

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.010

Notch1、Notch3 及 Hes1 在胃肠道间质瘤中的表达及临床意义*

樊晓静¹, 史志涛¹, 孙 昕¹, 曾斌芳²

(1. 新疆医科大学附属自治区中医院肿瘤外科, 乌鲁木齐 830000;
2. 新疆医科大学附属中医医院肿瘤科, 乌鲁木齐 834000)

[摘要] **目的** 探讨胃肠道间质瘤(GIST)患者肿瘤组织中 Notch 信号通路相关蛋白 Notch1、Notch3 及 Hes1 表达水平及临床意义。**方法** 采用实时定量 PCR(Q-PCR)和 Western blot 方法检测 135 例新鲜 GIST 标本及临近非肿瘤组织中 Notch1、Notch3 及 Hes1 mRNA 和蛋白表达情况。同时采用免疫组织化学方法检测 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达情况,并分析各蛋白表达与 GIST 患者临床病理因素的关系。另将野生型小鼠(WT)和 Notch1 基因敲除小鼠(KO) 40 只,分为 WT 组、KO 组、WT+GIST 组和 KO+GIST 组,检测各组 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达情况。**结果** 与临近非肿瘤组织相比,GIST 组织中 Notch1、Notch3 及 Hes1 mRNA 和蛋白表达均上调($P<0.05$)。GIST 标本的 Notch1、Notch3、Hes1 阳性率(59.26%、65.19%、62.22%)均高于临近非肿瘤组织(17.78%、22.22%、17.78%),差异有统计学意义($P<0.05$)。统计分析证实 Notch1 蛋白表达与 GIST 的 NIH 分级密切相关($\chi^2=8.532, P=0.002$);Notch3 蛋白表达与 GIST 的肿瘤转移密切相关($\chi^2=7.532, P=0.003$);Hes1 蛋白表达与 GIST 的肿瘤大小密切相关($\chi^2=6.781, P=0.012$)。各组小鼠 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达情况显示,与 WT 组相比,WT+GIST 组小鼠体内 3 种蛋白表达升高($P<0.05$);与 KO 组相比,KO+GIST 组小鼠体内 3 种蛋白表达无明显变化($P>0.05$);与 WT+GIST 组相比,KO+GIST 组小鼠体内 3 种蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论** Notch 信号通路相关蛋白 Notch1、Notch3 及 Hes1 在 GIST 患者组织中表达升高,Notch 信号通路的激活可能在 GIST 发生、发展过程中起重要作用。

[关键词] 胃肠道间质肿瘤;Notch1;Notch3;Hes1
[中图法分类号] R735 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)32-4500-05

Expression of Notch1,Notch3 and Hes1 in gastrointestinal stromal tumors and their clinical significance*

Fan Xiaojing¹, Shi Zhitao¹, Sun Xin¹, Zeng Binfang²

(1. Department of Oncology Surgery, the Affiliated Autonomous Regional Chinese Medicine of Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Department of Oncology, the Affiliated Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 834000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of Notch1, Notch3 and Hes1 in gastrointestinal stromal tumors(GIST) and their clinical significance. **Methods** Quantitative real-time polymerase chain-reaction(Q-PCR) and Western blot were applied to detect the mRNA and the expression of Notch1, Notch3 and Hes1 in 135 matched GIST specimens and adjacent tissues. Meanwhile, the expression of Notch1, Notch3 and Hes1 was detected by immunohistochemistry, and the relationship between their expression and clinicopathological factors in GIST patients was analyzed. In addition, a total of 40 wild type mice(WT) and Notch1 knockout mice(KO) was divided into WT group, KO group, WT+GIST group and KO+GIST group, and the expression of Notch1, Notch3 and Hes1 in each group was detected. **Results** Compared with adjacent tissues, the mRNA and the expression of Notch1, Notch3 and Hes1 were up-regulated in GIST tissues($P<0.05$). The positive rates of Notch1, Notch3 and Hes1 in the GIST specimens (59.26%, 65.19% and 62.22%) were higher than those in the adjacent tissues(17.78%, 22.22% and 17.78%), and the difference was statistically significant($P<0.05$). Statistical analysis showed that the expression of Notch1 was significantly correlated with the NIH grade of GIST($\chi^2=8.532, P=0.002$); the expression of Notch3 was significantly related with tumor metastasis of GIST ($\chi^2=7.532, P=0.003$); the expression of Hes1 was significantly associated with the tumor size of GIST($\chi^2=6.781, P=0.012$). The expression of Notch1, Notch3 and Hes1 was higher in WT+GIST group compared to the expression found in WT group(all $P<0.05$). There were no significant differences in the expression of Notch1, Notch3 and Hes1 between WT+GIST group and KO+GIST group. The expression of Notch1, Notch3 and Hes1 was lower in KO+GIST group compared to the expression found in WT+GIST group(all $P<0.05$). **Conclusion** The expression of Notch1, Notch3 and Hes1 related to Notch signaling pathway is elevated in GIST tissues, and the activation of Notch signaling pathway may play an important role in the occurrence and progression of GIST.

[Key words] gastrointestinal stromal tumors; Notch1; Notch3; Hes1

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)是临床上较常见的胃肠道肿瘤疾病,其具有发病率高和危害性大的特点,严重影响患者的生活质量和身体健康^[1]。早期肿瘤可

采用手术切除进行治疗,但有部分肿瘤较为复杂且不可切除。对于药物治疗,盐酸伊马替尼曾是临床上治疗 GIST 的主要药物,但伊马替尼存在严重的耐药性问题而成为临床上一个难

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160431)。 作者简介:樊晓静(1974—),主治医师,硕士,主要从事肿瘤外科方面的研究。

题^[2-4]。目前临床上尚无 GIST 的有效治疗药物,因此,探索新的 GIST 治疗靶点迫在眉睫。Notch 信号通路中的多个信号分子参与多种肿瘤的发生和发展过程已被证实^[5-7],但是关于 Notch 信号通路中各个信号分子,包括受体 Notch 1、Notch 3 等及下游靶基因 Hes 家族在 GIST 组织中的表达研究很少。本研究选取 2012—2016 年新疆医科大学附属医院自治区中医院收治的 GIST 患者作为研究对象,探讨 Notch 信号通路中 Notch 1、Notch 3 及下游靶基因 Hes-1 在 GIST 中的表达及临床意义,为 GIST 治疗探索新的治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 135 例 GIST 标本及相应的临近非肿瘤组织标本(距离肿瘤组织 2 cm 以上)均采集自 2012—2016 年该院收治的 GIST 患者。本研究纳入的患者均通过病理学方法确诊为 GIST。纳入标准^[8]:接受 R0 切除的原发性 GIST 患者。排除标准:(1)合并其他肿瘤或者其他重大疾病患者;(2)合并心理疾病、精神疾病患者。135 例 GIST 患者中,男 67 例,女 68 例;年龄为 26~84 岁,平均(59.92±8.91)岁;肿瘤直径 1.8~16.0 cm,平均(6.65±1.91)cm;肿瘤部位:胃部位 56 例,十二指肠部位 29 例,小肠部位 26 例,结直肠部位 13 例,其他部位 11 例;按美国国立卫生研究院(NIH)公布的 GIST 术后危险度分级系统(2008 版)进行分类,分为极低危 12 例,低危 24 例,中危 42 例和高危 57 例。临床标本采集及后续研究均获得患者同意和医院医学伦理审查。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器与试剂 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪(型号:ABI 7300,上海普迪生物技术有限公司);EL204 梅特勒电子天平(型号:EL204,厂家:郑州南北仪器设备有限公司);Notch-1、Notch-3、Hes-1 及 GAPDH 一抗均购自 Cell Signaling Technology 公司;二抗购自碧云天公司;免疫组织化学检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2.2 荧光定量 PCR^[9] 采用 Trizol 方法提取组织总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度后,取 2 μg 进行逆转录,生成 cDNA。采用 SYBR green 染料法进行定量检测,Notch1、Notch3、Hes1 及 GAPDH(内参)引物信息见表 1。

1.2.3 Western blot^[10] 常规方法提取组织总蛋白,二喹啉甲酸(BCA)方法测定蛋白质含量后,进行凝胶电泳,每孔上样 20 μg,电转至聚偏氟乙烯薄膜(PVDF)上后,3%的脱脂奶封闭 2 h,分布孵育抗人 Notch1、Notch3 及 Hes1 和 GAPDH 一抗,4℃孵育一抗过夜,接着进行 TBST 洗膜,最后孵育二抗并进行显影。采用 Quantity-One 软件对条带亮度进行分析。

1.2.4 免疫组织化学^[11] 采用常规方法制备 5 μm 厚的石蜡切片,进行免疫组织化学染色,采用抗 Notch1、Notch3 及 Hes1 单克隆抗体孵育,4℃过夜。洗涤后孵育二抗,加显色液后进行曝光。阳性细胞所占百分率(PP)得分:光学显微镜下(×400)观察,拍照,随机选取 10 个视野用于计算平均值,PP=阳性细胞数/总细胞数×100%。根据染色强度(0~3 分,0 分为无染色,1 分为弱染色,2 分为中度染色,3 分为强染色)进行判分。

1.2.5 动物实验部分 购买野生型小鼠(WT)和 Notch1 基因敲除小鼠(KO) 40 只,购自北京大学动物实验中心。随机分为 WT 组、KO 组、WT+GIST 组和 KO+GIST 组。每组 10 只。其中,WT+GIST 组:野生型小鼠(WT)接种 1×10⁶ 个 GIST 细胞。KO+GIST 组:Notch1 基因敲除小鼠(KO)接种 1×10⁶ 个 GIST 细胞。Western blot 法检测各组 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 本研究数据均采用 SPSS22.0 软件处理,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立 *t* 检验。计数资料用率表示,采用 χ^2 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Notch1、Notch3、Hes1 mRNA 和蛋白检测结果 采用 Q-PCR 方法检测 135 例 GIST 标本和临近非肿瘤组织标本,GIST 标本组 Notch1、Notch 3、Hes1 mRNA 表达量为 7.22±1.85、6.22±1.85、8.22±1.85,与非肿瘤组织(2.81±1.42、1.81±1.42、3.81±1.42)比较差异有统计学意义(*P*<0.05)。Western blot 检测结果表明,GIST 标本组 Notch1、Notch 3、Hes1 蛋白表达量为 1.32±0.61、2.32±0.61、1.92±0.61,高于与非肿瘤组织(0.83±0.50、0.93±0.50、0.93±0.50),差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 1~3。

表 1 Notch1、Notch3、Hes1 及 GAPDH 引物信息

基因	上游引物(5'~3')	下游引物(5'~3')	引物长度(bp)
Notch1	CAT GGA TCA GAA ACT CAG CAA AGT C	CAT GCC ATG CCT TGT CTT CA	179
Notch3	TAC AGG TGG CCA GAG TGG AA	GCA GTA GCA GAT AAA GGC ATC GAA	119
Hes1	GAA CGA TAA CCT TTG CAG GC	TTT CGA TTC CGC TAT GTG TG	130
GAPDH	CCT AGT TCG TCA TGG GTG TGA ACC A	GCC AGT AGA GGC AGG GAT GAT GTT C	186

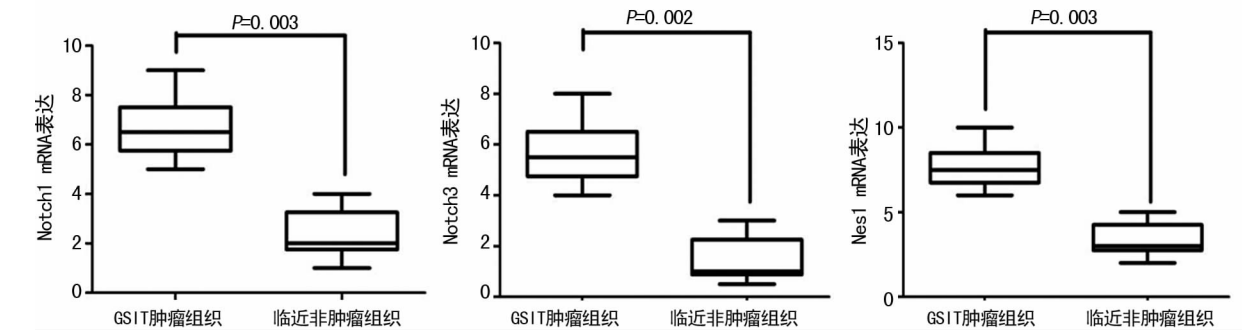


图 1 GIST 肿瘤组织与临近非肿瘤组织 Notch1、Notch3、Hes1 mRNA 相对表达量比较

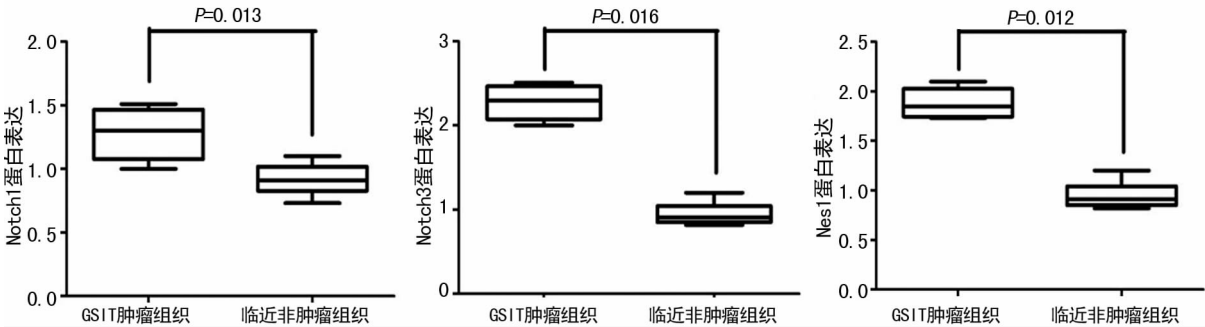


图 2 GIST 肿瘤组织与临近非肿瘤组织 Notch1、Notch3、Hes1 蛋白相对表达量比较

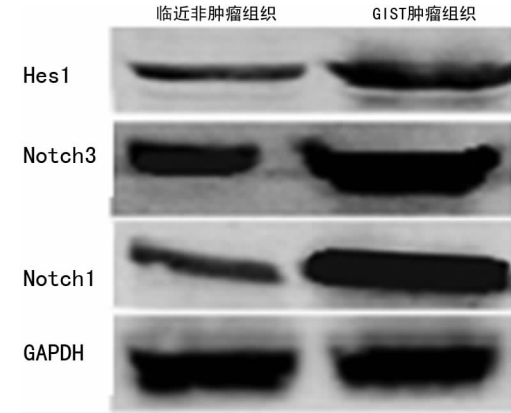


图 3 GIST 肿瘤组织与临近非肿瘤组织中 Notch1、Notch3、Hes1 蛋白表达 Western blot 检测

2.2 Notch1、Notch3 和 Hes1 蛋白在 GIST 组织与瘤旁组织中的表达阳性率 免疫组织化学结果表明,59.26%(84/135) GIST 标本为 Notch1 阳性,高于临近非肿瘤组织 17.78%(24/

135);65.19%(88/135)GIST 标本为 Notch3 阳性,高于临近非肿瘤组织 22.22%(24/135);62.22%(84/135) GIST 标本为 Hes1 阳性,高于临近非肿瘤组织 17.78%(24/135),差异均有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.3 Notch1、Notch3、Hes1 表达与 GIST 患者临床病理学特征关系分析 Notch1 蛋白表达与 GIST 的 NIH 分级存在相关性($\chi^2=8.532, P=0.002$);Notch3 蛋白表达与 GIST 的肿瘤转移存在相关性($\chi^2=7.532, P=0.003$);Hes1 蛋白表达与 GIST 的肿瘤大小存在相关性($\chi^2=6.781, P=0.012$),见表 2。

2.4 动物实验结果 Western blot 法检测各组 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达情况,与 WT 组相比,WT+GIST 组小鼠体内 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达升高($P<0.05$)。与 KO 组相比,KO+GIST 组小鼠体内 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达无明显变化($P>0.05$)。与 WT+GIST 组相比,KO+GIST 组小鼠体内 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达降低($P<0.05$),见表 3、图 5。

表 2 135 例 GIST 标本 Notch1、Notch3、Hes1 表达与患者临床病理学特征关系分析[n(%)]

项目	n	Notch1 阳性	χ^2	P	Notch3 阳性	χ^2	P	Hes1 阳性	χ^2	P
年龄(岁)			0.891	0.363		0.991	0.353		0.891	0.363
≤60	84	52(61.90)			50(59.52)			52(61.90)		
>60	51	32(62.75)			38(74.51)			32(62.75)		
性别			0.824	0.375		0.524	0.675		0.624	0.575
男	67	40(59.70)			42(62.69)			44(65.67)		
女	68	44(64.71)			46(67.65)			40(58.82)		
肿瘤大小(cm)			0.202	0.704		0.302	0.604		6.781	0.012
≤5	62	38(61.29)			40(64.52)			20(32.26)		
>5	73	46(63.01)			48(65.75)			64(87.67)		
肿瘤转移			0.845	0.208		7.532	0.003		0.345	0.728
否	39	25(64.10)			19(48.72)			26(66.67)		
是	96	59(61.46)			69(71.88)			58(60.42)		
肿瘤部位			0.961	0.316		0.761	0.116		0.861	0.216
胃	56	35(62.50)			36(64.29)			35(62.50)		
十二指肠	29	18(62.07)			18(62.07)			17(58.62)		
小肠	26	16(61.54)			17(65.38)			17(65.38)		
结直肠	13	8(61.54)			9(69.23)			8(61.54)		
其他	11	7(63.64)			8(72.73)			7(63.64)		
NIH 分级			8.532	0.002		0.601	0.563		0.602	0.533
极低危	12	9(75.00)			8(66.67)			8(66.67)		
低危	24	20(83.33)			16(66.67)			16(66.67)		
中危	42	35(83.33)			28(66.67)			28(66.67)		
高危	57	20(35.09)			36(63.18)			40(70.18)		

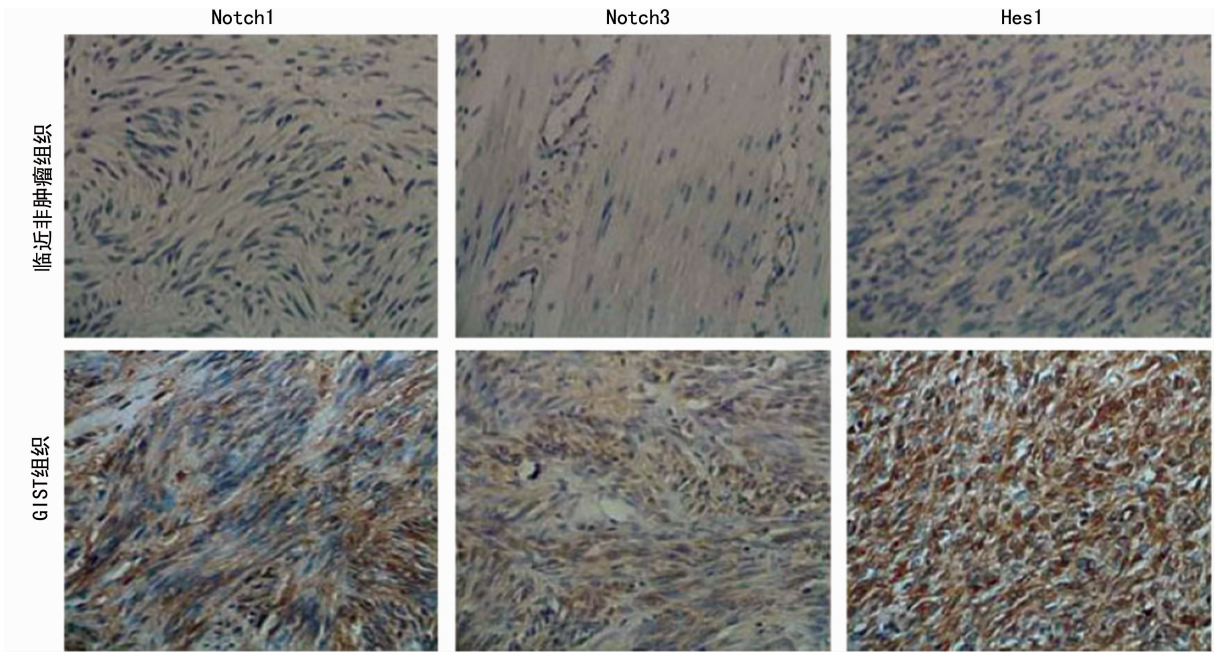


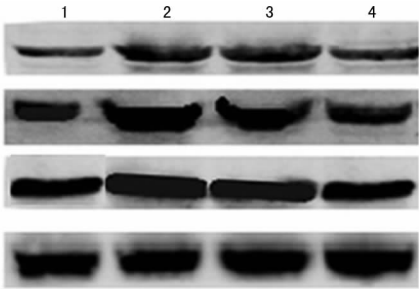
图 4 免疫组化检测 Notch1、Notch3、Hes1 蛋白的表达(×400)

表 3 Western blot 法检测各组 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达情况

项目	WT 组	WT+GIST 组	KO 组	KO+GIST 组
Notch1	0.92±0.12	1.62±0.34 ^a	0.93±0.12	0.92±0.12 ^b
Notch3	0.95±0.12	1.62±0.37 ^a	0.93±0.12	0.94±0.17 ^b
Hes1	0.94±0.12	1.62±0.34 ^a	0.96±0.12	0.92±0.12 ^b

^a: $P<0.05$,与 WT 组比较;^b: $P<0.05$,与 WT+GIST 组比较

本研究首次探讨 Notch 信号通路中 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白在 GIST 组织中的表达,135 例新鲜 GIST 标本 Q-PCR 及 Western blot 结果表明,与临近非肿瘤组织相比,GIST 组织中 Notch1、Notch3 及 Hes1 mRNA 和蛋白表达均上调($P<0.05$)。免疫组织化学结果表明,GIST 标本的 Notch1、Notch3、Hes1 阳性率(59.26%、65.19%、62.22%)均高于临近非肿瘤组织(17.78%、22.22%、17.78%)。可见 GIST 组织中 Notch1、Notch3 及 Hes1 mRNA 和蛋白表达均上调($P<0.05$)。同时本研究进一步探讨了 Notch1、Notch3 及 Hes1 在 135 例 GIST 肿瘤组织中的表达情况与临床因素之间的关系,研究表明,Notch1 蛋白表达与 GIST 的 NIH 分级有相关性($P=0.002$);Notch3 蛋白的表达与 GIST 的肿瘤转移有相关性(0.003);Hes1 蛋白表达与 GIST 的肿瘤大小有相关性($P=0.012$)。Western blot 法检测各组 Notch1、Notch3 及 Hes1 蛋白表达情况显示,与 WT 组相比,WT+GIST 组小鼠体内 3 种蛋白表达升高($P<0.05$);与 KO 组相比,KO+GIST 组小鼠体内 3 种蛋白表达无明显变化($P>0.05$);与 WT+GIST 组相比,KO+GIST 组小鼠体内 3 种蛋白表达降低($P<0.05$)。提示 Notch 信号通路的激活可能促进 GIST 的发生、发展。



1: WT 组;2: WT+GIST 组;3: KO 组;4: KO+GIST 组
图 5 动物实验结果 Western blot 检测结果

3 讨 论

Notch 信号通路参与多种肿瘤的发生和发展,其调控细胞多种进程,包括细胞的分化、增殖、凋亡及迁移等^[12-14]。Notch 1、Notch 2、Notch-3 和 Notch 4 是 Notch 受体,当 Notch 配体与 Notch 受体特异性结合后,Notch 信号通路随后被激活,进而激活下游靶基因 Hes 家族的转录^[15]。Hes1 作为 Notch 信号通路下游靶基因 Hes 家族的主要成员,也随之被激活^[16]。Notch 信号通路在不同的肿瘤中表现出不同的作用,具有促癌和抗癌的双重作用^[17]。众多研究结果表明,在卵巢癌、胆管癌、肺癌及乳腺癌中,Notch 信号通路表现促癌作用^[18]。而在皮肤癌、前列腺癌及神经内分泌肿瘤中,Notch 信号通路表现抗癌作用^[19-20]。目前,关于 Notch 信号通路中各个信号分子,包括受体 Notch 1、Notch 3 等及下游靶基因 Hes 家族在 GIST 组织中的表达研究很少,对此,本文将进行进一步探讨。

综上所述,Notch 信号通路相关蛋白 Notch1、Notch3 及 Hes1 在 GIST 患者组织中表达升高,Notch 信号通路的激活可能能在 GIST 发生、发展过程中起重要作用,有望进一步揭示 Notch 信号通路对 GIST 细胞抗凋亡和肿瘤转移等方面的具体机制,同时有望为 GIST 分子靶向治疗寻找新的有效靶点。

参考文献

[1] Demetri GD,von Mehren M,Antonescu CR,et al. NCCN Task Force report:update on the management of patients with gastrointestinal stromal tumors[J]. J Natl Compr Canc Netw,2012,8 Suppl 2:S1-41.

[2] Joensuu H. Adjuvant treatment of GIST:patient selection and treatment strategies[J]. Nat Rev Clin Oncol,2012,9 (6):351-358.

- [3] Dumont AG, Yang Y, Reynoso D, et al. Anti-tumor effects of the Notch pathway in gastrointestinal stromal tumors [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(9):1674-1683.
- [4] Joensuu H. Risk stratification of patients diagnosed with gastrointestinal stromal tumor [J]. *Hum Pathol*, 2013, 39(10):1411-1419.
- [5] 中国 CSCO 胃肠间质瘤专家委员会. 中国胃肠间质瘤诊断治疗共识(2013 年版) [J]. *中华胃肠外科杂志*, 2014, 17(4):393-398.
- [6] 王昊, 陈平, 柳欣欣, 等. 胃肠间质瘤 p-AKT(Thr308) 和 p-AKT(Ser473) 表达及其临床意义和预后分析 [J]. *肿瘤*, 2014, 34(6):541-546.
- [7] Ranganathan P, Weaver KL, Capobianco AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5):338-351.
- [8] Yuan X, Wu H, Xu H, et al. Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(1):20-27.
- [9] Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer [J]. *Curr Mol Med*, 2016, 6(8):905-918.
- [10] Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. NOTCH signaling as a novel cancer therapeutic target [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2016, 6(4):313-323.
- [11] Ma S, Shi Y, Pang Y, et al. Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 7(1):71.
- [12] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2):97-110.
- [13] Yu P, Petrus MN, Ju W, et al. Augmented efficacy with the combination of blockade of the Notch-1 pathway, bortezomib and romidepsin in a murine MT-1 adult T-cell leukemia model [J]. *Leukemia*, 2015, 29(3):556-566.
- [14] 苏进, 邓小峰, 刘波, 等. Notch 信号通路在胆管癌中的研究进展 [J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(8):1175-1180.
- [15] Kunnimalaiyaan M, Chen H. Tumor suppressor role of Notch-1 signaling in neuroendocrine tumors [J]. *Oncologist*, 2013, 12(5):535-542.
- [16] Zweidler-McKay PA, He Y, Xu L, et al. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies [J]. *Blood*, 2005, 106(12):3898-3906.
- [17] Dotto GP. Notch tumor suppressor function [J]. *Oncogene*, 2013, 27(38):5115-5123.
- [18] Radtke F, Rai K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 3(10):756-767.
- [19] Capaccione KM, Pine SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(7):1420-1430.
- [20] Andersson ER, Lendahl U. Therapeutic modulation of Notch signalling—are we there yet? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(5):357-378.

(收稿日期:2017-04-08 修回日期:2017-07-02)

(上接第 4499 页)

- Am, 2007, 87(6):1431-1446.
- [7] Maheshwari R, Subramanian RM. Severe acute pancreatitis and necrotizing pancreatitis [J]. *Crit Care Clin*, 2016, 32(2):279-290.
- [8] Zarem E. Treatment of severe acute pancreatitis and its complications [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(38):13879-13892.
- [9] Cucher D, Kulvatunyou N, Green DJ, et al. Gallstone pancreatitis: a review [J]. *Surg Clin North Am*, 2014, 94(2):257-280.
- [10] Zhang J, Jiang MX, Zheng Y, et al. Comparison of laparoscopy and open surgery in treating severe acute pancreatitis and its relative aftercare [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2016, 30(1):189-195.
- [11] da Costa DW, Schepers NJ, Römkens TE, et al. Endoscopic sphincterotomy and cholecystectomy in acute biliary pancreatitis [J]. *Surgeon*, 2016, 14(2):99-108.
- [12] Lv S, Fang Z, Wang A, et al. One-step LC and ERCP treatment of 40 cases with cholelithiasis complicated with common bile duct stones [J]. *Hepatogastroenterology*, 2015, 62(139):570-572.
- [13] Morris S, Gurusamy KS, Patel N, et al. Cost-effectiveness of early laparoscopic cholecystectomy for mild acute gallstone pancreatitis [J]. *Br J Surg*, 2014, 101(7):828-835.
- [14] ASGE Standards of Practice Committee, Chandrasekhara V, Khashab MA, et al. Adverse events associated with ERCP [J]. *Gastrointest Endosc*, 2017, 85(1):32-47.
- [15] Tohda G, Ohtani M, Dochin M. Efficacy and safety of emergency endoscopic retrograde cholangiopancreatography for acute cholangitis in the elderly [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(37):8382-8388.

(收稿日期:2017-04-14 修回日期:2017-06-03)