

ISSN 1009-3079 (print)
ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2012 年 5 月 8 日 第 20 卷 第 13 期 (Volume 20 Number 13)



13/2012

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊,是一份被《中国科技论文统计源期刊》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

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉主编

潘伯荣教授

主编

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
陈国忠主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊晓明教授
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
戈之铮教授
关玉盘教授
关晓辉主任医师
郭晓钟教授
郝建宇教授
何松教授

洪天配教授
黄培林教授
黄晓东主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠教授
江米足教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
姜相君主任医师
金瑞教授
蓝宇教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
廖家智副主任医师

林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海峰主任医师
刘海林主任医师
陆伦根教授
马红主任医师
马欣主任医师
毛高平教授
孟庆华教授
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
任粉玉教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
唐世刚教授
田宇彬教授
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党教授
王江滨教授
王俊平教授
王晓艳副教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
杨建民教授

姚树坤教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
郑素军副主任医师
周国雄主任医师
周宇教授
邹晓平主任医师
诸琦教授
于珮主任医师

消化外科学

白雪巍副主任医师
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
陈凇教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程树群副教授
崔云南教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
杜顺达副教授
房林教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
高毅主任医师
葛海燕教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾国利副主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
郝立强副教授
何超教授
何晓顺教授
何裕隆教授
黄志勇教授

季加孚教授
莫卫东教授
姜波健教授
金山主任医师
黎乐群教授
李革副教授
李国威教授
李华副教授
李华山主任医师
李胜研究员
李涛副主任医师
李文岗教授
李旭副教授
李永翔教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
刘宝林教授
刘超教授
刘建教授
刘颖斌主任医师
陆云飞教授
禄韶英副教授
吕云福教授
齐清会教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民主任医师
邱伟华主任医师
仇毓东教授
单云峰副主任医师
沈柏用副教授
施宝民教授
施诚仁教授
施晓雷副主任医师
石毓君研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
邵升副教授
谭晓冬教授
汤朝晖副主任医师
汤绍涛教授
唐南洪教授
田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王健生教授
王蒙副教授

王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泐副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
禹正杨副教授
张必翔主任医师
张宏伟教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张力为副教授
赵刚副教授
智绪亭教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
刘正稳教授
钱林学主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王凯教授
王怡主任医师
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
姚鹏副教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵秀英副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员

刘绍能主任医师
南极星教授
牛英才研究员
王富春教授
邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
李璦教授
刘宝瑞教授
刘平教授
刘云鹏教授
沈克平主任医师
王阁教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师

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

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员

陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授

黄园教授
李刚教授
李君文研究员
李增山副教授
刘克辛教授
刘森副教授
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
魏继福研究员
吴道澄教授
吴军研究员

吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
阴赅宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
门秀丽教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2012年5月8日 第20卷 第13期 (总第381期)

基础研究

1081 转染重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1的肝细胞系的建立及功能评价

常彬霞, 游绍莉, 李保森, 貌盼勇, 辛绍杰

1088 表氧化二十碳三烯酸对游离脂肪酸诱导胰岛 β 细胞凋亡的抑制作用

吴斌, 张玫, 吕瑞雪, 罗通行, 李一松, 王兰兰

1094 Ucn3及其受体CRFR2在肠易激综合征大鼠模型肠神经系统中的表达

刘兆霞, 季万胜, 刘晓丽, 王琳, 韩慧蓉, 房春燕, 赵廷坤, 徐继马, 张广学, 曲梅花

临床研究

1100 慢性HBV感染者外周血CXCR5⁺CD4⁺Tfh细胞的测定及其与FoxP3⁺Treg细胞的相关性

李凤惠, 吕洪敏, 王芳, 向慧玲, 王凤梅, 李晓爽, 泽塔多吉, 王鹏

1107 SELDI-TOF-MS技术在肝癌诊断和介入治疗评价中的价值

胡育斌, 林海澜, 郝明志, 叶韵斌, 陈慧菁, 陈起忠, 陈强

文献综述

1112 内源性大麻素系统对肝硬化的影响

张建, 戴二黑, 姜慧卿

1118 GLP-1及受体激动剂联合间充质干细胞对1型糖尿病胰岛 β 细胞的保护作用

王颜刚, 于江苏

研究快报

1123 Nesfatin-1对离体胃黏膜细胞胃酸分泌的影响

李静慧, 李学良, 吴静, 贾方圆, 林琳

1131 艾灸预处理对幽门螺杆菌胃黏膜炎性损伤大鼠血清IgG和eHSP72含量的影响

封迎帅, 易受乡, 林亚平, 彭艳, 史冬梅, 侯艳玲

1137 凉血愈肠汤对急性放射性肠炎的治疗及作用机制

武寒飞, 洪智攀, 丁健华, 赵克

临床经验

1142 食管远端鳞状上皮细胞间隙增宽对非糜烂性反流病诊断的价值

陈文科, 周丽雅, 陆京京, 薛艳, 崔荣丽

1148 乙肝后肝硬化合并肝性脑病的影响因素

张鸣, 段志军

1156 消化系疾病患者检验性失血量调查218例

张蕴秀, 尚静, 王培昌

病例报告

1160 Ménétrier's病致顽固性低蛋白血症1例

黄颖秋, 徐俊华, 韩春丽, 刘旭妍

附 录	1164 《世界华人消化杂志》投稿须知 1169 2012年国内国际会议预告
志 谢	1170 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1087 《世界华人消化杂志》栏目设置 1111 WJG总被引频次排名位于第174名 1117 《世界华人消化杂志》参考文献要求 1130 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.694 1136 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 1141 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 1155 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1159 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 1163 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
封面故事	《世界华人消化杂志》主编, 刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科
本期责任人	编务 周媛; 送审编辑 李军亮, 张姗姗; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 张姗姗; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 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 2012-05-08 原刊名 新消化病学杂志 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: wcjd@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: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com	主 编 程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心 党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科 江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科 刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科 吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科 马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科 王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心 张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心 编 辑 部 主 任 李军亮	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 《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/wcjd/ch/index.aspx), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。 特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。 2012年版权归世界华人消化杂志所有
---	--	--

World Chinese Journal of Digestology

May 2012 Contents in Brief Volume 20 Number 13

BASIC RESEARCH	1081 Construction and functional evaluation of a liver cell line tranfected with a vector expressing cytochrome P450 3A4 and glutathione-S-transferase A1 <i>Chang BX, You SL, Li BS, Mao PY, Xin SJ</i> 1088 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid inhibits free fatty acid-induced apoptosis of pancreatic β-cells through targeting nuclear ATF4 and ATF6 <i>Wu B, Zhang M, Lv RX, Luo TX, Li YS, Wang LL</i> 1094 Expression of Urocotin3 and CRFR2 in the enteric nervous system of rats with irritable bowel syndrome <i>Liu ZX, Ji WS, Liu XL, Wang L, Han HR, Fang CY, Zhao TK, Xu JM, Zhang GX, Qu MH</i>
CLINICAL RESEARCH	1100 Correlation between percentages of peripheral blood CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells and those of FoxP3⁺ Treg cells in patients with chronic hepatitis B virus infection <i>Li FH, Lv HM, Wang F, Xiang HL, Wang FM, Li XS, Zeta DJ, Wang P</i> 1107 Application of surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry to the diagnosis and evaluation of interventional effect in patients with hepatocellular carcinoma <i>Hu YB, Lin HL, Hao MZ, Ye YB, Chen HJ, Chen QZ, Chen Q</i>
REVIEW	1112 Role of the endocannabinoid system in the pathogenesis of cirrhosis <i>Zhang J, Dai EH, Jiang HQ</i> 1118 GLP-1 or GLP-1R agonists combined with mesenchymal stem cells protect islet β-cells in patients with type 1 diabetes mellitus <i>Wang YG, Yu JS</i>
RAPID COMMUNICATION	1123 Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion by cultured rat gastric mucosa cells <i>Li JH, Li XL, Wu J, Jia FY, Lin L</i> 1131 Effect of moxibustion pretreatment on serum levels of <i>Helicobacter pylori</i> IgG and eHSP72 in rats with <i>Helicobacter pylori</i>-induced gastritis <i>Feng YS, Yi SX, Lin YP, Peng Y, Shi DM, Hou YL</i> 1137 Therapeutic effect and mechanism of Liangxueyuchang Decoction on acute radiation-induced enteritis in a rat model <i>Wu HF, Hong ZP, Ding JH, Zhao K</i>
CLINICAL PRACTICE	1142 Evaluation of dilation of intercellular space of squamous epithelium in the lower esophagus in the diagnosis of non-erosive reflux disease <i>Chen WK, Zhou LY, Lu JJ, Xue Y, Cui RL</i> 1148 Retrospective analysis of factors influencing the development and progression of hepatic encephalopathy in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis <i>Zhang M, Duan ZJ</i> 1156 Blood loss from tests in patients with gastrointestinal diseases: An analysis of 218 cases <i>Zhang YX, Shang J, Wang PC</i>
CASE REPORT	1160 Ménétrier's disease with refractory hypoalbuminemia: A case report <i>Huang YQ, Xu JH, Han CL, Liu XY</i>

APPENDIX	1164 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 1169 Meeting events calendar in 2012
ACKNOWLEDGMENT	1170 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	Editor-in-Chief <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yuan Zhou</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li, Shan-Shan Zhang</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Shan-Shan Zhang</i> Proof Editor: <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 May 8, 2012

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)

EDITOR-IN-CHIEF

Ying-Sheng Cheng, Professor, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

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

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

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

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

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

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

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

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

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

SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue

RMB 2448 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)
CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2012 Published by *World Chinese Journal of Digestology (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 © 2012 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

转染重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1的肝细胞系的建立及功能评价

常彬霞, 貌盼勇, 游绍莉, 李保森, 辛绍杰

常彬霞, 貌盼勇, 游绍莉, 李保森, 辛绍杰, 中国人民解放军第302医院 北京市 100039

常彬霞, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎及非感染性肝病的研究。中国人民解放军军队临床高新技术重大基金资助项目, No. 2010gxj097

作者贡献分布: 此课题由辛绍杰、貌盼勇及常彬霞共同设计; 具体实验、统计学分析由常彬霞、游绍莉及李保森完成; 论文撰写由常彬霞与貌盼勇完成; 辛绍杰与貌盼勇审校。

通讯作者: 辛绍杰, 教授, 100039, 北京市, 中国人民解放军第302医院. xsj302@263.net

电话: 010-66933129-6024

收稿日期: 2012-01-29 修回日期: 2012-03-05

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

Construction and functional evaluation of a liver cell line tranfected with a vector expressing cytochrome P450 3A4 and glutathione-S-transferase A1

Bin-Xia Chang, Pan-Yong Mao, Shao-Li You, Bao-Sen Li, Shao-Jie Xin

Bin-Xia Chang, Pan-Yong Mao, Shao-Li You, Bao-Sen Li, Shao-Jie Xin, the 302nd Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Shao-Jie Xin, Professor, the 302nd Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. xsj302@263.net

Received: 2012-01-29 Revised: 2012-03-05

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To generate a new cell strain that could be used in the bioartificial liver support system.

METHODS: The C3A cell line was transfected with the recombinant plasmid pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1, which expresses both cytochrome P450 3A4 (CYP 3A4) and glutathione-S-transferase A1 (GSTA1), and cultured in MEM containing 400 mg/L Zeocin for 2 wk. The obtained cell line was named C3A-Unoptimized. The expression of CYP 3A4 and GSTA1 in C3A-Unoptimized cells was detected by qRT-PCR, and the function of the C3A-Unoptimized cell line was evaluated.

RESULTS: The C3A-Unoptimized cell line stably expressed both CYP 3A4 and GST A1.

www.wjgnet.com

The expression levels of CYP 3A4 and GSTA1 were higher in C3A-Unoptimized cells than in non-transfected C3A cells. Chromatogram assay showed that the activity of CYP 3A4 could be detected in C3A-Unoptimized cells but was undetectable in non-transfected C3A cells. Immunohistochemical staining indicated higher expression of GSTA1 in C3A-Unoptimized cells than in non-transfected C3A cells. The ability to metabolize lidocaine for C3A-Unoptimized cells was enhanced compared to non-transfected C3A cells (62.5% vs 30%).

CONCLUSION: The function of the C3A-Unoptimized cell line has been improved, and this cell line might be used in the bioartificial liver support system.

Key Words: Cytochrome P450 3A4; Glutathione-S-transferase A1; Drug metabolism; Bioartificial liver support system

Chang BX, Mao PY, You SL, Li BC, Xin SJ. Construction and functional evaluation of a liver cell line tranfected with a vector expressing cytochrome P450 3A4 and glutathione-S-transferase A1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1081-1087

摘要

目的: 获得一株适合用于生物人工肝支持系统的细胞材料。

方法: 用已构建好的重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1转染肝脏肿瘤细胞系C3A, 用Zeocin筛选, 所得细胞系命名为C3A-未优势化; 通过qRT-PCR方法检测目的基因表达情况; 对转染重组质粒的肝脏肿瘤细胞系C3A的合成、代谢、解毒等功能及性状进行综合评价。

结果: 成功构建了转染重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1的细胞系; 构建好的C3A-未优势化细胞系通过qRT-PCR方法检测其目的基因CYP 3A4和GST A1的表达量较正常C3A细胞系高; 通过色谱法证明CYP 3A4活性较正常C3A细胞系高; 用免疫组织化学实验证实目的基因GST A1的表达较正常C3A细胞系多;

■背景资料

生物型和混合型生物人工肝由于引入肝细胞, 在一定程度上能够替代肝脏的合成、解毒和代谢功能, 而受到广泛关注。但迄今为止尚未出现一种肝细胞能够完全满足生物人工肝的需要。

■同行评议者

唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

■研发前沿

最理想的生物人工肝反应器中的细胞材料应该具备成熟肝细胞的所有生物合成、代谢解毒功能,但迄今为止尚未出现一种肝细胞能够完全满足生物人工肝的需要。

另外,对利多卡因的代谢能力亦高于正常C3A细胞。

结论: 构建的C3A-未优势化细胞系功能有所改善,有望成为生物人工肝系统的细胞材料。

关键词: 细胞色素P450 3A4; 谷胱甘肽硫转移酶A1; 药物代谢; 生物人工肝支持系统

常彬霞, 貌盼勇, 游绍莉, 李保森, 辛绍杰. 转染重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1的肝细胞系的建立及功能评价. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1081-1087

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1081.asp>

0 引言

肝脏疾病时肝功能受损的患者, 药物代谢功能会受到不同程度的影响, 从而使得药物的不良反应增加, 疗效下降。大多数药物是先经 I 相反应再经 II 相反应后消除, 少数药物只经过 I 相反应或 II 相反应后消除, 最终由非极性化合物转变为极性化合物排出体外。肝脏中含量最丰富和最重要的 I 相药物代谢酶和 II 相药物代谢酶分别是细胞色素P450 3A4(cytochrome P450 3A4, CYP 3A4)和谷胱甘肽硫转移酶A1(glutathione-S-transferase A1, GST A1)。本试验旨在用已构建好的重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1转染肝脏肿瘤细胞系C3A, 并对其合成、代谢、解毒等功能及性状进行综合评价, 以期获得一株适用于生物人工肝支持系统的细胞材料。

1 材料和方法

1.1 材料 C3A细胞(中国人民解放军第302医院病毒研究室惠赠); pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1重组质粒(已构建完成); Zeocin(母液浓度100 g/L)、lipofectamine 2000、HQ高纯度质粒抽提试剂盒、TRIzol、逆转录试剂盒、RNase H(Invitrogen公司); MTT试剂盒(碧云天C0009); PV-9000二步法免疫组织化学检测试剂(中杉金桥); 鼠抗人GST A1单抗(美国Santa Cruz); 荧光定量PCR仪(BIO-RAD); 荧光显微镜、相差倒置显微镜摄像装置(日本Nikon); 全自动生化仪器AU5400(日本OLYMPUS公司); 液-质联用仪(Agilent LC-MSD VL, 配有Agilent 1100泵, 分析软件为Agilent Chemical Rev. B. 01. 03 [204]); Micro CL 21R高速冷冻离心机(Thermo Electron Corporation)。

1.2 方法

1.2.1 肝脏肿瘤细胞系C3A对Zeocin敏感度试验

(Kill Curves): 将生长状态良好, 处于对数生长期的C3A细胞, 按照密度比1:10接种到24孔板中。细胞铺板24 h后, 可以加入抗生素Zeocin进行筛选, Zeocin的筛选浓度为150-600 mg/L。根据抗生素的剂量范围和相关靶细胞的筛选信息设定合适的筛选剂量梯度, 每个梯度设置2个复孔。持续观察并记录细胞的生长情况, 每3 d换1次培养基, 加入抗生素继续筛选。靶细胞抗生素最佳筛选剂量为可在3 d内导致大量的细胞死亡, 并在2 wk内杀死所有细胞的浓度。

1.2.2 质粒瞬时共转染靶细胞: 用HQ高纯度质粒抽提试剂盒制备重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1。将状态良好、处于对数生长期的C3A细胞用0.25%胰酶消化, 用MEM培养液悬浮成单细胞悬液, 细胞计数后, 按照每孔 5×10^5 个细胞接种于6孔板的每个孔中。在细胞覆盖率80%左右时, 用lipofectamine 2000进行转染实验。在37 °C, 50 mL/L的CO₂的培养箱中培养4-6 h后, 换上MEM培养液(不含抗生素), 放置在37 °C, 50 mL/L的CO₂的培养箱中继续培养过夜; 24 h后, 消化细胞, 待稳转株筛选; 48 h后, 收集样品用于qRT-PCR。转染重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1的细胞系命名为C3A-未优势化, 未转染重组质粒的细胞系(空白对照)命名为C3A-空白。

1.2.3 稳转株的筛选: 细胞转染24 h后, 消化细胞, 按照1:30将细胞接种到5个10 cm的细胞培养皿中(空白对照细胞留1个皿即可)。待细胞贴壁后, 加入Kill curve实验中筛选出的抗生素剂量400 mg/L。持续观察细胞的筛选情况, 每3 d换1次含有抗生素Zeocin 400 mg/L的MEM培养液。待空白对照皿中的C3A细胞已经全部死亡, C3A-未优势化各皿中细胞克隆已经形成, 将所有细胞消化合并到1个6孔板中培养。扩增并冻存细胞, 并准备细胞进行基因和蛋白水平的检测。

1.2.4 qRT-PCR检测目的基因表达: 分别提取C3A-未优势化和C3A-空白细胞系的总RNA, 并反转录cDNA, 保存在-20 °C备用。通过qRT-PCR检测细胞样品中目的基因和内参基因GAPDH的表达量, 根据qRT-PCR反应曲线得到各样品目的基因和内参基因的Ct值, 采用 $\Delta\Delta C_t$ 的方法进行相对定量。使用空白的C3A样品作为对照样品, 检测各组样品目的基因的表达情况。

$\Delta\Delta C_t = (\text{待测样品的目的基因的Ct平均值} - \text{待测样品的内参基因的Ct平均值}) - (\text{对照样品的目的基因的Ct平均值} - \text{对照样品的内参基因的Ct平均值})$, 基因的表达量 $F = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。目的基因的检

测用引物序列(5'-3'): homo未优势化GSTA1-F: CTGAGCCGGGCTGACATTC, homo未优势化GSTA1-R: GGGCTGCCAGGCTGTAGAA; homo未优势化CYP3A4-F: CACCCACCTATGATACTGTGCTAC, homo未优势化CYP3A4-R: TCTATGTTGTCCTTGTCTTCTTGC; 内参GAPDH-F(bp114): GAAGGTCGGAGTCAACGGATT, 内参GAPDH-R(bp341C): CGCTCCTGGAAGATG-GTGAT.

PCR反应体系为: 10×PCR Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 2 μL, 25 mmol/L dNTPs 0.2 μL, 上下游引物各0.5 μL, 50×SYBR Mix 0.5 μL, Taq酶0.3 μL, 模板1.2 μL, ddH₂O补齐至25 μL; PCR反应程序: 95 °C 预变性2 min; 95 °C 变性10 s, 60 °C 退火30 s, 70 °C 延伸45 s, 40个循环; 熔解温度70 °C-95 °C.

1.2.5 MTT法检测重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1转染前后肝细胞系的增殖: 将生长状态良好, 处于对数生长期的细胞, 按照每100 μL 6 000个细胞接种至96孔板中, 每个检测时间点的C3A-空白和C3A-未优势化细胞分别接种3个孔, 空白孔各加入100 μL PBS. 分别于细胞贴壁24、48、72、96 h后进行MTT实验. 在570 nm测定吸光度(A)值, 根据数值绘制细胞增殖曲线.

1.2.6 生化指标的检测: 细胞培养上清液中前白蛋白、胆碱酯酶、甲胎蛋白、葡萄糖、肌酐的测定: 用5 mL培养瓶, 每瓶各加入不同株细胞约5×10⁵个, 加入含100 mL/L FBS的MEM培养液5 mL, 每日更换培养液, 约72 h待细胞长成单层后, 取培养液在OLYMPUS AU5400全自动生化仪器上检测细胞培养上清液中前白蛋白、胆碱酯酶、葡萄糖及肌酐; 用免疫比浊法检测甲胎蛋白.

1.2.7 细胞色素P450 3A4活性的测定: (1)液相条件: 色谱柱为Capcell PAK C18 90303 column (2.0×100 mm ID, 5 μm, Shiseido, Japan); 流动相为70:30的水(含0.1%甲酸、5 mmol/L 甲酸铵), 乙腈(含0.1%甲酸), 流速为0.2 mL/min; (2)质谱条件: 以ESI源正离子检测方式: 毛细管温度350 °C, 碰撞能量150, 毛细管电压+4 000 V; 咪达唑仑(MDZ)m/z 326(M+1)、羟-咪达唑仑(OH-MDZ) m/z 342(M+1)、内标普萘洛尔(PRO)m/z 260(M+1); (3)按照每孔约5×10⁵个细胞将C3A-空白和C3A-未优势化细胞接种于6孔板中, 每种细胞3个孔, 每孔加入含100 mL/L FBS的MEM培养液

2 mL, 置37 °C, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度的培养箱中过夜培养. 取出6孔板, 用无血清的MEM培养液清洗细胞2次; 用无血清的MEM培养液配置咪达唑仑(药物初始浓度1 g/L), 终浓度为1 mg/L, 室温孵育数分钟. 将配置好的含有咪达唑仑的培养液加入6孔板中, 每孔2 mL, 置37 °C、50 mL/L CO₂, 饱和湿度的培养箱中培养1 h. 取出6孔板, 从每孔中取出100 μL培养液于干净的微离心管中, 加入300 μL含PRO 100 μg/L的终止液终止反应; (4)随行标准曲线及质控样品制备: 取1 g/L MDZ母液用细胞培养液缓冲液稀释成10、20、50、200、500、1 000 μg/L标准曲线工作液. 加入3倍标准溶液体积的含PRO 100 μg/L的终止液混合, 涡旋涡旋2 min, 混匀后14 000 r/min离心10 min, 取上清10 μL进样至LC-MS检测.

1.2.8 C3A-空白及C3A-未优化细胞系代谢功能的检测(利多卡因转化试验): 按照每孔约5×10⁴个细胞将C3A-空白和C3A-未优势化细胞接种于24孔板中, 每组细胞12个孔, 每孔中加入含100 mL/L FBS的MEM培养液和含浓度为400 μg/L Zeocin, 100 mL/L FBS的MEM培养液1 mL, 置37 °C、50 mL/L CO₂, 饱和湿度的培养箱中过夜培养. 将浓度为20 g/L的盐酸利多卡因溶液分别用含100 mL/L FBS的MEM培养液和含浓度为400 μg/L Zeocin, 100 mL/L FBS的MEM培养液稀释至浓度为80 mg/L. 弃去24孔板中培养液, 将配置好的浓度为80 mg/L利多卡因溶液分别加入24孔板中的相应细胞中, 每孔约1 mL, 按照2、8、12、24 h留取培养液标本, 每次留取约500 μL, 4 °C保存. 留取的培养液标本送公安部物证鉴定中心用微流控毒物快速检测仪测定利多卡因浓度.

2 结果

2.1 肝脏肿瘤细胞系C3A对zeocin敏感度试验 用浓度为150-600 mg/L的Zeocin对C3A细胞进行敏感度试验, 结果确定最佳筛选剂量为400 mg/L, 加入该浓度抗生素筛选2 wk后, 细胞几乎全部死亡, 存活的个别细胞形态也发生了极大的变异, 符合Zeocin说明书中描述(图1).

2.2 qRT-PCR

2.2.1 CYP 3A4的表达: CYP 3A4在C3A-未优势化瞬时转染细胞中的表达量是在C3A-空白细胞中的45467531.15倍, 在C3A-未优势化稳转细胞中的表达量是在C3A-空白细胞中的256452.7175倍(图2A).

2.2.2 GST A1的表达: GST A1在C3A-未优势化

■ 相关报道

来源于HepG2的C3A细胞具有良好的肝细胞特异功能, 如分泌白蛋白和甲胎蛋白, 参与尿素合成和糖原合成, 分泌肝脏特异的凝血因子, 表达高水平的细胞色素酶P450活性等, 而且致瘤性较低.

■创新亮点

构建双表达重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1转染肝脏肿瘤细胞系C3A, 并对其合成、代谢、解毒等功能及性状进行综合评价。



图1 浓度为400 mg/L的Zeocin对C3A细胞进行敏感度试验2 wk时的细胞生长情况。

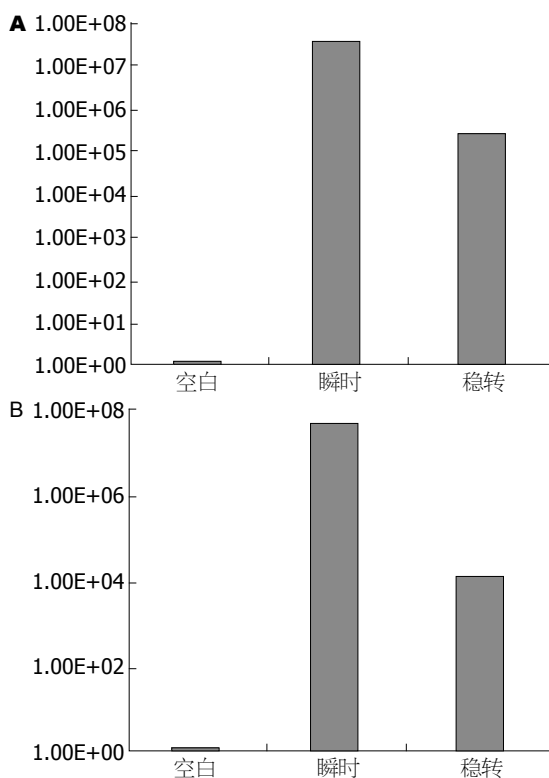


图2 C3A-空白、C3A-未优势化瞬时和稳转细胞目的基因的qRT-PCR检测。A: 目的基因CYP 3A4; B: 目的基因GST A1。

瞬时转染细胞中的表达量是在C3A-空白细胞中的47893725.72倍, 在C3A-未优势化稳转细胞中的表达量是在C3A-空白细胞中的13493.71523倍(图2B)。

2.3 MTT检测C3A-空白和C3A-未优势化细胞系的生长情况 转染重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1的细胞系C3A-未优势化生长速率低于未转染质粒的C3A-空白细胞系, 提示CYP 3A4和/或GST A1的表达量增加可能会导致细胞生长受到抑制(图3)。

2.4 C3A-未优势化肝细胞系的合成功能

2.4.1 前白蛋白、胆碱酯酶、甲胎蛋白、葡萄糖、肌酐的检测: 在C3A细胞转染重组质粒前后

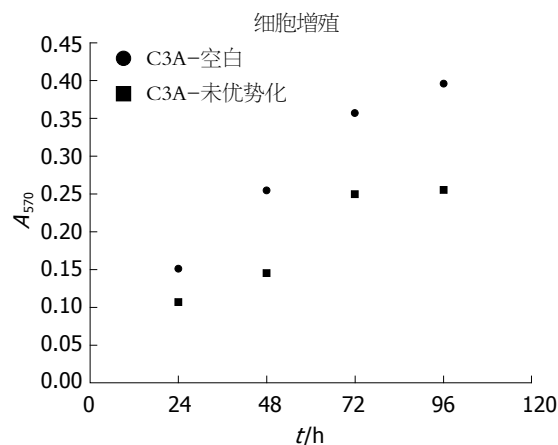


图3 C3A-空白和C3A-未优势化细胞系的生长情况。

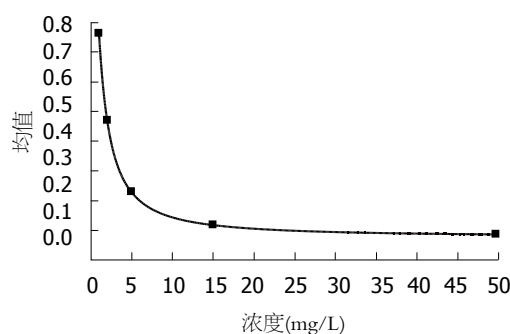


图4 根据标准品浓度与4值绘制出的标准曲线。

表1 C3A-空白和C3A-未优势化上清培养液中的各种生化指标的检测

检测指标	C3A-空白	C3A-未优势化
白蛋白(g/L)	1.67 ± 0.58	1.33 ± 0.58
前白蛋白(mg/L)	3.33 ± 0.58	3
胆碱酯酶(U/L)	20.67 ± 18.77	21.67 ± 31.5
甲胎蛋白(μg/L)	114.33 ± 2.08	398.67 ± 10.69 ^b
葡萄糖(mmol/L)	2.1 ± 0.1	1.52 ± 0.39

^bP<0.01 vs C3A-空白。

前白蛋白、胆碱酯酶、葡萄糖的检测结果显示无统计学差异, 而甲胎蛋白的检测结果显示存在统计学差异, C3A-未优势化细胞培养液中的AFP明显高于C3A-空白细胞(表1)。

2.4.2 细胞培养上清液中人白蛋白的ELISA检测: 根据标准曲线测得待测标本的ALB含量(mg/L, 图4); ELISA法检测C3A细胞在转染重组质粒前后细胞培养上清液中人白蛋白的含量变化, 分别为1.166 ± 0.123、1.119 ± 0.086, 二者无统计学差异。

2.5 C3A-空白和C3A-未优势化细胞系的细胞色素P450 3A4活性的测定 色谱法测定结果提

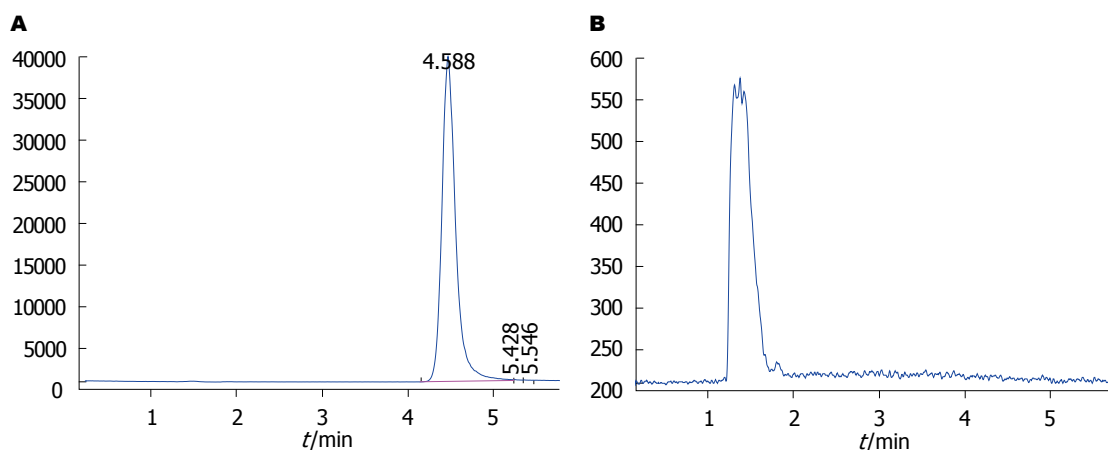


图 5 C3A-空白细胞株加入MDZ(1 mg/L)孵育1 h后的色谱图. A: 标准品; B: C3A-空白细胞.

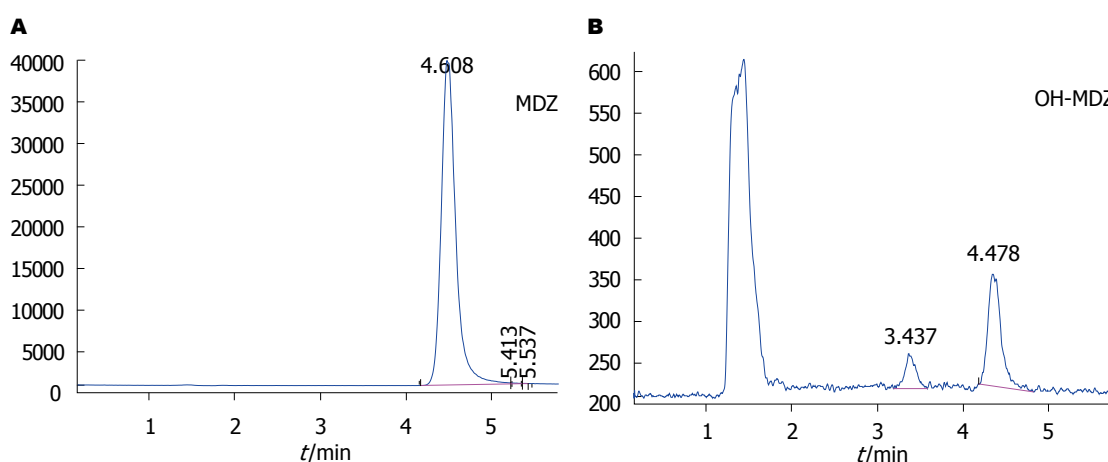


图 6 C3A-未优势化细胞株加入MDZ(1 mg/L)孵育1 h后的色谱图. A: 标准品; B: C3A-空白细胞.

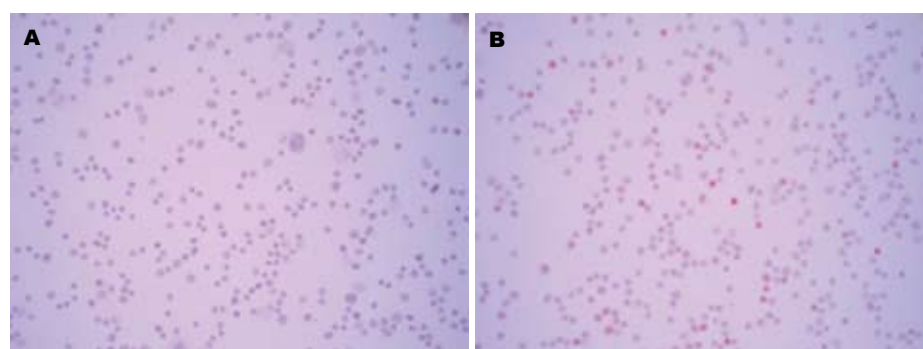


图 7 GST A1在C3A-空白肝细胞系及C3A-未优势化肝细胞系中的表达($\times 200$). A: C3A-空白肝细胞系; B: C3A-未优势化肝细胞系.

示, C3A-空白细胞株加入MDZ孵育1 h后无羟化MDZ的形成, 而C3A-未优势化细胞株加入MDZ孵育1 h后有2种羟化MDZ的形成, 说明C3A-未优势化细胞系的细胞色素P450 3A4存在活性, 而C3A-空白细胞系的细胞色素P450 3A4活性较低, 检测不出(图5, 6).

2.6 免疫组织化学检测GST A1在C3A-未优势化和C3A-空白肝细胞系中的表达 GST A1在C3A-未优势化细胞系中表达较好, 而在C3A-空白肝细胞系表达量较低, 检测不到(图7).

2.7 C3A-空白及C3A-未势优化细胞系的利多卡因转化试验 C3A-空白及C3A-未优势化细胞系在不同时间对利多卡因的代谢存在差异, 转染质粒的C3A-未优势化细胞系较未转染质粒的C3A-空白细胞系对利多卡因的代谢能力强, 代谢率为62.5%(表2).

3 讨论

肝脏是人体重要的合成、解毒和代谢器官. 在严重肝脏疾病时, 由于在肝脏表达的药物代谢

■名词解释

生物人工肝支持系统: 借助体外机械、化学或生物装置、暂时替代肝脏功能, 清除有害物质, 补充生物活性物质, 从而使肝细胞得以再生至自体肝脏功能恢复或等待机会进行肝移植的治疗方法。

表 2 C3A-空白及C3A-未优化细胞系的利多卡因转化试验

	利多卡因浓度(mg/L)	
	C3A-空白	C3A-未势优化
0 h	80	80
2 h	2.53 ± 8.48	39.99 ± 10.83 ^b
8 h	51.35 ± 15.33	35.11 ± 5.49 ^d
12 h	50.21 ± 7.46	35.08 ± 2.25 ^f
24 h	48.85 ± 9.72	30.66 ± 4.14 ^h

^b*P*<0.01; ^d*P*<0.01; ^f*P*<0.01; ^h*P*<0.01.

酶含量及活性均受到影响, 因此肝脏的药物代谢能力下降, 从而使得药效降低, 而不良反应增加, 影响药物疗效, 并且会进一步损伤肝脏. 对于此类患者, 在内科治疗效果不佳的情况下, 人工肝不失为一种良好的治疗方法. 人工肝中的生物型和混合型生物人工肝由于引入肝细胞, 在一定程度上能够替代肝脏的合成、解毒和代谢功能因而受到广泛关注. 最理想的生物人工肝反应器中的细胞材料应该具备成熟肝细胞的所有生物合成、代谢解毒功能^[1,2], 但迄今为止尚未出现一种肝细胞能够完全满足生物人工肝的需要. 现用于临床研究的从HepG2细胞系中获得的C3A细胞系, 被证实有一定的疗效^[3,4]. 严重肝脏疾病患者体内有大量毒性产物蓄积, 这些毒性产物在被生物人工肝解除的同时, 亦会对反应器中的肝细胞产生毒性作用. 本研究构建了表达 I 相药物代谢酶CYP 3A4和 II 相药物代谢酶GST-A1的C3A细胞系, 以期提高其对药物的代谢能力, 并减轻毒性产物对肝细胞的毒性损伤作用.

细胞色素P450酶(CYP450)是药物代谢涉及的主要酶, 因其CO结合物在450 nm处的光谱吸收峰而命名, 存在于许多组织和器官中, 但是含量在肝脏中最为丰富, 因此与肝脏疾病关系密切^[5]. CYP450能够催化大量内源性和外源性复合物的代谢, 包括: 异生物质、药物、环境毒物、类固醇和脂肪酸等, 其能够减轻药物毒性, 使得通常的用药剂量能够被多数人合理的速率清除^[6]. 真核细胞CYP450通常由480-560个氨基酸组成, 绝大多数嵌入内质网或线粒体膜中, 分别被称为微粒体型CYP450和线粒体型CYP450^[5]. 在57个人类CYP450中, 5个参与了95%的药物代谢反应^[7], 即: CYP 3A4、2C9、2C19、2D6和1A2. 其中, CYP 3A4是人类最重要、在肝脏中含量最丰富的药物代谢CYP450,

占总肝脏CYP450的60%, 能够代谢120多种不同种类的药物, 不同程度地参与60%的临床用药代谢^[5,8]. 肝脏疾病患者CYP 3A4蛋白的活性和表达均有不同程度的减少^[9-14].

GST由200-240个氨基酸组成, 其3级结构为一种球状的二聚体蛋白, 以同源或异源二聚体状态存在的GST具有催化活性^[15], 被分为Alpha(GSTA)、Kappa(GSTK)、Mu(GSTM)、Pi(GSTP)、Sigma(GSTS)、Theta(GSTT)、Zeta(GSTZ)和Omega(GSTO)等8个家族^[16,17]. GST是细胞防御多种内源性和环境产生的毒性化合物的一部分, 保护大分子免受活性亲电子物质的攻击^[18]. GST的通常反应是将谷胱甘肽(GSH)加至具有各种化学结构的亲电子物质上, 促进其在细胞内降解清除和/或分泌至细胞外. 重要的底物包括由 I 相CYP450催化衍生出的多环芳香族碳氢环氧化物, 多种氧化反应的副产物、工业污染物和化学药品、化疗药物、卤代溶剂等^[19]. 此外, GST亦可作为转运蛋白转运亲脂化合物, 如: 胆红素、胆酸、类固醇激素和不同的外源性化合物, 并参与类固醇激素的合成^[20]. 通过酶促和非酶促反应, 解除化学诱变剂、促癌剂以及脂质和DNA氢过氧化物的毒性, 保护正常细胞免受致癌和促癌因素的影响, 在抗诱变和抗肿瘤中起重要作用^[21,22]. 其中GSTA的活性和含量在人肝脏中占优势, 在肝细胞损伤时被快速大量释放入血, 包括2个由单独基因编码的免疫学不同的亚单位, GSTA1和GSTA2, 从人类肝脏中纯化出同源二聚体GSTA1-1、GSTA2-2和异源二聚体GSTA1-2. 某些GST同功酶含有非硒依赖性谷胱甘肽过氧化酶(GPx)的活性, 能清除脂类自由基, 有抗脂质过氧化的作用, GPx活性主要由GST-α展现, GSTA1-1是GST-α家族中的主要成员, 对于脂质过氧化物有较高的GPx活性.

本研究用构建好的重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1转染C3A细胞系. 用MTT法检测构建成功的转染未经优势化的重组质粒pBudCE4.1-CYP 3A4-GST A1的C3A-未优势化细胞系与作为对照的未转染质粒的C3A-空白的肝细胞增殖情况, 发现C3A-未优势化细胞系生长较C3A-空白缓慢, 从而得出结论CYP 3A4和GST A1的表达量增加会导致细胞生长受到抑制. 其原因可能为: 加入的筛选抗生素Zeocin细胞毒性较大, GST在对抗其细胞毒性的过程中, 需消耗GSH, 而GSH合成中的重要原料为谷氨酰胺,

是细胞培养液中的重要营养物质, 由于谷氨酰胺的含量明显减少, 从而使得细胞的生长受到抑制. 虽然C3A-未优势化细胞系的生长速度较C3A-空白缓慢, 但通过qRT-PCR、CYP 3A4的活性测定, GST A1的免疫组织化学以及利多卡因转化试验等研究结果表明, C3A-未优势化细胞系的CYP 3A4和GST A1的含量和活性均有所增加, 功能亦有所改善, 有望成为生物人工肝系统的细胞材料.

4 参考文献

- 1 Chamuleau RA, Deurholt T, Hoekstra R. Which are the right cells to be used in a bioartificial liver? *Metab Brain Dis* 2005; 20: 327-335
- 2 Hoque ME, Mao HQ, Ramakrishna S. Hybrid braided 3-D scaffold for bioartificial liver assist devices. *J Biomater Sci Polym Ed* 2007; 18: 45-58
- 3 Shi Q, Gaylor JD, Cousins R, Plevris J, Hayes PC, Grant MH. The effects of serum from patients with acute liver failure on the growth and metabolism of Hep G2 cells. *Artif Organs* 1998; 22: 1023-1030
- 4 刘鸿凌, 辛绍杰, 貌盼勇. 生物人工肝支持系统中细胞材料的选择. *中国组织工程研究与临床康复* 2007; 11: 9561-9564
- 5 Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1-42
- 6 Lee HS, Yang M. Applications of CYP-450 expression for biomonitoring in environmental health. *Environ Health Prev Med* 2008; 13: 84-93
- 7 Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet* 1997; 32: 210-258
- 8 McKinnon RA, Burgess WM, Hall PM, Roberts-Thomson SJ, Gonzalez FJ, McManus ME. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. *Gut* 1995; 36: 259-267
- 9 Yang LQ, Li SJ, Cao YF, Man XB, Yu WF, Wang HY, Wu MC. Different alterations of cytochrome P450 3A4 isoform and its gene expression in livers of patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 359-363
- 10 Lown K, Kolars J, Turgeon K, Merion R, Wrighton SA, Watkins PB. The erythromycin breath test selectively measures P450IIIa in patients with severe liver disease. *Clin Pharmacol Ther* 1992; 51: 229-238
- 11 Huet PM, Villeneuve JP. Determinants of drug disposition in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1983; 3: 913-918
- 12 Kleinbloesem CH, van Harten J, Wilson JP, Danhof M, van Brummelen P, Breimer DD. Nifedipine: kinetics and hemodynamic effects in patients with liver cirrhosis after intravenous and oral administration. *Clin Pharmacol Ther* 1986; 40: 21-28
- 13 Chalasani N, Gorski JC, Patel NH, Hall SD, Galinsky RE. Hepatic and intestinal cytochrome P450 3A activity in cirrhosis: effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2001; 34: 1103-1108
- 14 Horiike N, Abe M, Kumagi T, Hiasa Y, Akbar SM, Michitaka K, Onji M. The quantification of cytochrome P-450 (CYP 3A4) mRNA in the blood of patients with viral liver diseases. *Clin Biochem* 2005; 38: 531-534
- 15 Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* 1988; 23: 283-337
- 16 Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 1999; 31: 273-300
- 17 Blackburn AC, Tzeng HF, Anders MW, Board PG. Discovery of a functional polymorphism in human glutathione transferase zeta by expressed sequence tag database analysis. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 49-57
- 18 Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 2001; 482: 21-26
- 19 Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445-600
- 20 Johansson AS, Mannervik B. Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J Biol Chem* 2001; 276: 33061-33065
- 21 Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J* 1999; 18: 1321-1334
- 22 Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7369-7375

■同行评价

该研究设计合理, 实验技术成熟, 实验结果可信, 对生物人工肝系统的临床应用提供了较好的参考价值.

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

表氧化二十碳三烯酸对游离脂肪酸诱导胰岛β细胞凋亡的抑制作用

吴斌, 张玫, 吕瑞雪, 罗通行, 李一松, 王兰兰

■背景资料

研究显示血浆游离脂肪酸(FFAs)水平上升严重削弱胰腺β细胞功能, 循环FFAs水平急性上升可以有效地刺激β细胞分泌胰岛素; 然而, 持续性上升则导致胰腺β细胞凋亡。

吴斌, 张玫, 吕瑞雪, 罗通行, 李一松, 王兰兰, 四川大学华西医院实验医学科 四川省成都市 610041

吴斌, 讲师, 博士, 主要从事消化系统疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81101326

作者贡献分布: 吴斌与张玫对此文所作贡献均等; 此课题由吴斌设计; 流式细胞检测由张玫操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吕瑞雪提供; 原代细胞培养与处理由罗通行与李一松完成; 数据分析由吴斌、张玫及王兰兰完成; 本论文写作由吴斌完成。

通讯作者: 王兰兰, 教授, 主任检验师, 博士研究生导师, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院实验医学科。

wchcbc@yahoo.com.cn

电话: 028-85422615 传真: 028-85423496

收稿日期: 2012-02-01 修回日期: 2012-03-05

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

11,12-Epoxyeicosatrienoic acid inhibits free fatty acid-induced apoptosis of pancreatic β-cells through targeting nuclear ATF4 and ATF6

Bin Wu, Mei Zhang, Rui-Xue Lv, Tong-Xing Luo, Yi-Song Li, Lan-Lan Wang

Bin Wu, Mei Zhang, Rui-Xue Lv, Tong-Xing Luo, Yi-Song Li, Lan-Lan Wang, Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81101326

Correspondence to: Lan-Lan Wang, Professor, Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. wchcbc@yahoo.com.cn

Received: 2012-02-01 Revised: 2012-03-05

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of 11,12-epoxyeicosatrienoic acid (EET) on free fatty acid-induced cell apoptosis and translocation of activating transcription factor 4 (ATF4) and activating transcription factor 6 (ATF6) in primarily cultured murine pancreatic β-cells.

METHODS: Primary pancreatic β-cells were isolated from murine pancreas islets and cultured. After treatment with palmitic acid (400 μmol/L), pancreatic β-cells were incubated with 11,12-EET (100 nmol/L) for 24 h. Viability of primary pan-

creatic β-cells was examined by WST-1 colorimetric assay. Changes in mitochondrial membrane potential were evaluated to observe depolarization of cellular mitochondria by flow cytometry. Western blot was used to determine the protein expression of cytoplasmic and nuclear ATF4 and ATF6 to observe their translocation.

RESULTS: After treatment with palmitic acid and 11,12-EET for 24 h, viability of primary pancreatic β-cells was significantly increased ($62.1\% \pm 7.3\%$ vs $53.0\% \pm 6.1\%$, $P < 0.05$), and mitochondrial depolarization ($23.6\% \pm 3.4\%$ vs $35.2\% \pm 4.7\%$, $P < 0.05$) and apoptosis rate ($24.5\% \pm 4.2\%$ vs $40.1\% \pm 5.6\%$, $P < 0.05$) were markedly decreased compared to cells treated with palmitic acid alone. Palmitic acid significantly increased cytoplasmic but decreased nuclear protein levels of ATF4 and ATF6 in pancreatic β-cells.

CONCLUSION: 11,12-EET significantly inhibits FFA-induced apoptosis of pancreatic β-cells by inhibiting the translocation of ATF4 and ATF6.

Key Words: Free fatty acids; 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid; Endoplasmic reticulum stress; Activating transcription factor 4; Activating transcription factor 6; Pancreatic β-cells

Wu B, Zhang M, Lv RX, Luo TX, Li YS, Wang LL. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid inhibits free fatty acid-induced apoptosis of pancreatic β-cells through targeting nuclear ATF4 and ATF6. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1088-1093

摘要

目的: 研究11,12-表氧化二十碳三烯酸(11,12-epoxyeicosatrienoic acids, 11,12-EETs)抑制游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)对原代小鼠胰岛β细胞凋亡的影响, 探讨11,12-EETs保护胰岛β细胞是否通过抑制内质网应激相关转录因子ATF4与ATF6核转位来实现。

方法: 棕榈酸(palmitic acids, PA)诱导原代小鼠胰岛β细胞凋亡, 与11,12-EETs共同孵育24 h

■同行评议者

黄昆, 教授, 华中科技大学同济药学院

后, 采用流式细胞术检测该细胞的线粒体膜电位的变化与细胞凋亡水平的改变, 以观察11,12-EETs对原代小鼠胰岛β细胞的保护作用; 用免疫印迹法检测内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)相关转录因子ATF4与ATF6在胞浆与胞核中的蛋白表达, 以此观察二者的核转位改变。

结果: 100 nmol/L 11,12-EETs与400 μmol/L PA共同孵育胰岛β细胞24 h后, 与FFAs对照组相比, FFAs+EET组可显著提升胰岛β细胞的存活率($62.1\% \pm 7.3\%$ vs $53.0\% \pm 6.1\%$), 并明显降低胰岛β细胞线粒体的去极化水平($23.6\% \pm 3.4\%$ vs $35.2\% \pm 4.7\%$); 11,12-EETs可有效抑制PA诱导的细胞凋亡($24.5\% \pm 4.2\%$ vs $40.1\% \pm 5.6\%$); 同时, PA刺激的ATF4与ATF6的核转位受到11,12-EETs的影响, 胞核ATF4与ATF6蛋白水平显著性降低, 胞浆ATF4与ATF6蛋白水平明显上调。

结论: 11,12-EETs可以抑制FFAs诱导的凋亡, 其分子机制可能是通过抑制FFAs引发的ATF4与ATF6转位导致内质网应激相关基因表达。

关键词: 游离脂肪酸; 11,12-表氧化二十碳三烯酸; 内质网应激; 转录激活因子4; 转录激活因子6; 胰岛β细胞

吴斌, 张梅, 吕瑞雪, 罗通行, 李一松, 王兰兰. 表氧化二十碳三烯酸对游离脂肪酸诱导胰岛β细胞凋亡的抑制作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1088-1093

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1088.asp>

0 引言

研究显示血浆游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)水平上升严重削弱胰腺β细胞功能^[1-4]; 同时, 循环FFAs水平急性上升可以有效地刺激β细胞分泌胰岛素^[5]; 然而, 持续性上升则导致胰腺β细胞凋亡^[6]。11,12-表氧化二十碳三烯酸(11,12-epoxyeicosatrienoic acids, 11,12-EETs)由细胞色素P450表氧化酶代谢花生四烯酸产生, 被可溶性环氧水解酶(soluble epoxide hydrolase, SEH)代谢为DHET(dihydroxyeicosatrienoic acids)^[7]。传统观点认为其主要作用是激活钙敏感的钾通道使平滑肌细胞处于超极化状态从而舒张血管^[8]; 最近报道显示SEH基因敲除小鼠糖尿病模型胰岛β细胞功能明显改善^[9], EETs水平上升显著性抑制糖尿病发病过程的胰岛β细胞凋亡^[10]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)削弱2型糖尿病发病过程中的胰岛β细胞胰岛素分泌功能并导致

其凋亡^[11,12]。那么转录激活因子4(activating transcription factor 4, ATF4)与ATF6是否参与EETs抑制FFAs诱导的胰岛β细胞凋亡呢? 本实验以FFAs诱导胰岛β细胞凋亡, 通过11,12-EETs干预这一过程, 观察其是否有保护作用, 同时明确EETs对FFAs刺激的ATF4与ATF6转位的影响, 探讨EETs在保护糖尿病胰腺功能以及胰岛β细胞凋亡方面的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基、FBS和胰酶为Gibco公司产品; 11,12-EETs购自美国Cayman公司; 棕榈酸(palmitic acid, PA)、IV胶原酶、Histopaque-1077分离液和二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO)均购自Sigma-Aldrich公司; 无脂肪酸牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒和PVDF膜为德国ROCHE公司产品; 线粒体膜电位(JC-1)检测试剂盒、Annexin-V/PI细胞凋亡检测试剂盒及BCA增强型蛋白浓度检测试剂盒为中国碧云天生物技术公司产品; ATF4与ATF6抗体购自英国Abcam公司; β-actin为美国Santa-cruz公司产品; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和抗鼠IgG为美国Invitrogen公司产品; 增强化学发光法(ECL)试剂盒购自美国Thermo-fisher公司; 细胞胞浆和核蛋白抽提试剂盒与蛋白Marker为Fermentas公司产品; 流式细胞仪为Beckman coulter产品(FC500型)。实验中所用其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 胰岛分离和原代β细胞培养: 从8-10 wk的C57BL/6小鼠胰腺分离胰岛。斩首法处死小鼠, 将含有1 g/L IV型胶原酶的不含Ca²⁺Hanks缓冲液通过导管注入已处死小鼠胰腺使其膨胀, 胰腺随即分离取出, 然后在37 °C下孵育20 min; 加入一定比例Hitopaque-1077细胞分离液混合后采取密度梯度离心, 在解剖显微镜下手工吸出单个胰岛细胞。分离完全的β细胞植入6孔板、12孔板和96孔板, 用含100-200 mL/L FBS的RPMI1640培养基(血清浓度视分离β细胞状态)置于37 °C、50 mL/L CO₂的培养箱中经相应干预处理后用于后续实验。

1.2.2 细胞实验设计和分组处理: 本实验前期预实验显示20、50、100 nmol/L 11,12-EETs在胰岛β细胞保护方面存在剂量依赖性, 100 nmol/L 11,12-EETs保护效应最为显著; 同时我们观察到

■ 研发前沿

11,12-表氧化二十碳三烯酸(EETs)具有血管舒张、抗炎、抗高血压、促血管生成、抗动脉粥样硬化和抗缺血再灌注引起的损伤等众多生理作用; 最近其治疗胰岛素抵抗、1型和2型糖尿病的作用正越来越受到关注。

■相关报道

可溶性环氧化水解酶(SEH)基因敲除小鼠糖尿病模型胰岛β细胞功能明显改善, EETs水平上升显著性抑制糖尿病发病过程的胰岛β细胞凋亡。

100 nmol/L 11,12-EETs不会引起胰岛β细胞线粒体除极化和凋亡(结果在本文未显示)。细胞实验分组为: 空白对照组、溶媒对照组(0.4%无脂肪酸BSA和5 μL DMSO)、FFAs对照组(400 μmol/L PA)、FFAs+EET组(400 μmol/L PA+100 nmol/L 11,12-EET), 共同孵育24 h。

1.2.3 WST-1法检测细胞凋亡: 通常细胞毒性实验每孔加入100 μL(5 000个细胞), 并添加10 μL WST-1溶液。若起始培养体积为200 μL, 则需加入20 μL WST-1溶液, 其他情况以此类推。可以用添加相应量细胞培养液和WST-1溶液但未加细胞的孔作为空白对照。在450 nm测定吸光度(A)值, 该数值水平反映存活细胞数量和活力高低。

1.2.4 细胞线粒体膜电位(JC-1)检测: 取适量JC-1(200×), 按照每50 μL JC-1(200×)加入8 mL超纯水的比例稀释JC-1, 加入2 mL JC-1染色缓冲液(5×), 混匀后即成为JC-1染色工作液。Hanks缓冲液洗涤细胞1次, 加入0.5 mL RPMI1640细胞培养基, 再加入1 mL JC-1染色工作液, 充分混匀。细胞培养箱中37 °C孵育20 min; 孵育期间, 按照每1 mL JC-1染色缓冲液(5×)加入4 mL蒸馏水的比例, 配制适量的JC-1染色缓冲液(1×), 并放置于冰浴。孵育结束后, 吸除上清, 用JC-1染色缓冲液(1×)洗涤2次, 加入1 mL细胞培养液, 流式细胞仪上机检测。

1.2.5 流式细胞术检测早期凋亡: 把细胞培养液吸出至新的1.5 mL EP管, PBS洗涤1次, 加入适量胰酶工作液(含有EDTA)消化。若镜下观察细胞变圆即可停止消化, 1 000 r/min离心5 min, 弃掉上清; 加入前述中收集的细胞培养液, 稍混匀, 转移到离心管内, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 收集细胞, 用1×PBS缓冲液轻轻吹打混匀细胞; 取5-10万重悬的细胞, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入195 μL Annexin V-FITC结合液轻轻吹打, 室温下放置5 min; 再加入5 μL Annexin V-FITC溶液, 轻轻吹打混匀; 室温避光孵育10 min; 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入190 μL Annexin V-FITC结合液轻轻重悬细胞; 加入10 μL碘化丙啶染色液, 轻轻吹打混匀, 避光; 30 min内信号流式细胞仪检测为宜, Annexin V-FITC为绿色荧光, PI为红色荧光。

1.2.6 Western blot: 收集各组胰岛β细胞, 提取细胞胞浆蛋白与核蛋白, BCA增强蛋白浓度测定法进行蛋白定量。以每泳道20-25 μg蛋白量上样, 经SDS-PAGE电泳分离蛋白, 4 °C转膜过夜使蛋白转移至PVDF膜上。室温下脱脂奶粉封闭2.5 h,

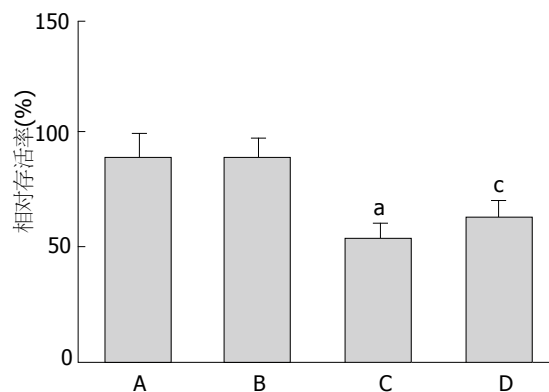


图1 11,12-EET抑制FFAs诱导的胰岛β细胞凋亡(WST-1法)。A: 空白对照组; B: 溶媒对照组; C: FFAs对照组; D: FFAs+EET组。^a $P < 0.05$ vs 空白对照组; ^c $P < 0.05$ vs FFAs对照组。

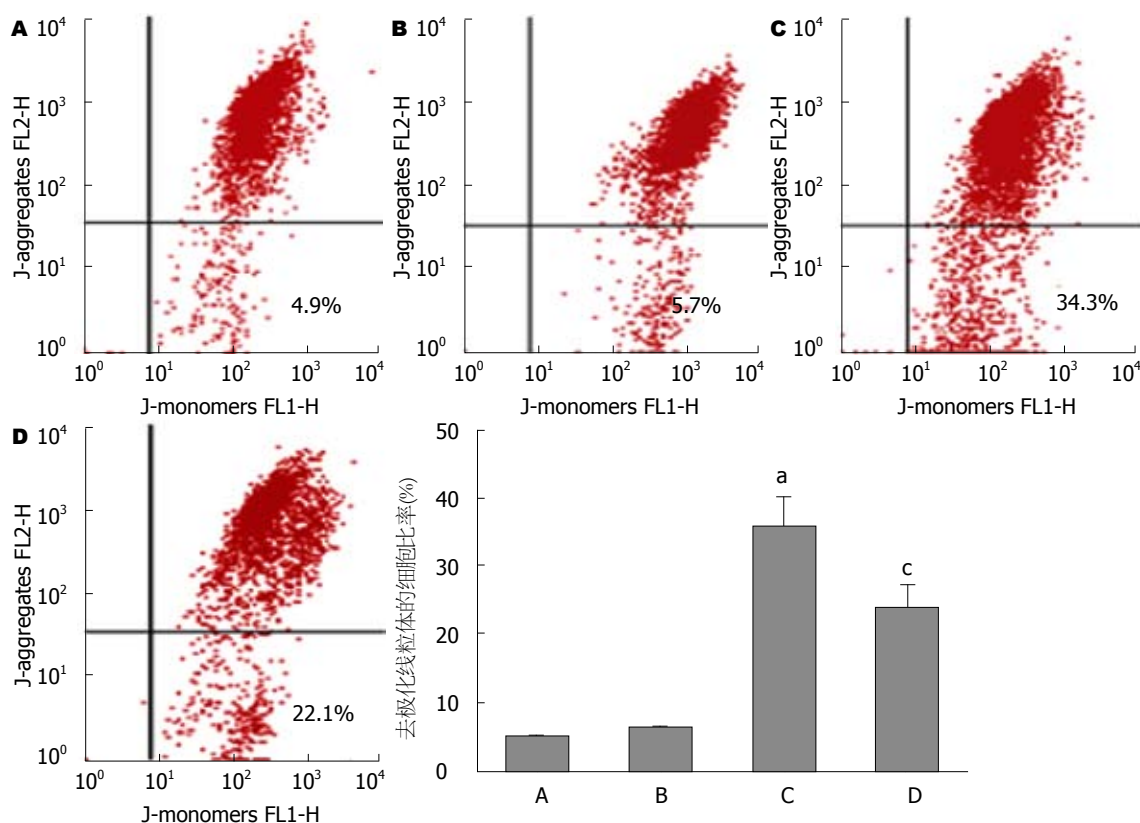
用一抗ATF4(1:2 000)、ATF6(1:2 000)孵育过夜, TBST缓冲液漂洗3-6次, 辣根过氧化物酶标记的山羊兔和鼠二抗(1:5 000)室温分别孵育2-3 h, 曝光显影成像通过凝胶分析系统软件分析。以上实验均重复3次。

统计学处理 所有数据均以mean±SD表示, 应用SPSS13.0软件按进行统计学分析, 每个分组间的差异采用单因素方差分析(ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 11,12-EET抑制FFAs诱导的小鼠原代胰岛β细胞凋亡 空白对照组细胞存活率为87.7%±10.3%, 溶媒对照组细胞存活率为86.2%±9.9%, FFAs对照组细胞存活率为53.0%±6.1%, FFAs+EET组细胞存活率为62.1%±7.3%。与空白对照组相比, FFAs组细胞存活率显著性降低($P < 0.05$), FFAs+EET组细胞存活率较FFAs对照组增高, 两者差异具有统计学差异($P < 0.05$, 图1); 流式细胞术检测各分组细胞线粒体膜电位, 与空白对照组比较, FFAs对照组含有去极化线粒体的细胞比率有显著性增高(35.2%±4.70% vs 4.7%±0.9%, $P < 0.05$), 而较FFAs对照组相比, FFAs+EET组含有去极化线粒体的细胞比率显著性降低(23.6%±3.4% vs 35.2%±4.70%, 图2); 流式细胞术检测各分组细胞凋亡, 结果显示FFAs对照组与空白对照组相比较其凋亡水平明显增高(40.1%±5.6% vs 8.2%±1.6%, $P < 0.05$), FFAs+EET组与FFAs对照组比较其凋亡水平则明显降低(24.5%±4.2% vs 40.1%±5.6%, $P < 0.05$, 图3)。综上所述, 11,12-EET可有效提高胰岛β细胞存活率和抑制FFAs诱导的细胞凋亡。

2.2 11,12-EET抑制FFAs刺激的小鼠原代胰岛β



■应用要点

本研究结果提示EETs在抑制FFAs诱导的胰岛β细胞凋亡方面起到重要的作用,这为我们提供胰岛素抵抗、代谢综合征和糖尿病等疾病时胰腺功能的保护提供新的理论依据与思路。

图 2 11,12-EET抑制FFAs诱导的胰岛β细胞线粒体膜电位下降。A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: FFAs对照组; D: FFAs+EET组。 ^a*P*<0.05 vs 空白对照组; ^c*P*<0.05 vs FFAs对照组。

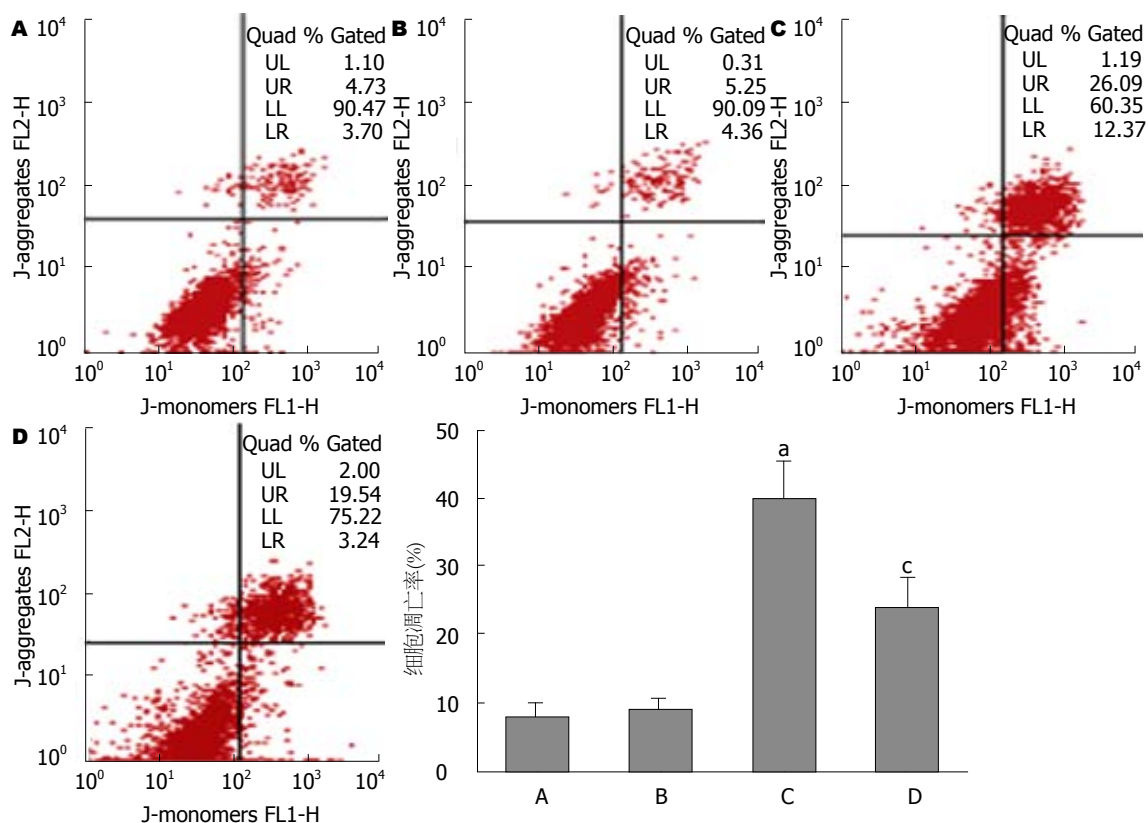


图 3 11,12-EET可减少FFAs诱导的细胞凋亡。A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: FFAs对照组; D: FFAs+EET组。 ^a*P*<0.05 vs 空白对照组; ^c*P*<0.05 vs FFAs对照组。

■同行评价

本文利用FFAs诱导胰岛β细胞凋亡,通过11,12-EETs干预这一过程确定EETs的保护性作用,并探讨了EETs在保护糖尿病胰腺功能以及胰岛β细胞凋亡的分子机制,文章思路较新颖,并有较好的研究意义和科研价值。

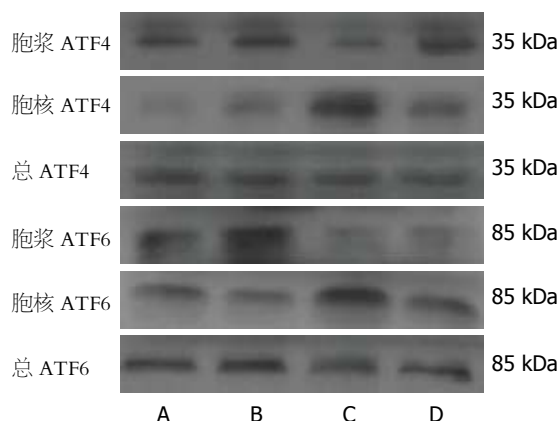


图4 11,12-EET抑制FFAs刺激的ATF4与ATF6核转位。A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: FFAs对照组; D: FFAs+EET组。

细胞ATF4与ATF6转录因子的核转位 Western blot显示, FFAs对照组胞浆ATF4/ATF6水平与其他各实验分组比较显著性降低($P<0.05$), 而核ATF4/ATF6水平较其他各实验分组明显升高($P<0.05$); 与FFAs对照组相比, FFAs+EET组胞浆ATF4/ATF6水平升高($P<0.05$), 核ATF4/ATF6水平降低($P<0.05$, 图4)。综上, 11,12-EET抑制FFAs刺激的ATF4与ATF6的核转位。

3 讨论

11,12-EET由细胞色素P450表氧化酶代谢花生四烯酸产生, 其在胰岛素分泌和作用以及糖脂代谢中扮演重要角色^[13]。现已证实, EETs具有血管舒张、抗炎症、抗高血压、促血管生成、抗动脉粥样硬化和抗缺血再灌注引起的损伤等众多生理作用^[14-16]。最近其治疗胰岛素抵抗、1型和2型糖尿病的作用正愈来愈受到关注^[17-20]。EETs主要通过激活PI3K-AKT信号通路从而抑制胰岛素抵抗, 抑制糖尿病引起的靶器官损伤, 但在其他调节通路上的机制仍不明确^[17,21,22]。血浆FFAs升高削弱胰腺β细胞分泌胰岛素, 促进肥胖所引起的糖耐量受损^[23]; 非糖尿病的健康个体持续性、生理性血浆FFAs升高预示其发展为2型糖尿病几率显著性增加^[24]。糖尿病发生、发展与胰岛β细胞功能失调、胰岛素分泌功能减退紧密相关, 内质网应激则参与了上述病程^[25,26]。Kharroubi等^[27]发现PA通过NF-κB诱导INS-1细胞凋亡, 同时诱发INS-1细胞内质网应激, ATF4发生选择性剪切即ATF4激活转入细胞核, ATF6转录激活; FFAs亦能诱导细胞线粒体功能失调。

FFAs引起的胰腺细胞内质网应激所致的胰岛β细胞功能失调、胰岛素分泌功能减退, 或最终引起胰岛β细胞凋亡与体内小分子活性物

质相关^[28-30]。然而目前尚未有文献报道EETs在FFAs诱导的胰岛β细胞凋亡方面的作用机制。为了探讨EETs在保护胰岛β细胞的新机制, 本文采用PA体外诱导原代小鼠胰岛β细胞凋亡, 同时采用11,12-EETs共同孵育, 利用细胞毒实验、线粒体膜电位检测和流式细胞术检测细胞凋亡以及Western blot检测内质网应激分子ATF4与ATF6核转位的变化。细胞毒实验结果显示11,12-EETs能够明显地保护胰岛β细胞, 提高了与PA共同作用下胰岛β细胞的存活数。线粒体膜电位检测能够直接反映该线粒体极化细胞的水平, 而除极化水平高低反映细胞是否处于细胞凋亡早期。那么通过其水平高低可以得出结论, 11,12-EETs可以显著性抑制FFAs所引起的胰岛β细胞早期凋亡。进一步就上述结果, 我们通过annexin-V/PI法检测细胞凋亡, 与线粒体膜电位检测结果类似, 最后得出, 11,12-EETs可以保护处于高浓度FFAs培养下的胰岛β细胞。Western blot明确显示, 11,12-EETs抑制PA所刺激的ATF4与ATF6转位, 提示由于核转位水平下降, UPR(unfolded protein response, UPR)基因表达水平降低, 从而起到保护胰岛β细胞的作用。

总之, 本研究结果提示EETs在抑制FFAs诱导的胰岛β细胞凋亡方面起到重要的作用。这为我们提供胰岛素抵抗、代谢综合征和糖尿病等疾病下胰腺功能保护提供新的理论依据与思路, 下一步我们将更深入地研究其分子机制和作用靶点。

4 参考文献

- 1 Carpentier A, Mittelman SD, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000; 49: 399-408
- 2 Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst H, Bretzel RG, Häring HU, Kellner M. [Apoptosis induced by free fatty acids]. *Med Klin (Munich)* 2003; 98: 248-252
- 3 Kishore P, Tonelli J, Koppaka S, Fratila C, Bose A, Lee DE, Reddy K, Hawkins M. Time-dependent effects of free fatty acids on glucose effectiveness in type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 1761-1768
- 4 Wilding JP. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2007; 24: 934-945
- 5 Lai E, Bikopoulos G, Wheeler MB, Rozakis-Adcock M, Volchuk A. Differential activation of ER stress and apoptosis in response to chronically elevated free fatty acids in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E540-E550
- 6 Wyne KL. Free fatty acids and type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 2003; 115 Suppl 8A: 29S-36S
- 7 Pfister SL, Gauthier KM, Campbell WB. Vascular

- pharmacology of epoxyeicosatrienoic acids. *Adv Pharmacol* 2010; 60: 27-59
- 8 Fleming I. DiscrEET regulators of homeostasis: epoxyeicosatrienoic acids, cytochrome P450 epoxygenases and vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 448-452
- 9 Luria A, Bettaieb A, Xi Y, Shieh GJ, Liu HC, Inoue H, Tsai HJ, Imig JD, Haj FG, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase deficiency alters pancreatic islet size and improves glucose homeostasis in a model of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 9038-9043
- 10 Luo P, Wang MH. Eicosanoids, β-cell function, and diabetes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; 95: 1-10
- 11 Back SH, Kang SW, Han J, Chung HT. Endoplasmic reticulum stress in the β-cell pathogenesis of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 618396
- 12 Quan W, Lim YM, Lee MS. Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic β-cells. *Exp Mol Med* 2012; 44: 81-88
- 13 Mustafa S, Sharma V, McNeill JH. Insulin resistance and endothelial dysfunction: Are epoxyeicosatrienoic acids the link? *Exp Clin Cardiol* 2009; 14: e41-e50
- 14 Gauthier KM, Yang W, Gross GJ, Campbell WB. Roles of epoxyeicosatrienoic acids in vascular regulation and cardiac preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007; 50: 601-608
- 15 Keserü B, Barbosa-Sicard E, Popp R, Fisslthaler B, Dietrich A, Gudermann T, Hammock BD, Falck JR, Weissmann N, Busse R, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response. *FASEB J* 2008; 22: 4306-4315
- 16 Loot AE, Fleming I. Cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids and pulmonary hypertension: central role of transient receptor potential C6 channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 57: 140-147
- 17 Xu X, Zhao CX, Wang L, Tu L, Fang X, Zheng C, Edin ML, Zeldin DC, Wang DW. Increased CYP2J3 expression reduces insulin resistance in fructose-treated rats and db/db mice. *Diabetes* 2010; 59: 997-1005
- 18 Burgess A, Vanella L, Bellner L, Schwartzman ML, Abraham NG. Epoxyeicosatrienoic acids and heme oxygenase-1 interaction attenuates diabetes and metabolic syndrome complications. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012; 97: 1-16
- 19 Chen G, Wang P, Zhao G, Xu G, Gruzdev A, Zeldin DC, Wang DW. Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 attenuates nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; 96: 63-71
- 20 Skepner JE, Shelly LD, Ji C, Reidich B, Luo Y. Chronic treatment with epoxyeicosatrienoic acids modulates insulin signaling and prevents insulin resistance in hepatocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; 94: 3-8
- 21 Dhanasekaran A, Gruenloh SK, Buonaccorsi JN, Zhang R, Gross GJ, Falck JR, Patel PK, Jacobs ER, Medhora M. Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxyeicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H724-H735
- 22 Xu X, Tu L, Wang L, Fang X, Wang DW. CYP2J3 Gene Delivery Reduces Insulin Resistance via Up-regulation of eNOS in Fructose-treated Rats. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10: 114
- 23 Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 351-356
- 24 Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Bajaj M, Mandarino L, DeFronzo R, Cusi K. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2461-2474
- 25 Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, Biden TJ. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007; 50: 752-763
- 26 Sari FR, Watanabe K, Thandavarayan RA, Harima M, Zhang S, Muslin AJ, Kodama M, Aizawa Y. 14-3-3 protein protects against cardiac endoplasmic reticulum stress (ERS) and ERS-initiated apoptosis in experimental diabetes. *J Pharmacol Sci* 2010; 113: 325-334
- 27 Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 2004; 145: 5087-5096
- 28 Maia RC, Culver CA, Laster SM. Evidence against calcium as a mediator of mitochondrial dysfunction during apoptosis induced by arachidonic acid and other free fatty acids. *J Immunol* 2006; 177: 6398-6404
- 29 van der Kallen CJ, van Greevenbroek MM, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver? *Apoptosis* 2009; 14: 1424-1434
- 30 Szabat M, Kalynyak TB, Lim GE, Chu KY, Yang YH, Asadi A, Gage BK, Ao Z, Warnock GL, Piret JM, Kieffer TJ, Johnson JD. Musashi expression in β-cells coordinates insulin expression, apoptosis and proliferation in response to endoplasmic reticulum stress in diabetes. *Cell Death Dis* 2011; 2: e232

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

Ucn3及其受体CRFR2在肠易激综合征大鼠模型肠神经系统中的表达

刘兆霞, 季万胜, 刘晓丽, 王琳, 韩慧蓉, 房春燕, 赵廷坤, 徐继马, 张广学, 曲梅花

■背景资料

随着人类对自身疾病谱变化的认识, 功能性胃肠病日渐受到重视, 其中肠易激综合征(IBS)作为功能性肠病的典型代表, 尤其受到关注。目前IBS的发病原因和机制不明。

刘兆霞, 季万胜, 徐继马, 潍坊医学院附属医院消化内科 山东省潍坊市 261041

刘晓丽, 王琳, 韩慧蓉, 房春燕, 赵廷坤, 张广学, 曲梅花, 潍坊医学院应用药理学山东省强化重点实验室 潍坊医学院药理教研室 山东省潍坊市 261053

刘兆霞, 在读硕士, 主要从事胃肠神经研究。

山东省自然科学基金资助项目, No. ZR2009DM024,

No. ZR2011HM043, No. ZR2009CL047

山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目,

No. BS2010SW034

山东省高等学校科技计划基金资助项目, No. J11LF33

作者贡献分布: 本研究由曲梅花与季万胜共同设计; 实验流程操作由刘兆霞、刘晓丽、王琳、韩慧蓉、房春燕、赵廷坤、徐继马及张广学完成; 数据分析由曲梅花与刘兆霞完成; 本论文写作由刘兆霞、曲梅花及季万胜完成; 研究经费由曲梅花与季万胜提供。

通讯作者: 曲梅花, 教授, 261053, 山东省潍坊市宝通西街7166号, 潍坊医学院药理学与生命科学学院应用药理学实验室。

qumeihua@hotmail.com

电话: 0536-8462466

收稿日期: 2011-07-24 修回日期: 2012-04-06

接受日期: 2012-04-17 在线出版日期: 2012-05-08

Expression of Urocotin3 and CRFR2 in the enteric nervous system of rats with irritable bowel syndrome

Zhao-Xia Liu, Wan-Sheng Ji, Xiao-Li Liu, Lin Wang, Hui-Rong Han, Chun-Yan Fang, Ting-Kun Zhao, Ji-Ma Xu, Guang-Xue Zhang, Mei-Hua Qu

Zhao-Xia Liu, Wan-Sheng Ji, Ji-Ma Xu, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261041, Shandong Province, China

Xiao-Li Liu, Lin Wang, Hui-Rong Han, Chun-Yan Fang, Ting-Kun Zhao, Guang-Xue Zhang, Mei-Hua Qu, Department of Pharmacology, Shandong Key Laboratory of Applied Pharmacology, College of Pharmaceutical and Biological Sciences, Weifang Medical University, Weifang 261053, Shandong Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Shandong Province, Nos. ZR2009DM024, ZR2011HM043 and R2009CL047; the Shandong Outstanding Young Scientist Scientific Research Award Foundation, No. BS2010SW034; and the Higher Educational Science and Technology Program of Shandong Province, No. J11LF33

Correspondence to: Mei-Hua Qu, Professor, Department of Pharmacology, Shandong Key laboratory of Applied Pharmacology, Pharmaceutical and Biological Sciences College, Weifang Medical University, 7166 Baotong Street, Weifang 261053, Shandong Province, China. qumeihua@hotmail.com

Received: 2011-07-24 Revised: 2012-04-06

Accepted: 2012-04-17 Published online: 2012-05-08

■同行评议者

李晓波, 教授, 上海交通大学药学院

Abstract

AIM: To examine the expression of Urocotin3 (Ucn3) and its receptor corticotrophin-releasing factor receptor 2 (CRFR2) in the colon of rats with irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: Thirty-six Wistar rats were randomly divided into four groups: normal control group (N), acute stress group (A), chronic stress group (C), and acute-chronic stress group (AC). The animal models were assessed by counting fecal pellets, open-field behavior scoring and fluid consumption testing. On day 28 after induction of IBS, the animals were killed to take colon tissue for detecting the expression of Ucn3 and CRFR2 by real-time PCR and for dissecting the myenteric plexus and submucosal plexus for immunofluorescence.

RESULTS: Both Ucn3 and CRFR2 were expressed in the myenteric and submucosal plexus in the colon of rats with IBS. The expression level of Ucn3 was higher in each stress group than in the control group (N: 1.108 ± 0.293 ; A: 3.594 ± 1.839 ; C: 1.852 ± 0.674 ; AC: 3.989 ± 1.591 ; all $P < 0.05$). The expression of Ucn3 in the acute stress and acute-chronic groups was higher than that in the chronic stress group ($P < 0.017, 0.002$). CRFR2 expression was also increased in all the three stress groups compared to the control group (A: 2.119 ± 0.468 ; C: 1.568 ± 0.507 ; AC: 2.392 ± 0.840 ; all $P < 0.05$). CRFR2 expression showed no significant differences among the three stress groups.

CONCLUSION: The expression of both Ucn3 and CRFR2 increases in the colon of IBS rats, and they may play an important role in the enteric neural system in rats with IBS.

Key Words: Urocotin3; Corticotrophin-releasing factor receptor 2; Stress; Irritable bowel syndrome

Liu ZX, Ji WS, Liu XL, Wang L, Han HR, Fang CY, Zhao TK, Xu JM, Zhang GX, Qu MH. Expression of Urocotin3 and CRFR2 in the enteric nervous system of rats with

irritable bowel syndrome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(13): 1094-1099

摘要

目的: 探讨尿皮质素3(Urocotin3, Ucn3)及其受体促肾上腺皮质释放因子受体2(corticotrophin releasing factor receptor 2, CRFR2)在肠易激综合征中的表达。

方法: 将36只180-220 g的Wistar大鼠随机分为对照组(N)、急性应激组(A, 急性束缚1 h)、慢性应激组(C, 28 d不可预知轻度应激)、急性慢性联合应激组(AC, 在慢性应激基础上给予急性束缚)4组建模。采用排便粒数、敞箱行为评分和蔗糖水偏嗜度评价动物模型。建成后留取大鼠结肠组织, 采用Real-time PCR方法检测各组大鼠结肠中Ucn3及其受体CRFR2表达水平的变化。

结果: Ucn3在各组大鼠结肠中的表达: N组 1.108 ± 0.293 , A组 3.594 ± 1.839 , C组 1.852 ± 0.674 , AC组 3.989 ± 1.591 , 各应激组Ucn3的表达均高于对照组($P < 0.05$), 各应激组间A组 vs C组($P < 0.017$), C组 vs AC组($P < 0.002$), 表达有统计学差异。CRFR2在各组大鼠结肠中的表达: N组 1.042 ± 0.217 , A组 2.119 ± 0.468 , C组 1.568 ± 0.507 , AC组 2.392 ± 0.840 , 各应激组CRFR2的表达均高于对照组($P < 0.05$), 各应激组之间没有统计学差异。

结论: 慢性应激、急性慢性联合应激建立肠易激综合征大鼠模型重复性好。Ucn3及其受体CRFR2在肠易激综合征中表达升高, 且Ucn3在急性应激后升高比慢性应激后更明显。

关键词: 尿皮质素3; 促肾上腺皮质激素释放因子受体2; 应激; 肠易激综合征

刘兆霞, 季万胜, 刘晓丽, 王琳, 韩慧蓉, 房春燕, 赵廷坤, 徐继马, 张广学, 曲梅花. Ucn3及其受体CRFR2在肠易激综合征大鼠模型肠神经系统中的表达. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1094-1099

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1094.asp>

0 引言

尿皮质素3(Urocotin3, Ucn3)是CRF家族的一个成员, 由Lewis等^[1]于2001年从小鼠和人cDNA文库中克隆出来的1个新基因, 对促肾上腺皮质释放因子受体2(corticotrophin-releasing factor receptor, CRFR2)具有高亲和性, 因而被认为是CRFR2的内源配体^[2,3]。Ohata等^[4]给自由活动的

♂ Wistar大鼠脑室内注射Ucn3后, 大鼠的自发性活动明显减少, 固定在一个姿势的时间延长, 表明Ucn3有抗焦虑作用。并且, 注射Ucn3后大鼠在熟悉的环境中活动明显被抑制, 说明Ucn3有很强的镇静效应。Hsu等^[5]应用PCR分析的方法观察到SCP即Ucn3在大多数组织中都有分布, 结肠、小肠、骨骼肌、胃、甲状腺、肾上腺、胰、脾、心都有较高水平的表达, 但其在肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)患者肠道的表达是否有改变还不清楚。CRFR2从组织分布上来看, CRFR2广泛分布于中枢和外周组织。在中枢, CRFR2可见于大脑皮质、下丘脑到脑干的各级水平。在外周, 分布于心肌细胞、胃肠道、肺、卵巢以及骨骼肌。且有研究发现CRFR2的激活可缓解结肠扩张诱导的内脏感觉^[6]。但有关CRFR2在大鼠结肠定量、定性、定位研究的报道尚未见。本研究具体检测Ucn3、CRFR2在结肠的表达, 探讨其表达变化与IBS发病机制的联系, 为进一步阐明Ucn3、CRFR2在IBS发生中的作用提供新的证据。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠, ♂, 体质量160-180 g。由山东鲁抗医药股份有限公司质检中心试验动物室提供[SLXK鲁20080002]。荧光定量real-time PCR试剂盒、总RNA提取试剂盒、cDNA逆转录合成试剂盒、DEPC、DNA Marker、EDTA均购自上海生工生物工程技术有限公司; 所用引物由大连宝生物公司设计合成; 美国PE公司5700型定量基因分析仪; 英国SYNGENE公司GENE GENIUS数码凝胶成像仪。

1.2 方法

1.2.1 肠易激动物模型的建立: 实验动物按体质量排序后依据数字表法随机分为4组: 对照组、急性应激组、慢性应激组和联合应激组。前4周, 急性应激组、对照组大鼠单笼常规饲养。慢性应激组、联合应激组大鼠单只孤养, 并参照文献^[7]施加以慢性不可预见性的刺激。第5周不予任何刺激, 第35天急性应激组、联合应激组给予急性束缚应激^[8]。

1.2.2 肠道敏感性评估: (1)排便测定: 动物置于代谢笼中, 测定各组大鼠2 h内排便粒数; (2)敞箱实验(open-field test): 本实验方法见文献^[9,10]; (3)糖水消耗实验: 本实验方法见文献^[11]。

1.2.3 免疫荧光检测Ucn3的表达: (1)取材: 将大鼠麻醉处死。剖腹手术分离远端结肠, 取距肛

■ 研究前沿

研究表明, 中枢神经和肠神经丛与IBS发病密切相关, 脑-肠轴上有多种机制单独或共同作用。Urocotin3及其受体是CRF家族的重要成员, 在IBS患者肠道神经的功能和分布尚不清楚。

■创新盘点

本研究旨在给予Wistar大鼠急性慢性刺激建立IBS动物模型,检测Ucn3及其受体CRFR2在结肠肠道神经的表达。研究表明,Ucn3及其受体在肠道神经有表达,且表达升高。

门约4 cm处结肠3 cm。沿肠系膜处打开肠管,置于4 °C含氧Kreb's溶液冲洗2遍,至干净。将肠管的浆膜面向上,固定于树脂托盘上,沿横轴和纵轴将其展开至面积最大,置于固定液室温固定至少24 h; (2)制备肠黏膜下神经丛(submucosal plexus, SMP)铺片标本:将固定好的标本裁剪成约1 cm×1 cm大小,在体视镜下可见黏膜层呈细颗粒状,应用显微分离器械小心分离黏膜层。然后将标本翻转,浆膜面向上固定,依次去除纵行肌和环形肌肌束,即得到完整的SMP铺片标本; (3)制备肠肌间神经丛(myenteric plexus, MP)铺片标本:浆膜面向上固定于树脂托盘上,镜下将肠壁的纵行肌和环形肌一同从黏膜下层剥离下来,然后将分离开的肌肉层环形肌面向上将其肌束剥离,即可得到MP铺片标本,显微镜下可见MP神经节呈网格状; (4)Ucn3抗体免疫荧光检测方法:将制备好的铺片标本裁剪成约0.5 cm×0.5 cm大小,室温下PBS溶液中漂洗10 min×3。10%封闭血清中室温下孵育2 h。加Ucn3一抗(1:100),室温过夜。室温下PBS漂洗10 min×3。SMP与MP分别加FITC标记羊抗兔IgG二抗(1:1000),室温避光2 h。PBS漂洗10 min×3,室温避光。将标本完全展开平铺于载玻片上,甘油封片,加盖玻片。荧光显微镜检查。

1.2.4 定量real-time PCR检测基因表达差异: (1)取材:对大鼠进行评分后,给予水合氯醛腹腔注射麻醉处死。剖腹手术分离远端结肠,取距肛门约4 cm处结肠1 cm; (2)mRNA的提取:按照生工RNA提取试剂盒说明提取结肠总RNA。 (3)cDNA的合成:按照生工cDNA合成试剂盒逆转录出cDNA;取总RNA 1.5 µg, 0.5 µg Oligo(dT) 12-18(0.5 g/L),加入DEPC H₂O至总体积10 µL,混匀后,70 °C, 5 min;立刻冰浴后加入5 µL M-MLV 5×Reaction Buffer, 2.5 µL dNTP(单个浓度为5 mmol/L), 0.5 µL RNasin Inhibitor, 1 µL M-MLV,然后补充DEPC水至总体积25 µL,轻轻混匀,37 °C, 60 min, 70 °C, 15 min; (4)PCR扩增:引物设计:从GenBank中查出大鼠Ucn3、CRFR2的mRNA序列,由大连宝生物公司设计合成引物如下: GAPDH上游引物: GGCACAGTCAAGGCT-GAGAATG, 下游引物: ATGGTGGTGAAGAC-GCCAGTA。扩增产物143 bp; Ucn3上游引物: TCCCACAAGTTCTACAACGCAGGA, 下游引物: TGGGCAGGTAGCCAAAGTTCTTCT, 扩增产物124 bp; CRFR2上游引物: TGGTG-CATACCTGCCCTATCATT, 下游引物: ACTA-

AGTCACCAGGTTCTTGCCA, 扩增产物98 bp。取2 µL cDNA为模板进行PCR扩展,加入扩增反应体系中,设3个复孔,PCR反应体系(25 µL)如下: 12.5 µL MIX, 6.5 µL ddH₂O, 上下游引物各2 µL, 2 µL cDNA模板。GAPDH反应条件: 50 °C 2 min, 预变性95 °C 5 min; 变性94 °C 5 s, 退火59 °C 30 s, 延伸72 °C 30 s, 共40个循环; 终末延伸72 °C 7 min。CRFR2、Ucn3反应条件: 50 °C 2 min, 预变性95 °C 5 min; 变性94 °C 5 s, 退火57 °C 30 s, 延伸72 °C 30 s, 共40个循环; 终末延伸72 °C 7 min。PCR产物通过含gold view的琼脂糖凝胶电泳,应用GENE GENIUS数码凝胶成像分析系统扫描分析,通过软件分析吸光度(A)值。

统计学处理 数据以mean±SD表示,采用SPSS13.0软件进行统计学分析,经方差齐性检验后,进行单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为有统计学显著差异。

2 结果

2.1 肠应激动物模型的建立及鉴定 给予应激刺激后,模型组大鼠排便数量明显增加,其中应激后7、14、21 d时,慢性应激组和联合应激组与对照组比较差异明显($P<0.05$)。在应激28 d时,急性应激组、联合应激组动物排便显著多于对照组,统计学差异明显;慢性应激组仍多于对照组,但统计学差异不明显。

给予应激刺激后的早期(9 d和18 d),模型组动物敞箱行为评分(包括水平运动得分和垂直运动得分)比对照组略有降低,但二者没有统计学差异。至应激27 d时,模型组动物敞箱行为评分显著低于对照组($P<0.05$)。至应激35 d时,这种降低的趋势仍然存在。

给予大鼠应激刺激,可导致其兴趣缺失,表现为模型组动物蔗糖水偏嗜度降低,其中造模28 d时,慢性应激组、联合应激组与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$);造模35 d时给予急性应激后,急性应激组、联合应激组与对照组相比差异有显著性($P<0.001$)。通过检测应激刺激对大鼠排便的影响;应激对大鼠敞箱行为评分的影响以及应激对大鼠蔗糖水偏嗜度的影响,均说明肠应激大鼠动物模型建立成功。

2.2 Ucn3在结肠表达的定性检测 检测Ucn3在大鼠结肠黏膜下神经丛和肌间神经丛神经细胞中的表达,结果显示Ucn3在黏膜下神经丛和肌间神经丛均有表达(图中箭头所指),图1。

2.3 结肠组织中Ucn3、CRFR2的表达 提取RNA

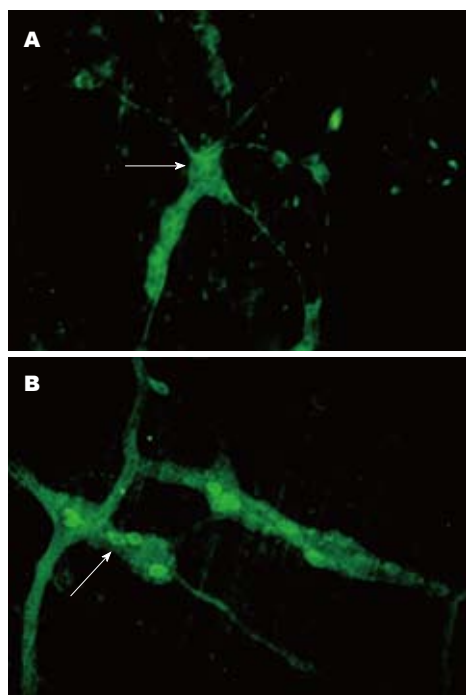


图1 Ucn3在结肠组织中的表达($\times 400$). A: 在SMP的表达; B: 在MP的表达.

后, 1.2%琼脂糖凝胶电泳分离, 在紫外线照射下清楚可见28S及18S的RNA带, 表明RNA无降解及DNA污染. 核酸定量仪测定的 A_{260}/A_{280} 比值大于1.8, 表明RNA纯度较高. Ucn3、CRFR2、GAPDH的扩增曲线成单峰, 表明扩增的PCR产物单一, 无特异性扩增产物. 显示Ucn3和CRFR2片段扩增情况(图2A), Ucn3预期片段为124 bp, CRFR2预期片段为98 bp. 分别显示Ucn3和CRFR2扩增片段退火曲线(图2B, C), 结果显示PCR产物为预期设计的Ucn3和CRFR2特异片段.

2.4 Ucn3、CRFR2的Real-time PCR 与正常对照组比较, 各应激组模型大鼠结肠中Ucn3以及CRFR2的表达量均有升高($P<0.01$).

2.4.1 Ucn3在各组大鼠结肠中的表达: 与正常对照组相比, 急性应激组Ucn3的表达升高至 3.59 ± 1.84 倍, 慢性应激组Ucn3的表达升高至 1.85 ± 0.67 倍, 联合应激组Ucn3的表达升高至 3.99 ± 1.59 倍, 急性应激组和联合应激组动物结肠Ucn3的表达明显高于慢性应激组(图3).

2.4.2 CRFR2在各组大鼠结肠中的表达: 与正常对照组相比, 急性应激组CRFR2的表达升高至 2.12 ± 0.47 倍, 慢性应激组CRFR2的表达升高至 1.575 ± 0.51 倍, 联合应激组CRFR2的表达升高至 2.39 ± 0.84 倍, 急性应激组和联合应激组动物结肠Ucn3的表达明显高于慢性应激组. 各应激组CRFR2的表达均高于对照组($P<0.05$), 但各应

激组之间没有统计学差异(图4).

3 讨论

应激行为是指动物在环境突然改变时, 表现出的不良行为反应. 本研究通过给予wistar大鼠急性应激、慢性应激、急慢性联合应激, 观察各组大鼠的排便粒数、敞箱行为和蔗糖水偏嗜度的改变, 发现慢性应激组和慢急性联合应激组大鼠排便粒数减少; 行为动作减少, 敞箱实验评分减低; 兴趣淡漠, 糖水偏嗜度降低, 从而成功建立了IBS大鼠模型.

过去IBS一直被认为是肠动力异常的疾病, 以后进一步的研究证实其具有内脏感觉异常^[12,13], 结肠对刺激的敏感性增高, 微弱的刺激在健康人不能引起明显的反应, 却可使IBS患者肠道痉挛性收缩而引起腹痛和排便异常, 降低了患者的生活质量^[14]. 研究较多的是肠神经丛和中枢神经在本病发病中的作用^[15]. 肠神经丛遍布于黏膜到浆膜的整个肠壁, 通过神经纤维和神经介质与中枢神经系统相联系, 把感觉信息传达到大脑, 使肠道的活动受中枢的调控.

促肾上腺激素释放激素(corticotrophin releasing factor, CRF)是一种重要的神经内分泌肽^[16,17], 主要由下丘脑分泌, CRF肽家族包括CRF配体(CRF、Ucn1、Ucn2、Ucn3等)以及CRF受体(CRFR1、CRFR2), 该家族的主要功能是调节机体各系统以应答应激刺激^[18], 调节内脏活动和情绪反应^[19-21]. Ucn3是CRF家族的一个新成员, 广泛分布在结肠、小肠、骨骼肌、胃、甲状腺、肾上腺、胰、脾、心等组织^[22]. 目前有关Ucn3在应激反应中作用的结论不一, 其具体作用机制也不详. Venihaki等^[23,24]采用open-field模型和明暗箱模型, 发现侧脑室注射Ucn3后, 大鼠在旷场模型中的探究行为增多, 在明暗箱模型中进入亮室的次数增加, 这均提示Ucn3发挥了抗焦虑的作用. Ohata等^[25]发现在熟悉的环境中, 中枢给予Ucn3甚至能够削弱CRF所导致的焦虑样行为. 目前也有实验结果不支持Ucn3抗焦虑作用, Pelley-mounter等^[26,27]中枢给予小鼠Ucn3 30 min后, 进行EPM的行为学评定, 未发现焦虑样行为有明显变化. 本实验通过real-time PCR试验方法定量检测到Ucn3在IBS大鼠的结肠中表达升高, 并通过免疫荧光定位检测到Ucn3在黏膜神经丛和肌间神经丛的表达. 并发现应激后大鼠结肠中Ucn3表达均升高. 但是急性应激后结肠中Ucn3表达较慢性应激后升高更明显, 两者间有统计学差异, 可能

■应用要点

本研究表明Ucn3及其受体在IBS的表达较正常升高, 这为研究IBS的发病机制提供了新的证据以及对新型抗焦虑药物的开发提供理论依据.

■同行评价

本文采用RT-PCR方法探讨Ucn3及其受体CRFR2在IBS大鼠结肠中的表达, 实验设计较合理, 并具有一定的理论价值和实际意义。

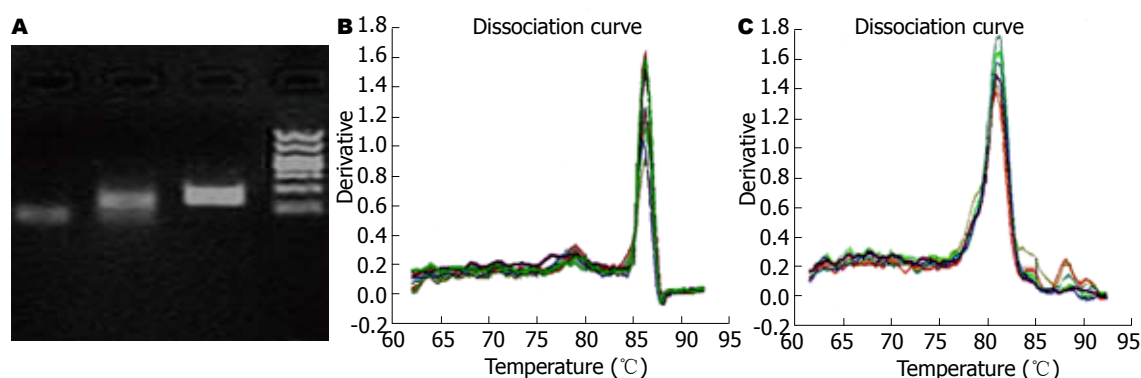


图2 结肠组织中Ucn3、CRFR2的表达。A: Ucn3、CRFR2片段PCR扩增。B: Ucn3片段的扩增产物溶解曲线。C: CRFR2片段的扩增产物溶解曲线。

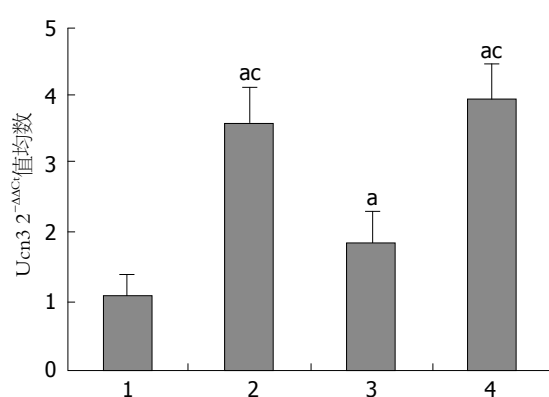


图3 在不同应激刺激大鼠结肠Ucn3 mRNA表达的变化。1: 正常组; 2: 急性应激组; 3: 慢性应激组; 4: 联合应激组; * $P < 0.05$ vs 正常组; * $P < 0.05$ vs 慢性应激组。

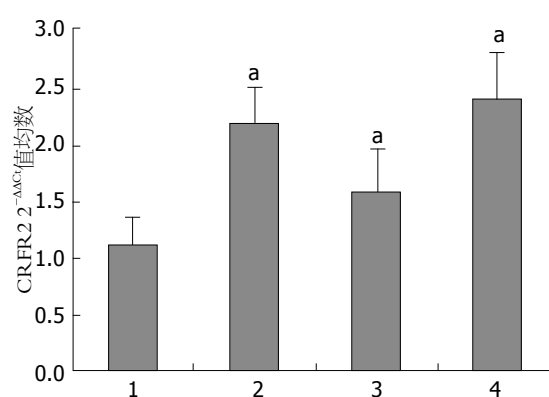


图4 不同应激刺激大鼠结肠后CRFR2在各组大鼠结肠中mRNA的表达变化。1: 正常组; 2: 急性应激组; 3: 慢性应激组; 4: 联合应激组; * $P < 0.05$ vs 正常组。

是由脑-肠互动^[28-30]发挥作用引起。

CRFR2因其mRNA剪接不同形成CRFR2 α 、CRFR2 β 和CRFR2 γ 3种亚型。其中CRFR2 α 主要分布在中枢^[31], 而CRFR2 β 在外周如骨骼肌及心肌等均有分布。Ucn3对CRFR2具有高亲和性, 因而认为CRFR2是Ucn3的内源配体。本实验发现给予应激后大鼠结肠中CRFR2表达升高, 但其表达与Ucn3并未形成相关关系。总之, 通过本次实验我们检测Ucn3及其受体CRFR2在应激后wistar大鼠结肠中表达, 不仅发现了其在各种应激中的表达差异, 还重点观察到了两因子在IBS中的表达变化情况, 这为研究IBS的发病机制提供了新的证据, 并对新型抗焦虑药物的开发提供理论依据。

4 参考文献

- Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, Bilezikian L, Rivier J, Sawchenko PE, Vale WW. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 recep-

- tor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7570-7575
- Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 21-26
- Nakamura T, Kawabe K, Sapru HN. Cardiovascular responses to microinjections of urocortin 3 into the nucleus tractus solitarius of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H325-H332
- Ohata H, Suzuki K, Oki Y, Shibasaki T. Urocortin in the ventromedial hypothalamic nucleus acts as an inhibitor of feeding behavior in rats. *Brain Res* 2000; 861: 1-7
- Hsu SY, Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med* 2001; 7: 605-611
- Spiller RC. Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2003; 6: 329-337
- Liu S, Gao N, Hu HZ, Wang X, Wang GD, Fang X, Gao X, Xia Y, Wood JD. Distribution and chemical coding of corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the guinea pig enteric nervous system. *J Comp Neurol* 2006; 494: 63-74
- Williams CL, Villar RG, Peterson JM, Burks TF. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome. *Gastroen-*

- terology 1988; 94: 611-621
- 9 郭玉婷, 李延青, 庄明蕊, 欧阳建东, 夏培君, 左秀丽, 张海燕, 匡荣光, 袁海鹏. 替加色罗治疗内脏高敏感大鼠前后感觉阈值的变化. 胃肠病学和肝病杂志 2004; 13: 337-380
- 10 Fang X, Liu S, Wang XY, Gao N, Hu HZ, Wang GD, Cook CH, Needleman BJ, Mikami DJ, Xia Y, Fei GJ, Hicks GA, Wood JD. Neurogastroenterology of tegaserod (HTF 919) in the submucosal division of the guinea-pig and human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 80-93
- 11 Benelli A, Filafferro M, Bertolini A, Genedani S. Influence of S-adenosyl-L-methionine on chronic mild stress-induced anhedonia in castrated rats. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 645-654
- 12 La JH, Sung TS, Kim HJ, Kim TW, Kang TM, Yang IS. Peripheral corticotropin releasing hormone mediates post-inflammatory visceral hypersensitivity in rats. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 731-736
- 13 Harris ML, Aziz Q. Brain-gut interaction in irritable bowel syndrome. *Hosp Med* 2003; 64: 264-269
- 14 陈明显, 蔡淦. 肠易激综合征生活质量评价的研究现状及展望. 世界华人消化杂志 2011; 19: 1-6
- 15 Kiba T. Relationships between the autonomic nervous system, humoral factors and immune functions in the intestine. *Digestion* 2006; 74: 215-227
- 16 Caso JR, Leza JC, Menchén L. The effects of physical and psychological stress on the gastro-intestinal tract: lessons from animal models. *Curr Mol Med* 2008; 8: 299-312
- 17 Taché Y, Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest* 2007; 117: 33-40
- 18 Stengel A, Taché Y. Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 219-239
- 19 Taché Y, Perdue MH. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 137-142
- 20 Chatzaki E, Murphy BJ, Wang L, Million M, Ohning GV, Crowe PD, Petroski R, Taché Y, Grigoriadis DE. Differential profile of CRF receptor distribution in the rat stomach and duodenum assessed by newly developed CRF receptor antibodies. *J Neurochem* 2004; 88: 1-11
- 21 Fukudo S. Role of corticotropin-releasing hormone in irritable bowel syndrome and intestinal inflammation. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 48-51
- 22 Baigent SM, Lowry PJ. mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 43-52
- 23 Fekete EM, Inoue K, Zhao Y, Rivier JE, Vale WW, Szücs A, Koob GF, Zorrilla EP. Delayed satiety-like actions and altered feeding microstructure by a selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist in rats: intra-hypothalamic urocortin 3 administration reduces food intake by prolonging the post-meal interval. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 1052-1068
- 24 Venihaki M, Sakihara S, Subramanian S, Dikkes P, Weninger SC, Liapakis G, Graf T, Majzoub JA. Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropin-releasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviours. *J Neuroendocrinol* 2004; 16: 411-422
- 25 Ohata H, Shibasaki T. Effects of urocortin 2 and 3 on motor activity and food intake in rats. *Peptides* 2004; 25: 1703-1709
- 26 Pellemounter MA, Joppa M, Carmouche M, Cullen MJ, Brown B, Murphy B, Grigoriadis DE, Ling N, Foster AC. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the anorexic syndrome induced by CRF. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 799-806
- 27 Pellemounter MA, Joppa M, Ling N, Foster AC. Behavioral and neuroendocrine effects of the selective CRF2 receptor agonists urocortin II and urocortin III. *Peptides* 2004; 25: 659-666
- 28 Liu S, Hu HZ, Gao N, Gao C, Wang G, Wang X, Peck OC, Kim G, Gao X, Xia Y, Wood JD. Neuroimmune interactions in guinea pig stomach and small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G154-G164
- 29 王利华, 方秀才, 潘国宗. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与神经纤维的关联. 中华消化杂志 2003; 23: 332-335
- 30 Liu S, Ren W, Qu MH, Bishop GA, Wang GD, Wang XY, Xia Y, Wood JD. Differential actions of urocortins on neurons of the myenteric division of the enteric nervous system in guinea pig distal colon. *Br J Pharmacol* 2010; 159: 222-236
- 31 Chen A, Perrin M, Brar B, Li C, Jamieson P, Di-gruccio M, Lewis K, Vale W. Mouse corticotropin-releasing factor receptor type 2alpha gene: isolation, distribution, pharmacological characterization and regulation by stress and glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 441-458

编辑 李军亮 电编 鲁亚静

慢性HBV感染者外周血CXCR5⁺CD4⁺Tfh细胞的测定及其与FoxP3⁺Treg细胞的相关性

李凤惠, 吕洪敏, 王芳, 向慧玲, 王凤梅, 李晓爽, 泽塔多吉, 王鹏

■背景资料

滤泡辅助T细胞(Tfh)作为B细胞产生抗体的最主要辅助性T细胞, 对于机体免疫稳态的维持起着重要作用。而慢性HBV感染者体内存在一系列免疫紊乱, Tfh细胞是否参与其中尚不清楚。

李凤惠, 李晓爽, 泽塔多吉, 天津医科大学第三中心临床学院 天津市 300170

吕洪敏, 王芳, 向慧玲, 王凤梅, 天津市第三中心医院消化内科 天津市 300170

王鹏, 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室 天津市 300170

李凤惠, 在读硕士, 主要从事肝脏相关疾病的研究。

天津市卫生局科技基金资助项目, No. 2010KZ123

作者贡献分布: 李凤惠与吕洪敏对此文所作贡献均等; 此课题的设计由吕洪敏与王芳完成; 主要实验由李凤惠与王鹏完成; 数据采集由李凤惠、李晓爽及泽塔多吉完成; 数据分析与文章起草由李凤惠完成; 文章修改与审阅由吕洪敏、向慧玲及王凤梅完成。

通讯作者: 吕洪敏, 教授, 主任医师, 300170, 天津市河东区津塘路83号, 天津市第三中心医院消化内科。

hongminlv@yahoo.com.cn

电话: 022-84112209 传真: 022-24382234

收稿日期: 2012-02-07 修回日期: 2012-03-14

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

Correlation between percentages of peripheral blood CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells and those of FoxP3⁺Treg cells in patients with chronic hepatitis B virus infection

Feng-Hui Li, Hong-Min Lv, Fang Wang, Hui-Ling Xiang, Feng-Mei Wang, Xiao-Shuang Li, Duo-Ji Zeta, Peng Wang

Feng-Hui Li, Xiao-Shuang Li, Duo-Ji Zeta, the Third Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China

Hong-Min Lv, Fang Wang, Hui-Ling Xiang, Feng-Mei Wang, Department of Gastroenterology, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China

Peng Wang, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cells, the Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China

Supported by: the Science and Technology Project of Tianjin Public Health Bureau, No. 2010KZ123

Correspondence to: Hong-Min Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the Third Central Hospital of Tianjin, 83 Jintang Road, Hedong District, Tianjin 300170, China. hongminlv@yahoo.com.cn

Received: 2012-02-07 Revised: 2012-03-14

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the percentages of blood CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells and those of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg cells in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: Fresh peripheral blood samples were collected from 15 chronic asymptomatic HBV carriers (AsC), 42 chronic hepatitis B (CHB) patients, of whom 25 were seropositive and 17 seronegative for HBeAg, 11 inactive HBsAg carriers (InC), and 15 healthy controls. The percentages of CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells and CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg cells were measured by flow cytometry.

RESULTS: The percentages of CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells in total CD4⁺T cells isolated from AsC, HBeAg(+)CHB and HBeAg(-)CHB patients were significantly higher than that from healthy controls [17.66 (15.34%-20.56%), 21.95 (19.60%-26.32%), 22.33 (17.58%-24.85%) vs 13.67 (9.80%-15.32%), all $P < 0.001$]. The percentages of CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells in HBeAg(+)CHB or HBeAg(-)CHB patients were elevated significantly compared to those in AsC or InC patients, 16.11 (12.33%-19.73%), $P < 0.05$. The percentage of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg cells in AsC patients was significantly higher than that in healthy controls, 7.70 (6.35%-9.13%) vs 6.53 (5.54%-7.35%), $P < 0.05$. Meanwhile, there was a decreasing tendency of the percentages of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg cells in HBeAg(+)CHB patients, 7.52 (6.09%-8.49%) compared to AsC patients. A negative correlation was found between the percentages of circulating CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells and the HBV DNA load ($r = -0.275$, $P < 0.05$), while no significant correlation was found between the percentages of circulating CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells and ALT or HBsAg levels.

CONCLUSION: CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells may participate in chronic HBV-related immune response, and the relative bias between CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg cells and CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells may correlate with disease activity.

Key Words: Hepatitis B virus; Follicular T helper cells; Regulatory T cells

Li FH, Lv HM, Wang F, Xiang HL, Wang FM, Li XS, Zeta DJ, Wang P. Correlation between percentages of peripheral blood CD4⁺CXCR5⁺Tfh cells and those of FoxP3⁺Treg cells in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1100-1106

■同行评议者

杨江华, 副教授, 安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院感染科

摘要

目的:探讨慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染不同阶段患者外周血CD4⁺T淋巴细胞中CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞及CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的百分比及其意义。

方法:应用流式细胞术检测15例慢性无症状HBV携带者(chronic asymptomatic HBV carriers, AsC)、42例慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者(HBeAg阳性25例、HBeAg阴性17例)、11例非活动性HBsAg携带者(inactive HBsAg carriers, InC)外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞及CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比,并与15例健康对照(healthy control, HC)进行比较。

结果:AsC、HBeAg(+)CHB、HBeAg(-)CHB组外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比分别为17.66(15.34%-20.56%), 21.95(19.60%-26.32%), 22.33(17.58%-24.85%), 显著高于HC组的13.67(9.80%-15.32%), 差异具有统计学意义($P<0.001$)。与AsC及InC组的16.11(12.33%-19.73%)相比, HBeAg(+), HBeAg(-)CHB组外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比显著升高($P<0.05$)。此外, AsC组外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比为7.70(6.35%-9.13%), 显著高于HC组的6.53(5.54%-7.35%), $P<0.05$ 。HBeAg(+)CHB组外周血CD4⁺T淋巴细胞中CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的频率为7.52(6.09%-8.49%), 与AsC组相比呈降低的趋势。外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比与HBV DNA载量呈负性相关($r=-0.275$, $P<0.05$); 而与血清ALT水平、HBsAg滴度无相关性。

结论:CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞可能参与了慢性HBV感染所介导的免疫反应, 外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞及CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的消长可能与疾病的活动性相关。

关键词:乙型肝炎病毒; 滤泡辅助性T细胞; 调节性T细胞

李凤惠, 吕洪敏, 王芳, 向慧玲, 王凤梅, 李晓爽, 泽塔多吉, 王鹏. 慢性HBV感染者外周血CXCR5⁺CD4⁺Tfh细胞的测定及其与FoxP3⁺Treg细胞的相关性. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1100-1106

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1100.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染的转归主要取决于病毒和机体免疫应答2个方面, 机体免疫功能紊乱, 尤其是T淋巴细胞亚群与其细胞因子的失调与慢性肝病的发生、发展密切相关^[1-3]。滤泡辅助性T细胞(follicular T helper cell, Tfh)是新近认识到的CD4⁺T细胞亚群中的一种, 是B细胞最主要的辅助细胞^[4,5]。Tfh功能的异常与多种疾病的发生有关^[6-9]。研究发现, Tfh细胞可能参与了慢性病毒感染所介导的免疫反应^[10,11]。FoxP3⁺调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是一类具有免疫抑制作用的T细胞亚群, 能够抑制免疫应答的强度从而维持机体的免疫平衡^[12,13]。近来发现, Treg细胞能够对Tfh细胞的功能及生发中心的反应进行调节^[14,15]。因此, Tfh细胞与Treg细胞在分化发育和功能发挥上可能存在相互抑制的作用。为研究CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞在慢性HBV感染不同阶段的特征及其与CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的相关性, 我们应用流式细胞仪对慢性HBV感染不同阶段患者及健康志愿者外周血中的2种细胞进行了测定。

面, 机体免疫功能紊乱, 尤其是T淋巴细胞亚群与其细胞因子的失调与慢性肝病的发生、发展密切相关^[1-3]。滤泡辅助性T细胞(follicular T helper cell, Tfh)是新近认识到的CD4⁺T细胞亚群中的一种, 是B细胞最主要的辅助细胞^[4,5]。Tfh功能的异常与多种疾病的发生有关^[6-9]。研究发现, Tfh细胞可能参与了慢性病毒感染所介导的免疫反应^[10,11]。FoxP3⁺调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)是一类具有免疫抑制作用的T细胞亚群, 能够抑制免疫应答的强度从而维持机体的免疫平衡^[12,13]。近来发现, Treg细胞能够对Tfh细胞的功能及生发中心的反应进行调节^[14,15]。因此, Tfh细胞与Treg细胞在分化发育和功能发挥上可能存在相互抑制的作用。为研究CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞在慢性HBV感染不同阶段的特征及其与CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的相关性, 我们应用流式细胞仪对慢性HBV感染不同阶段患者及健康志愿者外周血中的2种细胞进行了测定。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2010-12/2011-11就诊于天津市第三中心医院的慢性HBV感染者78例, 包括慢性HBV携带者(chronic asymptomatic HBV carriers, AsC)15例, 慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者42例(HBeAg阳性25例, HBeAg阴性17例), 非活动性HBsAg携带者(inactive HBsAg carriers, InC)11例。入选标准: (1)所有患者的诊断均符合2010版《慢性乙型肝炎防治指南》^[16]; (2)CHB患者入选前均未接受过干扰素及核苷类似物抗病毒治疗; 非活动性HBsAg携带者为既往HBV感染, 经抗病毒治疗或自发静息后, HBeAg转阴并已停用抗病毒药物1年以上; (3)排除同时合并其他肝炎病毒感染; 排除合并肝硬化、肝细胞癌、脂肪肝、酒精性肝病、自身免疫性肝病等慢性肝脏疾病者。另选取15例血清丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)正常, HBsAg阴性的健康查体者作为对照组(healthy control, HC)。鼠抗人CD4-FITC抗体、CD25-PECY5抗体及各自同型对照购自美国Beckman公司; 鼠抗人FoxP3-PE抗体及其同型对照购自eBioscience公司; 鼠抗人CXCR5-PerCP抗体及其同型对照购自RD公司; 流式细胞仪及其配套软件购自美国Beckman公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞:试验对象均于清晨空腹抽取外周静脉血1 mL, 经枸橼酸钠(EDTA)抗凝后, 静置送检。检

■研究前沿

滤泡辅助性T细胞是B细胞最主要的辅助细胞, 可能参与了慢性病毒感染所介导的免疫反应; FoxP3⁺调节性T细胞是一类具有免疫抑制作用的T细胞亚群, 能够抑制免疫应答的强度从而维持机体的免疫平衡。

■相关报道

Feng等应用流式细胞术对不同组别患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞进行检测,发现处于免疫清除期的CHB患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的频率显著高于处于免疫耐受期的CHB患者及健康对照组。

测步骤如下:取新鲜抗凝外周血100 μ L,加入CD4-FITC、CXCR5-PerCP抗体各10 μ L,另取新鲜抗凝外周血100 μ L加入10 μ L CD4-FITC、CXCR5同型对照-PerCP抗体作对照。室温避光孵育30 min,分别加入溶血素4.5 mL,37 $^{\circ}$ C气浴振荡10 min,裂解红细胞,1 600 r/min离心6 min,弃上清。每管加入PBS洗液2 mL,1 600 r/min离心5 min,弃上清,重复洗1遍。加入1%多聚甲醛固定,上机检测。Expo32软件收获细胞并进行数据分析,记录CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T细胞的百分比。

1.2.2 流式细胞术检测外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺-Treg细胞:取新鲜抗凝外周血100 μ L加入10 μ L CD4-FITC、CD25-PECY5抗体,另取新鲜抗凝外周血100 μ L加入10 μ L CD4-FITC、CD25-同型对照PECY5抗体作对照。室温避光孵育30 min,分别加入溶血素4.5 mL裂解10 min,1 600 r/min离心6 min,弃上清。加入新配置的破膜剂1 mL,4 $^{\circ}$ C冰箱孵育1 h,1 600 r/min离心6 min,弃上清。加入破膜缓冲液2 mL进行洗涤,1 600 r/min离心5 min,弃上清,重复洗1遍。样品管中加入FoxP3-PE抗体5 μ L,对照管内加入FoxP3同型对照-PE抗体5 μ L,4 $^{\circ}$ C避光孵育30 min。加入破膜缓冲液洗涤2遍,离心弃上清,加入1%多聚甲醛固定。Expo32软件收获细胞并进行数据分析,记录CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞占CD4⁺T细胞的百分比。

1.2.3 血清标记物的检测:使用全自动生物化学分析仪对ALT进行检测,正常值范围为 ≤ 40 U/L;HBV血清学标志物(HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc)采用酶联免疫吸附法检测;HBV DNA定量检测采用ABI Prism 7000荧光定量PCR法检测,正常值范围为 $\leq 1\ 000$ copies/mL,检测下限为100 copies/mL;HBsAg定量检测采用ARCHITECT i2000系统化学发光法检测,HBsAg检测值 <0.05 IU/mL为阴性。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计分析,结果以中位数(四分位数点)[median(IQR)]表示,多组间的比较采用Kruskal-Wallis检验,两组间的比较采用Mann-Whitney U检验,相关分析采用Spearman秩检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

患者的基本资料见表1。

2.1 慢性HBV感染不同阶段患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的比较 HC、AsC、HBeAg(+)CHB、

HBeAg(-)CHB、InC组外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的比例分别为:13.67(9.80%-15.32%),17.66(15.34%-20.56%),21.95(19.60%-26.32%),22.33(17.58%-24.85%),16.11(12.33%-19.73%)。与HC组相比,AsC、HBeAg(+)CHB、HBeAg(-)CHB组外周血CD4⁺T细胞中CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞频率显著升高($P<0.001$),差异具有统计学意义。此外,HBeAg(+)及HBeAg(-)CHB组外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的比例均高于AsC与InC组($P<0.05$),差异具有统计学意义。而该比例在HBeAg(+)CHB组与HBeAg(-)CHB组之间的差异无统计学意义(图1)。

2.2 慢性HBV感染不同阶段患者外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的比较 各组外周血CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞占CD4⁺T淋巴细胞的比值分别为:HC 6.53(5.54%-7.35%),AsC 7.70(6.35%-9.13%),HBeAg(+)CHB 7.52(6.09%-8.49%),HBeAg(-)CHB 7.17(5.72%-8.13%),InC 7.59(5.13%-8.06%)。AsC组外周血CD4⁺T淋巴细胞中CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的频率显著高于HC组($P<0.05$),差异具有统计学意义。HBeAg(+)CHB组外周血CD4⁺T淋巴细胞中CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的频率较AsC组有降低的趋势,差异无统计学意义(图2)。

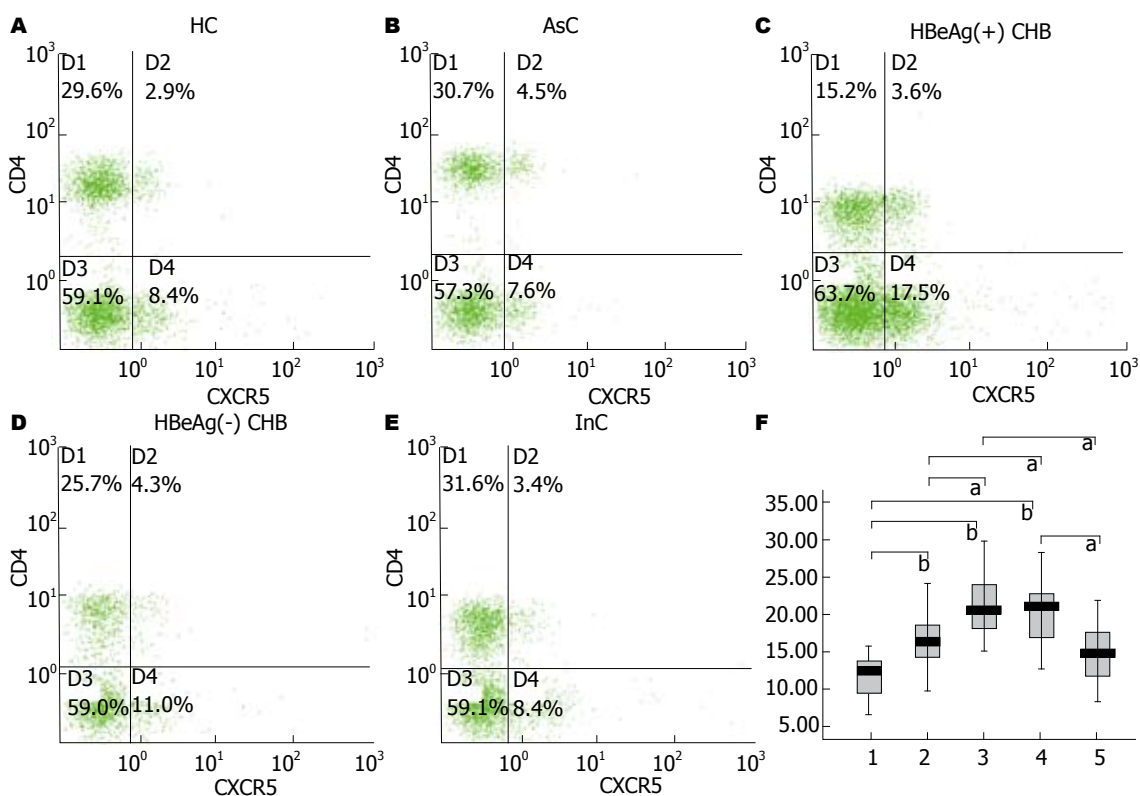
2.3 慢性HBV感染患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的相关性 慢性HBV感染者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞之间无相关性。此外,AsC、HBeAg(+)CHB、HBeAg(-)CHB、InC组外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞之间亦无明显相关性(图3)。

2.4 外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比与血清HBV DNA、HBsAg、ALT的相关性 将AsC、CHB组按血清HBV DNA载量的高低分为:HBV DNA $<10^5$ ($n=11$), 10^5 - 10^7 ($n=22$), $>10^7$ ($n=24$)3组,3组患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比分别为:21.21%(18.43%-24.36%),23.34%(18.34%-25.83%),19.48%(16.78%-21.89%),较HC组均有不同程度升高($P<0.001$);与HBV DNA $<10^5$, 10^5 - 10^7 组比较,HBV DNA $>10^7$ 组外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的频率虽无统计学差异,但有降低的趋势(图4A)。外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比与血清HBV DNA载量呈负性相关($r=-0.275$, $P=0.041$,图4B)。

将AsC、CHB、InC组按血清HBsAg滴度

表 1 研究对象的一般资料

	HC(<i>n</i> = 15)	AsC(<i>n</i> = 15)	HBeAg(+)-CHB(<i>n</i> = 25)	HBeAg(-)-CHB(<i>n</i> = 17)	InC(<i>n</i> = 11)
年龄(岁)	33(27-44)	28(23-38)	32(25-42)	49(45-57)	39(34-48)
性别(男/女)	8/7	6/9	14/11	9/8	4/7
ALT(U/L)	24.4(19.8-30.1)	23.0(19.0-29.0)	155.0(107.0-320.5)	172.0(63.0-299.5)	23.0(14.0-31.0)
HBsAg(+/-)	0/15	15/0	25/0	17/0	11/0
HBsAg(log10 IU/mL)	ND ¹	4.28(3.94-4.62)	3.95(3.24-4.21)	3.42(2.31-3.99)	2.27(1.61-3.55)
HBeAg(+/-)	0/15	15/0	25/0	0/17	0/11
HBV DNA (log10 copies/mL)	ND ¹	7.5(7.0-8.4)	7.1(6.6-7.6)	4.6(4.1-6.5)	NA ²

¹ND: 未检测; ²NA: 正常值范围。图 1 慢性HBV感染者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的分析。A, B, C, D, E: 流式细胞仪检测外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞; F: 各组间CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的比较, 1-5: HC, AsC, HBeAg(+)-CHB, HBeAg(-)-CHB, InC组。**P*<0.05, ^b*P*<0.001。

的高低分为: HBsAg<1 600(*n* = 22), 1 600-15 000(*n* = 27), >15 000(*n* = 19)3组^[1], 3组患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比分别为: 20.54%(16.59%-23.98%), 21.56%(16.60%-26.75%), 18.87%(16.76%-20.89%), 较HC组均有不同程度升高(*P*<0.001); 与HBsAg<1 600, 1 600-15 000组比较, HBsAg>15 000组外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的频率虽无统计学差异, 但有降低的趋势(图4C)。慢性HBV感染者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比与血清HBsAg滴度无相关性(图4D)。

将CHB组按血清ALT水平的高低分为:

ALT<2 ULN(*n* = 11), 2-8 ULN(*n* = 22), >8 ULN(*n* = 9)3组, 3组患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比分别为: 20.89%(16.76%-25.11%), 22.14%(18.76%-25.03%), 23.87%(20.66%-28.20%), 较HC组均有不同程度升高(*P*<0.001); 3组患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比呈递增的趋势, 组间差异无统计学意义(图4E)。外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比与血清ALT水平无相关性(图4F)。

随着血清HBV DNA载量、HBsAg滴度的增高及ALT水平的降低, 外周血CD4⁺T淋巴细胞

■创新盘点

本研究从疾病进展的角度出发, 对慢性HBV感染不同阶段患者外周血滤泡辅助性T细胞及调节性T细胞进行检测, 从而发现Treg及Tfh细胞的消长可能与疾病的活动性相关。

■应用要点

本外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞协同FoxP3⁺Treg细胞的检测,不仅有助于患者免疫状态的判断,亦可能为慢性HBV感染患者治疗时机的选择提供依据

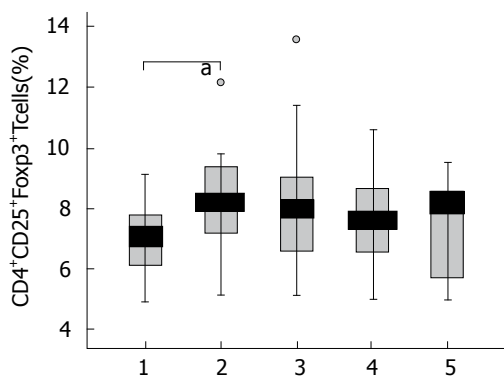


图2 各组间CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的比较. 1-5: HC, AsC, HBeAg(+)CHB, HBeAg(-)CH, InC组. **P*<0.05.

中CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的频率虽无统计学差异,但呈降低的趋势;外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞占CD4⁺T淋巴细胞的百分比与血清HBV DNA载量呈负性相关(*P*<0.05),而与血清HBsAg滴度、ALT水平无相关性。

3 讨论

CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞是新近发现的、不同于Th1、Th2和Th17的辅助性T细胞亚群,因其定位于淋巴滤泡生发中心,能辅助B细胞产生长久的、高亲和力的抗体而被命名,2000年由Schaerli和Breitfeld首次报道^[17,18]。目前认为,Tfh细胞具有独立的分化和调节机制,能够持续表达CXCR5和高水平的ICOS及PD-1产生效应因子IL-21^[19-22]。Tfh细胞功能失调与多种自身免疫性疾病的发生有关^[7,9,23,24]。研究发现,系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)及干燥综合征(Sjögren's syndrome, SS)患者外周血CD4⁺CXCR5⁺T细胞数量明显增高,并且与生发中心Tfh细胞一样能同时表达ICOS或PD-1,故将其称为循环型Tfh细胞。同时发现循环型Tfh细胞数量与SLE患者病情严重程度相关^[9]。Feng等^[11]报道,CHB患者外周血CD4⁺CXCR5⁺, CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺及CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺Tfh细胞数目升高,推测Tfh细胞可能参与了CHB的免疫紊乱。

在本研究中,慢性HBV感染患者体内均存在不同程度CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的升高,而处于免疫清除期的CHB患者水平最高,提示CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞可能参与了慢性HBV感染所介导的免疫反应,并与疾病的活动性相关。此外,通过相关分析发现,CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的频率与HBV DNA载量呈负性相关,提示CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的增高可能有利于机体对

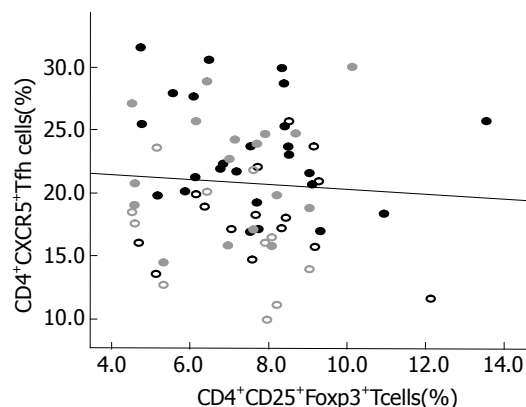


图3 CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞的相关性分析。

HBV的清除。因此,外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的测定,可能为慢性HBV感染患者治疗时机的选择提供依据。

FoxP3⁺Treg细胞是一群专职的主动抑制针对自身抗原或外来抗原免疫反应的细胞,在维持机体免疫平衡中发挥重要作用^[12,13]。Treg细胞不仅能够抑制Th1、Th2、Th17等效应T细胞所介导的免疫反应^[25-27],还能迁移到淋巴滤泡对Tfh细胞的功能进行调节^[14,15]。Aoki等^[28]在研究NTx-PD-1^{-/-}小鼠模型时发现,FoxP3⁺Treg细胞的减少及CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的异常聚集导致了自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)的发生。因此CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与FoxP3⁺Treg细胞平衡失调可能参与了AIH异常自身免疫过程。在本研究中,与AsC比较,HBeAg(+)CHB患者外周血FoxP3⁺Treg细胞数有降低的趋势,而CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞数有增高的趋势。提示由AsC进展到HBeAg(+)CHB的过程中,FoxP3⁺Treg细胞降低,使得AsC打破免疫耐受进入免疫清除期,同时伴有CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的增多,以便对B细胞提供更有利的辅助。因此CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞及FoxP3⁺Treg细胞的消长可能与疾病的活动性有关。

近来发现位于生发中心的Tfh细胞具有部分Th1、Th2及Th17细胞的特征,能产生Th1、Th2及Th17相关细胞因子^[29-31]。Morita等^[32]发现人类外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞具有不均一性,包含Th1、Th2及Th17样Tfh细胞。其中Th2及Th17样Tfh细胞能够对B细胞提供辅助,而Th1样Tfh细胞则不能辅助B细胞。青少年皮肌炎(juvenile dermatomyositis, JDM)患者体内Th2及Th17样Tfh细胞过度表达,使得Th2、Th17/Th1样Tfh细胞比例严重失衡,并发现Th2、Th17样Tfh细

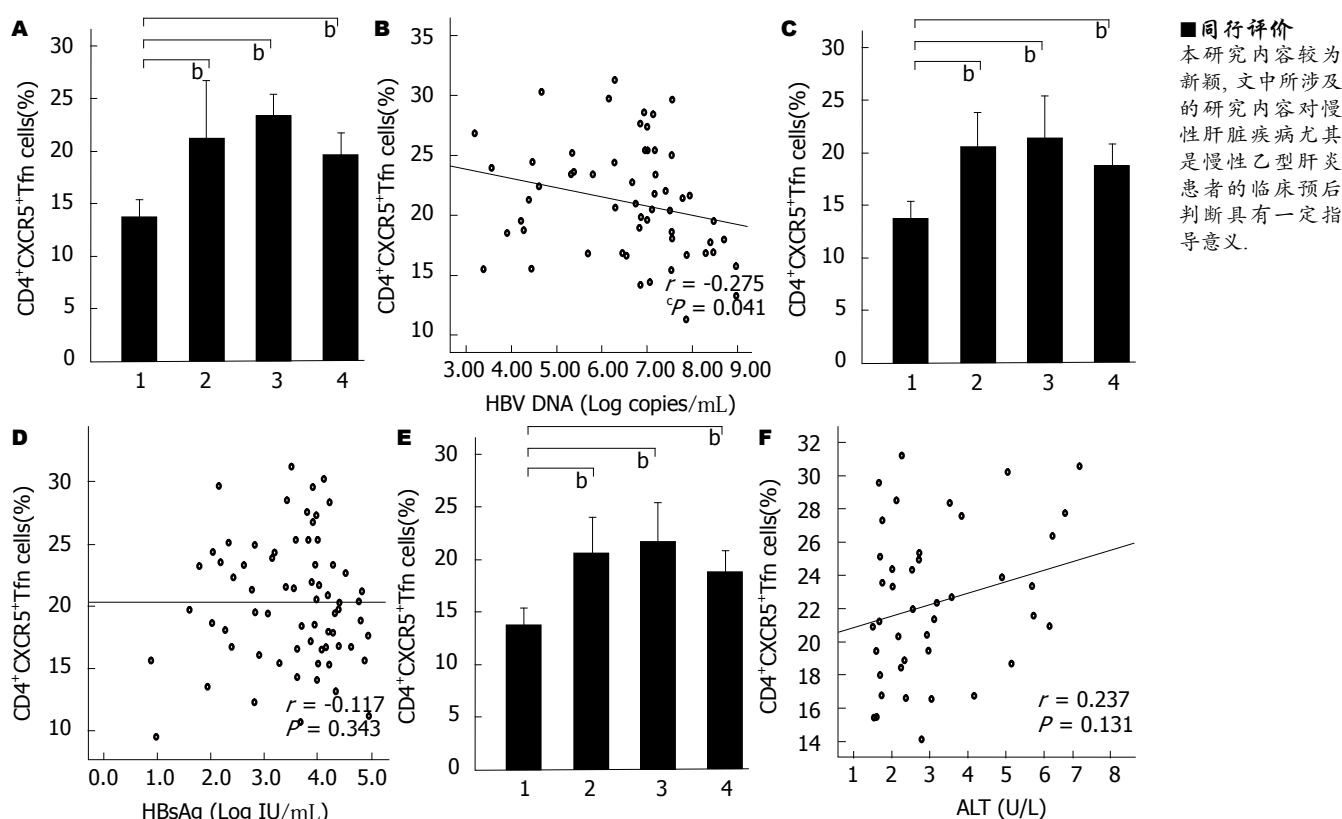


图4 CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与病毒及生化指标的相关性分析。A, B: CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与HBV DNA的关系, (A) 1-4: HC, HBV DNA<10⁵, 10⁵-10⁷, >10⁷组, ^b*P*<0.001。C, D: CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与HBsAg的关系, (C) 1-4: HC, HBsAg<1 600, 1 600-15 000, >15 000组, ^b*P*<0.001。E, F: CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞与ALT的关系, (E) 1-4: HC, ALT<2 ULN, 2-8 ULN, >8 ULN组, ^b*P*<0.001, (F) 1-8: 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700。

胞而非CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞总量与JDM患者体内自身抗体滴度及浆母细胞数相关。与上述研究结果相似, 本研究中慢性HBV感染者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞数与血清HBsAg滴度无相关性。我们还发现随着血清ALT水平的增高, 外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的频率随之增高, 推测可能与CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞中Th17样Tfh细胞的增高有关。此外, 本研究中非活动性HBsAg携带者血清HBeAg虽已转阴, 但外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞数与HBeAg(+)CHB患者相比有降低的趋势。研究也发现, 经阿德福韦酯抗病毒治疗后, 随着HBeAb的产生, CHB患者外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞数反而有所下降^[19]。因此推测慢性HBV感染的过程中, 尤其是经抗病毒治疗后, 患者体内的CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞不仅数量发生了变化, 内部亚群(Th2、Th17/Th1样Tfh细胞)的比例也可能发生了改变。

总之, CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞可能参与了慢性HBV感染所介导的免疫反应, 患者由免疫耐受期进入免疫清除期的过程中, 伴有CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg细胞降低及CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞的升高, 二者的消长可能与

疾病的活动性有关。因此, 外周血CD4⁺CXCR5⁺Tfh细胞协同FoxP3⁺Treg细胞的检测, 不仅有助于患者免疫状态的判断, 亦可能为慢性HBV感染患者治疗时机的选择提供依据。而慢性HBV感染者体内是否存在Th2、Th17及Th1样Tfh细胞的比例失衡及其在抗病毒治疗过程中的意义还需要扩大样本的进一步研究加以明确。

4 参考文献

- Hui CK, Lau GK. Immune system and hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S44-S48
- Ren F, Hino K, Yamaguchi Y, Funatsuki K, Hayashi A, Ishiko H, Furutani M, Yamasaki T, Korenaga K, Yamashita S, Konishi T, Okita K. Cytokine-dependent anti-viral role of CD4-positive T cells in therapeutic vaccination against chronic hepatitis B viral infection. *J Med Virol* 2003; 71: 376-384
- 闫杰, 谢雯, 冯鑫, 蔺亚辉, 王蓓蓓, 肖江, 欧蔚妮, 王艳斌, 成军. HBcAg特异性CTL在急性乙型肝炎与慢性乙型肝炎急性发作患者外周血中的数量差异. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 404-406
- Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 933-944
- Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 2008; 29:

- 138-149
- 6 Yu D, Batten M, Mackay CR, King C. Lineage specification and heterogeneity of T follicular helper cells. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 619-625
 - 7 de Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies A, Huang YL, Delsol G, Lamant L, Leroy K, Brière J, Molina T, Berger F, Gisselbrecht C, Xerri L, Gaulard P. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* 2007; 109: 4952-4963
 - 8 Coraglia A, Felippo M, Schierloh P, Malbran A, de Bracco MM. CD4⁺ T Lymphocytes with follicular helper phenotype (TFH) in patients with SH2D1A deficiency (XLP). *Clin Immunol* 2011; 141: 357-364
 - 9 Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, Manku H, Vyse TJ, Roncador G, Huttley GA, Goodnow CC, Vinuesa CG, Cook MC. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 234-244
 - 10 Harker JA, Lewis GM, Mack L, Zuniga EI. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science* 2011; 334: 825-829
 - 11 Feng J, Lu L, Hua C, Qin L, Zhao P, Wang J, Wang Y, Li W, Shi X, Jiang Y. High frequency of CD4⁺ CXCR5⁺ TFH cells in patients with immune-active chronic hepatitis B. *PLoS One* 2011; 6: e21698
 - 12 Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3⁺ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2832-2836
 - 13 Tan AT, Koh S, Goh W, Zhe HY, Gehring AJ, Lim SG, Bertolotti A. A longitudinal analysis of innate and adaptive immune profile during hepatic flares in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2010; 52: 330-339
 - 14 Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ, Fagarasan S, Liston A, Smith KG, Vinuesa CG. Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 2011; 17: 975-982
 - 15 Wollenberg I, Agua-Doce A, Hernández A, Almeida C, Oliveira VG, Faro J, Graca L. Regulation of the germinal center reaction by Foxp3⁺ follicular regulatory T cells. *J Immunol* 2011; 187: 4553-4560
 - 16 中华医学学会肝病学会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2011; 19: 13-24
 - 17 Schaerli P, Willmann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med* 2000; 192: 1553-1562
 - 18 Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 2000; 192: 1545-1552
 - 19 Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 445-489
 - 20 Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, Dent AL, Craft J, Crotty S. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* 2009; 325: 1006-1010
 - 21 Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, Wang YH, Dong C. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 2009; 325: 1001-1005
 - 22 King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 741-766
 - 23 Zhu C, Ma J, Liu Y, Tong J, Tian J, Chen J, Tang X, Xu H, Lu L, Wang S. Increased frequency of follicular helper T cells in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 943-950
 - 24 Linterman MA, Rigby RJ, Wong RK, Yu D, Brink R, Cannons JL, Schwartzberg PL, Cook MC, Walters GD, Vinuesa CG. Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 2009; 206: 561-576
 - 25 Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol* 2009; 10: 595-602
 - 26 Zheng Y, Chaudhry A, Kas A, deRoos P, Kim JM, Chu TT, Corcoran L, Treuting P, Klein U, Rudensky AY. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 2009; 458: 351-356
 - 27 Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. CD4⁺ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 2009; 326: 986-991
 - 28 Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Tanaka J, Watanabe T, Tanaka Y, Okazaki T, Chiba T, Watanabe N. Dysregulated generation of follicular helper T cells in the spleen triggers fatal autoimmune hepatitis in mice. *Gastroenterology* 2011; 140: 1322-1333. e1-e5
 - 29 Leavy O. T cells: The TFH-like transition of TH1 cells. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 74
 - 30 Zaretsky AG, Taylor JJ, King IL, Marshall FA, Mohrs M, Pearce EJ. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med* 2009; 206: 991-999
 - 31 Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho IC, Sharpe AH, Kuchroo VK. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol* 2009; 10: 167-175
 - 32 Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, Foucat E, Dullaers M, Oh S, Sabzghabaei N, Lavecchio EM, Punaro M, Pascual V, Banchereau J, Ueno H. Human blood CXCR5⁺CD4⁺ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 2011; 34: 108-121

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

SELDI-TOF-MS技术在肝癌诊断和介入治疗评价中的价值

胡育斌, 林海澜, 郝明志, 叶韵斌, 陈慧菁, 陈起忠, 陈 强

胡育斌, 林海澜, 郝明志, 陈起忠, 福建省肿瘤医院介入科 福建省福州市 350014

叶韵斌, 陈慧菁, 福建省肿瘤医院内科研究室 福建省福州市 350014

陈强, 福建医科大学附属协和医院肿瘤内科 福建省福州市 350001

胡育斌, 医师, 主要从事肝癌介入治疗的研究。

福建省卫生教育联合攻关计划基金资助项目, No. WKJ2005-2-015
作者贡献分布: 课题的设计由林海澜、叶韵斌及陈强完成; 数据收集由胡育斌与陈慧菁完成; 文章涉及的病例手术操作由胡育斌、林海澜、郝明志及陈起忠完成; 蛋白芯片数据采集及分析由叶韵斌与陈慧菁完成; 论文写作及修改由胡育斌、林海澜、郝明志、叶韵斌及陈慧菁完成。

通讯作者: 林海澜, 主任医师, 350014, 福建省福州市, 福建省肿瘤医院介入科. linhailan@foxmail.com

电话: 0597-83660063

收稿日期: 2012-02-04 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

Application of surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry to the diagnosis and evaluation of interventional effect in patients with hepatocellular carcinoma

Yu-Bin Hu, Hai-Lan Lin, Ming-Zhi Hao, Yun-Bin Ye, Hui-Jing Chen, Qi-Zhong Chen, Qiang Chen

Yu-Bin Hu, Hai-Lan Lin, Ming-Zhi Hao, Qi-Zhong Chen, Department of Interventional Radiology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian Province, China

Yun-Bin Ye, Hui-Jing Chen, Department of Immunooncology Laboratory, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian Province, China

Qiang Chen, Department of Oncology, Fujian Union Hospital, Fujian Medical College, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by: the Health Education Joint Research Program of Fujian Province, No. WKJ2005-2-015

Correspondence to: Hai-Lan Lin, Chief Physician, Department of Interventional Radiology, Fujian Provincial Tumor Hospital, Fuzhou 350014, Fujian Province, China. linhailan@foxmail.com

Received: 2012-02-04 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To establish a serum protein pattern model for diagnosing hepatocellular carcinoma (HCC) by using the surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SEL-

DI-TOF-MS), and to evaluate the value of this model in predicting the effect of interventional treatment for HCC.

METHODS: Serum samples collected from patients with HCC ($n = 60$) and healthy people ($n = 60$) were used for SELDI-TOF-MS on CM10 chips. The proteomic spectra were analyzed by using the Biomarker Wizard software. The diagnosis model was established by using the Biomarker Pattern software.

RESULTS: Three significantly different protein peaks were found in serum samples between HCC patients and healthy controls. A protein peak at 6 992 Da showed higher expression and the other two protein peaks (4 182 Da, 5 710 Da) showed lower expression in HCC patients than in healthy people. The diagnostic model containing these three candidate biomarkers could distinguish patients with HCC from healthy controls with a sensitivity of 93.3% (28/30), a specificity of 90.0% (27/30), an accuracy of 91.7% (55/60), and a Youden index value of 0.833. The protein peak at 4 182 Da was significantly decreased one month after interventional treatment in HCC patients ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The diagnostic model developed by using SELDI-TOF-MS allows efficiently identifying patients with HCC and may play a valuable role in the diagnosis of HCC. The protein peak at 4 182 Da is helpful for the evaluation of interventional curative effect in HCC patients.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Protein chip; Surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; Interventional treatment

Hu YB, Lin HL, Hao MZ, Ye YB, Chen HJ, Chen QZ, Chen Q. Application of surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry to the diagnosis and evaluation of interventional effect in patients with hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1107-1111

摘要

目的: 建立肝癌血清学诊断模型, 探讨评估

■背景资料

目前甲胎蛋白(AFP)诊断肝癌的敏感性和特异性尚不理想, 寻找新的肝癌标志物以提高肝癌诊断水平尤为重要。

■同行评议者

唐南洪, 教授, 福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所; 张宗明, 教授, 清华大学第一附属医院消化医学中心

■ 研发前沿

SELDI-TOF-MS在肝癌诊断的价值已得到肯定,而在介入治疗评价中的应用却鲜有报道.

SELDI-TOF-MS技术在肝癌诊断和介入治疗评价中的价值.

方法: 用弱阳离子交换芯片(CM10芯片)和表面增强激光解吸电离飞行时间质谱仪(surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术,测定60例肝癌患者和60例正常对照者的血清蛋白质指纹图谱,应用Biomarker Wizard统计软件比较肝癌组和正常对照组血清蛋白质表达的差异性,采用Biomarker Pattern软件分析数据建立肝癌诊断模型,比较介入治疗前后血清蛋白质指纹图谱的差异性.

结果: 在质荷比(M/Z)为2 000-10 000范围内,和正常血清比较,肝癌的差异峰有3个(M/Z为4 182 Da、5 710 Da、6 992 Da; $P<0.01$),4 182 Da和5 710 Da下调,6 992 Da上调.用这3个差异蛋白峰建立肝癌诊断模型,诊断肝癌的灵敏度为93.3%(28/30),特异度为90.0%(27/30),正确率为91.7%(55/60),约登指数为0.833.差异蛋白峰(M/Z 4 182 Da)在介入术后1 mo明显上调($P<0.05$).

结论: 应用SELDI-TOF-MS技术进行肝癌血清蛋白质指纹图谱分析,建立肝癌诊断树模型,对肝癌的诊断有一定的价值;筛选出的差异蛋白峰对肝癌的介入治疗评估有一定的应用价值.

关键词: 肝癌;蛋白芯片;表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术;介入治疗

胡育斌, 林海澜, 郝明志, 叶韵斌, 陈慧菁, 陈起忠, 陈强. SELDI-TOF-MS技术在肝癌诊断和介入治疗评价中的价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1107-1111

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1107.asp>

0 引言

原发性肝癌发病率和病死率高,在我国年发病数约30.6万人,死亡率居我国肿瘤死因的第2位^[1,2].早期诊断和治疗是提高原发性肝癌疗效的关键.目前表面增强激光解吸电离飞行时间质谱仪技术(surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)在肝癌诊断的价值已得到肯定^[3-6],而在介入治疗评价中的应用却鲜有报道.本课题应用SELDI-TOF-MS技术建立肝癌诊断模型,探讨其在原发性肝癌诊断和介入治疗评价中的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-01/12初次在我科治疗的原

发性肝癌患者60例,其中男48例,女12例,年龄19-81岁,中位年龄53岁,诊断符合2001-09第8届全国肝癌学术会议修订的诊断标准^[7],其中I b期10例,II a期14例,II b期19例,III a期9例,III b期8例.对照样品来自2009-01/12在我院体检的健康志愿者60例,其中男45例,女15例,年龄15-78岁,中位年龄49岁.乙酸钠、乙腈、三氟乙酸、尿素、CHAPS缓冲液购自Sigma公司,芥子酸、弱阳离子交换芯片(CM10)、生物处理器、PBS II质谱仪均购自美国Ciphergen公司.

1.2 方法 采集患者(治疗前)及健康对照者清晨空腹静脉血5 mL,4℃静置1 h后分离血清,-80℃保存.取10 μL与20 μL U9缓冲液EP管中充分混匀,冰浴振荡30 min,加入360 μL CM10-buffer混匀.用CM10-buffer预处理的芯片中加入100 μL处理好的样品,室温下震荡1 h.洗涤芯片,分2次加上SPA 2 μL,干燥即可上机检测.采用PBS II-C型蛋白质芯片阅读仪读取芯片,利用Ciphergen ProteinChip 3.1.1软件收集数据.利用Biomarker Wizard 3.1软件筛选表达有差异的蛋白质峰.

统计学处理 用BioMarker Wizard软件对血清蛋白质谱数据进行统计学分析,分析蛋白质峰强度与数量的差异性,筛选出的蛋白质峰在10%以上的不同样本中同时存在,且同一蛋白质峰在不同样本中的偏差<0.3%.对不同分组中相同质荷比的蛋白质含量用Biomarker Wizard软件进行分析, $P<0.05$ 具有统计学意义.用Biomarker Pattern软件用于分析数据建立分类树诊断模型.

2 结果

2.1 筛选肝癌组与健康对照组有统计学意义的差异蛋白质峰 肝癌患者与健康对照血清图谱相比较,筛选出3个差异蛋白质峰其质荷比(M/Z)分别为4 182 Da、5 710 Da、6 992 Da($P<0.01$,表1,图1).其中M/Z为4 182 Da、5 710 Da的差异蛋白质峰表达下调,M/Z为6 992 Da的差异蛋白质峰表达上调.

2.2 肝癌诊断模型的建立 采用BioMarker Patterns System软件以M/Z为4 182 Da、5 710 Da和6 992 Da的3个差异蛋白质峰建立肝癌诊断模型,其灵敏度为95.0%,特异度为91.7%(表2).

2.3 盲筛法验证模型 根据建立的肝癌诊断模型对随机抽选的30例肝癌患者和30例正常对照进行盲筛,结果灵敏度为93.3%,特异性为90.0%,符合率为91.7%,约登指数为0.833(表2).

2.4 肝癌介入治疗后1 wk血清蛋白质谱的差异

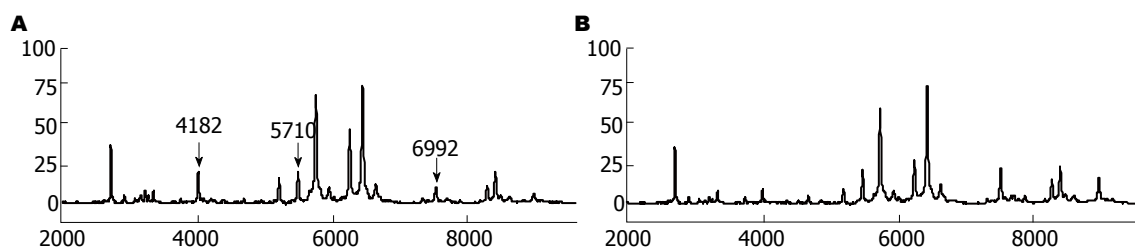


图1 肝癌组与健康对照组的血清差异蛋白指纹图谱. A: 健康对照组; B: 肝癌组.

■应用要点

由于蛋白质指纹图谱的重复性较差, 把血清蛋白质指纹图谱与AFP联合应用于肝癌的早期诊断, 可能是以后的发展方向.

表1 肝癌组与健康对照组比较的血清差异蛋白峰

M/Z(Da)	肝癌组平均值	肝癌组标准差	健康对照组平均值	健康对照组标准差	P值
4182	3.469	3.591	10.933	5.560	3.1×10^{-5}
5710	1.926	1.271	3.912	1.310	2.6×10^{-6}
6992	2.360	1.107	1.730	0.933	8.0×10^{-4}

表2 肝癌组与健康对照组的测试及盲筛验证结果

测试结果	正确划分(n)	错误划分(n)	正确率(%)
肝癌组	57	3	95.0
健康对照组	55	5	91.7
合计	112	8	93.3
盲筛验证结果			
肝癌组	28	2	93.3
健康对照组	27	3	90.0
合计	55	5	91.7

性分析 采用Biomarker Wizard软件对60例原发性肝癌患者介入治疗前与介入治疗后1 wk的血清蛋白质谱图进行比较和统计学分析(表3, 图2), 筛选有统计学意义的血清蛋白质差异峰. 结果显示: M/Z为4 182 Da、5 710 Da的2个差异蛋白质峰在介入治疗后1 wk表达均显著下调($P < 0.05$).

2.5 肝癌介入治疗后1 mo血清蛋白质谱的差异性分析 采用Biomarker Wizard软件对成功复查的40例原发性肝癌患者介入治疗前与介入治疗后1 mo的血清蛋白质谱图进行比较和统计学分析(表3, 图3), 筛选有统计学意义的血清蛋白差异峰. 结果显示: 肝癌介入治疗后1 mo M/Z为4 182 Da的血清蛋白质峰表达具有统计学意义($P < 0.05$), 表达而5 710 Da的差异蛋白峰表达无统计学意义($P > 0.05$).

3 讨论

临床上约有2/3的原发性肝癌患者初诊时已属中晚期, 失去了根治性治疗的机会, 一般生存期不到半年, 即使经过积极有效地治疗, 其5年生

存率也不足10%. 而早期发现的亚临床期小肝癌经过手术等综合治疗后, 5年生存率可提高为60%-80%. 因此肝癌早期诊断至关重要. 肝癌的形成是一个多步骤、多因素、多基因参与的过程, 包括一系列基因和蛋白质表达的变化, 而有些基因或蛋白可用作肝癌预后的标记^[8]. 目前肝癌的生物标记物以甲胎蛋白(AFP)最为理想^[9]. 但70%的肝癌患者血清AFP浓度低于诊断肝癌的临界值($500 \mu\text{g/L}$)^[10], 约30%的肝癌患者AFP阴性, 且易受肝炎、生殖源性肿瘤等影响出现假阳性^[11]. AFP的敏感性和特异性尚不理想, 多中心三期临床试验认为其灵敏度为43%, 特异度为46%^[12]. 故寻找新的肝癌标志物以提高肝癌诊断水平尤为重要.

蛋白质作为功能基因的直接体现者, 是生命活动和生物结构最主要的承担者^[13]. 尽管所有的细胞都拥有同样的基因组, 但在不同的细胞内会有不同的基因处在活跃状态, 从而合成不同的蛋白质; 即使同一细胞, 当处于不同机体功能状态时合成和分泌的蛋白质也会发生改变^[14]. 蛋白质通常代表疾病的分子诊断的终末点^[15], 人血清是一个蛋白质相当丰富并不断变化的系统, 可能含有大量未发现的可用作疾病标志物的多肽^[16], 单一的血清肿瘤标记物难以真正反溯到相关的细胞组织, 而发现一组与特定组织癌变相关的血清蛋白质(多参数标记物)则是更有效的途径, 这也就是所谓的“癌症指纹”^[17].

由于SELDI-TOF-MS技术具有高分辨率、高通量的特点, 其灵敏度可达 10^{-15} mol , 是目前最有希望的肿瘤早期检测方法^[18], 他可在疾病发生的极早期检测到某些蛋白质的变化, 由此从理

■同行评价

SELDI-TOF-MS技术用于评价肝癌介入治疗还较少见, 本文创新性较强, 有一定的学术价值。

表 3 肝癌介入治疗后1 wk和1 mo血清蛋白峰的差异表达

M/Z(Da)	介入前平均值	介入前标准差	介入后平均值	介入后标准差	P值
1 wk					
4 182	2.808	1.9013	1.908	1.0376	0.043
5 710	2.064	1.3469	1.328	0.6567	0.018
1 mo					
4 182	1.908	1.0376	3.220	2.3427	0.014
5 710	2.408	1.9287	1.968	0.8683	0.303

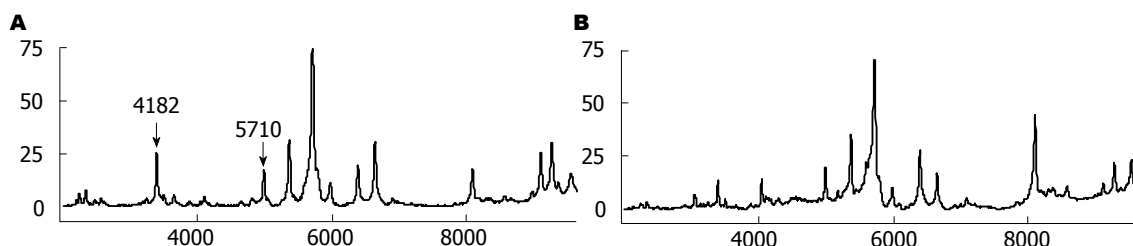


图 2 肝癌介入后1 wk血清蛋白指纹图谱. A: 介入治疗前; B: 介入治疗后1 wk.

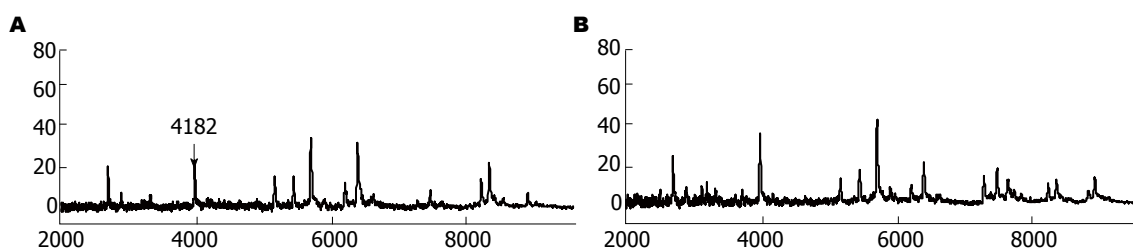


图 3 肝癌介入后1 mo血清蛋白指纹图谱. A: 介入治疗前; B: 介入治疗后1 mo.

论上讲, 该技术亦可用于肿瘤的早期预警。

本研究结果发现, M/Z为4 182 Da、5 710 Da处的蛋白质含量在正常人组明显高于肝癌组, 推测这两处蛋白质可能含有在肝细胞癌的发生、发展时被抑制的蛋白, 他们可能在维持细胞正常功能, 促进凋亡和抑制增殖等方面发挥作用. 本研究建立的肝癌诊断模型诊断肝癌的灵敏度达93.3%, 特异度达90.0%, 均明显优于文献报道的AFP诊断肝癌的价值, 在肝癌诊断中显示出了很好的应用价值。

肝癌组M/Z为4 182 Da处蛋白质峰值在介入治疗前明显低于正常对照组, 介入治疗后1 wk明显下调, 而介入术后1 mo 4 182 Da峰值显著上调, 有向正常对照峰值变化的趋势, 提示4 182 Da表达水平可能与肿瘤负荷的大小有关. 4 182 Da在介入治疗后1 wk表达下降, 可能与介入治疗后肝功能损伤有关, 而介入治疗后1 mo其表达明显增加, 考虑为介入治疗后肿瘤细胞大量坏死致使肿瘤负荷明显减小. 此动态变化规律, 提示M/Z为4 182 Da处的蛋白质很可能含有对肝癌介入治疗

极为敏感的靶分子. 随着在今后的研究中样本量的扩大, 随访时间的延长, 4 182 Da可能成为评价肝癌介入治疗的参考指标。

但由于SELDI-TOF-MS技术中每一个波峰的质荷比对应的可能是很多个相对分子质量相近的多肽, 并不能直接对复杂体液中的具体蛋白质或多肽进行鉴定^[19]. 同时由于蛋白质指纹图谱的重复性较差, 不同实验室对肝癌患者进行血清蛋白分析的结果不尽相同, 目前很难得到一个统一的“金标准”. 把血清蛋白质指纹图谱与AFP联合应用于肝癌的早期诊断, 可能是以后的发展方向。

4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2: 533-543
- 2 Wang HT, Wang J, Ou QJ, Liu XP, Chen S. [Expression of growth hormone receptor mRNA in hepatocellular carcinoma and matched para-cancer cirrhotic liver tissue]. *Ai Zheng* 2002; 21: 146-148
- 3 Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, Thar TT, Barget N, Wei W, Billingham LJ, Martin A, Beaugrand M, Johnson PJ. Changes in the serum proteome associ-

- ated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *Br J Cancer* 2006; 94: 287-292
- 4 Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Chen DS, Yu CY, Wen CL, Lu FJ, Chow LP. Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics* 2006; 6: 2865-2873
- 5 张辉, 高春芳, 赵光, 王秀丽. 飞行质谱技术筛选肝癌肿瘤标志物的临床意义. *中华实验外科杂志* 2006; 23: 279-281
- 6 刘池波, 潘春琴, 孙灵芬. 应用SELDI-TOF-MS技术建立肝癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2354-2357
- 7 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 324
- 8 Zeindl-Eberhart E, Haraida S, Liebmann S, Jungblut PR, Lamer S, Mayer D, Jäger G, Chung S, Rabes HM. Detection and identification of tumor-associated protein variants in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 2004; 39: 540-549
- 9 Feitelson MA, Sun B, Satioglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604
- 10 Seow TK, Liang RC, Leow CK, Chung MC. Hepatocellular carcinoma: from bedside to proteomics. *Proteomics* 2001; 1: 1249-1263
- 11 Yoshida S, Kurokohchi K, Arima K, Masaki T, Hosomi N, Funaki T, Murota M, Kita Y, Watanabe S, Kuriyama S. Clinical significance of lens culinaris agglutinin-reactive fraction of serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 305-309
- 12 Hayman MW, Przyborski SA. Proteomic identification of biomarkers expressed by human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 918-923
- 13 Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003; 422: 226-232
- 14 Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* 1996; 14: 61-65
- 15 Kumar S, Mohan A, Guleria R. Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers* 2006; 11: 385-405
- 16 Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature* 2003; 425: 905
- 17 Powell K. Proteomics delivers on promise of cancer biomarkers. *Nat Med* 2003; 9: 980
- 18 Paradis V, Degos F, Dargère D, Pham N, Belghiti J, Degott C, Janeau JL, Bezeaud A, Delforge D, Cubizolles M, Laurendeau I, Bedossa P. Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* 2005; 41: 40-47
- 19 Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 587-592

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 总被引频次排名位于第 174 名

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology (WJG)* 被 Science Citation Index Expanded (SCIE) 和 MEDLINE 等国际重要检索系统收录, 在国际上享有较高声誉和影响力. *WJG* 在 PubMed Central (PMC) 统计, 单月独立 IP 地址访问 58 257 次, 全文网络版 (HTML Full Text) 下载 94 888 次, 全文 PDF 下载 59 694 次. 另外根据基本科学指标库 (essential science indicators) 统计, 2000-01-01/2010-12-31, SCIE 检索的临床医学 (clinical medicine) 期刊有 1 105 种, 总被引频次排名, *WJG* 位于第 174 名. (2011-05-14 马连生 董事长/总编辑)

内源性大麻素系统对肝硬化的影响

张 建, 戴二黑, 姜慧卿

■背景资料

研究发现内源性大麻素系统与肝纤维化及肝硬化关系密切, 对内源性大麻素系统的研究有利于开发治疗肝纤维化的药物。

张建, 姜慧卿, 河北医科大学第二医院消化科 河北省消化病重点实验室 河北省消化病研究所 河北省石家庄市 050000
张建, 河北省人民医院消化科 河北省石家庄市 050051
戴二黑, 石家庄市第五医院 河北省石家庄市 050021
张建, 硕士, 医师, 主要从事慢性肝病基础及临床研究。
中国肝炎防治基金会王宝恩肝纤维化研究基金资助项目, No. 20080013
河北省自然科学基金资助项目, No. C2010000530
作者贡献分布: 本文综述由张建完成; 戴二黑与姜慧卿审核。
通讯作者: 姜慧卿, 主任医师, 教授, 博士生导师, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化科, 河北省消化病重点实验室, 河北省消化病研究所。
huiqingjiang@yahoo.com.cn
电话: 0311-66002955
收稿日期: 2012-02-21 修回日期: 2012-03-13
接收日期: 2012-03-28 在线出版日期: 2012-05-08

Role of the endocannabinoid system in the pathogenesis of cirrhosis

Jian Zhang, Er-Hei Dai, Hui-Qing Jiang

Jian Zhang, Hui-Qing Jiang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University; Hebei Key Laboratory of Gastroenterology; Hebei Institute of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Jian Zhang, Department of Gastroenterology, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China
Er-Hei Dai, the Fifth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050021, Hebei Province, China

Supported by: the Wang Bao-En Liver Fibrosis Research Foundation, No. 20080013; and the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2010000530

Correspondence to: Hui-Qing Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University; Hebei Key Laboratory of Gastroenterology; Hebei Institute of Gastroenterology, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. huiqingjiang@yahoo.com.cn

Received: 2012-02-21 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-03-28 Published online: 2012-05-08

Abstract

The endocannabinoid system is made up of endocannabinoid, cannabinoid receptor type 1 (CB1) and cannabinoid receptor type 2 (CB2). Many studies have found that hepatic myofibroblasts and vascular endothelial cells express more CB1 and CB2 in the development of chronic liver disease. There is a close relationship between the endocannabinoid system and liver fibrosis and cirrhosis. This paper aims to review recent

advances in understanding the role of the endocannabinoid system in the pathogenesis of fatty liver disease, liver fibrosis and cirrhosis complications.

Key Words: Endocannabinoid system; Liver fibrosis; Cirrhosis; Portal hypertension

Zhang J, Dai EH, Jiang HQ. Role of the endocannabinoid system in the pathogenesis of cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1112-1117

摘要

内源性大麻素系统包括内源性大麻素物质、特异性大麻素受体1(cannabinoid receptor 1, CB1)和大麻素受体2(cannabinoid receptor 2, CB2)。许多研究已经证实慢性肝病发展过程中, 肝脏肌成纤维细胞和血管内皮细胞的CB1和CB2表达升高, 内源性大麻素系统与肝纤维化及肝硬化关系密切。本文就内源性大麻素系统、内源性大麻素系统和脂肪性肝病、内源性大麻素系统和肝纤维化、内源性大麻素系统和肝硬化并发症等作一综述。

关键词: 内源性大麻素系统; 肝纤维化; 肝硬化; 门脉高压

张建, 戴二黑, 姜慧卿. 内源性大麻素系统对肝硬化的影响. *世界华人消化杂志* 2012; 20(13): 1112-1117

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1112.asp>

0 引言

大麻类物质是一种成瘾性物质, 其主要活性成分是 Δ^9 -四氢大麻酚(Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC)。有学者在人体内发现具有大麻作用的化合物, 称之为内源性大麻素。内源性大麻素由特异性大麻素受体1(cannabinoid receptor 1, CB1)和大麻素受体2(cannabinoid receptor 2, CB2)介导发挥作用。许多因素可影响肝纤维化, 包括细胞外间质(extracellular matrix, ECM)在肝脏中的沉积, 免疫细胞和炎症细胞的直接相互作用, 易患纤维化遗传因素等^[1]。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)在肝纤维化发生发展中起

■同行评议者

刘成海, 研究员, 上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所

主导作用. 在各种致病因素作用下, HSC增殖、转化为肌成纤维样母细胞, 合成和分泌ECM增多, 最终发生肝纤维化乃至肝硬化^[2,3]. 许多研究已经证实, 在慢性肝病的发展过程中, 肝脏的肌成纤维细胞和血管内皮细胞的CB1和CB2表达升高, 与此同时, 内源性大麻素类物质特别是花生四烯酸乙醇胺(anandamida, AEA)在肝脏中的浓度也增高^[4-6]. 可见, 内源性大麻素系统和肝纤维化之间的关系十分密切.

1 大麻素和大麻素受体

大麻类植物是成瘾性植物之一, 具有重要的药用价值. 1964年, 科学家阐释清楚了大麻素的主要活性成分 Δ^9 -THC的化学结构^[7], 从此对大麻素的研究不断深入. 人体内同样也存在类似于大麻的物质, 主要包括2-arachidonylglycerol(2-AG)、anandamide(AEA), 还包括一些其他内源性脂肪酸衍生物如noladinether和virodhamine等^[8]. 这些物质主要由免疫细胞、神经细胞、血管内皮细胞、心肌细胞等分泌. Matsuda等^[9]发现CB1是一种G蛋白偶联受体, 介导大麻素的生物学作用. 然而, CB1主要介导大麻素类物质产生精神和神经作用. 随后, 在对大麻素受体的研究过程中从脾脏的巨噬细胞内发现了CB2.

最初研究显示CB1的表达主要和神经系统相联系, 因为最初发现他们主要调节感知觉、认知力、行为和动作. 后来的研究发现CB1也存在于内皮细胞、脂肪细胞、肝细胞和胃肠道细胞中^[10-13], CB1受体主要与摄食、肥胖、胰岛素抵抗有密切关系. CB2受体主要存在于免疫系统, 主要包括: B细胞、自然杀伤细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、肥大细胞和T细胞等^[14]. 近期发现在心肌细胞、血管内皮细胞中也有表达^[15], CB2受体主要调节免疫, 抑制炎症反应. CB1和CB2受体均为G蛋白偶联受体, 大麻素与其受体结合后可通过抑制细胞内cAMP生成来发挥作用^[16]. 目前认为, 大麻素可通过简单扩散进入细胞或通过一种特殊转运体以易化扩散的方式进入细胞, 然后在脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)作用下快速水解, 降解成花生四烯酸和乙醇胺^[17]. 内源性大麻素系统紊乱可导致神经系统、代谢、免疫系统、心血管系统、消化系统和癌症等疾病^[18].

2 内源性大麻素系统和脂肪性肝病

脂肪肝定义为脂肪含量(主要为甘油三脂类)超

过肝脏重量的5%. 虽然长期以来都认为脂肪肝并非对身体有害, 但是越来越多的证据显示脂肪肝会导致肝功能异常, 甚至导致肝硬化. 实际上, 脂肪在肝脏的沉积促进了氧化应激和炎症反应, 从而导致细胞损伤和纤维组织在肝脏的沉积.

非酒精性脂肪肝病(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是代谢综合征的肝脏表现, NAFLD的临床表现从轻到重为: 肝脏脂肪变、非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化. 在20年内有20%的NAFLD患者可以发展为肝硬化或肝癌^[19,20]. Osei-Hyiaman等^[12]研究表明在高脂饮食的小鼠肝脏中, 内源性大麻素类物质和CB1表达增加. 他们发现CB1的激活会通过如下两种机制促进脂肪肝的发生, 一种是中枢性的促进食欲作用, 另一种是外周性的促进脂肪生成作用^[12]. 在高脂饮食的小鼠肝脏中, 内源性的AEA通过诱导脂质生成因子等促进脂肪酸生成. 内源性大麻素系统在肝脏中促进脂肪生成等作用可以被CB1特异性阻断剂利莫那班(Rimonabant)阻断, 用CB1^{-/-}小鼠研究得出了类似的结论^[12]. 研究发现, 在选择性肝脏CB1^{-/-}的小鼠中, 给予高脂饮食, 会加重这种小鼠的肥胖, 但是会抑制肝脏的脂肪变和提高其糖耐量^[21]. 有研究发现阻断CB1不仅可以逆转遗传性肥胖Zucker大鼠肝脏的脂肪变, 并且可以逆转高脂饮食所诱导的大鼠肝脏的脂肪变^[22,23]. CB1阻断剂可以通过各种机制改善胰岛素抵抗, 逆转肝脏脂肪变^[24,25]. 一些临床研究也验证了内源性大麻素类物质和其受体在NAFLD发生发展中起到一定作用. 在4组临床实验汇总结果中, 我们发现在肥胖患者中利莫那班能降低丙氨酸氨基转移酶的水平, 后者是NAFLD发生的重要标志^[26]. 并且研究者通过307例慢性丙型肝炎患者调查了大麻对肝脏脂肪变的影响, 研究发现吸食大麻是肝脏脂肪变加重的一个独立危险因素^[27]. 在NAFLD患者的肝脏中, CB2表达增加, 这表明了CB2也参与了NAFLD的发生, 可能CB2的作用比较弱^[28]. 因此内源性大麻素系统在人体中有促进肝脏脂肪变的作用.

在世界范围内, 酒精中毒是导致肝脏疾病的一个重要原因, 经常饮酒可以导致脂肪肝、酒精性肝炎、肝纤维化、肝硬化和门脉高压等肝硬化并发症. 在酒精性肝病的发生发展过程中, 内源性大麻素系统也扮演着重要角色. 长时间大量饮酒者肝脏的脂肪沉积是通过肝脏脂肪的生成增加导致的, 而这种肝脏脂肪增加是由

■研究前沿

在慢性肝病的发展过程中, 肝脏的肌成纤维细胞和血管内皮细胞的CB1和CB2表达升高. 与此同时, 内源性大麻素类物质在肝脏中的浓度也增高.

■相关报道

最近研究发现大麻素受体CB1和CB2的激活和肝纤维化关系密切。CB1阻断剂利莫那班可以抑制肝纤维化的发生,是一种潜在的治疗纤维化的药物。

于脂肪酸氧化作用降低实现的^[29]。在整体CB1^{-/-}小鼠和肝细胞CB1^{-/-}小鼠中,酒精所导致的脂肪变比在正常小鼠中轻。用酒精喂养整体CB1^{-/-}小鼠和肝细胞CB1^{-/-}小鼠会降低其脂质生成基因的表达,同时降低肉碱软脂酰转移酶1(carnitine palmitoyltransferase 1)的活性,然而在酒精喂养的普通小鼠中脂质生成基因的表达和肉碱软脂酰转移酶1的活性并没有降低。高酒精摄入会导致小鼠肝脏中肝星状细胞的CB1和2-AG表达增加,同时2-AG生物合成酶二酰基甘油酯酶表达增加。从而得出如下结论,2-AG通过CB1导致肝脏脂肪变,其中的机制包括脂肪生成增加和脂质氧化下降^[30]。

3 内源性大麻素系统和肝纤维化

病毒性肝炎、大量饮酒和NAFLD等导致肝纤维化病因的持续刺激,促进了肝脏肌成纤维细胞分泌细胞外间质。这些细胞外间质代替了变性、坏死的肝细胞,并且改变了肝脏的正常结构,最终导致肝硬化的发生,出现肝功能衰竭和门脉高压^[31]。通过对肝纤维化小鼠模型和肝纤维化患者的研究发现,内源性大麻素系统通过复杂的信号通路激活肝星状细胞,促进了肝脏细胞外间质的沉积,而激活大麻素受体可以促进HSC的死亡^[32]。

临床研究表明丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)患者吸食大麻会加重肝纤维化。270例患者均经肝脏活检确定,每日使用大麻可以促进纤维化的进展;并且每日使用大麻可以导致严重肝纤维化的发生,同时不依赖于Metavir活动度、肝脏活检年龄、过量乙醇摄取、脂肪变性和烟草使用等因素。所以每日吸食大麻与慢性丙型肝炎纤维化程度显著性相关^[33]。

有实验在基因和药物水平上通过对CB1和CB2的阻断来研究内源性大麻素系统对肝纤维化的影响,发现内源性大麻素系统有促进和抑制肝纤维化的双重作用^[34,35]。在CCl₄、硫代乙酰胺、胆道结扎3种肝纤维化小鼠模型中,CB1基因敲除的小鼠和用CB1拮抗剂利莫那班干预的小鼠肝纤维化的程度比普通小鼠轻^[5]。在多病因的肝纤维化患者肝脏活检中,CB2主要在纤维隔内部及边缘上平滑肌抗体α阳性的非实质细胞中表达;而在正常人肝脏中未检测到CB2。体外培养的成纤维细胞和激活的HSC中能检测到CB2。CCl₄诱导肝纤维化小鼠模型中,CB2基因缺失小鼠较野生型小鼠发生了更严重的肝纤维

化。该研究发现CB2在慢性肝损伤中起到了抗肝纤维化作用,提示CB2特异性激动剂有可能逆转肝纤维化^[4]。研究发现CB2的激活有利于急性肝损伤的恢复,同时证实CB2的激活有利于肝纤维化的逆转^[36]。

在肝纤维化的形成过程中,有很多细胞扮演了关键的角色,内源性大麻素系统对这些细胞的增殖和凋亡有调节作用^[23]。内源性大麻素系统通过免疫反应调节肝脏中的伤口愈合过程。有通过体外分离细胞的研究发现AEA和2-AG可以通过产生活性氧导致肝星状细胞凋亡。然而,内源性大麻素系统对肝星状细胞影响并不一定是通过CB1和CB2实现的^[34,35]。

由此看出,刺激CB1和CB2在肝纤维化形成的过程中会产生相反的作用:激活CB1可以促进肝纤维化的发生,而激活CB2可以抑制肝纤维化的发生。激活CB1的促肝纤维化作用强于激活CB2的抑制肝纤维化的作用,因此,针对内源性大麻素系统设计药物主要集中在CB1抑制剂的研究和评估。到目前为止,有关内源性大麻素系统的许多问题还有待研究,比如CB1和CB2与什么受体作用,还有没有其他内源性大麻素受体,CB1和CB2是通过什么信号通路来影响肝纤维化的发生。

4 内源性大麻素系统和肝硬化并发症

以内源性大麻素系统作为治疗肝纤维化的药物靶点,其优势不仅在于影响疾病发展的进程,而且还可以改善肝硬化的并发症,包括门脉高压、高动力循环综合征、肝性脑病。

4.1 门脉高压 肝硬化患者的肝脏结构发生改变,从而导致门脉高压。门静脉高压的降低有利于预防食管胃底静脉曲张破裂出血,因此,对于这些有出血危险的患者,降低门静脉高压是最适宜的治疗方法之一^[37]。

内源性大麻素系统与各种形成门静脉高压的机制都有关系。内源性大麻素系统长时间地作用于人体,可以阻断肝纤维化的进展并且有利于肝硬化患者肝脏紊乱结构的恢复,也有实验证实内源性大麻素系统可以通过影响血液循环动力作用而改善门静脉高压。有研究发现在离体大鼠肝脏中AEA可以增加肝内血管阻力,并且有剂量依赖性^[38,39]。内源性大麻素系统在硬化肝脏中的作用比在正常肝脏中的作用强,这些作用和环氧化酶诱导的血管活性相关的花生四烯酸类物质生成增加有关^[39]。在胆总管结扎大

鼠肝纤维化模型中, CB1拮抗剂可以逆转肝纤维化时增高的血管活性相关花生四烯酸类物质^[39]。

4.2 高动力循环综合征 晚期肝硬化患者存在高动力循环综合征, 表现为外周血管阻力的下降和心输出量代偿性增高^[40]。其血管的变化主要表现在内脏动脉的扩张, 导致机体有效血容量的下降, 通过肾素-血管紧张素-醛固酮系统、交感神经系统引起血管收缩和钠水潴留^[41]。

动脉扩张的机制目前没有完全研究清楚, 但是大部分人都认为血管活性物质的失衡起到了重要的作用, 这些血管活性物质包括NO、CO和前列腺素^[42-44]。已有研究发现内源性大麻素系统参与血管扩张和动脉压力下降^[45,46]。在肝硬化大鼠中, CB1特异性阻断剂利莫那班可以逆转动脉压过低, 增高动脉阻力^[45]。有研究发现从肝硬化大鼠中分离的单核细胞输入正常大鼠体内, 可以使动脉血压下降, 而从正常大鼠中分离的单核细胞并没有这种作用^[46]。与从正常人和大鼠体内提取的单核细胞相比, 从肝硬化患者和肝硬化大鼠体内提取的单核细胞中AEA的表达, 较正常人和大鼠提取的单核细胞明显升高^[46]。

腹水是肝硬化患者常见的并发症之一。腹水的发生代表了门脉压力的增高和钠水潴留的存在, 并且预示着患者预后不良和生活质量下降。高动力循环可以促进有效血容量减少并导致钠水潴留, 同时肝硬化时存在门脉压力增高, 导致腹腔液体积存^[41]。已有初步的研究显示, 在用CCl₄造模的肝硬化大鼠中, CB1特异性阻断剂利莫那班可以阻断腹水的生成^[47]; 腹水的减少是通过排钠促进钠水平衡, 同时, 钠的摄入并没有明显变化, 这些变化和高动力循环的变化是相互联系的, 这表明利莫那班对肾脏的影响是继发于对高动力循环影响之后的。

4.3 肝性脑病 肝性脑病多发生于急性肝损伤后, 表现为一系列神经症状。CB2的激活可以减轻急性肝损伤小鼠的神经评分和提高其认知功能, 阻断CB1可以产生相似的作用^[48]。大麻二酚可以改善肝性脑病所引起的认知和运动功能障碍^[49]。

5 结论

内源性大麻素系统在肝硬化的发生发展过程中扮演了重要作用^[50]。CB1有助于酒精性脂肪肝和NAFLD的发生, 有助于肝纤维化的发展以及肝硬化各种并发症的发生。CB2可以抑制肝纤维化的进展和肝脏炎症的活动, 抑制NAFLD的脂肪沉积。因此, 抑制CB1的活性和激活CB2的活性

将会是一个有效的治疗肝纤维化的手段。

6 参考文献

- Jiao J, Friedman SL, Aloman C. Hepatic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2009; 25: 223-229
- Solis-Herruzo JA, de la Torre P, Muñoz-Yagüe MT. Hepatic stellate cells (HSC): architects of hepatic fibrosis. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 438-439, 438-437
- Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, Mallat A, Lotersztajn S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 2005; 128: 742-755
- Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, Serriere-Lanneau V, Ledent C, Mallat A, Lotersztajn S. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006; 12: 671-676
- Caraceni P, Viola A, Piscitelli F, Giannone F, Berzigotti A, Cescon M, Domenicali M, Petrosino S, Giampalma E, Riili A, Grazi G, Golfieri R, Zoli M, Bernardi M, Di Marzo V. Circulating and hepatic endocannabinoids and endocannabinoid-related molecules in patients with cirrhosis. *Liver Int* 2010; 30: 816-825
- Mechoulam R, Gaoni Y. A total synthesis of DL-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1965; 87: 3273-3275
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 389-462
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561-564
- Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000; 346 Pt 3: 835-840
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortman S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003; 112: 423-431
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Olfertáler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 1298-1305
- Croci T, Manara L, Aureggi G, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 1393-1395
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995; 232: 54-61
- Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat

■同行评价

本文选题好, 内容丰富, 对于进一步了解肝纤维化本质有一定帮助, 具有较好的可读性。

- cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci Lett* 2006; 396: 113-116
- 16 Howlett AC, Johnson MR, Melvin LS, Milne GM. Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylylase cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol* 1988; 33: 297-302
 - 17 Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuron modulatory fatty acid amides. *Nature* 1996; 384: 83-87
 - 18 Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 405-446
 - 19 Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology* 2005; 42: 44-52
 - 20 Ong JP, Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis* 2007; 11: 1-16, vii
 - 21 Osei-Hyiaman D, Liu J, Zhou L, Godlewski G, Harvey-White J, Jeong WI, Bátkai S, Marsicano G, Lutz B, Buettner C, Kunos G. Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3160-3169
 - 22 Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, Janiak P, Marini P, Ravinet-Trillou C, Chabbert M, Cruciani N, Pfersdorff C, Roque C, Arnone M, Croci T, Soubrié P, Oury-Donat F, Maffrand JP, Scatton B, Lacheretz F, Le Fur G, Herbert JM, Bensaid M. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 2007; 46: 122-129
 - 23 Jourdan T, Djaouti L, Demizieux L, Gresti J, Vergès B, Degraze P. CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2010; 59: 926-934
 - 24 Migrenne S, Lacombe A, Lefèvre AL, Pruniaux MP, Guillot E, Galzin AM, Magnan C. Adiponectin is required to mediate rimonabant-induced improvement of insulin sensitivity but not body weight loss in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: R929-R935
 - 25 Watanabe T, Kubota N, Ohsugi M, Kubota T, Takamoto I, Iwabu M, Awazawa M, Katsuyama H, Hasegawa C, Tokuyama K, Moroi M, Sugi K, Yamauchi T, Noda T, Nagai R, Terauchi Y, Tobe K, Ueki K, Kadowaki T. Rimonabant ameliorates insulin resistance via both adiponectin-dependent and adiponectin-independent pathways. *J Biol Chem* 2009; 284: 1803-1812
 - 26 Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Després JP, McCarthy C, Scheen A. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2: S229-S240
 - 27 Hézode C, Zafrani ES, Roudot-Thoraval F, Costentin C, Hessami A, Bouvier-Alias M, Medkour F, Pawlostky JM, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis use: a novel risk factor of steatosis severity in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008; 134: 432-439
 - 28 Mendez-Sanchez N, Zamora-Valdes D, Pichardo-Bahena R, Barredo-Prieto B, Ponciano-Rodriguez G, Bermejo-Martínez L, Chavez-Tapia NC, Baptista-González HA, Uribe M. Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2007; 27: 215-219
 - 29 Reuben A. Alcohol and the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24: 328-338
 - 30 Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay P, Horiguchi N, Harvey-White J, Marsicano G, Lutz B, Gao B, Kunos G. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab* 2008; 7: 227-235
 - 31 Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2006; 10: 459-479, vii-viii
 - 32 Yang Q, Liu HY, Zhang YW, Wu WJ, Tang WX. Anandamide induces cell death through lipid rafts in hepatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 991-1001
 - 33 Hézode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES, Pawlostky JM, Dhumeaux D, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 42: 63-71
 - 34 Siegmund SV, Uchinami H, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1085-1095
 - 35 Siegmund SV, Qian T, de Minicis S, Harvey-White J, Kunos G, Vinod KY, Hungund B, Schwabe RF. The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB J* 2007; 21: 2798-2806
 - 36 Teixeira-Clerc F, Belot MP, Manin S, Deveaux V, Cadoudal T, Chobert MN, Louvet A, Zimmer A, Tordjmann T, Mallat A, Lotersztajn S. Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology* 2010; 52: 1046-1059
 - 37 Bosch J, Berzigotti A, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG. The management of portal hypertension: rational basis, available treatments and future options. *J Hepatol* 2008; 48 Suppl 1: S68-S92
 - 38 Yang YY, Lin HC, Huang YT, Lee TY, Hou MC, Wang YW, Lee FY, Lee SD. Roles of anandamide in the hepatic microcirculation in cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G328-G334
 - 39 Yang YY, Lin HC, Huang YT, Lee TY, Hou MC, Wang YW, Lee FY, Lee SD. Effect of chronic CB1 cannabinoid receptor antagonism on livers of rats with biliary cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112: 533-542
 - 40 Kowalski HJ, Abelmann WH. The cardiac output at rest in Laennec's cirrhosis. *J Clin Invest* 1953; 32: 1025-1033
 - 41 Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodés J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8: 1151-1157
 - 42 Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002; 35: 478-491
 - 43 Sacerdoti D, Abraham NG, Oyekan AO, Yang L, Gatta A, McGiff JC. Role of the heme oxygenases in abnormalities of the mesenteric circulation in cirrhotic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 636-643

- 44 Oberti F, Sogni P, Cailmail S, Moreau R, Pipy B, Le-
brec D. Role of prostacyclin in hemodynamic altera-
tions in conscious rats with extrahepatic or intrahe-
patic portal hypertension. *Hepatology* 1993; 18: 621-627
- 45 Bátkai S, J rai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshahi F, Khanolkar AD, Makri-
yannis A, Urbaschek R, Garcia N, Sanyal AJ, Kunos G. Endocannabinoids acting at vascular CB1 recep-
tors mediate the vasodilated state in advanced liver
cirrhosis. *Nat Med* 2001; 7: 827-832
- 46 Ros J, Cl ria J, To-Figueras J, Planagum  A, Cejudo-
Martín P, Fernández-Varo G, Martín-Ruiz R, Ar-
royo V, Rivera F, Rod s J, Jiménez W. Endogenous
cannabinoids: a new system involved in the homeo-
stasis of arterial pressure in experimental cirrhosis
in the rat. *Gastroenterology* 2002; 122: 85-93
- 47 Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Pertosa
AM, Principe A, Zambruni A, Trevisani F, Croci T,
Bernardi M. Cannabinoid type 1 receptor antago-
nism delays ascites formation in rats with cirrhosis.
Gastroenterology 2009; 137: 341-349
- 48 Avraham Y, Israeli E, Gabbay E, Okun A, Zolotarev
O, Silberman I, Ganzburg V, Dagon Y, Magen I, Vo-
robia L, Pappo O, Mechoulam R, Ilan Y, Berry EM.
Endocannabinoids affect neurological and cognitive
function in thioacetamide-induced hepatic enceph-
lopathy in mice. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 237-245
- 49 Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L,
Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates
cognitive and motor impairments in mice with bile
duct ligation. *J Hepatol* 2009; 51: 528-534
- 50 Parfieniuk A, Flisiak R. Role of cannabinoids in
chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2008; 14:
6109-6114

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang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].所参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.

GLP-1及受体激动剂联合间充质干细胞对1型糖尿病胰岛β细胞的保护作用

王颜刚, 于江苏

■背景资料

近年来,随着干细胞研究的深入,人们开始应用干细胞来治疗糖尿病,并取得了一定疗效,但仍存在一些不足,如体内存活时间短、转化效率低等。

王颜刚, 于江苏, 青岛大学医学院附属医院内分泌科 山东省青岛市 266003

王颜刚, 主任医师, 主要从事干细胞治疗糖尿病及并发症研究。

作者贡献分布: 王颜刚与于江苏对此文贡献均等, 共同参与了文献查阅及文章撰写。

通讯作者: 王颜刚, 主任医师, 266003, 山东省青岛市市南区江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内分泌科。

wangyg1966@yahoo.com.cn

电话: 0532-82911740

收稿日期: 2012-02-20 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-03-28 在线出版日期: 2012-05-08

GLP-1 or GLP-1R agonists combined with mesenchymal stem cells protect islet β-cells in patients with type 1 diabetes mellitus

Yan-Gang Wang, Jiang-Su Yu

Yan-Gang Wang, Jiang-Su Yu, Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Yan-Gang Wang, Chief Physician, Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, 16 Jiangsu Road, Shinan District, Qingdao 266003, Shandong Province, China. wangyg1966@yahoo.com.cn

Received: 2012-02-20 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-03-28 Published online: 2012-05-08

Abstract

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is the result of autoimmune-mediated destruction and apoptosis of pancreatic β-cells and dysfunction of pancreatic α-cells to inappropriately secrete glucagons to aggravate hyperglycemia. Early induction of immune tolerance, promoting β-cell regeneration and inhibiting the secretion of glucagons by α-cells are therefore the key to the treatment of T1DM. In addition to drug therapy, mesenchymal stem cells (MSCs) are also used to treat T1DM, because they can secrete anti-inflammatory and immunomodulatory factors to induce immune tolerance, inhibit T cell proliferation, and repair damaged tissue; and secrete several cytokines and biologically active substances to promote β-cell proliferation

and differentiation. However, while pancreatic β-cells proliferate after MSC therapy, pancreatic α-cells also show different degrees of proliferation. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and GLP-1 receptor (GLP-1R) agonists can inhibit the secretion of glucagons by pancreatic α-cells, promote β-cell proliferation and regeneration, inhibit β-cell apoptosis, and induce stem cells to differentiate into insulin-producing cells. Thus, combined use of MSCs with GLP-1 or GLP-1R agonists has synergistic effects in protecting β-cells.

Key Words: Glucagon-like peptide 1; Mesenchymal stem cells; Type 1 Diabetes Mellitus

Wang YG, Yu JS. GLP-1 or GLP-1R agonists combined with mesenchymal stem cells protect islet β-cells in patients with type 1 diabetes mellitus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1118-1122

摘要

1型糖尿病(type 1 diabetes Mellitus, T1DM)由于自身免疫介导引起胰岛β细胞破坏、凋亡增加,同时α细胞功能失调,不恰当分泌胰高血糖素,进一步加重高血糖。因而,早期诱导免疫耐受,刺激β细胞再生,抑制α细胞分泌胰高血糖素,将是治疗T1DM关键。目前T1DM除药物治疗外,由于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)能分泌抗炎和免疫调节因子,诱导免疫耐受,抑制T细胞的增殖,趋化并修复受损组织;同时分泌多种营养因子,促进β细胞增殖分化,从而治疗糖尿病。但MSCs治疗后胰岛β细胞增生的同时,α细胞也出现了不同程度的增生。胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)及受体激动剂能抑制α细胞分泌胰高血糖素,且有一定的促进胰岛β细胞增殖及再生,抑制β细胞凋亡,诱导干细胞向胰岛素分泌细胞分化的能力。两者联用,对胰岛β细胞保护方面具有协同作用。

关键词: 胰高血糖素样肽1; 间充质干细胞; 1型糖尿病

王颜刚, 于江苏. GLP-1及受体激动剂联合间充质干细胞对1型糖尿病胰岛β细胞的保护作用. 世界华人消化杂志 2012;

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

20(13): 1118-1122

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1118.asp>

0 引言

1型糖尿病(type 1 diabetes Mellitus, T1DM)的发生率在全球逐步攀升, 其高致死、致残率对人类健康提出了严峻的考验. T1DM为T淋巴细胞介导的自身免疫性疾病^[1], 在遗传易感因素与环境因素相互作用下, 体内的免疫调节逐渐失衡, 以胰岛β细胞损害导致严重胰岛素分泌障碍为特点, 血糖持续升高为标志^[2]. 由于T1DM患者胰岛β细胞功能差, 血糖难以控制, 容易出现糖尿病微血管病变和酮症酸中毒等危重并发症. 目前治疗仍然以胰岛素为主, 虽能有效缓解糖尿病症状, 但需终生胰岛素替代. 因此, 恢复有功能的胰岛β细胞数量成为治疗糖尿病的一种方法.

T1DM自然病程中胰岛炎症使β细胞经历凋亡至坏死, 最终进展为糖尿病. 因此, 早期干预尤为重要. 早期人类β细胞增殖的代偿性增加发生在T1DM发展的早期阶段. Willcox等^[3]对10名近期发病的T1DM患者捐赠的胰岛素组织研究显示T1DM患者由于自身免疫攻击, 胰岛α和β细胞都出现了明显的增殖; 而此现象在病史较长的T1DM和2型糖尿病(type 2 diabetes Mellitus, T2DM)受试者中并不明显. 这一结果提示早期诱导免疫耐受, 促进胰岛β细胞再生、增殖, 抑制α细胞分泌胰高血糖素, 将是治疗T1DM的关键.

1 间充质干细胞治疗1型糖尿病

目前国内外研究人员已开始使用一些免疫调节剂如环孢霉素、Teplizumab、铝剂疫苗、胰岛B链疫苗、利妥昔单抗等来治疗T1DM, 虽然具有一定的疗效, 然而由于不良反应大、临床效果不明显, 只对部分患者起到了一定的延迟作用, 而且停药后自身免疫反应重新出现, 距离临床推广尚有很长的路要走^[4-8].

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是多潜能、自我更新细胞, 主要功能特征为具有免疫调节、自我更新及向中胚层器官组织分化的能力, 能分泌许多营养因子和免疫调节因子, 进入到受损的组织器官中, 修复各种组织^[9-12]. 目前, 已有报道MSCs治疗移植抗宿主病、克隆氏病、难治性红斑狼疮、自身免疫性脑脊髓炎^[13-16]. 鉴于MSCs在上述领域进展, MSCs治疗糖尿病也引起了全球广泛关注.

MSCs修复胰岛β细胞免疫损伤机制目前尚

未完全阐明. MSCs分泌抗炎和免疫调节因子, 诱导免疫耐受, 抑制T细胞的增殖和抗原递呈细胞的成熟, 下调Th1(T helper 1), 上调Th2(T helper 2)细胞因子的分泌, 促进调节性T细胞的增生, 并且能够向受损伤组织趋化, 在局部微环境的作用下, 向组织修复所需要的细胞的方向转化, 从而最大程度保护胰岛β细胞数量及质量^[17-22], 为T1DM终生治疗、防治并发症的发生奠定基础. Li等^[13]研究表明MSCs能增加CD4⁺T细胞的数量, 减少CD8⁺T细胞的数量, 从而使CD4⁺/CD8⁺比例增加. 通过RT-PCR分析IL-2、IL-4、IL-12、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)等细胞因子的变化, 可推测Th1细胞向Th2细胞转化. MSCs可通过增加调节性T细胞的数量, 提高CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺的水平来改善T1DM的症状^[23]. 此外, MSCs还能分泌多种细胞因子, 通过其营养作用促进β细胞增殖分化^[24]. MSCs能够分泌多种生物活性物质和生长因子, 如肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、IL-6、IL-10、TGF-β等, 在胰岛发育、β细胞存活、胰岛微循环和胰岛素分泌中也起重要作用^[25-27].

干细胞治疗糖尿病是一项近年新兴且有广泛应用前景的高新技术, 多家临床研究机构已经开展相关的临床研究工作^[28-31]. 巴西圣保罗大学的Voltarelli等^[32]研究发现, 自体造血干细胞移植联合大剂量免疫抑制剂, 可以在毒性可接受范围内治疗新诊断的T1DM患者. 接受治疗后, 绝大多数患者胰岛β细胞功能增强, 不依赖胰岛素的时间也延长. Haritha等于2007年对19例14-28岁的T1DM患者做脂肪组织来源MSCs的移植, 随访1年, 未出现移植后感染, 严重的免疫抑制等不良反应. 胰岛素的用量平均下降了30%-50%, HbA1c水平也显著下降, C肽水平明显上升, 这为干细胞治疗T1DM提供了临床证据. 目前国内外主要以自体MSCs治疗为主, 但骨髓MSCs只占有核细胞的0.001%-0.01%, 且取材困难、创伤大, 受患者年龄、体内代谢和免疫等因素影响, 临床中难以开展^[33-35]. 此外, Fiorina等^[36]研究显示自体MSCs治疗的NOD(non obese diabetes)鼠身上发现了软组织和内脏肿瘤, 而异体MSCs没有发现肿瘤. 提示异体MSCs被宿主免疫系统所监控, 以确保细胞增殖效应在可控制范围之内. 美国学者Joshua采用多种心随机双盲法等对53例急性心肌

■研究前沿

目前治疗仍然以胰岛素为主, 虽能有效缓解糖尿病症状, 但需终生胰岛素替代. 因此, 恢复有功能的胰岛β细胞数量成为治疗糖尿病的一种方法.

■相关报道

国内外已有干细胞、GLP-1及受体激动剂治疗1型糖尿病的相关报道,但尚无联合治疗的报道。

梗塞患者静脉输入异体骨髓MSCs,随访6 mo,结果显示异体MSCs不仅安全、可靠,而且明显改善心、肺功能。这些重要的数据为异体MSCs治疗T1DM提供了可能。

同骨髓MSCs相比,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)具有来源丰富、取材方便、易于获得,不存在伦理问题、体外基因稳定、易于扩增、免疫原性低、异体移植不需要配型等诸多优点,已广泛应用于治疗临床多种疾病^[37-39]。我院内分泌科前期对T1DM模型鼠(NOD鼠),在发病前及发病后1 wk内注入hUCMSCs,观察3 mo。结果显示,与对照组相比,干预组CD4⁺T以及CD4⁺/CD8⁺T细胞的比例均明显下降,IL-2、TNF- α 水平较对照组也明显下降,而IL-10则呈现相反的变化趋势。从而提示hUCMSCs可促进Th1细胞向Th2细胞转化。此外,我们的研究显示,hUCMSCs还可提高CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的数量,胰岛周围的淋巴细胞浸润明显减轻;且干预组血糖明显下降,胰岛素的用量也明显减少;但hUCMSCs治疗后,胰岛 β 细胞增殖的同时,胰岛 α 细胞也出现了增生。课题组进一步在STZ(streptozocin)制备的糖尿病模型中应用hUCMSCs干预,也取得同样结果,而hUCMSCs联合二肽酶(dipeptidyl peptidase-IV, DPP-IV)抑制剂西格列汀治疗组胰岛 β 细胞数量明显增多,血糖下降也优于单用hUCMSCs组。由此推测,T1DM发病初期除胰岛内 β 细胞凋亡、坏死外, α 细胞分泌胰高血糖素,进一步恶化了高血糖。

2 GLP-1及受体激动剂治疗1型糖尿病

GLP-1(glucagon-like peptide 1)是由末端空肠、回肠和结肠的L细胞分泌的一种多肽激素,GLP-1与其受体结合,依赖葡萄糖产生ATP(adenosine triphosphate)转化为cAMP(cyclic adenosine monophosphate)途径增加胰岛 β 细胞内Ca²⁺浓度,促进囊泡释放胰岛素;同时抑制胰高血糖素的分泌,减少肝脏葡萄糖输出。此外,GLP-1还能促进胰岛 β 细胞增殖,抑制胰岛 β 细胞凋亡,保存 β 细胞对血糖的敏感性,抑制胃肠道蠕动和胃液分泌,延迟胃排空等^[40-43]。体内GLP-1水平随年龄增加而下降,由于GLP-1在人体内半衰期短,可被DPP-IV快速降解而失去活性,其生物学效应受到很大限制。近年来,科学家们从毒蜥唾液中分离得到一种多肽类物质Exendin-4,他与GLP-1有53%的同源性,N端的同源性更是高达80%,是天然的GLP-1受体激动剂,含有39个氨基酸,在哺乳动

物体内具有与GLP-1完全相同的功能,且均属于 β 受体家族的G偶联蛋白。Exendin-4 N端的第2个氨基酸为甘氨酸,不会被血浆中的DPP-IV分解,C端比GLP-1多9个氨基酸,不易被肽链内切酶降解,血浆半衰期更长,目前已广泛用于T2DM治疗,但对T1DM治疗处于探索阶段。

由于T1DM患者体内GLP-1分泌显著降低;因此,补充外源性GLP-1或其受体激动剂尤显重要。研究表明^[44-49]肠促胰素如GLP-1及其受体激动剂如Exendin-4可以抑制胰腺 α 细胞分泌胰高血糖素,促进胰岛 β 细胞增生并分泌胰岛素。美国学者Ellis等^[50]对20例病程15-20年T1DM患者在胰岛素(每天0.83 U/kg)治疗前提下,采用双盲、交叉、随机对照方法,口服DPP-IV抑制剂(西格列汀)100 mg/d,观察2 mo,结果显示西格列汀能明显减低餐后血糖波动,平均血糖下降0.6 mmol/L, HbA1c下降0.27% $\pm$ 0.11%,胰岛素使用剂量减少0.051/(kg·d)。Maki研究发现,连续4-8 wk向NOD小鼠体内注射GLP-1,可诱导 β 细胞再生,增强 β 细胞增殖,减少其凋亡。8 wk后仍可将近60%的小鼠血糖控制在正常范围内。此外,在Suarez-Pinzon等的研究中发现,机体内注入Exendin-4之后,有内分泌前体细胞的成年NOD小鼠的自身免疫性疾病会消除,使胰腺产生新的胰岛结构。Exendin-4可能是通过有效地消除自身免疫性效应T细胞,使自身内分泌前体细胞聚集成团,形成胰岛结构,以维持正常的血糖浓度。当Exendin-4在体内的浓度慢慢减退直至消失的时候,内分泌前体细胞团形成的胰岛结构也会再解散。鉴于Exendin-4尚不能完全使 β 细胞再生,且需多次皮下注射,价格昂贵,开发长效且更方便使用的药物剂型,是亟待解决的问题。

3 GLP-1及受体激动剂联合MSCs治疗1型糖尿病

GLP-1能通过多种细胞信号途径(如cAMP耦联的P38/SAPK2信号通路^[51])共同调节PDX-1(pancreatic-duodenal homeobox-1)基因的表达,促进胰岛素、生长抑素、葡萄糖激酶等胰腺细胞重要基因的表达,调控其特异基因表达,增强葡萄糖刺激性的胰岛素分泌,从而促进干细胞向胰岛素分泌细胞定向分化。目前GLP-1及其受体激动剂定向诱导干细胞分化为胰岛样细胞方面的研究取得了一些进展,诱导分化率和诱导后细胞胰岛素的分泌量相对较高,显示出其在干细胞定向分化及胰腺再生中的潜能和优越性^[52]。

鉴于以上研究,我们提出假设:在MSCs诱

导免疫耐受, 促进β细胞再生, 增加β细胞数量和质量的的基础上, 联合GLP-1或GLP-1受体激动剂以抑制胰岛α细胞分泌胰高血糖素, 进一步促进β细胞增殖与分化, 发挥两者的协同作用。目前二者联合应用的研究较少。2010年Sanz等^[53]在体外研究发现, 分离的hMSCs表达干细胞标记及mRNA和GLP-1受体蛋白。GLP-1能通过MEK和PKC信号通路减少hMSCs中PPAR γ 、C/EBP β 、AP2和LPL的表达, 促进未分化的hMSCs增生及细胞保护, 维持hMSC总量, 还能阻止其分化为脂肪形成, 减轻肥胖, 证实了二者联合治疗的可行性及有效性, 为以后体内研究提供了依据。

4 结论

T1DM的发病特点决定了早期诱导免疫耐受, 促进胰岛β细胞再生、增殖, 抑制α细胞分泌胰高血糖素分泌, 将是治疗T1DM的关键。MSCs和GLP-1及受体激动剂单独治疗T1DM方面的不足及联合治疗的互补性, 为其联合应用提供了可能。GLP-1基因治疗研究及MSCs的特性, 加上其易于提取、分离、纯化、扩增及可植入性等特点, 使之适合作为基因治疗的载体细胞。因而, 我们设想将Exendin-4作为目的基因, 通过基因转染技术, 将其转入MSCs, 然后注入体内, 从而发挥二者的协同作用, 既发挥MSCs诱导免疫耐受及分泌具有营养作用的细胞因子, 促进胰岛β细胞再生, 又发挥Exendin-4抑制α细胞分泌胰高血糖素的作用, 诱导其向胰岛细胞分化的能力, 从而为治疗初发T1DM提供新思路。

5 参考文献

- 1 Roep BO, De Vries RR. T-lymphocytes and the pathogenesis of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 697-711
- 2 Morran MP, Omenn GS, Pietropaolo M. Immunology and genetics of type 1 diabetes. *Mt Sinai J Med* 2008; 75: 314-327
- 3 Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Evidence of increased islet cell proliferation in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 2010; 53: 2020-2028
- 4 Jones D. Retuning the immune system: the future of type 1 diabetes therapy? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 600-601
- 5 Parving HH, Tarnow L, Nielsen FS, Rossing P, Mandrup-Poulsen T, Osterby R, Nerup J. Cyclosporine nephrotoxicity in type 1 diabetic patients. A 7-year follow-up study. *Diabetes Care* 1999; 22: 478-483
- 6 Ludvigsson J, Faresjö M, Hjorth M, Axelsson S, Chéramy M, Pihl M, Vaarala O, Forsander G, Ivarsson S, Johansson C, Lindh A, Nilsson NO, Aman J, Ortqvist E, Zerhouni P, Casas R. GAD treatment and insulin secretion in recent-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359: 1909-1920
- 7 Orban T, Farkas K, Jalahej H, Kis J, Treszl A, Falk B, Reijonen H, Wolfsdorf J, Ricker A, Matthews JB, Tcho N, Sayre P, Bianchini P. Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy. *J Autoimmun* 2010; 34: 408-415
- 8 Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Marks JB, McGee PF, Moran AM, Raskin P, Rodriguez H, Schatz DA, Wherrett D, Wilson DM, Lachin JM, Skyler JS. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* 2009; 361: 2143-2152
- 9 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147
- 10 Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011; 27: 243-261
- 11 杨乃龙, 林鹏. 骨髓间充质干细胞的分化潜能及临床应用价值. *中国组织工程研究与临床康复* 2007; 11: 475-477
- 12 李俊林, 李德华, 赵宝东, 王长辉, 王志云, 裴丹. 人脐带间充质干细胞体外向胰岛样细胞诱导分化及其治疗糖尿病效果. *中国组织工程研究与临床康复* 2009; 13: 2636-2640
- 13 Li H, Guo ZK, Li XS, Hou CM, Tang PH, Mao N. Functional and phenotypic alteration of intrasplenic lymphocytes affected by mesenchymal stem cells in a murine allosplenocyte transfusion model. *Cell Transplant* 2007; 16: 85-95
- 14 Tian Y, Deng YB, Huang YJ, Wang Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells decrease acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Immunol Invest* 2008; 37: 29-42
- 15 Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 2012; 35: 213-221
- 16 Tyndall A, Houssiau FA. Mesenchymal stem cells in the treatment of autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1413-1414
- 17 Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity* 2010; 43: 255-263
- 18 Li Y, Qu YH, Wu YF, Wang XP, Wei J, Huang WG, Zhou DH, Fang J, Huang K, Huang SL. Bone marrow mesenchymal stem cells reduce the antitumor activity of cytokine-induced killer/natural killer cells in K562 NOD/SCID mice. *Ann Hematol* 2011; 90: 873-885
- 19 Sa YL, Shen XM, Shi KQ, Tang H, Zhao RB, Lu J, Song JX, Yan XM. [Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on cytokines secretion from allogeneic dendritic cell activated cytokine-induced killer cells]. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2010; 26: 988-991
- 20 Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010; 184: 2321-2328
- 21 Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 413-421
- 22 Mabed M, Shahin M. Mesenchymal stem cell-based therapy for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012; 7: 179-190

■创新盘点

本文在干细胞、GLP-1及受体激动剂治疗1型糖尿病的基础上, 提出了二者联合治疗的可行性, 为以后的研究提供了方向。

■同行评价

本文对干细胞联合GLP1及受体激动剂治疗1型糖尿病进行了较为系统的综述,具有一定的参考价值。

- 23 Wen Y, Ouyang J, Yang R, Chen J, Liu Y, Zhou X, Burt RK. Reversal of new-onset type 1 diabetes in mice by syngeneic bone marrow transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 282-287
- 24 Xu YX, Chen L, Wang R, Hou WK, Lin P, Soto L, Sun Y, Dong QY. Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanisms. *Med Hypotheses* 2008; 71: 390-393
- 25 Sanvito F, Herrera PL, Huarte J, Nichols A, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. TGF-beta 1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro. *Development* 1994; 120: 3451-3462
- 26 Otonkoski T, Cirulli V, Beattie M, Mally MI, Soto G, Rubin JS, Hayek A. A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic beta-cell growth. *Endocrinology* 1996; 137: 3131-3139
- 27 Ciceri F, Piemonti L. Bone marrow and pancreatic islets: an old story with new perspectives. *Cell Transplant* 2010; 19: 1511-1522
- 28 Godfrey KJ, Mathew B, Bulman JC, Shah O, Clement S, Gallicano GI. Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells. *Diabet Med* 2012; 29: 14-23
- 29 Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, Ye M, Hu C, Yin Z, Li H, Zhang Y, Diao Y, Li Y, Chen Y, Sun X, Fisk MB, Skidgel R, Holterman M, Prabhakar B, Mazzone T. Reversal of type 1 diabetes via islet β cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells. *BMC Med* 2012; 10: 3
- 30 Feng K, Xu YW, Ye FG, Xiao L, Ma XH, Gao Y, Zhang X, Yao SZ, Shi BY. [Autologous peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of type 1 diabetic mellitus: a report of 16 cases]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2011; 91: 1966-1969
- 31 Ngoc PK, Phuc PV, Nhung TH, Thuy DT, Nguyet NT. Improving the efficacy of type 1 diabetes therapy by transplantation of immunisolated insulin-producing cells. *Hum Cell* 2011; 24: 86-95
- 32 Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Foss MC, Squiers E, Burt RK. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2007; 297: 1568-1576
- 33 Wang L, Zhao S, Mao H, Zhou L, Wang ZJ, Wang HX. Autologous bone marrow stem cell transplantation for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 3622-3628
- 34 张传仓, 朱为国, 封志纯. 自体骨髓干细胞移植治疗1型糖尿病的初步研究. *广东医学* 2004; 25: 1398-1399
- 35 胡丽敏, 李莉蓉, 朱大龙. 骨髓干细胞移植治疗1型糖尿病的理论与实践. *医学与哲学(临床决策论坛版)* 2009; 30: 22-24
- 36 Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol* 2009; 183: 993-1004
- 37 Ma L, Zhou Z, Zhang D, Yang S, Wang J, Xue F, Yang Y, Yang R. Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients. *Thromb Haemost* 2012; 107. [Epub ahead of print]
- 38 Zhang Z, Lin H, Shi M, Xu R, Fu J, Lv J, Chen L, Lv S, Li Y, Yu S, Geng H, Jin L, Lau GK, Wang FS. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2: 112-120
- 39 Shi W, Nie D, Jin G, Chen W, Xia L, Wu X, Su X, Xu X, Ni L, Zhang X, Zhang X, Chen J. BDNF blended chitosan scaffolds for human umbilical cord MSC transplants in traumatic brain injury therapy. *Bio-materials* 2012; 33: 3119-3126
- 40 Drucker DJ. Glucagon-like peptides. *Diabetes* 1998; 47: 159-169
- 41 Fineman MS, Cirincione BB, Maggs D, Diamant M. GLP-1 based therapies: differential effects on fasting and postprandial glucose. *Diabetes Obes Metab* 2012; Jan 10. [Epub ahead of print]
- 42 Rajan S, Torres J, Thompson MS, Philipson LH. SUMO downregulates GLP-1-stimulated cAMP generation and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302: E714-E723
- 43 Monami M. Glucagon-like peptide-1 and diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011; 2011: 901954
- 44 Kielgast U, Asmar M, Madsbad S, Holst JJ. Effect of glucagon-like peptide-1 on alpha- and beta-cell function in C-peptide-negative type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2492-2496
- 45 Tian L, Gao J, Hao J, Zhang Y, Yi H, O'Brien TD, Sorenson R, Luo J, Guo Z. Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating beta-cell replication in nonobese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Endocrinology* 2010; 151: 3049-3060
- 46 于文龙, 高宏, 余霄龙, 王丽, 阎胜利, 王颜刚. 脐带间充质干细胞移植治疗初发1型糖尿病. *中国组织工程研究与临床康复* 2011; 15: 4363-4366
- 47 张学峰, 张美荣, 胡建霞, 王丽, 张桂芝, 邵磊, 李晨刚, 高宏, 苗志敏, 王颜刚. 异种脐带间充质干细胞静脉应用的安全性. *中国组织工程研究与临床康复* 2010; 14: 5971-5975
- 48 孙晓晖, 王颜刚. 干细胞移植定向分化为胰岛 β 细胞治疗糖尿病. *中国组织工程研究与临床康复* 2009; 13: 165-171
- 49 Xu AJ, Zhu W, Tian F, Yan LH, Li T. Recombinant adenoviral expression of IL-10 protects beta cell from impairment induced by pro-inflammatory cytokine. *Mol Cell Biochem* 2010; 344: 163-171
- 50 Ellis SL, Moser EG, Snell-Bergeon JK, Rodionova AS, Hazenfield RM, Garg SK. Effect of sitagliptin on glucose control in adult patients with Type 1 diabetes: a pilot, double-blind, randomized, crossover trial. *Diabet Med* 2011; 28: 1176-1181
- 51 Kwon G, Pappan KL, Marshall CA, Schaffer JE, McDaniel ML. cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 8938-8945
- 52 闫磊, 慕晓玲. 胰高血糖素样肽1与干细胞定向分化. *中国生物工程杂志* 2007; 27: 115-119
- 53 Sanz C, Vázquez P, Blázquez C, Barrio PA, Alvarez Mdel M, Blázquez E. Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E634-E643

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

Nesfatin-1对离体胃黏膜细胞胃酸分泌的影响

李静慧, 李学良, 吴静, 贾方圆, 林琳

李静慧, 李学良, 吴静, 贾方圆, 林琳, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

李静慧, 硕士, 主要从事消化科胃肠动力方向的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81070308/H0308

作者贡献分布: 此课题由李学良、林琳及李静慧设计; 研究过程由李静慧、吴静及贾方圆操作完成; 数据分析由李静慧完成; 论文写作由李静慧与李学良完成。

通讯作者: 李学良, 主任医师, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科。

ligakur@yahoo.com.cn

电话: 025-83718836

收稿日期: 2012-02-08 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion by cultured rat gastric mucosa cells

Jing-Hui Li, Xue-Liang Li, Jing Wu, Fang-Yuan Jia, Lin Lin

Jing-Hui Li, Xue-Liang Li, Jing Wu, Fang-Yuan Jia, Lin Lin, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81070308/H0308

Correspondence to: Xue-Liang Li, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ligakur@yahoo.com.cn

Received: 2012-02-08 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To clarify the effect of nesfatin-1 on gastric acid secretion and the expression of the H^+/K^+ -ATPase mRNA and protein in rat gastric mucosa cells *in vitro*.

METHODS: Gastric mucosa cells were isolated from SD rats by enzymolysis and identified by immunofluorescence staining. Cultured rat gastric mucosa cells were divided into control group and nesfatin-1 group, and the nesfatin-1 group was pretreated with different concentrations ($0, 10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1} \mu\text{mol/L}$) of nesfatin-1 for different durations ($0, 1, 2, 3, 4 \text{ h}$). The effect of nesfatin-1 on gastric acid secretion was investigated by monitoring ^{14}C -aminopyrine (^{14}C -AP) accumulation, and the expression of H^+/K^+ -ATPase α and β subunit mRNA and protein was

examined by real-time PCR and Western blot.

RESULTS: Pretreatment with nesfatin-1 at a dose of 10^{-1} or $10^{-2} \mu\text{mol/L}$ for 2 or 3 h inhibited gastric acid secretion, but nesfatin-1 at a dose of 10^{-3} or $10^{-4} \mu\text{mol/L}$ had no such effect. Nesfatin-1 at a dose of $10^{-1} \mu\text{mol/L}$ inhibited the expression of H^+/K^+ -ATPase α subunit mRNA after pretreatment for 1, 2, or 3 h and inhibited the expression of H^+/K^+ -ATPase β subunit mRNAs after pretreatment for 1 or 2 h. In the dose range between 10^{-4} to $10^{-1} \mu\text{mol/L}$, nesfatin-1 dose-dependently inhibited the expression of H^+/K^+ -ATPase α subunit and β subunit mRNA after pretreatment for 2 h. Nesfatin-1 at a dose of $10^{-1} \mu\text{mol/L}$ inhibited H^+/K^+ -ATPase α subunit protein expression after pretreatment for 1, 2 or 3 h and inhibited H^+/K^+ -ATPase β subunit protein expression after pretreatment for 2 or 3 h. In the dose range between 10^{-3} to $10^{-1} \mu\text{mol/L}$, nesfatin-1 dose-dependently inhibited H^+/K^+ -ATPase α and β subunit protein expression after pretreatment for 2 h.

CONCLUSION: Our data suggest that nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion by rat gastric mucosa cells *in vitro* possibly by down-regulating the expression of H^+/K^+ -ATPase mRNA and protein.

Key Words: Nesfatin-1; Gastric acid; Gastric mucosa cells; H^+/K^+ -ATPase

Li JH, Li XL, Wu J, Jia FY, Lin L. Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion by cultured rat gastric mucosa cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1123-1130

摘要

目的: 研究nesfatin-1对离体培养的大鼠胃黏膜分泌的影响, 探讨nesfatin-1对 H^+/K^+ -ATP酶mRNA及蛋白表达的影响。

方法: 酶解法分离大鼠胃黏膜细胞, 细胞免疫荧光检测法鉴定细胞。用不同浓度的nesfatin-1(10^{-4} - $10^{-1} \mu\text{mol/L}$)对胃黏膜细胞进行处理0、1、2、3、4 h, 设立空白对照组, 以 ^{14}C -氨基比林摄取为酸分泌指标, 检测

■背景资料

Nesfatin-1是最近发现的一种新的厌食肽, 最初发现表达于调节摄食的下丘脑和脑干核中, 也表达于外周组织, 尤其是胃肠道中; 研究显示, nesfatin-1在胃黏膜的胃酸分泌功能中可能起着重要作用。

■同行评议者

任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

■研究前沿

Nesfatin-1可以调节多种重要生理活动,包括葡萄糖的代谢、免疫调节、胃肠运动和胃黏膜的保护作用,关于他对胃酸分泌的影响尚未见报道.

nesfatin-1对大鼠离体的胃黏膜细胞酸分泌的影响. 用RT-PCR法及Western印迹法检测nesfatin-1对胃黏膜细胞 H^+/K^+-ATP 酶 α (α)亚基和 β (β)亚基mRNA及蛋白表达的影响.

结果: Nesfatin-1在 10^{-1} $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,在1、2 h能够抑制离体培养的大鼠胃黏膜细胞的酸分泌. Nesfatin-1(10^{-1} $\mu\text{mol/L}$) 在1、2、3 h均能够抑制 H^+/K^+-ATP 酶 α 亚基mRNA表达水平;在1、2 h能够抑制 H^+/K^+-ATP 酶 β 亚基mRNA表达水平,分别与对照组相比,差异有统计学意义(均 $P<0.01$). Nesfatin-1(10^{-4} - 10^{-1} $\mu\text{mol/L}$)作用胃黏膜细胞2 h时,呈剂量依赖性抑制 α 亚基和 β 亚基mRNA表达水平,分别与对照组相比,差异有统计学意义(均 $P<0.01$). Nesfatin-1(10^{-1} $\mu\text{mol/L}$)在1、2、3 h能够抑制 α 亚基蛋白表达水平;在2、3 h能够抑制 β 亚基蛋白表达水平,分别与对照组相比,差异有统计学意义(均 $P<0.01$). Nesfatin-1(10^{-3} - 10^{-1} $\mu\text{mol/L}$)作用胃黏膜细胞2 h时,呈剂量依赖性抑制 α 亚基和 β 亚基蛋白表达水平,与对照组相比,差异有统计学意义(均 $P<0.01$).

结论: Nesfatin-1能抑制离体培养的大鼠胃黏膜细胞的酸分泌,有可能是通过下调 H^+/K^+-ATP 酶 α 亚基和 β 亚基的mRNA及蛋白表达的水平影响酸分泌.

关键词: Nesfatin-1; 胃酸; 胃黏膜细胞; H^+/K^+-ATP 酶

李静慧, 李学良, 吴静, 贾方圆, 林琳. Nesfatin-1对离体胃黏膜细胞胃酸分泌的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1123-1130

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1123.asp>

0 引言

Nesfatin-1是由日本学者发现的一种新的厌食肽^[1], 包含82个氨基酸, 起源于前体蛋白, 核组蛋白-2(nucleobindin2, NUCB2). NUCB2是由包含24个氨基酸的信号肽和396个氨基酸的蛋白结构组成, 在人类、大鼠和小鼠间保持高度同源性^[2]. NUCB2在激素原转化酶的作用下水解为N-端片段nesfatin-1和2个C-端肽nesfatin-2和nesfatin-3. 但只有nesfatin-1能够抑制大鼠的夜间摄食量和体质量的增加. NUCB2/nesfatin-1最初发现表达于调节摄食的下丘脑和脑干核中^[1], 也表达于外周组织, 尤其是胃肠道中^[3]. 中枢注射NUCB2/nesfatin-1不仅可以抑制大小鼠的夜间摄食量^[4,5], 还可以抑制小鼠的胃肠动力^[6]; 外周注射也可以抑制小鼠的夜间摄食量^[7], nesfatin-1以非饱和的方式

双向通过血脑屏障^[8,9], 提示nesfatin-1在外周也发挥重要的生理作用.

有研究表明, nesfatin-1的免疫阳性细胞高度表达于胃泌腺^[3]中, 我们的前期研究表明中枢注射nesfatin-1可以抑制大鼠的胃酸分泌, 那么nesfatin-1是否在外周也发挥同样的作用, 因此本研究研究了nesfatin-1对大鼠离体培养的胃黏膜细胞的胃酸分泌的影响. H^+/K^+-ATP 酶是胃酸分泌的最终环节, H^+/K^+-ATP 酶分为 α 和 β 两个亚单位^[10,11], α 亚单位含有ATP结合位点和酰基磷酸化作用位点, 起着催化和转运 H^+ 和 K^+ 的功能^[12], β 亚单位主要是稳定 α 亚单位及辅助泌酸^[13]. 若nesfatin-1能够影响大鼠离体培养的胃黏膜细胞的胃酸分泌, 那么nesfatin-1是否通过对 H^+/K^+-ATP 酶的 α 和 β 两个亚单位的调节而影响胃酸分泌, 本研究进一步探讨了nesfatin-1对 H^+/K^+-ATP 酶 α 和 β 两个亚单位mRNA和蛋白表达水平的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠, 体质量200-250 g, 由南京医科大学动物中心提供, 有实验动物合格证. 胎牛血清购自Sigma公司; nesfatin-1购自ENZO公司; ^{14}C -氨基比林购自Amersham公司; Ham's F12/DMEM培养基购自Gibco公司; H^+/K^+-ATP 酶 α 亚基、 H^+/K^+-ATP 酶 β 亚基引物由上海英俊公司合成; 链霉菌蛋白酶、抗 H^+/K^+-ATP 酶 α 亚基抗体购自Merk公司; 抗 H^+/K^+-ATP 酶 β 亚基单克隆抗体、抗组胺单克隆抗体、抗胃泌素单克隆抗体和抗生长抑素单克隆抗体购自Abcam公司; TRIzol试剂、BCA蛋白测定试剂盒、电化学发光(ECL)试剂盒购自Invitrogen公司; 逆转录试剂盒PrimscriptTM RT reagent Kit及Real-Time PCR试剂盒SYBR Premix Ex TaqTM II均购自日本TaKaRa公司; RIPA裂解液、PMSF购自碧云天生物技术研究所以.

1.2 方法

1.2.1 离体大鼠胃黏膜细胞培养和鉴定: (1) 培养所需液体Medium A: 50 mmol/L HEPES, 350 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, 0.5 mmol/L NaH_2PO_4 , 1 mmol/L Na_2HPO_4 , 20 mmol/L NaHCO_3 , 70 mmol/L NaCl, 20 mmol/L KCl, 11 mmol/L D(+)-glucose, pH 7.8; Medium B: A液中去除EDTA, 加10 mmol/L Ca^{2+} and 15 mmol/L Mg^{2+} , pH 7.4; Medium C: 140 mmol/L NaCl, 1.2 mmol/L MgSO_4 , 1 mmol/L CaCl_2 , 10 mmol/L HEPES, 11 mmol/L glucose, 100 mg/L DTT, 0.5 g/L BSA, pH 7.4; 消化液: 用Medium A配制, 链霉菌蛋白酶浓度为10 g/L; (2) 胃黏膜

细胞培养: 取非禁食SD大鼠, 脱颈处死, 结扎贲门、幽门, 取胃, 立即放入冰冷的PBS液中, 在胃底作一长约1 cm的切口, 用玻璃棒翻转胃, PBS清洗, 注入消化酶并结扎. 将翻转胃囊放入Medium A中, 消化30 min, 结束后放入Medium B中孵育10 min; 再将胃囊重新放入Medium A中消化30 min, 结束后放入Medium B中孵育10 min. 整个过程均给予震荡, 皆充以950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂^[14]. 收集最后一步的细胞, 过细胞筛网、离心, Medium C洗涤2次, 制成细胞悬液, 计数, 接种细胞至用鼠尾胶原包被的盖玻片上; (3)细胞免疫法鉴定胃黏膜细胞: 取出细胞爬片, 4%多聚甲醛固定20 min, 0.2%Triton X-100通透10 min, 与二抗相同宿主的血清封闭30 min, 分别加入抗H⁺/K⁺-ATPase β 亚基的单抗(1:2 000)、抗组胺的单抗(1:4 000)、抗胃泌素的单抗(1:1 000)和抗生长抑素(1 mg/L)的单抗, 4℃湿盒内过夜; 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗(1:500)室温2 h(避光); 用DAPI染核, 甘油封片, 激光共聚焦显微镜观察并拍照. 用PBS代替一抗, 作为阴性对照.

1.2.2 Nesfatin-1对离体培养的胃黏膜细胞分泌胃酸的影响: 胃黏膜细胞培养48 h后, 设立实验组、空白对照组和二硝基苯酚(DNP)组, 实验组分别加入浓度为10⁻⁴-10⁻¹ μ mol/L的nesfatin-1, 分别作用0、1、2、3、4 h. 加入¹⁴C-AP(终浓度为0.1 μ Ci/mL)^[15], 37℃平衡15 min; 充分混匀细胞, DNP组加入0.1 mmol/L二硝基苯酚用于校正非特异吸附的¹⁴C-AP, PBS洗涤后, 1% Triton X-100裂解细胞, 加入闪烁液中液闪记数. 实验组及对照组分别减除非特异吸附数值, 以对照组为100%, 计算实验组改变的百分数.

1.2.3 qRT-PCR检测H⁺/K⁺-ATP酶mRNA的表达: (1)实验分组: 根据预实验结果, 设立空白对照组, 实验组分别为nesfatin-1(10⁻¹ μ mol/L)作用于胃黏膜细胞1、2、3、4 h和10⁻⁴-10⁻¹ μ mol/L的nesfatin-1作用于胃黏膜细胞2 h; (2)RT-PCR: 按TRIzol试剂说明提取各组细胞总RNA, 依照逆转录试剂盒说明逆转录为cDNA. 按SYBR Premix Ex TaqTM II试剂盒说明进行RT-PCR, 反应体系为20 μ L, 循环条件为: 95℃ 90 s; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 40个循环; 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 55℃ 10 s, 80个循环. 根据溶解曲线确保其产物纯度, 采用制作标准曲线的方法得到数据. 引物序列为: α 亚基, 上游5'-GTGCCACATTCTTTGTGGTG, 下游5'-GAGCAGATGACTGACGTGCA; β 亚基, 上游5'-GTFFTCATGACTGGGCTCTT,

下游5'-CCCAGGAGCTGTTTCAGAG; GAPDH, 上游5'-GAGTCAACGGATTGGTCGT, 下游5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG.

1.2.4 Western印迹法检测H⁺/K⁺-ATP酶蛋白表达变化: 裂解液裂解细胞, 提取细胞蛋白, 用BCA法蛋白定量. 每孔40 μ g蛋白上样, 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜至聚偏氟乙烯膜(PVDF膜)上; 5%脱脂牛奶封闭2 h, 加一抗, 分别为抗H⁺/K⁺-ATPase α 亚基抗体(1:2 000)、抗H⁺/K⁺-ATPase β 亚基抗体(1:4 000)、抗Actin抗体(1:2 000), 4℃孵育过夜, 置37℃孵育二抗1 h. 用ECL化学发光试剂显影、定影; 采用Bio-Rad公司数码成像系统扫描图片, Quantity One软件灰度分析, 以Actin作为内参照, 进行定量分析.

统计学处理 用SPSS13.0统计软件进行分析, 结果用mean $\pm$ SD表示, 多组均数比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 离体大鼠胃黏膜细胞培养与鉴定 锥虫蓝排斥反应显示活细胞数>90%, 胃黏膜细胞培养24 h后, 可见细胞贴壁生长. 细胞免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜检测结果显示, 壁细胞与抗H⁺/K⁺-ATPase β 亚基单抗结合, ECL细胞与抗组胺单抗结合, G细胞与抗胃泌素单抗结合, D细胞与抗生长抑素单抗结合; 经FITC染色后, 细胞质显绿色荧光, 细胞核经DAPI染色发出蓝色荧光; 阴性对照仅见细胞核为蓝色荧光(图1).

2.2 Nesfatin-1对大鼠离体胃黏膜细胞胃酸分泌的影响 Nesfatin-1在10⁻⁴及10⁻³ μ mol/L时对胃黏膜细胞的基础酸分泌未见明显抑制作用, 但10⁻²及10⁻¹ μ mol/L的nesfatin-1在1 h(0.82 $\pm$ 0.06, 0.74 $\pm$ 0.03), 2 h(0.73 $\pm$ 0.07, 0.65 $\pm$ 0.09)均能抑制胃黏膜细胞的基础酸分泌, 与对照组(1.00)比较差异有统计学意义($P<0.01$, 图2). 但在3 h及4 h, nesfatin-1抑制大鼠胃黏膜分泌胃酸的作用消失.

2.3 Nesfatin-1对H⁺/K⁺-ATP酶 α , β 两个亚基mRNA表达的影响

2.3.1 Nesfatin-1对H⁺/K⁺-ATP酶 α 亚基mRNA表达的影响: nesfatin-1在浓度为10⁻¹ μ mol/L时, 在1 h(4.10 $\pm$ 0.32), 2 h(4.69 $\pm$ 0.06), 3 h(5.31 $\pm$ 0.23)能够抑制H⁺/K⁺-ATP酶 α 亚基mRNA表达水平, 与对照组(7.60 $\pm$ 0.53)比较, 差异有统计学意义($P<0.01$), 其中2 h的抑制作用最强. 而4 h(8.46 $\pm$ 1.49)时抑制作用消失($P>0.05$, 图3A). Nesfatin-1

■相关报道

研究表明, nesfatin-1的免疫阳性细胞高度表达于胃酸腺中, 且中枢注射nesfatin-1可以抑制大鼠的胃酸分泌.

■创新亮点

本文初次探讨了nesfatin-1对离体胃黏膜细胞的胃酸分泌的影响,并观察他对 H^+/K^+-ATP 酶的影响,为其将来的临床应用提供一定基础。

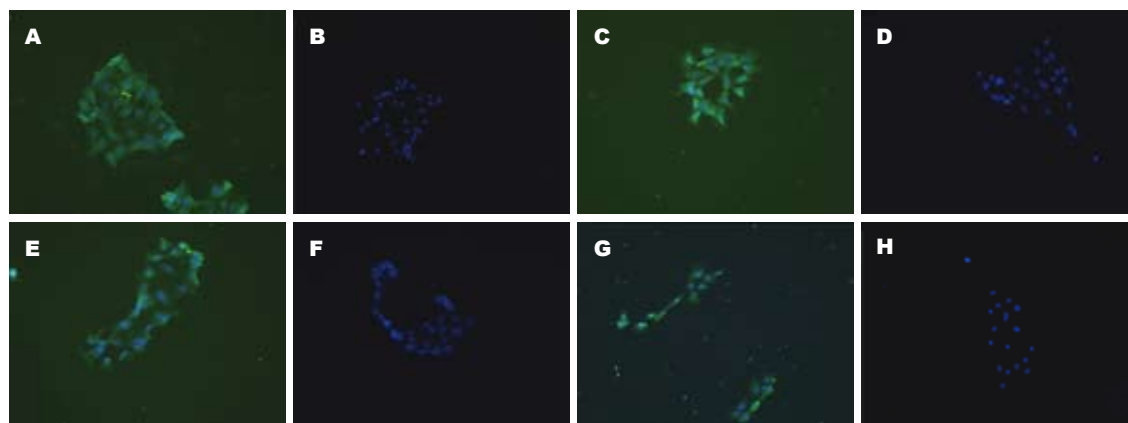


图1 免疫荧光染色法鉴定胃黏膜细胞($\times 400$)。A: 壁细胞; C: ECL细胞; E: G细胞; G: D细胞; B, D, F, H: 阴性对照。

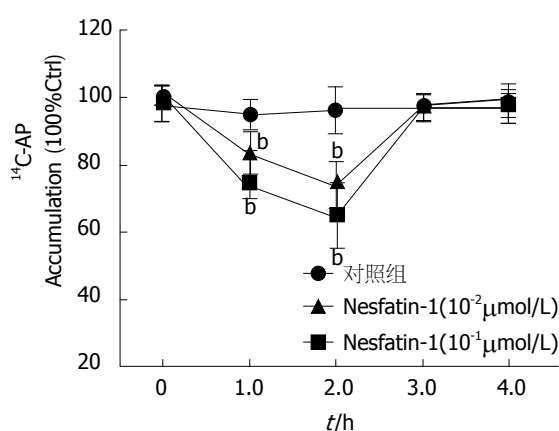


图2 Nesfatin-1对胃黏膜细胞胃酸分泌的影响。^b $P < 0.01$ vs 对照组。

作用胃黏膜细胞2 h, 在浓度为 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 和 10^{-1} $\mu\text{mol/L}$ 时, 呈剂量依赖性地抑制 H^+/K^+-ATP 酶 α 亚基mRNA表达水平(0.69 ± 0.02 , 0.44 ± 0.01 , 0.07 ± 0.00 , 0.05 ± 0.00), 分别与对照组(1.22 ± 0.03)相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$, 图4A), 实验组各组之间相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

2.3.2 Nesfatin-1对 H^+/K^+-ATP 酶 β 亚基mRNA表达的影响: nesfatin-1(10^{-1} $\mu\text{mol/L}$)在1 h(2.47 ± 0.17), 2 h(1.83 ± 0.22)抑制胃黏膜细胞 H^+/K^+-ATP 酶 β 亚基mRNA表达水平, 2 h时抑制作用最强, 分别与对照组(3.61 ± 0.34)比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$, 图3B)。至3 h(3.35 ± 0.24), 4 h(3.18 ± 0.25)时该抑制作用消失。进一步研究发现, nesfatin-1作用胃黏膜细胞2 h时, 其对 H^+/K^+-ATP 酶 β 亚基mRNA表达的抑制作用呈剂量依赖性。在nesfatin-1的浓度为 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 及 10^{-1} $\mu\text{mol/L}$ 时, H^+/K^+-ATP 酶 β 亚基mRNA的表达值分别为 1.00 ± 0.03 、 0.52 ± 0.01 、 0.35 ± 0.01 、 0.16 ± 0.005 , 与对照组(1.37 ± 0.04)相比, 差异均有统计

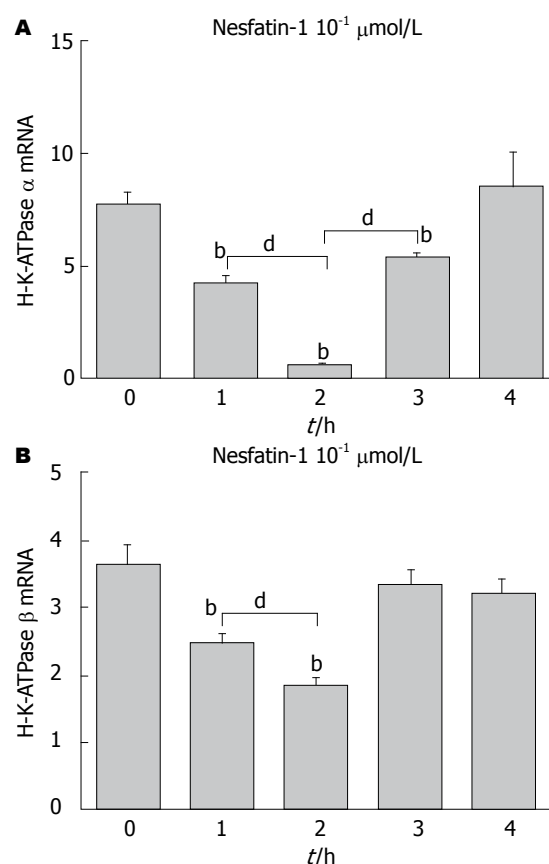


图3 Nesfatin-1(10^{-1} $\mu\text{mol/L}$)在不同作用时间对 H^+/K^+-ATP 酶 α 、 β 两个亚基mRNA表达的影响。A: H^+/K^+-ATP 酶 α mRNA; B: H^+/K^+-ATP 酶 β mRNA; ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 2 h作用时间。

学意义(均 $P < 0.01$, 图4B)。实验组各组之间相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

2.4 Nesfatin-1对 H^+/K^+-ATP 酶 α 、 β 两个亚基蛋白表达的影响

2.4.1 Nesfatin-1对 H^+/K^+-ATP 酶 α 亚基蛋白表达的影响: nesfatin-1(10^{-1} $\mu\text{mol/L}$)在1 h(0.56 ± 0.03), 2 h(0.26 ± 0.15)及3 h(0.54 ± 0.09)抑制了胃黏膜细胞 H^+/K^+-ATP 酶 α 亚基蛋白表达水平, 其

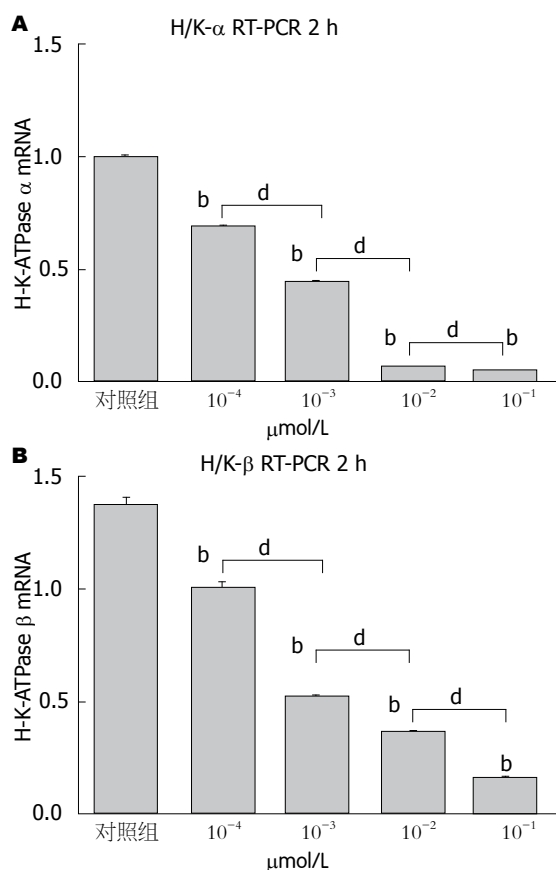


图 4 不同浓度的Nesfatin-1(10^{-4} – 10^{-1} μmol/L)作用2 h对H⁺/K⁺-ATP酶α, β两个亚基mRNA表达的影响. A: H-K-ATPase α mRNA; B: H-K-ATPase β mRNA; ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 实验组不同剂量间.

中2 h的抑制作用最强, 各时间点与对照组(1.02 ± 0.07)比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$, 图5A, B). 4 h(0.98 ± 0.02)时这种抑制作用消失($P > 0.05$). Nesfatin-1作用胃黏膜细胞2 h时, 在浓度为 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} μmol/L状态下, 其对H⁺/K⁺-ATP酶α亚基蛋白表达水平的抑制作用呈剂量依赖性, 其表达值分别为 0.39 ± 0.07 、 0.29 ± 0.02 、 0.17 ± 0.01 , 与对照组(0.48 ± 0.02)相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$, 图6A, B). 这3组之间相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$). 10^{-4} μmol/L nesfatin-1(0.45 ± 0.02)对H⁺/K⁺-ATP酶α亚基蛋白表达无影响.

2.4.2 Nesfatin-1对H⁺/K⁺-ATP酶β亚基蛋白表达的影响: nesfatin-1(10^{-1} μmol/L)在2 h(0.18 ± 0.01), 3 h(0.40 ± 0.01)均能够抑制H⁺/K⁺-ATP酶β亚基蛋白表达水平, 与对照组(0.72 ± 0.004)比较, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$). 而其中2 h的抑制作用强于3 h($P < 0.01$, 图5C). 但nesfatin-1在1 h(0.67 ± 0.04)和4 h(0.71 ± 0.01)时未表现出对H⁺/K⁺-ATP酶β亚基蛋白表达的抑制作用. 在

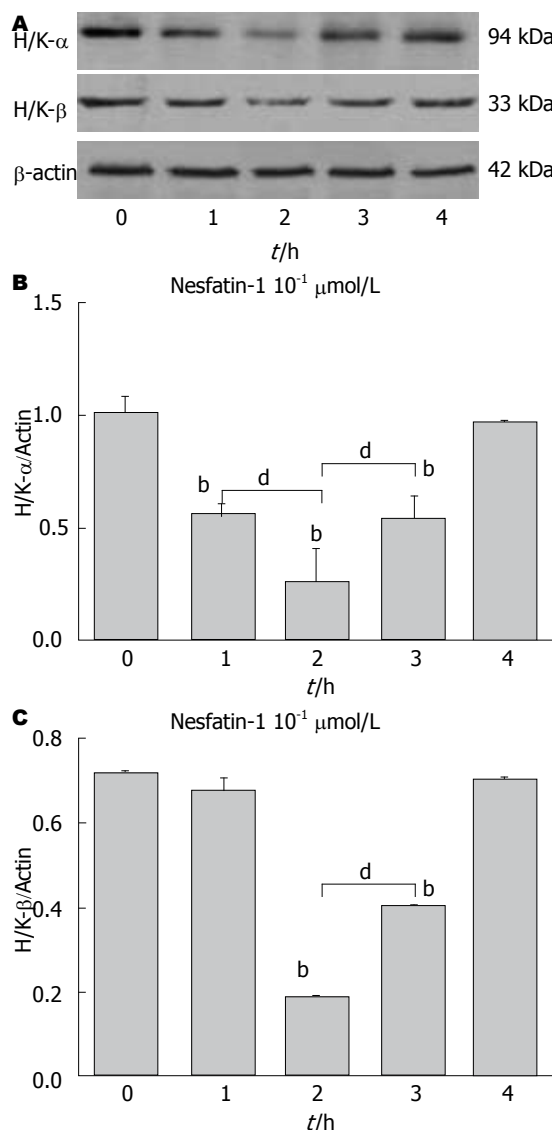


图 5 Nesfatin-1(10^{-1} μmol/L)在不同作用时间对H⁺/K⁺-ATP酶α, β两个亚基蛋白表达的影响. A: Western印迹法检测H⁺/K⁺-ATP酶蛋白表达; B: H/K-α/Actin; C: H/K-β/Actin; ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 2 h作用时间.

nesfatin-1作用2 h时, 在浓度分别为 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} μmol/L状态下, 均能抑制H⁺/K⁺-ATP酶β亚基蛋白表达, 其表达值分别为 0.59 ± 0.06 、 0.47 ± 0.05 、 0.31 ± 0.09 , 与对照组(0.82 ± 0.09)相比, 差异均有统计学意义($P < 0.01$, 图6C). 这3组之间相比, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$). 10^{-4} μmol/L nesfatin-1对H⁺/K⁺-ATP酶β亚基蛋白表达无影响($P > 0.05$).

3 讨论

NUCB2/nesfatin-1除广泛分布于中枢神经系统, 包括室旁核、弓状核、孤束核和动眼神经副核^[16-18]等, 也表达于外周, 如脂肪组织、胃、胰腺、十二指肠和睾丸^[3,19-22]等. Nesfatin-1可以调

■应用要点

本实验研究了nesfatin-1对离体培养的大鼠胃黏膜细胞胃酸分泌的影响, 并探讨了nesfatin-1对H⁺/K⁺-ATP酶α和β表达水平的作用, 有助于揭示该分子作用的具体机制, 并为临床治疗相关疾病提供一定的理论依据.

■同行评价

本研究先进性、科学性均较好, 结果可靠, 结论正确。

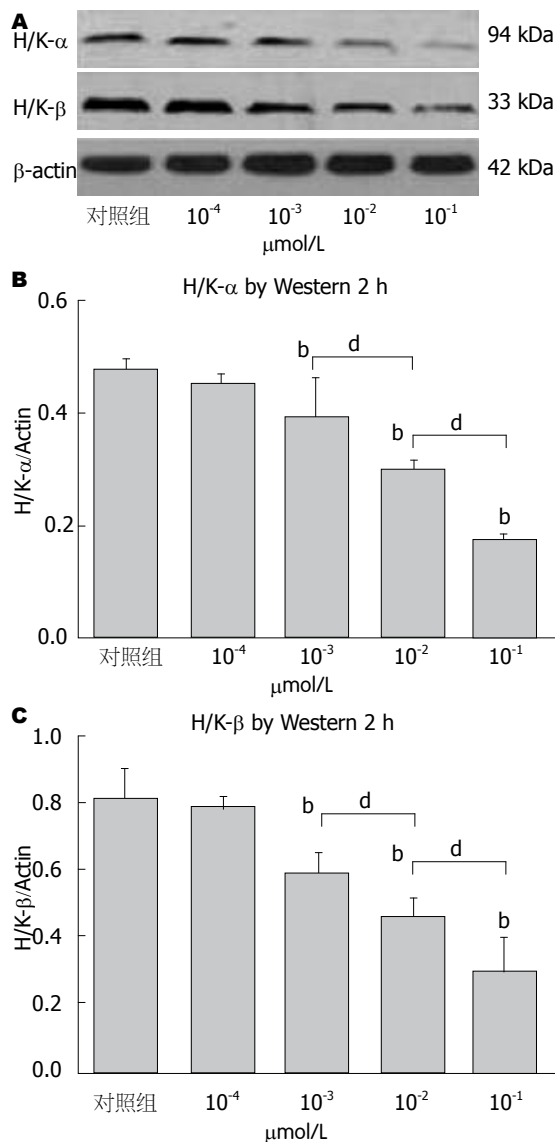


图6 不同浓度的Nesfatin-1(10⁻⁴–10⁻¹ μmol/L)作用2 h对H⁺/K⁺-ATP酶α, β两个亚基蛋白表达的影响. A: Western印迹法检测H⁺/K⁺-ATP酶蛋白表达; B: H/K-α/Actin; C: H/K-β/Actin; ^bP<0.01 vs 对照组; ^dP<0.01 vs 实验组不同剂量间。

节多种重要生理活动, 包括葡萄糖的代谢、免疫调节、胃肠运动和胃黏膜的保护作用^[4,6,23-25]等。有研究显示, NUCB2 mRNA在大鼠胃黏膜层的表达量是其大脑组织的10倍, 且nesfatin-1主要与胃泌酸腺中间部分的X/A样细胞分泌的葛瑞林(ghrelin)共存, nesfatin-1还在泌酸腺基底部的少数细胞中与生长抑素和组氨酸脱羧酶共存^[3]。Ghrelin、生长抑素、组氨酸脱羧酶均可影响胃酸的分泌^[26,27], 提示nesfatin-1在胃黏膜的分泌功能中起着重要作用。

胃酸分泌涉及了神经、内分泌、旁分泌、自分泌和神经-内分泌等复杂因素及其相互作用。本实验排除了影响胃酸分泌的神经、神经-内分泌等复杂因素, 研究nesfatin-1对大鼠离体培养

的胃黏膜酸分泌的影响。我们的研究表明, nesfatin-1能够抑制胃黏膜细胞的基础胃酸分泌, 且nesfatin-1随着处理时间延长而抑酸作用减弱, 其可能原因为nesfatin-1的活性随着孵育时间延长而减弱, 或是离体胃黏膜细胞随着分离时间延长使胃酸分泌功能减弱, 表现对外来刺激反应性减弱。Nesfatin-1与ghrelin、生长抑素、组氨酸脱羧酶共同表达于胃黏膜的泌酸腺, nesfatin-1是否通过影响这些因子的分泌而影响胃酸分泌, 需要进一步研究。

壁细胞包含大量的管泡结构, H⁺/K⁺-ATP酶位于这些管泡结构上。当壁细胞未受刺激时, 胞浆内管泡极多, 与线粒体相伴分布于整个胞质中, 分泌小管很少, 管腔狭窄, 表面微绒毛少而短; 当壁细胞受到刺激时, 胞浆内管泡减少, 分泌小管增多, 微绒毛也加长、变多, 使壁细胞分泌面积大大增加。H⁺/K⁺-ATP酶集中分布在壁细胞顶部分泌小管, 管状结构不断向顶部分泌小管融合, 使H⁺/K⁺-ATP酶不断向顶部质膜补充, 从而使壁细胞分泌胃酸^[28-30]。因此nesfatin-1可能通过下调H⁺/K⁺-ATP酶2个亚基的表达引起酸分泌功能的降低。

本实验中观察到nesfatin-1不仅能够下调H⁺/K⁺-ATP酶α, β两个亚基mRNA的表达, 还可以抑制H⁺/K⁺-ATP酶α, β两个亚基蛋白的表达, 与nesfatin-1抑制胃黏膜细胞酸分泌的结果一致。表明nesfatin-1抑制大鼠离体培养的胃黏膜细胞胃酸的分泌, 可能与其抑制H⁺/K⁺-ATP酶的合成有关。H⁺/K⁺-ATP酶的活性亦可以影响酸分泌, nesfatin-1是否也通过降低H⁺/K⁺-ATP酶的活性抑制胃黏膜细胞的酸分泌, 需要进一步研究。壁细胞内的分泌小管和管泡等形态、数量与壁细胞的分泌状态有关, 因此nesfatin-1是否通过影响壁细胞的形态而影响胃酸分泌, 需要电镜进一步观察壁细胞超微结构的变化情况。

H⁺/K⁺-ATP酶的2个亚单位的生物合成场所是壁细胞的内质网, 在高尔基体装配成二聚体后, α亚单位才稳定, 随后向高尔基体膜及管泡膜移动。本实验中观察到nesfatin-1抑制H⁺/K⁺-ATP酶α亚基和β亚基mRNA和蛋白表达的时间点与其抑制胃酸的时间稍有不一致, 认为可能是其2个亚基在高尔基体装配成二聚体后才能发挥作用, 故只有当这2个亚基在同一时间被抑制时, 才可观察到nesfatin-1对胃酸分泌的影响。胃酸的分泌还有赖于H⁺/K⁺-ATP酶从壁细胞胞质的管状结构不断向顶部分泌小管融合, nesfa-

tin-1是否影响这个融合的过程, 需免疫荧光进一步证实nesfatin-1作用于胃黏膜细胞时 H^+/K^+ -ATP酶2个亚基的具体分布位置. 另一方面, 因为有一系列的靶信号和蛋白-蛋白相互作用参与并调控这个过程^[31-34], 可通过检测这些蛋白的表达进一步证实nesfatin-1影响胃酸分泌的机制.

总之, nesfatin-1能够抑制离体培养的大鼠胃黏膜细胞的胃酸分泌, 并能下调 H^+/K^+ -ATP酶mRNA和蛋白的表达水平, 但这个过程具体是通过直接作用于壁细胞还是间接作用于胃黏膜其他细胞来完成, 又是作用于何受体, 这些问题均有待于进一步研究.

4 参考文献

- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443: 709-712
- Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 375-380
- Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 2009; 150: 232-238
- Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Mönnikes H, Lambrecht NW, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology* 2009; 150: 4911-4919
- Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides* 2011; 32: 36-43
- Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, Ataka K, Tsai M, Koyama K, Sato Y, Kato I, Fujimiya M, Inui A. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behaviour and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport* 2010; 21: 1008-1011
- Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009; 150: 662-671
- Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides* 2007; 28: 2223-2228
- Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007; 28: 2372-2381
- Agnew BJ, Duman JG, Watson CL, Coling DE, Forte JG. Cytological transformations associated with parietal cell stimulation: critical steps in the activation cascade. *J Cell Sci* 1999; 112: 2639-2646
- Zalewsky CA, Moody FG. Stereological analysis of the parietal cell during acid secretion and inhibition. *Gastroenterology* 1977; 73: 66-74
- Spicer Z, Miller ML, Andringa A, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Shull GE. Stomachs of mice lacking the gastric H,K-ATPase alpha -subunit have achlorhydria, abnormal parietal cells, and ciliated metaplasia. *J Biol Chem* 2000; 275: 21555-21565
- Scarff KL, Judd LM, Toh BH, Gleeson PA, Van Driel IR. Gastric H(+),K(+)-adenosine triphosphatase beta subunit is required for normal function, development, and membrane structure of mouse parietal cells. *Gastroenterology* 1999; 117: 605-618
- Lambrecht NW, Yakubov I, Scott D, Sachs G. Identification of the K efflux channel coupled to the gastric H-K-ATPase during acid secretion. *Physiol Genomics* 2005; 21: 81-91
- Soll AH. Secretagogue stimulation of [14C]aminopyrine accumulation by isolated canine parietal cells. *Am J Physiol* 1980; 238: G366-G375
- Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sed-bazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus co-express oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 2008; 149: 1295-1301
- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 2007; 148: 5088-5094
- Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jegu S, Shimizu H, Hashimoto K, Mori M, Luppi PH. The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 2008; 155: 174-181
- Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Rande HS. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* 2010; 151: 3169-3180
- Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1735-1741
- Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalize insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381: 643-648
- Foo KS, Brauner H, Ostenson CG, Broberger C. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *J Endocrinol* 2010; 204: 255-263
- Yosten GL, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R330-R336
- Özsavcı D, Erşahin M, Şener A, Özakpınar ÖB, Toklu HZ, Akakın D, Şener G, Yeğen BÇ. The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Neurosurgery* 2011; 68: 1699-1708; discussion 1708
- Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1039-1042
- Komasaka M, Horie S, Watanabe K, Murayama T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. *Eur J Pharmacol* 2002; 452: 235-243

- 27 Yakabi K, Ro S, Onouhi T, Tanaka T, Ohno S, Miura S, Johno Y, Takayama K. Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 1313-1321
- 28 Black JA, Forte TM, Forte JG. Inhibition of HCl secretion and the effects on ultrastructure and electrical resistance in isolated piglet gastric mucosa. *Gastroenterology* 1981; 81: 509-519
- 29 Forte TM, Machen TE, Forte JG. Ultrastructural changes in oxyntic cells associated with secretory function: a membrane-recycling hypothesis. *Gastroenterology* 1977; 73: 941-955
- 30 Duman JG, Pathak NJ, Ladinsky MS, McDonald KL, Forte JG. Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells. *J Cell Sci* 2002; 115: 1251-1258
- 31 Mizukawa Y, Nishizawa T, Nagao T, Kitamura K, Urushidani T. Cellular distribution of paracrine, a chloride intracellular channel-related protein, in various tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C786-C795
- 32 Chew CS, Chen X, Bollag RJ, Isales C, Ding KH, Zhang H. Targeted disruption of the Lasp-1 gene is linked to increases in histamine-stimulated gastric HCl secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G37-G44
- 33 Pagliocca A, Hegyi P, Venglovecz V, Rackstraw SA, Khan Z, Burdyga G, Wang TC, Dimaline R, Varro A, Dockray GJ. Identification of ezrin as a target of gastrin in immature mouse gastric parietal cells. *Exp Physiol* 2008; 93: 1174-1189
- 34 Ding X, Deng H, Wang D, Zhou J, Huang Y, Zhao X, Yu X, Wang M, Wang F, Ward T, Aikhionbare F, Yao X. Phospho-regulated ACAP4-Ezrin interaction is essential for histamine-stimulated parietal cell secretion. *J Biol Chem* 2010; 285: 18769-18780

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.694

本刊讯 2011-12-02, 一年一度的中国科技论文统计结果由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。(编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

艾灸预处理对幽门螺杆菌胃黏膜炎性损伤大鼠血清IgG和eHSP72含量的影响

封迎帅, 易受乡, 林亚平, 彭艳, 史冬梅, 侯艳玲

封迎帅, 湖南中医药大学针灸推拿学院经穴脏腑相关重点研究室 湖南省人民医院康复理疗科针灸室 湖南省长沙市 410007

易受乡, 林亚平, 彭艳, 史冬梅, 侯艳玲, 湖南中医药大学针灸推拿学院经穴脏腑相关重点研究室 针灸生物信息分析重点实验室 湖南省长沙市 410007

封迎帅, 在读博士, 医师, 主要从事针灸治病机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81072867

作者贡献分布: 此课题由林亚平、易受乡及彭艳设计; 研究过程由林亚平、封迎帅、彭艳、史冬梅及侯艳玲操作完成; 研究所用工具由林亚平提供; 数据分析由封迎帅、易受乡及林亚平完成; 本论文写作由封迎帅完成。

通讯作者: 林亚平, 教授, 410007, 湖南省长沙市韶山中路113号, 湖南中医药大学针灸推拿学院. lyplinda@yahoo.com.cn
电话: 0731-85381161

收稿日期: 2012-02-10 修回日期: 2012-03-14

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

Effect of moxibustion pretreatment on serum levels of *Helicobacter pylori* IgG and eHSP72 in rats with *Helicobacter pylori*-induced gastritis

Ying-Shuai Feng, Shou-Xiang Yi, Ya-Ping Lin, Yan Peng, Dong-Mei Shi, Yan-Ling Hou

Ying-Shuai Feng, Key Laboratory of Meridians and Viscera, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine; Department of Rehabilitation and Physiotherapy, People's Hospital of Hunan, Changsha 410007, Hunan Province, China

Shou-Xiang Yi, Ya-Ping Lin, Yan Peng, Dong-Mei Shi, Yan-Ling Hou, Key Laboratory of Meridians and Viscera; Key Laboratory of Acupuncture Biological Information Analysis, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072867

Correspondence to: Ya-Ping Lin, Professor, College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. lyplinda@yahoo.com.cn

Received: 2012-02-10 Revised: 2012-03-14

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of moxibustion pretreatment on serum levels of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) IgG and extracellular heat shock protein 72

(eHSP72) in rats with *H. pylori*-induced gastritis.

METHODS: Fifty healthy rats were randomly divided into five groups: A (normal controls), B (infected with *H. pylori*), C (moxibustion at acupoints), D (moxibustion at non-acupoints), and E (electroacupuncture at acupoints). Gastritis was induced in rats by oral gavage with *H. pylori*. The levels of serum *H. pylori* IgG and eHSP72 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS: Compared to group A, the ulcer index and serum levels of *H. pylori* IgG and eHSP72 significantly increased in group B (0.50 ± 1.00 vs 6.50 ± 4.75 , $76.72 \mu\text{g/L} \pm 11.02 \mu\text{g/L}$ vs $131.91 \mu\text{g/L} \pm 30.04 \mu\text{g/L}$, $152.2 \text{ ng/L} \pm 22.72 \text{ ng/L}$ vs $222.59 \text{ ng/L} \pm 56.69 \text{ ng/L}$, all $P < 0.01$). Compared to group B, the UI and serum levels of *H. pylori* IgG significantly decreased (6.50 ± 4.75 vs 1.00 ± 2.00 , $131.91 \mu\text{g/L} \pm 30.04 \mu\text{g/L}$ vs $86.25 \mu\text{g/L} \pm 18.63 \mu\text{g/L}$, both $P < 0.01$) and serum levels of eHSP72 significantly increased in group C ($222.59 \text{ ng/L} \pm 56.69 \text{ ng/L}$ vs $285.54 \text{ ng/L} \pm 68.23 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$). Compared to group D, the UI and serum levels of *H. pylori* IgG significantly decreased (3.00 ± 5.00 vs 1.00 ± 2.00 , $116.19 \mu\text{g/L} \pm 31.25 \mu\text{g/L}$ vs $86.25 \mu\text{g/L} \pm 18.63 \mu\text{g/L}$, both $P < 0.01$) and serum levels of eHSP72 significantly increased in group C ($185.97 \text{ ng/L} \pm 77.62 \text{ ng/L}$ vs $285.54 \text{ ng/L} \pm 68.23 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$). Compared to group E, serum levels of *H. pylori* IgG significantly decreased in group C ($120.25 \mu\text{g/L} \pm 25.40 \mu\text{g/L}$ vs $86.25 \mu\text{g/L} \pm 18.63 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Moxibustion at acupoints reduces *H. pylori*-induced gastric mucosal injury possibly via mechanisms associated with increasing serum levels of eHSP72.

Key Words: Moxibustion; *Helicobacter pylori*-induced gastritis; Extracellular heat shock protein 72; *Helicobacter pylori* IgG

Feng YS, Yi SX, Lin YP, Peng Y, Shi DM, Hou YL. Effect of moxibustion pretreatment on serum levels of *Helicobacter pylori* IgG and eHSP72 in rats with *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012;

■背景资料

艾灸足三里等穴能诱导HSP70表达, 对抗氧自由基损伤, 抑制细胞凋亡, 促进应激性溃疡胃黏膜细胞修复, 但是艾灸对幽门螺杆菌(*H. pylori*)相关性胃炎是否有干预作用, 其作用是否与eHSP72有关还有待进一步研究。

■同行评议者

刘宝瑞, 教授, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

■ 研发前沿

研究发现,穴位的艾灸刺激可诱导血清内eHSP70升高,缓解胃黏膜炎性损伤。

20(13): 1131-1136

摘要

目的: 探讨艾灸对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)胃炎大鼠血清*H. pylori* IgG和eHSP72含量的影响,初步揭示艾灸干预*H. pylori*胃黏膜炎性损伤,保护胃黏膜的机制。

方法: 50只健康大鼠随机分为5组,即A空白组、B模型组、C艾灸组、D艾灸非穴点组和E电针组,每组10只。采用*H. pylori*灌胃造模,酶联免疫法检测大鼠血清*H. pylori* IgG和eHSP72含量。

结果: 与A组比较,B组大鼠胃黏膜UI、血清*H. pylori* IgG和eHSP72含量升高(0.50 ± 1.00 vs 6.50 ± 4.75 , $76.72 \mu\text{g/L} \pm 11.02 \mu\text{g/L}$ vs $131.91 \mu\text{g/L} \pm 30.04 \mu\text{g/L}$, $152.2 \text{ ng/L} \pm 22.72 \text{ ng/L}$ vs $222.59 \text{ ng/L} \pm 56.69 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$);与B组相比,C组大鼠UI和*H. pylori* IgG含量降低(6.50 ± 4.75 vs 1.00 ± 2.00 , $131.91 \mu\text{g/L} \pm 30.04 \mu\text{g/L}$ vs $86.25 \mu\text{g/L} \pm 18.63 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$),eHSP72含量升高($222.59 \text{ ng/L} \pm 56.69 \text{ ng/L}$ vs $285.54 \text{ ng/L} \pm 68.23 \text{ ng/L}$, $P < 0.05$);与D组相比,C组大鼠UI和*H. pylori* IgG含量降低(3.00 ± 5.00 vs 1.00 ± 2.00 , $116.19 \mu\text{g/L} \pm 31.25 \mu\text{g/L}$ vs $86.25 \mu\text{g/L} \pm 18.63 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$),eHSP72含量升高($185.97 \text{ ng/L} \pm 77.62 \text{ ng/L}$ vs $285.54 \text{ ng/L} \pm 68.23 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$);与E组比较,C组大鼠*H. pylori* IgG含量降低($120.25 \mu\text{g/L} \pm 25.40 \mu\text{g/L}$ vs $86.25 \mu\text{g/L} \pm 18.63 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$)。

结论: 艾灸穴位可干预并减轻*H. pylori*胃黏膜炎性损伤,此作用可能是通过艾灸诱导血清eHSP72大量表达,启动和调控机体免疫系统对入侵的病原体*H. pylori*清除,达到抑制*H. pylori* IgG形成和保护胃黏膜损伤的作用。

关键词: 艾灸;幽门螺杆菌相关性胃炎;细胞外热休克蛋白72;幽门螺杆菌IgG

封迎帅, 易受乡, 林亚平, 彭艳, 史冬梅, 侯艳玲. 艾灸预处理对幽门螺杆菌胃黏膜炎性损伤大鼠血清IgG和eHSP72含量的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1131-1136
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1131.asp>

0 引言

本组前期研究发现,穴位的艾灸刺激可诱导血清内eHSP70升高,缓解胃黏膜炎性损伤^[1]。但艾灸是否可以干预幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)所致的大鼠胃黏膜炎性损伤过程,是否

通过诱导eHSP72释放来影响*H. pylori*的定植,从而影响了血清中*H. pylori* IgG抗体的含量,对抗*H. pylori*胃黏膜炎性损伤,从而保护胃黏膜还不明确。本研究采用*H. pylori*灌胃建立大鼠*H. pylori*胃炎模型,从eHSP72入手探讨艾灸对*H. pylori*大鼠胃黏膜的炎性损伤的干预作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠,SPF级,雌雄各半,体重180-220 g,共50只,由湖南中医药大学实验动物中心提供[合格证号SCXK(湘)2009-2004],饲养于湖南中医药大学实验动物中心。控制室温20℃-22℃,相对湿度65%-70%,大鼠在自然光暗周期的环境中饲养,所用颗粒饲料和垫料均由湖南中医药大学动物实验中心提供。施灸材料为苏州东方艾绒厂生产的“神灸300灸”艾柱(型号:东方一型),直径0.5 cm,高0.8 cm。*H. pylori*菌株(由南华大学微生物实验室提供*H. pylori*国际标准菌株SS1菌种,湖南中医药大学微生物实验室培养*H. pylori*菌株);小牛血清(上海瑞齐生物科技有限公司),幽门螺旋杆菌快速尿素酶试验试剂盒(三明市安信生物技术有限公司),10%乌拉坦、0.9%NaCl和多聚甲醛(湖南中医药大学针灸推拿实验室配制);大鼠血清*H. pylori* IgG和eHSP72酶免试剂盒(RD公司);阿莫西林(华北制药);华佗牌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司生产);G6805-2型电针治疗仪(上海医用机器厂)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组: 所有大鼠按随机数字表法分为5组:A:空白组,B:*H. pylori*胃炎模型(模型组),C:模型+艾灸穴位组(艾灸组),D:模型+艾灸非穴点组(艾灸对照点组),E:模型+电针穴位组(电针组),每组10只。

1.2.2 穴位定位: 动物穴位定位参考李忠仁主编《实验针灸学》常用动物穴位定位法及拟人对照法定位^[2]。足三里:膝关节后外侧,腓骨小头下约5 mm处;中脘:脐与胸骨剑突连线中点;关元:脐与耻骨联合上缘连线上3/5与下2/5交点,约脐下25 mm处;脾俞:第12胸椎棘突下,旁开5 mm;胃俞:第13胸椎棘突下,旁开5 mm;足三里的对照点在足阳明经和足太阳经之间,平足三里;中脘、关元的对照点分别在平中脘、关元穴的左侧腰部;脾俞、胃俞的对照点在腋后线和肩胛下角的中线上,分别平胸12、胸13。

1.2.3 动物造模及评价: (1)*H. pylori*胃炎造模:大

鼠禁食12 h, 先以 NaHCO_3 +消炎痛溶液0.5 mL/只灌胃, 禁食6 h后再以 $H. pylori$ (含量 10^9 /mL) 1.5 mL/只灌胃, 隔天1次, 连续5次, 灌胃完毕后, 禁食禁水4 h, 之后正常喂养; (2)造模成功指标: 尿素酶试验阳性, 胃黏膜涂片革兰染色发现 $H. pylori$, 胃黏膜组织HE染色镜检显示有炎性损伤即胃黏膜上皮细胞脱落并有炎性细胞浸润。

1.2.4 艾灸、电针: (1)艾灸: 取大鼠双侧足三里、中脘、关元、双侧脾俞和双侧胃俞穴及这些穴位的对照点穴位(非穴点), 局部剪毛, 艾柱粘于穴位或非穴对照点上点燃施灸。单只大鼠仰卧位固定, C组灸足三里、中脘和关元穴, D组灸足三里、中脘和关元穴的对照点非穴点; 双只大鼠俯卧位固定, C组灸脾俞和胃俞, D组灸脾俞和胃俞的对照点非穴点。采用苏州东方艾绒厂提供的“神灸300灸艾柱”进行施灸, 每个艾灸部位连续艾灸5壮, 总延时时约20 min左右, 每日1次, 连续16 d; (2)电针: 取大鼠双侧足三里、中脘、关元、双侧脾俞和双侧胃俞穴后穴位局部剪毛、络合碘消毒, 采用1寸、30号的华佗牌针灸针分别进行针刺, 针刺深度约2 mm左右, 针刺后连电针, 其中两侧足三里穴接在G6805-2型电针仪的第1组输出线上, 中脘和关元、两侧脾俞、两侧胃俞分别接在电针仪的第2、3、4组输出线上。单只大鼠仰卧位固定, E组电针足三里、中脘和关元穴; 双只大鼠俯卧位固定, E组电针脾俞和胃俞。一只大鼠每次共接2组输出线, 采用疏密波, 频率4/50 Hz, 脉宽0.5 ms, 输出电压2-4 V(频率慢的叫疏波, 一般是2-5次/分; 频率快的叫密波, 一般是50-100次/分); 强度以肢体出现轻微颤抖为度, 电针时间20 min, 每日1次, 连续16 d。

1.2.5 艾灸治疗处理: 所有动物分组后予以浓度为2.5 g/L的阿莫西林生理盐水溶液0.5 mL/只灌胃, 每天2次, 连续3 d(杀灭大鼠上消化道可能定植的 $H. pylori$); 第4天起每天下午13点所有大鼠捆绑于鼠板上, A、B组每日仅捆绑不做治疗, C、D组予以艾灸治疗, E组予以电针治疗, 每日1次, 连续16 d; 同时, 从实验第11天(即艾灸的第8天)开始灌胃, 隔天1次, 连续5次(即9 d), 灌胃前所有的大鼠禁食12 h, 上午10点左右A组先予以生理盐水0.5 mL/只灌胃, B、C、D、E组予以 NaHCO_3 +消炎痛溶液0.5 mL/只灌胃; 再禁食不禁水6 h后, 下午16:30开始进行第2次灌胃, A组予以生理盐水1.5 mL/只灌胃, B、C、D、E组予以 $H. pylori$ (1×10^9)1.5 mL/只灌胃, 灌胃完毕后,

禁食禁水4 h, 之后正常喂养; 于最后1次灌胃(艾灸)结束后的第4周(28 d), 禁食12 h后全部大鼠以10%乌拉坦(1 mL/100 g)麻醉固定取材。

胃黏膜处理: 大鼠剖腹取胃, 沿胃大弯剖开, 用冷生理盐水冲洗胃内残留物, 计数胃黏膜损伤指数。血清处理: 腹主动脉采血, 常温放置2-3 h, 4°C 2 000 r/min, 离心10 min, 取上清液, EP管分装, -20°C 保存, 待测。

1.2.6 观察指标: (1)胃黏膜损伤指数(UI): 参照GUTH法计算UI^[3,4]: 全胃各病灶长度之和为损伤指数, 以mm表示。损伤 ≤ 1 mm(包括糜烂点), 1分; $1\text{ mm} < \text{损伤} \leq 2\text{ mm}$, 2分; $2\text{ mm} < \text{损伤} \leq 3\text{ mm}$, 3分; $3\text{ mm} < \text{损伤} \leq 4\text{ mm}$, 4分; $> 4\text{ mm}$, 5分; 损伤宽度 $> 2\text{ mm}$ 者UI加倍; (2)血清 $H. pylori$ IgG和eHSP72含量测定: 按照RD公司的大鼠血清 $H. pylori$ IgG和eHSP72酶联免疫试剂盒要求, 采用酶联免疫法检测, 具体操作步骤如下: 样本2 000 r/min, 10 min离心, 样本及试剂盒恢复室温, 标准品配制。加入标准品和样本100 μL /孔, 37°C , 90 min, 洗板2次; 加入生物素化抗体工作液100 μL /孔, 37°C , 60 min, 洗板3次; 加入ABC工作液100 μL /孔, 37°C , 30 min, 洗板5次; 加入TMB显色剂100 μL /孔, 避光, 37°C , 10 min; 加入终止液100 μL /孔, 混匀后, 即刻测量吸光度(A)值。依据标准品和样本A值, 根据公式计算样本待测因子蛋白浓度。

统计学处理 所有资料进行正态性检验, 符合正态分布的数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 多组计量资料采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐者用LSD和SNK法, 方差不齐者用Tamhane's T2或Dunnett's T3法; 非正态分布数据用中位数 $\pm$ 四分位数间距表示, 采用秩和检验。所有数据使用SPSS19 for Windows软件进行处理。

2 结果

$H. pylori$ 胃炎造模成功的大鼠模型组织切片如图1。

2.1 艾灸预处理对 $H. pylori$ 胃黏膜炎性损伤大鼠胃黏膜UI的影响 与A组比较, B组大鼠胃黏膜UI值升高($P < 0.01$); 与B组相比, C、E组大鼠胃黏膜UI值降低($P < 0.01$), D组大鼠胃黏膜UI值无明显降低($P > 0.05$); 与D组相比, C、E组大鼠胃黏膜UI值降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上结果提示: $H. pylori$ 灌胃造模后, 胃黏膜UI明显升高; 艾灸, 电针预处理可降低胃黏膜UI, 保护胃黏膜, 且艾灸穴位作用较电针的明显(表1)。

2.2 艾灸预处理对 $H. pylori$ 胃黏膜炎性损伤大鼠

■ 相关报道

研究发现艾灸对胃黏膜损伤有保护作用, 灸疗对免疫功能的影响是一切作用的基础, 其中从eHSP72方面的来研究艾灸免疫调节作用是近年研究的热点。

■创新盘点

本研究从eHSP72入手探讨艾灸预处理是否能干预*H. pylori*所致胃黏膜炎性损伤,其是否通过诱导eHSP72释放来抑制*H. pylori* IgG形成和保护胃黏膜损伤,从而为艾灸防治*H. pylori*相关性胃炎提供了理论依据。

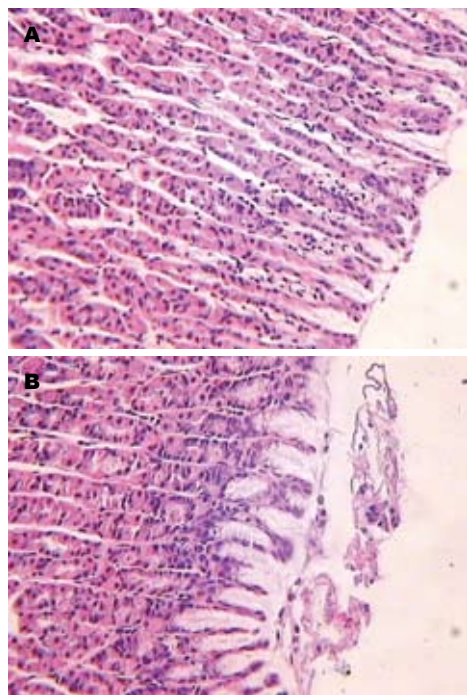


图1 空白组和模型组胃黏膜组织HE染色镜检比较($\times 400$). A: 空白组; B: 模型组。

血清*H. pylori* IgG的影响 与A组比较, B组大鼠血清*H. pylori* IgG含量明显升高($P<0.01$); 与B组比较, C组大鼠血清*H. pylori* IgG含量显著降低($P<0.01$), 而D、E组大鼠血清*H. pylori* IgG含量无明显降低($P>0.05$); 与D、E组比较, C组大鼠血清*H. pylori* IgG含量显著降低($P<0.01$)。以上结果提示: *H. pylori*灌胃造模后, 大鼠血清中*H. pylori* IgG含量显著上调; 先予以电针足三里、中脘、关元、脾俞和胃俞穴及艾灸对照点处理后再灌*H. pylori*, 大鼠血清中*H. pylori* IgG含量较B组无明显上升; 而先予以艾灸足三里、中脘、关元、脾俞和胃俞穴处理后再灌*H. pylori*, 大鼠血清中*H. pylori* IgG含量较B组明显下降。艾灸足三里、中脘、关元、脾俞和胃俞穴预处理可以抑制*H. pylori*模型大鼠血清*H. pylori* IgG的含量(表1)。

2.3 艾灸预处理对*H. pylori*胃黏膜炎性损伤大鼠血清eHSP72的影响 与A组比较, B组大鼠血清eHSP72表达升高($P<0.01$); 与B组比较, C组大鼠血清eHSP72表达升高($P<0.05$), D、E组大鼠血清eHSP72表达无明显升高($P>0.05$); 与D组比较, C组大鼠血清eHSP72表达升高($P<0.01$), 与E组比较, C组大鼠血清eHSP72表达无明显升高($P>0.05$)。以上结果提示: *H. pylori*灌胃造模后, 大鼠血清eHSP72含量显著增加; 先予以艾灸足三里、中脘、关元、脾俞和胃俞穴处理后再灌

表1 艾灸预处理对*H. pylori*胃黏膜炎性损伤大鼠的胃黏膜组织UI、*H. pylori* IgG及eHSP72含量的影响($n=10$, 中位数 $\pm$ 四分位数间距)

分组	UI	<i>H. pylori</i> IgG(μ g/L)	eHSP72(ng/L)
A组	0.50 $\pm$ 1.00	76.72 $\pm$ 11.02	152.20 $\pm$ 22.72
B组	6.50 $\pm$ 4.75 ^b	131.91 $\pm$ 30.04 ^b	222.59 $\pm$ 56.69 ^b
C组	1.00 $\pm$ 2.00 ^{df}	86.25 $\pm$ 18.63 ^{dhi}	285.54 $\pm$ 68.23 ^{bef}
D组	3.00 $\pm$ 5.00	116.19 $\pm$ 31.25	185.97 $\pm$ 77.62
E组	1.00 $\pm$ 1.25 ^{de}	120.25 $\pm$ 25.40	252.58 $\pm$ 73.68

^b $P<0.01$ vs A组; ^a $P<0.01$ vs B组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs D组; ^e $P<0.01$ vs E组。

H. pylori, 大鼠血清eHSP72含量较B组显著增加; 而予以电针足三里、中脘关元、脾俞和胃俞穴及艾灸对照点处理后再灌*H. pylori*, 大鼠血清eHSP72含量较B组无显著性差异($P>0.05$)。 *H. pylori*灌胃后, 大鼠血清eHSP72表达上调; 艾灸足三里、中脘、关元、脾俞和胃俞穴预处理可以促进模型大鼠血清eHSP72大量表达(表1)。

3 讨论

慢性胃炎是临床常见病、多发病, 目前已公认*H. pylori*感染是慢性胃炎的最常见的病因。*H. pylori*感染呈全球分布, 发达国家的总人口感染率达30%-50%, 而发展中国家的感染水平竟达80%^[5], 且*H. pylori*感染率随年龄增长而增长, 50岁以上的人群高达50%-60%^[6,7]; *H. pylori*阳性胃炎感染率高、危害性大, 久治不愈可导致消化性溃疡、胃黏膜淋巴瘤和胃癌等严重并发症。目前根除*H. pylori*的标准三联方案有良好的根除率, 但因*H. pylori*对抗生素耐药现象逐渐增加等方面的原因, 根除治疗的失败率逐年上升^[8-10]。近年来许多实验和临床研究表明祖国传统医学如: 中药、针刺、艾灸等在*H. pylori*阳性胃炎的防治中具有良好临床疗效^[11-13]。

灸疗法是祖国医学的重要组成部分, 对中华民族的繁衍昌盛和保障人民健康作出了重大贡献。传统中医理论认为灸疗具有消瘀散结、调和气血、温补脾胃、扶正祛邪和防病保健的功效, 其中防病保健作用即指艾灸“治未病”。中医历来主张“治未病”, “治未病”是中医防病保健的理论精髓之一^[14], 针灸“治未病”古来有之, 正常机体未病先防多用灸法。晋代范汪把这种防病的灸法称为“逆灸”。唐代的孙思邈是艾灸治未病的积极倡导者, 宋代窦材《扁鹊心书》中将灸法列为各种养生保健法的首位,

有“保命之法,灼艾第一”。元、明、清时期的医家也大都推崇艾灸治未病的保健灸法。现代医学也证明了针灸能够通过调节机体免疫功能,达到防病保健的作用^[15,16]。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一类细胞应激蛋白^[17], HSP70家族是其中最主要的一类。研究证明机体细胞在生理、心理^[18]应激状态下能将HSP主动分泌到细胞外,并将这种HSP叫做细胞外热休克蛋白(extracellular heat shock protein, eHSP)。应激时释放的eHSP72可能是免疫系统的一种“应激信使”或“危险信号”^[19],对免疫系统起到预警、启动和调控作用,有利于机体对入侵的病原刺激物迅速清除,而无病原物入侵时, eHSP70不会激活免疫细胞^[19]。eHSP72不仅可以调节固有免疫反应,也可以激发T细胞介导的适应性免疫反应^[20],从而增强细胞的免疫功能^[19]。研究发现在人的循环血液中可检测出eHSP72^[21],而风湿性关节炎^[22]、高血压、动脉粥样硬化^[23]等疾病患者血浆中eHSP70水平比正常健康人明显增高,且其水平与疾病的病理过程密切相关。机体处于正常生理状态遭受心理和生理应激时,血液中的eHSP72水平也会快速升高^[24],机体eHSP70释放的过度或不足都可能造成机体免疫功能失调。因此对eHSP70的释放和调控研究将有助于更好理解感染性和自身免疫性疾病的发病机制,并有可能通过干预eHSP70的释放或利用外源性eHSP70来防治这些疾病。

*H. pylori*是一种革兰氏阴性细菌,有鞭毛,*H. pylori*进入胃后,借助菌体一侧的鞭毛提供动力穿过胃黏膜粘液层,破坏胃黏膜结构引起局部炎症反应,并在黏膜局部和血清中产生*H. pylori* IgG抗体,但这种抗体没有清除*H. pylori*的作用,反而可通过抗原-抗体复合物的形成导致胃黏膜损伤^[25]。研究认为血清*H. pylori* IgG抗体检测结果阳性是检测*H. pylori*感染的标准之一^[26],*H. pylori* IgG在*H. pylori*胃炎的致病机制和疾病转归中发挥了一定的作用^[27],当机体受到*H. pylori*病原刺激时, eHSP72可能会启动和调控机体的免疫系统对入侵的病原物的清除^[27],并调节机体的免疫反应^[20],增强细胞的免疫功能^[19],干扰*H. pylori* IgG抗体的形成,从而减轻胃黏膜损伤。

通过本实验我们观察到, *H. pylori*灌胃造模后,大鼠胃黏膜UI值和血清*H. pylori* IgG含量显著升高,血清eHSP72含量显著增加;予以艾灸足三里、中脘、关元、脾俞和胃俞穴处理后

再灌*H. pylori*,胃黏膜UI值和血清*H. pylori* IgG含量较模型组显著降低,血清eHSP72含量较模型组显著增加;电针穴位后再灌*H. pylori*,胃黏膜UI值降低,血清eHSP72含量较模型组稍有升高($P>0.05$),但血清*H. pylori* IgG较模型组无明显降低;艾灸对照点后再灌*H. pylori*,胃黏膜UI值和血清*H. pylori* IgG较模型组无显著降低,血清eHSP72含量较模型组无明显升高。提示*H. pylori*直接灌胃后,大鼠胃黏膜明显受损,刺激大鼠血清eHSP72表达上调;艾灸足三里、中脘、关元、脾俞和胃俞穴可减轻*H. pylori*胃黏膜炎性损伤,这一作用可能是通过艾灸诱导血清eHSP72大量表达,启动和调控机体免疫系统对入侵的病原刺激物*H. pylori*清除,达到抑制*H. pylori* IgG的形成和保护胃黏膜损伤的作用,且这种干预作用与艾灸的激发人体正气,增强抗病能力、穴位的特异性作用是分不开的。而电针穴位虽能诱导血清eHSP72含量稍有升高,但是血清*H. pylori* IgG无明显降低,因此提示艾灸可能比电针对*H. pylori*胃黏膜炎性损伤修复作用强,这可能跟艾灸的治疗未病作用和热效应有关^[28]。

4 参考文献

- 1 易受乡,杜燕,林亚平,洪金标,彭宏,黄芸. 艾灸预处理对急性胃黏膜损伤大鼠血清中eHSP70及胃黏膜细胞NF- κ B的影响. 中华中医药杂志 2010; 25: 1462-1467
- 2 李忠仁. 实验针灸学. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-329
- 3 Guth PH, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine. *Gastroenterology* 1979; 76: 88-93
- 4 Xu X, Xie B, Pan S, Liu L, Wang Y, Chen C. Effects of sea buckthorn procyanidins on healing of acetic acid-induced lesions in the rat stomach. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16 Suppl 1: 234-238
- 5 Li YY, Hu PJ, Du GG, Hazell SL. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the Peoples Republic of China. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 446-449
- 6 章阳,郑文斌,黄美云,寇玉梅,杨南,韩思静. 成都市居民幽门螺旋杆菌感染状况分析. 华西医学 2009; 24: 2033-2034
- 7 周月婷. 上海地区企事业单位人员幽门螺旋杆菌感染率调查. 中国疗养医学 2010; 19: 191
- 8 史彤,刘文忠,萧树东,徐蔚文. 上海地区幽门螺杆菌对抗生素耐药率的变迁. 中华内科杂志 2000; 39: 576
- 9 成虹,胡伏莲. 北京地区幽门螺杆菌耐药情况及其变化趋势. 中华医学杂志 2005; 85: 2754-2757
- 10 王耀新. 三种喹诺酮类药物根治261例幽门螺旋杆菌感染疗效观察. 福建医药杂志 2009; 31: 136-137
- 11 Gao X, Yuan J, Li H, Ren S. Clinical research on acupuncture and moxibustion treatment of chronic atrophic gastritis. *J Tradit Chin Med* 2007; 27: 87-91
- 12 赵彬,张秋丽. 中西医结合治疗Hp胃炎及SOD变化的临床分析. 中国实用医药 2010; 5: 48-49
- 13 赵彩娇,范郁山. 灵龟八法治疗慢性浅表性胃炎(脾胃

■同行评价

本研究设计合理,结果可靠,结论可信,为艾灸预防*H. pylori*相关性胃炎提供了实验依据,具有较好的科学意义。

- 14 虚寒型)临床研究. 时珍国医国药 2010; 21: 1741-1742
- 14 Chang XR, Peng L, Yi SX, Peng Y, Yan J. Association of high expression in rat gastric mucosal heat shock protein 70 induced by moxibustion pretreatment with protection against stress injury. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4355-4359
- 15 Yi SX, Peng Y, Chang XR, Peng N, Yan J, Lin YP. Effect of pre-moxibustion on apoptosis and proliferation of gastric mucosa cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2174-2178
- 16 易受乡, 彭艳, 常小荣, 彭娜, 严洁, 林亚平. 艾灸足三里、梁门穴对应激性溃疡大鼠胃黏膜细胞凋亡的干预作用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3163-3168
- 17 Giffard RG, Han RQ, Emery JF, Duan M, Pittet JF. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70. *Anesthesiology* 2008; 109: 339-348
- 18 Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, Moseley PL, Hargreaves M, Febbraio MA. Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones* 2001; 6: 386-393
- 19 Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 425-434
- 20 Asea A. Mechanisms of HSP72 release. *J Biosci* 2007; 32: 579-584
- 21 Pockley AG, De Faire U, Kiessling R, Lemne C, Thulin T, Frostegård J. Circulating heat shock protein and heat shock protein antibody levels in established hypertension. *J Hypertens* 2002; 20: 1815-1820
- 22 Martin CA, Carsons SE, Kowalewski R, Bernstein D, Valentino M, Santiago-Schwarz F. Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming. *J Immunol* 2003; 171: 5736-5742
- 23 Pockley AG. Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 105: 1012-1017
- 24 Whitham M, Fortes MB. Heat shock protein 72: release and biological significance during exercise. *Front Biosci* 2008; 13: 1328-1339
- 25 Ernst PB, Pecquet S. Interactions between Helicobacter pylori and the local mucosal immune system. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1991; 187: 56-64
- 26 闫伟, 曹建彪. 胃幽门螺杆菌检测技术进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1527-1533
- 27 王晶桐, 刘玉兰. 幽门螺旋杆菌感染后血清学改变的研究. 中国消化内镜 2008; 12: 29-32
- 28 李晓泓. 针灸“治未病”与“针灸良性预应激假说”. 北京中医药大学学报 2003; 26: 82-85

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

凉血愈肠汤对急性放射性肠炎的治疗及作用机制

武寒飞, 洪智攀, 丁健华, 赵克

武寒飞, 洪智攀, 辽宁医学院第二炮兵总医院研究生培养基地 北京市 100088

武寒飞, 洪智攀, 丁健华, 赵克, 中国人民解放军第二炮兵总医院肛肠外科 中国人民解放军肛肠病专病中心 北京市 100088

武寒飞, 在读硕士, 主要从事结肠直肠癌外科临床与基础研究。

中国人民解放军全军医学科研“十二五”基金资助项目, No. cws11J032

作者贡献分布: 本研究由丁健华立题设计; 丁健华与赵克进行指导; 武寒飞与洪智攀负责动物实验、实验数据处理; 最终论文写作由武寒飞完成。

通讯作者: 赵克, 教授, 100088, 北京市新街口外大街16号, 中国人民解放军第二炮兵总医院肛肠外科, 中国人民解放军全军肛肠病专病中心。 wuhanfei234@sohu.com

电话: 010-66343441

收稿日期: 2012-02-06 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

Therapeutic effect and mechanism of Liangxueyuchang Decoction on acute radiation-induced enteritis in a rat model

Han-Fei Wu, Zhi-Pan Hong, Jian-Hua Ding, Ke Zhao

Han-Fei Wu, Zhi-Pan Hong, Licentiate Training Base for Liaoning Medical College, General Hospital of the Second Artillery Corps of Chinese PLA, Beijing 100088, China

Han-Fei Wu, Zhi-Pan Hong, Jian-Hua Ding, Ke Zhao, Department of Colorectal Surgery, General Hospital of the Second Artillery Corps of Chinese PLA; Anorectal Disease Center of Chinese PLA, Beijing 100088, China

Supported by: the Military Medical Research Foundation of Chinese PLA during the “12th Five-Year Plan” Period, No. cws11J032

Correspondence to: Ke Zhao, Professor, Department of Colorectal Surgery, General Hospital of the Second Artillery Corps of Chinese PLA; Anorectal Disease Center of Chinese PLA, 16 Xijiekou Avenue, Beijing 100088, China. wuhanfei234@sohu.com

Received: 2012-02-06 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic effect and mechanism of Liangxueyuchang Decoction on radiation-induced enteritis in a rat model.

METHODS: One hundred and fourteen SD rats were randomly divided into three groups. Group A ($n = 18$) underwent no treatment, while groups B ($n = 48$) and C ($n = 48$) underwent

whole abdominal irradiation at a single dose of 10 Gy and 15 Gy, respectively. After irradiation, groups B and C were further divided into two subgroups. Subgroups B1 and C1 were intragastrically administered with distilled water, while subgroups B2 and C2 were intragastrically administered with Liangxueyuchang Decoction for 7 d from the first day after irradiation. The general condition and defecation in rats of all groups were observed every day. Samples from the jejunum, upper rectum and mesenteric lymph nodes were taken on days 2, 4, and 7 to examine pathological changes and calculate crypt survival rate. The rectum was evaluated microscopically using a scoring system and bacterial translocation was examined.

RESULTS: The general condition and defecation were better in subgroups B2 and C2 than in subgroups B1 and C1, especially on days 5-7. Pathological changes in the intestinal mucosa were milder in subgroups B2 and C2 than in subgroups B1 and C1. Crypt survival rate was improved on days 4 and 7 in subgroups B2 and C2 compared to subgroups B1 and C1 ($F_d = 28.42$, $F_t = 32.58$, both $P < 0.01$). Rectal Hovdenak scores were higher in group C than in groups B and A, but were lower in subgroups B2 and C2 than in subgroups B1 and C1 (day 4: $F = 5.26$, 14.12 ; $P < 0.05$, $P < 0.01$). Bacterial translocation occurred after radiation in all groups, and the rate of bacterial translocation was significantly lower in subgroups B2 and C2 than in subgroups B1 and C1 ($F = 6.48$, 12.24 ; $P < 0.05$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Liangxueyuchang Decoction is effective in managing acute radiation-induced enteritis, and the therapeutic mechanism may be related to accelerating the recovery of injured intestinal mucosal epithelium, reducing bacterial translocation, and maintaining the normal structure and function of intestinal mucosa.

Key Words: Radiation-induced enteritis; Traditional Chinese Medicine; Bacterial translocation; Crypt survival rate

Wu HF, Hong ZP, Ding JH, Zhao K. Therapeutic effect and mechanism of Liangxueyuchang Decoction on acute

■背景资料

由于中医药相对价格低廉、容易在短时间内大量生产、配备使用,符合战时卫生保障需要,本课题组认为,疗效确切、机制明确的中药,在核辐射肠损伤时,具有广阔的应用前景,是军队卫生保障的良好选择之一。

■同行评议者

袁红霞, 研究员, 天津中医药大学

■研发前沿

建立不同剂量照射下核辐射肠损伤动物模型,更符合军队战时实际情况。目前国内、外动物模型,均为模拟平时肿瘤放疗所致的放射性肠炎,剂量适中,仍缺少大剂量、超大剂量动物模型。

radiation-induced enteritis in a rat model. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(13): 1137-1141

摘要

目的: 初步探讨凉血愈肠汤对常规剂量及高剂量放射所致大鼠放射性肠炎模型的治疗作用及其机制。

方法: 随机将114只♂SD大鼠分为3组, A组即正常对照组($n = 18$)、B组即常规剂量照射组($n = 48$)、C组即高剂量照射组($n = 48$), B组、C组以高能X线直线加速器分别给予10 Gy、15 Gy大鼠全腹腔照射。造模成功后, B、C实验组再随机分为2组, B1、C1组为照射后不给药组, 给予蒸馏水灌胃, B2、C2组为照射后给药组, 予喂凉血愈肠汤, 从照射后第1天开始, 各组连续灌胃7 d。每日观察大鼠一般状况和排便情况。各组分别于照射后第2、4、7天取空肠、直肠上段组织及肠系膜淋巴结, 光镜下观察肠壁各层形态学变化并计算单位面积空肠肠腺存活率, 并采用Hovdenak评分系统对直肠量化评分以及测定肠系膜淋巴结细菌移位率。

结果: 照射后给药组一般状况及排便情况较不给药组好, 5-7 d对比明显; 照射后给药组空肠、直肠黏膜基本完整, 炎症较轻, 而照射后不给药组出现黏膜坏死、脱落, 腺体萎缩, 炎症反应重等情况; 给药组在第4、7天均可以不同程度地提高肠腺存活率($F_d = 28.42$, $F_f = 32.58$, $P < 0.01$); 直肠Hovdenak评分中, C组分值高于B组高于A组, 给药组在第4天分值低于不给药组($F = 5.26$, $P < 0.05$; $F = 14.12$, $P < 0.01$); 照射后各组均出现细菌移位, 而给药组在第4天细菌移位率显著低于不给药组($F = 6.48$, $P < 0.05$; $F = 12.24$, $P < 0.01$)。

结论: 凉血愈肠汤对急性放射性肠炎疗效确切, 其疗效与核辐射剂量及用药时间有相关性, 其机制可能与加速急性放射性肠炎受损肠黏膜的修复, 减少细菌移位以及维持肠道黏膜结构和功能的稳定性有关。

关键词: 放射性肠炎; 中药; 细菌移位; 肠腺存活率

武寒飞, 洪智攀, 丁健华, 赵克. 凉血愈肠汤对急性放射性肠炎的治疗及作用机制. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1137-1141

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1137.asp>

0 引言

放射治疗是肿瘤的重要治疗手段之一, 大约

60%-70%的肿瘤患者在病程的不同时期需要接受放射治疗^[1], 而放射性肠炎是盆腔、腹腔或腹膜后恶性肿瘤放射治疗后的常见并发症, 分别累及小肠、结肠和直肠, 可导致绒毛破坏, 黏膜糜烂, 影响食物的消化吸收, 并可导致肠道细菌移位, 严重破坏肠黏膜屏障, 其临床表现主要为腹痛、腹泻、肛门坠痛, 里急后重、黏液血便、便血等症状。国内外文献报道放射性肠炎发生率差异较大, 约5%-20%^[2]。近年来随着肿瘤发病率的不断上升及放疗应用的日益增多, 放射性肠炎的发病率也在逐年增加, 受到国内外医学界的普遍关注。目前西医治疗本病的疗效不够理想, 而中医药作为我国传统医学宝库之一, 在胃肠道疾病的治疗方面具有独特优势, 我们在长期的临床实践中, 针对放射性肠炎总结了凉血愈肠汤, 且已用于治疗急、慢性放射性肠炎多年, 疗效良好, 初步随访结果显示其有效率为87.5%, 但对其机制尚不清楚, 故本实验将建立不同放射剂量所致大鼠放射性肠炎模型, 并分别研究凉血愈肠汤的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁及健康、成熟♂SD大鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司提供)114只, 体质量220-250 g。直线加速器由瑞典Elekta公司生产, 光学显微镜由日本Nikon公司生产, 组织切片机由德国LEICA公司生产。凉血愈肠汤基本配方为: 败酱草、地榆、仙鹤草、龙血竭、黄芩、黄柏、半支莲、黄芪、甘草。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立和分组: 114只大鼠随机分为3组, A组即正常对照组($n = 18$), B组即常规剂量照射组($n = 48$), C组即高剂量照射组($n = 48$)。大鼠禁食12-14 h, 称重后用水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔麻醉后, 以仰卧体位固定在有机玻璃板上, 以高能X线直线加速器给予全腹部照射, 从剑突至耻骨联合, 照射面积 $7 \times 5 \text{ cm}^2$, 其余部位以5 cm厚铅板屏蔽, 源皮距98 cm, 放射剂量率为500 cGy/min。其中B组照射剂量为10 Gy, C组照射剂量为15 Gy。正常对照A组大鼠不予照射。实验组再随机分为2组, 每组24只, B1、C1组照射后给予蒸馏水灌胃, 每天每只1 mL/100 g体质量; B2、C2组照射后给予喂凉血愈肠汤, 每天每只1.0 mL/100 g体质量灌胃, 药物浓度为2.0 g/mL。

1.2.2 观察指标与标本采集: 造模成功后, 每日观察大鼠一般状况, 主要是排便情况、精神状态

及活动度. 实验组分别于照射后第2、4、7天取大鼠8只(均为灌胃后6 h), 同时正常对照组在照射后第2、4、7天取大鼠6只进行实验. 处死前禁食水12 h, 颈椎脱臼处死后在严格无菌状态下取回肠系膜淋巴结2粒, 称重后待做细菌培养以测细菌移位率; 分别在距Treitz韧带远端3-4 cm处取约3 cm长的空肠段和2 cm长的直肠上段做病理切片. 光镜下观察组织形态学改变, 其中空肠计数单位面积的肠腺和绒毛数量, 以计算肠腺存活率, 而直肠采用Hovdenak评分系统进行量化评分.

1.2.3 检测指标: (1)空肠组织形态学观察及定量测定: 将10%甲醛固定好的3 cm空肠乙醇脱水, 浸蜡包埋, HE染色, 光镜下观察其形态学变化, 计数单位面积的肠腺和绒毛数量, 并计算肠腺存活率: 肠腺存活率 = 照射肠片上肠腺绒毛比/正常肠片上肠腺绒毛比 $\times 100\%$ ^[3]; (2)直肠Hovdenak评分: 将10%甲醛固定好的2 cm直肠上段乙醇脱水, 浸蜡包埋, HE染色, 光镜下观察黏膜上皮表面、腺体、固有层结构, 采用Hovdenak评分系统量化评分^[4], 最低分为0分, 最高分为12分, 分值越高, 黏膜病理改变越严重; (3)细菌学检查: 无菌状态下取肠系膜淋巴结2枚, 称重后制成组织匀浆. 取0.4 mL组织匀浆涂布于LB固体培养基上, 37℃孵育24 h, 然后计算菌落数. 每克组织菌落数>100个者为细菌培养阳性. 细菌移位率 = 阳性菌落数/接种平皿数 $\times 100\%$ ^[5].

统计学处理 除细菌移位率外所有数据以mean $\pm$ SD表示, 用SPSS13.0统计软件进行处理, 多个样本均数比较采用完全随机设计资料的方差分析. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组大鼠照射后整体征象观察

2.1.1 排便情况: (1)照射后第1-2天, 均有不同程度腹泻, C组较B组严重; (2)照射后第3-4天, 不给药组腹泻加重, 为血样稀便, 而给药组腹泻有所缓解; (3)照射后第5-7天, C1组为脓血便, C2组为红色稀便或黏液便(与药物颜色有关), 未见血便. B1组腹泻稍有缓解为黄色稀便, B2组接近正常, 多为红黄色软便(与药物颜色有关).

2.1.2 一般状况: (1)照射后第1-2天, C组大鼠蜷缩少动、反应迟钝、毛不光洁, 且有4只大鼠死亡, 其中C1组死亡3只, C2组1只. B组精神及活动度稍差, A组最为活跃; (2)照射后第3-4天, C组明显精神差, 基本不活动, 有弓背扭体现象, 并有5只大鼠死亡, 其中C1组死亡4只, C2组1只. B1组精

表1 照射后第2、4、7 d各组空肠肠腺存活率的变化 (mean $\pm$ SD, %)

分组	n	第2天	第4天	第7天
A	6	99.28 $\pm$ 1.36	99.32 $\pm$ 1.24	99.38 $\pm$ 1.32
B1	8, 8, 7	69.87 $\pm$ 4.82 ^b	52.36 $\pm$ 5.58 ^b	72.53 $\pm$ 4.15 ^b
B2	8	70.32 $\pm$ 5.24 ^b	77.48 $\pm$ 3.86 ^{bd}	86.35 $\pm$ 3.36 ^{bd}
C1	8, 6, 2	38.63 $\pm$ 3.08 ^b	34.26 $\pm$ 3.92 ^b	42.48 $\pm$ 4.14 ^b
C2	8, 8, 6	40.44 $\pm$ 3.74 ^b	48.78 $\pm$ 2.98 ^{bf}	68.26 $\pm$ 3.72 ^{bf}

^b $P < 0.01$ vs A组; ^d $P < 0.01$ vs B1组; ^f $P < 0.01$ vs C1组.

神及活动度差, 毛不光洁, 死亡1只. B2组活动度尚可, 毛色光洁, 接近正常, 无大鼠死亡; (3)照射后第5-7天, C1组大鼠精神极差, 毛竖立且稀疏, 活动极少, 其中1只大鼠出现行走颠簸现象, 死亡1只, C2组精神、活动度较C1组强, 毛色可, 无大鼠死亡. B2组精神较好, 活动状况及毛色基本达正常, 无大鼠死亡. 而正常对照A组动物饮食及排便正常, 体质量逐渐增加, 毛色光洁, 活动如常, 反应机警. 大鼠在4 d内死亡最多, 为10只, 其中C组死亡最多为9只(C1组7只, C2组2只), B1组死亡1只, 4 d后C1组又死亡1只, 共死亡大鼠11只, 以致在照射后第4天C1组取材6只, 第7天B1组取材7只, C1组取材2只, C2组取材6只.

2.2 空肠组织形态学改变 光学显微镜下, 与A组比较, B1、C1组空肠绒毛水肿, 炎性细胞浸润, 部分绒毛上皮细胞脱落及糜烂, 绒毛高度和隐窝深度降低, 肠隐窝内细胞有丝分裂相少见. 其中C1组空肠绒毛最为稀疏, 脱落最为严重, B1组较C1组轻. 而B2、C2组绒毛较完整, 绒毛高度和隐窝深度较大, 隐窝内细胞有丝分裂相多见, 少量炎性细胞浸润. 对比照射后天数来看, 2、4 d情况较差, 7 d较好. 肠腺存活率: 与A组相比, B、C组肠腺存活率均明显降低($F = 31.68$, $P < 0.01$), 2 d时给药组与不给药组均未见明显差别, 4、7 d时给药组显著高于不给药组($F_d = 28.42$, $F_f = 32.58$, $P < 0.01$), 且随着给药时间延长, 肠腺存活率逐渐升高, 但未能回升至正常对照组水平(表1).

2.3 直肠Hovdenak评分 光镜下观察直肠黏膜上皮表面、腺体、固有层结构特征, 由于照射剂量不同及对肠黏膜破坏的严重程度不同呈现分级现象. 根据Hovdenak评分标准, A组为0分; 第2天, C组得分高于B组($F = 11.63$, $P < 0.01$), 而给药组与不给药组未见明显差异; 第4天给药组均低于不给药组, 即B2组低于B1组($F = 14.12$, $P < 0.01$), C2组低于C1组($F = 5.26$, $P < 0.05$); 第7天

■创新盘点

本研究以不同程度核辐射损伤的大鼠模型为基础, 从多层次、多方面研究中药对核辐射肠损伤的治疗作用并探索其作用机制.

同行评价

该论文选题符合临床实际, 科研设计合理, 研究方法得当, 统计数据可信, 结论具有临床指导价值.

表 2 照射后第2、4、7 d各组直肠Hovdenak评分的比较(mean $\pm$ SD)

分组	<i>n</i>	第2天	第4天	第7天
A	6	0.00	0.00	0.00
B1	8, 8, 7	6.25 $\pm$ 0.37	7.28 $\pm$ 0.44	5.93 $\pm$ 0.12
B2	8	6.18 $\pm$ 0.29	5.16 $\pm$ 0.23 ^b	3.11 $\pm$ 0.29 ^b
C1	8, 6, 2	8.87 $\pm$ 0.36	10.23 $\pm$ 0.33	7.21 $\pm$ 0.14
C2	8, 8, 6	8.74 $\pm$ 0.42	8.34 $\pm$ 0.21 ^c	6.91 $\pm$ 0.31

^b*P* < 0.01 vs B1组; ^c*P* < 0.05 vs C1组.

表 3 照射后第2、4、7 d各组肠系膜淋巴结细菌移位率的变化(%)

分组	<i>n</i>	第2天	第4天	第7天
A	6	0.0	0.0	0.0
B1	8, 8, 7	87.5	100.0	71.4
B2	8	75.0	37.5 ^b	25.0 ^b
C1	8, 6, 2	100.0	100.0	66.7
C2	8, 8, 6	87.5	75.0 ^c	66.7

^b*P* < 0.01 vs B1组; ^c*P* < 0.05 vs C1组.

B2组低于B1组($F = 14.12$, $P < 0.01$), 而C2组与C1组差异无统计学意义. 照射后不给药组均在第4天出现最高分值, 各组第7天到达最低分值, 而照射后给药组均随着天数的增加分值逐渐降低(表2).

2.4 肠系膜淋巴结细菌移位率 照射后第2天B、C组均出现细菌移位, 给药组与不给药组比较未有明显差别, 照射后第4天给药组与不给药组比较细菌移位率显著降低, B2组较B1组由100%下降到了37.5%, 差异有统计学意义($F = 12.24$, $P < 0.01$), C2组较C1组由100%下降到了75.0%, 差异有统计学意义($F = 6.48$, $P < 0.05$), 照射后第7天B2组较B1组由71.4%下降到了25.0%, 差异有统计学意义($F = 12.24$, $P < 0.01$), C2组与C1组未见差别(表3).

3 讨论

放射性肠炎的形成是一个复杂的、多因素的过程, 急性放射性肠炎是黏膜隐窝有丝分裂细胞死亡、肠道黏膜屏障破坏及急性炎症的结果. 肠道黏膜上皮是对辐射高度敏感的组织, 电离辐射可以通过杀伤肠道黏膜上皮细胞和隐窝干细胞从而破坏肠道的吸收及屏障功能, 致使绒毛上皮的更新缺乏来源, 进而破坏其结构和功能的完整性, 肠腺干细胞因照射而引起死亡, 当肠腺内干细胞的数目趋于零时, 即可引起该肠腺的死亡, 并随着照射剂量的增加, 肠腺存活率降低^[6]. 在本实验中, 采用高能X射线分10 Gy、15 Gy两种剂量一次性给予大鼠全腹部照射, 大鼠出现不同程度的腹泻及血样便, 光镜下观察发现空、直肠黏膜坏死脱落、腺体萎缩、炎症反应等一系列形态学改变, 制造出可靠的急性放射性肠炎的动物模型^[7].

通过每天对大鼠一般状况的观察及光镜下形态学观察发现: 这些变化一般在照射后3-4 d

最为明显, 5-7 d开始好转, 肠黏膜开始修复, 这与国内外文献报道^[8-10]一致. 肠道上皮组织更新速度快, 平均3-5 d更新1次^[11-13], 即5 d后开始修复, 第7天后基本恢复正常, 所以在照射剂量一定限度内, 肠上皮可经历损伤和修复的变化过程, 由肠腺上皮的未分化细胞增生来补充绒毛的上皮细胞, 以维持绒毛结构和功能的完整性. 在10 Gy组中, 不给药组在4 d内死亡1只大鼠, 总死亡率仅为4.2%(1/24), 给药组无大鼠死亡; 而15 Gy组中, 不给药组总死亡率较高为33.3%(8/24), 给药组总死亡率仅有8.3%(2/24), 除去1只大鼠在4 d后死亡, 其余均在4 d内死亡. 通过死亡率及大鼠一般状况来看, 给药组显示出明显优势, 而且这种优势还包括给药组比不给药组直肠Hovdenak评分低, 空肠肠腺存活率高, 细菌移位率低, 并且这种优势是在照射后第4天即连续服药4 d后开始, 且在第7天达到最大值, 而凉血愈肠汤在服用2 d后对比不给药组并未显示出其应有的疗效. 这可能有两点原因: 第一, 照射后前2 d所致肠损伤并未达到最大值, 通过对大鼠前2 d一般状况的观察, 以及光镜下观察其空、直肠黏膜病理改变及直肠Hovdenak评分、空肠肠腺存活率、细菌移位率的测定均说明前2 d症状较轻; 第二, 用药时间太短达不到其功效, 根据我们临床中使用凉血愈肠汤来看, 短期内服用不会有太大的疗效, 这更加说明中药起效慢需长期服用的特点.

大鼠全腹经照射后会导致肠黏膜机械屏障破坏, 从而引起细菌移位. 细菌移位可成为内源性败血症和多器官功能衰竭等致死性并发症的根源, 降低细菌移位率可降低死亡率^[14], 肠道菌群对于帮助消化、代谢外源性化学物质, 维持肠道上皮的正常更新, 培育肠道免疫系统, 调节生后肠道的发育都有重要作用^[15]. 肠道依靠其机械、免疫屏障及正常的微生态环境, 可有效阻止

肠道细菌移位和内毒素血症. 本实验通过对各组大鼠肠系膜淋巴结细菌移位率的测定发现: 照射后第2天, 照射组均出现细菌移位, 说明照射后短时间内肠黏膜屏障就会被破坏, 且微生态环境也会被破坏, 有害菌过度生长, 有益菌被抑制, 造成菌群失调. 第4天给药组较不给药组细菌移位率低, 第7天10 Gy组中给药组较不给药组显著降低, 说明凉血愈肠汤在维护肠黏膜屏障的稳定和调节肠道内微生态平衡有一定作用.

总之, 本研究结果表明急性放射性肠炎期间, 凉血愈肠汤对常规剂量及高剂量组均有疗效, 尤其是在连续长时间服用该药后疗效显著, 其治疗机制可能与提高肠腺存活率, 减少细菌移位, 维持肠道黏膜结构和功能的稳定性及屏障作用有关. 而对于其更深一步的机制有待于我们下一步从组织学、细胞学、分子水平进行多层次、多方面的探索.

4 参考文献

- 1 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 357
- 2 叶需智. 放射性肠炎临床治疗现状评述. 癌症进展 2010; 8: 49-52
- 3 周元恺, 沈世仁. 小鼠肠腺剂量存活曲线的一种测定方法: 单位面积肠腺计数. 生物化学与生物物理进展 1979; 6: 70-73
- 4 Korkut C, Asoglu O, Aksoy M, Kapran Y, Bilge H, Kiremit-Korkut N, Parlak M. Histopathological comparison of topical therapy modalities for acute radiation proctitis in an experimental rat model. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4879-4883
- 5 王瑜, 张再重, 陈少全, 邹忠东, 涂小煌, 王烈. N-乙酰半胱氨酸对大鼠辐射损伤相关肠屏障功能障碍的防护作用. 中华胃肠外科杂志 2010; 13: 219-222
- 6 Fowler JF, Harari PM, Leborgne F, Leborgne JH. Acute radiation reactions in oral and pharyngeal mucosa: tolerable levels in altered fractionation schedules. *Radiother Oncol* 2003; 69: 161-168
- 7 董光龙, 刘晓玲, 王为忠. 腹部辐射致肠黏膜屏障损伤模型的建立. 中国临床营养杂志 2000; 8: 154-156
- 8 林红, 吴薇, 张焜和, 陈江, 黄德强, 汪泱, 曹勇. 抗大肠杆菌免疫卵黄球蛋白对大鼠放射性肠炎的防护作用. 中华放射医学与防护杂志 2002; 22: 94-96
- 9 毕迎惠, 韩俊庆, 盛巍, 李兆沛, 胡平平, 沈斌. 爱维治对急性放射性肠炎大鼠肠道修复作用的实验研究. 山东大学学报(医学版) 2007; 45: 274-278
- 10 Ersin S, Tuncyurek P, Esassolak M, Alkanat M, Buke C, Yilmaz M, Telefoncu A, Kose T. The prophylactic and therapeutic effects of glutamine- and arginine-enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. *J Surg Res* 2000; 89: 121-125
- 11 Brittan M, Wright NA. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 2004; 53: 899-910
- 12 Marshman E, Booth C, Potten CS. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 2002; 24: 91-98
- 13 张文华, 姚端, 朱思伟, 秦玉坤, 贾培杰. 加味痛泻要方对大鼠急性放射性肠炎肠道损伤的防护作用. 中国医药导刊 2009; 11: 280-282
- 14 Brook I, Ledney GD. Ofloxacin and penicillin G combination therapy in prevention of bacterial translocation and animal mortality after irradiation. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1685-1687
- 15 Weichselbaum RR. Bugging the intestinal response to radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13363-13364

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊.

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法. 定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种. 参加核心期刊评审的学科专家达8200多位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊.

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录. 在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心的感谢! (编辑部主任: 李军亮 2012-03-08).

食管远端鳞状上皮细胞间隙增宽对非糜烂性反流病诊断的价值

陈文科, 周丽雅, 陆京京, 薛艳, 崔荣丽

■背景资料

非糜烂性反流病 (NERD) 患者存在反流相关的症状, 但内镜下食管黏膜无明显的病变, 诊断较为困难, 但至今尚无单一诊断标准。

陈文科, 周丽雅, 陆京京, 薛艳, 崔荣丽, 北京大学第三医院消化科 北京市 100191

陈文科, 博士, 主治医师, 主要从事消化系疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由陈文科与周丽雅设计; 研究过程由陈文科、周丽雅、陆京京、薛艳及崔荣丽完成; 资料整理、分析及论文写作由陈文科完成。

通讯作者: 周丽雅, 教授, 100191, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院消化科. liyazhou@medmail.com.cn

电话: 010-82265126

收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-04-02

接受日期: 2012-04-17 在线出版日期: 2012-05-08

Evaluation of dilation of intercellular spaces of squamous epithelium in the lower esophagus in the diagnosis of non-erosive reflux disease

Wen-Ke Chen, Li-Ya Zhou, Jing-Jing Lu, Yan Xue, Rong-Li Cui

Wen-Ke Chen, Li-Ya Zhou, Jing-Jing Lu, Yan Xue, Rong-Li Cui, Department of Digestive Diseases, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China

Correspondence to: Li-Ya Zhou, Professor, Department of Digestive Diseases, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100191, China. liyazhou@medmail.com.cn

Received: 2012-03-09 Revised: 2012-04-02

Accepted: 2012-04-17 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To evaluate the diagnostic value of dilation of intercellular spaces (DIS) of squamous epithelium in the lower esophagus for non-erosive reflux disease (NERD).

METHODS: Sixty-six NERD patients and thirty-eight healthy volunteers were enrolled. All participants underwent evaluation using the gastro-esophageal reflux disease questionnaire (GerdQ), 24 h esophageal pH monitoring, gastroscopy, and biopsy of mucosa in the lower esophagus at the Z-line and 2 cm above the Z-line for measurement of diameter of intercellular spaces by transmission electron microscopy (TEM). NERD patients with negative pH monitoring results

underwent proton pump inhibitor test to confirm the diagnosis.

RESULTS: The mean diameter of intercellular spaces of squamous epithelium at the Z-line and 2 cm above the Z-line were $(0.90 \pm 0.11) \mu\text{m}$ and $(0.92 \pm 0.16) \mu\text{m}$ in the NERD group, and were $(0.65 \pm 0.08) \mu\text{m}$ and $(0.67 \pm 0.08) \mu\text{m}$ in the control group, without significant differences within the groups (both $P > 0.05$), but with significant differences between the two groups (both $P < 0.05$). No significant differences in the mean diameter of intercellular spaces of squamous epithelium at the Z-line and 2 cm above the Z-line in NERD patients were observed between pH(+) and pH(-) groups and between GerdQ(+) and GerdQ(-) groups. Positive correlations were found between the DeMeester scores and mean intercellular space diameters either at the Z-line ($r = 0.33$, $P = 0.001$) or 2 cm above the Z-line ($r = 0.35$, $P = 0.001$), and between the GerdQ scores and mean intercellular space diameters either at the Z-line ($r = 0.32$, $P = 0.006$) or 2 cm above the Z-line ($r = 0.45$, $P < 0.001$). The best cut-off values for mean intercellular space diameter were both $0.81 \mu\text{m}$ at the Z-line and 2 cm above the Z-line, with a highest Youden index of 0.808 at the Z-line (sensitivity 80.8%, specificity 100%) and $0.731 \mu\text{m}$ 2 cm above the Z-line (sensitivity 78.8%, specificity 97.4%).

CONCLUSION: The diameter of intercellular spaces of squamous epithelium in the lower esophagus of patients with NERD is significantly increased and correlates with acid reflux and reflux symptoms. Dilated intercellular space can serve as a sensitive and objective histopathological indicator for the diagnosis of NERD.

Key Words: Non-erosive reflux disease; Intercellular space; Transmission electron microscopy

Chen WK, Zhou LY, Lu JJ, Xue Y, Cui RL. Evaluation of dilation of intercellular space of squamous epithelium in the lower esophagus in the diagnosis of non-erosive reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1142-1147

■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

摘要

目的: 研究非糜烂性反流病(NERD)食管远端鳞状上皮细胞间隙变化及与食管酸暴露、反流症状严重程度关系, 探讨细胞间隙增宽对NERD诊断的价值。

方法: 纳入NERD患者(66例)和正常对照者(38例)。所有受试者行GerdQ调查、食管24 h pH值监测、胃镜检查并在食管齿状线(Z线)和Z上2 cm线位置取活检, 透射电镜测量鳞状上皮细胞间隙; pH监测阴性NERD患者行质子泵抑制剂诊断试验确诊。

结果: (1)NERD组Z线和Z线上2 cm的平均细胞间隙分别为 $(0.90 \pm 0.11) \mu\text{m}$ 、 $(0.92 \pm 0.16) \mu\text{m}$, 正常对照组分别为 $(0.65 \pm 0.08) \mu\text{m}$ 、 $(0.67 \pm 0.08) \mu\text{m}$, 两组间差异有统计学意义($P < 0.05$), 组内差异无统计学意义($P > 0.05$); (2)NERD患者Z线和Z线上2 cm两部位pH(+)亚组与pH(-)亚组的细胞间隙比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$); GerdQ(+)亚组与GerdQ(-)亚组的细胞间隙比较, 差异也均无统计学意义($P > 0.05$); (3)Z线和Z线上2 cm两部位的平均细胞间隙与DeMeester积分均呈正相关性, r 分别为 $0.33(P = 0.001)$ 、 $0.35(P = 0.001)$; 与GerdQ评分也均呈正相关性, r 分别为 $0.32(P = 0.006)$ 、 $0.45(P < 0.001)$; (4)Z线平均细胞间隙的cut-off值为 $0.81 \mu\text{m}$ 时, 约登指数最大(0.808), 诊断的敏感度为80.8%, 特异度为100.0%。Z线上2 cm平均细胞间隙的cut-off值为 $0.81 \mu\text{m}$ 时, 约登指数最大(0.731), 诊断的敏感度为75.8%, 特异度为97.4%。

结论: NERD食管远端鳞状上皮细胞间隙明显增宽, 细胞间隙与食管远端胃酸暴露和反流症状的严重程度呈正相关。细胞间隙增宽可作为NERD诊断的一种敏感客观结构指标。

关键词: 非糜烂性反流病; 细胞间隙; 透射电镜

陈文科, 周丽雅, 陆京京, 薛艳, 崔荣丽. 食管远端鳞状上皮细胞间隙增宽对非糜烂性反流病诊断的价值. 世界华人消化杂志 2012; 20(13): 1142-1147

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1142.asp>

0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是消化系统的一种常见病^[1,2], 临床上分为反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)、非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)及Barrett食管(Barrett's esophagus, BE)^[3]。NERD是

GERD的主要类型, 约占GERD的70%^[4,5], 临床诊断相对困难。有研究表明, NERD患者食管黏膜常规内镜下没有明显的病变, 但存在超微结构的改变, 其中以细胞间隙增宽(dilated intercellular space, DIS)最为明显^[6]。这为NERD的诊断提供了新思路^[7], 但高质量深入研究少见。已报道的研究大多样本量较小, 说服力不高。我们先前的研究结果显示^[8,9], GERD患者食管鳞状上皮细胞间隙明显增宽。本实验在前期的基础上对NERD进行深入研究, 探讨食管远端鳞状上皮细胞间隙变化及与食管酸暴露、反流症状严重程度关系, 进一步了解细胞间隙增宽对NERD诊断的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 2010-10/2011-07因反酸、烧心等反流症状到北京大学第三医院消化科就诊并诊断为NERD的患者, 年龄18-75岁。NERD诊断标准: 具有反酸、烧心等反流症状, 胃镜检查食管未见异常病变, 24 h pH监测阳性和/或质子泵抑制剂(PPI)试验阳性。无反流症状、胃镜检查食管未见异常病变及食管24 h pH监测阴性的健康志愿者作为正常对照。排除标准: 消化性溃疡、上消化道手术史、各种恶性肿瘤、糖尿病、硬皮病、妊娠及哺乳期妇女, 严重心、肺、肝、肾功能障碍者, 入选前2 wk内服用过抑酸药物者, 入选前1 wk服用过乙酰基水杨酸/非甾体抗炎药者, 凝血功能障碍者。本研究经北京大学第三医院伦理委员会批准, 所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 分组: (1)正常对照组: 34例, 男性9例, 女性29例, 男:女 = 1:3.2, 年龄 34.7 ± 11.2 岁; (2)NERD组: 66例, 男性21例, 女性45例, 男:女 = 1:2.1, 年龄 48.0 ± 14.0 岁。根据食管24 h pH监测结果分为pH(+)亚组和pH(-)亚组, 根据胃食管反流病问卷(GerdQ)评分结果分为GerdQ(+)亚组和GerdQ(-)亚组。

1.2.2 胃食管反流病问卷(GerdQ)调查^[10]: 受试者回忆过去1 wk内各个症状发生的频率, 其中包含4个反流相关症状的问题, 即阳性问题; 2个反流负相关问题, 即阴性问题。对症状的频度进行分级评分, 将评分总和即得出GerdQ评分。总范围为0-18分, 总分 ≥ 8 分提示GERD诊断, 定为阳性, < 8 分定为阴性。

1.2.3 胃镜检查及食管黏膜活检: 受试者行常规

■ 研究前沿

目前诊断NERD的常用方法有症状评分、胃镜检查、食管24 h pH值监测、PPI试验等, 但至今尚无单一诊断标准, 多采用上述几种方法的联合诊断。

■相关报道

研究表明,NERD患者食管黏膜常规内镜下没有破损表现,但存在细胞间隙的增宽,有学者提出食管上皮细胞间隙增宽可作为诊断NERD的客观结构指标,为NERD的诊断提供了新思路。

表 1 GerdQ评分和DeMeester积分情况

分组	n	GerdQ评分	DeMeester积分
对照组	38	5.8 ± 1.0	4.87 ± 3.25
NERD组	66	8.4 ± 2.2	18.42 ± 20.82
t值		8.291	5.177
P值		<0.001	<0.001

胃镜检查,并在食管远端齿状线(Z线)和Z线上方2 cm处各取一块黏膜组织。组织取出后迅速置于3%戊二醛-1%锇酸双固定,4℃冰箱保存,用于电镜切片的制作和细胞间隙的测量。

1.2.4 食管24 h pH监测: 检查前2 wk停用影响胃酸和胃肠动力的药物。食管pH<4的时间百分比≥4%和(或)DeMeester积分>14.72分为食管酸暴露异常,定为阳性,反之定为阴性。

1.2.5 质子泵抑制剂(PPI)试验: NERD患者服用埃索美拉唑20 mg/次,2次/d,治疗1-2 wk。反流症状明显缓解或消失者定为PPI试验阳性。

1.2.6 电镜测量: 标本送北京大学医学部分析中心电镜室,经固定、漂洗、脱水和包埋处理后制成超薄切片(50 nm),醋酸铀-柠檬酸铅染色。切片用JEOL JEM-1230透射电子显微镜放大6 000倍,采用Gatan Digital Micrograph软件于每例标本随机拍摄照片10张。采用IPP 5.0图像分析系统测量细胞间隙宽度。每张照片随机选取10个区域,以横切线测算其细胞间隙。每例研究对象可测得10组,共100个细胞间隙的数值,计算100个数值的平均数即为该研究对象的平均细胞间隙。每例研究对象10张照片中测得的最大细胞间隙的平均数值为最大细胞间隙,最小细胞间隙的平均数值为最小细胞间隙。Z线位置标本因部分病例取材过小或切片未见鳞状上皮,有14例无法进行有效测量。

统计学处理 采用SPSS11.0统计学软件进行分析。数据以mean±SD表示,采用独立样本t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。采用Pearson积差相关系数判断两组数据之间的相关性。以受试者工作特征曲线(ROC)来判断截断(cut-off)值。

2 结果

2.1 GerdQ评分和食管24 h pH值监测 NERD组GerdQ评分和DeMeester积分均明显高于对照组,差异有显著性。NERD组GerdQ评分≥8分患者43例,<8分患者23例,对照组GerdQ评分≥8分者2例,<8分患者36例。GerdQ评分诊断NERD的敏感度为65.2%,特异度为94.7%。食管24 h pH监测

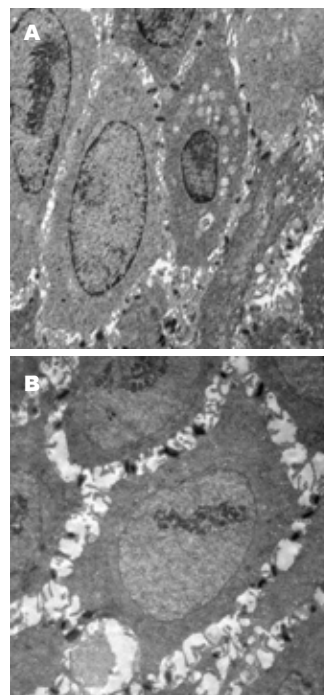


图 1 透射电镜下细胞间隙醋酸铀-柠檬酸铅染色(×6 000)。A: 正常对照者; B: NERD患者。

NERD组阳性34例,阴性32例,对照组阳性0例,阴性38例。食管24 h pH监测诊断NERD的敏感度为51.5%,特异度为100%(表1)。

2.2 食管鳞状上皮细胞间隙测量 电镜测量结果见图1。NERD组Z线上2 cm和Z线的平均细胞间隙、最大细胞间隙、最小细胞间隙均大于对照组(表2),差异有显著性($P<0.05$)。不同部位(Z线上2 cm与Z线)的平均细胞间隙、最大细胞间隙、最小细胞间隙在NERD组和对照组内均未见统计学差异(表3, $P>0.05$)。Z线上2 cm和Z线的平均细胞间隙、最大细胞间隙、最小细胞间隙均呈正相关,相关系数分别为0.55 ($P<0.001$)、0.47($P<0.001$)、0.42($P<0.001$)。

2.3 NERD患者各亚组食管鳞状上皮细胞间隙的比较 Z线上2 cm和Z线2个部位的平均细胞间隙、最大细胞间隙、最小细胞间隙均不受pH值结果和GerdQ评分的影响(表4, 5, $P>0.05$)。

2.4 细胞间隙与食管酸暴露、反流症状之间的关系 食管Z线、Z线上2 cm位置平均细胞间隙与DeMeester积分的相关系数分别为0.35($P=0.001$)、0.33($P=0.001$),与GerdQ评分的相关系数分别为0.45($P<0.001$)、0.32($P=0.006$),均呈正相关性。

2.5 细胞间隙cut-off值及诊断的敏感度、特异度 根据ROC曲线(图2),食管Z线平均细胞间隙的AUC为0.970, cut-off值为0.81 μm时,约登指数最大(0.808),诊断敏感度为80.8%,特异度为100.0%;食管Z线上2 cm平均细胞间隙的AUC

表 2 食管不同部位鳞状上皮细胞间隙 (μm)

分组	<i>n</i>	平均细胞间隙	最大细胞间隙	最小细胞间隙
Z线上2 cm				
对照组	38	0.67 ± 0.08	0.85 ± 0.13	0.51 ± 0.72
NERD组	66	0.92 ± 0.16	1.15 ± 0.22	0.71 ± 0.12
<i>t</i> 值		10.383	8.773	10.843
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001
Z线				
对照组	38	0.65 ± 0.08	0.81 ± 0.10	0.50 ± 0.07
NERD组	52	0.90 ± 0.11	1.13 ± 0.18	0.70 ± 0.11
<i>t</i> 值		12.271	10.549	10.584
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

表 3 不同组别食管鳞状上皮细胞间隙 (μm)

分组	<i>n</i>	平均细胞间隙	最大细胞间隙	最小细胞间隙
NERD组				
Z线上2 cm	66	0.92 ± 0.16	1.15 ± 0.22	0.71 ± 0.12
Z线	52	0.90 ± 0.11	1.13 ± 0.18	0.70 ± 0.11
<i>t</i> 值		0.620	0.539	0.720
<i>P</i> 值		0.536	0.591	0.473
对照组				
Z线上2 cm	38	0.67 ± 0.08	0.85 ± 0.13	0.51 ± 0.72
Z线	38	0.65 ± 0.08	0.81 ± 0.10	0.50 ± 0.07
<i>t</i> 值		0.977	1.262	0.131
<i>P</i> 值		0.332	0.211	0.896

表 4 NERD患者pH监测阳性/阴性食管鳞状上皮细胞间隙 (μm)

分组	<i>n</i>	平均细胞间隙	最大细胞间隙	最小细胞间隙
Z线上2 cm				
pH(+)	34	0.95 ± 0.18	1.19 ± 0.25	0.74 ± 0.13
pH(-)	32	0.89 ± 0.14	1.11 ± 0.19	0.69 ± 0.11
<i>t</i> 值		-1.407	-1.510	-1.619
<i>P</i> 值		0.164	0.136	0.110
Z线				
pH(+)	30	0.89 ± 0.11	1.10 ± 0.19	0.67 ± 0.12
pH(-)	22	0.93 ± 0.10	1.17 ± 0.17	0.72 ± 0.08
<i>t</i> 值		1.261	1.410	1.590
<i>P</i> 值		0.216	0.165	0.118

为0.941, cut-off值为0.81 μm时, 约登指数最大(0.731), 诊断敏感度为75.8%, 特异度为97.4%.

3 讨论

NERD患者存在反流相关的症状, 但内镜下食管黏膜无破损表现, 与其他内镜下有明显病变的GERD(RE和BE)相比, 诊断较为困难. 目前诊断NERD的常用方法有症状评分、胃镜检查、食

管24 h pH值监测、PPI试验等, 但至今尚无单一诊断标准, 多采用上述几种方法的联合诊断. 研究表明, 至少2/3的NERD患者显微镜下观察存在食管黏膜的微小病变, 包括细胞间隙增宽、乳头延长、基底细胞层增厚及炎症细胞浸润等, 以细胞间隙增宽最为明显. 近年来, 有学者用透射电镜对GERD患者食管鳞状上皮细胞间隙的超微结构进行了研究, 发现GERD患者细胞间隙较对

■创新盘点
本实验在前期研究的基础上重点对NERD深入研究, 扩大了NERD和正常对照的样本量, 增加了对较少研究的Z线位置细胞间隙的测量, 并与目前GERD诊断中常用的胃食管反流病问卷调查、食管24 h pH值监测方法比较, 进一步探讨食管远端鳞状上皮细胞间隙的变化对NERD诊断的价值.

■同行评价

本文具有较高的科学意义,对临床具有很好的指导作用。

表 5 NERD患者GerdQ评分阳性/阴性食管鳞状上皮细胞间隙(μm)

分组	<i>n</i>	平均细胞间隙	最大细胞间隙	最小细胞间隙
Z线上2 cm				
GerdQ(+)	23	0.90 ± 0.14	1.13 ± 0.20	0.70 ± 0.11
GerdQ(-)	43	0.96 ± 0.19	1.12 ± 0.25	0.73 ± 0.14
<i>t</i> 值		1.324	1.206	0.791
<i>P</i> 值		0.190	0.232	0.432
Z线				
GerdQ(+)	32	0.91 ± 0.10	1.15 ± 0.17	0.72 ± 0.08
GerdQ(-)	20	0.89 ± 0.12	1.10 ± 0.21	0.67 ± 0.13
<i>t</i> 值		-0.865	-0.960	-1.810
<i>P</i> 值		0.391	0.342	0.076

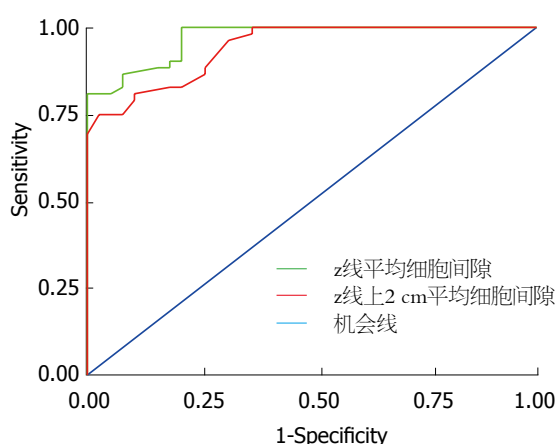


图 2 食管远端鳞状上皮平均细胞间隙的ROC曲线。

对照组增宽,经PPI治疗后随着反流症状的改善细胞间隙亦减小或恢复正常^[6,11,12],提出食管上皮细胞间隙增宽可作为诊断NERD的客观结构指标。但高质量的研究少见,大部分临床研究所纳入的NERD患者和正常对照者样本量较小,各研究数据差异也较大,研究结果可信度有限。究其原因,可能与透射电镜检查设备昂贵,操作复杂,开展机构较少和研究费用较高有关。我们和北京大学医学部分析中心电镜室紧密合作,对GERD患者食管鳞状上皮细胞间隙的变化进行了一系列研究,积累了丰富的经验。本实验在前期研究的基础上重点对NERD深入研究,扩大了NERD和正常对照的样本量,增加了对较少研究的Z线位置细胞间隙的测量,并与目前GERD诊断中常用的胃食管反流病问卷调查、食管24 h pH值监测方法比较,进一步探讨食管远端鳞状上皮细胞间隙的变化对NERD诊断的价值。

本研究显示,NERD患者无论是在Z线还是Z线上2 cm位置,鳞状上皮细胞平均细胞间隙、最大细胞间隙、最小细胞间隙均较正常对照明显

增宽,与国内外研究及我们前期的研究一致。但细胞间隙的数值存在一定差异,本研究NERD组的平均细胞间隙约为 $0.90 \mu\text{m}$,正常对照组约为 $0.65 \mu\text{m}$ 。本研究在病例选择时采取目前公认的诊断标准(临床症状+胃镜检查+24 h pH值监测和/或PPI试验),严格规范取材部位,在经验丰富的北京大学医学部分析中心电镜室进行电镜切片的制备和图像采集,在测量细胞间隙时严格规范测量步骤,因此研究结果可信度更高。

胃食管反流病的发生与酸暴露密切相关,食管远端鳞状上皮细胞间隙增宽是否与酸的病理性反流有关呢?本研究通过食管24 h pH值监测发现,食管Z线和Z线上2 cm位置平均细胞间隙与DeMeester积分均呈正相关,提示食管远端上皮细胞间隙增宽与胃酸的病理性反流密切相关,但细胞间隙增宽的程度在NERD患者pH(+)亚组与pH(-)亚组之间无明显差异,与Caviglia等的报道一致^[11,13]。在本研究中,我们尚探讨了食管上皮细胞间隙与反流症状的关系,发现Z线和Z线上2 cm位置平均细胞间隙与GerdQ评分均呈正相关,但细胞间隙增宽的程度在NERD患者GerdQ(+)亚组与GerdQ(-)亚组之间无明显差异。其机制可能是:酸的异常暴露引起食管上皮细胞间隙增宽,细胞间隙增宽后通透性增加,胃酸、胃蛋白酶、胆汁等损害因子进入上皮细胞并对其造成进一步损伤,同时刺激神经末梢,产生烧心等反流症状。本研究中食管24 h pH值监测显示,只有大约50%的NERD患者存在食管远端病理性酸反流。既往的报道也提示约50%患者酸反流在正常生理范围内,但其反流事件与症状相关。提示生理性酸反流通过增宽的细胞间隙,足以刺激神经末梢在这些患者产生烧心等反流症状,生理性酸反流的NERD患者病情的严

重程度可能更多的是与内脏高敏感性有关^[14,15]。

既然食管鳞状远端上皮细胞间隙的增宽与胃酸反流密切相关, Z线位置酸反流较Z线以上位置更明显, 会不会导致Z线处鳞状上皮细胞间隙增宽较Z线以上位置更明显呢? 既往各研究在选择取材位置时部位不一, 多数在Z线上方2-5 cm不等, 其中选择较多的是Z线上2 cm, Z线位置鲜有研究。我们的研究表明, Z线和Z线上2 cm位置鳞状上皮细胞间隙在NERD组和正常对照组均无明显差异, 且呈正相关性。考虑到胃镜检查活检时Z线位置较难对准, 所取组织部分黏膜为柱状上皮, 鳞状上皮较少, 电镜切片取材时较为困难, 而Z线和Z线上2 cm细胞间隙增宽无明显差异, 在以后的研究中建议在Z线上2 cm处活检较为简便。

有学者对食管鳞状上皮细胞间隙增宽诊断GERD进行了研究报道^[7,16,17], 细胞间隙增宽诊断NERD的敏感度约70%, 特异度可达100%; 但平均细胞间隙正常与异常的分界值各研究报道不一, 从0.74-2.40 μm 不等。我们的研究显示, 食管Z线和Z线上2 cm的平均细胞间隙cut-off值均为0.81 μm 。诊断的敏感度和特异度均较高, Z线的诊断敏感度为80.8%, 特异度为100.0%, Z线上2 cm的诊断敏感度为75.8%、特异度为97.4%。本研究中GerdQ评分诊断NERD的敏感度为65.2%, 特异度为94.7%, pH监测诊断NERD的敏感度为51.5%, 特异度为100%。与目前临床上常用的胃食管反流病问卷调查、食管24 h pH值监测方法相比, 食管鳞状上皮细胞间隙增宽具有更高的敏感度, 特异度也很好, 提示食管鳞状上皮细胞间隙可作为诊断NERD的客观结构指标, 这对诊断较为困难的NERD患者具有重要意义。

总之, NERD患者远端食管鳞状上皮细胞间隙较正常对照者明显增宽, 与食管远端酸暴露严重程度、反流症状严重程度呈正相关。细胞间隙增宽可作为NERD诊断的一种敏感客观结构指标。

4 参考文献

- 1 Locke GR, Talley NJ, Fett SL, Zinsmeister AR, Melton LJ. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* 1997; 112: 1448-1456
- 2 Chen M, Xiong L, Chen H, Xu A, He L, Hu P. Prevalence, risk factors and impact of gastroesophageal reflux disease symptoms: a population-based

- study in South China. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 759-767
- 3 DeVault KR, Castell DO. Updated guidelines for the diagnosis and treatment of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 190-200
- 4 Martinez SD, Malagon IB, Garewal HS, Cui H, Fass R. Non-erosive reflux disease (NERD)--acid reflux and symptom patterns. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 537-545
- 5 Goh KL. Changing epidemiology of gastroesophageal reflux disease in the Asian-Pacific region: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19 Suppl 3: S22-S25
- 6 Kahrilas PJ. Dilated intercellular spaces: extending the reach of the endoscope. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 549-550
- 7 Tobey NA, Carson JL, Alkiek RA, Orlando RC. Dilated intercellular spaces: a morphological feature of acid reflux--damaged human esophageal epithelium. *Gastroenterology* 1996; 111: 1200-1205
- 8 薛艳, 周丽雅, 林三仁, 黄永辉. 胃食管反流病患者食管下段鳞状上皮细胞间隙的改变. *中华消化杂志* 2006; 26: 797-800
- 9 薛艳, 周丽雅, 林三仁. 奥美拉唑治疗前后糜烂性食管炎患者食管鳞状上皮细胞间隙的变化. *中华内科杂志* 2007; 46: 93-95
- 10 Jones R, Junghard O, Dent J, Vakil N, Halling K, Wernersson B, Lind T. Development of the GerdQ, a tool for the diagnosis and management of gastroesophageal reflux disease in primary care. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30: 1030-1038
- 11 Calabrese C, Bortolotti M, Fabbri A, Areni A, Cenacchi G, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Reversibility of GERD ultrastructural alterations and relief of symptoms after omeprazole treatment. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 537-542
- 12 陶金, 肖英莲, 陈旻湖, 彭穗, 林金坤, 熊理守, 胡品津. 埃索美拉唑治疗前后胃食管反流病食管黏膜上皮细胞间隙的变化. *中华医学杂志* 2007; 87: 392-395
- 13 Caviglia R, Ribolsi M, Maggiano N, Gabbriellini AM, Emerenziani S, Guarino MP, Carotti S, Habib FI, Rabitti C, Cicala M. Dilated intercellular spaces of esophageal epithelium in nonerosive reflux disease patients with physiological esophageal acid exposure. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 543-548
- 14 Fass R. Epidemiology and pathophysiology of symptomatic gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: S2-S7
- 15 徐晓蓉, 邹多武, 李兆申, 许国铭, 杨敏, 叶萍, 陆建萍. 非糜烂性反流病患者食管感觉特征分析. *中华消化杂志* 2005; 25: 707-709
- 16 Ravelli AM, Villanacci V, Ruzzenenti N, Grigolato P, Tobanelli P, Klersy C, Rindi G. Dilated intercellular spaces: a major morphological feature of esophagitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 510-515
- 17 Calabrese C, Fabbri A, Bortolotti M, Cenacchi G, Areni A, Scialpi C, Miglioli M, Di Febo G. Dilated intercellular spaces as a marker of oesophageal damage: comparative results in gastro-oesophageal reflux disease with or without bile reflux. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 525-532

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

乙肝后肝硬化合并肝性脑病的影响因素

张 鸣, 段志军

■背景资料

我国是乙型肝炎的高流行区, 其中25%以上的携带者将发展为慢性肝炎, 而肝性脑病(HE)又是肝硬化最危险的并发症, 死亡率高。目前肝性脑病发病机制仍未完全明了, 且缺乏特效治疗。

张鸣, 段志军, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011

张鸣, 西安医学院第二附属医院消化内科 陕西省西安市 710038

张鸣, 住院医师, 主要从事慢性肝纤维化的相关研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30970886

大连市科技计划基金资助项目, No. 2008E13SF193

作者贡献分布: 本文由段志军设计及修改; 张鸣收集资料并完成论文写作。

通讯作者: 段志军, 教授, 主任医师, 博士生导师, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学附属第一医院消化内科。cathydoctor@yahoo.com

电话: 0411-83635963-7132

收稿日期: 2012-02-02 修回日期: 2012-03-14

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

Retrospective analysis of factors influencing the development and progression of hepatic encephalopathy in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis

Ming Zhang, Zhi-Jun Duan

Ming Zhang, Zhi-Jun Duan, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Ming Zhang, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30970886; and the Science and Technology Project of Dalian, No. 2008E13SF193

Correspondence to: Zhi-Jun Duan, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. cathydoctor@yahoo.com

Received: 2012-02-02 Revised: 2012-03-14

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To investigate the factors influencing the development and progression of hepatic encephalopathy (HE) in patients with hepatitis B virus (HBV)-related cirrhosis (HBCE).

METHODS: The clinical data for 78 patients with HBCE and 52 patients with HBV-related cirrhosis without HE (HBCNE) treated at the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University from March 2002 to May 2011 were retrospectively analyzed. Factors analyzed include gen-

der, age, precipitating factors, ascites, esophageal-gastric varices (EGV), splenomegaly, grade of HE, Child-Pugh grade, blood ammonia (NH₄), serum sodium (Na), serum cholinesterase (CHE), serum total bilirubin (TBil), serum albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Cr), and prothrombin time (PT).

RESULTS: Infection was the most common precipitating factor to induce HE in patients with HBV-related cirrhosis (35.6%). Grade II HE was most common (36.8%), followed by grade IV HE (25.3%). Child-Pugh grade, ascites, NH₄, Na, CHE, TBil, ALB, BUN, and PT were significantly different between the HBCE and HBCNE groups (0 : 8 : 79 vs 0 : 21 : 31, 19 : 68 vs 36 : 16, 20.74 ± 70.44 vs 46.53 ± 10.67, 136.01 ± 6.65 vs 141.48 ± 3.34, 1927.34 ± 70.52 vs 3342.01 ± 38.03, 91.75 ± 84.56 vs 58.98 ± 14.46, 25.53 ± 3.84 vs 29.48 ± 2.58, 13.57 ± 14.76 vs 6.41 ± 1.57, 21.34 ± 7.12 vs 18.59 ± 1.66; all *P* < 0.05). The level of NH₄ in patients with grade IV HE was significantly higher than those in patients with grade I, II or III HE (156.91 ± 62.94 vs 104.13 ± 73.07, 112.69 ± 60.87, 104.67 ± 82.00; all *P* < 0.05). Compared to patients with grade I HE, the levels of Na in patients with grade II, III or IV HE significantly decreased (135.22 ± 6.05, 134.91 ± 7.79, 134.55 ± 6.25 vs 139.73 ± 5.15; all *P* < 0.05), and CHE declined in patients with grade IV HE (1605.19 ± 76.01 vs 2325.46 ± 71.31, *P* < 0.05). The level of BUN in patients with grade IV HE was higher than those in patients with grade I or II HE (21.65 ± 23.69 vs 6.53 ± 3.41, 10.62 ± 7.37; both *P* < 0.05).

CONCLUSION: Preventing and controlling infection could decrease the incidence of HE in patients with HBV-related cirrhosis. High levels of NH₄, TBil and BUN, low levels of Na, CHE and ALB, Child-Pugh grade C, ascites, and prolonged PT could increase the incidence of HBCE. High levels of NH₄ and BUN, and low levels of Na and CHE are associated with more severe HE.

Key Words: Hepatitis B cirrhosis; Hepatic encephalopathy; Precipitating factors; Blood ammonia

Zhang M, Duan ZJ. Retrospective analysis of factors influencing the development and progression of hepatic

■同行评议者

吴君, 主任医师, 贵阳医学院附属医院感染科

encephalopathy in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1148-1155

摘要

目的: 探讨影响乙肝后肝硬化合并肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)发生、发展的相关因素, 为预防HE发生及改善预后提供依据。

方法: 回顾性分析2002-03/2011-05在大连医科大学附属第一医院收治的乙肝后肝硬化合并HE患者共87例。同时选取同期住院的乙肝后肝硬化未合并HE患者52例作为对照。分别统计入院时的临床表现, 根据West Haven标准和Child-Pugh分级进行HE分期和肝功能分级, 记录入院后各生化指标的第一次结果, 包括血氨、血钠、血清胆碱酯酶、血清总胆红素、血清白蛋白、血尿素氮、血清肌酐、凝血酶原时间。对以上资料进行对比分析研究, 寻找影响乙肝后肝硬化HE发生、发展的相关因素。

结果: 因HE入院患者中, 感染位居HE诱因首位(35.6%); HEⅡ期所占比例最高(36.8%), IV期居第2位(25.3%)。合并HE组与未合并HE组比较肝功能分级、腹水、血氨、血钠、血清胆碱酯酶、血清总胆红素、血清白蛋白、血尿素氮、凝血酶原时间均有统计学差异($0:8:79$ vs $0:21:31$, $19:68$ vs $36:16$, 20.74 ± 70.44 vs 46.53 ± 10.67 , 136.01 ± 6.65 vs 141.48 ± 3.34 , 1927.34 ± 70.52 vs 3342.01 ± 38.03 , 91.75 ± 84.56 vs 58.98 ± 14.46 , 25.53 ± 3.84 vs 29.48 ± 2.58 , 13.57 ± 14.76 vs 6.41 ± 1.57 , 21.34 ± 7.12 vs 18.59 ± 1.66 ; both $P < 0.05$)。肝功能程度与HE分期无关, 合并HE患者血氨水平在IV期较其他各期显著升高(156.91 ± 62.94 vs 104.13 ± 73.07 , 112.69 ± 60.87 , 104.67 ± 82.00 ; both $P < 0.05$)。血钠水平在Ⅱ期、Ⅲ期、IV期较Ⅰ期显著降低(135.22 ± 6.05 , 134.91 ± 7.79 , 134.55 ± 6.25 vs 139.73 ± 5.15 ; both $P < 0.05$)。血清胆碱酯酶水平在IV期较Ⅰ期显著降低(1605.19 ± 76.01 vs 2325.46 ± 71.31 , $P < 0.05$)。血尿素氮水平在IV期较Ⅰ期、Ⅱ期显著升高(21.65 ± 23.69 vs 6.53 ± 3.41 , 10.62 ± 7.37 ; both $P < 0.05$)。

结论: 在因HE入院患者中, 感染居乙肝后肝硬化发生HE诱因的首位。肝功能C级、合并腹水、高血氨、高血清总胆红素、高血尿素氮、低血钠、低血清胆碱酯酶、低血清白蛋白和凝血酶原时间延长可增加HE的发生率。高血氨、高血尿素氮、低血钠和低血清胆碱酯酶可加重HE的程度, 并影响预后。

关键词: 乙肝后肝硬化; 肝性脑病; 诱因; 血氨

张鸣, 段志军. 乙肝后肝硬化合并肝性脑病的影响因素. *世界华人消化杂志* 2012; 20(13): 1148-1155
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1148.asp>

0 引言

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)是以严重肝脏疾病和/或门体分流所致的代谢紊乱为基础, 并排除了其他已知脑病的中枢神经系统功能失调综合征。目前世界消化病协会(World Congress of Gastroenterology, WCOG)制定了维也纳分类, 按肝脏功能失调或障碍的性质将HE分为3种主要类型^[1]: A型, 急性肝功能衰竭相关HE; B型, 严重的门体分流相关HE; C型, 肝硬化和门脉高压和/或门体分流相关HE, 是最常见的类型, 按临床症状又分为轻微型HE和症状型HE。

在我国, 大多数HE为C型。C型HE大部分是由各种肝硬化引起, 其中以肝炎后肝硬化最常见。乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的感染是全球范围内最常见的一种感染性疾病^[2]。而我国又是乙型肝炎的高流行区, 全国HBV携带率为9.7%, 其中25%以上的携带者将发展为慢性肝炎^[3]。而慢性乙型肝炎患者发展为肝硬化的年发生率估计为2.1%^[4]。由于HE发病机制尚未完全明确, 且缺乏特效治疗, 故HE预后差, 死亡率高。目前国外主要针对A型、B型HE和酒精性肝硬化引起的HE进行动物实验和临床研究, 国内学者则对肝炎后肝硬化HE诊治研究较多, 而针对乙肝后肝硬化HE发生、发展影响因素的临床研究未见报道。本文对上述影响因素进行分析及研究, 找出与HE发生、发展密切相关的因素, 以便今后可以及时对这些因素进行监测或干预, 减少HE的发生或给予早期防治, 以提高患者的生活质量、延长生存期及改善预后。

1 材料和方法

1.1 材料 选择大连医科大学附属第一医院2002-03/2011-05住院的87例以乙肝后肝硬化合并HE患者为主要诊断病例, 同时选取同期住院的乙肝后肝硬化未合并HE患者52例作为对照。根据下述诊断标准及排除标准入选。肝炎后肝硬化诊断标准符合2000-09西安第10次全国病毒性肝炎学术会议修订的诊断标准^[5]。HE诊断标准符合第11次世界消化病会议制定的诊断标准^[1]。根据Child-Pugh分级^[6]进行肝功能分级。根据West Haven标准^[1]进行HE分期。排除标准: 排除曾接受

■研究前沿

目前HE治愈后容易反复, 尚无确切彻底的治疗方法。本研究旨在寻求与HE发生、发展密切相关的因素, 有针对性的进行监测或干预, 减少HE的发生或给予早期防治, 以提高患者的生活质量、延长生存期及改善预后。

■应用要点

把对影响乙肝后肝硬化HE发生、发展的相关因素应用于指导临床,将对肝性脑病的防治起到非常重要的作用。

腹部手术(上消化道硬化术、脾切除、肝硬化门腔静脉断流术及分流术等)及人工肝支持系统治疗患者;排除酒精性肝硬化以及其他原因引起的肝硬化患者;排除肝癌患者;排除心、肺、肾等重要脏器严重疾病患者;排除尿毒症、低血糖、糖尿病昏迷等代谢性脑病患者及排除酒精中毒、镇静安眠药、铅、锰、汞等引起的中毒性脑病患者;排除脑血管疾病、颅内肿瘤、颅内感染等颅脑疾病患者;排除癫痫、精神病患者及其他原因所致的昏迷或精神行为异常者。

1.2 方法

1.2.1 一般情况: 记录87例乙肝后肝硬化合并HE患者和52例乙肝后肝硬化未合并HE患者的性别、年龄、生化指标、病程资料进行对比分析。分析乙肝后肝硬化合并HE诱因和分期的构成。

1.2.2 对比乙肝后肝硬化合并HE与未合并HE患者的临床特征、生化指标: 临床特征包括性别、年龄、肝功能分级、腹水、食管胃底静脉曲张、脾大情况,生化指标包括血氨、血钠、血清胆碱酯酶、血清总胆红素、血清白蛋白、血尿素氮、血清肌酐、凝血酶原时间。所有资料均来自于患者入院时全面系统的病史采集、规范的体格检查及实验检查数据和胃镜、彩超、CT及核磁共振结果。

1.2.3 对比乙肝后肝硬化合并HE患者不同分期的临床特征、生化指标: 临床特征包括HE诱因、肝功能分级、腹水、食管胃底静脉曲张、脾大情况,生化指标包括血氨、血钠、血清胆碱酯酶、血清总胆红素、血清白蛋白、血尿素氮、血清肌酐、凝血酶原时间。

1.2.4 对比乙肝后肝硬化合并HE患者不同临床特征的血氨水平: 包括不同诱因、肝功能分级、有无腹水、食管胃底静脉曲张、脾大。

统计学处理 采用SPSS11.5软件进行数据统计分析,定量数据统计用 $\text{mean} \pm \text{SD}$,两组间比较采用 t 检验,3组以上组间比较方差齐时采用单因素方差分析,方差不齐时用秩和检验,统计构成比用百分数,定性数据比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 分析乙肝后肝硬化合并HE诱因和分期的构成 因乙肝后肝硬化合并HE入院患者中,HE最常见的诱因是感染(35.6%),其次是上消化道出血(16.1%)和高蛋白饮食(16.1%)。入院患者中HE II期所占比例最高(36.8%),IV期居第2位(25.3%),

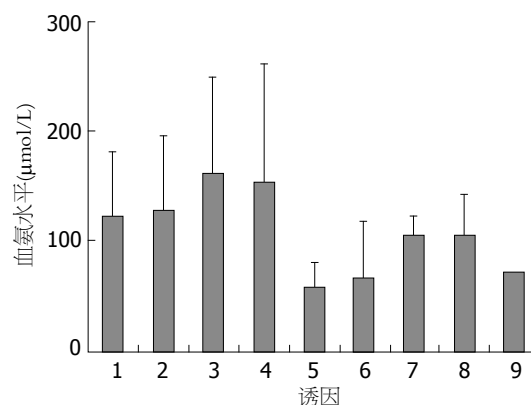


图1 乙肝后肝硬化合并HE不同诱因的血氨水平比较。1: 感染; 2: 上消化道出血; 3: 高蛋白饮食; 4: 电解质紊乱; 5: 肾功能不全; 6: 便秘; 7: 医源性因素; 8: 不明原因; 9: 劳累。 $P = 0.135$, 无统计学意义。

其次分别为III期(20.7%)和I期(17.2%)。

2.2 对比乙肝后肝硬化合并HE与未合并HE患者的临床特征、生化指标 两组肝功能分级、腹水体征有差异;血氨、血清总胆红素、血尿素氮水平显著升高,血钠、血清胆碱酯酶、血清白蛋白水平显著降低,凝血酶原时间显著延长,均有统计学差异($P < 0.05$);而性别、年龄、食管胃底静脉曲张、脾大、血清肌酐水平在两组之间均无统计学差异(表1)。

2.3 对比乙肝后肝硬化合并HE患者不同分期的临床特征、生化指标 IV期与其他各期比较,血氨水平显著升高;其他各期与I期比较,血钠水平显著降低;IV期与I期比较,血清胆碱酯酶水平显著降低;IV期与I期、II期比较,血尿素氮水平显著升高,均有统计学差异($P < 0.05$)。而不同分期之间诱因、肝功能分级、门脉高压表现(腹水、食管胃底静脉曲张和脾大)、血清总胆红素水平、血清白蛋白水平、血清肌酐水平、凝血酶原时间比较均无统计学差异(表2, 3)。

2.4 对比乙肝后肝硬化合并HE患者不同临床特征的血氨水平 不同诱因、肝功能分级、有无腹水、食管胃底静脉曲张、脾大的血氨水平比较均无统计学差异(图1-3)。

3 讨论

本研究结果显示感染、上消化道出血、高蛋白饮食、电解质紊乱、肾功能不全、便秘、医源性因素(大量利尿放腹水、使用镇静药物等)、劳累等诸多因素都可以诱发HE。其中,因HE入院的乙肝后肝硬化患者中,感染位居诱因首位,占有诱因的35.6%,远远高于上消化道出血和高蛋白饮食。结果与某些报道^[7-9]一致。与此不

表 1 乙肝后肝硬化合并HE与未合并HE患者临床特征和生化指标比较

■名词解释

肝性脑病: 一种以严重肝脏疾病或门体分流所致的代谢紊乱为基础, 并排除了其他已知脑病的中枢神经系统功能失调综合征。

	合并HE(<i>n</i> = 87)	未合并HE(<i>n</i> = 52)	<i>P</i> 值
性别			0.688
男	63(72.4%)	36(69.2%)	
女	24(27.6%)	16(30.8%)	
年龄(岁)	60.01 ± 11.99	67.23 ± 10.32	0.187
<45	8(9.2%)	8(15.4%)	
45-54	18(20.7%)	17(32.7%)	
55-64	31(35.6%)	15(28.8%)	
≥65	30(34.5%)	12(23.1%)	
肝功能分级			0.000
A	0(0.0%)	0(0.0%)	
B	8(9.2%)	21(40.4%)	
C	79(90.8%)	31(59.6%)	
门脉高压表现			
腹水	68(78.2%)	16(30.8%)	0.000
食管胃底静脉曲张	52(59.8%)	32(61.5%)	0.837
脾大	63(72.4%)	40(76.9%)	0.557
生化指标			
血氨(μmol/L)	120.74 ± 70.44	46.53 ± 10.67	0.000
血钠(mmol/L)	136.01 ± 6.65	141.48 ± 3.34	0.000
血清胆碱酯酶(U/L)	1927.34 ± 70.52	3342.01 ± 38.03	0.000
血清总胆红素(μmol/L)	91.75 ± 84.56	58.98 ± 14.46	0.003
血清白蛋白(g/L)	25.53 ± 3.84	29.48 ± 2.58	0.001
血尿素氮(mmol/L)	13.57 ± 14.76	6.41 ± 1.57	0.000
血清肌酐(μmol/L)	110.77 ± 87.07	98.55 ± 14.68	0.225
凝血酶原时间(s)	21.34 ± 7.12	18.59 ± 1.66	0.029

表 2 不同HE分期的临床特征比较*n*(%)

	I 期(<i>n</i> = 15)	II 期(<i>n</i> = 32)	III 期(<i>n</i> = 18)	IV 期(<i>n</i> = 22)	<i>P</i> 值
诱因					0.628
感染	4(26.7)	12(37.5)	7(38.9)	8(36.4)	
上消化道出血	1(6.7)	6(18.8)	1(5.6)	6(27.3)	
高蛋白饮食	3(20.0)	4(12.5)	3(16.7)	4(18.2)	
电解质紊乱	1(6.7)	2(6.3)	1(5.6)	2(9.1)	
肾功能不全	0(0.0)	1(3.1)	3(16.7)	0(0.0)	
便秘	1(6.7)	2(6.3)	1(5.6)	0(0.0)	
医源性因素	2(13.3)	1(3.1)	1(5.6)	0(0.0)	
不明原因	3(20.0)	3(9.4)	1(5.6)	2(9.1)	
劳累	0(0.0)	1(3.1)	0(0.0)	0(0.0)	
肝功能分级					0.060
A	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	
B	4(26.7)	3(9.4)	1(5.6)	0(0.0)	
C	11(73.3)	29(90.6)	17(94.4)	22(100.0)	
门脉高压表现					
腹水	10(66.7)	25(78.1)	13(72.2)	20(90.9)	0.305
食管胃底静脉曲张	10(66.7)	21(65.6)	9(50.0)	12(54.5)	0.633
脾大	11(73.3)	24(75.0)	13(72.2)	15(68.2)	0.958

同, 国内的有些文献报道上消化道出血是HE的最常见诱因^[10]. 存在这种不同的原因可能在于肝硬化病因学选择的差异, 还可能与病例的选择(部分上消化道出血患者住院期间发生HE不列

■ 同行评价

本研究旨在寻求与HE发生、发展密切相关的因素,结果有一定的临床指导意义。

表 3 不同HE分期的生化指标比较

生化指标	I 期 (n = 15)	II 期 (n = 32)	III 期 (n = 18)	IV 期 (n = 22)
血氨(μmol/L)	104.13 ± 73.07	112.69 ± 60.87	104.67 ± 82.00	156.91 ± 62.94 ^a
血钠(mmol/L)	139.73 ± 5.15 ^c	135.22 ± 6.05	134.91 ± 7.79	134.55 ± 6.25
胆碱酯酶(U/L)	2325.46 ± 71.31	1981.91 ± 70.12	1799.70 ± 52.54	1605.19 ± 76.01 ^e
总胆红素(μmol/L)	66.93 ± 45.68	91.11 ± 87.16	92.41 ± 74.16	111.89 ± 96.85
白蛋白(g/L)	26.21 ± 3.82	25.47 ± 3.84	25.33 ± 5.15	25.24 ± 2.75
尿素氮(mmol/L)	6.53 ± 3.41	10.62 ± 7.37	14.69 ± 12.65	21.65 ± 23.69 ^d
肌酐(μmol/L)	70.43 ± 18.04	94.68 ± 49.88	129.90 ± 75.08	147.56 ± 94.48
凝血酶原时间(s)	17.79 ± 2.17	22.49 ± 9.15	23.74 ± 9.28	21.19 ± 4.73

^aP<0.05 vs IV期; ^cP<0.05 vs I期; ^eP<0.05, IV vs I期; ^dP<0.05, IV vs I期, II期。

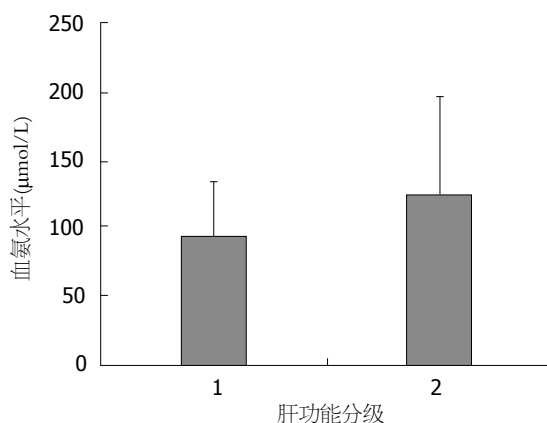


图 2 乙肝后肝硬化合并HE不同肝功能分级的血氨水平比较。1: 肝功能B级; 2: 肝功能C级。P = 0.295, 无统计学意义。

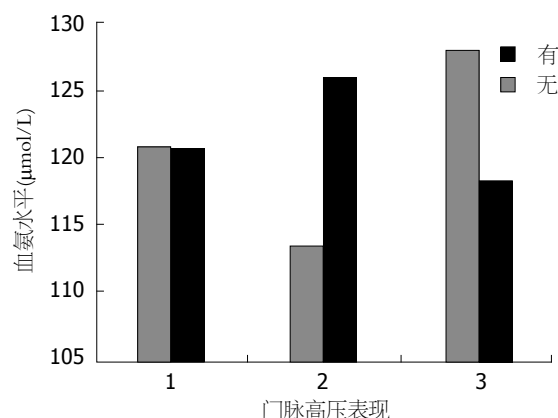


图 3 乙肝后肝硬化合并HE有无门脉高压表现的氨水平比较。1: 腹水; 2: 食管胃底静脉曲张; 3: 脾大。分别P = 0.994, 0.429, 0.542, 均无统计学意义。

入我们的入选标准)、患者所在的地区及对于上消化道出血和感染的诊出率不同有关。肝硬化患者由于脾功能亢进, 导致粒细胞减少, 机体免疫能力差, 加之肝脏对体内的细菌、毒素的清除能力降低, 容易并发感染。古希腊学者认为感染是大脑功能的重要调节因素^[11]。炎症因子影响脑细胞和血脑屏障功能, 引起细胞内新陈代谢异常, 导致脑细胞死亡和脑损伤^[12]。最近的研究表明, 感染与氨毒性有协同作用。氨不只是对星形细胞产生毒性作用, 而且还诱导中性粒细胞功能障碍释放活性氧, 促进了全身炎症反应, 可能进一步加剧氨毒性和减少中性粒细胞抗炎作用, 产生恶性循环^[13]。另外, 已证实炎症前细胞因子如肿瘤坏死因子-α和白介素在肝衰竭患者的肝脏、大脑中高度表达, 炎症前细胞因子能和氨在引起感染和肝细胞坏死方面起到协同作用, 改变细胞与细胞间的信号传导, 引起兴奋性过度的表现^[14]。近期有学者提出星形细胞能够介导炎症疾病发生, 最终诱导HE^[15]。因此, 乙肝后肝硬化患者应积极预防和控制感染, 可能降低HE

的发生率。

根据West Haven标准, 本研究显示乙肝后肝硬化合并HE的入院患者中II期居多。考虑HE已引起乙肝后肝硬化患者及其家属的重视, 能够较早发现, 及时入院治疗, 大大降低了HE的死亡率, 明显改善预后。近几年又提出轻微型HE, 即无明显HE的临床表现和生化异常, 用精细的智力测验和/或电生理检测可发现异常^[1]。但轻微型HE缺乏明显的临床症状, 极易被忽视, 甚至患者本身也不能察觉^[16]。国内学者已经证实轻微型HE降低了我国慢性肝病患者的生活质量^[17]。但目前我国对轻微型HE重视不够, 对肝硬化患者未能做到全面的检测, 降低了早期HE的诊出率。临床上大部分HE患者都是出现神经精神症状后入院, 延误了最佳的治疗时机。因此, 对肝硬化患者应完善智力测验及电生理检测, 并加强对患者及其家属HE相关知识的宣传, 以便更早的发现轻微型HE, 做到早治疗, 提高HE的好转率。

乙肝后肝硬化合并HE组与未合并HE组比较结果显示肝功能分级(Child-Pugh分级)、腹

水、血氨、血钠、血清胆碱酯酶、血清总胆红素、血清白蛋白、血尿素氮和凝血酶原时间有统计学差异。Child-Pugh分级能很好的预测肝细胞损害程度^[18],是迄今为止较为科学并在临床上被普遍使用的肝功能评估方法。他在各种肝病患者的病情评估、治疗效果评价、预后判断及慢性肝病患者的生活质量评估等方面均显示了重要的指导价值^[19,20],也是对肝硬化及其各种并发症病情转归的独立判断预后因素^[21,22]。本研究显示Child-Pugh分级与HE的发生密切相关,C级患者更易发生HE,结果与国外报道^[23]一致。一项前瞻性研究也发现肝功能从A级发展至C级的肝硬化患者5年内并发HE的概率明显增高^[24]。而轻微型HE到症状型HE的发展过程中Child-Pugh分数也明显增加^[25]。本结果发现除了HE分期外Child-Pugh分级中的评分指标(腹水、血清总胆红素、血清白蛋白和凝血酶原时间)作为独立因素均与HE的发生有密切关系。有学者建立了肝硬化HE发生的预测模型,其中包括血清总胆红素和凝血酶原时间^[26]。这些指标对HE发生的影响与Child-Pugh分级一致,同时也证明这些指标对肝细胞损害程度的评估具有一定的科学性。

肝硬化腹水发生率约为50%,是肝硬化患者最常见的并发症^[27,28]。腹水是多种因素综合作用的结果。门脉高压是主要原因,钠潴留增加,导致细胞外液增多,可滞留在腹腔内形成腹水。低钠血症也与腹水形成和持续存在有关。虽然目前钠潴留的发病机制尚不明确,但抗利尿激素分泌增加已证实是主要的低钠血症致病因子。血钠过低能够导致星形细胞水肿,引发多种蛋白质和RNA的修改,影响大脑功能,其中也影响到了下丘脑结构的改变,从而出现了HE症状^[29]。Shaikh等^[30]回顾性分析表明肝硬化患者血钠水平低于130 mmol/L时与正常水平比较,顽固性腹水和HE的发生率显著升高。很多研究^[31,32]也证实了这种观点。另外,有研究发现低血钠水平是乙肝后肝硬化患者发生腹水的独立危险因素^[33]。在乙肝后肝硬化合并HE患者不同分期的比较中显示随HE程度加重血钠水平逐渐降低,具有统计学差异,本结果与国外报道^[34]一致。目前已经证实肝硬化患者HE分期越高,预后越差^[35]。因此,血钠水平与HE发生、预后密切相关。综上所述,乙肝后肝硬化腹水患者应严格限水,但不宜盲目的限盐,在应用强利尿剂的同时,要注意监测血钠水平,严重时不仅需饮食补钠,还要静脉补钠。积极处理低钠血症对预防HE的发生、改

善预后是非常必要的。

血氨是HE发生的最重要因素,氨中毒学说多年来仍占中心地位^[36]。血清胆碱酯酶是一种肝脏合成后释放到血液中的非特异性酯酶。血清胆碱酯酶活性降低的程度与肝病严重程度密切相关。因此,其活性能较好地反映肝脏的合成功能^[37]。肝肾综合征时肾脏血管收缩,肾小球滤过率减少^[28]。而血尿素氮水平能粗略反映肾小球滤过功能,但其也受饮食、蛋白质分解、脱水等因素的影响。因此临床上常与血清肌酐配合来评价肾功能。但乙肝后肝硬化合并HE组与未合并HE组比较血清肌酐并无统计学差异,考虑肝硬化未合并HE患者入院时肝硬化已发展至失代偿期,部分患者已经伴有不同程度的肾功能不全。乙肝后肝硬化合并HE组与未合并HE组比较以及合并HE患者不同分期的比较结果说明高血氨、低血清胆碱酯酶和高血尿素氮水平不仅与乙肝后肝硬化HE的发生有关,而且与HE的预后密切相关。进一步支持了氨中毒学说,而Mathurin等^[38]研究也表明肝硬化患者肾功能不全时血钠、血清胆碱酯酶水平降低,血尿素氮水平升高,HE危险系数增加。国内学者的临床研究证实肝硬化患者的血氨水平在发生肝肾综合征时明显升高,并且与血尿素氮、血清肌酐水平呈正相关,进一步说明肝肾综合征在HE的发展中起重要作用^[39]。虽然本研究中绝大部分的HE患者血氨水平高于正常范围,但在不同诱因、肝功能分级、有无门脉高压表现之间血氨水平比较却无统计学差异。说明血氨并不被某一单一因素影响而显著升高,而是多种毒素诱发HE的联络点。且高氨血症绝不是唯一的因素,多种毒素都能与之相互协同,相互依赖,互为因果,导致代谢毒性物质产生增多、比例失衡,他们的协同毒性可能在HE的发病机制中有重要作用。因此,应深入研究HE的发病机制,了解他们的相互作用,发现阻断途径和靶点,指导临床治疗。

总之,在因HE入院患者中,感染居乙肝后肝硬化发生HE诱因的首位。肝功能C级、合并腹水、高血氨、高血清总胆红素、高血尿素氮、低血钠、低血清胆碱酯酶、低血清白蛋白和凝血酶原时间延长可增加HE的发生率。高血氨、高血尿素氮、低血钠和低血清胆碱酯酶可加重HE的程度,并影响预后。本研究致力于寻找乙肝后肝硬化HE患者发生、发展的影响因素,在临床工作中能够更好的进行监测和干预,降低HE的发生率和改善预后。但本研究作为回顾性分

析,对一些可疑因素如血脂指标、C反应蛋白等因素没有完整的数据资料未能进行监测与分析,对患者病情发展无法做到随访观察.因此,今后可进一步对乙肝后肝硬化患者进行前瞻性研究,以便更全面的研究乙肝后肝硬化患者HE的发生与发展,指导预防和治疗.

4 参考文献

- 1 Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002; 35: 716-721
- 2 Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol* 2000; 61: 362-366
- 3 Mast EE, Alter MJ, Margolis HS. Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine* 1999; 17: 1730-1733
- 4 Liaw YF, Tai DI, Chu CM, Chen TJ. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology* 1988; 8: 493-496
- 5 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001; 19: 56-62
- 6 Forman LM, Lucey MR. Predicting the prognosis of chronic liver disease: an evolution from child to MELD. Mayo End-stage Liver Disease. *Hepatology* 2001; 33: 473-475
- 7 Rohra DK, Jaipal AA, Mahmood K, Ahuja KL. Precipitating factors of hepatic encephalopathy in patients with chronic liver disease at Civil Hospital Karachi. *J Coll Physicians Surg Pak* 2008; 18: 130-131
- 8 Devrajani BR, Shah SZ, Devrajani T, Kumar D. Precipitating factors of hepatic encephalopathy at a tertiary care hospital Jamshoro, Hyderabad. *J Pak Med Assoc* 2009; 59: 683-686
- 9 Benhaddouch Z, Abidi K, Naoufel M, Abouqal R, Zeggwagh AA. [Mortality and prognostic factors of the cirrhotic patients with hepatic encephalopathy admitted to medical intensive care unit]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2007; 26: 490-495
- 10 吴雄健, 舒建昌. 86例肝性脑病患者诱因与预后关系分析. 中国医师进修杂志 2006; 29: 61-62
- 11 Shawcross DL, Olde Damink SW, Butterworth RF, Jalan R. Ammonia and hepatic encephalopathy: the more things change, the more they remain the same. *Metab Brain Dis* 2005; 20: 169-179
- 12 Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med* 2009; 37: S331-S336
- 13 Shawcross DL, Shabbir SS, Taylor NJ, Hughes RD. Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2010; 51: 1062-1069
- 14 Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: The concept of synergism. *Hepatol Res* 2008; 38: S116-S121
- 15 Arias JL, Aller MA, Sánchez-Patan F, Arias J. The inflammatory bases of hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1297-1310
- 16 Dhiman RK, Chawla YK. Minimal hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol* 2009; 28: 5-16
- 17 Bo ZJ, Qiu DK, Ma X, Zhang GS, Fan ZP, Huang YQ, Yu XF, Zeng MD. [Assessment of the health-related quality of life of patients with minimal hepatic encephalopathy]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2007; 15: 412-416
- 18 Omagari K, Ohba K, Kadokawa Y, Hazama H, Masuda J, Kinoshita H, Matsuo I, Ohnita K, Mizuta Y, Hayashida K, Kohno S. Comparison of the grade evaluated by "Liver damage" of Liver Cancer Study Group of Japan and Child-Pugh classification in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2006; 34: 266-272
- 19 Häuser W, Holtmann G, Grandt D. Determinants of health-related quality of life in patients with chronic liver diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 157-163
- 20 Hillaire S, Voitot H. [Cirrhosis]. *Pathol Biol (Paris)* 1999; 47: 895-902
- 21 Fernández-Esparrach G, Sánchez-Fueyo A, Ginès P, Uriz J, Quintó L, Ventura PJ, Cárdenas A, Guevara M, Sort P, Jiménez W, Bataller R, Arroyo V, Rodés J. A prognostic model for predicting survival in cirrhosis with ascites. *J Hepatol* 2001; 34: 46-52
- 22 Magliocchetti N, Torchio P, Corrao G, Aricò S, Favilli S. Prognostic factors for long-term survival in cirrhotic patients after the first episode of liver decompensation. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997; 29: 38-46
- 23 Romero-Gómez M, Boza F, García-Valdecasas MS, García E, Aguilar-Reina J. Subclinical hepatic encephalopathy predicts the development of overt hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2718-2723
- 24 Kim DU, Park GT, Koh DH, Cho HS, Kim YH, Shim SG, Kim JB, Lee SH, Choi HS, Hahm JS, Lee MH. [Five-year follow-up of clinical and laboratory data of early liver cirrhosis patients confirmed by liver biopsy]. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002; 8: 256-263
- 25 Hartmann JJ, Groeneweg M, Quero JC, Beijman SJ, de Man RA, Hop WC, Schalm SW. The prognostic significance of subclinical hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2029-2034
- 26 Takikawa Y, Endo R, Suzuki K, Tsubouchi H. Early prediction of short-term development of hepatic encephalopathy in patients with acute liver disease unrelated to paracetamol. A prospective study in Japan. *J Hepatol* 2009; 51: 1021-1029
- 27 Jang JW. Current status of liver diseases in Korea: liver cirrhosis. *Korean J Hepatol* 2009; 15 Suppl 6: S40-S49
- 28 Ackermann D. [Treatment of ascites, hyponatremia and hepatorenal syndrome in liver cirrhosis]. *Ther Umsch* 2009; 66: 747-751
- 29 Häussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 2008; 57: 1156-1165
- 30 Shaikh S, Mal G, Khalid S, Baloch GH, Akbar Y. Frequency of hyponatraemia and its influence on liver cirrhosis-related complications. *J Pak Med Assoc* 2010; 60: 116-120
- 31 Kim JH, Lee JS, Lee SH, Bae WK, Kim NH, Kim KA, Moon YS. The association between the serum sodium level and the severity of complications in liver cirrhosis. *Korean J Intern Med* 2009; 24: 106-112
- 32 Angeli P, Wong F, Watson H, Ginès P. Hyponatremia in cirrhosis: Results of a patient population survey. *Hepatology* 2006; 44: 1535-1542
- 33 Kim SU, Han KH, Nam CM, Park JY, Kim do Y, Chon CY, Ahn SH. Natural history of hepatitis B vi-

- rus-related cirrhotic patients hospitalized to control ascites. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1722-1727
- 34 Jenq CC, Tsai MH, Tian YC, Chang MY, Lin CY, Lien JM, Chen YC, Fang JT, Chen PC, Yang CW. Serum sodium predicts prognosis in critically ill cirrhotic patients. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 220-226
- 35 Bustamante J, Rimola A, Ventura PJ, Navasa M, Cirera I, Reggiardo V, Rodés J. Prognostic significance of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1999; 30: 890-895
- 36 Albrecht J, Jones EA. Hepatic encephalopathy: molecular mechanisms underlying the clinical syndrome. *J Neurol Sci* 1999; 170: 138-146
- 37 邓绪乐, 邹正升. 血清胆碱酯酶与病毒性肝炎肝组织病变的关系. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 120
- 38 Mathurin S, Jaimet C, Turletti C, Arosio A, González G, Kuzmich G. [Renal failure in patients with cirrhosis and ascites: incidence, etiology and predictive factors]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2008; 38: 116-125
- 39 He Y, Li GX, Xia Y. [Analysis of the relationship between hepatorenal syndrome and plasma ammonia]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2010; 18: 45-48

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ(密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), φ(体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max}, C_{max}, Vd, T_{1/2} CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

消化系统疾病患者检验性失血量调查218例

张蕴秀, 尚静, 王培昌

■背景资料

检验性失血等因素易导致重症患者出现贫血, 增加患者病死率和医疗费用, 并影响预后, 该问题在临床客观存在但尚未引起应有重视, 国内相关文献较少。

张蕴秀, 尚静, 王培昌, 首都医科大学宣武医院检验科 北京市 100053

张蕴秀, 主管检验师, 主要从事生物化学和分子生物学检验的研究。作者贡献分布: 本课题由张蕴秀与王培昌设计; 数据收集和分析由张蕴秀与尚静完成; 写作由张蕴秀完成, 王培昌指导。

通讯作者: 王培昌, 教授, 博士生导师, 100053, 北京市, 首都医科大学宣武医院检验科。peichangwang@yahoo.com

收稿日期: 2012-02-17 修回日期: 2012-03-25

接受日期: 2012-04-17 在线出版日期: 2012-05-08

Blood loss from tests in patients with gastrointestinal diseases: An analysis of 218 cases

Yun-Xiu Zhang, Jing Shang, Pei-Chang Wang

Yun-Xiu Zhang, Jing Shang, Pei-Chang Wang, Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China

Correspondence to: Pei-Chang Wang, Professor, Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China. peichangwang@yahoo.com
Received: 2012-02-17 Revised: 2012-03-25

Accepted: 2012-04-17 Published online: 2012-05-08

Abstract

AIM: To investigate the reasons for blood loss from tests in patients with gastrointestinal diseases and to explore countermeasures against such condition.

METHODS: Data were obtained from hospital LIS, including hospital stay, total blood loss, average daily blood loss, blood loss ratio between different tests, average volume collected for blood gas analysis.

RESULTS: The average daily blood loss in our patients was 7.63 mL. The average daily blood loss was 8.57 mL in the blood culture group and 5.58 mL in the non-blood culture group, with a significant difference between the two groups.

CONCLUSION: Attention should be paid to blood loss in patients undergoing a blood culture test. Improvement of the functions of LIS, standard operation, and reasonable use of ordinary syringe for blood collection could help reduce blood loss from tests.

■同行评议者

李振华, 教授, 中国中医科学院西苑医院消化科

Key Words: Blood loss from tests; Blood culture; Blood gas analysis

Zhang YX, Shang J, Wang PC. Blood loss from tests in patients with gastrointestinal diseases: An analysis of 218 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1156-1159

摘要

目的: 调查消化系统疾病患者的检验性失血量, 从临床检验学的角度分析失血原因, 寻找对策。

方法: 从医院LIS系统调取患者资料, 回顾性调查2011-01/09住院消化系统疾病患者218例的检验性失血量, 统计住院日、总失血量、日均失血量、各检验项目的失血比例、血气分析的平均采血量等数据。

结果: 消化系统疾病患者平均日失血量为7.63 mL, 血培养组日均失血量为8.57 mL, 非血培养组为5.58 mL, 两者差异显著, 有统计学意义($P < 0.01$)。

结论: 应重视有血培养检验患者的检验性失血问题, 完善LIS系统功能、正确规范操作、合理使用普通注射器采血等措施有助于减少检验性失血。

关键词: 检验性失血; 血培养; 血气分析

张蕴秀, 尚静, 王培昌. 消化系统疾病患者检验性失血量调查218例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(13): 1156-1159
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1156.asp>

0 引言

1992年, Gleason等^[1]提出诊断性失血是指实验室检查、心导管检查和介入放射诊疗引起的血液丢失。诊断性失血、患者手术后失血和红细胞生成障碍等因素易导致重症患者出现贫血, 进而影响心血管、呼吸系统和代谢系统的功能。此外, 贫血后输血治疗不仅增加患者的经济负担, 而且易产生输血后并发症^[2,3]。检验性失血是指在疾病的诊断和治疗过程中, 由于实验室检验造成的血液丢失。国内调查检验性失血量的

表 1 消化系统疾病患者的检验失血量

■创新盘点
本文有针对性的调查了消化系统疾病患者的检验失血量和失血原因, 从临床检验学的角度提出了切实可行的血液保护措施。

分组	住院日(d)	日均失血量(mL)	总失血量(mL)	占总血量的百分比(%)
所有患者				
平均数	25.83	7.63	192.69	4.82
中位数	23.00	6.47	139.50	3.49
四分位数	14.00–37.50	4.86–9.49	80.00–245.75	2.00–6.14
最大值	72.00	38.09	789.50	19.74
血培养组				
平均数	28.49	8.57	234.68	5.87
中位数	26.00	7.71	179.50	4.49
四分位数	16.00–40.00	5.40–10.71	93.00–324.00	2.33–8.10
最大值	72.00	38.09	789.50	19.74
非血培养组				
平均数	19.97	5.58	100.06	2.50
中位数	16.00	5.02	79.75	1.99
四分位数	11.75–29.00	4.36–6.32	61.75–112.13	1.54–2.80
最大值	51.00	13.50	265.50	6.64

成人总血容量按4 000 mL计算。

文章较少, 调查的病例数大多为65-140例^[4-6], 对消化系统疾病患者的检验性失血量研究更是未见报道。本文对首都医科大学宣武医院2011-01/09住院的消化系统疾病患者218例的检验性失血量进行回顾性调查, 从临床检验学的角度分析消化系统疾病患者的失血原因, 寻找对策。

1 材料和方法

1.1 材料 所有患者资料均来自我院实验室信息系统(LIS), 用综合查询的方法调取我院普外科ICU、急诊科ICU及消化科ICU的消化系统住院患者的资料。选取2011-01/09住院时间大于5 d的患者数据。共调查218例患者的资料, 其中男110例、女108例, 年龄28-75岁, 平均53.5岁, 218例住院患者中胃食管反流24例、食管癌15例、胃炎34例、胃癌21例、肠结核10例、大肠癌14例、炎症性肠病18例、慢性腹泻19例、肝硬化20例、肝癌6例、胰腺炎(胰腺癌)22例、胃肠道出血6例、其他9例, 住院时间6-72 d、平均25.83 d。将所有患者分为血培养组和非血培养组, 血培养组患者(150例)在住院期间至少做过一次血培养, 非血培养组患者(68例)在住院期间未做过血培养。两组患者一般资料比较无统计学差异, 具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 检验性失血量计算: 检验性失血量等于LIS系统中记载的各种化验项目的次数乘以标准采血量的累积和。分别记录血液常规检验、生化

检验、血气分析、凝血检测、血培养、免疫检验和其他检验项目的采血次数和失血量。

1.2.2 检验性失血的原因分析: (1)不合格标本的百分比: 根据2011-01/09检验科各专业组血液标本的工作量和各专业组标本拒收登记本中血液标本拒收记录来计算; (2)检验项目未正确合并的百分比: 在1.2.1的资料收集过程中, 记录未正确合并的检验申请数量, 除以总的检验申请数量即为百分比; (3)血气分析采血量的评估: 记录2011-06/09患者血气分析的实际采血量(mL), 计算平均值。

统计学处理 采用SPSS19.0统计学软件进行数据分析。用平均值、中位数、四分位数、最大值进行统计描述, 采用秩和检验进行组间比较。

2 结果

2.1 检验失血量 消化系统疾病患者检验用血量较大, 平均日失血量为7.63 mL, 血培养组日均失血量为8.57 mL, 非血培养组为5.58 mL, 两者差异显著, 有统计学意义($P<0.01$, 表1)。

2.2 检验性失血的分类 在各检验专业组中, 生化检验失血量最大(31.2%), 第2位的是血培养(23%), 第3位的是血常规(13.6%), 之后是血气分析(8.8%)、凝血检验(8.2%)、免疫检验(8.2%)、其他检验(6.9%)(表2)。

2.3 检验性失血的原因分析 不合格标本的百分比为0.14%; 检验项目未正确合并的百分比

■应用要点

通过规范标本采集方法,完善LIS功能,加强临床路径等血液保护制度相关规定的实施,减少患者不必要的检验性失血和经济负担。

表 2 检验性失血的分类

	总失血量	血液常规	生化检验	血气分析	凝血检测	免疫检验	血培养	其他检验
平均数	192.69	26.28	60.02	16.95	15.88	15.89	44.31	13.36
占总失血量的百分比(%)	100.00	13.60	31.20	8.80	8.20	8.20	23.00	6.9
中位数	139.50	20.00	43.00	7.50	9.00	8.00	20.00	12
四分位数	80-245.75	12-34	28-76.5	3-22.5	6-19.5	4-20.0	0-55	4-16
最大值	789.5	100	222	97.5	96	84	320	84

为0.45%;血气分析实际采血量的平均值是1.53 mL(0.5-2.7 mL),中位数是1.47 mL。

3 讨论

多项研究表明,危重症患者用于实验室检验的平均日失血量在10.9-55.5 mL^[4-11]。本研究的消化系疾病患者每日平均检验失血量是7.63 mL,明显少于平均水平^[4-11]。我院使用的是Vacuette真空采血管,生化、免疫检验常用采血管的采血量为4 mL,血常规为2 mL,血凝检验、血氨、急查钾钠为3 mL,血沉为1.5 mL,而BD血培养瓶每瓶需要血液10 mL。因此将患者分为血培养组和非血培养组,血培养组日均失血量为8.57 mL,非血培养组为5.58 mL,两者差异显著,与研究报道相符。此外,为了提高血培养诊断的敏感性,微生物专家建议,不明原因发热的患者应从不同部位分别取血2-3次,如双侧肘静脉,每个部位采需氧瓶和厌氧瓶各一个,共计4-6瓶(需要40-60 mL血液)。因此,临床医生应该高度重视有血培养检查患者的检验性失血问题。

目前,减少检验性失血的保护措施有以下几方面:(1)尽量采用无创监测技术替代有创性采血,如使用经皮脉搏氧饱和度监测仪,而不采用动脉血气分析;(2)在动静脉导管中安装密闭式带有储血器的采血系统,减少动静脉导管采血的浪费^[12];(3)小容量采血试管和微量标本床旁检测的应用;(4)制定患者血液保护制度,规范采血及相关操作。上述措施的应用都有其局限性,比如无创检测技术的应用有限,密闭式采血系统的费用问题,床旁检测的检验质量保证,医护人员对血液保护制度的依从性差等。

本文从临床检验学的角度考虑,提出目前医疗工作中能做到的几点血液保护措施供大家参考:(1)血气分析:目前北京的3级医院普遍使用真空采血管,每个采血管采集的血量是固定的,而血气分析采用肝素化的注射器采血,采血量取决于采血者的操作。本研究调查的结果是,血气分析的平均采血量是1.53 mL,中位数是1.47 mL,而

一般血气分析仪要求的采血量在0.5 mL以上,建议采血量在1-1.5 mL,可见有近一半的血气分析标本量是过多的,因此规范采血护士的操作,减少不必要的血液浪费是有必要的;(2)医护人员对血液保护制度的重视程度和相关规定:一方面依靠宣传教育提高医护人员对血液保护制度的重视程度,另一方面通过《临床路径》的制定等方法来规范、指导临床医生开出恰当的检验医嘱;(3)LIS的功能设置:本文的调查显示,未正确合并的检验报告单占总检验报告单的0.45%,血液标本采集不合格的比例是0.14%。随着临床检验项目日益增多,医护人员记忆这些项目的负担也随之增加,通过LIS系统辅助临床医生合理处置检验医嘱,提示护士正确采集标本,避免不必要的浪费是十分必要的;(4)检验医师的作用:检验医师在审核检验结果的过程中,会发现一些需要进一步检验的情况,比如血常规检验时发现病人有贫血,需要进一步检查网织红细胞,如果能及时通知医生增加检验医嘱,仍用原来的血液标本继续检验,能够减少病人重新采血的经济和心理负担,有助于疾病的早期诊断和治疗;(5)小容量采血管的使用:小容量采血管在自动化分析仪的使用上有一定的限制,目前未在综合性医院广泛使用,对于有贫血倾向的重症患者使用小容量采血管虽然增加检验科的工作量,但对于患者的血液保护是很有效的方法。此外,根据我院现有条件,采用普通注射器采血,合理分配各个检验项目的血液量,普通生化、免疫检验项目的需血量能节约1/3-1/2(1.3-2 mL),用加好EDTA的EP管代替真空采血管能节约1.8 mL的血液。

检验性失血对大多数轻症住院患者没有显著影响,但对危重症患者的影响较为明显^[10,13-16]。另外本研究发现,消化系疾病患者用于实验室检验的平均日失血量明显少于国内外报道的平均水平,除了与检验的条件与方法有关外,是否与不同疾病类型患者的选择有关,有待于进一步的深入研究验证。总之,在危重症患者出现贫血倾向时,应引起医生护士的高度重视,关注检

验性失血量, 为提高患者医疗质量、减轻经济负担而努力。

4 参考文献

- 1 Gleason E, Grossman S, Campbell C. Minimizing diagnostic blood loss in critically ill patients. *Am J Crit Care* 1992; 1: 85-90
- 2 Thomas J, Jensen L, Nahirniak S, Gibney RT. Anemia and blood transfusion practices in the critically ill: a prospective cohort review. *Heart Lung* 2010; 39: 217-225. Epub 2009 Sep 12
- 3 Pabla L, Watkins E, Doughty HA. A study of blood loss from phlebotomy in renal medical inpatients. *Transfus Med* 2009; 19: 309-314
- 4 姜东辉. ICU危重患者检验性失血与疾病预后的相关性研究. 大连医科大学, 2007: 1-30
- 5 史连义, 张淑杰, 张继领, 刘继勇, 邓琳棋. ICU及NICU危重病人检验性失血量及其失血原因分析. 护理研究 2010; 24: 2943-2945
- 6 张永利, 王勇, 万献尧. 危重症患者与采血相关的失血量调查. 中国呼吸与危重监护杂志 2007; 6: 391-392
- 7 丛丽, 黄海燕, 喻姣花. ICU患者诊断性失血的研究进展. 中华护理杂志 2011; 46: 197-198
- 8 Chant C, Wilson G, Friedrich JO. Anemia, transfusion, and phlebotomy practices in critically ill patients with prolonged ICU length of stay: a cohort study. *Crit Care* 2006; 10: R140
- 9 Vinagre Gaspar R, Cornejo Bauer C, Murillo Pérez A, Molano Alvarez E, Muñoz López O, Morales Sánchez C, López López C, Cabrero Cabrero AI, Cuenca Solanas M, García Fuentes C, Chico Fernández M, Alted López E. [Diagnostic blood losses in severe trauma patients]. *Enferm Intensiva* 2010; 21: 120-125. Epub 2010 Jul 4
- 10 Wisser D, van Ackern K, Knoll E, Wisser H, Bertsch T. Blood loss from laboratory tests. *Clin Chem* 2003; 49: 1651-1655
- 11 Shaffer C. Diagnostic blood loss in mechanically ventilated patients. *Heart Lung* 2007; 36: 217-222
- 12 Mukhopadhyay A, Yip HS, Prabhuswamy D, Chan YH, Phua J, Lim TK, Leong P. The use of a blood conservation device to reduce red blood cell transfusion requirements: a before and after study. *Crit Care* 2010; 14: R7
- 13 赵保民, 赵曙光, 刘震雄, 王旭霞, 杨琦, 赵玉玲, 周惠萍, 姜慧玲, 闻勤生. 内镜治疗并发胃肠道出血的预防与处理. 世界华人消化杂志 2011; 19: 289-294
- 14 Loomba R, Lutchman G, Kleiner DE, Ricks M, Feld JJ, Borg BB, Modi A, Nagabhyru P, Sumner AE, Liang TJ, Hoofnagle JH. Clinical trial: pilot study of metformin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 29: 172-182
- 15 Garinis GA, Fruci B, Mazza A, De Siena M, Abenavoli S, Gulletta E, Ventura V, Greco M, Abenavoli L, Belfiore A. Metformin versus dietary treatment in nonalcoholic hepatic steatosis: a randomized study. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: 1255-1264
- 16 Nadeau KJ, Ehlers LB, Zeitler PS, Love-Osborne K. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease with metformin versus lifestyle intervention in insulin-resistant adolescents. *Pediatr Diabetes* 2009; 10: 5-13

■同行评价

本文的科学性、创新性和可读性均较好, 提出的改进措施切实可行。

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

Ménétrier's病致顽固性低蛋白血症1例

黄颖秋, 徐俊华, 韩春丽, 刘旭妍

■背景资料

Ménétrier's病是临床罕见疾病, 以胃黏膜皱襞良性增生肥厚及低蛋白血症为主要特征, 多有消化不良症状, 但临床表现不典型, 容易误诊, 自1888年发现迄今仅见100余例报道。

黄颖秋, 徐俊华, 韩春丽, 中国医科大学第五临床学院 本溪钢铁(集团)总医院消化内科 辽宁省本溪市 117000

刘旭妍, 中国医科大学第五临床学院 本溪钢铁(集团)总医院病理科 辽宁省本溪市 117000

黄颖秋, 主任医师, 教授, 研究生导师, 主要从事胃肠道动力疾病、消化系统肿瘤及肝硬化的基础与临床研究。

作者贡献分布: 本文写作由黄颖秋完成; 徐俊华、韩春丽及刘旭妍提供部分资料。

通讯作者: 黄颖秋, 教授, 117000, 辽宁省本溪市平山区人民路29号, 中国医科大学第五临床学院, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科. huangyingqiu_bx@126.com

电话: 0414-2215137

收稿日期: 2012-01-29 修回日期: 2012-03-13

接受日期: 2012-03-25 在线出版日期: 2012-05-08

Ménétrier's disease with refractory hypoalbuminemia: A case report

Ying-Qiu Huang, Jun-Hua Xu, Chun-Li Han, Xu-Yan Liu

Ying-Qiu Huang, Jun-Hua Xu, Chun-Li Han, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group); the Fifth Clinical College of China Medical University, Benxi 117000, Liaoning Province, China

Xu-Yan Liu, Department of Pathology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group); the Fifth Clinical College of China Medical University, Benxi 117000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ying-Qiu Huang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Benxi Steel & Iron (Group); the Fifth Clinical College of China Medical University, 29 Renmin Road, Pingshan District, Benxi 117000, Liaoning Province, China. huangyingqiu_bx@126.com

Received: 2012-01-29 Revised: 2012-03-13

Accepted: 2012-03-25 Published online: 2012-05-08

Abstract

Ménétrier's disease (MD) is a rare hypertrophic gastropathy characterized by giant, hyperplastic gastric mucosal folds, hyperproliferative protein-losing gastropathy, hypoalbuminemia, increased mucus secretion, and hypochlorhydria. Here we report a case of MD with refractory hypoalbuminemia in a 55-year-old female patient who presented to our hospital with anorexia, edema in the face and double lower limbs for half a year. Her serum total protein level was 39.8 g/L and her albumin level was 23.8 g/L. A CT scan revealed diffuse, uneven thickening of large gastric mucosal folds. Gastroendoscopy showed hyperplastic gastric mucosal folds in the body and fundus and profuse mucus. Micro-

scopic examination of the biopsied specimens showed massive hyperplasia of surface and glandular mucous cells, a remarkable distortion of the foveolar, tortuosity and cystic dilatation of the glands. CT and endoscopy can help arrive at an accurate diagnosis of unexplained refractory hypoalbuminemia in patients without any gastropathy symptoms.

Key Words: Ménétrier's disease; Refractory hypoalbuminemia; Diagnosis

Huang YQ, Xu JH, Han CL, Liu XY. Ménétrier's disease with refractory hypoalbuminemia: A case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(13): 1160-1163

摘要

Ménétrier's病(Ménétrier's disease, MD)是一种罕见的肥厚性胃炎, 以胃黏膜皱襞粗大、肥厚致大量蛋白质丢失, 黏液分泌增加, 胃酸分泌减少及低蛋白血症为特征。本文报道MD致顽固性低蛋白血症1例。患者, 女, 55岁, 以“食欲减退, 颜面及双下肢水肿半年”入院。其血清总蛋白39.8 g/L, 白蛋白23.8 g/L。CT示胃黏膜皱襞弥漫性、不均匀增厚。胃镜示胃底和胃体黏膜皱襞肥厚、粗大, 胃内见大量黏液潴留。病理示胃小凹显著变长, 呈螺旋状改变, 固有层内腺体增生, 部分腺体呈囊性扩张, 可见黏液积聚。本病例提示, 对于无任何胃病症状而出现无法解释的顽固性低蛋白血症患者, 及时采取CT和内镜检查有助于早期诊断。

关键词: Ménétrier's病; 顽固性低蛋白血症; 诊断

黄颖秋, 徐俊华, 韩春丽, 刘旭妍. Ménétrier's病致顽固性低蛋白血症1例. *世界华人消化杂志* 2012; 20(13): 1160-1163
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1160.asp>

0 引言

Ménétrier's病(Ménétrier's disease, MD)是一种不明原因的罕见胃黏膜腺体增生病, 以胃黏膜良性增生肥厚为主要特征^[1]。该病于1888年由Ménétrier医生首次发现而得名。因其临床表现不典型, 误诊率极高, 国内外报道甚少。本文报道MD

■同行评议者

姜相君, 主任医师, 青岛市市立医院消化科

致顽固性低蛋白血症1例,以期引起临床工作者对此病的认识。

1 病例报告

患者,女,55岁,以“食欲减退,颜面及双下肢水肿半年”于2011-11-07入院。患者入院前半年,无明显诱因自觉食欲减退,颜面及双下肢水肿,呈进行性加重,无恶心、呕吐,无烧心、反酸,无腹痛、腹泻等消化不良症状,曾在中国医大盛京医院诊断为“低蛋白血症”,在家自行间断输注白蛋白治疗,因病情无缓解,来我院诊治。既往健康。

入院查体:神清,一般状态尚可,BP 120/80 mmHg,颜面水肿,皮肤黏膜无黄染,无肝掌、蜘蛛痣,全身浅表淋巴结无肿大,心肺无异常,腹平坦,无胃肠型,无腹壁静脉曲张,全腹无压痛,肝脾肋下未触及,未触及腹部包块,移动性浊音(-),双下肢明显凹陷性水肿,四肢关节无红肿热痛及功能障碍,双侧肌力5级,双侧Babinski征(-)。

实验室检查:血白细胞(white blood cells, WBC) $8.65 \times 10^9/L$,中性粒细胞66.87%,红细胞(red blood cells, RBC) $4.248 \times 10^{12}/L$,Hb 130.5 g/L,血小板 $247.8 \times 10^9/L$;尿蛋白(-);便潜血(-);AST 22 U/L,ALT 33 U/L,ALP 44 U/L, γ -GT 12 U/L,总蛋白39.8 g/L,白蛋白23.8 g/L,总胆红素15.8 $\mu\text{mol/L}$;Cr 84 $\mu\text{mol/L}$,BUN 8.65 mmol/L;HBsAb(+),HBsAg(-),HBeAg(-),HBeAb(-),HBcAb(-),SI(-),HAVAb(-),HCVAb(-);肿瘤标志物AFP 3.72 IU/mL,CEA 2.39 $\mu\text{g/L}$,CA125 9.67 U/mL,CA199 7.00 U/mL;FT3 4.63 pmol/L,FrT4 16.11 pmol/L,TSH3 4.811 IU/mL;B型钠尿肽前体31 ng/L。

ECG、腹部和心脏彩超均未见异常。胃镜示胃体大弯黏膜皱襞肥厚、粗大,水浸状,小弯黏膜多处见大小不等的颗粒样黏膜增生,顶端见黏膜剥脱糜烂,胃体下部前壁见一 $0.8 \text{ cm} \times 0.6 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 大小的结节样黏膜增生,顶端糜烂,白苔附着,胃窦四壁散在颗粒样、结节样黏膜增生,质地稍韧(图1A-C)。腹部CT示胃黏膜皱襞弥漫性、不均匀增厚,呈手指样或息肉样改变,胃腔变小,肝胆脾胰未见异常(图1D)。

胃镜活检组织病理报告:胃小凹显著变长,呈螺旋状改变,固有层内腺体增生,部分腺体囊性扩张,可见黏液积聚,间质内可见炎性细胞浸润(图1E)。根据上述资料,该病例诊断为MD,予白蛋白静脉滴注半月,症状无明显缓解,血浆总蛋白及白蛋白仍明显低于正常水平,建议其手术

治疗,患者拒绝。出院随访,患者间断自行输注白蛋白症状仍无缓解,血清白蛋白最低至19.7 g/L,病情持续恶化,周身水肿进一步加重,并引发胸腔积液及大量腹腔积液,经诊断性穿刺提示为漏出液,于2012-01-28患者入住我院普外科病房,拟行全胃切除术。

2 讨论

MD是一种以胃黏膜过度增生、胃壁广泛增厚为特征的罕见疾病^[1],其组织病理学特点为胃小凹显著变长、弯曲,呈螺旋状或树枝样改变,固有层内腺体增生、变形,呈囊性扩张,可见黏液积聚及炎性细胞浸润等。MD的发病原因尚不清楚,巨细胞病毒感染^[2,3]、疱疹病毒感染^[4]、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染^[2,5,6]、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)介导^[7]、胃上皮内转化生长因子- α (transforming growth factor- α , TGF- α)的过度表达^[1]以及TGF- α 相关的MUC2和MUC3的过度表达^[8]等因素可能参与了MD的发病机制。

MD患者多有消化不良症状,可能与胃腺体的黏液细胞增生,主细胞和壁细胞减少导致的胃蛋白酶和胃酸分泌减少有关。低蛋白血症是MD患者的主要特征,这可能由于蛋白摄入过少、丢失过多或胃黏膜过度分泌白蛋白以及重吸收障碍所致。此外,VEGF也可能介导了低蛋白血症的发生^[7]。上述原因常导致患者出现顽固的低蛋白血症。

MD为癌前病变^[9],已见MD引发胃癌的相关报道^[10]。MD与胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)都是酪氨酸激酶受体(PTKs)异常^[11]导致的胃部增生性疾病。MD的发病可能与TGF- α 和表皮生长因子受体(EGFR、PTK配体)的过度表达有关,由于TGF- α 局部产生过多,可过度激活EGFR信号通路,导致胃黏膜上皮细胞过度增生而形成巨大肥厚的胃黏膜皱襞^[11]。而GIST的发病可能与编码PTK的KIT基因突变导致构激酶(constitutive kinase)的激活和消化系Cajal细胞的肿瘤转变有关^[11]。

轻型MD患者采用质子泵抑制剂、胃黏膜保护剂及补充白蛋白等治疗可暂时缓解症状,但无法根治。近年研究显示,清除*H. pylori*^[6]、应用奥曲肽^[12]及EGFR抑制剂^[13]也可暂时缓解MD患者的低蛋白血症,这可能与奥曲肽或EGFR抑制剂阻断了EGF的促细胞增殖作用有关^[12,13]。但外科手术仍是目前MD确切有效的治疗手段。对

■ 相关报道

Iwama等报道巨细胞病毒和*H. pylori*双重感染致Ménétrier's病1例,该报道为探讨Ménétrier's病的发病原因提供了依据。

■ 应用要点

本病例以顽固性低蛋白血症为主要特征,无任何消化不良症状。本病例提示,对于临床无法解释的、治疗无效的顽固性低蛋白血症患者应高度怀疑Ménétrier's病,应尽早行胃镜及活检组织病理检查。

■名词解释

淋巴细胞性胃炎: 一种新型胃炎, 组织学以胃黏膜表面上皮和小凹上皮内的T淋巴细胞密集浸润为特征, 并以胃体黏膜最为显著, 内镜则显示胃黏膜皱襞粗大、糜烂等。

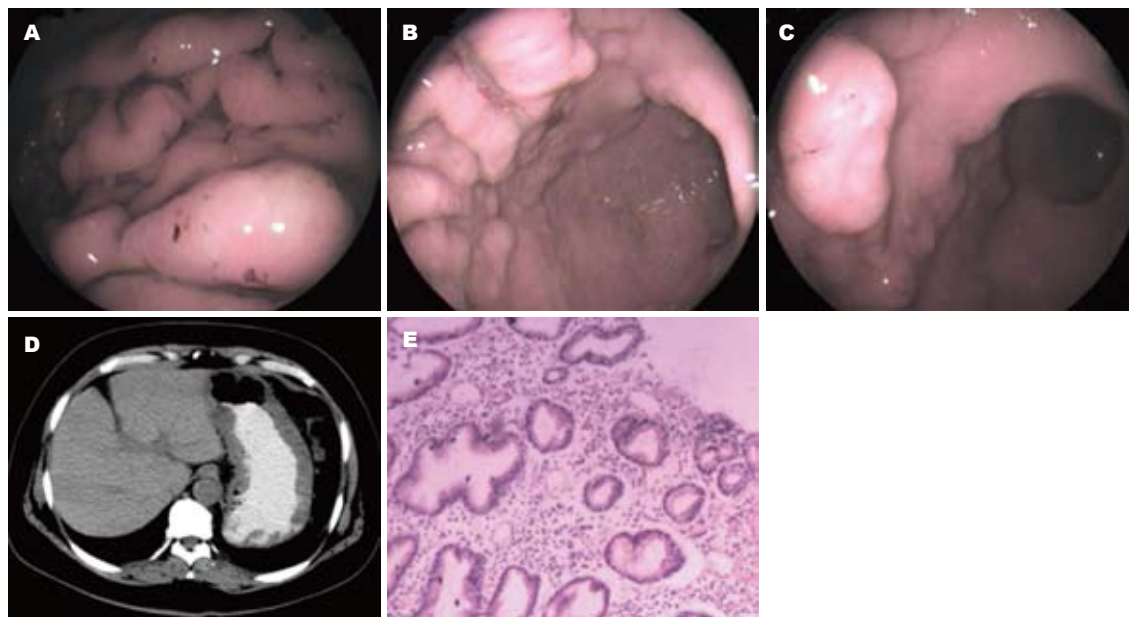


图1 MD患者胃镜、CT及病理资料. A: 胃底黏膜皱襞肥厚、粗大, 水浸状; B: 胃体黏膜皱襞肥厚、粗大, 多处见颗粒样黏膜增生; C: 胃体下部前壁见 $0.8\text{ cm} \times 0.6\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$ 结节样黏膜增生, 顶端糜烂, 白苔附着; D: CT示胃黏膜皱襞弥漫性、不均匀增厚; E: 病理示胃黏膜固有层内腺体增生, 部分腺体呈囊性扩张, 可见黏液积聚, 间质见淋巴细胞浸润(HE染色 $\times 100$).

内科治疗无效或癌变者, 可行全胃切除手术^[4]或腹腔镜下全胃切除术^[15], 对于无蛋白减少的MD患者, 也可在超声内镜(endoscopic ultrasound, EUS)引导下行内镜黏膜下切除术^[16].

本例患者以“食欲减退、颜面及双下肢水肿半年”入院, 院前及住院后的多次实验室检查均显示严重的低蛋白血症, 其肿瘤标志物、肝脏、肾脏、心脏及甲状腺功能等各项指标均正常, 患者无摄食障碍及偏食习惯, 也无小肠吸收不良综合征及蛋白丢失性肠病的依据, 因此可排除上述原因导致的水肿及低蛋白血症. 该患者经输注白蛋白等对症治疗半月后, 症状无缓解, 低蛋白血症也无改善, 对于这种无法解释的顽固性低蛋白血症患者, 应高度怀疑MD的可能. 此时采取胃镜或腹部CT检查显得极为重要. 该患经腹部CT、胃镜检查及病理活检最终证实为MD.

本例患者的临床表现很不典型, 其原因尚不清楚, 可能与个体差异有关. 此外, MD为癌前病变, 可诱发或伴发胃癌, 本例患者不仅胃底和胃体黏膜皱襞粗大、肥厚, 且胃体见 $0.8\text{ cm} \times 0.6\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$ 大小的黏膜增生性病变, 应与相关疾病鉴别. 病理活检、肿瘤标志物及相关实验室检查有助于MD与淋巴细胞性胃炎、嗜酸细胞性胃炎、*H. pylori*相关性胃炎、卓-艾氏综合征、胃癌、胃恶性淋巴瘤及各种胃肉芽肿病的鉴别诊断.

本例MD患者经内科保守治疗无效, 尽早采取外科手术或腹腔镜下全胃或部分胃切除应是

最佳和有效的治疗手段.

3 参考文献

- 1 Lambrecht NW. Ménétrier's disease of the stomach: a clinical challenge. *Curr Gastroenterol Rep* 2011; 13: 513-517
- 2 Iwama I, Kagimoto S, Takano T, Sekijima T, Kishimoto H, Oba A. Case of pediatric Ménétrier disease with cytomegalovirus and Helicobacter pylori coinfection. *Pediatr Int* 2010; 52: e200-e203
- 3 Gökçe S, Taşçılar ME, Dabak O, Devrim I, Aydın H, Unay B. Cytomegalovirus infection with gastric ulcers in Ménétrier's disease and hypergammaglobulinemia. *Turk J Pediatr* 2009; 51: 524
- 4 Jun DW, Kim DH, Kim SH, Song MH, Lee HH, Kim SH, Jo YJ, Park YS. Ménétrier's disease associated with herpes infection: response to treatment with acyclovir. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 1092-1095
- 5 Fretzayas A, Moustaki M, Alexopoulou E, Nicolaidou P. Menetrier's disease associated with Helicobacter pylori: three cases with sonographic findings and a literature review. *Ann Trop Paediatr* 2011; 31: 141-147
- 6 Lee SY. Future candidates for indications of Helicobacter pylori eradication: do the indications need to be revised? *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 200-211
- 7 Takeda T, Mitsuyama K, Tsuruta O, Kuboyama S, Kitazaki S, Sata M. Role of vascular endothelial growth factor in protein loss of Ménétrier's disease. *Int J Mol Med* 2006; 18: 571-576
- 8 Zimmer KP, Heine M, Weissen-Plenz G, Scholand KA, Herbst H, Naim HY. TGF α -associated MUC2 and MUC3 expression of the gastric epithelium in Menetrier's disease during remission of ulcerative colitis. *Gut* 2011; 60: 1607-1608
- 9 Famularo G, Sajeva MR, Gasbarrone L. Beyond gastritis and before cancer: the strange case of Ménétrier's disease. *Intern Emerg Med* 2011; 6: 369-371
- 10 Pereyra L, Gómez EJ, Mella JM, Casas G, Bugari G, Cimmino D, Pedreira S, Boerr LA. [Diffuse gastric

- cancer associated with Ménétrier's disease]. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2011; 41: 142-145
- 11 Coffey RJ, Washington MK, Corless CL, Heinrich MC. Ménétrier disease and gastrointestinal stromal tumors: hyperproliferative disorders of the stomach. *J Clin Invest* 2007; 117: 70-80
- 12 Rothenberg M, Pai R, Stuart K. Successful use of octreotide to treat Ménétrier's disease: a rare cause of abdominal pain, weight loss, edema, and hypoalbuminemia. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1403-1407
- 13 Fiske WH, Tanksley J, Nam KT, Goldenring JR, Slebos RJ, Liebler DC, Abtahi AM, La Fleur B, Ayers GD, Lind CD, Washington MK, Coffey RJ. Efficacy of cetuximab in the treatment of Menetrier's disease. *Sci Transl Med* 2009; 1: 8ra18
- 14 de Silva AP, Aryasingha S, Dassanayake AS, Hevavisenthi J, Ratnasena BG, de Silva HJ. Ménétrier's disease treated with gastrectomy. *Ceylon Med J* 2008; 53: 22-23
- 15 Sanchez C, Brody F, Pucci E, Bashir S. Laparoscopic total gastrectomy for Ménétrier's disease. *J Laparosc Adv Surg Tech A* 2007; 17: 32-35
- 16 Gleeson FC, Mangan TF, Levy MJ. Endoscopic ultrasound and endoscopic mucosal resection features of a non-protein losing form of Ménétrier's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; 6: e24-e25

■同行评价

本文报道的病例罕见, 内容详实可靠, 对临床相关疾病的诊治有较好的指导意义。

编辑 张姗姗 电编 鲁亚静

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的370位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

《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 (print), ISSN 2219-2859 (online), 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68.00元, 全年2448.00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》(2011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。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2010年《世界华人消化杂志》总被引频次3 458次, 影响因子0.694, 综合评价总分60.6分, 分别位居内科学类49种期刊的第5位、第7位、第6位, 分别位居1 998种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第79位、第320位、第190位; 其他指标: 他引率0.83, 被引半衰期4.9, 来源文献量712, 文献选出率0.90, 参考文献量17 963, 平均引文数25.23, 平均作者数4.35, 地区分布数29, 机构分布数349, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

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《生理学术名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP,

PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或 $T_{1/2}^1$, V_{max} 不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max} , C_{max} , Vd, $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家

标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 1×10^{12} /L, WBC数用 1×10^9 /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2011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: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

文大写字 F ; (3)卡方检验用希文小写字 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写字 r ; (5)自由度用希文小写字 ν ; (6)样本数用英文小写字 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用^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 $\pm$ 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g $\pm$ 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg $\pm$ 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm $\pm$ 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 $\rightarrow$ 23.5 $\rightarrow$ 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1000$, 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 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一

律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正

《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。

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

文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传。读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程。

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿。在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>。无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>。审稿过程平均时间需要14-28 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发表费, 文章发表后可获得1本样刊及10套单行本(稿酬)。

6 修回稿须知

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

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

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号
远洋国际中心D座903室
电话: 010-5908-0035
传真: 010-8538-1893
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

2012年国内国际会议预告

2012-05-26/31

2012年世界医学物理与生物医学工程大会

会议地点: 北京市

联系方式: info@wc2012.org

2012-06-01/03

2012中国北京超声医师学术大会

会议地点: 北京市

联系方式: zhumin301@163.com

2012-06-15/17

第一届糖尿病大会、第二届内分泌与代谢大会

会议地点: 北京市

联系方式: medical585@163.com

2012-06-15/17

第九届全国抗菌药物临床药理学术会议

会议地点: 北京市

联系方式: doctorzhengbo@163.com; liyun1907@sina.com

2012-06-29/07-01

第二十四次全国中西医结合消化学术会议

会议地点: 宁波市

联系方式: qgzxyjhxh@163.com

2012-06-30/07-01

中华医学会肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-07-01/31

第一届全国普通外科青年医师学术论坛

会议地点: 北京市

联系方式: cmacjs@cma.org.cn

2012-07-01/31

第二届全国普通外科手术技术学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lining@126.com

2012-07-27/29

第十届全国胃病学术大会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: xiaohuahuiyi2012@163.com

2012-08-08/10

第五届全国生物信息学与系统生物学学术大会暨国际生物信息学前沿研讨会

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: bioinfo@hrbmu.edu.cn

2012-08-25/29

第八届世界华人药物化学研讨会暨第九届IUPAC化学生物学国际研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: liangren@bjmu.edu.cn

2012-08-29/09-01

中华医学会第十一次全国内分泌学学术会议

会议地点: 广州市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-01/30

中华医学会第三次全国肝纤维化、肝硬化学术会议

会议地点: 郑州市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2012-09-01/30

第十五届全国中西医结合大肠肛门病学术交流会

会议地点: 济南市

联系方式: doclf@163.com

2012-09-14/16

中华医学会第十二次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: lilyjia@163.com

2012-09-21/30

2012中华影像技术第20次全国学术大会暨国际影像技术论坛

会议地点: 长春市

联系方式: ting@dxyer.com

2012-09-23/27

第九届海峡两岸细胞生物学研讨会

会议地点: 丽江市

联系方式: cscb@sibs.ac.cn

2012-10-21/11-10

第十四次全国中医肛肠学术交流大会

会议地点: 长沙市

联系方式: gcfh2012@163.com

2012-10-25/28

第13届亚太临床微生物暨感染病会议(APCCMI)

会议地点: 北京市

联系方式: bianxiaoxue@mpco.cn

2012-12-21/23

2012生物医学工程生物信息学国际会议

会议地点: 昆明市

联系方式: beb2012@126.com

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院院办

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

仇毓东 副教授
南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

傅春彬 主任医师
吉林省吉林市吉化集团公司总医院一院消化内科

高国全 教授
中山大学中山医学院生化系

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

管世鹤 副教授
安徽医科大学第一附属医院检验科

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

何敏 教授
广西医科大学医学科学实验中心

姜春萌 教授
大连医科大学附属第二医院消化科

李刚 教授
北京大学医学部生物化学与分子生物学系

李健丁 教授
山西医科大学第一医院放射科CT室

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医医院消化科

刘丽江 教授
江汉大学医学院病理学与病理生理学教研室

茅爱武 主任医师
上海同仁医院介入诊疗中心

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

谭晓冬 副教授
中国医科大学盛京医院胰腺甲状腺外科

田宇彬 教授
青岛大学医学院附属医院消化内科

万军 主任医师
中国人民解放军总医院南楼老年消化科

汪思应 教授
安徽医科大学实验动物中心86信箱(病理生理学专业)

王凯 教授
山东大学齐鲁医院肝病科

王娅兰 教授
重庆医科大学基础医学院病理教研室

魏睦新 教授
南京医科大学第一附属医院中西医结合科

吴泰璜 教授
山东省立医院肝胆外科

伍晓汀 主任医师
四川大学华西医院胃肠外科中心

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

宣世英 教授
山东省青岛市市立医院肝病内科

杨桦 教授
中国人民解放军第三军医大学新桥医院普通外科

杨家和 教授
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院综合三科