

细胞因子与慢性肝脏疾病的研究进展

孙明珠, 党双锁

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

党双锁, 教授, 博士生导师, 主要从事病毒性肝脏疾病的临床和基础研究。

作者贡献分布: 本文综述由孙明珠与党双锁完成; 党双锁审校。

通讯作者: 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。dang212@126.com

电话: 029-83036998 传真: 029-87679688

收稿日期: 2009-06-12 修回日期: 2009-07-20

接受日期: 2009-07-21 在线出版日期: 2009-07-28

Advances in research on the role of cytokines in chronic liver diseases

Ming-Zhu Sun, Shuang-Suo Dang

Ming-Zhu Sun, Shuang-Suo Dang, Department of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Professor Shuang-Suo Dang, Department of Infectious Disease, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. dang212@126.com

Received: 2009-06-12 Revised: 2009-07-20

Accepted: 2009-07-21 Published online: 2009-07-28

Abstract

Cytokines play an important role in the development of liver inflammatory injury. Various pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines constitute a cytokine network that mediates the development of various liver diseases. In recent years, numerous studies have been carried out on chronic liver diseases such as viral hepatitis, fatty liver, alcoholic liver disease and hepatic cirrhosis. Here, we will review the recent advances in research on the role of cytokines in chronic liver diseases and discuss future prospects in this field.

Key Words: Cytokine; Pro-inflammatory cytokines; Anti-inflammatory cytokines; Chronic liver diseases

Sun MZ, Dang SS. Advances in research on the role of cytokines in chronic liver diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2121-2126

摘要

肝脏炎性损伤的发生发展过程中, 细胞因子起着很重要的作用。众多致炎细胞因子和抗炎细胞因子构成细胞因子调控网络, 共同作用于组织细胞, 导致肝脏病变的演变。近年来, 学者们在部分病毒性肝炎、脂肪肝、酒精性肝病、肝硬化等慢性肝脏疾病进行了大量研究, 有不少新发现。本文简要总结了近年来国内外学者在细胞因子与慢性肝脏疾病关系的研究中所取得的共识与进展, 并试图提出未来研究议题供同行参考。

关键词: 细胞因子; 致炎因子; 抗炎因子; 慢性肝脏疾病

孙明珠, 党双锁. 细胞因子与慢性肝脏疾病的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2121-2126

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2121.asp>

0 引言

在研究慢性肝脏疾病肝损伤的发生发展过程中, 随着对细胞因子的认识和发现, 学者们发现众多细胞因子参与肝损伤的发生演变过程。加深了解细胞因子在肝损伤中的作用对于阐释肝脏疾病的发生机制意义重大。

1 细胞因子与肝脏疾病

细胞因子是20世纪50年代在研究感染性疾病时发现的。1974年Cohen *et al*提出了细胞因子的概念, 把在细胞间传递信息、对细胞起活化或抑制作用、并可由多种细胞产生的可溶性多肽分子统称为细胞因子^[1]。

1.1 细胞因子的概念和分类 据目前英汉汉英医学分科词典的解释: 细胞因子是由活化的免疫细胞和某些基质细胞分泌的、介导和调节免疫、炎症反应的小分子多肽, 是除免疫球蛋白和补体外的另一类非特异性免疫效应物质。他包括由淋巴细胞产生的淋巴因子(lymphokine)和由单核/巨噬细胞产生的单核因子(monokine)等。

根据细胞因子在炎症反应中的不同作用分为: 促炎细胞因子和抗炎细胞因子。促炎细胞因子, 也称致炎因子, 包括肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素

■背景资料

在学者发现并提出细胞因子的概念以后, 人们就开始对细胞因子在病毒性肝炎、脂肪肝、酒精性肝病、肝硬化等相关慢性肝脏疾病进行大量的研究。发现各种原因引起肝脏炎性损伤的发生发展过程中, 细胞因子起着很重要的作用。众多的致炎细胞因子和抗炎细胞因子构成细胞因子调控网络, 共同作用于组织细胞, 导致肝脏病变程度的演变与走向。

■同行评议者

赵桂鸣, 主任医师, 天津市肝病研究所天津市传染病医院慢性肝炎科

■研发前沿

细胞因子作为炎症反应的重要载体与肝脏疾病的进展或演变密切相关,由于细胞因子网络调控的复杂性,目前系统规范的研究不够深入.对细胞因子在酒精性肝病的作用中发现细胞因子起着重要作用,提示探索在其他慢性肝脏疾病发展变化中研究细胞因子的作用意义重大.

(interleukin, IL, 包括IL-1、IL-6、IL-8、IL-12等)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)等,与炎症的发生发展密切相关.抗炎细胞因子,也称抗炎因子,包括IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、脂连素(adiponectin)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-1受体抗体(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra)等^[2-6].

1.2 细胞因子与肝脏疾病 随着人们对细胞因子认识的进一步深入,学者们在研究肝脏疾病发病机制时发现细胞因子的合成及代谢与肝脏的病理损伤密切相关.现已明确,与肝脏疾病相关的细胞因子有TNF- α 、IL、IFN、TGF- β 等^[7-11].此外也发现,血液中的部分细胞因子主要在肝脏清除,能被肝细胞清除的细胞因子包括:IL-1、IL-3、IL-6、TNF- α 、IFN^[12-16].因此,了解肝脏疾病发生发展过程中细胞因子的变化和作用,对于阐释肝脏疾病的发生机制具有重要意义.

2 细胞因子与慢性肝脏疾病的关系

2.1 慢性乙型肝炎与细胞因子的关系 慢性乙型肝炎是细胞介导的免疫反应异常的结果.有学者^[17]曾检测慢性乙型肝炎患者100例及正常人15例血清TNF- α 、IL-2、IL-6、IL-8及HBV DNA定量等项指标,结果与正常人比较,轻度、中度、重度慢性乙型肝炎患者血清致炎因子TNF- α 、IL-6、IL-8、抗炎因子IL-2含量均有不同程度升高,其升高情况为:慢性乙型肝炎重度>中度>轻度.慢性乙型肝炎各组HBV DNA水平无明显变化. HBV DNA复制水平与血清致炎因子TNF- α 和IL-6、抗炎因子IL-2水平呈正相关.随着病程的延长,血清致炎因子TNF- α 、IL-6、IL-8、抗炎因子IL-2水平逐渐升高.由此得出结论:慢性乙型肝炎患者血清致炎因子TNF- α 、IL-6和IL-8、抗炎因子IL-2水平的高低能够反映肝细胞损害的程度.这些细胞因子参与了乙型肝炎的发病过程,在乙型肝炎转为慢性化过程中,均不同程度发挥了作用.

2.2 脂肪肝与细胞因子的关系 内毒素介导的细胞因子释放在脂肪肝的发展中占重要地位.脂肪肝患者肠道革兰阴性菌增加,肠壁通透性增加,网状内皮的功能降低,从而使血清中的内毒素增加.内毒素可以激活Kupffer细胞,使其释放细胞因子,造成肝脏的损害.经测定脂肪肝患者血清中致炎因子TNF- α 、IL-6水平升高.给予抗TNF- α 抗体可减少脂肪肝的发生,可见TNF- α 、

IL-6参与酒精性脂肪肝的形成发展.有学者研究发现TNF- α 与丙二醛正相关,与超氧化物歧化酶(super oxide dismutase, SOD)负相关,认为TNF- α 参与肝细胞的损害且与肝内过氧化反应加强、抗过氧化反应能力削弱有关^[18-20].

2.3 肝硬化与细胞因子的关系 肝硬化的病情发展,大多数经历了从代偿期到失代偿期的过程.为了评估酒精性肝硬化进展中细胞因子的作用,有学者^[21-25]评估了代偿和失代偿性酒精性肝硬化患者血清中致炎因子TNF- α 、IL-6、IL-8,抗炎因子IL-2、IL-10、TGF- β 水平.代偿性酒精性肝硬化的特征是IL-6增加、IL-10减少;TNF- α 、IL-8、TGF- β 水平与对照组的相同.在失代偿性酒精性肝硬化患者血清中,除了IL-6增加,也检测到TNF- α 和IL-8增加了;TGF- β 和IL-10水平与对照组的相同.这些结果有力地说明:代偿、尤其是失代偿酒精性肝硬化的特征是致炎因子和抗炎因子之间显著的平衡紊乱.

2.4 酒精性肝病与细胞因子的关系 酒精性肝炎是一个典型的致炎因子TNF- α 相关性疾病^[26].Mookerjee *et al*最近证明:TNF- α 在酒精性肝炎肝门和全身血流动力学紊乱中发挥主要作用^[27].TNF- α 的变化是肝脏损伤最早发生的活动之一,他刺激其他细胞因子的产生.酒精性肝硬化时TNF- α 似乎可能作为患者肝移植时肝功能紊乱的另外一个诊断标志.而且,一些研究数据显示:酒精性肝硬化不仅与致炎因子增多有关,而且与致炎因子和抗炎因子之间显著的平衡紊乱有关.而TNF- α 的紊乱可能与慢性乙型肝炎的死亡率有关.实际上,对缺少1型TNF受体的小鼠的抗体中和研究和实验显示:在部分肝切除术后,肝脏的再生是由TNF- α 1型TNF受体的活化开始的.动物实验数据进一步证实了TNF- α 在酒精相关性肝脏疾病中发挥主要作用.支持TNF- α 作用的最引人注目的证据来自于对小鼠的研究,在一项研究中发现,小鼠对酒精导致的肝脏疾病产生免疫耐受的时候,1型TNF受体基因就会断裂^[28-30].

3 细胞因子之间的关系及其生物学作用

在以上研究慢性肝脏疾病与细胞因子关系的过程中,我们不难发现体内各细胞因子间相互作用,形成细胞因子作用网络.细胞因子间的生物学活性通常存在交叉现象,即几种不同的细胞因子具有相同的生物学活性.一种细胞因子通常影响其他细胞因子的合成,导致连锁反应.例

■相关报道

Louis *et al*报道TNF- α 、白介素、干扰素、TGF- β 等细胞因子与肝脏疾病相关;Mookerjee *et al*报道TNF- α 在酒精性肝炎肝门和全身血流动力学紊乱中发挥主要作用.

如, 在炎症反应的急性期, 致炎因子TNF- α 诱导致炎因子IL-1的合成, 后者又诱导致炎因子IL-6的合成. 细胞因子的生物作用可相互影响, 两种细胞因子可能产生拮抗作用, 亦可能产生累加效应或协同作用. 细胞因子之间的相互诱导、抑制或加强最终形成多向调节网络, 这对免疫反应及炎症反应有重要的调控意义.

致炎因子IL-1和TNF- α 是炎症的主要中间介质, 具有相同的活性, 在肝组织纤维化过程中, 他们能够激活几种蛋白激酶; 而在肝细胞的体外培养中, 能由IL-1激活的酶谱范围更广, 提示在肝细胞增殖过程中IL-1通过更多的通路来起作用. 致炎因子IL-6是多种细胞如单核吞噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞和激活的T淋巴细胞等对IL-1和TNF- α 反应的产物. IL-6主要作用于肝细胞和B淋巴细胞, 刺激肝细胞合成纤维蛋白原等几种血清蛋白, 是活化的B淋巴细胞分化晚期的主要刺激因子. TNF- α 、IL-1和IL-6协同介导炎症的急性期反应. 在急性期反应中, 这些炎症因子刺激肝细胞合成包括C-反应蛋白、 α 2-巨球蛋白等抗蛋白酶和纤维蛋白酶原在内的所谓急性期反应蛋白, 抑制肝细胞合成白蛋白及转铁蛋白^[31-33].

目前发现的致炎因子CSF有粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)、单核-巨噬细胞集落刺激因子(monocyte-colony stimulating factor, M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF). M-CSF是炎症反应的敏感指标: 在炎症反应中炎性细胞浸润激活而产生M-CSF, M-CSF又可通过其受体引起内皮细胞、单核-巨噬细胞释放更多的M-CSF. 研究发现, 急性炎症患者循环血中M-CSF较正常对照组显著增高, 因此M-CSF的高低与炎症反应程度密切相关, 炎症反应越重, M-CSF升高越明显. M-CSF可以促进单核细胞释放致炎因子, 是体内重要的致炎因子之一, 而IL-10则是体内重要的抗炎因子, 能拮抗M-CSF的致炎作用. 肝移植后用G-CSF动员自体骨髓干细胞, 受体生存率高, 移植肝再生明显, 肝损伤轻^[34-37].

抗炎因子TGF- β 具有较强的抑制肝细胞有丝分裂的作用, 所以他在肝细胞再生过程中起着重要的调节作用. TGF- β 可抑制肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、TGF- α 和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)等对肝细胞再生的刺激作用. TGF- β 是肝纤维

化的重要始动因子, 由于在肝脏严重损伤时血浆浓度可显著升高, 并与谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)水平密切相关, 因此TGF- β 是肝脏炎症坏死的标志物^[38-39].

4 细胞因子与慢性肝脏疾病之间的关系

大多数慢性肝脏疾病的特征是: 许多致炎因子和抗炎因子在肝脏中过度表达所造成的炎症过程. 致炎因子和抗炎因子是肝脏炎症疾病的驱动力, 这往往导致肝脏纤维化和肝硬化. 致炎因子TNF- α 、抗炎因子IL-10和脂联素已经成为研究许多慢性肝脏疾病的重要因素和评价指标.

4.1 TNF- α 虽然之前在法国完成的一项研究显示了抗TNF- α 药物对治疗酒精性肝炎有潜在的有害作用, 但是人们仍然进行试验性研究, 如研究像英夫利昔单抗(infliximab)和依那西普(etanercept)这样的抗TNF- α 药物对于酒精性肝炎的治疗作用^[40-43]. 在一项24 wk皮下使用依那西普的试验中, 抗TNF- α 药物使丙型肝炎好转^[44-45].

抗TNF抗体治疗也成功地用于预防酒精引起的老鼠肝脏损伤^[46-51]. 有一个假说: 内毒素类肠内细菌产物可能在肝脏Kupffer细胞和其他细胞的活化中发挥重要的作用. 这个假说与最近的一项观察相一致: 长期摄入酒精的野生型老鼠产生的肝脏损伤比敲除分化簇14(cluster of differentiation14, CD14)引起的肝脏损伤更严重^[52-53]. 这些结果进一步支持了这样一个观点: 通过细胞内受体CD14发挥作用的肠内毒素在酒精导致的肝脏损伤早期发挥重要的作用. 有研究表明: 抗TNF- α 治疗(TNF- α 中和治疗)可以促进多种因素(酒精性、病毒性)所致的肝脏损伤的恢复^[26]. 可能不久的将来使用依那西普抗TNF的治疗措施会成为一种优先选择的治疗措施. TNF- α 中和疗法在许多慢性炎症疾病中已经被证明为高度有效. 虽然评估抗TNF- α 疗法的研究产生了许多有争议的结论, 一些实验数据从总体而言仍然证明抗TNF- α 治疗是最有吸引力的治疗方法.

4.2 IL-10 IL-10是一种重要的抗炎因子, 可抑制免疫细胞的活化, 具有潜在的抗炎和抗纤维化作用. 像IL-10的抗炎因子已经在慢性肝脏疾病患者身上试验过. IL-10产生减少可能与酒精性肝病的病理机制相关. 据检测, 在肝星形细胞中IL-10可能以自分泌的方式抑制胶原的合成, 而肝星形细胞参与了肝脏纤维化的重塑过程. 与

■创新盘点

本文较全面地总结了近年来国内外学者在细胞因子与慢性肝脏疾病之间的关系, 提出系统动态地研究细胞因子在慢性肝脏疾病发生发展过程中意义重大.

■应用要点

本文通过介绍细胞因子在慢性肝脏疾病中的研究结果,提出细胞因子之间的网络调控是影响慢性肝脏疾病进程的重要因素,对其某个细胞因子的检测或干预可能对于判断病情及治疗均有重要的意义。

野生小鼠相比, IL-10基因敲除的小鼠在重复注射四氯化碳后更多的出现了早期肝纤维化。然而,从早期肝纤维化小鼠中分离出来的肝星形细胞显示IL-10的合成有缺陷。这一缺陷可能成为病理性胶原产生过剩和从肝病到肝硬化进展的基础^[54-60]。在肝硬化进展中, IL-10的作用尤其应当加以阐释。

4.3 脂联素 脂联素是近来发现的一种脂肪组织特异性抗炎因子。脂联素可通过cAMP-PKA依赖途径抑制TNF- α 诱导的人主动脉内皮细胞黏附分子的表达,脂联素通过PI3K/Akt信号途径的激活,降低NF- κ B结合活性,刺激体外培养的人巨噬细胞分泌IL-10和IL-1ra,从而发挥抗炎作用。并可明显降低肝细胞的凋亡率,从而起到保护肝细胞的作用^[61-64]。预先应用重组脂联素干预可降低ALT血清水平以及致炎因子IL-4、TNF- α 和IFN- γ 的血清水平,以及升高抗炎因子IL-10的血清水平及其在肝脏中的表达,即脂联素通过促进抗炎因子、抑制致炎因子的产生,减轻肝脏炎症损伤^[65-71]。脂联素在慢性肝脏疾病的表达和作用及与炎症的关系越来越受到广大学者的关注,但目前研究结果不尽相同,甚至相互矛盾,需要进一步的研究与验证。

5 结论

细胞因子的失衡是慢性肝脏疾病进程中的基本环节,细胞因子与慢性肝脏疾病之间的相互作用会给未来的临床提供一个很有吸引力的诊断依据和治疗思路。事实上,在指导性研究中,抗炎症因子治疗很可能最终获得成功。在不久的将来,致炎因子抵抗会成为基本的临床概念,有希望产生更好的治疗许多慢性肝脏疾病的方法。虽然当前的研究已经阐明一些关键的细胞因子在慢性肝脏疾病中的作用,但是目前尚未有对慢性肝脏疾病的不同状态下致炎因子与抗炎因子变化的研究,更没有对慢性肝脏疾病不同组别的人群致炎因子和抗炎因子的变化进行研究,也没有对这些相关的致炎因子和抗炎因子之间的相互关系进行研究,而慢性肝脏疾病中这些细胞因子的变化,及其相互关系,可以揭示慢性肝脏疾病的感染状态、揭示慢性肝脏疾病的预后,为慢性肝脏疾病的早期诊断、及时治疗提供依据。只有在整个机体的内环境中弄清炎症因子之间的相互作用的具体机制,才有可能进一步阐释肝脏疾病的发生行为,并为临床治疗一系列慢性肝脏疾病寻找出高效、安全的途径。

6 参考文献

- 1 Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Commentary. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol* 1974; 12: 150-159
- 2 Khairova RA, Machado-Vieira R, Du J, Manji HK. A potential role for pro-inflammatory cytokines in regulating synaptic plasticity in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12: 561-578
- 3 Kim EY, Moudgil KD. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. *Immunol Lett* 2008; 120: 1-5
- 4 Uçeyler N, Sommer C. [Cytokine regulation and pain. Results of experimental and clinical research] *Schmerz* 2008; 22: 652-664
- 5 Godukhin OV. [The role of cytokines in the seizure activity development in the brain] *Zh Vyssh Nervo Deiat Im I P Pavlova* 2007; 57: 541-552
- 6 Niemann CU, Xu F, Choi S, Behrends M, Park Y, Hirose R, Maher JJ. Short Passive Cooling Protects Rats During Hepatectomy by Inducing Heat Shock Proteins and Limiting the Induction of Pro-Inflammatory Cytokines. *J Surg Res* 2008 Oct 16. [Epub ahead of print]
- 7 Louis R, Shute J, Goldring K, Perks B, Lau LC, Radermecker M, Djukanovic R. The effect of processing on inflammatory markers in induced sputum. *Eur Respir J* 1999; 13: 660-667
- 8 Stewart CR, Landseadel JP, Gurka MJ, Fairchild KD. Hypothermia increases interleukin-6 and interleukin-10 in juvenile endotoxemic mice*. *Pediatr Crit Care Med* 2009 Jul 11. [Epub ahead of print]
- 9 Barkhausen T, Hildebrand F, Krettek C, van Griensven M. DHEA-dependent and organ-specific regulation of TNF-alpha mRNA expression in a murine polymicrobial sepsis and trauma model. *Crit Care* 2009; 13: R114
- 10 Jiang L, Jiang LS, Cheng NS, Yan LN. Current prophylactic strategies against hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2489-2499
- 11 Matsuzaki K. Modulation of TGF-beta signaling during progression of chronic liver diseases. *Front Biosci* 2009; 14: 2923-2934
- 12 Wilt TJ, Shamliyan T, Shaukat A, Taylor BC, MacDonald R, Yuan JM, Johnson JR, Tacklind J, Rutks I, Kane RL. Management of chronic hepatitis B. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2008; (174): 1-671
- 13 Ludwiczek O, Vannier E, Moschen A, Salazar-Montes A, Borggraefe I, Gabay C, Enrich B, Kaser A, Siegmund B, Dinarello C, Tilg H. Impaired counter-regulation of interleukin-1 by the soluble IL-1 receptor type II in patients with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43: 1360-1365
- 14 Lai WK, Curbishley SM, Goddard S, Alabraba E, Shaw J, Youster J, McKeating J, Adams DH. Hepatitis C is associated with perturbation of intrahepatic myeloid and plasmacytoid dendritic cell function. *J Hepatol* 2007; 47: 338-347
- 15 Carroll MB, Bond MI. Use of tumor necrosis factor-alpha inhibitors in patients with chronic hepatitis B infection. *Semin Arthritis Rheum* 2008; 38: 208-217
- 16 Hosseini-Moghaddam SM, Mousavi A, Alavian SM. Is [beta]-interferon a promising therapeutic option for the management of hepatitis C? *J Antimicrob*

- Chemother 2009; 63: 1097-1103
- 17 Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int* 2006; 26: 1029-1039
 - 18 范小玲, 张维燕. 肝炎病毒感染与胰岛素抵抗. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2077-2081
 - 19 Tordjman J, Guerre-Millo M, Clément K. Adipose tissue inflammation and liver pathology in human obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34: 658-663
 - 20 Purohit V, Gao B, Song BJ. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol Clin Exp Res* 2009; 33: 191-205
 - 21 Daniluk J, Szuster-Ciesielska A, Drabko J, Kandefer-Szerszeń M. Serum cytokine levels in alcohol-related liver cirrhosis. *Alcohol* 2001; 23: 29-34
 - 22 Dang SS, Wang BF, Cheng YA, Song P, Liu ZG, Li ZF. Inhibitory effects of saikosaponin-d on CCl₄-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 557-563
 - 23 Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 861-882, x
 - 24 Moreno M, Bataller R. Cytokines and renin-angiotensin system signaling in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 825-852, ix
 - 25 Svegliati-Baroni G, De Minicis S, Marziani M. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. *Liver Int* 2008; 28: 1052-1064
 - 26 Menon KV, Stadheim L, Kamath PS, Wiesner RH, Gores GJ, Peine CJ, Shah V. A pilot study of the safety and tolerability of etanercept in patients with alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 255-260
 - 27 Mookerjee RP, Sen S, Davies NA, Hodges SJ, Williams R, Jalan R. Tumour necrosis factor alpha is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut* 2003; 52: 1182-1187
 - 28 Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, Orfao A. Chronic alcohol consumption is associated with changes in the distribution, immunophenotype, and the inflammatory cytokine secretion profile of circulating dendritic cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: 846-854
 - 29 Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997; 26: 1530-1537
 - 30 Yin M, Wheeler MD, Kono H, Bradford BU, Gallucci RM, Luster MI, Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 1999; 117: 942-952
 - 31 Pajak B, Orzechowska S, Pijet B, Pijet M, Pogorzelska A, Gajkowska B, Orzechowski A. Crossroads of cytokine signaling--the chase to stop muscle cachexia. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 9: 251-264
 - 32 Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 3574-3589
 - 33 Kang JX, Weylandt KH. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 fatty acids. *Subcell Biochem* 2008; 49: 133-143
 - 34 王君平, 孙殿兴, 李兵顺, 李敏然, 郭争荣, 亢继文, 李伟勇. 粒细胞集落刺激因子防治小鼠CCl₄所致肝损伤的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3395-3402
 - 35 Koskinas J, Zacharakis G, Sidiropoulos J, Elefsiniotis J, Savvas S, Kotsiou S, Kountouras D, Schina M, Kostopoulos P, Archimandritis A. Granulocyte colony stimulating factor in HCV genotype-1 patients who develop Peg-IFN-alpha2b related severe neutropenia: a preliminary report on treatment, safety and efficacy. *J Med Virol* 2009; 81: 848-852
 - 36 Han Y, Yan L, Han G, Zhou X, Hong L, Yin Z, Zhang X, Wang S, Wang J, Sun A, Liu Z, Xie H, Wu K, Ding J, Fan D. Controlled trials in hepatitis B virus-related decompensate liver cirrhosis: peripheral blood monocyte transplant versus granulocyte-colony-stimulating factor mobilization therapy. *Cytotherapy* 2008; 10: 390-396
 - 37 Durante-Mangoni E, Iardino P, Utili R, Adinolfi LE, Ruggiero G. Defective synthesis of granulocyte-colony stimulating factor in pegylated interferon-alpha treated chronic hepatitis C patients with declining leukocyte counts. *Antivir Ther* 2006; 11: 637-640
 - 38 Jung YA, Lee KM, Kim MK, Jung GS, Seo YJ, Kim HS, Cho HC, Lee KU, Park KG, Lee IK. Forkhead transcription factor FoxO1 inhibits insulin- and transforming growth factor-beta-stimulated plasminogen activator inhibitor-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386: 757-761
 - 39 Liang TJ, Yuan JH, Tan YR, Ren WH, Han GQ, Zhang J, Wang LC, Qin CY. Effect of ursodeoxycholic acid on TGF beta1/Smad signaling pathway in rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 1209-1213
 - 40 Williams R. The pervading influence of alcoholic liver disease in hepatology. *Alcohol Alcohol* 2008; 43: 393-397
 - 41 Koca SS, Bahcecioglu IH, Poyrazoglu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. The treatment with antibody of TNF-alpha reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine- and choline-deficient diet. *Inflammation* 2008; 31: 91-98
 - 42 Mora JM, Olmedo R, Curiel E, Muñoz J, Herrera M, Sella G. [MARS (Molecular Absorbent Recirculating System) as hepatic extracorporeal care in serious acute liver failure of alcoholic etiology] *Med Intensiva* 2006; 30: 402-406
 - 43 Song Z, Deaciuc I, Song M, Lee DY, Liu Y, Ji X, McClain C. Silymarin protects against acute ethanol-induced hepatotoxicity in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 407-413
 - 44 Torre F, Rossol S, Pelli N, Basso M, Delfino A, Picciotto A. Kinetics of soluble tumour necrosis factor (TNF)-alpha receptors and cytokines in the early phase of treatment for chronic hepatitis C: comparison between interferon (IFN)-alpha alone, IFN-alpha plus amantadine or plus ribavirin. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 507-512
 - 45 Giannitti C, Benucci M, Caporali R, Manganelli S, Bellisai F, Sebastiani GD, Galeazzi M. Efficacy and safety of anti-TNF-alpha therapy combined with cyclosporine A in patients with rheumatoid arthritis and concomitant hepatitis C virus infection. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009; 22: 543-546
 - 46 Jing Y, Shishkov A, Ponnappa BC. Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion in rat Kupffer cells by siRNA: in vivo efficacy of siRNA-liposomes. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 34-40
 - 47 Tilg H, Day CP. Management strategies in alcoholic

■名词解释

1 细胞因子: 细胞因子是由活化的免疫细胞和某些基质细胞分泌的、介导和调节免疫、炎症反应的小分子多肽, 是除免疫球蛋白和补体外的另一类非特异性免疫效应物质。他包括由淋巴细胞产生的淋巴因子(lymphokine)和由单核/巨噬细胞产生的单核因子(monokine)等。

2 脂联素: 为30 kDa的脂肪细胞补体相关蛋白, 肝脏和肌肉中存贮脂联素受体, 刺激肝脏脂联素受体可激活AMPK和PPAR- α , 起抗脂肪脂肪堆积作用。脂联素还具有抑制NF- κ B活化及抑制巨噬细胞功能的抗炎作用。脂联素和TNF- α 对IR和炎症的影响作用正好相反。

■同行评价

本文描述条理清楚, 结构严谨, 依据充分, 参考文献引用合理, 内容重要, 为研究细胞因子在慢性肝脏疾病中的作用提供了有力的依据。

- 48 Granado M, Priego T, Martín AI, Vara E, López-Calderón A, Angeles Villanúa M. Anti-tumor necrosis factor agent PEG-sTNFR1 improves the growth hormone/insulin-like growth factor-I system in adjuvant-induced arthritic rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 536: 204-210
- 49 Ponnappa BC, Israel Y, Aini M, Zhou F, Russ R, Cao QN, Hu Y, Rubin R. Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 569-577
- 50 Levitsky J, Mailliard ME. Diagnosis and therapy of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 233-247
- 51 Diehl AM. Effect of ethanol on tumor necrosis factor signaling during liver regeneration. *Clin Biochem* 1999; 32: 571-578
- 52 Spahr L, Rubbia-Brandt L, Frossard JL, Giostra E, Rougemont AL, Pugin J, Fischer M, Egger H, Hadengue A. Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study. *J Hepatol* 2002; 37: 448-455
- 53 Yin M, Bradford BU, Wheeler MD, Uesugi T, Froh M, Goyert SM, Thurman RG. Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice. *J Immunol* 2001; 166: 4737-4742
- 54 Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56: 1-26
- 55 Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75: 263-274
- 56 Bouzgarrou N, Hassen E, Farhat K, Bahri O, Gabbouj S, Maamouri N, Ben Mami N, Saffar H, Trabelsi A, Triki H, Chouchane L. Combined analysis of interferon-gamma and interleukin-10 gene polymorphisms and chronic hepatitis C severity. *Hum Immunol* 2009; 70: 230-236
- 57 Chuang JY, Yang SS, Lu YT, Hsieh YY, Chen CY, Chang SC, Chang CS, Yeh HZ, Kao JH. IL-10 promoter gene polymorphisms and sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 424-430
- 58 Emam EA, Emam M, Shehata AE, Emara M. Impact of *Schistosoma mansoni* co-infection on serum profile of interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Egypt J Immunol* 2006; 13: 33-40
- 59 Kaplan DE, Ikeda F, Li Y, Nakamoto N, Ganesan S, Valiga ME, Nunes FA, Rajender Reddy K, Chang KM. Peripheral virus-specific T-cell interleukin-10 responses develop early in acute hepatitis C infection and become dominant in chronic hepatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007; 4: 24-34
- 60 Verma V, Chakravarti A, Kar P. Cytokine levels of TGF-beta, IL-10, and sTNFalphaR2 in type C chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2233-2237
- 61 Derbala M, Rizk N, Al-Kaabi S, Amer A, Shebl F, Al Marri A, Aigha I, Alyaesi D, Mohamed H, Aman H, Basem N. Adiponectin changes in HCV-Genotype 4: relation to liver histology and response to treatment. *J Viral Hepat* 2009 Mar 25. [Epub ahead of print]
- 62 Arvaniti VA, Thomopoulos KC, Tsamandas A, Makri M, Psyrogiannis A, Vafiadis G, Asimakopoulos S, Labropoulou-Karatza C. Serum adiponectin levels in different types of non alcoholic liver disease. Correlation with steatosis, necroinflammation and fibrosis. *Acta Gastroenterol Belg* 2008; 71: 355-360
- 63 Chen X, Sebastian BM, Tang H, McMullen MM, Axhemi A, Jacobsen DW, Nagy LE. Taurine supplementation prevents ethanol-induced decrease in serum adiponectin and reduces hepatic steatosis in rats. *Hepatology* 2009; 49: 1554-1562
- 64 崔克勤, 赵翔伟, 张耀, 康小红, 孟杰, 陈贤栋, 罗格列酮治疗非乙醇性脂肪肝的疗效与脂联素相关. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1326-1329
- 65 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- 66 Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999; 100: 793-798
- 67 Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S87-S92
- 68 Siagris D, Vafiadis G, Michalaki M, Lekkou A, Starakis I, Makri M, Margaritis V, Christofidou M, Tsamandas AC, Labropoulou-Karatza C. Serum adiponectin in chronic hepatitis C and B. *J Viral Hepat* 2007; 14: 577-583
- 69 Hui CK, Zhang HY, Lee NP, Chan W, Yueng YH, Leung KW, Lu L, Leung N, Lo CM, Fan ST, Luk JM, Xu A, Lam KS, Kwong YL, Lau GK. Serum adiponectin is increased in advancing liver fibrosis and declines with reduction in fibrosis in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2007; 47: 191-202
- 70 Liew PL, Lee WJ, Lee YC, Wang HH, Wang W, Lin YC. Hepatic histopathology of morbid obesity: concurrence of other forms of chronic liver disease. *Obes Surg* 2006; 16: 1584-1593
- 71 Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2629-2640

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

瘦素在肝纤维化组织中的表达及其与肝星状细胞活化的关系

许晶, 朱净, 潘亮, 陆静贤, 肖明兵, 黄华, 倪润洲, 陆翠华

许晶, 朱净, 潘亮, 陆静贤, 肖明兵, 倪润洲, 陆翠华, 南通大学附属医院消化科, 江苏省南通市 226001

黄华, 南通大学附属医院病理科, 江苏省南通市 226001

许晶, 硕士, 主要从事肝纤维化疾病的研究。

南通市科技局社会发展基金资助项目, No. 2007030

作者贡献分布: 此课题由陆翠华设计; 研究过程由许晶与陆翠华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由肖明兵提供; 免疫组织化学实验黄华与陆静贤给予指导和帮助; 动物实验朱净与潘亮指导; 数据分析由许晶完成; 本论文写作由许晶与陆翠华完成; 倪润洲指导论文写作。

通讯作者: 陆翠华, 副教授, 医学博士, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化内科。lch670608@sina.com

收稿日期: 2009-04-13 修回日期: 2009-05-28

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-28

Expression of leptin in hepatic fibrosis and its relation with hepatic stellate cell activation

Jing Xu, Jing Zhu, Liang Pan, Jing-Xian Lu, Ming-Bing Xiao, Hua Huang, Run-Zhou Ni, Cui-Hua Lu

Jing Xu, Jing Zhu, Liang Pan, Jing-Xian Lu, Ming-Bing Xiao, Run-Zhou Ni, Cui-Hua Lu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Hua Huang, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Social Development Fund of Science and Technology Agency of Nantong, No. 2007030

Correspondence to: Professor Cui-Hua Lu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. lch670608@sina.com

Received: 2009-04-13 Revised: 2009-05-28

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the expression of leptin in hepatic fibrosis and explore its correlation with the expression of TGF- β 1 and α -SMA as well as its relation with the activation of hepatic stellate cells (HSC).

METHODS: Forty healthy male SD rats were randomly divided into normal control group and carbon tetrachloride treatment group. The rats were given a subcutaneous injection of either vehicle or carbon tetrachloride, and sacrificed at weeks 2, 4 and 6 after the injection,

respectively. The mRNA and protein expression of leptin, TGF- β 1 and α -SMA was assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), Western blot and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: Leptin, TGF- β 1 and α -SMA were lowly expressed in normal liver tissues. After injection of carbon tetrachloride, the expression of leptin, TGF- β 1 and α -SMA began to increase at week 2 and was significantly higher at weeks 4 and 6 ($P < 0.05$), showing a gradually rising trend. The expression of leptin was positively correlated with that of TGF- β 1 and α -SMA ($r = 0.668$ and 0.570 , respectively; both $P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of leptin, TGF- β 1 and α -SMA increases with the development of hepatic fibrosis. Leptin is probably involved in the activation of HSCs and the synthesis of extracellular matrix (ECM) in the development of hepatic fibrosis.

Key Words: Hepatic fibrosis; Leptin; Transforming growth factor- β 1; Hepatic stellate cells; α -smooth muscle actin

Xu J, Zhu J, Pan L, Lu JX, Xiao MB, Huang H, Ni RZ, Lu CH. Expression of leptin in hepatic fibrosis and its relation with hepatic stellate cell activation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2127-2130

摘要

目的: 探讨瘦素(leptin)在肝纤维化组织中的表达及其与肝纤维化过程中转化生长因子(TGF- β 1)以及 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达的相关性, 了解leptin与肝星状细胞(HSC)活化的关系。

方法: 健康♂SD大鼠40只, 随机分成正常对照组和CCl₄诱导的肝纤维化模型组。于造模2、4、6 wk末分批处死动物, 分别采用RT-PCR和Western blot、免疫组织化学方法联合检测leptin、TGF- β 1及 α -SMA在肝纤维化组织中的表达。

■背景资料

肝纤维化是多种慢性肝脏疾病发展至肝硬化的必经阶段, 瘦素(leptin)是由肥胖基因编码的一种由167个氨基酸组成的分泌型蛋白质, 主要由脂肪细胞分泌。1998年, Potter发现分离培养的大鼠肝星状细胞可大量表达leptin mRNA和蛋白后, leptin与肝病的关系开始受到关注。

■同行评议者

刘勇钢, 副主任医师, 天津市传染病医院病理科

■相关报道

Potter *et al*发现分离培养的大鼠HSC可大量表达leptin mRNA和蛋白后, leptin与肝病的关系开始受到关注. Leclercq *et al*发现leptin缺乏的小鼠因CCl₄所致的慢性肝脏损伤不发展为肝纤维化, 但给小鼠注射外源性leptin使其恢复到生理水平后, 小鼠发生了纤维化. Honda *et al*对先天leptin缺乏小鼠注射肝毒性药物硫代乙酰胺(TAA)后发现其肝脏组织中没有I型前胶原的表达, 但经注射重组小鼠leptin后, 在肝小叶中出现了纤维染色, I型前胶原mRNA的表达增加, 目前普遍认为, leptin在肝纤维化的发生发展中具有一定的作用.

结果: 正常对照组肝脏组织中leptin、TGF- β 1、 α -SMA均有微量表达; CCl₄注射2 wk后, leptin、TGF- β 1、 α -SMA表达开始增强, 2、4、6 wk肝组织中的表达强度呈明显递增趋势($P < 0.05$). leptin与TGF- β 1和 α -SMA表达均呈显著相关性($r = 0.668, 0.570$, 均 $P < 0.05$).

结论: leptin的阳性表达随着肝纤维化程度的加重而增强. 在肝纤维化过程中leptin可能参与了HSC活化、增殖以及ECM的合成.

关键词: 肝纤维化; 瘦素; 转化生长因子; 肝星状细胞; α 平滑肌肌动蛋白

许磊, 朱净, 潘亮, 陆静贤, 肖明兵, 黄华, 倪润洲, 陆翠华. 瘦素在肝纤维化组织中的表达及其与肝星状细胞活化的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2127-2130

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2127.asp>

0 引言

leptin是由肥胖基因编码的一种由167个氨基酸组成的分泌型蛋白质^[1], 主要由脂肪细胞分泌. 目前对于leptin的研究已由单纯的食欲控制和能量消耗^[2-3], 扩展到免疫应答、血细胞生成、血管发生以及组织新陈代谢的调节过程. 1998年, Potter *et al*^[4]发现分离培养的大鼠, 肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)可大量表达leptin mRNA和蛋白后, leptin与肝病的关系开始受到关注. 本研究采用CCl₄皮下注射制备肝纤维化模型, 分别用免疫组织化学和RT-PCR、Western blot联合检测leptin在肝纤维组织中的动态表达, 旨在进一步了解leptin在肝纤维化发生发展中的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Sprague-Dawley大鼠40只, 体质量 150 ± 20 g, 由南通大学动物实验中心提供. RT-PCR两步法试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司产品, PCR扩增用引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成. 一抗兔抗大鼠leptin与转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司, 免疫组织化学试剂盒购自北京中杉生物有限公司.

1.2 方法

1.2.1 分组及给药: SD大鼠用随机抽签法分为正常对照组和模型组. 正常对照组, 给予橄榄油溶

液3 mL/kg皮下注射, 每周2次, 共6 wk; 模型2、4、6 wk组, 给予600 mL/L CCl₄(精制橄榄油配置)3 mL/kg皮下注射, 每周称体质量1次, 根据体质量调整药物用量. 第6周模型组大鼠死亡2只.

1.2.2 标本处理: 于造模2、4、6 wk末分批处死大鼠, 大鼠处死时距离CCl₄注射时间为72 h. 第2、4周末分别处死模型组大鼠8只, 正常对照组2只; 第6周末处死模型组大鼠14只, 正常对照组4只. 大鼠处死后, 取出肝脏, 一部分经冷生理盐水灌注冲洗残血后采用液氮快速冷冻并置-80℃冰箱中保存待测; 另一部分于100 g/L甲醛固定, 用于免疫组织化学及纤维化组织病理学观察.

1.2.3 RT-PCR检测leptin与TGF- β 1、 α -SMA mRNA的表达: 从GenBank查取leptin与TGF- β 1、 α -SMA基因序列, 以Primer5软件设计引物各一对, leptin: 5'-TGG TCC TAT CTG TCC TAT GTT-3', 5'-GGA GGT TCT CGC AGG TTC T-3'片段大小286 bp; TGF- β 1: 5'-GCT AAT GGT GGA CCG CAA C-3', 5'-GCA GTG AGC ACT GAA GCG A-3'片段大小340 bp; α -SMA: 5'-CAG CGA TAA ACC AAC AAC A-3', 5'-ATA GGG ACC TCA GCA CAA A-3'片段大小570 bp; 内参照GAPDH: 5'-AAC GAC CCC TTC ATT GAC-3', 5'-TCC ACG ACA TAC TCA GCA C-3'片段大小191 bp. 上述引物均由上海生工生物技术服务有限公司合成. 采用TRIzol法提取肝组织总RNA. 按两步法RT-PCR试剂盒操作说明逆转录cDNA, 并进行PCR扩增. PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增条带.

1.2.4 Western blot检测leptin与TGF- β 1、 α -SMA蛋白的表达: 肝组织匀浆, 裂解液裂解后蛋白定量, 然后通过SDS-PAGE电泳分离, 硝酸纤维素膜转膜后封闭2 h, 分别加入leptin与TGF- β 1、 α -SMA和 β -actin一抗孵育过夜, 加leptin与TGF- β 1、 α -SMA和 β -actin二抗孵育1 h后, 化学发光法显示蛋白条带, 胶片显影、定影.

1.2.5 免疫组织化学检测leptin与TGF- β 1、 α -SMA蛋白的表达: 在高倍镜下, 每张切片随机观察5个高倍视野, 根据细胞着色深度及阳性细胞数分别记分为0-3分, 着色深度以多数细胞呈色程度为准. 凡细胞质或腺腔内黏液着浅棕色者为1分、棕色者为2分、深棕色者为3分、不着色为0分; 整块切片中阳性细胞占有细胞中的比例 $< 30\%$ 为1分、 $30\% - 70\%$ 为2分、 $> 70\%$ 为3分、无细胞着色为0分. 根据上述2项指标的积分分为4级, 0分为阴性(-)、2-3分为弱阳性

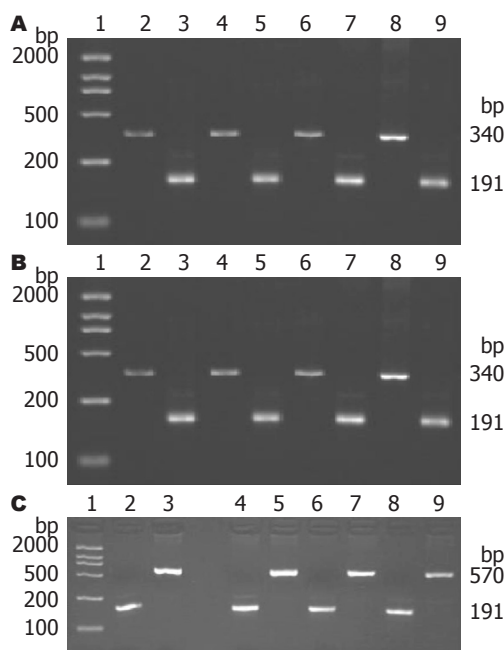


图1 leptin与TGF- β 1、 α -SMA mRNA的表达. A: leptin; B: TGF- β 1; C: α -SMA. 1: DNA Marker; 2: 正常组; 4: 2 wk组; 6: 4 wk组; 8: 6 wk组; 3、5、7、9: GAPDH.

(+), 4分为阳性(++), 5-6分为强阳性(+++). 4分以上为过表达. 同时设定阴性对照.

统计学处理 免疫组织化学资料采用秩变换方差分析统计和处理. RT-PCR资料采用捷达801分析软件中的凝胶分析软件对条带进行分析, 以各样本的平均 IA 值/各自GAPDH平均 IA 值来表示各目的基因的相对表达强度, 从而对目的基因表达的强度作半定量分析. $P < 0.05$ 差异有显著性. 所有数据由Stata7.0统计软件进行分析.

2 结果

2.1 光镜下肝脏形态学变化 正常对照组所有SD大鼠肝脏组织小叶结构完整. CCl_4 注射第2周时, 所有样本肝小叶小片肝细胞坏死, 炎症细胞浸润, 有4个样本轻度脂肪变性. CCl_4 注射第4周时所有样本肝小叶大片肝细胞坏死, 肝细胞呈明显的脂肪变性, 胶原纤维由汇管区深入小叶内, 有2个样本轻度纤维间隔形成. CCl_4 注射第6周时肝细胞变性坏死更加严重, 所有样本均有大量纤维间隔形成.

2.2 leptin与TGF- β 1、 α -SMA mRNA的表达 在正常对照组和各肝纤维化模型组, 均扩增出286 bp大小的leptin片段, 内参照GAPDH片段大小为191 bp. leptin mRNA在2、4、6 wk表达逐渐增强. 经灰度扫描和与内参照比较分析发现, 随着 CCl_4 注射时间的延长, 肝纤维化程度的加重,

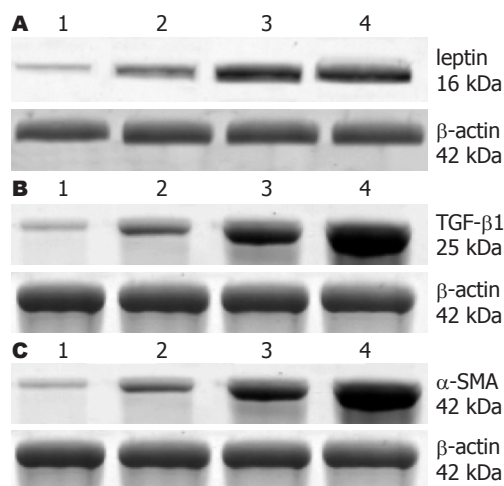


图2 Western blot检测各组蛋白的表达. A: leptin; B: TGF- β 1; C: α -SMA. 1: 正常对照组; 2、3、4: 分别为模型2, 4, 6 wk组.

leptin mRNA的表达逐渐增强, 到第6周时达到高峰. TGF- β 1、 α -SMA mRNA在肝组织中的表达及变化趋势同leptin, 扩增的TGF- β 1和 α -SMA mRNA的片段大小分别为340 bp和570 bp. 上述3种mRNA的表达在各模型组与正常对照组表达差异有显著性($P < 0.05$, 图1).

将RT-PCR半定量结果分析后发现, 随着 CCl_4 注射时间的延长, 肝纤维化程度的加重, 以上3种mRNA的表达逐渐增强, leptin与TGF- β 1和 α -SMA均有相关性显著性($r = 0.668, 0.570, P < 0.05$).

2.3 Western blot检测leptin与TGF- β 1、 α -SMA蛋白的表达 leptin蛋白的相对分子质量为16 kDa, 在正常对照组几乎无表达, 随着 CCl_4 注射时间的延长, 表达逐渐增强, TGF- β 1、 α -SMA蛋白的分子量分别为25 kDa和42 kDa, 表达趋势同leptin蛋白. 经统计学分析, leptin与TGF- β 1、 α -SMA在各组间的表达有显著差异($P < 0.05$), 在6 wk组的表达显著高于正常对照组($P < 0.05$, 图2).

2.4 免疫组织化学检测leptin与TGF- β 1、 α -SMA蛋白的表达 所需组织经100 g/L甲醛固定, 脱水, 石蜡切片, 脱蜡至水, 自动免疫组织化学染色仪染色, 苏木素复染, 自来水冲洗, 蓝化, 切片经梯度酒精脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树胶封固.

正常肝脏组织leptin有微量表达, α -SMA与TGF- β 1表达弱阳性. CCl_4 注射2 wk后, α -SMA与TGF- β 1开始表达, leptin表达增多, 主要分布在中央静脉及窦周细胞; 随着 CCl_4 注射时间的延长, 以上三者的表达逐渐增强, 主要分布在门静脉、汇管区等纤维增生区域; 到第6周时, 上述3

■创新盘点

根据本研究结果推测, 各种肝损伤因素促发HSC活化并大量表达leptin, 其后leptin上调TGF- β 1的水平, 并在其介导下进一步诱导HSC的活化和增殖, 加速肝纤维化的进程.

■同行评价

本研究选题新颖,设计合理,结果可靠,具有较好的学术价值。

种蛋白质的表达最强. 三者的表达部位相同.

3 讨论

肝纤维化是各种原因引起的慢性肝损伤所共有的病理改变,也是进一步向肝硬化发展的中间环节. 目前已明确HSC的激活和增殖是肝纤维化发生、发展的中心环节^[5],许多因素参与了该过程的发生.

从本研究结果看,leptin在正常对照组仅微量表达,而随着CCl₄注射时间的延长,伴随肝纤维化程度的加重,leptin的表达逐步增强,因此肝组织中leptin的表达水平与肝纤维化进展呈显著的正相关,提示leptin可能参与了大鼠肝纤维化的形成过程,其表达水平的上调与肝纤维化的发生和发展有关.

近来的研究表明,分离培养的大鼠HSC表达leptin mRNA和蛋白质^[6],原代培养的HSC加入leptin后,HSC的活化标志物 α -SMA表达增强,同时 α 1(I)型前胶原的表达增加. 本结果表明,正常肝组织 α -SMA、Leptin微量表达,而随着CCl₄注射时间的延长,肝纤维化程度的加重, α -SMA、leptin的表达均逐步增强,至6 wk时达到高峰. 统计学结果表明,leptin与 α -SMA在肝组织中的表达均同步增加,两者呈显著动态相关. 提示leptin可能与HSC的活化有关.

TGF- β 1是公认的HSC活化最强烈的刺激因子^[7-8],HSC的活化及表型转化与TGF- β 1密切相关. 用TGF- β 1刺激,能促进静态HSC向成纤维细胞转化,并促使HSC合成大量ECM. 本实验结果也证实,在大鼠纤维化肝组织中,TGF- β 1的表达较对照组明显增加,随着CCl₄注射时间的延长,表达逐渐增强. Ikejima *et al*^[9]的研究发现,leptin功能性受体ob-Rb主要分布于窦内皮细胞、Kupffer细胞上,而体外分离的HSC尚未发现有ob-Rb mRNA的表达,因此认为leptin直接影响HSC活化的可能性较小. 在随后的研究中还发现^[7-10],leptin通过激活STAT、AP-1、ET-1等信号通路,增加窦内皮细胞的TGF- β 1 mRNA的表

达. 本研究相关性分析表明,随着肝纤维化程度的加重,TGF- β 1与leptin的表达呈显著正相关,结合本实验研究结果,我们推测,各种肝损伤因素促发HSC活化并大量表达leptin,其后leptin上调TGF- β 1的水平,并在其介导下进一步诱导HSC的活化和增殖,加速肝纤维化的进程. 所以抑制leptin的表达,有望能抑制HSC的活化,从而减轻肝纤维化.

4 参考文献

- 1 Clement K, Boutin P, Froguel P. Genetics of obesity. *Am J Pharmacogenomics* 2002; 2: 177-187
- 2 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- 3 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
- 4 Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 178-182
- 5 Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 2005; 174: 6820-6828
- 6 Lin SY, Wang YY, Sheu WH. Increased serum leptin concentrations correlate with soluble tumour necrosis factor receptor levels in patients with cirrhosis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57: 805-811
- 7 Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis: evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002; 35: 762-771
- 8 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 9 Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 1399-1410
- 10 Tang M, Potter JJ, Mezey E. Leptin enhances the effect of transforming growth factor beta in increasing type I collagen formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 906-911

编辑 李军亮 电编 何基才

IFN- α 对大鼠胰腺纤维化组织中Smad7及PDGF-B表达的影响

白一彤, 陈少夫, 郑宏, 黄茜

白一彤, 郑宏, 黄茜, 中国医科大学研究生院 辽宁省沈阳市 110004

陈少夫, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

白一彤, 2007级中国医科大学硕士, 主要从事慢性胰腺炎的发病机制及临床研究.

作者贡献分布: 此课题由白一彤与陈少夫设计; 研究过程由白一彤、郑宏及黄茜操作完成; 研究试剂及分析工具由白一彤提供; 数据分析由白一彤完成; 本论文写作由白一彤完成.

通讯作者: 陈少夫, 教授, 主任医师, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科. baiyt_2008@163.com

电话: 024-82074322

收稿日期: 2009-05-15 修回日期: 2009-06-25

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-07-28

Effects of interferon-alpha on the expression of Smad7 and PDGF-B in fibrotic pancreas in rats

Yi-Tong Bai, Shao-Fu Chen, Hong Zheng, Qian Huang

Yi-Tong Bai, Hong Zheng, Qian Huang, Graduate School of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Shao-Fu Chen, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Shao-Fu Chen, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. baiyt_2008@163.com

Received: 2009-05-15 Revised: 2009-06-25

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of interferon-alpha (IFN- α) on the expression of Smad7 and PDGF-B in fibrotic pancreas in rats with diethyldithiocarbamate (DDC)-induced pancreatic fibrosis.

METHODS: Three hundreds and twelve female Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group, model control group and IFN- α treatment group. Rats in the model control group and IFN- α treatment group were given repeated intraperitoneal injections of DDC to induce pancreatic fibrosis. Meanwhile,

a subcutaneous injection of IFN- α was given to rats in the IFN- α treatment. The rats in the model control group were sacrificed at weeks 0, 1, 2, 4, 6 and 8 after initial induction with DDC, respectively, to take samples, while those in the IFN- α treatment group were sacrificed at week 6. The expression of Smad7 and PDGF-B in fibrotic pancreas were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with the normal control group, the expression of Smad7 in the model control group began to decrease from week 3 (34.22 ± 7.60 vs 53.46 ± 30.45 , $P < 0.01$) and was kept at low level from weeks 3 to 8, while the expression of PDGF-B in the model control group was high at the beginning ($P < 0.01$), gradually increased from weeks 3 to 7, and began to decrease from week 8. The expression level of Smad7 at week 6 in the IFN- α treatment group was significantly higher than that in the model control group (47.22 ± 17.26 vs 15.27 ± 9.65 , $P < 0.01$). In contrast, the expression level of PDGF-B at week 6 in the IFN- α treatment group was significantly lower than that in the model control group (29.13 ± 11.06 vs 57.63 ± 40.66 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: IFN- α is able to inhibit the expression of PDGF-B but promote the expression of Smad7 in fibrotic pancreas in rats.

Key Words: Pancreas; Fibrosis; Interferon-alpha; Platelet-derived growth factor-B; Smad7

Bai YT, Chen SF, Zheng H, Huang Q. Effects of interferon-alpha on the expression of Smad7 and PDGF-B in fibrotic pancreas in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2131-2136

摘要

目的: 观察Smad7和PDGF-B在纤维化胰腺组织中的表达及应用干扰素- α (IFN- α)对二者表达的影响.

方法: 312只雌性Wistar大鼠, 随机分成对照

■背景资料

近年来慢性胰腺炎发病率明显增高, 长期慢性发展可导致胰腺内外分泌功能不全, 为患者带来极大的痛苦, 探讨如何抑制慢性胰腺炎患者胰腺组织纤维化, 成为广大学者研究的对象.

■同行评议者

韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所; 任粉玉, 副教授, 延边大学附属医院消化内科

■研究前沿

Smad7、PDGF被认为在胰腺纤维化过程中起到重要的信号转导作用。能否通过改变二者在纤维化胰腺组织中的表达来抑制胰腺纤维化成为目前研究的焦点。

组、纤维化组和干扰素组。每周向纤维化组和干扰素组大鼠腹腔内注射2次二乙基二硫代氨基甲酸盐(diethyldithiocarbamate, DDC)造模;干扰素组于造模同时每天皮下注射IFN- α 10万单位。纤维化组分别于0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 wk末取材, 干扰素组于6 wk末取材, 应用免疫组织化学法测定纤维化胰腺组织中Smad7、PDGF-B的表达。

结果: 与对照组相比, Smad7表达于纤维化第3周开始减少(34.22 ± 7.60 vs 53.46 ± 30.45 , $P < 0.01$), 3-8 wk末呈低表达。PDGF-B表达从纤维化开始即呈高表达(均 $P < 0.01$), 随着时间的延长, PDGF-B表达逐渐增加, 造模8 wk末, PDGF-B下降。干扰素组6 wk末Smad7的表达较同期纤维化组增加(47.22 ± 17.26 vs 15.27 ± 9.65 , $P < 0.01$); PDGF-B表达明显减少(29.13 ± 11.06 vs 57.63 ± 40.66 , $P < 0.01$), 其表达同纤维化组3 wk末。

结论: 干扰素的应用可以降低PDGF-B的表达, 增高Smad7的表达。

关键词: 胰腺; 纤维化; 干扰素- α ; 血小板源性生长因子-B; Smad7

白一彤, 陈少夫, 郑宏, 黄茜. IFN- α 对大鼠胰腺纤维化组织中Smad7及PDGF-B表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2131-2136
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2131.asp>

0 引言

近年来慢性胰腺炎发病率日益增高^[1]。其主要病理学改变为胰腺纤维化, 探讨纤维化胰腺组织的分子学改变为抑制其发生、发展提供可能。研究发现^[2-3]: 胰腺星状细胞通过激活、转化, 促进细胞外基质的形成, 进而导致胰腺纤维化。血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor-B, PDGF-B)和转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor-beta1, TGF- $\beta 1$)在此过程中起重要作用。Smad基因家族成员是TGF在细胞内的信号转导分子。本研究PDGF-B、Smad7在胰腺纤维化过程中的表达以及干扰素干预对PDGF-B、Smad7表达的影响, 为应用干扰素治疗胰腺纤维化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠312只, 均购自北京维通利华实验动物公司, 清洁级, 体质量200-250 g。IFN- α 为哈药集团生物工程有限公司生产, 批号:

20060101。兔抗人Smad7多克隆抗体、兔抗大鼠PDGF-B均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及取材: 应用随机数字法将Wistar大鼠分为对照组($n = 147$)、纤维化组($n = 147$)及干扰素组($n = 18$)。向纤维化组及干扰素组大鼠ip DDC(浓度为150 g/L)1000 mg/kg, 每周2次。同时, 对照组注射等量生理盐水。并向干扰素组每天皮下注射IFN- α 10万单位, 其他2组皮下注射等量生理盐水, 纤维化组分别于0、1、2、3、4、6、8 wk末取材, 干扰素组于6 wk末取材。

1.2.2 Smad7、PDGF-B检测: 选取每只大鼠胰腺组织的5个不同部位100 g/L甲醛溶液中固定, 过夜, 石蜡包埋制作切片, 常规HE染色; 免疫组织化学按SP试剂盒说明书进行, DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封片。以染为淡黄色、黄色、棕黄色、棕褐色为阳性, 每张切片随机选取10个无重叠400倍高倍视野, 应用我院NIS-Elements F2.30图像采集软件进行图像采集, NIS-Elements BR3.0图像分析软件计算积分吸光度值(I4)。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 应用SPSS17.0软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Smad7的表达 Smad7表达在对照组各组间无显著性差异; 纤维化组与对照组比较, 0、1、2 wk末间无明显差异, 于造模第3 wk开始表达减少($P < 0.01$), 3-8 wk末呈低表达, 组间无显著性差异。干扰素组6 wk末表达较同期纤维化组增加, 差异显著($P < 0.01$), 但较对照组减少, 差异显著($P < 0.05$, 表1, 图1-2)。

2.2 PDGF-B的表达 PDGF-B表达在对照组各组间无显著性差异; 纤维化组与对照组比较, 从第1周即呈高表达($P < 0.05$), 1 wk组与2 wk组比较, 其表达无显著性差异, 后随时间延长, 表达逐渐增加, 组间差异显著($P < 0.01$)。8 wk末PDGF-B下降, 表达同纤维化组3 wk末。干扰素组6 wk末表达较同期纤维化组减少, 差异显著($P < 0.01$), 仍较对照组显著增加($P < 0.01$, 表2, 图1, 3)。

3 讨论

胰腺纤维化主要是通过激活胰腺星状细胞, 促进细胞外基质形成所致。研究发现胰腺星状细胞位于腺细胞间, 围绕于相邻腺细胞的基底部, 占胰腺细胞总数的3.99%^[4]。TGF- $\beta 1$ 、PDGF在

表 1 各组胰腺组织中Smad7的表达 (I4, mean \pm SD)

分组	0 wk组	1 wk组	2 wk组	3 wk组	4 wk组	6 wk组	8 wk组
对照组	52.13 \pm 29.89	50.12 \pm 29.11	51.35 \pm 42.15	53.46 \pm 30.45	60.12 \pm 29.56	56.47 \pm 27.32	55.89 \pm 30.22
纤维化组	53.88 \pm 30.13	52.48 \pm 10.04	50.45 \pm 9.68	34.22 \pm 7.60 ^b	28.11 \pm 5.73 ^b	15.27 \pm 9.65 ^b	19.72 \pm 11.74 ^b
干扰素组	—	—	—	—	—	47.22 \pm 17.26 ^{ad}	—

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 纤维化组。

表 2 各组胰腺组织中PDGF-B的表达 (I4, mean \pm SD)

分组	0 wk组	1 wk组	2 wk组	3 wk组	4 wk组	6 wk组	8 wk组
对照组	1.87 \pm 2.23	1.96 \pm 3.01	1.76 \pm 2.85	2.01 \pm 2.36	1.99 \pm 2.31	2.06 \pm 2.89	2.01 \pm 1.79
纤维化组	1.89 \pm 2.58	17.82 \pm 10.44 ^b	14.90 \pm 4.61 ^b	28.31 \pm 6.36 ^b	42.39 \pm 20.32 ^b	57.63 \pm 40.66 ^b	30.89 \pm 16.87 ^b
干扰素组	—	—	—	—	—	29.13 \pm 11.06 ^{bd}	—

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 纤维化组。

胰腺纤维化的过程中起最重要作用。TGF- β 1主要通过TGF- β 1/Smad途径发挥生物学效应: TGF- β 首先与细胞膜上的TGF- β 受体II结合, 形成信号受体复合物, 再与TGF- β 受体I结合, 并激活TGF- β 受体I, 对Smad2、Smad3进行磷酸化, 后者与Smad4形成复合物, 转移至细胞核中, 发挥转录调控作用^[5-7]。Smad蛋白可分为3类: (1)受体激活的Smads; (2)共同介体性Smads; (3)抑制性Smads^[8]。Smad7被认为是TGF- β 1家族受体激酶的关键作用底物^[9-10], TGF- β 1信号转导途径中抑制性调节蛋白^[11-12]。目前已知的Smad7抑制作用主要存在以下几种机制: (1)Smad7与TGF- β 受体I结合, 竞争性抑制Smad2、Smad3磷酸化, 对基因转录调控起负性调节作用; (2)Smad7直接与活化的TGF- β 1结合, 从而减少细胞膜上TGF- β 1的数量, 与细胞内各转录因子组氨酸去乙酰基酶结合, 影响转录因子的乙酰化, 抑制TGF- β 的信号转导; (3)Smad7募集Smad泛素化调节因子(Smurf)至TGF- β 受体, 促进TGF- β 受体降解, 从而发挥负调控作用^[13-16]。2008年杨小艳 *et al*^[17]采用基因重组技术构建大鼠Smad7真核表达质粒模型, 探讨Smad7在肝星状细胞中的表达, 进一步证实了Smad7参与了TGF- β /Smad信号转导。同年, 于鸿 *et al*^[18]通过转染Smad7基因, 发现大鼠肾小球系膜细胞中I、III型胶原表达明显降低, 得出结论: Smad7可以起到减轻肾纤维化的作用。由此, 如何通过上调Smad7的表达来抑制组织纤维化已成为越来越多的学者所关注。研究证实干扰素- α 不仅可以通过依赖或非依赖于P53的途径, 抑制细胞

■创新盘点

本文旨在研究胰腺组织纤维化过程中Smad7、PDGF-B表达的变化趋势, 及干扰素- α 的应用对二者表达的影响。

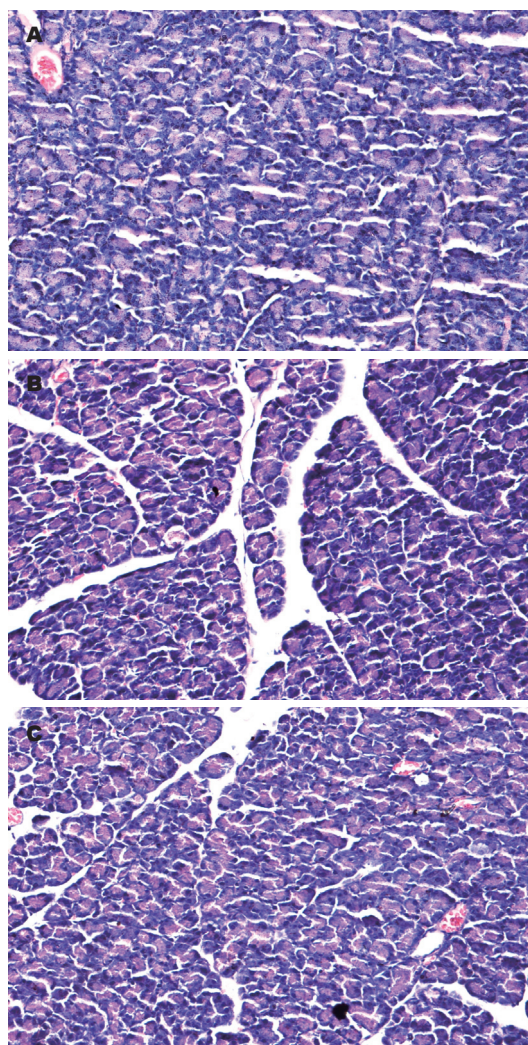


图 1 各组胰腺组织(H&E \times 200). A: 正常组; B: 纤维化组(8 wk末); C: 干扰素组(6 wk末)。

周期进程, 促进细胞凋亡, 还可以干预T淋巴细

■应用要点

Smad7、PDGF-B已被证实在胰腺纤维化过程中起重要作用,而本研究发现干扰素- α 可以改变Smad7、PDGF在纤维化胰腺组织中的表达,为临床上应用干扰素- α 抗胰腺纤维化提供重要的理论依据。

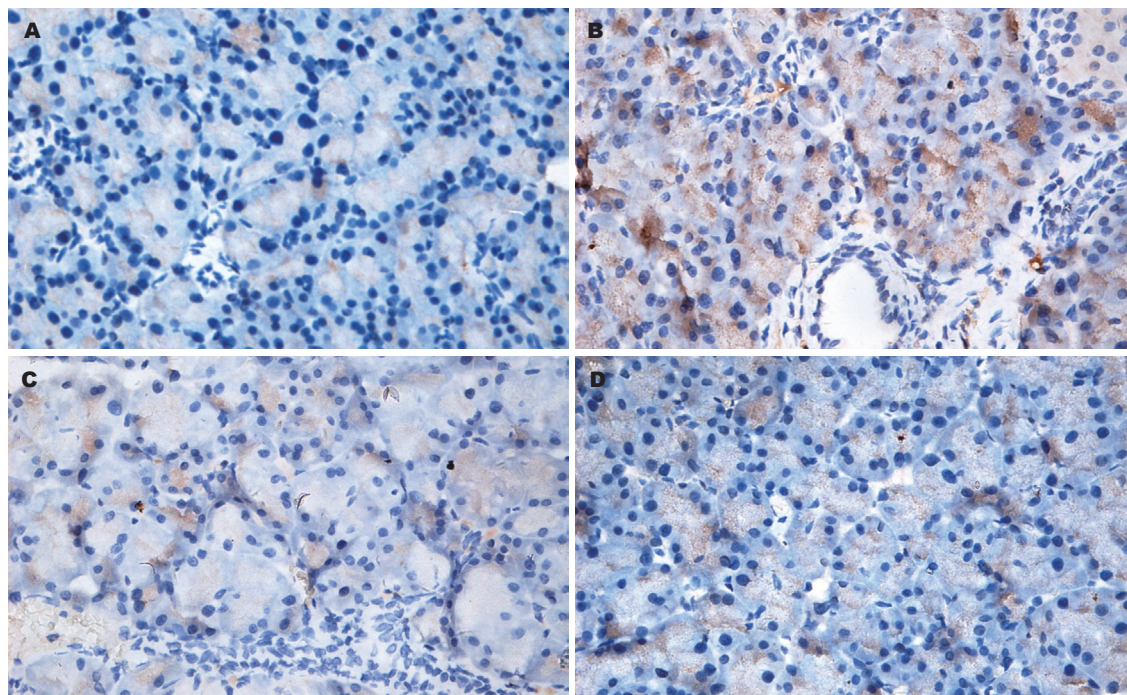


图2 胰腺组织中PDGF-B的表达(DAB染色 $\times 400$)。A: 正常组; B: 纤维化组(6 wk末); C: 纤维化组(8 wk末); D: 干扰素组(6 wk末)。

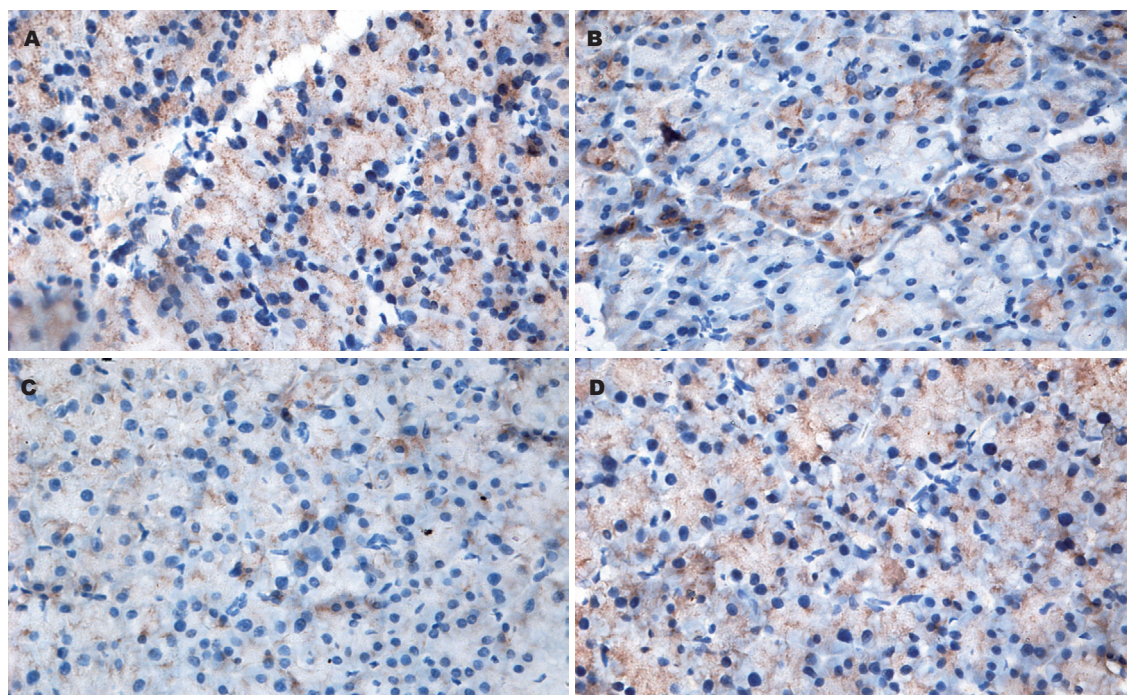


图3 胰腺组织中Smad7的表达(DAB染色 $\times 400$)。A: 正常组; B: 纤维化组(4 wk末); C: 纤维化组(8 wk末); D: 干扰素组(6 wk末)。

胞的功能,调节促炎和抗炎细胞因子的合成与分泌^[19-20]。目前为止,干扰素应用于抗纤维化的研究已遍布在多个领域,包括肝脏、心血管、肾脏等。早在2002年张惠芸 *et al*^[21]对116例慢性乙型肝炎患者进行了临床研究,证实IFN- α 可以减少血清透明质酸、层粘连蛋白、IV型胶原的表达,进而抑制纤维组织的形成与沉积。2006

年,饶慧瑛 *et al*^[22]经研究发现IFN- β 能通过上调Smad7的蛋白表达,抑制肝星状细胞的激活,发挥抗肝纤维化的作用。2007年Weng *et al*^[23]对慢性HBV感染患者进行了随机、开放、多中心试验,发现经IFN- γ 治疗9 mo后,可有效抑制肝组织纤维化,减少 α -SMA阳性肝星状细胞的数量。同年,车雷 *et al*^[24]通过体外培养大鼠肝星状细胞,

采用流式细胞仪研究IFN- α 对活化的大鼠肝星状细胞凋亡的影响, 结果显示: 肝星状细胞的早期凋亡率随干扰素浓度的增加而提高, 进一步证明了肝星状细胞早期凋亡可能与干扰素抗纤维化相关. 2008年姜琳 *et al*^[25]研究发现IFN- γ 可以通过上调肾小球系膜细胞Smad7而减少IV型胶原的表达, 从而抑制肾小球硬化. Hamzavi *et al*^[26]应用IFN- γ 干扰大鼠Smad7基因表达, 发现可以减轻大鼠肝损伤及肝纤维化. 认为IFN- γ 主要通过STAT-1信号途径诱导Smad7启动因子及蛋白表达, 进而起到抗肝脏细胞纤维化作用. 以上实验均证明了干扰素的应用可能对组织纤维化起到抑制作用. 从而引起了应用干扰素抑制胰腺纤维化的思考.

血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是从血小板中分离出的一种重要的促有丝分裂因子, 具有刺激特定细胞群分裂增殖的能力, 对胰腺星状细胞的活化、增殖、合成胶原及细胞外基质均有明显作用^[27-28]. PDGF在生理状态下主要储存在血小板的 α 颗粒中, 体内多种血细胞、组织细胞和某些肿瘤细胞等均可产生和分泌PDGF. 经典的PDGF由A链和B链通过二硫键形成二聚体(PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB), 近来发现PDGF还存在C链和D链, 同样形成二聚体(PDGF-CC, PDGF-DD)^[29]. PDGF在细胞内与受体结合后, 激活细胞内酪氨酸蛋白激酶, PDGF受体发生自动磷酸化, 与受体位点上的磷酸化酪氨酸同源区2(Src-SH2)或酪氨酸磷酸区域进行结合. 结合于已激活的PDGF受体分子经过一系列磷酸化反应, 可活化核膜上的丝氨酸或苏氨酸残基激酶, 再作用于核内蛋白转录因子, 经信号传递使DNA的一些活性转录区参与基因表达调控, 或增加拓扑异构酶活力, 改变RNA含量, 使细胞生长、分裂^[30]. 此外, PDGF对星状细胞具有明显的趋化作用, 可以使活化的星状细胞向受损的部位游走, 加重了受损部位胰腺的纤维化, 而位于胰腺微血管周围激活的胰腺星状细胞具有缩血管效应, 使胰腺微血管灌注不足, 导致微血管缺血从而加重胰腺纤维化和胰腺实质萎缩^[31-32]. 2003年吴强 *et al*^[33]应用免疫组织化学法检测大鼠肝纤维化组织中PDGF的表达, 发现其明显增强. 桂乐 *et al*^[34]通过原位杂交法发现干扰素的应用可使动脉粥样硬化的家兔PDGF- β 的表达显著减少, 并得出结论: PDGF- β 可能是促使血管平滑肌细胞增生、动脉粥样硬化进展的主要原因. 而应

用干扰素可以下调PDGF- β mRNA, 从而抑制动脉粥样硬化的形成与发展. 2009年Olson *et al*^[35]认为增加PDGFR- α 活性可使结缔组织变异, 促使组织纤维化的形成. 本研究发现PDGF-B表达于纤维化组6 wk末达高峰, 8 wk末下降, 考虑与纤维化晚期, 即使纤维组织增生, 但炎症细胞减少, 使PDGF-B表达减少相关. 于是, 本实验选择干扰素组于6 wk末取材, 避免因炎症细胞减少所致的PDGF-B表达下降而影响对应用干扰素后PDGF-B表达的观察.

本实验结果可见: 干扰素组6 wk末Smad7表达较同期纤维化组增加, 差异显著, 而较对照组减少. PDGF表达较同期纤维化组减少, 而较对照组显著增加.

总之, IFN- α 的应用可以提高Smad7的表达并且降低PDGF-B的表达. 但对于诱导胰腺纤维化时间较长组, 即纤维化较严重组, 干扰素的应用仅能起到部分作用, 而不能完全逆转Smad7及PDGF-B的表达. 因此我们主张早期应用干扰素, 方能起到较好的效果.

4 参考文献

- 1 陈浮, 李兆申, 王洛伟, 李淑德. 慢性胰腺炎的相关因素及诊治分析. 中华消化杂志 2006; 26: 515-518
- 2 Jaskiewicz K, Nalecz A, Rzepko R, Sledzinski Z. Immunocytes and activated stellate cells in pancreatic fibrogenesis. *Pancreas* 2003; 26: 239-242
- 3 Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grünert A, Bachem MG. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C532-C543
- 4 Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 1998; 43: 128-133
- 5 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 6 Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001; 187: 117-123
- 7 Kuang C, Xiao Y, Liu X, Stringfield TM, Zhang S, Wang Z, Chen Y. In vivo disruption of TGF-beta signaling by Smad7 leads to premalignant ductal lesions in the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 1858-1863
- 8 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471
- 9 Stopa M, Benes V, Ansorge W, Gressner AM,

■名词解释

胰腺星状细胞: 1982年Watari *et al*发现了一种胰腺细胞中富含维生素A的细胞, 该细胞可被激活转化为肌纤维母细胞, 能产生I、III型胶原、纤维结合蛋白和层粘连蛋白等, 位于胰腺小叶间和腺泡周围区, 围绕临近细胞基底部, 与胰腺纤维化有关, 命名为胰腺星状细胞.

■同行评价

本研究选题尚可,设计合理,内容重要,具有较好的理论意义。

- Dooley S. Genomic locus and promoter region of rat Smad7, an important antagonist of TGFbeta signaling. *Mamm Genome* 2000; 11: 169-176
- 10 Hill CS. The Smads. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31: 1249-1254
- 11 Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 1997; 389: 631-635
- 12 Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K, Böttinger EP. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S45-S52
- 13 Datta PK, Moses HL. STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3157-3167
- 14 Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 6: 1365-1375
- 15 Tajima Y, Goto K, Yoshida M, Shinomiya K, Sekimoto T, Yoneda Y, Miyazono K, Imamura T. Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J Biol Chem* 2003; 278: 10716-10721
- 16 Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001; 276: 12477-12480
- 17 杨小艳, 杨勇, 郑勇, 李睿, 周婷, 孙凯, 常向云, 陈卫刚. 大鼠Smad7真核表达质粒的构建及在肝星状细胞中的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3146-3151
- 18 于鸿, 陈琦, 刘晔, 赵仲华, 郭慕依. 转染Smad7基因的大鼠肾小球系膜细胞对 I、III 型胶原表达的改变. *复旦学报(医学版)* 2008; 35: 436-440
- 19 de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 912-920
- 20 Paaanen H, Laato M, Jaakkola M, Pulkki K, Niinikoski J, Nordback I. Serum tumour necrosis factor compared with C-reactive protein in the early assessment of severity of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995; 82: 271-273
- 21 张惠芸, 吕卉, 宋修光, 韩少磊. α -干扰素抗肝纤维化治疗的临床观察. *新医学* 2002; 33: 337-338
- 22 饶慧璇, 魏来, 费然, 王江华, 蒋栋, 张权, 丛旭. 干扰素 β 对肝星状细胞活化调控机制的影响. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 550-552
- 23 Weng H, Mertens PR, Gressner AM, Dooley S. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *J Hepatol* 2007; 46: 295-303
- 24 车雷, 马力, 吴丹, 李智伟. α -干扰素对活化的肝星状细胞早期凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1276-1279
- 25 姜琳, 李亮, 高冉, 谢国柱, 陈琦. IFN- γ 对大鼠肾小球系膜细胞Smad7及IV型胶原表达的影响. *济宁医学院学报* 2008; 31: 91-93
- 26 Hamzavi J, Ehnert S, Godoy P, Ciuculan L, Weng H, Mertens PR, Heuchel R, Dooley S. Disruption of the Smad7 gene enhances CCl4-dependent liver damage and fibrogenesis in mice. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2130-2144
- 27 Marra F, Gentilini A, Pinzani M, Choudhury GG, Parola M, Herbst H, Dianzani MU, Laffi G, Abboud HE, Gentilini P. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 112: 1297-1306
- 28 Luttenberger T, Schmid-Kotsas A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, Grünert A, Bachem MG. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest* 2000; 80: 47-55
- 29 Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 91-98
- 30 Pawson T. Protein modules and signalling networks. *Nature* 1995; 373: 573-580
- 31 Phillips PA, Wu MJ, Kumar RK, Doherty E, McCarroll JA, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Cell migration: a novel aspect of pancreatic stellate cell biology. *Gut* 2003; 52: 677-682
- 32 Apte MV, Phillips PA, Fahmy RG, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Naidoo D, Wilson JS. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 780-794
- 33 吴强, 宋少刚, 杨枫, 杨雁, 汪渊, 陈敏珠. 大鼠肝纤维化中PDGF和TGF- β 的动态改变. *安徽医科大学学报* 2003; 38: 340-341
- 34 桂乐, 杨钧国, 曹茂银, 任江华. α -2b干扰素抑制实验性动脉粥样硬化机制. *临床心血管病杂志* 2003; 19: 484-485
- 35 Olson LE, Soriano P. Increased PDGFRalpha activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell* 2009; 16: 303-313

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

靶向干预N-WASP功能区对大肠癌细胞侵袭转移能力的影响

黄宝玉, 赵任, 秦婧, 贾晓斌, 朱建伟

黄宝玉, 贾晓斌, 朱建伟, 南通大学附属医院普外科 江苏省南通市 226001

赵任, 上海交通大学医学院附属瑞金医院普外科 上海市 200025

秦婧, 南通大学医学院病理教研室 江苏省南通市 226001

黄宝玉, 住院医师, 硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30771126; No. 30772106

教育部回国留学人员基金资助项目, No. 2008-890

江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2006058

作者贡献分布: 此项课题由朱建伟设计; 研究工作由黄宝玉、赵任、秦婧及贾晓斌共同完成; 研究所用试剂和分析工具由朱建伟提供; 论文由黄宝玉与朱建伟撰写.

通讯作者: 朱建伟, 226001, 江苏省南通市, 江苏南通大学附属医院普外科. usazhujianwei@yahoo.com.cn
电话: 0513-81161221

收稿日期: 2009-05-26 修回日期: 2009-07-12

接受日期: 2009-07-13 在线出版日期: 2009-07-28

Interference targeting the G-actin binding domain of N-WASP inhibits the invasion and metastasis of colon cancer cells

Bao-Yu Huang, Ren Zhao, Jing Qin, Xiao-Bin Jia, Jian-Wei Zhu

Bao-Yu Huang, Xiao-Bin Jia, Jian-Wei Zhu, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Ren Zhao, Department of General Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Jing Qin, Department of Pathology, Medical School of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30771126 and 30772106; the Scientific Research Foundation for Returned Scholars, Ministry of Education of China, No. 2008-890; and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2006058

Correspondence to: Jian-Wei Zhu, Department of General Surgery, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. usazhujianwei@yahoo.com.cn

Received: 2009-05-26 Revised: 2009-07-12

Accepted: 2009-07-13 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To examine the effect of intervention targeting the G-actin binding domain of N-WASP on the invasion and metastasis of colon

cancer cells.

METHODS: Recombinant expression vector encoding the V motif of N-WASP was designed, constructed and transfected into human colon cancer cells (LoVo) to obtain stably expressed cell strain. Transwell assay was used to examine the change in the invasive ability of LoVo cells. Capture-ELISA assay was used to measure transferrin (Tfn) internalization, a hallmark of cell endocytosis. Furthermore, a mouse model of metastatic colon cancer was generated by injection of LoVo cells into the spleen of mice to observe liver metastasis.

RESULTS: The recombinant plasmid was successfully constructed and transfected into LoVo cells. Cells transfected with the recombinant plasmid showed a low invasive ability when compared with untransfected cells or cells transfected with empty plasmid. The number of recombinant plasmid-transfected cells passing through the Transwell membrane were significantly lower than those of untransfected cells or cells transfected with empty plasmid (42.15 ± 7.35 vs 85.25 ± 6.16 and 84.35 ± 7.99 , both $P < 0.05$). Capture-ELISA assay showed that internalization of transferrin in cells transfected with recombinant plasmid was attenuated dramatically when compared to control cells. Animal experiments showed that the number of mice developing liver metastasis in mice injected with recombinant plasmid-transfected cells was significantly lower than that in mice injected with untransfected or empty plasmid-transfected cells ($2/12$ vs $10/12$ and $10/12$).

CONCLUSION: Interference targeting the G-actin binding domain of N-WASP is able to inhibit the invasion and metastasis of colon cancer cells.

Key Words: N-WASP; Colorectal cancer; Metastasis; G-actin; Transwell assay

Huang BY, Zhao R, Qin J, Jia XB, Zhu JW. Interference targeting the G-actin binding domain of N-WASP inhibits the invasion and metastasis of colon cancer cells. *Shijie*

■背景资料

N-WASP与ARP2/3复合物聚集并活化ARP2/3复合物, 导致皮层肌动蛋白组装和分支结构的快速形成, 从而驱动了细胞运动的发生. 本实验采用基因克隆方法构建重组质粒, 靶向干预大肠癌细胞的N-WASP的功能区, 观察大肠癌细胞的侵袭转移能力的改变.

■同行评议者

程斌, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科

■研究前沿

N-WASP参与了肌动蛋白的装配过程,促进细胞运动性的改变,这在乳腺、神经等组织器官的肿瘤细胞中的表达均有报道,但与大肠癌的关系尚未报道。

Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(10): 2137-2141

摘要

目的: 探讨干扰N-WASP功能区对大肠癌细胞侵袭转移能力的影响。

方法: 采用基因克隆方法构建包含N-WASP功能区V片段的重组质粒,转染大肠癌株LoVo。采用Transwell穿膜实验观察大肠癌细胞侵袭能力的变化;应用Capture-ELISA方法检测大肠癌细胞内吞生物素标记的转铁蛋白(Tfn)的能力改变。脾内注射制备大肠癌肝转移裸鼠模型,在体内进一步观察大肠癌细胞转移能力改变。

结果: 成功构建了含有N-WASP的V结构区域的重组质粒,并转染大肠癌株LoVo获得稳定表达。实验组表达V片段的大肠癌细胞穿膜的细胞数为 42.15 ± 7.35 ,而对照表达空载体的大肠癌细胞穿膜细胞数为 85.25 ± 6.16 ,未转染的大肠癌细胞穿膜细胞数为 84.35 ± 7.99 ,与实验组相比具有显著差异($P < 0.05$)。表达V片段的大肠癌细胞内吞转铁蛋白的数量较对照组明显减少,内吞作用能力减弱。动物实验显示表达V片段的大肠癌细胞肝转移发生数为2/12,较对照组(10/12)和未转染组(10/12)明显减少。

结论: 靶向干预N-WASP与微丝蛋白结合的功能区域的新方法能够抑制人大肠癌细胞的侵袭和转移能力。

关键词: N-WASP; 大肠癌; 转移; 肌动蛋白单体; Transwell穿膜实验

黄宝玉, 赵任, 秦婧, 贾晓斌, 朱建伟. 靶向干预N-WASP功能区对大肠癌细胞侵袭转移能力的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2137-2141

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2137.asp>

0 引言

大肠癌在恶性肿瘤致死原因中位居第4位,肿瘤细胞的侵袭及转移是大肠癌患者主要的死亡原因。研究发现,肿瘤细胞侵袭转移与癌细胞的迁移、内吞作用及伪足形成等细胞运动性密切相关。研究发现,肌动蛋白骨架是细胞产生运动性的重要介质^[1],肌动蛋白的装配依靠蛋白复合物-ARP2/3复合物的催化作用^[2]。内源性ARP2/3复合体的激活依靠Neural-WASP(N-WASP)^[3]的激活作用。N-WASP蛋白质分子V区域是与肌动蛋白单体(G-actin)结合的部位,C与A区域是与

ARP2/3复合物结合的部位,只有完整的VCA结构同时结合G-actin和ARP2/3复合物,才能发挥N-WASP的促进ARP2/3介导的肌动蛋白聚合作用^[4]。因此,我们设想将N-WASP的V片段或CA片段单独在癌细胞内高表达,以此来靶向干扰N-WASP与actin和ARP2/3的结合,抑制癌细胞的肌动蛋白的装配,以此带来细胞运动性及侵袭转移能力的减弱。本研究设计和构建了N-WASP V片段重组DNA,转染大肠癌细胞,观察了癌细胞运动性及侵袭转移能力的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌细胞株LoVo购自中国科学院上海细胞所,以含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基(Gibco公司)在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中常规培养,对数生长期细胞用于后续实验。大肠杆菌DH5α由南通大学医学院微生物与免疫实验室惠赠,载体pEGFP-N2来自CloneTec公司,含有N-WASP全长基因的质粒由马里兰大学癌症中心惠赠。Taq DNA聚合酶、dNTP、EcoR I 和Xho I 限制性内切酶、T4连接酶、Lipofectamine2000(Invitrogen公司),胰蛋白酶(Amresco公司),Transwell chamber(Corning公司)。其余试剂均为国产分析纯。质粒提取试剂盒为Axygen公司产品,琼脂糖凝胶回收试剂盒为Watson公司产品。BALB/C裸小鼠36只,周龄4-6 wk,♀,体质量18-20 g,饲养于SPF环境下,来自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒的构建: 参考GenBank中人N-WASP的V区域序列设计引物,序列中包含了EcoR I 和Xho I 的酶切位点序列:上游引物:5'-CCG CTC GAG ATG AAC AAA GCA GCT TTT A-3'下游引物:5'-CGG AAT TCC ACA GAT TTT AGT TGG ATA CCC-3'。PCR条件:10× Buffer 5 μL, dNTP 1 μL, 上、下游引物各1 μL, Taq DNA聚合酶2.5 U, 质粒模板10 μL, 余用dd-H₂O补足50 μL。反应条件:94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共30个循环, 72℃ 7 min。产物进行凝胶电泳。胶回收, DNA片段酶切, 质粒连接。酶切鉴定和DNA测序。

1.2.2 大肠癌细胞质粒转染及稳定株筛选: 大肠癌细胞接种于六孔板。用50 μL Opti-MEMI培养基稀释1 μg质粒DNA, 每孔用50 μL Opti-MEMI培养基稀释4 μL Lipofectamine2000试剂, 5 min后同稀释的DNA混合。混合稀释的DNA和稀释

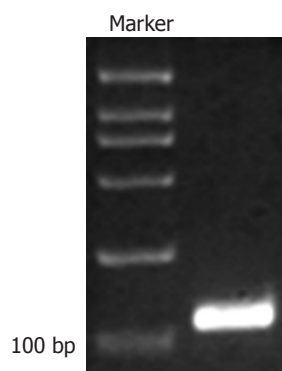


图 1 目的片段PCR产物的鉴定.

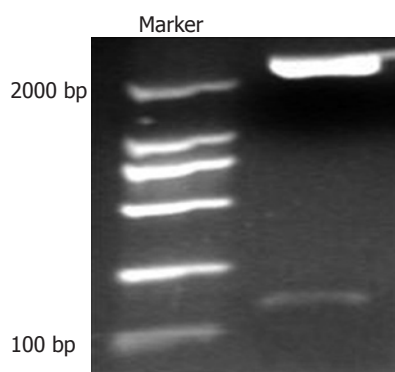


图 2 重组质粒的酶切鉴定.

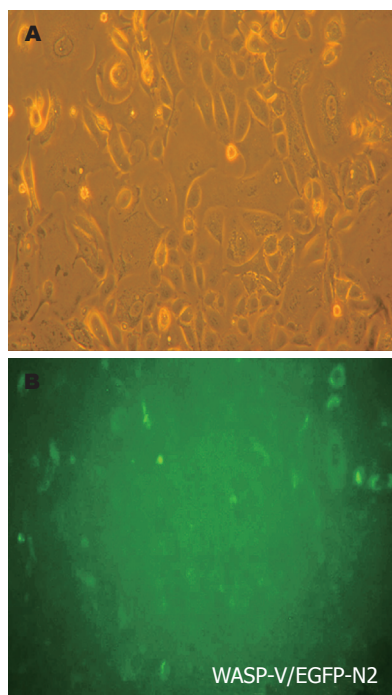


图 3 表达EGFP-V的大肠癌细胞. A: 大肠癌细胞相差显微镜下形态; B: 表达EGFP-V的大肠癌细胞.

■相关报道

有研究表明, N-WASP在头颈部、乳腺、胃、神经等组织肿瘤细胞中均有表达.

的Lipofectamine2000室温保存20 min. 在加入复合物前移去生长培养基, 替换为1.9 mL无血清RPMI 1640培养基, 将复合物加入到每个孔中, 摇动培养板, 轻轻混匀. 在37℃、50 mL/L的CO₂中培养6 h后换为完全培养基继续培养, 次日显微镜下观察绿色荧光表达, 并加入G418筛选, 获得稳定表达细胞.

1.2.3 Transwell侵袭实验: 转染48 h后细胞用2.5 g/L的胰酶消化, 调整细胞密度于 1×10^9 /L. 37℃、50 mL/L CO₂, 细胞悬液100 μL加入Transwell小室, 24孔板下室加入600 μL完全培养基, 培养24 h. 100 g/L甲醛固定细胞30 s, 结晶紫溶液细胞染色. 倒置显微镜下计数移到膜下层的细胞, 每张膜分别计数8个随机视野的穿膜细胞, 计算平均数. 每组细胞行4次Transwell侵袭实验.

1.2.4 Capture-ELISA检测细胞内吞作用: 上述3种细胞置37℃、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 30 min后加入bio-Tfn, 浓度为10 mg/L, 冰上培养30 min后, 37℃开始内吞5 min, 冰上终止细胞内吞. 96孔ELISA板, 每孔加入100 μL抗TFN抗体(2 mg/L), 4℃孵育过夜. 细胞裂解物, 每孔100 μL, 4℃孵育12 h, HRP-Streptavidin(1:5000稀释)100 μL, 37℃孵育1 h. TMB底物溶液0.1 mL, 37℃, 10-30 min. 2 mol/L硫酸0.05 mL终止反应, 450 nm处测吸光度值.

1.2.5 结肠癌肝转移动物模型的建立: 选用生长

状况良好的细胞, 消化, 洗涤, D-Hanks液悬浮, 血细胞计数板计数, 台盼兰染色观察细胞活力. 实验36只裸小鼠随机分为3组, 每组12只, 分别向脾脏注入 1×10^{10} /L细胞(3种不同细胞分别为V片段表达质粒转染细胞、空载体转染细胞、未转染细胞). 实验动物饲养于SPF环境下, 常规喂养给水, 12 h照明. 选用乙醚吸入麻醉, 左上腹切口, 长约0.5-1.0 cm, 进腹暴露脾脏后, 用5号针头将上述3组结肠癌细胞缓慢注入裸鼠脾脏, 每只裸鼠注射细胞悬液0.2 mL, 注射时间约3 min, 术毕, 关腹, 整个操作过程遵循无菌操作原则. 麻醉清醒后常规饲养. 接种8 wk后颈椎脱臼法处死动物, 观察癌细胞局部生长和肝转移情况.

统计学处理 采用多个均数的比较的F检验对数据进行分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义.

2 结果

2.1 PCR扩增目的片段V的鉴定 V片段凝胶电泳在约108 bp处有清晰明亮的特异条带, 与预期结果一致(图1).

2.2 重组质粒双酶切结果的鉴定 V重组质粒双酶切鉴定行凝胶电泳在大约2000 bp和108 bp处各有一明亮清晰特异条带(图2), 表明目的片段V已经准确连入表达载体的EcoR I和Xho I酶切位点之间, 成功构建重组真核表达质粒pEGFP-V. 经过DNA测序, 插入片段DNA序列正确.

应用要点

干扰癌细胞内N-WASP参与的ARP2/3复合物介导的肌动蛋白聚合作用可能是一条对抗大肠癌转移的新的途径。

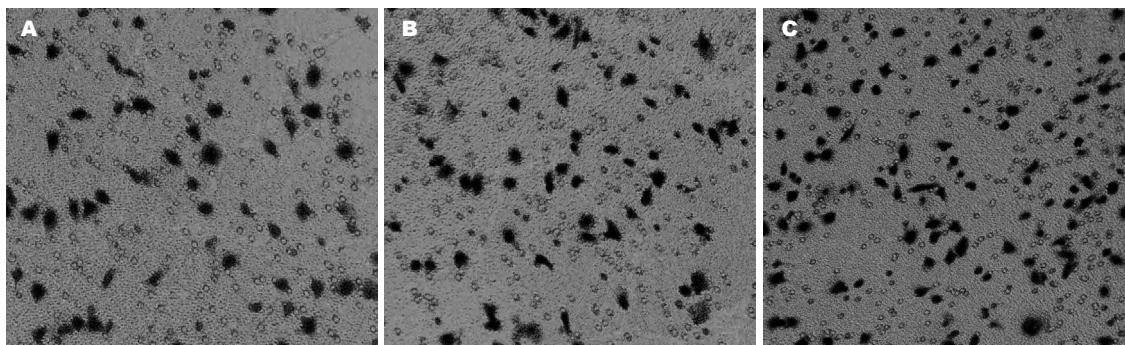


图4 Transwell小室观察癌细胞侵袭能力的改变. A: V质粒组; B: 空质粒组; C: 未转染组. A与B、C比较: 穿膜细胞数明显减少, 差异有统计学意义; B与C细胞穿膜情况比较无明显差异.

表1 Transwell小室细胞穿膜细胞计数

分组	视野数	穿膜细胞数(mean ± SD)
V片段组	8 × 4	42.15 ± 7.35
空质粒组	8 × 4	85.25 ± 6.16
未转染组	8 × 4	84.35 ± 7.99

2.3 转染细胞的荧光显微镜观察 显微镜下观察视野下绿色荧光表达, 结合同视野光镜下细胞形态比较(图3), 可见细胞质内的绿色荧光表达, 转染成功.

2.4 Transwell侵袭实验 3种细胞经Transwell小室培养模型培养后穿膜细胞进行计数显示V组癌细胞穿膜能力较其他2组明显减少(图4), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而空质粒组与未转染组间细胞穿膜能力无明显差异, 差异无统计学意义($P > 0.05$, 表1).

2.5 Capture-ELISA法检测大肠癌细胞内吞作用的变化 空质粒组与未转染组内吞转铁蛋白的数量相当; V质粒组与空质粒组和未转染组相比较内吞量明显减少($P < 0.05$, 图5).

2.6 动物实验 对照组(包括空载体转染癌细胞和未转染癌细胞)部分裸鼠有腹腔其他部位转移灶, 实验组未见腹腔其他部位转移. 大体标本观察空载体转染癌细胞和未转染癌细胞组的12只裸鼠分别各有10只发生肝转移, 实验组的12只裸鼠仅有2只发生肝转移.

3 讨论

大肠癌是临床常见的肿瘤类型. 在恶性肿瘤致死原因中位居第4位. 肿瘤细胞的侵袭及转移是大肠癌患者死亡的主要原因. 寻找对抗肿瘤转移的策略一直是临床及基础研究的热点.

肿瘤细胞的转移包括从原发病灶脱落并侵入脉管、在新的器官定植、转移灶形成新

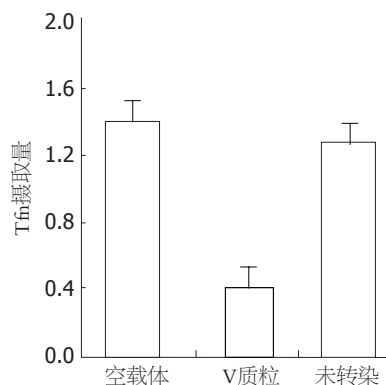


图5 癌细胞内吞能力的比较.

生血管并持续增殖等复杂过程^[5], 概括起来就是黏附、降解、移动和血管形成等^[6], 这一系列的过程都离不开细胞的运动. 通过对体外培养细胞的研究, 人们了解到细胞的运动与细胞皮层(cortex)微丝肌动蛋白的动态组装有着直接关系. 肌动蛋白的装配首先是肌动蛋白单体(G-actin)聚合成肌动蛋白丝(F-actin)的过程, 这一过程需要ARP2/3复合物介导的催化作用^[3]. 在细胞内, ARP2/3复合物一般处于失活或低活性状态. ARP2/3复合物的激活需要一种重要分子N-WASP的参与. N-WASP与ARP2/3复合物聚集并活化ARP2/3复合物, 进一步激活了微丝肌动蛋白聚合过程, 导致皮质肌动蛋白组装和分支快速形成^[7], 从而迅速驱动了细胞运动的发生. 由此可见, 在肌动蛋白聚合的过程中, N-WASP发挥了重要的作用, 直接影响了细胞运动的发生.

WASP家族是目前了解较多的一种肌动蛋白核化促进因子, 在体外实验中他能和肌动蛋白单体和ARP2/3复合物结合, 促进肌动蛋白微丝生长^[8]. WASP家族主要包括WASP^[9]和Neural-WASP(N-WASP), 在胃肠道组织中主要是N-WASP表达. N-WASP蛋白的羧基端由同源区域(V), 中央区域(C)和酸性区域(A)3个部分组

成^[10]. 其中的V区域是N-WASP与肌动蛋白单体结合的部位, C与A区域是与ARP2/3复合物结合的部位. 而只有完整的VCA区域同时结合G-actin和ARP2/3才能发挥促进ARP2/3介导的肌动蛋白的聚合作用. 研究发现N-WASP装配速度约是WASP的4倍^[11], 这可能与N-WASP有2个V同源区有关, 同时也说明V同源区是细胞信号级联诱导肌动蛋白聚合的关键区域^[12].

根据以上作用特点, 我们试图通过靶向抑制N-WASP蛋白结构功能区中与G-actin相结合的区域, 来抑制N-WASP促进ARP2/3的激活和由此介导的肌动蛋白的装配, 期望削弱肿瘤细胞的侵袭转移等运动, 最终达到抑制癌细胞转移侵袭的目的. 在本研究中, 我们设计了结构中仅含有N-WASP的V区域而没有CA区域的干扰性分子, 并构建重组的表达质粒, 转导进入大肠癌细胞, 用以干扰N-WASP促进ARP2/3介导的微丝聚合作用. 实验通过PCR获得目的片段, 将其和荧光表达载体pEGFP-N2分别以EcoR I 和Xho I 为酶切位点双酶切后连接, 获得重组质粒. 该质粒通过脂质体介导入大肠癌细胞LoVo. 借助载体自带的绿色荧光在显微镜下观察转染成功. Transwell侵袭实验表明, 与对照组和未转染组比较, 表达V片段的大肠癌细胞的侵袭力明显下降; Capture-ELISA法显示表达V片段的大肠癌细胞的内吞量较对照组和未转染组明显减少. 研究结果显示, 细胞内表达N-WASP的V片段作为拮抗分子, 能够干扰N-WASP结合ARP2/3而促进肌动蛋白装配的功能, 并带来癌细胞的运动性的改变, 最终导致癌细胞侵袭转移能力的抑制. 通过动物实验, 我们发现表达V片段的大肠癌细胞的肝转移数目相比空质粒组和未转染组明显减少.

本研究作为一个初步实验, 显示了N-WASP功能在大肠癌细胞运动和癌细胞的侵袭转移能力方面的重要性. 干扰癌细胞内N-WASP参与的ARP2/3复合物介导的肌动蛋白聚合作用可能是一条对抗大肠癌转移的新的途径. 我们的后续

研究将在体外合成干扰性小分子肽, 进一步验证对大肠癌侵袭转移的抑制性作用.

4 参考文献

- 1 Chen WT. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool* 1989; 251: 167-185
- 2 Fukui Y, de Hostos E, Yumura S, Kitanishi-Yumura T, Inou. Architectural dynamics of F-actin in eupodia suggests their role in invasive locomotion in Dictyostelium. *Exp Cell Res* 1999; 249: 33-45
- 3 Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; 112: 453-465
- 4 Kapus A, Szász K, Sun J, Rizoli S, Rotstein OD. Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. *J Biol Chem* 1999; 274: 8093-8102
- 5 Jiang WG, Puntis MC, Hallett MB. Molecular and cellular basis of cancer invasion and metastasis: implications for treatment. *Br J Surg* 1994; 81: 1576-1590
- 6 Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51: 5054s-5059s
- 7 Uruno T, Liu J, Zhang P, Fan Yx, Egile C, Li R, Mueller SC, Zhan X. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 259-266
- 8 Cooper JA, Wear MA, Weaver AM. Arp2/3 complex: advances on the inner workings of a molecular machine. *Cell* 2001; 107: 703-705
- 9 Yarar D, To W, Abo A, Welch MD. The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 1999; 9: 555-558
- 10 Antón IM, Jones GE, Wandosell F, Geha R, Ramesh N. WASP-interacting protein (WIP): working in polymerisation and much more. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 555-562
- 11 Volkmann N, Amann KJ, Stoilova-McPhie S, Egile C, Winter DC, Hazelwood L, Heuser JE, Li R, Pollard TD, Hanein D. Structure of Arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science* 2001; 293: 2456-2459
- 12 Yamaguchi H, Miki H, Suetsugu S, Ma L, Kirschner MW, Takenawa T. Two tandem verprolin homology domains are necessary for a strong activation of Arp2/3 complex-induced actin polymerization and induction of microspike formation by N-WASP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12631-12636

■同行评价

本研究具有一定原创性, 立题新颖, 实验设计科学, 研究手段先进, 结果明确可靠, 结论可信, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 何基才

JNK信号通路在大肠癌侵袭和转移中的作用及机制

周燕红, 何小飞, 高 卉, 王瑶芬

■背景资料

大肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 大肠癌转移是影响患者疗效和预后并导致死亡的重要因素, 是当前大肠癌研究中最重要的一个方面。近来研究表明c-Jun氨基末端激酶(JNK)/应激活化蛋白激酶(SAPK)信号途径在肿瘤的发生发展和转移中发挥重要作用, 但其在大肠癌侵袭和转移中的作用机制还不清楚。

周燕红, 何小飞, 高卉, 王瑶芬, 咸宁学院医学院消化内科 湖北省咸宁市 437100

周燕红, 副教授, 博士, 主要从事消化系统肿瘤的防治研究。

湖北省卫生厅基金资助项目, No. JX3C11

作者贡献分布: 此课题由周燕红与何小飞设计; 操作过程由周燕红、高卉及王瑶芬完成; 数据分析由周燕红完成; 本文写作由周燕红完成, 何小飞指导。

通讯作者: 周燕红, 副教授, 437100, 湖北省咸宁市, 咸宁学院医学院消化内科。yanhongzhou326@yahoo.com.cn

电话: 0715-8151280 传真: 0715-8151280

收稿日期: 2009-05-03 修回日期: 2009-07-01

接受日期: 2009-07-06 在线出版日期: 2009-07-28

Mechanisms underlying the role of JNK signaling pathway in the invasion and metastasis of colon cancer cells

Yan-Hong Zhou, Xiao-Fei He, Hui Gao, Yao-Fen Wang

Yan-Hong Zhou, Xiao-Fei He, Hui Gao, Yao-Fen Wang, Department of Gastroenterology, Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China

Supported by: the Foundation of Health Department of Hubei Province, No. JX3C11

Correspondence to: Yan-Hong Zhou, Department of Gastroenterology, Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China. yanhongzhou326@yahoo.com.cn

Received: 2009-05-03 Revised: 2009-07-01

Accepted: 2009-07-06 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of c-Jun-N-terminal kinase (JNK) signaling pathway on the migration and invasion of human colon cancer cells (LoVo) stimulated with fibronectin and explore possible mechanisms underlying such effects.

METHODS: LoVo cells were cultured in serum-free medium for 24 hours and then divided into normal control group (no fibronectin treatment), fibronectin treatment group (a 24-hour treatment with fibronectin at concentrations of 10, 20 and 40 mg/L, respectively), and SP600125 treatment group (a 24-hour treatment with 40 mg/L of fibronectin and SP600125 at concentrations of 20 and 40 μ mol/L, respectively). The *in vitro* migration and invasion of LoVo cells were measured by Boyden chamber assay. The phosphorylation levels of JNK and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by Western blot.

RESULTS: Fibronectin significantly increased the migration and invasion of LoVo cells, while SP600125 showed an obvious inhibitory effect on migration and invasion. The expression of p-JNK and MMP-9 in the fibronectin (40 mg/L) treatment group was more significantly upregulated than that in normal control group ($38.39\% \pm 5.97\%$ vs $28.61\% \pm 4.19\%$ and $58.25\% \pm 6.53\%$ vs $33.43\% \pm 2.05\%$, respectively; both $P < 0.01$). The upregulation of p-JNK and MMP-9 expression in the SP600125 (40 μ mol/L) treatment group was significantly lower than that in the fibronectin (40 mg/L) treatment group ($29.59\% \pm 2.17\%$ vs $38.39\% \pm 5.97\%$ and $36.69\% \pm 4.20\%$ vs $58.25\% \pm 6.53\%$, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Fibronectin can enhance the migration and invasion of human colon cancer cells perhaps through upregulation of p-JNK and MMP-9 expression.

Key Words: Colon cancer; Invasion; Metastasis; c-Jun NH2-terminal kinase; Fibronectin

Zhou YH, He XF, Gao H, Wang YF. Mechanisms underlying the role of JNK signaling pathway in the invasion and metastasis of colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2142-2146

摘要

目的: 观察c-Jun氨基末端激酶(c-jun-N-terminal kinase, JNK)信号通路的活化对大肠癌细胞运动、侵袭的影响, 并探讨大肠癌转移可能的分子机制。

方法: LoVo细胞无血清饥饿24 h同步化后, 对照组无纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)干预, FN组给予FN 10, 20, 40 mg/L, 24 h干预。JNK抑制剂组给予FN 40 mg/L+SP600125(20, 40 μ mol/L)干预24 h。用Boyden小室法检测其体外运动和侵袭能力。Western blot法检测JNK磷酸化和MMP-9蛋白质表达。

结果: FN可剂量性增加LoVo细胞运动和侵袭细胞数, SP600125能明显减少FN诱导的细胞运动和侵袭力。与对照组相比, FN 40 mg/L干预时p-JNK和MMP-9明显增高($38.39\% \pm$

■同行评议者

曹秀峰, 主任医师, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心; 唐世刚, 教授, 大连大学附属医院消化内科; 陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器外科

5.97% vs 28.61%±4.19%; 58.25%±6.53% vs 33.43%±2.05%, 均 $P<0.01$). 与FN 40 mg/L组相比, SP600125 40 μ mol/L能明显抑制p-JNK和MMP-9蛋白的表达(29.59%±2.17% vs 38.39%±5.97%, 36.69%±4.20% vs 58.25%±6.53%, 均 $P<0.01$).

结论: 大肠癌细胞JNK磷酸化可激活其下游成员使大肠癌基质金属蛋白酶的分泌增加, 导致大肠癌细胞的运动和侵袭力增加, 最终促进癌细胞的转移.

关键词: 大肠癌; 侵袭; 转移; c-Jun氨基末端激酶; 纤维粘连蛋白

周燕红, 何小飞, 高卉, 王瑶芬. JNK信号通路在大肠癌侵袭和转移中的作用及机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2142-2146

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2142.asp>

0 引言

大肠癌(colon cancer)是人类最常见的恶性肿瘤之一, 大肠癌转移是影响患者疗效和预后并导致死亡的重要因素. 肿瘤转移是多因素相互作用的结果, 已发现了很多导致肿瘤转移的生物学行为, 如细胞黏附(adhesion), 运动(migration)、侵袭(invasion)、血管生成(angiogenesis)以及生长(growth)等^[1]. 不断研究和探讨其机制, 进一步认识肿瘤转移, 可为治疗肿瘤转移提供更可靠的理论依据.

c-Jun氨基末端激酶(c-jun-N-terminal kinase, JNK)/应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)信号途径存在于多种生命过程中在细胞周期调节、细胞增殖和转化生长中具有重要作用. 近年来, 越来越多的研究表明JNK在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[2-3], 从而使JNK在临床上可作为一个潜在的分子治疗靶点. 本研究中以纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)作为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要成分诱导大肠癌细胞侵袭和运动, 探讨JNK作为整合素与FN结合的下流信号分子, 在大肠癌的转移中发挥的重要作用; 并探讨应用JNK抑制剂抑制大肠癌的侵袭和转移的可能性, 为明确大肠癌转移的发生机制以及寻找新的大肠癌治疗方案提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌细胞株LoVo购自武汉大学典型生物保藏中心; BD BioCoat™ Matrigel™

Invasion Chamber(No. 354483, 354578)试剂盒购自美国BD公司; 兔抗JNK多克隆抗体, 兔抗磷酸化JNK多克隆抗体购自Upstate公司; 鼠抗单克隆MMP-9抗体, β -actin多克隆抗体购自Santa Cruz公司; SP600125购自德国Merck公司, FN购自Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: LoVo细胞使用RPMI 1640加100 mL/L胎牛血清培养液, 置于37℃、50 mL/L CO₂的培养箱中培养. 细胞无血清饥饿24 h同步化后, 对照组无FN干预, FN组给予FN 10、20、40 mg/L 24 h干预. JNK抑制剂组给予FN 40 mg/L+SP600125(20, 40 μ mol/L)干预24 h.

1.2.2 体外细胞运动和侵袭力的测定: 采用Boyden小室法, 按照试剂盒说明书严格无菌进行操作. 从-20℃取出试剂盒至室温, 无血清培养液37℃, 50 mL/L CO₂细胞培养箱中水化上下室2 h. 对照组、FN 24 h干预及抑制剂组细胞制成细胞悬液. 上室加细胞悬液 5×10^5 /每室, 下室内加入NIH3T3细胞上清, 在37℃, 50 mL/L CO₂细胞培养箱中培养24 h, 用棉签擦掉膜内表面未穿过膜的细胞, Wright-Giemsa染色. 每组设3个复孔, 计算穿过膜细胞的平均值.

1.2.3 Western blot: 组织和细胞提取总蛋白后, 离心上清液蛋白定量保存于-80℃用于JNK、MMP-9及p-JNK Western blot分析. 40 μ g蛋白行SDS-PAGE变性凝胶电泳. 转膜封闭后与一抗(稀释浓度均为1:1000)4℃孵育过夜. 二抗室温反应2 h, 增强化学发光法(ECL)显影, 暗室压片. 胶片经凝胶成像分析系统处理数据.

统计学处理 实验数据以mean±SD表示, 采用SPSS11.5软件进行统计学分析, 两组间比较用单因素方差分析, 组间差异采用 q 检验. 以 $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 细胞运动和侵袭力 FN不同剂量(0、10、20、40 mg/L)及SP600125(20、40 μ mol/L)干预大肠癌细胞, 大肠癌细胞侵袭穿过Matrigel胶的平均数分别为15.33±2.52, 16.33±2.52, 19.00±1.00, 22.00±2.00, 17.67±2.52, 12.00±1.00; 运动穿过膜的平均数42.67±2.52, 46.00±1.00, 48.00±2.00, 52.67±2.52, 48.33±1.53, 43.67±3.21. FN能剂量依赖性增强大肠癌LoVo细胞的运动和侵袭力, FN 20 mg/L时LoVo细胞的运动和侵袭力明显增强($P<0.05$), 以FN 40 mg/L时细

■ 相关报道

本课题组前期研究表明, 胃泌素及其受体对大肠癌细胞FAK-Src-ERK1/2通路的影响在大肠癌的侵袭过程中起到了重要的作用.

■创新盘点

本课题用Western blot方法探讨JNK、磷酸化JNK,在FN诱导和抑制剂SP600125特异性抑制大肠癌LoVo细胞中表达的差异,观察JNK信号通路及下游信号通路MMP-9对大肠癌细胞运动、侵袭和转移的作用机制。

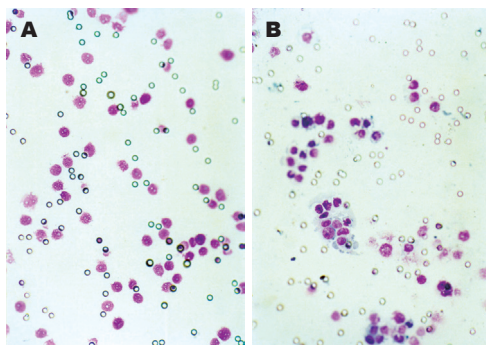


图1 大肠癌细胞运动能力检测结果($\times 100$). A: FN(40 mg/L); B: FN(40 mg/L)+SP600125(40 μ mol/L)

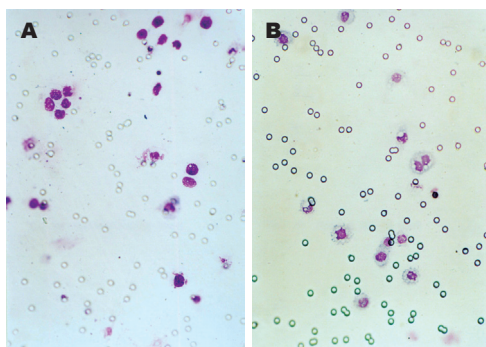


图2 大肠癌细胞侵袭力检测结果($\times 100$). A: FN(40 mg/L); B: FN(40 mg/L)+SP600125(40 μ mol/L)

胞的运动和侵袭力最强($P<0.01$). 我们选择FN 40 mg/L干预这一处理剂量的基础上加上不同浓度SP600125(20、40 μ mol/L)干预24 h. 结果表明, SP600125剂量依赖性地减少LoVo细胞24 h FN诱导细胞的运动和侵袭能力, 以40 μ mol/L SP600125抑制作用最强($P<0.01$, 图1-3).

2.2 JNK、MMP-9及p-JNK蛋白的表达 大肠癌LoVo细胞各组JNK均有表达, 但各组间无统计学意义. FN能剂量依赖性诱导p-JNK在大肠癌细胞中表达. 以FN 40 mg/L最明显($38.39\% \pm 5.97\%$ vs $28.61\% \pm 4.19\%$, $P<0.01$). SP600125对JNK蛋白的表达无明显影响. SP600125能明显抑制p-JNK蛋白的表达, 以40 μ mol/L SP600125抑制作用最强($29.59\% \pm 2.17\%$ vs $38.39\% \pm 5.97\%$, $P<0.01$, 图4-5). 大肠癌LoVo细胞FN 40 mg/L干预时MMP-9蛋白的表达明显增强($58.25\% \pm 6.53\%$ vs $33.43\% \pm 2.05\%$, $P<0.01$), SP600125能剂量依赖性地抑制MMP-9蛋白的表达, 以40 μ mol/L SP600125抑制作用最强($36.69\% \pm 4.20\%$ vs $58.25\% \pm 6.53\%$, $P<0.01$, 图4-5).

3 讨论

肿瘤细胞转移至远处器官决定于其从生长原

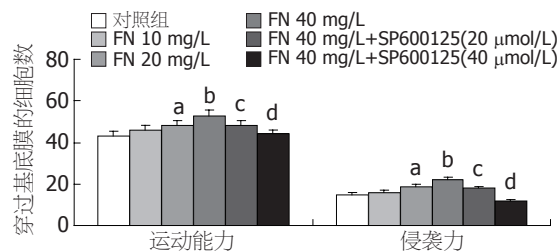


图3 大肠癌细胞运动能力和侵袭力. ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs FN(40 mg/L)组.

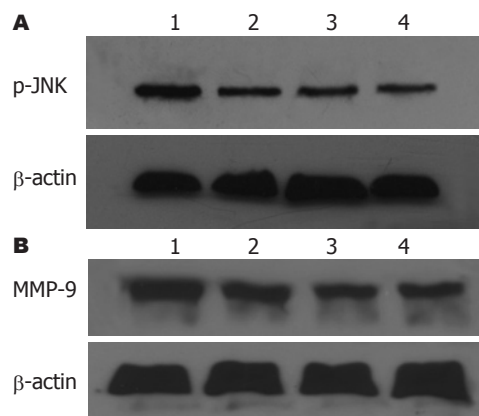


图4 LoVo细胞中p-JNK和MMP-9蛋白表达Western blot分析结果. A: p-JNK; B: MMP-9; 1: FN(40 mg/L); 2: FN(40 mg/L)+SP600125(20 μ mol/L); 3: FN(40 mg/L)+SP600125(40 μ mol/L); 4: 对照组.

位侵袭穿过组织屏障进入血循环的能力, 以及血循环中的肿瘤细胞黏附第2器官并生长增殖的能力. 肿瘤细胞侵袭和转移需细胞外基质(extracellular matrix, ECM)黏附和ECM降解的精确协同. FN是构成细胞外基质的主要成分, 他们在肿瘤细胞的增殖、分化和转移中具有重要作用. FN能反映肿瘤细胞的增殖活性及局部侵袭性, 是判定肿瘤淋巴结潜在转移的重要指标. JNK信号通路被上游信号激活后, 胞质中的JNK移位到细胞核, 可以进一步使核内的转录因子c-Jun氨基末端63及73位的丝氨酸残基磷酸化^[4-5]. JNK的活化需要FAK与Src及p130Cas的结合以及与Crk的缔和. 活化的JNK进入细胞核, 使转录因子c-Jun磷酸化, 与c-Fos形成AP-1(activator protein-1)转录因子复合物. AP-1调节下游基因控制细胞的增殖过程. 几种控制细胞迁移的信号通路包括Rac, FAK和Src与JNK信号通路密切相关^[6]. JNK信号通路是细胞迁移过程中所必需的^[7-8], 用其抑制剂SP600125抑制JNK活化可抑制细胞的迁移^[9-13].

本课题组前期研究表明胃泌素及其受体对大肠癌细胞FAK-Src-ERK1/2通路的影响在大肠

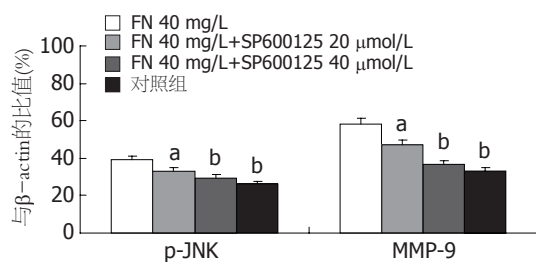


图5 Western blot示p-JNK/β-actin和MMP-9/β-actin百分率。^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs FN 40 mg/L组。

癌的侵袭过程中起到了重要的作用^[14]。细胞外的刺激通过FAK/Src或Ras激活MEKK1磷酸化, 激活MKK4或MKK7, 然后激活或磷酸化JNK, 活化的JNK依次磷酸化Jun, Paxillin, Spir, DCX和MAPs。Paxillin磷酸化能促进细胞黏附进而使细胞迁移增快^[15-16]。JNK在传导胞外信号至核转录因子时起着重要作用, 可以提高转录能力, 存在于多种生命过程中, 如细胞生长、癌基因转化、细胞分化和细胞死亡。在Ras诱导的转化实验中, Ras介导c-Jun的磷酸化是由JNK完成的。JNK磷酸化c-Jun位点的突变可抑制Ras引起的成瘤^[17]。提示JNK与肿瘤发生相关, 但其作用机制还不清楚。JNK信号途径的异常活化与多种人类肿瘤的发生发展密切相关, 因此JNK信号通路是一个干预治疗潜在的分子靶点。

MMP-9又被称为IV型胶原酶, 是基质金属蛋白酶家族成员之一。MMP-9的过表达可促进恶性肿瘤的发生与发展^[18-19]。侵袭和转移是恶性肿瘤细胞的重要特征。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)和纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)等蛋白酶类是细胞侵袭过程所必需的^[20-21]。MMP-9一方面降解、破坏靠近肿瘤细胞表面的ECM和BM, 释放大量的促生长因子, 导致细胞的异常增殖与凋亡抑制; 另一方面则通过毛细血管内生、新生血管生成等促进瘤细胞沿着缺失的BM向周围组织浸润, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移灶形成。研究表明MMP-9的表达和8NB19细胞(人神经胶质瘤细胞系)的侵袭性受JNK和ERK依赖的信号模式调节, 干预其中的任何一条信号通路都能够降低肿瘤细胞的侵袭性^[22]。

JNK及其信号通路在肿瘤侵袭和转移中起中介和信号放大作用, 一方面接受大量来自生长因子、丝裂原、环境刺激等的信号; 另一方面, 通过JNK级联反应作用于核转录因子, 调控基因表达, 期间伴有与其他信号通路的相互作用, 如整合素通路及PKC通路。对此信号传导中

任一位点的阻断都有可能成为抗大肠癌侵袭转移治疗新的靶点。

本课题用Western blot方法探讨JNK、磷酸化JNK, 在FN诱导和抑制剂SP600125特异性抑制大肠癌LoVo细胞中表达的差异, 观察JNK信号通路及下游信号通路MMP-9对大肠癌细胞运动、侵袭和转移的作用机制。结果表明FN可剂量依赖性地增加LoVo细胞运动和侵袭细胞数, 以FN 40 mg/L时细胞的运动和侵袭力最强($P<0.01$)。SP600125能明显减少FN诱导的细胞运动和侵袭力。磷酸化JNK蛋白和MMP-9蛋白的表达在FN地诱导下呈增强趋势, 以FN 40 mg/L最明显($P<0.01$)。SP600125能明显抑制FN诱导的大肠癌细胞磷酸化JNK蛋白和MMP-9蛋白的增高。

因此, 我们推测JNK可能通过激活其下游成员使大肠癌MMP的分泌增加、细胞-细胞黏附力下降而导致大肠癌细胞的运动和侵袭力增加, 最终促进癌细胞的转移。

4 参考文献

- Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 21-25
- 丁涛, 张祥宏, 李学民, 严霞, 邢凌霄, 王俊灵, 张杰英, 薛丽英, 赵晨燕, 崔晋峰. p-JNK JNK和PPAR γ 在食管癌变过程中的表达及其意义. *中国肿瘤临床* 2008; 35: 1348-1352
- 栾巍, 黄海辉, 梁后杰. SAPK/JNK信号通路在鼻咽癌放疗群集耐受中的作用研究. *第三军医大学学报* 2006; 28: 2177-2179
- Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 1995; 81: 1147-1157
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B, Davis RJ. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J* 1996; 15: 2760-2770
- Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB, Giancotti FG. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 1999; 145: 1461-1469
- Huynh-Do U, Vindis C, Liu H, Cerretti DP, McGrew JT, Enriquez M, Chen J, Daniel TO. Ephrin-B1 transduces signals to activate integrin-mediated migration, attachment and angiogenesis. *J Cell Sci* 2002; 115: 3073-3081
- Shin EY, Kim SY, Kim EG. c-Jun N-terminal kinase is involved in motility of endothelial cell. *Exp Mol Med* 2001; 33: 276-283
- Huang C, Rajfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K. JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* 2003; 424: 219-223
- Javelaud D, Laboureaud J, Gabison E, Verrecchia F, Mauviel A. Disruption of basal JNK activity differentially affects key fibroblast functions

■应用要点

肿瘤转移是多因素相互作用的结果, 不断研究和探讨其机制, 进一步认识肿瘤转移, 可为治疗肿瘤转移提供更可靠的理论依据。越来越多研究证实JNK与肿瘤转移相关。给予特异性的阻断剂, 在信号通路水平阻断和调控JNK的表达和活性, 将可能成为治疗大肠癌侵袭和转移一条新的治疗途径。从而使JNK在临床上可作为一个潜在的大肠癌侵袭和转移的分子治疗靶点。

■同行评价

本研究方法先进, 所得结论客观可信, 具有一定的实际应用价值.

- important for wound healing. *J Biol Chem* 2003; 278: 24624-24628
- 11 Kavurma MM, Khachigian LM. ERK, JNK, and p38 MAP kinases differentially regulate proliferation and migration of phenotypically distinct smooth muscle cell subtypes. *J Cell Biochem* 2003; 89: 289-300
- 12 Kawauchi T, Chihama K, Nabeshima Y, Hoshino M. The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO J* 2003; 22: 4190-4201
- 13 Yamauchi J, Chan JR, Shooter EM. Neurotrophin 3 activation of TrkC induces Schwann cell migration through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 14421-14426
- 14 周燕红, 于皆平, 罗和生, 黄永兰, 明媚, 于红刚. 胃泌素促FAK-Src-ERK1/2通路的活化对大肠癌细胞运动和侵袭的影响. *中华内科杂志* 2007; 46: 318-319
- 15 Huang C, Jacobson K, Schaller MD. A role for JNK-paxillin signaling in cell migration. *Cell Cycle* 2004; 3: 4-6
- 16 Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L. Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6354-6363
- 17 Behrens A, Jochum W, Sibilio M, Wagner EF. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. *Oncogene* 2000; 19: 2657-2663
- 18 Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 2000; 103: 481-490
- 19 Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 737-744
- 20 Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79: 143-180
- 21 Rabbani SA, Mazar AP. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 2001; 10: 393-415, x
- 22 Lakka SS, Bhattacharya A, Mohanam S, Boyd D, Rao JS. Regulation of the uPA gene in various grades of human glioma cells. *Int J Oncol* 2001; 18: 71-79

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森—路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

本刊讯 据汤姆森-路透科技信息集团2009-06-19发布《期刊引证报告》(*Journal Citation Reports*)的统计结果: *World Journal of Gastroenterology(WJG)*的总被引次数(TC): 10 822; 影响因子(IF): 2.081; 即年指数: 0.274; 论文数量: 1112; 半衰期: 3.1; 特征因子(EF): 0.05006. 特征因子这个指标是今年期刊引证报告里新加的一个指标. 与影响因子不同的是, 这个指标不仅考察了引文的数量, 而且考虑了施引期刊的影响力, 即: 某期刊如果越多地被高影响力的期刊引用, 则该期刊的影响力也越高. 正如Google考虑超链接的来源, 特征因子也充分考虑引文的来源, 并在计算中赋予不同施引期刊的引文以不同的权重. 特征因子分值的计算基于过去5年中期刊发表的论文在期刊引证报告统计当年的被引用情况. 与影响因子比较, 期刊特征因子分值的优点主要有: (1)特征因子考虑了期刊论文发表后5年的引用时段, 而影响因子只统计了2年的引文时段, 后者不能客观地反映期刊论文的引用高峰年份; (2)特征因子对期刊引证的统计包括自然科学和社会科学, 更为全面、完整; (3)特征因子的计算扣除了期刊的自引; (4)特征因子的计算基于随机的引文链接, 通过特征因子分值可以较为合理地测度科研人员用于阅读不同期刊的时间. 在55种国际胃肠病学和肝病学期刊中, *WJG*的EF, TC和IF分别名列第6, 9, 32位. (*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2009-07-28)

抑制促肝再生磷酸酶-3对大肠癌细胞迁移能力的影响

赵高平, 周总光, 郑雪莲

赵高平, 四川省医学科学院 四川省人民医院胃肠外科 四川省成都市 610072

周总光, 郑雪莲, 四川大学华西医院消化外科研究室 四川省成都市 610041

赵高平, 2005年四川大学华西临床医学院博士, 主治医师, 主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究。

作者贡献分布: 此课题由赵高平与周总光设计; 赵高平与郑雪莲操作完成实验; 由赵高平分析数据并撰写论文。

通讯作者: 周总光, 教授, 博士生导师, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院消化外科研究室。

zhgaoping@yahoo.com.cn

电话: 028-85422484

收稿日期: 2009-04-08 修回日期: 2009-06-24

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-07-28

Inhibition of phosphatase of regeneration liver-3 suppresses the migration of Colo-320 colon cancer cells

Gao-Ping Zhao, Zong-Guang Zhou, Xue-Lian Zheng

Gao-Ping Zhao, Department of Gastrointestinal Surgery, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Zong-Guang Zhou, Xue-Lian Zheng, Department of Digestive Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Zong-Guang Zhou, Department of Digestive Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. zhgaoping@yahoo.com.cn

Received: 2009-04-08 Revised: 2009-06-24

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of sodium orthovanadate (SoV), an inhibitor of phosphatase of regeneration liver-3 (PRL-3), on the migration of Colo-320 colon cancer cells.

METHODS: The expression levels of PRL-3 protein in seven colorectal cancer cell lines were examined by Western blot to screen the line with the highest expression of PRL-3 protein. The screened cell line was employed in subsequent drug intervention experiments. A scratch wound assay was performed to examine the effect of SoV (at a dose of 0.5 $\mu\text{mol/L}$) on the migration of Colo-320 cells. The migration distance of cells was determined under an inverted microscope.

The expression of PRL-3 mRNA in cells treated with SoV was detected by in situ hybridization.

RESULTS: Western blot analysis indicated that the colon cancer cell line Colo-320 had the highest expression level of PRL-3. The scratch wound assay showed that the migration distance of Colo-320 cells treated with SoV for 48 hours was significantly lower than that of control cells. The migration rate of SoV-treated cells was also significantly lower than that of control cells ($2.84 \pm 6.78 \mu\text{m/h}$ vs $39.12 \pm 10.11 \mu\text{m/h}$, $P < 0.00001$). In situ hybridization analysis showed that PRL-3 mRNA was highly expressed in control cells but not in SoV-treated cells.

CONCLUSION: SoV can effectively inhibit the migration of Colo-320 cells perhaps through downregulation of PRL-3 mRNA expression and suppression of PRL-3 catalytic activity.

Key Words: Phosphatase of regeneration liver-3; Colon cancer cell; Migration

Zhao GP, Zhou ZG, Zheng XL. Inhibition of phosphatase of regeneration liver-3 suppresses the migration of Colo-320 colon cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2147-2151

摘要

目的: 观察促肝再生磷酸酶-3(phosphatase of regeneration liver-3, PRL-3)抑制剂原钒酸钠(sodium orthovanadate, SoV)对大肠癌细胞株 Colo-320 迁移能力的影响。

方法: 应用Western blot方法检测PRL-3在7株大肠癌细胞中的表达, 筛选表达最强的1株做下一步抑制实验。选择PRL-3拮抗剂SoV, 通过细胞划痕实验观察其在0.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对癌细胞运动能力的影响, 高倍倒置显微镜下计算细胞迁移距离。细胞爬片原位杂交观察SoV对PRL-3 mRNA的表达。

结果: PRL-3表达最强的结肠癌细胞株为 Colo-320。细胞划痕实验显示, SoV作用48 h 细胞仅迁移相当于4-7个细胞的距离, 400×

■背景资料

促肝再生磷酸酶-3(PRL-3)又称为PTP4A3, 属于一类新型小分子蛋白酪氨酸磷酸酶。其最显著的特征是在COOH-端有独一无二的异戊二烯基化结构域单元, 与细胞内膜的蛋白定向和蛋白间相互作用关系密切。最早发现该基因与结直肠癌肝转移有关, 随后研究表明该基因还在胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤等肿瘤的发生、发展及晚期转移过程中扮演重要角色。

■同行评议者

戴冬秋, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科; 吴泰瑞, 教授, 山东省立医院肝胆外科

■研发前沿

结直肠癌转移是影响患者预后的最主要因素。PRL-3在肝转移灶中持续、稳定、高表达,是药物作用的理想靶点。围绕该靶点从不同角度研究和开发药物,将会是该领域今后发展的方向和重点。

倍镜下精确测量20个细胞在0-48 h迁移距离,计算对照组细胞迁移速度为 $39.12 \pm 10.11 \mu\text{m/h}$, SoV为 $12.84 \pm 6.78 \mu\text{m/h}$, 差异非常显著($P < 0.00001$)。SoV作用细胞48 h后原位杂交结果未见PRL-3 mRNA阳性表达。

结论: SoV能显著抑制Colo-320细胞迁移能力,其机制可能与抑制PRL-3酶活性以及基因转录有关。

关键词: 促肝再生磷酸酶-3; 大肠癌细胞; 迁移

赵高平, 周总光, 郑雪莲. 抑制促肝再生磷酸酶-3对大肠癌细胞迁移能力的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2147-2151
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2147.asp>

0 引言

细胞的生长、分化、转化等过程受酪氨酸的磷酸化/脱磷酸化组成的信号传导网络调控^[1-3]。蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases, PTPs)在酪氨酸的脱磷酸化过程中扮演着重要角色。如果这种平衡遭到破坏,最终会引起人类包括癌症和糖尿病在内的多种疾病^[4-5]。PRL-3作为小分子PTP,其COOH-端有一个特殊的异戊二烯基化结构域单元,这种独一无二的结构赋予细胞以特殊功能^[6-7]。虽然体内外实验已表明PRL-3能促进细胞生长、浸润、迁移以及癌性转移^[7-13],但以PRL-3为靶点,采用拮抗剂抑制其活性,观察拮抗剂对肿瘤的生长和转移的影响,目前尚未见报道。SoV即原钒酸钠(sodium orthovanadate),为PRL-3相对特异性抑制剂。已有研究显示,SoV能有效地抑制PTPs酶的活性区域^[14]。本论文观察SoV在体外对表达PRL-3的结肠癌细胞株Colo-320细胞迁移能力的影响,旨在为将来可能将SoV应用于临床提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 7株人大肠癌细胞株,即LoVo、CaCo-2、SW620、Ls-174t、Colo-320、HRC-99、HRC-101。LoVo和Ls-174t细胞株购自中国科学院上海细胞库, CaCo-2、SW620、Colo-320为四川大学华西医学中心保存培养, HRC-99、HRC-101为四川大学华西医院消化外科研究室原代培养至50代。HRC-99取自46岁女性中-低分化直肠癌患者, Duke's C期; HRC-101取自54岁男性中分化直肠癌患者, Duke's B期。上述细胞均用含10%新生牛血清、100 kU/L青霉素、

100 $\mu\text{g/L}$ 链霉素和0.01 mol/L HEPES的RPMI 1640培养基,在37℃、饱和湿度及50 mL/L CO₂条件下传代培养。

1.2 方法

1.2.1 Western blot法检测7株癌细胞PRL-3蛋白表达: 将冻存的7株细胞株迅速解冻,洗涤后离心培养,直至细胞呈对数生长。分别提取总蛋白质,制作标准蛋白曲线,测定蛋白浓度,按总蛋白量60 μg 上样行SDS-PAGE电泳分析,一抗为1:1000兔抗人PRL-3(美国Zymed公司),二抗为1:1000的辣根过氧化物酶连接的羊抗兔IgG,选 β -actin做内对照。用化学发光试剂盒(美国Sigma公司)在PVDF膜上显示条带,根据PRL-3蛋白量/ β -actin蛋白量比值来比较7株癌细胞PRL-3差异性表达。

1.2.2 细胞划痕实验(wound-healing assay)测定细胞迁移能力: 通过上述Western blot方法筛选出PRL-3高表达细胞株Colo-320,胰蛋白酶消化后配制成单细胞悬液。取2张盖玻片清洗消毒后放入6孔板的2个孔中,取含 1×10^8 个/L Colo-320细胞的完全培养基1 mL滴入这2个孔中,并完全浸没盖玻片,放入CO₂恒温孵箱中培养,隔日换培养液,直到玻片上几乎爬满单层细胞。用微量吸液管头在2张玻片上表面正中各划一条直线痕迹,用温PBS冲洗掉脱落细胞,倒置显微镜下照相(Olympus公司, IX-40型)。该实验需用血细胞计数台镜下观察和计算Colo-320细胞在药物干预下移动距离。同盖玻片清洗消毒方法,准备2块血细胞计数台,将3张玻片小心分别放在血细胞计数台上,注意上表面朝上。镜下调整玻片位置,使细胞划痕线与血细胞计数台中某一刻度直线重叠,作为药物干预前的位置标志。用树脂将玻片黏合在血细胞计数台上,保证位置不会在转运过程中移动,然后一起放入较大培养皿中(已消毒)。在玻片上滴加含0.5 $\mu\text{mol/L}$ SoV(Sigma公司)完全培养液,浸满整个玻片上表面。设另一张玻片为对照组,只加完全培养基。放入CO₂恒温孵箱中培养48 h,期间每隔6 h观察同一视野一次并拍照(100×、200×和400×各1张),每隔12 h换培养基或含药物的培养基1次。以上步骤重复3次。

1.2.3 高倍倒置显微镜下计算细胞迁移距离: 细胞孵育48 h后,照相记录观察视野中细胞的最终位置。血细胞计数台中心计数线最小正方形边距为1/4 mm,边缘计数线最小长方形长为1/4×5 mm。在400×倍镜下测出20个细胞(从0-48 h间断

■相关报道

研究显示, PRL-3的表达与多种恶性肿瘤的淋巴管浸润、淋巴结转移和肿瘤分期有关,是预测胃癌进展的一个新的分子标志物,是结直肠癌肝转移唯一的独立预测因素。Kaplan-Meier生存曲线表明, PRL-3表达组患者预后要比PRL-3(-)组好, PRL-3表达程度与生存时间呈负相关。

观察相同的细胞)向划痕中心直线移动的距离, 统计学分析对照组和实验组各20个细胞移动距离有无差异。

1.2.4 细胞爬片原位杂交观察SoV对PRL-3 mRNA的表达影响: 普通血盖片打底及消毒后制作对照组和实验组细胞爬片。待细胞贴片后, 换液加入含0.5 $\mu\text{mol/L}$ SoV完全培养液, 对照组不加药。继续培养48 h后用含40 g/L多聚甲醛的固定液4℃固定10 min。杂交前按酒精梯度脱水及脱酒精到水。盖玻片上滴加30 g/L柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 37℃通透细胞片20 min, 后再用固定液室温下固定10 min, 蒸馏水洗3次。按每张细胞片20 μL 加预杂交液, 38℃孵育2-4 h。在杂交前将地高辛标记的cDNA探针(探针序列为5'-ccacatgcgctttctctccccgacacctcgtgcacttg-3', 上海生能博彩生物技术有限公司)在80℃短暂复性, 然后加入杂交液20 μL , 其浓度为5 $\mu\text{g/L}$ 。恒温箱38℃-42℃杂交过夜。杂交后在37℃下用不同浓度的SSC洗涤, 共4次。最后显色阶段分别滴加封闭液, 生物素化鼠抗地高辛抗体, SABC及生物素化过氧化物酶, 水洗后酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 采用 t 检验方法, 用SPSS10.0统计软件分析。

2 结果

2.1 细胞株中PRL-3蛋白差异性表达 Western blot检测结果如图1所示, PRL-3蛋白在Ls-174t、Colo-320、SW620、HRC-99、HRC-101细胞株中可见表达, 其中Ls-174t、Colo-320和HRC-99表达最强, SW620和HRC-101细胞表达次之。另两株细胞LoVo、CaCo-2未见PRL-3蛋白表达。Ls-174t细胞株在培养皿中悬浮生长, 不利于观察; HRC-99原代培养细胞还未建立稳定细胞株系; Colo-320细胞贴壁生长, 且形态较好, 所以我们选择其作为下一步干预实验的研究对象。

2.2 SoV作用后细胞迁移能力的变化 48 h后, 对照组细胞几乎铺满了划痕区域, 而SoV组细胞仅仅迁移了相当于4-7个细胞的距离, 细胞迁移速度远远低于对照组(图2A-D), 细胞的运动能力显著受抑制。在400 \times 倍镜下精确测量20个细胞在0 h到48 h间迁移距离, 计算对照组细胞迁移速度为39.12 \pm 10.11 $\mu\text{m/h}$, SoV为12.84 \pm 6.78 $\mu\text{m/h}$, 两组细胞迁移速度有非常显著差异($P<0.00001$, 图2E-F)。

2.3 细胞形态及PRL-3 mRNA的表达变化 倒置

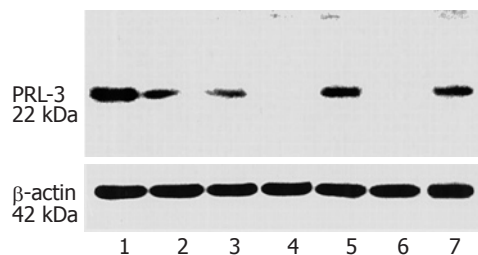


图1 PRL-3蛋白在结直肠癌细胞株中的差异性表达。1: HRC-99; 2: HRC-101; 3: SW620; 4: CaCo-2; 5: Colo-320; 6: LoVo; 7: Ls-174t。

显微镜下观察细胞形态, 对照组Colo-320细胞接种贴壁48 h进入指数生长期后, 细胞表现为高折光性, 呈长条梭形, 细胞相互紧密嵌合。原位杂交结果显示PRL-3 mRNA在胞质中强表达, 有些细胞还可看到胞核表达; SoV处理细胞48 h后可见明显的细胞损伤现象, 部分细胞表现为外形皱缩、变小变圆, 折光度下降, 细胞集落小且散在。原位杂交结果未见PRL-3 mRNA阳性表达(图3)。

3 讨论

钒属于化学元素周期表中VB族的过渡元素, 广泛存在于自然界中, 参与人体许多不同的生理过程, 如细胞的生长和分化、糖类及脂类的代谢等^[15]。SoV是金属钒化合物, 最初研究发现, SoV作用于糖尿病模型大鼠后产生明显的胰岛素样效应, 表现为血糖下降、糖原合成增强、糖脂代谢趋于平衡^[16-19]。其原因可能与SoV抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性有关。目前钒盐作为降血糖药物, 其口服制剂已完成临床I期试验, 进入II期试验阶段^[20-21]。

随着研究地深入, 人们发现SoV还可以通过改变酪氨酸磷酸酶功能区结构, 从而抑制酶的活性。核磁共振显示^[22-23], PRL-3酶活性中心在结合状态下是非常稳定的。在未与底物或抑制剂结合之前, 位于 $\beta 5$ 和 $\alpha 4$ 之间的磷酸盐结合环由于缺乏张力而不能很好地聚合, 这一区域核磁共振检测信号就很弱或无法检测。在加入SoV后, 由于离子从自由状态向结合状态转换, 活性位点环状区域检测到新的信号, 表明这些离子状态的底物通过配体与PRL-3结合, 使后者酶活性区域结构达到稳态。

为了了解SoV对肿瘤细胞运动能力的影响, 我们设计了Colo-320细胞爬片划痕实验。正如结果所示, 48 h后对照组细胞几乎铺满了划痕区域, 而SoV组细胞仅仅迁移了相当于4-7个细胞的距

■创新盘点

本文以PRL-3为靶点, 采用其相对特异性拮抗剂SoV抑制其活性, 观察其对结肠癌细胞迁移能力的影响, 同时提示PRL-3基因转录和酶活性受SoV双重抑制的作用机制, 目前尚未见报道。

■应用要点

本文观察到SoV作用结肠癌细胞后对细胞运动能力产生强烈的抑制效应,结合本课题组过去的研究报道,即SoV还对大肠癌细胞的增殖有抑制作用。这些研究作为将来可能将SoV应用于临床提供实验依据。

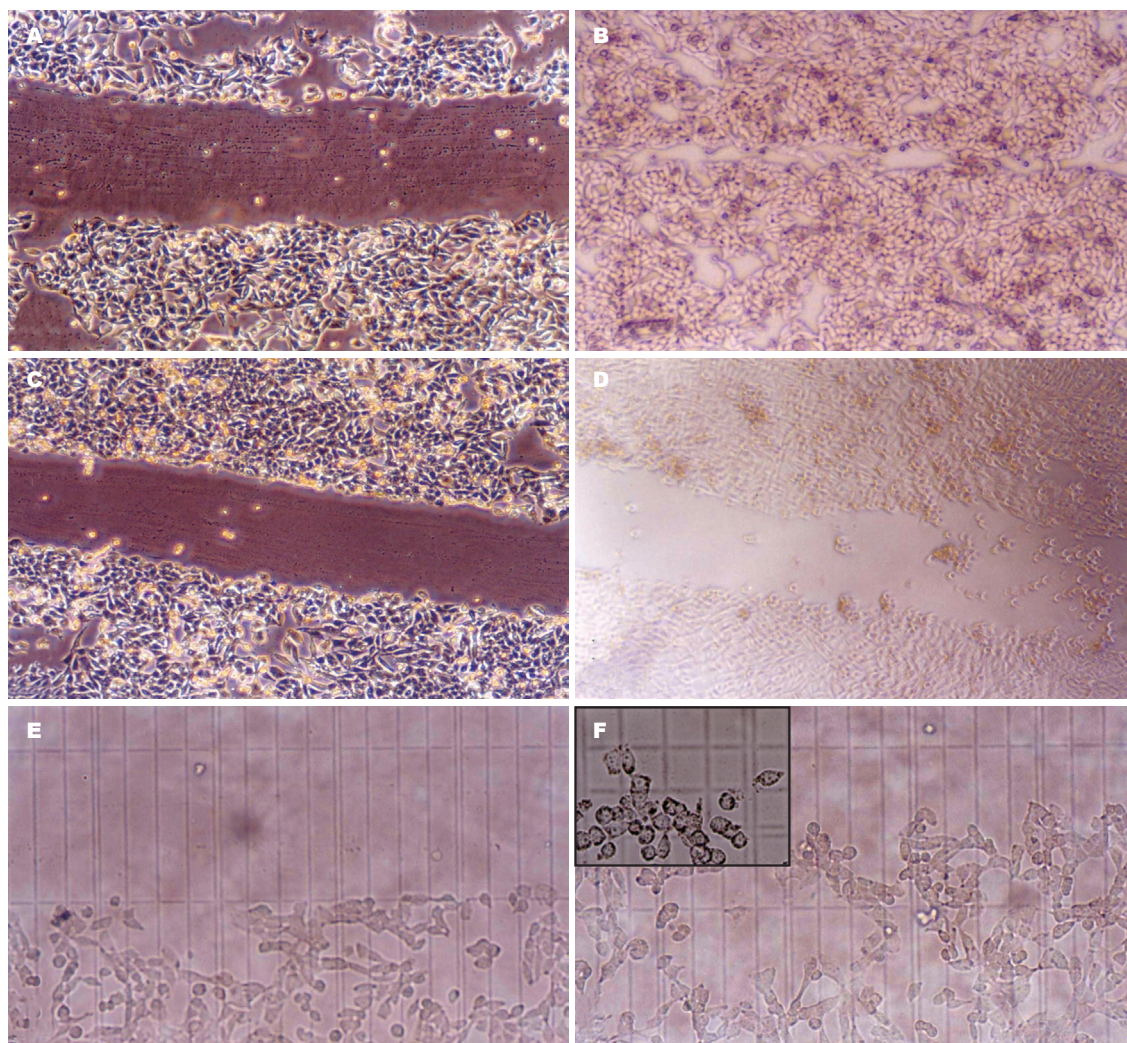


图2 SoV作用细胞后运动能力变化。A: 对照组0 h($\times 100$); B: 对照组48 h($\times 100$); C: SoV组0 h($\times 100$); D: SoV组48 h($\times 100$); E: 0 h细胞初始位置($\times 200$); F: SoV组48 h后细胞迁移位置($\times 200$)。

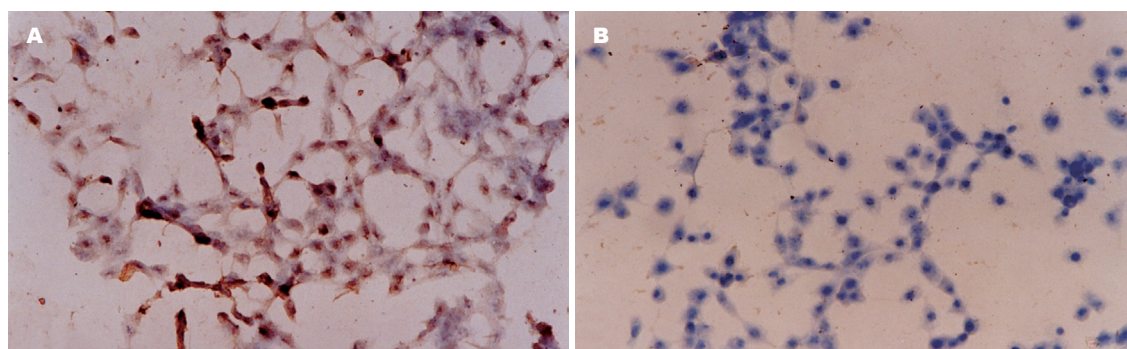


图3 Colo-320细胞在SoV作用后细胞形态改变及PRL-3 mRNA的表达(ISH $\times 200$)。A: 对照组PRL-3 mRNA表达强烈; B: SoV组未见PRL-3 mRNA表达。

离, 迁移速度远远低于对照组($P < 0.00001$)。Zeng *et al*^[8]观察到PRL-3主要聚集在细胞膜表面, 尤其是细胞膜的褶皱、突起以及空泡样延伸部分, 此外还可见于胞内肌动蛋白纤维上, 而这些结构在细胞的运动和浸润过程中起着重要的作用^[24-27]。由此推断, SoV通过对PRL-3酶活性抑制,

可能是遏制结肠癌细胞Colo-320运动能力的主要原因。

正常培养状态下Colo-320细胞表现为高折光性, 呈长条梭形, 细胞相互紧密嵌合细胞, ISH结果显示, PRL-3 mRNA在胞质中呈现强表达, 有些细胞还可看到胞核表达。SoV($0.5 \mu\text{mol/L}$)

处理细胞48 h后可见明显的细胞损伤现象, 部分细胞表现为外形皱缩、变小变圆, 折光度下降, 细胞集落小且散在。SoV作用细胞48 h后ISH未见PRL-3 mRNA阳性表达, 此结果提示SoV在转录水平抑制PRL-3 mRNA的表达。这一发现很有意义, 因为之前的报道均仅述及SoV在蛋白水平抑制PRL-3酶活性。药物影响基因表达的机制很复杂, 如调控离子流动、与染色体结合影响转录、调节受体传导通路等。SoV抑制PRL-3 mRNA表达可能也是抑制Colo-320癌细胞迁移能力的原因之一。

总之, 针对PRL-3能促进细胞生长增殖, 提高细胞迁移和浸润能力的特点, 我们应用PRL-3抑制剂SoV进行干预Colo-320细胞对PRL-3的表达, 观察到由此产生的对结肠癌细胞运动能力强烈的抑制效应, 同时提示PRL-3基因转录和酶活性受SoV双重抑制的作用机制。本实验为将来可能将SoV应用于临床提供实验依据。

4 参考文献

- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411: 355-365
- Tonks NK, Neel BG. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell* 1996; 87: 365-368
- Denu JM, Stuckey JA, Saper MA, Dixon JE. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* 1996; 87: 361-364
- Streuli M. Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 182-188
- Zhang ZY. Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2003; 73: 171-220
- Brown MS, Goldstein JL. Protein prenylation. Mad bet for Rab. *Nature* 1993; 366: 14-15
- Zeng Q, Si X, Horstmann H, Xu Y, Hong W, Pallen CJ. Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J Biol Chem* 2000; 275: 21444-21452
- Zeng Q, Dong JM, Guo K, Li J, Tan HX, Koh V, Pallen CJ, Manser E, Hong W. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis. *Cancer Res* 2003; 63: 2716-2722
- Matter WF, Estridge T, Zhang C, Belagaje R, Stancato L, Dixon J, Johnson B, Bloem L, Pickard T, Donaghue M, Acton S, Jeyaseelan R, Kadambi V, Vlahos CJ. Role of PRL-3, a human muscle-specific tyrosine phosphatase, in angiotensin-II signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 1061-1068
- Werner SR, Lee PA, DeCamp MW, Crowell DN, Randall SK, Crowell PL. Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* 2003; 202: 201-211
- Wu X, Zeng H, Zhang X, Zhao Y, Sha H, Ge X, Zhang M, Gao X, Xu Q. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am J Pathol* 2004; 164: 2039-2054
- Kato H, Semba S, Miskad UA, Seo Y, Kasuga M, Yokozaki H. High expression of PRL-3 promotes cancer cell motility and liver metastasis in human colorectal cancer: a predictive molecular marker of metachronous liver and lung metastases. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7318-7328
- Guo K, Li J, Tang JP, Koh V, Gan BQ, Zeng Q. Catalytic domain of PRL-3 plays an essential role in tumor metastasis: formation of PRL-3 tumors inside the blood vessels. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 945-951
- Pelassy C, Breitmayer JP, Aussel C. Inhibition of phosphatidylserine synthesis during Jurkat T cell activation. The phosphatase inhibitor, sodium ortho-vanadate bypasses the CD3/T cell receptor-induced second messenger signaling pathway. *Eur J Biochem* 2000; 267: 984-992
- Stern A, Yin X, Tsang SS, Davison A, Moon J. Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochem Cell Biol* 1993; 71: 103-112
- Cortizo AM, Caporossi M, Lettieri G, Etcheverry SB. Vanadate-induced nitric oxide production: role in osteoblast growth and differentiation. *Eur J Pharmacol* 2000; 400: 279-285
- Brichard SM, Henquin JC. The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 265-270
- Shafir E, Spielman S, Nachliel I, Khamaisi M, Bar-On H, Ziv E. Treatment of diabetes with vanadium salts: general overview and amelioration of nutritionally induced diabetes in the Psammomys obesus gerbil. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 55-66
- Thompson KH, Leichter J, McNeill JH. Studies of vanadyl sulfate as a glucose-lowering agent in STZ-diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 1549-1555
- Thompson KH, Orvig C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *J Inorg Biochem* 2006; 100: 1925-1935
- Thompson KH, Lichter J, LeBel C, Scaife MC, McNeill JH, Orvig C. Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future. *J Inorg Biochem* 2009; 103: 554-558
- Kozlov G, Cheng J, Ziomek E, Banville D, Gehring K, Ekiel I. Structural insights into molecular function of the metastasis-associated phosphatase PRL-3. *J Biol Chem* 2004; 279: 11882-11889
- Kozlov G, Cheng J, Lievre C, Banville D, Gehring K, Ekiel I. ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the human phosphatase PRL-3. *J Biomol NMR* 2002; 24: 169-170
- Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 112-120
- Mogilner A, Rubinstein B. The physics of filopodial protrusion. *Biophys J* 2005; 89: 782-795
- Atilgan E, Wirtz D, Sun SX. Mechanics and dynamics of actin-driven thin membrane protrusions. *Biophys J* 2006; 90: 65-76
- Le Clainche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 2008; 88: 489-513

■同行评价

本研究立意新颖, 方法得当, 分析合理, 研究有一定意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

海水浸泡降低血管内皮细胞迁移能力并抑制血管生成

熊鸣, 曲佳, 周兰萍, 张达矜, 乔媛媛, 胡明, 赵晓航

■背景资料

在前期研究中, 借助于实时定量PCR芯片技术, 我们发现海水浸泡能够广泛引起血管内皮细胞重要功能基因的差异表达, 包括细胞运动、血管生成在内的由血管内皮细胞参与的多种病理生理过程可能发生障碍。因此, 本文拟从功能验证的角度, 着重观察海水浸泡对血管内皮细胞迁移和血管生成功能的影响。

熊鸣, 曲佳, 张达矜, 乔媛媛, 胡明, 赵晓航, 中国人民解放军海军总医院基础医学研究中心 北京市 100048
周兰萍, 赵晓航, 中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021
熊鸣, 2007年武汉大学医学硕士, 主要从事海水浸泡伤致伤机制研究。

总后医药卫生科研计划基金资助项目, No. 06MB022

海后司令部科研计划基金资助项目, No. 07-3309

国家重点基础研究发展计划“973”基金资助项目, No. 2004CB518707

作者贡献分布: 主要实验操作由熊鸣、曲佳及周兰萍完成; 数据分析由熊鸣、曲佳、张达矜及乔媛媛完成; 免疫组织化学分析和评分由胡明完成; 熊鸣起草论文, 赵晓航负责实验设计、论文修改及审阅。

通讯作者: 赵晓航, 研究员, 100048, 北京市海淀区阜成路6号, 中国人民解放军海军总医院基础医学研究中心。

xhztiao@126.com

电话: 010-66958332 传真: 010-68780060

收稿日期: 2009-06-02 修回日期: 2009-07-13

接受日期: 2009-07-20 在线出版日期: 2009-07-28

Seawater immersion depresses the migration of vascular endothelial cell and inhibits angiogenesis

Ming Xiong, Jia Qu, Lan-Ping Zhou, Da-Jin Zhang, Yuan-Yuan Qiao, Ming Hu, Xiao-Hang Zhao

Ming Xiong, Jia Qu, Da-Jin Zhang, Yuan-Yuan Qiao, Ming Hu, Xiao-Hang Zhao, Center of Basic Medical Science, Navy General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Lan-Ping Zhou, Xiao-Hang Zhao, State Key Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute & Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Supported by: the Medical and Health Science Program of Chinese PLA GLD, No. 06MB0022; the Scientific Research Program of Naval Logistics Command, No. 07-3309; and the Major State Basic Research Development Program of China (973), No. 2004CB518707

Correspondence to: Xiao-Hang Zhao, Center of Basic Medical Science, Navy General Hospital of Chinese PLA, 6 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100037, China. xhztiao@126.com

Received: 2009-06-02 Revised: 2009-07-13

Accepted: 2009-07-20 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of seawater immersion on vascular endothelial cell migration and angiogenesis.

METHODS: A scratch wound model was estab-

lished using ECV304 cells. Cells were divided into control group (immersed in normal saline) and experimental group (immersed in seawater). Cell migration was examined using the scratch wound healing recovery assay. A nude mouse xenograft model was developed by subcutaneous inoculation of esophageal squamous cells (ECO156) in nude mice. Tumors were also divided into control group (immersed in normal saline) and experimental group (immersed in seawater). Tumor volume and weight were measured, and tumor growth curves were plotted. Neovascular vessels surrounding the tumor were observed, and microvessel density was detected by immunohistochemical staining.

RESULTS: After seawater immersion, ECV304 cells lost their normal morphology, and showed obvious dehydration with the prolongation of immersion duration. Seventeen hours after wounding, the scratch wound in the control group had almost completely healed, while that in the experiment group was still obvious, suggesting that the healing of scratch wound in the experiment group was delayed significantly and the migration of cells was depressed. The microvessel density in the experiment group was significantly lower than that in the control group (1.20 ± 0.44 vs 3.20 ± 0.83 , $P < 0.05$). Compared with the control group, tumors in the experiment group grew slowly and had significantly smaller size ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Seawater immersion may depress the migration of vascular endothelial cells and inhibit angiogenesis.

Key Words: Seawater immersion; Vascular endothelial cell; Angiogenesis; Cell migration

Xiong M, Qu J, Zhou LP, Zhang DJ, Qiao YY, Hu M, Zhao XH. Seawater immersion depresses the migration of vascular endothelial cells and inhibits angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2152-2158

摘要

目的: 观察海水浸泡对血管内皮细胞迁移和

■同行评议者

汪思应, 教授, 安徽医科大学实验动物中心

血管生成的影响, 为探讨海水致伤机制、制定科学救治原则提供实验依据。

方法: 建立ECV304细胞划痕创伤模型, 分别给予生理盐水和人工海水浸泡处理, 划痕创伤愈合修复分析观察细胞迁移能力; 建立人食管鳞癌EC0156裸鼠皮下移植瘤模型, 分别给予生理盐水和人工海水干预, 监测肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线, 观察肿瘤边缘血管的生成, 免疫组织化学染色检测肿瘤组织内微血管密度。

结果: 海水浸泡后, ECV304细胞失去正常形态, 并随浸泡时间的延长, 呈明显“脱水”状态。在划痕后17 h, 对照组划痕已基本愈合, 而实验组仍可见清晰划痕, 且以实验4 h组划痕尤其明显。与对照组相比, 实验组细胞划痕愈合明显延迟, 细胞迁移能力降低; 与对照组相比实验组肿瘤边缘新生血管较少, 前者肿瘤边缘新生血管较丰富, 两者有显著性差异(微血管密度值: 1.2 ± 0.44 vs 3.2 ± 0.83 , $P < 0.05$)。实验组肿瘤生长缓慢, 肿瘤体积较小($P < 0.05$)。

结论: 海水浸泡能够降低血管内皮细胞迁移能力并抑制血管生成。

关键词: 海水浸泡; 血管内皮细胞; 血管生成; 细胞迁移

熊鸣, 曲佳, 周兰萍, 张达黔, 乔媛媛, 胡明, 赵晓航. 海水浸泡降低血管内皮细胞迁移能力并抑制血管生成. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2152-2158

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2152.asp>

0 引言

21世纪是海洋世纪, 也是我国海洋经济可持续发展的时代, 伴随着各类海洋产业的蓬勃发展, 海上事故的发生频率日益增高, 如何开展科学有效的海上救援成为亟待解决的问题。由于海水具有高盐、高渗、偏碱等特点, 在这种特殊环境条件下落水人员易遭受创伤和海水浸泡的复合打击, 伤情进展和致伤机制与陆地伤明显不同^[1]。研究发现, 腹部开放伤合并海水浸泡情况下, 海水直接损伤创伤局部组织血管, 或通过腹膜透析作用进入体内, 使循环系统处于高盐、高渗状态, 机体内环境稳态被破坏, 大量修复细胞, 尤其是血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)的结构和功能受损, 创伤愈合明显延迟, 伤员救治也更为复杂^[2-3]。本课题组在前期的研究中, 借助于实时定量PCR

芯片技术发现海水浸泡能够广泛引起血管内皮细胞重要功能基因表达改变。其中, E选择素(selectin E, SELE)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、凝血酶敏感蛋白-1(thrombospondin 1, TSP-1)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases, MMP-9)等一系列与细胞运动、血管生成相关的基因均出现了不同程度的差异表达^[4]。因此, 在前期工作基础上, 进一步观察海水浸泡对血管内皮细胞迁移和血管生成的影响, 为探讨海水致伤机制、制定科学救治原则提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 实验用健康♀Bab/c裸鼠, 周龄5 wk, 体重15-16 g, 共18只, 由中国医学科学院实验动物研究所繁育厂提供。DMEM培养基购自Gibco/BRL公司; 胰酶购自Promega公司; SP试剂盒、EDTA抗原修复液(pH9.0)和DAB试剂盒购自迈新公司; 兔抗人VWF多克隆抗体购自DakoCytomation公司。

1.2 方法

1.2.1 人工海水配制: 实验用人工海水参照国家海洋局第三研究所标准^[3]配制, 主要指标为: 渗透压 1250.00 ± 11.52 mOsm/L, pH8.2, 钠离子浓度 630.00 ± 5.33 mmol/L, 钾离子浓度 10.88 ± 0.68 mmol/L, 氯离子浓度 658.80 ± 5.25 mmol/L。

1.2.2 细胞培养: 人食管鳞癌细胞系EC0156由中国医学科学院肿瘤研究所建系^[5], 人脐静脉内皮细胞系ECV304购自中国医学科学院细胞中心, 2种细胞均培养于DMEM培养基中, 含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L青霉素和100 g/L链霉素, 置于50 mL/L CO₂的37℃孵箱内培养, 每3-4 d传代1次。

1.2.3 ECV304细胞划痕创伤模型的建立: 处于对数生长期的ECV304细胞经2.5 g/L的胰酶消化后, 与含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基混合, 制成单细胞悬液, 按每孔约 3×10^5 细胞密度均匀接种于预先放置有0.01%多聚赖氨酸包被的无菌盖玻片的6孔细胞培养板中, 37℃培养至细胞融合率达到60%-70%时, 用无菌200 μL枪头沿细胞层纵轴作两道平行的划痕, 造成单层融合细胞划痕创伤模型^[6-7]。

1.2.4 划痕创伤愈合修复分析观察海水浸泡对ECV304细胞迁移能力的影响: 弃去旧的培养液, 每孔加入1 mL含200 mL/L胎牛血清的新鲜DMEM培养液, 37℃孵育15 min。沿划痕边缘等

■ 研发前沿

血管内皮细胞迁移和血管生成是创伤愈合过程中的关键步骤, 通过观察海水浸泡的影响, 有助于阐明海水浸泡延缓创伤愈合的可能机制, 为探讨海水致伤机制、制定科学救治原则提供实验依据。

■相关报道

宁浩勇 *et al* 在海水浸泡对伤口愈合时间影响的动物实验中也发现, 创伤合并海水浸泡后, 血管内皮细胞、成纤维细胞等修复细胞功能受损, 伤口血管化程度降低, 肉芽组织成熟缓慢, 伤口愈合时间明显延迟. 该研究与本文的结果具有一致性.

间距作4个标记作为观察点, 倒置显微镜下拍照, 此时划痕宽度作为划痕初始宽度(时间记为0 h). 根据不同处理因素随机分为对照组和实验组, 对照组每孔补加1 mL生理盐水, 实验组每孔补加1 mL人工海水, 轻轻混匀; 根据不同处理时间, 每组又进一步分为2 h处理组和4 h处理组, 各组均设3个平行对照孔. 置于37℃孵育继续培养相应时间后, 在上述标记的4个相同观察点拍照, 然后用1×PBS轻轻洗3次, 更换2 mL含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液继续培养. 每隔4 h拍照1次, 直至划痕愈合或基本愈合, 结束观察. 各处理组划痕的愈合速度即反映各组细胞的迁移能力^[6-7].

1.2.5 EC0156裸鼠皮下移植瘤模型的建立和分组处理: 处于对数生长期的EC0156细胞经2.5 g/L胰酶消化后与1×PBS混合, 制成单细胞悬液, 按每只 1×10^7 细胞接种于裸鼠背部右后肢外侧皮下. 从接种当日(即接种后0天)算起, 至第7天, 全部裸鼠均存活并出现皮下可触摸的质硬肿块. 用游标卡尺测量肿瘤结节的长(l)和宽(b)(精确度0.002 cm), 按公式 $V = lb^2/2$ 计算肿瘤体积. 根据肿瘤体积大小进行配对并随机分为2组, 对照组和实验组, 每组8只, 分别依次编号并做好标记. 对照组经肿瘤包膜于肿瘤底部注射生理盐水, 每只500 μ L, 实验组经肿瘤包膜于肿瘤底部注射等量人工海水, 形成大小较对称的水泡, 均匀包围整个肿瘤. 2 h后水泡基本吸收, 重复前面操作, 分别再次注射500 μ L生理盐水和人工海水. 定期观察裸鼠精神状态、饮食及排便情况. 分别于第10天、第12天测量肿瘤体积大小, 取每组6只裸鼠肿瘤体积的平均值绘制肿瘤生长曲线. 第12天结束观察, 麻醉处死裸鼠, 手术切开肿瘤周围皮肤, 观察肿瘤血管生成情况并拍照, 然后将肿瘤完整剥离下来, 称质量并测量肿瘤大小. 将肿瘤组织分为2份保存, 1份置于液氮冻存备用, 另1份以甲醛溶液固定常规石蜡包埋, 用于免疫组织化学染色.

1.2.6 肿瘤组织内微血管密度检测: 通过VWF免疫组织化学染色显示裸鼠移植瘤中微血管, 具体方法参考试剂盒说明书进行, 主要步骤如下: (1)石蜡包埋组织4 μ m厚连续切片, 常规脱蜡和水化; (2)EDTA抗原修复液热修复20 min, 冷却至室温, 1×PBS漂洗; (3)内源性过氧化物酶阻断剂室温下孵育10 min, 1×PBS漂洗; (4)正常非免疫羊血清封闭, 室温下孵育10 min; (5)1:400稀释的兔抗人VWF多克隆抗体4℃孵育过夜, 阴

性对照以1×PBS代替, 1×PBS漂洗; (6)1:200生物素标记的羊抗兔IgG室温下孵育10 min, 1×PBS漂洗; (7)过氧化物酶标记的链霉素抗生物素室温下孵育10 min, 1×PBS漂洗; (8)DAB显色, 蒸馏水冲洗, 结晶紫复染; (9)梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察并收集图像. 微血管密度计数参照Weidner方法^[8-10]进行, 先在低倍(×4)镜下扫视整个切片, 寻找血管密集区, 再在高倍(×20)镜下计数被VWF抗体染成棕黄色的微血管数目, 结果用5个20倍视野下微血管数目的平均数表示.

统计学处理 计量资料以mean±SD表示, 组间比较用*t*检验, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 为有极显著性差异.

2 结果

2.1 海水浸泡对ECV304细胞迁移能力的影响 在细胞划痕创伤模型的基础上, 2组细胞分别给予生理盐水和人工海水处理, 结果显示: (1)与正常培养的ECV304细胞相比, 对照组经生理盐水浸泡2 h后, 细胞形态无明显变化, 浸泡4 h后, 少数细胞胞体略变细长, 更换正常培养液后2 h内细胞形态即可恢复正常; 而实验组经人工海水浸泡2 h后, 细胞出现皱缩, 胞体变细长, 细胞间隙增大, 更换正常培养液后12 h细胞形态基本恢复; 浸泡4 h后, 细胞进一步皱缩, 胞体失去正常的立体结构, 部分细胞核变小, 呈明显“脱水”状态, 细胞间隙进一步增大, 更换正常培养液后12 h细胞形态仍未恢复(图1). (2)在划痕后17 h, 对照组划痕已基本愈合, 而实验组仍可见清晰划痕, 且以4 h实验组划痕尤为明显(图2), 提示海水浸泡能够降低ECV304细胞迁移能力, 延缓划痕创伤愈合.

2.2 裸鼠移植瘤的生长 从接种当日(即接种后0 d)算起, 至第7天, 全部裸鼠均存活并出现皮下可触摸的质硬肿块, 成瘤率100%. 根据肿瘤体积大小均匀配对分组, 对照组和实验组平均肿瘤体积无显著性差异. 此后, 分别给予生理盐水和人工海水处理, 随着时间的延长, 两组肿瘤体积在第10天开始出现显著性差异($P < 0.05$), 至第12天, 两者差异具有极显著性($P < 0.01$, 表1). 以接种后天数为横坐标, 肿瘤体积大小为纵坐标, 取每组8只裸鼠肿瘤体积的平均值绘制肿瘤生长曲线. 结果如图3所示, 对照组肿瘤呈递增性生长, 而实验组肿瘤在人工海水处理后, 起初生长明显受抑制, 第10天与第7天相比, 肿瘤体积无明显增大, 甚至略有缩小, 随后开始增大, 但

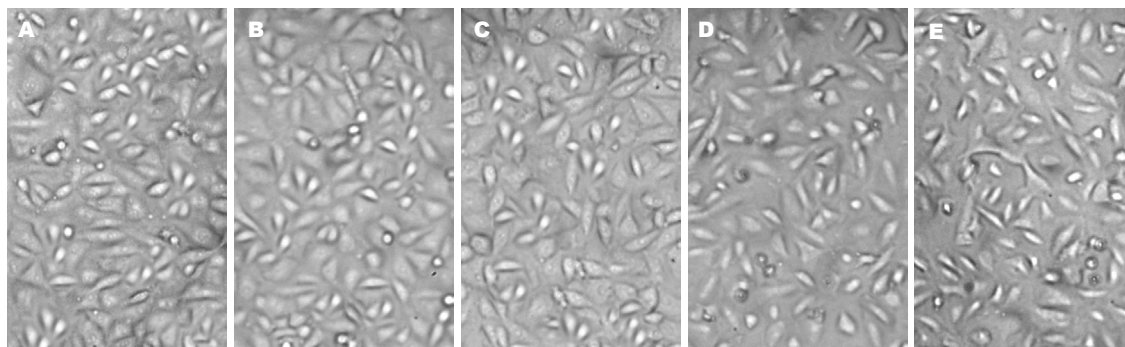


图1 不同处理组ECV304细胞形态($\times 100$). A: 正常细胞; B: 2 h对照组; C: 4 h对照组; D: 2 h实验组; E: 4 h实验组.

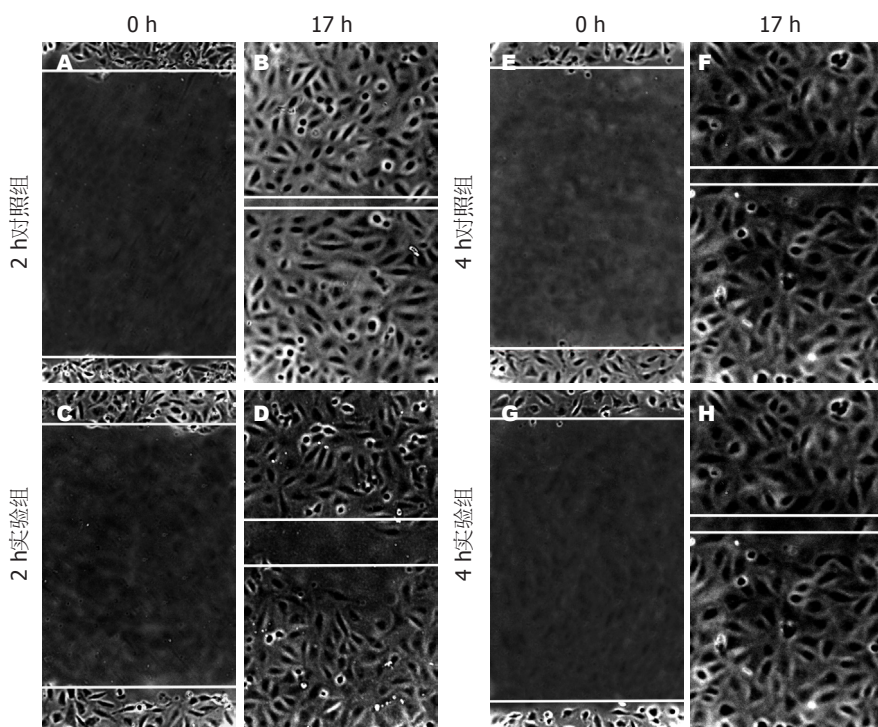


图2 划痕创伤愈合实验结果($\times 100$). 图中白色直线标记的是划痕边缘, 2条直线之间的间距代表划痕宽度. A-B: 2 h对照组初始划痕和培养17 h时划痕; C-D: 2 h实验组初始划痕和培养17 h时划痕; E-F: 4 h对照组初始划痕和培养17 h时划痕; G-H: 4 h实验组初始划痕和培养17 h时划痕.

■创新盘点

本课题组在前期的研究中, 通过血管内皮功能相关基因实时定量PCR芯片分析, 发现海水浸泡能够导致一系列与细胞运动、血管生成相关基因的表达改变. 因此, 本研究在此基础上, 通过内皮细胞功能实验, 进一步观察海水浸泡对血管内皮迁移和血管生成的影响. 从基因表达水平及其功能分析两方面, 为认识海水致伤分子机制提供了实验依据.

表1 肿瘤经生理盐水和海水处理后裸鼠肿瘤体积变化 (mean \pm SD)

分组	肿瘤体积 (mm ³)		
	第7天	第10天	第12天
对照组	42.67 \pm 22.52	77.63 \pm 32.05	194.59 \pm 70.49
实验组	47.25 \pm 19.88	45.48 \pm 31.12 ^a	87.88 \pm 22.46 ^b

^a $P < 0.05$ vs 第10天对照组; ^b $P < 0.01$ vs 第12天对照组.

生长速度仍明显慢于对照组肿瘤. 接种后第12天, 麻醉处死裸鼠, 将肿瘤完整剥离下来, 称质量, 对照组和实验组肿瘤质量分别为 0.055 ± 0.03 g和 0.02 ± 0.01 g, 两者相比有显著性差异($P < 0.05$). 与对照组相比, 实验组肿瘤生长缓慢, 肿瘤体积较小.

2.3 肿瘤周围新生血管 接种后第12天观察肿瘤周围新生血管. 结果如图4所示, 对照组裸鼠肿

瘤呈鲜红色, 周围血管丰富, 血管分支较密集, 并从瘤体边缘向瘤体内伸展, 瘤体内可见明显的微小血管网. 实验组裸鼠肿瘤呈淡粉色, 周围血管较少, 血管分支稀疏, 少有达到瘤体边缘, 瘤体内仅见少量细小血管, 无明显可见的微小血管网.

2.4 肿瘤组织内微血管密度 通过VWF免疫组织化学染色进一步显示肿瘤组织内微血管(图5), VWF特异性表达于呈线性排列的血管内皮细胞胞质中, 呈弥漫性棕黄色(图中箭头所示). 肿瘤组织内微血管主要分布于肿瘤间质中. 在相同大小的视野下, 对照组血管密度较高, 而实验组血管密度较低, 结果与图4一致. 进一步通过统计学分析, 对照组微血管密度值为 3.2 ± 0.83 , 实验组微血管密度值为 1.2 ± 0.44 , 两者相比具有显著性差异($P < 0.05$). 上述结果提示海水能够抑制血管生成.

■应用要点

认识海水致伤分子机制, 为制定海难或战伤落水伤员的救治原则提供科学依据。

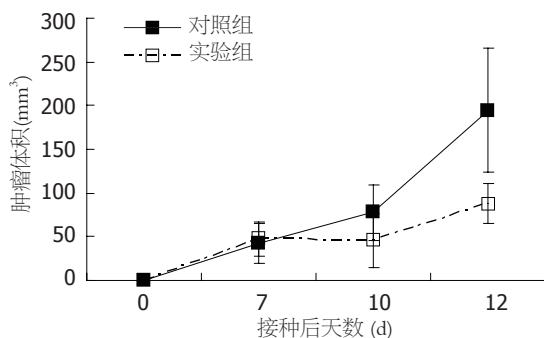


图 3 2组裸鼠肿瘤生长曲线。

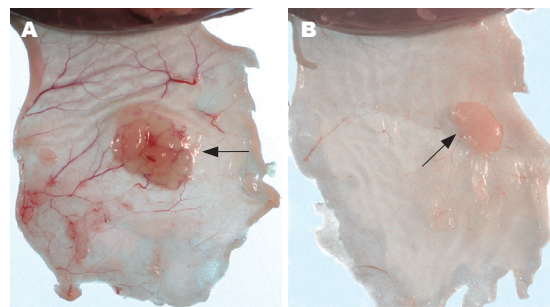


图 4 肿瘤周围新生血管. 图中箭头所指为肿瘤. A: 对照组; B: 实验组。

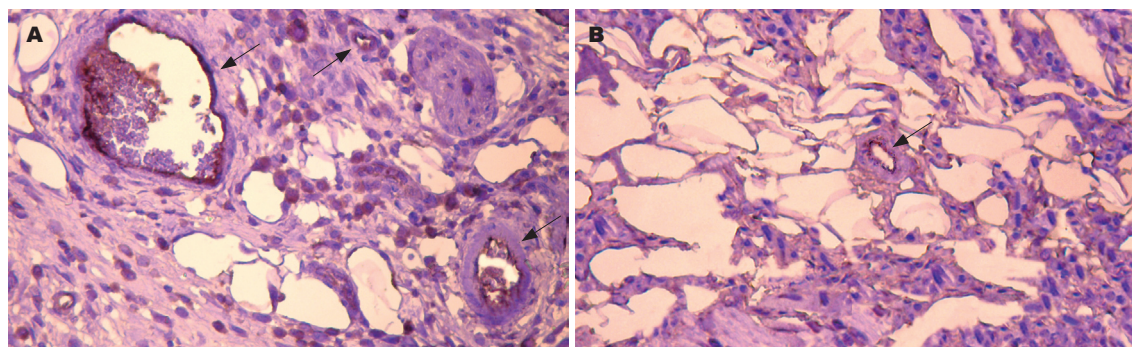


图 5 VWF免疫组织化学染色示肿瘤组织内微血管($\times 200$). 图中箭头所示为微血管, 可见VWF特异性表达于呈线性排列的血管内皮细胞胞质中, 呈弥漫性棕黄色. A: 对照组; B: 实验组。

3 讨论

血管生成(angiogenesis)是指从已存在的血管中以萌芽的方式形成新生血管的过程. 他是许多生理和病理过程, 包括胚胎发育, 创伤愈合, 组织再生和肿瘤生长所必需的基本步骤^[11-12]. 该过程受到促血管生成因子(如VEGF, 碱性成纤维细胞生长因子等)和抗血管生成因子(如TSP-1, 纤溶酶原活化抑制剂-1等)之间严格平衡的调节, 并包含多种细胞协同参与的一系列级联事件^[13-15]. 已有的研究表明, 在血管生成过程中, 血管内皮细胞是最重要的细胞, 通过分泌多种酶、黏附分子、促/抗血管生成因子, 定向迁移和增殖等作用参与了血管生成的全过程. 其中, 血管内皮细胞脱离基底膜, 向促血管生成因子迁移被认为是新生血管形成的始动环节^[16-17].

本研究首先用观察细胞迁移和生物学功能的经典方法划痕创伤愈合修复分析^[6], 观察了海水浸泡对血管内皮细胞迁移的影响. 通过ECV304细胞划痕创伤模型, 观察并比较了生理盐水浸泡和海水浸泡对ECV304细胞形态和划痕创伤愈合功能的影响. 结果显示, 生理盐水处理后细胞形态无明显改变, 或仅发生轻微改变, 更换正常培养基后短期内形态即可恢复正常; 而细胞经海水处理后, 细胞形态皱缩, 细胞间隙增

大, 呈“脱水”样改变, 并随着浸泡时间延长而加剧, 更换正常培养基后细胞形态恢复时间显著延长. 提示, 海水高钠、高渗导致ECV304细胞脱水, 细胞内液大量丢失, 细胞结构受损, 并且随着浸泡时间延长, 受损程度逐渐加重, 并且更换正常培养基后恢复时间也相应延长. 而细胞经等渗生理盐水浸泡, 细胞形态虽然也发生一些轻微变化, 可能只是细胞在无营养状态下的一种自我保护形式, 细胞受损不严重, 因此在更换正常培养基后, 细胞迅速恢复正常形态^[18-19]. 观察细胞划痕愈合实验, 在划痕后17 h, 对照组划痕已基本愈合, 而实验组仍可见清晰划痕, 并且以实验4 h组划痕尤为明显. 提示, 海水浸泡使ECV304细胞结构的改变导致了细胞功能障碍, 表现在细胞迁移能力降低, 细胞划痕愈合明显延迟. 推测其原因, 可能由于高渗海水导致细胞内液大量丢失, 细胞核和线粒体、高尔基体等重要细胞器结构受损, 细胞能量代谢和蛋白质合成障碍, 并且随着浸泡时间延长损伤程度逐渐加重^[20-23]. 在更换正常培养基后, 细胞功能短期内不能完全恢复, 因此细胞运动能力降低, 划痕愈合延迟, 并且延迟程度与细胞浸泡时间呈正相关.

进一步借助裸鼠皮下移植瘤模型, 观察海水浸泡对血管生成的影响^[24]. 结果显示, 对照组

肿瘤边缘新生血管较丰富, 瘤体内微血管密度值为 3.2 ± 0.83 , 而实验组肿瘤边缘新生血管较少, 瘤体内微血管密度值为 1.2 ± 0.44 , 两者具有显著性差异($P < 0.05$)。与对照组相比, 实验组肿瘤生长缓慢, 肿瘤体积较小。提示海水浸泡能够抑制血管生成, 而肿瘤血管生成是维持肿瘤血供、促进肿瘤生长的必要条件^[25]。该结果进一步验证了我们前期有关海水对大鼠肠系膜血管内皮功能基因表达影响的研究, 提示海水浸泡可以影响血管生成相关基因的表达^[4]。也与宁浩勇 *et al* 的研究结果一致, 即创伤合并海水浸泡后, 修复细胞功能受损, 伤口血管化程度降低, 伤口愈合时间明显延迟^[3]。

已知血管生成是创伤愈合过程中的必需步骤, 该过程受到促血管生成因子和抗血管生成因子间严格的调节。在前期的工作中, 我们发现海水浸泡引起VEGF、TSP-1、MMP-9等一系列重要的促/抗血管生成基因的表达改变。本研究通过功能性实验进一步证实了海水浸泡能够抑制体内血管生成, 而这可能是其延缓伤口愈合的重要原因之一。同时, 在创伤愈合中, 血管内皮细胞作为重要的修复细胞, 参与了血管生成的全过程^[26-28], 尤其是内皮细胞脱离基底膜、向促血管生成因子迁移的过程被认为是新生血管形成的始动环节。因此, 海水浸泡能够抑制血管内皮细胞迁移, 可能是其抑制血管生成的原因之一。

此外, 血管内皮细胞作为血液与组织间代谢交换的重要屏障, 还具有重要的内分泌功能, 参与维持血流动力学平衡、形成抗血栓表面以及免疫与炎症反应等重要病理生理活动^[29-30]。我们在研究中发现, 海水浸泡能够导致血管内皮细胞损伤, 不仅体现在细胞结构的破坏, 而且还能广泛引起内皮细胞重要功能基因的表达改变。因此, 除了血管生成以外, 包括凝血、炎症反应在内的由血管内皮细胞参与的多种病理生理过程均可能发生障碍, 而这都将加重创伤的病理过程, 导致伤口愈合延缓^[31-32]。

总之, 本研究的结果表明, 海水浸泡能够降低血管内皮细胞迁移能力, 并抑制血管生成。

4 参考文献

- 1 虞积耀, 赖西南. 海战伤合并海水浸泡伤的伤情特点及救治技术研究进展. 解放军医学杂志 2004; 29: 1017-1019
- 2 沈宏亮, 王强. 海水浸泡创伤病理生理学变化和救治措施的研究进展. 第二军医大学学报 2003; 24: 1365-1367
- 3 宁浩勇, 孟宇宏, 王大鹏, 刘肖, 杨兴东, 尚立群, 姜

- 涛, 虞积耀. 海水浸泡对伤口愈合时间影响的动物实验观察. 中华航海医学与高气压医学杂志 2008; 15: 82-84
- 4 张达矜, 曲佳, 熊鸣, 乔媛媛, 王大鹏, 虞积耀, 赵晓航. 海水浸泡对血管内皮功能基因的影响. 解放军医学杂志 2009; 34: 88-93
- 5 Wang Q, Xu Y, Zhao X, Chang Y, Liu Y, Jiang L, Sharma J, Seo DK, Yan H. A facile one-step in situ functionalization of quantum dots with preserved photoluminescence for bioconjugation. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 6380-6381
- 6 Liang XJ, Choi Y, Sackett DL, Park JK. Nitrosoureas inhibit the stathmin-mediated migration and invasion of malignant glioma cells. *Cancer Res* 2008; 68: 5267-5272
- 7 Bindschadler M, McGrath JL. Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics. *J Cell Sci* 2007; 120: 876-884
- 8 Bahramsoltani M, Plendl J, Janczyk P, Custodis P, Kaessmeyer S. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in vivo, ex vivo and in vitro - an overview. *ALTEX* 2009; 26: 95-107
- 9 Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 9-19
- 10 Staton CA, Reed MW, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 2009; 90: 195-221
- 11 Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-936
- 12 Chan LK. Current thoughts on angiogenesis. *J Wound Care* 2009; 18: 12-14, 16
- 13 Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005; 9: 777-794
- 14 Gill SE, Parks WC. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1334-1347
- 15 Krady MM, Zeng J, Yu J, MacLauchlan S, Skokos EA, Tian W, Bornstein P, Sessa WC, Kyriakides TR. Thrombospondin-2 modulates extracellular matrix remodeling during physiological angiogenesis. *Am J Pathol* 2008; 173: 879-891
- 16 Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Angel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2224-2243
- 17 Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 2007; 100: 782-794
- 18 Zhang A, Xu LX, Sandison GA, Cheng S. Morphological study of endothelial cells during freezing. *Phys Med Biol* 2006; 51: 6047-6060
- 19 Parolari A, Sala R, Antona C, Bussolati O, Alamanni F, Mezzadri P, Dall'Asta V, Gazzola GC, Biglioli P. Hypertonicity induces injury to cultured human endothelium: attenuation by glutamine. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1770-1775
- 20 Malek AM, Xu C, Kim ES, Alper SL. Hypertonicity triggers RhoA-dependent assembly of myosin-containing striated polygonal actin networks in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C1645-C1659
- 21 Chen L, Wu Q, Guo F, Xia B, Zuo J. Expression of Dishevelled-1 in wound healing after acute myocardial infarction: possible involvement in myofibroblast proliferation and migration. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 257-264
- 22 Real C, Caiado F, Dias S. Endothelial progenitors

■同行评价

本研究选题新颖, 设计合理, 具有较好的实际应用价值。

- in vascular repair and angiogenesis: how many are needed and what to do? *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2008; 8: 185-193
- 23 Yan H, Lai XN, Ge HJ. Comparative study on effects of burn-blast combined injury and burn-firearm combined injury complicated with seawater immersion on vascular endothelial cells. *Chin J Traumatol* 2005; 8: 147-150
- 24 陈坚, 钟良, 钱立平, 蒋蔚茹, 黄剑平, 秋冬妮. 丹参酮 II A 磺酸钠对 MKN-45 胃癌裸鼠移植瘤增殖及血管生成的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2507-2511
- 25 Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29: 15-18
- 26 Tamura K, Hashimoto K, Suzuki K, Yoshie M, Kutsukake M, Sakurai T. Insulin-like growth factor binding protein-7 (IGFBP7) blocks vascular endothelial cell growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in human vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 2009; 610: 61-67
- 27 Xueyong L, Shaozong C, Wangzhou L, Yuejun L, Xiaoxing L, Jing L, Yanli W, Jinqing L. Differentiation of the pericyte in wound healing: The precursor, the process, and the role of the vascular endothelial cell. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 346-355
- 28 Lee JG, Kay EP. FGF-2-induced wound healing in corneal endothelial cells requires Cdc42 activation and Rho inactivation through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1376-1386
- 29 Suzuki Y, Mogami H, Ihara H, Urano T. Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. *Blood* 2009; 113: 470-478
- 30 Ma L, Francia G, Vilorio-Petit A, Hicklin DJ, du Manoir J, Rak J, Kerbel RS. In vitro procoagulant activity induced in endothelial cells by chemotherapy and antiangiogenic drug combinations: modulation by lower-dose chemotherapy. *Cancer Res* 2005; 65: 5365-5373
- 31 Fan ZF, Wang JH, Li ZQ, Yi CH. [Influence of sea water immersion on inflammation and healing of the wounds in scalded rats] *Zhonghua Shaoshang Zazhi* 2006; 22: 215-217
- 32 Wang Y, Lu E, Yu J, Li H, Wang D, Zhou Z. [Hemodynamic and pathologic changes in open abdominal wound after seawater immersion in dog] *Zhonghua Waikexue Zazhi* 2000; 38: 700-702

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

^{18}F -FDG PET/CT对进展期胃癌治疗前评估的可行性

王欣, 于丽娟, 王大龙, 贾承晔, 田墨涵

王欣, 于丽娟, 王大龙, 贾承晔, 田墨涵, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院PET-CT中心 黑龙江省哈尔滨市 150081
王欣, 副主任医师, 主要研究方向为肿瘤的功能影像及分子影像研究。

黑龙江省卫生厅科研基金资助项目, No. 2006-187
哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内科研启动基金资助项目, No. JJ2009-13

作者贡献分布: 此课题由王欣设计; 研究过程由王欣、于丽娟及王大龙操作完成; 数据分析由王欣、贾承晔及田墨涵完成; 本文写作由王欣完成。

通讯作者: 王欣, 副主任医师, 150081, 黑龙江省哈尔滨市哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院PET-CT中心。
lxl20040130@163.com.cn

电话: 0451-86298556

收稿日期: 2009-05-14 修回日期: 2009-06-25

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-07-28

Feasibility of using ^{18}F -FDG PET/CT for pretherapeutic evaluation of advanced gastric cancer

Xin Wang, Li-Juan Yu, Da-Long Wang, Cheng-Ye Jia, Mo-Han Tian

Xin Wang, Li-Juan Yu, Da-Long Wang, Cheng-Ye Jia, Mo-Han Tian, PET-CT Center, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Scientific Research Program of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2006-187; and the Scientific Research Priming Foundation of Tumor Hospital of Harbin Medical University, No. JJ2009-13

Correspondence to: Dr. Xin Wang, PET-CT Center, the Affiliated Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China. lxl20040130@163.com

Received: 2009-05-14 Revised: 2009-06-25

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the feasibility of using ^{18}F -FDG PET/CT for pretherapeutic evaluation of advanced gastric cancer.

METHODS: The clinical records of 40 advanced gastric cancer patients who underwent ^{18}F -FDG PET/CT before treatment were reviewed retrospectively. Of these patients, 14 patients underwent radical gastrectomy, and the other patients underwent chemotherapy or palliative gastrectomy. The lymph nodes were classified into two groups ($\text{N}_1 + \text{N}_2$ group and N_3 group) based on

anatomic sites. Lymph node metastasis was assessed on group basis. All PET/CT images were interpreted according to visual evaluation and standardized uptake values (SUVs).

RESULTS: The diagnostic sensitivity of ^{18}F -FDG PET/CT, PET and CT for primary tumors was 97.5%, 65% and 90%, respectively. The sensitivity, specificity, and accuracy of ^{18}F -FDG PET/CT for $\text{N}_1 + \text{N}_2$ metastases were 71.4%, 77.8% and 85.7%, respectively, while the sensitivity of PET/CT for N_3 metastases was 100%. PET/CT detected 21 cases of metastases undetected by routine method. Accordingly, the TNM stage of tumors was upgraded in 40% of patients.

CONCLUSION: It is feasible to use ^{18}F -FDG PET/CT for pretherapeutic evaluation of advanced gastric cancer, and the diagnostic outcomes revealed by PET/CT may have a clinically significant impact on the choice of initial therapy.

Key Words: Advanced gastric cancer; ^{18}F -FDG PET/CT; Pretherapeutic evaluation

Wang X, Yu LJ, Wang DL, Jia CY, Tian MH. Feasibility of using ^{18}F -FDG PET/CT for pretherapeutic evaluation of advanced gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2159-2163

摘要

目的: 探讨 ^{18}F -FDG PET/CT对进展期胃癌治疗前评估的可行性。

方法: 回顾性分析40例进展期胃癌患者 ^{18}F -FDG PET/CT常规检查结果资料, 与内镜、手术病理和临床随访作对照; 其中14例患者行根治性手术, 余行化疗或姑息治疗。根据解剖部位将淋巴结分为 $\text{N}_1 + \text{N}_2$ 和 N_3 组, 淋巴结有无转移以组为单位。原发灶、淋巴结及其他器官转移灶的判断通过目测分析结合标准化摄取值来确定。

结果: PET/CT对胃原发癌的灵敏度为97.5%。PET和CT的灵敏度分别为65%和90%; 14例根治手术患者 N_1 、 N_2 淋巴结有无转移PET/CT的确诊率为85.7%, 灵敏度为71.4%, 特异性为

■背景资料

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内发病率和死亡率均居恶性肿瘤前2位。临床上进展期胃癌占大多数, 进展期胃癌治疗前的全面评价, 包括对淋巴结转移的精确诊断, 对恰当的治疗策略的制定影响重大。

■同行评议者

张小晋, 主任医师, 北京积水潭医院消化内科

■研发前沿

正电子发射计算机断层成像/X线计算机断层成像(PET/CT), 将PET的功能成像和CT解剖成像整合为一体化成像仪。于1998年由Townsend *et al* 首先研制成功, 大量的临床应用显示PET与CT的融合图像对多种肿瘤的诊断与分期及治疗反应的评价具有重要价值, 但其在进展期胃癌的临床应用价值还未确定。

■相关报道

最近2年有2位作者分别报道了¹⁸F-FDG PET/CT对胃癌术后复发的监测有较高的应用价值; 也有学者提出PET/CT两种影像的互补, 有可能改变¹⁸F-FDG PET在胃癌评估中灵敏度较低的状况, 从而改善胃癌临床分期的精确度。

77.8%; 对N₃淋巴结的灵敏度为100%。PET/CT发现21处临床未怀疑的转移灶; PET/CT检查后40%(16/40)的病例分期发生变化。

结论: ¹⁸F-FDG PET/CT可用于进展期胃癌的治疗前评估。

关键词: 进展期胃癌; ¹⁸氟-氟脱氧葡萄糖-正电子发射断层显像; 治疗前评估

王欣, 于丽娟, 王大龙, 贾承晔, 田墨涵. ¹⁸F-FDG PET/CT对进展期胃癌治疗前评估的可行性. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2159-2163

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2159.asp>

0 引言

胃癌在世界范围内发病率和死亡率均居恶性肿瘤前2位。在我国胃癌男、女性世界调整死亡率均居于首位, 并且呈逐年上升趋势^[1]。临床上进展期胃癌占大多数, 治疗手段是以手术为主的综合治疗, 即手术切除辅以化疗、放疗、免疫治疗等其他治疗, 近年来, 在临床开展的术前辅助化疗, 即新辅助化疗治疗效果较满意, 日益引起重视^[2], 因此, 进展期胃癌治疗前的全面评价, 包括对淋巴结转移的精确诊断, 对恰当的治疗策略的制定影响重大。¹⁸氟-氟脱氧葡萄糖-正电子发射断层显像(¹⁸F-FDG PET), 虽然在肺癌等恶性肿瘤的诊断、分期或再分期以及疗效监测有很高的准确度, 但对胃癌的应用受限, 主要因为PET对早期胃癌和部分进展期胃癌原发灶、淋巴结转移的灵敏度较低^[3-6], 其临床价值在于发现远隔转移和伴发的其他恶性病变^[7]。

正电子发射计算机断层成像/X线计算机断层成像(PET/CT), 于1998年由Townsend *et al* 首先研制成功, 将PET和CT同机融合的PET/CT提供了最大限度的改善肿瘤的诊断、分期、远处播散灶的发现和定位的可能性^[8]。近些年, PET/CT已在多种消化器官肿瘤的应用上显示出优势^[9-10], 但有关胃癌的研究较少; 最近2年有3位作者报道了¹⁸F-FDG PET/CT在胃癌术后复发监测中的应用^[11-13], 结果并不一致; 但有学者提出PET/CT两种影像的互补, 有可能改变¹⁸F-FDG PET在胃癌评估中灵敏度较低的状况^[14]。本文的目的即在探讨¹⁸F-FDG PET/CT对进展期胃癌治疗前评估的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 回顾分析40例进展期胃癌患者¹⁸F-FDG

PET/CT常规检查的影像资料和临床资料; 全部病例¹⁸F-FDG PET/CT显像前未行针对胃癌的任何治疗; 糖尿病患者, 空腹血糖水平高于6.1 mmol/L的不在入选之列。患者中男28例, 女12例, 年龄41-80岁; 原发灶10例位于上1/3, 18例位于中1/3, 12例位于下1/3; Bormann分型: I型5例, II型6例, III型21例, IV型8例; 组织学类型: 高分化腺癌12例, 中分化腺癌8例, 低分化腺癌14例, 印戒细胞癌6例; 27例淋巴结转移; 8例肝转移, 3例肺转移, 5例骨转移, 2例肾上腺转移; 腹膜种植转移13例。临床常规分期检查包括临床体格检查、胃镜、胸部平片或CT、骨骼ECT、上腹部CT及全腹超声。其中14例行根治性手术, 余行化疗或姑息性治疗。

1.2 方法

1.2.1 ¹⁸F-FDG PET/CT检查: 检查前禁食6 h以上, 静脉注射¹⁸F-FDG 0.8-0.12 mCi/kg, 平静休息40-75 min后行PET/CT扫描, 扫描前 po 500 mL纯净水, 以使胃腔膨胀。PET/CT扫描仪为Discovery ST(GE Corporation), PET 2D模式扫描, 2.5 min/床位, 迭代法重建; CT螺旋扫描200 mA, 0.75螺距, 3.75 mm层厚。以CT数据为PET作衰减校正。¹⁸F-FDG经mini-TRACE(GE Corporation)和FN自动化合成系统生产, 放化纯度大于98%。

1.2.2 图像分析方法: 在Xeleris图像处理工作站, 由2位有经验的医师共同阅读图像, 阅读前未告知胃镜检查结果, 以2位医师协商一致的意見为结果。PET判断胃癌以目测为主, 目测法以胃区的局灶放射性浓聚为恶性病变, 较弥漫的类似肝脏的放射性浓聚视为生理性摄取; CT以胃壁出现局限不规则增厚和密度较致密为胃癌确定表现; PET/CT图像融合后, 机器自带软件自动计算的SUV(标准化摄取值), 原发灶、淋巴结及其他器官转移灶SUV的最大值被记录。淋巴结和其他器官转移转移以目测结合SUV值判断, 通常以SUV_{max}大于2.5为阳性。

1.2.3 诊断标准: 手术病理或上消化道内窥镜对原发灶; CT和临床随访对肝、肾上腺、淋巴结和肺转移; CT、脱落细胞和临床随访证实腹水、腹膜和胸膜的播散转移; 骨扫描和临床随访证实骨转移。临床随访为: 可疑病变在初次发现和随后的复查比较有大小变化, 被判定为肯定的病灶。

2 结果

2.1 原发灶诊断 高、中分化腺癌摄取值多数较

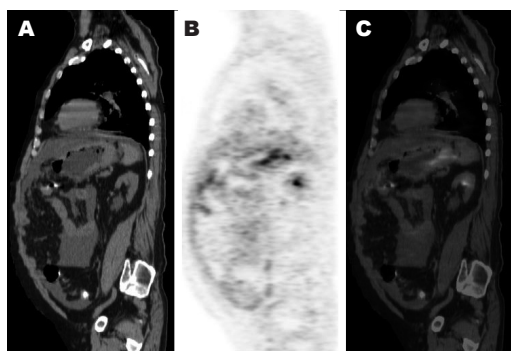


图1 胃体低分化腺癌, 大网膜种植转移. A: CT矢状位图像示胃体后壁弥漫不均匀增厚; B: 同层PET图像示胃后壁高度放射性浓聚, 肝下前腹壁后条状放射性浓聚; C: 融合图像显示增厚胃壁与放射性浓聚一致, 肝下前腹壁后放射性浓聚为大网膜转移。

高, SUV_{max} : 3.3-13.5; 低分化腺癌摄取值范围较宽, SUV_{max} : 1.6-9.0(图1-2); 印戒细胞癌摄取偏低, SUV_{max} : 2.2-4.7, 平均值为 3.7 ± 0.9 。40例中单纯PET可确定26例为胃癌, 其余14例摄取程度较轻, 或难以和生理性摄取区分, 灵敏度65%; CT确定36例为胃癌, 灵敏度90%; PET/CT融合后可区分出39例胃癌, 灵敏度97.5%。

2.2 淋巴结转移 14例根治手术患者 N_1 、 N_2 淋巴结有无转移PET/CT总的正确诊断率85.7%, 灵敏度为71.4%, 特异性为77.8%(图3); 2例假阴性分别见于印戒细胞癌和低分化腺癌, 原发灶的摄取值分别为3.7和4.8, CT上可见胃周有小淋巴结, 但PET未见放射性摄取。对 N_3 淋巴结的灵敏度为100%。

2.3 远隔转移 13例腹膜种植转移, PET/CT检查前仅发现3例。PET/CT正确诊断10例(76.9%), 8例PET上可见放射性摄取, SUV_{max} 介于1.9-14.7, 5例无可辨的放射性摄取; 10例CT上可见网膜、腹膜增厚, 表现为脂肪间隙的混浊、索条影及结节、肿块形成, 少量积液, 但7例平扫CT漏诊(图4); 血行转移18处(肝转移8例, 骨转移5例, 肺转移3例, 肾上腺转移2例), PET/CT检查前仅发现7处。肝转移 SUV_{max} 介于4.4-9.7, 多见于高分化腺癌(6/8)。骨转移 SUV_{max} 介于2.3-22.5, 多见于低分化腺癌(3/5); 3例CT上表现为以成骨为主的混合性骨破坏, 2例为溶骨破坏, ^{18}F -FDG摄取值均高于原发灶。肺转移3例, 都为低分化腺癌, CT为多发软组织密度小结节, PET未见放射性摄取。肾上腺转移1例为双肾上腺肿块, 1例为单发肾上腺结节, SUV_{max} 分别为13.0、7.0。

2.4 PET/CT检查后临床分期的改变 PET/CT检查后40%(16/40)的病例分期发生变化, 其中N分期

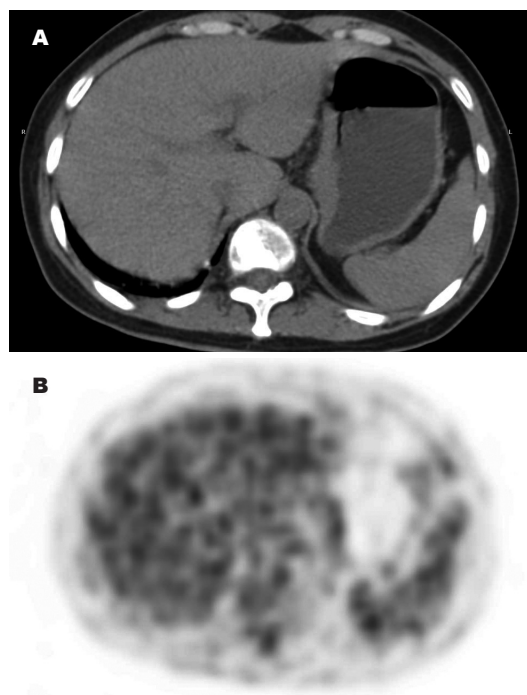


图2 胃体小弯低分化腺癌, 无明显放射性浓聚. A: CT横轴位图像示胃体小弯胃壁局限增厚、僵硬; B: PET同层图像显示胃壁仅轻度放射性摄取, 与肝脏、脾脏近似。

下调2例, M分期下调1例, N分期上调5例, M分期上调8例。

3 讨论

进展期胃癌的原发灶的 ^{18}F -FDG摄取表现多样, 部分腺癌摄取程度较高, 而印戒细胞癌和部分低分化腺癌的摄取较低^[15-17], 甚至在单纯PET图像上难以和生理摄取区分; 一体化的PET/CT将放射性浓聚和CT形态有机的结合, 根据CT胃壁是否增厚、僵硬, 能够鉴别一部分生理性摄取和病变摄取, 显著提高原发癌的诊断阳性率。需要注意的是PET/CT扫描前要让受检者充分饮水, 使胃壁舒张, 有助于减少胃壁的生理性摄取^[18-20]和CT的诊断。

目前, 国内外缺少大样本的PET/CT在胃癌N分期应用的研究。在我们14例根治手术患者的淋巴结转移的PET/CT图像分析中, 仍主要以淋巴结的 SUV 值 ≥ 2.5 为阳性诊断标准, 对 N_1+N_2 淋巴结转移总的准确率为85.7%, N_3 淋巴结的阳性率为100%。我们的研究中, 影响淋巴结诊断灵敏度的主要原因为黏液腺癌和印戒细胞癌转移淋巴结的低摄取, 这与Kim *et al*^[21]的研究一致。国外学者报道由于PET图像上胃周淋巴结常与原发灶融为一体, 无法区分, 导致单纯PET对 N_1 淋巴结的检出不理想^[16], 但PET显示出对淋巴结转

■应用要点

PET/CT扫描前应嘱患者充分饮水, 使胃壁舒张, 有助于减少胃壁的生理性摄取和CT的诊断。

■名词解释

1 PET: 正电子发射断层显像技术, 是经静脉注射微量标记了正电子核素的示踪剂, 在体外通过晶体探头探测正电子核素衰变发射的伽马射线, 进行断层成像的一种医学成像技术。

2 PET/CT: 是将一台PET成像仪和一台X线计算机断层成像仪(CT)放置在同一个机架内, 两者共用同一个扫描床的复合成像设备, 应用时进行CT和PET的成像, 可将两种医学图像精确融合成复合影像, 有利于病变的发现、定位和定性。

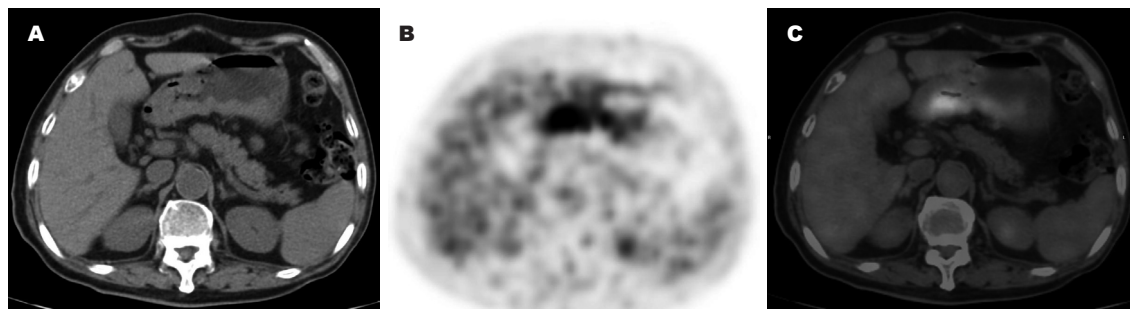


图3 胃窦高分化腺癌。A: CT横轴位图像示胃周和腹膜后多发淋巴结增大, 疑转移; B: 同层PET仅胃后一枚淋巴结结节状放射性浓聚, 下调N分期; C: 为A、B的融合图像。手术病理胃周、腹膜后多发淋巴结增生, 胃周1枚淋巴结转移。

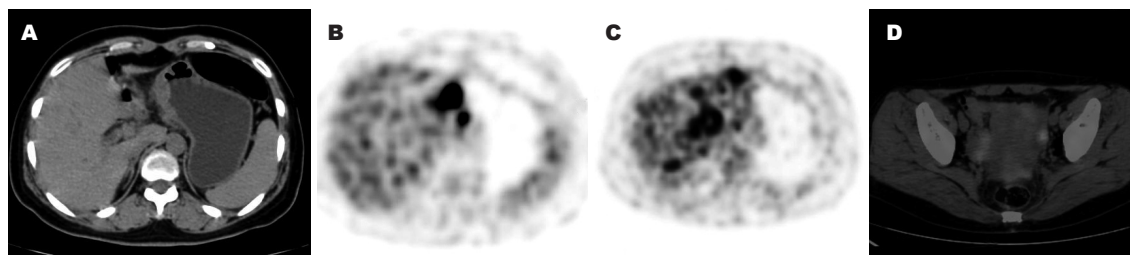


图4 胃窦中分化腺癌, 多处远隔转移。A: CT图像示胃窦小弯壁增厚; B: 与A同层PET图像示增厚胃壁高度 ^{18}F -FDG摄取; 小弯另一放射性浓聚结节为淋巴结转移; C: PET图像示肝内多发放射性浓聚为肝转移灶; D: PET与CT融合图像示盆腔腹膜多发放射性浓聚结节为种植转移灶。

移有很高的特异性^[16,21]。国内21例胃癌的研究显示, PET判断淋巴结转移的准确率和术中淋巴结评估的准确率接近, 为85.7%^[22]。已有学者提出将PET与CT结合, 有可明显改善胃癌的手术前分期^[23], 但PET与CT如何结合, 其应用方法和诊断标准尚需进一步探索。

^{18}F -FDG PET/CT对进展期胃癌胸部至腹腔远隔转移有很高的价值, 在我们的研究中PET/CT发现了21处未被临床怀疑的转移灶, 使40%的病例临床TNM分期发生变化。我们的研究显示PET/CT对肝转移、骨转移以及腹膜转移都有很高的灵敏度, 与Yoshioka *et al*^[15]的单纯PET的研究报告不同, 这得益于PET与CT的同机图像的互相补充, 使单纯PET上摄取较低的成骨转移、单纯PET上与胃肠道生理摄取难以区分的腹腔的异常放射性浓聚得到有效诊断; PET/CT有可能明显提高进展期胃癌治疗前分期的准确性, 从而有利于治疗决策的选择。

我们当前的回顾性研究还存在一定的缺陷, 根治手术病例较少, 未区分PET/CT对N1和N2淋巴结转移的诊断效能, 因而尚不能肯定PET/CT对淋巴结清扫范围的指导作用, 这有赖于进一步的前瞻性研究。此外, PET/CT对进展期胃癌的诊断价值尚需与临床常用的增强MSCT进一步比较。

4 参考文献

- 1 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 101-105
- 2 何若冰, 陈俊强. 胃癌新辅助化疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1207-1211
- 3 Shoda H, Kakugawa Y, Saito D, Kozu T, Terauchi T, Daisaki H, Hamashima C, Muramatsu Y, Moriyama N, Saito H. Evaluation of ^{18}F -2-deoxy-2-fluoro-glucose positron emission tomography for gastric cancer screening in asymptomatic individuals undergoing endoscopy. *Br J Cancer* 2007; 97: 1493-1498
- 4 Kwee RM, Kwee TC. Imaging in assessing lymph node status in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2009; 12: 6-22
- 5 肖亚景, 张祥松, 徐卫平, 唐安戌, 乔穗宪. ^{18}F -FDG PET显像在原发性胃癌中的应用. 中华核医学杂志 2004; 24: 59-61
- 6 Yamada A, Oguchi K, Fukushima M, Imai Y, Kadoya M. Evaluation of 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose positron emission tomography in gastric carcinoma: relation to histological subtypes, depth of tumor invasion, and glucose transporter-1 expression. *Ann Nucl Med* 2006; 20: 597-604
- 7 Mukai K, Ishida Y, Okajima K, Isozaki H, Morimoto T, Nishiyama S. Usefulness of preoperative FDG-PET for detection of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2006; 9: 192-196
- 8 Beyer T, Townsend DW, Brun T, Kinahan PE, Charron M, Roddy R, Jerin J, Young J, Byars L, Nutt R. A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *J Nucl Med* 2000; 41: 1369-1379
- 9 王欣, 于丽娟. ^{18}F -FDG PET/CT综合分析法在胰腺癌诊断中的价值. 中国医学影像技术 2007; 23: 1709-1712
- 10 Jadvar H, Henderson RW, Conti PS. 2-deoxy-

- 2-[F-18]fluoro-D-glucose-positron emission tomography/computed tomography imaging evaluation of esophageal cancer. *Mol Imaging Biol* 2006; 8: 193-200
- 11 Park MJ, Lee WJ, Lim HK, Park KW, Choi JY, Kim BT. Detecting recurrence of gastric cancer: the value of FDG PET/CT. *Abdom Imaging* 2008 Jun 10. [Epub ahead of print]
- 12 Sim SH, Kim YJ, Oh DY, Lee SH, Kim DW, Kang WJ, Im SA, Kim TY, Kim WH, Heo DS, Bang YJ. The role of PET/CT in detection of gastric cancer recurrence. *BMC Cancer* 2009; 9: 73
- 13 Sun L, Su XH, Guan YS, Pan WM, Luo ZM, Wei JH, Wu H. Clinical role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in post-operative follow up of gastric cancer: initial results. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4627-4632
- 14 Rosenbaum SJ, Stergar H, Antoch G, Veit P, Bockisch A, Kühl H. Staging and follow-up of gastrointestinal tumors with PET/CT. *Abdom Imaging* 2006; 31: 25-35
- 15 Yoshioka T, Yamaguchi K, Kubota K, Saginoya T, Yamazaki T, Ido T, Yamaura G, Takahashi H, Fukuda H, Kanamaru R. Evaluation of 18F-FDG PET in patients with advanced, metastatic, or recurrent gastric cancer. *J Nucl Med* 2003; 44: 690-699
- 16 Yun M, Lim JS, Noh SH, Hyung WJ, Cheong JH, Bong JK, Cho A, Lee JD. Lymph node staging of gastric cancer using (18)F-FDG PET: a comparison study with CT. *J Nucl Med* 2005; 46: 1582-1588
- 17 Stahl A, Ott K, Weber WA, Becker K, Link T, Siewert JR, Schwaiger M, Fink U. FDG PET imaging of locally advanced gastric carcinomas: correlation with endoscopic and histopathological findings. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 288-295
- 18 Tian J, Chen L, Wei B, Shao M, Ding Y, Yin D, Yao S. The value of vesicant 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (18F-FDG PET) in gastric malignancies. *Nucl Med Commun* 2004; 25: 825-831
- 19 Yun M, Choi HS, Yoo E, Bong JK, Ryu YH, Lee JD. The role of gastric distention in differentiating recurrent tumor from physiologic uptake in the remnant stomach on 18F-FDG PET. *J Nucl Med* 2005; 46: 953-957
- 20 Kamimura K, Fujita S, Nishii R, Wakamatsu H, Nagamachi S, Yano T, Ogita M, Umemura Y, Fujimoto T, Nakajo M. An analysis of the physiological FDG uptake in the stomach with the water gastric distention method. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34: 1815-1818
- 21 Kim SK, Kang KW, Lee JS, Kim HK, Chang HJ, Choi JY, Lee JH, Ryu KW, Kim YW, Bae JM. Assessment of lymph node metastases using 18F-FDG PET in patients with advanced gastric cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33: 148-155
- 22 卫勃, 陈凇, 田嘉禾, 邵明哲, 姚树林, 尹大一, 孔庆龙, 李荣. 正电子发射断层成像技术对胃癌术前的诊断价值及临床意义. *中华胃肠外科杂志* 2003; 6: 167-170
- 23 Chen J, Cheong JH, Yun MJ, Kim J, Lim JS, Hyung WJ, Noh SH. Improvement in preoperative staging of gastric adenocarcinoma with positron emission tomography. *Cancer* 2005; 103: 2383-2390

■同行评价

本研究立题较好, 设计合理, 因为是回顾性研究, 所以得出的结论有待进一步大范围的临床观察和考证。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

●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 *et al*”的右上角注角码; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注角码. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

原代肝细胞分离培养技术现状及展望

牟卉卉, 胡康洪

■背景资料

乙型肝炎病毒(HBV)感染导致的慢性肝炎是严重威胁人类健康的世界性疾病。由于缺乏理想的体外感染模型, HBV复制机制的研究和抗病毒药物筛选一直受到制约。实验室对获得足够数量以及生长状态良好的肝细胞的需求十分迫切, 发展和完善原代肝细胞分离技术和培养技术是进行HBV基础研究、新药发现以及生物人工肝应用的关键一步。

牟卉卉, 胡康洪, 中国科学院武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室 湖北省武汉市 430071

胡康洪, 德国雷根斯堡大学分子和细胞解剖学研究所 德国雷根斯堡 93051

国家十一五传染病重大专项任务基金资助项目, No. 2008ZX10002-011

作者贡献分布: 牟卉卉负责资料的搜集、整理及文章的撰写; 胡康洪负责课题方向的选择及文章的审核。

通讯作者: 胡康洪, 研究员, 博士, 博士生导师, 430071, 湖北省武汉市, 中国科学院武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室。hukgh@wh.iov.cn

电话: 027-87198362

收稿日期: 2009-04-20 修回日期: 2009-06-18

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-28

Recent advances in techniques for isolation and culture of primary hepatocytes

Hui-Hui Mou, Kang-Hong Hu

Hui-Hui Mou, Kang-Hong Hu, State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Kang-Hong Hu, Institute of Molecular and Cellular Anatomy, University of Regensburg, Regensburg D-93053, Germany

Supported by: the National Key Project in the Field of Infectious Diseases, No. 2008ZX10002-011

Correspondence to: Professor Kang-Hong Hu, State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, Hubei Province, China. hukgh@wh.iov.cn

Received: 2009-04-20 Revised: 2009-06-18

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-28

Abstract

Isolation and culture of primary hepatocytes are key steps for establishment of the *in vitro* cellular model of HBV infection and clinical application of bioartificial liver. Over the past decade, numerous studies have been performed on the isolation and culture of hepatocytes. In this article, we will review the advantages and disadvantages of various hepatocyte isolation and culture techniques developed so far and discuss future prospects in this field.

Key Words: Primary hepatocyte; Hepatitis B virus; Bioartificial liver; Techniques for isolation and culture of hepatocytes

Mou HH, Hu KH. Recent advances in techniques for

isolation and culture of primary hepatocytes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(21): 2164-2170

摘要

原代肝细胞的分离和培养是建立体外HBV感染的细胞模型和临床应用生物人工肝的关键步骤, 许多学者对肝细胞分离和培养技术做了大量探索。本文就近年来建立的各种肝细胞分离技术和培养技术的优缺点进行比较, 并对该领域今后的发展前景作了展望。

关键词: 原代肝细胞; 乙型肝炎病毒; 生物人工肝; 肝细胞分离培养技术

牟卉卉, 胡康洪. 原代肝细胞分离培养技术现状及展望. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2164-2170

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2164.asp>

0 引言

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的严重危害人类健康的病毒性传染病。要对HBV的进入机制进行研究, 就需要具有良好分化表型的原代肝细胞作为工具^[1]。而随着生物人工肝在治疗急性肝衰竭领域的广泛应用, 也需要具有较好生存能力和分化功能的原代肝细胞作为生物材料。因此, 肝细胞的分离、培养技术受到了越来越多的关注。近年来, 许多学者在原代肝细胞分离和培养技术上做了大量的探索, 为肝细胞分离、培养技术的实际应用提供了大量的技术支持, 现将各种方法的优缺点作一比较并对该领域的前景作概述性展望。

1 细胞的分离方法

体外培养肝细胞的关键是如何分离得到形态完整、体外代谢活性高的肝细胞。自1953年Anderson^[2]首创剪切法从肝脏分离肝细胞以来, 各实验室对肝细胞的分离方法进行了不断改进。在众多方法中, 主要分为非灌流的方法和灌流的方法。

1.1 采用非灌流的方法 早期的研究一般通过非灌流这种简单的步骤分离肝细胞。

■同行评议者

孙殿兴, 主任医师, 白求恩国际和平医院肝病科

1.1.1 机械分离法: 机械分离法是利用机械剪切及强力吹打等物理手段来分离肝细胞的方法^[3]. 张顶 *et al*^[4]在分离树鼯肝细胞的过程中, 首先将树鼯的肝脏剪成小块, 然后通过挤压、剪碎和震荡等机械手段, 使肝细胞从肝组织上脱落, 从而获得互相分离的肝细胞.

1.1.2 胰酶消化法: 胰酶消化法是利用胰酶来破坏肝细胞之间的桥连, 使肝细胞分离的一种方法. Dulbecco *et al*^[5]首次采用胰酶来分离猴肾细胞、大鼠肝细胞, 并运用到体外细胞的研究和培养中. 刘友平 *et al*^[6]利用该方法分离肝细胞时, 首先取出小鼠的肝组织用眼科剪剪碎至糊状, 然后用缓冲液充分清洗并加入胰酶进行消化. 待消化完全后用D-Hank's液清洗, 最后加入含有血清的培养液终止胰酶的作用, 得到消化彻底的细胞悬液.

1.1.3 胶原酶消化法: 胶原酶消化法是利用胶原酶来破坏细胞间的纤维成分, 使肝细胞分离的一种方法. 王琳 *et al*^[7]在利用该方法分离新生小鼠肝细胞时, 首先将新生小鼠的肝脏剪成1 mm³组织块, 用无钙无镁的D-Hank's液反复冲洗后加入胶原酶进行消化. 最后用DMEM液终止胶原酶的作用, 得到肝细胞悬液.

1.2 采用灌流的方法 虽然非灌流的方法以其简单易行的特点得到了一定的应用, 但由于存在消化不完全、分离得到的肝细胞中多细胞团块存在的问题, 不能满足许多基础研究或临床应用的要求. 1969年, Berry和Friend^[8]引入了肝脏灌流法, 灌流可以使消化液与肝组织更加充分地接触, 不仅提高了分离效率, 还使分离所得肝细胞的活力和数量大大提高.

1.2.1 离体胶原酶灌流法: 离体胶原酶灌流法是将离体灌注与胶原酶消化相结合的方法. 在使用该方法分离肝细胞时, 首先将动物肝脏取出, 于门静脉内置管或直接在获得的肝组织块的血管或切口内置管, 用预热的无钙无镁的D-Hank's液灌流. 然后换用胶原酶作持续灌流, 使肝细胞与间质分离. 最后用培养液终止胶原酶的消化作用, 过滤、离心、弃上清后得到肝细胞悬液^[9].

1.2.2 Seglen两步灌流法(原位胶原酶灌注法): 自从引入灌流法分离肝细胞以来, 许多学者根据不同的应用条件对灌流法进行了改良. 其中Seglen^[10]经过一系列细致的研究, 创立了改良的Seglen两步灌流法, 这一方法已成为应用至今的标准的原代肝细胞分离方法. 两步灌流法主要是通过门静脉先后用含EDTA或EGTA缓冲液和

胶原酶缓冲液进行灌注来分离肝细胞的方法. 许多学者在具体操作中, 不断改进两步灌流法的灌注条件, 目的在于进一步减少分离过程中肝细胞的损伤, 提高肝细胞的活率^[11-12].

1.2.3 半原位胶原酶灌流法: 半原位胶原酶灌流法是我国学者彭齐容 *et al*^[13]以Seglen法为基础建立的肝细胞分离技术. 俞红 *et al*^[14]在采用该方法分离乳猪肝细胞时, 首先用无钙无镁的D-Hank's液于门静脉进行原位灌注. 接着, 除保留门静脉以外, 离断肝脏血管并将肝脏移入无菌平皿中, 继续用胶原酶进行灌注使肝细胞与间质细胞分离. 最后钝性撕裂组织, 过滤洗涤后得到制备好的细胞悬液.

1.2.4 下腔静脉插管的逆向胶原酶灌注法: 下腔静脉插管的逆向胶原酶灌注法是在肝下腔静脉插管, 并结合逆向胶原酶灌注来分离肝细胞的方法^[9]. 在采用该方法分离肝细胞时, 首先将灌注针逆向插入下腔静脉后固定, 门静脉开放做流出道. 接着用含EGTA或EDTA的灌注液进行灌注, 一段时间后再用含有Ca²⁺的胶原酶进行充分灌注. 灌流结束后, 将细胞过滤、清洗后得到制备好的肝细胞悬液.

1.2.5 Gerlach五步胶原酶灌流法: 在使用两步灌流法分离大的肝组织块时, 仍存在消化不完全的问题. 而Gerlach *et al*^[15]在两步灌流法的基础上, 创立了联合门静脉和肝动脉的五步胶原酶灌流技术, 建立了一种高效的细胞分离方法(图1).

刘应生 *et al*^[16]在使用该方法分离细胞时, 采用了无钙缓冲液进行开放灌注, 以去除器官内血细胞, 这样可以得到纯度更高的肝细胞. 并且用无Ca²⁺缓冲液洗掉Ca²⁺后再用含Ca²⁺缓冲液开放灌注, 这样可以提前为胶原酶营造一个Ca²⁺环境. 最后用4℃的培养液进行灌注, 低温的环境可以减少操作过程对细胞造成的损害.

不同的分离方法具有不同特点, 各方法的优缺点对比见表1.

2 细胞的培养方法

自19世纪末以来, 鉴于肝脏代谢学、毒理学、生物化学与分子生物学研究不断增长的需求, 众多科学家都致力于肝细胞培养技术的不断探索, 使该领域得到了较快的发展. 到目前为止, 用于肝细胞培养的方法主要有以下几种, 现叙述如下.

2.1 组织块贴壁培养法 该法是用培养肝细胞的最原始的方法. 聂兴草 *et al*^[23]在运用该方法培

■研发前沿

摸索最佳的分离方法和培养条件, 使分离培养得到的原代肝细胞获得足够的细胞数量和最佳的生存能力. 在众多科学家的共同努力下, 出现了许多更加优化的分离条件和新颖的细胞培养系统.

■相关报道

对于肝细胞的培养, 三维细胞培养技术受到了越来越多的关注. 许多研究者正致力于对最佳培养方式的探索. 除了球状体培养法、微通道培养法以及生物反应器培养法等方法外, 印制阵列培养法也受到了关注, 是一种具有较大应用前景的肝细胞培养方法.

表 1 迄今发展的各种肝细胞分离方法的优缺点对比

分离方法	最适对象	优点	缺点	参考文献
机械分离法	小型动物及肝组织块	操作简单; 不需要复杂仪器和昂贵的胶原酶; 分离得到细胞的膜蛋白的成分和性质不易发生改变	所得细胞的收获量和成活率很低	[3], [4]
胰酶消化法		操作简单; 酶价格便宜	胰酶易造成肝细胞死亡, 使细胞存活率低	[17], [18]
胶原酶消化法	肝脏体积小的动物	操作简单; 细胞产率高、损伤小, 且细胞维持特异功能时间较长	胶原酶价格昂贵; 获得的肝细胞悬液多细胞团块存在	[7], [18]
离体胶原酶灌注法		该法具有较好的细胞收率	需要较高的操作水平; 需要摸索最适酶浓度和作用时间; 所得细胞存活率低	[9], [19]
半原位胶原酶灌注法	适用于大规模的肝细胞分离	不需要特殊设备; 半原位灌注使胶原酶的用量仅为原位灌注的1/4	操作技巧要求高; 易发生污染; 细胞易发生灌注再损伤而具有较低的生存能力	[14], [18]
Seglen两步灌注法	主要适用于中等大小动物	所得肝细胞较纯, 细胞存活率高; 可分离肝实质细胞及肝非实质细胞	操作过程复杂, 影响因素多, 细胞易污染; 需要恒流灌注装置, 胶原酶消耗量大	[18], [20], [21]
下腔静脉插管的逆向胶原酶灌注法		灌注效率高, 细胞收率高; 分离得到的细胞纯度高、生存能力强; 节省胶原酶; 细胞不易发生污染	该方法要求较高的操作技巧	[9], [22]
Gerlach五步胶原酶灌注法	主要用于大规模肝细胞分离	分离效率高, 所得细胞纯度高; 灌注的同时分离肝脏, 可避免污染; 所得细胞具有较强的生存能力和分化特性	操作过程复杂; 该方法的分离效果易受到不同的胶原酶浓度、动物体质量和月龄的影响	[16]

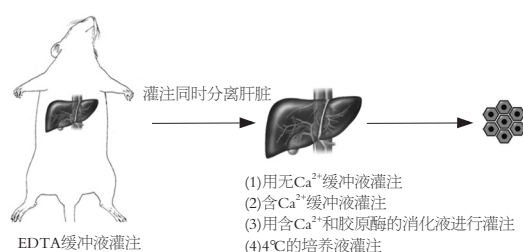


图 1 Gerlach五步胶原酶灌注法流程.

养肝细胞时, 首先将肝组织块用消化液短时间处理, 然后直接贴于培养瓶内壁, 加入培养液后置于37℃、50 mL/L CO₂条件下进行培养.

2.2 肝细胞-非实质细胞混合培养法 研究表明, 肝非实质细胞在肝细胞特性及生物学功能的维持中发挥着举足轻重的作用^[24]. Bhatia *et al*^[25]认为, 肝非实质细胞能够通过生成HGF等生长因子来促进肝细胞的增殖, 并使肝细胞维持其生物学特性. 王英杰 *et al*^[26]在使用该方法培养肝细胞时, 将所得肝细胞、肝非实质细胞按2:1的比例混合, 在37℃条件下旋转培养1 h, 使两类细胞形成球形聚集体后移入被覆聚乙二醇基异丁烯酸的培养瓶中, 在常规条件下继续旋转培养.

2.3 单层胶原培养法 由于肝细胞属上皮细胞类型, 所以细胞所处的微环境对于细胞生存能力

和分化特性的维持发挥着至关重要的作用^[27]. 而加入到培养体系中的胶原可以为细胞提供一个类似于体内环境的微环境, 有利于细胞生长状态和分化特性的维持. 在使用该方法培养肝细胞时, 首先将分离得到的肝细胞接种在胶原涂层的平面载体上, 然后加入培养液在37℃、50 mL/L CO₂的条件下进行培养.

2.4 双层胶夹层培养法 双层胶夹层培养法也称胶原三明治培养法, 是较为常用的三维细胞培养方法^[28]. 胶原夹层的制备方法是: 首先在培养器皿中加入适量胶原, 放置过夜, 使胶原在培养器皿底部均匀地铺上一层. 将多余的胶原吸出后加入分离好的细胞悬液, 在37℃、50 mL/L CO₂的环境中培养一定时间, 使肝细胞能够黏附到胶原表面. 最后再在细胞悬液上加入胶原, 待胶原形成均匀的一层胶原膜后, 加入培养液继续培养.

2.5 微载体黏附培养法 微载体黏附培养法是将分离得到的肝细胞与微载体一起加到培养介质中, 利用肝细胞具有贴壁生长的特性, 通过振动或其他手段, 使肝细胞附着到微载体表面, 形成以微载体为中心的肝细胞聚集体而进行培养的一种方法^[29]. 为了更有利于肝细胞的大规模培养, 许多学者优化了常规微载体制备的反应条

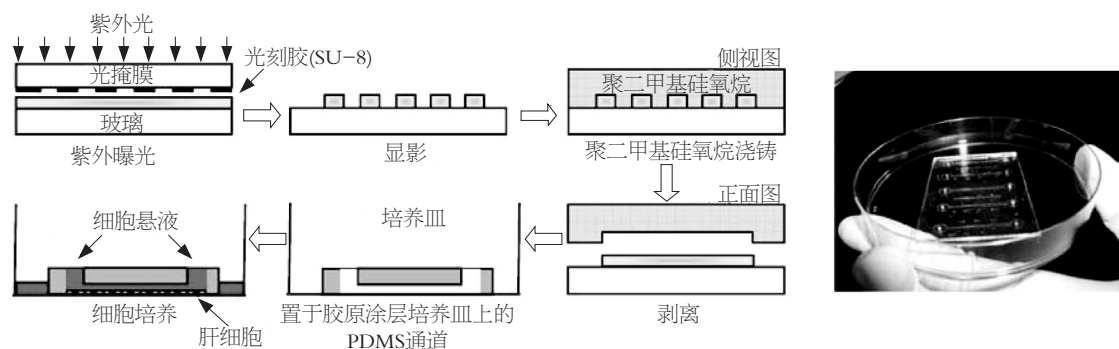


图2 微流体通道制作过程以及成品图示。

件, 希望能进行肝细胞的大规模培养^[30-33]。

2.6 微囊培养法 微囊培养法是将肝细胞悬浮在多聚赖氨酸与海藻酸反应形成的囊内, 形成微囊化的肝细胞^[34]。细胞生存所需要的营养物质、氧气、代谢产物及其分泌的生物活性物质能通过囊膜出入, 而宿主免疫细胞、免疫球蛋白、补体等则不能通过半透膜。微囊既作为免疫隔离屏障又具有良好的通透性, 使囊内肝细胞保持良好的生存能力和生物学特性, 并且能够不受宿主的免疫排斥而长期存活^[35]。

2.7 球形聚集体培养法 提高培养细胞的密度、维持肝细胞的体外活性和分化特性, 一直是现有细胞培养方法亟待解决的问题。而培养方法的改进目前主要集中在两个方面, 即提高培养细胞的密度、维持较高的生存能力和分化特性^[36]。

球形聚集体培养法是根据新分离的肝细胞具有相互聚集的特性, 通过一定的手段抑制肝细胞单层贴壁生长, 使肝细胞聚集成多细胞球状体来进行培养的方法。

最初, 人们主要采用肝细胞球形聚集体回旋培养法, 该方法是通过转动培养烧瓶来促使肝细胞的聚集。由于该方法在维持培养体系中肝细胞分化特性方面所具有的优势, 使其在抗肿瘤新药筛选领域得到了一定应用^[37]。但研究发现, 通过回旋的方式来促进肝细胞球状体的形成需较长时间, 而球状体形成的推迟会使肝细胞较快失去分化表型和发生死亡, 所以该方法一直未得到十分广泛的应用。而Brophy *et al*^[38]采用振荡的方式来促进球形聚集体的形成, 并且研究发现, 球状体振荡培养法是一种比单层培养系统乃至球状体回旋培养法更加快速、高效的肝细胞培养方法, 是一种可用于原代肝细胞培养的三维细胞培养法。

2.8 微流体通道培养法 微流体通道培养法是采用软蚀刻技术, 以聚二甲基硅氧烷(polydimethyl

siloxane, PDMS)为材料制成微小腔室来进行原代肝细胞培养的方法^[39]。

在制作微通道时, 首先将负性光致抗蚀剂以旋转的方式铺到硼硅酸盐玻璃表面。然后将玻璃片置于热平板上, 分别于65℃烘烤5 min和95℃烘烤20 min。接着, 在制作的光蚀胶上面放上铬模具, 用紫外线进行照射。再将照射后的光蚀胶置于热平板上, 分别于65℃烘烤1 min和95℃烘烤10 min。用显影剂显影后用异丙醇清洗, 得到了制作微通道的模板。把制作好的模板置于培养皿中, 将与固化剂以10:1的比例配制成的PDMS倾倒到制作好的模具上, 脱气除去气泡, 置于80℃的对流箱中固化1 h。之后将膜取出, 冷却到室温后, 将PDMS膜从模具上剥下, 切成适合大小并用细的不锈钢管在每条通道的两头钻孔。最后, 将PDMS膜直接放到培养皿中待用。制作过程和得到的装置见图2。

采用该方法进行细胞培养时, 首先将微通道灭菌, 然后放置到用胶原涂层的组织培养皿上, PDMS的界面性质会使他可逆地黏附到培养皿的底部。接着用PBS浸润微通道, 将要培养的细胞接种到微通道中并加入培养液进行培养。此外, 在PDMS膜的外围要倒入一定量的培养液, 以防止微通道中培养液的汽化。

2.9 生物反应器培养系统 生物反应器是生物人工肝(bioartificial liver, BAL)系统的核心部件, 承担着大量培养肝细胞和维持其功能的任务。设计合理的生物反应器能够为培养其中的肝细胞提供充足的营养, 排除代谢产物, 维持其正常的生长状态和生化指标^[40-41]。目前已有的生物反应器包括: (1)中空纤维生物反应器; (2)平板单层生物反应器; (3)灌注床或支架生物反应器; (4)包被悬浮生物反应器。其中研究和应用较多的是中空纤维反应器。

在使用该系统进行细胞培养时, 首先将分

■创新盘点

本文除总结近年来出现的肝细胞的分离和培养技术, 还对这些方法的优缺点进行了详细的对比。对于新出现的一些方法, 文中也有较详细的论述。

■应用要点

肝细胞的分离和培养技术在HBV感染模型的建立、生物人工肝的运用以及许多相关生命科学领域的研究中发挥着十分重要的作用。本文对于肝细胞分离和培养技术作了较详尽的概述,这对于实际应用具有指导意义。

表 2 各种肝细胞培养方法的优缺点对比

培养方法	最适对象	优点	缺点	参考文献
组织块贴壁培养法		操作简便, 流程短, 成本低	所培养的细胞数量有限、且细胞成分不纯; 细胞生长状态较差	[6]
肝细胞-非实质细胞混		细胞具有良好的生长状态和分化特性; 提高培养细胞的密度	需较高的细胞分离技术; 培养条件要求高	[26], [46]
合培养法		操作简单; 细胞能在较长时间内维持正常形态和生理功能, 有一定的增殖能力.	不能用于大规模细胞培养; 易使肝细胞失去分化表型	[47], [48], [49]
单层胶原培养法		细胞生长状态好; 良好微环境有助于维持肝细胞功能和分化特性	需要昂贵的胶原; 需要较高的技术支持	[50], [51]
微载体黏附培养法	动物细胞	具有相对较大培养空间; 培养环境均一, 避免发生接触抑制; 实现细胞可控生长;	细胞易失去正常形态和分化功能; 剪切力、营养供给等因素会影响细胞生存和分化; 存在使用安全性问题	[30], [31], [32], [33], [49], [52]
微囊培养法	和人肝细胞系	培养的细胞具良好代谢活性; 能为细胞提供适宜的微环境; 细胞存活率高; 培养的细胞可用于异种移植	存在生物相容性问题; 细胞培养的效果受多种因素制约, 稳定性差	[34], [35], [53]
球形聚集体培养法	适用于原代细胞培养	设备简单, 节省经费; 培养的细胞具有良好的生长状态和分化特性; 不需特殊载体; 实现了高密度细胞培养	需纯度较高的细胞来源; 需较高操作水平	[36], [38], [54]
微流体通道培养法	适用于微量原代细胞培养	所需细胞数量和试剂量少; 能维持细胞良好的生长和分化状态; 细胞能维持特异性表型	需特殊技术、花费大; 细胞生长速率慢、易感性低; 不能进行大规模细胞培养	[39]
生物反应器培养系统	大规模细胞培养	可进行大规模细胞培养; 可避免异种细胞产物抑制细胞的生长、分化; 细胞生长状态好	需高的技术和经济支持; 细胞活力低; 肝细胞功能难以长期维持	[40], [41], [42], [44], [45], [55],

离得到的生长状态良好的肝细胞悬浮于胶原凝胶中并接种于中空纤维管外间隙。然后通过中空纤维管内间隙, 将培养液加入到循环体系中, 最后将整个中空纤维管置于培养箱中进行培养。培养于该系统中的肝细胞通过管壁上的微孔与培养液中的营养物质进行物质交换, 来维持较好的生长状态^[42]。

在研究与应用过程中, 许多科学家对该系统进行了改进, 如Jasmund *et al*^[43]将肝细胞接种于中空纤维的外腔, 而灌流液亦灌注于外腔, 纤维内腔则专门用于供氧及控制培养温度。这样可以保证系统中的细胞具有良好的营养供应, 并且能够在更加适宜的温度和气体环境下生长。而何礼荣 *et al*^[44]设计的编织型中空纤维管生物反应器, 改进了普通反应器中肝细胞易沉积到基底部的缺点, 使培养的细胞具有较好的生存能力和生长特性。另外, Chia *et al*^[45]将肝细胞附着在微载体表面或包裹在微囊中, 然后接种到生物反应器中, 这样可以为细胞提供一个类似于体内的微环境, 使培养于其中的肝细胞能够更好地维持其分化状态和功能。

迄今发展的各种肝细胞培养方法各具优缺点, 对比见表2。

3 讨论与应用前景展望

在过去的几十年里, 肝细胞的体外培养技术在众多科学家的共同努力下得到了迅猛的发展, 出现了能满足各种实验要求的细胞分离与培养方法, 促进了以肝细胞分离、培养为基础的各项研究的进程。

3.1 利用已知成分的化学培养液实现肝细胞的可控培养 在探索过程中, 除了对肝细胞的分离、培养技术进行研究外, 还有人对用于肝细胞培养的培养液成分进行了摸索^[56]。最初, 人们在培养液中加入一定量的胎牛血清, 使培养的肝细胞能够在较长时间内维持生存能力, 但这样并不利于肝细胞分化特性的维持。失去分化表型的肝细胞无法被HBV感染, 故使用该培养液培养得到的肝细胞不能作为细胞模型应用到对HBV感染的研究当中。有人发现, 门静脉血中含有一定成分, 能促进肝细胞分化。但从不同动物血管中收集得到的门静脉血成分所具有的不均一性, 阻碍了该培养液的广泛的应用。近年来, 随着人们对肝细胞生长、分化相关细胞因子研

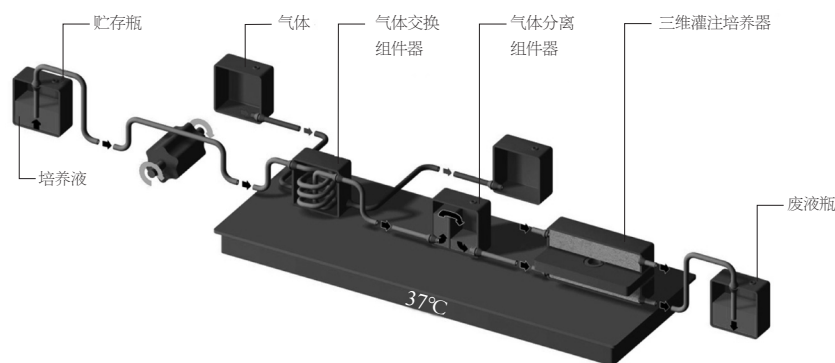


图3 基于人工脉管的三维培养系统。

■同行评价

本文内容全面, 有深度, 提供了很多有意义的新信息, 对于原代肝细胞分离培养技术的应用与改进, 有重要的指导价值。

究的深入, 不同生长因子在肝细胞生长、分化的不同阶段所起作用也逐渐得到了阐明。为了能使肝细胞能在完全可控的条件下生长, 科学家们多采用无血清的已知成分的化学培养液, 然后再加入一定量的能促进肝细胞分化的生长因子, 实现了肝细胞的可控培养。

3.2 基于人工脉管的三维培养系统 有关原代肝细胞培养, 科学家们最关心的还是处于培养体系中的肝细胞能否在尽可能长的时间内维持其分化表型, 使HBV能够在自然培养状态下成功感染肝细胞, 进而鉴定HBV受体, 深入研究HBV复制过程及致病机制, 并进行有效的抗病毒药物筛选。但到目前为止, 所有的培养方法都难以达到此要求, 培养得到的细胞或者具有较低的生存能力, 或者在培养过程中很快失去分化表型。所以, 缺乏模拟体内HBV感染过程的体外感染细胞系统, 一直是进行HBV基础研究的一个巨大的技术瓶颈。胡康洪 *et al*^[37,57-58]在研究肾小管的发育和功能性成熟的过程中, 创建了一种全新的基于人工脉管的三维培养系统(图3)。经过详细研究处于培养体系中的组织外植体的微环境后发现, 培养液体积远大于组织外植体的体积(也称死角体积)是制约外植体分化的关键, 而以人工脉管取代胶原作为生长支架的三维培养系统可最大限度降低死角体积, 有助于在较长时间内维持原代细胞的分化表型。同时, 经过筛选得到的聚酯羊毛人工脉管在加入培养液后可模拟天然的毛细血管, 保证了组织表面均匀的液体交换。该培养系统不仅为细胞提供了某种程度的机械保护, 也很好地模拟了体内微环境, 使培养其中的细胞能在较长的时间内维持良好的生长、分化状态。

受到该思路的启发, 我们拟将该基于人工脉管的三维培养系统运用到原代肝细胞的培养中, 在不含血清的化学培养液中加入各种肝细胞生长因子, 并通过不断优化培养条件, 建立适

用于HBV感染的原代肝细胞培养模型。

4 结论

我们相信, 肝细胞分离培养技术的不断完善必将对以肝细胞研究为基础的病毒学、病理学和毒理学、生物化学、药代动力学、发育生物学以及以肝细胞移植为基础的临床治疗与应用产生巨大的推动作用。

5 参考文献

- Bremer CM, Bung C, Kott N, Hardt M, Glebe D. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cell Microbiol* 2009; 11: 249-260
- Anderson NG. The mass isolation of whole cells from rat liver. *Science* 1953; 117: 627-628
- Mitry RR, Hughes RD, Aw MM, Terry C, Mieli-Vergani G, Girlanda R, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, Dhawan A. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplant* 2003; 12: 69-74
- 张顶, 高丽, 张远旭, 孙丽, 冯悦, 何有文, 夏雪山, 张华堂. 树鼯肝细胞体外分离培养体系的复建及主要影响因素分析. *动物学研究* 2009; 30: 24-30
- Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* 1954; 99: 167-182
- 刘友平, 丁慧荣, 何涛, 代荣阳, 李洪. 一种简单、经济、高效的大量肝细胞培养方法. *生物学通报* 2005; 15: 47-48
- 王琳, 徐建波, 田元, 吴河水. 一种分离新生小鼠肝细胞的简单方法. *中国优生与遗传杂志* 2007; 15: 10-12
- Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520
- 李涛, 彭志海, 孙星, 唐华美, 裘国强. 经肝静脉与门静脉离体灌注分离猪肝细胞的比较研究. *肝脏* 2005; 10: 22-23
- Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83
- Gerlach JC, Brombacher J, Klöppel K, Schnoy N, Neuhaus P. Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers. *Transplantation* 1994; 57: 1318-1322
- 王英杰, 刘国栋. 大量分离乳猪肝细胞的方法. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 661-662
- 彭齐荣, 袁爱力, 赖卓胜, 朱薇. 大鼠肝细胞的大量分离方法. *现代消化及介入诊疗* 1999; 4: 27-29
- 俞红, 秦爱兰, 周霞秋, 向晓星, 张韡. 乳猪肝细胞的分离、培养及功能检测. *上海第二医科大学学报* 2004;

- 24: 178-180
- 15 Gerlach J, Brombacher J, Smith M, Neuhaus P. High yield hepatocyte isolation from pig livers for investigation of hybrid liver support systems: influence of collagenase concentration and body weight. *J Surg Res* 1996; 62: 85-89
- 16 刘应生, 胡以刚. 猪肝细胞的Gerlach分离法. 广州医学院学报 2002; 30: 54-57
- 17 罗树宏, 舒衡平. 鼠肝细胞的分离及传代培养. 湖南医科大学学报 1991; 16: 189-192
- 18 田三德, 潘婕, 解尚云. 体外肝细胞培养的研究进展. 陕西科技大学学报(自然科学版) 2006; 24: 152-155
- 19 王海霞, 陈爱芳, 张晓伟, 张汝建. 不同方法分离大鼠肝细胞的比较研究. 肝脏 2008; 13: 234-235
- 20 王宇明. 分离小鼠肝细胞的一种简易灌注法. 中国应用生理学杂志 1993; 9: 65-67
- 21 徐哲, 白雪帆, 滕光菊, 黄长形. 大鼠肝细胞分离、原代培养及生物学特性研究. 医学研究生学报 2003; 16: 342-344
- 22 Aiken J, Cima L, Schloo B, Mooney D, Johnson L, Langer R, Vacanti JP. Studies in rat liver perfusion for optimal harvest of hepatocytes. *J Pediatr Surg* 1990; 25: 140-144; discussion 144-145
- 23 聂兴草, 方峰. 一种改良的小鼠原代肝细胞培养方法. 同济医科大学学报 2000; 29: 160-161, 167
- 24 张莉萍, 康格非. 原代肝细胞培养的研究现状. 国外医学·临床生物化学与检验学分册 2004; 25: 193-196
- 25 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999; 13: 1883-1900
- 26 王英杰, 李梦东. 培养人肝细胞用于生物人工肝的初步研究. 第三军医大学学报 1997; 19: 194-195
- 27 韩聚强. 体外肝细胞培养技术新进展. 河北医科大学学报 2002; 23: 184-186
- 28 王贵民, 孟伟. 肝细胞制备和培养技术. 吉林医学 2003; 24: 11-12
- 29 Consolo F, Fiore GB, Truscetto S, Caronna M, Morbiducci U, Montevicchi FM, Redaelli A. A computational model for the optimization of transport phenomena in a rotating hollow-fiber bioreactor for artificial liver. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15: 41-55
- 30 洪奕, 龚逸鸿, 高长有, 沈家骢. 壳聚糖涂层聚乳酸细胞微载体的制备和性能. 材料研究学报 2005; 19: 589-593
- 31 Tao X, Shaolin L, Yaoting Y. Preparation and culture of hepatocyte on gelatin microcarriers. *J Biomed Mater Res A* 2003; 65: 306-310
- 32 张立国, 潘继伦, 李结良, 俞耀庭. 乳糖修饰壳聚糖微载体的制备及对培养肝细胞代谢活性的影响. 离子交换与吸附 2004; 20: 231-236
- 33 Wu C, Pan J, Bao Z, Yu Y. Fabrication and characterization of chitosan microcarrier for hepatocyte culture. *J Mater Sci Mater Med* 2007; 18: 2211-2214
- 34 许烂漫, 陈永平. 微囊化肝细胞在急性肝衰竭中的研究进展. 国际流行病学传染病学杂志 2006; 33: 121-123, 128
- 35 张金卷, 宋继昌. 生物型人工肝肝细胞培养系统的研究进展. 武警医学院学报 2003; 12: 234-235, 238
- 36 闫峰, 赵军, 马建仓, 苏清华. 用于生物人工肝的乳猪肝细胞球形聚集培养. 陕西医学杂志 2003; 32: 477-479
- 37 胡康洪, 姚颖. 三维细胞培养技术的研究与应用. 医学分子生物学杂志 2008; 5: 185-188
- 38 Brophy CM, Luebke-Wheeler JL, Amiot BP, Khan H, Remmel RP, Rinaldo P, Nyberg SL. Rat hepatocyte spheroids formed by rocked technique maintain differentiated hepatocyte gene expression and function. *Hepatology* 2009; 49: 578-586
- 39 Sodunke TR, Bouchard MJ, Noh HM. Microfluidic platform for hepatitis B viral replication study. *Biomed Microdevices* 2008; 10: 393-402
- 40 刘剑峰, 李明, 杨巍, 楼哈芬. 一种新型生物人工肝支持系统. 透析与人工器官 2007; 18: 9-13
- 41 陈阳, 余小舫. 生物人工肝的细胞培养及反应器进展. 国际外科学杂志 2007; 34: 107-111
- 42 王英杰, 刘鸿凌, 郭海涛, 刘俊, 文红伟, 王宇明. 培养猪肝细胞中空纤维型生物反应器的制备. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 358-360
- 43 Jasmund I, Langsch A, Simmoteit R, Bader A. Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol Prog* 2002; 18: 839-846
- 44 何礼荣, 王英杰, 戴坤扬, 张允平, 刘俊, 郭海涛, 刘鸿凌. 两种人工肝生物反应器内乳猪肝细胞培养的比较研究. 肝脏 2006; 11: 377-380
- 45 Chia SM, Wan AC, Quek CH, Mao HQ, Xu X, Shen L, Ng ML, Leong KW, Yu H. Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. *Biomaterials* 2002; 23: 849-856
- 46 Nyberg SL, Shatford RA, Hu WS, Payne WD, Cerra FB. Hepatocyte culture systems for artificial liver support: implications for critical care medicine (bioartificial liver support). *Crit Care Med* 1992; 20: 1157-1168
- 47 Koike M, Matsushita M, Taguchi K, Uchino J. Function of culturing monolayer hepatocytes by collagen gel coating and coculture with nonparenchymal cells. *Artif Organs* 1996; 20: 186-192
- 48 Kern A, Bader A, Pichlmayr R, Sewing KF. Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans. *Biochem Pharmacol* 1997; 54: 761-772
- 49 李晓斌. 用于生物人工肝的细胞培养及其应用. 国外医学·消化系疾病分册 2000; 20: 30-33
- 50 Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, Tompkins RG. Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J* 1989; 3: 174-177
- 51 王莹, 张先杰, 宋茂民, 孙家邦, 段钟平, 陈煜, 乔欣. 三明治构型大鼠原代肝细胞长期培养及功能测定. 传染病信息 2007; 20: 158-162
- 52 Chamuleau RA, Deurholt T, Hoekstra R. Which are the right cells to be used in a bioartificial liver? *Metab Brain Dis* 2005; 20: 327-335
- 53 张金卷, 李涛. 微囊化乳猪肝细胞培养. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 48
- 54 王宇明. 肝细胞培养系统在生物人工肝中应用的研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1993; 20: 97-102
- 55 向德栋, 王英杰, 王宇明. 人工肝生物反应器研究进展. 世界华人消化杂志 2003; 11: 598-600
- 56 陈柯, 高毅. 有效原代猪肝细胞培养体系的研制. 世界华人消化杂志 1999; 7: 206-209
- 57 胡康洪, 闫朝丽. 创建可控制的生长环境诱导肾干细胞体外分化肾小管. 生物医学工程研究 2008; 27: 175-178
- 58 Hu K, Denk L, de Vries U, Minuth WW. Chemically defined medium environment for the development of renal stem cells into tubules. *Biotechnol J* 2007; 2: 992-995

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

高原缺氧与肝脏损伤

荣黎, 曾维政, 吴晓玲

荣黎, 重庆医科大学附属第二医院消化内科 重庆市 400016
曾维政, 吴晓玲, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科
四川省成都市 610083

作者贡献分布: 本文由荣黎综述; 曾维政与吴晓玲审核。

通讯作者: 曾维政, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科. zengweizheng@163.com

电话: 028-86570347

收稿日期: 2009-05-29 修回日期: 2009-07-08

接受日期: 2009-07-13 在线出版日期: 2009-07-28

High-altitude hypoxia and liver injury

Li Rong, Wei-Zheng Zeng, Xiao-Ling Wu

Li Rong, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Wei-Zheng Zeng, Xiao-Ling Wu, Department of Gastroenterology, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Correspondence to: Wei-Zheng Zeng, Department of Gastroenterology, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. zengweizheng@163.com

Received: 2009-05-29 Revised: 2009-07-08

Accepted: 2009-07-13 Published online: 2009-07-28

Abstract

Because of bad environmental conditions at high altitude, such as low atmospheric pressure and partial pressure of oxygen and strong radiation, high-altitude sickness is a common and frequently occurring disease in high-altitude regions. To meet military, economic and cultural needs, more and more people are entering into high-altitude regions. Accordingly, the research on the pathogenesis, clinical symptoms, prevention and therapy of high-altitude sickness is attracting wider attention. In this article, we will review the relationship between high-altitude environmental conditions and liver injury, and discuss the mechanisms underlying high altitude-induced liver injury.

Key Words: High-altitude region; Hypoxia; Hepatocyte injury

Rong L, Zeng WZ, Wu XL. High-altitude hypoxia and liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2171-2178

摘要

高原自然条件恶劣, 低气压、低氧分压、辐射强等因素严重影响人们的身体健康, 使得高原病成为高原地区特有的常见病和多发病。随着军事、经济、文化的发展, 越来越多的人进入高原, 对高原病发病机制、临床症状、预防及治疗等研究成为热点。本文就高原环境、肝细胞缺氧及由此可能导致的肝脏在细胞、分子及基因水平的变化作一综述。

关键词: 高原; 缺氧; 肝细胞损伤

荣黎, 曾维政, 吴晓玲. 高原缺氧与肝脏损伤. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2171-2178

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2171.asp>

0 引言

随着军事、经济、文化的发展, 越来越多的人不断进入高原, 高原病随之成为威胁由平原进入高原或由高原进入更高海拔的人们身体健康的高原地区特有的疾病。最新研究表明, 我国内陆上海和广东地区总人口中, 脂肪肝的患病率分别为17%和15%。颜俊 *et al*^[1] 的调查发现502名高原受检者中, 有86名为不同程度的脂肪肝患者, 患病率为17.1%。蒋瑾 *et al*^[2] 的研究亦发现高原低氧环境为脂肪肝易发因素。戴青湘^[3] 在744名高原干部体检时发现其脂肪肝患病率为39.25%。最近, 闫敏 *et al*^[4] 对西藏高原的脂肪肝发病率调查显示, 接受体检的696名当地干部脂肪肝检出率为29.89%。以上调查提示, 缺氧已成为高原脂肪肝高患病率的一个重要因素。有资料表明, 高原红细胞增多症患者20%-40%有肝大, 高原性心脏病患者28%有肝大。这类患者肝大的原因主要是由于急性或慢性缺氧对肝细胞的损害, 致肝细胞充血、水肿及脂肪变性。高原地区脂肪肝的发生率高于平原, 且以Ⅲ级脂肪肝的发生率最高, 可能是由于低氧抑制三羧酸循环, 肝细胞对脂肪酸的氧化能力降低, 促进脂肪酸的合成, 引起脂肪在肝内堆积, 超过了肝脏的转运能力; 且低氧干扰了正常的磷脂代谢过

■背景资料

各种急慢性高原病严重影响着高原地区军民的身体健康状况。既往的高原病研究主要集中在高原肺损伤、高原脑损伤及高原性心脏病等方面, 而对于高原低氧环境导致肝损伤的研究还相对少见。因此对高原缺氧这种特殊环境所致各种疾病的发病机制研究非常必要。

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■研究前沿

随着军事、经济、文化的发展,越来越多的人进入高原,对高原病发病机制、临床症状、预防及治疗等研究成为热点。

程,降低了肝脏的转运能力。

1 高原环境的主要不利因素

高原地区空气稀薄,气压低,海拔每升高100米,相应大气压就下降5 mmHg,氧分压随之下降1.1 mmHg。以往高原流行病学调查显示海拔3000 m、3700 m、3900 m、4500 m 4个不同海拔的人群,其高原发病率分别为57%、64%、89%、100%,这充分说明海拔高度对高原发病率的影响^[5]。同时,太阳辐射及气候变化等亦构成多种高原疾病的致病因素^[6-8]。以往研究表明,高原居民体内存在着一定程度的氧自由基(oxygen free radical, OFR)代谢紊乱,主要表现为自由基清除剂超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性下降,而脂质过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)增多,且此现象随海拔升高而明显,其原因可能与高原缺氧、空气稀薄、辐射增加,使OFR产生增多、抗氧化剂SOD等消耗有关。大量OFR长期作用于生物体的细胞膜及细胞器膜可造成组织细胞的损伤。

2 肝脏的血液供应和氧代谢

肝脏是机体最重要的代谢器官,是机体的能量加工厂及各种生理活性物质的重要合成场所。由于其血供的特殊性,形成了肝脏内氧分压梯度代谢现象,因此肝脏对缺氧极为敏感。肝脏具有双重血供-肝固有动脉和门静脉。前者的血液供应占肝脏血流量的1/4,主要为肝脏供氧;后者提供肝脏3/4的血供,主要为肝脏提供营养。肝动脉和门静脉经肝门入肝后反复分支,分别形成小叶间动脉和静脉,其动静脉血液在肝窦内混合并与肝细胞发生物质交换,随后汇入中央静脉。故肝脏的微循环就是门静脉与肝动脉终末支经肝窦然后到细小肝静脉这样一个循环。肝窦内皮细胞是肝窦的主要成分,具有机械屏障、物质转运、代谢及分泌等功能,肝脏许多病理过程的发生都有肝窦内皮细胞的参与。肝窦内皮细胞在肝脏缺氧时出现功能异常的时间早于肝脏实质细胞,而其结构和功能的恢复却晚于后者,这是因为他是缺氧损伤的靶点,受损后又可导致肝脏微循环障碍,继而加重肝细胞的损伤^[9]。同时,肝窦内皮细胞可释放和表达多种生物活性分子从而损伤肝细胞。

Rappaport腺泡学说将腺泡小叶分为3个区带。靠近汇管区者为1区带,近中央静脉区者为3区带,2区带介于之间。1区带优先获得含氧和营养的

新鲜血液,细胞新陈代谢活跃,抵御疾病能力强,细胞再生最早出现;3区带的肝细胞营养条件差,对缺氧等有害因素的抵抗力及肝细胞再生能力较弱^[10]。3区带的肝细胞浆中所含线粒体多于1区带的肝细胞,且线粒体的数量随氧浓度的降低而升高。血液从门静脉到中央静脉沿着肝窦的氧代谢过程中形成了明显的氧分压梯度,氧分压从门静脉周围区域65 mmHg降至中央静脉周围35 mmHg。氧分压梯度被认为是糖代谢酶编码基因的主要调节者。糖酵解酶如葡萄糖激酶,乳酸激酶,乳酸脱氢酶在氧分压较低的3区带表达,此处肝脏的代谢以无氧酵解为主;在氧分压较高的1区带,肝脏的糖代谢以糖原生及糖原合成为主。

肝脏在低氧状况下具有一定的调节适应能力。慢性缺氧时,激活的缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)结合于调控相关靶基因的缺氧反应元件,通过转录相关靶基因如促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等增加红细胞和血管数量以提高组织的氧供;急性缺氧时, HIF-1调控转录葡萄糖激酶、乳酸激酶,乳酸脱氢酶等以启动无氧酵解提供能量,从而增强低氧条件下的代谢适应能力,故HIF-1在肝脏缺氧的病理状况中起到重要调控作用^[9]。

3 HIF-1

HIF-1是Semenza *et al*^[11]在低氧的肝癌细胞株核提取物中发现的一种蛋白,普遍存在于人和哺乳动物体内。他是一种异源二聚体转录因子,由 α 亚基和 β 亚基组成,其中HIF-1 α 是主要的功能亚基。HIF-1 α 含有一个独特的氧依赖降解区(oxygen-dependent degradation domain, ODD),在控制HIF-1 α 的稳定方面起着关键作用。常氧情况下HIF-1 α 极不稳定,易被泛素依赖的蛋白水解酶降解而几乎不发生表达;缺氧情况下,由于HIF-1 α mRNA的连续合成而得以稳定表达。HIF-1 β 在几乎所有细胞内广泛表达,对氧的依赖性较弱。缺氧时, HIF-1 α 被运输到核内,与HIF-1 β 形成二聚体,并结合于不同靶基因的调控序列即缺氧反应元件(hypoxia-responsive element, HRE),从而启动靶基因的转录与表达,如VEGF、EPO、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、糖酵解所必需的酶、一些涉及铁代谢和细胞生存的蛋白质等。HIF-1 α 激活、启动靶基因的表达以适应缺氧的几种主要途径:

(1)通过促红细胞增值以增加全身组织氧的运输,如提高转铁蛋白及其受体、血红素氧合酶1和促红细胞生成素等基因和产物水平。(2)通过血管扩张和新生血管生成以增加局部组织氧供,如一氧化氮合酶、血管内皮生长因子等基因及产物的增多。(3)增强细胞在低氧情况下的代谢适应能力,如葡萄糖载体蛋白和糖酵解酶合成增加等。

细胞感受缺氧刺激后是通过什么信号转导途径来调节细胞HIF-1 α 的表达和转录活性呢?研究发现缺氧诱导因子脯氨酸羟化酶(proline hydroxylase, HPH)的羟基化作用对于HIF-1 α 的降解或稳定起着关键作用。在氧分子和铁离子存在的条件下, HIF-1 α 氧依赖降解区内的脯氨酸残基在HPH作用下发生羟基化,使肿瘤抑制蛋白(von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, pVHL)和HIF-1 α 稳定结合, HIF-1 α 迅速降解。缺氧状态下,脯氨酸残基羟基化反映受阻,细胞内HIF-1 α 水平增加^[12]。蛋白磷酸化对HIF-1 α 水平的调节同样具有重要作用。实验发现丝/苏氨酸激酶抑制剂和酪氨酸激酶抑制剂处理可使缺氧细胞内HIF-1 α 水平下降,而丝/苏氨酸磷酸酶抑制剂和酪氨酸磷酸酶抑制剂处理则使缺氧细胞HIF-1 α 水平升高。Jiang *et al*^[13]发现抑癌基因PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)功能缺失型突变的肿瘤细胞内HIF-1 α 蛋白质水平上调,而磷酸酯肌醇3激酶(phosphoinosine 3 kinase, PI3K)特异性抑制剂LY294002能够呈剂量依赖性地抑制这种上调作用,将野生型PTEN(野生型PTEN对PI3K/Akt信号途径具有抑制作用)导入PTEN缺乏的PC-3细胞也能下调细胞内HIF-1 α 水平,说明PI3K信号通路对HIF-1 α 水平具有调节作用。Sodhi *et al*^[14]研究发现PI3K经Akt信号途径激活糖原合成激酶(glycogen synthesis kinase, GSK)-3, GSK-3能直接使HIF-1 α 氧依赖性降解区内的氨基酸残基磷酸化,从而使HIF-1 α 稳定性增加。研究发现^[15]缺氧条件下不产生活性氧的rho0细胞与产生活性氧的细胞在HIF-1 α 蛋白质稳定性、核转位过程和转录活性三个方面均无显著差异,但有实验结果表明^[16]用鱼藤酮和DPI抑制线粒体复合物I电子传递链可以导致Rac1(Rac1与Ras同属小GTP酶Rho家族,能够激活丝/苏氨酸蛋白激酶)的活性受到抑制,使HIF-1 α 蛋白质的缺氧诱导性表达下降。故缺氧条件下活性氧对于HIF-1 α 的调节有待深入研究。Tacchini *et al*^[18]的体外试

验研究显示肝细胞生长因子能激活HIF- α ,而抗氧化剂N乙酰半胱氨酸能抑制其激活。Alvres *et al*的研究发现PI3K-FRAP/mTOR途径和MAPK途径能在无氧条件下增强HIF-1 α 的转录及翻译,其中MAPK信号转导是HIF-1转录活动调节的一个重要机制。缺氧(80 mL/L O₂)培养的肝细胞经胰岛素处理,可通过PI3K途径使HIF-1 α 蛋白表达增加大约6倍, HIF-2 α 表达增加5倍, HIF-3 α 增加3倍^[19]。Blagosklonny *et al*^[17]的研究提示P53的失活及癌基因如Src的激活能上调HIF-1的表达。冯珍 *et al*^[20]的研究提示HIF-1 α 可能通过调节基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase, MMP-2)和VEGF的表达促进了肝纤维化的发展。吴晓兰 *et al*^[21]的试验研究显示,缺氧诱导的细胞抑制和凋亡中, *p53*、*p21*下调和*bcl-2*上调依赖于HIF-1 α 调节。已往对HIF-1 α 的研究主要集中于其在肿瘤的发生、发展、浸润、转移中的作用,而在高原低压缺氧情况下肝脏的损伤和修复过程中的表达及其机制的研究还甚少。

Peet *et al*研究发现1种天冬酰胺羟化酶,可在常氧下抑制HIF-1 α 的活性^[22]。已证实天冬酰胺羟化酶就是原来认为的HIF抑制因子(factor inhibiting HIFs, FIH)。FIH与HPH的活性均是氧依赖性的,受氧浓度的调节。随着氧浓度的下降而失活,使HIF得以稳定表达。近年发现小泛素蛋白样修饰蛋白(small ubiquitin-related modifier, SUMO)化修饰能在常氧和相对低氧条件下调节HIF-1 α 蛋白的稳定性,从而改变其转录活性。SUMO由Meluh和Koshland *et al*^[23]发现,并由Mahajan *et al*^[24]首先提出。Shao *et al*^[25]研究发现,用低氧刺激成年小鼠后,其体内SUMO-1的mRNA和蛋白表达水平均急剧增加, SUMO-1与HIF-1 α 共同定位于核内,表明SUMO-1能使HIF-1 α 发生SUMO化,其原因可能是低氧使得E3酶活性增加^[26]。近来的一系列研究均表明: SUMO化可使HIF-1 α 的稳定性和转录活性发生改变^[25-30]。

4 缺氧和肝细胞损伤

高原缺氧初期,机体可以在代偿范围内产生适应性变化,表现为糖酵解增强,细胞线粒体数目增多,膜表面积增大,呼吸链中细胞色素氧化酶和琥珀酸脱氢酶等增加。但持续的缺氧最终导致组织细胞缺氧损伤,这种缺氧损伤主要表现在细胞膜、线粒体、溶酶体变化上。缺氧造成细胞膜对离子的高通透性,钠离子内流,又由于ATP生成减少,使钠泵发生功能障碍,钠离子进

■ 相关报道

颜俊 *et al*的调查发现502名高原受检者中,有86名为不同程度的脂肪肝患者,患病率为17.1%。蒋瑾 *et al*的研究亦发现高原低氧环境为脂肪肝易发因素。戴青湘^[3]在744名高原干部体检时发现其脂肪肝患病率为39.25%。最近,闫敏 *et al*对西藏高原的脂肪肝发病率调查显示,接受体检的696名当地干部脂肪肝检出率为29.89%。

■应用要点

普通实验动物以及适当的低压缺氧装置是研究高原缺氧所致肝脏损伤模型的有用工具。相当一部分高原居民患有不同程度的肝脏病变,分子、基因水平的深入探讨成为高原肝病研究的重要手段。

一步内流,导致细胞水肿;缺氧造成钾离子外流,导致组织细胞合成障碍;缺氧引发钙离子内流,抑制线粒体的呼吸功能,激活磷脂酶,使膜磷脂分解,引起溶酶体损伤,并激活蛋白水解酶,使黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶,致氧自由基生成增多,加重细胞损伤;钙超载还可激活kupffer细胞,后者释放大量的毒性物质介导肝脏损伤;肝窦内皮细胞钙超载可致肝内微循环阻力增大,发生微循环障碍。当线粒体氧分压低于0.1 kPa时,脱氢酶活性下降,使线粒体呼吸功能下降,电子传递障碍,产生大量活性自由基。缺氧导致的酸中毒及细胞内高钙可引起磷脂酶活性增高,使溶酶体膜磷脂分解,溶酶体破裂后释放多种水解酶,导致组织溶解破坏^[10]。

氧自由基包括超氧化物自由基、过氧化氢、羟自由基等,主要源于体内细胞质黄嘌呤氧化酶、Kupffer细胞、中性粒细胞,对几乎所有生物活性物质均具损伤作用。自由基引起肝细胞损伤的机制:(1)改变蛋白质结构;(2)直接损伤肝细胞生命必需基团;(3)启动脂质过氧化反应;(4)消除自由基清除剂^[10]。细胞膜主要由膜脂组成,而膜脂的主要成分是多聚不饱和脂肪酸,因此容易受自由基攻击而发生一系列氧化连锁反应,即脂质过氧化反应。脂质过氧化是指发生在多不饱和脂肪酸中的一系列自由基反应,其主要损伤部位在生物膜及亚细胞器,而肝脏是机体抗脂质过氧化损伤的中心。脂质过氧化反应的中间产物自由基和终产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)均可致膜受损;同时脂质过氧化反应激活花生四烯酸途径,形成白三烯、前列腺素等高度活性物质,并产生氧自由基,如此反复形成恶性循环,加重组织细胞损伤。刘丽萍 *et al*^[33]研究显示,慢性高原病患者体内MDA明显升高,超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活力显著降低,说明缺氧产生的氧自由基可攻击肝细胞膜产生脂质过氧化,造成肝组织结构和功能的损伤。张志琳 *et al*^[34]认为,缺氧可使血管内皮细胞产生的氧自由基发生脂质过氧化损伤细胞,而且其脂质过氧化产物MDA可使蛋白质发生交联聚合反应引起细胞损伤。脂质过氧化反应损伤肝细胞的机制主要包括^[10]:(1)扩大自由基的连锁反应;(2)脂质过氧化物本身的毒性作用;(3)直接损伤肝细胞质膜;(4)脂质过氧化反应产生大量过氧化氢、脂质过氧化氢;(5)脂质过氧化过程中磷脂酶A2和磷脂酶C被激活,使游离花生四烯酸产生增多,后者对肝细

胞具有一定损伤作用。MDA是脂质过氧化反应的最终代谢产物,能反映自由基产生及其引发的脂质过氧化反应,其含量与脂质过氧化反应强度及组织损伤程度呈正相关。SOD主要来源于肝脏,能清除过多的氧自由基,有较强的抗氧化能力。SOD减少可以代表肝脏抗氧化损伤能力的降低。动物实验表明急性低压缺氧后肝功指标显著升高,大鼠肝脏的超微结构改变明显,表现为线粒体肿胀、脊断裂、核固缩等。有研究发现高海拔地区人群的肝功能指标如ALT、AST、 γ -GT、ALP水平较平原组地区人群显著升高。张红梅 *et al*^[35]在检测慢性高原病患者肝功能变化时亦发现实验组ALT、AST等升高,总蛋白和白蛋白均降低。崔建华 *et al*^[36]研究发现,入住高原3 mo的受试人群血清肝功指标增高,表明当人群不能耐受高原慢性缺氧时,可引起肝细胞损害。长期缺氧引起肺血管收缩,肺动脉高压,右心房压力增加,肝静脉回流受阻可导致肝静脉淤血;同时缺氧本身可引起肝脏充血、肿胀,功能受损。马志军 *et al*^[37]在研究高原低氧家兔的肝细胞超微结构时发现,平原家兔随移居时间的延长,线粒体数量明显减少,并出现线粒体和内质网的肿胀和扩张;高原喂养8 wk的家兔肝细胞超微结构表现为肝细胞水肿,胞质增多,线粒体分布稀疏,肿胀明显呈球形,粗面内质网肿胀,多聚核蛋白体从内质网表面脱落,滑面内质网扩张更为明显。张彦博 *et al*报道,高原地区土生狗和绵羊的肝细胞在光镜下中度浑浊,部分肝细胞内可见到脂肪变性和点状坏死,星状细胞胞质内见到较多脂滴,部分脂滴呈空泡样变性,且这种变化随海拔高度升高而越发明显。蒋瑾 *et al*研究表明,高海拔环境使肝脏处于相对乏氧状态,产生大量活性氧类物质;特别是饮酒者,乙醇和乙醛在肝脏的氧化分解代谢不全,又可产生大量的氧自由基,进一步加重肝细胞的损伤,加速肝细胞脂肪变性的形成。周嘉鹤 *et al*^[39]发现实验大鼠随着缺氧时间延长,肝组织的SOD含量明显降低,而MDA含量显著增加,说明缺氧导致氧自由基对肝细胞质膜的破坏性增加,肝细胞抗氧化能力下降,提示长期慢性缺氧容易导致肝功能的损害。王立义^[40]在平原大鼠急进高原后肝肾的电镜观察中发现,平原大鼠急进高原后2 d即出现肝细胞内部分线粒体局部外膜和嵴消失,糖原减少,内质网局部有脱颗粒现象,推测可能是在急性低氧环境下机体肝功能障碍的病理基础。

5 缺氧与肝细胞凋亡

肝细胞凋亡主要表现为: 细胞皱缩变小, 胞膜保持完整, 胞质浓缩, 内质网扩张呈囊泡状并与细胞膜融合, 核染色质固缩并边缘化, 核DNA被核酸酶降解为规则的DNA片段, 电泳表现为特殊的“梯带现象”。凋亡后期细胞膜内陷, 将细胞分割为含有各种细胞成分的膜结构即凋亡小体, 并为吞噬细胞所吞噬^[41]。

根据凋亡调控基因在细胞凋亡过程中所起的作用, 将凋亡调控基因分为3类。一是促进细胞凋亡的基因, 包括野生型P53、C-fos、白介素-1转化酶(ICE)、Fas/Apo-1、Bax、C-myc、TNF- α 等; 二是抑制细胞凋亡的基因, 包括**bcl-2**、Ced-9、突变型**p53**、**bcl-x**等; 三是在细胞凋亡过程中表达的基因, 包括cyclin-D、**p53**、TGF- β 、**c-myc**、热休克蛋白-70(heat shock protein, HSP-70)等。

既往研究认为肝细胞凋亡主要为死亡受体通路和线粒体依赖性的细胞凋亡通路所介导。死亡受体途径的发生是由FasL、TNF- α 、TRAIL各自与相应细胞膜上受体特异性结合后聚集胞质内的caspase-8或caspase-10, 进而激活下游的caspase-3, 引发细胞凋亡。Lapinski *et al*^[42]的研究发现病毒性肝炎等肝病中, Fas受体诱导了肝细胞凋亡。Ribeiro *et al*^[43]也发现在非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)及酒精性脂肪型肝炎(alcoholic steatohepatitis, ASH)中可见到Fas受体介导的肝细胞凋亡。史洪涛 *et al*^[47]在非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)大鼠实验中, 发现随着肝细胞凋亡的增加, caspase-3也相应增高, 提示caspase-3介导的肝细胞凋亡可能是脂肪肝发病过程中肝细胞损伤的重要机制。Thiery *et al*^[44]的研究发现野生型**p53**有明显的促肝细胞凋亡的作用, 主要通过转录、激活并抑制抗凋亡基因来实现。Liu *et al*^[45]发现**p53**在脂肪肝发病中起重要作用, 并且与**p21**共同起协调作用。线粒体途径涉及线粒体跨膜电位消失, 膜通透性改变, 细胞色素C释放, 活化caspase-9, 在d-ATP存在时, 引起下游caspase-3、6、7的活化, 介导细胞凋亡。Sato *et al*^[46]发现脂肪肝中TNF- α 的上调可引起线粒体膜通透性改变并引起凋亡发生。近年研究发现内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)通路参与介导了肝细胞的凋亡。所谓内质网应激是指^[48-52]各种原因引起内质网中出现错误折叠和未折叠蛋白在腔内

聚集以及钙离子平衡紊乱, 导致caspase-12活化诱导GRP78/Bip, GRP94, GADD34, GADD45A, CHOP等分子伴侣产生增加, 继而激活非细胞色素C依赖的caspase-9, 引发级联反应, 诱导凋亡。葡萄糖调节蛋白78(glucose regulatory protein-78, GRP78)是位于内质网的一种分子伴侣蛋白, 协助新生蛋白质正确结构的折叠, 内质网发生应激时其表达显著增加, Lee^[53]认为可作为内质网应激的标志蛋白。Ji *et al*^[54]发现, 内质网应激时位于内质网膜上的转录因子固醇调节元件结合蛋白-1(Sterol regulatory element binding protein, SREBP-1)表达增加, 且转录活性受到激活, 进而与靶基因的固醇调节元件结合, 从而调节脂质合成。Werstuck *et al*^[55]也发现, 内质网应激可促使肝细胞甘油三酯、胆固醇等脂质合成增加。林胜利 *et al*^[56]的研究也发现, 内质网应激在四氯化碳诱导的大鼠脂肪肝变性中起了重要作用。

大量动物实验发现缺氧可导致细胞凋亡增加。齐丽彤 *et al*^[57]证实缺氧可以诱导鼠心肌细胞凋亡, 且凋亡细胞数量随缺氧时间的延长而增加。司少艳 *et al*^[58]的实验表明, 慢性缺氧通过降低**bcl-2**的表达来促进大鼠胸腺细胞凋亡的发生。Shimizu *et al*^[60]的实验也表明缺氧可以诱导凋亡的发生, 其他凋亡相关基因如**p53**, **fas**, **c-jun**等同样参与了缺氧所诱导的细胞凋亡。但梁桃 *et al*^[59]在大鼠肝脏缺氧性损伤中凋亡机制的研究时却发现: 缺氧组中凋亡细胞明显低于对照组, 提示缺氧情况下, 调节凋亡的细胞因子可能发生变化, 实验组中Bcl-2过度表达而Bax表达减少从而抑制凋亡, 进而使肝脏增殖和凋亡平衡发生失调。吉瑞瑞 *et al*^[61]的体外细胞缺氧模型中发现缺氧模型组血管内皮细胞发生凋亡, 形态学表现为: 染色质高度浓缩, 沿核膜排列形成大小不同的块状, 流式细胞仪检测发现缺氧组模型细胞DNA在G₀/G₁前出现明显的凋亡亚二倍体峰, DNA琼脂糖凝胶电泳检测缺氧组模型细胞有明显的DNA梯形条带, 有不规律的DNA断裂, 表明缺氧可以诱导细胞凋亡的发生。

肝细胞凋亡在酒精性脂肪性肝病(alcoholic fatty liver disease, AFLD)的发生发展中具有重要作用, 氧化应激被认为是主要发生机制之一^[62-64]。活性氧和脂质过氧化产物可诱导细胞色素p450E1生成, 同时可引起线粒体功能丧失, 导致前凋亡因子如细胞色素C从线粒体释放。研究发现肝细胞Bcl-2蛋白表达与丙二醛的水平之间呈负相关, 提示Bcl-2可阻断肝组织脂质过氧化

■同行评价

本文有较好的科学性和可读性, 较好地反映了我国和国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

物和活性氧类物质的积聚,减轻肝组织的损伤。肝细胞凋亡在NAFLD中也显著增高,而氧化应激和脂质过氧化同样参与了肝细胞凋亡^[65-66]。缺氧引起肝细胞线粒体受损,肝细胞氧化磷酸化产能减少,肝细胞生物膜损伤;钙超载触发细胞凋亡;线粒体功能受损还使得肝脏氧自由基增多,导致DNA、蛋白质、脂膜的氧化损伤,从而导致细胞凋亡。黎一鸣 *et al*^[68]在肝动脉缺血对肝细胞凋亡的影响研究中发现,氧自由基在肝动脉缺血诱发的肝组织细胞凋亡发生中发挥了最为重要的作用。氧自由基促进组织中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,后者可诱发细胞凋亡的发生。ROS包括超氧阴离子,羟甲基、过氧化氢,脂质过氧化产物等。羟自由基不仅使细胞膜发生脂质过氧化,还损坏线粒体内膜,进而启动下游事件的发生影响细胞生存,并通过与之相关的核糖多聚酶的激活而导致DNA氧化损伤乃至死亡^[67]。试验表明,ROS升高或者耗竭内源性抗氧化剂可导致程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),其机制与ROS的增加导致凋亡抑制基因*bcl-2*表达水平上调有关。近年有研究表明缺氧条件下HIF-1 α 有促凋亡作用。Sowter *et al*^[69]研究发现在HIF-1 α 缺陷的KA13细胞,缺氧后只有少量BNIP3蛋白表达,细胞凋亡率降低,但在有HIF-1 α 表达的细胞中,BNIP3蛋白表达增加,进而推测BNIP3蛋白的产生是HIF-1 α 依赖性的。Kim *et al*^[70]发现在缺氧时HIF-1 α 可直接结合Noxa启动子区域的缺氧反应元件,从而使其表达增加,进而产生活性氧族、释放线粒体细胞色素C、活化caspase,诱导细胞凋亡。HIF-1 α 可以通过与促凋亡蛋白P53作用,提高后者的稳定性来促进细胞凋亡,也可通过上调其他促凋亡蛋白如BNIP3、Noxa等的表达水平而引起细胞凋亡^[71]。有实验表明缺氧可诱导野生型胚胎干细胞P53的表达,但在HIF-1 α 基因缺陷的胚胎干细胞中,P53蛋白水平则没有明显变化,从而推测缺氧时P53蛋白水平的升高是HIF-1 α 依赖性的,并证实HIF-1 α 是通过直接结合P53,增加后者稳定性,从而促进细胞发生凋亡。盛庆丰 *et al*^[72]在肝癌细胞缺氧与凋亡和增殖的实验中发现,随着缺氧程度的加重,HIF-1 α 在转录和翻译水平的表达逐渐增加,同时癌细胞凋亡的数目也明显增加,表现为两者的正相关性。与上述诸实验结果相反的是,张金平 *et al*^[73]的实验表明,红景天苷可抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡,该作用可能是通过激活PI(3)K/Akt信

号通路而上调HIF-1 α 的表达。李军昌 *et al*^[74]的实验表明:缺血再灌注损伤所致心肌细胞凋亡可通过PI3K/Akt途径的活化而下降。由此可见,证实缺氧是否通过激活HIF-1 α 途径来阻止或诱导肝细胞凋亡在缺氧致肝细胞损伤的研究中具有重要意义。

6 结论

既往对高原缺氧环境下肝损伤的试验大多从组织、细胞水平加以探讨,对于深入从细胞因子和基因水平探究缺氧造成肝损伤机制的试验研究还较少。随着医学事业发展,我们有必要更进一步深入了解和掌握高原环境所致肝脏急慢性损伤的发病机制,并研发出相应有效的药物,从而有助于高原疾病的预防和治疗。

7 参考文献

- 1 颜俊,曾蓉.高原脂肪肝患病情况调查.西南国防医药 2003; 13: 307-308
- 2 蒋瑾,付凯,仁青多吉,席增华.高海拔地区脂肪肝CT表现的分析.西藏医药杂志 2004; 25: 49-51
- 3 戴青湘.高原地区干部体检肥胖者其血脂、脂肪肝的初步分析.高原医学杂志 2003; 13: 23-25
- 4 闫敏,陈勇,关志峰.西藏高原脂肪肝患病情况及防治策略浅析.中国预防医学杂志 2007; 8: 116-119
- 5 达娃拉姆.高原多发病的生成机理与预防治疗.中国现代药物应用 2008; 2: 72-73
- 6 冯建明,沈括.慢性高原病的诊治进展.中国实用内科杂志 2007; 27: 75-77
- 7 侯少范,王五一,李海蓉,杨林生.高原环境因素与自由基反应.地理科学进展 2006; 25: 82-88
- 8 高钰琪,黄斌,黄庆愿,高文祥.高原军事医学基础研究进展.西南国防医药 2003; 13: 561-564
- 9 李斌,张培建,王红鲜,陶立德.肝脏的氧代谢与缺氧诱导因子-1表达的关系.国际外科学杂志 2006; 33: 18-22
- 10 梁扩寰,李绍白.肝脏病学.第2版.北京:人民卫生出版社,2006: 499-504
- 11 Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2001; 7: 345-350
- 12 胡瑞成,谭双香.缺氧诱导因子1 α 蛋白质水平及活性调节.国外医学·分子生物学分册 2003; 25: 99-102
- 13 Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 363-369
- 14 Sodhi A, Montaner S, Miyazaki H, Gutkind JS. MAPK and Akt act cooperatively but independently on hypoxia inducible factor-1 α in rasV12 upregulation of VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 292-300
- 15 Vaux EC, Metzen E, Yeates KM, Ratcliffe PJ. Regulation of hypoxia-inducible factor is preserved in the absence of a functioning mitochondrial respiratory chain. *Blood* 2001; 98: 296-302
- 16 Hirota K, Semenza GL. Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 2001; 276: 21166-21172
- 17 Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T, Neckers L. p53 inhibits hypoxia-inducible

- factor-stimulated transcription. *J Biol Chem* 1998; 273: 11995-11998
- 18 Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1363-1371
- 19 Kietzmann T, Samoylenko A, Roth U, Jungermann K. Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes. *Blood* 2003; 101: 907-914
- 20 冯珍, 陈平圣, 张爱凤, 刘东风, 张晓明, 王莉. 缺氧诱导因子-1 α 及其下游分子在大鼠肝纤维化组织中的表达. *现代医学* 2005; 33: 211-215
- 21 吴晓兰. 缺氧诱导因子-1研究进展. *国外医学·分子生物学分册* 2000; 22: 202-206
- 22 Peet D, Linke S. Regulation of HIF: asparaginyl hydroxylation. *Novartis Found Symp* 2006; 272: 37-49; discussion 49-53, 131-140
- 23 Meluh PB, Koshland D. Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 1995; 6: 793-807
- 24 Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 1997; 88: 97-107
- 25 Shao R, Zhang FP, Tian F, Anders Friberg P, Wang X, Sjöland H, Billig H. Increase of SUMO-1 expression in response to hypoxia: direct interaction with HIF-1 α in adult mouse brain and heart in vivo. *FEBS Lett* 2004; 569: 293-300
- 26 Cheng J, Kang X, Zhang S, Yeh ET. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 α during hypoxia. *Cell* 2007; 131: 584-595
- 27 Berta MA, Mazure N, Hattab M, Pouyssegur J, Brahimi-Horn MC. SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1 α reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 646-652
- 28 Bae SH, Jeong JW, Park JA, Kim SH, Bae MK, Choi SJ, Kim KW. Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 394-400
- 29 Rizos H, Woodruff S, Kefford RF. p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners. *Cell Cycle* 2005; 4: 597-603
- 30 田华, 戴爱国. HIF-1 α 的可逆性SUMO化修饰. *中国生物化学与分子生物学报* 2009; 25: 1-6
- 31 张翠萍, 谢印芝, 尹昭云. 高原低氧对消化系统生理功能影响及病理损伤. *解放军预防医学杂志* 2003; 21: 229-231
- 32 Pore N, Jiang Z, Shu HK, Bernhard E, Kao GD, Maity A. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1 α expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 471-479
- 33 刘丽萍, 阿祥仁. 高原红细胞增多症患者体内氧自由基代谢的研究. *临床荟萃* 2003; 18: 316-317
- 34 张志琳, 包仕尧, 吴鸿飞, 夏银燕. 血管内皮细胞缺氧性损伤及药物干预作用的实验观察. *江苏医药* 1998; 24: 805-807
- 35 张红梅, 王海, 黄海宝. 慢性高原肝病功能及血清酶的改变. *中外健康文摘* 2008; 5: 43-44
- 36 崔建华, 王引虎, 郭玉新, 张西洲, 高亮, 李彬, 王伟, 哈振德. 高原移居者出现高原症状时的血生化改变. *中国临床康复* 2006; 10: 14-15
- 37 马志军, 王可, 贾伟, 赵霞, 王榕. 高原低氧兔肝细胞超微结构的体视学研究. *青海医学院报* 1995; 16: 8-10
- 38 范任华, 陈平圣, 赵迪, 张万东. 化学缺氧对肝星状细胞基质金属蛋白酶-2表达及活性的影响. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 654-657
- 39 周嘉鹤, 陈彦凡, 陈少贤. 参一胶囊对慢性缺氧所致肝胆脂质过氧化的影响. *浙江中西医结合杂志* 2004; 4: 21-22
- 40 王立义. 平原大鼠急进高原后肝肾的电镜观察. *高原医学杂志* 1997; 7: 31-32
- 41 宋勇. 活性氧与细胞凋亡的研究进展. *国外医学·呼吸系统分册* 1997; 17: 30-32
- 42 Łapinski TW, Wiercińska-Drapała A, Panasiuk A, Kovalchuk O. Concentrations of ssDNA in liver tissue and its correlation with sFas and sFasL in serum of patients infected with HBV, HCV, HCV and HIV. *Adv Med Sci* 2007; 52: 109-113
- 43 Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Solá S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A, Moura MC, Camilo ME, Rodrigues CM. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF- κ B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1708-1717
- 44 Thierry J, Abouzahr S, Dorothee G, Jalil A, Richon C, Vergnon I, Mami-Chouaib F, Chouaib S. p53 potentiation of tumor cell susceptibility to CTL involves Fas and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005; 174: 871-878
- 45 Liu XF, Xia YF, Li MZ, Wang HM, He YX, Zheng ML, Yang HL, Huang WL. The effect of p21 antisense oligodeoxynucleotides on the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells with normal p53 function. *Cell Biol Int* 2006; 30: 283-287
- 46 Sato N. Central role of mitochondria in metabolic regulation of liver pathophysiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S1-S6
- 47 史洪涛, 陈东风, 李陶, 熊仁平. Caspase-3在大鼠非酒精性脂肪肝形成中的作用. *中华消化杂志* 2005; 25: 173-174
- 48 吴涛, 季光, 郑培永, 柳涛. 内质网应激与肝细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2507-2515
- 49 冯献启, 邹萍. 内质网应激反应性凋亡途径研究进展. *国外医学·肿瘤学分册* 2004; 31: 726-731
- 50 Kondo S, Saito A, Hino S, Murakami T, Ogata M, Kanemoto S, Nara S, Yamashita A, Yoshinaga K, Hara H, Imaizumi K. BFB2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1716-1729
- 51 Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277: 34287-34294
- 52 Masud A, Mohapatra A, Lakhani SA, Ferrandino A, Hakem R, Flavell RA. Endoplasmic reticulum stress-induced death of mouse embryonic fibroblasts requires the intrinsic pathway of apoptosis. *J Biol Chem* 2007; 282: 14132-14139
- 53 Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 2005; 35: 373-381
- 54 Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases

- hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003; 124: 1488-1499
- 55 Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001; 107: 1263-1273
 - 56 林胜利, 卓德祥, 王晓红, 吴逸园, 王珂, 吴耀南, 张卫光, 李载权, 唐朝枢. 氧化损伤与内质网应激在四氯化碳致大鼠肝脂肪变性中的作用机制. *中国生物化学与分子生物学报* 2006; 22: 422-430
 - 57 齐丽彤, 张钧华, 高萌, 周爱儒. 缺氧对乳鼠心肌细胞凋亡的诱导作用. *中国介入心脏病学杂志* 1998; 6: 138-140
 - 58 司少艳, 李新元. 慢性缺氧对胸腺细胞凋亡的影响及Bcl-2基因的调控作用. *中国试验临床免疫学杂志* 1999; 11: 459-461
 - 59 梁桃, 马占军, 刘铁夫, 刘冰榕. 对大鼠肝脏缺氧性损伤中凋亡机制的研究. *中华实用医学* 2001; 3: 1-3
 - 60 Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, Otsuki Y, Matsuda H, Tsujimoto Y. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res* 1996; 56: 2161-2166
 - 61 吉瑞瑞, 李付英, 张雪静, 段重高, 周亚伟. 淫羊藿苷对缺氧诱导血管内皮细胞损伤的保护作用. *中国中西医结合杂志* 2005; 25: 525-530
 - 62 Slomiany A, Piotrowski E, Grabska M, Piotrowski J, Slomiany BL. Chronic ethanol-initiated apoptosis in hepatocytes is induced by changes in membrane biogenesis and intracellular transport. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 334-343
 - 63 Schuster N, Kriegstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 1-14
 - 64 Feldstein AE, Gores GJ. Apoptosis in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *Front Biosci* 2005; 10: 3093-3099
 - 65 Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, Taniai M, Burgart LJ, Lindor KD, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125: 437-443
 - 66 刘翼, 李昌平, 祝琳. 氧应激、脂质过氧化及肝细胞凋亡与非乙醇性脂肪肝病. *医学综述* 2008; 14: 1468-1470
 - 67 Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 10: 17-24
 - 68 黎一鸣, 徐心, 吉鸿, 雷团结. 肝动脉缺血对肝细胞凋亡的影响及其机制初探. *西安交通大学学报(医学版)* 2002; 65: 393-395
 - 69 Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 6669-6673
 - 70 Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med* 2004; 199: 113-124
 - 71 张莉, 李丽华, 屈艺, 母得志. 缺氧诱导因子1与细胞凋亡. *中国实用儿科杂志* 2007; 22: 716-718
 - 72 盛庆丰, 咸华, 印其友. 二氯化钴诱导大鼠肝癌细胞缺氧与凋亡和增殖的研究. *南通大学学报(医学版)* 2008; 28: 324-326
 - 73 张金平, 陈建宗, 刘安恒, 张娟, 贾新, 蒋蔚峰. 红景天苷通过HIF-1途径对缺氧诱导心肌细胞凋亡的抑制作用. *第四军医大学学报* 2008; 29: 1057-1060
 - 74 李军昌, 王宗仁, 李秋霞, 张海峰, 王文, 王跃民, 李晶华. PI3K/Akt信号通路介导芪丹通脉片抑制缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡. *中国现代医学杂志* 2007; 17: 1183-1186
 - 75 Belaiba RS, Bonello S, Zähringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Görlach A. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4691-4697
 - 76 陈圣平, 翟为溶, 张月娥, 张锦生, 顾映红. 缺氧对肝星状细胞基质金属蛋白酶-1表达及活性调节的影响. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 276-279

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被收录情况

本刊讯 《世界华人消化杂志》被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2008年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

PARs与消化系肿瘤关系的研究进展

李 轩, 谢立群

李轩, 谢立群, 武警医学院附属医院消化科 天津市 300162
作者贡献分布: 本文由李轩综述, 谢立群审校.
通讯作者: 谢立群, 300162, 天津市, 武警医学院附属医院消化科. jwys_1983@hotmail.com
电话: 022-60578763
收稿日期: 2008-10-16 修回日期: 2008-11-28
接受日期: 2008-12-01 在线出版日期: 2009-07-28

Advances in the relationship between protease-activated receptors and digestive system tumors

Xuan Li, Li-Qun Xie

Xuan Li, Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China
Correspondence to: Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China. jwys_1983@hotmail.com
Received: 2009-10-16 Revised: 2009-11-28
Accepted: 2009-12-01 Published online: 2009-07-28

Abstract

Protease-activated receptors (PARs), belonging to a family of G-protein-coupled seven-transmembrane-domain receptors, are widely distributed in digestive organs. PARs are highly expressed in digestive system tumors, and their expression is positively correlated with the malignancy, invasiveness and metastasis of digestive system neoplasm. PAR agonists are able to promote the proliferation, invasion and metastasis of tumor cells *in vitro*. The role of PARs in tumor cells depends on a variety of signal transduction pathways. However, the mechanism underlying their role in the proliferation, invasion and metastasis of tumor cells remains unclear. In this article, we will review their role in the development and progression of digestive system tumors and the molecular mechanism underlying such role.

Key Words: Protease-activated receptor; Tumor; Digestive system

Li X, Xie LQ. Advances in the relationship between protease-activated receptors and digestive system tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2179-2183

摘要

蛋白酶激活受体(protease-activated receptor, PARs)家族是一类与G蛋白相偶联、有7个跨膜单位的受体家族,广泛分布于消化系统脏器及组织. PARs与消化系肿瘤关系密切,主要表现在PARs在肿瘤组织中高表达,其表达与肿瘤的恶性程度及侵袭转移能力正相关性. 体外研究表明,利用PARs的激动剂干预肿瘤细胞,可加强其增殖、侵袭转移能力. PARs对肿瘤细胞增殖、侵袭能力的调控依赖于多种信号转导途径,其作用机制尚不明确,现就此作一综述.

关键词: 蛋白酶激活受体; 肿瘤; 消化系统

李轩, 谢立群. PARs与消化系统肿瘤关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2179-2183
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2179.asp>

0 引言

蛋白酶激活受体(protease activated receptors, PARs)属于与G蛋白相偶联、有7个跨膜单位的受体家族,广泛分布于各个组织和系统中. PARs在消化系统中发挥多种生理学作用,能够促进胃黏液分泌、调节离子转运、调节胃肠动力. 新近发现,PARs还与消化系肿瘤的增殖、生长、转移具有密切关系,关于PARs对肿瘤的影响作用及其分子机制的研究也越来越多,并取得了新的进展,本文就当前PARs在消化系统肿瘤中的作用及其分子机制的研究进展综述如下.

1 PARs受体家族结构、激活特点及分布

PARs属于与G蛋白相偶联、有7个跨膜单位的受体家族. 最早发现的蛋白酶激活受体被称为PAR-1,后来的为PAR-2、PAR-3、PAR-4. PARs家族成员均有7个疏水的螺旋状跨膜区域,形成3个胞外环状结构和3个胞内环状结构,还有1个胞内C-端和胞外N-端. PAR-1、PAR-2和PAR-3的基因紧密定位于染色体的同一位点,位于5q13, PAR4基因则相距较远,位于19p12^[1]. 人类的PAR1为编码425个氨基酸残基的蛋白, PAR2

■背景资料

PARs在消化系统中发挥多种生理学作用,能够促进胃黏液分泌、调节离子转运、调节胃肠动力. 新近发现,PARs还与消化系肿瘤的增殖、生长、转移具有密切关系,关于PARs对肿瘤的影响作用及其分子机制的研究也越来越多,并取得了新的进展.

■同行评议者

施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科

■研究前沿

PARs在肿瘤的增殖、生长、转移中起着关键作用, 基于PARs相关的肿瘤治疗方案必将成为新的研究热点.

和PAR1有30%的氨基酸同源性, PAR3和PAR1、PAR2有28%的序列同源性, PAR4和其他PARs有33%的同源性, 主要表现在氨基和羧基端有明显的不同.

胰蛋白酶和类胰蛋白酶是最早被发现的蛋白酶激活受体的天然激动剂^[2]. 胰蛋白酶可以激活PAR-2、PAR-3及PAR-4, 而类胰蛋白酶只能激活PAR-2. 后来又陆续发现凝血酶、凝血因子VIIa/组织因子复合物、凝血因子Xa等也可激活PARs. 其中凝血酶作用可以激活PAR-1、PAR-3和PAR-4, 人类PAR-1和PAR-3对浓度在nmol以下的凝血酶即有反应, 而PAR-4则需要较高浓度的凝血酶才能被激活. 近期研究发现, 模仿配体区域合成的激动肽(agonist peptide, AP)也可直接激活PARs, 这些合成肽已用于PARs功能的研究. 已知4种人类PARs的激动肽序列如下: PAR1为NH₂-SFLLRN, PAR2为NH₂-SLIGKV, PAR3为NH₂-TFRGAP, PAR4为NH₂-GYPGQV^[3]. 除了激动剂, PAR-1^[4]和PAR-2^[5]的拮抗剂也已经被合成, 并且被应用于肿瘤和炎症的研究中.

PARs广泛分布于各种组织和系统, 激活后引起多种生理病理作用. 人体内几乎所有细胞中都有不同类型PARs的存在与表达, 其生理功能非常广泛, 包括诱发凝血反应、促进细胞分裂与增殖、释放炎症介质或细胞因子调控局部炎症反应^[6]、收缩子宫、胃肠道和气管平滑肌、调节血管张力等^[7]. 激活PARs能够刺激胞质磷脂酶C、A和D, 激活蛋白激酶C、有丝分裂原激活蛋白激酶和酪氨酸蛋白激酶, 暂时升高胞质游离钙离子的浓度, 开放细胞膜离子通道, 并促进细胞生长^[8].

2 PARs与消化系统肿瘤

越来越多的研究表明, PAR与肿瘤的增殖和转移具有密切关系. 在众多的肿瘤中都有PARs表达, 且强度高于正常组织细胞, 学者们认为激活后的PAR很可能通过下游的信号通路促进了肿瘤的增殖和转移. 但在不同的组织细胞中, PAR的表达程度并不相同, PAR调控肿瘤细胞增殖、生长、转移的方式也一样, 即使同一肿瘤中PARs家族的各个成员之间也有很大差别.

2.1 PARs在消化系统肿瘤中的表达及作用

2.1.1 结肠癌: Darmoul *et al*研究发现, PAR-1只有在结肠癌细胞中才有表达, 在正常的结肠组织中并无表达. 如果用凝血酶和蛋白酶激活受体-1激动剂(protease activated receptors-1-activated-

peptide, PAR-1-AP-1)处理休眠期的结肠癌细胞, 会使细胞出现极明显的有丝分裂反应. 另外, 用凝血酶和PAR-1-AP-1激活结肠癌细胞的PAR-1, 细胞侵袭和迁移能力明显增强^[9]. PAR-2也在结肠癌组织及细胞中广泛表达, 对10种结肠癌细胞系进行PAR-2 mRNA水平和蛋白水平进行研究后发现, HT-29, C119A, Caco-2, SW480, HCT-8和T84等6种结肠癌细胞PAR-2表达水平较高, 而在其他结肠癌细胞株中PAR-2仅有较低水平的mRNA表达. 进一步研究还发现PAR-2蛋白只表达在细胞表面, 当用1-100 nmol/L浓度的胰蛋白酶或10-100 μ mol/L浓度的蛋白酶激活受体-2激动剂(protease activated receptors-2-activated-peptide, PAR-2-AP-2)刺激HT-29细胞时, 细胞内钙离子浓度明显增加, 细胞表现出强烈的有丝分裂反应, 细胞数量增加3倍^[10].

2.1.2 胃癌: PAR-1在胃癌中有表达, 但对胃癌组织及正常组织中PAR-1的对照研究还未见报道. PAR-2在大部分胃癌中癌细胞表达呈阳性, 且其表达与胃癌细胞的淋巴侵犯、静脉侵犯、肝转移密切相关. 值得注意的是PAR-2表达阳性的患者其预后要比PAR-2表达阴性的患者预后差^[11].

Caruso *et al*研究发现, PAR-2激活后可以促进胃癌细胞的增殖^[12]. 而激活PAR-1和PAR-2均能促进胃癌细胞向周边组织的黏附. PAR-1激活后可促使整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 介导的胃癌细胞MKN-1向玻璃粘连蛋白黏附, 而PAR-2激活后则促使胃癌细胞向纤维黏合蛋白黏附. 这两种黏附作用都可以被Src激酶抑制剂除莠霉素(herbimycin)所阻断. 其中, PAR-2介导的细胞黏附效果更为明显^[13].

2.1.3 胰腺癌: Rudroff *et al*通过对PAR-1基因转录水平进行检测可以得知, 胰腺癌细胞中的PAR-1 mRNA的水平远高于正常组织的mRNA水平, 且在不同分化程度的胰腺癌细胞之间, PAR-1 mRNA的表达水平差距可达到25倍之多^[14]. 蛋白定量分析发现PAR-1只存在胰腺癌细胞中, 在正常的胰腺中没有表达. 另又研究表明, PAR-1作为凝血酶的受体可以促使胰腺癌细胞向癌细胞外的基质蛋白和上皮细胞黏附^[15]. Ikeda *et al*对胰腺癌中PAR-2表达水平研究后发现, 浸润性生长的胰腺癌细胞中的PAR-2表达水平要高于膨胀性生长的胰腺癌. 而在纤维化的胰腺癌中, PAR-2的表达水平明显增高, 且纤维化胰腺癌组织中PAR-2的表达水平要高于轻微纤维化的胰

腺癌^[16]。胰蛋白酶和PAR-2激动剂(PAR-2-AP-2)处理胰腺癌细胞,可以明显促进细胞增殖^[17]。用PAR-2激动剂作用于表达PAR-2的胰腺癌细胞,发现上清液中白介素-8(interleukin-8, IL-8)明显升高。另外,IL-8受体在胰腺癌和周围的成纤维细胞中均有表达。这些结果提示PAR-2促使胰腺癌细胞释放IL-8^[18]。

2.1.4 肝癌及肝硬化: PAR-1在肝细胞癌的发展和肝癌细胞的迁移中起到重要的作用。Kaufmann *et al*研究发现,利用凝血酶和PAR-1激动剂TFLRN-NH(2)刺激肝癌细胞系,可增加肝癌细胞的透过胶原膜的跨膜活动。而这种效应可以被PAR-1的选择性拮抗剂SCH 79797所阻断,证明PAR-1可以调控肝癌细胞的迁徙,另外PAR-4的选择性激动剂AYPGKF-NH(2)也可以促进肝细胞迁移,而其拮抗剂则可减弱凝血酶介导的肝癌细胞的侵袭、转移活性。PARs还促进了肝纤维化过程。研究证实随着肝纤维化的进行性加重,肝星状细胞内PAR-1及PAR-2的表达增加,而且PAR-1-AP-1及凝血酶、PAR-2-AP-2及纤维蛋白溶酶可能分别通过PAR-1及PAR-2促进肝星状细胞的增殖和胶原纤维的增加^[19]。

2.2 PARs促进肿瘤细胞的增殖、侵犯和转移的作用机制 PARs在引起消化系肿瘤中以多种方式促进肿瘤细胞的增殖、侵犯和转移中,但归结起来,主要通过以下途径促进肿瘤细胞的增殖、侵犯和转移。

2.2.1 PAR促进肿瘤细胞的增殖的机制: 通过MMPs-EGFR-MAPK-ERK1/2途径。PAR-1和PAR-2均可通过转激活EGFR-MAPK途径促进对肿瘤细胞的增殖。Darmoul *et al*利用凝血酶和胰蛋白酶分别作用于PAR-1和PAR-2后,发现在细胞内产生了一系列变化,依次为:基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)表达上调,引起转化生长因子- α (transforming growth factor, TGF- α)释放 \rightarrow TGF- α 介导的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的激活和磷酸化 \rightarrow 细胞外信号调节激酶ERK1/2的活化 and 细胞增殖。这一系列的过程可被MMP抑制剂巴马司他、TGF- α 中和抗体及EGFR配体结合区域阻断性抗体所阻断。同时PAR-1的激活还诱导Src激酶的磷酸化,Src在PAR-1介导的ERK1/2激活中也起到促进作用^[20-21]。Caruso *et al*学者利用胃癌细胞的实验研究发现,通过抑制EGFR酪氨酸激酶的活性可以完全阻断由

PAR-2介导的胃癌细胞的增殖,而利用抗体阻止EGF与EGFR的结合,却不能阻止EGFR的信号传递和PAR-2诱导的细胞增殖,这一点也充分说明,PAR-2可以通过转激活EGFR受体促进细胞增殖而不依赖于EGF本身^[12]。结合以上两点也可以说明PAR-2可以转激活EGFR,且通过EGFR发挥促进细胞增殖的作用。激活后的EGFR可以刺激DNA合成和G₀期细胞进入S期,并可通过S6激酶,使S6蛋白磷酸化,促进核糖体40S亚基与mRNA结合,在蛋白质合成的调节中发挥作用。另外EGFR还可以促进细胞的恶性转化。

激活NF- κ B途径. Macfarlane *et al*实验发现利用凝血酶激活PAR-1后,可增强NF- κ B与DNA结合的活性,而且利用SB-203589和PD098059阻断P38和ERK1/2后也不能抑制有PAR-1激发的NF- κ B的活性,这提示,PAR-1激活NF- κ B是个独立的过程,而不需要经过P38和ERK1/2等经典的MAPK信号转导通路。而且NF- κ B的异常激活常导致不依赖于有丝分裂的生长和异常方式的细胞存活。除了参与癌症的恶性转化,NF- κ B还可能通过促进肿瘤血管生成、侵袭、转移来促进肿瘤的恶变。虽然尚未见PAR-2在肿瘤细胞中对NF- κ B的作用的报道,但在皮肤上皮细胞中,PAR-2可以激活NF- κ B,促进NF- κ B与DNA的结合^[22]。在肿瘤细胞中,PAR-2与NF- κ B的关系需进一步研究。

胰蛋白酶的自分泌循环. 胰蛋白酶不仅是PAR-2的激动剂,而且其合成也受到PAR-2的调控,Ducroc *et al*在结肠癌细胞中发现,随着PAR-2的激活,胰蛋白酶的合成释放增加,增加的胰蛋白酶又可激活更多的PAR-2。胰蛋白酶这种自分泌循环的方式对肿瘤的增殖和转移具有重要的促进作用^[23]。

促进前列腺素合成. Yoshii *et al*学者通过实验发现,MEK抑制剂PD98059可以完全阻断PAR-2诱导的MAPK磷酸化和肿瘤细胞的增殖。同时也发现胰蛋白酶原和PAR-2可以促进前列腺素E₂合成,并利用前列腺素抑制剂吲哚美辛NS398阻断前列腺素E₂的合成,可间接抑制PAR-2诱导的癌细胞的增殖。同时利用甲磺酸卡替司他,特异性的胰蛋白酶原抑制剂,也可以以浓度依赖的方式阻断DLD-1的增殖^[24]。这充分说明PAR-2通过对前列腺素合成的调节也可间接促进结肠癌细胞的增殖生长。

2.2.2 PARs与肿瘤的转移、侵袭: 激活MMPs途

■ 相关报道

越来越多的研究表明,PAR与肿瘤的增殖和转移具有密切关系。在众多的肿瘤中都有PARs表达,且强度高于正常组织细胞,学者们认为激活后的PAR很可能通过下游的信号通路促进了肿瘤的增殖和转移。

■同行评价

本文对PRAs在消化系统常见肿瘤中的表达和作用阐述清楚, 文章符合综述要求, 总体内容充实, 学术价值较好。

径. 基质金属蛋白酶家族成员MMP-2, MMP-9和MT-MMP被认为和癌细胞侵袭密切相关, 是多种癌症的表型特征和重要预后标志^[25]. MMPs作为无活性的酶原形式分泌, 需要水解其氨基末端后才能表达活性. 人胰蛋白酶-2在激活MMPs上起更重要的作用. 胰蛋白酶-2使MMP-9前体的Arg87-Phe88肽键断裂, 使其由99 kDa的前体转化成77 kDa的活性蛋白形式, 同时在使MMP-2前体的Arg99-Lys100肽键断裂, 促进其活化上起到一定的作用^[26]. 目前研究发现, 激活PAR-1和PAR-2均可以引起宿主细胞分泌MMPs, MMPs作为蛋白水解酶本身就可以降解细胞外基质, 在肿瘤细胞的侵袭转移中起重要作用, 而且能促进TGF- α 的释放, 继而转导激活EGFR, 促进人成纤维细胞和结肠癌细胞增殖迁移.

促进血管生成. Salah *et al*在动物模型中发现, PAR1的基因表达在血管生成中起关键作用, 活化的PAR-1明显诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)VEGR mRNA的表达, 增强VEGF蛋白表达^[27]. 动物实验发现, 给雄性BALB/c系小鼠皮下注射转染PAR1的SB-2细胞系之后, 可见转移瘤的血管新生及肿瘤生长明显加快, 在这一过程中, 需要VEGF、蛋白激酶C(PKC)、Src和磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)的参与. 而采用无转染PAR1的SB-2细胞的对照小鼠血管新生和肿瘤生长都比较慢.

重塑癌细胞骨架. Evenram *et al*研究发现PAR-1激活后可诱导细胞骨架的重组和黏着斑复合物的形成, 促进胸腺癌细胞的恶性侵袭^[28]. Ge *et al*也发现, 在具有转移性乳腺癌细胞中, PAR-2在细胞表面分布并不均匀. 利用胰蛋白酶激活PAR-2后, 可使肿瘤细胞骨架重塑, PAR-2、beta-arrestin-2、ERK1/2在癌细胞伪足部位的定位从引起细胞极性的改变, 进而促进细胞迁移^[29].

PAR-1和PAR-4触发的肝癌细胞迁移可以通过抑制一系列的关键的信号的关键分子来阻断, 包括G(i)/G(o)family家族的G蛋白, MMPs, ERK/MAPKinase, 周期性AMP依赖蛋白激酶(cyclic AMP-dependent protein kinase), Src酪氨酸激酶和EGFR受体激酶. 这些试验结果表明指出, PAR-1和PAR-4协作的信号网络, 可以促进凝血酶介导的肿瘤细胞的迁移^[30]. 但对于PARs家族其他成员在肝癌中的作用尚未见报道. 另外Miyata *et al*报道, PAR-1和PAR-2可促进整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 依赖的胃癌细胞向周围组织黏附, 这也是PAR-1和PAR-2促进肿瘤转移和侵犯的关键步骤^[13].

3 结论

当前对PARs家族在肿瘤的发生发展中的作用及其机制的研究越来越深入, 人们已经认识到PARs在肿瘤的增殖、生长、转移中起着关键作用, 基于PARs相关的肿瘤治疗方案必将成为新的研究热点. 但PARs与肿瘤关系的研究仍然很不完善, 有待于进一步的研究.

4 参考文献

- 1 Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 579-621
- 2 Kahn ML, Hammes SR, Botka C, Coughlin SR. Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem* 1998; 273: 23290-23296
- 3 Hollenberg MD. Protease-activated receptors: PAR4 and counting: how long is the course? *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 271-273
- 4 Damiano BP, Derian CK, Maryanoff BE, Zhang HC, Gordon PA. RWJ-58259: a selective antagonist of protease activated receptor-1. *Cardiovasc Drug Rev* 2003; 21: 313-326
- 5 Hembrough TA, Swerdlow B, Swartz GM. Novel antagonists of Par-2: inhibition of tumor growth, angiogenesis, and inflammation. *Blood* 2005; 104: 11
- 6 Cunningham MA, Rondeau E, Chen X, Coughlin SR, Holdsworth SR, Tipping PG. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 2000; 191: 455-462
- 7 Hamilton JR, Frauman AG, Cocks TM. Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists. *Circ Res* 2001; 89: 92-98
- 8 Brass LF. Thrombin receptor antagonists: a work in progress. *Coron Artery Dis* 1997; 8: 49-58
- 9 Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol* 2003; 162: 1503-1513
- 10 Darmoul D, Marie JC, Devaud H, Gratio V, Laburthe M. Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2. *Br J Cancer* 2001; 85: 772-779
- 11 Fujimoto D, Hirono Y, Goi T, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A. Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in gastric cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93: 139-144
- 12 Caruso R, Pallone F, Fina D, Gioia V, Peluso I, Caprioli F, Stolfi C, Perfetti A, Spagnoli LG, Palmieri G, Macdonald TT, Monteleone G. Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *Am J Pathol* 2006; 169: 268-278
- 13 Miyata S, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyazaki K. Trypsin stimulates integrin $\alpha(5)\beta(1)$ -dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* 2000;

- 275: 4592-4598
- 14 Rudroff C, Seibold S, Kaufmann R, Zetina CC, Reise K, Schäfer U, Schneider A, Brockmann M, Scheele J, Neugebauer EA. Expression of the thrombin receptor PAR-1 correlates with tumour cell differentiation of pancreatic adenocarcinoma in vitro. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 181-189
 - 15 Rudroff C, Striegler S, Schilli M, Scheele J. Thrombin enhances adhesion in pancreatic cancer in vitro through the activation of the thrombin receptor PAR 1. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 472-476
 - 16 Ikeda O, Egami H, Ishiko T, Ishikawa S, Kamohara H, Hidaka H, Mita S, Ogawa M. Expression of proteinase-activated receptor-2 in human pancreatic cancer: a possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 295-300
 - 17 Shimamoto R, Sawada T, Uchima Y, Inoue M, Kimura K, Yamashita Y, Yamada N, Nishihara T, Ohira M, Hirakawa K. A role for protease-activated receptor-2 in pancreatic cancer cell proliferation. *Int J Oncol* 2004; 24: 1401-1406
 - 18 Ikeda O, Egami H, Ishiko T, Ishikawa S, Kamohara H, Hidaka H, Takahashi M, Ogawa M. Signal of proteinase-activated receptor-2 contributes to highly malignant potential of human pancreatic cancer by up-regulation of interleukin-8 release. *Int J Oncol* 2006; 28: 939-946
 - 19 Gaça MD, Zhou X, Benyon RC. Regulation of hepatic stellate cell proliferation and collagen synthesis by proteinase-activated receptors. *J Hepatol* 2002; 36: 362-369
 - 20 Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Peiretti F, Laburthe M. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cancer Res* 2004; 2: 514-522
 - 21 Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Laburthe M. Protease-activated receptor 2 in colon cancer: trypsin-induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 2004; 279: 20927-20934
 - 22 Macfarlane SR, Sloss CM, Cameron P, Kanke T, McKenzie RC, Plevin R. The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of proteinase-activated receptor-2 mediated nuclear factor kappa B signalling in keratinocytes. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 535-544
 - 23 Ducroc R, Bontemps C, Marazova K, Devaud H, Darmoul D, Laburthe M. Trypsin is produced by and activates protease-activated receptor-2 in human cancer colon cells: evidence for new autocrine loop. *Life Sci* 2002; 70: 1359-1367
 - 24 Yoshii M, Jikuhara A, Mori S, Iwagaki H, Takahashi HK, Nishibori M, Tanaka N. Mast cell tryptase stimulates DLD-1 carcinoma through prostaglandin- and MAP kinase-dependent manners. *J Pharmacol Sci* 2005; 98: 450-458
 - 25 Zeng ZS, Shu WP, Cohen AM, Guillem JG. Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 144-148
 - 26 Sorsa T, Salo T, Koivunen E, Tyynelä J, Kontinen YT, Bergmann U, Tuuttila A, Niemi E, Teronen O, Heikkilä P, Tschesche H, Leinonen J, Osman S, Stenman UH. Activation of type IV procollagenases by human tumor-associated trypsin-2. *J Biol Chem* 1997; 272: 21067-21074
 - 27 Yin YJ, Salah Z, Maoz M, Ram SC, Ochayon S, Neufeld G, Katzav S, Bar-Shavit R. Oncogenic transformation induces tumor angiogenesis: a role for PAR1 activation. *FASEB J* 2003; 17: 163-174
 - 28 Even-Ram SC, Maoz M, Pokroy E, Reich R, Katz BZ, Gutwein P, Altevogt P, Bar-Shavit R. Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the alpha vbeta 5 integrin. *J Biol Chem* 2001; 276: 10952-10962
 - 29 Ge L, Shenoy SK, Lefkowitz RJ, DeFea K. Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem* 2004; 279: 55419-55424
 - 30 Kaufmann R, Rahn S, Pollrich K, Hertel J, Dittmar Y, Hommann M, Henklein P, Biskup C, Westermann M, Hollenberg MD, Settmacher U. Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *J Cell Physiol* 2007; 211: 699-707

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

针刺对便秘模型大鼠PGP9.5表达的影响

丁曙晴, 丁义江, 季新涛, 韩帖梅, 孙明明, 霍维宇, 黄书亮, 耿建祥

■背景资料

结肠慢传输型便秘症状顽固, 临床治疗困难。患者常长期依赖刺激性泻剂, 部分患者最终需手术切除传输迟缓的结肠缓解症状。近年来研究表明针刺疗效较好, 作用机制不明确。探讨针刺机制之一为改善肠神经系统神经元功能。

丁曙晴, 季新涛, 孙明明, 霍维宇, 南京中医药大学研究生部江苏省南京市 210046

丁曙晴, 丁义江, 南京中医药大学第三附属医院全国中医肛肠医疗中心 江苏省南京市 210001

韩帖梅, 黄书亮, 耿建祥, 南京中医药大学第三附属医院病理科 江苏省南京市 210001

江苏省中医药局基金资助项目, No. HL07061

作者贡献分布: 此课题由丁曙晴与丁义江设计; 实验研究由季新涛, 孙明明及霍维宇操作完成; 病理研究由韩帖梅、黄书亮及耿建祥完成; 图像分析由季新涛完成; 数据分析由丁曙晴完成; 本论文写作由丁曙晴与丁义江完成。

通讯作者: 丁曙晴, 副主任中医师, 210001, 江苏省南京市金陵路1号, 南京中医药大学第三附属医院全国中医肛肠医疗中心。njgczx@gmail.com

电话: 025-85885759

收稿日期: 2009-05-18 修回日期: 2009-06-30

接受日期: 2009-07-06 在线出版日期: 2009-07-28

Effect of acupuncture on PGP 9.5 expression in rats with experimental constipation

Shu-Qing Ding, Yi-Jiang Ding, Xin-Tao Ji, Dian-Mei Han, Ming-Ming Sun, Wei-Yu Huo, Shu-Liang Huang, Jian-Xiang Gen

Shu-Qing Ding, Xin-Tao Ji, Ming-Ming Sun, Wei-Yu Huo, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Shu-Qing Ding, Yi-Jiang Ding, National Chinese Medical Center of Colorectal Diseases, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Dian-Mei Han, Shu-Liang Huang, Jian-Xiang Gen, Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of Jiangsu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. HL07061
Correspondence to: Shu-Qing Ding, National Chinese Medical Center of Colorectal Diseases, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. njgczx@gmail.com

Received: 2009-05-18 Revised: 2009-06-30

Accepted: 2009-07-06 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of acupuncture on the expression of PGP 9.5 (a neuronal marker in the enteric nervous system) in rats with experimental constipation.

METHODS: A total of sixty rats were used in the study, of which 15 rats were included in normal control group and the remaining 45 rats were in-

tragastrically administered with Rhubarb Decoction to induce experimental constipation. The resulting 36 model rats were equally divided into model control group, sham treatment group and acupuncture treatment group. Rats in the model control group ($n = 12$) were killed before treatment, while those in the acupuncture treatment group and sham treatment group were subjected to electroacupuncture or sham treatment for 14 days and killed. The intestinal canal about 5 cm away from the anus was taken. HE staining and immunohistochemical staining were then performed to determine the integrated absorbance (IA) of PGP9.5 staining.

RESULTS: The IA value was significantly higher in the normal group than the model control group (47.38 ± 9.04 vs 20.36 ± 9.12 , $P < 0.000$). No significant difference was noted in the IA value between the sham treatment group and the model control group (28.51 ± 9.43 vs 20.36 ± 9.12 , $P = 0.200$). The IA value was significantly higher in the acupuncture treatment group than the model control group and sham treatment group (41.39 ± 19.56 vs 28.51 ± 9.43 and 20.36 ± 9.12 , $P = 0.021$ and 0.002 , respectively) though no significant difference was observed between the normal control group and the acupuncture treatment group ($P = 0.297$).

CONCLUSION: Acupuncture can help improve the function of intestinal ganglion cells in rats with Rhubarb Decoction-induced slow-transit constipation.

Key Words: Slow-transit constipation; Model; Enteric nervous system; Intestinal neuron; PGP9.5 expression

Ding SQ, Ding YJ, Ji XT, Han DM, Sun MM, Huo WY, Huang SL, Gen JX. Effect of acupuncture on PGP 9.5 expression in rats with experimental constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2184-2187

摘要

目的: 观察针刺对便秘模型大鼠肠神经系统神经元标志物PGP9.5表达的影响。

方法: 将60只大鼠按照体质量及随机分组。正

■同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

常对照组15只, 45只大鼠予生大黄水煎液灌胃, 开始用量为100 g/(kg·d), 最后为1280 g/(kg·d), 45 d后造模36只, 治疗前处死12只作为造模未治疗前组对照, 剩余随机分为针刺组和空白治疗组, 各12只. 针刺组大鼠针刺天枢和足三里, 天枢加电针, 疏密波刺激10 min, 每日1次, 共计14 d; 空白治疗组不给予治疗. 2组14 d后处死, 取距离肛门5 cm肠管, 用HE染色和PGP9.5免疫组织化学染色, 采用Image-Pro Plus 5.0计算各组PGP9.5的综合吸光度值(LA值)分析肠神经节细胞的状况.

结果: 正常组PGP9.5表达的LA值($\times 10^4$)为 47.38 ± 9.04 , 治疗前组为 20.36 ± 9.12 , 2组比较有显著差异($P < 0.000$); 空白组为 28.51 ± 9.43 , 与治疗前组比较无统计学差异($P > 0.05$); 针刺组为 41.39 ± 19.56 , 与治疗前组和空白组比较均有统计学差异(均 $P < 0.05$), 与正常组比较无统计学差异($P > 0.05$).

结论: 针刺有助于改善大黄水煎液灌胃泻剂便秘模型大鼠神经节细胞功能.

关键词: 结肠慢传输性便秘; 模型; 肠神经系统; 肠神经; PGP9.5表达

丁曙晴, 丁义江, 季新涛, 韩帖梅, 孙明明, 霍维宇, 黄书亮, 耿建祥. 针刺对便秘模型大鼠PGP9.5表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2184-2187

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2184.asp>

0 引言

结肠慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)病因不明, 症状顽固, 常造成泻剂依赖, 治疗困难. 针刺治疗便秘首见于内经, 至今已积累了丰富的治疗经验, 对慢性便秘治疗安全有效^[1]. 我们采用针刺治疗该疾病, 取得较好的疗效^[2]. 为了阐明针刺是否通过影响肠神经系统的神经元途径起治疗作用, 我们采用其标志物蛋白基因产物PGP9.5的病理学改变探讨其作用机制, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年Wistar大鼠60只, 雌雄不限, 体质量170-240 g, 由南京江宁青龙山实验动物繁殖场提供, 质量合格证号SCXK(苏)2006-2008. 实验期间所有动物均标准饲料及蒸馏水喂养, 自由摄取. 生大黄: 1000 g, 购自南京市药材公司. 生大黄水煎液: 将1000 g生大黄粉碎浸泡于3000 mL蒸馏水中6 h后回流煮沸60 min, 过滤并浓缩至1000

mL, 得到100%生大黄水煎液. PGP9.5试剂及一抗: 购自北京中杉金桥公司, 即用型, 抗体批号为ZM-0137. 二抗购自广州迈新生物公司, DAB显色液购自美国基因公司. 针具: 采用0.25 mm \times 25 mm华佗牌一次性无菌针灸针, 华佗牌电子针疗仪SDZ-II型. 大鼠固定器: 采用南京中医药大学针药结合实验室制大鼠针刺固定器. 电子天平: FA1604, 上海天平仪器厂生产. 病理显微图像分析系统: 专业图像分析软件Image-Pro Plus 5.0版.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 按照体质量随机分组, 每组15只. 正常对照组, 饲以普通软饲料等待造模组造模成功并治疗结束; 造模组45只给予造模, 成功后随机平均分成治疗前组、针刺组和空白治疗组. 结肠慢传输性便秘动物模型制作参照文献[3]方法, 给予生大黄水煎液, 开始用量为100 g/(kg·d), 给药以每笼大鼠的平均体质量计算, 以后每日在前日的基础上加倍, 直到出现半数致泻保持此剂量到80%的稀便消失然后再在此基础上加倍给药, 最后用量为1280 g/(kg·d), 如此方法共饲养45 d.

1.2.2 大鼠处理: 正常组: 自实验开始至结束自然饲养, 不给予任何干预. 空白组: 造模成功后与针刺组在同一环境下固定, 以对照针刺组可能因恐惧等因素造成的肠动力紊乱. 针刺组: 为造模成功后给予针刺治疗, 将大鼠固定在自制的大鼠固定器上, 参照实验针灸学大鼠取穴对照表针刺天枢、足三里. 用华佗牌美容针刺入穴位0.5-0.7 cm, 天枢加电针, 左右交替, 疏密波刺激10 min, 每日1次, 共计14 d. 留取标本: 治疗前组造模成功后处死, 针刺组和空白治疗组实验结束后6 h处死, 均为脱颈椎处死后取距肛侧5 cm结肠全层, 1 cm \times 1 cm, 平铺至滤纸上后放入100 g/L中性甲醛固定. 免疫组织化学染色: 组织经常规取材处理后, 用PBS(pH7.4)冲洗, 柠檬酸pH6.0抗原修复, 高压锅煮沸, 每张切片加一抗(PGP9.5), 4℃冰箱过夜, 次日PBS冲洗, 加二抗, 室温下孵育30 min, 最后用DAB显色, 苏木素复染. 已知阳性切片作阳性对照.

1.2.3 结果评估: 肉眼观察每张染好的切片, 取肌层纵长10 mm为连续观察范围, 在中倍镜下观察图片至阳性染色区域, 换高倍镜下截取染色阳性面积图片, 每例10个视野后存储图像文件备图像软件分析. 经观察, 神经节数目多少与面积大小无关, 数目很少面积可以很大, 而数目很多面积可能非常小. 因此采用专业图像分析软

■ 研发前沿

目前研究已表明, 针刺治疗慢性便秘途径之一为调节肠神经系统功能, 可能通过调节肠神经元、Cajal间质细胞、各种兴奋性和抑制性脑肠肽类激素、突触功能和神经胶质细胞等起作用, 有待深入探讨.

■名词解释

PGP9.5: 是一种由2450个碱基组成, 包含212个氨基酸的神经元特异性羧基末端水解酶。在研究肠神经系统的形态特征及结构特点中, PGP9.5有良好的表达功能, 可显示阳性神经元形态, 特征性地评价肠神经节细胞功能。

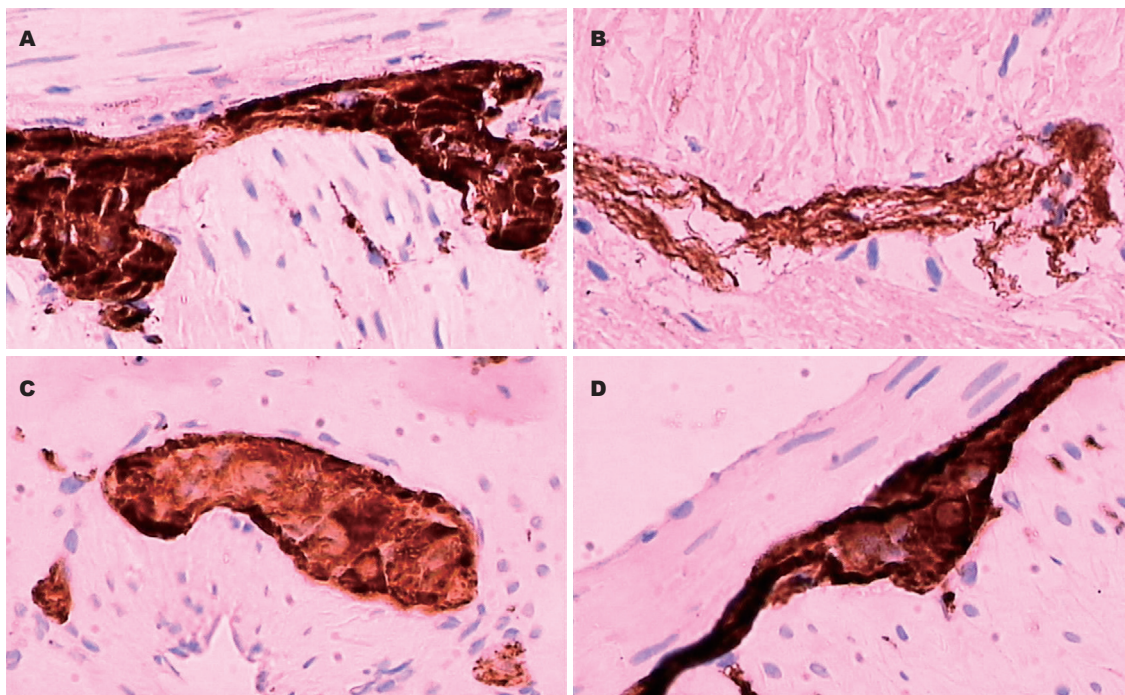


图1 各组大鼠肠肌间神经丛PGP9.5阳性表达($\times 400$)。A: 正常组; B: 治疗前组; C: 空白组; D: 针刺组。

件Image-Pro Plus提供的工具计算综合吸光度值(integrated absorbance, IA), 等于染色阳性面积 \times 平均阳性表达区密度, 此值与目标物质的总量成正比, 反映肠神经系统神经元状况。

统计学处理 用SPSS11.5统计软件进行统计分析。计量数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 各组间比较用方差分析法, 组间比较用LSD法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠结肠PGP免疫表达 正常组大鼠结肠环纵肌间神经丛可见正常神经节细胞, 节细胞阳性表达染色深且分布均匀(图1A)。治疗前组环纵肌纤维增粗, 部分断裂, 排列紊乱, 空泡样改变, 神经节细胞减少, 节细胞阳性表达染色下降(图1B)。空白组环纵肌纤维断裂有修复, 空泡样改变有所恢复(图1C)。针刺组: 环纵肌修复好转, 神经节细胞空泡样改变好转(图1D)。

2.2 各组IA值($\times 10^4$)的比较 正常组IA值与对照组比较有显著差异(47.38 ± 9.04 vs 20.36 ± 9.12 , $P < 0.000$); 空白组(28.51 ± 9.43)与治疗前组比较无统计学差异($P = 0.200$); 针刺组(41.39 ± 19.56), 与治疗前组和空白组比较均有统计学差异($P = 0.021$, 0.002), 与正常组比较无统计学差异($P = 0.297$)。

3 讨论

结肠慢传输性便秘是临床常见的难治性便秘

之一, 西药促肠动力药尽管有一定疗效, 但对心血管系统的不良反应日益引起人们的关注。由于患者长期依赖各种刺激性泻药帮助排便, 对各种药物治疗反应较差, 而针刺治疗临床有效, 日益受到重视。近年来, 对结肠慢传输性便秘的病因病理学研究显示其是“肠神经病”, 即肠神经系统功能及Cajal间质系统的异常^[4]。本课题旨在探讨针刺治疗结肠慢传输性便秘的作用机制是否通过肠神经系统神经元途径调控。

国内外动物便秘模型的制作主要通过口服复方地芬诺酯(止泻药)^[5]、接触性泻剂大黄和酚酞^[6]及阿密曲替林(抗抑郁药)^[7]等造成动物排便次数减少、便干等状态来实现。综观各种模型制作方法, 仅接触性泻剂对肠神经系统的损伤作用进行过系列研究^[8], 发现该方法建立的模型稳定, 且最接近STC模型病理学变化, 是目前研究STC的常用模型^[9]。临床所遇该类患者也长期服用各种刺激性泻剂并形成依赖。因此采用该种泻剂模型作为结肠慢传输性便秘模型来研究针刺作用机制应具有代表性。从本研究观察大黄水煎液灌胃确实可造成大鼠肠神经系统肌间神经系统破坏, 表现为肌肉断裂、空泡和神经元标志物表达下降, 刺激性泻剂灌胃停用后等待自然恢复已不能达到正常状态, 采用针刺后对由泻剂造成的便秘模型大鼠肠神经节功能恢复具有促进作用。

肠神经系统主要分为肌间神经丛和黏膜下神经丛, 神经丛内的肽能神经元是一种以多肽为神经递质的特殊神经元, 众多神经递质参与其中, 对结肠运动的调控起着主要作用. 肠神经系统的功能状态与肠动力是直接相关的. 我们可以通过对其标志物表达的检测来反映其功能状态. PGP9.5是一种由2450个碱基组成, 包含212个氨基酸的神经元特异性羧基末端水解酶, 在研究肠神经系统的形态特征及结构特点中, PGP9.5有良好的表达功能, 可显示阳性神经元形态, 特征性地评价肠神经节细胞的成熟度^[10]. 李瑞午 *et al*^[11]在研究针刺对大鼠胃肠肌间神经丛NO能神经元的影响, 针刺足三里有利于胃肠道功能的恢复. 展淑琴 *et al*^[12]研究电针大鼠足三里穴, 发现脑内P物质的基因表达增加. 曹东元 *et al*^[13]亦通过电刺激大鼠足三里发现结肠SP含量显著增高, 以促进胃肠运动. 目前国内尚没有利用PGP9.5特异性地反映肠神经系统神经节细胞的表达. 其表达与其对结肠动力的影响直接相关. 因此我们采用这一指标根据多组对照比较可以认为针刺有助于改善肠神经系统神经元破坏后神经节细胞的功能, 几乎恢复正常(针刺组与正常对照组比较无统计学意义). 针刺治疗通过调节肠神经系统的神经节细胞功能起效得到证实, 应该对结肠慢传输性便秘的临床治疗提供了一条针对病因治疗的新途径.

4 参考文献

- 1 孙明明, 丁曙晴, 丁义江. 慢性功能性便秘的针灸治疗进展. 结直肠肛门外科杂志 2007; 13: 192-194
- 2 丁曙晴, 丁义江, 王玲玲, 舒琳, 金洵, 蒋亚文. 针灸治疗慢性便秘31例临床疗效分析. 中华中医药学刊 2008; 26: 434-436
- 3 张连阳, 高峰, 童卫东, 张胜本, 黄显凯. 一种大鼠“泻剂结肠”模型的建立. 大肠肛门病外科杂志 1998; 4: 66-68
- 4 Bassotti G, Villanacci V. Slow transit constipation: a functional disorder becomes an enteric neuropathy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4609-4613
- 5 李业鹏, 崔生辉, 江涛, 李燕俊, 李玉伟, 韩春卉, 刘红蕾, 张靖. 小鼠便秘模型的建立. 中国食品卫生杂志 2000; 12: 1-4
- 6 巫全胜, 吴曙光, 赵菊花, 郭科男, 董小君, 钱宁. 大鼠药物依赖性便秘模型的制作. 实验动物科学 2007; 24: 70-72
- 7 Tsusumi K, Kishimoto S, Koshitani O, Kohri H. Amitriptyline-induced constipation in cynomolgus monkeys is beneficial for the evaluation of laxative efficacy. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 657-659
- 8 易宏辉, 柳一红, 李富军. 大黄类泻剂对大鼠结肠肌间、黏膜下神经丛VIP能神经递质的影响. 中国医师杂志 2001; S1: 27-28
- 9 王岚, 彭成. 便秘动物模型的研究进展. 广州中医药大学学报 2007; 24: 174-176
- 10 刘丽, 施诚仁, 张忠德, 李敏, 张文竹. PGP9.5在SD大鼠肠神经节细胞成熟度评价中的作用. 中华小儿外科杂志 2003; 24: 254-257
- 11 李瑞午, 李翠红, 郭莹, 葛文津, 夏立营. 针刺对大鼠胃肠肌间神经丛NO能神经元的影响. 上海针灸杂志 2002; 21: 40-42
- 12 展淑琴, 赵晏, 郭新奎, 王会生. 电针对大鼠脑内P物质基础表达的影响. 山东中医药大学学报 2007; 31: 492-495
- 13 曹东元, 牛汉璋, 赵晏, 杜剑青, 朱忠良. 穴位刺激经初级传入反射引起SP释放. 中国针灸 2001; 21: 623-625

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本研究设计合理, 方法可行, 结果可信, 有一定的参考价值.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)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; (2)作者 署名一般不超过8人. 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”; (3)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; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)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; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合征大鼠IL-1 β 、IL-10表达的影响

胡俊, 胡团敏, 何文钦, 黄永德

■背景资料

肠易激综合征(IBS)是消化科常见疾病, IBS的发病机制复杂, 是多种因素作用的结果。肠道持续性低度炎症、精神心理因素、内脏高敏感性、胃肠动力异常、感染等因素可能与IBS发病有关。

胡俊, 胡团敏, 何文钦, 黄永德, 中国人民解放军第180医院消化内科 福建省泉州市 362000

作者贡献分布: 本课题由胡团敏设计; 研究过程由胡俊, 胡团敏, 何文钦及黄永德操作完成; 数据分析和论文写作由胡团敏与胡俊完成。

通讯作者: 胡团敏, 362000, 福建省泉州市, 中国人民解放军第180医院. yihu180@yahoo.com.cn

电话: 0595-28919141

收稿日期: 2009-05-13 修回日期: 2009-06-20

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-07-28

Effects of Huangshu Enema on the levels of serum IL-1 β and IL-10 in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

Jun Hu, Tuan-Min Hu, Wen-Qin He, Yong-De Huang

Jun Hu, Tuan-Min Hu, Wen-Qin He, Yong-De Huang, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Correspondence to: Dr. Tuan-Min Hu, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. yihu180@yahoo.com.cn

Received: 2009-05-13 Revised: 2009-06-20

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of Huangshu Enema (HSE) on the levels of IL-1 β and IL-10 in the serum of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (D-IBS).

METHODS: A rat model of D-IBS was created by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress. Sixty healthy female Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group ($n = 15$), model control group ($n = 15$), HSE treatment group ($n = 15$) and dicetel treatment group ($n = 15$). The changes in serum IL-1 β and IL-10 levels in rats were observed.

RESULTS: The level of serum IL-1 β was significantly higher in the model control group than the normal control group, while the level of serum IL-10 was significantly lower in the model

control group than in the normal control group ($t = 21.9998$ and 27.0556 , respectively; both $P < 0.01$). The level of serum IL-1 β in the two treatment groups significantly decreased when compared to the model control group ($t = 12.0599$ and 6.1647 , respectively; both $P < 0.01$), while the level of serum IL-10 in the two treatment groups significantly increased when compared to the model control group ($t = 17.3802$ and 6.8408 , respectively; both $P < 0.01$). HSE was superior to dicetel in decreasing serum IL-1 β level and increasing serum IL-10 level ($t = 9.7410$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: HSE may be able to reduce the number of activated immune cells, increase anti-inflammatory cytokines and enhance the anti-inflammatory activity, and adjust the imbalance between anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines, thereby exerting therapeutic effects on D-IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Huangshu Enema; Inflammatory cytokines; Interleukin-1 β ; Interleukin-10

Hu J, Hu TM, He WQ, Huang YD. Effects of Huangshu Enema on the levels of serum IL-1 β and IL-10 in rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2188-2191

摘要

目的: 评价黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合征(Diarrhea-irritable bowel syndrome D-IBS)大鼠血清IL-1 β 、IL-10表达的影响。

方法: 采用乙酸灌肠加束缚应激法建立D-IBS模型, 将60只健康♀SD大鼠随机分为正常对照组、模型组、HSE灌肠液组、得舒特组, 每组15只, 分别观察治疗后大鼠血清IL-1 β 、IL-10的表达。

结果: 与正常对照组比较, 模型组IL-1 β 显著升高、IL-10显著降低($t = 21.9998$, $t = 27.0556$; 均 $P < 0.01$), 治疗后HSE灌肠液组和得舒特

■同行评议者

魏睦新, 教授, 南京医科大学第一附属医院中医内科

组IL-1 β 较模型组显著降低($t = 12.0599$, $t = 6.1647$; 均 $P < 0.01$), 而两者IL-10明显升高($t = 17.3802$, $t = 6.8408$; 均 $P < 0.01$), 且HSE灌肠液组效果优于得舒特组($t = 9.7410$, $P < 0.01$).

结论: HSE灌肠液可能通过降低活化的免疫细胞数目和上调抗炎因子及增强其抗炎活性, 纠正促炎/抗炎因子失衡, 从而达到治疗D-IBS的目的.

关键词: 肠易激综合征; 黄术灌肠液; 炎症细胞因子; 白介素-1 β ; 白介素-10

胡俊, 胡团敏, 何文钦, 黄永德. 黄术灌肠液对腹泻型肠易激综合征大鼠IL-1 β 、IL-10表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2188-2191
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2188.asp

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的病因与发病机制目前尚未完全明了, 但越来越多研究表明, 炎症与IBS发病有着密不可分的联系. 研究发现, 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)^[1-2]、P物质(substance P, SP)^[3]、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptides, VIP)^[4]、胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)^[5]及白介素(interleukin, IL)^[6-7]等作为中间环节, 在IBS的发生和发展中起着重要作用. 促炎因子与抗炎因子失衡可能是IBS发生发展的关键. 本实验主要观察黄术灌肠液对IBS大鼠血清白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白介素-10(interleukin-10, IL-10)的影响, 以探讨黄术灌肠液治疗IBS的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♀SD大鼠60只, 体重180 \pm 20 g, 购于江西中医学院(动物合格证号: SCXK 2006-0001); 自组中药方剂黄术灌肠液: 大黄、黄芩、黄连、黄芪、白术各15 g, 加水煎煮至500 mL; 阳性对照药为得舒特, 法国苏威制药, 批号H20040759; 大鼠IL-1 β ELISA检测试剂盒(批号: RT110371)、IL-10 ELISA检测试剂盒(批号: RT116876)购于广州齐云生物制剂公司.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 适应性喂养3 d后, 随机分为正常对照组, 模型组, 黄术灌肠液组, 得舒特组, 每组15只. 对模型组、黄术灌肠液组及得舒特组进行造模. 动物模型制作参照文献[8-10]并略

表 1 各组大鼠血清IL-1 β 及IL-10浓度($n = 15$, mean \pm SD, ng/L)

分组	IL-1 β	IL-10
正常组	42.67 \pm 4.82	177.79 \pm 11.99
模型组	104.91 \pm 9.84 ^b	71.66 \pm 9.33 ^b
黄术灌肠液组	64.38 \pm 8.52 ^d	147.72 \pm 14.15 ^d
得舒特组	87.42 \pm 4.89	99.68 \pm 12.83

^b $P < 0.01$ vs 正常组, 黄术灌肠液组, 得舒特组; ^d $P < 0.01$ vs 得舒特组.

加改动. 模型组大鼠经肛门插入石蜡油润滑过的自制导管, 插入深度距肛门8 cm, 缓慢注入40 mL/L的乙酸1 mL, 拔出导管, 将大鼠尾巴抬高并压迫肛门1 min, 然后用0.01 mol/L PBS 1 mL冲洗结肠. 乙酸灌肠后, 用胶带束缚大鼠肩部、前肢及胸部, 限制大鼠用前肢抓搔头面部, 但不限制其活动, 束缚时间为1 h, 之后释放归笼, 充分补液, 自由进食, 造模时间为14 d.

1.2.2 给药: 造模成功后, 黄术灌肠液组以黄术灌肠液3 mL保留灌肠; 得舒特组给予得舒特水溶液0.015 g/(kg·d)灌胃, 模型组及正常对照组以蒸馏水3 mL灌胃, 每日1次, 以上均给药14 d.

1.2.3 IL-1 β 、IL-10表达的检测: 给药结束后第2天, 各组大鼠心脏取血, 3000 r/min离心分离血清, ELISA法检测血清IL-1 β 、IL-10含量. 具体操作严格按照试剂盒说明书.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 统计软件处理数据资料, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 模型观察 所有造模大鼠在造模2-3 d后出现腹泻, 呈黄色稀便样和/或肛周体毛被稀便沾染. 5-6 d后体质量略下降, 活动及进食明显减少, 进水增多. 低倍光学显微镜下可见模型组大鼠结肠标本黏膜下层血管轻度扩张, 黏膜完整, 未见溃疡及黏膜增厚, 可见少量炎症细胞浸润, 主要为增多的淋巴细胞及肥大细胞.

2.2 疗效观察 黄术灌肠液组及得舒特组用药1 wk后腹泻明显减轻, 进食进水逐渐恢复正常, 用药结束后光学显微镜下见结肠标本淋巴细胞及肥大细胞明显减少.

2.3 大鼠血清IL-1 β 、IL-10表达 模型组大鼠较正常组大鼠血清IL-1 β 表达显著增高($t = 21.9998$, $P < 0.01$)且IL-10明显降低($t = 27.0556$, $P < 0.01$), 治疗后大鼠血清IL-1 β 较模型组显著降低(黄术灌肠液组 $t = 12.0599$, $P < 0.01$; 得舒特组 $t =$

■ 研发前沿

肠道持续性低度炎症与IBS发病之间的联系是近年来研究的热点. 肠道持续性低度炎症的发生机制尚待进一步研究.

■ 创新盘点

传统治疗IBS多以口服药为主, 本研究通过自组中药方剂保留灌肠, 高浓度药物直接作用于病变部位, 疗效显著, 目前国内尚少见类似报道.

■应用要点

本文深入探讨了IBS中促炎因子IL-1 β 及抗炎因子IL-10表达改变,为肠道低度炎症在IBS发病中占有重要地位提供了重要依据,可能为阐明IBS发病机制及治疗带来新的希望。

6.1647, $P < 0.01$)而IL-10明显升高(黄术灌肠液组 $t = 17.3802$, $P < 0.01$; 得舒特组 $t = 6.8408$, $P < 0.01$),且黄术灌肠液组效果优于得舒特组($t = 9.7410$, $P < 0.01$, 表1)。

3 讨论

长期以来,IBS被认为是一种慢性功能性肠道疾病而不是炎症性疾病,近年来有学者从IBS患者结肠标本内发现增多的肥大细胞,从而提出了IBS患者肠壁内可能有炎症成分参与^[11]。O'Sullivan *et al*^[12]研究发现绝大多数IBS患者末端回肠和盲肠的肥大细胞数目显著升高。而Chadwick *et al*^[13]的研究表明:40%的IBS患者肠黏膜活检组织可见非特异性炎症改变,而其余患者病理检查虽然正常,但上皮内淋巴细胞及CD25⁺/CD3⁺ T细胞数量显著增加。随着对PI-IBS的深入研究,进一步证明了部分IBS患者中存在肠黏膜低度炎症和免疫细胞功能活化。

近年来的研究进一步提示肠道炎症在IBS的发病中起着举足轻重的作用。Törnblom *et al*^[14]研究发现,IBS患者不仅肠黏膜存在轻度炎症和免疫激活,而且肠神经丛内有淋巴细胞的低度浸润,并有神经元退化现象。而胃肠道动力障碍及感觉过敏正是以肠神经系统异常为基础^[15]。肠黏膜炎症还可以通过肠道局部的神经内分泌免疫网络的复杂作用引起肠神经系统(enteric nervous system, ENS)-平滑肌功能可逆性的改变,最终导致肠黏膜化学感受器和机械感受器对各种刺激敏感性增高^[16]。此外,低度炎症还可以通过改变非炎症部位肠神经反射回路和上皮细胞功能而引起非炎症部位感觉过敏^[17]。肠道持续低度炎症的原因仍未完全清楚,促炎因子与抗炎因子表达失衡可能是其重要机制。

IL-1 β 是重要的促炎因子之一,也是炎症反应的重要介质,IL-1 β 可提高胃肠道胆碱能神经对乙酰胆碱及其他炎性介质的敏感性,IL-1 β 还可抑制肠道Na-K-ATP酶的活性,进而抑制水、钠吸收而产生腹泻,最终导致胃肠功能的紊乱。Gwee *et al*^[18]发现急性胃肠炎后发展为IBS患者比急性胃肠炎不进展为IBS者有更高的直肠黏膜IL-1 β mRNA表达。王利华 *et al*^[19]研究也证实了这点。而IL-10是重要的抗炎因子并与IBS密切相关,Gonsalkorale *et al*^[20]研究发现,IBS患者IL-10基因频率较正常显著降低,提示IL-10产生减少的个体更容易发生IBS。

本研究中自组中药方剂黄术灌肠液主要成

分为大黄、黄芩、白术等,现代医学研究表明大黄具有抑菌、调节肠管舒缩运动、清除肠道有毒物质活性等作用;黄芪能清除体内氧自由基、扩张血管、改善微循环及调节机体免疫功能;白术与黄芪配伍具有协同作用,可调控肠黏膜细胞炎症修复,改善肠道功能^[21-22]。我们前期的临床治疗研究亦表明本组方剂配伍合理,具有明显协同作用,抗菌消炎,改善黏膜血循环,促进炎症修复,调整肠道功能^[23]。尤其是黄术灌肠液通过灌肠给药高浓度直接作用于病变部位,扶正祛邪,促进局部炎症和水肿消退,缩短病程。而且灌肠治疗减少了药物在肝脏的首过效应,有着传统口服给药无法比拟的优势^[24]。本研究结果显示,IBS大鼠促炎因子IL-1 β 水平升高而抗炎因子IL-10水平降低,提示促炎/抗炎因子失衡在IBS的发生和发展中占有重要地位。黄术灌肠液灌肠治疗后显著降低IBS大鼠血清IL-1 β 及升高IL-10,且效果明显优于得舒特组,说明黄术灌肠液可能通过降低活化的免疫细胞数目,减少IL-1 β 表达,上调抗炎因子IL-10及增强其抗炎活性,从而纠正抗炎/促炎因子失衡,最终达到对IBS的治疗效果。

4 参考文献

- 1 Sikander A, Rana SV, Prasad KK. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clin Chim Acta* 2009; 403: 47-55
- 2 Houghton LA, Atkinson W, Lockhart C, Whorwell PJ, Keevil B. Sigmoid-colonic motility in health and irritable bowel syndrome: a role for 5-hydroxytryptamine. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 724-731
- 3 Wang WF, Yang YS, Peng LH, Sun G. Alteration of substance P-containing neural pathways in a rat model of irritable bowel syndrome with rectal distension. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 211-218
- 4 Palsson OS, Morteau O, Bozyski EM, Woosley JT, Sartor RB, Davies MJ, Johnson DA, Turner MJ, Whitehead WE. Elevated vasoactive intestinal peptide concentrations in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1236-1243
- 5 Zhang H, Yan Y, Shi R, Lin Z, Wang M, Lin L. Correlation of gut hormones with irritable bowel syndrome. *Digestion* 2008; 78: 72-76
- 6 Dinan TG, Clarke G, Quigley EM, Scott LV, Shanahan F, Cryan J, Cooney J, Keeling PW. Enhanced cholinergic-mediated increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6 in irritable bowel syndrome: role of muscarinic receptors. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2570-2576
- 7 Liebrechts T, Adam B, Bredack C, Röth A, Heinzel S, Lester S, Downie-Doyle S, Smith E, Drew P, Talley NJ, Holtmann G. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 132: 913-920
- 8 La JH, Kim TW, Sung TS, Kang JW, Kim HJ, Yang IS. Visceral hypersensitivity and altered colonic

- motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2791-2795
- 9 徐俊荣, 罗金燕, 尚磊, 孔武明. 从肠肌间神经丛抑制性神经递质的改变探讨IBS不同亚型的发病机制. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2332-2338
- 10 徐俊荣, 罗金燕, 尚磊, 孔武明. 大鼠肠易激综合征肠黏膜下神经丛可塑性的研究. *中华消化杂志* 2007; 27: 107-110
- 11 Piche T, Saint-Paul MC, Dainese R, Marine-Barjoan E, Iannelli A, Montoya ML, Peyron JF, Czerucka D, Cherikh F, Filippi J, Tran A, Hébuterne X. Mast cells and cellularity of the colonic mucosa correlated with fatigue and depression in irritable bowel syndrome. *Gut* 2008; 57: 468-473
- 12 O'Sullivan M, Clayton N, Breslin NP, Harman I, Bountra C, McLaren A, O'Morain CA. Increased mast cells in the irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 449-457
- 13 Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, Wilson I. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 122: 1778-1783
- 14 Törnblom H, Lindberg G, Nyberg B, Veress B. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 1972-1979
- 15 Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci* 2006; 126-127: 264-272
- 16 Collins SM, Piche T, Rampal P. The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2001; 49: 743-745
- 17 De Giorgio R, Barbara G, Blennerhassett P, Wang L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Collins SM, Tougas G. Intestinal inflammation and activation of sensory nerve pathways: a functional and morphological study in the nematode infected rat. *Gut* 2001; 49: 822-827
- 18 Gwee KA, Collins SM, Read NW, Rajnakova A, Deng Y, Graham JC, McKendrick MW, Mochhala SM. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut* 2003; 52: 523-526
- 19 王利华, 方秀才, 潘国忠. 肠道感染与肠易激综合征. *中华内科杂志* 2002; 41: 90-93
- 20 Gonsalkorale WM, Perrey C, Pravica V, Whorwell PJ, Hutchinson IV. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut* 2003; 52: 91-93
- 21 张喜平, 袁玉梅. 黄芪注射液临床应用概况. *医学研究杂志* 2007; 36: 96-98
- 22 张子理, 陈蔚文. 党参、黄芪、白术提取物配伍应用对小肠上皮细胞增殖的影响. *广州中医药大学学报* 2002; 19: 137-140
- 23 胡团敏, 黄永德, 张丽婷. 结肠易激综合征128例中药灌肠治疗探讨. *中国现代医生* 2008; 46: 29-30
- 24 吴东, 孙健平, 吴军, 郑建平, 陈其雨. 自拟灌肠1号结合中药内服治疗慢性溃疡性结肠炎90例分析. *现代中西医结合杂志* 2007; 16: 338-339

■同行评价

本研究设计合理, 内容具有原创性, 学术价值较好。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

●消息●

《世界华人消化杂志》标点符号用法

本刊讯 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。(常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

糖尿病消化不良患者症状及其与近端胃功能的关系

张月霞, 蓝宇

■背景资料

胃肠道损害是糖尿病患者常见的并发症, 研究表明糖尿病消化不良患者存在近端胃功能障碍。故近端胃功能障碍可能是引起各种不适症状的原因之一。既往对糖尿病患者消化系统症状的发生分布及其与近端胃功能的关系报道较少, 各个症状的发生及与近端胃功能的关系尚不明确。

张月霞, 蓝宇, 北京积水潭医院消化科 北京大学医学部第四临床医学院 北京市 100035

作者贡献分布: 此课题由张月霞与蓝宇共同设计; 研究过程、数据分析及文章撰写由张月霞完成; 文章的指导及审阅由蓝宇完成。
通讯作者: 蓝宇, 教授, 100035, 北京市西城区新街口东街31号, 北京积水潭医院消化科, 北京大学医学部第四临床医学院。
lanyu-mail@sohu.com

电话: 010-58517177

收稿日期: 2009-04-23 修回日期: 2009-06-22

接受日期: 2009-06-29 在线出版日期: 2009-07-28

Relationship between dyspeptic symptoms and proximal stomach function in diabetic patients

Yue-Xia Zhang, Yu Lan

Yue-Xia Zhang, Yu Lan, Department of Gastroenterology, Beijing Jishuitan Hospital, the Fourth Medical College of Peking University, Beijing 100035, China

Correspondence to: Professor Yu Lan, Department of Gastroenterology, Beijing Jishuitan Hospital, the Fourth Medical College of Peking University, Beijing 100035, China. lanyu-mail@sohu.com

Received: 2009-04-23 Revised: 2009-06-22

Accepted: 2009-06-29 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the relationship between dyspeptic symptoms and proximal stomach function in diabetic patients (DM).

METHODS: Forty-four DM patients were enrolled in the study. After scoring symptoms, the patients were divided into two groups: those with dyspepsia ($n = 24$) and those without gastrointestinal symptoms ($n = 20$). The water load test was performed to determine the function of proximal stomach. The area and circumference of proximal (cardia) and distal stomach (antrum) were measured by ultrasonography.

RESULTS: Of 24 diabetic patients with dyspepsia, 18 (75%) had abdominal distention, 16 (66.7%) had epigastric discomfort (66.7%) and 16 (66.7%) had constipation. Proximal stomach function was impaired more seriously in patients with dyspepsia. There was no correlation between proximal stomach function and total

dyspeptic symptom score. The scores of epigastric discomfort and abdominal distention were negatively correlated with the changes in the area and circumference of gastric fundus when different water loads were given.

CONCLUSION: Abdominal distention, epigastric discomfort and constipation are common dyspeptic symptoms in diabetic patients. The presence of epigastric discomfort and abdominal distention indicates the impairment of proximal stomach function.

Key Words: Diabetes; Dyspepsia; Stomach; Proximal end

Zhang YX, Lan Y. Relationship between dyspeptic symptoms and proximal stomach function in diabetic patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2192-2194

摘要

目的: 了解糖尿病患者消化不良症状与近端胃功能的关系。

方法: 糖尿病患者44例, 对有胃肠症状者进行症状评分, 其中有消化不良症状者24例, 无胃肠症状及其他脏器并发症者20例, 以水负荷试验测定近端胃功能, 同时B超测定近端胃(胃底)和远端胃(胃窦)的横截面积和周长。

结果: 24例有胃肠症状糖尿病患者中出现腹胀18例(75%), 上腹不适16例(66.7%), 便秘16例(66.7%); 有胃肠症状组近端胃功能损害明显; 消化系统症状总积分与近端胃各参数之间无相关性, 上腹不适及腹胀积分与不同饮水量时胃底面积差值, 胃底周长差值成负相关。

结论: 糖尿病患者消化系统症状以腹胀、上腹不适及便秘较常见, 有胃肠症状者上腹不适、腹胀的出现提示近端胃功能受损。

关键词: 糖尿病; 消化不良; 胃; 近端

张月霞, 蓝宇. 糖尿病消化不良患者症状及其与近端胃功能的关系. *世界华人消化杂志* 2009; 17(21): 2192-2194

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2192.asp>

■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科; 王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室; 喻荣彬, 副教授, 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系

0 引言

胃肠道损害是糖尿病患者常见的并发症, 研究表明糖尿病消化不良患者存在近端胃功能障碍^[1], 故近端胃功能障碍可能是引起各种不适症状的原因之一, 糖尿病患者常见的各种消化系症状包括腹胀、上腹不适、上腹痛、早饱、恶心、呕吐、吞咽困难、便秘、腹泻等, 既往对糖尿病患者消化系症状的发生分布及其与近端胃功能的关系报道较少, 各个症状的发生及与近端胃功能的关系尚不明确。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2007-09/2008-03在我院就诊的糖尿病患者44例, 根据并发症及消化系症状的有无将其分为2组。无胃肠症状糖尿病组: 20例, 男9例, 女11例, 年龄43-76(平均 64.3 ± 8.0)岁, 糖尿病病程1-18(平均 9.3 ± 8.1)年。所有患者均符合2005年ADA糖尿病的诊断标准, 但无全身并发症, 无消化不良症状。糖尿病消化不良组: 24例, 男11例, 女13例, 年龄51-76(平均 67.6 ± 6.6)岁, 糖尿病病程1-22(平均 10.2 ± 7.8)年。均有消化系症状, 且积分 ≥ 6 分, 且除外消化系肿瘤, 溃疡, 糜烂性胃炎, 反流性食管炎, 肝胆胰腺等器质性疾病。以上患者均志愿参加本研究, 本研究所有项目均为无创检查。

1.2 方法

1.2.1 消化系症状评分: 询问患者症状并填写消化系症状评分表^[2-3], 其胃肠道症状包括上腹不适、上腹胀、上腹痛、嗝气、早饱、恶心、呕吐、反酸、烧心、便秘、腹泻等, 并分别对上述症状进行4分法评分, 按严重程度计0-3分: 0分为无症状; 1分为轻度, 症状轻, 需注意才能感觉到; 2分为中度, 自觉症状明显, 但不影响工作生活; 3分为重度, 自觉症状明显, 影响工作生活。按频度计0-3分: 0分为不发作; 1分为每周发作1-3次; 2分为每周发作4-6次; 3分为 >1 次/d或持续。胃肠道症状总积分为每项不适症状的频度与程度之和, 积分 ≥ 6 分者纳入有症状组。

1.2.2 近端胃功能测定: 采用水负荷试验, 受试者空腹8 h以上, 以100 mL/20 s的速度饮37℃白开水, 分别记录出现饱感时的饮水量(阈值饮水量)和饮至不能再饮或出现不适症状时的饮水量(饱足饮水量), 并计算他们的差值。在达到阈值和饱足饮水量时, 以LOGIQ9型B超(美国GE公司)分别测量近端胃(胃底)和远端胃(胃窦)的横截面周长和面积, 计算饱足与阈值饮水量时近、远端胃周长和面积变化的差值, 以了解近端胃及远端胃扩张的程度及胃底的顺应性。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件, 计量

资料的分析采用 t 检验或单因素方差分析, 计数资料的分析采用卡方检验, 相关性的分析采用直线回归分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 有胃肠症状糖尿病组患者症状分布 对24例有症状的糖尿病患者胃肠症状评分显示, 上腹不适16例(66.7%), 上腹痛8例(33.3%), 上腹胀18例(75%), 恶心4例(16.7%), 呕吐1例(4.2%), 早饱8例(33.3%), 烧心10例(41.7%), 反酸13例(54.2%), 便秘16例(66.7%), 其中便秘与腹泻交替4例(16.7%)。上消化道症状以上腹胀、上腹不适最常见, 下消化道症状则以便秘为主要表现。

2.2 有无胃肠症状糖尿病组近端胃功能比较 有胃肠症状糖尿病组饱感阈值饮水量、最大耐受饮水量、饮水量差值、胃底面积差值均明显低于无胃肠症状糖尿病组($P < 0.05$), 而远端胃(胃窦)各指标两组比较无显著差别(表1)。

2.3 糖尿病消化系症状与近端胃功能参数的关系 有症状糖尿病组消化系症状总积分与近端胃功能各参数之间无相关性。而上腹不适计分与胃底面积差值、胃底周长差值成负相关($r = -0.53, P = 0.008; r = -0.49, P = 0.015$), 上腹胀计分也与胃底面积差值、胃底周长差值成负相关($r = -0.48, P = 0.017; r = -0.53, P = 0.008$)。余各项症状评分与近端胃指标无显著相关性。

3 讨论

糖尿病是以慢性高血糖为特征的代谢性疾病, 长期高血糖可导致机体持久不可逆的功能和结构改变, 胃肠合并症是其中很常见的一种, 临床上可表现为上腹胀、上腹不适、上腹痛、早饱、恶心、呕吐等, 症状缺乏特异性^[4]。以往对导致上述胃肠功能障碍的动力因素研究较多, 但并非所有的胃肠症状均由运动功能障碍导致, 两者之间也并不总呈相关关系, 部分患者与近端胃的适应性松弛障碍及感知功能异常有关^[5]。近年, 人们对近端胃功能的研究主要集中在动物实验、健康人及功能性消化不良患者^[6-7], 对糖尿病消化不良研究较少。

本研究对24例有胃肠症状糖尿病患者症状的发生情况进行分析, 上胃肠症状发生率由高到低依次为腹胀(75%), 上腹不适(66.7%), 反酸(54.2%), 烧心(41.7%), 上腹痛(33.3%), 早饱(33%), 而恶心呕吐很少见。以往的研究^[8-9]表明有胃肠症状糖尿病患者与健康对照组比较, 近

■研发前沿

糖尿病患者消化系症状的发生分布, 其与近端胃功能的关系, 目前尚不明确。近端胃功能研究较准确特异的方法及各项值的意义。

■创新盘点

糖尿病消化不良患者上消化系症状以腹胀、上腹不适最常见, 反酸、烧心的发生率也较高。糖尿病有胃肠症状患者近端胃功能损害较无症状患者明显, 上腹胀、上腹不适与近端胃功能损害有关, 这之前文章所描述的早饱为近端胃功能损害特异表现不完全一致。

■应用要点

本研究发现腹胀、上腹不适是糖尿病消化不良患者较多发及较特异的症状,症状的发生与近端胃功能损害有关,且糖尿病患者胃食管反流病的发生较健康人增加,有助于糖尿病胃肠相关并发症的早期诊断和治疗。

表 1 近端胃功能各指标比较

分组	n	饱感阈值 饮水量(mL)	最大耐受 饮水量(mL)	饮水量 差(mL)	胃底面积 差(cm ²)	胃窦面积 差(cm ²)	胃底周长 差(cm)	胃窦周长 差(cm)
无症状组	20	870±225	1360±322	490±150	19.78±12.07	7.78±4.60	5.01±3.04	3.49±1.77
有症状组	24	638±311 ^a	1000±424 ^a	362±146 ^a	11.76±6.85 ^a	7.93±2.95	3.67±2.17	3.74±1.67

^aP<0.05 vs 实验组。

端胃感觉功能受损,容受性及顺应性均较健康对照减低。本研究采用饮水试验测定近端胃功能,让患者在一定时间内饮入纯水直至产生饱感或上腹部症状,这时大部分饮入的水存于近端胃,尚未及排至远端胃,从而使该试验结果能较好地单一反映近端胃容受性扩张的情况,与球囊扩张近端胃具有相似的效果且更符合生理。一般认为水负荷试验的饮水量与胃底壁的顺应性和感觉有关^[10-11],本试验结果可以看出糖尿病消化不良患者的阈值饮水量和饱足饮水量均较无症状组明显减少,表明患者存在近端胃感觉阈值减低,感觉功能障碍;饮水量及胃底面积饱足饮水前后增加较无症状组减少,说明近端胃舒张功能减退,与Undeland *et al*的结论一致^[12]。将消化系症状积分与近端胃各指标行相关性分析可见,胃肠症状总积分与饮水试验近端胃各指标均无相关性,可见引起消化系症状发生原因较多,近端胃功能损害仅是其中原因之一;上腹不适、上腹胀这两个症状的积分与胃底面积差值、胃底周长差值呈负相关,表明近端胃舒张功能差,容易出现腹胀、上腹不适等症状。上腹胀、上腹不适症状可能提示糖尿病患者近端胃功能受损。

对症状进行分析时我们还可发现糖尿病患者反酸、烧心等胃食管反流的症状发生率明显高于正常人群(约为50%),曾有学者行这方面的研究^[13]发现,胃食管反流病患者存在胃扩张、胃排空减慢、胃底顺应性较正常人增加及感觉阈值下降,推测反流的症状可能与近端胃功能损害有关。考虑糖尿病患者反流症状发生率高的原因可能有:糖尿病患者食管神经肌肉病变,导致廓清能力下降^[14-15];近端胃容受性下降,导致胃内容物容纳障碍,加上胃窦动力减低,胃排空延迟^[1],胃内容物反流增加等综合因素导致。

总之,糖尿病消化不良患者上消化道症状以腹胀、上腹不适最常见,下消化道症状以便秘为主要表现,反酸、烧心的发生率也较高。糖尿病有胃肠症状患者近端胃功能损害较无症状患者明显,上腹胀、上腹不适与近端胃功能损

害有关,这与之前文章所描述的早饱^[2,10]为近端胃功能损害特异表现不一致,需要加大样本量,进一步研究证实。

4 参考文献

- 1 蓝宇,柯美云,朱朝晖,李方,谷成明. 糖尿病不同阶段胃运动功能的临床研究. 中华消化杂志 2001; 21: 716-719
- 2 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
- 3 宋志强,柯美云,王智凤,刘晓红,方秀才. 有和无重叠症状的功能性消化不良患者中消化不良症状学和发病机制的比较研究. 胃肠病学 2006; 11: 458-461
- 4 蓝宇,张贲,叶华,梁学亚. 糖尿病消化不良症状调查及其与其他脏器合并症关系. 基础医学与临床 2001; 21(增刊): 81
- 5 柯美云. 胃肠功能和动力障碍研究进展. 现代消化及介入诊疗 2004; 9: 1-3
- 6 张瑞星,姚树坤,高洪生,张艳丽,刘俊宝. 近端胃功能与功能性消化不良症状的关系. 基础医学与临床 2005; 25: 58-61
- 7 张侃,谢小平,孙圣斌,黄绪群,侯晓华. 肠易激综合征患者近端胃舒张和排空功能的研究. 胃肠病学 2007; 12: 298-300
- 8 蓝宇,吴改玲,闫冰,王杞,张灵云,张月霞. 糖尿病消化不良患者的自主神经功能及其对近端胃功能的影响. 胃肠病学 2006; 11: 484-487
- 9 Samsom M, Salet GA, Roelofs JM, Akkermans LM, Vanberge-Henegouwen GP, Smout AJ. Compliance of the proximal stomach and dyspeptic symptoms in patients with type I diabetes mellitus. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2037-2042
- 10 李启祥,朱良如,侯晓华. 饮水负荷试验测定胃感觉的临床研究. 中华内科杂志 2004; 43: 436-438
- 11 邵池,赵宏,柯美云,王智凤. 水负荷试验联合B超在评价功能性消化不良近端胃功能障碍中的地位. 中华消化杂志 2005; 25: 23-25
- 12 Undeland KA, Hausken T, Aanderud S, Berstad A. Lower postprandial gastric volume response in diabetic patients with vagal neuropathy. *Neurogastroenterol Motil* 1997; 9: 19-24
- 13 于凤海,李兆申,许国铭,邹多武,尹宁. 反流性食管炎患者的胃近端顺应性和感觉功能研究. 第二军医大学学报 2001; 22: 213-215
- 14 Nishida T, Tsuji S, Tsujii M, Arimitsu S, Sato T, Haruna Y, Miyamoto T, Kanda T, Kawano S, Hori M. Gastroesophageal reflux disease related to diabetes: Analysis of 241 cases with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 258-265
- 15 刘明,巫协宁,王国良,叶蓉绍. 糖尿病患者的食管测压研究. 中华消化杂志 1995; 15: 200-202

■同行评价

本研究选题较好,设计合理,结论可信,具有一定的临床价值。

全胃切除术后应用不同营养制剂进行肠内营养58例

宋茂力, 邹小明, 李晓林

宋茂力, 邹小明, 李晓林, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

作者贡献分布: 此课题由宋茂力设计; 研究过程由宋茂力、邹小明及李小林操作完成; 本论文写作由宋茂力完成。

通讯作者: 邹小明, 教授, 博士生导师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科. zou4930@yahoo.com.cn

电话: 0451-86605126 传真: 0451-86605126

收稿日期: 2009-04-30 修回日期: 2009-06-15

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-28

Enteral nutrition in patients after total gastrectomy: an analysis of 58 cases

Mao-Li Song, Xiao-Ming Zou, Xiao-Lin Li

Mao-Li Song, Xiao-Ming Zou, Xiao-Lin Li, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Professor Xiao-Ming Zou, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Baojian Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zou4930@yahoo.com.cn

Received: 2009-04-30 Revised: 2009-06-15

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To seek appropriate enteral nutrition methods for patients after total gastrectomy.

METHODS: A total of 58 patients after total gastrectomy were included in this randomized controlled study. These patients were divided into control group (TPF) and experimental group (TPF+SP). Early enteral nutrition was achieved via a nasointestinal tube. Postoperatively, the time of first flatus and defecation, the incidence of digestive symptoms (including abdominal distension, diarrhea, nausea and vomiting) and the occurrence of anastomotic leakage were compared between the two groups.

RESULTS: No anastomotic leakage was noted in all patients. No significant differences were observed in the time of first flatus and defecation, the incidence of diarrhea, nausea and vomiting, and the occurrence of anastomotic leakage between the two groups (all $P > 0.05$). In con-

trast, the incidence of abdominal distension in the control group was significantly higher than that in the experimental group (46.7 % vs 21.4 %, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Enteral nutrition preparations easily absorbed through the small intestine (e.g., SP) should be used for early enteral nutrition in patients after total gastrectomy. Preparations containing dietary fiber (e.g., TPF) should be replenished after the recovery of intestine function.

Key Words: Enteral nutrition; Total gastrectomy; Enteral nutritional suspension

Song ML, Zou XM, Li XL. Enteral nutrition in patients after total gastrectomy: an analysis of 58 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2195-2197

摘要

目的: 探讨全胃切除术后, 应用肠内营养制剂进行肠内营养的合理方法。

方法: 采用随机对照法将58例全胃切除术后患者随机分为对照组(能全力), 实验组(能全力和百普力), 经鼻肠管进行早期肠内营养, 观察两组术后肠功能恢复排气时间, 排便时间, 腹胀, 腹泻, 恶心, 呕吐以及吻合口瘘的发生。

结果: 所有患者均完成肠内营养治疗, 无吻合口瘘发生。两组比较恢复排气时间, 排便时间以及腹泻、恶心和呕吐无明显差异($P > 0.05$), 对照组腹胀的发生率明显高于实验组差异显著(46.7% vs 21.4%, $P < 0.05$)。

结论: 全胃切除术早期选用以小肠吸收为主的营养制剂(百普力), 待肠功能恢复后再添加含有膳食纤维的营养制剂(能全力)更为合理。

关键词: 肠内营养; 全胃切除; 肠内营养混悬液

宋茂力, 邹小明, 李晓林. 全胃切除术后应用不同营养制剂进行肠内营养58例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(21): 2195-2197
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2195.asp>

■背景资料

目前, 多数学者认为, 只要患者胃肠道功能完整或具有部分胃肠道功能, 能源物质供给的最佳途径是胃肠道。全胃切除术后小肠功能在数小时内即可恢复, 因此, 全胃切除术后早期EN在临床营养治疗中所占比例越来越高。

■同行评议者

程爱国, 教授, 华北煤炭医学院临床医学系

■研发前沿

如何选择合适的肠内营养制剂,降低胃肠道并发症,使之发挥最大的治疗作用,为广大临床医生面临的实践课题。

0 引言

全胃切除术后患者处于高代谢状态,术后早期肠内营养(enteral nutrition, EN)支持已成为近代营养治疗的基本原则。但EN的常见并发症腹泻、腹胀、恶心、呕吐等是导致其不能顺利进行的重要原因。本研究拟通过随机对照研究,观察EN相关并发症的发生,探讨在全胃切除术后早期应用不同营养制剂的合理方法。

1 材料和方法

1.1 材料 回顾2003-2008年在我院因胃癌接受根治性全胃切除空肠代胃术治疗的58例患者。随机分成2组,对照组30例(能全力组)和实验组28例(百普力+能全力组)。所有患者术前均未接受营养支持,术前排除肠梗阻、炎症性肠病及代谢疾病。对照组与实验组术前在体质量、血红蛋白、血清白蛋白、术中失血量及手术时间上无统计学差异,具有可比性。

EN选用百普力和能全力2种营养制剂(荷兰纽迪希亚公司生产)。百普力主要成分为水、乳清蛋白水解物、植物油、麦芽糖糊精、维生素、矿物质和微量元素等人体必须的营养物质,呈混悬性液,以短肽蛋白为主,低脂肪,低渣,等热量,即1 mL含4.18 KJ热量,每500 mL总热量2090 KJ,其中蛋白质:脂肪:碳水化合物=16%:9%:75%。能全力主要成分为水、麦芽糖、糊精、酪蛋白、植物脂肪、矿物质、维生素和多种微量元素与百普力不同点在于添加大豆多糖纤维成分。每500 mL总热量2090 KJ,不含乳糖,渗透压为250 mmol/L,蛋白质:脂肪:碳水化合物=16%:35%:49%。

1.2 方法 术中消化系重建完成后,将鼻胃管(Flocare CH10, 荷兰纽迪希亚出口有限公司)置于吻合口远端30-50 cm,拔出导丝可靠固定。术后第1天给予0.9%生理盐水250 mL,自鼻胃管缓慢滴入80-100 mL/h。术后第2、3天给予对照组500 mL能全力/5-8 h,实验组500 mL百普力/5-8 h;第4、5、6、7给予对照组1000 mL能全力/8-16 h、实验组500 mL能全力+500 mL百普力/8-16 h。8 d后停止灌注,患者恢复流质饮食。肠内营养支持期间,能量不足部分由静脉营养补充。

观察指标:观察术后肠功能恢复排气时间,排便时间,消化系症状包括腹胀(症状评定标准:腹部膨隆,腹部胀满,或伴有嗝气,肠鸣,排气增多及腹痛等症状)^[1]、腹泻(每日大便3次以上伴大便性状改变,且量大于200 g)^[2]、恶心和呕吐,

表 1 术后恢复排气时间,排便时间和消化系症状发生率

观察指标	对照组(n = 30)	实验组(n = 28)
腹胀n(%)	14(46.7) ^a	6(21.4)
腹泻n(%)	6(20)	4(14.3)
恶心和/或呕吐n(%)	3(10)	2(7.1)
恢复肛门排气时间(h)	47 ± 20	49 ± 18
恢复排便(h)	71 ± 12	68 ± 15

^aP<0.05 vs 实验组。

吻合口瘘的发生。

统计学处理 计量资料结果以mean±SD表示,采用t检验,以P<0.05为有统计学意义。计数资料结果采用χ²检验。

2 结果

所有患者均完成研究,无死亡,无吻合口瘘的发生。术后恢复排气时间,排便时间对照组与实验组比较无显著差异(P>0.05)。消化系症状腹泻、恶心和呕吐发生率对照组与实验组比较无显著差异(P>0.05),腹胀发生率对照组与实验组比较有显著差别(P<0.05,表1)。

3 讨论

全胃切除术后机体处于一种应激和高分解代谢状态,为使机体尽早恢复,减少各种并发症的发生,早期EN必不可少。早期EN支持的优点:(1)维持肠黏膜细胞结构和功能的完整性,促进肠道功能的恢复^[3-4],有利于防止肠道细菌移位,降低肠源性感染的发生,阻断全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),有效减少并发症的发生^[5]。(2)营养物质经门静脉系统吸收,有利于肝脏的蛋白质合成和代谢调节;(3)EN更符合生理状态,更安全,且价格低廉;(4)减少吻合口瘘的发生,如果一旦发生吻合口瘘,长期EN比静脉营养的优势则更加明显^[6]。

研究表明,如果腹部手术或创伤前小肠功能正常,则术后小肠的运动和吸收功能即刻恢复;同时发现腹部手术后胃肠道麻痹以胃和结肠为主^[7-8],结肠功能大多于术后3-5 d恢复^[9]。这为早期EN提供了理论依据。但EN常见并发症有腹痛、腹胀、腹泻、恶心、呕吐等,影响EN应用,其主要原因:(1)由于全胃切除术后迷走神经干切断、胃肠道原有解剖结构和肠道神经内分泌系统发生改变,致使消化系规律性蠕动功能

■应用要点

本文观察发现全胃切除术后早期应选用以小肠吸收为主的营养制剂(百普力),待3-5 d肠功能恢复后再添加含有膳食纤维的营养制剂(能全力)更为合理。

减慢, 肠道激素的分泌减少, 从而影响EN的耐受性^[10]; (2)EN的输注速度增加过快、浓度高、营养液温度低、营养液被污染^[11]; (3)低蛋白血症所致肠壁水肿以及手术时间较长等有关。

术后腹胀与膳食纤维的关系目前尚不统一。多数学者认为: (1)在肠功能未恢复前, 膳食纤维经细菌的分解产生气体引起腹胀; (2)膳食纤维酵解, 产生短链脂肪酸、氢气、二氧化碳和甲烷等气体, 可蓄积在肠道内而加重术后的腹胀^[12]。但也有学者认为, 膳食纤维可能有利于肠道功能包括腹胀的恢复^[13]。

本研究中对照组(能全力组)的腹胀发生率46.7%明显高于实验组(百普力+能全力组)21.4%, 差异显著($P<0.05$), 说明全胃切除术后患者早期EN应选用以小肠吸收为主的短肽蛋白、低脂、低渣的百普力, 等到结直肠功能恢复后(术后3-5 d)再添加能全力更为合理。含膳食纤维的能全力在肠功能未恢复前可能是腹胀发生率高的原因之一。同时观察两组恢复肛门排气排便时间两组无明显差别。

国内外报道EN相关性腹泻的发生率为2%-60%^[14]。本研究2组EN腹泻的总体发生率17.2%, 其中对照组为20%, 实验组14.3%, 两组比较无明显统计学差异。腹泻患者均可通过调整输液速度、浓度, 营养液的温度, 得到改善或消失。恶心或呕吐的总体发生率8.6%, 对照组为10%, 实验组7.1%。通过调整输液速度症状消失。

总之, 根据我们的观察发现全胃切除术后经管饲方法^[15]早期选用以小肠吸收为主的营养制剂(百普力组), 待肠功能恢复后再添加含有膳食纤维的营养制剂(能全力组)更为合理。虽然全胃切除术后胃管引流量较少, 但对于空肠代胃的患者不易早期拔出, 因胃管可起到减轻空肠

储袋张力, 防止吻合口瘘; 同时可观察营养液是否发生反流的作用。

4 参考文献

- 1 王进海, 罗金燕, 王学勤, 于祥艺. 思密达治疗功能性肠胀气的临床研究. 世界华人消化杂志 1998; 6: 337-339
- 2 刘俊, 夏强. 胃癌术后膳食纤维和早期肠内营养与消化道并发症的关系. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 223-225
- 3 卢晓明, 牛彦锋, 王国斌, 陈道达. 肠内营养对胃癌术后近期的免疫和营养状况的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2225-2227
- 4 姜英俊, 孔心涓, 程广, 田字彬. 术前合理营养支持对胃癌及结直肠癌患者术后恢复的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1928-1932
- 5 王远志, 丁岩, 冰吴健, 邓彬, 肖炜明. 早期肠内营养联合肠屏障保护剂治疗急性重症胰腺炎64例. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3545-3548
- 6 吴文川, 靳大勇. 胰十二指肠切除术后肠内营养与肠外营养治疗费用的比较. 中国实用外科杂志 2002; 22: 276
- 7 Baskin WN. Advances in enteral nutrition techniques. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1547-1553
- 8 宋延强, 吕文平, 庞新建. 老年胃癌患者术后早期肠内营养与肠外营养疗效的比较. 中华普通外科杂志 2004; 19: 97-99
- 9 刘强, 王舒宝. 胃癌全胃及近端切除术后肠内营养治疗的临床研究. 中国肿瘤临床 1999; 26: 565
- 10 谢小平, 揭志刚, 李映良, 廖信芳. 老年胃癌患者术后早期肠内营养耐受性分析. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 539-540
- 11 詹文华. 关注全胃切除病例的营养问题. 中国临床营养杂志 2003; 11: 77-78
- 12 Nakao M, Ogura Y, Satake S, Ito I, Iguchi A, Takagi K, Nabeshima T. Usefulness of soluble dietary fiber for the treatment of diarrhea during enteral nutrition in elderly patients. *Nutrition* 2002; 18: 35-39
- 13 李宁, 蒋小华, 朱维铭. 含膳食纤维和中链三酰甘油的肠内营养制剂在胃癌术后的应用. 肠内与肠外营养 2004; 11: 158-160
- 14 高岩, 赵鸣雁, 安群. 危重患者早期肠内营养相关并发症分析. 中国综合临床 2004; 20: 126-127
- 15 王新宜, 陈艳秋, 宗敏, 陈霞飞. 管饲方法与临床病人耐受性和并发症的关系. 肠外与肠内营养 2002; 9: 75-76

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本研究目的明确, 方法得当, 统计学方法选择正确, 结论可信, 对临床应用具有参考价值。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布《世界华人消化杂志》 2007年影响因子0.568

本刊讯 2007年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位。2007年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位。即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54。(编辑: 程剑侠 2009-07-28)

非酒精性脂肪肝患者心脏舒张功能与肝功能的相关性

黄健, 黄群, 陈小珠, 周锋, 何剑琴, 王晓玲

■背景资料

近年非酒精性脂肪肝病的发病率逐年增加, 胰岛素抵抗和遗传易感性参与其发病。心血管疾病中冠心病是引起心力衰竭常见的病因。冠心病的患者中心舒张功能不全是最早期的表现。最近临床研究表明非酒精性脂肪肝与冠心病关系密切。本文旨在研究NAFLD患者中心舒张功能变化及与肝功能参数的相关性, 以探讨舒张功能变化在NAFLD中的临床意义。

黄健, 黄群, 周锋, 何剑琴, 王晓玲, 广东医学院附属福田医院消化内科 广东省深圳市 518033

陈小珠, 广东医学院附属福田医院超声科 广东省深圳市 518033

作者贡献分布: 黄健、黄群及陈小珠对此文所作贡献均等; 此课题由黄群设计; 研究过程由陈小珠与黄群操作完成; 研究所用材料由陈小珠、周锋、何剑琴及王晓玲提供; 数据分析由黄健完成; 本论文写作由黄健与黄群完成。

通讯作者: 黄健, 主治医师, 518033, 广东省深圳市深南中路3025号, 广东医学院附属福田医院消化内科。

wangkin89@hotmail.com

电话: 0755-83982222-6323

收稿日期: 2009-05-27 修回日期: 2009-07-12

接受日期: 2009-07-13 在线出版日期: 2009-07-28

A study of the relationship between cardiac diastolic function and liver function in patients with nonalcoholic fatty liver disease

Jian Huang, Qun Huang, Xiao-Zhu Chen, Feng Zhou, Jian-Qin He, Xiao-Ling Wang

Jian Huang, Qun Huang, Feng Zhou, Jian-Qin He, Xiao-Ling Wang, Department of Gastroenterology, Shenzhen Futian People's Hospital, Guangdong Medical College, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China

Xiao-Zhu Chen, Department of Ultrasound, Shenzhen Futian People's Hospital, Guangdong Medical College, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Jian Huang, Department of Gastroenterology, Shenzhen Futian People's Hospital, Guangdong Medical College, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China. wangkin89@hotmail.com

Received: 2009-05-27 Revised: 2009-07-12

Accepted: 2009-07-13 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To explore changes in cardiac diastolic function in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) by color Doppler Echocardiography and analyze the relationship between liver function and cardiac diastolic function in these patients.

METHODS: One hundred and twenty NAFLD patients treated at our hospital from July 2005 to June 2008 and equal number of matched healthy controls were included in this study. All participants were subjected to routine liver function tests. Meanwhile, B-mode ultrasound diagnosis

of fatty liver and color Doppler echocardiographic evaluation of cardiac diastolic function were carried out. Diastolic cardiac dysfunction (DCD) was defined when the patient had an E/A ratio less than 1.

RESULTS: The incidence of diastolic cardiac dysfunction in patients with NAFLD was significantly higher than that in normal controls (26.7% vs 5.0%, $P < 0.01$). As the fatty liver disease progressed, the E/A ratio decreased gradually ($P < 0.01$). In NAFLD patients with DCD, the levels of ALT, AST and GGT and patient age were significantly higher than those in patients without DCD ($P < 0.01$). Significant differences were noted in TBIL and DBIL levels between normal controls and patients with moderate or severe NAFLD (both $P < 0.01$). A significant difference was also noted in IBIL level between normal controls and NAFLD patients ($P < 0.01$). Logistic analysis showed that serum GGT level was an independent risk factor for the E/A ratio in NAFLD patients ($OR = 1.050$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: DCD is commonly seen in patients with NAFLD. The levels of ALT, AST and GGT significantly increase in NAFLD patients with DCD. Elevated GGT may be a novel risk factor for DCD or coronary artery disease.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Cardiac diastolic dysfunction; Color doppler echocardiography; Live function

Huang J, Huang Q, Chen XZ, Zhou F, He JQ, Wang XL. A study of the relationship between cardiac diastolic function and liver function in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2198-2202

摘要

目的: 采用彩色多普勒超声心动图方法了解NAFLD患者心脏舒张功能。分析肝功能与心脏舒张功能不全的相关性。

方法: 收集2005-07/2008-06我院非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)

■同行评议者

王承党, 副教授, 福建医科大学附属第一医院消化内科

患者120例和健康对照组120例. 检测肝功能ALT、AST、GGT、TBIL、IBIL、DBIL水平. 采用B超对患者进行脂肪肝诊断, 应用彩色多普勒超声心动图技术评价心脏的舒张功能, E/A比值小于1被定义为心脏舒张功能不全(diastolic cardiac dysfunction, DCD).

结果: NAFLD患者DCD的发生率为26.7%, 显著高于正常对照组的5.0% ($P < 0.01$). 随着脂肪肝的发展, 患者的E/A的比值逐步降低 ($P < 0.01$). NAFLD患者中, 合并DCD的患者ALT、AST、GGT及年龄明显高于舒张功能正常组 ($P < 0.01$). TBIL与DBIL在正常对照组与NAFLD重度及中度比较差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$); IBIL在正常对照组与各级NAFLD组两两比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); Logistic回归分析显示, 血清GGT水平是E/A比值的独立危险因素 ($OR = 1.050, P < 0.01$).

结论: NAFLD患者常伴有DCD, NAFLD并DCD患者中, ALT、AST、GGT显著升高. 升高的血清GGT水平可能是DCD或冠心病新的危险因素.

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 心脏舒张功能不全; 彩色多普勒超声心动图; 肝功能

黄健, 黄群, 陈小珠, 周峰, 何剑琴, 王晓玲. 非酒精性脂肪肝患者心脏舒张功能与肝功能的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2198-2202
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2198.asp>

0 引言

目前, 非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率逐年上升, 已成为最常见的非感染性肝脏疾病. 研究表明, NAFLD是代谢综合征(metabolic syndrome, MS)在肝脏中的表现, MS是导致动脉粥样硬化和临床心脑血管事件发生的重要原因. NAFLD的出现可能不仅仅是心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)发生的标志, 甚至是CVD的早期中间状态. 因此, 本研究应用彩色多普勒超声心动图技术, 无创性评价NAFLD患者的心脏舒张功能, 同时探讨心脏舒张功能的改变与肝功能参数之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2005-07/2008-06在广东医学院附属福田医院参加体检或门诊检查的NAFLD患者共120例, 其中男85例, 女35例, 平均年龄

41.9(24-65)岁. 所有患者的诊断均符合2006年我国非酒精性脂肪性肝诊疗指南中的诊断标准^[1], 其临床诊断标准包括: (1)无饮酒史或饮酒折合乙醇量男性每周小于140 g, 女性每周小于70 g; (2)除外病毒性肝炎、药物性肝炎、全胃肠外营养、肝豆状核变性等可导致脂肪肝的特定疾病; (3)除原发疾病临床表现外, 可有乏力、消化不良、肝区隐痛、肝脾肿大等非特异性症状及体征; (4)可有体质量超重和(或)内脏性肥胖、空腹血糖增高、血脂紊乱、高血压等代谢综合征相关组分; (5)血清转氨酶和 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transferase, GGT)水平可有轻至中度增高(小于5倍正常值上限), 通常以丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)增高为主; (6)肝脏影像学表现符合弥漫性脂肪肝的影像学诊断标准; (7)肝活检组织检查组织学改变符合脂肪性肝病的病理学诊断标准. 凡具备上述第1-5项和第6或第7项中任何一项者即可诊断为NAFLD. 正常对照组: 为体检正常的人员120例, 性别、年龄与NAFLD组患者相匹配, 体质量指数(body mass index, BMI)相近. 排除标准: 排除风湿性心脏病及其瓣膜病、心肌病、肺心病、及有明显心脏功能不全症状及体征的患者.

1.2 方法

1.2.1 彩色多普勒超声检查: 按照美国超声心动图学会推荐的方法, 常规行M型、二维超声及彩色多普勒超声心动图检查. 采用ACUSON Sequoia C256型彩色多普勒超声心动图诊断仪, 探头频率2.0-3.5 MHz. 患者采取左侧卧位, 同步体表心电图监测. 二维超声指导下的M型超声心动图按标准测量室间隔厚度, 左室后壁厚度, 左室舒张末径、左室收缩末径和左室缩短分数. 左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)的测量于标准心尖四腔观用双平面Simpson's法获得. 利用Doppler技术获得二尖瓣口血流频谱, 并测量出E峰与A峰速度, 计算其比值(E/A比值), 测量值均为连续3个心动周期测值取平均获得. 以LVEF来评价心脏的收缩功能. 以二尖瓣口血流频谱中的E/A比值表示心脏的舒张功能, 当E/A比值小于1, 即认为患者的舒张功能下降, 为舒张功能不全(diastolic cardiac dysfunction, DCD).

1.2.2 肝脏影像学检查: 所有患者和正常对照者空腹, 采用PHILIPS5500彩色多普勒超声仪行腹部肝胆脾B超检查. 16例患者还进行了肝脏CT扫

■研究前沿

非酒精性脂肪肝与心血管疾病的密切关系, 评价能否采用无创的心脏彩超检查, 及早发现处于心脏舒张功能不全的NAFLD患者, 有待进一步研究. 肝功能参数中, 哪个指标与舒张功能不全有关系, 仍有待进一步的研究.

■相关报道

前瞻性的研究发现非酒精性脂肪肝患者的冠心病发生率明显增加, 非酒精性脂肪肝是心血管疾病的独立危险因素, 并独立与冠心病及其严重程度密切相关, 在有代谢综合征存在的心血管事件中起关键作用, 此外肝功能参数中丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、 γ -谷氨酰转肽酶除了与肝脏疾病相关外, 与糖尿病、冠心病、肿瘤均密切相关.

■创新盘点

非酒精性脂肪肝患者中,舒张功能不全的发生率明显高于正常对照组。随着脂肪肝的程度加重,E/A比值逐渐下降。肝功能参数研究中, γ -谷氨酰转氨酶的异常与肝脏疾病及心脏疾病均有相关性。

表 1 正常对照组与NAFLD组肝功能参数及E/A比值比较 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	ALT (U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)	TBIL(μ mol/L)	DBIL(μ mol/L)	IBIL(μ mol/L)	E/A
正常对照组	120	27.23 \pm 5.71	22.45 \pm 4.94	29.75 \pm 9.70	19.62 \pm 2.41	3.22 \pm 1.06	17.95 \pm 7.37	1.32 \pm 0.20
NAFLD组								
轻度	69	33.29 \pm 8.76 ^a	27.26 \pm 7.98 ^b	36.41 \pm 16.80 ^a	20.35 \pm 3.06	3.04 \pm 1.03	17.30 \pm 2.59 ^b	1.30 \pm 0.25
中度	33	57.70 \pm 19.26 ^{bd}	44.42 \pm 11.27 ^{bd}	74.42 \pm 20.90 ^{bd}	22.22 \pm 2.37 ^{bc}	3.51 \pm 1.20 ^b	18.71 \pm 2.19 ^b	1.07 \pm 0.33 ^{bd}
重度	18	87.00 \pm 25.76 ^{adf}	71.20 \pm 16.08 ^{bdf}	120.61 \pm 30.12 ^{bdf}	25.47 \pm 3.60 ^{bdf}	4.83 \pm 1.88 ^{bdf}	20.61 \pm 2.69 ^{bf}	0.91 \pm 0.31 ^{bd}
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs NAFLD组(轻度); ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs NAFLD组(中度)。

表 2 NAFLD组中根据E/A值分组的肝功能参数比较 (mean \pm SD)

分组	<i>n</i>	ALT (U/L)	AST(U/L)	GGT(U/L)	TBIL(μ mol/L)	DBIL(μ mol/L)	IBIL(μ mol/L)	年龄
DCD组	32	64.47 \pm 29.33	50.31 \pm 21.44	88.28 \pm 39.30	22.77 \pm 3.16	4.01 \pm 1.67	18.75 \pm 2.38	48.78 \pm 8.86
舒张功能正常组	88	42.09 \pm 20.16	34.31 \pm 15.78	49.02 \pm 29.54	21.22 \pm 3.49	3.24 \pm 1.20	17.92 \pm 2.86	39.40 \pm 9.14
<i>t</i> 值		6.240	3.947	5.528	0.652	2.408	2.430	0.119
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.000	0.029	0.006	0.176	0.000

描以进一步明确诊断,脂肪肝的诊断亦符合上述诊疗指南中的影像学诊断标准^[2],并根据影像学的诊断标准将脂肪肝分为轻度、中度、重度。
1.2.3 肝功能检测: 进行心脏彩超检查的当天上午所有患者和正常对照者空腹抽外周静脉血4 mL,进行肝功能ALT、AST、GGT、TBIL、IBIL、DBIL等检测。检测仪器为Beckman Coulter SYNCHRON LX20全自动生化分析仪。主要检测指标及其正常参考值分别为ALT(0-40 U/L), AST(8-40U/L), GGT(11-50 U/L), TBIL(5.1-25.0 μ mol/L), DBIL(0.5-6.8 μ mol/L), IBIL(1.7-20.0 μ mol/L), 若肝功能参数出现异常, 4 wk后复查。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件包,所有符合正态分布的连续变量以mean \pm SD表示。两样本均数的比较应用*t*检验; 计数资料采用 χ^2 检验; 多个样本资料均数比较采用方差分析, *P*<0.05为差异有统计学意义。E/A值与其他因素的分析用二项分类Logistic回归分析, 进入方程的水准 $\alpha = 0.05$, 剔除方程的水准 $\alpha = 0.10$ 。

2 结果

2.1 DCD发生率 NAFLD患者中,有DCD发生32例,发生率为26.7%,明显高于正常对照组的6例(5.0%)(*P* = 0.001)。

2.2 正常对照组及各级NAFLD组肝功能参数的比较 ALT、AST、GGT、TBIL、DBIL、IBIL、

E/A, 组间均数差异有统计学意义(表1)。经均数两两比较显示, ALT、AST、GGT在正常对照组和各级NAFLD组中, 差异有统计学意义(*P*<0.05或0.01)。TBIL在正常对照组与NAFLD重度及中度比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。NAFLD轻度与NAFLD中度及重度比较差异有统计学意义(*P*<0.05或0.01), NAFLD中度与重度比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。DBIL在正常对照组与NAFLD中度及重度比较差异有统计学意义(*P*<0.01), NAFLD轻度与NAFLD重度比较差异有统计学意义(*P*<0.01), NAFLD中度与重度比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。IBIL在正常对照组与各级NAFLD组两两比较, 差异有统计学意义(*P*<0.01), NAFLD中度与重度比较, 差异有统计学意义(*P*<0.01)。E/A值正常对照组与NAFLD中度及重度两两比较, 差异有统计学意义(*P*<0.01), NAFLD轻度与NAFLD中度及重度两两比较, 差异有统计学意义(*P*<0.01, 表2)。

2.3 NAFLD组中DCD与舒张功能正常组肝功能参数的比较 NAFLD组中, DCD组与舒张功能正常组比较, ALT、AST、GGT、年龄之间差异具有统计学意义(*P*<0.01)。

2.4 NAFLD组中DCD危险因素Logistic回归分析 NAFLD组中, 以E/A是否小于1为应变量, ALT、AST、GGT、TBIL、DBIL、IBIL为协变量, 行二项分类Logistic回归, 结果显示GGT是DCD的独立危险因素(表3)。

■应用要点

通过本研究提示, 对于肝功能异常的非酒精性脂肪肝患者, 特别是 γ -谷氨酰转氨酶升高者, 应定期行心脏彩超检查, 了解心脏的舒张功能, 及早对心血管疾病的发生进行一级预防, 提高非酒精性脂肪肝患者的生存质量。

表 3 被入选方程的因素

分组	B	SE	Wald	Sig	Exp(B)	95%CI
GGT	0.049	0.013	14.285	0.000	1.050	1.024, 1.077
常数	-2.720	0.597	20.788	0.000	0.66	

3 讨论

近年国外许多前瞻性的流行病学研究发现发现NAFLD与CVD关系密切。CVD主要的病理基础是动脉粥样硬化, 分子生物学的研究提示NAFLD可能通过氧化应激、炎症、内分泌激素、糖脂代谢异常等多种途径损伤动脉内膜, 进而形成动脉粥样硬化^[2-3]。Hamaguchi *et al*^[4]通过对NAFLD患者的前瞻性研究发现, NAFLD患者CVD的发生率明显增加, NAFLD是CVD的独立危险因素, 并且在有MS存在的心血管事件中起关键作用。Arslan *et al*^[5]的研究提示NAFLD独立与冠心病及其严重程度密切相关。

在充血性心力衰竭的患者中, 有30%-50%是单纯性DCD所导致的, DCD可以是收缩功能异常的早期表现; 或伴随收缩功能异常同时存在; 也可以收缩功能正常, DCD单独存在。因此早期发现心脏DCD有十分重要的临床意义。能引起DCD的疾病有高血压、糖尿病、冠心病、肥厚性心肌病和心肌淀粉样变性的。在排除肥厚性心肌病和心肌淀粉样变性等几种特殊心脏病后, 高血压、糖尿病和冠心病等MS组分成为最常见的病因。因此通过了解NAFLD患者的舒张功能, 或许能预测未来CVD的发生率。本文在排除了年龄、性别和BMI的影响后发现, NAFLD患者心脏舒张功能不全的发生率为26.7%, 明显高于正常对照的5.0% ($P<0.001$), 与Fallo *et al*^[6]的研究一致。Fallo *et al*^[4]在原发性高血压合并NAFLD的患者中发现, DCD的发生率明显高于没有NAFLD的高血压患者(62.5 vs 21.1%, $P<0.001$)。

在评价CDC功能的影像学参数上, 本文采用具有无创性, 可重复性的彩色多普勒超声技术测量二尖瓣口血流频谱中的E/A比值来评价心脏舒张功能。此方法可受检测者的体温, 心率, 呼吸而出现心脏舒张功能下降的假阳性结果。此外, 随着年龄的增长, 特别是40岁以上的人群, 部分人群因心室肌退化, 导致心室顺应性下降, 心脏舒张功能受影响而出现舒张功能不全。本文结果显示随着NAFLD的不断加重, 轻度、中度与重度NAFLD患者E/A比值逐渐下降, 两两比较, 组间差异具有统计学意义。但轻度脂

肪性肝病与正常对照组相比, 两者之间差异无统计学意义, 是否NAFLD进展到一定程度后, 才出现有临床意义的DCD, 有待进一步的研究。另外我们发现, 有DCD的NAFLD患者的年龄明显高于无DCD的NAFLD患者, 提示年龄是NAFLD容易合并DCD的一个危险因素, 对于何种年龄的NAFLD患者可行心脏彩超检查及早发现CVD疾病有待进一步研究。在肝功能参数的研究中, 近年发现ALT、AST、GGT等指标除了与肝脏疾病相关外, 与糖尿病、CVD、肿瘤均密切相关。Schindhelm *et al*^[7]对年龄50岁-75岁的白人进行了为期10年的前瞻性研究, 发现轻至中度升高的ALT独立于其他CVD的经典危险因素和MS, 可作为CVD发生的预测指标。Goessling *et al*^[8]对一大样本白人20年随访的队列研究显示, 升高的基础ALT水平与随后发生的糖尿病, MS明显相关, 但与心血管疾病和死亡率不相关。Ruhl *et al*^[9]通过对美国人群肝功能参数的研究发现, ALT的异常只与肝脏疾病的发生相关, GGT不但与肝脏疾病相关, 还与肿瘤, 糖尿病等代谢异常疾病关系密切。本研究中, 随着NAFLD的进展, ALT、AST、GGT是逐步升高, NAFLD轻、中、重度3者中, 两两比较, 差异有统计学意义。在心脏舒张功能的改变与肝功能参数之间关系的研究中发现, NAFLD患者中与心舒张功能正常组相比, DCD组中ALT、AST、GGT、TBIL、DBIL、IBIL是明显增高的, 两组比较差异有统计学意义, 提示肝功能参数与心脏舒张功能的改变有关系。为了进一步分析肝功能与DCD的关系, 在病例组中我们进行了Logistic回归分析, 发现只有GGT能入选最后方程, 是E/A值预测危险系数为1.050(1.024-1.077), 是E/A比值的独立危险因素, 提示GGT的异常与DCD密切相关, GGT可作为CVD的一个预测指标。在肝功能指标的研究中, 本文结果提示ALT、AST与肝脏疾病关系密切, 而GGT除了与肝脏疾病相关外, 与心脏系统疾病也有密切关系, 与Goessling *et al*^[8]的研究一致。

NAFLD及肝功能参数中ALT、AST与DCD及CVD的关系仍未明确, 有待更多的大样

■名词解释

E/A比值: 超声心动图评价左室舒张功能常用的方法之一。利用Doppler技术获得二尖瓣口血流频谱, 正常二尖血流频谱由舒张早期快速充盈波(E波), 和左心房主动收缩所致充盈波(A波)组成。正常值为 $E>A$, $1.0<E/A<2.0$ 。当E/A比值小于1, 即认为患者的舒张功能下降。

■同行评价

本文选题比较新,有一定的创新性,对临床有指导作用。

本及前瞻性研究进一步证明。通过本文的研究提示,对于肝功能异常的NAFLD患者,特别是GGT升高者,应定期行心脏彩超检查,了解心脏的舒张功能,及早对CVD的发生进行一级预防,提高NAFLD患者的生存质量。

4 参考文献

- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝病杂志 2006; 14: 161-163
- 钱林, 胡小宣. 非酒精性脂肪肝分子发病机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2848-2852
- 陈宁, 杨明, 黄锦平. 非酒精性脂肪性肝病患者的血浆 Ghrelin水平与颈动脉粥样硬化的相关性. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3890-3893
- Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nagata C, Takeda J, Sarui H, Kawahito Y, Yoshida N, Suetsugu A, Kato T, Okuda J, Ida K, Yoshikawa T. Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1579-1584
- Arslan U, Türkoğlu S, Balcioglu S, Tavil Y, Karakan T, Cengel A. Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2007; 18: 433-436
- Fallo F, Dalla Pozza A, Sonino N, Lupia M, Tona F, Federspil G, Ermani M, Catena C, Soardo G, Di Piazza L, Bernardi S, Bertolotto M, Pinamonti B, Fabris B, Sechi LA. Non-alcoholic fatty liver disease is associated with left ventricular diastolic dysfunction in essential hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009 Mar 17. [Epub ahead of print]
- Schindhelm RK, Dekker JM, Nijpels G, Bouter LM, Stehouwer CD, Heine RJ, Diamant M. Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis* 2007; 191: 391-396
- Goessling W, Massaro JM, Vasan RS, D'Agostino RB Sr, Ellison RC, Fox CS. Aminotransferase levels and 20-year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease. *Gastroenterology* 2008; 135: 1935-1944, 1944.e1
- Ruhl CE, Everhart JE. Elevated serum alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase and mortality in the United States population. *Gastroenterology* 2009; 136: 477-485.e11

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*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), *p*(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. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

肝硬化与肺功能异常的关系

欧阳菲菲, 王连源

欧阳菲菲, 王连源, 中山大学第二附属医院消化内科 广东省广州市 510120

作者贡献分布: 欧阳菲菲与王连源对此文所作贡献均等; 此课题由王连源设计, 并提供研究经费、行政支持, 技术指导以及对文章作批评性审阅; 研究过程、统计分析及文章起草由欧阳菲菲完成。

通讯作者: 王连源, 510120, 广东省广州市, 广东省中山大学第二附属医院消化内科. Wangly1950@163.com

收稿日期: 2009-04-13 修回日期: 2009-05-28

接受日期: 2009-06-08 在线出版日期: 2009-07-28

Relationship between liver cirrhosis and pulmonary function impairment

Fei-Fei Ouyang, Lian-Yuan Wang

Fei-Fei Ouyang, Lian-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Correspondence to: Lian-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. Wangly1950@163.com

Received: 2009-04-13 Revised: 2009-05-28

Accepted: 2009-06-08 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To determine the relationship between liver cirrhosis and pulmonary function impairment.

METHODS: Fifty patients with liver cirrhosis, who were treated at our hospital and the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University from May 2007 to March 2008, were included in the study. All patients underwent pulmonary function tests (PFTs) to assess forced expiratory volume in one second (FEV₁), FEV₁/FVC (forced vital capacity), single-breath carbon monoxide diffusing capacity (DLCO) and DLCO per unit of alveolar volume (KCO, also known as DLCO/VA). The mean FEV₁, FEV₁/FVC, DLCO and KCO were compared between patients with and without liver palm, spider naevi, clinical jaundice, hypoproteinemia, hypersplenism or widening of the portal vein, respectively.

RESULTS: Approximately 34 percent of pa-

tients presented with ventilation abnormalities, mainly restrictive ventilation disorders. Decreased diffusion capacity was the most common pulmonary function disorder and was found in 72% of patients. The Child-Pugh score was correlated inversely with KCO ($r = -0.351$, $P < 0.05$). Serum albumin level was correlated positively with FEV₁ and KCO ($r = 0.334$ and 0.336 , respectively; both $P < 0.05$). The width of the portal vein was correlated inversely with FEV₁ and DLCO ($r = -0.389$ and -0.417 , respectively; both $P < 0.05$). The thickness of the spleen was correlated inversely with DLCO and KCO ($r = -0.644$ and -0.536 , respectively; both $P < 0.01$). Hemoglobin concentration and the thickness of the spleen were independent predictors of DLCO ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The impairment of diffusion capacity is a very common disorder in patients with liver cirrhosis. Long-term portal hypertension is closely associated with the development of impaired diffusion capacity in patients with liver cirrhosis.

Key Words: Liver cirrhosis; Pulmonary function; Carbon monoxide diffusing capacity; Hepatopulmonary syndrome

Ouyang FF, Wang LY. Relationship between liver cirrhosis and pulmonary function impairment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2203-2207

摘要

目的: 了解肝硬化患者肺功能异常与肝病之间的关系。

方法: 选取2007-05/2008-03我院及中山大学附属第一医院住院肝硬化患者50例。肺功能检测患者第一秒用力呼气量(FEV₁)、一秒率(FEV₁/FVC), 单次呼吸法检测肺一氧化碳弥散量(DLCO)、比弥散量(KCO, 即单位肺泡的DLCO)。将肝硬化患者分别按患者肝掌、蜘蛛痣、显性黄疸、白蛋白减低、脾亢、门静脉增宽等的异常与否分成阳性组(+)和阴性组(-), 比较组间FEV₁、FEV₁/FVC、DLCO、KCO均值的差异。

■背景资料

肝肺综合征是继发于晚期肝病的严重并发症, 通过引起低氧血症而使患者死亡率增加。通常认为肝病通过多种复杂的机制导致肺血管扩张从而影响了肺的气体交换。这些患者的肺功能往往有明显减退, 又以一氧化碳弥散量(DLCO)降低最具标志性。

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

■相关报道

Møller *et al*在对肝硬化患者进行肺功能检测的同时,还利用放射性核素对肺循环的血流动力学指标进行检测,认为患者有肺循环时间缩短,肺血容量减低,并且与DLCO减低呈正相关,提示肺血管因素在肺功能异常中起重要作用。

结果:约34%患者出现通气功能障碍,以限制性通气为主;有72%的患者出现弥散功能减退,为最主要的肺功能改变。Child-Pugh积分与KCO呈负相关($r = -0.351, P < 0.05$);白蛋白水平与FEV₁、KCO呈正相关($r = 0.334, 0.336$, 均 $P < 0.05$);门静脉宽度与FEV₁、DLCO呈负相关($r = -0.389, -0.417$, 均 $P < 0.05$);脾厚度与DLCO、KCO呈负相关($r = -0.644, -0.536$, 均 $P < 0.01$)。血红蛋白浓度和脾脏厚度是DLCO的独立预测因子($P < 0.05$)。

结论:弥散障碍在肝硬化患者中发生率较高,门静脉高压的长期作用与之有密切关系。

关键词:肝硬化;肺功能;一氧化碳弥散量;肝肺综合征

欧阳菲菲,王连源.肝硬化与肺功能异常的关系.世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2203-2207

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2203.asp>

0 引言

慢性肝病患者经常可以出现其他系统器官的受累,肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS)是发生于晚期肝病的一种危及生命的严重并发症,是由肺血管扩张所引起的动脉氧合障碍,可以概括为一组临床三联征,即慢性肝病或门脉高压症、低氧血症以及肺血管扩张。并发HPS的肝硬化患者,虽然大部分时候低氧血症尚不足以致命,但能明显恶化患者的预后。HPS起病较隐匿,临床上诊断往往滞后,在患者出现非常严重的低氧血症时才被发现。肺功能测试被应用于HPS的辅助诊断,这类患者肺功能有明显减退,其中最具标志性的是一氧化碳弥散量(carbon monoxide diffusing capacity, DLCO)的降低。原位肝移植可以使85%的HPS患者缓解低氧血症,成为目前治疗HPS唯一明确有效的方法。曾有肝移植中心将DLCO中度减退用作筛查HPS的指标之一^[1]。然而近年来有学者发现,肝移植虽然能逆转动脉氧合障碍,但患者减退的肺弥散功能却仍然维持在术前水平持久得不到改善,这使得HPS患者肺功能的改变及其与肝病的关系变得更加引人注目。本研究旨在通过对肝硬化患者进行肺功能检查,探讨肺功能异常与肝硬化临床表现和体征、生化改变、肝功能分级之间的关系,进一步探索弥散障碍可能的发生机制。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2007-05/2008-03我院及中山大学附

属第一医院住院肝硬化患者共50例。排除标准:慢性肺部疾病、急性呼吸道感染、吸烟史、胸部手术史、胸廓或脊柱畸形、心肾功能不全、恶性肿瘤、重度贫血。

1.2 方法

入选患者均测试肺通气功能和弥散功能。肺功能检查使用美国Medical graphic公司Elite体积描记肺功能测试系统检测第一秒用力呼气量(FEV₁)、一秒率(FEV₁/FVC),单次呼吸法检测肺DLCO、比弥散量(KCO,即单位肺泡的DLCO)。检查均取坐位进行,FEV₁/FVC结果以实测百分比表示,FEV₁、DLCO、KCO结果以实测值占预计值的百分比表示,以低于预计值的80%为异常。预计值由患者性别、身高、体质量、体表面积等为依据计算^[2]。

记录患者住院期间血常规、肝功能、腹部B超等结果,根据其是否存在肝掌、蜘蛛痣、显性黄疸、白蛋白减低、脾亢、门静脉增宽等异常,将患者分成阳性组(+)和阴性组(-),比较两组肺功能的差异。对肺功能与其他临床指标进行相关分析,并以DLCO作为因变量,采用线性回归分析脾厚度、FEV₁、Hb、门静脉宽度在预测DLCO中的价值。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件,计量资料以mean±SD表示,均数的比较采用 t 检验。计数资料以率表示,对不同指标间相关关系根据资料分布类型采用Pearson积矩相关或Spearman等级相关进行分析。对DLCO建立多重线性回归模型。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 肺功能 17例(34%)患者出现通气功能障碍,其中限制性通气功能障碍11例(22%),阻塞性通气功能障碍4例(8%),混合性通气功能障碍2例(4%);出现DLCO下降的达36例(72%),其均值低于正常下限(80%),KCO下降22例(44%)。患者按照肝功能Child-Pugh分级,有Child A级22例,Child B级19例,Child C级9例。总的肺功能受损的情况在Child A、B、C级之间无显著差异($P > 0.05$,表1)。

2.2 肺功能异常与肝硬化临床表现及生化指标的关系 低蛋白血症患者FEV₁显著降低($P < 0.01$);脾亢患者的KCO显著降低($P < 0.01$);门静脉增宽的患者DLCO、KCO均显著降低($P < 0.01$)。肝病体征则与肺功能没有明显关系(表2)。

2.3 异常的肺功能指标与其他肺功能指标、年

■创新盘点

本文较全面地分析了肝病的各种临床表现与肺功能指标的关系,揭示了肺弥散功能与肝储备功能并无直接关系,而与门静脉高压密切相关,并建立了关于DLCO的多重线性回归模型。

表 1 肺功能检测结果 (%)

	总均数	A级(n = 22)	B级(n = 19)	C级(n = 9)
FEV ₁	84.1 ± 17.4	87.4 ± 19.3	82.8 ± 10.0	78.3 ± 24.6
FEV ₁ /FVC	77.8 ± 7.0	76.3 ± 6.7	78.9 ± 8.2	79.4 ± 3.7
DLCO	67.5 ± 18.0	71.5 ± 16.5	65.1 ± 18.1	61.8 ± 21.5
KCO	80.4 ± 19.2	87.3 ± 18.6	75.6 ± 18.7	72.4 ± 17.6

应用要点

本研究提示临床上门静脉增宽以及脾大较明显的肝硬化患者肺部受累的可能性较大, 据此宜进一步进行血气分析、对比增强超声心动图等肝肺综合征有关的检查。

表 2 肝硬化表现和生化改变与肺功能异常的关系 (P值)

分组	n	FEV ₁	FEV ₁ /FVC	DLCO	KCO
肝掌	+ 13	0.223	0.750	0.135	0.069
	- 37				
蜘蛛痣	+ 17	0.778	0.783	0.305	0.707
	- 33				
显性黄疸	+ 23	0.964	0.105	0.788	0.443
	- 27				
白蛋白减低	+ 32	0.008	0.389	0.811	0.135
	- 18				
脾亢	+ 30	0.415	0.606	0.327	0.005
	- 20				
门静脉增宽	+ 16	0.112	0.686	0.005	0.006
	- 12				

龄、肝功能、血气分析等的相关关系 FEV₁与DLCO、KCO、血红蛋白、白蛋白均呈正相关($r = 0.559, 0.318, 0.328, 0.334, P < 0.05$), 与门静脉宽度呈负相关($r = -0.389, P < 0.05$); DLCO与血红蛋白呈正相关($r = 0.4, P < 0.01$), 与门静脉宽度、脾厚度呈负相关($r = -0.417, -0.644, P < 0.05$); KCO与血红蛋白和白蛋白呈正相关($r = 0.471, 0.336, P < 0.05$), 与Child积分和脾厚度呈负相关($r = -0.351, -0.536, P < 0.05$)(表3, 图1)。

2.4 DLCO的多重线性回归模型 Hb和脾厚对DLCO的回归关系具有统计学意义, 是DLCO的独立预测因子, 可以较好的预测DLCO值(表4)。

3 讨论

我们发现FEV₁与血白蛋白水平呈正相关($r = 0.334, P < 0.05$), 在白蛋白减低的患者组FEV₁亦明显降低($P < 0.05$), 考虑是低白蛋白血症通过引起胸腹水, 使肺容积减小而降低了FEV₁。FEV₁与门静脉宽度呈负相关($r = -0.389, P < 0.05$), 由于门静脉增宽间接反映出门静脉压力增高, 这里可能有两个原因: 门静脉压越高, 胸腹水生成越多, 从而加重限制性通气障碍, 使FEV₁降低; 门静脉压越高, 从侧支循环流入体循环和肺循环的代谢产物越多, 可能引起支气管平滑肌痉挛而

降低FEV₁^[3]。

国内学者多认为肝硬化患者弥散功能的减低随Child分级而加重, 蜘蛛痣阳性者肺功能损害更严重^[4-5]。本研究DLCO、KCO在各肝功能分级之间没有统计学差异, 这与Yigit *et al*^[6]的结果相符。弥散功能与蜘蛛痣、肝掌、黄疸均没有明显关系。通过相关分析可以看出, 除去贫血的影响, 弥散功能与肝硬化的关系有几个特点: (1)KCO与肝储备功能有关, 体现在其与Child积分、白蛋白水平的相关性, 肝功能越差, KCO越低; DLCO则否。由于KCO即DLCO/VA, VA是肺泡通气量, 直接受到胸腹水的影响, 后者是低白蛋白血症的后果, 并参与Child-Pugh积分的评判, 所以我们推测胸腹水的存在是潜在的联系KCO与肝功能的桥梁, 实则肺弥散与肝功能并无联系。(2)KCO、DLCO均与门静脉高压的影响有关, 体现在门静脉越宽或脾脏厚度越大, 弥散量越低。(3)KCO、DLCO均与FEV₁呈正相关, 提示肝硬化患者通气功能越好, 弥散量越大。基于此我们成功构建了关于预测DLCO的多重线性回归模型, 其中Hb和脾厚是DLCO的独立预测因子, 各指标对DLCO的影响力(方向)排序为: 脾厚(负向)>Hb(正向)>门静脉宽度(负向)>FEV₁(正向)。孙勇伟 *et al*^[7]曾经对DLCO与Child-Pugh评分、P_{A-a}O₂、VC(肺活量)进行多重线性回归分析, 认为后3者是DLCO的独立危险因素。但是其回归方程的校正决定系数仅0.28, 而我们的回归方程校正决定系数为0.636, 显然回归的效果较其要更好一些。

肝硬化患者的弥散障碍一直以来被视作并发HPS的标志之一。然而Lima *et al*^[8]的研究发现在40个DLCO降低的肝硬化患者中80%不符合HPS的诊断标准; Martinez-Palli *et al*^[9]进行的30例肝移植前瞻性研究, 在平均术后15 mo时, 肝功能、血气指标、通气/血流比值均恢复正常, 但其中24例HPS患者直至平均术后86 mo时复查, DLCO仍维持在术前水平。由此我们可以推测弥散功能减退在肝硬化和HPS患者的低氧血症中

■名词解释

1 DLCO: 指单位时间内、单位压力下通过肺泡毛细血管膜进入毛细血管血液中的CO量。

2 KCO: 即DLCO/VA, 一氧化碳弥散量与肺泡气量之比。由于很难采取肺毛细血管的血样测定氧分压, 临床上很少测定氧的弥散量, 而是采用CO测试弥散功能。

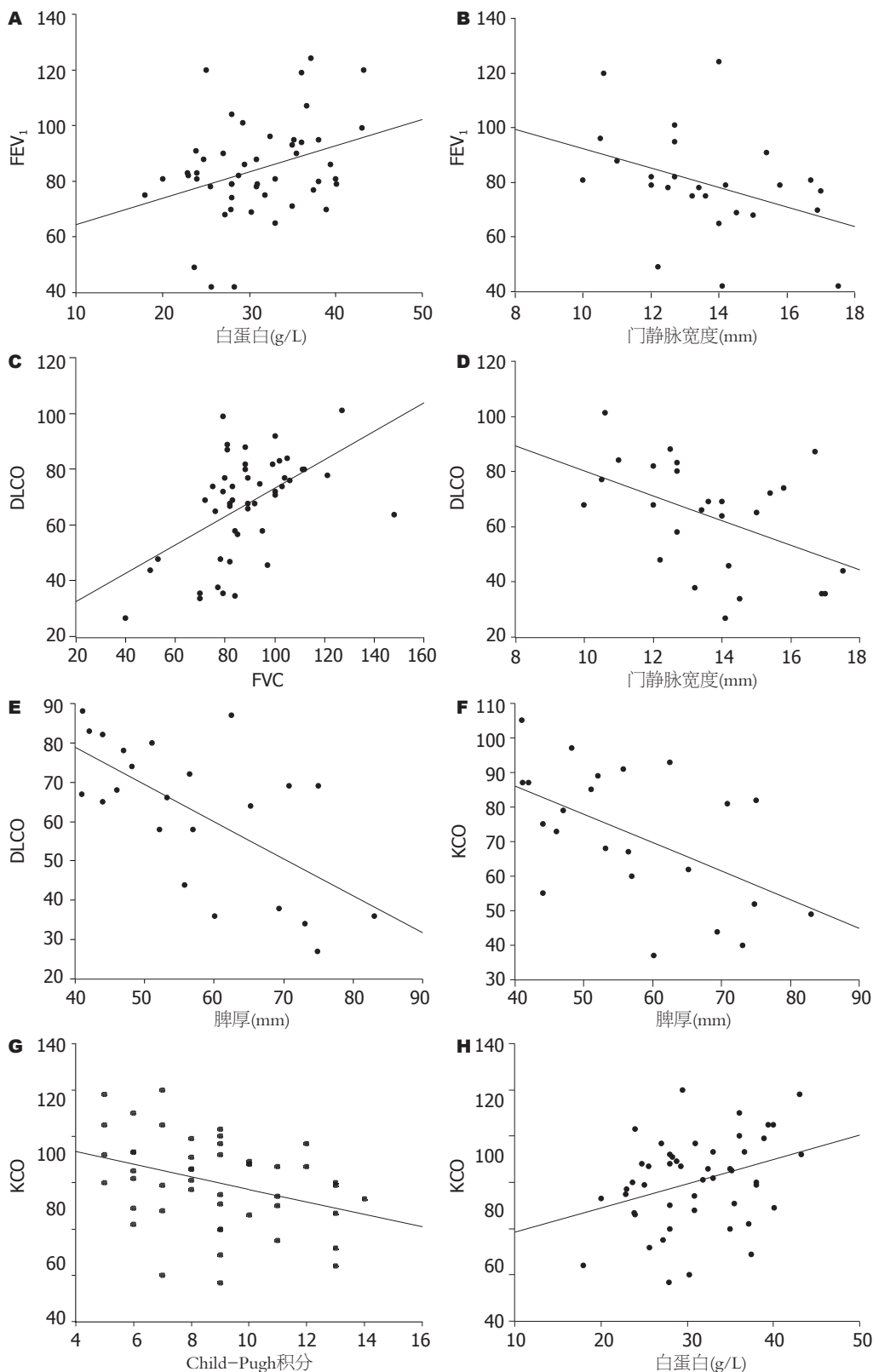


图1 肺功能与其他检查指标的相关关系。

不起主导作用。那么弥散障碍的症结到底在哪里, 这让我们不得不重新审视弥散屏障-肺泡上皮细胞及基底膜、肺与毛细血管间隔、毛细血管内皮及基底膜。膜相扩散是影响弥散量的最主要因素。Martínez-Palli *et al*^[9]、Fallon *et al*^[10]

均在2006年提出了“肺血管重塑”的概念, 肺微血管的结构改变比肺血管扩张对肺换气功能的影响更大。Matsubara *et al*^[11]研究了肝硬化患者肺血管的组织学改变, 发现肺血管改变出现在肌型小动脉, 包括扩张、管壁增厚、血栓

表 3 肺功能与其他指标的直线相关分析 (r值)

	FEV ₁	血红蛋白	白蛋白	Child积分	脾厚度	门静脉宽度
FEV ₁		0.328 ^a	0.334	-0.258	-0.311	-0.389
FEV ₁ /FVC	0.121	0.133	-0.034	0.188	0.343	-0.084
DLCO	0.559 ^b	0.400 ^b	0.142	-0.211	-0.644	-0.417
KCO	0.318 ^a	0.471 ^b	0.336	-0.351	-0.536	-0.308

■同行评价

本研究方法可靠, 结论合理, 研究结果对临床有一定的指导价值。

表 4 多重线性回归模型的回归系数及检验

变量	回归系数	标准化回归系数 (变量)	P值	校正决定系数 (模型)	P值
常数	69.791	0.000	0.034	0.636	0.001
Hb(g/L)	0.508	0.497	0.010		
脾厚(mm)	-1.002	-0.653	0.001		
门静脉宽度 (mm)	-0.465	-0.046	0.774		
FEV ₁	0.143	0.182	0.445		

形成等。其管壁增厚与肝内门静脉壁增厚相关。Lamps *et al*^[12]则发现肝硬化患者的肺静脉内膜明显增厚。类似的管径扩大、管壁增厚以及小静脉动脉化的改变甚至在肝硬化门静脉高压症患者的结肠黏膜血管也普遍存在^[13]。由此我们不难推测肺毛细血管壁在门静脉高压的长期作用下也受到波及, 其血管膜很可能也有增厚现象, 从而限制了气体的弥散。在这方面尚需更多更细致的组织病理学研究来证实。

4 参考文献

1 Martínez GP, Barberà JA, Visa J, Rimola A, Paré JC, Roca J, Navasa M, Rodés J, Rodríguez-Roisin R. Hepatopulmonary syndrome in candidates for liver transplantation. *J Hepatol* 2001; 34: 651-657
2 陈文彬, 殷大奎, 袁玉如, 罗炎杰, 叶馨, 何太灵. 应用电子肺计测定健康成人肺功能的正常值及其预计值公式. *华西医科大学学报* 1988; 19: 184-188
3 杨清民, 路庆安. 肝硬化患者呼吸系统损害的临床表

现. *医学综述* 1999; 5: 368-369
4 方小雨, 鲍昭方. 肝硬化失代偿期对肺功能的影响. *中华消化杂志* 1996; 16: 296-297
5 梁学亚, 贾绮宾, 张小晋, 张小磊, 李宪. 肝-肺综合征与蜘蛛痣及食管-胃底静脉曲张的关系. *北京医学* 1999; 21: 206-209
6 Yigit IP, Hacievliyagil SS, Seckin Y, Oner RI, Karıncaoglu M. The relationship between severity of liver cirrhosis and pulmonary function tests. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1951-1956
7 孙勇伟, 花荣, 罗蒙, 徐琳, 徐庆, 陈炜, 吴志勇. 肝硬化门静脉高压症患者呼吸功能和肺循环血流动力学变化的临床研究. *外科理论与实践* 2007; 12: 422-428
8 Lima BL, França AV, Pazin-Filho A, Araújo WM, Martinez JA, Maciel BC, Simões MV, Terra-Filho J, Martinelli AL. Frequency, clinical characteristics, and respiratory parameters of hepatopulmonary syndrome. *Mayo Clin Proc* 2004; 79: 42-48
9 Martínez-Palli G, Gómez FP, Barberà JA, Navasa M, Roca J, Rodríguez-Roisin R, Burgos F, Gistau C. Sustained low diffusing capacity in hepatopulmonary syndrome after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5878-5883
10 Fallon MB. Hepatopulmonary syndrome: more than just a matter of tone? *Hepatology* 2006; 43: 912-914
11 Matsubara O, Nakamura T, Uehara T, Kasuga T. Histometrical investigation of the pulmonary artery in severe hepatic disease. *J Pathol* 1984; 143: 31-37
12 Lamps LW, Carson K, Bradley AL, Pinson CW, Johnson JE, Coogan AC, Hunter EB, Clavien PA, Washington MK. Pulmonary vascular morphological changes in cirrhotic patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1999; 5: 57-64
13 Lamps LW, Hunt CM, Green A, Gray GF Jr, Washington K. Alterations in colonic mucosal vessels in patients with cirrhosis and noncirrhotic portal hypertension. *Hum Pathol* 1998; 29: 527-535

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

超声内镜下诊治上消化道良性隆起型病变118例

丁向萍, 张锦华, 庄剑波, 缪连生, 张富花, 袁菊霞, 陈丽

■背景资料

超声内镜能精确分辨胃肠道腔壁构造和临近器官的结构, 诊断普通胃镜和体外超声不能发现的黏膜内、黏膜下、肌层等病变, 提高了诊断率, 同时减少了内镜切除和活检的风险, 避免源于固有肌层的病变内镜下切除而导致穿孔, 降低了手术探查的比例。

丁向萍, 张锦华, 庄剑波, 缪连生, 张富花, 袁菊霞, 陈丽, 甘肃省第二人民医院消化科 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 丁向萍、张锦华、庄剑波、缪连生、张富花、袁菊霞及陈丽对此文贡献均等; 此课题由丁向萍、张锦华及庄剑波设计; 内镜治疗主要由张锦华完成; 检查与治疗操作过程由丁向萍、张锦华、庄剑波、缪连生、张富花、袁菊霞及陈丽共同完成; 资料搜集主要由丁向萍、袁菊霞及陈丽完成; 数据分析由丁向萍、张锦华及庄剑波完成; 本论文写作由丁向萍、张锦华及庄剑波完成。

通讯作者: 丁向萍, 730000, 甘肃省兰州市城关区和政西街1号, 甘肃省第二人民医院消化科. lydingxp@sina.com

电话: 0931-8708312

收稿日期: 2009-04-07 修回日期: 2009-06-20

接受日期: 2009-06-23 在线出版日期: 2009-07-28

Diagnosis and therapy of benign upper gastrointestinal protruding lesions using endoscopic ultrasonography: an analysis of 118 cases

Xiang-Ping Ding, Jin-Hua Zhang, Jian-Bo Zhuang, Lian-Sheng Miao, Fu-Hua Zhang, Ju-Xia Yuan, Li Chen

Xiang-Ping Ding, Jin-Hua Zhang, Jian-Bo Zhuang, Lian-Sheng Miao, Fu-Hua Zhang, Ju-Xia Yuan, Li Chen, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Dr. Xiang-Ping Ding, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. lydingxp@sina.com

Received: 2009-04-07 Revised: 2009-06-20

Accepted: 2009-06-23 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To evaluate the value of endoscopic ultrasonography (EUS) in the diagnosis and treatment of benign upper gastrointestinal protruding lesions (BUGPL).

METHODS: One hundred and eighteen patients with BUGPL were examined by EUS. Of these patients, 80 underwent electrocoagulation, endoscopic mucosal resection using a cap (EMR-C), nylon loop ligation, snare excision or surgical clipping under endoscopic guidance.

RESULTS: Leiomyoma was the most common (accounting for 62.2%) benign protruding lesion in the esophagus. Gastric stromal tumor ac-

counted for 50 percent of benign gastric protruding lesions. Polypus and cyst accounted for 57.9 and 31.6 percent of benign protruding lesions in the duodenum, respectively. Of 80 BUGPL patients treated under endoscopic guidance, only those treated by EMR-C had minimal hemorrhage. Hemostasis was achieved using argon ion beam or titanic clips.

CONCLUSION: Electrocoagulation, nylon loop ligation, snare excision and surgical clipping under endoscopic guidance are safe and effective for BUGPL patients, while EMR-C may incur a risk of minimal hemorrhage.

Key Words: Endoscopic ultrasonography; Upper gastrointestinal tract; Leiomyoma; Stromal tumor; therapy; Cap-endoscopic mucosal resection

Ding XP, Zhang JH, Zhuang JB, Miao LS, Zhang FH, Yuan JX, Chen L. Diagnosis and therapy of benign upper gastrointestinal protruding lesions: a report of 118 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2208-2211

摘要

目的: 探讨超声内镜在上消化道良性隆起型病变(upper gastrointestinal benign protrusive lesions, UGBPL)的诊断价值和不同治疗方法的优缺点。

方法: 运用超声内镜检查118例上消化道隆起型病变, 并对其中80例分别用内镜下高频电直接切除、透明帽下黏膜切除术(cap-endoscopic mucosal resection, cEMR)、尼龙绳结扎、圈套器套扎及鼠齿钳钳夹治疗。

结果: 食管隆起病变以平滑肌瘤最常见, 占食管良性病变的62.2%; 胃间质瘤占胃良性隆起性病变的50%, 十二指肠以息肉多见, 占十二指肠良性隆起性病变57.9%, 囊肿占31.6%; 本组施行内镜下治疗仅cEMR术中少量渗血, 用氩气或者钛夹即可止血。

结论: 超声内镜下高频电直接切除、尼龙绳结扎、圈套器套扎、鼠齿钳钳夹方法安全、有效, cEMR相对有出血危险。

■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

关键词: 超声内镜; 上消化道; 平滑肌瘤; 间质瘤; 治疗; 透明帽下黏膜切除术

丁向萍, 张锦华, 庄剑波, 缪连生, 张富花, 袁菊霞, 陈丽. 超声内镜下诊治上消化道良性隆起型病变118例. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2208-2211
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2208.asp>

0 引言

上消化道隆起型病变是指食管、胃和部分十二指肠突出于黏膜平面的隆起病变. 超声内镜结合内镜和超声的特点, 既能观察黏膜表面的病变, 又能观察纵深方向的黏膜下、黏膜内和壁外的病变. 本文总结2007-12/2009-02我院行超声内镜检查的上消化道良性隆起病变患者118例, 并对其中来源于黏膜及黏膜下层的80例患者用不同的方法进行镜下治疗, 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2007-12/2009-02我院行超声内镜检查的上消化道良性隆起病变患者118例, 男66例, 女52例, 年龄19-80(平均55)岁. 其中食管隆起病变37例, 胃隆起病变52例, 十二指肠隆起病变19例, 外压病变10例. 超声内镜为Olympus公司超声内镜小探头及标准探头, 探头频率为5、12和20 MHz, 型号为Olympus-UM-2000; 金属圈套器为Olympus SD-7P-1; 尼龙绳圈套器为Olympus MAJ-254; 活检钳为回春医疗器材公司生成的QYQ-A2.3×1600; 内窥镜套扎器为天津天医医用公司生产的72753593-8; 钛夹为Olympus HX-5LR-1; 氩气高频电刀为YH-AG9800. 术前准备: 术前15 min口服利多卡因胶浆消泡剂, 部分太紧张的患者静脉注射咪达唑仑4 mg.

1.2 方法 首先详细了解内镜检查结果, 明确检查目的. 然后, 常规做普通胃镜检查, 发现病变部位后, 抽吸胃内容物, 经附送水管注入蒸馏水进食管和胃腔, 用超声小探头检查食管及胃底病变, 标准探头检查胃窦、胃体及十二指肠病变^[1]. 明白病变来源及回声性质后, 根据病变大小用不同方法治疗, 治疗病例黏膜下层均完整. 对于0.6-0.8 cm隆起明显来源于黏膜层病变直接用金属圈套器套住, 高频电切除; 对于1.5-2.5 cm突出明显的病变用尼龙绳底部结扎后取活检; 食管0.8-1.2 cm隆起不明显的病例用套扎器负压吸起后套扎; 十二指肠囊肿在病变两侧用鼠齿钳钳夹治疗; 对1.2-2.0 cm不能全部吸入透明帽及扁平不能尼龙绳套住的病灶, 行内镜下cEMR术: 先

于病变底部注射美兰肾上腺素生理盐水, 抬起后经透明帽用金属圈套器套住, 高频电切除; 局部渗血或大出血用氩气或钛夹止血, 切除标本均送病理检查, 黏膜层病变直接取组织送检.

2 结果

2.1 超声内镜检查结果 118例病变分别为平滑肌瘤、间质瘤、脂肪瘤^[2]、囊肿^[3]、息肉、胃食管外压迫、异位胰腺及静脉瘤. 食管以平滑肌瘤多见, 占食管良性病变的62.2%; 胃间质瘤^[4]多发于胃底, 占胃良性隆起性病变的50%; 十二指肠以息肉多见, 占十二指肠良性隆起性病变57.9%, 囊肿占31.6%(表1).

2.2 内镜下不同的治疗方法 对80例患者施行内镜下治疗, 6例十二指肠囊肿行鼠齿钳钳夹治疗, 高频电直接切除息肉12例, 无出血及穿孔; 尼龙绳结扎胃底、食管平滑肌瘤、间质瘤及十二指肠息肉19例; 套扎器套扎食管下段平滑肌瘤3例; cEMR治疗胃食管隆起性病变40例, 术中均有不同程度的出血, 用钛夹止血治疗5例, 其余用氩气局部治疗及局部肾上腺素生理盐水、凝血酶喷洒止血, 无穿孔及迟发出血. 随访3 mo, 未见病变复发表2).

3 讨论

超声内镜能精确分辨胃肠道腔壁构造和临近器官的结构, 诊断普通胃镜和体外超声不能发现的黏膜内、黏膜下、肌层等病变^[1]. 提高了诊断率, 同时减少了内镜切除和活检的风险, 避免源于固有肌层的病变内镜下切除而导致穿孔, 降低了手术探查的比例. 超声内镜下平滑肌瘤和间质瘤^[5-7]难鉴别, 免疫组织化学检测CD117、CD34及SMA可确定诊断. 本组病例有两例平滑肌瘤超声内镜误认为间质瘤, 1例间质瘤患者误认为平滑肌瘤. 消化系壁外压迫是临床常见问题, 超声内镜对消化系壁外压迫诊断准确率为100%, 超声内镜对脂肪瘤的诊断与病理符合率达93.8%^[8]. 囊肿太大会造成机械性梗阻. 本组病例十二指肠囊肿占31.6%, 其与血管瘤^[9]间的鉴别诊断不可忽视, 必要时用超声多普勒探查. 消化系息肉^[10-11]尤其是腺瘤性息肉易发生癌变, 国外资料表明当腺瘤体积<10 mm时癌变率为0.3%-1.3%, 体积>10 mm时癌变率为6.8%-9.5%, 体积>20 mm时癌变率为6.8%-46%, 其中绒毛状腺瘤>20 mm时癌变率高达50%以上^[12]. 内镜下尼龙绳套扎联合电凝电切治疗胃肠道>2 cm大

■ 研究前沿

超声内镜目前主要集中于EUS-FNA及腹腔神经节阻滞术, 而在上消化系良性隆起型病变中的价值更大, 更实用, 因为预防肿瘤发生比治疗更重要.

■应用要点

内镜下尼龙绳套扎息肉安全有效,对胃食管隆起型病变的诊断灵敏度高。

表 1 超声内镜下上消化道良性病变内镜特点及检出比例

病种	超声内镜特点	部位	n	同部位比例(%)
平滑肌瘤	梭形或椭圆形, 低回声、回声均匀、边界清, 有低回声包膜	食管	23	62.2
		胃	8	15.4
间质瘤	低回声、回声可不均匀、边界清, 有高回声包膜	十二指肠	1	5.3
		食管	6	16.2
		胃	26	50.0
囊肿	无回声, 均匀, 边界清, 压之变形	食管	1	2.7
		十二指肠	6	31.6
息肉(包括腺瘤样息肉)	高回声, 来源于黏膜层	食管	3	8.1
		胃	16	30.8
		十二指肠	11	57.9
静脉曲张	黏膜下层的无回声结构, 边界清晰, 与周围血管相通或不相通	食管	3	8.1
脂肪瘤	密集高回声, 均匀, 边界清	食管	1	2.7
		十二指肠	1	5.3
外压隆起性病变	来源壁外、边界不清, 常见主动脉、肝、脾、结肠及胰腺囊肿, 注气后明显	胃	8	15.4
		食管	2	5.4
异位胰腺	中高回声、不均匀、边界清	胃	2	3.8

表 2 不同治疗方法的优缺点及最适病变比较

方法	n	优点	缺点	并发症	最适病变
直接切除术	12	见效快, 治疗彻底	较大病变有出血及穿孔风险	出血及穿孔	黏膜层, 小于1 cm, 球形或有蒂病变
EMR术	40	切除病变彻底	技术要求高, 易出现并发症	出血、穿孔	黏膜及黏膜下层, 小于2 cm良性病变及早癌
尼龙绳结扎术	19	安全, 无出血及穿孔风险	扁平病变不能套住	无	黏膜及黏膜下层, 2-3 cm良性隆起性病变
套扎器套扎术	3	安全	不能吸入套扎器的病变无法治疗	无	黏膜及黏膜下层, 0.8-1.2 cm病变
鼠齿钳钳夹术	6	安全、经济	无法送病理	无	囊肿

息肉的方法并发症少, 是治疗宽基和粗蒂息肉的有效方法^[13]。本组病例尼龙绳套扎后部分高频电切除, 部分开窗后取活检, 无出血及穿孔等并发症。

内镜下套扎治疗消化系息肉, 组织损伤少, 黏膜修复快, 并发症少, 易掌握, 安全, 有效, 无任何并发症^[14]。超声内镜对胃食管隆起性病变的部位、范围及大小能作出更准确判断, 对治疗方案的选择具有重要的指导意义^[15]。内镜下治疗隆起性病变各种方法相互补充, 既安全有效, 又降低医疗风险, 对肿瘤的发生起到很好的预防作用。

4 参考文献

- 金震东, 李兆申. 消化超声内镜学. 第1版. 北京: 科技出版社, 2006; 168-177
- 彭贵勇, 房殿春, 唐郡, 孙永刚, 李向红. 超声内镜指导下内镜治疗胃黏膜下肿瘤. 第三军医大学学报 2006; 28: 260-262
- 张锦华, 庄剑波, 缪连生, 袁菊霞, 陈丽. 十二指肠囊

肿的内镜诊断及治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3925-3927

- Jeon SW, Park YD, Chung YJ, Cho CM, Tak WY, Kweon YO, Kim SK, Choi YH. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: endosonographic differentiation in relation to histological risk. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2069-2075
- 陈立刚, 任建林. 超声内镜在食管常见疾病诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3216-3218
- Lachter J, Bishara N, Rahimi E, Shiller M, Cohen H, Reshef R. EUS clarifies the natural history and ideal management of GISTs. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 1653-1656
- Kang JH, Lim JS, Kim JH, Hyung WJ, Chung YE, Choi JY, Park MS, Kim MJ, Kim KW. Role of EUS and MDCT in the diagnosis of gastric submucosal tumors according to the revised pathologic concept of gastrointestinal stromal tumors. *Eur Radiol* 2009; 19: 924-934
- Zhang YQ, Yao LQ, Qin XY, Zhou PH, Xu MD, Hou YY. [Diagnosis and treatment of gastrointestinal lipoma] *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2007; 10: 512-514
- El-Saadany M, Jalil S, Irisawa A, Shibukawa G, Ohira H, Bhutani MS. EUS for portal hypertension: a comprehensive and critical appraisal of clinical

- and experimental indications. *Endoscopy* 2008; 40: 690-696
- 10 屠惠明, 许科斌, 乔峤, 钱萃萃, 魏丽君, 刘慧智. 内镜下尼龙绳套扎治疗消化道巨大息肉的应用. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 140-141
- 11 Bardan E, Maor Y, Carter D, Lang A, Bar-Meir S, Avidan B. Endoscopic ultrasound (EUS) before gastric polyp resection: is it mandatory? *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 371-374
- 12 杨传春, 朱家沂, 杨斌, 伏亦伟, 王连英, 汤晓怀. 内镜下尼龙绳套扎联合高频电凝切治疗消化道大息肉. *中国实用医药* 2007; 2: 63-64
- 13 杜志强, 樊芳, 龙文秀. 内镜下尼龙绳套扎联合电切治疗胃肠道大息肉25例的临床应用. *四川医学* 2008; 29: 559-560
- 14 苑东亚. 内镜下套扎治疗消化道息肉20例. *临床军医杂志* 2005; 33: 641
- 15 徐萍, 周小江, 刘志坚, 祝荫, 陈幼祥, 朱萱, 吕农华. 超声内镜和胃镜对食管黏膜隆起性病变的诊断价值比较. *江西医学院学报* 2007; 47: 62-63

■同行评价

本文特色之处在于EUS指导下对于不同类型的隆起型病变采取不同的内镜下治疗, 并对于其适应证及并发症进行了评价, 对于临床有一定的借鉴意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 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¹ $P<0.05$, ² $P<0.01$; 第3套为³ $P<0.05$, ⁴ $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。(5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。(常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

NFκB1基因启动子区域多态性与中国湖北汉族人溃疡性结肠炎的关系

雷媛, 邓长生

■背景资料

目前已知有5种NF-κB/Rel蛋白, 分别为NFκB1(p50, 其前体p105)、NFκB2(p52, 其前体p100)、RelA(p65)、RelB和Rel. 人类NFκB1基因编码2种蛋白, 一种是不与DNA结合的p105, 另一种是与DNA结合的p50. 此外, 有研究认为在IBD患者中, NF-κB主要由p50/p50同源二聚体组成. 因此, NFκB1基因启动子区域多态性可能与IBD的发病存在关系.

雷媛, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市430071

作者贡献分布: 此课题由雷媛与邓长生设计, 研究过程由雷媛操作完成, 研究所用新试剂及分析仪器由雷媛提供, 数据分析及论文写作由雷媛完成, 邓长生审核.

通讯作者: 邓长生, 教授, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科. dengcs06@yahoo.com.cn
电话: 027-67813079

收稿日期: 2009-05-13 修回日期: 2009-06-29

接受日期: 2009-07-06 在线出版日期: 2009-07-28

Association of NFκB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism with ulcerative colitis in Chinese Han population of Hubei Province

Yuan Lei, Chang-Sheng Deng

Yuan Lei, Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province China. dengcs06@yahoo.com.cn

Received: 2009-05-13 Revised: 2009-06-29

Accepted: 2009-07-06 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To investigate the association between NFκB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism and ulcerative colitis in Chinese Han population of Hubei Province.

METHODS: The NFκB1-94ins/delATTG promoter polymorphism was genotyped in 73 unrelated Chinese patients with ulcerative colitis and 121 healthy controls using polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The correlation of allele and genotype frequencies for this locus with the clinical subtypes of ulcerative colitis was analyzed. The results were compared with those obtained in a previous study of Italian population.

RESULTS: No significant differences were found in genotype and allele frequencies of the

NFκB1-94ins/delATTG promoter polymorphism between patients with ulcerative colitis and healthy controls. There was no significant correlation between allele and genotype frequencies for this locus and the clinical subtypes of ulcerative colitis ($P > 0.05$). However, the genotypes ($\chi^2 = 13.155$, $P < 0.05$) and allele frequencies ($OR = 0.566$, 95%CI: 0.413-0.774, $P < 0.01$) for this locus were significantly different between the Chinese and Italian populations.

CONCLUSION: No association between NFκB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism and ulcerative colitis is found in Chinese Han population of Hubei Province.

Key Words: Ulcerative colitis; NFκB1; Polymorphism

Lei Y, Deng CS. Association of NFκB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism with ulcerative colitis in Chinese Han population of Hubei Province. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2212-2216

摘要

目的: 研究NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG与中国汉族人溃疡性结肠炎的相关性.

方法: 采用PCR限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)法, 检测73例中国湖北汉族溃疡性结肠炎患者与121例健康对照者NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG基因型, 分析该基因多态性与溃疡性结肠炎以及临床亚型的相关性, 并将该结果与已报道的意大利人群中该位点多态性分布进行比较.

结果: 在NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG位点UC组的基因型频率、等位基因频率、临床亚型与正常对照组比较无显著相关性($P > 0.05$); 然而, 中国湖北汉族人群与意大利高加索人群在该位点的基因型($\chi^2 = 13.155$, $P < 0.05$)和等位基因($OR = 0.566$, 95%CI 0.413-0.774, $P < 0.01$)频率分布有显著差异.

结论: NFκB1基因启动子区域多态性与中国

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

湖北汉族人溃疡性结肠炎无显著相关性。

关键词: 溃疡性结肠炎; NF- κ B1; 基因多态性

雷媛, 邓长生. NF- κ B1基因启动子区域多态性与中国湖北汉族人溃疡性结肠炎的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(21): 2212-2216

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2212.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因未明的累及胃肠道的慢性非特异性炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). 该疾病在西方国家常见, 但随着生活方式变化和认识水平的提高, 我国IBD的发病率呈上升趋势, 国内文献综合分析UC患者10 218例, 发现近10年该报道比例数上升3.1倍, 其增长速度较快. 据多家国内医院病例的统计推测, UC的发病率为11.6/105^[1], CD的发病率为1.4/105^[2], 实际病例可能更多, 而且25%的IBD患者在青少年时期发病^[3], 严重影响了青少年生长发育和身心健康. 随着患者人数的增多, 加之该病程迁延, 反复发作, 临床诊断复杂而棘手, 又有严重并发症和癌变危险, 因此, 不断深入进行IBD基因多态性的研究, 了解各种基因的不同基因型在人群中的分布, 从基因水平探讨该病在不同种族或不同人群中可能存在不同发病率, 或不同临床特征的机制, 对今后筛选易感人群, 诊断、预测疾病严重程度和提供个体化治疗都具有重要意义. 核因子- κ B(NF- κ B)是Sen和Baltimore *et al*^[4]在1986年从B淋巴细胞、浆细胞核中检测到的, 其在许多基因的启动子和增强子中, 都存在功能性NF- κ B的结合位点 κ B序列(10 bp: 5'-GGGACTTTCC-3'), 且活化的NF- κ B能与DNA链上的特定序列结合, 启动和调节众多与炎症免疫反应有关的细胞因子和炎症介质的基因转录及调控, 特别是与机体防御反应有关的即早基因(immediate-early genes)的表达调控^[5]. 一些学者相继发现, NF- κ B与哮喘、动脉粥样硬化、关节炎、糖尿病、IBD等有关, 这也说明NF- κ B是炎症性疾病的危险因素^[6]. NF- κ B在溃疡性结肠炎的肠上皮表面表达呈显著上调, 作为一种普遍存在的转录因子, 是多种信号转导途径的汇聚点. 同时, NF- κ B作为一种多向转录调节作用的因子, 在治疗学中将其作为一种靶向因子. 治疗UC常用的药物氨基水杨酸类制

剂、糖皮质激素、非甾体类消炎药等都可通过抑制NF- κ B活性发挥作用. 在基因治疗上, 其也可以通过下调促炎细胞因子的表达, 降低NF- κ B活性达到治疗效果.

近年发展起来的全基因组扫描研究和IBD候选基因研究均证实IBD的发病具有遗传易感性. 全基因组扫描结果显示IBD易感座位分布于第1、3、4、5、6、7、10、12、14、16、19号和X染色体上^[7]. 而对位于4号染色体4q24的NF- κ B1基因是炎症性肠病的一个重要候选基因^[8-9]. 因此, 我们对中国湖北汉族人UC与NF- κ B1基因启动子-94ins/del ATTG多态性的相关性进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-2008年在武汉大学中南医院等大型综合医院就诊的湖北汉族UC患者73例, 男38例, 女35例, 平均年龄42.1 \pm 13.8岁, 诊断标准按中华医学会消化病学分会“对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”. 此外, 收集中南医院健康体检者121名, 无大肠癌、胃癌、类风湿性关节炎、心脏病、银屑病、糖尿病等疾病史. 上述均来自湖北的自然人, 系汉族, 无血缘关系. 病例组和对照组的年龄和性别差异无显著性.

1.2 方法

1.2.1 蛋白酶K/酚/氯仿法提取基因组DNA: 采血3 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 常规蛋白酶K消化, 苯酚/氯仿提取. 提取的DNA溶解于TE中, 4℃或-20℃保存.

1.2.2 NF- κ B1基因启动子区域多态性检测: 采用PCR限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)法. NF- κ B1基因扩增引物, 购自上海生物工程有限公司, 引物序列参照参考文献[13]设计: 上游: 5'-TTTAATCTGTGAAGAGATGTGAAT-3' 下游: 5'-CTAGCAGGGCGCTCCCGAAT-3'. PCR反应体系总体积20 μ L: 2 \times Taq mastermix 10 μ L, Genomic DNA 100 ng(2 μ L), Primer-F 2 μ L(2 μ mol/L), Primer-R 2 μ L(2 μ mol/L), ddH₂O补足体积至20 μ L. 反应条件: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 54℃复性30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环, 72℃延伸5 min, 最后置于4℃终止反应. PCR扩增片段为279 bp. PCR扩增产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳并在紫外分析仪下验证. 将10 μ L PCR上述扩增产物用限制性内切酶Van911(PflMI)进行酶切反应, 该位点有野生纯合子WW(ins/ins), 变异纯合子DD(del/del), 杂合

■研究前沿

遗传易感性是溃疡性结肠炎乃至炎症性肠病发病的基本条件, 溃疡性结肠炎的遗传学研究是值得关注的问题, 但至今尚未发现与溃疡性结肠炎发病特异相关的易感基因. 全基因组扫描结果显示IBD易感座位分布于第1、3、4、5、6、7、10、12、14、16、19号和X染色体上. 而对位于4号染色体4q24的NF- κ B1基因是炎症性肠病的一个重要候选基因.

■相关报道

NF- κ B1是多条信号转导通路的交汇点, 对其研究逐步深入, 已经发现NF- κ B1基因启动子区域多态性与胃癌、前列腺癌、非霍奇金淋巴瘤、鼻咽癌、头颈部鳞癌、心脏病、银屑病、风湿性关节炎等多种肿瘤和免疫病相关; 且NF- κ B1基因多态性具有显著的人种差异, 炎症性肠病和此基因的关系目前存在争议, 值得进一步研究探讨.

■创新盘点

本研究关于NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG多态性和溃疡性结肠炎相关性的报道在亚洲尚属首次,并了解我国NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG基因型分布与世界有关人种的异同。

表 1 健康对照组与UC组NFκB1-94ins/del ATTG基因多态性分布比较 $n(\%)$

分组	n	基因型			等位基因	
		WW	WD	DD	W	D
健康对照组	121	37(30.6)	58(47.9)	26(21.5)	132(54.5)	110(45.5)
UC组	73	21(28.8)	36(49.3)	16(21.9)	78(53.4)	78(53.4)

基因型: 野生纯合子WW(-94insATTG/-94insATTG); 杂合子WD(-94insATTG/-94delATTG); 变异纯合子DD(-94delATTG/-94delATTG); 等位基因: W(-94insATTG allele); D(-94delATTG allele)。

表 2 UC临床亚型中NFκB1-94ins/del ATTG基因多态性分布比较 $n(\%)$

分组	基因型			等位基因	
	WW	WD	DD	W	D
性别					
男	12(31.6)	20(52.6)	6(15.8)	44(57.9)	32(42.1)
女	9(25.7)	16(45.7)	10(28.6)	34(48.6)	36(51.4)
发病年龄(岁)					
<40	10(31.3)	15(46.9)	7(21.9)	35(54.7)	29(45.3)
≥40	11(26.8)	21(51.2)	9(22.0)	43(52.4)	39(47.6)
病变范围					
远端性	16(32.0)	21(42.0)	13(26.0)	53(53.0)	47(47.0)
广泛性	5(21.7)	15(65.2)	3(13.0)	25(54.3)	21(45.7)

基因型: 野生纯合子WW(-94insATTG/-94insATTG); 杂合子WD(-94insATTG/-94delATTG); 变异纯合子DD(-94delATTG/-94delATTG); 等位基因: W(-94insATTG allele); D(-94delATTG allele)。

子WD(ins/del), 酶切产物用25 g/L琼脂糖凝胶电泳并在紫外分析仪下验证。

统计学处理 采用 χ^2 检验进行Hardy-Weinberg平衡吻合性检验, 分析样本的群体代表性。采用 χ^2 检验和Fisher exact检测UC组与正常对照组之间基因频率的差异, $P<0.05$ 为差异有显著性, 相对风险用OR值及95%可信区间(95%CI)来评价。所有数据输入SPSS13.0软件包进行统计分析。

2 结果

2.1 NFκB1-94ins/del ATTG基因型和等位基因频率分布 健康对照组和UC病例组的NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡, 健康对照者和UC患者的NFκB1-94ins/del ATTG基因型和等位基因频率分布见表1。该基因型和等位基因频率的分布和中国湖北汉族人群UC患者无差异显著性($P>0.05$)。

2.2 UC临床亚型中NFκB1-94ins/del ATTG基因

多态性分布 根据年龄、性别和结肠炎部位分类的UC患者的各亚型, 其NFκB1-94ins/del ATTG基因型和等位基因频率分布无差异显著性(表2, $P>0.05$)。

3 讨论

IBD已被流行病学、临床、动物模型及分子生物学研究证明是一种多基因遗传病, 但迄今为止尚未发现与UC发病特异相关的易感基因。NF-κB/Rel家族及其与疾病的关系, 受到关注。目前已知有5种NF-κB/Rel蛋白, 分别为NFκB1(p50, 其前体p105)、NFκB2(p52, 其前体p100)、RelA(p65)、RelB和Rel^[10]。NF-κB/Rel家族成员之间借助疏水性相互作用介导的二聚化作用, 几乎可以形成所有理论上可能组合形式的同源和异源二聚体。其中发挥主要功能的是分别由NFκB1基因和NFκB2基因编码的p50和p65形成的p50/p65异源二聚体。因此NF-κB通常指由p50和p65组成的异源二聚体, 他几乎存在于所有细胞中。NFκB1基因编码NF-κB/Rel和IκB家族中的3种蛋白: p105、p50和IκB-γ(小鼠), 位于4q24染色体, 长156 kb, 内含子区从323 bp到40000 bp变动, 有24种编码顺序, 人类NFκB1基因编码2种蛋白, 一种是不与DNA结合的p105, 另一种是与DNA结合的p50^[11]。此外, Adrtie *et al*^[12]研究认为在IBD患者中, NF-κB主要由p50/p50同源二聚体组成。

随着人类基因组研究的进展, 人们逐渐认识到不同的基因背景, 可以造成不同种族或不同地域的人群对于某种疾病可能存在不同的易感性。Karban *et al*^[13]对北美非犹太人群中350例UC患者和820例健康对照者的NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG多态性的研究结果显示, 基因型DD携带频率与正常对照组比显著升高(21.4% vs 14.8%, $P = 0.0043$, $OR = 1.57$, 95%CI: 1.14-2.16), 提示基因型DD与北美非犹太人UC患者显著相关, 首次提出NFκB1基因启动子-94

ins/del ATTG多态性与UC的易感性有关. 之后 Borm *et al*^[14]对北欧荷兰高加索人群的NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG多态性的研究结果, 也显示基因型DD和等位基因D携带频率与正常对照组比显著升高, 并且还发现在年轻发病的患者中意义更大. 但是在以英国^[15]、德国^[16]为代表的西欧和以匈牙利^[17]为代表的东欧的研究结果却显示与之相反的结果. 我们对NFκB1-94ins/del ATTG基因多态性和UC相关性的研究在亚洲尚属首次, 结果出乎意料的与异基因的欧洲白种人相似: NFκB1-94ins/del ATTG的多态性与UC患者以及其临床亚型没有相关性. 并通过健康对照组NFκB1-94ins/del ATTG基因多态性与意大利高加索健康人群^[18]比较提示, 意大利人以基因型WW(45.7%)为主, 中国人以基因型WD(47.9%)为主, 该位点的基因型($\chi^2 = 13.155$, $P < 0.05$)和等位基因频率($OR = 0.566$, 95%CI: 0.413-0.774, $P < 0.01$)在中国和意大利人群中的分布有显著差异. 各人种在NFκB1基因型和等位基因频率分布的不同, 将有助于从基因水平深入了解不同种族和不同地区人群可能存在不同发病率或不同临床特征的机制.

我们的研究结果显示: 与健康对照组比较, NFκB1启动子-94ins/del ATTG的基因型WW频率较低(28.8% vs 30.6%), 而WD和DD基因型频率较高(49.3% vs 47.9%, 21.9% vs 21.5%), 但是差异均无显著性($P > 0.05$). 一方面提示NFκB1基因多态性可能在UC的遗传发病机制中不起重要作用; 或NFκB1基因并不是UC的致病基因, 只是和真正的致病基因处于紧密连锁关系. 另一方面, 推测NFκB1基因多态性可能与UC的易感性存在关联. 由于UC发病涉及诸多基因, 众多基因不是单独发挥作用, 而是作为一个整体对机体进行调节, NFκB1基因与UC的易感性是否受到了主要组织相容性复合体MHC(位于IBD3区域)、编码细胞因子(位于IBD5区域)、趋化因子、生长因子、细胞黏附因子(位于IBD6区域)等其他基因相互交叉作用的影响, NFκB1基因与CARD15/NOD2, IKBL, IL-1RN等基因是否存在相互协同或拮抗作用, 都有待后续研究揭示. 然而, 2组样本量不够大、检测方法等因素难免出现的试验误差, 可能不足以发现两者间实际存在的差异; 另外, 也不能忽略个体间基因型和表型之间存在个体差异.

总之, 我们初步的研究提示NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG的多态性和中国UC患者以及

其临床亚型没有相关性, 中国和意大利人群的NFκB1基因启动子-94ins/del ATTG的基因型和等位基因频率差异有显著性, 提示了该基因存在种族差异.

4 参考文献

- 1 中国炎症性肠病协作组. 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
- 2 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
- 3 Rubin GP, Hungin AP, Kelly PJ, Ling J. Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1553-1559
- 4 Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716
- 5 Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 1993; 290 (Pt 2): 297-308
- 6 Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 3-6
- 7 夏冰. 重视炎症性肠病遗传易感性的研究. 胃肠病学 2007; 12: 71-73
- 8 Le Beau MM, Ito C, Cogswell P, Espinosa R 3rd, Fernald AA, Baldwin AS Jr. Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF-kappa B (NFKB2) and the I kappa B/MAD-3 (NFKBI) inhibitor of NF-kappa B to 4q24 and 14q13, respectively. *Genomics* 1992; 14: 529-531
- 9 Mathew S, Murty VV, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Chromosomal localization of genes encoding the transcription factors, c-rel, NF-kappa Bp50, NF-kappa Bp65, and Iy-10 by fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1993; 8: 191-193
- 10 邓长生, 夏冰. 炎症性肠病. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 73-76
- 11 Heron E, Deloukas P, van Loon AP. The complete exon-intron structure of the 156-kb human gene NFKB1, which encodes the p105 and p50 proteins of transcription factors NF-kappa B and I kappa B-gamma: implications for NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genomics* 1995; 30: 493-505
- 12 Ardite E, Panés J, Miranda M, Salas A, Elizalde JI, Sans M, Arce Y, Bordas JM, Fernández-Checa JC, Piqué JM. Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 1998; 124: 431-433
- 13 Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Novet FJ, Brant SR. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 35-45
- 14 Borm ME, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Kraal G, Bouma G. A NFKB1 promoter polymorphism is involved in susceptibility to ulcerative colitis. *Int J*

■应用要点

本研究丰富基因多态性与溃疡性结肠炎相关性的研究, 为UC的流行病学调查提供一些遗传学依据, 为进一步探讨与溃疡性结肠炎发病特异相关的易感基因作一铺垫.

■同行评价

本研究选题重要, 试验及统计方法得当, 具有一定的参考价值.

- Immunogenet* 2005; 32: 401-405
- 15 Mirza MM, Fisher SA, Onnie C, Lewis CM, Mathew CG, Sanderson J, Forbes A. No association of the NFKB1 promoter polymorphism with ulcerative colitis in a British case control cohort. *Gut* 2005; 54: 1205-1206
- 16 Glas J, Török HP, Tonenchi L, Müller-Myhsok B, Mussack T, Wetzke M, Klein W, Epplen JT, Griga T, Schiemann U, Lohse P, Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Folwaczny C. Role of the NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism in IBD and potential interactions with polymorphisms in the CARD15/NOD2, IKBL, and IL-1RN genes. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 606-611
- 17 Szamosi T, Lakatos PL, Szilvasi A, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Szabo O, Satori A, Tulassay Z, Miheller P, Horvath HC, Papp J, Tordai A, Andrikovics H. The 3'UTR NFKBIA variant is associated with extensive colitis in Hungarian IBD patients. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 351-359
- 18 Latiano A, Palmieri O, Valvano MR, Bossa F, Latiano T, Corritore G, DeSanto E, Andriulli A, Annese V. Evaluating the role of the genetic variations of PTPN22, NFKB1, and FcGR3A genes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1212-1219

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 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, 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助.

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

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

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务. (常务副总编辑: 张海宁 2009-07-28)

中国大陆地区炎症性肠病肠外表现的汇总分析

郑连鹏, 吕宗舜, 张洁, 曹晓沧, 王绪霖

郑连鹏, 吕宗舜, 张洁, 曹晓沧, 王绪霖, 天津医科大学总医院消化内科 天津市 300070

作者贡献分布: 此课题由郑连鹏、吕宗舜、张洁、曹晓沧及王绪霖共同设计, 采集数据和分析数据并共同完成论文写作。

通讯作者: 郑连鹏, 300070, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化内科. zhenglianpeng@yahoo.com.cn

电话: 022-60362949

收稿日期: 2008-08-26 修回日期: 2008-09-22

接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-28

A meta-analysis of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease in Mainland China

Lian-Peng Zheng, Zong-Shun Lv, Jie Zhang, Xiao-Cang Cao, Xu-Lin Wang

Lian-Peng Zheng, Zong-Shun Lv, Jie Zhang, Xiao-Cang Cao, Xu-Lin Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300070, China

Correspondence to: Lian-Peng Zheng, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Tianjin 300070, China. zhenglianpeng@yahoo.com.cn

Received: 2008-08-26 Revised: 2009-09-22

Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-28

Abstract

AIM: To summarize the extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease (IBD) in Mainland China to facilitate prompt and accurate diagnosis of this disease.

METHODS: IBD-related medical literature over the past 30 years was collected by retrospectively searching the Chinese Database of Biology and Medicine (CBM, 1979-01/2008-01). The data concerning the extraintestinal manifestations of IBD were recorded, pooled and statistically analyzed.

RESULTS: A total of 169 articles were retrieved, in which 14,963 cases of ulcerative colitis and 3,659 cases of Crohn's disease were reported. Diverse extraintestinal manifestations were found in approximately 15% of ulcerative colitis patients and 31% of Crohn's disease patients.

CONCLUSION: Besides alimentary tract in-

volvement, inflammatory bowel disease often involves multiple organs simultaneously. This may lead to misdiagnosis and bring difficulties to the clinical diagnosis of the disease.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Ulcerative colitis; Crohn's disease; Extraintestinal manifestations; Meta-analysis

Zheng LP, Lv ZS, Zhang J, Cao XC, Wang XL. A meta-analysis of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease in Mainland China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2217-2220

摘要

目的: 总结我国大陆地区炎症性肠病(IBD)肠外表现, 为临床医师快速准确诊断本病提供线索。

方法: 对我国近30年来报道的IBD文献进行计算机CBM与文献追溯检索, 对符合标准的肠外病变部位数据进行摘录、登记、统计分析。

结果: 1979-01/2008-01符合标准的文献169篇。报道UC患者14963例, CD患者3659例, 大约15% UC患者与31% CD患者存在多种多样的肠外表现。

结论: IBD除累及消化系外, 常同时累及多个系统, 易导致误诊, 给临床诊断带来困难。

关键词: 炎症性肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 肠外表现; 汇总分析

郑连鹏, 吕宗舜, 张洁, 曹晓沧, 王绪霖. 中国大陆地区炎症性肠病肠外表现的汇总分析. *世界华人消化杂志* 2009; 17(21): 2217-2220

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2217.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种病因尚不十分清楚的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。目前其病因尚未完全明确, 与环境、遗传、免疫、感

■背景资料

炎症性肠病是一种病因尚不十分清楚的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。其临床症状多种多样, 并且肠外表现较为常见, 常同时累及多个系统。临床工作中, 如果对此认识不足常会贻误诊断。

■同行评议者

高泽立, 副教授, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

■研究前沿

炎症性肠病的肠外表现较为常见, 误诊率高。在国内文献中可见部分医院或地区小样本病例报道, 但详细的流行病学调查尚未开展。

染、过敏及精神因素等有关。其临床症状多种多样, 并且肠外表现较为常见, 常可同时累及多个系统, 误诊率高。临床工作中, 如果对此认识不足常会贻误诊断。本研究着重分析IBD的肠外表现, 期望能为临床医师快速、准确地诊断本病提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料 检索中国生物医学文献光盘数据库(CBM, 1979-2008-01), 并文献追溯检索。检索词为炎症性肠病、溃疡性结肠炎、非特异性溃疡性结肠炎、UC、克罗恩病、克隆氏病、克隆病、Crohn病和CD。收集所研究IBD的临床、病理、诊断、误诊及描述性流行病学资料记录肠外表现的文献, 进行报道病例统计分析。对来自同一单位、同一作者的文献一并收集用做变量数据收集。

1.2 方法 逐篇复习文献, 进行质量评估。对所选用的文献中所有的一般人口学特征、临床、病理、诊断及误诊有关变量特征的数据进行转换、摘录。2个评论员独立选择试验并提取资料, 如遇不一致, 通过讨论解决。

统计学处理 本文涉及描述性流行病学资料汇总, 对一般人口学特征数据采用Excel统计软件进行分类汇总, 对每篇文章中涉及临床、病理、诊断及误诊有关变量特征的数据都先转换成绝对数, 再转换成率, 标准误的计算采用总分例数进行校正以计算95%CI。

2 结果

经CBM与人工检索, 初检出1979-01/2008-01发表和(或)全国性会议交流的有关文献9147条目录, 阅读标题和摘要, 排除8978篇重复、无具体实质相关内容, 与本研究无关的文献。共收集符合文献纳入及排除标准的文献169篇^[1-42]。全部查找到原文。UC合计报道14963例, 分析13926例。男8001例, 女5925例(有1037例未进行性别描述)男:女=1.35:1。发病年龄2 mo-91岁, 平均年龄为41.2±7.7岁, 高发人群为30-49岁的中青年。CD合计报道例数3659, 分析3625例, 男2167例, 女1458例(有34例未进行性别描述), 男:女=1.49:1。发病年龄1-84岁, 平均年龄为31.7±9.2岁, 高发人群为20-39岁的中青年。阅读文献后, 统计IBD的肠外表现报道例数(*n*)、发生率及其95%CI。IBD的肠外表现以肝胆病变、骨关节病变、口腔溃疡、皮肤损害、眼病

变及生长发育受阻较为常见, 亦可见有关内分泌、血液、呼吸、泌尿、心血管等系统病变的报道。具体结果见表1。

3 讨论

据统计大约有15% UC及31% CD患者存在多种多样的肠外表现。这些并发症可发生在IBD之前、之后或伴随着IBD发生, 全面而深刻地认识其肠外表现有助于对患者病情进行全面评估, 这对IBD的诊断、鉴别诊断及治疗有重要意义。关于其机制, 可能与自身免疫因素有关, 亦可能与IBD合并细菌感染引起的菌血症有关, 或者某些毒性物质的吸收, 以及药物治疗的不良反应有关。

几种重要的肠道外并发症的发病特点和机制为: (1)口腔溃疡: 以阿弗他溃疡为主, 常呈一过性, 并反复发生。通常在IBD活动期出现, 并随着IBD症状的缓解而缓解, 且与疾病的活动性相关。部分患者因慢性失血而致缺铁性贫血, 可伴发口角炎和舌痛。当口腔溃疡反复时, 需要监测全血细胞计数、血清铁和叶酸水平、C反应蛋白等指标, 及时予以相关治疗以减少口腔溃疡的复发。(2)骨关节病变包括外周型和中央型。外周型关节炎较多见, 常累及单个大关节, 如膝、踝、腕、肘关节, 亦可同时累及多个关节, 呈非对称性。常表现为受累关节局部红、肿、热、痛, 一般不引起关节畸形, 类风湿因子阴性。起病急, 病程短, 少有后遗症, 但可复发。糖皮质激素治疗后关节炎消退, 结肠切除后关节炎完全消失。中央型关节炎指强直性脊柱炎和骶髂关节炎, 二者可同时或者单独发病, 较少见。强直性脊柱炎的临床表现和放射学改变与原发强直性脊柱炎极相似, 男性多见, 属于HLA-B27相关性关节炎。脊柱炎的自然病程与IBD无关, 可出现于结肠炎前后或同时, 病变常累及整个脊柱, 导致脊柱畸形、僵直, 活动受限或丧失, 应用非甾体类抗炎药治疗或物理治疗可改善症状, 但直、结肠切除后, 脊柱炎并不消退。骶髂关节炎患者可无症状或有腰骶部疼痛, 多经X线检查发现骶髂关节模糊、变窄、边缘硬化和侵蚀, 但极少进展至强直性脊柱炎。绝大多数伴有骶髂关节炎的患者HLA-B27阴性。(3)肝胆病变: 为本病最为常见的一种表现, 且肝脏损害随病变程度和病变范围的变化而呈正相关。常见的肝胆疾病有脂肪肝、原发性硬化性胆管炎、胆管周围炎、胆结石、慢性肝炎、胆囊炎、肝

表 1 IBD的肠外表现

分组	UC			CD		
	<i>n</i>	%	95%CI	<i>n</i>	%	95%CI
口腔溃疡	232	2.05	1.93-2.17	243	7.79	6.96-8.62
骨关节病变	740	5.12	5.07-5.17	231	7.49	6.66-8.32
肝胆病变	553	4.69	4.52-4.86	247	9.58	8.55-10.61
皮肤损害	215	1.97	1.86-2.10	160	5.82	5.03-6.61
眼病变	121	1.22	1.10-1.34	39	6.36	4.47-8.25
泌尿系统病变	45	0.91	0.69-1.13	29	1.59	1.05-2.13
心血管系统病变	41	1.03	0.76-1.30	12	0.87	0.41-1.33
血液系统病变	17	0.41	0.25-0.57	6	2.06	0.44-3.68
内分泌系统病变	23	0.58	0.38-0.78	22	3.79	2.27-5.31
呼吸系统病变	15	0.39	0.22-0.56	25	1.76	1.11-2.41
生长发育受阻	28	8.70	5.65-11.75	27	12.00	7.78-16.22
其他	46	0.76	0.59-0.93	61	2.68	2.07-3.27

■应用要点

本文旨在对炎症性肠病的肠外表现情况进行探讨。通过计算机文献检索中国生物医学文献光盘数据库, 收集1979-2008年间所有发表和交换文献资料, 逐篇复习, 进行评估, 其发生率较高。通过本文的综合分析, 希望能为临床医生快速准确地诊断IBD提供重要线索。

硬化、胆管癌等。其机制推测可能和下列因素有关: 自身免疫因素, 肠道菌群自溃疡面进入血流, 引起门静脉菌血症, 最后累及肝脏, 全身性“中毒”, IBD使某些有毒的大分子物质得以吸收, 如胆酸吸收后可引起胆管周围炎, 营养不良和蛋白质丢失等。(4)皮肤损害: 主要包括结节性红斑、坏疽性脓皮病、Sweet综合征、增殖性脓皮炎等。以结节性红斑最为常见, 其多为多发性、有触痛的炎性结节, 双下肢多见。结节性红斑可出现于使用柳氮磺胺吡啶的患者, 可能与使用柳氮磺胺吡啶引起的过敏反应有关, 部分也可见于急性期的IBD患者, 可同时有关节炎, 女性多见。其次是坏疽性脓皮病, 通常出现于炎症性肠病的活动期, 少数情况下可在疾病静止期持续存在。其他病变较为少见。应用糖皮质激素治疗有效, 绝大多数患者结肠切除后皮肤损害会自行愈合。(5)眼病变: 以巩膜炎、前葡萄膜炎、结膜炎常见, 亦可发生角膜病、视网膜血管炎、脉络膜炎、虹膜炎等。巩膜炎常与IBD的活动性有关, 临床表现为巩膜和/或结膜红斑、畏光、眼部烧灼感。葡萄膜炎可威胁到视力, 部分葡萄膜炎无症状, 可通过裂隙灯检查发现。及时治疗可消除葡萄膜炎失明的危险, 在临床工作中需要引起注意。眼病常随严重的结肠炎出现, 同时并发关节炎及皮肤病变。局部应用糖皮质激素可控制症状, 但与肠病的活动性不平行, 结肠切除后虹膜炎、葡萄膜炎仍可复发。

除上述的几种常见并发症外, IBD患者亦可出现其他几种较为特殊的并发症, 而且最早的症状可能不是肠道症状。泌尿系统病变、内分泌系统病变、呼吸系统损害、生长发育受阻均

可在肠道症状之前出现。此外, IBD患者还可有其他血液学表现, 如自身免疫性溶血、血小板减少、静脉血栓等。

总之, IBD存在着复杂多样的肠外表现, 因此对IBD的诊断、鉴别诊断有重要的参考价值, 故临床医师应加深对他的认识以助于IBD的快速、准确的诊断。

4 参考文献

- 1 巫协宁, 徐家裕, 胡运彪, 陈其芬, 柳恕中, 储榆德. 特发性溃疡性结肠炎117例分析. 上海医学 1979; 2: 9-11
- 2 中华医学会北京分会内科消化病协作组. 北京地区所见的溃疡性结肠炎(摘要). 北京医学 1981; 4: 254
- 3 乔丽华, 刘国安, 杨成梯. 国内1363例非特异性溃疡性结肠炎临床分析. 中西医结合杂志 1987; 7: 308-311
- 4 裴瑛, 李素青, 王宝恩. 克隆氏病的肠外表现和并发症(87例分析). 北京医学 1988; 10: 257-259
- 5 安子元, 徐计秀, 徐大毅. 中国的克隆氏病-942例分析. 新消化病学杂志 1993; 1: 25-27
- 6 严仲瑜, 周红, 黄庭庭. 溃疡性结肠炎的治疗(附193例分析). 中国实用外科杂志 1995; 15: 538-539
- 7 林世富. Crohn病的肠道外表现(附26例临床分析). 四川医学 1995; 16: 84-85
- 8 蒋建苏, 殷菊香, 殷素花. 以肺部症状为主要表现的溃疡性结肠炎2例. 福建医药杂志 1997; 5: 73
- 9 常玉英, 程鹏, 张燕军. 克隆氏病68例临床分析. 临床医学 1997; 17: 32-34
- 10 薛平, 胡以则, 沈华. 炎症性肠病外科治疗的临床分析(附224例报告). 医学新知杂志 2001; 11: 93-94
- 11 吕红, 钱家鸣, 王利华. 溃疡性结肠炎的肠外表现. 中华内科杂志 2002; 41: 675-677
- 12 沈惠青, 王惠玲, 申芳娥. 儿童炎症性肠病53例临床分析. 中国实用儿科杂志 2003; 18: 667-670
- 13 郭云蔚, 胡品津, 彭仲生. 141例溃疡性结肠炎临床分析. 中国医师杂志 2002; 4: 12-14
- 14 蔡文哲, 高锐, 黄宏佳. Crohn病16例临床分析. 中国基层医药 2003; 10: 302-305
- 15 苏锐, 张桂霞. 溃疡性结肠炎活动期临床及结肠镜检查分析. 中国内镜杂志 2004; 10: 103-104
- 16 王玉芳, 欧阳钦, 张伟, 贺国斌, 王烜, 奚维东, 杨丽, 梁

■同行评价

IBD存在着复杂多样的肠外表现, 本文对指导内科医生IBD的诊断、治疗有重要的参考价值。

- 洪亮, 王再见, 张虎. 四川省357例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. 四川医学 2005; 26: 384-385
- 17 钱家鸣, 吕红, 李巍, 王利华. 克罗恩病的肠外表现和并发症. 中华消化杂志 2004; 24: 395-398
- 18 曹倩, 胡伟玲, 高敏, 周刚, 姚健敏. 379例炎症性肠病临床特征分析. 中华消化杂志 2005; 25: 222-225
- 19 刘萱, 杜正光, 贾继东. 160例溃疡性结肠炎患者中原发性硬化性胆管炎的检出率. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 614
- 20 施昕, 黄伟, 陈燕萍. 溃疡性结肠炎并发腹腔血管栓塞9例临床分析. 浙江临床医学 2005; 7: 936
- 21 柳娟, 廖山翌, 刘思纯. 内镜结合病理检查在溃疡性结肠炎和克罗恩病鉴别诊断中的价值. 胃肠病学和肝病杂志 2005; 14: 401-404
- 22 杜俊东, 李基业, 黎沾良. 炎症性肠病135例临床分析. 中国实用外科杂志 2005; 25: 559-561
- 23 吴小丽, 吴健胜, 金抒清, 周刚. 克罗恩病的临床多样性及结肠镜表现分析. 实用医学杂志 2005; 21: 64-65
- 24 杨维良, 李福军, 张浩民, 赵志, 张建国, 裴建华, 张成, 汪艳军. 克罗恩病102例临床分型及术式选择. 中国现代手术学杂志 2006; 10: 95-98
- 25 杨英, 陈隆典. 85例克罗恩病的临床研究. 胃肠病学 2006; 11: 222-225
- 26 陈倩, 张渊, 张顺财, 祝培珠. 克罗恩病43例临床分析. 中国临床医学 2006; 13: 417-418
- 27 中国炎症性肠病协作组. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾性分析. 中华消化杂志 2006; 26: 368-372
- 28 李钦民, 韩真. 炎症性肠病101例临床回顾性分析. 皖南医学院学报 2006; 25: 124-125
- 29 张冰凌, 陈春晓, 王陈红, 厉有名. 108例克罗恩病临床特点及胶囊内镜下表现. 中华消化杂志 2006; 26: 622-623
- 30 王晓娣, 吴铁镭, 韩春丽. 溃疡性结肠炎的内镜特点和临床分析(附802例报告). 北京医学 2006; 28: 325-327
- 31 李一, 夏冰, 姜黎, 邓长生, 丁一娟, 罗和生, 任宏宇, 侯晓华, 侯伟, 刘南植, 许桦林, 李瑾. 炎症性肠病的并发症与肠外表现. 中华消化内镜杂志 2006; 23: 365-367
- 32 吴曦, 刘新光, 田雨, 李俊霞. 炎症性肠病患者的肠外表现(附201例临床分析). 中国实用内科杂志 2006; 26: 190-194
- 33 张冬, 姜渊贵, 田字彬. 青岛地区炎症性肠病临床特征的研究. 中国消化内镜 2007; 1: 26-30
- 34 闫伟, 盛剑秋, 赵晓军, 陈智敏, 吴爱东, 夏长虹, 张迎芬, 李世荣. 327例溃疡性结肠炎临床特征分析. 胃肠病学 2007; 12: 83-87
- 35 陆枫林, 李卫东. 365例炎症性肠病、缺血性肠炎临床与病理诊断分析. 临床荟萃 2007; 22: 1080-1083
- 36 王常会, 李福康, 林静. 中、重型溃疡性结肠炎176例临床诊疗分析. 泰山医学院学报 2007; 28: 370-371
- 37 李莉, 刘庆森, 杨云生. 86例Crohn病临床特征及治疗分析. 实用临床医药杂志 2007; 11: 83-85
- 38 伏代刚, 甘华田. 92例溃疡性结肠炎临床及病理结果分析. 华西医学 2007; 22: 356-357
- 39 汪志凌, 毛萌, 王增贵. 儿童溃疡性结肠炎172例. 实用儿科临床杂志 2007; 22: 508-510
- 40 崔巍, 刘冬研. HLA-B27与炎症性肠病患者伴骨关节病变的相关性研究. 中国全科医学 2007; 10: 1591-1592
- 41 张新红. 小儿溃疡性结肠炎46例临床分析. 中国煤炭工业医学杂志 2007; 10: 687-688
- 42 孙克敏, 张百成. 溃疡性结肠炎肠道外表现172例分析. 中国民康医学 2008; 20: 93

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

● 消息 ●

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库. 此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求.

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录. 《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊. 《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive>(编辑部主任: 程剑侠 2009-07-28)

Infliximab治疗难治性克罗恩病并发腹腔脓肿1例

庞智, 沈必武, 郑家驹

庞智, 沈必武, 郑家驹, 江苏省苏州市立医院北区消化内科
江苏省苏州市 215008

作者贡献分布: 此课题由庞智设计; 病例收集由庞智与沈必武完成; 研究过程由庞智与郑家驹完成; 本论文写作由庞智完成。

通讯作者: 庞智, 主任医师, 215008, 江苏省苏州市广济路242号, 江苏省苏州市立医院北区消化内科, pangzhi0273@sina.com

电话: 0512-62363122 传真: 0512-65332028

收稿日期: 2009-04-14 修回日期: 2009-06-15

接受日期: 2009-06-15 在线出版日期: 2009-07-28

Intra-abdominal abscess develops during infliximab treatment of refractory Crohn's disease: a report of one case

Zhi Pang, Bi-Wu Shen, Jia-Ju Zheng

Zhi Pang, Bi-Wu Shen, Jia-Ju Zheng, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (North Area), Suzhou 215008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Zhi Pang, Department of Gastroenterology, Suzhou Municipal Hospital (North Area), 242 Guangji Road, Suzhou 215008, Jiangsu Province, China. pangzhi0273@sina.com

Received: 2009-04-14 Revised: 2009-06-15

Accepted: 2009-06-15 Published online: 2009-07-28

Abstract

A male patient who had recurrent abdominal pain and diarrhea for more than 12 years was admitted to our hospital because of symptom exacerbation and fever for 20 days. According to clinical, imaging and colonoscopic manifestations, he was diagnosed as refractory Crohn's disease. He was treated intravenously with infliximab at a dose of 5 mg/kg at weeks 0, 2, and 6 for induction therapy, followed by an 8-week interval maintenance treatment. Intra-abdominal abscess developed at week 21 after the first infliximab infusion, suggesting that infliximab treatment of refractory Crohn's disease may increase the risk of infection.

Key Words: Infliximab; Refractory Crohn's disease; Intra-abdominal abscess

Pang Z, Shen BW, Zheng JJ. Intra-abdominal abscess develops during infliximab treatment of refractory Crohn's disease: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(21): 2221-2222

摘要

患者1例: 反复腹痛、腹泻12年余, 加重20 d伴发热入院, 据临床表现、影像学及肠镜检查确诊为难治性克罗恩病, 于0, 2, 6 wk时, 静脉滴注Infliximab(5 mg/kg)进行诱导治疗, 隔8 wk后再予静脉滴注1次, 进行维持缓解治疗。患者于首次滴注后21 wk发生腹腔脓肿。提示接受Infliximab治疗的患者可能增加感染的潜在危险, 值得引起重视。

关键词: Infliximab; 难治性克罗恩病; 腹腔脓肿

庞智, 沈必武, 郑家驹. Infliximab治疗难治性克罗恩病并发腹腔脓肿1例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(21): 2221-2222

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2221.asp>

0 引言

英夫利西(Infliximab)是一种人/鼠嵌合的抗肿瘤坏死因子(TNF- α)mAb, 对难治性克罗恩病(Crohn's disease, CD)具有迅速诱导缓解的疗效^[1-2]。我院2007-10以来, 应用Infliximab治疗难治性CD 10例, 对其临床疗效和安全性进行了评估, 患者可迅速改善临床症状及较好的结肠黏膜愈合作用。其中1例第4次静滴Infliximab后并发腹腔脓肿, 现报道如下。

1 病例报告

男, 36岁, 因反复腹痛、腹泻12年余, 加重伴发热20 d, 于去年12 mo收治我科。患者12余年前曾因“腹痛、腹泻、脓血便”在当地医院诊断为CD, 给予抗炎、解痉和支持对症治疗, 病情无明显好转, 反复发作, 并于2001年行升结肠上部、横结肠和降结肠切除, 两侧断端对端吻合术, 病理切片报告结肠全层中度慢性炎症, 可见裂隙状溃疡、非干酪性肉芽肿形成, 确诊为CD。术后坚持口服“5-氨基水杨酸(美沙拉嗪)”维持治疗, 去年6 mo行全消化系钡透发现远端小肠节段性僵硬、狭窄, 多处肠内瘘, 遂来我院治疗, 用“美沙拉嗪”和“肾上腺皮质激素”等诱导缓解治疗近1 mo, 无明显疗效, 后经静脉滴注Infliximab治疗(剂量5.0 mg/kg), 病情逐渐好转后

■背景资料

克罗恩病(CD)是由Burrill Crohn在1932年最早描述的, 1973年WHO将其定为Crohn病。本病以欧美国家发病率高, 近几年我国发病率呈增加趋势。目前, 只有Infliximab获美国FDA批准用于克罗恩病的治疗。迄今, infliximab在我国已经开始应用一年余, 在临床上获得了一致的好评。

■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

■研发前沿

CD是一种病因尚不清楚的胃肠道慢性炎症性肉芽肿性疾病,随着对CD慢性炎症过程生物学知识的不断深化,现已有多种特异性生物学疗法得到发展,可针对性地对炎症发病机制中的具体某一步骤进行靶向性治疗。现已表明,能有效治疗CD的生物学疗法有针对肿瘤坏死因子(TNF)的单克隆抗体(infliximab),但是其长期安全性需进一步扩大研究。

出院,2 wk后又滴注1次Infliximab,腹痛、腹泻缓解,第6周再次滴注1次,无任何不适表现。隔8 wk后再予静脉滴注1次,进行维持缓解治疗。近20 d来患者出现发热、腹痛,大便黄色稀水样,无脓血每日,4-5次,全身乏力,进食很少,常感恶心,呕吐为胃内容物,无血块,无咳嗽,无胸闷气急,体质量明显下降约10 kg,睡眠差。入院查体: T: 38.4℃, P 96次/min, R 20次/min, BP 100/60 mmHg,消瘦,中度贫血貌,精神萎,全身浅表淋巴结不肿大,双肺呼吸音清,未闻及明显干湿啰音。心律齐,未闻及杂音。腹平,柔软,脐周和右下腹压痛,无明显反跳痛和肌紧张,肝脾肋下未触及,右下腹似扪及一6 cm×8 cm大小包块,边界欠清楚,有压痛,质软,活动度欠佳。腹部叩诊呈鼓音,移动性浊音阴性,肠鸣音3次/min,双下肢轻度水肿,关节无肿痛。实验室检查:血常规: WBC $9.25 \times 10^9/L$, Hb 76 g/L, Plt $183 \times 10^9/L$, Neut 85.4%, Lym 12.5%。大便常规: 黄稀,脓细胞(+),隐血试验(-)。血抗结核抗体阴性。结核菌素试验阴性。血肿瘤标志物均正常范围。血沉15 mm/h, C反应蛋白27.83 mg/L,血清总蛋白35.4 g/L,白蛋白16.6 g/L。全胸片检查无异常。腹部平片示小肠不全性梗阻。腹部CT右下腹腔内脓肿。入院后给予“加替沙星”和“替硝唑”抗炎和全胃肠外营养治疗4 d后,体温升至39.4℃,腹痛加重,大便每日5-6次,多呈稀水状,无脓血。改用亚胺培南西司他丁钠(泰能)治疗1 wk后患者体温下降不明显,转外科手术治疗。手术方式以脓肿引流加回盲部病变肠管切除。术后继续抗炎,营养支持和控制症状治疗,手术后15 d体温下降,腹痛腹泻缓解,病情好转出院,并口服“美沙拉嗪”和免疫抑制药物雷公藤多甙片维持缓解。

2 讨论

Infliximab治疗CD在我国尚属起步阶段。国外报道,应用Infliximab治疗活动性CD(5 mg/kg单次静脉滴注)后,2 wk内临床有效者达58%;如继续于第2,6周及以后每8 wk 1次重复滴注相同剂量Infliximab后,第30周时有效率为39%^[3]。本组对传统使用的药物未能有效控制症状的难治性CD患者10例,应用Infliximab静脉滴注后,也取得了

较好的临床效应,治疗前有腹痛腹泻者,2 wk内大便次数明显减为每天3-4次,大便稀水样转为糊状,腹痛缓解。体质量有不同程度增长。治疗后激素应用剂量明显减少或停用。以往,激素是治疗中-重度CD的一线药物,其治疗目的是使患者临床症状得到缓解,然后以免疫抑制剂维持长期缓解^[4];而生物学制剂的治疗目的是促使肠道黏膜病变愈合。Infliximab是目前国际上上市的3种抗TNF- α 生物学制剂(另2种为阿达木单抗adalimumab及西他利珠单抗certolizumab)应用最早,也是疗效最为明显的单抗,可使半数左右的CD患者达到黏膜愈合,改观了传统上治疗以达到缓解为目的的观念。生物学疗法的危险性已较明确,特别是感染并发症比使用传统药物时风险更大,一旦发生感染,不但被迫终止继续治疗,并可能造成严重后果。为了避免不良反应,应严格选择适应证,使用本品前应检查患者是否有潜在的感染等,使每一个接受Infliximab治疗的患者避免处于可能引起感染的潜在危险因素之中。本组1例于首次滴注后21 wk发生腹腔脓肿,值得引起重视。

3 参考文献

- 1 Clark M, Colombel JF, Feagan BC, Fedorak RN, Hanauer SB, Kamm MA, Mayer L, Regueiro C, Rutgeerts P, Sandborn WJ, Sands BE, Schreiber S, Targan S, Travis S, Vermeire S. American gastroenterological association consensus development conference on the use of biologics in the treatment of inflammatory bowel disease, June 21-23, 2006. *Gastroenterology* 2007; 133: 312-339
- 2 Lémann M, Mary JY, Duclos B, Veyrac M, Dupas JL, Delchier JC, Laharie D, Moreau J, Cadiot G, Picon L, Bourreille A, Sobahni I, Colombel JF. Infliximab plus azathioprine for steroid-dependent Crohn's disease patients: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 1054-1061
- 3 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
- 4 Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezaand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 1398-1405

编辑 李军亮 电编 何基才

■同行评价

本文报道Infliximab治疗难治性克罗恩病并发腹腔脓肿1例,值得引起临床重视,有临床意义和实用价值,对临床有一定指导作用。