

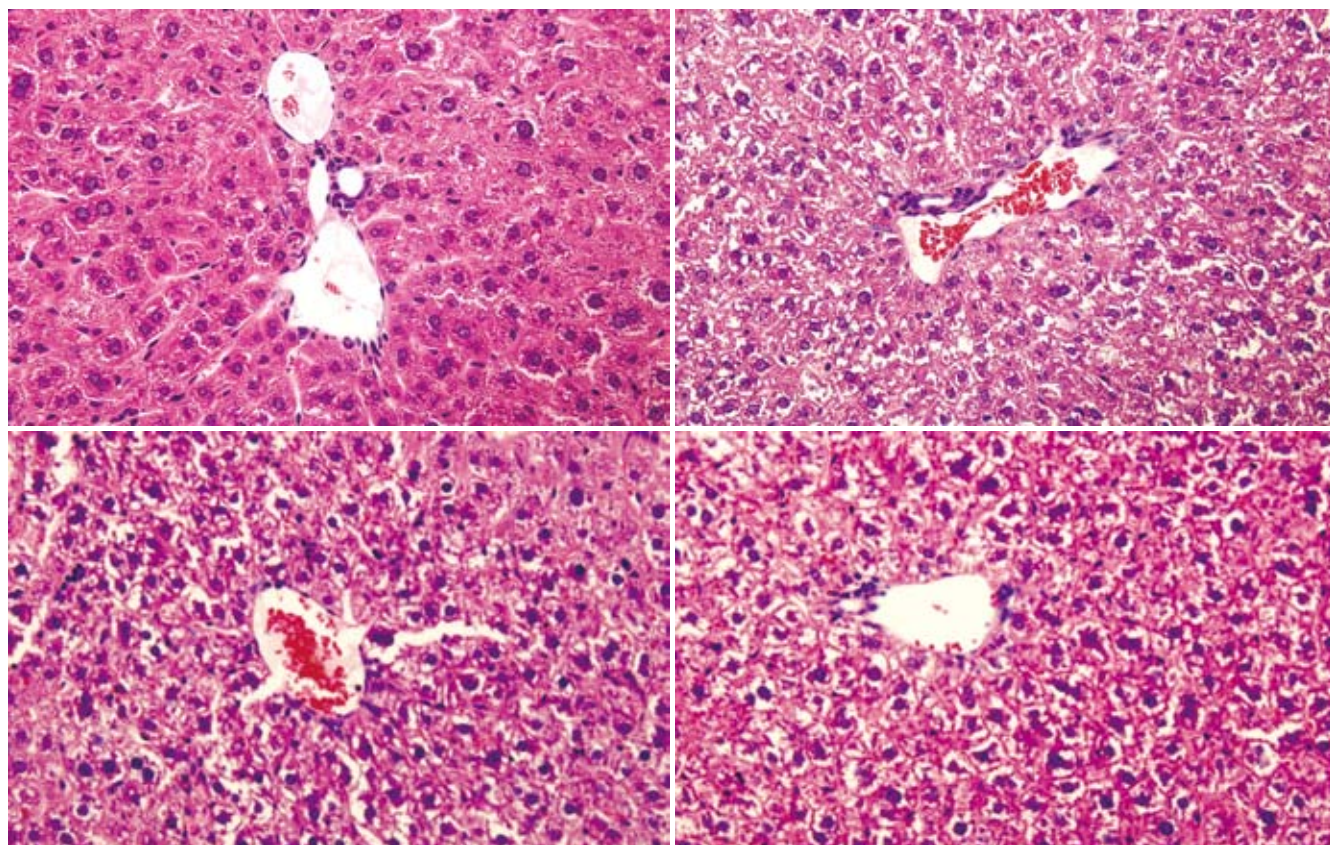
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2010年3月8日 第18卷 第7期 (Volume 18 Number 7)



7 / 2010

ISSN 1009-3079



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
杨思凤教授
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
程斌副教授
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
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
王承党副教授
王晓艳副教授
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
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
陈立波副教授
陈凜教授
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
英卫东副主任医师
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
李文岗副教授

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
汤恢焕教授
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	高泽立副教授	沈洪教授	袁友红副教授	周素芳教授
王正康教授	龚国忠教授	唐志鹏研究员		周晓东研究员
王志刚副主任医师	管世鹤副教授	王富春教授	消化中西医结合学	周晓武副主任医师
王忠裕教授	何生松教授	王新月教授	唐文富副教授	
吴河水教授	胡国信副主任医师	谢鸣教授	王学美研究员	消化病理学
吴健雄教授	林菊生教授	徐列明教授	魏睦新教授	杜祥教授
吴金术教授	刘正稳教授	许玲副教授	张春虎副教授	李淳副教授
吴泰璜教授	貌盼勇研究员	张声生教授		刘丽江教授
吴志勇教授	宁琴教授		消化基础研究	刘勇钢副主任医师
谢敏主任医师	钱林学主任医师	消化肿瘤学	曹洁副教授	马大烈教授
谢晓华副教授	孙殿兴主任医师	曹秀峰教授	曹鹏副研究员	潘兴华副主任医师
邢光明教授	谭德明教授	曹志成院士	樊红副教授	王鲁平主任医师
徐大华主任医师	汤华研究员	陈公琰主任医师	高春芳研究员	王娅兰教授
徐迅迪副主任医师	唐霓副研究员	李璦教授	高国全教授	魏蕾教授
徐泱副主任医师	唐晓鹏教授	刘宝瑞教授	高英堂研究员	颜宏利副教授
许戈良教授	王凯教授	刘彬彬副研究员	管冬元副教授	于颖彦教授
严律南教授	王怡主任医师	刘云鹏教授	胡旭初副教授	余宏宇教授
杨柏霖副主任医师	魏来教授	沈克平主任医师	黄园教授	张锦生教授
杨家和主任医师	吴建国教授	肖文华主任医师	黄文林教授	赵景民教授
杨秋蒙副主任医师	吴君主任医师	熊斌教授	李刚教授	朱亮副教授
杨维良教授	宣世英教授	张凤春教授	李杰副教授	
伊力亚尔·夏合丁教授	杨江华副主任医师		李永哲副研究员	
殷正丰教授	杨林副研究员	消化影像学	李增山副教授	
于聪慧教授	姚鹏副教授	白彬主任医师	刘克辛教授	
于则利教授	张继明教授	陈克敏教授	梅林教授	
郁宝铭教授	张明辉副主任医师	官泳松教授	钱睿哲教授	
元云飞教授	张占卿主任医师	韩新巍教授	任超世研究员	
张佳林教授	赵桂鸣主任医师	李健丁教授	任浩副教授	
张进祥副教授	赵连三教授	龙学颖副主任医师	台桂香教授	
张俊副研究员	周霞秋教授	倪才方教授	谭学瑞教授	
张群华教授	朱传武主任医师	魏经国教授	田文静副教授	
张水军教授	庄林主任医师	肖恩华教授	田颖刚副研究员	
张宗明教授		徐爱民副教授	汪思应教授	
周伟平教授	消化中医药学	徐克教授	吴军研究员	
邹小明教授	蔡淦教授	严惟力副教授	吴俊华副教授	
	陈治水主任医师	扬业发教授	徐宁志研究员	
消化感染病学	杜群副研究员	杨建勇教授	许文燮教授	
陈国凤主任医师	黄恒青主任医师	赵卫主任医师	姚登福教授	
陈红松研究员	李军祥教授		阴赆宏研究员	
陈建杰教授	李康副教授	消化内镜及介入治疗学	郁卫东副研究员	
陈仕珠主任医师	李勇副教授	丁佑铭教授	喻荣彬副教授	
陈志辉副主任医师	李振华教授	郝俊鸣副主任医师	张青云研究员	
党双锁教授	刘成海研究员	潘林娜教授	张学教授	
丁惠国教授	刘孟安教授	孙明军教授	赵平副教授	
范建高教授	刘平教授	万军教授	周南进研究员	
范小玲主任医师	刘绍能主任医师	吴硕东教授	周士胜教授	
高润平教授				

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2010年3月8日 第18卷 第7期 (总第303期)

述 评	641 鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200诱导人肝癌细胞株凋亡的作用及机制 秦成勇, 刘慧
基础研究	646 丹皮酚联合5-FU对食管癌EC9706细胞增殖及凋亡的影响 冯怡锟, 付春景, 黄幼田, 赵继敏, 马俊芬 652 HH胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用及其机制 张传涛, 廖志航, 吴疆, 范昕建, 孟宪丽, 陈东辉 657 Met-RANTES干预实验性小鼠溃疡性结肠炎对MIP-3 α 及其受体CCR6的影响 张海峰, 钟万锬, 周国雄, 丁晓凌, 黄华
临床研究	664 NOS/NO体系在慢性肝炎及肝硬化患者中的表达 李睿, 张宁, 赵瑾, 徐丽红, 黎永军, 刘芳, 陈卫刚 669 脾动脉栓塞术对肝癌伴脾亢患者免疫功能的影响 马立辉, 周健, 史丽民, 胡大为, 王助新, 崔亮 676 胆固醇与胆结石的关系 席子明, 马远方 679 CT结肠造影的优势及关键技术 叶玉芳, 张淑倩, 李东辉, 王连庆, 周汝明, 刘蓉辉, 孙吉林
文献综述	685 非酒精性脂肪肝细胞损伤敏感性的机制 沈红, 柳涛, 张莉, 郑培永, 季光, 邢练军 689 Th17/Treg失衡与炎症性肠病的关系 葛婷, 唐志鹏, 王亮, 张亚利 695 肠黏膜屏障在炎症性肠病中作用机制的研究进展 毛靖伟, 王英德
研究快报	699 胃痛消痞方对脾胃虚寒型功能性消化不良大鼠胃肠动力和胃动素的影响 陈苏宁, 梁靓靓, 史业东 703 慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞超微结构的损伤 张丹, 夏志伟, 韩亚京 707 TNF- α 诱导肝干细胞凋亡及信号转导途径的改变 余科科, 汪思应 711 六棱菊提取物对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响 伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 施树云, 王建国, 杨雷香, 赵昱 716 不同抗生素对ICR小鼠肠道微生物体外转化黄豆苷原的影响 倪鑫, 郝庆红, 成志远, 樊进茹, 梁晓琳, 王秀伶
临床经验	722 原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜胃动素、血管活性肠肽的表达 高瑞梅, 许琳, 孟欣颖, 王青 726 胃镜活检组织 <i>kiss-1</i> 基因检测与肿瘤分期及预后的关系 徐夏, 张志强, 关晓军, 卢润章, 吴丹西, 郑丹

	730 中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的系统评价 盛颖玥, 邹晓平, 于成功, 吕瑛, 张丽莉
	736 梗阻性左半结直肠癌术前支架减压与急诊手术248例 徐琨, 张宏, 冯勇, 丛进春, 陈春生, 刘恩卿
	741 中药提取液体外抗肠道念珠菌的作用 邓洁华, 王刚生, 马耀辉, 史敏, 李波
附 录	744 《世界华人消化杂志》投稿须知 749 2010年国内国际会议预告
志 谢	750 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	656 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 675 《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布《世界华人消化杂志》2008年影响因子0.547 678 汤姆森-路透公布2008年 <i>WJG</i> 影响因子2.081 684 《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》 688 《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务 702 《世界华人消化杂志》修回稿须知 715 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》影响因子0.729 721 《世界华人消化杂志》计量单位标准 729 《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》
封面故事	伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 施树云, 王建国, 杨雷香, 赵昱. 六棱菊提取物对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 711-715 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/711.asp
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李瑞敏; 组版编辑 吴鹏朕; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李军亮; 形式规范 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2010-03-08

原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣

总 编 辑 马连生

编辑部主任 李军亮

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

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: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

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: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

印刷 北京科信印刷厂

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)

订购 全国各地邮电局

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: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

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。

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.baishideng.com/wjcd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2010年版版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 **ISSN 1009-3079**
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 **M 4481**

国内定价 每份56.00元 全年2016.00元

广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

March 2010 Contents in Brief Volume 18 Number 7

EDITORIAL	641 Apoptosis-inducing effect of synthetic chenodeoxycholic acid derivative, HS-1200, in human hepatoma cell line BEL-7402 and the mechanisms involved <i>Qin CY, Liu H</i>
BASIC RESEARCH	646 Effects of paeonol and 5-FU on the proliferation and apoptosis of human esophageal carcinoma EC9706 cells <i>Feng YK, Fu CJ, Huang YT, Zhao JM, Ma JF</i> 652 Anti-hepatitis B virus effects of HH Capsules <i>in vitro</i> and potential mechanisms involved <i>Zhang CT, Liao ZH, Wu J, Fan XJ, Meng XL, Chen DH</i> 657 Met-RANTES down-regulates the expression of MIP-3 α and CCR6 in the colon of mice with experimental ulcerative colitis <i>Zhang HF, Zhong WE, Zhou GX, Ding XL, Huang H</i>
CLINICAL RESEARCH	664 Peripheral and portal plasma iNOS activity and hepatic expression of iNOS in patients with chronic hepatitis or liver cirrhosis <i>Li R, Zhang N, Zhao J, Xu LH, Li YJ, Liu F, Chen WG</i> 669 Impact of splenectomy partial splenic embolization on immune function in patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism <i>Ma LH, Zhou J, Shi LM, Hu DW, Wang ZX, Cui L</i> 676 Relationship between blood total cholesterol and gallstones <i>Xi ZM, Ma YF</i> 679 Computed tomography colonography: advantages and main points <i>Ye YF, Zhang SQ, Li DH, Wang LQ, Zhou RM, Liu RH, Sun JL</i>
REVIEW	685 Pathogenesis of increased sensitivity of hepatocytes to injury in non-alcoholic fatty liver disease <i>Shen H, Liu T, Zhang L, Zheng PY, Ji G, Xing LJ</i> 689 Relationship between Th17/Treg imbalance and inflammatory bowel disease <i>Ge T, Tang ZP, Wang L, Zhang YL</i> 695 Advances in understanding the pathogenesis of mucosal barrier dysfunction in inflammatory bowel disease <i>Mao JW, Wang YD</i>
RAPID COMMUNICATION	699 Influence of Weitongxiaopi Decoction on gastrointestinal motility and plasma motilin levels in rats with functional dyspepsia caused by spleen-stomach deficiency-cold <i>Chen SN, Liang JJ, Shi YD</i> 703 Chronic water immersion-restraint stress-induced ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal in the rat gastric antrum <i>Zhang D, Xia ZW, Han YJ</i> 707 Tumor necrosis factor- α induces the apoptosis of hepatic stem cells by altering multiple signaling pathways <i>Yu KK, Wang SY</i> 711 <i>Laggera alata</i> extract prevents acetamidophenol-induced liver damage in mice <i>Wu YH, Hao BJ, Hu SQ, Shi SY, Wang JG, Yang LX, Zhao Y</i> 716 Effects of different antibiotics on daidzein biotransformation by intestinal microflora of ICR mice <i>in vitro</i> <i>Ni X, Hao QH, Cheng ZY, Fan JR, Liang XL, Wang XL</i>
CLINICAL PRACTICE	722 Expression of motilin and vasoactive intestinal peptide in gastric mucosa of patients with primary bile reflux gastritis <i>Gao RM, Xu L, Meng XY, Wang Q</i>

	726 Relationship of <i>kiss-1</i> gene expression with the TNM stage and prognosis in gastric cancer <i>Xu X, Zhang ZQ, Guan XJ, Lu RZ, Wu DX, Zheng D</i>
	730 Adjuvant treatment of severe acute pancreatitis with rhubarb: a systematic review <i>Sheng YY, Zou XP, Yu CG, Lv Y, Zhang LL</i>
	736 Comparison of the outcomes of preoperative stent insertion and emergency surgery in the treatment of obstructive left-sided colorectal cancer: an analysis of 248 cases <i>Xu K, Zhang H, Feng Y, Cong JC, Chen CS, Liu EQ</i>
	741 Antifungal effect of extracts of traditional Chinese herbs against intestinal <i>Candida in vitro</i> <i>Deng JH, Wang GS, Ma YH, Shi M, Li B</i>
APPENDIX	744 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology 749 Meeting events calendar in 2010
ACKNOWLEDGMENT	750 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Wu YH, Hao BJ, Hu SQ, Shi SY, Wang JG, Yang LX, Zhao Y. Laggera alata</i> extract prevents acetamidophenol-induced liver damage in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(7): 711-715 http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/711.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Rui-Min 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>

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 March 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*

鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200诱导人肝癌细胞株凋亡的作用及机制

秦成勇, 刘慧

秦成勇, 刘慧, 山东大学附属省立医院消化内科 山东省济南市 250021
秦成勇, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事肝癌预防及治疗的基础与临床研究.
作者贡献分布: 本述评由秦成勇与刘慧完成; 秦成勇审校.
通讯作者: 秦成勇, 主任医师, 教授, 250021, 山东省济南市经五路324号, 山东大学附属省立医院消化内科.
cy_qin62@yahoo.com.cn
电话: 0531-86881009
收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2010-01-25
接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-08

Apoptosis-inducing effect of synthetic chenodeoxycholic acid derivative, HS-1200, in human hepatoma cell line BEL-7402 and the mechanisms involved

Cheng-Yong Qin, Hui Liu

Cheng-Yong Qin, Hui Liu, Department of Gastroenterology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China
Correspondence to: Professor Cheng-Yong Qin, Department of Gastroenterology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, 324 Jingwu Road, Jinan 250021, Shandong Province, China. cy_qin62@yahoo.com.cn
Received: 2009-10-16 Revised: 2010-01-25
Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-08

Abstract

Chenodeoxycholic acid (CDCA) derivative HS-1200 can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human hepatoma BEL7402 cells in a dose- and time-dependent manner. In contrast, HS-1200 shows no apoptosis-inducing effect in normal human hepatic cell lines. HS-1200 induces the apoptosis of BEL7402 cells perhaps by up-regulating the expression of Bax protein and down-regulating the expression of Bcl-2 protein. The increased ratio of Bax to Bcl-2 might contribute to the permeabilization of the outer mitochondrial membrane (OMM) and make it permeable to intermembrane space proteins such as cytochrome C. Once released, cytochrome C promotes the activation of caspase-9 and thereby results in the activation of caspase-3,

which functions as the downstream effector of the cell death program. Furthermore, as caspase-8-specific inhibitor z-IETDfmk shows no impact on HS-1200-mediated apoptosis of BEL7402 cells, HS-1200 induces apoptosis perhaps via the activation of mitochondrial pathway.

Key Words: Chenodeoxycholic acid derivative; Hepatoma cell line; Apoptosis; Mechanism

Qin CY, Liu H. Apoptosis-inducing effect of synthetic chenodeoxycholic acid derivative, HS-1200, in human hepatoma cell line BEL-7402 and the mechanisms involved. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 641-645

摘要

鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200可有效地抑制肝肿瘤细胞株BEL7402的生长, 其作用随药物浓度提高和作用时间延长而增强, 呈一定的剂量、时间依赖性; 鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200对人肝肿瘤细胞株BEL7402有显著的生长抑制作用, 该生长抑制作用与HS-1200诱导肝肿瘤细胞凋亡有关; HS-1200对正常肝细胞株无生长抑制及诱导凋亡的作用. HS-1200诱导凋亡的机制可能是HS-1200提升Bax而降低Bcl-2的表达, 从而使线粒体膜通透性增高, 使细胞色素C由线粒体释放入胞质, 活化caspase-9, 活化的caspase-9切割pro-caspase-3生成caspase-3, 从而诱导凋亡; 但上述凋亡过程中caspase-8特异性抑制剂未改变HS-1200诱导的凋亡, 因而HS-1200诱导肝肿瘤细胞凋亡途径为内源性凋亡途径.

关键词: 鹅脱氧胆酸衍生物; 肝癌细胞株; 凋亡; 机制

秦成勇, 刘慧. 鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200诱导人肝癌细胞株凋亡的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18(7): 641-645
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/641.asp>

0 引言

原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,

背景资料

目前肝癌的治疗仍以手术切除为首选的治疗方法, 但手术切除的突出问题是术后复发率高、手术切除率低, 加上绝大多数患者在确诊时已属临床中晚期, 失去了手术治疗的机会, 因此, 人们不断研究出一些新的疗法, 或者采取多种疗法的综合治疗以提高肝癌的总体疗效. 在各种治疗方法中, 肝癌的化疗在肝癌的治疗中占有重要的地位. 但由于肝癌对化疗不敏感或由于连续化疗产生耐药性, 在多数肝癌患者中化疗有效率往往低于25%. 因而, 迫切需要创造出有效的治疗肝癌的化疗药物. 最近许多研究表明, 鹅脱氧胆酸衍生物能诱导多种癌细胞凋亡并能抑制其增殖, 如乳腺癌细胞、人前列腺癌细胞、人子宫颈癌细胞、及人骨肉瘤细胞等.

同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

相关报道
有报道疏水性胆汁酸如鹅脱氧胆酸在体内及体外实验中可诱导肝细胞凋亡。

占原发性肝肿瘤的80%-90%^[1]。在我国,自20世纪90年代以来肝癌的年病死率已上升为城市和农村恶性肿瘤病死率的第2位和第1位。目前肝癌的治疗仍以手术切除为首选的治疗方法,但手术切除的突出问题是术后复发率高、手术切除率低,加上绝大多数患者在确诊时已属临床中晚期,失去了手术治疗的机会。因此,人们不断研究出一些新的疗法,或者采取多种疗法的综合治疗以提高肝癌的总体疗效。在各种治疗方法中,肝癌的化疗在肝癌的治疗中占有重要的地位。但由于肝癌对化疗不敏感或由于连续化疗产生耐药性,在多数肝癌患者中化疗有效率往往低于25%^[2,3]。因而,迫切需要创造出有效的治疗肝癌的化疗药物。

胆汁酸是胆固醇的主要极性衍生物,他有助于饮食中脂质的吸收,并且能调整控制胆固醇体内平衡的基因表达。根据其化学结构的不同,不同胆汁酸表现出不同的生物效应^[4]。鹅脱氧胆酸可使胆固醇结石溶解,而胆酸及脱氧胆酸则无此作用。临床常用鹅脱氧胆酸及熊去氧胆酸治疗胆固醇结石。最近许多研究表明,鹅脱氧胆酸衍生物*N*-[(3 α ,5 β ,7 α)-3,7-二羟基-24-氧代胆甾烷-24-基] β -丙氨酸苄酯(HS-1200)和*N*-[(3 α ,5 β ,7 α)-3,7-二羟基-24-氧代胆甾烷-24-基]*L*-苯丙氨酸苄酯(HS-1199)能诱导多种癌细胞凋亡并能抑制其增殖,如乳腺癌细胞、人前列腺癌细胞、人子宫颈癌细胞、及人骨肉瘤细胞^[5-8]等;两种胆汁酸衍生物的效果,以HS-1200作用更强^[9]。另有报道疏水性胆汁酸如鹅脱氧胆酸在体内及体外实验中可诱导肝细胞凋亡^[10-14]。上述研究证明鹅脱氧胆酸衍生物具有诱导多种肿瘤细胞凋亡的作用,并且鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200对人肝肿瘤细胞株BEL7402有显著的生长抑制作用,该生长抑制作用与HS-1200诱导肝肿瘤细胞凋亡有关;HS-1200对正常肝细胞株无生长抑制及诱导凋亡的作用^[15]。

1 鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200对肝肿瘤细胞凋亡信号通路的作用及证据

我们应用人工合成的鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200作用于肝肿瘤细胞株BEL7402和正常肝细胞株L-02,发现他对肝肿瘤细胞株有明显的生长抑制作用,其抑制率具有明显的药物浓度依赖性和时间依赖性,而对正常肝细胞株则无生长抑制作用。这说明HS-1200可以有效地杀伤肝肿瘤细胞,对正常肝细胞则无杀伤作用,这为HS-1200

应用于临床治疗肝癌提供了实验依据。细胞凋亡是由于启动了细胞内的自杀程序,导致细胞核染色质浓缩,并聚集于细胞核周边,在被激活的内源性核酸内切酶作用下,染色质DNA规律性断裂为大量200 bp大小及其倍体的核苷酸片段,形成核碎片,同时细胞内发生一系列生化改变。最后,细胞膜包裹细胞质和核碎片,形成大小不一的凋亡小体(apoptosis bodies)。DNA断裂是凋亡细胞的特征之一,我们应用DNA琼脂糖凝胶电泳检测发现,经HS-1200处理的肝肿瘤细胞出现典型的DNA梯形带,说明细胞发生了凋亡。同时荧光显微镜下可观察到典型的细胞凋亡的形态特征,说明HS-1200抑制人肝肿瘤细胞的生长主要是通过诱导细胞凋亡实现的。了解细胞凋亡信号通路可有助于探讨癌症的发生机制进而发现更有效的治疗方法,因而我们进一步探讨HS-1200诱导肝肿瘤细胞凋亡的机制。目前认为细胞凋亡信号通路包括两条^[16]:(1)来自于细胞膜外的死亡受体(death receptors)信号通路:一些凋亡刺激因素激活细胞膜外死亡受体,死亡受体进一步活化膜上Fas相关的死亡结构域(fas associated death domain, FADD),结合并活化半胱氨酸天冬氨酸特异蛋白酶8(cysteine aspartate specific proteinase cysteine aspartases 8, caspase-8),活化的caspase-8进一步切割pro-caspase-3生成caspase-3,从而诱导凋亡;(2)线粒体信号通路:许多凋亡信号通过进入线粒体,诱导线粒体内的细胞色素C(cytochrome C, Cyto-C)等小分子释放到胞质,活化caspase-9,活化的caspase-9切割pro-caspase-3生成caspase-3,从而诱导凋亡。这一过程中,Bcl-2, Bcl-xL等抑制这一过程,而Bax, BNIP3等促进这一过程。

1.1 Bcl-2家族与细胞凋亡 线虫是良好的研究细胞凋亡的模型,最早在凋亡中发现ced-9基因具有抗凋亡作用,在哺乳动物中与之同源的是Bcl-2家族。而Bcl-2基因首先在人体内的B淋巴细胞中发现^[17]。Bcl-2家族是凋亡信号通路中最重要的蛋白家族之一,在哺乳动物中,迄今发现28个成员,按功能可以分为三类:(1)Bcl-2亚家族(抗凋亡亚家族),这类亚家族成员包括Bcl-2, Bcl-xL^[18], Bcl-W^[19]等;(2)Bax亚家族(促凋亡亚家族),主要包括Bax^[20], Bcl-Xs等;(3)BH₃ only亚家族,这类亚家族成员也是促凋亡性的,由于其功能结构域中仅仅包含BH₃结构域,故命名为BH₃ only亚家族,目前发现该家族成员包括Bid^[21,22], Bad, Blk, P193, NOXA等。按结构上

划分, Bcl-2蛋白家族成员都有4个关键性结构域(BH₁-BH₄), 他们在Bcl-2家族中高度保守. 而且Bcl-2家族蛋白都拥有一个C末端跨膜结构域(TM), 他是促进蛋白质与线粒体结合的关键性部位. 他存在于BH₁和BH₄之间. 按功能上可以分为两大类, 促凋亡和抗凋亡. 尤其是BH₄结构域仅存在于Bcl-2家族中抗凋亡成员中, 如Bcl-2, Bcl-xL, 而在促凋亡成员中都不存在BH₄结构域, 表明BH₄结构域对于Bcl-2家族抗细胞凋亡起到关键性作用. 相反, BH₁和BH₂主要是蛋白质间相互作用的区域, 尤其是Bcl-2家族蛋白中, 抗凋亡和促凋亡成员之间的相互作用所需要的结构域. 另外, 在促凋亡成员中也有许多成员, 仅仅包含BH₃结构域, 称为BH₃亚家族. 因此, 通常认为BH₃是Bcl-2家族中促凋亡的关键结构域. 而Bax亚家族成员都包含有BH₁, BH₂和BH₃三个结构域. 已经证明Bcl-2家族成员与线粒体膜通透性相关并调结膜的完整性^[23]. Bcl-2家族中促凋亡成员如Bax, 一般认为通过破坏线粒体功能, 导致线粒体通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)的开放^[24], 使线粒体内的一些小分子物质, 如Cyto-C, smac渗漏到胞质, 从而诱导细胞凋亡^[25-27]. 当给一定的凋亡刺激时, 这些蛋白转位之线粒体膜上, 诱导PTP开放. 已经发现Bax与PTP孔的形成单位VDAC或ANT存在直接相互作用的关系^[28]; 相反, Bcl-2可以阻断PTP开放从而抑制细胞凋亡^[25-27]. 其机制是Bcl-2直接或间接抑制VDAC或通过破坏Bax与VDAC或ANT的相互作用. 在凋亡过程中, Bax表达水平升高能通过抑制Bcl-2的活性而诱导凋亡^[29]; 在药物诱导的凋亡过程中, Bcl-2与Bax的比率的提高较单纯Bcl-2的表达升高, 使细胞存活方面发挥更为重要的作用^[30]. 我们研究表明经HS-1200处理的肝肿瘤细胞, 其Bax的表达水平增高而Bcl-2的表达降低, 使得Bax与Bcl-2的比率明显升高, Bax不仅发挥其诱导凋亡作用, 而且抑制Bcl-2抗凋亡作用, 因而肝肿瘤细胞的线粒体膜电位降低, 线粒体膜电位的降低提示肝肿瘤细胞经HS-1200处理后细胞线粒体外膜通透性发生了变化; 上述表明Bax与Bcl-2比率的提高与线粒体外膜通透性增高有关.

1.2 线粒体与细胞凋亡 线粒体是细胞的一个独特而重要的细胞器, 是细胞的“动力工厂”. 新近研究表明, 线粒体功能改变与细胞凋亡密切相关, 包括促凋亡因子、活性氧(ROS)过度生成、能量生成障碍、胞质内钙失衡等. 在线

粒体的细胞凋亡通路中, 线粒体扮演着重要角色, (1)释放caspases激活因子如Cyto-C; (2)丧失电子传递链功能, ATP生成减少, 细胞能量不平衡; (3)线粒体膜电位消失, 诱导细胞凋亡的产生; (4)承载着Bcl-2家族蛋白调节细胞凋亡的功能. 同时, 在多种诱导凋亡的因素, 物理化学、生化等外界因素、细胞内的氧化应激凋亡的反应等, 都与线粒体直接相关. 上述表明, 线粒体在细胞凋亡中处于中心位置. 线粒体释放Cyto-C, 是caspase自身正反馈激活链中关键步骤, 受Bcl-2蛋白家族调控^[25,26]. 线粒体在细胞凋亡过程中最重要的一点在于他可释放能够激活Caspase的蛋白^[31]. 在无细胞的体系中, 自发的、可以由Bcl-2抑制的染色质聚集和DNA片段化依赖于线粒体的存在, 进而发现实际上是依赖于Cyto-C从线粒体中的释放. 从线粒体释放的Cyto-C与Apaf-1、Procaspase-9结合在一起形成“凋亡体”(Apoptosome), 其结果是caspase-9的激活^[32]. 除Cyto-C之外, 线粒体还可释放其他介导细胞凋亡的分子: Procaspase-3和AIF(Apoptosis-inducing factor). AIF在体外可作用于Procaspase 3, 并且其本身可能就是一个caspase. 线粒体发生上述改变的机制在于线粒体膜上一种叫PT通道(permeability transition pore)的形成. 促凋亡信号会使caspases激活(某些Caspase的底物就是位于线粒体膜上的蛋白)、胞质Ca²⁺水平升高、产生Ceramide, 诸如此类的改变会直接或间接地引发PT通道. PT通道是由线粒体一些内膜外膜蛋白组成的, 定位于内外膜接触点, 并可以无选择性地允许≤1.5 kDa分子通过^[33]. 这个通道的开放会由于线粒体基质内的高渗透压, 使线粒体内外H⁺梯度消失, 呼吸链脱耦联, 能量产生中断; 还会由于水和溶质的进入使基质肿胀并导致外膜破裂, 释放出包括Cyto-C在内的各种活性蛋白^[34,35]. 线粒体在细胞凋亡中的重要性还在于他与Bcl-2基因家族之间的关系. 实际上, 很多Bcl-2家族的蛋白如Bcl-2、Bax、BCL-xL等都定位于线粒体膜上. 而且实验证实, Bcl-2家族蛋白可以影响PT通道开放及其Cyto-C、AIF的释放, 还可以改变线粒体外膜的通透性^[36,37]. 如Bax一方面可以直接促使线粒体膜内的大小约为12 kDa的Cyto-C在外膜未被破坏的情况下通过某种通道释放至胞质; 另一方面, 又可以激发PT通道的开放. 而Bcl-2蛋白则起抑制作用.

Bcl-2蛋白家族成员, 在线粒体膜上形成同源或异源二聚体, 直接决定细胞的命运. 如促

应用要点
本文提示: 鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200有望成为治疗肝癌的药物.

同行评价
本文系统综述了鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200的生物学意义及对肝癌细胞株的作用及机制,对国内同行具有一定的参考和指导意义。

凋亡蛋白Bax转位至线粒体膜上,自身形成同源二聚体,打开PTP孔,诱导Cyto-C,凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)等从线粒体释放至胞质^[38,39]。在胞质中Cyto-C与Apaf-1,以及pro-caspase-9共同结合在一起形成“凋亡体(apoptosome)”,激活caspase-9,进一步活化caspase-3,执行细胞凋亡。然而,如果抗凋亡蛋白Bcl-2在线粒体外膜上高表达,一方面与Bax结合,抑制Cyto-C释放的正反馈机制;另一方面,他有“质子泵”的功能,使线粒体内呼吸产生的H⁺外泵至胞质,维持跨膜电位 $\Delta\psi_m$,减少ROS生成,抑制细胞凋亡。许多证据认为线粒体内Cyto-C的释放是细胞凋亡发生的重要一步;Cyto-C从线粒体内膜空间的正常位置释放后,使得线粒体外膜通透性、膜电位以及超微结构都发生了改变。线粒体基本功能的改变以及线粒体膜通透性的变化,在细胞凋亡的调节中起了重要作用。

2 结论

肝肿瘤细胞经HS-1200处理后发生了细胞程序性死亡,其机制如下:HS-1200处理后肝肿瘤细胞中促凋亡蛋白Bax明显升高,而抗凋亡蛋白Bcl-2的表达明显降低,因而Bax与Bcl-2的比率大大提高,Bax的促凋亡作用不仅增强,而且限制Bcl-2的抗凋亡作用;Bcl-2家族蛋白表达情况的变化引发线粒体PT通道的开放,这个通道的开放会由于线粒体基质内的高渗透压,使线粒体内外H⁺梯度消失,呼吸链脱耦联,能量产生中断;还会由于水和溶质的进入使基质肿胀并导致外膜破裂,释放出包括Cyto-C在内的各种活性蛋白。我们研究发现HS-1200处理后肝肿瘤细胞的线粒体膜电位丧失并有Cyto-C由线粒体释放入胞质,验证了Bcl-2家族蛋白表达情况的变化引发的线粒体结构和功能的改变。线粒体基本功能的改变以及线粒体膜通透性的变化,在细胞凋亡的调节中发挥重要作用。Western blot结果表明Apaf-1、cleaved-caspase-9和cleaved-caspase-3的蛋白表达水平明显升高,而pro-caspase-8的表达无变化;并且,流式细胞学检测发现鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200诱导肝肿瘤细胞BEL7402凋亡可被caspase-9抑制剂抑制,而不被caspase-8抑制剂抑制。上述结果证明,Cyto-C进入胞质中,则以dATP/ATP依赖的方式与Apaf-1结合,形成低聚体并激活caspase-9前体;结果激活caspase-9并进一步导致

下游的效应caspase-3激活,最终导致细胞凋亡。鹅脱氧胆酸衍生物HS-1200有望成为治疗肝癌的药物。

3 参考文献

- 1 Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: S5-S16
- 2 Simonetti RG, Liberati A, Angiolini C, Pagliaro L. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Ann Oncol* 1997; 8: 117-136
- 3 Weimann A, Oldhafer KJ, Pichlmayr R. Primary liver cancers. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 387-396
- 4 Hofmann AF. Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* 1984; 4: 4S-14S
- 5 Im EO, Choi YH, Paik KJ, Suh H, Jin Y, Kim KW, Yoo YH, Kim ND. Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer Lett* 2001; 163: 83-93
- 6 Choi YH, Im EO, Suh H, Jin Y, Yoo YH, Kim ND. Apoptosis and modulation of cell cycle control by synthetic derivatives of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in human prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2003; 199: 157-167
- 7 Kim GC, Her YS, Park JH, Mon YS, Yoo YH, Shin SH, Park BS. Synthetic bile acid derivative HS-1200-induced apoptosis of human osteosarcoma cells. *Korean J Anat* 2004; 37: 449-457
- 8 Im E, Choi SH, Suh H, Choi YH, Yoo YH, Kim ND. Synthetic bile acid derivatives induce apoptosis through a c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB-dependent process in human cervical carcinoma cells. *Cancer Lett* 2005; 229: 49-57
- 9 Yee SB, Yeo WJ, Park BS, Kim JY, Baek SJ, Kim YC, Seo SY, Lee SH, Kim JH, Suh H, Kim ND, Lim YJ, Yoo YH. Synthetic chenodeoxycholic acid derivatives inhibit glioblastoma multiform tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2005; 27: 653-659
- 10 Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Roberts PJ, Svingen PA, Kaufmann SH, Gores GJ. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 1999; 103: 137-145
- 11 Becker S, Reinehr R, Graf D, vom Dahl S, Häussinger D. Hydrophobic bile salts induce hepatocyte shrinkage via NADPH oxidase activation. *Cell Physiol Biochem* 2007; 19: 89-98
- 12 Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology* 1999; 117: 669-677
- 13 Yerushalmi B, Dahl R, Devereaux MW, Gumprich E, Sokol RJ. Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology* 2001; 33: 616-626
- 14 Chieco P, Romagnoli E, Aicardi G, Suozzi A, Forti GC, Roda A. Apoptosis induced in rat hepatocytes by in vivo exposure to taurochenodeoxycholate. *Histochem J* 1997; 29: 875-883
- 15 Liu H, Qin CK, Han GQ, Xu HW, Ren WH, Qin CY. Synthetic chenodeoxycholic acid derivative, HS-1200, induces apoptosis of human hepatoma

- cells via a mitochondrial pathway. *Cancer Lett* 2008; 270: 242-249
- 16 Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 139-163
- 17 Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-1443
- 18 Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, Thompson CB. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608
- 19 Gibson L, Holmgren SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM, Cory S. bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 1996; 13: 665-675
- 20 Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* 1995; 14: 5589-5596
- 21 Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 1995; 374: 736-739
- 22 Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 1996; 10: 2859-2869
- 23 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326
- 24 Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1182-1191
- 25 He J, Xiao Y, Casiano CA, Zhang L. Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in coronary artery endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 896-903
- 26 Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4997-5002
- 27 Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998; 391: 496-499
- 28 Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341 (Pt 2): 233-249
- 29 Noguchi K, Kitanaka C, Yamana H, Kokubu A, Mochizuki T, Kuchino Y. Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1999; 274: 32580-32587
- 30 Salomons GS, Brady HJ, Verwijs-Janssen M, Van Den Berg JD, Hart AA, Van Den Berg H, Behrendt H, Hählen K, Smets LA. The Bax alpha:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia. *Int J Cancer* 1997; 71: 959-965
- 31 Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-290
- 32 Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999; 13: 3179-3184
- 33 Zoratti M, Szabò I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241: 139-176
- 34 Javadov S, Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 1-22
- 35 Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6353-6364
- 36 Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Mase B, Kroemer G. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett* 1996; 384: 53-57
- 37 Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res* 2007; 17: 759-771
- 38 Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ, Shore GC. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 1998; 143: 207-215
- 39 Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 1998; 17: 3878-3885

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

丹皮酚联合5-FU对食管癌EC9706细胞增殖及凋亡的影响

冯怡锟, 付春景, 黄幼田, 赵继敏, 马俊芬

背景资料
丹皮酚是牡丹皮的主要活性成分, 具有广泛的药理活性, 包括解热、镇痛、抗菌消炎、抗动脉粥样硬化、抑制血小板聚集及增强细胞免疫功能和抗氧化作用。近年来研究发现, Pae有一定的抗肿瘤活性, 体外实验发现他对多种肿瘤细胞株有增殖抑制作用, 灌胃给药对小鼠肝肿瘤有抑制作用。

冯怡锟, 付春景, 黄幼田, 赵继敏, 马俊芬, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室 河南省郑州市 450052
冯怡锟, 2007级郑州大学基础医学院病理学与病理生理学专业硕士, 主要从事细胞凋亡方面的研究。
作者贡献分布: 此课题由付春景与冯怡锟设计; 研究过程由冯怡锟操作完成; 实验中得到黄幼田、赵继敏及马俊芬技术支持; 数据分析及论文写作由冯怡锟与付春景完成。
通讯作者: 付春景, 教授, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学基础医学院病理生理学教研室, fujing@zzu.edu.cn
电话: 0371-67100981
收稿日期: 2009-12-08 修回日期: 2010-02-08
接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-08

Effects of paeonol and 5-FU on the proliferation and apoptosis of human esophageal carcinoma EC9706 cells

Yi-Kun Feng, Chun-Jing Fu, You-Tian Huang, Ji-Min Zhao, Jun-Fen Ma

Yi-Kun Feng, Chun-Jing Fu, You-Tian Huang, Ji-Min Zhao, Jun-Fen Ma, Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Correspondence to: Professor Chun-Jing Fu, Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. fujing@zzu.edu.cn
Received: 2009-12-08 Revised: 2010-02-08
Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of paeonol alone or in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on the proliferation and apoptosis of human esophageal carcinoma EC9706 cells.

METHODS: Six different concentrations of paeonol (7.81, 15.63, 31.25, 62.50, 125.00 and 250.00 mg/L, respectively), three different concentrations of 5-FU (12.50, 25.00 and 50.00 mg/L, respectively), and paeonol (31.25 mg/L) in combination with 5-FU (12.50 mg/L) were used to treat EC9706 cells for different durations (24, 48 and 72 h). Untreated EC9706 cells were used as the control group. The proliferation of EC9706 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay after treatment for different durations. After treatment of EC9706 cells with paeonol at concentrations of 31.25, 62.50, 125.00

and 250.00 mg/L for 72 hours, the cell cycle was analyzed by flow cytometry; cell morphological changes were observed using an inverted microscope; the morphology of apoptotic cells was observed by HE staining and light microscopy. The expression of apoptosis-associated proteins Bcl-2 and Bax was detected by immunocytochemistry after treatment of EC9706 cells with paeonol (31.25 mg/L) and 5-FU (12.50 mg/L), alone or in combination, for 48 hours.

RESULTS: Paeonol or 5-FU could significantly inhibit the proliferation of EC9706 cells in a concentration- and time-dependent manner (both $P < 0.05$). Paeonol in combination with 5-FU showed more significant inhibitory effects on the proliferation of EC9706 cells when compared with paeonol or 5-FU alone (both $P < 0.05$). Paeonol (125.00 mg/L) treatment altered the cell cycle distribution of EC9706 cells: the percentages of cells in G_0/G_1 and G_2/M phases decreased, while that of cells in S phase increased (G_0/G_1 phase: $21.18\% \pm 2.28\%$ vs $62.17\% \pm 5.23\%$; G_2/M phase: $0.76\% \pm 0.54\%$ vs $9.92\% \pm 3.10\%$; S phase $78.06\% \pm 2.82\%$ vs $27.91\% \pm 2.13\%$; all $P < 0.05$). Typical apoptotic changes were observed in EC9706 cells treated with paeonol. Both paeonol and 5-FU down-regulated the expression of Bcl-2 and up-regulated the expression of Bax, which was especially prominent in the combination group (2.21 ± 0.14 vs 5.67 ± 0.30 and 4.22 ± 0.34 ; 8.55 ± 0.33 vs 3.90 ± 0.27 and 6.28 ± 0.26 , all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Paeonol can significantly inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human esophageal carcinoma EC9706 cells. Paeonol in combination with 5-FU shows a synergistic effect in suppressing the proliferation and promoting the apoptosis of EC9706 cells.

Key Words: Paeonol; 5-Fluorouracil; Esophageal carcinoma; Proliferation; Apoptosis; Bcl-2; Bax

Feng YK, Fu CJ, Huang YT, Zhao JM, Ma JF. Effects of paeonol and 5-FU on the proliferation and apoptosis of human esophageal carcinoma EC9706 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 646-651

同行评议者
马大烈, 教授, 上海第二军医大学长海医院病理科

摘要

目的: 探讨丹皮酚(paeonol, Pae)单独及联合5-FU对人食管癌EC9706细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用。

方法: 采用6种浓度的Pae(7.81、15.63、31.25、62.50、125.00、250.00 mg/L)、3种浓度的5-FU(12.50、25.00、50.00 mg/L)及Pae(31.25 mg/L)和5-FU(12.50 mg/L)联合分别处理EC9706细胞24、48、72 h, 同时设对照组(细胞不做处理), 采用MTT法检测各个时间段细胞的增殖情况; 采用流式细胞术检测4种浓度的Pae(31.25、62.50、125.00、250.00 mg/L)处理EC9706细胞72 h后细胞周期的变化; 倒置显微镜下观察各Pae组细胞各时间段形态学变化, HE染色光镜下观察凋亡细胞; 采用免疫细胞化学法检测经Pae(31.25 mg/L)、5-FU(12.50 mg/L)单独和联合作用48 h后细胞中凋亡相关蛋白Bcl-2及Bax的表达。

结果: Pae、5-FU可明显抑制EC9706细胞增殖, 并随着浓度的增加和作用时间的延长而增强($P<0.05$), Pae与5-FU联合用药比单用Pae或5-FU抑制效果更明显($P<0.05$); Pae作用后EC9706细胞中G₀/G₁期和G₂/M期细胞比例下降, S期细胞比例上升(Pae 125.00 mg/L组: G₀/G₁期21.18%±2.28% vs 62.17%±5.23%、G₂/M期0.76%±0.54% vs 9.92%±3.10%、S期78.06%±2.82% vs 27.91%±2.13%, 均 $P<0.05$); HE染色光镜下可见典型的肿瘤细胞凋亡改变; Pae、5-FU可下调EC9706细胞中Bcl-2蛋白表达, 同时增强EC9706细胞中Bax蛋白的表达, 联合用药组较单药组作用更为明显(2.21±0.14 vs 5.67±0.30, 4.22±0.34; 8.55±0.33 vs 3.90±0.27, 6.28±0.26, 均 $P<0.05$)。

结论: Pae可明显抑制人食管癌EC9706细胞的增殖, 促进其凋亡, Pae联合5-FU作用更为明显。

关键词: 丹皮酚; 5-氟尿嘧啶; 食管癌; 增殖; 凋亡; Bcl-2; Bax

冯怡锴, 付春景, 黄幼田, 赵继敏, 马俊芬. 丹皮酚联合5-FU对食管癌EC9706细胞增殖及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 646-651
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/646.asp>

0 引言

食管癌是世界上最常见的六大恶性肿瘤之一, 严重威胁着人类的健康, 其死亡率居整个肿瘤死亡的第6位^[1]. 中国是世界上食管癌发病率和

死亡率最高的国家, 河南省又是中国食管癌发病率和病死率最高的地区. 食管鳞癌侵袭性强, 预后差, 临床进展迅速, 多伴有淋巴结转移, 且易复发. 化疗药5-FU是食管癌治疗中最常用的药物之一, 但是逐渐出现的耐药却成为治疗中的一个难题, 而且5-FU的不良反应较多, 限制了其临床应用及疗效的进一步提高, 因此临床上主张联合用药. 丹皮酚(paeonol, Pae)是牡丹皮的主要活性成分, 具有广泛的药理活性, 包括解热、镇痛、抗菌消炎、抗动脉粥样硬化、抑制血小板聚集及增强细胞免疫功能和抗氧化作用^[2-7]. 近年来研究发现, Pae有一定的抗肿瘤活性, 体外实验发现他对多种肿瘤细胞株有增殖抑制作用, 灌胃给药对小鼠肝肿瘤有抑制作用^[8-11]. 本研究旨在探讨Pae和5-FU联合应用对人食管癌EC9706细胞的抑制作用, 为Pae临床应用于食管癌的治疗提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌EC9706细胞株, 由中国医学科学院肿瘤医院研究所分子肿瘤学国家重点实验室惠赠; RPMI 1640购于美国Gibco公司; 胎牛血清购于杭州赛乐生物科技有限公司; 胰蛋白酶购于美国Hykelone公司; Pae购自南京金陵药业股份有限公司; 5-FU购自上海旭东海普药业有限公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于Amresco公司; 二甲基亚砜(DMSO)购于美国Sigma公司; 碘化丙啶(PI)购于美国Sigma公司; RNaseA购于天根生化科技有限公司; Bcl-2抗体、Bax抗体、通用型免疫组织化学(SP)染色试剂盒、DAB显色试剂盒均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 食管癌EC9706细胞于RPMI 1640培养液(含100 mL/L胎牛血清, 100 kU/L青霉素和100 kU/L链霉素), 37℃、50 mL/L CO₂细胞培养箱内贴壁培养. 隔天换液, 2-3 d传代1次, 取对数生长期细胞进行以下实验。

1.2.2 MTT法: 按文献描述的方法进行实验^[12], 设不同浓度药物实验组、细胞对照组和空白对照组, 取对数生长期细胞 6×10^7 /L接种于96孔板上, 每组设3个复孔, 每孔接种100 μL, 置37℃、50 mL/L CO₂细胞培养箱中继续培养24 h后, 弃上清, 实验组每孔分别加入200 μL培养液稀释的药物(Pae终浓度为7.81、15.63、31.25、62.50、125.00、250.00 mg/L, 5-FU终浓度为12.50、25.00、50.00 mg/L, 联用组终浓度为Pae 31.25

研发前沿
本研究为Pae的临床应用提供了实验依据, 为食管癌患者的中药防治、改善预后和提高生活质量开辟了一条新途径, 但具体用法和剂量还有待进一步研究。

相关报道
有研究发现Pae对多种体外培养的肿瘤细胞有增殖抑制作用, 体内应用有抗肿瘤作用.

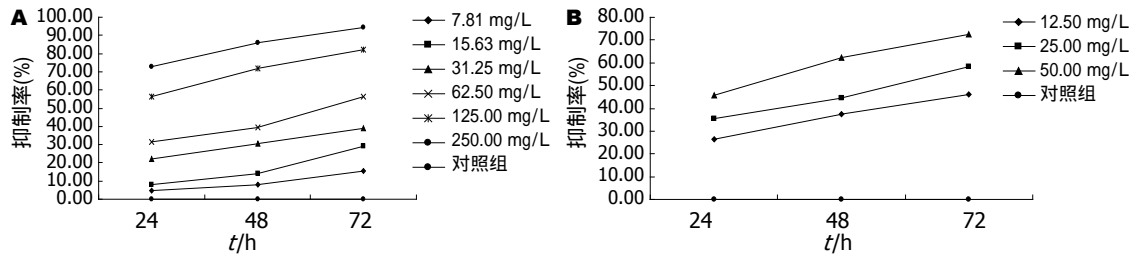


图1 Pae、5-FU不同浓度各时间对EC9706细胞的抑制率. A: Pae; B: 5-FU.

mg/L+5-FU 12.50 mg/L, 两药合用的比例为1:1方案), 细胞对照组和空白对照组只加入等量的培养液, 分别继续培养24、48、72 h, 在终止培养前4 h实验组及对照组每孔加入20 μ L MTT(5 g/L), 再培养4 h后, 小心吸弃上清, 加入150 μ L DMSO溶解MTT沉淀, 用振荡器振荡10 min, 待紫色结晶完全溶解, 酶标仪上570 nm波长处测定吸光度值(A值). 按下式计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率: 肿瘤细胞生长抑制率(%) = [1-(实验组A值-空白对照组A值)/(细胞对照组A值-空白对照组A值)] \times 100%.

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期: 消化收集各实验组(Pae浓度分别为31.25、62.50、125.00、250.00 mg/L)及对照组培养72 h的细胞, 3 000 r/min离心10 min, PBS漂洗, 200目滤网过滤, 调整单细胞悬液浓度为 1×10^9 /L. 体积分数为700 mL/L的预冷乙醇固定, PBS漂洗, 加入RNase 37 $^{\circ}$ C水浴30 min, 再加入PI染液4 $^{\circ}$ C避光染色30 min, 上机(激发波长488 nm)检测细胞周期.

1.2.4 细胞形态学观察: 倒置显微镜下观察: 取对数生长期EC9706细胞消化传代并延续培养24 h后换含不同浓度Pae(7.81-250 mg/L)的培养液继续培养, 对照组只加等量培养液培养, 倒置显微镜下连续观察细胞生长情况; HE染色: 将细胞涂片用冷丙酮4 $^{\circ}$ C固定20 min, 自然晾干, 水化后用5 mL/L Triton-X 100 PBS溶液处理10 min, 水化后Gill苏木精染2 min, 10 mL/L盐酸乙醇处理1 s, 42 $^{\circ}$ C温水蓝化10 min, 伊红染2 s, 常规脱水封片后光镜下观察形态学变化.

1.2.5 免疫细胞化学法检测凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax的表达: 取对数生长期的EC9706细胞用胰酶消化, 加1640培养液制成 1.5×10^8 /L的细胞悬液, 取24孔板放入已消毒玻片, 每孔加0.4 mL细胞悬液, 培养24 h待其贴壁后分为实验组和对照组, 其中实验组分别加入0.5 mL培养液稀释的药物(Pae 31.25 mg/L、5-FU 12.50 mg/L、Pae 31.25 mg/L+5-FU 12.50 mg/L, 两药合用的比例为1:1

方案), 对照组加入等量培养液. 培养48 h后吸弃孔内液体, PBS洗3次, 每次3 min, 40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次, 每次3 min, 取出盖玻片细胞面朝上晾干后用中性树胶固定于载玻片上, PBS洗3次, 每次3 min, 0.3% Triton-X 100(1 g/L柠檬酸钠配制)冰浴中孵育30 min, 其余步骤按SP试剂盒操作说明进行, 每次实验均以PBS代替一抗做阴性对照. 最后DAB显色, 光学显微镜下观察, 摄片.

1.2.6 免疫细胞化学结果判定: Bcl-2、Bax蛋白阳性信号呈棕黄色颗粒样物质, 主要位于细胞质内. 高倍镜下随机选取10个视野(每个视野观察细胞数不少于100个), 按阳性细胞所占百分比及着色深浅进行结果判定^[13]. 评分标准: (1) 阳性细胞数计分: <1%为0分; 1%-25%为1分; 26%-50%为2分; 51%-75%为3分; >76%为4分; (2) 细胞着色强度计分: 无显色为0分; 淡黄色为1分; 棕黄色为2分; 棕褐色为3分. 最后综合两部分得分进行综合评分.

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件进行统计学处理, 计量资料采用mean \pm SD表示, 采用单因素方差分析, 以 $\alpha = 0.05$ 为显著性标准, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 Pae、5-FU单药对EC9706细胞的增殖抑制作用 与对照组相比, Pae和5-FU各单药组均对EC9706细胞的增殖有明显的抑制作用(均 $P < 0.05$), 药物浓度越高, 作用时间越长, 其抑制作用越强(均 $P < 0.05$, 图1).

2.2 Pae、5-FU联用对EC9706细胞的增殖抑制作用 与对照组相比, Pae与5-FU联用组明显抑制EC9706细胞的增殖($P < 0.05$), 且其抑制作用强于各同浓度单药组(均 $P < 0.05$, 图2).

2.3 Pae对人食管癌细胞EC9706细胞周期的影响 当EC9706细胞经系列浓度Pae作用72 h后, 细胞周期分布受到干扰, 与细胞对照组相比, 用药组

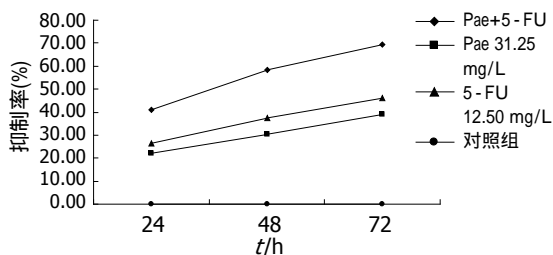


图 2 Pae、5-FU单独及联合应用不同时间对EC9706细胞的抑制率。

表 1 Pae对食管癌EC9706细胞周期的影响 (mean ± SD)

分组	细胞周期分布(%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	62.17 ± 5.23	27.91 ± 2.13	9.92 ± 3.10
Pae(mg/L)			
31.25	60.35 ± 1.51	39.48 ± 1.54 ^a	0.17 ± 0.04 ^a
62.5	42.49 ± 1.18 ^{bc}	56.42 ± 0.78 ^{bc}	1.09 ± 0.41 ^a
125	21.18 ± 2.28 ^{bc}	78.06 ± 2.82 ^{bc}	0.76 ± 0.54 ^a
250	17.80 ± 4.40 ^a	80.74 ± 3.88 ^b	1.46 ± 0.68 ^a

^aP<0.05 vs 对照组; ^bP<0.05 vs 邻近上组。

G₀/G₁期和G₂/M期细胞比例下降, S期细胞比例上升(均P<0.05)。而且Pae浓度越高, S期细胞比例也越高, S期细胞周期阻滞作用表现出剂量依赖性(P<0.05, 表1)。

2.4 细胞形态学观察 倒置显微镜下观察, 对照组EC9706细胞增殖旺盛, 呈多边形贴壁生长, 胞体大、折光率高, 随着时间延长无明显变化。药物作用24 h后, Pae 7.81、15.63 mg/L组与对照组相比无明显差别, Pae 31.25-250.00 mg/L组细胞增殖减慢, 可见部分细胞变小、变圆, 折光率下降, 贴壁能力降低(贴壁不牢); 药物作用48 h后, 各用药组细胞均可见上述变化, 而且更明显, 细胞间接触变松, 部分细胞浮起; 药物作用72 h后, 各用药组细胞逐渐脱离培养瓶壁, 悬浮于培养液中, 药物浓度越高, 漂浮细胞的数量就越多, Pae 125.00 mg/L组和250.00 mg/L组除少量圆形完整细胞外, 还可见大量悬浮的细胞碎片。HE染色, 对照组正常细胞染色体呈均匀淡蓝色或蓝色, 未见凋亡小体。用药组中Pae 31.25-250.00 mg/L组出现较多的凋亡细胞, 表现为细胞体积缩小, 核固缩、核碎裂、染色变深, 部分裂解形成凋亡小体。而坏死细胞肿胀, 细胞膜呈连续性破坏, 核呈淡蓝色, 甚至蓝色消失。

2.5 Pae、5-FU单独及联合应用对EC9706细胞

表 2 Pae、5-FU单独及联合应用对食管癌EC9706细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的影响 (mean ± SD)

分组	Bcl-2	Bax
对照组	7.54 ± 0.19	2.10 ± 0.17
Pae 31.25 mg/L	5.67 ± 0.30 ^a	3.90 ± 0.27 ^a
5-FU 12.5 mg/L	4.22 ± 0.34 ^a	6.28 ± 0.26 ^a
Pae 31.25 mg/L+ 5-FU 12.5 mg/L	2.21 ± 0.14 ^{bc}	8.55 ± 0.33 ^{bc}

^aP<0.05 vs 对照组; ^bP<0.05 vs 各单药组。

凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax表达的影响 Bcl-2、Bax的表达主要位于细胞质, 阳性细胞胞质被染成黄色或棕黄色, 阴性细胞胞质为蓝色。对照组Bcl-2蛋白表达率最高, Bax蛋白表达率最低, 各实验组Bcl-2蛋白表达率均有所下降, Bax蛋白表达率均有所上升, 以联合用药组最为显著, 各实验组与对照组相比差异均有统计学意义(均P<0.05), 联合用药组与各单药组相比差异均具有显著性(均P<0.05, 表2, 图3)。

3 讨论

Pae又称牡丹酚, 是毛茛科植物牡丹(paeonia suffruticosa andr)根皮和萝摩科植物长徐长卿干燥根或全草的主要有效成分。Pae是一种小分子的酚类化合物, 呈白色针状结晶, 具有熔点低(51 °C ± 1 °C)、易挥发及水溶性差的特性^[14-16]。其相对分子质量为166.18 Da, 分子式为C₉H₁₀O₃, 化学名2-羟基-4-甲氧基苯乙酮^[17]。有研究发现Pae对多种体外培养的肿瘤细胞有增殖抑制作用, 体内应用有抗肿瘤作用^[8-11]。本实验以食管癌EC9706细胞为研究对象, 进一步探讨Pae单独及和5-FU联合应用抗肿瘤的可能性。结果显示, Pae和5-FU单独应用对EC9706细胞的增殖均有抑制作用, 随着药物浓度的升高和作用时间的延长, 抑制细胞增殖的作用逐渐增强。Pae与5-FU联合应用对EC9706细胞有协同抑制作用, 抑制率较单用其中一种药物时显著提高。流式细胞仪发现Pae作用于EC9706细胞后细胞周期分布也发生了明显变化, 表现为S期细胞比例上升, G₀/G₁期和G₂/M期细胞比例下降, 且S期细胞周期阻滞作用表现出剂量依赖性。表明Pae对EC9706细胞周期分布的影响主要是阻滞细胞周期中S期向G₂/M期的转变过程, 减少有丝分裂。Pae改变了细胞周期, 使细胞被阻滞在S期, 而5-FU是细胞周期选择性作用药物, 选择作用于

创新亮点
本实验以食管癌EC9706细胞为研究对象, 进一步探讨Pae单独及和5-FU联合应用抗肿瘤的可能性。结果显示, Pae和5-FU单独应用对EC9706细胞的增殖均有抑制作用, 随着药物浓度的升高和作用时间的延长, 抑制细胞增殖的作用逐渐增强, 联合用药效果更明显。

应用要点
若能在临床上联合应用Pae和5-FU治疗食管癌,有可能既降低化疗药物的使用剂量又提高疗效,减轻化疗药物对患者的不良反应.

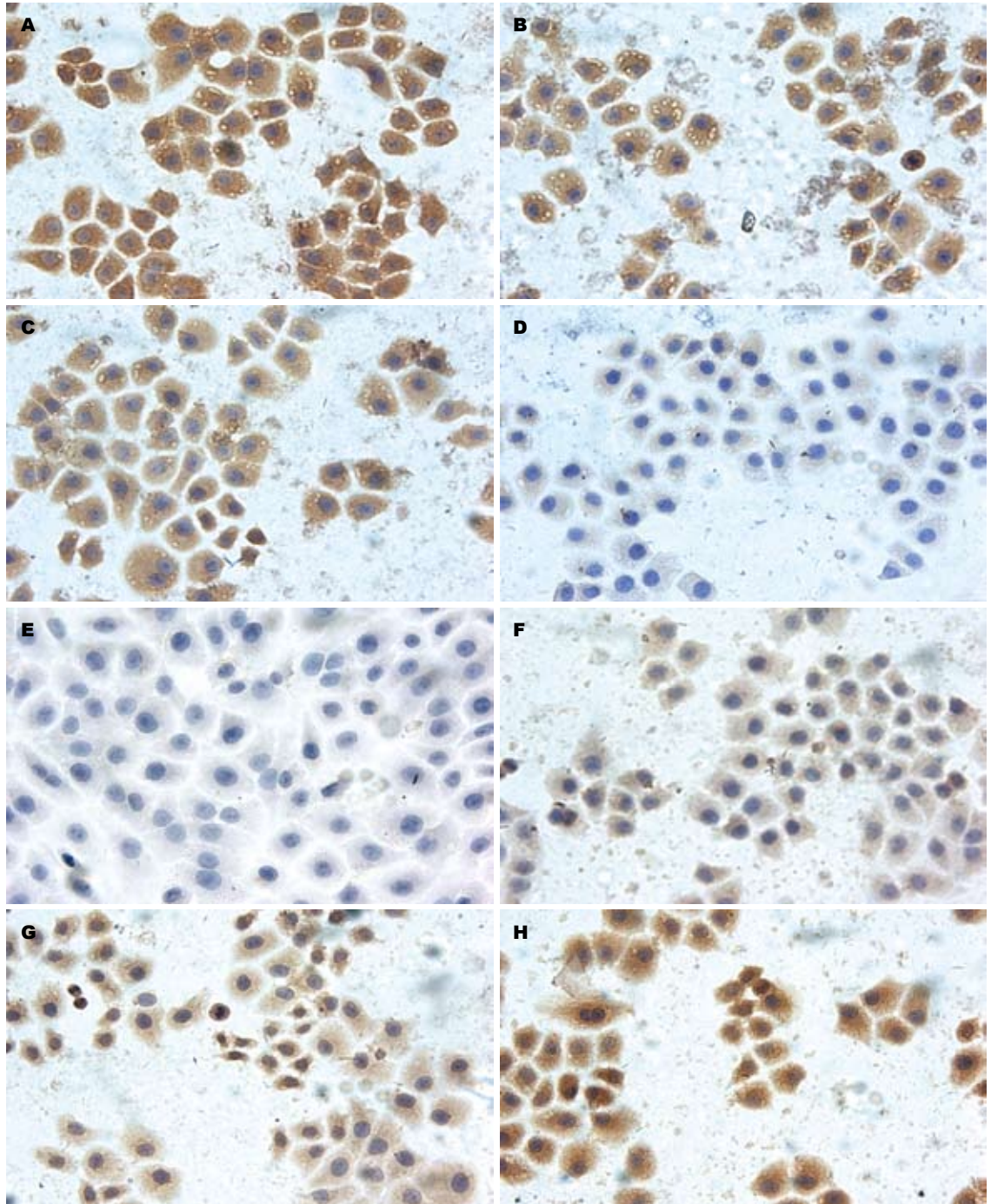


图3 食管癌EC9706细胞中Bcl-2、Bax的表达(SP×400). A-D: Bcl-2; E-H: Bax, A, E: 对照组; B, F: Pae 31.25 mg/L处理组; C, G: 5-FU 12.50 mg/L处理组; D, H: Pae 31.25 mg/L+5-FU 12.50 mg/L组.

S期细胞,两药联合使用使S期细胞明显增多,形成细胞增殖的瓶颈,故两药联合使用具有协同效应,能增强抗肿瘤作用.

细胞凋亡是一个程序化、多基因调控的过程,与细胞凋亡相关的基因大致有Bcl-2家族、P53、Fas、c-Myc、K-ras等,其中Bcl-2是凋亡调控的中心环节.体外实验表明,去除生长因子后,正常细胞便逐渐转向凋亡,而当Bcl-2过度表达时,这一凋亡现象便被抑制^[18-21].由此可

见,Bcl-2可通过抑制凋亡延长细胞寿命,产生细胞过度增殖和堆积,在肿瘤发生中起始动作用.Bax基因是一种凋亡促进基因,属Bcl-2同一家族^[22,23].Bax基因的作用与Bcl-2相反,其单体以及Bax/Bax形式的同源二聚体均有促凋亡作用.Bax又可与Bcl-2形成异源二聚体,抑制后者的功能促进凋亡.Bcl-2/Bax两蛋白之间的比例是细胞凋亡发生与否的关键因素^[24,25].本实验发现,Pae和5-FU能明显下调食管癌EC9706细胞Bcl-2

蛋白的表达, 上调Bax蛋白的表达, 使Bcl-2/Bax比例下降, 而联合用药组效果更为显著, 与单药组相比差异具有显著性。

总之, Pae联合5-FU对食管癌EC9706细胞的增殖抑制有协同作用, 其机制可能在于通过改变细胞周期, 下调Bcl-2的表达, 上调Bax表达, 使得Bcl-2/Bax比值降低诱导凋亡。若能在临床上联合应用Pae和5-FU治疗食管癌, 有可能既降低化疗药物的使用剂量又提高疗效, 减轻化疗药物对患者的不良反应。本研究为Pae的临床应用提供了实验依据, 为食管癌患者的中药防治、改善预后和提高生活质量开辟了一条新途径, 但具体用法和剂量还有待进一步研究。

4 参考文献

- Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29
- 张广饮, 禹志颖, 赵厚长. 丹皮酚对大鼠反复性脑缺血的保护作用. *中药材* 1997; 20: 626-628
- 孙言才, 沈玉先, 孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展. *中成药* 2004; 26: 579-582
- 李薇, 王远亮, 蔡绍哲, 张海雁, 施红艳, 黄凤玲, 曹雪波. 丹皮酚和阿司匹林对大鼠血液流变性影响的比较. *中草药* 2000; 31: 29-31
- 李后开, 戴敏, 汪电雷, 唐丽琴. 兔动脉粥样硬化模型的建立及丹皮酚药物作用的实验研究. *中国中医药科技* 2005; 12: 129-130
- 孙文芳, 高素洁, 高金霞, 臧玉华. 丹皮酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. *中国临床康复* 2004; 8: 3088-3089
- 丘少鹏, 王道虎, 刘卓炜, 李俊彪, 梅骅. 丹皮酚磺酸钠在动物肾缺血再灌注损伤中的作用. *中华肾脏病杂志* 2001; 17: 185-187
- 孙国平, 沈玉先, 张玲玲, 王华, 魏伟, 徐叔云. 丹皮酚的体内外抗肿瘤作用. *安徽医科大学学报* 2002; 37: 183-185
- 孙国平, 沈玉先, 张玲玲, 周爱武, 魏伟, 徐叔云. 丹皮酚对HepA荷瘤小鼠免疫调节和抗肿瘤作用研究. *中国药理学通报* 2003; 19: 160-162
- 孙国平, 王华, 沈玉先, 翟志敏, 魏伟, 徐叔云. 丹皮酚诱导K562细胞凋亡的研究. *中国药理学通报* 2004; 20: 550-552
- 孙国平, 王华, 沈玉先, 徐叔云. 丹皮酚在体外对4种肿瘤细胞株的增殖抑制作用. *安徽医药* 2004; 8: 85-87
- Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 1989; 60: 206-210
- Krajewska M, Krajewski S, Epstein JL, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996; 148: 1567-1576
- Riley CM, Ren TC. Simple method for the determination of paeonol in human and rabbit plasma by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection. *J Chromatogr* 1989; 489: 432-437
- 赵新峰, 孙毓庆. 胶束电动毛细管色谱法测定牡丹皮及六味地黄丸中丹皮酚的含量. *沈阳药科大学学报* 2002; 19: 35-37, 55
- 张纯, 郭澄, 高杰. 丹皮酚 β 环糊精的理化性质. *第二军医大学学报* 1997; 18: 95-96
- 李晨旭, 卢景芬, 古力努尔, 波拉提, 尚明英, 杨东辉, 吴军, 屠鹏飞, 蔡少青. 补阳还五汤及其有效成分体外给药对脑细胞膜流动性的影响. *中国药学杂志* 2001; 36: 528-531
- Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992; 258: 302-304
- Heiser D, Labi V, Erlacher M, Villunger A. The Bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease. *Exp Gerontol* 2004; 39: 1125-1135
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Toge T. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer* 2004; 101: 2491-2502
- Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DC. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* 2003; 116: 4053-4056
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326
- Sumantran VN, Lee DS, Baker VV, Murray S, Strawderman M, Wicha MS. A bcl-x(S) adenovirus demonstrates therapeutic efficacy in an ascites model of human breast cancer. *J Soc Gynecol Investig* 2000; 7: 184-189
- Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998; 391: 496-499
- Leung LK, Wang TT. Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/Bax apoptosis pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 55: 73-83

同行评价
本研究结果可靠,
结论可信, 但创新性一般。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

HH胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用及其机制

张传涛, 廖志航, 吴疆, 范昕建, 孟宪丽, 陈东辉

背景资料
慢性病毒性乙型肝炎(简称慢性乙型肝炎)呈世界性流行,我国是慢性乙型肝炎的高发地区。慢性乙型肝炎严重危害我国人民的生命健康,而对于慢性乙型肝炎的治疗,目前仍无理想的药物及方法,因此寻找安全有效的抗乙型肝炎病毒(HBV)药物十分迫切。

张传涛, 范昕建, 孟宪丽, 成都中医药大学 四川省成都市 610075
廖志航, 陈东辉, 四川省中医药科学院 四川省成都市 610041
吴疆, 四川大学华西医院 四川省成都市 610041
张传涛, 博士, 主要从事中医药防治病毒性肝炎研究, 国家“十一五”科技支撑计划基金资助项目, No. 2007BAI40B03
成都中医药大学博士研究生创新基金资助项目
作者贡献分布: 张传涛与范昕建对此文贡献均等; 此课题由张传涛与范昕建设计; 研究过程由张传涛与吴疆操作完成; 药物制备由孟宪丽指导完成; 研究所用试剂及分析工具由廖志航与陈东辉提供; 数据分析由陈东辉与廖志航完成; 本论文写作由张传涛与范昕建完成; 吴疆、廖志航及陈东辉负责文献检索。
通讯作者: 范昕建, 教授, 博士, 610075, 四川省成都市十二桥路37号, 成都中医药大学. zct801012@126.com
电话: 028-66990507
收稿日期: 2009-12-05 修回日期: 2010-01-05
接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-03-08

Anti-hepatitis B virus effects of HH Capsules *in vitro* and potential mechanisms involved

Chuan-Tao Zhang, Zhi-Hang Liao, Jiang Wu, Xin-jian Fan, Xian-Li Meng, Dong-Hui Chen

Chuan-Tao Zhang, Xin-Jian Fan, Xian-Li Meng, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 60075, Sichuan Province, China
Zhi-Hang Liao, Dong-Hui Chen, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Jiang Wu, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by: the National Key Technology R&D Program during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2007BAI40B03; and the Doctoral Innovation Fund of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine
Correspondence to: Professor Xin-Jian Fan, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 37 Shierqiao Road, Chengdu 610075, Sichuan Province, China. zct801012@126.com
Received: 2009-12-05 Revised: 2010-01-05
Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the anti-hepatitis B virus effects of HH Capsules in HepG 2.2.15 cell line and explore potential mechanisms involved.

METHODS: HepG2.2.15 cells were randomly divided into blank control group, positive control group (lamivudine), and HH Capsule group. The HH Capsule group was further divided into ten subgroups according to the concentration of

HH Capsules used. Drug toxicity was detected using Cell Counting Kit-8 (CCK-8). Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and hepatitis B virus e antigen (HBeAg) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Hepatitis B virus DNA (HBV DNA) was measured by fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (PCR). The expression of 2'5'-oligoadenylate synthetase (2'5'-OAS) and RNA-dependent protein kinase (PKR) mRNAs and proteins was detected by fluorescence-based quantitative PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: The half toxic concentration (TC₅₀) of HH Capsules is 2.113 g/L. HH Capsules at concentrations of 312, 156, 78 and 39 mg/L could reduce the quantity of extracellular HbsAg (0.834 ± 0.008, 1.021 ± 0.011, 1.347 ± 0.017 and 1.548 ± 0.015 *vs* 2.593 ± 0.008) and HbeAg (0.285 ± 0.007, 0.462 ± 0.008, 0.565 ± 0.009 and 0.733 ± 0.008 *vs* 1.334 ± 0.007). HH Capsules at concentrations of 312 and 156 mg/L could reduce intracellular HBV DNA [(3.423 ± 0.110) × 10⁹ copies/L and (3.640 ± 0.082) × 10⁹ copies/L *vs* (6.857 ± 0.060) × 10⁹ copies/L] and extracellular HBV DNA levels (6 547 ± 87 and 7 710 ± 62 *vs* 24 300 ± 200). HH Capsules at a concentration of 312 mg/L could up-regulate the expression of intracellular OAS (0.885 ± 0.038 *vs* 0.688 ± 0.068) and PKR mRNAs (0.139 ± 0.06 *vs* 0.058 ± 0.005) and proteins.

CONCLUSION: HH Capsules can exert anti-hepatitis B virus effects *in vitro* perhaps by up-regulating the expression of OAS and PKR mRNAs and proteins.

Key Words: HH Capsules; Hepatitis B virus; Oligoadenylate synthetase; RNA-dependent protein kinase

Zhang CT, Liao ZH, Wu J, Fan XJ, Meng XL, Chen DH. Anti-hepatitis B virus effects of HH Capsules *in vitro* and potential mechanisms involved. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 652-656

摘要

目的: 研究HH胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用及其对抗病毒蛋白2'5'-寡腺苷酸合成酶

同行评议者
王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

(2'5'-Oligoadenylate Synthetase, 2'5'-OAS)、RAN依赖蛋白激酶(RAN-dependent protein kinase, PKR)的影响。

方法: HepG2.2.15是目前最常用的乙型肝炎病毒感染体外实验模型, 将细胞随机分为空白对照组、阳性对照组(3TC)、不同浓度的HH胶囊组。用CCK-8检测药物细胞毒性, 酶联免疫法检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg); 荧光定量聚合酶链反应法检测乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA); 用Western blot、荧光定量PCR方法分别检测细胞内抗病毒蛋白2'5'-OAS、PKR及其mRNA水平。

结果: HH胶囊的 TC_{50} 是2.11 g/L、312.00 mg/L、156.00 mg/L、78.00 mg/L、39.00 mg/L HH胶囊均可以降低细胞外HBeAg(0.285 ± 0.007 , 0.462 ± 0.008 , 0.565 ± 0.009 , 0.733 ± 0.008 vs 1.334 ± 0.007)和HbsAg(0.834 ± 0.008 , 1.021 ± 0.011 , 1.347 ± 0.017 , 1.548 ± 0.015 vs 2.593 ± 0.008)水平, 312.00 mg/L、156.00 mg/L HH胶囊均可以减低细胞内乙型肝炎病毒DNA[(3.423 ± 0.110) $\times 10^9$ copies/L, (3.640 ± 0.082) $\times 10^9$ copies/L vs (6.857 ± 0.060) $\times 10^9$ copies/L]、细胞外乙型肝炎病毒DNA($6\ 547 \pm 87$, $7\ 710 \pm 62$ vs $24\ 300 \pm 200$), 312.00 mg/L HH胶囊可以增加细胞内OAS mRNA(0.885 ± 0.038 vs 0.688 ± 0.068)、PKR mRNA(0.139 ± 0.06 vs 0.058 ± 0.005)表达及其OAS、PKR蛋白水平。

结论: HH胶囊具有良好的抗乙型肝炎病毒作用, 推测可能与增加细胞内OAS、PKR及其mRNA水平有关。

关键词: HH胶囊; 乙型肝炎病毒; 寡腺苷酸合成酶; RAN依赖蛋白激酶

张传涛, 廖志航, 吴疆, 范昕建, 孟宪丽, 陈东辉. HH胶囊体外抗乙型肝炎病毒的作用及其机制. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 652-656
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/652.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)呈世界性流行, 我国是慢性病毒性乙型肝炎(简称慢性乙型肝炎)的高发地区, 慢性乙型肝炎严重危害我国人民的生命健康, 而对于慢性乙型肝炎的治疗, 目前仍无理想的药物及方法, 因此寻找安全有效的抗HBV药物十分迫切。HepG2.2.15细

胞是一种转染了人HBV DNA的人肝癌细胞株, 能持续而稳定地表达HBsAg、HBeAg、HBV DNA, 是目前筛选抗HBV新药的最常用细胞模型。HH胶囊是我们长期临床治疗慢性乙型肝炎的经验方, 我们在国家“十一五”科技支撑计划项目资助下对HH胶囊进行了一系列的新药开发研究, 现将HH胶囊体外抗HBV作用及部分作用机制研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2.2.15细胞由四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室保种, 细胞接种在含100 mL/L胎牛血清的1640培养液中, 在37℃、50 mL/L CO₂、95%湿度的培养箱中培养, 实验过程中每周用G418筛选。拉米夫定(3TC, 葛兰素史克)用二甲基亚砜(DMSO)溶解于培养液, 稀释成不同浓度^[1]。HH胶囊由黄连6 g、虎杖15 g、赶黄草15 g、甘草5 g等组成, 由四川省中医药科学院制备水、醇提取物后, 用DMSO溶解于培养液^[2]。CCK-8试剂盒(碧云天生物), 原装特优级胎牛血清(赛默飞世尔生物), G418(Sigma), RPMI 1640培养基干粉(Gibco), 基因扩增仪(Bio-Rad), CO₂培养箱(Sanyo), 垂直板电泳转移装置(上海天能生物), 电泳仪(北京君意), PVDF膜(Whatman), 化学发光试剂(ShineGene), OAS/PKR一抗(Santa Cruz), 内参一抗(Santa Cruz)。

1.2 方法

1.2.1 药物毒性实验: 将浓度为 1.0×10^8 /L的细胞悬液接种于96孔板, 细胞分为3个浓度3TC(300.00、200.00、100.00 mg/L)、10个浓度HH组(5.00 g/L、2.50 g/L、1.25 g/L、625.00 mg/L、312.00 mg/L、156.00 mg/L、78.00 mg/L、39.00 mg/L、20.00 mg/L、10.00 mg/L)、0.1% DMSO、空白组, 每组4复孔, 每孔100 μ L, 48 h换液1次, 分别在第48、96、144 h进行细胞毒性实验^[3], 用酶标仪读取A值, 波长450/650 nm。计算药物对细胞抑制百分率(%) = (对照孔平均A值-试验孔平均A值)/对照孔平均A值 $\times 100\%$, 半数毒性浓度(TC_{50})计算公式^[4]: $TC_{50} = \text{Antilog}[B + (50 - <50\%抑制百分率) / (>50\%抑制百分率 - <50\%抑制百分率) \times C]$, 式中C = A - B, A = $\log(>50\%药物浓度)$, B = $\log(<50\%药物浓度)$ 。

1.2.2 HH胶囊的药效学实验: 将细胞悬液接种于24孔板, 分为DMSO组、3TC组(200.00 mg/L)、4个HH浓度组(312.00、156.00、78.00、39.00 mg/L), 每组4复孔, 每孔600 μ L, 48 h换液1次,

研发前沿
研发安全有效的抗HBV药物是目前病毒性肝炎防治领域的热点、重点。

相关报道
一些专家学者对中医药防治慢性乙型肝炎进行了系列研发, 总结出一系列有效的方药, 如复方六月雪、参灵益肝颗粒、白背叶根、青蒿素、野老鹤草、虎杖、大黄、蕨麻。JAK-STAT信号转导通路是目前临床使用的许多抗HBV药物如3TC、干扰素等发挥抗病毒作用的途径之一。

创新盘点

本研究采用荧光定量PCR、Western blot技术,探讨了HH胶囊体外抗HBV作用,检测细胞内外HBV DNA,并首次初步探讨了HH胶囊体外对JAK-STAT信号转导通路部分信号的影响。

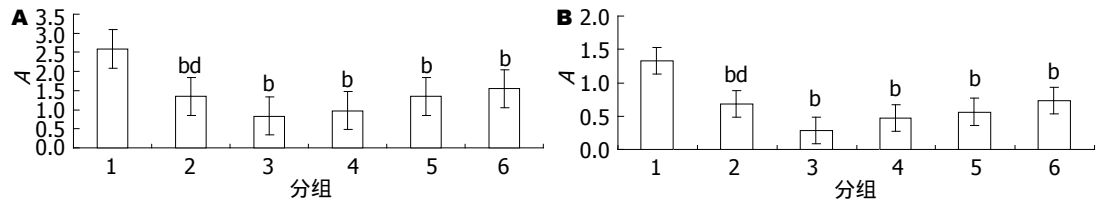


图1 HH胶囊对HBsAg及HBeAg的影响。A: HBsAg; B: HBeAg。1: DMSO组; 2: 3TC组; 3: HH(312.00 mg/L)组; 4: HH(156.00 mg/L)组; 5: HH(78.00 mg/L)组; 6: HH(39.00 mg/L)组; ^b $P < 0.01$ vs DMSO组, ^{bd} $P < 0.01$ vs HH(312 mg/L)组。

144 h时分别收集细胞上清及细胞, -80°C 冻存, 待测。

1.2.3 上清HBsAg、HBeAg检测: 采用酶联免疫检测试剂盒(上海科华生物)检测上清HBsAg、HBeAg, 严格按试剂盒说明书操作。药物对HBsAg/HBeAg的抑制百分率 = $(A_{\text{对照孔}} - A_{\text{实验孔}}) / A_{\text{对照孔}} \times 100$ 。50%抑制浓度(IC_{50})是对HBsAg、HBeAg抑制率为50%时浓度。

1.2.4 培养上清中HBV DNA检测: 采用荧光定量PCR检测试剂盒(达安基因)检测上清中HBV DNA, 严格按试剂盒说明书操作。药物对HBV DNA的抑制率 = $(\text{对照组HBV DNA拷贝数} - \text{实验组HBV DNA拷贝数}) / \text{对照组HBV DNA拷贝数} \times 100\%$ 。

1.2.5 细胞内中HBV DNA检测: 采用DNA提取试剂盒(天根生化)提取细胞内总DNA, 采用荧光定量PCR检测试剂盒(达安基因)检测细胞内HBV DNA, 严格按试剂盒说明书操作。药物对HBV DNA的抑制率 = $(\text{对照组HBV DNA拷贝数} - \text{实验组HRV DNA拷贝数}) / \text{对照组HBV DNA拷贝数} \times 100\%$ 。

以治疗指数(TI)评价药物临床应用前景, $\text{TI} = \text{TC}_{50} / \text{IC}_{50}$, $\text{TI} > 2$ 为有效低毒, $2 > \text{TI} > 1$ 为低效有毒, $\text{TI} < 1$ 为有毒性作用。以药物作用第144 h的TI为标准。

1.2.6 HH胶囊作用机制研究实验: 将浓度 1.0×10^8 /L的细胞悬液接种于12孔板, 分为DMSO组、3TC组(200.00 mg/L)、2个HH浓度组(312 mg/L、78 mg/L), 每组3复孔, 每孔1 000 μL , 48 h换液1次, 144 h时收集细胞, -80°C 冻存, 待测。

1.2.7 细胞内OAS、PKR mRNA的荧光定量PCR检测: 根据互联网生物信息资源辅助设计引物序列为: OASF: CAAGGTGGTAAAGGGTGGCT; OASR: CAACTTCACGGAAAATGCTCT, 191 bp; PKRF: TAACGAGAAGGCGGAGCG; PKRR: CCATTTGGATGAAAAGGCACT, 197 bp; TRIzol一步法提取细胞总RNA, 取2 μg 细胞总RNA为模板进行逆转录, 行PCR反应时, 取1

μL 逆转录得到的cDNA为模板, 待测基因引物浓度按30 pmol/50 μL 体系进行扩增, PCR扩增条件为 94°C 4 min; 94°C 0.5 min; 60°C 0.5 min; 72°C 0.5 min, 循环35次; 72°C 检测信号。

1.2.8 细胞内OAS、PKR蛋白Western blot检测^[5]: 待测细胞用蛋白质裂解液裂解30 min, 13 000 r/min, 4°C 离心20 min, 取含50 μg 总蛋白的上清液以12% SDS-PAGE凝胶电泳, 过夜转膜后, 在摇床上室温封闭4 h, 膜置于含1:500一抗或1:3 000内参一抗的封闭液孵育3 h, Tris碱-氯化钠-吐温20洗液(TBST)洗膜3次, 1:5 000浓度加入二抗孵育1.5 h, TBST洗膜3次, 将化学发光试剂加于膜上, 立即在暗室曝光、洗片, 对胶片进行扫描, 然后用UVP凝胶图像处理系统Labworks4.6软件分析目的条带的灰度值。

统计学处理 采用SPSS13.0统计分析软件, 不同组之间进行 t 检验分析, 数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。

2 结果

2.1 实验药物对细胞毒性实验 3个浓度3TC、0.1% DMSO对2.2.15细胞均无细胞毒性, 但HH胶囊对细胞有一定细胞毒性, 且毒性具有浓度依赖性, HH胶囊的 TC_{50} 是2.11 g/L。

2.2 HH胶囊对上清中HBeAg、HBsAg影响 312.00、156.00、78.00、39.00 mg/L的HH胶囊可以减低上清中HBeAg(0.285 ± 0.007 、 0.462 ± 0.008 、 0.565 ± 0.009 、 0.733 ± 0.008 vs 1.334 ± 0.007)、HBsAg(0.834 ± 0.008 、 1.021 ± 0.011 、 1.347 ± 0.017 、 1.548 ± 0.015 vs 2.593 ± 0.008), 312.00 mg/L HH胶囊对HBeAg、HBsAg抑制作用强于3TC组(0.285 ± 0.007 vs 0.684 ± 0.008 ; 0.834 ± 0.008 vs 1.346 ± 0.020), 提示HH胶囊对2.2.15细胞分泌的HBeAg、HBsAg具有抑制作用(图1)。

2.3 HH胶囊对细胞内、外HBV DNA影响 312.00、156.00 mg/L HH胶囊均可以减低细胞内HBV DNA内(3.423 ± 0.110 、 3.640 ± 0.082 vs 6.857 ± 0.060 , $\times 10^9$ copies/L)、细胞外HBV

应用要点

本研究将JAK-STAT信号转导通路引入到中药抗HBV研究中, 为以后中药抗HBV研究提供思路。

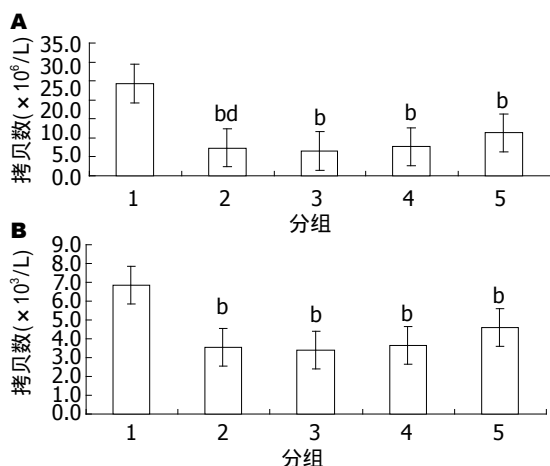


图 2 HH胶囊对细胞内外HBV DNA影响. A: 细胞外, B: 细胞内. 1: DMSO组; 2: 3TC组; 3: HH(312 mg/L)组; 4: HH(156 mg/L)组; 5: HH(78 mg/L)组, $^b P < 0.01$ vs DMSO组, $^{bd} P < 0.01$ vs HH(312 mg/L)组.

DNA($6\ 547 \pm 87$ 、 $7\ 710 \pm 62$ vs $24\ 300 \pm 200$), 312.00 mg/L HH胶囊对细胞外HBV DNA抑制作用强于3TC组($6\ 547 \pm 87$ vs $7\ 326 \pm 25$), 提示HH胶囊可以降低细胞内、外HBV DNA水平(图2).

2.4 HH胶囊对细胞内OAS、PKR mRNA影响 312.00 mg/L HH胶囊、3TC可以增加细胞内OAS(0.885 ± 0.038 、 0.791 ± 0.018 vs 0.688 ± 0.068)、PKR mRNA(0.139 ± 0.06 、 0.089 ± 0.003 vs 0.058 ± 0.005)水平(图3).

2.5 HH胶囊对细胞内OAS、PKR蛋白影响 HH胶囊可以增加细胞内OAS、PKR蛋白水平, 与空白组比较, 高浓度HH组差异有统计学意义($P < 0.01$, 图4).

3 讨论

中医药是我国的特色和优势, 众多专家学者对中医药防治慢性乙型肝炎进行了系列研发, 总结出一系列有效的方药, 如复方六月雪、参灵益肝颗粒、白背叶根、青蒿素、野老鹤草、虎杖、大黄、蕨麻^[1-2,6-11]. HH胶囊由黄连、赶黄草、虎杖、甘草等多味中药组成, 具有清热祛湿解毒等功能, 是我们长期临床治疗病毒性乙型肝炎的经验基础方, 我们在临床实践中发现具有较好的抗HBV、保肝作用, HH胶囊在国家“十一五”科技支撑计划项目资助下进行了抗HBV开发研究.

为了使HH胶囊中复方成分很好的溶解到培养液中, 我们采用0.1% DMSO作为助溶剂, 药物对细胞毒性实验中, 我们发现0.1% DMSO、3个浓度3TC对2.2.15细胞是无毒性的, 高浓度的HH胶囊对2.2.15细胞有一定毒性, 并且HH胶

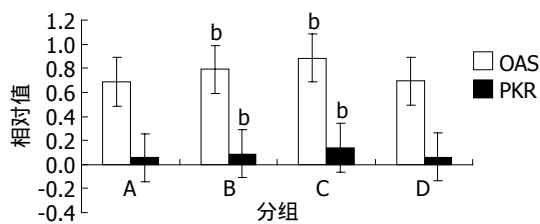


图 3 HH胶囊对OAS、PKR mRNA影响. A: DMSO组; B: 3TC组; C: HH(312 mg/L)组; D: HH(78 mg/L)组, $^b P < 0.01$ vs DMSO组.

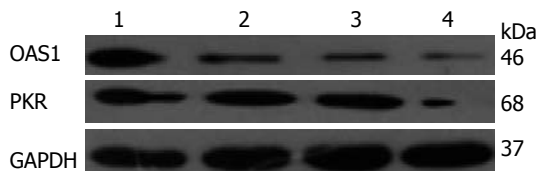


图 4 HH胶囊对细胞内OAS、PKR蛋白影响. 1: HH高浓度组; 2: HH低浓度组; 3: 3TC组; 4: 空白对照组

囊细胞毒性具有浓度依赖性, HH胶囊的 TC_{50} 是2.11 g/L, HBeAg、HBsAg的 IC_{50} 若分别按78.00 mg/L、156.00 mg/L算, HBeAg、HBsAg的TI分别是27、14, 所以HH胶囊对HBeAg、HBsAg的实际TI分别大于27、14, 均大于2, 提示HH胶囊抗HBV低毒有效, 具有良好的新药应用前景.

本次实验药效学研究揭示HH胶囊可以不同程度地降低培养上清中HBsAg、HbeAg、细胞内外的HBV DNA, 312.00 mg/LHH胶囊对HBeAg、HBsAg、细胞外HBV DNA抑制作用强于200.00 mg/L 3TC组($P < 0.01$), 但是在抑制细胞内HBV DNA方面二者无明显差异($P > 0.05$), 提示HH胶囊体外具有直接抗HBV作用, 另外HH胶囊中的部分单味药或单体已被开发为治疗慢性乙型肝炎的临床新药, 并取得良好效果^[12,13], 所以HH胶囊有望开发为临床抗HBV新药.

JAK-STAT信号转导通路是目前临床使用的许多抗HBV药物如3TC、干扰素等发挥抗病毒作用的途径之一, 这些药物通过调控该信号转导通路诱导产生抗病毒蛋白2'5'-OAS、PKR而发挥抗病毒作用的^[14-16], 研究抗HBV药物对JAK-STAT信号通路影响已经成为目前该领域研究热点, 但是目前JAK-STAT信号转导通路尚未应用于中医药抗HBV研究领域, 在中医药抗HBV研究领域尚属空白, 所以本次药物的机制学研究中引入JAK-STAT信号转导通路, 采用荧光定量PCR、Western blot方法初步探讨了HH胶囊对该信号通路的效应产物抗病毒蛋白OAS、PKR影响, 具有较高的创新性. 本研究结果提示HH胶囊可以增强2.2.15细胞内OAS、PKR及其mRNA表

名词解释
CCK-8试剂盒: Cell Counting Kit-8简称CCK-8试剂盒, 是一种基于WST-8的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒. WST-8是一种类似于MTT的化合物, 是MTT的一种升级替代产品, 和MTT或其他MTT类似产品如XTT、MTS等相比有明显的优点, 故逐渐广泛应用于细胞增殖和细胞毒性实验.

同行评价
本文选题明确,具有一定的创新性,实验方法简单可靠,可重复性强,文题较准确反映了研究工作的科学问题和特定内容,可读性强。

达水平,进而引起病毒mRNA降解和抑制蛋白质合成达到抗HBV效果,推测HH胶囊抗HBV作用可能与增强2.2.15细胞内OAS、PKR及其mRNA表达水平有关,调控JAK-STAT信号转导通路有可能是HH胶囊抗HBV作用的机制之一,当然还有必要对JAK-STAT信号转导通路中其他信号进行研究、验证。

总之,本次研究不仅从体外实验研究了HH胶囊抗HBV作用,为HH胶囊申报临床新药提供依据,以降低病毒性肝炎的死亡率及其造成的经济损失,具有重要社会意义;另外本研究还首次从信号转导通路的角度探讨了HH胶囊抗HBV作用机制,有一定的学术创新价值。当然,体外实验毕竟不能完全模拟体内过程,我们正在进一步采用鸭乙型肝炎、HBV转基因小鼠等模型进行体内实验进行验证。

4 参考文献

- 1 Li J, Huang H, Feng M, Zhou W, Shi X, Zhou P. In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of a plant extract from *Geranium carolinianum* L. *Antiviral Res* 2008; 79: 114-120
- 2 Romero MR, Efferth T, Serrano MA, Castaño B, Macias RI, Briz O, Marin JJ. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system. *Antiviral Res* 2005; 68: 75-83
- 3 邓展生, 张璇, 邹冬青, 许宇霞, 胡懿合. 骨碎补各种提取成分对人骨髓间充质干细胞的影响. *中国现代医学杂志* 2005; 15: 2426-2429
- 4 汪延, 方光如, 徐跃定, 冯伟民, 陶佩珍, 滕立. 螺旋藻多糖在2215细胞培养中对乙型肝炎病毒表面抗原和e抗原及HBV-DNA的抑制作用. *江苏农业学报* 2000; 16: 41-45
- 5 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第2版. 北京: 北京协和医科大学出版社, 2001: 398-400
- 6 张士军, 林军, 蒋伟哲, 黄春喜, 黄仁彬. 复方六月雪对鸭乙型肝炎病毒DNA的抑制作用. *中药材* 2007; 30: 191-193
- 7 张洪泉, 葛慧, 李心, 武玉清, 陈压西. 参灵益肝颗粒抗乙型肝炎病毒作用的实验研究. *中国中西医结合杂志* 2007; 27: 244-246
- 8 Zhao YL, Cai GM, Hong X, Shan LM, Xiao XH. Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserine* L. *Phytomedicine* 2008; 15: 253-258
- 9 刘妮, 朱辨弦, 黄正昌, 朱宇同, 陈俏妍, 郭兴伯, 李国桥. 大黄醇提液对2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg的抑制作用. *中药材* 2004; 27: 419-421
- 10 徐舒, 吕志平, 蔡红兵, 张晓刚, 刘强, 谭焱. 白背叶根抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究. *中西医结合学报* 2006; 4: 285-288
- 11 Chang JS, Liu HW, Wang KC, Chen MC, Chiang LC, Hua YC, Lin CC. Ethanol extract of *Polygonum cuspidatum* inhibits hepatitis B virus in a stable HBV-producing cell line. *Antiviral Res* 2005; 66: 29-34
- 12 万军, 何基德. 甘草酸二铵注射液联合肝炎灵注射液治疗慢性乙型肝炎的疗效. *浙江中医药大学学报* 2007; 31: 319-320
- 13 杨珊明, 周建芳. 贺普丁耐药的慢性乙型肝炎联合肝炎灵或迈普新疗效观察. *实用药物与临床* 2007; 10: 147-149
- 14 张权, 魏来, 王燕. ISGF3:IFN- α 抗乙型肝炎病毒信号转导机制的重要因子. *中华实验和临床病毒学杂志* 2005; 19: 110-113
- 15 Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285: 1-24
- 16 管世鹤, 陆蒙吉, Roggendorf M, Schlaak JF. 3TC部分调节2.2.15细胞干扰素诱导基因表达. *中华实验和临床病毒学杂志* 2005; 19: 400

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 •

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)

Met-RANTES干预实验性小鼠溃疡性结肠炎对MIP-3 α 及其受体CCR6的影响

张海峰, 钟万锴, 周国雄, 丁晓凌, 黄华

张海峰, 周国雄, 丁晓凌, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

钟万锴, 宁波市第六医院消化内科 浙江省宁波市 315040

黄华, 南通大学附属医院病理科 江苏省南通市 226001

张海峰, 主治医师, 南通大学附属医院消化内科, 主要从事炎症性肠病的研究。

江苏省重点医学人才基金资助项目, No. RC 2007085

作者贡献分布: 此课题由张海峰、钟万锴及周国雄设计; 研究过程由钟万锴与张海峰操作完成; 病理操作由黄华完成; 数据分析由张海峰、钟万锴、周国雄及丁晓凌完成; 本论文写作由张海峰与钟万锴完成。

通讯作者: 周国雄, 主任医师, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科。

zhouguoxiong@medmail.com.cn

电话: 0513-81161826

收稿日期: 2009-11-18 修回日期: 2010-02-01

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-08

Met-RANTES down-regulates the expression of MIP-3 α and CCR6 in the colon of mice with experimental ulcerative colitis

Hai-Feng Zhang, Wan-E Zhong, Guo-Xiong Zhou, Xiao-Ling Ding, Hua Huang

Hai-Feng Zhang, Wan-E Zhong, Guo-Xiong Zhou, Xiao-Ling Ding, Hua Huang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation for Key Medical Talents in Jiangsu Province, No. RC 2007085

Correspondence to: Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. zhouguoxiong@medmail.com.cn

Received: 2009-11-18 Revised: 2010-02-01

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the role of macrophage inflammatory protein-3 α (MIP-3 α) and chemokine receptor 6 (CCR6) in the pathogenesis of ulcerative colitis (UC) and to explore the mechanism of therapeutic effect of Met-RANTES against UC.

METHODS: Forty mice were randomly and equally divided into four groups: blank control group, model control group, normal saline group, and Met-RANTES treatment group. Ulcerative colitis was induced in mice by giving

dextran sodium sulfate (DSS). The impact of Met-RANTES on disease activity index (DAI), gross morphological score (GMS) and histopathological score (HPS) in UC was then evaluated. The expression of MIP-3 α and CCR6 mRNAs was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of MIP-3 α and CCR6 proteins was examined by Western blot and immunohistochemistry.

RESULTS: The DAI, GMS and HPS were higher in the model control group and the normal saline group than in the blank control group. The expression levels of MIP-3 α and CCR6 mRNAs and proteins in UC were significantly higher in the model control group and the normal saline group than in the blank control group (all $P < 0.01$). The DAI, GMS and HPS as well as the expression levels of MIP-3 α and CCR6 mRNAs and proteins in the Met-RANTES treatment group were significantly lower than those in the model control group and the normal saline group (mRNA: 0.21 ± 0.08 vs 1.09 ± 0.08 and 1.08 ± 0.07 , and 0.25 ± 0.08 vs 1.11 ± 0.07 and 1.05 ± 0.08 ; protein: 0.28 ± 0.08 vs 0.98 ± 0.07 and 1.05 ± 0.06 , and 0.25 ± 0.07 vs 1.19 ± 0.07 and 1.15 ± 0.06 ; all $P < 0.01$). In contrast, no statistical differences were noted in DAI, GMS and HPS as well as the expression levels of MIP-3 α and CCR6 mRNAs and proteins between the model control group and the normal saline group (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of MIP-3 α and its receptor CCR6 is up-regulated in UC, which is closely related with the development and progression of UC. Met-RANTES can down-regulate the expression of MIP-3 α and CCR6 and ameliorate inflammatory damage in mice with UC. MIP-3 α and CCR6 may represent novel pharmacological targets for treatment of UC.

Key Words: Ulcerative colitis; Macrophage inflammatory protein-3 α ; Chemokine receptor 6; Met-RANTES

Zhang HF, Zhong WE, Zhou GX, Ding XL, Huang H. Met-RANTES down-regulates the expression of MIP-

背景资料
随着我国人民生活、生活水平的提高, 其生活方式、饮食结构发生巨大变化, 因此我国炎症性肠病特别是UC的发病率明显上升。但UC的病因和发病机制尚不清楚, 故迫切需要对其进行相关研究。

同行评议者
邵先玉, 主任医师, 泰山医学院附属医院消化内科

研究前沿

目前认为细胞因子网络调控的失衡可能是导致肠黏膜多种病理改变的关键,在UC发病发展中起着重要作用.以趋化因子及其受体分子为控制靶点,通过激活或拮抗趋化因子受体的信号传导来调控趋化因子系统的功能,从而探索治疗UC的方法已逐渐成为学术界所关注.

3 α and CCR6 in the colon of mice with experimental ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 657-663

摘要

目的: 探讨MIP-3 α 及其受体CCR6在实验性小鼠溃疡性结肠炎(UC)发病中的作用,并分析Met-RANTES疗效机制.

方法: 用葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导建立结肠炎小鼠模型,观察Met-RANTES对小鼠结肠炎病活动指数(DAI)、大体形态评分(GMS)、结肠组织学病理评分(HPS)的影响;并通过RT-PCR检测其对小鼠结肠组织MIP-3 α 、CCR6 mRNA的表达变化及Western blot和免疫组织化学方法检测其小鼠结肠组织MIP-3 α 、CCR6的蛋白表达变化.

结果: DAI、GMS和HPS在DSS模型组和生理盐水治疗组中高于空白对照组, MIP-3 α 和CCR6在小鼠溃疡性结肠炎中表达上调,在小鼠空白对照组中不表达或弱阳性表达,差异有统计学意义($P < 0.01$);与DSS模型组和生理盐水治疗组相比, Met-RANTES治疗组小鼠DAI、GMS和HPS降低, MIP-3 α 和CCR6表达下调(mRNA: 0.21 ± 0.08 vs 1.09 ± 0.08 , 1.08 ± 0.07 ; 0.25 ± 0.08 vs 1.11 ± 0.07 , 1.05 ± 0.08 , $P < 0.01$; 蛋白: 0.28 ± 0.08 vs 0.98 ± 0.07 , 1.05 ± 0.06 ; 0.25 ± 0.07 vs 1.19 ± 0.07 , 1.15 ± 0.06 , $P < 0.01$);生理盐水治疗组小鼠DAI、GMS和HPS以及MIP-3 α 和CCR6表达与DSS模型组相比表达无明显差异($P > 0.05$).

结论: MIP-3 α 与CCR6参与了小鼠UC的发生、发展; Met-RANTES能下调MIP-3 α 及CCR6的表达,并能减轻炎症损伤;针对MIP-3 α 或CCR6的靶向治疗可能是UC一种有效的治疗方法.

关键词: 溃疡性结肠炎; MIP-3 α ; CCR6; Met-RANTES

张海峰, 钟万锴, 周国雄, 丁晓凌, 黄华. Met-RANTES干预实验性小鼠溃疡性结肠炎对MIP-3 α 及其受体CCR6的影响. *世界华人消化杂志* 2010; 18(7): 657-663
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/657.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因和发病机制不明的炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD). 目前认为其发病可能与遗传、免疫、感染及精神等多因素相互作用有关,

而免疫学因素是UC研究中的热点. UC在欧美国家较多见,近年来我国发病率不断上升^[1]. 在治疗上,除传统的水杨酸类、糖皮质激素和免疫抑制剂药物以外,新的治疗方法包括生物制剂不断出现,但未能取得突破性进展,很多方法还停留在实验室阶段. 通过阻断有关趋化因子或(和)阻断趋化因子受体来间接阻断趋化因子从而阻止炎症细胞募集到炎症部位是一种新的抗炎策略^[2-8]. 我们以趋化因子拮抗剂Met-RANTES干预葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠UC,探索MIP-3 α 及其受体CCR6在UC中的作用,并探讨Met-RANTES疗效可能机制.

1 材料和方法

1.1 材料 Balb/c小鼠,♀,40只,周龄4-6 wk,体重14-20 g,购自南通大学动物实验中心(屏障环境); Met-RANTES, R&D公司提供.

1.2 方法

1.2.1 UC模型建立: 造模前小鼠在动物房屏障环境饲养1 wk,按Stevceva等^[9]的方法,将40只Balb/c小鼠随机分为空白对照组、DSS模型对照组、生理盐水治疗组和Met-RANTES治疗组. 空白对照组饮用蒸馏水饮7 d. DSS模型对照组、生理盐水治疗组和Met-RANTES治疗组饮用50 g/L DSS溶液(5 mg DSS溶于100 mL蒸馏水)7 d,建立急性期UC模型; DSS模型对照组未给予任何治疗;趋化因子拮抗剂Met-RANTES治疗组从给DSS第3天开始给予Met-RANTES(20 μ g溶于0.5 mL PBS中, ip, qd),共5 d;生理盐水治疗组小鼠从给DSS第3天开始给予生理盐水(0.5 mL, ip, qd),共5 d. 第8天用颈椎脱臼法处死所有小鼠. 采集小鼠结肠标本备检.

1.2.2 症状体征观察及评分: 造模过程中每日观察小鼠体重变化、大便性状、便血等情况. 参照Murano等^[10]所列标准进行评分,疾病活动指数(DAI) = (体质量下降分数+大便性状分数+便血分数)/3. DAI评分标准: 无体质量下降、大便性状正常、无便血分别记为0分;体质量下降1%-5%记为1分;体质量下降5%-10%、半稀便、大便隐血(+)分别记为2分;体质量下降10%-15%记为3分;体质量下降>15%、稀便、便血分别记为4分.

1.2.3 大体形态评分: 小鼠以颈椎脱臼法处死后,立即开腹分离结肠,沿肠系膜剪开肠腔,祛除大便,生理盐水冲洗数次,观察大体形态改变,参

照下列标准进行评分: 无损伤为0分; 黏膜充血为1分; 溃疡面积<受损面积的25%为2分; 溃疡面积 = 受损面积的25%-50%为3分; 溃疡面积>受损面积的50%为4分。

1.2.4 组织学评分: 取病变明显处组织, 常规石蜡包埋、切片、HE染色, 观察组织学改变, 参照Boirivant^[11]所列标准进行盲法评分: 正常记为0分; 极低白细胞浸润, <10% hpfi记为1分; 少量白细胞浸润, 10%-25% hpfi记为2分; 中量白细胞浸润, 25%-50% hpfi, 同时伴血管密集和肠壁增厚记为3分; 大量白细胞浸润, >50% hpfi, 血管高度密集, 隐窝变形、扭曲, 肠壁肿胀伴溃疡记为4分。

1.2.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定MIP-3 α 、CCR6: 提取总RNA然后逆转录反应合成cDNA, 取5 μ L cDNA用于PCR扩增。以GAPDH为内参照。GAPDH、MIP-3 α 和CCR6引物由上海生工生物科技公司设计并合成。GAPDH引物系列如下: 上游引物为5'-ATG GGA AGC TGG TCA TCA AC-3', 下游引物为5'TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT-3', 扩增长度484 bp。MIP-3A上游引物为5'-AGC AGC AAG CAA CTA CGA CT-3', 下游引物为5'-TCT TAG GCT GAG GAG GTT CA-3', 扩增长度202 bp。CCR6上游引物为5'-GGT CAA CTT TAA CTG TGG GAT G-3', 下游引物为5'-GGT GTA GGC GAG GAC TTT CT-3', 扩增长度514 bp。MIP-3 α 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 s, 循环34次, 72 $^{\circ}$ C延伸7 min。CCR6和GAPDH扩增反应步骤同上, 58 $^{\circ}$ C退火30 s。扩增后取PCR产物作1.5 g/L琼脂糖凝胶电泳。用“凝胶分析系统”对条带作半定量分析, 读取其积分吸光度值(IA值), 以MIP-3 α 及CCR6平均IA值/GAPDH平均IA值来表示MIP-3 α 及CCR6相对表达强度。

1.2.6 Western blot检测MIP-3 α 、CCR6蛋白表达: 提取总蛋白, 紫外分光光度法测定总蛋白浓度, 制备10 g/L十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 蛋白上样量每孔20 μ L, 在垂直电泳槽中电泳后转膜至硝酸纤维素膜上, 5% TBST封闭4 h, 加入稀释的MIP-3 α 、CCR6一抗(工作浓度1:300)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST洗膜10 min \times 3次, 加入稀释的二抗(工作浓度1:15 000)孵育3 h, ECL荧光试剂显影。以GAPDH为内参照, 凝胶成像分析系统处理数据, 以MIP-3 α 或CCR6与内参照的灰度比值作为MIP-3 α 或CCR6蛋白的相对表达量。

1.2.7 免疫组织化学法检测MIP-3 α 、CCR6蛋

表 1 各组疾病活动指数和组织学评分比较 (分, mean \pm SD)

分组	DAI评分	大体形态评分	组织学评分
空白对照组	0.56 \pm 0.18	0.34 \pm 0.21	0.89 \pm 0.28
DSS模型对照组	3.52 \pm 0.47 ^{bd}	2.89 \pm 0.56 ^{bd}	4.49 \pm 0.46 ^{bd}
生理盐水治疗组	3.52 \pm 0.47 ^{bd}	2.85 \pm 0.51 ^{bd}	4.25 \pm 0.31 ^{bd}
Met-RANTES治疗组	0.96 \pm 0.17 ^{ab}	0.98 \pm 0.34 ^{ad}	1.58 \pm 0.38 ^{ad}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 空白对照组; ^dP<0.01 vs Met-RANTES组。

白表达: 采用Elivison二步法。MIP-3 α 工作浓度15 μ g/L, CCR6工作浓度1:300, 二抗工作浓度1:500, 具体步骤参照试剂盒说明书, 光学显微镜下观察蛋白表达。结果判断^[12]: 胞膜或胞质中呈棕黄色或褐色颗粒状物者为阳性细胞。每张切片随机选取4个高倍视野, 分别根据染色强度和阳性细胞比例进行评分, 总分为两者之积。染色强度: 0分, 无棕黄色颗粒; 1分, 淡黄色颗粒; 2分, 深棕色颗粒; 3分, 大量深棕色或褐色颗粒。阳性细胞比例: 0分, 阴性; 1分, 1%-25%; 2分: 26%-50%; 3分, 51%-75%; 4, 76%-100%。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 用STATA10.0统计软件进行t检验, 方差分析, P<0.05有统计学意义。

2 结果

2.1 DAI评分 空白对照组小鼠饮食、活动及大便性状正常, 毛色光泽, 体质量略有增加。各造模组小鼠造模后第1天开始出现厌食、活动减少、竖毛、大便表现为稀便或半成形不黏肛便, 体质量减轻; 第3天开始出现便血或大便隐血[(+)(++)]; 体质量减轻更加明显; 趋化因子拮抗剂Met-RANTES治疗组, 给药后饮食、体质量逐渐增加、毛色逐渐恢复光泽, 便血或大便隐血逐渐减少至消失或隐血(\pm -+), DSS模型对照组和生理盐水治疗组与空白对照组相比, DAI评分明显增高, 差异有统计学意义(均P<0.01); 生理盐水治疗组小鼠与DSS模型对照组小鼠DAI评分差异无统计学意义(P>0.05); 趋化因子拮抗剂Met-RANTES治疗组与DSS模型对照组和生理盐水治疗组对比, DAI明显下降, 差异有统计学意义(均P<0.01); Met-RANTES治疗组与空白对照组相比, 差异有统计学意义(P<0.05, 表1)。

2.2 大体形态观察及评分 空白对照组小鼠结肠黏膜无充血水肿、糜烂及溃疡形成, 两只远端结肠黏膜轻度充血。DSS模型对照组, 生理盐水

相关报道
Bhatia等研究发现在蛙皮素诱导的急性胰腺炎模型中给予Met-RANTES可以明显减轻肺损害。均提示Met-RANTES具有广泛的生物学作用。

创新盘点
本研究通过Met-RANTES阻断MIP-3 α 及其受体CCR6从而阻止炎症细胞募集到炎症部位,是一种新的抗炎策略,以探索细胞因子在UC中的作用,并探讨Met-RANTES疗效可能机制。

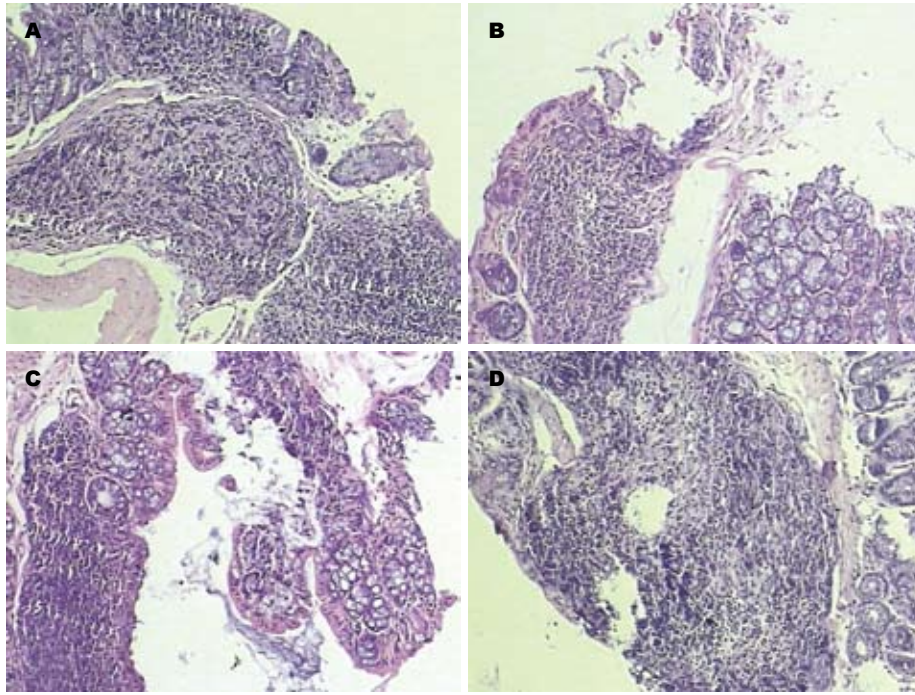


图1 小鼠结肠标本(HE \times 100). A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 生理盐水治疗组; D: Met-RANTES治疗组。

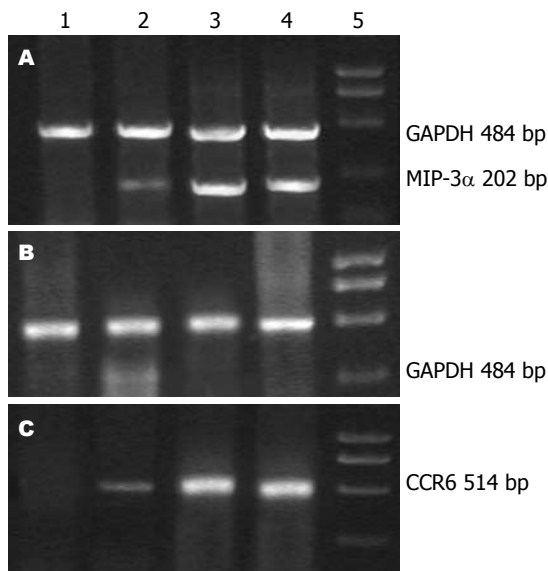


图2 小鼠结肠标本MIP-3 α 、GAPDH和CCR6的mRNA表达。A: MIP-3; B: GAPDH; C: CCR6。1: 空白对照组; 2: Met-RANTES治疗组; 3: 生理盐水治疗组; 4: 模型对照组; 5: Marker。

治疗组小鼠结肠黏膜充血水肿、糜烂及少许浅表溃疡形成,病变连续存在。Met-RANTES治疗组结肠黏膜轻度充血水肿,无糜烂及溃疡形成(表1)。

2.3 组织学观察及评分 空白对照组小鼠结肠黏膜上皮完整,固有层腺体形态正常、排列整齐,黏膜及黏膜下层可见少量炎症细胞浸润,未见糜烂及溃疡(图1A)。DSS模型对照组,生理盐水治疗组小鼠结肠黏膜上皮损伤、缺失、糜烂及溃疡形成,固有层腺体变形、排列紊乱,黏膜及

黏膜下层可见密集分布的淋巴细胞和单核细胞浸润,亦可见少量中性粒细胞浸润,偶见淋巴滤泡形成(图1B, C)。Met-RANTES治疗组结肠黏膜可见炎症细胞浸润,程度较DSS模型组和生理盐水治疗组轻,未见明显糜烂及溃疡(图1D, 表1)。

2.4 MIP-3 α 、CCR6 mRNA表达 空白对照组MIP-3 α 、CCR6 mRNA微弱表达; DSS模型对照组和生理盐水治疗组MIP-3 α 、CCR6 mRNA表达上调,明显高于空白对照组($P < 0.01$); RANTES治疗组MIP-3 α 、CCR6 mRNA表达上调,幅度较DSS模型组和生理盐水治疗组明显降低,与空白对照组、DSS模型组及生理盐水治疗组相比差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 0.01 , 表2, 图2)。

2.5 MIP-3 α 、CCR6蛋白表达 空白对照组MIP-3 α 、CCR6蛋白微弱表达; DSS模型对照组和生理盐水治疗组MIP-3 α 、CCR6蛋白表达上调,明显高于空白对照组($P < 0.01$); Met-RANTES治疗组MIP-3 α 、CCR6蛋白表达上调,幅度较DSS模型组和生理盐水治疗组明显降低,与DSS模型对照组和生理盐水治疗组比较($P < 0.01$); Met-RANTES治疗组MIP-3 α 、CCR6蛋白表达与空白对照组相比($P < 0.05$, 表2, 图3)。

2.6 免疫组织化学 对照组MIP-3 α 、CCR6不表达或仅弱阳性表达; DSS模型组和生理盐水治疗组MIP-3 α 、CCR6表达上调,明显高于对照组(均 $P < 0.01$); Met-RANTES治疗组MIP-3 α 、CCR6表达上调,幅度较DSS模型组和生理盐水

表 2 各组MIP-3 α 、CCR6 mRNA、蛋白表达和免疫组织化学评分 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	mRNA		蛋白		免疫组织化学评分(分)	
	MIP-3 α	CCR6	MIP-3 α	CCR6	MIP-3 α	CCR6
空白对照组	0.09 \pm 0.06	0.11 \pm 0.06	0.08 \pm 0.06	0.07 \pm 0.06	0.51 \pm 0.38	0.61 \pm 0.47
DSS模型对照组	1.09 \pm 0.08 ^{bd}	1.11 \pm 0.07 ^{bd}	0.98 \pm 0.07 ^{bd}	1.19 \pm 0.07 ^{bd}	4.17 \pm 0.46 ^{bd}	5.01 \pm 1.05 ^{bd}
生理盐水治疗组	1.08 \pm 0.07 ^{bd}	1.05 \pm 0.08 ^{bd}	1.05 \pm 0.06 ^{bd}	1.15 \pm 0.06 ^{bd}	4.37 \pm 0.76 ^{bd}	5.05 \pm 1.09 ^{bd}
met-RANTES治疗组	0.21 \pm 0.08 ^{ad}	0.25 \pm 0.08 ^{ad}	0.28 \pm 0.08 ^{ad}	0.25 \pm 0.07 ^{ad}	2.65 \pm 0.32 ^{ad}	2.62 \pm 0.48 ^{ad}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 空白对照组; ^d $P < 0.01$ vs Met-RANTES组.

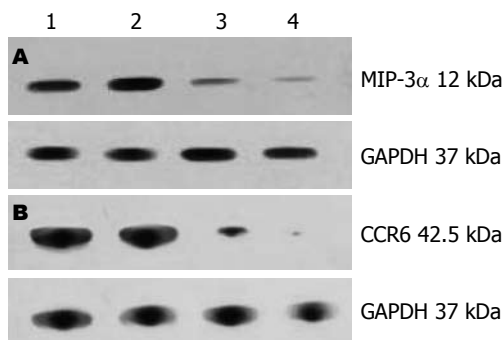


图 3 小鼠结肠标本MIP-3 α 、CCR6蛋白的表达. A: MIP-3 α ; B: CCR6. 1: DSS模型组; 2: 生理盐水治疗组; 3: Met-RANTES治疗组; 4: 对照组.

治疗组明显降低(均 $P < 0.01$); Met-RANTES治疗组MIP-3 α 、CCR6蛋白表达与对照组相比有明显差异(均 $P < 0.05$, 表2, 图4).

3 讨论

趋化因子是一类促炎细胞因子, 趋化因子通过其相应受体对多种细胞如淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、树突状细胞(DC)等的趋化作用而在多种疾病的免疫反应和炎症损伤中发挥重要作用. MIP-3 α 通过其受体CCR6的作用趋化未成熟树突状细胞进入结肠黏膜, 同时活化和趋化淋巴细胞^[13,14]. 在UC中, 肠上皮细胞能吸引中性粒细胞和淋巴细胞等炎症细胞到受累肠黏膜表面, 并释放细胞因子, 在细胞因子IL-1 α 、TNF- α 等的作用下NF- κ B表达上调, NF- κ B进一步上调MIP-3 α 以及CCR6的表达^[15]. 从而使更多的imDC和趋化淋巴细胞聚集于受累肠壁, 使炎症进一步加重. DC是一类专职抗原呈递细胞, 具有强大的抗原呈递和处理功能. 成熟树突状细胞可以激活T淋巴细胞发生免疫反应并表达重要的共刺激分子如CD80、CD86、CD83、CD54和CD40等^[16]. 尽管产生炎症的原因各不相同, 但最终导致炎症的途径是由CD4 T细胞分化的辅助性T细胞1(Th1)或Th2所介导. UC通常被

认为是Th2介导的肠道黏膜炎症.

Met-RANTES是CC亚族趋化因子拮抗剂, 通过重组人RANTES(regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), 在RANTES的NH2端加上蛋氨酸(met)修饰后得到RANTES的类似物Met-RANTES(me-thionylated RANTES). 研究发现, Met-RANTES是人CCR1的有效拮抗剂, 同时也具有拮抗CCR5的作用^[17-20], 可以竞争性结合趋化因子受体而抑制RANTES和MIP-1 α 的趋化作用, 特异性抑制其对单核细胞, 嗜酸性粒细胞和T细胞趋化作用. Uchida等^[21]在小鼠气管移植实验中发现, 给予Met-RANTES能减轻气道闭塞和下调细胞外信号调节酶的表达. Bhatia等^[22]研究发现在蛙皮素诱导的急性胰腺炎模型中给予Met-RANTES可以明显减轻肺损害. 均提示Met-RANTES具有广泛的生物学作用.

在一些慢性炎症性疾病中, 趋化因子靶向治疗逐渐被学术界关注, 许多趋化因子和他们的受体已被成功地作为靶向治疗干预. Hyun等^[23]在小鼠大肠炎动物模型研究表明: 在大肠炎的发展阶段, 给予IP-10单克隆抗体能减轻临床症状和组织损伤、减少IP-10 mRNA的表达以及减少单核细胞在淋巴结和结肠的累积. Rivera-Nieves等^[24]通过自发鼠类动物模型研究发现, 在慢性回肠炎早期CCR9表达增多; CCL25, 即胸腺表达的趋化因子(TECK), 表达局限于小肠; 给予抗体阻断CCL25/CCR9能减轻早期慢性鼠类回肠炎, 而在后期阶段由于CCR9表达下降, 治疗效果不佳. Kucuk等^[25]研究表明在小鼠实验性结肠炎模型中给予Met-RANTES治疗可以明显减少结肠黏膜的损害同时可以抑制肠道内细菌的移位. 我们的研究发现, 在DSS诱导的小鼠结肠炎模型中, MIP-3 α 及其受体CCR6表达明显上调, 在空白对照组小鼠不表达或弱阳性表达. 在DSS诱导的小鼠结肠炎模型中通过给予趋化因子拮抗剂Met-RANTES, 小鼠临床症状较DSS模型对照组

应用要点
MIP-3 α 与CCR6参与了小鼠UC的发生、发展; Met-RANTES能下调MIP-3 α 及CCR6的表达, 并能减轻炎症损伤; 针对MIP-3 α 或CCR6的靶向治疗可能是UC一种有效的治疗方法.

同行评价
 本文探索MIP-3 α 及其受体CCR6在UC中的作用,并探讨Met-RANTES疗效机制,有一定的科研和临床意义。

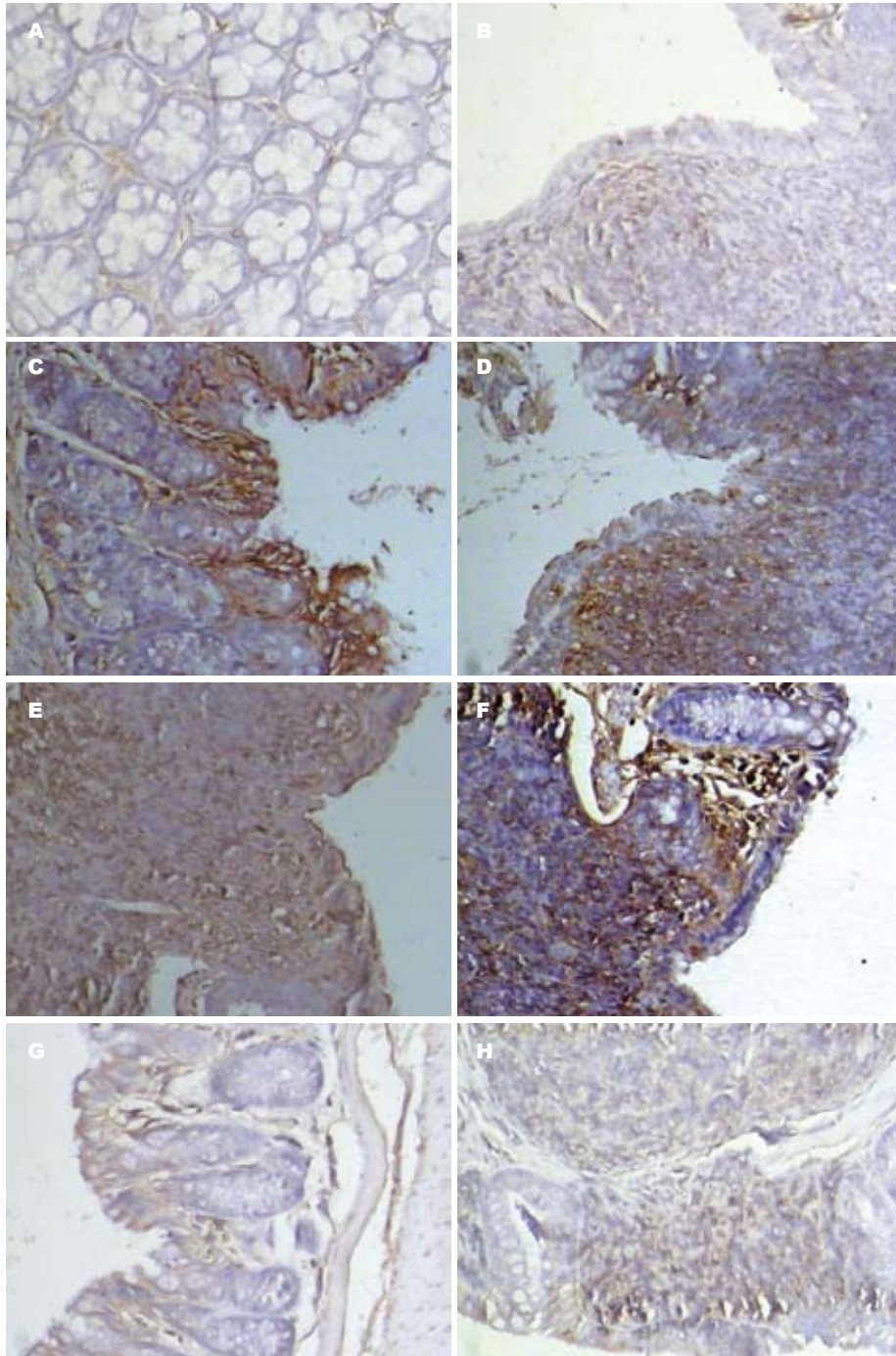


图4 各组MIP-3 α 、CCR6的表达. A, B: 空白对照组; C, D: DSS模型对照组; E, F: 生理盐水治疗组; G, H: Met-RANTES治疗组. A, C, E, G: MIP-3 α 表达($\times 100$); B, D, F, H: CCR6表达($\times 400$).

和生理盐水治疗组明显减轻, MIP-3 α 与CCR6表达显著下调. CCR6作为MIP-3 α 的受体, 其表达情况与MIP-3 α 的表达情况相一致, 提示MIP-3 α 和CCR6在UC的发病中扮演重要作用, 且Met-RANTES对UC有治疗作用, 其机制可能是通过拮抗MIP-3 α 和CCR6来实现的. 但Met-RANTES治疗组小鼠和正常空白对照组相比, MIP-3 α 、CCR6的表达是上调的, 差异有统计学意义, 推测其原因可能为在给予Met-RANTES时候, 同时也在给予DSS; 其次, Met-RANTES不是MIP-3 α 和CCR6的特异拮抗剂; Met-RANTES的给予剂

量也有待进一步探索. Met-RANTES在UC中的作用还不完全清楚, 深入研究Met-RANTES在UC中的作用以及其与MIP-3 α 、CCR6的相互关系将给UC治疗带来希望.

我们认为, MIP-3 α 、CCR6在UC的发病发展中起着重要作用, Met-RANTES具有拮抗MIP-3 α 、CCR6的活性并对UC有治疗作用. 因此, 通过拮抗炎因子活性来减轻炎症损伤并达到治疗目的, 是一种可行的UC治疗方法, 但是寻找安全有效的炎症因子拮抗剂, 仍需要进一步研究.

4 参考文献

- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 2002; 441: 500-513
- Pannellini T, Iezzi M, Di Carlo E, Eleuterio E, Coletti A, Modesti A, Rosini S, Neri M, Musiani P. The expression of LEC/CCL16, a powerful inflammatory chemokine, is upregulated in ulcerative colitis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17: 171-180
- Carlsen HS, Baekkevold ES, Morton HC, Haraldsen G, Brandtzaeg P. Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Blood* 2004; 104: 3021-3027
- Yang SK, Choi MS, Kim OH, Myung SJ, Jung HY, Hong WS, Kim JH, Min YI. The increased expression of an array of C-X-C and C-C chemokines in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis: regulation by corticosteroids. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 126-132
- Papadakis KA, Prehn J, Zhu D, Landers C, Gaiennie J, Fleshner PR, Targan SR. Expression and regulation of the chemokine receptor CXCR3 on lymphocytes from normal and inflammatory bowel disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 778-788
- Buanne P, Di Carlo E, Caputi L, Brandolini L, Mosca M, Cattani F, Pellegrini L, Biordi L, Coletti G, Sorrentino C, Fedele G, Colotta F, Melillo G, Bertini R. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. *J Leukoc Biol* 2007; 82: 1239-1246
- Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 469-499
- Stevceva L, Pavli P, Husband AJ, Doe WF. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it. *BMC Clin Pathol* 2001; 1: 3
- Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 51-58
- Boirivant M, Fuss IJ, Ferroni L, De Pascale M, Strober W. Oral administration of recombinant cholera toxin subunit B inhibits IL-12-mediated murine experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis. *J Immunol* 2001; 166: 3522-3532
- Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pathol* 2003; 199: 28-35
- Watanabe S, Yamakawa M, Hiroaki T, Kawata S, Kimura O. Correlation of dendritic cell infiltration with active crypt inflammation in ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2007; 122: 288-297
- Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. Regulated MIP-3 α /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G710-G719
- Jin Y, Fuller L, Ciancio G, Burke GW 3rd, Tzakis AG, Ricordi C, Miller J, Esquenzai V. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow. *Hum Immunol* 2004; 65: 93-103
- Oki M, Ohtani H, Kinouchi Y, Sato E, Nakamura S, Matsumoto T, Nagura H, Yoshie O, Shimosegawa T. Accumulation of CCR5+ T cells around RANTES+ granulomas in Crohn's disease: a pivotal site of Th1-shifted immune response? *Lab Invest* 2005; 85: 137-145
- Matsuzaki K, Hokari R, Kato S, Tsuzuki Y, Tanaka H, Kurihara C, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Nagata K, Miura S. Differential expression of CCR5 and CRTH2 on infiltrated cells in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1081-1088
- Kiss DL, Longden J, Fechner GA, Avery VM. The functional antagonist Met-RANTES: a modified agonist that induces differential CCR5 trafficking. *Cell Mol Biol Lett* 2009; 14: 537-547
- Akyildiz H, Akcan A, Sozuer E, Kucuk C, Yilmaz N, Deniz K. The preventive effect of Met-RANTES on postoperative intraperitoneal adhesion formation in the rat model. *Surgery* 2008; 144: 404-409
- Uchida O, Kajiwarra N, Hayashi A, Miyajima K, Nagatsuka T, Hayashi H, Taira M, Kimura M, Tsuboi M, Kato H. Met-RANTES ameliorates fibrous airway obliteration and decreases ERK expression in a murine model of bronchiolitis obliterans. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 13: 82-86
- Bhatia M, Proudfoot AE, Wells TN, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Treatment with Met-RANTES reduces lung injury in caerulein-induced pancreatitis. *Br J Surg* 2003; 90: 698-704
- Hyun JG, Lee G, Brown JB, Grimm GR, Tang Y, Mittal N, Dirisina R, Zhang Z, Fryer JP, Weinstock JV, Luster AD, Barrett TA. Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 799-805
- Rivera-Nieves J, Ho J, Bamias G, Ivashkina N, Ley K, Oppermann M, Cominelli F. Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1518-1529
- Kucuk C, Sozuer E, Gursoy S, Canoz O, Artis T, Akcan A, Akyildiz H, Muhtaroglu S. Treatment with Met-RANTES decreases bacterial translocation in experimental colitis. *Am J Surg* 2006; 191: 77-83

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

iNOS/NO体系在慢性肝炎及肝硬化患者中的表达

李睿, 张宁, 赵瑾, 徐丽红, 黎永军, 刘芳, 陈卫刚

背景资料
在病毒性肝炎和肝硬化的发生、发展过程中, 内源性NO是一个非常重要的生理性及病理生理性因子, 但NO与肝病的确切关系有待进一步阐明。

李睿, 张宁, 徐丽红, 黎永军, 刘芳, 陈卫刚, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008

赵瑾, 新疆石河子大学医学院病理科 新疆维吾尔自治区石河子市 832002

李睿, 华中科技大学同济医学院附属协和医院在读博士, 主要从事功能性肠病的研究。

作者贡献分布: 李睿、陈卫刚及张宁对此文所作贡献均等; 此课题由李睿、陈卫刚、张宁、徐丽红及黎永军设计; 研究过程由李睿、陈卫刚、张宁、刘芳及赵瑾操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由赵瑾提供; 数据分析由陈卫刚、张宁及李睿完成; 本论文写作由李睿、陈卫刚及张宁完成。

通讯作者: 陈卫刚, 副主任医师, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科。cwg_sh@126.com

电话: 0993-2859284

收稿日期: 2009-11-08 修回日期: 2010-01-03

接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-03-08

Peripheral and portal plasma iNOS activity and hepatic expression of iNOS in patients with chronic hepatitis or liver cirrhosis

Rui Li, Ning Zhang, Jin Zhao, Li-Hong Xu, Yong-Jun Li, Fang Liu, Wei-Gang Chen

Rui Li, Ning Zhang, Li-Hong Xu, Yong-Jun Li, Fang Liu, Wei-Gang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jin Zhao, Department of Pathology, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Wei-Gang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. cwg_sh@126.com

Received: 2009-11-08 Revised: 2010-01-03

Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the role of nitric oxide (NO) in the development and progression of hepatitis and liver cirrhosis.

METHODS: Peripheral and portal plasma inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity was measured by the nitric acid reductase method. The expression of iNOS mRNA and protein in the liver was measured by reverse transcription-

polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: Peripheral and portal plasma iNOS activity, especially the latter, was significantly higher in patients with chronic hepatitis or liver cirrhosis than in normal controls ($F = 102.793$ and 25.052 , respectively; both $P < 0.01$). The expression levels of iNOS protein in the liver of patients with chronic hepatitis or liver cirrhosis were enhanced when compared to that in normal controls ($F = 46.796$, $P < 0.05$). The expression levels of iNOS mRNA in the liver of patients with chronic hepatitis or hepatic cirrhosis were also higher than that in normal controls ($F = 26.832$, $P < 0.01$), showing an increasing trend with the progression of the diseases.

CONCLUSION: The iNOS/NO system plays an important role in the development and progression of chronic hepatitis and hepatic cirrhosis perhaps by dilating blood vessels.

Key Words: Chronic Hepatitis; Cirrhosis; Nitric oxide; Inducible nitric oxide synthase

Li R, Zhang N, Zhao J, Xu LH, Li YJ, Liu F, Chen WG. Peripheral and portal plasma iNOS activity and hepatic expression of iNOS in patients with chronic hepatitis or liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 664-668

摘要

目的: 探讨内源性NO在慢性病毒性肝炎-肝硬化发展进程中的作用。

方法: 采用硝酸还原酶法比色测定外周静脉及门静脉血浆中iNOS活性, 并用免疫组织化学和RT-PCR方法观察肝组织iNOS蛋白及RNA的表达。

结果: 在慢性肝炎患者及肝硬化患者门静脉血与外周血中iNOS活性与对照组相比均明显升高($F = 102.793$, 25.052 , $P < 0.01$), 且门静脉血iNOS活性增高更为明显。慢性肝炎组及肝硬化组中iNOS蛋白的灰阶值均低于正常对照组($F = 46.796$, $P < 0.05$), 表明iNOS表达增强。慢性

同行评议者
朱传武, 主任医师, 江苏省苏州市第五人民医院传染科

肝炎组、肝硬化组iNOS mRNA的表达均分别显著高于正常对照组($F = 26.832, P < 0.01$), 且随着肝脏病变的加重表达逐渐增加。

结论: iNOS/NO体系在慢性肝炎-肝硬化发生发展中起着保持血管舒张状态的重要作用。

关键词: 慢性肝炎; 肝硬化; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶

李睿, 张宁, 赵瑾, 徐丽红, 黎永军, 刘芳, 陈卫刚. iNOS/NO体系在慢性肝炎及肝硬化患者中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 664-668

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/664.asp>

0 引言

一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种气体信号分子具有信息传递、介导炎症反应等多种功能。NO参与了多种肝脏疾病的发生与发展, 参与肝硬化高动力循环的形成和维持, 近年来, 肝内一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)克隆的出现, 使NO与肝病关系的研究不断深入。然而, 有关NO慢性肝炎患者与肝硬化患者中的表达差异尚少见报道。本文通过病理诊断对20例慢性肝炎患者、20例肝硬化患者和10例正常人门静脉血及外周血中NO进行检测, 并观察诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在肝组织中蛋白以及mRNA的表达情况, 比较NO在门静脉血与外周血中的差异, 并检测iNOS/NO体系在慢性肝炎患者及肝硬化患者中的表达水平, 分析其中的差异变化, 以探讨NO在肝硬化发生、发展过程中发挥的作用, 为肝硬化的早期诊断提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2006-01/2009-01我院肝病住院患者40例, 肝硬化诊断均符合2000-09西安中华医学会传染病与寄生虫病学会分会肝病分会联合修订的标准, 慢性肝炎组均为乙型肝炎表面抗原阳性, 但病理检查未达到肝硬化诊断标准的患者, 正常对照组为经伦理委员会讨论批准的健康体检人员, 甲、乙、丙型肝炎肝均为阴性, 肝功能正常, 通过B超导向下肝穿刺活检, 取患者肝组织, 通过病理学诊断, 确定慢性肝炎组患者20例, 其中男12例, 女8例, 平均年龄53.55岁; 乙型肝炎后肝硬化组患者20例, 其中男8例, 女12例, 平均年龄50.35岁; 正常对照组10例, 其中男7例, 女3例, 平均年龄45.68岁, 肝病组均无原发性心肺肾疾病, 无肿瘤病史, 近期无服用硝基类药物史。

iNOS测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; iNOS上下游引物均由上海生工生物工程公司合成; RNA抽提试剂TRIzol为美国Invitrogen公司产品; RT-PCR一步法试剂盒为德国QIAGEN产品; iNOS单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 标本收集: 3组人员清晨空腹采肘静脉血(肝素钠抗凝)3 mL, B超导向下经肝穿刺门静脉插管取门静脉血约1 mL, 4 °C 4 000 r/min离心10 min, 分离血清-80 °C冰箱保存; 所有受试者均在B超导向下经肝穿刺, 取肝组织1.8 cm×0.2 cm放入洁净EP管中密封, -80 °C冰箱保存, 另取一次用100 g/L甲醛固定后, 石蜡包埋。

1.2.2 血清中iNOS活性的测定: 采用硝酸还原酶化学比色法, 根据试剂盒操作步骤检测。

1.2.3 RT-PCR检测肝组织内iNOS mRNA的表达: 使用TRIzol法提取肝脏总RNA, 应用10 g/L的琼脂糖凝胶电泳检查RNA的完整性, 并用紫外分光光度仪行RNA浓度及纯度测定, A_{260}/A_{280} 均为1.8-2.0说明RNA纯度较高。应用RT-PCR一步法检测试剂盒对肝组织总RNA进行扩增。设计引物, iNOS引物序列为: 上游: 5'-GGAGCCAGCTCTGCATTATC -3', 下游: 5'-TT TTGTCTCCAAGGGACCAG-3', 片段长度195 bp; 内参GAPDH引物序列: 上游: 5'-ACCACAG TCCATGCCATCAC-3', 下游: 5'-TCCACCACC CTGTTGCTGTA-3', 片段长度452 bp。iNOS的RT-PCR反应条件: 50 °C, 30 min; 95 °C, 15 min; 94 °C, 30 s, 52 °C, 45 s, 72 °C, 60 s, 共35个循环; 72 °C延伸10 min, 反应结束后, PCR产物用20 g/L的琼脂糖凝胶进行电泳分析, 采用Quantity one凝胶成像分析系统计算各个条带的吸光度值, 以iNOS/GAPDH比值表示iNOS mRNA的相对表达水平。

1.2.4 iNOS蛋白表达: 采用ABC免疫组织化学方法, 石蜡包埋组织后, 5 μm厚连续切片, 脱蜡至水, 抗原热修复, DAB显色, 苏木素复染, 脱水、透明, 中性树脂封片。阳性部位在胞质处显棕黄色。每例切片在低倍镜下将视野按十字形分为上、下、左、右、中5个区域, 然后在400倍镜视野下应用OLMPUS-DP70彩色病理图文分析系统, 测定免疫反应阳性产物灰度值, 灰度值越低说明表达越强, 反映细胞内蛋白表达量越多, 以灰度值来进行量化后的统计学分析。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学分析, 所有数据以mean±SD表示, 采用方差分析

研发前沿
肝病患者血清NO水平明显升高, 说明NO参与肝炎、肝炎后肝硬化发病过程, 寻求NO在慢性肝病损害和保护作用的浓度界限, 有可能为利用NO控制慢性肝病、肝硬化提供新的治疗方案。

相关报道
Stark等的研究表明内毒素刺激的库普弗细胞和肝细胞的NO释放增加, NO水平的上升与肝细胞蛋白质合成的下降相平行, 表明NO能抑制肝细胞蛋白质的合成, 这可能是临床上常见的肝硬化患者易产生低蛋白血症的原因之一。

创新盘点
本文采用门静脉取血的方法测定门静脉血中iNOS的含量并与外周静脉血比较差异。

表 1 各组门静脉血与外周静脉血之间iNOS活力的比较 (mean ± SD, kU/L)

分组	n	门静脉血	外周静脉血	t值	P值
正常对照组	10	9.02 ± 1.04	8.63 ± 1.98	0.422	0.682
慢性肝炎组	20	13.30 ± 1.73 ^a	12.87 ± 2.59 ^b	0.623	0.537
肝硬化组	20	19.29 ± 1.93 ^{bd}	16.07 ± 2.22 ^{bc}	4.913	0.000

^aP<0.01 vs 正常对照组; ^bP<0.05, ^dP<0.01 vs 慢性肝炎组。

表 2 各组肝组织中iNOS mRNA相对表达量与蛋白的表达 (mean ± SD)

分组	n	iNOS蛋白	iNOS mRNA
正常对照组	10	181.71 ± 6.75	0.53 ± 0.08
慢性肝炎组	20	166.01 ± 8.23 ^a	0.75 ± 0.18 ^b
肝硬化组	20	144.56 ± 10.93 ^{bc}	0.89 ± 0.06 ^{bc}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 正常对照组; ^cP<0.05 vs 慢性肝炎组。

进行组间比较, 使用独立样本t检验与相关性分析, P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常人及慢性肝炎患者、肝硬化患者门静脉血及外周血中iNOS活性的变化 肝硬化组以及慢性肝炎组患者门静脉血iNOS活性与正常对照组比较均明显升高($F = 102.793, P < 0.01$)。在此基础上进一步行组间两两比较差异均有统计学意义。肝硬化组以及慢性肝炎组患者外周静脉血iNOS活性与正常对照组比较也明显升高($F = 25.052, P \leq 0.01$)。各组患者门静脉血与外周静脉血之间iNOS活力的比较, 正常对照组和慢性肝炎组门静脉血与外周静脉血之间iNOS活力相比差异无统计学意义, 但在肝硬化组, 门静脉血中iNOS活力明显高于外周静脉血, 二者差异有统计学意义(表1)。

2.2 正常人及慢性肝炎患者、肝硬化患者肝组织中iNOS mRNA的表达 肝硬化组iNOS mRNA的相对表达量显著高于正常对照组($F = 26.832, P < 0.01$)。行Q检验示肝硬化组、慢性肝炎组及正常对照组两两比较均有统计学意义, 且随着肝硬化病变的加重, iNOS mRNA的表达逐渐增加(图1, 表2)。

2.3 正常人及慢性肝炎患者、肝硬化患者肝组织中iNOS蛋白的表达 慢性肝炎组iNOS的灰阶值低于正常对照组, 而肝硬化组肝组织中iNOS的灰阶值最低($F = 46.796, P < 0.05$)。表明肝硬化患者肝组织中iNOS蛋白的表达最高(图2, 表2)。

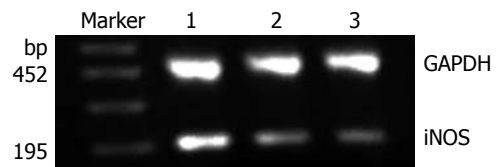


图 1 各组肝组织中iNOS mRNA的表达。1: 肝硬化组; 2: 慢性肝炎组; 3: 正常对照组。

3 讨论

肝硬化是一种多种致病因素长期或反复作用于肝脏引起的肝实质弥漫性损害, 使肝细胞变性、坏死、再生, 导致肝小叶和肝血管结构的紊乱, 最终形成假小叶及血管重建, 进一步引起一系列肝功能损害和门静脉高压的临床表现, 病毒性肝炎是肝硬化发病的主要原因之一。

NO由L-精氨酸(L-arginine)在NOS的作用下生成, NO是一种活性很强的自由基, 具有氧化、还原特性。内源性NO是由L-精氨酸通过NOS的催化, 脱去胍基末端氮原子与氧结合而成。在NO合成过程中, NOS是一重要的限速酶, 目前已经确定的NOS有3型^[1]: 神经原型NOS(nNOS)主要分布在神经元细胞, 参与神经信息传递; 内皮型NOS(eNOS)主要分布于内皮细胞, 起着维持血液和淋巴循环的作用; 诱导型NOS(iNOS)分布广泛, 主要参与炎症反应。nNOS、eNOS在静息期细胞持续表达, 产生低浓度的NO, 发挥生理性调节作用, 所以也统称为结构型NOS, 受钙调素调控; 而iNOS在静息期细胞不表达, 在细胞受到各种刺激因子例如内毒素、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 等作用后可诱导激活iNOS, 以不依赖钙调素调控的方式促进NO的快速合成, 发挥特定的病理生理调节作用。iNOS主要分布在血管内皮、巨噬细胞、中性粒细胞、肝细胞等部位^[2]。NO是一种强有力的血管内皮细胞舒张因子, 广泛参与机体生理功能的调节。NO作为一种细胞传导信使, 以扩散方式到达靶细胞, 在许多组织中发挥重要的生理和病理作用, 其重要作用是介导血管平滑肌

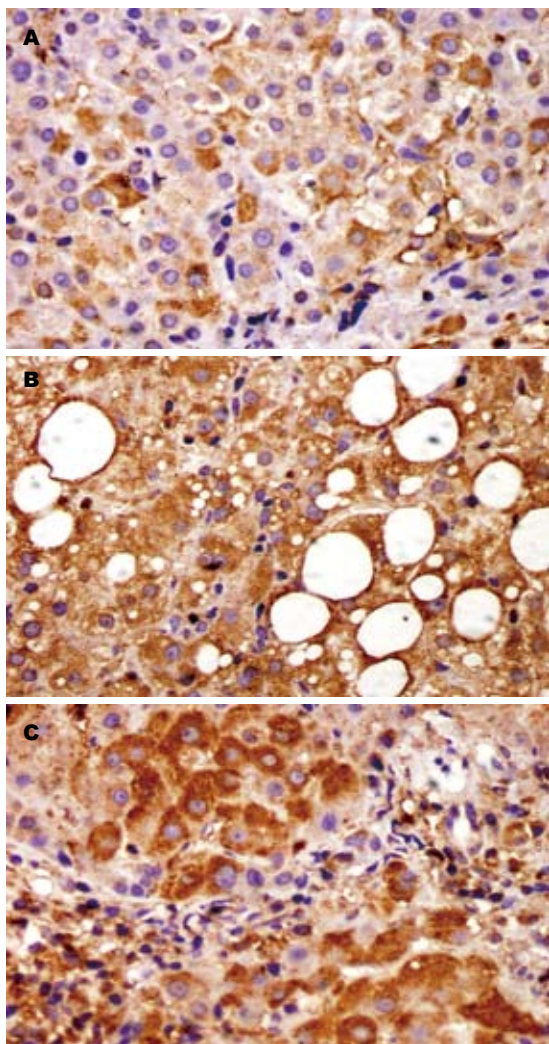


图 2 iNOS在各组肝组织中的表达(DAB × 100). A: 正常对照组; B: 慢性肝炎组; C: 肝硬化组.

扩张. 有很多实验证明, 在肝硬化患者和动物血浆中, NO水平明显增高, 且与疾病的严重性相关^[3,4]. 有学者证实肝硬化门脉高压者内脏组织, 如腹主动脉、肠系膜动脉、肝脏、胃肠黏膜等NOS均表达升高, 致使内脏血管扩张从而使流入门静脉血量增多^[5,6].

我们的研究显示: 在肝硬化患者门静脉血与外周血中iNOS活力与对照组、慢性肝炎组相比均明显升高; 研究还显示肝硬化时门静脉血较外周静脉血中iNOS活力升高更为明显, 表示iNOS活力在门脉系统中作用更为显著. 慢性肝炎及肝硬化肝组织中iNOS蛋白的表达以及iNOS mRNA的表达与对照组相比均明显增加, 且肝硬化组较慢性肝炎组iNOS蛋白及mRNA的表达也明显升高. 因此, iNOS慢性肝炎向肝硬化发展过程中可能逐渐增高, NO参与了慢性肝炎到肝硬化发展进程.

然而在肝炎、肝硬化发病过程中, NO起损伤还是保护作用, 仍有争议. 潘红英等^[7]报道, 慢性重型病毒肝炎(早期)患者血清NO的水平显著高于健康者, 且NO与总胆红素呈显著正相关, 与血浆凝血酶原活动度呈显著负相关, 由此说明, 慢重肝(早期)患者血清NO水平高低在一定程度上反映了肝细胞受损害的轻重, 可作为判定慢重肝(早期)的指标之一. Sharara等^[8]在用IFN- α 治疗丙型肝炎的过程中, 观察到NOS活性及NO含量随血清ALT和HCV mRNA的降低而升高, 提示NO水平与肝损害程度呈负相关, 推测NO在肝损害中具有保护作用. 然而, 另有研究显示: LPS和/或病毒诱生的IFN- γ 、TNF- α 等多种细胞因子导致肝细胞、库普弗细胞产生大量NO, 而NO可造成线粒体损伤, 即过量NO可致氧化性肝损伤. 因此, 长期高水平NO对细胞的毒性作用可能大于保护作用^[9]. Stark等^[10]的研究表明内毒素刺激的库普弗细胞和肝细胞的NO释放增加, NO水平的上升与肝细胞蛋白质合成的下降相平行, 表明NO能抑制肝细胞蛋白质的合成, 这可能是临床上常见的肝硬化患者易产生低蛋白血症的原因之一. NO可以通过抑制线粒体鸟头酸酶活性对肝细胞的能量代谢产生重要影响. 另外, NO对肝细胞葡萄糖代谢、脂类代谢亦有影响, 并且可通过抑制DNA合成的酶类而抑制NOS DNA的合成, 早在1991年Vallance等^[11]首先提出内源性NO合成和释放过多是引起肝硬化高动力循环的主要介质这一假说. 有学者对肝硬化患者血清NO水平与对照组进行比较, 发现肝硬化患者血清NO水平明显升高, 且随着病情进展呈递增性变化, 说明血清中NO水平与肝功能状态有关^[12].

肝硬化门静脉高压主要与门静脉系统血流受阻以及内脏血流高动力循环有关, 二者均与肝硬化时血管活性物质的代谢紊乱密切相关. NO致门静脉高压高动力循环的机制是: (1)NO能与可溶性鸟苷酸环化酶活性基团的Fe²⁺结合, 使该酶激活, 激活的鸟苷酸环化酶作用于GTP使之转化为cGMP, 进而激活依赖于cGMP的蛋白激酶, 使胞质内游离Ca²⁺降低, 血管平滑肌舒张^[13]. Pizcueta等^[14]对CCl₄所致大鼠肝硬化的研究表明, 在使用NOS抑制剂L-NMMA后肝硬化大鼠平均动脉压、内脏血管阻力、门静脉阻力显著升高, 心输出量、门静脉压力显著降低, 如预先给予L-精氨酸则可以阻断L-NMMA的有关效应, 提示NO参与了肝硬化门静脉高压时高动

应用要点
本研究提示, 门静脉取血的方法相对安全, 门静脉血中相关因子的变化可相对直接的反应肝脏病理生理变化.

同行评价
 本文通过检测慢性肝炎和肝硬化患者外周静脉血、门静脉血及肝组织中iNOS/NO体系的表达,进一步说明NO与肝硬化的关系,具有一定的意义。

力循环的形成,在肝硬化门静脉高压症的形成和维持中起着重要作用;(2)肝硬化时血清NO水平升高能够降低内脏血管对缩血管物质如内皮素、去甲肾上腺素、血管紧张素等的敏感性^[5];(3)NO对门脉系统侧支循环的建立也起一定作用,NO能使血管括约肌舒张,或引起A-V短路开放,可导致门静脉血流量和内脏血流量的进一步增加^[6]。

由此我们推测NO含量升高主要因为高水平的内毒素通过刺激巨噬细胞、库普弗细胞释放细胞因子,诱导诱生型一氧化氮合酶生成大量NO,硬化的肝窦内皮细胞内皮型一氧化氮合酶功能减退,NO释放减少使肝内血管阻力增加,进一步促进肝硬化的发展。

目前对于NO对肝炎、肝硬化形成的作用机制并未完全阐明,但是气体信号分子NO体系的确参与了肝硬化门静脉高压的形成,并对肝脏的血流调节具有重要的作用,而NO与其他信号分子之间有无相互调节作用,均有待于进一步的研究证实。

4 参考文献

- 1 Rockey DC, Shah V. Nitric oxide biology and the liver: report of an AASLD research workshop. *Hepatology* 2004; 39: 250-257
- 2 Stadler J, Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, Ochoa JB, Simmons RL. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1991; 260: C910-C916
- 3 Huang YQ, Xiao SD, Zhang DZ, Mo JZ. Nitric oxide synthase distribution in esophageal mucosa and hemodynamic changes in rats with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 213-216
- 4 李蕴铷, 孙静媛. 一氧化氮和内皮素在肝硬变合并肝肾综合征患者中的变化及意义. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 484-485
- 5 Ohta M, Tarnawski AS, Itani R, Pai R, Tomikawa M, Sugimachi K, Sarfeh JJ. Tumor necrosis factor alpha regulates nitric oxide synthase expression in portal

- hypertensive gastric mucosa of rats. *Hepatology* 1998; 27: 906-913
- 6 Sánchez-Rodríguez A, Criado M, Rodríguez-López AM, Esteller A, Martín de Arriba A, López-Novoa JM. Increased nitric oxide synthesis and inducible nitric oxide synthase expression in patients with alcoholic and non-alcoholic liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94: 637-643
- 7 潘红英, 童永喜, 娄国强, 俞秀丽, 卢德荣, 吴惟一. N-乙酰半胱氨酸对重型病毒性肝炎患者血清一氧化氮水平的影响. *中国现代应用药学杂志* 2004; 21: 255-257
- 8 Sharara AI, Perkins DJ, Misukonis MA, Chan SU, Dornitz JA, Weinberg JB. Interferon (IFN)-alpha activation of human blood mononuclear cells in vitro and in vivo for nitric oxide synthase (NOS) type 2 mRNA and protein expression: possible relationship of induced NOS2 to the anti-hepatitis C effects of IFN-alpha in vivo. *J Exp Med* 1997; 186: 1495-1502
- 9 王玉华, 马万林, 孙宝佳, 宋爱华, 王晋生, 韩淑华, 吴淑兰, 韩忠厚. 各型病毒性肝炎一氧化氮变化及其临床意义. *河北医科大学学报* 1999; 20: 269-271
- 10 Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-1949
- 11 Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337: 776-778
- 12 Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002; 35: 478-491
- 13 Dufour JF, Turner TJ, Arias IM. Nitric oxide blocks bile canalicular contraction by inhibiting inositol trisphosphate-dependent calcium mobilization. *Gastroenterology* 1995; 108: 841-849
- 14 Pizcueta P, Piqué JM, Fernández M, Bosch J, Rodés J, Whittle BJ, Moncada S. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992; 103: 1909-1915
- 15 Hartleb M, Moreau R, Cailmail S, Gaudin C, Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to endothelin 1 in rats with cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1085-1093
- 16 Lee FY, Colombato LA, Albillos A, Groszmann RJ. Administration of N omega-nitro-L-arginine ameliorates portal-systemic shunting in portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1993; 105: 1464-1470

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

脾动脉栓塞术对肝癌伴脾亢患者免疫功能的影响

马立辉, 周健, 史丽民, 胡大为, 王助新, 崔亮

马立辉, 史丽民, 胡大为, 王助新, 崔亮, 承德医学院附属医院肿瘤外科 河北省承德市 067000
周健, 承德医学院附属医院老年病科 河北省承德市 067000
马立辉, 副教授, 从事肿瘤外科的临床、科研及教学工作。
作者贡献分布: 马立辉与周健对此文贡献均等; 此课题由马立辉与周健设计; 研究过程由马立辉、周健、史丽民、胡大为、王助新及崔亮共同完成; 研究所用临床医疗材料由胡大为提供; 数据分析由马立辉、周健及崔亮完成; 本论文写作由马立辉、周健、王助新及崔亮共同完成。
通讯作者: 胡大为, 主任医师, 067000, 河北省承德市, 承德医学院附属医院肿瘤外科. malihui3939@sina.com
电话: 0314-2065898
收稿日期: 2010-01-11 修回日期: 2010-02-19
接受日期: 2010-02-23 在线出版日期: 2010-03-08

Impact of splenectomy partial splenic embolization on immune function in patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism

Li-Hui Ma, Jian Zhou, Li-Min Shi, Da-Wei Hu, Zhu-Xin Wang, Liang Cui

Li-Hui Ma, Li-Min Shi, Da-Wei Hu, Zhu-Xin Wang, Liang Cui, Department of Oncosurgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
Jian Zhou, Department of Gerontology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
Correspondence to: Da-Wei Hu, Department of Oncosurgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China. malihui3939@sina.com
Received: 2010-01-11 Revised: 2010-02-19
Accepted: 2010-02-23 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the impact of splenectomy and partial splenic embolization (PSE) on immune function in patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism.

METHODS: A prospective study was performed. Sixty-nine patient clinically diagnosed as liver cancer with hypersplenism were randomly divided into two groups: PSE group ($n = 37$) and splenectomy group ($n = 32$). The PSE group underwent PSE and transcatheter arterial chemoembolization (TACE), while the splenectomy group underwent splenectomy and TACE. Before and after treatment, blood routine exami-

nation was performed, and immunologic parameters were determined in both groups. The complications associated with treatment were also observed.

RESULTS: In the PSE group, significant differences were noted in WBC and PLT (both $P < 0.05$) but not in RBC ($P > 0.05$) between before and after treatment. Similar results were also obtained in the splenectomy group. No significant differences were found in preoperative CD4⁺ lymphocyte percentage and CD4⁺/CD8⁺ ratio between the PSE group and the splenectomy group. However, significant differences were noted in CD4⁺ lymphocyte percentage and CD4⁺/CD8⁺ ratio 7 and 28 days after treatment (CD4⁺: $t = 16.063$ and 9.409 , both $P < 0.05$; CD4⁺/CD8⁺: $t = 2.060$ and 2.228 , both $P < 0.05$). Significant differences were noted between preoperative and postoperative CD4⁺ lymphocyte percentage and CD4⁺/CD8⁺ ratio in the PSE group (all $P < 0.05$) but not in the splenectomy group (all $P > 0.05$). There is no significant difference in the incidence of complications (such as fever, abdominal pain, ascites, and pleural effusion) between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: PSE has several advantages over splenectomy in the treatment of hepatocellular carcinoma with hypersplenism, including simpleness, fewer complications, and being able to improve cellular immune function.

Key Words: Liver cancer; Hypersplenism; Partial splenic embolization; Splenectomy; Immune function

Ma LH, Zhou J, Shi LM, Hu DW, Wang ZX, Cui L. Impact of splenectomy partial splenic embolization on immune function in patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 669-675

摘要

目的: 研究脾切除及部分脾动脉栓塞术(PSE)对肝癌伴脾亢患者免疫功能的影响。

方法: 前瞻性研究肝癌合并脾亢的患者69例,

背景资料
肝癌伴脾功能亢进临床较为常见。近年来有人应用部分脾动脉栓塞术(PSE)治疗肝癌伴脾功能亢进,经初步临床观察,他可能是一个未来的治疗方向,其对患者免疫功能的影响是目前临床关注的重要课题。

同行评议者
黄志勇, 教授, 华中科技大学同济医院普外科

相关报道

Tomikawa等在实验鼠中研究发现肝部分切除脾栓塞后DNA合成多于未栓塞组,并且肝细胞生长因子的激活也早于未栓塞组,证明了脾可产生某种毒素或因子对机体免疫功能有不良影响。

全部经过影像学及实验室检查证实为肝癌合并脾亢,随机分为两组,其中PSE组37例,脾切除组32例。PSE组实施肝癌介入治疗同时行PSE(双介入)治疗,脾切除组实施肝癌介入治疗同时行外科切脾。观察两组术前术后的外周血象、免疫系统指标及临床症状体征的变化。

结果: 在PSE组,术后测WBC、PLT,与术前比较均有显著性差异($P<0.05$);术后测RBC与术前相比无显著差异($P>0.05$)。在脾切除组,术后测WBC、PLT,与术前比较均有显著性差异($P<0.05$);术后测RBC与术前相比无显著差异($P>0.05$)。术前测PSE组与脾切除组的 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$,两组间无显著差异,术后7 d、术后28 d测 $CD4^+$,两组间有显著差异($t = 16.063, 9.409, P<0.05$)。术后7 d、术后28 d测 $CD4^+/CD8^+$,两组间有显著差异($t = 2.060, 2.228, P<0.05$)。在PSE组,术后测 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 分别与术前比较,均有显著性差异($P<0.05$)。在脾切除组,术后测 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 分别与术前比较,均无显著性差异($P>0.05$)。两组病例术后并发症(发热、腹痛、腹水、胸腔积液)发生率的比较均无显著性差异($P>0.05$)。

结论: PSE与传统脾切除术相比,有操作简单、并发症少、术后细胞免疫功能改善等优点,取得了更好的临床治疗效果。

关键词: 肝癌;脾功能亢进;部分脾栓塞术;脾切除;免疫功能

马立辉,周健,史丽民,胡大为,王助新,崔亮.脾动脉栓塞术对肝癌伴脾亢患者免疫功能的影响.世界华人消化杂志 2010;18(7):669-675
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/669.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球第5位常见的肿瘤,占有所有癌症的5.6%^[1,2]。在我国,肝癌每年的新发病例占全世界肝癌病例数的43.7%^[3],其中50%-90%的肝癌患者合并肝硬化或脾功能亢进^[4]。由于多数肝癌患者临床就医时已是晚期,且能够外科手术治疗的低于20%^[5],所以大多数选择经导管动脉栓塞化疗(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)^[6,7]。肝癌患者多数合并有肝硬化、脾脏功能亢进,有些学者认为巨脾脾亢患者抗氧化维生素含量和抗氧化酶活性降低、促进肝硬化发展并具有负性抗肿瘤作用^[8]。目前外科治疗脾亢主要是脾切除术,而肝癌根治术同时行脾

切除术,手术的创伤大、风险高,全脾切除术后患者免疫系统功能与保脾者相比明显下降,因此近年来已陆续报道了应用部分性脾栓塞术(partial splenic embolization, PSE)治疗脾功能亢进,是在保持脾脏部分功能的基础上治疗脾亢。在进行肝癌介入治疗的同时进行PSE,具有创伤小、风险小的优点,本文通过检测PSE术前术后患者血常规、免疫学指标,探讨PSE对患者免疫功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2006-03/2009-02河北省承德医学院附属医院就诊,并被临床确诊为肝癌合并脾功能亢进的患者69例,其中37例行PSE同时行肝癌介入治疗术(双介入治疗术),32例实施外科切脾同时行肝癌介入治疗术。69例患者均为原发性肝癌伴脾功能亢进患者,其中男30例,女39例,年龄33-74(平均51)岁;手术治疗两组的患者性别、年龄无显著性差异($P<0.05$)。全部病例的诊断标准符合中国抗癌协会肝癌专业委员会2001-09在广州召开的第八届全国肝癌学术会议上正式通过的“原发性肝癌的临床诊断与分期标准”及脾功能亢进国内的诊断标准(1991)。

1.2 方法

1.2.1 手术: (1)PSE:采用Seldinger穿刺技术,在数字减影X光机引导下,穿刺右股动脉送入5F RH导管或5F cobra导管,经髂总动脉、腹主动脉、腹腔动脉干,行造影检查,了解肝癌情况及脾脏大小情况。先行肝动脉灌注化疗及栓塞治疗,然后将导管超选择插入脾下极动脉,经导管缓慢注入明胶海绵颗粒混悬剂,行脾下极动脉栓塞。根据栓塞过程中脾动脉血流情况掌握栓塞面积:血流速度稍有减慢栓塞程度约40%,轻度减慢约60%,明显减慢或成蠕动样前进栓塞程度大于80%。(2)全脾切除术:于左肋缘下切口进腹,结扎脾动脉主干,离断脾胃、脾肾和脾膈韧带,搬出脾脏予以切除。腹腔镜下切脾按文献方法进行^[9]。

1.2.2 血常规检测: 术前1 d,术后1 d、术后7 d、术后28 d化验患者红细胞计数(RBC)、白细胞计数(WBC)、血小板计数(PLT)。检测患者免疫功能指标:术前1 d,术后7 d、术后28 d检测 $CD4^+$ 细胞比例、 $CD8^+$ 细胞比例及 $CD4^+/CD8^+$ 比值测定。

1.2.3 观察术后并发症: 观察患者术后腹痛(程度、持续时间、是否有顽固性腹痛的发生及其持续时间)、胃肠道反应(恶心、呕吐情况及

创新亮点
本文通过检测PSE术前术后患者血常规、免疫学指标, 探讨PSE对患者免疫功能的影响。

表 1 两组患者中WBC、RBC和PLT的变化 (mean ± SD)

	WBC		RBC		PLT	
	PSE组	脾切除术组	PSE组	脾切除术组	PSE组	脾切除术组
术前	2.54 ± 0.66	2.43 ± 0.53	3.40 ± 0.67	3.31 ± 0.67	49.81 ± 7.55	50.72 ± 8.81
术后1 d	8.13 ± 1.40	8.05 ± 1.58	3.44 ± 0.68	3.35 ± 0.70	78.54 ± 10.15	81.09 ± 8.91
术后7 d	6.20 ± 1.38 ^a	6.10 ± 2.03 ^a	3.46 ± 0.84	3.44 ± 0.68	117.41 ± 11.26 ^a	119.22 ± 12.53 ^a
术后28 d	5.65 ± 1.45 ^a	5.53 ± 1.48 ^a	3.49 ± 0.89	3.39 ± 0.71	182.54 ± 23.55 ^a	180.19 ± 36.54 ^a

^aP<0.05 vs 同组术前。

表 2 两组患者T细胞亚群的变化 (mean ± SD)

	CD4 ⁺ 细胞比例				CD4 ⁺ /CD8 ⁺ 比值			
	PSE组	脾切除术组	值	P值	PSE组	脾切除术组	值	P值
术前	30.55 ± 6.00	28.03 ± 5.79	1.765	0.082	1.51 ± 0.26	1.49 ± 0.29	0.326	0.745
术后7 d	48.55 ± 4.26 ^a	29.16 ± 5.73	16.063	0.000	1.59 ± 0.24 ^a	1.46 ± 0.28	2.060	0.043
术后28 d	45.07 ± 7.41 ^a	29.66 ± 5.97	9.409	0.000	1.62 ± 0.23 ^a	1.50 ± 0.22	2.228	0.029

^aP<0.05 vs 同组术前。

发生时间)、发热(程度、持续时间)、腹水、胸水、门静脉血栓、爆发性感染、脾脓肿的发生情况。

统计学处理 各项指标检测所得数值用Excel建立数据库, 采用SPSS13.0软件进行统计分析, 计量资料采用mean±SD表示, 各组间比较采用t检验, 计数资料采用χ²检验。检验水准P = 0.05。

2 结果

2.1 血常规的变化

2.1.1 WBC: PSE组与脾切除术组WBC比较, 术前、术后均无显著性差异(均P>0.05)。在PSE组, WBC术前与术后7、28 d比较, 均有显著性差异(t = 15.103, 11.872, 均P<0.05)。在脾切除术组, WBC术前与术后7、28 d比较, 也有显著性差异(t = 9.498, 10.478, 均P<0.05, 表1)。

2.1.2 RBC: PSE组与脾切除术组RBC比较, 术前、术后均无显著性差异(均P>0.05)。在PSE组, RBC术前与术后7、28 d比较, 无显著性差异(t = 0.687, 0.743, 均P>0.05)。在脾切除术组, RBC术前与术后7、28 d比较, 无显著性差异(t = 1.470, 0.606, 均P>0.05, 表1)。

2.1.3 PLT变化: PSE组与脾切除术组PLT比较, 术前、术后均无显著性差异(均P>0.05)。在PSE组, PLT术前与术后7、28 d比较, 有显著性差异(t = 33.268, 35.505, 均P<0.05)。在脾切除术组, PLT术前

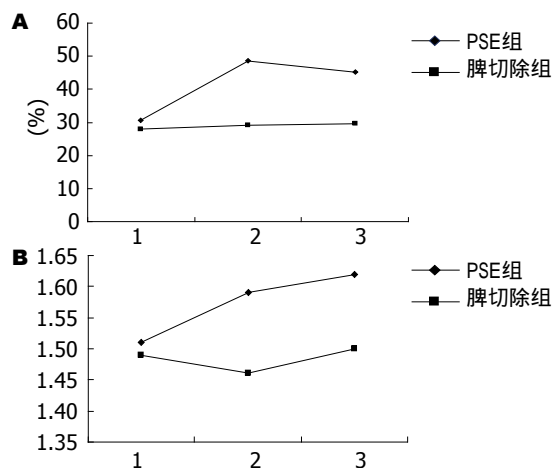


图 1 两组患者T细胞亚群的变化。A: CD4⁺细胞比例; B: CD4⁺/CD8⁺比值。1: 术前; 2: 7 d; 3: 28 d。

与术后7、28 d比较, 有显著性差异(t = 25.776, 20.668, 均P<0.05, 表1)。

2.2 T细胞亚群的变化

2.2.1 CD4⁺细胞比例: PSE组与脾切除术组CD4⁺细胞比例术前比较, 无显著差异(P>0.05); PSE组与脾切除术组CD4⁺细胞比例术后7、28 d比较, 均有显著差异(均P<0.05, 表2, 图1)。在PSE组, CD4⁺细胞比例术后7、28 d与术前比较, 均有显著性差异(t = 13.947, 8.314, 均P<0.05)。在脾切除术组, CD4⁺细胞比例术后7、28 d与术前比较, 均无显著性差异(t = 0.946, 1.009, 均P>0.05, 表2, 图1)。

2.2.2 CD4⁺/CD8⁺比值: PSE组与脾切除术组术前

应用要点
PSE与传统脾切除术相比,有操作简单、并发症少、术后细胞免疫功能改善等优点,取得了更好的临床治疗效果。

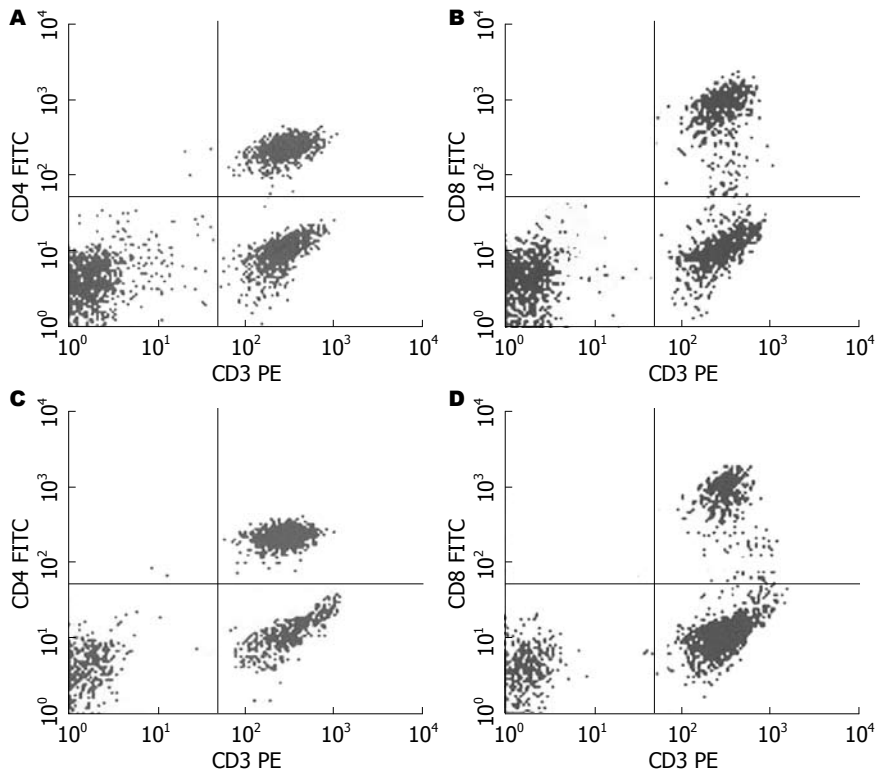


图 2 术前及术后28 d CD4⁺、CD8⁺的比率和CD4⁺/CD8⁺比值. A, B: 术前; C, D: 术后28 d; A, C: CD4⁺; B, D: CD8⁺.

表 3 两组患者并发症发生率

分组	PSE n(%)	脾切除组 n(%)	χ^2 值	P值
发热(>38.5)	32(86.48)	26(81.25)	0.351	0.553
腹痛	30(81.08)	25(78.13)	0.093	0.761
腹水	7(18.92)	6(18.75)	0.000	0.986
胸腔积液	1(2.70)	4(12.50)	1.210	0.271

CD4⁺/CD8⁺比值的比较,无显著性差异($P>0.05$); PSE组与脾切除术组术后7、28 d CD4⁺/CD8⁺比值的比较,均有显著性差异(均 $P<0.05$,表2,图1)。在PSE组,术后7、28 d CD4⁺/CD8⁺比值与术前比较,有显著性差异($t = 2.259, 2.950$,均 $P<0.05$)。在脾切除术组,术后7、28 d CD4⁺/CD8⁺比值与术前比较,无显著性差异($t = 1.416, 0.130$,均 $P>0.05$,表2,图1)。

2.3 流式细胞仪分析结果 术前CD4⁺、CD8⁺的比率和CD4⁺/CD8⁺比值分别为31.72%、25.43%、1.25 : 1; 术后28 d CD4⁺、CD8⁺比率和CD4⁺/CD8⁺比值分别为56.13%、21.24%、2.64 : 1(图2)。

2.4 术后并发症 两组患者术后并发症(发热、腹痛、腹水胸腔积液)的发生率比较均无显著性差异($P>0.05$),在PSE组,术后均恢复,37例均无死亡,无后遗症。脾切除组,术后均恢复,32例均无死亡,无后遗症(表3)。

在PSE组,栓塞面积大,并发症出现多。本组

脾栓塞面积60%的病例25例,脾栓塞面积40%的病例12例。12例栓塞面积40%的病例术后8例出现发热,25例栓塞面积60%的病例术24例出现发热,两组比较有显著性差异($P<0.05$)。12例栓塞面积40%的病例术后7例出现腹痛,25例栓塞面积60%的病例术23例出现发热,两组比较有显著性差异($P<0.05$)。12例栓塞面积40%的病例术后2例出现腹水,25例栓塞面积60%的病例术5例出现发热,两组比较无显著性差异($P>0.05$)。

2.5 PSE造影图像 PSE造影图像见图3。

3 讨论

我国原发性肝癌患者多数是在乙型肝炎、肝硬化的基础上发展的,绝大部分合并脾功能亢进^[2]。脾脏是免疫活性细胞受抗原刺激后分化增殖、发生免疫应答的重要外周淋巴器官之一^[10],在机体免疫反应中起着重要作用。正常脾脏切除后,可导致机体免疫功能下降,出现急性爆发性感染。脾动脉节段性分布特征为PSE提供了解剖学基础,脾动脉自腹腔动脉干发出后,逐级分出脾叶动脉、脾段动脉、亚段动脉,供应相应区域的脾脏组织,各叶、段、亚段间血管吻合极少。上述特征为PSE提供了解剖学依据,即当栓塞某叶支或段支后,相应区域的脾脏组织会发生缺血梗死。因此,行PSE准确的选择靶动脉是极其必要的。脾动脉近端栓塞后,脾实质通过侧支循

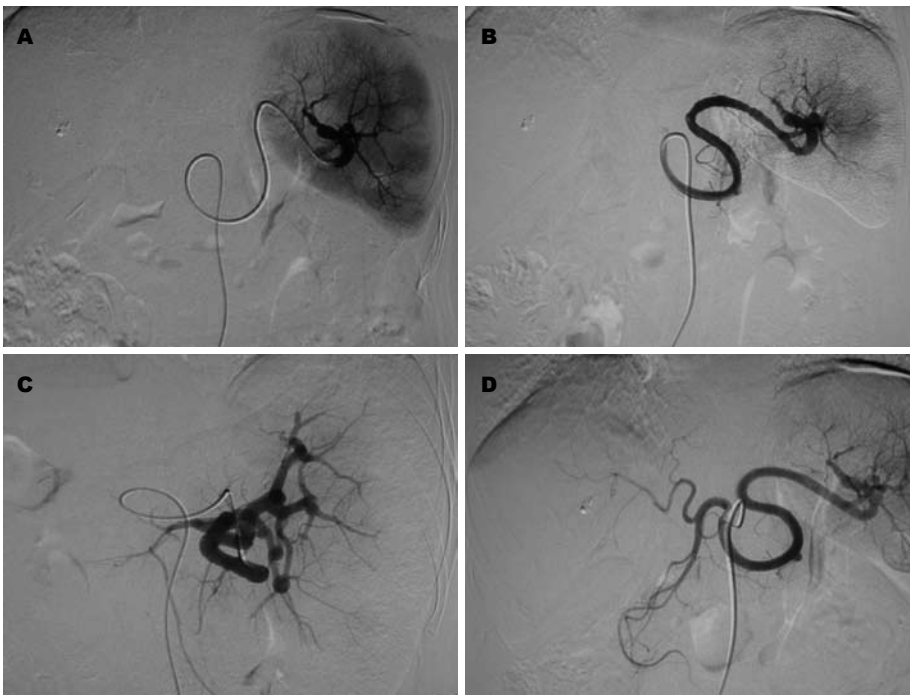


图3 肝癌伴脾亢患者术中脾造影术. A: 脾栓塞前造影; B, C: 脾栓塞后造影; D: PSE及TACE后造影.

同行评价
本研究分析了部分脾动脉栓塞术治疗肝癌伴脾亢患者术前术后的外周血象及临床症状体征的变化情况, 并且检测免疫系统指标 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 的变化, 具有一定的新颖性.

环可不产生梗死, 而外周脾动脉, 经脾段动脉分支之间吻合动脉较少, 且栓塞剂均分布在外周脾组织, 至梗死机化, 包绕在残留脾组织外周, 能有效地限制了脾脏进一步增大. 因此把脾段外周小动脉支作为栓塞靶动脉是PSE治疗脾亢的前提.

人体免疫系统是复杂的调节网络, 各免疫细胞间具有相互促进, 相互制约的作用, 并以此维持生理平衡^[16]. 正常机体中各种T细胞亚群相互作用, 维持着机体的正常免疫功能, 当不同淋巴细胞亚群的数量和功能发生异常时, 机体免疫功能将发生紊乱. $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 分别代表TH/诱导亚群和HS/抑制亚群, $CD4^+/CD8^+$ 比值减少是免疫缺陷的重要指征^[11].

本研究通过对肝癌合并脾功能亢进的患者进行肝癌介入治疗, 同时分别进行PSE和脾切除. 初步研究结果表明, 部分性脾栓塞术较脾切除治疗脾功能亢进更安全有效, 并且能改善患者的免疫功能.

PSE和脾切除术对外周血象有相同的影响. PSE组与脾切除术组术后白细胞、血小板较术前均明显增高, 有显著差异. 脾脏具有清除血细胞的功能. 脾功能亢进时, 大量的血液淤滞在肿大的脾脏内, 在功能活跃的巨噬细胞系统的作用下, 血细胞被大量破坏, 以及因脾脏过度分泌血小板抗体(PA-IgG)更加重了血小板的破坏^[15]导致外周血细胞, 尤其是白细胞、血小板减少. 脾切除后, 脾脏破坏外周血细胞的功能消失, 外

周血细胞的数量明显上升, 和术前比较有显著差异. 而部分性脾栓塞术通过栓塞部分脾动脉分支, 将脾脏外周的红髓部分栓塞, 使网状内皮细胞数目减少, 该部分脾实质缺血性坏死、机化、萎缩, 最终被结缔组织增生代替. 这种不可逆的病理改变削弱了脾脏吞噬和破坏血细胞的能力, 减少血细胞在脾脏的滞留和破坏, 从而改善脾功能亢进患者的外周血象. PSE组与脾切除组, 术后7 d、28 d外周血细胞数量比较无显著差异. 综合以上PSE治疗脾功能亢进对外周血细胞的影响方面达到了和脾切除的相同疗效. 红细胞数量术前术后无明显变化. 这一结果与Xu等^[13]的研究结果一致, 但Pålsson等^[14]报道: 根据长期随访结果, 脾栓塞患者术后在经过一段较长时间后, 其红细胞升高具有显著差异.

PSE与脾切除术相比, 有改善患者术后免疫功能的作用. 本课题表明: PSE组经过PSE治疗后, $CD4^+$ T细胞亚群于术后7 d、28 d较术前有不同程度的改善, 经统计分析有显著差异($P<0.05$). $CD4^+/CD8^+$ 比值较术前明显改善, 经统计分析有显著差异($P<0.05$). $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 分别代表TH/诱导亚群和TS抑制亚群. 肝癌合并脾功能亢进患者, $CD4^+$ 降低, $CD4^+/CD8^+$ 降低, 从而导致机体免疫监视、防御和调节功能低下^[17,18]. 脾为免疫调节的重要器官, 也是强烈影响细胞免疫的动力器官^[19]. 主要起到免疫功能的是脾脏的骨髓部分, 骨髓位于脾脏中央部. PSE后脾脏外围或部分被栓塞, 外周较大范围的组织增生, 限制了

脾脏的充血肿大^[20],但其内部组织未受影响.本课题PSE组,肝癌合并脾功能亢进患者在行肝癌介入治疗的基础上行PSE后,CD4⁺、CD8⁺明显改善,CD4⁺/CD8⁺比值较术前明显增高,均有统计学意义($P<0.05$).说明肝癌合并脾功能亢进患者的脾脏并非无功能,而是其功能由正性免疫效应转向负性免疫效应,可产生正常脾脏不会产生的某种毒素或因子,对抗体产生了不良结果,这是一种双向调节作用.脾功能亢进行部分脾栓塞后可以减弱这种免疫抑制作用,使患者的免疫功能得到改善. Tomikawa等^[21]在实验鼠中研究发现肝部分切除脾栓塞后DNA合成多于未栓塞组,并且肝细胞生长因子的激活也早于未栓塞组,证明了病脾可产生某种毒素或因子对机体免疫功能有不良影响.而脾切除组,肝癌合并脾功能亢进者行脾切除术后,CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺比值均有所下降但差异无统计学意义($P>0.05$).以上结果提示脾脏被切除后,其产生淋巴细胞合成抗体的功能被剥夺,机体T淋巴细胞系统出现紊乱,淋巴细胞转换率明显下降,但本次样本均取自成年人,因为成年人免疫系统完善,淋巴结发育成熟,脾切除后机体免疫功能尚有其他淋巴器官代偿^[22]. PSE组较脾切除术后第7 d、28 d的CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺比值均有明显改善,差异显著,有统计学意义($P>0.05$),说明PSE较脾切除能够保留脾脏的正常免疫功能并能改善脾功能亢进时增强的负性免疫效应.

PSE栓塞面积与术后并发症是有联系的.从理论上讲,栓塞面积与疗效成正比,即面积越大,疗效越明显,多数学者认为^[23-26]残留20%的脾组织就可以维持脾脏的免疫功能及过滤作用,但栓塞后综合征重,易出现脾脓肿、败血症和肝功能衰竭等严重并发症.也有学者认为栓塞面积小于30%则难以达到改善外周血象的理想疗效或中远期复发脾亢的风险增高^[27].另有作者提出分期栓塞即分2-3次进行脾脏栓塞,每次栓塞范围在30%左右,此法比较安全^[28],故本研究PSE组栓塞脾脏面积选定于40%-60%,其中三系外周血细胞均出现下降栓塞60%,其余栓塞40%. PSE组术后出现32例需处理的发热(发热主要和栓塞后组织缺血梗死、炎性渗出、液化吸收、急性水肿刺激包膜有关),其中栓塞40%的患者中8例出现发热,栓塞60%的患者中24例发热,经检验两组比较有显著性差异,说明患者术后发热情况和栓塞面积有正相关,栓塞面积越大出现发热的几率越大.共有30例出现腹痛,栓塞

40%的12例患者中7例出现腹痛,绝大多数疼痛于II度以下(疼痛明显,睡眠受干扰),栓塞60%的25例患者中23例出现腹痛,4例出现III度疼痛(疼痛剧烈,伴自主神经功能紊乱,睡眠严重受干扰)栓塞40%的25例中2例出现顽固性腹痛.两组比较腹痛有显著性差异,说明腹痛和栓塞面积大小成正相关性.脾切除组的术后并发症主要是发热、右上腹痛.其发热原因主要是由于术后吸收热.6例出现腹水,是由于脾切除术及肝介入术后肝功能异常、术后禁饮食低蛋白血症所致. PSE组和脾切除组术后并发症发生率经统计学分析虽无显著差异,但从手术方式上来看,行PSE治疗是和肝癌介入治疗同时进行的,无需另行手术切口,而脾切除则需要在全麻下于左肋缘下切开进行,切口约10 cm,这增加了麻醉风险,手术风险,且创伤大.

总之, PSE与传统脾切除术相比,有操作简单、并发症少、术后细胞免疫功能改善等优点,取得了更好的临床治疗效果.

4 参考文献

- Lau WY. Primary liver tumors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 135-144
- Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: S5-S16
- Lai EC, Lau WY. The continuing challenge of hepatic cancer in Asia. *Surgeon* 2005; 3: 210-215
- Kumpe DA, Rumack CM, Pretorius DH, Stoecker TJ, Stellin GP. Partial splenic embolization in children with hypersplenism. *Radiology* 1985; 155: 357-362
- Zhang BH, Yang BH, Tang ZY. Randomized controlled trial of screening for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 417-422
- Lladó L, Virgili J, Figueras J, Valls C, Dominguez J, Rafecas A, Torras J, Fabregat J, Guardiola J, Jaurieta E. A prognostic index of the survival of patients with unresectable hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization. *Cancer* 2000; 88: 50-57
- Zangos S, Gille T, Eichler K, Engelmann K, Woitaschek D, Balzer JO, Mack MG, Thalhammer A, Vogl TJ. [Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinomas: technique, indications, results] *Radiologe* 2001; 41: 906-914
- 姜洪池, 赵宪琪. 肝硬化门静脉高压症切脾对肝硬化有益还是有害. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 581-583
- 徐大华. 腹腔镜脾切除术. *中华外科杂志* 2005; 43: 696-672
- 梁扩寰. 肝脏病学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 306-308
- 韩铭钧, 赵仲春, 任克, 张汉国, 徐克, 张曦彤. 部分性脾栓塞在肝癌介入治疗中的应用. *中华放射学杂志* 1996; 30: 616-619
- 霍枫, 蒲淼水, 詹世林, 汪邵平, 陈建雄. 原发性肝癌合并脾功能亢进的外科治疗. *中国普外基础与临床杂志* 2006; 13: 173-174
- Xu RY, Liu B, Lin N. Therapeutic effects of

- endoscopic variceal ligation combined with partial splenic embolization for portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1072-1074
- 14 Pålsson B, Hallén M, Forsberg AM, Alwmark A. Partial splenic embolization: long-term outcome. *Langenbecks Arch Surg* 2003; 387: 421-6
- 15 Noguchi H, Hirai K, Aoki Y, Sakata K, Tanikawa K. Changes in platelet kinetics after a partial splenic arterial embolization in cirrhotic patients with hypersplenism. *Hepatology* 1995; 22: 1682-1688
- 16 康格菲. 临床生物化学. 第1版. 北京: 人民出版社, 1989: 45
- 17 左朝晖, 张柏和, 姜小清, 谭春祁, 莫胜川, 欧阳永忠, 周德善. 肝癌伴脾功能亢进症行肝脾联合切除术后肝功能和免疫功能的变化. *中国普通外科杂志* 2008; 17: 6-9
- 18 冯凯, 马宽生. 继发性脾功能亢进症的治疗现状及展望. *国外医学·外科学分册* 2005; 32: 183-187
- 19 陈积圣, 耿海涛. 门脉高压脾功能亢进的保脾手术. *肝胆外科杂志* 1996; 4: 196-197
- 20 梅雀林, 李彦豪, 陈勇. 部分性脾栓塞术治疗地中海贫血的长期疗效观察. *中华放射学杂志* 2000; 34: 820-822
- 21 Tomikawa M, Hashizume M, Highashi H, Ohta M, Sugimachi K. The role of the spleen, platelets, and plasma hepatocyte growth factor activity on hepatic regeneration in rats. *J Am Coll Surg* 1996; 182: 12-16
- 22 华积德. 脾外伤的处理. *肝胆外科杂志* 1997; 5: 375-377
- 23 Numata S, Akagi K, Sakino I, Ogata H, Kawadoko T, Suzuki N, Nomiya K, Tsuji H, Fujishima M. [Partial splenic embolization for the treatment of liver cirrhosis with hypersplenism: assessment of clinical response and liver function] *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1997; 94: 526-531
- 24 Iida T, Sakino I, Akagi K. [Prognosis of residual spleen after partial splenic embolization for the treatment of hypersplenism in cirrhosis] *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 1998; 58: 152-156
- 25 Moro E, Pais M, Benvegnù M, Ferrari M, Bittolo Bon G. [Decrease of insulin resistance after splenectomy in a diabetic patient with liver cirrhosis and portal hypertension. Physiopathologic evaluation] *Minerva Gastroenterol Dietol* 1994; 40: 213-218
- 26 Sangro B, Bilbao I, Herrero I, Corella C, Longo J, Beloqui O, Ruiz J, Zozaya JM, Quiroga J, Prieto J. Partial splenic embolization for the treatment of hypersplenism in cirrhosis. *Hepatology* 1993; 18: 309-314
- 27 宁文锋, 张明亮. 不同脾动脉栓塞面积治疗肝硬化合并脾功能亢进临床分析. *南华大学学报(医学版)* 2004; 32: 170-172
- 28 王文明, 王保华, 盛玉国, 李乃选, 荆秀荣, 段新武, 许春华. 部分脾脏栓塞术治疗肝硬化门脉高压合并脾机能亢进的临床研究. *医学影像学杂志* 2004; 14: 458-460
- 29 陈黎, 张宇峰. 部分性脾栓塞术治疗门脉高压性肝硬化脾亢的近期临床疗效. *广西医学* 2005; 27: 1922-1924

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年版中国科技期刊引证报告》(核心版)发布
《世界华人消化杂志》2008年影响因子 0.547

本刊讯 中国科学技术信息研究所发布2008年《世界华人消化杂志》的总被引频次为2 480, 位居1 868种中国科技论文统计源期刊的第100位, 41种内科学类期刊的第6位. 2008年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.547, 41种内科学类期刊的第17位. 大家最为关注的是《2009年版中国科技期刊引证报告》(核心版)中新增一个综合评价指标, 即综合评价总分, 该指标根据科学计量学原理, 系统性地综合考虑被评价期刊的各影响力指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等)在其所在学科中的相对位置, 并按照一定的权重系数将这些指标进行综合集成, 对期刊进行综合评价. 《世界华人消化杂志》总分为49.5, 在41种内科学类期刊中排名第8位, 在1 868种中国科技期刊排名第341位. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

胆固醇与胆结石的关系

席子明, 马远方

背景资料
20世纪后30年, 胆固醇结石病的基础研究经历了卓有成效的发展, 较清晰地建立了以胆汁分泌、成核和胆囊动力-三方面缺陷为基础的胆石形成机制的学说。进入21世纪以来, 胆石病基础研究在流行病学研究胆石病的遗传和环境因素、致石基因研究、胆汁脂类转运机制的研究等方面取得进展。胆固醇与胆结石关系的研究较少, 本文通过普查的方法, 对胆结石与胆固醇的关系进行研究。

同行评议者
韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

席子明, 马远方, 河南大学细胞与分子免疫学实验室 河南省开封市 475001
席子明, 河南大学在读博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤免疫和外科基础研究。
通讯作者: 马远方, 教授, 博士生导师, 475001, 河南省开封市, 河南大学细胞与分子免疫学实验室. mayf@henu.edu.cn
电话: 0378-2194706
收稿日期: 2009-08-09 修回日期: 2009-10-14
接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2010-03-08

Relationship between blood total cholesterol and gallstones

Zi-Ming Xi, Yuan-Fang Ma

Zi-Ming Xi, Yuan-Fang Ma, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Henan University, Kaifeng 475001, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Yuan-Fang Ma, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Henan University, Kaifeng 475001, Henan Province, China. mayf@henu.edu.cn
Received: 2009-08-09 Revised: 2009-10-14
Accepted: 2009-11-23 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between blood total cholesterol and gallstones.

METHODS: The teaching and administrative staff ($n = 3905$) at a university who underwent a routine physical examination were included in the study. Gallstones were detected by color ultrasound, and blood total cholesterol was determined using an automatic biochemical analyzer.

RESULTS: A total of 189 cases of gallstones were screened, of which 68 (35.98%) had markedly elevated cholesterol levels (> 5.17 mmol/L), 40 (21.16%) had slightly elevated cholesterol levels (4.67-5.16 mmol/L), and 81 cases (42.86%) had normal cholesterol levels (< 5.17 mmol/L). The prevalence of gallstones in subjects with elevated cholesterol levels was significantly higher than that in subjects with normal cholesterol levels ($P < 0.01$).

CONCLUSION: High cholesterol may be associated with the development of gallstones. During

conservative therapy of gallstones, lowering cholesterol should be considered.

Key Words: Cholesterol; Gallstones; Physical examination

Xi ZM, Ma YF. Relationship between blood total cholesterol and gallstones. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 676-678

摘要

目的: 探讨胆固醇与胆结石的关系。

方法: 对某高校3 905名教职员工进行健康检查, 采用彩超进行肝胆检查, 全自动生化分析仪进行血总胆固醇测定, 分析他们二者的关系。

结果: 3 905名教职员工健康检查发现胆结石189例, 其中胆固醇增高(>5.17 mmol/L)68例(35.98%), 胆固醇正常偏高(4.67-5.16 mmol/L)40例(21.16%), 胆固醇正常(<5.17 mmol/L)81例(42.86%), 胆固醇正常偏高和增高与胆固醇正常相比, 其胆结石发病率明显增高(均 $P < 0.01$)。

结论: 胆结石与高胆固醇增高有一定关系, 在胆结石保守治疗时, 应注意降低胆固醇。

关键词: 胆固醇; 胆结石; 健康检查

席子明, 马远方. 胆固醇与胆结石关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 676-678
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/676.asp>

0 引言

胆石病是世界范围的常见病, 其大多数指胆囊结石, 常见主要成分是胆固醇, 属于胆固醇类结石。全国两次胆石病调查结果显示, 我国胆囊结石的比例正逐渐增加^[1]。20世纪后30年, 胆固醇结石病的基础研究经历了卓有成效的发展, 较清晰地建立了以胆汁分泌、成核和胆囊动力-三方面缺陷为基础的胆石形成机制的学说^[2], 进入

21世纪以来, 胆石病基础研究在流行病学研究胆石病的遗传和环境因素、致石基因研究、胆汁脂类转运机制的研究等^[3,4]方面取得进展, 胆固醇与胆结石关系的研究较少, 本文通过普查的方法, 对胆结石与胆固醇的关系进行研究.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2009-03-06对某高校3 905名教职员工进行了健康检查, 其中男2 340例, 女1 565例, 共发现胆囊结石189例, 其中男104例(55.03%); 女85例(44.97%). 人群发病率为4.84%, 男性发病率为4.44%; 女性发病率为5.43%, 女性发病率比男性高0.99%.

1.2 方法 采用西门子ACUSON ANTARES彩超进行胆囊检查, 奥林巴斯AU400全自动生化分析仪进行胆固醇测定, 参考值: >5.17 mmol/L为增高, <5.17 mmol/L为正常, 4.67-5.16 mmol/L为正常偏高. 检查前要求被检查者3 d不吃肉、鸡蛋, 不喝酒, 空腹静脉采血.

统计学处理 计算资料以例数(*n*)和百分数表示, 用 χ^2 检验. 以 $P < 0.05$ 有统计学差异.

2 结果

2.1 胆结石病例年龄分布 21-30岁1例(0.53%); 31-40岁16例(8.47%); 41-50岁41例(21.68%); 51-60岁55例(29.10%); 61-70岁33例(17.46%); 71-80岁32例(16.93%); 80-90岁11例(5.82%). 41-60岁91例(48.15%)为高发年龄段, 与其他年龄段相比发病率明显增高(均 $P < 0.01$, 图1).

2.2 胆结石与血总胆固醇 胆结石病例血总胆固醇在1.67-2.16 mmol/L 8例(4.23%); 2.17-2.66 mmol/L 0例; 2.67-3.16 mmol/L 8例(4.23%); 3.17-3.66 mmol/L 15例(7.94%); 3.67-4.16 mmol/L 24例(12.70%); 4.17-4.66 mmol/L 26例(13.76%); 4.67-5.16 mmol/L 40例(21.16%); 5.17-5.67 mmol/L 41例(21.69%); 5.68-6.17 mmol/L 10例(5.29%); 6.18-6.67 mmol/L 15例(7.94%); 6.68-7.17 mmol/L 2例(1.06%). 胆结石病例胆固醇多数在4.0-6.0 mmol/L之间. 胆固醇增高68例(35.98%); 胆固醇正常偏高40例(21.16%); 胆固醇正常81例(42.86%), 胆固醇正常偏高和增高与胆固醇正常相比, 其胆结石发病率明显增高(均 $P < 0.01$, 图2).

3 讨论

胆石症包括发生在胆囊和胆管的结石, 是常见病、多发病. 随着人们生活水平的提高, 我国胆

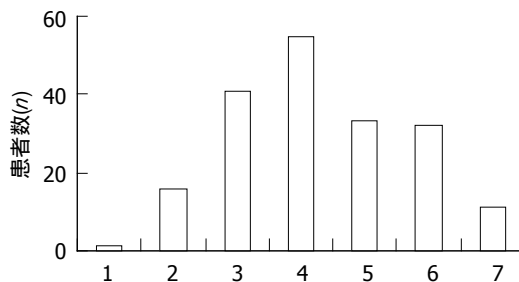


图1 胆结石患者年龄分布. 1: 21-30; 2: 31-40; 3: 41-50; 4: 51-60; 5: 61-70; 6: 71-80; 7: 81-90.

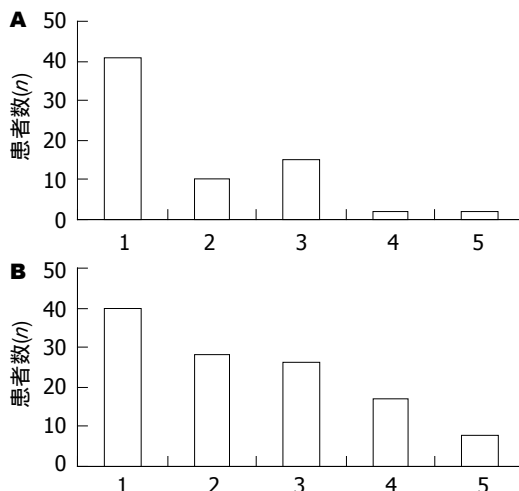


图2 胆结石患者分布. A: 胆固醇增高, 1: 5.17-5.67 mmol/L; 2: 5.68-6.17 mmol/L; 3: 6.18-6.67 mmol/L; 4: 6.68-7.17 mmol/L; 5: 7.18-7.67 mmol/L, B: 胆固醇正常, 1: 4.67-5.17 mmol/L; 2: 4.66-4.17 mmol/L; 3: 4.16-3.67 mmol/L; 4: 3.66-3.17 mmol/L; 5: 3.16-2.67 mmol/L.

石症的特点发生了明显变化. 1981年以前的资料显示, 我国胆管结石的发病率比胆囊结石高, 胆色素结石比胆固醇结石多, 1983-1985年对全国11 342例胆石症调查显示, 胆囊结石发生率已高于胆管结石, 胆固醇结石已多于胆色素结石^[5]. 本文报道189例胆石症均为胆囊结石, 手术21例均为胆固醇结石. 美国胆石症患者约为2 000万, 发病率为10%^[6]. 1989年第4次全国胆道外科会议上, 报道了采用B超检查对几个地区居民进行胆石症普查的结果, 共普查10.26万例, 发现胆石症6 790例, 总患病率为6.62%^[6]. 本文报道胆石症患病率为4.84%. 在我国, 因胆石症住院的例数仅次于急性阑尾炎, 女性患者较男性多2-3倍^[7], 本文报道男性发病率为4.44%, 女性发病率为5.43%, 女性发病率比男性高0.99%.

当血液中胆固醇增多时, 可经过肝细胞质膜转运分泌进入胆汁, 使胆汁中胆固醇浓度增加, 胆固醇在胆汁中呈过饱和状态而在胆囊内结晶, 逐渐形成胆结石^[8]. 冠心病和胆结石有较多的共

相关报道
1989年第4次全国胆道外科会议上, 报道了采用B超检查对几个地区居民进行胆石症普查的结果, 共普查10.26万例, 发现胆石症6 790例, 总患病率为6.62%.

应用要点
胆结石形成的关键是胆汁中胆固醇过饱和, 鉴于高胆固醇有可能增加胆结石发病率, 所以在胆结石保守治疗时, 应注意降低血胆固醇.

同行评价
本文通过3 905例职工的健康体检资料,探讨胆固醇与胆结石的关系,对于胆石病的发病机制及其治疗有一定意义。

同因素,如年龄、性别、种族、肥胖、高脂血症、糖尿病等,有研究发现冠心病合并胆结石者明显高于冠状动脉造影正常者,同时胆结石合并冠心病明显高于无胆结石者,回顾性研究证实高胆固醇增高胆结石发病率^[9]。通过高胆固醇饮食对胆结石形成的动物实验,用0.3%的高胆固醇饲料进行试验喂养狗,连续喂养6 wk,观察动物胆结石的形成,测定血中胆固醇和甘油三酯水平,分析胆汁中成分的改变,在实验4 wk内试验组动物形成胆结石,且成石率为100%,结石直径为1-11 mm实验组动物血清胆固醇和甘油三酯水平显著提高(均 $P<0.01$),胆汁中胆固醇和胆固醇结晶显著升高($P<0.01$),通过高胆固醇膳食,实验动物血清及胆固醇和甘油三酯水平增加,胆汁中胆固醇增加,成石性胆汁形成,提示胆固醇代谢的异常变化在胆囊结石中起作用^[10]。本文报道189例胆结石,胆固醇增高68例(35.98%);胆固醇正常偏高40例(21.16%);胆固醇正常81例(42.86%)。胆固醇正常偏高和增高与胆固醇正常相比,其胆结石发病率增高(均 $P<0.01$)。胆结石形成的关键是胆汁中胆固醇过饱和,鉴于高胆固醇有可能增加胆结石发病率,所以在胆结石保守治疗时,应

注意降低血胆固醇。

本研究的不足在于没有分析甘油三酯,甚至低密度脂蛋白、高密度脂蛋白与胆结石的关系。

4 参考文献

- 1 中华外科学会胆道外科学组. 我国胆石病十年来的变迁. 中华外科杂志 1995; 33: 652-658
- 2 Lopez RR, Benner KG, Ivancev K, Keefe EB, Deveney CW, Pinson CW. Management of biliary complications after liver transplantation. *Am J Surg* 1992; 163: 519-524
- 3 韩天权, 姜翀弋, 张圣道. 胆固醇结石病的病因和机制研究进展. 肝胆胰外科杂志 2006; 18: 296-270
- 4 韩天权, 蒋兆彦, 张圣道. 胆固醇结石形成机制的基因研究现状与展望. 外科理论与实践 2009; 14: 125-127
- 5 吴在德. 外科学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 616-617
- 6 皮执民. 消化外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 903, 911
- 7 石美鑫. 实用外科学(上册). 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1029-1030
- 8 孙世民. 血脂与胆结石的相关性分析. 中华医药杂志 2004; 9: 223
- 9 谷明林, 姜彬, 沈建平, 于圣永, 龚觉晓. 胆固醇及胆红素水平与冠心病、胆结石的关系探讨. 西部医学 2008; 20: 1197-1199
- 10 李秋荣, 拱玉华, 周建萍, 邵青, 庞保柱. 高胆固醇饮食对胆结石形成的研究. 临床肝胆病杂志 2002; 18: 320-321

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 2008 年 WJG 影响因子 2.081

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

CT结肠造影的优势及关键技术

叶玉芳, 张淑倩, 李东辉, 王连庆, 周汝明, 刘蓉辉, 孙吉林

叶玉芳, 张淑倩, 王连庆, 周汝明, 刘蓉辉, 孙吉林, 河北省人民医院医学影像中心 河北省石家庄市 050051
李东辉, 河北经贸大学医学院 河北省石家庄市 050061
叶玉芳, 2004年河北医科大学学士, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病影像学研究。
作者贡献分布: 叶玉芳与张淑倩对此文贡献均等; 此课题由叶玉芳与张淑倩设计; 研究过程由叶玉芳、张淑倩、王连庆及周汝明操作完成; 李东辉在课题的立项和病例资料的收集方面贡献较大; 刘蓉辉与孙吉林负责病例临床资料的整理; 数据分析由叶玉芳与张淑倩完成; 本论文写作由叶玉芳与张淑倩完成。
通讯作者: 张淑倩, 副主任医师, 050051, 河北省石家庄市, 河北省人民医院医学影像中心. zhangshuqian2@sina.com
电话: 0311-85988047
收稿日期: 2009-11-27 修回日期: 2010-01-03
接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-03-08

Computed tomography colonography: advantages and main points

Yu-Fang Ye, Shu-Qian Zhang, Dong-Hui Li, Lian-Qing Wang, Ru-Ming Zhou, Rong-Hui Liu, Ji-Lin Sun

Yu-Fang Ye, Shu-Qian Zhang, Lian-Qing Wang, Ru-Ming Zhou, Rong-Hui Liu, Ji-Lin Sun, Medical Imaging Center, People's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China
Dong-Hui Li, the Affiliated Hospital of Hebei University of Economics & Business, Shijiazhuang 050061, Hebei Province, China
Correspondence to: Shu-Qian Zhang, Medical Imaging Center, People's Hospital of Hebei Province, 348 Heping West Road, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China. zhangshuqian2@sina.com
Received: 2009-11-27 Revised: 2010-01-03
Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To evaluate the advantages of computed tomography (CT) colonography and to summarize the main points for CT colonography.

METHODS: Multislice CT colonography was performed in 46 patients with suspected colonic diseases, of which some patients underwent CT colonography in both the supine and prone positions. Different post-processing techniques such as multiplanar reformation (MPR), CT virtual colonoscopy, shaded surface display, Raysum and virtual pathology were employed to evaluate the mucosal and peripheral appear-

ance of the colon.

RESULTS: Eleven patients showed negative results. Eleven patients were diagnosed as colon polyps, of which one had familial colonic polyposis. Sixteen patients were diagnosed as malignant lesions, of which 2 showed local thickening of the colon wall and 14 showed mass lesions. Five patients were diagnosed as inflammatory diseases.

CONCLUSION: The location, size, density and adjacent invasion of colon lesions can be evaluated objectively by CT colonography. The main points for CT colonography include sufficient cleansing of the colon lumen, adequate air injection, and combination of multiple post-processing techniques.

Key Words: Tomography; X-ray computed tomography; Colorectal polyp; Colonography

Ye YF, Zhang SQ, Li DH, Wang LQ, Zhou RM, Liu RH, Sun JL. Computed tomography colonography: advantages and main points. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 679-684

摘要

目的: 评价CT结肠造影(CTC)对结肠病变检出的优势, 总结结肠CTC检查的技术关键。

方法: 对46例患者行结肠充气CTC检查, 部分病例采用了仰及俯卧位双体位扫描, 综合应用了包括多平面重建、仿真内窥镜、表面和透明重建、管腔展开等多种后处理技术来评价结肠黏膜面及肠外表现。

结果: 11例CTC未见异常, 11例为结肠息肉(其中1例为家族性息肉病患者), 16例结肠恶性病变(2例表现为结肠壁局限性增厚、14例表现为肠壁肿块), 5例结肠炎性病变, 3例其他结肠病变。

结论: CTC可真实地评价结肠病变的部位、大小以及周围侵犯; 充分的肠道准备、充入足够量的气体并充分利用多种后处理技术是

背景资料
随着螺旋CT成像技术的不断发展进步, 多层螺旋CT(MSCT)的快速容积数据采集和强大的图像后处理重建功能, 使结肠的CT成像成为可能。基于MSCT进行的结肠充气后的检查又被称为CT结肠造影(CTC)。

同行评议者
袁友红, 副教授, 湖南省人民医院科研部

研发前沿

有关CTC的研究已在多个领域广泛展开,包括临床应用、软件开发、肠内容物标记、CT技术的优化、显示方法研究及计算机辅助诊断等.

CTC的技术关键.

关键词: 体层摄影术; X线计算机; 结肠息肉; 结肠成像

叶玉芳, 张淑倩, 李东辉, 王连庆, 周汝明, 刘睿辉, 孙吉林. CT结肠造影的优势及关键技术. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 679-684

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/679.asp>

0 引言

随着螺旋CT成像技术的不断发展进步,多层螺旋CT(multislice computed tomography, MSCT)的快速容积数据采集和强大的图像后处理重建功能,使结肠的CT成像成为可能,基于MSCT进行的结肠注气后的检查又被称为CT结肠造影(computed tomography colonography, CTC). 本文应用了结肠充气法对患者进行了CTC的扫描,评价了该方法对结肠病变的检出较结肠镜和常规腹部CT的优势所在,并总结了结肠CTC检查的技术关键.

1 材料和方法

1.1 材料 收集46例于我院行结肠充气法CTC的患者,其中男28例,女18例;年龄18-84(平均年龄56)岁. 临床表现有腹痛、腹泻、便血、便秘、肛门下坠等. 本组46例中12例未行结肠镜检查,其中5例为高龄(≥ 71 岁)或合并严重心血管疾病;其余34例中只有19例结肠镜检查顺利到达盲肠,1例因结肠曲度过大而未能到达回盲部,1例因结肠内大量粪便致不能进镜,13例因肠壁病变致管腔狭窄而使结肠镜不能通过.

1.2 方法

1.2.1 肠道准备: 除2例因特殊原因未行肠道准备外,44例患者均在检查前2 d给予少渣饮食,39例于检查当日早8:00口服20%甘露醇250 mL,后服糖盐水1 500-2 000 mL; 1例采用口服硫酸镁的方法导泻; 2例采用了番泻叶加灌肠的方法导泻; 2例口服“和爽”(复方聚乙二醇电解质散,每袋137.15 g,深圳万和制药有限公司生产)导泻. 导泻后6 h行多层螺旋CT检查. 13例肠道准备满意,无明显残留液体及粪便; 33例结肠内残留或多或少的粪便或液体.

1.2.2 检查设备及扫描参数、后处理技术: 33例采用了德国产西门子16层螺旋CT(Siemens Sensation 16), 13例采用了美国产GE 64层螺旋CT(应用GE Lightspeed VCT螺旋CT扫描机,

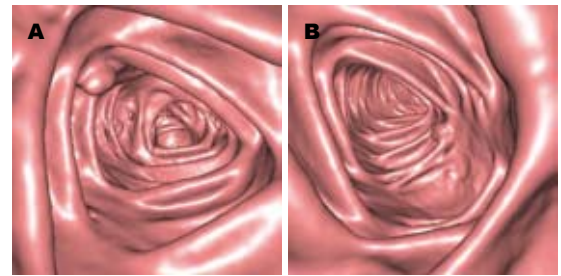


图 1 男, 49岁, 间断便血1年. A: 自盲肠向直肠方向观察的仿真内窥镜图像; B: 自直肠向盲肠方向观察的仿真内窥镜图像. 可见黏膜皱上一小结节样隆起性病变, 结肠镜证实为一小息肉.

Advantage Workstation 4.3_08工作站). 扫描层厚5.0 mm, 重建间隔0.625 mm, 视野(FOV)50 cm \times 50 cm, 120 kV, 200 mA. 扫描时间与扫描范围有关, 扫描范围50-90 cm, 扫描时间4.1-7.0 s. 本组病例所采用的后处理技术主要有多平面重建(multiple planar reformation, MPR)、表面重建、透明重建、仿真内窥镜和管腔展开, 其中管腔展开技术仅应用于由GE Lightspeed VCT螺旋CT扫描机扫描的13例患者. 由2名有经验的诊断专业医师对所得原始图像及后处理图像进行评价和分析.

1.2.3 充气方法及扫描体位: 嘱患者左侧卧位于检查床上, 自肛门插入肛管注入空气1 000-1 500 mL, 视患者体形不同注气量有所增减; 待患者觉腹胀后停止注气, 扫描仰卧位定位像, 观察各段结肠的充气情况, 如有肠段充气差, 需补充注气达满意后扫描. 先给予仰卧位扫描, 肠道清洁无明显残留液体及粪便者不再行俯卧位扫描, 若遇肠道准备较差患者, 需改俯卧位再次扫描. 本组中8例患者只给予了仰卧位扫描, 其余38例先后行仰卧及俯卧位扫描.

2 结果

2.1 CTC结果阴性 46例中有11例的CTC未发现异常. 其中4例未行结肠镜检查; 1例因结肠曲度过大、1例因结肠脾曲大量较硬较大粪块而使结肠镜无法通过, 这两例经CTC检查为阴性结果. 另外5例CTC阴性结果的病例, 1例结肠镜检查报肠激惹, 1例结肠镜报横结肠外压性病变, 3例经结肠镜检查为慢性乙状结肠或直肠炎.

2.2 结肠隆起性病变

2.2.1 息肉: 35例CTC阳性的病例中, 11例经CTC检出了结肠息肉. 其中1例为家族性息肉病患者. 其余10例患者经CTC共检出了17枚息肉, 息肉的生长部位按发生频率高低依次为乙状结肠(7)、

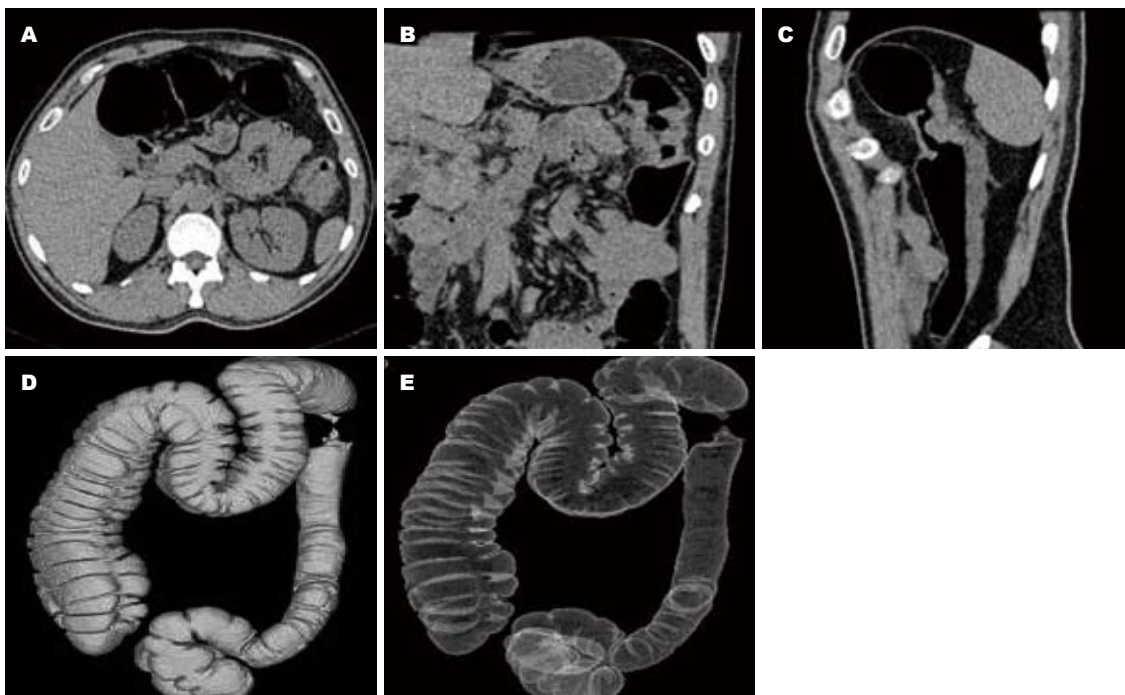


图 2 男, 44岁, 腹痛、便血6 mo. A: 横断面图像; B: 冠状面MPR图像; C: 矢状面MPR图像; D: 全结肠表面重建图像; E: 全结肠透明重建图像. MPR图像可见降结肠近段肠壁明显不规则增厚, 浆膜面毛糙, 周围脂肪间隙模糊不清, 术后病理为低分化腺癌侵及浆膜. 全结肠表面重建图像可见降结肠近段类似“苹果核”样改变的塑形缺损. 全结肠透明重建图像可见降结肠近段类似“苹果核”样透明化的塑形缺损.

相关报道
Fletcher等研究显示结合仰卧位和俯卧位CTC扫描, 可明显提高对直径5 mm以上息肉检出的敏感性, 单用仰卧位扫描时其敏感性为45.1%, 结合俯卧位扫描时敏感性提高到68.6%, 同时俯卧位扫描尤其有助于左半结肠和直肠息肉的检出.



图 3 女, 58岁, 右下腹不适6 mo. 横断面见升结肠近端肠壁明显不规则增厚, 管腔狭窄, 浆膜面毛糙, 可见突起样影, 同层面见升结肠左后方脂肪间隙内多发结节样淋巴结影, 术后病理回报升结肠高分化腺癌伴周围淋巴结转移.

按发生频率高低依次为乙状结肠(6)、结肠肝曲(5)、结肠脾曲(2)、横结肠中段(2)、盲肠及升结肠(2); 肿块大小介于1.2-7.0 cm; CTC观察到浆膜面受侵者11例; 周围淋巴结转移者5例(图3); 远处转移者4例, 其中2例因肠道梗阻较重而施行姑息改道手术, 2例行内镜下结肠支架置入, 后行辅助化学治疗.

2.2.3 结肠炎性病变: 属于此类的共有5例, 除1例表现为回盲瓣旁憩室炎外, 其余4例CTC上均表现为结肠肠壁的增厚, 可为局限性增厚, 可为累及一段肠管的对称性增厚, 也可累及多段肠管的肠壁增厚, 其中2例因管腔狭窄导致结肠镜无法通过. 本组病例经临床对症治疗后, 复查腹部CT提示病变较前好转或临床症状明显缓解.

2.2.4 其他: 本组中1例经CTC证实为先天性巨结肠短段型; 2例为横结肠及乙状结肠冗长症. 上述35例均经电子结肠镜或手术病理证实.

盲肠及升结肠(5)、结肠脾曲(3)、直肠(2); 息肉大小小于0.5 cm的有5枚, 大于0.5 cm而小于1.0 cm的有8枚, 大于1.0 cm的有4枚; CTC观察息肉基底较宽的5枚, 窄基底或细蒂者12枚(图1).

2.2.2 恶性占位: 35例CTC阳性的病例中, 有16例患者经CTC检出结肠恶性病变, 其中2例表现为肠壁局限性增厚, 均发生于结肠肝曲, 经手术病理证实分别为高分化腺癌和腺瘤伴小灶状癌变; 表现为肿块者14例(共15个肿块), 其中10例因肿块直接导致了结肠管腔狭窄(图2), 而使CTC前的结肠镜检查失败; 肠壁增厚或肿块生长部位

3 讨论

结肠镜由于能够直观地显示黏膜而成为评价结肠的标准检查方法^[1-10], 可用作诊断和治疗, 因为如果息肉较小可被切除、活检以取得病理学诊断^[11-14]. 但他是一项有创检查方法, 除检查前需经充分肠道准备外, 检查过程中患者较为痛苦, 且有发生结肠出血、穿孔等严重并发症的可能

应用要点
在对CTC图像进行分析时,可先采用仿真内窥镜进行腔内飞越,发现黏膜面的隆起性病变时,再结合多平面重建图像寻找该隆起性病变在横断、冠状及矢状位图像中的位置,通过了解病变内部的密度来评价该隆起性病变的性质。

性^[15];由于造成结肠梗阻的结直肠癌不能通过内镜,因此无法对肿瘤本身进行评价,而对这种患者用钡剂检查,在技术上也存在通过障碍等困难,同时还会提高因钡剂浓缩造成的结肠梗阻加重的危险性;仅能检测结肠黏膜表面情况,无法检测结肠外如浆膜受累以及结肠病变对肠外的侵犯。结肠镜也有一定的失败率,他取决于检查者的技巧、肠道局部解剖关系、之前是否有腹部手术史以及患者对麻醉的耐受力。本组46例中除12例未行结肠镜检查外,其余34例结肠镜的完成率约为55.9%(19/34)。

CTC的仿真内窥镜技术可以任意旋转视角进行多方位观察,因此大大提高了结肠黏膜的显示率,从而避免了结肠镜检查盲区,避免漏诊病变。本组中1例结肠肝曲占位患者,CTC前的结肠镜漏诊乙状结肠病变1处,经CTC提示后行二次肠镜发现病变。与结肠镜相比,CTC检查无需插管,只需自肛门注入适量的空气使结肠充分扩张,除患者自觉腹胀外,无其他明显不适,因此尤其适用于高危人群的筛选检查,无肠穿孔、出血并发症,对于高龄或合并其他严重心血管疾患的患者,目前CTC是可以代替结肠镜的唯一检查。本组中有5例是因高龄(≥ 71 岁)或合并严重心血管疾患,不适合行结肠镜检查,从而选择结肠CTC检查的。因此说,结肠CTC是对结肠镜的一个重要的补充检查手段。

CTC对结肠梗阻性病变的应用已超出结肠镜的诊断范围,因为镜身不能通过的狭窄段是可以被气体自由贯穿的,因此术前能够完整评价结肠情况的检查首选CTC。后处理技术之一的仿真内窥镜可自梗阻点近端和远端任意观察结肠内腔与病变;对 ≥ 5 mm的息肉或肿瘤病变的细节显示与结肠镜相似^[16-22];CTC可通过多平面重建的后处理方式得到病变部分冠状位及矢状位图像,从而清晰显示周围的解剖结构,进而更加精确定位结肠内病变,而不是像结肠镜那样只能通过距肛缘的长度来大致判断病变位置,而且这种能够显示结肠整体的重建图像更受临床医师欢迎;不仅可显示肠壁黏膜面,还可以显示肠外结构,对结肠癌患者,为临床医生提供结肠外受累信息,有助于对结肠癌进行分期,对手术计划的制订起到关键的辅助作用,也可了解克隆氏病及溃疡性结肠炎对结肠的侵犯范围,评价保守治疗效果。本组16例恶性病变患者,除2例表现为肠壁增厚的患者局部浆膜面光滑未受侵外,通过多平面重建图像观察到浆膜面受

侵者11例;周围淋巴结转移者5例,与手术所见相符。

CTC可真实地评价肿块的部位、大小以及周围侵犯的情况^[23-32],与结肠镜相比,CTC在评价恶性病变的远处转移方面的优势更是显而易见的。而此点又是手术是否执行的关键因素,本组中远处转移者4例,有2例因肠道梗阻较重而施行姑息改道手术,有2例行内镜下结肠支架置入,后行辅助化学治疗,如果这4例患者单独依靠结肠镜结果而贸然手术的话,不仅临床医师会在术中遭遇术前想不到的一些情况,而使手术达不到预期的效果,而且患者要承受更大的身体和心理的痛苦。

与常规CT的腹部扫描相比,CTC的优势在于患者不必等待口服阳性肠道对比剂进入结肠所需的时间(至少2 h);对于那些未行肠道准备的患者,常规的腹部结肠检查会受肠内粪便的影响而不能客观评价病变的位置或形态;对于结肠息肉等较微小病变,常规腹部结肠CT扫描常是阴性结果。

CTC的技术关键:(1)需进行充分的肠道清洁准备,如果肠道内仍可见大量残余液体,需结合仰、俯卧位两种体位观察。由于本组中71.7%(33/46)的患者肠道准备都不能达到满意的程度,因此在CTC扫描时需改变体位扫描,通过结合仰、俯卧位2种体位观察,可使气体和残余液体重新分布,以弥补被残余液体所掩盖的那部分结肠肠壁。有研究指出,双体位扫描还能使结肠的扩张度得到显著改善,横结肠在仰卧位,直肠、乙状结肠在俯卧位具有更为满意的扩张度^[33]。Fletcher等研究显示结合仰卧位和俯卧位CTC扫描,可明显提高对直径5 mm以上息肉检出的敏感性,单用仰卧位扫描时其敏感性为45.1%,结合俯卧位扫描时敏感性提高到68.6%,同时俯卧位扫描尤其有助于左半结肠和直肠息肉的检出^[34]。(2)需注入足够量的气体使结肠肠腔尽可能的扩张。CTC检查技术由于向结肠肠腔内注入适量的空气使结肠充分扩张,从而形成了肠腔内气体与肠壁的密度对比,易于进行仿真内窥镜、表面重建和透明重建的后处理;也由于结肠肠壁被尽可能的展开,从而使对肠壁细节的观察和评价变得更加客观真实,再通过多平面重建的方式为临床医师提供更加直观的图像资料。肠腔扩张不良是造成结肠仿真内窥镜技术中病灶漏诊的重要原因之一,肠管扩张不良将使仿真内窥镜视野狭小,不利于病

灶的检出和细致观察; 在扩张不足的肠管中结肠袋间皱襞往往更加突出明显, 会造成仿真内窥镜视野中皱襞下盲区的产生. 因而保证结肠的充分扩张、结肠壁平坦、皱襞尽量展开是仿真内窥镜技术的基本要求^[35,36]. 因此结肠内注气量的多少决定了肠壁的展开程度, 从而直接决定了CTC评价结肠病变的有效性. (3)利用多种后处理技术辨认息肉、结肠皱襞和粪便残渣. CTC检查对于结肠较大的占位性病变显示较为清晰, 检出率较高, 但对于结肠微小病变, 如小于5 mm的息肉, 多位作者的研究显示其检出率均不高^[16-22], 除了上述的两种因素制约了结肠微小病变的检出外, 合理地运用多种后处理技术也有助于结肠微小病变的显示和鉴别. 因为结肠黏膜面和肠外表现分别可由仿真内窥镜和多平面重建的方式显示出来. 在结肠各段充气良好的情况下, 表面重建和透明重建侧重于显示病变在结肠这一整体中的定位, 而不是对病变细节的显示, 因此作者认为结肠的表面重建和透明重建是“锦上添花”的后处理方法. 由于仿真内窥镜技术能够多方位观察结肠黏膜, 不存在检查盲区, 因此对结肠隆起性病变检出的敏感性较高, 作者通过对46例结肠充气CTC患者进行后处理后发现, 在对CTC图像进行分析时, 可先采用仿真内窥镜进行腔内飞越, 发现黏膜面的隆起性病变时, 再结合多平面重建图像寻找该隆起性病变在横断、冠状及矢状位图像中的位置, 通过了解病变内部的密度来评价该隆起性病变的性质. 在诸多后处理方式中, 管腔展开技术又被称为仿真病理, 是将结肠黏膜以平铺的方式展开, 从而将所有结肠黏膜直接呈现在观察者的面前, 进一步提高了黏膜病变的显示率. 本组中有13例也采用了该种后处理技术.

从1994-02全美胃肠道放射学会上, Vining和Gelfand博士第1次展示了通过应用螺旋CT扫描获得的容积数据报告以及结肠仿真内窥镜的飞越录像开始到现在, 有关CTC的研究已在多个领域广泛展开, 包括临床应用、软件开发、肠内容物标记、CT技术的优化、显示方法研究及计算机辅助诊断等. 相信随着计算机技术的不断发展, CTC的临床应用研究还将达到一个崭新的高度, 还会有越来越多的患者得益于这项检查方法.

4 参考文献

1 Wan J, Zhang ZQ, Zhu C, Wang MW, Zhao DH, Fu YH, Zhang JP, Wang YH, Wu BY. Colonoscopic

- screening and follow-up for colorectal cancer in the elderly. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 267-269
- 2 Makin GB, Breen DJ, Monson JR. The impact of new technology on surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 612-621
- 3 Han Y, Uno Y, Munakata A. Does flexible small-diameter colonoscope reduce insertion pain during colonoscopy? *World J Gastroenterol* 2000; 6: 659-663
- 4 吴云林, 刘建安, 孙蕴伟, 马天乐, 孙波, 诸琦. 诺仕帕控制结肠镜检查腹痛的临床研究. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 880
- 5 苏鲁, 潘洪珍, 翁敬飏, 徐艺华, 陈芳, 洪梅燕. 美蓝染色放大电子结肠镜观察结肠息肉与组织病理学的关系. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1227-1229
- 6 王燕斌, 杨昭徐. 大肠癌的常规诊断. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 792-793
- 7 韩英. 大肠癌早期内镜的治疗. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 790-792
- 8 李世荣. 大肠癌早期诊断的策略. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 780-782
- 9 于皆平, 董卫国. 大肠癌早期诊断的现状. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 553-554
- 10 张亚历, 周殿元. 肠镜检查在早期大肠癌诊断中的重要作用. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 640-642
- 11 Sung JJ, Chan FK, Leung WK, Wu JC, Lau JY, Ching J, To KF, Lee YT, Luk YW, Kung NN, Kwok SP, Li MK, Chung SC. Screening for colorectal cancer in Chinese: comparison of fecal occult blood test, flexible sigmoidoscopy, and colonoscopy. *Gastroenterology* 2003; 124: 608-614
- 12 Jung M, Beilenhoff U, Pietsch M, Kraft B, Rippin G. Standardized reprocessing of reusable colonoscopy biopsy forceps is effective: results of a German multicenter study. *Endoscopy* 2003; 35: 197-202
- 13 Liangpunsakul S, Rex DK. Colon tumors and colonoscopy. *Endoscopy* 2002; 34: 875-881
- 14 Lewis JD, Ng K, Hung KE, Bilker WB, Berlin JA, Brensinger C, Rustgi AK. Detection of proximal adenomatous polyps with screening sigmoidoscopy: a systematic review and meta-analysis of screening colonoscopy. *Arch Intern Med* 2003; 163: 413-420
- 15 Detsky AS. Screening for colon cancer--can we afford colonoscopy? *N Engl J Med* 2001; 345: 607-608
- 16 Iannaccone R, Laghi A, Catalano C, Brink JA, Mangiapane F, Trenna S, Piacentini F, Passariello R. Detection of colorectal lesions: lower-dose multi-detector row helical CT colonography compared with conventional colonoscopy. *Radiology* 2003; 229: 775-781
- 17 Sosna J, Morrin MM, Kruskal JB, Lavin PT, Rosen MP, Raptopoulos V. CT colonography of colorectal polyps: a metaanalysis. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 181: 1593-1598
- 18 Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ahlquist DA, Nelson H, MacCarty RL, Harmsen WS, Ilstrup DM. Detection of colorectal polyps with CT colonography: initial assessment of sensitivity and specificity. *Radiology* 1997; 205: 59-65
- 19 Kay CL, Kulling D, Hawes RH, Young JW, Cotton PB. Virtual endoscopy--comparison with colonoscopy in the detection of space-occupying lesions of the colon. *Endoscopy* 2000; 32: 226-232
- 20 Macari M, Megibow AJ. Pitfalls of using three-dimensional CT colonography with two-dimensional imaging correlation. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176: 137-143
- 21 Rex DK, Vining D, Kopecky KK. An initial

同行评价
本文的科学性、
创新性和可读性
能较好地反映我
国CT影像先进
水平。

- experience with screening for colon polyps using spiral CT with and without CT colography (virtual colonoscopy). *Gastrointest Endosc* 1999; 50: 309-313
- 22 Fenlon HM, Ferrucci JT. First International Symposium on Virtual Colonoscopy. *AJR Am J Roentgenol* 1999; 173: 565-569
- 23 Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ehman RL, Ilstrup DM. Colorectal polyp detection with CT colography: two- versus three-dimensional techniques. Work in progress. *Radiology* 1996; 200: 49-54
- 24 Beaulieu CF, Jeffrey RB Jr, Karadi C, Paik DS, Napel S. Display modes for CT colonography. Part II. Blinded comparison of axial CT and virtual endoscopic and panoramic endoscopic volume-rendered studies. *Radiology* 1999; 212: 203-212
- 25 Macari M, Bini EJ, Xue X, Milano A, Katz SS, Resnick D, Chandarana H, Krinsky G, Klingenberg K, Marshall CH, Megibow AJ. Colorectal neoplasms: prospective comparison of thin-section low-dose multi-detector row CT colonography and conventional colonoscopy for detection. *Radiology* 2002; 224: 383-392
- 26 Iannaccone R, Laghi A, Catalano C, Mangiapane F, Lamazza A, Schillaci A, Sinibaldi G, Murakami T, Sammartino P, Hori M, Piacentini F, Nofroni I, Stipa V, Passariello R. Computed tomographic colonography without cathartic preparation for the detection of colorectal polyps. *Gastroenterology* 2004; 127: 1300-1311
- 27 Mainenti PP, Romano M, Imbriaco M, Camera L, Pace L, D'Antonio D, Bucci L, Galloro G, Salvatore M. Added value of CT colonography after a positive conventional colonoscopy: impact on treatment strategy. *Abdom Imaging* 2005; 30: 42-47
- 28 Yeshwant SC, Summers RM, Yao J, Brickman DS, Choi JR, Pickhardt PJ. Polyps: linear and volumetric measurement at CT colonography. *Radiology* 2006; 241: 802-811
- 29 Pickhardt PJ, Lehman VT, Winter TC, Taylor AJ. Polyp volume versus linear size measurements at CT colonography: implications for noninvasive surveillance of unresected colorectal lesions. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 186: 1605-1610
- 30 Taylor SA, Halligan S, Slater A, Marshall M, Bartram CI. Comparison of radiologists' confidence in excluding significant colorectal neoplasia with multidetector-row CT colonography compared with double contrast barium enema. *Br J Radiol* 2006; 79: 208-215
- 31 Lefere PA, Gryspeerdt SS, Dewyspelaere J, Baekelandt M, Van Holsbeeck BG. Dietary fecal tagging as a cleansing method before CT colonography: initial results polyp detection and patient acceptance. *Radiology* 2002; 224: 393-403
- 32 Pickhardt PJ, Choi JR, Hwang I, Butler JA, Puckett ML, Hildebrandt HA, Wong RK, Nugent PA, Mysliwiec PA, Schindler WR. Computed tomographic virtual colonoscopy to screen for colorectal neoplasia in asymptomatic adults. *N Engl J Med* 2003; 349: 2191-2200
- 33 叶靖, 陈君坤, 张宗军. CT仿真内窥镜检查时仰卧位和俯卧位对充气结肠扩张度影响的研究. *中华放射学杂志* 2003; 37: 469-471
- 34 Fletcher JG, Johnson CD, Welch TJ, MacCarty RL, Ahlquist DA, Reed JE, Harmsen WS, Wilson LA. Optimization of CT colonography technique: prospective trial in 180 patients. *Radiology* 2000; 216: 704-711
- 35 余深平, 李子平, 许达生, 林尔坚, 林佩庄, 徐巧兰. 大肠充气螺旋CT扫描图像后处理功能的临床应用. *中华放射学杂志* 2000; 34: 295-299
- 36 Fenlon HM, Clarke PD, Ferrucci JT. Virtual colonoscopy: imaging features with colonoscopic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 1303-1309

编辑 李军亮 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》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32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500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1980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)

非酒精性脂肪肝细胞损伤敏感性的机制

沈红, 柳涛, 张莉, 郑培永, 季光, 邢练军

沈红, 柳涛, 张莉, 郑培永, 季光, 邢练军, 上海中医药大学附属龙华医院 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032
教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NCET07-0563
国家自然科学基金资助项目, No. 30772802, 30873260
上海市教委重点学科基金资助项目, No. J50305
作者贡献分布: 文献检索、资料分析由沈红、柳涛及张莉完成; 选题、指导、审校由郑培永、季光及邢练军完成。
通讯作者: 邢练军, 主任医师, 200032, 上海市, 上海中医药大学附属龙华医院肝病科. xingdoctor126.com
电话: 021-64876542
收稿日期: 2009-11-26 修回日期: 2010-01-20
接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-08

Pathogenesis of increased sensitivity of hepatocytes to injury in non-alcoholic fatty liver disease

Hong Shen, Tao Liu, Li Zhang, Pei-Yong Zheng, Guang Ji, Lian-Jun Xing

Hong Shen, Tao Liu, Li Zhang, Pei-Yong Zheng, Guang Ji, Lian-Jun Xing, Institute of Digestive Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by: the Program for New Century Excellent Talents in University, No. NCET07-0563; the National Natural Science Foundation of China, No. 30772802, 30873260; and the Leading Academic Discipline Project of Shanghai Municipal Education Commission, No. J50305
Correspondence to: Lian-Jun Xing, Liver Section, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. xingdoctor@163.com
Received: 2009-11-26 Revised: 2010-01-20
Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-08

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is closely associated with genetic, environmental, and metabolic stress. Elevated sensitivity of hepatocytes to injury is found in NAFLD in some circumstances, such as exposure to hepatotoxic substances (carbon tetrachloride, alcohol) and cholestasis. Mitochondrial dysfunction, free fatty acids, oxidative stress, inflammatory factor and calcium overload in hepatocytes play an important role in the pathogenesis of increased sensitivity of hepatocytes to injury in NAFLD. Further elucidation of the pathogenesis of hepatocyte sensitivity to injury may provide a new strategy for prevention

and treatment of NAFLD.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Hepatocyte; Sensitivity; Pathogenesis

Shen H, Liu T, Zhang L, Zheng PY, Ji G, Xing LJ. Pathogenesis of increased sensitivity of hepatocytes to injury in non-alcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 685-688

摘要

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是遗传-环境-代谢应激相关性肝病. NAFLD肝细胞对损伤因素如毒性化学物质(四氯化碳)、酒精、胆汁淤积的敏感性增加. 线粒体功能障碍、游离脂肪酸、氧应激、炎症因子、肝细胞钙超载等在NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制中起重要作用. 对NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制探索将成为研制防治肝病药物重要的新途径.

关键词: 非酒精性脂肪肝; 肝细胞; 敏感性; 机制

沈红, 柳涛, 张莉, 郑培永, 季光, 邢练军. 非酒精性脂肪肝细胞损伤敏感性的机制. *世界华人消化杂志* 2010; 18(7): 685-688
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/685.asp>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除乙醇和其他明确的肝损伤因素外所致的, 以弥漫性肝大泡性脂肪变、伴或不伴炎症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、肝纤维化以及肝硬化^[1]. 在西方国家, NAFLD是最常见的肝脏疾病之一, 占总肝病的17%-33%^[2,3].

目前在NAFLD发展过程中, 胰岛素抵抗被认为是最主要的病理生理因素^[4,5]. NAFLD肝细胞对损伤因素如毒性化学物质(四氯化碳)、酒精、胆汁淤积的敏感性增加. 但是NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制是什么呢? 本文主要围绕NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制展开, 对NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制探索将成为研

背景资料

目前在NAFLD发展过程中, 胰岛素抵抗被认为是最主要的病理生理因素. NAFLD肝细胞对损伤因素如毒性化学物质(四氯化碳)、酒精、胆汁淤积的敏感性增加. 但是NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制是什么呢? 本文主要围绕NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制展开, 对NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制探索将成为研制防治肝病药物重要的新途径.

同行评议者
党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

研发前沿
关于细胞死亡过程的研究,近年来已成为生物学、医学研究的一个热点。

制防治肝病药物重要的新途径。

1 肝细胞损伤的相关因素

肝细胞损伤是遗传、环境、体内多因素改变介导的生物学过程,是肝脏疾病的共有表现。肝脏可受外来侵害因素或内在循环紊乱、代谢障碍、免疫反应等因素的影响,通过适应性防御反应和破坏性反应过程,发生变性、凋亡、坏死、免疫-炎症反应、纤维化、缺血、基因表达异常、再生等多种形式的肝损伤改变。各种损害因子可分别或先后以肝细胞、库普弗细胞、肝星状细胞、内皮细胞和胆管细胞等为靶细胞,激发细胞损伤及其伴同的组织结构和功能改变,导致肝细胞损伤。

2 肝细胞损伤的类别

关于细胞死亡过程的研究,近年来已成为生物学、医学研究的一个热点。肝细胞损伤可分为两种:一种是肝细胞变性,也称为亚致死性损伤;另一种是致死性细胞损伤,又可分为凋亡和坏死两种类型^[6,7]。在凋亡的级联反应中,一类重要的物质就是胱冬肽酶(caspase)。在不同的细胞类型中,凋亡有两条不同的信号传播途径^[8]:(1)启动caspase被激活后,产生一强的信号反应,然后直接活化效应caspase;(2)当启动caspase活化的程序不够充分时,通常需要线粒体的参与放大这一过程。

3 NAFLD肝细胞损伤敏感的机制

3.1 线粒体与肝损伤 近年来关于线粒体的研究表明,线粒体在NAFLD肝细胞死亡中起着关键的作用。线粒体功能障碍已成为肝脏损伤的一个机制,他在细胞凋亡以及坏死的过程中都起着重要的作用^[9]。

3.1.1 细胞色素C的释放:细胞色素C是线粒体释放的前凋亡因素。在细胞质,细胞色素C与凋亡激活因子I结合后,再与ATP结合,激活caspase-9,然后激活caspase-3, caspase-3刺激凋亡的效应途径,导致ADP-核糖聚合酶断裂,核小体间DNA水解,细胞皱缩,染色体边缘化,核小叶形成。caspase也参与线粒体释放细胞色素C的上游过程, TNF- α 和FasL与其受体的结合激活caspase-8, caspase-8断裂Bid,然后定位至线粒体,诱导细胞色素C的释放。

3.1.2 线粒体瞬时通透性孔道:线粒体的主要功能为通过氧化磷酸化合成ATP,在线粒体内膜经呼吸链电子传递转化还原等价物以利用能量。

线粒体瞬时通透性孔(mitochondria permeability transition pore, MPT)^[10-12]是线粒体内膜一种可由铜离子诱导的可逆性通道,他在跨膜线粒体蛋白释放至胞液的过程中起到重要作用。氧化磷酸化障碍及MPT改变均可以引起细胞损伤。PT孔开放可诱致线粒体去极化、解偶联、肿胀、使内膜对相对分子质量小于1.5 kDa的溶质分子自由通透,如果PT孔开放,导致外膜破裂,则可释放出细胞色素C引起凋亡。

3.1.3 Bcl-2家族的作用:与死亡程序相关的另一重要成分是Bcl-2家族^[13]。这一家族的不同成员对凋亡或坏死可能具有促进或抑制两种不同的作用,其主要作用靶点是线粒体。近年来,有关**bcl-2**基因蛋白家族作用机制方面进行了大量研究,对其已有了一定了解,并提出了几种作用模式,但确切的机制尚未确定。Harris等^[14]指出,**bcl-2**基因蛋白家族对于PT孔的开放和关闭起关键的调节作用,促凋亡蛋白Bax等可以通过与内膜的腺苷转位因子(adenine nucleotide translocator, ANT)或电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channel, VDAC)的结合介导PT孔的开放,而抗凋亡类蛋白如Bcl-2、Bcl-xL等则可通过与Bax竞争性地与ANT结合,或者直接阻止Bax与ANT、VDAC的结合来发挥其抗凋亡效应。Mikhailov等^[15]研究发现,发生膜转位Bax在线粒体膜上形成了由四聚体到十聚体组成的低聚复合物,从而在线粒体外膜上形成通道介导细胞色素C的释放,此复合物的形成可被Bcl-2抑制。由上可见,Bax对于细胞色素C的释放起着关键的作用,在凋亡信号的刺激下Bax可从胞质转位到线粒体膜上,从而启动线粒体介导的细胞凋亡。抗凋亡类Bcl-2蛋白可以通过阻止促凋亡蛋白在线粒体膜上形成低聚体来发挥其抗凋亡作用^[16]。

3.2 胆汁淤积与肝细胞损伤 在NAFLD胆汁淤积中,升高的疏水性胆汁酸加速了肝细胞坏死,最终导致肝损伤和肝硬化^[17]。其机制为:疏水性胆汁酸通过激活Fas和TRALL死亡受体,线粒体功能障碍,氧化应激, JNK/AP-1信号通路诱导肝细胞凋亡^[18-22]。也有文章报道疏水性胆汁酸也通过内质网应激诱导的肝细胞凋亡^[23]。

3.3 氧应激与肝损伤

3.3.1 细胞自由基的直接损害与脂质过氧化作用:为反应性氧化物(ROS)及其代谢产物的产生超过对其去毒或防御的能力。氧化物和抗氧化物之间的动态失衡导致氧化应激。ROS通过传

递1个或2个电子对细胞成分和生物物质起直接损害作用。OH⁻主要与细胞脂质、蛋白质、DNA起反应; O²⁻与和H₂O₂主要与细胞蛋白质而不是脂质或DNA起反应。ROS损害的重要靶位是线粒体。由于mtDNA缺失及修复障碍, 导致MPT开放、呼吸链电子传递受阻、NF-κB核内移位等改变, 促进继发性氧应激, 使ROS生成增多及抗氧化物缺失。在应激的驱动下, ROS进一步通过脂质过氧化介导生化性和结构性破坏, ROS氧化细胞及细胞器的生物膜, 从磷脂膜的多不饱和脂肪酸提取H⁺进行链反应形成脂质过氧化物, 可诱致细胞死亡。

3.3.2 ROS与细胞内信号级联反应: ROS为细胞信号传递分子及细胞信号传导刺激因子。细胞信号受氧化还原的调节, 效应细胞对ROS反应可使其自身的信号分子产生信号变异, 引发一系列信号级联反应影响其生物功能。ROS通过调节和活化细胞内信号分子的表达, 扩增与级联反应相关的细胞损害。ROS内信号级联反应包括诱致应激活化的蛋白激酶、转录因子(激活物蛋白-1、缺氧诱致因子-1、NF-κB等)、凋亡信号调节物(caspase、Bad、Bcl-2等)以及琉基在细胞内翻译水平的信号传导改变等表达异常。肝脏缺血再灌注损伤反应后期(>24 h)则表现为炎症介导的坏死、凋亡。

3.4 肿瘤坏死因子与肝损伤 TNF-α是一种大多由巨噬细胞产生的细胞因子。TNF-α是凋亡的重要介质之一。TNF-α介导肝细胞损伤的机制尚不十分明了, 大量研究证明, TNF大多数生物学效应由TNF-R1介导^[24,25]。TNF-R1胞内区含死亡结构域, 其引起细胞凋亡或通过激活核转录因子NF-κB使某些细胞增殖、分化; 也可触发信号传导级联而导致细胞凋亡。TNF与TNF-R1结合, 可通过以下3条途径触发细胞死亡。第一条途径: TNF与TNF-R1结合并使TNF-R1在胞内形成三聚体, 后者与TNF受体相关死亡结构域蛋白(TNF-receptor-associated death domain, TRADD)连接^[26], 引起不同的生物学效应。第二条途径: TNF与TNF-R1结合, 通过TRADD聚集RIP(Receptor-interacting protein)^[27]。RIP死亡区优先与TRADD死亡区结合并与TNF-R1发生较弱的连接, 引起细胞的凋亡。第三条途径: TNF诱导细胞凋亡的另一途径是鞘磷脂酶(sphingomyelinase, SMase), 其产生的脂质神经酰胺(ceramide, CM)作为死亡信号级联中重要的信号物质, 可引起细胞凋亡和NF-κB激活^[28]。同时神经酰胺可直接与线粒体内

细胞色素C结合, 释放线粒体, 或者通过促进氧化应激而导致其对肝细胞的损伤。

3.5 肝细胞钙超载与肝损伤 细胞的许多重要生理代谢活动都与胞内Ca²⁺浓度有关, 且钙稳态对细胞的生存极为重要^[29]。在NAFLD中细胞毒性物质CCl₄可直接损伤肝细胞膜, 使Ca²⁺跨膜内流增加引起肝细胞受损。大量Ca²⁺涌入细胞并主要聚集在线粒体内, 由于线粒体膜电势丧失, 呼吸链功能障碍, 电子传递链电子外漏增加, 促进了氧自由基的产生。导致线粒体及肝细胞的脂质过氧化损伤。Ca²⁺激活Ca²⁺依赖性磷脂酶, 促进膜磷脂分解^[30]; 从而促使核苷酸酶、腺核苷酸环化酶、Na⁺-Ca²⁺-ATP酶降解^[31]; 激活钙依赖核苷酸内切酶, 引起DNA水解^[32]阻断胞内依靠转录而进行的潜在修复过程。这些因素都可加重肝细胞损伤, 产生恶性循环。

4 结论

总之, NAFLD肝细胞损伤敏感性是一种由多种因素介导的复杂的生物学过程, 损伤的结果是肝细胞可能发生凋亡或者坏死。但是NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制仍未完全阐明。进一步研究NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制将对于肝脏疾病的预防和治疗起到重要的作用。

5 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 Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004; 40: 1387-1395
- 3 Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43: S99-S112
- 4 Marchesini G, Marzocchi R. Metabolic syndrome and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 105-117, ix
- 5 Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 1-16, vii
- 6 Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 2000; 32: 39-47
- 7 Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21: 1725-1741
- 8 Pessayre D, Mansouri A, Haouzi D, Fromenty B. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol Toxicol* 1999; 15: 367-373
- 9 Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C. Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol* 1998; 275: G387-G392
- 10 Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The

相关报道
近年来关于线粒体的研究表明, 线粒体在NAFLD肝细胞死亡中起着关键的作用。线粒体功能障碍已成为肝脏损伤的一个机制, 他在细胞凋亡以及坏死的过程中都起着重要的作用。

同行评价

本文总结了最新非酒精性脂肪肝细胞损伤敏感性的机制的研究进展,文笔流畅,观点明确,对于进一步研究NAFLD肝细胞损伤敏感性的机制有一定的参考意义。

- mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 177-196
- 11 Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1-G6
 - 12 Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 151-165
 - 13 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326
 - 14 Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1182-1191
 - 15 Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 2001; 276: 18361-18374
 - 16 Wu Y, Xing D, Chen WR. Single cell FRET imaging for determination of pathway of tumor cell apoptosis induced by photofrin-PDT. *Cell Cycle* 2006; 5: 729-734
 - 17 Hofmann AF. Cholestatic liver disease: pathophysiology and therapeutic options. *Liver* 2002; 22 Suppl 2: 14-19
 - 18 Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 1998; 4: 165-178
 - 19 Rust C, Karnitz LM, Paya CV, Moscat J, Simari RD, Gores GJ. The bile acid taurochenodeoxycholate activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2000; 275: 20210-20216
 - 20 Sokol RJ, Straka MS, Dahl R, Devereaux MW, Yerushalmi B, Gumprich E, Elkins N, Everson G. Role of oxidant stress in the permeability transition induced in rat hepatic mitochondria by hydrophobic bile acids. *Pediatr Res* 2001; 49: 519-531
 - 21 Graf D, Kurz AK, Fischer R, Reinehr R, Häussinger D. Tauroolithocholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 2002; 122: 1411-1427
 - 22 Higuchi H, Yoon JH, Grambihler A, Werneburg N, Bronk SF, Gores GJ. Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 454-461
 - 23 Tsuchiya S, Tsuji M, Morio Y, Oguchi K. Involvement of endoplasmic reticulum in glycochenodeoxycholic acid-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 2006; 166: 140-149
 - 24 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365
 - 25 Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two runner necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 392-399
 - 26 Park A, Baichwal VR. Systematic mutational analysis of the death domain of the tumor necrosis factor receptor 1-associated protein TRADD. *J Biol Chem* 1996; 271: 9858-9862
 - 27 Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 1996; 4: 387-396
 - 28 Schütze S, Machleidt T, Krönke M. The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 533-541
 - 29 崔婕, 薛绍白. 胞内钙的稳态调节. *细胞生物学杂志* 1995; 17: 97-100
 - 30 Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Sakitani K, Inoue K. Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J Hepatol* 2000; 32: 251-260
 - 31 梁浩晖, 王成友, 倪勇. 肝脏缺血再灌注损伤发生机制的研究进展. *肝胆外科杂志* 2002; 10: 478-479
 - 32 巫协宁. 急性肝损伤的细胞学机制. *国外医学·消化系疾病分册* 1998; 18: 14-16

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》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.

Th17/Treg失衡与炎症性肠病的关系

葛婷, 唐志鹏, 王亮, 张亚利

葛婷, 唐志鹏, 王亮, 张亚利, 上海中医药大学附属龙华医院
消化内科 上海中医药大学脾胃病研究所 上海市 200032
国家自然科学基金资助项目, No. 30873261
作者贡献分布: 本文综述由葛婷完成; 唐志鹏指导审校; 王亮与
张亚利协助完成。
通讯作者: 唐志鹏, 研究员, 200032, 上海市, 上海中医药大学附
属龙华医院消化内科, 上海中医药大学脾胃病研究所。
zhipengtang@sohu.com
电话: 021-64385700-3923
收稿日期: 2009-11-18 修回日期: 2009-12-10
接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-08

Relationship between Th17/Treg imbalance and inflammatory bowel disease

Ting Ge, Zhi-Peng Tang, Liang Wang, Ya-Li Zhang

Ting Ge, Zhi-Peng Tang, Liang Wang, Ya-Li Zhang, De-
partment of Gastroenterology, Longhua Hospital & Institute
of Digestive Diseases, Shanghai University of Traditional
Chinese Medicine, Shanghai 200032, China
Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 30873261
Correspondence to: Zhi-Peng Tang, Department of Gas-
troenterology, Longhua Hospital & Institute of Digestive
Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medi-
cine, Shanghai 200032, China. zhipengtang@sohu.com
Received: 2009-11-08 Revised: 2009-12-10
Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-08

Abstract

The etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) remain incompletely understood. Inflammatory process caused by abnormal intestinal mucosal immune responses plays an important role in the pathogenesis of IBD. T helper 17 (Th17) cells mediate chronic inflammation and autoimmune diseases, while regulatory T (Treg) cells suppress autoimmunity. There is an interrelationship between Th17 cells and Treg cells. Some studies have shown that Th17/Treg balance is critical in maintaining intestinal immune homeostasis. Th17/Treg imbalance may be a cause of human IBD. Recent studies have also shown that transforming growth factor- β , interleukin-6 and retinoic acid may be key factors regulating Th17/Treg balance. As intestinal flora is closely related with the occurrence of IBD, probiotic treatment of IBD has attracted wide attention. Elucidation of the regulation of

Th17/Treg balance is key to understanding IBD.

Key Words: T helper 17 cell; Regulatory T cell; Inflammatory bowel disease

Ge T, Tang ZP, Wang L, Zhang YL. Relationship between Th17/Treg imbalance and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 689-694

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的病因和发病机制尚未完全明确, 肠道黏膜免疫系统异常反应所导致的炎症过程在发病中起重要作用. 辅助性T细胞17(T helper 17 cells, Th17)可介导慢性炎症和自身免疫性疾病的发生, 调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)有抑制自身免疫的功能, 二者存在相互转化的关系. 有研究表明Th17/Treg转化平衡是维持肠道免疫稳态的重要因素, 这可能是导致人类IBD的原因之一. 最近研究表明TGF- β , IL-6和维甲酸(retinoic acid, RA)可能是调控二者平衡关系的重要因素. 肠道菌群(intestinal flora)与IBD的发生发展关系密切, 益生菌(probiotics)对IBD的治疗作用成为研究的热点. 深化对Th17/Treg转化调控关系的研究是当前重要的研究课题.

关键词: 辅助性T细胞17; 调节性T细胞; 炎症性肠病

葛婷, 唐志鹏, 王亮, 张亚利. Th17/Treg失衡与炎症性肠病的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18(7): 689-694
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/689.asp>

0 引言

IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). 目前认为环境、遗传、感染和免疫是IBD的主要病因, 国外学者做了大量研究^[1-3]表明肠道黏膜免疫反应的激活是导致IBD发生、发展和转归过程的直接原因. Th17的发现解释了传统Th1/Th2轴异常现象发生的原因, 研究证实Th17可参与IBD尤其是UC的发生. Treg数量减少或功能异常均可导致IBD的发生. 转化生长因子- β (transforming growth

背景资料
炎症性肠病(IBD)的病因和发病机制受到医学界的重视, 肠道黏膜免疫系统的异常反应成为其发病机制研究的热点, 而辅助性T细胞17(Th17)和调节性T细胞(Treg)调控关系的失衡在IBD发病过程中发挥重要作用.

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

Th17介导慢性炎症和自身免疫性疾病的发生。Treg可抑制自身免疫。研究表明TGF- β 、IL-6和维甲酸(RA)可能是调控二者平衡关系的重要因素。肠道菌群失调是造成免疫异常,诱导IBD发病的主要原因,益生菌(probiotics)是治疗该病的有效方法。

factor β , TGF- β)诱导幼稚T细胞转化为Treg抑制自身免疫;在IL-6存在的情况下, TGF- β 则促进幼稚T淋巴细胞分化为Th17细胞,分泌前炎症因子IL-17,促进自身免疫和炎症的发生。RA通过其受体RAR α 可调节FOXP3和IL-17表达,从而诱导FOXP3表达和抑制Th17的极化。菌群失调是IBD的发病因素之一,益生菌制剂可有效调节患者肠道菌群平衡,是治疗IBD的辅助疗法。这些研究深化了对IBD发病机制和治疗的认知。本文将结合这些研究热点,介绍Th17/Treg失衡以及肠道菌群与IBD关系的研究概况。

1 Th17的调控和生物学效应

1.1 Th17的发现 Th17的发现源于免疫学家对自身免疫性疾病的研究。一直以来,研究人员认为Th1功能失调可引起自身免疫性疾病,如多发性硬化病,类风湿关节炎及其实验模型的发生。然而研究发现,抑制或敲除Th1型细胞因子IL-12和IFN- γ 对诱导实验性自身免疫性脑炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)产生不同影响,敲除IL-12 p40的小鼠对诱导EAE产生抵抗,而敲除IFN- γ 则产生易感性^[4]。IL-23的发现引起人们重新评价IL-12和IL-23在诱导EAE过程中的作用^[5]。IL-23是IL-12家族的新成员,IL-23与IL-12共同拥有亚单位p40,另一个亚单位p35被p19取代。一些研究表明IL-23 p19缺陷小鼠不能诱导EAE和胶原性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA),而IL-12 p35缺陷小鼠则可以诱导这两种疾病模型。这提示至少IL-23参与诱导自身免疫疾病动物模型^[5]。2005年, Park等^[6]和Harrington等^[7]研究发现, IL-23通过促进CD4⁺ T细胞分泌炎症细胞因子IL-17而发挥其促炎效应,因此IL-23 p19基因的敲除影响了细胞因子IL-17的水平,间接影响自身免疫性疾病的发生,并首次提出Th17细胞的概念。

1.2 Th17的分化和调控

1.2.1 Th17的分化: 过去发现IL-23基因敲除小鼠体内不能产生Th17,表明IL-23在Th17分化中发挥重要作用。近年来的研究显示IL-23只表达于已激活的或记忆性CD4⁺ T细胞^[7,8],这说明IL-23不参与Th17细胞的早期分化,但在维持Th17表型稳定、存活、增殖及功能方面起重要作用。

为了找出诱导初始CD4⁺ T细胞分化为Th17的关键细胞因子, Veldhous等^[9]敲除TGF- β R2基因,结果发现该鼠体内缺乏Th17细胞,不能诱导EAE发生,而注射TGF- β 中和性抗体能阻止或减

少EAE病情。还有研究发现TGF- β 1的缺陷可阻止EAE小鼠Th17细胞的分化,抑制小鼠对EAE的诱导^[10]。这表明TGF- β 是Th17分化的必需因子,同时也是诱导初始CD4⁺ T细胞分化为具有免疫抑制作用的CD25⁺Foxp3调节性T细胞(Treg)的主要细胞因子。TGF- β 在Th17分化中发挥至关重要的作用。

有研究表明,阻断IL-6信号通路抑制了鼠Th17细胞的分化,说明IL-6和TGF- β 是诱导Th17分化的关键。在TGF- β 单独存在条件下,初始CD4⁺ T细胞被诱导分化为Treg细胞^[11]。Xu等^[12]做了一项研究,体外激活纯化的小鼠CD25⁺ T细胞后产生大量TGF- β ,在IL-6存在时CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T细胞分化为Th17; IL-6可诱导CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺(GFP⁺)T细胞分化为Th17。因此IL-6是决定初始CD4⁺ T细胞分化为Treg还是Th17的关键因子。

研究发现Th17能分泌产生IL-21来促进自身分化进程^[13]。IL-6可诱导Th17分泌IL-21,后者通过正反馈诱导IL-21和IL-23R的表达,同时IL-21诱导STAT3表达并与IL-23系统共同诱导ROR γ t表达,促进IL-17的产生^[14]。

总之, Th17的分化主要包括3个阶段: TGF- β 和IL-6首先启动Th17分化, IL-21介导Th17扩大分化规模, IL-23则在分化后期维持Th17稳定分化成熟。

1.2.2 Th17的调控: 维甲酸相关孤儿素受体 γ (ROR γ t)是Th17分化的重要转录因子^[15]。ROR γ t是维甲酸家族成员之一,特定表达与T细胞区域,其作用是调节胸腺中T细胞的发育和外周血中效应性T细胞的分化。有研究发现,未致敏T细胞充分表达ROR γ t可诱导其向Th17细胞方向分化,分泌IL-17发挥致炎作用;若缺乏ROR γ t的表达,则其不能向Th17细胞方向分化^[16]。新近研究还表明Th17细胞分化的另一个转录激活因子ROR,他可上调Th17细胞表达。Yang等^[17]在研究中发现ROR缺陷导致IL-17在体内外表达减少。ROR可能通过与ROR γ t共同表达的协同方式促进Th17细胞的分化^[16]。

Stat3是IL-6, IL-21和IL-23的主要信号传导因子,是产生IL-17的关键因子, Stat3缺乏导致IL-17产生细胞减少^[18-20]。还有研究表明Stat3可调节ROR γ t的表达, Stat3缺乏使ROR γ t的表达受损,导致T细胞中T-box(T-bet)和Foxp3表达增加;相反, Stat3的功能亢进时ROR γ t的表达增加,抑制Foxp3的表达,抑制CD4⁺ Th细胞向Treg方向分

化,促进Th17细胞的增殖. Stat3同时可诱导IL-23R^[21].

干扰调节因子-4(interference regulatory factor 4, IRF4)最近被报道是Th17分化的重要因子^[22]. 有研究发现IRF4参与EAE模型鼠炎性Th17细胞的发育过程^[23]. 进一步研究发现, IRF4^{-/-} T细胞不能产生IL-17. IRF4^{-/-}小鼠不能诱导EAE, IRF4在ROR γ t表达中起重要作用^[22].

1.3 Th17的生物学效应 Th17分泌多种细胞因子, 主要分泌IL-17A(IL-17), IL-17F, IL-21和IL-22. IL-17细胞因子家族包括IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E(IL-25)和IL-17F. IL-17是通过获得性免疫与先天性免疫系统联合的方式来促进炎症的发生, 并且也像大多数炎症因子一样主要是在体外发挥作用.

Th17相关细胞因子可引发许多炎症反应. IL-17可促进炎症细胞因子, 趋化因子(如MCP-1和MIP-2), 环氧合酶-2, 组织降解蛋白酶(MMPs)及基质金属蛋白酶等的合成, 引起组织细胞浸润和组织破坏^[24,25]. 源于Th17的细胞因子可以保护宿主对抗各种细菌和真菌, 特别在对黏膜表面的保护上起重要作用, 这些功能加强修复, 促进中性粒细胞活化, 刺激上皮细胞产生防御作用^[25].

2 Treg的调控和生物学效应

2.1 Treg的发现 Sakaguchi等^[26]在1995年做了一个创新性的研究, 首次在啮齿类动物身上发现CD4⁺ T细胞的一个亚型表达CD25(IL-2受体 α 链), 被称为CD4⁺CD25⁺ T细胞亚群. 实验中将小鼠外周CD4⁺CD25⁺ T细胞去除后引发自身免疫性疾病, 而将CD4⁺CD25⁺ T细胞和CD4单阳性T细胞共同过继转移, 则可预防自身免疫性疾病的发生, 这表明此类T细胞能介导外周免疫耐受, 可能是导致各种自身免疫疾病发生的原因.

2.2 Treg的分类和功能 根据细胞因子表面标记、转录因子的表达及分泌细胞因子的不同, CD4⁺ Treg主要分为两个亚群: 自然调节性T细胞(nature Treg, nTreg)和适应调节性T细胞(adaptive or induced Treg, aTreg or iTreg). nTreg主要指在胸腺发育成熟后进入外周淋巴组织的Treg细胞, 在预防病理性自身免疫反应方面起作用; iTreg主要由成熟T细胞诱导产生, 在微生物感染和移植免疫中起主要作用. nTreg主要为CD4⁺CD25⁺ Treg, 目前对这类亚型的研究较多, 约占外周CD4⁺ T细胞的5%-10%, 是维持机体内环境稳定的主要Treg, 其功能为通过下调自身免疫应答来诱导自

身免疫耐受和抑制自身免疫疾病的发生^[27]. 这种功能使CD4⁺CD25⁺ Treg在自身免疫疾病, 慢性炎症, 肿瘤免疫和器官移植等中发挥重要作用.

2.3 Treg的调控 FOXP3属于foxhead家族分叉头/翼状螺旋(forkhead/winged-helix)转录调节因子, 目前是公认的CD4⁺CD25⁺ Treg特异性标志. 在转基因动物实验中发现, 随着FOXP3表达水平的降低, nTreg的抑制功能丧失, 并分化为Th2细胞, 最终导致自身免疫综合征^[28]. 还有实验证明, T细胞表面过度表达FOXP3可以使其转变为Treg表型, 并发挥其抑制活性^[29]. 持续表达FOXP3是维持Treg抑制活性的关键因素^[30]. 因此FOXP3对CD4⁺CD25⁺ Treg的发育、外周表达和功能维持起关键性作用.

TGF- β 由Th3分泌, 是重要的免疫调节因子, 通过调节FOXP3表达来影响Treg的功能. 研究表明TGF- β 对维持小鼠外周CD4⁺CD25⁺ Treg的数量, 功能及FOXP3表达至关重要, TGF- β 在外周诱导FOXP3的表达^[31,32]. 在没有TGF- β 存在的情况下, Treg细胞抑制功能减弱, 在体内存活率降低^[10,33]. TGF- β 激活Smad3, 同时刺激TCR诱导NFAT的活化. Smad3和NFAT共同作用促进FOXP3表达^[34]. 此外, 诱导FOXP3的表达还需要IL-2介导激活Stat5. TGF- β 和IL-2可维持分化后Treg细胞的生存和功能^[35].

3 Th17/Treg失衡在炎症性肠病中的作用

传统观念认为, UC患者肠道黏膜炎症主要是由IL-4和IL-13促进分化的Th2细胞占优势; 而CD患者主要是IL-12促进分化的Th1细胞占优势. Th17细胞的发现拓宽了对IBD形成机制的认识, 有助于解释Th1/Th2轴中异常现象发生的原因. Kinugasa等^[36]指出IL-17通过细胞外信号调节(ERK)-丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路参与调节肠上皮屏障功能, IL-17可能是引起肠道炎症的潜在因素. Veldhoen等^[37]发现, 在大肠炎症模型小鼠的肠道和淋巴器官中, 可以同时检测出IFN- γ ⁺和IL-17⁺的CD4⁺ T细胞. 另一项研究发现活动性CD和UC患者病变肠黏膜中CD3⁺ T细胞、CD68⁺单核细胞和巨噬细胞中可以检测到IL-17的表达. 活动性CD患者中IL-17细胞数是正常对照组的20倍, 是非活动性CD患者的4倍. 相对于正常人, CD和UC患者血清中的IL-17明显增高, 非活动性IBD患者血清中的IL-17也升高. 重组IL-23可以进一步诱导UC患者的LP-CD4⁺细胞产生IL-17, 但对CD患者这种作用却

相关报道

Mucida等研究表明在IL-6存在的情况下, TGF- β 则促进幼稚T淋巴细胞分化为Th17细胞, 分泌前炎症因子IL-17, 促进自身免疫和炎症的发生. Kitani等的实验也证明Treg可有效的修复IBD患者黏膜炎症, 但是在炎症部位出现IL-6和/或IL-23时, Treg则分化为致病性Th17. Bai等实验对RA和RAR α 在人类和小鼠结肠炎免疫应答中的作用机制进行了研究, 结果表明RA可以诱导FOXP3表达, 下调IL-17表达. 因此, TGF- β , IL-6和RA对Th17/Treg的调控在炎症性肠病形成过程中起重要作用.

创新盘点
本文总结近年的文献,将TGF- β 、IL-6和RA与Th17/Treg的平衡关系联系在一起,明确Th17/Treg的失衡是导致IBD的重要发病机制,并指出益生菌是治疗IBD的有效药物。

很弱,这更证实了UC患者中Th17免疫的显著特征^[38]。以上研究均提示Th17细胞参与了炎症性肠病的发病。

CD4⁺CD25⁺ Treg细胞数量减少、功能异常或抑制功能受损,均可导致肠黏膜损伤,从而诱发IBD的发生。Becker等^[39]研究表明,TGF- β 主要参与诱导和维持转录因子FOXP3的表达以及CD4⁺CD25⁺ Treg细胞的增殖与活化,FOXP3通过下调Smad3进而增强TGF- β 信号通路,加强后者的免疫抑制活性。活化后的Treg细胞可与高浓度TGF- β 抗体特异性结合,阻断Treg细胞的免疫抑制效应,同时Treg细胞分泌的TGF- β 与自身细胞膜受体结合,激活后再借助细胞-细胞间接触从而发挥其免疫抑制效应。另有研究认为Tregs依赖IL-10、TGF- β 抑制先天或获得性免疫诱导的肠黏膜炎症反应,CD4⁺CD25⁺ Treg细胞数量的减少或功能异常可能是导致IBD发病的主要因素^[40,41]。

Th17和Treg是CD4⁺ T细胞的亚型,二者存在相互转化关系。TGF- β 诱导幼稚T细胞转化为Treg抑制自身免疫。在IL-6存在的情况下,TGF- β 则促进幼稚T淋巴细胞分化为Th17细胞,分泌前炎症因子IL-17,促进自身免疫和炎症的发生^[42]。虽然Treg可有效的修复IBD患者黏膜炎症,但是在炎症部位出现IL-6和/或IL-23时,Treg则分化为致病性Th17^[43]。因此,Th17/Treg平衡转化关系的变化在IBD形成过程中起重要作用。

调控Th17/Treg之间的平衡,可能成为治疗IBD的新方法。维生素A代谢产物RA是TGF- β 依赖免疫应答的主要调控因子,可阻止IL-6启动诱导前炎症Th17细胞并促进抗炎Treg的分化^[42]。这些发现提示RA可调控前炎症和抗炎免疫。RA的作用主要通过核受体RAR α 介导。活化的RAR α 可调节FOXP3和IL-17表达,和/或直接调节ROR γ t基因,从而引起诱导FOXP3表达和抑制Th17的极化。研究表明,只有在TGF- β 和RA存在的条件下,肠系膜淋巴结树突状细胞CD103⁺才可以诱导FOXP3⁺ Tregs^[44,45]。还有实验^[46]对RA和RAR α 在人类和小鼠结肠炎免疫应答中的作用机制进行了研究,结果表明RA可以诱导FOXP3表达,下调IL-17表达。一些学者提出RA可以通过调控Th17/Treg来维持体内免疫稳态的平衡^[47]。因此,RA可能通过对Th17/Treg的调控,继而影响IBD的进程。

4 肠道菌群与IBD的关系

胃肠道内存在着大量的微生物,这些共生菌群与

人体健康息息相关。随着对肠道菌群的深入研究,人们发现IBD的发病与肠道菌群失调密切相关。哈佛医学院的Mazmanian等^[48]发表文章指出肠道生态失调(dysbiosis)是造成免疫失衡,诱发IBD等肠道疾病的主要原因。实验性结肠炎动物模型均是在有肠道细菌时发生的。例如IL-10基因敲除小鼠和HLA-B27转基因大鼠等模型在无菌条件下喂养不会形成肠道炎症^[49]。大量研究表明^[50,51],IBD患者的肠道菌群与正常人相比表现出明显不同,如双歧杆菌和产酪酸菌减少。这为益生菌治疗或辅助治疗IBD提供了理论依据。

5 益生菌对IBD的治疗作用

目前临床常用的益生菌主要为双歧杆菌、乳杆菌、粪肠球菌、某些种类的非致病性大肠埃希菌等。Zocco等^[52]的研究中,187例静止期UC患者随机接受乳杆菌GG、美沙拉嗪或两者联合治疗,结果显示乳杆菌GG控制UC复发的作用与美沙拉嗪相比无明显差异,但在延长复发时间方面似更为有效。Fedorak等^[53]总结了2005年之前和之后到2007年两个阶段中益生菌治疗IBD的研究。分析表明益生菌能够预防、缓解、治疗IBD或减少其复发。其中酪酸梭菌显示出良好的效果。Pochard等^[54]的实验证明了乳酸菌促进IL-12和IFN- α 的分泌,从而调节Th1/Th2的平衡。Menard等^[55]研究表明,乳酸菌的代谢产物可发挥抗TNF- α 的作用,抑制NF- κ B的表达。研究^[56]表明,益生菌可减少恶唑酮诱导的实验性结肠炎小鼠血清中IL-23和TNF- α 分泌。而IL-23是维持Th17表型稳定、存活、增殖及功能的重要因素,因此,益生菌可以通过减少IL-23的分泌,进而抑制IL-17的产生和功能,这证实了益生菌制剂可通过此途径改善肠道炎症状态。另有研究^[57]认为益生菌可促进TGF- β 轴调节性细胞分化,抑制前炎症因子的产生。因此,益生菌是治疗IBD的有效辅助药物。

6 结论

Th17和Treg的转化平衡关系失衡是诱导IBD的原因之一。Th17促进肠道炎症的发生,诱导自身免疫疾病的发生,而Treg则抑制肠黏膜炎症反应。目前研究认为TGF- β 、IL-6和RA可相互作用调节Th17/Treg平衡,若此平衡失调导致IL-17等促炎因子的分泌增多,Treg数量减少抑制自身免疫的功能减弱,则最终引起肠黏膜损伤诱发IBD。而肠道菌群在IBD的发病过程中发挥重要

作用, 益生菌可抑制炎症因子的分泌, 为IBD的治疗提供了新的方向. Th17/Treg相互转化的调控机制研究深化了对IBD免疫机制的认识, 并且可能提示今后治疗IBD的新策略.

7 参考文献

- Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, Szabolcs M, Herron A, Magnusdottir E, Calame K. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol* 2006; 7: 457-465
- Kallies A, Hawkins ED, Belz GT, Metcalf D, Hommel M, Corcoran LM, Hodgkin PD, Nutt SL. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat Immunol* 2006; 7: 466-474
- Spahn TW, Herbst H, Rennert PD, Lügering N, Maaser C, Kraft M, Fontana A, Weiner HL, Domschke W, Kucharzik T. Induction of colitis in mice deficient of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes is associated with increased disease severity and formation of colonic lymphoid patches. *Am J Pathol* 2002; 161: 2273-2282
- Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112: 1557-1569
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421: 744-748
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6: 1133-1141
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6: 1123-1132
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; 278: 1910-1914
- Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol* 2006; 7: 1151-1156
- Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007; 26: 579-591
- Betelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238
- Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 2007; 178: 6725-6729
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007; 448: 484-487
- Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007; 8: 967-974
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-1133
- Huang Z, Xie H, Wang R, Sun Z. Retinoid-related orphan receptor gamma t is a potential therapeutic target for controlling inflammatory autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 737-743
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 2008; 28: 29-39
- Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, Xin H, Kortylewski M, Albesiano E, Hipkiss EL, Getnet D, Goldberg MV, Maris CH, Housseau F, Yu H, Pardoll DM, Drake CG. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 2007; 179: 4313-4317
- Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, Kapur R, Levy DE, Kansas GS, Kaplan MH. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol* 2007; 178: 4901-4907
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26: 371-381
- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 9358-9363
- Brüstle A, Heink S, Huber M, Rosenplänter C, Stadelmann C, Yu P, Arpaia E, Mak TW, Kamradt T, Lohoff M. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 2007; 8: 958-966
- Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112: 1557-1569
- Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476
- Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 2004; 190: 624-631
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in

应用要点
本文对TGF-β, IL-6和RA调控Th17/Treg的平衡作用机制以及益生菌对IBD的治疗作用进行了初步的综述, 为IBD的发病机制和治疗方法提供了新的思路 and 方向.

同行评价

本文对Th17/Treg与维甲酸的调控关系在形成炎症性肠病中的作用进行了综述,有一定学术价值。

- dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212: 8-27
- 28 Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007; 445: 766-770
- 29 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336
- 30 Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007; 8: 277-284
- 31 Luo ZX, Liu EM, Deng B, Li X, Chen KH, Wang LJ, Huang Y, Fu Z. [Role of Foxp3 expression and CD4+CD25+ regulatory T cells on the pathogenesis of childhood asthma] *Zhonghua Erke Zazhi* 2006; 44: 267-271
- 32 Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198: 1875-1886
- 33 Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201: 1061-1067
- 34 Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 2008; 9: 194-202
- 35 Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, Vegoe AL, Hsieh CS, Jenkins MK, Farrar MA. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 2008; 28: 112-121
- 36 Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* 2000; 118: 1001-1011
- 37 Veldhoen M, Stockinger B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol* 2006; 27: 358-361
- 38 Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K, Isobe K, Hibi T. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 1682-1689
- 39 Becker C, Fantini MC, Neurath MF. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 97-106
- 40 Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 132-141
- 41 Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 677-686
- 42 Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317: 256-260
- 43 Kitani A, Xu L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunol* 2008; 1 Suppl 1: S43-S46
- 44 Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007; 204: 1775-1785
- 45 Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; 204: 1757-1764
- 46 Bai A, Lu N, Guo Y, Liu Z, Chen J, Peng Z. All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 959-969
- 47 Shale M, Ghosh S. Beyond TNF, Th1 and Th2 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2008; 57: 1349-1351
- 48 Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453: 620-625
- 49 Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med* 2005; 143: 895-904
- 50 Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13780-13785
- 51 Mylonaki M, Rayment NB, Rampton DS, Hudspith BN, Brostoff J. Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 481-487
- 52 Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1567-1574
- 53 Fedorak RN. Understanding why probiotic therapies can be effective in treating IBD. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42 Suppl 3 Pt 1: S111-S115
- 54 Pochard P, Gosset P, Grangette C, Andre C, Tonnel AB, Pestel J, Mercenier A. Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 617-623
- 55 Ménard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut* 2004; 53: 821-828
- 56 Zhang HQ, Ding TT, Zhao JS, Yang X, Zhang HX, Zhang JJ, Cui YL. Therapeutic effects of Clostridium butyricum on experimental colitis induced by oxazolone in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1821-1828
- 57 Vojdani A, Lambert J, Kellermann G. The Role of Th17 in Neuroimmune Disorders: A Target for CAM Therapy. Part III. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009 Jul 21. [Epub ahead of print]

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

肠黏膜屏障在炎症性肠病中作用机制的研究进展

毛靖伟, 王英德

毛靖伟, 王英德, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011
作者贡献分布: 本文综述由毛靖伟与王英德完成; 王英德审校。
通讯作者: 王英德, 教授, 硕士生导师, 116011, 辽宁省大连市中山路222号, 大连医科大学附属第一医院消化内科。
albertwyd@yahoo.com.cn
电话: 0411-83635963-3162
收稿日期: 2009-12-05 修回日期: 2010-01-17
接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-08

Advances in understanding the pathogenesis of mucosal barrier dysfunction in inflammatory bowel disease

Jing-Wei Mao, Ying-De Wang

Jing-Wei Mao, Ying-De Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Correspondence to: Professor Ying-De Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Dalian 116011, Liaoning Province, China. albertwyd@yahoo.com.cn
Received: 2009-12-05 Revised: 2010-01-17
Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-08

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic nonspecific intestinal inflammatory disease whose pathogenesis is closely associated with the alterations in mucosal barrier function. Normal mucosal barrier can not only maintain the stability of enteric flora and prevent the translocation of microbes and endotoxin but also play an important role in intestinal immune defense against microbes. Functional impairment of mucosal barrier has been noted in IBD. In this article, we will review the recent advances in understanding the pathogenesis of mucosal barrier dysfunction in IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Mechanical barrier; Immunologic barrier; Biological barrier

Mao JW, Wang YD. Advances in understanding the pathogenesis of mucosal barrier dysfunction in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 695-698

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是肠道慢性非特异性炎症, 黏膜屏障与IBD的关系密切。正常的肠黏膜屏障能维持肠道内菌群的稳定、防止肠道内细菌及毒素的移位以及对微生物进行适当的免疫防御反应起重要作用。而当发生IBD时存在肠黏膜屏障功能的障碍。本文就肠黏膜屏障功能在IBD中作用机制的研究进展作一综述。

关键词: 炎症性肠病; 机械屏障; 免疫屏障; 生物屏障

毛靖伟, 王英德. 肠黏膜屏障在炎症性肠病中作用机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(7): 695-698
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/695.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、克罗恩病(Crohn's disease, CD), 发病率逐年增高, 而其发病机制还未完全阐明, 但可以肯定肠黏膜屏障功能失调参与了IBD的发生, 无论UC或CD均存在肠黏膜屏障功能障碍。肠黏膜屏障主要包括机械屏障、免疫屏障及生物屏障。机械屏障由肠上皮细胞、肠黏液组成; 免疫屏障即肠道免疫防御系统主要由分泌性免疫球蛋白(secretory immunoglobulin, SIgA)和肠相关淋巴组织(gut associated lymphatic tissue, GALT)构成; 肠道正常菌群构成了肠道的生物屏障。

1 机械屏障

1.1 肠上皮细胞的屏障功能 完整的肠上皮细胞能阻止细菌及毒素等大分子渗透至肠黏膜固有层, 激活固有层免疫细胞维护肠黏膜屏障功能的稳定, 避免了黏膜异常免疫反应的发生。CD患者一级亲属存在肠上皮通透性异常, 说明肠黏膜屏障功能在IBD中具有遗传易感性^[1]。

肠上皮细胞屏障功能主要依赖肠上皮细胞间的紧密连接。上皮细胞紧密连接由紧密连接蛋白构成, 这些蛋白主要包括闭锁蛋白、

背景资料

正常的肠黏膜屏障能维持肠道菌群稳定、防止肠道内细菌及毒素的移位对肠腔内微生物进行适当的免疫耐受及防御反应。炎症性肠病(IBD)是肠道的慢性非特异性炎症, 发病率逐年增高, 发病机制未完全阐明。但可以肯定, 肠黏膜屏障功能失调参与了IBD的发生。

同行评议者
夏冰, 教授, 武汉大学中南医院消化内科

研发前沿
肠黏膜屏障功能异常是IBD发病的重要环节。黏膜屏障功能的研究将有助于进一步对IBD发病机制的认识。IBD中遗传易感基因、黏膜免疫以及肠腔内的微生物如何影响黏膜屏障功能正成为IBD的研究热点。

连接相关分子等跨膜蛋白和闭锁小带(zonula occludens, ZO)、丝状肌动蛋白等30多种胞内蛋白。在IBD患者结肠黏膜中存在连接复合物(E-黏钙蛋白及 β -连环蛋白)的表达下调^[2]。肠上皮细胞间的紧密连接能被TNF- α 、IL-17、INF- γ 等多种细胞因子及上皮下的免疫网络所动态调控^[3]。正常的肠上皮细胞功能在肠机械屏障中起不可低估的作用。肠黏膜上皮细胞能表达前列腺素受体EP4(也被称为PTGER4), EP4能调节上皮的屏障功能: EP4基敲除小鼠更易患葡聚糖诱导的结肠炎^[4]。上皮细胞不断与肠腔内的微生物及上皮下的免疫细胞网络接触和相互作用。核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)在IBD中的作用已经得到公认^[5]。上皮细胞特殊的NF- κ B活化或抑制可能是其炎症再发或抑制的关键。IBD中肠腔内有些细菌可能通过抑制NF- κ B抑制蛋白(inhibitor nuclear factor-kappa B, I κ B)的降解、抑制与P50-P65异源二聚体结合的I κ B在蛋白化以及增强过氧化合物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)- γ 介导的RelA核输出发挥降低上皮细胞中NF- κ B活性的功能^[6]。肠上皮细胞能表达Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)、核苷酸结合寡聚域蛋白-2(nucleotide-binding oligomerization domain protein-2, NOD2)。TLRs家族是一种识别微生物体上保守结构-病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs), 他可表达于肠道黏膜的上皮细胞中, 并介导微生物与细胞之间的相互作用, 对维护正常的肠黏膜屏障必不可少。TLRs能够识别共生菌或病原菌表达的PAMPs, 与黏膜耐受和保护有密切关系^[7]。TLRs信号途径可激活蛋白激酶C(protein kinase C, PKC), 引起ZO-1向细胞顶部紧密连接处的转移, 从而增强肠道黏膜屏障的完整性^[8]。NOD2基因为第1个已证实的人类CD易感基因^[9], 其蛋白的生理功能主要为: 调控细胞的凋亡及对细菌成分的反应, 诱导NF- κ B的激活^[10]。NOD2突变后能降低NF- κ B的活性, 造成机体先天免疫系统低反应性, 从而诱导了机体对肠腔内微生物异常强烈的继发性免疫反应, 进而引起CD的发生^[11]。Hisamatsu等^[12]推测NOD2作为抗菌因子参与黏膜上皮细胞对肠道细菌的反应, NOD2基因变异引起相应功能缺陷故无法防御有害菌群, 导致CD发生。Rosenstiel等^[13]也发现在NF- κ B介导下, TNF- α 和INF- γ 可上调肠上

皮细胞内NOD2基因表达, 提高对LPS的敏感性。
1.2 肠黏液 肠上皮表面覆盖的黏液主要为杯状细胞分泌的MUC2、MUC3等黏蛋白, 他们是一类糖蛋白, 有细菌黏附结合的生态位点, 可与肠上皮细胞上的结合位点竞争, 从而阻止细菌与肠上皮细胞结合, 有利于肠蠕动时清除细菌。肠黏液对抑制结肠炎的发生起重要作用^[14], MUC2缺失的小鼠能发生自发性结肠炎^[15]。杯状细胞除了分泌MUC系列黏蛋白, 还能分泌三叶草样多肽, 其在上皮/黏膜防御及修复中起关键作用^[16]。杯状细胞分泌的一种抵抗素样分子(resistin-like molecule, RELM) β , 被发现能诱导细菌的聚集, 而敲除这种基因能减少葡聚糖诱导的结肠炎症性损伤^[17]。

2 免疫屏障

肠道免疫防御系统可以称为黏膜的监视系统, 他对肠道内的菌群及抗原进行识别并作出不同的反应, 以维持肠道及全身的免疫平衡。

2.1 SIgA 黏膜浆细胞分泌IgA, 肠上皮细胞产生分泌片段, 2分子IgA通过J-链和1个分泌片段连接形成SIgA。SIgA分泌后分布于黏膜表面, 是肠道免疫屏障的重要方面。SIgA能中和毒素、细菌和其他生物活性抗原, 在补体等作用下溶解细菌, 与之形成抗原抗体复合物, 封闭其与肠上皮细胞结合的特异部位, 阻止细菌与肠上皮细胞吸附。此外, SIgA还通过介导抗体依赖细胞介导的细胞毒(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)作用等机制来行使多种功能。
2.2 GALT GALT中派伊尔氏结(Peyer's patches, PP)、孤立的淋巴滤泡及黏膜固有层是肠道黏膜免疫的诱发部位, 而黏膜固有层既是诱发部位又是效应部位, 另外, 上皮细胞间淋巴细胞也是黏膜免疫的效应部位。

GALT中还包括微皱褶细胞(micro-fold cell, 即M细胞)、潘氏细胞、树突状细胞(dendritic cell, DC)、巨噬细胞。肠黏膜内的“哨兵细胞”不断地监测肠道内的微生物, 其中的M细胞通过对大分子、IgA复合物及微生物的胞饮作用, 将他们运输至抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)。在APC中, 骨髓来源的DC是肠黏膜固有层中主要的亚型, 根据部位、成熟的程度及炎症阶段可表现大量的可塑功能。体内免疫荧光显微镜技术发现DC在肠上皮形成了大量的网络, 同时通过上皮细胞间隙与肠腔内的抗原相互作用^[18]。肠腔内定植的DC对细菌选择

相关报道
国外Wells等报道了黏膜免疫屏障尤其是肠相关淋巴组织(GALT)中的多种免疫细胞及其表达的受体(TLRs、NLRs、CLRs等)对腔内微生物的不同免疫反应在肠黏膜中的作用。

能部分的被CX3CR1依赖机制调节, 这种机制能允许DC与微生物直接接触^[19]. TLRs与相应的配体作用后能刺激未成熟的CD11c⁺、CD11b+DC产生IL-23; 而IL-23基因敲除实验证实, IL-23在结肠炎症小鼠模型的炎症中起主导作用^[20]. DC在IL-4、B淋巴细胞及肠内细菌参与下于肠道炎症的肉芽肿形成中起作用^[21]. GALT中的潘氏细胞位于绒毛隐窝的底部, 他们分泌抗微生物肽, 包括: α 与 β 防御素^[22]. 潘氏细胞 α -防御素的分泌减少可导致NOD2突变患者回肠末端CD的发生^[23]. 由于炎症信号, 循环中的巨噬细胞迁移到肠黏膜固有层, 这些细胞不同于腔内定植的巨噬细胞, 他们能表达髓样细胞触发受体(triggering receptor expressed on myeloid cells, TREM)-1/2、NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs)及TLRs^[24,25]. 小鼠体内的巨噬细胞对STAT3选择性裂解, 说明巨噬细胞对IBD有调节作用^[26]. IL-10基因敲除的小鼠由于肠道内的巨噬细胞产生大量的IL-12、IL-23而导致了肠道的炎症, 去除小鼠体内的巨噬细胞后可阻止结肠炎的发展^[27]. 体内的免疫细胞如巨噬细胞和DC迁移至目标黏膜组织依赖细胞因子、炎症介质、黏附分子等的表达. 此外, 这些细胞产生的活性氧是炎症、组织损伤、上皮细胞通透性的关键因素. 补充活化的DC及巨噬细胞至黏膜固有层, 可放大局部炎症反应^[28], 这些细胞对黏膜的归巢被炎症介质受体和细菌信号调控. 由不同种类受体识别不同类的微生物分子是黏膜免疫的重要环节, 已有十余种TLRs、二十余种NLRs、一些C型凝集素受体(C-type lectin receptors, CLR)以及 β -葡聚糖受体被证实参与了黏膜免疫过程^[29]. 这些受体除了在肠上皮细胞内表达, 还主要在上述的DC、巨噬细胞及潘氏细胞中表达. TLR识别微生物后, 通过已知的NOD2蛋白激活NF- κ B途径, 启动信号级联反应, 诱导相关基因表达以防御微生物. 细菌肽聚糖成分胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)可被NLRP1炎性体所识别^[30], 持续的MDP刺激可能使这些通路对入侵肠道的微生物等的耐受.

3 生物屏障

微生物控制着易感宿主IBD的进展. 微生物动态平衡尤其是黏膜中的共生菌群和宿主防御反应在慢性IBD发生、发展中起中枢性作用. 运用抗生素对IBD的一些亚型有益, 同时益生菌或某些细菌前体能改善IBD^[31]. 不同种系的实验鼠自发

慢性结肠炎的发生依赖腔内菌群参与: 肠道限菌状态下, 实验鼠的结肠炎很少发生; 但是当肠腔内给予一定量的细菌后则很快发生结肠炎^[32]. 肠道共生菌群及其产物可能作为自身抗原而诱导免疫耐受, 肠道感染时, 一些条件致病菌损害肠黏膜屏障, 肠腔内细菌及其产物等抗原移至肠黏膜固有层并激活黏膜免疫系统, 使之对肠腔内抗原失去耐受, 从而诱发IBD^[33]. 宿主防御反应比肠道内细菌种类本身更可能决定这种相互作用的结果. 由于菌丛的多样性、复杂性及对他们特性的研究方法有限阻碍了微生物-宿主相互作用的研究. 对微生物进行基因分析及菌丛分布、动力学等研究, 将有助于对IBD进一步了解.

4 结论

正常的肠黏膜屏障对维持肠道内微生物的稳定、防止肠道内细菌及毒素移位及适当的细菌免疫防御反应有重要作用. 肠黏膜屏障中任一屏障的功能异常均可导致多种肠道疾病的发生. 肠黏膜屏障功能异常是IBD发病的重要环节. 改善肠黏膜屏障功能是治疗IBD的重要目标, 如何用药、用什么药对黏膜屏障功能进行调节依赖对肠黏膜屏障的深入研究. 对IBD中遗传易感基因、肠腔内的微生物以及黏膜免疫, 尤其是固有层内免疫细胞及细胞因子网络如何影响黏膜屏障功能进行更深层次的研究, 将有助于我们对其发病机制的认识.

5 参考文献

- Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006; 55: 342-347
- Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G216-G228
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
- Kabashima K, Saji T, Murata T, Nagamachi M, Matsuoka T, Segi E, Tsuboi K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Miyachi Y, Ichikawa A, Narumiya S. The prostaglandin receptor EP4 suppresses colitis, mucosal damage and CD4 cell activation in the gut. *J Clin Invest* 2002; 109: 883-893
- Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 2008; 263: 591-596
- Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of

创新盘点
本文从肠黏膜屏障中机械屏障、免疫屏障及生物屏障三个方面对IBD的发病机制进行阐述, 分析了近年来国内外关于IBD发病研究中的上述三方面的最新进展, 探讨今后的研究发展方向, 加深对IBD的认识.

同行评价
本文选题尚可, 有
一定的新意, 内容
全面, 具有一定的
可读性.

- IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 2000; 289: 1560-1563
- 7 Lee J, Gonzales-Navajas JM, Raz E. The "polarizing-tolerizing" mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Semin Immunopathol* 2008; 30: 3-9
- 8 Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 2004; 127: 224-238
- 9 Cooney R, Jewell D. The genetic basis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2009; 27: 428-442
- 10 Proell M, Riedl SJ, Fritz JH, Rojas AM, Schwarzenbacher R. The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS One* 2008; 3: e2119
- 11 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606
- 12 Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124: 993-1000
- 13 Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K, Kühbacher T, Waetzig GH, Seeger D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124: 1001-1009
- 14 An G, Wei B, Xia B, McDaniel JM, Ju T, Cummings RD, Braun J, Xia L. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans. *J Exp Med* 2007; 204: 1417-1429
- 15 Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006; 131: 117-129
- 16 Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; 274: 262-265
- 17 McVay LD, Keilbaugh SA, Wong TM, Kierstein S, Shin ME, Lehrke M, Lefterova MI, Shifflett DE, Barnes SL, Cominelli F, Cohn SM, Hecht G, Lazar MA, Haczku A, Wu GD. Absence of bacterially induced RELMbeta reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. *J Clin Invest* 2006; 116: 2914-2923
- 18 Chieppa M, Rescigno M, Huang AY, Germain RN. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* 2006; 203: 2841-2852
- 19 Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005; 307: 254-258
- 20 Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 693-706
- 21 Mizoguchi A, Ogawa A, Takedatsu H, Sugimoto K, Shimomura Y, Shirane K, Nagahama K, Nagaiishi T, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan AK. Dependence of intestinal granuloma formation on unique myeloid DC-like cells. *J Clin Invest* 2007; 117: 605-615
- 22 Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 202-208
- 23 Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H Jr, Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18129-18134
- 24 Schenk M, Bouchon A, Birrer S, Colonna M, Mueller C. Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. *J Immunol* 2005; 174: 517-524
- 25 Weber B, Saurer L, Mueller C. Intestinal macrophages: differentiation and involvement in intestinal immunopathologies. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 171-184
- 26 Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Förster I, Akira S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999; 10: 39-49
- 27 Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Sato T, Matsuoka K, Arai K, Nakai T, Hasegawa A, Inoue N, Watanabe N, Akagawa KS, Hibi T. Abnormally differentiated subsets of intestinal macrophage play a key role in Th1-dominant chronic colitis through excess production of IL-12 and IL-23 in response to bacteria. *J Immunol* 2005; 175: 6900-6908
- 28 Fort MM, Leach MW, Rennick DM. A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis. *J Immunol* 1998; 161: 3256-3261
- 29 Wells JM, Loonen LM, Karczewski JM. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 41-48
- 30 Bruey JM, Bruey-Sedano N, Luciano F, Zhai D, Balpai R, Xu C, Kress CL, Bailly-Maitre B, Li X, Osterman A, Matsuzawa S, Terskikh AV, Faustin B, Reed JC. Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* 2007; 129: 45-56
- 31 Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003; 124: 1202-1209
- 32 Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev* 2005; 206: 260-276
- 33 Boirivant M, Amendola A, Butera A. Intestinal microflora and immunoregulation. *Mucosal Immunol* 2008; 1 Suppl 1: S47-S49

胃痛消痞方对脾胃虚寒型功能性消化不良大鼠胃肠动力和胃动素的影响

陈苏宁, 梁靓靓, 史业东

陈苏宁, 梁靓靓, 史业东, 中国医科大学附属盛京医院中医科 辽宁省沈阳市 110004
辽宁省科技厅自然科学基金资助项目, No. 20082101
作者贡献分布: 陈苏宁、梁靓靓及史业东在该实验中贡献均等; 陈苏宁负责设计课题、文章撰写、修改及数据分析; 梁靓靓负责数据整理、统计分析、文章撰写; 史业东负责动物实验、数据搜集整理及统计分析。
通讯作者: 陈苏宁, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院中医科。
chensn@sj-hospital.org
电话: 024-96615-66311
收稿日期: 2009-11-19 修回日期: 2010-01-14
接受日期: 2010-01-20 在线出版日期: 2010-03-08

Influence of Weitongxiaopi Decoction on gastrointestinal motility and plasma motilin levels in rats with functional dyspepsia caused by spleen-stomach deficiency-cold

Su-Ning Chen, Jing-Jing Liang, Ye-Dong Shi

Su-Ning Chen, Jing-Jing Liang, Ye-Dong Shi, Department of Traditional Chinese Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20082101
Correspondence to: Professor Su-Ning Chen, Department of Traditional Chinese Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chensn@sj-hospital.org
Received: 2009-11-19 Revised: 2010-01-14
Accepted: 2010-01-20 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To observe the impact of Weitongxiaopi (WTXP) Decoction on gastrointestinal motility and plasma motilin levels in rats with functional dyspepsia (FD) due to spleen-stomach deficiency-cold.

METHODS: FD was induced in 66 rats by giving vinegar. The rats were then randomly divided into six groups: normal control group, model control group, low-dose WTXP Decoction group, medium-dose WTXP Decoction group, high-dose WTXP Decoction group and domperidone

group. The latter five groups were given normal saline, different concentrations of WTXP Decoction and domperidone by gastrogavage twice a day for 14 days. Plasma motilin (MOT) level, gastric emptying rate and small intestinal propulsion rate were measured.

RESULTS: WTXP Decoction at all concentrations could significantly increase plasma MOT levels and small intestinal propulsion rates in FD model rats (MOT: $104.57 \text{ pmol/L} \pm 14.05 \text{ pmol/L}$, $124.90 \text{ pmol/L} \pm 15.21 \text{ pmol/L}$, and $125.84 \text{ pmol/L} \pm 27.67 \text{ pmol/L}$ vs $81.95 \text{ pmol/L} \pm 12.02 \text{ pmol/L}$, all $P < 0.01$; small intestinal propulsion rate: $55.62\% \pm 2.92\%$, $56.91\% \pm 4.65\%$, and $59.04\% \pm 3.24\%$ vs $51.80\% \pm 3.57\%$; all $P < 0.01$). No significant differences were noted in small intestinal propulsion rates among the normal control group, medium- and high-dose WTXP Decoction groups (all $P > 0.05$). However, the small intestinal propulsion rates in these three groups were better than that in the domperidone group (all $P < 0.01$). Although WTXP Decoction at all concentrations could improve gastric emptying rate, there were no significant differences in gastric emptying rates between the WTXP Decoction groups and the domperidone group (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: WTXP Decoction can promote gastrointestinal motility in rats with FD due to spleen-stomach deficiency-cold by increasing plasma MOT levels.

Key Words: Weitongxiaopi Decoction; Functional dyspepsia; Gastrointestinal motility; Motilin

Chen SN, Liang JJ, Shi YD. Influence of Weitongxiaopi Decoction on gastrointestinal motility and plasma motilin levels in rats with functional dyspepsia caused by spleen-stomach deficiency-cold. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 699-702

摘要

目的: 观察胃痛消痞方对功能性消化不良(FD)大鼠胃肠动力、血浆胃动素(MOT)的影响。

背景资料
功能性消化不良(FD)是最常见的消化内科疾病。该病的病因和发病机制至今尚未清楚, 西医无特效药, 多采取对症治疗, 而中医治疗FD可获得满意的疗效。因此寻找促胃动力中药具有现实的理论意义和实用价值。

同行评议者
姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科

研发前沿

本文主要研究中
药对功能性消化
不良胃肠激素及
胃肠动力的研究,
是目前治疗FD领
域中比较热门的
话题. 亟待解决的
问题是中药促胃
肠激素分泌的作
用机制.

方法: 将66只大鼠以食醋灌胃建立FD模型, 随机分为空白组、模型组、中药(低、中、高)剂量组、多潘立酮组; 分别用生理盐水、不同浓度的胃痛消痞方、多潘立酮, 每日2次灌胃治疗14 d; 观测各组大鼠血浆MOT水平、小肠推进比、胃内排空率.

结果: 与模型组比较, 各浓度胃痛消痞方均能明显提高血浆MOT含量、提高小肠推进比, 差异有统计学意义(MOT含量: 104.57 pmol/L \pm 14.05 pmol/L, 124.90 pmol/L \pm 15.21 pmol/L, 125.84 pmol/L \pm 27.67 pmol/L vs 81.95 pmol/L \pm 12.02 pmol/L, $P < 0.01$; 小肠推进比: 55.62% \pm 2.92%, 56.91% \pm 4.65%, 59.04% \pm 3.24% vs 51.80% \pm 3.57%, $P < 0.01$), 空白组、中药中、高剂量组之间小肠推进比无明显差异($P > 0.05$), 但均高于多潘立酮组($P < 0.01$); 能提高胃排空率, 与多潘立酮组无统计学差异($P > 0.05$).

结论: 胃痛消痞方能通过提高血浆中MOT水平, 从而促进脾胃虚寒型FD大鼠的胃肠动力.

关键词: 胃痛消痞方; 功能性消化不良; 胃肠动力; 胃动素

陈苏宁, 梁靓靓, 史业东. 胃痛消痞方对脾胃虚寒型功能性消化不良大鼠胃肠动力和胃动素的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 699-702

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/699.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是消化系常见疾病, 其发病机制较复杂. 目前西医治疗本病, 多采用促胃肠动力药, 如多潘立酮、莫沙必利等, 方法单一, 只能改善胃肠动力问题. 经过多年的临床观察, 我们发现“脾胃虚寒”是其临床主要证型, 胃痛消痞方是以四君子汤为基础加减而来, 该方既能改善胃肠动力, 又能消食导滞, 我科临床应用多年取得很好疗效. 本实验研究该方对实验大鼠胃肠动力和胃动素(motilin, MOT)的影响, 探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级Wistar大鼠66只, δ , 周龄10-12 wk, 体质量180-220 g, 购于中国医科大学附属盛京医院动物实验室, 动物使用许可证号SYSK(辽)2003-0019. 胃痛消痞方(党参、茯苓、白术、干姜、鸡内金、焦山楂、延胡索、肉桂、砂仁、薏苡仁、炙甘草)购于辽宁中医药

大学中药局. 按照中药常规煎法制成相当于生药1 kg/L的药液, 4 °C冰箱保存备用. 给药前, 将药液配制成所需浓度的药液. 多潘立酮(每片10 mg), 西安杨森公司生产, 批号(080903368), 每日给药前用蒸馏水配制成0.3 g/L浓度的药液. 羟甲基纤维素(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20080523); 食用醋(沈阳市酿造厂, 总酸量35 g/L, 生产批号: 200807); MOT放免试剂盒(中国人民解放军东亚免疫试剂所产品). 营养性半固体糊的制备: 取5 g羟甲基纤维素溶于100 mL蒸馏水中, 然后分别加入奶粉8 g、糖4 g、淀粉4 g、2 mL碳素墨水及蒸馏水, 每加一次搅拌均匀, 配成半固体糊150 mL(约150 g), 置冰箱中冷藏保存, 使用前2 h取出, 恢复常温.

1.2 方法

1.2.1 造模: 按文献[1]方法, 用4 °C食醋给大鼠10 L/g灌胃, 每日1次, 连续10 d. 大鼠出现活动减少、倦卧少动、饮食及饮水量减少. 造模成功后每组随机取大鼠1只, 处死后取胃观察胃黏膜, 胃黏膜表面无溃疡及黏膜损害, 说明造模成功.

1.2.2 分组及给药: 大鼠适应性饲养1 wk后, 将大鼠随机分为空白组、模型组、中药低、中、高剂量组、多潘立酮组, 每组11只. 造模, 造模成功后给药, 依据人和鼠给药剂量换算公式^[2]: $d_B = d_A R_B / R_A (W_A / W_B)^{1/3}$, 计算出中药低、中、高剂量组分别予相当于含生药0.625 kg/L、1.25 kg/L、1.875 kg/L的中药煎剂2 mL灌胃, 多潘立酮组予0.3 g/L的多潘立酮溶液2 mL灌胃, 模型组予生理盐水2 mL灌胃, 均为每日2次, 共2 wk.

1.2.3 观察实验指标: 末次给药后禁食不禁水, 24 h后予半固体糊0.3 mL/100 g灌胃, 30 min后迅速打开腹腔, 腹主动脉采血, 置于含30 μ L的100 g/L的EDTA和30 μ L抑肽酶混合均匀的塑料试管里, 用低温离心机4 °C, 3 600 r/min, 离心5 min, 分离血浆, 分装, -70 °C冰箱保存. 按试剂盒说明书, 用自动放免仪(GC-1500, 中国科大中佳公司)测出MOT值. 同时结扎贲门和幽门, 剪取肠管, 测小肠总长度(幽门-回盲部), 从幽门至墨汁前沿的距离作为“墨汁在肠内推进距离”, 按公式计算: 小肠推进比 = 墨汁推进长度/小肠全长 \times 100%. 同时取胃, 称质量, 沿胃大弯剪开胃体, 洗去胃内容物, 拭干后称胃净质量, 按公式计算^[4]: 胃排空率 = [1-(胃全质量-胃净质量)/灌胃量] \times 100%.

统计学处理 资料数据以mean \pm SD表示, 采用F分析, 用SPSS17.0软件进行统计学分析,

相关报道

近年来多数学者认为胃肠运动功能障碍是FD的主要发病机制. 另有研究证实FD患者胃排空延长、收缩减弱或期收缩缺乏均与MOT不出现释放高峰或峰值下降有关.

表 1 各组大鼠小肠推进比、胃排空率的比较 ($n = 10, \%$)

分组	小肠推进比	胃排空率
空白组	59.59 ± 2.97 ^{bd}	75.78 ± 3.45
模型组	43.98 ± 3.95	56.07 ± 6.04
中药低剂量组	55.62 ± 2.92 ^{bce}	75.41 ± 2.86 ^b
中药中剂量组	56.91 ± 4.65 ^{bd}	76.11 ± 2.60 ^b
中药高剂量组	59.04 ± 3.24 ^{bd}	76.31 ± 4.13 ^b
多潘立酮组	51.80 ± 3.57 ^{bf}	77.06 ± 3.66 ^b

^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 多潘立酮组; ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 空白组.

$P < 0.05$ 为差异具有显著性意义.

2 结果

2.1 对血浆MOT的影响 多潘立酮组及中药各治疗组MOT水平明显高于模型组(107.21 pmol/L ± 10.22 pmol/L, 104.57 pmol/L ± 14.05 pmol/L, 124.90 pmol/L ± 15.21 pmol/L, 125.84 pmol/L ± 27.67 pmol/L vs 81.95 pmol/L ± 12.02 pmol/L, $P < 0.01$); 中药中、高剂量组MOT水平均高于多潘立酮组, 差异显著($P < 0.01$), 但两组之间无明显差异($P > 0.05$); 中药低剂量组与多潘立酮组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$).

2.2 对小肠推进比及胃排空率的影响 各治疗组小肠推进比及胃排空率均高于模型组($P < 0.01$); 空白组、中药中、高剂量组之间小肠推进比无明显差异($P > 0.05$), 但均高于多潘立酮组($P < 0.01$); 中药低剂量组与吗叮啉组相比, 中药低剂量组与空白组比较, 小肠推进比差异有统计学意义($P < 0.05$); 中药低、中、高剂量组胃排空率与多潘立酮组比较, 均无明显差异($P > 0.05$, 表1).

3 讨论

FD在我国的发病率约为20%-30%^[4]. 虽然目前FD发病机制尚未阐明, 但近年来, 诸多研究表明, FD的发病与胃动力障碍及神经系统、神经递质的调节有关. 胃肠激素是影响胃肠动力的重要因素, 其含量减少可引起FD患者的胃肠动力改变, 临床主要表现为胃排空障碍^[5].

FD属于中医学胃痞病范畴, 《伤寒论·辨太阳病脉证并治》记载:“但满而不痛者, 此为痞”. 中医认为, 情志不畅、饮食不节、素体禀赋不足、湿热内阻等原因, 导致中焦气机阻滞, 脾胃升降失调, 是本病的主要病因病机. 其病位在胃, 但与肝脾两脏密切, 或脾胃同病、或肝

脾同病. 脾主运化水谷, 脾气弱、脾失健运则食物消化吸收功能障碍, 从而出现食欲不振、食后腹胀、便溏等症状. 脾性喜燥而恶湿, 长期脾气虚弱, 水谷运化不利, 湿滞脾胃, 寒湿伤及脾阳, 故可出现四肢不温, 口淡不渴, 腹痛, 喜温喜按等症状. 按照中医辨证分析, 有人大致将FD分为气滞型和虚寒型^[6], 此处所谓的虚寒型即是脾胃虚寒型. 我们参考多种FD造模方式^[1,7,8], 最终选定邱赛红等^[1]的以冰食醋灌胃治疗脾胃虚寒证的造模方法, 造模后经随机抽样观察, 未发现胃黏膜溃疡及炎症等病变, 说明食醋对胃黏膜未造成损伤, 造模成功.

胃痛消痞方源于《太平惠民和剂局方》的经典名方四君子汤, 方中君以党参、茯苓、白术补气健脾; 臣以砂仁行气调中、和胃醒脾, 薏苡仁健脾益胃, 鸡内金、焦山楂健脾胃、消食积; 佐以肉桂、延胡索、干姜温阳止痛, 使以调和诸药、补脾益气之甘草, 共奏健脾行气、消食除胀之功效. 实验结果表明, 胃痛消痞方可明显促进FD大鼠的胃动力. 各浓度组可以显著提高胃排空率及小肠推进比, 其中在促进胃排空方面与多潘立酮作用相当, 差异无统计学意义; 在提高小肠推进比方面, 均强于多潘立酮组. 近年来, 许多人致力于中医药促胃肠动力的研究, 取得了不错的成果. 有研究也证实, 砂仁^[9-11]等对胃排空和肠道传输均有较强促进作用. 鸡内金^[9,12]可提高胃运动机能, 增强胃蛋白酶、胰脂肪酶活性. 砂仁、党参^[12]等可以增强胃的功能, 促进消化液的分泌, 增进肠道运动, 排出消化管内的积气, 起到帮助消化、消除肠胀气的症状.

MOT是胃肠激素中重要的一种, 在多数哺乳动物的上消化道均有表达^[13]. MOT主要作用于平滑肌上的胃动素受体, 导致平滑肌收缩, 加速胃排空和小肠传输时间. 研究发现MOT通过直接作用于消化道平滑肌上的受体引起平滑肌内环-磷酸鸟苷(c-GMP)浓度增加, 使细胞内钙离子从微粒体释放出来^[14]. 也有实验证实MOT可明显升高神经元内Ca²⁺浓度^[15]. 细胞内Ca²⁺浓度增加后可引起平滑肌收缩. 本实验研究发现, 不同浓度的胃痛消痞方, 均可以提高FD大鼠血浆中MOT含量, 其中低剂量组与多潘立酮作用相当, 而中、高剂量组MOT水平, 则明显高于多潘立酮组($P < 0.01$). 推测胃痛消痞方可能通过刺激胃窦部及十二指肠胃动素分泌细胞, 促进MOT的分泌. 提示胃痛消痞方促进胃肠动力

创新点
本研究首次通过观察胃痛消痞方对脾胃虚寒型FD大鼠模型血浆MOT含量和胃排空的影响, 探讨其作用机制.

应用要点
胃痛消痞方能显著增大大鼠模型血浆MOT的含量, 表明其能通过促进内源性MOT的释放、促进胃排空达到治疗的目的, 为临床上应用胃痛消痞方治疗脾胃虚寒型FD提供了理论和实验依据.

同行评价
本研究选题一般,
采用的方法可行,
学术价值一般。

的作用,可能是通过提高大鼠血浆中MOT含量实现的。

另外,在实验过程中发现,不同浓度的胃痛消痞方,在治疗过程中未出现治疗效果的显著差异,提示在调整胃肠动力的时候,中药剂量运用应该适度,并非剂量越大越好。

4 参考文献

- 1 邱赛红,李飞艳,尹健康,罗跃龙,吴红娟,肖锦仁.两种大鼠脾胃虚寒模型制备方法的比较研究.湖南中医学院学报 2004; 24: 30-33
- 2 孙敬方.动物实验方法学.第1版.北京:人民卫生出版社,2001: 357
- 3 陈思维,薛淑英,王敏伟.介绍一种简易实验性胃排空测定方法.中国药理学通报 1994; 10: 317-318
- 4 沈志祥,陈喜兰,谭诗云,徐连根.消化系统疾病诊断和治疗学.北京:科学技术文献出版社,2004: 166
- 5 Fujimiya M, Inui A. Peptidergic regulation of gastrointestinal motility in rodents. *Peptides* 2000; 21: 1565-1582
- 6 姚金星.中西医结合治疗功能性消化不良106例.世界

- 7 华人消化杂志 2002; 10: 1345-1346
- 7 郭海军,林浩,李国成,李亦武,陶秀良,罗树星.功能性消化不良的动物模型研究.中国中西医结合消化杂志 2001; 9: 141-142
- 8 李涯松,单兆伟,沈洪,马骋,吴静.和胃胶囊对实验大鼠胃动力的影响.中国中西医结合脾胃杂志 2000; 8: 327-329
- 9 朱金照,冷恩仁,陈东风,史洪涛,桂先勇.15味中药促胃肠动力作用的筛选研究.第三军医大学学报 2000; 22: 436
- 10 王贺玲,李岩,白菡,张健.理气中药对鼠胃肠动力的影响.世界华人消化杂志 2004; 12: 1136-1138
- 11 李岩,王学清,张卫卫,王江玥.术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响.世界华人消化杂志 2002; 10: 575-577
- 12 高学敏.中药学.北京:中国中医药出版社,2002: 240, 319, 500
- 13 王志刚,刘凤林,秦新裕.胃动素受体的研究进展.国外医学·药学分册 2001; 28: 344
- 14 黄文,林日增,李东涛,许刚.功能性消化不良患者胃排空障碍与血浆胃动素和生长抑素的关系.实用医药杂志 2007; 24: 809-810
- 15 杨侠,董蕾,杨浩.大鼠肠肌间神经元胃动素受体的表达及胃动素引起神经元内钙信号的机制.四川大学学报(医学版) 2006; 37: 683-686

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》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 修回稿件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改,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,须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有.编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞超微结构的损伤

张丹, 夏志伟, 韩亚京

张丹, 夏志伟, 韩亚京, 北京大学第三医院消化科 北京市 100191
作者贡献分布: 此课题由夏志伟与张丹共同设计; 研究过程和数据分析由张丹完成; 实验技术选择和操作方法由韩亚京指导支持; 文章撰写由张丹和夏志伟共同完成。
通讯作者: 夏志伟, 副教授, 100191, 北京市, 北京大学第三医院消化科. xiazhiwei@medmail.com.cn
电话: 010-82266699-8768
收稿日期: 2009-09-20 修回日期: 2009-12-20
接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-03-08

Chronic water immersion-restraint stress-induced ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal in the rat gastric antrum

Dan Zhang, Zhi-Wei Xia, Ya-Jing Han

Dan Zhang, Zhi-Wei Xia, Ya-Jing Han, Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Correspondence to: Associated Professor Zhi-Wei Xia, Department of Digestive Diseases, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China. xiazhiwei@medmail.com.cn
Received: 2009-09-20 Revised: 2009-12-20
Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the alterations in the ultrastructure of interstitial cells of Cajal (ICC) in the gastric antrum of rats undergoing chronic water immersion-restraint stress.

METHODS: Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into six groups: three experimental groups and three matched control groups. The three experimental groups underwent water immersion-restraint stress for one hour daily for 3, 7 and 28 days, respectively, while the three control groups were allowed free access to food and water. On days 4, 8 and 29, the rats in both the experimental and control groups were sacrificed. Two pieces of antrum tissues were taken from each of three rats in each group and fixed in 3% glutaraldehyde for electron microscopic examination. The severity of injury was then scored.

RESULTS: Compared to the control groups, the ICC in the gastric antrum of rats in the experimental groups showed widened perinuclear space, discontinuous basement membrane, cytoplasmic dissolution and vacuolation, decreased number of gap junctions, mitochondrial swelling and vacuolation, dilated endoplasmic reticulum, decreased amount of rough endoplasmic reticulum, and nuclear abnormality. With the prolongation of stress duration, the ultrastructural injury to ICC was aggravated, particularly prominent in cytoplasmic dissolution and vacuolation and the decrease in the amount of rough endoplasmic reticulum.

CONCLUSION: Chronic water immersion-restraint stress can induce ultrastructural injury to ICC in the rat gastric antrum.

Key Words: Chronic water immersion-restraint stress; Interstitial cell of Cajal; Ultrastructure

Zhang D, Xia ZW, Han YJ. Chronic water immersion-restraint stress-induced ultrastructural injury to interstitial cells of Cajal in the rat gastric antrum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 703-706

摘要

目的: 研究不同时程慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞(ICC)超微结构的损伤, 量化分析细胞内不同超微结构的损伤程度。

方法: 48只雄性SD大鼠随机分为6组, 即实验3 d、7 d、28 d组和对照3 d、7 d、28 d组, 每组8只。实验组每日给予束缚水浸1 h, 对照组自由摄食饮水; 禁食12 h后分别于第4、8、29天晨脱颈处死, 每组中的3只大鼠被各取胃窦组织2块放入3%戊二醛中固定并送电镜室镜检。将损伤的严重程度分成0-3级并以此标准计分并计算。

结果: 不同应激时间组大鼠胃窦ICC的核周间隙、基膜、内质网的损伤严重程度无明显差别。缝隙连接和线粒体的损伤积分有明显差异, 胞质溶解、粗面内质网减少、核异常程度积分有极显著性差异; 量化分析显示: 随着应激时间的延长, 超微结构受损呈现逐渐加重的

背景资料

既往的研究表明, 急性高强度的应激刺激可以导致大鼠胃运动功能障碍和ICC超微结构损伤。而慢性长时间的应激刺激同样也可以导致大鼠胃运动功能受损, 一方面表现在胃ICC数量的变化, 同时也表现为明显的超微结构广泛受损。目前, 多数关于ICC超微结构的变化都局限于描述性的叙述, 而缺乏更加客观的量化研究资料。

同行评议者

任超世, 研究员, 中国医学科学院生物医学工程研究所; 高英堂, 研究员, 天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

研究前沿

当大鼠面临慢性应激时,其胃内ICC的超微结构明显受损,且这种损害随着时间的延长逐渐加重,这种损伤可能是其胃动力改变的病理生理机制之一,但不同细胞器受损伤的程度变化并不一致,机体在接受应激后自身的调节补偿机制的存在时其变化过程更为复杂。至于超微结构的损伤在应激刺激消失后是否可以恢复、损伤的严重性和可逆性与刺激的强度和时程是否相关等问题均需要进一步研究确认。

趋势,主要表现在缝隙连接、线粒体、胞质和粗面内质网等方面。

结论:慢性应激可以导致大鼠胃窦ICC超微结构的损伤,不同细胞超微结构的损伤随应激的延长有所差别;量化分析可以显示不同细胞器受损伤的程度。

关键词:束缚水浸;Cajal间质细胞;超微结构

张丹,夏志伟,韩亚京.慢性束缚水浸应激对大鼠胃窦Cajal间质细胞超微结构的损伤.世界华人消化杂志 2010; 18(7): 703-706

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/703.asp>

0 引言

既往的研究表明,急性高强度的应激刺激可以导致大鼠胃运动功能障碍^[1-2]和ICC超微结构损伤^[3]。而慢性长时间的应激刺激同样也可以导致大鼠胃运动功能受损^[4],一方面表现在胃ICC数量的变化,同时也表现为明显的超微结构广泛受损。目前,多数关于ICC超微结构的变化都局限于描述性的叙述,而缺乏更加客观的量化研究资料。基于此,本文拟通过尝试对细胞核、细胞器的变化进行分级评分的方法,旨在定量地评价损伤,更科学地探讨超微结构受损的严重程度。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级SD健康大鼠48只,♂,体质量150-160 g,购自北京大学医学部实验动物部。本研究得到北京大学医学部动物保护委员会认可。

1.2 方法

1.2.1 分组:48只♂SD大鼠随机分为6组,即实验3 d、7 d、28 d组和同期对照组,每组8只,对照组不接受任何刺激,自由摄食饮水;实验组大鼠23℃束缚水浸1 h/d,分别于第4天、8天、29天晨与禁食12 h后将实验组和对照组大鼠一并脱颈处死。

1.2.2 组织获得:全部大鼠游离全胃;沿胃大弯侧剪开,去离子水冲洗干净后迅速剪取其腺胃幽门旁0.5 cm前壁大弯侧组织各2块(每组中的3只大鼠)大小为2 mm×1 mm,立即放入3%戊二醛中固定,送北京大学医学部病理电镜室镜检。

1.2.3 标本制备:固定后的组织用0.2 mol/L蔗糖磷酸缓冲液漂洗,再用2%的四氧化锇后固定1 h,丙酮中梯度脱水,在1%醋酸双氧铀中停滞染色1 h,再通过环氧丙烷与环氧树脂。1 mm切片用亚甲蓝染色,在光镜下观察,确定黏膜层、环形肌层、纵行肌层,超薄切片用酒精醋酸双氧铀、

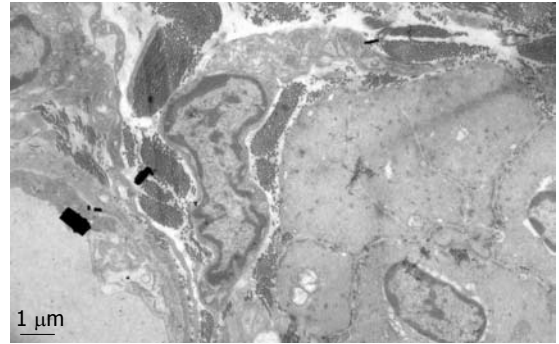


图1 对照组大鼠胃窦组织的透射电镜下表现($\times 12\ 000$)。

再用柠檬酸盐后染色,保留纵行肌层、环形肌层、黏膜下层、部分黏膜层,用HITACHI H-600透射电镜观察、照相。

1.2.4 电镜观察:观察两组大鼠胃窦部ICC的超微结构改变并进行比较。在透射电镜下,每组大鼠胃窦标本内选取10个ICC细胞,其中5个环肌内ICC,5个环纵肌间ICC,观察ICC超微结构受损情况。观察项目包括:核周间隙增宽(A)、基膜不完整不连续(B)、胞质溶解空泡化(C)、缝隙连接减少(D)、线粒体肿胀空泡化(E)、内质网扩张(F)、粗面内质网减少(G)、核异常程度(H)。A-G损伤程度评分方法:0分:正常,无任何损害;1分:轻度受损,损害面积小于全部的1/4;2分:中度受损,损害面积为全部的1/4-1/2;3分:重度受损,损害面积大于全部的1/2。H损伤程度评分方法:0分:正常,无任何损害;1分:染色质边集;2分:核皱缩;3分:核碎裂、凋亡小体形成。

统计学处理 所得全部数据录入SPSS13.0,并采用 t 检验、一般线性模型等方法进行统计学处理,设定 $P = \text{Sig}(2\text{-tailed}) < 0.05$ 为有统计学意义, $P = \text{Sig}(2\text{-tailed}) < 0.01$ 为有显著统计学意义。

2 结果

与相应对照组比较,不同时程的实验组大鼠胃窦ICC均出现核周间隙增宽、基膜不完整不连续、胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化、内质网扩张、粗面内质网减少以及核异常,同期的实验组和对照组间上述项目积分程度几乎均有显著差异($P < 0.05$)。不同应激时间的核周间隙增宽、基膜不完整不连续、内质网扩张的损伤评分无差别($P > 0.05$),而缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化的损伤评分存在差异($P < 0.05$),胞质溶解空泡化、粗面内质网减少、核异常程度的损害差异则更为明显($P < 0.01$)。随着应激时间的延长,胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空

创新盘点
本文拟通过尝试对细胞核、细胞器的变化进行分级评分的方法,旨在定量地评价损伤,更科学地探讨超微结构受损的严重程度.

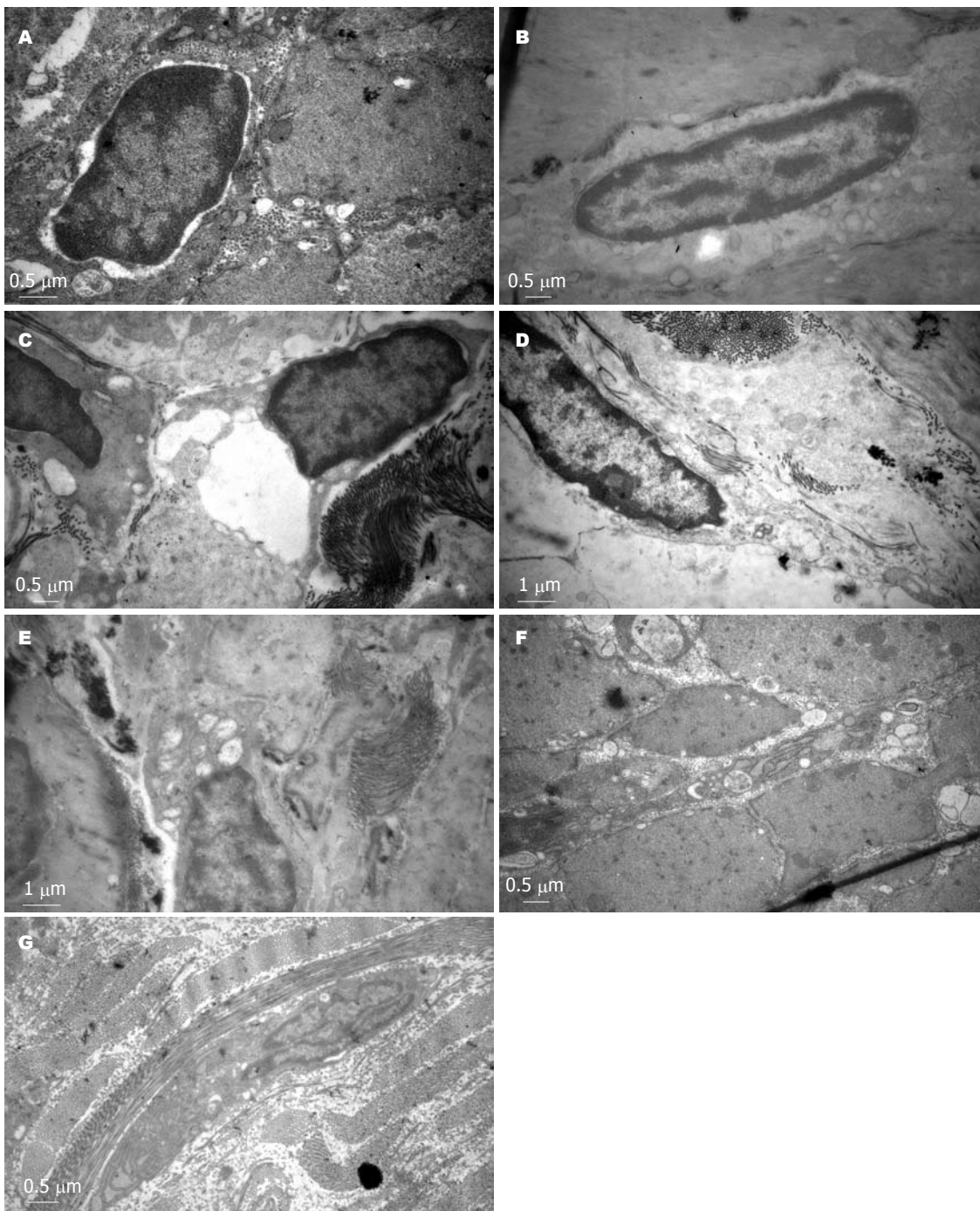


图 2 实验组大鼠胃窦组织的透射电镜下表现. A: 核周间隙增宽($\times 30\ 000$); B: 基膜不连续不完整($\times 20\ 000$); C: 胞质溶解空泡化($\times 20\ 000$); D: 缝隙连接减少($\times 15\ 000$); E: 线粒体肿胀空泡化、粗面内质网减少($\times 15\ 000$); F: 内质网扩张($\times 20\ 000$); G: 核异常($\times 12\ 000$).

泡化、粗面内质网减少、核异常程度几乎均呈现逐渐加重的趋势,其中以胞质溶解空泡化、粗面内质网减少最突出(表1,图1,2).

3 讨论

大鼠的整个胃肠道均有ICC-MY和ICC-IM, ICC-MY负责起搏,而ICC-IM则作为神经递质的中介者起到电传导的作用^[5-8].正常大鼠胃内ICC超微结构的特点为核大、线粒体丰富、缝隙连接较

多等^[9-10],而其在消化系的主要功能为:胃肠道平滑肌活动的起搏;推进电活动的传播;调节神经递质.功能是要靠结构来实现的,ICC有非常丰富的线粒体,这说明其功能活跃,适应其作为胃肠慢波起搏细胞的需要;该细胞互相之间、与神经末梢之间、与平滑肌细胞之间形成很多缝隙连接,这也说明了其作为神经系统控制胃肠平滑肌的中介功能;粗面内质网、滑面内质网和丰富的高尔基体,说明其具有活跃的合成功能以适应其

同行评价
本文运用统计学分析方法,对本次系列研究得到的数据进行挖掘,有一定的学术价值。

表 1 慢性应激大鼠胃窦ICC超微结构损伤程度评分(分, mean ± SD)

分组	A		B		C		D		E		F		G		H	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
3 d	1.2 ± 0.7	0.8 ± 0.5	2.3 ± 0.5	0.7 ± 0.4	1.4 ± 0.6	0.2 ± 0.2	1.4 ± 0.6	0.1 ± 0.1	1.5 ± 0.6	0.6 ± 0.4	1.9 ± 0.8	0.3 ± 0.2	1.2 ± 0.5	0.1 ± 0.1	1.3 ± 0.8	0.3 ± 0.2
	1.5 ± 0.8	0.7 ± 0.5	2.2 ± 0.7	0.5 ± 0.3	1.4 ± 0.5	0.3 ± 0.3	1.4 ± 0.6	0.3 ± 0.3	2.1 ± 0.7 ^c	0.6 ± 0.4	1.9 ± 0.9	0.2 ± 0.2	1.7 ± 0.7 ^c	0.1 ± 0.0	2.2 ± 0.6 ^c	0.4 ± 0.2
28 d	1.4 ± 0.5	0.6 ± 0.4	2.8 ± 0.8	0.6 ± 0.3	2.6 ± 0.5 ^a	0.2 ± 0.2	2.7 ± 0.7 ^a	0.1 ± 0.1	2.7 ± 0.9 ^a	0.5 ± 0.3	2.5 ± 0.6	0.2 ± 0.1	2.3 ± 0.8 ^a	0.3 ± 0.1	2.3 ± 0.9 ^a	0.4 ± 0.2

A: 核周间隙增宽; B: 基膜不完整不连续; C: 胞质溶解空泡化; D: 缝隙连接减少; E: 线粒体肿胀空泡化; F: 内质网扩张; G: 粗面内质网减少; H: 核异常程度。^a*P*<0.05 vs 同组3 d, ^c*P*<0.05 vs 同组3 d。

通过合成神经递质NO、CO达到调节电传导的作用。因此,我们将应激后可能发生损害的微结构分别进行量化分析并结合与其功能的关系将其归类:影响起搏的结构:A、E、H;影响电传播的中介结构:D;影响调节功能的结构:B、C、G、F。

本实验结果显示:在大鼠接受低强度慢性应激刺激后,其胃窦ICC的超微结构受到广泛的破坏。因此可以认为,应激可以损伤大鼠胃窦ICC功能的各个方面。而ICC的起搏、传导及调节功能的改变可能是应激状态下胃肠功能改变的重要机制^[11,12]。本研究得出:无论应激多长时间,核周间隙、基膜、内质网等遭受破坏的程度无差别;而在胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化、粗面内质网减少、核异常的程度则有着统计学意义的差别存在,其规律就是随着应激时间的延长,胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化、粗面内质网减少、核异常几乎均呈现逐渐加重的趋势,其中以胞质溶解空泡化、粗面内质网减少最为突出。而胞质溶解空泡化、缝隙连接减少、线粒体肿胀空泡化、粗面内质网减少、核异常涵盖了ICC的主要功能,也就是说,应激时间越长,胃内ICC起搏、传导和调节神经递质的能力越差,尤其是调节功能。其实,ICC合成NO和CO等重要神经递质减少,仍然是使得ICC传导来自神经的冲动到肌细胞或其他ICC的功能大大减弱。

由此,我们可以看出,当大鼠面临慢性应激时,其胃内ICC的超微结构明显受损,且这种损害随着时间的延长逐渐加重,这种损伤可能是其胃动力改变的病理生理机制之一,但不同细胞器受损伤的程度变化并不一致,机体在接受应激后自身的调节补偿机制的存在时其变化过程更为复杂。至于超微结构的损伤在应激刺激消

失后是否可以恢复、损伤的严重性和可逆性与刺激的强度和时程是否相关等问题均需要进一步研究确认。

4 参考文献

- 1 姚泰,罗自强.生理学.第1版.北京:人民卫生出版社,2001:490-491
- 2 刘劲松,杨菊,侯晓华.寒冷浸水应激对大鼠胃排空及肠肌间神经递质的影响.中华消化杂志 2004;24:492-493
- 3 Kaszuba-Zwoińska J, Gil K, Ziomber A, Zaraska W, Pawlicki R, Królczyk G, Matyja A, Thor PJ. Loss of interstitial cells of Cajal after pulsating electromagnetic field (PEMF) in gastrointestinal tract of the rats. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 421-432
- 4 张丹,夏至伟,韩亚京.不同时程慢性束缚水浸应激对大鼠胃排空的影响.中国实验动物学报 2009; 17: 11-14
- 5 Nakagawa T, Misawa H, Nakajima Y, Takaki M. Absence of peristalsis in the ileum of W/W(V) mutant mice that are selectively deficient in myenteric interstitial cells of Cajal. *J Smooth Muscle Res* 2005; 41: 141-151
- 6 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
- 7 Sanders KM, Ordög T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11: 311-338
- 8 Kito Y, Suzuki H. Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39: 163-173
- 9 张亚萍,张宽学,高革,罗金燕.大鼠胃肠道Cajal间质细胞的超微结构研究.胃肠病学和肝病杂志 2002; 11: 112-114
- 10 Ishikawa K, Komuro T, Hirota S, Kitamura Y. Ultrastructural identification of the c-kit-expressing interstitial cells in the rat stomach: a comparison of control and Ws/Ws mutant rats. *Cell Tissue Res* 1997; 289: 137-143
- 11 张亚萍,张宽学,罗金燕,石德红.糖尿病大鼠胃部Cajal间质细胞超微结构变化的研究.中华消化杂志 2003; 23: 116-117
- 12 钱秋海,王志程,魏建萍,张桢.糖胃安对糖尿病胃轻瘫模型大鼠超微结构的影响.中国临床药理学杂志 2007; 23: 311-312

TNF- α 诱导肝干细胞凋亡及信号转导途径的改变

余科科, 汪思应

余科科, 汪思应, 安徽医科大学基础医学院 安徽省合肥市 230032

安徽省2006研究实验基地科研带头人培养专项基金资助项目
安徽医科大学青年教师科研基金资助项目, No. 2002
作者贡献分布: 此课题由汪思应总体设计及数据分析; 研究工作
及论文撰写由余科科完成。

通讯作者: 汪思应, 教授, 博士生导师, 230032, 安徽省合肥市,
安徽医科大学基础医学院病理生理教研室。

sywang@ahmu.edu.cn

电话: 0551-5161129

收稿日期: 2009-11-24 修回日期: 2010-01-04

接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-03-08

Tumor necrosis factor- α induces the apoptosis of hepatic stem cells by altering multiple signaling pathways

Ke-Ke Yu, Si-Ying Wang

Ke-Ke Yu, Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Supported by: the Special Fund for Research Leaders of Research Experiment Base in Anhui Province in 2006; and the Research Fund for Young Researchers in Anhui Medical University, No. 2002

Correspondence to: Professor Si-Ying Wang, Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China. sywang@ahmu.edu.cn

Received: 2009-11-24 Revised: 2010-01-04

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the apoptosis-inducing effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on hepatic stem cells (WB cells) and to elucidate the molecular mechanisms involved.

METHODS: After WB cells were incubated with TNF- α for different durations, cell apoptosis and cell cycle alterations were analyzed by flow cytometry; DNA alterations were tested by agarose gel electrophoresis; and signaling molecules related to cell proliferation and apoptosis were analyzed by Western blot and electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

RESULTS: After treatment with TNF- α for 24 h, apoptosis was induced in 51% of WB cells, and the DNA was broken down into 180-200 bp frag-

ments. Of all growth or apoptosis regulatory proteins examined, the levels of caspase-3 and activated NF- κ B were found to be up-regulated after TNF- α treatment. Furthermore, TNF- α treatment could also induce Erk/Akt hypophosphorylation.

CONCLUSION: TNF- α induces growth inhibition and apoptosis of WB cells perhaps by up-regulating caspase-3 and activated NF- κ B and inducing Erk/Akt hypophosphorylation.

Key Words: Tumor necrosis factor- α ; Hepatic stem cell; Apoptosis; Phosphorylation; Signaling pathway

Yu KK, Wang SY. Tumor necrosis factor- α induces the apoptosis of hepatic stem cells by altering multiple signaling pathways. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 707-710

摘要

目的: 研究肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导肝干细胞(WB细胞)凋亡及其信号转导机制。

方法: WB细胞经TNF- α 诱导不同时间, 用流式细胞术(FCS)检测细胞凋亡及细胞周期改变; 用核酸提取及电泳技术检测细胞DNA的变化; 经Western blot检测TNF- α 诱导WB细胞与凋亡有关分子的变化。

结果: TNF- α 诱导WB细胞24 h, FCS发现51%细胞凋亡, 核酸电泳出现DNA “ladder”现象; 同时与细胞凋亡相关的转录因子NF- κ B核内转移, 活化的凋亡蛋白酶caspase-3增多, 而与细胞增殖相关的信号转导途径被阻断-磷酸化的Erk/Akt水平下调。

结论: 经TNF- α 诱导, 与凋亡相关的信号分子caspases-3被激活, 而与细胞增殖有关的信号途径被阻断(p-Erk/Akt)下调, 导致细胞可能发生增殖阻滞而凋亡。

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 肝干细胞; 细胞凋亡; 磷酸化; 信号转导

余科科, 汪思应. TNF- α 诱导肝干细胞凋亡及信号转导途径的改

背景资料

肝功能衰竭目前还没有特效的治疗措施, 肝移植由于供体、价格等因素使其应用受到限制, 最近研究显示肝干细胞可能在肝脏结构与功能重建中发挥治疗作用。

同行评议者
洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分分泌科

研发前沿
细胞因子作为炎症反应的重要载体与肝脏疾病的进展密切相关,探索细胞因子在肝脏疾病发展以及干细胞移植治疗肝脏疾病是该研究领域的热点.

变. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 707-710
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/707.asp>

0 引言

病毒性肝炎是我国一个高发性传染病,随着病程可发展为肝硬化、重症肝坏死、肝功能衰竭.其病理特点是大块或亚大块肝细胞坏死,残存肝细胞的增殖受多种因素的影响,故依赖病变肝脏自身的能力引发肝再生有很大困难,而传统的抗病毒及支持对症治疗无法使患者痊愈.原位肝移植由于供肝缺乏、费用昂贵、可能存在免疫排斥问题等使临床受益者极少.肝细胞移植及生物人工肝是治疗严重肝病的有效手段,但自体肝细胞获取困难、增殖性差、细胞长期培养困难等又极大地制约了他们在临床的应用.而干细胞具有向成熟肝细胞分化的潜能,并参与肝功能重建^[1,2],即可以利用干细胞作为组织工程的启动细胞进行治疗性克隆扩增,在肝脏结构与功能重建中发挥治疗作用,这将给肝病治疗提供新的措施.调查发现,肝硬化、重症肝坏死患者血清TNF- α 水平均有不同程度的升高并与病情呈正相关,提示TNF- α 含量与肝细胞坏死程度密切相关.TNF- α 是否能诱导肝干细胞凋亡导致坏死的肝脏再生障碍而加重病情甚至导致患者死亡?为明确TNF- α 升高与肝干细胞凋亡之间的关系及可能的分子机制,我们采用流式细胞术(flow cytometry, FCS)及Western blot、凝胶阻滞实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)等实验方法检测细胞凋亡及凋亡相关途径的变化.

1 材料和方法

1.1 材料 肝干细胞株(WB细胞)^[3]我室保存.培养条件为DMEM、100 mL/L胎牛血清,50 mL/L CO₂、37 °C环境下培养.DMEM、胰酶为Gibco公司产品;胎牛血清为Life Technologies公司产品;DNA提取试剂盒为Promega公司产品;TNF- α 为Sigma公司产品;抗体、HRP-羊抗鼠及羊抗兔IgG、ECL检测系统为Santa Cruz产品.[γ -³²P]ATP购自北京亚辉生物医学工程公司,NF- κ B双链寡核苷酸探针(由Promega公司提供)序列如下5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 3'-TCA ACT CCG CTG AAA GGG TCC G-5'.

1.2 方法

1.2.1 TNF- α 诱导细胞凋亡: WB细胞以 1×10^8

个/L培养于培养瓶,细胞贴壁后,换加入放线菌素(ActD)15 μ g/L无血清培养液处理细胞30 min,用20、40、80、100 μ g/L TNF- α ,经不同时相(8、18、24 h)处理WB细胞,对照组加等量生理盐水.

1.2.2 FCS检测细胞凋亡:离心收集经TNF- α 诱导的WB细胞 1×10^6 个,PBS洗2次,用700 mL/L乙醇4 °C固定细胞24 h,PBS洗2次,RNA酶消化,37 °C 30 min,加入PI染色,4 °C 30 min流式细胞仪测定.

1.2.3 凋亡细胞的核酸电泳检测:取经TNF- α 诱导的WB细胞 2×10^6 个,用含2 mmol/L EDTA、pH7.5的PBS离心洗2次(1 200 r/min),弃上清,加400 μ L TBE(临用时加0.25% NP40),10 μ L RNase至1 g/L,37 °C,30 min,加蛋白酶K(1 g/L)10 μ L,37 °C,30 min.14 000 r/min,4 °C离心15 min,收集上清(-70 °C),取上清50 μ L,加上样缓冲液5 μ L,1.5%琼脂糖凝胶电泳30 min,紫外线透视镜下观察,凋亡细胞出现DNA ladder.

1.2.4 EMSA:细胞用预冷的PBS洗2次,提取核蛋白液.NF- κ B寡核苷酸(1.75 μ mol/L)2 μ L加 $10 \times$ T4多核苷酸激酶缓冲液1 μ L,[γ -³²P]ATP(111 TBq/mmol)1 μ L,无菌水5 μ L,最后加T4多核苷酸激酶(5-10 U/ μ L)1 μ L,37 °C保温10 min,再向反应体系中加入1 μ L 0.5 mol/L EDTA终止反应.核蛋白在DNA结合液(20 mmol/L Hepes pH7.9,100 mmol/L KCl,20% glycerol,0.2 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L DTT,0.5 mmol/L PMSF)与1 μ L ³²P标记的NF- κ B寡核苷酸探针4 °C反应20 min.电泳、显影、定影、水洗、晾干.

1.2.5 Western blot:提取细胞总蛋白,100 μ g蛋白经SDS-PAGE电泳,电转至PVDF膜后浸入含50 g/L脱脂奶粉的TBST 4 °C过夜,加一抗(caspases-3/8、p-Akt/p-ERK)室温1 h,TBST洗4 \times 10 min,加HRP标记的相应二抗(1:5 000),室温1 h,TBST洗4 \times 10 min.ECL系统A、B液等体积混合,均匀涂在PVDF膜上,再将PVDF膜转移到保鲜膜并包裹好,X线片压片,曝光60 s,显影1 min,定影5 min.

2 结果

2.1 ActD/TNF- α 诱导肝干细胞DNA断裂经ActD诱导,TNF- α 为80、100 μ g/L时细胞出现凋亡典型的DNA ladder,即核酸经琼脂糖凝胶电泳呈现180-200 bp或其整倍数的“梯带”现象(图1),当TNF- α 为80 μ g/L时凋亡率超过50%,而对照组

相关报道
2007年Nguyen等报道肝细胞损害的反应中,肝脏启动免疫应答机制,分泌一系列细胞因子包括HGF、EGF等刺激卵圆细胞的增殖分化,参与肝损伤的修复及肝细胞再生.

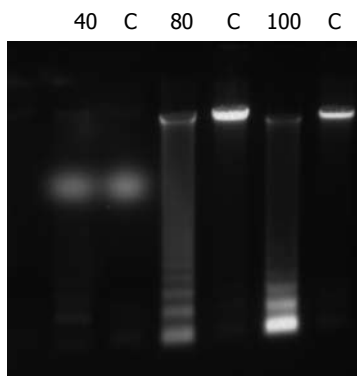


图 1 ActD / TNF- α 40、80、100 μ g/L 诱导肝干细胞凋亡. C: 对照组.

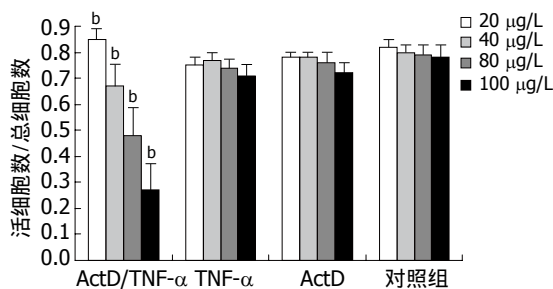


图 2 不同浓度TNF- α 对ActD致敏WB细胞的细胞毒作用. ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

创新亮点
 本文论述了研究 TNF- α 诱导肝干细胞(WB细胞)凋亡及其信号转导机制. 阐述细胞因子与肝干细胞的关系, 提出对肝衰竭患者若辅以抗 TNF- α 治疗, 可能通过减少细胞凋亡, 提高细胞增生能力增强肝再生.

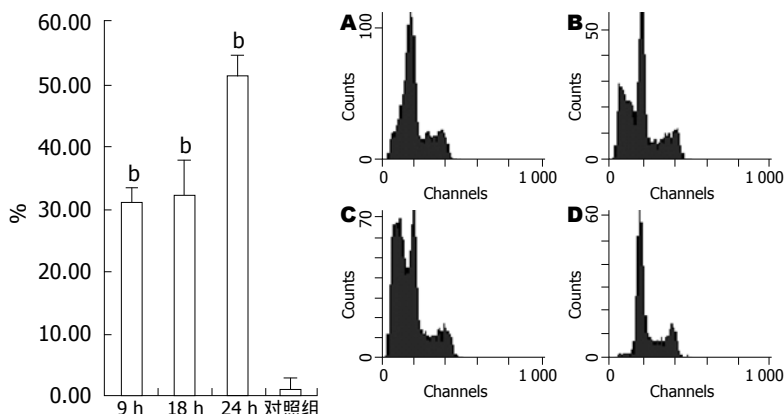


图 3 不同时间ActD/TNF- α 诱导WB细胞凋亡. A: 9 h; B: 18 h; C: 24 h; D: 对照组. ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

凋亡率低(图2). 80 μ g/L TNF- α 诱导WB细胞9、18、24 h, 凋亡细胞比例为31%、32%、51%, 对照组0.89%(图3).

2.2 TNF- α 对细胞凋亡相关分子的影响 TNF- α 诱导WB细胞1 h, 细胞总蛋白中活化的凋亡蛋白酶 caspase-3增多, 与细胞增殖相关的信号转导途径被阻断-磷酸化的Erk/Akt水平下调(图4). TNF- α 诱导20 min即出现NF- κ B核内转移(图5).

3 讨论

干细胞分化发育的特异性是其自身特性和生存微环境联合作用的结果, 其中微环境起重要作用. 近期研究结果显示, 肝干细胞具有在组织器官中自我修复及再生能力, 在细胞活性因子如 HGF^[4,5]、TGF- α 、EGF诱导下可以增生、定向分化为成熟肝实质细胞, 即细胞活性因子可能是调控肝干细胞分化的主要因素; 有研究发现干细胞表达TGF- α 、aFGF、HGF、SCF的受体, 表明生长因子可能通过自分泌和旁分泌方式调控他们的生长. 故我们认为肝脏微环境是调控肝干细胞生长发育的关键, 似乎只要给予肝脏再生的微环境, 干细胞就可以在体内分化成肝细胞. 因此, 模拟特定细胞分化的体内环境是诱导肝干细胞定向分化的关键所在.

在肝脏再生机制的研究中显示, 肝干细胞

只有在肝脏严重损伤的病理情况下才产生应答并大量增殖, 参与肝脏的修复^[6]. TNF- α 是一种促炎性细胞因子, 在肝脏主要由激活的Kupffer细胞产生, 既能直接损伤肝细胞, 又能参与肝脏炎症、肝细胞再生等, 适量表达可激活NF- κ B启动肝细胞增殖^[7]; 如大量持续表达, 则会引起细胞凋亡, 延缓肝细胞再生^[8,9]. 近年来研究发现TNF- α 能引起肝细胞凋亡, 在暴发性肝衰竭中, TNF- α 介导的肝细胞凋亡起很重要的作用. Takei等研究证实, TNF- α 抗体可阻止半乳糖胺引起的肝细胞凋亡, 防止暴发性肝衰竭发生^[10,11]. 持续升高的TNF- α 是否也能诱导肝干细胞凋亡导致肝再生障碍? 通常肝细胞对TNF- α 耐受, 在某些毒性因子致敏后, TNF- α 则对肝细胞产生毒性作用. 本研究结果显示: 在给予放线菌素(ActD)一种人称“转录捕获”的RNA合成抑制剂的刺激后, TNF- α 表现出细胞毒作用, 肝干细胞对刺激变得敏感导致凋亡. 通过对TNF- α 不同剂量、不同时相诱导的WB细胞, 用流式细胞术(FCS)检测发现G₂+M期细胞比例明显减少, 说明细胞增殖性减弱; 核酸电泳出现DNA ladder说明DNA被激活的核酸内切酶切割成180-200 bp或其整倍数的片段即凋亡信号途径被激活; 我们进一步采用Western blot在蛋白水平检测与细胞凋亡相关的信号转导途径的改变, 结果显

同行评价
本文选题尚可,设计基本合理,结果可信,具有一定学术价值.

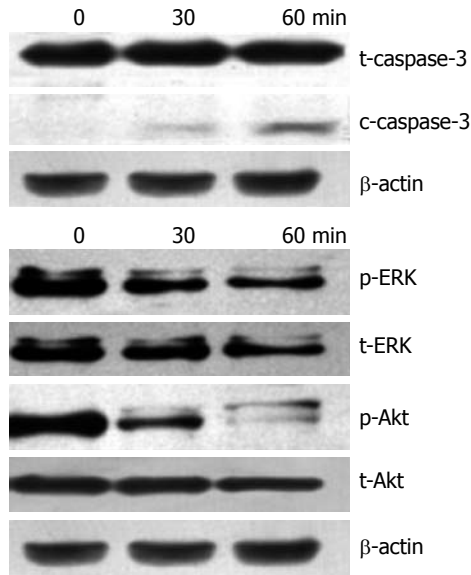


图 4 TNF- α 作用1 h, 活化的caspase增多, p-ERK/Akt减少.

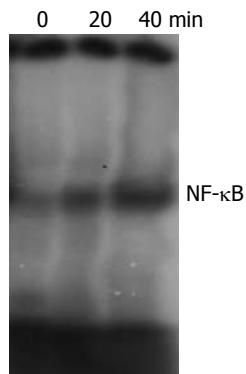


图 5 TNF- α 作用20 min即出现NF- κ B转入核内.

示凋亡相关的caspase-3表达上调,而与细胞增殖相关的MAPK、PI3K^[12]信号途径中关键分子Erk和Akt的磷酸化水平下调,导致细胞增殖阻滞,发生凋亡.另外, TNF- α 还可激活NF- κ B^[13],这是一种在调控细胞的生存和凋亡中起关键作用的调控因子.我们的研究结果显示经TNF- α 诱导的WB细胞20 min后即出现NF- κ B核内转移.而NF- κ B持续活化可能促进细胞凋亡.因此我们推测这些可能是导致坏死的肝脏再生障碍而加重病情甚至导致患者死亡的重要机制.

病毒性肝炎、肝硬化是临床常见病,约10%的患者最终死于肝功能衰竭,肝干细胞的生存和凋亡对肝损伤的修复及再生有重要意义^[14,15],肝干细胞移植将是解决供体肝脏严重缺乏的重要途径之一;另外,自体的肝干细胞移植能有效地避免排斥反应.而合适的生长微环境或细胞

因子对肝干细胞的自我更新和增殖有重要作用,我们的研究结果提示对肝衰竭患者若辅以抗TNF- α 治疗,可能通过减少细胞凋亡,提高细胞增生能力来增强肝再生.

4 参考文献

- 1 Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 893-899
- 2 Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002; 156: 173-184
- 3 Presnell SC, Hooth MJ, Borchert KM, Coleman WB, Grisham JW, Smith GJ. Establishment of a functional HGF/C-MET autocrine loop in spontaneous transformants of WB-F344 rat liver stem-like cells. *Hepatology* 1998; 28: 1253-1259
- 4 Li H, Jiang T, Lin Y, Zhao Z, Zhang N. HGF protects rat mesangial cells from high-glucose-mediated oxidative stress. *Am J Nephrol* 2006; 26: 519-530
- 5 Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-S53
- 6 Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; 33: 738-750
- 7 Watanabe T, Jono H, Han J, Lim DJ, Li JD. Synergistic activation of NF-kappaB by nontypeable Haemophilus influenzae and tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3563-3568
- 8 孙明珠, 党双锁. 细胞因子与慢性肝脏疾病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2121-2126
- 9 游晶, 庄林, 马永良, 唐宝璋. 慢性乙型肝炎的Th细胞亚群及相关细胞因子网络失衡. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 791-799
- 10 Takei Y, Okumura S, Nagal H. TNF- α induced apoptosis of hepatocyte precedes massive hepatic necrosis during the cause of acute hepatitis failure. *Hepatology* 1995; 22: 380-390
- 11 Menon KV, Stadheim L, Kamath PS, Wiesner RH, Gores GJ, Peine CJ, Shah V. A pilot study of the safety and tolerability of etanercept in patients with alcoholic hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 255-260
- 12 Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, Hylemon PB, Dent P. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology* 2002; 35: 779-789
- 13 Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappaB signaling system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 187-197
- 14 Schaff Z, Nagy P. [Novel factors playing a role in the pathomechanism of diffuse liver diseases: apoptosis and hepatic stem cells] *Orv Hetil* 2004; 145: 1787-1793
- 15 姚鹏, 李绍祥. 肝干细胞与肝损伤的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1655-1660

编辑 李军亮 电编 何基才

六棱菊提取物对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响

伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 施树云, 王建国, 杨雷香, 赵昱

伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 中国计量学院生命科学院药系 浙江省杭州市 310018
施树云, 杨雷香, 赵昱, 浙江大学药学院 浙江省杭州市 310053

王建国, 浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室 浙江省杭州市 310003

国家自然科学基金资助项目, No. 30701049

浙江省实验动物科技计划基金资助项目, No. 2008F80016

作者贡献分布: 本论文由伍义行设计和撰写; 赵昱提供技术指导; 研究过程具体操作由郝冰洁、胡少青、施树云、王建国及杨雷香完成。

通讯作者: 伍义行, 副教授, 医学博士, 310018, 浙江省杭州市下沙高教园区学源街258号, 中国计量学院生命科学院药系。yihangwu@126.com

电话: 0571-86835702 传真: 0571-86914449

收稿日期: 2009-12-11 修回日期: 2010-02-02

接受日期: 2010-02-09 在线出版日期: 2010-03-08

***Laggera alata* extract prevents acetamidophenol-induced liver damage in mice**

Yi-Hang Wu, Bing-Jie Hao, Shao-Qing Hu, Shu-Yun Shi, Jian-Guo Wang, Lei-Xiang Yang, Yu Zhao

Yi-Hang Wu, Bing-Jie Hao, Shao-Qing Hu, Department of Pharmacy, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China

Shu-Yun Shi, Lei-Xiang Yang, Yu Zhao, College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China

Jian-Guo Wang, State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30701049; and the Experimental Animal Science and Technology Project of Zhejiang Province, No. 2008F800169

Correspondence to: Associate Professor Yi-Hang Wu, Department of Pharmacy, College of Life Sciences, China Jiliang University, 258 Xueyuan Street, Xiasha Higher Education Zone, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China. yihangwu@126.com

Received: 2009-12-11 Revised: 2010-02-02

Accepted: 2010-02-09 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the protective effects of *Laggera alata* against acetamidophenol-induced liver damage.

METHODS: The main components of *Laggera alata* extract (LAE) were quantitatively analyzed by the Folin-Ciocalteu method and high-

pressure liquid chromatography (HPLC). Before mice were intragastrically given high-dosage acetamidophenol (1000 mg/kg), different doses of LAE (50, 100 and 200 mg/kg) was intragastrically administered to investigate its preventive effect against acetamidophenol-induced liver damage.

RESULTS: Quantitative analysis of LAE by the Folin Ciocalteu method showed that LAE contains a high content of phenolic compounds (52.6 g GAE/100 g extract). The HPLC analysis indicated that dicaffeoylquinic acids are the major components of LAE, whose content amounts to 53%. LAE at a dose of 100 mg/kg could obviously protect mice from acetamidophenol-induced death. LAE at doses of 50, 100 and 200 mg/kg (especially 100 and 200 mg/kg) significantly reduced serum AST and ALT levels in mice treated with acetamidophenol. Furthermore, LAE at all doses could improve acetamidophenol-induced hepatic injury.

CONCLUSION: LAE has potent protective effect against acetamidophenol-induced liver injury in mice. Dicaffeoylquinic acids may be the active ingredients in LAE that are responsible for the hepatoprotective effects of LAE.

Key Words: *Laggera alata*; Dicaffeoylquinic acid; Acetamidophenol; Hepatoprotection

Wu YH, Hao BJ, Hu SQ, Shi SY, Wang JG, Yang LX, Zhao Y. *Laggera alata* extract prevents acetamidophenol-induced liver damage in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 711-715

摘要

目的: 探讨六棱菊提取物(LAE)对药物性肝损伤的抑制作用。

方法: 采用Folin Ciocalteu和HPLC方法对LAE的主要成分进行定量分析; 通过预防给药探讨LAE对大剂量(1000 mg/kg)醋氨酚引起的小鼠中毒死亡的影响; 运用醋氨酚引起的小鼠急性肝损伤模型评价LAE大(200 mg/kg)、中(100 mg/kg)、小(50 mg/kg)剂量对药物性肝损

背景资料

近年来药物性肝炎问题日益突出, 但尚无防治药物性肝炎的有效方法。六棱菊是一种常用的民间草药, 有关该植物化学成分的研究已有不少报道, 但有关其药理学研究报道还比较少, 且尚未见其用于药物性肝损伤的报道。

同行评议者
谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

研发前沿

各种原因引起的肝损伤发病率高, 治疗困难, 对传统中药或民间药物中寻找安全高效的保肝药物是抗肝炎药物研究的热点之一, 而深入研究植物提取物的物质基础和药效机制是当前亟待解决的问题。

伤的抑制作用。

结果: Folin Ciocalteu法测定结果表明LAE的总酚含量为56.5 g GAE/100 g提取物; HPLC分析结果显示LAE的主要成分为二咖啡酰奎尼酸类化合物, 其含量为53.0%。醋氨酚中毒保护试验表明, LAE在100 mg/kg剂量下对大剂量醋氨酚所致小鼠死亡有明显抑制作用。药效评价结果显示: LAE在50、100和200 mg/kg剂量下灌胃给药, 均能明显降低肝损伤小鼠血清AST和ALT水平, 其中100和200 mg/kg剂量具有显著性影响; 病理组织学检测表明, 模型组小鼠肝组织呈现以中央静脉为中心的放射状坏死和脂肪变性, LAE大、中、小剂量组小鼠肝损伤均有一定程度的改善。

结论: 六棱菊对醋氨酚所致的药物性肝损伤具有较强的抑制作用。二咖啡酰奎尼酸类化合物可能是六棱菊保肝作用的主要物质基础。

关键词: 六棱菊; 二咖啡酰奎尼酸类化合物; 醋氨酚; 保肝作用

伍义行, 郝冰洁, 胡少青, 施树云, 王建国, 杨雷香, 赵昱. 六棱菊提取物对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 711-715
http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/711.asp

0 引言

菊科六棱菊属(*Laggera genus*)植物约有20余种, 主要分布在非洲热带及亚洲东南部。国内外仅对少数几种该属植物进行过研究, 其中包括产于我国的六棱菊(*Laggera alata*)。他是我国仅有的两种药用六棱菊属植物之一, 主要分布在长江以南及西南地区。六棱菊属植物广泛用于民间, 具有清热解毒、抗菌消炎等功效, 疗效甚著^[1]。作为一种治疗炎症性疾病的民间草药六棱菊已被使用了300多年, 有关该植物化学成分的研究已有报道^[2-7], 但有关其药理学研究报道还很少。在前期对其进行系统的植物化学和抗炎药理研究基础上^[4-6,8], 我们对六棱菊提取物的主要成分进行了定量分析, 并采用药物性肝损伤模型-醋氨酚诱导的小鼠急性肝损伤模型研究了该提取物的保肝作用。

1 材料和方法

1.1 材料 六棱菊全草采集于云南省腾冲县(标本号: ZY200308LA); AST/GOT测试盒和ALT/GPT测试盒(宁波慈城生化试剂厂); 醋氨酚[含量≥

98.0%, 中国医药(集团)上海化学试剂公司]; 维生素C片(湖北华中药业有限公司); Folin-Ciocalteu试剂(Merck公司产品)。ICR小鼠, 雌雄各半, 体质量20 g±2 g, 清洁级, 浙江省实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 六棱菊提取物(LAE)的制备与分析: 取干燥药材20 kg, 以950 mL/L乙醇回流提取3次, 提取液合并浓缩得浸膏915 g, 用热水溶解后用乙酸乙酯萃取以除去亲脂性成分, 留下的水溶液用正丁醇分割, 将正丁醇部分浓缩, 得棕黑色粉末320 g, 即LAE; Folin Ciocalteu比色法测定LAE总酚含量; 成分分离: 取2.0 g提取物溶解在水里, 通过Sephadex LH-20柱层析, 用甲醇洗脱分离出3个化合物: A、B和C。HPLC定量分析条件为: Waters 2695型色谱仪, 色谱柱Zorbax SB-C18, 柱温30℃, 流速为0.8 mL/min, 洗脱条件为1 mL/L乙酸和乙腈, 检测波长为280 nm。

1.2.2 LAE对醋氨酚所致小鼠死亡率的影响: ICR小鼠30只, 随机分成3个组: 溶剂(生理盐水)组(NS 10 mL/kg, $n = 10$)、维生素C组(VitC 1 000 mg/kg, $n = 10$)和LAE组(LAE 100 mg/kg, $n = 10$)。各组动物灌胃给药, 每天1次, 连续3 d。末次给药后1 h, 所有小鼠灌胃给予醋氨酚1 000 mg/kg。醋氨酚致毒24 h后记录各组死亡情况^[8,9]。

1.2.3 LAE对醋氨酚致小鼠急性肝损伤的影响: ICR小鼠60只, 随机分成6个组: 溶剂组(NS 10 mL/kg, $n = 10$)、模型组(NS 10 mL/kg, $n = 10$)、维生素C组(VitC 1 000 mg/kg, $n = 10$)、六棱菊小剂量组(LAE 50 mg/kg, $n = 10$)、六棱菊中剂量组(LAE 100 mg/kg, $n = 10$)和六棱菊大剂量组(LAE 200 mg/kg, $n = 10$)。各组动物灌胃给药, 每天1次, 连续7 d。末次给药后5 h, 各组小鼠(溶剂对照组除外)一次性灌胃醋氨酚500 mg/kg; 末次给药24 h后, 摘眼球取血, 分离血清, 按试剂盒说明测定AST和ALT活性, 同时取肝进行病理组织学检查^[9-11]。

统计学处理 统计分析采用SPSS version 10.0软件处理, 实验数据以mean±SD表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)和Student's *t*-test, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 LAE的量化分析 LAE的总酚含量为56.5 g GAE/100 g提取物。经光谱分析和文献对照^[12,13], 从提取物中分离的3个化合物分别确定为: 3, 4-*O*-二咖啡酰奎尼酸(A)、3, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸

创新盘点

本研究首次采用醋氨酚引起的小鼠急性肝损伤模型探讨六棱菊提取物对药物性肝损伤的影响。

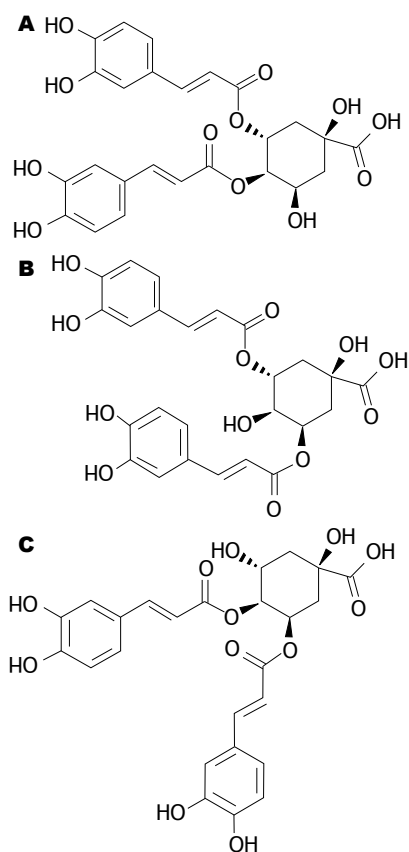


图1 二咖啡酰奎尼酸类化合物的化学结构. A: 3, 4-*O*-二咖啡酰奎尼酸; B: 3, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸; C: 4, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸.

(B)和4, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸(C), 3个化合物的分子式为: $C_{25}H_{24}O_{12}$, 相对分子质量为516.45 Da, 其结构见图1. 二咖啡酰奎尼酸类化合物(3, 4-*O*-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸和4, 5-*O*-二咖啡酰奎尼酸)是LAE的主要成分, 其含量为53.0%.

2.2 LAE对醋氨酚所致小鼠死亡率的影响 溶剂组死亡率为90%, VitC组为40%, LAE组死亡率为50%. VitC和LAE对醋氨酚致小鼠死亡的保护率分别为50%和40%(表1).

2.3 LAE对醋氨酚致小鼠急性肝损伤的影响 LAE大、中、小剂量均能明显降低肝损伤小鼠血清AST和ALT水平, 其中大、中剂量具有显著性作用($P < 0.05$ 或 0.01 , 表2). VitC也具有显著保护作用; 型组小鼠肝细胞呈现以汇管区为中心的放射状坏死和脂肪变性, LAE组和VitC组小鼠肝损伤均有一定程度的改善(图2).

3 讨论

药物性肝炎(drug-induced hepatitis)是指在治疗过程中由于药物的毒性损害或过敏反应所致的肝脏疾病, 主要是由于用药不慎或滥用

表1 LAE对醋氨酚所致小鼠死亡率的影响 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	剂量(mg/kg)	死亡率(%)	保护率(%)
溶剂	-	90	-
VitC	1 000	40	50
中剂量LAE	100	50	40

表2 LAE对醋氨酚致小鼠肝损伤的影响 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
溶剂	45.82 \pm 6.13 ^b	21.35 \pm 3.57 ^b
模型组	124.42 \pm 15.64	60.27 \pm 8.69
VitC	79.62 \pm 14.55 ^a	42.53 \pm 10.29 ^a
LAE组(mg/kg)		
50	98.74 \pm 21.05	45.46 \pm 11.67
100	84.51 \pm 11.74 ^a	40.22 \pm 10.26 ^a
200	80.28 \pm 7.62 ^b	33.12 \pm 6.59 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组.

药物引起. 近年来随着新药的不断问世和药物品种及剂量的增加, 药物性肝炎有逐年增多的趋势. 尽管药物性肝炎问题日益突出, 但迄今尚无预防药物性肝炎的有效方法. 当前药物性肝炎的治疗主要是祛除病因治疗, 即停用肝损害药物, 并施以“保肝”治疗药物^[14]. 醋氨酚(acetamidophenol), 又名扑热息痛, 是临床常用的解热镇痛药, 临床常用剂量不会导致肝损害, 但大剂量的醋氨酚可产生严重的肝损伤, 其损伤机制是在其代谢过程中产生大量的 N -乙酰对苯醌亚胺(NAPQI)超过了GSH的解毒能力, NAPQI具有亲电性和强大的氧化作用, 于是未被清除的NAPQI与生物大分子共价结合, 导致蛋白质巯基被氧化和芳香基化, 以及生物膜系统发生脂质过氧化, 从而导致肝细胞变性坏死^[15]. 醋氨酚诱导的小鼠肝损伤模型是药物性肝损伤模型的代表, 常用于药物性肝损伤的药效评价.

六棱菊作为一种民间药用植物, 在民间和中医实践中广泛用于炎症性疾病(包括肝炎)的治疗, 疗效甚著. 目前国内外对六棱菊的研究主要停留在植物化学成分和复方研究上, 缺乏现代药理和药效物质基础相关研究, 且尚无六棱菊改善药物性肝损伤的现代研究报道^[2-8]. 因此, 本课题组在研究六棱菊提取物的抗炎作用的同时, 运用大鼠原代肝细胞损伤模型探索性地考察了LAE的体外抗肝细胞损伤作用, 结果证实其具较

应用要点
本研究将为六棱菊及其提取物用于药物性肝损伤的保肝治疗提供一定理论依据, 同时也为六棱菊植物的民间应用和中医临床用药提供部分科学依据.

名词解释

药物性肝炎: 指在治疗过程中由于药物的毒性损害或过敏反应所致的肝脏疾病, 主要是由于用药不慎或滥用药物引起。

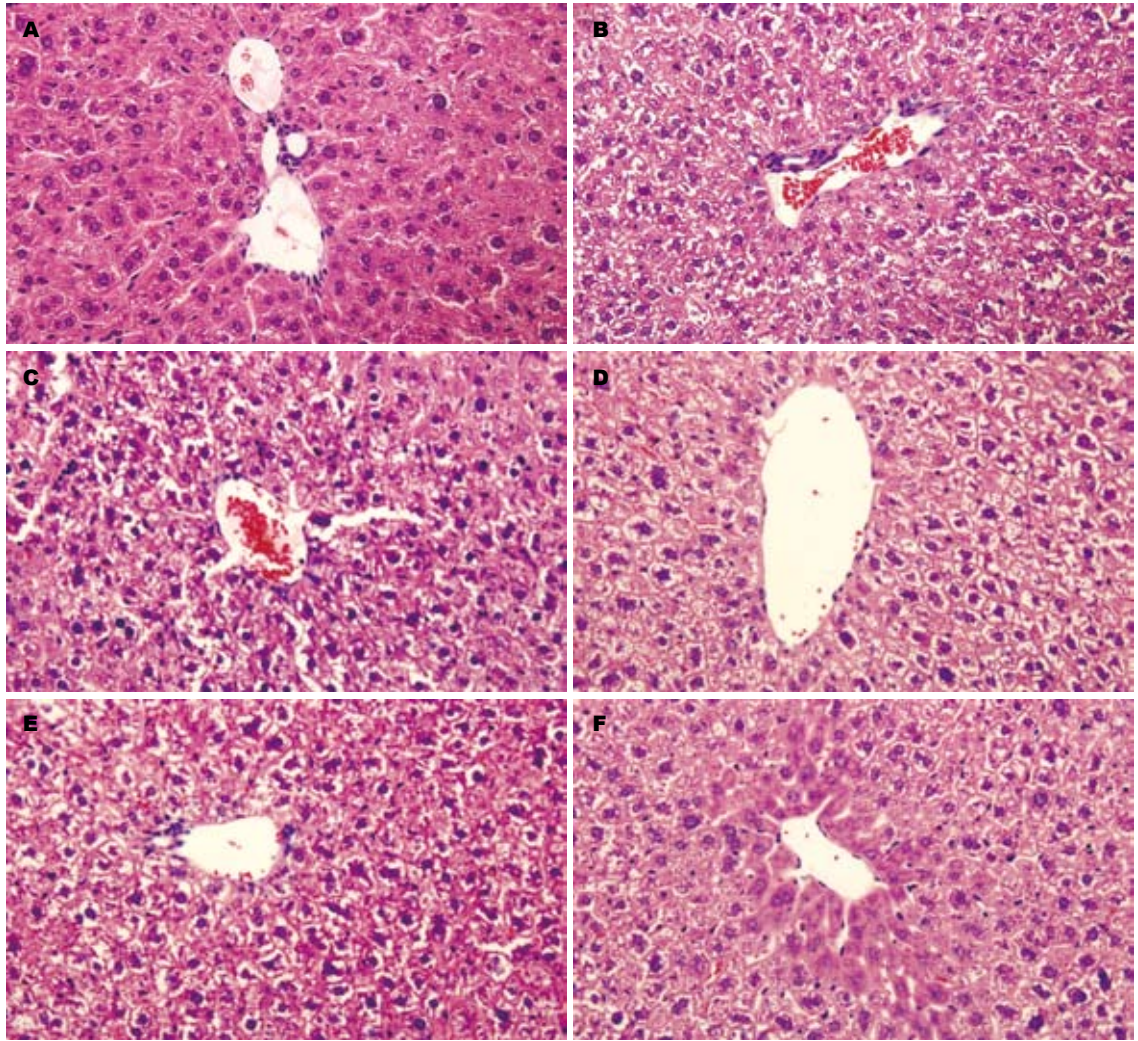


图 2 LAE对醋氨酚致小鼠肝组织病理改变的影响(HE × 400)。A: 溶剂组; B: 模型组; C: VitC组; D: 低剂量LAE组; E: 中剂量LAE组; F: 高剂量LAE组。

强的体外抗肝细胞损伤作用。在体外实验的基础上, 我们对LAE的物质基础进行了量化分析(分离鉴定了LAE的主要成分为二咖啡酰奎尼酸类化合物, 并采用HPLC进行定量分析), 并采用CCl₄、D-GalN引起的化学性肝损伤和BCG-LPS引起的免疫性肝损伤动物模型对该提取物的保肝作用进行了深入研究(部分资料尚未出版), 体内外研究表明, LAE对CCl₄、D-GalN和BCG-LPS引起的肝损伤具有较强的保护作用^[16]。

在LAE的保肝作用已明确的基础上, 本文进一步探讨了LAE对醋氨酚诱导的小鼠急性肝损伤模型的保护作用, 旨在探讨其对药物性肝损伤的影响。故首先研究了LAE对大剂量(1 000 mg/kg)醋氨酚引起的小鼠中毒死亡的影响, 结果表明, LAE和阳性药物VitC对大剂量醋氨酚所致小鼠死亡有明显保护作用。然后以醋氨酚为肝毒物, 建立小鼠急性药物性肝损伤模型, 并用评价LAE对药物性肝损伤的影响。结果表

明, LAE对醋氨酚引起的肝损伤小鼠血清转氨酶(AST和ALT)升高有明显抑制作用, 同时对醋氨酚导致的肝组织病理改变具有一定程度的改善, 而阳性药物VitC也产生了相似的影响。提示LAE可能具有较强的抗药物性肝损伤的潜力。

总之, 在前期研究基础上, 本研究初步表明LAE对醋氨酚引起的药物性肝损伤具有明显的保护作用, 并初步探索了其药效物质基础, 为该植物的民间应用和中医临床应用提供了部分科学依据。

4 参考文献

- 1 江苏新医学院. 中药大辞典(下册). 第1版. 上海: 上海科技出版社, 2009: 1889-1890, 2238-2239
- 2 Bohlmann F, Wallmeyer M, Jakupovic J, Gerke T, King RM, Robinson H. Cuauthemone sesquiterpenoids from *Blumea alata*. *Phytochemistry* 1985; 24: 505-509
- 3 Raharivelomanana P, Bianchini JP, Ramanoelina ARP, Rasoarhona JRE, Faure R, Cambon A.

- Eudesmane sesquiterpenes from *Laggera alata*. *Phytochemistry* 1998; 47: 1085-1088
- 4 Zheng QX, Xu ZJ, Sun XF, Gueritte Francoise, Cesario Michele, Cheng Christopher HK, Sun HD, Zhao Y. New eudesmane and eremophilane derivatives from *Laggera alata*. *Chin Chem Lett* 2003; 14: 393-396
- 5 Zheng QX, Xu ZJ, Sun XF, Guéritte F, Cesario M, Sun HD, Cheng CH, Hao XJ, Zhao Y. Eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from *Laggera alata*. *J Nat Prod* 2003; 66: 1078-1081
- 6 Zheng Q, Xu Z, Sun X, Yao W, Sun H, Cheng CH, Zhao Y. Eudesmane and megastigmane glucosides from *Laggera alata*. *Phytochemistry* 2003; 63: 835-839
- 7 Ekundayo O, Oguntimein B, Laakso I, Hiltunen R. Composition of the Essential Oil of *Laggera alata*. *Planta Med* 1989; 55: 573-574
- 8 Wu Y, Zhou C, Song L, Li X, Shi S, Mo J, Chen H, Bai H, Wu X, Zhao J, Zhang R, Hao X, Sun H, Zhao Y. Effect of total phenolics from *Laggera alata* on acute and chronic inflammation models. *J Ethnopharmacol* 2006; 108: 243-250
- 9 德清, 丁保国, 马艳青, 赵海璐, Thomas G Nei, Tomlinson Brian, 田亚平, 王成彬, Critchley Julian AJH. 黄芪总黄酮对扑热息痛所致小鼠肝损伤防护作用的研究. *中国中药杂志* 2001; 26: 483-485
- 10 Peterson FJ, Knodell RG. Ascorbic acid protects against acetaminophen- and cocaine-induced hepatic damage in mice. *Drug Nutr Interact* 1984; 3: 33-41
- 11 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1347-1348
- 12 Merfort I. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica Montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry* 1992; 31: 2111-2113
- 13 Um BH, Polat M, Lobstein A, Weniger B, Aragón R, Declercq L, Anton R. A new dicaffeoylquinic acid butyl ester from *Isertia pittieri*. *Fitoterapia* 2002; 73: 550-552
- 14 霍荻, 杨运高, 敖飞健, 戴炜, 李莉洁, 郭亚兵. 医用三氧与中药对醋氨酚犬中毒性肝炎的保护作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 282-286
- 15 Macrides TA, Naylor LM, Kalafatis N, Shihata A, Wright PF. Hepatoprotective effects of the shark bile salt 5beta-scymnol on acetaminophen-induced liver damage in mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 33: 31-37
- 16 Wu YH, Zhang XM, Hu MH, Wu XM, Zhao Y. Effect of *Laggera alata* on hepatocyte damage induced by carbon tetrachloride in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2009; 126: 50-56

同行评价
本文研究六棱菊提取物对药物肝损伤的抑制作用, 设计合理, 有一定的科学性.

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 •

《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》
2008年影响因子 0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统, 在“万方数据-数字化期刊群”基础上, 结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD), 以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊. 对全部期刊的引文数据, 严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后, 进行规范化处理和有效链接, 经统计分析, 编制而成. 2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次, 影响因子0.729, 即年指标0.142, 引用期刊数732, 学科扩散指标0.533, 被引半衰期4.303, H指数8. (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

不同抗生素对ICR小鼠肠道微生物体外转化黄豆苷原的影响

倪鑫, 郝庆红, 成志远, 樊进茹, 梁晓琳, 王秀伶

背景资料
具有天然雌激素活性的大豆异黄酮是大豆在其生长过程中形成的一类次生代谢产物, 与其他类营养物质相比, 虽含量较低但其对人体生理健康却起着不可忽视的作用。体内外实验均表明, 大豆异黄酮被人或其他动物摄取后, 将被寄居在胃肠道内的微生物菌群逐步降解为生理活性更高更广的各种代谢产物。然而, 人和其他动物体内的肠道微生物菌群受包括饮食、抗生素使用、疾病以及压力在内的各种因素影响较大, 这些外界因素的改变会直接影响大豆异黄酮在体内的吸收与转化, 进而影响了大豆异黄酮对人体和其他动物的有益调节作用。因而, 研究不同因素对体内大豆异黄酮转化菌株的影响具有重要意义。

倪鑫, 郝庆红, 成志远, 樊进茹, 梁晓琳, 王秀伶, 河北农业大学生命科学学院 河北省保定市 071000
国家自然科学基金资助项目, No. 30570035
作者贡献分布: 此课题是由王秀伶、倪鑫及郝庆红共同设计; 研究过程主要由倪鑫、郝庆红及王秀伶完成; 资料查找和数据统计由倪鑫、成志远、樊进茹及梁晓琳共同完成; 论文写作由倪鑫与王秀伶完成。
通讯作者: 王秀伶, 教授, 071000, 河北省保定市河北农业大学生命科学学院, 灵雨寺街289号, 河北农业大学生命科学学院。
wxling2000@hebau.edu.cn
电话: 0312-7528257
收稿日期: 2009-10-25 修回日期: 2010-01-15
接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-03-08

Effects of different antibiotics on daidzein biotransformation by intestinal microflora of ICR mice *in vitro*

Xin Ni, Qing-Hong Hao, Zhi-Yuan Cheng, Jin-Ru Fan, Xiao-Lin Liang, Xiu-Ling Wang

Xin Ni, Qing-Hong Hao, Zhi-Yuan Cheng, Jin-Ru Fan, Xiao-Lin Liang, Xiu-Ling Wang, College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30570035
Correspondence to: Professor Xiu-Ling Wang, College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, 289 Ling Yusi Street, Baoding 071001, Hebei Province, China. wxling2000@hebau.edu.cn
Received: 2009-10-25 Revised: 2009-01-15
Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of different antibiotics on the bioconversion of daidzein into equol by intestinal microflora of ICR mice *in vitro* and to determine the critical inhibitory concentrations of sensitive antibiotics.

METHODS: Fresh fecal samples of ICR mice were cultured in brain heart infusion (BHI) broth containing substrate daidzein and different antibiotics at normal adult doses. After incubation in an anaerobic chamber for three days, the biotransformation of daidzein by intestinal microflora of ICR mice was detected by high performance liquid chromatography (HPLC).

The critical inhibitory concentrations of sensitive antibiotics were determined by decreasing the amount of antibiotics gradually.

RESULTS: At normal adult doses, all 11 antibiotics showed complete inhibition of the bioconversion of daidzein into equol. Amoxicillin, ofloxacin and norfloxacin at concentrations of 1/32 of the normal adult doses showed no obvious inhibitory effects on daidzein bioconversion. In contrast, azithromycin, leucomycin, oxytetracycline, rifampicin, and metronidazole at similar concentrations could completely inhibit daidzein bioconversion. Doxycycline, erythromycin and cephradine at similar concentrations reduced the biosynthesis of equol from daidzein by 87.7%, 80.5% and 65.2%, respectively. At concentrations of 1/256 of the normal adult doses, azithromycin, rifampicin and metronidazole showed complete inhibition of the bioconversion of daidzein into equol. The lowest inhibitory concentrations of these three sensitive antibiotics were 1/512, 1/800 and 1/1 024 of the normal adult doses, respectively.

CONCLUSION: Different antibiotics show different inhibitory effects on the bioconversion of daidzein into equol by intestinal microflora of ICR mice. Amoxicillin, ofloxacin and norfloxacin show the weakest inhibitory effects on daidzein bioconversion, whereas metronidazole, rifampicin and azithromycin are the most sensitive antibiotics, of which metronidazole shows the strongest inhibitory effects, followed by rifampicin and azithromycin.

Key Words: Antibiotics; ICR mouse; Daidzein; Microbial biotransformation

Ni X, Hao QH, Cheng ZY, Fan JR, Liang XL, Wang XL. Effects of different antibiotics on daidzein biotransformation by intestinal microflora of ICR mice *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 716-721

摘要

目的: 探讨不同抗生素对ICR小鼠肠道微生物菌群体外转化黄豆苷原为雌马酚的影响, 确定

同行评议者
魏继福, 副研究员, 江苏省人民医院中心实验室

敏感抗生素抑制雌马酚合成的临界点浓度.

方法: 取ICR小鼠新鲜粪样于BHI液体培养基中, 加入底物黄豆苷原, 同时加入正常成人剂量的抗生素在厌氧工作站中培养3 d, 采用高效液相色谱检测黄豆苷原被转化情况. 根据转化结果依次降低所挑选的敏感抗生素浓度, 确定各种不同抗生素抑制ICR小鼠肠道微生物菌群转化黄豆苷原为雌马酚的临界点浓度.

结果: 当使用正常成人剂量时, 11种供试抗生素均完全抑制ICR小鼠肠道微生物菌群体外转化黄豆苷原为雌马酚能力; 当加入正常成人剂量1/32浓度时, 阿莫西林(amoxicillin, AMX)、氧氟沙星(ofloxacin, OFLX)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)几乎不产生抑制作用, 多西环素(doxycycline, DOX)、利君沙(erythromycin ethylsuccinate, EES)和头孢拉定(cefradine, CED)使培养基中雌马酚浓度降低了87.7%, 80.5%和65.2%, 其余5种抗生素阿奇霉素(azithromycin, AZI)、吉他霉素(leucomycin, LM)、土霉素(oxytetracycline, OTC)、利福平(rifampicin, RFP)和甲硝唑(metronidazole, MNZ), 则完全抑制黄豆苷原向雌马酚的转化; 当使用剂量为正常成人剂量1/256时, AZI、RFP和MNZ完全抑制了ICR小鼠肠道微生物菌群体外转化能力, 继续降低抗生素浓度, 测得AZI、RFP和MNZ有效抑制黄豆苷原转化为雌马酚的临界点浓度分别为1/512, 1/800和1/1 024.

结论: 不同种类抗生素对ICR小鼠肠道微生物菌群中大豆异黄酮转化菌株的抑制作用不同, 11种抗生素中抑制作用最小的是AMX、OFLX和NOR; 抑制作用最强的是MNZ, 其次为RFP和AZI.

关键词: 抗生素; ICR小鼠; 黄豆苷原; 微生物转化

倪鑫, 郝庆红, 成志远, 樊进茹, 梁晓琳, 王秀伶. 不同抗生素对ICR小鼠肠道微生物体外转化黄豆苷原的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 716-721
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/716.asp>

0 引言

具有天然雌激素活性的大豆异黄酮(soybean isoflavone)是大豆在其生长过程中形成的一类次生代谢产物, 主要由黄豆苷原(daidzein)、染料木黄酮(genistein)组成^[1], 人体本身虽不能合成, 但大豆异黄酮却对人体的生理健康有着不可忽视的作用. 美国科学家1986年首先发现大

豆异黄酮具有抑制癌细胞生长的作用, 尤其对人体结肠癌、乳腺癌和前列腺癌等与性激素有关的癌症具有很好的预防和治疗作用. 此外, 大豆异黄酮还具有防治中老年骨质疏松, 减少心脑血管发病率, 减轻更年期妇女不适症等多种功效^[2,3]. 体内外试验均表明, 大豆异黄酮被人或动物吸收后, 主要被肠道内的微生物菌群逐步降解^[4,5], 其中黄豆苷原被降解为二氢黄豆苷原(dihydrodaidzein, DHD)、雌马酚(equol)和去氧甲基安哥拉紫檀素(*O*-Desmethylangolensin, *O*-Dma); 染料木黄酮被降解为二氢染料木黄酮(dihydrogenistein, DHG)和4-乙基苯酚(4-Ethylphenol)等不同代谢产物, 在目前已知的大豆异黄酮所有代谢产物中雌马酚是活性最高的成分^[6,7]. 然而, 由于受饮食习惯、年龄、大肠中氧化还原状态、疾病、抗生素使用等诸多因素影响^[8-13], 寄居在胃肠道内的大豆异黄酮转化菌株的正常生长与转化也随之受到影响. 据国外报道, 甲硝唑(metronidazole, MNZ)、卡那霉素(kanamycin, KAN)、万古霉素(vancomycin, VAN)和KAN+VAN可使猕猴血清中雌马酚水平分别下降80%, 93%, 98%和99%; 多西环素(doxycycline, DOX)对雌马酚水平没有影响, 但能增加血浆黄豆苷原、染料木黄酮、二氢染料木黄酮和黄豆黄素的水平. ICR小鼠形体小、饮食单一、寿命短且不同个体间差异较小, 特别是经体外转化试验发现, 其肠道微生物菌群转化黄豆苷原重现性好, 因此, 本文以ICR小鼠为试材, 研究不同抗生素对其粪样中大豆异黄酮转化菌株的影响. 研究结果不仅为进一步研究不同抗生素的体内影响提供参考, 在指导人们合理使用抗生素方面也具有实际意义.

1 材料和方法

1.1 材料 阿莫西林(AMX, 华北制药集团制剂有限公司, 0.25 g); 头孢拉定(CED, 上海五洲药业股份有限公司, 0.25 g); 氧氟沙星(OFLX, 华北制药集团制剂有限公司, 0.1 g); 诺氟沙星(NOR, 吉林亚泰明星制药有限公司, 0.1 g); 利君沙(EES, 西安利君制药有限责任公司, 0.125 g); 吉他霉素(LM, 河南天工药业有限公司, 0.1 g); 阿奇霉素(AZI, 四川美大康药业股份有限公司, 0.25 g); 多西环素(DOX, 新乡同心药业有限公司, 0.1 g); 土霉素(OTC, 河北东风药业有限公司, 0.25 g); 利福平(RFP, 沈阳红旗制药有限公司, 0.15 g); 甲硝唑(MNZ, 山西春宇制药有限公司, 0.2 g). ICR小鼠,

相关报道

2003年BLAIR等研究发现甲硝唑、卡那霉素、万古霉素和卡那霉素+万古霉素可使猕猴血浆中雌马酚水平分别下降80%, 93%, 98%和99%. 而多西环素、卡那霉素和卡那霉素+万古霉素则能增加猕猴血浆中大豆黄素水平. 不同种类抗生素对异黄酮代谢影响不同, 有些抗生素会影响肠道对异黄酮的吸收, 而有些则能扰乱肠道微生物菌群平衡, 直接影响异黄酮的体内代谢.

创新盘点

本研究首次报道了添加不同种类不同浓度的抗生素对ICR小鼠肠道微生物菌群体外转化黄豆苷原为雌马酚能力存在较大差异。通过供试抗生素所属类别及作用特点,可对小鼠肠道内参与雌马酚合成的微生物菌株特点进行推测。

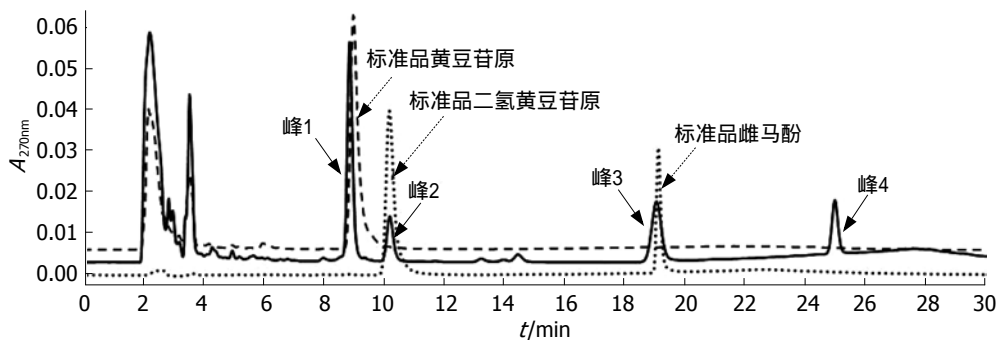


图1 未加抗生素小鼠肠道菌群体外转化底物黄豆苷原的高效液相色谱图。

月龄2 mo, 购于北京实验动物研究中心, 厌氧工作站为Concept 400型, 英国Ruskin公司。

1.2 方法

1.2.1 样品采集: 用灭菌镊子或消毒棉签取适量新鲜ICR小鼠粪样, 置于脑心浸液(BHI)培养基的试管内于厌氧工作站内培养24 h。工作站内通入的混合气体为850 mL/L N₂、100 mL/L H₂和50 mL/L CO₂, 温度为37 °C。

1.2.2 对照组处理: 将培养后粪样震荡混匀后, 取100 μL接种到盛有1 mL新鲜BHI液体培养基的试管中, 在37 °C下厌氧培养24 h后, 加入10 mmol/L的底物黄豆苷原20 μL, 继续在厌氧工作站内培养3 d。

1.2.3 抗生素处理: 将培养后粪样震荡混匀后, 取100 μL接种到盛有1 mL新鲜BHI液体培养基的试管中, 在37 °C下厌氧培养24 h后, 加入10 mmol/L的底物黄豆苷原20 μL和不同浓度的各种抗生素(从正常成人剂量开始, 以2倍逐渐递减), 继续在厌氧工作站内培养3 d。

1.2.4 高效液相色谱(HPLC): 将工作站内培养基用等量乙酸乙酯萃取3次, 离心浓缩仪蒸干后加入100%甲醇并在HPLC上(Waters1525)检测, 所用流动相为乙腈和水, 具体方法参照以往报道^[14]。根据HPLC检测结果确定敏感抗生素有效抑制黄豆苷原向雌马酚转化的临界点浓度。

1.2.5 标准曲线的测定: 将黄豆苷原(美国Indofine公司)、二氢黄豆苷原(本实验室纯化保存)和雌马酚(美国LCIabs公司)标准品分别配制成1.0、0.5、0.2、0.1和0.05 mmol/L等5个浓度, 在270 nm下用高效液相色谱测定标准溶液, 色谱仪自动记录各浓度下的谱峰积分面积, 每样品重复3次。以各标准品浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 作回归方程。

2 结果

2.1 对照组HPLC检测结果 在厌氧工作站内培养

的仅加入底物而没有加入任何抗生素的ICR小鼠菌群培养液用乙酸乙酯萃取后, 在HPLC色谱上明显出现四个谱峰(图1实线); 将底物黄豆苷原加入到既不接入ICR小鼠菌群又无任何抗生素的新鲜BHI液体培养基中, 37 °C下培养相同时间后用乙酸乙酯进行萃取, 通过HPLC检测出现一物质峰(图1短划线); 将标准品二氢黄豆苷原与雌马酚混合后在完全相同条件下进行高效液相检测, HPLC色谱上出现两个峰(图1圆点), 其中前面峰为二氢黄豆苷原, 后面峰为雌马酚。由图1可以看出, ICR小鼠肠道菌群代谢产物中的峰1的出峰时间(8.902 min)与底物黄豆苷原基本一致, 峰2(10.224 min)和峰3(19.156 min)与标准品二氢黄豆苷原和雌马酚的出峰时间完全相同, 代谢产物中的峰4(24.996 min)在不加入底物仅接入小鼠菌群的培养基中也同样存在, 且该峰不随底物黄豆苷原的增加而增大(结果未显示), 因而, 将峰4确定为菌群代谢培养基所产生。根据谱峰保留时间和紫外吸收图谱^[14,15], 将8.902 min出现的峰1确定为未被转化的底物黄豆苷原, 将10.224 min和19.156 min出现的峰2和峰3分别确定为代谢产物二氢黄豆苷原和雌马酚。

2.2 外标法测定各代谢产物含量 根据各标准液浓度及HPLC测得的峰面积, 得到各标准品的标准曲线方程分别为: 黄豆苷原 $y = 2E+07x-267270$ ($R^2 = 0.9995$); 二氢黄豆苷原 $y = 1E+07x+38125$ ($R^2 = 0.9999$); 雌马酚 $y = 3E+06x-68164$ ($R^2 = 0.9983$)。根据标准曲线将HPLC测得的各代谢产物峰面积转化为相应浓度, 比较不同抗生素对ICR小鼠肠道菌群转化黄豆苷原的影响。

2.3 抗生素处理

2.3.1 正常成人抗生素浓度处理: 使用正常成人剂量的抗生素处理体外培养的ICR小鼠粪样菌群时, HPLC未检测到有二氢黄豆苷原和雌马酚

表 1 正常成人剂量1/32浓度的抗生素对ICR小鼠肠道菌群体外转化黄豆苷原的影响

抗生素	1/32浓度 ¹ (mg/L)	黄豆苷原及其代谢产物 (μmol/L)		
		Daidzein	DHD	Equol
未加抗生素	-	20.2	12.6	125.9
AMX	5.1	2.8	0.0	116.6
CED	1.0	59.4	0.0	43.8
OFLX	4.1	6.2	10.5	114.0
NOR	2.0	16.0	10.8	113.7
EES	5.1	37.9	20.7	24.5
AZI	5.1	116.1	0.0	0.0
LM	12.2	122.4	0.0	0.0
OTC	5.1	112.2	0.0	0.0
DOX	2.1	42.2	6.2	15.5
RFP	6.1	102.0	0.0	0.0
MNZ	4.1	174.2	0.0	0.0

1: 抗生素正常成人剂量(单位: mg/L): AMX: 164; CED: 32.6; OFLX: 130; NOR: 65; EES: 164; AZI: 164; LM: 390; OTC: 164; DOX: 66; RFP: 196; MNZ: 130.

产生, 这表明该浓度下全部11种供试抗生素均完全抑制了ICR肠道菌群转化黄豆苷原为雌马酚的能力.

2.3.2 正常成人抗生素浓度的1/32处理: 对上述11种抗生素按2倍递减依次降低抗生素浓度, 结果发现, 在正常成人剂量1/32的浓度下, AMX、OFLX和NOR处理的ICR小鼠肠道菌群转化黄豆苷原为雌马酚的量与对照接近, 表明这三种抗生素在该浓度下对ICR小鼠肠道菌群影响较弱, 为不敏感抗生素. DOX、EES和CED则明显抑制了ICR小鼠肠道菌群转化能力, 使培养基中雌马酚浓度分别降低了87.7%, 80.5%和65.2%. 在全部11种供试抗生素中, AZI、LM、OTC、RFP和MNZ抑制作用最强, 使加入培养基中的底物黄豆苷原完全没有被转化(表1).

2.3.3 正常成人剂量1/256处理: 将正常成人剂量1/32浓度下明显抑制雌马酚生成的8种抗生素(DOX, EES, CED, AZI, LM, OTC, RFP和MNZ)继续降低浓度. 结果发现, 当使用正常成人剂量1/256时, EES处理与对照结果完全相同, 表明该浓度下EES对ICR小鼠肠道微生物菌群转化黄豆苷原能力无任何影响, CED和DOX则对雌马酚的生成表现出轻微抑制作用. 在该浓度下LM和OTC则明显抑制了ICR小鼠肠道菌群转化生成雌马酚能力, 使培养基中雌马酚的生成量分别降低了88.8%和90.7%. 在正常成人剂量1/256浓度下, 三种抗生素即AZI、RFP和MNZ则表现出

表 2 正常成人剂量1/256浓度的抗生素对ICR小鼠肠道菌群体外转化黄豆苷原的影响

抗生素	1/256浓度 (mg/L)	黄豆苷原及其代谢产物 (μmol/L)		
		Daidzein	DHD	Equol
未加抗生素	-	20.2	12.6	125.9
CED	0.1	1.4	0.0	106.7
EES	0.5	4.3	21.2	123.2
AZI	0.5	123.1	0.0	0.0
LM	1.2	112.0	0.0	14.1
OTC	0.5	110.4	0.0	11.7
DOX	0.2	10.4	0.0	93.3
RFP	0.6	108.2	0.0	0.0
MNZ	0.4	148.6	0.0	0.0

极强的抑制作用, 完全抑制了ICR小鼠肠道菌群转化黄豆苷原能力, 称之为极敏感抗生素(表2).

2.3.4 极敏感抗生素抑制转化的最低临界浓度: 对AZI、RFP和MNZ继续降低浓度, 当使用正常成人剂量1/512处理ICR小鼠肠道菌群时, AZI处理下开始有少量二氢黄豆苷原和雌马酚生成, 表明AZI有效抑制雌马酚生成的临界点浓度大约在1/512, 在该浓度下使雌马酚的生成量降低了94.8%. 与AZI不同, RFP和MNZ在该浓度下仍完全抑制了ICR小鼠肠道菌群体外转化黄豆苷原为雌马酚的能力(图2).

为确定RFP和MNZ有效抑制雌马酚生成的临界点浓度, 继续降低浓度到正常成人剂量1/1 024. 结果发现, 在该极低浓度下, RFP处理时, HPLC虽检测到有大量二氢黄豆苷原生成, 但完全抑制了雌马酚的生成; MNZ在该极低浓度下对雌马酚生成有明显抑制作用, 使培养基中的雌马酚生成量降低了85.2%. 为更准确确定RFP和MNZ有效抑制雌马酚生成的临界点浓度, 最后又尝试了正常成人剂量1/800浓度处理, 结果发现, MNZ在该浓度下能完全抑制黄豆苷原的转化, 而RFP在该浓度下完全抑制雌马酚的生成, 但HPLC检测到有少量二氢黄豆苷原(5.5 μmol/L)被生成. 因此, 将RFP和MNZ有效抑制雌马酚生成的临界点浓度分别定为1/800和1/1 024(图3).

3 讨论

大量研究表明, 大豆异黄酮代谢产物具有比大豆异黄酮更高更广的生物学活性. 雌马酚为大豆异黄酮黄豆苷原代谢产物, 也是目前大豆异黄酮所有微生物代谢产物中活性最高的成

应用要点
本实验通过雌马酚生成量研究了不同抗生素对ICR小鼠肠道微生物菌群体外转化黄豆苷原的抑制作用, 确定了敏感抗生素种类及其抑制雌马酚合成的临界点浓度. 研究结果既可指导临床医师合理用药, 又将为进一步体内实验提供理论指导.

名词解释

微生物生物转化: 是利用微生物代谢中产生的酶对天然化合物进行结构修饰的过程, 通过微生物转化技术可以获得大量的新化合物。由于一种微生物可以转化多种在分子结构上完全不同的物质, 不同微生物对结构相似的物质可以发生类似的反应, 所以微生物转化已成为现代生物技术的重要组成部分。

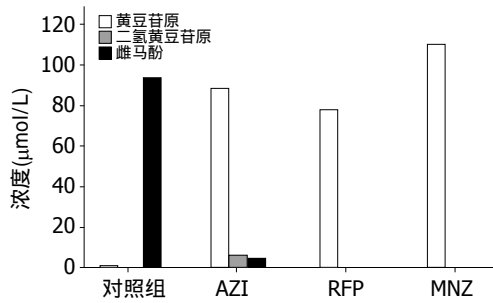


图 2 AZI、RFP和MNZ在正常成人剂量1/512浓度下对ICR小鼠肠道菌群转化黄豆苷原的影响。

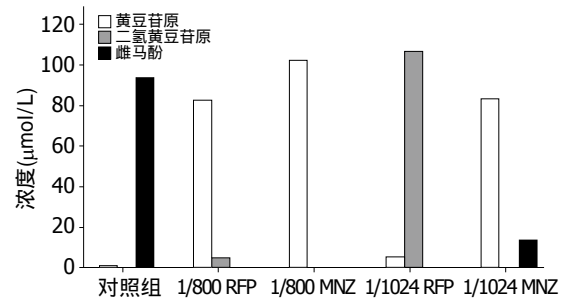


图 3 RFP和MNZ在极低浓度下对ICR小鼠肠道菌群体外转化黄豆苷原的影响。

分, Axelson等1982年在人体尿液中首次检测到了雌马酚。雌马酚在结构上与人体雌激素受体雌二醇最为接近, 可与雌激素受体结合, 依据体内雌激素水平发挥类似雌激素或拮抗雌激素的双重调节作用。此外, 雌马酚在抗氧化、抑制癌细胞生长、减少骨质疏松和缓和妇女更年期症状方面的生理作用明显高于其亲本化合物黄豆苷原。因此, 本研究中主要以培养基中雌马酚的生成量来评价不同抗生素对ICR小鼠肠道微生物菌群对黄豆苷原体外转化的抑制作用。

近年来大豆异黄酮转化菌株陆续从不同动物胃肠道微生物菌群中分离出来, 尽管从不同动物体内分离的具有相同转化作用的大豆异黄酮转化菌株各不相同, 但总体上大豆异黄酮转化菌株为人和其他动物体内的非优势菌群, 其正常生长繁殖很可能依赖于其周围环境中的优势微生物菌群的相对平衡。使用一定浓度的抗生素会破坏肠道微生物菌群平衡, 进而影响了大豆异黄酮微生物转化菌株的正常生长与转化。本研究中, 当使用正常成人剂量的1/32时, CED、EES和DOX明显抑制了ICR小鼠肠道微生物菌体外转化黄豆苷原为雌马酚能力, 而当使用浓度降低到正常成人用量的1/256时, 上述三种抗生素几乎不产生影响。推测, 该浓度或许对ICR小鼠肠道内某些优势菌群有一定影响, 但对总的肠道微生物菌群平衡并不造成威胁。同时, ICR小鼠肠道内的大豆异黄酮转化菌株可能对这些抗生素并非十分敏感。然而, 体内外环境存在较大差异, 从口腔(口服药)经胃进入肠道过程中, 药物要经过一个重新被吸收、分布、代谢和排泄的过程, 因此, 有必要对体外转化敏感抗生素进行进一步体内试验, 以便更准确更合理指导用药。

本研究中MNZ、AZI和RFP在极低浓度下(<1/512)即可完全抑制ICR小鼠肠道微生物菌群将黄豆苷原转化为雌马酚的能力, 尤其是MNZ

在使用正常成人用量1/1024时即可完全抑制雌马酚的生成。推测这些在极低浓度下即可有效抑制黄豆苷原向雌马酚有效转化的抗生素可能直接对大豆异黄酮转化菌株有较强的抑杀作用, 特别是属硝基咪唑类的MNZ通过抑制DNA合成具有抗厌氧菌作用, 而对需氧菌或兼性需氧菌无效。RFP是利福霉素SV的人工半合成产物, 是一线抗结核病药物。RFP不仅对结核杆菌及麻风杆菌有作用, 对革兰氏阴性杆菌也有抑制作用。结核病属人体慢性疾病, 结核病患者需长期服用抗结核药物, 其对患者肠道微生物菌群中大豆异黄酮微生物转化菌株可能是毁灭性的。AZI是唯一半合成15元环大环内酯类抗生素, 尤其对革兰氏阴性菌有较强的抗菌作用。值得一提的是, AZI在大环内酯类抗生素中半衰期长(35-48 h), 且大部分以原形由粪便排出体外, 因而对肠道敏感微生物菌群的不良作用会明显加强。AZI因其疗效好, 不良反应小, 目前作为抗感染药物正被广泛使用, 有关AZI对体内大豆异黄酮转化菌株的抑杀作用有必要进一步研究。

4 参考文献

- 张逊, 姚文, 朱伟云. 肠道大豆异黄酮降解菌研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 973-978
- Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J, Höckerstedt K, Hämäläinen E, Wähälä K, Mäkelä T, Hase T. Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41: 331-337
- 龚福明, 柳陈坚. 传统大豆发酵食品在心脑血管疾病防治上的研究现状. 中国微生物学杂志 2009; 21: 369-373
- 李咏梅, 李晓眠, 朱泽. 苷类中药肠道细菌生物转化的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 2144-2148
- Hur HG, Lay JO Jr, Beger RD, Freeman JP, Rafii F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol* 2000; 174: 422-428
- Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 1984; 40: 569-578
- Chang YC, Nair MG. Metabolism of daidzein and

- genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod* 1995; 58: 1892-1896
- 8 Atkinson C, Skor HE, Dawn Fitzgibbons E, Scholes D, Chen C, Wähälä K, Schwartz SM, Lampe JW. Urinary equol excretion in relation to 2-hydroxyestrone and 16 α -hydroxyestrone concentrations: an observational study of young to middle-aged women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86: 71-77
- 9 Zubik L, Meydani M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1459-1465
- 10 Tamuraa M, Hirayamab K, Itohb K, Suzukia H, Shinoharaa K. Effects of soy protein-isoflavone diet on plasma isoflavone and intestinal microflora in adult mice. *Nutr Res* 2002; 22: 705-713
- 11 Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* 2000; 36: 27-32
- 12 Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA. Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr* 2002; 132: 3168-3171
- 13 Blair RM, Appt SE, Franke AA, Clarkson TB. Treatment with antibiotics reduces plasma equol concentration in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Nutr* 2003; 133: 2262-2267
- 14 Wang XL, Shin KH, Hur HG, Kim SI. Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium. *J Biotechnol* 2005; 115: 261-269
- 15 Wang XL, Hur HG, Lee JH, Kim KT, Kim SI. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 214-219

同行评价
本文探讨不同抗生素对ICR小鼠肠道微生物菌群体外转化黄豆苷原为雌马酚的影响,有一定的科学意义。

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》计量单位标准

本刊讯 本刊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 kDa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±前后都要列出. 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 pg/ml ± 0.27 pg/ml 应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/L$, WBC数用 $\times 10^9/L$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 μ mol/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 μ g, 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酒精; 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.

原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜胃动素、血管活性肠肽的表达

高瑞梅, 许琳, 孟欣颖, 王青

背景资料
临床工作中, 胆汁反流性胃炎的检出率在同期胃镜检出率中一直较高, 但其发病机制尚无定论。已有研究显示, 胆汁反流患者多伴有胃肠道运动功能障碍如胃窦功能减弱、胃窦幽门十二指肠协调运动障碍、幽门压力降低、胃排空延迟等, 部分胃肠激素亦参与了其发病。

高瑞梅, 许琳, 孟欣颖, 王青, 青岛大学医学院附属青岛市立医院东区消化内科 山东省青岛市 266071
作者贡献分布: 高瑞梅与王青对此文所作贡献均等; 此课题由高瑞梅、许琳及王青设计; 研究过程由高瑞梅与王青操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王青提供; 数据分析由高瑞梅完成; 本论文的写作由高瑞梅、孟欣颖及王青完成。
通讯作者: 王青, 主任医师, 266071, 山东省青岛市东海中路5号, 青岛大学医学院附属青岛市立医院东区消化内科。
wangq2008001@163.com
电话: 0532-88905630
收稿日期: 2009-11-24 修回日期: 2010-01-15
接受日期: 2010-01-19 在线出版日期: 2010-03-08

Expression of motilin and vasoactive intestinal peptide in gastric mucosa of patients with primary bile reflux gastritis

Rui-Mei Gao, Lin Xu, Xin-Ying Meng, Qing Wang

Rui-Mei Gao, Lin Xu, Xin-Ying Meng, Qing Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, Shandong Province, China
Correspondence to: Qing Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University Medical College, 5 Donghai Middle Road, Qingdao 266071, Shandong Province, China. wangq2008001@163.com
Received: 2009-11-24 Revised: 2010-01-15
Accepted: 2010-01-19 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of motilin and vasoactive intestinal peptide (VIP) in gastric mucosa of patients with primary bile reflux gastritis.

METHODS: Seventy-four patients with primary bile reflux gastric were divided into low reflux group ($n = 42$) and high reflux group ($n = 32$). A control group was composed of 28 subjects who showed no abnormalities during 24-hour gastric bilirubin monitoring with Bilitec 2000 and gastroscopic examination. The expression of motilin and VIP in biopsy specimens was detected by immunohistochemistry and analyzed using pathology image analysis software.

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

RESULTS: The expression levels of motilin in the high and low reflux groups were lower than that in the control group (558.93 ± 223.63 and 787.09 ± 252.97 vs 941.50 ± 275.87 , respectively; both $P < 0.05$), while the expression levels of VIP in the high and low reflux groups were higher than in the control group (1700.06 ± 486.55 and 1241.19 ± 359.34 vs 959.00 ± 335.78 , respectively; both $P < 0.01$). The detection rates of metaplasia atrophy in the high and low reflux groups were higher than that in the control group (50.0% and 26.2% vs 7.1%, respectively; $P < 0.01$ and 0.05). Patients with metaplastic atrophic gastritis had higher reflux rate than those with superficial gastritis (59.3% vs 30.5%, $P < 0.05$). The detection rate of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) decreased with the aggravation of bile reflux (64.3% and 47.6% vs 25.0%, respectively; $P < 0.01$ and 0.05).

CONCLUSION: The parasecretion of motilin and VIP may play a role in the development of bile reflux gastritis. Bile reflux is one of the risk factors for gastric mucosa injury. Bile reflux can inhibit the infection of *H.pylori*.

Key Words: Duodenogastric reflux; Primary bile reflux gastritis; Motilin; Vasoactive intestinal peptide; *Helicobacter pylori*

Gao RM, Xu L, Meng XY, Wang Q. Expression of motilin and vasoactive intestinal peptide in gastric mucosa of patients with primary bile reflux gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 722-725

摘要

目的: 探讨胃黏膜胃动素(MTL)、血管活性肠肽(VIP)的表达与原发性胆汁反流性胃炎之间的关系。

方法: 标本取自74例原发性胆汁反流性胃炎患者, 其中低反流组42例和高反流组32例, 24 h胃内胆红素监测及电子胃镜检查未见异常者28例为对照组。采用免疫组织化学法检测胃黏膜MTL和VIP表达, 并用病理图像分析软件进行分析。

结果: 高、低反流组较对照组胃黏膜MTL表达明显降低(558.93 ± 223.63 , 787.09 ± 252.97 vs 941.50 ± 275.87 , 均 $P < 0.05$); VIP表达较对照组明显增高(1700.06 ± 486.55 , 1241.19 ± 359.34 vs 959.00 ± 335.78 , 均 $P < 0.01$). 高、低反流组胃黏膜化生性萎缩检出率均较对照组高(50.0%, 26.2% vs 7.1%, $P < 0.01$ 或0.05). 化生性萎缩组较浅表性胃炎组胆汁反流程度重(59.3% vs 30.5%, $P < 0.05$). 随着胆汁反流程度的加重, 幽门螺杆菌检出率下降(64.3%, 47.6% vs 25.0%, $P < 0.01$ 或0.05).

结论: 胃黏膜MTL及VIP分泌紊乱可能在胆汁反流性胃炎发生中起作用. 胆汁反流是胃黏膜损伤的危险因素之一, 胆汁反流对幽门螺杆菌感染起抑制作用.

关键词: 十二指肠胃反流; 原发性胆汁反流性胃炎; 胃动素; 血管活性肠肽; 幽门螺杆菌

高瑞梅, 许琳, 孟欣颖, 王青. 原发性胆汁反流性胃炎胃黏膜胃动素、血管活性肠肽的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 722-725

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/722.asp>

0 引言

原发性胆汁反流性胃炎(primary bile reflux gastritis, PBRG)的发病机制目前尚不明确, 国内外文献报道, 胆汁反流性胃炎占同期胃镜检出率的9.9%-24.2%, 研究其发病机制对于预防胆汁反流的发生有重要作用. 脑肠肽是一种具有神经递质和激素双重功能的小分子多肽, 在调节胃肠运动中起重要作用. 本研究通过对胃黏膜胃肠激素胃动素(motilin, MTL)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)半定量表达, 探讨胃黏膜中胃肠激素的变化及幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染与PBRG发生的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选择于2008-10/2009-04青岛市市立医院就诊的PBRG患者74例, 其中男35例, 女39例, 年龄18-70(平均 46.87 ± 14.40)岁. 纳入标准^[1]: 具有腹痛、腹胀、恶心、呕吐胆汁等4项症状中至少2项, 近3 mo每周症状发作不少于3次, 且胃镜检查发现黏液湖胆染同时伴胃窦黏膜糜烂和(或)明显充血, 并经24 h胆红素监测仪(Bilitec2000)检测证实存在病理性十二指肠反流的患者. 剔除标准: 近4 wk来曾用抗生素、泌剂或质子泵抑制剂者, 腹部手术史, 食管糜烂、上消化道狭

窄和肿瘤, 消化性溃疡, 肝、胆、胰等其他消化系统疾患, 严重心肺疾病、糖尿病、神经系统疾病等. 正常对照组选择无腹部手术史、无消化系统慢性病史、无糖尿病和肝、胆、胰疾患等病史, 近3 mo无消化系症状, 24 h胃内胆红素监测及电子胃镜检查未见异常且病理证实为非肿瘤者28例, 其中男13例, 女15例, 年龄25-68(平均 46.64 ± 13.70)岁. 免疫组织化学广谱试剂盒、DAB显色剂均购自福州迈新生物技术开发公司. MTL鼠抗人单克隆抗体购自中美科技公司. VIP兔抗人多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司. 便携式胆汁监测仪(Bilitec2000)由瑞典Medtronic Synectics公司生产. 病理图像分析采用专业图像分析软件Image-ProPlus(IPP)6.0.

1.2 方法

1.2.1 分组: 根据中国慢性胃炎共识意见^[2]将PBRG患者按病理表现分为浅表性胃炎组、化生性萎缩组及非化生性萎缩组. 使用Bilitec2000以胃内记录到胆红素吸收值 ≥ 0.25 为胆汁反流, 计算胆红素吸收值 ≥ 0.25 的时间百分比, 胆红素吸收值以0.25为界值时, 取反流时间百分比的中位数23.60%作为分界, 将反流分为低反流组($< 23.60\%$)和高反流组($\geq 23.60\%$)^[3].

1.2.2 胃镜检查及黏膜活检: 所有受试者均接受Olympus260型电子胃镜检查, 常规在胃窦小弯侧和大弯侧距幽门2-3 cm处取3块组织, 垂直活检, 深达黏膜肌层. 其中1块作快速尿素酶试验, 其余2块活检标本经100 g/L甲醛固定, 行胃黏膜垂直包埋、切片, 分别用于苏木精伊红(HE)染色、AB-PAS染色、改良Giemsa染色及免疫组织化学检查.

1.2.3 24 h胃内胆红素监测: 所有受试者胃镜检查后1 wk内, 行便携式胆汁监测仪(Bilitec2000)检测, 连续记录24 h胃内胆红素浓度. 监测过程中三餐进半流质饮食. 不进食番茄、胡萝卜、香蕉、橙、蛋黄等光吸收特性与胆红素相近的食物及饮料. 连续监测24 h, 以胃内记录到胆红素吸收值 ≥ 0.25 诊断为胆汁反流, 计算胆红素吸收值 ≥ 0.25 的时间百分比.

1.2.4 *H.pylori*测定: 快速尿素酶试验阳性并改良Giemsa染色镜检找到*H.pylori*. 同时具备作为*H.pylori*阳性标准.

1.2.5 免疫组织化学染色: 按SP法免疫组化染色试剂盒操作步骤进行. MTL、VIP阳性染色主要位于胞质内, 为棕黄色颗粒沉积, 免疫组织化学结果定量判断标准: 染色后先在光镜下做

研发前沿

Bilitec2000胆红素监测仪是根据胆汁内胆红素在450 nm处存在特异吸收峰的特点, 利用分光光度计原理设计而成. 有研究表明Bilitec2000在监测胃内胆红素乃至胆汁反流中是一个比较可靠的设备, 可以应用于DGR的临床诊治和研究.

相关报道

Vere等研究发现胆汁反流性胃炎中组织学慢性炎症表现多于急性炎症. 肠化生发生比例为34.83%, 而*H.pylori*感染率为16.08%. 提示肠化生与胆汁反流关系更为密切. Taylor等在大鼠实验中发现空肠胃侧侧吻合后, 8 wk可发生肠化生, 56 wk发生率达10%, 认为胆汁反流因素促成了肠化生.

创新盘点

本文将高低反流组与正常对照组胃黏膜兴奋性和抑制性胃肠激素的变化做比较研究胆汁反流性胃炎的发病机制,并研究胃黏膜损伤程度与胆汁反流程度及*H.pylori*之间的关系。

表 1 胃黏膜MTL、VIP表达量及*H.pylori*检测结果 (mean ± SD)

分组	n	MTL	VIP	<i>H.pylori</i> n(%)
对照组	28	941.50 ± 275.87	959.00 ± 335.78	18(64.3)
低反流组	42	787.09 ± 252.97 ^a	1 241.19 ± 359.34 ^a	20(47.6)
高反流组	32	558.93 ± 223.63 ^{ac}	1 700.06 ± 486.55 ^{ac}	8(25.0) ^{ac}

^a*P*<0.05 vs 对照组; ^c*P*<0.05 vs 低反流组。

定性观察,然后于高倍镜下(×400)观察胃黏膜MTL、VIP阳性表达情况,并随机选取互不重叠的5个视野,用专业图像分析软件Image-Pro[®] Plus(IPP)6.0测定每个视野阳性染色的累积光密度(累积吸光度 = 平均吸光度 × 面积),取其平均值作为该切片胃黏膜MTL、VIP表达的半定量指标。

统计学处理 应用SPSS11.5软件,对所得计数资料的阳性率的比较采用 χ^2 检验。计量资料数据均以mean ± SD表示,多组资料间比较采用单因素方差分析,以*P*<0.05作为差异有显著意义的检验标准。

2 结果

2.1 各组MTL和VIP的表达及*H.pylori*阳性率的比较 高、低反流组胃黏膜MTL表达均较对照组低($F = 17.85, q = 8.33, 3.56, P < 0.01, 0.05$),而VIP表达较对照组高($F = 26.89, q = 10.17, 4.11, P < 0.01$),且皆有统计学意义。高反流组胃黏膜MTL表达较低反流组低($q = 5.48, P < 0.01$),具有统计学意义;VIP表达较低反流组高($P = 6.94, P < 0.01$),具有统计学意义。高反流组*H.pylori*阳性检出率较对照组、低反流组低($\chi^2 = 9.386, P < 0.01; \chi^2 = 3.951, P < 0.05$)。低反流组与对照组*H.pylori*阳性检出率差别无统计学意义($\chi^2 = 1.880, P > 0.05$,表1)。

2.2 不同类型萎缩性胃炎检出率的比较 高、低反流组胃黏膜化生性萎缩检出率均较对照组高($\chi^2 = 13.061, 4.031, P < 0.01, 0.05$),且高反流组较低反流组胃黏膜化生性萎缩检出率高($\chi^2 = 4.443, P < 0.05$)。各组非化生性萎缩性胃炎检出率无统计学差异($\chi^2 = 0.026-2.411, P > 0.05$,表2)。

2.3 胃黏膜不同病变高反流率、*H.pylori*阳性率的比较 化生性萎缩组较浅表性胃炎组胆汁反流程度重($\chi^2 = 5.191, P < 0.05$);非化生性萎缩组与化生性萎缩、浅表性胃炎组胆汁反流程度无统计学差异($\chi^2 = 0.602-0.833, P > 0.05$)。各组*H.pylori*阳性检出率无统计学差异($\chi^2 =$

表 2 不同类型萎缩性胃炎检出率 n(%)

分组	n	化生性萎缩	非化生性萎缩
对照组	28	2(7.1)	1(3.6)
低反流组	42	11(26.2) ^a	6(14.3)
高反流组	32	16(50.0) ^{ac}	5(15.6)

^a*P*<0.05 vs 对照组; ^c*P*<0.05 vs 低反流组。

表 3 胃黏膜不同病变高反流率及*H.pylori*阳性率 n(%)

分组	n	高反流n(%)	<i>H.pylori</i> n(%)
浅表性胃炎组	36	11(30.5)	14(38.9)
化生性萎缩组	27	16(59.3) ^a	10(37.0)
非化生性萎缩	11	5(45.5)	4(36.4)

^a*P*<0.05 vs 浅表性胃炎组。

0.000-0.022, *P*>0.05,表3)。

3 讨论

正常生理条件下,机体存在十二指肠胃反流(duodenogastric reflux, DGR)^[4]。反流物不对胃黏膜造成损害。但PBRG患者,由于胃-幽门-十二指肠运动障碍,十二指肠内容物(胆汁酸、胆盐和溶血卵磷脂)反流入胃,在胃酸的作用下,破坏胃黏膜屏障,引起H⁺向上皮细胞内反渗,造成胃黏膜慢性炎症、糜烂甚至溃疡。

本研究发现,随着反流程度的逐渐加重,PBRG患者胃黏膜MTL的表达呈下降趋势,而VIP的表达依次增加,且组与组之间比较,具有统计学意义(*P*<0.05)。有研究证实MTL是兴奋性神经递质,MTL的生理作用是调节胃肠移行性运动复合波(migrating myoelectric complex, MMC),具有强烈刺激上消化系的机械活动和电活动的作用,从而起肠道清道夫的作用。有研究表明,MTL水平降低可使胃排空延缓^[5,6]。VIP是抑制性神经递质,许多研究已证明VIP在胃肠运动调节中主要起抑制效应^[7],可抑制下食管

应用要点

研究胃黏膜中胃肠激素的变化及*H.pylori*感染与PBRG发生的关系。初步了解胃肠激素变化在PBRG的发病中所起的作用,对于预防胆汁反流的发生提供了一定的理论基础。

括约肌、胃幽门括约肌和肠肌张力, 抑制胃酸及胃蛋白酶的分泌, 并能减慢胃排空、松弛消化系括约肌. 分析其机制可能是兴奋性递质的减少和抑制性递质的增加两者联合使胃排空延长, 胃收缩减弱, 胃III相的收缩缺乏或缩短使腹腔内压减低, 导致胃内容清除能力下降, 从而使十二指肠内容物反流机会增加, 故MTL较低及VIP较高者为高反流组. MTL及VIP可能在胆汁反流发生中起作用.

另一方面, 胃清除能力下降又延长了有害物质胆汁酸在胃内的滞留时间, 增加对胃黏膜的侵袭机会, 使胃黏膜损伤进一步加重. 从该研究看化生性萎缩性胃炎较浅表性胃炎组, 胆汁高反流患者所占的比例大(59.3% vs 30.5%), 比较具有统计学意义($P < 0.05$), 非化生性萎缩与浅表性胃炎组比较虽无统计学意义, 但高反流患者比例也有增加(45.5% vs 30.5%), 即胃黏膜损伤重者, 胆汁反流程度重, 其胃内胆汁酸浓度也高, 这与国外研究报道的胃黏膜肠上皮化生的患者其胃内总胆酸的浓度显著高于无肠上皮化生者一致^[8]; 反之, 随着胆汁反流程度的逐渐加重, 胃黏膜损伤加重且以化生性萎缩为主, 且比较有统计学意义($P < 0.05$), 非化生性萎缩之间无统计学意义. 本试验中, 高低反流组化生性萎缩检出率明显高于对照组(50.0%、26.2% vs 7.1%), 这与国内外文献报道胆汁反流性胃炎与胃黏膜肠化生、萎缩有关^[9,10]一致. 故胃黏膜损伤程度可能与胆汁反流程度相关, 胆汁反流使胃黏膜化生性萎缩风险率增加.

从*H.pylori*感染阳性率上看, PBRG患者不同胃黏膜病变, *H.pylori*表达阳性率之间无统计学差异($P > 0.05$); 而化生性萎缩性胃炎组较浅表性胃炎组反流程度重($P < 0.05$). 表明胆汁反流与PBRG的胃黏膜损害有明显利害关系, 而*H.pylori*感染似乎对其无明显影响, 从具体数据看, 化生性萎缩组高反流者占59.3%比浅表性胃炎(30.5%)高得多, 两者*H.pylori*检出率(37.0% vs 38.9%)无明显差异, 这与最近的文献报道一致^[11], 认为肠化生是胆汁反流的一种特异性表现, 而*H.pylori*感染与肠化生无因果关系. *H.pylori*感染与胆汁反流性胃炎的关系尚存在争议^[12]. 胆酸与*H.pylori*感染对胃黏膜损伤是协同作用还是互不干涉或胆酸抑制*H.pylori*生长尚不明确. 本研究发现, 高反流组*H.pylori*阳性检出率较对照组、低反流组低($P < 0.05$), 即反流程度重者, *H.pylori*感染率下

降. 这与我国近几年的研究报道一致, 分析原因可能是: (1)*H.pylori*生存环境为 $pH \leq 4$ 的酸性环境中, 正常胃内的 pH 为2-3, 胆汁反流使胃酸中和, 不适宜*H.pylori*的生长. (2)*H.pylori*在高浓度的胆汁酸作用下, 其外形由原来的杆状变成表面带有气泡的球状, 最后浓缩呈团块状而失去活性. 使得高反流组较其他两组*H.pylori*感染检出率低.

总之, PBRG患者存在兴奋性激素MTL及抑制性激素VIP的分泌失调, MTL及VIP可能在胆汁反流发生中起作用. 随着胆汁反流程度的加重, 胃黏膜损伤程度加重, 可致胃萎缩、肠上皮化生的发生. 胆汁反流对*H.pylori*感染起抑制作用.

4 参考文献

- 孔建华, 杨昭徐. 胃排空障碍在胆汁反流性胃炎发病中的作用. 中华内科杂志 2005; 44: 852-853
- 中华医学会消化病学分会. 中国慢性胃炎共识意见. 胃肠病学 2006; 11: 674-684
- 姜东春, 韩俊岭, 李莉, 韩莹. 原发性病理性十二指肠胃反流致病的因素分析. 山东医药 2009; 49: 7-10
- Bollschweiler E, Wolfgarten E, Pütz B, Gutschow C, Hölscher AH. Bile reflux into the stomach and the esophagus for volunteers older than 40 years. *Digestion* 2005; 71: 65-71
- Esposito S, Valente G, Zavallone A, Guidali P, Rapa A, Oderda G. Histological score for cells with irregular nuclear contours for the diagnosis of reflux esophagitis in children. *Hum Pathol* 2004; 35: 96-101
- Okamoto K, Iwakiri R, Mori M, Hara M, Oda K, Danjo A, Ootani A, Sakata H, Fujimoto K. Clinical symptoms in endoscopic reflux esophagitis: evaluation in 8031 adult subjects. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 2237-2241
- Li LS, Qu RY, Wang W, Guo H. Significance of changes of gastrointestinal peptides in blood and ileum of experimental spleen deficiency rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 553-556
- Nakamura M, Haruma K, Kamada T, Mihara M, Yoshihara M, Imagawa M, Kajiyama G. Duodenogastric reflux is associated with antral metaplastic gastritis. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 53-59
- 林金坤, 曾志荣, 高修仁, 陈为, 胡品津. 十二指肠胃反流与胃黏膜炎症关系探讨. 中华消化杂志 2004; 24: 87-89
- Dixon MF, Mapstone NP, Neville PM, Moayyedi P, Axon AT. Bile reflux gastritis and intestinal metaplasia at the cardia. *Gut* 2002; 51: 351-355
- 朱元民, 刘玉兰, 吴南茜, 李菁. 胃黏膜肠化生与其它病理表现的相关性研究. 中国消化内镜 2008; 2: 35-37
- Abe H, Murakami K, Satoh S, Sato R, Kodama M, Arita T, Fujioka T. Influence of bile reflux and Helicobacter pylori infection on gastritis in the remnant gastric mucosa after distal gastrectomy. *J Gastroenterol* 2005; 40: 563-569

同行评价
本文对胆汁反流性胃炎的病理生理机制的阐述提供了理论依据, 对该病的临床诊治具有一定潜在指导意义.

编辑 李军亮 电编 何基才

胃镜活检组织 *kiss-1* 基因检测与肿瘤分期及预后的关系

徐夏, 张志强, 关晓军, 卢润章, 吴丹西, 郑丹

背景资料
肿瘤转移是恶性肿瘤最重要的生物学特征之一, 肿瘤转移抑制基因在体内能直接抑制转移潜能并抑制肿瘤向第二位点扩散, 故成为临床及基础研究的热点, *kiss-1* 基因是近年新发现的一种肿瘤转移抑制基因。

徐夏, 张志强, 关晓军, 卢润章, 吴丹西, 哈尔滨市第一医院血液病肿瘤研究所 黑龙江省哈尔滨市 150010
郑丹, 哈尔滨市红十字医院妇产科 黑龙江省哈尔滨市 150010
哈尔滨市科技创新人才研究专项基金资助项目, No. RC2008RFQQS078
作者贡献分布: 此课题由徐夏与关晓军设计; 研究过程由徐夏、关晓军、卢润章及张志强操作完成; 研究所用试剂及分析工具由卢润章提供; 数据分析由徐夏、吴丹西及郑丹完成。
通讯作者: 徐夏, 副主任医师, 150010, 黑龙江省哈尔滨市道里区地段街149号, 哈尔滨市第一医院血液病肿瘤研究所。
xuxia1972@126.com
电话: 0451-84883478 传真: 0451-87650339
收稿日期: 2009-12-16 修回日期: 2010-01-21
接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-08

Relationship of *kiss-1* gene expression with the TNM stage and prognosis in gastric cancer

Xia Xu, Zhi-Qiang Zhang, Xiao-Jun Guan, Run-Zhang Lu, Dan-Xi Wu, Dan Zheng

Xia Xu, Zhi-Qiang Zhang, Xiao-Jun Guan, Run-Zhang Lu, Dan-Xi Wu, Institute of Hematology & Oncology, Harbin First Hospital, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China

Dan Zheng, Department of Obstetrics and Gynecology, Harbin Red Cross Hospital, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Special Fund for Scientific and Technological Innovative Talents in Harbin, No. RC2008RFQQS078
Correspondence to: Xia Xu, Institute of Hematology & Oncology, Harbin First Hospital, 149 Didian Street, Daoli District, Harbin 150010, Heilongjiang Province, China. xuxia1972@126.com

Received: 2009-12-16 Revised: 2010-01-21
Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical value of the expression of *kiss-1* (a metastasis suppressor gene) in gastric cancer.

METHODS: The expression of *kiss-1* mRNA in gastroscopic biopsy specimens taken from 30 gastric cancer patients was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. Based on *kiss-1* expression level, the patients were divided into two groups: those with high and low expression of *kiss-1* mRNA. The clinicopathologic characteristics of gastric cancer were then

compared between the two groups.

RESULTS: The expression levels of *kiss-1* mRNA in stage III-IV (TNM) gastric cancer patients ($t = 1.87, F = 1.00, P = 0.025$) and those with frequent venous invasion ($t = 3.51, F = 1.22, P = 0.009$) or frequent distant lymph node metastasis ($t = 2.26, F = 2.17, P = 0.009$) were significantly lower than those in stage I-II (TNM) gastric cancer patients and those without venous invasion or distant lymph node metastasis, respectively.

CONCLUSION: The expression level of *kiss-1* mRNA can be used as an important biological marker for evaluating the TNM stage and prognosis of gastric cancer.

Key Words: *Kiss-1*; Prognosis; Tumor staging; Prognosis

Xu X, Zhang ZQ, Guan XJ, Lu RZ, Wu DX, Zheng D. Relationship of *kiss-1* gene expression with the TNM stage and prognosis in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 726-729

摘要

目的: 研究 *kiss-1* 基因在胃癌中的表达水平及其临床意义。

方法: 30例患者依照PCR技术检测出的 *kiss-1* 表达中位数分为高表达和低表达2组, 对比临床病理学特征。

结果: *kiss-1* 基因低表达者较高表达者均伴有低肿瘤分期 ($t = 1.87, F = 1.00, P = 0.025$)、频发肿瘤周围静脉侵袭 ($t = 3.51, F = 1.22, P = 0.009$) 和远处淋巴结转移 ($t = 2.26, F = 2.17, P = 0.009$)。

结论: *kiss-1* 基因表达可以成为反映胃癌分期和预后的重要生物学标志物。

关键词: *kiss-1*; 胃镜; 肿瘤分期; 预后

徐夏, 张志强, 关晓军, 卢润章, 吴丹西, 郑丹. 胃镜活检组织 *kiss-1* 基因检测与肿瘤分期及预后的关系. *世界华人消化杂志* 2010; 18(7): 726-729

同行评议者
姚登福, 教授, 南通大学附属医院分子医学中心

http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/726.asp

0 引言

肿瘤转移是恶性肿瘤最重要的生物学特征之一, 肿瘤转移抑制基因在体内能直接抑制转移潜能并抑制肿瘤向第二位点扩散, 故成为临床及基础研究的热点, *kiss-1*基因是近年新发现的一种肿瘤转移抑制基因. 我们选取已经病理证实但未行手术和其他治疗的胃癌患者, 在麻醉下活检肿瘤组织, 应用PCR技术提取并扩增肿瘤的*kiss-1* mRNA, 通过该基因的表达同时结合患者经手术后的临床病理学特征进行分析, 旨在分析其在胃癌发生、发展及浸润、转移中所起的作用, 为进一步探讨胃癌的发生、发展及浸润、转移机制和寻找有效地抑制胃癌浸润、转移途径提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol试剂为大连宝生物工程有限公司生产. 逆转录合成试剂盒为瑞士Roche公司生产. Olympus CV-240电子胃镜, 美国ABI公司PCR仪, 德国贝朗医疗有限公司Perfusor Compact S注射泵, 英国GE公司Datex-Ohmeda Excel-80麻醉机.

1.2 方法

1.2.1 分组: 对30例病理证实均为胃腺癌, 之前均未接受手术、化疗、放疗及免疫治疗的患者行胃镜活检, 手术后平均分为2组进行临床病理学特征分析, 分组原则为通过测定所得*kiss-1*基因表达率的中位数来界定, 分为高表达组(15例)和低表达组(15例).

1.2.2 取材: 所有患者应用注射泵推注瑞芬太尼和丙泊酚, 在麻醉状态下使胃镜进至病变部位, 应用活检钳夹取肿瘤组织数块, 检查中确保患者生命体征平稳.

1.2.3 RNA抽提和RT-PCR: 将存放在标本瓶中的2-4块肿瘤组织用DEPC处理过的生理盐水洗净血液, 立即置于液氮中, 24 h后储存在-80 °C冰箱保存, 备RNA抽提. 用TRIzol试剂提取组织总RNA, 逆转录合成cDNA. PCR扩增检测*kiss-1*基因的mRNA表达及其 β -actin表达, 以 β -actin作定量对照, 对结果进行分析. PCR引物序列及退火温度见表1. PCR反应后, 2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下照相.

统计学处理 采用SPSS14.0统计软件, 采用 χ^2 检验中Fisher确切概率法、*t*检验和*F*检验, ($P < 0.05$)为差异有统计学意义.

2 结果

结合临床病理学特征, 发现*kiss-1* mRNA表达水平在TNM I - II、无肿瘤周围静脉侵袭以及无远处淋巴结转移的患者明显高于TNM III-IV、有肿瘤周围静脉侵袭和有远处淋巴结转移者 ($P < 0.05$). 不同临床病理学特征胃癌组织中*kiss-1* mRNA表达见表2及图1.

3 讨论

目前, 癌症是威胁人类健康的第一杀手, 大多数患者死于癌症的转移. 如果肿瘤转移得到控制, 将大幅度提高肿瘤患者的生存期限和生活质量^[1,2]. 因此, 揭示肿瘤侵袭和转移的分子机制是当今肿瘤研究的焦点. *kiss-1*是继nm23后1996年首先由Lee等^[3]使用修饰递减杂交技术, 在黑色素瘤细胞系中分离鉴别的另一种新近发现的与肿瘤转移有关的肿瘤转移抑制基因. *kiss-1*基因定位于染色体1q32-q41, 有4个外显子, 编码1个大小为145个氨基酸的亲水性蛋白^[4-7]. Kotani等^[8]报道1个由*kiss-1*蛋白的68-121个氨基酸残基构成的54个氨基酸残基肽, 在孤儿G蛋白偶联受体(orphan G protein-coupled receptors, GPCRs)上显示拮抗活性的天然多肽, 这种*kiss-1*多肽能明显抑制肿瘤细胞的化学趋向性和侵袭性, 并限制肿瘤细胞的迁移蠕动功能, 从而抑制恶性肿瘤的侵袭和转移. 随后应用RT-PCR、原位杂交及免疫组织化学等方法, 研究发现*kiss-1*基因在包括甲状腺、乳腺、心脏、肝脏、胃、结肠、肾脏、胰腺、膀胱、卵巢等多种正常组织中广泛表达, 在肿瘤存在转移、进展快、预后差者表达阴性或缺失, 而*kiss-1*阳性率高者肿瘤进展慢、淋巴结及远处转移率低、预后好^[9-17]. 这些研究结果进一步印证了*kiss-1*为恶性肿瘤重要的转移抑制基因, 是评估恶性肿瘤侵袭和转移潜能及预后的重要标志物^[10-11,18-19].

本试验结果显示: *kiss-1* mRNA表达在肿瘤分期方面相比较差异有显著性($P < 0.05$); *kiss-1* mRNA在不同分化的胃癌组织中*kiss-1* mRNA表达组间比较差异无显著性, 表明*kiss-1*参与胃癌的发生发展过程, 可能和*kiss-1*通过信号传导通路促使细胞内第二信使DAG和IP3产生, 导致细胞内钙离子水平增加, 进而抑制肿瘤细胞的增殖、诱导其凋亡有关^[20].

本试验结果显示: *kiss-1* mRNA在有肿瘤周围静脉侵袭以及远处淋巴结转移的胃癌患者表达率降低, 与无肿瘤周围静脉侵袭($P < 0.01$)以及

研究前沿
研究发现*kiss-1*基因的表达下降或缺失与包括黑色素瘤、乳腺癌、膀胱癌、食管癌、肝癌、胰腺癌、结肠癌等多种疾病的进展和转移密切相关, *kiss-1*基因及其蛋白产物为临床癌症转移的治疗提供了新的靶点, 亟待研究的问题是*kiss-1*基因抑制肿瘤转移的具体机制和如何利用他进行抑制治疗.

创新亮点
本文运用麻醉条件下胃镜活检组织检测*kiss-1*基因的表达水平, 取得了与检测病理标本基因表达情况相似的结果, 创新点在于无痛和微创技术.

应用要点
手术前通过胃镜活检组织检测 *kiss-1* 基因的表达水平, 可以预先检测并分析胃癌的分期及预后, 对于临床有一定的指导意义, 从而为患者制定最佳治疗方案并可节约医疗成本。

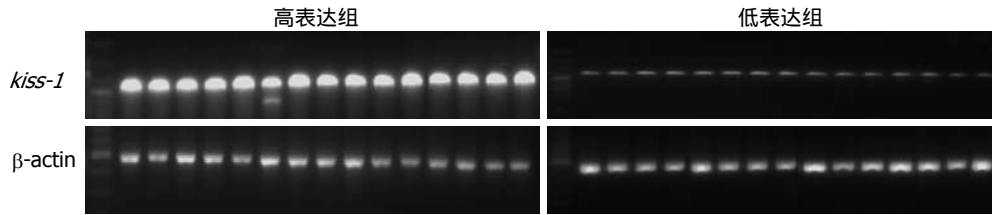


图 1 *kiss-1* mRNA低表达及高表达。

表 1 RT-PCR的引物序列

引物名称	引物序列	退火温度(°C)
<i>kiss-1</i>	上游引物 5'-GCCATTAGAAAAGGTGGCCTC-3'	55
	下游引物 5'-CCAGTTGTAGTTCGGCAGGTCCTC-3'	
β-actin	上游引物 5'-GATTCCTATGTGGGCGACGAG-3'	55
	下游引物 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3'	

表 2 不同临床病理特征胃癌组织中*kiss-1*蛋白的表达

	高表达	低表达	<i>t</i> 值	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
肿瘤大小(cm)	6.7 × 4.3	6.5 × 5.3	1.36	1.74	0.374
分化程度					
高	9	8	0.00	1.00	1.000
中/低	6	7			
肿瘤分期					
/	12	5	1.87	1.00	0.025
/	3	10			
静脉侵袭					
阳	4	12	3.51	1.22	0.009
阴	11	3			
远处转移					
有	2	7	2.26	2.17	0.009
无	13	8			

远处淋巴结转移($P \leq 0.01$)的胃癌患者表达率相比, 差异有显著性; 表明*kiss-1*参与胃癌浸润转移过程, 可能是*kiss-1*可通过调节细胞质内抑制性IκBα降解胞质中p65/p50 NF-κB蛋白, 使其与MMP-9启动子的结合降低, 从而减少MMP-9的合成, 导致细胞外基质降解减少、细胞间黏附能力增强及肿瘤细胞移行能力下降, 进而抑制肿瘤细胞的侵袭性^[14-21]。

本研究采用微创、无痛的方式取得胃肠中活检组织, 可以对肿瘤的分期及预后进行早期判定, 方法简单、方便、价格低、易为患者接受, *kiss-1*基因表达缺失或下调在胃癌的发展、侵袭及转移过程中发挥重要的作用^[2,22], 可已成为判断肿瘤已发生侵袭和转移的重要的生物学标志; 并且可以把*kiss-1*基因作为靶点对肿瘤转

移进行基因治疗^[23-25]。*kiss-1*基因在胃癌发生、发展及浸润、转移过程中的具体作用机制还有待于进一步的研究。

志谢: 感谢哈尔滨市第一医院科教科崔艳科长在研究工作中给予的大力帮助。

4 参考文献

- Dhar DK, Kubota H, Tachibana M, Kinugasa S, Masunaga R, Shibakita M, Kohno H, Nagasue N. Prognosis of T4 gastric carcinoma patients: an appraisal of aggressive surgical treatment. *J Surg Oncol* 2001; 76: 278-282
- 张延新, 任亮, 宁文刚, 杜华贞, 陈奎生, 张云汉. *kiss-1* 蛋白在胃癌中的表达及临床病理意义. *广东医学* 2008; 29: 2035-2036
- Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1731-1737
- West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics* 1998; 54: 145-148
- Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 2001; 276: 28969-28975
- Janneau JL, Maldonado-Estrada J, Tachdjian G, Miran I, Motté N, Saulnier P, Sabourin JC, Coté JF, Simon B, Frydman R, Chaouat G, Bellet D. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by normal and tumoral trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5336-5339
- Dun SL, Brailoiu GC, Parsons A, Yang J, Zeng Q, Chen X, Chang JK, Dun NJ. Metastatin-like

- immunoreactivity in the rat medulla oblongata and spinal cord. *Neurosci Lett* 2003; 335: 197-201
- 8 Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276: 34631-34636
- 9 Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ, Burch HB, Schuppert F, Burman KD, Saji M. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2399
- 10 Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KiSS-1 in bladder cancer: loss of KiSS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Am J Pathol* 2003; 162: 609-617
- 11 Ikeguchi M, Yamaguchi K, Kaibara N. Clinical significance of the loss of KiSS-1 and orphan G-protein-coupled receptor (hOT7T175) gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1379-1383
- 12 Stark AM, Tongers K, Maass N, Mehdorn HM, Held-Feindt J. Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 191-198
- 13 Hata K, Dhar DK, Watanabe Y, Nakai H, Hoshiai H. Expression of metastin and a G-protein-coupled receptor (AXOR12) in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43: 1452-1459
- 14 Hou YK, Wang Y, Cong WM, Wu MC. [Expression of tumor metastasis-suppressor gene KiSS-1 and matrix metalloproteinase-9 in portal vein tumor thrombus of hepatocellular carcinoma] *Ai Zheng* 2007; 26: 591-595
- 15 Wang ZH, Feng XS, Wang GP, Gao SG, Mi JQ, Sun JT, Qu ZF, Han J, Zhang L. [Expression and clinical significance of KiSS-1 and E-cadherin in gastric cardia carcinoma] *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2007; 10: 380-382
- 16 Shengbing Z, Feng LJ, Bin W, Lingyun G, Aimin H. Expression of KiSS-1 gene and its role in invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Anat Rec (Hoboken)* 2009; 292: 1128-1134
- 17 桑温昌, 何庆泗, 孙充兵. Kiss-1和kai-1在大肠癌组织中的表达及临床意义. *中国现代普通外科进展* 2009; 12: 398-401
- 18 Dhar DK, Naora H, Kubota H, Maruyama R, Yoshimura H, Tonomoto Y, Tachibana M, Ono T, Otani H, Nagasue N. Downregulation of KiSS-1 expression is responsible for tumor invasion and worse prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 111: 868-872
- 19 Yao HL, Yang ZL, Li YG, Liu GW. [In situ hybridization study on the expression of Kiss-1 and KAI-1 metastasis suppressor genes in gastric cancer] *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2007; 10: 274-277
- 20 Rao JS, Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M, Lakka SS. MMP-9 short interfering RNA induced senescence resulting in inhibition of medulloblastoma growth via p16(INK4a) and mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 2007; 67: 4956-4964
- 21 Hori A, Honda S, Asada M, Ohtaki T, Oda K, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Onda H, Kurokawa T, Nishimura O, Fujino M. Metastin suppresses the motility and growth of CHO cells transfected with its receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 958-963
- 22 Mead EJ, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Kisspeptins: a multifunctional peptide system with a role in reproduction, cancer and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 1143-1153
- 23 王战会, 冯笑山. 肿瘤转移抑制基因kiss-1的研究进展. *临床肿瘤学杂志* 2006; 11: 553-555
- 24 Iiizumi M, Liu W, Pai SK, Furuta E, Watabe K. Drug development against metastasis-related genes and their pathways: a rationale for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1786: 87-104
- 25 Shoji S, Tang XY, Umemura S, Itoh J, Takekoshi S, Shima M, Usui Y, Nagata Y, Uchida T, Osamura RY, Terachi T. Metastin inhibits migration and invasion of renal cell carcinoma with overexpression of metastin receptor. *Eur Urol* 2009; 55: 441-449

同行评价
本文科学性和可读性能反映胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

编辑 李军亮 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》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)

中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的系统评价

盛颖玥, 邹晓平, 于成功, 吕瑛, 张丽莉

背景资料
重症急性胰腺炎(SAP)由于其病因和发病机制复杂, 近年来通过对胰酶作用、细胞因子、炎症介质、血液滤过、营养支持等在SAP发病中作用的研究, 为提高SAP治愈率提供了有力的理论基础支持。SAP的治疗应是综合性的, 中西医结合治疗SAP有大量文献报道其疗效显著。

盛颖玥, 邹晓平, 于成功, 吕瑛, 张丽莉, 南京大学医学院附属鼓楼医院消化内科 江苏省南京市 210008
盛颖玥, 南京中医药大学 江苏省南京市 210008
作者贡献分布: 此课题由邹晓平、于成功、吕瑛共同设计; 研究过程由盛颖玥、张丽莉操作完成; 数据分析、论文写作由盛颖玥完成。
通讯作者: 邹晓平, 主任医师, 210008, 江苏省南京市, 南京大学附属鼓楼医院消化内科。zouxiaoping795@hotmail.com
电话: 025-83106666
收稿日期: 2009-12-01 修回日期: 2010-01-04
接受日期: 2010-01-11 在线出版日期: 2010-03-08

Adjuvant treatment of severe acute pancreatitis with rhubarb: a systematic review

Ying-Yue Sheng, Xiao-Ping Zou, Cheng-Gong Yu, Ying Lv, Li-Li Zhang

Ying-Yue Sheng, Xiao-Ping Zou, Cheng-Gong Yu, Ying Lv, Li-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Ying-Yue Sheng, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Xiao-Ping Zou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, Jiangsu Province, China. zouxiaoping795@hotmail.com
Received: 2009-12-01 Revised: 2010-01-04
Accepted: 2010-01-11 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To compare the efficacy of rhubarb in the adjuvant treatment of severe acute pancreatitis.

METHODS: The following electronic biological databases were searched: Medline (1966 to 2009), Chinese Biological Medical Database (CBMdisk, 1978 to 2009), CNKI (1994 to 2009) and CQVIP (1989 to 2009). A manual search of relevant journals and conference proceedings was also performed. Randomized controlled trials (RCT) evaluating the efficacy of rhubarb in the adjuvant treatment of severe acute pancreatitis were collected. The retrieved studies were screened according to predefined inclusion and exclusion criteria, and the quality of included studies was evaluated. A meta-analysis was then performed using RevMan 4.2 software.

同行评议者
刘凤斌, 教授, 广州中医药大学第一附属医院消化内科

RESULTS: A total of 10 studies were included into the analysis. Compared with control patients, patients adjunctively treated with rhubarb had significantly faster relief of abdominal pain (WMD = -2.14; 95 confidence interval (CI): -2.57, -1.70; $P < 0.01$), and lower incidence of complications (RR = 0.49; 95%CI: 0.36, 0.65; $P < 0.01$). However, there was no significant difference in hospital mortality between the two groups of patients (RR = 0.54; 95%CI: 0.25, 1.13; $P = 0.10$).

CONCLUSION: Adjuvant therapy of severe acute pancreatitis with rhubarb can decrease the incidence of complications and shorten the time of abdominal pain, but can not improve hospital mortality.

Key Words: Integrated Chinese and Western medicine; Rhubarb; Severe acute pancreatitis; Meta-analysis; Systematic review

Sheng YY, Zou XP, Yu CG, Lv Y, Zhang LL. Adjuvant treatment of severe acute pancreatitis with rhubarb: a systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 730-735

摘要

目的: 评价中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的疗效。

方法: 检索2009-06以前Medline、中国生物医学文献数据库(CBMdisk, 1978-2009)、中国期刊全文数据库(CNKI, 1994-2009)、维普数据库(1989-2009)发表的有关中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎疗效的随机对照临床试验并手工检索相关文献, 按入选和排除标准选择试验、评价入选文献的质量, 提取相关数据, 采用RevMan4.2软件进行统计学分析。

结果: 共有10项临床试验纳入本研究, 大黄辅助治疗组腹痛缓解时间(WMD = -2.14, 95%CI: -2.57, -1.70; $P < 0.01$)、并发症发生率(RR = 0.49; 95%CI: 0.36, 0.65; $P < 0.01$)均明显低于对照组, 差异有统计学意义。病死率(RR = 0.54; 95%CI: 0.25, 1.13; $P = 0.10$)与对照组比较无统计学意义。

结论: 中药大黄辅助治疗SAP能显著降低患者并发症发病率, 并能缩短患者腹痛持续时间, 但对于降低死亡率与对照组无区别. 中药大黄辅助治疗SAP值得临床推广应用.

关键词: 中西医; 大黄; 重症急性胰腺炎; Meta分析; 系统评价

盛颖明, 邹晓平, 于成功, 吕瑛, 张丽莉. 中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的系统评价. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 730-735
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/730.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床上常见急腹症之一, 发病率约为每10万人5.4-79.8例, 死亡率为10%-15%; 其严重程度从自限性的轻型胰腺炎到威胁生命的双重胰腺炎不等, 其中约20%可发展成重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)^[1-3]. SAP起病急、进展快, 病情复杂, 临床病理变化多端, 早期即可发生全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官衰竭(multiple organ failure, MOF), 严重危害人类生命健康. 近年来, 随着医学科学的发展, 特别是生长抑素的应用和外科重症监护技术(SICU)等的进步, SAP病死率已有所下降. 目前SAP的治疗已从以往主张早期积极手术、规则性胰腺切除的方式转变到主张以个体化综合内科保守治疗为主的治疗方案^[4], 其临床效果明显, 病死率已降至20%-30%^[5], 其中具有中国特色的中西医结合治疗SAP的研究也取得了很大进展, 引起了医学界的关注. 大量文献表明^[6-7], 中西医结合治疗SAP相对于单纯西医治疗具有相当优势, 2000年杭州会议重症急性胰腺炎诊治草案^[8]就已建议将中药大黄、芒硝纳入非手术治疗范畴. 但是由于在临床治疗性研究中方法学应用不够规范, 且样本量都较小, 在一定程度上影响了研究结论的真实性和可重复性, 研究结果难以得到国外医学界的承认, 以致中西医结合治疗SAP的方法难以得到推广应用. 此外国内SAP的临床研究主要集中在病例报道及回顾性研究上, 前瞻性RCT研究较少, 论证力度较弱, 为此, 本研究参照Cochrane系统评价方法, 对国内外有关文献进行系统评价, 旨在明确中药大黄辅助治疗SAP的临床疗效.

1 材料和方法

1.1 材料 初检所得文献共计3 040篇, 其中10篇检索于Medline(1966-2009), 检索词主题为“Severe Acute Pancreatitis”、“Chinese Medic”“Traditional”; 2 301篇检索于中国生物医学文献数据库(CBMdisk, 1978-2009): 1 964篇检索主题为“胰腺炎, 急性坏死性/DT/TH/ZJ/ZH/ZD/ZY”、337篇检索主题为“胰腺炎”、检索词 = “胰腺炎, 急性坏死性/DT/ZJ/ZB/ZH/ZD/ZY”、“随机 or 对照”; 569篇检索于维普数据库(1989-2009): 157篇检索词为关键词 = “重症胰腺炎”、关键词 = “中西医”, 38篇检索关键词 = “重症胰腺炎”、关键词 = “中药”, 26篇检索关键词 = “重症胰腺炎”、关键词 = “中医药”, 236篇检索关键词 = “重症急性胰腺炎”, 55篇检索关键词 = “中西医”、关键词 = “重症急性胰腺炎”、关键词 = “中药”, 34篇检索关键词 = “重症急性胰腺炎”、关键词 = “中医药”, 23篇检索关键词 = “急性出血性胰腺炎”; 160篇检索于中国期刊全文数据库(CNKI, 1994-2009): 81篇检索词为关键词 = “重症胰腺炎”并且“治疗”并且“中西医”或“中医”或者“中药”, 46篇关键词 = “重症急性胰腺炎”、关键词 = “中西医结合治疗”, 20篇关键词 = “坏死性胰腺炎”并且“治疗”并且“中西医”或“中医”或“中药”, 13篇关键词 = “出血性胰腺炎”并且“治疗”并且“中西医”或“中医”或“中药”.

1.2 方法

1.2.1 纳入与排除标准: 纳入标准: (1)受试者性别、病因不限, 年龄>16岁; (2)有SAP的具体诊断标准, 诊断标准参照[(1992-05在第四届会议上制定的诊断标准/重症急性胰腺炎的临床诊断标准及分级标准1996年第二次方案)/2000年杭州会议之重症急性胰腺炎诊治草案/2001年中华医学会外科学分会胰腺学组修订的《重症急性胰腺炎诊治原则草案》标准/2002-03曼谷世界胃肠病大会制订的SAP诊断标准/2004年中国急性胰腺炎诊治指南(草案)]; (3)随机对照试验(RCTs), 有西医常规治疗作为对照组, 且两组观察例数明确, 病例年龄、性别、病情等具有可比性(注: 对照组为常规治疗, 禁食、补液、抑制胰液分泌和营养支持等, 治疗组在对照组常规治疗基础上加用中药大黄辅助治疗); (4)必须包括终点指标数据中至少1项(终点指标: 腹痛缓解

研究前沿
系统评价是目前研究的热点, 中西医结合治疗SAP临床有显著的优势, 但国内SAP临床研究主要集中在病例报道和回顾性研究, 且治疗方法、用量等均有异同, 而前瞻性RCT研究相对较少, 论证力度较弱, 研究结果难以得到推广应用.

相关报道
崔乃强等做了中西医结合治疗SAP的中药筛选;胡石甫等行Meta分析中西医结合治疗SAP较单纯西医治疗有明显优势。

表1 各研究特征及质量评价

研究者	随机方法	隐蔽分组	盲法	失访或退出	ITT分析	基线相似性	研究人数(n/n)	研究方案	疗效指标
贾国强等 ^[10]	Doll式	未提及	未提及	0	-	相似	81/72	大黄(灌胃/灌肠) vs 常规	H+I
刘学良等 ^[11]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	35/27	大黄(灌胃/灌肠) vs 常规	I
李玉明等 ^[12]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	30/30	大黄(灌胃/口服) vs 常规	I
田辉等 ^[13]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	20/20	大黄(灌肠) vs 常规	H+I
幸军等 ^[14]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	16/15	大黄(灌胃/口服) vs 常规	A+I
袁楚明等 ^[15]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	26/22	大黄(灌胃/口服) vs 常规	A+H+I
赵珂等 ^[16]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	34/34	大黄(灌胃/口服) vs 常规	I
曾艳等 ^[17]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	42/40	大黄(灌胃/口服) vs 常规	A
薄世宁等 ^[18]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	20/17	大黄(灌胃/口服) vs 常规	A
李小荣等 ^[19]	不清楚	未提及	未提及	0	-	相似	18/20	大黄(灌胃/口服) vs 常规	A

A = 腹痛缓解时间(d); H = 并发症发生; I = 死亡。

时间, 并发症发生率及病死率); (5)在专业杂志公开发表的文献; 排除标准: (1)半随机对照试验(qRCTs); (2)未提供SAP诊断标准; (3)未提供研究所需终点指标; (4)文献未设对照组; (5)对照组中有其他中药治疗成分; (6)治疗组干预措施中除中药药物治疗外还有其他辅助干预处理如针灸等, 或施行了对照组未使用的其他西医治疗方法; (7)原始数据记录不完整而无法利用的文献, 重复发表的文献。

1.2.2 质量评价: 各纳入研究的方法学质量评价采用Cochrane手册4.2^[9]推荐的简单评估法。评价条目包括评价随机对照试验外部与内部真实性的关键指标: (1)随机方法是否正确; (2)是否做到分配隐藏, 分配隐藏是否充分; (3)是否实施盲法; (4)是否报告失访和退出情况, 如有失访或退出是否采用意向治疗(ITT)分析; (5)基线资料是否可比。对于分配隐藏, 将试验评为A(完全隐藏)、B(不清楚是否隐藏)、C(隐藏不充分)和D(没有使用隐藏)4个等级。在其他方面将试验评为A(是)、B(不清楚)、C(否)3级。如各评价条目均为A级, 则为低度偏倚, 发生各种偏倚的可能性最小, 质量评为A级; 若有一个条目或多个条目为B, 则该试验有发生相应偏倚的中等度可能性, 质量评为B级; 如其中有一个条目或多个条目为C, 则该试验有发生相应偏倚的高度可能性, 质量评为C级。

1.2.3 资料提取: 提取的主要资料包括: (1)试验的基本情况、两组患者的基线情况和疾病状况; (2)试验设计、研究时间和干预措施、结局测量指标; (3)反应研究质量的指标。

统计学处理 采用RevMan 4.2(Review

Manager)进行固定或随机效应模型的Meta分析, 并作森林图和漏斗图。计数资料采用相对危险度(RR)为疗效分析统计量; 计量资料采用加权均数差(WMD), 各效应量均以95%CI表示。各纳入研究结果间的异质性采用 χ^2 检验, 若纳入研究间的差异没有统计学意义时($P \geq 0.1$, $I^2 \leq 50\%$), 采用固定效应模型进行分析。若各研究间存在统计学上的异质性($P < 0.1$, $I^2 > 50\%$), 先分析异质性来源, 去除异质性。如异质性仍存在, 但临床上提示存在同质性, 可进行合并, 则应用随机效应模型进行Meta分析。若异质性过大导致不能合并则采用描述性分析。对因研究方法学不同导致的异质性, 则进行敏感性分析, 剔除权重最大的研究后对Meta分析结果的稳定性进行评价。

2 结果

2.1 文献检索结果 查阅所获资料的参考文献, 手工检索相关文献并获取全文, 剔除动物实验、综述、个案、重复发表文献以及与SAP无关的文献, 共获得中药大黄治疗SAP临床随机对照试验中文文献10篇符合入选和排除标准纳入本研究, 各研究的具体情况见表1。

2.2 纳入研究文献的质量评价 (1)随机分配方法: 所有或多条质量评价标准仅部分满足(或不清楚), 所有文献在文中都有“随机”字样, 其中有1篇按照Doll式分配法, 其他文献均无具体随机方法, 因此, 9个研究都存在选择性偏倚的高度可能性; (2)分配方案隐藏: 10个研究均未说明是否隐藏了分配方案。因此, 10个研究都存在选择性偏倚的高度可能性; (3)盲法: 所有研究均不清楚盲法的使用, 这些研究均存在实施和测量偏

应用要点
 中药大黄辅助治疗SAP是具有中国特色的治疗方案, 本研究表明, 中药结合西医治疗SAP能显著缩短患者腹痛缓解时间, 降低并发症发生率, 临床疗效显著。

表 2 两组患者腹痛缓解时间

Study or sub-category	n	治疗组 (mean ± SD)	n	对照组 (mean ± SD)	WMD (fixed) 95%CI	Weight(%)	WMD (fixed) 95%CI
01大黄							
曾艳 2007	42	2.30 ± 1.40	40	4.20 ± 2.00	—■—	3.82	-1.90 [-2.65, -1.15]
薄世宁 2000	20	4.85 ± 2.28	17	6.82 ± 2.27	—■—	0.99	-1.97 [-3.44, -0.50]
李小荣 2003	18	12.40 ± 4.10	20	18.50 ± 3.30	◀	0.38	-6.10 [-8.48, -3.72]
辛军 2004	16	2.70 ± 1.20	15	4.90 ± 2.50	—■—	1.11	-2.20 [-3.60, -0.80]
袁楚明 2007	26	4.01 ± 0.42	22	6.05 ± 1.52	—■—	5.01	-2.04 [-2.70, -1.38]
95%CI	122		114		◆	11.30	-2.14 [-2.57, -1.70]
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 11.15$, $df = 4$ ($P = 0.02$), $I^2 = 64.1\%$							
Test for overall effect: $Z = 9.61$ ($P < 0.00001$)							

表 3 两组患者并发症发生率

Study or sub-category	治疗组 (n/n)	对照组 (n/n)	RR (fixed) 95%CI	Weight(%)	RR (fixed) 95%CI
田辉 2005	7/20	12/20	—■—	15.82	0.58 [0.29, 1.17]
贾国强 2006	25/81	47/72	—■—	65.61	0.47 [0.33, 0.68]
袁楚明 2007	7/26	13/22	—■—	18.57	0.46 [0.22, 0.94]
Total(95%CI)	127	114	◆	100.00	0.49 [0.36, 0.65]
Total events: 39(治疗组), 72(对照组)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 0.32$, $df = 2$ ($P = 0.85$), $I^2 = 0\%$					
Test for overall effect: $Z = 4.76$ ($P < 0.00001$)					

0.1 0.2 0.5 1 2 5 10
 Favours治疗组 Favours对照组

倚的可能性; (4)失访或退出:所有研究均未报道失访情况和进行ITT分析, 表明10个研究都存在损耗偏倚的可能性; (5)均交待基线情况. 由此可见, 仅1个研究^[10]质量较好, 为B级, 其余试验均为低质量研究, 研究质量为C级(表1).

2.3 纳入研究的临床特点 10个研究共包括受试对象605例(治疗组322例, 对照组283例), 大黄用量: 5 g tid 1篇^[16]; 10 g bid 1篇^[13]; 15 g bid 2篇^[10,19]; 20 g bid 2篇^[17]; 30 g bid 3篇^[11,14,18]; 50 g bid 2篇^[12,15]. 大黄用法有灌胃、口服或灌肠, 所有文献均未报道不良及严重不良事件(表1).

2.4 疗效分析结果 各纳入研究评价了腹痛缓解时间, 并发症发生率及死亡率等指标, 但因纳入的结局指标不完全相同, 故本研究对其分别进行了分析.

2.4.1 2组患者腹痛缓解时间: 见表2, 共有5项研究提供了患者腹痛缓解时间, 这些研究包括236例研究对象, 其中治疗组122例, 对照组114例, 各项研究异质性检验无明显异质性($\chi^2 = 11.15$, $P = 0.02$), 采用固定效应模型, 结果显示大黄辅助治

疗SAP缓解腹痛的时间显著短于对照组[WMD = -2.14, 95%CI: (-2.57)-(-1.70), $P < 0.01$]. 敏感性分析, 用随机效应模型替代固定效应模型来考察结论的稳定性, 两种方法结果基本一致, 稳定性较好[WMD = -2.39, 95%CI: (-3.23)-(-1.55), $P < 0.01$].

2.4.2 并发症发生率: 如表3, 共纳入3项研究, 这些研究包括241例研究对象, 其中治疗组127例, 对照组114例. 治疗组并发症发患者数39例, 对照组并发症发患者数72例. 异质性检验无明显异质性($\chi^2 = 0.32$, $P = 0.85$), 因此采用固定效应模型, 表明大黄辅助治疗SAP后患者并发症发生率显著降低(RR = 0.49, 95%CI: 0.36-0.65, $P < 0.01$). 敏感性分析, 随机效应模型替代分析效应量, 仍然得出以上相同结论, 证明Meta分析结果的稳定性较好(RR = 0.49, 95%CI: 0.36-0.66, $P < 0.01$).

2.4.3 两组患者死亡率: 如表4, 7项研究提供了死亡例数指标, 这些研究包括462例研究对象, 其中治疗组242例, 对照组220例. 治疗组最终死亡

同行评价
本文从循证医学角度对中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎进行了系统评价,对指导临床和相关研究具有一定的实用价值和指导意义。

表 4 两组患者死亡率

Study or sub-category	治疗组 (n/n)	对照组 (n/n)	RR (fixed) 95%CI	Weight(%)	RR (fixed) 95%CI
刘学良 2003	1/35	2/27	← 0.39 [0.04, 4.03]	12.70	0.39 [0.04, 4.03]
李玉明 2004	1/30	1/30	← 1.00 [0.07, 15.26]	5.83	1.00 [0.07, 15.26]
辛军 2004	1/16	1/15	← 0.94 [0.06, 13.68]	5.81	0.94 [0.06, 13.68]
田辉 2005	2/20	5/20	← 0.40 [0.09, 1.83]	28.13	0.40 [0.09, 1.83]
贾国强 2006	1/81	4/72	← 0.22 [0.03, 1.94]	23.83	0.22 [0.03, 1.94]
赵柯 2006	1/34	1/34	← 1.00 [0.07, 15.34]	5.63	1.00 [0.07, 15.34]
袁楚明 2007	3/26	3/22	← 0.85 [0.19, 3.78]	18.28	0.85 [0.19, 3.78]
Total(95%CI)	242	220	◀ 0.54 [0.25, 1.13]	100.00	0.54 [0.25, 1.13]
Total events: 10(治疗组), 17(对照组)					
Test for heterogeneity: $\chi^2 = 1.78$, $df = 6$ ($P = 0.94$), $I^2 = 0\%$					
Test for overall effect: $Z = 1.63$ ($P = 0.10$)					

0.1 0.2 0.5 1 2 5 10
Favours治疗组 Favours对照组

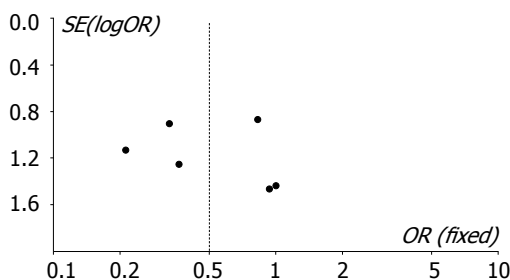


图 1 文献发表偏倚。

人数10例,对照组死亡人数17例。异质性检验无明显异质性($\chi^2 = 1.78$, $P = 0.94$),因此采用固定效应模型,表明中药大黄辅助治疗SAP后患者最终死亡率与对照组无统计学差异($RR = 0.54$, $95\%CI: 0.25-1.13$, $P = 0.10$)。

2.5 文献发表偏倚 从中医药辅助治疗SAP死亡率Meta分析的漏斗图(图1)可看出,倒漏斗状对称分布,散在基底部,稍有些不对称,显示存在发表偏倚,漏斗尖部不明显,表明高质量大样本文献少。

3 讨论

研究结论效果越好的(阳性结论)文章越容易发表,效果较差或阴性结果的文章不易发表,此即为发表偏倚。本研究纳入的10篇文献终点指标全部为阳性结果,存在严重的发表偏倚,这与文献报道的一致^[20]。再者,本研究录入的文献研究质量不高,缺少高质量的RCT文献支撑。

本研究纳入的10篇文献中大黄治疗SAP常用的治疗方法有灌胃、灌肠,用量则颇有区

别: 5、10、20 g各1篇; 15、50 g各2篇; 30 g 3篇。用量区别颇大,大黄是安全、毒性较低的药物, SAP由于肠道动力障碍,故应加大大黄用量。2001年中华医学会外科学分会胰腺学组修订的《重症急性胰腺炎诊治原则草案》标准推荐大黄用法为15 g bid灌胃或灌肠,有人研究30、60、90 g大黄灌胃,结果表明30 g效果最佳,因此大黄的标准基础用量还有待进一步规范。

我们采用Meta分析方法对纳入10例研究进行了合并分析,结果显示: (1)中药结合西医治疗SAP能显著缩短患者腹痛缓解时间,降低并发症发生率。各项研究异质性统一,分析结果稳定性好,有极显著统计学意义($P < 0.01$); (2)本研究大黄辅助治疗SAP对于降低死亡率无优势($P = 0.10$),考虑与研究文献样本量小有关,也与大黄用量的不统一相关,有待进一步研究统计; (3)单药大黄其功用颇多,主为通里攻下、清热利胆,其有效药物成分是大黄蒽醌,可抑制厌氧菌感染,促进肠蠕动,清除肠麻痹;维持肠道菌群平衡,保护肠道黏膜屏障,抑制肠道细菌易位和内毒素的吸收,其中研究较多的主要成分大黄素可干预凋亡调控基因,诱导胰腺腺泡细胞凋亡,从而避免或减少胰酶及炎症介质释放,阻断发病环节,还可调控细胞增殖和分化,加速胰腺组织的再生和修复^[21]。因此,在中药大黄辅助治疗SAP的研究中,我们应该进一步寻找、建立并评价更适合、更规范的治疗指导,以形成统一标准指导临床治疗。

本研究所纳入的文献存在如下问题: (1)纳入研究质量均不高:全部为国内研究,在纳入的

10个研究中, 仅1篇按照Doll式分配法, 其他文献均无具体随机方法, 所有试验也没有随机分配方案的隐藏, 这些均可导致试验的高度选择性偏倚. 所有研究均未提及盲法, 这些可能导致实施和测量性偏倚, 影响到试验的质量. 纳入研究样本量大多较小, 10个试验共纳入605例患者. 因此该研究人群的代表性较差, 最终使该系统评价的推广性受到限制; (2)纳入文献均未提及治疗过程中出现的不良反应及例数, 无法做安全性分析, 不利于推广应用. 长期以来人们普遍认为中药没有或少有不良反应, 但近年来国内外对中药毒性和不良反应的报道屡有出现^[22], 因此在进一步的临床试验中对中西医结合治疗的疗效及不良反应应予以同等的重视.

总之, 中药大黄辅助治疗SAP为具有中国特色的“个体化”治疗, 具有显著的疗效, 在临床上占有一定治疗优势, 但由于本研究中符合纳入标准的RCT在质量上的局限, 还有待于严谨设计的大样本、多中心、规范统一用法用量, 随机、对照、安慰剂平行临床试验, 以提供更加充分的证据, 并在今后的临床研究中进一步验证及推广.

4 参考文献

- Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-S39
- Yousaf M, McCallion K, Diamond T. Management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003; 90: 407-420
- Karakan T, Ergun M, Dogan I, Cindoruk M, Unal S. Comparison of early enteral nutrition in severe acute pancreatitis with prebiotic fiber supplementation versus standard enteral solution: a prospective randomized double-blind study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2733-2737
- 张圣道, 张臣烈, 汤耀卿. 外科治疗胰腺炎198例疗效分析. 武汉: 第十二届全国外科学术会议, 1993: 72
- 黎介寿, 李维勤. 重症急性胰腺炎手术指征和时机的再认识. *中国实用外科杂志* 2003; 23: 513-51
- 胡石甫, 陈凌, 崔乃强. 重症急性胰腺炎中西医结合与西医治疗效果荟萃分析. *中国现代普外科进展* 2008; 11: 24-28
- 曲鹏飞, 崔强. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎病死率的Meta分析及中药筛选. *江苏中医药* 2008; 40: 76-77
- 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治草案(2000年杭州会议). *胰腺病学* 2001; 1: 46-48
- Alderson P, Green S, Higgins JPT. Cochrane Reviewers' Handbook 4.2.2 [updated March 2004]. In: *The Cochrane Library*, Issue 1, 2004
- 贾国强, 阳丹才让, 张伟. 生大黄在高海拔地区重症急性胰腺炎治疗中的临床观察. *陕西中医* 2006; 27: 1045-1101
- 刘学良, 金维, 刘进. 中西医结合治疗急性出血坏死性胰腺炎35例. *山西中医* 2003; 19: 25-26
- 李玉明, 樊锦河, 王亚明, 葛振明. 大黄联合西医综合治疗急性重症胰腺炎的价值探讨. *中华腹部疾病杂志* 2004; 4: 483-484
- 田辉, 王可富, 吴铁军. 大黄粉灌肠辅助治疗急性重症胰腺炎临床分析. *山东医药* 2005; 45: 41-42
- 幸军, 冯青青, 李春安, 樊拖迎. 善得定和生大黄联合应用治疗重症急性胰腺炎. *中华急诊医学杂志* 2004; 13: 468-469
- 袁楚明, 陈梦云, 李奕琰, 陈健芳. 早期应用生大黄对重症急性胰腺炎的疗效. *胰腺病学* 2007; 7: 31-33
- 赵珂, 李楠. 生大黄粉生长抑素八肽治疗重症急性胰腺炎. *医药论坛杂志* 2006; 27: 32-33
- 曾艳, 冯俊, 李树生, 杨光田. 施他宁联合大黄治疗重症急性胰腺炎42例临床分析. *临床内科杂志* 2007; 24: 709-711
- 薄世宁, 张淑文, 王宝恩. 中药大黄对急性出血坏死性胰腺炎治疗作用的研究. *中国中西医结合急救杂志* 2000; 7: 362-364
- 李小荣, 汤辉焕, 胡随瑜, 吴飞跃, 张阳德. 甘遂、大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的临床疗效研究. *湖南中医学院学报* 2003; 23: 46-49
- Tang JL, Zhan SY, Ernst E. Review of randomised controlled trials of traditional Chinese medicine. *BMJ* 1999; 319: 160-161
- 楼恺娴, 龚自华, 袁耀宗, 涂水平, 翟祖康, 徐家裕. 大黄素对急性胰腺炎胰腺组织TGF β 1表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2001; 21: 433-436
- 黄秋云. 浅谈中药的毒性和不良反应, 指导临床合理使用. *海峡药学* 2007; 19: 138-140

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

梗阻性左半结肠癌术前支架减压与急诊手术248例

徐琨, 张宏, 冯勇, 丛进春, 陈春生, 刘恩卿

背景资料
梗阻性结肠癌大多需要急诊手术治疗, 其预后较择期手术差的多, 出现各种并发症几率增加, 近年来采用结肠腔内支架置入治疗结肠癌梗阻被认为是安全有效的治疗方法。

徐琨, 张宏, 冯勇, 丛进春, 陈春生, 刘恩卿, 中国医科大学附属盛京医院结肠直肠肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110004
作者贡献分布: 徐琨、张宏、冯勇、丛进春、陈春生及刘恩卿贡献均等; 所有患者手术由张宏、冯勇、陈春生及刘恩卿完成; 研究思路由徐琨、冯勇、张宏及丛进春提出, 徐琨进行患者随访统计; 论文由徐琨、张宏及丛进春完成; 冯勇、陈春生及刘恩卿进行修改、校审。
通讯作者: 冯勇, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院结肠直肠肿瘤外科。
fengy@sj-hospital.org
收稿日期: 2009-12-03 修回日期: 2010-01-20
接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-08

Comparison of the outcomes of preoperative stent insertion and emergency surgery in the treatment of obstructive left-sided colorectal cancer: an analysis of 248 cases

Kun Xu, Hong Zhang, Yong Feng, Jin-Chun Cong, Chun-Sheng Chen, En-Qing Liu

Kun Xu, Hong Zhang, Yong Feng, Jin-Chun Cong, Chun-Sheng Chen, En-Qing Liu, Department of Colorectal Tumor Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Professor Yong Feng, Department of Colorectal Tumor Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. fengy@sj-hospital.org
Received: 2009-12-03 Revised: 2010-01-20
Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of self-expanding metallic stents (SEMSs) and to compare the short- and long-term outcomes of preoperative stent insertion and emergency surgery in the treatment of obstructive left-sided colorectal cancer.

METHODS: Sixty-two patients who underwent SEMS insertion and 186 patients who underwent primary emergency surgery for left-sided colorectal cancer from 2000 to 2008 were retrospectively analyzed.

RESULTS: The SEMSs were placed successfully in 61 patients, of which 14.5% developed complications such as perforating and migra-

tion. Primary anastomosis rate was higher in patients undergoing stent insertion than in those undergoing emergency surgery (87.1% vs 34.4%, $P = 0.001$). The complication rate was higher in patients undergoing emergency surgery than in those undergoing stent insertion (47.3% vs 17.7%, $P = 0.000$). No significant difference was noted in the survival curve between the two groups ($P = 0.497$).

CONCLUSION: Preoperative stent insertion is safe and effective in the treatment of obstructive left-sided colorectal cancer and may result in a higher primary anastomosis rate. Stent insertion does not seem to have a deleterious effect on prognosis.

Key Words: Obstructive colorectal cancer; Left side; Primary resection and anastomosis; Stent; Outcome

Xu K, Zhang H, Feng Y, Cong JC, Chen CS, Liu EQ. Comparison of the outcomes of preoperative stent insertion and emergency surgery in the treatment of obstructive left-sided colorectal cancer: an analysis of 248 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 736-740

摘要

目的: 评价梗阻性结肠癌支架置入的安全性, 比较支架减压后手术与急诊手术的短、长期效果。

方法: 回顾性分析2000-10/2008-02我院248例梗阻性左半结肠癌手术患者的临床资料, 按支架与否分为两组, 统计结肠镜下留置结肠腔内支架本身的成功率及并发症情况。比较两期切除吻合例数、吻合口漏、切口感染、脾撕裂、腹腔脓肿等短期并发症、住院期间死亡率及两组生存曲线。

结果: 内镜下留置结肠腔内镍钛记忆合金支架成功率98.4%, 总的并发症发生率14.5%, 其中严重并发症(穿孔、支架移位)发生率4.8%。

期吻合支架组明显高于急诊手术组(87.1% vs 34.4%, $P = 0.001$)。总的并发症支架组明显低于急诊手术组(17.7% vs 47.3%, $P = 0.000$)。

同行评议者
季加孚, 教授, 北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

两组患者2年生存曲线几乎重叠, 之后支架组生存率略高于急诊手术组, 但两组生存曲线比较无统计学差异($P = 0.497$).

结论: 对于梗阻性左半结直肠癌患者, 结肠镜下留置结肠腔内支架术前减压是一种比较理想的辅助方法, 增加一期切除吻合机会, 避免造口, 降低短期并发症, 长期生存率也较急诊手术有一定的提高.

关键词: 梗阻性结直肠癌; 左半; 一期切除吻合; 支架; 治疗结果

徐琨, 张宏, 冯勇, 丛进春, 陈春生, 刘恩卿. 梗阻性左半结直肠癌术前支架减压与急诊手术248例. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 736-740
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/736.asp>

0 引言

大肠癌是常见的消化系恶性肿瘤之一, 其发病率呈逐年上升趋势, 7%-47%的结直肠癌患者会出现急性梗阻^[1,2], 70%梗阻的肿瘤位于左半结肠及直肠乙状结肠交界处, 出现梗阻的患者85%需要急诊手术治疗, 其预后较择期手术差的多^[3,4]. 急诊手术的死亡率在15%-20%, 出现各种并发症高达45%-81%, 而择期手术的死亡率只有0.9%-6%^[5,6]. 近年来采用结肠腔内支架置入治疗结直肠癌梗阻被认为是安全有效的, 其作为术前减压已经被越来越多的人采纳, 但对于这一有创治疗的长期结果随访不多, 仅见于少数病例. 本文总结近8年来我院采用不同方法治疗的248例左半结直肠癌合并急性肠梗阻患者资料分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 回顾性分析2000-10/2008-02我院248例梗阻性左半结直肠癌手术患者的临床资料, 按支架与否分为两组: 支架组62例, 采用结肠镜下留置结肠腔内支架术前减压, 其中54例行I期切除吻合, 5例已经广泛转移的患者支架后放弃手术, 2例行择期Hartmann手术, 1例穿孔, 急诊Hartmann手术; 急诊手术组186例, 其中64例急诊减压后I期切除吻合, 其余122例急诊行Hartmann手术. 封闭式洗肠装置(日本, Create Medic公司).

1.2 方法

1.2.1 纳入标准: (1)术前CT或肠镜诊断脾曲及脾曲以下的结肠癌, 距肛门缘大于10 cm的直肠癌;

(2)术前有腹痛、腹胀肠梗阻表现, 立位腹平片有肠管扩张、见液气平面者; (3)术前无腹膜炎表现; (4)所有患者均未进行术前辅助化疗.

1.2.2 结肠镜下留置结肠腔内支架术前减压: 患者自愿选择支架与否, 所有支架置入由1名内镜医师完成. 结肠镜下留置结肠腔内支架: 纤维结肠镜达肿瘤狭窄部位后, 经活检通道导入导丝, 在X线透视下通过狭窄部, 经导丝引入导管注入适量造影剂, 了解肠道肿瘤部位、长度、狭窄程度及有无并发肠道穿孔, 决定选用支架的类型、型号, 再在内镜直视下将支架及输送器送到超出狭窄区域2 cm处, 使狭窄处位于支架的中部, 确定支架的位置无误后, 释放支架. 支架置入后患者开始排气排便, 腹痛腹胀逐渐改善. 术前常规口服肠道抑菌剂及口服洗肠液清洁肠道, 2 wk内行结直肠癌根治术.

1.2.3 急诊一期切除吻合的结直肠癌根治术: 选择基础状态较好、年龄<60岁、术前血清白蛋白>35 g/L、血红蛋白>100 g/L及不合并心肺疾病的患者, 经术中单纯减压或减压后灌洗, 急诊行I期切除吻合的结直肠癌根治术: (1)单纯减压I期切除吻合: 手术时先按常规根治术方法游离结肠, 断系膜血管, 在肿瘤远端肠管拟切断处裸化肠壁, 离断肠管, 近端闭锁后外提至远离切口, 贴近肿瘤切开肠壁, 插入直径2-3 cm的螺旋管并结扎紧, 螺旋管远端与手术台下塑料袋连接并扎紧袋口, 从扩张的小肠开始用手向结肠依次推挤, 反复数次, 至肠腔排空为止. 近端结肠根据肿瘤根治原则再切除一段, 然后行肠管端端或端侧吻合; (2)术中经阑尾残端结肠灌洗减压: 游离切断肠管及减压步骤同上. 减压后肠钳夹闭回肠末端, 从阑尾根部插入12号导尿管并固定, 导尿管与清洁灌肠袋连接, 用3-6 L生理盐水冲洗结肠清洁, 改用0.2%甲硝唑500 mL冲洗, 拔除导尿管, 行阑尾切除术, 切除吻合方法同上; (3)术中封闭式洗肠装置结肠灌洗减压: 游离切断肠管步骤同上. 经肿瘤近端肠管插入洗肠装置内配备的蛇皮管, 结扎固定, 经侧孔导入洗肠导管至盲肠, 导管接灌肠袋, 冲洗及吻合方法也同上. 患者当中: 18例经单纯减压I期切除吻合, 24例经阑尾残端结肠灌洗减压I期切除吻合, 22例行封闭式洗肠装置结肠灌洗减压I期切除吻合.

1.2.4 急诊Hartmann手术: 年龄>60岁、术前血清白蛋白<35 g/L、血红蛋白<100 g/L、基础状态较差的患者急诊行Hartmann术.

研究前沿
 支架后长期生存情况的统计分析, 需多中心、大样本长期随访统计.

相关报道
 国内外文献报道支架可以迅速解除梗阻、减少急诊手术及减少造口, 尤其可提高基础状态差患者的生活质量, 但对长期生存情况的报道不一.

创新盘点

本文从支架置入后短期及长期效果进行统计分析,病例数较多,统计结果有一定意义。

表 1 患者临床病理特征

	支架组(<i>n</i> = 62)	急诊手术组(<i>n</i> = 186)	<i>P</i> 值
年龄(岁)	64.18 ± 8.46	63.02 ± 8.65	0.347
男/女	38/24	112/74	0.881
位置			0.901
降结肠	23	65	
乙状结肠	30	96	
直肠	9	25	
肿瘤分化			0.676
高中分化	56	160	
低分化	5	21	
黏液腺癌	1	5	
TNM分期			0.351
I	9	28	
II	42	138	
III	11	20	

表 2 肠道支架置入情况

并发症	<i>n</i> (%)	结果
穿孔	1(1.6)	急诊手术(Hartmann术)
支架移位再梗阻	2(3.2)	急诊手术(期切除吻合)
少量出血	2(3.2)	择期手术(期切除吻合)
轻微腹痛	3(4.8)	择期手术(期切除吻合)
里急后重	1(1.6)	择期手术(期切除吻合)
合计	9(14.5)	

表 3 患者术后的短期效果

	支架组(<i>n</i> = 62)	急诊手术组(<i>n</i> = 186)	<i>P</i> 值
期切除吻合	54	64	0.001
并发症(%)			
吻合口瘘 ^M	3(4.8%)	14 ^N	0.574
切口感染	5(8.1%)	39	0.021
脾撕裂	0	5	0.335
腹腔内脓肿	1(1.6%)	8	0.457
肠梗阻需手术	0	6	0.341
切口疝	1	6	0.684
心血管意外	0	3	0.575
呼吸衰竭	1	4	1.000
导管脓毒症	0	3	0.575
总的并发症	11	88	0.000
住院死亡率	0	3	0.575

M: 吻合口瘘包括经造影证实的亚临床瘘; N: 期切除吻合的64例中的14例吻合口漏。

1.2.5 观察指标: 结肠镜下留置结肠腔内支架的成功率及并发症情况; 比较两组 I 期切除吻合例数、吻合口漏、切口感染、脾撕裂、腹腔脓肿等短期并发症、住院期间死亡率; 随访两组生存情况。

统计学处理 数据分析计量资料采用SPSS13.0软件包独立样本 t 检验分析; 计数资料采用SPSS13.0软件包的 χ^2 检验. 采用SPSS13.0软件的Kaplan-Meier法绘制生存曲线, 生存曲线运用时序检验Log2rank进行统计学分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床病理特征 两组研究对象在年龄、性别比例、肿瘤位置、肿瘤分化及TNM分期上相当($P > 0.05$, 表1)。

2.2 经内镜下留置结肠腔内镍钛记忆合金支架 本组经内镜下留置结肠腔内镍钛记忆合金支架成功率98.4%, 总的并发症发生率14.5%, 其中严重并发症(穿孔、支架移位)发生率4.8%; 1例穿孔, 急诊行Hartmann手术, 发生开展支架的初期; 2例因支架移位再梗阻, 急诊手术, 经术中肠道灌洗, 行 I 期吻合, 无吻合口瘘发生; 另外, 5例因肿瘤广泛转移, 支架后放弃手术; 其余56例支架置入后2 wk内行结直肠癌根治术; 其中2例因盆腔多发种植病灶而行Hartmann手术. 支架后 I 期吻合共54例(表2)。

2.3 期吻合情况及短期并发症 支架组62例中 I 期吻合54例(87.1%), 3例发生吻合口漏, 保守治疗痊愈; 急诊手术组186例中 I 期切除吻合64

例(34.4%), 吻合口漏14例, 其中11例保守治疗痊愈, 2例行近端结肠造口, 1例并感染性休克死亡. 总的并发症(有的患者同时有2个或多个并发症)支架组与急诊手术组相比有明显差异为(17.7% vs 47.3%, $P = 0.000$). 其中切口感染急诊手术组明显高于支架组($P = 0.021$), 其余各并发症吻合口漏、脾撕裂、腹腔脓肿、肠梗阻需手术、切口疝、心血管意外、呼吸衰竭、导管脓毒症急诊手术组均高于支架组, 但无统计学意义(均 $P > 0.05$). 支架组住院期间无死亡病例, 急诊手术组住院期间死亡3例, 1例吻合口漏合并感染性休克死亡, 1例心血管外死亡和1例呼吸衰竭死亡, 但两组无统计学差异($P = 0.575$, 表3)。

2.4 长期生存率 支架组62例4例失访, 3例死于其他疾病, 中位随访时间为46.53 mo; 急诊手术组9例失访, 5例死于其他疾病, 中位随访时间44.18 mo. 两组2年生存曲线几乎重叠, 之后支架组生存率略高于急诊手术组, 但差异无统计学差异($P = 0.497$, 图1)。

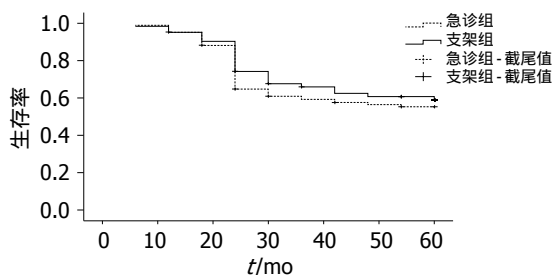


图1 患者生存曲线.

3 讨论

文献报道经内镜下留置结肠腔内镍钛记忆合金支架成功率为88%-100%, 但有穿孔、出血、轻微腹痛、支架移位、支架阻塞再梗阻等并发症, 严重并发症穿孔少见^[7-10]. 本研究中支架成功率98.4%, 与文献报道接近, 1例穿孔, 发生于开展支架初期, 之后未再出现, 随着技术的熟练, 穿孔并发症可能减少, 2例因支架移位再梗阻, 为不完全梗阻, 所以肠道支架置入在不完全梗阻者应慎用. 内镜下留置结肠腔内镍钛记忆合金支架可迅速消除肠梗阻的症状和X线异常表现, 为有可能进行根治的患者赢得足够的肠道准备时间, 使患者有时间进行机体状态调整, 避免急诊手术应激, 增加择期手术时进行I期吻合的机会、降低并发症. 所以支架组I期吻合率明显高于急诊手术组.

左半结肠癌合并完全性肠梗阻往往需要急诊手术, 其经典术式是Hartmann术, 但结肠造口对患者生活造成的种种不便, 甚至有的患者对造口不能够接受, 20世纪80年代以来, 国内外文献均有报道通过不同方法结肠减压I期切除吻合, 但疗效各异^[11-15]. 已有报道支架可以迅速解除梗阻、减少急诊手术及减少造口, 尤其可提高基础状态差患者的生活质量^[16]. 本研究中急诊手术根据患者不同的情况, 分别采用Hartmann术、单纯减压I期切除吻合、术中经阑尾残端结肠灌洗减压I期切除吻合、术中封闭式洗肠装置结肠灌洗减压I期切除吻合. 急诊手术组总的短期并发症明显高于支架组, 急诊条件下手术, 肠管扩张积气积粪, 术野受限, 分离及术中减压过程中, 可能造成脾脏撕裂, 且很难做到完全封闭、无污染, 肠管暴露时间长, 减压时需游离、挤压, 造成脾脏撕裂、切口感染、腹腔脓肿、术后肠粘连梗阻等并发症高. 因急诊手术需减压切口往往加大, 加之手术时间长、污染等切口感染裂开几率增加, 术后切口疝发生几率也较择期手术增

加. 急诊条件下手术, 患者应激反应强烈, 心肺并发症相对增加. 急诊手术组更容易出现导管脓毒症, 这与他的高吻合口瘘有关, 本组的3例导管脓毒症都是于长期静脉营养有关. 支架组I期切除吻合率, 明显高于急诊手术组(87.1% vs 34.4%, $P = 0.001$), 支架组3例吻合口漏经保守治疗均痊愈, 而急诊手术组14例吻合口漏保守治疗痊愈11例, 2例行近端结肠造口, 1例合并感染性休克死亡. 说明急诊手术组吻合口漏口发生几率大且严重, 患者基础状态往往较差, 保守治疗不易成功、风险大, 需谨慎. 急诊手术组住院期间死亡3例, 1例心血管意外死亡、1例呼吸衰竭死亡、1例合并吻合口漏, 感染性休克死亡, 而支架组住院期间无死亡病例, 说明急诊条件手术, 患者基础状态差, 来不及调整, 且应激反应强烈, 各种并发症发生率高, 1个患者发生并发症可能不止一个, 多个并发症导致患者死亡. 所以择期手术比急诊手术安全得多.

支架组长期生存率略高于急诊手术组, 可能是术野暴露差, 根治很难以彻底, 且挤压肠管难免造成肿瘤细胞脱落种植或瘤栓逆行转移, 急诊条件手术患者术后感染并发症增加, 术后机体免疫功能下降也给肿瘤复发造成条件, 另外患者合并吻合口漏几率增加. 有文献报道, 吻合口漏增加局部复发率, 从而导致长期的生存率下降^[17,18]. 急诊手术术后短期并发症多, 延缓手术至第1次化疗间期, 可能也是造成其长期生存率偏低的原因. 另外急诊手术造口成为永久造口几率增加, 不免对患者心理造成负面影响, 可能对长期生存率有影响. 无论何种方法, 对比其生存情况都会有争议, 首先不可能所有患者均严格的采用一种化疗方案, 另外在化疗结束后不可避免的会有部分患者求助于一种或多种抗肿瘤药物. 在本组研究中还存在一个术者因素, 研究中共统计4位术者的手术, 有的术者习惯于1种辅助方法, 很少会用另外1种, 这些都会引起结果的差异. 不过本研究中每组均有上述因素存在, 因此也只从组间作比较. 有的学者报道支架后5年生存率较择期手术降低^[19], 也有报道支架后较急诊手术并发症降低, 但长期生存率无明显差异^[20], 另有报道对于不能手术切除的患者, 单纯支架减压比手术减压并发症低, 而生存率相近^[21], 值得进一步采用多中心研究来评价支架的长期效果.

总之, 对于梗阻性左半结肠癌患者的I

应用要点
对于梗阻性左半结肠癌患者的I期切除吻合, 结肠镜下留置结肠腔内支架术前减压是一种比较理想的辅助方法.

同行评价
 本文是此领域国内报道病例数较大的一回顾性研究,对两组患者进行了生存方面分析,具有一定的临床意义。

期切除吻合,结肠镜下留置结肠腔内支架术前减压是一种比较理想的辅助方法,可以避免急诊手术、增加 I 期切除吻合机会、避免造口、降低短期并发症,且长期生存率也较急诊手术有一定的提高。

4 参考文献

- Lee YM, Law WL, Chu KW, Poon RT. Emergency surgery for obstructing colorectal cancers: a comparison between right-sided and left-sided lesions. *J Am Coll Surg* 2001; 192: 719-725
- Huang TJ, Wang JY, Lee LW, Chen FM, Chuan CH, Chan HM, Hou MF, Huang CJ, Huang YS, Hsieh JS. Emergency one-stage surgery for obstructing left-sided colorectal carcinomas. *Kaohsiung J Med Sci* 2002; 18: 323-328
- Zucchetti F, Negro F, Matera D, Bolognini S, Mafucci S. Colorectal cancer: obstruction is an independent negative prognostic factor after radical resection. *Ann Ital Chir* 2002; 73: 421-425
- Saliangas K, Economou A, Nikoloudis N, Andreadis E, Prodromou K, Chrissidou M, Topsis D, Chrissidis T. Treatment of complicated colorectal cancer. Evaluation of the outcome. *Tech Coloproctol* 2004; 8 Suppl 1: s199-201
- Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, O'Donoghue DP. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg* 1996; 83: 46-50
- Leong QM, Aung MO, Ho CK, Sim R. Emergency colorectal resections in Asian octogenarians: factors impacting surgical outcome. *Surg Today* 2009; 39: 575-579
- Dronamraju SS, Ramamurthy S, Kelly SB, Hayat M. Role of self-expanding metallic stents in the management of malignant obstruction of the proximal colon. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1657-1661
- Im JP, Kim SG, Kang HW, Kim JS, Jung HC, Song IS. Clinical outcomes and patency of self-expanding metal stents in patients with malignant colorectal obstruction: a prospective single center study. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 789-794
- Shrivastava V, Tariq O, Tiam R, Nyhsen C, Marsh R. Palliation of obstructing malignant colonic lesions using self-expanding metal stents: a single-center experience. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008; 31: 931-936
- Repici A, De Caro G, Luigiano C, Fabbri C, Pagano N, Preatoni P, Danese S, Fuccio L, Consolo P, Malesci A, D'Imperio N, Cennamo V. WallFlex colonic stent placement for management of malignant colonic obstruction: a prospective study at two centers. *Gastrointest Endosc* 2008; 67: 77-84
- Tschmelitsch J, Wykypiel H, Prommegger R, Bodner E. Colostomy vs tube cecostomy for protection of a low anastomosis in rectal cancer. *Arch Surg* 1999; 134: 1385-1388
- Dudley HA, Racliffe AG, McGeehan D. Intraoperative irrigation of the colon to permit primary anastomosis. *Br J Surg* 1980; 67: 80-81
- Arnaud JP, Tuech JJ, Duplessis R, Pessaux P. [Role of subtotal/total colectomy in emergency treatment of occlusive cancer of the left colon] *Ann Chir* 1999; 53: 1019-1022
- Alcantara M, Serra X, Bombardó J, Falcó J, Perandreu J, Ayguavives I, Mora L, Hernando R, Navarro S. Colorectal stenting as an effective therapy for preoperative and palliative treatment of large bowel obstruction: 9 years' experience. *Tech Coloproctol* 2007; 11: 316-322
- Fischer A, Schrag HJ, Goos M, Obermaier R, Hopt UT, Baier PK. Transanal endoscopic tube decompression of acute colonic obstruction: experience with 51 cases. *Surg Endosc* 2008; 22: 683-688
- Cantarella F, Bugiantella W, Mingrone E, Graziosi L, Ricci P, Rossi P, Donini A. [Preliminary experience on the application of metallic stents for treatment of colorectal malignant stenosis] *Ann Ital Chir* 2009; 80: 127-130
- Branagan G, Finnis D. Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1021-1026
- Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, Bokey EL. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg* 2004; 240: 255-259
- Kim JS, Hur H, Min BS, Sohn SK, Cho CH, Kim NK. Oncologic outcomes of self-expanding metallic stent insertion as a bridge to surgery in the management of left-sided colon cancer obstruction: comparison with nonobstructing elective surgery. *World J Surg* 2009; 33: 1281-1286
- Dastur JK, Forshaw MJ, Modarai B, Solkar MM, Raymond T, Parker MC. Comparison of short- and long-term outcomes following either insertion of self-expanding metallic stents or emergency surgery in malignant large bowel obstruction. *Tech Coloproctol* 2008; 12: 51-55
- Faragher IG, Chaitowitz IM, Stupart DA. Long-term results of palliative stenting or surgery for incurable obstructing colon cancer. *Colorectal Dis* 2008; 10: 668-672

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

中药提取液体外抗肠道念珠菌的作用

邓洁华, 王刚生, 马耀辉, 史敏, 李波

邓洁华, 王刚生, 马耀辉, 史敏, 李波, 河北医科大学第二医院 河北省石家庄市050000

作者贡献分布: 此课题由王刚生与邓洁华设计; 研究过程由王刚生指导; 邓洁华、马耀辉、史敏及李波操作完成; 数据分析由邓洁华、马耀辉及史敏完成; 本论文写作由邓洁华、王刚生及马耀辉完成。

通讯作者: 王刚生, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院皮肤科。djh092@163.com

电话: 0311-66002375

收稿日期: 2009-11-24 修回日期: 2010-01-25

接受日期: 2010-01-26 在线出版日期: 2010-03-08

Antifungal effect of extracts of 32 traditional Chinese herbs against intestinal *Candida in vitro*

Jie-Hua Deng, Gang-Sheng Wang, Yao-Hui Ma, Min Shi, Bo Li

Jie-Hua Deng, Gang-Sheng Wang, Yao-Hui Ma, Min Shi, Bo Li, Department of Dermatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Gang-Sheng Wang, Department of Dermatology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Western Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. djh092@163.com

Received: 2009-11-24 Revised: 2010-01-25

Accepted: 2010-01-26 Published online: 2010-03-08

Abstract

AIM: To investigate the antifungal activity of alcohol extracts of 27 traditional Chinese herbs (TCHs) and extracting oils from 5 TCHs against intestinal *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis*) *in vitro*.

METHODS: The alcohol extracts of 27 TCHs were serially diluted to concentrations ranging from 50 to 3.125 g/L, while the extracting oils from 5 TCHs were serially diluted to concentrations ranging from 5 to 0.0097 mL/L. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of these herb extracts against intestinal *Candida* were then determined.

RESULTS: The alcohol extracts of 6 (cortex pseudolaricis, coptis chinensis, phellodendron amurense, Chinese gall, cassia, and clove), 4 (patchouli, Chuanxiong, acorus calamus, and fructus cnidii), and 2 (fructus schizandrae and fennel) TCHs had

mean MICs of 1.56 g/L to 3.25 g/L, 12.5 g/L, and 50 g/L, respectively. The alcohol extracts of the remaining 15 TCHs exhibited no antifungal effect. The extracting oils from 5 TCHs (cassia oil, Agastache rugosa oil, clove oil, small fennel oil, and fructus schizandrae oil) showed potent antifungal effect against intestinal *Candida*.

CONCLUSION: The alcohol extracts of 6 TCHs and extracting oils from 5 TCHs have significant antifungal activity against pathogenic *Candida* species (*C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis*).

Key Words: Intestinal *Candida*; Alcohol extract of traditional Chinese herb; Extracting oil from traditional Chinese herb; Antifungal activity

Deng JH, Wang GS, Ma YH, Shi M, Li B. Antifungal effect of extracts of 32 traditional Chinese herbs against intestinal *Candida in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(7): 741-743

摘要

目的: 观察27种中药醇提液及5种中药提取油对肠道念珠菌(白念、热带、克柔氏)的体外抗菌活性。

方法: 采用试管药基法将27种中药醇提取液倍比稀释成浓度50-3.125 g/L, 中药提取油倍比稀释成5-0.0097 mL/L, 对肠道念珠菌进行MIC观察。

结果: 27种中药醇提取液中有6种(土槿皮、黄连、黄柏、五倍子、桂皮、丁香)MIC均值为1.56-3.25 g/L, 4种(广藿香、川芎、菖蒲、蛇床子)MIC均值12.5 g/L, 2种(五味子、小茴香)MIC均值50 g/L, 对念珠菌有不同程度的抑制作用, 其他15种中药醇提取液无抑制作用。5种中药提取油(桂皮油、藿香油、丁香油、小茴香油、五味子油)对念珠菌均有较强的抑制作用。

结论: 6种中药醇提取液及5种中药提取油对念珠菌(白念、热带、克柔氏)均有较强的抑制作用。

关键词: 肠道念珠菌; 中药醇提取液; 中药提取油; 抗菌活性

背景资料
念珠菌感染在院内真菌感染中占首位, 肠道念珠菌感染仅次于下呼吸道占第2位, 以白念珠菌最多, 其次是热带念珠菌、克柔氏念珠菌, 由于临床上高效安全的抗真菌药物较少, 因此, 念珠菌感染的发病率呈上升趋势。

同行评议者
高国全, 教授, 中山大学中山医学院生化系

研发前沿
念珠菌耐药株日
渐增多,目前,抗
真菌药物较多、
不良反应较大,
且无良好的中药
治疗。

邓洁华,王刚生,马耀辉,史敏,李波. 中药提取液体外抗肠道念
珠菌的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(7): 741-743
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/741.asp>

0 引言

由于临床上广泛应用广谱抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂等,使肠道真菌感染的发病率日益增加。而抗真菌治疗的药物仍以西药为主:价格昂贵、不良反应多,易产生耐药菌株,他们虽然对某些真菌感染有效,但从高效、低毒、抗真菌谱和耐药性方面评价,没有一种令人满意。近年来,许多国内外学者对中草药抗真菌实验做了大量的筛选工作,发现有许多中草药及其提取物有很好的抗真菌作用^[1-7]。本研究用32种中药的提取液对肠道念珠菌(白念珠菌、热带念珠菌、克柔氏念珠菌)进行体外抗菌活性的测定,为治疗肠道念珠菌感染开发高效、低毒的天然药物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 中药提取液: (1)醇提液: 土槿皮、黄连、黄柏、五倍子、桂皮、丁香、蛇床子、广藿香、五味子、川芎、菖蒲、小茴香、天冬、石榴皮、板蓝根、苦参、儿茶、乌梅、地肤子、马勃、虎杖、香附、决明子、半夏、川芎、石决明、蒲黄; (2)挥发油: 桂皮油、藿香油、丁香油、小茴香油、五味子油。均由河北医科大学制药厂提取并提供。念珠菌临床株: 来自我院真菌室,均为致病性真菌(从肠道真菌病患者便中分离,直接镜检可见大量菌丝及芽生孢子,培养有酵母样菌落生长,经鉴定为白念珠菌10株、热带念珠菌10株及克柔氏念珠菌10株)。标准株: 白念珠菌1株、热带念珠菌1株及克柔氏念珠菌1株,均来自中科院微生物所。

1.2 方法

1.2.1 药基配制: 将中药醇提取液及中药提取油(溶于950 mL/L乙醇内,配成100 mL/L的药物母液)分别溶于高压灭菌(120 °C, 0.1 Pa, 20 min)后的葡萄糖蛋白胨琼脂基(40 g/L葡萄糖, 10 g/L蛋白胨, 20 g/L琼脂)内,趁热(60 °C左右)充分混合,中药醇提取液倍比稀释成50、25、12.5、6.25、3.125、1.56及0.78 g/L(以生药计算)。中药提取油倍比稀释成10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.156、0.078、0.039及0.0195 mL/L的系列药物浓度,药物终浓度中乙醇不超过50 mL/L培养基,每个试管5 mL放置斜面。

1.2.2 菌种接种: 挑取已活化的菌株,加入8.5 g/L氯化钠溶液中,用血细胞计数板将菌悬液浓度调节为 1×10^8 CFU/L。每个试管药基内接种100 μ L菌悬液,每个浓度接种2管,置36 °C恒温箱内,

每日观察生长情况,并记录,120 h后判读结果。

1.2.3 MIC值的判读: 用葡萄糖蛋白胨琼脂基加菌悬液管作阳性对照,用葡萄糖蛋白胨琼脂基管作阴性对照。将每管生长的情况与阳性及阴性对照管比较,以无真菌生长的最低药物浓度药基管为MIC终点。

2 结果

2.1 中药醇提液抗念珠菌的MIC值 27种中药醇提液有6种(桂皮、丁香、五味子、土槿皮、黄连、黄柏)MIC均值1.56-3.25 g/L, 4种(广藿香、川芎、菖蒲、蛇床子)MIC均值12.5 g/L, 2种(五味子、小茴香)MIC均值50 g/L,对肠道念珠菌(白念、热带、克柔氏)有不同程度的抑制作用,见表1。其他15种醇提液(天冬、石榴皮、板蓝根、苦参、儿茶、乌梅、地肤子、马勃、虎杖、香附、决明子、半夏、川芎、石决明、蒲黄)均无抑菌作用。

2.2 中药提取油抗念珠菌的MIC值 5种中药提取油(桂皮油、藿香油、丁香油、小茴香油、五味子油)对肠道念珠菌均有较强的抗菌作用,抗菌作用依次为桂皮油(0.039 mL/L)、藿香油(0.078-0.156 mL/L)、丁香油(0.156-0.313 mL/L)、小茴香油(0.156-0.313 mL/L)、五味子油(0.313 mL/L),见表2。

3 讨论

近年来,许多学者对中草药抗真菌作用进行了大量的筛选试验,发现许多种中草药具有抗真菌作用,宫毓静等用164种中药乙醇提取物进行抗真菌作用研究,发现黄连、土皮、肉桂、丁香、珊瑚姜、紫草素等有不同程度的抗真菌作用^[8]。相比较传统抗真菌药物如氟康唑,中草药具有抗真菌作用强、不易耐药、低毒性等优点^[9-11]。且我们曾发现肉桂油对小鼠肠道念珠菌有抑制作用^[12]。MIC值为抑制病菌生长繁殖的最低药物浓度,测定抗真菌药物的MIC值为抗真菌药物临床应用提供实验依据,并可进行致病真菌耐药的监测^[9,13]。中草药抗真菌MIC值测定,为筛选抗真菌中草药提供依据。由于各作者对中药提取方法以及提取有效成分不同,抗真菌作用的MIC值出现差异。经水煎或与培养基共同高压,可使某些药物的有效成分破坏。本实验采用了中药的醇提取液和提取油两种方法,如:桂皮油对念珠菌MIC(0.039 mL/L)、醇提液(1.56 g/L),藿香油(0.078-0.156 mL/L)、醇提液(12.5 g/L),丁香油(0.156-0.313 mL/L)、醇提液(1.56 g/L),小茴香油(0.156-0.313 mL/L)、醇提液(50 g/L),五味子

相关报道
宫毓静等用164种
中药乙醇提取物
进行抗真菌作用
研究,发现黄连、
土皮、肉桂、丁
香、珊瑚姜、紫
草素等有不同程
度的抗真菌作用。

创新盘点
本文研究了部分中药抗念珠菌的MIC值, 对比了中药醇提液与提取油的抗真菌活性。

表 1 中药醇提取液抗念珠菌MIC分布 (g/L)

中药	白念临床株(n = 10)		标准株 (n = 1)	热带临床株(n = 10)		标准株 (n = 1)	克柔氏临床株(n = 10)		标准株 (n = 1)
	范围	均值		范围	均值		范围	均值	
桂皮	1.56-3.25	1.56	1.56	0.78-3.25	1.56	1.56	1.56-3.25	1.56	1.56
丁香	1.56-3.25	1.56	1.56	1.56-3.25	1.56	1.56	3.25-6.25	3.25	3.25
五倍子	3.25-6.25	3.25	3.25	0.78-3.25	1.56	1.56	3.25-6.25	3.25	3.25
土槿皮	1.56-6.25	3.25	3.25	1.56-6.25	3.25	3.25	3.25-6.25	3.25	3.25
黄连	3.25-6.25	3.25	3.25	3.25-12.50	6.25	6.25	3.25-6.25	3.25	3.25
黄柏	3.25-6.25	3.25	3.25	3.25-6.25	3.25	3.25	3.25-6.25	3.25	3.25
广藿香	6.25-25.00	12.50	12.50	6.25-12.50	6.25	6.25	6.25-12.50	6.25	6.25
川芎	6.25-25.00	12.50	12.50	12.50-25.00	12.50	12.50	12.50-25.00	25.00	25.00
菖蒲	12.50-25.00	12.50	12.50	6.25-12.50	12.50	12.50	12.50-25.00	25.00	25.00
蛇床子	12.50-25.00	12.50	12.50	12.50-25.00	25.00	25.00	12.50-25.00	25.00	25.00
五味子	25.00-50.00	50.00	50.00	25.00-50.00	50.00	50.00	25.00-50.00	50.00	50.00
小茴香	25.00-50.00	50.00	50.00	25.00-50.00	50.00	50.00	25.00-50.00	50.00	50.00

表 2 中药提取油抗念珠菌MIC分布 (mL/L)

中药	白念临床株(n = 10)		标准株 (n = 1)	热带临床株(n = 10)		标准株 (n = 1)	克柔氏临床株(n = 10)		标准株 (n = 1)
	范围	均值		范围	均值		范围	均值	
桂皮油	0.019-0.039	0.039	0.039	0.039-0.019	0.039	0.039	0.039-0.078	0.078	0.078
藿香油	0.078-0.156	0.078	0.078	0.078-0.313	0.156	0.156	0.078-0.156	0.156	0.156
丁香油	0.156-0.313	0.156	0.156	0.078-0.313	0.156	0.156	0.078-0.156	0.156	0.156
小茴香油	0.078-0.313	0.156	0.156	0.156-0.625	0.313	0.313	0.078-0.313	0.156	0.156
五味子油	0.156-0.313	0.313	0.313	0.313-0.625	0.313	0.313	0.313-0.625	0.313	0.313

油(0.313 mL/L)、醇提液(50 g/L), 抗念珠菌的效果也有明显差异, 中药提取油对念珠菌的抗菌作用优于中药醇提取液。文献报道, 桂皮油、丁香油、八角茴香油、藿香油^[14]、五味子油在1 mL/L以下的浓度下, 有很强的抗真菌作用。本实验进一步证明了其抗菌作用。因中药醇提取液、中药水提取液或中药提取的挥发油所做的体外抗真菌实验, 均为中药抗真菌初筛阶段。为临床提供高效、低毒抗真菌制剂, 还需对中药抗真菌有效化学成分、作用机制及药理作用等进一步研究, 为合成新的抗真菌中药制剂奠定理论基础。

4 参考文献

1 马廉兰, 张文平, 曾祥风, 张瑞芸, 程小浪. 116种中草药对白念珠菌的抑菌实验. 赣南医学院学报 1998; 18: 189-192
 2 谢子梅, 许扬. 抗真菌中药的作用机理研究进展. 中国中药杂志 2004; 29: 200-202
 3 江涛, 曹煜, 赵秀华, 夏明静. 22种中草药有效成分抗真菌研究及新剂型应用. 中华皮肤科杂志 1999; 32: 316-318
 4 李俭, 李立秋, 薛艳华, 卓越, 马淑霞, 聂清. 三种中药

挥发油抗真菌作用的实验观察. 中国微生态学杂志 1997; 8: 31-32
 5 杨得坡, Jean-Pierre C, Joëue M. 藿香和广藿香挥发油对皮肤癣菌和条件致病真菌的抑制作用. 中国药理学杂志 2000; 35: 9-11
 6 谢小梅, 张文平, 傅颖媛, 许扬. 肉桂醛与柠檬醛抗曲霉菌作用机制的研究. 中草药 2004; 35: 430-432
 7 张文平, 刘志春, 刘建新, 傅颖媛. 微量法测定肉桂醛、柠檬醛体外抗深部真菌活性. 赣南医学院学报 2004; 24: 364-366
 8 宫毓静, 安汝国, 虞慧, 王理达, 郑俊华, 果德安. 164种中药乙醇提取物抗真菌作用研究. 中草药 2002; 33: 42-47
 9 于晓虹, 杨国玲, 刘晓明, 王华. 氟康唑、特比萘芬和伊曲康唑对白念珠菌的体外敏感性试验. 中国皮肤性病学杂志 2008; 22: 668
 10 滕炳会, 于长平, 杜文莉, 张克伟. 43株念珠菌分离鉴定和药敏试验研究. 预防医学论坛 2007; 13: 722-723
 11 张文平, 王小丽, 黄真, 谢水祥. 肉桂醛体外诱导白色念珠菌耐药的实验. 中国临床康复 2006; 10: 148-150
 12 马耀辉, 邓洁华, 王刚生, 张晓光, 王爱学, 四荣联. 肉桂油对小鼠胃白念珠菌感染的治疗作用. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1545-1547
 13 秦晓峰, 吴建华, 黄懿, 张丽娟, 顾军. 微量稀释法测定白念珠菌对氟康唑的MIC值及两种药敏试验的比较. 中国麻风皮肤病杂志 2009; 25: 87-89
 14 张广文, 蓝文建, 苏镜媛, 曾陇梅, 杨得坡, 王发松. 广藿香精油化学成分分析及其抗菌活性(). 中草药 2002; 33: 210-212

同行评价
本文探讨了多种中药提取液对肠道念珠菌的抑制效果, 为临床应用提供了基础依据, 具有一定的创新性。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

《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fengstroke, 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t_{1/2}或T_{1/2}¹, 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ln-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

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 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M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: 010-85381892, 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)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希腊文小写 ν ; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 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; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<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±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1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mean±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±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±0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm±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→23.5→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≤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)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 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。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,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。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。参考文献格式如下:

- 1 Jung EM, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6356-6364 [PMID: 18081224; DOI: 10.3748/wjg.13.6356]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

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 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)。

5 修回稿须知

5.1 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。

5.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删节时,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。

5.3 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

2010-03-25/28

第二十届亚太肝病学会年会

会议地点: 北京市

联系方式: info@apasl2010beijing.org

2010-04-02/05

第九届全国儿科放射学术大会

会议地点: 南京市

联系方式: gausli@yahoo.com.cn

2010-04-09/12

第二十六届国际放射学大会

会议地点: 上海市

联系方式: icr2010@cma.org.cn

2010-04-14/18

第四十五届欧洲肝脏研究协会会议(EASL)

会议地点: 奥地利, 维也纳

联系方式: <http://www2.kenes.com/liver-congress/pages/home.aspx>

2010-04-16/17

2010消化疾病诊断与鉴别诊断临床思维医师论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cmdabm@yahoo.com.cn

2010-05-01/05

美国消化疾病周(DDW)

会议地点: 美国, 新奥尔良

联系方式: <http://www.ddw.org/wmspage.cfm?parm1=679>

2010-05-13/16

第四届MDCA肿瘤分子靶向及个体化医疗高峰论坛

会议地点: 北京市

联系方式: 010-58430577

2010-05-13/15

第五届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 南京市

联系方式: office@cnsld.org

2010-05-28/31

2010中国普外科焦点问题学术论坛

会议地点: 兰州市

联系方式: 2010fis@gmail.com

2010-06-04/06

2010国际腹部创伤暨第十届全国脾脏外科学术研讨会

会议地点: 合肥市

联系方式: qiaohaiquan2008@yahoo.com.cn

2010-06-04/06

第二届世纪坛国际结直肠肛门病论坛

会议地点: 北京市

联系方式: luoch301@gmail.com; luoch301@gmail.com

2010-06-17/21

2010年全国肝脏疾病临床学术大会暨欧洲肝病学会日

会议地点: 厦门市

联系方式: zhgz@vip.163.com

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

2010-09-01

中华医学会第十次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 成都市

联系方式: <http://www.csgd.org.cn/2010/>

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/>

2010-10-23/27

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/>

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!

党双锁 教授

西安交通大学第二医院感染科

高国全 教授

中山大学中山医学院生化系

高英堂 研究员

天津市肝胆疾病研究所分子细胞室

戈之铮 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

顾岩 教授

上海交通大学医学院附属上海第九人民医院外科

韩天权 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

洪天配 教授

北京大学第三医院内分泌科

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

黄志勇 教授

华中科技大学同济医学院普外科

江学良 主任医师

中国人民解放军济南军区总医院消化科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

李华 副教授

中山大学附属第三医院肝脏外科

刘凤斌 教授

广州中医药大学第一附属医院消化内科

马大烈 教授

上海第二军医大学长海医院病理科

任超世 研究员

中国医学科学院生物医学工程研究所

邵先玉 主任医师

泰山医学院附属医院消化内科

孙学英 教授

哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝脾外科中心

谭德明 教授

中南大学湘雅医院感染病科

宛新建 副教授

上海市第一人民医院消化内科

王凯 教授

山东大学齐鲁医院肝病科

魏继福 副研究员

江苏省人民医院中心实验室

夏冰 教授

武汉大学中南医院消化内科

徐可树 教授

华中科技大学同济医学院协和医院消化内科

杨维良 教授

哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

姚登福 教授

南通大学附属医院分子医学中心

阴赅宏 研究员

首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科

于则利 教授

首都医科大学附属北京同仁医院外科

袁友红 副教授

湖南省人民医院科研部

周士胜 教授

大连大学医学院医学研究中心

朱传武 主任医师

江苏省苏州市第五人民医院传染科