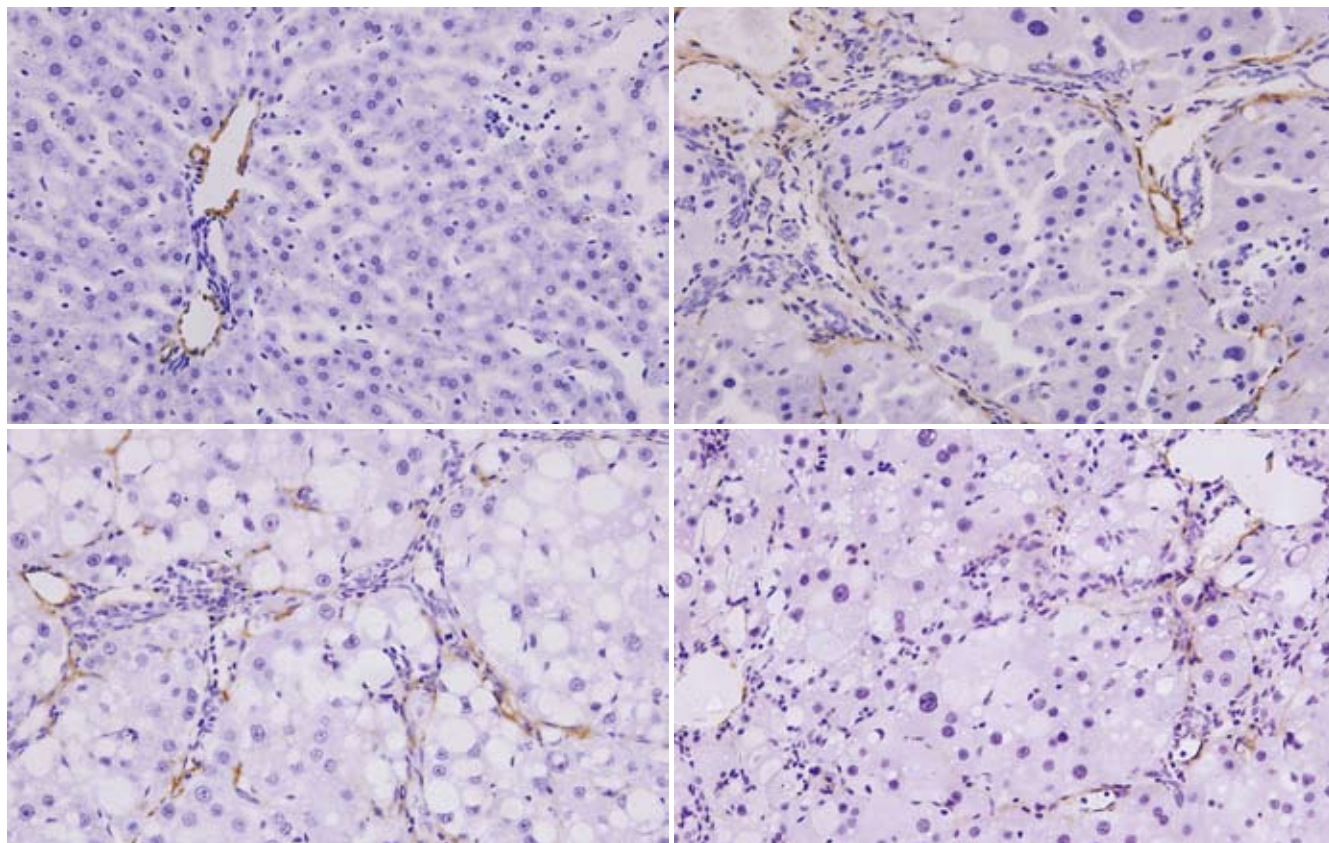


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010年7月8日 第18卷 第19期 (Volume 18 Number 19)



19 / 2010

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊,是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》,荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
王宝恩教授
危北海研究员
吴孟超教授
杨春波教授
周殿元教授

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

程英升教授
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授

马红主任医师
马欣主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
田宇彬教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承尧教授
王艳艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周晓东副教授
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学
蔡开琳副教授

蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇教授
季加孚教授
莫卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师

李文岗教授
李旭副教授
李永翔主任医师
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
汤恢煊教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授

高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师

沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璦教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
严惟力副教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授
吴硕东教授

袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄园教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
田颖刚副研究员
王钦红教授
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员

周士胜教授
周素芳教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010年7月8日 第18卷 第19期 (总第315期)

述 评

- 1961 新时期消化内镜中心护理工作模式思考
潘茵, 张瑾, 郑颖, 刘占举

基 础 研 究

- 1964 酸奶对胃溃疡模型大鼠胃黏膜损伤的抑制作用
王超, 袁卫新, 祝闯辉, 陈健康, 赵玉峰
- 1969 MAPK/ERK信号通路在胃癌细胞来源的外来体诱导Jurkat T细胞凋亡中的作用
曲晶磊, 赵明芳, 曲秀娟, 侯科佐, 姜又红, 杨向红, 刘云鹏
- 1974 二甲双胍对AGS胃癌细胞生长侵袭的抑制作用
薛知新, 钟捷, 赵丹瑜, 许慈, 孙萍胡, 姚静静
- 1979 牛磺熊去氧胆酸抑制四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化
王丹, 杨玲, 黄金明, 王保永, 李靓, 钱伟, 叶进, 侯晓华
- 1985 非人灵长类动物急性肝功能衰竭模型的建立
徐玉振, 薛琨, 高毅, 潘明新, 简国登, 刘晓明, 饶军华
- 1990 COX-2抑制剂塞来昔布提高人结肠癌细胞SW480的放射敏感性
夏曙, 刘飞, 刘细友, 付强, 付秀根, 郑微

临 床 研 究

- 1995 基质金属蛋白酶在食管癌组织中的表达及与微量元素含量之间的关系
陈超伍, 马洪升
- 2001 胃印戒细胞癌的细胞起源及其癌前病变的病理学
周志华, 张建东, 赵海滨, 赵玲娜, 单宝珍

焦 点 论 坛

- 2007 肠黏膜组织内神经递质和基质细胞参与炎症性肠病发生
刘占举, 苏婧玲, 庞雪花, 甘华田, 陈宁, 刘玉兰, 白爱平, 袁川评, 王玮, 柳巨雄
- 2008 溃疡性结肠炎相关结直肠癌变机制研究进展
苏婧玲, 刘占举
- 2013 神经肽Y在免疫和溃疡性结肠炎发病中的作用
庞雪花, 甘华田
- 2017 克罗恩病肠道纤维化的发生机制和临床治疗
陈宁, 刘玉兰
- 2020 肠黏膜非免疫细胞在炎症性肠病发病中的作用
白爱平
- 2024 神经-内分泌-免疫网络与炎症性肠病
袁川评, 王玮, 柳巨雄

文 献 综 述

- 2029 代谢综合征对慢性病毒性肝炎临床转归的影响及其机制
李磊, 丁惠国
- 2033 饮食因素与大肠癌关系的研究进展
孙丽红

研 究 快 报

- 2038 抑制细胞因子RhoA的表达对肝星状细胞株HSC-T6胶原分泌的影响
王波, 王艳芬, 田德安, 王天才

临 床 经 验

- 2043 内镜下支架置入治疗贲门失迟缓症27例
秦咏梅, 张彩凤, 刘竹娥, 罗艳丽, 王文菊
- 2047 抑癌基因PTEN及P16蛋白在疣状胃炎及胃癌组织中的表达及意义
丁世华, 刘俊, 舒晴, 王建平, 邓联民, 刘新民
- 2050 胃病患者胃黏膜真菌基因的多样性

	<p>王垂杰, 郑剑玲, 宫雁冰, 傅纪婷, 齐贺, 耿薇, 李玉锋, 段薇</p> <p>2055 非酒精性脂肪性肝病合并原发性空肠腺癌1例</p> <p>张姮, 黄晓东, 范彦, 吴杰, 王萍</p> <p>2058 缺血性结肠炎37例</p> <p>台卫平, 胡品津</p>
病例报告	<p>2062 异时性多原发结肠癌合并原发性空肠腺癌1例</p> <p>夏翠峰, 李强, 李云峰, 潘定国, 冯瑞</p>
附录	<p>2064 《世界华人消化杂志》投稿须知</p> <p>2069 2010年国内国际会议预告</p>
志 谢	2070 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>1963 《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务</p> <p>1968 《世界华人消化杂志》数字用法标准</p> <p>1973 2008年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>1984 汤姆森-路透公布2009年WJG影响因子2.092</p> <p>1989 《世界华人消化杂志》修回稿须知</p> <p>2012 《世界华人消化杂志》正文要求</p> <p>2016 《世界华人消化杂志》名词术语标准</p> <p>2028 《世界华人消化杂志》栏目设置</p> <p>2037 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>2042 2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结</p> <p>2046 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》</p> <p>2061 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标</p> <p>2063 WJG成功通过评审被PMC收录</p>
封面故事	<p>王丹, 杨玲, 黄金明, 王保永, 李靓, 钱伟, 叶进, 侯晓华. 牛磺熊去氧胆酸抑制四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 1979-1984</p> <p>http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1979.asp</p>
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏联; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p>世界华人消化杂志</p> <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名</p> <p>(旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2010-07-08 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮</p> <p>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p> <p>印刷 北京科信印刷厂</p> <p>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p>订购 全国各地邮电局</p> <p>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2010年版权归世界华人消化杂志所有</p>
<p>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</p> <p>邮发代号 82-262 国外代号 M 4481 国内定价 每册56.00元 全年2016.00元 广告经营许可证 1401004000050</p> <p style="text-align: center;">www.wjgnet.com</p>		

World Chinese Journal of Digestology

July 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 19

EDITORIAL	1961 Current nursing models in endoscopy centers <i>Pan J, Zhang J, Zheng Y, Liu ZJ</i>
BASIC RESEARCH	<p>1964 Yoghourt accelerates the recovery of gastric ulcer in rats <i>Wang C, Yuan WX, Zhu MH, Chen JK, Zhao YF</i></p> <p>1969 Role of MAPK/ERK signaling pathway in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells <i>Qu JL, Zhao MF, Qu XJ, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP</i></p> <p>1974 Metformin inhibits cell proliferation and migration in gastric cancer cell line AGS <i>Xue ZX, Zhong J, Zhao DY, Xu C, Sun PH, Yao JJ</i></p> <p>1979 Tauroursodeoxycholic acid inhibits carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats <i>Wang D, Yang L, Huang JM, Wang BY, Li L, Qian W, Ye J, Hou XH</i></p> <p>1985 Establishment of a non-human primate model of acute liver failure <i>Xu YZ, Xue K, Gao Y, Pan MX, Jian GD, Liu XM, Rao JH</i></p> <p>1990 COX-2 inhibitor celecoxib improves radiosensitivity of human colon carcinoma cell line SW480 <i>Xia S, Liu F, Liu XY, Fu Q, Fu XG, Zheng W</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1995 Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in esophageal carcinoma and their relationship with trace elements <i>Chen CW, Ma HS</i></p> <p>2001 Cell origin and premalignant lesions of gastric signet-ring cell carcinoma: a histopathologic study <i>Zhou ZH, Zhang JD, Zhao HB, Zhao LN, Shan BZ</i></p>
TOPIC HIGHLIGHT	<p>2007 Involvement of neurotransmitters and stromal cells in the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease <i>Liu ZJ, Su JL, Pang XH, Gan HT, Chen N, Liu YL, Bai AP, Yuan CP, Wang W, Liu JX</i></p> <p>2008 Mechanisms underlying development of ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma <i>Su JL, Liu ZJ</i></p> <p>2013 Role of neuropeptide Y in the immune system and the pathogenesis of ulcerative colitis <i>Pang XH, Gan HT</i></p> <p>2017 Pathogenesis and management of intestinal fibrosis in Crohn's disease <i>Chen N, Liu YL</i></p> <p>2020 Role of non-immune cells in the intestinal mucosa in the pathogenesis of inflammatory bowel disease <i>Bai AP</i></p> <p>2024 Neuro-endocrine-immune network and inflammatory bowel disease <i>Yuan CP, Wang W, Liu JX</i></p>
REVIEW	<p>2029 Effects of metabolic syndrome on the outcomes of chronic viral hepatitis and mechanisms involved <i>Li L, Ding HG</i></p> <p>2033 Advances in understanding the relationship between dietary factors and risk of colorectal cancer <i>Sun LH</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>2038 Inhibition of RhoA expression reduces the secretion of extracellular matrix components in hepatic stellate cells <i>Wang B, Wang YF, Tian DA, Wang TC</i></p>

CLINICAL PRACTICE	<p>2043 Endoscopic retrievable stent placement for treatment of esophageal achalasia: an analysis of 27 cases <i>Qin YM, Zhang CF, Liu ZE, Luo YL, Wang WJ</i></p> <p>2047 Expression of PTEN and P16 proteins in varioliform gastritis and gastric cancer <i>Ding SH, Liu J, Shu Q, Wang JP, Deng LM, Liu XM</i></p> <p>2050 Genetic polymorphisms of <i>fungi</i> in gastric mucosa of patients with different gastric diseases <i>Wang CJ, Zheng JL, Gong YB, Fu JT, Qi H, Geng W, Li YF, Duan W</i></p> <p>2055 Relationship between leptin and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease <i>Zhang H, Huang XD, Fan Y, Wu J, Wang P</i></p> <p>2058 Ischemic colitis: an analysis of 37 cases <i>Tai WP, Hu PJ</i></p>
CASE REPORT	<p>2062 Metachronous multiple primary colon cancer with primary adenocarcinoma of the jejunum: a report of one case <i>Xia CF, Li Q, Li YF, Pan DG, Feng R</i></p>
APPENDIX	<p>2064 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>2069 Meeting events calendar in 2010</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>2070 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p>Wang D, Yang L, Huang JM, Wang BY, Li L, Qian W, Ye J, Hou XH. Tauroursodeoxycholic acid inhibits carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(19): 1979-1984 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1979.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date July 8, 2010

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 56 Yuan for each issue
RMB 2016 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2010 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2010 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

新时期消化内镜中心护理工作模式思考

潘茵, 张瑾, 郑颖, 刘占举

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

同济大学附属第十人民医院优秀学科带头人基金资助项目, No. 09RD101

刘占举, 教授, 擅长炎症性肠病、肝脏病以及自身免疫病的诊断、治疗和免疫病理机制研究。

作者贡献分布: 潘茵与刘占举负责课题设计和论文撰写, 张瑾与郑颖收集资料。

通讯作者: 刘占举, 教授, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院消化内科. zhanjuli@yahoo.com

电话: 021-66301164

收稿日期: 2010-03-11 修回日期: 2010-06-15

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-07-08

Current nursing models in endoscopy centers

Jun Pan, Jin Zhang, Ying Zheng, Zhan-Ju Liu

Jun Pan, Jin Zhang, Ying Zheng, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Correspondence to: Professor Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China. zhanjuli@yahoo.com

Received: 2010-03-11 Revised: 2010-06-15

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-07-08

Abstract

Endoscopic examination and therapy as a special clinical approach can currently be performed in many large general hospitals. With the rapid development and wide utilization of endoscopic techniques in clinical practice, relevant nursing techniques and skills are becoming more complicated. In this article, we discuss the nursing models in endoscopy centers. It seems to be important to adopt centralized and integrated management system in endoscopy centers to protect the rights and interests of patients and guarantee their health and safety.

Key Words: Endoscopic examination; Endoscopic therapy; Nursing model

Pan J, Zhang J, Zheng Y, Liu ZJ. Current nursing models in endoscopy centers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 1961-1963

摘要

内镜下检查和治疗是近年来大型医院开展的一

项特殊性诊疗工作, 随着医用内镜技术在临床各学科的发展和广泛应用, 护理技术操作日趋复杂. 本文根据内镜中心的发展趋势, 提出了内镜中心的工作模式与护理体会. 如何在复杂的技术操作中实现内镜检查的中心化、一体化管理, 保护患者的权益, 保障医疗安全尤其重要.

关键词: 内镜检查; 内镜治疗; 护理模式

潘茵, 张瑾, 郑颖, 刘占举. 新时期消化内镜中心护理工作模式思考. *世界华人消化杂志* 2010; 18(19): 1961-1963

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1961.asp>

0 引言

随着医疗技术的飞速发展和进步, 内镜技术的不断成熟和发展, 各种内镜检查和治疗在临床上的应用越来越广泛, 对疾病的诊治与预防起到了积极的作用. 通过内镜还可以使用各种微型手术器械进行手术治疗, 这些手术具有创伤小、康复快、费用低等优点, 深受广大患者欢迎. 伴随内镜学的各种新技术、新理论的迅速发展, 临床上对内镜护理学也提出了更高的要求. 因此新时期发展并完善内镜护理学的工作模式迫在眉睫.

1 发展趋势

近年来, 诊疗组织和医疗设施中心化正成为现代医疗体系发展的一个趋势. 国外相当普遍, 国内也有这种趋势. 优点是: 便于资源共享、统管, 提高了业务活动效率、设备利用率和经济效益, 促进了学科间的协作, 为医疗、科研、教学提供了有利条件. 越来越多的医疗机构成立了独立的内镜中心, 整合各科室的内镜资源, 统一管理, 协调力量, 发挥集体协同作用, 做好内镜诊疗工作, 为患者解除病痛, 同时又为科研、教学提供了有利条件. 目前内镜中心主要承担有胃镜、结肠镜、小肠镜、十二指肠镜、胆道镜、超声内镜、喉镜、支气管镜等内镜, 宫腔镜、腹腔镜等腔镜检查. 由此, 对内镜护士知识水平提出了更高的要求. 提高内镜护理人员的综合

■背景资料

越来越多的医疗机构成立了独立的内镜中心, 整合各科室的内镜资源, 统一管理, 协调力量, 发挥集体协同作用, 做好内镜诊疗工作, 为患者解除病痛, 同时又为科研、教学提供了有利条件. 目前内镜中心主要承担有胃镜、结肠镜、小肠镜、十二指肠镜、胆道镜、超声内镜、喉镜、支气管镜等内镜, 宫腔镜、腹腔镜等腔镜检查. 因此新时期发展并完善内镜护理学的工作模式迫在眉睫.

■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

■研发前沿

内镜学的迅速发展,各种新技术、新理论、新观点、新方法、新信息的层出不穷,对护理人员也提出了更高、更严的要求。只有提高内镜护理管理者和护士的自身素质,建立一支高素质的护理队伍,才能适应新时期内镜中心的发展需要。

素质成为内镜护理管理者的重要任务^[1-3]。

2 管理模式

2.1 建立高素质内镜中心护士队伍 在现代管理的诸多因素中,人的因素是第一位的,内镜学的迅速发展,各种新技术、新理论、新观点、新方法、新信息的层出不穷,对护理人员也提出了更高、更严的要求,只有提高内镜护理管理者和护士的自身素质,建立一支高素质的护理队伍,才能适应新时期内镜中心的发展需要。内镜中心护理工作模式已不单纯是过去简单的技术劳动检查配合,而要向科技含量高要求、高深度的学科发展。随着科学技术的飞速发展,内镜下微创治疗的开展,新技术、新器械层出不穷,各种技术不断向细致、复杂的方向转变,要求内镜护理人员不但需要具有丰富的工作经验,还需具有先进的专业知识和高超的临床技能,才能配合医生完成多项新技术。作为内镜护理管理者,要制定专科业务学习内容和计划,设定学习目标,按计划组织学习和培训,加强学习业务技能,如常规护理培训、三基业务学习、专科技能训练、专科护理培训,并进行考核,必须人人过关,通过系统的规范化培训,有计划、有步骤的狠抓护士基本技能和护理专科岗位技能训练,才能使护理人员理论知识广度和深度得到拓宽和加深,才能培养具有扎实的护理水平和精湛的专科技能护士。为此,通过系统的学习培训,不断提高了内镜中心护理专业护士的素质、提高了护理人员的理论水平、操作技能,才能有效地提高了内镜中心护理工作的质量^[1-3]。

2.2 建立健全内镜中心管理制度 现代化医院将是高度制度化、规范化、程序化、标准化、信息化的医院,因此,新时期内镜中心必须具有现代化的科学管理制度,他是提高内镜中心现代化管理水平的根本保证。为此,我们在坚持贯彻医疗护理操作技术常规外,针对内镜中心的工作特点,建立健全科学合理的管理制度,制定了内镜中心各项规章制度、明确各项工作岗位职责,制定了各项护理操作流程,使各项护理工作有章可循、有疑可查,坚持按制度去管理,按制度去工作,按制度去检查、考核和评比,做到赏罚分明,建立健全的内镜中心各项规章制度及护理操作流程,使护理管理逐步走向制度化、规范化、程序化、标准化管理,使护士在执行护理操作时方便、快捷、程序清楚,增强了操作性和实用性;严格执行各项规章制度,制定了

内镜中心人员职责和护理质量考核标准,定期并及时检查考评,督促各项护理工作落实,考评结果做到有奖有罚,赏罚分明;建立各项应急预案,培养护士的风险意识及抗风险能力,使护士在遇到突发事件时,能及早发现及杜绝各类护理风险隐患。护理规章制度反映了护理工作的客观规律性,是实践经验的总结。根据内镜中心工作特殊性,严格的制度化管理及完善的护理操作流程,减少了医疗护理差错事故的发生,确保医疗护理质量,同时有利于培养护士严谨的科学态度,严格的工作作风,增强了护理人员的工作自觉性、主动性和慎独精神。

2.3 专科内镜下操作护理训练 建立胃镜、结肠镜、小肠镜、十二指肠镜、胆道镜、超声内镜、喉镜、支气管镜、宫腔镜、腹腔镜等内镜的器械要求,适应证与禁忌证,术前准备、术中护理配合和术后护理以及并发症的防治,不同操作护理特殊要求不同,注意事项不同,根据每一操作特点,制定操作技术流程以及危急情况急救预案,加强学习训练,提高内镜专科护理技术水平,培养内镜专业化骨干,促进内镜护理工作的专业化发展^[4,5]。

2.4 控制内镜中心感染 随着内镜技术的广泛应用,患者自我保护意识逐渐加强,由于内镜材料特殊,精密度高,结构复杂,用后的消毒灭菌难度大,其内镜及附件消毒灭菌不容忽视,并日益受到重视,影响了医疗质量和患者的医疗安全。要严格按照卫生部2004年《内镜清洗消毒技术操作规范》,对内镜室的清洗、消毒工作进行规范,加强内镜中心的医院感染控制与管理工作。规范布局、购置设备,做到操作治疗室与清洗消毒室分离,设置单独的清洗消毒室和内镜诊疗室,严格消毒程序;定期监测,消毒剂浓度每日定时进行化学监测,保证清洗消毒的时间,消毒后或灭菌后的内镜及内镜附件、消毒剂浓度每月都进行生物学监测,生物学监测每月由科室自己做,医院感染管理科抽检,监测结果符合要求并做好监测记录。监测结果若有问题时,科室与医院感染管理科共同进行原因分析并采取有效措施,确保消毒灭菌效果;关于一次性使用的各种导管及附件,这也是内镜介入治疗过程导致交叉感染最危险的因素,应特别加以重视,避免重复使用。另外,内镜中心医护人员加强自身防护,注射肝炎疫苗,操作时穿隔离衣、鞋套、戴口罩帽子、带乳胶手套,由于戊二醛对眼角膜损害,因此清洗消毒内镜时医护人员要带防护眼镜。规范

的内镜中心医院感染管理,可以有效地控制医院感染发生,确保医疗护理安全.

2.5 逐渐完善物品仪器设备管理 内镜是集光学、机械、电子学于一体昂贵易损的精密医疗仪器,其保养和维护非常重要,这是确保内镜正常使用以及延长其使用寿命的关键.内镜中心全体医务人员必须做好岗前培训,熟练掌握内镜的性能和原理,熟悉内镜的保养和维护,各类仪器及器械使用过程中要轻取轻放,使用后清洗消毒,精心保养,爱护公共财产,提高主人翁的精神.内镜中心仪器设备专人保管,设立具备良好通风、防霉、除湿等功能的内镜柜,使内镜专柜存放,定期检查保养.建立仪器设备使用运行登记本,内镜及附件维护和保养本,指定专人负责制.内镜附件属易损部件,内镜附件定期清点,登记入账、避免遗失,如有损坏及时补充.使用过的内镜附件,要彻底清洗消毒、校正复位、涂上保护硅油液备用.完善内镜中心的抢救仪器和药品,使其处于备用状态,并专人负责,以确保医疗护理安全.

2.6 多媒体教学系统及信息管理 内镜中心可以设有多媒体示教室,进行多媒体教学活动.通过内镜中心操作主机上的视频输出线将操作视频画面同步显示在多媒体示教室的大屏幕上,操作者在操作室内还可以通过音频工具与示教室内的听课人员进行直接对话,讨论,开展互动,有利于更好地进行科研教学工作.有条件的医院,内镜中心的信息保存和管理应由信息专业人员进行维护,对各种资料进行分类、存档,以利于教学和科研.

2.7 现代管理和护理模式对临床促进作用 新时期内镜中心的成立,由全院各科室的医师到内镜中心进行内镜检查操作,内镜中心护理人员做好术前准备、术中护理及配合、术后护理及监护,内镜的清洗与消毒以及仪器设备保养与维护等工作.内镜中心使医院内部资源进行了重组,合理了人力资源配置,使医院的资源可以共享,便于统一管理,提高了工作效率,促进各科室间的合作,为科研、教学活动提供良好的平台^[1-3].

3 结论

为了适应新时期内镜中心的发展,护理管理者 and 护理人员应面对挑战,不断进取,不断充实和完善,努力把新时期的内镜中心工作提高到一个新水平,共同促进内镜中心事业发展.更好地为患者服务,提高医疗护理质量.

4 参考文献

- 1 Ylinen ER, Vehviläinen-Julkunen K, Pietilä AM. Nurses' knowledge and skills in colonoscopy patients' pain management. *J Clin Nurs* 2007; 16: 1125-1133
- 2 Verschuur EM, Kuipers EJ, Siersema PD. Nurses working in GI and endoscopic practice: a review. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 469-479
- 3 Ganz RA. Nurses working in gastroenterology: what should be the scope of practice? *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 480-482
- 4 Cohen LB. Patient monitoring during gastrointestinal endoscopy: why, when, and how? *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008; 18: 651-63, vii
- 5 Dellon ES, Lippmann QK, Sandler RS, Shaheen NJ. Gastrointestinal endoscopy nurse experience and polyp detection during screening colonoscopy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: 1342-1347

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本文内容新颖,对临床管理消化内镜有一定帮助.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务

本刊讯 2009-12-28,《世界华人消化杂志》按时完成2009年1-36期的出版任务,出版各类文章774篇,全部经过同行专家评议.其中评论性文章158篇(20.41%),原创性文章237篇(30.62%),研究快报91篇(11.76%),临床经验253篇(32.69%),病例报告13篇(1.68%),会议纪要2篇(0.26%).

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进.

酸奶对胃溃疡模型大鼠胃黏膜损伤的抑制作用

王超, 袁卫新, 祝闽辉, 陈健康, 赵玉峰

■背景资料

有人认为酸奶含有益生菌群有利于肠道环境的改善, 促进溃疡愈合, 也有人认为导致溃疡的一个重要原因就是胃酸分泌过多, 而酸奶含大量乳酸, 会加重溃疡进程。胃溃疡患者喝酸奶到底有益还是有害, 一直众说纷纭。

王超, 袁卫新, 祝闽辉, 中国人民解放军第四军医大学口腔医学系六队 陕西省西安市 710032

陈健康, 赵玉峰, 中国人民解放军第四军医大学基础医学实验部 陕西省西安市 710032

作者贡献分布: 此课题由王超、袁卫新及祝闽辉设计; 研究过程由祝闽辉、袁卫新及王超操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈健康提供; 数据分析由王超与袁卫新完成; 本论文写作由王超与祝闽辉完成; 本论文撰写由赵玉峰指导。

通讯作者: 陈健康, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学基础医学实验部. jkchen@fmmu.edu.cn

电话: 029-84773159

收稿日期: 2010-03-24 修回日期: 2010-05-18

接受日期: 2010-05-25 在线出版日期: 2010-07-08

Yoghourt accelerates the recovery of gastric ulcer in rats

Chao Wang, Wei-Xin Yuan, Min-Hui Zhu,
Jian-Kang Chen, Yu-Feng Zhao

Chao Wang, Wei-Xin Yuan, Min-Hui Zhu, Department of Stomatology (Division VI), the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Jian-Kang Chen, Yu-Feng Zhao, Department of Experimental Basic Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jin-Kang Chen, Department of Experimental Basic Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. jkchen@fmmu.edu.cn

Received: 2010-03-24 Revised: 2010-05-18

Accepted: 2010-05-25 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To investigate whether yoghurt accelerates the recovery of gastric ulcer in rats.

METHODS: Gastric ulcer was induced in rats by intraperitoneal injection of reserpine at a dose of 0.5 mL/kg. Rats with gastric ulcer were then divided into three groups: yoghurt group, milk group and sodium chloride group, which were intragastrically given yoghurt, milk and sodium chloride once (5 mL/kg) every other day, respectively. All animals were killed on day 7 after administration. The extent of mucosal lesions was evaluated based on Guth score. The levels of prostaglandin E2 (PGE2) and superoxide dismutase (SOD) in gastric mucosa were measured.

RESULTS: Punctiform erosion and hemorrhage

were observed by naked eyes in rats of each group. Guth score was significantly lower in the yoghurt group than in the milk group (1.33 ± 0.577 vs 5.00 ± 1.323 , $P < 0.05$) though there was no significant difference between the yoghurt group and sodium chloride group ($P > 0.05$). Epithelial cell necrosis and shedding and neutrophil infiltration of the propria lamina were observed by microscopy. The lesions in rats of the sodium chloride group were more severe than those in rats of the yoghurt group. The content of PGE2 in gastric mucosa was significantly higher in the yoghurt group than in the sodium chloride group (248.6 ± 43.73 vs 79.52 ± 31.74 , $P < 0.05$) though no significant difference was observed between the yoghurt group and the milk group. The content of SOD in gastric mucosa was significantly lower in the yoghurt group than in the milk group (148.1 ± 2.18 vs 156.6 ± 1.66 , $P < 0.01$), but showed no significant difference between the yoghurt group and the sodium chloride group.

CONCLUSION: Yoghurt exerts a positive effect on the recovery of gastric ulcer in rats possibly by increasing PGE2 content and decreasing SOD content.

Key Words: Gastric ulcer; Yoghourt; Superoxide dismutase; Prostaglandin E2

Wang C, Yuan WX, Zhu MH, Chen JK, Zhao YF. Yoghourt accelerates the recovery of gastric ulcer in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 1964-1968

摘要

目的: 观察酸奶对大鼠胃黏膜损伤的促进或抑制修复作用。

方法: 利血平0.5 mL/kg腹腔注射, 制作大鼠胃溃疡模型, 然后各组大鼠分别用酸奶, 纯奶, 生理盐水5 mL/kg每天1次灌胃, 7 d后, 处死并解剖大鼠。观察胃黏膜损伤情况、测定胃黏膜中前列腺素E2(PGE2)的表达量、超氧化物歧化酶(SOD)表达量来评估酸奶对胃溃疡的损伤或修复作用。

结果: 3组大鼠胃黏膜均有点状出血, Guth积

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

分法得出酸奶组较纯奶组积分少,有统计学差异(1.33 ± 0.577 vs 5.00 ± 1.323 , $P < 0.05$),镜下病理切片观察发现,各组大鼠胃黏膜不同程度充血,生理盐水组上皮严重脱落且腺体萎缩,酸奶组损伤不明显,仅有少量中性粒细胞浸润和上皮脱落.酸奶组PGE2表达明显比生理盐水组表达量高,有统计学差异(248.6 ± 43.73 vs 79.52 ± 31.74 , $P < 0.05$).酸奶组SOD表达量比纯奶组低,差异有统计学意义(148.1 ± 2.18 vs 156.6 ± 1.66 , $P < 0.01$).

结论: 酸奶对大鼠胃溃疡的恢复有一定的促进作用,同时胃黏膜PGE2表达量升高, SOD表达量下降.

关键词: 胃溃疡; 酸奶; 超氧化物歧化酶; 前列腺素2

王超, 袁卫新, 祝国辉, 陈健康, 赵玉峰. 酸奶对胃溃疡模型大鼠胃黏膜损伤的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 1964-1968

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1964.asp>

0 引言

消化系溃疡是机体在胃或肠黏膜出现的糜烂和溃疡,是严重心理障碍和危重临床疾病的常见并发症,是现代生活常见病^[1,2].现代社会生活节奏加快,压力大,生活不规律,损伤因素多,胃溃疡的发病率因此有所提高,同时因该病不一定出现症状,潜在危害性较大.有研究表明,消化性溃疡,可能与机体神经内分泌失调、胃黏膜屏障保护功能削弱及胃黏膜损伤因素作用相对增强等因素有关^[3-8].发酵性酸奶是指以牛奶为原材料,经过杀菌后接入乳酸菌经发酵后产生的乳产品.具有调节消化系菌群平衡,提高免疫力,预防心血管疾病,以及防癌抗癌的作用等^[9-11].本实验选用注射利血平建立急性胃溃疡模型^[12],观察酸奶对大鼠急性胃黏膜损伤后愈合的促进作用.以纯牛奶和生理盐水作为对照组.测定包括胃黏膜损伤指数、胃黏膜光镜下改变、胃壁组织内前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)表达以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的四项指标^[12-17].

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年SD大鼠27只,♂, 体重250-300 g,由第四军医大学动物实验中心提供. SOD试剂盒(南京建成生物制剂公司), 甲醇, 生理盐水, 0.5 mol/L KOH甲醇溶液, 利血平注射液(天津药业集团有限公司, 生产批号080705), 0.1

mol/L NaOH溶液, 甲醛固定液, 冰醋酸, 酸奶、纯奶(西安东方乳业多鲜牌). 手术器械、缝合线、离心机、注射器(1 mL×2、5 mL×2)、752型分光光度计、紫外分光光度计、37℃恒温水浴锅、组织匀浆机、灌胃针头、移液枪(250 μL)、直尺.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模^[18]: 将所有大鼠于实验环境中适应性饲养7 d. 注射建立大鼠胃溃疡模型: 所有大鼠于第8日上午7:00开始禁食不禁水至第9日上午7:00. 第9日上午7:00各组动物均皮下注射利血平0.5 mL/kg. 造模结束后,按照实验分组情况将大鼠随机分为3组,分别为酸奶组、纯奶组、生理盐水组,每组9只. 分装入3个笼子里,记录好组别. 大鼠称体质量确定灌胃剂量,剂量均为5 mL/kg体质量,每天1次. 连续灌胃6 d. 于1 wk后处死全部大鼠.

1.2.2 胃壁观察及损伤程度测定: 剖腹取出大鼠胃,结扎幽门贲门部,用注射器由幽门部刺入胃幽门部吸取胃液备用. 将取下的胃沿大弯侧切开胃壁,生理盐水冲洗净,分离前后壁,观察前壁内侧面. 用双盲法依Guth标准评定损伤指数: <1 mm为1分, 1-2 mm为2分, 2-3 mm为3分, 3-4 mm为4分,并剪取一小块胃黏膜组织制成石蜡切片供组织学观察.

1.2.3 PGE2含量测定: 取离心胃液上清液0.05 mL,加入0.5 mol/L KOH甲醇溶液0.2 mL,在50℃下异构化20 min,用甲醇稀释至2 mL,空白对照组以蒸馏水代替胃液上清液,于278 nm处测定其光吸收值. 根据Lipidus等的克分子吸收系数计算: $PGE2 \text{ 含量} = E_{278} \times m/\epsilon \times D = E_{278} \times 13.13 \times D$ (稀释倍数).

1.2.4 SOD活性测定: 用电子秤称取胃组织0.5 g置于匀浆器,加1 mL PDS溶液,轻碾磨成匀浆. 离心取上清液,放入-80℃保存. 然后按照试剂盒要求进行测定,测得A值,据标准曲线求得其含量,胃黏膜中SOD活性用ng/dL表示.

1.2.5 切片制作: 以溃疡部位为中心修剪胃壁组织,以溃疡瘢痕平行于胃长轴方向的最长径中心取材,切取含溃疡边缘约3 mm组织在内的溃疡组织块(正常组取胃前壁近幽门处的组织)约1.0 cm×1.2 cm大小,一部分迅速置于甲醛中固定24 h,石蜡包埋,5 μm厚度切片,备免疫组织化学使用及作HE染色(中性树脂封片,光镜观察).

统计学处理 采用GraphPad Prism 5分析软

■ 研发前沿

该研究领域的热点在于具体是酸奶中哪种有效成分能够促进胃溃疡愈合以及SOD、PGE2如何通过对其下游通路的调节作用,从分子水平改善胃黏膜细胞微环境,促进细胞修复,减少炎症发生.

■相关报道

有研究表明,消化性溃疡,可能与机体神经内分泌失调、胃黏膜屏障保护功能削弱及胃黏膜损伤因素作用相对增强等因素有关。

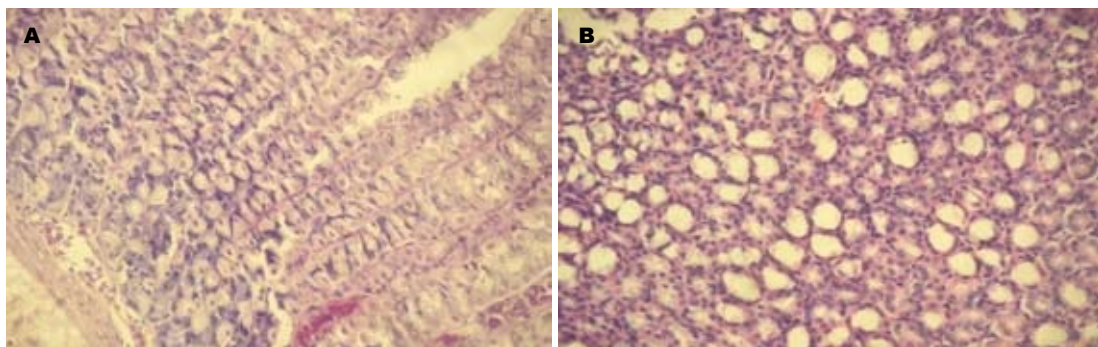


图1 酸奶组细胞组织病理变化. A: 胃腺结构正常, 黏膜下层有少量炎细胞浸润; B: 胃腺横切面结构, 仅有少量腺体萎缩.

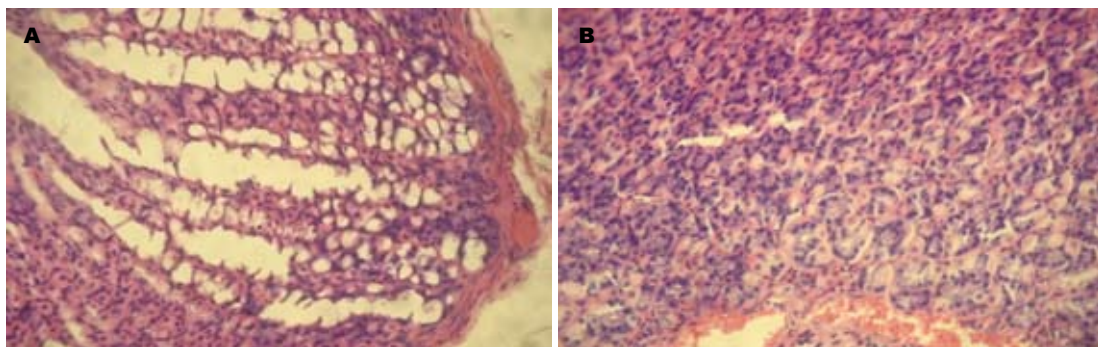


图2 纯奶组细胞组织病理变化. A: 小鼠胃黏膜, 上皮结构破坏明显, 腺细胞大量萎缩; B: 胃黏膜横切面, 黏膜层充血明显, 中性粒细胞浸润.

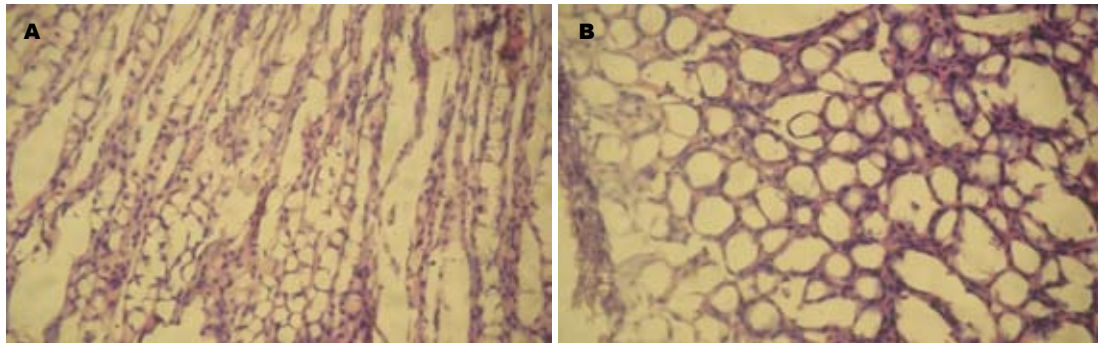


图3 生理盐水组细胞组织病理变化. A: 胃黏膜严重萎缩, 破坏明显, 胃腺萎缩成棘状; B: 胃黏膜横切面, 上皮细胞萎缩, 胃腺管腔增粗.

件包进行统计学分析, 所有数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 组间比较以独立样本秩和检验. $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 一般状况 皮下注射利血平后, 大鼠当天表现为精神萎靡, 食欲不振, 第2天恢复. 灌胃期各组大鼠一般状况良好, 尤其是酸奶组大鼠活泼.

2.2 组织病理学 酸奶组上皮细胞少许脱落, 腺体结构完整, 充血及中性粒细胞浸润不明显(图1). 纯奶组上皮细胞有脱落, 腺体萎缩明显, 可见大范围的充血区, 中性粒细胞和淋巴细胞的浸润

(图2). 生理盐水组上皮细胞脱落, 腺体严重萎缩, 黏膜下充血明显, 有中性粒细胞及淋巴细胞浸润(图3).

2.3 免疫组织化学各值的统计 解剖大鼠胃后, 用Guth积分法统计大鼠胃黏膜点状、线状糜烂及出血. Guth积分比较, 酸奶组与纯奶组有统计学差异($P < 0.05$); 酸奶组与生理盐水组无统计学差异($P > 0.05$). PEG2比较, 酸奶组与生理盐水组有统计学差异($P < 0.05$), 酸奶组与纯奶组无统计学差异($P > 0.05$). SOD含量比较, 酸奶组与纯奶组有统计学差异($P < 0.01$), 酸奶组与生理盐水组无统计学差异($P > 0.05$, 表1, 图4).

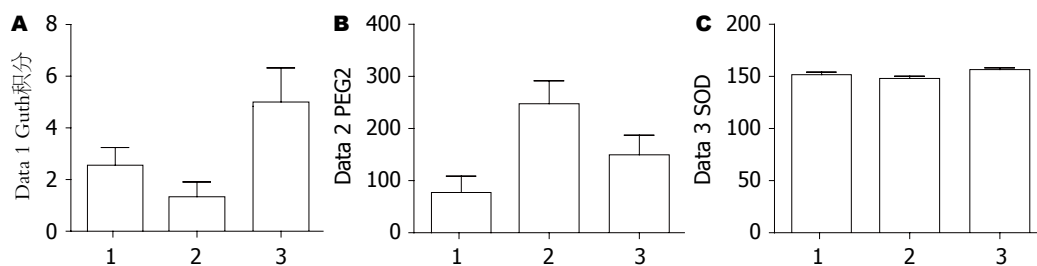


图 4 Guth积分法统计大鼠胃黏膜点状, 线状糜烂及出血. 1: 生理盐水组; 2: 酸奶组; 3: 纯奶组; A: Guth积分; B: PEG2; C: SOD.

■创新盘点

本实验选用了比较系统的评定指标, 包括从肉眼观察, 组织病理学分析到免疫组织化学分析, 能够从微观到宏观的了解小鼠胃溃疡的变化情况。

表 1 免疫组织化学各值的统计 (mean ± SD)

分组	Guth积分	PEG2	SOD含量
生理盐水组	2.86 ± 0.766	79.52 ± 31.74	153.20 ± 2.60
酸奶组	1.33 ± 0.577	248.60 ± 43.73	148.10 ± 2.18
纯奶组	5.00 ± 1.323	173.80 ± 35.97	156.60 ± 1.66

3 讨论

现代医学表明, 胃酸和胃蛋白酶自身消化作用、幽门螺杆菌感染、服用非甾体抗炎药之外, 还可以由情绪波动、过度劳累、饮食失调、吸烟、酗酒等因素引起胃溃疡^[19,20]。

胃溃疡患者喝酸奶到底有益还是有害, 一直众说纷纭。有人认为酸奶含有益生菌群有利于肠道环境的改善^[21,22], 促进溃疡愈合^[10], 也有人认为导致溃疡的一个重要原因就是胃酸分泌过多^[3], 而酸奶含大量乳酸, 会加重溃疡进程。

本实验设置纯奶组、生理盐水组两对照组, 对比观察酸奶对胃溃疡大鼠模型愈合情况的影响。胃黏膜受损以后, 上皮细胞产生和分泌PEG2, PEG2有促进胃黏膜屏障修复的功能^[23], 扩张血管, 改善黏膜的血流供应, 故能维持黏膜细胞的氧气供给^[24], 同时能清除和缓冲进入黏膜的H⁺, 保护胃黏膜^[25,26], 因此本实验中选取PEG2评价酸奶对胃溃疡的修复作用。实验结果显示, 酸奶组PEG2含量明显高于生理盐水组, 说明酸奶有利于胃黏膜损伤后PEG2的产生和释放, 促进溃疡愈合。

SOD含量与胃组织内超氧化物的含量有关^[27], 氧自由基越多, SOD含量越多, 说明胃黏膜损伤因素越多^[28,29]。酸奶组的SOD含量明显低于纯奶组, 说明酸奶可能减少组织中的氧自由基, 对胃黏膜的修复有积极作用^[30]。

本实验双盲法测定的Guth积分表明酸奶组的胃溃疡Guth积分小于纯奶组, 表明酸奶组的溃疡面积较小。组织病理学观察发现酸奶组腺体结构完整, 胃黏膜损伤较轻, 而纯奶组胃黏膜

上皮细胞有脱落, 黏膜下大面积充血。可见, 酸奶对胃黏膜的保护作用明显, 能明显的促进溃疡面的愈合, 保护黏膜上皮结构, 减轻炎症反应和充血。

通过该实验可以解决酸奶对胃溃疡有益还是有害的争议, 初步证实了酸奶能通过促进上皮细胞产生和分泌PEG2以促进胃黏膜保护屏障的形成, 以及通过减少组织中的氧自由基, 促进胃溃疡的愈合。

4 参考文献

- 魏以召, 张燕, 杨拯, 孟玲, 张晓. 消化性溃疡相关基因研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1548-1553
- 梅杰, 李芳, 陈建敏, 张晓, 杨拯. 胃黏膜屏障与胃溃疡的研究进展. 实用医学杂志 2009; 25: 841-843
- 陆再英, 钟南山. 内科学. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 387-395
- Izzotti A, Durando P, Ansaldi F, Gianiorio F, Pulliero A. Interaction between *Helicobacter pylori*, diet, and genetic polymorphisms as related to non-cancer diseases. *Mutat Res* 2009; 667: 142-157
- Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 63-96
- Zullo A, Hassan C, Campo SM, Morini S. Bleeding peptic ulcer in the elderly: risk factors and prevention strategies. *Drugs Aging* 2007; 24: 815-828
- 王恩华, 邱雪杉, 文继舫. 病理学. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 2008: 204-215
- 魏房, 孙威, 王强, 刘丽, 任庆华. HIF-1α与iNOS、COX-2在胃癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3900-3903
- 翟伟宇, 刘伯阳, 王惠艳. 双歧杆菌多元蛋白酸奶的免疫调节和抑瘤作用的研究. 中国微生态学杂志 2003; 15: 15-16
- 刘伯阳, 姚淑娟, 刘吉成. 青春双歧杆菌双元蛋白酸奶对肠道的保护作用. 中国临床康复 2005; 9: 41-43
- 冉冉, 王世平, 刘慧. 藏灵菇源酸奶复合菌发酵剂对大鼠降胆固醇的研究. 营养学报 2009; 31: 59-62
- 卢文丽, 方肇勤, 侯俐, 潘志强, 刘小美. 常见胃溃疡模型小鼠胃组织病理变化及差异. 中华中医药学刊 2008; 26: 551-555
- 王晓洁, 杨立红, 梁建光. 小鼠实验性胃溃疡病理变化评定标准的量化. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1709-1712
- 吴娟, 田德禄. 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证胃黏膜G、D细胞变化及胃泌素、生长抑素的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3840-3843
- Galiñanes M, Ferrari R, Qiu Y, Cargnoni A,

■同行评价

本文是前瞻性实验性研究, 立题重点明确, 研究内容集中, 实验材料与方法规范, 结果可信, 观点明确, 有一定的先进性, 对临床消化性溃疡的防治有参考意义。

- Ezrin A, Hearse DJ. PEG-SOD and myocardial antioxidant status during ischaemia and reperfusion: dose-response studies in the isolated blood perfused rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 1021-1030
- 16 Al-Howiriny T, Al-Sohaibani M, Al-Said M, Al-Yahya M, El-Tahir K, Rafatullah S. Effect of Commiphora opobalsamum (L.) Engl. (Balessan) on experimental gastric ulcers and secretion in rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 98: 287-294
- 17 俞慧宏, 吴小翎, 张苜, 宁波. 测定胃癌患者肿瘤组织与外周血中前列腺素E2的临床意义. 第三军医大学学报 2008; 30: 445-446
- 18 廖书胜, 周勇杰, 戴幸平, 蒋荣鑫. 健胃愈疡颗粒剂对大鼠胃溃疡模型溃疡愈合及胃组织IL-1 β 蛋白表达的影响. 现代生物医学进展 2008; 8: 1415-1418
- 19 Delatore J, Boylan JJ. Bleeding gastric ulcer: a complication from gastrostomy tube replacement. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 482-484
- 20 杜秀芳, 杨拯, 孟玲, 张晓. 应激性胃溃疡的治疗研究进展. 现代预防医学 2008; 35: 3858-3862
- 21 杨俊, 张中伟, 秦环龙. 乳酸菌对肠上皮细胞侵袭性大肠杆菌损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3394-3399
- 22 沈通一, 秦环龙. 乳酸杆菌对肠上皮黏附机制研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2631-2636
- 23 陈主初. 病理生理学. 第1版. 北京: 高等教育出版社, 2005: 318-319
- 24 蔺武, 刘心娟, 吴静, 林香春, 魏南, 姜国俊. 胃癌组织中前列腺素E2受体的表达及意义. 山东医药 2009; 49: 71-72
- 25 胡义亭, 甄承恩, 邢国章, 张曼利, 张建生, 王鼎鑫, 卢亚敏. 消化性溃疡患者转化生长因子 α 、表皮生长因子和前列腺素E2的关系. 世界华人消化杂志 2002; 10: 43-47
- 26 张彬, 周业江. 环氧化酶-2在胃癌中的研究进展. 实用医学杂志 2009; 25: 4077-4078
- 27 张炎, 刘刚, 王育红, 陈学东. 肿瘤坏死因子- α 、白介素-6、丙二醛、超氧化物歧化酶在大鼠腹腔海水浸泡伤中的表达. 实用医学杂志 2009; 25: 3764-3766
- 28 陈刚领, 郑建普, 李亚娟, 卞卡. H₂O₂氧化损伤血管内皮模型的构建及超氧化物歧化酶对损伤的逆转作用. 中国药理学通报 2009; 25: 884-887
- 29 孙丽慧, 冯化杰. 大鼠乙酸胃溃疡修复过程中SOD、GSH-P活性的研究. 齐齐哈尔医学院学报 1999; 20: 201-202
- 30 Reddi AR, Jensen LT, Naranuntarat A, Rosenfeld L, Leung E, Shah R, Culotta VC. The overlapping roles of manganese and Cu/Zn SOD in oxidative stress protection. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 154-162

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; 101 \leq 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿拉伯数字不移行!

MAPK/ERK信号通路在胃癌细胞来源的外来体诱导Jurkat T细胞凋亡中的作用

曲晶磊, 赵明芳, 曲秀娟, 侯科佐, 姜又红, 杨向红, 刘云鹏

曲晶磊, 赵明芳, 曲秀娟, 侯科佐, 刘云鹏, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科 辽宁省沈阳市 110001

姜又红, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所 辽宁省沈阳市 110001

杨向红, 中国医科大学附属盛京医院病理科 辽宁省沈阳市 110004

曲晶磊, 讲师, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究.

辽宁省教育厅实验室基金资助项目, No. 2008S246

作者贡献分布: 此课题由曲晶磊、刘云鹏、姜又红及杨向红设计; 研究过程由曲晶磊、赵明芳、曲秀娟及侯科佐完成; 数据分析及论文写作由曲晶磊与刘云鹏完成.

通讯作者: 刘云鹏, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肿瘤内科. cmuliuyunpeng@yahoo.cn
电话: 024-83282312

收稿日期: 2010-03-21 修回日期: 2010-05-19

接受日期: 2010-05-25 在线出版日期: 2010-07-08

Role of MAPK/ERK signaling pathway in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells

Jing-Lei Qu, Ming-Fang Zhao, Xiu-Juan Qu, Ke-Zuo Hou, You-Hong Jiang, Xiang-Hong Yang, Yun-Peng Liu

Jing-Lei Qu, Ming-Fang Zhao, Xiu-Juan Qu, Ke-Zuo Hou, Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

You-Hong Jiang, Institute of Cancer Research, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Xiang-Hong Yang, Department of Pathology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Laboratory Foundation of Education Department of Liaoning Province, No. 2008S246

Correspondence to: Professor Yun-Peng Liu, Department of Medical Oncology, the First Hospital of China Medical University, 155 North Nanjing Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. cmuliuyunpeng@yahoo.cn

Received: 2010-03-21 Revised: 2010-05-19

Accepted: 2010-05-25 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To investigate the role of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling pathway in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells.

METHODS: Gastric cancer exosomes were isolated and purified by serial centrifugation and sucrose gradient ultracentrifugation. The morphology of gastric cancer exosomes was observed by electron microscopy. Cell apoptosis was determined by propidium iodide staining and flow cytometry. The expression of caspase-3 and -8 and p-ERK was assayed by Western blot.

RESULTS: Gastric cancer exosomes, ranging in diameter from 30 to 100 nm, had a characteristic saucer-like shape that was limited by a lipid bilayer. These exosomes induced Jurkat T cell apoptosis in a time- and dose-dependent manner. Activation of caspase-3 and -8 and down-regulation of p-ERK expression were noted in exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells.

CONCLUSION: Gastric cancer exosomes induce apoptosis of Jurkat T cells possibly by inhibiting the MAPK/ERK pathway.

Key Words: Exosome; Apoptosis; MAPK/ERK pathway; Gastric cancer

Qu JL, Zhao MF, Qu XJ, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP. Role of MAPK/ERK signaling pathway in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 1969-1973

摘要

目的: 研究胃癌细胞来源的外来体对Jurkat T细胞凋亡的影响, 初步探讨MAPK/ERK通路在此过程中的作用.

方法: 采用离心超滤和蔗糖密度梯度超速离心的方法从胃癌SGC7901细胞的上清液中分离出胃癌细胞来源的外来体. 透射电子显微镜下观察外来体形态, 流式细胞仪PI染色检测细胞凋亡, Western blot检测蛋白表达.

结果: 透射电子显微镜下观察胃癌SGC7901细胞来源的外来体具有特征性的盘状结构, 由双层膜构成, 他们的直径为30-100 nm. 外来体能以时间和剂量依赖性的方式诱导Jurkat T细胞

■背景资料

肿瘤能在人体内发生并长期生存, 是由于肿瘤细胞在长期的生长过程中形成了多重免疫逃逸机制, 使机体的免疫系统无法对肿瘤细胞进行识别和杀伤. 最近研究表明肿瘤细胞分泌的exosomes能抑制T细胞和NK细胞的功能, 诱导免疫耐受. 本课题组之前的研究显示肿瘤来源的exosomes能诱导Jurkat T细胞凋亡, 在凋亡过程中伴随有PI3K/Akt通路的失活, 但MAPK/ERK信号通路在此过程中的作用不清楚.

■同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院消化内科

■研究前沿

最近研究发现很多类型的细胞都能释放exosomes, 但是大多数研究集中在免疫细胞和肿瘤细胞释放的exosomes.

凋亡, 在凋亡过程中伴有caspase-3, 8的活化和p-ERK表达的下调.

结论: 胃癌细胞来源的外来体能诱导Jurkat T细胞凋亡, 其机制可能与抑制MAPK/ERK通路的活性有关.

关键词: 外来体; 凋亡; MAPK/ERK通路; 胃癌

曲磊磊, 赵明芳, 曲秀娟, 侯科佐, 姜又红, 杨向红, 刘云鹏. MAPK/ERK信号通路在胃癌细胞来源的外来体诱导Jurkat T细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 1969-1973
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1969.asp>

0 引言

肿瘤能在人体内发生并长期生存, 是由于肿瘤细胞在长期的生长过程中形成了多重免疫逃逸机制, 使机体的免疫系统无法对肿瘤细胞进行识别和杀伤. 最近研究表明肿瘤细胞分泌的exosomes能抑制T细胞和NK细胞的功能, 诱导免疫耐受^[1,2]. 本课题组之前的研究显示肿瘤来源的exosomes能诱导Jurkat T细胞凋亡, 在凋亡过程中伴随有PI3K/Akt通路的失活^[3], 但MAPK/ERK信号通路在此过程中的作用不清楚. 本研究分离纯化了胃癌SGC7901细胞来源的exosomes, 评价了MAPK/ERK信号通路在胃癌细胞来源的exosomes诱导Jurkat T细胞凋亡中的作用, 为进一步阐明exosomes诱导肿瘤免疫逃避和免疫耐受的机制提供了理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基购自Gibco公司, 胎牛血清购自天津血液病研究所. 100 kDa MWCO Amicon超滤管购自美国Millipore公司, 重水购自美国Sigma公司. 兔抗人caspase-3抗体购自Santa Cruz公司, 兔抗人caspase-8抗体购自Lab Vision公司, 鼠抗人Tubulin抗体购自BD Biosciences Pharmingen公司, 兔抗人p-ERK和ERK抗体购自Cell Signaling公司. 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司, ECL试剂盒购自PIERCE公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人低分化胃腺癌细胞株SGC7901和Jurkat T细胞为本实验室常规传代培养, 生长于含有100 mL/L灭活胎牛血清、12 kU/L庆大霉素的RPMI 1640培养液中, 于37 °C、50 mL/L CO₂、饱和湿度的培养箱内培养, 0.25%胰酶消化液消化传代, 2-3 d传代1次. 所有实验均采用对数生长

期细胞. 血清来源的exosomes的去除采用两步法分离, 即10 000 g×30 min, 100 000 g×1 h.

1.2.2 exosomes的制备: 胃癌SGC7901细胞培养48 h后收集细胞上清液用于exosomes的制备. 首先, 收集的上清液通过一系列离心去除细胞及碎片: 4 °C, 300 g×10 min、1 200 g×30 min、10 000 g×30 min. 然后将上清液移入100 kDa MWCO Amicon 50 mL超滤离心管中, 4 °C离心, 1 000 g×30 min, 取浓缩液. 将超滤后液体移至含有30%蔗糖/重水垫的15 mL超速离心管中, 4 °C 100 000 g超速离心1 h. 收集底部含有exosomes的缓冲垫, 用至少5倍体积的PBS稀释后, 置于100 kDa MWCO Amicon超滤离心管中, 4 °C 1 000 g离心30 min, 重复3次. 得到的浓缩液即为exosomes, 0.22 μm滤膜过滤除菌, 用Bardford法检测蛋白浓度, 分装备用, -80 °C保存.

1.2.3 电镜: 将exosomes超速离心成沉淀后, 经固定液(2%多聚甲醛, 0.25%戊二醛)4 °C固定1 h, PBS洗涤3次(15分/次), 1%锇酸固定1.5 h, PBS洗涤3次(15分/次), 梯度酒精脱水, 环氧树脂浸透过夜、包埋, 于35 °C、45 °C、60 °C聚合24 h, 经超薄切片、铅铀染色后透射电镜下观察摄片.

1.2.4 细胞凋亡的检测: 取对数生长期的Jurkat T细胞, 将细胞浓度调至3×10⁵/mL接种于6孔板, 分别加入终浓度为0、25、100和400 mg/L的exosomes培养24和48 h后收集细胞于流式管中, 冷PBS洗2次, 用70%的冷乙醇4 °C固定过夜后, 冷PBS洗2次, 加入RNase A(20 mg/L)37 °C孵育30 min后, 加入PI(20 mg/L)避光孵育30 min, 用FACScan流式细胞仪进行DNA含量检测, 判定凋亡百分率.

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达: 分别收集对照组及处理组细胞, 将其裂解于200 μL含有蛋白酶抑制剂(100 mg/L PMSF, 2 mg/L Aprotinin)的裂解液中[1% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄], 4 °C裂解40 min, 15 000 r/min离心20 min, 取上清, 用Bardford法进行蛋白定量. 与3×样品缓冲液混合后, 煮沸5 min. 将样品在10%的SDS-聚丙烯酰胺中进行电泳3 h, 然后转印至硝酸纤维素膜上. 用5%脱脂牛奶封闭1 h后, 分别加入一抗, 4 °C过夜. TTBS洗4次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温作用30 min, ECL法显色, GIS凝胶图像分析系统照相并分析处理.

统计学处理 所有数据均为3次独立实验结

果, 以mean±SD表示. 采用SPSS13.0统计软件进行统计学分析. 两组之间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 exosomes的形态观察 通过离心超滤和蔗糖密度梯度离心, 我们从胃癌SGC7901细胞的上清液中分离出肿瘤来源的exosomes, 然后通过透射电子显微镜对其形态进行了观察. 如图1所示: exosomes具有特征性的盘状结构, 由双层膜构成, 他们的直径为30-100 nm.

2.2 胃癌细胞来源的exosomes诱导Jurkat T细胞凋亡 流式细胞仪分析显示不同浓度的exosomes作用于Jurkat T细胞24和48 h后, exosomes以时间和剂量依赖性的方式诱导Jurkat T细胞凋亡. 400 mg/L的exosomes作用于Jurkat T细胞48 h后, 有34.61%的细胞发生了凋亡, 而对照组仅有2.72%的细胞发生凋亡($P<0.01$, 图2).

2.3 exosomes对Jurkat T细胞凋亡相关蛋白表达的影响 400 mg/L的exosomes分别作用于Jurkat T细胞24和48 h, Western blot结果显示, exosomes作用24 h能检测出裂解的caspase-3和caspase-8片段, 48 h时更明显(图3).

2.4 exosomes下调p-ERK的表达 由于MAPK/ERK通路在细胞增殖和凋亡方面的发挥着重要的作用, 我们进一步检测了ERK的活性, Western blot结果显示exosomes以时间依赖性的方式下调p-ERK的表达(图4).

3 讨论

exosomes是由细胞分泌至胞外的膜性小囊泡, 表面含有大量与其来源和功能密切相关的蛋白质和脂质成分^[4,5]. 最近研究发现很多类型的细胞都能释放exosomes, 但是大多数研究集中在免疫细胞和肿瘤细胞释放的exosomes. 由于树突状细胞和肿瘤细胞来源的exosomes可同时表达MHC、共刺激分子、热休克蛋白和肿瘤抗原, 体内和体外实验证明其能诱发和增强机体的免疫反应, 具有抗肿瘤作用^[6,7], 因此exosomes作为一种新型的亚细胞疫苗被广泛研究. 但近年来也有研究表明肿瘤来源exosomes在特定的环境中也能下调免疫应答或诱导免疫耐受, 这给exosomes的研究提出了新的挑战. 目前越来越多的证据表明exosomes在体内发挥免疫增强作用依赖宿主的树突状细胞^[8], exosomes和免疫细胞的直接作用通常表现为免疫抑制. Taylor和Gercel-Talor报道, 卵巢癌来源

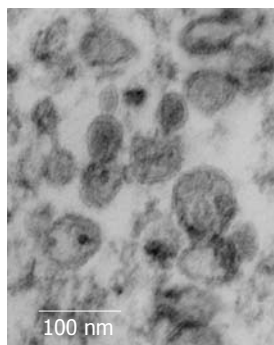


图1 胃癌SGC7901细胞来源的exosomes的电镜下形态.

■相关报道

目前多数学者认为肿瘤来源的exosomes诱导免疫耐受与其表面表达FasL和TRAIL有关, 其可能通过与T细胞表面的死亡受体结合而诱导细胞凋亡.

的exosomes抑制T细胞活化的信号分子CD3- ζ 和JAK 3的表达, 从而诱导T细胞凋亡^[9]. 另外一项研究结果显示exosomes能选择性破坏淋巴瘤对IL-2的反应^[10].

基于上述研究结果, 我们以胃癌SGC7901细胞为模型, 研究了肿瘤来源的exosomes对Jurkat T细胞活性的影响. 结果显示, 胃癌细胞来源的exosomes能以时间和剂量依赖性的方式诱导Jurkat T细胞凋亡, 且在凋亡过程中存在caspase-3和caspase-8的活化. 目前多数学者认为肿瘤来源的exosomes诱导免疫耐受与其表面表达FasL和TRAIL有关^[11,12], 其可能通过与T细胞表面的死亡受体结合而诱导细胞凋亡. 我们的研究发现exosomes在诱导Jurkat T细胞凋亡过程中激活了caspase-8, 提示exosomes通过死亡受体通路诱导细胞凋亡.

细胞的存活主要取决于增殖和凋亡信号的平衡. MAPK/ERK信号转导通路是细胞内重要的促增殖和抗凋亡通路, 通过影响下游细胞周期调节蛋白、凋亡相关蛋白等效应分子的活性, 在细胞的增殖、分化和凋亡中起着重要作用^[13,14]. 本研究发现胃癌细胞来源的exosomes在诱导Jurkat T细胞凋亡过程中伴随有p-ERK表达的下调, 提示exosomes可能过下调ERK的活性而发挥促凋亡作用. 我们之前的研究显示胃癌细胞来源的exosomes在诱导Jurkat T细胞凋亡过程上调了泛素连接酶Cbl蛋白的表达, 并通过泛素化PI3K启动蛋白酶体降解途径, 进而抑制Akt的活性, 最终导致细胞凋亡的发生^[3]. 而近来研究表明, Cbl蛋白也能调控MAPK/ERK通路的活性. Zha等报道转染Cbl显性失活突变体的CD4⁺ T细胞, 能增强抗CD3/CD28诱导的p-ERK的表达^[15]. 这些结果提示在exosomes诱导Jurkat T细胞凋亡过程中, ERK可能是Cbl蛋白作用的另一靶分子.

总之, 本研究结果显示胃癌细胞能通过释放exosomes呈递凋亡信号给抗肿瘤的T细胞, 而不需要细胞与细胞间的直接接触. 研究首次报

同行评价

本文有先进性和科学性,对揭示肿瘤免疫机制有一定帮助。

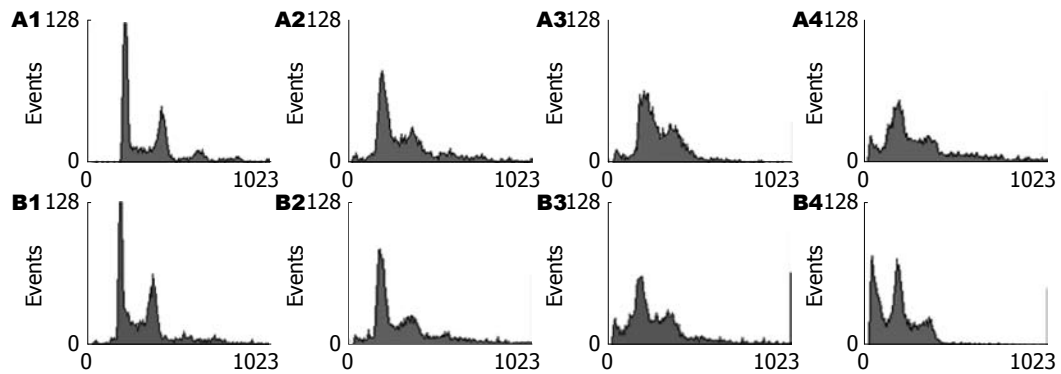


图 2 不同浓度SGC7901细胞来源的exosomes对Jurkat T细胞凋亡的影响. A: 24 h; B: 48 h; 1: 对照组; 2: 25 mg/L; 3: 100 mg/L; 4: 400 mg/L.

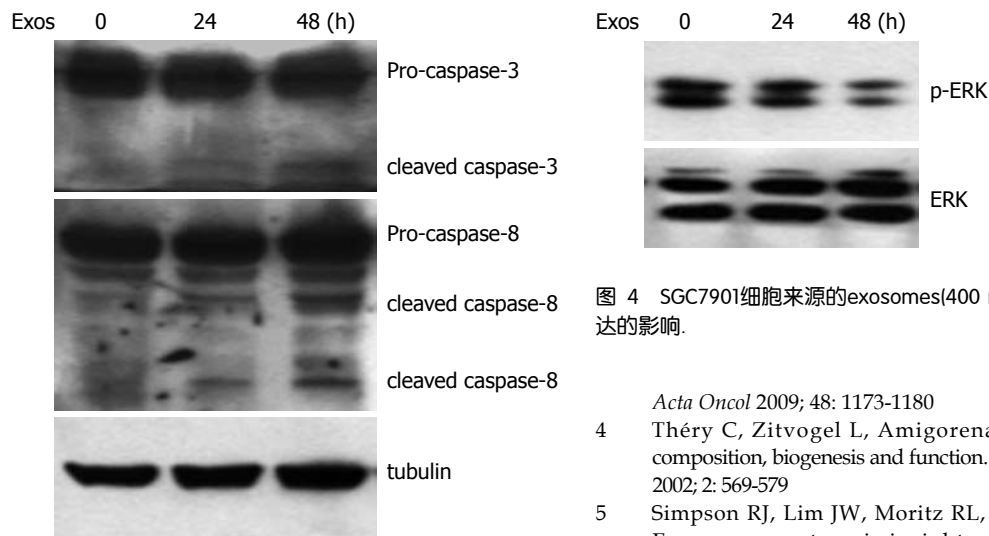


图 3 SGC7901细胞来源的exosomes对caspase-3和caspase-8活化的影响。

道了胃癌细胞来源的exosomes在诱导Jurkat T细胞凋亡过程中伴随有ERK活性的下调,提示MAPK/ERK通路的失活可能是exosomes诱导免疫耐受的一种机制. 进一步研究exosomes和免疫细胞相互作用的分子机制能为我们更好地理解肿瘤免疫抑制的机制提供新的思路。

参考文献

- Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ* 2008; 15: 80-88
- Ashiru O, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res* 2010; 70: 481-489
- Qu JL, Qu XJ, Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, Teng YE, Zhang Y, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP. The role of cbl family of ubiquitin ligases in gastric cancer exosome-induced apoptosis of Jurkat T cells.

图 4 SGC7901细胞来源的exosomes(400 mg/L)对p-ERK表达的影响。

- Acta Oncol* 2009; 48: 1173-1180
- Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 569-579
- Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009; 6: 267-283
- 罗治彬, 徐采朴, 王东, 王阁, 肖世全, 朱高友, 房殿春. 致敏树突细胞及其亚细胞成分对荷胃癌小鼠的免疫治疗作用研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 9-12
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001; 7: 297-303
- Zeelenberg IS, Ostrowski M, Krumeich S, Bobrie A, Jancic C, Boissonnas A, Delcayre A, Le Pecq JB, Combadière B, Amigorena S, Théry C. Targeting tumor antigens to secreted membrane vesicles in vivo induces efficient antitumor immune responses. *Cancer Res* 2008; 68: 1228-1235
- Taylor DD, Gerçel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer* 2005; 92: 305-311
- Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res* 2007; 67: 7458-7466
- Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregini E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005; 128: 1796-1804
- Abusamra AJ, Zhong Z, Zheng X, Li M, Ichim TE,

- Chin JL, Min WP. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 2005; 35: 169-173
- 13 张丰, 李楠. ERK/ MAPK信号传导途径在乳腺肿瘤治疗中的意义. *中国肿瘤生物治疗杂志* 2007; 14: 497-500
- 14 Maemura K, Shiraishi N, Sakagami K, Kawakami K, Inoue T, Murano M, Watanabe M, Otsuki Y. Proliferative effects of gamma-aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 688-696
- 15 Zha Y, Gajewski TF. An adenoviral vector encoding dominant negative Cbl lowers the threshold for T cell activation in post-thymic T cells. *Cell Immunol* 2007; 247: 95-102

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病学杂志	580	28	-0.50	0.415	23	-0.20
G083	心肺血管病杂志	246	37	-0.79	0.361	31	-0.31
G419	心血管病学进展	585	26	-0.49	0.410	25	-0.21
G260	心脏杂志	553	29	-0.52	0.406	26	-0.22
G610	胰腺病学	268	35	-0.77	0.366	30	-0.30
G234	中国动脉硬化杂志	934	15	-0.19	0.557	16	0.07
G267	中国实用内科杂志	2309	7	1.00	0.487	20	-0.06
G211	中国糖尿病杂志	1567	11	0.36	0.570	13	0.10
G380	中国心血管杂志	256	36	-0.78	0.225	37	-0.57
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	657	21	-0.43	0.562	14	0.08
G633	中国血液净化	680	19	-0.41	0.546	18	0.05
G119	中国循环杂志	694	18	-0.40	0.406	26	-0.22
G231	中华肝脏病杂志	3283	4	1.84	1.119	2	1.15
G235	中华高血压杂志	1168	14	0.01	0.730	8	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	166	38	-0.86	0.207	38	-0.60
G876	中华老年心脑血管病杂志	588	24	-0.49	0.442	21	-0.15
G155	中华内分泌代谢杂志	1612	10	0.40	0.897	5	0.73
G156	中华内科杂志	3484	3	2.02	0.788	7	0.52
G161	中华肾脏病杂志	1643	9	0.42	1.068	3	1.05
G285	中华消化内镜杂志	1314	13	0.14	0.578	12	0.11
G168	中华消化杂志	2571	5	1.23	1.025	4	0.97
G892	中华心率失常学杂志	494	30	-0.57	0.657	9	0.26
G170	中华心血管病杂志	4186	2	2.63	1.375	1	1.64
G172	中华血液学杂志	1501	12	0.30	0.489	19	-0.06
	平均值	1154			0.520		

以上数据摘自2009年版《中国科技期刊引证报告》(核心版). 科学技术文献出版社, 177-178.

二甲双胍对AGS胃癌细胞生长侵袭的抑制作用

薛知新, 钟捷, 赵丹瑜, 许慈, 孙萍胡, 姚静静

■背景资料

胃癌是对人类健康危害极大的疾病, 临床上化疗药物效果不佳、不良反应大。近来糖尿病与肿瘤关系的研究逐渐将人们的目光引向降糖药物二甲双胍。二甲双胍的抑制肿瘤作用在部分肿瘤类型少量临床前研究, 但在消化系统尤其胃癌方面尚未见有报道。

薛知新, 钟捷, 赵丹瑜, 许慈, 孙萍胡, 姚静静, 上海交通大学附属瑞金医院消化内科 上海市 200025

薛知新, 上海交通大学附属瑞金医院硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤研究。

作者贡献分布: 此课题由薛知新和钟捷设计; 研究过程由薛知新操作完成; 研究所用新试剂由钟捷、赵丹瑜及姚静静提供, 分析工具由许慈与孙萍胡提供; 数据分析由薛知新完成; 本论文写作由薛知新完成, 钟捷进行批评性审阅。

通讯作者: 钟捷, 教授, 主任医师, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学附属瑞金医院消化内科。

jimmyzj64@medmail.com.cn

电话: 021-64370045

收稿日期: 2010-03-15 修回日期: 2010-05-21

接受日期: 2010-05-25 在线出版日期: 2010-07-08

Metformin inhibits cell proliferation and migration in gastric cancer cell line AGS

Zhi-Xin Xue, Jie Zhong, Dan-Yu Zhao, Ci Xu, Ping-Hu Sun, Jing-Jing Yao

Zhi-Xin Xue, Jie Zhong, Dan-Yu Zhao, Ci Xu, Ping-Hu Sun, Jing-Jing Yao, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Professor Jie Zhong, Department of Gastroenterology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 197 Ruijin Er Road, Shanghai 200025, China. jimmyzj64@medmail.com.cn

Received: 2010-03-15 Revised: 2010-05-21

Accepted: 2010-05-25 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of metformin, a widely used antihyperglycemic agent, on cell proliferation, apoptosis and migration in human gastric cancer cell line AGS, and to examine whether there are synergistic effects between metformin and 5-fluorouracil (5-FU).

METHODS: AGS cells were treated with metformin alone or in combination with 5-FU. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect cell relative viability at 24, 48 and 72 h after treatment. Apoptosis and mitochondrial membrane potential were examined by flow cytometry (FCM) at 48 h. Cell migration at 72 h was determined by scratch assay. The expression of cyclin D1, Bcl-2, MMP-2, MMP-9 and Bax mRNAs in AGS cells at 24 h was detected by RT-PCR.

RESULTS: Metformin significantly inhibited cell proliferation in a dose- and time-dependent manner (24, 48 and 72 h: $F = 99.32, 127.30$ and 235.72 , respectively; all $P < 0.01$). After metformin treatment, mitochondrial membrane potential decreased ($t = 12.43, P < 0.01$), apoptosis rate increased ($t = 8.32, P < 0.01$), and average migration velocity was reduced (12, 24 and 48 h: $t = 9.13, 13.77$ and 14.21 , respectively; all $P < 0.01$) in AGS cells. The expression of cyclin D1, Bcl-2, MMP-2 and MMP-9 mRNAs was down-regulated, while that of Bax mRNA was up-regulated after metformin treatment. Metformin treatment enhanced 5-FU-mediated cell growth inhibition (24 h: $t = 2.97, P < 0.05$; 48 h, $t = 4.61, P < 0.01$; 72 h: $t = 6.02, P < 0.01$).

CONCLUSION: Metformin can inhibit cell proliferation and migration and promote apoptosis in human gastric cancer cell line AGS. Metformin and 5-FU have a synergistic anti-proliferation effect in AGS cells.

Key Words: Gastric neoplasm; Metformin; Proliferation; Migration; Apoptosis; Drug synergism

Xue ZX, Zhong J, Zhao DY, Xu C, Sun PH, Yao JJ. Metformin inhibits cell proliferation and migration in gastric cancer cell line AGS. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 1974-1978

摘要

目的: 研究应用安全性较好的二甲双胍对胃癌细胞的抑制作用, 初步探讨可能机制。

方法: 以二甲双胍联合或不联合5-氟尿嘧啶干预AGS细胞作为实验组, 无药物组作对照。干预24、48、72 h应用MTT检测细胞增殖, 干预48 h流式细胞术检测凋亡、线粒体膜电位, 72 h通过细胞划痕实验反映迁移能力改变, 药物作用24 h抽取细胞RNA以RT-PCR检测相关基因转录改变。

结果: AGS细胞相对活力明显降低(24、48、72 h: $F = 99.32, 127.30, 235.72$, 均 $P < 0.01$), 并具有浓度-时间依赖性, 联合应用5-氟尿嘧啶显示协同作用(24 h: $t = 2.97, P < 0.05$; 48、72 h: $t = 4.61,$

■同行评议者

王振宇, 教授, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

6.02, 均 $P<0.01$). 线粒体膜电位下降($t = 12.43$, $P<0.01$), 凋亡增加($t = 8.32$, $P<0.01$), 平均迁移速率明显减慢(12、24、48 h: $t = 9.13$, 13.77 , 14.21 , 均 $P<0.01$), cyclin D1、Bcl-2、MMP-2、MMP-9 mRNA均减少, Bax增加.

结论: 二甲双胍能够抑制AGS胃癌细胞增殖、迁移, 促进凋亡, 与5-氟尿嘧啶联合应用具有协同抑制作用.

关键词: 胃肿瘤; 二甲双胍; 增殖; 迁移; 细胞凋亡; 药物协同作用

薛知新, 钟捷, 赵丹瑜, 许慈, 孙萍胡, 姚静静. 二甲双胍对AGS胃癌细胞生长侵袭的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 1974-1978
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1974.asp>

0 引言

近年来, 关于药物治疗糖尿病引发肿瘤发生的研究逐渐将人们的目光引向降糖药物二甲双胍^[1,2]. 二甲双胍在乳腺癌、前列腺癌等肿瘤的临床前研究可见报道, 但在消化系尤其胃癌方面, 尚未见有报道^[3,4]. 本研究通过检测二甲双胍干预人AGS胃癌细胞后其生长、凋亡、侵袭能力的改变、相关基因转录以及与化疗药物联合用药的效果, 初步探讨可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 AGS胃癌细胞为上海交通大学瑞金医院内科实验室保存. RPMI 1640培养液、胎牛血清、青霉素、胰酶购自Gibco公司. 二甲双胍、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲亚砜(DMSO)购自Sigma公司. Annexin V-FITC流式细胞凋亡检测试剂盒购自Becton Dickinson公司. TRIzol、逆转录试剂盒购自TaKaRa公司. PCR试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司. PCR引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成. 酶联免疫检测仪为Thermo公司产品. 流式细胞仪为Becton Dickinson公司产品. 凝胶成像系统为BIO-RAD公司产品. 流式细胞术检测结果用CELLQUET软件分析, 细胞划痕实验结果用ImagePro软件分析.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物干预: AGS细胞在37 °C, 50 mL/L CO₂的饱和湿度无菌培养箱常规培养于含100 mL/L胎牛血清, 100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液中. 一定浓度的二甲

双胍在每次实验前即时配制.

1.2.2 相对生存能力分析: 处于对数生长期的细胞以每孔 $8 \times 10^3/200 \mu\text{L}$ 接种于96孔板, 设对照组和实验组, 每组8复孔, 周边余孔以无菌PBS封闭. 培养24 h后, 每孔换以含不同浓度(0、5、10、12.5、17.5、20 mmol/L)二甲双胍的培养基, 其中0 mmol/L组为对照组, 其余均为实验组. 分别继续培养24、48、72 h, 每孔加入5 g/L MTT 20 μL , 37 °C孵育4 h, 弃去液体, 每孔加DMSO 150 μL , 避光振荡20 min使结晶充分溶解. 酶联免疫检测仪570 nm波长测定吸光度(A)值, 以不加细胞的培养基孔调零. 细胞相对存活率 = (实验孔 A_{570} -调零孔 A_{570})/(对照孔 A_{570} -调零孔 A_{570}) $\times 100\%$. 联合用药实验设无药物对照组、单用二甲双胍组、单用5-氟尿嘧啶(40 mg/L)组、两药联合应用组, 以MTT分析.

1.2.3 细胞凋亡及线粒体膜电位检测: 细胞以每孔 $3 \times 10^5/2 \text{ mL}$ 接种于6孔板, 每组设3复孔. 培养24 h后再以二甲双胍作用48 h, 用不含EDTA的0.25%胰酶消化并收集细胞于流式管, 离心弃上清, 每管加结合缓冲液100 μL 重悬, 加Annexin V-FITC 5 μL 避光10 min, 加碘化丙啶, 之后以结合缓冲液补足500 μL , 流式细胞仪检测细胞凋亡. 线粒体膜电位检测方法为将消化所得细胞经PBS洗涤离心, 加10 μL 罗达明-123(10 mg/L), 37 °C避光孵育20 min, PBS洗涤两次, 上流式细胞仪检测.

1.2.4 侵袭能力分析: 细胞划痕实验将细胞以每孔 $2 \times 10^5/2 \text{ mL}$ 接种于6孔板, 每组3复孔, 为提供显微镜下参照, 事先在每孔底部水平方向画5条平行线. 24 h后, 加含或不含二甲双胍完全培养基继续培养72 h, 各组细胞均达到80%-90%融合, 换无血清培养液饥饿过夜使细胞同步化, 以200 μL 移液器枪头在每孔中央纵向划一直线, 无菌PBS轻柔洗涤2次, 加无血清培养基培养. 分别在划痕后0、12、24、48 h显微镜下观察划痕处的细胞生长状况并拍照.

1.2.5 RT-PCR检测相关基因转录: 二甲双胍干预24 h后以TRIzol法提取各组细胞总RNA, 取1 μg 逆转录成cDNA, 进行PCR反应, 控制反应循环数勿使反应进入平台期. 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参. GAPDH引物: 上游: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC, 下游: ATGGTGGTGAAGACGCCAGT; 周期蛋白D1(cyclin D1)引物: 上游: TCTACACCGACAACCTCCATCC, 下游: TGTGAGGCGGTAGTAGGACAG; B

■研发前沿

临床安全性较高的常用药以及食品提取物抗肿瘤作用逐渐受到重视. 二甲双胍作为AMPK的激活剂, 其在肿瘤治疗方面的应用及相关机制逐渐成为研究热点.

■相关报道

AMPK作为细胞能量平衡方面的重要分子, 其参与对肿瘤的调控作用被发现. 可能通过抑制mTOR途径起到抗肿瘤作用.

■创新盘点

本研究将临床上已经广泛使用的降糖药物二甲双胍应用于胃癌细胞,观察对胃癌细胞生长、侵袭的抑制作用,并且探讨了与胃癌常用化疗药物5-氟尿嘧啶的联合用药效果,有望为胃癌治疗提供新的思路。

表 1 AGS细胞经二甲双胍作用后MTT结果 (I_{570} , mean \pm SD)

分组	0 mmol/L	5 mmol/L	10 mmol/L	12.5 mmol/L	17.5 mmol/L	20 mmol/L
24 h	0.80 \pm 0.02	0.72 \pm 0.03 ^b	0.67 \pm 0.02 ^b	0.65 \pm 0.03 ^b	0.60 \pm 0.02 ^b	0.53 \pm 0.01 ^b
48 h	1.01 \pm 0.10	0.81 \pm 0.09 ^b	0.76 \pm 0.04 ^b	0.70 \pm 0.03 ^b	0.63 \pm 0.05 ^b	0.56 \pm 0.07 ^b
72 h	1.50 \pm 0.15	0.85 \pm 0.04 ^b	0.75 \pm 0.05 ^b	0.70 \pm 0.04 ^b	0.63 \pm 0.05 ^b	0.52 \pm 0.03 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表 2 AGS细胞经不同浓度二甲双胍与5-FU联合用药MTT结果 (I_{570} , mean \pm SD)

分组	C	M(10)	F	M(10)+F	M(5)+F	M(15)+F
24 h	0.98 \pm 0.08	0.86 \pm 0.05 ^b	0.93 \pm 0.09	0.80 \pm 0.03 ^c	0.92 \pm 0.10	0.71 \pm 0.07
48 h	1.60 \pm 0.07	1.02 \pm 0.03 ^b	0.99 \pm 0.04	0.84 \pm 0.06 ^d	0.89 \pm 0.05	0.78 \pm 0.03
72 h	2.10 \pm 0.11	1.08 \pm 0.04 ^b	0.83 \pm 0.06	0.54 \pm 0.09 ^d	0.60 \pm 0.07	0.45 \pm 0.11

C: 对照组; F: 5-FU(40 mg/L); M(5): 二甲双胍浓度5 mmol/L; M(10): 二甲双胍浓度10 mmol/L; M(15): 二甲双胍浓度15 mmol/L.

^b $P < 0.01$ vs M(10)+F组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs F组.

表 3 二甲双胍对AGS细胞凋亡影响 (% , mean \pm SD)

分组	早期凋亡	晚期凋亡	总凋亡
对照组	0.18 \pm 0.04	0.05 \pm 0.02	0.23 \pm 0.32
二甲双胍组	6.45 \pm 1.65 ^a	25.56 \pm 7.92 ^b	32.01 \pm 6.62 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)引物: 上游: GATGGCAAATGACCAGCAGA, 下游: GCAGGATAGCAGCACAGGAT; B细胞淋巴瘤/白血病-2相关x蛋白(Bax)引物: 上游AGGATCGAGCAGGGCGAATG, 下游GCTCCCGGAGGAAGTCCAAT; 基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)引物: 上游CCGTCGCCCATCATCAAGTTCC, 下游GCACGAGCAAAGGCATCATCCA; 基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)引物: 上游TCCCTGGAGACCTGAGAACC, 下游CGGCAAGTCTTCCGAGTAGTTT.

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 应用SPSS13.0统计软件, 进行单因素方差分析、 t 检验, 按 $\alpha = 0.05$ 的检验水准, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 二甲双胍能抑制AGS细胞增殖 MTT分析显示, 12、24、48 h对照组吸光度低于实验组, 差异具统计学意义($F = 99.32, 127.30, 235.72$, 均

$P < 0.01$), 提示二甲双胍可以明显抑制AGS细胞生长, 且随药物浓度和作用时间延长抑制效果更加明显. 达到50%抑制率的药物浓度在10 mmol/L左右, 之后实验均在此浓度进行(表1, 图1).

2.2 二甲双胍与5-FU联合用药显示协同效应 实验组中联合用药组比单用二甲双胍组、单用5-FU组抑制增殖作用更加明显, 差异具统计学意义(联合用药组24 h: $t = 3.74$, 48 h: $t = 6.06$, 72 h: $t = 12.94$, 均 $P < 0.01$ vs 单用二甲双胍组; 联合用药组24 h: $t = 2.97$, $P < 0.05$, 48 h: $t = 4.61$, $P < 0.01$, 72 h: $t = 6.02$, $P < 0.01$ vs 单用5-FU组). 不同浓度二甲双胍与5-FU合用, 抑制率具有差异, 尤其较高浓度(15 mmol/L)与较低浓度(5 mmol/L)之间, 但随着时间延长差异逐渐变小(24 h: $F = 10.01$, $P < 0.01$; 48 h: $F = 5.41$, $P < 0.05$; 72 h: $F = 3.40$, $P > 0.05$, 表2).

2.3 二甲双胍促进AGS细胞凋亡, 降低线粒体膜电位 AGS细胞经二甲双胍作用后早期凋亡($t = 6.57$, $P < 0.05$)、晚期凋亡($t = 5.58$, $P < 0.01$)、总凋亡($t = 8.32$, $P < 0.01$)比例均明显上升, 并呈现明显低线粒体膜电位(高荧光强度)状态(380.61 ± 52.25 vs 5.49 ± 0.89 , $t = 12.43$, $P < 0.01$). 提示二甲双胍具有通过影响线粒体膜电位促进AGS胃癌细胞凋亡作用(表3).

2.4 二甲双胍抑制AGS细胞迁移 实验组的12、24、48 h平均迁移速率均明显小于对照组($t = 9.13, 13.77, 14.21$, 均 $P < 0.01$), 对照组48 h后部分视野划痕得到“愈合”(表4, 图2).

2.5 二甲双胍影响相关基因转录 二甲双胍作用

■应用要点

本研究发现胃癌细胞经二甲双胍作用后, 细胞增殖、迁移受到明显抑制, 凋亡增加, 并与5-氟尿嘧啶联合用药能显示协同作用, 在临床上有可能为联合化疗治疗胃癌提供新的补充途径, 降低常用化疗药物剂量, 减轻不良反应.

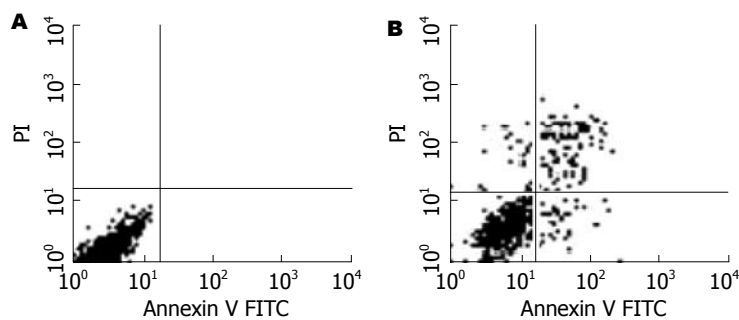


图 1 二甲双胍作用后AGS细胞凋亡的改变. A: 对照组; B: 二甲双胍组.

■名词解释

腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK): 是一种在细胞内行使能量代谢调节的蛋白激酶. 是一种三聚体, 催化亚基 α , 调节亚基 γ , β 亚基为连接 α 与 γ 亚基的桥梁. AMPK在糖尿病及肥胖症等代谢性疾病中发挥重要作用. 近来发现AMPK与衰老、神经系统的能量代谢调控、肿瘤调控等方面也密切相关.

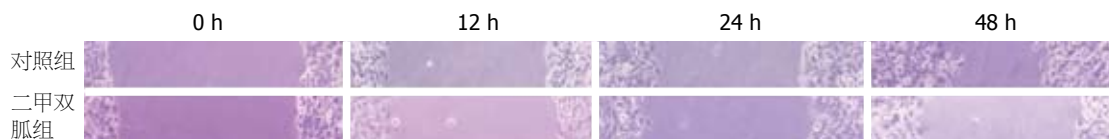


图 2 二甲双胍作用后AGS细胞划痕实验结果.

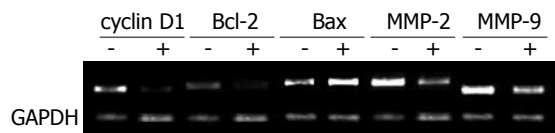


图 3 二甲双胍作用后AGS细胞相关基因RT-PCR结果.

后, 与对照组相比, cyclin D1、Bcl-2、MMP-2、MMP-9的量均明显减少, Bax量增加. 与前述增殖、迁移抑制、促进凋亡结果相符(图3).

3 讨论

细胞恶性增殖、永生化、转移都是肿瘤发生发展中最基本也是不可避免的问题, 二甲双胍是否能对胃癌细胞的这些变化具有抑制作用也成为其抗肿瘤效应的关键. 于是实验从细胞增殖、凋亡、迁移等方面着手设计, 观察药物干预后改变, 并检测相关基因转录的变化以期探索可能作用机制. 从结果来看, AGS胃癌细胞经二甲双胍作用后, 细胞增殖、迁移受到明显抑制, 凋亡增加. RT-PCR检测的5个相关基因中, cyclin D1是细胞周期调控中的重要分子, 结果显示其量减少, 使得细胞不能进行有效增殖^[5]. 这与Ben等^[4]的研究发现相符. Bcl-2基因家族与细胞凋亡密切相关, 家族成员中包括对凋亡有抑制作用的比如Bcl-2, 也有促进凋亡的比如Bax. 本实验中Bcl-2减少, 而Bax增加, 两种变化均指向了促进细胞凋亡进行的方向. 另外, 肿瘤转移也是影响肿瘤预后的极大因素, 80%-90%的胃癌患者发现有转移^[6]. MMP家族中的MMP-2、MMP-9是肿瘤发生转移非常关键的分子^[7]. 二甲双胍下调了MMP-2、MMP-9, 从而有效地抑制了细胞迁移. 除此之外, 胃癌是临床上治疗相当

表 4 二甲双胍对AGS细胞平均迁移速率影响

	对照组	二甲双胍组
平均距离(μm)		
0 h	2 104.07 \pm 107.88	2 431.81 \pm 239.32
12 h	1 815.42 \pm 94.21	2 322.44 \pm 217.42
24 h	1 445.28 \pm 94.22	2 249.05 \pm 220.56
48 h	1 138.36 \pm 122.00	2 047.03 \pm 173.08
平均速率($\mu\text{m/s}$)		
12 h	6.68 \pm 0.60	2.53 \pm 0.51 ^b
24 h	6.47 \pm 0.50	2.12 \pm 0.23 ^b
48 h	5.59 \pm 0.10	2.23 \pm 0.40 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

棘手的一种疾病, 因为其不仅对一般化疗药物不敏感, 并且胃癌常用化疗药物如5-FU不良反应相当严重. 二甲双胍作为一种临床广泛应用的安全药物, 如果能增强胃癌细胞对常用化疗药物敏感性, 将提供一个潜在的新治疗途径. 于是本实验联合应用5-FU与二甲双胍, 结果显示具有协同作用, 为临床联合用药治疗胃癌拓展了一条可参考的思路.

近来, 临床常用药以及食品提取物抗肿瘤作用逐渐受到重视^[8,9]. 二甲双胍作为安全有效的降糖药物, 其降血糖机制被认为与激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)有关^[10,11]. AMPK虽是细胞能量平衡方面的重要分子, 但最近研究发现他还参与对肿瘤细胞的调控^[12-14]. AMPK能够磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR), 并通过mTOR下游分子使cyclin D1、MMP-9等与肿瘤发生、发展相关的分子表达增加^[15,16]. 作

■同行评价

本研究设计尚可, 内容新颖, 有一定参考价值.

为AMPK的激活剂, 二甲双胍的抗肿瘤效应已被少量研究证实, 比如Zakikhani等^[17]和Dowling等^[18]分别证明二甲双胍能抑制乳腺癌细胞生长, Jiralerspong等^[19]发现二甲双胍能提高糖尿病乳腺癌患者对新辅助化疗的反应性. 这些研究主要局限于乳腺癌等肿瘤类型, 对于消化系统肿瘤研究较少. 本实验用二甲双胍干预AGS胃癌细胞, 试图探究安全、经济的临床常用药物二甲双胍能否为胃癌这类对化疗普遍不敏感的实体性消化系统肿瘤提供新的治疗可能性.

二甲双胍应用于AGS胃癌细胞能够发挥抗肿瘤效应, 并且作为一种安全性较好的药物, 很值得进一步探索在肿瘤治疗方面的应用, 期待更多深入的基础及临床研究, 为胃癌以至其他肿瘤治疗开辟更安全有效的途径^[20].

4 参考文献

- Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 137: 482-488
- Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. *Diabetes Care* 2006; 29: 254-258
- Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE, Thor AD. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* 2009; 8: 909-915
- Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 2008; 27: 3576-3586
- Moghaddam SJ, Haghighi EN, Samiee S, Shahid N, Keramati AR, Dadgar S, Zali MR. Immunohistochemical analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 588-593
- Kunisaki C, Makino H, Akiyama H, Otsuka Y, Ono HA, Kosaka T, Takagawa R, Nagahori Y, Takahashi M, Kito F, Shimada H. Clinical significance of the metastatic lymph-node ratio in early gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 542-549
- de Mingo M, Morán A, Sánchez-Pernaute A, Iniesta P, Díez-Valladares L, Pérez-Aguirre E, de Juan C, García-Aranda C, Díaz-López A, García-Botella A, Martín-Antona E, Benito M, Torres A, Balibrea JL. Expression of MMP-9 and TIMP-1 as prognostic markers in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 315-319
- Johnson JJ, Bailey HH, Mukhtar H. Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective. *Phytomedicine* 2010; 17: 3-13
- Nakamura Y, Yogosawa S, Izutani Y, Watanabe H, Otsuji E, Sakai T. A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Mol Cancer* 2009; 8: 100
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001; 108: 1167-1174
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005; 310: 1642-1646
- Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 774-785
- Hadad SM, Fleming S, Thompson AM. Targeting AMPK: a new therapeutic opportunity in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 67: 1-7
- Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 563-575
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 2003; 17: 1829-1834
- Graff JR, Zimmer SG. Translational control and metastatic progression: enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 265-273
- Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 10269-10273
- Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 10804-10812
- Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam P, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3297-3302
- Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V. Metformin in breast cancer: time for action. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3271-3273

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

牛磺熊去氧胆酸抑制四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化

王丹, 杨玲, 黄金明, 王保永, 李靓, 钱伟, 叶进, 侯晓华

王丹, 杨玲, 黄金明, 王保永, 李靓, 钱伟, 叶进, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

王丹, 硕士, 主要从事慢性肝病防治研究。

作者贡献分布: 此课题由杨玲、叶进及侯晓华设计; 研究过程由王丹、黄金明、王保永、李靓及钱伟操作完成; 研究所用试剂及分析工具由杨玲提供; 数据分析由王丹与黄金明完成; 本论文写作由王丹完成; 杨玲与叶进指导。

通讯作者: 叶进, 教授, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科。

yejin8688@sina.com

电话: 027-85726381 传真: 027-85726086

收稿日期: 2010-01-12 修回日期: 2010-05-17

接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-07-08

Tauroursodeoxycholic acid inhibits carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats

Dan Wang, Ling Yang, Jin-Ming Huang, Bao-Yong Wang, Liang Li, Wei Qian, Jin Ye, Xiao-Hua Hou

Dan Wang, Ling Yang, Jin-Ming Huang, Bao-Yong Wang, Liang Li, Wei Qian, Jin Ye, Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430020, Hubei Province, China

Correspondence to: Professor Jin Ye, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430020, Hubei Province, China. yejin8688@sina.com

Received: 2010-01-12 Revised: 2010-05-17

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To determine the inhibitory effects of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats.

METHODS: A total of 75 healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: normal control group, model group, low-dose TUDCA group, high-dose TUDCA group and pentoxifylline (PTX) group. Hepatic fibrosis was induced in rats by hypodermic injection of carbon tetrachloride (40%). The low- and high-dose TUDCA groups were orally administered TUDCA at doses of 50 and 100 mg/(kg·d), respectively. The PTX group was orally administered PTX at a dose of 16 mg/(kg·d). The treatment lasted 8 wk for all the groups. Hematoxylin and eosin staining

and Masson's trichrome staining of liver tissue was performed for histopathological evaluation of liver fibrosis. Serum parameters of liver fibrosis were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in liver tissue was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with the model group, the levels of serum hyaluronic acid (HA), laminin (LN) and type IV collagen (IV-C) significantly decreased in the low- and high-dose TUDCA groups and the PTX group (HA: 146.33 ± 35.13 , 162.2 ± 24.80 and 137.14 ± 22.24 vs 252.83 ± 51.94 ; LN: 77.20 ± 11.84 , 66.80 ± 16.78 and 82.00 ± 10.74 vs 108.00 ± 30.00 ; IV-C: 14.14 ± 2.59 , 12.60 ± 3.17 and 10.09 ± 2.22 vs 25.08 ± 5.93 , all $P < 0.05$). Compared with the model group and normal control group, fibrous septa became thinner and even disappeared, and the number of diffuse cirrhotic nodules and the area of collagen fiber decreased in the TUDCA and PTX intervention groups (all $P < 0.05$). The expression intensity of TGF- β 1 and α -SMA proteins was significantly lower in the TUDCA and PTX intervention groups than in the model group (all $P < 0.05$), but showed no significant difference between the TUDCA and PTX treatment groups.

CONCLUSION: TUDCA can prevent carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by reducing TGF- β 1 synthesis, inhibiting hepatic stellate cell activation and decreasing extracellular matrix synthesis.

Key Words: Liver fibrosis; Tauroursodeoxycholic acid; Collagen fiber; Transforming growth factor- β 1; α -smooth muscle actin

Wang D, Yang L, Huang JM, Wang BY, Li L, Qian W, Ye J, Hou XH. Tauroursodeoxycholic acid inhibits carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 1979-1984

摘要

目的: 探讨牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)对四氯化碳(CCl_4)诱发大鼠肝纤维化的抑制作用。

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的共同病理基础, 肝脏中细胞外基质合成与降解失衡是肝纤维化发生的主要机制。各种病因所致反复或持续的慢性肝实质炎症、坏死可导致肝脏持续不断的纤维增生而形成肝纤维化。

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

■研究前沿

牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)是一种结合型天然胆汁酸,广泛存在于人和动物的胆汁中,具有保护肝细胞,拮抗疏水性胆汁酸的细胞毒作用促进胆汁酸转运和分泌。

方法:健康6周龄♂SD大鼠75只,随机分为空白对照组、模型对照组、TUDCA低剂量组、TUDCA高剂量组、己酮可可碱(PTX)阳性对照组,每组15只。用40%的CCl₄油溶液,大鼠背部皮下注射3 mL/kg(首次5 mL/kg)造大鼠肝纤维化模型。各组给予相应浓度干预药物溶液灌胃8 wk,检测血清纤维化指标HA、LN、IV-C;胶原纤维染色(Masson三色染色)观察各组胶原纤维面积比变化;免疫组织化学SP法观察TGF-β1及α-SMA在大鼠肝组织中的表达及分布变化。

结果:8 wk后,TUDCA及PTX干预组与模型组相比,血清HA、LN、IV-C有明显降低(146.33±35.13, 162.2±24.80, 137.14±22.24 vs 252.83±51.94; 77.20±11.84, 66.80±16.78, 82.00±10.74 vs 108.00±30.00; 14.14±2.59, 12.60±3.17, 10.09±2.22 vs 25.08±5.93, 均 $P<0.05$);肝组织纤维间隔变细或消失,形成弥漫性肝硬化结节减少,胶原面积比降低($P<0.05$);免疫组织化学结果显示,TUDCA及PTX干预组与模型组相比,TGF-β1及α-SMA阳性表达减少,图像软件半定量分析结果显示差异有显著性($P<0.05$)。而TUDCA低剂量组与高剂量组及PTX组三者之间结果差异无显著性。

结论:TUDCA对CCl₄诱发的大鼠肝纤维化有拮抗作用,主要是通过减少TGF-β1合成,抑制HSC细胞活化,降低细胞外基质合成,延缓肝纤维化进程。

关键词:肝纤维化;牛磺熊去氧胆酸;胶原纤维;转化生长因子β1;α-平滑肌肌动蛋白

王丹, 杨玲, 黄金明, 王保永, 李靓, 钱伟, 叶进, 侯晓华. 牛磺熊去氧胆酸抑制四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 1979-1984

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1979.asp>

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病发展为肝硬化的共同病理基础,肝脏中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解失衡是肝纤维化发生的主要机制。各种病因所致反复或持续的慢性肝实质炎症、坏死可导致肝脏持续不断的纤维增生而形成肝纤维化。牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)是一种结合型天然胆汁酸,广泛存在于人和动物的胆汁中,具有保护肝细胞,拮抗疏水性胆汁酸的细胞毒作用^[1-4],促进胆汁酸转运和分泌^[5-8],以及抗细胞凋亡作用^[9,10]。已有研究显示,给予等待肝移植的肝

硬化患者口服TUDCA,可明显改善其肝功能及胆汁淤积,减少患者住院天数^[11]。TUDCA对原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)患者也有效,可以明显改善PBC患者肝功能,拮抗毒性胆汁酸对肝脏的损伤^[12]。本文通过动物模型来探讨TUDCA抗纤维化作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物与分组:健康6周龄♂SD大鼠75只,体质量180-210 g,购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,每组15只。随机分为5组:空白对照组[蒸馏水10 mL/(kg·d)]、模型组[蒸馏水10 mL/(kg·d)]、TUDCA低剂量组[50 mg/(kg·d)]、TUDCA高剂量组[100 mg/(kg·d)]、己酮可可碱(PTX)阳性对照组[16 mg/(kg·d)]。主要试剂:TUDCA(滔罗特胶囊)由铨福发展有限公司提供;CCl₄(分析纯级)由郑州化学试剂二厂提供;TGF-β1兔抗鼠即用型抗体及SP试剂盒购于北京中山生物制品有限公司;α-SMA小鼠抗大鼠单克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司;Masson三色染色试剂盒购于迈新试剂公司;血清肝纤维化指标检测试剂盒购于上海昕辉科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 造模及给药方法:用花生油与CCl₄按3:2的比例配制成40%的CCl₄油溶液,按每次3 mL/kg(首次5 mL/kg)大鼠背部皮下注射,正常组注射同等剂量未添加CCl₄的花生油,每周一和周四各注射1次,连续8 wk,共16次。大鼠在第一次皮下注射CCl₄后的第二天即开始灌胃给药,各给药组给予相应浓度的药物灌胃[10 mL/(kg·d)],正常组和模型组给予等量蒸馏水,共56 d。大鼠自由饮水、摄食。

1.2.2 取材:末次给药灌胃后禁食一晚,用1%戊巴比妥钠麻醉动物,打开腹腔于腹主动脉取血制备血清,-20℃冰箱内保存;肝脏标本取右叶相同的部分,以4%多聚甲醛固定,3 d内石蜡包埋备组织病理学检测。

1.2.3 血清纤维化指标检测:用ELISA法检测血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、四型胶原(type IV collagen, IV-C)浓度。

1.2.4 肝组织TGF-β1及α-SMA表达的检测:采用免疫组织化学SP染色法。石蜡切片置于用1:10的多聚赖氨酸处理的玻片上,温控箱中烤干。TGF-β1及α-SMA单抗工作液浓度分别为1:300, 1:100。详细操作按照说明书进行。PBS代替一抗做阴性对

表 1 血清HA、LN及IV-C测定结果 ($\mu\text{g/L}$, mean \pm SD)

分组	空白组	模型组	低TUDCA组	高TUDCA组	PTX组
IV-C	7.48 \pm 1.00	25.08 \pm 5.93 ^a	14.14 \pm 2.59 ^{ac}	12.60 \pm 3.17 ^c	10.09 \pm 2.22 ^c
HA	100.33 \pm 5.05	252.83 \pm 51.94 ^a	146.33 \pm 35.13 ^{ac}	162.20 \pm 24.80 ^{ac}	137.14 \pm 22.24 ^{ac}
LN	39.25 \pm 5.62	108.00 \pm 30.00 ^a	77.20 \pm 11.84 ^{ac}	66.80 \pm 16.78 ^{ac}	82.00 \pm 10.74 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组. HA: 透明质酸; LN: 层粘连蛋白; IV-C: 四型胶原.

照. 通过Olympus显微摄像系统于放大400倍下, 每张切片随机选取5个视野照相, 以胞质内棕色颗粒为TGF- β 1及 α -SMA阳性表达, 采用Image-proplus v6.0软件进行定量分析, 测定其平均吸光度值(A值).

1.2.5 病理形态学观察 采用肝组织HE染色及胶原纤维(Masson)染色法, 每张切片于放大200倍镜下随机取5个视野, 用Image-proplus v6.0软件进行胶原定量分析: 胶原纤维面积百分比 = 胶原纤维面积/肝组织面积 \times 100%.

统计学处理 采用SPSS11.0软件进行分析. 数据以mean \pm SD表示, 多组资料间比较采用ANOVA分析.

2 结果

2.1 血清纤维化指标 8 wk后, TUDCA及PTX干预组与模型组相比, 血清HA、LN、IV-C有明显降低(146.33 \pm 35.13, 162.2 \pm 24.80, 137.14 \pm 22.24 vs 252.83 \pm 51.94; 77.20 \pm 11.84, 66.80 \pm 16.78, 82.00 \pm 10.74 vs 108.00 \pm 30.00; 14.14 \pm 2.59, 12.60 \pm 3.17, 10.09 \pm 2.22 vs 25.08 \pm 5.93, 均 $P < 0.05$, 表1).

2.2 TUDCA对肝纤维化大鼠肝脏组织病理变化的影响 HE染色显示正常组见肝细胞以中央静脉为中心向周围呈放射状排列, 结构完整(图1A). 模型组显示肝细胞索排列紊乱, 肝细胞呈弥漫性脂肪变性, 空泡形成, 汇管区扩大, 汇管区和肝小叶内可见淋巴细胞浸润, 假小叶形成(图1B). TUDCA治疗组见肝细胞坏死及空泡变性减少, 淋巴细胞浸润减少(图1C).

Masson染色可见正常组胶原纤维在血管周围少量表达(图2A), 与模型组和药物干预组都有明显差异($P < 0.05$), 其中模型组胶原纤维增生明显, 部分区域形成假小叶(图2B), TUDCA干预组及PTX组胶原纤维沉积减少, 形成的纤维间隔和假小叶明显减少(图2C, 2D), 与模型组间差异有统计学意义($P < 0.05$). PTX阳性对照组与治疗组之间无显著差异. 各组胶原面积百分比结果见表2.

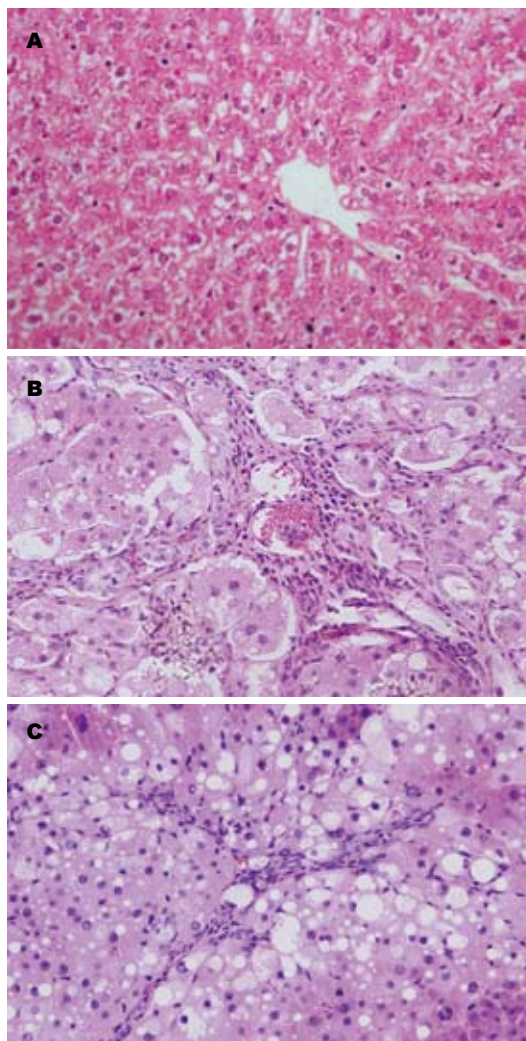


图 1 TUDCA对肝纤维化大鼠肝脏组织病理变化的影响(HE \times 400). A: 正常组见肝细胞以中央静脉为中心向周围呈放射状排列, 结构完整; B: 模型组见肝细胞索排列紊乱, 假小叶形成; C: TUDCA干预组炎性细胞浸润少.

2.3 TUDCA对肝纤维化大鼠肝组织TGF- β 1表达的影响 TGF- β 1在正常组肝细胞内几乎无表达, 肝窦间隙, 汇管区基质及间质细胞胞质内有少量表达(图3A). 模型组肝内表达明显增强, 主要见于小叶周围扩大的纤维组织内的成纤维细胞、窦周细胞、炎性细胞以及增生的胆小管周围梭状细胞内(图3B). TGF- β 1表达的阳性强度明显高于正常组($P < 0.05$); TUDCA和PTX干预组

■ 相关报道

临床研究显示 TUDCA已经用于治疗胆固醇结石和胆汁性消化不良, 并能改善等待肝移植的肝硬化患者、慢性丙型肝炎患者及原发性胆汁性肝硬化患者的肝功能, 减缓病程进展.

■应用要点

TUDCA是一种新型天然胆汁酸酰胺化物,较熊去氧胆酸具有更强的亲水性和细胞保护作用,并能抗肝纤维化,可用于慢性肝炎、肝纤维化的治疗。

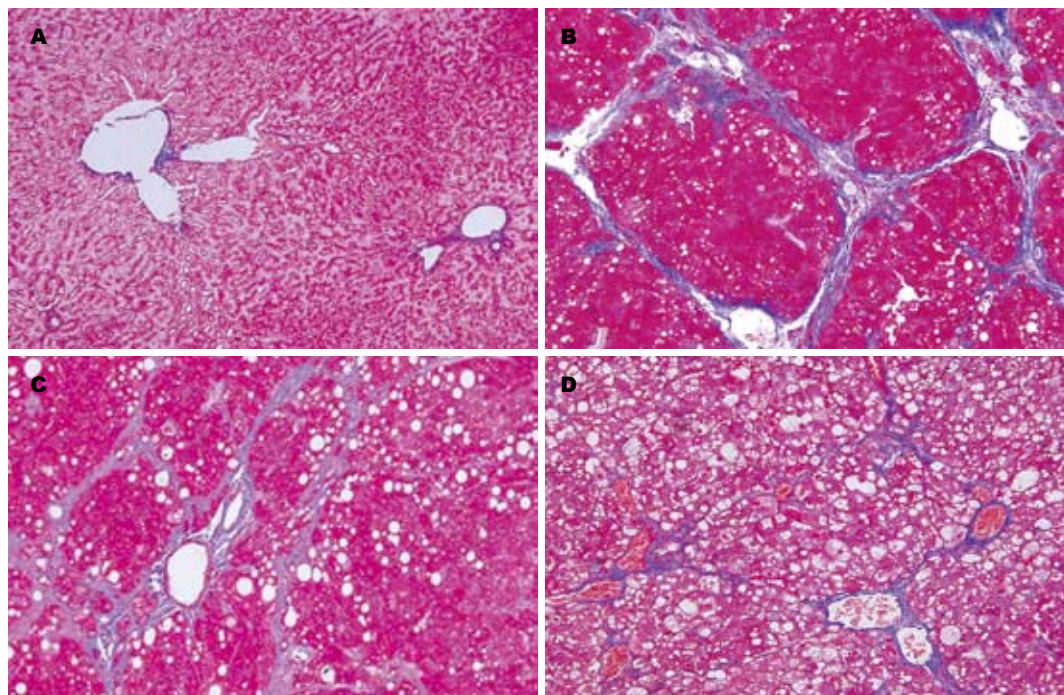


图2 TUDCA对CCl₄大鼠肝纤维化模型肝组织胶原纤维表达的影响(Masson染色×200). A: 正常组; B: 模型组胶原纤维增生明显,形成多个假小叶; C: 低剂量TUDCA组形成胶原纤维间隔细小; D: 高剂量TUDCA组形成胶原纤维间隔细小。

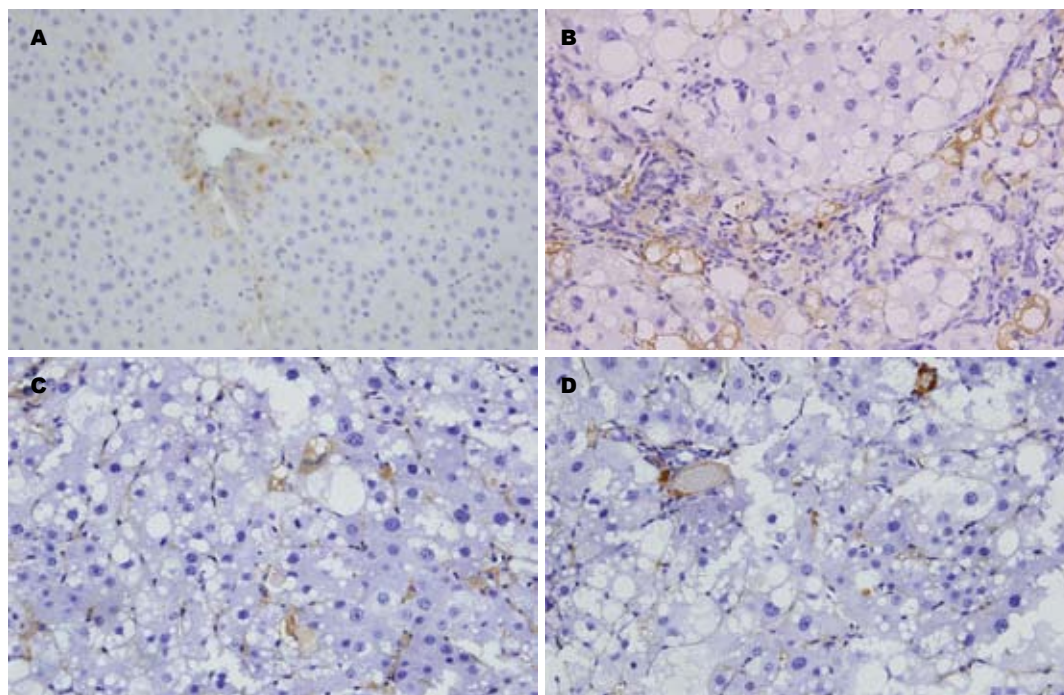
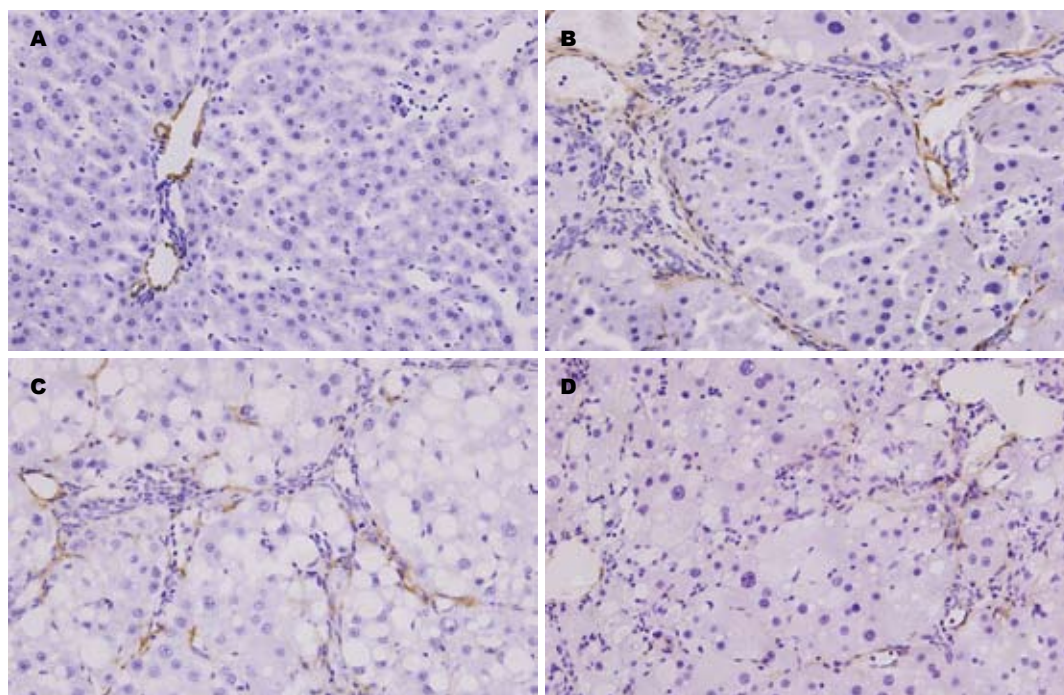


图3 TUDCA对CCl₄大鼠肝纤维化模型肝组织TGF-β1表达的影响(免疫组织化学染色×400). A: 正常组TGF-β1表达少许; B: 模型组肝内TGF-β1表达明显增强; C: 低剂量TUDCA组TGF-β1表达减少; D: 高剂量TUDCA组TGF-β1表达减少。

TGF-β1表达较模型组明显减轻,主要表达集中在汇管区、间质细胞和炎性细胞胞质内(图3C, 3D)。各组TGF-β1表达的MOD结果见表2。

2.4 TUDCA对肝纤维化大鼠肝组织α-SMA表达的影响 正常组仅在血管壁有少量的α-SMA表达(图4A)。模型组除血管壁表达外,在门静

脉、汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦中的阳性表达细胞也明显增加,棕黄色颗粒主要见于胞质(图4B)。TUDCA干预组(图4C, 4D)与模型组相比,阳性表达的细胞明显减少,且胞质阳性染色减轻,半定量α-SMA表达的平均光密度值较模型组低($P<0.05$)。TUDCA干预组与PTX干预组



■同行评价
本文实验设计合理, 结果可信, 有一定的参考价值.

图 4 TUDCA对CCl₄大鼠肝纤维化模型肝组织α-SMA表达的影响(免疫组织化学染色×200). A: 正常组只在血管壁表达少许α-SMA; B: 模型组α-SMA阳性表达明显增强; C: 低剂量TUDCA组形成纤维间隔少细小, α-SMA表达少; D: 高剂量TUDCA组形成纤维间隔少细小, α-SMA表达少.

表 2 胶原面积比, TGF-β1及α-SMA的表达 (mean ± SD)

分组	胶原面积比(%)	TGF-β1(4值)	α-SMA(4值)
空白组	1.17 ± 0.53	11.27 ± 1.95	6.07 ± 0.45
模型组	6.51 ± 1.03 ^a	67.57 ± 4.41 ^a	38.89 ± 3.91 ^a
低剂量组	3.36 ± 0.48 ^{ac}	48.03 ± 4.29 ^{ac}	23.49 ± 2.37 ^{ac}
高剂量组	4.13 ± 0.63 ^{ac}	51.58 ± 6.10 ^{ac}	16.98 ± 2.13 ^{ac}
己酮组	4.15 ± 0.61 ^{ac}	43.59 ± 3.64 ^{ac}	30.23 ± 3.66 ^{ac}

^a*P*<0.05 vs 空白组; ^c*P*<0.05 vs 模型组; ^{ac}*P*<0.05 vs 己酮组.

相比无显著差异. TUDCA干预低剂量和高剂量组之间也无显著差异. 各组表达α-SMA的MOD结果见表2.

3 讨论

TUDCA是一种新型天然胆汁酸酰胺化物, 在体内是熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)与牛磺酸的结合形成的一种亲水性的胆汁酸. 最早在熊胆粉中发现. 胆汁酸在临床上已经用于治疗胆固醇结石和胆汁性消化不良及慢性肝脏疾病, 尤其是原发性胆汁性肝硬化和慢性肝炎. 而TUDCA作为最新的胆汁酸药物, 体内及体外研究显示, 其与UDCA相比有更强的细胞保护作用^[13,14]. 目前已有临床研究提示用TUDCA治疗由丙型肝炎病毒引起的慢性病毒性肝炎, 可

明显降低血清转氨酶水平, 减缓病程进展^[15]. 本实验结果表明, 用CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型, TUDCA干预组大鼠血清HA、LA、IV-C水平比模型组低; 而肝组织Masson染色显示, TUDCA干预组大鼠肝组织中纤维间隔变细, 纤维增生减少, 半定量结果显示其胶原含量比模型组少 (*P*<0.05), 说明TUDCA存在抗纤维化作用.

TGF-β1在调控纤维化发生发展的中起着核心作用^[19], 具有促进肝脏间质细胞分化和增殖, 增加ECM的沉积, 抑制其降解的作用^[16]. 同时, TGF-β1也可抑制肝细胞再生, 促其凋亡, 使肝实质细胞与间质成分比例失调, 导致肝脏外基质代谢紊乱, 在Disse间隙过度沉积. TGF-β1调节肝纤维化发生发展的另一重要作用是使HSC激活. 目前研究认为, TGF-β1是调节HSC活化最重要的细胞因子^[16]. 活化的HSC可通过自分泌及旁分泌作用促进大量的ECM, 如HA、LN及IV-C合成^[17,18]. 这些ECM在肝脏中过量沉积, 进一步刺激纤维形成及HSC激活, 激活的HSC又可进一步产生TGF-β1, 使纤维化持续发展^[19]. 因此, 抑制肝细胞受损, 以及调控TGF-β1合成在抗纤维化有着重要意义. 本实验结果显示, TUDCA治疗组中肝组织TGF-β1表达比模型组显著降低 (*P*<0.05), 而HSC活化的标志物α-SMA的表达也低于模型组 (*P*<0.05), 提示TUDCA干预组中肝组

织活化的HSC细胞比模型组减少。

总之,在CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型中,TUDCA抑制TGF- β 1合成及表达,进而抑制HSC活化,减少肝组织ECM合成,减低其在肝脏中的沉积,发挥抗纤维化作用。

4 参考文献

- 1 Kitani K, Kanai S. Tauroursodeoxycholate prevents taurocholate induced cholestasis. *Life Sci* 1982; 30: 515-523
- 2 Kanai S, Ohta M, Kitani K, Sato Y. Tauro beta-muricholate is as effective as tauroursodeoxycholate in preventing taurochenodeoxycholate-induced liver damage in the rat. *Life Sci* 1990; 47: 2421-2428
- 3 Ohiwa T, Katagiri K, Hoshino M, Hayakawa T, Nakai T. Tauroursodeoxycholate and tauro-beta-muricholate exert cytoprotection by reducing intrahepatocyte taurochenodeoxycholate content. *Hepatology* 1993; 17: 470-476
- 4 Heuman DM, Mills AS, McCall J, Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts. In vivo studies in the rat. *Gastroenterology* 1991; 100: 203-211
- 5 Beuers U, Nathanson MH, Isales CM, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca⁺⁺ mechanisms defective in cholestasis. *J Clin Invest* 1993; 92: 2984-2993
- 6 Beuers U, Throckmorton DC, Anderson MS, Isales CM, Thasler W, Kullak-Ublick GA, Sauter G, Koebe HG, Paumgartner G, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid activates protein kinase C in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1996; 110: 1553-1563
- 7 Bruck R, Nathanson MH, Roelofsen H, Boyer JL. Effects of protein kinase C and cytosolic Ca²⁺ on exocytosis in the isolated perfused rat liver. *Hepatology* 1994; 20: 1032-1040
- 8 Dombrowski F, Stieger B, Beuers U. Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Lab Invest* 2006; 86: 166-174
- 9 Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, Sohn J, Krishnan B, Lewis DE, Yoffe B. Effect of tauroursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress-induced caspase-12 activation. *Hepatology* 2002; 36: 592-601
- 10 Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology* 2004; 39: 1563-1573
- 11 Caglieris S, Giannini E, Dardano G, Mondello L, Valente U, Testa R. Tauroursodeoxycholic acid administration as adjuvant therapy in cirrhotic patients on transplantation waiting lists. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1045-1047
- 12 Crosignani A, Battezzati PM, Setchell KD, Invernizzi P, Covini G, Zuin M, Podda M. Tauroursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis. A dose-response study. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 809-815
- 13 Tsukahara K, Kanai S, Ohta M, Kitani K. Taurine conjugate of ursodeoxycholate plays a major role in the hepatoprotective effect against cholestasis induced by taurochenodeoxycholate in rats. *Liver* 1993; 13: 262-269
- 14 Heuman DM, Bajaj R. Ursodeoxycholate conjugates protect against disruption of cholesterol-rich membranes by bile salts. *Gastroenterology* 1994; 106: 1333-1341
- 15 Crosignani A, Budillon G, Cimino L, Del Vecchio Blanco C, Loguercio C, Ideo G, Raimondo G, Stabellini R, Podda M. Tauroursodeoxycholic acid for the treatment of HCV-related chronic hepatitis: a multicenter placebo-controlled study. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1624-1629
- 16 王爱民, 王俊红, 马红菊, 张秀巧, 郭俊英, 韩涛, 王宝恩. 生长因子对大鼠肝星状细胞间质胶原酶基因表达的调节作用. *中华实验外科杂志* 2003; 20: 234-235
- 17 Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997; 150: 1647-1659
- 18 Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 1996; 54: S39-S45
- 19 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

汤姆森 - 路透公布 2009 年 WJG 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology* (WJG) (中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, WJG 在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。(WJG 编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

非人灵长类动物急性肝功能衰竭模型的建立

徐玉振, 薛琨, 高毅, 潘明新, 简国登, 刘晓明, 饶军华

徐玉振, 薛琨, 高毅, 潘明新, 简国登, 南方医科大学附属医院肝胆二科 广东省广州市 510282

刘晓明, 饶军华, 广东省昆虫研究所华南灵长类研究开发中心 广东省广州市 510555

徐玉振, 在读博士, 主要从事肝胆外科及生物人工肝的研制与开发.

国家高技术研究发展计划基金资助项目(863计划), No. 2006AA02A141

作者贡献分布: 该课题由高毅、徐玉振及潘明新酝酿设计; 高毅为863项目总负责; 实验过程由徐玉振、薛琨及简国登操作完成; 实验动物由刘晓明与饶军华提供; 数据分析由徐玉振完成; 论文写作由徐玉振完成; 高毅与潘明新提出修改和指导建议.

通讯作者: 高毅, 教授, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学附属医院肝胆二科. gaoyi6146@133.com

电话: 020-62782560

收稿日期: 2010-04-15 修回日期: 2010-06-13

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-08

Establishment of a non-human primate model of acute liver failure

Yu-Zhen Xu, Kun Xue, Yi Gao, Ming-Xin Pan, Guo-Deng Jian, Xiao-Ming Liu, Jun-Hua Rao

Yu-Zhen Xu, Kun Xue, Yi Gao, Ming-Xin Pan, Guo-Deng Jian, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Xiao-Ming Liu, Jun-Hua Rao, South-China Primate Research & Development Center of Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510555, Guangdong Province, China

Supported by: the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA02A141

Correspondence to: Professor Yi Gao, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. gaoyi6146@133.com

Received: 2010-04-15 Revised: 2010-06-13

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To establish a non-human primate model of acute liver failure (ALF).

METHODS: Fifteen healthy cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) were randomly divided into three groups, which were administered with D-galactosamine via the jugular vein at doses of 0.45 (high-dose group), 0.3 (medium-dose group) and 0.15 g/kg (low-dose group), respectively, to induce ALF. At 0, 12, 24, 36,

48, 60, 72 and 96 h after administration, clinical and intracranial pressure (ICP) data were recorded, and blood samples were collected for measurement of alanine aminotransferase (ALT), prothrombin time (PT), total bilirubin (TBIL), and ammonia (NH_3). Animal survival time was recorded to compare the survival rates among the three groups. Postmortem examination was performed in dead cynomolgus monkeys.

RESULTS: All animals were dead in the high- and medium-dose groups, and the mean survival time was $56.1 \text{ h} \pm 8.1 \text{ h}$ and $109.8 \text{ h} \pm 11.2 \text{ h}$, respectively. Only one animal died at 98 h after treatment in the low-dose group. In the high- and medium-dose groups, serum levels of ALT, PT, TBIL and NH_3 , and ICP were significantly higher at all time points than at baseline (0 h) (all $P < 0.05$). All these parameters were normal at 60 h in the low-dose group. Inflammatory cell infiltration and hepatic cell necrosis were observed in dead cynomolgus monkeys.

CONCLUSION: A cynomolgus monkey model of AHF has been successfully established and can be used for future ALF research.

Key Words: Acute liver failure; *Macaca fascicularis*; D-galactosamine; Animal model

Xu YZ, Xue K, Gao Y, Pan MX, Jian GD, Liu XM, Rao JH. Establishment of a non-human primate model of acute liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 1985-1989

摘要

目的: 构建一种稳定的非人灵长类大动物急性肝衰竭模型.

方法: 将15只食蟹猴随机分成3组, 经颈外静脉分别注射0.45、0.3和0.15 g/kg D-氨基半乳糖胺, 构建食蟹猴肝衰竭动物模型. 动态检测给药前(0 h)、给药后12、24、36、48、60、72、96 h生命体征、颅内压(ICP)及血清丙氨酸转氨酶(ALT)、凝血酶原时间(PT)、总胆红素(TBIL)、血氨(NH_3)的变化. 观察动物临床表现及病程进展情况, 记录动物生存时间, 动

■背景资料

急性肝功能衰竭(ALF)因为病情复杂、影响因素多、缺乏对照而难以确切判断疗效. 建立理想的ALF动物模型, 是进行ALF研究的基础. 目前的ALF动物模型多是鼠、兔、猪、犬类.

■同行评议者

张进祥, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院

■研发前沿

本研究是肝胆科对于终末期肝病处理方面的难点及急需解决的问题,属本学科的研究热点。目前生物人工肝的开发研究中大动物模型多采用猪、犬,与人类的差异很大,急需建立与人类类似的动物模型,为生物人工肝的临床应用奠定基础。

物死亡后行组织病理学检查。

结果: 0.45 g/kg和0.3 g/kg组动物全部死亡,生存时间分别为 $56.1 \text{ h} \pm 8.1 \text{ h}$ 和 $109.8 \text{ h} \pm 11.2 \text{ h}$, 0.15 g/kg实验猴除1只98 h死亡外其余全部存活。0.45 g/kg和0.3 g/kg组动物各时点的ALT、TBIL、PT、 NH_3 及ICP均明显高于基线值(0 h),差异有统计学意义($P < 0.05$), 0.15 g/kg实验猴各指标在60 h后渐恢复正常。死亡动物组织病理检查见肝细胞坏死,肝内炎性细胞浸润。

结论: 以0.3 g/kg的D-氨基半乳糖胺诱发食蟹猴急性肝功能衰竭动物模型,符合急性肝功能衰竭的临床表现、病理变化,可用于急性肝功能衰竭的动物实验研究。

关键词: 急性肝功能衰竭; 食蟹猴; D-氨基半乳糖胺; 动物模型

徐玉振, 薛琨, 高毅, 潘明新, 简国登, 刘晓明, 饶军华. 非人灵长类动物急性肝功能衰竭模型的建立. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 1985-1989

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1985.asp>

0 引言

急性肝功能衰竭(acute liver failure, ALF)病情复杂、影响因素多、缺乏对照而难以确切判断疗效。临床上为研究ALF的发病机制和治疗多以啮齿类、犬类动物建立ALF模型,目前国内外尚未见以非人灵长类动物建立的ALF模型的报道。

1 材料和方法

1.1 材料 食蟹猴(*Macaca Faiscularis*)15只,均为♂,年龄 $7.1 \text{ 岁} \pm 1.2 \text{ 岁}$,体质量 $6.4 \text{ kg} \pm 1.1 \text{ kg}$,由广东省昆虫研究所华南灵长类研究开发中心提供[合格证号SCXK(粤)2009-2010],达到《国标14925-94》要求的实验用猴质量标准(本实验已通过南方医科大学伦理委员会审核)。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 将15只食蟹猴随机分为3组,每组5只。给药剂量分别为0.45 g/kg(高剂量组)、0.3 g/kg(中剂量组)及0.15 g/kg(低剂量组)。D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-gal)盐酸盐购自江苏省南京博源医药科技有限公司,药物纯度为98%,溶于5%的葡萄糖溶液中,配制药物的浓度为0.5 kg/L,调节pH值为6.8,配好的溶液2 h内应用。动物术前12 h禁食,自由饮水。速眠新II(0.1 mL/kg)和氯胺酮(0.1 mL/kg)麻醉,10 min内将配制好的D-gal溶液经颈外静脉一次性输入实验猴

体内。颅顶钻一小洞,插入Codman微传感器测量颅内压(intracranial pressure, ICP)。实验后给予常规饲料,辅以新鲜水果,提供充足饮水,增加营养支持。

1.2.2 指标观察: 记录动物的存活时间。计时从D-gal完全输入体内开始,时间精确到分钟,存活动物观察到130 h。给药前(0 h)、给药后12、24、36、48、60、72、96 h测量体温、血压、心率等生命体征及ICP,肝功能检测由南方医科大学附属南方医院临床检验中心按常规方法检测。动物死后由南方医科大学司法鉴定中心行尸检,动物死后取肝脏、肾脏、脾脏、肺、肠组织,并行光镜及电镜观察。

统计学处理 采用SPSS13.0统计学软件处理。计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。组间计量资料比较采用 t 检验及单因素方差分析,组间动物生存率的比较采用Kaplan-Meier法进行分析。

2 结果

2.1 一般状况 各组动物的生命体征在给药前后无明显变化,给药后12 h开始出现进食量减少。0.45 g/kg组动物病情发展迅速,死亡前出现肝昏迷; 0.3 g/kg组中1只实验猴术后26 h出现剧烈恶心呕吐,所有猴后期发生抽搐并在短时间内出现肝昏迷死亡。0.45 g/kg组存活时间为 $56.1 \text{ h} \pm 8.1 \text{ h}$, 0.3 g/kg组存活时间为 $109.8 \text{ h} \pm 11.2 \text{ h}$, 0.15 g/kg组除1只猴在98 h不明原因死亡外其余全部存活。经Log-rank检验,三组生存率曲线有显著差别,统计量为21.933($P = 0.000$,图1)。

2.2 血清生化指标及颅内压的变化 注射D-gal后,15只动物均出现肝功能异常,各时间点血清凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、ICP平均明显高于基线值(0 h)($P < 0.05$ 或0.01), 0.45 g/kg D-gal组动物48 h时PT升至 $84.28 \text{ s} \pm 5.47 \text{ s}$,约为基线值的9倍,ICP水平为 $19.40 \text{ mmHg} \pm 1.34 \text{ mmHg}$,约为基线值的2倍,所有实验动物血清丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、血氨(blood ammonia, NH_3)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)水平逐渐升高,其中给予0.45 g/kg D-gal的动物注射48 h时ALT、 NH_3 、TBIL水平分别为 $1\,026.60 \text{ U/L} \pm 84.78 \text{ U/L}$ 、 $196.80 \text{ mmol/L} \pm 9.26 \text{ mmol/L}$ 、 $27.74 \text{ mmol/L} \pm 2.34 \text{ mmol/L}$,约为基线值的31、6、6倍,给予0.3 g/kg动物ALT、 NH_3 、TBIL水平亦进行性升高,96 h时分别达 $1\,032.00 \text{ U/L} \pm 92.41 \text{ U/L}$ 、 $296.12 \text{ mmol/L} \pm 18.17 \text{ mmol/L}$ 、 $115.86 \text{ mmol/L} \pm 6.84 \text{ mmol/L}$,约为基线值的31、9、

■相关报道

国内外的报道ALF模型甚多,动物模型主要有两大类:即药物肝损伤和外科手术模型。

表 1 各组实验猴的生化指标及颅内压的变化 (mean \pm SD)

分组	ALT(U/L)	TBIL(mmol/L)	PT(s)	NH ₃ (g/dL)	ICP(mmHg)
高剂量组					
0 h	32.68 \pm 2.35	0.85 \pm 0.17	9.63 \pm 0.32	33.60 \pm 2.71	7.94 \pm 0.65
12 h	200.80 \pm 22.61	1.81 \pm 0.24	13.20 \pm 1.75	81.58 \pm 5.39	10.96 \pm 0.56
24 h	608.40 \pm 39.75	13.60 \pm 1.60	34.24 \pm 3.28	102.04 \pm 6.48	12.00 \pm 0.37
36 h	787.40 \pm 47.47	19.80 \pm 1.01	55.90 \pm 5.19	132.56 \pm 8.47	12.98 \pm 0.49
48 h	1 026.60 \pm 84.78	27.74 \pm 2.34	84.28 \pm 5.47	196.80 \pm 9.26	19.40 \pm 1.34
60 h					
72 h					
96 h					
中剂量组					
0 h	32.00 \pm 2.55	0.88 \pm 0.15	9.30 \pm 0.24	31.68 \pm 2.47	7.80 \pm 0.39
12 h	150.00 \pm 9.19 ^a	1.64 \pm 0.29	13.12 \pm 0.96	51.36 \pm 2.59 ^a	10.14 \pm 0.71 ^a
24 h	377.20 \pm 34.33 ^a	11.53 \pm 1.35	27.00 \pm 2.08 ^a	70.82 \pm 3.46 ^a	10.40 \pm 0.52 ^a
36 h	338.60 \pm 24.12 ^a	14.22 \pm 0.70 ^a	41.16 \pm 3.20 ^a	98.02 \pm 6.77 ^a	11.94 \pm 0.74 ^a
48 h	493.60 \pm 46.49 ^a	18.24 \pm 1.39 ^a	63.96 \pm 4.69 ^a	161.60 \pm 11.68 ^a	14.06 \pm 1.02 ^a
60 h	710.60 \pm 29.18	59.80 \pm 2.26	109.38 \pm 8.90	201.98 \pm 9.86	19.58 \pm 1.09 ^a
72 h	907.20 \pm 42.46	85.36 \pm 4.04	139.96 \pm 11.58	261.98 \pm 9.86	
96 h	1 032.00 \pm 92.41	115.86 \pm 6.84		296.12 \pm 18.17	
低剂量组					
0 h	31.20 \pm 2.59	0.97 \pm 0.20	9.52 \pm 0.36	31.32 \pm 1.99	7.48 \pm 0.40
12 h	100.40 \pm 22.64 ^{ac}	1.46 \pm 0.28	10.22 \pm 0.66 ^{ac}	32.66 \pm 3.00 ^a	7.88 \pm 0.40 ^a
24 h	152.00 \pm 17.45 ^{ac}	11.30 \pm 0.79 ^a	20.90 \pm 1.60 ^{ac}	36.92 \pm 4.11 ^{ac}	8.02 \pm 0.18 ^a
36 h	221.00 \pm 23.32 ^{ac}	12.40 \pm 1.60 ^a	32.88 \pm 2.92 ^{ac}	57.24 \pm 3.20 ^{ac}	8.32 \pm 0.44 ^{ac}
48 h	331.00 \pm 36.33 ^{ac}	16.92 \pm 1.02 ^a	51.00 \pm 2.85 ^{ac}	79.70 \pm 3.19 ^{ac}	10.22 \pm 0.70 ^{ac}
60 h	409.00 \pm 27.95 ^c	34.54 \pm 1.73 ^c	61.48 \pm 6.22 ^c	100.66 \pm 6.69 ^c	10.16 \pm 0.69 ^c
72 h	336.60 \pm 50.92 ^c	21.44 \pm 1.44 ^c	64.18 \pm 5.40 ^c	87.66 \pm 4.79 ^c	
96 h	206.60 \pm 41.64 ^c	18.84 \pm 0.94 ^c	65.56 \pm 4.03 ^c		

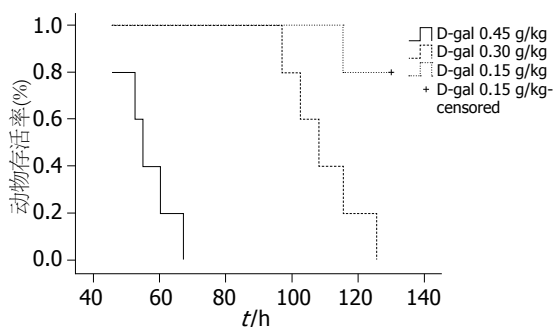
^a $P < 0.05$ vs 高剂量组同时点; ^c $P < 0.05$ vs 中剂量组同时点.

图 1 各组食蟹猴生存率曲线.

120倍, 而给予0.15 g/kg D-gal的动物ALT、NH₃、TBIL水平在60 h达到峰值, 后逐渐下降至96 h时约为基线值的6、2、20倍, 为206.60 U/L \pm 41.64 U/L、64.56 mmol/L \pm 4.03 mmol/L、18.84 mmol/L \pm 0.94 mmol/L(表1).

2.3 组织病理学检查 尸检肝脏体积较正常缩小, 散在针尖至米粒大小出血点, 肝脏切面有暗红

色淤血. 光镜见肝细胞胞质疏松化、空泡变性, 部分肝细胞内可见脂肪空泡. 汇管区可见少量中性粒细胞和淋巴细胞浸润(图2). 电镜见可见肝细胞核不规则, 粗面内质网扩张, 线粒体疏松变, 异染色质在核膜下聚集(图3).

3 讨论

ALF的特征是起病急, 发病2 wk内出现Ⅱ度以上肝性脑病的肝衰竭症候群^[1]. 实验动物的选择要遵从选用与研究对象结构、机能、代谢及疾病特征相类似的实验动物这一原则^[2]. 查阅国内外文献, 大部分以鼠、兔、猪、犬类建立ALF模型^[3-7], 与啮齿类、犬类动物相比, 非人灵长类动物(non-human primate, NHP)的生理特征以及免疫系统与人类相似, 98%的基因与人类相同^[8].

D-gal在肝内通过半乳糖途径代谢, 具有较强的肝特异性毒性作用, 可在短时间内引起严重肝损害, 其作用机制是: (1)通过抑制肝细胞

■创新盘点

本研究以非人灵长类动物雄性食蟹猴作为模型动物, 通过颈外静脉注射不同剂量的D-gal, 观察动物的临床、生化、及组织学变化特征, 成功建立了食蟹猴ALF模型并摸索出最佳药物剂量, 为国内外首次报道.

■同行评价

本研究选题较好,设计合理,具有很好的参考价值。

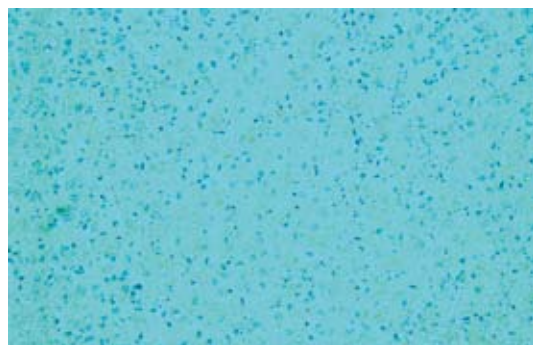


图2 肝细胞胞质疏松化、空泡变性($\times 200$)。

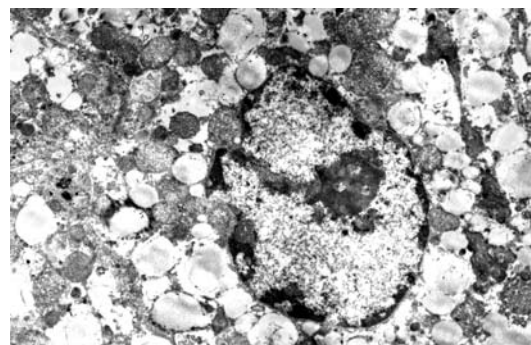


图3 细胞核不规则,粗面内质网扩张($\times 3\ 000$)。

的RNA和浆膜蛋白合成造成肝细胞坏死;(2)肝细胞坏死与细胞外 Ca^{2+} 大量进入细胞内有关^[9];(3)近年来,人们对此动物模型所引发的门脉内毒素血症,进入肝脏使库普弗细胞(kupffer cells, KCs)过度激活, KCs释放细胞因子,介导炎症级联反应(inflammatory cascade),在ALF模型的形成过程中所起的重要作用特别关注^[10-12]。D-gal诱发肝损伤有剂量依赖性,我们的研究也证实了这一点。所有实验动物血清天冬氨酸转氨酶水平逐渐升高,表明给予不同剂量的D-gal都可以造成急性肝损伤,且损伤程度与剂量成正相关。低剂量组转氨酶在60 h后开始下降,表明肝功能有所恢复,这也与观察的实际情况相符。

本实验中发现动物注射D-gal后TBIL进行性升高,0.45 g/kg及0.3 g/kg的动物至死亡时并未见降低,我们研究中发现有两只0.3 g/Kg的食蟹猴在110 h检测转氨酶急剧降低,而胆红素仍处于高位,呈现所谓“胆酶分离”,动物很快死亡这也与文献报道的一致^[13]。

PT是反映肝脏合成功能、储备功能、病变严重程度及预后的一个非常重要的指标。注射D-gal后各时间点血清PT明显高于基线值,表明肝脏功能严重受损。

ALF患者发生肝性脑病是判断其预后的关键。肝性脑病以意识水平的快速恶化,ICP增高和中枢灌注压降低为特征,神经病理学改变为脑水肿。研究表明,血氨在ALF肝性脑病的发病过程中起着重要作用,可以直接抑制兴奋性及抑制性突触后电位产生,进而改变神经电活动^[14]。我们在本研究中发现注射D-gal后血氨水平逐渐升高,在高、中剂量两组中动物死亡前血氨达到基线值的9和6倍。微传感器检测颅内压发现注射D-gal 48 h后高、中剂量组动物颅内压升高到基线值的两倍以上。结合动物死亡前存在昏睡,不能唤醒,对疼痛刺激不敏感,直

至各种反射消失,肌张力由增强变为降低,表明动物死亡前发生了肝昏迷。

总之,我们认为0.3 g/kg组所建模型符合理想的ALF模型要求^[15],一是从临床表现、生理生化指标及组织病理学改变证实发生了肝功能衰竭;二是与临床上患者的肝衰竭进程相似,后期发生肝性脑病的表现;三是高剂量组生存时间太短,没有治疗的时间窗,动物就很快死亡。而低剂量组除一只猴在98 h不明原因死亡外,其他均存活,且在60 h左右各项指标逐渐恢复,这可能与肝脏的强大再生及恢复能力有关。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组,中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南. 中华肝病杂志 2006; 9: 643-646
- 2 方厚华. 医学实验模型动物. 第1版. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 118
- 3 Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81: 145-157
- 4 García-Moreno LM, Conejo NM, González-Pardo H, Aller MA, Nava MP, Arias J, Arias JL. Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 127-132
- 5 Uchida Y, Kaibori M, Hijikawa T, Ishizaki M, Ozaki T, Tanaka H, Matsui K, Tokuhara K, Kwon AH, Kamiyama Y, Okumura T. Protective effect of neutrophil elastase inhibitor (FR136706) in lethal acute liver failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats. *J Surg Res* 2008; 145: 57-65
- 6 Totsugawa T, Yong C, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Noguchi H, Okitsu T, Westerman KA, Kohara M, Reth M, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N. Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination. *J Hepatol* 2007; 47: 74-82
- 7 Patzer JF 2nd, Block GD, Khanna A, Yin WY, Molmenti E, Gerber D, Kramer DJ, Scott VL, Aggarwal S, Wagner RA, Fulmer ML, Amiot BP, Mazariegos GV. D-galactosamine based canine acute liver failure model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002; 1: 354-367
- 8 匡德宣, 代解杰, 鲁帅尧, 叶尤松, 孙晓梅. 不同剂量链脲菌素对恒河猴某些常规生理指标的影响. 中国实验

- 动物学报 2003; 11: 54
- 9 McMillan JM, Jollow DJ. Galactosamine hepatotoxicity: effect of galactosamine on glutathione resynthesis in rat primary hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 115: 234-240
- 10 Sass G, Heinlein S, Agli A, Bang R, Schümann J, Tiegs G. Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* 2002; 19: 115-120
- 11 Nakayama Y, Shimizu Y, Hirano K, Ebata K, Minemura M, Watanabe A, Sugiyama T. CTLA-4Ig suppresses liver injury by inhibiting acquired immune responses in a mouse model of fulminant hepatitis. *Hepatology* 2005; 42: 915-924
- 12 Kitazawa T, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fujimoto M, Fukui H. Expression of Toll-like receptor 4 in various organs in rats with D-galactosamine-induced acute hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e494-e498
- 13 Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 2005; 172: 367-379
- 14 Ferenci P. Brain dysfunction in fulminant hepatic failure. *J Hepatol* 1994; 21: 487-490
- 15 Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 770-774

编辑 曹丽鸥 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

COX-2抑制剂塞来昔布提高人结肠癌细胞SW480的放射敏感性

夏曙, 刘飞, 刘细友, 付强, 付秀根, 郑微

■背景资料

PI3K/Akt途径是一条维持细胞生命活动重要的信号转导通路; 多种恶性肿瘤中均存在COX-2过表达的情况。抑制PI3K/Akt/COX-2的活化, 可能具有放射增敏作用。

夏曙, 刘飞, 刘细友, 付强, 付秀根, 郑微, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科 湖北省武汉市 430030

夏曙, 2006年华中科技大学毕业, 博士, 主要从事恶性肿瘤综合治疗和放射生物学研究。

教育部新教师基金资助项目, No. 200804871034

湖北省自然科学基金资助项目, No. 2008cdb133

作者贡献分布: 此课题由夏曙设计; 研究过程由夏曙、刘飞、刘细友、付强、付秀根及郑微完成; 分析软件由夏曙提供; 数据分析由夏曙完成; 本论文写作由夏曙完成。

通讯作者: 夏曙, 博士, 主治医师, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤科。

xiashu1900@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-03-10 修回日期: 2010-06-06

接受日期: 2010-06-07 在线出版日期: 2010-07-08

COX-2 inhibitor celecoxib improves radiosensitivity of human colon carcinoma cell line SW480

Shu Xia, Fei Liu, Xi-You Liu, Qiang Fu, Xiu-Gen Fu, Wei Zheng

Shu Xia, Fei Liu, Xi-You Liu, Qiang Fu, Xiu-Gen Fu, Wei Zheng, Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: the Foundation for Youth Scholars of Ministry of Education of China, No. 200804871034; and the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2008cdb133

Correspondence to: Shu Xia, Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xiashu1900@yahoo.com.cn

Received: 2010-03-10 Revised: 2010-06-06

Accepted: 2010-06-07 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To determine whether celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, can improve radiosensitivity of human colon carcinoma cell line SW480.

METHODS: Cultured SW480 cells were treated with celecoxib for 24 h and then irradiated with different doses of X-rays. Cell survival was evaluated by colony formation assay. To calculate Dq, D0, SF2 and SER, the cell survival curve was fitted by the one-hit multi-target model. After 6-Gy radiation, the apoptosis of SW480 cells was

detected by flow cytometry, and the expression of pAkt, COX-2, and pBad in SW480 cells was detected by Western blot.

RESULTS: The Dq, D0 and SF2 values for irradiated SW480 cells pretreated with celecoxib were lower than those for untreated ones (0.995 vs 2.527, 1.091 vs 1.622 and 0.352 vs 0.805, respectively; all $P < 0.05$). The SER for irradiated SW480 cells pretreated with celecoxib was 1.487. X-ray radiation enhanced the expression of pAkt, COX-2 and pBad proteins in SW480 cells. The expression levels of pAkt, COX-2 and pBad proteins in irradiated SW480 cells pretreated with celecoxib were lower than those in untreated ones. The apoptosis rate was significantly higher in irradiated SW480 cells pretreated with celecoxib than in untreated ones (15.02 ± 2.16 vs 6.25 ± 1.22 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Celecoxib improves radiosensitivity of human colon carcinoma cell line SW480 perhaps by inhibiting the activation of the PI3K/Akt/COX-2 pathway.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Radiosensitivity; Colon carcinoma

Xia S, Liu F, Liu XY, Fu Q, Fu XG, Zheng W. COX-2 inhibitor celecoxib improves radiosensitivity of human colon carcinoma cell line SW480. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 1990-1994

摘要

目的: 探讨COX-2抑制剂塞来昔布对人结肠癌细胞SW480放射增敏的作用机制。

方法: 体外培养结肠癌细胞SW480。COX-2抑制剂塞来昔布作用SW480细胞24 h, X线不同剂量照射, 克隆形成法计算细胞存活率, 单击多靶模型拟合细胞存活曲线, 计算Dq、D0、SF2值和放射增敏比(SER); X线6 Gy照射后, 流式细胞仪检测细胞凋亡变化, 应用Western blot方法检测磷酸化Akt、COX-2、磷酸化Bad蛋白的表达。

■同行评议者

曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

结果: celecoxib联合照射组的Dq、D0及SF2均明显低于单纯照射组(0.995 vs 2.527, 1.091 vs 1.622, 0.352 vs 0.805, 均 $P<0.05$), celecoxib联合照射组SER为1.487; 照射能够提高pAkt、COX-2和pBad的表达, celecoxib联合照射组pAkt、COX-2和pBad表达低于单纯照射组; celecoxib联合照射组SW480的细胞凋亡率明显高于单纯照射组(15.02 ± 2.16 vs 6.25 ± 1.22 , $P<0.05$).

结论: celecoxib能够抑制PI3K/Akt/COX-2途径的活化, 从而提高SW480细胞放射治疗的效果.

关键词: 环氧合酶-2; 放射敏感性; 结肠癌

夏曙, 刘飞, 刘细友, 付强, 付秀根, 郑微. COX-2抑制剂塞来昔布提高人结肠癌细胞SW480的放射敏感性. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 1990-1994

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1990.asp>

0 引言

PI3K/Akt信号转导途径是一条重要的信号转导通路, 在凋亡、增殖和能量代谢等细胞生命活动中起重要作用. 电离辐射、紫外线和细胞毒性药物均可激活PI3K/Akt信号转导途径, 通过其适应性地调节, 抑制细胞凋亡、促进细胞增殖分裂和损伤修复, 维持细胞生命活动的稳定^[1-4]. PI3K/Akt信号转导途径参与调节COX-2的表达. 研究发现, 多种恶性肿瘤中均存在COX-2过表达的情况. COX-2过表达可以促进新生血管生成、促进肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡, 抑制COX-2在抑制结直肠癌的发生发展中具有重要的意义. 本实验通过应用COX-2抑制剂塞来昔布作用SW480细胞, 观察SW480细胞放射敏感性的变化, 初步探讨抑制PI3K/Akt/COX-2途径对人结肠癌细胞SW480放射增敏的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌SW480细胞株为华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心实验室保存. RPMI 1640细胞培养基为美国Gibco公司产品; 塞来昔布为安徽合肥森瑞化工有限公司产品; 兔抗人磷酸化Akt抗体(pAkt Thr308)为美国Cell Signaling公司产品; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记为美国Pierce公司产品; β -actin兔抗人单克隆抗体为美国Santa Cruz公司产品; COX-2(N-20)山羊抗人多克隆抗体、pBad(S112)兔抗人多克隆抗体为美

国Santa Cruz公司产品. Saturn-43型直线加速器为美国GE公司产品; PCR仪为美国Biometro T3 thermocycle产品; GDS8000型成像分析系统为英国UVP公司产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人结肠癌SW480细胞接种于含100 mL/L加热灭活胎牛血清的RPMI 1640完全培养液中, 置于37℃、50 mL/L CO₂、相对湿度90%的细胞培养箱中培养, 细胞呈贴壁生长. 取对数生长期的细胞, 进行实验.

1.2.2 药物细胞毒性测定(MTT法): 对数生长期SW480细胞以接种于96孔板; 加入celecoxib, 浓度分别为80, 100, 120, 140, 160 μ mol/L, 药物作用24 h; 去培养液, 加MTT(5 g/L)20 μ L/孔避光培养4 h; 去MTT加入DMSO 150 μ L/孔作用15 min, 充分振荡10 min; 酶标仪492 nm波长测定各孔吸光度值. 按公式计算细胞抑制率(抑制率 = 1-药物实验组吸光度值/未加药物对照组吸光度值 $\times 100\%$). 药物效应中效方程式法计算药物半数抑制浓度(IC₅₀). 药物效应中效方程式 $fa/fu = (D/Dm)^m$, 进行中效作图 $y = \log fa/fu$, $x = \log D$, $y = ax+b$ (fa为效应, fa = 抑制率, fu为1-fa, D为药物浓度, Dm为中效剂量, 即0.5效应时的药物浓度, m为斜率).

1.2.3 细胞照射: 将对数生长期细胞置于0.5 cm的补偿物上, 将直线加速器机架角度为180度, 以保证相同厚度的剂量建成区. 应用6 MV X线按所需剂量输出剂量照射.

1.2.4 细胞克隆形成法测定药物对SW480细胞的放射增敏作用: 取celecoxib的20%细胞抑制浓度(IC₂₀)为药物增敏浓度. 实验分组为: 对照组、单纯照射组、celecoxib联合照射组. 对数生长期细胞接种60 mm细胞培养皿, celecoxib联合照射组加入药物作用24 h, X线0、2、3、4、6、8 Gy照射细胞, 3 h后更换不含药物培养基继续培养2 wk, 终止培养, 甲醇固定20 min, Giemsa染色15 min. 自然干燥后计数细胞克隆(50个细胞/克隆). 计算集落形成率及细胞存活分数, 集落形成率(PE) = 空白对照组集落数/空白对照组接种细胞数 $\times 100\%$; 细胞存活分数(SF) = 某一剂量照射实验组的集落数/该组细胞接种数 \times 集落形成率(PE). 放疗加药组得到的细胞存活分数均用单纯给药组细胞存活分数校正, 以消除药物作用对SF的影响.

1.2.5 Western blot方法检测磷酸化Akt、COX-2、磷酸化Bad蛋白的表达: 按上述分组给药作用24 h, X线6 Gy照射细胞1 h后, 细胞裂解液(50

■研发前沿

提高恶性肿瘤的放射生物学效应是肿瘤放射增敏的研究热点, 目前很多放射增敏药物提高肿瘤细胞内在的放射敏感性主要是通过增加细胞DNA损伤及抑制DNA损伤后再修复实现的.

■创新亮点

本研究提示,放射诱导PI3K/Akt/COX-2途径的活化是SW480细胞放射抗拒的重要原因,celecoxib能够抑制PI3K/Akt/COX-2途径的活化,抑制Bad蛋白的磷酸化,从而提高SW480细胞放射治疗的效果。

表 1 celecoxib对SW480细胞的放射增敏作用

	Dq	D0	SF2
单纯照射组	2.527	1.622	0.805
celecoxib联合照射组	0.995	1.091	0.352

mmol/L Tris-Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.02%叠氮钠, 0.1% SDS, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L aprotinin, 1% NP-40, 0.5%去氧胆酸钠)提取细胞总蛋白, 加热变性后-20℃保存。取50 μg蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳, 将凝胶中的蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上, 封闭液(TBS+5%脱脂奶粉+0.5% tween-20)封闭1 h, 加入相应浓度的一抗(pAkt 1:200, COX-2 1:200, pBad 1:200) 4℃孵育过夜, 洗膜后, 加入1:5 000的辣根过氧化物酶标记的相应二抗孵育2 h, 采用化学发光法(ECL)曝光胶片, 冲洗显色检测相应蛋白条带。英国UVP公司GPS8000型凝胶成像分析系统扫描分析蛋白条带。

1.2.6 细胞凋亡检测: 按上述分组给药作用24 h, X线6 Gy照射细胞, 3 h后, 消化收集细胞。1 000 r/min离心5 min收集细胞制成细胞悬液, 0.01 mol/L PBS液冲洗2次, 用-20℃ 80%乙醇固定细胞, 细胞悬液1 000 r/min离心5 min, 去掉乙醇固定液, PBS液洗涤2次, 调整细胞浓度为 5×10^8 /L, 加入PI染液1 mL(50 mg/L PI, 100 mg/L RNase, 0.1% TRItton-100), 4℃孵育60 min, 200目钢筛过滤, 流式细胞术检测细胞凋亡。

统计学处理 每组实验均重复3次。实验数据以均数表示。存活曲线用单击多靶模型拟合。放射增敏比(SER)定义为单纯放射组的D0除以增敏组D0。应用SPSS11.0软件进行统计分析, 均值用mean±SD表示, 组间进行t检验, 以 $P<0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 celecoxib对SW480细胞的抑制作用 celecoxib对SW480细胞的抑制作用存在剂量依赖性。根据药物效应中效方程式法计算药物 IC_{50} , celecoxib的 IC_{50} 为 $135.47 \mu\text{mol/L} \pm 26.32 \mu\text{mol/L}$ 。通过进行中效作图, celecoxib的 IC_{20} 约为 $45 \mu\text{mol/L}$ 。取药物的 IC_{20} 为放射增敏浓度。

2.2 抑制COX-2提高SW480细胞的放射敏感性 通过单击多靶模型拟合细胞存活曲线发现, celecoxib联合照射组的Dq、D0及SF2均明显低于单纯照射组(表1, 图1)。celecoxib联合照射组SER为

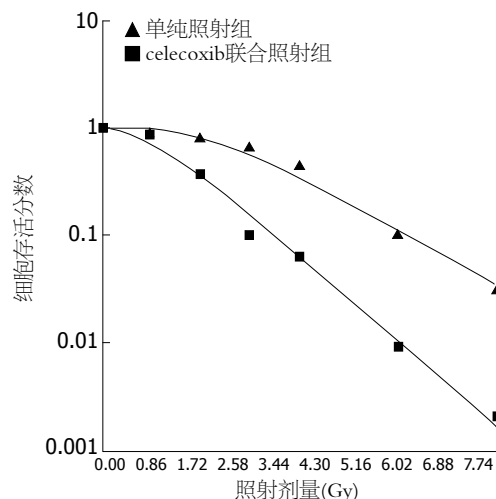


图 1 SW480细胞单纯照射组和celecoxib联合照射组的单击多靶模型拟合存活曲线。

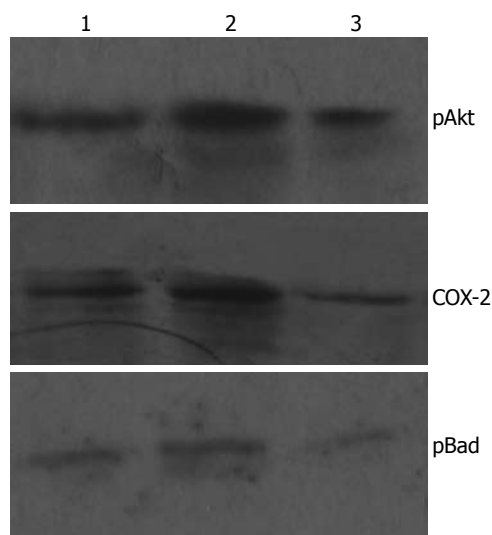


图 2 pAkt、COX-2、pBad蛋白的表达变化。1: 对照组; 2: 单纯照射组; 3: celecoxib联合照射组。

1.487。抑制COX-2明显提高SW480细胞的放射敏感性。

2.3 磷酸化Akt、COX-2、磷酸化Bad蛋白的表达变化 以β-actin为内参照研究, 进行检测蛋白质的比较研究。pAkt蛋白: 照射能够提高pAkt蛋白的表达, celecoxib联合照射组pAkt蛋白表达低于单纯照射组; COX-2蛋白: 照射能够提高COX-2蛋白的表达, celecoxib联合照射组COX-2蛋白表达低于单纯照射组; pBad蛋白: 照射能够提高pBad蛋白的表达, celecoxib联合照射组pBad蛋白的表达低于单纯照射组; 灰度分析蛋白各组间的表达水平存在统计学差异($P<0.05$, 表2, 图2)。

2.4 照射后细胞凋亡的变化 应用celecoxib抑制

表 2 pAkt、COX-2、pBad蛋白的表达变化灰度值

	pAkt	COX-2	pBad
对照组	0.4824 ± 0.0071	0.3625 ± 0.0064	0.2569 ± 0.0069
单纯照射组	0.8199 ± 0.0163	0.8165 ± 0.0201	0.3176 ± 0.0041
celecoxib联合照射组	0.3526 ± 0.0127	0.3248 ± 0.0098	0.1342 ± 0.0061

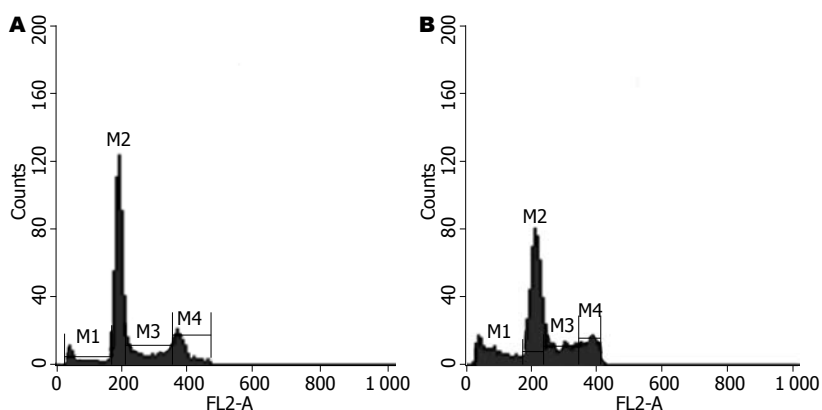


图 3 SW480细胞单纯照射组和celecoxib联合照射组细胞凋亡图. A: 单纯照射组M1: 6.76; B: celecoxib联合照射组M1: 14.67. M1: 凋亡率; M2: G₁期; M3: S期; M4: G₂/M期.

PI3K/Akt/COX-2通路后, 能够明显提高辐射对联合照射组SW480细胞的杀伤作用, 通过流式细胞技术检测发现细胞凋亡率明显高于单独照射组, SW480细胞celecoxib联合照射组和单纯照射组细胞凋亡率分别为 15.02 ± 2.16 和 6.25 ± 1.22 , 凋亡率差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图3).

3 讨论

细胞在一系列内外因素的作用下, 通过启动PI3K/Akt信号转导通路, 诱导细胞的增殖、分化, 避免细胞发生凋亡. 生长因子(EGF、IGF等)、原癌基因激活、抑癌基因的失活、化疗药及DNA损伤均能活化PI3K/Akt信号转导通路^[5,6]. COX-2基因定位于1号染色体1q25.2-25.3, 由10个外显子和9个内含子构成. COX-2与其同工酶COX-1在氨基酸序列上有61%相同, 但表达形式和功能不同. COX-1为结构型表达, 其酶促产物参与维持正常生理功能, 如胃肠道黏膜的保护; COX-2为诱导型表达, 正常情况下只存在于部分肾、脑组织及妊娠后期胎盘中, 当受到炎症介质、促癌因素刺激时, 表达增加^[7,8]. COX-2及其产物PGs可进入核内, 调节靶基因的转录. 多种恶性肿瘤中均存在COX-2过表达的情况. COX-2过表达可以促进新生血管生成、促进肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡. 塞来昔布是一种COX-2的抑制剂, 研究表明抑制肿瘤细胞内的COX-2能够提高放射治疗的效果, 其可能机制如下: (1)降低细胞内前列腺素E₂水平, 减少其对细胞的放

射保护作用^[9,10]; (2)塞来昔布能够抑制细胞增殖, 促进凋亡^[11-14]; (3)抑制细胞DNA损伤后的再修复^[15,16]. 但是, PI3K/Akt信号转导途径与COX-2肿瘤细胞放射治疗中的作用及其调节机制尚不甚清晰, 值得深入研究.

我们设计通过抑制COX-2来研究PI3K/Akt/COX-2在SW480细胞放射治疗中的作用. 我们发现抑制COX-2通路能够明显提高SW480细胞的放射敏感性. 通过细胞集落形成试验, 单靶多击模型拟合细胞存活曲线发现, celecoxib联合照射组SER是单纯照射组的1.487倍; celecoxib联合照射组的D₀值明显低于单纯照射组. 这说明, 抑制COX-2能够明显提高SW480细胞的放射敏感性. 同时, celecoxib联合照射组的D_q值明显低于单纯照射组, 表明抑制COX-2能够抑制SW480细胞的亚致死性损伤的再修复过程, 这可能是提高SW480细胞放射敏感性的重要原因.

我们在celecoxib联合照射组的研究中发现, celecoxib联合照射组pAkt蛋白的表达明显低于单纯照射组. 这说明celecoxib能够抑制照射引起的Akt蛋白磷酸化, 提示我们COX-2可能是Akt发生磷酸化的重要原因. 有学者研究认为: COX-2是一个早反应基因, 能够被多种生长因子和细胞因子活化, 促进细胞增殖生长, celecoxib抑制COX-2的产生, 抑制Akt发生磷酸化, 从而导致细胞凋亡^[17]. Lin等^[18]在对高表达COX-2的人肺腺癌细胞CL-10研究中发现, COX-2高表达能够使细胞对长春花碱和紫外线导致的凋亡产生抵抗,

■应用要点

COX-2过表达可以促进新生血管生成, 促进肿瘤细胞增殖, 抑制细胞凋亡. 本实验通过应用COX-2抑制剂塞来昔布作用SW480细胞, 提高SW480细胞放射敏感性, 进一步可应用临床提高放射治疗的效果.

同行评价

本研究科学结论明确, 实验证据充足, 统计分析结果可信, 文章的科学性、创新性和可读性较好地反映了我国胃肠病学基础研究的先进水平。

其原因是通过COX-2诱导Akt磷酸化实现的, 抑制COX-2则可以明显增加长春花碱和紫外线导致的细胞凋亡。也有研究认为, COX-2的产物前列腺素E2是导致PI3K/Akt信号转导通路活化的重要原因, celecoxib通过抑制COX-2而使前列腺素E2减少, 导致Akt磷酸化减少^[19]。我们的结果支持celecoxib抑制Akt磷酸化。

PI3K依赖性的Akt激活可以使Bad的Ser136/Ser112残基磷酸化, 磷酸化的Bad与Bcl-2或Bcl-xL解聚, Bad再与抗凋亡结合蛋白14-3-3相结合, 而游离的Bcl-2发挥抗凋亡作用^[20]。我们发现, celecoxib联合照射组的细胞凋亡率明显高于单纯对照组, celecoxib联合照射组磷酸化pBad的表达水平低于单纯对照组, 提示celecoxib能够通过提高抑制Bad磷酸化促进细胞凋亡。

我们的研究提示, 放射诱导PI3K/Akt/COX-2途径的活化是SW480细胞放射抗拒的重要原因, celecoxib能够抑制PI3K/Akt/COX-2途径的活化, 抑制Bad蛋白的磷酸化, 从而提高SW480细胞放射治疗的效果。

参考文献

- Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, Zhang J, Signoretti S, Loda M, Roberts TM, Zhao JJ. Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature* 2008; 454: 776-779
- Kim S, Wong P, Coulombe PA. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature* 2006; 441: 362-365
- Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS, Gartel A, Hay N. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 7831-7841
- Opel D, Westhoff MA, Bender A, Braun V, Debatin KM, Fulda S. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition broadly sensitizes glioblastoma cells to death receptor- and drug-induced apoptosis. *Cancer Res* 2008; 68: 6271-6280
- Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 2008; 27: 5497-5510
- Toulany M, Kehlbach R, Rodemann HP, Mozdarani H. Radiocontrast media affect radiation-induced DNA damage repair in vitro and in vivo by affecting Akt signalling. *Radiother Oncol* 2010; 94: 110-116
- Ristimäki A, Honkanen N, Jänkälä H, Sipponen P, Härkönen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1276-1280
- Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg

- AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 429-434
- Tessner TG, Muhale F, Schloemann S, Cohn SM, Morrison AR, Stenson WF. Ionizing radiation up-regulates cyclooxygenase-2 in I407 cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis* 2004; 25: 37-45
- Raju U, Nakata E, Yang P, Newman RA, Ang KK, Milas L. In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 886-894
- Swamy MV, Herzog CR, Rao CV. Inhibition of COX-2 in colon cancer cell lines by celecoxib increases the nuclear localization of active p53. *Cancer Res* 2003; 63: 5239-5242
- Huang S, Sinicrope FA. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells. *Autophagy* 2010; 6: 256-269
- Wen B, Deutsch E, Eschwege P, De Crevoisier R, Nasr E, Eschwege F, Bourhis J. Cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 enhances antitumor effect of irradiation on hormone refractory human prostate carcinoma cells. *J Urol* 2003; 170: 2036-2039
- Chuang HC, Kardosh AH, Gaffney KJ, Petasis NA, Schönthal AH. COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation in vitro. *Mol Cancer* 2008; 7: 38
- Kang KB, Zhu C, Yong SK, Gao Q, Wong MC. Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: Induction of DNA damage leading to p53-dependent G1 cell cycle arrest and autophagy. *Mol Cancer* 2009; 8: 66
- Lim JW, Kim H, Kim KH. Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 46093-46100
- Barnes NL, Warnberg F, Farnie G, White D, Jiang W, Anderson E, Bundred NJ. Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *Br J Cancer* 2007; 96: 575-582
- Lin MT, Lee RC, Yang PC, Ho FM, Kuo ML. Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 48997-49002
- Yasumaru M, Tsuji S, Tsujii M, Irie T, Komori M, Kimura A, Nishida T, Kakiuchi Y, Kawai N, Murata H, Horimoto M, Sasaki Y, Hayashi N, Kawano S, Hori M. Inhibition of angiotensin II activity enhanced the antitumor effect of cyclooxygenase-2 inhibitors via insulin-like growth factor I receptor pathway. *Cancer Res* 2003; 63: 6726-6734
- Henshall DC, Araki T, Schindler CK, Lan JQ, Tiekoter KL, Taki W, Simon RP. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. *J Neurosci* 2002; 22: 8458-8465

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

基质金属蛋白酶在食管癌组织中的表达及与微量元素含量之间的关系

陈超伍, 马洪升

陈超伍, 江苏省扬州大学临床医学院附属医院消化内科 江苏省扬州市 225001

马洪升, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
陈超伍, 硕士, 从事食管癌方向的研究。

作者贡献分布: 陈超伍与马洪升对此文所作贡献均等; 此课题由马洪升与陈超伍设计; 研究过程由马洪升与陈超伍操作完成。研究所用试剂及分析工具由马洪升提供; 数据分析由陈超伍完成; 本论文写作由陈超伍完成。

通讯作者: 马洪升, 教授, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科, mahongsheng63@163.com

收稿日期: 2010-04-04 修回日期: 2010-06-15

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-08

Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in esophageal carcinoma and their relationship with trace elements

Chao-Wu Chen, Hong-Sheng Ma

Chao-Wu Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Yangzhou University & Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China

Hong-Sheng Ma, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Professor Hong-Sheng Ma, Department of Gastroenterology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. mahongsheng63@163.com

Received: 2010-04-04 Revised: 2010-06-15

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To explore the role of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 and trace elements in the occurrence, growth, invasion and metastasis of esophageal carcinoma.

METHODS: The expression of MMP-2 and MMP-9 in 49 esophageal carcinoma specimens and 16 carcinoma-adjacent esophageal tissue specimens was detected by immunohistochemistry. The correlation of MMP-2 and MMP-9 expression with tumor grade, differentiation, lymph node metastasis, and patients' gender and age was analyzed. The content of trace elements in esophageal carcinoma was measured using a

Shimadzu AA-670 atomic absorption spectrophotometer.

RESULTS: The positive rates of MMP-2 and MMP-9 expression in esophageal carcinoma were higher than that in carcinoma-adjacent esophageal tissue (69.3% vs 12.5% and 71.4% vs 6.25%, respectively, both $P < 0.05$). The positive rates of MMP-2 and MMP-9 expression were significantly higher in esophageal carcinoma patients with lymph node metastasis than in those without lymph node metastasis (85.7% vs 47.6% and 82.1% vs 52.3%, respectively, both $P < 0.05$). The positive rates of MMP-2 and MMP-9 expression were not correlated with tumor differentiation, pathologic type, and patients' age and gender (all $P > 0.05$). The average content of zinc (Zn) and the ratio of Zn to copper (Cu) in esophageal carcinoma were significantly lower than those in carcinoma-adjacent tissue ($8.13 \mu\text{g/g} \pm 3.08 \mu\text{g/g}$ vs $11.63 \mu\text{g/g} \pm 3.49 \mu\text{g/g}$; 7.50 ± 3.65 vs 15.40 ± 6.84 ; both $P < 0.05$). The Zn/Cu ratio in adenocarcinoma was significantly lower than that in squamous cell carcinoma (4.48 ± 3.52 vs 8.02 ± 3.45 , $P < 0.05$). The average content of selenium (Se) in adenocarcinoma was significantly higher than that in squamous cell carcinoma ($0.91 \mu\text{g/g} \pm 1.72 \mu\text{g/g}$ vs $0.29 \mu\text{g/g} \pm 0.28 \mu\text{g/g}$, $P < 0.05$). The average content of Zn in esophageal carcinoma and the Zn/Cu ratio in patients with lymph node metastasis were significantly lower than those in esophageal carcinoma tissue and patients without lymph node metastasis, respectively ($7.72 \mu\text{g/g} \pm 3.03 \mu\text{g/g}$ vs $9.59 \mu\text{g/g} \pm 3.06 \mu\text{g/g}$; 6.91 ± 3.86 vs 9.93 ± 4.81 ; both $P < 0.05$). The content of trace elements in esophageal carcinoma was not correlated with tumor differentiation, pathologic type, and patients' age and gender.

CONCLUSION: MMP-2 and MMP-9 expression, Zn content, and Zn/Cu ratio are closely correlated with the occurrence, growth and metastasis of esophageal carcinoma. Combined detection of trace element content and MMP-2 and MMP-9 expression may provide an objective indicator to

■背景资料

我国是世界上食管癌高发地区之一, 每年死亡人数占恶性肿瘤死亡人数的第四位, 食管癌淋巴结转移率及复发率高, 其临床进展较快, 预后较差。

■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

■研究前沿

食管癌的发生发展与各种因素:如遗传、环境、污染、微量元素有关,对食管癌原因及发生发展的研究为我国研究的热点之一。

estimate the biological behavior and prognosis of esophageal carcinoma.

Key Words: Matrix metalloproteinases-2; Matrix metalloproteinases-9; Immunohistochemistry; Esophageal carcinoma

Chen CW, Ma HS. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in esophageal carcinoma and their relationship with trace elements. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 1995-2000

摘要

目的: 探讨MMP-9、MMP-2及微量元素在食管癌的发生、发展、浸润、转移过程中的作用及相互关系。

方法: 应用免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)SP法检测49例食管癌及16例癌旁组织中MMP-2、MMP-9蛋白的表达情况与食管癌的病理分型、分化程度、淋巴结转移及患者性别、年龄之间的相互关系。用AA-670原子吸收分光光度计测定食管癌组织中微量元素的含量。并对两者的结果做相关分析。

结果: MMP-2、MMP-9蛋白的表达在食管癌中表达明显高于癌旁正常组织(69.3% vs 12.5%, 71.4% vs 6.25%), 且在有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组(85.7% vs 47.6%, 82.1% vs 52.3%), 但在不同病理分型、年龄、性别、分期、分化程度中无明显统计学差异。食管癌组织中Zn含量及Zn/Cu显著低于癌旁正常食管组织Zn含量及Zn/Cu($8.13 \mu\text{g/g} \pm 3.08 \mu\text{g/g}$ vs $11.63 \mu\text{g/g} \pm 3.49 \mu\text{g/g}$; 7.50 ± 3.65 vs 15.40 ± 6.84), 同时腺癌的Zn/Cu低于鳞癌的Zn/Cu(4.48 ± 3.52 vs 8.02 ± 3.45), 食管腺癌组织中Se的含量显著高于食管鳞癌中Se的含量($0.91 \mu\text{g/g} \pm 1.72 \mu\text{g/g}$ vs $0.29 \mu\text{g/g} \pm 0.28 \mu\text{g/g}$); 有淋巴结转移组癌组织中Zn含量及Zn/Cu显著低于无淋巴结转移组癌组织中Zn含量及Zn/Cu($7.72 \mu\text{g/g} \pm 3.03 \mu\text{g/g}$ vs $9.59 \mu\text{g/g} \pm 3.06 \mu\text{g/g}$; 6.91 ± 3.86 vs 9.93 ± 4.81)。而不同分化程度、不同分期、不同年龄、不同性别的食管癌中微量元素含量没有明显差别。

结论: MMP-2、MMP-9及微量元素Zn的含量及Zn/Cu与在食管癌的发生发展及侵袭转移中可能起重要作用。联合检测微量元素、MMP-2与MMP-9有可能成为判断食管癌生物学行为的客观指标, 对判断预后可能有一定价值。

关键词: 基质金属蛋白酶2; 基质金属蛋白酶9; 免疫组织化学; 食管癌

陈超伍, 马洪升. 基质金属蛋白酶在食管癌组织中的表达及与微量元素含量之间的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18(19): 1995-2000

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1995.asp>

0 引言

我国是世界上食管癌高发地区之一, 每年死亡人数占恶性肿瘤死亡人数的第4位, 食管癌淋巴结转移率及复发率高, 其临床进展较快, 预后较差。近年随着消化系内镜技术的发展, 提高了对早期病变的认识水平, 使得局限于黏膜内及黏膜下的食管癌的检出率有所提高, 但仍然未能达到一个理想的水平。因此从分子病理学角度深入研究食管癌的发病机制及转移机制, 对于早期发现、诊断和治疗食管癌, 从而提高患者的生存率、改善生活质量有十分重要的意义。本试验通过研究食管癌组织、食管癌旁正常组织中的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的表达及微量元素的含量, 寻找他们在食管癌组织与食管正常组织、有无淋巴结转移的食管癌组织中表达的差异, 并结合临床资料, 探讨他们与食管癌的分化、有无转移及肿瘤分期的关系, 为临床防治食管癌和判断预后提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 食管癌及癌旁组织标本来自于四川大学华西医院胸外科2004-2007年手术切除标本, 食管癌组织共49例, 癌旁正常组织均取自距癌灶6 cm的食管上切端标本共16例, 总共65例。食管癌按照有无淋巴结转移、TNM分期、分化程度和年龄、性别进行分类, 所有病例术前均无化疗、放疗及免疫治疗史。共有鳞癌39例, 腺癌10例, 癌旁正常食管组织16例; 根据国际抗癌联盟(UICC)美国抗癌联合会(AJCC)的TNM分期标准: 其中I级7例, II级12例, III级22例, IV级8例; 男42例, 女7例; 大于等于60岁的21例, 小于60岁的28例; 有淋巴结转移的28例, 无淋巴结转移的21例; 高分化6例, 中分化16例, 低分化27例。DAB、免疫组织化学染色试剂盒、兔抗人MMP-9多克隆抗体、兔抗人MMP-2多克隆抗体(北京中杉金桥公司)。SOLAAR M6原子吸收分光光度计(Thermo Elemental)。

1.2 方法

1.2.1 微量元素的检测: 精密称取病理石蜡切片至15 mL塑料离心管中, 加1 mL硝酸(GR)放置过夜, 90 °C水浴30 min消化溶解样品, Milli Q超纯

表 1 食管癌与癌旁组织中MMP-9蛋白表达的关系

分组	n	MMP-2					MMP-9				
		阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2 值	P值	阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2 值	P值
食管癌	49	34	15	69.3	15.797	0.00	34	15	69.3	15.797	0.00
癌旁正常	16	2	14	12.5			2	14	12.5		

表 2 食管组织中MMP-9蛋白的表达与临床病理特征的关系

病理特征	n	MMP-2					MMP-9				
		阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2 值	P值	阳性	阴性	阳性率(%)	χ^2 值	P值
类型											
鳞癌	39	27	12	69.2	0.002	0.962	28	11	71.8	0.013	>0.05
腺癌	10	7	3	70.0			7	3	70.0		
性别											
男	42	30	12	71.4	0.576	0.448	30	12	71.4	0.000	>0.05
女	7	4	3	57.1			5	2	71.4		
淋巴结转移											
有	28	24	4	85.7	8.199	0.004	23	5	82.1	5.004	0.025
无	21	10	11	47.6			11	10	52.3		
TNM											
I + II	19	11	8	57.9	1.930	0.165	13	6	68.4	0.138	0.711
III + IV	30	23	7	76.7			22	8	73.3		
年龄(岁)											
≥60	21	17	4	80.9	2.314	0.128	16	5	76.1	0.408	0.523
<60	28	17	11	60.7			19	9	67.8		
分化程度											
高分化	6	3	3	50.0	0.282 ^A	0.595 ^A	4	2	66.7	0.009 ^A	0.926 ^A
中分化	16	10	6	62.5	1.910 ^B	0.167 ^B	11	5	68.8	0.136 ^B	0.712 ^B
低分化	27	21	6	77.8	1.166 ^C	0.280 ^C	20	7	74.0	0.142 ^C	0.707 ^C

^A高中分化之间比较; ^B高低分化之间比较; ^C中低分化之间比较。

水定容至5.0 mL刻度后旋涡混匀得分析样液. 标准曲线法定量。

1.2.2 MMPs的检测: 免疫组织化学方法按试剂盒说明书进行, 用已知阳性切片作阳性对照, 以PBS代替一抗作空白对照. 以正常血清代替一抗作阴性对照。

1.2.3 MMPs结果的判断标准: 染色以细胞质呈清晰棕黄色为阳性, 以染色强度和阳性细胞百分率之和来评估. 染色强度: 0分, 无色为非阳性细胞; 1分, 淡黄为弱阳性; 2分, 深黄为中等阳性; 3分, 棕色为强阳性. 阳性细胞百分率: 0分, 无阳性细胞, 1分, 阳性细胞<25%, 2分, 阳性细胞占25%-50%, 3分, 阳性细胞占51%-75%, 4分, 阳性细胞>75%. 两项之和: 0分为(-), 2分为(+), 3-4分为(++), 5-7分为(+++). 本研究以0-1分为(-), 2分及以上为(+).

统计学处理 计数资料采用 χ^2 检验. 计量资

■相关报道

国内外学者对人体不同部位、不同组织中的肿瘤进行研究显示: 在不同肿瘤组织中, MMPs具有不同的分布; 在不同部位的肿瘤中MMPs增高的程度不同, 并与肿瘤进展及预后相关。

料采用 t 检验, 两者间相关关系用单因素Logistic回归分析. 所有数据统计在SPSS11.0统计软件上进行. $P<0.05$ 表示差异有显著意义。

2 结果

2.1 食管癌及癌旁组织中MMPs的表达 MMP-2蛋白在食管癌组织中的阳性率为69.3%(34/49), 显著高于正常食管上皮12.5%(2/16)($P<0.05$, 表1), 但鳞癌和腺癌组织中MMP-2蛋白阳性率之间差别无统计学意义($P>0.05$); 有淋巴结转移组和无淋巴结转移组MMP-2蛋白的阳性表达率为85.7%(24/28)和47.6%(10/21), 差异有统计学意义($P<0.05$); 但在不同病理分型、年龄、性别、分期、分化程度中无明显统计学差异(表2, 图1)。

MMP-9蛋白在食管癌组织中的阳性率为71.4%(35/49), 显著高于癌旁正常食管上皮6.25%(1/16)($P<0.05$, 表2), 有淋巴结转移组和

■创新盘点

本研究应用SP法检测食管癌及癌旁组织中MMP-2、MMP-9蛋白的表达情况并测定食管癌组织中微量元素的含量,以进一步明确两者相关性,对提高食管癌的检出率及判断预后提供依据。

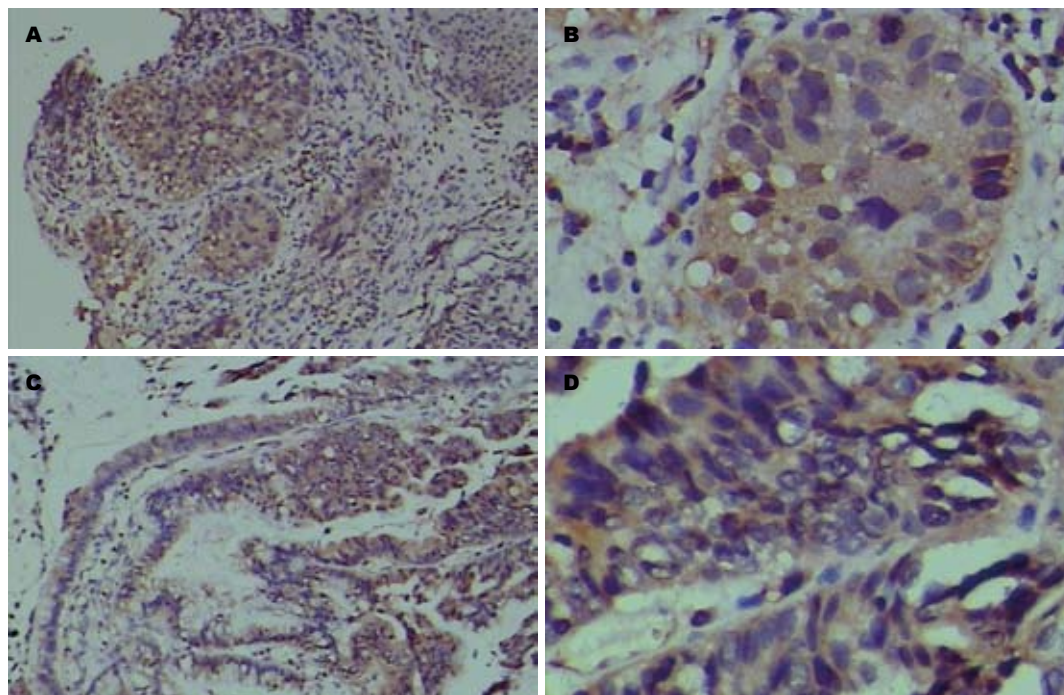


图1 MMP-2在食管癌中的表达。A: 鳞癌中阳性表达(SP×400); B: 在鳞癌中阳性表达(SP×800); C: 腺癌中阳性表达(SP×400); D: 腺癌中阳性表达(SP×800)。

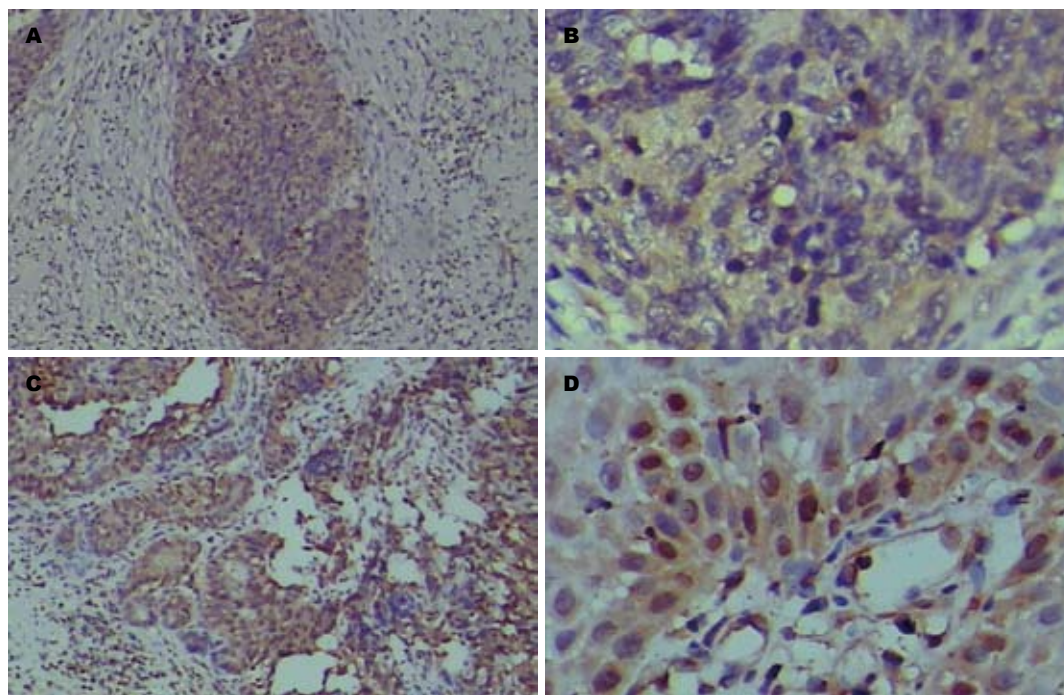


图2 MMP-9在食管癌中表达。A: 鳞癌中阳性表达(SP×400); B: 鳞癌中阳性表达(SP×800); C: 腺癌中阳性表达(SP×400); D: 腺癌中阳性表达(SP×800)。

无淋巴结转移组MMP-9蛋白的阳性表达率为82.1%(23/28)和52.3%(11/21), 差异有统计学意义($P<0.05$); 但不同病理分型、年龄、性别、分期、分化程度中无明显统计学差异(表2, 图2)。

2.2 微量元素的含量 食管癌组织中Zn含量、Zn/Cu显著低于癌旁正常食管组织Zn含量, 而其中

腺癌低于鳞癌, 食管腺癌组织中Se的含量显著高于食管鳞癌中Se的含量; 有淋巴结转移组癌组织中Zn含量显著低于无淋巴结转移组癌组织中Zn含量, 有淋巴结转移组癌组织中Zn/Cu, 显著低于无淋巴结转移组癌组织中Zn/Cu。而不同分化程度、不同分期、不同年龄、不同性别的

表 3 微量元素量的测定结果 (mean ± SD)

	Zn(μg/g)	Cu(μg/g)	Se(μg/g)	Zn/Cu	Mn(μg/g)
食管癌	8.13 ± 3.08 ^a	1.64 ± 2.78	0.18 ± 0.24	7.50 ± 3.65 ^a	0.38 ± 0.71
癌旁组织	11.63 ± 3.49	1.00 ± 0.78	0.12 ± 0.10	15.40 ± 6.84	0.41 ± 0.21
病理					
鳞癌	8.65 ± 2.88 ^a	1.65 ± 3.00	0.29 ± 0.28 ^a	8.02 ± 3.45 ^a	0.16 ± 0.23
腺癌	5.15 ± 2.52	1.54 ± 0.71	0.91 ± 1.72	4.48 ± 3.52	0.25 ± 0.30
分期					
I + II	9.18 ± 2.65	1.19 ± 0.47	0.26 ± 0.13	8.95 ± 4.11	0.17 ± 0.16
III + IV	8.13 ± 3.44	1.30 ± 0.70	0.46 ± 0.91	7.80 ± 4.81	0.18 ± 0.29
淋巴结转移					
有	7.72 ± 3.03 ^a	1.39 ± 0.69 ^a	0.46 ± 0.94	6.91 ± 3.86 ^a	0.20 ± 0.29
无	9.59 ± 3.06	1.09 ± 0.48	0.29 ± 0.18	9.93 ± 4.81	0.16 ± 0.17
性别					
男	8.28 ± 3.03	1.76 ± 3.00	0.41 ± 0.76	7.42 ± 3.73	0.18 ± 0.26
女	7.24 ± 3.44	0.93 ± 0.27	0.21 ± 0.18	7.93 ± 1.28	0.14 ± 0.09
年龄(岁)					
≥60	7.91 ± 3.14	1.20 ± 0.63	0.25 ± 0.18	7.61 ± 3.25	0.12 ± 0.13
<60	8.31 ± 3.08	1.99 ± 3.68	0.49 ± 0.93	7.41 ± 4.01	0.22 ± 0.30
分化程度					
高分化	8.45 ± 2.34	1.16 ± 0.48	0.56 ± 1.29	8.34 ± 3.34	0.16 ± 0.23
中分化	8.00 ± 3.57	1.36 ± 0.67	0.37 ± 0.39	7.40 ± 4.33	0.22 ± 0.35
低分化	9.13 ± 3.36	1.23 ± 0.67	0.27 ± 0.15	8.97 ± 5.47	0.15 ± 0.96

^a*P* < 0.05.

表 4 MMPs与微量元素的相关关系

分组	Zn	Cu	Mn	Se	Zn/Cu
B(MMP-2)	-2.332	0.036	-1.606	-1.356	-0.256
<i>P</i> (MMP-2)	0.010	0.942	0.062	0.075	0.012
B(MMP-9)	-1.887	0.270	-1.324	-1.112	-0.213
<i>P</i> (MMP-9)	0.003	0.567	0.119	0.137	0.020

的食管癌中微量元素含量没有明显差别(表3)。

2.3 MMPs与微量元素的相关关系 结果显示, 食管癌及癌旁正常组织中微量元素Zn的含量及Zn/Cu与MMP-2、MMP-9蛋白的阳性表达呈负相关(回归系数 $B < 0$ 、 $P < 0.05$), 而Cu、Mn、Se的含量与MMP-2、MMP-9蛋白的阳性表达无相关关系($P > 0.05$, 表4)。

3 讨论

MMPs是一类以Zn为辅助因子的蛋白酶家族, 通过介导细胞外基质降解而参与组织正常发育、组织重建、修复、细胞迁移、血管生成、炎症反应、伤口愈合、肿瘤侵袭和转移等过程。越来越多证据^[1]表明, MMPs对良性和恶性肿瘤的生长、血管形成也有重要作用。国内外学者对

人体不同部位、不同组织中的肿瘤进行研究显示: 在不同肿瘤组织中, MMPs具有不同的分布; 在不同部位的肿瘤中MMPs增高的程度不同, 并与肿瘤进展及预后相关^[2-7]。

研究发现, MMP-2、MMP-9与肿瘤细胞的浸润和转移有关^[8-10]。MMP-9属于明胶酶类, 又称为明胶酶B(gelatinase B)。他可以有效地降解基底膜的主要成分IV、V、VI、X型胶原^[11,12], 目前认为MMP-9能够降解基底膜糖蛋白以及几乎细胞外基质的所有成分, 在肿瘤浸润转移中发挥重要作用^[13,14]。

在本研究中, 食管癌MMP-2、MMP-9蛋白的表达率为69.3%, 71.4%, 远远高出在癌旁组织表达阳性率的12.5%, 6.25%; MMP-9、MMP-2蛋白在淋巴结转移组的阳性率也显著高于无转移组的MMP-9、MMP-2阳性率。这说明MMP-2、MMP-9可能在食管癌的进展与肿瘤转移中发挥作用。本实验中食管腺癌阳性表达率明显高于食管鳞癌, 可能与纳入病例的淋巴结转移率不同有关。

有研究表明某些微量元素在体内含量的变化与肿瘤的发生、发展、预防密切相关, 张秀兰等^[15]报道, 健康人、食管上皮重度不典型增生

■应用要点

联合检测微量元素、MMP-2与MMP-9有可能成为判断食管癌生物学行为的客观指标, 对判断预后可能有一定价值。

■同行评价

本研究对于探讨食管癌的发病机制具有一定的意义。

和食管癌患者血清Zn依次呈递减趋势,而食管上皮重度增生和食管癌患者血清Cu及Cu/Zn比值较健康者依次增高,之间存在显著性差异。食管贲门癌患者生存4年以上者术前的血清Cu/Zn比值显著低于4年内死亡者,且存在显著性差异。说明术前血清Cu/Zn比值较小的生存期较长,故可判断其疗效和预后。对食管癌高发区内食管癌、食管上皮重度增生和健康对照者血清Se测定,结果表明重度增生者血清Se含量高于食管癌而低于健康者,均有显著性差异,表明血清Se水平随食管上皮细胞异常程度的加重而逐渐降低。王明臣等^[16]研究显示,随食管上皮病变进展,血清Cu呈显著增加趋势。陈立公等^[17]发现食管癌组织中Zn、Mn含量显著低于癌旁食管组织和正常食管组织,而癌旁正常食管组织中Mn的含量又明显低于正常人食管组织中Mn的含量,其差异均具有显著性。提示Mn与食管癌关系密切。恶性程度高和有淋巴结转移的食管癌组织中,其Zn、Mn含量明显降低。

在本研究中,食管癌组织中锌的含量显著低于癌旁正常食管组织中锌的含量,且有淋巴结转移组的食管癌组织中锌的含量显著低于无淋巴结转移组中锌的含量,而与年龄、性别、分化程度无明显关系,说明在食管癌发生、发展及转移中微量元素的含量可能发挥了一定的作用。而在腺癌中的Zn的含量要明显小于鳞癌中Zn的含量,与相关文献报道不同,可能和腺鳞癌的标本的淋巴结转移率不同所致。

本研究中食管癌中微量元素Zn的含量与Zn/Cu与MMP-2、MMP-9呈负相关,提示微量元素Zn的含量可能下调了MMP-9、MMP-2蛋白的表达,但是Zn作为MMPs的催化物,如何下调了MMPs的表达,有待进一步研究。本研究结果显示MMP-9、MMP-2及微量元素与食管癌侵袭转移密切相关,抑制MMP-9、MMP-2的活性或者是针对性的补充和减少不同微量元素可能会是一个极其重要的治疗恶性肿瘤的新方向。微量元素及MMPs与食管癌的生物行为的关系使他很可能作为判定肿瘤恶性程度、评估预后的重要指标之一。

4 参考文献

- 1 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
- 2 Passlick B, Siene W, Seen-Hibler R, Wöckel W, Thetter O, Mutschler W, Pantel K. Overexpression of matrix metalloproteinase 2 predicts unfavorable outcome in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3944-3948
- 3 Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, Papakonstantinou H, Karavana V, Stefanakis S, Sotsiou F, Pintzas A. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 2009-2013
- 4 Baker EA, Leaper DJ. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. *Eur J Cancer* 2003; 39: 981-988
- 5 Ogata Y, Matono K, Sasatomi T, Ishibashi N, Ohkita A, Mizobe T, Ogo S, Ikeda S, Ozasa H, Shirouzu K. The MMP-9 expression determined the efficacy of postoperative adjuvant chemotherapy using oral fluoropyrimidines in stage II or III colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57: 577-583
- 6 陆兴, 姚利, 刘平平, 胡洪义, 刘凤安. 基质金属蛋白酶2及其组织抑制物在鼻咽癌中的表达. *中国耳鼻喉头颈外科* 2007; 14: 483-486
- 7 Sarioğlu S, Ozer E, Kirimca F, Sis B, Pabuçcuoğlu U. Matrix metalloproteinase-2 expression in laryngeal preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract* 2001; 197: 483-486
- 8 Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL. Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2941-2944
- 9 Lou G, Gao Y, Ning XM, Zhang QF. Expression and correlation of CD44v6, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 in Krukenberg tumor. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5032-5036
- 10 Li BH, Zhao P, Liu SZ, Yu YM, Han M, Wen JK. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metallo-proteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3046-3050
- 11 Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1755: 37-69
- 12 黄晓曦. 基质金属蛋白酶及其抑制剂与肿瘤浸润和转移关系的研究. *医学综述* 2002; 8: 561-563
- 13 Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 207-214
- 14 Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Sato F, Itami A, Imamura M. Expression of cyclooxygenase-2 is associated with carcinogenesis of the lower part of thoracic esophageal squamous cell carcinoma and p53 expression. *Oncology* 2002; 62: 46-54
- 15 张秀兰, 李学东, 乔翠云, 李绍森, 梁素元. 食管癌高发区磁县居民硒铜锌水平的研究. *微量元素与健康研究* 1998; 15: 27-28
- 16 王明臣, 杨利军, 王俊萍, 苗健, 陈本懋. 食管癌及癌前增生人群血清Cu和Cu/Zn SOD含量及其关系的研究. *微量元素与健康研究* 1999; 16: 42-43
- 17 陈立公, 赵东, 宋光民, 汪运山, 李前仁. 食管癌组织中锌锰含量的临床研究. *微量元素与健康研究* 2002; 19: 19-20

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

胃印戒细胞癌的细胞起源及其癌前病变的病理学

周志华, 张建东, 赵海滨, 赵玲娜, 单宝珍

周志华, 赵海滨, 赵玲娜, 单宝珍, 中国人民解放军第101医院病理科 江苏省无锡市214044

张建东, 中国人民解放军第101医院医务处 江苏省无锡市214044

周志华, 主治医师, 主要从事胃癌发生机制和肿瘤干细胞相关领域的研究.

作者贡献分布: 此课题由周志华与张建东设计; 研究过程由周志华与赵海滨完成; 研究所用试剂及分析工具由赵玲娜与单宝珍提供; 数据分析由周志华完成; 论文写作由周志华与张建东完成.

通讯作者: 周志华, 主治医师, 214044, 江苏省无锡市兴源北路101号, 中国人民解放军第101医院病理科. zhzhou97@163.com
电话: 0510-85142281

收稿日期: 2010-04-09 修回日期: 2010-06-10

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-08

Cell origin and premalignant lesions of gastric signet-ring cell carcinoma: a histopathologic study

Zhi-Hua Zhou, Jian-Dong Zhang, Hai-Bin Zhao, Ling-Na Zhao, Bao-Zhen Shan

Zhi-Hua Zhou, Hai-Bin Zhao, Ling-Na Zhao, Bao-Zhen Shan, Department of Pathology, the 101st Hospital of Chinese PLA, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China

Jian-Dong Zhang, Department of Medical Services, the 101st Hospital of Chinese PLA, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhi-Hua Zhou, Department of Pathology, the 101st Hospital of Chinese PLA, 101 North Xingyuan Road, Wuxi 214044, Jiangsu Province, China. zhzhou97@163.com

Received: 2010-04-09 Revised: 2010-06-10

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To investigate the cell origin and premalignant lesions of gastric signet-ring cell carcinoma (SRCC).

METHODS: A total of 42 cases of early gastric SRCC were included in this study. The histological morphology of gastric SRCC was observed. Differentiation markers MUC5AC and MUC6 were labeled by immunohistochemical double-staining of gastric SRCC tissue. The expression of Ki-67 and gastrointestinal stem/progenitor cell marker musashi-1 in SRCC was detected by immunohistochemistry. Additionally, the immunophenotype of gastric glands adjacent to carcinoma was also detected.

RESULTS: Early gastric SRCC was characterized by a two-layered structure consisting of superficial layer and basal layer. The superficial layer contained typical large signet-ring cells that possessed abundant cytoplasm, whereas the basal layer was composed of small-sized primitive cancer cells with a high nucleus/cytoplasm ratio. Cells in the basal layer shared common morphologic features and a similar anatomic location with those in the proliferative zone of gastric glands. These cells were negative for both MUC5AC and MUC6, or merely exhibited a weak MUC5AC expression. Compared with the superficial layer, the percentages of Ki-67- and musashi-1-positive cells were significantly higher in the basal layer ($t = 31.0$ and 22.8 , respectively, both $P < 0.01$). Cells in the basal layer could differentiate into typical signet-ring cells, which resembles the differentiation process of proliferative zone cells into gastric pit cells. Dysplasia of the proliferative zone of gastric glands adjacent to SRCC was noted, and dysplastic cells in the proliferative zone were phenotypically consistent with cancer cells in the basal layer.

CONCLUSION: Gastric SRCC may originate from MUC5AC⁻/MUC6^{low} pre-pit cells in the proliferative zone of gastric glands. Dysplasia of the proliferative zone may represent the premalignant lesions of gastric SRCC.

Key Words: Gastric neoplasm; Signet-ring cell carcinoma; Carcinogenesis; Immunohistochemistry

Zhou ZH, Zhang JD, Zhao HB, Zhao LN, Shan BZ. Cell origin and premalignant lesions of gastric signet-ring cell carcinoma: a histopathologic study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2001-2006

摘要

目的: 研究胃印戒细胞癌的发生与胃腺增殖区的关系, 探讨其细胞起源和癌前病变.

方法: 以42例早期胃印戒细胞癌为研究对象, 观测其组织形态, 采用免疫组织化学双染标记癌灶内分化标志物MUC5AC和MUC6的表达情况, 检测癌灶不同区域Ki-67以及胃肠道

■背景资料

近年来, 世界范围内胃印戒细胞癌的发生率呈现上升趋势, 其发生机制尚不十分清楚. 多数的研究认为, 胃印戒细胞癌起源于胃腺的增殖区, 该区域存在较多不成熟细胞, 可能包括了干细胞和多种前体细胞.

■同行评议者

王娅兰, 教授, 重庆医科大学基础医学院病理教研室

■研发前沿

胃癌包括胃印戒细胞癌起源于干细胞还是具有一定分化程度的前体细胞,以及此类胃癌是否存在癌前病变,为较多研究者所关注。

干/祖细胞标志物musashi-1的表达差异,并与癌旁胃腺进行对比。

结果:早期胃印戒细胞癌具有特征性的分层结构。该结构分为两层,浅表层为典型的印戒细胞,体积大,胞质丰富,基底层为原始的癌细胞,体积小,核/浆比大;在形态和解剖定位上,基底层癌细胞与癌旁胃腺增殖区细胞类似,免疫组织化学显示其MUC5AC、MUC6表达均为阴性,或仅微弱表达MUC5AC,而Ki-67、musashi-1表达率显著高于浅表层印戒细胞($t = 31.0$ 和 22.8 , $P < 0.01$);基底层癌细胞可向浅表层印戒细胞分化过渡,这与增殖区细胞向胃小凹上皮分化的过程相似;癌旁可见胃腺增殖区细胞异型增生,其表型与分层结构基底层癌细胞一致。

结论:胃印戒细胞癌可能起源于增殖区MUC5AC^{low}MUC6的胃小凹前体细胞,同时增殖区的异型增生是此类胃癌的癌前病变。

关键词:胃肿瘤;印戒细胞癌;肿瘤发生;免疫组织化学

周志华, 张建东, 赵海滨, 赵玲娜, 单宝珍. 胃印戒细胞癌的细胞起源及其癌前病变的病理学. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2001-2006

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2001.asp>

0 引言

基于临床病理特征的不同,胃癌可分为肠型和弥漫型两类^[1]。近年的流行病学调查显示,胃癌的总体发病率已明显下降^[2],但弥漫型胃癌尤其是印戒细胞癌的发病率却显著升高^[3],因此这类胃癌也受到越来越多的关注。迄今,胃印戒细胞癌的早期诊断率不高,一个重要原因是对此类胃癌的病理形成机制和癌前病变尚不清楚。胃印戒细胞癌与肠型胃癌相似,起源于胃黏膜上皮。组织学上,胃黏膜的基本结构单位是胃单元(gastric units),该结构为单克隆起源^[4],由胃小凹和胃腺组成,其中胃腺又依次分为峡部、腺颈和基底部。胃腺的峡部以及腺颈上部的细胞增殖活跃,被称为增殖区。研究证实,增殖区是胃印戒细胞癌起源的部位^[5]。然而,这一区域实际上含有多种低分化细胞,并具有不同分化方向^[6,7],印戒细胞癌究竟起源于增殖区的何种细胞,目前尚不清楚。为探讨这一问题,本研究以早期胃印戒细胞癌为观测模型,采用免疫组织化学双染的方法,观测了早期肿瘤细胞的空间分布、分化表型和增殖特性,希望为认识此类肿瘤的细胞起源及其

癌前病变提供新的病理学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 回顾我院1988-2008年以及无锡市第三人民医院2007-2008年手术切除的胃癌根治标本约2 200例,根据最新WHO国际肿瘤病理分类对胃印戒细胞癌的病理诊断标准(印戒细胞占癌细胞总数的50%以上),以及早期胃癌的诊断标准(癌细胞浸润深度不超过黏膜下层),共确认42例早期印戒细胞癌标本作为研究对象,患者年龄30-77岁,其中男25例,女17例,均无家族史;肿瘤分期:24例为T1a期,局限于黏膜内;18例为T1b期,累及黏膜下层。对所有标本的存档蜡块连续切片(厚3 μ m),苏木精-伊红(HE)染色。另取10例正常胃黏膜作为对照。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色:采用免疫组织化学双染标记MUC5AC和MUC6阳性细胞,其中MUC5AC主要表达于胃小凹、峡部和腺颈部的黏液细胞^[8](抗体购自福州迈新公司,为工作液),MUC6则局限于腺颈的黏液细胞和基底部的幽门腺上皮^[8](浓缩抗体购自上海长岛公司,稀释度1:50),此二者常被用来作为胃上皮分化的标志物。操作按产品说明书进行,并根据文献略有改变^[9],步骤简述如下:石蜡切片脱蜡至水;柠檬酸缓冲液(pH6.0)95 $^{\circ}$ C修复10 min,保温10 min;3% H₂O₂室温孵育后血清封闭10 min;而后采用SP法先标记MUC6,显色系统为BCIP/NBT,阳性呈蓝黑色,定位于细胞质;随后再次进行抗原修复,目的为暴露MUC5AC抗原,同时灭活前一次染色时残留抗体的免疫活性,抗原修复方法同前。采用SP法标记MUC5AC,显色系统为HRP/AEC,阳性部位呈红色,定位于细胞质。另取连续切片单独标记Ki-67(抗体购自福州迈新公司,为工作液)和musashi-1(Santa Cruz公司,浓缩液,稀释度1:100),其中musashi-1为一类RNA结合蛋白,与干细胞的不对称分裂有关^[10],是神经干细胞和胃肠道干/祖细胞的标志物^[11-13]。染色仍采用SP法,显色系统为HRP/DAB,阳性部位呈棕黄色,定位于细胞核。阴性对照采用PBS替代一抗与切片孵育,其余操作相同。

1.2.2 不同区域印戒细胞平均Ki-67、musashi-1阳性细胞比例的测定及比较:免疫组织化学染色标记Ki-67、musashi-1后,检测不同区域阳性癌细胞的比率。每例标本测定两个区域:癌灶靠近黏膜表面上皮的浅表部分和浸润最深的

■相关报道

Humar等以早期的遗传性弥漫型胃癌为研究模型,发现在胃腺增殖区细胞黏附性的下降或缺失是胃印戒细胞癌发生的重要机制。

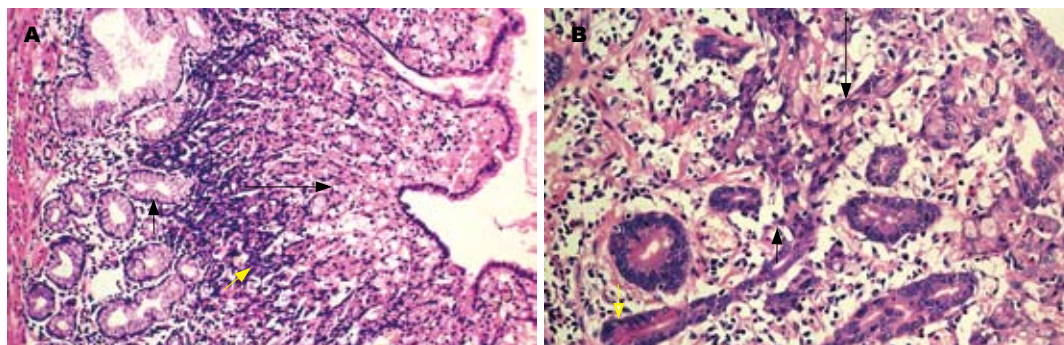


图1 早期胃印戒细胞癌的分层结构(H&E染色). A: 分层结构的浅表层为典型的印戒细胞, 体积大, 细胞核偏于一侧, 胞质丰富(长黑箭头); 基底层为体积较小的癌细胞(黄箭头), 核/浆比大, 胞质略嗜碱, 并向浅表层的印戒细胞过渡. 分层结构下方的胃腺细胞形态正常(短黑细箭头); B: 胃腺颈/峡部细胞(短黑细箭头)出现明显的异型增生, 并过渡为浅表层的印戒细胞(长黑箭头). 颈/峡部细胞可视为分层结构的基底层, 而胃腺的底部仅出现肠上皮化生及轻度异型增生(黄箭头).

■创新盘点

本研究以早期胃印戒细胞癌为观测模型, 采用免疫组织化学双染的方法, 观测早期肿瘤细胞的空间分布、分化表型和干细胞/前体细胞标志物musashi-1的表达情况, 为认识此类肿瘤的细胞起源及其癌前病变提供了病理学依据.

部位. 每个区域随机选取5个视野, 计数Ki-67、musashi-1表达呈阳性的癌细胞数, 除以上述5个视野内癌细胞总数, 即得到阳性细胞比率. 采用 t 检验比较不同区域阳性细胞比率的差异.

2 结果

2.1 早期胃印戒细胞癌的组织结构 HE切片显示, 印戒细胞在胃黏膜层形成典型的分层结构(layered structure), 见于38例标本. 该结构可分为上下两层, 浅表层为经典型印戒细胞, 体积较大, 靠近胃黏膜表面, 而基底层位于黏膜中部, 其细胞构成具有两种形式: (1)由体积较小的印戒细胞或原始癌细胞构成, 其核/浆比大, 并逐渐向浅表层过渡为体积较大的印戒细胞(图1A); (2)由异型增生的峡/颈部细胞构成, 直接向黏膜浅表层移行过渡为典型的印戒细胞(图1B). 在解剖位置上, 分层结构位于黏膜层的中上部, 与胃单元的峡/颈部区域重叠(图2A), 同时分层结构下方的胃腺细胞可保持正常(图1A), 或仅有轻度异型增生(图1B).

2.2 分层结构中癌细胞的分化特性 分层结构上下层细胞在形态上显示两者分化程度不同: 浅表层典型的印戒细胞, 其体积较大, 胞质内黏液丰富, 细胞核受挤压呈弯月形, 偏位, 总体形态上接近于胃小凹上皮; 基底层的癌细胞体积较小, 核/浆比大, 胞质略嗜碱, 形态与峡/颈部细胞相似, 并可向黏膜浅表移行为经典的印戒细胞, 反映其分化更为原始(图1). 免疫组织化学双染显示, 在所有病例中, 浅表层印戒细胞MUC5AC表达呈强阳性, 而越接近基底层MUC5AC表达越弱, 到达分层结构底部时癌细胞MUC5AC表达呈弱阳性或不表达(图2B). MUC6在大多数病例的分层结构内不表达, 只有少数病例(11/42)

可在分层结构的基底层见少数MUC6阳性的癌细胞(比例<10%).

2.3 分层结构中癌细胞的增殖特性 Ki67标记显示胃单元的增殖区, 并可见分层结构尤其是基底层的癌细胞与癌旁胃单元的增殖区在空间位置上重叠. 进一步观测发现, 分层结构基底层的癌细胞增殖较活跃(阳性比率为 $28.7\% \pm 4.3\%$), 而越靠近浅表层, 印戒细胞Ki67阳性率越低(图2C), 经统计浅表层的经典型印戒细胞Ki67表达率为 $6.2\% \pm 1.2\%$, 显著低于基底层低分化的癌细胞($t = 31.0, P < 0.01$).

2.4 分层结构中癌细胞musashi-1的表达 musashi-1染色标记胃单元峡/颈部区域, 与Ki67标记的连续切片对比可发现这一区域涵盖了增殖区. 分层结构上下两层细胞musashi-1的表达不同, 其中基底层低分化癌细胞的阳性率为 $35.3\% \pm 4.4\%$, 向浅表层移行的过程中musashi-1表达下降, 分层结构浅表层经典型印戒细胞的表达阳性率为 $13.8\% \pm 3.8\%$, 显著低于基底层低分化的癌细胞($t = 22.8, P < 0.01$, 图2D).

2.5 癌旁黏膜增殖区的改变 对癌旁胃黏膜的观察显示, 其形态与正常胃黏膜存在差异, 这种差异主要位于增殖区(31/42)及胃小凹(39/42). 增殖区的改变表现为该区域延长, 细胞增殖活跃, 并具有异型性, 其细胞核增大、深染, 分裂象易见, 而胞质减少, 明显嗜碱性(图3A, B), 免疫组织化学染色显示增生的细胞MUC6呈阴性, 而MUC5AC呈弱阳性, 并表达musashi-1(图3C, D). 胃小凹表现为长度增加, 并且分枝, 黏液细胞体积明显增大, 可呈气球状(球样增生), 胞质黏液丰富(图3A); 而在部分病例(23/42), 可见胃小凹的黏液细胞增生, 排列密集, 细胞质减少, 且细胞核增大, 并可出现异型性.

■应用要点

本文研究胃印戒细胞癌的起源,并探讨其癌前病变,对此类胃癌的早期防治可能具有一定意义。

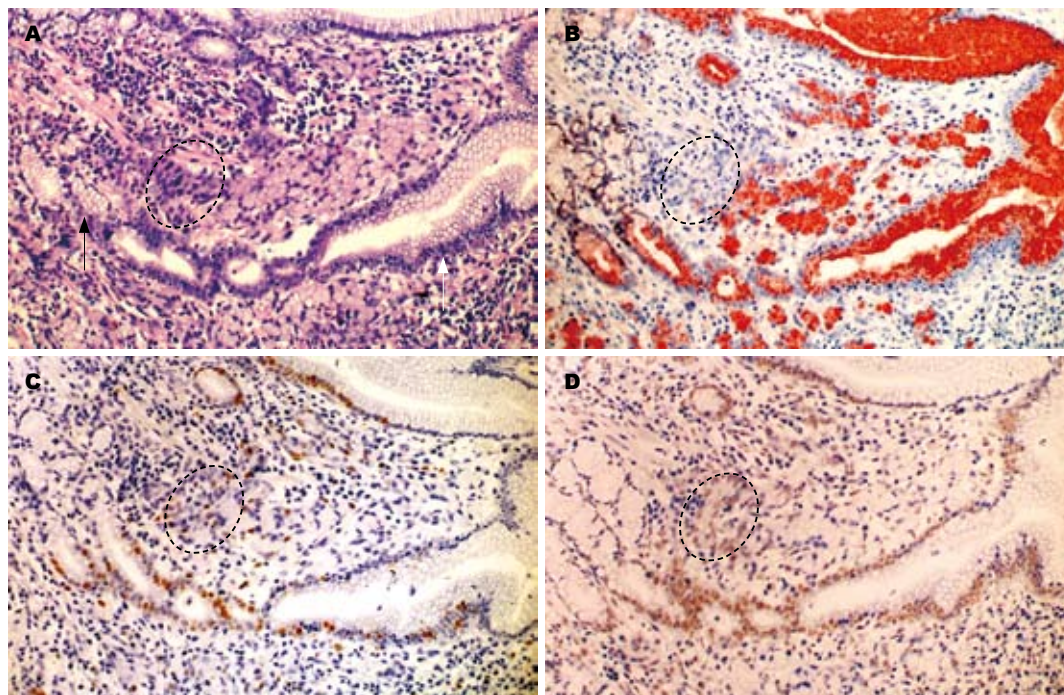


图2 连续切片显示分层结构的解剖位置及免疫表型. A: HE染色显示分层结构位于胃小凹(白色细箭头)与胃腺基底部(黑色细箭头)之间的颈/峡部区域. 椭圆形区域显示分层结构基底部的癌细胞; B: 免疫组织化学双染显示分层结构MUC5AC(红色)和MUC6(黑色)的表达情况,基底层癌细胞呈MUC5AC⁺MUC6⁺,或仅微弱表达MUC5AC,过渡为浅表层的典型印戒细胞后MUC5AC呈强阳性,MUC6在分层结构内不表达,仅见于癌旁胃腺基底部的幽门腺上皮; C: Ki-67标记显示分层结构基底层癌细胞增殖活跃,而浅表层印戒细胞增殖活性较低,同时可见基底层癌细胞与癌旁胃腺的增殖区位于同一水平; D: 分层结构基底层癌细胞表达胃肠干/祖细胞标志物musashi-1,其阳性率高于浅表层印戒细胞,同时可见癌旁胃腺增殖区也表达musashi-1.

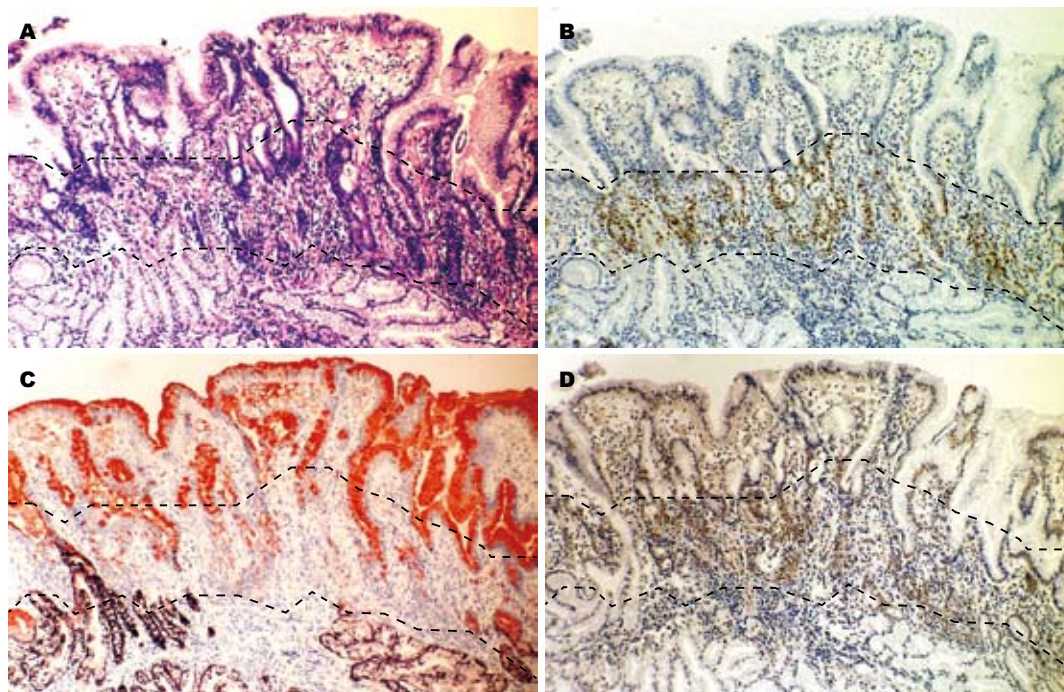


图3 连续切片显示癌旁胃腺增殖区(虚线之间区域)的改变. A: HE切片显示增殖区延长,部分扭曲,细胞核深染,具有异性; B: Ki-67标记显示扩展的增殖区; C: 免疫组织化学双染显示增殖区细胞多呈MUC5AC⁺MUC6⁺,或微弱表达MUC5AC; D: 免疫标记显示增殖区细胞musashi-1呈阳性.

3 讨论

本研究以早期胃印戒细胞癌为观测模型,探讨

了印戒细胞癌形成初期时的组织学特点及分化表型. 与以往研究结果相似^[5,14-16],本研究在早期

胃印戒细胞癌内亦发现特征性的分层结构,证实印戒细胞癌发生于胃腺增殖区,依据为:(1)分层结构位于黏膜层中上部,与胃腺的颈/峡部对应,空间范围上涵盖了增殖区;(2)颈/峡部细胞(包括增殖区细胞)可发生异型增生,并向黏膜表浅层延伸,移行过渡为经典的印戒细胞;(3)分层结构基底部的癌细胞增殖活跃并表达musashi-1,表型与胃腺增殖区相似;(4)癌旁胃黏膜内增殖区扩展,细胞具有异型性。

在以上研究基础上,我们进一步发现:(1)印戒细胞具有胃小凹上皮的分化表型,表达MUC5AC,这与以往研究一致^[17];(2)分层结构模拟了增殖区细胞向胃小凹细胞的分化过程:基底层癌细胞向黏膜浅表层移行为经典印戒细胞的过程中,细胞分化渐趋成熟,表现为干/祖细胞标志物musashi-1表达减少,而MUC5AC表达增强,在形态上也逐渐接近胃小凹上皮;(3)基底层癌细胞移行为印戒细胞的过程中,增殖活性不断减弱,这与正常增殖区细胞向胃小凹上皮分化的过程相似;(4)癌旁胃腺的增殖区扩展,细胞增殖活跃,其表型与低分化癌细胞类似,MUC5AC呈弱阳性或阴性,MUC6不表达;(5)癌旁黏膜可见胃小凹上皮球样增生或具有异型性,说明癌旁的胃小凹细胞虽未癌变,但在分化上出现紊乱。故综合以上结果,我们认为胃印戒细胞癌可能起源于增殖区内MUC5AC弱阳性或阴性、MUC6阴性(MUC5AC^{low}MUC6)的细胞。这些细胞在分化为胃小凹上皮的过程中发生恶性转化,导致了印戒细胞癌的形成。

近年来,随着肿瘤干细胞学说的兴起,有学者提出了胃癌干细胞的概念^[18],并认为胃癌干细胞是驱动胃癌发生发展的根源,这在针对胃癌细胞系的研究中已获得了初步的证据^[19]。而在胃印戒细胞癌,Humar等^[20]发现同一癌灶内的印戒细胞其CDH1基因甲基化的位点相同,说明病灶具有单克隆性,起源于同一始祖细胞,因此也提示胃印戒细胞癌内很可能存在胃癌干细胞。本研究发现分层结构基底部MUC5AC^{low}MUC6的低分化癌细胞表达musashi-1,说明部分癌细胞具有干细胞特性,与上述观点吻合。理论上,肿瘤干细胞很可能由正常干细胞转化而来,而并非源自分化的细胞。因为干细胞存活寿命较长,有足够长的时间积累癌变所需的基因事件,同时,其自我更新相关的信号通路已激活,只需更少的基因事件就可能完成恶性转化^[21]。研究发现,与结直肠癌形成有重要关系的抑癌基因

APC在小鼠的结肠干细胞失活后可诱发腺瘤形成,并可演进为腺癌,证实了上述观点^[22,23]。故此推测胃干细胞是印戒细胞癌的起源细胞似乎具有一定的合理性。

但实际上,具有一定分化程度的前体细胞(祖细胞)也可癌变成为肿瘤干细胞,这在白血病的研究中已得到证实^[24]。而且新近对小鼠胃腺的研究有力地证实,胃干细胞实际上位于胃腺的基底部^[25,26],而非增殖区。因此,如果人的胃干细胞确实位于胃腺基底部,现有的病理形态学观察结果不支持胃印戒细胞癌起源于胃干细胞的观点,因为部分病例内可见胃腺颈/峡部异型增生并过渡为印戒细胞,而此时胃腺基底部细胞保持正常或仅有轻度异型增生。考虑到分层结构模拟了增殖区向胃小凹上皮分化的过程,同时上述分层结构基底层的低分化癌细胞仍可微弱表达MUC5AC,我们认为胃小凹前体细胞是最可能的来源。

此外,有关胃印戒细胞癌是否存在癌前病变目前仍有不同的观点。Humar等^[27]认为增殖区细胞由于CDH1基因失活导致细胞失去黏附性和分化极性,直接从腺体基板上脱离侵入间质,形成了印戒细胞癌。这一发生模式并不包括异型增生的阶段。但Carneiro等^[28]及Rogers等^[29]观察印戒细胞癌标本发现,癌旁黏膜内存在原位印戒细胞癌病灶和上皮异型增生,说明胃印戒细胞癌的发生同其他类型的肿瘤一样,是一个多步骤多阶段的过程,而上皮异型增生可能为此类肿瘤的癌前病变。本研究发现癌旁胃黏膜的增殖区扩展,并且细胞具有异型性,其免疫表型也与基底层癌细胞一致,提示增殖区细胞的异型增生是胃印戒细胞癌的癌前病变。在以往的研究中,我们也曾提出:具有胃型分化(主要表达MUC5AC)的上皮异型增生病变是胃印戒细胞癌的癌前病变^[30],因为在早期胃印戒细胞癌的癌旁黏膜内常观察到表达MUC5AC的异型性腺体。根据本研究结果,我们认为上述异型性腺体实质上可能源于增殖区细胞的异型增生。本研究观察到癌旁胃小凹延长、分支以及小凹上皮的异型增生,与以往研究结果类似,均可能为增殖区细胞向胃小凹上皮分化的过程中发生紊乱所导致。

总之,本研究认为胃印戒细胞癌起源于胃腺增殖区MUC5AC^{low}MUC6的胃小凹前体细胞,同时,该区域细胞的异型增生可能是此类胃癌的癌前病变。上述结论对我们深入了解胃印戒细胞癌的发生机制,尽早实施医学干预降低其

■名词解释

分层结构:是早期胃印戒细胞癌的特征性组织结构,可分为两层:浅层为分化成熟的印戒细胞,体积较大;底层为低分化的癌细胞,体积小。有时分层结构除以上两层外,在底层下方还有一层分化程度较高的癌细胞,具有胃腺基底部细胞的分化表型。

■同行评价

本研究拟探讨胃印戒细胞癌的发生,对胃癌防治具有一定意义。

死亡率可能具有一定意义。

4 参考文献

- 1 Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49
- 2 Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58: 71-96
- 3 Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 765-770
- 4 McDonald SA, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L, Rodriguez-Justo M, Deheragoda M, Leedham SJ, Taylor RW, Lee CY, Preston SL, Lovell M, Hunt T, Elia G, Oukrif D, Harrison R, Novelli MR, Mitchell I, Stoker DL, Turnbull DM, Jankowski JA, Wright NA. Mechanisms of field cancerization in the human stomach: the expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 500-510
- 5 Humar B, Fukuzawa R, Blair V, Dunbier A, More H, Charlton A, Yang HK, Kim WH, Reeve AE, Martin I, Guilford P. Destabilized adhesion in the gastric proliferative zone and c-Src kinase activation mark the development of early diffuse gastric cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 2480-2489
- 6 Karam SM, Straiton T, Hassan WM, Leblond CP. Defining epithelial cell progenitors in the human oxyntic mucosa. *Stem Cells* 2003; 21: 322-336
- 7 Karam SM. A focus on parietal cells as a renewing cell population. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 538-546
- 8 Babu SD, Jayanthi V, Devaraj N, Reis CA, Devaraj H. Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in *Helicobacter pylori* infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium. *Mol Cancer* 2006; 5: 10
- 9 虞有智, 林敏, 薛卫成, 宋秋静, 沈丹华. 免疫组织化学三重染色技术. *中华病理学杂志* 2005; 34: 244-245
- 10 Okabe M, Imai T, Kurusu M, Hiromi Y, Okano H. Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division. *Nature* 2001; 411: 94-98
- 11 Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H. Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* 2000; 22: 139-153
- 12 Akasaka Y, Saikawa Y, Fujita K, Kubota T, Ishikawa Y, Fujimoto A, Ishii T, Okano H, Kitajima M. Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. *Histopathology* 2005; 47: 348-356
- 13 Brittan M, Wright NA. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 2004; 53: 899-910
- 14 Akamatsu T, Katsuyama T. Histochemical demonstration of mucins in the intramucosal laminated structure of human gastric signet ring cell carcinoma and its relation to submucosal invasion. *Histochem J* 1990; 22: 416-425
- 15 Natsagdorj L, Sugihara H, Bamba M, Hattori T. Intratumoural heterogeneity of intestinal expression reflects environmental induction and progression-related loss of induction in undifferentiated-type gastric carcinomas. *Histopathology* 2008; 53: 685-697
- 16 王夷黎, 戴匡渠, 刘勇. 胃印戒细胞癌的形态发生. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 394-396
- 17 Nguyen MD, Plasil B, Wen P, Frankel WL. Mucin profiles in signet-ring cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 799-804
- 18 Takaishi S, Okumura T, Wang TC. Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2876-2882
- 19 Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009; 27: 1006-1020
- 20 Humar B, Blair V, Charlton A, More H, Martin I, Guilford P. E-cadherin deficiency initiates gastric signet-ring cell carcinoma in mice and man. *Cancer Res* 2009; 69: 2050-2056
- 21 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- 22 Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009; 457: 608-611
- 23 Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T. Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol* 2009; 217: 307-317
- 24 Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 2006; 442: 818-822
- 25 Qiao XT, Ziel JW, McKimpson W, Madison BB, Todisco A, Merchant JL, Samuelson LC, Gumucio DL. Prospective identification of a multilineage progenitor in murine stomach epithelium. *Gastroenterology* 2007; 133: 1989-1998
- 26 Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N, Poulsom R, Clevers H. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 2010; 6: 25-36
- 27 Humar B, Guilford P. Hereditary diffuse gastric cancer and lost cell polarity: a short path to cancer. *Future Oncol* 2008; 4: 229-239
- 28 Carneiro F, Huntsman DG, Smyrk TC, Owen DA, Seruca R, Pharoah P, Caldas C, Sobrinho-Simões M. Model of the early development of diffuse gastric cancer in E-cadherin mutation carriers and its implications for patient screening. *J Pathol* 2004; 203: 681-687
- 29 Rogers WM, Dobo E, Norton JA, Van Dam J, Jeffrey RB, Huntsman DG, Kingham K, Chun N, Ford JM, Longacre TA. Risk-reducing total gastrectomy for germline mutations in E-cadherin (CDH1): pathologic findings with clinical implications. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 799-809
- 30 周志华, 赵海滨, 张建东, 赵玲娜, 单宝珍. 胃上皮异型增生在印戒细胞癌发生中的作用. *实用医学杂志* 2009; 25: 3791-3795

肠黏膜组织内神经递质和基质细胞参与炎症性肠病发生

刘占举, 苏婧玲, 庞雪花, 甘华田, 陈宁, 刘玉兰, 白爱平, 袁川评, 王玮, 柳巨雄

编者按 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)肠黏膜组织内各种免疫细胞通过固有和获得性免疫应答效应,引起激活,释放促炎症细胞因子,导致局部炎症反应.在炎症肠黏膜组织出现肌间神经丛炎,肠黏膜组织内神经纤维细胞通过释放神经递质,调节黏膜组织内淋巴细胞的激活.肠黏膜组织内非免疫细胞如上皮细胞、肥大细胞、血管内皮细胞和基质细胞参与了黏膜免疫病理损伤过程,而成纤维细胞和肌成纤维细胞分泌大量细胞外基质,沉积在组织内,引发肠道纤维化.长期慢性炎症刺激,诱导肠上皮细胞基因突变导致结直肠癌变发生.本焦点论坛通过阐述肠黏膜组织内神经-内分泌-免疫调节,以及非免疫细胞的效应应答,深入探讨炎症性肠病的发生机制,并为临床治疗提供了新的理论基础.

- 1 溃疡性结肠炎相关结直肠癌变机制研究进展 2008
- 2 神经肽Y在免疫和溃疡性结肠炎发病中的作用 2013
- 3 克罗恩病肠道纤维化的发生机制和临床治疗 2017
- 4 肠黏膜非免疫细胞在炎症性肠病发病中的作用 2020
- 5 神经-内分泌-免疫网络与炎症性肠病 2024

溃疡性结肠炎相关结直肠癌变机制研究进展

苏婧玲, 刘占举

■背景资料

长期UC患者罹患CRC的危险性显著升高, 该观点已得到专家的广泛认同。UC并发CRC的具体机制目前仍不太清楚, 但推测在长期病程中慢性炎症和氧化损伤可能在癌变进程中发挥关键作用。在遗传因素方面, 与散发性CRC相比, UC相关CRC的遗传物质改变在时间阶段上存在差异性; 在免疫因素方面, 一系列细胞因子的释放在促进肠上皮细胞炎症反应的同时也增加了上皮细胞异型增生的几率。

苏婧玲, 刘占举, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科 上海市 200072

国家自然科学基金资助项目, No. 30770988, No. 30971358
作者贡献分布: 此课题由刘占举设计; 论文写作由苏婧玲与刘占举完成。

通讯作者: 刘占举, 教授, 200072, 上海市延长中路301号, 同济大学附属第十人民医院胃肠内科。zhanjuliu@yahoo.com
电话: 021-66301164

收稿日期: 2010-03-11 修回日期: 2010-06-11

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-07-08

Mechanisms underlying development of ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma

Jing-Ling Su, Zhan-Ju Liu

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

Correspondence to: Professor Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China. zhanjuliu@yahoo.com
Received: 2010-03-11 Revised: 2010-06-11
Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-07-08

Abstract

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract arising from the genetic predisposing factor and the abnormality of the immune system. Long-term course of UC may cause the development of several complications, such as colorectal carcinoma. The mechanisms underlying the development of UC-associated colorectal carcinoma, involving a series of changes from genetic materials to signal transduction, are extremely complicated and differ from those behind the development of sporadic colorectal carcinoma. This article discusses the mechanisms underlying the development of UC-associated colorectal carcinoma.

Key Words: Ulcerative colitis; Colorectal cancer; Chromosomal instability; CpG island methylation; Microsatellite instability; Loss of heterozygosity

Su JL, Liu ZJ. Mechanisms underlying development of ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2008-2012

摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是遗传易感因素和免疫系统异常所导致的一种肠道慢性炎症性疾病, 长期病程可导致多种并发症的发生, 其中以结直肠癌变后果最为严重。UC导致结直肠癌变的机制十分复杂, 从遗传物质到信号转导等的一系列改变可能在UC相关的癌变进程中产生重要影响, 同时在发病机制方面, UC相关结直肠癌(colorectal cancer, CRC)与散发性CRC仍存在一定差异性, 本文重点就上述方面阐述UC相关结直肠癌变机制。

关键词: 溃疡性结肠炎; 结直肠癌; 染色体不稳定; CPG岛甲基化; 微卫星不稳定; 杂合性缺失

苏婧玲, 刘占举. 溃疡性结肠炎相关结直肠癌变机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(19): 2008-2012

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2008.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种结肠慢性非特异性炎症, 临床上以反复发作的腹痛、腹泻及黏液脓血便为特征, 其病因可能与遗传易感人群在多因素作用下所引起的肠道黏膜免疫系统异常反应相关^[1]。1925年Crohn和Rosenberg首次对与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)相关的UC案例作了报道。现今大部分研究已证实, UC长期患者发生癌变的危险性升高。据国外文献报道, 10、20及30年UC患者发生CRC的累计危险性分别为0.6%、5.4%和7.5%^[2], 而因此所导致的死亡人数占总体患者的15%^[3]。在UC患者中, 有多种危险因素与CRC发生相关, 包括: 疾病持续时间、病变范围、严重程度、发病年龄、CRC家族史、原发性硬化性胆管炎和上皮异型增生等。UC并发CRC癌变可能与其慢性炎症长期作用相关, 其发生发展经历着从正常上皮组织、低度异型增生、高度异型增生到癌变的一个过程^[4], 但目前具体机制仍不明, 多方面因素改变均可能在癌变过程中发挥重要作用, 本文重点就上述方面阐述UC导致CRC癌

■同行评议者

杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院

变的机制。

1 染色体不稳定

研究已证实, 在与UC相关CRC中染色体不稳定(chromosomal instability, CIN)发生频率最高(85%)^[5,6]。CIN在UC相关CRC癌变进程中是一个早期事件, 通常发生在非异形增生上皮到异形增生上皮, 和异型增生到癌症进程中, 最终导致染色体的一系列改变^[7]。CIN存在于异型增生上皮和肠道间质细胞中, 间质细胞的染色体不稳定同样在癌变进程中发挥重要作用。相关报道证实, 肠道间质细胞中17号染色体上相关位点改变可对结肠癌变产生影响^[8]。导致CIN重要机制之一是端粒损耗。端粒对于染色体末端的端端融合、降解和重组起到很好的保护作用, 从而能够维持染色体的稳定, 端粒可随细胞分裂而缩短, 因此, 随着年龄增长, 多数正常组织中的端粒长度会有不同程度的变短^[9]。在UC患者中, 病变结肠的细胞端粒缩短速度快于正常结肠组织, 特别在异型增生和癌变的进程中^[10]。UC癌变进程中端粒缩短的具体机制不甚明了, 推测炎症反应和氧化损伤可能发挥关键作用^[7], 当端粒缩短到一定程度使DNA损伤检查点缺乏时, 就可引起细胞有丝分裂后期形成染色体端端融合, 导致染色体断裂-融合-桥周期形成, 该周期可促进染色体不稳定性的累积。染色体的端粒损耗最常出现在10、11、21、16和19号^[11]。Risques等^[12]的研究在UC患者中比较了结肠上皮细胞及胃上皮细胞的端粒缩短速度, 发现结肠上皮细胞的端粒缩短速度最为明显, 是正常对照组的2倍, 而胃上皮细胞端粒与正常对照组相比未见明显缩短, 证实UC病程中端粒缩短机制与局部炎症反应而非遗传性端粒缺陷相关。但据Getliffe等^[13]的研究报道, 与正常对照组、CD对照组比较, UC患者外周血淋巴细胞端粒无明显缩短, 该研究推测, 在UC患者外周血淋巴细胞中, 并不是由端粒缩短, 而可能是由端粒脱帽或检测点蛋白缺失等其他机制导致CIN。

2 CpG岛甲基化现象

在散发性CRC中普遍存在的CpG岛甲基化现象(CpG island methylator phenotype, CIMP)岛甲基化现象同样也在UC相关的CRC癌变机制中发挥重要作用。CpG岛是存在于基因启动子结构中的一些胞嘧啶-鸟嘌呤双核苷酸序列, 过度的胞嘧啶甲基化可促进启动子沉默和某些基因表达的缺失, 由于很多基因涉及细胞周期调控、细

胞黏附和DNA修复, 因此CIMP可能与某些癌症的发生相关^[14]。DNA甲基化分为A型和C型, A型甲基化与年龄相关, 在正常及癌变的结直肠黏膜中均可检测到(如ER); C型甲基化与CRC癌变相关, 可导致相关基因的病理沉默(如hMLH1, MGMT, p16, p14)^[15]。Osborn等^[16]发现在散发性CRC和UC相关CRC中EYA4基因启动子普遍存在高甲基化现象, 该现象与基因沉默相关。另一项研究阐述了BRAF基因在UC相关的CRC癌变中的作用机制, 发现BRAF基因突变在CRC癌变进程中并非初始事件, 而是通过hMLH1启动子的高甲基化导致相关错配修复基因的缺失, 最终导致UC相关CRC的发生^[17]。在UC相关CRC癌变进程中, CIMP通常来说是一个早期事件, 在发生时点上与散发性CRC相同, 其发生率在癌变进程中可从<1%到70%不等^[18]。研究显示, 在UC患者未有异型增生的直肠炎症黏膜中即能检测到ER、p14和p16等基因启动子的过度甲基化表达, 提示在UC病程早期即开始发生相关基因甲基化, 从而导致UC癌变发生的危险性增高^[19]。Konishi等^[20]在UC相关CRC、UC相关异型增生和散发性CRC患者病理组织中检测了11个基因位点的甲基化水平, 发现除外MGMT位点外, 余位点CIMP水平UC相关CRC患者均比散发性CRC患者低, 故作者认为, 其实DNA甲基化改变在UC相关CRC中并不常见。

3 微卫星不稳定性

微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)通常发生在UC相关CRC癌变的早期阶段, MSI在UC患者的异型增生区和癌变细胞中均存在。在UC患者中, 由MSI机制所导致的CRC癌变大概占发病总数的15%, 概率与散发性CRC相等。在正常细胞的DNA复制过程中, 存在DNA碱基对错配修复的过程, MSI旁路途径可导致错配修复基因相关功能的缺失, 散发性CRC中MSI涉及6种包含在错配修复系统中的不同蛋白(hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6, 和hMLH3)^[21]。与散发性CRC不同, 在UC相关CRC中, MSI所导致的错配修复缺失主要涉及MLH1, MSH2, MSH6, 和PMS2, 此外还包括低频率的MLH1启动子甲基化^[22]。Fujiwara等^[23]在57例UC患者结肠黏膜(病理诊断包括癌症、异型增生、诊断未明和正常黏膜)中分析了MSI的表达情况, MSI高表达在上述四组中的比例分别为36%、33%、45%和0%, MSI高表达与hMLH1高甲基化和hMSH2

■研究前沿

UC并发CRC癌变可能与其慢性炎症长期作用相关, 其发生发展经历着从正常上皮组织、低度异型增生、高度异型增生到癌变的一个过程, 但目前具体机制仍不明。

■相关报道

Risques等的研究在UC患者中比较了结肠上皮细胞及胃上皮细胞的端粒缩短速度,发现结肠上皮细胞的端粒缩短速度最为明显,是正常对照组的2倍,而胃上皮细胞端粒与正常对照组相比未见明显缩短,证实UC病程中端粒缩短机制与局部炎症反应而非遗传性端粒缺陷相关。

表达丧失显著相关,同时发现MSI旁路途径是通过TGF- β RII突变最终导致基因错配修复系统的失效。其他研究者在UC患者异型增生相关区域(dysplasia associated lesion or mass, DALM)比较了CIN和MSI发生情况,免疫组织化学的MLH1, PMS2, MSH2和MSH6错配基因显示阴性在新生物中所占比例为5%,而BAT25和BAT26在肿瘤中检测到的比例为14%,提示MSI在UC患者DALM中所占的比例并不高,不如CIN显著^[24]。

4 杂合性缺失

杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)是在UC癌变进程中较晚发生的一个机制,且与散发性CRC中的LOH机制存在明显差异。细胞遗传学研究证实,几乎所有的肿瘤细胞中均存在染色体片段的非随机性丢失,这些丢失片段中可能存在与肿瘤发生相关的某些基因,所谓杂合性缺失即指同一位点上两个多态性等位基因其中之一出现的缺失。*p53*、*k-ras*、APC均是与肿瘤发生发展相关几个较重要的基因位点,在散发性CRC中,*p53*的LOH发生在腺瘤向腺癌转变的最后阶段;在相关肿瘤区域内存在18号染色体上*k-ras*癌基因的激活;APC功能缺失是散发性CRC发病过程中一个典型的早期事件,且在85%的散发性和遗传性结肠肿瘤中能检测到APC功能缺失^[25]。与散发性CRC不同,*p53*的LOH在UC相关CRC中反而是一个早期事件且可在外观正常的黏膜中检测到;*k-ras*的突变尽管在散发性CRC中并不少见,但在UC相关CRC中发生频率较低,且与相关进程中息肉形成相关;APC突变发生较晚且出现频率较低,通常出现在后期高度异型增生和癌变进程中^[18]。Leedham等^[26]在UC相关腺瘤中检测了起始基因的突变情况,亦发现在腺瘤中主要的起始突变基因为*p53*,但也有4例为*k-ras*,在异型增生周围区域的一些非异型增生隐窝中也能见到*p53*突变基因,少数非异型增生隐窝中的突变为*k-ras*,再次证实了*p53*的LOH是相关区域中的主要起始突变,且同时并存有*k-ras*的LOH,同时周围非异型增生区域中也存在有局部及区域性的癌前基因突变。

5 NF- κ B-IL-6-STAT3信号通路

NF- κ B是在肿瘤发生发展中发挥重要作用的一个核转录因子,其通过调节许多相关基因的表达来对免疫应答产生影响,NF- κ B对细胞免疫应答的调节涉及细胞黏附、分化、增生、血管产

生和凋亡。在UC相关的CRC中,由NF- κ B诱导产生的细胞因子能够促使UC相关CRC发生发展,而NF- κ B在肠上皮细胞中的活动则能促进新产生的肿瘤细胞存活^[27]。IL-6就是由NF- κ B调节的重要的一个多功能细胞因子,其同时作用于肠上皮细胞及免疫细胞,从而促进肠上皮细胞的异型增生和免疫细胞炎症介质的释放而导致肿瘤发生。IL-6能结合于可溶性或膜结合IL-6受体(IL-6Ra),而与膜相关gp130亚单位相互作用,然后引起下游Stat3等一系列的信号活化^[28]。在UC相关CRC中,NF- κ B-IL-6-STAT3级联反应是一条促进肿瘤细胞存活和增生的重要信号转导通路。IL-6在UC相关CRC的晚期阶段能够促进结直肠癌细胞增生,阻断IL-6信号通路能够延缓肿瘤细胞的增生速度^[29]。IL-6的致癌作用主要取决于Stat3的活化与否,消除Stat3在肠上皮细胞中的作用能有效抑制UC相关CRC发生发展。Sergei等^[30]的研究发现,在DSS诱导的小鼠结肠炎模型中,IL-6^{-/-}小鼠的cyclin D表达明显降低,提示在IL-6缺乏时肿瘤的增生能力有显著下降;同时通过对IL-6^{-/-}小鼠肠道可溶性产物分析,发现Stat3活动也有明显减弱。

6 其他

其他白介素同样在UC相关CRC免疫学发病机制中产生重要影响。IL-10是主要由辅助性T细胞和调节性T细胞产生的一种抗炎细胞因子,对持续性的肠道炎症具有强烈的抑制作用。在IL-10^{-/-}小鼠中,随着年龄增长结肠上皮细胞将发生异型增生并最终发生结肠肿瘤,有报道显示IL-10^{-/-}小鼠在6 mo内发生结肠肿瘤的比例大约接近22%^[31]。但IL-10在人类IBD患者中的表达与肠道上皮异型增生的关系尚未明确,Szkaradkiewicz等^[32]通过对UC相关CRC患者的血清学检测发现IL-10的水平处于正常范围内。

UC重要的发病机制之一即为肠上皮屏障功能的改变。在UC相关CRC中,肠上皮屏障功能的改变可能对异型增生的进程产生影响。紧密连接是肠上皮屏障的一个重要组成部分,其中包含有claudin蛋白。现今研究已在多种癌前病变中检测到claudin蛋白的改变,同时发现claudin-1和 β -catenin在细胞核内的共存可能与转移性结肠腺癌相关,claudin-1过表达能增加肿瘤细胞的转移率^[33]。Weber等^[34]通过半定量免疫组织化学染色对IBD相关性异型增生和腺癌患者的活检组织进行分析,结果证实claudin-1和claudin-2在相

关患者活检组织中的表达有明显升高, 并推测 β -catenin活化可能是claudin-1和claudin-2表达改变的潜在作用机制。

7 结论

长期UC患者罹患CRC的危险性显著升高, 该观点已得到专家的广泛认同。UC并发CRC的具体机制目前仍不太清楚, 但推测在长期病程中慢性炎症和氧化损伤可能在癌变进程中发挥关键作用。在遗传因素方面, 与散发性CRC相比, UC相关CRC的遗传物质改变在时间阶段上存在差异性; 在免疫因素方面, 一系列细胞因子的释放在促进肠上皮细胞炎症反应的同时也增加了上皮细胞异型增生的几率。与上述环节相关的遗传物质的改变及细胞因子的释放已成为现今研究的热点。

8 参考文献

- Scaldaferri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis* 2007; 8: 171-178
- Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, David G, Pandur T, Balogh M, Fischer S, Vargha P, Lakatos PL. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 205-211
- Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 2: 1-5
- Itzkowitz SH, Harpaz N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2004; 126: 1634-1648
- Willenbacher RF, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH 2nd, Waldman FM. Chromosomal alterations in ulcerative colitis-related neoplastic progression. *Gastroenterology* 1997; 113: 791-801
- Willenbacher RF, Aust DE, Chang CG, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH 2nd, Waldman FM. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *Am J Pathol* 1999; 154: 1825-1830
- Seril DN, Liao J, Yang GY, Yang CS. Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 2003; 24: 353-362
- Ishiguro K, Yoshida T, Yagishita H, Numata Y, Okayasu T. Epithelial and stromal genetic instability contributes to genesis of colorectal adenomas. *Gut* 2006; 55: 695-702
- Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, Oshimura M, Nakamura K. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* 2002; 37: 523-531
- O'Sullivan JN, Bronner MP, Brentnall TA, Finley JC, Shen WT, Emerson S, Emond MJ, Gollahon KA, Moskovitz AH, Crispin DA, Potter JD, Rabinovitch PS. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* 2002; 32: 280-284
- Cottliar A, Fundia A, Boerr L, Sambuelli A, Negreira S, Gil A, Gómez JC, Chopita N, Bernedo A, Slavutsky I. High frequencies of telomeric associations, chromosome aberrations, and sister chromatid exchanges in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2301-2307
- Risques RA, Lai LA, Brentnall TA, Li L, Feng Z, Gallaher J, Mandelson MT, Potter JD, Bronner MP, Rabinovitch PS. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterology* 2008; 135: 410-418
- Getliffe KM, Al Dulaimi D, Martin-Ruiz C, Holder RL, von Zglinicki T, Morris A, Nwokolo CU. Lymphocyte telomere dynamics and telomerase activity in inflammatory bowel disease: effect of drugs and smoking. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 121-131
- Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 2001; 134: 573-586
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8681-8686
- Osborn NK, Zou H, Molina JR, Lesche R, Lewin J, Lofton-Day C, Klatt KK, Harrington JJ, Burgart LJ, Ahlquist DA. Aberrant methylation of the eyes absent 4 gene in ulcerative colitis-associated dysplasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 212-218
- Aust DE, Haase M, Dobryden L, Markwarth A, Löhrs U, Wittekind C, Baretton GB, Tannapfel A. Mutations of the BRAF gene in ulcerative colitis-related colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 115: 673-677
- Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3937-3947
- Wang FY, Arisawa T, Tahara T, Takahama K, Watanabe M, Hirata I, Nakano H. Aberrant DNA methylation in ulcerative colitis without neoplasia. *Hepatology* 2008; 55: 62-65
- Konishi K, Shen L, Wang S, Meltzer SJ, Harpaz N, Issa JP. Rare CpG island methylator phenotype in ulcerative colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 2007; 132: 1254-1260
- Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 89-96
- Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res* 2009; 29: 2727-2737
- Fujiwara I, Yashiro M, Kubo N, Maeda K, Hirakawa K. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer is frequently associated with the microsatellite instability pathway. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1387-1394
- van Dieren JM, Wink JC, Vissers KJ, van Marion R, Hoogmans MM, Dinjens WN, Schouten WR, Tanke HJ, Szuhai K, Kuipers EJ, van der Woude CJ, van Dekken H. Chromosomal and microsatellite instability of adenocarcinomas and dysplastic lesions (DALM) in ulcerative colitis. *Diagn Mol Pathol* 2006; 15: 216-222
- Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 378-389
- Leedham SJ, Graham TA, Oukrif D, McDonald SA,

■同行评价

本文从“染色体不稳定”“甲基化”“微卫星不稳定”等与UC结肠癌变的相关分子途径重点综述了UC相关结肠癌变机制, 对临床进一步研究UC相关的结肠癌有一定的指导意义。

- Rodriguez-Justo M, Harrison RF, Shepherd NA, Novelli MR, Jankowski JA, Wright NA. Clonality, founder mutations, and field cancerization in human ulcerative colitis-associated neoplasia. *Gastroenterology* 2009; 136: 542-550.e6
- 27 Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 749-759
- 28 Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Nagayasu T, Sekine I. Expression of p-STAT3 in human colorectal adenocarcinoma and adenoma; correlation with clinicopathological factors. *J Clin Pathol* 2005; 58: 833-838
- 29 Becker C, Fantini MC, Wirtz S, Nikolaev A, Lehr HA, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle* 2005; 4: 217-220
- 30 Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103-113
- 31 Zhang R, Ma A, Urbanski SJ, McCafferty DM. Induction of inducible nitric oxide synthase: a protective mechanism in colitis-induced adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1122-1130
- 32 Szkaradkiewicz A, Marciniak R, Chudzicka-Strugała I, Wasilewska A, Drews M, Majewski P, Karpiński T, Zwoździak B. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009; 57: 291-294
- 33 Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res* 2001; 12: 469-476
- 34 Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest* 2008; 88: 1110-1120

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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 ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第 3 套为 ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

神经肽Y在免疫和溃疡性结肠炎发病中的作用

庞雪花, 甘华田

庞雪花, 甘华田, 四川大学华西医院消化科 四川省成都市 610041

国家自然科学基金资助项目, No. 30770983

通讯作者: 甘华田, 教授, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化科. ganhuatian@hotmail.com

收稿日期: 2010-03-11 修回日期: 2010-06-13

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-07-08

Role of neuropeptide Y in the immune system and the pathogenesis of ulcerative colitis

Xue-Hua Pang, Hua-Tian Gan

Xue-Hua Pang, Hua-Tian Gan, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770983

Correspondence to: Professor Hua-Tian Gan, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, 610041, Sichuan Province, China. ganhuatian@hotmail.com

Received: 2010-03-11 Revised: 2010-06-13

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-07-08

Abstract

The pathogenesis of ulcerative colitis (UC) remains unclear. Immune dysfunction has been considered to be main etiological factor for UC. Increasing evidence suggests that neuropeptide Y (NPY) is involved in immune dysfunction and the pathogenesis of UC. This paper reviews the latest advances in understanding the role of NPY in the immune system and the pathogenesis of UC.

Key Words: Neuropeptide Y; Ulcerative colitis; Immune system

Pang XH, Gan HT. Role of neuropeptide Y in the immune system and the pathogenesis of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2013-2016

摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的病因及发病机制目前尚不明确, 但免疫异常已被公认为是其发病的主要因素之一。近年, 不少研究表明

神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)在免疫系统中起着重要作用。因此, 推测NPY在UC的发生发展中可能也起着重要作用, 本文就目前NPY与免疫和UC的研究现状作一简要评述。

关键词: 神经肽Y; 溃疡性结肠炎; 免疫系统

庞雪花, 甘华田. 神经肽Y在免疫和溃疡性结肠炎发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(19): 2013-2016

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2013.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种肠道慢性炎症性疾病, 其病因及发病机制目前尚不十分明确, 但免疫异常已被公认为是其发病的主要因素之一。近年, 不少研究表明神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)在免疫系统中起着重要作用, 从细胞趋化到细胞因子释放以及抗体的产生都有影响, 从而推测NPY在UC的发病中可能也起着重要作用。实际上, 国外已有学者使用NPY敲除或NPY Y1受体敲除小鼠进行研究, 已经证实了NPY在UC发生发展中起着重要作用。本文就目前NPY与免疫和UC的研究现状作一简要综述。

1 免疫系统

免疫系统是一个由多种免疫器官所组成的复杂网络, 产生多种免疫细胞参与免疫反应。协调的免疫反应有能力识别并消灭有害因子, 同时阻止对机体自身组织的不恰当反应, 当这种平衡被打破后, 将导致自身免疫异常, 包括一系列免疫因素, 如: 自身抗体、抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)、T、B细胞和信使分子如细胞因子和化学趋化素等。细胞因子对免疫反应是必需的, 产生不同细胞因子的T细胞亚群已经与许多不同的炎症、自身免疫和过敏疾病相关, 如: Th2细胞(产生IL-4、IL-5、和IL-13)参与过敏反应如哮喘^[1]等, Th1细胞(产生IFN- γ)促进了几种炎症性和自身免疫性疾病的发展如溃疡性结肠炎^[2]、1型糖尿病等。了解Th1/Th2的调节

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)是一种肠道慢性炎症性疾病, 其病因及发病机制目前尚不十分明确, 但免疫异常已被公认为是其发病的主要因素之一。近年, 不少研究表明神经肽Y(NPY)在免疫系统中起着重要作用, 从细胞趋化到细胞因子释放以及抗体的产生都有影响, 从而推测NPY在UC的发病中可能也起着重要作用。

■同行评议者

戈之铮, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

■相关报道

国外已有学者使用NPY敲除或NPY Y1受体敲除小鼠进行研究,已经证实了NPY在UC发生发展中起着重要作用。

机制,可能为炎症性和自身免疫性疾病的治疗提供新的思路。

2 免疫系统与UC

免疫异常已被公认为是UC发病的主要因素,有研究表明,UC的发病与CD4⁺ T细胞密切相关,人体内存在两种CD4⁺ T细胞,即Th1和Th2,他们在体内发挥着重要的免疫效应。在葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的急性结肠炎模型, Th1细胞明显增多,提示Th1优势反应可能与急性期肠黏膜病变有关^[3], DSS诱导的结肠炎慢性期, Th1和Th2细胞均与病变有关,但可能是以Th2型免疫反应占优势^[4],三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎模型证实炎症是Th1细胞介导的^[5]。Th1/Th2的分化正如人体的免疫系统一样保持着平衡,一旦平衡被打破,就会发生疾患。Th1和Th2细胞的分化主要受细胞因子的调节,而他们都依赖于抗原呈递细胞和未接触抗原的T细胞(Thp)之间的相互反应^[6]。

APC包括巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)在UC炎症的始动与发展中起着重要作用,在肠道抗原、炎症因子等作用下,肠道大量趋化聚集而来的APC被激活,他们吞噬抗原,并将抗原信息呈递给T细胞,抗原信息进入T细胞,激活T细胞,和周围的共刺激受体形成免疫链。APC对于T细胞的激活是必需的。在吞噬和处理抗原的同时,致病因子促使巨噬细胞分泌高水平的IL-12, IL-12促进巨噬细胞分泌TNF- α 、Th1细胞分泌IFN- γ ,并通过反馈刺激产生更高水平的IL-12,随后刺激巨噬细胞分泌一系列炎症前细胞因子如IL-6和TNF、IL-1、NO、PGE2等而诱发炎症^[7]。活化的巨噬细胞亦可上调Th1活性,促其释放炎症因子,破坏Th1与Th2间平衡,进一步加重结肠炎症反应^[8]。

3 NPY与免疫系统

3.1 神经系统与免疫系统 许多年来,免疫系统一直被看做一个独立系统,被抗原刺激激活,受免疫细胞因子调控。然而,近年来,神经系统和免疫系统之间的相互关系已引起学界高度重视,逐渐增多的证据表明他们之间联系紧密。这两个系统之间的联系途径主要是交感神经系统,交感神经纤维末梢在初级和次级淋巴器官如脾脏的T、B淋巴细胞间形成突触样联系^[9]。交感神经系统被激活后,神经末梢释放儿茶酚胺类,如去甲肾上腺素以及神经肽类包括NPY。已有研

究表明,脑/神经系统和免疫系统之间可通过神经肽与细胞因子相互沟通,免疫系统的白细胞表面存在着神经肽受体,这些白细胞可以通过神经肽而受到神经免疫调节^[10]。而免疫细胞也能自身分泌神经肽,通过旁分泌或自分泌的形式影响神经或免疫细胞^[11]。深入研究还发现免疫细胞能够释放一些细胞因子,通过旁分泌的形式能够影响神经的生长、分化以及神经肽的产生^[12,13]。神经肽可能是免疫反应过程中神经调控机制的最主要因素。

3.2 NPY与免疫组织 NPY是由36个氨基酸组成的肽类激素,广泛分布于中枢和外周神经组织的神经元中,也存在于组织、器官中,如心脏及胃肠道等。NPY释放后主要通过其受体起作用,影响多种生物学功能,近年来, NPY在免疫系统的作用也逐渐被认识。NPY源神经纤维不仅存在于免疫组织,而且直接与免疫细胞联系。研究表明,许多NPY阳性神经纤维存在于大鼠的脾脏, NPY阳性神经纤维还与淋巴细胞和巨噬细胞密切相连^[14]。在他们突触联系的位点可能检测出较高浓度的NPY。此外,在结肠、肝脏及胆囊组织内也检测到NPY的表达^[15]。除了神经系统外,免疫细胞激活后也可表达NPY,通过自分泌形式调节免疫细胞,如单核细胞、B细胞以及一系列T淋巴细胞^[16]。

NPY释放后主要通过Y受体起作用,已有研究表明在免疫器官和免疫细胞表面存在Y受体的表达。在猪的脾脏中,可检测到高水平的Y1和低水平的Y2受体^[17]。此外,在DC、巨噬细胞、NK细胞、肥大细胞以及T、B淋巴细胞中均可检测到Y1受体的表达^[18]。因此,神经系统对免疫系统的作用可能通过NPY的释放,以及NPY和Y受体在免疫系统的表达而产生影响。

3.3 NPY与免疫细胞 研究证明, NPY能增强卟啉醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)刺激的小鼠腹膜巨噬细胞的氧化反应,趋化、黏附及吞噬能力^[19,20],刺激巨噬细胞产生IL-1 β 、IL-6和TNF等细胞因子,促发炎症反应。进一步研究显示,来源于NPY Y1敲除(Y1^{-/-})小鼠的腹膜巨噬细胞产生细胞因子的能力受损, Y1受体拮抗剂也同样导致细胞因子产生减少,提示NPY可能通过Y1受体发挥作用^[18]。

对小鼠淋巴细胞的研究发现, NPY抑制T细胞激活。NPY存在时, TCR所诱导的T细胞的分化、增殖明显受到抑制^[18], Bedoui等使用Y1受体激动剂,证明NPY的这一作用是通过Y1受体

而调节的^[21]. 而NPY在调节Th T细胞产生细胞因子方面也具有一定作用, Kawamura等证明, NPY抑制Th1产生干扰素, 促进Th2产生IL-4, 导致Th1向Th2细胞转化^[22]. 在小鼠活体实验中, Y1受体激动剂使CD4⁺ T细胞干扰素生成减少, 表明NPY可能是通过Y1受体抑制Th1反应^[21].

4 NPY与UC

许多研究表明NPY与免疫系统关系密切, 而UC是一种肠道慢性炎症性疾病, 免疫反应异常在其发病过程中起着十分重要的作用, NPY与UC之间又有什么联系呢?

研究发现DSS诱导的结肠炎, 其结肠组织中NPY表达增加^[23,24], 在UC的患者血清中NPY增加^[25]. 有实验用神经肽Y敲除(NPY^{-/-})小鼠和野生型(WT)小鼠进行对照研究, 发现经DSS诱导NPY^{-/-}小鼠结肠炎症明显比WT小鼠更轻, 提示神经肽Y可能有正向调节结肠炎症的作用.

NPY主要是通过Y受体发挥作用, 目前已被克隆的神经肽Y受体有Y1、Y2、Y3、Y4、Y5和Y6受体亚型, 不同的神经肽Y受体调节NPY的不同功能. 有研究证实, NPY通过Y1受体在DSS诱导的结肠炎的黏膜炎症中起着重要作用, 缺乏Y1受体的小鼠在DSS诱导时, 其耐受性更强, 表现为体质量减轻缓慢, 结肠炎症程度较轻等. 此外, 给予Y1受体拮抗剂起到了类似的结果^[18,26], 这些研究提示, 通过阻断Y1受体的活性, 也可能减轻结肠炎症, 这可能为UC的治疗策略提供一个新思路.

在Y1^{-/-}小鼠中结肠炎症的减轻是源于APC功能缺陷, APC功能缺陷导致IL-12及IFN- γ 生成减少, 而IL-12是激活T细胞向Th1效应性T细胞分化的关键因素, IFN- γ 是T细胞反应的标志, IL-12及IFN- γ 生成减少导致T细胞激活障碍^[18]. DSS诱导结肠炎是高度依赖于APC的功能, 因此, NPY可激活抗原呈递细胞, 当APC缺乏Y1受体, NPY通过Y1受体的信号缺乏, 致APC功能缺陷, 进而引起TNF及IL-12减少, T细胞不能被激活, T细胞反应不能被触发, 结肠炎症减轻.

5 结论

NPY通过其Y1受体在免疫系统中起着双重效应: 刺激APC但抑制T细胞激活. 在自身免疫性疾病以及炎症性疾病中, NPY以及Y1受体能够成为调节T细胞免疫反应的一个新靶点.

6 参考文献

- Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 789-815
- Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 267-273
- Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 2000; 62: 240-248
- Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391
- Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 648-656
- De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1229-1235
- Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 281-286
- Klebl FH, Olsen JE, Jain S, Doe WF. Expression of macrophage-colony stimulating factor in normal and inflammatory bowel disease intestine. *J Pathol* 2001; 195: 609-615
- Straub RH, Schaller T, Miller LE, von Hörsten S, Jessop DS, Falk W, Schölmerich J. Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the sympathetic nerve-macrophage interplay. *J Neurochem* 2000; 75: 2464-2471
- De la Fuente M, Medina S, Del Rio M, Ferrández MD, Hernanz A. Effect of aging on the modulation of macrophage functions by neuropeptides. *Life Sci* 2000; 67: 2125-2135
- Bracci-Laudiero L, Aloe L, Stenfors C, Tirassa P, Theodorsson E, Lundberg T. Nerve growth factor stimulates production of neuropeptide Y in human lymphocytes. *Neuroreport* 1996; 7: 485-488
- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 243-251
- Lambrecht BN. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res* 2001; 2: 133-138
- Romano TA, Felten SY, Felten DL, Olschowka JA. Neuropeptide-Y innervation of the rat spleen: another potential immunomodulatory neuropeptide. *Brain Behav Immun* 1991; 5: 116-131
- Elitsur Y, Luk GD, Colberg M, Gesell MS, Dosesescu J, Moshier JA. Neuropeptide Y (NPY) enhances proliferation of human colonic lamina propria lymphocytes. *Neuropeptides* 1994; 26: 289-295
- Schwarz H, Villiger PM, von Kempis J, Lotz M. Neuropeptide Y is an inducible gene in the human immune system. *J Neuroimmunol* 1994; 51: 53-61
- Gehlert DR, Gackenhaimer SL. Unexpected high density of neuropeptide Y Y1 receptors in the guinea pig spleen. *Peptides* 1996; 17: 1345-1348
- Wheway J, Mackay CR, Newton RA, Sainsbury A, Boey D, Herzog H, Mackay F. A fundamental

■应用要点

通过阻断Y1受体的活性, 也可能减轻结肠炎症, 这可能为UC的治疗策略提供一个新思路.

■同行评价

本文对UC的病因及治疗方法的研究提供了思路, 有较好的可读性。

- bimodal role for neuropeptide Y1 receptor in the immune system. *J Exp Med* 2005; 202: 1527-1538
- 19 De la Fuente M, Bernaez I, Del Rio M, Hernanz A. Stimulation of murine peritoneal macrophage functions by neuropeptide Y and peptide YY. Involvement of protein kinase C. *Immunology* 1993; 80: 259-265
- 20 De la Fuente M, Del Río M, Medina S. Changes with aging in the modulation by neuropeptide Y of murine peritoneal macrophage functions. *J Neuroimmunol* 2001; 116: 156-167
- 21 Bedoui S, Miyake S, Lin Y, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck-Sickinger A, von Hörsten S, Yamamura T. Neuropeptide Y (NPY) suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: NPY1 receptor-specific inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. *J Immunol* 2003; 171: 3451-3458
- 22 Bedoui S, Kawamura N, Straub RH, Pabst R, Yamamura T, von Hörsten S. Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J Neuroimmunol* 2003; 134: 1-11
- 23 Chandrasekharan BP, Bala V, Kolachala V, Sitaraman SV, Srinivasan S. Neuropeptide Y (NPY) modulates dextran solidum sulfate (DSS) induced colitis. *FASEB J* 2007; 21: 924.1
- 24 Chandrasekharan B, Bala V, Kolachala VL, Vijay-Kumar M, Jones D, Gewirtz AT, Sitaraman SV, Srinivasan S. Targeted deletion of neuropeptide Y (NPY) modulates experimental colitis. *PLoS One* 2008; 3: e3304
- 25 Straub RH, Herfarth H, Falk W, Andus T, Schölmerich J. Uncoupling of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammatory bowel disease? *J Neuroimmunol* 2002; 126: 116-125
- 26 Hassani H, Lucas G, Rozell B, Ernfors P. Attenuation of acute experimental colitis by preventing NPY Y1 receptor signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G550-G556

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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。

克罗恩病肠道纤维化的发生机制和临床治疗

陈宁, 刘玉兰

陈宁, 刘玉兰, 北京大学人民医院消化科 北京市 100044
通讯作者: 刘玉兰, 100044, 北京市西城区西直门南大街11号,
北京大学人民医院消化科. liuyulan@pkuph.edu.cn
电话: 010-88325559
收稿日期: 2010-03-11 修回日期: 2010-06-12
接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-07-08

Pathogenesis and management of intestinal fibrosis in Crohn's disease

Ning Chen, Yu-Lan Liu

Ning Chen, Yu-Lan Liu, Department of Gastroenterology,
Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China
Correspondence to: Yu-Lan Liu, Department of Gastro-
enterology, Peking University People's Hospital, Beijing
100044, China. liuyulan@pkuph.edu.cn
Received: 2010-03-11 Revised: 2010-06-12
Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-07-08

Abstract

Crohn's disease (CD) is characterized by intestinal fibrosis that can eventually result in intestinal strictures, one of the most severe complications in CD. At present, few effective therapies for strictures are available. Here, we review the pathogenesis and management of intestinal fibrosis in CD.

Key Words: Crohn's disease; Fibrosis; Extracellular matrix

Chen N, Liu YL. Pathogenesis and management of intestinal fibrosis in Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2017-2019

摘要

肠道纤维化是克罗恩病的特征表现, 其反复发作导致的肠道狭窄是克罗恩病最严重的并发症之一, 目前治疗手段有限. 本文对克罗恩病肠道纤维化发生机制及目前治疗手段进行综述.

关键词: 克罗恩病; 纤维化; 细胞外基质

陈宁, 刘玉兰. 克罗恩病肠道纤维化的发生机制和临床治疗. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2017-2019

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2017.asp>

0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)的特征性临床表现之一为肠道纤维化, 进而形成狭窄. CD的发病过程中, 肠道慢性透壁性炎症以及过度的损伤修复, 导致过多异常的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积, 最终引发肠道狭窄的形成^[1]. ECM收缩还会进一步引发瘢痕形成、组织扭曲和肠梗阻. 约有1/3的CD患者合并肠道狭窄, 为缓解肠道狭窄, CD患者不得不接受手术治疗, 而术后仍有70%患者再次发生狭窄^[2,3], 反复发生的肠道炎症和狭窄严重影响了患者的生活质量. 虽然CD的炎症发病机制已有广泛研究, 但针对肠道纤维化和狭窄的发生机制研究仍较为局限, 本文将CD肠道纤维化发生机制和目前治疗手段进行综述.

1 肠道纤维化的发生机制

目前认为CD肠道纤维化是ECM、成纤维细胞、细胞因子等多种因素之间复杂作用的结果. 炎症等因素引发的肠道组织细胞因子增加, 这些细胞因子刺激成纤维细胞、肌成纤维细胞等间充质细胞异常活跃, 过度表达大量细胞外基质, 沉积在组织内, 引发肠道纤维化, 同时激活的成纤维细胞和炎症细胞又进一步分泌细胞因子, 形成恶性循环.

1.1 ECM 狭窄肠道主要表现为肠壁全层增厚, 病理组织学表现为黏膜下层大量平滑肌细胞, 伴有胶原沉积和黏膜肌层破裂扩张. 胶原在固有肌层之间延伸, 形成明显增厚的肌层^[1]. 胶原是主要的ECM成分, 具有很多亚型. 正常肠道中主要的胶原亚型为I型胶原、III型胶原和V型胶原. 狭窄肠道胶原总量增加, 其中III型和V型胶原的相对量也增加. 这些亚型在修复组织中含量很高, III型胶原还具有收缩的倾向^[4]. CD患者肠道中胶原的过度表达导致疤痕收缩和狭窄形成. 除此之外, 其他ECM也参与了纤维化的形成, 如纤连蛋白, 促进细胞基质之间的相互作用, 从

■背景资料

CD的发病过程中, 肠道慢性透壁性炎症以及过度的损伤修复, 导致过多异常的细胞外基质(ECM)沉积, 最终引发肠道狭窄的形成. ECM收缩还会进一步引发瘢痕形成、组织扭曲和肠梗阻. 约有1/3的CD患者合并肠道狭窄, 为缓解肠道狭窄, CD患者不得不接受手术治疗, 而术后仍有70%患者再次发生狭窄, 反复发生的肠道炎症和狭窄严重影响了患者的生活质量. 虽然CD的炎症发病机制已有广泛研究, 但针对肠道纤维化和狭窄的发生机制研究仍较为局限.

■同行评议者

江学良, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

■研发前沿

近几年对于肠道纤维化发病机制的研究提示,对TGF- β 的抑制有望成为治疗靶点,但由于缺少合适的反应CD肠道纤维化的动物模型,相关研究仍具有较大难度。

而有助于成纤维细胞与ECM的联系^[5]。

1.2 成纤维细胞 成纤维细胞在纤维化的发生机制中占有主要位置。狭窄部位的纤维化组织中具有大量成纤维细胞聚积,他们的聚集与促纤维化生长因子和ECM的表达相关^[6]。从CD狭窄组织分离的成纤维细胞具有独特的特性:可表达黏附分子、生长因子、ECM,即使失去体内刺激也可以持续生长,这些都与从正常人肠道、溃疡性结肠炎肠道、甚至CD患者非狭窄肠道分离的成纤维细胞不同^[7]。这种独特的成纤维细胞表达的黏附分子,如细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1,在细胞动员和细胞间相互作用中具有重要作用^[8]。另外这些成纤维细胞过度表达核转录因子NF- κ B,反映出细胞因子刺激增强。

除成纤维细胞外,众多其他间充质细胞也可能参与了CD肠道纤维化的过程,如肌成纤维细胞、平滑肌细胞等,目前认为肠道纤维化并非由其中某一种细胞类型单一主导,成纤维细胞、肌成纤维细胞以及各种类型的平滑肌细胞可能是处于不断分化和去分化的同一群细胞的不同阶段^[9]。这些细胞可以根据细胞骨骼细丝波形蛋白(V)和 α 平滑肌肌动蛋白(A)的染色来鉴别。典型的成纤维细胞为V+/A-,平滑肌细胞为V-/A+,肌成纤维细胞为V+/A+。

1.3 生长因子 已有研究发现,众多生长因子在CD的狭窄组织中过度表达,从而促进成纤维细胞和肌成纤维细胞的进一步增生。如胰岛素样生长因子 I (insulin like growth factor 1, IGF- I)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血小板来源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、基础成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)^[10-13]。这些因子还可刺激ECM合成,促进血管生成和组织愈合。最近发现结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在慢性纤维化的形成中至关重要,狭窄组织的成纤维细胞可以持续过度表达CTGF, TGF- β 1在调节其产生中起关键作用^[14]。

TGF- β 是调节成纤维细胞活性的重要因子。成纤维细胞本身就可以过度表达TGF- β 。正常组织愈合过程是促纤维化与抗纤维化细胞因子相互作用的结果,其中TGF- β 1、CTGF具有促纤维化作用,其过度表达使组织愈合过程不能正常终止,过度纤维化产生,最终致使肠道狭窄形成。

TGF- β 具有不同亚型,其中TGF- β 1是最主要的促纤维化因子^[11]。

2 肠道纤维化的治疗

2.1 手术治疗 狭窄部位切除术或者狭窄成形术是治疗CD有症状肠道狭窄的首选方式,但复发率较高。复发部位以吻合口近端新的回肠末端最为常见^[15]。相对于传统的端端缝合手术,采用宽肠腔的订书器吻合可能会减少复发^[16]。狭窄成形术不需切除肠道,从而保留了原肠道的长度,但最终术后结果与切除手术相差无几。术后的复发危险因素包括青年、病程短、距上次手术短时间内非弥漫性病变等^[17]。有一些药物可用于减少术后复发,如硝基咪唑类抗生素奥硝唑、甲硝唑, 6-巯基嘌呤, 柳氮磺胺吡啶,但这些药物并非专门针对预防纤维化形成,疗效有限^[18,19]。

2.2 内镜下治疗 内镜下球囊扩张术可能推迟外科手术的时间,但复发率较高。有报道局部辅助激素和硫唑嘌呤注射可能延缓复发^[20],但缺乏循证医学证据。

2.3 生物学治疗

2.3.1 英夫利昔: 为TNF- α 单克隆抗体,已经被包括我国在内的众多国家应用于临床诱导和维持CD缓解。有研究认为他的早期应用可以减少表皮下组织与细菌成分接触,从而缓解促纤维化反应,因而对预防纤维化形成具有长期益处。但也有研究认为该药物促使组织迅速愈合,可能导致过多瘢痕组织形成,并可通过抑制TNF- α 对TGF- β 信号通路作用,进而促进狭窄形成^[14]。总之英夫利昔对CD肠道纤维化的作用还需进一步研究定论。

2.3.2 其他: IL-10和抗CD40抗体被证实具有抗纤维化作用^[21,22],可能具有一定的治疗前景。

3 结论

相对于CD的肠道炎症反应,我们对于CD的肠道纤维化和狭窄形成所知甚少,目前的治疗手段也极为有限,复发率较高。近几年对于肠道纤维化发病机制的研究提示,对TGF- β 的抑制有望成为治疗靶点,但由于缺少合适的反应CD肠道纤维化的动物模型,相关研究仍具有较大难度。总之,CD肠道纤维化是成纤维细胞、平滑肌细胞、细胞因子、局部炎症细胞等多种因素之间复杂作用的结果,目前缺乏行之有效的治疗和预防方法,更好的了解肠道纤维化的形成机制可能有助于未来寻找有效的治疗手段。

■应用要点

IL-10和抗CD40抗体被证实具有抗纤维化作用,可能具有一定的治疗前景。

4 参考文献

- 1 Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ, Gotschalk N, Gay S, Gay R. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1988; 94: 257-265
- 2 Cohen RD, Larson LR, Roth JM, Becker RV, Mummert LL. The cost of hospitalization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 524-530
- 3 Silverstein MD, Loftus EV, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Feagan BG, Nietert PJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of a population-based cohort. *Gastroenterology* 1999; 117: 49-57
- 4 Ehrlich HP, White BS. The identification of alpha A and alpha B collagen chains in hypertrophic scar. *Exp Mol Pathol* 1981; 34: 1-8
- 5 Dammeier J, Brauchle M, Falk W, Grotendorst GR, Werner S. Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 909-922
- 6 Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, Docherty NG, Watson RW, O'Connell PR. Fibrogenesis in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 439-448
- 7 McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C172-C182
- 8 Beddy DJ, Watson WR, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Critical involvement of stress-activated mitogen-activated protein kinases in the regulation of intracellular adhesion molecule-1 in serosal fibroblasts isolated from patients with Crohn's disease. *J Am Coll Surg* 2004; 199: 234-242
- 9 Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P. Medical therapy for Crohn's disease strictures. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 55-60
- 10 Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G809-G818
- 11 Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B, Bercik P, Van Kampen C, Galeazzi F, Sime PJ, Gaultie J, Collins SM. TGF-beta1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G116-G128
- 12 Jobson TM, Billington CK, Hall IP. Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J Clin Invest* 1998; 101: 2650-2657
- 13 Beddy D, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Increased vascular endothelial growth factor production in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 2004; 91: 72-77
- 14 Beddy D, Mulsow J, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Expression and regulation of connective tissue growth factor by transforming growth factor beta and tumour necrosis factor alpha in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 2006; 93: 1290-1296
- 15 Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990; 99: 956-963
- 16 Muñoz-Juárez M, Yamamoto T, Wolff BG, Keighley MR. Wide-lumen stapled anastomosis vs. conventional end-to-end anastomosis in the treatment of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 20-25; discussion 25-26
- 17 Dietz DW, Fazio VW, Laureti S, Strong SA, Hull TL, Church J, Remzi FH, Lavery IC, Senagore AJ. Strictureplasty in diffuse Crohn's jejunoileitis: safe and durable. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 764-770
- 18 Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S, D'Haens G, Baert F, Noman M, Aerden I, De Hertogh G, Geboes K, Hiele M, D'Hoore A, Penninckx F. Ornidazole for prophylaxis of postoperative Crohn's disease recurrence: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2005; 128: 856-861
- 19 Ewe K, Herfarth C, Malchow H, Jesdinsky HJ. Postoperative recurrence of Crohn's disease in relation to radicality of operation and sulfasalazine prophylaxis: a multicenter trial. *Digestion* 1989; 42: 224-232
- 20 Brooker JC, Beckett CG, Saunders BP, Benson MJ. Long-acting steroid injection after endoscopic dilation of anastomotic Crohn's strictures may improve the outcome: a retrospective case series. *Endoscopy* 2003; 35: 333-337
- 21 Mu W, Ouyang X, Agarwal A, Zhang L, Long DA, Cruz PE, Roncal CA, Glushakova OY, Chiodo VA, Atkinson MA, Hauswirth WW, Flotte TR, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3651-3660
- 22 Kasran A, Boon L, Wortel CH, Hogezaand RA, Schreiber S, Goldin E, Boer M, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 111-122

■同行评价

本文对CD肠道纤维化部分形成原因和机制进行了综述, 有一定学术价值和临床意义。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

肠黏膜非免疫细胞在炎症性肠病发病中的作用

白爱平

■背景资料

肠黏膜非免疫细胞包括上皮细胞、肥大细胞和基质细胞等细胞。近年来研究发现, 肠黏膜非免疫细胞具有很多生物学功能, 与肠黏膜免疫细胞存在密切的相互作用, 参与肠黏膜免疫反应, 在炎症性肠病(IBD)发病中起重要作用。

白爱平, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

国家自然科学基金资助项目, No. 30860108

江西省自然科学基金资助项目, No. 2007GZY1168

江西省青年科学家培养对象计划资助

通讯作者: 白爱平, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科. baiap@163.com

收稿日期: 2010-03-11 修回日期: 2010-06-10

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-07-08

Role of non-immune cells in the intestinal mucosa in the pathogenesis of inflammatory bowel disease

Ai-Ping Bai

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

Supported by: National Natural Scientific Foundation of China, No. 30860108; the National Natural Scientific Foundation of Jiangxi Province, No. 2007GZY1168; the Young Scientist Cultivation Program of Jiangxi Province

Correspondence to: Ai-Ping Bai, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. baiap@163.com

Received: 2010-03-11 Revised: 2010-06-10

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-07-08

Abstract

Under physiological conditions, non-immune cells in the intestinal mucosa, including epithelial cells, mast cells, endothelial cells and stromal cells, play important roles in maintaining normal intestinal structure and function. During the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD), these non-immune cells interact with each other by secreting abundant proinflammatory cytokines and chemokines, modulate innate and adaptive immune functions, and thereby contribute to the development of IBD. In this paper, we review the role of these non-immune cells in the pathogenesis of IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Epithelial cell; Mast cell; Endothelial cell; Stromal cell; Pathogenesis

Bai AP. Role of non-immune cells in the intestinal mucosa

in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(19): 2020-2023

摘要

肠黏膜非免疫细胞如上皮细胞、肥大细胞、血管内皮细胞和基质细胞等具有很多生物学功能, 这些细胞与肠黏膜免疫细胞存在密切的相互作用, 参与了肠黏膜的固有免疫和适应性免疫反应, 维持肠黏膜结构和功能的稳定。炎症性肠病发病时, 上述细胞间的相互作用失调, 影响了肠黏膜功能的平衡, 造成组织损伤和慢性炎症的发生。本文详细讨论了肠黏膜非免疫细胞的功能, 及在炎症性肠病发病中的作用。

关键词: 炎症性肠病; 上皮细胞; 肥大细胞; 基质细胞; 血管内皮细胞; 发病机制

白爱平. 肠黏膜非免疫细胞在炎症性肠病发病中的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2020-2023

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2020.asp>

0 引言

肠黏膜非免疫细胞包括上皮细胞、肥大细胞和基质细胞等细胞。近年来研究发现, 肠黏膜非免疫细胞具有很多生物学功能, 与肠黏膜免疫细胞存在密切的相互作用, 参与肠黏膜免疫反应, 在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病中起重要作用。

1 肠上皮细胞

肠黏膜上皮细胞分为四种类型: 具有吸收功能的柱状细胞、分泌黏液的杯状细胞、肠内分泌细胞和潘氏(paneth cell)细胞等。肠道炎症时, 肠黏膜上皮细胞参与了肠黏膜固有免疫和适应性免疫反应, 如肠上皮黏膜屏障、黏膜上皮细胞受致病菌及细菌产物损伤后产生免疫反应等^[1]。

IBD发病时, 肠黏膜上皮细胞的生存时间明显缩短, 上皮细胞凋亡指数(M30)及凋亡增殖比与对照组相比增高^[2], 说明IBD病变肠上皮细胞凋亡与增殖的平衡被打破, 细胞凋亡的速率超过了代偿性细胞增殖, 导致肠上皮屏障的缺损。

■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

IBD肠上皮细胞受损伤的机制可能为^[3,4]: 炎症肠黏膜固有层细胞释放多种蛋白质, 如穿孔素、颗粒酶A等, 直接杀伤上皮细胞; 炎症肠黏膜局部表达增多的细胞因子诱导上皮细胞表达Fas, 经固有层细胞高表达的FasL诱导上皮细胞发生凋亡。

正常肠黏膜单层上皮细胞构成了肠黏膜屏障, 该屏障只能让水分子、电解质和营养物质等通过, 但肠腔内大量的抗原物质、细菌及其产物如脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)等不能通过。肠黏膜屏障对肠腔内物质的选择性通透作用, 是由细胞间紧密连接所调节的, 肠上皮细胞间紧密连接在维持上皮细胞屏障功能的完整、黏膜的稳定等方面起重要作用^[5]。黏膜固有层肌成纤维细胞所分泌的TGF- β , 能加强细胞间紧密连接, 而一些炎症细胞因子如INF- γ 、TNF等, 能增加黏膜屏障的通透性, 使肠腔内一些细菌产物如LPS进入肠壁^[6]。IBD患者肠黏膜通透性可能为先天性增高, 或炎症肠黏膜激活的T细胞、巨噬细胞分泌大量INF- γ 、TNF, 诱导肠黏膜通透性增高, 导致大量肠腔内抗原进入肠黏膜固有层, 进一步激活免疫细胞, 放大炎症反应。肠上皮细胞间紧密是由上皮细胞骨架蛋白、细胞间黏附分子所维系, 如果先天性地使细胞黏附分子基因沉默, 动物肠上皮细胞间紧密连接将受影响, 肠道出现类似克罗恩病(Crohn's disease, CD)组织学改变的炎症^[7], 说明IBD患者肠上皮细胞间黏附分子能可能存在异常。

肠上皮细胞在肠黏膜免疫反应中的作用日益引人注目。IBD发病时, 肠腔内大量病原微生物或毒性产物能诱导肠上皮细胞发生反应, 如分泌趋化因子IL-8等。肠上皮细胞受病原微生物或毒性产物的刺激, 细胞内NF- κ B被激活, NF- κ B移位到核内, 与相关基因包括IL-8基因的启动子结合, 调节IL-8等表达^[8]。上皮细胞所分泌的IL-8能在肠黏膜局部趋化外周血中的免疫细胞进入肠黏膜。LPS为革兰氏阴性菌的细菌壁成分, 在结肠肠腔中浓度很高。正常人肠上皮细胞不表达LPS受体如TLR4、CD14, 对LPS基本上无反应。IBD患者肠黏膜上皮细胞则表达这些受体, 受LPS刺激后, 上皮细胞内NF- κ B被激活, 分泌IL-8等细胞因子^[9]。最近有研究发现, 肠道益生菌能有效地抑制肠上皮细胞NF- κ B的激活和IL-8等炎症细胞因子的分泌^[10], 说明肠道益生菌能调节肠上皮细胞的功能, 抑制肠黏膜免疫反应。

IBD发病时, 肠上皮细胞功能发生紊乱, 会

导致人体出现一些临床症状。例如, 肠道产生的大量炎症介质使上皮细胞的水和电解质转运功能紊乱, 诱导上皮细胞向肠腔内分泌氯离子, 导致大量的液体的丢失, 患者出现腹泻等症状。肠黏膜层的其他细胞, 如肌成纤维细胞、固有层淋巴细胞和肠神经细胞等, 对肠上皮细胞电解质转运等功能具有一定的调节作用。

2 肥大细胞

肠黏膜肥大细胞主要位于消化系黏膜血管和神经周围的结缔组织中, 其生长主要依赖于T细胞所产生的IL-3、IL-4。当外界抗原、补体片段、IgG等在调理素IgE介导下结合肥大细胞, 引起肥大细胞激活并脱颗粒, 释放大量的化学介质, 其中包括引起血管痉挛的介质如组胺、白三烯、血小板活化因子等; 具有趋化活性的介质如嗜酸性粒细胞趋化因子A、淋巴细胞趋化因子等; 及蛋白酶、溶酶体水解酶、肝素等酶类^[11]。这些介质趋化嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等细胞迁移至炎症部位, 并引起局部组织血管扩张、水肿和微血栓形成, 多种蛋白酶可加剧组织的炎症反应。

肠黏膜肥大细胞能分泌多种细胞因子, 包括IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、INF- γ 和TNF等。肥大细胞能分泌的细胞因子或向T细胞递呈抗原, 影响T细胞的功能与活化^[12]。肥大细胞所分泌的IL-4, 能诱导TH0细胞向TH2细胞分化, 抑制TH1细胞的产生, 并调节TH2型细胞免疫反应。肥大细胞表达MHC-II类分子, 具有抗原递呈功能, 能把加工的抗原肽分子递呈给CD4⁺ T细胞, 诱导T细胞的激活。

肠黏膜肥大细胞是否参与IBD发病及具体的机制目前尚存在争议。Higa等^[13]用5%醋酸灌肠诱导小鼠结肠炎模型, 并对炎症肠道的肥大细胞进行了计数, 他们发现结肠炎症的严重程度与肥大细胞的数量成正比, 但如果用肥大细胞膜稳定剂酮替芬预先处理小鼠, 诱导的小鼠结肠炎症损伤并没有改善。Gelbmann等^[14]用免疫组织化学法检测了CD患者炎症肠道有纤维化出现的病变组织中肥大细胞分泌蛋白酶情况, 结果CD患者有纤维化病变的炎症肠组织中高表达肥大细胞所分泌的类胰蛋白酶和糜蛋白酶等, 明显高于正常人和非纤维化肠组织, 他们推测肥大细胞在炎症肠道聚集, 与CD患者肠道纤维化及狭窄的形成有关。

Galli提出了“肥大细胞-细胞因子级联反应”学说, 该学说内容如下^[15]: 肥大细胞激活后

■研究前沿

目前有关肠黏膜平滑肌细胞的研究较少。研究认为, 肠黏膜平滑肌细胞能合成胶原, 并受很多细胞因子和药物的调节。

■相关报道

Higa等用5%醋酸灌肠诱导小鼠结肠炎模型,并对炎症肠道的肥大细胞进行了计数,他们发现结肠炎症的严重程度与肥大细胞的数量成正比,但如果用肥大细胞膜稳定剂酮替芬预先处理小鼠,诱导的小鼠结肠炎症损伤并没有改善。

释放介质和细胞因子,这些介质和细胞因子作用于组织中的细胞并产生生物学效应;肥大细胞所分泌的细胞因子作用于组织细胞和趋化的细胞,并诱导这些细胞分泌炎症细胞因子如TNF等,进而对组织细胞和趋化细胞发挥作用,进一步放大炎症反应效应。但肠道肥大细胞是否参与IBD发病、肥大细胞所分泌的介质和细胞因子在IBD发病机制中的作用究竟如何等问题,尚需进一步研究证实。

3 血管内皮细胞

肠黏膜血管内皮细胞表达的黏附分子调节循环中白细胞进入肠黏膜淋巴组织及固有层。血管内皮细胞表达的血管细胞黏附分子(mucosal vascular addressin-1, MAdCAM-1)是免疫球蛋白超家族黏附分子,能与淋巴细胞表达的 $\alpha 4\beta 7$ 整合素结合,引导淋巴细胞进入黏膜。活动性IBD时,黏膜血管内皮细胞高表达这些黏附分子,促进循环中中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞迁移至黏膜^[16]。LPS、TNF和IL-1等能诱导血管内皮细胞高表达E-选择素等黏附分子^[17],E-选择素能促进白细胞进入黏膜固有层,细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管黏附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)能促进循环中单核细胞迁入固有层。通常,循环中白细胞进入黏膜需要多个步骤,包括识别、黏附内皮细胞、出血管、沿趋化因子浓度梯度趋化。并且,白细胞黏附自炎症肠黏膜分离的内皮细胞的能力,较黏附同一患者非炎症肠黏膜的内皮细胞强。实验研究发现^[18],抑制肠黏膜血管内皮细胞黏附分子的表达,能抑制白细胞黏附内皮细胞及向炎症肠黏膜局部浸润,实验性结肠炎的病情明显缓解。如何有效地抑制肠黏膜血管内皮细胞表达黏附分子,有可能是今后IBD临床治疗研究的目标之一。

4 基质细胞

肠黏膜基质细胞包括成纤维细胞、肌成纤维细胞、平滑肌细胞等。最近,成纤维细胞、肌成纤维细胞和平滑肌细胞在肠道炎症和IBD发病机制中的作用引起很多学者的注意。

肌成纤维细胞通常位于黏膜基底膜下,紧邻上皮细胞,具有很多生物学功能^[19]。成纤维细胞和肌成纤维细胞能促进黏膜上皮细胞的生长和发育,对上皮细胞的生长和凋亡过程具有一定的调节作用。肌成纤维细胞具有一定的收缩功能,肠黏膜受损伤时,肌成纤维细胞发生收缩

能减少肠黏膜溃疡的面积,促进肠黏膜的修复。肌成纤维细胞能合成细胞外基质蛋白,并经分泌TGF- β 促进肠上皮细胞修复、调节黏膜屏障功能,经分泌环氧化酶产物调节肠上皮细胞的水电解质转运。成纤维细胞和肌成纤维细胞表达一些生长因子和细胞因子如TGF- β 、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子、IL-1和TNF等,这些生长因子和细胞因子经自分泌或旁分泌作用,调节成纤维细胞和肌成纤维细胞的激活、增殖。并且,这些基质细胞通过分泌细胞因子和介质等,或直接与T细胞接触,与黏膜T细胞产生相互作用,参与了IBD肠黏膜炎症反应^[20]。研究显示,溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者炎症肠黏膜固有层肌成纤维细胞数量增多^[21]。

肠道纤维化的发生与成纤维细胞和肌成纤维细胞有关。成纤维细胞和肌成纤维细胞是合成细胞外基质蛋白的主要来源,这些细胞能合成细胞外基质蛋白、促进胶原沉积、促进肉芽肿及肠道纤维化的形成,参与了CD肠道狭窄的机制。与正常肠黏膜、没有发生狭窄的炎症肠黏膜成纤维细胞相比,自CD患者狭窄肠段分离的成纤维细胞能合成大量的胶原,尤其是III型胶原,并且,TGF- $\beta 1$ 能明显诱导成纤维细胞合成III型胶原^[22]。成纤维细胞和肌成纤维细胞合成细胞外基质受TGF- β 调节。有学者将细菌菌壁成分注射入大鼠肠壁,诱导大鼠结肠炎及纤维化模型后分离出肠黏膜成纤维细胞,体外经TGF- $\beta 1$ 刺激,成纤维细胞分泌大量的胶原^[23]。

TGF- β 有三种类型,即TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 、TGF- $\beta 3$,不同类型TGF- β 的功能有所不同。在组织损伤修复中,TGF- $\beta 1$ 和TGF- $\beta 2$ 能促进细胞外基质大量沉积,并形成瘢痕;TGF- $\beta 3$ 具组织修复功能,但不会诱导纤维化发生^[24]。研究发现^[25],正常人肠黏膜肌成纤维细胞主要分泌TGF- $\beta 1$,UC患者肠黏膜肌成纤维细胞分泌TGF- $\beta 1$ 和TGF- $\beta 3$,而自CD患者肠黏膜分离出的肌成纤维细胞分泌大量的TGF- $\beta 2$,分泌TGF- $\beta 3$ 的量很少,并且,自CD患者肠黏膜分离出的肌成纤维细胞较正常人和UC患者肠黏膜肌成纤维细胞增殖明显活跃。以上研究说明,CD患者肠黏膜肌成纤维细胞分泌大量的TGF- $\beta 2$,而分泌TGF- $\beta 3$ 的量很少,并且肌成纤维细胞具有很强的增殖能力,是肠道狭窄的主要原因。

目前有关肠黏膜平滑肌细胞的研究较少。研究认为,肠黏膜平滑肌细胞能合成胶原,并受很多细胞因子和药物的调节。例如,TGF- $\beta 1$ 能增强

平滑肌细胞合成胶原^[26]; 而一些炎症细胞因子如 IL-1 β 等抑制平滑肌细胞合成胶原, 并诱导平滑肌细胞表达胶原酶, 增强其对胶原的分解^[27]. 皮质激素则能抑制炎症细胞因子 IL-1 β 的上述作用^[28].

5 结论

肠黏膜上皮细胞、基质细胞、肥大细胞、内皮细胞等与肠黏膜免疫细胞间相互作用, 调节肠黏膜免疫的动态平衡, 维持肠黏膜结构的稳定. IBD 发病时, 上述的相互作用失调, 影响了肠黏膜功能的平衡, 造成组织损伤和慢性炎症的发生. 针对上述细胞与细胞间及细胞与细胞外基质间相互作用的研究, 有利于为治疗 CD 和 UC 寻找新的靶点.

6 参考文献

- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
- 严瑾, 欧阳钦, 刘卫平, 李甘地, 李俸媛. 溃疡性结肠炎肠上皮细胞的凋亡和增殖. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 161-163
- 刘小方, 欧阳钦, 邱春华. 穿孔素在溃疡性结肠炎患者肠黏膜的表达及意义. *中华消化杂志* 2001; 21: 443-444
- 严瑾, 欧阳钦, 陈代云, 刘卫平, 李甘地. 溃疡性结肠炎中 Fas/FasL 介导的结肠上皮细胞凋亡. *中华消化杂志* 2001; 21: 397-399
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 799-809
- Wang F, Schwarz BT, Graham WV, Wang Y, Su L, Clayburgh DR, Abraham C, Turner JR. IFN- γ -induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology* 2006; 131: 1153-1163
- Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995; 270: 1203-1207
- Van De Walle J, Romier B, Larondelle Y, Schneider YJ. Influence of deoxynivalenol on NF- κ B activation and IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol Lett* 2008; 177: 205-214
- Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7017
- Bai AP, Ouyang Q, Zhang W, Wang CH, Li SF. Probiotics inhibit TNF- α -induced interleukin-8 secretion of HT29 cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 455-457
- Incorvaia C, Frati F, Sensi L, Riario-Sforza GG, Marcucci F. Allergic inflammation and the oral mucosa. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2007; 1: 35-38
- Lorentz A, Bischoff SC. Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4. *Immunol Rev* 2001; 179: 57-60
- Higa A, Ishikawa N, Eto T, Nawa Y. Evaluation of the role of mast cells in the progression of acetic acid-induced colitis in mice. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 774-777
- Gelbmann CM, Mestermann S, Gross V, Köllinger M, Schölmerich J, Falk W. Strictures in Crohn's disease are characterised by an accumulation of mast cells colocalised with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut* 1999; 45: 210-217
- Galli SJ, Grimaldeston M, Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 478-486
- Thomas PD, Forbes A, Price AB, Nicholls RJ, Ciclitira PJ. Differential expression of cell adhesion molecules within inflamed ileal pouch mucosa: relationship to recruited cell subtypes. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 137-144
- Rivera-Nieves J, Gofu G, Ley K. Leukocyte adhesion molecules in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1715-1735
- Farkas S, Hornung M, Sattler C, Edtinger K, Steinbauer M, Anthuber M, Schlitt HJ, Herfarth H, Geissler EK. Blocking MAdCAM-1 in vivo reduces leukocyte extravasation and reverses chronic inflammation in experimental colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 71-78
- Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: G2-G7
- Sogawa M, Matsumoto T, Yamagami H, Yamada T, Ozeki Y, Yano I, Nakajima Y, Arakawa T, Kaneda K. A murine model of granulomatous colitis with mesenteric lymphadenitis induced by mycobacterial cord factor. *Virchows Arch* 2003; 442: 151-158
- 方维丽, 王邦茂, 阎雪燕, 郭霞, 杨玉龙, 姜葵. 肠上皮肌成纤维细胞与溃疡性结肠炎关系的初步探讨. *中华消化杂志* 2002; 22: 664-666
- Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF- β 1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 16-26
- van Tol EA, Holt L, Li FL, Kong FM, Rippe R, Yamauchi M, Pucilowska J, Lund PK, Sartor RB. Bacterial cell wall polymers promote intestinal fibrosis by direct stimulation of myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 277: G245-G255
- Jenkins G. The role of proteases in transforming growth factor- β activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1068-1078
- McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF- β isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C172-C182
- Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. IGF-I and TGF- β 1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G809-G818
- Graham MF, Willey A, Adams J, Yager D, Diegelmann RF. Interleukin 1 β down-regulates collagen and augments collagenase expression in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 344-350
- Graham MF, Willey A, Zhu YN, Yager DR, Sugerman HJ, Diegelmann RF. Corticosteroids repress the interleukin 1 β -induced secretion of collagenase in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 1924-1929

同行评价

本文有一定的实用性和临床意义.

神经-内分泌-免疫网络与炎症性肠病

袁川评, 王玮, 柳巨雄

■背景资料

过去欧洲和北美人群中IBD发病率高, 亚洲人群发病率较低, 然而近20年来, IBD在亚洲人群中的发病呈现明显增高趋势。由于IBD病因和发病机制不明确, 使得IBD的预防与治疗比较棘手。目前认为它是一种自身免疫性疾病, 主要由遗传易感性、胃肠道益生菌与致病菌失衡、肠上皮细胞完整性受损以及宿主免疫功能失调等综合作用的作用而致病。其中免疫因素在IBD的发生发展中发挥着至关重要的作用, 特别是Th1/Th2失衡引起的免疫异常在IBD的发病中占有中心地位。

袁川评, 王玮, 柳巨雄, 吉林大学畜牧兽医学院 吉林省长春市 130062

国家自然科学基金资助项目, No. 30671535, 30871840

通讯作者: 柳巨雄, 教授, 130062, 吉林省长春市西安大路5333号, 吉林大学畜牧兽医学院. juxiongliu@sina.com

电话: 0431-87836163

收稿日期: 2010-03-11 修回日期: 2010-06-17

接受日期: 2010-06-28 在线出版日期: 2010-07-08

Neuro-endocrine-immune network and inflammatory bowel disease

Chuan-Ping Yuan, Wei Wang, Ju-Xiong Liu

Chuan-Ping Yuan, Wei Wang, Ju-Xiong Liu, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30671535 and 30871840

Correspondence to: Professor Ju-Xiong Liu, Department of Basic Veterinary Medicine, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, Jilin Province, China. juxiongliu@sina.com

Received: 2010-03-11 Revised: 2010-06-17

Accepted: 2010-06-28 Published online: 2010-07-08

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of chronic inflammatory gastrointestinal diseases of unknown etiology, including mainly ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Numerous studies have indicated that there is considerable relationship between the pathogenesis of IBD and the neuro-endocrine-immune network. This article will describe the essential role of the neuro-immune-endocrine network in the development of IBD in terms of the hypothalamus-autonomic nervous system (HANS) axis, hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and immunity.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Neuro-endocrine-immune network; Hypothalamus-autonomic nervous system axis; Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; Immunity

Yuan CP, Wang W, Liu JX. Neuro-endocrine-immune network and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2024-2028

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种病因不明的慢性胃肠道炎症性疾病, 他主要包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)。近年来, 大量研究表明, 其发病机制与神经-内分泌-免疫网络(neuro-endocrine-immune network)密切相关。因此本文分别从下丘脑-自主神经系统轴(hypothalamus-autonomic nervous system axis, HANS)、下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)和免疫三个方面阐述该网络在IBD发生发展过程中的重要作用。

关键词: 炎症性肠病; 神经-内分泌-免疫网络; 下丘脑-自主神经系统轴; 下丘脑-垂体-肾上腺轴; 免疫

袁川评, 王玮, 柳巨雄. 神经-内分泌-免疫网络与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2024-2028

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2024.asp>

0 引言

神经-内分泌-免疫网络(neuro-endocrine-immune network)是二十一世纪对生物体自身调控机制研究中最引人注目的热点之一。科学家们已通过大量实验证实, 神经系统通过其广泛的外周神经突触及其分泌的神经递质和众多的内分泌激素, 甚至还有神经细胞分泌的细胞因子, 来共同调控着免疫系统的功能; 而免疫系统通过免疫细胞产生的多种细胞因子和激素样物质反馈作用于神经内分泌系统。两个系统的细胞表面都证实有相关受体接受对方传来的各种信息。这种双向的复杂作用使两个系统内或系统之间得以相互交通和调节, 构成神经内分泌免疫调节网络(neuro-endocrine-immunoregulatory network), 共同维持着机体的稳态。当这个稳态被各种外来或内在的因素打破时, 神经-内分泌-免疫调节网络中的某些部分会作出反应和功能上的改变, 同时涉及的网络中其他相关环节也随之发生变化, 进而导致某些疾病和病理

■同行评议者

梅林, 教授, 北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

过程的出现. 而炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因不明的慢性非特异性的肠道炎症性疾病, 他主要包括两个独立的疾病: 克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC). 过去欧洲和北美人群中IBD发病率较高, 亚洲人群发病率较低, 然而近20年来, IBD在亚洲人群中的发病呈现明显增高趋势^[1]. 由于IBD病因和发病机制不明确, 使得IBD的预防与治疗比较棘手. 目前认为他是一种自身免疫性疾病, 主要由遗传易感性、胃肠道益生菌与致病菌失衡、肠上皮细胞完整性受损以及宿主免疫功能失调等综合因素的作用而致病^[2,3]. 其中免疫因素在IBD的发生发展中发挥着至关重要的作用, 特别是Th1/Th2失衡引起的免疫异常在IBD的发病中占有中心地位^[4]. 因此笔者拟从神经-内分泌-免疫调节网络的角度来探讨IBD的发病机制, 以期为疾病的防治提供新的思路.

1 神经-免疫-内分泌网络概述

自1977年, Besedovsky提出, 人体内存在有神经-内分泌-免疫网络的假说^[5]以来, 神经、免疫、内分泌三大系统之间的相互关系得到了广泛关注. 并且他们之间的这种网络关系的揭示, 不是通过静态的组织解剖的研究来完成的, 因为这种网络关系并没有固定静止的解剖结构作为基础. 近年来, 随着分子生物学的发展, 神经科学和免疫学向分子水平的深入, 已逐步证明: 神经系统、免疫系统、内分泌系统之间进行信息沟通的语言是一套通用的信息分子, 即各种神经递质、激素和细胞因子^[6]. 三大系统的细胞表面都有接受这些分子语言的受体; 同时也都能分泌这些信息分子^[7,8]. 如免疫细胞不但产生细胞因子, 也能分泌神经递质和内分泌激素; 而神经细胞除产生神经递质外, 也可以分泌激素和细胞因子. 正是通过对这三大系统的细胞和分子(包括膜分子)的功能的深入研究和作用方式的精细描述, 才揭示了连接这三大系统功能的分子调节网络. 我们必须承认, 神经-内分泌-免疫网络学说的产生, 说明了现代医学在注重局部微观研究的同时, 也逐步走向对机体整体调控的探讨^[9]. 将神经、免疫、内分泌三者有机结合起来, 整合了机体最重要的三大功能系统的相互调节关系, 为从分子水平认识机体整体功能提供了有意义的研究模式, 而且在生物医学范围内深化了对疾病发生机制的认识. 该网络中

任何环节的紊乱均不可避免地影响其他系统的功能, 从而导致相关疾病的产生^[10]. 该三大系统间的作用是双向而不是单向的, 但这种双向作用又是极其复杂的. 而这种复杂且广泛的网络作用主要与下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴和下丘脑-自主神经系统(hypothalamus-autonomic nervous system, HANS)轴的相关激素、神经递质及细胞因子密切相关. 因此, 从两轴与IBD关系的角度来探讨神经-内分泌-免疫调节网络在IBD的发生发展过程中的作用显得尤为重要.

2 HPA轴与IBD

在炎症性肠病过程中, 炎症部位细胞因子的释放可以刺激并影响下丘脑、垂体和肾上腺的细胞因子水平. 比如, 在由链球菌细胞壁诱导的关节炎或大肠炎中, HPA轴可以发生系统性反应^[11]. 大量存在于HPA轴中的类固醇激素和交感神经递质可以作为抗炎介质, 他们都是由免疫特赦器官大脑分泌的. 而一些抑制性反馈系统就可以减缓细胞因子在非神经元部位的过度产生, 从而保护大脑. 其中在HPA轴中的类固醇激素的代表主要是皮质醇, 他是正常代谢功能必须的, 其分泌主要受海马区、下丘脑和垂体三个基本位点调节. 皮质醇能通过血脑屏障, 到达中枢神经系统的广泛区域, 特别是神经内分泌调节网络中的关键位点, 如杏仁核、海马区和下丘脑. 自20世纪40年代起, 肾上腺糖皮质激素(glucocorticosteroid, GCS)已被用作IBD的主要治疗药物. 他是由肾上腺皮质中束状带分泌的一类甾体激素, 其分泌受促肾上腺皮质激素(adrenocorticotropin hormone, ATCH)调节. GCS具有快速、强大而非特异性的抗炎作用, 对各种炎症均有效. 在炎症初期, GCS抑制毛细血管扩张, 减轻渗出和水肿, 同时又抑制白细胞的浸润和吞噬, 从而减轻炎症症状. 在炎症后期, 抑制毛细血管和纤维母细胞的增生, 延缓肉芽组织的生成, 从而减轻疤痕和粘连等炎症后遗症. GCS首先扩散进入胞质内, 并与GR-Hsp结合, 然后Hsp被解离, GCS和GR形成的复合物进入细胞核, 与靶基因启动子序列的GRE结合, 诱导多种抗炎因子(如IL-4、IL-10等)的基因转录, 抑制致炎因子(如IL-1、IL-2、IL-8等)的基因转录, 从而产生抗炎的作用. 在IBD的治疗过程中, 他能促进多种抗炎基因(如细胞因子、酶类、受体和粘附分子等)的表达. 主要是通过阻止活性的

■研发前沿
神经-内分泌-免疫网络是二十一世纪对生物体自身调控机制研究中最引人注目的热点之一.

■相关报道

大量研究资料表明: IBD发病过程是包括各种细胞因子在内的自身免疫异常, 并最终导致组织损伤。

GCS受体与活性转录因子的结合而发挥作用(如NF- κ B, 活性蛋白-1), 他们都能调控炎症基因的表达。其中NF- κ B在IBD的发病机制中有重要的地位, GCS能阻滞NF- κ B的活化并诱导I- κ B α 的表达, 稳定NF- κ Bp65/I- κ B α 系统, 抑制IBD炎症进一步发展^[2,12]。另外他还可以通过降低毛细血管通透性和稳定细胞膜来减少白三烯、前列腺素及血栓素等炎症因子的释放, 抑制炎症反应, 缓解临床症状, 从而有效的控制急性活动性炎症^[13]。中重度UC患者早期接受糖皮质激素治疗, 可以获得较好的治疗效果^[14]。同样, 糖皮质激素也用于大多数中重度CD患者的治疗, 他与UC一样, 在炎症急性期的治疗效果较好, 能达到80%以上^[15]。

3 HANS轴与IBD

同样, HANS轴也可以由细胞因子活化^[16]。交感神经系统的活化可以引起局部的免疫抑制, 比如脾脏^[17]。大量存在于HANS轴中交感神经递质可以作为抗炎介质, 同样都是由免疫特赦器官大脑分泌的。而存在于HANS轴的类型固醇激素和神经递质主要包括促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)、去甲肾上腺素、P物质(substance P, SP)、降钙素基因相关蛋白(calcitonin gene related peptide, CGRP)、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)、血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)等^[18]。其中CRH是中枢神经系统、免疫系统和很多外周神经系统包括肠嗜铬细胞产生的一种神经肽, 他充当着HANS轴的重要调节剂。在中枢神经系统中, CRH从室旁核投射到脑干, 他和蓝斑有突触连接。而其他来源于室旁核的CRH纤维延伸至脊髓。因此交感神经的活化可能受到释放CRH的神经元的影响。而蓝斑是去甲肾上腺素能神经纤维的唯一来源, 他投射到中脑、小脑、海马区和新皮质。蓝斑主动控制警觉、注意力和调整行为的心理准备, 同时还调节疼痛和痛性刺激的行为反应等。当给予中枢促肾上腺皮质激素释放激素时, 能抑制胃排空时间和加速结肠运输。去甲肾上腺素是肾上腺素去掉N-甲基后形成的, 是一种神经递质, 主要由交感节后神经元和脑内肾上腺素能神经末梢合成和分泌, 是后者释放的主要递质, 同时也是一种激素。随着去甲肾上腺素的不断氧化, 更多稳定的NPY常常作为交感神经系统活性的标志物^[19]。而在下丘脑的室旁核中, 去甲肾上腺素

和NPY是CRH分泌的主要刺激物。脑室内或静脉注射NPY, 均会增加内源性糖皮质激素的血清水平。大量研究表明, 促肾上腺皮质激素释放激素、降钙素基因相关蛋白和SP在自身免疫细胞上具有促炎活性。他们可以刺激巨噬细胞释放TNF- α , IL-1和IL-6, 并且能激活NK细胞。另外, P物质能促进肥大细胞释放大量的血清素和组胺等介质, 作用于血管, 从而使血管扩张、增强其通透性^[20]。相反, 血管活性肽可以抑制单核细胞和T细胞产生促炎类细胞因子, 并且抑制NK细胞的功能和降低TLRs在肠上皮细胞中的表达^[20]。在IBD病变组织中, 分泌VIP、SP和生长抑素(somatostatin, SS)等胃肠肽激素的神经纤维突触板与免疫活性细胞的距离只有20-200 nm, 有的甚至更近^[21]。这也说明在炎症部位, 某些类型的免疫细胞可以产生诸如VIP、SP和SS等多种胃肠肽激素。又如从IBD肠壁中分离出炎症细胞, 发现IBD患者肠壁嗜酸性细胞产生大量的VIP和SP, 且VIP多于SP, 与非IBD标本相比有显著性差异^[22]。这些都说明, 胃肠肽类激素可以通过旁分泌和神经分泌来实现对IBD炎症的调节, 主要的途径有: 影响血液供应、血管壁通透性和炎症细胞、免疫活性细胞的功能和细胞因子的分泌等^[23]。

4 免疫与IBD

在免疫系统中, T细胞占有极其重要的地位, 在肠道菌群的增殖反应中起重要作用。T细胞的多种功能是由不同的T细胞亚群协同完成的。其中, Th1细胞主要表达IL-2、IFN- γ 和TNF- β , 而Th2细胞表达IL-4、IL-5、IL-9、IL-13等^[24]。由于细胞因子分泌的相互性, 对Th1细胞与Th2细胞的区分依赖于IFN- γ 以及IL-4的分泌。Th1细胞分泌IFN- γ , 不分泌IL-4, 而Th2细胞分泌IL-4, 不分泌IFN- γ 。在机体的正常生命活动中, Th1细胞与Th2细胞处于动态的平衡之中, 这两类细胞是相互制约的, IFN- γ 和IL-2可促进Th1细胞的分化, IL-4是Th2细胞分泌的细胞因子, IL-5、IL-6、IL-10和IL-13促进Th2分化。Th1和Th2细胞由共同的前身细胞Th0细胞分化而来, 决定分化取向的因素主要有遗传因素、病原体或抗原的种类、剂量和免疫途径、APC的种类, 其中尤为重要是细胞因子^[25]。而细胞因子是由机体的免疫细胞和非免疫细胞合成和分泌的具有广泛生物学活性的小分子多肽, 能调节多种细胞的生理功能, 在免疫系统中起着重要作用。根据细胞因

子在炎症中的作用可将其分为致炎细胞因子、抗炎细胞因子和生长因子三大类。其中, 致炎细胞因子包括TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-6、IL-12和IFN- γ 等, 多数由单核细胞及巨噬细胞产生, 参与细胞免疫, 在肠道中起促炎作用并可以作为黏膜损伤的介质; 抗炎细胞因子包括IL-4、IL-5、IL-10、IL-13等, 主要由T细胞产生, 参与体液免疫, 以抗炎的方式发挥作用; 生长因子包括胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)等, 发挥增殖和生长调节作用。

大量研究资料表明: IBD发病过程是包括各种细胞因子在内的自身免疫异常, 并最终导致组织损伤。Th1/Th2免疫应答的失衡表现为Th1和Th2亚类分泌的细胞因子即致炎细胞因子与抗炎细胞因子之间平衡的失调, 由此所致的免疫异常被视为IBD发病的重要机制。这些细胞因子共同组成了一个复杂的细胞因子网络, 他们在IBD的发病过程中发挥着各自的作用, 或起致炎作用, 或起抗炎作用。他们主要通过特异性地作用于靶细胞上的受体, 激活细胞内信号转导过程, 来产生特定的生物学效应^[3]。如果机体免疫系统选择了某一亚群为主的应答, 这种Th细胞就会正反馈地加强自身优势, 压抑另一亚群的发展, 因此Th1/Th2的失衡是导致IBD发生或加重的主要原因。而CD和UC有着不同的免疫反应类型, 其中以Th1细胞为主的黏膜免疫应答发展为CD, 释放IFN- γ 、TNF- α 、IL-21增加, IL-4减少; 以Th2细胞为主的黏膜免疫应答则在UC中占优势, IL-5、IL-13增加, 但IL-4不增加^[26]。Th1/Th2平衡受细胞因子调节, 其中IL-12、IFN- γ 、IL-4和IL-10是参与其调节的重要因子。细胞因子失调可由Th1/Th2紊乱引起, 并反馈性地加重Th1/Th2失衡, 形成恶性循环^[27]。因此我们可以说, Th1和Th2细胞通过其分泌产物之间的相互调节来维持Th1/Th2之间的平衡。

5 结论

HPA轴和HANS轴都可以由外周分泌的或体循环内的促炎刺激物诱导活化^[11,28-32], 并且在远离局部炎症的其他部位也将会发生重大变化, 从而影响局部炎症的免疫反应^[33,34]。在IBD炎症初期, HPA轴和HANS轴能以平行的方式通过体液和神经调节减轻炎症^[20]。在CD和UC患者中

NPY血清水平显著升高, 说明中枢自主神经系统占据一定的优势, 也就是说HANS轴处于兴奋状态; 然而随着炎症的加重, 促炎因子逐渐增加, 从而降低了HPA轴的活性, 使两轴不能协同发挥作用, 这种现象称为HPA轴和HANS轴解耦联^[35]。在两轴的解耦联过程中, 皮质醇(和其他类固醇激素)和神经递质类的协同作用消失, 使促炎占据优势。比如IL-6能降低HPA轴的反应活性, 这说明了在两轴的解耦联过程受到很多抑炎和促炎细胞因子的调节。由此可以看出, IBD的发病机制与神经-内分泌-免疫调节网络密切相关, 尤其是HPA轴和HANS轴, 在IBD的发生发展过程中发挥着至关重要的作用。因此, 从HPA轴和HANS轴的角度去探讨IBD相关细胞因子、神经递质和激素在IBD发病机制中的作用显得尤为重要。

6 参考文献

- 1 Goh K, Xiao SD. Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis* 2009; 10: 1-6
- 2 邓长生, 夏冰. 炎症性肠病. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1-221
- 3 张雪莉. 电刺激疑核对炎症性肠病大鼠IL-2、IFN- γ 表达的影响. 吉林大学 2009: 6-18
- 4 赵玉洁, 袁耀宗. 炎症性肠病发病机制新进展. 胃肠病学 2008; 13: 181-183
- 5 Besedovsky H, Sorkin E. Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 1977; 27: 1-12
- 6 Chesnokova V, Melmed S. Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology* 2002; 143: 1571-1574
- 7 Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 10
- 8 Jiang CL, Lu CL, Liu XY. The molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15: 363-369
- 9 付义, 陈冰. 神经-内分泌-免疫(NEI)网络研究促进中西医结合. 中华中医药学刊 2008; 26: 821-822
- 10 孙藏, 陆大祥. 神经-内分泌-免疫调节网络与疾病. 中国病理生理杂志 2000; 16: 761-763
- 11 Herfarth H, Brand K, Rath HC, Rogler G, Schölmerich J, Falk W. Nuclear factor-kappa B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 59-65
- 12 Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F, Hofmann M, Stremmel W, Thiele H, Ziegler R, Nawroth PP. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 1999; 45: 693-704
- 13 黄瑛, 王玉环. 儿童炎症性肠病的药物治疗. 医药专论 2009; 30: 459-464
- 14 Hyams J, Markowitz J, Lerer T, Griffiths A, Mack D,

■同行评价

本文内容重要, 有一定的参考价值。

- Bousvaros A, Otley A, Evans J, Pfefferkorn M, Rosh J, Rothbaum R, Kugathasan S, Mezoff A, Wyllie R, Tolia V, delRosario JF, Moyer MS, Oliva-Hemker M, Leleiko N. The natural history of corticosteroid therapy for ulcerative colitis in children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1118-1123
- 15 Markowitz J, Hyams J, Mack D, Leleiko N, Evans J, Kugathasan S, Pfefferkorn M, Mezoff A, Rosh J, Tolia V, Otley A, Griffiths A, Moyer MS, Oliva-Hemker M, Wyllie R, Rothbaum R, Bousvaros A, Del Rosario JF, Hale S, Lerer T. Corticosteroid therapy in the age of infliximab: acute and 1-year outcomes in newly diagnosed children with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 1124-1129
- 16 Helwig BG, Craig RA, Fels RJ, Blecha F, Kenney MJ. Central nervous system administration of interleukin-6 produces splenic sympathoexcitation. *Auton Neurosci* 2008; 141: 104-111
- 17 Ambrosini E, Aloisi F. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* 2004; 29: 1017-1038
- 18 Aibara K, Akaike N. Acetylcholine-activated ionic currents in isolated paratracheal ganglion cells of the rat. *Brain Res* 1991; 558: 20-26
- 19 Taylor CT, Keely SJ. The autonomic nervous system and inflammatory bowel disease. *Auton Neurosci* 2007; 133: 104-114
- 20 Contesse V, Lefebvre H, Lenglet S, Kuhn JM, Delarue C, Vaudry H. Role of 5-HT in the regulation of the brain-pituitary-adrenal axis: effects of 5-HT on adrenocortical cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78: 967-983
- 21 Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton Neurosci* 2006; 126-127: 250-257
- 22 Qian BF, Zhou GQ, Hammarström ML, Danielsson A. Both substance P and its receptor are expressed in mouse intestinal T lymphocytes. *Neuroendocrinology* 2001; 73: 358-368
- 23 Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 249-290
- 24 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573
- 25 邢同京, 章廉. Th类细胞极化群体的基础与临床. 第1版. 北京: 军事医学科学院出版社, 2002: 108-183
- 26 Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22: 382-389
- 27 赵玉洁, 袁耀宗. 炎症性肠病发病机制新进展. 胃肠病学 2008; 13: 181-183
- 28 Blalock JE, Smith EM. The immune system: our mobile brain? *Immunol Today* 1985; 6: 115-117
- 29 Palma BD, Tiba PA, Machado RB, Tufik S, Suchecki D. [Immune outcomes of sleep disorders: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as a modulatory factor] *Rev Bras Psiquiatr* 2007; 29 Suppl 1: S33-S38
- 30 Arafah BM. Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: limitations of current assessment methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3725-3745
- 31 Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ. Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63: 324-331
- 32 Sinha R, Fox H, Hong KI, Sofuoglu M, Morgan PT, Bergquist KT. Sex steroid hormones, stress response, and drug craving in cocaine-dependent women: implications for relapse susceptibility. *Exp Clin Psychopharmacol* 2007; 15: 445-452
- 33 Härle P, Straub RH, Wiest R, Mayer A, Schölmerich J, Atzeni F, Carrabba M, Cutolo M, Sarzi-Puttini P. Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 51-56
- 34 Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 595-638
- 35 Straub RH, Herfarth H, Falk W, Andus T, Schölmerich J. Uncoupling of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammatory bowel disease? *J Neuroimmunol* 2002; 126: 116-125

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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.

代谢综合征对慢性病毒性肝炎临床转归的影响及其机制

李磊, 丁惠国

李磊, 丁惠国, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科
北京市 100069

作者贡献分布: 李磊负责收集文献, 撰写论文; 丁惠国负责审阅
和修稿。

通讯作者: 丁惠国, 教授, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北
京佑安医院肝病消化科. dinghuiguo@medmail.com.cn

电话: 010-83997117 传真: 010-63295525

收稿日期: 2010-02-15 修回日期: 2010-04-30

接受日期: 2010-05-10 在线出版日期: 2010-07-08

Effects of metabolic syndrome on the outcomes of chronic viral hepatitis and mechanisms involved

Lei Li, Hui-Guo Ding

Lei Li, Hui-Guo Ding, Department of Gastroenterology,
Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing
100069, China

Correspondence to: Professor Hui-Guo Ding, Department
of Gastroenterology, Beijing Youan Hospital, Capital Medi-
cal University, Beijing 100069,
China. dinghuiguo@medmail.com.cn

Received: 2010-02-15 Revised: 2010-04-30

Accepted: 2010-05-10 Published online: 2010-07-08

Abstract

Chronic hepatitis virus infection can result in liver dysfunction, cirrhosis and hepatocellular carcinoma and is therefore a serious public health matter. With the alteration of people's living habits, the prevalence of metabolic syndrome is gradually increasing. Metabolic syndrome, especially fatty liver disease, may be one of risk factors for aggravation of liver injury, poor prognosis, and poor response to antiviral therapy in patients with chronic viral hepatitis.

Key Words: Metabolic syndrome; Fatty liver disease; Chronic viral hepatitis; Poor prognosis

Li L, Ding HG. Effects of metabolic syndrome on the outcomes of chronic viral hepatitis and mechanisms involved. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2029-2032

摘要

慢性肝炎病毒感染是一个严重的公共卫生事

件, 可导致的肝衰竭、肝硬化和肝细胞癌。随着我国人民生活习惯的改变, 代谢综合征患病率不断上升。代谢综合征, 尤其是脂肪性肝病, 可能是加重慢性病毒性肝炎患者肝组织学损伤以及导致其预后不良和抗病毒治疗应答差的危险因素之一。

关键词: 代谢综合征; 脂肪性肝病; 慢性病毒性肝炎; 预后不良

李磊, 丁惠国. 代谢综合征对慢性病毒性肝炎临床转归的影响及其机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18(19): 2029-2032
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2029.asp>

0 引言

肝炎病毒感染是一个严重的公共卫生事件, 全球有超过5亿的人口存在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)慢性感染, 多数HBV携带者在中国, 慢性HCV感染在中国亦不少见, 每年约有100万人死于HBV感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌^[1]。中国改革开放30年来, 人民生活水平明显改善, 西方某些不良饮食习惯和生活方式(高热量、高脂饮食、体力活动减少)、健康卫生常识缺乏等, 导致肥胖-脂肪肝(fatty liver disease, FLD)代谢综合征(metabolic syndrome, MS)患病率不断上升。MS, 尤其是脂肪性肝病, 可能是加重慢性病毒性肝炎患者肝组织学损伤以及导致其预后不良和抗病毒治疗应答差的危险因素之一^[2,3]。MS又称胰岛素抵抗代谢综合征(insulin resistance metabolic syndrome, IRMS), 是由于胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)引发的一系列临床、生化、体液代谢失常, 从而引起多种物质代谢失常的综合征, 常包括肥胖、高血压、高血糖、脂肪肝、血脂异常等^[4]。当前日益增多的主要是与IR和遗传易感密切相关的非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), NAFLD现已成为发达国家慢性肝病的重要病因, 在我国经济发达地区普通成人NAFLD患病率亦已高达15%-20%, 并且

■背景资料

慢性肝炎病毒感染是一个严重的公共卫生事件, 可导致的肝衰竭、肝硬化和肝细胞癌。随着我国人民生活习惯的改变, 代谢综合征患病率不断上升。

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■研究前沿

代谢综合征可能是加重慢性病毒性肝炎患者肝组织学损伤及导致其预后不良和抗病毒治疗应答差的危险因素之一。

NAFLD的发病率仍在不断增加且有低龄化趋势^[5]。单纯性脂肪肝已发展到非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)阶段或脂肪变发生在慢性丙型肝炎(chronic hepatitis C, CHC)和慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)等慢性病毒性肝病患者,那么肝硬化和肝细胞癌发生率及其相关死亡将会大大增加^[6]。因此,重视慢性病毒性肝炎合并代谢异常的研究及临床诊治具有极其重要的现实意义。

1 慢性病毒性肝炎与NAFLD

1.1 肥胖-脂肪肝发生率逐年增加 20世纪60年代的酒精性肝硬化与其他病因的肝硬化相比,欧洲占42%,美洲66%,亚洲11%,而中国不足5%。但近30年来,随着生活水平的提高、饮食结构的改变和酒精消费的日益增长,酒精肝和脂肪肝的发病率迅速上升,占肝硬化病因的15%-20%。引起脂肪肝的病因是多种多样的,但其中最重要的是肥胖、饮酒、糖尿病。我国普通人群脂肪肝的发生率为10%,而肥胖者脂肪肝发病率为50%-75%。上海市对4 009名机关干部的调查发现,肥胖者达31.6%,Ⅱ型糖尿病患者合并脂肪肝发生率为40%-50%,嗜酒者脂肪肝发生率57.7%;50岁以上者脂肪肝发生率为24.5%^[7]。北京地区2004年14家单位体检发现,城市居民脂肪肝发生率逐年增加,结果见表1。最近,广东地区脂肪肝流行病学调查结果显示,城市人口脂肪肝患病率为17.5%,而体质指数在23-28的超重人群中,约有31.9%的人患脂肪肝,肥胖人群脂肪肝发生率为55.4%。因此,肥胖是酒精及非酒精性脂肪肝的主要原因,中国肥胖人群逐年上升(以BMI>25为肥胖的标准:图1)。2009年北京市调查发现^[8],以BMI>28为肥胖的标准:北京人体质量超重36.4%,肥胖13.5%。因此,肥胖-饮酒-脂肪肝已经成为中国肝脏疾病的第二大病因。

近年来研究发现,欧美、日本成人NAFLD发生率17%-33%,与肥胖及其相关MS有密切关系。在一些特定人群,如不明原因血清ALT升高者,肥胖症,2型糖尿病及高TG血症患者,NAFLD和NASH发病率更高^[9]。

近年来,国内外研究均提示,儿童肥胖及脂肪肝发生率明显增加。1995年日本学者报道:4-12岁儿童NAFLD患病率为2.6%,男性高于女性(3.4% vs 1.8%),24%肥胖儿童ALT增高,B超证实83%脂肪肝。美国学者研究也得到了相似的结果(图2)。

1.2 慢性病毒性肝炎合并NAFLD流行病学 肝炎病毒感染是我国肝脏疾病的主要原因,HBV感染仍是一个严重的公共卫生问题。全约20亿人有HBV感染证据,其中慢性HBV感染约占全球人口6%。在慢性HBV感染者中,约15%-25%最终将死于与HBV感染相关的肝病^[1]。据世界卫生组织报道,全球每年约100万人死于与HBV感染相关的肝病。2006年,卫生部开展了全国人群乙型肝炎血清流行病学调查显示,全国1-59岁人群乙型肝炎表面抗原携带率为7.18%(2002年全国乙型肝炎血清流行病学调查结果,HBsAg流行率为9.09%)。其中,1-4岁人群乙型肝炎表面抗原携带率为0.96%,5-14岁人群为2.42%,15-59岁人群乙型肝炎表面抗原携带率达8.57%。显示了中国乙型肝炎疫苗取得了突出的成绩。根据卫生部公布的传染病疫情显示,丙型肝炎发病率在病毒性肝炎中也呈明显的上升之势。世界卫生组织公布的数据表明,全球丙型肝炎患者占总人口3%,1992年我国病毒性肝炎血清流行病学调查,人群抗-HCV阳性率为3.2%。来自6个国家11项有关慢性丙型肝炎的研究表明,感染HCV 7年至50年后肝硬化发生率为0.3%-55.0%,肝癌发生率为0-23%,平均感染20年后,肝硬化发生率约为10%-15%,因接受输血感染者约为20%-30%。我国丙型肝炎国家十五科技攻关的资料表明,感染HCV 10年和20年以上的肝硬化发生率分别为9.20%和15.29%。那么,肥胖-脂肪肝-MS在慢性病毒性肝炎疾病进展中起什么作用?

已有研究报道,50%左右的成人CHC患者伴有肝细胞脂肪变^[10],在儿童亦大约10%的CHC患者同时合并NASH。在排除了肝细胞脂肪变的常见病因(包括肥胖、糖尿病、高脂血症和嗜酒等)后,仍有30%左右的CHC患者存在肝细胞脂肪变。早期文献报道约有27%-51%的CHB患者存在肝细胞脂肪变,不同国家NAFLD在CHB中的检出率差别较大。我国的流行病学资料显示,CHB患者中肝脂肪变患病率为14%且有逐年增高趋势。但大多数研究认为CHB中的脂肪变明显低于CHC。近年来由于NAFLD的发病率逐年增加,导致肝脂肪变与CHB在同一个体中合并存在病例明显增多。在血清ALT增高的肥胖症患者中,一半以上可能合并其他损肝因素,在欧美和日本主要是并存CHC,而在中国则为CHB^[11]。

1.3 NAFLD对病毒性肝炎的影响 众所周知,HCV本身能影响CHC脂肪变的进展。无论是何种基因类型的HCV感染,并存的肝脂肪变均

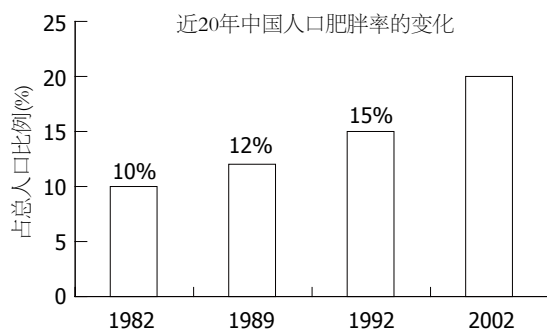


图1 BMI>25为肥胖的标准, 中国肥胖发生率调查结果。

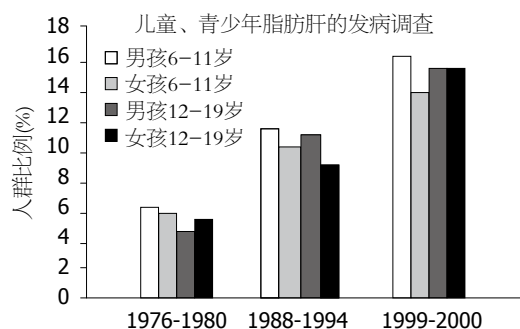


图2 美国营养与健康学会(national health and nutrition examination survey, NHANES)调查儿童肥胖结果。

■ 相关报道

Williams等报道,单纯性脂肪肝已发展到非酒精性脂肪性肝炎阶段或肝脂肪变发生在慢性丙型肝炎和慢性乙型肝炎等慢性病毒性肝病者,那么肝硬化和肝细胞癌发生率及其相关死亡将会大大增加。因此,重视慢性病毒性肝炎合并代谢异常的研究及临床诊治具有极其重要的现实意义。

表1 北京市14家单位体检结果

时间(年)	抽检人数(n)	脂肪肝发病率(%)		
		最低	最高	平均
1998	1 360	9.74	29.46	23.16
2003	6 009	12.60	43.30	26.10

发病年龄主要在30-50岁中青年, 海军总医院动态监测的流行病学数据, 健康网, 2004-03-08。

与CHC患者肝组织学分级和分期密切相关^[12]。CHC患者肝脂肪变的严重性与肝纤维化程度呈正相关, 肝脂肪变的危险因素还可增加CHC患者肝细胞癌的发病率^[13]。

肝细胞脂肪变对CHB肝纤维化的影响以及脂肪变的存在及加重是否对肝病的进展具有协同作用, 现存观点不一致。我们既往研究表明, HBV患者肝脏脂肪变性比正常人群多见, 可能归因于代谢因素以及HBV间接促进脂肪变性的发展, 并未发现HBV患者脂肪变性与纤维化严重程度相关^[14]。肝细胞脂肪变或多或少会影响CHB的纤维化进展。也有学者认为相对于CHC而言, 影响CHB肝纤维化进展的因素太多, 如与HBV相关的炎症程度、范围及疾病时间等, 因此要研究肝细胞脂肪变对其肝纤维化进展影响, 就必须对病毒的复制水平、机体的免疫状态以及肝细胞脂肪变和纤维化程度等进行长期的随访研究。研究发现肥胖、糖尿病、MS以及酒精滥用均可增加CHB患者肝硬化和肝癌的发病率, 合并肝脂肪变的CHB患者可能比不伴肝脂肪变的CHB更易发生肝硬化和肝癌^[15,16]。在肥胖症患者中, 间隔纤维化和肝硬化通常见于合并HBV感染者, 而不伴有其他明确损肝因素的NAFLD患者其肝组织学损伤通常较轻^[5]。肝损伤多数混合病因共同作用, 对肝损伤和纤维化有促进作用, 影响干扰素的抗病毒治疗效果。MS增加慢性

乙型肝炎肝硬化、肝癌的风险。

2 慢性病毒性肝炎与其他代谢异常

2.1 病毒性肝炎与糖尿病 慢性肝损伤亦可影响糖代谢, 导致葡萄糖耐量减退甚至发生糖尿病。而且糖尿病患者易患病毒性肝炎, 文献报道其患病率约为正常人的2-4倍, 原发性肝癌的发生率也为正常的4倍。有许多报道认为CHC患者中的糖尿病患病率很高, 并且HCV可能是糖尿病进展的危险因素。多项研究证明CHC患者中糖尿病的患病率要高于CHB。也有报道糖尿病在丙肝肝硬化中的发生率高于乙型肝炎肝硬化。Cheng等对中国2 838例2型糖尿病患者进行了HBsAg检测, 并比较了HBsAg阳性和HBsAg阴性两组糖尿病患者发生心血管事件和肾脏终末期疾病的危险因素, 结果发现在中国2型糖尿病患者中, HBV感染是终末期肾病的重要危险因素^[17]。也有研究显示糖尿病是乙型肝炎所致肝细胞癌切除术后复发的独立危险因素。肥胖和糖尿病为酒精性肝硬化和HCC的独立危险因素。Younossi等报道, 合并糖尿病的NAFLD患者肝硬化(25% vs 10.2%)和肝病死亡(18.2% vs 2.3%)显著增加。肝病程度可能被心脑血管事件掩盖, 而老年DM患者尸检肝硬化检出率高达10%-20%。

因此, HBV感染与糖尿病之间存在错综复杂的关系, 两者互为因素, 并促进疾病的发生和进展。

2.2 慢性病毒性肝炎与动脉粥样硬化 肥胖症和肝脂肪变可增加慢性病毒性肝炎患者动脉硬化性心脑血管事件的发病率。研究显示, 与NASH患者相似, CHB和CHC患者颈动脉粥样硬化的检出率均显著高于正常对照人群, 并存的代谢紊乱和肝细胞脂肪变可能是其易发动脉硬化的原因^[18]。有人认为HBV可能是导致动脉粥样硬

■同行评价

本文介绍MS对病毒性肝炎的影响及有关机制,对临床工作者认识和了解这方面知识有一定帮助。

化的候选病原体。HBV可能与动脉粥样硬化的进展交织在一起,因为他是细胞内病原体之一,长期持续性感染能对肝脏产生损害,进而导致宿主的糖脂代谢紊乱。然而一项健康普查中发现HBsAg携带者与动脉粥样硬化之间关系密切,HBV携带者中动脉粥样硬化的患病率升高,HBsAg阳性是患冠心病的危险因素之一。目前许多研究表明NASH、HCV、HBV与早期动脉粥样硬化有关,其中炎症在动脉粥样硬化形成中可能起着十分重要的作用。

3 结论

总之,慢性病毒性肝炎与MS都是严重危害人类健康的常见慢性疾病,两者之间会合并存在或者相继发生,但二者之间的关系及相互作用机制尚有待进一步探讨。MS可影响慢性病毒性肝炎发展及预后。目前国外对病毒性肝炎与MS相互关联的研究主要集中于CHC,代谢紊乱与CHB相互关系的研究甚少。因此,开展HBV合并MS的基础和临床研究是我们当前所面临的新课题,具有重要的现实意义。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病分会及中华医学会感染病学分会联合制订. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-431
- 2 Taylor BC, Yuan JM, Shamliyan TA, Shaikat A, Kane RL, Wilt TJ. Clinical outcomes in adults with chronic hepatitis B in association with patient and viral characteristics: A systematic review of evidence. *Hepatology* 2009; 49: S85-S95
- 3 Cross TJ, Quaglia A, Hughes S, Joshi D, Harrison PM. The impact of hepatic steatosis on the natural history of chronic hepatitis C infection. *J Viral Hepat* 2009; 16: 492-499
- 4 Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 2005; 56: 45-62
- 5 Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol* 2009; 50: 204-210
- 6 Williams R. Global challenges in liver disease.

Hepatology 2006; 44: 521-526

- 7 范建高, 朱军, 李新建, 李锐, 戴菲, 宋晓敏, 陈兰, 李锋, 陈世耀. 上海市成人脂肪肝病患病率及其危险因素流行病学调查. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 83-88
- 8 张仁汉, 向小平, 宁心惠, 周喆, 刘宇, 王建辉. 北京市城区中老年居民代谢综合征的患病现状及危险因素分析. 中国全科医学 2009; 12: 2276-2278
- 9 Kotronen A, Juurinen L, Hakkarainen A, Westerbacka J, Cornér A, Bergholm R, Yki-Järvinen H. Liver fat is increased in type 2 diabetic patients and underestimated by serum alanine aminotransferase compared with equally obese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008; 31: 165-169
- 10 Cheung O, Sanyal AJ. Hepatitis C infection and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2008; 12: 573-85, viii-ix
- 11 Fan JG, Chitturi S. Hepatitis B and fatty liver: causal or coincidental? *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 679-681
- 12 Jonsson JR, Barrie HD, O'Rourke P, Clouston AD, Powell EE. Obesity and steatosis influence serum and hepatic inflammatory markers in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48: 80-87
- 13 Machado MV, Cortez-Pinto H. Insulin resistance and steatosis in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2009; 8 Suppl 1: S67-S75
- 14 Peng D, Han Y, Ding H, Wei L. Hepatic steatosis in chronic hepatitis B patients is associated with metabolic factors more than viral factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1082-1088
- 15 Wong GL, Wong VW, Choi PC, Chan AW, Chim AM, Yiu KK, Chan HY, Chan FK, Sung JJ, Chan HL. Metabolic syndrome increases the risk of liver cirrhosis in chronic hepatitis B. *Gut* 2009; 58: 111-117
- 16 Na TY, Shin YK, Roh KJ, Kang SA, Hong I, Oh SJ, Seong JK, Park CK, Choi YL, Lee MO. Liver X receptor mediates hepatitis B virus X protein-induced lipogenesis in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 1122-1131
- 17 Cheng AY, Kong AP, Wong VW, So WY, Chan HL, Ho CS, Lam CW, Tam JS, Chow CC, Cockram CS, Chan JC, Tong PC. Chronic hepatitis B viral infection independently predicts renal outcome in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2006; 49: 1777-1784
- 18 Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Arcaro G, Day C. Differences and similarities in early atherosclerosis between patients with non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis B and C. *J Hepatol* 2007; 46: 1126-1132

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

饮食因素与大肠癌关系的研究进展

孙丽红

孙丽红, 上海中医药大学医学技术学院 上海市 201210
通讯作者: 孙丽红, 201210, 上海市浦东新区蔡伦路1200号, 上海中医药大学医学技术学院. slh_186@yahoo.com.cn
收稿日期: 2010-01-09 修回日期: 2010-05-19
接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-07-08

Advances in understanding the relationship between dietary factors and risk of colorectal cancer

Li-Hong Sun

Li-Hong Sun, School of Health Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China

Correspondence to: Li-Hong Sun, School of Health Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China. slh_186@yahoo.com.cn

Received: 2010-01-09 Revised: 2010-05-19

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-07-08

Abstract

The purpose of this paper is to summarize the relationship between dietary factors and risk of colorectal cancer. There is evidence that meat, high-fat diet and drinking increase the chance of developing colorectal cancer, while whole grains, dietary fiber, folacin, selenium, zinc and calcium reduce the risk of colorectal cancer. Therefore, an inadequate diet may contribute to the development of colorectal cancer. These viewpoints provide a basis for prevention of colorectal cancer in terms of diet control.

Key Words: Colorectal cancer; Dietary factor; Dietary fiber

Sun LH. Advances in understanding the relationship between dietary factors and risk of colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2033-2037

摘要

本文综述了近几年来饮食因素对大肠癌发病的影响, 提示肉类、高脂肪饮食和饮酒会增加大肠癌发病的几率; 而全谷食物、膳食纤维、叶酸、硒和钙减少大肠癌的危险性。可见不合理的饮食对大肠癌的发生影响很大, 这从

饮食角度为防治肿瘤提供了依据。

关键词: 大肠癌; 饮食因素; 膳食纤维

孙丽红. 饮食因素与大肠癌关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(19): 2033-2037

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2033.asp>

0 引言

近年来随着人民生活水平的提高, 结、直肠癌发病率呈逐年上升趋势, 位居全世界癌症发生率和死亡率第4位, 在发达国家及发展中国家的城市地区发病率较高, 现在认为大肠癌是很大程度上受食物和营养因素影响的主要癌症之一^[1]。

1 肉类、脂肪酸与大肠癌发病的关系

1.1 肉类 Potter等^[2]通过对2002年13组病例分析, 提示肉食的摄入增加100 g/d可使大肠癌的发病几率增加12%-17%; Sandhu等^[3]报道增加肉食25 g/d, 发病几率增加49%; Hill等^[4]指出自1965年英国瘦猪肉食用量从60 kg下降到40 kg, 相应的结肠癌的发病率下降了50%; 1997年有学者^[5]提出增加结肠直肠癌危险性的可能机制: (1)烹调瘦肉过程中产生杂环氨基酸; (2)大肠肠腔中内生的亚硝酸盐产物; (3)铁剂在氧化作用中的作用; Giovannucci等^[6]对美国男性的队列研究也报道, 每周吃牛肉、羊肉和猪肉5份以上者与吃肉少于每月1次者相比, 结肠癌危险性有中等程度增加(RR = 1.7, 1.2-2.6)。Tiemersma等^[7]在历时8年的研究中发现, 男性瘦肉摄入增加大肠癌发病几率, 并且呈正相关, 而家禽和鱼的摄入可以降低女性大肠癌发生。对Nat1、Nat2、GSTM1多态性分析表明, 在摄入过多肉食的大肠癌患者中GSTM1亚型的结肠癌患病率相对较低。Probst-Hensch等^[8]报道吃红肉每周多于1次, 油炸的时间延长10%、肉的表面呈焦黄者比每周吃红肉少于1次、油炸时间少于10%, 以及肉的表面只有微黄者患腺瘤的危险性增加(OR = 2.2, 1.1-4.3)。Howe等^[9]发现, 膳食胆固醇多略增加结、直肠癌的危险性[OR = 1.3(1.2-1.5)]。

■背景资料

近年来随着人民生活水平的提高, 饮食结构的变化, 结、直肠癌发病率呈逐年上升趋势, 位居全世界癌症发生率和死亡率第四位, 在发达国家及发展中国家的城市地区发病率较高, 现在认为大肠癌是很大程度上受食物和营养因素影响的主要癌症之一。据此, 本作者对饮食因素与大肠癌的关系进行了深入的研究。

■同行评议者

田颖刚, 副研究员, 南昌大学中德食品工程中心

■研发前沿

对于饮食与大肠癌的关系,目前膳食纤维、非淀粉性蔬菜、水果、维生素和硒、钙等矿物质、含酒精饮料等是研究的热点和重点。但是目前饮食与大肠癌关系的研究中,对于膳食纤维、肉类等对大肠癌作用的确切机制尚未明确。

1.2 脂肪酸 Willett等^[10]发现,脂肪摄入量最高比最低五分位的人群结肠癌的危险性加倍。Golbohm等^[11]对荷兰女性的研究表明,饱和脂肪摄入最高四分位人群结肠癌的危险性略有增加。Bernstein等^[12]进一步研究证实脂肪可能通过生成的氧化物和脂肪酸产生致癌作用。动物实验表明,增加脂肪摄入导致肝脏合成胆固醇和胆汁酸的增加,从而导致二者在大肠腔和粪便中的含量升高;大肠菌丛(特别是厌氧菌)将其转变成胆固醇代谢产物和氧化胆汁酸,后者在体内经酶转化为致癌物质,他对大肠隐窝上皮细胞有细胞毒作用,造成不可修复的DNA损伤,从而起到促进大肠癌肿瘤生成的作用。O'Keefe等^[13]指出同一危险群体中大肠癌和腺瘤患者粪胆酸浓度比正常人高;脂肪和固醇类、胆汁酸和盐在肠内经代谢生成次级致癌物质(脱氧胆酸和石胆酸),可促使腺瘤生长和演变,诱导上皮增生进而使肿瘤恶变。如某些个体肠黏膜上皮有遗传易感性,此时胆酸就很可能成为大肠癌致癌因素。另外,脂肪酸(尤其呈离子状态时)还可刺激大肠引起炎症反应,并可促进肠黏膜上皮DNA合成,诱导并活化鸟氨酸脱羧酶,使饮食中的脂肪形成初级胆汁酸经大肠细菌转化生成次级胆汁酸(如脱氧胆酸),引起大肠黏膜非特异性损伤和上皮细胞增生,肠腔内这些变化均是诱发大肠肿瘤的因素。Pickering等^[14]报道Guillem和Weinstein提出脂肪、胆酸以及细菌间的相互作用在肠内产生过量的二酰甘油(DAG),后者可能模拟和增强细胞复制的信号,动物和人体实验均显示脂肪和纤维可影响DAG水平及细菌集落形成。

高脂肪饮食特别是动物脂肪,同结直肠癌发生危险度相关^[15],而饲喂富含不饱和脂肪酸(ω -3和 ω -6)食物的动物,其大肠肿瘤的发生显著减少,支持这一观点的是,地中海居民和爱斯基摩人大肠癌发生率,主要是他们的脂肪来源于橄榄油和鱼油(ω -3);Caygill等^[16]研究显示,鱼类和n-3系列多不饱和脂肪酸的摄入同大肠癌的发生几率呈负相关。

2 糖类与大肠癌发病的关系

2.1 淀粉 世界各国在传统膳食以谷类为主的人群,例如在亚洲和某些非洲地区的结肠癌危险性较低。Cassidy等^[17]通过一项对个体膳食摄入量的相关性研究发现,在12个国家中摄入高的淀粉与结、直肠癌的危险性减少有强的相关性($r = -0.7-0.8$),调整脂肪和蛋白质摄入量7 d后的

相关性仍有统计学显著性。Caderni等^[18]动物实验研究表明,高淀粉性膳食可减少结肠细胞增生,并抑制隐窝细胞畸变灶及肿瘤形成。Thun等^[19]分析了全谷食物以及全谷食物或精加工谷物的变化对结肠直肠癌的影响,结果发现全谷食物与癌症危险减少有关,且其对结肠癌的作用比对直肠癌强。有关淀粉与结肠直肠癌关系研究的证据很不一致,对此可能有若干种解释,可能是由于精致的淀粉性食物可提高血糖和胰岛素水平而增加了结、直肠癌的危险性。

2.2 膳食纤维 膳食纤维存在于蔬菜、水果、谷物等食物中,主要分为不可溶性纤维(如木质素、纤维素、半纤维素等)和可溶性纤维(包括果胶、树胶和胶浆等),对大肠黏膜有一定保护作用。已有大量实验和流行病学调查对膳食纤维与大肠癌发生关系进行了研究。Yeh等^[20]进行的病例对照研究认为男女蔬菜、水果消耗量均和结、直肠癌风险呈负相关。Chiu等^[21]对上海1990-1993年大肠癌的发病率进行了以人群为基础的病例对照研究,结果表明,来自食物的各种纤维和结肠癌风险呈负相关性,而蔬菜和水果的纤维和结肠癌风险的降低强烈相关,在男女中均一致,但小麦纤维的负相关仅限于女性,而豆类纤维的负相关仅限于男性。英国医学研究委员会的Bingham等^[22]通过对比欧洲10个国家519 978人的饮食习惯和大肠癌的发病后发现,膳食纤维的摄入和大肠癌的发病呈负相关,且对左半结肠保护作用最大,对直肠保护作用最小,且与膳食纤维的来源无关。在瑞典进行的包括61 463名妇女的前瞻性队列研究(平均随访9.6年),发现总的水果及蔬菜的消耗与大肠癌呈负相关,似呈剂量-反应效应。

目前,对膳食纤维降低大肠癌发病率的机制说法不一。Kim等^[23]认为纤维有增加排便量,稀释致癌物质和降低粪便运转时间、黏附肠腔内潜在的致癌物质、黏附二级胆酸、降低粪便pH值,改善结肠菌群,进一步研究显示纤维食物发酵、结肠内细菌利用淀粉产生短链脂肪酸(醋酸盐、丁酸盐、丙酸盐)有抗癌作用;我国学者傅红等^[24]证实人类饮食中的纤维组织经肠道细菌发酵作用后产生短链脂肪酸,试验表明,3种短链脂肪酸均可影响人大肠癌细胞的表型、显著延长肿瘤细胞倍增时间、增强癌细胞分化标志无阻蛋白酶的表达,并明显抑制癌细胞的转移;Evans等提出了lectin/galactose假说:认为蔬

菜水果中半乳糖的含量同纤维素饮食的预防结肠癌作用有关^[25,26]。因为结肠癌进展期和前期最明显的糖基化异常表现是Thomsen-Friedenreich抗原的黏膜表达增加,结果形成不可替代终末的半乳糖残基的黏膜表达,致使肠腔内半乳糖结合植物血凝素与上皮结合,当其进入细胞后,植物血凝素可以刺激上述结合的细胞增生。2002年Rhodes等^[26]研究证实,花生植物血凝素选择性地与Thomsen-Friedenreich结合,饮食和微生物源性的半乳糖结合植物血凝素具有促进癌前细胞表面、表达有终末半乳糖残基的结肠上皮有丝分裂作用。水果和蔬菜中的纤维素可以黏附半乳糖结合植物血凝素,进而抑制饮食及微生物源的半乳糖结合植物血凝素同结肠上皮的结合,从而减少大肠癌的发生。其他人体实验表明,补充麦麸可降低几种与结肠直肠癌危险性有关的指标,这些指标包括粪便的致突变性^[27]、粪便中总胆酸及次级胆酸排出量^[28,29]以及高危人群的直肠细胞增生^[30]。

3 叶酸、硒、钙与大肠癌发病的关系

3.1 叶酸 一系列研究表明,长期食用富含叶酸的食物可以降低结肠癌发生的危险度。Freudenheim等^[31]研究发现叶酸摄入量与结肠直肠癌危险性减少有关。2002年Fuchs等^[32]在对护士健康调查的队列研究中分析了叶酸摄入同有家族病史的个体的结肠癌危险度关系,其中88 758例符合条件,最初6 956(7.8%)亲属中有结肠癌病史,10年后上升至11 808例,随访16年,786例发生了结肠癌,164例发生了直肠癌。同每日食用叶酸小于200 μg 妇女相比,每日食用超过400 μg 的妇女结肠癌相对危险度分别为:有阳性家族史的0.48(95%CI: 0.28-0.83, $P = 0.02$),无阳性家族史的0.81(95%CI: 0.62-1.07),根据以上结果以及亲属中有结肠癌病史者,使用多种维生素(叶酸每日400 μg)超过5年,可以降低结肠癌危险度超过50%;Duthie等^[33]提出2种假说:(1)叶酸缺乏引起DNA甲基化作用过少,导致与癌变相关的原癌基因激活失调;(2)叶酸缺乏可改变核苷酸前体池,包括DNA合成过程中错误连接,进一步引起DNA链损伤和染色体破坏成为促进大肠癌发生的原因之一。Feinberg等^[34]提出甲基供体与结肠直肠癌发生有关机制:慢性蛋氨酸和胆碱的缺乏可改变DNA的甲基化作用,从而导致大鼠和小鼠产生癌症,缺乏叶酸可能有类似的作用,DNA的高甲基化或低甲基化都是癌症

发生的早期标志。

3.2 硒 半胱氨酸是硒蛋白的成分,一些硒蛋白就是酶,这些酶在活动位点含有硒半胱氨酸。Rayman等^[35]报道自20世纪70年代始,流行病学研究已证实硒的摄入同结肠癌的死亡率呈负相关;Reddy等^[36]发现在结肠癌变的动物模型中,硒复合物可以抑制腺瘤的发展;Seo等^[37]指出硒蛋氨酸可以通过氧化还原作用激活P53肿瘤抑制蛋白,进而激活P53通路的DNA修复支路。硒的浓度决定了P53的活性,有了充足供给可以增强P53依赖DNA的修复。

3.3 钙 美国学者Levin等^[38]的研究发现,摄入高钙者比低钙者大肠癌发生率显著降低,间歇性摄入高钙饮食,可减弱离子化脱氧胆酸、脂肪酸、亚油酸盐和油酸盐的促细胞分裂作用,每日摄入1.5-2 g钙,可使大肠癌高危人群结肠黏膜细胞DNA合成显著减少;Baron等^[39]将930例既往有结肠腺瘤史的患者随机分为2组,1组服用碳酸钙3 g/d,另1组空白对照,结肠镜随访1-4年后发现前者腺瘤发展显著延缓,相对危险度0.85(95%CI: 0.74-0.98, $P = 0.03$),且在高钙饮食开始1年后即表现出防护作用,说明钙在结肠癌变过程中很早就起作用;Wu等^[40]的研究表明,服用高钙制剂可以降低远端结肠癌肿的发生。已有报道证实^[41]维生素D和钙可能预防结、直肠癌的机制:他们与胆酸和脂肪酸结合形成惰性皂,或直接作用于细胞周期,使结肠上皮细胞增殖减少和最终分化增加。临床干预试验表明,添加钙可减少结肠直肠上皮细胞增生。维生素D的作用机制与其对钙代谢的调节密切相关。2003年Lamprecht等^[42]报道,细胞外钙可以通过钙感受体的活化,导致细胞内存钙离子浓度瞬时增高,诱导化学防护效应,包括抑制生长和改善结肠细胞分化。

4 饮酒、咖啡与大肠癌发病的关系

Hirayama等^[43]研究发现,每天饮酒男性的乙状结肠癌死亡率为不饮酒者的5倍。1992-1994年^[44]加拿大安大略省对咖啡与膀胱癌、结肠癌和直肠癌之间的关系进行了研究。调查包括927个膀胱癌病例,991个结肠癌病例及875个直肠癌病例,共2 118例。相对于那些每天喝少于1杯咖啡的风险比,喝1-2杯的是0.9(95%CI: 0.8-1.1),3-4杯的是0.8(95%CI: 0.7-1.0),喝5或较多杯的是0.7(95%CI: 0.5-0.9),此作用是线形(正比)的关系。在周刊《美国胃肠病学杂志》的专栏文章

■创新盘点

本文通过目前对饮食与大肠癌关系的大量文献研究,总结了目前这方面的最新研究成果、对各种营养素与大肠癌的关系作出了全面的总结和分析。

■应用要点

通过本文对饮食因素与大肠癌的关系进行探讨,为积极采取合理的膳食措施、防治肿瘤、降低肿瘤发病率以及促进肿瘤患者的康复提供了一定的理论依据。

里,康士坦丁博士表示,对9 849位自愿者近19年来咖啡因的摄入量进行统计后得出,咖啡因或许就是咖啡能防治肿瘤的关键。目前更多的是认为咖啡因与机体内抗肿瘤细胞因子有相互作用(现认为主要是TNF),从而能抑制肿瘤细胞DNA合成、抑制DNA潜在致死性修复、释放G2阻遏等而起作用。

5 结论

大肠癌发病的相关因素错综复杂,如机体的免疫功能、遗传因素、职业因素、地理物理因素和污染因素等,饮食因素是众多影响因素之一。从本文的分析也发现,饮食因素、营养成分与大肠癌的关系十分密切。期望今后能从更广、更深的角度对饮食因素与大肠癌的关系进行探讨,为积极采取合理的膳食措施、防治肿瘤、降低肿瘤发病率以及促进肿瘤患者的康复提供一定的理论依据。

6 参考文献

- 1 陈君石,闻芝梅.食物、营养与癌症预防.第1版.上海:上海医科大学出版社,1999:230
- 2 Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 916-932
- 3 Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 439-446
- 4 Hill MJ. Cereals, cereal fibre and colorectal cancer risk: a review of the epidemiological literature. *Eur J Cancer Prev* 1997; 6: 219-225
- 5 Hill MJ. Mechanisms of diet and colon carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8 Suppl 1: S95-S98
- 6 Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 1994; 54: 2390-2397
- 7 Tiemersma EW, Kampman E, Bueno de Mesquita HB, Bunschoten A, van Schothorst EM, Kok FJ, Kromhout D. Meat consumption, cigarette smoking, and genetic susceptibility in the etiology of colorectal cancer: results from a Dutch prospective study. *Cancer Causes Control* 2002; 13: 383-393
- 8 Probst-Hensch NM, Sinha R, Longnecker MP, Witte JS, Ingles SA, Frankl HD, Lee ER, Haile RW. Meat preparation and colorectal adenomas in a large sigmoidoscopy-based case-control study in California (United States). *Cancer Causes Control* 1997; 8: 175-183
- 9 Howe GR, Aronson KJ, Benito E, Castelleto R, Cornée J, Duffy S, Gallagher RP, Iscovich JM, Dengao J, Kaaks R, Kune GA, Kune S, Lee HP, Lee M, Miller AB, Peters RK, Potter JD, Riboli E, Slattery ML, Trichopoulos D, Tuyns A, Tzonou A, Watson LF, Whittemore AS, Shu Z. The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Cancer Causes Control* 1997; 8:

215-228

- 10 Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990; 323: 1664-1672
- 11 Goldbohm RA, van den Brandt PA, van 't Veer P, Brants HA, Dorant E, Sturmans F, Hermus RJ. A prospective cohort study on the relation between meat consumption and the risk of colon cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 718-723
- 12 Bernstein C, Bernstein H, Garewal H, Dinning P, Jabi R, Sampliner RE, McCuskey MK, Panda M, Roe DJ, L'Heureux L, Payne C. A bile acid-induced apoptosis assay for colon cancer risk and associated quality control studies. *Cancer Res* 1999; 59: 2353-2357
- 13 O'Keefe SJ, Kidd M, Espitalier-Noel G, Owira P. Rarity of colon cancer in Africans is associated with low animal product consumption, not fiber. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1373-1380
- 14 Pickering JS, Lupton JR, Chapkin RS. Dietary fat, fiber, and carcinogen alter fecal diacylglycerol composition and mass. *Cancer Res* 1995; 55: 2293-2298
- 15 Potter JD. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 127-146
- 16 Caygill CP, Charlett A, Hill MJ. Fat, fish, fish oil and cancer. *Br J Cancer* 1996; 74: 159-164
- 17 Cassidy A, Bingham SA, Cummings JH. Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br J Cancer* 1994; 69: 937-942
- 18 Caderni G, Dolara P, Spagnesi T, Luceri C, Bianchini F, Mastrandrea V, Morozzi G. Rats fed high starch diets have lower colonic proliferation and fecal bile acids than high sucrose-fed controls. *J Nutr* 1993; 123: 704-712
- 19 Thun MJ, Calle EE, Namboodiri MM, Flanders WD, Coates RJ, Byers T, Boffetta P, Garfinkel L, Heath CW Jr. Risk factors for fatal colon cancer in a large prospective study. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1491-1500
- 20 Yeh CC, Hsieh LL, Tang R, Chang-Chieh CR, Sung FC. Risk factors for colorectal cancer in Taiwan: a hospital-based case-control study. *J Formos Med Assoc* 2003; 102: 305-312
- 21 Chiu BC, Ji BT, Dai Q, Gridley G, McLaughlin JK, Gao YT, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Dietary factors and risk of colon cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 201-208
- 22 Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361: 1496-1501
- 23 Kim YI. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 2000; 118: 1235-1257
- 24 傅红, 师英强, 莫善斌. 短链脂肪酸对人结肠癌Caco-2细胞增殖分化的影响与临床意义. *中华消化杂志* 2003; 23: 473-476
- 25 Evans RC, Fear S, Ashby D, Hackett A, Williams E, Van Der Vliet M, Dunstan FD, Rhodes JM. Diet

- and colorectal cancer: an investigation of the lectin/galactose hypothesis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1784-1792
- 26 Rhodes JM. Lectins, colitis and colon cancer. *J R Coll Physicians Lond* 2000; 34: 191-196
- 27 Reddy B, Engle A, Katsifis S, Simi B, Bartram HP, Perrino P, Mahan C. Biochemical epidemiology of colon cancer: effect of types of dietary fiber on fecal mutagens, acid, and neutral sterols in healthy subjects. *Cancer Res* 1989; 49: 4629-4635
- 28 Reddy BS, Engle A, Simi B, Goldman M. Effect of dietary fiber on colonic bacterial enzymes and bile acids in relation to colon cancer. *Gastroenterology* 1992; 102: 1475-1482
- 29 Alberts DS, Ritenbaugh C, Story JA, Aickin M, Rees-McGee S, Buller MK, Atwood J, Phelps J, Ramanujam PS, Bellapravalu S, Patel J, Bextinger L, Clark L. Randomized, double-blinded, placebo-controlled study of effect of wheat bran fiber and calcium on fecal bile acids in patients with resected adenomatous colon polyps. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 81-92
- 30 Alberts DS, Einspahr J, Rees-McGee S, Ramanujam P, Buller MK, Clark L, Ritenbaugh C, Atwood J, Pethigal P, Earnest D. Effects of dietary wheat bran fiber on rectal epithelial cell proliferation in patients with resection for colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1280-1285
- 31 Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Haughey BP, Cholewinski S, Wilkinson G. Folate intake and carcinogenesis of the colon and rectum. *Int J Epidemiol* 1991; 20: 368-374
- 32 Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Speizer FE, Giovannucci EL. The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 227-234
- 33 Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 1999; 55: 578-592
- 34 Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988; 48: 1159-1161
- 35 Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356: 233-241
- 36 Reddy BS. The Fourth DeWitt S. Goodman lecture. Novel approaches to the prevention of colon cancer by nutritional manipulation and chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 239-247
- 37 Seo YR, Kelley MR, Smith ML. Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14548-14553
- 38 Levin B. Nutrition and colorectal cancer. *Cancer* 1992; 70: 1723-1726
- 39 Baron JA, Beach M, Mandel JS, van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, Rothstein R, Summers RW, Snover DC, Beck GJ, Bond JH, Greenberg ER. Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 101-107
- 40 Wu K, Willett WC, Fuchs CS, Colditz GA, Giovannucci EL. Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 437-446
- 41 Newmark HL, Wargovich MJ, Bruce WR. Colon cancer and dietary fat, phosphate, and calcium: a hypothesis. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 1323-1325
- 42 Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 601-614
- 43 Hirayama T. Association between alcohol consumption and cancer of the sigmoid colon: observations from a Japanese cohort study. *Lancet* 1989; 2: 725-727
- 44 Woolcott CG, King WD, Marrett LD. Coffee and tea consumption and cancers of the bladder, colon and rectum. *Eur J Cancer Prev* 2002; 11: 137-145

■同行评价

本综述选题尚可,内容较为全面,对临床具有重大指导意义。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

●消息●

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标,选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种,统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年),涉及期刊12 400余种。本版还加大了专家评审力度,5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审,从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊,分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表,第66页)。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

抑制细胞因子RhoA的表达对肝星状细胞株HSC-T6胶原分泌的影响

王波, 王艳芬, 田德安, 王天才

■背景资料

肝纤维化是各种慢性肝病进展到肝硬化的必经中间环节。肝星状细胞是肝纤维化发生发展的关键细胞, 肝星状细胞活化并产生大量细胞外基质是肝纤维化发生发展的核心步骤。本课题组既往的研究显示RhoA在肝纤维化发生过程中起着重要的作用。本实验采用体外合成的反义寡核苷酸和小干扰RNA转染大鼠肝星状细胞株HSC-T6, 检测细胞外基质成分的表达, 比较两种不同反义技术抑制RhoA信号传导途经对活化HSC的作用, 为下一步肝纤维化的试验性基因治疗提供依据。

■同行评议者

唐世刚, 教授, 大连大学附属中山医院消化内科

王波, 王艳芬, 田德安, 王天才, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

国家自然科学基金资助项目, No. 30800968

作者贡献分布: 此课题由王波与王天才设计; 研究过程及数据分析由王波与王艳芬完成; 论文书写由王波与田德安完成。

通讯作者: 王天才, 教授, 主任医师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。
tcwang@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83663611

收稿日期: 2010-04-03 修回日期: 2010-06-06

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-08

Inhibition of RhoA expression reduces the secretion of extracellular matrix components in hepatic stellate cells

Bo Wang, Yan-Fen Wang, De-An Tian, Tian-Cai Wang

Bo Wang, Yan-Fen Wang, De-An Tian, Tian-Cai Wang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China.

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30800968

Correspondence to: Professor Tian-Cai Wang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tcwang@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2010-04-03 Revised: 2010-06-06

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of antisense oligodeoxynucleotide- and small-interfering RNA (siRNA)-mediated inhibition of RhoA expression on the secretion of extracellular matrix components in hepatic stellate cells (HSC-T6) to seek new approaches for the treatment of liver fibrosis.

METHODS: An antisense oligodeoxynucleotide and a siRNA targeting the RhoA gene were designed and transfected into HSC-T6 cells. The expression of RhoA and type I collagen (Col I) mRNAs in HSC-T6 cells was detected by RT-PCR. The expression of RhoA protein in HSC-T6 cells was detected by Western blot. The contents of hyaluronic acid, laminin and PIIP in cell su-

pernatants were measured by ELISA.

RESULTS: After antisense oligodeoxynucleotide or siRNA transfection, the relative expression levels of RhoA mRNA were changed from 0.892 ± 0.051 and 0.937 ± 0.044 to 0.113 ± 0.024 and 0.212 ± 0.042 , respectively; the expression of RhoA protein and the contents of extracellular matrix components decreased markedly; and the relative expression levels of Col I mRNA decreased from 0.709 ± 0.067 and 0.695 ± 0.087 to 0.436 ± 0.037 and 0.201 ± 0.044 , respectively.

CONCLUSION: Specific blockade of RhoA expression decreases the secretion of extracellular matrix components in HSC-T6 cells. RhoA-specific siRNA is superior to antisense oligodeoxynucleotide in down-regulating RhoA expression and therefore represents a better strategy for gene therapy of liver fibrosis.

Key Words: RhoA; Antisense oligodeoxynucleotide; Small-interfering RNA; Liver fibrosis; Gene therapy

Wang B, Wang YF, Tian DA, Wang TC. Inhibition of RhoA expression reduces the secretion of extracellular matrix components in hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2038-2042

摘要

目的: 观察并比较两种方法抑制RhoA的表达对细胞外基质成分, 如I型胶原、透明质酸以及层粘连蛋白合成的影响, 为肝纤维化的基因治疗寻求新的途径。

方法: 设计并合成针对RhoA相同靶点的反义寡核苷酸和小干扰RNA, 分别转染肝星状细胞株HSC-T6, 逆转录PCR技术检测细胞中RhoA和I型胶原mRNA的表达; Western blot检测细胞中RhoA蛋白质的表达; ELISA检测培养上清中透明质酸(HA)、层黏蛋白(LN)及PIIP的含量。

结果: 转染RhoA反义寡核苷酸和小干扰RNA Rat1质粒后, HSC-T6中RhoA mRNA的表达分别由 0.892 ± 0.051 、 0.937 ± 0.044 降为 0.113

± 0.024 、 0.212 ± 0.042 ; 蛋白质表达水平均明显下调; 细胞内 I 型胶原 mRNA 的表达分别由 0.709 ± 0.067 、 0.695 ± 0.087 降为 0.436 ± 0.037 、 0.201 ± 0.044 ; 细胞外基质成分如 HA、LN 及 PIIP 的表达水平明显下降. 两者相比, 小干扰 RNA 具有更强的生物学效应.

结论: 靶向抑制细胞因子 RhoA 的表达可明显减少肝星状细胞株 HSC-T6 细胞外基质的合成, 且小干扰 RNA 的效果明显优于针对同一靶点的反义寡核苷酸, 显示 RNAi 技术应用于肝纤维化基因治疗的良好前景.

关键词: RhoA; 反义寡核苷酸; 小干扰 RNA; 肝纤维化; 基因治疗

王波, 王艳芬, 田德安, 王天才. 抑制细胞因子 RhoA 的表达对肝星状细胞株 HSC-T6 胶原分泌的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2038–2042

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2038.asp>

0 引言

肝纤维化是各种慢性肝病进展到肝硬化的必经中间环节. 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化发生发展的关键细胞, HSC 活化为肌成纤维细胞是肝纤维化发生发展的核心事件. 研究证实, HSC 的活化是由肝细胞变性坏死引发的大量细胞因子、受体和转录因子激活的一系列复杂的过程, 早期抑制 HSC 的活化是最为有效的逆转肝纤维化的途径之一^[1]. 近年来, 细胞因子 RhoA 在 HSC 活化过程中的地位日益引起人们的关注, 我们既往通过动态观察 RhoA 在肝纤维化形成过程中的表达变化, 证实 RhoA 和细胞骨架重排在肝纤维化发生过程中起着重要的作用^[2]. 小干扰 RNA (small interferon RNA, siRNA) 和反义寡核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, ASODN) 是相继发展起来的较为成熟的反义 RNA 技术, 在病毒感染、肿瘤和遗传疾病的治疗方面显示出很强的优势和潜力. 对比研究这两种技术抑制 RhoA 表达来干扰活化的 HSC 分泌细胞外基质国内外未见报道. 本实验采取体外转录合成针对 RhoA 基因序列上相同靶点的 siRNA 和 ASODN, 转染大鼠肝星状细胞株 HSC-T6, 通过比较检测细胞外基质成分的表达, 观察抑制 RhoA 信号传导途径对活化 HSC 的作用, 并为下一步肝纤维化的试验性基因治疗提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 为本实

验室冻存, 带有绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 并表达大鼠 RhoA 特异性 siRNA 的质粒 (Rat1 质粒和 Rat2 质粒) 及阴性对照质粒 (HK-A 质粒) 为本实验室保存; 针对其相同靶点设计的 ASODN 以及用于对照的正义寡核苷酸 (sense oligodeoxynucleotide, SODN) 为本实验室保存; DMEM 培养基及新生牛血清购自 Gibco 公司; 脂质体 LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司; MML-V 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司; DNA Marker I 购自北京天为时代科技有限公司; PCR 引物由上海生工公司合成; RhoA 抗体购自 Santa Cruz 公司; 透明质酸、层粘连蛋白及 III 型前胶原肽定量 ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞分组: 待 HSC-T6 生长到对数生长期, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 按每孔 5×10^5 接种到六孔培养板. 针对 ASODN, 分为空白对照组、脂质体对照组、阴性对照组 (转染 SODN 400 nmol/L) 和 ASODN 组 (包括 A 组, 300 nmol/L 以及 B 组 600 nmol/L 两种浓度); 对于 siRNA, 分为空白对照组、脂质体对照组、阴性对照组 (转染 HK-A 质粒)、siRNA 组 (包括 A 组, 转染 Rat1 以及 B 组转染 Rat2 质粒), 每组另设 3 个复孔作为对照.

1.2.2 细胞转染: 在超净工作台内, 将脂质体、无血清 DMEM 培养基、寡核苷酸或质粒按一定比例配制好 0.1 mL 转染液, 室温静置 5 min 使用. 待细胞生长到 70% 融合时, 将培养板中的培养基吸出, 将转染液依次加入各培养孔中, 然后每孔加入含 100 mL/L FBS 的 DMEM 培养基 0.9 mL, 继续培养; 24 h 后荧光倒置显微镜下观察细胞荧光, 转染 48 h 后收集细胞和上清, 进行下一步检测.

1.2.3 RT-PCR: 培养细胞总 RNA 的提取按 TRIzol 试剂盒操作说明书进行, 反应分两步进行, 取总 RNA 5 μ g, 在 M-MLV 逆转录酶作用下逆转录为 cDNA, 以此为模板, 按以下条件进行 PCR 反应: RhoA 的上游引物为 5'-GTAGAGTTGGCTTATGGG-3', 下游引物为 5'-CTCACTCCGTCTTTGGTC-3', 扩增的片段长度为 347 bp. 扩增的条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 进入 32 个循环: 变性 94 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 53 $^{\circ}$ C 50 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 40 s, 最后再延伸: 72 $^{\circ}$ C, 8 min. Col I 上游引物为 5'-TGCGTTCGTGGCTCTCAGGGTAG-3', 下游引物为 5'-GCATGTGCGGGCAGGGTTCTTTC-3', 扩增的片段长度为 259 bp. 扩增的条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 进入 32 个循环: 变性 95 $^{\circ}$ C 1 min, 退火

■ 研发前沿

细胞骨架结构的改变是肝星状细胞活化的始动环节, RhoA 信号传导途径在调控细胞骨架成分过程中起着重要作用, 因此其在星状细胞活化过程中的地位日益引起人们的关注. 以 RhoA 为靶点, 利用分子生物学技术抑制 RhoA 的表达将有助于维持肝星状细胞于“静态”表型, 从而延缓肝纤维化的进程.

■ 相关报道

2000 年 Nawata 等首先发现 RhoA 通过调节肌动蛋白骨架结构参与肝星状细胞的活化, 给予 Y27632 抑制 RhoA 信号传导途径后能降低星状细胞的增殖. 随后, 人们在研究一氧化氮、血管紧张素 II 和瘦素等细胞因子与肝纤维化的关系时, 均发现了 RhoA 信号传导途径的参与.

■创新盘点

Nawata 试图采用 Y27632 抑制 RhoA 信号传导途径,来达到逆转肝纤维化的目的。Y27632 主要调节 RhoA 通路的下游因子,作用及调控机制显然更为复杂。因此,本研究试图采用分子生物学技术直接抑制 RhoA 的表达。反义寡核苷酸和小干扰 RNA 都是成熟的反义技术,对比研究有利于寻找更有效的治疗手段,为今后的实验提供依据。

表 1 转染后各组细胞中 RhoA mRNA 的表达量 (灰度比值, mean \pm SD)

分组	空白对照组	脂质体对照组	阴性对照组	干预A组	干预B组
ASODN	0.892 \pm 0.051	0.932 \pm 0.049	0.924 \pm 0.054	0.113 \pm 0.024 ^b	0.297 \pm 0.060 ^b
siRNA	0.937 \pm 0.044	0.965 \pm 0.021	0.978 \pm 0.020	0.212 \pm 0.042 ^b	0.924 \pm 0.045

^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组。

表 2 转染后各组细胞中 Col I mRNA 的表达量 (灰度比值, mean \pm SD)

分组	空白对照组	脂质体对照组	阴性对照组	干预组
ASODN	0.709 \pm 0.067	0.718 \pm 0.052	0.722 \pm 0.048	0.436 \pm 0.037 ^b
siRNA	0.695 \pm 0.087	0.721 \pm 0.086	0.679 \pm 0.050	0.201 \pm 0.044 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 阴性对照组; ^d $P < 0.01$ vs ASODN。

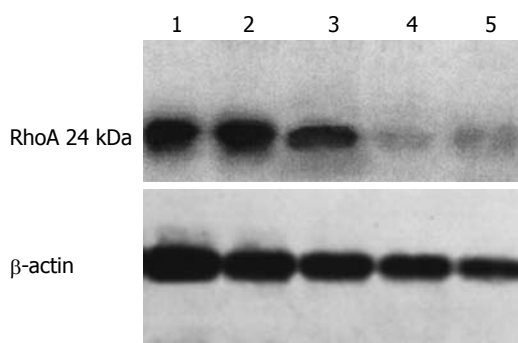


图 1 转染后各组细胞 RhoA 蛋白质的表达。1: 空白对照组(正常生长的 HSC-T6 细胞株); 2: ASODN 试验转染 600 nmol/L 的 SODN; 3: siRNA 试验转染无关质粒 HK-A; 4: siRNA 试验转染 Rat1 质粒; 5: ASODN 试验转染 600 nmol/L 的 ASODN。

53 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 最后再延伸: 72 $^{\circ}\text{C}$, 8 min。内参照 β -actin 扩增片段为 525 bp。PCR 反应产物 5 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳 30 min (80 V)。图像分析仪采集图像, 以内参 β -actin 为基准, 做半定量分析, 即以扩增目的片段/ β -actin 的灰度比值表示所扩增的目的基因片段的相对表达水平。

1.2.4 Western blot: 按分子克隆操作指南方法, 收集细胞提取细胞蛋白质, 考马斯亮蓝染色测定样品浓度并调整上样量至 50 μg 。12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳。NC 膜印迹, 而后依次以含 5% 脱脂奶粉 TBS-T 溶液封闭、小鼠抗大鼠 RhoA 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 辣根过氧化物酶标记二抗孵育, 最后采用 ECL 系统感光显像。报告结果至少重复二遍以上。

1.2.5 ELISA: 按试剂盒说明术操作, 标准品行倍比稀释, 待测品孔中每孔加待测上清 100 μL , 反应板混匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 120 min。先后加一抗工作液、酶标抗体工作液及底物工作液孵育, 最后

加 50 μL 终止液混匀, 在 492 nm 处测吸光值, 根据标准品浓度计算待测样品的含量。

统计学处理 数据采用 mean \pm SD 表示, 采用 SAS 统计软件统计分析, 组间分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态观察 荧光倒置显微镜下可见 HSC 中发出绿色荧光, 说明转染成功, 各干扰组细胞贴壁生长与空白对照组无明显变化。

2.2 siRNA 及 ASODN 对 HSC-T6 细胞中 RhoA 表达的影响 转染 siRNA 质粒后, 只有 Rat1 组能够下调 RhoA mRNA 的表达。转染 ASODN 后, RhoA mRNA 的表达下降, 尤其是高浓度转染组。而对照组和 SODN 转染组之间无明显差异(表 1)。选择转染高浓度 ASODN 和 Rat1 质粒组细胞株, 检测 RhoA 蛋白质的表达。干扰组细胞中 RhoA 蛋白质的表达明显下调, 显示出 ASODN 和 siRNA 均能有效抑制 RhoA 的表达, 结果见图 1。

2.3 ASODN 及 siRNA 对 HSC-T6 细胞中 Col I 表达的影响 组内比较, 转染高浓度的 ASODN 或 siRNA 质粒均明显下调 I 型胶原 mRNA 的表达; 组间比较, siRNA 质粒的干扰效果较 ASODN 明显增强(表 2)。

2.4 ASODN 及 siRNA 对 HSC-T6 培养上清中 HA、LN 及 PIIP 的影响 组内比较, 转染高浓度的 ASODN 或 siRNA 质粒均明显下调 I 型胶原 mRNA 的表达; 组间比较, siRNA 质粒的干扰效果较 ASODN 明显增强(表 3)。

3 讨论

我们既往的研究证实, 肝纤维化时 HSC 细胞骨

表 3 转染后各组细胞培养上清中HA的表达量 ($\mu\text{g/L}$, mean \pm SD)

分组	HA		LN		PIIIP	
	ASODN	siRNA	ASODN	siRNA	ASODN	siRNA
空白对照组	6.468 \pm 0.677	6.433 \pm 0.946	59.441 \pm 4.846	60.042 \pm 2.016	31.941 \pm 3.008	34.821 \pm 2.621
脂质体对照组	7.635 \pm 1.184	6.475 \pm 0.696	57.884 \pm 6.076	59.761 \pm 3.008	38.592 \pm 4.832	49.597 \pm 9.237
阴性对照组	7.105 \pm 1.302	6.019 \pm 0.726	54.725 \pm 2.943	56.704 \pm 3.295	35.937 \pm 9.850	46.263 \pm 3.081
干预组	3.925 \pm 0.228 ^a	2.887 \pm 0.382 ^{ac}	13.087 \pm 2.939 ^a	5.709 \pm 1.817 ^{ac}	22.231 \pm 2.221 ^a	8.920 \pm 4.515 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组; ^c $P < 0.05$ vs ASODN.

架重排是HSC活化重要细胞生物学基础, 细胞因子RhoA在肝纤维化时的表达显著上调, 并和HSC中肌动蛋白细胞骨架成分的表达变化一致, 表明其参与了HSC活化过程且发挥了重要的生物学效应^[2,3].

HSC-T6是由SV40-T6抗原转染原代大鼠HSC而来, 他表达Desmin和 α -SMA, 具有活化HSC的特征, 常用于探讨肝纤维化形成的分子机制^[4]. 本实验在我们前期的研究基础上^[5], 借助HSC-T6这一体外细胞模型, 采用分子生物学方法高度特异性的抑制RhoA的表达, 观察其对下游细胞外基质成分分泌的影响, 试图为肝纤维化的治疗寻找新的靶点.

反义技术是指根据核酸间碱基配对结合的原理, 用人工或生物合成的特定互补配对的反义核酸或他们的化学修饰物与细胞内的特定基因相互作用, 从基因水平上干扰遗传信息从核酸向蛋白质的传递过程. ASODN和siRNA是相继发现的两种反义技术. 两者均是以mRNA为靶点, 通过序列特异性结合并降解同源mRNA抑制靶基因表达功能^[6].

由于ASODN和siRNA作用机制上具有共性, 两者对于目标mRNA的作用靶点是否一致呢? 在本实验中, 我们首先采用计算机模拟设计合成针对RhoA的siRNA, 通过实测筛选出具有抑制效应的Rat1质粒, 然后根据此质粒的作用位点合成ASODN. 结果显示, siRNA Rat1质粒和不同浓度的ASODN都能够有效的抑制RhoA的表达. 证实利用反义技术沉默星状细胞中目的基因的表达是可行的, 而且siRNA和ASODN的可接近位点基本上是一致的.

尽管反义技术能够有效抑制靶基因的表达, 但是也有其自身的弱点. 天然的ASODN和siRNA都是不稳定的, 容易被体内各种酶所破坏. 另外, 与靶细胞内特定的位点发生作用, 必须有较好的细胞通透性, 且能在靶细胞内保持

一定的浓度. 天然的ASODN和siRNA难以同时满足以上要求. 因此, 必须对其结构进行化学修饰来提高其反义活性, 基本手段包括磷酸骨架修饰、核糖修饰和碱基修饰等^[7]. 本实验采用磷酸硫酰修饰的ASODN即使高浓度转染亦能够保持分子结构稳定发挥作用, 且对靶细胞无明显的毒性反应. 提示设计合理的反义寡核苷酸仍有希望应用于肝纤维化的基因治疗.

对下游指标的检测发现, 尽管ASODN和siRNA均能下调I型胶原mRNA和细胞外基质成分的表达, 但是两者相比其抑制效率siRNA远高于ASODN. 除去分子结构可能带来的差异外, 提示两者具有不同的反义作用机制. 一般认为, ASODN在细胞核内与mRNA的前体相互作用形成mRNA-DNA双链, 激活RnaseH, 水解该mRNA, 阻断其进入胞质从而破坏蛋白质的翻译过程^[8,9]. 而双链siRNA导入细胞后, 在细胞质内先形成核糖核苷酸蛋白复合物及RNA诱导的基因沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), 通过反义链的介导下识别和降解成熟mRNA发挥效应^[10]. 我们推测mRNA前体和成熟mRNA一级结构的轻微差异可能导致其二级结构的不同, 从而引起两者抑制效应的差别.

目前siRNA正逐步取代ASODN成为分子生物学尤其是肿瘤学研究领域的热门工具. 但是有科学家认为, 相对于RNA分子, DNA分子更稳定且容易大量合成从而满足临床需要, 这也是时至今日大家仍然未放弃探讨ASODN机制的原因之一. 况且研究ASODN的成功经验对于siRNA具有借鉴和指导意义^[11]. 根据本实验结果我们认为, 无论是siRNA还是ASODN, 都有希望用于干预肝纤维化时HSC活化带来的细胞外基质成分沉积. 两者本质上都只是技术手段, 最终能否用于临床治疗仍然有很多问题亟待解决.

4 参考文献

- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis.

■应用要点

肝星状细胞活化是肝纤维化的核心事件, 细胞表型改变是其早期关键步骤. 由于RhoA是目前发现为数不多的能够调控肝星状细胞形态学的细胞因子, 因此对其进行充分的研究有助于寻找阻断星状细胞的激活的途径, 从而延缓肝纤维化的进程.

■同行评价

本研究设计合理, 结果可信, 有较好的研究价值.

- 2 Gastroenterology 2008; 134: 1655-1669
王波, 王天才, 梁扩寰. 细胞因子RhoA在实验性大鼠肝纤维化形成过程中的作用机制. 中华消化杂志 2004; 24: 414-417
- 3 王波, 王天才, 梁扩寰. Stress fiber、Vinculin和FAK对大鼠肝纤维化作用机制的研究. 华中科技大学学报(医学版) 2004; 33: 282-286
- 4 Vogel S, Piantedosi R, Frank J, Lalazar A, Rockey DC, Friedman SL, Blaner WS. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J Lipid Res* 2000; 41: 882-893
- 5 王艳芬, 田德安, 王波, 张琼, 刘梅, 但自力, 王南下, 刘南植. RhoA特异性RNA干扰对肝星状细胞T6细胞外基质表达的影响. 中华消化杂志 2007; 27: 495-496
- 6 Hebert CG, Valdes JJ, Bentley WE. Beyond silencing-engineering applications of RNA interference and antisense technology for altering cellular phenotype. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19: 500-505
- 7 Miyake H, Fujisawa M. Promise of antisense oligodeoxynucleotide-based therapy for bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8: 1851-1854
- 8 Jin Y, Liu S, Yu B, Golan S, Koh CG, Yang J, Huynh L, Yang X, Pang J, Muthusamy N, Chan KK, Byrd JC, Talmon Y, Lee LJ, Lee RJ, Marcucci G. Targeted delivery of antisense oligodeoxynucleotide by transferrin conjugated pH-sensitive lipopolyplex nanoparticles: a novel oligonucleotide-based therapeutic strategy in acute myeloid leukemia. *Mol Pharm* 2010; 7: 196-206
- 9 Du L, Gatti RA. Progress toward therapy with antisense-mediated splicing modulation. *Curr Opin Mol Ther* 2009; 11: 116-123
- 10 Nowotny M, Yang W. Structural and functional modules in RNA interference. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19: 286-293
- 11 Rayburn ER, Zhang R. Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible? *Drug Discov Today* 2008; 13: 513-521

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*)编辑委员会共计400人, 全部为副教授及副主任医师以上. *WCJD*编委会审稿费结算工作于每年01-05开始. 本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费用, 共计40 850, 数据以稿件审回日期为准. *WCJD*共计审稿1 418篇, 其中送审专家377位, 共计送审次数2 094次, 成功审回次数1 634, 成功率78.03%. 其中审稿次数排前三位的为: 西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位, 各17篇; 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位, 16篇; 中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位, 各15篇.

*WCJD*编辑部感谢各位编委2009年对*WCJD*工作的支持, 同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作. 审稿费已经通过邮局汇款, 如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差, 请各位编委与编辑部联系, 联系电话: 010-85381892, 联系人: 李军亮. (编辑部主任: 李军亮 2010-04-20)

内镜下支架置入治疗贲门失迟缓症27例

秦咏梅, 张彩凤, 刘竹娥, 罗艳丽, 王文菊

秦咏梅, 张彩凤, 刘竹娥, 罗艳丽, 王文菊, 新乡医学院第一附属医院消化内科 河南省卫辉市 453100

作者贡献分布: 秦咏梅与张彩凤对此文所作贡献均等; 此课题由秦咏梅与张彩凤设计; 研究过程由秦咏梅、张彩凤、刘竹娥、罗艳丽及王文菊操作完成; 研究所用器械及分析工具由秦咏梅联系提供; 数据分析由秦咏梅完成; 本论文写作由秦咏梅与张彩凤完成。

通讯作者: 秦咏梅, 副主任医师, 453100, 河南省卫辉市, 河南省新乡医学院第一附属医院消化内科. yongmeiqin120@126.com
电话: 0373-4402912

收稿日期: 2010-04-23 修回日期: 2010-06-06

接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-08

Endoscopic retrievable stent placement for treatment of esophageal achalasia: an analysis of 27 cases

Yong-Mei Qin, Cai-Feng Zhang, Zhu-E Liu, Yan-Li Luo, Wen-Ju Wang

Yong-Mei Qin, Cai-Feng Zhang, Zhu-E Liu, Yan-Li Luo, Wen-Ju Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China

Correspondence to: Yong-Mei Qin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China. yongmeiqin120@126.com

Received: 2010-04-23 Revised: 2010-06-06

Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To compare the efficacy and safety of endoscopic retrievable stent placement and pneumatic dilation in the treatment of achalasia.

METHODS: A total of 27 patients diagnosed with achalasia were allocated for a temporary retrievable stent placement ($n = 12$, therapeutic group) or pneumatic dilation ($n = 15$, control group). The stents were placed using a gastroscope under fluoroscopic guidance, and removed 10-14 d after placement. Data on the symptom scores, the diameter of lower esophagus, the lower esophageal sphincter pressure, the response rate, and the rate of complications were compared between the two groups. Follow-up observations were performed at 1 month and at 1 and 2 years postoperatively.

RESULTS: Stent placement and pneumatic dilation were technically successful in 26 patients. Only one patient in the control group developed mediastinal fistula and exited. Statistically significant differences were noted between pretreatment and post-treatment data on the symptom scores, the diameter of lower esophagus, and the lower esophageal sphincter pressure (all $P < 0.01$). There were no significant differences in therapeutic outcomes at 1 mo between the two groups. The response rates in the therapeutic group at 1 mo, 6 mo, 1 year and 2 years were 83.3%, 75.0%, 66.7% and 58.3%, respectively, and those in the control group were 85.7%, 64.3%, 50.0% and 42.9%, respectively. There were significant differences in the remission rates at 1 and 2 years between the two groups (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Both endoscopic retrievable stent placement and pneumatic dilation are effective and safe in the treatment of achalasia. Temporary retrievable stent placement is associated with a better long-term clinical efficacy as compared with pneumatic dilation.

Key Words: Esophageal achalasia; Pneumatic dilation; Endoscopy; Stent

Qin YM, Zhang CF, Liu ZE, Luo YL; Wang WJ. Endoscopic retrievable stent placement for treatment of esophageal achalasia: an analysis of 27 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2043-2046

摘要

目的: 观察内镜下支架置入治疗贲门失迟缓症的近期、远期疗效和安全性。

方法: 对我院2003-2007年就诊的27例贲门失迟缓症患者, 经临床、钡餐造影、内镜检查确诊, 随机分组进行内镜下支架置入或球囊扩张治疗。记录扩张前和扩张后1 mo的症状积分、食管下段括约肌压力(lower esophageal sphincter, LES)、钡餐造影显示的食管最大宽度及食管体部蠕动情况, 并进行2年随访。

结果: 2组患者扩张后1 mo复查吞咽困难等

■背景资料

贲门失弛缓症是食管运动障碍性疾病, 临床治疗包括药物治疗, 内镜下球囊扩张、肉毒素注射, 开胸手术, 胸/腹腔镜下手术治疗。

■同行评议者

程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

■研发前沿

各种治疗方法均有其优缺点, 确定客观评判标准, 选择疗效好, 并发症少, 创伤小的治疗方法是目前研究热点。

症状均明显缓解。支架组、球囊组有效率分别为83.3%(10/12)、85.7%(12/14), 症状积分治疗前、后为6.4分 \pm 1.6分、6.1分 \pm 1.6分和3.2分 \pm 1.9分、3.5分 \pm 1.7分; LESP治疗前、后为25.2 mmHg \pm 2.5 mmHg、26.3 mmHg \pm 2.2 mmHg和20.9 mmHg \pm 1.9 mmHg、21.6 mmHg \pm 1.7 mmHg; 食管的最大宽度治疗前、后为6.2 cm \pm 1.3 cm、5.5 cm \pm 1.5 cm和4.2 cm \pm 1.3 cm、3.6 cm \pm 1.3 cm, 2组治疗前后数据差异有统计学意义(均 $P < 0.01$), 治疗有效, 但组间相比无差异($P > 0.05$)。随访6 mo、1年、2年, 支架组症状缓解率分别为75.0%(9/12)、66.7%(8/12)、58.3%(7/12); 球囊组为64.3%(9/14)、50.0%(7/14)、42.9%(6/14)。2年有效率两组有差异($P < 0.01$)。球囊组1例患者出现纵膈穿孔, 手术治愈, 退出观察, 余患者均未出现严重并发症。

结论: 内镜下支架置入、球囊扩张治疗贲门失弛缓症近期、远期疗效较好, 并发症少, 可降低LESP, 减少食管扩张程度, 从而缓解症状, 支架置入远期疗效更佳。

关键词: 贲门失弛缓症; 球囊扩张; 内镜检查; 支架

秦咏梅, 张彩凤, 刘竹娥, 罗艳丽, 王文菊. 内镜下支架置入治疗贲门失弛缓症27例. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2043-2046

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2043.asp>

0 引言

贲门失弛缓症是食管下段括约肌(lower esophageal sphincter, LES)松弛异常及食管体部缺乏推进性蠕动为特征的食管运动功能障碍性疾病。临床表现为顽固性吞咽困难、反流、胸骨后疼痛等症状, 病因不清, 可能与基因遗传、自身免疫、病毒感染及心理社会因素有关。目前治疗方法有药物, 内镜下球囊扩张、胸/腹腔镜下手术治疗, 开胸手术等。我院对确诊的患者进行了胃镜下可回收支架置入或球囊扩张治疗, 旨在比较两种治疗方法的疗效与安全性。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-03/2007-10在我院就诊的患者, 依据胃镜检查、X线吞钡摄片诊断贲门失弛缓症, 排除其他原因所致的食管、贲门狭窄, 包括肿瘤、术后、反流性食管炎瘢痕狭窄等, 排除下列疾病: 胃肠道穿孔病史, 出血性疾病, 严重心肺疾病, 其他部位恶性肿瘤, 合并精神疾病或神经官能症。纳入病例27例, 男17例, 女10例, 年龄

16-72(平均43 \pm 6.2)岁。按数字表随机分为2组, 支架置入为治疗组12例, 球囊扩张为对照组15例, 两组年龄构成、临床症状评分、食管下段括约肌静息压、食管的最大宽度值差异均无统计学意义。

1.2 方法

1.2.1 支架置入: 采用Olympus公司GIF-240型胃镜, 支架为南京微创公司生产可回收式食管全覆膜镍钛记忆合金支架, 直径20 mm, 长度60-80 mm。术前禁食24 h, 术前15 min肌肉注射地西泮10 mg, 口服利多卡因胶浆10 mL。插入胃镜, 吸净食管内残留液体, 测定狭窄环大小及长短, 选择合适长度支架。将导丝经活检孔插入至十二指肠降部, 退镜, 循导丝将支架及推送装置送入贲门处, 支架下端超出贲门约0.5-1.0 cm, 在X线下精确定位, 释放支架, 再次进镜观察支架膨胀情况及位置, 然后将支架顶端回收线经鼻腔引出, 固定于面颊。观察患者反应情况。10-14 d后取出。取出时在胃镜下注入约500 mL冰水, 待支架收缩后轻拉回收线取出。术后禁食24 h。常规给予抑酸、保护胃黏膜治疗。

1.2.2 球囊扩张: 采用Boston公司生产的RigineX(30 mm)气囊扩张器, 及配套导丝、压力泵。术前禁食24 h, 口服利多卡因胶浆10 mL。插入胃镜, 吸净食管内残留液体, 至十二指肠降部, 经活检孔插入导丝并留置, 退镜, 导丝引导插入球囊扩张器到食管下段贲门口, 再次进镜, 将球囊中点定位于贲门狭窄处, 并保持在此位置。内镜监视下缓慢给气囊充气, 逐渐加压, 压力达4-8 PSI(1 PSI = 6.89 kPa), 持续3-5 min, 间隔5 min, 持续2-3次。注意观察患者反应, 必要时降低球囊内压力或减少持续时间。扩张结束后抽出球囊内气体退出, 若渗血较多, 局部喷洒去甲肾上腺素止血。观察患者反应情况。术后禁食48 h, 常规给予抑酸、保护胃黏膜治疗。

1.2.3 观察指标: 观察支架置入、球囊扩张后的并发症, 是否出现支架移位, 胸痛, 反流、出血, 穿孔或瘘管形成。采用贲门失弛缓症症状评分量化表^[1]及X线吞钡摄片或内镜检查评价治疗效果。(1)症状评分, 按吞咽困难、胸痛、食物反流的有无和程度或频率分别记为0-3分, 分为4级(0, 1, 2, 3)。0级: 积分0-1, 无上述症状; 1级: 积分2-3, 吞咽固体困难, 偶有胸痛和食物反流; 2级: 积分4-6, 吞咽半流质食物困难, 每天出现胸痛和反流; 3级: 积分 >6 , 吞咽流质食物困难, 每餐有胸痛和反流。(2)LES静息压力; (3)食管的最大宽度。

■相关报道

内镜下肉毒素注射治疗超过50%的患者症状在6 mo内复发, 外科开胸手术治疗长期疗效好, 复发率低, 但创伤大, 费用高, 老年高危患者不能耐受。球囊扩张治疗操作简单, 患者耐受性好, 近期疗效好, 可作首选治疗措施。

表 1 两组患者治疗前后食管功能状态比较 (mean ± SD)

分组	症状评分		括约肌静息压(mmHg)		食管最大宽度(cm)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
支架组	6.4 ± 1.6	3.2 ± 1.9 ^b	25.2 ± 2.5	20.9 ± 1.9 ^b	6.2 ± 1.3	4.2 ± 1.3 ^b
球囊组	6.1 ± 1.6	3.5 ± 1.7 ^b	26.3 ± 2.2	21.6 ± 1.7 ^b	5.5 ± 1.5	3.6 ± 1.3 ^b

^b $P < 0.01$ vs 治疗前。

表 2 4 wk后两组治疗方法疗效比较

分组	n	治愈	显效	有效	有效率(%)
支架组	12	3	7	0	83.3
球囊组	14	2	6	4	85.7

支架组与球囊组比较($\chi^2 = 0.1425$, $P > 0.5$)。

1.2.4 疗效判断: 治愈: 症状评分1分; 显效: 症状改善2个积分或完全消失; 有效: 改善1个积分; 无效: 症状无改善或加重, 积分大于6分。以显效和有效病例计算缓解率或有效率。术后1 mo复查症状评分量表, LES静息压力; 食管的最大宽度。以后每半年采用症状评分表评价1次, 通过门诊、电话访问或信访询问患者吞咽困难、胸痛、反食症状, 疑为复发, 行X线钡餐摄片确诊, 随访2年。

2 结果

治疗组患者支架置入过程顺利, 整个手术过程10-20 min。只有1例患者支架在第4天发生移位, 在X线下重新调整。2例患者在第4-5天诉胸痛, 能忍受, 未服止痛剂直至第10天取出支架后, 症状逐渐缓解。3例患者出现反流症状, 支架取出后缓解。本组患者中未出现出血、穿孔及食物嵌顿等并发症。在球囊扩张组中1例发生纵膈穿孔, 手术治愈, 退出观察。2例患者术后当天出血, 排柏油样便, 对症治疗后缓解。治疗前及治疗后4 wk两组症状评分、食管下段括约肌静息压、食管最大宽度见表1。治疗后两组组内的症状评分、括约肌静息压、食管最大宽度与治疗前相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 但治疗后4 wk两组间的观察指标相比, 差异无统计学意义($P > 0.5$)。支架组有效率为83.3%, 球囊组为85.7%, 差异无统计学意义($P > 0.5$, 表2)。治疗无效的4例患者再次行球囊扩张治疗, 3例缓解, 1例转手术治疗。6 mo、1年、2年复查缓解率支架组依次为75.0%(9/12)、66.7%(8/12)、58.3%(7/12); 球

囊组为64.3%(9/14)、50.0%(7/14)、42.9%(6/14)。

3 讨论

贲门失弛缓症以LES动力障碍及其静息压增高为特征。有报道长期持续发作的患者发生食管恶性肿瘤的危险是其他人群的40-140倍^[2-5]。发病机制不明。多数学者认为是因病毒感染或环境因素导致食管壁内肌间神经丛炎症, 炎症反应引起易感人群的自身免疫反应, 使松弛LES的神经元和神经纤维减少或缺失引起^[6,7]。目前无根治性措施。临床治疗上主要是减轻LES的梗阻, 缓解症状。利于食物顺利通过食管进入胃内, 以减少食物及其分泌物对食管黏膜的刺激, 避免食管炎症、溃疡、癌变及呼吸系统并发症的发生。内镜下气囊扩张治疗原理是通过机械方法使部分LES肌纤维断裂, 起到类似手术治疗的作用, 使LES压力下降, 部分或完全纠正LES松弛障碍。本组患者皆在清醒状态下扩张, 能够耐受的压力为4-8 PSI, 一般达不到所报道的15 PSI^[8]。仅1例出现严重并发症, 患者的症状积分、LES静息压、食管最大宽度治疗前后明显改善, 差异有统计学意义。另首次治疗失败的患者1 mo后再反复扩张, 3例患者症状仍能改善。2年后有效率为58.3%, 疗效较满意。有报道球囊扩张操作简单, 缓解率高达60%-90%^[9-12], 是一线治疗方案。但长期随访, 10年后缓解率降至20%-61%^[10,13,14]。支架置入用于治疗恶性狭窄或瘘管形成, 因可出现移位、穿孔、刺激周围肉芽组织生长而不能取出等不良反应, 一般不用于治疗良性疾病。而近年已有支架置入治疗本病的报道, 疗效满意^[15-17]。原理为支架持续扩张使LES肌纤维断裂, 重新塑型降低压力。而有些患者, 特别是年老体弱者, 难以忍受内镜下长时间治疗, 本组球囊扩张手术时间为30-45 min, 而一般肉毒素注射需20-35 min, 而支架置入不超过20 min。支架置入组治疗前后观察指标均明显好转, 差异有统计学意义。与球囊组相比, 治疗后1 mo患者症状积分、LES静息压、食管最

■应用要点

可回收金属覆膜支架置入治疗操作简单、操作时间更短, 并发症少, 近、中期疗效好, 值得推广。

■同行评价
本研究对临床医
师有参考价值。

大宽度、近期有效率均无差异, 2年后有效率达58.3%, 与球囊组相比(42.7%)差异有统计学意义($P<0.01$), 远期疗效较好。Zhao等^[18]单中心观察置放大直径(30 mm)特制支架75例10年, 有效率为83.3%, 无严重并发症及不良反应。胃镜下治疗本病方法还有肉毒素注射, Wang等^[19]经过Meta分析, 得出球囊扩张疗效优越于肉毒素注射, 并且复发率低, 而外科Heller手术治疗缓解率最高, 但创伤大, 花费高。另外可供选择的治疗方案还有胸腔镜或腹腔镜下Heller手术治疗, 疗效满意^[8,20]。

由于各种胃镜下治疗方法在治疗贲门失弛缓症的有效性和安全性方面各有优势, 建议在临床工作中依患者具体情况选择治疗方法。

4 参考文献

- 1 Pasricha PJ, Ravich WJ, Hendrix TR, Sostre S, Jones B, Kalloo AN. Intraspincteric botulinum toxin for the treatment of achalasia. *N Engl J Med* 1995; 332: 774-778
- 2 Brucher BL, Stein HJ, Bartels H, Feussner H, Siewert JR. Achalasia and esophageal cancer: incidence, prevalence, and prognosis. *World J Surg* 2001; 25: 745-749
- 3 West RL, Hirsch DP, Bartelsman JF, de Borst J, Ferwerda G, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Long term results of pneumatic dilation in achalasia followed for more than 5 years. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1346-1351
- 4 Lehman MB, Clark SB, Ormsby AH, Rice TW, Richter JE, Goldblum JR. Squamous mucosal alterations in esophagectomy specimens from patients with end-stage achalasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 1413-1418
- 5 Mayberry JF. Epidemiology and demographics of achalasia. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001; 11: 235-248, v
- 6 Boeckxstaens GE. Achalasia: virus-induced euthanasia of neurons? *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1610-1612
- 7 Wattoo DA, Costa M. Distribution of peptide-containing nerve fibres in achalasia of the oesophagus. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 478-485
- 8 曾晓清, 陈世耀, 王剑, 马丽黎, 倪燕君, 王群, 姚礼庆. 贲门失弛缓症的内镜治疗与外科手术处理方法比较. *中华消化杂志* 2009; 29: 8-12
- 9 Annese V, Bassotti G. Non-surgical treatment of esophageal achalasia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5763-5766
- 10 Mikaeli J, Islami F, Malekzadeh R. Achalasia: a review of Western and Iranian experiences. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5000-5009
- 11 杨艳, 余皆平, 李欢, 曹俊, 于红刚. 内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症81例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1024-1026
- 12 吴杰, 贾业贵, 李红燕, 陈时, 甘洪颖. 内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症远期疗效观察. *中国内镜杂志* 2007; 13: 177-181
- 13 Jordan PH Jr. Longterm results of esophageal myotomy for achalasia. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 137-145
- 14 West RL, Hirsch DP, Bartelsman JF, de Borst J, Ferwerda G, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Long term results of pneumatic dilation in achalasia followed for more than 5 years. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1346-1351
- 15 Cheng YS, Li MH, Chen WX, Chen NW, Zhuang QX, Shang KZ. Selection and evaluation of three interventional procedures for achalasia based on long-term follow-up. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2370-2373
- 16 Mukherjee S, Kaplan DS, Parasher G, Sipple MS. Expandable metal stents in achalasia--is there a role? *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2185-2188
- 17 De Palma GD, Catanzano C. Removable self-expanding metal stents: a pilot study for treatment of achalasia of the esophagus. *Endoscopy* 1998; 30: S95-S96
- 18 Zhao JG, Li YD, Cheng YS, Li MH, Chen NW, Chen WX, Shang KZ. Long-term safety and outcome of a temporary self-expanding metallic stent for achalasia: a prospective study with a 13-year single-center experience. *Eur Radiol* 2009; 19: 1973-1980
- 19 Wang L, Li YM, Li L, Yu CH. A systematic review and meta-analysis of the Chinese literature for the treatment of achalasia. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5900-5906
- 20 何泽峰, 王建军, 汪文东, 杨光海, 詹曦, 马千里, 石思恩. 贲门失弛缓症治疗方式的探讨. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 333-336

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发, 采用定量评价和定性分析相结合的方法, 对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究, 得出了65个学术期刊排行榜, 其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

抑癌基因PTEN及P16蛋白在疣状胃炎及胃癌组织中的表达及意义

丁世华, 刘俊, 舒晴, 王建平, 邓联民, 刘新民

丁世华, 刘俊, 舒晴, 王建平, 邓联民, 刘新民, 深圳市第二人民医院消化科 广东省深圳市 518035
深圳市科技局基金资助项目, No. 200902042
作者贡献分布: 本课题由刘俊、刘新民及丁世华共同设计; 研究过程由丁世华、舒晴及邓联民完成; 统计数据由王建平提供; 本论文写作由丁世华与刘俊完成。
通讯作者: 刘俊, 教授, 主任医师, 518035, 广东省深圳市, 深圳市第二人民医院消化科, shding123@163.com
电话: 0755-83366388
收稿日期: 2010-02-07 修回日期: 2010-05-03
接受日期: 2010-05-18 在线出版日期: 2010-07-08

Expression of PTEN and P16 proteins in varioliform gastritis and gastric cancer

Shi-Hua Ding, Jun Liu, Qing Shu, Jian-Ping Wang, Lian-Min Deng, Xin-Min Liu

Shi-Hua Ding, Jun Liu, Qing Shu, Jian-Ping Wang, Lian-Min Deng, Xin-Min Liu, Department of gastroenterology, Shenzhen Second Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China
Supported by: the Foundation of Science Technology Bureau Of Shenzhen, No. 200902042
Correspondence to: Professor Jun Liu, Department of Gastroenterology, Shenzhen Second Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong Province, China. shding123@163.com
Received: 2010-02-07 Revised: 2010-05-03
Accepted: 2010-05-18 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To explore the relationship between varioliform gastritis and gastric cancer.

METHODS: The expression of PTEN and P16 proteins in chronic superficial gastritis, varioliform gastritis and gastric cancer was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rate of PTEN protein expression in varioliform gastritis was significantly lower than that in chronic superficial gastritis (44.4% vs 92%, $\chi^2 = 14.47$, $P < 0.01$) though no significant difference was noted between varioliform gastritis and gastric cancer (44.4% vs 25.8%, $\chi^2 = 2.51$, $P > 0.05$). The positive rate of P16 protein expression in varioliform gastritis was significantly lower than that in chronic

superficial gastritis (50% vs 96%, $\chi^2 = 14.56$, $P < 0.01$), but significantly higher than that in gastric cancer (50% vs 19.4%, $\chi^2 = 6.80$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Both PTEN and P16 proteins may be involved in the evolution of varioliform gastritis to gastric cancer.

Key Words: Varioliform gastritis; Gastric cancer; PTEN; P16

Ding SH, Liu J, Shu Q, Wang JP, Deng LM, Liu XM. Expression of PTEN and P16 proteins in varioliform gastritis and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2047-2049

摘要

目的: 探讨疣状胃炎与胃癌之间的关系。

方法: 采用免疫组织化学法检测PTEN及P16蛋白在慢性浅表性胃炎、疣状胃炎及胃癌组织中的表达。

结果: 疣状胃炎组PTEN蛋白阳性率显著低于慢性浅表性胃炎组(44.4% vs 92%, $\chi^2 = 14.47$, $P < 0.01$), 而与胃癌组(25.8%)比较无显著差异($\chi^2 = 2.51$, $P > 0.05$)。疣状胃炎组P16蛋白阳性率显著低于慢性浅表性胃炎组(50% vs 96%, $\chi^2 = 14.56$, $P < 0.01$), 但明显高于胃癌组(19.4%)($\chi^2 = 6.80$, $P < 0.01$)。

结论: 抑癌基因PTEN及P16可能参与了疣状胃炎癌变过程。

关键词: 疣状胃炎; 胃癌; PTEN蛋白; P16蛋白

丁世华, 刘俊, 舒晴, 王建平, 邓联民, 刘新民. 抑癌基因PTEN及P16蛋白在疣状胃炎及胃癌组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2047-2049
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2047.asp>

0 引言

疣状胃炎(varioliform gastritis)是一种特殊类型

■背景资料

疣状胃炎在内镜下可分为成熟型和未成熟型两型, 在病理学上存在一定比例的肠上皮化生和不典型增生。少数临床研究观察到疣状胃炎可发生癌变, 但其与胃癌的关系尚不明确。

■同行评议者

曹秀峰, 教授, 南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心; 关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

■研发前沿

疣状胃炎是否会癌变及其癌变的分子机制是目前的研究热点。

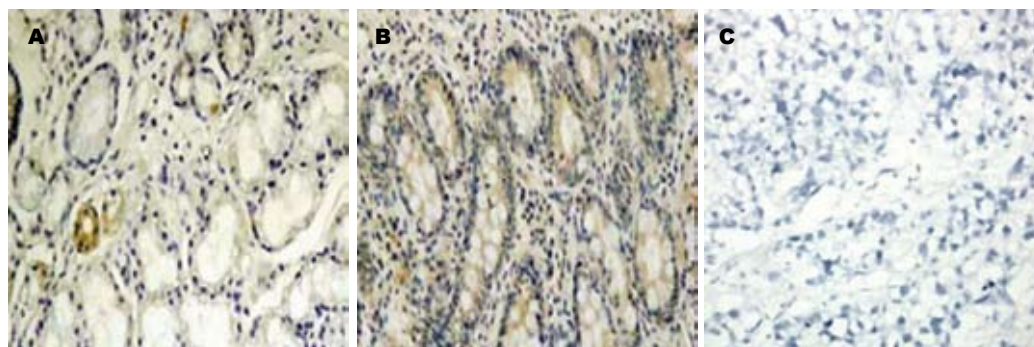


图 1 PTEN蛋白的表达($\times 200$). A: 浅表性胃炎; B: 疣状胃炎; C: 胃癌.

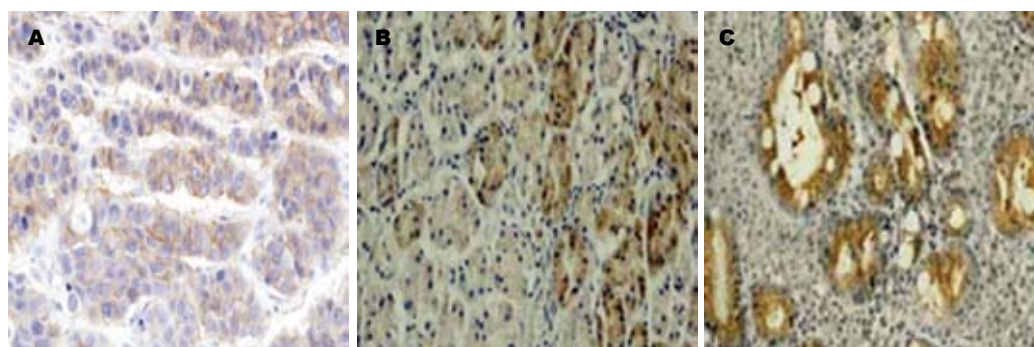


图 2 P16蛋白表达($\times 200$). A: 胃癌; B: 浅表性胃炎; C: 疣状胃炎.

的慢性胃炎, 又称隆起糜烂性胃炎. 临床表现缺乏特异性, 主要依靠胃镜诊断. 在内镜下可分为成熟型和未成熟型两型, 在病理学上存在一定比例的肠上皮化生和不典型增生. 少数临床研究^[1,2]观察到疣状胃炎可发生癌变, 但其与胃癌的关系尚不明确, 癌变的分子机制尚不清楚. 本研究通过免疫组织化学法检测抑癌基因PTEN及P16蛋白在疣状胃炎、胃癌组织中的表达, 探讨疣状胃炎与胃癌之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院病理科2009-01/2009-12胃镜活检和手术切除标本蜡块92例, 其中慢性浅表性胃炎25例、疣状胃炎36例、胃癌31例. 主要试剂PTEN及P16鼠抗人单抗, 通用二部法免疫组织化学检测试剂及DAB显色试剂盒均购自上海生物工程技术有限公司.

1.2 方法 石蜡切片脱蜡至水, 用高压抗原修复法进行预处理; 3% H_2O_2 去离子水孵育5 min, 以阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗, 滴加一抗, 4 $^{\circ}C$ 过夜, PBS 冲洗2 min, 共3次; 滴加通用型IgG 抗体, 室温30 min, PBS冲洗2 min, 共2次, DAB溶液显色; 蒸馏水冲洗、复染、脱水、封片. PBS代替一抗作为阴性对照. 免疫组织化学染色结果

判定: 细胞质或细胞核着棕黄色者为阳性染色, 每例随机观察10个高倍视野($\times 200$), 计算阳性细胞百分率, 阳性细胞数 $\geq 5\%$ 为阳性染色, $< 5\%$ 或缺乏者为阴性染色.

统计学处理 计算各组的阳性率, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

疣状胃炎组PTEN蛋白阳性率显著低于慢性浅表性胃炎组(44.4% vs 92%, $\chi^2 = 14.47$, $P < 0.01$), 而与胃癌组(25.8%)比较无显著差异($\chi^2 = 2.51$, $P > 0.05$). 疣状胃炎组P16蛋白阳性率显著低于慢性浅表性胃炎组(50% vs 96%, $\chi^2 = 14.56$, $P < 0.01$), 但明显高于胃癌组(19.4%)($\chi^2 = 6.80$, $P < 0.01$, 图 1, 2).

3 讨论

胃癌的发生、发展是一个多因素、多基因作用的复杂过程, 与癌基因的激活和抑癌基因的失活密切相关^[3-5]. 抑癌基因PTEN基因定是位于染色体10q23.3的肿瘤抑制基因, 编码PTEN蛋白, 参与氨基酸磷酸酶和丝氨酸/苏氨酸磷酸酶介导的信号传导过程, 使第二信使PIP3去磷酸化, 从而抑制细胞生长和凋亡, 在多种肿瘤中频发

■相关报道

宋莹等用免疫组织化学检测癌基因P21、P53蛋白的表达, 发现疣状胃炎的表达高于慢性浅表性胃炎, 且*H. pylori*阳性高于*H. pylori*阴性者.

突变和缺失. Gou等^[6]研究发现PTEN基因可在4个位点发生突变, 胃癌组织中PTEN蛋白表达率为66%明显低于癌旁组织(100%). Kang等^[7]分析310例胃癌PTEN基因表达变化, 62例无PTEN表达, 而且PTEN的表达与肿瘤深度、大小、进展阶段相关. 进一步研究还发现PTEN基因通过刺激血管生成参与了胃癌的转移^[8]并与胃癌患者的生存期密切相关^[9]. 由此可见, PTEN基因失活参与了胃癌的发生和发展. 本研究显示疣状胃炎组、胃癌组PTEN蛋白阳性率分别为44.4%、25.8%均显著低于慢性浅表性胃炎组92%, 而疣状胃炎组与胃癌组比较无显著差异. 表明疣状胃炎组织中已有PTEN基因失活, 具有发展成胃癌的可能.

*p16*基因定位染色体9q21, 编码相对分子质量为16 kDa的P16蛋白, 特异性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶4和6活性, 调控细胞周期, 参与了人类多种肿瘤的发生和发展, 故又称多种肿瘤抑制基因. *p16*基因失活形式包括纯和性缺失、突变、异常甲基化和表达下降. 多项研究^[10-13]表明胃癌组织中均有*p16*基因启动子超甲基化和P16蛋白表达降低, 并与胃癌组织类型、分化程度及转移密切相关. Jang等^[14]用甲基化特异性PCR法检测了46例胃癌及癌旁组织中*p16*基因, 发现43%的胃癌及59%的胃癌旁组织有*p16*基因启动子超甲基化, 在癌旁组织中*p16*基因启动子超甲基化与慢性炎症的程度、腺体萎缩密切相关, 由此认为*p16*基因表达缺失可能是胃癌发生中的早期事件. Mino等^[15]报道良性胃疾病行胃切除术后发生的残胃癌组织中*p16*基因启动子超甲基化高达69%, 明显高于异时胃癌和原发性胃癌, *p16*基因表达失活可能是残胃癌发生的分子机制之一. 本组资料显示疣状胃炎组P16蛋白阳性率50%显著低于慢性浅表性胃炎组96%, 但明显高于胃癌组(19.4%). 研究结果表明P16参与了胃癌的发生, 疣状胃炎可能是胃黏膜组织癌变的中间阶段. 总之疣状胃炎具有癌变的潜能, 机体内存在慢性浅表性胃炎→疣状胃炎→胃癌的过程, 抑癌基因PTEN及P16失活可能是其分子机制之一.

4 参考文献

- 1 Cappell MS, Green PH, Marboe C. Neoplasia in chronic erosive (varioliform) gastritis. *Dig Dis Sci*

- 1988; 33: 1035-1039
- 2 姚亿蓉, 周中源, 徐诗光, 李咪凤, 王瑞年. 疣状胃炎82例胃镜观察. *河南医科大学学报* 1995; 30: 425
- 3 Honda T, Tamura G, Endoh Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T. Expression of tumor suppressor and tumor-related proteins in differentiated carcinoma, undifferentiated carcinoma with tubular component and pure undifferentiated carcinoma of the stomach. *Jpn J Clin Oncol* 2005; 35: 580-586
- 4 Elistratova EP, Laktionov PP, Shelestiuk PI, Tuzikov SA, Vlasov VV, Rykova Elu. [Immunohistochemical and molecular-genetic markers in gastric cancer diagnostics] *Biomed Khim* 2009; 55: 15-31
- 5 Zhao YF, Zhang YG, Tian XX, Juan Du, Jie Zheng. Aberrant methylation of multiple genes in gastric carcinomas. *Int J Surg Pathol* 2007; 15: 242-251
- 6 Guo CY, Xu XF, Wu JY, Liu SF. PCR-SSCP-DNA sequencing method in detecting PTEN gene mutation and its significance in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3804-3811
- 7 Kang YH, Lee HS, Kim WH. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002; 82: 285-291
- 8 Park GS, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ. [Expression of PTEN and its correlation with angiogenesis in gastric carcinoma] *Korean J Gastroenterol* 2005; 46: 196-203
- 9 Deng H, Wu RL, Zhou HY, Huang X, Chen Y, Liu LJ. Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1013-1017
- 10 He XS, Rong YH, Su Q, Luo Q, He DM, Li YL, Chen Y. Expression of p16 gene and Rb protein in gastric carcinoma and their clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2218-2223
- 11 Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'rabi A, Forghani MN, Raziee HR, Mashhadinejad A, Jafarzadeh M, Esmaili-Shandiz E, Dadkhah E. p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2055-2060
- 12 Hara A, Yashima K, Yasugi A, Koda M, Kawaguchi K, Harada K, Andachi H, Shiota G, Ito H, Murawaki Y. Expression of Fhit, Mlh1, p16INK4A and E-cadherin in early gastric neoplasia: Correlation with histological grade and gastric phenotype. *Oncol Rep* 2007; 18: 553-559
- 13 Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Wang FY, Nakamura M, Sakata M, Nagasaka M, Takagi T, Kamiya Y, Fujita H, Nakamura M, Hasegawa S, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Hirata I, Nakano H. Risk prediction of gastric cancer by analysis of aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric epithelium. *Digestion* 2007; 75: 54-61
- 14 Jang TJ, Kim DI, Shin YM, Chang HK, Yang CH. p16(INK4a) Promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation. *Int J Cancer* 2001; 93: 629-634
- 15 Mino A, Onoda N, Yashiro M, Aya M, Fujiwara I, Kubo N, Sawada T, Ohira M, Kato Y, Hirakawa K. Frequent p16 CpG island hypermethylation in primary remnant gastric cancer suggesting an independent carcinogenic pathway. *Oncol Rep* 2006; 15: 615-620

■同行评价

本研究方法设计合理, 论述清楚, 结论可靠, 具有一定的基础与临床研究价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

胃病患者胃黏膜真菌基因的多样性

王垂杰, 郑剑玲, 宫雁冰, 傅纪婷, 齐贺, 耿薇, 李玉峰, 段薇

■背景资料

现有研究认为导致胃黏膜炎症损伤及转化的机制与幽门螺杆菌(*H.pylori*)等微生物感染有密切关系,且有研究发现,胃溃疡合并真菌感染者溃疡口愈合进程明显延长,溃疡面积明显大于单纯性溃疡。在胃癌组织样本中也常可检出真菌,且真菌产生的毒素与肿瘤发生密切相关。目前对胃黏膜真菌多样性及进化方向与病理程度的关系,尚缺乏研究。

王垂杰, 傅纪婷, 李玉峰, 辽宁中医药大学附属一院消化科辽宁省沈阳市 110101
郑剑玲, 宫雁冰, 齐贺, 耿薇, 段薇, 辽宁省基础医学研究所辽宁省沈阳市 110101
国家重点基础研究发展规划基金资助项目, No. 2006CB504809
作者贡献分布: 王垂杰与郑剑玲对此文所作贡献均等; 此课题由王垂杰与郑剑玲共同设计; 研究过程由郑剑玲、宫雁冰、傅纪婷及齐贺操作完成; 样本资料由傅纪婷与李玉峰提供; 研究所用新试剂由段薇提供; 数据分析由耿薇与宫雁冰完成; 本论文写作由王垂杰、郑剑玲及齐贺完成。
通讯作者: 王垂杰, 教授, 主任医师, 110032, 辽宁中医药大学附属一院消化内科。shenyangzheng@hotmail.com
电话: 024-86291123
收稿日期: 2010-03-30 修回日期: 2010-06-17
接受日期: 2010-06-22 在线出版日期: 2010-07-08

Genetic polymorphisms of fungi in gastric mucosa of patients with different gastric diseases

Chui-Jie Wang, Jian-Ling Zheng, Yan-Bing Gong, Ji-Ting Fu, He Qi, Wei Geng, Yu-Feng Li, Wei Duan

Chui-Jie Wang, Ji-Ting Fu, Yu-Feng Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China
Jian-Ling Zheng, Yan-Bing Gong, He Qi, Wei Geng, Wei Duan, Institute of Basic Medical Sciences of Liaoning Province, Shenyang 110101, Liaoning Province, China
Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China, No. 2006CB504809
Correspondence to: Professor Chui-Jie Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. shenyangzheng@hotmail.com
Received: 2010-03-30 Revised: 2010-06-17
Accepted: 2010-06-22 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To explore the relationship between fungal evolution and the severity of gastric mucosal lesions by analyzing the genetic diversity of fungi in gastric mucosa of patients with different gastric diseases.

METHODS: Sixty-five gastric mucosal specimens, including 52 chronic gastritis specimens, 11 gastric ulcer specimens, and 2 gastric carcinoma specimens, were collected by gastroscopy. CHROM agar medium was used for iso-

lation and identification of fungal strains. The fungal strains isolated were grouped according to the severity of lesions, and 18 strains were randomly selected to sequence the internal transcribed spacer (ITS) regions for homology comparison and phylogenetic tree building. The relationship between fungal evolution and the severity of gastric mucosal lesions was then analyzed.

RESULTS: A total of 34 (34/65, 52.3%) fungal strains were isolated, of which 23 (23/52, 44.2%) from gastritis samples, 9 (9/11, 81.8%) from gastric ulcer samples, and 2 (2/2, 100%) from gastric carcinoma. There was significant difference in the fungal detection rate among different groups of patients ($\chi^2 = 7.023, P = 0.030$). The ITS sequences of all the 18 strains were deposited in GenBank (GenBank Accession Nos. GQ280298-GQ280334). The phylogenetic tree obtained suggested that some fungal strains in certain evolution branches were closely related to the severity of gastric mucosa lesions.

CONCLUSION: The severity of gastric mucosal lesions is associated with fungal evolution directions.

Key Words: Fungi; *Candida albicans*; Gastric ulcer; Gastric carcinoma; *Helicobacter pylori*

Wang CJ, Zheng JL, Gong YB, Fu JT, Qi H, Geng W, Li YF, Duan W. Genetic polymorphisms of fungi in gastric mucosa of patients with different gastric diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2050-2054

摘要

目的: 检测人胃黏膜病变处的真菌, 及其基因多样性, 分析菌种进化分支与黏膜病理损伤的关系。

方法: 用胃镜钳取有病损的胃黏膜标本65例(慢性胃炎52例, 胃溃疡11例, 胃癌2例)。用念珠菌显色培养基(CHROM agar)进行分离培养鉴定。对鉴定为真菌的菌株样本按照病理程度分组, 随机抽取菌株样本进行ITS序列检测, 并比对同源性, 建立进化树, 分析菌株进化分支

■同行评议者

杨江华, 副教授, 安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院感染科

与胃黏膜病理损伤的关系.

结果: 分离培养出真菌菌株34个(34/65, 52.3%), 真菌阳性率在慢性胃炎、胃溃疡、胃癌样本中分别为44.2%(23/52), 818%(9/11), 100%(2/2), 差异有统计学意义($\chi^2 = 7.023$, $P = 0.030$). 进行ITS序列检测的18个菌株申请GenBank序列注册号为GQ280298-GQ280334, 建立系统进化树显示真菌菌株某些进化分支与胃黏膜病损有密切关系.

结论: 不同进化分支的真菌对胃黏膜炎症损伤的程度存在差异.

关键词: 真菌; 白色念珠菌; 胃溃疡; 胃癌; 幽门螺旋杆菌

王垂杰, 郑剑玲, 宫雁冰, 傅纪婷, 齐贺, 耿薇, 李玉峰, 段薇. 胃病患者胃黏膜真菌基因的多样性. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2050-2054
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2050.asp>

0 引言

胃黏膜损伤严重影响患者的消化功能和生活质量, 其中胃黏膜层和固有腺体的慢性炎症性损伤诊断为慢性胃炎, 当黏膜病损超过黏膜肌层则诊断为胃溃疡, 当细胞出现异型性诊断为肿瘤. 现有研究认为导致胃黏膜炎症损伤及转化的机制与幽门螺杆菌(*helicobacter pylori*, *H.pylori*)等微生物感染有密切关系^[1-3], 且有研究发现, 胃溃疡合并真菌感染者溃疡口愈合进程明显延长, 溃疡面积明显大于单纯性溃疡^[4]. 在胃癌组织样本中也常可检出真菌, 且真菌产生的毒素与肿瘤发生密切相关^[5]. 目前对胃黏膜真菌多样性及进化方向与病损程度的关系, 尚缺乏研究. 本实验通过检测胃黏膜白色念珠菌的ITS(internal transcribed spacer region)序列基因多样性, 分析真菌菌株进化方向与胃黏膜病损的关系, 初步探寻胃黏膜损害密切相关真菌菌株.

1 材料和方法

1.1 材料 2008-07-07/08-25于辽宁中医药大学消化科胃镜检查的患者, 经知情同意, 自愿参加本项研究, 共65例. 其中慢性胃炎52例, 胃溃疡11例, 胃癌2例. 男43例, 女22例, 年龄18-79岁, 平均年龄为46.32岁, 近3 mo内未使用糖皮质激素等免疫抑制剂. 用胃镜钳取胃窦部黏膜组织样本, 约3 mm×2 mm×1 mm大小, 置于无菌Ep管

中, -20℃保存. 同时记录受检者年龄、性别、学历、吸烟、饮酒习惯、病史、病理诊断、用药治疗、快速尿素酶检查 *H.pylori* 情况.

1.2 方法

1.2.1 真菌分离培养: 胃黏膜样本加入200 μL生理盐水稀释, 吹打混匀. 取20 μL样本液, 接种于CHROM agar念珠菌显色培养基(郑州博赛生物科技股份有限公司), 37℃培养3 d. 参照产品说明书, 依据分离培养菌落颜色进行鉴定(白色念珠菌呈绿色, 热带念珠菌呈蓝色, 光滑念珠菌呈紫色, 克柔念珠菌呈粉色, 其余念珠菌呈白色). 用无菌牙签挑取单个菌落于Ep管中, -20℃保存.

1.2.2 白色念珠菌DNA提取: 按照病损分组, 选取真菌菌株样本5 μL, 接种于1 mL液体沙保罗培养基(杭州天和微生物试剂有限公司)中增菌. 菌液加入5 μL溶细胞酶(3 g/L, 以山梨醇溶液配制)(Sigma, US), 37℃水浴过夜, 去细胞壁. 常规酚-氯仿法提取DNA^[6].

1.2.3 PCR扩增和序列检测: 用真菌ITS序列通用引物ITS1: TCCGT AGGTG AACCT GCGG; ITS4: TCCTC CGCTT ATTGA TATGC^[7](上海生工生物工程技术有限公司)进行PCR扩增. PCR体系(50 μL): 41 μL H₂O, 5.0 μL 10×Buffer, 1 μL 10 mmol/L dNTP(Roche, Switzerland), 0.5 μL 20 μmol/L前引物, 0.5 μL 20 μmol/L后引物, 0.25 μL 5 U/μL TaqE(TaKaRa, 大连宝生物工程技术有限公司), DNA模板2 μL. 循环条件: 95℃热启动5 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40个循环; 72℃ 10 min; 4℃保存. 20%琼脂糖1X TAE缓冲液, genefinder(Bio-V, 厦门百维信生物科技有限公司)核酸染料染色, 110 V 30 min电泳. PCR产物500-900 bp, 紫外线凝胶扫描成像(Bio-V, 厦门百维信生物科技有限公司), 并记录实验结果. 将PCR阳性产物送上海生工生物工程技术有限公司进行测序, 测序所获得DNA序列提交GenBank, 登记注册国际基因库接受号(genbank acceseion No.), 进行序列比对分析.

1.2.4 序列分析及进化树建立: 对测序结果用ClustalX程序进行比对排序, 采用MEGA3.0(molecular evolutionary genetics analysis, MEGA)软件邻接法(Neighbor-Joining tree)建立进化树.

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件对数据进行Pearson χ^2 检验, Kendall等级相关分析, 对ITS序列检测结果、病理诊断、*H.pylori*、年龄、性别、学历、吸烟、饮酒习惯等各观察指标进行比较分析. $P < 0.05$ 为有统计学意义.

■ 研发前沿

对白色念珠菌致病菌株的进一步研究, 可以成为胃溃疡防治的一个发展方向.

■相关报道

随着遗传学和表观遗传学的发展, 现有研究发现真菌在宿主黏膜表面形成黏附时, 涉及染色体重排、组蛋白编码相关的SIR2, 及Cphlp、Tuplp、Rbplp等多种转录因子参与调控。

表 1 胃黏膜菌株样本ITS序列检测结果

序号	菌株号	ITS序列号	性别 ^a	年龄	<i>H.pylori</i> ^b	分组 ^c	诊断
1	ZB066	FJ697172 ^d	M	57	1	D	胃癌
2	ZB007	GQ280298	M	58	1	D	胃癌
3	ZB009	GQ280300	F	78	1	B	慢性萎缩性胃炎伴糜烂, 十二指肠溃疡
4	ZB011	GQ280302	M	39	1	C	胃溃疡, 糜烂性胃炎
5	ZB016	GQ280304	F	56	0	B	慢性萎缩性胃炎伴糜烂
6	ZB024	GQ280307	F	23	1	A	慢性浅表性胃炎伴胆汁反流
7	ZB026	GQ280309	M	30	1	B	慢性浅表性胃炎伴糜烂
8	ZB028	GQ280311	M	55	1	A	慢性浅表性胃炎伴胆汁反流, 十二指肠球溃疡
9	ZB032	GQ280314	F	42	0	A	慢性浅表性胃炎
10	ZB047	GQ280319	M	44	1	B	慢性浅表性胃炎伴糜烂、胆汁反流
11	ZB052	GQ280321	M	65	1	A	慢性萎缩性胃炎伴肠化生
12	ZB054	GQ280323	M	71	1	B	慢性浅表性胃炎伴糜烂
13	ZB056	GQ280324	M	40	0	A	浅表性胃炎, 十二指肠球炎
14	ZB059	GQ280325	F	31	1	A	慢性浅表性胃炎伴胆汁反流
15	ZB068	GQ280328	F	25	1	B	慢性浅表性胃炎伴糜烂、
16	ZB071	GQ280330	F	43	0	B	慢性浅表性胃炎伴糜烂、胆汁反流
17	ZB073	GQ280332	M	30	1	C	胃溃疡S期, 伴胆汁反流
18	ZB082	GQ280334	F	27	0	A	慢性浅表性胃炎

^a M = 男, F = 女; ^b 幽门螺旋杆菌检测: 1 = 阳性, 0 = 阴性; ^c A组: 病理损害达黏膜浅层的样本; B组: 病理损害达黏膜下层, 出现糜烂; C组: 胃溃疡; D组: 胃癌; ^d 光滑念珠菌。

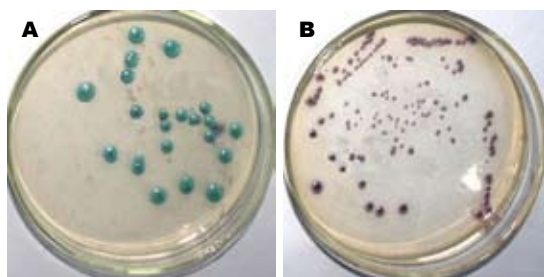


图 1 CHROM agar念珠菌显色培养基检测结果. A: 呈绿色菌落为白色念珠菌; B: (菌株ZB066)呈紫色菌落为光滑念珠菌。

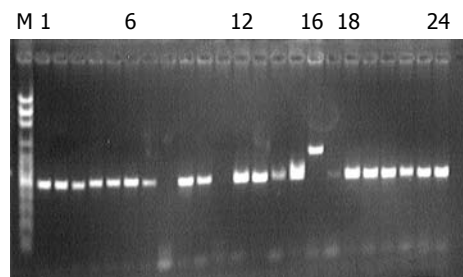


图 2 ITS1-ITS 2基因序列PCR产物电泳图. M: 100 bp DNA ladder Marker, 白色念珠菌为535 bp, 光滑念珠菌为871 bp。

2 结果

2.1 胃黏膜真菌分离培养检测结果 共分离培养出34个真菌菌株(34/65, 52.3%), 在CHROM agar念珠菌显色培养基中, 仅有一个样本(菌株ZB066)呈紫色菌落为光滑念珠菌, 来自胃癌样本. 其余均呈绿色菌落为白色念珠菌, 检测结果见图1。

2.2 ITS序列PCR扩增结果 34个真菌菌株样本均可扩增出ITS1-ITS 2基因序列, PCR产物白色念珠菌为535 bp, 光滑念珠菌为871 bp(图2)。

2.3 ITS序列分析 样本按照病理损害程度分为4组: A组: 病理损害达黏膜浅层的样本(包括浅表性胃炎、萎缩性胃炎), 随机取7个样本; B组:

病理损害达黏膜下层, 出现糜烂(包括浅表性胃炎、萎缩性胃炎), 随机取7个样本; C组: 病理损害达到黏膜肌层(胃溃疡), 随机取2个样本; D组: 细胞出现异型性(胃癌), 取2个样本, 进行ITS序列检测. 测序所获得DNA序列提交GenBank, 登记注册国际基因库接受号(genbank acceseion No), 测序结果及GenBank注册号见表1. 测序结果进行序列比对分析, 建立ITS序列系统进化树见图3。

2.4 白色念珠菌检出阳性率与病理诊断及流行病因素相关性分析 按照病理诊断分组, 真菌阳性率在慢性胃炎、胃溃疡、胃癌样本中分别为44.2%(23/52), 81.8%(9/11), 100%(2/2), 差异有统计学意义($\chi^2 = 7.023, P = 0.030$). 经Kendall等级

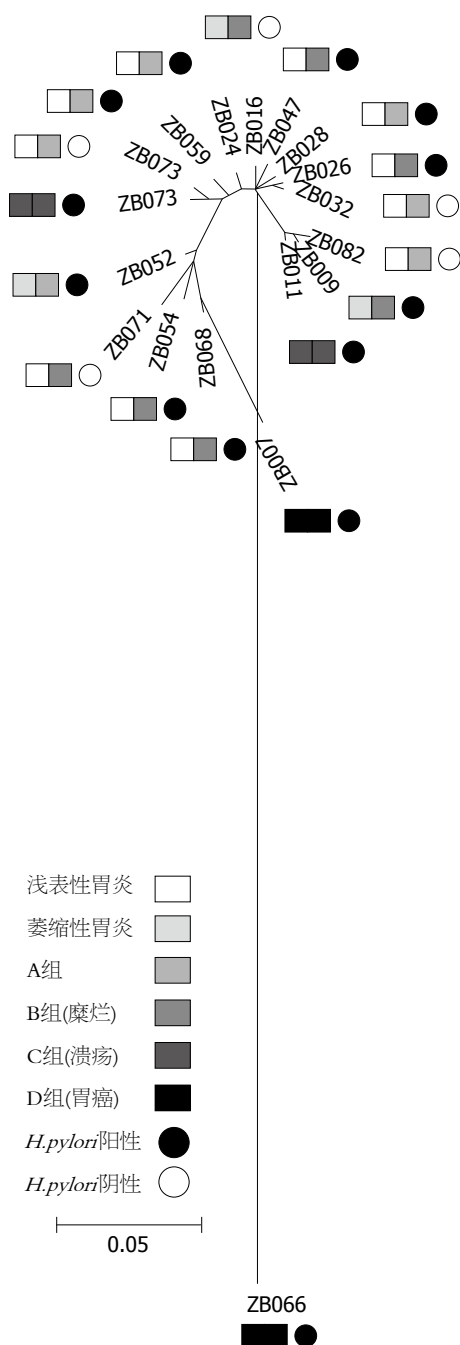


图 3 18个菌株用MEGA3.0邻接法对ITS序列构建的系统进化树. A组: 病理损害达黏膜浅层的样本; B组: 病理损害达黏膜下层, 出现糜烂; C组: 胃溃疡; D组: 胃癌. *H.pylori*: 幽门螺旋杆菌.

相关分析, 白色念珠菌阳性率与*H.pylori*阳性、性别、年龄、吸烟、饮酒、学历的相关性, 均无统计学意义($P>0.05$).

3 讨论

50年前已有真菌与胃病密切相关的研究报道^[8], 也发现白色念珠菌作为最常见的寄居于人体的深部真菌, 有较强的致病性^[9], 因其也多见于无症状的黏膜表面, 长期以来被认为是条件致病

菌. 随着遗传学和表观遗传学的发展, 现有研究发现真菌在宿主黏膜表面形成黏附时, 涉及染色体重排(chromosomal rearrangements)、组蛋白编码相关的SIR2(Silent information regulator 2), 及Cph1p、Tup1p、Rbp1p等多种转录因子参与调控^[10]. 真菌的多样性和基因多态性造成真菌不同菌株间毒性的巨大差异, 这也解释了同为白色念珠菌为什么有的致病性强, 而有的无明显致病性. 因此, 通过对真菌的遗传学分类和进化方式的研究, 可以对致病性真菌进行早期筛查和预防, 也成为胃病的预防学研究的一个发展方向.

本实验选取ITS序列作为对真菌多样性的检测方法, 因真核细胞核糖体rRNA基因编码DNA序列为18S rRNA-ITS1-58S rRNA-ITS2-28S rRNA的串联重复, 其中ITS1(internal transcribed spacer region 1)和ITS2(internal transcribed spacer region 2)为内含子转录间隔区, ITS1-ITS2部分受自然选择压力小, 进化速度较快, 从中可以获得较多的进化信息. 同时, 5S rRNA-58S rRNA rRNA-28S rRNA高度保守, 具有种间特异性和种内保守性. 对真菌的ITS区进行分析, 可以获得真菌种类鉴定和进化方式的可靠遗传信息, 将ITS序列提交GenBank, 可以与全球各地提交的真菌ITS序列进行序列比对, 从而了解相关真菌菌种和菌株的同源性关系、进化分支方向和分布情况, 已经广泛应用于真菌的分类进化方面的研究^[11].

本实验将来自胃黏膜的18个真菌菌株建立系统进化树, 从同源序列对比分析中, 可见菌株ZB024、ZB056、ZB059进化分支对黏膜的损伤程度最小, 即便合并*H.pylori*感染, 病损仍局限在黏膜浅层. 菌株ZB007、ZB052、ZB054、ZB068、ZB071、ZB073进化分支, 对黏膜损伤最重, 不合并*H.pylori*感染的情况下即可出现胃黏膜糜烂, 如果合并*H.pylori*感染, 可出现腺体萎缩、肠化生、溃疡和肿瘤, 也可合并十二指肠溃疡. 菌株ZB009、ZB011、ZB016、ZB026、ZB028、ZB032、ZB047、ZB066、ZB082进化分支, 需与*H.pylori*联合, 才能对黏膜产生较重的损伤. 其中ZB016、ZB032和ZB082的宿主都是女性、*H.pylori*阴性, 病损则局限在黏膜浅层和下层. 该进化分支在合并*H.pylori*感染的情况下, 对黏膜损伤较重, 其中ZB009和ZB028宿主虽胃黏膜病损较轻, 但十二指肠出现溃疡. 该进化分支也可出现肿瘤, 但是进化距离较远的光滑念

■同行评价
本研究内容重要,
有一定新颖性.

珠菌。由此推测,这一进化分支的真菌菌株对黏膜的损伤程度,受宿主性别、*H.pylori*感染等多因素影响。

本实验分离培养出的34个胃黏膜真菌菌株中,为33例白色念珠菌,1例光滑念珠菌,与已有的报道不尽相同。Zwolinska等学者用API系统检测检测了293个消化不良和胃溃疡患者的胃黏膜活检样本,分离培养出的真菌菌种中,光滑念珠菌占42.4%,白色念珠菌占38.7%^[12]。本实验的光滑念珠菌检出率低可能与样本选取和检测方法有关。

本实验的胃黏膜样本真菌检出率为52.3%,在胃炎样本中为44.2%,胃溃疡为81.8%,与已有的研究报道相近。Karkowska-Kuleta报道在54.2%的胃溃疡患者和10.3%慢性胃炎患者的胃黏膜样本中分离培养出真菌^[4]。本实验中胃炎和胃溃疡患者的真菌检出率较高,可能与样本选取情况有关,如:地域、季节、饮食习惯、患者就医习惯等因素。我国进行胃镜检查的患者均为胃不适症状较重的患者,这可能对其真菌检出率有所影响。现有研究发现胃溃疡合并真菌感染者溃疡口愈合进程明显延长,溃疡面积明显大于单纯性溃疡,应用抗真菌治疗4 wk后,溃疡面积显著减小,症状减轻^[4]。用大鼠动物模型实验发现白色念珠菌可加重胃溃疡面积,减少胃血流量^[13]。Ramaswamy等也报道难治性胃溃疡与白色念珠菌感染有关,采用抗真菌治疗,并去除离子泵抑制剂后,溃疡愈合^[14]。已有的研究发现白色念珠菌产生分泌性蛋白酶和细胞外磷脂酶,可以对黏膜产生破坏作用,也是白色念珠菌附着于宿主黏膜的毒力因子^[10]。在本实验也发现白色念珠菌可能参与胃黏膜炎症破坏,与胃黏膜损伤密切相关。本实验胃癌样本仅为2例,分别检出白色念珠菌和光滑念珠菌,其进化分支与其他胃黏膜破坏密切的菌株进化距离很近,已有研究也认为关于真菌产生的毒素与细胞转化密切相关^[15],胃癌与真菌进化分支的关系尚需扩大样本量进一步研究。

总之,本实验发现胃黏膜真菌感染可加重黏膜炎症破坏。白色念珠菌的ITS序列同源性对比分析发现,某些进化分支的菌株在没有*H.pylori*合并感染的情况下,可导致较重的胃黏膜和固有腺体破坏。某些进化分支的白色念珠菌菌株,需与*H.pylori*合并感染的情况下,参与胃黏膜破坏。另一些致病性弱的白色念珠菌菌株,即便是

与*H.pylori*合并感染,也不会对胃黏膜产生显著的破坏。因此,对白色念珠菌致病菌株的进一步研究,可以成为胃溃疡防治的一个发展方向。

4 参考文献

- 1 Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
- 2 Shirin H, Hibshoosh H, Kawabata Y, Weinstein IB, Moss SF. p16Ink4a is overexpressed in *H. pylori*-associated gastritis and is correlated with increased epithelial apoptosis. *Helicobacter* 2003; 8: 66-71
- 3 Houghton J, Korah RM, Condon MR, Kim KH. Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 465-478
- 4 Zwolińska-Wcisło M, Budak A, Trojanowska D, Bogdał J, Stachura J. Fungal colonization of the stomach and its clinical relevance. *Mycoses* 1998; 41: 327-334
- 5 余尚扬, 刘达云, 陈铭, 翟志辉, 王秋雁, 黄雪. 真菌感染对胃粘膜上皮细胞增殖与凋亡的影响. *广西医学* 2002; 24: 1332-1334
- 6 Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, D'Amore G, Leone G, Fadda G. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1871-1875
- 7 Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2006; 47: 225-229
- 8 Ahnlund HO, Pallin B, Peterhoff R, Schönebeck J. Mycosis of the stomach. *Acta Chir Scand* 1967; 133: 555-562
- 9 Blank F, Chin O, Just G, Meranze DR, Shimkin MB, Wieder R. Carcinogens from fungi pathogenic for man. *Cancer Res* 1968; 28: 2276-2281
- 10 Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 2009; 56: 211-224
- 11 俞和韦, 王中康, 刘莉, 夏玉先, 殷幼平, 袁青, 曹月青, 彭国雄. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道真菌多样性分析. *微生物学报* 2008; 48: 439-445
- 12 Zwolińska-Wcisło M, Brzozowski T, Mach T, Budak A, Trojanowska D, Konturek PC, Pajdo R, Drozdowicz D, Kwiecień S. Are probiotics effective in the treatment of fungal colonization of the gastrointestinal tract? Experimental and clinical studies. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 Suppl 9: 35-49
- 13 Zwolińska-Wcisło M, Budak A, Bogdał J, Trojanowska D, Stachura J. Fungal colonization of gastric mucosa and its clinical relevance. *Med Sci Monit* 2001; 7: 982-988
- 14 Ramaswamy K, Correa M, Koshy A. Non-healing gastric ulcer associated with *Candida* infection. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25: 57-58
- 15 O'Grady JF, Reade PC. *Candida albicans* as a promoter of oral mucosal neoplasia. *Carcinogenesis* 1992; 13: 783-786

非酒精性脂肪性肝病患者瘦素与肝纤维化的关系

张 姮, 黄晓东, 范 彦, 吴 杰, 王 萍

张姮, 黄晓东, 范彦, 吴杰, 王萍, 武汉市中心医院消化内科
湖北省武汉市 430014

作者贡献分布: 张姮与黄晓东对此文所作贡献均等; 此课题由张姮、黄晓东、范彦、吴杰及王萍设计; 研究过程由张姮、黄晓东及范彦操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由黄晓东提供; 数据分析由张姮与范彦完成; 本论文写作由张姮、黄晓东及范彦完成。

通讯作者: 黄晓东, 主任医师, 430014, 湖北省武汉市胜利街26号, 武汉市中心医院消化内科, huangxiaodong88@163.com
电话: 027-82211211

收稿日期: 2010-03-24 修回日期: 2010-06-03

接受日期: 2010-06-07 在线出版日期: 2010-07-08

Relationship between leptin and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease

Heng Zhang, Xiao-Dong Huang, Yan Fan, Jie Wu, Ping Wang

Heng Zhang, Xiao-Dong Huang, Yan Fan, Jie Wu, Ping Wang, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China

Correspondence to: Xiao-Dong Huang, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China. huangxiaodong88@163.com

Received: 2010-03-24 Revised: 2010-06-03

Accepted: 2010-06-07 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To explore the role of leptin in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) by exploring the relationship between leptin and liver fibrosis in NAFLD patients.

METHODS: Blood samples were collected from 33 NAFLD patients and 30 normal controls. Serum leptin, hyaluronic acid (HA), laminin (LN), type III procollagen (PC-III), and type IV collagen (IV-C) were determined by radioimmunoassay. Fasting blood glucose (FBG), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), fasting insulin (FINS), and body mass index (BMI) were also routinely measured.

RESULTS: The levels of leptin, BMI, FINS and HOMA IR were significantly higher in NAFLD patients than in normal controls ($11.07 \mu\text{g/L} \pm$

$3.40 \mu\text{g/L}$ vs $5.45 \mu\text{g/L} \pm 1.86 \mu\text{g/L}$, 27.33 ± 2.98 vs 6.32 ± 1.76 , $14.19 \text{ mU/L} \pm 2.65 \text{ mU/L}$ vs $8.71 \text{ mU/L} \pm 1.79 \text{ mU/L}$ and 3.48 ± 0.65 vs 1.93 ± 0.37 , respectively; all $P < 0.05$). No significant differences were noted in the levels of PC-III, IV-C, LN and HA between mild NAFLD patients and normal controls (all $P > 0.05$). However, the levels of PC-III, IV-C, LN and HA were significantly higher in moderate and severe NAFLD patients than in normal controls (all $P < 0.05$). Serum leptin was correlated with the degree of liver fibrosis in moderate and severe NAFLD patients ($P < 0.05$) but not in mild NAFLD patients ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Leptin is closely correlated with the progression of liver fibrosis in NAFLD patients.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Leptin; Liver fibrosis

Zhang H, Huang XD, Fan Y, Wu J, Wang P. Relationship between leptin and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2055-2057

摘要

目的: 研究非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)患者血清瘦素水平与肝纤维化指标的相关性, 来探讨瘦素在NAFLD发展进程中的作用。

方法: 应用放射免疫法(RIA)测定33例NAFLD患者及30例对照组的瘦素、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C), 并测定空腹血糖(FBG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、空腹胰岛素(FINS)、体质指数检测(BMI)等临床指标。

结果: NAFLD患者的瘦素、BMI、空腹胰岛素及胰岛素抵抗指数(HOMA IR)分别为 $11.07 \mu\text{g/L} \pm 3.40 \mu\text{g/L}$ 、 27.33 ± 2.98 、 $14.19 \text{ mU/L} \pm 2.65 \text{ mU/L}$ 、 3.48 ± 0.65 , 显著高于对照组($P < 0.05$); 血清PCⅢ、Ⅳ-C、LN、HA在轻度NAFLD患者分别为 $68.17 \mu\text{g/L} \pm 19.31 \mu\text{g/L}$ 、

■背景资料

瘦素是由白色脂肪细胞分泌的肽类激素, 参与摄食行为和能量代谢的调节, 与NAFLD关系密切。近年来瘦素在肝纤维化形成过程中的作用越来越受关注, 本文通过研究血清瘦素水平与肝纤维化指标的相关性, 来探讨瘦素在NAFLD发展进程中的作用。

■同行评议者

徐可树, 教授, 华中科技大学同济医学院协和医院消化内科

■研究前沿

瘦素作为一种促纤维化因子正在被人们逐步认识,但在NAFLD中的作用机制尚不明确,有待进一步认识。

39.06 $\mu\text{g/L} \pm 13.84 \mu\text{g/L}$ 、62.51 $\mu\text{g/L} \pm 21.37 \mu\text{g/L}$ 、44.52 $\mu\text{g/L} \pm 14.73 \mu\text{g/L}$, 与对照组比较无显著性差异($P>0.05$), 在中、重度NAFLD患者分别为164.62 $\mu\text{g/L} \pm 18.47 \mu\text{g/L}$ 、83.32 $\mu\text{g/L} \pm 24.73 \mu\text{g/L}$ 、152.22 $\mu\text{g/L} \pm 20.74 \mu\text{g/L}$ 、212.51 $\mu\text{g/L} \pm 19.62 \mu\text{g/L}$, 明显高于对照组($P<0.05$), 以HA最为显著($P<0.01$); 轻度NAFLD患者, 其血清瘦素与肝纤维化指标无相关关系($P>0.05$); 中、重度NAFLD患者血清瘦素水平与肝纤维化指标有相关关系($P<0.05$).

结论: 瘦素与NAFLD患者肝纤维化进程密切相关。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 瘦素; 肝纤维化

张姮, 黄晓东, 范彦, 吴杰, 王萍. 非酒精性脂肪性肝病患者瘦素与肝纤维化的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2055-2057
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2055.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)和肝硬化, NAFLD是隐匿性肝硬化的重要病因之一。瘦素是由白色脂肪细胞分泌的肽类激素, 参与摄食行为和能量代谢的调节, 与NAFLD关系密切。近年来瘦素在肝纤维化形成过程中的作用越来越受关注, 本文通过研究血清瘦素水平与肝纤维化指标的相关性, 来探讨瘦素在NAFLD发展进程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 武汉市中心医院消化内科2007-03/09收治NAFLD患者33例, 诊断标准符合非酒精性脂肪性肝病诊疗指南^[1]。其中男18例, 女15例, 平均年龄45.87岁 ± 9.35 岁; 根据非酒精性脂肪性肝病诊疗指南标准分为: 轻度脂肪肝($n = 10$)、中度脂肪肝($n = 15$)、重度脂肪肝($n = 8$)。选择健康体检者30例作为对照组, 其中男16例, 女14例, 平均年龄46.46岁 ± 8.72 岁。病例组与对照组性别、年龄没有显著性差异。所有入选者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 体质量指数检测: 过夜禁食14 h, 于清晨空腹, 仅留宽松内衣, 测量升高、体质量, 计算体

质量指数(body mass index, BMI)。

1.2.2 实验室检查: 过夜禁食14 h, 于清晨卧位时取肘静脉血4 mL, 不抗凝, 分离血浆, -20°C 低温冰箱保存。全自动生化分析仪测定常规生化指标, 包括空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)。空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)用北京北方生物技术研究所以生产的试剂盒, 用化学荧光法测定, C-肽(C-P)用北京北方生物技术研究所以生产的试剂盒, 用放射免疫法(RIA)测定。

1.2.3 胰岛素抵抗评价方法: 采用胰岛素抵抗指数(HOMA IR) = $\text{FBG}(\text{mmol/L}) \times \text{FINS}(\text{mU/L}) / 22.5$ 。

1.2.4 血清瘦素测定: 采用RIA测定, 试剂盒由北方生物技术研究所以提供。

1.2.5 肝纤维化指标检测: 采用RIA检测血清学指标透明质酸(hyaluronic acid, HA), 层粘连蛋白(laminin, LN), III型前胶原(type III procollagen, PCIII), IV型胶原(type IV collagen, IV-C), 试剂盒由上海海研医学生物技术有限公司提供。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件, 根据研究目的和数据类型不同分别进行 t 检验、 χ^2 检验等, 各变量间相关关系采用多元逐步回归分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAFLD组与对照组的一般情况 NAFLD患者的BMI、空腹胰岛素及HOMA IR水平显著高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表1)。以瘦素(Y)为因变量, 以BMI、HOMA IR、C-肽、TC及TG为自变量, 进行多元逐步回归分析, 结果BMI、HOMA IR入选, 得到回归方程: $Y = 0.159\text{BMI} + 1.570\text{HOMA IR} - 10.731$ ($P<0.05$)。

2.2 NAFLD组与对照组瘦素、肝纤维化指标的变化 血清PCIII、IV-C、LN、HA在轻度NAFLD患者与对照组比较无显著性差异($P>0.05$), 在中、重度NAFLD患者明显高于对照组($P<0.05$), 并以HA最为显著($P<0.01$, 表2)。

2.3 血清瘦素水平与肝纤维化指标的相关性 轻度NAFLD患者, 其血清瘦素与肝纤维化指标无相关关系($P>0.05$); 中、重度NAFLD患者血清瘦素水平与肝纤维化指标有相关关系($P<0.05$, 表3)。

3 讨论

NAFLD是指除酒精和其他明确的损肝因素所致的, 以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征

表 1 NAFLD组与对照组瘦素及实验检测 (mean \pm SD)

分组	NAFLD	对照组	P值
BMI	27.33 \pm 2.98	16.32 \pm 1.76	<0.05
TC(mmol/L)	4.33 \pm 0.95	3.89 \pm 0.59	>0.05
TG(mmol/L)	1.61 \pm 0.38	1.29 \pm 0.41	>0.05
C肽(mmol/L)	1.72 \pm 0.30	1.37 \pm 0.88	>0.05
FBG(mmol/L)	5.41 \pm 0.92	5.01 \pm 0.68	>0.05
FINS(mU/L)	14.19 \pm 2.65	8.71 \pm 1.79	<0.05
HOMAIR	3.48 \pm 0.65	1.93 \pm 0.37	<0.05
瘦素(μ g/L)	11.07 \pm 3.40	5.45 \pm 1.86	<0.05

的临床病理综合征。瘦素又称脂肪抑素,是由肥胖基因编码的代谢性激素,主要在白色脂肪组织特异性表达,能抑制脂肪合成,进而调节机体脂肪沉积及能量平衡。本研究NAFLD患者血清瘦素水平明显高于对照组,且以瘦素为因变量,多项指标作为自变量,进行多元逐步回归分析,发现BMI及HOMA IR与瘦素关系密切,提示NAFLD患者瘦素升高与肥胖、胰岛素抵抗等因素有关,与文献报道一致^[2,3]。

NASH患者中有20%-40%进展至肝纤维化或者肝硬化^[4],肝脏纤维化是NAFLD进展的重要病理过程。研究均表明HA、PCIII、IV-C、LN的变化水平与肝纤维化的程度成正相关^[5]。本研究发现,比较不同程度NAFLD患者,发现轻度NAFLD患者肝纤维化四项指标与对照组相比无显著性差异($P>0.05$),而在中、重度NAFLD患者明显高于对照组($P<0.05$),并以HA最为显著,且中、重度非酒精性脂肪肝患者血清瘦素水平与肝纤维化血清学指标呈正相关,提示瘦素与NAFLD肝纤维化进程相关。

目前认为,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)是引起肝纤维化的主要细胞,在非酒精性脂肪性肝病发生发展中,瘦素的作用机制可能有以下几个方面:(1)活化的HSC能够表达ob2Rb,与瘦素结合后通过Janus酪氨酸激酶/信号转导与转录激活因子(JAK/STAT)途径介导瘦素信号转导。活化的HSC还大量表达瘦素mRNA和蛋白,通过自分泌促进自身活化,参与肝纤维化的发展^[6]。(2)转化生长因子 β 1(transforming growth factor beta-1, TGF- β 1)是肝纤维化过程中的关键因子,有研究发现,在NASH患者,特别是肝纤维化患者肝组织中,瘦素受体表达增加,TGF- β 1基因表达明显增加,二者呈正相关,瘦素可能通过上调TGF- β 1的含量促进肝纤维化的形

表 2 各组患者血清瘦素与肝纤维化指标的变化 (mean \pm SD, μ g/L)

分组	HA	LN	PC III	IV-C	瘦素
对照组	38.93 \pm 14.62	60.20 \pm 20.2	59.89 \pm 24.6	32.11 \pm 12.6	5.45 \pm 1.86
轻度	44.52 \pm 14.73	62.51 \pm 21.37	68.17 \pm 19.31	39.06 \pm 13.84	7.57 \pm 3.79
中、重度	212.51 \pm 19.62	152.22 \pm 20.74	164.62 \pm 18.47	83.32 \pm 24.73	13.01 \pm 2.56

表 3 血清瘦素水平与肝纤维化指标的关系

分组	HA	LN	PC III	IV-C
轻度NAFLD	0.301	0.142	0.296	0.363
中、重度NAFLD	0.603	0.598	0.557	0.626

成^[7,8];(3)瘦素可能通过其他炎性反应促进肝纤维化作用。

总之,瘦素作为一种促纤维化因子正在被人们逐步认识,但其在NAFLD中的作用机制尚不明确,有待进一步认识。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝脏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. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 161-163
- 2 Oneta CM, Dufour JF. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *Swiss Med Wkly* 2002; 132: 493-505
- 3 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379
- 4 Jansen PL. Non-alcoholic steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1079-1085
- 5 Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; 37: 493-503
- 6 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
- 7 Cayón A, Crespo J, Mayorga M, Guerra A, Pons-Romero F. Increased expression of Ob-Rb and its relationship with the overexpression of TGF-beta1 and the stage of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2006; 26: 1065-1071
- 8 Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y, Sato N. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2005; 33: 151-154

■同行评价

本文源于临床,探讨非酒精性脂肪性肝病患者瘦素与肝纤维化相关的多项指标之间的关系,具有一定的科学意义及临床价值。

缺血性结肠炎37例

台卫平, 胡品津

■背景资料

随着人口老年化的到来, 缺血性结肠炎是临床上腹痛以及下消化道出血的常见原因。症状不典型时, 容易与其他疾病混淆, 本文对其特点以及诊治进行了分析。

台卫平, 北京世纪坛医院消化内科 北京市 100038
台卫平, 广东省第二人民医院消化内科 广东省广州市 510080
胡品津, 中山大学附属第一医院消化内科 广东省广州市 510080
作者贡献分布: 此课题由胡品津与台卫平设计; 研究过程由台卫平操作完成; 数据分析与论文写作由台卫平完成。
通讯作者: 台卫平, 主治医师, 100038, 北京市海淀区, 北京世纪坛医院消化内科, taiweiping@sohu.com
电话: 020-89168081
收稿日期: 2010-01-31 修回日期: 2010-05-22
接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-07-08

Ischemic colitis: an analysis of 37 cases

Wei-Ping Tai, Pin-Jin Hu

Wei-Ping Tai, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China

Wei-Ping Tai, Department of Gastroenterology, Guangdong Second Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Pin-Jin Hu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wei-Ping Tai, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China. taiweiping@sohu.com

Received: 2010-01-31 Revised: 2010-05-22

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-07-08

Abstract

AIM: To analyze the clinical features, endoscopic characteristics, diagnosis and treatment of ischemic colitis.

METHODS: A retrospective analysis was performed to summarize the clinical features, predisposing factors, colonoscopic findings and outcomes in 37 patients suffering from ischemic colitis.

RESULTS: Ischemic colitis occurred more often in elderly patients. In our series, 70.3% (26/37) of patients were older than 60 years. These patients often had concomitant basic diseases, such as hypertension, coronary heart disease, diabetes and cerebrovascular diseases. The main manifestations of ischemic colitis were abdominal pain and diarrhea and bloody stools. The lesions revealed by colonoscopy were mainly located

in the left colon and distributed in a segmental pattern, and the pathological changes included mucosal edema, congestion, erosion and ulceration. The prognosis was good in most cases. Of all 37 patients, 27 (72.9%) almost completely recovered.

CONCLUSION: Ischemic colitis should be suspected in elderly patients with acute abdominal pain, diarrhea and bloody stools. Early colonoscopy in combination with clinical analysis is helpful for accurate diagnosis and appropriate treatment of ischemic colitis. Colonoscopy may induce ischemic colitis and should be cautiously performed.

Key Words: Ischemic colitis; Colonoscopy; Endoscopic characteristics

Tai WP, Hu PJ. Ischemic colitis: an analysis of 37 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2058-2061

摘要

目的: 探讨缺血性结肠炎的临床特点、内镜特征及诊断和治疗方法。

方法: 对37例缺血性结肠炎患者的临床表现、易患因素、结肠镜检查、患者的转归等资料进行回顾性分析。

结果: 缺血性结肠炎多发于老年患者, 其中>60岁者占70.3%(26/37)。多伴有高血压、冠心病、糖尿病以及脑血管病等基础疾病。腹痛、腹泻以及便血为主要临床表现。结肠镜下以黏膜充血、水肿、糜烂、溃疡等为主要表现, 为非特异性表现, 病变主要见于左半结肠, 呈节段性分布。多数患者预后良好, 27例(72.9%, 27/37)患者基本愈合。

结论: 老年患者出现急性腹痛、腹泻以及便血应注意缺血性结肠炎可能, 早期结肠镜检查, 综合临床分析可及时明确诊断指导治疗。结肠镜检查时应该小心操作因为肠镜检查本身可以诱发缺血性结肠炎。

关键词: 缺血性结肠炎; 结肠镜; 内镜特征

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

台卫平, 胡品津. 缺血性结肠炎37例. 世界华人消化杂志 2010; 18(19): 2058-2061
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2058.asp>

0 引言

缺血性结肠炎(ischemic colitis, IC)是临床上腹痛以及下消化道出血的常见病因之一, 是缺血性肠病中最常见的临床类型. 缺血性肠病是20世纪60年代提出的一组具有一定临床病理特点的独立性疾病, 是肠血管功能或形态变化所致的疾病, 此病可累及整个消化系, 但主要累及结肠, IC是由于各种原因导致某一节段结肠的血液供应不足或回流受阻引起的病变. Marston等根据其病变程度将IC分为3型: 一过型、狭窄型、坏疽型^[1]. 本病多见于50岁以上的中老年人, 女性多于男性. 随着我国人口的老齡化, 对本病的及时诊断和正确治疗日趋重要, 尤其是当症状不典型时, 容易与其他疾病混淆. 目前随着目前生活方式的改变和人口的老齡化, 该病有增多趋势^[2]. 美国的一项报道认为普通人群的发病率为4.5/10万-44/10万, 而在肠易激综合征以及慢性阻塞性肺病患者中危险度增加了2-4倍. 在大于65岁的患者以及女性患者危险性增加^[3]. 本文总结了近年来我院的37例IC患者, 对其特点以及诊治进行了分析.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-01/2009-12广东省第二人民医院消化内科37例IC患者的临床病例资料, 其中患者男女比为17:20, 平均年龄52.8岁±16.5岁, 男性平均51.7岁±16.2岁, 女性53.6岁±12.0岁, 其中>60岁者占70.3%(26/37), 40岁以下者5.4%(2/37). 血液检查提示呈白细胞数及CRP值上升的炎症反应者25例, 生化无特殊, 12例患者血气分析提示患者有轻微代谢性酸中度.

1.2 方法 对临床症状、既往史等背景因素、结肠镜检查所见及治疗经过等进行了研究. 当临床可疑为IC时, 排除了结肠镜检查禁忌证后在24-72 h内行内镜检查. 根据病变部位的活检材料进行病理组织学检查. 以黏膜出血、纤维素析出、腺管变性、坏死和剥脱、黏膜下层出血、水肿、纤维蛋白析出、炎症细胞浸润为IC急性期表现, 在确认无抗生素等药物使用史情况下, 在行便培养除外了感染性结肠炎时, 可临床诊断为IC, 给予患者活血、扩血管、抗凝等治疗以及针对基础疾病给予对症治疗, 常规给

予患者低流量吸氧治疗. 根据患者病情变化择期复查肠镜检查以观察治愈过程.

2 结果

2.1 临床表现 主要症状有: (1)腹痛: 37例患者中在发病前都出现腹痛, 多为一过性或阵发性剧烈绞、隐痛, 疼痛部位以左下腹及脐周为主, 其中1例为现弥漫性全腹痛. (2)腹痛合并腹泻11例(29.7%), 大便次数为3-6次/日, 为稀便或者血便. (3)腹痛、腹泻合并便血7例(18.9%). (4)伴有恶心、呕吐症状14例(37.8%); 伴发热6例(16.2%). 主要体征为腹部压痛28例(75.7%), 其中以左下腹、脐周压痛为多见, 1例为全腹弥漫性压痛. 肠鸣音活跃20例(54.1%).

2.2 基础疾病 合并高血压病13例、冠心病11例、脑血管病史8例、糖尿病8例、高脂血症7例、房颤5例、陈旧性心梗病史1例, 风湿性关节炎病史1例(部分患者同时合并有多个疾病). 同时合并高血压、冠心病者8例. 同时存在3种以上上述基础病患者5例.

2.3 内镜表现 内镜下病变多为节段性分布; 表现为黏膜充血、水肿, 黏膜下出血、红斑、点片状糜烂及浅溃疡形成, 溃疡多呈纵行或不规则形病变沿长轴分布, 且靠近肠系膜侧. 病变肠段与正常肠段间分界较明显(图1A). 2例患者可见肠腔局部狭窄. 病变累及范围及部位: 累积降结肠及脾区者16例; 单纯累积乙状结肠12例; 同时累及乙状结肠及降结肠5例; 乙状结肠及降结肠至脾曲处2例; 累及左半横结肠及降结肠脾区者1例; 横结肠及降结肠、乙状结肠者1例; 没有累及直肠及升结肠病例.

2.4 病理表现 病理学显示为非特异性改变, 多可见水肿、中性粒细胞浸润、毛细血管扩张、黏膜下出血、小静脉内血栓形成等改变. 有的患者可见巨噬细胞内含铁血黄素沉着, 腺体结构破坏及炎性肉芽肿形成.

2.5 治疗与转归 明确诊断后患者给予罂粟碱、复方丹参、低分子右旋糖酐等活血、扩血管、抗凝等治疗, 常规给予患者低流量吸氧治疗. 疗程10-14 d, 同时针对原发疾病如高血压病、冠心病、脑血管病、糖尿病、高脂血症、房颤、陈旧性心梗病史等进行控制血压, 改善冠脉循环、改善脑部供血、控制以及监测血糖、降低血脂以及胆固醇、控制房颤以及纠正心衰等治疗. 30例(81.1%)患者明确诊断给予针对性治疗2 d后停止便血, 腹痛等症状也基本缓解. 2 wk后

■应用要点

由于IC病情变化快, 短期内复查病变多可愈合, 故怀疑IC者应早行结肠镜检查.

■同行评价

本文总结了缺血性结肠炎的临床特点,有理有据,切合临床实际,结果可信,对临床工作具有一定的参考价值。

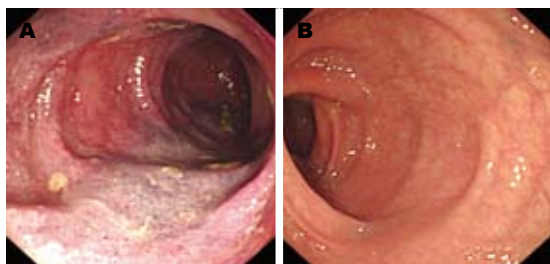


图1 缺血性结肠炎肠镜表现. A: 治疗前; B: 治疗2 wk后.

复查结肠镜患者病变均明显减轻, 27例(72.9%)病变基本愈合(图1B), 8例(21.6%)病变明显减轻, 但仍有轻度糜烂. 有2例(5.4%)患者因高龄、并发症多而死亡(1例房颤合并心衰, 肺炎, 肠道感染; 1例脑梗死, 糖尿病合并肠道感染, 多器官功能衰竭).

3 讨论

坏疽型IC起病凶险, 临床可出现休克、急性腹膜炎、急性肠梗阻、肠穿孔等表现, 多需外科手术治疗. 非坏疽型患者临床表现相对较轻, 给予积极及时治疗预后较好, 其中慢性型可表现为间断、复发性腹痛, 程度不一, 腹部压痛相对较轻, 可形成肠腔狭窄以及不全肠梗阻. 而一过型临床最多见. 症状轻、恢复快, 预后好, 也是临床最常见的, 为本文主要讨论对象. IC多见于老年人. 本组患者平均年龄为52.8岁±16.5岁, 其中>60岁者占70.3%(26/37); 女性患者稍多于男性(20:17). 本组患者多有血流动力学相关性基础疾病, 如冠心病、高血压、糖尿病、高脂血症、脑血管病、结缔组织病等. 其他本组患者未见但文献报道有腹部手术史、放化疗、女性长期服用避孕药等可引起血管损伤以及血流动力学异常也是本病易患因素^[4]. 肠道梗阻如结肠癌, 肠道憩室或者肠道套叠也是IC的原因^[5]. 有一些药物可能导致患者容易并发IC例如抗生素类, 食欲抑制剂, 化疗药物, 导致患者便秘药物; IC在腹部动脉瘤修补手术后患者的IC发病率为2%-3%^[6]. IC同时也是冠状动脉搭桥手术以及结肠镜检查的一个罕见并发症^[5]. 某些IC被认为与一些遗传缺陷例如蛋白C, 蛋白S以及抗凝血酶III的遗传缺陷^[7], Prothrombin 20210G/A基因突变有关^[8].

本组患者以腹痛、便血和腹泻为主要临床症状. 腹痛多为突发性, 呈阵发或持续性绞痛. 多位于左下腹或脐周, 且腹痛有进食后出现或加重, 症状与体征不相符等特点. 如出现腹肌紧张、反

跳痛、腹水时应警惕出现肠坏死以及肠穿孔. 一过性IC患者在对症治疗后, 临床症状常可在48 h左右内缓解, 故症状消失快也是临床特点.

结肠镜检查是诊断IC的简单有效方法, 可明确病变范围、严重程度并可复查. 本组资料显示: 发生部位以脾区及降结肠为最多. 由于结肠脾区血供为肠系膜上、下动脉的移行部位, 此处吻合支少, 故相对易发生缺血性损伤. 而降乙结肠主要由肠系膜下动脉供血. 其管腔较肠系膜上动脉管腔细, 故容易发生血栓. 直肠为肠系膜下动脉及直肠动脉双重供血. 故病变很少累及直肠. 镜下病变特点表现为节段性、多发黏膜充血、水肿、糜烂、溃疡等. 病变与正常黏膜间分界清晰. 由于IC病情变化快, 短期内复查病变多可愈合, 故怀疑IC者应早行结肠镜检查. IC病变多位于左半结肠. 且常规服泻药有加重肠缺血的可能, 故可仅予灌肠做术前准备, 如有肠坏死、肠穿孔时禁忌结肠镜检查. 需要注意的是由于结肠镜检查本身有诱发IC或者加重IC的可能, 应该尤其注意结肠镜检查医师的资质以及水平^[5]. 肠道压力超过30 mmHg时减少了结肠的血流, 可能使得结肠更加缺血; 这个风险可以通过吹入CO₂从而降低相关风险, 是因为CO₂可以通过肠道快速吸收, 并且具有肠道血管扩张作用. 另外, 缺血的结肠血管非常薄并且有穿孔的风险, 因此结肠镜检查应该尤其警惕^[9].

当前缺血性结肠炎在临床上仍无特异性诊断方法, 对50岁以上合并有高血压、高血脂、动脉粥样硬化和糖尿病等多种影响血流动力学疾病, 临床有腹痛、血便等症状应考虑本病. 须及时进一步检查以尽快明确诊断. 实验室检查中没有特异性的实验室指标, 但是患者通常伴有轻微的白细胞升高以及核左移. 鉴别诊断包括有感染性肠炎, 炎症性肠病, 伪膜性肠炎, 憩室炎以及结肠癌. 所有疑诊IC的患者均应进行大便培养^[10], 而沙门氏以及志贺氏菌属可能是IC的一个诱因. 寄生虫或者病毒感染例如巨细胞病毒感染应该被排除, 因为寄生虫以及巨细胞病毒感染可能可以导致类似的肠道病变^[10]. 患者的转归与疾病的严重程度, 范围以及缺血的严重性, 并发症以及基础疾病, 年龄等因素相关, 也与患者的及时诊断以及合适的临床治疗有关.

4 参考文献

- 1 Marston A, Pheils MT, Thomas ML, Morson BC. Ischaemic colitis. *Gut* 1966; 7: 1-15
- 2 杨雪松, 吕愈敏, 于长福. 等缺血性结肠炎的临床及内

- 镜特点和转归. 中华消化杂志 2002; 22: 282
- 3 Higgins PD, Davis KJ, Laine L. Systematic review: the epidemiology of ischaemic colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 729-738
- 4 Sun MY, Maykel JA. Ischemic colitis. *Clin Colon Rectal Surg* 2007; 20: 5-12
- 5 Green BT, Tendler DA. Ischemic colitis: a clinical review. *South Med J* 2005; 98: 217-222
- 6 Steele SR. Ischemic colitis complicating major vascular surgery. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 1099-1114, ix
- 7 Verger P, Blanc C, Feydy P, Boey S. [Ischemic colitis caused by protein S deficiency] *Presse Med* 1996; 25: 1350
- 8 Balian A, Veyradier A, Naveau S, Wolf M, Montembault S, Giraud V, Borotto E, Henry C, Meyer D, Chaput JC. Prothrombin 20210G/A mutation in two patients with mesenteric ischemia. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1910-1913
- 9 Brandt LJ, Boley SJ, Sammartano R. Carbon dioxide and room air insufflation of the colon. Effects on colonic blood flow and intraluminal pressure in the dog. *Gastrointest Endosc* 1986; 32: 324-329
- 10 Su C, Brandt LJ, Sigal SH, Alt E, Steinberg JJ, Patterson K, Tarr PI. The immunohistological diagnosis of *E. coli* O157:H7 colitis: possible association with colonic ischemia. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 1055-1059

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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。

异时性多原发结肠癌合并原发性空肠腺癌1例

夏翠锋, 李强, 李云峰, 潘定国, 冯瑞

■背景资料

本例患者在20年的时间内先后发生横结肠、升结肠、乙状结肠、降结肠及空肠腺癌, 在排除HNPPC后确诊多原发结直肠癌, 同时合并原发性空肠腺癌, 均行手术切除及术后全身化疗后疗效好, 患者术后长期生存, 临床上实属罕见。

夏翠锋, 李强, 李云峰, 潘定国, 冯瑞, 云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心 云南省昆明市 650118

作者贡献分布: 夏翠锋负责文章的撰写, 李强及李云峰、潘定国、冯瑞负责文章材料的收集与整理。

通讯作者: 夏翠锋, 650118, 云南省昆明市, 云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心, yykxzj598@yahoo.cn

电话: 0871-8185656

收稿日期: 2010-01-17 修回日期: 2010-03-19

接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-07-08

Metachronous multiple primary colon cancer with primary adenocarcinoma of the jejunum: a report of one case

Cui-Feng Xia, Qiang Li, Yun-Feng Li, Ding-Guo Pan, Rui Feng

Cui-Feng Xia, Qiang Li, Yun-Feng Li, Ding-Guo Pan, Rui Feng, Colorectal Cancer Research Center, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650118, Yunnan Province, China

Correspondence to: Cui-Feng Xia, Colorectal Cancer Research Center, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming 650118, Yunnan Province, China. yykxzj598@yahoo.cn

Received: 2010-01-17 Revised: 2010-03-19

Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-07-08

Abstract

Metachronous multiple primary colon cancer is defined as two or more newly developed cancers occurring at least 6 months after the initial colon cancer in different parts of the colon. Here, we reported a patient who developed primary colon cancers of the transverse colon, ascending colon, sigmoid colon and descending colon, and adenocarcinoma of the jejunum successively in 20 years. All cancers were subjected to surgical resection and postoperative chemotherapy. The patient had a good outcome and long-term postoperative survival, which is rarely seen in patients with such disease.

Key Words: Metachronous cancer; Multiple primary colon cancer; Adenocarcinoma of the jejunum

Xia CF, Li Q, Li YF, Pan DG, Feng R. Metachronous multiple primary colon cancer with primary adenocarcinoma of the jejunum: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(19): 2062-2063

■同行评议者

何超, 教授, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

摘要

异时性多原发结肠癌是在不同时间(相隔 ≥ 6 mo)内在不同的部位相继出现结肠恶性肿瘤且病理排除同一种肿瘤复发及转移。本例患者在20年的时间内先后发生横结肠、升结肠、乙状结肠、降结肠及空肠腺癌, 均行手术切除及术后全身化疗后疗效好, 患者术后长期生存, 临床上实属罕见。

关键词: 异时性; 多原发结肠癌; 空肠腺癌

夏翠锋, 李强, 李云峰, 潘定国, 冯瑞. 异时性多原发结肠癌合并原发性空肠腺癌1例. *世界华人消化杂志* 2010; 18(19): 2062-2063

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2062.asp>

0 引言

多原发性结肠癌是指同一个体同时或先后在结肠的不同部位发生2种或以上原发性恶性肿瘤, 根据发生的时间又可分为同时性及异时性多原发结肠癌, 本例患者在20余年的时间内先后在横结肠、升结肠、乙状结肠、降结肠出现原发性恶性肿瘤, 同时合并空肠腺癌, 并行多次根治性切除术, 术后行辅助化疗后长期生存, 临床上罕见, 现报道如下。

1 病例报告

男, 73岁, 因“横结肠、升结肠、乙状结肠、降结肠及小肠腺癌术后”就诊。患者于1978年因“左下腹疼痛, 大便带血”确诊为降结肠癌, 在我院行根治性左半结肠切除术, 术后行5-FU+CF+DDP化疗6周期, 好转后出院。随后于1984年、1990年、2002年及2005年分别确诊为升结肠、横结肠、空肠及乙状结肠腺癌, 确诊后分别行根治性切除术, 术后病理: 降结肠、升结肠及横结肠、空肠、乙状结肠腺癌。术后均行以5-FU为基础的化疗, 化疗结束后定期随访, 并对其家系进行纤维结肠镜检查, 同时进行随访, 未发现遗传倾向。入院后检查: CT: 腹腔内结构紊乱, 但未见明显肿块。纤维结肠镜检查: 距肛门约

20 cm处可见回结肠吻合口, 未见明显异常. 肿瘤标志物: CEA、CA242均正常、CA199为67 μg/L.

2 讨论

多原发癌是指同一个体同时或先后在不同的部位发生2种或以上原发性恶性肿瘤, 根据发生的时间又可分为同时性及异时性多原发癌, 除大肠可发生多原发癌以外, 可存在同一机体在不同组织器官或同一器官组织不同时/同时发生原发性恶性肿瘤. 1880年Czerny首次报道多原发大肠癌后, 国内外均有不同的报道^[1,4]. 对于多原发大肠癌的诊断, 多数学者采用1932年Warren与Gates制定的诊断标准: (1)每个癌灶必须独立存在; (2)各自均具有独特的病理学形态; (3)癌灶间须间隔一定距离的正常组织, 可明确除外转移与复发; (4)严格除外家族性腺瘤性息肉病和溃疡性结肠炎患者, 同时性多原癌需在6 mo以内, 异时性需二癌间隔6 mo以上^[2,3]. 本例患者为异时性多原发癌, 各种原发癌时间间隔在3年以上, 且排除了复发及转移的可能, 并经家系调查未发现遗传倾向, 同时在多原发大肠癌的同时, 合并原发性小肠腺癌, 实属罕见. 因此, 我们在大肠癌的诊治过程中, 特别是术前诊断, 术中确诊、术后定期随诊, 应特别警惕有发生多原发大肠癌的可能, 术后随诊中纤维结肠镜检查尤为重要, 但也不能忽视其他辅助诊断方法, 在诊

断多原发大肠癌的同时, 应对患者进行遗传学检查, 并对患者的家系进行调查, 以排除遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC). 本例患者是在排除HNPCC后, 在大肠癌的随诊过程中发现患者持续贫血, 大便潜血阳性, 进一步行小肠气钡双重造影才发现小肠肿瘤. 故在肿瘤患者的诊断中应观察每一项异常指标, 不但存在有同时/异时性大肠癌, 还应警惕不同组织器官发生多原癌的可能. 在其手术治疗方法上, 目前仍存在不同的观点, 部分学者认为对同时性多原发大肠癌宜早期行全结肠或次全结肠切除术, 有部分学者认为行扩大根治切除术为佳, 对异时性多原发大肠癌, 若无手术禁忌, 多次进行根治术即可. 而笔者认为, 对多原发性结直肠癌术式的选择应根据患者的一般情况、肿瘤的具体部位及淋巴引流、病理类型、肿瘤大小、发生时间以及患者的生活环境及质量等来进行全面综合的分析, 以防误诊误治, 降低患者的生活质量.

3 参考文献

- 1 郝希山, 王殿昌. 腹部肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 513
- 2 夏金堂, 刘锦怀, 刘明重, 李喻元. 34例多原发性恶性肿瘤的大肠癌病例分析. 现代临床普通外科 1997; 2: 18-19, 21
- 3 尹志强, 叶应生, 张少锋. 43例多原发性结直肠癌的诊治分析. 结直肠肛门外科 2006; 12: 345-347
- 4 房继军, 皇甫深强. 大肠多原发癌19例临床分析. 山东医药 2008; 48: 40

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本病例较少见, 对临床医师有一定参考价值.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010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\(WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26\)](http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive(WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26))

《世界华人消化杂志》投稿须知

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

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(ISSN 1009-3079, CN 14-1260/R)》是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊。OA最大的优点是面向全国本领域专家及公众开放无需注册, 免费获取PDF等格式的全文, 切实破除了传统性期刊阻碍科学研究成果快速传播的障碍。OA是一项真正意义上的公益性科学传播工具, 编委、作者和读者利益的最大化的目标, 努力推进本学科的繁荣和发展。

《世界华人消化杂志》定价56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《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期刊(科技部列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、《中国学术期刊评价研究

报告-RCCS权威、核心期刊排行榜与指南》和中国知识资源总库收录。2008年度《世界华人消化杂志》总被引频次为2480, 位居内科学类41种期刊的第6位; 影响因子为0.547, 位居内科医学类41种期刊的第17位。《世界华人消化杂志》即年指标0.059, 他引率0.79, 地区分布数29, 基金论文比0.340, 国际论文比0.00, 学科影响指标0.59, 综合评价总分49.5, 位居内科学类41种期刊的第8位。

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

2 撰稿要求

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

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

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

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2009年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-85381901, 传真: 010-85381893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 ≤ 1000 , 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1486800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号

分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

3 稿件格式

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

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

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

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

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通

大学医学院附属医院仁济医院,上海市消化疾病研究所。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 P , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材

料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262。

2010年,《世界华人消化杂志》将坚持开放获取(open access, OA)的出版模式,编辑出版高质量文章,努力实现编委、作者和读者利益的最大化,努力推进本学科的繁荣和发展,向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊:序号,作者(列出全体作者),文题,刊名,年,卷,起页-止页,PMID和DOI编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接,包括首次提交的稿件,同行评议人报告,作者给审稿人回信和作者修回稿,以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见,指出问题与不足;作者也可以随时修改完善自己发表的论文,使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿,不接受其他方式的投稿,如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com,电话:010-8538-1892,传真:010-8538-1893寻求

帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 d。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审,2位或以上通过为录用,否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费,文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括:(1)保证无重复发表或一稿多投;(2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突;(3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负;(4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件;通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核复核稿;(5)列出作者贡献分布;(6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信;(7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部。

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期寄回,所造成的问题由作者承担责任。

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期):起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司

100025,北京市朝阳区东四环中路62号

远洋国际中心D座903室

电话:010-8538-1892

传真:010-8538-1893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

2010年国内国际会议预告

2010-07-15/17

2010年中国医师协会内分泌代谢科医师分会年会

会议地点: 广州市

联系方式: Endocri_hy@dmed-bj.com

2010-07-15/18

第四届地坛国际感染病会议(DICID)

会议地点: 北京市

联系方式: info@bjditan.org

2010-08-18/21

第二十一届世界癌症大会

会议地点: 深圳市

联系方式: bgs@caca.sina.net

2010-08-19/22

第二十二次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: szzyy88@163.com

2010-08-28/29

第三届首都急诊医学高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cfeccm@163.com

2010-09-01

第二次肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 太原市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2010-09-08/12

第九届全国介入放射学学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: csir2010@163.com

2010-09-09/11

中华医学会第十一次全国感染病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: infectioncma@163.com

2010-09-10/12

第四届国际肝病学会年会

会议地点: 加拿大, 蒙特利尔

联系方式: info@ilca-online.org

2010-09-16/19

第十三届全国临床肿瘤学大会暨2010年CSCO学术年会

会议地点: 北京市

联系方式: <http://reg.cSCO.org.cn/reg2010/>

2010-09-21/25

肝脏疾病病理基础及治疗进展

会议地点: 西安市

联系方式: 029-85323924

2010-10-12/16

无创性肝纤维化诊断及常见肝病新进展学习班

会议地点: 南京市

联系方式: 025-80864021

2010-10-23/27

第十八届欧盟胃肠病周

会议地点: 西班牙, 巴塞罗那

联系方式: <http://uegw10.uegf.org/>

2010-10-28/30

中华医学会第十次全国消化系统疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: yjliu@cma.org.cn

2010-11-12/15

内镜黏膜下剥离术(ESD)及其并发症防治学习班

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: liubingrong@medmail.com.cn

2010-11-17/20

中华医学会糖尿病学分会第十四次全国学术会议

会议地点: 苏州市

联系方式: fredfeng@cma.org.cn

2010-11-17/21

消化及消化内镜前沿理论和技术学习班

会议地点: 南京市

联系方式: 025-80004616

2010-11-18/21

第十四届全国胆道外科学术会议暨2010中国国际肝胆外科论坛

会议地点: 上海市

联系方式: ncbs_cifhbs@126.com

2010-12-02/06

第九届广东省消化内镜学术年会

会议地点: 广州市

联系方式: 020-61641541

2010-12-26/30

肝胆疾病-肝功能衰竭治疗新理念

会议地点: 南京市

联系方式: 025-83106666-66866

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹秀峰 教授
南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈洪 副教授
东南大学附属中大医院消化科

程英升 教授
同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

崔莲花 副教授
青岛大学医学院公共卫生系

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

范学工 教授
中南大学湘雅医院感染病科

戈之铮 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

江学良 主任医师
中国人民解放军济南军区总医院消化科

蓝宇 教授
北京积水潭医院消化科

刘绍能 主任医师
中国中医科学院广安门医院消化科

梅林 教授
北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

潘秀珍 教授
福建省立医院消化内科

谭德明 教授
中南大学湘雅医院感染病科

唐世刚 教授
大连大学附属中山医院消化内科

田颖刚 副研究员
南昌大学中德食品工程中心

田宇彬 教授
青岛大学医学院附属医院消化内科

王炳元 教授
中国医科大学附属第一医院消化内科

王健生 教授
西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王文跃 主任医师
中日友好医院普通外科

王娅兰 教授
重庆医科大学基础医学院病理教研室

王振宁 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

徐可树 教授
华中科技大学同济医学院协和医院消化内科

杨柏霖 副主任医师
南京中医药大学附属医院

杨江华 副教授
安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院感染科

于颖彦 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

喻荣彬 副教授
南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

张进祥 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院

张宗明 教授
清华大学第一附属医院消化医学中心