza,

315-321 Lockhart Road, Wan Chai,

Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpg@baishideng.com

<http://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

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

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 90.67 Yuan for each issue

RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved. 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/tgzx.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

基于电-机复合机制实现胃动力学的检测与评价

赵舒, 任超世

赵舒, 任超世, 中国医学科学院, 北京协和医学院生物医学工程研究所 天津市 300192

赵舒, 博士, 助理研究员, 主要从事生物电阻抗技术基础与临床应用研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81301288

作者贡献分布: 赵舒完成论文写作; 任超世修改、审定.

通讯作者: 任超世, 教授, 博士生导师, 300192, 天津市南开区白堤路236号, 中国医学科学院生物医学工程研究所.

renbme@163.com

电话: 022-87891583

收稿日期: 2013-10-30 修回日期: 2013-12-10

接受日期: 2013-12-19 在线出版日期: 2014-02-08

Gastric motility measurement and evaluation based on electrical-mechanical composite mechanism

Shu Zhao, Chao-Shi Ren

Shu Zhao, Chao-Shi Ren, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81301288

Correspondence to: Chao-Shi Ren, Professor, Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 236 Baidi Road, Nankai District, Tianjin 300192, China. renbme@163.com

Received: 2013-10-30 Revised: 2013-12-10

Accepted: 2013-12-19 Published online: 2014-02-08

Abstract

Gastric motility and emptying are a composite course involving electrical activity and mechanical contraction. In the research of gastric motility, the electrical activity should be closely connected to the subsequent mechanical contraction based on the understanding of electrical-mechanical composite mechanism. Existing simulation research and clinical research suggest that electrogastrogram (EGG) signals can provide physiological time scales, and gastric motility can be extracted from impedance signals. According to the coupling of the myoelectric activity and the mechanical contraction of the stomach, the correlation analysis of multiple signals can be performed. And then the influence of various factors such as the range, time and transmission distance of the gastric contraction

can be deeply explored. The method combining gastric impedance and synchronous EGG measurements is effective and promising for evaluating gastric motility.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gastric motility; Electrical-mechanical composite mechanism; Electrical bioimpedance; Electrogastrogram

Zhao S, Ren CS. Gastric motility measurement and evaluation based on electrical-mechanical composite mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 453-460 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/453>. asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.453>

摘要

胃的运动和排空是一个复杂的电活动-机械收缩和传导的过程, 胃动力学研究应该基于电-机复合机制的认识高度, 将电活动和由其引发的胃机械收缩与传导紧密联系. 相关模拟与临床实验研究表明, 电阻抗胃运动信号与胃电图 (electrogastrogram, EGG) 检测结合, 以EGG作为胃起搏生理时标, 由多通道电阻抗信号提取胃的运动状态, 依据EGG活动与机械收缩的偶联, 进行多源信号相关分析, 深入探讨胃传导性收缩的幅度、时限、方向以及传导距离等因素的影响, 可建立有效的胃动力功能无损检测 and 评价新方法, 实现基于胃动力电-机复合机制的胃动力学研究.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 胃动力; 电-机复合机制; 生物电阻抗; 胃电图

核心提示: 胃阻抗信号与胃的运动相对应, 胃电图 (electrogastrogram) 反映胃的电活动, 以其表征胃的起搏, 作为生理时标, 以阻抗信号提取胃的运动信息, 依据胃电活动与机械收缩的偶联, 可建立有效的、基于电-机复合机制的无损胃动力检测和评价方法.

赵舒, 任超世. 基于电-机复合机制实现胃动力学的检测与评价. *世界华人消化杂志* 2014; 22(4): 453-460 URL: <http://>

■背景资料

胃肠疾病常见多发, 严重影响到人们的工作和生活质量. 随着社会经济的发展和, 工作节奏加快, 压力增加, 生活规律性变化, 发病率呈现逐年升高的趋势. 已受到国内外消化内科医生的特别关注和重视. 胃肠疾病通常与胃功能紊乱相关, 功能性胃肠疾病和胃肠动力障碍是目前消化系统疾病研究中最引人注目的领域. 在胃肠领域中, 这两大类疾病患病率高, 治疗困难, 消耗医药资源大, 其病因与发病机制至今还不十分清楚.

■同行评议者

魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院

■ 研发前沿

长期以来,人们对胃动力功能的研究落后于对胃的内、外分泌功能及胃的形态学的研究,其中一个很重要的原因就是缺乏方便、有效的胃动力学检查手段,研究、提供一种方便、有效,能反映整个消化过程胃的运动及变化,可全面、准确进行胃动力学无损检测与评价的方法,是胃动力学研究与临床应用深入和进一步发展的需要,也是胃动力检测方法的研究前沿。

www.wjgnet.com/1009-3079/22/453.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.453

0 引言

胃肠动力学是一门正在迅速发展、多学科交叉的新兴学科^[1,2],在国内外一直是研究的热点^[3]。30年来,人们对功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGID)以及胃肠动力障碍性疾病(disorders of gastrointestinal motility, DGIM)的认识有了长足的进步,但仍有诸多问题尚不够清楚^[4]。近年来,通过应用现代生物学技术进行研究,使人们对胃肠生物力学的认识有了一定程度的提高,并获得了大量宝贵信息。研究数据表明,胃肠神经与胃肠肌肉之间存在相互协调、相互作用的关系,但这种关系并非呈线性^[4]。现代医学的检测手段通过大量动物实验逐渐应用于人体,有些已为临床服务。胃肠腔压力、排空和运行时间、各括约肌功能及肌电活动等研究为生理和病理状态下的胃肠运动提供了大量的客观资料,而食物、酸度、胃肠激素、神经、药物、精神环境等对胃肠运动影响的研究亦逐步深入,使胃肠运动观念不断更新和发展^[5]。

消化系自然形成的具有自主调节机制的力学器官,摄入食物的种类不同,其动力模式不同,以使食物达到最大限度的消化和吸收,并最终将废物排出体外。其调节能力之神奇,使人叹为观止^[4]。胃的收缩是发生在平滑肌细胞膜表面的肌电活动的机械性表现,他由胃平滑肌的电活动开始,引发胃体、胃窦收缩并向远端的幽门传播,是一个从电活动开始,到机械收缩、胃体蠕动、传导的复杂过程^[2]。他遵从电活动的节律,也取决于传导性收缩的幅度、收缩时限、方向以及传导距离等因素的影响,同时还受到食物种类、胃肠激素反应、昼间变异等多种因素的制约^[3]。

胃动力或胃的运动和排空是一个复杂的电活动-机械收缩和传导的过程,单方面从电(活动)或机(机械收缩)的角度认识和研究胃动力显然是不完整的。必须从电-机复合机制的高度认识和建立胃动力检测与评价方法^[1]。

1 胃动力电-机复合机制

胃是由明显不同的三个肌肉单位组成,即胃底、胃窦、幽门,他们互相协调,与十二指肠运动相联系,不仅将其内容物向前推送,也参与完成混合、研磨及吸收食物并最终将废物排出体

外的过程,许多胃肠疾病的根本在于运送其内容物受阻。胃肠道对食物的混合及推进功能是通过三种类型的收缩运动的调控完成的。(1)节律性位相性收缩运动;(2)极度推进性收缩运动;(3)张力性收缩。混合推进运动的作用取决于传导性收缩的频率、幅度、收缩时限、方向以及传导的距离^[6]。

在非消化期和消化期间,胃运动形式及其调节机制有不同的特点^[7]。胃空腹状态下并非静止,胃腔内压力呈周期性变化,出现静息和运动循环往复的空腔(消化间期)运动模式,称为消化间期移行性复合运动(interdigestive migrating motor complex, MMC)。消化系各部位的运动状况及其内容物的流动形式存在着很大的差异。首先发现胃肠道具有运输食物功能的生理学家,当时没有办法对其进行检测。直至今日,由于缺乏相应的检测技术,有关消化系运动模式及食物流动形式的研究仍然不够完善^[4]。胃的蠕动是由胃平滑肌细胞的电活动激活的。在胃的蠕动性收缩中,肌电电流流经所累及的肌肉。这些电流能触发胃的收缩,但并不是一定伴随收缩。已观察到两种胃的肌电活动:慢波和锋电位(图1)。锋电位直接与窦部收缩有关,当慢波伴发锋电位,胃窦就发生收缩,锋电位的频率、振幅、持续时间决定了肌肉收缩的力度和持续时间。因为锋电位只能发生在慢波时相上,所以胃收缩的节律由胃慢波的频率决定^[2]。

胃的肌电活动可在浆膜、腔内或体表进行测量,浆膜或腔内电极都能记录慢波和锋电位。浆膜记录胃肌电活动是最可靠的,但这种方法是有创伤的。腔内记录是比较可靠的,而且比浆膜记录创伤性小。体表记录的胃肌电活动称为胃电图(electrogastrogram, EGG),EGG是无创的,因而颇具吸引力,他反映了胃的不同区域肌电活动的总和^[3]。EGG可精确地测量胃慢波,用于研究胃收缩的节律性,但不能反映锋电位,EGG不直接对应于胃的运动,与胃收缩或运动状态的关联性不强。

胃动力研究涉及胃在消化期的运动和排空过程,以及非消化期(消化间期)的MMC。胃的收缩是发生在平滑肌细胞膜表面的肌电活动的机械性表现,他由胃平滑肌的电活动开始,引发胃体、胃窦收缩并向远端的幽门传播,是一个由电活动激励,产生机械收缩,继而引发胃体蠕动、传导的复杂过程^[2]。他遵从电活动的节律,也取决于传导性收缩的幅度、收缩时限、方向

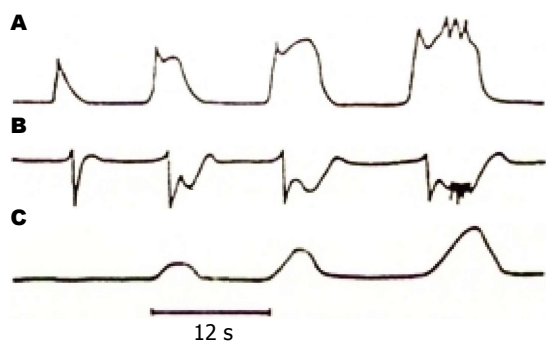


图1 胃肌电活动的慢波和锋电位。A: 细胞内记录; B: 细胞外记录; C: 机械收缩。

以及传导距离等因素的影响^[3]。

人们通常认为, 胃肠运动是在神经系统控制下进行的被动性收缩。事实上, 胃肠运动的许多方面由肌肉本身固有性质所决定。了解胃肠运动的调控机制有助于认识胃肠运动及食物运输过程, 并能够正确地理解产生消化系各部位功能差异的原因^[4]。胃的收缩和蠕动遵从电活动的节律, 也取决于肌肉本身的固有性质。胃动力学研究应该基于电-机复合机制的认识高度, 建立有效的胃动力检测与评价方法, 将电活动和由其引发的胃机械收缩与传导紧密联系, 深入分析胃传导性收缩的幅度、收缩时限、方向以及传导距离等因素的影响。

2 胃运动检测方法

1887年, Pflunger最早采用气球记纹法观察胃运动功能。如今腔内压力测定, 放射性核素技术(闪烁显像、放射性核素呼气实验等)以及体表EGG, B超等的临床应用, 提高了人们对胃运动生理及病理生理的认识。末端开放导管灌注系统和微型压力传感器的发展, 使远端胃和十二指肠运动的临床观察成为可能, 并作为胃运动障碍性疾病的检测手段。末端带囊导管加腔内传感器、恒压器可记录近端胃张力性收缩和舒张; 胃窦壁运动、幽门压力也可利用最近研制的传感器进行测定^[5]。遗憾的是, 这些方法大都或者有创, 或者使用射线、放射性核素, 对患者有害。超声方法虽然可以观察到胃排空或胃运动情况, 但要用于消化过程的长时间检查和评价, 在操作和技术上还存在不少困难, 难于实现。EGG虽然无创、方便, 但其与胃运动的相关性不强, 特异性存在争议, 有待进一步深入研究。因而目前尚无一种方法可完整地了解胃排空和运动情况, 很难预测哪种方法可以作为诊断常规^[5]。

应该指出, 以上方法除了有创、有害、操

作困难、价格昂贵等外, 还有一个共同、最大的问题, 就是没有能从电-机复合机制的高度上获取胃动力参数。他们只是从机或电的角度测量某一、两项指标(压力、张力、顺应性、通过时间、排空率、胃电等), 与整个消化过程的胃运动状态和胃动力变化相关性不强, 难于全面、准确反映胃肠道动力与消化生理、病理变化规律。

胃电活动的锋电位直接与窦部收缩有关, 当慢波伴发锋电位时, 胃窦就发生收缩, 其收缩节律就是胃慢波的频率。所以只要同时获取到胃电活动的慢波与锋电位, 就可以在一定程度上将胃的电活动与胃体的机械收缩相关联, 基于电-机复合机制进行胃动力研究。采用浆膜或腔内电极能同时记录到慢波和锋电位, 尤其是浆膜电极记录的胃肌电活动是最可靠的, 如将其记录到的慢波和锋电位相关联, 就可以实现基于电-机复合机制的胃动力学研究。虽然浆膜或腔内电极方法是有创伤的, 难以应用于临床, 但是对于实验动物的胃动力学研究还是一种不错和可行的手段。曾见到一些胃动力研究工作, 其在动物实验中采用了浆膜胃电检测方法^[8,9], 但却只利用了其中的胃电慢波信号, 仅限于研究胃电活动的节律性影响, 舍弃了直接反映胃运动的锋电位信息, 十分可惜。如果能同时利用浆膜电极胃电记录获取的慢波与锋电位, 并将胃的电活动和胃的收缩运动相关联, 就可实现基于电-机复合机制的胃动力学研究。从而提升其研究工作水平及学术价值。

3 阻抗胃动力测量与应用

生物电阻抗, 或简称阻抗测量技术, 是一种利用生物组织与器官的电特性及其变化规律提取与人体生理、病理状况相关的生物医学信息的检测技术, 具有无创、无害、廉价、操作简单和功能信息丰富等特点。胃是人体内比较容易提取阻抗信息的器官之一, 胃的容积可由空腹状态下的约50 mL增加到摄入食物后的1.5 L左右^[7], 变化显著。在胃的活动期, 如胃排空或胃收缩、蠕动时, 由于胃的形态、容积及其内容物组成情况的改变所导致的胃部电特性变化非常明显。因而, 胃阻抗及其变化可有效地反映胃容积(胃排空)和胃动力(胃的收缩和胃体运动)状况^[1]。生物电阻抗胃动力检测通过置于人体上腹的体表电极注入微小激励电流, 检测电阻抗信号, 通过消化过程中胃的电特性及其变化规律, 提取与胃运动过程相联系的胃动力学信息, 是一种方

■ 相关报道

电阻抗胃动力检测是一种发展中的新技术, 其进一步的深化与发展应深入研究体表测量的信号幅值与腹内胃运动的定量关系; 发展多导阻抗测量技术; 提取食物消化过程中沿胃体、胃窦到幽门的运动传播信息。电阻断层成像(electrical impedance tomography, EIT)代表了生物阻抗技术的发展方向, 具有功能成像、无损伤和医学图像监护三大优势。EIT胃动力测量以置于体表的电极阵列实现无损检测, 以实时图像方式直接显示体内胃体的收缩和运动状况, 将为胃动力学基础研究与临床应用提供一种全新的图像检测与监护手段, 具有潜在的诱人应用前景。

■ 创新盘点

胃的收缩由胃平滑肌的电活动开始,引发胃体、胃窦收缩并向远端的幽门传播,是一个由电活动激励,产生机械收缩,继而引发胃体蠕动、传导的复杂过程。本文基于电-机复合机制认识高度,将EGG和阻抗胃动力检测有机地结合,从体表阻抗信号提取胃的收缩运动与传导信息,建立能完整了解胃运动和排空情况,可有效检测与评价胃动力功能的无损伤研究方法。为实现基于电-机复合机制的胃动力学研究和临床检测提供了一种方便、安全、有效的手段。

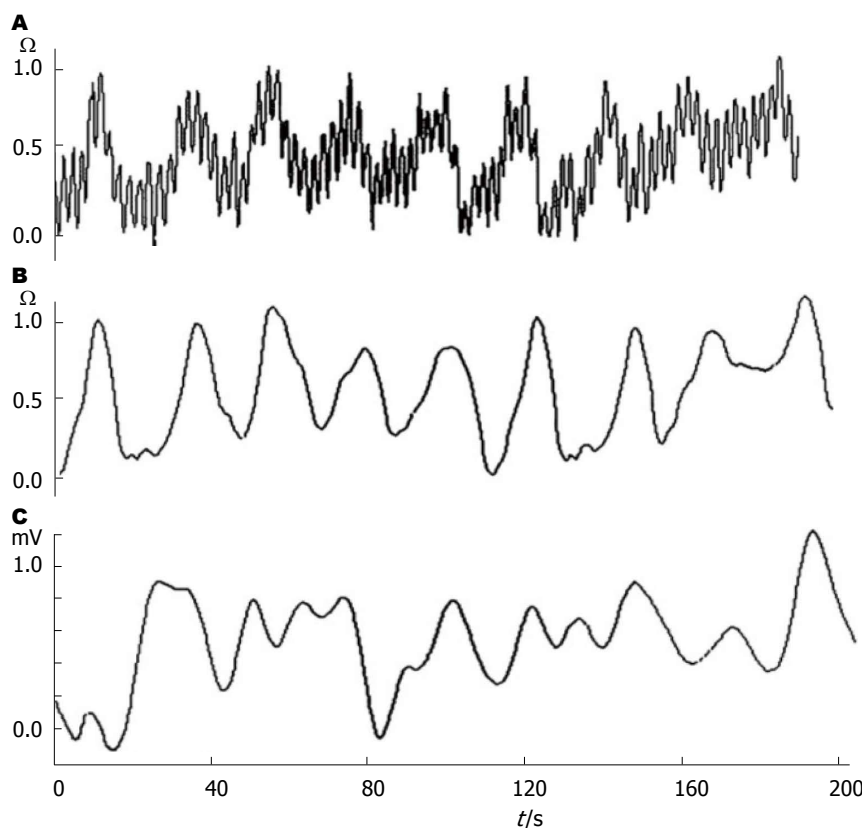


图2 生物电阻抗胃动力测量结果。A: 阻抗混合信号; B: 分离出的胃运动; C: 同步EGG信号。

便、廉价的无损伤检测与评价方法^[10]。

Sutton等与McClelland等^[11,12]于1985年报告了采用阻抗方法提取胃运动信号的研究工作,得到了反映胃排空过程的曲线,并从中获取到与胃收缩频率相一致的, 2-4次/min的胃蠕动信号。为采用阻抗方法提取胃动力信息奠定了基础。Familoni等^[13]于1987年将阻抗方法和EGG测量结合以获得胃电活动和胃收缩的信息,表明只要合理放置电极就可以通过阻抗方法无创检测胃电和胃收缩活动,可通过EGG波形的分析获得胃内电活动的运动方向。为了研究胃部阻抗信号变化的原因, Kothapalli^[14]在1992年建立了一个腹部三维模型以研究相关因素对胃阻抗变化的贡献,分析了当电流激励电极和电压检测电极位于不同位置时,阻抗信号与食物容量、电阻率和胃收缩的关系。在药物影响实验方面, Murphy等^[15]1997年以生物电阻抗法作为胃排空检测手段,比较了镇痛药盐酸曲马朵和吗啡对人体胃排空的影响。其间,还有不少学者报告了胃阻抗测量方法^[16-19]、测量装置^[20,21]、胃阻抗信息处理^[22,23]及用于胃排空测量及影响因素分析^[24-26]、返流^[27,28]、胃扩张状态测定^[29]等研究结果。

值得注意的是李章勇等2007年报告了一种

采用阻抗测量进行胃动力检测的方法,并通过小波多分辨分析从体表胃阻抗混合信号中分离出反映胃运动的信号^[30,31],如图2, 3。此后,王伟^[32-34]、李章勇^[35-42]、刘纯伦^[43]、方晓杰^[44]、阳家长^[45]、刘圣蓉^[46]、赵舒^[47,48]、任超世^[49,50]等陆续报告了阻抗胃动力测量方法的改进与发展,以及采用阻抗胃动力方法用于功能性消化不良、糜烂性胃炎患者检测,以及某些药物对胃动力影响的临床实验研究结果,显示了电阻抗胃动力检测方法良好的临床应用前景。

2010年,李章勇等^[51]以青年学生为检测对象,采用四通道阻抗胃动力检测方法研究胃运动空间传导关系,观察到主频为3次/min的阻抗胃动力信号波形自近端胃体向幽门方向的传导,且胃运动的前向传导和逆向传导时相关系明显,交替存在。当前向传导和逆向传导相遇时会出现传导失耦联(图4)。表明了多道阻抗胃动力检测方法用于研究阻抗胃动力信息的幅值、频率变化和空间传导关系的可行性。

4 阻抗胃动力测量方法学研究

电阻抗胃动力检测虽然已显示出良好的临床应用前景。但是,作为一种采用体表电极的间接测量方法,腹部体表阻抗信号与腹内胃运动之间

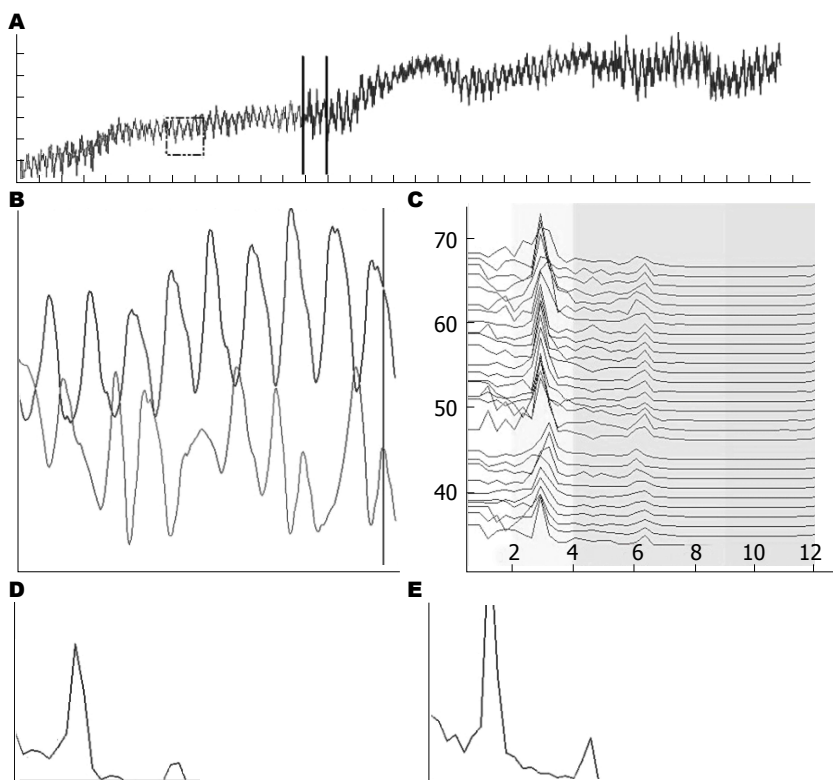


图3 典型的健康人阻抗胃动力信号与谱分析结果。A: 原始阻抗混合信号; B: 提取的胃动力信号(上)和同步EGG信号(下); C: 胃动力信号动态谱; D: 餐前阻抗胃动力总功率谱; E: 餐后阻抗胃动力总功率谱。

■应用要点

电阻抗胃动力检测已显示出良好的发展与应用前景,但仍需要一个从方法学研究到应用技术研究,再到临床应用的发展过程。要求工程技术与临床应用紧密结合、相互促进以及多方面的合作与配合,特别需要临床医生和工程技术人员,才能逐渐完善,日臻成熟。浆膜电极胃电记录能可靠地获取胃电活动的慢波和锋电位,将慢波和锋电位相关联,可实现基于电-机复合机制的胃动力学研究。虽然是一种有创方法,但用于实验动物的胃动力学研究还是一种不错和可行的手段。

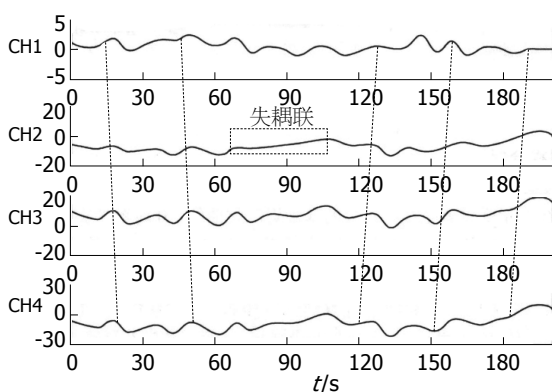


图4 四通道阻抗胃动力检测结果。

的定量关系尚未建立,相关性还有待深入研究。目前的单通道阻抗测量以体表胃投影区的平均阻抗变化反映胃的运动,还不能准确表明胃不同部位的收缩差异和沿胃体、胃窦直至幽门的传导时相关关系,阻抗胃动力测量的方法学研究仍需继续深入。为了给阻抗胃动力测量方法提供基础支持,作者进行了阻抗胃动力测量方法的原理仿真与模拟实验研究。

4.1 原理仿真研究 阻抗胃动力测量原理研究以盐水槽中的胃弯管模型仿真腹中的胃体,借助Comsol multiphysics软件,采用有限元法(finite element method, FEM),通过改变模型形状和各部分电导

率分布来模拟胃的收缩、运动过程。研究胃部电导率与容积变化,胃的收缩蠕动、传导过程对体表多通道阻抗测量信号的影响及变化规律。

结果表明,由体表获得的阻抗信号的幅值变化,与消化过程中胃部电导率、容积和胃环行肌的收缩深度(腔闭合程度)相关。当胃收缩蠕动波从起搏点向幽门传导时,多通道体表胃阻抗信号的频率反映胃不同部位的收缩节律,各通道的波形存在明显的时相关系。胃内容物分别为高电导率和低电导率(相对于背景)情况时,体表电压波形的变化趋势相同,方向相反。但高、低电导率胃内容物对体表测量阻抗信号的影响不是简单的反相关系(图5)。

4.2 模拟验证实验 为验证仿真研究结果的有效性,建立了盐水槽模拟实验装置和相应的多通道阻抗胃动力测量系统,以不同形状、不同电导率胃体模型在盐水槽中的运动模拟胃的收缩与传导,进行胃动力检测模拟验证实验(图6)。结果表明多通道电阻抗信号的变化规律与胃电导率和运动方向的变化规律相同,能较好地反映胃收缩位相和运动传导的过程,与仿真研究结果相符。

以上阻抗胃动力测量仿真与模拟验证实验表明,由体表获取的阻抗信号与消化过程中胃

■名词解释

生物电阻抗技术: 一种利用组织与器官的电特性及其变化规律提取与人体生理、病理状况相联系生物医学信息的检测技术, 具有无创、廉价、方便和功能信息丰富等特点。采用生物阻抗方法, 通过置于上腹体表的电极注入微小激励电流, 测量电阻抗信号, 依据消化过程中胃组织的电特性及其变化规律, 可无创提取与胃动力学状况相对应的生理、病理信息, 检测胃的运动状况, 获取胃的收缩、蠕动、传导及排空过程信息。

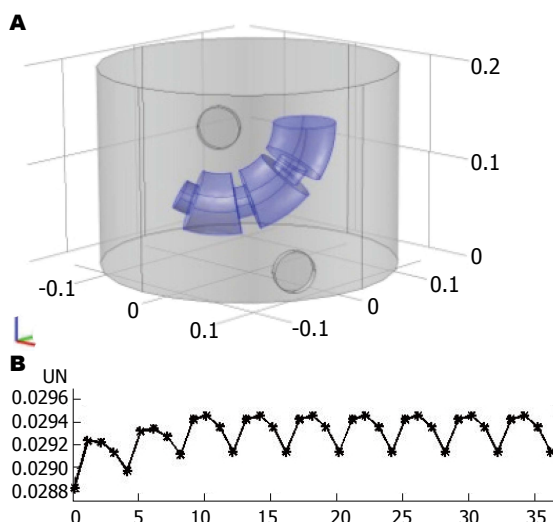


图5 胃弯管模型与胃收缩传导仿真结果。A: 胃弯管模型; B: 胃收缩传导仿真结果。

电导率、容积和胃环行肌的收缩程度相关。多通道阻抗胃动力测量的各通道波形存在明显的相位相关性, 反映了胃的收缩和蠕动节律, 以及收缩、蠕动从起搏点向幽门传导的时相关系, 为阻抗胃动力测量方法奠定了理论基础, 为发展多道阻抗胃动力测量方法和测量系统的设计提供了仿真基础与实验依据。

5 结论

胃动力是一个电活动-机械收缩和传导的复杂过程, 应该从电-机复合机制的高度认识和研究胃动力, 建立可完整了解胃运动和排空情况的胃动力检测与评价方法^[52]。浆膜电极胃电记录能可靠地获取胃电活动的慢波和锋电位, 将慢波和锋电位相关联, 可实现基于电-机复合机制的胃动力学研究。虽然是一种有创方法, 但用于实验动物的胃动力学研究还是一种不错和方便的手段, 应该引起相关研究人员的注意。

EGG是由胃的体表投影区记录的胃电活动, 无创、方便, 反映了胃不同区域肌电活动的总和, 可用于精确地测量胃慢波, 与胃的收缩节律相对应。生物电阻抗胃动力检测通过置于人体上腹的体表电极注入微小交流电流, 依据消化过程中胃的电特性及其变化规律, 提取与胃收缩、蠕动及传导过程相联系生物医学信息, 是一种方便、廉价的无损伤检测与评价方法。多通道阻抗胃动力测量以各通道波形的幅值和相位关系, 反映胃的收缩和蠕动, 以及其从起搏点向幽门的传导过程, 是阻抗胃动力测量方法进一步深化、发展的方向。将EGG和阻抗胃动

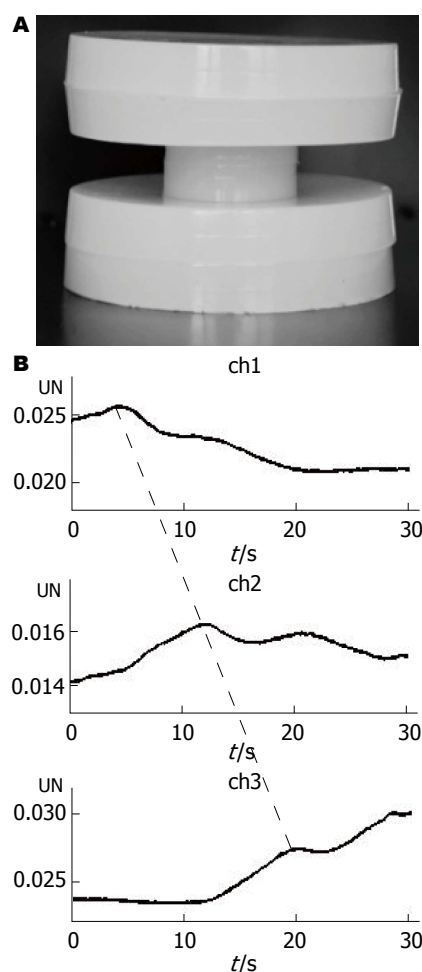


图6 阻抗胃动力测量动态模拟试验。A: 三层琼脂胃体模型; B: 多通道测量信号反映胃的收缩和蠕动传导。

力检测有机地结合, 以EGG表征胃的起搏, 作为生理时标, 以阻抗信号提取胃的运动信息, 依据胃电活动与机械收缩的偶联, 进行多信号相关分析, 可建立有效的胃动力功能无损伤检测和评价方法, 实现基于胃动力电-机复合机制的胃动力学研究。

电阻抗胃动力检测是一种发展中的新技术, 显示了良好的应用前景。和其他成熟技术一样, 阻抗胃动力检测也需要一个从方法学研究到应用技术研究, 再到临床应用的发展过程。他要求工程技术与临床应用紧密结合、相互促进, 需要多方面的合作与配合, 特别需要临床医生和工程技术人员的努力和默契。电阻抗胃动力检测作为一种间接测量方法, 体表阻抗信号与腹内胃运动之间的定量关系, 以及消化期、消化间期各种因素的影响还有待进一步深入研究。

6 参考文献

- 1 李章勇, 任超世. 生物阻抗技术与胃动力评价. 第1版. 重庆: 重庆大学出版社, 2010: 1-4

- 2 周吕, 柯美云. 神经胃肠病学与动力基础与临床. 第1版. 北京: 科学出版社, 2005: 22-24
- 3 周吕, 柯美云. 肠胃动力学: 基础与临床. 第1版. 北京: 科学出版社, 1999: 185-187
- 4 Hans Gregersen著. 樊艳华, 王虹, 窦艳玲译. 胃肠生物力学: 胃肠动力新视角. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 128-130
- 5 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学(上册). 第1版. 北京: 科学出版社, 1994: 161-167
- 6 Schuster MM, Crowell MD, Koch KL编. 许彬, 袁耀宗译. 舒斯特胃肠动力学. 第2版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003: 4-10
- 7 姚泰. 生理学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 234-236
- 8 黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬. 5-HT及电刺激对胃节律紊乱模型新西兰白兔胃电活动的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2486-2491
- 9 黄伟锋, 张慧, 欧阳守, 卢春敬. 大黄素对兔胃电的影响及其作用机制. 世界华人消化杂志 2012; 20: 3417-3423
- 10 赵舒, 任超世. 无创检测与评价胃动力功能-生物电阻抗方法. 世界华人消化杂志 2006; 14: 465-469
- 11 Sutton JA, Thompson S, Sobnack R. Measurement of gastric emptying rates by radioactive isotope scanning and epigastric impedance. *Lancet* 1985; 1: 898-900 [PMID: 2858747 DOI: 10.1097/00132586-198606000-00036]
- 12 McClelland GR, Sutton JA. Epigastric impedance: a non-invasive method for the assessment of gastric emptying and motility. *Gut* 1985; 26: 607-614 [PMID: 3891533 DOI: 10.1136/gut.26.6.607]
- 13 FAMILONI BO, Kingma YJ, Bowes KL. Noninvasive assessment of human gastric motor function. *IEEE Trans Biomed Eng* 1987; 34: 30-36 [PMID: 3557481 DOI: 10.1109/TBME.1987.326012]
- 14 Kothapalli B. Origin of changes in the epigastric impedance signal as determined by a three-dimensional model. *IEEE Trans Biomed Eng* 1992; 39: 1005-1010 [PMID: 1452167 DOI: 10.1109/10.161332]
- 15 Murphy DB, Sutton A, Prescott LF, Murphy MB. A comparison of the effects of tramadol and morphine on gastric emptying in man. *Anaesthesia* 1997; 52: 1224-1229 [PMID: 9485982 DOI: 10.1111/j.1365-2044.1997.214-az0349.x]
- 16 Sutton JA, Kilminster SG, Mould GP. The clinical pharmacology of single doses of otilonium bromide in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 52: 365-369 [PMID: 9272405 DOI: 10.1007/s002280050302]
- 17 Giouvanoudi A, Amaee WB, Sutton JA, Horton P, Morton R, Hall W, Morgan L, Freedman MR, Spyrou NM. Physiological interpretation of electrical impedance epigastrogaphy measurements. *Physiol Meas* 2003; 24: 45-55 [PMID: 12636186 DOI: 10.1088/0967-3334/24/1/304]
- 18 Beltrán NE, de Folter JJ, Godínez MM, Díaz U, Sacristán E. Algorithm for characteristic parameter estimation of gastric impedance spectra in humans. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2007; 2007: 4131-4134 [PMID: 18002911 DOI: 10.1109/IEMBS.2007.4353245]
- 19 Giouvanoudi AC, Spyrou NM. Epigastric electrical impedance for the quantitative determination of the gastric acidity. *Physiol Meas* 2008; 29: 1305-1317 [PMID: 18854603 DOI: 10.1088/0967-3334/29/11/006]
- 20 Chen RX, Wan DR. Further investigation of reliability on impedance gastrograph for continuous measurement of human gastric contractile activity. *Proceedings of the 8th international conference on electrical bio-impedance*, Kupio, Finland, 1992 July 28-31: 151-152
- 21 陈日新, 程立红, 康明非. 健康成人胃运动阻抗图特征的功率谱分析. 江西中医学院学报 1997; 9: 25-26
- 22 赵瑞珍, 郑建勇, 宋国乡. 小波变换方法检测胃动力. 第四军医大学学报 2001; 22: 1700-1703
- 23 Zhang F, Jiang DZ. [Noninvasive measurement of gastric emptying rates and gastric motility]. *Zhongguo Yiliao Qixie Zazhi* 2001; 25: 209-212 [PMID: 12583219 DOI: 10.3969/j.issn.1671-7104.2001.04.007]
- 24 Nakae Y, Onouchi H, Kagaya M, Kondo T. Effects of aging and gastric lipolysis on gastric emptying of lipid in liquid meal. *J Gastroenterol* 1999; 34: 445-449 [PMID: 10452675 DOI: 10.1007/s005350050294]
- 25 Chaw CS, Yazaki E, Evans DF. The effect of pH change on the gastric emptying of liquids measured by electrical impedance tomography and pH-sensitive radiotelemetry capsule. *Int J Pharm* 2001; 227: 167-175 [PMID: 11564551 DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00795-5]
- 26 Soulsby CT, Khela M, Yazaki E, Evans DF, Hennessy E, Powell-Tuck J. Measurements of gastric emptying during continuous nasogastric infusion of liquid feed: electric impedance tomography versus gamma scintigraphy. *Clin Nutr* 2006; 25: 671-680 [PMID: 16698141 DOI: 10.1016/j.clnu.2005.11.015]
- 27 Zentilin P, Dulbecco P, Savarino E, Giannini E, Savarino V. Combined multichannel intraluminal impedance and pH-metry: a novel technique to improve detection of gastro-oesophageal reflux literature review. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 565-569 [PMID: 15460839 DOI: 10.1016/j.dld.2004.03.019]
- 28 Garay L, Ramos EG, Cardiel E, Muñoz R, Hernández PR. In vivo and in situ measurement of electrical impedance for determination of distention in proximal stomach of rats. *Med Eng Phys* 2006; 28: 648-655 [PMID: 16483828 DOI: 10.1016/j.medengphys.2005.10.010]
- 29 Chen CL, Cook IJ. Proximal versus distal oesophageal motility as assessed by combined impedance and manometry. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 104-109 [PMID: 18760980 DOI: 10.1016/j.dld.2008.05.003]
- 30 Li ZY, Sha H, Wang Y, Zhao S, Wang W, Ren CS. A new approach of gastric motility measurement and evaluation by bioimpedance. *Proceedings of 13th international conference on electrical bio-impedance & 8th conference on electrical impedance tomography*, Graz, Austria, 2007 August 29: 691-694
- 31 Li ZY, Ren CS, Sha H. Wavelet transform to extract bio-impedance gastric motility information. *Proceedings of the 2nd international conference on complex systems and applications-modeling, control and simulations*, Jinan, China, 2007 June 8-10: 1237-1241
- 32 王伟, 李章勇, 任超世. 小波变换和阻抗技术在胃动力研究中的应用. 中国组织工程研究与临床康复 2007; 11: 2434-2436
- 33 王伟, 任超世, 李章勇, 魏进民. 基于阻抗法的胃排空检测. 临床医学工程 2008; 15: 24-26
- 34 王伟, 任超世, 李章勇. 胃电和胃阻抗信号的同步采集与分析系统. 微计算机信息 2009; 25: 74-76
- 35 李章勇, 任超世, 沙洪, 王伟. 基于Aduc834的生物阻抗胃动力信号采集方法. 自动化与仪表 2007; 22: 13-16
- 36 李章勇, 赵舒, 王妍, 沙洪, 任超世. 电阻抗胃动力信息

同行评价

胃的收缩是发生在平滑肌细胞膜表面的肌电活动的机械性表现, 是一个由电活动激励, 产生机械收缩, 继而引发胃体蠕动、传导的复杂过程. 胃的运动状态的评价, 对于功能性胃病的诊断有及其重要的作用, 对于类似萎缩性胃炎等器质性病变的评价和疗效评估也有参考价值. 本文比较权威地评述了这个研究领域的发展概况, 也提出了有价值的展望信息, 有较高的学术价值.

- 检测与处理方法研究. 中国组织工程研究与临床康复 2007; 12: 647-650
- 37 李章勇, 沙洪, 赵舒, 王妍, 任超世. 采用电阻抗方法测量液体胃排空. 中国医疗器械杂志 2008; 32: 253-256
- 38 李章勇, 沙洪, 赵舒, 王妍, 任超世. 生物电阻抗方法测量液体胃排空研究. 中国组织工程研究与临床康复 2008; 12: 2477-2480
- 39 李章勇, 胡娜, 任超世. 功能性消化不良诊断与生物电阻抗检测方法. 国际生物医学工程杂志 2009; 32: 125-127
- 40 李章勇, 任超世. 阻抗胃动力检测方法与功能性消化不良评价. 中国生物医学工程学报 2009; 28: 372-376
- 41 Li Z, Ren C. Gastric motility measurement and evaluation of functional dyspepsia by a bio-impedance method. *Physiol Meas* 2008; 29: S373-S382 [PMID: 18544817 DOI: 10.1088/0967-3334] 45
- 42 Li ZY, Ren CS, Zhao S, Sha H, Deng J. Gastric motility functional study based on electrical bioimpedance measurements and simultaneous electrogastrography. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011; 12: 983-989 [PMID: 22135147 DOI: 10.1088/0967-3334/29/6/S31] 46
- 43 刘纯伦, 李章勇, 方晓杰, 王伟, 任超世, 潘敏. 功能性消化不良病人胃动力检测初步探讨. 中国医学物理学杂志 2008; 25: 657-659 47
- 44 方晓杰, 刘纯伦, 李章勇, 周旭春, 王丕龙, 任超世. 生物阻抗技术评价多潘立酮对功能性消化不良胃动力的影响. 中国实用内科杂志 2009; 29: 333-335 48
- 45 阳家长, 李章勇, 刘纯伦, 方晓杰. 生物阻抗方法评价糜烂性胃炎患者胃动力. 重庆医学 2009; 38: 1356-1358 49
- 46 刘圣蓉, 李章勇, 任超世, 刘纯伦, 方晓杰. 胃炎患者的胃动力功能评价. 中国医学物理学杂志 2009; 26: 1224-1227 50
- 47 赵舒, 任超世. 生物阻抗胃动力检测方法. 中国医学装备 2010; 7: 1-6 51
- 48 赵舒, 沙洪, 李章勇, 任超世. 基于小波能量熵特征的阻抗胃动力信号识别. 中国生物医学工程学报 2011; 30: 321-325 52
- 49 任超世, 李章勇, 王伟, 赵舒, 邓娟. 无创电阻抗胃动力检测与评价. 中国组织工程研究与临床康复 2010; 14: 1653-1657 53
- 50 任超世, 李章勇, 赵舒. 生物电阻抗胃动力检测与评价. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1-8 54
- 51 李章勇, 蒋祥林, 任超世, 郭毅军, 张汇泉, 赵德春. 多道阻抗胃动力信息采集和分析方法. 国际生物医学工程杂志 2010; 33: 36-39 55
- 52 Zhao S, Sha H, Li ZY, Ren CS. Electrical bioimpedance gastric motility measurement based on an electrical-mechanical composite mechanism. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 3282-3287 [PMID: 22783053 DOI: 10.3748/wjg.v18.i25.3282] 56

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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)

P162通过抑制Chk1/2表达增加食管癌细胞株Eca109的放射敏感性

张红, 吴清明, 龙辉, 陈洁, 陈建华

张红, 陈洁, 武汉科技大学 湖北省武汉市 430064
吴清明, 武汉科技大学医学院 湖北省武汉市 430065
龙辉, 武汉科技大学附属天佑医院 湖北省武汉市 430064
陈建华, 武汉凯泰新生物技术有限公司 湖北省武汉市 430074

张红, 在读硕士, 主要从事食管癌的基础研究。
作者贡献分布: 课题由张红、吴清明、龙辉及陈洁设计; 研究过程由张红操作完成; 写作由张红与吴清明共同完成; P162由陈建华提供。

通讯作者: 吴清明, 教授, 430065, 湖北省武汉市黄家湖西路, 武汉科技大学医学院. wuhe9224@sina.com
电话: 027-68893428

收稿日期: 2013-10-21 修回日期: 2013-12-05

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

P162 increases radiosensitivity of esophageal cancer cell line Eca109 by inhibiting Chk1/2 expression

Hong Zhang, Qing-Ming Wu, Hui Long, Jie Chen, Jian-Hua Chen

Hong Zhang, Jie Chen, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China

Qing-Ming Wu, School of Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei Province, China

Hui Long, Tianyou Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430064, Hubei Province, China

Jian-Hua Chen, Wuhan KatyGen Pharmaceuticals. Inc, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Correspondence to: Qing-Ming Wu, Professor, Wuhan University of Science and Technology, Huangjiahu West Road, Wuhan 430065, Hubei Province, China. wuhe9224@sina.com

Received: 2013-10-21 Revised: 2013-12-05

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To investigate whether P162 increases the radiosensitivity of esophageal cancer cell line Eca109 by inhibiting the expression of Chk1/2, and to observe its influence on cell cycle progression.

METHODS: Eca109 cells were exposed to small doses of repeated X-rays to develop a radio-resistant cell line Eca109R. Cells were divided into four groups: a group without exposure to either P162 or X-rays, a group exposed only to

X-rays, a group exposed only to P162, and a group exposed to both P162 and X-rays. Both Eca109 and Eca109R cell lines were used in each group. The optimal radiation dose was determined by MTT assay. The CCK-8 method was used to determine the optimal drug concentration needed for subsequent experiments. Western blot was used to detect the dynamic changes in Chk1 and Chk2 proteins. The change in cell cycle progression was measured by flow cytometry.

RESULTS: The radio-resistant Eca109R cell line was successfully developed. A radiation dose of 6 Gy was used as the optimal radiation dose for subsequent experiments, and 20 mg/L was used as the optimal concentration of P162. Western blot showed that both Eca109 and Eca109R cell lines expressed a small amount of Chk1 and Chk2. After irradiation, Chk1 and Chk2 expression was up-regulated in both cell lines. After treatment with 20 mg/L P162 for 48 h, the expression levels of Chk1 and Chk2 in Eca109 cells were 0.244 ± 0.013 and 0.148 ± 0.011 , respectively, and the corresponding values in Eca109R cells were 0.139 ± 0.010 and 0.134 ± 0.008 . At 24 h after 6 Gy irradiation, the expression levels of Chk1 and Chk2 in Eca109 cells were 0.154 ± 0.013 and 0.124 ± 0.011 , respectively, and the corresponding values in Eca109R cells were 0.083 ± 0.010 and 0.059 ± 0.009 . P162 treatment significantly reduced Chk1 and Chk2 expression ($P < 0.05$ for all). Cell cycle analysis revealed that exposure to P162 alone only slightly reduced the percentage of cells in G₂ phase, but exposure to both P162 and X-rays significantly decreased the percentage of cells in G₂ phase.

CONCLUSION: Eca109R cells are more radio-resistant than Eca109 cells. P162 relieves G₂/M phase arrest by inhibiting the expression of Chk1 and Chk2 to increase radiosensitivity of esophageal cancer cell line Eca109.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

■背景资料

我国是食管癌高发区, 食管癌进展快, 预后差. 食管癌的治疗方式主要包括手术、放疗、化疗、内镜下治疗以及新辅助疗法等多种手段, 大多数患者就诊时已属中晚期, 放射治疗成为主要的手段之一。

■同行评议者

程英升, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

■研究前沿

放射抗拒被公认为是食管癌局部复发、放疗失败的重要原因,学者提出放射抗拒的4R机制: DNA的损伤修复、细胞周期重分布、细胞增殖机制及肿瘤细胞再氧合机制。如何提高放疗的敏感性成为目前放疗研究的重点之一。

Key Words: Esophageal cancer; Radiosensitivity; P162; Checkpoint kinase 1; Checkpoint kinase 2

Zhang H, Wu QM, Long H, Chen J, Chen JH. P162 increases radiosensitivity of esophageal cancer cell line Eca109 by inhibiting Chk1/2 expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 461-468 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/461.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.461>

摘要

目的: 研究P162是否通过抑制细胞周期检测点激酶(checkpoint kinase, Chk)1/2的表达来增加食管癌细胞株Eca109放射敏感性,并观察其对细胞周期的影响。

方法: 以食管癌细胞株Eca109为研究对象,小剂量反复照射形成有一定放射抗拒性的细胞株Eca109R;将实验分为不加P162不照射组、不加P162照射组、加P162不照射组及加P162照射组四大组,每组分别包含Eca109与Eca109R二种细胞株;MTT法选取实验合适的照射剂量;CCK-8法测定实验所需的最适P162浓度;Western blot检测4组细胞中Chk1与Chk2蛋白表达的动态变化;流式细胞仪检测4组细胞的细胞周期变化。

结果: 成功诱导具有放射抗拒性的食管癌细胞株Eca109R;6 Gy为实验照射剂量;以20 mg/L的P162为实验浓度;Western blot显示Eca109及Eca109R均存在少量的Chk1及Chk2蛋白,照射后Chk1与Chk2的表达增高,加用20 mg/L P162培养48 h后,Eca109中Chk1与Chk2值分别为 0.244 ± 0.013 、 0.148 ± 0.011 ,6 Gy照射后24 h其值分别为 0.154 ± 0.013 、 0.124 ± 0.011 ;Eca109R中Chk1与Chk2值分别为 0.139 ± 0.010 、 0.134 ± 0.008 ,6 Gy照射后24 h其值分别为 0.083 ± 0.010 、 0.059 ± 0.009 ,照射后二者表达均明显降低($P < 0.05$);细胞周期显示,加用P162不照射组的G₂期较不加药组下降,加药照射组较不加药照射组G₂期显著下降($P < 0.05$)。

结论: Eca109R更有放射抗拒性。P162通过抑制Chk1、Chk2的表达来解除细胞G₂/M期阻滞,增加食管癌细胞株Eca109放射敏感性。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 食管癌;放射增敏;P162;细胞周期检测点激酶1;细胞周期检测点激酶2

核心提示: P162可能通过干预G3BP(Ras-GTPase-

activating protein SH3 domain binding protein)功能,使抑癌基因p53活性增加,抑制了ATM、ATR通路激活,进而抑制细胞周期检测点激酶(checkpoint kinase, Chk)1、Chk2的表达来抑制细胞DNA损伤修复,消除照射后G₂期的阻滞,使G₂期末修复的细胞进入M期,增加食管癌的放射敏感性。

张红,吴清明,龙辉,陈洁,陈建华. P162通过抑制Chk1/2表达增加食管癌细胞株Eca109的放射敏感性. *世界华人消化杂志* 2014; 22(4): 461-468 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/461.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.461>

0 引言

食管癌是发生于食管上皮组织的恶性肿瘤,他是我国常见的恶性肿瘤^[1],放射治疗是其主要的手段之一^[2]。近30年来,食管癌常规放疗效果无明显提高,患者5年生存率仅在20%左右^[3,4],影响放疗效果的因素很多,而放射抗拒被公认为是肿瘤局部复发、放疗失败的重要原因^[5]。如何提高放射治疗的敏感性成为当前治疗食管癌的一个亟待解决的问题。细胞周期检测点激酶(checkpoint kinase, Chk)1和Chk2是DNA损伤修复信号转导通路中非常重要的蛋白激酶^[6]。P162是利用计算机辅助筛选的一条具有抗癌机制的全新多肽(中国专利2010101400323, PCT WO2011/124063 A1),学者研究证实, P162对结肠癌^[7]、食管癌^[8]细胞株都有明显的抗癌作用,他是否能通过抑制细胞周期检测点信号转导通路增加肿瘤的放射敏感性呢?检测他对Chk1和Chk2是否有抑制作用,可以了解放射增敏的机制,为开辟食管癌治疗新道路提供有力的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌细胞株Eca109(由太和医院馈赠);P162(武汉凯泰新生物技术有限公司提供);RPMI 1640培养粉(Gibco公司);胎牛血清(杭州四季青有限公司);胰蛋白酶粉(美国Amresco公司);Chk1及Chk2抗体(美国Santa Cruz公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国Sigma公司);CCK-8试剂盒(碧云天生物科技有限公司);BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物科技有限公司);PVDF膜(Millipore公司);CO₂恒温细胞培养箱(Heal Force公司);倒置显微镜(Olympus公司);超净工作台(苏州净化);酶联免疫检测仪(BioTek公司);流式

表 1 放射线对Eca109细胞增殖抑制率(mean ± SD, %)

时间(h)	放射剂量(Gy)			
	2	4	6	8
24	24.90 ± 2.87	41.42 ± 2.01	45.04 ± 1.43	52.46 ± 1.22
48	25.48 ± 1.99	39.40 ± 2.28	47.87 ± 1.69	59.62 ± 1.87
72	36.27 ± 2.86	48.63 ± 1.97	60.76 ± 2.14	67.92 ± 2.02

细胞仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: Eca109细胞用含有10%胎牛血清、青-链霉素的RPMI 1640培养基, 于37℃、5%CO₂饱和湿度的恒温培养箱中培养, 根据细胞生长的速度及培养基的颜色更换培养基, 一般为1 d/次, 用0.25%的胰蛋白酶消化传代继续培养或冻存。

1.2.2 不同放射剂量下细胞增殖抑制率测定: 采用四甲基唑蓝(MTT)法, 将对数生长的细胞, 分别以2、4、6、8 Gy照射后立即制成单细胞悬液常规接种96孔板, 设6个复孔; 以未照射为对照组, 2、4、6、8 Gy为放射组, 同时设空白组(无细胞培养液); 分别培养24、48、72 h, 每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μL培养4 h后加二甲基亚砜150 μL/孔, 振荡10 min, 上机检测各孔A值(波长490 nm), 计算细胞增殖抑制率(%) = (1-放射组平均A值/对照组平均A值) × 100%。实验重复3次。

1.2.3 不同浓度P162的细胞增殖抑制率: 将对数生长的细胞, 制成单细胞悬液常规接种96孔板, 设6个复孔; 以未加药的为对照组, 5、10、20、40、60 mg/L为实验组, 同时设空白组(无细胞培养液); 培养至细胞单层铺满后分别加入5、10、20、40、60 mg/L浓度梯度的P162, 继续培养24、48、72 h后, 每孔加入10 μL的CCK-8溶液培养1 h后上机检测各孔A值(波长450 nm), 增殖抑制率(%) = (1-实验组A值/对照组A值) × 100%。实验重复3次。

1.2.4 细胞照射: (1)诱导Eca109R细胞株形成: 采用Varian2300直线加速器6MV-X, 表面加1.5 cm标准等效填充物, 源至标本距离100 cm, 照射野10 cm × 10 cm, 吸收剂量率为1.5 Gy/min。取对数生长期的Eca109细胞株, X线照射8 Gy后, 继续培养至细胞长满瓶底, 胰酶消化传代接种, 待细胞长至对数期, 再次X线照射8 Gy, 如此重复以上过程, 待总放射剂量达到60 Gy后, Eca109R细胞株形成; (2)细胞放射线处理: 采用Varian2300直线加速器6MV-X, 表面加1.5 cm标准等效填充

物, 源至标本距离100 cm, 照射野10 cm × 10 cm, 吸收剂量率为1.5 Gy/min。将待测细胞X线照射6 Gy, 放回培养箱中继续培养, 在照射后1、2、4、24、48 h胰酶消化后实验。

1.2.5 Western blot测定: 将待测细胞胰酶消化后提取核蛋白, 各样品取50 μg总蛋白上样电泳, 转膜(湿转法), 转膜条件: Chk1-200 mA, 120 min; Chk2-200 mA, 120 min后, 300 mA, 25 min; 用含5%脱脂奶粉的TBST(封闭液)浸泡PVDF膜, 室温摇床封闭2 h。Chk1、Chk2各1:200稀释后, 使PVDF膜浸泡于其孵育液中, 4℃孵育过夜, 充分洗涤, 再浸泡于二抗孵育液中, 室温孵育2 h后充分洗涤, 每张膜滴加适量的ECL底物液, 孵育数分钟, 最后显影、定影。LaminB为内参。实验重复3次。

1.2.6 细胞周期测定: 将对数生长期的细胞胰酶消化, 1000 r/min离心5 min后收集; 再用PBS离心洗涤2遍; 用PBS制成单细胞悬液, 取1 × 10⁶个细胞加入流式试管中; 加入100 μL DNA Prep LPR, 轻轻混匀, 室温下避光反应1 min; 再加入1 mL DNA Prep Stain, 轻轻混匀, 室温避光反应15-20 min; 用300目的尼龙过滤网过滤细胞, 上机检测。实验重复3次。

1.2.7 实验分组: 实验分为4组: (1)不加P162不照射组; (2)加P162不照射组; (3)不加P162照射组; (4)加P162照射4大组。4大组各含Eca109、Eca109R两种细胞株。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行分析, 计量资料用mean ± SD表示, 多样本均数间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用配对t检验, P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放射线对Eca109细胞增殖抑制率测定 由表1及图1可知: (1)随着放射剂量的增加, 细胞增殖抑制率逐渐增大; (2)随着培养时间的增加, 细胞增殖抑制率也逐渐加大; (3)细胞照射6 Gy的放射剂量时, 其增殖抑制率在24、48、72 h均接近50%; (4)所以6 Gy为最佳放射剂量, 后续实验选

■ 相关报道

癌细胞在射线照射引起DNA损伤后, 将快速启动细胞周期检测点信号转导通路, 使受损伤的细胞停滞于G₂/M期进行自身修复, 解除G₂期阻滞可以增加放射敏感性。P162可以增加食管癌的放射敏感性, 但具体机制待进一步研究。

■创新盘点

P162是利用计算机辅助筛选的一条具有抗癌机制的全新多肽,其结构与G3BP的NTF2蛋白域特异性结合,干预G3BP蛋白功能磷酸化,研究其增敏机制为恶性肿瘤的治疗开辟新的道路。

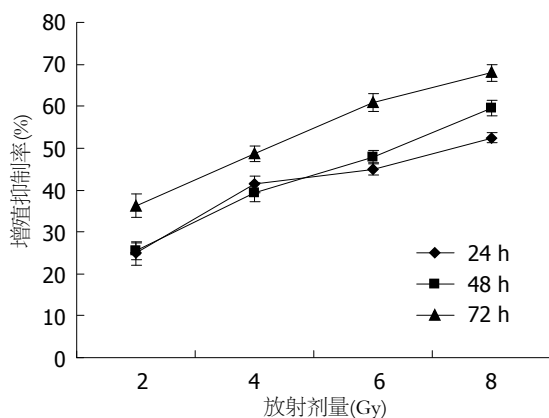


图1 不同剂量放射线对Eca109细胞作用不同时间后增殖抑制率曲线。

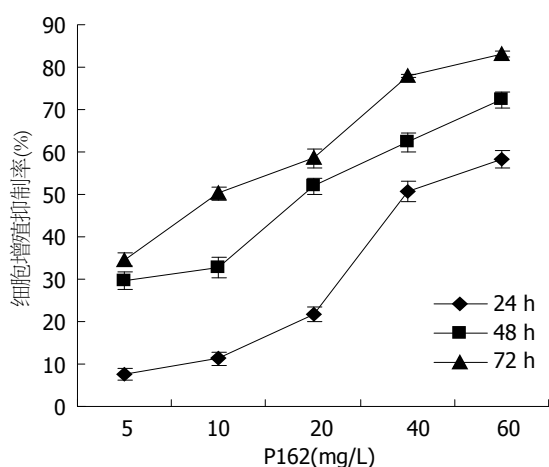


图2 不同浓度P162对Eca109R细胞作用不同时间后增殖抑制率曲线。

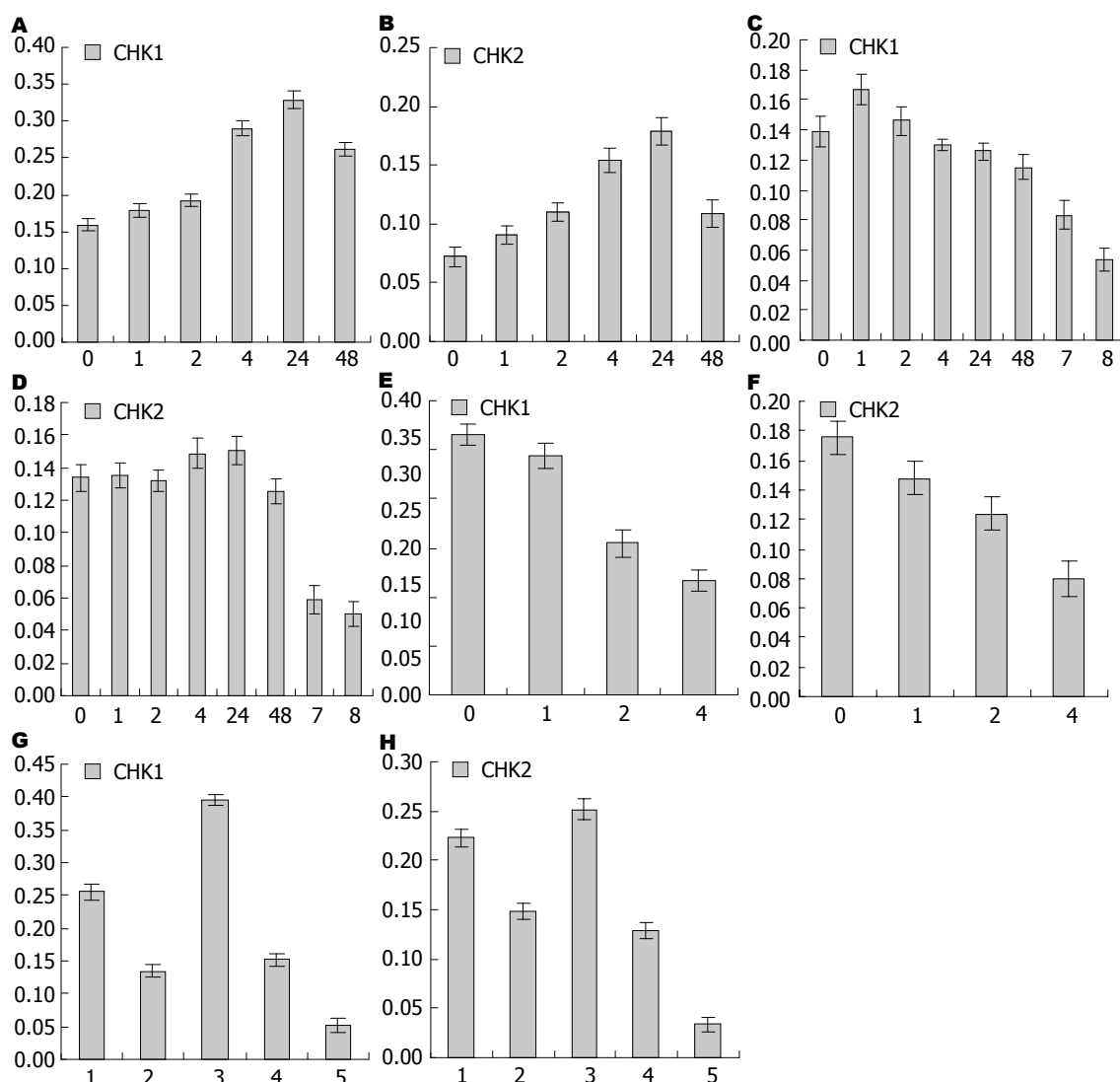
取6 Gy为放射剂量。

2.2 P162对Eca109R细胞增殖抑制率测定 由图2及表2可知: (1)随着P162浓度的增加,细胞增殖抑制率逐渐增大, P162对细胞抑制作用与浓度呈正相关; (2)随着培养时间的增加,细胞增殖抑制率也逐渐加大; (3)当P162浓度在20 mg/L时,细胞增殖抑制率在48、72 h均达到50%左右,故后续试验P162的最佳浓度选取20 mg/L。

2.3 Chk1、Chk2蛋白的表达 Western blot结果显示: (1)由图3A, B可知食管癌细胞株Eca109中未照射时存在一定量的Chk1与Chk2表达,经过6 Gy照射后,随着时间变化, Chk1与Chk2呈峰样变化,先逐渐增加再逐渐下降; (2)由图3C, D可知食管癌细胞株Eca109R中未照射时也存在一定量的Chk1与Chk2表达,经过6 Gy照射后,随着时间变化, Chk1逐渐下降, Chk2略呈峰样变化; (3)由图3C, D可知食管癌细胞株Eca109R加用20 mg/L的P162, 6 Gy照射后24 h, Chk1及Chk2均较

未加药照射24 h后明显下降(P 值分别为: 0.0015, 0.0000, $P < 0.05$), 加用40 mg/L P162 6 Gy照射后24 h, Chk1与Chk2表达下降更加明显(P 值分别为0.0002、0.0018, $P < 0.05$); 这说明在细胞株Eca109R中加用P162后能明显抑制Chk1、Chk2表达, 逆转放射抗拒, 且这种作用与其浓度正相关; (4)由图3E, F可知食管癌细胞株Eca109加用P162后未经照射时, Chk1与Chk2蛋白表达下降(P 值分别为0.0018、0.0003, $P < 0.05$), 加P162经照射后与未加药照射者相比Chk1与Chk2蛋白降低更加明显, P 值分别为0.0015、0.0000(照射后24 h); 0.0000、0.0000(照射后48 h)($P < 0.05$), 提示在细胞株Eca109中加用P162后能抑制Chk1、Chk2表达; (5)如图3G, H所示, Eca109R细胞株中Chk1与Chk2的表达高于Eca109细胞株(P 值分别为0.0002、0.0013, $P < 0.05$), 提示Chk1与Chk2参与了细胞放射抵抗; Eca109R与Eca109比较, 加用P162后, Eca109R与Eca109中Chk1、Chk2表达均下降(P 值分别为0.0000、0.0004, $P < 0.05$), Eca109R对Chk1、Chk2抑制作用比Eca109更加明显, 这提示P162对Eca109R及Eca109细胞株均有增敏作用, 是通过抑制Chk1、Chk2达到增敏效果的; (6)由上述图可知: Eca109及Eca109R两组细胞株中Chk1的表达高于Chk2, 提示Chk1在食管癌Eca109的放射抗拒形成中可能起主要作用; 两组细胞株加药经过6 Gy照射后, Chk1与Chk2表达均发生变化, 但Chk1蛋白的变化更明显, 提示P162可能主要是通过抑制Chk1蛋白的表达来增加细胞株的放射敏感性。

2.4 细胞周期测定 由图4A, B可知Eca109照射前后比较, G_2 期由1.61%明显增加到66.7%, 提示照射后出现 G_2 /M期阻滞; 由图4C, D可知Eca109R照射前后比较, G_2 期增加, 说明Eca109R照射后也发生细胞周期改变, 出现 G_2 期阻滞; 与Eca109比较, Eca109R未照射时 G_2 期比例高于Eca109细胞株($P = 0.0011$), 提示 G_2 /M期阻滞程度高于Eca109细胞株, 即表明Eca109R细胞株放射抗拒性高于Eca109细胞株; Eca109加用P162照射前 G_2 期比例比未加药未照射组下降($P = 0.0086$), 照射后加药组比不加药组亦下降($P = 0.0066$); Eca109R加用P162未照射组 G_2 期比例较未加药未照射组 G_2 期比例降低($P = 0.0019$), 照射后加药组比不加药组下降更明显($P = 0.0008$); 综合以上结果可知, P162能改变Eca109与Eca109R细胞株的细胞周期, 降低 G_2 期比例, 解除 G_2 期阻滞, 从而达到放射增敏。



■应用要点

本实验从DNA损伤修复及细胞周期重分布进行研究,我们还可以从细胞增殖机制及细胞再氧合机制入手,找到其他增加肿瘤放疗敏感性的方法,为食管癌的治疗,也为其他恶性肿瘤的治疗提供思路。

图 3 P162对食管癌细胞株Eca109及Eca109R放射前后Chk1、Chk2蛋白表达的影响. A: Eca109、6 Gy照射后1、2、4、24、48 h Chk1的表达; B: Eca109、6 Gy照射后1、2、4、24、48 h Chk2的表达; C: Eca109R、6 Gy照射后1、2、4、24、48 h、加P162 20 mg/L培养48 h再6 Gy照射后24 h、加P162 40 mg/L培养48 h再6 Gy照射后24 h Chk1的表达; D: Eca109R、6 Gy照射后1、2、4、24、48 h加P162 20 mg/L培养48 h再6 Gy照射后24 h加P162 40 mg/L培养48 h再6 Gy照射后24 h Chk2的表达; E: Eca109、Eca109加P162培养48 h、Eca109加P162培养48 h照射后24、48 h Chk1的表达; F: Eca109、Eca109加P162培养48 h、Eca109加P162培养48 h照射后24、48 h Chk2的表达; G: Eca109、Eca109+P162 20 mg/L培养48 h、Eca109R、Eca109R+P162 20 mg/L培养48 h、Eca109R+P162 40 mg/L培养48 h后Chk1的表达; H: Eca109、Eca109+P162 20 mg/L培养48 h、Eca109R、Eca109R+P162 20 mg/L培养48 h、Eca109R+P162 40 mg/L培养48 h后Chk2的表达。

表 2 P162对Eca109R细胞增殖抑制率(mean ± SD, %)

时间(h)	P162浓度(mg/L)				
	5	10	20	40	60
24	7.57 ± 1.23	11.30 ± 1.59	21.73 ± 1.83	50.77 ± 2.36	58.22 ± 2.17
48	29.71 ± 2.07	32.77 ± 2.43	51.92 ± 1.91	62.26 ± 2.21	72.31 ± 1.89
72	34.52 ± 1.57	50.23 ± 1.62	58.47 ± 2.11	77.87 ± 0.36	83.25 ± 0.71

3 讨论

Chk1、Chk2是DNA损伤修复信号转导通路中非常重要的蛋白激酶^[9]。一般情况下,当放射线引起肿瘤细胞DNA损伤后,细胞将快速启动细胞

周期检测点信号转导通路^[10-13],通过调节细胞周期相关蛋白的表达变化,促使受损伤的细胞停滞于G₁/S期、G₂/M期的检测点^[14]。而G₂期阻滞与DNA损伤修复有关,他为照射后受损伤肿瘤

同行评价

本文有一定的新意,实验设计合理,结果有说服力,具有一定指导意义。

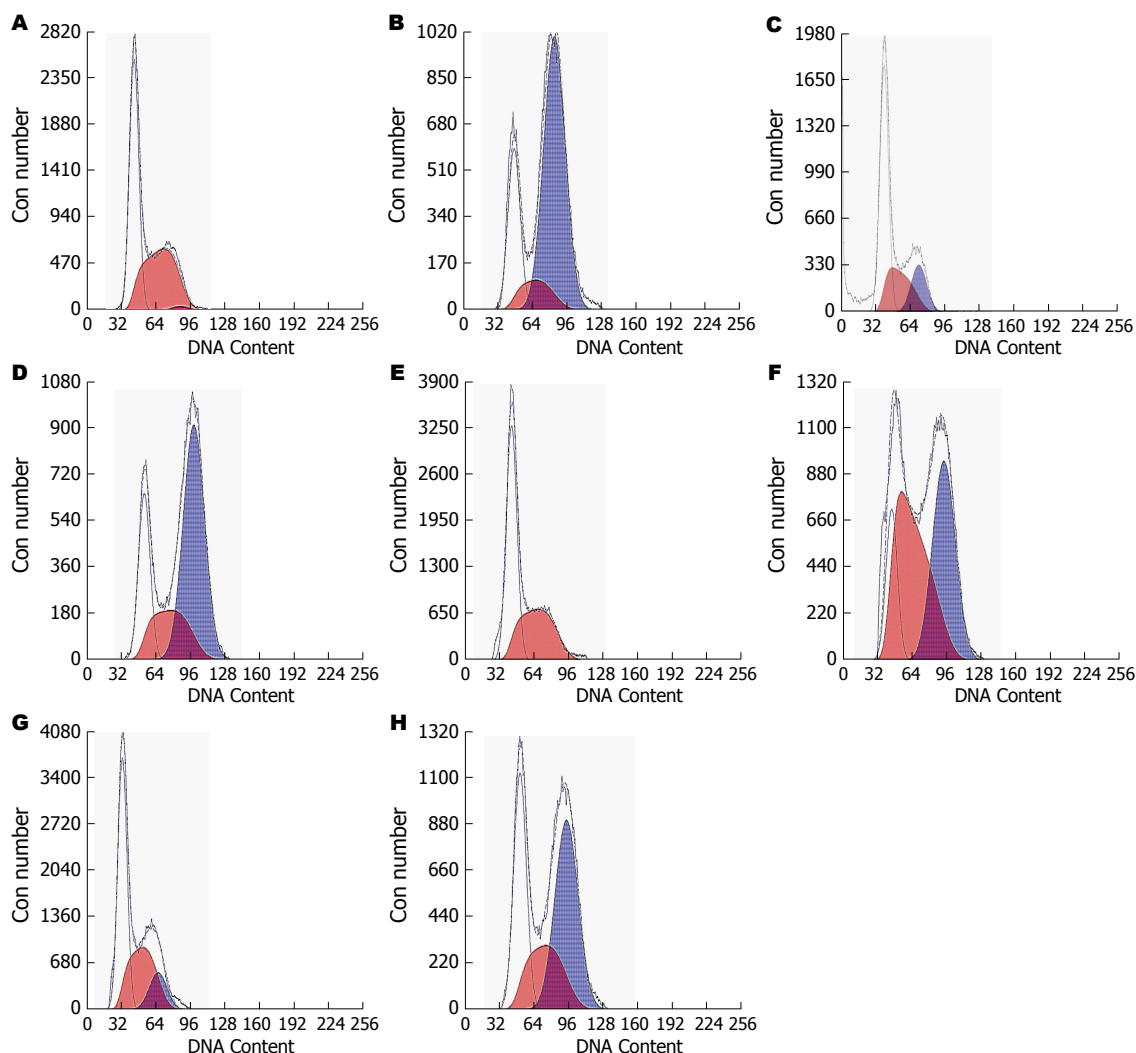


图4 P162对食管癌细胞株Eca109及Eca109R放射前后细胞周期的影响。A: Eca109; B: Eca109照射后24 h; C: Eca109R; D: Eca109R照射后24 h; E: Eca109+P162培养48 h; F: Eca109+P162培养48 h再照射后24 h; G: Eca109R+P162培养48 h; H: Eca109R+P162培养48 h再照射后24 h。

细胞修复创造条件,降低了放射线对肿瘤细胞的杀灭效应,从而使放射抗拒性增加^[15]。

在肝癌^[16]、胰腺癌^[17]、前列腺癌^[18]、肺癌^[19]等多种恶性肿瘤中干扰Chk1和Chk2的表达可以促使肿瘤的凋亡。建立质粒连接的Chk1和Chk2 shRNA,经脂质体转染Eca109食管癌细胞后,Chk1和Chk2表达在mRNA及其蛋白水平均明显下降^[20]。抑制Chk1和Chk2蛋白表达,可以消除肿瘤细胞照射后G₂期阻滞,有效地提高放射线对肿瘤细胞的杀灭效应。

本研究发现,食管癌细胞株Eca109及Eca109R的细胞中存在少量的Chk1及Chk2表达,在经过6 Gy射线照射后,二者表达呈先上升后下降趋势,提示在经过射线照射后,细胞中自身有一定的修复功能,出现Chk、Chk2短期的变化,加用P162不照射时,二个细胞株中Chk1及Chk2表达均减少,加用P162并进行照射后,Chk1及

Chk2表达明显降低,且Chk1的降低幅度更大,即P162对Chk1及Chk2抑制明显增加,提示P162通过抑制Chk1及Chk2的表达即减少自身损伤修复来增加放射敏感性。细胞周期显示,食管癌细胞株Eca109及Eca109R经过6 Gy射线照射后,G₂期明显增加,提示细胞经过照射后,发生G₂期的阻滞,自身进行损伤修复,加用P162未经照射时的G₂期略下降,然而加用P162经过6 Gy照射后24 h,细胞周期发生明显变化,G₂期比例明显下降,甚至逆转,并且随着P162浓度加大,逆转更加明显。这些结果充分地表明P162能降低Chk1及Chk2的表达,通过抑制Chk1及Chk2的表达来解除照射后细胞G₂/M期阻滞,减少自身修复,进而提高细胞的放射敏感性,起到放射增敏作用。

P162是利用计算机辅助筛选的一条具有抗癌机制的全新多肽,其结构与G3BP(Ras-GTPase-activating protein SH3 domain binding pro-

tein)的NTF2蛋白域发生特异性结合, 干预G3BP蛋白功能磷酸化^[21]. Kennedy等^[22]与Vognsen等^[23]研究证实G3BP通过N端的NTF2样结构域与GAP的SH3结构域相联系, 参与到许多生长因子的信息传递通路, 如Ras通路、PI3K通路、NF- κ B的调节和HER通路等, Ming等^[24]与Li等^[25]发现G3BP参与了p53的负性调节, 在肿瘤的发生中起重要的作用. p53的激活与ATM密切相关^[26], Chk1、Chk2是ATM下游的关键酶, 从而推断G3BP与ATM有关联, 而P162能干预G3BP的活性^[8], 所以我们考虑P162是通过这条途径来抑制Chk1及Chk2的表达, 抑制细胞DNA修复, 消除照射后G₂期的阻滞, 使G₂期末修复的细胞进入M期, 从而增加食管癌的放射敏感性.

我们经过射线反复照射, 成功诱导了食管癌细胞株Eca109R, 实验发现其Chk1、Chk2的表达较Eca109中Chk1、Chk2表达高, 而且细胞周期发生改变, 说明Eca109R比Eca109细胞株具有更高的放射抗拒性, 这与Fukuda等^[27]研究一致, 而学者研究^[28]认为反复分级放射诱导食管癌细胞株, 可以使细胞具有干细胞特性. 而干细胞比普通癌细胞具有更强的放射抗拒性^[29]. 有学者认为P75NTR具有食管癌干细胞的特性^[30], 前期课题组研究证明^[8]: 食管癌Eca109细胞株中存在P75NTR的表达, 由此我们是否可以推测Eca109R具有一定的干细胞特性? 这有待进一步实验证实.

Pajonk等^[31]提出临床放射治疗失败是由于肿瘤细胞中的一小部分具有放射抗拒性的细胞(干细胞)造成的, 主要是4R机制介导的^[5]: DNA的损伤修复、细胞周期重分布、细胞增殖机制及肿瘤细胞再氧合机制. 本实验从DNA损伤修复及细胞周期重分布为靶点研究, 为食管癌的治疗开辟了广阔的前景. 另外, 我们还可以从细胞增殖机制及细胞再氧合机制入手, 找到增加肿瘤治疗敏感性的靶点, 为其他恶性肿瘤的治疗提供思路.

志谢: 感谢吴清明教授、龙辉副教授、陈洁研究生协助设计完成此课题, 感谢武汉凯泰新生物技术有限公司陈建华博士提供多肽P162.

4 参考文献

- 1 单保恩. 第十四届中国科协年会第17分会场: 环境危害与健康防护研讨会论文集. 河北医科大学, 2012
- 2 Muijs CT, Pruim J, Beukema JC, Berveling MJ, Plukker JT, Langendijk JA. Oesophageal tumour

progression between the diagnostic ¹⁸F-FDG-PET and the ¹⁸F-FDG-PET for radiotherapy treatment planning. *Radiother Oncol* 2013; 106: 283-287 [PMID: 23199654 DOI: 10.1016/j.radonc.2012.10.015]

- 3 郝捷, 邵康. 中国食管癌流行病学现状、诊疗现状及未来对策. *中国癌症杂志* 2011; 21: 501-504
- 4 Smit JK, Faber H, Niemantsverdriet M, Baanstra M, Bussink J, Hollema H, van Os RP, Plukker JT, Coppes RP. Prediction of response to radiotherapy in the treatment of esophageal cancer using stem cell markers. *Radiother Oncol* 2013; 107: 434-441 [PMID: 23684587 DOI: 10.1016/j.radonc.2013.03.027]
- 5 Nguyen GH, Murph MM, Chang JY. Cancer stem cell radioresistance and enrichment: where frontline radiation therapy may fail in lung and esophageal cancers. *Cancers (Basel)* 2011; 3: 1232-1252 [PMID: 21603589 DOI: 10.3390/cancers3011232]
- 6 Caputo F, Vegliante R, Ghibelli L. Redox modulation of the DNA damage response. *Biochem Pharmacol* 2012; 84: 1292-1306 [PMID: 22846600 DOI: 10.1016/j.bcp.2012.07.022]
- 7 Zhang H, Zhang S, He H, Zhao W, Ren K, Chen J, Shao RG. RasGAP-derived peptide 38GAP potentiates the cytotoxicity of cisplatin through inhibitions of Akt, ERK and NF- κ B in colon carcinoma HCT116 cells. *Cancer Lett* 2011; 308: 62-70 [PMID: 21570766 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.04.014]
- 8 郑娇娇, 吴清明, 陈建华, 陈彩虹, 龙辉. P162对食管癌细胞株Eca109的放射增敏作用及其对p75NTR表达的影响. *中国病理生理杂志* 2013; 29: 103-107
- 9 Bensimon A, Aebersold R, Shiloh Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Lett* 2011; 585: 1625-1639 [PMID: 21570395 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.05.013]
- 10 Fokas E, Prevo R, Hammond EM, Brunner TB, McKenna WG, Muschel RJ. Targeting ATR in DNA damage response and cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev* 2014; 40: 109-117 [PMID: 23583268 DOI: 10.1016/j.ctrv.2013.03.002]
- 11 Toledo LI, Murga M, Fernandez-Capetillo O. Targeting ATR and Chk1 kinases for cancer treatment: a new model for new (and old) drugs. *Mol Oncol* 2011; 5: 368-373 [PMID: 21820372 DOI: 10.1016/j.molonc.2011.07.002]
- 12 Maugeri-Saccà M, Bartucci M, De Maria R. Checkpoint kinase 1 inhibitors for potentiating systemic anticancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2013; 39: 525-533 [PMID: 23207059 DOI: 10.1016/j.ctrv.2012.10.007]
- 13 Hyun SY, Rosen EM, Jang YJ. Novel DNA damage checkpoint in mitosis: Mitotic DNA damage induces re-replication without cell division in various cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423: 593-599 [PMID: 22704936 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.023]
- 14 Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today* 2012; 17: 194-202 [PMID: 22192883 DOI: 10.1016/j.drudis.2011.12.009]
- 15 Stracker TH, Usui T, Petrini JH. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 2009; 8: 1047-1054 [PMID: 19473886 DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.04.012]
- 16 Moon DO, Kim MO, Choi YH, Hyun JW, Chang WY, Kim GY. Butein induces G(2)/M phase ar-

- rest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. *Cancer Lett* 2010; 288: 204-213 [PMID: 19643530 DOI: 10.1016/j.canlet.2009.07.002]
- 17 Boreddy SR, Srivastava SK. Pancreatic cancer chemoprevention by phytochemicals. *Cancer Lett* 2012 Oct 27. [Epub ahead of print] [PMID: 23111102 DOI: 10.1016/j.canlet.2012.10.020]
 - 18 Chen HM, Chang FR, Hsieh YC, Cheng YJ, Hsieh KC, Tsai LM, Lin AS, Wu YC, Yuan SS. A novel synthetic protoapigenone analogue, WYC02-9, induces DNA damage and apoptosis in DU145 prostate cancer cells through generation of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2011; 50: 1151-1162 [PMID: 21256211 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.015]
 - 19 Grabauskiene S, Bergeron EJ, Chen G, Chang AC, Lin J, Thomas DG, Giordano TJ, Beer DG, Morgan MA, Reddy RM. CHK1 levels correlate with sensitization to pemetrexed by CHK1 inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 2013; 82: 477-484 [PMID: 24113549 DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.09.010]
 - 20 王玉祥. RNA干扰细胞周期检测点激酶CHK1和CHK2表达对食管癌细胞照射后细胞周期阻滞的消除作用. 河北医科大学, 2005: 1-156
 - 21 Pamonsinlapatham P, Hadj-Slimane R, Lepelletier Y, Allain B, Toccafondi M, Garbay C, Raynaud F. p120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): a multi-interacting protein in downstream signaling. *Biochimie* 2009; 91: 320-328 [PMID: 19022332 DOI: 10.1016/j.biochi.2008.10.010]
 - 22 Kennedy D, French J, Guitard E, Ru K, Tocque B, Mattick J. Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and ras-GAP(120) binding studies. *J Cell Biochem* 2001; 84: 173-187 [PMID: 11746526]
 - 23 Vognsen T, Kristensen O. Crystal structure of the Rasputin NTF2-like domain from *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420: 188-192 [PMID: 22414690 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.140]
 - 24 Ming M, He YY. PTEN in DNA damage repair. *Cancer Lett* 2012; 319: 125-129 [PMID: 22266095 DOI: 10.1016/j.canlet.2012.01.003]
 - 25 Li Y, Qu X, Qu J, Zhang Y, Liu J, Teng Y, Hu X, Hou K, Liu Y. Arsenic trioxide induces apoptosis and G2/M phase arrest by inducing Cbl to inhibit PI3K/Akt signaling and thereby regulate p53 activation. *Cancer Lett* 2009; 284: 208-215 [PMID: 19457607 DOI: 10.1016/j.canlet.2009.04.035]
 - 26 Yuan J, Luo K, Zhang L, Cheville JC, Lou Z. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53. *Cell* 2010; 140: 384-396 [PMID: 20096447 DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.032]
 - 27 Fukuda K, Sakakura C, Miyagawa K, Kuriu Y, Kin S, Nakase Y, Hagiwara A, Mitsufuji S, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. Differential gene expression profiles of radioresistant oesophageal cancer cell lines established by continuous fractionated irradiation. *Br J Cancer* 2004; 91: 1543-1550 [PMID: 15365572]
 - 28 Zhang X, Komaki R, Wang L, Fang B, Chang JY. Treatment of radioresistant stem-like esophageal cancer cells by an apoptotic gene-armed, telomerase-specific oncolytic adenovirus. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2813-2823 [PMID: 18451249 DOI: 10.1158/1078-0432]
 - 29 Peitzsch C, Kurth I, Kunz-Schughart L, Baumann M, Dubrovska A. Discovery of the cancer stem cell related determinants of radioresistance. *Radiother Oncol* 2013; 108: 378-387 [PMID: 23830195 DOI: 10.1016/j.radonc.2013.06.003]
 - 30 孙志刚, 黄盛冬, 张宝仁, 徐志云, 刘晓红, 龚德军, 袁扬. 食管肿瘤干细胞的分选及鉴定的实验研究. 中华医学杂志 2009; 89: 291-295
 - 31 Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells* 2010; 28: 639-648 [PMID: 20135685 DOI: 10.1002/stem.318]

编辑 田滢 电编 闫晋利



shRNA maspin/pGenesil-1.1表达载体的构建及意义

倪江涛, 杨紫汐, 易永芬

倪江涛, 杨紫汐, 泸州医学院病理教研室 四川省泸州市 646000

易永芬, 重庆医科大学病理教研室, 分子医学与肿瘤研究中心 重庆市 400016

倪江涛, 讲师, 主要从事消化系肿瘤的研究。

重庆市教委科研基金资助项目, No. 040310

作者贡献分布: 此课题由倪江涛与易永芬设计; 基因重组、RT-PCR和Western blot检测由倪江涛与杨紫汐完成; 数据分析由倪江涛完成; 论文写作由倪江涛与易永芬完成。

通讯作者: 易永芬, 教授, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号, 重庆医科大学病理教研室, 分子医学与肿瘤研究中心。

yi Yongfen1953@yahoo.com.cn

电话: 023-68485789

收稿日期: 2013-11-26 修回日期: 2013-12-05

接受日期: 2013-12-12 在线出版日期: 2014-02-08

Construction of a eukaryotic expression vector containing shRNA targeting maspin

Jiang-Tao Ni, Zi-Xi Yang, Yong-Fen Yi

Jiang-Tao Ni, Zi-Xi Yang, Department of Pathology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Yong-Fen Yi, Department of Pathology, Molecular Medicine and Tumor Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of Chongqing Education Commission, No. 040310

Correspondence to: Yong-Fen Yi, Professor, Department of Pathology, Molecular Medicine and Tumor Research Center, Chongqing Medical University, 1 Medical University Road, Yuzhong District, Chongqing 400016, China. yi Yongfen1953@yahoo.com.cn

Received: 2013-11-26 Revised: 2013-12-05

Accepted: 2013-12-12 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To construct a eukaryotic expression vector containing short hairpin RNA (shRNA) targeting the *maspin* gene.

METHODS: A shRNA targeting the *maspin* gene was ligated to the pGenesil-1.1 plasmid expressing green fluorescent protein. Recombinant *maspin*/pGenesil positive plasmid and YX/pGenesil negative plasmid were constructed. After recombinant plasmids were transfected into MKN-28 cells, RT-PCR and Western blot were performed to detect *maspin* mRNA and protein expression, respectively.

RESULTS: The recombinant plasmids were validated by gel electrophoresis and DNA sequence analysis. RT-PCR and Western blot analyses indicated that after successful transfection, both *maspin* mRNA and protein expression in the *maspin*/pGenesil group was dramatically down-regulated, compared with that in the YX/pGenesil group (0.127 ± 0.02 vs 0.510 ± 0.01 , $P < 0.05$; 0.24 ± 0.10 vs 0.65 ± 0.09 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The *maspin* shRNA recombinant plasmid has been constructed successfully. Transfection with the *maspin* shRNA recombinant plasmid could inhibit the expression of *maspin* mRNA and protein effectively in human gastric cancer cell line MKN-28.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: *Maspin*; shRNA; Gastric cancer

Ni JT, Yang ZX, Yi YF. Construction of a eukaryotic expression vector containing shRNA targeting *maspin*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 469-475 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/469.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.469>

摘要

目的: 构建*maspin*基因shRNA真核表达载体, 为进一步研究*maspin*基因在胃癌细胞株MKN-28生长、浸润、转移中的作用奠定基础。

方法: 设计合成针对*maspin*基因的shRNA与表达绿色荧光蛋白的pGenesil-1.1质粒连接, 构建的重组质粒分别命名为阳性质粒*maspin*/pGenesil和阴性质粒YX/pGenesil。分别用RT-PCR和Western blot检测转染重组质粒前后胃癌细胞株MKN-28 *maspin*的表达变化。

结果: 通过凝胶电泳和DNA测序分析, 成功构建针对*maspin*特异性shRNA真核表达质粒*maspin*/pGenesil及YX/pGenesil。RT-PCR与Western blot检测发现转染成功后*maspin*/pGenesil组比YX/pGenesil组*maspin* mRNA的

■背景资料

Maspin是新发现的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 可诱导多种肿瘤细胞出现凋亡、抑制血管形成、促进细胞与基底膜及细胞外基质黏附, 但有关*maspin*与胃癌的关系, 国内外少有报道, 本研究拟构建*maspin*/pGenesil-1.1表达载体沉默*maspin*的表达, 为后续进一步研究*maspin*基因在胃癌细胞生长、浸润、转移中的作用奠定基础。

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

■ 研发前沿

*Maspin*基因在多种肿瘤中表现出抑癌活性,而在有些肿瘤,如卵巢癌中则相反,这个矛盾的结果还没有得到合理的解释,人们开始对*maspin*基因是否是抑癌基因提出了质疑。目前需要研究的是*maspin*基因是通过怎样的途径在肿瘤细胞中发挥作用的。

表达显著下降(0.127 ± 0.02 vs 0.510 ± 0.01 , $P < 0.05$); *maspin*/pGenesil组比YX/pGenesil组*maspin*蛋白表达也显著下降(0.24 ± 0.10 vs 0.65 ± 0.09 , $P < 0.05$)。

结论: 成功构建了重组质粒*maspin*/pGenesil,经转染能有效抑制人胃癌细胞株MKN-28*maspin*基因的表达。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: *Maspin*; shRNA; 胃癌

核心提示: 根据shRNA设计原则,设计针对*maspin*基因编码区的RNA干扰靶位点,构建了2个RNAi质粒表达载体即: *maspin*/pGenesil(阳性对照)、YX/pGenesil(阴性对照)。最后,通过RT-PCR与Western blot检测发现阳性质粒转染成功后可显著下调胃癌细胞株*maspin*的表达。

倪江海, 杨紫汐, 易永芬. shRNA *maspin*/pGenesil-1.1表达载体的构建及意义. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 469-475
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/469.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.469>

0 引言

*Maspin*是使用减数杂交和差异显示技术通过对正常乳腺上皮与乳腺癌进行比较研究时得到的一种肿瘤抑制基因,他是丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族成员之一,参与细胞外基质降解^[1]。在体外,前列腺癌与乳腺癌细胞株中,*maspin*显示出抑制肿瘤细胞侵袭与运动的能力,在动物模型中降低癌细胞株转移的能力^[2]。然而AbdEl-Wahed等^[3]在研究卵巢肿瘤时发现卵巢良性上皮肿瘤与正常卵巢表面上皮均无*maspin*表达,却在卵巢恶性肿瘤中过表达。在胆囊癌^[4]、胰腺癌、结直肠癌^[5]及甲状腺癌^[6]中也发现*maspin*表达上调,这两种截然相反的现象使人们开始质疑其是否为一抑癌基因。为此本课题组前期采用了基因重组的方法,构建*maspin*/PCR2.1重组质粒转染至胃癌细胞株,曾探索上调*maspin*的表达对胃癌细胞凋亡的影响^[7],证实了*maspin*基因与胃癌细胞凋亡密切相关,上调*maspin*的表达能够提高胃癌细胞对凋亡刺激信号的敏感性,诱导胃癌细胞发生凋亡,但是该基因在胃癌发生、浸润、转移中的作用究竟如何,有待通过实验进一步证实。为此,本实验拟构建针对*maspin*基因shRNA真核表达载体,转染胃癌细胞株MKN-28,为进一步研究*maspin*基因在胃癌

细胞株MKN-28生长、浸润、转移中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞株MKN-28细胞,本实验室保存,真核表达质粒载体pGenesil-1.1、大肠杆菌DH5 α 购自武汉晶赛生物技术有限公司;各工具酶购自TaKaRa公司。RT-PCR及TRIzol试剂、阳离子脂质体LipofectamineTM2000购自Invitrogen公司;PVDF膜是Whatman公司的产品;兔抗人*maspin*多克隆抗体购自Abzoom公司;小鼠抗人GAPDH多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;无内毒素质粒中量抽提试剂盒购自Omega公司;小规模质粒纯化试剂盒为中鼎生物技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 *maspin*短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA)的设计与构建: 根据shRNA设计原则,在GenBank中查阅人源*maspin*基因序列(GI: 453368),设计针对*maspin*基因编码区的RNA干扰(RNA interference, RNAi)靶位点1个,为: 1012-1031: 5'-GTGGCCCTATCAAATGTTA-3'。阴性对照为已明确的不针对任何人mRNA的RNAi靶位点,其序列为: 5'-GACTTCATA-AGGCGCATGC-3'。为此,共构建了2个RNAi质粒表达载体即: *maspin*/pGenesil、YX/pGenesil。两个基因片段均由武汉晶赛生物技术有限公司合成(表1)。各用25 μ L退火缓冲液溶解上述合成1 A单链目的基因片段。然后各取单链目的基因片段正链和负链,分别为2 μ L和16 μ L,退火缓冲液混匀。经95 $^{\circ}$ C水浴退火5 min,自然冷却至37 $^{\circ}$ C 1 h。用Eco31 I限制性内切酶酶切质粒载体pGenesil-1.1,使之线性化。接着使用T4 DNA连接酶将准备好的目的基因片段连接到线性化质粒载体pGenesil-1.1,22 $^{\circ}$ C水浴过夜,构建shRNA *maspin*/pGenesil-1.1重组质粒,转化入处于感受态大肠杆菌DH5 α ,随后接种在含卡那霉素罗氏培养基的培养皿中,37 $^{\circ}$ C过夜。

1.2.2 shRNA *maspin*/pGenesil-1.1表达载体的鉴定: 将提取的重组质粒经Sal I酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,判断酶切产物大小;并将含重组质粒的菌液送武汉晶赛生物技术有限公司测序,以鉴定重组质粒是否构建成功。

1.2.3 shRNA *maspin*/pGenesil-1.1转染MKN-28细胞: 使用阳离子脂质体LipofectamineTM2000

表 1 maspin shRNA的序列及结构

shRNA	序列及结构
maspin/pGenesil	5'-CACC GTGGCCCTATCAAATGTTA TTCAAGACG TAACATTTGATAGGGCCAC TTTTTT G-3' 5'-AGCTCAAAAAA GTGGCCCTATCAAATGTTA CGTCTTGAA TAACATTTGATAGGGCCAC-3'
YX/pGenesil	5'-CACCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTC TTTTTT G-3' 5'-AGCTCAAAAAAGACTTCATAAGGCGCATGC CGTCTTGAAGCATGCGCCTTATGAAGTC

CACC: 人工插入序列; TTTTTT和AAAAAA: 终止序列; TTCAAGACG和CGTCTTGAA: 茎环; AGCTC: *Sal* I 酶切位点。

表 2 合成的引物序列

名称	引物序列	大小(bp)
maspin	5'-CTCCAGGCCCGCAATGGAT-3' 5'-GGGCTATGCCAC TAAGGAG-3'	1240
GAPDH	5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' 5'-CAAAGTTGTCATGGATGA-3'	208

进行转染, 按照脂质体说明书操作. 将表达质粒 maspin/pGenesil、YX/pGenesil及空载体分别转染MKN-28细胞, 并用400 μ g/mL G418抗性筛选.

1.2.4 计算转染率: 取转染后的细胞常规铺片, 置于荧光显微镜下观察并计算转染率, 转染效率 = (发出绿色荧光的细胞数/可见光下总细胞数) \times 100%.

1.2.5 RT-PCR检测转染细胞maspin在转录水平的表达: 用TRIzol提取细胞总RNA, 10 \times RT Buffer 1 μ L, RNase Free H₂O 3.75 μ L, dNTP Mixture(各 10 mmol/L 1 μ L, RNase inhibitor 0.25 μ L, AMV reverse transcriptase 0.5 μ L, Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μ L, 总RNA 1 μ L, 共10 μ L反应体系. 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 20 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min进行反转录反应, 所得产物用于PCR扩增. 瞬时离心3-5 s, 混匀后maspin与GAPDH(内参)按下列条件进行PCR反应: 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min. PCR结束后各取5 μ L反应液1%琼脂糖凝胶电泳, 经Bio-Rad凝胶成像系统采集图像、保存, 用Quantity One 4.5.0软件进行分析, 将各目的基因与GAPDH灰度值的比值作为其mRNA表达量, 每样本重复3次. maspin与GAPDH的RT-PCR引物序列如表2, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

1.2.6 Western blot检测转染细胞maspin蛋白表达: 收集实验组和对照组的细胞1 \times 10⁶个, 提取蛋白, 每空80 μ g上样量, 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转印蛋白质, 免疫反应时加入5%蛋白封闭液

稀释的HRP标记的羊抗鼠或者羊抗兔二抗体(工作浓度1:1000), 室温下在摇床上振摇60 min. 最后进行化学发光, 在BIO-RAD成像仪上进行图像采集、保存, 并用Quantity One 4.5.0软件分析, 将各目的基因与GAPDH灰度值的比值作为其蛋白表达量, 每样本重复3次.

统计学处理 使用SPSS11.5统计学软件进行统计分析. 数据以mean \pm SD表示, 两两之间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 重组质粒鉴定及转染率检测 在本研究中插入的目的基因片段里, 设计了一个*Sal* I 的酶切位点, 而质粒pGenesil-1.1本来就有*Sal* I 酶切位点, 如插入正确, 质粒就能被*Sal* I 酶切出一条长约916 bp的DNA片段. 经限制性内切酶*Sal* I 酶切鉴定分析: 重组质粒maspin/pGenesil与YX/pGenesil符合设计要求(图1A). 测序结果也证实设计基因序列正确插入质粒中, 成功构建重组质粒. 重组质粒maspin/pGenesil与YX/pGenesil在脂质体介导下转染胃癌细胞株MKN-28. 在转染后约6-12 h, 倒置荧光显微镜下即可观察到MKN-28细胞株内出现绿色荧光, 在48 h时荧光强度达到最强, 其转染效率约65%(图1B, C).

2.2 RT-PCR检测转染重组质粒对maspin转录水平表达的影响 实验组maspin/pGenesil与对照组[阴性对照YX/pGenesil、空白对照(仅加入脂质体)]细胞相比, 对照组细胞maspin mRNA表达明显较阴性对照和空白对照组减弱($P = 0.0001$),

■ 相关报道

Maspin基因在体外, 前列腺癌与乳腺癌细胞株中, maspin显示出抑制肿瘤细胞侵袭与运动的能力. 在动物模型中降低癌细胞株转移的能力, 但在卵巢肿瘤中发现卵巢良性上皮肿瘤与正常卵巢表面上皮均无maspin表达, 却在卵巢恶性肿瘤中过表达.

■创新盘点

我们通过构建针对 *maspin* 基因的 shRNA 表达载体, 利用特异、高效、快捷的 RNA 干扰技术, 沉默胃癌细胞 *maspin* 基因, 为进一步研究 *maspin* 在胃癌细胞中的功能奠定基础。

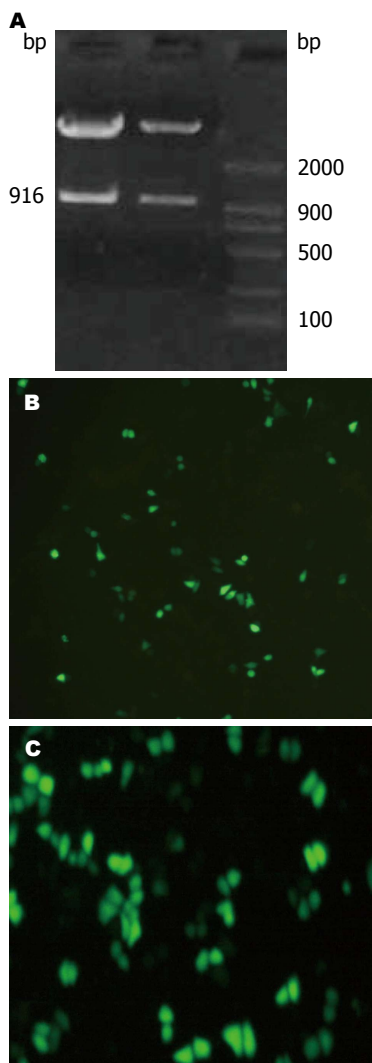


图1 重组质粒 *Sal*I 酶切电泳图及荧光显微镜观察 MKN-28 细胞转染 *maspin/pGenesil* 的效率。A: 重组质粒 *Sal*I 酶切电泳图。1: *maspin/pGenesil*; 2: *YX/pGenesil*; 3: DL2000 Marker; B: MKN-28 细胞转染 *maspin/pGenesil* 24 h; C: MKN-28 细胞转染 *maspin/pGenesil* 48 h。

而阴性对照组与空白对照组之间的差异无统计学意义 ($P = 0.334$) (表3, 图2)。

2.3 Western blot检测转染重组质粒对 *maspin* 蛋白表达的影响 内参 GAPDH 条带粗细亮度基本一致, 没有显著差别 ($P = 0.52$), 说明蛋白上样量一致 (三组细胞的 *maspin* 蛋白的表达情况如图3)。实验组与对照组相比, 实验组 *maspin* 蛋白表达明显低于阴性对照和空白对照组 (表4), 其差异有统计学意义 ($P = 0.0001$), 而阴性对照组与空白对照组之间的差异无统计学意义 ($P = 0.52$), 说明转染重组质粒 *maspin/pGenesil* 组的 *maspin* 蛋白表达受到抑制。

3 讨论

恶性肿瘤是严重危害人类健康的疾病。我国每

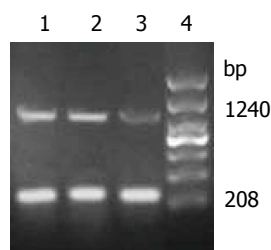


图2 转染重组质粒的 MKN-28 细胞 *maspin* mRNA 的表达。1: Lipofectamine group; 2: *YX/pGenesil*; 3: *maspin/pGenesil*; 4: DL2000 Marker。

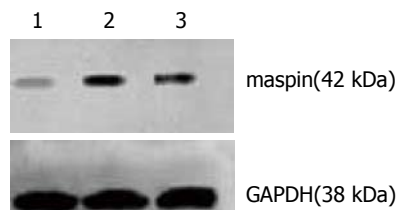


图3 转染重组质粒的 MKN-28 细胞 *maspin* mRNA 的表达。1: *maspin/pGenesil*; 2: Lipofectamine group; 3: *YX/pGenesil*。

年约新增312万例恶性肿瘤患者, 因癌死亡超过200万例。胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在消化系统中占第一位, 多种癌基因和抑癌基因的异常与胃癌的发生发展密切相关, 因此研究与胃癌密切相关的基因十分必要。

maspin 基因于1994年首次发现, 该基因定位于染色体18q21.3-q23, 编码一种42 kDa的蛋白质^[6,8], 有研究表明 *maspin* 可诱导细胞凋亡、抑制血管形成、促进细胞与基底膜及细胞外基质黏附^[9-13], 可用于胆管癌的预后判断及化疗效果判断^[14]。目前国内外关于 *maspin* 生物学功能的研究还处在初始阶段, *maspin* shRNA 对胃癌细胞的影响未见报道。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是近年发展起来的一种新技术, 是一种由双链RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱发的特定基因沉默技术, 在此过程中, 与双链RNA有同源序列的 mRNA 被降解, 从而达到沉默该基因表达的目的。由于其导致的基因沉默发生在转录后水平, 故又被称为转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[15,16]。RNAi 技术作为一种能使生物体特定基因沉默的新方法, 其出现为基因功能研究提供了新的方法^[17,18]。RNAi 现象在多种生物中存在, 如: 植物^[19]、线虫^[20,21]以及果蝇^[22-25]等。1999年 Tuschl 等^[26]报道在哺乳动物中也存在 RNAi 现象。2001年, Elbashir 等^[27]应用 RNAi 技术成功地在哺乳动物细胞中诱导了基因沉默现象。Meng 等^[28]利用小干扰

表 3 maspin/pGenesil、YX/pGenesil及脂质体组细胞maspin mRNA灰度值(mean ± SD)

分组	maspin	GAPDH	比率
Lipofectamine	839.0 ± 70.3	1578.5 ± 109	0.531 ± 0.02
YX/pGenesil	802.3 ± 76.4	1571.6 ± 80.3	0.510 ± 0.01
maspin/pGenesil	203.1 ± 10.6	1588.6 ± 90.5	0.127 ± 0.02 ^a

^aP<0.05 vs YX/pGenesil组。

表 4 MKN-28 maspin蛋白表达的灰度值(mean ± SD)

分组	maspin	GAPDH	比率
Lipofectamine	25331.62 ± 2166.22	38142.45 ± 4566.32	0.66 ± 0.12
YX/pGenesil	24996.12 ± 3095.28	38562.70 ± 3912.55	0.65 ± 0.09
maspin/pGenesil	9121.15 ± 1897.02	38384.29 ± 3124.36	0.24 ± 0.10 ^b

^aP<0.05 vs YX/pGenesil组。

RNA(small interference RNA, siRNA)沉默胃癌细胞株SGC-7901中*Raf-1*基因后*Raf-1*蛋白水平明显下降, 两个血管生长促进因子: 血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)和低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)表达也下调。Jinawath等^[29]研究发现, 将核仁蛋白NOL8特异性siRNA转染ST-4、TMK-1和MKN45三种不同的胃癌细胞株, 可以有效地降低该基因的表达, 并能诱导这些细胞凋亡。

实施RNA干扰目前可以采用: (1)体外转录法; (2)载体表达法, 将DNA模板导入到细胞内后通过转录的方式再产生dsRNA^[30]; (3)化学合成法, 人工制备siRNA, 然后导入细胞内。本实验根据siRNA载体表达法的原理, 构建针对*maspin*基因的shRNA重组质粒maspin/pGenesil, 将其转染入胃癌细胞株MKN-28中。当针对*maspin*基因的shRNA模板进入细胞内以后, 通过转录的方式产生dsRNA。所产生的dsRNA被一种双链RNA特异性的核酸内切酶(dsRNA-specific endonuclease, Dicer)识别, 切割成21-23个核苷酸的siRNA片段^[31]。这些片段随后与该核酸酶的dsRNA结构域结合, 并且作为模板识别目的基因*maspin* mRNA。识别之后, *maspin* mRNA与dsRNA的有义链发生链互换, 原先dsRNA中的有义链被*maspin* mRNA代替, 从Dicer酶-dsRNA复合物中释放出来, 而*maspin* mRNA则处于原先的有义链所处的位置。随之, 形成RNA诱导的沉默复合物(RNA-

induced silencing complex, RISC), 继而RISC特异性地对目的基因*maspin* mRNA进行切割, 使*maspin* mRNA分子失去编码蛋白质的功能, 从而使*maspin*基因沉默, 产生RNA干扰现象。由此, 我们采用RT-PCR和Western blot分别在转录及蛋白水平检测*maspin*基因表达的时候, 发现maspin/pGenesil组都显著低于YX/pGenesil组。由于真核表达质粒携带有绿色荧光蛋白基因, 在荧光显微镜下可以观察到含有shRNA maspin/pGenesil的细胞, 从而计算转染效率。

总之, 在本实验中我们成功构建了maspin/pGenesil、YX/pGenesil重组质粒, 转染胃癌细胞株MKN-28后, *maspin*表达下调, 取得了沉默*maspin*表达的效果, 为深入研究*maspin*基因在胃癌细胞株MKN-28生长、浸润、转移中的作用奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Maspin expression in normal lung and non-small-cell lung cancers: cellular property-associated expression under the control of promoter DNA methylation. *Oncogene* 2004; 23: 4041-4049 [PMID: 15048080 DOI: 10.1038/sj.onc.1207557]
- 2 Maass N, Hojo T, Zhang M, Sager R, Jonat W, Nagasaki K. Maspin--a novel protease inhibitor with tumor-suppressing activity in breast cancer. *Acta Oncol* 2000; 39: 931-934 [PMID: 11206999 DOI: 10.1080/02841860050215909]
- 3 Abd El-Wahed MM. Expression and subcellular localization of maspin in human ovarian epithelial neoplasms: correlation with clinicopathologic features. *J Egypt Natl Canc Inst* 2005; 17: 173-183 [PMID: 16799655]

■应用要点

RNAi独特的作用机制以及其简便的操作流程和对*maspin*表达抑制的高效性, 为胃癌基因治疗打下一定的基础。

■名词解释

shRNA: 是short hairpin RNA 的缩写, 翻译为“短发夹RNA”, shRNA包括两个短反向重复序列, 随后再连上5-6个T作为RNA聚合酶Ⅲ的转录终止子。

- 4 Dong P, Zhang Y, Gu J, Wu W, Li M, Yang J, Zhang L, Lu J, Mu J, Chen L, Li S, Wang J, Liu Y. Wogonin, an active ingredient of Chinese herb medicine *Scutellaria baicalensis*, inhibits the mobility and invasion of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells by inducing the expression of maspin. *J Ethnopharmacol* 2011; 137: 1373-1380 [PMID: 21855619 DOI: 10.1016/j.jep.2011.08.005]
- 5 Gurzu S, Szentirmay Z, Popa D, Jung I. Practical value of the new system for Maspin assessment, in colorectal cancer. *Neoplasma* 2013; 60: 373-383 [PMID: 23581409 DOI: 10.4149/neo_2013_049]
- 6 Berardi R, Morgese F, Onofri A, Mazzanti P, Pistelli M, Ballatore Z, Savini A, De Lisa M, Caramanti M, Rinaldi S, Pagliaretta S, Santoni M, Pierantoni C, Cascinu S. Role of maspin in cancer. *Clin Transl Med* 2013; 2: 8 [PMID: 23497644 DOI: 10.1186/2001-1326-2-8]
- 7 郑爱华, 易永芬, 周文文. MASPIN真核表达载体的构建及对胃癌细胞SGC7901的诱导凋亡作用. *癌症* 2008; 27: 1161-1165
- 8 邓伟, 易永芬, 刘丹丹. 胃癌组织Maspin, uPA, MMP-7表达的意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 660-661
- 9 Choy B, Findeis-Hosey JJ, Li F, McMahon LA, Yang Q, Xu H. High frequency of coexpression of maspin with p63 and p53 in squamous cell carcinoma but not in adenocarcinoma of the lung. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6: 2542-2547 [PMID: 24228118]
- 10 Fawzy AI, Gayyed MF, Elsaghir GA, Elbadry MS. Expression of Snail transcription factor in prostatic adenocarcinoma in Egypt: correlation with Maspin protein expression and clinicopathologic variables. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6: 1558-1566 [PMID: 23923074]
- 11 Wang Y, Sheng S, Zhang J, Dzinic S, Li S, Fang F, Wu N, Zheng Q, Yang Y. Elevated maspin expression is associated with better overall survival in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). *PLoS One* 2013; 8: e63581 [PMID: 23717449 DOI: 10.1371/journal.pone.0063581]
- 12 Kaplun A, Dzinic S, Bernardo M, Sheng S. Tumor suppressor maspin as a rheostat in HDAC regulation to achieve the fine-tuning of epithelial homeostasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2012; 22: 249-258 [PMID: 23140166 DOI: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v22.i3.80]
- 13 Zhang W, Shi HY, Zhang M. Maspin overexpression modulates tumor cell apoptosis through the regulation of Bcl-2 family proteins. *BMC Cancer* 2005; 5: 50 [PMID: 15907209 DOI: 10.1186/1471-2407-5-50]
- 14 Romani AA, Soliani P, Desenzani S, Borghetti AF, Crafa P. The associated expression of Maspin and Bax proteins as a potential prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer* 2006; 6: 255 [PMID: 17067385 DOI: 10.1186/1471-2407-6-255]
- 15 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251 [PMID: 12110901 DOI: 10.1038/418244a]
- 16 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 737-747 [PMID: 12360232 DOI: 10.1038/nrg908]
- 17 Hohjoh H. Disease-causing allele-specific silencing by RNA interference. *Pharmaceuticals* (Basel) 2013; 6: 522-535 [PMID: 24276122 DOI: 10.3390/ph6040522]
- 18 Guo B, Zhang B, Zheng L, Tang T, Liu J, Wu H, Yang Z, Peng S, He X, Zhang H, Yue KK, He F, Zhang L, Qin L, Bian Z, Tan W, Liang Z, Lu A, Zhang G. Therapeutic RNA interference targeting CKIP-1 with a cross-species sequence to stimulate bone formation. *Bone* 2014; 59: 76-88 [PMID: 24246247 DOI: 10.1016/j.bone.2013.11.007]
- 19 Palauqui JC, Elmayan T, Pollien JM, Vaucheret H. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 1997; 16: 4738-4745 [PMID: 9303318 DOI: 10.1093/emboj/16.15.4738]
- 20 Tijsterman M, May RC, Simmer F, Okihara KL, Plasterk RH. Genes required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 2004; 14: 111-116 [PMID: 14738731 DOI: 10.1016/j.cub.2003.12.029]
- 21 van Haaften G, Romeijn R, Pothof J, Koole W, Mullenders LH, Pastink A, Plasterk RH, Tijsterman M. Identification of conserved pathways of DNA-damage response and radiation protection by genome-wide RNAi. *Curr Biol* 2006; 16: 1344-1350 [PMID: 16824923 DOI: 10.1016/j.cub.2006.05.047]
- 22 Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; 101: 25-33 [PMID: 10778853 DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80620-0]
- 23 Xiong XP, Kurthkoti K, Chang KY, Lichinchi G, De N, Schneemann A, MacRae IJ, Rana TM, Perrimon N, Zhou R. Core small nuclear ribonucleoprotein particle splicing factor Smd1 modulates RNA interference in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 16520-16525 [PMID: 24067655 DOI: 10.1073/pnas.1315803110]
- 24 Cernilogar FM, Burroughs AM, Lanzuolo C, Breiling A, Imhof A, Orlando V. RNA-interference components are dispensable for transcriptional silencing of the *drosophila* bithorax-complex. *PLoS One* 2013; 8: e65740 [PMID: 23785447 DOI: 10.1371/journal.pone.0065740]
- 25 Stotz SC, Clapham DE. Anion-sensitive fluorophore identifies the *Drosophila* swell-activated chloride channel in a genome-wide RNA interference screen. *PLoS One* 2012; 7: e46865 [PMID: 23056495 DOI: 10.1371/journal.pone.0046865]
- 26 Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 1999; 13: 3191-3197 [PMID: 10617568 DOI: 10.1101/gad.13.24.3191]
- 27 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498 [PMID: 11373684 DOI: 10.1038/35078107]
- 28 Meng F, Ding J, Liu N, Zhang J, Shao X, Shen H, Xue Y, Xie H, Fan D. Inhibition of gastric cancer angiogenesis by vector-based RNA interference for Raf-1. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 113-117 [PMID: 15662129 DOI: 10.4161/cbt.4.1.1446]
- 29 Jinawath N, Furukawa Y, Nakamura Y. Identification of NOL8, a nucleolar protein containing an RNA recognition motif (RRM), which was overexpressed in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Sci* 2004; 95: 430-435 [PMID: 15132771 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb03227.x]
- 30 Ohta A, Inoue A, Taira K. [Basic research on and

application of RNA interference]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2004; 31: 827-831 [PMID: 15222096]
31 Hannon GJ, Conklin DS. RNA interference by short

hairpin RNAs expressed in vertebrate cells. *Methods Mol Biol* 2004; 257: 255-266 [PMID: 14770011 DOI: 10.1385/1-59259-750-5]

■同行评价

本实验选题新颖、设计合理, 所得数据客观可信, 具有明显的临床意义。

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

藤黄对人结肠癌HCT116细胞裸鼠原位移植模型的作用

竺平, 谷云飞, 杨柏霖, 林秋, 丁义江

■背景资料

结直肠癌是世界范围内发病率仅次于肺癌和乳腺癌的第三大恶性肿瘤, 近年来我国结直肠癌发病率和死亡率均呈上升趋势。以手术及放化疗为主的综合治疗目前仍然是结直肠癌的主要治疗方法, 手术的风险以及放化疗带来的并发症常让医生和患者陷入两难困局。因此迫切需要发现能够有效治疗结直肠癌的新方法。

竺平, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210046

谷云飞, 杨柏霖, 南京中医药大学附属医院肛肠科 江苏省南京市 210029

林秋, 江苏省中西医结合医院肛肠科 江苏省南京市 210028

丁义江, 南京中医药大学第三附属医院肛肠科 江苏省南京市 210001

竺平, 在读博士, 主要从事结直肠疾病的临床及基础研究。

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2008457

南京中医药大学基础研究和重点培育基金资助项目, No. 09XPY01

作者贡献分布: 此课题由竺平、谷云飞及杨柏霖设计; 实验过程由竺平与杨柏霖操作完成; 数据分析由林秋完成; 本论文写作由竺平与丁义江共同完成。

通讯作者: 谷云飞, 教授, 主任医师, 210029, 江苏省南京市汉中中路155号, 南京中医药大学附属医院肛肠科。guyunfei127@126.com
电话: 025-86617141

收稿日期: 2013-10-30 修回日期: 2013-12-03

接受日期: 2013-12-04 在线出版日期: 2014-02-08

Effects of gamboge in an orthotopic mouse model of colon cancer

Ping Zhu, Yun-Fei Gu, Bo-Lin Yang, Qiu Lin, Yi-Jiang Ding

Ping Zhu, the First Clinical Medical School, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Yun-Fei Gu, Bo-Lin Yang, Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Qiu Lin, Department of Colorectal Surgery, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, Jiangsu Province, China

Yi-Jiang Ding, Department of Colorectal Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2008457; and the Basic Research Priorities Program Foundation of Nanjing University of Chinese Medicine, No. 09XPY01

Correspondence to: Yun-Fei Gu, Professor, Chief Physician, Department of Colorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, 155 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. guyunfei127@126.com

Received: 2013-10-30 Revised: 2013-12-03

Accepted: 2013-12-04 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To study the antitumor and anti-metastatic effects of gamboge in an orthotopic mouse model developed with human colon cancer cell line HCT116.

METHODS: A colon cancer model was developed by surgical orthotopic implantation of green fluorescent protein (GFP)-expressing HCT 116 tumor in nude mice. Forty mice were equally randomized into four groups. Group 1 served as a negative control and received intragastric infusion of normal saline once daily. Group 2 received intraperitoneal injection of 5-fluorouracil at a dose of 25 mg/kg three times per week. Groups 3 and 4 received intragastric infusion of gamboge extract at a dose of 10 and 20 mg/kg, respectively, once daily. Each animal was checked for mortality and signs of morbidity every day. Primary tumor volume and metastasis for each animal were observed under a fluorescence imaging system twice a week, and body weights were measured as well. At the end of the experiment, all mice were sacrificed and open fluorescent images of tumors and metastases expressing GFP were acquired, and the tumor was removed from each mouse and weighed.

RESULTS: After initiation of different treatment regimens, the average tumor volume (mm^3) was significantly smaller in the gamboge (20 mg/kg) group than the control group at each observation point (d4: 104.5 ± 35.5 vs 164.1 ± 66.1 ; d7: 102.6 ± 53.8 vs 286.2 ± 132.0 ; d11: 137.6 ± 70.5 vs 324.4 ± 115.8 ; d14: 207.2 ± 101.7 vs 434.2 ± 169.3 ; d21: 229.8 ± 99.8 vs 480.4 ± 165.5 ; $P < 0.05$ for all). At the end of the study, the average tumor weight was significantly smaller in the gamboge group (20 mg/kg) than in the control group (0.58 ± 0.26 vs 0.92 ± 0.26 , $P < 0.05$). There were no statistical differences between the gamboge (20 mg/kg) group and 5-fluorouracil group, as well as between the gamboge (10 mg/kg) group and control group, in term of average tumor volume and weight ($P > 0.05$ for all). At the end of the experiment, open GFP imaging demonstrated that all groups presented metastasis of lymph nodes or the pancreas, although there were no significant differences between the four groups with regard to the metastasis rate ($P > 0.05$ for all). No significant morbidity or weight loss was found in all tumor-bearing mice.

■同行评议者

白雪, 副主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院普通外科

CONCLUSION: Gamboge at a dose of 20 mg/kg was able to suppress HCT 116 tumor growth in an orthotopic mouse model of colon cancer safely and effectively, and may possess clinical therapeutic potential for colorectal cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gamboge; HCT116; Nude mice; Orthotopic model; Colorectal cancer

Zhu P, Gu YF, Yang BL, Lin Q, Ding YJ. Effects of gamboge in an orthotopic mouse model of colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 476-482 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/476.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.476>

摘要

目的: 研究藤黄对人结肠癌HCT116细胞建立的裸鼠外科原位移植瘤生长及转移的抑制作用。

方法: 通过外科原位移植能表达绿色荧光蛋白人结肠癌HCT116细胞的方法建立裸鼠结肠癌模型。40只模型裸鼠随机分为对照组(G1), 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)组(G2), 10、20 mg/kg藤黄组(G3、G4), 每组10只。G1组采用生理盐水灌胃, 1次/d; G2组用25 mg/kg的5-FU进行腹腔灌注, 3次/wk; G3、G4组分别给予相应剂量的藤黄提取物灌胃, 1次/d。每天观察受试裸鼠的并发症及死亡情况, 2次/wk在体外荧光影像系统下观察移植肿瘤大小并测量裸鼠体质量, 实验终点处死所有受试裸鼠在开放荧光系统下观察肿瘤生长及转移情况, 切除移植肿瘤进行称体质量。

结果: 药物干预后, 20 mg/kg藤黄组各观察点的平均肿瘤体积(mm^3)均小于对照组(d4: 104.5 ± 35.5 vs 164.1 ± 66.1 ; d7: 102.6 ± 53.8 vs 286.2 ± 132.0 ; d11: 137.6 ± 70.5 vs 324.4 ± 115.8 ; d14: 207.2 ± 101.7 vs 434.2 ± 169.3 ; d21: 229.8 ± 99.8 vs 480.4 ± 165.5), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验终点20 mg/kg藤黄组的平均肿瘤质量轻于对照组($0.58 \text{ g} \pm 0.26 \text{ g}$ vs $0.92 \text{ g} \pm 0.26 \text{ g}$), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。20 mg/kg藤黄组与5-FU组之间比较, 10 mg/kg藤黄组与对照组比较, 无论是各观察点平均肿瘤体积还是实验终点肿瘤重量差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验终点开放体内荧光成像显示各组均出现了不同程度的胰腺及淋巴结转移, 比较组间淋巴结及胰腺转移率的差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验过程中各组实验动物均未出现药物相关的不

良反应, 各组荷瘤裸鼠的平均体质量未出现明显波动。

结论: 藤黄在达到一定干预剂量(20 mg/kg)后能安全有效地抑制人结肠癌HCT116细胞裸鼠原位移植瘤的生长, 可能具有潜在的临床抗结肠癌作用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 藤黄; HCT116; 裸鼠; 原位移植模型; 结肠癌

核心提示: 藤黄在达到一定干预剂量(20 mg/kg)后能有效地抑制人结肠癌HCT116细胞裸鼠原位移植瘤的生长, 该作用和5-氟尿嘧啶相似, 同时不会增加受试动物的不良反应, 提示藤黄可能具有潜在的临床抗结肠癌作用。

竺平, 谷云飞, 杨柏霖, 林秋, 丁义江. 藤黄对人结肠癌HCT116细胞裸鼠原位移植模型的作用. *世界华人消化杂志* 2014; 22(4): 476-482 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/476.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.476>

0 引言

结直肠癌是世界范围内发病率仅次于肺癌和乳腺癌的第三大恶性肿瘤, 每年约有120万的新增病例和60万死亡病例^[1]。近年来随着生活水平的提高和膳食结构的改变, 我国结直肠癌发病率和死亡率均呈上升趋势^[2]。以手术及放化疗为主的综合治疗目前仍然是结直肠癌的主要治疗方法^[3]。尽管近年来随着新型化疗药物如奥沙利铂, 伊立替康以及生物靶向制剂的应用将晚期结直肠癌的总生存期平均延长至2年左右^[4-6], 但5年生存率仍不能让人满意^[7], 且手术的风险以及放化疗带来的并发症常让医生和患者陷入两难困局。因此迫切需要发现能够有效治疗结直肠癌的新方法。近年来以紫杉醇、喜树碱衍生物为代表的诸多植物药显示出巨大抗肿瘤潜力, 因而得到越来越多的关注。研究证实中药藤黄及其主要成分藤黄酸可通过多种途径起到抑制肿瘤细胞的作用^[8-13]。我们的前期研究证明藤黄提取物可有效抑制人结肠癌HCT116细胞的生长^[14]。进一步研究发现这种抑制作用可能是通过调节Bax、Bcl-2、MLH-1、MSH2及p53等基因蛋白表达, 产生G₂/M期阻滞, 诱导细胞凋亡等途径实现的。为了明确藤黄对动物在体结肠肿瘤是否具有同样的作用, 我们在本研究中运用经过绿色荧光转染的HCT116细胞建立了裸鼠

■ 研发前沿

近年来许多植物药显示出巨大抗肿瘤潜力, 因而得到越来越多的关注。现代研究证实中药藤黄及其主要成分藤黄酸可通过抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管形成等多个途径起到抗恶性肿瘤的作用, 是一种多靶点的抗肿瘤天然药物。

■相关报道

藤黄中的主要抗肿瘤活性成分为藤黄酸和新藤黄酸。藤黄酸能够明显抑制人结肠癌细胞株SW480的增殖,诱导SW480细胞发生G₂/M期阻滞,其作用机制可能与抑制VEGFR2表达有关。新藤黄酸通过下调细胞周期蛋白cyclin D1、cyclin E的表达和上调P21、P27的表达,使HCT116细胞阻滞在G₀/G₁期,进而显著抑制HCT116细胞的增殖,并诱导其凋亡。

结肠癌原位移植模型,通过观察不同剂量藤黄干预后肿瘤的生长、转移情况,进一步确定藤黄的抗结直肠癌作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞株HCT116购自中国科学院上海细胞生物研究所;绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达质粒pEGFP-N3(-)购自美国BD Biosciences公司;逆转录病毒pLPCX购自日本Clontech Laboratories公司;RPMI 1640培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司;氯化钠注射液购自南京小营药业,浓度为250 mL: 2.25 g,批号为H32023209;5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)购自天津金耀氨基酸有限公司,浓度为10 mL: 0.25 g,批号为H12020959;藤黄购自南京中医药大学附属医院药剂科。♀ Balb/c裸鼠,鼠龄7 wk,体质量18-22 g购自扬州大学比较医学中心,实验动物许可证号为SCXK(苏)2007-0011,动物合格证号为0001868,在无特定病原体(specific-pathogen free, SPF)级屏障系统中进行饲养,饲料为钴60辐射灭菌过的大小鼠专用颗粒饲料购自江苏省协同医药生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HCT116-GFP细胞株的构建和筛选: (1)人结肠癌细胞株HCT116在含10%胎牛血清, 100 IU/mL青霉素, 100 IU/mL链霉素的DMEM培养液中, 37 °C、5%CO₂条件下培养, 传代; (2)绿色荧光蛋白逆转录病毒转染载体PT67-Plpcx-EGFP由南京源端生物科技公司参照文献[15]的方法构建。培养PT67-pLPCX-EGFP包装细胞, 收集包装细胞培养上清, 将上清分别加入培养的人结肠癌HCT116细胞中进行转染, 48 h后用含有浓度为800 µg/mL的新霉素(G418)进行筛选, 建立稳定表达GFP的细胞株, 配制成 1.5×10^7 /mL的绿色荧光蛋白转染的人结肠癌细胞(HCT116-GFP)。

1.2.2 藤黄的制备: 参照文献[14]的方法, 取藤黄200 g, 依次用8倍量、6倍量的950 mL/L乙醇回流提取两次, 每次1 h, 合并滤液, 浓缩至无醇味, 用蒸馏水稀释至200 mL, 得醇提取物。取醇提取物100 mL, 加蒸馏水稀释至500 mL, 氢氧化钠调pH至8, 离心(转速3000 r/min, 离心10 min), 取上清液得浓度为0.1 g/mL药液, 避光储存在4 °C环境下, 使用前用生理盐水分别配置成1和2 mg/mL的实验浓度。

1.2.3 裸鼠结肠癌原位荧光移植模型的建立: 所有动物实验均在东南大学实验物中心完成, 实验室使用许可证号为SYXK(苏)2007-0011。参照文献[16]的方法, 将浓度为 5×10^7 /mL HCT116-GFP细胞悬液分别皮下接种于2只Balb/c裸鼠背部, 每只0.1 mL。稳定传代2次, 当肿瘤达10 mm × 10 mm时从皮下移植处取出, 在RPMI 1640培养液中将瘤块修剪成1 mm × 1 mm大小, 准备进行原位移植。选取40只♀ Balb/c裸鼠, 对受体裸鼠采用肌肉注射麻醉, 在裸鼠左下腹部做一1 cm的纵切口, 剪开皮肤和腹膜, 暴露回盲部并将其提出腹膜外, ×8外科手术显微(ZOOM645S, 江南禹成光学仪器有限公司)切开结肠浆膜, 用8-0外科缝线(上海浦东金环医疗用品有限公司)将1个瘤块贯穿后缝入结肠浆膜内以形成原位移植瘤, 将结肠放回腹腔并固定在腹膜上, 5-0外科缝线(上海浦东金环医疗用品有限公司)关闭腹腔。所有手术操作均在超净工作台中完成。

1.2.4 实验动物分组及药物干预: 在原位移植后18 d, 肿瘤体积达80 mm³, 将40只原位移植模型裸鼠, 随机分成4组, 每组10只, 分别进行药物干预(表1)。

1.2.5 临床观察及肿瘤测量: 开始药物干预后, 每天观察实验动物的日常行为、全身性表现、皮肤毛发及死亡情况。每周2次测量实验动物的体质量。药物干预后3 wk, 当对照组平均肿瘤体积达到480 mm³或动物状态不佳为实验终点, 遵照动物福利原则处死所有存活的荷瘤鼠, 打开腹腔进行尸检, 检查原发肿瘤及转移情况。切除原发肿瘤进行称质量并计算抑瘤率, 抑瘤率 = (对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量) / 对照组平均瘤质量 × 100%。

1.2.6 肿瘤生长荧光成像: 每周2次运用IFLUOR-100小动物活体荧光影像系统(南京东图数码科技有限公司)对实验动物进行体外整体荧光成像, 观察体内原发肿瘤生长情况。实验终点将裸鼠解剖并进行开放式荧光成像, 根据绿色荧光的表达来判断原位移植瘤的生长及转移情况。每个时间位点选取典型的原发灶在荧光影像系统下拍摄分辨率为1392 × 1040的照片, 用Image-Pro 5.1(美国Media Cybernetics公司)测量裸鼠原位肿瘤的长径(L)和短径(W), 并根据公式 $(L \times W^2) \times 1/2$ 计算肿瘤体积(V)。

1.2.7 组织学分析: 开放式荧光成像后, 切除实验裸鼠全部原发肿瘤和转移灶, 用电子天平(TANITA® KO-160)对原发肿瘤称质量, 并立即将所取

表 1 给药方法和剂量

分组	试验药物	实验剂量(mg/kg)	给药剂量(μ L)	给药频率	给药途径
G1	0.9%氯化钠	—	200	1次/d	灌胃
G2	5-氟尿嘧啶	25	200	3次/wk	腹腔灌注
G3	藤黄	10	200	1次/d	灌胃
G4	藤黄	20	200	1次/d	灌胃

■创新盘点

本研究发现藤黄只有在较高剂量时才能有效抑制受试动物结肠原位移植瘤的生长,提示藤黄的抗结肠肿瘤作用可能是剂量依赖性的。有效剂量的藤黄并不会增加实验动物的不良反应。

表 2 药物干预前后不同时间点荧光测量原发肿瘤的平均体积(mm^3 , mean \pm SD)

分组	治疗方法	药物干预前	第4天	第7天	第11天	第14天	第21天
G1	对照组	82.8 \pm 23.9	164.1 \pm 66.1	286.2 \pm 132.0	324.4 \pm 115.8	434.2 \pm 169.3	480.4 \pm 165.5
G2	5-氟尿嘧啶	82.1 \pm 17.1	61.7 \pm 26.0 ^a	89.6 \pm 57.0 ^a	132.8 \pm 90.9 ^a	172.0 \pm 115.1 ^a	196.9 \pm 123.8 ^a
G3	藤黄(10 mg/kg)	84.5 \pm 29.4	138.3 \pm 45.1	267.2 \pm 150.4	312.6 \pm 167.2	374.8 \pm 250.4	423.3 \pm 289.1
G4	藤黄(20 mg/kg)	83.4 \pm 29.9	104.5 \pm 35.5 ^a	102.6 \pm 53.8 ^a	137.6 \pm 70.5 ^a	207.2 \pm 101.7 ^a	229.8 \pm 99.8 ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表 3 实验终点各组裸鼠原发肿瘤重量及抑瘤率

分组	治疗方法	肿瘤重量(g) (mean \pm SD)	P 值	抑瘤率(%)
G1	对照组	0.92 \pm 0.26	—	—
G2	5-氟尿嘧啶	0.51 \pm 0.28	0.003 ^a	45
G3	藤黄(10 mg/kg)	0.71 \pm 0.30	0.117 ^a	23
G4	藤黄(20 mg/kg)	0.58 \pm 0.26	0.010 ^a	37

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

标本置于 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮中, 2-3 h后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱中保存。另取部分原发肿瘤和转移灶置于4%甲醛中固定, 石蜡包埋并切片, 切片用H&E染色后通过显微镜观察病理性质。

统计学处理 采用SPSS17.0软件进行数据分析。计量资料用mean \pm SD表示, 采用 t 检验进行比较; 计数资料用%表示, 多组间比较采用 χ^2 检验或Fisher精确概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 藤黄对裸鼠原位移植肿瘤的抑制作用 药物干预后, 每周2次采用整体荧光影像技术测量肿瘤体积, 计算各组模型动物原发肿瘤的平均体积。药物干预3 wk为实验终点, 处死存活的实验动物, 切除原发肿瘤称质量。结果显示20 mg/kg藤黄组各观察点的平均肿瘤体积及实验终点的肿瘤重量与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2, 3), 与5-FU组比较差异无统计学意

义($P > 0.05$)(表2, 3); 10 mg/kg藤黄组无论是各观察点平均肿瘤体积还是实验终点肿瘤重量与对照组比较无明显差异($P > 0.05$)(表2, 3)。根据瘤质量计算抑瘤率, 20 mg/kg藤黄组和5-FU组的抑瘤率分别为37%和45%, 10 mg/kg藤黄组的抑瘤率为23%(表3)。

2.2 藤黄对肿瘤转移的作用 药物干预3 wk为实验终点。处死所有存活的实验动物, 开放体内荧光成像检查肿瘤生长及转移情况, 荧光系统发现了肠系膜淋巴结、腰淋巴结及胰腺转移灶(图1)。用 χ^2 检验对4组间淋巴转移情况进行比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 5.6000$, $P > 0.05$, 表4), 采用fisher精确概率法对胰腺转移情况进行分析, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 表4)。对切除标本进行H&E染色显示移植肿瘤及转移淋巴结均为低分化腺癌(图2)。

2.3 藤黄对裸鼠的不良反应观察 考虑到藤黄毒性较强, 为了明确实验剂量的藤黄对受试动物的影响, 我们每日观察并记录了裸鼠的日常行

■应用要点

本研究通过外科原位移植能表达绿色荧光蛋白HCT116肿瘤的方法建立了裸鼠结肠癌模型,使观察者无需借助麻醉、造影剂及侵入性手术等方式即可在体外对活体肿瘤的生长和转移进行实时追踪观察,从而减少实验动物的死亡和实验偏差,是评估抗肿瘤药物作用的理想载体。

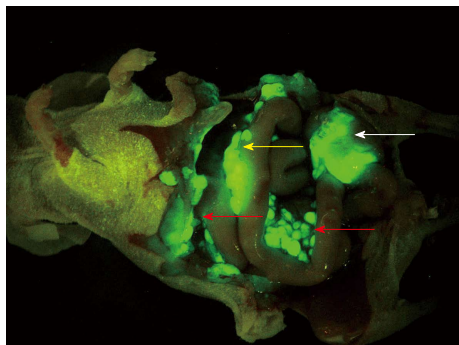


图1 开放荧光显示原位移植肿瘤,淋巴结及胰腺转移。白色箭头为结肠原位移植瘤;红色箭头为转移的淋巴结;黄色箭头为胰腺转移。

表4 实验终点时肿瘤转移情况

分组	治疗方法	淋巴结转移率	胰腺转移率
G1	对照组	7/10	1/10
G2	5-氟尿嘧啶	2/10	2/10
G3	藤黄(10 mg/kg)	6/10	5/10
G4	藤黄(20 mg/kg)	5/10	2/10

为、全身性表现、皮肤毛发及死亡情况,两个不同剂量藤黄组内的实验动物均未出现药物相关的不良反应,唯一的1只死亡系因肿瘤恶病质导致。每周测量裸鼠体质量2次,各组荷瘤裸鼠的平均体质量随着时间的推移逐渐减轻,但未出现明显波动(图3),4组裸鼠的最大体质量丢失量出现在药物干预后第21天(表5),均未超过基线体质量的20%。和对照组相比,20 mg/kg藤黄组和5-FU组的体质量丢失较少,而10 mg/kg藤黄组的体质量丢失较多(表5)。

3 讨论

藤黄系藤黄科植物藤黄树所分泌出的干燥树脂,主要产于东南亚地区,其性寒,味酸、辛、涩,有毒,具破血散结、解毒、止血、杀虫之功效,用于治疗瘰疬、痈疽、疔肿等顽疾^[17]。现代研究证明藤黄可通过多种机制起到抗肿瘤效果,是一种多靶点的抗肿瘤天然药物。藤黄抗癌研究协作组发现藤黄对小鼠腹水型肝癌ECA、S180、S37、ARA4、W256有抑制作用,对体外培养的人肝癌细胞BEL-7402与宫颈癌HeLa细胞株也有程度不等的抑制作用^[8]。刘若庸等^[9]证实合用藤黄能提高小鼠肿瘤MA737的放疗效果。我们的体外研究证实藤黄可以有效抑制人结肠癌细胞HCT116的增殖,可能是潜在的抗结肠癌中药^[14]。为了能更客观地评价藤黄的临床抗肿瘤

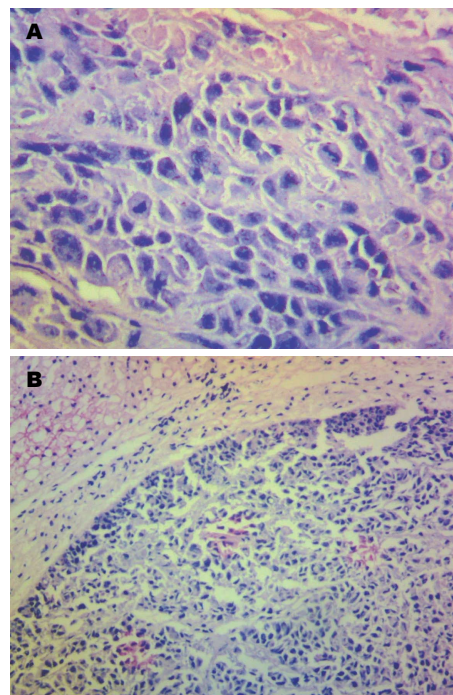


图2 病理结果显示原发肿瘤及转移的淋巴结均为低分化腺癌。A: 原位移植瘤(HE × 400); B: 转移的腰淋巴结(HE × 100)。

作用,还需要对能模拟人类结直肠癌特性的模型动物进行在体研究,否则无法提供有说服力的结果。

裸鼠皮下异种移植瘤模型虽然成瘤性高^[18],但由于生长环境的密闭性,导致该模型无法模拟人类结肠癌常见的局部和远处转移^[19]。基因工程鼠可表现出类似于人类结直肠癌的基因学特点,但在肿瘤生物学及肿瘤谱方面存在不小差距,如自发性成瘤时间较长、无远处转移、容易发生淋巴瘤而非结肠癌等,因此在合适的基因小鼠模型出现前,异种移植小鼠模型仍是进行抗结直肠癌药物疗效评价的最佳载体^[20]。我们利用绿色荧光转染的HCT116细胞建立了人结肠癌裸鼠外科原位移植模型(surgical orthotopic implantation, SOI),该模型是利用手术的方法将能稳定表达绿色荧光的结肠癌肿瘤组织原位移植到实验动物的结肠浆膜下,该模型可以为移植瘤提供最适宜的生长环境,具有和人类结直肠癌相似的生长和转移模式^[16,21]。通过选择性肿瘤荧光成像,观察者无需借助麻醉、造影剂及侵入性手术等方式即可在体外对活体肿瘤的生长和转移进行实时追踪观察,从而减少实验动物的死亡和实验偏差,是评估抗肿瘤药物作用的理想载体^[22]。

本研究结果显示,20 mg/kg藤黄具有显著

表 5 药物干预后裸鼠体质量变化情况

分组	治疗方法	裸鼠体质量(g) (d0)	裸鼠体质量(g) (d21)	最大体质量丢失量 (%)
G1	对照组	19.8 ± 0.9	17.2 ± 1.8	13
G2	5-氟尿嘧啶	19.9 ± 1.2	18.0 ± 2.1	9.5
G3	藤黄(10 mg/kg)	19.9 ± 0.9	16.6 ± 2.0	17
G4	藤黄(20 mg/kg)	20.2 ± 1.5	18.1 ± 2.4	10

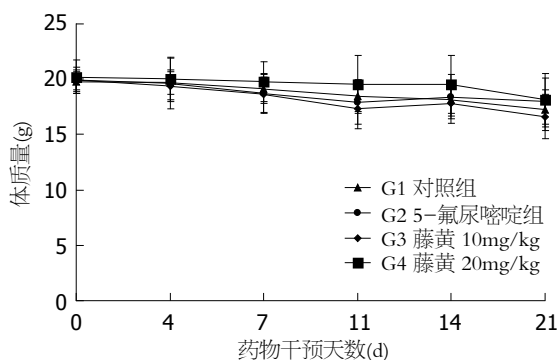


图 3 治疗期间各组模型动物的评价体质量变化。

抑制人结肠癌HCT116细胞裸鼠原位移植瘤生长的作用, 该作用与5-FU相似。10 mg/kg藤黄则对移植肿瘤的生长无明显抑制作用, 提示藤黄抗结肠癌的作用可能呈浓度依赖性, 这和我们之前应用藤黄对HCT116细胞进行体外干预的结果类似^[14]。藤黄中的藤黄酸、新藤黄酸为抗肿瘤作用的有效成分, 具有抗癌谱广, 毒性较低的特点^[23,24]。杨平等研究发现藤黄酸能够明显抑制人结肠癌细胞株SW480的增殖, 诱导SW480细胞发生G₂/M期阻滞, 其作用机制可能与抑制VEGFR2表达有关^[25]。周兰贞等^[26]研究发现新藤黄酸通过下调细胞周期蛋白cyclin D1、cyclin E的表达和上调P21、P27的表达, 使HCT116细胞阻滞在G₀/G₁期, 进而显著抑制HCT116细胞的增殖, 并诱导其凋亡。我们进一步的研究结果提示藤黄对HCT116的抑制作用可能是通过调节*Bax*、*Bcl-2*、*MLH-1*、*MSH2*及*p53*等基因蛋白表达, 产生G₂/M期阻滞, 诱导细胞凋亡等途径实现的。侵袭和转移是恶性肿瘤患者死亡的主要原因^[27], 转移的发生是一个多步骤的复杂过程, 包括细胞启动、细胞外基质蛋白水解、细胞外渗以及维持在远处脏器生长的能力等^[28]。本实验终点各组均出现了不同程度的淋巴结及胰腺转移, 但未出现人结直肠癌常见的肝脏转移, 这和我们之前的实验结果有所区别^[16,29], 可能和本研究观察时间较短以及裸鼠原位移植模型和人结肠癌的

转移模式仍存在一定的差异有关。通过对转移情况的比较发现, 各组间的淋巴结及胰腺转移无显著差异, 提示干预期间各组药物并未表现出显著地抑制肿瘤转移作用。藤黄具有一定的毒性, 大剂量的藤黄可导致恶心、呕吐及峻泻^[30], 为了明确藤黄对实验动物的影响, 我们对受试裸鼠的日常行为、全身性表现、皮肤毛发、死亡情况以及体质量变化情况进行观察, 不同剂量藤黄组的裸鼠未出现药物相关的不良反应。各组受试裸鼠的体质量随着肿瘤的生长而逐渐减轻, 但未出现明显波动, 20 mg/kg藤黄组和5-FU组的体质量丢失量少于对照组和10 mg/kg藤黄组。以上结果提示裸鼠体质量的减轻可能和肿瘤消耗而非药物毒性有关, 通过对肿瘤生长的有效抑制可减少裸鼠因肿瘤消耗而引起的体质量减轻, 较大剂量的藤黄在提高抑瘤作用的同时不会增加实验动物的不良反应。

本研究中利用可稳定表达绿色荧光的裸鼠原位移植结肠癌模型对藤黄抗结肠癌作用进行了探索研究, 目前国内外尚未见相似报道。研究结果提示较高剂量的藤黄显示出了和5-FU相似的肿瘤抑制效果, 同时不会增加受试动物的毒性反应, 提示藤黄是一种非常有潜力的结肠癌治疗药物。其作用机制如何? 增加干预剂量是否能提高藤黄抑制肿瘤生长及转移的作用? 这些问题仍需进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917 [PMID: 21351269 DOI: 10.1002/ijc.25516]
- 2 陈琼, 刘志才, 程兰平, 宋国慧, 孙喜斌, 郑荣寿, 张思维, 陈万青. 2003-2007年中国结直肠癌发病与死亡分析. *中国肿瘤* 2012; 21: 179-182
- 3 Minsky BD. Adjuvant therapy of resectable rectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2002; 28: 181-188 [PMID: 12363458 DOI: 10.1016/S0305-7372(02)00037-3]
- 4 Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocáková I, Ruff

同行评价

本文内容新颖, 结构层次清晰, 条理分明, 提供了充足的有意义的信息, 具有较高的学术价值。

- P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Wolf M, Gansert J. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4697-4705 [PMID: 20921465 DOI: 10.1200/JCO.2009.27.4860]
- 5 Sobrero A, Ackland S, Clarke S, Perez-Carrión R, Chiara S, Gapski J, Mainwaring P, Langer B, Young S. Phase IV study of bevacizumab in combination with infusional fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) in first-line metastatic colorectal cancer. *Oncology* 2009; 77: 113-119 [PMID: 19628950 DOI: 10.1159/000229787]
 - 6 Welch S, Spithoff K, Rumble RB, Maroun J. Bevacizumab combined with chemotherapy for patients with advanced colorectal cancer: a systematic review. *Ann Oncol* 2010; 21: 1152-1162 [PMID: 19942597]
 - 7 Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 476-487 [PMID: 15689586 DOI: 10.1056/NEJMra040958]
 - 8 藤黄抗癌研究协作组. 藤黄(总体)抗癌实验与临床研究报告. *江西医药* 1982; (3): 1-5
 - 9 刘若庸, 李德华, 王洁, 陈绮. 藤黄制剂与放疗合用对小鼠肿瘤MA737的疗效观察. *天津药学* 1989; (6): 6-7
 - 10 Lu N, Yang Y, You QD, Ling Y, Gao Y, Gu HY, Zhao L, Wang XT, Guo QL. Gambogic acid inhibits angiogenesis through suppressing vascular endothelial growth factor-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1. *Cancer Lett* 2007; 258: 80-89 [PMID: 17920764 DOI: 10.1016/j.canlet.2007.08.015]
 - 11 Yang Y, Yang L, You QD, Nie FF, Gu HY, Zhao L, Wang XT, Guo QL. Differential apoptotic induction of gambogic acid, a novel anticancer natural product, on hepatoma cells and normal hepatocytes. *Cancer Lett* 2007; 256: 259-266 [PMID: 17693016 DOI: 10.1016/j.canlet.2007.06.014]
 - 12 Yu J, Guo QL, You QD, Zhao L, Gu HY, Yang Y, Zhang HW, Tan Z, Wang X. Gambogic acid-induced G2/M phase cell-cycle arrest via disturbing CDK7-mediated phosphorylation of CDC2/p34 in human gastric carcinoma BGC-823 cells. *Carcinogenesis* 2007; 28: 632-638 [PMID: 17012222 DOI: 10.1093/carcin/bgl168]
 - 13 Huang H, Chen D, Li S, Li X, Liu N, Lu X, Liu S, Zhao K, Zhao C, Guo H, Yang C, Zhou P, Dong X, Zhang C, Guanmei QP, Liu J. Gambogic acid enhances proteasome inhibitor-induced anticancer activity. *Cancer Lett* 2011; 301: 221-228 [PMID: 21216092 DOI: 10.1016/j.canlet.2010.12.015]
 - 14 竺平, 谷云飞, 杨柏霖, 林秋, 陈红锦, 孙桂东, 丁义江. 有毒中药对人结肠癌HCT116和SW480细胞的生长抑制作用. *南京中医药大学学报* 2013; 29: 351-354
 - 15 Yang M, Jiang P, Sun FX, Hasegawa S, Baranov E, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Hoffman RM. A fluorescent orthotopic bone metastasis model of human prostate cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 781-786 [PMID: 10029062]
 - 16 Chen HJ, Yang BL, Chen YG, Lin Q, Zhang SP, Gu YF. A GFP-labeled human colon cancer metastasis model featuring surgical orthotopic implantation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 4263-4266 [PMID: 23167325 DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.9.4263]
 - 17 刘卫海, 赖小平, 周兴挺. 新藤黄酸的研究进展. *时珍国医国药* 2010; 21: 2347-2349
 - 18 Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Willson JK. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor beta receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 22044-22049 [PMID: 7665626 DOI: 10.1074/jbc.270.37.22044]
 - 19 Fu XY, Besterman JM, Monosov A, Hoffman RM. Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 9345-9349 [PMID: 1924398 DOI: 10.1073/pnas.88.20.9345]
 - 20 Taketo MM, Edelmann W. Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology* 2009; 136: 780-798 [PMID: 19263594]
 - 21 Rajput A, Dominguez San Martin I, Rose R, Beko A, Levea C, Sharratt E, Mazurchuk R, Hoffman RM, Brattain MG, Wang J. Characterization of HCT116 human colon cancer cells in an orthotopic model. *J Surg Res* 2008; 147: 276-281 [PMID: 17961596 DOI: 10.1016/j.jss.2007.04.021]
 - 22 Katz MH, Takimoto S, Spivack D, Moossa AR, Hoffman RM, Bouvet M. A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics. *J Surg Res* 2003; 113: 151-160 [PMID: 12943825 DOI: 10.1016/s0022-4804(03)00234-8]
 - 23 侯毅, 竺平, 陈昌岐, 朱秉宜, 谷云飞. 藤黄酸抗肿瘤机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 2412-2417
 - 24 刘卫海, 赖小平, 周兴挺. 新藤黄酸的研究进展. *时珍国医国药* 2010; 21: 2347-2349
 - 25 杨平, 曹杰, 张通, 王强, 孙政, 张伟健, 曾山崎. 藤黄酸对人结肠癌SW480细胞增殖及VEGFR2表达的影响. *中国中医基础医学杂志* 2012; 18: 520-522
 - 26 周兰贞, 晏烽根, 李庆林. 新藤黄酸诱导人结肠癌HCT116细胞凋亡的作用机制研究. *肿瘤* 2011; 31: 580-584
 - 27 Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 365-370 [PMID: 15846061]
 - 28 Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 55-63 [PMID: 12509767 DOI: 10.1038/nrc967]
 - 29 Yang BL, Chen HJ, Chen YG, Gu YF, Zhang SP, Lin Q, Sun Y. Inhibitory effects of baicalin on orthotopic xenografts of colorectal cancer cells that are deficient in a mismatch repair gene in nude mice. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28: 547-553 [PMID: 22914965 DOI: 10.1007/s00384-012-1562-z]
 - 30 Panthong A, Norkaew P, Kanjanapothi D, Taesotikul T, Anantachoke N, Reutrakul V. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboge from *Garcinia hanburyi* Hook f. *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 335-340 [PMID: 17360136]

编辑 田滢 电编 闫晋利



不同剂量咪唑安定在肥胖患者无痛胃肠镜麻醉中的作用

李红培, 李皓, 刘毅, 张宏

李红培, 李皓, 刘毅, 张宏, 中国人民解放军总医院麻醉手术中心 北京市 100853

李红培, 医师, 在读硕士, 主要从事临床麻醉学的研究。

作者贡献分布: 本文研究设计由李红培与李皓完成; 手术中麻醉由李红培与李皓完成; 刘毅与张宏共同参与本研究。

通讯作者: 张宏, 教授, 主任医师, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院麻醉手术中心。

zhanghong_301@163.com

收稿日期: 2013-11-11 修回日期: 2013-12-05

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

Midazolam for painless gastrointestinal endoscopy in obese patients

Hong-Pei Li, Hao Li, Yi Liu, Hong Zhang

Hong-Pei Li, Hao Li, Yi Liu, Hong Zhang, Anesthesia and Operation Center, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Hong Zhang, Professor, Chief Physician, Anesthesia and Operation Center, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. zhanghong_301@163.com

Received: 2013-11-11 Revised: 2013-12-05

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To assess the efficacy and safety of different doses of midazolam for gastrointestinal endoscopy in obese patients.

METHODS: One hundred and twenty-six patients who underwent painless gastroscopy were randomly divided into four groups: A, B, C and D. Groups A, B, and C were intravenously given 0.01, 0.02, and 0.03 mg/kg of midazolam before the examination, respectively, while group D was not given midazolam. All patients were intravenously given fentanyl 1 µg/kg and propofol 1.0-2.0 mg/kg 3 min later. If the patient had somatic reaction, an additional propofol 0.3-0.5 mg/kg was given. The blood pressure (BP), heart rate (HR), SpO₂, the initial and total doses of propofol, side effects, as well as the patient's and doctor's satisfaction were recorded.

RESULTS: The initial dose of propofol in groups A, B and C (95.62 mg ± 16.59 mg, 87.50 mg ± 13.81 mg, 79.09 mg ± 16.74 mg) were sig-

nificantly less than that in group D (126.67 mg ± 20.48 mg) ($P < 0.05$ for all), while the total dose of propofol were less in groups B and C than in group D ($P < 0.05$ for both), but had no statistical difference between groups A and D. The rates of hypoxemia and assisted ventilation in groups A, B and C (3.03%, 3.33%, 12.12%) were lower than that in group D (26.67%) ($P < 0.05$ for all), but the incidence of dizziness and sleepiness in group C (51.51%) was significantly higher than those in the other groups ($P < 0.05$ for all).

CONCLUSION: In obese patients, application of midazolam in painless gastrointestinal endoscopy is simple, safe and effective.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Midazolam; Obesity; Gastrointestinal endoscopy

Li HP, Li H, Liu Y, Zhang H. Midazolam for painless gastrointestinal endoscopy in obese patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 483-487 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/483.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.483>

摘要

目的: 观察不同剂量咪唑安定用于肥胖患者无痛胃肠镜检查中的安全性以及最佳剂量。

方法: 126例肥胖患者随机分为A、B、C、D 4组。A、B、C 3组于镜检前分别静脉推注咪唑安定剂量0.01、0.02、0.03 mg/kg, D组为对照组, 不使用咪唑安定。同时4组患者静脉滴注芬太尼1 µg/kg, 3 min后缓慢静脉推注异丙酚1.0-2.0 mg/kg, 至患者睫毛反射消失, 进入睡眠状态后给予镜检。术中如有体动反应, 追加异丙酚0.3-0.5 mg/kg, 每次30-50 mg。观察各组血压、心率、SpO₂、异丙酚用量以及不良反应的发生。记录患者和镜检医生的满意度。

结果: A、B、C组异丙酚首次剂量分别为95.62 mg ± 16.59 mg、87.50 mg ± 13.81 mg以及79.09 mg ± 16.74 mg明显少于D组(126.67 mg ± 20.48 mg, 具有统计学差异($P < 0.05$), 异

■背景资料

肥胖常复合糖尿病、高血压、阻塞性睡眠呼吸暂停综合征、代谢综合征等疾病。肥胖患者下颌肥厚和胸部脂肪限制寰枢关节运动及颈椎屈曲, 颌下脂肪使开口受限, 舌体、口内软组织肥厚可造成气道狭窄, 使得麻醉风险尤其是呼吸风险大大增加。建立合理的麻醉方案对于肥胖患者无痛胃肠镜检查尤为重要。

■同行评议者

张庆瑜, 教授, 主任医师, 天津医科大学总医院科研处

■研发前沿

肥胖患者由于肥胖和自身气道的因素使其麻醉的难度和风险较正常患者加大。肥胖患者采用联合用药,咪唑安定0.02 mg/kg既能减少异丙酚的用药首剂量和总剂量,同时并发症少苏醒快,满足术中镇静深度的要求,又能保证循环和呼吸功能的稳定。

丙酚总量B、C组($128.83 \text{ mg} \pm 22.65 \text{ mg}$)和($125.30 \text{ mg} \pm 26.95 \text{ mg}$)明显少于D组($157.23 \text{ mg} \pm 33.39 \text{ mg}$)($P < 0.05$), A组($146.64 \text{ mg} \pm 28.03 \text{ mg}$)与D组无统计学差异($P > 0.05$)。A、B、C组术中低氧血症和面罩辅助呼吸发生率(3.03%、3.33%、12.12%)较D组(26.67%)减少,但C组头晕嗜睡情况发生率(51.51%)明显高于其他各组(15.15%、20.00%、13.33%)($P < 0.05$)。

结论:咪唑安定-芬太尼-异丙酚复合麻醉用于肥胖患者无痛胃肠镜检查是安全的,咪唑安定0.02 mg/kg既能减少异丙酚的用药首剂量和总剂量,同时并发症少苏醒快,可作为推荐剂量。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:咪唑安定;肥胖;无痛胃肠镜

核心提示:本文观察了不同剂量咪唑安定用于肥胖患者无痛胃肠镜检查中的安全性以及最佳剂量,经过观察得出咪唑安定-芬太尼-异丙酚复合麻醉用于肥胖患者无痛胃肠镜检查是安全的,咪唑安定0.02 mg/kg既能减少异丙酚的用药首剂量和总剂量,同时并发症少苏醒快,可作为推荐剂量。

李红培, 李皓, 刘毅, 张宏. 不同剂量咪唑安定在肥胖患者无痛胃肠镜麻醉中的作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 483-487
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/483.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.483>

0 引言

无痛胃肠镜检查术已广泛开展,其优点突出,越来越受到认可^[1,2]。同时随着人民生活水平的提高,临床工作中肥胖患者比例也越来越高,此类患者行无痛胃肠镜风险远高于正常体质量者。本研究采用咪唑安定复合芬太尼异丙酚联合用药用于我院体检中心无痛胃肠镜检查的麻醉,旨在讨论不同剂量咪唑安定用于肥胖患者无痛胃肠镜检查中的安全性以及最佳剂量。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2013-05/2013-08于我院健康体检中心行无痛胃肠镜检查的患者126例,其中男111例,女15例,美国麻醉医师协会(American Society of Anesthesiologists, ASA)分级 I - II级,年龄27-63岁,体质量指数(body mass index, BMI) $> 28 \text{ kg/m}^2$,一般情况良好。所有病例均在胃肠镜前行血常规、肝肾功、电解质、心电图、胸片检查,术前均无麻醉药物过敏史以及

胃潴留、上消化道大出血、重度贫血、心肺疾病等病史,检查时间8-25 min。采用随机对照开放式研究方法,将符合纳入、排除标准的126例患者根据就诊顺序,按随机数字表法分为4组: A组为0.01 mg/kg组、B组为0.02 mg/kg组、C组为0.03 mg/kg组和D组为对照组。所有患者于术前签署胃肠镜及经静脉药物麻醉知情同意。

1.2 方法

1.2.1 麻醉:患者左侧卧位,内窥镜面罩吸氧,常规监测:心电图、每隔5 min测量无创血压、持续脉搏氧饱和度。A、B、C三组于镜检前分别静脉推注咪唑安定(江苏安华药业公司)剂量0.01、0.02、0.03 mg/kg, D组为对照组,不使用咪唑安定。同时4组患者静脉滴注芬太尼1 $\mu\text{g/kg}$, 3 min后缓慢静脉推注异丙酚(Astrazeneca公司)1.0-2.0 mg/kg,至患者睫毛反射消失,进入睡眠状态后给予镜检。术中如有体动反应,追加异丙酚0.3-0.5 mg/kg,每次30-50 mg。检查过程中严密监测血压(blood pressure, BP)、心率(heart rate, HR)、静脉血氧饱和度(venous oxygen saturation, SpO₂)以及患者的反应。SpO₂ $< 90\%$ 时托下颌使呼吸道通畅,持续时间 $> 1 \text{ min}$ 则面罩加压给氧,必要时给予气管插管控制气道。术中当收缩压(systolic blood pressure, SBP)低于90 mmHg,给予麻黄素10 mg处理;当HR低于50次/min,给予阿托品0.5 mg直至HR > 50 次/min为止。整个实验过程中各参与者的分工固定,由技术熟练的消化内镜医生进行内镜操作。

1.2.2 观察指标:(1)监测数据:记录术前、术中及术后SpO₂、HR、BP、麻醉后意识消失时间、手术时间(胃镜开始至肠镜结束的时间)、苏醒时间(回答切题,定向明确),患者苏醒后停止吸氧10 min后SpO₂,记录异丙酚的首次剂量,结束时异丙酚总剂量;(2)并发症:观察镜检中低氧血症(SpO₂ $< 90\%$)、心动过缓(HR < 50 次/min)、低血压(SBP $<$ 术前70%或 $< 90 \text{ mmHg}$)、术后恶心呕吐、头晕、嗜睡等发生情况;(3)满意度:镜检结束询问患者知晓情况,术后行镜检医生满意度评分(百分制)及患者整体满意度评分(5分为优,无任何痛苦;4分为良,有轻痛;3分为一般,多处不适但可以忍受;2分为差,很不舒适、痛苦不堪;1分为极差,十分痛苦以致无法忍受)。

统计学处理 应用SPSS19.0软件,计量资料以mean \pm SD表示,采用方差分析,计数资料采用 χ^2 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

■相关报道

国内外文献报道应用咪唑安定以及芬太尼与异丙酚合用时,异丙酚的用量可以减少,在达到检查所需麻醉深度的同时,减少了各种并发症的发生率。

表 1 各组患者一般资料、术者及患者满意度评分比较(mean ± SD)

分组	<i>n</i>	性别 (男/女)	年龄 (岁)	体质量指数 (kg/m ²)	手术时间 (min)	镜检医生 满意度评分	患者满意 度评分
A	33	27/6	48.18 ± 7.25	29.74 ± 1.82	14.75 ± 4.50	97.57 ± 1.63	4.97 ± 0.18
B	30	27/3	48.20 ± 6.78	29.59 ± 1.44	12.60 ± 3.02	97.50 ± 1.71	5.00 ± 0.00
C	33	29/4	48.09 ± 7.21	31.14 ± 3.33	27.74 ± 1.82	97.87 ± 1.90	5.00 ± 0.00
D	30	28/2	47.40 ± 8.00	30.19 ± 2.06	27.74 ± 1.82	97.00 ± 1.48	4.90 ± 0.30

表 2 患者生命体征变化比较(mean ± SD)

分 组	入室			胃镜开始		肠镜开始		出室		SpO ₂
	HR (次/min)	BP (mmHg)	SpO ₂	HR (次/min)	BP (mmHg)	HR (次/min)	BP (mmHg)	HR (次/min)	BP (mmHg)	
A	76.42 ± 11.26	129.81 ± 84.79	97.45 ± 1.52	74.85 ± 10.91	118.76 ± 13.74/77.60 ± 12.52	67.21 ± 10.04	114.39 ± 12.49/70.21 ± 11.36	65.72 ± 9.21	114.88 ± 11.43/71.06 ± 9.97	97.93 ± 1.53
B	75.83 ± 8.03	136.00 ± 82.97	97.27 ± 1.43	75.20 ± 10.83	124.97 ± 15.03/78.33 ± 12.44	68.86 ± 9.80	116.43 ± 12.25/72.77 ± 11.64	68.93 ± 8.17	116.63 ± 9.30/72.63 ± 10.10	97.76 ± 1.73
C	74.75 ± 12.78	135.18 ± 89.54	97.21 ± 1.57	73.82 ± 10.35	125.24 ± 16.09/80.84 ± 16.32	69.24 ± 9.35	119.57 ± 14.79/72.97 ± 13.19	69.27 ± 8.75	120.67 ± 11.01/75.88 ± 12.09	97.78 ± 1.69
D	72.50 ± 12.78	136.67 ± 85.5	97.10 ± 1.37	70.93 ± 10.11	124.10 ± 20.43/80.2 ± 15.81	68.17 ± 10.00	117.90 ± 16.36/75.27 ± 14.46	66.40 ± 10.04	118.90 ± 15.45/75.10 ± 11.10	97.50 ± 1.37

A组: 0.01mg/kg组; B组: 0.02 mg/kg组; C组: 0.03 mg/kg组; D组: 对照组. BP: 血压; HR: 心率; SpO₂: 静脉血氧饱和度.

2 结果

2.1 各组患者一般资料、患者知晓情况及满意度评分比较 4组间年龄、性别、手术时间、BMI等相比, 无统计学差异. 各组患者均无术中知晓, 患者及镜检医生满意度评分各组之间无统计学差异(表1).

2.2 各组间患者生命体征变化比较 对比4组受检者胃镜检查操作前、中、后的生命体征(血压、心率、血氧饱和度数值)变化(表2). 4组收缩压及舒张压均成先下降后回升的态势, 操作过程中均控制在正常范围内. 心率与血压表现相似, 差异无显著性. 4组患者出室SpO₂均有下降, 但在正常范围内.

2.3 麻醉药物用量以及苏醒时间比较 各组苏醒时间均无差异显著性. A、B、C组异丙酚首次剂量分别为95.62 mg ± 16.59 mg、87.50 mg ± 13.81 mg以及79.09 mg ± 16.74 mg明显少于D组(126.67 mg ± 20.48 mg), 具有统计学差异($P < 0.05$), 异丙酚总量B、C组(128.83 mg ± 22.65 mg)和(125.30 mg ± 26.95 mg)明显少于D组(157.23 mg ± 33.39 mg)($P < 0.05$), A组(146.64 mg ± 28.03 mg)与D组无统计学差异($P > 0.05$). 苏醒后10 min SpO₂均低于入室氧饱和度, 但仍在正

常范围之内, $>95\%$ ($P > 0.05$)(表3).

2.4 各组间不良反应情况比较 各组均无苏醒延迟发生. 由于术前常规给予托烷司琼等止吐药物, 故而各组均无恶心呕吐发生. 心动过缓以及低血压均在D组发生, 但与A、B、C组比较无统计学差异. 随着咪唑安定用量增加, 异丙酚首剂量的减少, A、B、C组术中低氧血症和面罩辅助呼吸发生率(3.03%、3.33%、12.12%)较D组(26.67%)减少($P < 0.05$), 给予托举下颌以及面罩加压通气等方法均得以缓解. 但随着咪唑安定用量的逐渐增加, 头晕嗜睡的发生率却相应增加, C组头晕嗜睡情况发生率(51.51%)明显高于其他各组(15.15%、20.00%、13.33%)($P < 0.05$)(表4).

3 讨论

胃肠镜检查是目前消化系统疾病诊治中最直接有效的检查方法, 应用普遍, 但检查过程中会给患者带来一定程度的痛苦^[1]. 应用镇静麻醉开展无痛胃肠镜检查可以大大降低检查过程中不适感, 提高患者的舒适度和满意度^[2], 同时也增加了患者的依从性, 方便了检查者的操作.

体质量指数(body mass index, BMI)是一种近年来国际流行的标准体质量测量方法, 是世

■创新盘点

作者认为单用异丙酚或者异丙酚联合用药静脉麻醉都可以用于肥胖患者, 但在肥胖患者联合用药的药物配伍组合及用药剂量的选择, 国内外文献报道较少. 本文论证了咪唑安定0.02 mg/kg可作为推荐剂量有较强的实用意义.

■应用要点

咪唑安定-芬太尼-异丙酚复合麻醉用于肥胖患者无痛胃肠镜检查,起到了良好的镇静镇痛效果,还能消除单用丙泊酚麻醉的小足。患者不良反应少、麻醉效果好。该方法提高了肥胖患者无痛胃肠镜检查的安全性,值得临床推广。

表 3 麻醉药物用量以及苏醒时间比较(mean ± SD)

分组	n	异丙酚首剂量(mg)	异丙酚总量(mg)	苏醒时间(min)	苏醒后10 min SPO ₂
A	33	95.62 ± 16.59 ^a	146.64 ± 28.03	14.60 ± 4.53	95.44 ± 1.93
B	30	87.50 ± 13.81 ^a	128.83 ± 22.65 ^a	12.60 ± 3.02	95.27 ± 1.85
C	33	79.09 ± 16.74 ^a	125.30 ± 26.95 ^a	13.42 ± 3.31	95.00 ± 2.44
D	30	126.67 ± 20.48	157.23 ± 33.39	14.10 ± 3.90	95.70 ± 1.72

^aP<0.05 vs D组。A组: 0.01 mg/kg组; B组: 0.02 mg/kg组; C组: 0.03 mg/kg组; D组: 对照组。

表 4 不良反应情况比较(mean ± SD)

分组	n	术中					术后
		低血压	心动过缓	低氧血症	恶心呕吐	头晕嗜睡	
A	33	0	0	1 ^a	0	5	0
B	30	0	0	1 ^a	0	6	0
C	33	0	1	4 ^a	0	17 ^a	0
D	30	1	2	8	0	4	0

^aP<0.05 vs D组。A组: 0.01 mg/kg组; B组: 0.02 mg/kg组; C组: 0.03 mg/kg组; D组: 对照组。

世界卫生组织(WHO)推荐的国际统一使用的肥胖分型标准参数^[3]。BMI = 体质量(kg)/身高(m)²。中华人民共和国国家卫生与计划生育委员会在2013年制定的成人体质量判定中制定了中国标准,当BMI>28 kg/m²为肥胖。肥胖常与糖尿病、高血压、阻塞性睡眠呼吸暂停综合征、代谢综合征等危险因素相伴出现^[4,5],肥胖患者下颌肥厚和胸部脂肪限制寰枢关节运动及颈椎屈曲,颌下脂肪使开口受限,舌体、口内软组织肥厚可造成气道狭窄,使得麻醉风险尤其是呼吸道风险大大增加。肥胖患者进行无痛胃肠镜检查,单独使用异丙酚达到所需的麻醉深度,剂量往往较大,容易导致麻醉偏深,出现苏醒延迟以及循环抑制等并发症^[6,7]。同时由于自身气道条件,咽部空间小以及氧储备能力差,异丙酚促进咽部的塌陷,易造成呼吸道梗阻,发生低氧血症^[8]。在上消化道胃镜操作中,内镜从口插入,这迫使麻醉医生与镜检医生共用气道,给麻醉医生的工作带来了更大的挑战^[9]。故而本研究采取咪唑安定复合异丙酚及麻醉性镇痛药物的联合用药旨在减少不良反应的发生。国内文献报道应用咪唑安定以及芬太尼与异丙酚合用时,异丙酚的用量可以减少,在达到检查所需麻醉深度的同时,减少了各种并发症的发生率^[10,11]。然而肥胖患者咪唑安定剂量的选择如何才能既能满足术中镇静深度的要求,又能保证循环和呼吸功能的稳定,是临床麻醉医师所关心的问题^[12],

国内外文献中相关报道较少。本研究在确定联合用药优于单一用药的基础上,探讨更适合肥胖患者的用药组合及用药剂量。

由于体检中心患者多为门诊患者,因此研究设定咪唑安定采用小剂量,在复合芬太尼、异丙酚后,A、B、C组在达到睡眠状态所用的异丙酚首次剂量明显减少,在异丙酚总量的统计中,B、C组明显减少。异丙酚首剂量减少,能减少肥胖患者在镜检初期发生呼吸抑制以及低氧的风险。有研究表明,无痛胃镜联合肠镜检查中,先进行无痛胃镜检查的总异丙酚剂量要小于先进行肠镜检查,这与胃镜检查对咽部的刺激较大有关^[13]。本研究中均先进行胃镜检查再进行肠镜检查的顺序,降低了发生误吸的风险。以异丙酚为主辅以小剂量咪唑安定和芬太尼可有效地减轻或消除心因性应激或内镜检查所带来的某些不良反应^[14]。三药合用可以减少每种药物的用量和不良反应,从而更大的发挥每种药物的优势,并且随着咪唑安定的剂量增加,达到胃肠镜检查所需麻醉深度的异丙酚的首剂量减少,这样既能满足操作者镜检过程的要求,同时减少肥胖患者呼吸抑制等围术期不良事件的发生。

随着异丙酚用量的增加,心动过缓及低血压的发生率也相应增多,导致麻黄素及阿托品使用增加,提示异丙酚用量增大对循环系统也有相应的抑制作用^[15,16]。复合使用咪唑安定后减少了异丙酚的用量,提高了无痛胃肠镜检查麻醉

的平稳性。4组患者在检查过程中均出现了不同程度的低氧血症, 包括呼吸变慢、呼吸抑制、潮气量减少等。D组患者中 SpO_2 下降者明显增多($\text{SpO}_2 < 90\%$ 者占26.7%), 因 SpO_2 过低, 不得不暂停检查、采取面罩加压给氧或口咽通气道等措施改善缺氧症状4例, 从而延误了胃肠镜检查时间。而A、B组患者中大多数能维持 SpO_2 在正常水平, 各仅1例 SpO_2 低于90%, 均可托举下颌后缓解。C组患者中4例发生低氧血症, 但与A、B组无统计学差异, 说明咪唑安定的复合可以减少肥胖患者低氧血症的发生率, 提高无痛胃肠镜检查术的安全性。同时, 复合使用咪唑安定的组中与未使用咪唑安定的组中均无恶心呕吐、苏醒延迟的发生。但随着咪唑安定用量的逐渐增加, C组患者苏醒后头晕嗜睡的发生明显增高, 使得在患者离院时间延长, 离开医院后增加了一定得风险。咪唑安定在0.03 mg/kg及以上, 肥胖患者嗜睡发生率明显高于0.01 mg/kg以及0.02 mg/kg组, 增加了患者术后呼吸抑制发生的风险, 因此不推荐使用咪唑安定使用剂量超过0.03 mg/kg。

总之, 咪唑安定-芬太尼-异丙酚复合麻醉用于肥胖患者无痛胃肠镜检查, 起到了良好的镇静镇痛效果, 提高了肥胖患者检查的安全性, 值得临床推广。咪唑安定0.02 mg/kg既能减少异丙酚的用药首剂量和总剂量, 同时并发症少苏醒快, 能降低血氧症、呼吸循环抑制、苏醒延迟、头晕嗜睡等不良反应的发生, 可作为推荐剂量。

4 参考文献

- 1 李妍蔚. 麻醉药物在无痛消化内镜中的应用研究. 胃肠病学 2010; 15: 632-634
- 2 姜陆洋, 冯艺. 镇静镇痛药在无痛胃肠镜检查中的应用. 临床药物治疗杂志 2012; 10: 25-28
- 3 朱智明, 段立平, 臧贵明, 费宇行, 高连如, 张照馥, 石湘芸. 应用3种肥胖判定计算方法及标准对2825例成人肥胖判定结果的对比分析. 中国临床康复 2004; 8: 2810-2811
- 4 庞华英, 尚汉翼, 朱宝宽. 关于中国人肥胖标准的探讨. 医学研究通讯 2002; 31: 45-48
- 5 Fanti L, Agostoni M, Gemma M, Radaelli F, Conigliaro R, Beretta L, Rossi G, Guslandi M, Testoni PA. Sedation and monitoring for gastrointestinal endoscopy: A nationwide web survey in Italy. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 726-730 [PMID: 21640673 DOI: 10.1016/j.dld.2011.04.012]
- 6 Madan AK, Tichansky DS, Isom J, Minard G, Bee TK. Monitored anesthesia care with propofol versus surgeon-monitored sedation with benzodiazepines and narcotics for preoperative endoscopy in the morbidly obese. *Obes Surg* 2008; 18: 545-548 [PMID: 18386111 DOI: 10.1007/s11695-007-9338-1]
- 7 舒丽娟, 魏新川. 联合用药在肥胖患者无痛胃镜中的应用. 实用医学杂志 2011; 22: 4142-4144
- 8 Bale E, Berreth R. The obese patient. Anaesthetic issues: airway and positioning. *J Perioper Pract* 2010; 20: 294-299 [PMID: 20860190]
- 9 金华, 衡新华, 李德亮, 唐天云, 李勇军, 唐晓丹. 胃镜检查患者异丙酚复合咪唑安定、芬太尼麻醉的效果. 中华麻醉学杂志 2006; 26: 375-376
- 10 Beitz A, Riphaut A, Meining A, Kronshage T, Geist C, Wagenpfeil S, Weber A, Jung A, Bajbouj M, Pox C, Schneider G, Schmid RM, Wehrmann T, von Delius S. Capnographic monitoring reduces the incidence of arterial oxygen desaturation and hypoxemia during propofol sedation for colonoscopy: a randomized, controlled study (ColoCap Study). *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1205-1212 [PMID: 22641306 DOI: 10.1038/ajg.2012.136]
- 11 Heuss LT, Froehlich F, Beglinger C. Nonanesthesiologist-administered propofol sedation: from the exception to standard practice. Sedation and monitoring trends over 20 years. *Endoscopy* 2012; 44: 504-511 [PMID: 22389232 DOI: 10.1055/s-0031-1291668]
- 12 宗明江, 赵豫华, 周丽萍, 常存, 邢书生, 李志强, 李清. 咪唑安定或丙泊酚伍用芬太尼对镇静深度和呼吸、循环的影响. 临床麻醉学杂志 2005; 21: 13-16
- 13 孙昕, 王园园, 王青. 麻醉下胃肠镜联合检查不同时序的效果. 中华现代护理杂志 2010; 16: 330-333
- 14 杨恒, 骆宏. 酒石酸布托啡诺复合丙泊酚、咪达唑仑在胃肠镜检查中的应用. 临床麻醉学杂志 2011; 27: 825-826
- 15 Padmanabhan U, Leslie K. Australian anaesthetists' practice of sedation for gastrointestinal endoscopy in adult patients. *Anaesth Intensive Care* 2008; 36: 436-441 [PMID: 18564807]
- 16 Faigel DO, Baron TH, Goldstein JL, Hirota WK, Jacobson BC, Johanson JF, Leighton JA, Mallery JS, Peterson KA, Waring JP, Fanelli RD, Wheeler-Harbaugh J. Guidelines for the use of deep sedation and anesthesia for GI endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 613-617 [PMID: 12397263]

同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 对临床内镜麻醉具有实用价值和指导意义。

编辑 田滢 电编 闫晋利



胃食管反流病中西医治疗的进展

汪晓奕, 朱凌云

■背景资料

作为消化系统中的一种常见病, 尽管胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)呈现出一个良性过程, 但其症状本身却可严重影响患者的日常生活, 且其发病率正逐年升高, 因而也成为了当今消化领域中的一个热点, 对其深入的研究具有重要的临床意义。

汪晓奕, 朱凌云, 上海市中医医院消化内科 上海市 200071
汪晓奕, 硕士, 主要从事中医消化内科的研究。
作者贡献分布: 本文综述由汪晓奕完成; 朱凌云审核。
通讯作者: 朱凌云, 副教授, 主任医师, 200071, 上海市闸北区芷江中路274号, 上海市中医医院消化内科。
zhulingyun2211@hotmail.com
电话: 021-56639828
收稿日期: 2013-09-11 修回日期: 2013-11-19
接受日期: 2013-12-05 在线出版日期: 2014-02-08

Progress in treatment of gastroesophageal reflux disease by traditional Chinese medicine and Western medicine

Xiao-Yi Wang, Ling-Yun Zhu

Xiao-Yi Wang, Ling-Yun Zhu, Department of Gastroenterology, Shanghai Traditional Chinese Medicine Hospital, Shanghai 200071, China
Correspondence to: Ling-Yun Zhu, Associate Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Shanghai Traditional Chinese Medicine Hospital, 274 Zhijiang Middle Road, Zhabei District, Shanghai 200071, China. zhulingyun2211@hotmail.com
Received: 2013-09-11 Revised: 2013-11-19
Accepted: 2013-12-05 Published online: 2014-02-08

Abstract

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is one of the most common digestive system diseases. Although the disease is benign, its symptoms can seriously affect the patient's daily life. The etiology and pathogenesis of GERD are complex. Currently, great progress has been made in the diagnosis of GERD; however, its treatment is still confined to the inhibition of gastric acid secretion, with the use of proton pump inhibitors (PPIs) being the main means of treatment. However, long-term use or discontinued use of PPIs has many disadvantages and limitations. Traditional Chinese medicine based on disease differentiation treatment combined with syndrome differentiation treatment is a comprehensive treatment and has certain advantages in the treatment of GERD.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gastroesophageal reflux disease; Pathogenesis; Traditional Chinese medicine; Western medicine; Proton pump inhibitors

Wang XY, Zhu LY. Progress in treatment of gastroesophageal reflux disease by traditional Chinese medicine and Western medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 488-493 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/488.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.488>

摘要

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)作为消化系统中最常见的疾病之一, 尽管该疾病呈现一个良性过程, 但症状本身却可严重影响患者的日常生活. 其病因及发病机制复杂, 目前西医在诊断GERD方面取得了较大进步, 但在治疗方面仍然以抑制胃酸分泌, 尤其是质子泵抑制剂(pump inhibitors, PPI)的使用作为主要手段. 但长期维持或一旦停用此类药物后均有其局限性. 中医药作为一种综合治疗手段, 基于中医传统理论, 通过辨病论治与辨证施治相结合的方法对该病进行对因对症治疗, 具有一定优势。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 胃食管反流病; 发病机制; 中西医治疗; 质子泵抑制剂; 进展

核心提示: 目前西医在诊断胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease)方面取得了较大进步, 但在治疗方面仍以抑酸作为主要手段. 但长期维持或一旦停用后均有局限性. 中医药作为一种综合治疗手段, 通过辨病论治与辨证施治相结合的方法对该病进行对因对症治疗, 具有一定优势。

汪晓奕, 朱凌云. 胃食管反流病中西医治疗的进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22(4): 488-493 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/488.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.488>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)系指胃内容物反流入食管, 引起不适症

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

状和/或并发症的一种疾病。其临床表现主要为与反流相关的症状群, 包括典型和常见的因反流物所致的食管内刺激症状如烧心、反酸, 其他非典型但与之密切相关的症状如吞咽困难、胸痛、嗝气、上腹不适等, 此外还有与反流相关但却易被人忽略的食管外症状如咳嗽、哮喘、咽喉炎等^[1]。GERD可分为非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)、糜烂性食管炎(erosive esophagitis, EE)和Barrett食管(Barrett's esophagus, BE)三种类型^[2-5]。GERD在世界各地的发病率不同^[6], 在西欧和北美GERD症状的患病率为10%-25%^[7]。国内尚缺少GERD全国范围内的流行病学资料, 近年来的调查显示浙江省10地市初筛患病率为7.28%^[8], 北京市GERD的检出率为8.77%^[9]。虽然在亚洲地区, GERD报道的患病率普遍低于欧美国家, 但相关资料显示反流性食管炎的检出率正在逐年升高^[10-12], 因而他也成为了当今消化领域研究中的一个热点。本文就当前中西医对本病的发病机制、治疗方案及用药等做一总结, 现综述如下。

1 西医对GERD病因及发病机制阐述

随着GERD发病率的逐年升高, 近年来对其病因及发病机制也进行了多项研究。从GERD的病理生理角度来看, 其病因复杂, 大致表现在以下几个方面^[13,14]: (1)抗反流屏障削弱: 包括食管下括约肌压力(lower esophageal sphincter pressure, LES)降低、一过性下食管括约肌松弛(transit LES relaxation, TLESR)、食管裂孔疝(hiatus hernia, HH)、食管解剖结构缺陷等; (2)反流物的攻击作用, 包括胃酸、胆汁、消化酶、酒精、刺激性药食物等; (3)食管黏膜防御作用减弱; (4)食管清除能力降低: 主要为食管体部运动功能障碍(ineffective esophageal motility, IEM)、唾液分泌减少等; (5)胃动力障碍: 主要为胃排空延迟; (6) Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)数量减少和功能障碍; (7)其他因素: 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染、食管感觉异常、自主神经功能紊乱、心理因素等。2008年在三亚召开的胃食管反流病高峰论坛上, 多位消化病专家一致认为^[15]: 食管下括约肌和食管体部运动障碍、胃排空障碍及胃十二指肠协调运动障碍是GERD发病的启动因素, 食管下括约肌压力降低及一过性下食管括约肌松弛过度是导致反流发生的基础, 而食管体部运动异常减弱了食管的酸清除能力, 导致过多的胃内容

物(主要是胃酸)反流入食管能对胃黏膜产生直接侵蚀作用, 因而其可认为是GERD发病的直接致病因素。

2 西医对GERD的治疗

美国GERD指南及中国胃食管反流病治疗共识意见中都明确指出, GERD的治疗目标是: 缓解反流症状、治愈食管炎、提高生活质量以及预防复发和并发症^[4,5,16-20]。其内容主要包括以下几方面。

2.1 生活方式改变 大量研究表明, 戒烟、减少脂肪餐摄入、抬高床头、避免餐后3 h平卧等可以减少食管远端的酸暴露。而某些确定的食物(如巧克力、酒精、薄荷油, 还有大蒜和洋葱等)可以降低食管括约肌的压力^[21]。一些研究者认为, 有20%-30%的安慰剂反应率应归因于生活方式的改变, 但其对患者生活质量的潜在负面影响目前尚未有研究^[22]。

2.2 药物治疗

2.2.1 抑酸药物: 美国胃肠病学会的GERD治疗指南中将抑制胃酸分泌作为具有一级证据的首选治疗方法, 而中国GERD的共识意见中亦确定质子泵抑制剂(pump inhibitor, PPI)是用于治疗GERD最有效的首选抑酸药物^[15,21-24]。PPI治疗GERD的疗效已在世界各国得到认可^[4]。既往研究证实^[25], PPI对糜烂性食管炎治疗8 wk的愈合率为78%-93%, 连续用药12 mo显示持续愈合率为80%-90%, 对非糜烂性胃食管反流病的疗效与之相似, 对Barrett食管症状的缓解率也可高达80%。PPI通过强大的抑酸作用可明显减少胃液分泌量, 缓解胃酸对食管黏膜的攻击作用, 并能最大程度控制24 h胃内pH值, 减少酸反流, 治愈食管炎^[26], 这点在2008三亚召开的胃食管反流病高峰论坛上也得到了诸多消化病专家的一致认同^[15]。目前维持治疗的方法主要有: 维持原剂量或减量、间歇用药或按需治疗, 其具体治疗方案应个体化^[17-19,21]。

然而作为抑酸治疗的首选药物, PPI仅从攻击因子角度进行治疗, 而非改变引起反流的动力因素^[27], 因此在停用PPI后, 糜烂性食管炎的复发率为75%-92%, 这些复发患者再用PPI仍可获得缓解, 但再次停药后, 其再次复发的机会约为90%左右^[28,29]。且由于其对胃酸的强效抑制作用, 有部分文献报道长期服用PPI可能造成高胃泌素血症、肠道细菌过度生长、肠道感染以及营养吸收不良等^[30]。另外, 因需长期进行维持性治疗

■ 研发前沿

近年来西医有关胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)病因学分类及诊断方法的研究已有了较大的进展, 但在治疗方面, 抑酸仍为首选手段。然而对于长期维持服药产生的不良反应等, 西医仍未找到良好的解决办法。中医通过辨证论治途径为GERD的治疗开拓了新的思路。

■相关报道

美国胃食管反流疾病指南中指出, 目前已经明确有部分患者应用传统、常规剂量的PPI治疗效果不佳, 对于这些患者, 加大剂量并且每日加大到2倍剂量才合适。难治性GERD常是抗反流手术甚至是正在发展的内镜下治疗技术的基本适应证。

用药将不可避免会导致其敏感性下降, 必须通过加大剂量才能抑制反流症状, 然而其长久使用的不良反应又可导致肝损害的危险^[31]。而近年来相关研究也已证实, GERD在标准剂量(每日1次, 每次1片)PPI治疗下, 症状仍未见缓解(每周至少有1次症状发生)的PPI治疗失效患者正在日渐增多, 其比例可高达20%-30%^[32]。

2.2.2 促动力药物: 尽管动力异常是GERD的发病基础, 但目前尚未研制出有效的靶点药物^[15]。当前的治疗仅在抑酸药物治疗效果不佳时, 考虑联合应用促动力药物, 特别是对于伴有胃排空延迟的患者, 其机制主要是通过增加LES张力以促进胃、食管排空而减少胃食管反流的发生^[21]。因此促动力药仅作为GERD治疗的辅助用药, 而非根本治疗措施^[24]。目前临床上多使用多潘立酮、莫沙必利、伊托必利等药物^[33]。

2.2.3 新研发药物: 下食管括约肌一过性松弛(transient lower esophageal sphincter relaxation, TLESR)是GERD的重要病理生理机制, 降低TLESR频率, 可减少食管远端酸暴露和弱酸反流^[34]。因此, 针对TLESR的靶向药物, 如γ-氨基丁酸B受体(γ-aminobutyric acid, GABA-B)激动药和亲代谢谷氨酸盐受体5调节药(mGluR5)成为目前临床研究的热点^[35,36]。其中GABA-B受体激动剂巴氯芬是当前控制TLESR发生最具应用前景的药物^[37]。目前正期待这些药物在GERD患者中的临床疗效及评价反馈。

2.3 非药物治疗 其中包括手术治疗及内镜治疗。抗反流手术在缓解不适症状和愈合食管炎方面的疗效与药物治疗相当^[24]。虽现已证实有癌变的BE患者原则上应进行手术治疗, 但对症状不典型、抑酸治疗效果差的患者, 手术疗效通常不能达到预期目标^[21], 且相当一部分患者术后仍需规则用药^[20]。而短期初步研究提示, 内镜治疗可改善GERD症状量表积分, 减少PPI使用量, 提高患者生活质量和满意度^[24]。然而, 目前仍然缺乏长期的包括假治疗组在内的随机双盲对照试验^[22], 而临床上也观察到一些少见但严重的并发症(包括穿孔、死亡等)^[24]。

3 中医对GERD病因病机的认识

因GERD以烧心、反酸、胸骨后或心窝部烧灼样疼痛等症状为其主要临床表现, 故可将此病归属于中医“吞酸”、“吐酸”、“嘈杂”、“反胃”、“噎膈”、“胸痹”等范畴。在1997年国家技术监督局发布的国家标准《中医

临床诊疗术语》中将本病称为“食管瘕”, 其与GERD的症候较为相近, 但仍不十分准确^[38]。祖国医学认为, 其病位主要在胃及食管, 与肝、胆、脾、肺密切相关。本病总体上属本虚标实之证, 其中以脾胃虚弱为本, 气郁、食滞、痰火、湿浊为标。多由情志不遂、忧思怒嗔导致肝失疏泄, 横逆脾胃, 胃气上逆; 或饮食失调, 过食辛辣刺激之物、嗜烟饮酒等灼伤胃经, 气机受阻, 胃失和降; 或素患胆病, 邪毒蕴积, 胆热犯胃, 胃气不和, 反逆呕苦; 或劳逸不均、久病伤脾, 脾失健运, 痰湿内生导致痰气交阻, 肺气上逆等而引发此病^[39]。由此可见, 本病的主要机制变化可归结为脏腑气机失调导致胃失和降上逆所致。

4 中医对GERD的治疗

4.1 治法思路 蔡淦^[40]认为本病为本虚标实之证, 主要因脾虚肝失疏泄、肝火挟浊邪上泛引起, 以健脾和胃、疏肝清热为基本治法。赵荣荣^[41]认为本病的总病机为胃失和降、胃气上逆。宗东垣之法, 在辨证论治的基础上从调理脾胃升降功能着手, 并配以宽胸快膈之法。王庆其^[42]认为该病病位涉及胃、肝、胆、脾, 病机主要责之于气机升降失常。在治疗上其主张以清代医家吴鞠通提出的“治中焦如衡, 非平不安”为准绳, 以调理脾胃气机升降为原则, 以辛开苦降为大法。张国伦^[43]认为本病病位在胃与食管, 与肝关系密切, 肝气犯胃、胃失和降是其病机关键, 故在治疗中总以疏肝和胃、行气降逆之法贯穿始终, 并遵循《临证指南医案》中“纳食主胃, 运化在脾, 太阴湿土, 得阳始运, 阳明燥土, 得阴自安”之论, 时时顾护脾胃。田德禄^[44]认为本病病在食管, 属胃所主, 与肝、胆、脾密切相关。肝胃不和, 郁而化热, 肝移热于胆, 胆气不降, 胆热挟持胃气上逆是本病的主要病机。故对本病的治疗亦多从疏肝清胆、和胃通降立法, 肝胃同治。

4.2 辨证论治 2009年在深圳召开的中华中医药学会脾胃病分会第21届全国脾胃病学术会议上通过审定的《胃食管反流病中医诊疗共识意见》中指出本病的辨证可分为肝胃郁热、胆热犯胃、中虚气逆、气郁痰阻、瘀血阻络等五型治疗^[45]。而近现代医家则多根据自己的临床经验和体会进行辨证施治: 徐景藩^[46]将本病辨证为四型治疗: 气郁证以理气解郁、和胃降逆为法, 方用木香调气散、吴氏新制橘皮竹茹汤、解郁

合欢汤加減; 痰气交阻证以理气解郁、化痰散结为法, 方用半夏厚朴汤加減; 肝胃郁热证以清泄肝胃郁热、理气降逆为法, 方用左金丸、大黄甘草汤、济生橘皮竹茹汤加減; 气滞血瘀证以行气化瘀为法, 方用血府逐瘀汤随证加減, 临床疗效甚佳。贺仲华^[47]将反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)视为GERD的较严重阶段, 并将其分四型辨证施治: 肝胃郁热型: 多在RE的早中期, 治拟疏肝清胆、和胃降逆法, 用化肝煎、左金丸、济生橘皮竹茹汤加減; 肝郁痰结型: 在RE的中后期, 治拟疏肝解郁、化痰散结、和胃降逆法, 用半夏厚朴汤、温胆汤合旋覆代赭汤加減; 肝胃血瘀型: 在RE的后期, 治拟疏肝行气活血、和胃降逆止痛法, 用血府逐瘀汤合启膈散加減; 肝胃阴虚型: 在RE的恢复期, 治拟养阴柔肝和胃降逆法, 用一贯煎、益胃汤加減。汪荫华^[48]将本病分为七种证型, 据证施治: 肝胃不和证, 治以疏肝理气、和胃降逆, 常用柴胡疏肝散加減; 肝(胆)胃郁热证, 治以泄肝利胆、和胃降逆, 常用左金丸合化肝煎加減; 气郁痰阻证, 治以理气解郁、化痰散结, 常用旋覆半夏汤加味; 寒热错杂证, 治以调气和胃、辛开苦降, 常用左金丸合甘草泻心汤加減; 气滞血瘀证, 治以行气化瘀、和胃降逆, 常用血府逐瘀汤合旋覆代赭汤加減; 脾虚气逆证, 治以益气健脾、和胃降逆, 常用香砂六君子汤合旋覆代赭汤加減; 胃阴不足证, 治以滋阴养胃、润燥降逆, 常用沙参麦冬汤合益胃汤加減。

4.3 专方专药 张方东等^[49]采用合蒲七汤加味治疗66例GERD, 基本方用: 黄连6 g、吴茱萸3 g、白芍15 g、炙甘草6 g、丹参15 g、砂仁9 g、檀香6 g、蒲公英15 g、三七粉5 g、佛手10 g、陈皮10 g、姜半夏9 g、枳壳10 g、白术15 g、白及12 g、制大黄3 g、厚朴花6 g。治疗2个疗程8 wk后, 治疗组总有效率92.43%明显高于兰索拉唑、莫沙必利联合铝碳酸镁的对照组。殷利娜^[50]采用半夏泻心汤加味治疗60例GERD, 基本方用: 姜半夏12 g、黄连8 g、甘草、大枣、枳实、黄芩各10 g、干姜6 g、海螵蛸20 g、煅瓦楞30 g、党参、白及各15 g、代赭石30 g。经过1个疗程60 d治疗, 总有效率达93.33%。李保双等^[51]采用复方枳苏汤治疗40例GERD, 基本方用: 紫苏梗10 g、枳壳10 g、香附10 g、半夏10 g、陈皮10 g、厚朴10 g、虎杖10 g、海螵蛸30 g、茯苓15 g、甘草3 g。治疗1 mo后, 有效率97.5%, 治疗前后主要症状积分及总分与治疗前比较均明显减低。冀秀

萍等^[52]采用大柴胡汤加減治疗45例GERD, 基本方用: 柴胡10 g、黄芩10 g、清半夏10 g、白芍20 g、炒枳实15 g、厚朴12 g、生大黄3 g、炙甘草6 g、生姜9 g、大枣3枚。治疗8 wk后, 治疗组总有效率达91.1%高于奥美拉唑联合多潘立酮的对照组, 且在临床主要症候疗效比较上, 治疗组各项也均高于对照组。

4.4 其他治疗 现代经穴研究表明, 刺激相关穴位能增强胃蠕动、抑制胃酸分泌、增加胃排空, 对GERD具有一定的防治效果^[53]。卢岱静^[54]将RE患者分为4组: 针刺组30例, 采用针刺内关、公孙、阳陵泉治疗; 中药组30例, 内服和胃降逆功效之中药; 针药组30例, 采用针刺加内服中药; 西药组30例, 采用奥美拉唑肠溶胶囊口服。结果显示针药组、针刺组、中药组及西药组治疗后胃动素和胃泌素水平均较治疗前水平明显升高; 治疗后针药组血浆胃动素和胃泌素水平明显高于其他组; 且针药组症状改善率及胃镜下炎症改善明显高于其他组。朱东晓^[55]根据中医辨证论治理论和经络学说, 应用低频脉冲电刺激加耳穴磁疗法相结合治疗GERD患者60例。治疗组采用无创低频脉冲电加耳穴磁疗法, 对照组口服西药普瑞博思。两组均以7 d为1个疗程。治疗后, 治疗组总有效率为91.7%高于对照组为80.0%。蒋守忠^[56]将60例GERD患者随机分为两组, 治疗组予以白酒浸泡中药所制成的药液涂敷于双侧足太阳膀胱经、肝胆俞、脾胃俞上, 并配合手法操作, 对照组口服奥美拉唑肠溶片及西沙比利片, 疗程均为3 wk。结果显示, 治疗组总体疗效明显高于对照组。

5 结论

作为消化系统中的一种常见病, 近年来有关于GERD病因学分类及诊断方法的研究已有了较大的进展, 但在治疗方面, PPI抑酸治疗仍然是目前的主要治疗手段, 然而长期维持服用的药物不良反应及对某些难治性患者的无效性, 西医仍未找到良好的解决办法。作为中医药治疗的优势病种, 中医在GERD治疗方面独辟蹊径, 以辨病与辨证相结合、整体与局部相兼治, 可以弥补现代医学对难治性反流性食管炎、夜间酸突破等疑难复杂病例治疗方案的不足, 也能减少西药长期服用给机体带来的不良反应。但目前临床报道诊断和选例标准过于笼统, 疗效判定不统一, 不利于本病的准确诊治。如何制定出符合临床实际的辨证分型方法和诊断疗效标准, 筛选出最佳的治疗

■创新盘点

本文就中西医结合治疗GERD的相关进展作一综述, 并着重在中医辨证分型治疗、专方专药及中医特色疗法方面进行了详细介绍。

■应用要点

作为中医药治疗的优势病种, 中医在GERD治疗方面独辟蹊径, 以辨病与辨证相结合、整体与局部相兼治, 可以弥补现代医学对难治性反流性食管炎、夜间酸突破等疑难复杂病例治疗方案的不足, 也能减少西药长期服用给机体带来的不良反应等。

方案和方法, 以加快中医药对此病诊疗的现代化进程确是当今中医治疗GERD的一大难点, 值得我们进一步去探究和完善。

6 参考文献

- Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1900-1920; quiz 1943 [PMID: 16928254 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00630.x]
- Fock KM, Talley N, Hunt R, Fass R, Nandurkar S, Lam SK, Goh KL, Sollano J. Report of the Asia-Pacific consensus on the management of gastroesophageal reflux disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 357-367 [PMID: 15012771 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03419.x]
- Armstrong D, Marshall JK, Chiba N, Enns R, Fallone CA, Fass R, Hollingworth R, Hunt RH, Kahrilas PJ, Mayrand S, Moayyedi P, Paterson WG, Sadowski D, van Zanten SJ. Canadian Consensus Conference on the management of gastroesophageal reflux disease in adults - update 2004. *Can J Gastroenterol* 2005; 19: 15-35 [PMID: 15685294]
- DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 190-200 [PMID: 15654800 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.41217.x]
- Playford RJ. New British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut* 2006; 55: 442 [PMID: 16531521 DOI: 10.1136/gut.2010.235259]
- 袁耀宗, 邹多武, 汤玉茗, 许国铭. 胃食管反流病的蒙特利尔(Montreal)定义和分类—基于循证医学的全球共识. *中华消化杂志* 2006; 26: 686-689
- Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, Johansson S. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut* 2005; 54: 710-717 [PMID: 15831922 DOI: 10.1136/gut.2004.051821]
- 章宏, 徐晶, 厉有名, 虞朝辉, 许国强, 陈春晓, 季峰. 浙江省内科门诊人群胃食管反流病及危险因素流行病学调查. *中华消化杂志* 2007; 27: 443-446
- 胡水清, 张玫, 牛小羽, 周俊. 门诊患者胃食管反流病的流行病学调查. *实用医学杂志* 2009; 25: 141-143
- 李兆申, 徐晓蓉, 许国铭, 邹多武, 孙振兴, 王雯, 叶萍, 陆建萍. 反流性食管炎的临床特征分析. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 315-318
- 胡兆元, 周丽雅, 林三仁, 薛艳. 十年间2088例反流性食管炎临床分析. *中华消化杂志* 2005; 25: 717-719
- 瞿国强, 胡宏艳, 李安, 郭金芝, 梁先发, 汤胜君, 龙翔, 钱立康, 程雪霞, 曹彬. 胃食管反流病患者生活质量调查187例. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 834-838
- 方莉, 孟立娜. 胃食管反流病的发病机制相关因素及其药物治疗. *胃肠病学* 2008; 13: 696-698
- 涂蕾, 侯晓华. 胃食管反流病的病因和发病机制. 现代消化与介入诊疗 2011; 16: 37-41
- 中华消化杂志编委会, 中华医学会消化病学分会动力学分组. 2008胃食管反流病高峰论坛(三亚). *中华消化杂志* 2009; 29: 145-147
- Moss SF, Armstrong D, Arnold R, Ferenci P, Fock KM, Holtmann G, McCarthy DM, Moraes-Filho JP, Mutschler E, Playford R, Spechler SJ, Stanghellini V, Modlin IM. GERD 2003 -- a consensus on the way ahead. *Digestion* 2003; 67: 111-117 [PMID: 12853722]
- Bautista, Jimmy M. The rising trend of on-demand and intermittent proton pump inhibitor therapy in

gastroesophageal reflux disease: What is the evidence? *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 112-114 [DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04713.x]

- Khean-Lee Goh. "On-demand" therapy for gastroesophageal reflux disease: Are current proton pump inhibitors good candidates? *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 115-118 [DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04714.x]
- Ting K Cheung, Benjamin CY Wong. Proton-pump inhibitor failure/resistance: Proposed mechanisms and therapeutic algorithm. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 119-124 [DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04716.x]
- 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 胃食管反流病中西医结合诊疗共识意见(2010). *中国中西医结合杂志* 2011; 31: 1551-1552
- 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 胃食管反流病治疗共识意见(2007, 西安). *中华消化杂志* 2007; 27: 689-690
- 李巍, 张澍田. 美国胃食管反流疾病诊断和治疗指南评介. *中国实用内科学杂志* 2006; 26: 1992-1997
- Katz PO, Gerson LB, Vela MF. Guidelines for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2013; 108: 308-328; quiz 329 [PMID: 23419381 DOI: 10.1038/ajg.2012.444]
- 中国胃食管反流病共识意见专家组. 中国胃食管反流病共识意见(2006-10, 三亚). *中华内科杂志* 2007; 46: 170-173
- Vigneri S, Termini R, Leandro G, Badalamenti S, Pantalena M, Savarino V, Di Mario F, Battaglia G, Mela GS, Pilotto A. A comparison of five maintenance therapies for reflux esophagitis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1106-1110 [PMID: 7565948 DOI: 10.1056/NEJM199510263331703]
- 王智凤, 柯美云, 蓝宇. 正常人和胃食管反流者的昼夜食管pH和动态变化. *中华消化杂志* 1998; 18: 242
- 柯美云, 孙晓红. 重视胃食管反流病整体治疗的重要性. *中华消化杂志* 2006; 26: 145-146
- Harris RA, Kuppermann M, Richter JE. Prevention of recurrences of erosive reflux esophagitis: a cost-effectiveness analysis of maintenance proton pump inhibition. *Am J Med* 1997; 102: 78-88 [PMID: 9209204 DOI: 10.1016/S0002-9343(96)00301-4]
- 王虹. PPI治疗胃食管反流病失效的原因和对策. *国外医学(消化系疾病分册)* 2005; 25: 305-308
- Savarino V, Di Mario F, Scarpignato C. Proton pump inhibitors in GORD An overview of their pharmacology, efficacy and safety. *Pharmacol Res* 2009; 59: 135-153 [PMID: 18977444 DOI: 10.1016/j.phrs.2008.09.016]
- 宗亮, 田耀洲. 胃食管反流病的中西医治疗进展. *浙江中西医结合杂志* 2009; 19: 189-190
- 危北海. 胃食管反流病中西医治疗现状和展望. *北京中医药* 2008; 27: 163-164
- 方莉, 孟立娜. 胃食管反流病的发病机制相关因素及其药物治疗. *胃肠病学* 2008; 13: 696-698
- 赵洪川. 胃食管反流病的治疗进展. *临床药物治疗杂志* 2010; 8: 37-41
- Lehmann A. Novel treatments of GERD: focus on the lower esophageal sphincter. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12 Suppl 1: 103-110 [PMID: 18924449]
- Vakil N. New pharmacological agents for the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2008; 8: 117-122 [PMID: 18641594]
- Cicciaglione AF, Marzio L. Effect of acute and chron-

■名词解释

Barrett食管: 指食管下段的鳞状上皮被柱状上皮覆盖. 普遍认为是获得性, 并与反流性食管炎相关, 并有发生腺癌的可能. 其表现主要是胃食管反流及并发症所引起的相关症状;

食管裂孔疝: 指腹腔内脏器(主要是胃)通过膈食管裂孔进入胸腔所致的疾病. 食管裂孔疝患者可以无症状或症状轻微, 裂孔疝和反流性食管炎可同时也可独立存在, 其症状轻重与疝囊大小、食管炎症的严重程度无关。

- ic administration of the GABA B agonist baclofen on 24 hour pH metry and symptoms in control subjects and in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* 2003; 52: 464-470 [PMID: 12631652 DOI: 10.1136/gut.52.4.464]
- 38 周鸿, 陈鸣艳, 吕宾. 难治性胃食管反流病中西医治疗现状. *环球中医药* 2011; 4: 16-19
- 39 朱生樱, 李勇, 朱晓燕, 马淑颖. 胃食管反流病证型研究. *上海中医药杂志* 2002; 36: 12-13
- 40 刘群. 蔡淦治疗胃食管反流性疾病经验. *上海中医药杂志* 2005; 39: 27-28
- 41 翟军鹏, 李晓宁, 陈詒. 赵荣莱教授治疗胃食管反流病经验. *北京中医药* 2008; 27: 19-20
- 42 薛辉, 陈正, 宋琦. 王庆其治疗胃肠病学术经验摘要. *江苏中医药* 2009; 41: 17-19
- 43 杨海卿, 王科峰. 张国伦教授治疗胃食管反流病经验. *云南中医中药杂志* 2009; 30: 1-2
- 44 李晓林. 田德禄教授治疗胃食管反流病经验. *北京中医药大学学报(中医临床版)* 2011; 18: 30-31
- 45 中华中医药学会脾胃病分会. 胃食管反流病中医诊疗共识意见(2009, 深圳). *中医杂志* 2010; 51: 844-847
- 46 徐景藩. 关于诊治胃食管反流病的几点管见. *江苏中医药* 2010; 42: 1-2
- 47 胡梅. 贺仲华治疗胃食管反流病经验. *世界中西医结合杂志* 2011; 6: 555-556
- 48 潘存生. 汪荫华治疗胃食管反流病的经验与特色. *江苏中医药* 2012; 44: 11-12
- 49 张方东, 林建泉, 高乾良. 三合蒲七汤加味治疗胃食管反流病66例临床观察. *光明中医* 2012; 27: 1765-1766
- 50 殷利娜. 半夏泻心汤加味治疗胃食管反流病60例. *陕西中医* 2012; 33: 1135-1136
- 51 李保双, 常婧舒. 复方枳苏汤治疗胃食管反流病40例临床观察. *河北中医* 2012; 34: 19-23
- 52 冀秀萍, 马骋宇. 大柴胡汤加减治疗胃食管反流病45例临床观察. *江苏中医药* 2013; 45: 36-37
- 53 解然勇, 侯超, 王璇, 王灿, 秦博, 高军杰. 电针足三里联合甲氧氯普胺注射治疗上消化道术后胃肠功能紊乱50例. *陕西中医* 2013; 34: 744-745
- 54 卢岱静. 针药并用对反流性食管炎患者胃泌素、胃动素的影响. *上海针灸杂志* 2010; 29: 218-220
- 55 朱东晓. 低频脉冲配合耳穴贴磁治疗胃食管反流60例. *云南中医中药杂志* 2010; 31: 41-42
- 56 蒋守忠. 药穴指针疗法治疗60例胃食管反流病的疗效观察. *中国当代医药* 2012; 19: 93-96

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



■同行评价

文章立意有依据, 综述内容集中, 观点明确, 讨论简洁, 在中医辨证分型治疗和单方治疗方面叙述详细, 对GERD中医治疗的研究有一定的参考意义。

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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。

肿瘤干细胞相关信号通路在胃癌发生发展中的研究进展

席小龙, 姜波健, 俞继卫

■背景资料

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 最新统计数据表明, 胃癌在癌症相关肿瘤死亡中居第3位。胃癌的发病率高、进展快, 手术治疗后易复发和转移成为胃癌治疗的难题。胃癌干细胞相关信号通路的改变是导致胃癌侵袭、转移及化疗耐药的主要原因。

席小龙, 姜波健, 俞继卫, 上海交通大学医学院附属第三人民医院普外一科 上海市 201900

席小龙, 安徽省蚌埠医学院研究生部 安徽省蚌埠市 233000

席小龙, 硕士, 主要从事胆囊癌和胃癌的临床和基础研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81101850

上海市教育委员会基金资助项目, No. 12YZ047

作者贡献分布: 席小龙负责文献收集和初稿撰写; 姜波健负责初稿修改; 俞继卫负责文章终审和修改。

通讯作者: 俞继卫, 副主任医师, 201900, 上海市宝山区漠河路280号, 上海交通大学医学院附属第三人民医院普外一科。

jiweiyu919@hotmail.com

收稿日期: 2013-11-07 修回日期: 2013-12-10

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

Cancer stem cell-related signaling pathways in development of gastric cancer

Xiao-Long Xi, Bo-Jian Jiang, Ji-Wei Yu

Xiao-Long Xi, Bo-Jian Jiang, Ji-Wei Yu, Department of General Surgery, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China

Xiao-Long Xi, Graduate School of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, Anhui Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81101850; the Shanghai Municipal Education Commission Funded Project, No. 12YZ047

Correspondence to: Ji-Wei Yu, Associate Chief Physician, Department of General Surgery, No. 3 People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 280 Mohe Road, Baoshan District, Shanghai 201900, China. jiweiyu919@hotmail.com

Received: 2013-11-07 Revised: 2013-12-10

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

Cancer stem cells are a subset of cancer cells with self-renewal and differentiation capacity. They play an important role in gastric carcinogenesis, proliferation, migration, invasion and metastasis and are involved in resistance to chemotherapy. Numerous studies indicate that stem cell-related signaling pathways (such as Wnt, Notch, Hedgehog, PI3K, and BMP) are activated in the occurrence and development of gastric cancer. Inhibition of tumor self-renewal-related signaling pathways can significantly improve the prognosis of patients with gastric cancer. In this paper we will review the roles of these cancer stem cell-related signaling pathways in gastric cancer.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Cancer stem cells; Wnt; Notch; Hedgehog; PI3K/AKT; BMP

Xi XL, Jiang BJ, Yu JW. Cancer stem cell-related signaling pathways in development of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 494-500 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/494.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.494>

摘要

肿瘤干细胞是肿瘤组织中一群具有自我更新和多向分化能力的干细胞亚群。胃癌干细胞在胃癌的发生、增殖、迁移、侵袭及转移中起重要作用, 并参与了化疗耐药。大量的研究表明干细胞相关信号通路(如: Wnt、Notch、Hedgehog、PI3K/AKT和BMP等)在胃癌的发生与发展中被激活。抑制相肿瘤自我更新相关信号通路则明显改善胃癌患者的预后。本文就上述肿瘤干细胞相关信号通路在胃癌中的作用研究作一综述。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肿瘤干细胞; Wnt; Notch; Hedgehog; PI3K; BMP

核心提示: 本文着重阐述了肿瘤干细胞相关信号通路(Wnt、Notch、Hedgehog、PI3K/AKT和BMP)在胃癌的发生发展、侵袭转移及化疗耐药中的作用, 并阐述了这些通路与胃癌干细胞的关系, 为胃癌治疗提供了新的思路及治疗策略。

席小龙, 姜波健, 俞继卫. 肿瘤干细胞相关信号通路在胃癌发生发展中的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 494-500 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/494.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.494>

0 引言

在实体肿瘤中存在小部分具有干细胞特性即自我更新和多向分化能力的干细胞亚群, 这部分细胞亚群被称为肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs). CSCs在一定条件下, 可以分化成多种功

■同行评议者

徐浹, 副主任医师, 上海复旦大学附属中山医院



能细胞. 肿瘤干细胞最早由Dick等^[1]在白血病的研究中得到证实, 后来相继有研究报导在体内多种器官实体瘤中发现肿瘤干细胞, 如: 结肠癌、肝癌及脑肿瘤^[2-4]. 肿瘤干细胞对肿瘤的存活、增殖、转移、复发及化疗耐药性中都有着重要影响. 大量研究表明肿瘤干细胞相关信号通路(如: Wnt、Notch和Hedgehog等)与胃癌的发生与发展有密切关系^[5-7]. 肿瘤干细胞相关信号转导通路的阐明, 必将给肿瘤干细胞的治疗带来新的希望, 从而最终治愈肿瘤.

1 胃癌干细胞

寻找胃癌干细胞(gastric cancer stem cells, GC-SCs)特异性标志物或基因一直是胃癌研究的重点. 最近国外研究初步显示, CD133、CD44、Musashi-1及 β 1-integrin等可能是胃肠肿瘤干细胞候选标志物, 这些标志物阳性的肿瘤细胞与其他普通肿瘤细胞相比, 在动物体内具有更高的致癌潜能, 在体外则具有较高的增殖、克隆形成能力及侵袭能力.

最早关于胃癌干细胞的来源目前有两种观点: 一种是胃癌干细胞来源于正常的胃干细胞(gastric stem cells, GSCs), 另一种观点认为胃癌干细胞起源于骨髓源性细胞(bone marrow derived cells, BMDCs). 胃癌干细胞研究主要使用CD133、CD44等作为胃癌干细胞表面标志物. Hashimoto等^[8]在对189例胃癌患者的研究中发现, 在细胞质阳性表达CD133的胃癌细胞与阴性表达的胃癌细胞相比具有更高的致癌能力, 并与癌症的进展、化疗耐药、复发及预后呈正相关. 研究还表明CD133的表达与缺氧诱导因子1- α (hypoxia inducible factor 1- α , HIF1- α)的表达相关. 而Lee等^[9]研究发现CD133的表达与化疗耐药和胃癌复发有关. Zieker等^[10]在对MKN45胃癌细胞株的研究时发现, 当把分选后的胃癌细胞接种到裸鼠体内观测肿瘤的形成时, CD44⁺组可在体内形成肿瘤, 而CD44⁻组则不能成瘤^[10]. Takaishi等^[11]研究发现, 在胃癌细胞株MKN-45、MKN-74和NCI-N87中, CD44⁺组细胞具有干细胞的自我更新和产生有差异的后代的能力, 并能产生CD44⁻细胞. 而当使用shRNA干扰CD44⁺细胞后, 其克隆球形成能力明显降低, 克隆球体积与未干扰组比明显缩小. 而CD44⁻细胞的致瘤和成瘤能力明显低于CD44⁺组.

2 相关信号传导通路

微环境中产生的信号通路(Wnt、Hedgehog、

Notch、PI3K和BMP信号通路等)调控胃干细胞特性、细胞的迁移及分化. 多种复杂因素(PI3K/AKT信号通路、Wnt信号通路异常等)导致胃干细胞恶性转化为胃肿瘤干细胞, 后者无限制的克隆化是启动胃癌发生、发展的关键所在.

2.1 Notch信号通路 哺乳动物Notch通路包括一个保守的跨膜受体家族(Notch1-4)和一些与之相互作用的特异性配体(DLL1、DLL3、DLL4、Jagged1和Jagged2), 通过配受体见得相互作用进而来调节细胞的命运. Notch受体是一种跨膜蛋白, 含有一个细胞外段(可与表皮生长因子样配体结合)和一个细胞内段(intracellular domain, ICD). Notch配体也是一种跨膜转运蛋白, 因此Notch信号通路的激活发生在细胞间的直接接触. 将Notch配体结合到Notch受体胞外部分后触发两个连续的蛋白水解酶(a disintegrin and metalloprotease, ADAM酶和 γ -分泌酶)裂解受体, 释放一个活跃的细胞内段(notch intracellular domain, NICD). NICD是Notch受体的活化形式, 可以转移到细胞核, 在细胞核NICD被装配成一个大的转录激活复合物并与保守的转录因子CSL相互作用, 激活CSL依赖的下游基因转录, 如: *HES/HEY*、*NF- κ B*、*PI3K*、*AKT*、*cyclinD1*、*p21*和*p27*^[12]. Notch信号通路在许多肿瘤的自我更新中的作用已被证实, 如乳腺癌、成神经管细胞瘤、胰腺癌^[13]. 虽然在胃癌干细胞中没有直接的证据支持Notch的作用, 但Notch信号的异常激活被发现. 大约75%的早期胃癌表达Notch配体Jagged1, 并与胃癌的组织侵犯及患者的生存率相关^[5]. 该研究还发现Notch信号促进胃癌细胞的集落形成、迁移和侵袭部分是通过环氧化酶2(cyclooxygenase-2, Cox-2)起作用的. 另外一项研究^[14]显示Notch信号通过表达Twist和信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)促进胃癌的发展. Yao等^[15]在研究研究胃癌细胞株SGC7901时发现, 细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)抑制剂PD98059可增强组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACI)曲古抑菌素A(trichostatin A, TSA)诱导的细胞生长停滞、细胞凋亡和*p21WAF1/CIP1*基因活化. 因此, PD98059联合TSA可为胃癌患者提供一个新的治疗策略. 另有研究表明, CD44⁺胃癌干细胞与CD44⁻胃癌细胞相比, 增殖能力增加, 而增殖能力的增加与Notch1的高表达有关. 另外CD44⁺胃癌干细胞有更强的体外克隆球形成, 更高的体

■研究前沿

本文主要探讨了肿瘤干细胞相关信号通路的激活在胃癌发生发展中的作用, 阐明了相关通路在胃癌中的作用机制, 可为胃癌的治疗提供一定的参考价值.

■创新盘点

本文重点详细介绍了Wnt、Notch、Hedgehog、PI3K/AKT和BMP信号通路在胃癌中的最新研究进展,信号通路阐述较齐全、新颖,基本代表了目前的最新研究结果。

内致癌能力,并与微血管密度相关。而榄香烯 β 在体外可通过抑制Notch1抑制胃癌干细胞的生长,在体内通过干扰Notch1的表达抑制肿瘤的生长并减少肿瘤的血管浸润^[16]。

2.2 Wnt信号通路 Wnt通路有两条,一条是经典的Wnt通路,Wnt信号通过 β -连环蛋白通路参与决定细胞的命运。另一条非经典Wnt信号通路,Wnt信号通过一个独立的 β -连环蛋白通路,参与细胞的运动和极性。虽然很多研究显示了其在胚胎行程中的重要作用,但很少有关于其在癌干细胞生物学中作用的研究。在经典的Wnt信号通路中,Wnt配体结合受体复合物Frizzled和LRP5/6(低密度脂蛋白受体家族成员),稳定 β -连环蛋白信号。在没有Wnt信号时, β -连环蛋白结合于蛋白APC和Axin上,形成一个降解复合物。在降解复合物的参与下, β -连环蛋白连续地被CK1和GSK3 β 上保守的丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化。磷酸化的信号募集含 β -TrCP的E3泛素连接酶, β -连环蛋白随后被相关蛋白水解酶水解。在存在Wnt信号时,Wnt结合Frizzled/LRP5/6受体复合物,激活蛋白Dishevelled(Dvl),Dvl可阻断降解复合物的形成,从而阻止了 β -连环蛋白的磷酸化而保持了其稳定性,使 β -连环蛋白在细胞质中积累。细胞质中积累的 β -连环蛋白易位到细胞核内,取代阻遏蛋白Groucho和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC),并与TCF/LEF转录因子结合,激活Wnt相关靶基因(如*c-myc*、*cyclinD1*)的表达。Wnt信号通路在肿瘤干细胞自我更新能力中的重要作用已经在多种恶性肿瘤中被证实,如结肠癌、乳腺癌、白血病^[17]。Cai等^[6]研究发现,使用Wnt信号通路抑制剂DKK-1可降低胃癌MKN-45细胞系干细胞克隆球中细胞的自我更新能力,而使用Wnt通路激活剂氯化锂则可提高胃癌干细胞的自我更新能力。Oshima等^[18]对小鼠动物实验的研究表明Wnt信号通路在胃癌的发展中起重要作用。该研究发现携带K19-Wnt1的转基因小鼠在胃黏膜表达WNT1,使用角蛋白19(keratin 19, K19)启动子,显著地抑制癌前病变上皮细胞的分化。而携带K19-Wnt1/C2mE复合基因的小鼠在胃组织中表达Cox-2和其下游的分子微粒体前列腺素E合酶1(microsomal prostaglandin E synthase-1, mPGES-1),使胃的黏液细胞出现化生,进一步出现非典型增生及胃肿瘤。最近一项研究表明,携带Wnt通路拮抗基因Dickkopf-1(DKK1)的腺病毒Ad5/35-DKK1转染CD44⁺细胞后,可有效的抑

制内源性的Wnt信号的表达。DKK1的过表达抑制CD44⁺细胞的生存、克隆球形成和侵袭能力,而这种抑制作用可被GSK-3特异性抑制剂BIO-acetoxime逆转。更重要的是,引入DKK1可消除CD44⁺细胞的体内成瘤能力。而腺病毒Ad5/35-DKK1对正常组织起源细胞只有很小的不良反应^[19]。Huang等^[20]发现,促红细胞生成肝细胞A2(*EphA2*)基因可通过Wnt通路促进胃癌细胞出现上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。该研究发现在胃癌细胞系SGC7901和AGS中,过表达EphA2可上调EMT相关基因(如:*N-cadherin*、*Snail*和 β -catenin)的表达,降低E-cadherin的表达,与此同时Wnt通路靶基因*TCF4*、*Cyclin-D1*和*c-Myc*表达也增加,而使用EphA2的特异性shRNA干扰后得出了相反的结果。另外,在EphA2过表达组中使用Wnt通路抑制剂XAV939降低Wnt通路相关蛋白表达的同时可降低EphA2及EMT相关蛋白的过表达,而在EphA2沉默组使用Wnt通路激活剂LiCl可增加EphA2及EMT相关蛋白的表达。

2.3 Hedgehog信号通路 Hedgehog(Hh)信号通路最初在果蝇的胚胎发育研究中被发现。哺乳动物Hh通路包括Sonic(SHH)、Desert(DHH)和Indian(IHH)3种配体,细胞膜受体Patched(PTCH1/2)、G蛋白偶联受体、信号转导蛋白Smoothened(SMO)和下游基因表达调节蛋白GLI1、GLI2和GLI3。在没有Hh信号存在时,GLIs为信号通路的抑制剂。在没有相关配体存在时,PTCH1抑制SMO,阻断GLI的调节作用。当Hh配体与受体PTCH结合时,可释放被抑制的信号转导蛋白SMO,SMO进而诱导GLI的表达。GLIs作为激活剂或抑制剂调节相关蛋白(如:*c-myc*和*cyclinD1*等)的表达。Hh信号在癌症干细胞中的作用已经在许多癌症,包括多发性骨髓瘤、胶质母细胞瘤、胰腺癌等被描述^[21]。而在胃癌中,Song等^[22]研究表明,Hh信号在维持胃癌干细胞特性中起重要作用。他们发现在胃癌肿瘤干细胞球落中Hh信号过表达,应用环杷明或5E1抗体干扰Hh信号通路可降低胃癌细胞的自我更新能力。Zhang等^[7]从胃癌细胞株AGS中分离提取的CD44⁺CD24⁺胃癌细胞具有自我更新和多向分化潜能,而且与CD44⁺CD24⁺对照组相比表达Hh通路信号分子(包括SHH、PTCH1和GLI3)升高。另外一项在对41例胃癌患者的胃癌组织标本研究中发现^[23],Hh信号通路的激活与胃癌患者的预后有关。该研究显示在癌组织中的免疫组织化

学中, Hh信号通路相关分子表达增高, 但与肿瘤的临床病理因素没有显著的相关性. PTCH1与肿瘤分化型患者的不良预后相关. SHH和PTCH1 mRNA水平高与不良预后相关, 多因素分析显示PTCH1 mRNA水平升高是肝转移的独立预后因素. 大量研究表明Hh信号的过度表达促进胃癌细胞的增殖和生存, 而且与胃癌的低分化、侵袭性呈正相关^[24-26]. Lee等^[27]发现, 512例胃癌患者组织样本中分别有105例(20.0%)、83例(16.3%)、130例(25.5%)、61例(12.0%)和206例(40.8%)阳性表达*IHH*、*PTCH1*、*GLI2*、*SMO*和*FOXA2*基因. PTCH1在中高等分化程度胃管状腺癌、肠型胃癌和分期较低的胃癌中表达较高, GLI2与淋巴管血管浸润及肠型胃癌的发生相关. 多变量分析研究发现癌肿分期高和PTCH1阴性表达分别是胃癌患者低总体生存率的独立影响因素($P<0.001$, 0.045). 而*IHH*、*SMO*和*FOXA2*的表达与肿瘤的临床病理分期及对患者预后的影响无统计学意义. 另有研究发现人硫酸酯酶1(HSulf-1)可通过抑制Hh通路抑制胃癌细胞株MKN28细胞的增殖和生长. HSulf-1可抑制GLI介导的转录并下调Hh包括*GLI1*、*PTCH1*、*HHIP*、*CCND1*、*C-myc*和*BCL-2*等下游靶基因的表达^[28].

2.4 PI3K/AKT信号通路 PI3K/AKT通路即磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号通路. PI3K是细胞内重要的信号转导分子, 主要由催化亚基P110和调节亚基P85组成. AKT即蛋白激酶B, 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶. 在生长因子、细胞因子、激素等细胞外信号刺激作用下, PI3K被激活, 使细胞膜磷脂肌醇磷酸化, 产生3,4二磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol biphosphate, PIP2)、3,4,5三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3), PIP2、PIP3作为第二信使在细胞质内与AKT结合, 促进AKT的Ser473和Thr308位点磷酸化而激活AKT, 激活的AKT通过促进mTOR、BAD、GSK3、Caspase3等下游底物的磷酸化而发挥生物学效应, 如细胞增殖、凋亡等. 在肝细胞癌、乳腺癌、胶质瘤、急性髓系白血病等肿瘤中, PI3K/AKT信号通路参与了肿瘤干细胞的增殖、分化及化疗耐药^[29-32]. 在胃癌中, PI3K/AKT信号通路的激活与抑制与胃癌细胞的增殖、化疗耐药等密切相关. Dun等^[33]研究发现, 霉酚酸通过抑制PI3K/AKT/mTOR通路的激活抑制胃癌细胞株AGS的细胞增殖. 而在胃癌细胞株SGC7901、AGS中, 高表达磷酸化的AKT可因细胞黏附分

子L1(*L1cam*)基因的干扰而降低, 而在细胞株HGC27、MKN28中, 低表达磷酸化的AKT可因*L1cam*基因的过表达而上调. 裸鼠体内实验显示, *L1cam*促进肿瘤细胞的侵袭及迁移作用可因干扰*L1cam*的表达或用LY294002(PI3K抑制剂)抑制PI3K/AKT激活而被抑制^[34]. 另有研究表明, 用LY294002抑制AKT的表达可恢复胃癌细胞因转录因子FOXO1的过表达而导致的顺铂耐药^[35]. 在幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染相关的胃癌细胞株AGS中, 含缬酪肽蛋白通过PI3K/AKT通路降低细胞的监管作用而逃避细胞凋亡^[36].

2.5 BMP信号通路 BMP即骨髓形态发生蛋白(bone morphogenetic protein), 属于转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)超家族的成员之一, 分布于人体多种组织及细胞中. BMP与BMP受体的细胞膜外结构域结合, 激活SMAD1、5、8蛋白, 随后结合SMAD4蛋白形成SMAD蛋白复合物, 进入细胞核与转录因子结合调节基因的表达. BMP信号通路的激活与肺癌^[37]、乳腺癌^[38]、肾细胞癌^[39]、结直肠癌^[40]等密切相关. 在胃癌中, Zhang等^[41]研究表明, BMP-2可抑制胃癌细胞的生长, 使G₁期细胞增加, 使S期的细胞减少. 另有报道显示, 在弥漫型胃癌中, BMP-2和BMP-4的表达抑制细胞的增殖^[42]. 在对胃癌侵袭及转移的研究中, Kang等^[43]研究发现PI3K/AKT、ERK通路参与了BMP-2介导的胃癌细胞运动及侵袭. 最新一项研究发现, 在巨噬细胞与胃癌细胞共培养时, 巨噬细胞可通过TGF- β /BMPs通路上调胃癌细胞侵袭相关基因的表达而提高胃癌的侵袭能力, 而抑制TGF- β /BMPs通路则下调胃癌细胞侵袭相关基因的表达及胃癌的侵袭能力^[44].

3 肿瘤微环境与胃癌

肿瘤微环境由多种细胞(如间充质细胞、血管内皮细胞、肿瘤相关成纤维细胞、脂肪细胞、炎症细胞等)、细胞外基质及多种细胞生长因子、趋化因子、激素、酶等组成. 目前越来越多的研究表明, 胃癌微环境与胃癌的发生发展及胃癌干细胞通路的激活密切相关. Donnelly等^[45]发现, 激活SHH通路可介导骨髓源性间充质干细胞(bone-marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)的增殖, 并可促使其转移到胃上皮, 促进胃癌的发展^[46]. 另有研究研究表明, BM-MSCs可激活WNT和TGF- β 信号通路, 为胃癌干

■应用要点

通过本文的研究, 可为胃癌的临床治疗提供新的思路, 比如使用化疗药物联合信号通路抑制剂治疗耐药性胃癌.

■同行评价
本文具有一定指
导意义。

细胞特性的维持及胃癌的发展提供有利的肿瘤微环境。

4 *H. pylori*与胃癌

*H. pylori*是一种螺旋状、革兰染色阴性的微需氧菌,定居于几乎一半人类的胃上皮细胞中。*H. pylori*感染胃上皮细胞可导致急性胃炎,进一步发展可导致慢性胃炎、肠上皮化生,最终导致了胃癌的发生^[47,48]。有报道表明*H. pylori*与CSCs相互作用调节胃癌的发生与发展^[49]。最新研究发现,*H. pylori*可通过细胞毒素相关基因A(cytotoxin-associated gene A, *CagA*)的表达促进胃上皮细胞出现EMT,并表达肿瘤干细胞标志物CD44,感染*H. pylori*的胃上皮细胞的迁移、侵袭能力增强。在体外,只在*H. pylori*诱导的CD44⁺细胞出现间质细胞表型,而CD44⁻细胞中没有出现间质细胞表型。小鼠体内试验显示,与CD44⁻细胞相比,CD44⁺细胞具有更高的成瘤能力^[50]。

5 结论

通过寻找特异性干细胞标志物如CD133、CD44等分离筛选胃癌干细胞并针对性消除这些细胞有利于胃癌的治疗。已有很多证据表明在胃癌中多种信号转导通路的调节出现异常。然而这些信号通路在胃癌发生发展中的相对重要性以及激活时间先后顺序仍未研究透彻。这些细胞信号通路的激活或抑制导致多种胃癌恶性表型的发生发展,如细胞增殖力的增加、细胞抗凋亡和侵袭力的增强。阐明这些信号通路的激活时间及作用机制,有助于抗胃癌药物的开发及应用。胃癌细胞中信号转导系统是一个复杂的、相互作用的网络体系,目前大部分靶向治疗药物一般仅能针对一个靶点发挥效应,疗效都不确切,因此多靶点联合用药将是胃癌分子靶向治疗的热点研究方向。因此我们预测,依据不同类型胃癌的信号通路异常改变,针对性地通过靶向治疗同时抑制多种信号通路可能会提高胃癌治疗的效果,改善患者的生存和预后,并且可能阻止胃癌化疗耐药性的发生及发展。

6 参考文献

- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3: 730-737 [PMID: 9212098]
- Cai Z, Ke J, He X, Yuan R, Chen Y, Wu X, Wang L, Wang J, Lan P, Wu X. Significance of mTOR Signaling and Its Inhibitor Against Cancer Stem-Like Cells in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol* 2014; 21:

- 179-188 [PMID: 23907312]
- Wilson GS, Hu Z, Duan W, Tian A, Wang XM, McLeod D, Lam V, George J, Qiao L. Efficacy of using cancer stem cell markers in isolating and characterizing liver cancer stem cells. *Stem Cells Dev* 2013; 22: 2655-2664 [PMID: 23638793 DOI: 10.1089/scd.2012.0703]
- Choi SA, Lee JY, Phi JH, Wang KC, Park CK, Park SH, Kim SK. Identification of brain tumour initiating cells using the stem cell marker aldehyde dehydrogenase. *Eur J Cancer* 2014; 50: 137-149 [PMID: 24103144 DOI: 10.1016/j.ejca.2013.09.004]
- Yeh TS, Wu CW, Hsu KW, Liao WJ, Yang MC, Li AF, Wang AM, Kuo ML, Chi CW. The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2. *Cancer Res* 2009; 69: 5039-5048 [PMID: 19491270 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4021]
- Cai C, Zhu X. The Wnt/ β -catenin pathway regulates self-renewal of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *Mol Med Rep* 2012; 5: 1191-1196 [PMID: 22367735 DOI: 10.3892/mmr.2012.802]
- Zhang C, Li C, He F, Cai Y, Yang H. Identification of CD44⁺CD24⁺ gastric cancer stem cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 1679-1686 [PMID: 21882047 DOI: 10.1007/s00432-011-1038-5]
- Hashimoto K, Aoyagi K, Isobe T, Kouhiji K, Shirouzu K. Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2014; 17: 97-106 [PMID: 23558457]
- Lee HH, Seo KJ, An CH, Kim JS, Jeon HM. CD133 expression is correlated with chemoresistance and early recurrence of gastric cancer. *J Surg Oncol* 2012; 106: 999-1004 [PMID: 22674531 DOI: 10.1002/jso.23178]
- Zieker D, Bühler S, Ustündag Z, Königsrainer I, Manncke S, Bajaeifer K, Vollmer J, Fend F, Northoff H, Königsrainer A, Glatzle J. Induction of tumor stem cell differentiation--novel strategy to overcome therapy resistance in gastric cancer. *Langenbecks Arch Surg* 2013; 398: 603-608 [PMID: 23412594 DOI: 10.1007/s00423-013-1058-5]
- Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009; 27: 1006-1020 [PMID: 19415765 DOI: 10.1002/stem.30]
- Wang Z, Li Y, Sarkar FH. Notch signaling proteins: legitimate targets for cancer therapy. *Curr Protein Pept Sci* 2010; 11: 398-408 [PMID: 20491628]
- Pannuti A, Foreman K, Rizzo P, Osipo C, Golde T, Osborne B, Miele L. Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3141-3152 [PMID: 20530696 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2823]
- Hsu KW, Hsieh RH, Huang KH, Fen-Yau Li A, Chi CW, Wang TY, Tseng MJ, Wu KJ, Yeh TS. Activation of the Notch1/STAT3/Twist signaling axis promotes gastric cancer progression. *Carcinogenesis* 2012; 33: 1459-1467 [PMID: 22581828 DOI: 10.1093/carcin/bgs165]
- Yao J, Qian CJ, Ye B, Zhang X, Liang Y. ERK inhibition enhances TSA-induced gastric cancer cell apoptosis via NF- κ B-dependent and Notch-independent mechanism. *Life Sci* 2012; 91: 186-193 [PMID: 22781708 DOI: 10.1016/j.lfs.2012.06.034]
- Yan B, Zhou Y, Feng S, Lv C, Xiu L, Zhang Y, Shi J, Li Y, Wei P, Qin Z. β -Elemene-Attenuated Tumor

- Angiogenesis by Targeting Notch-1 in Gastric Cancer Stem-Like Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 268468 [PMID: 23710217 DOI: 10.1155/2013/268468]
- 17 Takahashi-Yanaga F, Kahn M. Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3153-3162 [PMID: 20530697 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2943]
 - 18 Oshima H, Matsunaga A, Fujimura T, Tsukamoto T, Taketo MM, Oshima M. Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E2 pathway. *Gastroenterology* 2006; 131: 1086-1095 [PMID: 17030179]
 - 19 Wang B, Liu J, Ma LN, Xiao HL, Wang YZ, Li Y, Wang Z, Fan L, Lan C, Yang M, Hu L, Wei Y, Bian XW, Chen D, Wang J. Chimeric 5/35 adenovirus-mediated Dickkopf-1 overexpression suppressed tumorigenicity of CD44+ gastric cancer cells via attenuating Wnt signaling. *J Gastroenterol* 2013; 48: 798-808 [PMID: 23188090 DOI: 10.1007/s00535-012-0711-z]
 - 20 Huang J, Xiao D, Li G, Ma J, Chen P, Yuan W, Hou F, Ge J, Zhong M, Tang Y, Xia X, Chen Z. EphA2 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer cells. *Oncogene* 2013 Jun 10. [Epub ahead of print] [PMID: 23752181 DOI: 10.1038/onc.2013.238]
 - 21 Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3130-3140 [PMID: 20530699 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2846]
 - 22 Song Z, Yue W, Wei B, Wang N, Li T, Guan L, Shi S, Zeng Q, Pei X, Chen L. Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *PLoS One* 2011; 6: e17687 [PMID: 21394208 DOI: 10.1371/journal.pone.0017687]
 - 23 Saze Z, Terashima M, Kogure M, Ohsuka F, Suzuki H, Gotoh M. Activation of the sonic hedgehog pathway and its prognostic impact in patients with gastric cancer. *Dig Surg* 2012; 29: 115-123 [PMID: 22456124 DOI: 10.1159/000336949]
 - 24 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; 425: 846-851 [PMID: 14520411]
 - 25 Han ME, Lee YS, Baek SY, Kim BS, Kim JB, Oh SO. Hedgehog signaling regulates the survival of gastric cancer cells by regulating the expression of Bcl-2. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 3033-3043 [PMID: 19742123 DOI: 10.3390/ijms10073033]
 - 26 Lee SY, Han HS, Lee KY, Hwang TS, Kim JH, Sung IK, Park HS, Jin CJ, Choi KW. Sonic hedgehog expression in gastric cancer and gastric adenoma. *Oncol Rep* 2007; 17: 1051-1055 [PMID: 17390043]
 - 27 Lee SJ, Do IG, Lee J, Kim KM, Jang J, Sohn I, Kang WK. Gastric cancer (GC) patients with hedgehog pathway activation: PTCH1 and GLI2 as independent prognostic factors. *Target Oncol* 2013; 8: 271-280 [PMID: 23371028 DOI: 10.1007/s11523-013-0253-1]
 - 28 Ma HY, Zhang F, Li J, Mo ML, Chen Z, Liu L, Zhou HM, Sheng Q. HSulf-1 suppresses cell growth and down-regulates Hedgehog signaling in human gastric cancer cells. *Oncol Lett* 2011; 2: 1291-1295 [PMID: 22848304]
 - 29 Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO. Lupeol targets liver tumor-initiating cells through phosphatase and tensin homolog modulation. *Hepatology* 2011; 53: 160-170 [PMID: 20979057 DOI: 10.1002/hep.24000]
 - 30 Korkaya H, Paulson A, Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Brown M, Dutcher J, Clouthier SG, Wicha MS. Regulation of mammary stem/progenitor cells by PTEN/Akt/ β -catenin signaling. *PLoS Biol* 2009; 7: e1000121 [PMID: 19492080 DOI: 10.1371/journal.pbio.1000121]
 - 31 Kahana S, Finniss S, Cazacu S, Xiang C, Lee HK, Brodie S, Goldstein RS, Roitman V, Slavin S, Mikkelsen T, Brodie C. Proteasome inhibitors sensitize glioma cells and glioma stem cells to TRAIL-induced apoptosis by PKC ϵ -dependent downregulation of AKT and XIAP expressions. *Cell Signal* 2011; 23: 1348-1357 [PMID: 21440622 DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.03.017]
 - 32 Sykes SM, Lane SW, Bullinger L, Kalaitzidis D, Yusuf R, Saez B, Ferraro F, Mercier F, Singh H, Brumme KM, Acharya SS, Scholl C, Tothova Z, Attar EC, Fröhling S, DePinho RA, Armstrong SA, Gilliland DG, Scadden DT. AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias. *Cell* 2011; 146: 697-708 [PMID: 21884932 DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.032]
 - 33 Dun B, Xu H, Sharma A, Liu H, Yu H, Yi B, Liu X, He M, Zeng L, She JX. Delineation of biological and molecular mechanisms underlying the diverse anti-cancer activities of mycophenolic acid. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6: 2880-2886 [PMID: 24294374]
 - 34 Chen DL, Zeng ZL, Yang J, Ren C, Wang DS, Wu WJ, Xu RH. L1cam promotes tumor progression and metastasis and is an independent unfavorable prognostic factor in gastric cancer. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 43 [PMID: 23806079 DOI: 10.1186/1756-8722-6-43]
 - 35 Park J, Ko YS, Yoon J, Kim MA, Park JW, Kim WH, Choi Y, Kim JH, Cheon Y, Lee BL. The forkhead transcription factor FOXO1 mediates cisplatin resistance in gastric cancer cells by activating phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Gastric Cancer* 2013 Nov 8. [Epub ahead of print] [PMID: 24202965]
 - 36 Yu CC, Yang JC, Chang YC, Chuang JG, Lin CW, Wu MS, Chow LP. VCP phosphorylation-dependent interaction partners prevent apoptosis in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *PLoS One* 2013; 8: e55724 [PMID: 23383273 DOI: 10.1371/journal.pone.0055724]
 - 37 Langenfeld E, Deen M, Zachariah E, Langenfeld J. Small molecule antagonist of the bone morphogenetic protein type I receptors suppresses growth and expression of Id1 and Id3 in lung cancer cells expressing Oct4 or nestin. *Mol Cancer* 2013; 12: 129 [PMID: 24160469]
 - 38 Garulli C, Kalogris C, Pietrella L, Bartolacci C, Andreani C, Falconi M, Marchini C, Amici A. Dorsomorphin reverses the mesenchymal phenotype of breast cancer initiating cells by inhibition of bone morphogenetic protein signaling. *Cell Signal* 2014; 26: 352-362 [PMID: 24280125 DOI: 10.1016/j.cellsig.2013.11.022]
 - 39 Wang L, Park P, Zhang H, La Marca F, Claeson A, Than K, Rahman S, Lin CY. BMP-2 inhibits tumor growth of human renal cell carcinoma and induces bone formation. *Int J Cancer* 2012; 131: 1941-1950 [PMID: 22275155 DOI: 10.1002/ijc.27444]

- 40 Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P, Todaro M, Iovino F, Ricci-Vitiani L, Gulotta G, Dieli F, de Maria R, Stassi G. Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. *Gastroenterology* 2011; 140: 297-309 [PMID: 20951698 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.10.005]
- 41 Zhang J, Ge Y, Sun L, Cao J, Wu Q, Guo L, Wang Z. Effect of bone morphogenetic protein-2 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Int J Med Sci* 2012; 9: 184-192 [PMID: 22359486 DOI: 10.7150/ijms.3859]
- 42 Shirai YT, Ehata S, Yashiro M, Yanagihara K, Hirakawa K, Miyazono K. Bone morphogenetic protein-2 and -4 play tumor suppressive roles in human diffuse-type gastric carcinoma. *Am J Pathol* 2011; 179: 2920-2930 [PMID: 21996676 DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.08.022]
- 43 Kang MH, Oh SC, Lee HJ, Kang HN, Kim JL, Kim JS, Yoo YA. Metastatic function of BMP-2 in gastric cancer cells: the role of PI3K/AKT, MAPK, the NF- κ B pathway, and MMP-9 expression. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1746-1762 [PMID: 21570392 DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.04.006]
- 44 Shen Z, Kauttu T, Cao J, Seppänen H, Vainionpää S, Ye Y, Wang S, Mustonen H, Puolakkainen P. Macrophage coculture enhanced invasion of gastric cancer cells via TGF- β and BMP pathways. *Scand J Gastroenterol* 2013; 48: 466-472 [PMID: 23517295 DOI: 10.3109/00365521.2013.772226]
- 45 Donnelly JM, Chawla A, Houghton J, Zavros Y. Sonic hedgehog mediates the proliferation and recruitment of transformed mesenchymal stem cells to the stomach. *PLoS One* 2013; 8: e75225 [PMID: 24069395 DOI: 10.1371/journal.pone.0075225]
- 46 Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology* 2012; 79: 290-306 [PMID: 22688186 DOI: 10.1159/000337296]
- 47 Ding SZ, Zheng PY. Helicobacter pylori infection induced gastric cancer; advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. *Gut Pathog* 2012; 4: 18 [PMID: 23217022 DOI: 10.1186/1757-4749-4-18]
- 48 Uehara T, Ma D, Yao Y, Lynch JP, Morales K, Ziober A, Feldman M, Ota H, Sepulveda AR. H. pylori infection is associated with DNA damage of Lgr5-positive epithelial stem cells in the stomach of patients with gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 140-149 [PMID: 22945475 DOI: 10.1007/s10620-012-2360-8]
- 49 Pilpilidis I, Kountouras J, Zavros 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]
- 50 Bessède E, Staedel C, Acuña Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, Belleannée G, Mégraud F, Varon C. Helicobacter pylori generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene* 2013 Oct 7. [Epub ahead of print] [PMID: 24096479 DOI: 10.1038/onc.2013.380]

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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%。

长链非编码RNA在胃癌中的研究进展

胡 谦, 胡小云

胡谦, 胡小云, 南昌大学第二附属医院胃肠外科 江西省南昌市 330006

胡谦, 主要从事胃癌的相关研究.

作者贡献分布: 本文综述由胡谦完成; 胡小云审校.

通讯作者: 胡小云, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院胃肠外科.

huxiaoyun1965@163.com

电话: 0791-86301536

收稿日期: 2013-11-23 修回日期: 2013-12-11

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

Long non-coding RNAs and gastric carcinoma

Qian Hu, Xiao-Yun Hu

Qian Hu, Xiao-Yun Hu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Xiao-Yun Hu, Professor, Chief Physician, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huxiaoyun1965@163.com

Received: 2013-11-23 Revised: 2013-12-11

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are a group of RNA molecules which are longer than 200 nucleotides. They do not contain functional open reading frames and can not encode proteins. A large number of transcribed lncRNAs in the genome are becoming the new hot spot in cancer research after microRNA due to their carcinogenic and tumor suppressor properties. Recently, several studies indicated that lncRNAs participate in epigenetic modification and play an important role in gene expression regulation. lncRNAs were related to gastric carcinoma development, invasion and metastasis. Further research on the relationship between lncRNAs and gastric carcinoma may provide new strategies for gastric carcinoma prevention, diagnosis and treatment. This article reviews the latest studies on lncRNAs in gastric carcinoma.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Long non-coding RNAs; Gastric carcinoma;

Research progress

Hu Q, Hu XY. Long non-coding RNAs and gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 501-507 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/501.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.501>

摘要

长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于200核苷酸, 缺少特异开放阅读框, 不具备蛋白质编码功能的一类RNA分子. 在基因组中大量转录的lncRNA, 因其在致癌与抑癌途径中显露出的潜在作用, 成为继微RNA(microRNA, miRNA)后肿瘤研究的新热点. 近年来研究显示, lncRNA参与表观遗传修饰, 在基因表达调控中起重要作用, lncRNA与胃癌的发生、发展、肿瘤侵袭、转移密切相关. 深入研究lncRNA与胃癌的发病关系有望为胃癌的预防和诊治提供新的策略. 本文结合国内外最新报道, 对lncRNA在胃癌中的研究进展作一综述.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 长链非编码RNA; 胃癌; 研究进展

核心提示: 长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)是当前分子生物学和遗传性研究的热门. 已有研究表明lncRNA与癌症的发生、发展、转移、复发存在密切关系, 近年来, 关于lncRNA与胃癌之间的关系的初步显示, 许多lncRNA在胃癌发生发展、转移中起重要作用.

胡谦, 胡小云. 长链非编码RNA在胃癌中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22(4): 501-507 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/501.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.501>

0 引言

全球癌症统计中, 胃癌发病率排名第4位, 亚洲胃癌患者占全球总数的60%, 中国胃癌患者在亚洲又是最多的^[1-3]. 尽管诊断技术在不断提高, 以手术治疗为主的综合治疗手段越来越丰富(包括化疗、靶向治疗等), 但胃癌仍旧是全球第二

■背景资料

在基因组中大量转录的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA), 因其在致癌与抑癌途径中显露出的潜在作用, 成为继microRNA后肿瘤研究的新热点. 深入研究lncRNA与胃癌的发病关系有望为胃癌的预防和诊治提供新的策略.

■同行评议者

潘阳林, 副主任医师, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化病医院消化科

■ 研发前沿

本文结合国内外最新报道,对lncRNA在胃癌中的研究进展作一综述,为将来研究提供理论支持。

大癌症致死性疾病^[4]。因此,探索胃癌发生发展的分子机制,寻找可靠的生物标志物作早期诊断依据和可靠的治疗靶点,提高胃癌患者的生存期显得尤为迫切。在基因组中大量转录的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA),因其在致癌与抑癌途径中显露出的潜在作用,成为继microRNA后肿瘤研究的新热点。

1 lncRNA概述

基因组测序工程显示人类基因组包括约20000种蛋白编码基因,仅占总基因的约2%,超过90%的转录子是非编码RNA。非编码RNA不具有开放阅读框,无蛋白翻译功能。根据非编码RNA的长短分为三种类型,长链、中链、短链非编码RNA。lncRNA是一类转录本长度大于200个核苷酸不编码蛋白质的RNA分子,短链RNA是一类转录本长度界于18-25个核苷酸不编码蛋白质的RNA分子^[5-7],microRNA属于短链RNA,已有研究证实microRNA不仅在基因调控中起关键作用,而且在癌肿中扮演重要角色^[8]。继microRNA后,lncRNA的研究已然成为当前全球生物研究的热点。近来研究表明,在人类机体中,估计有15000种lncRNA,大部分lncRNA显示了不同的组织特异性^[9]。lncRNA具有不同的亚细胞定位,并在不同的细胞定位中起不同的作用,尤其是在细胞核中。根据他们在基因组上相对于蛋白编码基因的位置和特征,可将lncRNA分为五大类:(1)正义lncRNA(sense lncRNA):与同一条链上蛋白编码基因转录方向相同;(2)反义lncRNA(anti-sense lncRNA):与同一条链上蛋白编码基因转录方向相反;(3)双向lncRNA(bidirectional lncRNA):可同时向同一条链上蛋白编码基因转录方向相同或相反的方向转录;(4)基因内lncRNA(intronic lncRNA):从基因的内含子区转录得到;(5)基因间lncRNA(intergenic lncRNA):从两个基因间的区域转录得到,即lincRNA^[10]。

2 lncRNA与肿瘤

lncRNA发现时被认为是转录噪音,但越来越多的研究表明,lncRNA不仅参与多种生物学进程及扮演多种角色(如剪接、转录干扰、转录后调控、基因组印迹、染色质修饰、细胞周期调控、表观遗传学调控、免疫监视等)^[11,12],而且广泛参与机体的生理和病理过程。研究证实,异常的lncRNA表达跟许多疾病相关^[13,14],能够导

致包括肿瘤在内的多种疾病^[15,16],尽管具体的机制尚不清楚,但在不同的癌肿中,许多lncRNA扮演着双重角色,即致癌及抑癌。因此,在庞大的与癌肿相关的机制网络中,探究与癌症相关的lncRNA以及lncRNA在癌肿形成、转移、肿瘤耐药中的分子生物学机制显得尤为重要。

3 lncRNA与胃癌的关系

已有研究表明lncRNA与癌症的发生、发展、转移、复发存在密切关系^[17,18],近来,Cao等^[19]利用生物信息学方法筛查80对胃癌病理组织和正常胃组织中lncRNA表达的情况。首先,他们从GEO(Gene Expression Omnibus)下载了2套公开发表的针对胃癌的外显子序列,又下载了关于相关对应的正常胃组织的数据。然后,将外显子序列重新注解,做成新的探针,获取探针回馈的lncRNA基因水平。最终发现,有88种lncRNA在胃癌组织中异常表达。王亚芳等^[20]的研究发现缺氧诱导的胃癌细胞与常氧的胃癌细胞比较,lncRNA表达谱发生显著变化,提示差异性表达的lncRNA可能参与了缺氧环境下胃癌细胞多种恶性表型的变化。近年来,关于lncRNA与胃癌的关系出现许多研究,研究初步显示,许多lncRNA在胃癌发生发展、转移中起重要作用。

3.1 lncRNA-GACAT1 lncRNA-GACAT1(gastric cancer-associated transcript 1)长度为577核苷酸,缺乏完整的开放阅读框,由位于染色体2上的GACAT1基因编码。Sun等^[21]对78例胃癌组织进行研究,发现与正常组织相比,lncRNA-AC096655.1-002在59%(46/78)的胃癌组织中低表达。对临床病理资料研究显示AC096655.1-002与TNM分期有关,其表达水平可对胃癌的远处转移($P<0.001$)、肿瘤分化($P<0.05$)和浸润深度($P<0.05$)具有明显的预测作用。在Sun的研究发表不久后,AC096655.1-002被基因命名委员会(HUGO Gene Nomenclature Committee, HGNC)命名为GACAT1^[22]。Sun的研究提示GACAT1在胃癌中的诊治中具有潜在的应用价值。

3.2 lncRNA-H19 H19基因系母系等位基因,父系印迹,在哺乳动物中呈现进化上的保守性,是最早被鉴定的印迹基因之一。H19基因位于人染色体11p15.5,共有5个外显子及4个内含子,H19基因编码一个2.3 kb的非编码RNA分子,命名为H19,H19是第一个发现与癌症相关的lncRNA。H19在胚胎发育期呈高表达,主要集中表达于内胚层及中胚层来源的组织,出生后H19的表

达降低, 仅在心肌及骨骼肌中有一定的表达^[23]. *H19/Igf2*印迹基因隶属于一个基因印迹群, 在进化上具有高度的保守性. *H19*基因为母源性印迹基因, 而*Igf2*基因为父源性印迹基因, 两者相距90 kb, 皆受*H19*基因上游4 kb处差异甲基化区(differentially methylated region, DMR)或印记调控区(imprinting control region, ICR)调控^[24].

一些研究证实H19在一些癌症中高表达, 存在致癌作用, 比如乳腺癌^[25], 也有一些研究表明, H19在一些癌症中低表达, 比如肝癌^[26]. H19在不同肿瘤中扮演致癌与抑癌的双面角色, 这种矛盾角色可能与H19本身的功能多样性以及组织特异性有关^[27]. 为了探究H19与胃癌的关系, Yang等^[28]应用RT-PCR检测了胃癌组织和正常胃组织中lncRNA H19的表达水平, 结果显示, H19在胃癌组织中的表达升高. 体外细胞试验发现过表达H19明显促进胃癌AGS细胞的增长, 而利用siRNA沉默H19表达后则可诱导胃癌AGS细胞的凋亡. 表明了lncRNA H19在胃癌生长分子病因学中的重要性. 另外, 为了探究H19导致癌细胞增殖的机制, Yang等^[28]利用免疫沉淀方法, 在AGS胃癌细胞株中利用抗体结合P53, 结果发现P53与抗体结合后, 细胞株AGS的H19表达明显上调, 体外细胞功能实验发现H19不仅能结合P53, 而且可以抑制P53的活性并降低P53下游靶基因*Bax*(凋亡相关基因)的水平, 从而促进胃癌细胞增殖和逃逸凋亡. Song等^[29]的研究同样证实, H19在胃癌组织中的表达明显高于非肿瘤组织. Song等^[29]的体外细胞试验和Yang等^[28]的研究结果一样, 在胃癌细胞株, H19明显高表达. Arita等^[30]的研究也证实, 胃癌患者的血清H19水平比对照组(正常人血清)的升高. 通过这些研究初步表明lncRNA H19参与胃癌生长分子病因学中的机制, 深入研究, 可能揭示H19在胃癌诊治中的应用价值.

3.3 HOTAIR HOX转录反义RNA(HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)是第一个被发现具有反式转录调控作用的lncRNA, 定位于12q13.13, 其功能片段位于5'端1-300 nt和3'端1500-2146 nt区域, HOTAIR不编码蛋白, 而是作为一个分子支架, 结合至少2个不同的组蛋白修饰复合物: (1)5'端结合多梳抑制复合体2(polycomb repressive complex 2, PRC2), 介导染色体组蛋白H3K27甲基化(histone H3 tri-methylated at lysine 27, H3K27me3); (2)3'端结合组蛋白赖氨酸去甲基化酶(lysine specific demethylase1, LSD1), 介

导染色体组蛋白H3K4Me2的去甲基作用(histone H3 dimethyl Lys4, H3K4me2). HOTAIR并介导这2种复合体结合到特异性的基因组位点, 位于染色体2的HOXD是PRC2的一个靶点, 与HOXD结合后使该位点上一段40 kb的区域发生转录沉默^[31]. Gupta等^[32]研究发现在乳腺癌中, 发生上述联级反应导致乳腺上皮细胞的基因表达方式变得更类似于胚胎成纤维细胞, 而且肿瘤转移能力表现出某种程度上依赖于PRC2而增强, 针对HOTAIR进行siRNA干扰, 能够抑制肿瘤转移, 尤其是在PRC2过度活跃的细胞中. 已有研究发现结直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、鼻咽癌与HOTAIR相关^[33-36]. 为了探究HOTAIR与胃癌的关系, Endo等^[37]研究发现, 与正常胃组织对比, 胃癌组织中HOTAIR显著高表达, 而且对临床资料研究显示HOTAIR高表达与淋巴结转移、血管侵犯、生存期短成正相关性. 这些对临床资料的研究结果与Hajjari等^[38]和Xu等^[39]的研究结果一致. 但是, Endo的实验并未显示HOTAIR表达与胃癌细胞生长存在明显关系, 与H19不同. 活体动物实验, NOG鼠建模, 结果显示NOG HOTAIR阳性组与NOGHOTAIR阴性组对比, 二者肿瘤生长无明显差异, 但HOTAIR的高表达与胃癌肝转移率升高相关, 而沉默HOTAIR, 胃癌腹膜转移率降低, 动物实验同样显示了HOTAIR与胃癌转移的关系. Xu等^[39]的研究还采用siRNA干扰技术, 在胃癌AGS细胞株使HOTAIR沉默, 结果显示AGS细胞株的侵袭力显著减弱, 将HOTAIR转染至AGS胃癌细胞株中并表达, 结果显示, 这些AGS胃癌细胞株的繁殖情况和凋亡情况较无转染的AGS细胞株无明显差别. 以上研究结果提示HOTAIR参与胃癌转移中的分子病因学机制, 可能与原发癌灶生长无明显关系. 为了探究胃癌组织中HOTAIR高表达的机制, Hajjari等^[38]的研究初步显示HOTAIR与*SUZ12*基因存在一定关系, 具体机制有待进一步研究. 为了探究胃癌组织中HOTAIR高表达与胃癌侵袭力提高相关的作用机制, Xu等^[39]采用RT-PCR技术, 结果显示HOTAIR表达与ICAM-1及MMPs家族相关(包括MMP1、MMP3、MMP9), HOTAIR沉默后MMP1、MMP3表达显著下降. 另外, 细胞试验证实HOTAIR上调将促进胃癌细胞的上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 这又可使胃癌细胞侵袭能力增加, 沉默HOTAIR可使EMT逆转. Xu等的研究还显示: 利用HOTAIR高表达来作为预测是否存在淋巴结

■相关报道

本文结合国内外最新报道, 对lncRNA在胃癌中的研究进展作一综述. 具体相关报道见综述全文.

■创新盘点

本文结合国内外最新报道,对lncRNA在胃癌中的研究进展作一综述。

转移的指标,其诊断性ROC曲线下面积达到0.8,提示HOTAIR高表达有很好的预测淋巴结转移的价值。他们采用多因素分析显示HOTAIR表达可作为总生存的独立预后因素;在淋巴转移分级为N2、N3a的胃癌患者中,HOTAIR低表达的患者相比HOTAIR高表达的患者,中位生存时间显著延长。

总之,HOTAIR在胃癌中表达与胃癌转移相关,具体机制有待进一步研究,研究结果初步显示HOTAIR可较好的预测淋巴结转移和预后,有较大的潜在临床应用价值。

3.4 CCAT1 近来Nissan等^[40]的研究显示结肠癌病理组织中lncRNA-CCAT1较结肠正常组织表达显著增高。Yang等^[41]的研究发现lncRNA-CCAT1(colon cancer associated transcript 1)在胃癌组织中也呈高表达,并且临床病理资料研究显示CCAT1在胃癌组织中的表达与胃癌原发瘤灶大小、淋巴结转移、远处转移相关。活体动物试验研究显示,通过染色质免疫共沉淀技术证实CCAT1启动子区域,c-Myc和E-box(enhancer-box)的相互作用激活CCAT1的表达,体外细胞研究显示CCAT1的表达与胃癌细胞的增殖和迁移密切相关。

3.5 MEG3 母系印记基因3(maternal imprinted genes 3, *MEG3*)是首次由Miyoshi等^[42]在2000年发现的,MEG3 lncRNA长约1.6 kb,缺乏完整的开放阅读框,由位于染色体14q32上的*MEG3*基因编码。在多种正常组织中均有表达,在脑膜瘤、结肠癌、鼻咽癌以及白血病等多种肿瘤中其表达水平降低或出现缺失。此外,还发现异位表达MEG3可抑制不同种类的人类癌细胞系的生长,可能是潜在的肿瘤抑制基因^[43]。目前对*MEG3*基因的功能尚不完全清楚,特别是对*MEG3*基因编码的lncRNA-MEG3在胃癌中是如何发挥作用的还知之甚少。为了研究其在胃癌中的情况,Sun等^[44]利用RT-PCR检测发现,与对照组正常胃组织比较,MEG3 lncRNA在胃癌组织中表达低,而且临床病理资料研究显示肿瘤分期越晚,表达下降更为明显,低MEG3 lncRNA表达比高表达的患者生存期更短,提示MEG3 lncRNA低表达的患者预后不良。体外细胞试验证实,很多胃癌细胞株中无MEG3 lncRNA表达。为了探究胃癌细胞株中MEG3 lncRNA低表达甚至不表达的机制,Sun在细胞试验研究发现DNA甲基化可导致MEG3 lncRNA不表达,提示DNA甲基化可能与MEG3 lncRNA在胃癌中低

表达/不表达相关,他们还证实高表达MEG3 lncRNA可抑制胃癌细胞生长并促进细胞凋亡,沉默MEG3可促进胃癌细胞增殖。为了探究MEG3 lncRNA影响胃癌细胞生长与凋亡的机制,Sun研究发现,在AGS胃癌细胞株中,MEG3 lncRNA的表达可刺激p53蛋白表达,从而抑制胃癌细胞生长并促进细胞凋亡。这些结果提示,胃癌的分子病因学中,MEG3 lncRNA低表达扮演重要角色,并提示MEG3 lncRNA可作为判断胃癌预后的一项指标。

3.6 SUMO1P3 基因组中存在一些与正常基因非常相似但不能表达的DNA序列,称为伪基因(pseudogene),其编码的lncRNA也是lncRNA家族成员之一。*SUMO*(small ubiquitin-like modifier)基因是泛素样基因家族中的一员,编码SUMO蛋白。和泛素(ubiquitin)结合底物蛋白后引起底物蛋白降解的作用不同,SUMO蛋白和相应的底物蛋白结合后不会引起底物蛋白的降解,而是调节底物蛋白的功能,在转录、DNA修复、核质转运、染色体分离及染色体代谢等方面发挥重要调控作用^[45]。已发现越来越多的和癌症相关的蛋白都存在SUMO-1修饰^[46]。SUMO1P3(small ubiquitin-like modifier1 pseudogene 3) lncRNA是与*SUMO*基因非常相似的伪基因编码的lncRNA,为了研究SUMO1P3 lncRNA表达与胃癌的关系,Mei等^[47]利用RT-PCR检测发现,SUMO1P3 lncRNA在胃癌中表达上调,而且临床病理资料研究显示与患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤分化、淋巴转移、肿瘤侵袭和CEA水平显著相关。分化程度较高的胃癌组织中SUMO1P3 lncRNA表达更高。与胃癌中CEA阴性的对比,胃癌中CEA升高的SUMO1P3 lncRNA表达更高。

3.7 BM742401 Park等^[48]利用RNA序列技术对比胃癌组织和正常胃组织中lncRNA的表达情况,研究发现31种新的lncRNA在胃癌中表达异常。BM742401证实无开发阅读框,无翻译蛋白功能,并被证实其为胃癌转移相关表型而不是胃癌增殖相关表型,与HOTAIR相似,但目前未被HGNC具体命名。提示BM742401参与胃癌转移的分子机制,并可能成为胃癌治疗的新靶点。

4 结论

lncRNA有些在胃癌中过表达,有些在胃癌中低表达或者不表达,相关研究也初步揭示引起lncRNA在胃癌中异常表达的机制以及lncRNA异常表达对胃癌生长、侵袭、转移影响的机制,

但更具体的机制还有待更进一步的研究. 上述针对lncRNA与胃癌的生长、侵袭、转移关系的研究为进一步寻找胃癌的治疗方法奠定了理论基础. 是否可以利用阻断在胃癌中过表达的lncRNA或者上调在胃癌中低表达甚至不表达的lncRNA作为潜在的胃癌治疗策略, 需有待更深入的研究和探索. lncRNA与胃癌的耐药是否有关还需进一步研究^[49]. lncRNA作为临床诊断与临床预后预测的指标, 必须经过长期的临床实践检验^[50]. 同时, 由于lncRNA本身的特殊性, 其种类繁多, 哪些与胃癌密切相关是以后研究面临的难题; 不像蛋白质的序列可被分成不同的类别, 而且蛋白质的这些类别可代表他们各自的功能, lncRNA保守, 其原始序列所包含的信息少, 因此难以预测其功能, 序列相差很大的lncRNA可能具有相似的功能, 序列相似的lncRNA又可能功能相差很大; 另外, 同一种lncRNA在胃癌中可能有多种作用机制, 不同机制间错综复杂的网络关系又会给研究带来巨大困难.

总之, 寻找与胃癌相关的lncRNA, 深入研究他们在胃癌发生发展中的作用及机制, 并将其作为临床早期诊断和预后判断的指标以及抗肿瘤的靶点, 可能为胃癌的临床诊治开辟新的途径, 带来重大突破.

5 参考文献

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90 [PMID: 21296855 DOI: 10.3322/caac.20107]
- Villanueva MT. Combination therapy: update on gastric cancer in East Asia. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 690 [PMID: 22048625 DOI: 10.1038/nrclinonc.2011.171]
- Lin Y, Ueda J, Kikuchi S, Totsuka Y, Wei WQ, Qiao YL, Inoue M. Comparative epidemiology of gastric cancer between Japan and China. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4421-4428 [PMID: 22110269 DOI: 10.3748/wjg.v17.i39.4421]
- Hartgrink HH, Jansen EP, van Grieken NC, van de Velde CJ. Gastric cancer. *Lancet* 2009; 374: 477-490 [PMID: 19625077 DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60617-6]
- ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Girosi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetrie D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Reymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA, Lagarde J, Abril JF, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermüller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korbel J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB, Ganesh M, Patel S, Tammana H, Chrast J, Henriksen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Carninci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaöz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Löytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Srinivasan M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA; NISC Comparative Sequencing Program; Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center; Washington University Genome Sequencing Center; Broad Institute; Children's Hospital Oakland Research Institute, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameur A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Shahab A, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley MJ, Inman D, Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Zhang X, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Ruan Y, Iyer VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyas E, Hallgrímsson IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B, de Jong PJ. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007; 447: 799-816 [PMID: 17571346]

■应用要点

寻找与胃癌相关的lncRNA, 深入研究他们在胃癌发生发展中的作用及机制, 并将其作为临床早期诊断和预后判断的指标以及抗肿瘤的靶点, 可能为胃癌的临床诊治开辟新的途径, 带来重大突破.

同行评价

本文对lncRNA进行了较为全面的介绍,重点阐述了若干lncRNA在胃癌中的表达及功能,准确反映了lncRNA胃癌领域的研究进展。

- 6 Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009; 458: 223-227 [PMID: 19182780 DOI: 10.1038/nature07672]
- 7 Nagano T, Fraser P. No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell* 2011; 145: 178-181 [PMID: 21496640 DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.014]
- 8 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866 [PMID: 17060945 DOI: 10.1038/nrc1997]
- 9 Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhata R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 2012; 22: 1775-1789 [PMID: 22955988 DOI: 10.1101/gr.132159.111]
- 10 Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 2009; 136: 629-641 [PMID: 19239885 DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.006]
- 11 Louro R, Smirnova AS, Verjovski-Almeida S. Long intronic noncoding RNA transcription: expression noise or expression choice? *Genomics* 2009; 93: 291-298 [PMID: 19071207 DOI: 10.1016/j.ygeno.2008.11.009]
- 12 Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 155-159 [PMID: 19188922 DOI: 10.1038/nrg2521]
- 13 Wapinski O, Chang HY. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol* 2011; 21: 354-361 [PMID: 21550244 DOI: 10.1016/j.tcb.2011.04.001]
- 14 Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 861-874 [PMID: 22094949 DOI: 10.1038/nrg3074]
- 15 Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov* 2011; 1: 391-407 [PMID: 22096659 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0209]
- 16 Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer* 2011; 10: 38 [PMID: 21489289 DOI: 10.1186/1476-4598-10-38]
- 17 Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol* 2012; 9: 703-719 [PMID: 22664915 DOI: 10.4161/rna.20481]
- 18 Mitra SA, Mitra AP, Triche TJ. A central role for long non-coding RNA in cancer. *Front Genet* 2012; 3: 17 [PMID: 22363342 DOI: 10.3389/fgene.2012.00017]
- 19 Cao WJ, Wu HL, He BS, Zhang YS, Zhang ZY. Analysis of long non-coding RNA expression profiles in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 3658-3664 [PMID: 23801869 DOI: 10.3748/wjg.v19.i23.3658]
- 20 王亚芳, 刘理礼, 靳海峰, 张慧, 张宏博, 聂勇战, 吴开春, 樊代明. LncRNA在缺氧诱导的胃癌细胞中表达谱的变化. *现代肿瘤医学* 2013; 21: 225-228
- 21 Sun W, Wu Y, Yu X, Liu Y, Song H, Xia T, Xiao B, Guo J. Decreased expression of long noncoding RNA AC096655.1-002 in gastric cancer and its clinical significance. *Tumour Biol* 2013; 34: 2697-2701 [PMID: 23645148 DOI: 10.1007/s13277-013-0821-0]
- 22 Xiao B, Guo J. Long noncoding RNA AC096655.1-002 has been officially named as gastric cancer-associated transcript 1, GACAT1. *Tumour Biol* 2013; 34: 3271 [PMID: 23754450 DOI: 10.1007/s13277-013-0916-7]
- 23 Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B. Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature* 1993; 365: 764-767 [PMID: 7692308 DOI: 10.1038/365764a0]
- 24 Thorvaldsen JL, Duran KL, Bartolomei MS. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev* 1998; 12: 3693-3702 [PMID: 9851976 DOI: 10.1101/gad.12.23.3693]
- 25 Berteaux N, Lottin S, Monté D, Pinte S, Quatannens B, Coll J, Hondermarck H, Curgy JJ, Dugimont T, Adriaenssens E. H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. *J Biol Chem* 2005; 280: 29625-29636 [PMID: 15985428 DOI: 10.1074/jbc.M504033200]
- 26 Zhang L, Yang F, Yuan JH, Yuan SX, Zhou WP, Huo XS, Xu D, Bi HS, Wang F, Sun SH. Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2013; 34: 577-586 [PMID: 23222811 DOI: 10.1093/carcin/bgs381]
- 27 Hajjari M, Khoshnevisan A. Potential long non-coding RNAs to be considered as biomarkers or therapeutic targets in gastric cancer. *Front Genet* 2013; 4: 210 [PMID: 24151500 DOI: 10.3389/fgene.2013.00210]
- 28 Yang F, Bi J, Xue X, Zheng L, Zhi K, Hua J, Fang G. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *FEBS J* 2012; 279: 3159-3165 [PMID: 22776265 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x]
- 29 Song H, Sun W, Ye G, Ding X, Liu Z, Zhang S, Xia T, Xiao B, Xi Y, Guo J. Long non-coding RNA expression profile in human gastric cancer and its clinical significances. *J Transl Med* 2013; 11: 225 [PMID: 24063685 DOI: 10.1186/1479-5876-11-225]
- 30 Arita T, Ichikawa D, Konishi H, Komatsu S, Shiozaki A, Shoda K, Kawaguchi T, Hirajima S, Nagata H, Kubota T, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2013; 33: 3185-3193 [PMID: 23898077]
- 31 Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007; 129: 1311-1323 [PMID: 17604720 DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.022]
- 32 Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464: 1071-1076 [PMID: 20393566 DOI: 10.1038/nature08975]
- 33 Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K,

- Imoto S, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Suzuki A, Komune S, Miyano S, Mori M. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res* 2011; 71: 6320-6326 [PMID: 21862635 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1021]
- 34 Kim K, Jutooru I, Chadalapaka G, Johnson G, Frank J, Burghardt R, Kim S, Safe S. HOTAIR is a negative prognostic factor and exhibits pro-oncogenic activity in pancreatic cancer. *Oncogene* 2013; 32: 1616-1625 [PMID: 22614017 DOI: 10.1038/onc.2012.193]
- 35 Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, Abe J, Tamai K, Tanaka N, Sato I, Takahashi S, Kondo T, Satoh K. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 436: 319-324 [PMID: 23743197 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.101]
- 36 Nie Y, Liu X, Qu S, Song E, Zou H, Gong C. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and survival. *Cancer Sci* 2013; 104: 458-464 [PMID: 23281836 DOI: 10.1111/cas.12092]
- 37 Endo H, Shioki T, Nakagawa T, Yokoyama M, Tamai K, Yamanami H, Fujita T, Sato I, Yamaguchi K, Tanaka N, Iijima K, Shimosegawa T, Sugamura K, Satoh K. Enhanced expression of long non-coding RNA HOTAIR is associated with the development of gastric cancer. *PLoS One* 2013; 8: e77070 [PMID: 24130837 DOI: 10.1371/journal.pone.0077070]
- 38 Hajjari M, Behmanesh M, Sadeghizadeh M, Zeinodini M. Up-regulation of HOTAIR long non-coding RNA in human gastric adenocarcinoma tissues. *Med Oncol* 2013; 30: 670 [PMID: 23888369 DOI: 10.1007/s12032-013-0670-0]
- 39 Xu ZY, Yu QM, Du YA, Yang LT, Dong RZ, Huang L, Yu PF, Cheng XD. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR suppresses tumor invasion and reverses epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Int J Biol Sci* 2013; 9: 587-597 [PMID: 23847441 DOI: 10.7150/ijbs.6339]
- 40 Nissan A, Stojadinovic A, Mitrani-Rosenbaum S, Halle D, Grinbaum R, Roistacher M, Bochem A, Dayanc BE, Ritter G, Gomceli I, Bostanci EB, Akoglu M, Chen YT, Old LJ, Gure AO. Colon cancer associated transcript-1: a novel RNA expressed in malignant and pre-malignant human tissues. *Int J Cancer* 2012; 130: 1598-1606 [PMID: 21547902 DOI: 10.1002/ijc.26170]
- 41 Yang F, Xue X, Bi J, Zheng L, Zhi K, Gu Y, Fang G. Long noncoding RNA CCAT1, which could be activated by c-Myc, promotes the progression of gastric carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 437-445 [PMID: 23143645 DOI: 10.1007/s00432-012-1324-x]
- 42 Miyoshi N, Wagatsuma H, Wakana S, Shiroishi T, Nomura M, Aisaka K, Kohda T, Surani MA, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Identification of an imprinted gene, Meg3/Gtl2 and its human homologue MEG3, first mapped on mouse distal chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genes Cells* 2000; 5: 211-220 [PMID: 10759892 DOI: 10.1046/j.1365-2443.2000.00320.x]
- 43 Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J Mol Endocrinol* 2012; 48: R45-R53 [PMID: 22393162 DOI: 10.1530/JME-12-0008]
- 44 Sun M, Xia R, Jin F, Xu T, Liu Z, De W, Liu X. Downregulated long noncoding RNA MEG3 is associated with poor prognosis and promotes cell proliferation in gastric cancer. *Tumour Biol* 2013 Sep 5. [Epub ahead of print] [PMID: 24006224 DOI: 10.1007/s13277-013-1142-z]
- 45 Martin S, Nishimune A, Mellor JR, Henley JM. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission. *Nature* 2007; 447: 321-325 [PMID: 17486098 DOI: 10.1038/nature05736]
- 46 Baek SH. A novel link between SUMO modification and cancer metastasis. *Cell Cycle* 2006; 5: 1492-1495 [PMID: 16861889 DOI: 10.4161/cc.5.14.3008]
- 47 Mei D, Song H, Wang K, Lou Y, Sun W, Liu Z, Ding X, Guo J. Up-regulation of SUMO1 pseudogene 3 (SUMO1P3) in gastric cancer and its clinical association. *Med Oncol* 2013; 30: 709 [PMID: 23996296 DOI: 10.1007/s12032-013-0709-2]
- 48 Park SM, Park SJ, Kim HJ, Kwon OH, Kang TW, Sohn HA, Kim SK, Moo Noh S, Song KS, Jang SJ, Sung Kim Y, Kim SY. A known expressed sequence tag, BM742401, is a potent lincRNA inhibiting cancer metastasis. *Exp Mol Med* 2013; 45: e31 [PMID: 23846333 DOI: 10.1038/emmm.2013.59]
- 49 王颖, 樊代明. 长链非编码RNA DMT1v4(NR_024549)在胃癌多药耐药中的作用及机制研究. 第四军医大学, 2012: 1-138
- 50 Qi P, Du X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Mod Pathol* 2013; 26: 155-165 [PMID: 22996375 DOI: 10.1038/modpathol.2012.160]

编辑 田滢 电编 闫晋利



锌指蛋白A20对炎症反应和细胞凋亡的调控作用及其在炎症性肠病中的影响

季 蓉, 吴焕淦, 施 茵

■背景资料

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD) 一种病因不明的慢性肠道炎症性疾病, 主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 其发病机制可能因感染、遗传、免疫等因素引起肠道免疫反应紊乱导致肠组织炎症病变与结构破坏。该病在欧美国家多发, 但近年来研究表明该病在我国的发展呈上升趋势。

季蓉, 上海中医药大学岳阳临床医学院 上海市 200437
吴焕淦, 施茵, 上海市针灸经络研究所 上海市 200030
季蓉, 在读硕士, 主要从事针灸治疗炎症性肠病的相关研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 81273844
国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目, No. 2009CB522900

作者贡献分布: 本文综述由季蓉完成, 吴焕淦与施茵负责指导审核。
通讯作者: 施茵, 博士, 主任医师, 博士生导师, 200030, 上海市宛平南路650号, 上海市针灸经络研究所。flysy0636@hotmail.com
电话: 021-64383910 传真: 021-64644238
收稿日期: 2013-09-02 修回日期: 2013-12-03
接受日期: 2013-12-05 在线出版日期: 2014-02-08

Regulatory effect of zinc finger protein A20 on inflammation and apoptosis: Implications for inflammatory bowel disease

Rong Ji, Huan-Gan Wu, Yin Shi

Rong Ji, Yueyang Clinical College of Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China
Huan-Gan Wu, Yin Shi, Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, Shanghai 200030, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81273844; the National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2009CB522900
Correspondence to: Yin Shi, Chief Physician, Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, 650 Wanping South Road, Shanghai 200030, China. flysy0636@hotmail.com
Received: 2013-09-02 Revised: 2013-12-03
Accepted: 2013-12-05 Published online: 2014-02-08

Abstract

Zinc finger protein A20, also known as tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3), is a protein with dual enzyme activities: ubiquitination and deubiquitination. It can negatively regulate inflammation and apoptosis mediated by a variety of signal transduction pathway, playing an important role in the occurrence, development and prognosis of inflammatory diseases, especially inflammatory bowel diseases. In recent years, the role of zinc finger protein A20 in inflammation and apoptosis has gained growing concern. This paper gives a brief overview of the biological effects of zinc finger protein A20 on inflammation and apoptosis

mediated by tumor necrosis factor alpha/tumor necrosis factor receptor 1, nuclear factor kappa B, lipopolysaccharide/lipopolysaccharide - nuclear factor kappa B, oxidized low density lipoprotein and other pathways as well as the negative regulatory effect of zinc finger protein A20 on intestinal inflammation and epithelial apoptosis in inflammatory bowel disease.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Zinc finger protein A20; Inflammation; apoptosis; Inflammatory bowel disease

Ji R, Wu HG, Shi Y. Regulatory effect of zinc finger protein A20 on inflammation and apoptosis: Implications for inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(4): 508-514 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/508.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.508>

摘要

锌指蛋白A20, 又称肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3(tumor necrosis factor alpha-induced protein 3, TNFAIP3), 是一种具有泛素化和去泛素化双重酶活性蛋白, 能负调控多种信号转导途径介导的炎症反应和细胞凋亡, 在炎症性疾病[尤其是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)]的发生、发展以及转归中发挥着重要作用。近年来, 有关A20蛋白在炎症反应和细胞凋亡中的影响作用已日益受到关注。本文旨从A20的生物学效应以及对肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor α , TNF- α)/肿瘤坏死因子受体-1(tumour necrosis factor receptor 1, TNFR1)、核转录因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)/LPS-NF- κ B、氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OxLDL)等途径介导的炎症反应和细胞凋亡及其对IBD的肠道炎症和肠上皮细胞凋亡的负调控作用等方面作一简要概述。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

关键词: 锌指蛋白A20; 炎症反应; 细胞凋亡; 炎症性肠病

核心提示: A20能抑制肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor α , TNF- α)/肿瘤坏死因子受体-1(tumour necrosis factor receptor 1, TNFR1)、核转录因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)/LPS-NF- κ B、氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OxLDL)等途径介导的炎症反应和细胞凋亡. 并通过对这些途径的抑制作用而起到对炎症性肠病的肠道组织炎症和肠上皮细胞凋亡的负调控作用.

季蓉, 吴焕淦, 施茵. 锌指蛋白A20对炎症反应和细胞凋亡的调控作用及其在炎症性肠病中的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 508-514 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/508.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.508>

0 引言

锌指蛋白A20^[1], 又称肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白3(tumor necrosis factor alpha-induced protein 3, TNFAIP3), 是一种具有高度生物学活性的蛋白. 1990年由美国密西根州医科大学病理系Dixit等^[2,3]在经肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor α , TNF- α)处理后的人脐静脉内皮细胞中首次发现该基因, 测序后发现其可读框编码一个新型锌指蛋白, 故命名为锌指蛋白A20(简称A20). 人类A20基因定位于染色体6q23.3, 全长790个氨基酸, 分子量为90 kDa, 鼠则较人的少15个氨基酸. 他含有两个功能结构域^[4]: 即N(氨基)末端的包含去泛素化酶(deubiquitylating enzymes, DUB)的卵巢肿瘤(ovarian tumor, OTU)结构域和C(羧基)末端的锌指结构(zinc fingers, ZnFs)包含E3连接酶的结构域. N末端区是A20的特征性结构区, 为一种去泛素化酶, 能够将信号转导通路中的多种蛋白诸如核转录因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路中的受体作用蛋白(receptor-interacting protein, RIP)等发生去泛素化, 从而抑制蛋白酶对其的降解作用; C末端区是锌指区, 含有7个重复的Cys2/Cys2型结构(两个半胱氨酸残基和两个半胱氨酸残基通过与位于中心的锌离子以配位键结合, 形成的一个稳定的指状结构), 是一种泛素化酶, 能够使RIP Lys48泛素化^[5-7]. A20的这两种功能结构域(酶)的活性共同作用, 以控制泛素化和去泛素化修饰. 泛素化是继磷酸化后第二大蛋白质修饰作用, 与磷酸化相似, 泛素化也是一个可逆

的过程, 他由泛素化酶和去泛素化酶相互调节, 因此, 具有多种重要的生理功能.

随着对该基因的不断深入研究发现, 锌指蛋白A20能负调控多种信号转导途径介导的炎症反应和细胞凋亡. 而近年来通过大量研究证实, TNF- α 是介导炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)肠道炎症以及肠上皮细胞凋亡的主要炎性因子之一, 由此推测由TNF- α 诱导产生的A20或TNFAIP3在IBD的发生、发展以及转归中可能发挥着重要作用. 笔者查阅了近年来有关A20调控不同途径介导的炎症反应和细胞凋亡的相关研究文献进行综述, 以期对A20或TNFAIP3的生物学效应以及在IBD的作用有更进一步的认识.

1 锌指蛋白A20抑制TNF- α /TNFR1介导的炎症反应和细胞凋亡

TNF- α 作为促炎因子的核心成员, 通过与其不同受体[肿瘤坏死因子受体1(tumour necrosis factor receptor 1, TNFR1)和/或TNFR2]结合而发挥不同的调节作用. TNF- α 通过与TNFR1结合后, 一种途径是由TNFR1胞内区的DD与含有死亡结构域的肿瘤坏死因子受体结合蛋白(TNFR1-associated death domain, TRADD)结合, TRADD中的DD与RIP结合成信号复合体后, 再与Fas相关的死亡结构域(Fas-associated death domain, FADD)结合并使其激活, 即通过TNFR1-TRADD-FADD途径招募FLICE(FADD-like ICE)PMACH(MORT1-associated CED-3 homolog)/Caspase8, 再激活Caspase3来诱导细胞凋亡^[8-10]; 另一种途径是由TNFR1胞内区的DD与含有死亡结构域的TRADD结合, TRADD中的DD与RIP结合成信号复合体后, 再与肿瘤坏死因子受体相关因子(TNF receptor-associated factors, TRAFs)结合进而激活NF- κ B, 活化的NF- κ B可以调控各种基因(其中包括调控细胞凋亡和炎症反应的基因)表达, 抑制细胞凋亡和促进炎症反应^[11]. TNFR2的生物学功能主要在于配体传递, 使配体集中在TNFR1附近, 并增强TNFR1信号传导. TNFR2活化不直接参与细胞凋亡, 而是通过诱导内源性TNF- α 的分泌, 后者活化TNFR1后诱导细胞凋亡, 但是活化的TNFR2可通过肿瘤坏死因子受体相关因子2(TNF receptor-associated factor 2, TRAF2)大大增强TNFR1诱导的细胞凋亡^[12]. 而锌指蛋白A20由于具有阻止TNF- α 诱导的包括外周血白细胞等在内的许多组织细

■ 研发前沿

近年来随着人们对A20的深入研究, 日渐发现其作为一种泛素化修饰酶, 在天然和获得性免疫调节中均有着重要作用. 其能负调控多种信号转导途径介导的炎症反应和细胞凋亡.

■相关报道

郑翠芳, 黄瑛等在《锌指蛋白A20在炎症性肠病患者肠黏膜中的表达及意义》一文中对57例患儿肠道黏膜标本进行分析发现: IBD患儿存在肠道炎症反应过度而A20表达水平上调不足的现象. 认为A20表达水平的异常可能参与了IBD的发生和发展.

胞发生凋亡的作用, 因此在凋亡研究领域, A20又被称为抗凋亡蛋白A20^[13]. He等^[9]通过研究发现, Jurkat T细胞中A20蛋白能抑制TNF- α /TNFR1途径介导的细胞凋亡, 其可以阻止Caspase8酶原裂解成有催化活性的亚单位以及随后的瀑布式级联反应, 从而抑制细胞凋亡. 进一步的研究发现, A20能抑制死亡结构域接头蛋白TRADD和RIP聚集到TNFR1胞浆内死亡结构域部分, 由此阻碍信号的传递, 达到抑制TNF- α /TNFR1途径细胞凋亡的发生. Lee等^[14]观察到A20缺陷小鼠对TNF- α 的敏感性异常增高, 注射0.1 mg/kg的TNF- α , 2 h内小鼠全部死亡; 而野生型对照组小鼠即使注射0.4 mg/kg的TNF- α , 小鼠仍然能够全部存活. 吴丽娟等^[15]研究发现锌指蛋白A20表达可以减少炎症细胞因子TNF- α 的分泌, 提示A20表达可以下调细胞炎症反应. 该结果从一定角度解释了A20缺陷小鼠对TNF- α 的敏感性异常增高的现象. Vincenz等^[16]发现细胞受TNF- α 刺激时, A20通过与14-3-3蛋白(一个在真核生物中广泛表达的酸性蛋白家族, 主要以同源/异源二聚体形式存在, 通过磷酸化丝/苏氨酸作用与靶蛋白或靶蛋白的两个结构域结合)结合, 进一步加强了与TRAF2的作用, 而且14-3-3二聚体作为一种桥梁, 介导A20和c-Raf-1之间相互作用, 共同抑制TNF- α 诱导的细胞凋亡.

2 锌指蛋白A20抑制NF- κ B介导的炎症反应和细胞凋亡

NF- κ B是一种介导促炎反应的高度保守的核转录因子, 研究发现NF- κ B与细胞凋亡的关系也相当密切, 其参与多种凋亡相关基因的转录调控, 具有抑制和促进细胞凋亡的双向作用^[17]. 生理情况下, NF- κ B二聚体以非活性状态存在于细胞胞浆中, 而NF- κ B的抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)的锚蛋白重复序列结构域能够使NF- κ B维持这种非活性状态^[18]. 经过外界的炎症细胞因子或者微生物感染的刺激之后, I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)复合体(包括IKK α 、IKK β 、IKK γ)使I κ B磷酸化, 触发I κ B从NF- κ B上脱落并被泛素化, 继而被蛋白酶体介导降解, 使得NF- κ B由非活性状态被激活, 最终NF- κ B进入细胞核调控目的基因表达, 由此介导炎症反应和细胞凋亡的发生^[19]. 因此, NF- κ B信号通路的调控对于炎症反应和细胞凋亡有着重要的意义^[20]. A20是一种有效的NF- κ B信号抑制因子, 其不仅能够抑制NF- κ B的活性, 还能进一步阻断NF- κ B所调

控的相关蛋白和多种炎症因子的释放^[1,10]. A20通过其泛素化和去泛素化的双重酶作用, 使NF- κ B信号通路中的关键接头分子肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)去泛素化及受体作用蛋白1(receptor-interacting protein, RIP1)泛素化而降解, 从而抑制NF- κ B信号通路的活化^[21]. 近年的研究发现, TRAF6的活化和下游的信号转导必须依赖于E2酶复合体Ubc13/Uev1a. Shembade等^[22]发现A20可干扰TRAF6与E2酶Ubc13和UbcH5c的结合, 再通过蛋白酶体途径降解Ubc13和UbcH5c. 对于RIP1, A20可先切割RIP1上的K63多聚泛素化链, 继而结合K48多聚泛素链至RIP1上来降解RIP1^[23]. 最新研究发现, A20还能通过其第7锌指与IKK γ (又名NEMO)特异性结合, 阻断IKK被转化生长因子 β 激活激酶(transforming growth factor beta-activated kinase 1, TAK1)磷酸化, 同样能抑制NF- κ B的信号通路^[24]. Lee等^[14]与吴丽娟等^[25]发现敲除或人工突变A20基因的动物对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的敏感性异常增高, 体内炎症反应失控, 发生严重的多器官炎症, 死亡率大幅提高, 而正常个体A20则能够抑制炎症的发展. Onose等^[26]与Heyninck等^[27]发现A20表达升高可以抑制NF- κ B的过度激活, 在流感病毒感染人和小鼠时, 支气管上皮NF- κ B表达增高, 而经A20转染的细胞则可明显抑制NF- κ B的活性. 桂俊等^[28]研究发现, A20不仅能显著抑制TNF- α 上调的NF- κ B启动子活性; 并能抑制柯萨奇病毒CVB3上调的NF- κ B启动子活性. 由此提示A20可调节病毒介导的炎症信号通路, 为进一步研究A20参与抗病毒免疫调节机制奠定了基础.

3 锌指蛋白A20抑制LPS或LPS-NF- κ B介导的炎症反应和细胞凋亡

内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁外层成分, 主要化学成分是LPS. LPS可以激活单核巨噬细胞, 刺激NF- κ B的活化, 从而诱导炎症细胞因子如TNF- α 、白介素(interleukin, IL)-1、IL-6、IL-8等大量表达, 引发机体炎症反应. Lee等^[14]发现A20缺陷小鼠对LPS的敏感性异常增高, 注射5 mg/kg的LPS, 2 h内小鼠全部死亡; 而野生型对照组小鼠即使注射25 mg/kg的LPS, 动物仍全部存活, 病理检查无明显异常. Heyninck等^[29]研究发现, A20能显著抑制LPS诱导的内皮细胞凋亡; 同时, A20还可抑制LPS诱导的Caspase3表达, 说明A20可能是通过影响Caspase3的表达,

从而抑制其诱导的内皮细胞凋亡。糜建红^[30]观察到A20能够抑制LPS所致的内皮细胞凋亡以及90%的E-选择素表达。E-选择素是一种典型的糖蛋白,对感染和炎症过程的发展起着重要作用。其启动子近侧含有3个NF- κ B结合位点,因此,A20的作用机制可能是通过负调控NF- κ B的活性而抑制E-选择素的表达,从而对内毒素性内皮细胞的损伤起到保护作用^[31]。另外在转染外源性A20基因对内毒素诱导的内皮细胞IL-8表达的实验研究中发现,内毒素刺激6 h后,IL-8在内皮细胞中的分泌量明显增加,而转染A20基因的内皮细胞能减少70%以上内毒素诱导的IL-8分泌,其机制可能是IL-8含有NF- κ B结合位点,而A20能抑制内毒素诱导的NF- κ B活化,从而减少内毒素诱导的内皮细胞分泌IL-8,进而抑制其介导的炎症反应^[32]。LPS还能激活Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4),活化的TLR4与其下游信号分子构成胞浆信号复合物,诱导I κ B磷酸化及随后降解,引起NF- κ B移位入核,介导炎症反应。邹循亮等^[33]用脂质体转染A20基因至大鼠腹膜间皮细胞(rat peritoneal mesothelial cells, RPMCs),Western blot结果显示,6 h后RPMCs的A20蛋白水平显著增高且持续高表达,显著抑制LPS诱导的TLR4蛋白的表达、延缓I κ B的降解。孟召友等^[34]利用LPS诱导人脐静脉内皮细胞产生炎症反应,利用Western blot检测A20蛋白及NF- κ B p65的表达情况,结果显示LPS刺激后A20基因的人工锌指转录因子(zinc finger-artificial transcription factor, ZF-ATF)转染组NF- κ B p65的表达(19.8 ± 4.5)较空载体组(90.2 ± 5.9)及空白组(96.3 ± 3.3)显著下调($P < 0.01$),证明A20通过阻断NF- κ B通路从而抑制了炎症反应。提示A20可对LPS介导的炎症信号通路多个环节产生抑制效应,保护机体免受LPS所介导的炎症损害。

4 锌指蛋白A20抑制氧化低密度脂蛋白介导的细胞凋亡

氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OxLDL)能够通过各种不同的途径诱导多种组织细胞(如内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞等)的凋亡。目前公认的主要方式有两种^[35],一种是Fas(可以识别一种表达于髓样细胞、T淋巴细胞和成纤维细胞表面的未知分子,并诱导多种人细胞凋亡的单克隆抗体)及其配体FasL途径(Fas/FasL途径),另一种是线粒体途径。前者是OxLDL通过线粒体膜上的Caspase依赖性和非

依赖性途径上调Fas死亡受体。死亡受体与配体结合后使受体胞质区的“死亡区域”相聚,并与特定的接头蛋白的“死亡区域”再聚,在接头蛋白作用下Caspase8聚集成大分子复合物凋亡酶体,且Caspase8能自身切割成有活性的Caspase酶,进而切割Caspase3酶原而成Caspase3,诱导细胞凋亡^[36]。后者是OxLDL可直接作用于线粒体,导致线粒体膜电位的变化、细胞色素C释放入胞质以及活性氧簇产生和膜相关基因表达,从而诱导细胞凋亡^[37]。A20蛋白能够显著降低Fas的表达以及细胞表面FasL的密度,降低Caspase8的活性,从而有效地阻断OxLDL诱导的细胞凋亡作用;在受到OxLDL刺激后,巨噬细胞能大量表达A20蛋白,同时Bax和Bak抗凋亡基因表达增强而Bcl-xL和Bcl-2凋亡基因表达减弱;转染了A20蛋白的巨噬细胞表现出了强大的抗OxLDL诱导细胞凋亡的能力,各种促凋亡基因的表达明显减少;同时,线粒体向胞质内释放的细胞色素C以及其他一些有毒物质显著减少。这表明A20蛋白能够拮抗由OxLDL介导的两种途径的细胞凋亡^[38]。

5 锌指蛋白A20对IBD的肠道炎症和肠上皮细胞凋亡的负调控作用

IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD),目前IBD的确切病因和发病机制仍不甚清楚。但近年来研究发现,由众多炎性细胞因子参与并介导的肠上皮屏障损伤在IBD的发病和进程中扮演重要角色,其中TNF- α 已被认为是IBD发病的关键性细胞因子^[38,39],其诱导其他多种炎症介质(如IL-1、IL-6、IFN- γ 等)释放,激活全身和肠道局部免疫系统,引起免疫级联反应诱导肠道局部甚至全身炎症反应。本课题组研究证实TNF- α 可通过其受体(主要是TNFR1)途径诱导肠上皮细胞过度凋亡^[40,41]和肠上皮细胞紧密连接蛋白及其mRNA表达减少或分布异常^[42],从而导致IBD肠上皮屏障损伤及肠道持续炎症。

锌指蛋白A20通过其泛素化和去泛素化功能对多种途径介导的炎症反应起到负调控的作用。近年来通过对IBD的大量研究,提示TNF- α 介导的NF- κ B-MLCK紧密连接途径和TRADD-FADD细胞凋亡途径是介导肠上皮损伤的重要环节之一。其中NF- κ B-MLCK紧密连接途径是由TNF- α 与肠上皮细胞膜表面的TNFR1结合后,通过RIP1、TRAF6等一系列信号分子转导活化

■创新盘点

本文就锌指蛋白A20对炎症反应和细胞凋亡的调控作用及其在IBD中的影响进行了较为系统的综述,以期今后深入研究A20以及指导IBD等炎症性疾病的临床治疗提供新的思路。

■应用要点

IBD是由肠上皮细胞凋亡而致的肠上皮屏障损伤和肠道组织炎症所致,而A20能负调控炎症反应和细胞凋亡,两者相结合将为今后的研究方向提供新的思路,并在指导IBD的治疗中发挥重要作用。

NF- κ B;活化的NF- κ B再与肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)转录启动子下游的NF- κ B结合区域相结合进而激活MLCK启动子,引起MLCK的转录^[43,44];MLCK是肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)的专一底物酶,当MLCK受钙调蛋白等激活后,使得含有紧密连接蛋白的细胞膜被细胞内吞或降解,出现肠上皮细胞紧密连接松弛而形成细胞间隙,造成肠上皮通透性增加^[45,46]。而TRADD-FADD细胞凋亡途径是TNF- α 与TNFR1结合成寡聚体后,通过TNFR1胞内区的DD与TRADD结合,继而TRADD的DD与RIP结合成信号复合体后,再与FADD结合并使其激活,激活的FADD再依次活化FADD样ICE蛋白(FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme protease, FLICE)/MACH(MORT1-associated CED-3 homolog)、Caspase8和Caspase3等,将死亡信号依次下传,最终诱导肠上皮细胞凋亡,造成肠上皮通透性增加和肠上皮屏障损伤。因此,TNF- α /TNFR1可通过NF- κ B-MLCK途径,造成肠上皮细胞紧密连接蛋白重排或缺失和肠上皮通透性增加;同时TNF- α /TNFR1还可通过TRADD-FADD途径诱导肠上皮细胞大量凋亡,是介导肠上皮屏障损伤和肠道炎症的重要环节之一。而锌指蛋白A20则能通过其双重的泛素化和去泛素化的酶活性,影响RIP、TRAF6、TRADD等接头分子在TNFR1信号复合体中的募集及信号转导,因此,A20在TNF- α 介导的NF- κ B-MLCK途径和TRADD-FADD细胞凋亡途径中发挥负调控作用^[47]。除此之外,A20还被认为是IBD的易感基因之一,其表达下调或缺失对IBD的肠上皮屏障调控具有重要影响。郑翠芳等^[48]收集了57例2008-2010年就诊并行肠镜检查的患儿肠道黏膜标本,通过对其研究发现IBD患儿存在肠道炎症反应过度而A20表达水平不足的现象。这进一步证明了A20对IBD的发生与发展有重要意义。

6 结论

目前关于锌指蛋白A20对炎症反应和细胞凋亡的调控机制研究逐渐受到关注,A20蛋白可通过抑制TNF- α /TNFR1、NF- κ B、LPS/LPS-NF- κ B以及OxLDL等多条信号途径来调控炎症反应和细胞凋亡,为炎症性疾病的诊治提供了有力的证据。但将A20与特定炎症性疾病相结合,研究其在相应炎症性疾病中所起的作用研究还尚少;尤其是A20在IBD发病机制中的作用研究也刚

起步,目前尚不能将A20对炎症反应和细胞凋亡的调控机制运用于指导IBD的临床治疗。但是A20以其独特的泛素化和去泛素化双重酶活性的生物学特性,在今后指导IBD的治疗中将发挥重要作用。本文对A20蛋白在炎症反应和细胞凋亡中的调控作用及其在IBD中的影响作了简要介绍,希望能为今后深入研究A20以及指导IBD等炎症性疾病临床治疗提供新的思路。

7 参考文献

- 1 Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol* 2009; 30: 383-391 [PMID: 19643665 DOI: 10.1016/j.it.2009.05.007]
- 2 Pipari AW, Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 1990; 265: 14705-14708 [PMID: 2118515]
- 3 Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, O'Rourke K, Ward PA, Prochownik EV, Marks RM. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J Biol Chem* 1990; 265: 2973-2978 [PMID: 2406243]
- 4 王静,倪秀雄. 锌指蛋白A20的结构特点及其对树突状细胞成熟和凋亡的影响. *海峡医药* 2012; 24: 8-10
- 5 Coornaert B, Carpentier I, Beyaert R. A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J Biol Chem* 2009; 284: 8217-8221 [PMID: 19008218 DOI: 10.1074/jbc.R800032200]
- 6 Lin SC, Chung JY, Lamothe B, Rajashankar K, Lu M, Lo YC, Lam AY, Darnay BG, Wu H. Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20. *J Mol Biol* 2008; 376: 526-540 [PMID: 18164316 DOI: 10.1016/j.jmb.2007.11.092]
- 7 Xu M, Skaug B, Zeng W, Chen ZJ. A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNFalpha and IL-1beta. *Mol Cell* 2009; 36: 302-314 [PMID: 19854138 DOI: 10.1016/j.molcel.2009.10.002]
- 8 Li HL, Wang AB, Zhang R, Wei YS, Chen HZ, She ZG, Huang Y, Liu DP, Liang CC. A20 inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis through negative Fas/Fas ligand-dependent activation of caspase-8 and mitochondrial pathways in murine RAW264.7 macrophages. *J Cell Physiol* 2006; 208: 307-318 [PMID: 16646083 DOI: 10.1002/jcp.20665]
- 9 He KL, Ting AT. A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6034-6045 [PMID: 12167698 DOI: 10.1128/mcb.22.17.6034-6045.2002]
- 10 Daniel S, Arvelo MB, Patel VI, Longo CR, Shrikhande G, Shukri T, Mahiou J, Sun DW, Motley C, Grey ST, Ferran C. A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood* 2004; 104: 2376-2384 [PMID: 15251990 DOI: 10.1182/blood-2003-02-0635]
- 11 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor

- I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114: 181-190 [PMID: 12887920 DOI: 10.1016/s0092-8674903000521-x]
- 12 Depuydt B, van Loo G, Vandenabeele P, Declercq W. Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors. *J Cell Sci* 2005; 118: 497-504 [PMID: 15657078 DOI: 10.1242/jcs.01640]
 - 13 Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JH, Noller HF. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 2001; 292: 883-896 [PMID: 11283358 DOI: 10.1126/science.1060089]
 - 14 Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000; 289: 2350-2354 [PMID: 11009421 DOI: 10.1126/science.289.5488.2350]
 - 15 吴丽娟, 刘国栋, 陈伟, 蒋建新, 朱佩芳. 锌指蛋白A20对人单核细胞LPS应答的影响. 第三军医大学学报 2007; 29: 1388-1390
 - 16 Vincenz C, Dixit VM. 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J Biol Chem* 1996; 271: 20029-20034 [PMID: 8702721 DOI: 10.1074/jbc.271.33.20029]
 - 17 Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gélinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 2006; 25: 6800-6816 [PMID: 17072329 DOI: 10.1038/sj.onc.1209938]
 - 18 Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621-663 [PMID: 10837071 DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621]
 - 19 Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004; 18: 2195-2224 [PMID: 15371334 DOI: 10.1101/gad.1228704]
 - 20 Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a001651 [PMID: 20457564 DOI: 10.1101/cshperspect.a001651]
 - 21 Evans PC, Ovaa H, Hamon M, Kilshaw PJ, Hamm S, Bauer S, Ploegh HL, Smith TS. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *Biochem J* 2004; 378: 727-734 [PMID: 14748687 DOI: 10.1042/bj20031377]
 - 22 Shembade N, Ma A, Harhaj EW. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science* 2010; 327: 1135-1139 [PMID: 20185725 DOI: 10.1126/science.1182364]
 - 23 Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 2004; 430: 694-699 [PMID: 15258597 DOI: 10.1038/nature02794]
 - 24 Skaug B, Chen J, Du F, He J, Ma A, Chen ZJ. Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. *Mol Cell* 2011; 44: 559-571 [PMID: 22099304 DOI: 10.1016/j.molcel.2011.09.015]
 - 25 吴丽娟, 陈潇, 冯建男, 但刚, 龚杨彬, 曾平. 锌指蛋白A20突变体转基因小鼠腺毒症肺损伤的研究. 第三军医大学学报 2010; 5: 435-437
 - 26 Onose A, Hashimoto S, Hayashi S, Maruoka S, Kumasawa F, Mizumura K, Jibiki I, Matsumoto K, Gon Y, Kobayashi T, Takahashi N, Shibata Y, Abiko Y, Shibata T, Shimizu K, Horie T. An inhibitory effect of A20 on NF-kappaB activation in airway epithelium upon influenza virus infection. *Eur J Pharmacol* 2006; 541: 198-204 [PMID: 16765340 DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.03.073]
 - 27 Heyninck K, Beyaert R. The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF-kappaB activation at the level of TRAF6. *FEBS Lett* 1999; 442: 147-150 [PMID: 9928991 DOI: 10.1016/s0014-5793(98)01645-7]
 - 28 桂俊, 李桥, 熊思东, 徐薇. 肿瘤坏死因子α诱导蛋白3对NF-κB信号通路的抑制作用. 现代免疫学 2011; 31: 107-112
 - 29 Heyninck K, De Valck D, Vanden Berghe W, Van Crielinge W, Contreras R, Fiers W, Haegeman G, Beyaert R. The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NF-kappaB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated trans-activation signal and directly binds to a novel NF-kappaB-inhibiting protein ABIN. *J Cell Biol* 1999; 145: 1471-1482 [PMID: 10385526 DOI: 10.1083/jcb.145.7.1471]
 - 30 糜建红, 朱楚洪, 应大君. 锌指蛋白基因对内毒素诱导选择素表达的影响. 解剖学报 2004; 35: 548-550
 - 31 朱楚洪, 应大君, 糜建红, 张伟, 孙建森. 锌指蛋白A20在内毒素所致人脐静脉内皮细胞损伤中的作用. 解剖学报 2003; 34: 629-632
 - 32 糜建红, 朱楚洪, 应大君. 转染锌指蛋白基因A20抑制内毒素诱导的内皮细胞IL-8表达的研究. 第三军医大学学报 2004; 26: 591-593
 - 33 邹循亮, 鄢巨振, 徐刚, 吴平. 锌指蛋白A20对脂多糖诱导的大鼠腹膜间皮细胞炎症效应的影响. 中国血液净化 2012; 11: 554-558
 - 34 孟召友, 赵海霞, 黄嘉璐, 汪思嘉, 陈康宁, 周振华. A20人工锌指转录因子真核载体的构建及其对内皮细胞炎症反应的影响. 第三军医大学学报 2013; 35: 509-512
 - 35 赖玲玲, 李文庭, 贺永文. 锌指蛋白A20及其对细胞凋亡的抑制作用. 国际流行病学传染病学杂志 2007; 34: 122-124
 - 36 Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 177-196 [PMID: 9714796 DOI: 10.1016/s0005-2728(98)00112-1]
 - 37 Madesh M, Ramachandran A, Balasubramanian KA. Nitric oxide prevents anoxia-induced apoptosis in colonic HT29 cells. *Arch Biochem Biophys* 1999; 366: 240-248 [PMID: 10356289 DOI: 10.1006/abbi.1999.1185]
 - 38 van Dulleman HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995; 109: 129-135 [PMID: 7797011 DOI: 10.1016/0016-5085(95)90277-5]
 - 39 Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989; 56: 731-740 [PMID: 2647299 DOI: 10.1016/0092-8674(89)90676-4]
 - 40 施茵, 包春辉, 吴焕淦, 陈巍峰, 秦秀娣, 张榕, 吴璐一. 隔药灸结合针刺对克罗恩病患者肠黏膜TNF-α、TNFR1、TNFR2表达及肠上皮细胞凋亡的影响. 上海中医药杂志 2011; 45: 46-50

■名词解释

A20: 又称肿瘤坏死因子α诱导蛋白3, 是一种具有高度生物学活性的蛋白;

LPS: 又称脂多糖是脂质和多糖的复合物及革兰氏阴性细菌细胞壁的主要成分, 是内毒素和重要群特异性抗原(O抗原); OxLDL: 又称氧化低密度脂蛋白, 是天然的低密度脂蛋白经氧化修饰形成的脂蛋白。

■同行评价

本文较为全面地综述了锌指蛋白A20对炎症反应和细胞凋亡的调控作用,以及A20在IBD中的影响。但A20在特定疾病以及在IBD发病机制中的作用研究刚刚起步,目前尚不能运用于指导IBD的临床治疗,但是在今后指导IBD的治疗中将发挥重要作用。

- 41 Shi Y, Zhou EH, Wu HG, Zhou CL, Wang QY, Qi L. Moxibustion treatment restoring the intestinal epithelium barrier in rats with Crohn's disease by down-regulating tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor receptor 1, and tumor necrosis factor receptor 2. *Chin J Integr Med* 2011; 17: 212-217 [PMID: 21359923 DOI: 10.1007/s11655-011-0669-3]
- 42 Bao CH, Wu LY, Shi Y, Wu HG, Liu HR, Zhang R, Yu LQ, Wang JH. Moxibustion down-regulates colonic epithelial cell apoptosis and repairs tight junctions in rats with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4960-4970 [PMID: 22174545 DOI: 10.3748/wjg.v17.i45.4960]
- 43 Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G496-G504 [PMID: 16474009 DOI: 10.1152/ajpgi.00318.2005]
- 44 Shen L, Black ED, Witkowski ED, Lencer WI, Guerriero V, Schneeberger EE, Turner JR. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci* 2006; 119: 2095-2106 [PMID: 16638813 DOI: 10.1242/jcs.02915]
- 45 Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G367-G376 [PMID: 14766535 DOI: 10.1152/ajpgi.00173.2003]
- 46 崔巍, 刘冬妍, 马力, 刘沛. TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1788-1793
- 47 Kolodziej LE, Lodolce JP, Chang JE, Schneider JR, Grimm WA, Bartulis SJ, Zhu X, Messer JS, Murphy SF, Reddy N, Turner JR, Boone DL. TNFAIP3 maintains intestinal barrier function and supports epithelial cell tight junctions. *PLoS One* 2011; 6: e26352 [PMID: 22031828 DOI: 10.1371/journal.pone.0026352]
- 48 郑翠芳, 黄瑛. 锌指蛋白A20在炎症性肠病患者肠黏膜中的表达及意义. *中华儿科杂志* 2011; 49: 261-265

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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)

半乳糖凝集素-9与炎症性肠病关系的研究进展

朱丽萍, 王鹏举, 刘静, 李林静, 李治国, 江红艳, 冯百岁

朱丽萍, 刘静, 李林静, 李治国, 江红艳, 冯百岁, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

王鹏举, 郑州大学第一附属医院中英分子肿瘤学研究中心 河南省郑州市 450052

朱丽萍, 硕士, 主要从事炎症性肠病免疫学发病机制的研究。国家自然科学基金面上资助项目, No. 81070288, 81270452 河南省医学科技攻关计划基金资助项目, No. 201001004 河南省医学科技学术带头人出国培训计划基金资助项目, No. 201201013

作者贡献分布: 本综述由朱丽萍资料整理、分析、总结; 王鹏举、刘静、李林静、李治国及江红艳收集资料、翻译完成; 冯百岁审校。

通讯作者: 冯百岁, 教授, 主任医师, 博士生导师, 450052, 河南省郑州市二七区建设路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科。fbs163@163.com

电话: 0371-66862052

收稿日期: 2013-10-23 修回日期: 2013-12-03

接受日期: 2013-12-04 在线出版日期: 2014-02-08

Galectin-9 and inflammatory bowel disease

Li-Ping Zhu, Peng-Ju Wang, Jing Liu, Lin-Jing Li, Zhi-Guo Li, Hong-Yan Jiang, Bai-Sui Feng

Li-Ping Zhu, Jing Liu, Lin-Jing Li, Zhi-Guo Li, Hong-Yan Jiang, Bai-Sui Feng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Peng-Ju Wang, Sino-British Research Centre for Molecular Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, Nos. 81070288 and 81270452; the Medical Science and Technique Foundation of He'nan Province, No. 201001004; the Foundation for Leaders of Overseas Training in Medical Science and Technique of He'nan Province, No. 201201013

Correspondence to: Bai-Sui Feng, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Erqi District, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China. fbs163@163.com

Received: 2013-10-23 Revised: 2013-12-03

Accepted: 2013-12-04 Published online: 2014-02-08

Abstract

Galectin-9 (Gal-9), a beta-galactoside binding lectin, is a tandem-repeat-type member of the galectin family which can specifically recognize and bind to galactosidase associated with diverse biological processes. Gal-9 is widely expressed in various tissues, plays a role in cell growth, polarization, adhesion, aggregation, and

apoptosis, and has important functions in inflammatory diseases, autoimmune diseases, tumors, and infections. Our recent studies showed that Gal-9 is strongly associated with the genesis and development of inflammatory bowel disease. Here we will review the progress in understanding the role of Gal-9 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Galectin-9; Inflammatory bowel disease; Tim-3; Immunity

Zhu LP, Wang PJ, Liu J, Li LJ, Li ZG, Jiang HY, Feng BS. Galectin-9 and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 515-520 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/515.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.515>

摘要

半乳糖凝集素-9(galectin-9, Gal-9)是能特异性识别、结合半乳糖苷的半乳糖凝集素家族成员之一。该蛋白广泛表达于机体组织, 参与细胞生长、分化、黏附、聚集、凋亡等, 与炎症性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤、细菌病毒感染等多类疾病密切相关。近年研究发现, Gal-9与炎症性肠病的发生、发展关系密切, 本文就Gal-9与炎症性肠病的关系进行综述。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 半乳糖凝集素-9; 炎症性肠病; Tim-3; 免疫

核心提示: 半乳糖凝集素-9(galectin-9, Gal-9)负性调控Th1/Th17细胞免疫应答, 介导相应免疫细胞细胞凋亡, Gal-9及其相关调控因子表达异常参与炎症性肠病(inflammatory bowel disease)的发生发展。

朱丽萍, 王鹏举, 刘静, 李林静, 李治国, 江红艳, 冯百岁. 半乳糖凝集素-9与炎症性肠病关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2014; 22(4): 515-520 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/515.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.515>

■背景资料

早期研究发现半乳糖凝集素-9(galectin-9, Gal-9)参与细胞生长、分化、黏附、聚集、凋亡等多种生物学活动, 与炎症性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤、细菌病毒感染等多类疾病密切相关, 近年来研究显示, Gal-9在免疫调节中发挥广泛且复杂的作用, 与炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的关系受到越来越多学者的关注。

■同行评议者

万军, 教授, 中国人民解放军总医院南楼老年消化科

■ 研发前沿

Gal-9与IBD的发生、发展关系密切,但不同学者提出不同的信号通路,何种信号通路在IBD中起决定作用尚不清楚,这是当今乃至今后的研究热点。

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种发病机制不明确,与环境、遗传、免疫等因素相关反复发作的慢性肠道炎症性疾病,包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、克罗恩病(Crohn's disease, CD)。近年来IBD发病率有逐渐增高的趋势,但其确切发病机制还不十分清楚。肠道内环境与宿主不恰当的免疫应答正受到密切关注,目前一般认为IBD是遗传易感人群肠道黏膜损伤后,过量细菌侵入黏膜下层,激发固有及适应性异常免疫应答所致。半乳糖凝集素-9(galectin-9, Gal-9)是能特异性识别、结合半乳糖苷的半乳糖凝集素(galectin)家族成员之一,可与多种糖蛋白连接发挥作用,并参与细胞生长、分化、黏附、聚集、凋亡等多种生物学活动,与炎症性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤、细菌病毒感染等多类疾病密切相关^[1],尤其与炎症性肠病的发生、发展的关系受到越来越多学者关注。

1 Gal-9的生物学功能

1.1 Gal-9概述 半乳糖凝集素-9(galectin-9, Gal-9)是1997年由Wada等^[2]从鼠胚肾组织中首次分离出来的能特异性识别、结合半乳糖苷,具有嗜酸性粒细胞趋化性^[1]的半乳糖凝集素(galectin)家族成员之一,他存在于多种物种,并在组织分布上具有广泛性。他由2个串联的糖识别结构域(carbohydrate-recognition domains, CRD)通过一条肽链相连而成,其中C-CRD是受体识别、诱导T细胞凋亡的最主要决定区域^[3,4],而N-CRD在激活树突状细胞(dendritic-like cells, DCs)方面更有效^[4]。在结构上可分为膜结合型、可溶型两种,根据CRD连接肽段的长短可分为L、M、S三种亚型, T细胞有选择性的高表达Gal-9(M)、Gal-9(L),低表达Gal-9(S),而在结肠癌细胞血管黏附上Gal-9(L)具有抑制作用, Gal-9(S)、Gal-9(M)具有促进作用^[5]。人Gal-9基因位于人类染色体17q11.1,包括11个外显子,转录区长度约为1.7 kb,编码蛋白相对分子量约34-39 kDa,在人体肝脏、脾脏、小肠、肾脏、肺脏、骨骼肌、免疫细胞等组织中广泛表达。不同位置的Gal-9其功能或是相反的,如胞内的Gal-9可触发单核细胞释放促炎因子^[1],而胞外的Gal-9可诱导单核细胞凋亡^[6]。

1.2 Gal-9与免疫调节 Gal-9是一种新发现的以Tim-3、CD44为主要受体分子的嗜酸性粒细胞

趋化因子,其以浓度依赖的方式延长嗜酸性粒细胞的存活,并抑制其凋亡^[7]。因Tim-3表达于特异性T细胞^[8]、固有免疫细胞^[9],故Gal-9在免疫调节中发挥着重要作用。在单纯疱疹病毒感染中Gal-9对CD8⁺ T细胞具有抑制作用,潜伏感染时上调的Gal-9表达可致CD8⁺ T细胞免疫活性减弱,而Gal-9基因敲除的小鼠, CD8⁺ T细胞免疫活性较强^[10,11]。Gal-9/Tim-3反应可激活CD4⁺ T细胞,在HIV-1感染中抑制持续的免疫激活及相关的组织损伤。丙型肝炎患者的肝脏库普弗细胞有更多的Gal-9表达,并伴有循环血中Gal-9升高^[12],通过与Tim-3结合参与固有免疫应答及适应性Th1/Tc1功能失调,最终导致HCV持续感染^[13]。

1.3 Gal-9与细胞黏附、聚集 Gal-9在机体组织中广泛表达,其黏附、聚集作用在多种生物活动中发挥重要的调节作用。成纤维细胞膜上的Gal-9在干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的诱导下表达增多,这些胞膜Gal-9表达量升高的细胞即可被嗜酸性粒细胞有选择性地黏附^[14]。该蛋白对CD44依赖的白细胞识别、黏附细胞外基质发挥调节作用,是其抑制气道过敏性炎症和气道高反应的重要机制^[15]。除参与炎症反应外, Gal-9在肿瘤转移中也发挥重要作用。有研究指出,当Gal-9表达降低时,乳腺癌细胞聚集表现被抑制,而增殖、黏附、侵袭作用增强^[16],与之前有关黑色素瘤的研究结果类似^[17]。

1.4 Gal-9与细胞凋亡 Gal-9在细胞凋亡中发挥重要作用,如在丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染患者肝库普弗细胞表面, Gal-9可通过活化Caspase8途径诱导HCV特异性CD8⁺ T细胞凋亡^[12],而抗蛋白酶的重组Gal-9(hGal-9)可通过Caspase8、9、3诱导5种骨髓瘤细胞的凋亡^[18]。此外, Gal-9还可促使DC、Tim-3⁺CD8⁺ T细胞活化增殖,产生更多的穿孔素、颗粒酶B诱导肿瘤细胞凋亡^[19]。而Gal-9通过钙-钙蛋白酶-Caspase1信号通路诱导如MOLT-4(T细胞)、THP-1(巨噬细胞)等多种免疫细胞凋亡^[20,21],是其参与机体炎症反应的重要机制之一。

2 Gal-9与IBD的关系

IBD是一种发病机制不明确,与环境、遗传、免疫等因素相关反复发作的慢性肠道炎症性疾病^[22]。近年来,其发病率有逐渐增高的趋势,但其确切发病机制还不十分清楚。目前一般认为IBD是遗传易感人群肠道黏膜损伤后,过量细菌侵入黏膜下层,激发固有及适应性异常免疫

反应所致, 其中涉及肠道感染, 肠上皮屏障破坏, 固有及适应性免疫激活等。

2.1 Gal-9与Th1/Th17 近年来, 炎症性肠病的发生、发展与免疫应答异常尤其是与Th1/Th17失调的关系已受到越来越多学者的密切关注。Rovedatti等^[23]对IBD患者进行组织病理学研究发现, IBD患者肠黏膜炎症处比非炎症处Th17、Th1/Th17均增加, IL-17表达上调。后有学者在动物实验中也发现了类似结果, 并且应用Th1型细胞因子IL-12的抗体对炎症性肠病动物模型进行治疗, 炎症可在一定程度上得到缓解, 而Th1型细胞因子IFN- γ 缺陷小鼠不能诱导结肠炎的发生^[24,25]。Gal-9对Th1、Th2、Th17、Tregs、嗜酸性粒细胞等免疫细胞具有调节作用已得到大量研究的支持; 其与Tim-3结合, 下调自身免疫性疾病, 诱导免疫耐受也成为近年来免疫异常类疾病的研究热点。因Gal-9与Tim-3结合可诱导Th1细胞凋亡, 阻止Th1、Th17细胞因子的释放(保护作用), 负性调节Th1/Th17, 上调调节性T细胞(Tregs)^[26], 可推测Gal-9/Tim-3与炎症性肠病的发生发展密切相关, Gal-9与Tim-3结合或有下调IBD炎症反应的作用。

另有学者研究发现, 溃疡性结肠炎患者及结肠炎模型小鼠体内Tim-3、Gal-9较正常者明显降低, 并伴有Th17响应升高, Treg细胞响应衰减, Th1反应明显降低。应用外源性Gal-9干预可改变不同T细胞亚群间的平衡, 减轻小鼠结肠炎症状^[27], 这与Veenstra等^[28]在GVHD的研究中发现, 应用Tim-3抗体或利用*Tim-3*基因敲除方法阻断Tim-3/Gal-9反应, 可增高T细胞增殖及GVHD肠道炎症表现的结果一致。提示了Tim-3/Gal-9通路异常与结肠炎关系密切, 或是UC的发病机制之一。Li等^[29]在TNBS-结肠炎建模前12 h腹腔注射重组Tim-3蛋白能够明显加重小鼠结肠炎症状, 且结肠炎症状与小鼠体内Tim-3⁺细胞成正相关, 前炎性因子IFN- γ 、IL-17、IL-23水平明显升高, 而抗炎性因子IL-4、TGF- β 水平明显下降; 经典的Treg细胞群表达CD25、FoxP3的CD4⁺ T细胞数目减少, 肠系膜淋巴结细胞CD80表达水平下降, 同时CD4⁺ T细胞CTLA-4的表达降低, 而CD28的表达升高。提示了Tim-3分子可能通过对共刺激分子CD28、CD80、CTLA-4的调节, 影响CD4⁺ T效应细胞不同亚群的极化, 发挥对结肠炎的负调节作用, 提示了Gal-9相对减少或增加结肠炎的炎症反应。同样有研究发现, CD患者黏膜下及外周血中Th1表面Tim-3表达较对照组

明显降低, 并伴有Th1表面Tim-3上调异常, Tim-3的相对减少或致CD发病^[30]。提示Tim-3/Gal-9通路或在UC、CD的发病中发挥不同的调节作用, 或为IBD治疗提供新思路。

2.2 Gal-9与固有免疫 大量研究证明, 肥大细胞增殖、脱颗粒增多可激活固有免疫、适应性免疫, 介导神经免疫相互作用, 进而破坏肠上皮屏障, 而参与IBD发病^[31,32]。我们前期研究发现, 肥大细胞还可通过Fc- γ 受体与鞭毛蛋白特异性结合后脱颗粒, 在肠道炎症反应中发挥重要作用^[33]。而已有学者在过敏性肠炎的研究中发现, 肠上皮细胞、血清中Gal-9表达与急性过敏的皮肤反应, 肥大细胞脱颗粒, Th1、Treg细胞分化成负相关^[34]。而Gal-9调节作用是通过参与调节外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分泌IFN- γ 、IL-10的过程实现的^[35]。另有研究发现, 肥大细胞产生的类胰蛋白酶可激活T84细胞的PAR-2受体, 进而诱导T84细胞表达Gal-9增多, 应用外源性Gal-9抗体阻断Gal-9作用则可抑制抗原特异性Th2反应, 小鼠肠道炎症减轻^[36], 这与前文Shi、Li等^[2-29,33]指出的Gal-9具有抑制结肠炎症的作用不一致, 或许是Gal-9在不同类型的结肠炎中参与的免疫通路不同, 对于不同类型肠道炎症的调节作用或许相反, 因此Gal-9在IBD中的具体免疫调节机制有待进一步研究。此外, 肥大细胞也可分泌Gal-9, 且可发挥自分泌调节作用, 抑制IgE与抗原结合后诱导的肥大细胞过度脱颗粒^[37]。由此可推测Gal-9或是通过调节肥大细胞免疫功能从而调节IBD发病。我们前期研究发现, 应用美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎后, 患者血清TNF- α 及IL-8较柳氮磺吡啶对照组降低, 且临床症状缓解、镜下黏膜修复优于对照组^[38]。后进一步研究发现实验性结肠炎小鼠结肠黏膜有大量炎性细胞浸润并TNF mRNA水平明显升高, 抗TNF-单克隆抗体治疗可有效地阻断慢性结肠炎的发生, 降低CD4⁺ T细胞和单核巨噬细胞浸润及CD4⁺ T细胞效应应答^[39]。TLR2介导HMC-1细胞对PGN的吸收, 致T84单层屏障功能破坏, 阻断TLR2可阻断HMC-1被激活, 及其引起的T84单层屏障功能减退^[40]。人固有免疫的单核/巨噬细胞特异性受体(刺激性的有TLR, 抑制性的有Tim-3)与微生物产物结合后, 进行识别、应答。有研究发现, 其他细胞表达的Gal-9与单核/巨噬细胞表达的Tim-3结合后, 可负性调节TLR介导的IL-12表达。而单核细胞表达的强效的或沉默的Gal-9可通过

■相关报道

大量研究证实, Gal-9负性调控Th1/Th17细胞免疫应答, Tim-3表达失调参与自身免疫性疾病、过敏性疾病、病毒及细菌感染相关疾病等多种疾病。

■创新盘点

本文从Gal-9的生物学功能及其与IBD的关系两部分进行了较为系统的阐述,指出Gal-9在IBD发生、发展中的可能参与的信号通路,或是IBD治疗的新靶点。

加强的TLR信号通路调节*Tim-3*、*IL-12/IL-23*基因转录^[41]。另有研究也发现, Gal-9可下调巨噬细胞TNF- α 、TLR2表达,降低小鼠体内的促炎因子、趋化因子,如TNF- α 、IL-1B、IL-6及角化细胞衍生细胞因子。而Gal-9缺陷小鼠急性炎症明显,中性粒细胞、TNF- α 升高,应用Gal-9治疗后炎症减轻^[42]。由此可推测, Gal-9或通过固有免疫中发挥重要的调节作用而参与IBD的发病。

2.3 Gal-9与肠道感染 IBD是一种病因及发病机制尚不完全明确的非特异性慢性肠道炎症性疾病,目前,肠道微生物及微生物产物因素越来越受到重视。我们前期研究发现,肠上皮细胞可转运肽聚糖与肥大细胞表面TLR2受体结合,呈递于胞内NOD2受体,进而肥大细胞活化脱颗粒释放组胺等炎症介质参与肠道炎症的发生^[43]。UC患者血清中鞭毛蛋白抗体及黏膜下鞭毛蛋白量较对照组明显增多,且与病情呈正相关^[44]。最近的流行病学分析发现,急性弯曲菌肠炎可诱发易感人群发生IBD或使IBD患者病情加重^[45,46],这可能因为肠上皮细胞受到相应抗原刺激后发生M样细胞变化,发挥转运、胞吞抗原的作用,而这种可逆性分化与Caco-2细胞、淋巴滤泡相关上皮细胞Gal-9表达上调有关^[47]。Kalischuk等^[48]发现空肠弯曲菌可诱导非侵入性共生菌通过上皮转胞吞作用移位,破坏肠上皮屏障功能;而受弯曲菌感染的单层肠上皮表达Gal-9的增高,肠绒毛结构缺失及与吸收功能相关的分子表达明显减少^[49],提示了IBD与肠道细菌感染发病相关,而Gal-9或参与肠上皮屏障破坏及激活免疫应答,但其确切机制还有待进一步研究。

2.4 Gal-9与凝血 已有研究发现, IBD患者体内存在与凝血激活和全身炎症反应中的血小板聚集有关的较高血栓风险^[50],应用氯吡格雷抑制血小板聚集可降低IBD模型小鼠的CMDI、DAI、MPO积分、减轻体重降低^[51],此外,已有学者指出, Gal-9还可激活凝血酶,促使血小板聚集,在凝血中发挥重要调节作用^[52]。由此可推测, Gal-9或是IBD高凝状态的始动因子,但需进一步研究证实。

3 结论

Gal-9作为一种作用复杂,分布广泛的半乳糖结合蛋白,在免疫调节中发挥重要作用,为IBD的研究提供了一个新思路。其参与固有及适应性免疫调节,与IBD的发生、发展关系密切,并有望成为IBD治疗的新靶点。但因其表达广泛、作用复杂而在IBD研究中的具体机制尚不完全明确,尚需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Wiersma VR, de Bruyn M, Helfrich W, Bremer E. Therapeutic potential of Galectin-9 in human disease. *Med Res Rev* 2013; 33 Suppl 1: E102-E126 [PMID: 21793015 DOI: 10.1002/med.20249]
- 2 Wada J, Kanwar YS. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem* 1997; 272: 6078-6086 [PMID: 9038233 DOI: 10.1074/jbc.272.9.6078]
- 3 Bi S, Earl LA, Jacobs L, Baum LG. Structural features of galectin-9 and galectin-1 that determine distinct T cell death pathways. *J Biol Chem* 2008; 283: 12248-12258 [PMID: 18258591 DOI: 10.1074/jbc.M800523200]
- 4 Bose KS, Sarma RH. Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 66: 1173-1179 [PMID: 2 DOI: 10.1016/j.molimm.2010.11.011]
- 5 Zhang F, Zheng M, Qu Y, Li J, Ji J, Feng B, Lu A, Li J, Wang M, Liu B. Different roles of galectin-9 isoforms in modulating E-selectin expression and adhesion function in LoVo colon carcinoma cells. *Mol Biol Rep* 2009; 36: 823-830 [PMID: 18401566 DOI: 10.1007/s11033-008-9251-1]
- 6 Matsuura A, Tsukada J, Mizobe T, Higashi T, Mouri F, Tanikawa R, Yamauchi A, Hirashima M, Tanaka Y. Intracellular galectin-9 activates inflammatory cytokines in monocytes. *Genes Cells* 2009; 14: 511-521 [PMID: 19335620 DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01287.x]
- 7 Matsumoto R, Hirashima M, Kita H, Gleich GJ. Biological activities of egalectin: a novel eosinophil-activating factor. *J Immunol* 2002; 168: 1961-1967 [PMID: 11823532 DOI: 10.1007/s11033-008-9251-2]
- 8 Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, Zheng XX, Strom TB, Kuchroo VK. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 2005; 6: 1245-1252 [PMID: 16286920 DOI: 10.1038/ni1271]
- 9 Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylinositol receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2010; 235: 172-189 [PMID: 20536563 DOI: 10.1111/j.0101]
- 10 Sehrawat S, Reddy PB, Rajasagi N, Suryawanshi A, Hirashima M, Rouse BT. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000882 [PMID: 20463811 DOI: 10.1371/journal.ppat.10]
- 11 Reddy PB, Sehrawat S, Suryawanshi A, Rajasagi NK, Mulik S, Hirashima M, Rouse BT. Influence of galectin-9/Tim-3 interaction on herpes simplex virus-1 latency. *J Immunol* 2011; 187: 5745-5755 [PMID: 22021615 DOI: 10.4049/jimmunol.1102105]
- 12 Mengshol JA, Golden-Mason L, Arikawa T, Smith M, Niki T, McWilliams R, Randall JA, McMahan R, Zimmerman MA, Rangachari M, Dobrinskikh E, Busson P, Polyak SJ, Hirashima M, Rosen HR. A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection.

- tion. *PLoS One* 2010; 5: e9504 [PMID: 20209097 DOI: 10.1371/journal.pone.0009504]
- 13 Bitensky L, Cashman B, Johnstone JJ, Chayen J. Effect of glucocorticoids on the hexose monophosphate pathway in human rheumatoid synovial lining cells in vitro and in vivo. *Ann Rheum Dis* 1977; 36: 448-452 [PMID: 21637 DOI: 10.1371/journal.pone.0019664]
 - 14 Asakura H, Kashio Y, Nakamura K, Seki M, Dai S, Shirato Y, Abedin MJ, Yoshida N, Nishi N, Imaizumi T, Saita N, Toyama Y, Takashima H, Nakamura T, Ohkawa M, Hirashima M. Selective eosinophil adhesion to fibroblast via IFN-gamma-induced galectin-9. *J Immunol* 2002; 169: 5912-5918 [PMID: 12421975]
 - 15 Katoh S, Ishii N, Nobumoto A, Takeshita K, Dai SY, Shinonaga R, Niki T, Nishi N, Tominaga A, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176: 27-35 [PMID: 17446336 DOI: 10.1164/rccm]
 - 16 Zhang ZY, Dong JH, Chen YW, Wang XQ, Li CH, Wang J, Wang GQ, Li HL, Wang XD. Galectin-9 acts as a prognostic factor with antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 2503-2509 [PMID: 22938412]
 - 17 Kageshita T, Kashio Y, Yamauchi A, Seki M, Abedin MJ, Nishi N, Shoji H, Nakamura T, Ono T, Hirashima M. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int J Cancer* 2002; 99: 809-816 [PMID: 12115481 DOI: 10.103]
 - 18 Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Oomizu S, Terui Y, Taniyama A, Adachi S, Takagi T, Yamamoto M, Sasaki N, Horiike S, Hatake K, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki M. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia* 2010; 24: 843-850 [PMID: 20200560 DOI: 10.1038/leu.2010.25]
 - 19 Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S, Kontani K, Nobumoto A, Tateno H, Watanabe K, Niki T, Katoh S, Miyake M, Nagahata S, Hirabayashi J, Kuchroo VK, Yamauchi A, Hirashima M. Galectin-9 increases Tim-3+ dendritic cells and CD8+ T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions. *J Immunol* 2008; 181: 7660-7669 [PMID: 19017954]
 - 20 Lu LH, Nakagawa R, Kashio Y, Ito A, Shoji H, Nishi N, Hirashima M, Yamauchi A, Nakamura T. Characterization of galectin-9-induced death of Jurkat T cells. *J Biochem* 2007; 141: 157-172 [PMID: 17167046 DOI: 10.1093/jb/mvm019]
 - 21 Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, Nakamura T, Hirashima M. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol* 2003; 170: 3631-3636 [PMID: 12646627]
 - 22 Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut* 2013 Jul 22. [Epub ahead of print] [PMID: 23878165]
 - 23 Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, Corazza GR, Monteleone G, Di Sabatino A, Macdonald TT. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; 58: 1629-1636 [PMID: 19740775 DOI: 10.1136/gut.2009.182170]
 - 24 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434 [PMID: 17653185 DOI: 10.1038/nat]
 - 25 Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1808-1813 [PMID: 20222127 DOI: 10.1002/ibd.21248]
 - 26 Seki M, Oomizu S, Sakata KM, Sakata A, Arikawa T, Watanabe K, Ito K, Takeshita K, Niki T, Saita N, Nishi N, Yamauchi A, Katoh S, Matsukawa A, Kuchroo V, Hirashima M. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 2008; 127: 78-88 [PMID: 18282810 DOI: 10.1016/j.clim.2008.01.006]
 - 27 Shi F, Guo X, Jiang X, Zhou P, Xiao Y, Zhou T, Chen G, Zhao Z, Xiao H, Hou C, Li X, Yang X, Wang R, Feng J, Shen B, Li Y, Han G. Dysregulated Tim-3 expression and its correlation with imbalanced CD4 helper T cell function in ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2012; 145: 230-240 [PMID: 23117395 DOI: 10.1016/j.clim.2]
 - 28 Veenstra RG, Taylor PA, Zhou Q, Panoskaltsis-Mortari A, Hirashima M, Flynn R, Liu D, Anderson AC, Strom TB, Kuchroo VK, Blazar BR. Contrasting acute graft-versus-host disease effects of Tim-3/galectin-9 pathway blockade dependent upon the presence of donor regulatory T cells. *Blood* 2012; 120: 682-690 [PMID: 22677125 DOI: 10.1182/blood-2011-10-387977]
 - 29 Li X, Chen G, Li Y, Wang R, Wang L, Lin Z, Gao X, Feng J, Ma Y, Shen B, Li Y, Han G. Involvement of T cell Ig Mucin-3 (Tim-3) in the negative regulation of inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2010; 134: 169-177 [PMID: 19913460 DOI: 10.1016/j.clim.2009.09.012]
 - 30 Morimoto K, Hosomi S, Yamagami H, Watanabe K, Kamata N, Sogawa M, Machida H, Okazaki H, Tanigawa T, Nagahara H, Noda E, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Maeda K, Hirakawa K, Arakawa T. Dysregulated upregulation of T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 on mucosal T helper 1 cells in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46: 701-709 [PMID: 21463244 DOI: 10.3109/00365521.2011.568518]
 - 31 De Winter BY, van den Wijngaard RM, de Jonge WJ. Intestinal mast cells in gut inflammation and motility disturbances. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 66-73 [PMID: 21497195 DOI: 10.1016/j.bbdis.2011.03.016]
 - 32 Wierzbicki M, Brzezińska-Błaszczyk E. [The role of mast cells in the development of inflammatory bowel diseases]. *Postepy Hig Med Dosw* (Online) 2008; 62: 642-650 [PMID: 19037190]
 - 33 Chen X, Feng BS, Zheng PY, Liao XQ, Chong J, Tang SG, Yang PC. Fc gamma receptor signaling in mast cells links microbial stimulation to mucosal immune inflammation in the intestine. *Am J Pathol* 2008; 173: 1647-1656 [PMID: 18974296 DOI: 10.2353/ajpath]
 - 34 de Kivit S, Saeland E, Kraneveld AD, van de Kant HJ, Schouten B, van Esch BC, Knol J, Sprickelman AB, van der Aa LB, Knippels LM, Garssen J, van Kooyk Y, Willemsen LE. Galectin-9 induced by dietary synbiotics is involved in suppression of allergic symptoms in mice and humans. *Allergy* 2012; 67: 343-352 [PMID: 22229637]

■应用要点

Gal-9与其配体及相关调控因子在IBD中表达失调或功能异常,有望通过改变其表达或修复其功能,指导临床疗效评估及药物靶向治疗。

■同行评价

本文选题较为新颖, 文献调研较充分, 内容也较全面, 具有一定指导意义。

- 35 de Kivit S, Kraneveld AD, Knippels LM, van Kooyk Y, Garssen J, Willemsen LE. Intestinal epithelium-derived galectin-9 is involved in the immunomodulating effects of nondigestible oligosaccharides. *J Innate Immun* 2013; 5: 625-638 [PMID: 23735749 DOI: 10.1159/000350515]
- 36 Chen X, Song CH, Liu ZQ, Feng BS, Zheng PY, Li P, In SH, Tang SG, Yang PC. Intestinal epithelial cells express galectin-9 in patients with food allergy that plays a critical role in sustaining allergic status in mouse intestine. *Allergy* 2011; 66: 1038-1046 [PMID: 21426359 DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02585.x]
- 37 Niki T, Tsutsui S, Hirose S, Aradono S, Sugimoto Y, Takeshita K, Nishi N, Hirashima M. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem* 2009; 284: 32344-32352 [PMID: 19776007]
- 38 冯百岁, 刘占举, 牛正先. 美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的临床疗效及对血清TNF- α 和IL-8的影响. *郑州大学学报(医学版)* 2006; 41: 830-832
- 39 冯百岁, 刘占举. 抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体与小鼠发生的慢性结肠炎的关系. *中国实用内科杂志* 2006; 26: 280-282
- 40 冯百岁, 张文萍, 陈永忠. TLR和NOD2在肥大细胞激活中的作用. *河南医学研究* 2008; 17: 301-304
- 41 Ma CJ, Li GY, Cheng YQ, Wang JM, Ying RS, Shi L, Wu XY, Niki T, Hirashima M, Li CF, Moorman JP, Yao ZQ. Cis association of galectin-9 with Tim-3 differentially regulates IL-12/IL-23 expressions in monocytes via TLR signaling. *PLoS One* 2013; 8: e72488 [PMID: 23967307 DOI: 10.1371/journal.pone.0072488]
- 42 Kojima K, Arikawa T, Saita N, Goto E, Tsumura S, Tanaka R, Masunaga A, Niki T, Oomizu S, Hirashima M, Kohrogi H. Galectin-9 attenuates acute lung injury by expanding CD14⁺ plasmacytoid dendritic cell-like macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 328-339 [PMID: 21562126 DOI: 10.1164/rccm.20]
- 43 Wu L, Feng BS, He SH, Zheng PY, Croitoru K, Yang PC. Bacterial peptidoglycan breaks down intestinal tolerance via mast cell activation: the role of TLR2 and NOD2. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 538-545 [PMID: 17563761 DOI: 10.1164/rccm.201010-1566O]
- 44 周川, 郝卉杰, 薛福敏, 张建立, 石朝阳, 杨万荷, 全亚林, 冯百岁. 溃疡性结肠炎患者血清和结肠上皮细胞中细菌鞭毛蛋白的表达. *郑州大学学报(医学版)* 2012; 47: 454-456
- 45 Masclee GM, Penders J, Jonkers DM, Wolffs PF, Pierik MJ. Is clostridium difficile associated with relapse of inflammatory bowel disease? results from a retrospective and prospective cohort study in the Netherlands. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 2125-2131 [PMID: 23867869 DOI: 10.1097/MIB.0b013e318297d222]
- 46 O'Hara JR, Feener TD, Fischer CD, Buret AG. Campylobacter jejuni disrupts protective Toll-like receptor 9 signaling in colonic epithelial cells and increases the severity of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Infect Immun* 2012; 80: 1563-1571 [PMID: 22311925 DOI: 10.1128/IAI.06066-11]
- 47 Pielage JF, Cichon C, Greune L, Hirashima M, Kucharzik T, Schmidt MA. Reversible differentiation of Caco-2 cells reveals galectin-9 as a surface marker molecule for human follicle-associated epithelia and M cell-like cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 1886-1901 [PMID: 17596995]
- 48 Kalischuk LD, Inglis GD, Buret AG. Campylobacter jejuni induces transcellular translocation of commensal bacteria via lipid rafts. *Gut Pathog* 2009; 1: 2 [PMID: 19338680 DOI: 10.1186/1757-4749-1-2]
- 49 Kalischuk LD, Leggett F, Inglis GD. Campylobacter jejuni induces transcytosis of commensal bacteria across the intestinal epithelium through M-like cells. *Gut Pathog* 2010; 2: 14 [PMID: 21040540 DOI: 10.1186/1757]
- 50 Stadnicki A. Involvement of coagulation and hemostasis in inflammatory bowel diseases. *Curr Vasc Pharmacol* 2012; 10: 659-669 [PMID: 22272910 DOI: 10.2174/157016112801784495]
- 51 Patel SH, Rachchh MA, Jadav PD. Evaluation of anti-inflammatory effect of anti-platelet agent-clopidogrel in experimentally induced inflammatory bowel disease. *Indian J Pharmacol* 2012; 44: 744-748 [PMID: 23248405 DOI: 10.4103/0253-7613.103278]
- 52 Nishi N, Itoh A, Shoji H, Miyanaka H, Nakamura T. Galectin-8 and galectin-9 are novel substrates for thrombin. *Glycobiology* 2006; 16: 15C-20C [PMID: 16868247 DOI: 10.1093/glycob/cw1028]

编辑 田滢 电编 闫晋利



炎症性肠病与间充质干细胞的研究进展

林 艳, 郑长青

林艳, 郑长青, 中国医科大学附属盛京医院第二消化内科 辽宁省沈阳市 110022

林艳, 讲师, 主治医师, 主要从事炎症性肠病的研究.

沈阳市科学技术基金资助项目, No. F13-318-1-42

作者贡献分布: 本文综述由林艳完成; 郑长青审校.

通讯作者: 林艳, 讲师, 主治医师, 110022, 辽宁省沈阳市铁西区滑翔路39号, 中国医科大学附属盛京医院第二消化内科. lin_yan02@sina.com

电话: 024-96615-26211

收稿日期: 2013-11-20 修回日期: 2013-12-25

接受日期: 2014-01-08 在线出版日期: 2014-02-08

Inflammatory bowel disease and mesenchymal stem cells

Yan Lin, Chang-Qing Zheng

Yan Lin, Chang-Qing Zheng, Second Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110022, Liaoning Province, China

Supported by: the Science and Technology Project of Shenyang, No. F13-318-1-42

Correspondence to: Yan Lin, Lecturer, Attending Physician, Second Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital, China Medical University, 39 Huaxiang Street, Tiexi District, Shenyang 110022, Liaoning Province, China. lin_yan02@sina.com

Received: 2013-11-20 Revised: 2013-12-25

Accepted: 2014-01-08 Published online: 2014-02-08

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic non-specific inflammatory disease with unknown etiology; it is associated with genetic factors, immune factors, intestinal flora, infection, and other factors. In recent years, mesenchymal stem cells (MSCs) have attracted more and more attention in the treatment of IBD, and the therapeutic effects may be associated with their anti-inflammatory and immunomodulatory effects as well as intestinal epithelium reconstruction. In this article, we will review the causes of IBD and possible mechanisms of MSCs in treating IBD.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Mesenchymal stem cells; Etiology; Treatment

Lin Y, Zheng CQ. Inflammatory bowel disease and

mesenchymal stem cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(4): 521-526 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/521.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.521>

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因未明的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 其发病与遗传、免疫、肠道菌群、感染等多方面因素有关. 近年来间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在IBD治疗中的作用得到越来越多的重视, 其治疗IBD可能与其抗炎、免疫调节及肠上皮重建等多方面机制有关. 本研究将对IBD的病因以及MSCs在治疗IBD中的可能机制进行综述.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 炎症性肠病; 间充质干细胞; 病因; 治疗

核心提示: 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)作为一种病因尚未完全明确的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 其传统的治疗方法多不能使患者的病情得到长期的缓解及控制复发. 而间充质干细胞在IBD治疗中的作用得到了较多的认可和一定程度的进展. 本文通过综述国内外文献对上述问题进行探讨.

林艳, 郑长青. 炎症性肠病与间充质干细胞的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 521-526 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/521.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.521>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病, 其具体的病因还未完全明确, IBD主要分为溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)两种类型. 本病呈慢性复发迁延病程, 治疗效果不佳, 多数患者的生活质量受到严重影响^[1]. 近年来, 随着人们不断提高的生活水平以及类似于西方化生活方式的转变, 我国IBD的

■背景资料

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)呈慢性复发迁延病程, 传统的治疗效果不佳. 近年来, 间充质干细胞移植来修复机体的受损组织从而治疗或者治愈疾病成为医学界的热点研究. 本文将对间充质干细胞与IBD的研究进展进行综述, 探讨间充质干细胞治疗IBD的可能机制.

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

■ 研发前沿

本文通过对国内外文献的综述来探讨IBD的可能病因以及间充质干细胞治疗IBD的可能机制,为间充质干细胞在临床中的应用提出一定的理论依据。

发病率逐年上升。其明确的病因和发病机制尚未完全清楚,最有可能的是具有易感基因的人群在环境和肠道菌群作用下,发生免疫紊乱以及炎症反应失调。目前IBD的治疗主要还是集中在控制IBD患者的炎症活动和调节IBD患者的免疫紊乱两个方向,5-氨基水杨酸、糖皮质激素、免疫抑制剂和生物制剂往往是临床治疗过程中常采取的方案,但上述治疗均存在一定的不良反应,且不能使IBD患者的病情得到长期的缓解及控制复发。近年来,利用干细胞移植来修复机体的受损组织从而治疗或者治愈疾病成为医学界的热点研究,并且在国内外也有较多的报道证明了干细胞移植在IBD患者治疗中的作用,所以说这为IBD的治疗提供了新的选择。在国内外外的研究中,间充质干细胞在IBD治疗中的作用得到了较多的认可和一定程度的进展。因此,本文将对间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)与IBD的研究进展作一综述,探讨MSCs治疗IBD的可能机制。

1 IBD的病因

IBD是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病,包括UC与CD,两者在组织学和临床表现上具有较大的差异。其中CD可发生于消化系统的任何部位(从口腔至肛门均可以受累),但多见于末段回肠和邻近的结肠,呈现出非连续性的肉芽肿性病变,表现为节段性或跳跃性的分布,病变间的黏膜正常;UC最常见于直肠和结肠,其病变累及部位多自肛端的直肠逆行向近段发展,病变局限于黏膜层以及黏膜下层,呈连续性病变,表现为肠道黏膜充血水肿以及糜烂或者浅溃疡形成。目前国内外的学者多认为IBD是多因素共同作用的结果,现将其病因简述如下:(1)易感基因:IBD具有家族聚集的现象和遗传倾向,目前多数研究显现出IBD的地域、种族的差异以及单卵双生子的高共患率,以上这些均证明了遗传因素在IBD的发病过程当中起着重要的作用,当前的研究指出NOD2/CARD15和ATG16L1基因是西方犹太人与白种人群CD的重要易感基因^[2,3],此外CD的相关基因IL23R、PTPN2也被认为与CD患者的自主免疫紊乱有关联^[4];而对于UC的患者而言,MICA和MICB发生基因突变之后,其与受体NKG2D的结合能力可能发生改变,进而可以影响免疫系统的活性,诱发UC的发病^[5];此外TNF-308A基因发生突变以后,TNF-α的活性增加或者是分泌增多进而可以导致患者肠

道黏膜致炎因子与抑炎因子的失衡,提示TNF-308A可能为UC患者的易感基因^[6];(2)肠道微生物:国内外众多的学者经过研究认为肠道内大量的微生物可能在IBD的发病过程有着一定的作用,由致病菌分泌的毒素能够同肠道上皮细胞膜表面的特异性受体相结合,从而导致肠道黏膜损伤或诱发炎症反应^[7],Antonelli等^[8]通过研究指出空肠弯曲菌、难辨性梭状芽孢杆菌以及巨细胞病毒可能参与在IBD患者的急性发作过程中。其中,难辨性梭状芽孢杆菌在IBD患者的发病以及转归的过程之中,尤其是在使用了抗生素治疗的患者当中可能发挥着重要的作用^[9,10];(3)肠道黏膜上皮的损伤:肠黏膜屏障是肠道防御的重要组成部分,肠黏膜上皮细胞是肠内容物与固有层免疫细胞之间的天然屏障,其与IBD间的关系一直受到较为广泛的关注,曾敬清等^[11]通过研究指出肠黏膜上皮细胞在病原微生物的刺激下可在炎症的早期即通过转化行使DC样专职抗原提呈细胞的作用,从而诱发肠黏膜Th2促炎应答进而参与IBD患者的发病,而Dotan等^[12]通过研究指出IBD患者的肠道黏膜上皮细胞通过增强Th0细胞的活化和增殖并使其向Th1细胞分化,分泌干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)等炎症因子,加重结肠的炎症反应;(4)肠道免疫:免疫因素,无论是肠黏膜的固有免疫还是肠黏膜的获得性免疫,均在IBD的发病中起着重要的作用和地位,这一点也得到了国内外学者和专家的广泛认可,各国学者也在肠道免疫方向进行着较多和深入的研究。最新的研究发现,肠黏膜组织中固有性免疫应答调节功能的异常与缺失在IBD患者的发病过程中发挥着重要的地位和作用^[13,14]。肠道内的致病微生物抗原特异性激活IBD患者肠道黏膜内的淋巴细胞[如B细胞、T细胞、自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)、Mφ和DC细胞等]是IBD患者免疫学的重要特点^[15-17]。上述免疫系统的异常应答可以导致体内多种炎症因子如介白素(interleukin, IL)-12、IL-1β、IFN-γ、IL-17、IL-4、IL-13等分泌增加,引发或者加重肠道黏膜的免疫损伤。此外,近年来也有较多的证据表明miRNA在肠道黏膜上皮的差异性表达对肠道的屏障功能也有着显著的影响,miRNA也与IBD的发生以及发展过程密切相关^[18],miRNA表达谱也有可能成为IBD患者有效的诊断工具与治疗靶点^[19];(5)其他因素,如维生素,Ikoma等^[20]通过研究指出补充了维生素D和维生素E对IBD的模型大鼠肠道黏

膜的愈合具有明显的促进作用, 以上研究表明维生素在IBD患者的发病过程可能发挥着一定的作用。

2 间充质干细胞与IBD

2.1 间充质干细胞 MSCs最初是20世纪70年代由Friedenstein等^[21]发现的基质细胞, 随后的进一步研究证实了这些细胞的可塑性并被命名为MSCs。MSCs不仅可以来源于骨髓, 还可以来源于成人的组织如脂肪、肝脏、肺、羊水、肌肉以及肾脏等, MSCs具有较强的自我更新能力和多向分化的潜能, 在适当的诱导条件下MSCs能够向成骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、神经细胞、肝脏细胞、心肌细胞和表皮细胞分化^[22]。国际细胞治疗协会将MSCs定义^[23]为: (1)贴壁性, 具有类似脂肪细胞的形态; (2)表达基质细胞的表面抗原, 但不表达造血细胞表面抗原; (3)拥有向成骨细胞、脂肪细胞以及软骨细胞分化的潜能。目前在临床和基础研究中使用的MSCs主要来自骨髓以及脐带血。

2.2 间充质干细胞治疗IBD的可能机制 MSCs用于治疗IBD在国内外均有相关的报道, Garcia-Olmo等^[24]报道了将自体MSCs局部注射进入克隆氏病患者的9个瘻管中, 8 wk后复查发现75%的瘻管愈合。我国学者刘静等^[25]亦报道了对1例顽固性溃疡性结肠炎患者采用脐带血MSCs治疗得到了良好的效果。通过国内外大量的动物实验和临床试验研究, 考虑MSCs治疗IBD的可能机制主要有以下几个方面。

2.2.1 MSCs在IBD治疗中的抗炎作用: MSCs对IBD患者损伤和炎症的部位具有很强的趋向性^[26,27], MSCs这类在体内微环境下主动迁徙至损伤部位并且进行修复的作用被称为MSCs的“归巢”作用^[28-31]。段征等^[32]对UC大鼠模型的均尾静脉注射入1 mL使用了荧光标记的骨髓间充质干细胞并进行观察, 发现第14天时UC模型大鼠病变部位的LA值高于同组其余消化系各段以及正常组大鼠的结肠($P<0.05$), 这指出迁移至炎性或损伤部位的结肠的骨髓间充质干细胞要显著高于正常的结肠。MSCs具有分泌抗炎细胞因子, 如前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)、IL-10、吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)的功能, 也有促进Th2细胞和DC祖细胞释放IL-4、IL-10的作用^[33], Aggarwal等^[34]通过研究发现MSCs可以分泌PGE2, 在培养基中加入TNF- α 或IFN- γ , MSCs分泌PGE2增加,

这进一步说明炎症因子可增强MSCs分泌PGE2, 从而进一步去抑制T细胞、DC以及NK细胞。Liang等^[35]利用人脐带血来源的MSCs治疗肠炎模型的小鼠, 发现人脐带血来源的MSCs不仅能够抑制IFN- γ 基因的表达式, 还能够阻断肠黏膜固有层内浸润的单核细胞释放IL-17, 进而使炎症和损伤处的IFN- γ 、IL-17含量降低。以上这些均证明了MSCs可以通过其“归巢”作用迁移至肠黏膜的受损部位, 并通过其抗炎的作用治疗IBD。

2.2.2 MSCs在IBD治疗中的免疫调节作用: 上文已指出, 尽管目前IBD的发病机制尚不完全清楚, 但国内外许多学者都认为自身免疫异常和紊乱在IBD患者的发病过程中起着重要的作用, 多种免疫性淋巴细胞在IBD患者的免疫异常与紊乱过程中有着重要的地位。MSCs具有多种免疫调节的作用, MSCs可以通过抑制T细胞的增殖、抑制DC的成熟和功能、抑制B细胞的增殖以及最后分化进行免疫调节, 对其他的免疫细胞如NK细胞和巨噬细胞也有着免疫调节的作用^[36]。Krampera等^[37]通过对小鼠模型的研究指出MSCs可通过细胞接触依赖机制进而明显下调幼稚性T细胞以及记忆性抗原特异性T细胞对其同源肽的反应。Comoli等^[38]通过研究指出MSCs可以阻止外周血单核细胞中富集的B细胞产生免疫球蛋白, Krampera等^[37]也同样通过研究证明了MSCs具有影响B细胞的分化、抗体产生和趋化行为的能力。Aggarwal等^[34]通过研究提出MSCs可以导致髓样DC细胞TNF- α 表达的下降, 上调淋巴样DC细胞IL-1的表达; Nauta等^[39]通过研究表明MSCs可以通过产生IL-6抗体和抗巨噬细胞集落刺激因子抗体进而阻断DC的免疫抑制。Sotiropoulou等^[40]通过研究证明MSCs可抑制被IL-2激活的NK细胞分泌IL-10、TNF- α 、INF- γ 等炎症因子。以上学者的研究证实了MSCs可能是通过对多种免疫细胞的调节而影响IBD病程中的免疫异常与紊乱, 从而达到治疗IBD的目的。

2.2.3 MSCs在IBD治疗中的上皮重建作用: 在IBD的治疗过程中, MSCs可以定植在受损的肠道组织中修复肠上皮, 其可能机制在于以下三个方面: (1)MSCs分化为肠上皮细胞和内皮细胞修复受损肠上皮: Komori等^[41]将来源于转基因小鼠且表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的骨髓移植进入使用三硝基苯磺酸(trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS)诱导的结肠炎大鼠体内, 发现给予TNBS 28 d以后, 大鼠结肠上皮细胞中的表达GFP阳性的细胞占到

■ 相关报道

Garcia-Olmo等报道了将自体MSCs局部注射进入克隆氏病患者的9个瘻管中, 8 wk后复查发现75%的瘻管愈合。我国学者刘静等亦报道了对1例顽固性溃疡性结肠炎患者采用脐带血MSCs治疗得到了良好的效果。

■ 创新盘点

本文回顾大量文献,对间充质干细胞治疗IBD的机制及研究进展进行了较全面综述。

总数的37.6%,这些表明骨髓MSCs是肠黏膜中再生细胞的重要来源。Brittan等^[42]通过研究指出,TNBS结肠炎模型小鼠行异基因骨髓移植以后,骨髓来源的内皮细胞、周细胞和血管平滑肌细胞散在分布于血管壁上,且能够见到完全由骨髓来源的细胞构成的血管。这说明MSCs能够分化成肠道上皮细胞以及内皮细胞,进而发挥修复肠道组织的功能;(2)MSCs分泌细胞因子促进肠上皮重建:Kim等^[43]通过研究显示MSCs能够分泌粒细胞集落刺激因子、粒-巨噬细胞集落刺激因子、巨噬细胞集落刺激因子等多种集落刺激因子。而Liu等^[44]通过对脐带血来源的MSCs的检测发现其能够分泌较多IL-6、IL-8、基质金属蛋白酶抑制剂1(tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP-1)、TIMP-2等细胞因子。Weil等^[45]通过研究证实MSCs可以通过旁分泌IL-6、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种细胞,并且通过下调凋亡信号通路进而使受到缺氧而损伤的胎儿肠黏膜上皮细胞的存活和增殖能力增强。上述细胞因子在肠道黏膜屏障的保护和肠道上皮的修复的过程中发挥着关键性的作用。IL-6可以通过调节bcl-2和fas抑制由于缺氧而诱导的肠黏膜细胞的凋亡^[46];HGF能够通过抑制肠上皮细胞凋亡,进而诱导肠黏膜的再生^[47];VEGF能够促进血管的生成,提高移植的干细胞的成活率^[48]。所以说,MSCs可以通过直接或间接分泌多种细胞因子促进肠上皮的重建;(3)MSCs调节肠道干细胞微环境促进肠上皮重建:国外学者^[49,50]通过研究表明在受损的肠黏膜组织中,MSCs不但可以分化为肌成纤维细胞进而修复受损组织,而且在肠上皮组织自我更新的过程也发挥着关键性的作用。Brittan等^[51]通过研究发现骨髓来源的成纤维细胞能够分泌多种细胞因子,进而调节肠黏膜上皮干细胞的微环境,进而间接维持肠黏膜上皮的稳定。所以说,移植的MSCs与其定植部位肠道的微环境间存在相互作用的效应。

3 结论

MSCs是近年来IBD治疗的重点,具有广泛的研究空间与前景。但MSCs对IBD的治疗仍然处于一个实验性的时期,仍有许多临床研究或者基础研究的问题需要解决,如MSCs移植的途径与数量和最佳时机的选择,MSCs移植后的免疫重建、分化途径以及在其IBD治疗中的具体作用,

MSCs在机体内存活以及维持效应的有效时间, MSCs在体内是否会诱发肿瘤等,以上仍有较多的问题需要在以后的研究中不断探索。但相信,随着MSCs移植技术的不断发展,会有更多的IBD患者从中受益,也为未来IBD的治疗提供了一个新的方法及方向。

4 参考文献

- 1 Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11: 7-13 [PMID: 20016504 DOI: 10.1038/ni.1818]
- 2 Gerseemann M, Wehkamp J, Stange EF. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2012; 271: 421-428 [PMID: 22324936 DOI: 10.1111/j.1365-2796.2012.02515.x]
- 3 Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474: 298-306 [PMID: 21677746 DOI: 10.1038/nature10208]
- 4 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434 [PMID: 17653185 DOI: 10.1038/nature06005]
- 5 Li Y, Xia B, Lü M, Ge L, Zhang X. MICB0106 gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in central China. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 153-159 [PMID: 19662431 DOI: 10.1007/s00384-009-0787-y]
- 6 Fan W, Maoqing W, Wangyang C, Fulan H, Dandan L, Jiaojiao R, Xinshu D, Binbin C, Yashuang Z. Relationship between the polymorphism of tumor necrosis factor- α -308 G > A and susceptibility to inflammatory bowel diseases and colorectal cancer: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 432-437 [PMID: 21248737 DOI: 10.1038/ejhg.2010.159]
- 7 Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercoe E, Moore RA, Holt RA. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 299-306 [PMID: 22009989 DOI: 10.1101/gr.126516.111]
- 8 Antonelli E, Baldoni M, Giovenali P, Villanacci V, Essatari M, Bassotti G. Intestinal superinfections in patients with inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis* 2012; 6: 154-159 [PMID: 22325169 DOI: 10.1016/j.crohns.2011.07.012]
- 9 Kariv R, Navaneethan U, Venkatesh PG, Lopez R, Shen B. Impact of Clostridium difficile infection in patients with ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2011; 5: 34-40 [PMID: 21272802 DOI: 10.1016/j.crohns.2010.09.007]
- 10 Cornely OA, Crook DW, Esposito R, Poirier A, Somero MS, Weiss K, Sears P, Gorbach S. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with Clostridium difficile in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Infect Dis* 2012; 12: 281-289 [PMID: 22321770 DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70374-7]
- 11 曾敬清, 刘伟, 林凯, 杨芬, 张彦洁, 章丽雅, 王俊祺, 周同, 许春娣. DC SIGN在小鼠炎症性肠病上皮细胞表达及其黏膜损伤的免疫调节. *现代免疫学* 2012; 32: 109-1114
- 12 Dotan I, Allez M, Nakazawa A, Brimnes J, Schulder-Katz M, Mayer L. Intestinal epithelial cells from

- inflammatory bowel disease patients preferentially stimulate CD4⁺ T cells to proliferate and secrete interferon-gamma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1630-G1640 [PMID: 17347451 DOI: 10.1152/ajpgi.00294.2006]
- 13 Marks DJ. Defective innate immunity in inflammatory bowel disease: a Crohn's disease exclusivity? *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27: 328-334 [PMID: 21483259 DOI: 10.1097/MOG.0b013e3283463b45]
 - 14 Casanova JL, Abel L. Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages. *J Exp Med* 2009; 206: 1839-1843 [PMID: 19687225 DOI: 10.1084/jem.20091683]
 - 15 Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet* 2012; 380: 1606-1619 [PMID: 22914296 DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0]
 - 16 Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012; 380: 1590-1605 [PMID: 22914295 DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60026-9]
 - 17 Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 599-608 [PMID: 22907164 DOI: 10.1038/nrgastro.2012.152]
 - 18 Pekow JR, Kwon JH. MicroRNAs in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 187-193 [PMID: 21425211 DOI: 10.1002/ibd.21691]
 - 19 Archanioti P, Gazouli M, Theodoropoulos G, Vaio-poulou A, Nikiteas N. Micro-RNAs as regulators and possible diagnostic bio-markers in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2011; 5: 520-524 [PMID: 22115369 DOI: 10.1016/j.crohns.2011.05.007]
 - 20 Ikoma D, Ichikawa D, Tani N, Ikoma H, Tomita H, Sai S, Okamoto K, Kikuchi S, Fujiwara H, Ueda Y, Hagiwara A, Yamagishi H. [Plasma methylation-specific polymerase chain reaction as a diagnostic tool for esophageal cancer patients]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33: 1717-1719 [PMID: 17212085]
 - 21 Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92 [PMID: 4455512]
 - 22 Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007; 100: 1249-1260 [PMID: 17495232 DOI: 10.1161/01.RES.0000265074.83288.09]
 - 23 Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7: 393-395 [PMID: 16236628 DOI: 10.1080/14653240500319234]
 - 24 García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1416-1423 [PMID: 15933795 DOI: 10.1007/s10350-005-0052-6]
 - 25 刘静, 韩冬梅, 薛梅, 朱玲, 王志东, 闫洪敏, 郭子宽, 王恒湘. 脐带间充质干细胞输注治疗顽固性溃疡性结肠炎. *组织工程与重建外科杂志* 2011; 7: 258-260
 - 26 Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* 2007; 262: 509-525 [PMID: 17949362 DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01844.x]
 - 27 Ozaki K, Sato K, Oh I, Meguro A, Tatara R, Muroi K, Ozawa K. Mechanisms of immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Int J Hematol* 2007; 86: 5-7 [PMID: 17675259 DOI: 10.1532/IJH97.07003]
 - 28 Wu Y, Wang J, Scott PG, Tredget EE. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Repair Regen* 2007; 15 Suppl 1: S18-S26 [PMID: 17727462 DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00221.x]
 - 29 Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 2111-2121, 2121.e1-3 [PMID: 18455168 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.015]
 - 30 Tögel F, Yang Y, Zhang P, Hu Z, Westenfelder C. Bioluminescence imaging to monitor the in vivo distribution of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F315-F321 [PMID: 18480180 DOI: 10.1152/ajprenal.00098.2008]
 - 31 Hara M, Murakami T, Kobayashi E. In vivo bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* 2008; 30: 163-171 [PMID: 18222064 DOI: 10.1016/j.jaut.2007.12.007]
 - 32 段征, 徐艳华, 陈小云, 汪维伟. 间充质干细胞移植后在溃疡性结肠炎大鼠体内的迁移. *重庆医科大学学报* 2010; 35: 367-369
 - 33 Auletta JJ, Deans RJ, Bartholomew AM. Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. *Blood* 2012; 119: 1801-1809 [PMID: 22228625 DOI: 10.1182/blood-2011-10-384354]
 - 34 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105: 1815-1822 [PMID: 15494428 DOI: 10.1182/blood-2004-04-1559]
 - 35 Liang L, Dong C, Chen X, Fang Z, Xu J, Liu M, Zhang X, Gu DS, Wang D, Du W, Zhu D, Han ZC. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate mice trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. *Cell Transplant* 2011; 20: 1395-1408 [PMID: 21396175 DOI: 10.3727/096368910X557245]
 - 36 Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 2012; 35: 213-221 [PMID: 22370776 DOI: 10.1007/s12272-012-0202-z]
 - 37 Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 386-398 [PMID: 16123384 DOI: 10.1634/stemcells.2005-0008]
 - 38 Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A, Cometa A, Cioni M, Porretti L, Barberi W, Frassonni F, Locatelli F. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 1196-1202 [PMID: 18029377 DOI: 10.1093/ndt/gfm740]
 - 39 Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177: 2080-2087 [PMID: 16887966]

■应用要点

通过本文对国内外文献的综述, 为将来在临床工作中应用间充质干细胞治疗IBD提出了一定的理论依据。

■名词解释

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 定义为: (1) 贴壁性, 具有类似脂肪细胞的形态; (2) 表达基质细胞的表面抗原, 但不表达造血细胞表面抗原; (3) 拥有向成骨细胞、脂肪细胞以及软骨细胞分化的潜能。

■同行评价

本文综述立题有依据,目的明确,内容集中,举例贴切,分析讨论客观,参考文献适中,较全面综述MSCs治疗IBD的疗效及其疗效机制,对IBD的临床治疗研究有参考意义。

- 40 Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24: 74-85 [PMID: 16099998 DOI: 10.1634/stemcells.2004-0359]
- 41 Komori M, Tsuji S, Tsujii M, Murata H, Iijima H, Yasumaru M, Nishida T, Irie T, Kawano S, Hori M. Involvement of bone marrow-derived cells in healing of experimental colitis in rats. *Wound Repair Regen* 2005; 13: 109-118 [PMID: 15659043 DOI: 10.1111/j.1067-1927.2005.130114.x]
- 42 Brittan M, Chance V, Elia G, Poulosom R, Alison MR, MacDonald TT, Wright NA. A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasclogenesis and myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 128: 1984-1995 [PMID: 15940631 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.03.028]
- 43 Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, Yang YS, Im HJ, Kim KH, Jung HL, Sung KW, Koo HH. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* 2005; 31: 119-126 [PMID: 15919213 DOI: 10.1016/j.cyto.2005.04.004]
- 44 Liu CH, Hwang SM. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine* 2005; 32: 270-279 [PMID: 16377203 DOI: 10.1016/j.cyto.2005.11.003]
- 45 Weil BR, Markel TA, Herrmann JL, Abarbanell AM, Meldrum DR. Mesenchymal stem cells enhance the viability and proliferation of human fetal intestinal epithelial cells following hypoxic injury via paracrine mechanisms. *Surgery* 2009; 146: 190-197 [PMID: 19628073 DOI: 10.1016/j.surg.2009.03.031]
- 46 Rollwagen FM, Madhavan S, Singh A, Li YY, Wolcott K, Maheshwari R. IL-6 protects enterocytes from hypoxia-induced apoptosis by induction of bcl-2 mRNA and reduction of fas mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 1094-1098 [PMID: 16870148 DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.07.016]
- 47 Schwartz MZ, Kato Y, Yu D, Lukish JR. Growth-factor enhancement of compromised gut function following massive small-bowel resection. *Pediatr Surg Int* 2000; 16: 174-175 [PMID: 10786975 DOI: 10.1007/s003830050716]
- 48 von Dobschuetz E, Meyer S, Thorn D, Marme D, Hopt UT, Thomusch O. Targeting vascular endothelial growth factor pathway offers new possibilities to counteract microvascular disturbances during ischemia/reperfusion of the pancreas. *Transplantation* 2006; 82: 543-549 [PMID: 16926599 DOI: 10.1097/01.tp.0000229434.92523.99]
- 49 Hayashi Y, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Ishii S, Nakamura T, Eguchi H, Kawano S. The transdifferentiation of bone-marrow-derived cells in colonic mucosal regeneration after dextran-sulfate-sodium-induced colitis in mice. *Pharmacology* 2007; 80: 193-199 [PMID: 17587885 DOI: 10.1159/000104148]
- 50 Tanaka H, Arimura Y, Yabana T, Goto A, Hosokawa M, Nagaishi K, Yamashita K, Yamamoto H, Sasaki Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Myogenic lineage differentiated mesenchymal stem cells enhance recovery from dextran sulfate sodium-induced colitis in the rat. *J Gastroenterol* 2011; 46: 143-152 [PMID: 20848145 DOI: 10.1007/s00535-010-0320-7]
- 51 Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Goldman J, Alison MR, Wright NA. Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* 2002; 50: 752-757 [PMID: 12010874 DOI: 10.1136/gut.50.6.752]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



IGRA及TB-PCR在肠结核与克罗恩病鉴别诊断中的价值

张俊, 高峰

张俊, 高峰, 新疆维吾尔自治区人民医院消化内科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830001

作者贡献分布: 本文综述由张俊完成; 高峰审校。

通讯作者: 高峰, 副教授, 主任医师, 830001, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市天池路91号, 新疆维吾尔自治区人民医院消化内科。

xjgf@sina.com

电话: 0991-8563847

收稿日期: 2013-11-09 修回日期: 2013-11-27

接受日期: 2013-11-29 在线出版日期: 2014-02-08

Value of interferon- γ release assay and polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* in differentiation of intestinal tuberculosis from Crohn's disease

Jun Zhang, Feng Gao

Jun Zhang, Feng Gao, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830001, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China

Correspondence to: Feng Gao, Associate Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Xinjiang Uyghur Autonomous Region, 91 Tianchi Road, Urumqi 830001, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China. xjgf@sina.com

Received: 2013-11-09 Revised: 2013-11-27

Accepted: 2013-11-29 Published online: 2014-02-08

Abstract

China is one of the countries having the highest burden of tuberculosis. The number of patients with Crohn's disease (CD) is gradually increasing in China. Sometimes intestinal tuberculosis (ITB) and CD are quite similar in clinical manifestations and the findings of radiological and endoscopic examinations, and it is difficult to differentiate the two diseases; however, the treatments and prognosis of the two diseases are completely different. Besides clinical characteristics, radiological examinations, endoscopic examinations, histopathological examinations, acid-fast staining, *Mycobacterium tuberculosis* culture, serum markers and tuberculin skin test (TST), interferon- γ release assay (IGRA) and polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* (TB-PCR) have recently been used to differentiate ITD from CD. Both IGRA and TB-

PCR have a high sensitivity and specificity in diagnosis of ITB when differentiating ITB from CD. This review focuses on the value of IGRA and TB-PCR in the differentiation of ITB from CD.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Interferon- γ release assay; Polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*; Intestinal tuberculosis; Crohn's disease; Differential diagnosis

Zhang J, Gao F. Value of interferon- γ release assay and polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* in differentiation of intestinal tuberculosis from Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 527-532 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/527.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.527>

摘要

中国是结核病高负担国家之一,加之目前我国克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者数量在逐步增加,而肠结核(intestinal tuberculosis, ITB)和CD的临床表现、放射学检查及内镜检查结果等方面有时很相似。两者的鉴别有时很困难,然而两者的治疗方案及预后截然不同。除了从传统的临床表现、放射学检查、内镜检查、组织病理学检查、抗酸染色、结核分枝杆菌培养、血清标志物及结核菌素皮肤试验(tuberculin skin test, TST)等方面鉴别这两种疾病,近年来的研究用 γ 干扰素释放分析(interferon- γ release assay, IGRA)及结核分枝杆菌聚合酶链反应(polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*, TB-PCR)来鉴别ITB与CD。在鉴别ITB和CD时,IGRA及TB-PCR诊断ITB的敏感度及特异度均较高。本文就IGRA与TB-PCR在鉴别ITB和CD中的价值进行综述。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: γ 干扰素释放分析; 结核分枝杆菌聚合酶链反应; 肠结核; 克罗恩病; 鉴别诊断

核心提示: 肠结核(intestinal tuberculosis, ITB)临床

■背景资料

目前我国结核病年发病约为130万例,占全球发病的14.3%,位居全球第2位。肠结核(intestinal tuberculosis, ITB)属于结核病的一种类型,我国近十多年来克罗恩病(Crohn's disease, CD)就诊人数呈逐步增加的趋势非常明显,而ITB临床上与CD酷似,而治疗方法完全不同,两病的鉴别一直是个难题。

■同行评议者

江学良, 教授, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

■相关报道

Kim等报道肠结核组 γ 干扰素释放分析(interferon- γ release assay, IGRA)阳性率较克罗恩病组高,差异具有统计意义,且诊断ITB的敏感度为67%,特异度为90%。而Ramadass等研究报道粪便TB-PCR诊断ITB的敏感度为79%,特异度为88%。研究结果显示IGRA及TB-PCR诊断ITB的敏感度及特异度均较高。

上与克罗恩病(Crohn's disease, CD)酷似,两病的鉴别一直是我们所面对目前难题。传统的鉴别方法在鉴别ITB与CD时具有诸多局限性,而近年来的研究用 γ 干扰素释放分析(interferon- γ release assay, IGRA)及结核分枝杆菌聚合酶链反应(polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*, TB-PCR)来鉴别ITB与CD。结果显示IGRA及TB-PCR诊断ITB的敏感度及特异度均较高,这为两病的鉴别提供了有价值的新方法,两病的鉴别是目前及今后相当长时间内的研究热点。

张俊, 高峰. IGRA及TB-PCR在肠结核与克罗恩病鉴别诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 527-532 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/527.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.527>

0 引言

我国是全球22个结核病流行严重的国家之一,目前我国结核病年发病人数约为130万,占全球发病的14.3%,位居全球第2位^[1]。发展中国家是结核病的高发区,肠结核(intestinal tuberculosis, ITB)是常见的肺外结核病^[2]。肺外结核占全球所有结核病的15%-20%^[3],欧盟国家肺外结核占所有结核病的比例从2002年的16.4%上升到2011年的22.4%^[4]。ITB是结核分枝杆菌引起的肠道慢性特异性感染。克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种病因尚不十分清楚的胃肠道慢性炎性肉芽肿性疾病^[5]。研究表明CD在欧美国家是常见病^[6-9],CD属于炎症性肠病的一种类型,发展中国家炎症性肠病的发病率呈上升趋势^[10]。Prideaux等^[11]报道近20年来,亚洲国家炎症性肠病发病率和患病率呈逐年增加趋势。在我国,近十多年来CD就诊人数呈逐步增加的趋势非常明显^[12],并且CD存在东西方差异^[13]。CD的临床表现缺乏特异性,极易导致误诊^[14]。何瑶等^[15]进行的回结肠CD与ITB临床及内镜特征比较研究发现半数患者不能依靠活检病理和临床内镜评分获得比较可靠的诊断。传统的鉴别方法在鉴别ITB与CD时具有诸多局限性。ITB临床上与CD酷似,而治疗方法完全不同,两病的鉴别一直是个难题^[16]。近年来的研究用 γ 干扰素释放分析(interferon- γ release assay, IGRA)及结核分枝杆菌聚合酶链反应(polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis*, TB-PCR)来鉴别ITB与CD。在鉴别ITB与CD时,IGRA及TB-PCR诊断ITB的敏感度及特异度均较高,提示有较好的应用价值及应用前景。

1 IGRA在ITB与CD鉴别诊断中的价值

研究表明结核分枝杆菌(*mycobacterium tuberculosis*, MTB)基因中含有RD1基因序列,该序列编码产生的培养滤液蛋白-10(culture filtrate protein-10, CFP-10)和早期分泌靶向抗原-6(early secretory antigenic target-6, ESAT-6)是MTB的特异性抗原^[17]。当MTB的特异性抗原再次刺激感染MTB后的记忆性T淋巴细胞,记忆性T淋巴细胞就会释放 γ 干扰素,IGRA通过检测 γ 干扰素的分泌情况来诊断有无MTB感染^[18]。近年来国外的研究表明IGRA在检测MTB感染中有较好的敏感度和特异度^[19-22]。目前应用在ITB与CD鉴别诊断中的IGRA包括QuantiFERON-TB gold test(QFT-G)和结核杆菌T细胞斑点试验(T cell spot of tuberculosis test, T-SPOT.TB)。

1.1 QFT-G QFT-G利用MTB特异性蛋白质ESAT-6和CFP-10刺激宿主全血中的淋巴细胞,如果宿主曾经暴露于MTB,暴露于MTB后的致敏淋巴细胞经ESAT-6和CFP-10再次刺激就会释放 γ 干扰素,然后用酶联免疫吸附试验检测释放的 γ 干扰素来诊断有无MTB感染。卡介苗及环境分枝杆菌可能导致TST出现假阳性结果,而不能导致QFT-G出现假阳性结果,所以QFT-G特异度比TST更好,美国FDA已批准用QFT-G作为一种辅助检查来诊断结核病和结核的潜伏期^[23,24]。Klein等^[25]研究报道在行抗肿瘤坏死因子- α 治疗的患者中检测潜伏期结核QFT-G的特异度比TST更好。Khalil等^[26]研究得出检测活动性肺结核时QFT-G的敏感度比TST更好,且其敏感度不受之前接种过卡介苗及暴露过环境分枝杆菌的影响。ITB属于肺外结核病, Fan等^[27]进行的Meta分析得出QFT-G诊断肺外结核的总敏感度和特异度分别为72%(95%CI: 65%-79%) and 82%(95%CI: 78%-87%)。Kim等^[28]研究报道ITB组QFT-G阳性率为66.7%, CD组QFT-G阳性率为9.7%, ITB组QFT-G阳性率较CD组高,差异具有统计学意义;对于抗酿酒酵母抗体(anti-saccharomyces cerevisiae antibodies, ASCA)阳性或QFT-G阴性的病例, ASCA诊断CD的敏感度为44.4%、特异度为96%、阳性预测值为91.4%、阴性预测值为64.3%。在ITB很普遍的韩国, ASCA是一种有价值的诊断CD的方法,尤其将ASCA与QFT-G联合起来用于鉴别CD与ITB时,这种联合诊断法可能在CD与ITB的鉴别诊断中非常有用。另外, Kim等^[29]研究发现QFT-G与TST有很好的一致性, ITB组的QFT-G阳性率(67%)较

CD组阳性率(9%)高, 差异具有统计学意义; ITB组的TST阳性率(67%)较CD组阳性率(16%)高, 差异具有统计学意义. QFT-G诊断ITB的敏感度为67%, 特异度为90%, 阳性预测值为87%, 阴性预测值为73%, 虽然QFT-G具有一定的局限性, 但QFT-G结合TST在诊断ITB时的效能是令人满意的. 目前QFT-G用于鉴别ITB与CD的研究较T-SPOT.TB用于鉴别ITB与CD的研究少, 待今后进一步研究来证实QFT-G在ITB与CD鉴别诊断中的价值.

1.2 T-SPOT.TB T-SPOT.TB是应用酶联免疫斑点技术检测经MTB特异性抗原ESAT-6和CFP-10刺激后外周血中释放 γ 干扰素的T细胞^[30]. TST中使用的纯蛋白衍化物的某些抗原成分与卡介苗和环境分枝杆菌的抗原成分相同, 可发生交叉反应, 导致TST的特异性较低; 并且TST对于免疫受损患者的敏感度较低^[31]. 国外报道T-SPOT.TB诊断结核的敏感度为83%-97%^[32]. Feng等^[33]研究报道T-SPOT.TB诊断结核病的敏感度及特异度均较TST更好. Meier等^[34]研究报道在确诊为结核病的72例患者中有70例T-SPOT.TB呈阳性, T-SPOT.TB诊断结核的敏感度为97.2%. 并对其中45例T-SPOT.TB阳性患者行TST, 发现TST的阳性率为89%, 对这45例T-SPOT.TB阳性患者而言, T-SPOT.TB的阳性率(100%)与TST的阳性率(89%)的差异无统计学意义. ITB属于肺外结核病, Liao等^[35]研究报道T-SPOT.TB诊断肺外结核的敏感度和特异度分别为79.8%和81.6%. Fan等^[27]的Meta分析得出T-SPOT.TB诊断肺外结核的总敏感度和特异度分别为90%(95%CI: 86%-93%)和68%(95%CI: 64%-73%). Baek等^[36]研究得出T-SPOT.TB诊断ITB的敏感度为100%、特异度为78.1%、阳性预测值为68.9%、阴性预测值为100%, 当ITB与CD的鉴别有困难时, T-SPOT.TB的鉴别诊断价值较高: 阴性结果可基本排除ITB. Li等^[37]研究得出T-SPOT.TB诊断ITB的敏感度为84.2%, 特异度为75.4%, 阳性预测值为50.0%, 阴性预测值为94.2%; 在结核流行地区鉴别ITB和CD时, 鉴于T-SPOT.TB有很高的阴性预测值可很好地排除ITB, 所以他可能是一种在实践中有价值的诊断方法. Lee等^[38]研究报道T-SPOT.TB诊断ITB的敏感度为100%、特异度为83.3%、阳性预测值为60.0%、阴性预测值为100%, 当鉴别ITB与CD有困难时, T-SPOT.TB可能是一种可快速排除ITB的有用方法. Lei等^[39]研究得出T-SPOT.TB诊断

ITB的敏感度为86%、特异度为93%、阳性预测值为88%、阴性预测值为91%, 由于T-SPOT.TB在诊断ITB时具有很高的特异性及阴性预测值, 其在排除ITB时具有较高的价值. 雷少妮等^[40]研究报道CD组、ITB组、肠外结核组及其他疾病组T-SPOT.TB阳性率分别为6.7%、85.7%、70%及0%, 各组间差异具有统计学意义; T-SPOT.TB检测ITB的敏感度为85.7%、特异度为93.3%, 阴性预测值为12.5%.

2 TB-PCR在ITB与CD鉴别诊断中的价值

PCR可使DNA的合成量呈指数增长, 可用PCR检测MTB DNA, TB-PCR是一种在鉴别ITB及CD时的快速病原学诊断方法. 在目前的研究中, TB-PCR的引物来自MTB的特异性IS6110序列, IS6110序列具有较高的敏感性和特异性^[41]. 目前TB-PCR可用于肠黏膜组织和粪便中的MTB DNA检测.

2.1 粪便MTB DNA检测 Ramadass等^[42]研究得出结核在印度很普遍, 在鉴别ITB与CD时, 从确诊为ITB或CD患者的粪便中提取DNA, 并实施TB-PCR, 粪便TB-PCR诊断ITB的敏感度为79%, 特异度为88%, 阳性预测值为79%, 阴性预测值为88%. Balamurugan等^[43]研究报道12例已确诊ITB患者中有11例粪便TB-PCR阳性, 而15例健康对照者的粪便TB-PCR全为阴性, ITB组和健康对照组TB-PCR阳性率的差异具有统计学意义并且粪便TB-PCR的敏感度优于病理检查及肠黏膜组织MTB培养. Sucharita等^[44]对27例未治疗的ITB及48例CD实施粪便TB-PCR, ITB组TB-PCR阳性率为77.8%, CD组TB-PCR阳性率为14.6%, 差异具有统计学意义; TB-PCR的敏感度、特异度、阳性预测值及阴性预测值分别为75%、87%、77%及85%. Balamurugan等^[45]研究报道粪便TB-PCR阳性率在未治疗的ITB组、治疗过的ITB组、痰涂片阳性肺结核组及对照组分别为88.8%(16/18)、0%(0/8)、85.7%(12/14)及0%(0/30); 粪便TB-PCR诊断ITB的敏感度、特异度、阳性预测值及阴性预测值分别为88.8%、100%、100%及93.7%.

2.2 肠黏膜组织MTB DNA检测 1994年Anand等^[46]对1例慢性腹泻患者的肠黏膜组织实施TB-PCR, 与MTB探针杂交结果呈阳性, 该患者在抗结核治疗后内镜下异常病变完全消失, 该研究表明在诊断ITB时可对肠黏膜活检组织行TB-PCR. 甘华田等^[47]对36例ITB肠黏膜组织及26例CD

■创新盘点

本文详细而全面介绍从细胞免疫方面及生物分子水平来鉴别肠结核及克罗恩病.

■应用要点

本文着重综述 IGRA 及 TB-PCR 在肠结核与克罗恩病鉴别诊断中的价值, IGRA 从细胞免疫方面及 TB-PCR 从病原学方面为解决肠结核及克罗恩病的鉴别难题开辟了一条新的途径。

肠黏膜组织实施 TB-PCR 发现 ITB 组及 CD 组的 TB-PCR 阳性率分别为 75% 和 0%。Jin 等^[48]认为病理组织学检查与 TB-PCR 联用是鉴别诊断 CD 与 ITB 的最佳方法, 对确诊为 ITB 或 CD 的患者进行病理组织研究, 并实施 TB-PCR, TB-PCR 诊断 ITB 的敏感度和特异度分别为 88.9% 和 100%; 发现病理特征结合了组织 TB-PCR 后, 依据病理特征诊断 ITB 的敏感度可显著提高。Amarapurkar 等^[49]进行了一项超过 3 年的前瞻性研究发现: 与 ITB 鉴别时, 发热、便血、腹泻和病程在诊断 CD 时的准确度最高, 其准确度为 84.62%; 而对活检组织实施 TB-PCR 的准确度为 82.6%。陈瑜君等^[50]研究得出 TB-PCR 在 ITB 与 CD 的鉴别诊断中, TB-PCR 诊断 ITB 的敏感度为 32%, 特异度为 100%, 阳性预测值为 100%, 阴性预测值为 59.5%。甘华田等^[51]研究得出 TB-PCR 检测 MTB DNA 在 ITB 组的总阳性率为 63.2%, 在与 CD 肉芽肿形态相同的 ITB 组中的阳性率为 71.4%, 在无肉芽肿病变的 ITB 组中的阳性率为 64.7%, 在 CD 组全为阴性; 而抗酸染色在 ITB 组总阳性率为 21.1%, TB-PCR 在 ITB 组的总阳性率较抗酸染色高, 差异具有统计学意义, 该研究得出内镜活检病理对肠结核与 CD 的鉴别诊断有一定局限, PCR 技术是鉴别 ITB 和 CD 极有价值的一种新方法。Amarapurkar 等^[52]报道肠黏膜组织 TB-PCR 在 ITB 组的阳性率仅 21.6%, 在 CD 组的阳性率为 5%, TB-PCR 诊断 ITB 的特异性达 95%, 故 TB-PCR 在 ITB 与 CD 的鉴别诊断中可能有价值。

3 结论

我国是结核病高发国家之一, 且我国 CD 的发病率呈增高趋势, 然而 ITB 和 CD 在许多方面极为相似, 有时两者的鉴别非常困难, 然而两者的治疗及预后截然不同, 误诊率非常高, 错误的治疗甚至可能危及患者的生命, 传统的鉴别方法具有诸多局限性。在 ITB 和 CD 的鉴别诊断中, IGRA 诊断 ITB 的敏感度及特异度均较高, 尤其较高的阴性预测值可快速排除 ITB, 且 IGRA 具有不受卡介苗及环境分枝杆菌的影响, 结果客观, 非侵入性及方便快捷等优点; 在 ITB 和 CD 的鉴别诊断中, TB-PCR 诊断 ITB 的敏感度及特异度均较高, 尤其极高的特异度在临床诊断中有极好的应用价值及应用前景, 已有的研究表明通过控制主客观因素可减少 TB-PCR 的假阳性及假阴性结果, 并且可提高 TB-PCR 敏感度。TB-PCR 出结果快, 尤其粪便 TB-PCR 具有方便检测及非

侵入性等优点, 但是 TB-PCR 技术要求高。希望今后寻找到除了 MTB 的特异性 IS6110 序列以外 MTB 的其他特异性序列以提高 TB-PCR 的敏感性。虽然传统的鉴别 ITB 与 CD 的方法具有诸多局限性, 但其具有费用低、技术要求不高等优点, IGRA、TB-PCR 及某些传统方法的结合可能提高诊断的效能而并不大大增加医疗费用。希望今后进行大样本量的前瞻性研究以评价 IGRA 和 TB-PCR 在鉴别 ITB 和 CD 中的价值。

4 参考文献

- 1 张元浩. 卫生部介绍全国肺结核疫情现状. 中国全科医学(医生读者版) 2011; 14: 43
- 2 Dye C. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 2006; 367: 938-940 [PMID: 16546542]
- 3 Mehta PK, Raj A, Singh N, Khuller GK. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 66: 20-36 [PMID: 22574812 DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00987.x]
- 4 Sandgren A, Hollo V, van der Werf MJ. Extrapulmonary tuberculosis in the European Union and European Economic Area, 2002 to 2011. *Euro Surveill* 2013; 18: pii: 20431 [PMID: 23557943]
- 5 陆再英, 钟南山. 内科学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 415
- 6 Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8-15 [PMID: 10701144]
- 7 Herrinton LJ, Liu L, Fireman B, Lewis JD, Allison JE, Flowers N, Hutfless S, Velazquez FS, Abramson O, Altschuler A, Perry GS. Time trends in therapies and outcomes for adult inflammatory bowel disease, Northern California, 1998-2005. *Gastroenterology* 2009; 137: 502-511 [PMID: 19445944 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.04.063]
- 8 Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5A-36A [PMID: 16151544]
- 9 Amre DK, Mack DR, Morgan K, Krupoves A, Costea I, Lambrette P, Grimard G, Dong J, Feguerly H, Bucionis V, Deslandres C, Levy E, Seidman EG. Autophagy gene ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn's disease in Canadian children. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 501-507 [PMID: 18985712 DOI: 10.1002/ibd.20785]
- 10 Rogler G, Bernstein CN, Sood A, Goh KL, Yamamoto-Furusho JK, Abbas Z, Fried M. Role of biological therapy for inflammatory bowel disease in developing countries. *Gut* 2012; 61: 706-712 [PMID: 21997549 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300613]
- 11 Prideaux L, Kamm MA, De Cruz PP, Chan FK,

- Ng SC. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1266-1280 [PMID: 22497584 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07150.x]
- 12 APDW2004 Chinese IBD Working Group. Retrospective analysis of 515 cases of Crohn's disease hospitalization in China: nationwide study from 1990 to 2003. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1009-1015 [PMID: 16724987]
 - 13 Wang YF, Zhang H, Ouyang Q. Clinical manifestations of inflammatory bowel disease: East and West differences. *J Dig Dis* 2007; 8: 121-127 [PMID: 17650222]
 - 14 沈志坤. 中国大陆地区克罗恩病临床误诊的汇总分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2460-2463
 - 15 何瑶, 陈瑜君, 杨红, 胡仁伟, 欧阳春辉, 黄梅芳, 廖旺娣, 钱家鸣, 欧阳钦, 吴小平, 夏冰, 吕衣华, 胡品津. 回结肠克罗恩病与肠结核临床及内镜特征比较. *中华消化内镜杂志* 2012; 29: 325-328
 - 16 胡品津. 我们能解决克罗恩病与肠结核鉴别诊断的难题吗? *中华消化杂志* 2011; 31: 192-194
 - 17 Lalvani A. Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control. *Thorax* 2003; 58: 916-918 [PMID: 14586040]
 - 18 Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 761-776 [PMID: 15567126]
 - 19 Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest* 2010; 137: 952-968 [PMID: 20022968 DOI: 10.1378/chest.09-2350]
 - 20 Riazi S, Zeligs B, Yeager H, Peters SM, Benavides GA, Di Mita O, Bellanti JA. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children using interferon-gamma release assays (IGRAs). *Allergy Asthma Proc* 2012; 33: 217-226 [PMID: 22584190 DOI: 10.2500/aap.2012.33.3574]
 - 21 Fathy MM, Asaad A, Mansour M, El-Said H, El-Haddad OK. Cellular interferon-gamma based assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Egypt J Immunol* 2007; 14: 33-41 [PMID: 18689279]
 - 22 Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with Mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1164-1170 [PMID: 18276940 DOI: 10.1164/rccm.200711-1613OC]
 - 23 Chawla H, Lobato MN, Sosa LE, ZuWallack R. Predictors for a positive QuantiFERON-TB-Gold test in BCG-vaccinated adults with a positive tuberculin skin test. *J Infect Public Health* 2012; 5: 369-373 [PMID: 23287606 DOI: 10.1016/j.jiph.2012.06.003]
 - 24 Masood Ahmad, Gene R. Pesola. False-positive QuantiFERON gold tests. *Chest* 2010; 138: 84A
 - 25 Klein M, Jarosová K, Forejtová S, Bečvář R, Sedová L, Pavelka K, Simková G, Svobodová R, Hviscová K, Mann H, Půtová I, Vencovský J. Quantiferon TB Gold and tuberculin skin tests for the detection of latent tuberculosis infection in patients treated with tumour necrosis factor alpha blocking agents. *Clin Exp Rheumatol* 2013; 31: 111-117 [PMID: 23101473]
 - 26 Khalil KF, Ambreen A, Butt T. Comparison of sensitivity of QuantiFERON-TB gold test and tuberculin skin test in active pulmonary tuberculosis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2013; 23: 633-636 [PMID: 24034187 DOI: 09.2013/JCPSP.633636]
 - 27 Fan L, Chen Z, Hao XH, Hu ZY, Xiao HP. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 65: 456-466 [PMID: 22487051 DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00972.x]
 - 28 Kim YS, Kim YH, Kim WH, Kim JS, Park YS, Yang SK, Ye BD, Jang BI, Jung SA, Jeon YT, Cheon JH, Choi YS, Choi JH, Kim BJ, Choi CH, Han DS. Diagnostic utility of anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) and Interferon-γ assay in the differential diagnosis of Crohn's disease and intestinal tuberculosis. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1527-1532 [PMID: 21575618 DOI: 10.1016/j.cca.2011.04.029]
 - 29 Kim BJ, Choi YS, Jang BI, Park YS, Kim WH, Kim YS, Jung SA, Han DS, Kim JS, Choi JH, Choi CH, Jeon YT, Cheon JH, Ye BD, Yang SK, Kim YH. Prospective evaluation of the clinical utility of interferon-γ assay in the differential diagnosis of intestinal tuberculosis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1308-1313 [PMID: 21053248 DOI: 10.1002/ibd.21490]
 - 30 Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 824-828 [PMID: 11282752]
 - 31 Ozekinci T, Ozbek E, Celik Y. Comparison of tuberculin skin test and a specific T-cell-based test, T-Spot.TB, for the diagnosis of latent tuberculosis infection. *J Int Med Res* 2007; 35: 696-703 [PMID: 17944056]
 - 32 Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *Chest* 2007; 131: 1898-1906 [PMID: 17565023]
 - 33 Feng Y, Diao N, Shao L, Wu J, Zhang S, Jin J, Wang F, Weng X, Zhang Y, Zhang W. Interferon-gamma release assay performance in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *PLoS One* 2012; 7: e32652 [PMID: 22427859 DOI: 10.1371/journal.pone.0032652]
 - 34 Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 529-536 [PMID: 16133410]
 - 35 Liao CH, Chou CH, Lai CC, Huang YT, Tan CK, Hsu HL, Hsueh PR. Diagnostic performance of an enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in extrapulmonary tuberculosis varies between different sites of disease. *J Infect* 2009; 59: 402-408 [PMID: 19819258 DOI: 10.1016/j.jinf.2009.10.001]
 - 36 Baek DH, Song GA, Ryu DY, Kim DU. The usefulness of in vitro interferon-γ assay for differential diagnosis between intestinal tuberculosis and Crohn's disease. *J Crohn's Colitis* 2013; 7: S63
 - 37 Li Y, Zhang LF, Liu XQ, Wang L, Wang X, Wang J, Qian JM. The role of in vitro interferon-γ-release assay in differentiating intestinal tuberculosis from Crohn's disease in China. *J Crohns Colitis* 2012; 6: 317-323 [PMID: 22405168 DOI: 10.1016/j.crohns.2011.09.002]
 - 38 Lee JN, Ryu DY, Park SH, You HS, Lee BE, Kim DU,

同行评价

本文就IGRA与TB-PCR在鉴别ITB和CD中的价值进行综述, 思路清楚, 资料较完整, 对临床有一定参考价值。

- Kim TO, Heo J, Kim GH, Song GA, Kim S, Park do Y. [The usefulness of in vitro interferon-gamma assay for differential diagnosis between intestinal tuberculosis and Crohn's disease]. *Korean J Gastroenterol* 2010; 55: 376-383 [PMID: 20571305 DOI: 201006255]
- 39 Lei Y, Yi FM, Zhao J, Luckheeram RV, Huang S, Chen M, Huang MF, Li J, Zhou R, Yang GF, Xia B. Utility of in vitro interferon- γ release assay in differential diagnosis between intestinal tuberculosis and Crohn's disease. *J Dig Dis* 2013; 14: 68-75 [PMID: 23176201 DOI: 10.1111/1751-2980.12017]
- 40 雷少妮, 刘家云, 梁洁. 结核杆菌T细胞斑点试验在克罗恩病与肠结核鉴别诊断中的应用价值. *中华消化杂志* 2011; 31: 677-680
- 41 Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1990; 161: 977-981 [PMID: 2109022]
- 42 Ramadass B, Chittaranjan S, Subramanian V, Ramakrishna BS. Fecal polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 to distinguish Crohn's disease from intestinal tuberculosis. *Indian J Gastroenterol* 2010; 29: 152-156 [PMID: 20577845 DOI: 10.1007/s12664-010-0022-3]
- 43 Balamurugan R, Subramanian V, Ramakrishna B S. Fecal polymerase chain reaction in diagnosis of intestinal tuberculosis. *Gut* 2005; 54: A18
- 44 Sucharita P, Chittaranjan, Ramadass Balamurugan, Balakrishnan S, Ramakrishna. Role of fecal polymerase chain reaction in the differentiation of intestinal tuberculosis from Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008; 134: A-644
- 45 Balamurugan R, Venkataraman S, John KR, Ramakrishna BS. PCR amplification of the IS6110 insertion element of *Mycobacterium tuberculosis* in fecal samples from patients with intestinal tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1884-1886 [PMID: 16672431]
- 46 Anand BS, Schneider FE, El-Zaatari FA, Shawar RM, Clarridge JE, Graham DY. Diagnosis of intestinal tuberculosis by polymerase chain reaction on endoscopic biopsy specimens. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 2248-2249 [PMID: 7977255]
- 47 甘华田, 欧阳钦, 步宏, 陈德珍, 李甘地, 李蜀华, 杨秀英. 聚合酶链反应对肠结核和克隆病的诊断价值. *中华内科杂志* 1995; 34: 30-33
- 48 Jin XJ, Kim JM, Kim HK, Kim L, Choi SJ, Park IS, Han JY, Chu YC, Song JY, Kwon KS, Kim EJ. Histopathology and TB-PCR kit analysis in differentiating the diagnosis of intestinal tuberculosis and Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2496-2503 [PMID: 20503449]
- 49 Amarapurkar DN, Patel ND, Rane PS. Diagnosis of Crohn's disease in India where tuberculosis is widely prevalent. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 741-746 [PMID: 18205265]
- 50 陈瑜君, 何瑶, 陈白莉, 毛仁, 晁康, 徐萍萍, 曾志荣, 陈旻湖, 胡品津. PCR法检测结核分枝杆菌DNA在鉴别克罗恩病与肠结核中的价值. *中国病理生理杂志* 2013; 29: 188-192
- 51 甘华田, 欧阳钦, 步宏, 杨秀英. 结核杆菌DNA检测在肠结核与克罗恩病鉴别诊断中的价值. *中华消化杂志* 2001; 4: 215-218
- 52 Amarapurkar DN, Patel ND, Amarapurkar AD, Agal S, Baigal R, Gupte P. Tissue polymerase chain reaction in diagnosis of intestinal tuberculosis and Crohn's disease. *J Assoc Physicians India* 2004; 52: 863-867 [PMID: 15906835]

编辑 田滢 电编 闫晋利



潜在可切除结直肠癌肝转移转化治疗的研究进展

吴斌, 杨金坤, 朱莹杰

吴斌, 杨金坤, 朱莹杰, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科 上海市 200032

吴斌, 在读硕士, 主要从事中西医结合治疗消化系统恶性肿瘤的研究。

作者贡献分布: 本文综述由吴斌完成; 朱莹杰与杨金坤审核。

通讯作者: 杨金坤, 主任医师, 200032, 上海市徐汇区宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科。

jinkunyang@126.com

电话: 021-64385700

收稿日期: 2013-11-07 修回日期: 2013-12-01

接受日期: 2013-12-12 在线出版日期: 2014-02-08

Conversion therapy for colorectal cancer patients with potentially resectable liver metastases

Bin Wu, Jin-Kun Yang, Ying-Jie Zhu

Bin Wu, Jin-Kun Yang, Ying-Jie Zhu, Department of Oncology (Division I), the Affiliated Longhua Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Jin-Kun Yang, Chief Physician, Department of Oncology (Division I), the Affiliated Longhua Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 725 Wanping South Road, Xuhui District, Shanghai 200032, China. jinkunyang@126.com

Received: 2013-11-07 Revised: 2013-12-01

Accepted: 2013-12-12 Published online: 2014-02-08

Abstract

Conversion therapy brings hope of a cure for colorectal cancer patients with potentially resectable liver metastases. Recent studies demonstrated that conversion therapy could achieve shrinkage of liver metastases and thus render some for resection and offer the chance of long-term survival. Besides preoperative systemic chemotherapy, oncosurgical modalities are also available, primarily including liver resection following portal vein ligation/embolization and two-stage liver resection. In this article, we will review recent advances in conversion therapy for these patients.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Conversion therapy; Colorectal liver metastases; Potentially resectable

Wu B, Yang JK, Zhu YJ. Conversion therapy for colorectal cancer patients with potentially resectable liver metastases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(4): 533-540 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/533.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.533>

摘要

转化治疗给潜在可切除的结直肠癌肝转移(colorectal liver metastases, CRLM)患者带来了治愈的希望。近年,一些研究表明转化治疗可以使肝转移灶出现缩小,使部分初始不可切除的CRLM患者的转化为可切除,从而使这部分患者获得长期生存。在治疗的选择上,除了全身化疗外,门静脉栓塞/结扎、分期肝叶切除等一些外科手段也运用其中这使得更多初始不可切除的CRLM患者获得手术切除的机会。本文将对转化治疗近期的发展近况作一介绍,以供临床在诊治时可以作为参考。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 转化治疗; 结直肠癌肝转移; 潜在可切除

核心提示: 潜在可切除的结直肠癌肝转移患者是介于初始可切除与不可切除之间的患者,以全身化疗及肝脏为导向的局部治疗是这部分患者获得手术切除及长期生存的关键。

吴斌, 杨金坤, 朱莹杰. 潜在可切除结直肠癌肝转移转化治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 533-540 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/533.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.533>

0 引言

肝脏是结直肠癌血行转移最主要的靶器官^[1]. 肝转移灶无法切除患者的中位生存期仅6.9 mo, 5年生存率接近0%^[2]; 而肝转移灶能根治性切除患者的中位生存期为35 mo, 5年生存率可达30%-50%^[3]. 然而首次确诊时已经约有15%-25%的结直肠癌患者伴有肝转移, 其中只有10%-15%的患者适合手术切除, 绝大部分患者因肝外转移病变累及多支大血管和预留肝功能不足等因素而不能手术切除. 2012年《ESMO

■背景资料

大肠癌的发病率呈逐年上升的趋势, 而肝脏又是结直肠癌血行转移的主要靶器官. 手术切除肝转移灶是这部分患者获得长期生存的关键所在. 而转化治疗是初始不可切除的结直肠癌肝转移患者获得长期生存的希望。

■同行评议者

朴龙镇, 副教授, 延边大学附属医院肿瘤科

■研发前沿

新型分子标志物的发现带动了新型靶向药物的问世,使得对肿瘤的治疗更有针对性,朝着以个体为导向的方向发展.

结直肠癌诊疗共识指南》围绕转移灶是否能够切除和通过转化治疗进行转化把直肠癌肝(肺)转移患者分成了4组,其中第1组是指肝和(或)肺转移灶初始难以达到R0切除,但经过化疗或联合靶向等治疗可能R0切除,即潜在可切除或初始不可切除的患者.据报道,潜在可切除的结直肠癌肝转移(colorectal liver metastases, CRLM)患者降期后的可切除率为13%-54%^[4,5].转化治疗如何提高这组患者的手术切除率成为了一个热门话题.

转化治疗是指潜在可切除的CRLM患者,通过某些治疗措施能使初始不可切除的病灶转化为可切除的方式. Bismuth等于1996年首次报道了对330例初始不可切除的CRLM患者进行术前化疗,患者接受FOLFOX方案的术前化疗后53例(16%)患者转化为可切除,5年生存率达到了40%,这项研究成为了当代转化治疗的基石.通常所说的转化治疗是以转化化疗为代表,以缩小转移灶并将其转化为可切除的病灶的治疗方式;对CRLM患者而言广义上的转化治疗实际上是多学科参与的以缩小肿瘤病灶和增加残肝体积为目的的一系列治疗,包括化疗(联合靶向药物)、肝动脉灌注化疗(hepatic arterial infusion, HAI)、门静脉栓塞/结扎(porta vein embolization/ligation, PVE/L)、分期肝叶切除(two-stage hepatectomy, TSH).通过上述方式的治疗可以使部分初始不可切除的CRLM患者出现肿瘤的退缩、残肝容积的增加从而使这部分患者获得手术切除的机会.

1 缩小(毁损)肿瘤的治疗

1.1 转化化疗 潜在可切除的CRLM患者推荐术前可采用短期多药联合、足量密集型的化疗方案,也可联合分子靶向药物.关于化疗时间,推荐手术前至少进行2-3周期.高强度的化疗能够提高初始不可切除的肝转移瘤转化的R0切除率,为患者创造了手术机会.强烈的化疗方案表现在药物种类的叠加上及药物剂量的增加.

1.1.1 两药方案: 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)/亚叶酸钙(leucovorin calcium, LV)联合奥沙利铂(oxaliplatin, OXA)的化疗方案可使不可切除的CRLM患者获得7%-51%左右的肝切除率;而联合伊立替康(irinotecan, CPT-11)的化疗方案可获得9%-35%左右的肝切除率^[6]. Alberts等^[7]对44例仅有肝转移CRLM患者给予FOLFOX4方案(5-FU、LV、O)的转化治疗,反

应率(response rate, RR)为60%, R0切除为40%. Pozzo等^[8]使用FOLFIRI方案[5-FU(F)、亚叶酸钙(LV)、伊立替康(I)]对40例不可切除的患进行转化化疗,客观反应率(objective response rate, ORR)为47.5%,最终30%的患者转化为可切除.这项研究2007年的随访结果显示^[9],两组患者的中位肿瘤进展时间分别为(14.3 mo vs 5.2 mo),手术组的中位术后无病生存期为52.5 mo.近年有关于增加伊立替康剂量以提高CRLM患者R0切除率的报道,尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1, UGT1A1)基因状态被认为是指导伊立替康使用的分子标志物.西班牙^[10]的爬坡实验证明UGT1A1野生型的患者适合高剂量或标准剂量的伊立替康(450 mg/m²),杂合型患者适合的剂量为390 mg/m²,纯合子型的患者则推荐低剂量的伊立替康(150 mg/m²).卡培他滨、S-1作为5-FU类口服药物,也已被多项研究证明可以安全替代5-FU/LV静滴与奥沙利铂、伊立替康联用,不缩短PFS和OS^[11-13].

1.1.2 三药方案: 两药联合方案取得显著疗效的同时使得研究者们开始关注三种细胞毒药物联合方案在CRLM患者中的使用. Falcone等^[14]分析了既往7个随机三期临床研究结果,发现那些在整个治疗过程中接受3种高效药物治疗的患者获得了更大的生存获益.受此启发纳入了244例初始不可切除的CRLM患者,随机分为FOLF-
OXIRI组[5-氟尿嘧啶(F)、亚叶酸钙(LV)、伊立替康(I)、奥沙利铂(O)]与FOLFIRI组,结果显示三药联合方案可显著地提高仅肝转移患者的手术R0切除率(36% vs 12%),无病生存率(9.8 mo vs 5.9 mo),总生存率(22.6 mo vs 16.7 mo).该研究随访结果显示R0切除的患者中29%的患者5年内未出现复发,5年及8年的生存率分别达到了42%及33%^[15].另一项随机对照的METHEP研究^[16]比较了标准的二药化疗方案(FOLFIRI, high dose-FOLFIRI, FOLFOX-4, FOLFOX-7)和三药化疗方案(FOLFIRINOX)对不可切除CRLM患者的影响,初步分析显示FOLFIRINOX方案和high dose-FOLFIRI方案组分别获得了52%和50%的客观缓解率,而R0切除率分别达到了36%和37%,同时两个高效化疗方案的安全性也是被肯定的.

1.2 化疗联合靶向的治疗 靶向药物(targeted medicine)通过与癌症发生、肿瘤生长所必需的特定分子靶点的作用来阻止癌细胞的生长.

近年分子靶向药物人血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)联合奥沙利铂/依立替康为主的化疗方案被运用于CRLM患者的术前治疗中被证明可以进一步提高转化率,使得更多初始不可切除的CRLM患者行手术切除的机会。

(1)VEGF单抗: 贝伐珠单抗(bevacizumab)是针对VEGF的人源化单克隆抗体。2003年美国Duke大学Herbert Hurwitz等报告了贝伐珠单抗治疗晚期大肠癌疗效显著,引起高度关注。关于贝伐单抗在治疗mCRC中的价值时各项研究有不同的意见。在与铂类药物联合运用方面, In NO16966^[17]研究结果显示, 贝伐珠单抗与CapeOX[卡培他滨、OXA]/FOLFOX方案的联合一线治疗显著提高了患者的PFS(9.4 mo vs 8.0 mo, $P = 0.0023$), 但是在OS和RR上贝伐珠单抗与CapeOX/FOLFOX组与安慰剂组相比并无获益。在与伊立替康联合方面AVF2107g^[18]和ARTIST研究^[19](静脉注射氟尿嘧啶联合伊立替康的IFL/mIFL方案)均证明了化疗联合贝伐单抗可使ORR提高10%并显著延长了患者的PFS与OS。BICC研究^[20]是在优化伊立替康用法的同时, 比较FOLFIRI/BVZ方案与mIFL/BVZ方案用于一线治疗晚期肠癌患者, 结果示在中位OS上FOLFIRI/BVZ方案(28 mo vs 19.2 mo, $P = 0.037$)有获益, 而PFS、ORR上两组无显著差别。贝伐珠单抗与FOLFOXIRI方案联合, 入组患者的疾病控制率达到了100%及76%的客观缓解率, 并使17%的患者获得了二次手术的机会, 并且不良反应是可控制的。

(2)EGFR单抗: 西妥昔单抗(cetuximab)是一种重组的人鼠嵌合性EGFR的单克隆抗体而大肠癌以及许多实体瘤中EGFR过度表达, 近年多篇报告显示其疗效与KRAS基因状态密切相关。西妥昔单抗与伊立替康的联合的方案主要有CRYSTAL(一线联合FOLFIRI), 与奥沙利铂的联合的方案主要有OPUS研究。CRYSTAL^[21]III期随机对照临床研究显示, 西妥昔单抗联合FOLFIRI组及FOLFIRI组的无进展生存期的危险比为0.85($P = 0.048$), ORR之比为1.4($P = 0.004$)。对肿瘤组织标本KRAS突变状态与临床疗效的相关性显示, 野生型患者接受西妥昔单抗联合FOLFIRI治疗疗效明显优于单独FOLFIRI组。OPUS研究^[22]是在FOLFOX4化疗的基础上联合西妥昔单抗一线治疗CRLM患者的与单

纯FOLFOX4化疗组相比较, 结果显示对KRAS野生型mCRC患者, 与单独FOLFOX4化疗方案相比, 西妥昔单抗联合FOLFOX4化疗显著提高总缓解率(57.3% vs 34%, $P = 0.0027$), 肿瘤最佳缩小比例平均高11.6%, 显著延长PFS(8.3 mo vs 7.2 mo, $P = 0.0064$)。CELIM研究^[23]报道了FOLF-FOX6联合西妥昔单抗与FOLFIRI联合西妥昔单抗一线治疗转移性CRLM患者, FOLFOX6联合西妥昔单抗组的RR为68%, R0切除率为20%; FOLFIRI联合西妥昔单抗组的RR为57%, R0切除率为30%, 在所有入组的患者中70%的KRAS基因野生型患者肿瘤出现了退缩, 34%的KRAS基因野生型患者获得了R0切除。然而, 在西妥昔单抗联合伊立替康或奥沙利铂为基础的传统两药化疗方案带来可喜结果的同时, 近期两项III期随机对照研究质疑了西妥昔单抗联合奥沙利铂为基础方案的有效性。COIN研究^[24,25]比较了奥沙利铂为基础的化疗(CapeOX/FOLFOX)联合或不联合西妥昔单抗治疗, 结果显示在KRAS基因野生型患者中(CapeOX/FOLFOX)联合西妥昔单抗与单纯化疗组OS、PFS上均无获益, KRAS基因野生型患者仅在RR上略有获益(59% vs 50%, $P = 0.02$)。2010年美国临床肿瘤学会(American Society of Clinical Oncology, ASCO)会议上对COIN研究的重新分组显示FOLFOX联合西妥昔单抗组在PFS上有获益($P = 0.07$), 而CapeOX联合西妥昔单抗组无获益。而NORDIC VII研究^[26]将FLOX方案[5-FU(F)静脉推注, 亚叶酸钙(LV), 奥沙利铂(O)]作为化疗骨架。患者随机分为3组: A组为FLOX治疗至进展, B组为FLOX+西妥昔单抗治疗至进展, C组为间断性FLOX(16 wk停药、疾病进展后恢复)+持续性西妥昔单抗治疗至进展。主要终点指标是PFS。结果示3组在PFS、RR、OS上均无显著差异。303例KRAS野生型患者中, B组在PFS、OS、RR上与A组亦无显著差异。

KRAS基因状态被证明与西妥昔单抗疗效相关的同时, 对于西妥昔单抗联合奥沙利铂为基础的方案(OPUS、COIN、NORDIC VII)的研究进一步提示在与传统化疗联合的基础上如何合理有效地使用靶向药物给出一些证据。故西妥昔单抗应该避免在奥沙利铂+卡培他滨或推注5-FU的基础上联合西妥昔单抗, 建议与FOLFIRI或FOLFOX方案联合使用美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南不推荐西妥昔单抗与FOLFOX方案

■相关报道

尽管多药联合、足量密集型的化疗方案, 或与靶向药物联合的治疗模式已被指南所推荐, 但其不良反应是制约其运用的主要因素。

■创新盘点

结直肠癌肝转移治疗手段多样化,概念及指南更新频繁。在已发表的文献中存在选题范围过大导致对问题的阐述不充分。本文选题范围小,将这部分的科研成果逐一进行阐述,相对而言对临床的指导价值更高。

联合使用。另外**BRAF**基因状态被证实只是一个预后不良的标志而不是西妥昔单抗疗效的基因标志物^[27]。

(3)帕尼单抗(panitumumab):帕尼单抗是一种完全人源化的单克隆抗体,与EGFR具有高度亲和性,可以同时阻断EGF和TGF-2 α 与EGFR结合,且半衰期更长。PRIME研究^[28]结果显示在**KRAS**基因野生型患者中(93%),帕尼单抗-FOLFOX4组较FOLFOX4组在PFS(9.6 mo vs 8.0 mo, $P = 0.02$)有优势,而OS并无获益;**KRAS**基因野生型组较**KRAS**基因突变组PFS明显获益,在RR上两组分别为55%、48%。另一项随机III期临床研究^[29]比较了帕尼单抗联合FOLFIRI组与FOLFIRI组二线治疗mCRC患者,联合帕尼单抗后RR具有明显优势(35% vs 10%)。GONO^[30]报道了FOLFOXIRI方案联合帕尼单抗一线治疗(**KRAS**、**NRAS**、**HRAS**、**BRAF**)均野生型的mCRC患者的II期临床研究。研究入组了37例mCRC患者,33例(89%)达到了客观缓解,16例行二期手术的患者中有13例(35%)获得了R0切除。在随后的17.7 mo的随访中,mPFS为11.3 mo。

(4)靶向药物的联合应用:靶向药物联合应用在转移性大肠癌治疗中的作用已有文献报道,但结果令人失望。CAIRO2研究^[31]对CapeOX联合贝伐单抗基础上能否进一步联合C225进行了探讨,PACCE研究^[32]对L-OHP/CPT-11一线化疗联合贝伐单抗基础上能否进一步联合帕尼单抗进行了探讨,发现靶向药物两两联合未能对疗效和远期生存产生影响,甚至反而增加毒性。

1.3 肝动脉灌注化疗 由于肝转移癌血供90%-100%来自肝动脉,经肝动脉灌注化疗肝动脉灌注化疗(hepatic arterial infusion, HAI)药物,由于药物首先经过肝脏,可以在病灶局部形成较高的药物浓度,有利于提高化疗效果这成为HAI的理论基础。去氧氟尿苷(doxifluridine, FUDR)在肝脏的首过提取率可达94%,是较好的局部化疗药物。对于初始不可切除的CRLM患者,运用HAI可获得较高的客观反应率(55%-70%)和R0切除率(16%-18%)^[33,34]。一项Meta研究^[35]分析了近期10项随机对照研究,比较以氟尿嘧啶为基础的HAI组与全身化疗组对初始不可切除的CRLM患者的影响,结果HAI组较化疗组在肿瘤客观反映率上有明显优势(42.9% vs 18.4%, $P < 0.0001$),但在OS上并无获益。提示HAI对肿瘤的退缩或许是一种较佳的治疗方式。目前并无高级别的研究表明HAI可以代替全身化疗

作为一种主要的转化治疗方式,虽然HAI被证明有效,但是HAI并不比全身化疗具有显著优势,只是建议与全身化疗联合使用可能有助于延长患者的OS。

1.4 转化化疗的问题 术前短期多药联合、足量密集型的强烈的化疗方案虽然带来了R0切除率的提高,明显增加了CRLM患者的生存获益,但随之而来的肝损伤也开始被高度关注。奥沙利铂为主的化疗可导致肝窦间隙扩张;伊立替康为主的化疗可导致脂肪性肝炎。这些肝损害这种损伤可能导致手术风险增加,甚至导致转移灶无法切除增加术后并发症的发生率^[36,37]。贝伐珠单抗可增加器官穿孔、出血的风险,并且抑制伤口愈合;同时由于血管内皮生长因子在肝脏再生中发挥重要作用,因此术前接受血管内皮生长因子拮抗剂可能致术后肝脏再生能力下降,增加术后肝衰竭的风险^[38,39],因此建议停用贝伐珠单抗后6 wk(2个贝伐单抗半衰期)进行手术治疗。为减轻化疗性肝损伤的发生术前化疗时间不宜超过3-4 mo。对经过转化治疗有望达到R0切除的患者,由于放射学方法证实的化疗后完全缓解(complete clinical response, CCR)约有83%的灶经病理学检查或随访发现仍有活的癌细胞,建议在影像学病灶消失前进行切除,避免CCR的发生^[40]。

2 增大正常肝体积的治疗

增大肝脏体积的治疗主要是为了解决因手术切除肝脏转移灶后面临的残肝体积不足而无法手术的难点。这部分患者需要或并不需要术前化疗使转移灶出现退缩,重要的是手术后要有足够肝脏组织能满足基本生理功能的需求。肝脏细胞属于暂不增值细胞当遭遇手术等打击后可再次进入细胞周期这为增大残肝体积的方法提供了一定的理论基础,增大肝脏体积的治疗主要包括以下两种方法。

2.1 PVE/L 当进行右半肝三区肝切除或右半肝切除术后左半肝体积过小,此时虽然两个相邻的肝段存在充分的血液循环和胆汁引流,但剩余的肝实质不能代偿而发生肝衰竭。为了避免手术后因残肝体积过小需要一种方法使得肝脏体积增大而适合手术的切除。Kinoshita等^[41]与Makuuchi等^[42]发现肝癌或胆管癌的患者肿瘤侵犯门静脉右支后受阻塞部分的肝叶发生了萎缩而对侧肝脏即出现代偿性肥大。受此启发门静脉栓塞术被用于切除肝脏的体积过大或者预计

保留的正常肝脏体积不足总体积的30%的病例^[43,44]。PVE/L后, 通过3-9 wk的肝脏再生, 对侧肝脏增加的体积可以达到肝脏总体积的15%^[45]。PVE/PVL术后可切除率约在60%-88%, 导致无法手术主要原因是行PVE/PVL术后肿瘤的进展^[46]。术后患者的5年生存率达到了38%左右。一项Meta分析^[47]显示PVE主要并发症是肝血肿、肝脓肿、左门静脉血栓形成、门脉高压、胆管炎, 发生率为2.2%, 死亡率为0。

2.2 TSH 当肝脏的左右两个肝叶都存在转移病灶时, PVE/PVL术在此时也是不适用的, 这类患者即使经手术切除肝转移病灶后也会因残肝体积不足而发生肝衰竭。因此有学者引入了分期肝叶切除这个概念^[48], 这个方法主要用于需要行右半肝或右肝三区切除, 同时左半肝或左肝外叶有转移灶的病例。TSH是一种整体的治疗方式, 这个治疗被分为两部分实施。第1步, 先行原发肿瘤的根治性切除和残肝转移灶的局部切除, 一般位于左半肝或者左外叶, 并可同时行病侧PVE/L; 第2步, 行残留转移灶所分布的右半肝或右三肝切除。二次肝切除前残肝体积的大小是决定是否可行二次肝切除的关键如果残肝体积过小, 此时PVE/L可以使残肝体积代偿的增大使得手术顺利进行。另外为了避免肿瘤在两步之间的间隙发生进展, 有必要运用全身性的化疗或以肝脏局部化的治疗减小肝脏转移灶的体积。同时为了避免化疗药物可能对再生肝组织的再生所产生的影响, 化疗应该在第一次肝切除后的3 wk开始以保证肝组织的再生的安全^[49]。TSH分流了同时切除肿瘤组织和正常肝组织后的风险; 也评估了肿瘤对化疗的敏感性指导辅助化疗用药^[50]。近期一项回顾性研究^[51]分析了459例接受TSH治疗的CRLM患者, 其总88%的患者首次肝脏手术前接受了转化化疗, 第一阶段肝切除后17%的患者接受了辅助化疗, 76%的患者也进行了PVE术。最后有75%的患者获得了R0切除, 中位OS达到了37 mo。所以针对其中的肝脏左右两个肝叶都存在转移病灶的患者而言分期肝叶切除是一种安全有效的转化治疗方式。

3 结论

转化治疗的发展无疑给潜在可切除的CRLM患者带来了巨大的生存获益。虽然手术是CRLM患者最为理想的治疗方式但初始可获得手术治疗的患者的比例低, 这成为了影响CRLM患者整体生存率的主要因素。而转化治疗的发展, 从联合

化疗到化疗联合靶向进一步提高了手术的R0切除率; 以增大残肝体积的治疗方式解决了因肝容量不足而导致的手术禁忌, 以上两方面又相互影响着治疗的整个过程, 使得临床工作中可以根据具体患者的情况制定出最佳的治疗决策争取获得手术切除的可能性。同时转化治疗所带来的负面影响以及术后复发的也是不容忽视的。转化治疗如何更好地运用于潜在可切除的CRLM患者这需要更多循证医学的证据的支持。

4 参考文献

- Fong Y, Cohen AM, Fortner JG, Enker WE, Turnbull AD, Coit DG, Marrero AM, Prasad M, Blumgart LH, Brennan MF. Liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol* 1997; 15: 938-946 [PMID: 9060531]
- Sharma S, Camci C, Jabbour N. Management of hepatic metastasis from colorectal cancers: an update. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008; 15: 570-580 [PMID: 18987925 DOI: 10.1007/s00534-008-1350-x]
- Yang AD, Brouquet A, Vauthey JN. Extending limits of resection for metastatic colorectal cancer: risk benefit ratio. *J Surg Oncol* 2010; 102: 996-1001 [PMID: 21166004]
- Askaroglu B, Akboru MH, Dincer ST, Hancilar T, Yoney A, Isikli L and Unsal M. Analysis of patients diagnosed as rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy and radiotherapy alone. *J Clin Oncol* 2007; 25: a14582
- Köhne CH, van Cutsem E, Wils J, Bokemeyer C, El-Serafi M, Lutz MP, Lorenz M, Reichardt P, Rückle-Lanz H, Frickhofen N, Fuchs R, Mergenthaler HG, Langenbuch T, Vanhoefer U, Rougier P, Voigtman R, Müller L, Genicot B, Anak O, Nordlinger B. Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4856-4865 [PMID: 15939923 DOI: 10.1200/JCO.2005.05.546]
- Hind D, Tappenden P, Tumur I, Eggington S, Sutcliffe P, Ryan A. The use of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed for the treatment of advanced colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2008; 12: iii-ix, xi-162 [PMID: 18462574]
- Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, Goldberg RM, Mahoney MR, Dakhil SR, Levitt R, Rowland K, Nair S, Sargent DJ, Donohue JH. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin for patients with unresectable liver-only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group phase II study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9243-9249 [PMID: 16230673 DOI: 10.1200/JCO.2005.07.740]
- Pozzo C, Basso M, Cassano A, Quirino M, Schinzari G, Trigila N, Vellone M, Giuliani F, Nuzzo G, Barone C. Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2004; 15: 933-939 [PMID: 15151951 DOI: 10.1093/annonc/mdh217]

■应用要点

化疗联合靶向药物的治疗已被证实较联合化疗带来更高的R0切除率; 而对KRAS基因野生型的患者而言西妥昔单抗为主的方案较贝伐单抗为主的方案有更高的转化切除率。

■名词解释

2009年结肠癌和直肠癌美国国立综合癌症网络指南(中国版)中规定:初次诊断转移灶可手术切除的患者实行的术前化疗称新辅助化疗;而以缩小转移灶并将其转化为可切除的病灶称转化治疗。

- 9 Barone C, Nuzzo G, Cassano A, Basso M, Schinzari G, Giuliani F, D'Argento E, Trigila N, Astone A, Pozzo C. Final analysis of colorectal cancer patients treated with irinotecan and 5-fluorouracil plus folinic acid neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases. *Br J Cancer* 2007; 97: 1035-1039 [PMID: 17895897 DOI: 10.1038/sj.bjc.6603988]
- 10 Marcuello E, Pérez D, Paré L, Salazar J, Sebio A, del Rio E, Baiget M. A genotype-directed phase I-IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; 105: 53-57 [PMID: 21654688 DOI: 10.1038/bjc.2011.206]
- 11 Arkenau HT, Arnold D, Cassidy J, Diaz-Rubio E, Douillard JY, Hochster H, Martoni A, Grothey A, Hinke A, Schmiegler W, Schmoll HJ, Porschen R. Efficacy of oxaliplatin plus capecitabine or infusional fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5910-5917 [PMID: 19018087 DOI: 10.1200/JCO.2008.16.7759]
- 12 Muro K, Boku N, Shimada Y, Tsuji A, Sameshima S, Baba H, Satoh T, Denda T, Ina K, Nishina T, Yamaguchi K, Takiuchi H, Esaki T, Tokunaga S, Kuwano H, Komatsu Y, Watanabe M, Hyodo I, Morita S, Sugihara K. Irinotecan plus S-1 (IRIS) versus fluorouracil and folinic acid plus irinotecan (FOLFIRI) as second-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomised phase 2/3 non-inferiority study (FIRIS study). *Lancet Oncol* 2010; 11: 853-860 [PMID: 20708966 DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70181-9]
- 13 Kim SY, S Hong Y, K Shim E, Kong SY, Shin A, Baek JY, Jung KH. S-1 plus irinotecan and oxaliplatin for the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: a prospective phase II study and pharmacogenetic analysis. *Br J Cancer* 2013; 109: 1420-1427 [PMID: 23963147 DOI: 10.1038/bjc.2013.479]
- 14 Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crinò L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L, Cortesi E, Picone V, Vitello S, Chiara S, Granetto C, Porcile G, Fioretto L, Orlandini C, Andreuccetti M, Masi G. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1670-1676 [PMID: 17470860 DOI: 10.1200/JCO.2006.09.0928]
- 15 Masi G, Loupakis F, Pollina L, Vasile E, Cupini S, Ricci S, Brunetti IM, Ferraldeschi R, Naso G, Filipponi F, Pietrabissa A, Goletti O, Baldi G, Fornaro L, Andreuccetti M, Falcone A. Long-term outcome of initially unresectable metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil/leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) followed by radical surgery of metastases. *Ann Surg* 2009; 249: 420-425 [PMID: 19247029]
- 16 Rivoire M, Thezenas S, Rebischung C, Viret F, Guimbaud R, Francois E, Ducreux M, Quenet F, Desseigne F, Ychou M. Preliminary results of a randomized phase II trial comparing standard bi-therapy versus three intensified chemotherapy regimens as treatment for patients with unresectable liver metastases from colorectal cancer (METHEP). *J Clin Oncol* 2008; 26: a4075
- 17 Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirén F, Cassidy J. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2013-2019 [PMID: 18421054 DOI: 10.1200/JCO.2007.14.9930]
- 18 Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, Hambleton J, Novotny WF, Kabbinnar F. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3502-3508 [PMID: 15908660 DOI: 10.1200/JCO.2005.10.017]
- 19 Guan ZZ, Xu JM, Luo RC, Feng FY, Wang LW, Shen L, Yu SY, Ba Y, Liang J, Wang D, Qin SK, Wang JJ, He J, Qi C, Xu RH. Efficacy and safety of bevacizumab plus chemotherapy in Chinese patients with metastatic colorectal cancer: a randomized phase III ARTIST trial. *Chin J Cancer* 2011; 30: 682-689 [PMID: 21959045 DOI: 10.5732/cjc.011.10188]
- 20 Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, Wierzbicki R, Ganju V, Jeffery M, Schulz J, Richards D, Soufi-Mahjoubi R, Wang B, Barrueco J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4779-4786 [PMID: 17947725 DOI: 10.1200/JCO.2007.11.3357]
- 21 Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 1408-1417 [PMID: 19339720 DOI: 10.1056/NEJMoa0805019]
- 22 Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, Zampino M, Donea S, Ludwig H, Zube A, Koralewski P. Cetuximab plus 5-FU/FA/oxaliplatin (FOLFOX-4) versus FOLFOX-4 in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): OPUS, a randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4035
- 23 Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, Raab HR, Lordick F, Hartmann JT, Lang H, Frilling A, Stoecklmaier J, Weitz J, Konopke R, Stroszczyński C, Liersch T, Ockert D, Herrmann T, Goekkurt E, Parisi F, Köhne CH. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 38-47 [PMID: 19942479 DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70330-4]
- 24 Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, Idziaszczyk S, Harris R, Fisher D, Kenny SL, Kay E, Mitchell JK, Madi A, Jasani B, James MD, Bridgewater J, Kennedy MJ, Claes B, Lambrechts D, Kaplan R, Cheadle JP. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011; 377: 2103-2114 [PMID: 21641636]
- 25 Maughan T, Adams RA, Smith CG, Seymour MT,

- Wilson RH, Meade AM, Fisher D, Madi A, Cheadle J, Kaplan RS. Identification of potentially responsive subsets when cetuximab is added to oxaliplatin-fluoropyrimidine chemotherapy (CT) in first-line advanced colorectal cancer (aCRC): Mature results of the MRC COIN trial. *J Clin Oncol* 2010; 28: a3502
- 26 Okines A, Puerto OD, Cunningham D, Chau I, Van Cutsem E, Saltz L, Cassidy J. Surgery with curative-intent in patients treated with first-line chemotherapy plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer First BEAT and the randomised phase-III NO16966 trial. *Br J Cancer* 2009; 101: 1033-1038 [PMID: 19789532]
- 27 Bokemeyer C, Kohne C, Rougier P, Stroh C, Schlichting M, Van Cutsem E. Cetuximab with chemotherapy (CT) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of the CRYSTAL and OPUS studies according to KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* 2010; 28: a3506
- 28 Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocáková I, Ruff P, Blasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Wolf M, Gansert J. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4697-4705 [PMID: 20921465 DOI: 10.1200/JCO.2009.27.4860]
- 29 Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, André T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, Ciuleanu TE, Roman L, Van Cutsem E, Tzekova V, Collins S, Oliner KS, Rong A, Gansert J. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4706-4713 [PMID: 20921462 DOI: 10.1200/JCO.2009.27.6055]
- 30 Fornaro L, Lonardi S, Masi G, Loupakis F, Bergamo F, Salvatore L, Cremolini C, Schirripa M, Vivaldi C, Aprile G, Zaniboni A, Bracarda S, Fontanini G, Sensi E, Lupi C, Morvillo M, Zagonel V, Falcone A. FOLFOXIRI in combination with panitumumab as first-line treatment in quadruple wild-type (KRAS, NRAS, HRAS, BRAF) metastatic colorectal cancer patients: a phase II trial by the Gruppo Oncologico Nord Ovest (GONO). *Ann Oncol* 2013; 24: 2062-2067 [PMID: 23666916 DOI: 10.1093/annonc/mdt165]
- 31 Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, van Groenigen CJ, Sinnige HA, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Antonini NF, Mol L, van Krieken JH, Dalesio O, Punt CJ. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360: 563-572 [PMID: 19196673 DOI: 10.1056/NEJMoa0808268]
- 32 Hecht JR, Mitchell E, Chidiac T, Scroggin C, Hagenstad C, Spigel D, Marshall J, Cohn A, McCollum D, Stella P, Deeter R, Shahin S, Amado RG. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 672-680 [PMID: 19114685 DOI: 10.1200/JCO.2008.19.8135]
- 33 Ducreux M, Ychou M, Laplanche A, Gamelin E, Lasser P, Hussein F, Quenet F, Viret F, Jacob JH, Boige V, Elias D, Delperro JR, Lubinski M. Hepatic arterial oxaliplatin infusion plus intravenous chemotherapy in colorectal cancer with inoperable hepatic metastases: a trial of the gastrointestinal group of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4881-4887 [PMID: 16009952 DOI: 10.1200/JCO.2005.05.120]
- 34 Boige V, Malka D, Elias D, Castaing M, De Baere T, Goere D, Dromain C, Pocard M, Ducreux M. Hepatic arterial infusion of oxaliplatin and intravenous LV5FU2 in unresectable liver metastases from colorectal cancer after systemic chemotherapy failure. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 219-226 [PMID: 17896145 DOI: 10.1245/s10434-007-9581-7]
- 35 Mocellin S, Pasquali S, Nitti D. Fluoropyrimidine-HAI (hepatic arterial infusion) versus systemic chemotherapy (SCT) for unresectable liver metastases from colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; (3): CD007823 [PMID: 19588444]
- 36 Aloia T, Sebah M, Plasse M, Karam V, Lévi F, Giacchetti S, Azoulay D, Bismuth H, Castaing D, Adam R. Liver histology and surgical outcomes after preoperative chemotherapy with fluorouracil plus oxaliplatin in colorectal cancer liver metastases. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4983-4990 [PMID: 17075116 DOI: 10.1200/JCO.2006.05.8156]
- 37 Pawlik TM, Olin K, Gleisner AL, Torbenson M, Schulick R, Choti MA. Preoperative chemotherapy for colorectal liver metastases: impact on hepatic histology and postoperative outcome. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 860-868 [PMID: 17492335 DOI: 10.1007/s11605-007-0149-4]
- 38 Ellis LM, Curley SA, Grothey A. Surgical resection after downsizing of colorectal liver metastasis in the era of bevacizumab. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4853-4855 [PMID: 16051943 DOI: 10.1200/JCO.2005.23.754]
- 39 Drixler TA, Vogten MJ, Ritchie ED, van Vroonhoven TJ, Gebbink MF, Voest EE, Borel Rinkes IH. Liver regeneration is an angiogenesis-associated phenomenon. *Ann Surg* 2002; 236: 703-711; discussion 711-712 [PMID: 12454508 DOI: 10.1097/00000658-200212000-00002]
- 40 Benoist S, Brouquet A, Penna C, Julié C, El Hajjam M, Chagnon S, Mitry E, Rougier P, Nordlinger B. Complete response of colorectal liver metastases after chemotherapy: does it mean cure? *J Clin Oncol* 2006; 24: 3939-3945 [PMID: 16921046 DOI: 10.1200/JCO.2006.05.8727]
- 41 Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K, Igawa S, Yamasaki O, Kubo S. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 1986; 10: 803-808 [PMID: 3022488 DOI: 10.1007/BF01655244]
- 42 Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunvén P, Yamazaki S, Hasegawa H, Ozaki H. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 1990; 107: 521-527 [PMID: 2333592]
- 43 Elias D, Ouellet JF, De Baère T, Lasser P, Roche A. Preoperative selective portal vein embolization before hepatectomy for liver metastases: long-term results and impact on survival. *Surgery* 2002; 131: 294-299 [PMID: 11894034 DOI: 10.1067/msy.2002.120234]

同行评价

本文通过阐述转化治疗给潜在可切除的结直肠癌肝转移应用, 把近几年的研究成果逐一阐述。内容客观、新颖, 对临床工作有一定的参考价值。

- 44 Jaeck D, Bachellier P, Nakano H, Oussoultzoglou E, Weber JC, Wolf P, Greget M. One or two-stage hepatectomy combined with portal vein embolization for initially nonresectable colorectal liver metastases. *Am J Surg* 2003; 185: 221-229 [PMID: 12620560 DOI: 10.1016/S0002-9610(02)01373-9]
- 45 Kokudo N, Tada K, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M, Ohta K, Yamaguchi T, Matsubara T, Takahashi T, Nakajima T, Muto T, Ikari T, Yanagisawa A, Kato Y. Proliferative activity of intrahepatic colorectal metastases after preoperative hemihepatic portal vein embolization. *Hepatology* 2001; 34: 267-272 [PMID: 11481611 DOI: 10.1053/jhep.2001.26513]
- 46 Popescu I, Alexandrescu S, Croitoru A, Boros M. Strategies to convert to resectability the initially unresectable colorectal liver metastases. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 739-744 [PMID: 19621694]
- 47 Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J, Habib N, Jiao LR. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg* 2008; 247: 49-57 [PMID: 18156923 DOI: 10.1097/SLA.0b013e31815f6e5b]
- 48 Lygidakis NJ, Vlachos L, Raptis S, Rassidakis G, Balaskas C, Sgourakis G, Mourikis D, Kehagias D, Kittas C. New frontiers in liver surgery. Two-stage liver surgery for the management of advanced metastatic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2013; 46: 2216-2228 [PMID: 10521971]
- 49 Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two-stage hepatectomy: A planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Ann Surg* 2000; 232: 777-785 [PMID: 11088072 DOI: 10.1097/0000658-200012000-00006]
- 50 Lygidakis NJ, Bhagat AD, Vrachnos P, Grigorakis L. Challenges in everyday surgical practice: synchronous bilobar hepatic colorectal metastases--newer multimodality approach. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1020-1024 [PMID: 17629030]
- 51 Lam VW, Laurence JM, Johnston E, Hollands MJ, Pleass HC, Richardson AJ. A systematic review of two-stage hepatectomy in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)* 2013; 15: 483-491 [PMID: 23750490 DOI: 10.1111/j.1477-2574.2012.00607.x]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, 1cpm(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t_{1/2}或T, V_{max}不能写成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ln-(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。

肝内型门脉高压大鼠门静脉超微结构及生物力学特性的改变

文彬, 邓鑫, 陈然, 彭佩纯

文彬, 邓鑫, 陈然, 彭佩纯, 广西中医药大学附属瑞康医院 广西
广西壮族自治区南宁市 530000

文彬, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 81160433

广西科技厅重点课题基金资助项目, No.

2011GXNSFD018035

广西卫生厅重点课题基金资助项目, No. 广重20122031

中南大学博士后科学基金资助项目, No. 2013M531816

作者贡献分布: 文彬与邓鑫对此文所作贡献均等; 此课题由邓鑫
设计; 过程由文彬、陈然及彭佩纯操作完成; 研究所用新试剂及
分析工具由邓鑫提供; 数据分析由文彬完成; 本论文写作由文彬
与邓鑫完成.

通讯作者: 邓鑫, 主任医师, 530000, 广西壮族自治区南宁市华东
路10号, 广西中医药大学附属瑞康医院消化科. dx8848@126.com
电话: 0771-2238026

收稿日期: 2013-11-10 修回日期: 2013-12-05

接受日期: 2013-12-12 在线出版日期: 2014-02-08

Changes in ultrastructure and biomechanical properties of the portal vein in rats with intrahepatic portal hypertension

Bin Wen, Xin Deng, Ran Chen, Pei-Chun Peng

Bin Wen, Xin Deng, Ran Chen, Pei-Chun Peng, Ruikang
Hospital Affiliated to Guangxi Chinese Medicine University,
Nanning 530000, Guangxi Zhuang Autonomous Region,
China

Supported by: the National Natural Science Foundation of
China, No. 81160433; the Guangxi Natural Science Founda-
tion, No. 2011GXNSFD018035; the Guangxi Health Depart-
ment Key Project, No. 20122031; and the China Postdoctoral
Science Foundation Funded Project, No. 2013M531816

Correspondence to: Xin Deng, Chief Physician, Depart-
ment of Gastroenterology, Ruikang Hospital, Guangxi
Traditional Chinese Medical University, 10 Huadong Road,
Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region,
China. dx8848@126.com

Received: 2013-11-10 Revised: 2013-12-05

Accepted: 2013-12-12 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To observe the ultrastructure and biomechanical properties of the portal vein in rats with intrahepatic portal hypertension to provide an experimental basis for further exploring the pathogenesis of portal hypertension.

METHODS: Subcutaneous injection of carbon

tetrachloride was performed to induce intrahepatic portal hypertension in rats. Biomechanical methods were used to determine portal vein diameter, longitudinal tensile stress-strain curve and the size of the residual stress during portal hypertension formation. Portal vein ultrastructure was observed by electron microscopy.

RESULTS: Compared with normal rats, the portal vein diameter was significantly greater in rats with portal hypertension (1.53 ± 0.28 mm *vs* 1.14 ± 0.17 mm, $P < 0.01$); portal vein ultrastructure changed significantly; longitudinal tensile stress - strain curve was steeper; the time consumed for the whole process of tensile strain was shorter; the stress at 50% strain was significantly larger (1.04 ± 0.13 N *vs* 0.51 ± 0.08 N, $P < 0.01$); the opening angle of the portal vein and arc fluctuations increased significantly ($110.34^\circ \pm 8.09^\circ$ *vs* $79.93^\circ \pm 2.44^\circ$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Rats with intrahepatic portal hypertension have abnormal portal vein wall remodeling, decreased portal vein compliance, and changes in circumferential and axial biomechanical characteristics.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Portal hypertension; Ultrastructure; Stress-strain; Residual stress; Compliance

Wen B, Deng X, Chen R, Peng PC. Changes in ultrastructure and biomechanical properties of the portal vein in rats with intrahepatic portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 541-545 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/541.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.541>

摘要

目的: 观察肝内型门脉高压大鼠门静脉超微结构及生物力学特性, 为进一步探索门脉高压病理机制提供实验依据.

方法: 四氯化碳皮下注射诱导肝内型门静脉

■背景资料

门脉高压时门脉系统生物力学发生了显著改变, 据应力-生长法则, 应力环境的改变将导致应力-生长失衡, 门静脉管壁形态结构也随之发生改变, 因此研究门静脉管壁超微结构、力学特性与门脉高压症的相关性至关重要.

■同行评议者

杨家和, 教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院综合治疗三科

■研究前沿

生物力学是国内研究新热点,目前门脉系统的力学研究多集中于“血流动力学”研究,对门静脉管壁超微结构、力学分布与门脉高压相关性研究尚未深入。

■相关报道

张宗荣,汤松伟等在门脉高压兔的模型中,认为门脉系统的低剪切应力与高周向应力状态参与了门脉高压症并发症发生的力学基础(肝前型门静脉高压兔门脉系统血管应力的研究)。贺细菊,张兴华等对门静脉高压症猪离体状态的生物力学特性改变和几何性状的进行研究,发现门脉高压时门静脉弹性模量随压力变大而增大,顺应性随压力增大而下降(门静脉高压症猪门静脉的生物力学特性及其临床意义),为临床血管移植提供了一定力学数据。施斌,朱樑等观察了大鼠肝内型门脉高压症形成中门静脉零应力状态及轴向拉伸时应力-伸长比的动态变化,认为门脉高压时高压、高流量的特殊血液动力学状态可引起门静脉力学特性(轴向和周向)的力学改变,这些变化又可进一步加重门脉高压血液动力学异常及病理生理改变,造成恶性循环。

高压大鼠模型,生物力学技术测定门脉高压形成中门静脉在体直径、纵向拉伸应力-应变曲线及残余应力大小,透射电镜下观察门静脉超微结构。

结果:与正常组大鼠相比,门脉高压组大鼠门静脉体外直径显著增粗($1.53\text{ mm} \pm 0.28\text{ mm}$ vs $1.14\text{ mm} \pm 0.17\text{ mm}$, $P < 0.01$);门静脉超微结构发生显著改变;纵向拉伸应力-应变曲线较陡峭,整个拉伸应变过程耗时短,50%应变时应力是 $1.04\text{ N} \pm 0.13\text{ N}$,显著大于正常组($0.51\text{ N} \pm 0.08\text{ N}$, $P < 0.01$);门静脉张开角的弧度及组内波动幅度较正常组显著增大($110.34^\circ \pm 8.09^\circ$ vs $79.93^\circ \pm 2.44^\circ$, $P < 0.01$)。

结论:肝内型门脉高压大鼠门静脉管壁存在异常重构,其顺应性下降,门静脉呈周向和轴向高应力的生物力学特性改变。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词:门脉高压;超微结构;应力-应变;残余应力;顺应性

核心提示:肝内型门脉高压时,门静脉超微结构存在异常重构,如门静脉管壁内皮细胞基底膜不完整,细胞间隙连接疏松;平滑肌细胞减少,周围胶原纤维增多,胞质肌丝少而紊乱,部分线粒体嵴断裂、空泡化;外膜可见大量胶原纤维及疏松结缔组织增生,管壁顺应性下降,门静脉轴向及周向处于高应力状态。

文彬,邓鑫,陈然,彭佩纯.肝内型门脉高压大鼠门静脉超微结构及生物力学特性的改变.世界华人消化杂志 2014; 22(4): 541-545 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/541>. asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.541>

0 引言

目前,国内外对门脉系统的血流动力学已作了广泛研究^[1,2],发现门脉高压时最突出的病理生理特征为门脉系统的高阻力、高压、高流量及低外周阻力的全身高动力循环状态。由于原有力学平衡遭打破,门脉系统的生物力学发生了结构和功能改变已得到初步证实^[3,4]。但门静脉管壁重构、生物力学特性的改变与门脉高压相关性的研究尚未深入,本实验拟对大鼠门静脉超微结构、纵向拉伸应力-应变及无载荷状态下残余应力的探讨,对门静脉超微结构和顺应性进行测试评估,旨在进一步从生物力学角度阐述门脉高压的病理机制。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠,SPF级,6-7周龄,体质量 $160\text{ g} \pm 20\text{ g}$,购自广西医科大学动物实验中心,动物合格证:scxk桂2009-0002。四氯化碳(CCl_4),购自天津富宇精细化工试剂厂产品。TY8000系列(50-5000 N)伺服控制拉力试验机。Image-Pro Plus6.0图像分析软件(Media Cybernetics公司)。纯丙酮(EPON812),H-7650型透射电子显微镜(日本日立公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组和模型制备:大鼠在适应性饲养1 wk后,随机分为对照组(30只)和模型组(40只),采用复合因素法造模^[5],造模组大鼠首次按 $0.5\text{ mL}/100\text{ g}$ 腹部皮下注射(贝蒂斯橄榄油60%+40% CCl_4)混合液,以后每隔3日按 $0.3\text{ mL}/100\text{ g}$ 体质量皮下注射,每周2次,150 mL/L乙醇为唯一饮料,同时辅以20%猪油、0.5%胆固醇、79.5%玉米面混合饲料,共计12 wk;正常组则以普通饲料和纯净水喂养。

1.2.2 大鼠门静脉在体直径的测量:造模成功后(正常组 $n = 30$,模型组 $n = 35$),水合氯醛以 $0.3\text{ mL}/100\text{ g}$ 腹腔注射麻醉,剖开腹腔,逐层分离出门静脉,将分离出的门静脉以记号笔标记两端,平行置上刻度尺,数码相机拍照,所得数值输入计算机,Image-Pro Plus6.0图像分析软件测量门静脉段(胃冠状静脉分支点下游2 cm)在体的直径。门静脉纵向拉伸试验、残余应力、超微结构的测定均在测量门静脉体外直径后随机抽取进行实验。

1.2.3 大鼠门静脉纵向拉伸试验:逐层剥离出门静脉(正常组 $n = 12$,模型组 $n = 12$),沿其轴向主干两端剪下长度25 mm,将门静脉两端夹在伺服控制拉力试验机的夹具上,夹具间距为20 mm,以5%/min应变率增加(5 mm/min)进行拉伸测试,记录应变为50%及试样断裂时的应力,UTM107 WIN-XP测试软件描绘出应力-应变曲线。实验前需要对每个试样反复加载卸载进行预调处理。

1.2.4 大鼠门静脉残余应力的测定:所有操作均在 25°C 下进行,取新鲜门静脉主干(正常组 $n = 12$,模型组 $n = 12$),移入剩有生理盐水的培养皿中,沿其长轴连续横切,得到厚度约为1 mm的血管环,沿门静脉血管环径向剪开,静置20 min左右,数码相机拍照零应力状态血管环横切面图像(以门静脉环内壁中点为顶点,沿两个断端的内壁作一连线,所形成的夹角即为张开角),计算机图文系统测量门静脉张开角,以此代表门静

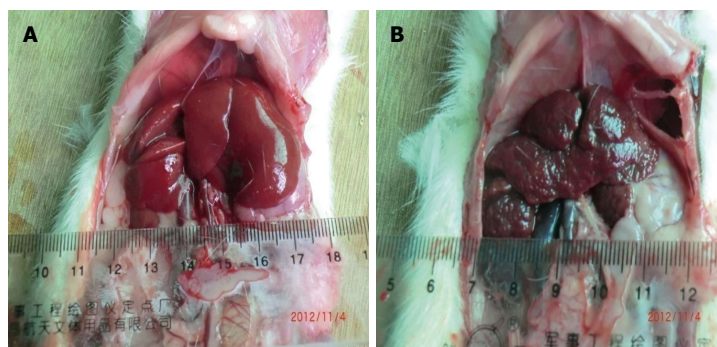


图1 大鼠门静脉体外直径(mm). A: 正常组; B: 门脉高压组.

■创新盘点

本文从门静脉微观结构及力学异常分布等方面探讨门脉高压病理机制, 与传统侧重研究门脉系统“血流动力学”相比具有一定创新性.

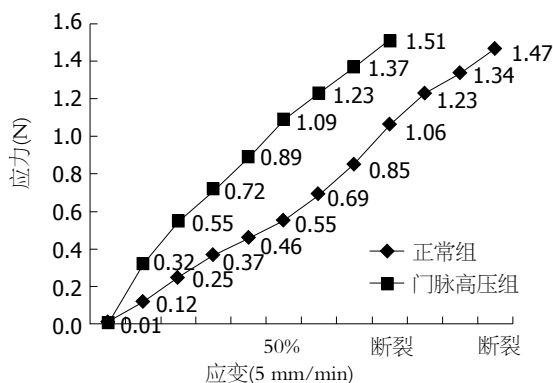


图2 门静脉应力-应变曲线.

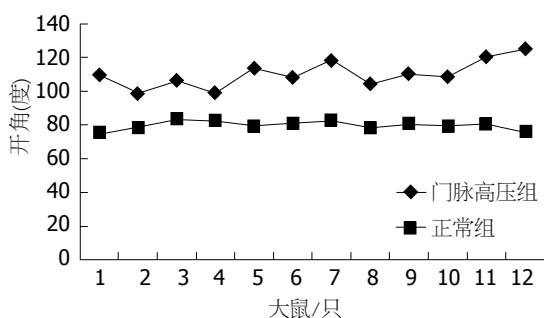


图3 门静脉残余应力曲线.

脉零应力状态的变化.

1.2.5 大鼠门静脉超微结构测定: 取相同部位新鲜门静脉主干(正常组 $n=6$, 模型组 $n=11$), 切成大小约 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$, 投入 4°C 预冷的4%戊二醛, 固定24 h, 再经1%四氧化锇固定2 h, 常规乙醇和丙酮脱水, 加丙酮-EPON812环氧树脂包埋, 修块及切片, 铀-铅染色, 透射电镜下观察门静脉管壁超微结构.

统计学处理 实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用SPSS11.5统计软件行 t 检验和方差分析, 比较组间差异有无统计学意义, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠门静脉体外直径变化 正常组大鼠实验

期间无死亡, 模型组大鼠死亡5只, 模型成功率达87.5%. 与正常组大鼠相比, 门脉高压组大鼠门静脉管腔充盈, 体外直径显著增粗($1.53\text{ mm} \pm 0.28\text{ mm}$ vs $1.14\text{ mm} \pm 0.17\text{ mm}$, $P < 0.01$, 图1).

2.2 大鼠门静脉纵向拉伸试验结果 正常组大鼠门静脉以每分钟5%应变率增加(5 mm/min)进行拉伸过程中, 应变达50%时应力为 $0.51\text{ N} \pm 0.08\text{ N}$, 此时应力-应变曲线较平坦, 门静脉拉伸应变从50%到试样断裂过程中, 应力-应变曲线较前陡峭, 应力达 1.47 N , 应变为96.46%时试样断裂. 门脉高压组大鼠门静脉以同样速率拉伸过程中, 应力-应变曲线始终陡峭, 门静脉拉伸应变达50%时应力为 $1.04\text{ N} \pm 0.13\text{ N}$, 当应力达到 1.51 N 、应变为95.67%时门静脉断裂, 试样拉伸应变耗时较正常组短, 在同等应变条件下, 门脉高压组的应力显著高于正常组($P < 0.01$)(图2).

2.3 大鼠门静脉张开角的变化 正常大鼠门静脉沿径向剪开后展开角呈小“c”形, 角度约 75.4° 至 83.2° 左右, 组内波动范围小; 门脉高压组试样切开后展开角呈大“C”形, 角度在 98.7° 至 124.9° 之间, 组内波动幅度较大. 对两组门静脉张开角均值行方差分析与 t 检验, 显示两组门静脉张开角大小之间有统计学差异($P < 0.01$); 正常大鼠门静脉组内差异小, 门脉高压组组内差异大($P < 0.01$), 以均值为基数绘制门静脉张开角曲线, 正常组大鼠门静脉张开角图像基本呈一直线, 门脉高压组门静脉张开角图像较正常组大(图3).

2.4 门静脉超微结构改变 正常组大鼠门静脉内膜内皮细胞表面光滑, 基底膜完整, 细胞间隙连接紧密; 中膜层平滑肌细胞呈梭形, 排列成束, 胞质中可见肌丝; 外膜可见弹性纤维、胶原纤维及疏松结缔组织排列规则. 门脉高压组门静脉内皮细胞基底膜不完整, 细胞间隙连接疏松; 中膜层平滑肌细胞减少, 周围胶原纤维增多, 胞质中肌丝少而紊乱, 部分线粒体嵴断裂、空泡

■应用要点

探讨门静脉管壁超微结构及力学异常分布, 为从生物力学角度揭示门脉高压病理机制提供新思路; 同时为人工血管移植提供力学参考价值, 提高血管移植远期不良并发症。

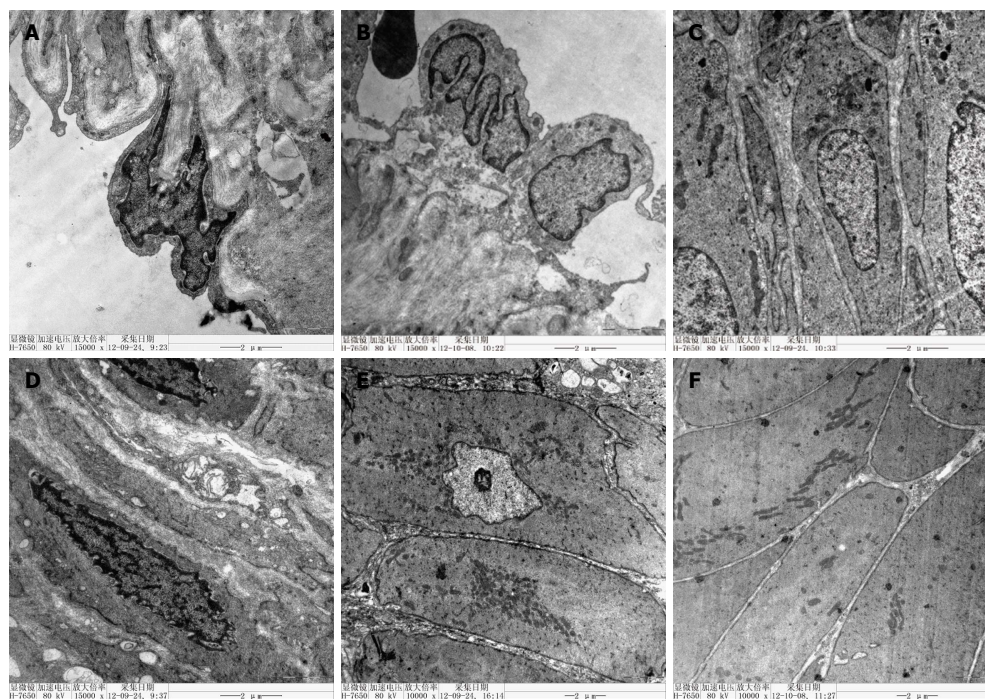


图4 门静脉超微结构(TEM). A: 正常组门静脉内膜层; B: 门脉高压组门静脉内膜层; C: 正常组门静脉中膜层; D: 门脉高压组门静脉中膜层; E: 正常组门静脉外膜层; F: 门脉高压组门静脉外膜层。

化; 外膜未见平滑肌细胞、弹性纤维, 可见大量胶原纤维及疏松结缔组织增生(图4)。

3 讨论

肝硬化门脉高压症病理机制复杂, 其中一个显著特点就是全身高动力循环状态。这种特殊的血流动力学改变势必影响门静脉的应力状态^[6]。顺应性是反应血管应力状态的重要指标之一, 血管管壁超微结构与之密切相关, 目前与管壁顺应性密切相关的组织学成分主要包含内皮细胞、平滑肌细胞、弹性纤维及胶原纤维。研究发现血管在低应力时, 主要由管壁内皮细胞及平滑肌细胞承载^[7,8], 高应力时则胶原纤维的拉伸起主要作用。平滑肌细胞主要分为收缩和合成型两种, 收缩型平滑肌细胞胞质内肌丝丰富而细胞器较少, 合成型平滑肌细胞则是胞质内肌丝少, 细胞器丰富, 生理条件下两者处于动态平衡, 合成型占绝对优势时会影响血管的收缩功能, 使管壁趋于扩张。但持续的管壁扩张, 血管力学重新分布, 胶原纤维被拉伸, 由于胶原纤维比弹性纤维具备一定的强度和刚度, 因此门静脉管壁相对会变硬, 顺应性下降。目前常用胶原纤维与弹性纤维含量比值来代表血管刚度, 比值越大则刚度越大, 反之血管弹性及顺应性越差^[9]。实验中通过透射电镜观察门静脉超微结构, 发现门脉高压时门静脉超微结构发生显著

改变, 中膜平滑肌细胞及胞质肌丝减少, 胶原纤维相应增多, 平滑肌细胞处于合成型状态, 有利于门静脉管壁持续扩张; 另一方面门静脉管壁外膜中胶原纤维与弹性纤维比值增大, 无疑促进血管硬度增加、弹性下降。因此我们推测门静脉平滑肌细胞转型及外膜胶原纤维与弹性纤维等微观结构成分失衡是门脉高压时门静脉持续扩张及管壁顺应性下降等生物力学改变的重要原因之一。

血管轴向拉伸是研究生物材料力学特性的重要方法, 可以反映生物材料的轴向力学特性, 与血管的顺应性显著相关。顺应性是单位压力下血管容积改变, 涵盖周向应力和轴向应力, 是检测血管弹性功能重要指标^[10]。本研究显示正常组大鼠门静脉纵向拉伸应变达到50%时只需很小的力, 试样应力-应变曲线平坦, 试样拉伸应变可塑性强, 说明门静脉组织具有极好的弹性拉伸性能, 顺应性好; 门脉高压组门静脉拉伸应变为50%时应力较正常组大($P<0.01$), 整个拉伸应变耗时较短, 血管组织容易达到自身弹性极限(断裂), 在相同应变下, 门脉高压组门静脉拉伸应力显著高于正常组。结合门静脉超微结构改变, 我们认为门静脉异常重构及高轴向应力共同作用下, 门静脉管壁相对固有成分被破坏, 硬度增加, 顺应性下降。Cahill等^[11]与Menon等^[12]进一步研究发现应力在门静脉顺应性下降、硬度

增加时对管壁的直接破坏力增强.这与本实验结果中门静脉超微结构异常重构相符合,血管壁的破坏则有助于门静脉血栓形成,进一步加重肝脏的损害及门脉高压的维持.

血管的零应力状态并不是无载荷状态下的血管,而是指血管环被径向切开,将残余应力释放后的状态,此时血管环会自动张开呈一定弧度,我们称之为张开角^[13].门静脉张开角代表门静脉的残余应力大小,其意义在于可从力学角度反映血管组织重建程度、应力分布情况及周向力学特性^[14].本实验基于此原理,通过测量两组大鼠门静脉张开角来量化残余应力大小.实验中正常组门静脉零应力状态下张开角较小,组内波动幅度不大;而门脉高压组门静脉张开角大,组内波动范围差异大,表明门脉高压组大鼠门静脉处于高周向应力状态下.也有研究发现门脉高压时,门脉高应力状态使门静脉内外壁应力分布不一致,导致内外壁生长不均匀,内壁细胞的生长速度大于外壁细胞的生长速度,造成内壁周向应变大于外壁,内壁的残余应力增大,张开角相应增大^[15].由此可知血管内部微观结构重排可引起残余应力的改变,残余应力一旦改变势必影响承载对象-管壁组织细胞学的活性,引起管壁结构成分和功能发生变化,最终导致周向应力在血管壁的分布异常.这种正反馈调节可能是门脉高压症并发恶性循环的原因之一.

总之,本实验通过对门静脉超微结构及生物力学特性的研究,结果表明肝内型门脉高压时,门静脉超微结构存在异常重构、管壁顺应性下降,门静脉轴向及周向处于高应力状态.门静脉管壁这种重构及力学异常分布,为我们从生物力学角度揭示门脉高压病理机制提供新思路;同时对门静脉微观成分及顺应性的研究可以为人工血管移植提供力学依据,提高血管移植成功率,减少远期不良并发症.

4 参考文献

- 1 Zekanovic D, Ljubicic N, Boban M, Nikolic M, Delic-Brkljacic D, Gacina P, Klarin I, Turcinov J. Doppler ultrasound of hepatic and system hemodynamics in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Dig Dis Sci* 2010; 55: 458-466 [PMID: 19277866 DOI: 10.1007/s10620-009-0760-1]
- 2 张潭,宇雪豹,秦艳娟,吴小微,范文涛.肝硬化患者门静脉血流动力学彩色多普勒超声检测分析. *中国中西医结合消化杂志* 2013; 23: 257-259
- 3 贺细菊,黄铁柱.门静脉高压症对肝内外相关血管形态结构及生物力学特性的影响. *中国临床解剖学杂志* 2008; 26: 95-98
- 4 邓鑫,吴发胜,梁健.肝宁方对肝硬化门脉高压生物力学的影响. *医学信息* 2011; 24: 928-929
- 5 梁扩寰,李绍白.门静脉高压症.北京:人民军医出版社,1999: 414-416
- 6 张宗荣,汤松伟,朱樑,吴国强,姜宗来,施斌.肝前型门静脉高压兔门脉系统血管应力的研究. *生物医学工程学杂志* 2008; 25: 1322-1326
- 7 Reneman RS, Arts T, Hoeks AP. Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory. *J Vasc Res* 2006; 43: 251-269 [PMID: 16491020 DOI: 10.1159/000091648]
- 8 Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 2005; 85: 9-23 [PMID: 15568038 DOI: 10.1038/labinvest.3700215]
- 9 李运辉,褚海波,徐永波,王涛,王国华.曲张大隐静脉管壁病理改变与临床病期的关系. *实用医药杂志* 2009; 26: 6-9
- 10 Kong X, Han B, Wang H, Li H, Xu W, Liu W. Mechanical properties of biodegradable small-diameter chitosan artificial vascular prosthesis. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100: 1938-1945 [PMID: 22492590 DOI: 10.1002/jbm.a.34136]
- 11 Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 273-293 [PMID: 11516480 DOI: 10.1016/S0163-7258(01)00128-0]
- 12 Menon KV, Kamath PS. Regional and systemic hemodynamic disturbances in cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 617-627, viii [PMID: 11565133 DOI: 10.1016/S1089-3261]
- 13 Fung YC, Liu SQ. Strain distribution in small blood vessels with zero-stress state taken into consideration. *Am J Physiol* 1992; 262: H544-H552 [PMID: 1539714]
- 14 宋玉祥,陈峰,熊江,郭伟,潘秀颀,贾森皓,刘杰.氢气饱和和生理盐水对腹主动脉瘤大鼠主动脉残余应力的影响. *中国修复重建外科杂志* 2013; 27: 881-884
- 15 Liu SQ. Focal expression of angiotensin II type 1 receptor and smooth muscle cell proliferation in the neointima of experimental vein grafts: relation to eddy blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2630-2639 [PMID: 10559005 DOI: 10.1161/01.ATV.19.11.2630]

■同行评价

本文进一步探讨了肝内型门脉高压大鼠门静脉生物力学特性及力学特点,为后续治疗及血管移植创造条件,证据充分,引用合理,研究具有一定新颖性.

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



葛根芩连汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎的影响

续 畅, 王允亮, 张慧芹, 刘泽洲, 郝 钰, 牛建昭, 李军祥

■背景资料

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是非酒精性单纯性脂肪肝病向肝纤维化、肝硬化转化的关键环节, 是隐源性肝硬化的重要病因之一。

续畅, 张慧芹, 刘泽洲, 郝钰, 牛建昭, 北京中医药大学基础医学院 北京市 100029

王允亮, 李军祥, 北京中医药大学东方医院消化科 北京市 100078

续畅, 在读硕士, 主要从事肝病中药干预的研究。

高等学校学科创新引智计划基金资助项目, No. B07007

作者贡献分布: 课题设计由牛建昭与李军祥完成; 研究过程由续畅、王允亮、张慧芹及刘泽洲完成; 试剂由牛建昭与郝钰提供; 数据分析由续畅与张慧芹; 论文写作由续畅与李军祥完成。

通讯作者: 李军祥, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 100078, 北京市丰台区方庄芳星园一区6号, 东方医院消化内科。lijx1226@263.net

电话: 010-64286762

收稿日期: 2013-10-15 修回日期: 2013-11-06

接受日期: 2013-12-13 在线出版日期: 2014-02-08

Effects of Gegen Qinglian Tang on high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats

Chang Xu, Yun-Liang Wang, Hui-Qin Zhang, Ze-Zhou Liu, Yu Hao, Jian-Zhao Niu, Jun-Xiang Li

Chang Xu, Hui-Qin Zhang, Ze-Zhou Liu, Yu Hao, Jian-Zhao Niu, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Yun-Liang Wang, Jun-Xiang Li, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China
Supported by: the Discipline Innovative Intelligence Program Funded Project (project 111), No. B07007

Correspondence to: Jun-Xiang Li, Chief Physician, Professor, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, 6 District 1, Fangxingyuan, Fangzhuang, Fengtai District, Beijing 100078, China. lijx1226@263.net

Received: 2013-10-15 Revised: 2013-11-06

Accepted: 2013-12-13 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To explore the effects of Gegen Qinglian Tang on high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis(NASH) in rats.

METHODS: SD rats were fed a high-fat diet to induce nonalcoholic steatohepatitis. Different doses of Gegen Qinglian Tang were administered intragastrically when the rats were fed the high-fat diet. Blood samples were harvested after 8 wk to detect aspartate aminotransferase (AST), alanine transaminase (ALT), cholesterol

total (CHO), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), fasting plasma glucose (FPG), and fasting insulin (FINS). Liver tissue samples were taken for hematoxylin-eosin (HE) staining and oil-red O staining. In addition, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score (NAS) and homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were assessed.

RESULTS: Compared with the model group, the levels of serum AST, ALT, CHO, LDL and HOMA-IR were significantly decreased and the levels of serum HDL significantly increased in the high dose Gegen Qinglian group. The results of HE staining, oil-red O staining and NAS assessment showed that Gegen Qinglian Tang could significantly inhibit the development of NASH.

CONCLUSION: Gegen Qinglian Tang has therapeutic effects against NASH in SD rats, and it can improve insulin resistance.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Gegen Qinglian Tang; Nonalcoholic steatohepatitis; SD rats; High-fat diet; Insulin resistance

Xu C, Wang YL, Zhang HQ, Liu ZZ, Hao Y, Niu JZ, Li JX. Effects of Gegen Qinglian Tang on high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 546-552 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/546.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.546>

摘要

目的: 探讨葛根芩连汤对非酒精性脂肪性肝炎的干预作用。

方法: 高脂饲料喂养SD大鼠以制备非酒精性脂肪性肝炎模型, 各给药组在造模的同时进行灌胃给药, 持续8 wk后取材, 血清用比色法对谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、总胆固醇(cholesterol total, CHO)、低密度脂蛋

■同行评议者

庄林, 主任医师, 昆明市第三人民医院肝病科

白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)的含量进行检测, 用放免法对空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)的含量进行检测, 并进行胰岛素抵抗指数(homeostatic model assessment of insulin resistance, HOMA-IR)计算; 肝组织制成石蜡切片及冰冻切片进行HE及油红O染色, 并根据“非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)活动度积分”对各组肝组织进行NASH评估。

结果: 与空白组比较, NASH大鼠血清中AST、ALT、CHO、LDL的含量显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), HDL的含量显著降低($P<0.01$), HOMA-IR指数显著升高($P<0.05$), 葛根芩连汤可显著抑制高脂饲料喂养SD大鼠过程中血清AST、ALT、CHO、LDL含量($P<0.01$)及HOMA-IR指数的升高($P<0.05$)以及HDL含量的降低($P<0.01$); HE染色、油红O染色及NAFLD活动度积分结果显示, 葛根芩连汤可显著抑制NASH及相关病理变化的发生发展。

结论: 葛根芩连汤对非酒精性脂肪性肝炎有一定的干预作用, 并可改善胰岛素抵抗。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 葛根芩连汤; 非酒精性脂肪性肝炎; 大鼠; 高脂饮食; 胰岛素抵抗

核心提示: 在“异病同治”中医理论指导下, 现代中医应用该方治疗湿热内蕴证2型糖尿病疗效明确, 具有明显降糖、降血脂、改善胰岛素抵抗及抗氧化等作用。本课题组应用临床流行病学调查及因子分析等方法研究了NASH的病机、证型及证候要素, 认为NASH的核心病机、主要证型及证候要素与2型糖尿病类似, 符合“异病-同证-同治”的原则。

续畅, 王允亮, 张慧芹, 刘泽洲, 郝钰, 牛建昭, 李军祥. 葛根芩连汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎的影响. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 546-552 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/546.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.546>

0 引言

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是一种无过量饮酒, 以肝实质细胞脂肪变和脂肪贮积为特征, 伴随弥漫性肝小叶轻度炎症和/或肝中央静脉、肝窦周围胶原沉积的

临床病理综合征^[1]。研究表明, NASH是非酒精性单纯性脂肪肝向肝纤维化、肝硬化转化的关键环节, 是隐匿性肝硬化的重要病因之一^[2]。NASH的发病机制至今尚不清楚, “二次打击”学说目前被广泛认可^[3]。其中, 第一次打击源于肝细胞的脂肪变性, 其核心病理机制是胰岛素抵抗^[4]。进而, 肝组织出现脂质过氧化、氧自由基损伤、线粒体功能障碍以及炎性细胞因子增多等病理过程, 形成“二次打击”^[5]。另有学者认为, NASH属代谢综合征表现之一, 与肥胖、高脂血症、2型糖尿病等常常并发或相互转化^[6]。因此, 理想的NASH防治药物应具有多靶点、能干预多个病理环节。

目前, 西医临床尚无治疗NASH疗效确切的药物。现有的治疗方案主要用于: (1)改善糖、脂肪代谢(吡格列酮、罗格列酮、二甲双胍等); (2)抗氧化、抗炎(N-乙酰半胱氨酸、维生素E、熊去氧胆酸等); (3)降脂(他汀、贝特类药物等)。上述药物虽然有各自的理论依据, 但缺少明确的临床疗效和大规模RCT试验数据支持^[7]。因此, 开发疗效肯定的NASH防治药物仍然是研究者关注的热点。

葛根芩连汤源自《伤寒论》, 由4味中药组成(葛根、黄芩、黄连、甘草), 用于治疗湿热所致腹泻和痢疾, 是治疗急性腹泻的经典方剂^[8]。在“异病同治”中医理论指导下, 现代中医应用该方治疗湿热内蕴证2型糖尿病疗效明确, 具有明显降糖、降血脂、改善胰岛素抵抗及抗氧化等作用^[9,10]。本课题组应用临床流行病学调查及因子分析等方法研究了NASH的病机、证型及证候要素, 认为NASH的核心病机、主要证型及证候要素与2型糖尿病类似, 符合“异病-同证-同治”的原则^[11]。为此, 本实验采用高脂饲料诱导NASH大鼠模型, 系统观察了葛根芩连汤对NASH大鼠胰岛素抵抗、脂肪代谢、肝细胞脂肪沉积的影响, 期望为开发防治NASH及其并发症有效的中药制剂提供新思路 and 实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠购自北京维通利华实验动物有限公司[SCXK(京)2012-0001]。被试药(葛根芩连汤颗粒剂)由北京中医药大学东方医院制剂室提供。谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、总胆固醇(cholesterol total, CHO)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密

■研发前沿
NASH的发病机制至今尚不清楚, “二次打击”学说目前被广泛认可。

■相关报道

葛根素(葛根的主要成分)可显著改善高脂饲料诱导大鼠肝脏脂肪变性,抑制炎症因子表达。小檗碱(黄连的主要成分)可改善db/db小鼠脂代谢、增强外周组织AMP活化激酶(AMPK)活性及脂肪酸氧化能力;黄芩苷(黄芩的主要成分)可降低脂肪肝模型大鼠血清中TC、FFA及胰岛素的浓度,并增强AMPK和乙酰辅酶A羧化酶磷酸化的能力。

表 1 NAFLD活动度积分组织学评分判断标准

程度评分	肝脂肪变	小叶内炎症	肝细胞气球样变
0	<5%	无病灶	无
1	5%~33%	<2	少量气球样细胞
2	34%~66%	2~4	较多/显著气球样变
3	>66%	>4	

NAS \geq 5分者可明确NASH的诊断; NAS<3分则可排除NASH; 两者之间者为NASH可能。

度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)比色法试剂盒, 购自中生北控股份有限公司。空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)放免法试剂盒, 购自北京华英生物技术研究所。高脂饲料(88%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇), 购自北京华阜康生物科技股份有限公司; 阳性药水飞蓟宾胶囊(水林佳, 批准文号: 国药准字H20040299)为天津天士力制药股份有限公司产品; UCT超薄切片机, 德国莱卡; BS224S电子天平, 德国赛多利斯; 超低温冰箱, 海尔集团; SC3616低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; BX40光学显微镜, 日本OLYMPUS; CamERC5s照相系统, 德国蔡司ZEISS; MVLTIKAN MK3酶标仪, 美国Thermo公司; 7160全自动生化仪, 日本日立公司; r-911全自动放免计数仪, 中国科技大学实业总公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处置: ♂ SD大鼠(SPF级)50只(120 g \pm 5 g)随机分为5组: 正常对照组、NASH模型组、水飞蓟宾组(21 mg/kg, 按人临床用量换算)、葛根芩连汤高剂量组(9.6 g/kg, 按生药量换算)和葛根芩连汤低剂量组(4.8 g/kg, 按生药量换算), 每组10只。依照本实验室常规方法^[12], 全部大鼠适应性喂养7 d后, 正常对照组饲喂普通饲料, 其余各组均饲喂高脂饲料, 持续8 wk。本实验采用预防给药的方式, 每天上午灌胃给药1次, 正常对照组及模型组灌胃给予同体积蒸馏水。大鼠自由饮水, 每天观察动物进食、二便、活动、毛发等情况。每周计量体质量1次。第8周实验结束时, 全部大鼠禁食24 h, 称质量、麻醉(10%水合氯醛, 0.04 mL/kg体质量)、腹主动脉取血、静置30 min后离心制备血清(3000 r/min)。取相同部位肝组织, 一部分经4%多聚甲醛固定, 用于制备石蜡切片; 另一部分经OCT包埋、制备冰冻切片。

1.2.2 血清AST、ALT、CHO、LDL及HDL含量测定: 采用比色法, 全自动生化分析仪依照常规

方法检测。

1.2.3 胰岛素抵抗水平测定: 比色法检测血清中FPG的含量, 放免法检测血清中FINS的浓度, 根据公式计算HOMA-IR指数, 即HOMA-IR = FPG(mmol/L) \times FINS(mIU/L)/22.5。

1.2.4 肝组织病理学检测: 常规石蜡包埋、石蜡切片(4 μ m)及HE染色、光镜观察并摄片; 冰冻切片(10 μ m)行常规油红O染色、光镜观察并摄片。NASH病理诊断标准采用“亚太地区非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗共识”推荐的美国国立卫生研究院NASH临床研究网络病理委员会2005年制定的NAFLD活动度积分^[13](NAFLD activity score, NAS)进行评估。NAS组织学评分系统对14项病理改变, 3项指标进行了半定量评估计分(表1)。

统计学处理 定量数据采用SPSS18.0软件对血清生化指标检测结果进行统计学分析。计量资料采用mean \pm SD的形式表示对符合正态分布且方差齐性的计量资料组间比较采用ANOVA单因素方差分析; 对符合正态分布且方差不齐的计量资料组间比较采用Welch检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 各组大鼠实验期间均无死亡。正常对照大鼠毛发柔顺、有光泽, 精神状态良好, 取材时肉眼观察肝脏颜色红润, 与周边脏器边缘清晰。NASH模型大鼠体质量在前4 wk快速增长, 4 wk后增长速度显著下降, 大鼠毛发紊乱、无光泽, 精神萎靡, 取材时肉眼观察肝脏颜色变黄, 肝脏肿大(部分肝表面可见结节及与周边组织粘连)。葛根芩连汤高、低剂量组及阳性对照大鼠肝组织肉眼观察颜色变浅, 肿大不明显, 与周边脏器少有黏连。

2.2 血清生化指标检测 如表2所示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清中AST、ALT、CHO、LDL的含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而

表 2 各组大鼠血清中AST、ALT、CHO、LDL、HDL含量($n=10$, mean \pm SD)

分组	AST(U/L)	ALT(U/L)	CHO(mmol/L)	LDL(mmol/L)	HDL(mmol/L)
正常组	299.88 \pm 3.74	19.49 \pm 4.68	1.68 \pm 0.19	0.16 \pm 0.02	1.41 \pm 0.13
模型组	424.13 \pm 15.69 ^a	38.46 \pm 5.22 ^b	2.81 \pm 0.79 ^b	1.13 \pm 0.30 ^b	1.00 \pm 0.06 ^b
阳性药组	230.97 \pm 12.74 ^d	22.40 \pm 7.08 ^c	1.77 \pm 0.13 ^d	0.52 \pm 0.04 ^d	1.11 \pm 0.16
高剂量组	251.31 \pm 33.62 ^d	19.32 \pm 2.37 ^d	1.53 \pm 0.11 ^d	0.10 \pm 0.01 ^d	1.54 \pm 0.18 ^d
低剂量组	256.60 \pm 27.15 ^d	24.76 \pm 6.89 ^c	1.94 \pm 0.39 ^c	0.55 \pm 0.25 ^d	1.09 \pm 0.19

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 模型组. AST: 谷草转氨酶; ALT: 谷丙转氨酶; CHO: 总胆固醇; LDL: 低密度脂蛋白; HDL: 高密度脂蛋白.

表 3 各组大鼠血清中FPG、INS含量及HOMA-IR指数($n=10$, mean \pm SD)

分组	FPG(mmol/L)	FINS(mIU/L)	HOMA-IR
正常组	3.51 \pm 0.67	16.67 \pm 4.00	2.56 \pm 0.50
模型组	4.74 \pm 2.20 ^a	17.09 \pm 2.40	3.72 \pm 2.18 ^a
阳性药组	2.24 \pm 1.17	12.74 \pm 2.49 ^b	1.20 \pm 0.53 ^c
高剂量组	1.90 \pm 0.87 ^c	15.79 \pm 2.41	1.31 \pm 0.60 ^c
低剂量组	2.96 \pm 2.52	17.48 \pm 1.67	2.40 \pm 2.18

^a $P<0.05$ vs 正常组; ^b $P<0.01$, ^c $P<0.05$ vs 模型组. FPG: 空腹血糖; FINS: 空腹胰岛素; HOMA-IR: 胰岛素抵抗指数.

HDL的含量则显著降低($P<0.01$); 与模型组比较, 阳性药组、葛根芩连汤高剂量组及低剂量组大鼠血清中AST、ALT、CHO、LDL的含量均显著降低($P<0.01$), 除高剂量组外, 阳性药及低剂量组大鼠血清中HDL的含量无明显改变.

2.3 胰岛素抵抗检测 如表3所示, 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清中FPG与FINS的含量均呈升高的趋势, 经计算HOMA-IR值显著升高($P<0.05$); 与模型组比较, 除低剂量外, 阳性药组、葛根芩连汤高剂量组大鼠HOMA-IR值均显著降低($P<0.05$).

2.4 肝组织病理学检测 正常对照大鼠肝组织石蜡切片、光镜下可见: 肝组织着色均匀, 肝细胞索排列规则, 肝细胞结构清晰(图1A); 模型组大鼠肝组织呈大面积脂肪样变, 中央静脉周围肝细胞呈严重空泡化, 部分可见炎性细胞浸润(图1B); 阳性药、葛根芩连汤高低剂量干预组大鼠肝组织脂肪变程度明显减弱, 炎性细胞浸润减少(图1C-E). 为显示肝细胞内脂滴的多少、分布, 我们对肝组织冰冻切片行油红O染色(红色示脂滴), 染色结果显示, 正常对照组大鼠肝组织不着色(图2A); 模型组大鼠肝组织可见大量脂滴(图2B); 阳性药、葛根芩连汤高低剂量干预组大鼠肝组织中脂滴明显减少、呈不均匀分

布(图1C-E). NAS组织学病理评分结果显示: 模型组NAS为 $8 \pm 0.00(>5)$, 表明NASH模型复制成功; 阳性药组、葛根芩连汤高剂量组NAS评分分别为 2.8 ± 1.94 及 $2.8 \pm 2.55(<3)$, 提示药物的干预作用有效; 而葛根芩连汤低剂量组NAS评分为 $4.4 \pm 1.99(>3-<5)$, 提示药物干预作用不明显(表4).

3 讨论

NASH是以肝小叶为病变主体的, 以弥散性肝细胞大泡性脂肪变性及弥散性肝小叶轻度炎症为病理特征的临床病理综合征^[12]. 现代中医根据其肝郁脾虚、痰湿阻滞、湿热内蕴、痰瘀互结、肝肾不足等主要临床特征, 将NASH归属于“肝癖”、“肝胀”、“痞满”、“胁痛”、“积聚”、“肥气”、“痰浊”、“肝痞”、“瘀证”等病证范畴. 李军祥教授根据本病的病位、病因、病机特点认为: 脾虚肝郁、痰瘀互结、湿热等是NASH临床主要证候要素, 对应的治法当以疏肝健脾、祛痰化瘀、清热化湿^[13].

葛根芩连汤通常用于治疗太阳表邪内陷所致热下利证. 现代中医在大量临床实践中发现, 该方对改善2型糖尿病脾胃湿热、脾失健运等临床证候疗效显著, 并通过动物实验及多中心

■创新盘点
在“异病同治”中医理论指导下, 应用葛根芩连汤干预NASH的发生发展.

■应用要点

葛根芩连汤干预NASH发生、发展的物质基础明确、可靠,为进一步探讨该复方中药的分子药理机制提供很好的背景资料。

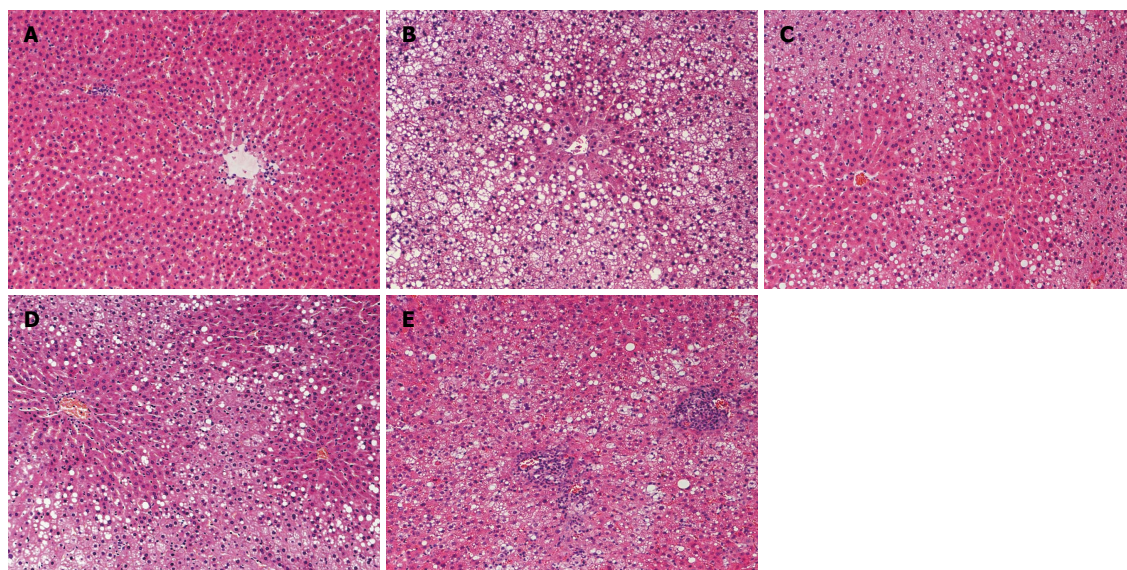


图1 大鼠肝组织石蜡切片HE染色光镜观察结果($\times 100$)。A: 正常对照组; B: 模型组; C: 阳性干预对照组; D: 葛根芩连汤高剂量干预组; E: 葛根芩连汤低剂量干预组。

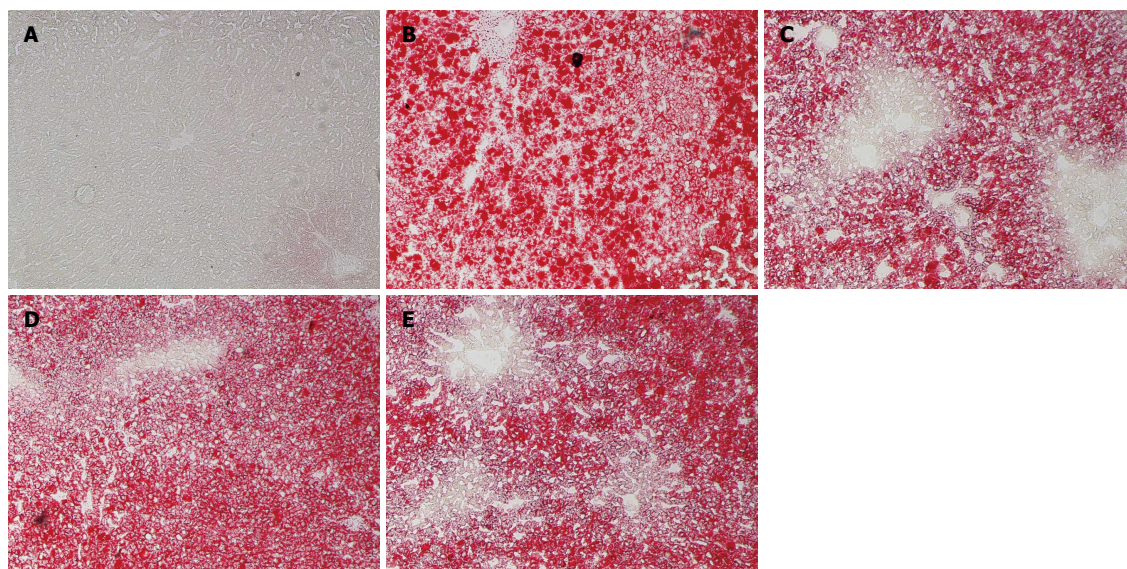


图2 大鼠肝组织冰冻切片油红O染色光镜观察结果($\times 100$)。A: 正常对照组; B: 模型组; C: 阳性干预对照组; D: 葛根芩连汤高剂量干预组; E: 葛根芩连汤低剂量干预组。

临床试验证明了葛根芩连汤防治2型糖尿病的药效作用^[10]。2型糖尿病、高脂血症、非酒精性脂肪性肝病同属代谢综合征, 他们之间具有共同的病理特征(如胰岛素抵抗、肝脏脂肪代谢紊乱、氧化应激等), 并在一定条件下可相互诱发或转化。根据中医“异病-同证-同治”原则, 本课题组提出葛根芩连汤可通过调节胰岛素抵抗、改善脂代谢等影响NASH形成的假说。为验证该假说是否成立, 本实验制备了高脂饲料诱导大鼠NASH模型, 选取水飞蓟宾胶囊(水林佳)为阳性对照药, 观察了葛根芩连汤对NASH形成过程中胰岛素抵抗、脂代谢、肝脂肪变等病理

环节的干预作用。水飞蓟宾胶囊主要成分为水飞蓟宾, 是从水飞蓟的种皮中提取的一种黄酮化合物, 用于治疗高血脂和非酒精性脂肪肝, 临床应用广泛、药理机制较明确。

本实验的结果表明: 水飞蓟宾胶囊和葛根芩连汤预防性给药均能显著改善高脂饲料诱导的脂肪性肝病的发生、发展, 可显著降低大鼠血清中AST、ALT、CHO及LDL含量, 促进血清中HDL水平的增多。血清中FPG、FINS及HOMA-IR指数检测结果提示, 葛根芩连汤对高脂饲料引发的NAFLD大鼠胰岛素抵抗具有显著改善作用。而肝组织病理学检测结果提示, 葛根

表 4 各组肝组织NAFLD活动度积分(NAS)组织学评分($n = 10$, mean \pm SD)

分组	肝脂肪变	小叶内炎症	肝细胞气球样变	NAS总分
正常对照组	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00	0.0 \pm 0.00
NASH模型组	3.0 \pm 0.00	3.0 \pm 0.00	2.0 \pm 0.00	8.0 \pm 0.00
阳性对照组	1.4 \pm 0.55	0.6 \pm 0.55	0.8 \pm 0.84	2.8 \pm 1.94
葛根芩连汤高剂量组	1.0 \pm 0.71	0.8 \pm 0.84	1.0 \pm 1.00	2.8 \pm 2.55
葛根芩连汤低剂量组	1.6 \pm 0.55	1.4 \pm 0.89	1.4 \pm 0.55	4.4 \pm 1.99

NAS ≥ 5 分者可明确NASH的诊断; NAS < 3 分则可排除NASH; 两者之间者为NASH可能。

芩连汤对肝细胞脂肪变及炎性细胞浸润有明显保护作用。高脂饮食诱发的大鼠NASH模型是经典的代谢综合征模型之一, 其在形态学、病理生理学方面与人的NASH病理特点相似, 广泛用于研究NASH发生机制及抗NASH药物的评价上^[14]。该造模方法的主要原理: 通过增加饮食中脂质的摄入量, 显著提高血液中游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)含量。过剩的FFA一方面引起机体脂肪酸代谢紊乱, 导致肝细胞内甘油三酯(triglyceride, TG)蓄积; 另一方面诱发胰岛素抵抗, 对肝脏形成“第一次打击”。脂肪酸代谢紊乱及胰岛素抵抗又增加肝细胞对各种损伤因素及炎症的敏感性, 易产生大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 进而启动氧化应激, 形成对肝脏的“第二次打击”, 最终导致NASH的发生。本实验结果表明: 葛根芩连汤对大鼠NASH的发生、发展具有明显的抑制作用, 提示其药理机制可能是: 通过调节脂代谢和改善胰岛素抵抗, 干预了NASH发生的早期环节(一次打击)。

葛根芩连汤中主要组分(葛根、黄连、黄芩)的生物活性已有报道, 如葛根素(葛根的主要成分)可显著改善高脂饲料诱导大鼠肝脏脂肪变性, 抑制炎症因子表达^[15]。小檗碱(黄连的主要成分)可改善db/db小鼠脂代谢、增强外周组织AMP活化激酶(AMP activated kinase, AMPK)活性及脂肪酸氧化能力^[16]; 黄芩苷(黄芩的主要成分)可降低脂肪肝模型大鼠血清中TC、FFA及胰岛素的浓度, 并增强AMPK和乙酰辅酶A羧化酶磷酸化的能力^[17]。上述文献资料提示, 葛根芩连汤干预NASH发生、发展的物质基础明确、可靠, 为进一步探讨该复方中药的分子药理机制提供很好的背景资料。

总之, 本文仅对葛根芩连汤防治NASH的药效学做了初步观察, 其深入的药理机制探讨正在进行中, 尤其对该药在改善胰岛素抵抗及脂

代谢调节的分子机制上开展了大量的实验研究, 相关研究成果将陆续报道。

4 参考文献

- Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology* 2006; 49: 450-465 [PMID: 17064291 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02416.x]
- Kashi MR, Torres DM, Harrison SA. Current and emerging therapies in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 396-406 [PMID: 18956296 DOI: 10.1055/s-0028-1091984]
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845 [PMID: 9547102 DOI: 10.1016/S0016-5085(98)70599-2]
- Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379 [PMID: 11826411 DOI: 10.1053/jhep.2002.30692]
- Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001; 121: 710-723 [PMID: 11522755 DOI: 10.1053/gast.2001.27126]
- Smith BW, Adams LA. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 456-465 [PMID: 21556019 DOI: 10.1038/nrendo.2011.72]
- 周琦, 范建高. 非酒精性脂肪性肝炎的药物治疗. *胃肠病学和肝病杂志* 2009; 18: 189-192
- 张明俊. 葛根芩连汤临床应用. *河南中医* 2011; 31: 457-461
- Tong XL, Zhao LH, Lian FM, Zhou Q, Xia L, Zhang JC, Chen XY, Ji HY. Clinical observations on the dose-effect relationship of gegen qin lian decoction on 54 out-patients with type 2 diabetes. *J Tradit Chin Med* 2011; 31: 56-59 [PMID: 21563509 DOI: 10.1016/S0254-6272(11)60013-7]
- 赵林华, 姬航宇, 冀博文, 宋军, 仝小林. 葛根芩连汤治疗糖尿病理论探讨. *中华中医药杂志* 2012; 27: 280-284
- 李军祥, 陈润花, 苏冬梅, 李立. 中医药治疗非酒精性脂肪性肝病研究述评. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1443-1451
- 李军祥, 陈润花. 非酒精性脂肪性肝病的中医药研究进展. *现代消化及介入诊疗* 2009; 14: 180-185
- 陈润花, 张海鹏, 李军祥. 非酒精性脂肪性肝病的中医证候研究进展. *中西医结合肝病杂志* 2008; 18: 63-65
- 曹玉珍, 张秀英, 王鑫, 王媛媛. 非酒精性脂肪性肝炎动物模型的研究进展. *黑龙江畜牧兽医(科技版)* 2011; 1: 17-20

■名词解释

胰岛素抵抗指数: 用于评价机体的胰岛素抵抗水平的指标。HOMA-IR = FPG, (mmol/L) \times FINS, (mIU/L)/22.5。该值随着胰岛素抵抗水平的升高而升高。

■同行评价

《葛根芩连汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝病的影响》一文是一篇好文章和好研究。该研究提出了葛根芩连汤治疗非酒精性脂肪性肝病的学术观点依据,用合理的设计进行了动物实验,试验结果可信,别人可以重复。该文具科学性、创新性和可读性,在一定程度上反映了我国胃肠病学基础研究的先进水平。

- 15 郑培永, 马赞颂, 柳涛, 邢练军, 季光. 葛根素对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏脂质的影响. 上海中医药杂志 2008; 42: 61-63
- 16 Kim WS, Lee YS, Cha SH, Jeong HW, Choe SS, Lee MR, Oh GT, Park HS, Lee KU, Lane MD, Kim JB. Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:

E812-E819 [PMID: 19176354 DOI: 10.1152/ajpendo.90710.2008]

- 17 Guo HX, Liu DH, Ma Y, Liu JF, Wang Y, Du ZY, Wang X, Shen JK, Peng HL. Long-term baicalin administration ameliorates metabolic disorders and hepatic steatosis in rats given a high-fat diet. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30: 1505-1512 [PMID: 19890358 DOI: 10.1038/aps.2009.150]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改,而作者必须于15天内将单位介绍信、作者复核要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期发回的,作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期);起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

RNA干扰技术沉默MCM7基因对人肝癌SMMC-7721细胞生物学行为的影响

孙雯, 曹骥, 卢晓旭, 朱伶群, 杨春, 欧超, 骆成飘, 李瑗, 苏建家

孙雯, 曹骥, 卢晓旭, 朱伶群, 杨春, 欧超, 骆成飘, 李瑗, 苏建家, 广西壮族自治区肿瘤防治研究所实验研究部 广西壮族自治区南宁市 530021

孙雯, 卢晓旭, 朱伶群, 广西医科大学研究生学院 广西壮族自治区南宁市 530021

孙雯, 在读硕士, 主要从事肝病病因学、发病机制方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30960428

广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研基金资助项目, No. Z2012352

作者贡献分布: 此课题由曹骥设计; 研究过程由孙雯、卢晓旭、朱伶群、杨春、欧超、骆成飘、李瑗及苏建家操作完成; 数据分析和论文写作由孙雯与曹骥完成。

通讯作者: 曹骥, 副研究员, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路22号, 广西壮族自治区肿瘤防治研究所实验研究部。

caojicn@163.com

电话: 0771-5310593

收稿日期: 2013-11-14 修回日期: 2013-12-04

接受日期: 2013-12-12 在线出版日期: 2014-02-08

Effects of RNA interference-mediated MCM7 knockdown on biological behavior of human liver cancer SMMC-7721 cells

Wen Sun, Ji Cao, Xiao-Xu Lu, Ling-Qun Zhu, Chun Yang, Chao Ou, Cheng-Piao Luo, Yuan Li, Jian-Jia Su

Wen Sun, Ji Cao, Xiao-Xu Lu, Ling-Qun Zhu, Chun Yang, Chao Ou, Cheng-Piao Luo, Yuan Li, Jian-Jia Su, Research Department of Guangxi Cancer Institute, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Wen Sun, Xiao-Xu Lu, Ling-Qun Zhu, Graduate School of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30960428; and the Guangxi Zhuang Autonomous Region Health Department Self-financing Scientific Research Project, No. Z2012352

Correspondence to: Ji Cao, Associate Researcher, Research Department of Guangxi Cancer Institute, 22 Shuangyong Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. caojicn@163.com

Received: 2013-11-14 Revised: 2013-12-04

Accepted: 2013-12-12 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of mini-chromosome maintenance protein7 (MCM7) gene silencing on the proliferation and apoptosis of human liver cancer SMMC-7721 cells and the possible mechanisms involved.

METHODS: Four vectors carrying shRNAs targeting the MCM7 gene (MCM7-shRNA expression vector) were constructed and were selected for effective targets. SMMC-7721 cells were divided into three groups: an experimental group, a normal control group and a negative control group. The experimental group was transfected with the recombinant lentivirus vector (LV-shRNA-MCM7), the negative control was transfected with an control lentiviral vector (LV-shRNA-NC), and the normal control received no treatment. The mRNA and protein levels of MCM7 were analyzed by RT-PCR, quantitative real-time PCR (qPCR), and Western blot. Cell proliferation was detected by MTT assay, and cell colony formation was detected by Giemsa staining. Cell cycle progression and apoptosis were observed by flow cytometry (FCM).

RESULTS: MCM7-shRNA expression vectors were successfully constructed and verified by DNA sequencing. After transfecting SMMC-7721 cells with various vectors, cell fluorescence was observed in > 90% of cells. MCM7 mRNA and protein expression in the four MCM7-shRNA groups was down-regulated by > 50% compared with the negative control group and normal control group. The LV-shRNA-MCM7 vector had the highest efficiency and was used in subsequent experiments. MTT results showed that cell proliferation in the experimental group at 24, 48, 72 and 96 h after transfection was significantly lower than that in the negative control group and normal control group ($P < 0.05$ for all). Giemsa staining results showed that the colony formation rate was significantly lower in the experimental group than in the two control groups ($6.00\% \pm 0.50\%$ vs $14.10\% \pm 0.36\%$, $13.73\% \pm 0.17\%$, $P < 0.05$ for both). FCM analysis showed that the percentage of cells in G₁ phase increased in cells transfected with the MCM7-shRNA ($P < 0.05$ for both). The apoptosis rate was significantly higher in the experimental group than in the negative control group and blank control group ($22.27\% \pm 1.22\%$ vs $0.05\% \pm 0.07\%$, $0.03\% \pm 0.06\%$, $P < 0.05$ for both).

■背景资料

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界三大癌症之一, 大多数患者就诊时已属晚期, 具有发病率高、致死率高、预后较差、目前尚无有效治疗手段等特点。及早对其进行有效干预是改善其疗效的关键。研究发现, 细胞周期调控机制紊乱导致的细胞增殖失控是肿瘤发生的重要机制之一。

■同行评议者

单云峰, 副主任医师, 温州医学院第一附属医院肝胆外科

■研究前沿

微小染色体维持蛋白7(minichromosome maintenance protein 7, MCM7)作为DNA复制的准许因子,可启动和参与DNA复制,参与调节细胞增殖。近年来,越来越多的研究发现MCM7与肿瘤的发生发展、恶性转化密切相关。

CONCLUSION: RNAi-induced MCM7 down-regulation could inhibit cell growth, suppress cell colony formation, block the cell cycle at G₁ phase, and induce cell apoptosis in SMMC-7721 cells.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Liver cancer; MCM7; RNA interference; Gene therapy

Sun W, Cao J, Lu XX, Zhu LQ, Yang C, Ou C, Luo CP, Li Y, Su JJ. Effects of RNA interference-mediated MCM7 knockdown on biological behavior of human liver cancer SMMC-7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 553-562 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/553.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.553>

摘要

目的: 探讨微小染色体维持蛋白7(mini-chromosome maintenance protein 7, MCM7)基因沉默后对人肝癌细胞系SMMC-7721增殖和凋亡的影响及可能作用机制。

方法: 利用RNA干扰技术,构建4个靶向MCM7基因shRNA载体(MCM7-shRNA表达载体),并对不同靶点进行有效筛选。将人肝癌细胞系SMMC-7721接种于六孔板,分为3组:以MCM7基因沉默重组慢病毒颗粒(LV-shRNA-MCM7)感染SMMC-7721,作为实验组;以对照慢病毒颗粒(LV-shRNA-NC)感染SMMC-7721,作为阴性对照组;空白对照组常规培养,不做任何处理。应用RT-PCR、实时荧光定量PCR和Western blot技术检测MCM7基因mRNA和蛋白的表达,评价干扰效果并筛选有效靶点;MTT法检测细胞体外增生能力,Giemsa染色法检测各组细胞的克隆形成;流式细胞技术(flow cytometry, FCM)分别检测各组细胞增殖和凋亡的变化情况。

结果: 成功构建MCM7-shRNA表达载体,经测序验证无误,感染SMMC-7721细胞后,细胞荧光显示感染率>90%,内源性靶点得到确认。Western blot及Real-time PCR结果显示:实验组的四种靶点MCM7-shRNA干扰序列中,与阴性对照组和空白对照组比较,MCM7 mRNA和MCM7蛋白的表达水平下调均达50%以上,其中以LV-shRNA-MCM7(4)靶点敲减效率最高,分别达88.95%、87.89%和82.25%、81.63%,差异具有统计学意义($P<0.05$),以此作为实验组。MTT法结果显示:实验组细胞490 nm处的吸光度(A)值在转染后24、48、

72和96 h时均低于阴性对照组、空白对照组,差别显著($P<0.05$)。同时Giemsa染色法结果显示:LV-shRNA-MCM7组的克隆形成率($6.00\% \pm 0.50\%$)明显低于空白对照组($14.10\% \pm 0.36\%$)、阴性对照组($13.73\% \pm 0.17\%$),实验组细胞生长明显受到抑制($P<0.05$)。流式细胞技术显示:实验组较阴性对照组、空白对照组G₁期延长,S期缩短,差别显著($P<0.05$)。实验组细胞凋亡率为($22.27\% \pm 1.22\%$),明显高于阴性对照组($0.05\% \pm 0.07\%$)和空白对照组($0.03\% \pm 0.06\%$),实验组较阴性对照组、空白对照组出现了明显的细胞凋亡($P<0.05$)。

结论: MCM7基因的RNAi重组体可以有效地抑制MCM7基因的表达, RNA干扰技术沉默MCM7基因能够抑制肝癌细胞的生长,阻滞细胞期于G₁期,促进其凋亡。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝癌; MCM7; RNA干扰; 基因治疗

核心提示: 本实验利用慢病毒为载体,采用慢病毒转染法将MCM7-shRNA质粒转入人肝癌SMMC-7721细胞后,肝癌细胞周期进程得到有效阻滞,凋亡大幅增加,可明显抑制肝癌生长增殖功能。

孙雯, 曹骥, 卢晓旭, 朱伶群, 杨春, 欧超, 骆成飘, 李媛, 苏建家. RNA干扰技术沉默MCM7基因对肝癌SMMC-7721细胞生物学行为的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22(4): 553-562 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/553.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.553>

0 引言

众所周知,恶性肿瘤的发生发展是一个多因素、多阶段、多基因共同参与的过程。其中一个显著特征是细胞具有自主生长特性,即持续地分裂与繁殖。细胞周期是一个有多种控制因子共同参与的精细平衡的过程,这一过程的任何缺陷都可能导致遗传信息的改变,从而导致肿瘤等各种疾病的发生。研究发现,细胞周期调控机制紊乱导致的细胞增殖失控是包括肝癌在内多种肿瘤发生的重要机制之一^[1]。微小染色体维持蛋白7(mini-chromosome maintenance protein 7, MCM7)作为DNA复制的准许因子,可启动和参与DNA复制,确保DNA的复制在每个细胞周期仅发生一次,参与调节细胞增殖^[2]。

本课题组前期研究表明,MCM7蛋白在肝癌组织中呈高表达,且发现MCM7蛋白表达与患者

肝癌分期、转移及复发相关,提示MCM7基因与肝癌的发生有关^[3]。为了进一步探讨MCM7基因在肝癌发展中的作用,本研究应用RNA干扰技术,构建靶向MCM7基因的shRNA载体,转染人肝癌SMMC-7721细胞,观察沉默MCM7基因表达后对细胞增殖和凋亡的影响,为肝癌的分子靶向治疗研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌SMMC-7721细胞株购自中科院上海细胞研究所, shRNA靶点设计、4种同时带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和嘌呤霉素抗性筛选标记的MCM7基因沉默重组慢病毒颗粒LV-shRNA-MCM7(1、2、3、4)及对照慢病毒颗粒(LV-shRNA-NC)由上海吉凯基因技术有限公司包装; DMEM、胎牛血清和PBS购自Hyclone公司、TRIzol购自Invitrogen公司、逆转录试剂盒购自美国Fermentas公司, 荧光定量PCR试剂盒购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司、DNA Marker购自广州东盛生物科技有限公司。Western blot及IP细胞裂解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)、BCA蛋白浓度测试试剂盒(增强型)、20×TBS缓冲液等均购自江苏碧云天生物技术研究所; 蛋白质预染Marker购自美国Fermentas(MBI)公司。PVDF膜购自美国Millipore公司。细胞周期检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司。细胞凋亡试剂盒AnnexinV-PE/7-AAD购自美国Beckman Coulter公司(No. 735618)。噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)均购自北京Solarbio科技有限公司。Giemsa染液(ECM550)购自美国Chemicon公司。MCM7和GAPDH引物由上海生工生物工程公司合成。兔抗人MCM7单克隆抗体购自美国Abcam公司, 鼠抗人GAPDH单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 近红外染料标记的二抗与Odyssey红外荧光成像仪购自美国LI-COR公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝癌细胞株SMMC-7721在37℃、5%CO₂条件下, 置于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM培养基中培养。细胞随机分3组: 实验组(LV-shRNA-MCM7慢病毒转染组, 有4个靶点)、阴性对照组(LV-shRNA-NC空载质粒组)和空白对照组(未转染组)。实验用细胞均处于对数生长期。

1.2.2 细胞转染: 转染过程按照吉凯公司转染说明书进行, 转染前12 h将对数生长期的人肝癌细胞系SMMC-7721接种于6孔板, 每孔种细胞数为 6×10^5 个/孔; 12 h后, 细胞融合率达到30%即进行转染; 转染的感染复数(multiplicity of infection, MOI)为30, 4个实验组中分别加入LV-shRNA-MCM7(1、2、3、4), 阴性对照组加入LV-shRNA-NC, 每组均设3个重复孔, 每孔均加入polybrene及感染增强液, 每孔液体总体积为1 mL, 继续在37℃、5%CO₂培养箱中培养, 并在荧光倒置显微镜下观察荧光表达阳性率。转染12 h后换含10%新生胎牛血清的高糖DMEM培养。转染84 h后荧光最强, 转染后4-5 d收获细胞。空白对照组细胞不做任何处理, 常规培养。

1.2.3 嘌呤霉素(puromycin)筛选稳定转染细胞株: 预实验确定嘌呤霉素抗性细胞的筛选浓度, 即药物处理48 h后SMMC-7721细胞全部死亡的最低药物浓度。转染48 h后每孔加入1 μg/mL的嘌呤霉素作用于细胞, 筛选稳定转染的细胞(实验过程中必须设置空细胞的加药组, 以确保药物的有效性), 转染96 h后换液弃掉未转染进的无嘌呤霉素抗性的细胞, 之后继续使用含0.1 μg/mL嘌呤霉素的培养基培养细胞, 维持病毒整合后的稳定性。

1.2.4 RT-PCR、实时荧光定量PCR检测MCM7基因的mRNA表达及筛选有效靶点序列: 应用Primer 5.0软件设计引物, MCM7上游引物: 5'-GTGGAGATGGCGAGAG-3', 下游引物: 5'-ATGGCTTCATTACATCTTC-3', 扩增片段146 bp; 内参GAPDH上游引物: 5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3', 下游引物: 5'-AC-CACCTGTTGCTGTAGCC-3', 扩增片段200 bp。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。TRIzol法分别提取6组细胞总RNA, 并逆转录为cDNA。设置反应条件为: 95℃预变性30 s; 95℃变性5 s, 60℃退火30 s, 共40个循环。同时扩增各个样本的目的基因和内参基因。每组细胞设计3个重复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析法, 通过GAPDH基因水平校正。Ct值为每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环按公式“ $\Delta CT = CT_{\text{平均值}}(\text{目的基因}) - CT_{\text{平均值}}(\text{内参基因})$ ”分别计算实验组、阴性对照组及空白对照组的 ΔCT , 以阴性对照组RNA的 ΔCT 作为参照, 再按公式“ $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{实验组}} - \Delta CT_{\text{阴性对照组}}$ ”, 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 即为MCM7 mRNA相对表达量。根据结果确定有效靶点序列并进行后续试验。

■ 相关报道

本课题组前期实验结果表明, MCM7不仅在人肝癌组织中高表达, 在大鼠和树鼩肝癌模型中亦呈高表达, 且发现MCM7蛋白表达与患者肝癌分期、转移及复发相关, 提示MCM7基因与肝癌的发生有关, MCM7极可能是肝癌发生发展中的关键作用分子。

■创新盘点

目前尚无MCM7基因沉默对肝癌细胞生长和增殖的影响的报道, 本实验利用慢病毒为载体, 采用慢病毒转染法将MCM7-shRNA转入人肝癌SMMC-7721细胞中, 探讨沉默MCM7表达对SMMC-7721细胞增殖和凋亡的影响。

1.2.5 Western blot检测MCM7蛋白表达: 提取各组细胞总蛋白, BCA法测定蛋白浓度, -80°C 保存备用。蛋白变性后每孔上样50 μg , 经10%SDS-PAGE胶上电泳, 100 mA电流条件下90 min转至PVDF膜, 用TBST配制5%脱脂牛奶封闭1 h, 用MCM7、GAPDH两张膜一抗 4°C 下孵育过夜(MCM7一抗稀释度为1:2000), 次日用TBST洗膜, 常温下孵育相应二抗(二抗稀释度均为1:10000)1 h, TBST洗膜5 min/次 \times 3次。采用Odyssey红外荧光成像仪对PVDF膜进行扫描, 获取图像, 并进行条带灰度值分析; 目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.2.6 MTT法分析细胞增殖: 将对数生长期的各组细胞接种于96孔板, 2×10^3 /孔, 每组细胞均做5个复孔; 分别于种板后24、48、72、96 h加入新鲜配制的MTT溶液(5 mg/mL)20 μL ; 4 h后, 吸弃上清, 每孔加入150 μL DMSO, 振荡器震荡10 min, 充分溶解紫色结晶。酶标仪测定各孔490 nm波长处吸光度(A)值, 取5个复孔的平均数, 绘制生长曲线。

1.2.7 Giemsa染色检测各组细胞的克隆形成: 取对数生长期细胞重悬, 将3组细胞以1000个/孔接种于6孔板, 每组设3个复孔, 置 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度的细胞培养箱中培养2 wk, 当6孔板中出现肉眼可见克隆时即终止培养, 弃培养液, PBS浸洗细胞2次, 甲醇固定15 min, 去固定液, Giemsa染色30 min, 冲去染色液, 室温下空气干燥, 在显微镜下计数含50个细胞以上的细胞克隆数。克隆形成率 = (每孔克隆数/每孔接种细胞数) \times 100%。

1.2.8 细胞周期检测: 取各组对数生长期细胞, 分别按 10^5 个/孔接种于6孔板中, 设置1个调机孔。各组细胞经胰酶消化后, 计数板计数细胞, 每管取 1×10^6 个细胞; 预冷的PBS洗细胞3次, 最后一次1000 r/min, 离心1 min, 去上清; 每管加入100 μL RNase, 37°C 水浴30 min; 每管再加入500 μL PI染液, 室温避光孵育30 min; 流式细胞仪上机检测, 实验重复3次。

1.2.9 细胞凋亡检测: 各组细胞经胰酶消化后, 每管取 1×10^6 个细胞, 预冷的PBS洗2次, 将细胞重悬于200 μL Binding Buffer中, 加2 μL Annexin V-PE, 小心混匀, 冰上避光孵育15 min。后加入100 μL Binding Buffer和1 μL 7-放线菌素D(7-aminoactinomycin D, 7-AAD), 2 h内上机检测细胞凋亡率。实验重复3次。

统计学处理 应用SPSS16.0统计软件进行分析, 计量资料采用mean \pm SD表示, 计量资料多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

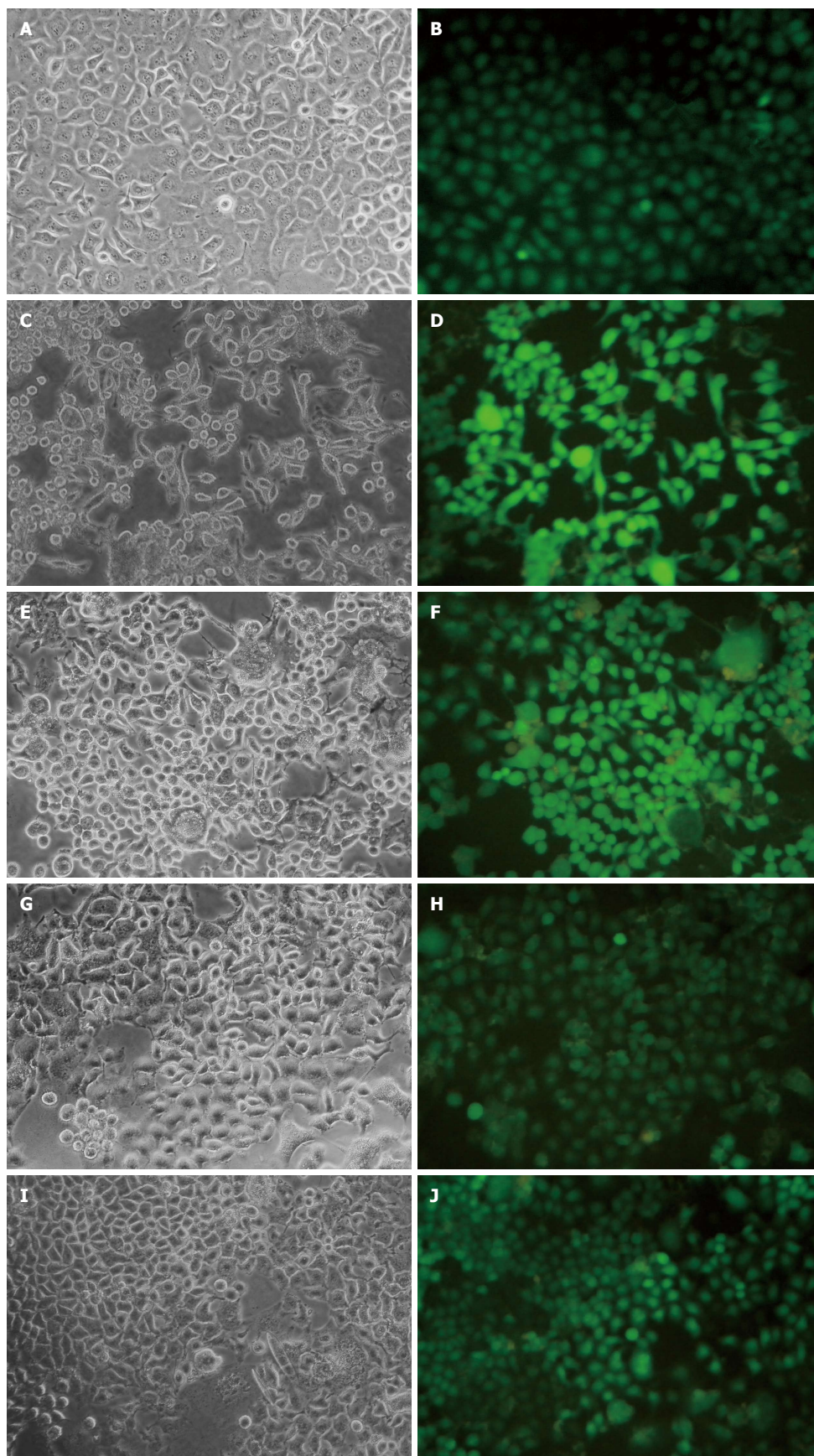
2 结果

2.1 荧光显微镜判断慢病毒感染SMMC-7721细胞效率 在MOI = 30的条件下, 4种慢病毒LV-shRNA-MCM7和阴性对照病毒LV-shRNA-NC感染SMMC-7721细胞, 48 h后加1 $\mu\text{g/mL}$ 的嘌呤霉素处理, 84 h后GFP(绿色荧光蛋白)表达率稳定增强, 荧光镜观察绿色荧光, 慢病毒感染效率 $>95\%$, 说明转染率 $>50\%$, 内源性靶点得到验证, 可进行实时定量PCR检测。如图1所示, 在含有不同干扰序列的慢病毒转染后, 各组SMMC-7721细胞GFP荧光显色均匀一致, GFP荧光蛋白表达强度无明显差别, 提示各组细胞的慢病毒感染效率一致。

2.2 MCM7 mRNA表达和有效靶点的筛选结果 采用RT-PCR、实时荧光定量PCR的方法检测目的基因MCM7 mRNA的表达情况, 进而判断不同靶点的干扰效果。4个靶点中, 相对NC组和空白对照组, 目的基因的表达水平下调均达50%以上, 其中以4号靶点敲减效率达88.95%和87.89%, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 所以LV-shRNA-MCM7(4)靶点是RNAi的最佳靶点。阴性对照组和空白对照组相比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1, 2, 图2)。

2.3 MCM7蛋白表达水平测定结果 以GAPDH为内参照, 4组LV-shRNA-MCM7组蛋白相对表达量相比阴性对照组相对表达量分别减少了63.54% \pm 0.84%、57.72% \pm 1.07%、66.98% \pm 0.57%、82.25% \pm 0.16%, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$), 均 $>50\%$, 并且通过数据可知LV-shRNA-MCM7(4)靶点是RNAi的最有效靶点, MCM7蛋白表达抑制率达82.25%。相对空白对照组, MCM7蛋白表达抑制率达81.63%($P < 0.05$)。阴性对照组和空白对照组相比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3, 4, 图3, 4)。

2.4 细胞增殖活性判定 与空白对照组和阴性对照组相比, 实验组细胞490 nm处的A值在转染后24、48、72和96 h时均较低, 且差异均有统计学意义(0.49 ± 0.07 vs 0.60 ± 0.03 , 0.57 ± 0.03 , $F = 8.97$; 0.80 ± 0.12 vs 1.03 ± 0.05 , 1.02 ± 0.09 , $F = 10.55$; 1.05 ± 0.06 vs 1.37 ± 0.05 , 1.34 ± 0.03 , $F = 33.49$; 1.19 ± 0.07 vs 1.94 ± 0.03 , 1.87 ± 0.08 , $F =$



■应用要点

本研究结果表明, MCM7 RNA干扰后肝癌细胞周期进程得到有效阻滞, 凋亡大幅增加, 可明显抑制肝癌生长增殖功能. MCM7基因有可能成为肝癌基因治疗的一个有效靶点.

图 1 shRNA慢病毒感染SMMC-7721细胞(84 h, $\times 200$). A, B: LV-shRNA-MCM7(1)病毒载体感染的SMMC-7721细胞; C, D: LV-shRNA-MCM7(2)病毒载体感染的SMMC-7721细胞; E, F: LV-shRNA-MCM7(3)病毒载体感染的SMMC-7721细胞; G, H: LV-shRNA-MCM7(4)病毒载体感染的SMMC-7721; I, J: LV-shRNA-NC病毒载体感染的SMMC-7721细胞.

■名词解释

MCM7: 微小染色体维持蛋白家族是一类在真核生物广泛存在的高度保守的蛋白质, 在真核细胞的复制起始和延伸中发挥着重要的作用。MCM7作为MCM复合体的组成成分之一, 与其他MCM蛋白形成多聚体, 保证了DNA在一个细胞周期只复制一次。RNA干扰(RNA interference, RNAi): 在进化过程中高度保守的、由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象。由于使用RNAi技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达, 所以该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。

表 1 各靶点序列

各靶点序号	靶点序列
LV-shRNA-MCM7(1)	5'-GGAGAAAGAAGATGTGAAT-3'
LV-shRNA-MCM7(2)	5'-TAGTAAGGATGCCACCTAT-3'
LV-shRNA-MCM7(3)	5'-GGCATGAAGATGTGAAGAA-3'
LV-shRNA-MCM7(4)	5'-GGACTCAATTTGTGAGAAT-3'
NC(Negative Control)	5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'

MCM7: 微小染色体维持蛋白7。

表 2 各组细胞MCM7 mRNA相对表达量

分组	MCM7 mRNA相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Control	0.989 ± 0.380
LV-shRNA-NC	1.005 ± 0.126
LV-shRNA-MCM7(1)	0.500 ± 0.180
LV-shRNA-MCM7(2)	0.485 ± 0.130
LV-shRNA-MCM7(3)	0.460 ± 0.263
LV-shRNA-MCM7(4)	0.110 ± 0.022

MCM7: 微小染色体维持蛋白7。

表 3 各组MCM7蛋白相对表达量(MCM7/GAPDH条带灰度值)

分组	MCM7蛋白相对表达量
Control	1.29 ± 0.02
LV-shRNA-NC	1.33 ± 0.01
LV-shRNA-MCM7(1)	0.49 ± 0.01
LV-shRNA-MCM7(2)	0.56 ± 0.01
LV-shRNA-MCM7(3)	0.44 ± 0.00
LV-shRNA-MCM7(4)	0.24 ± 0.00

MCM7: 微小染色体维持蛋白7。

216.24, 均 $P<0.05$). 由此可见, 实验组细胞生长明显受到抑制(表5, 图5)。

2.5 各组细胞克隆的影响比较 Giemsa染色法检测结果表明, 各组细胞克隆形成数不相等, 但LV-shRNA-MCM7组较空白对照组、阴性对照组均有所减少。LV-shRNA-MCM7组的克隆形成率($6.00\% \pm 0.50\%$)与空白对照组($14.10\% \pm 0.36\%$)、阴性对照组($13.73\% \pm 0.17\%$)比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 空白对照组与阴性对照组比较($P>0.05$), 差异无统计学意义(图6, 7)。

2.6 流式细胞术检测细胞周期 与阴性对照组和空白对照组相比, LV-shRNA-MCM7组SMMC-7721细胞G₁期比例明显增多($71.13\% \pm 0.31\%$ vs $49.9\% \pm 0.64\%$, $50.97\% \pm 1.16\%$, $F =$

表 4 各组相对LV-shRNA-NC组蛋白表达抑制率(% , mean ± SD)

分组	相对LV-shRNA-NC组蛋白表达抑制率
Control	3.38 ± 1.72
LV-shRNA-NC	0.00 ± 1.01
LV-shRNA-MCM7(1)	63.54 ± 0.84
LV-shRNA-MCM7(2)	57.72 ± 1.07
LV-shRNA-MCM7(3)	66.98 ± 0.57
LV-shRNA-MCM7(4)	82.25 ± 0.16

MCM7: 微小染色体维持蛋白7。

697.87, $P<0.05$). 相比阴性对照组和空白对照组, 实验组G₂期细胞比例明显减少($26.6\% \pm 0.30\%$ vs $37.7\% \pm 1.98\%$, $38.53\% \pm 2.69\%$, $F = 14.152$, 均 $P<0.05$), 同时实验组S期细胞比例也较阴性对照组和空白对照组明显减少($2.28\% \pm 0.06\%$ vs $12.5\% \pm 2.72\%$, $10.51\% \pm 3.16\%$, $F = 46.164$, $P<0.05$). LV-shRNA-MCM7组SMMC-7721细胞G₁期比例增高, S期比例降低($P<0.05$). 阴性对照组和空白对照组比较差异无统计学意义(表6, 图8, 9)。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 检测结果表明, LV-shRNA-MCM7组SMMC-7721细胞凋亡率为 $22.27\% \pm 1.22\%$, 明显高于阴性对照组($0.05\% \pm 0.07\%$)和空白对照组($0.03\% \pm 0.06\%$), 差异均有统计学意义($P<0.05$). 阴性对照组和空白对照组上述指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)(图10)。

3 讨论

MCM家族是一类在真核生物广泛存在的高度保守的蛋白质, 被认为是复制准许因子(replication licensing factor, RLF)中的一个重要成员, 在真核细胞的复制起始和延伸中发挥着重要的作用。MCM7作为MCM复合体的成分之一, 与其他MCM蛋白形成多聚体, 保证了DNA在一个细胞

表 5 3组细胞不同时点细胞活力的比较(mean ± SD)

分组	24 h	48 h	72 h	96 h
实验组	0.49 ± 0.07 ^a	0.80 ± 0.12 ^a	1.05 ± 0.06 ^a	1.19 ± 0.07 ^a
空白对照组	0.60 ± 0.03	1.03 ± 0.05	1.37 ± 0.05	1.94 ± 0.03
阴性对照组	0.57 ± 0.03	1.02 ± 0.09	1.34 ± 0.03	1.87 ± 0.08

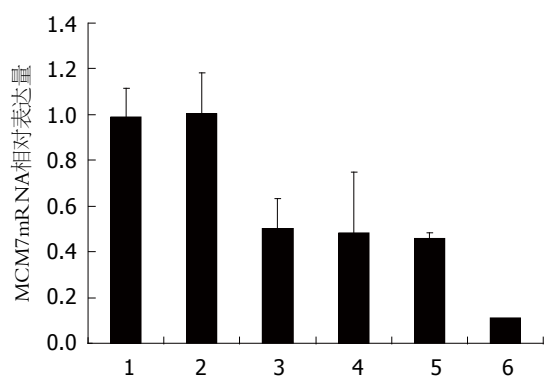
^aP<0.05 vs 空白对照组。

图 2 各组细胞MCM7mRNA相对表达量。1: Control; 2: LV-shRNA-NC; 3: LV-shRNA-MCM7-1; 4: LV-shRNA-MCM7-2; 5: LV-shRNA-MCM7-3; 6: LV-shRNA-MCM7-4。MCM7: 微小染色体维持蛋白7。

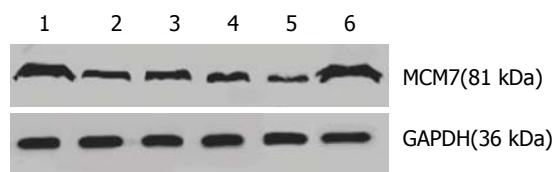


图 3 Western blot检测各组细胞中MCM7蛋白的表达。1: 空白对照组; 2: LV-shRNA-MCM7(1)组; 3: LV-shRNA-MCM7(2)组; 4: LV-shRNA-MCM7(3)组; 5: LV-shRNA-MCM7(4)组; 6: LV-shRNA-NC组。MCM7: 微小染色体维持蛋白7。

周期只复制一次, 是细胞周期调控、转录和细胞增殖重要的调节因子^[4], 其在DNA复制调控中的重要作用也越来越引起人们的关注。MCM7基因组序列中的微小RNA簇(microRNAs)可下调多个抑癌因子及凋亡因子的表达^[5]。有研究发现, MCM7和MCM复合体上有多个潜在的磷酸化位点, 其自身或者靶蛋白磷酸化在DNA复制过程中起重要作用^[6,7], RACK1参与并促进MCM7蛋白的磷酸化, 并使进入S期的细胞增多, 促进细胞增殖和克隆形成^[8]。此外还有研究报道, MCM7蛋白在TGF-β抑癌通路中起关键作用, Rb与MCM7相互结合可抑制DNA的复制, 而肿瘤的抑制因子TGF-β1可在细胞周期G₁晚期到S期, 通过阻止Rb与MCM7分离而阻滞细胞周期从而发挥抑制肿瘤的作用, 若Rb丢失或MCM7过表

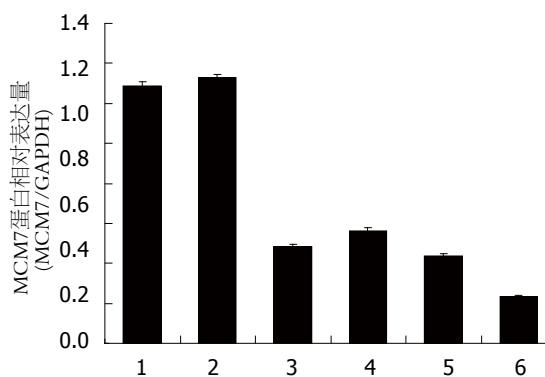


图 4 各组MCM7蛋白相对表达量(MCM7/GAPDH条带灰度值)。1: Control; 2: LV-shRNA-NC; 3: LV-shRNA-MCM7-1; 4: LV-shRNA-MCM7-2; 5: LV-shRNA-MCM7-3; 6: LV-shRNA-MCM7-4。MCM7: 微小染色体维持蛋白7。

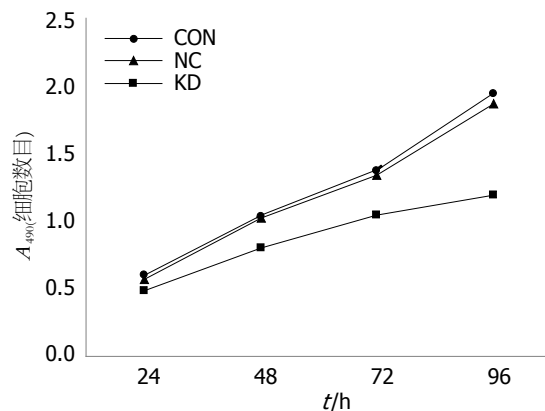


图 5 各组细胞生长曲线。KD: 实验组; CON: 空白对照组; NC: 阴性对照组。

达均可取消TGF-β1的作用, 从而失去其抑癌功能, 导致细胞进入异常的增殖周期, 进而促进肿瘤的进展^[9]。

目前研究发现, MCM7在众多肿瘤中异常表达, 如在乳腺癌、肺癌、霍奇金淋巴瘤和结肠癌中高表达^[10-13], 与肿瘤发生发展密切相关。有研究报道, MCM7蛋白在人肝癌组织中呈高表达, 对术后预测等有重要的意义^[14,15]。本课题组前期实验结果表明, MCM7蛋白不仅在人肝癌组织中高表达, 在大鼠和树鼯肝癌模型中亦呈高

■同行评价

本文选题新颖, 方法科学, 通过RNA干扰抑制肝癌细胞系中MCM7的表达, 同时检测对细胞增殖、细胞克隆形成及细胞周期的影响, 结果能客观的支持研究的结论。对MCM7在肝癌细胞生长中的作用研究有非常重要的理论价值。

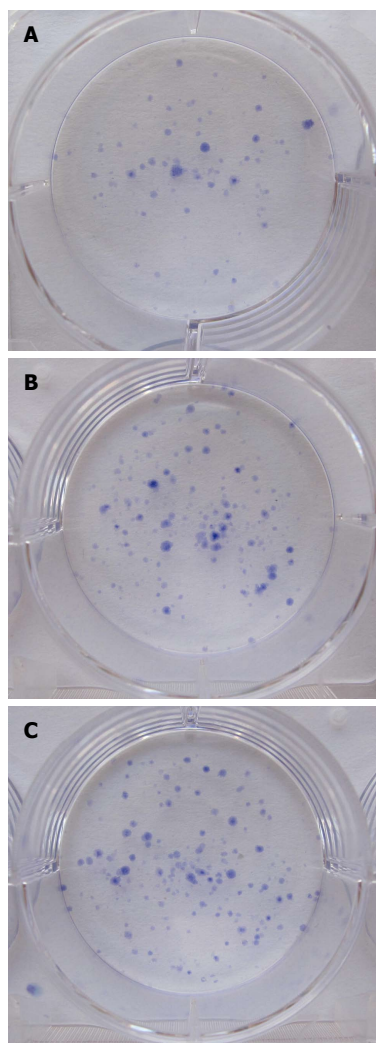


图 6 各组细胞克隆形成的比较. A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组.

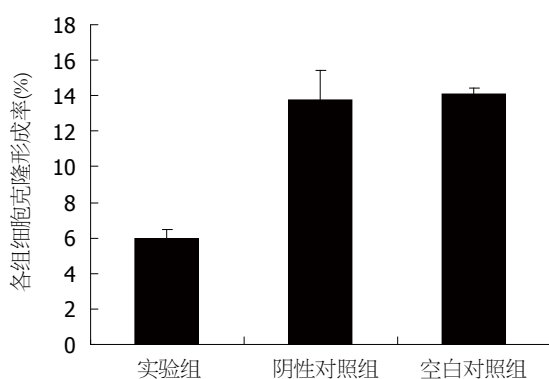


图 7 各组细胞克隆形成的比较.

表达, MCM7极可能是肝癌发生发展中的关键作用分子.

已有研究表明, 在非小细胞肺癌中, MCM7可作为一个潜在的肿瘤治疗靶点^[16], 通过特异性的小干扰RNA(siRNAs)抑制溴尿嘧啶的整合从而抑制MCM7的表达, 可明显抑制肺癌细胞的

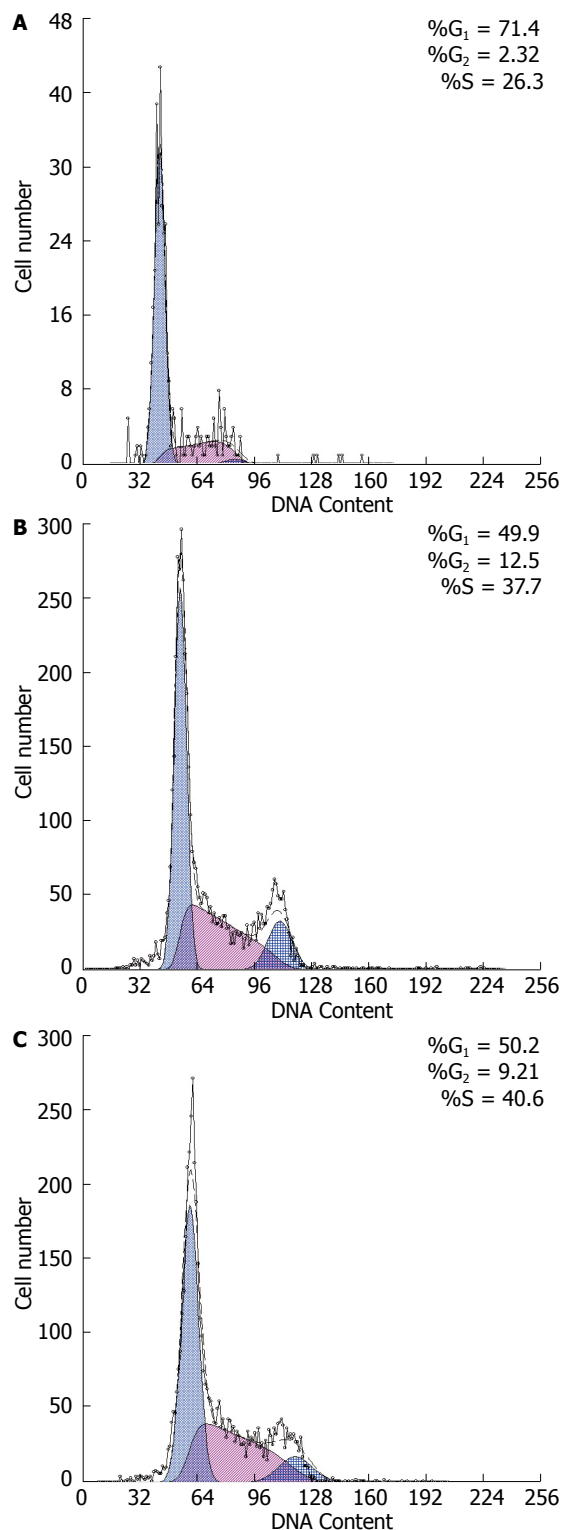


图 8 流式细胞术检测各组细胞的周期. A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组.

生长. 目前尚无MCM7基因沉默对肝癌细胞生长和增殖的影响的报道, 本实验利用慢病毒为载体, 采用慢病毒转染法将MCM7-shRNA质粒转入人肝癌SMMC-7721细胞中, 探讨沉默MCM7表达对SMMC-7721细胞增殖和凋亡的影响.

本实验中我们设计和合成了MCM7小分子

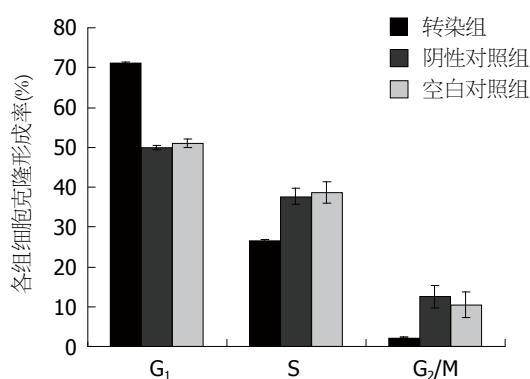


图9 各组细胞周期比例。

表6 各组细胞周期比较(% , mean ± SD)

分组	G ₁ 期	G ₂ 期	S期
实验组	71.13 ± 0.31	26.60 ± 0.30	2.28 ± 0.06
阴性对照组	49.90 ± 0.64	37.70 ± 1.98	12.50 ± 2.72
空白对照组	50.97 ± 1.16	38.53 ± 2.69	10.51 ± 3.16

干扰RNA, 将其转染进入人肝癌SMMC-7721细胞中后, 通过Western blot和RT-PCR结果显示, 实验组的四种靶点MCM7-shRNA干扰序列中, 和阴性对照组和空白对照组比较, *MCM7* mRNA和MCM7蛋白的表达水平下调均达50%以上, 其中以4号靶点敲减效率最高, 分别达88.95%、87.89%和82.25%、81.63%。所以LV-shRNA-MCM7(4)靶点是RNAi的最佳靶点。说明慢病毒转染成功, 并且MCM7-shRNA慢病毒载体能有效的下调SMMC-7721细胞MCM7的表达。

流式细胞术检测发现, 与阴性对照组和空白对照组比较, 实验组细胞主要处于G₁期, 处于S期的细胞所占比例明显减少, 且实验组凋亡率明显增加。MTT法检测结果显示实验组细胞增殖活力明显弱于空白对照组和阴性对照组。同时Giemsa染色法试验结果显示实验组细胞克隆形成率明显低于空白对照组和阴性对照组, 与流式细胞术和MTT法检测结果相符。提示可能是MCM7直接或间接的参与到肝癌细胞周期的调控, 使细胞分裂停滞在G₁期附近, 进而抑制肝癌细胞的增殖。

因此, 本研究结果表明, MCM7 RNA干扰后肝癌细胞周期进程得到有效阻滞, 凋亡大幅增加, 可明显抑制肝癌生长增殖功能。MCM7基因有可能成为肝癌基因治疗的一个有效靶点。

4 参考文献

1 Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer.

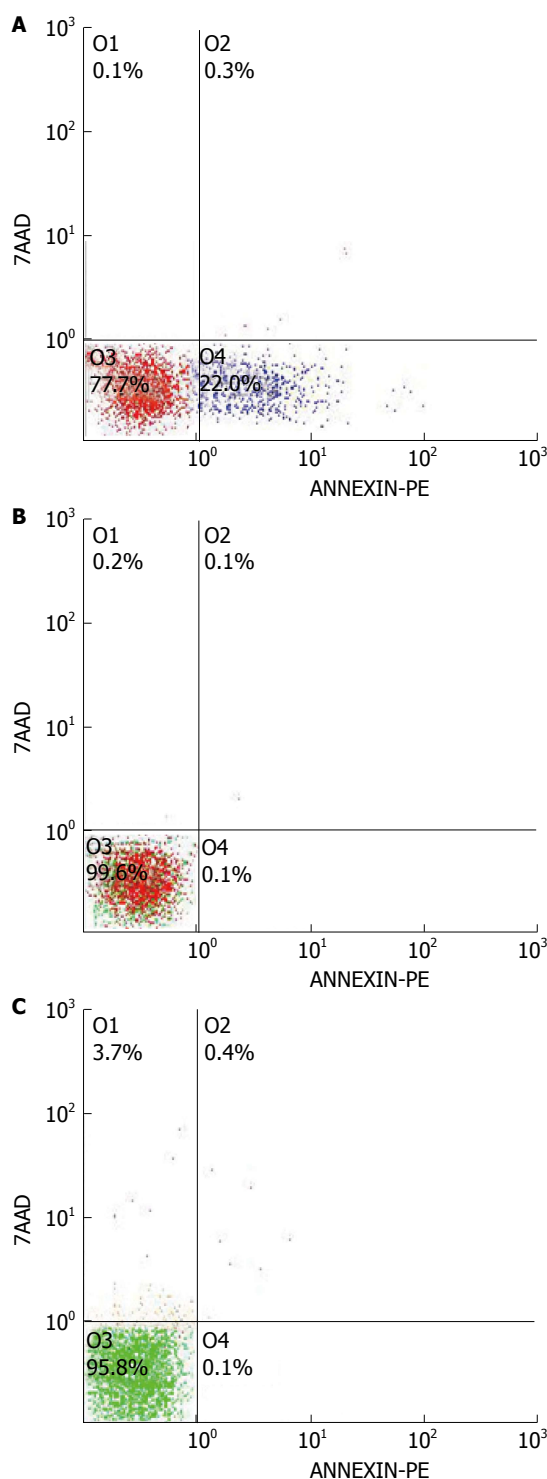


图10 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率。A: 实验组; B: 阴性对照组; C: 空白对照组。

J Pathol 2012; 226: 352-364 [PMID: 21990031 DOI: 10.1002/path.3022]

2 Walters AD, Chong JP. Methanococcus maripaludis: an archaeon with multiple functional MCM proteins? *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 1-6 [PMID: 19143592 DOI: 10.1042/BST0370001]

3 朱伶群, 杨春, 秦虹, 卢晓旭, 李瑗, 欧超, 苏建家, 曹骥. MCM7蛋白在人大鼠树鼩肝癌组织中的表达和意义. *中国肿瘤临床* 2013; 40: 951-955

4 Nowińska K, Dziągł P. [The role of MCM proteins

- in cell proliferation and tumorigenesis]. *Postepy Hig Med Dosw* (Online) 2010; 64: 627-635 [PMID: 21160097]
- 5 Luo JH. Oncogenic activity of MCM7 transforming cluster. *World J Clin Oncol* 2011; 2: 120-124 [PMID: 21603321 DOI: 10.5306/wjco.v2.i2.120]
- 6 Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 2001; 114: 1447-1454 [PMID: 11282021]
- 7 Kudoh A, Daikoku T, Ishimi Y, Kawaguchi Y, Shirata N, Iwahori S, Isomura H, Tsurumi T. Phosphorylation of MCM4 at sites inactivating DNA helicase activity of the MCM4-MCM6-MCM7 complex during Epstein-Barr virus productive replication. *J Virol* 2006; 80: 10064-10072 [PMID: 17005684 DOI: 10.1128/JVI.00678-06]
- 8 李墨, 吴非, 张恒, 韩艳玲, 刘俊, 陈小龙, 韩昱晨. RACK1通过影响MCM7磷酸化促进肺癌细胞的增殖. *肿瘤* 2012; 3: 149-158
- 9 Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicolo-so MS, de Martino I, Iliopoulos D, Pilozzi E, Liu CG, Negrini M, Cavazzini L, Volinia S, Alder H, Ruco LP, Baldassarre G, Croce CM, Vecchione A. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 272-286 [PMID: 18328430 DOI: 10.1016/j.ccr.2008.02.013]
- 10 任占平, 石喆, 杜娟, 陈蔚麟, 唐德艳, 戴文斌. 乳腺癌组织中HPV16 18E6及p53 MCM7蛋白的表达及意义. *中国肿瘤临床* 2008; 35: 327-331
- 11 Fujioka S, Shomori K, Nishihara K, Yamaga K, Nosaka K, Araki K, Haruki T, Taniguchi Y, Nakamura H, Ito H. Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): Prognostic implication. *Lung Cancer* 2009; 65: 223-229 [PMID: 19144445 DOI: 10.1016/j.lungcan.2008.11.007]
- 12 Marnerides A, Vassilakopoulos TP, Boltetsou E, Levidou G, Angelopoulou MK, Thymara I, Kyrtsonis MC, Pappi V, Tsopra O, Panayiotidis P, Pangalis GA, Beris P, Patsouris E, Korkolopoulou P. Immunohistochemical expression and prognostic significance of CCND3, MCM2 and MCM7 in Hodgkin lymphoma. *Anticancer Res* 2011; 31: 3585-3594 [PMID: 21965782]
- 13 Nishihara K, Shomori K, Fujioka S, Tokuyasu N, Inaba A, Osaki M, Ogawa T, Ito H. Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: implication of prognostic significance. *Int J Oncol* 2008; 33: 245-251 [PMID: 18636144]
- 14 刘娟, 殷飞, 姚树坤. 细胞周期素D1, 视网膜母细胞瘤样蛋白2及微小染色体维持蛋白7在肝细胞癌中的表达及对预后的意义. *中国病理生理杂志* 2011; 27: 304-309
- 15 Zhou YM, Zhang XF, Cao L, Li B, Sui CJ, Li YM, Yin ZF. MCM7 expression predicts post-operative prognosis for hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2012; 32: 1505-1509 [PMID: 22784096 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2012.02846.x]
- 16 Toyokawa G, Masuda K, Daigo Y, Cho HS, Yoshimatsu M, Takawa M, Hayami S, Maejima K, Chino M, Field HI, Neal DE, Tsuchiya E, Ponder BA, Maehara Y, Nakamura Y, Hamamoto R. Minichromosome Maintenance Protein 7 is a potential therapeutic target in human cancer and a novel prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 2011; 10: 65 [PMID: 21619671 DOI: 10.1186/1476-4598-10-65]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



As₂O₃对体外肠癌细胞HCT116生长和增殖周期的影响

蔡朋朋, 冯越, 王东红, 周艳, 孙丽慧, 李晶

蔡朋朋, 王东红, 周艳, 齐齐哈尔医学院附属三院消化科 黑龙江省齐齐哈尔市 161000

冯越, 齐齐哈尔医学院 黑龙江省齐齐哈尔市 161000

孙丽慧, 齐齐哈尔医学院组胚教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161000

李晶, 齐齐哈尔医学院附属三院药剂科 黑龙江省齐齐哈尔市 161000

蔡朋朋, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤化疗的研究。

黑龙江省教育厅基金资助项目, No. 12521634

黑龙江省大学生创新创业训练基金资助项目, No.

201311230020

作者贡献分布: 蔡朋朋与王东红进行细胞培养、论文的撰写, 以及统筹管理; 冯越进行数据分析处理; 周艳负责MTT测定细胞生长; 孙丽慧与李晶进行流式细胞术和技术咨询。

通讯作者: 蔡朋朋, 主治医师, 161000, 黑龙江省齐齐哈尔市铁锋区太顺街, 齐齐哈尔医学院附属三院消化科。

villain789@sohu.com

收稿日期: 2013-06-27 修回日期: 2013-12-15

接受日期: 2013-12-27 在线出版日期: 2014-02-08

Effect of arsenic trioxide on growth and cell cycle progression in colon cancer cell line HCT116

Peng-Peng Cai, Yue Feng, Dong-Hong Wang, Yan Zhou, Li-Hui Sun, Jing Li

Peng-Peng Cai, Dong-Hong Wang, Yan Zhou, Department of Digestive Medicine, the third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar 161000, Heilongjiang Province, China

Yue Feng, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161000, Heilongjiang Province, China

Li-Hui Sun, Department of Histology, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161000, Heilongjiang Province, China

Jing Li, Department of Pharmacy, the third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar 161000, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Heilongjiang Provincial Education Office Project, No. 12521634; the Heilongjiang Provincial College Student Innovation Training Project, No. 201311230020

Correspondence to: Peng-Peng Cai, Attending Physician, Department of Digestive Medicine, the third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Taishun Street, Tiefeng District, Qiqihar 161000, Heilongjiang Province, China. villain789@sohu.com

Received: 2013-06-27 Revised: 2013-12-15

Accepted: 2013-12-27 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To study the effect of arsenic trioxide (As₂O₃) on cell growth and cell cycle progression in human colon carcinoma cell line HCT116.

METHODS: HCT116 cells cultured *in vitro* were divided into a control group, a 0.5 μmol/L As₂O₃ group, a 1.5 μmol/L As₂O₃ group, and a 2.5 μmol/L As₂O₃ group. After treatment with As₂O₃ for different durations, the effect of different concentrations of arsenic trioxide on the growth of colon cancer cells was detected by MTT assay. Cell growth curve was plotted to observe the change in cell proliferation. Flow cytometry (FCM) was used to determine cell cycle progression.

RESULTS: Low dose of As₂O₃ (0.5 μmol/L) had no significant inhibitory effect on HCT116 cells compared with the control group ($P > 0.05$), but 1.5 and 2.5 μmol/L of As₂O₃ showed a significant inhibitory effect on cell growth in a time-dependent manner ($38.64\% \pm 0.16\%$, $51.42\% \pm 0.53\%$ vs $8.35\% \pm 0.76\%$, $P < 0.05$ for both). In the 1.5 μmol/L As₂O₃ group, the inhibitory effect was most obvious on day 3, then gradually declined; however, such a downward trend was not observed in the 2.5 μmol/L As₂O₃ group ($52.93\% \pm 1.53\%$). FCM analysis showed that As₂O₃ at a concentration of 0.5 μmol/L had no significant effect on the percentages of cells in S phase and G₂/M phase ($35.58\% \pm 0.63\%$ vs $25.69\% \pm 1.46\%$; $33.41\% \pm 0.73\%$ vs $30.44\% \pm 1.51\%$, $P > 0.05$ for both). However, As₂O₃ at concentrations of 1.5 μmol/L and 2.5 μmol/L significantly increased the percentages of cells in S phase but decreased the percentages of cells in G₂/M phase (1.5 μmol/L: $42.69\% \pm 2.64\%$ and $22.46\% \pm 0.59\%$; 2.5 μmol/L: $45.71\% \pm 1.53\%$ and $14.66\% \pm 0.92\%$; $P < 0.05$ for all).

CONCLUSION: Arsenic trioxide has an obvious inhibitory effect on the proliferation of HCT116 cells, mainly by inhibiting the synthesis of DNA in the proliferation stage. The effective dose and treatment time are important in clinical application of As₂O₃ for cancer chemotherapy in order to improve the effect of chemotherapy, reduce toxicity reactions and delay the occurrence of drug resistance.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

■背景资料

三氧化二砷(As₂O₃)是中药砒霜石的主要成分, 他能够通过多种调节因子抑制细胞DNA和RNA合成、干扰细胞代谢、使细胞染色体畸变, 可引起多种肿瘤细胞多种基因的表达改变, 其抗肿瘤作用得到广泛关注, 同时其不良反应是临床必须注意的事情, 其不良反应产生的重要原因之一是剂量过大和化疗时间窗未控制好, 目前As₂O₃对肠癌细胞的化疗效果和和不良反应, 尚缺乏足够的实验资料, 本研究应用MTT法观察As₂O₃对人低分化结肠腺癌细胞株HCT-116的抑制情况, 以及流式细胞仪观察细胞周期变化, 探讨As₂O₃对肠癌细胞化疗的适宜剂量和化疗时间窗, 以便临床更合理应用减轻其不良反应。

■同行评议者

白雪, 副主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院普外科

■ 研究前沿

1971年哈尔滨医科大学第一临床医学院率先用三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病取得成功以后,砷剂成为国际血液、肿瘤界研究的新热点。近年来的研究证实,As₂O₃抗肿瘤机制是多途径、多靶点的,其应用于肿瘤的治疗从体外观察、建立动物模型在体实验到最后临床试验均取得了一定疗效,研究各种细胞通路和信号传导机制,探索其治疗作用及抗肿瘤机制,为开辟三氧化二砷新的治疗作用提供参考,但其具体抗肿瘤机制,尤其是其不良反应是临床应该考虑的问题,有待进一步研究。

Key Words: Arsenic trioxide; HCT116 cells; Inhibition rate; Cell cycle

Cai PP, Feng Y, Wang DH, Zhou Y, Sun LH, Li J. Effect of arsenic trioxide on growth and cell cycle progression in colon cancer cell line HCT116. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 563-567 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/563.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.563>

摘要

目的: 研究三氧化二砷(As₂O₃)对人体外肠癌细胞HCT116的生长抑制作用和增殖周期的影响。

方法: 肠癌细胞HCT116进行体外培养后,分成对照组、0.5 μmol/L As₂O₃组、1.5 μmol/L As₂O₃组、2.5 μmol/L As₂O₃组,在不同时间段内,MTT法观察不同浓度As₂O₃对肠癌细胞的生长抑制情况,绘制细胞生长曲线;流式细胞术分析细胞增殖的周期变化。

结果: MTT结果显示0.5 μmol/L的低剂量As₂O₃抑制率与对照组无明显差别($P>0.05$),1.5 μmol/L As₂O₃组抑制率和2.5 μmol/L As₂O₃组抑制率与对照组相比较,组间均有差异($P<0.05$),且As₂O₃对肿瘤细胞的抑制作用均随时间延长而增强,并在第3天时抑制作用最明显(1.5 μmol/L As₂O₃组抑制率为38.64%±0.16%,2.5 μmol/L As₂O₃组抑制率为51.42%±0.53%,对照组是8.35%±0.76%),然后第4天有下降的趋势,但2.5 μmol/L As₂O₃的抑制作用第4天未见明显下降趋势(抑制率为52.93%±1.53%);流式细胞术分析表明,As₂O₃为0.5 μmol/L时,S期细胞分布35.58%±0.63%(对照组25.69%±1.46%),G₂/M期细胞分布33.41%±0.73%(对照组30.44%±1.51%)两者比较没有统计学差异($P>0.05$),当As₂O₃浓度为1.5 μmol/L时,S期细胞占42.69%±2.64%,G₂/M期细胞占22.46%±0.59%,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$);药物提高到2.5 μmol/L时,S期细胞占45.71%±1.53%,G₂/M期细胞占14.66%±0.92%,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

结论: As₂O₃对人体外肠癌细胞HCT116具有明显的抑制作用,主要抑制肿瘤细胞DNA合成的增殖期,且至少1.5 μmol/L以上的As₂O₃浓度才能达到抑制肿瘤增长繁殖的效果,所以临床应用As₂O₃进行肠癌化疗时应掌握好有效的剂量浓度和化疗时间窗,从而提高化疗效果的同时最大减轻不良反应,延缓耐药性的发生。

关键词: 三氧化二砷; 肠癌细胞HCT116; 抑制率; 细胞周期

核心提示: 本文研究了As₂O₃对人肠癌细胞HCT116的生长抑制作用和增殖周期的影响。发现As₂O₃对肠癌细胞HCT116具有明显的抑制作用,主要抑制在DNA合成的增殖期,且至少1.5 μmol/L以上的As₂O₃才有效,故As₂O₃进行肠癌化疗时应掌握好剂量浓度和化疗时间窗。

蔡朋朋, 冯越, 王东红, 周艳, 孙丽慧, 李晶. As₂O₃对体外肠癌细胞HCT116生长和增殖周期的影响. *世界华人消化杂志* 2014; 22(4): 563-567 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/563.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.563>

0 引言

大肠癌为我国常见的消化系统恶性肿瘤之一,而且发病率近年有逐年上升的趋势,流行病学表明,全球大肠癌每年新发病例数达94万例,每年近50万例死于大肠癌,大肠癌死亡居癌症死因第3位,在我国大肠癌也是最常见的恶性肿瘤之一,目前居恶性肿瘤发病率第4位,5年生存率为60%左右^[1,2]。大肠癌的发病与生活方式改变及膳食结构不合理密切相关,患者就诊时往往已到了晚期并发生转移,失去了手术的机会,化疗成为重要的治疗手段,但一定要密切注意化疗药物的不良反应,祖国传统医学治疗肿瘤有着悠久的历史,三氧化二砷(As₂O₃)是中药砒霜石的主要成分,他能够通过多种调节因子抑制细胞DNA和RNA合成、干扰细胞代谢、可引起肿瘤细胞多种基因的表达改变^[3-5],其抗肿瘤作用得到广泛关注,但其应用于临床最大担心就是其不良反应,而不良反应产生的重要原因之一是剂量过大和化疗时间窗没控制好,目前As₂O₃对肠癌细胞的化疗效果和不良反应,尚缺乏足够的实验资料,本研究应用MTT比色法和流式细胞术观察As₂O₃对肠腺癌细胞株HCT116的生长和增殖的影响,探讨As₂O₃对肠癌细胞化疗的适宜剂量和化疗时间窗,以便临床更合理应用减轻其不良反应。

1 材料和方法

1.1 材料 As₂O₃注射液购自哈尔滨伊达药业有限公司, RPMI 1640和胎牛血清由Gibco/BRL美国公司提供, MTT由上海华舜生物有限公司生产, 肠癌细胞HCT-116由哈尔滨医科大学附属第一医院提供, 超纯水仪Purelabplus公司生产, 恒温

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

培养箱, 由苏州安泰技术有限公司生产, CO₂培养箱购自日本SANYO公司, OLYMPUS(IX50-S8F2)倒置显微镜和酶标仪(SAFIRE2)由奥地利生产, PI试剂盒购北京宝赛公司, 流式细胞仪(FACS Calibur)美国BD公司生产.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 复苏后的HCT116细胞接种于50 mL培养瓶中, 加入RPMI 1640培养液(含热灭活胎牛血清, 2 g/L NaHCO₃, 青霉素和链霉素各100 mg/L)中, 置于37 °C、5%CO₂浓度及饱和湿度的恒温细胞培养箱中培养, 细胞为贴壁上皮样生长, 用0.15%胰蛋白酶消化传代, 以培养液吹打制成单细胞悬液, 取对数生长期细胞用于实验.

1.2.2 分组及药物处理: 将 5×10^4 个/mL单细胞悬液接种于96孔培养板中, 分组为: 阴性对照组加入10%的完全培养液, 实验低剂量组加入0.5 μmol/L的As₂O₃, 中剂量组加1.5 μmol/L As₂O₃, 高剂量组加2.5 μmol/L的As₂O₃培养液, 每隔3 d更换一次培养液, 在不同时间取出培养细胞用于实验.

1.2.3 MTT比色法测定细胞生长抑制率: 96孔培养板内加入 5×10^4 个/mL单细胞悬液, 3 °C, 5%CO₂孵箱中培养24 h, 24 h后弃去培养液, 分别加入不同浓度的As₂O₃(浓度同前)培养液200 μL/孔, 同一浓度设3复孔, 同时设3孔阴性对照, 加入等体积的PBS, 放入37 °C、5%CO₂培养箱中培养, 分别培养1、2、3和4 d后, 各取出一个培养板, 吸去上清液, 每孔加入无血清的培养液180 μL及20 μL MTT液(用PBS配成50 mg/mL), 37 °C孵育4 h, 弃去上清液, 每孔加入150 μL DMSO, 在微量振荡器上低速振荡10 min, 酶标仪测量各孔的吸光度(A)值, 按公式抑制率 = $(1 - A_{\text{用药组}} / A_{\text{细胞对照组}}) \times 100\%$ 计算, 以横轴为时间, 纵轴为抑制率绘制细胞生长曲线.

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期: 收集分别经不同浓度的As₂O₃(浓度同前)混合培养液处理的细胞, 培养72 h(上述MTT研究显示, 药物第3天作用最强)后取出, 0.15%胰酶消化, 空白对照管加等量培养液, 1000 r/min离心10 min, 弃上清液, 冷PBS漂洗后震荡, 使细胞悬浮以去除细胞碎片, 调整细胞数为 5×10^5 – 10×10^5 个/mL, 4 °C离心10 min, 弃上清液, 加入预冷的700 mL/L乙醇固定, 碘化丙啶(propidium iodide, PI)单染, 上机检测细胞周期, 软件分析细胞周期分布.

统计学处理 使用SPSS12.0进行软件分析, 数据以mean ± SD表示, 组间比较用*t*检验,

P < 0.05为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 MTT 所设3个浓度的As₂O₃, 其中0.5 μmol/L的低剂量As₂O₃抑制率与对照组无明显差别(*P* > 0.05); 1.5 μmol/L As₂O₃组抑制率和2.5 μmol/L As₂O₃组抑制率与对照组相比较, 组间均有差异(*P* < 0.05), 且As₂O₃对肿瘤细胞的抑制作用均随时间延长而增强, 并在第3天时抑制作用最明显(1.5 μmol/L As₂O₃组抑制率为38.64% ± 0.16%, 2.5 μmol/L As₂O₃组抑制率为51.42% ± 0.53%, 对照组是8.35% ± 0.76%), 然后第4天有下降的趋势, 但2.5 mol/L As₂O₃的抑制作用未见明显下降趋势(抑制率为52.93% ± 1.53%)(图1).

2.2 流式细胞仪分析细胞周期 肠癌HCT116经过不同浓度的As₂O₃作用后细胞周期出现变化, 与对照组相比, As₂O₃为0.5 μmol/L时, S期细胞分布35.58% ± 0.63%(对照组25.69% ± 1.46%), G₂/M期细胞分布33.41% ± 0.73%(对照组30.44% ± 1.51%)两者比较没有统计学差异(*P* > 0.05), 说明药物浓度较低时, 对肿瘤细胞抑制反应较弱, 当As₂O₃浓度为1.5 μmol/L时, G₀/G₁期细胞分布34.85% ± 1.53%, S期细胞分布42.69% ± 2.64%, G₂/M期细胞分布22.46% ± 0.59%, 与对照组比较有差异(*P* < 0.05), 药物提高到2.5 μmol/L时, G₀/G₁期细胞分布39.63% ± 0.74%, S期细胞分布45.71% ± 1.53%, G₂/M期细胞分布14.66% ± 0.92%, 与对照组比较有差异(*P* < 0.05), 以上说明至少1.5 μmol/L以上的药物浓度才能达到抑制肿瘤增长繁殖的效果, 随As₂O₃浓度的升高G₀/G₁期和G₂/M期的肿瘤细胞数下降, S期细胞数上升, 表明As₂O₃是把肿瘤细胞阻滞在S期, 来抑制细胞有丝分裂的(表1).

3 讨论

大肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 由于生活节奏的加快、高脂饮食以及体育锻炼减少等, 导致肠癌发病率越来越多, 对于晚期患者化疗成为重要的治疗手段. 但目前化疗药疗效差且对机体有严重的不良反应, 如肝肾损伤、免疫下降、骨髓抑制、消化系反应等, 许多患者或因化疗药物的昂贵放弃治疗, 或直接死于化疗药物的不良反应引起的并发症等, 而产生不良反应的重要原因之一是剂量过大或最佳化疗的时间窗没控制好, 自我国学者首先发现As₂O₃具有良好的抗急性早幼粒白血病的作用以来, 目

■创新盘点

本文通过MTT对肿瘤细胞抑制情况和流式细胞术分析了细胞周期变化, 阐述了减轻不良反应的机制, 为临床更科学的应用提供了可能.

■应用要点

本研究着重就As₂O₃不良反应的预防及机制进行探讨,本文通过MTT对肿瘤细胞抑制情况和流式细胞术分析了细胞周期变化,阐述了抑制肠癌细胞的变化规律及细胞周期改变,临床上As₂O₃应该掌握适当的剂量和在合适的时间窗内应用,可以有效减少不良反应的发生,在达到化疗目的的同时,为患者减轻不良反应,提高患者的生存质量,为患者带来福音。

表 1 As₂O₃对肠癌HCT116细胞周期变化(mean ± SD, %)

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	43.87 ± 1.51	25.69 ± 1.46	30.44 ± 1.51
0.5 μmol/L As ₂ O ₃ 组	31.01 ± 0.69	35.58 ± 0.63	33.41 ± 0.73
1.5 μmol/L As ₂ O ₃ 组	34.85 ± 1.53 ^{ac}	42.69 ± 2.64 ^{ac}	22.46 ± 0.59 ^{ac}
2.5 μmol/L As ₂ O ₃ 组	39.63 ± 0.74 ^c	45.71 ± 1.53 ^c	14.66 ± 0.92 ^c

^aP<0.05 vs 2.5 μmol/L As₂O₃组; ^cP<0.01 vs 对照组。

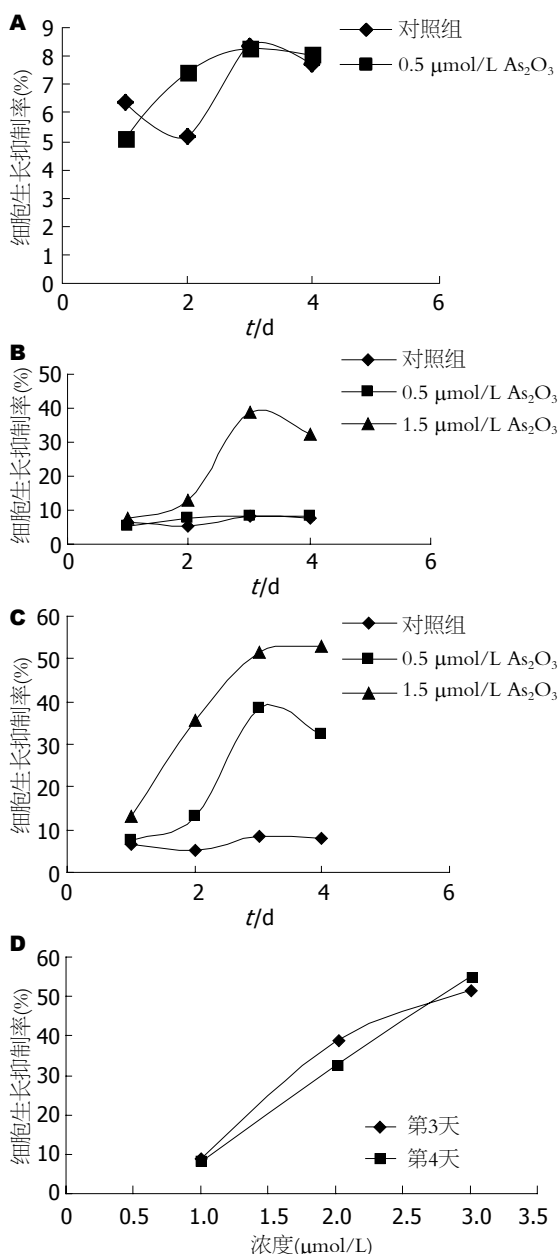


图 1 As₂O₃对肠癌HCT-116细胞的影响。A: 低剂量; B: 低、中剂量; C: 中、高剂量; D: 第3、4天。

前国内外学者不仅对其抗白血病的机制进行了深入的探讨^[6-12],而且对其抗实体瘤的作用也进行了广泛的研究,砷剂是否对正常细胞有不良

反应取决于其剂量及作用的时间,国内刘建伟等^[13]体外研究已证明As₂O₃对肝癌细胞有明显的抑制增殖及诱导凋亡的作用。本研究应用As₂O₃作用于人体外肠癌HCT116细胞后,MTT显示0.5 μmol/L的低剂量As₂O₃抑制率与对照组无明显差别,1.5 μmol/L As₂O₃组抑制率和2.5 μmol/L As₂O₃组抑制率与对照组相比较,组间均有差异(P<0.05),且浓度愈大抑制作用愈强,出现剂量依赖性,但第1天抑制作用不明显,可能是作用时间短,处于药物敏感基因表达的时间窗内,致使细胞对化疗药不敏感,从第3天起抑制明显增强,第4天又有所下降,这与徐丹等^[14]的研究的As₂O₃肠癌细胞CCL-187的抑制结果类似,但不同的是本研究中2.5 μmol/L As₂O₃对细胞的抑制率在第4天未见明显下降,分析可能原因和肠癌细胞种系的不同或培养基不同有关,有待于进一步分析研究,以上研究表明至少1.5 μmol/L以上的As₂O₃浓度才能达到抑制肿瘤增长繁殖的效果,且随着As₂O₃浓度的增大,抑制作用明显越来越强,不容易出现耐药性,提示我们临床应用As₂O₃进行肠癌化疗时,应掌握好有效的剂量和适宜疗程,不能只追求高剂量来增强化疗效果,以控制毒性反应的发生;流式细胞仪检测细胞周期,发现随着As₂O₃浓度的提高,G₀/G₁期的转变逐渐减少,说明原始肿瘤细胞G₀期在减少,该期细胞是肿瘤复发和增值的源头和阵地,G₀期的减少这在一定程度降低了肿瘤复发的机会,同时处于S期细胞逐渐增多,G₂/M期细胞数的减少,提示As₂O₃主要是使肿瘤细胞阻滞在DNA合成期,从而阻滞有丝分裂的继续,而达到抗肿瘤的目的,G₂/M期值的减少,可能主要原因是阻止了相关转录因子如E2F等^[15]的释放,从而抑制细胞的转录和蛋白表达,这提示我们As₂O₃在临床上使用的化疗时间应该在肿瘤细胞处于DNA合成的增殖期时间窗内,完全可以达到事半功倍的效果,而对于处于静止状态的肿瘤细胞作用不

大, 高浓度长时间的持续化疗反而会引起严重的不良反应, 即“过度治疗”是有害无益的。

综合以上的研究结果表明As₂O₃对体外人肠癌HCT116细胞有较强的抑制杀伤作用, 虽然肿瘤细胞表现出具有浓度依赖性, 但一定要掌握好适当的有效剂量浓度和最佳化疗时机, 这样可以杀死肿瘤细胞的同时, 最大地减轻不良反应和延缓耐药性的发生, 增强肠癌的化疗效果, 提高患者的生存质量。

4 参考文献

- 1 Yang L, Parkin DM, Ferlay J, Li L, Chen Y. Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 243-250 [PMID: 15668501]
- 2 邓小英, 惠二京, 李招发. 大肠癌疗效及预后预测生物标志物的研究进展. *胃肠病学和肝病学杂志* 2013; 5: 393-395
- 3 姜华. 三氧化二砷抗肿瘤作用的机制研究. *中国现代药物应用* 2012; 20: 74-75
- 4 邢茂, 张恩娟, 叶鑫. 三氧化二砷诱导肿瘤细胞凋亡途径的研究. *中国药理学通报* 2002; 18: 87-90
- 5 李海燕, 曹励民, 王娟. 三氧化二砷对人肝癌SMMC-7721细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响. *中国老年学杂志* 2013; 6: 2572-2574
- 6 燕玮, 胡文旭, 杨威. 砷剂联合全反式维甲酸诱导治疗急性早幼粒细胞白血病疗效的影响因素分析. *现代肿瘤医学* 2012; 11: 2374-2376
- 7 Lin-Cereghino GP, Godfrey L, de la Cruz BJ, Johnson S, Khuongsathiene S, Tolstorukov I, Yan M, Lin-Cereghino J, Veenhuis M, Subramani S, Cregg JM. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 883-897 [PMID: 16428444]
- 8 Geisler JP, Tammela JE, Manahan KJ, Geisler HE, Miller GA, Zhou Z, Wiemann MC. HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 165-168 [PMID: 15032273]
- 9 Pei R, Cao J, Ma J, Zhang P, Liu X, Du X, Chen D, Sha K, Chen L, Li S, Wu J, Fan Z, Lin L, Ye P, Tang S, Zhang B. Long term curative effects of sequential therapy with all-trans retinoic acid, arsenious oxide and chemotherapy on patients with acute promyelocytic leukemia. *Hematology* 2012; 17: 311-316 [PMID: 23168069]
- 10 Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *Int J Hematol* 2013; 97: 717-725 [PMID: 23670176]
- 11 朱喜丹, 陈梅, 冯林, 田刚. 全反式维甲酸联合三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病的疗效观察. *国际检验医学杂志* 2013; 3: 309-310
- 12 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 施福东, 邱凤琴, 洪洛珈, 韩雪英, 杨惠芬, 宋颖昭, 刘艳平, 周晋, 金镇敬. 三氧化二砷注射治疗72例急性早幼粒细胞白血病. *中华血液学杂志* 1996; 8: 58-60
- 13 刘建伟, 唐毅, 沈雁, 钟雪云. 三氧化二砷和细胞分化剂诱导肝癌细胞凋亡的阈值. *中华实验外科杂志* 2003; 2: 116-118
- 14 徐丹, 杨幼林, 徐洪雨. 三氧化二砷对人大肠癌细胞生长的抑制作用. *广东医学* 2008; 6: 908-910
- 15 冯春琼, 马文丽, 郑文岭. 三氧化二砷作用机制研究进展. *癌症* 2002; 21: 1386-1389

■同行评价

本文研究方法客观, 结果可靠, 具有重要的临床意义。

编辑 田滢 电编 闫晋利



α 体甘草酸制剂对早期自身免疫性肝炎炎症活动的控制作用

司常云, 徐芸, 保洁

■背景资料

自身免疫性肝炎是一种病因不明的肝脏慢性炎症, 临床特征为不同程度的血清转氨酶升高、高免疫球蛋白血症、血清抗体阳性, 组织学特征为界面性肝炎及汇管区浆细胞浸润。多发于女性, 一般起病缓慢, 也可快速发展为肝硬化和肝衰竭。免疫抑制治疗有效, 目前标准治疗方案为糖皮质激素联合硫唑嘌呤。

司常云, 徐芸, 保洁, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450001

司常云, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 主要数据分析及文章起草由司常云完成; 课题设计、文章修改及审阅由徐芸完成; 数据提供由保洁完成。

通讯作者: 徐芸, 主任医师, 教授, 450001, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院消化内科。

xuyun@medmail.com.cn

电话: 0371-66862052

收稿日期: 2013-10-25 修回日期: 2014-01-06

接受日期: 2014-01-08 在线出版日期: 2014-02-08

Efficacy of α -glycyrrhizic acid in management of early autoimmune hepatitis

Chang-Yun Si, Yun Xu, Jie Bao

Chang-Yun Si, Yun Xu, Jie Bao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Correspondence to: Yun Xu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Zhengzhou 450001, Henan Province, China. xuyun@medmail.com.cn

Received: 2013-10-25 Revised: 2014-01-06

Accepted: 2014-01-08 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of α -glycyrrhizic acid (α -GL) in the management of early autoimmune hepatitis (AIH).

METHODS: Seventy-six patients with AIH treated at our hospital between February 2009 and October 2012 were enrolled into the study. The patients were divided randomly into two groups: a treatment group and a control group, with 38 patients in each group. Patients in the treatment group received magnesium isoglycyrrhizinate injection for 3 wk and diammonium glycyrrhizinate enteric-coated capsules for 1 year. Patients in the control group received compound glycyrrhizin injection for 3 wk and compound glycyrrhizin tablets for 1 year.

RESULTS: The liver function of patients in both groups improved significantly after treatment (ALT: $31.00 \text{ U/L} \pm 4.27 \text{ U/L}$ vs $76.42 \text{ U/L} \pm 9.34 \text{ U/L}$, AST: $29.26 \text{ U/L} \pm 3.57 \text{ U/L}$ vs $73.21 \text{ U/L} \pm$

10.69 U/L , GLOB: $32.27 \pm 4.84 \text{ g/L}$ vs $36.10 \text{ g/L} \pm 3.83 \text{ g/L}$; ALT: $49.26 \text{ U/L} \pm 6.05 \text{ U/L}$ vs $77.79 \text{ U/L} \pm 6.45 \text{ U/L}$, AST: $42.05 \text{ U/L} \pm 5.87 \text{ U/L}$ vs $74.53 \text{ U/L} \pm 5.91 \text{ U/L}$, GLOB: $35.56 \text{ g/L} \pm 1.05 \text{ g/L}$ vs $36.71 \text{ g/L} \pm 2.29 \text{ g/L}$; all $P < 0.05$), and the improvement was more significant in the treatment group than in the control group (all $P < 0.05$). The levels of IgG and gamma globulin declined significantly after treatment in both groups (IgG: $13.47 \text{ g/L} \pm 0.57 \text{ g/L}$ vs $16.87 \text{ g/L} \pm 1.29 \text{ g/L}$, gamma globulin: $13.45 \text{ g/L} \pm 1.67 \text{ g/L}$ vs $17.07 \text{ g/L} \pm 3.29 \text{ g/L}$; IgG: $15.39 \text{ g/L} \pm 1.28 \text{ g/L}$ vs $17.14 \text{ g/L} \pm 1.36 \text{ g/L}$, gamma globulin: $15.07 \text{ g/L} \pm 2.08 \text{ g/L}$ vs $17.47 \text{ g/L} \pm 2.29 \text{ g/L}$; all $P < 0.05$), and the decline was more significant in the treatment group (all $P < 0.05$). The C3 level increased significantly after treatment in both groups ($1.048 \text{ g/L} \pm 0.103 \text{ g/L}$ vs $0.597 \text{ g/L} \pm 0.074 \text{ g/L}$; $0.840 \text{ g/L} \pm 0.121 \text{ g/L}$ vs $0.611 \text{ g/L} \pm 0.053 \text{ g/L}$; both $P < 0.05$), and the increase was more significant in the treatment group ($P < 0.05$). The effective rate was significantly higher in the treatment group than in the control group (86.8% vs 73.7%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: α -GL has a more significant effect than β -GL in controlling inflammatory activity in early AIH.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: α -glycyrrhizic acid; Early AIH; Inflammatory activity

Si CY, Xu Y, Bao J. Efficacy of α -glycyrrhizic acid in management of early autoimmune hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 568-572 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/568.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.568>

摘要

目的: 观察 α 体甘草酸制剂对于早期自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)炎症活动的控制作用。

方法: 选择2009-2/2012-10我院收治的早期

■同行评议者

庄林, 主任医师, 昆明市第三人民医院肝病科

AIH患者76例, 随机分为试验组和对照组, 每组各38例, 试验组应用异甘草酸镁及甘草酸二铵肠溶胶囊(α 体甘草酸)治疗, 对照组应用复方甘草酸苷(β 体甘草酸)治疗; 观察两组患者治疗前后的肝功能、免疫学指标、肝组织学变化。

结果: (1)两组治疗后谷丙转氨酶、谷草转氨酶、球蛋白较治疗前降低($31.00 \text{ U/L} \pm 4.27 \text{ U/L}$ vs $76.42 \text{ U/L} \pm 9.34 \text{ U/L}$, $29.26 \text{ U/L} \pm 3.57 \text{ U/L}$ vs $73.21 \text{ U/L} \pm 10.69 \text{ U/L}$, $32.27 \pm 4.84 \text{ g/L}$ vs $36.10 \text{ g/L} \pm 3.83 \text{ g/L}$; $49.26 \text{ U/L} \pm 6.05 \text{ U/L}$ vs $77.79 \text{ U/L} \pm 6.45 \text{ U/L}$, $42.05 \text{ U/L} \pm 5.87 \text{ U/L}$ vs $74.53 \text{ U/L} \pm 5.91 \text{ U/L}$, $35.56 \text{ g/L} \pm 1.05 \text{ g/L}$ vs $36.71 \text{ g/L} \pm 2.29 \text{ g/L}$; 均 $P < 0.05$), 试验组较对照组降低更明显($31.00 \text{ U/L} \pm 4.27 \text{ U/L}$ vs $49.26 \text{ U/L} \pm 6.05 \text{ U/L}$, $29.26 \text{ U/L} \pm 3.57 \text{ U/L}$ vs $42.05 \text{ U/L} \pm 5.87 \text{ U/L}$, $32.27 \text{ g/L} \pm 4.84 \text{ g/L}$ vs $35.56 \text{ g/L} \pm 1.05 \text{ g/L}$, 均 $P < 0.05$); (2)两组治疗后IgG、 γ -球蛋白均较治疗前降低($13.47 \text{ g/L} \pm 0.57 \text{ g/L}$ vs $16.87 \text{ g/L} \pm 1.29 \text{ g/L}$, $13.45 \text{ g/L} \pm 1.67 \text{ g/L}$ vs $17.07 \text{ g/L} \pm 3.29 \text{ g/L}$; $15.39 \text{ g/L} \pm 1.28 \text{ g/L}$ vs $17.14 \text{ g/L} \pm 1.36 \text{ g/L}$, $15.07 \text{ g/L} \pm 2.08 \text{ g/L}$ vs $17.47 \text{ g/L} \pm 2.29 \text{ g/L}$, 均 $P < 0.05$), 试验组较对照组降低更明显($13.47 \text{ g/L} \pm 0.57 \text{ g/L}$ vs $15.39 \text{ g/L} \pm 1.28 \text{ g/L}$, $13.45 \text{ g/L} \pm 1.67 \text{ g/L}$ vs $15.07 \text{ g/L} \pm 2.08 \text{ g/L}$; 均 $P < 0.05$); 治疗后C3较治疗前增高($1.048 \text{ g/L} \pm 0.103 \text{ g/L}$ vs $0.597 \text{ g/L} \pm 0.074 \text{ g/L}$; $0.840 \text{ g/L} \pm 0.121 \text{ g/L}$ vs $0.611 \text{ g/L} \pm 0.053 \text{ g/L}$; 均 $P < 0.05$), 试验组较对照组升高明显($1.048 \text{ g/L} \pm 0.103 \text{ g/L}$ vs $0.840 \text{ g/L} \pm 0.121 \text{ g/L}$, $P < 0.05$); (3)试验组有效率高于对照组(86.8% vs 73.7% , $P < 0.05$), 试验组不良反应发生率低于对照组(5.26% vs 15.79% , $P < 0.05$)。

结论: α 体甘草酸制剂对于控制早期AIH的炎症活动有显著作用, 且优于 β 体甘草酸制剂。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: α 体甘草酸; 早期自身免疫性肝炎; 炎症活动

核心提示: 长期应用 α 体甘草酸可有效控制早期自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis)的炎症活动, 延缓疾病进展, 且不良反应小, 值得临床推广。

司常云, 徐芸, 保洁. α 体甘草酸制剂对早期自身免疫性肝炎炎症活动的控制作用. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 568-572
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/568.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.568>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是由异常自身免疫反应介导的肝实质炎症性病变, 以血清转氨酶升高、高免疫球蛋白血症、循环自身抗体和组织学上有界面性肝炎及汇管区浆细胞浸润为特点^[1]. 主要治疗方法为免疫抑制治疗, 大部分患者应答良好, 但由于不良反应较多, 临床应用有严格的指征, 需考虑患者的血清转氨酶水平、 γ 球蛋白或IgG水平及肝组织学表现^[2-4]. 在临床上, 有部分早期AIH患者尚未达到免疫抑制治疗指征, 但组织学存在轻度炎症活动, 对于这部分患者, 寻找能有效控制炎症活动、减缓疾病进展的非激素类药物具有重大意义. 甘草酸类药物是临床上常用的抗炎保肝药物, 除具有一般保肝药的作用外, 更重要的是具有肾上腺皮质激素样作用及免疫调节作用^[5], 这在AIH的治疗中极其可贵, 不失为早期AIH治疗的合适选择. 甘草酸制剂又有 α 体甘草酸(α -glycyrrhizic acid, α -GL)制剂和 β 体甘草酸制剂两种, 研究发现 α -GL比 β -GL抗炎活性强、肝脏靶向性高、不良反应小^[6], 本试验正是通过比较长期应用 α -GL制剂及 β -GL制剂对于早期AIH的疗效, 为此部分患者的临床用药选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 选择我院2009-2/2012-10收治的早期AIH患者76例, 诊断标准依据2010年美国肝病学会(American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD)制定的AIH诊断和治疗指南, 均为确诊为AIH、有轻度炎症活动但未达免疫抑制治疗指征的患者, 已排除合并药物性、病毒性、遗传代谢性等肝损害的病例. 男8例, 女68例, 平均年龄 47.8 ± 15.3 岁. 按照随机数字表法分为试验组和对照组, 每组各38例, 两组患者年龄、性别、病程等一般资料差异无统计学意义. 异甘草酸镁注射液(天晴甘美, 江苏正大天晴股份有限公司, 10 mL: 50 mg/支, 国药准字H20051942); 甘草酸二铵肠溶胶囊(天晴甘平, 江苏正大天晴股份有限公司, 50 mg/粒, 国药准字H20040628); 复方甘草酸苷注射液(美能, 日本米诺发源制药株式会社, 20 mL: 40 mg/支, 国药准字J20080080); 复方甘草酸苷片(美能, 日本米诺发源制药株式会社, 25 mg/片, 国药准字J20080079)。

1.2 方法

1.2.1 治疗: 试验组先应用异甘草酸镁注射液

■研发前沿

α 体甘草酸短期应用可改善自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的肝功、免疫学指标, 关于其具体适应证、治疗时间、远期疗效及对肝组织学的作用有待进一步研究。

■相关报道

目前已有报道表明甘草酸治疗AIH的短期疗效确定, 不良反应小, 亦有关于 α 体甘草酸治疗不能应用激素的AIH后肝硬化失代偿期患者疗效显著的报道。

■创新盘点

本文的研究对象有针对性,为早期AIH患者,不同于其他同类研究中研究对象范围太大;研究中观察随访时间较长,且有肝组织学的比较。

表 1 两组治疗前后肝功能变化

项目	试验组		对照组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
ALT(U/L)	76.42 ± 9.34	31.00 ± 4.27 ^{ac}	77.79 ± 6.45	49.26 ± 6.05 ^a
AST(U/L)	73.21 ± 10.69	29.26 ± 3.57 ^{ac}	74.53 ± 5.91	42.05 ± 5.87 ^a
GLOB(g/L)	36.10 ± 3.83	32.27 ± 4.84 ^{ac}	36.71 ± 2.29	35.56 ± 1.05 ^a

^a*P*<0.05 vs 同组治疗前; ^c*P*<0.05 vs 对照组治疗后. ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶; GLOB: 球蛋白。

表 2 两组治疗前后免疫学指标变化(g/L)

项目	试验组		对照组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
IgG	16.87 ± 1.29	13.47 ± 0.57 ^{ac}	17.14 ± 1.36	15.39 ± 1.28 ^a
C3	0.597 ± 0.074	1.048 ± 0.103 ^{ac}	0.611 ± 0.053	0.840 ± 0.121 ^a
γ-球蛋白	17.07 ± 3.29	13.45 ± 1.67 ^{ac}	17.47 ± 2.29	15.07 ± 2.08 ^a

^a*P*<0.05 vs 同组治疗前; ^c*P*<0.05 vs 对照组治疗后。

200 mg加入5%葡萄糖注射液250 mL中静脉滴注, 1次/d, 连用3 wk, 后改为口服甘草酸二铵肠溶胶囊1次150 mg, 3次/d; 对照组先应用复方甘草酸苷注射液120 mg加入5%葡萄糖注射液250 mL中静脉滴注, 1次/d, 连用3 wk, 后改为口服复方甘草酸苷片1次75 mg, 3次/d. 两组疗程均为1年, 治疗期间每3月复查1次肝功、免疫学指标, 1年后复查肝穿。

1.2.2 观察项目: (1)肝功能: 谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartic transaminase, AST)、球蛋白(globulin, GLOB); (2)免疫学指标: IgG、C3、γ球蛋白; (3)肝组织学: 治疗前后行超声引导下肝穿刺活检术, 标本放置40 g/L中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋、切片后行HE染色、网染、MASSON染色及免疫组织化学(CK7、CD38、CD138); 参考2001年版《病毒性肝炎防治方案》中慢性肝炎病理分级分期, 将肝脏炎症活动分为G0-G4级, 纤维化程度分为S0-S4期^[7]; (4)症状: 治疗后纳差、乏力、恶心、腹胀等较治疗前是否有变化(消失、减轻、不变、加重); (5)不良反应: 浮肿、低钾血症、血压升高、皮疹、恶心呕吐等。

1.2.3 疗效评定标准: (1)显效: ALT、AST、IgG、γ球蛋白恢复正常, 症状明显改善或消失; (2)有效: ALT、AST、IgG、γ球蛋白较治疗前下降50%, 症状有改善; (3)无效: ALT、AST、IgG、γ球蛋白下降不明显或升高, 症状改善不明显或无改善。

统计学处理 应用SPSS15.0统计软件进行分析, 计量资料以mean±SD表示, 计量资料采用*t*检验, 计数资料采用χ²检验. *P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后肝功能的变化 两组治疗前ALT、AST、GLOB比较, 差异无统计学意义(*P*>0.05); 治疗后ALT、AST、GLOB较治疗前降低, 差异有统计学意义(*P*<0.05), 试验组较对照组上述指标降低更明显(*P*<0.05)(表1)。

2.2 治疗前后免疫学指标的变化 两组治疗前IgG、γ球蛋白、C3比较, 差异无统计学意义(*P*>0.05); 治疗后IgG、γ球蛋白均较治疗前降低(*P*<0.05)、C3较治疗前升高(*P*<0.05), 试验组较对照组上述指标降低更明显(*P*<0.05)(表2)。

2.3 肝组织学变化 试验组与对照组均在治疗前行肝穿刺活检术, 大部分患者病理特点为肝小叶结构基本存在, 肝细胞轻度水变性伴点灶状坏死, 汇管区有少量淋巴细胞、浆细胞浸润, 轻度界面炎, 病理分级分期为G1-2S0-2; 治疗1年后, 试验组有8例患者复查肝穿, 3例组织学无明显变化, 2例由G1S1转为G2S2, 3例由G2S1转为G1S1, 对照组有5例复查肝穿, 3例由G1S1转为G2S2, 2例无明显变化。

2.4 疗效比较 试验组有效率高于对照组, 差异有统计学意义(*P*<0.05)(表3)。

2.5 不良反应 试验组有1例患者出现浮肿, 1例出

■应用要点

通过全面观察对比α体甘草酸、β体甘草酸对早期AIH肝功、免疫学指标、肝组织学的作用, 证实α体甘草酸疗效确定, 为早期AIH患者提供了有效、不良反应小的治疗方案。

表 3 两组治疗效果比较($n = 38$)

分组	显效	有效	无效	总有效率(%)
试验组	18	15	5	86.8 ^a
对照组	10	18	10	73.7

^a $P < 0.05$ vs 对照组.

现血压升高, 不良反应发生率5.26%; 对照组有6例出现浮肿, 不良反应发生率为15.79%; 试验组不良反应发生率低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$).

3 讨论

AASLD对于AIH的诊断及治疗进行了详细的描述, 治疗上首选药物为糖皮质激素及硫唑嘌呤, 有严格的指征, 对于无症状或症状轻微、实验室和组织学轻度异常达不到免疫抑制治疗指征的AIH患者, 没有统一的治疗方案^[2]. 对于这部分患者的治疗, 有些报道倾向于免疫抑制治疗^[8,9], 但考虑到免疫抑制治疗风险较大、疗程较长、患者难以接受, 有必要寻找能有效控制肝脏炎症活动、不良反应小的非激素类药物, 甘草酸类药物可作为选择之一.

甘草酸制剂中的主要有效成分为甘草酸, 是从中药甘草中提取的活性成分, 具有抗炎、免疫调节、保护肝细胞膜、改善肝功能、抗纤维化、抗细胞凋亡等多种作用^[10], 是临床上常用的抗炎保肝药物. 不同于其他保肝药物的是甘草酸具有糖皮质激素的结构特征从而能够发挥类固醇样作用, 这在AIH的治疗中有重要作用, 已有多项报道表明甘草酸对于AIH的短期疗效确定, 于短时间内改善肝脏生化学指标, 可作为AIH的辅助治疗^[11-13]. 甘草酸存在一对差向异构体, 即18 α -GL和18 β -GL, 与 β -GL相比, α -GL具有(1)亲脂性好、在体内易于与受体蛋白结合;(2)易于与类固醇激素的靶细胞受体结合, 抗炎活性强;(3)肝脏靶向性高、不良反应少等优点^[6]. 目前临床上常见的异甘草酸镁与甘草酸二铵脂质复合物均为新一代 α -GL制剂, 复方甘草酸苷则为二代 β -GL制剂^[14], 已有多项研究报道前者对于病毒性肝炎、药物性肝损伤等疗效明显优于后者^[15], 对于AIH报道较少.

本研究中我们应用 α -GL制剂、 β -GL制剂治疗具有轻度炎症活动的早期AIH, 结果表明 α -GL制剂、 β -GL制剂均可通过抗炎、免疫调

节等类激素作用有效改善早期AIH的肝功能、免疫学指标, 有效控制其肝脏炎症活动, 延缓病情进展. 同时通过治疗前后两组各个指标的对比可知, α -GL制剂在改善早期AIH的肝功、免疫学指标方面优于 β -GL制剂, 总体疗效及安全性均高于 β -GL制剂, 更能有效控制早期AIH肝脏炎症活动, 且无激素的多种不良反应, 在临床上对于这部分患者可推广应用, 但一定要掌握好适应证并密切随访肝功、免疫学指标及肝穿(尤其对于生化免疫学指标正常的患者), 一旦炎症活动加重达到免疫抑制治疗指征, 应及时更改治疗方案, 以免延误病情.

由于肝穿刺的有创性, 大部分患者短期内难以接受二次肝穿, 试验组复查肝穿的少数患者中, 肝组织学炎症较前减轻、不变、加重的比例分别为37.5%、37.5%、25%, α -GL制剂对于早期AIH更为远期的疗效、肝组织学的作用有待我们继续长期的随访观察.

4 参考文献

- 1 姚光弼. 临床肝脏病学. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 103-106
- 2 Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 2193-2213 [PMID: 20513004 DOI: 10.1002/hep.23584]
- 3 Heneghan MA, Yeoman AD, Verma S, Smith AD, Longhi MS. Autoimmune hepatitis. *Lancet* 2013; 382: 1433-1444 [PMID: 23768844 DOI: 10.1016/S0140-6736(12)62163-1]
- 4 肖潇, 邱德凯, 马雄. 自身免疫性肝炎. 中华消化杂志 2013; 33: 63-66
- 5 张明发, 沈雅琴. 甘草酸及其苷元甘草次酸的糖皮质激素样作用. 现代药物与临床 2011; 26: 33-34
- 6 颜苗, 李兰芳, 李煥德. 甘草酸、甘草次酸18位差向异构体比较研究的进展. 中药新药与临床药理 2010; 21: 562-566
- 7 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. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- 8 Zachou K, Muratori P, Koukoulis GK, Granito A, Gatselis N, Fabbri A, Dalekos GN, Muratori L. Review article: autoimmune hepatitis -- current management and challenges. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 887-913 [PMID: 24010812 DOI: 10.1111/apt.12470]
- 9 Czaja AJ. Difficult treatment decisions in autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 934-947 [PMID: 20180231]
- 10 韩瑶璐, 王彬, 王政雨, 张亚弢, 杨凌云, 周金培, 张惠斌. 甘草酸药理作用的研究进展. 中国新药杂志 2012; 21: 2499-2504
- 11 Yasui S, Fujiwara K, Tawada A, Fukuda Y, Nakano M, Yokosuka O. Efficacy of intravenous glycyrrhizin in the early stage of acute onset autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 3638-3647 [PMID: 21681505 DOI: 10.1007/s10620-011-1789-5]
- 12 李蕴钊, 王文冰, 张黎颖, 欧蔚妮, 谢雯, 魏来. 甘草酸

■名词解释

早期自身免疫性肝炎: 根据2010年AASLD制定的AIH诊疗指南, 诊断为AIH, 无症状或症状轻微、实验室和组织学轻度异常达不到免疫抑制治疗指征, 但组织学提示轻度炎症活动.

■同行评价

本研究内容有一定的重要性, 研究结果对临床有一定的指导作用, 值得进一步深入研究。

- 13 马红, 段维佳. 辅助用药在自身免疫性肝病中的应用. 中华肝脏病杂志 2011; 19: 234-235
- 14 颜苗, 张金娇, 李焕德, 朱荣华, 李兰芳. RP-HPLC法同时测定甘草酸制剂中18 α -、18 β -甘草酸的含量. 药物分析杂志 2012; 32: 301-304
- 15 Manns MP, Wedemeyer H, Singer A, Khomutjanskaja N, Dienes HP, Roskams T, Goldin R, Hehnke U, Inoue H. Glycyrrhizin in patients who failed previous interferon alpha-based therapies: biochemical and histological effects after 52 weeks. *J Viral Hepat* 2012; 19: 537-546 [PMID: 22762137 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2011.01579.x]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病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。

IL-18与肝癌家族聚集性的相关性

莫金英, 吴继周, 吴健林, 韦颖华, 张鹭, 宁秋悦, 胡蝶飞, 万裴琦

莫金英, 吴继周, 吴健林, 韦颖华, 张鹭, 宁秋悦, 胡蝶飞, 万裴琦, 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

莫金英, 硕士, 主要从事肝脏疾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: 此课题由吴继周与莫金英共同设计; 研究过程和数据分由莫金英、吴健林、韦颖华及张鹭操作完成; 研究标本由宁秋悦、胡蝶飞及万裴琦协助提供; 论文写作由莫金英与吴继周共同完成; 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: 2013-09-26 修回日期: 2013-11-05

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

Correlation between IL-18 and familial aggregation of hepatocellular carcinoma

Jin-Ying Mo, Ji-Zhou Wu, Jian-Lin Wu, Ying-Hua Wei, Lu Zhang, Qiu-Yue Ning, Die-Fei Hu, Pei-Qi Wan

Jin-Ying Mo, Ji-Zhou Wu, Jian-Lin Wu, Ying-Hua Wei, Lu Zhang, Qiu-Yue Ning, Die-Fei Hu, Pei-Qi Wan, 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: 2013-09-26 Revised: 2013-11-05

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between serum level of cytokine interleukin (IL)-18 and familial aggregation of hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum levels of IL-18 in 108 pairs of carcinoma-free members from HCC high-incidence families and those from carcinoma-free families.

RESULTS: Serum levels of cytokine IL-18 were

significantly lower in carcinoma-free members from HCC high-incidence families than in those from carcinoma-free families ($P < 0.05$), regardless of sex, HBsAg infection and age. In carcinoma-free members from HCC high-incidence families, the levels of IL-18 were significantly different between first-degree relatives and the second-degree relatives ($t = -2.713$, $P = 0.032$). The level of IL-18 declined with the increase in the number of HCC patients in HCC high-incidence families ($Z = -2.09$, $P = 0.037$).

CONCLUSION: IL-18 might have a close relationship to the familial aggregation of HCC, and IL-18 may be a protective factor against HCC.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Cytokines; Interleukin-18; Familial aggregation; Hepatocellular carcinoma

Mo JY, Wu JZ, Wu JL, Wei YH, Zhang L, Ning QY, Hu DF, Wan PQ. Correlation between IL-18 and familial aggregation of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 573-577 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/573.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.573>

摘要

目的: 探讨细胞因子白介素(interleukin, IL)-18的表达水平与肝癌家族聚集性的相关性。

方法: 在广西肝癌高发区利用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测108对经配对设计的肝癌高发家族和无癌家族成员外周血清IL-18的水平。

结果: 肝癌高发家族组中不论从总体上比较还是从性别、HBsAg感染情况、年龄上分层比较, 细胞因子IL-18的表达水平均显著低于无癌家族成员组($P < 0.05$); 在肝癌高发家族组中, 一级亲属与二级亲属成员之间血清IL-18的表达水平有显著性差异($t = -2.713$, $P = 0.032$); 肝癌高发家族组中随着家族中肝癌患病人数的增加, IL-18的表达水平下降($Z =$

■背景资料

广西为肝癌高发地区, 并呈现出肝癌发病家族聚集现象。目前国内外对于肝癌家族聚集现象的研究较少, 对于肝癌家族成员发生肝癌前机体是否已存在免疫调节紊乱还不清楚。

■同行评议者

肖文华, 主任医师, 中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤科

■研究前沿

肝癌高发家族成员的免疫状态、细胞因子的表达情况以及遗传基因与肝癌之间的关系是目前关于研究肝癌发病机制的热点之一。

-2.09, $P = 0.037$).

结论: 细胞因子IL-18与肝癌家族聚集性密切相关, IL-18可能是降低肝癌发生风险的一个保护性因子。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 细胞因子; 白介素-18; 家族聚集性; 肝细胞肝癌

核心提示: 肝癌高发家族成员的白介素(interleukin, IL)-18表达水平不论从性别上比较还是从HBsAg感染情况、年龄上比较, 均显著低于无癌家族成员; 肝癌高发家族组IL-18表达水平的变化显示出与先证者血缘关系、家族中先证者的人数密切相关。

莫金英, 吴继周, 吴健林, 韦颖华, 张鹭, 宁秋悦, 胡蝶飞, 万裴琦. IL-18与肝癌家族聚集性的相关性. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 573-577 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/573.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.573>

0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)还在继续肆虐全球, 目前全世界每年新发60万例不同肤色、不同国度的肝癌患者, 沉重的医疗负担及高死亡率使世界各国人民深受其害. 目前肝癌发病率排名前四位国家依次是: 中国、中非国家、日本、东非国家. 中国是世界上排名第一的肝癌大国, 每年每10万人中有将近30人罹患肝癌, 经流行病学调查研究发现在中国东南沿海一带如江苏、福建、广西等为肝癌的高发区^[1]. 然而在广西部分地区的某些村落里一个家族中竟有数人患有肝癌, 呈现出肝癌发病家族聚集现象^[2,3]. 目前, 国内外对于肝癌家族聚集性的研究较少, 对于肝癌家族聚集发病的机制还不十分明确. 许多研究表明, 机体的免疫状态失衡是导致肿瘤发生的重要因素, 因此本研究主要通过检测肝癌高发家族与无癌家族成员中细胞因子白介素(interleukin, IL)-18的水平, 探讨IL-18与肝癌家族聚集性之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 所有研究对象均来自广西肝癌高发地区, 肝癌高发家族是指同一家族成员中有2个或2个以上成员有肝癌病史, 家族中确诊为肝癌的患者为先证者; 无癌家族是指与肝癌高发家族

在同一个地区有相同的生活环境, 但家族成员中无任何癌症病史. 研究对象以年龄 ± 5 岁、相同的性别、民族、相同的HBV携带状况进行配对, 以尽量减少组间误差, 所有研究对象中无肝癌患者, 抗HCV抗体阴性. 肝癌高发家族中, 个体与先证者的遗传物质之间只经历了一次减数分裂定义为一级亲属, 如父母、子女等; 个体与先证者之间的遗传物质只经历了二次减数分裂定义为二级亲属, 如伯、叔、舅、姨等; 以此类推确定三级及以上亲属^[3].

1.2 方法

1.2.1 血清标本采集与处理: 所有研究对象清晨空腹采外周静脉血5 mL室温静置后离心分离血清, 置于-80 °C低温冰箱冻存集中进行检测。

1.2.2 IL-18的检测: 使用ELISA法检测血清中IL-18的水平, 采用ELISA试剂盒(武汉华美生物技术有限公司, Cusabio Biotech, human IL-18)检测血清中IL-18的水平, 严格按照说明书要求操作, 使用美国的BIO-RAD的iMark全自动酶标仪进行检测。

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行数据分析, 各组的IL-18表达水平如果服从正态分布以mean \pm SD表示, 配对资料呈正态分布用配对 t 检验, 非配对资料服从正态分布用两独立样本的 t 检验, 偏态资料用M(P25, P75)表示, 偏态分布用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌高发家族组与无癌家族组IL-18表达情况比较 肝癌高发家族成员中IL-18的表达水平明显低于无癌家族成员组, 差别有统计学意义($t = 5.367$, $P = 0.000$)(表1); 从性别、HBsAg感染情况、年龄上分层对比肝癌高发家族与无癌家族成员的IL-18浓度水平发现, 肝癌高发家族成员的IL-18表达水平均显著低于无癌家族成员($P < 0.05$)(表1)。

2.2 肝癌高发家族组中先证者的性别比较 本研究中肝癌高发家族组108例成员共来自15个肝癌高发家族, 在这15个肝癌高发家族中先证者共有49例, 其中男42例, 女7例, 男性肝癌发病率明显高于女性。

2.3 肝癌高发家族组各级亲属之间的IL-18表达水平比较 高发家族成员组一级亲属的IL-18表达水平明显低于二级亲属($P < 0.05$); 一级亲属与三级及以上亲属的IL-18表达水平无差异($P > 0.05$); 二级亲属与三级亲属之间的IL-18表达

■相关报道

IL-18在调节Th1/Th2细胞平衡, 增强NK细胞、CTL细胞等的抗肿瘤活性方面起重要作用。

表 1 肝癌高发家族与无癌家族白介素-18表达水平分析(mean ± SD, pg/mL)

	<i>n</i>	无癌家族	肝癌高发家族	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
总检验		52.527 ± 24.88	35.56 ± 23.21	5.367	0.000
性别					
男	70	52.33 ± 24.94	33.14 ± 21.70	4.636	0.000
女	38	52.75 ± 24.63	40.89 ± 26.83	2.428	0.020
HBsAg					
阳性	24	61.46 ± 25.73	40.37 ± 20.17	2.889	0.000
阴性	84	49.91 ± 23.96	34.58 ± 24.70	4.286	0.000
年龄(岁)					
>25	53	50.70 ± 22.58	31.62 ± 21.97	4.290	0.000
≤25	55	54.17 ± 26.74	39.96 ± 24.95	2.873	0.006

■创新盘点

既往的研究通常将肝癌患者作为研究对象进行病例对照研究,而本文将肝癌高发家族中未发生肝癌的成员作为研究对象,以了解肝癌发生前肝癌高发家族成员体内的免疫变化。

表 2 肝癌高发家族中各级亲属血清IL-18含量的比较(mean ± SD, pg/mL)

分组	<i>n</i>	IL-18	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
一级亲属	58	31.06 ± 20.21	-2.713	0.032 ^a
二级亲属	37	41.10 ± 24.51	-0.151	0.881
三级及以上亲属	13	42.41 ± 32.65	-1.203	0.249

^a*P* < 0.05 vs 二级亲属. IL: 白介素.

表 3 肝癌高发家族组中患肝癌例数与IL-18的关系(pg/mL)

分组	<i>n</i>	IL-18 M (P25, P75)
2-3例	43	38.79(21.55, 60.62)
4例及以上	65	30.46(14.21, 42.87)
<i>Z</i> 值	-	-2.09
<i>P</i> 值	-	0.037

IL: 白介素.

水平无差异(*P* > 0.05)(表2).

2.4 肝癌高发家族中患肝癌的先证者例数与IL-18表达水平的关系分析 研究结果显示,随着家族中肝癌患病人数的增加,高发家族中IL-18的表达水平下降(*P* = 0.037)(表3).

3 讨论

IL-18最初被认为是促进INF-γ生成的一个重要因子,主要由激活的巨噬细胞、枯否细胞、B细胞等产生,具有诱导Th1型细胞分化、增强NK细胞活性、通过Fas和Fas配体相互作用诱导细胞凋亡、抑制血管生成等多种生物功能^[4,5].近年来国内外对于研究IL-18与肝癌之间的关系已取得较多的成果.王平等^[6]在利用IL-18的复制缺陷型腺病毒治疗肝癌大鼠时发现,IL-18能有

效地抑制肝癌细胞系CBRH3的生长,充分显示了IL-18的抗肿瘤效应.叶文峰等^[7]以HepG2细胞在裸鼠皮下接种形成人肝癌皮下移植瘤,之后向其腹腔内注射IL-18进行治疗,发现IL-18通过抑制血管生成及Caspase3参与的细胞凋亡信号转导从而有效地抑制肝癌的生长.然而,Teixeira等^[8]通过对巴西肝癌患者的研究发现IL-18-607*A等位基因可能是巴西原发性肝癌的易感基因,IL-18-607*C和-137*C等位基因可能分别与结节型肝癌、弥漫型肝癌相关.此外,Teixeira等^[9]发现在HCV感染相关性HCC患者血清中IL-18的表达水平明显高于HCV相关性慢性肝炎患者及健康者,提示IL-18的表达水平有望成为诊断HCV相关性HCC的另一个敏感指标.上述文献均说明IL-18与肝癌的发生、发展密切相关,但其与肝癌家庭聚集性的关系如何,在国内外尚未有研究报道.

在本研究中,我们发现肝癌高发家族成员组血清的IL-18表达水平显著低于无癌家族成员组(*P* < 0.05);之后我们进一步分层比较肝癌高发家族组成员与无癌家族成员的IL-18表达水平发现,肝癌高发家族组IL-18表达水平不论从性别上比较还是从HBV感染情况、年龄上比较,均显著低于无癌家族成员(*P* < 0.05),提示IL-18水平的降低与肝癌的家族聚集性密切相关,但是

■应用要点

本文通过ELISA检测肝癌高发家族中无癌成员IL-18的水平,进一步探讨细胞因子与肝癌家族聚集现象的相关性。

其中的机制还尚未清楚。有研究表明Th1介导的细胞免疫在机体内发挥主要的抗肿瘤作用, Th1/Th2的失衡是导致肿瘤细胞发生免疫逃逸, 促进肿瘤发生的关键环节^[10]。IL-18通过刺激NK细胞、CTL细胞来增强Th1型细胞免疫反应, 同时可以诱导Th1细胞产生IFN- γ 调节Th1/Th2之间的平衡, 并使Th1型细胞处于优势状态^[10,11], 当机体内IL-18水平低下时, Th1/Th2之间的平衡被打破, 并向Th2方向漂移, 此时机体发生肿瘤的风险也随着增大。本研究中肝癌高发家族组成员中IL-18表达水平较无癌家族成员组明显降低, 差异有统计学意义, 由此推测肝癌高发家族成员的Th1反应模式处于弱势状态, 此时机体的细胞免疫功能下降, 不能有效地清除肿瘤细胞, 使肿瘤得以生存、发展。还有学者提出IL-18主要是通过增强T细胞、NK细胞、CTL细胞的活性而发挥抗肿瘤作用, 能有效抑制黑色素瘤、肝癌等肿瘤细胞的生长^[12-16]。在肝癌高发家族成员体内IL-18表达水平低下, 机体内T细胞、NK细胞、CTL细胞不能有效被激活发挥抗肿瘤作用, 使得高发家族成员患肝癌的风险增大, 由此推测, IL-18可能是降低肝癌发生风险的保护性因子, 但不排除由于某些未知基因的显性作用导致肝癌高发家族组IL-18的表达低下。

有研究报道HBsAg感染是导致HCC发生的重要危险因素^[2,17], 因此我们分别对比肝癌高发家族成员组中HBsAg阳性与HBsAg阴性成员的IL-18表达水平及无癌家族成员组中HBsAg阳性与HBsAg阴性成员的IL-18表达水平, 结果均无统计学差异($P>0.05$), 提示HBsAg感染状况对IL-18表达水平无明显影响, IL-18与肝癌家族聚集性之间的密切关系与HBV感染状况无直接关系。但因本研究的样本量偏小, 需进一步研究证实。众所周知, 男性肝癌的发病率明显高于女性^[1]。本研究中, 在15个肝癌高发家系的49例先证者中, 男性比率明显高于女性, 这与既往的流行病学调查结果相一致。虽然在肝癌高发家族中男性与女性成员的IL-18表达水平未提示有明显统计学差异, 但男性成员的IL-18表达水平低于女性成员, 而在无癌家族成员中却无此表现, 我们推测也许在发生肝癌之前肝癌高发家族男性成员体内已经存在Th1/Th2平衡失调, 并表现出部分细胞因子表达水平低下。

此外, 我们还发现在肝癌高发家族成员组中一级亲属血清中的IL-18水平较二级亲属低, 差异有统计学意义($t = -2.713$, $P = 0.032$), 即与先

证者血缘关系越亲近, IL-18的表达水平越低。但在三级亲属中因样本例数较少, 与一级、二级亲属比较时未提示明显差异。同时, 随着家族中先证者人数的增加, IL-18的表达水平也相应下降。因此, 我们推测IL-18的表达水平与肝癌家族聚集性之间的密切关系可能与遗传因素有一定关系。有研究发现IL-18基因中的三个等位基因-148C、+8925G、+13925C的表达与肝癌的发生密切相关^[18]。还有研究提示HLA-DRB1*04等位基因可能是导致广西肝癌高发区原发性肝癌家族聚集性的危险基因^[19]。在本组研究中, 肝癌高发家族组IL-18表达水平的变化显示出与先证者血缘关系、家族中先证者的人数密切相关, 也许在肝癌高发家族成员组体内存在某些等位基因的表达或缺失而导致肝癌高发家族成员血清中IL-18的表达水平发生上述变化, 但究竟与哪个等位基因相关, 还有待深入研究。

4 参考文献

- 1 叶家才, 崔书中, 巴明臣. 原发性肝癌的流行病学特征及其危险因素. 实用医学杂志 2008; 24: 1839-1841
- 2 吴继周, 李国坚, 陈务卿, 臧宁, 吴健林, 玉艳红, 陈茂伟, 韦颖华, 万裴琦, 胡蝶飞, 宁秋悦, 贺荣. 广西新发现肝癌高发点的初步流行病学研究. 内科 2009; 4: 678-680
- 3 庞裕, 李国坚, 吴继周, 吴健林, 陈务卿, 宁秋悦, 韦颖华, 胡蝶飞, 覃玲. P53抗体与广西肝癌家族聚集性的相关性研究. 中华医学遗传学杂志 2012; 29: 206-209
- 4 Swain SL. Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. *J Exp Med* 2001; 194: F11-F14 [PMID: 11489958]
- 5 Tangkijvanich P, Thong-ngam D, Mahachai V, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Role of serum interleukin-18 as a prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4345-4349 [PMID: 17708609]
- 6 王平, 张柏和, 杨家和, 李楠, 吴孟超. 白细胞介素18对肝细胞肝癌治疗的实验研究. 中华普通外科杂志 2003; 18: 480-482
- 7 叶文峰. IL-18抗裸鼠移植性肝细胞癌机制的研究. 苏州大学, 2009
- 8 Teixeira AC, Mendes CT, Marano LA, Deghaide NH, Secaf M, Elias J, Muglia V, Donadi EA, Martinelli AL. Alleles and genotypes of polymorphisms of IL-18, TNF- α and IFN- γ are associated with a higher risk and severity of hepatocellular carcinoma (HCC) in Brazil. *Hum Immunol* 2013; 74: 1024-1029 [PMID: 23632060 DOI: 10.1016/j.humimm.2013.04.029]
- 9 Mohran ZY, Ali-Eldin FA, Abdel Aal HA. Serum interleukin-18: does it have a role in the diagnosis of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma? *Arab J Gastroenterol* 2011; 12: 29-33 [PMID: 21429452 DOI: 10.1016/j.ajg.2010.11.002]
- 10 张鹭, 李国坚, 吴继周, 吴健林, 陈茂伟, 陈务卿, 韦颖华, 胡蝶飞, 宁秋悦, 庞裕. Th1/Th2细胞相关因子对肝癌家族聚集性的影响研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2012; 32: 1000-1004
- 11 Palma G, Barbieri A, Bimonte S, Palla M, Zappav-

- gna S, Caraglia M, Ascierto PA, Ciliberto G, Arra C. Interleukin 18: Friend or foe in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1836: 296-303 [PMID: 24120852 DOI: 10.1016/j.bbcan.2013.09.001]
- 12 Wang Q, Yu H, Ju DW, He L, Pan JP, Xia DJ, Zhang LH, Cao X. Intratumoral IL-18 gene transfer improves therapeutic efficacy of antibody-targeted superantigen in established murine melanoma. *Gene Ther* 2001; 8: 542-550 [PMID: 11319621]
- 13 Ju DW, Yang Y, Tao Q, Song WG, He L, Chen G, Gu S, Ting CC, Cao X. Interleukin-18 gene transfer increases antitumor effects of suicide gene therapy through efficient induction of antitumor immunity. *Gene Ther* 2000; 7: 1672-1679 [PMID: 11083476]
- 14 杨静悦, 曹大勇, 刘文超, 斯小明. IL-18基因增强肿瘤抗原致敏DC诱导的CTL特异性杀伤肝癌细胞. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2009; 16: 55-58
- 15 Wigginton JM, Lee JK, Wilttrout TA, Alvord WG, Hixon JA, Subleski J, Back TC, Wilttrout RH. Synergistic engagement of an ineffective endogenous anti-tumor immune response and induction of IFN-gamma and Fas-ligand-dependent tumor eradication by combined administration of IL-18 and IL-2. *J Immunol* 2002; 169: 4467-4474 [PMID: 12370382]
- 16 Osaki T, Péron JM, Cai Q, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Lotze MT, Tahara H. IFN-gamma-inducing factor/IL-18 administration mediates IFN-gamma- and IL-12-independent antitumor effects. *J Immunol* 1998; 160: 1742-1749 [PMID: 9469432]
- 17 Mailian ES, Chabdarova RN, Korzun EI. [Energy reactions in the skeletal muscles of rats after short-term space flight on Kosmos-1514]. *Kosm Biol Aviokosm Med* 1988; 22: 55-58 [PMID: 3047495 DOI: 10.1002/hep.22962]
- 18 Kim YS, Cheong JY, Cho SW, Lee KM, Hwang JC, Oh B, Kimm K, Lee JA, Park BL, Cheong HS, Shin HD, Kim JH. A functional SNP of the Interleukin-18 gene is associated with the presence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-infected patients. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2722-2728 [PMID: 19757044 DOI: 10.1007/s10620-009-0970-6]
- 19 马莎莎, 吴继周, 吴健林, 刘芳, 胡蝶飞, 宁秋悦, 庞裕. HLA-DRB1 20/04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: 346-351

■同行评价

本文首次探讨IL-18与广西肝癌家族聚集性发病的相关性, 对了解肝癌高发家族成员癌前机体的免疫学变化具有一定指导意义。

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 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。

ENBD与ERBD治疗急性梗阻性胆管炎56例

谢宏民, 杨新魁, 李佳璇

■背景资料

化脓性胆管炎内镜下胆汁引流通常有鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)和内镜置入塑料胆管支架引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)两种方法, 临床上常用的是鼻胆管引流术, 但临床工作中发现该方法存在患者不适反应较大, 患者依从性较差, 国内外研究ERBD代替ENBD进行内引流是否可行。

谢宏民, 杨新魁, 李佳璇, 广东医学院附属陈星海医院消化内科 广东省中山市 528415

谢宏民, 主治医师, 主要从事ERCP、胰腺癌的诊治及消化内镜的研究。

作者贡献分布: 课题设计由谢宏民完成; 试剂、病历提供由杨新魁完成; 数据分析由李佳璇完成。

通讯作者: 杨新魁, 主任医师, 528415, 广东省中山市小榄下基路133号, 广东医学院附属陈星海医院消化内科. 1183181@qq.com 电话: 0760-22287202

收稿日期: 2013-11-04 修回日期: 2013-12-01

接受日期: 2013-12-12 在线出版日期: 2014-02-08

Treatment of acute obstructive cholangitis by ENBD and ERBD: Analysis of 56 cases

Hong-Min Xie, Xin-Kui Yang, Jia-Xuan Li

Hong-Min Xie, Xin-Kui Yang, Jia-Xuan Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China

Correspondence to: Xin-Kui Yang, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, 133 Xiaolanxiaji Road, Zhongshan 528415, Guangdong Province, China. 1183181@qq.com

Received: 2013-11-04 Revised: 2013-12-01

Accepted: 2013-12-12 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To compare the safety and effectiveness of endoscopic nasobiliary drainage (ENBD) versus endoscopic retrograde biliary drainage (ERBD) in patients with acute obstructive cholangitis.

METHODS: Fifty-six selected patients with acute obstructive cholangitis were randomized to undergo emergency endoscopic biliary drainage by ENBD ($n = 28$) or ERBD ($n = 28$). Clinical outcomes and adverse events were compared between the two groups.

RESULTS: Baseline patient data were similar between the two groups. Endoscopic biliary drainage was successful in all patients. Complication rates were similar between the ENBD and ERBD groups. There was no significant difference in the incidence of abdominal pain, fever, or jaundice at 12, 24 h, 3 d, and 7 d postoperatively. However, the incidence rate of blockage

was statistically higher in the ERBD group than in the ENBD group ($P = 0.015$).

CONCLUSION: Endoscopic biliary decompression is an effective treatment for patients with acute obstructive cholangitis. In contrast to other studies, we found an increased rate of blockage in patients undergoing ERBD. If the patient has more purulent bile or poor liver function, ENBD should be used.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Endoscopic retrograde biliary drainage; Endoscopic nasobiliary drainage; Acute obstructive cholangitis

Xie HM, Yang XK, Li JX. Treatment of acute obstructive cholangitis by ENBD and ERBD: Analysis of 56 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 578-582 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/578.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.578>

摘要

目的: 内镜下胆汁引流通常有鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)和内镜置入塑料胆管支架引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)两种方法。我们比较了ENBD和ERBD治疗本院56例急性梗阻性胆管炎的治疗效果。

方法: 共筛选出56例急性梗阻性胆管炎患者随机接受急诊ENBD($n = 28$)或ERBD组($n = 28$)。分别比较临床结果和并发症。

结果: ENBD组与ERBD相比较, 所有患者成功手术。两组患者临床表现是相似的($P > 0.1$), 腹痛、发热、黄疸症状发生率术后12、24 h、3、7 d对比无明显差异($P > 0.1$), 并发症发生率两组相似($P > 0.1$)。然而, ERBD堵塞的发病率显著高于鼻胆管引流($P = 0.015$)。

结论: 两种胆管引流(ERBD和ENBD)是急性梗阻性胆管炎患者有效的治疗方法, 但ERBD阻塞率更高, 如果患者脓性胆汁较多, 而且肝功能较差的情况下, 则应该选择ENBD行外引流。

■同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 内镜置入塑料胆管支架引流术; 鼻胆管引流; 急性梗阻性胆管炎

核心提示: 内镜鼻胆管引流术, 鼻胆管引流(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)或内镜置入塑料胆管支架引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)都是有效的, 现有的研究证明了ERBD更舒适, 采用ERBD可以保持水电解质平衡, 这些都是ERBD优点, 但ERBD更容易发生阻塞, 从而导致转氨酶下降缓慢. 在两种方法的选取上, 如果患者鼻咽敏感性高、脓性胆汁较少、肝功能较好的情况, 可以选择ERBD法行内引流, 但如果患者脓性胆汁较多, 而且肝功能较差的情况下, 则应该选择ENBD行外引流.

谢宏民, 杨新魁, 李佳璇. ENBD与ERBD治疗急性梗阻性胆管炎56例. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 578-582 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/578.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.578>

0 引言

急性梗阻性胆管炎, 特别是化脓性胆管炎, 多由于胆管结石或胆管狭窄引起, 紧急情况下, 可引起感染性休克, 如果没有及时和适当的治疗, 病情危重, 甚至死亡. 胆道引流是治疗急性化脓性胆管炎的有效手段, 传统上多数患者接受紧急胆道接受紧急手术引流^[1], 但由于手术患者多数有休克, 急诊手术创伤较大, 发病率和死亡率非常高. 内镜逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)的开展是微创治疗急性梗阻性胆管炎的一项重要手段, 使介入治疗的方式成为可能^[2]. 内镜下胆管减压术治疗阻塞性引起的化脓性胆管炎创伤小、效果好, 较手术引流更具优势^[3-6], 这些患者在引流后有必要行二次ERCP检查或手术切除胆管结石. 内镜胆管引流的方法包括内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)和内镜下塑料支架胆管引流(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD), 可以合并行括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)^[7]. ENBD可以在外部放置引流瓶直接观察引流物, 引流胆汁可做胆汁培养和冲洗导管. 然而, 鼻胆管引流治疗的患者会觉得咽部不鼻部不适, 严重患者无法忍受甚至自行拉出. ERBD是一个内部的引流过程无不适. 相对来说, 因导管移位和无法冲洗有闭塞的风险. Lee等^[8-10]的研究发现, ENBD与

ERBD在急性梗阻性研究胆管炎中无任何不同, 而Cotton等^[11]则发现, ENBD虽与ERBD在治疗效果上相近, 但ERBD更容易发生支架堵塞. 本研究通过对比两种内镜下引流术, 分析两种引流方法的优缺点.

1 材料和方法

1.1 材料 本研究将2007-01/2013-06广东医学院附属陈星海医院共有56例急性梗阻性胆管炎患者, 随机分为两组, 分组后分别接受ENBD及ERBD术. 被诊断为急性胆管炎的患者多数临床表现为: 腹痛、黄疸和发热, 肝功能检查提示胆道梗阻. B超或CT成像提示: 胆管梗阻. 并用抗生素治疗无明显缓解. 这些患者常有进行性黄疸, 右上腹疼痛, 持续发热, 甚至出现精神障碍和休克. 继发胆总管结石或胆管良性狭窄, 需要急诊内镜胆道引流. 将患者随机分为ENBD($n = 28$)和ERBD组($n = 28$). 十二指肠镜(TJF-260V, 奥林巴斯, 日本), 塑料支架(直胆道支架, 8.5 F, 奥林巴斯公司), 常规鼻胆管(波科公司).

1.2 方法

1.2.1 治疗: 在发病后所有梗阻性胆管炎患者24 h内由经验丰富的内镜医师进行ERCP, 患者接受地西洋和度冷丁清醒镇静, 使用十二指肠镜通过十二指肠乳头进行胆总管插管后, 注入造影剂明确胆管炎病因、胆管梗阻的位置、胆管直径. 两组患者分别接受放置塑料支架, 或常规鼻胆管. 手术后, 所有患者接受内科抗感染治疗, 使用促生长素抑制素降低ERCP术后胰腺炎^[10-14]. 如果鼻胆导管或支架闭塞不足或不引流, 则用甲硝唑冲洗, 或者重新置管.

1.2.2 数据收集: 手术后, 所有患者均严格观察7 d. 主要转归指标为临床表现为腹痛、发热、黄疸等, ERCP的相关并发症, 包括ERCP术后胰腺炎[表现为典型的疼痛较前加重, 血清淀粉酶(脂肪酶)持续升高]、术后消化系出血、阻塞、支架移位等. 在症状缓解后, 所有患者进行了第二次ERCP取石或手术切除胆囊.

统计学处理 所有数据采用SPSS11.0统计软件进行统计分析, 计量数据采用mean±SD的形式表示, 两样本采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 56例急性梗阻性胆管炎患者的临床特征

■ 研究前沿

化脓性胆管炎为内科常见急重症, 是ERCP治疗中的重点项目, 但临床研究面临的问题是ERCP为创性介入治疗, 手术要求较高, 临床病例相对较少.

■ 相关报道

Zhang等研究表明导管阻塞后造成的明显后果是转氨酶下降变慢, 对肝功能较差的患者有加重肝损伤的危险, 但在术后出血及胰腺炎等常见并发症上并无重要影响. 本研究就本院进行的ERCP就导管阻塞问题进行进一步验证, 从而指导临床工作.

■创新盘点

本研究的创新之处在于将ERBD作为一种内引流应用在临床工作,既往已有相关文献研究了ERBD较ENBD较为舒适,本研究系统化总结了临床上的表现,就内引流的一些需要考虑的并发症如导管阻塞进行了研究。

表 1 两组内镜下引流临床特征比较($n = 28$)

临床特点	ENBD组	ERBD组
性别(男/女)	12/16	16/12
年龄(岁)	54.8 ± 18.2	55.5 ± 19.1
上腹疼痛	26	25
发热	20	21
黄疸	13	10
精神障碍	3	4
休克	6	7
症状持续时间(d)	1.3 ± 0.8	1.5 ± 0.6

ENBD: 内镜下鼻胆管引流; ERBD: 内镜下塑料支架引流。

表 2 两组患者ERCP后并发症($n = 28, n(\%)$)

分组	ENBD组	ERBD组	P值
总发生率	6/28(21.4)	9/28(32.1)	0.237
术中出血	1(3.57)	1(3.57)	1.0
术后出血	1(3.57)	0(0)	0.495
胰腺炎	2(7.1)	2(7.1)	1.0
引流管阻塞	1(3.57)	5(17.8)	0.015
移位	1(3.57)	1(3.57)	1.0

ENBD: 内镜下鼻胆管引流; ERBD: 内镜下塑料支架引流; ERCP: 十二指肠镜下逆行胰胆管造影。

表1中两组临床特征上无显著差异, ENBD、ERBD组年龄构成分别为54.8岁±19.2岁、55.3岁±19.1岁, 临床表现上, 具有右上腹疼痛患者, ENBD和ERBD组分别为92.8%、89.2%, 发热患者为71.4%、75%, 黄疸患者为46.4%、35.7%。精神障碍的患者为10%, 低血压的患者为15%。症状持续时间ENBD组为1.3 d±0.8 d, ERBD组为1.5 d±0.6 d。两组间无统计学差异。在所有56例患者中, 使用ENBD或ERBD手术全部成功(100%)。花费的时间ENBD为22.5 min±7.4 min和ERBD为19.5 min±8.1 min。所有患者中, 最常见的引起急性梗阻性胆管炎的原因为胆管结石, ENBD组为66.0%, ERBD组为61.7%, 胆总管单发结石ENBD组和ERBD组分别为19.1%、14.9%。在ERCP后, 引流出脓性胆汁, ENBD组和ERBD组分别34%及29.8%(表1)。

2.2 ERCP术后的临床表现 腹痛、发热、黄疸和实验室检查两组ERCP治疗后7 d之内得到改善组。引流后所有患者精神错乱和低血压完全纠正, 临床表现相似(图1)。

2.3 术后并发症比较 ENBD组与ERBD组相比较, 分别有1例和5例患者引流管阻塞, 其堵塞率

■应用要点

本文总结的实际特点与临床工作是相符合的, 对于指导ERCP的实际操作有应用价值, 针对不同类型的患者选择不同的手术方式, 对于改善患者ERCP术后的安全性、舒适性有积极意义。

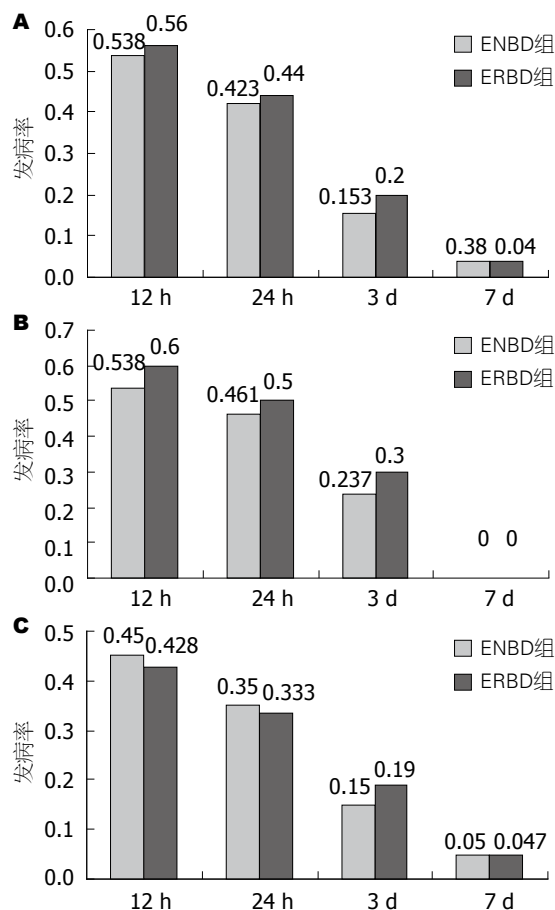


图 1 ENBD组与ERBD组术后临床表现。A: 腹痛治疗前后对比; B: 发热治疗前后对比; C: 黄疸治疗前后对比。ENBD: 内镜下鼻胆管引流; ERBD: 内镜下塑料支架引流。

ERBD组明显高于ENBD组(17.8% vs 3.5%, $P = 0.015$)。两组都有1例患者有消化系出血, 通过局部注射肾上腺素, 并通过热凝并且自发地停止。7 d之内, 1例患者鼻胆管引流组发生迟发性出血, 两组患者都有2例患者出现术后胰腺炎, 经内科保守治疗后治愈。56例患者无穿孔并发症及无在评估期间死亡(表2)。

3 讨论

由于胆管结石的急性胆管炎多数病情严重, 伴有低血压和精神障碍。紧急引流非常重要, 在中度和轻度疾病的患者, 如果按内科抗感染病情没有好转, 也要求行ENBD或ERBD引流^[15], 因为充分引流后可降低并发症发生率和缩短住院时间。ENBD与ERBD研究比较没有表现出明显的手术成功率及临床表现的不同^[16]。然而, 已经有研究表明, 留置支架可避免由于鼻胆管导致的不适^[7]。该研究证实相对留置支架而言, 留置鼻胆管的患者更容易无法耐受鼻胆管的鼻咽部的刺激而自行拔管。我们比较的ERBD与ENBD

治疗急性梗阻性胆管炎. 发现ENBD或ERBD两种治疗都是有效的. 临床症状和体征在两种内镜下引流治疗后7 d内都得到改善. 然而, 在术后并发症的比较中发现, 术后常见的并发症如出血及术后胰腺炎发生率并无明显差异, 证明ERBD与ENBD在预防术后并发症上效果相似, 但ERBD更易堵塞, 可能与发生导管移位有关, Zhang等^[7]的研究表明导管阻塞后造成的明显后果是转氨酶下降变慢, 对肝功能较差的患者有加重肝损伤的危险, 但在术后出血及胰腺炎等常见并发症上并无重要影响. 理论上, 一个10 F大支架应该引流更充分. 然而, 缺乏实验相关依据. 有研究表明, 支架堵塞率较高为10 F支架及6-7 F支架的^[8-10]. 所以我们选择8.5 F支架, 原因如下: 直径接近鼻胆导管, 操作方便, 创伤小, 由于ERBD堵塞的发病率明显高于ENBD. 因此, 如果有大量的化脓性胆汁, ENBD较ERBD更适宜, 因为鼻胆导管可以容易引流及冲洗, 以防止堵塞, 也可用于重复胆管造影.

总之, 本研究表明内镜鼻胆管引流术, ENBD或ERBD都是有效的, 相对而言, 现有的研究证明了ERBD更舒适, 并且内引流物中的水电解质在小肠内易吸收, 相对外引流直接排出体外, 采用ERBD可以保持水电解质平衡^[8], 这些都是ERBD优点, 但ERBD更容易发生阻塞, 从而导致转氨酶下降缓慢. 在两种方法的选取上, 如果患者鼻咽敏感性高、脓性胆汁较少、肝功能较好的情况, 可以选择ERBD法行内引流, 但如果患者脓性胆汁较多, 而且肝功能较差的情况下, 则应该选择ENBD行外引流.

4 参考文献

- Boey JH, Way LW. Acute cholangitis. *Ann Surg* 1980; 191: 264-270 [PMID: 7362292 DOI: 10.1097/0000658-198003000-00002]
- Lai EC, Mok FP, Tan ES, Lo CM, Fan ST, You KT, Wong J. Endoscopic biliary drainage for severe acute cholangitis. *N Engl J Med* 1992; 326: 1582-1586 [PMID: 1584258 DOI: 10.1056/NEJM199206113262401]
- Christoforidis E, Mantzoros I, Goulimaris I, Kanellos I, Tsorlini H, Vakalis I, Betsis D. Endoscopic management strategies in relation to the severity of acute cholangitis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2006; 16: 325-329 [PMID: 17057573 DOI: 10.1097/01.sle.0000213744.15773.88]
- Leung JW, Chung SC, Sung JJ, Banez VP, Li AK. Urgent endoscopic drainage for acute suppurative cholangitis. *Lancet* 1989; 1: 1307-1309 [PMID: 2566834 DOI: 10.1016/S0140-6736(89)92696-2]
- Tsuyuguchi T, Takada T, Kawarada Y, Nimura Y, Wada K, Nagino M, Mayumi T, Yoshida M, Miura F, Tanaka A, Yamashita Y, Hirota M, Hirata K, Yasuda H, Kimura Y, Strasberg S, Pitt H, Büchler MW, Neuhaus H, Belghiti J, de Santibanes E, Fan ST, Liau KH, Sachakul V. Techniques of biliary drainage for acute cholangitis: Tokyo Guidelines. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 35-45 [PMID: 17252295 DOI: 10.1007/s00534-006-1154-9]
- Nagino M, Takada T, Kawarada Y, Nimura Y, Yamashita Y, Tsuyuguchi T, Wada K, Mayumi T, Yoshida M, Miura F, Strasberg SM, Pitt HA, Belghiti J, Fan ST, Liau KH, Belli G, Chen XP, Lai EC, Philippi BP, Singh H, Supe A. Methods and timing of biliary drainage for acute cholangitis: Tokyo Guidelines. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 14: 68-77 [PMID: 17252299 DOI: 10.1007/s00534-006-1158-5]
- Zhang RL, Cheng L, Cai XB, Zhao H, Zhu F, Wan XJ. Comparison of the safety and effectiveness of endoscopic biliary decompression by nasobiliary catheter and plastic stent placement in acute obstructive cholangitis. *Swiss Med Wkly* 2013; 143: w13823 [PMID: 23832310]
- Lee DW, Chan AC, Lam YH, Ng EK, Lau JY, Law BK, Lai CW, Sung JJ, Chung SC. Biliary decompression by nasobiliary catheter or biliary stent in acute suppurative cholangitis: a prospective randomized trial. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 361-365 [PMID: 12196773 DOI: 10.1016/S0016-5107(02)70039-4]
- Park SY, Park CH, Cho SB, Yoon KW, Lee WS, Kim HS, Choi SK, Rew JS. The safety and effectiveness of endoscopic biliary decompression by plastic stent placement in acute suppurative cholangitis compared with nasobiliary drainage. *Gastrointest Endosc* 2008; 68: 1076-1080 [PMID: 18635173 DOI: 10.1016/j]
- Sharma BC, Kumar R, Agarwal N, Sarin SK. Endoscopic biliary drainage by nasobiliary drain or by stent placement in patients with acute cholangitis. *Endoscopy* 2005; 37: 439-443 [PMID: 15844022 DOI: 10.1055/s-2005-861054]
- Cotton PB, Garrow DA, Gallagher J, Romagnuolo J. Risk factors for complications after ERCP: a multivariate analysis of 11,497 procedures over 12 years. *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 80-88 [PMID: 19286178 DOI: 10.1016/j.gie.2008.10.039]
- Rudin D, Kiss A, Wetz RV, Sottile VM. Somatostatin and gabexate for post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis prevention: meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 977-983 [PMID: 17559376 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.04928.x]
- Lee KT, Lee DH, Yoo BM. The prophylactic effect of somatostatin on post-therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis: a randomized, multicenter controlled trial. *Pancreas* 2008; 37: 445-448 [PMID: 18953260 DOI: 10.1097/MPA]
- Omata F, Deshpande G, Tokuda Y, Takahashi O, Ohde S, Carr-Locke DL, Jacobs JL, Mine T, Fukui T. Meta-analysis: somatostatin or its long-acting analogue, octreotide, for prophylaxis against post-ERCP pancreatitis. *J Gastroenterol* 2010; 45: 885-895 [PMID: 20373114 DOI: 10.1007/s00535-010-0234-4]
- Agarwal N, Sharma BC, Sarin SK. Endoscopic management of acute cholangitis in elderly patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6551-6555

■名词解释

内窥镜鼻胆管引流术: ERCP术后常见的外引流术, 内镜下塑料支架胆管引流(ERBD)主要应用于胆道梗阻的术后内引流, 近年来有学者应用于常规ERCP术后引流.

■同行评价

急性梗阻性胆管炎以通畅引流为主,更适合应用ENBD,优势是不言而喻的,从导管阻塞上看,一些患者如果鼻咽敏感性高、脓性胆汁较少、肝功能较好的情况,可以选择ERBD法行内引流,有一定的临床实用价值。

- [PMID: 17072990]
16 Kumar R, Sharma BC, Singh J, Sarin SK. Endoscopic biliary drainage for severe acute cholangitis in biliary

obstruction as a result of malignant and benign diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 994-997 [PMID: 15304115 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03415.x]

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

两种亚型FD患者的口盲传递时间

付遥焱, 刘诗

付遥焱, 刘诗, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

付遥焱, 主要从事功能性消化不良的发病机制的研究。

“十一五”国家科技支撑计划课题基金资助项目, No.

2007BAI04B01

作者贡献分布: 付遥焱与刘诗对此文所作贡献均等; 此课题由付遥焱与刘诗共同设计及操作完成; 数据分析由付遥焱完成; 本文写作由付遥焱与刘诗完成。

通讯作者: 刘诗, 教授, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科。

shiliugao@yahoo.com

收稿日期: 2013-05-11 修回日期: 2013-07-03

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

Assessment of orocecal transit time by breath hydrogen test in two subtypes of functional dyspepsia

Yao-Yao Fu, Shi Liu

Yao-Yao Fu, Shi Liu, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: the Supporting Program of the “Eleventh Five-year Plan” for Sci & Tech Research of China, No. 2007BAI04B01

Correspondence to: Shi Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. shiliugao@yahoo.com

Received: 2013-05-11 Revised: 2013-07-03

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To explore the orocecal transit time (OCTT) in two subtypes of functional dyspepsia, and to study the effects of gender, age and body mass index (BMI) on OCTT.

METHODS: Twenty-five postprandial distress syndrome (PDS) patients, twenty-two epigastric pain syndrome (EPS) patients and twenty healthy volunteers were used. All of them received the breath hydrogen test, and the OCTT was recorded.

RESULTS: A significant difference in OCTT was detected between PDS patients and healthy volunteers, but not between EPS patients and

healthy volunteers. Gender appeared not to influence OCTT in all three groups. There was a positive correlation between age and OCTT in healthy volunteers, but not in PDS patients or EPS patients. BMI-related differences in OCTT were noted in healthy volunteers, but not in PDS patients or EPS patients.

CONCLUSION: In PDS patients, intestinal transit function is impaired. Age and BMI appear to influence OCTT in healthy volunteers, but not in PDS patients or EPS patients.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Functional dyspepsia; Hydrogen breath test; Orocecal transit time; Intestinal transit function

Fu YY, Liu S. Assessment of orocecal transit time by breath hydrogen test in two subtypes of functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 583-587 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/583.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.583>

摘要

目的: 研究两种亚型功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)患者的口盲传递时间, 探讨性别、年龄、体质量指数(body mass index, BMI)对口盲传递时间的影响。

方法: 对25例餐后不适综合征(postprandial distress syndrome, PDS)患者、22例上腹痛综合征(epigastric pain syndrome, EPS)患者及20例健康对照者进行氢呼吸实验, 记录口盲传递时间(orocecal transit time, OCTT)。

结果: (1)PDS组的OCTT较健康组明显延长, 而EPS组与健康组无显著差异; (2)三个实验组中, 不同性别之间的OCTT均无显著差异; (3)健康组中, 年龄与OCTT呈正相关, PDS组及EPS组中无该相关性; (4)健康组中, BMI与OCTT呈正相关; PDS组及EPS组中无该相关性。

结论: PDS患者的小肠传输功能明显下降; 年龄及BMI对健康人的OCTT有一定影响, 而对

■背景资料

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)按照罗马Ⅲ标准分为餐后不适综合征(postprandial distress syndrome, PDS)和上腹疼痛综合征(epigastric pain syndrome, EPS)。FD发病机制复杂, 主要包括胃肠动力障碍、内脏高敏感、HP感染、胃肠激素的变化及社会心理因素等方面。其中, 部分FD患者的小肠动力存在障碍, 小肠传输功能亦属于小肠动力的一种, 该项功能与FD之间的研究甚少, 且存在争议。

■同行评议者

卜平, 教授, 扬州大学医学院

■研究前沿

口盲肠传递时间(orocaecal transit time, OCTT)也称小肠传递时间,主要反映小肠传输功能。氢呼吸实验没有创伤性,且操作简单,费用低,易为受试者接受。近年来,氢呼吸实验应用广泛,但将该实验应用于FD患者小肠传输功能的测定国外报道甚少,且两种亚型FD患者小肠传输功能的比较国内尚无报道。本文旨在应用氢呼吸实验对两种亚型FD患者的小肠传输功能进行研究,并了解性别、年龄、BMI对小肠传输功能有无影响。

■相关报道

有关小肠传输功能与FD之间关系的研究甚少,且国外研究结果存在争议。Waldron采用葡萄糖氢呼吸实验对50例FD患者及30名健康志愿者行OCTT检测,结果提示FD患者的OCTT明显延长($P < 0.01$)。Lorena在2002年行乳果糖氢呼吸实验,发现FD患者的OCTT与健康人并无差异($P = 1.00$),说明FD患者的小肠传输功能尚可,这与Wegener的报道一致。上述研究者虽均采用氢呼吸实验的方法测定OCTT,但所用底物是不同的,而Lorena选取的固体餐含乳果糖,且糖类剂量亦不相同,以上两种不同的实验方法可能是导致研究结果不一致的原因之一。

PDS患者及EPS患者无显著影响。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 功能性消化不良; 氢呼吸实验; 口盲传递时间; 小肠传输功能

核心提示: 本研究发现餐后不适综合征(postprandial distress syndrome, PDS)组的口盲肠传递时间(orocaecal transit time, OCTT)较健康组明显延长,但上腹疼痛综合征(epigastric pain syndrome)组与健康组之间无明显差异,说明PDS患者的小肠传输功能较正常人下降,而EPS组患者该功能尚可;另外,本研究还发现OCTT存在部分可能的影响因素。在健康组中,年龄、体质量指数(body mass index)与OCTT呈正相关,但男女之间无明显差异。

付遥焱, 刘诗. 两种亚型FD患者的口盲传递时间. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 583-587 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/583.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.583>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是一种常见的临床症候群,按照罗马III标准分为餐后不适综合征(postprandial distress syndrome, PDS)和上腹疼痛综合征(epigastric pain syndrome, EPS)^[1]。FD发病机制复杂,有关胃肠动力障碍的研究较多,如胃排空延缓及胃容纳舒张功能障碍可以引起FD患者的症状^[2,3],但小肠传输功能与FD的关系研究较少。

口盲肠传递时间(orocaecal transit time, OCTT)也称小肠传递时间,主要反映小肠传输功能。其原理为:乳果糖是人工合成的双糖,因小肠缺乏水解该糖的酶而不能被小肠吸收,因此口服后,乳果糖进入结肠,被细菌发酵产氢,故口服乳果糖后呼气中氢气排出所需时间即为OCTT^[4]。小肠传递时间的标准测定方法是核素标记试餐体外扫描法,但该方法研究费用昂贵^[5],而氢呼吸实验没有创伤性,且操作简单,费用低,易为受试者接受^[6]。近年来,氢呼吸实验应用广泛,但将该实验应用于FD患者小肠传输功能的测定国外报道甚少,且两种亚型FD患者小肠传输功能的比较国内尚无报道。

本文旨在应用氢呼吸实验对两种亚型FD患者的小肠传输功能进行研究,并了解性别、年龄、体质量指数(body mass index, BMI)对小肠传输功能有无影响。

1 材料和方法

1.1 材料 (1)PDS患者组:符合罗马III标准的PDS患者25例^[1],男10例,女15例。年龄为18-55岁,平均39.4岁±10.0岁;(2)EPS组:符合罗马III标准的EPS患者22例^[1],男10例,女12例。年龄为19-56岁,平均39.0岁±11.0岁。受试患者均接受上消化道胃镜、肝胆胰B超、血尿常规,肝肾功能、血糖检查以排除消化系统器质性病变;(3)健康对照组:选取健康成年人20例,男10例,女10例。年龄为23-55岁,平均38.6岁±11.7岁。健康对照组要求无腹部手术史,近半年无消化系统症状,无严重全身器质性疾病,近2 wk没有服用可能影响胃肠道运动或分泌的药物,近1 wk未服用抗生素。以上3组受试者的年龄、性别差异无统计学意义。该实验经过华中科技大学同济医学院附属协和医院伦理委员会批准,所有健康志愿者均在《知情同意书》上签名。

1.2 方法 受试者禁食12 h后于次日晨行基础呼吸氢浓度测试后,予200 mL温水送服乳果糖10 g。每隔10 min测一次呼吸氢浓度,若呼气数值高于基础呼吸氢浓度5 ppm以上,且连续3次,以时间为横坐标,呼吸氢浓度为纵坐标作图,则第1次出现H₂持续升高的时间即为OCTT。出现双峰的受试者,以第二峰出现的时间为准。试验过程全程禁食、禁饮、禁烟,避免剧烈运动及打瞌睡。试验所用仪器为深圳市海得威生物科技有限公司生产,灵敏度为1 ppm;试验药品为乳果糖口服溶液,由丹东康复制药有限公司生产(规格为10 mL: 5 g)。

统计学处理 结果以mean±SD表示,以F检验比较各组数据的方差齐性。方差齐时,用t检验,方差不齐时用t'检验;统计分析采用SPSS17.0统计软件包来完成。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种亚型FD患者与健康组OCTT的比较 健康组、PDS组、EPS组OCTT的均值分别为:82.5 min±11.6 min、109.6 min±16.7 min、89.1 min±15.1 min。其中,健康组与PDS组间有显著差异($P < 0.0001$),健康组与EPS组之间无明显差异($P = 0.1228$)(图1)。

2.2 性别对OCTT的影响 健康组、PDS组及EPS组中,男女之间OCTT值均无显著差异。具体数值如下:健康组中,男性均值为84.0 min±9.7 min,女性均值为81.0 min±13.7 min, $P = 0.5789$;PDS组中,男性均值为113.0 min±18.3 min,女性

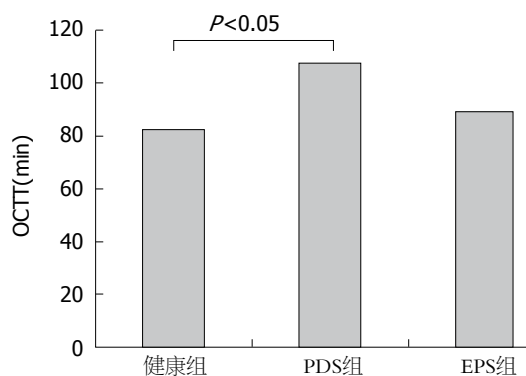


图1 两种亚型FD患者与健康组之间OCTT的比较. OCTT: 口盲肠传递时间; PDS: 餐后不适综合征; EPS: 上腹痛综合征.

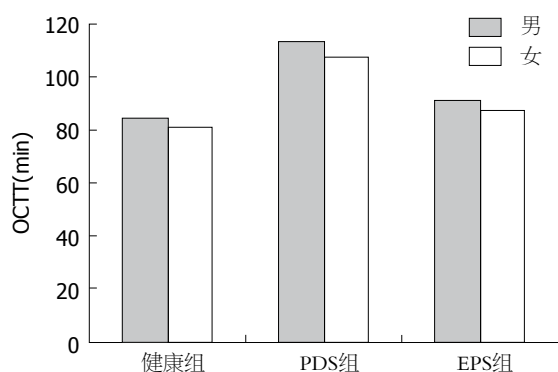


图2 不同性别之间OCTT的比较. OCTT: 口盲肠传递时间; PDS: 餐后不适综合征; EPS: 上腹痛综合征.

均值为107.3 min ± 15.8 min, $P = 0.4151$; EPS组中, 男性均值为91.0 min ± 14.4 min, 女性均值为87.5 min ± 16.0 min, $P = 0.6003$ (图2).

2.3 年龄对OCTT的影响 健康组中, 年龄与OCTT呈正相关: $r = 0.7092$, $P = 0.0005$; PDS组中, 年龄与OCTT无显著相关性: $r = 0.2338$, $P = 0.2607$; EPS组中, 年龄与OCTT亦无显著相关性: $r = 0.3991$, $P = 0.0657$ (图3).

2.4 BMI与OCTT的关系 健康组中, BMI与OCTT呈正相关: $r = 0.4570$, $P = 0.0428$; PDS组中, BMI与OCTT无显著相关性: $r = 0.0061$, $P = 0.9768$; EPS组中, BMI与OCTT亦无显著相关性: $r = -0.0470$, $P = 0.8356$ (图4).

3 讨论

FD发病机制尚未完全明确, 部分研究表明胃肠动力紊乱与之相关^[7]. 有关胃排空及胃容纳舒张功能的研究较多^[8,9], 但小肠动力方面研究较少. Jebbink等^[10]和Bassotti等^[11]发现部分FD患者存在小肠动力障碍. 小肠传输功能亦属于小肠动力的一种, 目前检测小肠传输功能的方法主要有放射性核素标记法、不透X线标志物法、测

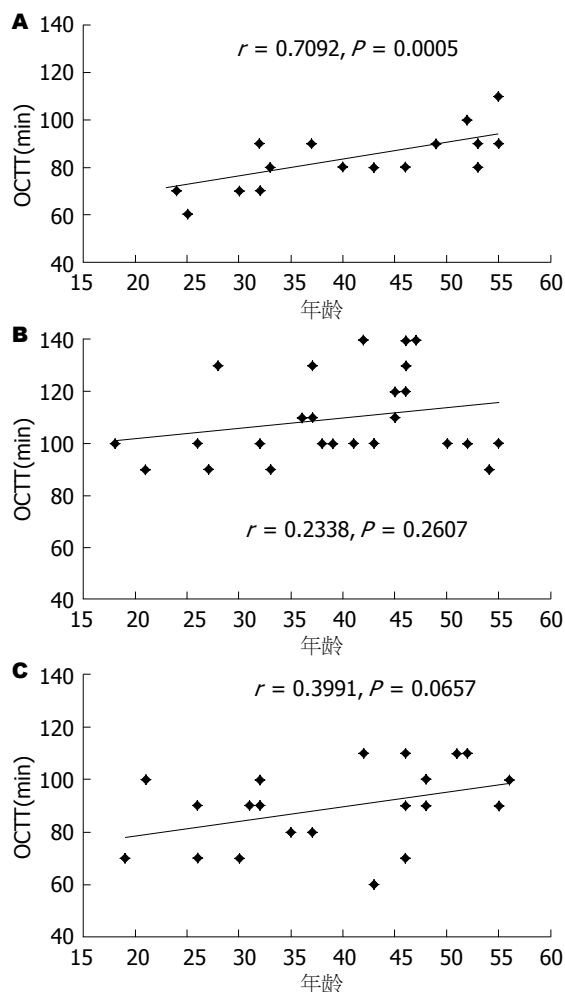


图3 年龄与OCTT的关系. A: 健康组; B: PDS组; C: EPS组. OCTT: 口盲肠传递时间; PDS: 餐后不适综合征; EPS: 上腹痛综合征.

压法等, 但上述方法有的为侵入性检测, 有的费用昂贵且对实验设备有较高要求^[12-14]. 氢呼吸实验因其操作简单、无创伤性、费用低的优点被众多研究者采用^[6].

有关小肠传输功能与FD之间关系的研究甚少, 且国外研究结果存在争议. Waldron等^[15]采用葡萄糖氢呼吸实验对50例FD患者及30名健康志愿者行OCTT检测, 结果提示FD患者的OCTT明显延长($P < 0.01$). Lorena等^[16]在2002年行乳果糖氢呼吸实验, 发现FD患者的OCTT与健康人并无差异($P = 1.00$), 说明FD患者的小肠传输功能尚可, 这与Wegener等^[17]的报道一致. 上述研究者虽均采用氢呼吸实验的方法测定OCTT, 但所底物是不同的, Waldron等^[15]所用的固体餐含葡萄糖, 而Lorena等^[16]选取的固体餐含乳果糖, 且糖类剂量亦不相同, 以上两种不同的实验方法可能是导致研究结果不一致的原因之一.

本研究发现PDS组的OCTT较健康组明显

■创新盘点

氢呼吸实验原理为: 乳果糖是人工合成的双糖, 因小肠缺乏水解该糖的酶而不能被小肠吸收, 因此口服后, 乳果糖进入结肠, 被细菌发酵产氢, 故口服乳果糖后呼气中氢气排出所需时间即为OCTT. 小肠传输时间的标准测定方法是核素标记试餐体外扫描法, 但该方法研究费用昂贵, 而氢呼吸实验无创性, 且操作简单, 近年来, 将该实验应用于FD患者小肠传输功能的测定国外报道甚少, 且两种亚型FD患者小肠传输功能的比较国内尚无报道.

■应用要点

FD中的PDS亚型是进食相关性消化不良, 指进食平常餐量后的上腹胀饱不适, 或是不能完成平常餐量就过早的出现早饱, 以上症状1周至少发作数次. 本研究采用乳果糖氢呼吸实验表明PDS患者存在小肠传输功能延缓, 而EPS患者无该特点, 这可能与两种亚型FD患者不同的发病机制有关, 这对临床上FD患者的分型及指导用药具有重要的意义.

■名词解释

口盲肠传递时间 (oro-caecal transit time, OCTT) 也称小肠传递时间, 主要反映小肠传输功能。其原理为: 乳果糖是人工合成的双糖, 因小肠缺乏水解该糖的酶而不能被小肠吸收, 因此口服后, 乳果糖进入结肠, 被细菌发酵产氢, 故口服乳果糖后呼气中氢气排出所需时间即为 OCTT。

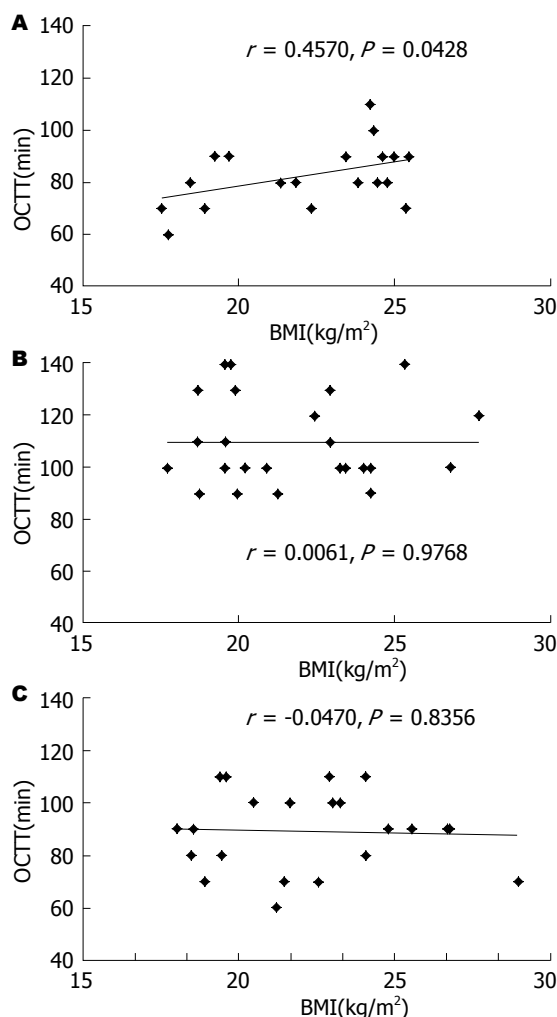


图4 BMI与OCTT的关系。A: 健康组; B: PDS组; C: EPS组。OCTT: 口盲肠传递时间; PDS: 餐后不适综合征; EPS: 上腹痛疼痛综合征; BMI: 体质质量指数。

延长, 但EPS组与健康组之间无明显差异, 说明PDS患者的小肠传输功能较正常人下降, 而EPS组患者该功能尚可。这与国外的研究结果^[16]略有不同。可能原因如下: (1)样本量不同; (2)研究对象的差异: Lorena等^[16]选取的FD患者是罗马II标准中的动力障碍样消化不良患者, 而本研究按照罗马III标准进行分类, 分别对PDS及EPS两种亚型患者进行研究; (3)实验方法不同: Lorena等^[16]采用的是20 g乳果糖, 我们采用的是10 g, 乳果糖的克数不同对试验结果亦有影响。La Brooy等^[18]分别采用不同克数乳果糖(10、15、20 g)进行氢呼吸试验, 发现随着乳果糖剂量增加, OCTT值是缩短的。且Wilberg等^[19]对12例健康志愿者进行研究, 发现选择10 g这种剂量更接近于正常值。相对于Lorena等^[16]而言, 本实验在实验方法及对象上的选取更具说服力。

另外, 本研究还发现OCTT存在部分可能的影响因素。在健康组中, 年龄、BMI与OCTT呈

正相关, 但男女之间无明显差异。Pilotto等^[20]对10例健康青年人及22例健康老年人分别进行氢呼吸实验, 发现老年组的OCTT明显长于青年组, 说明年龄可能是健康人胃肠传输功能的影响因素之一, 这与本实验得到的结论一致。而对于两种亚型FD患者, 性别、年龄及BMI对其并无显著影响, 我们推测FD患者在病理状态下, 小肠传输功能并不像健康人那样具有一定规律性, 可以随年龄及BMI而变化, 其中机制有待今后进一步研究。

FD中的PDS亚型是进食相关性消化不良, 指进食平常餐量后的上腹饱胀不适, 或是不能完成平常餐量就过早的出现早饱, 以上症状1 wk至少发作数次^[21]。本研究采用乳果糖氢呼吸实验表明PDS患者存在小肠传输功能延缓, 而EPS患者无该特点, 这可能与两种亚型FD患者不同的发病机制有关, 这对临床上FD患者的分型及指导用药具有重要的意义。

4 参考文献

- 1 Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, Stanghellini V. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1466-1479 [PMID: 16678560 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.11.059]
- 2 Tack J, Bisschops R, Sarnelli G. Pathophysiology and treatment of functional dyspepsia. *Gastroenterology* 2004; 127: 1239-1255 [PMID: 15481001 DOI: 10.1053/j.gastro.2004.05.030]
- 3 Tack J, Piessevaux H, Coulie B, Caenepeel P, Janssens J. Role of impaired gastric accommodation to a meal in functional dyspepsia. *Gastroenterology* 1998; 115: 1346-1352 [PMID: 9834261]
- 4 郑家驹. 呼气氢试验临床应用与研究进展. *中华消化杂志* 1999; 19: 51-52
- 5 Maurer AH, Krevsky B. Whole-gut transit scintigraphy in the evaluation of small-bowel and colon transit disorders. *Semin Nucl Med* 1995; 25: 326-338 [PMID: 8545637]
- 6 Jorge JM, Wexner SD, Ehrenpreis ED. The lactulose hydrogen breath test as a measure of oro-caecal transit time. *Eur J Surg* 1994; 160: 409-416 [PMID: 7811826]
- 7 Stanghellini V, Corinaldesi R, Tosetti C. Relevance of gastrointestinal motor disturbances in functional dyspepsia. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1998; 12: 533-544 [PMID: 9890086]
- 8 Tack J. Gastric motor and sensory function. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 557-565 [PMID: 19726981 DOI: 10.1097/MOG.0b013e328331b5ad]
- 9 Kindt S, Tack J. Impaired gastric accommodation and its role in dyspepsia. *Gut* 2006; 55: 1685-1691 [PMID: 16854999 DOI: 10.1136/gut.2005.085365]
- 10 Jebbink HJ, vanBerge-Henegouwen GP, Akkermans LM, Smout AJ. Small intestinal motor abnormalities in patients with functional dyspepsia demonstrated by ambulatory manometry. *Gut* 1996; 38: 694-700 [PMID: 8707114]

- 11 Bassotti G, Pelli MA, Morelli A. Duodenojejunal motor activity in patients with chronic dyspeptic symptoms. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12: 17-21 [PMID: 2303682]
- 12 Grybäck P, Blomquist L, Schnell PO, Jacobsson H, Hellström PM. [Scintigraphic assessment of the small intestine transit. Diagnostic investigation of dysmotility with 99mTc-HIDA]. *Lakartidningen* 2002; 99: 1556-1558, 1561-1562 [PMID: 12025209]
- 13 Turberg Y, Dederding JP. [Evaluation of small intestinal motility]. *Schweiz Med Wochenschr Suppl* 1993; 54: 26-31 [PMID: 8211047]
- 14 周丽雅, 李炳庆, 林三仁, 王爱英, 董秀云, 李兆申, 袁耀宗, 于中麟, 刘新光, 王惠吉, 郑意端. 盐酸伊托必利治疗功能性消化不良的多中心临床研究. *中国临床药理学杂志* 2000; 16: 403-407
- 15 Waldron B, Cullen PT, Kumar R, Smith D, Jankowski J, Hopwood D, Sutton D, Kennedy N, Campbell FC. Evidence for hypomotility in non-ulcer dyspepsia: a prospective multifactorial study. *Gut* 1991; 32: 246-251 [PMID: 2013418]
- 16 Lorena SL, de Souza Almeida JR, Mesquita MA. Orocecal transit time in patients with functional dyspepsia. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: 21-24 [PMID: 12080221]
- 17 Wegener M, Börsch G, Schaffstein J, Reuter C, Leverkus F. Frequency of idiopathic gastric stasis and intestinal transit disorders in essential dyspepsia. *J Clin Gastroenterol* 1989; 11: 163-168 [PMID: 2738359]
- 18 La Brooy SJ, Male PJ, Beavis AK, Misiewicz JJ. Assessment of the reproducibility of the lactulose H2 breath test as a measure of mouth to caecum transit time. *Gut* 1983; 24: 893-896 [PMID: 6618268]
- 19 Wilberg S, Pieramico O, Malfertheiner P. [The H2-lactulose breath test in the diagnosis of intestinal transit time]. *Leber Magen Darm* 1990; 20: 129-137 [PMID: 2377020]
- 20 Pilotto A, Franceschi M, Del Favero G, Fabrello R, Di Mario F, Valerio G. The effect of aging on oro-cecal transit time in normal subjects and patients with gallstone disease. *Aging (Milano)* 1995; 7: 234-237 [PMID: 8541377]
- 21 Geeraerts B, Tack J. Functional dyspepsia: past, present, and future. *J Gastroenterol* 2008; 43: 251-255 [PMID: 18458839 DOI: 10.1007/s00535-008-2167-8]

■同行评价

氢呼吸实验对两种亚型FD患者口盲传递时间的研究有一定临床价值, 方法可靠。

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

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

普芦卡必利治疗慢性便秘的系统评价

侯毅, 谷云飞, 朱秉宜

■背景资料

便秘是一种常见的慢性功能性疾病, 主要表现为排便次数减少、便坚硬干结、排便费力、腹胀、排便不尽感明显等等, 对患者的生活质量造成不良影响。其中女性的患病率约为男性的2倍, 并与年龄呈正相关, 65岁以后尤为明显。治疗慢性便秘的药物众多, 但大多不能有效缓解症状, 不良反应明显, 如西沙比利、替加色罗等, 在治疗剂量产生心脏不良反应。

侯毅, 南京中医药大学第一临床医学院 江苏省南京市 210029

谷云飞, 朱秉宜, 南京中医药大学附属医院 江苏省南京市 210029

侯毅, 博士生, 主要从事中医外科学和肛肠病学研究。

作者贡献分布: 本文由谷云飞与朱秉宜设计; 文献搜集、论文写作由侯毅完成; 谷云飞审核。

通讯作者: 谷云飞, 教授, 主任医师, 210029, 江苏省南京市汉中 路155号, 南京中医药大学附属医院。guyunfei127@126.com

电话: 0258-6617141

收稿日期: 2013-11-13 修回日期: 2013-12-11

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

Prucalopride for treatment of chronic constipation: A systematic review

Yi Hou, Yun-Fei Gu, Bing-Yi Zhu

Yi Hou, the First Clinical Medical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Yun-Fei Gu, Bing-Yi Zhu, Department of Colorectal Surgery, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yun-Fei Gu, Professor, Chief Physician, Department of Colorectal Surgery, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, 155 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. guyunfei127@126.com

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

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of prucalopride in the treatment of chronic constipation.

METHODS: A systematic review of randomized controlled trials (RCTs) of prucalopride for chronic constipation was performed.

RESULTS: A total of five RCTs with 2587 patients were included. The proportions of patients with ≥ 3 SCBMs (spontaneous complete bowel movement)/week, or improvement of overall PAC-SYM symptom score and PAC-QOL satisfaction score ≥ 1 relative to baseline values were significantly higher in the prucalopride groups (2 and 4 mg/d) compared with the placebo group. The incidences of nausea, diarrhea and headache

were significantly higher in the prucalopride groups compared with the placebo group. Both of the treatments groups had no significant variations of electrocardiogram (ECG). One patient with arrhythmia and myocardial infarction was reported in the placebo group, and eventually died. Three patients with supraventricular tachycardia were reported in the prucalopride 2 mg/d group, and one of them with mitral valve prolapse and supraventricular tachycardia had disease progression. The proportion of patients dropping out of the study was significantly lower in the prucalopride 2 mg/d group compared with the prucalopride 4 mg/d group.

CONCLUSION: According to the meta-analysis of these 5 trails, prucalopride 2 mg/d was safe and effective in the treatment of chronic constipation.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Prucalopride; Chronic constipation; Drug evaluation; Meta analysis

Hou Y, Gu YF, Zhu BY. Prucalopride for treatment of chronic constipation: A systematic review. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(4): 588-595 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/588.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.588>

摘要

目的: 评价普芦卡必利治疗慢性便秘的有效性和安全性。

方法: 对普芦卡必利治疗慢性便秘的随机对照试验(randomized controlled trials, RCTs)进行系统评价。

结果: 共纳入5项RCTs, 2587例患者。普芦卡必利2和4 mg/d组每周 ≥ 3 次自发完全排便(spontaneous complete bowel movement, SCBM)的患者比例、PAC-SYM症状总评分及PAC-QOL满意度较基线 ≥ 1 分的患者比例高于安慰剂组。普芦卡必利2和4 mg/d组恶心、腹泻、头痛的发生率均高于安慰剂组, 对心电

■同行评议者

邵华, 副主任药师, 东南大学附属中大医院药剂科

图无明显影响(包括QT间期)。安慰剂组报道1例出现心律不齐、心肌梗死, 最终死亡, 2 mg/d组报道3例出现室上性心动过速, 其中1名患者原有二尖瓣脱垂室上性心动过速病史, 服用药物后病情进展。2 mg/d因不良事件(adverse events, AEs)退出研究的患者比例明显低于4 mg/d, 其余各项比较2组无统计学差异。

结论: 普芦卡必利2 mg/d治疗慢性便秘更安全有效, 但由于缺乏高质量研究, 纳入文献数量较少, 应谨慎对待上述结论。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 普芦卡必利; 慢性便秘; 药物评价; Meta分析

核心提示: Meta分析作为循证医学工具发展至今已较为成熟, 其通过增大样本含量来增加结论的可信度, 解决单个小样本临床试验结果的不一致性, 结论相对更为可靠。本文正是通过这一科学手段, 对普芦卡必利治疗慢性便秘的有效性和安全性进行评估, 给广大临床工作者提供参考。

侯毅, 谷云飞, 朱秉宜. 普芦卡必利治疗慢性便秘的系统评价. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 588-595 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/588.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i4.588>

0 引言

便秘是一种常见的慢性功能性疾病, 主要表现为排便次数减少、粪便坚硬干结、排便费力、腹胀、排便不尽感明显等等, 对患者的生活质量造成不良影响^[1,2]。北美流行病学调查显示, 普通人群中慢性便秘患者约占15%, 但有些学者估计高达27%。其中女性的患病率约为男性的2倍, 并与年龄呈正相关, 特别是在65岁以后尤为明显^[3,4]。目前治疗慢性便秘的药物众多, 包括氯离子通道激活剂, 神经营养因子和五羟色胺(5-hydroxytyptamine, 5-HT)类制剂等^[5-8], 但大多不能有效缓解症状, 且不良反应明显^[9], 如西沙比利、替加色罗等, 这些药物缺乏对5-HT₄受体的高度选择性, 会同其他受体如5-HT_{1B/D}和心脏的hERG钾通道相互作用, 在治疗剂量产生心脏不良反应^[10-13]。

普芦卡必利是新型二氢苯并呋喃甲酰胺衍生物的代表药物, 是首个选择性、高亲和性5-HT₄受体激动剂。实验证明其能促进胃、小肠和结肠平滑肌运动, 可增加动物模型结肠的蠕动反射和集团运动, 与非靶器官的相互作用极

小^[14,15]。目前国内外关于普芦卡必利治疗慢性便秘的临床研究已有较多报道, 我们运用系统评价的方法, 收集全世界已发表的普芦卡必利治疗慢性便秘的随机对照试验(randomized controlled trails, RCTs)进行Meta分析, 以期对其疗效和安全性进行评价, 为慢性便秘的临床治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 研究类型: 普芦卡必利治疗慢性便秘的RCTs。纳入文献为发表的全文和摘要, 限中、英文语种。研究对象: 年龄≥18岁, 诊断为慢性便秘的患者。慢性便秘的诊断标准为罗马标准、每周不超过2次自发排便, 或者25%以上的排便时间中排便费力^[16](自发排便是指最后一次摄入泻剂超过24 h后发生的排便)。不包含内分泌、新陈代谢、药物引起的便秘。排除普芦卡必利治疗脊髓损伤引起的便秘的文献。干预措施: 试验组口服任何剂量的普芦卡必利治疗, 对照组口服安慰剂或任何阳性对照药物。结局指标: 主要指标: 每周≥3次自发完全排便(spontaneous complete bowel movement, SCBM)的患者比例(只有患者认为有完全排空的感觉的自主排便才称为自发完全排便)。次要指标: 便秘症状问卷(PAC-SYM)总评分的变化情况。便秘患者生活质量自评量表(PAC-QOL)满意度较基线≥1分的患者比例。AEs发生情况包括: 总的AEs发生率、严重不良事件(serious adverse events, SAEs)的发生率, 因AEs退出研究的患者比例, 与普芦卡必利相关的AEs患者比例(例如QT间期延长、心动过速、死亡等)。

1.2 方法

1.2.1 排除标准: 纳入研究的终点观察指标无以上任一结局指标的RCTs; 报道普芦卡必利治疗慢性便秘的体外实验; 无法获得全文且摘要无详细数据的文献; 相同资料重复发表的文献。

1.2.2 检索策略: 计算机检索PubMed、EMbase、OVID、中国生物医学文献服务系统、维普中文科技期刊全文数据库、万方数据资源、中国知网全文数据库, 检索时间从建库到2013-10。英文检索词包括constipation、prucalopride、5-HT₄、R09388、R108512、resolor、unii-0A09iuw5tp、4-Amino-5-chloro-2,3-dihydro-N-[1-(3-methoxypropyl)-4-piperidyl]-7-benzofurancarboxamide; 中文检索词包括便秘、普芦卡必利。若某研究在不同出版物重复报道, 采

■研究前沿

普芦卡必利是新型二氢苯并呋喃甲酰胺衍生物的代表药物, 是首个选择性、高亲和性五羟色胺(5-hydroxytyptamine, 5-HT)₄受体激动剂。实验证明其能促进胃、小肠和结肠平滑肌运动, 可增加动物模型结肠的蠕动反射和集团运动, 与非靶器官的相互作用极小。

■相关报道

Busti、Potet等报道西沙比利、替加色罗等药物治疗慢性便秘,由于缺乏对5-HT₄受体的高度选择性,会同其他受体如5-HT_{1B/D}和心脏的hERG钾通道相互作用,在治疗剂量产生心脏不良反应。

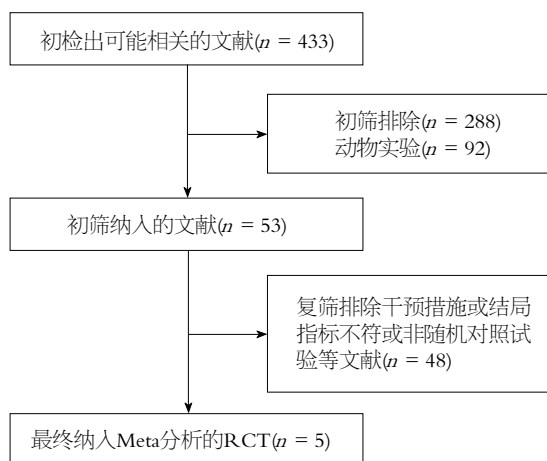


图1 文献检索流程图及结果。

用最新发表结果。

1.2.3 文献质量评价和资料提取: 由2位研究者独立进行文献质量评价, 存在分歧时由第3名研究者参与决定纳入与否, 并按设计表格提取资料。所有纳入文献方法学质量评价采用Cochrane协作网推荐的方法进行, 质量评价包括: (1)随机分配方法; (2)分配方案隐藏; (3)盲法; (4)是否描述失访、退出发生情况; (5)是否进行意向性分析(intention to treat, ITT)。

统计学处理 采用Stata12.0软件进行分析。对试验结果进行异质性分析, 如异质性检验结果显示各研究间存在异质性($I^2 > 50\%$, $P < 0.10$), 选用随机效应模型计算, 反之选用固定效应模型计算。结果用比数比(odds ratio, OR)及其95%可信区间(95%CI)表示。若各临床试验提供的数据不能进行Meta分析, 则只对其进行描述性的定性分析。采用SPSS16.0进行 χ^2 检验分析亚组间差异。绘制漏斗图, 用Begg秩相关法分析是否存在发表偏倚。

2 结果

2.1 纳入试验的特点及方法学质量 初检出相关文献433篇, 阅读文题及摘要后, 排除综述类文章、信件及动物实验, 筛选得到53篇文献(英文52篇, 中文1篇), 其中48篇干预措施或结局指标不符被排除, 最终纳入5个RCTs^[17-21], 包括2587例患者。除1篇为国内研究^[21], 其余试验均为国外研究(图1)。

所有RCTs均有明确的纳入及排除标准, 入选患者均为成年人, 1篇^[20]研究对象为老年患者, 年龄范围为64-95岁, 平均年龄76.4岁 \pm 0.88岁。3篇描述随机方法^[18-20], 5篇均采用双盲法, 3篇采

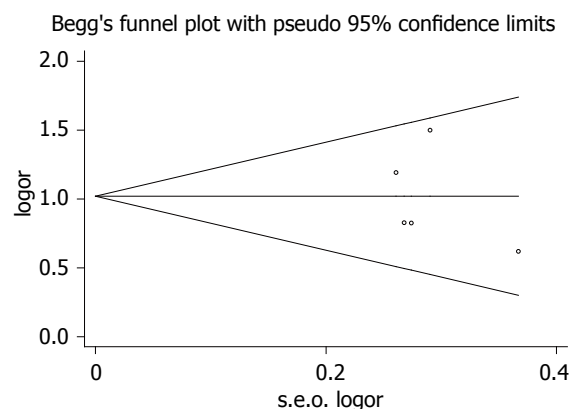


图2 发表性偏倚的漏斗图。

用ITT^[17,20,21]。1篇治疗组采用2 mg/d^[21], 3篇为2 mg/d和4 mg/d^[17-19], 1篇为1、2、4 mg/d^[20], 5项研究均以安慰剂为对照组。所有RCTs均明确指出治疗组和对照组基线情况具有可比性, 均报告了退出和失访情况(表1, 2)。利用2 mg/d每周 ≥ 3 次SCBM患者比例OR值的对数及其对数的标准误绘制漏斗图, 图形显示左右对称, 用Begg秩相关法分析, $\text{Pr}>|z| = 0.81 > 0.05$, 提示不存在发表偏倚(图2)。

2.2 每周 ≥ 3 次SCBM的患者比例 5项RCTs均报道了每周 ≥ 3 次SCBM的患者比例。2与4 mg/d研究间均不存在异质性(2 mg/d: $I^2 = 25.5\%$, $P = 0.252$; 4 mg/d: $I^2 = 14.3\%$, $P = 0.321$), 故采用固定效应模型计算, 2治疗组均优于安慰剂(2 mg/d: OR = 2.79, 95%CI: 2.17-3.58, $P < 0.001$; 4 mg/d: OR = 2.43, 95%CI: 1.84-3.21, $P < 0.001$)(图3)。2和4 mg/d经 χ^2 检验比较, 两者无统计学差异($\chi^2 = 1.3$, $P = 0.254 > 0.05$)。有1项RCT^[20]报道了1 mg/d ≥ 3 次SCBM的比率为43.7%(33/76), 与安慰剂(24.6%, 17/70)相比无统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 PAC-SYM总评分 有3项RCTs^[17-19]报道了PAC-SYM总评分, 但均只报道了患者总例数及分数的均值, 未提供分数的标准差, 无法进行Meta分析。3篇文献报道各剂量普芦卡必利均优于安慰剂($P < 0.05$), 各治疗组之间无统计学差异。2.4 PAC-QOL满意度较基线 ≥ 1 分的患者比例 有3项RCTs报道了PAC-QOL满意度较基线 ≥ 1 分的患者比例^[17-19], 2与4 mg/d研究间均不存在异质性(2 mg/d: $I^2 = 0$, $P = 0.848$; 4 mg/d: $I^2 = 0$, $P = 0.536$), 故采用固定效应模型计算, 2治疗组均优于安慰剂(2 mg/d: OR = 2.43, 95%CI: 1.88-3.14, $P < 0.001$; 4 mg/d: OR = 2.47, 95%CI: 1.90-3.20, $P < 0.001$)(图4)。2和4 mg/d经 χ^2 检验比较, 两者无

表 1 纳入研究的基本特征

研究(年份)	n	年龄范围(岁, 均值)	女性(%)	干预措施治疗组对照组	结局指标
Tack等 ^[17] 2008	713	17–89 43.9 ± 0.57	90.8	2 mg/d(n = 236) for 12 wk 安慰剂(n = 240) for 12 wk	①+②+③+④
Camilleri等 ^[18] 2008	620	18–85 48.3 ± 0.60	87.9	4 mg/d(n = 237) for 12wk 2 mg/d(n = 207) for 12 wk 安慰剂(n = 209) for 12 wk	①+②+③+④
Quigley等 ^[19] 2008	641	18–95 47.9 ± 0.54	86.6	4 mg/d(n = 204) for 12wk 2 mg/d(n = 214) for 12wk 安慰剂(n = 212) for 12 wk	①+②+③+④
Müller-Lissner等 ^[20] 2010	300	64–95 76.4 ± 0.88	70.0	1 mg/d(n = 76) for 4wk 2 mg/d(n = 75) for 4wk 安慰剂(n = 70) for 4 wk	①+②+③+④
邹多武等 ^[21] 2012	313	18–65 41.2 ± 13.60	88.5	4 mg/d(n = 79) for 4 wk 2 mg/d(n = 155) for 12 wk 安慰剂(n = 158) for 12 wk	①+④

①: 每周≥3次SCBM的患者比例; ②: PAC-SYM总评分; ③: PAC-QOL满意度较基线≥1分的患者比例; ④: AEs.

表 2 纳入研究的方法学质量评价

研究	随机	分配隐藏	盲法	失访/退出研究	意向性分析	质量等级
Tack等 ^[17]	是, 未描述具体方法	不详	双盲	有	是	B
Camilleri等 ^[18]	随机数字表	充分	双盲	有	否	B
Quigley等 ^[19]	随机数字表	充分	双盲	有	否	B
Müller-Lissner等 ^[20]	随机数字表	不详	双盲	有	是	B
邹多武等 ^[21]	是, 未描述具体方法	不详	双盲	有	是	B

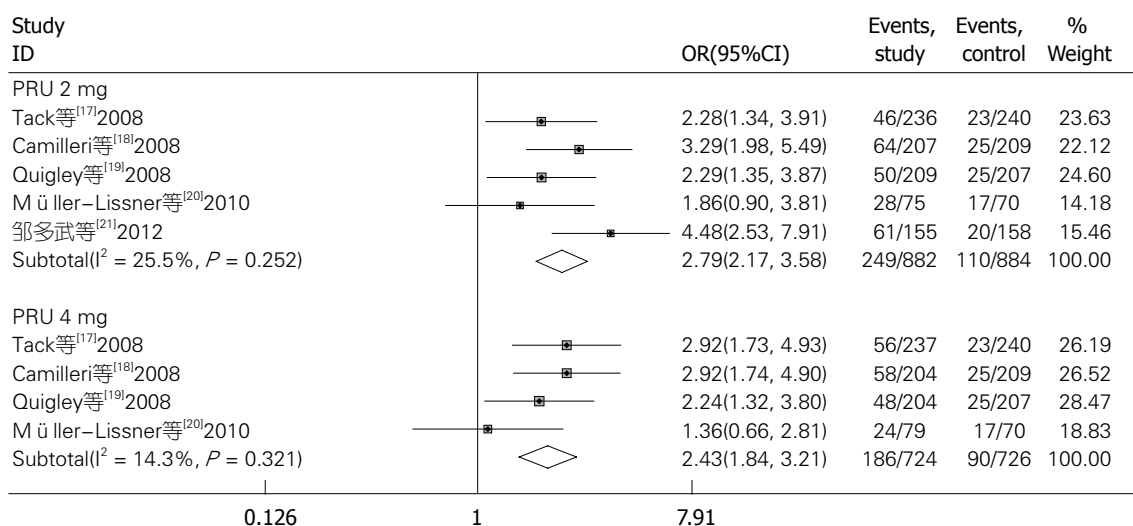


图 3 每周≥3次SCBM的患者比例的Meta分析.

统计学差异($\chi^2 = 0.031, P = 0.86 > 0.05$).

2.5 不良事件 5项RCTs均报道了AEs, 4项RCTs^[17,18,20,21]作了详细描述, 5项RCTs均可提取总的AEs发生率的数据作Meta分析, 2与4 mg/d

均高于安慰剂组, 2治疗组相比无统计学差异(图5), 1项RCT报道了1 mg/d总的AEs发生率为48.7%(37/76), 与安慰剂(45.7%, 32/70)相比无统计学差异($P > 0.05$). 2和4 mg/d因不良反应退出研

■创新盘点

本研究运用Stata12.0软件统计分析, 对普芦卡必利治疗慢性便秘的有效性安全性进行评价, 并行亚组分析, 提示普芦卡必利2 mg/d治疗慢性便秘更安全有效.

■应用要点

本文检索到的文献纳入的研究对象主要为成年女性,对男性及儿童的治疗情况不明,故而可能影响结论的真实性和可靠性。如能在以后的研究中扩大受试范围,将可提供证实普芦卡必利治疗慢性便秘安全有效的更具说服力的、可靠的证据。

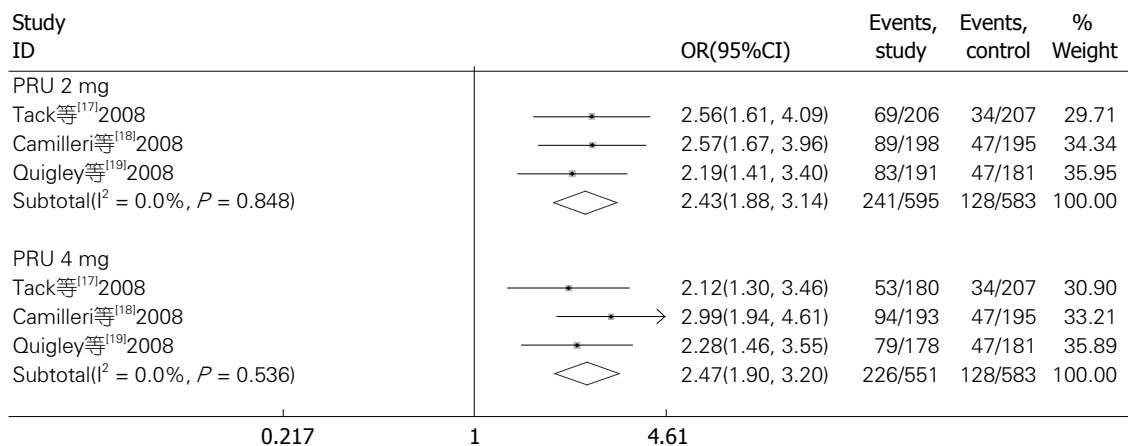
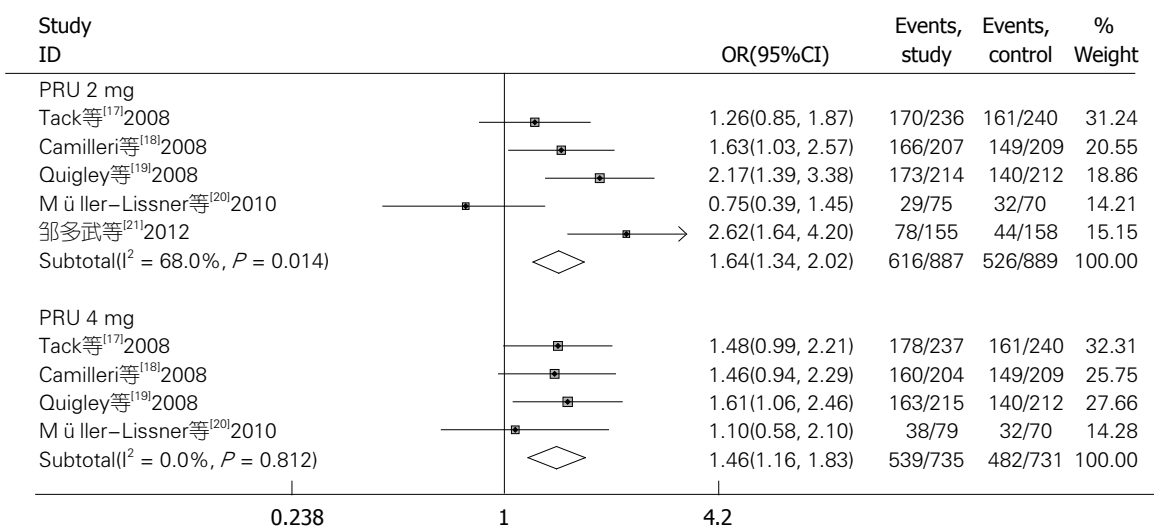
图 4 PAC-QOL满意度较基线 ≥ 1 分的患者比例的Meta分析。

图 5 经历不良反应的患者比例的Meta分析。

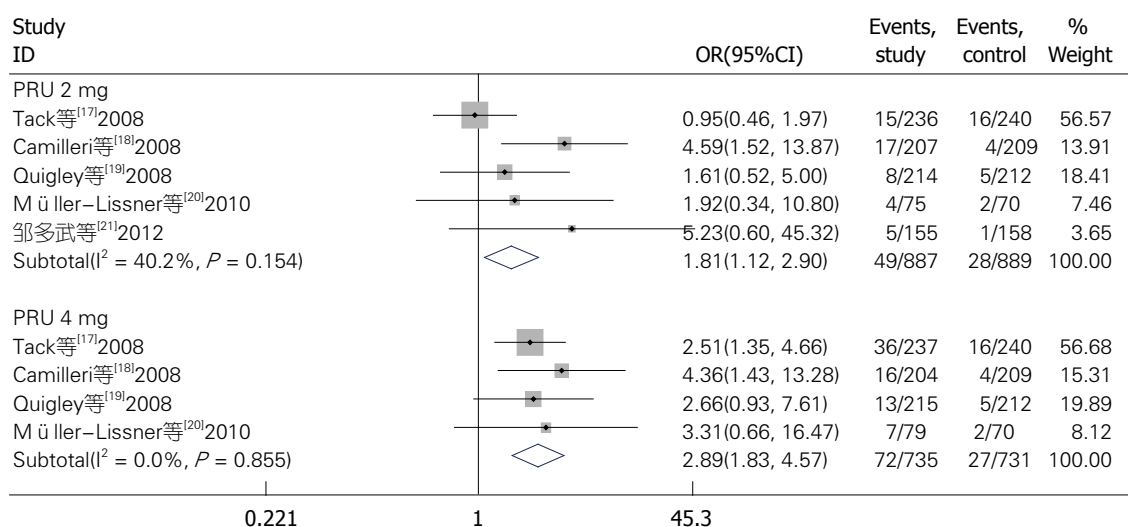


图 6 因AEs退出研究的患者比例的Meta分析。

究的患者比率均高于安慰剂(2 mg/d: OR = 1.81, 95%CI: 1.83-4.57, $P < 0.001$), 结果不存在异质性 95%CI: 1.12-2.90, $P = 0.015$; 4 mg/d: OR = 2.89, (2 mg/d: $I^2 = 40.2\%$, $P = 0.154$; 4 mg/d: $I^2 = 0$, $P =$

表 3 不良事件(普芦卡必利 vs 安慰剂)

不良事件	异质性检验	OR(95%CI)	研究数	n(实验组)	n(对照组)	P值
恶心	0.176	2 mg/d: 2.27(1.59–3.26)	4[18,19,21]	104/518	53/519	0
	0.415	4 mg/d: 2.27(1.58–3.25)	3[18,19,21]	104/520	53/519	0
腹泻	0.992	2 mg/d: 2.72(1.67–4.44)	3[18,19,21]	60/518	24/519	0
	0.453	4 mg/d: 3.40(2.11–5.48)	3[18,19,21]	73/520	24/519	0
腹痛	0.412	2 mg/d: 1.21(0.87–1.67)	3[18,19,21]	98/518	85/519	0.252
	0.622	4 mg/d: 1.22(0.88–1.68)	3[18,19,21]	99/520	85/519	0.227
头痛	0.418	2 mg/d: 2.07(1.49–2.88)	3[18,19,21]	121/518	68/519	0
	0.570	4 mg/d: 2.48(1.79–3.42)	3[18,19,21]	138/520	68/519	0
QT间期延长	0.790	2 mg/d: 1.20(0.32–4.54)	3[18,20,21]	5/450	4/450	0.788
	0.367	4 mg/d: 0.47(0.10–2.07)	3[18,20,21]	1/421	4/450	0.316

■同行评价

本文系统评价普芦卡必利治疗慢性便秘的有效性和安全性, 分析细致方法全面, 对存在的问题也进行了探讨, 文章的科学性、创新性和可读性较好, 对指导临床及科研有一定参考价值。

0.855)(图6), 2 mg/d明显少于4 mg/d($\chi^2 = 10.66$, $P = 0.001 < 0.01$)。5项RCTs均对SAEs作了描述。具体AEs分析结果: 2项RCTs^[17,18]报道了呕吐、腹胀的发生率, 2、4 mg/d与安慰剂相比无统计学差异(呕吐: $\chi^2 = 4.09$, $P = 0.129 > 0.0167$; 腹胀: $\chi^2 = 1.060$, $P = 0.303 > 0.0167$)。另2项RCTs报道了头晕的发生率^[17,20], 2 mg/d、4 mg/d与安慰剂相比无统计学差异($\chi^2 = 0.3$, $P = 0.584 > 0.0167$)。其余主要AEs的Meta分析结果如表3。

3 讨论

共纳入5项已发表的普芦卡必利治疗慢性便秘的RCTs, 1篇为中文文献, 4篇为英文文献, 所有研究均采用罗马II诊断标准, 以安慰剂为对照。5项研究入选患者均为成年人, 其中1项为老年患者。

每周SCBM ≥ 3 次可视为正常排便习惯。5项RCTs的Meta分析显示普芦卡必利2和4 mg/d均能提高每周SCBM ≥ 3 次的患者比率, 结果显示不存在异质性。2与4 mg/d相比无统计学差异。

有3项RCTs报道了PAC-SYM总评分及PAC-QOL满意度较基线 ≥ 1 分的患者比例, 研究结果均提示2与4 mg/d优于安慰剂, 两个治疗组间疗效无明显差别。

普芦卡必利2及4 mg/d总的AEs发生率均高于安慰剂(2 mg/d: OR = 1.64, 95%CI: 1.34–2.02, $P = 0$; 4 mg/d: OR = 1.458, 95%CI: 1.162–1.831, $P = 0.001$), 2 mg/d研究间存在异质性($I^2 = 68.0\%$, $P = 0.014$), 故采用随机效应模型计算, 敏感性分析去除两个样本量较小的RCTs后^[20,21], 合并效应差异仍具有统计学意义, 森林图结果方向也未发生改变(OR = 1.612, 95%CI: 1.261–2.061, $P < 0.001$), 且异质性消失($I^2 = 37.7\%$, $P = 0.201$), 表明此分析结果的稳定性较好。4 mg/d研究间

不存在异质性($I^2 = 0$, $P = 0.812$); 2与4 mg/d相比无统计学差异($\chi^2 = 2.890$, $P = 0.089 > 0.05$)。2和4 mg/d因不良反应退出研究的患者比率均高于安慰剂, 结果不存在异质性, 2 mg/d明显少于4 mg/d($\chi^2 = 10.657$, $P = 0.001 < 0.01$)。

纳入的各文献报道消化系及头部不适症状是普芦卡必利的主要不良反应, 多发生在治疗的第1周, 程度为轻到中度, 持续时间短暂。对恶心、腹泻等不良反应, Meta分析提示2及4 mg/d的发生率均高于安慰剂, 而呕吐、腹痛、腹胀、头晕则无明显差别, 2与4 mg/d之间无统计学差异(P 值分别为0.129、0.975、0.303、0.584均 $P > 0.05$)。对3项RCTs的Meta分析显示2与4 mg/d头痛发生率高于安慰剂, 治疗组之间无统计学差异($\chi^2 = 1.399$, $P = 0.237 > 0.05$)。系统评价未发现普芦卡必利对心电图有明显影响(包括QT间期)。SAEs的发生率低, 血常规、肝肾功能等实验室检查结果与安慰剂相比无显著差异。安慰剂组1例出现心律不齐、心肌梗死, 最终死亡, 作者认为与研究不相关^[20], 2 mg/d组3例出现室上性心动过速, 退出研究, 其中1例患者原有二尖瓣脱垂室上性心动过速病史, 服用药物后病情进展^[18]。该不良反应发生率低, 且因心血管事件死亡的病例出现在安慰剂组, 故提示普芦卡必利无明显心脏毒性。

有1项RCT^[20]报道了普芦卡必利1 mg/d组的治疗情况, 结果提示1 mg/d不能提高每周SCBM ≥ 3 次的患者比例, 但PAC-SYM总评分较安慰剂组高, 排便相关症状改善($P < 0.05$)。其AEs发生情况与安慰剂相比无明显差别。结果提示1 mg/d治疗慢性功能便秘疗效不理想, 但由于研究样本量较小, 无足够证据支持, 还待进一步研究。

根据森林图显示, Müller-Lissner^[20]的研究结

果与其他文献相比异质性较大, 阅读文献后考虑原因可能为研究对象均为老年人(年龄: 64-95岁, 76.4 ± 0.88 岁), 基础疾病较多, 其中包括帕金森病及抑郁症的患者, 研究期间受试者允许服用抗胆碱能类及三环抗抑郁药物, 基础疾病及药物作用等均有可能影响试验结果. 敏感性分析去除Müller-Lissner等的研究后, 合并效应差异无异质性(每周 ≥ 3 次SCBM的患者比例: 2 mg/d: $I^2 = 25.2\%$, $P = 0.260$; 4 mg/d: $I^2 = 0$, $P = 0.721$. 4 mg/d经历不良反应的患者比例: $I^2 = 0$, $P = 0.943$. 因AEs退出研究的患者比例: 2 mg/d: $I^2 = 45\%$, $P = 0.183$; 4 mg/d: $I^2 = 0$, $P = 0.690$), 仍具有统计学意义, 森林图结果方向也未发生改变(每周 ≥ 3 次SCBM的患者比例: 2 mg/d: OR = 2.941, 95%CI: 2.254-3.838, $P < 0.001$; 4 mg/d: OR = 2.682, 95%CI: 1.984-3.627, $P < 0.001$. 4 mg/d经历不良反应的患者比例: OR = 1.518, 95%CI: 1.190-1.937, $P = 0.001$. 因AEs退出研究的患者比例: 2 mg/d: OR = 1.796, 95%CI: 1.096-2.945, $P = 0.02$; 4 mg/d: OR = 2.850, 95%CI: 1.766-4.600, $P < 0.001$), 表明此分析结果的稳定性较好.

总之, 普芦卡必利2及4 mg/d均对慢性便秘有治疗作用, 且2者无统计学差异. 2组的不良反应主要为轻到中度的恶心、腹泻等消化系统症状及头痛等, 心脏毒性亦不明显, 但2 mg/d因不良反应退出研究的患者比率 < 4 mg/d. 系统评价结果提示普芦卡必利2 mg/d治疗慢性便秘更安全有效, 但纳入试验也存在一定问题, 纳入的5个RCTs的方法学质量评价结果显示均存在很多缺陷, 主要归纳为以下几个方面的问题: (1)未报告随机方法及分配方案的隐藏; (2)未进行意向性分析; (3)无随访, 或有随访, 但未讲明随访时间; (4)纳入研究对象主要为成年女性, 对男性及儿童的治疗情况不明, 故而可能影响结论的真实性和可靠性. 漏斗图分析提示无发表偏倚, 但纳入研究较少, 仅限于已发表的中、英文全文文献, 不排除存在语言偏倚、地区偏倚等等, 故应谨慎看待以上结论.

4 参考文献

- Irvine EJ, Ferrazzi S, Pare P, Thompson WG, Rance L. Health-related quality of life in functional GI disorders: focus on constipation and resource utilization. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1986-1993 [PMID: 12190165 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2002.05843]
- Johanson JF, Kralstein J. Chronic constipation: a survey of the patient perspective. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 599-608 [PMID: 17305761 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.03238]
- Stewart WF, Liberman JN, Sandler RS, Woods MS, Stenmagen A, Chee E, Lipton RB, Farup CE. Epidemiology of constipation (EPOC) study in the United States: relation of clinical subtypes to sociodemographic features. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3530-3540 [PMID: 10606315 DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01642]
- Higgins PD, Johanson JF. Epidemiology of constipation in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 750-759 [PMID: 15089911]
- Briejer MR, Akkermans LM, Schuurkes JA. Gastrointestinal prokinetic benzamides: the pharmacology underlying stimulation of motility. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 631-651 [PMID: 8746557]
- Briejer MR, Schuurkes JA. 5-HT₃ and 5-HT₄ receptors and cholinergic and tachykininergic neurotransmission in the guinea-pig proximal colon. *Eur J Pharmacol* 1996; 308: 173-180 [PMID: 8840129 DOI: 10.1016/0014-2999(96)00297]
- Tonini M. 5-Hydroxytryptamine effects in the gut: the 3, 4, and 7 receptors. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 637-642 [PMID: 16185301 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2005.00716]
- Tonini M, De Giorgio R, Spelta V, Bassotti G, Di Nucci A, Anselmi L, Balestra B, De Ponti F. 5-HT₄ receptors contribute to the motor stimulating effect of levosulpiride in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis* 2003; 35: 244-250 [PMID: 12801035]
- Bassotti G, Villanacci V. Slow transit constipation: a functional disorder becomes an enteric neuropathy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4609-4613 [PMID: 16937428]
- Busti AJ, Murillo JR, Cryer B. Tegaserod-induced myocardial infarction: case report and hypothesis. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 526-531 [PMID: 15098809 DOI: 10.1592/phco.24.5.526.33351]
- Potet F, Bouyssou T, Escande D, Baró I. Gastrointestinal prokinetic drugs have different affinity for the human cardiac human ether-à-gogo K(+) channel. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 1007-1012 [PMID: 11714889]
- Tonini M, Pace F. Drugs acting on serotonin receptors for the treatment of functional GI disorders. *Dig Dis* 2006; 24: 59-69 [PMID: 16699264 DOI: 10.1159/000090309]
- De Maeyer JH, Lefebvre RA, Schuurkes JA. 5-HT₄ receptor agonists: similar but not the same. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 99-112 [PMID: 18199093 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2007.01059]
- Emmanuel AV, Roy AJ, Nicholls TJ, Kamm MA. Prucalopride, a systemic enterokinetic, for the treatment of constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1347-1356 [PMID: 12144586 DOI: 10.1046/j.1365-2036.2002.01272]
- Coremans G, Kerstens R, De Pauw M, Stevens M. Prucalopride is effective in patients with severe chronic constipation in whom laxatives fail to provide adequate relief. Results of a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Digestion* 2003; 67: 82-89 [PMID: 12743445 DOI: 10.1159/000070202]
- Drossman DA, Sandler RS, McKee DC, Lovitz AJ. Bowel patterns among subjects not seeking health care. Use of a questionnaire to identify a population with bowel dysfunction. *Gastroenterology* 1982; 83: 529-534 [PMID: 7095360]
- Tack J, van Outryve M, Beyens G, Kerstens R,

- Vandeplasse L. Prucalopride (Resolor) in the treatment of severe chronic constipation in patients dissatisfied with laxatives. *Gut* 2009; 58: 357-365 [PMID: 18987031 DOI: 10.1136/gut.2008.162404]
- 18 Camilleri M, Kerstens R, Rykx A, Vandeplasse L. A placebo-controlled trial of prucalopride for severe chronic constipation. *N Engl J Med* 2008; 358: 2344-2354 [PMID: 18509121 DOI: 10.1056/NEJMoa0800670]
- 19 Quigley EM, Vandeplasse L, Kerstens R, Ausma J. Clinical trial: the efficacy, impact on quality of life, and safety and tolerability of prucalopride in severe chronic constipation--a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 315-328 [PMID: 19035970 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2008.03884]
- 20 Müller-Lissner S, Rykx A, Kerstens R, Vandeplasse L. A double-blind, placebo-controlled study of prucalopride in elderly patients with chronic constipation. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 991-998, e255 [PMID: 20529205 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2010.01533]
- 21 邹多武, 柯美云, 袁耀宗, 李延青, 林琳, 郝建宇, 侯晓华, Niwat Montreewasuwat. 普芦卡必利治疗慢性便秘的中国多中心随机、双盲、安慰剂对照临床研究. *中华消化杂志* 2012; 32: 847-851

编辑 田滢 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG)被Science Citation Index Expanded (SCIE)和MEDLINE等国际重要检索系统收录,在国际上享有较高声誉和影响力。WJG在PubMed Central (PMC)统计,单月独立IP地址访问58 257次,全文网络版(HTML Full Text)下载94 888次,全文PDF下载59 694次。另外根据基本科学指标库(essential science indicators)统计,2000-01-01/2010-12-31, SCIE检索的临床医学(clinical medicine)期刊有1 105种,总被引频次排名, WJG位于第174名。(2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

RT-PCR技术定量检测新疆溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化

蒋曼, 高鸿亮, 姚萍

■背景资料

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC) 在我国的发生率呈逐年增长趋势, 病因和发病机制尚不明确。目前认为, UC的发病涉及遗传、环境、肠道菌群失调和免疫异常等多种因素, 而肠道菌群失调可能是该病发病的触发点, 也是近年来消化领域的研究热点。

蒋曼, 高鸿亮, 姚萍, 新疆医科大学第一附属医院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

蒋曼, 硕士, 主要从事肠道菌群与溃疡性结肠炎相关性的研究。
作者贡献分布: 方法研究、数据整理、统计分析及文章起草由蒋曼完成; 设计、论文修改及审阅由姚萍与高鸿亮完成。

通讯作者: 姚萍, 教授, 主任医师, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新市区鲤鱼山南路137号, 新疆医科大学第一附属医院消化科。pingyaozh@sina.com

收稿日期: 2013-11-27 修回日期: 2013-12-11

接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

Quantification of intestinal microflora in ulcerative colitis patients using real-time PCR

Man Jiang, Hong-Liang Gao, Ping Yao

Man Jiang, Hong-Liang Gao, Ping Yao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Ping Yao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, 137 Liyushan South Road, Xinshe District, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. pingyaozh@sina.com

Received: 2013-11-27 Revised: 2013-12-11

Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To analyze the variation of intestinal microflora in patients with ulcerative colitis in Xinjiang by real-time fluorescence quantitative PCR to reveal the role and significance of intestinal microflora in the pathogenesis of ulcerative colitis.

METHODS: Specific primers for 16s rDNA of *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* spp and *Faecalibacterium prausnitzii* were designed. The feces of ulcerative colitis patients and normal controls in Xinjiang were collected. Bacterial genomic DNA was extracted from fecal samples and used to quantify the above five bacteria by real-time fluorescence quantitative PCR.

RESULTS: The level of *Bacteroides* in ulcerative colitis patients was significantly higher than that

in healthy controls (3.05 ± 0.22 vs 2.81 ± 0.21 , $P < 0.05$), whereas those of *Clostridium* (3.14 ± 0.17 vs 3.35 ± 0.12), *Bifidobacterium* spp (2.92 ± 0.16 vs 3.20 ± 0.13) and *Faecalibacterium prausnitzii* (2.77 ± 0.16 vs 2.95 ± 0.19) were significantly lower in ulcerative colitis patients than in healthy controls ($P < 0.05$ for all). The level of *Fusobacterium* showed no significant difference (3.20 ± 0.13 vs 3.15 ± 0.17 , $P > 0.05$) between the two groups.

CONCLUSION: The changes in the levels of *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* spp and *Faecalibacterium prausnitzii* may be associated with the pathogenesis of UC.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Ulcerative colitis; Intestinal microflora; Real-time fluorescence quantitative PCR

Jiang M, Gao HL, Yao P. Quantification of intestinal microflora in ulcerative colitis patients using real-time PCR. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 596-600
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/596.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.596>

摘要

目的: 应用SYBR Green I 实时荧光定量PCR法分析新疆溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化, 探讨肠道菌群在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)发病中的作用及意义。

方法: 根据细菌的16s DNA基因序列设计拟杆菌属、梭杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属的特异性引物。收集新疆溃疡性结肠炎患者及正常对照者粪便, 提取细菌基因组DNA, 应用SYBR Green I 实时荧光定量PCR反应测定5种细菌的数量。

结果: UC患者组拟杆菌属的数量(3.05 ± 0.22)较正常对照(2.81 ± 0.21)明显增多; 梭菌属(3.14 ± 0.17)、双歧杆菌属(2.92 ± 0.16)、柔嫩梭菌属(2.77 ± 0.16)的数量较正常对照(3.35 ± 0.12 , 3.08 ± 0.14 , 2.95 ± 0.19)的数量明显减少,

■同行评议者

江学良, 教授, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

差异有统计学意义($P<0.05$), 梭杆菌属在两组间差异无统计学意义($P>0.05$).

结论: 拟杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属数量的改变可能与新疆UC的发病相关.

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: 溃疡性结肠炎; 肠道菌群; 实时荧光定量PCR

核心提示: 本文研究发现与正常对照相比, 溃疡性结肠炎患者粪便菌群中拟杆菌属的数量明显增多, 而梭菌属、双歧杆菌属、柔嫩梭菌属的数量明显减少, 提示溃疡性结肠炎患者的肠道菌群发生了改变, 可能与其发病相关. 本研究结果为探索溃疡性结肠炎的病因及发病机制提供了一定的线索.

蒋曼, 高鸿亮, 姚萍. RT-PCR技术定量检测新疆溃疡性结肠炎患者肠道菌群的变化. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 596-600 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/596.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.596>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因不明的直肠和结肠的慢性非特异性炎症性疾病. 病变局限在大肠黏膜及黏膜下层, 以溃疡为主, 多累及直肠和远端结肠. 临床主要表现为腹痛、腹泻、黏液脓血便, 病程迁延, 轻重不等且容易复发. 目前大多研究认为UC的发病涉及遗传、环境、肠道菌群失调和免疫异常等多种因素, 而肠道菌群失调可能是该病发病的触发点^[1-3], 因此肠道菌群与UC之间的关系成为近年来消化领域的研究热点, 但肠道菌群失调对于UC的发病机制究竟有何意义尚不完全清楚. 有研究发现不同地区的UC发病率不相同, 可能与患者的居住地理环境、生活水平及饮食习惯相关^[4,5], 因此, 本研究尝试通过实时荧光定量PCR技术对新疆地区UC患者及其正常对照者粪便中拟杆菌属、梭杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属进行定量, 探讨肠道菌群与UC的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 粪便标本取自新疆医科大学第一附属医院消化科及体检中心, 正常对照者30例, 男14例, 女16例, 平均36.67岁±11.64岁, 无消化道慢性病史, 常规体检及粪便常规检查均未见异常. UC患者30例, 男14例, 女16例, 平均38.33岁

表1 入选溃疡性结肠炎患者及对照组临床特征

临床特征	病例组	对照组
性别(男/女)	14/16	14/16
年龄(mean ± SD, 岁)	38.33 ± 10.04	36.67 ± 11.64
临床分期		
活动期	18	—
缓解期	12	—
病变范围		
全结肠型	3	—
直肠型	8	—
左半结肠型	4	—
广泛结肠型	3	—
直肠乙状结肠型	12	—
用药情况		
水杨酸类药物	6	—
糖皮质激素	0	—
抗生素	0	—
未用任何药物	24	—

±10.04岁, 经结肠镜及病理组织学检查, 均符合2007年《对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见》的诊断标准^[6]. 所有研究对象均为长期居住在新疆的患者(居住年限>10年). 所有研究对象留取粪便标本前4 wk内均未应用抗生素或微生态制剂. 所选取的两组基线资料比较差异均无统计学意义($P>0.05$)(表1). 主要仪器及试剂: QIAamp DNA Stool MinKit试剂盒(德国Qiagen公司)、实时定量PCR试剂盒(德国Qiagen公司)、荧光定量PCR仪(iCycler Iq5)、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(离心柱型)(北京天根)、-80 °C超低温冰箱、电泳仪及凝胶成像分析系统等, 所用引物均参照GenBank提供的序列, 由上海生物工程公司合成.

1.2 方法

1.2.1 粪便标本采集及DNA提取: 所用研究标本均于排便后迅速收集于无菌培养皿内, 并迅速置于-80 °C超低温冰箱内保存. 称取0.2 g粪便按照QIAamp DNA Stool MinKit试剂盒操作说明提取粪便细菌基因组DNA, -20 °C保存.

1.2.2 常规PCR反应: 反应体系为20 μL: 2×Taq PCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物各0.5 μL(表2), ddH₂O 7 μL, DNA模板2 μL; 反应条件: 95 °C预变性3 min; 95 °C变性30 s; 拟杆菌属62.8 °C、梭杆菌属50.8 °C、梭菌属51.2 °C、双歧杆菌属55 °C、柔嫩梭菌属57 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 循环35次, 72 °C复性5 min, 4 °C保存. 取PCR反应产物10 μL与2 μL Loading Buf-

■ 创新盘点

研究显示新疆地区UC患者与健康对照者粪便菌群存在显著的差异, UC患者拟杆菌属的数量较正常对照明显增多, 梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属较正常对照明显减少, 提示UC患者肠道发生了微生物生态失衡, 肠道菌群与UC的发病密切相关.

■同行评价
本文具有一定指导意义。

表 2 16s rDNA基因PCR扩增引物序列

PCR模板	扩增片段长度(bp)	引物序列(5'-3')
拟杆菌属	200	F: 5'-CTGAACCAGCCAAGTAGCG-3' R: 5'-CCGCAAACCTTTCACAACTGACTTA-3'
梭杆菌属	100	F: 5'-CGCAGAAGGTGAAAGTCCTGTAT-3' R: 5'-TGGTCCTCACTGATTACACAGA-3'
梭菌属	200	F: 5'-TGAAAGATGGCATCATCATTCAAC-3' R: 5'-GGTAACGTCATTATCTTCCCCAAA-3'
双歧杆菌属	243	F: 5'-TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG-3' R: 5'-CCACATCCAGC(A/G)TCCAC-3'
柔嫩梭菌属	158	F: 5'-CCCTTCAGTGCCGCAGT-3' R: 5'-GTCGCAGGATGTCAAGAC-3'

表 3 粪便的细菌定量结果($\lg x \pm \lg x$ 拷贝数/克湿便)

分组	拟杆菌属	梭杆菌属	梭菌属	双歧杆菌属	柔嫩梭菌属
UC组	3.05 ± 0.22	3.20 ± 0.13	3.14 ± 0.17	2.92 ± 0.16	2.77 ± 0.16
正常组	2.81 ± 0.21	3.15 ± 0.17	3.35 ± 0.12	3.08 ± 0.14	2.95 ± 0.19
P值	0.001	0.17	0.001	0.001	0.001

UC: 溃疡性结肠炎。

fer混匀上样, 在2.0%琼脂糖凝胶中进行电泳, 电压120 V, 时间30 min, 电泳结束后用凝胶成像仪分析系统摄像。

1.2.3 实时荧光定量RT-PCR检测: (1)标准曲线的建立: 采用实时荧光定量RT-PCR方法, 反应体系20 μ L: 荧光染料10 μ L, 模板2 μ L, 上、下游引物各0.5 μ L(表2), ddH₂O 7 μ L, 以正常组中DNA样本为模板, 常规PCR引物扩增16s rDNA靶片段, 将PCR产物纯化后作为DNA标准品, 进行梯度稀释(浓度为 10^2 - 10^7 copies/ μ L)作为模板加入反应体系中。按照操作说明在荧光定量PCR仪Bio-rad IQ5 System中进行实时荧光定量RT-PCR反应。反应条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min 95 $^{\circ}$ C变性10 s, T $^{\circ}$ C(拟杆菌属62.8 $^{\circ}$ C、梭杆菌属50.8 $^{\circ}$ C、梭菌属51.2 $^{\circ}$ C、双歧杆菌属55 $^{\circ}$ C、柔嫩梭菌属57 $^{\circ}$ C)退火30 s, 65 $^{\circ}$ C延伸10 s, 读取定量荧光数据, 共40个循环; 反应进行融解曲线分析, 并读取融解曲线荧光数据。根据读取的荧光数据, 由系统软件自动分析循环阈值(cycle threshold, Ct), 并生成标准曲线; (2)待测粪便样品定量分析: 提取所有研究标本粪便DNA分别进行5种细菌的SRBR Green I 实时荧光定量PCR反应, 反应体系及反应条件与标准品制备时相同。每次实验同时设标准品校正和ddH₂O为DNA模板的阴性对照, 所有样品均同

时做2个平行复孔。反应完毕后根据融解曲线分析PCR产物的特异性, 并由Ligyt Cyclor PCR仪分析定量结果。

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件进行数据整理和统计分析, 样品定量数据经对数转换后以 $\lg x \pm \lg x$ 表示, 采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 引物特异性鉴定 用2.0%琼脂糖凝胶电泳分析正常对照粪便标本的16s rDNA常规PCR产物, 以100 bp DNA Ladder为标准。可见PCR产物均显示出特异性条带, 未见明显非特异扩增区带, 提示各细菌的引物特异性较好, 可用于实时荧光定量PCR反应(图1, 2)。

2.2 粪便细菌的定量检测 每份粪便标本所含的5种细菌的拷贝数可通过Ct值与标准曲线比较得到, 实时荧光定量PCR仪通过系统内置的软件iCycler Optical System Interface software处理后直接给出定量结果。溃疡性结肠炎患者粪便中拟杆菌属的数量较正常对照明显增多($P < 0.05$), 而梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属的数量均较正常对照明显减少($P < 0.05$), 梭杆菌属的数量在两组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

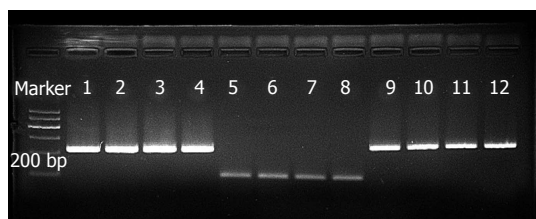


图1 拟杆菌属、梭杆菌属及梭菌属常规PCR反应结果. Marker: 从下到上100、200、300、400、500 bp; 1-4: 拟杆菌属(200 bp); 5-8: 梭杆菌属(100 bp); 9-12: 梭菌属(200 bp).

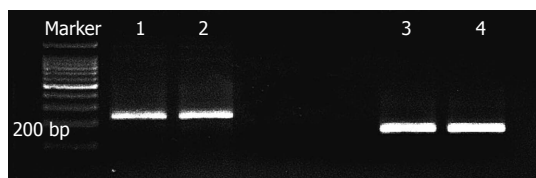


图2 双歧杆菌属及柔嫩梭菌属常规PCR反应结果. Marker: 从下到上100、200、300、400、500 bp; 1, 2: 双歧杆菌属(243 bp); 3, 4: 柔嫩梭菌属(158 bp).

3 讨论

近年来, 随着社会的不断发展, 人们生活水平的提高, UC的发病率在国内外都有逐渐增高趋势^[4,7-10], UC的病程长短不一, 且易反复发作, 严重影响人们的生活质量. 目前UC的病因和发病机制尚不十分明确, 多数研究认为免疫调节是其关键直接发病机制, 肠道菌群是这种免疫损伤过程的重要激发因素, 因此人们越来越关注肠腔内细菌与UC的关系. 肠道细菌的详细组成到目前为止尚未完全明确, 粪便标本常用于研究结肠菌群, 主要代表远端结肠的腔内环境^[11]. 对粪便标本进行肠道细菌培养只能对10%-40%的肠道细菌进行鉴别, 仍有部分细菌不能通过培养获得^[12,13]. 随着现代分子生物学理论和技术的迅速发展, 出现了许多非培养依赖的新方法用以检测肠道细菌, 实时荧光定量PCR技术就是其中的一种, 应用于肠道微生物研究, 具有灵敏度高、特异性强、定量准确等优点^[14].

研究发现不同地区UC的发病率不同, Pridenau等^[5]研究发现UC发病率和患病率在亚洲国家比西方国家低, 但近年来UC在亚洲国家的发病率及患病率迅速增加, 可能与亚洲国家加强与西方国家的联系, 西方化的饮食, 抗生素的滥用, 卫生条件的改善, 预防接种及肠道微生物菌群的改变相关. UC的发病率在西班牙的纳瓦拉较高^[15], 但在乌拉圭的一些地区却较低^[16], 这可能与患者居住的环境、卫生条件、生活水平、饮食习惯等相关. 新疆拥有独特的地理环境, 在

这里长期居住的居民所处的环境、生活习惯及饮食习惯都与中国其他地区不尽相同, 因此本研究尝试应用SYBR Green I 实时荧光定量PCR法定量检测新疆地区UC患者及正常对照者粪便中拟杆菌属、梭杆菌属、梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属的数量, 结果显示溃疡性结肠炎患者粪便中拟杆菌的数量较正常对照明显增多, 而梭菌属、双歧杆菌属、柔嫩梭菌属的数量较正常对照明显减少, 梭杆菌的数量在两组之间的差异没有统计学意义, 提示肠道菌群数量的改变可能与UC的发病有关. Machiels等^[17]研究也发现UC患者肠道菌群的组成与健康对照者存在明显的差异, 同属于厚壁菌门的能够产生丁酸盐的罗氏菌属及柔嫩梭菌属在UC患者中均减少. Rajilić-Stojanović等^[18]应用基因芯片技术分析溃疡性结肠炎患者与健康对照者粪便菌群发现UC患者粪便菌群中梭菌群IV及参与丁酸盐及丙酸盐代谢菌群数量减少, 而艰难梭状芽孢杆菌、弯曲杆菌、幽门螺杆菌、消化链球菌等机会致病菌增加, 提示UC患者肠道菌群生态失衡, 可能与其发病相关. 我国白鹏等^[19]研究发现UC活动期患者粪便双歧杆菌、乳酸杆菌数量较正常对照明显减少, 而UC缓解期患者粪便菌群与正常对照无明显差异. 提示肠道菌群失调可能是具有UC遗传易感性个体发病的触发因素. 但我国张静等^[20]应用ETIC-PCR技术研究UC和其他肠道疾病的肠道菌群发现UC可能存在较单一的肠道优势菌群, 推测其发病机制可能与特定的优势细菌感染有关. 但是目前并没有发现UC的特异性致病菌, 大多研究都支持生态失衡假说^[21,22], 即UC的发病可能是由肠道微生态发生紊乱引起的, 而不是由某一特定细菌引起的. 但是肠道微生态系统是一个庞大而复杂的系统, 其与UC发病的具体机制还有待进一步更明确的研究.

总之, 我们的研究显示新疆地区UC患者与健康对照者粪便菌群存在显著的差异, UC患者拟杆菌属的数量较正常对照明显增多, 梭菌属、双歧杆菌属及柔嫩梭菌属较正常对照明显减少, 提示UC患者肠道发生了微生态失衡, 肠道菌群与UC的发病密切相关. 由于研究方法不同或肠道微生态系统太复杂, 各项关于肠道菌群的研究结果不尽相同, 但目前仍无法阐明UC患者中的肠道菌群变化, 究竟是导致肠道炎症的原因还是结果, 因此肠道菌群与UC的相关性还有待更深入的研究.

4 参考文献

- 1 Gentschew L, Ferguson LR. Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 524-535 [PMID: 22495981 DOI: 10.1002/mnfr.201100630]
- 2 Stephani J, Radulovic K, Niess JH. Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 59: 161-177 [PMID: 21445715 DOI: 10.1007/s00005-011-0122-5]
- 3 Khan MW, Kale AA, Bere P, Vajjala S, Gounaris E, Papanati KC. Microbes, intestinal inflammation and probiotics. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 6: 81-94 [PMID: 22149584 DOI: 10.1586/egh.11.94]
- 4 Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142: 46-54. e42; quiz e30 [PMID: 22001864 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.10.001]
- 5 Prideaux L, Kamm MA, De Cruz PP, Chan FK, Ng SC. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1266-1280 [PMID: 22497584 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07150.x]
- 6 中华医学会消化病学分会炎症性肠病协作组, 欧阳钦, 胡品津, 钱家鸣, 郑家驹, 胡仁伟. 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
- 7 Kappelman MD, Moore KR, Allen JK, Cook SF. Recent trends in the prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in a commercially insured US population. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 519-525 [PMID: 22926499 DOI: 10.1007/s10620-012-2371-5]
- 8 Hope B, Shahdadpuri R, Dunne C, Broderick AM, Grant T, Hamzawi M, O'Driscoll K, Quinn S, Hussey S, Bourke B. Rapid rise in incidence of Irish paediatric inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child* 2012; 97: 590-594 [PMID: 22550323 DOI: 10.1136/archdischild-2011-300651]
- 9 中国炎症性肠病协作组, 王玉芳, 欧阳钦. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. *中华消化杂志* 2006; 26: 368-372
- 10 欧阳钦, Rakesh T, Kl G, 潘国宗, Km F, Claudio F, Sk L, 萧树东, 张虎, 梁红亮, 王玉芳. 亚太地区炎症性肠病处理共识意见(一). *胃肠病学* 2006; 11: 233-238
- 11 Hill MJ, Drasar BS. The normal colonic bacterial flora. *Gut* 1975; 16: 318-323 [PMID: 1093952]
- 12 Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998; 180: 4765-4774 [PMID: 9733676]
- 13 Tannock GW. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. *Br J Nutr* 2002; 87 Suppl 2: S199-S201 [PMID: 12088519 DOI: 10.1079/BJN-BJN/2002538]
- 14 Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J, Schreiber S. Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2566-2572 [PMID: 15184435 DOI: 10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004]
- 15 Arin Letamendia A, Borda Celaya F, Burusco Pater-nain MJ, Prieto Martínez C, Martínez Echeverría A, Elizalde Apestegui I, Laiglesia Izquierdo M, Macias Mendizábal E, Tamburri Moso P, Sánchez Valverde F. [High incidence rates of inflammatory bowel disease in Navarra (Spain). Results of a prospective, population-based study]. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31: 111-116 [PMID: 18341841]
- 16 Buenavida G, Casañías A, Vázquez C, De Souza M, Martínez L, Gardil I, Silveira A, Iade B. Incidence of inflammatory bowel disease in five geographical areas of Uruguay in the biennial 2007-2008. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2011; 41: 281-287 [PMID: 22292223]
- 17 Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Van Immerseel F, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2013 Sep 10. [Epub ahead of print] [PMID: 24021287 DOI: 10.1136/gutjnl-2013-304833]
- 18 Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19: 481-488 [PMID: 23385241 DOI: 10.1097/MIB.0b013e31827fec6d]
- 19 白鹏, 吕愈敏, 顾芳. 细菌16SrDNA荧光定量PCR法分析溃疡性结肠炎患者肠道菌群变化. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 17: 566-571
- 20 张静, 韩英, 王继恒, 王志红. UC和其他肠道疾病肠道菌丛结构的ERIC-PCR指纹图谱分析. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 430-433
- 21 Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspeth BN, Rayment N, Brostoff J, Parkhill J, Dougan G, Petrovska L. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 2011; 11: 7 [PMID: 21219646 DOI: 10.1186/1471-2180-11-7]
- 22 Takaishi H, Matsuki T, Nakazawa A, Takada T, Kado S, Asahara T, Kamada N, Sakuraba A, Yajima T, Higuchi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Nomoto K, Tanaka R, Hibi T. Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 2008; 298: 463-472 [PMID: 17897884 DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.07.016]

编辑 田滢 电编 闫晋利



注水法与注气法在老年患者结肠镜检查中的比较

王文静, 高建新, 钱晶瑶, 齐艳荣, 孙明昊, 韩海英, 刘文天

王文静, 天津医科大学 天津市 300070

王文静, 高建新, 钱晶瑶, 齐艳荣, 天津市大港油田总医院消化内科 天津市 300280

孙明昊, 天津市大港油田总医院神经内科 天津市 300280

韩海英, 天津市大港油田总医院内镜室 天津市 300280

刘文天, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

王文静, 医师, 主要从事消化内科和消化内镜的研究。

作者贡献分布: 此课题由刘文天与王文静设计; 研究过程由王文静、高建新及钱晶瑶完成; 数据处理由齐艳荣、孙明昊及韩海英完成; 论文写作由王文静完成。

通讯作者: 刘文天, 教授, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科。wentianliu160@gmail.com

电话: 022-25966484

收稿日期: 2013-11-17 修回日期: 2013-12-07

接受日期: 2013-12-12 在线出版日期: 2014-02-08

Water injection versus air insufflation for colonoscopy in elderly patients

Wen-Jing Wang, Jian-Xin Gao, Jing-Yao Qian, Yan-Rong Qi, Ming-Hao Sun, Hai-Ying Han, Wen-Tian Liu

Wen-Jing Wang, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Wen-Jing Wang, Jian-Xin Gao, Jing-Yao Qian, Yan-Rong Qi, Department of Gastroenterology, Dagang Oil Field General Hospital, Tianjin 300280, China

Ming-Hao Sun, Department of Neurology, Tianjin Dagang Oil Field General Hospital, Tianjin 300280, China
Hai-Ying Han, Department of Neurology, Dagang Oil Field General Hospital, Tianjin 300280, China

Wen-Tian Liu, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Correspondence to: Wen-Tian Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Heping District, Tianjin 300052, China. wentianliu160@gmail.com

Received: 2013-11-17 Revised: 2013-12-07

Accepted: 2013-12-12 Published online: 2014-02-08

Abstract

AIM: To compare the impact of water injection versus air insufflation for colonoscopy on cecal intubation rate, cecal intubation time and pain degree in elderly patients.

METHODS: Two hundred elderly patients (aged 65-82 years) who underwent non-narcotic colonoscopy were randomly divided into two groups: water injection and air insufflation. The cecal intubation rate, cecal intubation time and pain degree were compared between the two groups.

RESULTS: There were no significant differences in cecal intubation rate (98% vs 94%, $P > 0.05$) or cecal intubation time ($7.83 \text{ min} \pm 1.58 \text{ min}$ vs $8.01 \text{ min} \pm 1.26 \text{ min}$, $P > 0.05$) between the water injection and air insufflation groups. Abdominal pain score was significantly lower in the water injection than in the air insufflation group (3.23 ± 1.71 vs 4.87 ± 1.94 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Compared with air insufflation colonoscopy, water injection colonoscopy has similar cecal intubation rate and cecal intubation time, but is associated with significantly lower pain in elderly patients.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: The elderly; Injection colonoscopy; Cecal intubation rate; Cecal intubation time; Abdominal pain

Wang WJ, Gao JX, Qian JY, Qi YR, Sun MH, Han HY, Liu WT. Water injection versus air insufflation for colonoscopy in elderly patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(4): 601-605 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/601.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.601>

摘要

目的: 明确注水法结肠镜与注气法结肠镜比较在老年患者结肠镜检查中达盲率、达盲时间及疼痛程度方面的影响。

方法: 门诊非麻醉结肠镜检查的老年患者(年龄65-82岁)200例, 随机分为结肠注水法组(A组)和传统注气法组(B组), 比较两组患者达盲率、达盲时间及疼痛程度等方面的差异。

结果: 注水组最终达盲率为98%, 注气组的达盲率为94%, 注水组与注气组达盲时间分别为 $7.83 \text{ min} \pm 1.58 \text{ min}$ 、 $8.01 \text{ min} \pm 1.26 \text{ min}$, 达盲率及达盲时间方面差异均没有显著性($P > 0.05$)。注水组腹痛评分($3.23 \text{ 分} \pm 1.71 \text{ 分}$)明显低于注气组腹痛评分($4.87 \text{ 分} \pm 1.94 \text{ 分}$)($P < 0.05$)。

■背景资料

近年来, 消化系统肿瘤的全球范围呈上升趋势。我国大肠癌发病率上升趋势亦十分明显。目前使用结肠镜是发现并治疗结肠疾病较理想方法, 但进行结肠镜检查时的不适感使多数患者存在顾虑。本文就结肠镜检查中注水法与注气法的优劣进行比较与分析, 以发现更好的操作方法, 提高患者舒适度。

■同行评议者

董蕾, 主任, 教授, 博士生导师, 西安交通大学第二附属医院消化内科

■研发前沿

本文重点研究注水法结肠镜与注气法结肠镜相比在老年患者结肠镜检查中的应用价值: 针对老年人肠道特点, 注水法是否可以提高老年患者结肠镜操作过程中的舒适度。

结论: 注水法结肠镜虽然对于老年患者在达盲率及达盲时间上没有显著影响, 但是可以有效减轻老年患者检查中的腹痛程度。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 老年人; 注水结肠镜; 达盲率; 达盲时间; 腹痛程度

核心提示: 本研究发现注水法与注气法结肠镜在达盲率、达盲时间方面没有显著性差异, 但是注水法结肠镜可有效减轻患者检查过程中腹痛程度, 提高患者舒适度。

王文静, 高建新, 钱晶瑶, 齐艳荣, 孙明昊, 韩海英, 刘文天. 注水法与注气法在老年患者结肠镜检查中的比较. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 601-605 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/601.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.601>

0 引言

结肠恶性肿瘤是我国常见消化系恶性肿瘤之一, 随着我国逐步步入老龄化社会, 结肠癌对老年人的健康和生活质量均已构成严重的危害. 近年来, 结肠镜筛查不仅增加了肠息肉的检出率, 同时对于结肠癌的早期发现及诊治起到了重要作用^[1-3]. 但是由于老年人横结肠冗长、腹部肌肉相对松弛、肠道活动度相对较大, 常常给结肠镜的插入带来困难^[4,5]. 国外有关报道指出, 结肠镜插入的成功率及插镜时间与患者的年龄、性别、腹部或盆腔手术史及肠道憩室病有关^[6-8], 老年女性、有腹部或盆腔手术史的患者, 结肠镜检查的插镜时间较长. 结肠镜检查是诊断结肠疾病最可靠的方式之一. 结肠镜检查可常规应用注气法, 就是检查的整个过程中注入空气. 也有的结肠镜检查中应用注水法, 就是在结肠镜操作过程中除常规注入空气外, 间断注入温水. 常规注气法结肠镜检查往往会造成不同程度的腹痛、腹胀等不适, 导致一些患者不愿接受检查, 甚至有可能因惧怕检查而延误严重肠道疾病的最佳诊治时机. 因此探求更好的结肠镜检查方式具有重要临床意义. 下面我们探讨在老年患者当中, 结肠镜注水法与注气法的优劣.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2012-06/2012-12于我院门诊就诊或住院、准备行结肠镜检查的老年患者. 排除标准: 年龄<65岁或年龄>82岁; 肠道准备差; 近

期急性肠道出血; 伴严重慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、严重心脏病以及结肠镜检查禁忌证; 非疼痛原因不能配合的患者. 结果共纳入200例老年患者, 其中A: 注水组100例, 男性61例, 女性39例, 中位年龄73.4岁±4.67岁. B: 注气组100例, 男58例, 女42例, 中位年龄72.8岁±5.58岁. 以相应方式行结肠镜检查. 所有入组患者均需要签署知情同意书. 两组患者在性别、年龄、肠道准备、体质质量指数、是否便秘以及是否曾有腹部手术史等方面无显著性差异($P>0.05$). 肠镜为奥林巴斯CF-H260型结肠镜.

1.2 方法 全部患者均经过肠道准备, 清肠药物为聚乙二醇电解质散, 检查前禁食8-12 h, 检查清晨分别于4:00、6:00各口服1000 mL清肠药物, 20-30 min内服用完毕, 肠道清洁好后接受肠镜检查. 患者常规采取左侧卧位的姿势, 操作前需要在患者肛门处和镜身前部涂抹复方丁卡因胶浆, 可以局部麻醉并且减少摩擦利于进镜. 由1名有经验肠镜医师利用单盲法进行检查. A组(注水组)应用Olympus OFP内镜送水泵, 将消毒过的水泵至于36℃的恒温控制的温盐水中, 可调节水的流量的注水端插入活检孔道, 左手操作部控制注气按钮, 结肠镜进入直肠后, 可直接注气穿过直肠, 向右旋转进镜便可进入乙状结肠. 脚部控制注水量, 提供视野, 轻调角度向上并左旋镜身便可进入Rs部位; 于此处继续左旋内镜并且通过低压注水保持镜头清晰以便观察狭窄腔隙的走行, 并循腔推进内镜, 然后右旋镜身进镜便可越过另一皱褶进入乙状结肠. 解剖学上, 乙状结肠处于多种多样的弯曲松弛状态, SD移行部急峻弯曲, 是一个注气结肠镜不容易通过也容易结攀并且患者容易出现腹痛之处, 边注水打开肠腔, 进镜方向根据肠黏膜面上光的明暗、反射的不同、皱褶的走行等因素, 在瞬间确定下一步插入的方向, 并迅速将内镜的前端对准预定走行方向, 并且因为操作中水的重力作用, 乙状结肠处较为急峻的弯曲处变钝, 使得通过时痛苦程度减轻. 通过乙状结肠后进入降结肠可直接注气通过, 直至横结肠下垂角. 因为很多老年患者横结肠冗长下垂, 形成一个锐角, 用同样的注水方法通过此处. 如果检查过程中残留粪便的污水影响了视野, 可以随时将污水吸出, 注入干净的温水使视野清晰利于进镜并且观察阑尾开口. 整个操作过程中, 间断应用注水法打开肠腔, 其他容易通过之处仍然注气完

■相关报道

注水法与注气法的对比在国外多有报道, LEUNG等的一项研究表明, 对于有经验内镜医师, 注气结肠镜到达回盲部的平均时间长达37 min, 注水结肠镜长为34 min, 也就是说两者在达盲时间方面没有显著性差异.

表 1 接受结肠镜检查的老年患者总体情况 ($n = 100$)

分组	性别 (男/女)	年龄 (岁)	体质量指数 (kg/m ²)	腹部手术史 (n)	便秘 (n)	肠道准备(n)			
						理想	尚可	稍差	很差
A组	61/39	73.4 ± 4.67	25.87 ± 5.50	12	16	55	34	8	3
B组	58/42	72.8 ± 5.58	25.85 ± 4.96	10	14	50	41	7	2
P值	0.773	0.428	0.974	0.974	0.822	0.763			

A组: 注水组; B组: 注气组。

表 2 两种检查方法达盲率及达盲时间的比较

分组	达盲率(%)	达盲时间(min)	平均腹痛VAS评分(分)
A组	98	7.65(7.83 ± 1.58)	4.05(3.23 ± 1.71)
B组	94	8.11(8.01 ± 1.26)	5.68(4.87 ± 1.94)
P值	0.279	0.207	0.000

A组: 注水组; B组: 注气组。

表 3 操作失败病例原因比较($n = 100, n$)

分组	未达盲总数	因腹痛放弃或改为麻醉	肠道清洁差	横结肠冗长
A组	2	0	0	2(均到达横结肠)
B组	6	3(到达降乙交界处)	2(到达乙状结肠)	1(到达横结肠)

A组: 注水组; B组: 注气组。

成。B组(注气组)采用传统的单人结肠镜操作法, 全程注气完成, 边进镜边充气打开肠腔, 边观察, 如发现问题可及时处理。两组均使用奥林巴斯 CF-H260型结肠镜。检查中, 如果因为腹痛难忍等原因, 患者要求可以改为麻醉无痛结肠镜。如果需要留取病理及小息肉切除等方面操作, 均于退镜时完成。患者的腹痛评分由护士负责, 按照可视疼痛评分(visual analog scale, VAS)疼痛评分标准, 分为0-10分, 0分: 无痛; 3分以下: 有轻微的疼痛, 能忍受; 4-6分: 患者疼痛并影响睡眠, 尚能忍受; 7-10分: 患者有渐强烈的疼痛, 疼痛难忍, 影响食欲, 影响睡眠。比较两组患者在达盲率、达盲时间、腹痛程度等方面的差异。

统计学处理 所有数据采用SPSS17.0软件进行分析。计数资料两组间比较采用 χ^2 检验。计量资料以mean ± SD表示, 两组间数据比较依据资料的性质, 采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组成 注气组100例和注水100例, 在结肠镜检查中, 注气组6例, 注水组2例, 未能到达回

盲部, 或者临时要求改为麻醉结肠镜才到达回盲部。两组在性别、年龄、体质量指数、肠道准备、是否便秘以及是否曾有腹部手术史等方面无显著性差异($P > 0.05$, 表1)。

2.2 一般结果 A组(注水组)和B组(注气组)结肠镜检查达盲率分别为98%和94%。平均达盲时间分别为7.65 min(7.83 min ± 1.58 min) vs 8.11 min(8.01 min ± 1.26 min)。平均腹痛VAS评分分数分别为4.05分(3.23分 ± 1.71分)和5.68分(4.87分 ± 1.94分)(表2)。由表2可以看出, 两种检查方法在腹痛程度上存在显著性差异($P < 0.05$), 注水组明显较注气组腹痛VAS评分要低, 但是达盲率及达盲时间方面没有显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 操作失败病例原因比较 注水组2例失败均因为横结肠冗长, 到达横结肠下垂角处无法继续操作。注气组6例失败, 其中3例因为腹痛不能忍受要求停止或改为麻醉结肠镜, 均到达降乙交界处。2例因为肠道清洁差导致失败, 到达乙状结肠无法继续。1例因为横结肠冗长到达横结肠下垂角无法再继续操作(表3)。

■创新盘点

以往类似文章、报道也多对比研究了注水法与注气法结肠镜在舒适度、达盲率、达盲时间等方面的影响, 本文的创新之处在于, 分析和对比了失败案例的失败原因, 同时详细介绍了注水法的操作细节, 值得参考。

■应用要点

将来可以将注水法应用于结肠镜操作过程中, 全程注气为主, 间断注水减轻操作中腹痛程度。同时可以应用二氧化碳气体的注入, 减轻患者肠镜操作后的腹胀及腹痛程度。将几种方法相结合应用, 提高患者肠镜操作中及操作后的舒适度。

■名词解释

Olympus OFP内镜送水泵: OFP内镜送水泵是专为奥林巴斯电子内镜设计的周边产品。是一款高效的蠕动式冲洗泵,注入水后,可直接对黏膜表面进行冲洗,从而取得良好的观察、诊断、治疗效果。

3 讨论

近些年来,许多学者都在努力研究怎样才能有效减轻结肠镜检查时的痛苦。同时对于老年人来讲,因为老年人横结肠冗长、腹部肌肉相对松弛、肠道活动度相对较大,结肠镜检查更是困难。年龄>80岁的女性患者、长期便秘的老年患者、有腹部或盆腔手术史的老年患者在行结肠镜检查时都容易出现插镜困难的情况。这是因为老年女性肠道活动度较大、腹部肌肉松弛,所以插镜时镜身就很容易结袢。并且老年女性对于疼痛的忍受性较差,包括腹部或盆腔手术后特别容易造成肠管之间黏连等。所以对老年患者,尤其是老年女性患者行结肠镜检查会相对比较困难,有过腹部及盆腔手术史的人会更加困难。随着麻醉技术的不断发展,近些年来“无痛内镜”在临床得到广泛的应用。在麻醉状态下,患者行结肠镜检查时的舒适度会明显提高,但是跟普通肠镜相比较,除了需要耗费更多的人力及物力成本以外,麻醉下结肠镜又增加了麻醉的风险,尤其对心肺功能不好的老年患者危险性就会更是会大大增加。同时麻醉下结肠镜检查难以观察患者的表情变化,无法准确掌握患者的耐受力并及时预防并发症发生^[9],部分患者会在检查过程中出现不同程度心率减慢、血压下降和呼吸暂停^[10]。所以影响了麻醉结肠镜在临床中对于老年患者的应用。同时有学者在不断研究应用二氧化碳作为肠镜检查时的注入气体,但是其实这种方法本身只能使检查完成后肠道内气体快速吸收,减轻检查以后的腹胀感,并不能减轻结肠镜操作过程中的腹痛程度^[11,12]。也有一些学者试图应用背景音乐的方法减轻患者肠镜检查过程中的腹痛,但效果不佳。

结肠镜检查过程中失败并且造成患者痛苦的最常见原因就是在乙状结肠成角或存在结肠冗长症^[13]。最近研究^[14-16]表明,注水法结肠镜可减少患者检查过程中腹痛程度。在本研究中,我们对比了传统的注气法结肠镜及注水法结肠镜在达盲率、达盲时间及患者疼痛程度方面的差异。虽然注气法结肠镜在检查的过程中一直在边吸气边退镜再进镜,但肠腔内必然会有大量气体残留。乙状结肠气体上升至患者右侧结肠,会使乙状结肠更加扭曲,角度更加锐利,使通过痛苦程度增加,因此结肠镜无碍通过乙状结肠是结肠镜检查成功的关键。而注水法可良好的避免肠道痉挛或者延长,减少成角的发生。患者

躺在检查床上,采取左侧卧位,由于重力的作用,水向低位降结肠流去,拉直乙状结肠部位的弯曲,打开肠腔,乙状结肠的肠系膜牵拉减少,使患者的不适感明显降低。本研究结果表明,注水组的患者腹痛的评分(3.23分±1.71分),明显低于注气组的(4.87分±1.94分)。这说明,注水法结肠镜检查确实能够有效减轻患者的腹痛程度。注水组结肠镜检查达盲率达98%,注气组为94%,按照常理推断,注水法使通过乙状结肠时角度变钝,疼痛程度减轻,应该最终注水组达盲率明显高于注气组,但是研究结果计算出 $P>0.05$,差异没有统计学意义,也可能与我们的例数不多有关。

在本次研究当中,注水组结肠镜操作过程中2例患者未能到达回盲部,均因为横结肠冗长最终镜身长度不够导致无法到达回盲部,且该两位患者均有便秘和结肠黑变病病史。而注气组有6例未能达盲,只有1例由于横结肠冗长导致操作不能继续进行,其余3例是因为操作过程中的腹痛难以忍受最终导致要求终止操作或者改为麻醉结肠镜,另外2例则是因为肠道清洁差,视野不清楚无法继续进镜导致操作终止。从失败的案例可以看出,注水组患者更少的因为腹痛或者肠道清洁差操作失败,因为注水可以减轻腹痛程度,并且如果注水组患者肠道清洁差,我们可以间断注入清水、吸出粪水直至肠道被冲刷干净,看清肠腔继续进镜,而注气组却无法做到这一点。再比较未达盲患者操作停止时镜子前端所到达的位置,注水组两个失败患者均到达横结肠,而注气组只有1例因为横结肠冗长的患者到达横结肠,其余5例患者均在乙状结肠或者降乙交界处操作无法再继续进行。总之注水法结肠镜确实有其优势所在,减轻患者腹痛程度,并且即使在失败的患者当中,注水法也可以尽可能观察更多的肠腔。

目前结肠镜检查时应用注水法时注入水的最适宜温度与最佳注水量尚存在一定的争议。目前应用最为广泛的水温就是36℃,因为这个温度相对来说最接近人体的温度,患者应用起来舒适度较好,不会出现黏膜烫伤、腹痛或者直肠刺激症状^[17]。本例研究注水量为约为200-1500 mL左右。

应用影像学方面的检查来检查肠道疾患,存在不能更直观的观察病灶、容易遗漏较小病变、或不能留取病理确定疾病性质等等的弊端,所以内镜检查有很多其他非侵入性检查不可替

代的价值. 因此寻找更舒适的结肠镜检查方法变得更加重要. 本研究表明, 注水法结肠镜检查是一种可以明显减轻老年患者肠镜检查操作过程中腹痛的方法. 它操作并不复杂、同时节省了麻醉药物的费用, 并且降低了老年患者的麻醉方面的风险, 临床上值得进一步推广实施. 展望未来, 也许有一天, 我们的老年患者在行结肠镜检查时可以有背景音乐帮助他们舒缓紧张的情绪, 可以应用间断注水法, 同时间断注入二氧化碳气体^[18], 这样既减轻了操作过程中的痛苦, 又减轻了操作完成后的腹胀程度, 同时应用透明帽^[19]的检查方法提高各种肠道疾病的检出率. 那将是很理想的事情, 希望通过我们的研究逐步变为现实, 让更多的患者从中受益.

4 参考文献

- Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, Ahnen DJ, Garewal H, Chejfec G. Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380. *N Engl J Med* 2000; 343: 162-168 [PMID: 10900274 DOI: 10.1056/NEJM200007203430301]
- Imperiale TF, Wagner DR, Lin CY, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF. Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *N Engl J Med* 2000; 343: 169-174 [PMID: 10900275 DOI: 10.1056/NEJM200007203430302]
- Rex DK, Johnson DA, Lieberman DA, Burt RW, Sonnenberg A. Colorectal cancer prevention 2000: screening recommendations of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 868-877 [PMID: 10763931 DOI: 10.1016/S0002-9270(00)00851-0]
- Bowles CJ, Leicester R, Romaya C, Swarbrick E, Williams CB, Epstein O. A prospective study of colonoscopy practice in the UK today: are we adequately prepared for national colorectal cancer screening tomorrow? *Gut* 2004; 53: 277-283 [PMID: 14724164 DOI: 10.1136/gut.2003.016436]
- Ransohoff DF. Colon cancer screening in 2005: status and challenges. *Gastroenterology* 2005; 128: 1685-1695 [PMID: 15887159 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.04.005]
- Dafnis G, Granath F, Pahlman L, Ekblom A, Blomqvist P. Patient factors influencing the completion rate in colonoscopy. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 113-118 [PMID: 15733524 DOI: 10.1016/j.dld.2004.09.015]
- Church JM. Complete colonoscopy: how often? And if not, why not? *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 556-560 [PMID: 8147359]
- Ciocco WC, Rusin LC. Factors that predict incomplete colonoscopy. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 964-968 [PMID: 7656745 DOI: 10.1007/BF02049733]
- 夏莉. 结肠镜检查的护理体会. *临床和实验医学杂志* 2008; 7: 193-194
- 周骥, 付雄, 周正华. 无痛肠镜单人操作132例临床分析. *中国社区医师* 2008; 32: 337-342
- Shi WB, Wang ZH, Qu CY, Zhang Y, Jiang H, Zhou M, Chen Y, Xu LM. Comparison between air and carbon dioxide insufflation in the endoscopic submucosal excavation of gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 7296-7301 [PMID: 23326136 DOI: 10.3748/wjg.v18.i48.7296]
- Wu J, Hu B. The role of carbon dioxide insufflation in colonoscopy: a systematic review and meta-analysis. *Endoscopy* 2012; 44: 128-136 [PMID: 22271023 DOI: 10.1055/s-0031-1291487]
- Gay G, Delvaux M. Double-balloon colonoscopy after failed conventional colonoscopy: a pilot series with a new instrument. *Endoscopy* 2007; 39: 788-792 [PMID: 17703387]
- Leung J, Mann S, Siao-Salera R, Ransibrahmanakul K, Lim B, Canete W, Samson L, Gutierrez R, Leung FW. A randomized, controlled trial to confirm the beneficial effects of the water method on U.S. veterans undergoing colonoscopy with the option of on-demand sedation. *Gastrointest Endosc* 2011; 73: 103-110 [PMID: 21184876 DOI: 10.1016/j.gie.2010.09.020]
- Leung FW, Leung JW, Mann SK, Friedland S, Ramirez FC, Olafsson S. DDW 2011 cutting edge colonoscopy techniques - state of the art lecture master class - warm water infusion/CO(2) insufflation for colonoscopy. *J Intern Gastroenterol* 2011; 1: 78-82 [PMID: 21776430]
- Radaelli F, Paggi S, Amato A, Terruzzi V. Warm water infusion versus air insufflation for unsedated colonoscopy: a randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2010; 72: 701-709 [PMID: 20883846 DOI: 10.1016/j.gie.2010.06.025]
- Rabenstein T, Radaelli F, Zolk O. Warm water infusion colonoscopy: a review and meta-analysis. *Endoscopy* 2012; 44: 940-951 [PMID: 22987214 DOI: 10.1055/s-0032-1310157]
- 陈英, 杜斌, 杨春敏, 范勤, 韩全利, 李静, 贾敏, 于妍. 二氧化碳灌注提高老年患者结肠镜检查舒适度的随机对照研究. *胃肠病学* 2012; 17: 288-292
- 李明阳, 王志强, 张子其, 陈孝, 刘婧, 付永和. 透明帽辅助结肠镜单人操作在老年患者检查中的临床应用. *现代生物医学进展* 2010; 10: 4504-4506

■同行评价

注气和注水两种方法临床上均有应用, 注气法应用更为普遍, 而日本医生喜欢注水. 两者临床效果差别不大, 但注水法较为麻烦, 中国医生大多不用. 本文在两种方法上做了对比, 对临床有一定的指导作用.

编辑 郭鹏 电编 闫晋利



回盲部病变1例

王玉珍, 胡义亭, 杨晶, 苏少慧

■背景资料

患者从8岁开始因右下腹部症状就医, 9年间辗转多家医院, 做过多次肠道检查, 口服过多种药物, 最终因肠梗阻行手术治疗, 病理报告不支持结核和Crohn病, 未见淋巴瘤。患者术后无腹部不适, 能正常上学。

王玉珍, 胡义亭, 杨晶, 苏少慧, 河北省人民医院消化科 河北省石家庄市 050071

王玉珍, 主任医师, 主要从事慢性肝病和功能性胃肠病的研究。
作者贡献分布: 王玉珍为文章起草者; 胡义亭负责资料的收集; 杨晶与苏少慧负责患者的治疗。

通讯作者: 王玉珍, 主任医师, 050071, 河北省石家庄市和平西路348号, 河北省人民医院消化科。wyzhen211@126.com
收稿日期: 2013-07-23 修回日期: 2013-12-05
接受日期: 2013-12-15 在线出版日期: 2014-02-08

A case of ileocecal lesion

Yu-Zhen Wang, Yi-Ting Hu, Jing Yang, Shao-Hui Su

Yu-Zhen Wang, Yi-Ting Hu, Jing Yang, Shao-Hui Su, Department of Digestive, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050071, Hebei Province, China

Correspondence to: Yu-Zhen Wang, Chief Physician, Department of Digestive, Hebei People's Hospital, 348 Heping West Road, Shijiazhuang 050071, Hebei Province, China. wyzhen211@126.com

Received: 2013-07-23 Revised: 2013-12-05
Accepted: 2013-12-15 Published online: 2014-02-08

Abstract

A female patients presented with a lower right abdominal lesion initially found at the age of 12. Subsequently, the lesion was once diagnosed as "appendicitis", "intestinal tuberculosis", and "Crohn's disease" and received corresponding treatments. She received surgical treatment at 17 years of age due to incomplete intestinal obstruction, and postoperative pathology did not support the diagnosis of tuberculosis, Crohn's disease, and lymphoma. Her condition was stable during the following 3 years of postoperative follow-up.

© 2014 Baishideng Publishing Group Co., Limited. All rights reserved.

Key Words: Ileocecal lesion; Follow-up

Wang YZ, Hu YT, Yang J, Su SH. A case of ileocecal lesion. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2014; 22(4): 606-608
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/606.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.606>

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

摘要

女, 从12岁开始发现右下腹部病变, 曾经按

“阑尾炎”、“肠结核”、“Crohn病”给予治疗, 17岁因发生不全肠梗阻行手术治疗, 术后病理不支持结核和Crohn病, 未见淋巴瘤。术后随访3年病情稳定。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 回盲部; 随访

核心提示: 患者因回盲部病变辗转多年就诊, 进行过结肠镜、消化系造影、腹部CT等各种检查, 口服过5联抗痨药物, 按照克罗恩病进行过规范治疗, 最终发生不全肠梗阻行手术治疗, 术后病理报告不支持结核和Crohn病, 未见淋巴瘤。患者术后无腹部不适, 能正常上学。

王玉珍, 胡义亭, 杨晶, 苏少慧. 回盲部病变1例. 世界华人消化杂志 2014; 22(4): 606-608 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/606.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i4.606>

0 引言

回盲部是消化系统小肠与大肠的交汇区, 该部位淋巴组织丰富, 是多种疾病如淋巴瘤、结核、炎症性肠病等好发部位, 是消化科医生面临的诊治难点。

1 病例报告

女, 学生, 出生于1993年, 2001年(8岁)开始出现间断腹痛, 右下腹隐痛, 可忍受, 无发热、腹泻、便血, 腹痛严重时当地输“抗菌素”能减轻疼痛, 2005年(12岁)腹痛加重, 右侧为主, 伴有恶心、呕吐, 无发热, 无大便异常, 当地按“阑尾炎”行阑尾切除, 术中发现“阑尾明显水肿”, 给予切除, 同时发现“周围有一包块”, 大小不详, 未予处理。术后半年患者食欲好, 体重增加。手术半年后患者腹痛时有发作, 在北京医科大学附属第一医院行钡灌肠检查, 结果未见异常, 未行治疗。

患者于2006年(13岁)因右下腹痛就诊于我院消化科。入院查体, T 36.5 °C, P 90次/min, BP 120/80 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa), 患者比同龄

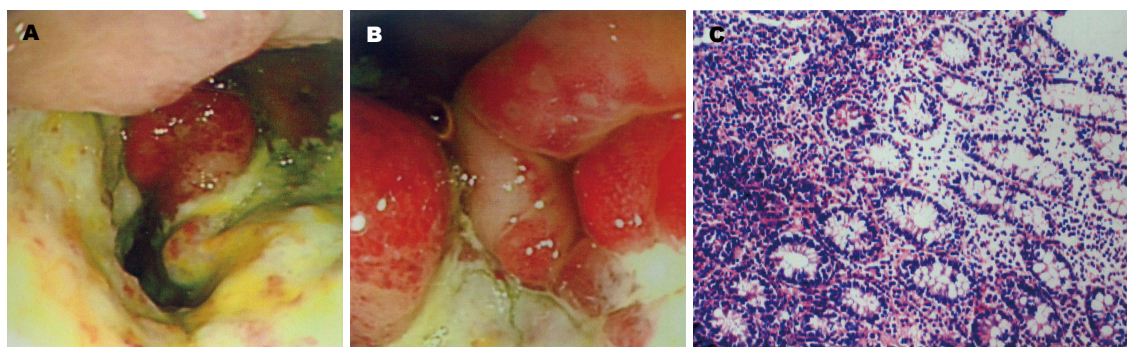


图1 2006年结肠镜及病理结果. A: 回盲瓣; B: 盲肠; C: 回盲部($\times 200$), 咬检组织, 黏膜中度慢性炎症, 急性反应, 伴炎性肉芽组织.

人消瘦, 体质量30 kg, 心肺查体无异常, 右下腹触及饱满, 有压痛, 无反跳痛, 肌紧张, 胸片显示心肺膈未见异常, 3次血常规检查WBC: $10.1 \times 10^9/L$ - $13.1 \times 10^9/L$ 之间, 中性粒细胞(N)0.75-0.8, 血红蛋白(Hb)115-120 g/L, 血小板 $320 \times 10^9/L$ - $390 \times 10^9/L$, 血沉正常, PPD(-), 尿便常规未见异常, 生化检查无异常. 结肠镜检查回肠末端未见异常, 回盲瓣及盲肠、部分升结肠可见巨大浅表溃疡, 约占2/3官腔周径, 附着白苔, 周边皱襞隆起, 局部呈结节样改变. 结肠镜检查如图所示, 并同时附病理检查结果(图1).

盲肠黏膜涂片, 发现耐酸杆菌. CT示盲肠升结肠中下段及末端回肠管壁增厚, 肠系膜及大网膜多发结节影, 不排除结核. 给予试验性抗痨治疗(2006-12开始)口服异烟肼0.3, 1次/d, 利福喷丁0.45, 2次/wk, 乙胺丁醇0.5, 1次/d. 患者腹痛缓解, 带药出院. 出院后患者坚持口服抗痨药物, 半年内体质量逐渐增加.

2007-09患者又因消瘦、乏力(服抗痨药9 mo)就诊于北京市儿童医院, 当时体质量29 kg, 同龄儿应在45 kg左右. 行结肠镜及全消化系造影等检查诊断肠结核? 给予5联抗痨治疗, 分别是异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、链霉素. 住院12 d出院后继续坚持5联抗痨治疗半年.

2008-05(服抗痨药1年5 mo)出现腹痛, 伴有不全肠梗阻的临床表现, 腹痛发作时右下腹部可以触及大小5 cm \times 5 cm包块. 再次就诊于河北省级医院, 复查结肠镜示: 回盲部、升结肠黏膜充血糜烂, 血管纹理不清晰, 肠腔变窄, 应用靛胭脂染色后可见铺路石样改变, 放大肠镜观察病变处正常黏膜结构消失. 镜下诊断为Crohn病? 回盲部咬检病理报告肠壁黏膜浅表性溃疡, 肠壁大部分由较多的淋巴细胞, 中性粒细胞及血管构成肉芽肿结构, 符合克罗恩病. 停抗痨药物给

予奥沙拉嗪, 3 g/d口服, 腹痛仍有间断发作, 自己有时能触到右下腹包块.

2009-03患者再次就诊于北京医科大学附属医院, 当时查结肠镜报告: 盲肠溃疡, 回盲瓣狭窄性质待查, 克罗恩病可能性大. 病理报告: 黏膜慢性炎症, 间质淋巴、单核及中性粒细胞浸润, 腺体增生, 伴有轻度非典型变, 伴有溃疡形成. 小肠造影报告: 回盲部溃疡、狭窄, 伴有不全梗阻. 诊断为克罗恩病. 口服美沙拉嗪基础上加上强的松和硫唑嘌呤, 住院16 d, 糖皮质激素逐渐减量出院, 出院后坚持口服美沙拉嗪和硫唑嘌呤, 腹痛症状略有缓解, 腹痛时仍可触到右下腹部包块.

2010-02因反复发生不全肠梗阻就诊我院外科, 当时患者17岁, 体质量45 kg, 生命体征稳定, 血常规、便常规及生化检查均在正常范围, 钡灌肠显示回盲部结肠轻度狭窄, 外形无明显异常, 考虑盲肠及部分升结肠炎性病变. 行手术治疗, 手术记录回盲部探及肿物5 cm \times 4 cm \times 3 cm, 和周围轻度黏连, 回肠末端20 cm扩张, 肠壁增厚, 行右半结肠切除术, 距离回盲部25 cm断小肠, 切除肠管33 cm, 行回肠横结肠端侧吻合, 切除肠段经我院及北京医科大学病理科会诊均不支持结核和Crohn病, 未见淋巴瘤. 手术标本及病理图片如下(图2).

术后患者未服用任何药物, 已经随诊3年多, 饮食正常, 无腹痛发作, 大便正常, 体质量55 kg, 学习成绩优秀, 未再进一步行肠道检查.

2 讨论

该患者自8岁开始因腹部症状多次、多地就诊, 检查结果集中在回盲部病变上. 回盲部结构复杂, 功能特殊, 肠内容物在此停留时间较长, 导致该部位疾病发生率高. 回盲部病变主要病因

■研发前沿

回盲部病变病情复杂, 是消化科医生面临的诊治难点, 尤其在结核和炎症性肠病之间鉴别起来很困难, 目前, 回盲部病变的诊断没有金标准, 需要消化科医生积累更多的临床经验与同行分享.

■创新盘点

该病例报道随诊患者7年, 对各种检查及治疗有详细的追踪资料, 有手术标本及病理检查结果, 对回盲部病变的诊治贡献了1份难得的病例.

■同行评价

本文对内镜医师和临床医师有很好的学术价值,具有一定指导意义.

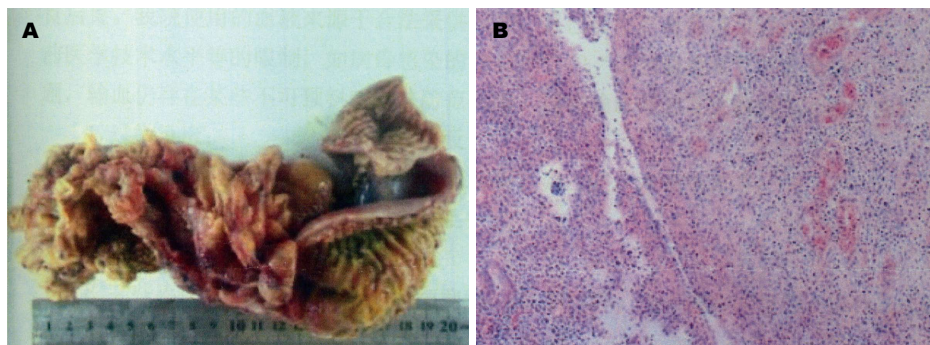


图 2 2012年手术标本及病理结果. A: 大体标本; B: 病理($\times 40$), 不支持肠结核或克罗恩病, 考虑炎性病变伴有淋巴组织增生.

有结核、Crohn病、淋巴瘤、白塞氏病、慢性感染性疾病如耶尔森菌感染、癌肿等. 该患者多次结肠镜检查取组织活检未见肿瘤细胞, 无口腔、外阴溃疡及皮肤病变, 可以除外该部位癌肿及白塞病, 无发热及生化上酶学变化, 组织学也不支持淋巴瘤. 因盲肠黏膜涂片找到耐酸杆菌和随后活检组织病理报告符合Crohn病, 先后给予抗痨治疗和5氨基水杨酸、强的松和硫

唑嘌呤治疗, 最终因反复发生的不全肠梗阻行手术治疗, 术后病理否定结核和Crohn病, 术后随诊3年多未发现患者异常. 回顾患者诊疗过程, 是否有慢性细菌感染存在? 抗结核治疗可能对患者的病情发展起到了一定的控制作用.

3 参考文献

- 1 孔文霞, 高青. 回盲部病变诊断的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 2382-2387

编辑 田滢 电编 闫晋利



《世界华人消化杂志》投稿须知

1 投稿总则

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

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章。最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平。

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(*Baishideng Publishing Group*, *BPG*)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上。OAJ最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊。论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本。BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑。目前编辑和出版42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平。

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

Journals》和《Digital Object Identifier》收录。《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号。《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

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

2 撰稿要求

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

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

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

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

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

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

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

量”应改为物质的相对分子质量。如30 kD改为*M_r* 30 000或30 kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体)。计量单位在+、-及-后列出。在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/mL应改为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L。M_r明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的

相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1\,000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用

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

3 稿件格式

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

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

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

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

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

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

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象, 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度, 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准, 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参

考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上

角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>. 审稿过程平均时间需要14-28天. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审.

6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进.

2013年国内国际会议预告

2014-03-12/15

2014年亚太肝病研究协会肝病周(APASL)

会议地点: 澳大利亚

联系方式: <http://apasl2014.com/>

2014-04-05/09

2014年美国癌症研究协会大会(AACR)

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.aacr.org/home/scientists/meetings--workshops/meetings--workshops-calendar.aspx>

2014-04-09/13

2014年第49届欧洲肝病研究协年会(EASL)

会议地点: 英国

联系方式: http://www.easl.eu/_the-international-liver-congress/general-information

2014-04-18/05-20

2014中国超声医学学术大会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://www.cuda.org.cn/new/meeting>

2014-04-26/27

中华医学会临床药学会2014年全国学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.cncscp.org/>

2014-05-04/06

2014年美国消化疾病周(DDW)

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.ddw.org/attendees/faqs>

2014-05-16/18

2014第七届世界癌症大会

会议地点: 南京市

联系方式: <http://www.bitlifesciences.com/cancer2014/cn/meeting.asp>

2014-05-23/24

第六届药源性疾病与安全用药中国论坛-消化系统与肝病药物专题研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: adrhuiyi@126.com

2014-05-30/06-03

2014年美国临床肿瘤协会年会(ASCO)

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.asco.org/meetings/calendar-events>

2014-06-04/07

2014年第20届国际肝移植协会年会(ILTS)

会议地点: 英国

联系方式: <http://www.ilts.org/meetings/>

2014-06-09/12

2014年第47届欧洲儿科胃肠病、肝病和营养学协会大会(ESPGHAN)

会议地点: 以色列

联系方式: <http://www.espghan2014.org/>

2014-06-18/21

2014年欧洲胃肠与腹部放射学协会肝部成像研讨会(ESGAR)

会议地点: 奥地利

联系方式: <http://www.esgar.org/files/File/ESGAR14>

2014-06-25/28

2014年世界胃肠癌大会(WGIC)

会议地点: 西班牙

联系方式: <http://worldgicancer.com/WCGI>

2014-06-25/28

2014年第14届欧洲内窥镜手术协会国际大会(EAES)

会议地点: 法国

联系方式: hdimcs@163.com

2014-06-27/28

2014中华医学会肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 上海市

联系方式: lilyjia@163.com

2014-07-26/31

2014年世界移植大会

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.wtc2014.org/>

2014-07-28/30

第3届国际肠胃病学与泌尿学大会

会议地点: 美国

联系方式: <http://www.omicsgroup.com/gastroenterology-urology-conference-2014/registration.php>

2014-09-05/07

2014年第8届国际肝癌协会大会(ILCA)

会议地点: 日本

联系方式: <http://www.ilca2014.org/>

2014-09-26/30

2014年欧洲临床肿瘤协会年会(ESMO)

会议地点: 西班牙

联系方式: <http://www.esmo.org/>

2014-10-18/22

2014年第22届欧洲联合胃肠病学周(UEG)

会议地点: 奥地利

联系方式: <http://www.ueg.eu/week/past-future/future-ueg-week/>

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈国忠 主任医师
广西医科大学消化内科

戴朝六 教授
中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

党双锁 教授
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

杜雅菊 主任医师
哈尔滨医科大学附属第二医院

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

傅华群 教授
南昌大学第二附属医院

官泳松 教授
四川大学华西医院放射科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

郝丽萍 副教授
华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

官泳松 教授
四川大学华西医院放射科

何敏 教授
广西医科大学医学科学实验中心

江建新 副主任医师
贵阳医学院附属医院肝胆胰脾外科

刘杰民 副主任医师
贵州省人民医院消化内镜科

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院

林潮双 主任医师
中山大学附属第三医院

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

任粉玉 教授
吉林省延边大学附属医院消化内科

石毓君 副研究员
四川大学华西医院

齐清会 教授
大连医科大学附属第一医院

邱伟华 主任医师
上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科

王德盛 副主任医师
中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王刚 副研究员
哈尔滨医科大学附属第一医院

魏睦新 教授
南京医科大学第一附属医院

吴建兵 教授
南昌大学第二附属医院

肖秀英 主治医师
上海交通大学医学院附属仁济医院肿瘤科

薛东波 教授
哈尔滨医科大学附属第一医院

殷正丰 教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院

袁建业 副研究员
上海中医药大学附属龙华医院/脾胃病研究所

张明辉 副主任医师
河北医科大学第一医院

《中文核心期刊要目总览》收录证书

《中文核心期刊要目总览》入编通知

尊敬的主编先生/女士：

我们谨此郑重通知：依据文献计量学的原理和方法，经研究人员对相关文献的检索、统计和分析，以及学科专家评审，贵刊《世界华人消化杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2011年版（即第六版）之临床医学/特种医学类的核心期刊。该书由北京大学出版社出版。书中按《中国图书馆分类法》的学科体系，列出了73个学科的核心期刊表，并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括：题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN号、CN号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。

评选核心期刊的工作，是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动，研究工作量浩大。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

课题组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究，进一步改进了核心期刊评价方法，使之更趋科学合理，力求使评价结果符合客观实际。对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标，选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种，统计到的文献数量共计221177余万篇次，涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

需要特别指出的是，该研究成果只是一种参考工具书，主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考，例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等，不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂
撰安

《中文核心期刊要目总览》2011年版编委会
代章：





Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**
Flat C, 23/F., Lucky Plaza,
315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China
Fax: +852-3177-9906
Telephone: +852-6555-7188
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

