

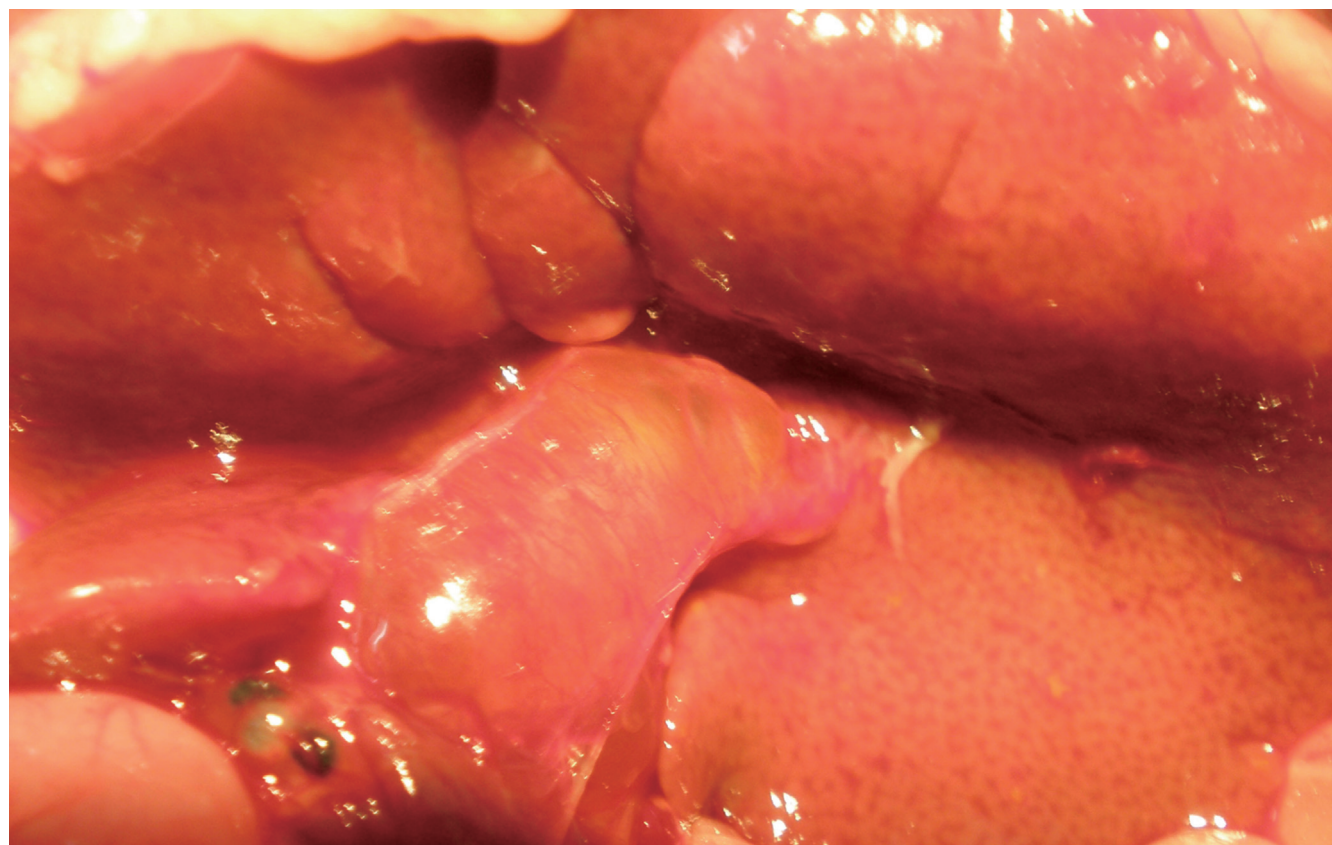
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)  
CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2011 年 6 月 18 日 第 19 卷 第 17 期 (Volume 19 Number 17)**



**17/2011**

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

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

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
苒新明教授  
陈国忠副主任医师  
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

邓长生教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
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  
侯晓华教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
霍丽娟教授  
季国忠教授  
江米足主任医师  
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  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
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  
刘铁夫教授  
刘莹副主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
吕志武教授  
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  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
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  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张晓岚教授  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
周国雄主任医师  
周晓东副教授  
周宇教授  
朱春兰主任医师  
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  
陈力教授  
陈立波教授  
陈凇教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
董明教授  
杜成友教授  
杜顺达副主任医师  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
高成新教授  
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  
姜卫东教授  
姜波健教授  
蒋龙元副教授  
金山副教授  
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

李杰教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
李小荣教授  
李旭副教授  
李永翔主任医师  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘颖斌主任医师  
卢实春教授  
陆才德教授  
陆云飞教授  
禄韶英副主任医师  
吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
仇毓东副教授  
裘正军教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
施宝民教授  
施诚仁教授  
施晓雷副主任医师  
石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤恢焕教授  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

汪根树副教授  
王春友教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王广义教授  
王健生教授  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王悦华副主任医师  
王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴河水教授  
吴健雄教授  
吴金术教授  
吴泰璜教授  
吴志勇教授  
伍晓汀教授  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师  
徐迅迪教授  
徐洪副教授  
徐戈良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨维良教授  
杨银学教授  
杨尹默教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
禹正杨副教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
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  
张群华教授  
张水军教授  
张宗明教授  
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  
陈仕珠主任医师  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
高润平教授  
高泽立副教授  
高志良主任医师  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
郝春秋副教授  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
靳雪源副主任医师  
林菊生教授  
刘正稳教授  
宁琴教授  
牛俊奇教授

钱林学主任医师  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
唐晓鹏教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
魏来教授  
吴建国教授  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副教授  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵连三教授  
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

蔡淦教授

陈治水主任医师  
杜群副研究员  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李康副教授  
李晓波教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
龙致贤教授  
南极星教授  
牛英才研究员  
沈洪教授  
司富春教授  
唐志鹏研究员  
王富春教授  
王新月教授  
邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
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  
陈公琰主任医师  
陈克能教授  
代智副研究员  
华海清教授  
李瑗教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘云鹏教授  
秦叔逵教授  
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  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授  
韩新巍教授  
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  
施海彬教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐辉雄教授  
徐克教授  
严惟力副教授  
杨业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
茅爱武教授  
潘林娜教授  
孙明军教授  
万军教授  
吴硕东教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
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  
曹师承教授  
陈敬贤教授  
陈秋生教授  
陈志龙教授  
崔莲花副教授  
樊红教授  
高春芳研究员  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
何敏教授  
黄昆教授  
黄文林教授  
黄园教授  
李东辉教授  
李刚教授  
李杰副教授  
李君文研究员  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
刘森副教授

梅林教授  
钱其军研究员  
钱睿哲教授  
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  
田颖刚副研究员  
汪思应教授  
王钦红教授  
魏继福副研究员  
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  
姚登福教授  
阴赅宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬副教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授  
周晓东研究员  
周晓武副主任医师  
朱进霞教授

### 消化病理学

杜祥教授  
李菊玲副教授  
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  
吕宁主任医师  
马大烈教授  
门秀丽教授  
潘兴华副主任医师  
孙伟副研究员  
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  
赵景民教授  
朱亮副教授



# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2011 年 6 月 18 日 第 19 卷 第 17 期 (总第349期)

## 述 评

1761 Wnt信号转导通路与肝纤维化关系的研究现况

万赞燕, 胡国信

## 基 础 研 究

1767 幽门螺杆菌对胃癌细胞BGC-823形态及凋亡相关基因表达的影响

吴莺, 李翔, 周红, 范钰, 张允历, 沈琰, 何亚龙

1773 白介素-10对梗阻性黄疸大鼠肝组织转化生长因子 $\beta$ 1表达和肝细胞凋亡的影响

曹阳, 赵闯, 徐锋, 戴朝六

1780 鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的纤维化相关基因表达和蛋白谱的影响

廖明, 莫财锋, 周怡, 何敏, 卓朗

1785 塞莱昔布对幽门螺杆菌蛋白质组的影响

高培培, 王蔚虹, 王静, 李江, 董欣红

## 临 床 研 究

1791 血清补体C3和C4对慢性乙型肝炎患者肝组织病理状态的判断价值

张占卿, 陆伟, 王雁冰, 饶敏, 冯洁, 沈芳, 冯艳玲

## 文 献 综 述

1796 PNPLA3基因在非酒精性脂肪性肝病中的作用

李冬阳, 林连捷, 郑长青

1802 肝癌干细胞与肝癌复发转移的研究进展

邱谢武, 于聪慧

1808 肠易激综合征与肠道细菌关系的研究进展

舒小闯, 王少东, 汪芳裕

1813 益生菌和胃肠道疾病

蒋烨, 刘俊, 任宏宇

1819 JNK信号通路介导的凋亡在疾病中的作用

侯炳旭, 冯丽英

## 研 究 快 报

1826 抗纤复方I号对乙醛刺激的肝星状细胞的细胞外基质及细胞因子分泌的干预作用

林红, 黄玉红, 李异玲, 傅宝玉, 王炳元

1830 抑制JNK信号通路对结肠癌HT-29细胞增殖和凋亡的影响

张志永, 张谢夫

## 临 床 经 验

1834 间苯三酚在食管疾病特殊内镜诊治中的应用价值

陈念钧, 程斌, 廖家智, 李荣香, 胡继芬, 杨玉珍

1839 超声血流参数对肝硬化门脉高压症的诊断价值

雷震, 杨世梅, 李加平, 邱冬, 罗燕

1843 复方斑蝥胶囊对肝癌患者TACE治疗前后细胞免疫功能的影响

殷飞, 李进军, 曹凤, 姚树坤

1847 活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样病变56例

陈文科, 邹兵, 王成文, 郭海, 郑爱萍

1851 克罗恩病外科治疗19例

栾洋, 宗光全, 陈坚, 宣喆, 徐琳, 王伟, 王峰, 刘绪舜

1855 DNA修复基因XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感的Meta分析

梁天伟, 孙轶, 卢永刚



	1860 <b>Runx3</b> 基因甲基化及Runx3蛋白表达在结肠癌发生中的意义 何绍亚, 韩盛玺, 蒋仁发, 向阳生
附 录	1864 《世界华人消化杂志》投稿须知 1869 2011年国内国际会议预告
志 谢	1870 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1779 《世界华人消化杂志》参考文献要求 1795 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》 1801 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1807 招聘生物医学编辑部主任 1812 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》 1833 <i>WJG</i> 总被引频次排名位于第174名 1838 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.625 1850 汤姆森-路透公布2009年 <i>WJG</i> 影响因子2.092 1854 <i>WJG</i> 成功通过评审被PMC收录 1863 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
封面故事	曹阳, 赵闯, 徐锋, 戴朝六. 白介素-10对梗阻性黄疸大鼠肝组织转化生长因子 $\beta$ 1表达和肝细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1773-1779 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1773.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1773.asp</a>
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 李薇; 审核编辑 李军亮; 形式规范 马连生

<p><b>世界华人消化杂志</b></p> <p><b>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</b></p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2011-06-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 编辑部主任 李军亮 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</p>	<p><b>编辑</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>出版</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p> <p><b>印刷</b> 北京科信印刷厂</p> <p><b>发行</b> 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</p> <p><b>订购</b> 全国各地邮电局</p> <p><b>邮购</b> 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 <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></p>	<p>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</p> <p>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx">http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx</a>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</p> <p><b>特别声明</b> 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</p> <p>2011年版权归世界华人消化杂志所有</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

# World Chinese Journal of Digestology

**June 2011 Contents in Brief Volume 19 Number 17**

<b>EDITORIAL</b>	1761 Relationship between the Wnt signaling pathway and liver fibrosis: recent research status <i>Wan ZY, Hu GX</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>1767 Effect of <i>H.pylori</i> extract on cellular morphology and apoptosis-related gene expression in human gastric cancer BGC-823 cells <i>Wu Y, Li X, Zhou H, Fan Y, Zhang YL, Shen Y, He YL</i></p> <p>1773 Interleukin-10 suppresses hepatic TGF-<math>\beta</math>1 expression and attenuates hepatocyte apoptosis in biliary-obstructed rats <i>Cao Y, Zhao C, Xu F, Dai CL</i></p> <p>1780 Alterations in fibrosis-related gene expression and proteomic expression profile in rat hepatic stellate cells exposed to the cocktail <i>Liao M, Mo CF, Zhou Y, He M, Zhuo L</i></p> <p>1785 Proteomic profiling of <i>Helicobacter pylori</i> treated with celecoxib <i>Gao PP, Wang WH, Wang J, Li J, Dong XH</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	1791 Serum complement C3 and C4 levels for evaluation of hepatic pathological status in patients with chronic hepatitis B <i>Zhang ZQ, Lu W, Wang YB, Rao M, Feng J, Shen F, Feng YL</i>
<b>REVIEW</b>	<p>1796 Advances in understanding the role of PNPLA3 in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease <i>Li DY, Lin LJ, Zheng CQ</i></p> <p>1802 Advances in understanding the relationship between liver cancer stem cells and metastasis and relapse of liver cancer <i>Qiu XW, Yu CH</i></p> <p>1808 Advances in understanding the relationship between irritable bowel syndrome and intestinal bacteria <i>Shu XC, Wang SD, Wang FY</i></p> <p>1813 Probiotics and gastrointestinal diseases <i>Jiang Y, Liu J, Ren HY</i></p> <p>1819 Role of JNK signaling pathway-mediated apoptosis in diseases <i>Hou BX, Feng LY</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>1826 KangXian FuFang I inhibits acetaldehyde-stimulated extracellular matrix synthesis and cytokine secretion in cultured hepatic stellate cells <i>Lin H, Huang YH, Li YL, Fu BY, Wang BY</i></p> <p>1830 Inhibition of the JNK signaling pathway suppresses cell proliferation but promotes apoptosis in human colon carcinoma cell line HT-29 <i>Zhang ZY, Zhang XF</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>1834 Clinical application of phloroglucinol in special endoscopic treatment for esophageal diseases <i>Chen NJ, Cheng B, Liao JZ, Li RX, Hu JF, Yang YZ</i></p> <p>1839 Diagnostic value of hemodynamic parameters measured by ultrasound in patients with hepatic cirrhosis and portal hypertension <i>Lei Z, Yang SM, Li JP, Qiu D, Luo Y</i></p>

	<p>1843 Fufang Banmao Capsules improve immunological status in patients with hepatocellular carcinoma before and after transcatheter arterial chemoembolization <i>Yin F, Li JJ, Cao F, Yao SK</i></p> <p>1847 Biopsy forceps polypectomy for diminutive polypoid lesions of the upper gastrointestinal tract: an analysis of 56 cases <i>Chen WK, Zou B, Wang CW, Guo H, Zheng AP</i></p> <p>1851 Surgical treatment of Crohn's disease: an analysis of 19 cases <i>Luan Y, Zong GQ, Chen J, Xuan J, Xu L, Wang W, Wang F, Liu XS</i></p> <p>1855 Association between DNA repair gene XRCC3 Thr241 Met single nucleotide polymorphisms and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis <i>Liang TW, Sun Y, Lu YG</i></p> <p>1860 Significance of methylation and protein expression of the Runx3 gene in colon carcinogenesis <i>He SY, Han SX, Jiang RF, Xiang YS</i></p>
<b>APPENDIX</b>	<p>1864 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>1869 Meeting events calendar in 2011</p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	1870 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
<b>COVER</b>	<p><i>Cao Y, Zhao C, Xu F, Dai CL.</i> Interleukin-10 suppresses hepatic TGF-<math>\beta</math>1 expression and attenuates hepatocyte apoptosis in biliary-obstructed rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(17): 1773-1779 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1773.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1773.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Wei Li</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** June 18, 2011

### 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: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@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: [wjgd@wjgnet.com](mailto:wjgd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

### SCIENCE EDITORS

Director: Jun-Liang Li

### SUBSCRIPTION

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

### CSSN

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

### COPYRIGHT

© 2011 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

### SPECIAL STATEMENT

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2011 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*



# Wnt信号转导通路与肝纤维化关系的研究现况

万赞燕, 胡国信

万赞燕, 胡国信, 南昌大学第一附属医院感染科 江西省南昌市 330006

胡国信, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事肝纤维化方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30760230

通讯作者: 胡国信, 副教授, 330006, 江西省南昌市东湖区永外正街17号, 南昌大学第一附属医院感染科. huguoxin8228@sina.com

收稿日期: 2011-04-14 修回日期: 2011-05-14

接受日期: 2011-05-17 在线出版日期: 2011-06-18

## Relationship between the Wnt signaling pathway and liver fibrosis: recent research status

Zan-Yan Wan, Guo-Xin Hu

Zan-Yan Wan, Guo-Xin Hu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30760230

Correspondence to: Associate Professor Guo-Xin Hu, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwai Zheng Avenue, Donghu District, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huguoxin8228@sina.com

Received: 2011-04-14 Revised: 2011-05-14

Accepted: 2011-05-17 Published online: 2011-06-18

## Abstract

The Wnt signaling pathway participates in many physiological and pathological processes such as cell differentiation, carcinogenesis, apoptosis, immunity, and stress. Many studies have shown that blockage of the Wnt signaling pathway can induce cancer cell apoptosis. Many signaling pathways are associated with the pathogenesis of liver fibrosis. Several studies have shown that the Wnt signaling pathway is involved in the formation of liver fibrosis. Blockage of the Wnt signaling pathway could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of hepatic stellate cell (HSC). Since the activation of HSC plays a key role in the pathogenesis of liver fibrosis, induction of HSC apoptosis represents a new strategy for treating the disease. Elucidation of the relationship between the Wnt signaling pathway and liver fibrosis will certainly provide a theoretical basis for clinical treatment of the disease.

Key Words: Wnt signaling pathway; Hepatic stellate

cell; Liver fibrosis

Wan ZY, Hu GX. Relationship between the Wnt signaling pathway and liver fibrosis: recent research status. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(17): 1761-1766

## 摘要

Wnt信号转导通路是近年来分子生物学、细胞生物学和肿瘤研究中的一大热点, 其参与调控细胞分化、癌变、凋亡及机体免疫、应激等多种病理生理过程。目前许多关于癌症方面的研究均已证实, 阻断Wnt信号通路可以诱导癌症细胞的凋亡。肝纤维化的发生与多种信号通路的激活相关, 有研究证实Wnt信号通路也参与了肝纤维化的发生, 阻断该通路可以抑制HSC增殖及诱导其凋亡。HSC的活化作为肝纤维化发生的关键环节, 通过诱导其凋亡有可能成为一种新的肝纤维化治疗方法。研究Wnt信号通路与肝纤维化关系为将来临床应用提供一定的理论基础。

关键词: Wnt信号转导通路; 肝星状细胞; 肝纤维化

万赞燕, 胡国信. Wnt信号转导通路与肝纤维化关系的研究现况. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1761-1766

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1761.asp>

## 0 引言

肝纤维化是肝脏对各种原因所致慢性肝损伤的创伤愈合反应, 导致肝小叶内和汇管区大量纤维组织增生和沉淀, 病理学特点是以胶原蛋白为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)各种成分合成增多, 降解相对不足, 但并未形成小叶内间隔(再生结节), 如进一步发展则进入肝硬化不可逆转阶段。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)被认为是肝脏合成ECM的主要细胞, 其激活发生肌成纤维细胞的表型转换被认为是肝纤维化发生的中心环节<sup>[1,2]</sup>。Wnt信号通路途径最初的研究主要集中在胚胎发育和干细胞维持分化方面, 目前认为该信号通路参与了肿瘤的发生, 阻断该通路可以抑制癌细胞的增殖和诱导凋亡<sup>[3]</sup>。近年来研究认为该信号通路与多种器

## ■背景资料

Wnt信号通路途径最初的研究主要集中在胚胎发育和干细胞维持分化方面, 目前认为该信号通路参与了肿瘤的发生, 阻断该通路可以抑制癌细胞的增殖和诱导凋亡。

## ■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

## ■ 研发前沿

Wnt信号转导通路是近年来分子生物学、细胞生物学和肿瘤研究中的一大热点,其参与调控细胞分化、癌变、凋亡及机体免疫、应激等多种病理生理过程。

官纤维化的发生有关, Liu等<sup>[4]</sup>用博来霉素诱导的肺纤维化家鼠模型中发现肺纤维化区域上皮细胞表达 $\beta$ -catenin增多, 其下游基因产物cyclin D1、MMP-7和TGF- $\beta$ 在肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞以及间质中的表达也相应有所上升; Hwang等<sup>[5]</sup>认为Wnt/ $\beta$ -catenin信号参与了肾纤维化的发生。

最近较多研究<sup>[6-8]</sup>也证实了Wnt信号通路参与了HSC的活化及肝纤维化的发生, 本文就Wnt信号通路与HSC、肝纤维化的关系作一简要综述, 为将来抗纤维化治疗提供一定理论依据。

## 1 Wnt信号转导通路

现认为Wnt信号大体分为两种通路, 即经典 $\beta$ -catenin依赖信号通路和非经典 $\beta$ -catenin独立通路。

经典 $\beta$ -catenin依赖信号通路即Wnt/ $\beta$ -catenin通路, 主要成员包括Wnt蛋白家族、Frizzled/低密度脂蛋白受体相关蛋白(Fz/LRP)、Dishevelled蛋白(Dsh)、 $\beta$ -catenin、 $\beta$ -catenin降解复合体以及T淋巴细胞因子/淋巴增强因子(T cell factor/lymphoid enhancer factor, Tcf/Lef)转录因子家族等<sup>[9]</sup>。 $\beta$ -catenin降解复合体由糖原合成激酶3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )、酪蛋白激酶I $\alpha$ (casein kinase I $\alpha$ , CKI $\alpha$ )、支架蛋白(Axin)、结肠腺瘤性息肉病(adenomatous polyposis coli, APC)基因蛋白组成, 其中Axin与APC起着载体的作用。当经典Wnt信号通路被激活时, 分泌到细胞外的Wnt蛋白与跨膜受体Fz和低密度脂蛋白相关受体LRP5/6复合物结合, 并激活细胞内的Dsh, 激活的Dsh可抑制GSK-3 $\beta$ 的活性并使其从Axin上脱落, 从而影响了酶体复合物中CKI $\alpha$ 及GSK-3 $\beta$ 对 $\beta$ -catenin丝氨酸及苏氨酸的磷酸化及降解, 导致 $\beta$ -catenin在胞质中的累积。当 $\beta$ -catenin积累达到一定游离水平时即可发生核转移, 并与核内转录因子Tcf/Lef结合形成转录复合物, 激活相关目的基因的表达, 引起细胞生物活性的改变<sup>[9]</sup>。另外还有Siah介导的 $\beta$ -catenin非依赖经典磷酸化的降解途径, 以及非Wnt信号通路蛋白与 $\beta$ -catenin之间相互作用构成不同信号间的对话<sup>[10]</sup>。Soriano等<sup>[11]</sup>对老年性痴呆病研究中发现GSK-3、 $\beta$ -catenin、蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)可与早衰蛋白1结合形成复合物, 早衰蛋白1与PKA之间的相互作用可增强依赖性GSK-3对 $\beta$ -catenin的磷酸化作用过程, 导致 $\beta$ -catenin的降解, 该研究证实了PKA与

早衰蛋白1结合可抑制Wnt信号分子 $\beta$ -catenin的转导。然而与之相反的结论关于人胚肾细胞培养的研究却表明了PKA增加了HEK-293细胞Tcf的转录, 前列腺素E2激活PKA后可直接磷酸化 $\beta$ -catenin Ser675, 抑制其泛素化, 引起其在细胞内的累积, 发生核内转移<sup>[12]</sup>。上述两者关于PKA与Wnt通路之间关系的研究结论存在分歧, 至今为止还没有确切的说法, 值得进一步探讨。

非经典 $\beta$ -catenin独立通路有多种, 其中研究最多的包括Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 通路和细胞急性通路(planar cell polarity pathway, PCP)<sup>[13,14]</sup>。在Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 信号通路中, Wnt-Fz受体结合复合物通过G蛋白激活磷脂酶C, 从而导致细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 水平升高及下游信号分子蛋白激酶C的激活。PCP通路通过激活Dvl、小G蛋白(Rho或者Rac)以及Rho激酶JNK来发挥调节细胞骨架、细胞移行以及细胞极性的作用<sup>[15]</sup>。PCP及Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 通路均证实了在癌症方面起着不可或缺的作用<sup>[14]</sup>, 如非经典蛋白Wnt5a可通过激活PKC/ $\text{Ca}^{2+}$ 诱导上皮间叶细胞转换(epithelial mesenchymal transition, EMT), 介导黑素瘤的转移<sup>[16]</sup>。尽管在果蝇中没有发现Wnt蛋白参与到PCP通路中<sup>[17]</sup>, 但是在脊椎动物中PCP通路可由非经典Wnt蛋白如Wnt5a和Wnt11激活, 这些蛋白并不介导 $\beta$ -catenin的激活<sup>[18,19]</sup>。

## 2 Wnt蛋白及其受体

Wnt蛋白是一种富含半胱氨酸高度保守的分泌性糖蛋白, 至今研究发现主要有19个Wnt蛋白<sup>[20]</sup>, 参与经典信号通路的Wnt蛋白有Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8等, 参与非经典信号通路Wnt蛋白有Wnt5a、Wnt4、Wnt11等。Wnt基因家族在肝脏各种细胞中均有表达, 某些经典及非经典Wnt蛋白在成年小鼠肝脏的各种细胞中均有表达, 包括肝细胞、胆管上皮细胞、HSC和Kupffer细胞, 例如Wnt1、Wnt2、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt11在肝细胞中表达, Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16在HSC中表达<sup>[21]</sup>。同时, 各种细胞在激活或静止状态下Wnt蛋白表达也是不一样的, 各自介导不同信号转导引起病理生理的变化, 导致不同种疾病的发生。

Wnt信号受体包括主要受体和共同受体。Fz作为Wnt信号的主要受体是一种7次跨膜蛋白, 至今发现有10种即Fz-1至Fz-10, 不同的Wnt蛋白可以与相同或不同的Fz受体结合, 然后激活不

同或相同的下游分子介导Wnt/ $\beta$ -catenin、PCP及Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  3种信号通路的传导. LRP5/6是Wnt信号通路共同受体, 他与Fz受体并不是单独各自与Wnt蛋白配体结合发挥信号转导作用的, 而是两者共同与Wnt蛋白构成三聚体, 从而发生配体与受体的结合. Wnt蛋白在此复合物中发挥着中介调节作用, 受体Fz和LRP5/6细胞外区域分别与Wnt蛋白不同部位结合后导致各自细胞内结构的变化, 激活信号转导. 另外, Fz受体种类可识别不同种Wnt蛋白, 与之结合可激活3种不同信号通路的传导, 如表达有Fz-1的大鼠可促进Wnt8在细胞表面的聚集从而导致Wnt/ $\beta$ -catenin通路的激活, 相反, 发现表达有Wnt5a或者Fz-2受体的非洲爪蟾细胞内的 $\text{Ca}^{2+}$ 水平增高, 进一步促进PKC的激活<sup>[22]</sup>.

### 3 Wnt信号转导通路的目的基因及抑制剂

Wnt经典信号通路通过核内 $\beta$ -catenin激活的Tcf/Lef刺激各种目的基因的表达, 包括c-Myc、cyclin D1、Fra1、c-Jun、过氧化物酶增殖激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)、交配相关蛋白、CD44、尿激酶型纤溶酶原激活受体、Tcf/Lef基因结合位点的激活因子基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)(MMP2、MMP3、MMP7和MMP9)、COX-2以及VEGFR等<sup>[23-25]</sup>. MMPs是一类具有 $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Zn}^{2+}$ 离子依赖的内源性蛋白酶, 肝内主要由HSC合成, 可降解多种ECM成分, 在肝纤维化的发展过程中起着重要的作用.

Wnt信号通路抑制剂主要包括有分泌Fz相关蛋白(secreted Frizzled related proteins, sFRPs)和Wnt抑制蛋白(Wnt inhibitory protein, WIF). sFRPs和WIF可分别与Wnt蛋白结合, 同时sFRPs也可与Fz受体结合, 从而导致经典信号及非经典信号两条通路传导的抑制. 另外某些sFRPs可与非Wnt信号成员分子相互作用参与细胞的代谢, 例如肿瘤细胞分泌的sFRP2在ECM累积通过与纤连蛋白-整合素复合物相互作用, 磷酸化FAK及激活NF- $\kappa$ B从而抑制细胞的凋亡及JNKs, 进一步提高乳腺肿瘤细胞生存性<sup>[26]</sup>.

Wnt信号抑制剂还包括有Dkk蛋白家族, 例如DKK-1作为LRP5/6拮抗配体可特定抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的传导. Wise和SOST组成另外一类LRP5/6拮抗配体家族, 体外实验发现其作用机制与Dkk-1相似, SOST可降解Wnt蛋白-Fz-LRP6三聚体复合物, 从而发挥对该信号通

路的抑制作用<sup>[27]</sup>. 另外, Shisa蛋白家族是研究较少的Wnt信号抑制剂.

### 4 Wnt信号通路参与HSC活化与增殖

HSC是一种肝脏非实质性细胞, 其激活在肝纤维化形成的过程中发挥着至关重要的作用. 最近有研究表明HSC作为一种前体细胞, 可分化为内皮细胞、肝细胞血统样(lineages), 并进一步在大鼠实验中发现其表达有干细胞标志物CD133及Oct4<sup>[28,29]</sup>. 静止的HSC富含维生素A及表达神经纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP), 激活分化为肌成纤维细胞过程中表达 $\alpha$ -SMA及合成谷氨酰胺合成酶. Wnt信号被证实肝脏胚胎分化发育中有着重要的作用, 引起肝脏体积的增大及肝细胞数量的增多等, 同时被证实与HSC的增殖与分化也存在着密切联系.

Kordes等<sup>[28]</sup>研究发现在静止的HSC中,  $\beta$ -catenin及经典Wnt蛋白Wnt1、Wnt2、Wnt3/3a、Wnt7a/b、Wnt8a、Wnt10b等均有表达; 在HSC分化为肌成纤维细胞的过程中, 经典蛋白虽也有所表达, 但相对于静止状态而言, 其表达水平有所下降, 同时非经典Wnt蛋白Wnt4、Wnt5a和Wnt11等的表达反而上升. 另外, 通过GSK-3 $\beta$ 抑制剂TWS119模仿经典Wnt信号通路刺激HSC后, 发现 $\alpha$ -SMA、增殖细胞核抗原Ki-67(99 $\pm$ 1)%、Wnt5a等表达均下降, 而GFAP、Wnt10b表达上升, 这说明了经典Wnt信号通路参与了HSC静止状态的维持, 降低了DNA的合成及阻止了HSC进入细胞周期循环. 虽然上述研究表明了经典Wnt信号通路并不参与HSC向成纤维细胞(myofibroblast, MFB)的转化, 但近几年越来越多研究结果显示经典Wnt信号通路参与了HSC活化、增殖等的过程. 2006年Haughton等<sup>[30]</sup>短期使用利福平可以抑制体外培养的从人肝脏提取出的HSC  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1的表达, 同时下调Wnt信号相关基因 $\beta$ -catenin和桥粒胶蛋白(desmocollin)的表达, 这在一定程度说明了经典Wnt信号参与了HSC的活化增殖, 并可能与TGF- $\beta$ 1信号之间存在着一定的交叉. 翁志宏等<sup>[31]</sup>通过转染Tcf依赖的荧光素酶报告质粒(pTOPFLASH)检测HSC-T6细胞内的Wnt/ $\beta$ -catenin转录活性, 发现HSC-T6转染阳性组荧光素酶活性明显高于阴性对照组( $P<0.01$ ), 表明活化的HSC过程中有经典Wnt的激活, 并将Tcf的显性负性突变体dnTcf表达质粒转染HSC-T6抑制Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的激活,  $\alpha$ -SMA和I型胶原蛋白表达下

### ■ 相关报道

Liu等用博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型中发现肺纤维化区域上皮细胞表达 $\beta$ -catenin增多, 其下游基因产物cyclin D1、MMP-7和TGF- $\beta$ 在肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞以及间质中的表达也相应有所上升.



## ■同行评价

本文内容丰富, 条理清晰, 可读性强, 反映了研究工作的科学问题和特定内容。

降( $P<0.05$ ), 进一步说明了经典Wnt信号通路与HSC活化密切相关. Kang等<sup>[6]</sup>关于姜黄素的研究认为氧化低密度脂蛋白(OX-LDL)通过结合受体(LDL-1)可诱导HSC的激活, 表达TGF- $\beta$ 1、血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、 $\alpha$ -SMA及I型胶原等, 而姜黄素则可抑制Wnt3a介导的经典Wnt信号激活诱导的LDL-1的表达, 同时 $\beta$ -catenin降解增多. 李文庭等<sup>[7]</sup>利用载有WIF-1的真核质粒转染HSC-T6后发现其活性较转染对照组和阴性对照组明显下降(均 $P<0.05$ ), 同时 $\alpha$ -SMA、Smad3及 $\beta$ -catenin的表达下降, 这说明通过阻断Wnt经典信号可抑制HSC的活化. 最近Li等<sup>[8]</sup>另外一项关于这方面的研究进一步证实了上述观点, 同样用质粒转染技术发现Wnt信号抑制剂Pokeweed抗病毒蛋白(pokeweed antiviral protein, PAP)可减轻肝纤维化的病理改变, 改善肝功能, 降低模型大鼠的 $\alpha$ -SMA、 $\beta$ -catenin的表达及体外培养HSC的活力.

目前大量研究证实非经典Wnt信号也参与了HSC的活化与增殖. Jiang等<sup>[32]</sup>研究使用微阵列法检测了几千个基因, 发现受体Fz-2及配体Wnt4、Wnt5等基因在激活培养的HSC和肝纤维化组织中表达均上升, 而磷酸化的 $\beta$ -catenin和核转入并无明显改变, 由此可说明非经典Wnt信号Wnt5a、Fz-2参与了HSC向肌成纤维母细胞的分化和肝纤维化的形成. 用血小板衍生生长因子-BB(platelet derived growth factor, PDGF-BB)激活HSC, 在48 h后用DNA微阵法在基因水平上检测显示Fz-10和 $\alpha$ -钙/钙调蛋白依赖蛋白激酶II(calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha, CAMK2A)表达上升, 而在蛋白水平上只有Fz-10增高, 由此可知Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 通路参与了HSC的激活与增殖<sup>[33]</sup>. 非经典信号蛋白Wnt4、Wnt5a及受体Fz-1、Fz-2、LRP6和Ryk mRNA水平在培养激活7 d的HSC中表达明显上升, 相比静止的HSC上升3-12倍左右, 并通过诱导cyclin D1和抗脂肪生成因子(PPAR $\beta$ )来刺激HSC的增殖,  $\alpha$ -SMA蛋白表达也随着增加<sup>[34]</sup>. 另外, 非经典蛋白Wnt4及其受体Fz-2在SD大鼠肝纤维化模型肝组织中的表达较正常大鼠相对增多, 这表明了非经典Wnt信号通路可能介导了肝纤维化动物模型的发生机制<sup>[35]</sup>.

## 5 Wnt信号通路参与HSC的凋亡信号

近年来许多关于肿瘤及癌前病变的研究都证

实了阻断经典Wnt信号通路可诱导相关病变细胞的凋亡. 在癌前病变的肝组织中发现Wnt/ $\beta$ -catenin信号是激活的, 干扰素- $\alpha$ 2b可抑制该信号通路并促进细胞的凋亡<sup>[36]</sup>. 还有研究发现非经典蛋白Wnt5a可促进间质性肺炎中肺成纤维细胞的增殖及抑制 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的凋亡, 增加粘连蛋白及整合素- $\alpha$ 5的表达<sup>[37]</sup>.

最近关于促HSC凋亡在肝纤维化治疗机制研究方面, Wnt信号作为HSC凋亡信号的一条途径逐渐被引起重视, 关于这方面相关研究有可能为将来治疗肝纤维化奠定实验基础. Wnt信号抑制参与了姜黄素诱导的人端粒逆转酶引起的HSC凋亡, 其相关信号成员Axin及FOS样抗原1(FOS-like antigen 1, FRA1)的蛋白表达有所下降<sup>[38]</sup>. Cheng等<sup>[34]</sup>分别从体外培养的HSC和从胆汁阻塞性肝纤维化大鼠模型中分离提取的HSC中证实Wnt信号共同受体阻断剂DKK-1可增加脂肪形成转录因子(C/EBP $\alpha$ )及PPAR $\gamma$ 的表达, 从而使得HSC维持静止状态, 同时运用TUNNEL荧光染色发现DKK-1的高表达可增加HSC的凋亡, caspase3蛋白表达相应增加. Myung等<sup>[39]</sup>研究表明经典Wnt3蛋白可激活人HSC LX-2并抑制肿瘤坏死因子凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)诱导的凋亡, LX-2细胞Fz2、Fz7、Fz10和I型胶原的基因表达增加,  $\alpha$ -SMA蛋白表达也上升; 而sFRP1的过表达则可以拮抗Wnt3a对其的激活作用, caspase3表达水平明显提高, 增强了TRAIL诱导的HSC凋亡.

## 6 Wnt信号与肝纤维化机制信号间的对话

肝纤维化形成过程中受到众多细胞因子的调节, 目前认为其中最重要的是PDGF与TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$ 1是HSC活化、增殖必需的调节因子, TGF- $\beta$ 1先与跨膜蛋白II型受体结合, 再与I型受体结合激活形成II型受体-TGF- $\beta$ 1-I型受体三聚体复合物, 活化的受体催化一类重要的信号分子Smad发生丝氨酸磷酸化, Smad分子形成同源或异源寡聚体后进入细胞核, 调节相关基因的转录. 有研究表明 $\beta$ -catenin可通过结合Smad核转入复合物调控依赖Smad信号的基因转录<sup>[40,41]</sup>. 李文庭等<sup>[7]</sup>实验发现了Wnt信号抑制剂WIF-1可下调活化HSC的 $\beta$ -catenin表达, 同时还可抑制Smad3的表达, 两者表达具有相关性, 这说明WIF可通过阻断TGF- $\beta$ 1信号通路从抑制活化HSC, 因此认为TGF- $\beta$ 1/Smad与经典Wnt两

种信号之间存在着对话(crosstalk). PPARs是一类新的固醇类激素受体, 可被脂肪酸及代谢产物激活, PPAR $\gamma$ 的表达增加可以抑制HSC的增殖、迁移, 抑制HSC分泌胶原、促炎因子和多种细胞因子, 此信号分子参与了肝纤维化的抑制. 植物性姜黄素<sup>[6]</sup>可通过激活PPAR $\gamma$ 阻断Wnt信号通路介导的LOX-1基因表达, 从而减少氧化低密度脂蛋白对HSC的诱导激活, 进一步抑制II型糖尿病及非酒精性肝炎相关性肝纤维化的发生. 该研究说明了Wnt信号通路和肝纤维化PPAR $\gamma$ 信号之间存在着关联和对话.

## 7 Wnt信号转导通路和肝纤维化的临床研究

目前关于Wnt信号通路和肿瘤疾病的临床研究较多, 如Ding等<sup>[42]</sup>的研究发现Wnt信号抑制剂DDK-3和WIF-1的下调表达可通过激活Wnt信号通路促进肝癌的发展. 而目前有关Wnt信号通路和肝纤维化的临床研究较少. Shackel等<sup>[43]</sup>对原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)的临床研究发现, 相比较正常人肝组织, Wnt13、Wnt5a、 $\beta$ -catenin、Fz在PBC肝组织的mRNA表达分别增加了5.7倍、3.6倍、1.8倍、4.4倍, Wnt信号目的基因*c-myc*、*c-jun*、*c-fos*相关抗原1及cyclin D1等的表达也相应增加. 另外相比正常肝组织, Wnt5a、Fz及 $\beta$ -catenin在PBC、原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)和HCV相关性肝硬化中的表达均有所上升, 这说明Wnt信号激活参与了所有形式的肝硬化. Bengochea等<sup>[44]</sup>临床研究表明相比正常人肝组织平均95%人肝细胞癌组织和68%癌周围组织可发生8个Wnt/Fz事件, 他们分别是Fz-3/6/7、Wnt3/4/5a蛋白表达上升及sFRP1/5蛋白表达下降, 并发现非硬化的癌周组织每个样本事件发生数量值为 $0.6 \pm 0.6$ , 相比硬化的癌周组织 $1.4 \pm 0.9$ , 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 从而进一步证实了肝硬化的发生与Wnt信号有关.

## 8 结论

Wnt信号转导通路在肝纤维化发生发展中起着重要作用, 但该通路在肝纤维化发生过程中的具体作用及机制尚未完全阐明. 虽然目前较多研究均证实了Wnt信号通路参与了HSC的活化, 阻断经典或非经典Wnt信号通路可抑制HSC的增殖及诱导其凋亡, 但关于其改善肝功能的研究仍很少, 同时阻断该通路可能具有广泛的不良生物学效应. 关于Wnt信号是否参与HSC的起始激活或是肝纤维化的维持及其调控机制、并

与其他信号通路间的相互作用等诸多问题尚有待进一步研究. 随着研究的深入必将有助于揭示Wnt抗肝纤维化的具体机制, 为肝纤维化的防治提供一种新的可能途径及干预靶点.

## 9 参考文献

- 1 Bolarin DM, Azinge EC. Biochemical markers, extracellular components in liver fibrosis and cirrhosis. *Nig Q J Hosp Med* 2007; 17: 42-52
- 2 Sarem M, Znaidak R, Macías M, Rey R. [Hepatic stellate cells: its role in normal and pathological conditions]. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 93-101
- 3 Wang J, Wynshaw-Boris A. The canonical Wnt pathway in early mammalian embryogenesis and stem cell maintenance/differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 533-539
- 4 Liu L, Carron B, Yee HT, Yie TA, Hajjou M, Rom W. Wnt pathway in pulmonary fibrosis in the bleomycin mouse model. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2009; 28: 99-108
- 5 Hwang I, Seo EY, Ha H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: a novel target for therapeutic intervention of fibrotic kidney disease. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 1653-1662
- 6 Kang Q, Chen A. Curcumin eliminates oxidized LDL roles in activating hepatic stellate cells by suppressing gene expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Lab Invest* 2009; 89: 1275-1290
- 7 李文庭, 陈西柳, 李宜, 朱传龙, 徐媛媛, 沈强, 高人煮. Wnt抑制因子-1对肝星状细胞活化的影响. *肝脏* 2010; 15: 338-341
- 8 Li W, Zhu C, Chen X, Li Y, Gao R, Wu Q. Pokeweed antiviral protein down-regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signalling to attenuate liver fibrogenesis in vitro and in vivo. *Dig Liver Dis* 2011; 43: 559-566
- 9 Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006; 281: 22429-22433
- 10 Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* 2006; 38: 1-10
- 11 Soriano S, Kang DE, Fu M, Pestell R, Chevallier N, Zheng H, Koo EH. Presenilin 1 negatively regulates  $\beta$ -catenin/T cell factor/lymphoid enhancer factor-1 signaling independently of  $\beta$ -amyloid precursor protein and notch processing. *J Cell Biol* 2001; 152: 785-794
- 12 Fujino H, West KA, Regan JW. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and stimulation of T-cell factor signaling following activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2. *J Biol Chem* 2002; 277: 2614-2619
- 13 Semenov MV, Habas R, Macdonald BT, He X. Snapshot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* 2007; 131: 1378
- 14 Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 2005; 38: 439-446
- 15 Kim GH, Han JK. JNK and ROK $\alpha$  function in the noncanonical Wnt/RhoA signaling pathway to regulate *Xenopus* convergent extension movements. *Dev Dyn* 2005; 232: 958-968
- 16 Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, Shah KV, Hewitt KJ, Rosenthal DT, Indig FE, Jiang Y, Nickoloff BJ, Taub

- DD, Trent JM, Moon RT, Bittner M, Weeraratna AT. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007; 282: 17259-17271
- 17 van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 2008; 1: re9
  - 18 Moon RT, Campbell RM, Christian JL, McGrew LL, Shih J, Fraser S. Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development* 1993; 119: 97-111
  - 19 Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saúde L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW. Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 2000; 405: 76-81
  - 20 Bejsovec A. Wnt pathway activation: new relations and locations. *Cell* 2005; 120: 11-14
  - 21 Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 2007; 45: 1298-1305
  - 22 Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr Biol* 1999; 9: 695-698
  - 23 Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-1851
  - 24 Hurlstone A, Clevers H. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J* 2002; 21: 2303-2311
  - 25 Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem* 2005; 280: 19185-19195
  - 26 Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 2008; 121: 737-746
  - 27 Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 2005; 280: 26770-26775
  - 28 Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367: 116-123
  - 29 Kordes C, Sawitza I, Häussinger D. Hepatic and pancreatic stellate cells in focus. *Biol Chem* 2009; 390: 1003-1012
  - 30 Haughton EL, Tucker SJ, Marek CJ, Durward E, Leel V, Bascal Z, Monaghan T, Koruth M, Collie-Duguid E, Mann DA, Trim JE, Wright MC. Pregnane X receptor activators inhibit human hepatic stellate cell transdifferentiation in vitro. *Gastroenterology* 2006; 131: 194-209
  - 31 翁志宏, 雷延昌, 彭程, 张淑玲. 阻断Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路对肝星状细胞活化的影响. *实用医学杂志* 2007; 23: 1951-1953
  - 32 Jiang F, Parsons CJ, Stefanovic B. Gene expression profile of quiescent and activated rat hepatic stellate cells implicates Wnt signaling pathway in activation. *J Hepatol* 2006; 45: 401-409
  - 33 Shin HW, Park SY, Lee KB, Shin E, Nam SW, Lee JY, Jang JJ. Transcriptional profiling and Wnt signaling activation in proliferation of human hepatic stellate cells induced by PDGF-BB. *Korean J Hepatol* 2009; 15: 486-495
  - 34 Cheng JH, She H, Han YP, Wang J, Xiong S, Asahina K, Tsukamoto H. Wnt antagonism inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G39-G49
  - 35 何益, 熊伍军. Wnt4/Frizzled2在肝纤维化组织中的表达及其意义. *肝脏* 2008; 13: 216-218
  - 36 Parody JP, Alvarez ML, Quiroga AD, Ceballos MP, Frances DE, Pisani GB, Pellegrino JM, Carnovale CE, Carrillo MC. Attenuation of the Wnt/beta-catenin/TCF pathway by in vivo interferon-alpha2b (IFN-alpha2b) treatment in preneoplastic rat livers. *Growth Factors* 2010; 28: 166-177
  - 37 Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, Oriss T, Gibson KF, Feghali-Bostwick C, Kaminski N. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 41: 583-589
  - 38 Shin HW, Park SY, Lee KB, Jang JJ. Down-regulation of Wnt signaling during apoptosis of human hepatic stellate cells. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 208-212
  - 39 Myung SJ, Yoon JH, Gwak GY, Kim W, Lee JH, Kim KM, Shin CS, Jang JJ, Lee SH, Lee SM, Lee HS. Wnt signaling enhances the activation and survival of human hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2007; 581: 2954-2958
  - 40 Lei S, Dubeykovskiy A, Chakladar A, Wojtukiewicz L, Wang TC. The murine gastrin promoter is synergistically activated by transforming growth factor-beta/Smad and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 42492-42502
  - 41 Hussein SM, Duff EK, Sirard C. Smad4 and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of *Msx2*. *J Biol Chem* 2003; 278: 48805-48814
  - 42 Ding Z, Qian YB, Zhu LX, Xiong QR. Promoter methylation and mRNA expression of DKK-3 and WIF-1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2595-2601
  - 43 Shackel NA, McGuinness PH, Abbott CA, Gorrell MD, McCaughan GW. Identification of novel molecules and pathogenic pathways in primary biliary cirrhosis: cDNA array analysis of intrahepatic differential gene expression. *Gut* 2001; 49: 565-576
  - 44 Bengochea A, de Souza MM, Lefrançois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, Kim M, Wands JR, Trepo C, Hainaut P, Scoazec JY, Vitvitski L, Merle P. Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2008; 99: 143-150

编辑 李薇 电编 何基才



# 幽门螺杆菌对胃癌细胞BGC-823形态及凋亡相关基因表达的影响

吴莺, 李翔, 周红, 范钰, 张允历, 沈琰, 何亚龙

吴莺, 李翔, 张允历, 沈琰, 何亚龙, 江苏大学附属医院消化科 江苏省镇江市 212001

周红, 江苏大学基础医学与医学技术学院 江苏省镇江市 212013

范钰, 江苏大学附属人民医院肿瘤科 江苏省镇江市 212001  
吴莺, 副教授, 主任医师, 在读博士, 主要从事幽门螺杆菌与胃肠疾病方面的研究。

江苏省研究生培养创新计划基金资助项目, No. 1221270009

作者贡献分布: 吴莺与李翔对此文所作贡献均等; 此课题由吴莺、周红及范钰设计, 研究过程由李翔、沈琰及何亚龙操作完成; 研究所用试剂及分析工具由吴莺、周红及张允历提供; 数据分析由吴莺、李翔及何亚龙完成; 本论文写作由吴莺与李翔完成。

通讯作者: 吴莺, 副教授, 212001, 江苏省镇江市解放路438号, 江苏大学附属医院消化科. jszjwy@hotmail.com  
电话: 0511-85026370

收稿日期: 2011-03-29 修回日期: 2011-05-21

接受日期: 2011-06-02 在线出版日期: 2011-06-18

## Effect of *H.pylori* extract on cellular morphology and apoptosis-related gene expression in human gastric cancer BGC-823 cells

Ying Wu, Xiang Li, Hong Zhou, Yu Fan, You-Li Zhang, Yan Shen, Ya-Long He

Ying Wu, Xiang Li, You-Li Zhang, Yan Shen, Ya-Long He, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Hong Zhou, Department of Clinical Laboratory and Hematology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Yu Fan, Cancer Institute, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China

Supported by: the Postgraduate Training Program of Jiangsu Province, No. 1221270009

Correspondence to: Associate Professor Ying Wu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, 438 Jiefang Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. jszjwy@hotmail.com

Received: 2011-03-29 Revised: 2011-05-21

Accepted: 2011-06-02 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of *H.pylori* extract on cellular morphology and apoptosis-related gene expression in human gastric cancer BGC-823 cells.

**METHODS:** After BGC-823 cells were treated with ultrasonic extract of the east Asia type or the Western type of *H.pylori* strain, the changes in cellular morphology were observed by microscopy, and the expression of survivin and caspase-3 mRNAs was detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (QRT-PCR). The possible correlation between the expression of survivin mRNA and that of caspase-3 mRNA was also analyzed.

**RESULTS:** Hummingbird phenotype was observed in BGC-823 cells 12 h after stimulation *H.pylori* extract, which was most obvious at 24 h. The percentage of cells showing hummingbird phenotype was significantly higher in cells treated with the extract of the east Asia type than in those treated with the extract of the Western type ( $29.3 \pm 2.1$  vs  $8.0 \pm 2.0$ ,  $F = 164.73$ ,  $P < 0.05$ ). The expression of survivin mRNA was significantly higher and that of caspase-3 mRNA was significantly lower in BGC-823 cells treated with *H.pylori* extract than in control cells (both  $P < 0.05$ ). Statistical difference was also noted in the expression of survivin and caspase-3 mRNAs between cells treated with the extract of the east Asia type group and those with the extract of the Western type group.

**CONCLUSION:** *H.pylori* extract could induce changes in cellular morphology and expression of survivin and caspase-3 mRNAs in human gastric cancer BGC-823 cells. The extract of the east Asia type of *H.pylori* has more potent biological activity than that of the Western type.

**Key Words:** *H.pylori*; Hummingbird phenotype; Apoptosis-related genes; CagA typing

Wu Y, Li X, Zhou H, Fan Y, Zhang YL, Shen Y, He YL. Effect of *H.pylori* extract on cellular morphology and apoptosis-related gene expression in human gastric cancer BGC-823 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1767-1772

## 摘要

**目的:** 探讨*H.pylori*刺激人胃癌细胞BGC-823

## ■背景资料

不同幽门螺杆菌(*H.pylori*)之间存在菌株的毒力差异, 主要与毒力因子的基因型相关。CagA蛋白是*H.pylori*最主要的毒力因子之一。CagA蛋白的分型主要根据CagA蛋白C端酪氨酸磷酸化位点(EPIYA)的数目和氨基酸主要序列, 分为东亚型和西方型, 并且认为这种东西方菌株之间的毒力差异, 可能与这两个地区不同的胃癌的发病率相关。

## ■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

## ■ 研发前沿

胃癌发病机制的研究一直是目前研究的热点。而凋亡相关基因表达的变化,在胃癌的形成中发挥了重要作用。在体外感染过程中,*H.pylori*引起的凋亡已经研究了一段时间,但是令人信服的分子机制仍未阐明。

后,对细胞形态以及凋亡抑制基因Survivin和凋亡基因caspase-3 mRNA表达的影响。

**方法:** 分别用东亚型*H.pylori*菌株和西方型*H.pylori*菌株超声提取物,刺激胃癌细胞BGC-823,显微镜下直接观察细胞形态的变化。同时利用荧光定量聚合酶链反应(QRT-PCR)检测胃癌细胞BGC-823凋亡抑制基因Survivin和凋亡基因caspase-3 mRNA的表达水平。

**结果:** *H.pylori*刺激胃癌细胞BGC-823后12 h,出现蜂鸟表型,呈时间依赖性,24 h最明显,东亚型组与西方型组相比,引起的细胞蜂鸟表型百分率明显增加( $29.3\% \pm 2.1\%$  vs  $8.0\% \pm 2.0\%$ ,  $F = 164.73$ ,  $P < 0.05$ )。 *H.pylori*超声提取液刺激胃癌细胞BGC-823后,在东亚型组和西方型组均出现凋亡抑制基因Survivin mRNA的表达量明显上调,与对照组相比caspase-3 mRNA的表达量明显下降( $P < 0.05$ );并且东亚型组Survivin mRNA的表达的上调以及caspase-3 mRNA的表达较西方型组均明显下降( $P < 0.05$ )。

**结论:** *H.pylori*超声提取液可诱导胃癌细胞BGC-823发生形态学改变,并且引起凋亡抑制基因Survivin mRNA表达上调、凋亡基因caspase-3 mRNA表达下降。东西方型*H.pylori*菌株之间存在生物活性的差异。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 蜂鸟表型; 凋亡相关基因; CagA蛋白分型

吴莺, 李翔, 周红, 范钰, 张允历, 沈琰, 何亚龙. 幽门螺杆菌对胃癌细胞BGC-823形态及凋亡相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1767-1772  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1767.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)感染,增加了胃癌发生的危险性,主要指远端胃腺癌,而贲门癌或称近端胃癌与*H.pylori*感染的关系不大。*H.pylori*感染的临床结果,与*H.pylori*的菌株毒力差异、环境因素及宿主因素相关。*H.pylori*分为cagA基因阳性菌株和cagA基因阴性菌株,研究显示<sup>[1-6]</sup>, CagA阳性菌株感染具有更强毒力和胃癌生成的危险性。cagA基因阳性菌株感染与癌前病变及远端胃癌的生成关系更密切。对*H.pylori*感染个体以及体外细胞学的研究显示<sup>[7-12]</sup>, *H.pylori*影响了细胞的凋亡和增殖,并最终引起癌变。本研究用cagA基因阳性*H.pylori*超声提取液刺激胃癌上皮细胞BGC-823,观察细胞形态学的改变以

及对凋亡抑制基因Survivin和凋亡基因caspase-3 mRNA表达的影响,探讨其可能的分子机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** *H.pylori*固体培养基、微需氧环境发生袋、选择性抗生素及厌氧培养罐购自德国Merck公司。小牛血清为兰州民海生物工程有限公司产品,无菌羊全血为金坛欣迪公司产品。*H.pylori* W24菌株由江苏大学附属医院消化科保存,分离自江苏大学附属医院的胃病患者(1例十二指肠球部溃疡的患者, cagA基因阳性),并经测序,确定其基因型为东亚型;国际标准菌株11637(cagA基因阳性)由江苏大学附属医院实验室保存,据其公布的基因序列定为西方型(其核酸序列GenBank接受号: AB015416; 蛋白序列GenBank接受号: BAB20926.1)<sup>[13]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 *H.pylori*培养及菌体提取物的制备:** 将冻存的*H.pylori*菌接种于哥伦比亚固体琼脂培养基,加入100 mL/L的新鲜羊血,在微需氧环境,37 °C下培养,72 h后收集细菌,经鉴定为*H.pylori*菌株,然后将生长良好的*H.pylori*刮下后用PBS漂洗两遍,然后将之悬于不含血清的DMEM培养液中,菌体悬液经超声裂解(100 W, 30 s, 10次,间隔20 s,冰浴冷却,低温离心,12 000 r/min, 4 °C),10 min后,取上清,-20 °C保存备用。

**1.2.2 细胞培养:** 人胃癌上皮细胞株BGC-823由江苏大学生命科学院提供,含100 mL/L新生小牛血清的DMEM培养基,于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>温箱中培养,2-3 d更换培养基,待细胞铺满底后,用2.5 g/L的胰酶消化成单个细胞,继续培养,取对数生长期细胞进行实验。BGC-823人胃癌上皮细胞,为人低分化胃癌细胞,建自1例62岁的胃癌患者。3个连续实验结果为最终结果,并为观察结果。

**1.2.3 蜂鸟表型观察:** 细胞消化计数后,以每孔 $3 \times 10^4$ 个细胞接种6孔板后,待细胞贴壁后,加入无血清DMEM培养液的饥饿12 h后,按每孔加入25 g/L *H.pylori*超声提取液100 μL,放培养箱中继续培养,分别在12、24 h时间位点,显微镜下直接观察细胞形态的变化,随机计数200倍视野下100个细胞中的蜂鸟表型数目。

**1.2.4 RT-PCR检测相关凋亡基因:** 提取各时间段胃癌细胞总RNA,然后检测吸光度(A)值,所提取的RNA纯度 $A_{260}/A_{280}$ 均在1.80以上。按照逆转录试剂盒说明书,将细胞的总RNA逆转录成cDNA,以GAPDH为内参照进行PCR。引物设计

与合成: 参照GenBank中的Survivin和caspase-3的基因全序列设计PCR引物. Survivin引物序列: 上游引物P1: 5'-AGAACTGGCCCTTCTTGGAGG-3'; 下游引物 P2: 5'-CTTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3', (GenBank登录号: AY795969.1); caspase-3引物序列: 上游引物P1: 5'-CAAACCTTTTTCAGAGGGGATCG-3'; 下游引物P2: 5'-GCATACTGTTTCAGCATGGCAC-3', (GenBank登录号: AY219866.1). 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成. 反应条件均为: 95 °C 30 s, 95 °C 40 s, 61 °C-71 °C 40 s, 72 °C 45 s, 40个循环, 72 °C 10 min.

**统计学处理** 用SPSS13.0统计软件进行检验, 实验数据均以mean±SD进行表示. 多个均数间比较, 用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用SNK检验,  $P<0.05$ 表示差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 *H.pylori*超声提取液刺激BGC-823细胞后细胞蜂鸟表型的变化** *H.pylori*超声提取液刺激BGC-823细胞12 h后, 细胞开始出现蜂鸟表型, 蜂鸟表型百分率随时间延长而增加, 呈时间依赖性, 24 h最明显(图1), 2个实验组分别与对照组相比, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 表1). 36 h后蜂鸟表型消失, 细胞出现空泡病变, 部分崩解, 形成碎片. 对照组细胞没有出现蜂鸟表型. 实验组中, 东亚型*H.pylori*刺激组的蜂鸟表型百分率在12、24 h, 与西方型*H.pylori*刺激组相比, 明显增高, 差异具有统计学意义(12 h,  $F = 52.00$ ; 24 h,  $F = 164.73$ ,  $P<0.05$ , 表1).

**2.2 *H.pylori*超声提取液刺激胃癌细胞BGC-823后细胞凋亡相关基因表达的变化** *H.pylori*超声提取液能够诱导胃癌细胞BGC-823凋亡抑制基因Survivin的mRNA表达量的增加. 刺激12 h时, 凋亡抑制基因Survivin的mRNA表达量最大, 随后, Survivin的mRNA表达量有所下降, 与对照组相比, 差异有统计学意义( $P<0.05$ ). 在实验组中, 东亚型组, 与西方型处理组相比, Survivin的mRNA的表达在12 h上调的更明显, 差异有统计学意义( $F = 326.260$ ,  $P<0.05$ , 图2A).

*H.pylori*超声提取液能够引起胃癌细胞BGC-823凋亡基因caspase-3的mRNA表达的下调. 在实验组, 刺激12 h时, 凋亡基因caspase-3的mRNA的表达下降最明显, 与对照组相比差异有统计学意义( $P<0.05$ ); 随后, caspase-3的mRNA表

表1 *H.pylori*超声提取液刺激胃癌细胞BGC-823后, 蜂鸟表型率的比较 (%)

作用时间	对照组	东亚型处理组	西方型处理组
12 h	1.05 ± 0.5	5.0 ± 0.5 <sup>ac</sup>	2.0 ± 0.5 <sup>a</sup>
24 h	1.50 ± 1.8	29.3 ± 2.1 <sup>a</sup>	8.0 ± 2.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 西方型处理组.

达有所增加. 而东亚型组, 与西方型处理组相比, caspase-3基因的mRNA表达在12 h下降得更明显, 差异有统计学意义( $F = 240.388$ ,  $P<0.05$ , 图2B).

## 3 讨论

*cagA*基因编码的CagA蛋白, 是*H.pylori*的主要毒力因子之一, 被注入*H.pylori*黏附的胃上皮细胞后, 通过Src家族激酶在其保守的C-端酪氨酸磷酸化基序-EPIYA基序上进行酪氨酸磷酸化, 并与细胞磷酸酶SHP-2连接引起其异常的酪氨酸磷酸化, 引起细胞形态学改变蜂鸟表型, 表现为细胞的分散、伪足的延伸, 这种细胞具有肌动蛋白聚合、细胞骨架重排、细胞活力明显增强的特征. 同时CagA还引起Erk信号途径的异常激活, 诱导了cyclin D1, 启动了G<sub>1</sub>-S过程, 基质金属蛋白酶1(matrix metalloprotease-1, MMP-1)的分泌, 破坏了胃基质<sup>[14,15]</sup>; CagA蛋白还上调NF-κB转录因子, 经由MAP激酶途径刺激细胞因子的生成, 像IL-8<sup>[16]</sup>. CagA蛋白的这些作用在胃腺癌的形成中发挥了重要作用. 这些结果显示了*H.pylori* CagA蛋白是涉及胃腺癌形成的第一个被识别的细菌癌蛋白. CagA的酪氨酸磷酸化以及CagA蛋白与SHP-2的连接, 是蜂鸟表型变化所必需的2个过程<sup>[17,18]</sup>. 蜂鸟表型的改变, 在*cagA*基因阳性*H.pylori*的发病机制中起关键作用<sup>[19]</sup>.

本研究使用的野生菌W24菌株, 分离自镇江的一个十二指肠球部溃疡的患者, PCR测定显示为*cagA*基因阳性菌株, CagA蛋白序列测定为东亚型; 另一株11637国际标准菌株, 也为*cagA*基因阳性菌株, GenBank上公布序列显示为西方型<sup>[13]</sup>. 我们应用这2个来自东西方的*H.pylori*菌株分别刺激人胃癌细胞BGC-823, 均引起了细胞蜂鸟表型改变, 对照组几乎没有这种改变, 差异有统计学意义. 蜂鸟表型的改变在作用24 h时最明显, 与Zhang等<sup>[20]</sup>的研究一致. 东亚型菌株, 在不同时间段引起的蜂鸟表型百分率分别是西方型菌株2倍、3倍(12 h,  $F = 52.00$ ; 24 h,  $F = 164.73$ ,

## ■ 相关报道

吴莺等的研究显示镇江地区不同*H.pylori*的*cagA*基因及其3'可变区结构的变化, 以及不同地区*H.pylori* *cagA*基因羧基端可变区及其蛋白序列的差异, 显示CagA蛋白存在东亚型和西方型的差异; Higashi等的研究也显示了CagA蛋白的分型与*H.pylori*的生物活性相关, 与胃黏膜萎缩、肠化生、胃癌相关, 东亚和西方之间CagA蛋白结构的不同是其功能不同的关键.



# ■创新盘点

*H. pylori*可以引起体外培养细胞蜂鸟表型改变。本研究显示东西方*H. pylori*引起细胞蜂鸟表型的能力存在差异；进一步的研究显示，东西方*H. pylori*引起的细胞凋亡相关基因的mRNA表达也存在差异，进一步揭示了东西方型*H. pylori*的生物学功能上的差异。

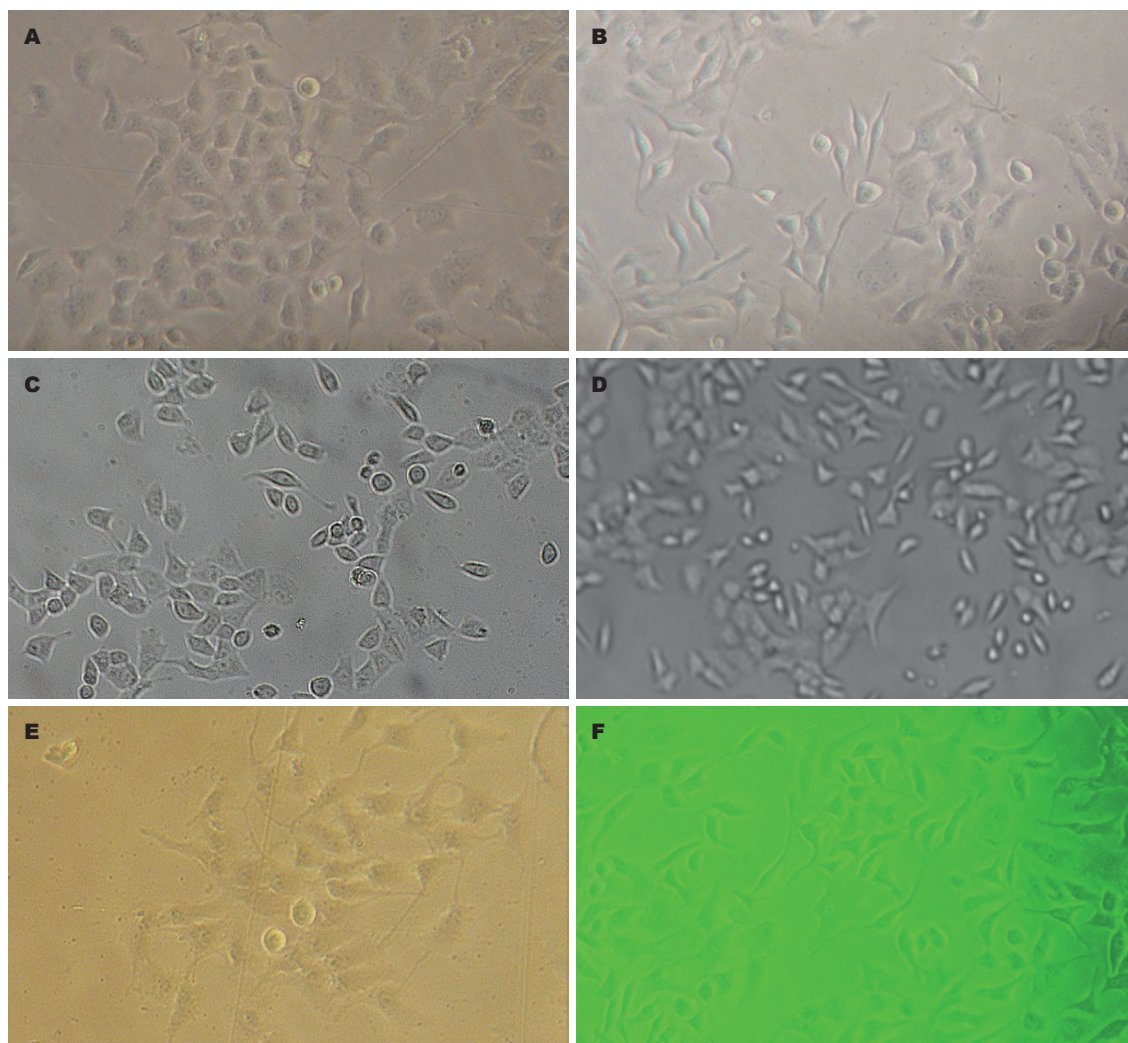


图1 *H. pylori*超声提取液刺激胃癌细胞BGC-823后, 12、24 h细胞形态学的改变. A, D: 对照组; B, E: 东亚型菌株处理组; C, F: 西方型菌株处理组; A-C: 12 h; D-F: 24 h.

$P < 0.05$ ), 显示东亚型菌株, 与西方型菌株相比, 能够引起更多的细胞蜂鸟表型改变。

同为*cagA*基因阳性的*H. pylori*菌株之间, 存在生物活性差异, 主要与CagA蛋白的C端酪氨酸磷酸化位点(EPIYA)的数目和氨基酸序列的变化相关。东亚型*H. pylori*菌株, 主要来自中国、日本、韩国, 具有相似的CagA蛋白的结构, 即EPIYA-A-B-D型; 西方型*H. pylori*菌株, 主要来自欧洲、美国、澳大利亚等国家, 具有相似的CagA蛋白结构, 即EPIYA-A-B-C型。影响与SHP-2连接能力以及CagA蛋白酪氨酸磷酸化能力的主要是CagA蛋白的序列中的EPIYA-C或EPIYA-D。而东亚型菌株的EPIYA-D, 与西方型菌株的EPIYA-C相比, 具有更强的与SHP-2的连接能力, 以及酪氨酸磷酸化能力, 因而能引起更多的蜂鸟表型改变、更多的IL-8的分泌, 具有更强的生物活性<sup>[20-22]</sup>。

*cagA*阳性*H. pylori*的持续感染, 使得胃上皮细胞持续受到不断注入的新CagA蛋白的攻击, 持续受到CagA激活的SHP-2致癌蛋白的异常刺激, 逐渐引起的下游基因表达的改变, 而凋亡相关基因表达的变化, 在胃癌的形成中发挥了重要作用。在体外实验中, *H. pylori*能够引起不同胃上皮细胞的凋亡, *H. pylori*的毒力因子, 包括CagA蛋白, 均能引起凋亡<sup>[23-27]</sup>。但是令人信服的分子机制仍未阐明。一些报道显示, 细胞内蛋白激酶途径<sup>[28]</sup>或caspase-3<sup>[29]</sup>与*H. pylori*, 是引起胃上皮细胞凋亡的主要因素。多个研究显示线粒体途径, 可能是*H. pylori*感染引起的胃上皮细胞凋亡的主要信号途径<sup>[30,31]</sup>。

我们用*H. pylori*超声提取液刺激胃癌细胞BGC-823, 引起了细胞凋亡抑制基因Survivin基因mRNA表达的上调, 凋亡基因caspase-3基因mRNA表达的下降, 与对照组相比, 差异有统计

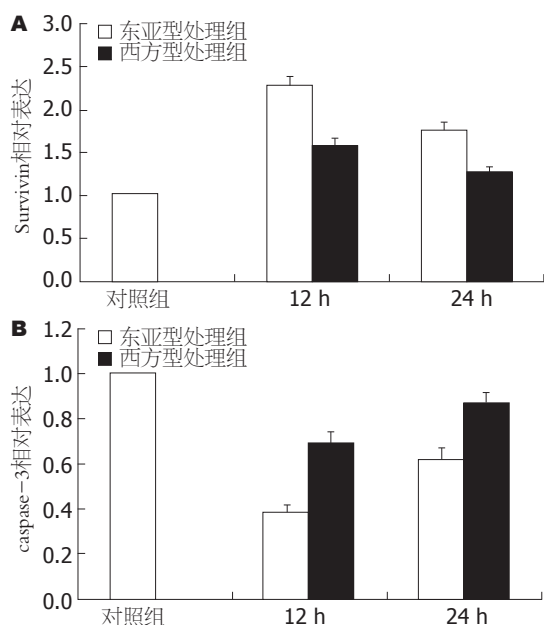


图2 *H. pylori*超声提取液对胃癌细胞BGC-823的caspase-3及Survivin基因表达量的影响。A: Survivin; B: caspase-3。

学意义。这2个基因的变化在*H. pylori*刺激细胞后12 h最明显,以后有所恢复。这个结果反映了*H. pylori*在这个时间段对胃癌细胞的直接刺激作用,提示*H. pylori*的持续刺激可能是造成胃黏膜慢性炎症损伤的基础。Survivin通过触发终端效应器caspase-3和caspase-7而阻止了凋亡。Valenzuela等的体外研究显示,*H. pylori*感染胃上皮细胞后, Survivin的过表达,减少了细胞的凋亡<sup>[7]</sup>。因此, Survivin在胃黏膜是重要的生存因子。Yu等<sup>[32]</sup>的研究显示,在胃癌中Survivin的表达,与凋亡的减少、COX-2的表达相关。另一方面,在非肿瘤组织中, Survivin的表达与*H. pylori*感染、胃炎密切相关。应用胃癌和正常黏膜标本的研究显示,在正常胃黏膜,没有Survivin基因的表达,但是有caspase-3基因的mRNA和蛋白表达;在胃癌和癌症邻近正常组织中, Survivin基因的表达增加;而在胃癌标本中,仅有procaspase-3的表达,而活性caspase-3则完全检测不到,在癌症邻近正常黏膜,也没有检测到caspase-3的基因和蛋白表达<sup>[32,33]</sup>,伴有较高Survivin表达的胃癌患者,组织学分级和分期较差,因此Survivin基因可作为预测预后的指标<sup>[34]</sup>,控制Survivin基因的表达有助于胃癌的化疗<sup>[35]</sup>。因此, caspase-3和Survivin表达水平的变化在正常黏膜向胃癌转化过程中发挥了重要作用。

东亚型菌株,与西方型菌株相比,引起凋亡相关基因表达的变化更明显,具有统计学意义

( $P < 0.05$ ),显示了东亚型菌株,与西方型菌株相比,具有更强的生物学活性。

我们的研究显示, *H. pylori*超声提取液引起了细胞形态学改变和凋亡相关基因表达的变化,显示*H. pylori*在启动胃黏膜炎症和萎缩的同时,还伴有某些细胞因子的变化,以及凋亡相关蛋白表达的变化,如Survivin基因的过表达,引起细胞的增殖、凋亡抑制和胃癌形成。cagA基因阳性的东西方菌株之间存在生物活性的差异:东亚型菌株,与西方型菌株相比,具有更强的诱导细胞增殖表现改变的能力以及对凋亡相关基因表达变化的影响更大,因而显示了更强的生物学活性。东西方*H. pylori*菌株之间的生物学活性差异,可能是造成东西方地区胃癌发病率不同的原因。

#### 4 参考文献

- Backert S, Schwarz T, Miehke S, Kirsch C, Sommer C, Kwok T, Gerhard M, Goebel UB, Lehn N, Koenig W, Meyer TF. Functional analysis of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun* 2004; 72: 1043-1056
- Tanaka H, Yoshida M, Azuma T. [The role of CagA in *H. pylori* infection]. *Nippon Rinsho* 2009; 67: 2245-2249
- Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96: 835-843
- Hatakeyama M. The role of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis. *Int J Hematol* 2006; 84: 301-308
- Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol* 2009; 44: 239-248
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789
- Valenzuela M, Pérez-Pérez G, Corvalán AH, Carrasco G, Urrea H, Bravo D, Toledo H, Quest AF. *Helicobacter pylori*-induced loss of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin is linked to gastritis and death of human gastric cells. *J Infect Dis* 2010; 202: 1021-1030
- Matsumoto A, Isomoto H, Nakayama M, Hisatsune J, Nishi Y, Nakashima Y, Matsushima K, Kurazono H, Nakao K, Hirayama T, Kohno S. *Helicobacter pylori* VacA reduces the cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-XL, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 999-1006
- Konturek PC, Konturek SJ, Bielanski W, Kania J, Zuchowicz M, Hartwich A, Rehfeld JF, Hahn EG. Influence of COX-2 inhibition by rofecoxib on serum and tumor progastrin and gastrin levels and expression of PPARgamma and apoptosis-related proteins in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 2005-2017
- Wu MS, Shun CT, Wang HP, Sheu JC, Lee WJ,

#### ■应用要点

本文进一步研究东西方*H. pylori*的生物学差异的原因,有可能揭示东亚地区胃癌高发的原因,以及*H. pylori*的致病机制。应用CagA蛋白突变体的研究,可能能够更准确的揭示不同CagA蛋白致病力差异的机制。



## ■同行评价

本文设计严谨, 方法先进, 具有较好的理论意义。

- Wang TH, Lin JT. Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1997; 112: 1457-1465
- 11 Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, De Rosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut* 1999; 44: 789-799
- 12 Maor-Kendler Y, Gabay G, Bernheim J, Naftali T, Lesin I, Leichtman G, Pomeranz I, Novis B. Expression of bcl-2 in autoimmune and *Helicobacter pylori*-associated atrophic gastritis. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 680-685
- 13 吴莺, 张允历, 范钰, 魏金文, 何亚龙, 沈琰, 陈劲频, 印亦萍, 王文兵. 镇江地区 *H.pylori* 的 *cagA* 基因及其 3' 可变区结构的变化. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3147-3151
- 14 Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Pestell RG, Blaser MJ, Chen CC. Mechanisms for *Helicobacter pylori* CagA-induced cyclin D1 expression that affect cell cycle. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1740-1752
- 15 Pillinger MH, Marjanovic N, Kim SY, Lee YC, Scher JU, Roper J, Abeles AM, Izmirly PI, Axelrod M, Pillinger MY, Tolani S, Dinsell V, Abramson SB, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* stimulates gastric epithelial cell MMP-1 secretion via CagA-dependent and -independent ERK activation. *J Biol Chem* 2007; 282: 18722-18731
- 16 Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 9300-9305
- 17 Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002; 43: 971-980
- 18 Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, Azuma T, Hatakeyama M. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* 2006; 130: 1181-1190
- 19 Backert S, Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Meyer TF. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 2001; 42: 631-644
- 20 Zhang Y, Argent RH, Letley DP, Thomas RJ, Atherton JC. Tyrosine phosphorylation of CagA from Chinese *Helicobacter pylori* isolates in AGS gastric epithelial cells. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 786-790
- 21 Azuma T. *Helicobacter pylori* CagA protein variation associated with gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol* 2004; 39: 97-103
- 22 Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 14428-14433
- 23 Konturek PC, Pierzchalski P, Konturek SJ, Meixner H, Faller G, Kirchner T, Hahn EG. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 375-383
- 24 Ahmed A, Smoot D, Littleton G, Tackey R, Walters CS, Kashanchi F, Allen CR, Ashktorab H. *Helicobacter pylori* inhibits gastric cell cycle progression. *Microbes Infect* 2000; 2: 1159-1169
- 25 Shirin H, Sordillo EM, Oh SH, Yamamoto H, Delohery T, Weinstein IB, Moss SF. *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Res* 1999; 59: 2277-2281
- 26 Buti L, Spooner E, Van der Veen AG, Rappuoli R, Covacci A, Ploegh HL. *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASP2) tumor suppressor pathway of the host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 9238-9243
- 27 Le'Negrato G, Ricci V, Hofman V, Mograbi B, Hofman P, Rossi B. Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the cag pathogenicity island phenotype. *Infect Immun* 2001; 69: 5001-5009
- 28 Domek MJ, Netzer P, Prins B, Nguyen T, Liang D, Wyle FA, Warner A. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in human epithelial gastric cells by stress activated protein kinase pathway. *Helicobacter* 2001; 6: 110-115
- 29 Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK, Pyo S. Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Toxicon* 2003; 42: 601-611
- 30 Zhang H, Fang DC, Lan CH, Luo YH. *Helicobacter pylori* infection induces apoptosis in gastric cancer cells through the mitochondrial pathway. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1051-1056
- 31 Galmiche A, Rassow J. Targeting of *Helicobacter pylori* VacA to mitochondria. *Gut Microbes* 2010; 1: 392-395
- 32 Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002; 87: 91-97
- 33 Kania J, Konturek SJ, Marlicz K, Hahn EG, Konturek PC. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 266-271
- 34 Li YH, Wang C, Meng K, Chen LB, Zhou XJ. Influence of survivin and caspase-3 on cell apoptosis and prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1984-1988
- 35 Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, Torigoe T, Sato N, Watanabe N. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. *Cancer Sci* 2004; 95: 44-51

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 白介素-10对梗阻性黄疸大鼠肝组织转化生长因子 $\beta$ 1表达和肝细胞凋亡的影响

曹阳, 赵闯, 徐锋, 戴朝六

曹阳, 赵闯, 徐锋, 戴朝六, 中国医科大学附属盛京医院肝胆脾外科 辽宁省沈阳市 110004

曹阳, 在读硕士, 主要从事肝胆疾病基础与临床研究.

沈阳市科学技术计划项目基金资助项目, No. F10-205-1-53

**作者贡献分布:** 此课题由戴朝六与曹阳设计; 研究过程由曹阳与赵闯操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由戴朝六与赵闯提供; 数据分析由曹阳与徐锋完成; 本论文写作由戴朝六与曹阳完成.

**通讯作者:** 戴朝六, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院肝胆脾外科.

cmueycaoyangcmu@163.com

收稿日期: 2011-04-18 修回日期: 2011-05-20

接受日期: 2011-05-24 在线出版日期: 2011-06-18

## Interleukin-10 suppresses hepatic TGF- $\beta$ 1 expression and attenuates hepatocyte apoptosis in biliary-obstructed rats

Yang Cao, Chuang Zhao, Feng Xu, Chao-Liu Dai

Yang Cao, Chuang Zhao, Feng Xu, Chao-Liu Dai, Department of Hepatobiliary & Splenic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Shenyang Science and Technology Program, No. F10-205-1-53

Correspondence to: Professor Chao-Liu Dai, Department of Hepatobiliary & Splenic Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Avenue, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. cmueycaoyangcmu@163.com

Received: 2011-04-18 Revised: 2011-05-20

Accepted: 2011-05-24 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To explore the effect of interleukin-10 (IL-10) on hepatocyte apoptosis in biliary-obstructed rats.

**METHODS:** Male Wistar rats were divided randomly into sham operation (SO) group, obstructive jaundice (OJ) group and IL-10 group. Rats of the OJ and IL-10 groups underwent ligation and severing of the common bile duct, while mobilization of the common bile duct was performed in the SO group. The IL-10 group was intraperitoneally injected with IL-10 (4  $\mu$ g/kg) daily after operation. The mRNA and protein expression

of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in liver tissue was detected by fluorescence real-time quantitative PCR and immunohistochemical staining, respectively. Blood samples were taken to measure serum total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) levels, while hepatic cell apoptosis was evaluated by TUNEL method.

**RESULTS:** Compared to the SO group, the levels of serum ALT and AST, hepatic TGF- $\beta$ 1 mRNA and protein expression, and hepatic cell apoptosis index significantly increased in the OJ group 3 days after operation (ALT: 91.83 U/L  $\pm$  21.47 U/L vs 47.67 U/L  $\pm$  12.79 U/L; AST: 208.67 U/L  $\pm$  32.36 U/L vs 75.17 U/L  $\pm$  11.96 U/L; TGF- $\beta$ 1 mRNA: 7.48  $\pm$  1.51 vs 1.21  $\pm$  0.79; TGF- $\beta$ 1 protein: 6.11%  $\pm$  1.11% vs 1.26%  $\pm$  0.64%; apoptosis: 15.06%  $\pm$  1.17% vs 3.94%  $\pm$  0.46%; all  $P < 0.05$ ), and further increased 7 d after operation (ALT: 178.83 U/L  $\pm$  46.25 U/L vs 44.50 U/L  $\pm$  9.97 U/L; AST: 461.17 U/L  $\pm$  88.48 U/L vs 76.50 U/L  $\pm$  12.39 U/L; TGF- $\beta$ 1 mRNA: 11.98  $\pm$  3.05 vs 1.01  $\pm$  0.52; TGF- $\beta$ 1 protein: 9.97%  $\pm$  2.84% vs 1.68%  $\pm$  0.71%; apoptosis: 23.49%  $\pm$  3.35% vs 4.31%  $\pm$  0.67%; all  $P < 0.05$ ). Treatment with IL-10 significantly decreased hepatic function, hepatic TGF- $\beta$ 1 expression, and hepatic cell apoptosis compared to the OJ group 7 d after operation (ALT: 94.17 U/L  $\pm$  20.02 U/L vs 178.83 U/L  $\pm$  46.25 U/L; AST: 257.83 U/L  $\pm$  56.53 U/L vs 461.17 U/L  $\pm$  88.48 U/L; TGF- $\beta$ 1 mRNA: 7.05  $\pm$  1.15 vs 11.98  $\pm$  3.05; TGF- $\beta$ 1 protein: 7.06%  $\pm$  1.32% vs 9.97%  $\pm$  2.84%; apoptosis: 15.08%  $\pm$  1.69% vs 23.49%  $\pm$  3.35%; all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** IL-10 could attenuate hepatocyte apoptosis by suppressing hepatic TGF- $\beta$ 1 expression in biliary-obstructed rats.

**Key Words:** Obstructive jaundice; Apoptosis; Interleukin-10; Transforming growth factor- $\beta$ 1

Cao Y, Zhao C, Xu F, Dai CL. Interleukin-10 suppresses hepatic TGF- $\beta$ 1 expression and attenuates hepatocyte apoptosis in biliary-obstructed rats. *Shijie Huaren Xiaowai*

## ■背景资料

梗阻性黄疸是外科常见的临床问题, 此类患者往往并发不同程度的肝功能不全甚至出现肝功能衰竭. 随着细胞凋亡测定方法的改进, 越来越多的证据表明, 肝细胞凋亡在梗阻性黄疸肝功能衰竭中起着重要的促进作用.

## ■同行评议者

崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外科



## ■ 研发前沿

梗阻性黄疸受损肝脏治疗中,以肝细胞凋亡为靶点的治疗日益成为肝胆外科研究领域的热点。

hua Zazhi 2011; 19(17): 1773-1779

## 摘要

**目的:** 探讨白介素-10(IL-10)对梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡的作用。

**方法:** Wistar  $\delta$  大鼠随机分为假手术(SO)组、梗阻性黄疸(OJ)组和IL-10组。OJ组和IL-10组结扎切断胆总管建立梗阻性黄疸模型, SO组仅游离胆总管。IL-10组术后第1天开始每天腹腔内注射IL-10(4  $\mu$ g/kg)。实时荧光定量PCR法检测肝组织转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) mRNA的水平, 免疫组织化学法检测肝组织TGF- $\beta$ 1蛋白表达情况。末端脱氧核苷酸介导生物素标记(TUNEL)法检测大鼠肝细胞凋亡情况, 并检测血清TBIL、DBIL、ALT和AST水平。

**结果:** 胆总管结扎术后3 d, 与SO组相比, OJ组大鼠血清转氨酶、肝组织TGF- $\beta$ 1表达水平及肝细胞凋亡率均明显升高(ALT: 91.83 U/L  $\pm$  21.47 U/L vs 47.67 U/L  $\pm$  12.79 U/L; AST: 208.67 U/L  $\pm$  32.36 U/L vs 75.17 U/L  $\pm$  11.96 U/L; TGF- $\beta$ 1 mRNA: 7.48  $\pm$  1.51 vs 1.21  $\pm$  0.79; TGF- $\beta$ 1蛋白: 6.11%  $\pm$  1.11% vs 1.26%  $\pm$  0.64%; 凋亡: 15.06%  $\pm$  1.17% vs 3.94%  $\pm$  0.46%; 均 $P$ <0.05)。胆总管结扎术后7 d, 与SO组相比, OJ组大鼠上述各项实验指标均进一步升高(ALT: 178.83 U/L  $\pm$  46.25 U/L vs 44.50 U/L  $\pm$  9.97 U/L; AST: 461.17 U/L  $\pm$  88.48 U/L vs 76.50 U/L  $\pm$  12.39 U/L; TGF- $\beta$ 1 mRNA: 11.98  $\pm$  3.05 vs 1.01  $\pm$  0.52; TGF- $\beta$ 1蛋白: 9.97%  $\pm$  2.84% vs 1.68%  $\pm$  0.71%; 凋亡: 23.49%  $\pm$  3.35% vs 4.31%  $\pm$  0.67%; 均 $P$ <0.05)。应用IL-10治疗后, 与OJ组相比, IL-10组大鼠肝功能、肝组织TGF- $\beta$ 1表达水平及肝细胞凋亡率均明显降低(ALT: 94.17 U/L  $\pm$  20.02 U/L vs 178.83 U/L  $\pm$  46.25 U/L; AST: 257.83 U/L  $\pm$  56.53 U/L vs 461.17 U/L  $\pm$  88.48 U/L; TGF- $\beta$ 1 mRNA: 7.05  $\pm$  1.15 vs 11.98  $\pm$  3.05; TGF- $\beta$ 1蛋白: 7.06%  $\pm$  1.32% vs 9.97%  $\pm$  2.84%; 凋亡: 15.08%  $\pm$  1.69% vs 23.49%  $\pm$  3.35%; 均 $P$ <0.05)。

**结论:** IL-10可通过抑制肝组织TGF- $\beta$ 1的表达, 而减少梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡。

**关键词:** 梗阻性黄疸; 凋亡; 白介素-10; 转化生长因子- $\beta$ 1

曹阳, 赵闯, 徐锋, 戴朝六. 白介素-10对梗阻性黄疸大鼠肝组织转化生长因子 $\beta$ 1表达和肝细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1773-1779

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1773.asp>

## 0 引言

梗阻性黄疸是外科常见的临床问题, 此类患者往往并发不同程度的肝功能不全甚至出现肝功能衰竭<sup>[1-3]</sup>。既往研究表明, 肝细胞凋亡在梗阻性黄疸肝脏损伤过程中起着重要作用, 是肝细胞死亡的主要方式之一, 而肝组织转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)对肝细胞凋亡有着明显的促进作用<sup>[4-8]</sup>。最近研究发现, 白介素-10(interleukin-10, IL-10)可减少外源性内毒素所致肝损伤过程中的肝细胞凋亡<sup>[9]</sup>。此外, 也有研究发现, 外源性IL-10可通过抑制肝组织TGF- $\beta$ 1的表达而改善肝纤维化<sup>[10]</sup>。本实验旨在通过研究外源性IL-10对梗阻性黄疸大鼠肝组织TGF- $\beta$ 1表达、肝细胞凋亡率的影响, 探讨IL-10对梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡的作用及其分子生物学机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** Wistar  $\delta$  大鼠, 体质量200-240 g, 中国医科大学附属盛京医院实验动物中心提供; 重组大鼠IL-10购自美国PeproTech公司; 末端脱氧核苷酸介导生物素标记(TUNEL)凋亡试剂盒购自德国Roche Diagnostics公司; 大鼠TGF- $\beta$ 1多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; 免疫组织化学SP染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 总RNA抽提试剂盒、逆转录试剂盒及PCR扩增试剂盒均购自TaKaRa公司; 内参 $\beta$ -actin及TGF- $\beta$ 1引物由北京奥科生物技术有限公司设计合成; 荧光定量仪: LightCycler定量PCR扩增仪及配套分析软件Roche LightCycler Run 5.32(德国Roche Diagnostics公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 分组:** Wistar  $\delta$  大鼠30只随机分为假手术组(SO组)12只、梗阻性黄疸组(OJ组)12只和IL-10组6只。SO组和OJ组再随机分设术后3 d和术后7 d两个亚组, 每个亚组6只。

**1.2.2 模型制备和取材:** 参照Erguder等报道的方法建立梗阻性黄疸模型, 各组大鼠均用100 g/L水合氯醛(按3  $\mu$ L/g)腹腔内注射麻醉, 于十二指肠韧带内辨认胆总管, 距离十二指肠2.0 cm处游离胆总管约0.5 cm, SO组手术到此为止, OJ组和IL-10组3/0丝线双重结扎并于结间切断胆总管<sup>[11,12]</sup>。IL-10组大鼠术后第1天开始每天腹腔内注射IL-10(4  $\mu$ g/kg), 于术后7 d取材。SO组和OJ组大鼠术后对应时间点腹腔内注射同等剂量的生理盐水, 分别于术后3 d和7 d取材。上述各

组大鼠均腹主动脉采血,离心取上层血清后置于-80℃冰箱保存待行肝功能检测;快速夹取肝左叶部分组织置于-80℃冰箱保存待行肝组织TGF- $\beta$ 1 mRNA检测;另取肝左叶部分组织置于40 g/L多聚甲醛中固定待行肝脏免疫组织化学及肝细胞凋亡检测。

1.2.3 肝功能指标检测:使用全自动生化分析仪测定不同时点血清TBIL、DBIL、ALT和AST水平。

1.2.4 实时荧光定量PCR法检测肝组织TGF- $\beta$ 1 mRNA表达水平: (1)总RNA抽取:按总RNA抽提试剂盒说明书操作步骤提取肝组织总RNA,紫外分光光度计测定纯度并定量; (2)逆转录合成cDNA:反应体系为20.0  $\mu$ L: 5 $\times$ PrimeScript<sup>TM</sup> Buffer 4.0  $\mu$ L, Random 6 mers 1.0  $\mu$ L, PrimeScript<sup>TM</sup> RT Enzyme Mix I 1.0  $\mu$ L, Oligo dT Primer 1.0  $\mu$ L, 总RNA 1.0  $\mu$ L, 加去RNA酶水至总体积为20.0  $\mu$ L。37℃水浴15 min后, 85℃水浴5 s灭活内转录酶。产物置于-20℃冰箱内冻存储备用; (3)PCR扩增:内参基因 $\beta$ -actin:上游引物5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 下游引物5'-GACTCATCGTACTCCTGCCTGCTG-3', 扩增产物长度150 bp。目的基因TGF- $\beta$ 1:上游引物5'-AGGGCTTTTCGCTTCAGTGCT-3', 下游引物5'-CCATGAGGAGCAGGAAGGGT-3', 扩增产物长度141 bp。反应体系为20.0  $\mu$ L: 上下游引物各0.4  $\mu$ L, SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 10.0  $\mu$ L, dH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu$ L, cDNA模板2.0  $\mu$ L。反应条件: 95℃预变性10 s, 60℃退火20 s, 72℃延伸20 s, 共45个循环, 在退火阶段收集特异性荧光信号。结果计算:  $\Delta\Delta C_t = (\text{实验组目的基因}C_t\text{均值} - \text{实验组内参基因}C_t\text{均值}) - (\text{对照组目的基因}C_t\text{均值} - \text{对照组内参基因}C_t\text{均值})$ , 然后取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 即代表被测样品初始TGF- $\beta$ 1 mRNA的含量<sup>[13]</sup>。

1.2.5 免疫组织化学法检测肝组织TGF- $\beta$ 1表达:石蜡切片常规脱蜡至水, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液消除内源性过氧化物酶活性, 0.1 mol/L枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原, 正常山羊血清封闭非特异性抗原后, 滴加兔抗大鼠TGF- $\beta$ 1多抗(1:100), 二抗, DAB显色, 苏木素复染封片。PBS代替一抗作对照, 检测肝组织TGF- $\beta$ 1表达情况。每例切片随机计数5个400倍视野, 以平均每100个细胞中含阳性细胞个数作为其平均阳性率。

1.2.6 肝细胞凋亡检测:采用TUNEL法检测大鼠肝细胞凋亡状态。主要步骤: (1)石蜡切片常规脱蜡水化, 浓度为20  $\mu$ g/mL蛋白酶K消化37℃ $\times$ 15 min; (2)加50  $\mu$ L TUNEL反应混合液于标本



图1 大鼠胆总管结扎术后7 d取材肉眼所见。肝脏呈淤胆状, 颜色为棕黄色, 结扎处近肝脏侧胆总管明显增粗。

上, 于暗湿盒中反应37℃ $\times$ 60 min; (3)加50  $\mu$ L converter-POD于标本上, 于暗湿盒中反应37℃ $\times$ 30 min; (4)DAB显色, 苏木素复染。每例切片随机计数5个400倍视野, 以平均每100个细胞中含凋亡细胞个数作为凋亡指数(apoptosis index, AI)。

统计学处理 所有实验数据均以mean $\pm$ SD表示, 组间比较采用SPSS17.0统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 术后一般情况及取材肉眼所见 OJ组和IL-10组大鼠胆总管结扎术后1 d出现尿色加深, 术后2 d出现皮肤及巩膜黄染, 大便颜色变浅。取材时可见肝脏呈淤胆状, 颜色由暗红转为棕黄色; 结扎处近肝脏侧胆总管明显增粗, 直径由正常的1 mm增至3-5 mm不等。SO组大鼠无上述梗阻性黄疸表现(图1)。

2.2 肝功能指标的检测 SO组术后各时点血清中胆红素和转氨酶水平均较低。OJ组随着胆总管结扎时间的延长, 术后血清中胆红素和转氨酶水平逐渐升高且均高于SO组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); IL-10组转氨酶水平明显低于OJ组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 但胆红素水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表1)。

2.3 肝组织TGF- $\beta$ 1 mRNA的表达 SO组术后各时点肝组织中TGF- $\beta$ 1 mRNA表达水平均较低。OJ组随着胆总管结扎时间的延长, 术后肝组织中TGF- $\beta$ 1 mRNA表达水平逐渐升高且均高于SO组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); IL-10组肝组织中TGF- $\beta$ 1 mRNA水平明显低于OJ组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表2, 图2)。

2.4 肝组织TGF- $\beta$ 1蛋白的表达情况 阳性染色呈

## ■相关报道

Zhong等研究表明, 白介素-10可通过抑制肝组织TGF- $\beta$ 1的表达而减少由外源性内毒素所致肝损伤过程中的肝细胞凋亡。

## ■创新盘点

本实验通过建立梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡模型, 阐述白介素-10可通过降低肝组织TGF- $\beta$ 1的表达, 抑制梗阻性黄疸肝细胞凋亡并改善受损肝功能。

表 1 各组大鼠血清ALT、AST、TBIL和DBIL水平比较 (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ )

分组	ALT(U/L)		AST(U/L)		TBIL( $\mu$ mol/L)		DBIL( $\mu$ mol/L)	
	3 d	7 d	3 d	7 d	3 d	7 d	3 d	7 d
SO组	47.67 $\pm$ 12.79	44.50 $\pm$ 9.97	75.17 $\pm$ 11.96	76.50 $\pm$ 12.39	5.36 $\pm$ 1.51	6.44 $\pm$ 1.93	3.69 $\pm$ 0.98	4.78 $\pm$ 1.42
OJ组	91.83 $\pm$ 21.47 <sup>a</sup>	178.83 $\pm$ 46.25 <sup>a</sup>	208.67 $\pm$ 32.36 <sup>a</sup>	461.17 $\pm$ 88.48 <sup>a</sup>	72.46 $\pm$ 11.35 <sup>a</sup>	109.28 $\pm$ 22.68 <sup>a</sup>	61.16 $\pm$ 13.85 <sup>a</sup>	95.79 $\pm$ 19.00 <sup>a</sup>
IL-10组		94.17 $\pm$ 20.02 <sup>c</sup>		257.83 $\pm$ 56.53 <sup>c</sup>		103.13 $\pm$ 13.77 <sup>c</sup>		88.10 $\pm$ 7.74 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs SO组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs OJ组。

表 2 各组大鼠肝组织TGF- $\beta$ 1 mRNA、蛋白的表达和肝细胞AI (mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ )

分组	TGF- $\beta$ 1 mRNA		TGF- $\beta$ 1蛋白(%)		AI(%)	
	3 d	7 d	3 d	7 d	3 d	7 d
SO组	1.21 $\pm$ 0.79	1.01 $\pm$ 0.52	1.26 $\pm$ 0.64	1.68 $\pm$ 0.71	3.94 $\pm$ 0.46	4.31 $\pm$ 0.67
OJ组	7.48 $\pm$ 1.51 <sup>a</sup>	11.98 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>	6.11 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	9.97 $\pm$ 2.84 <sup>a</sup>	15.06 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	23.49 $\pm$ 3.35 <sup>a</sup>
IL-10组		7.05 $\pm$ 1.15 <sup>c</sup>		7.06 $\pm$ 1.32 <sup>c</sup>		15.08 $\pm$ 1.69 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs SO组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs OJ组。

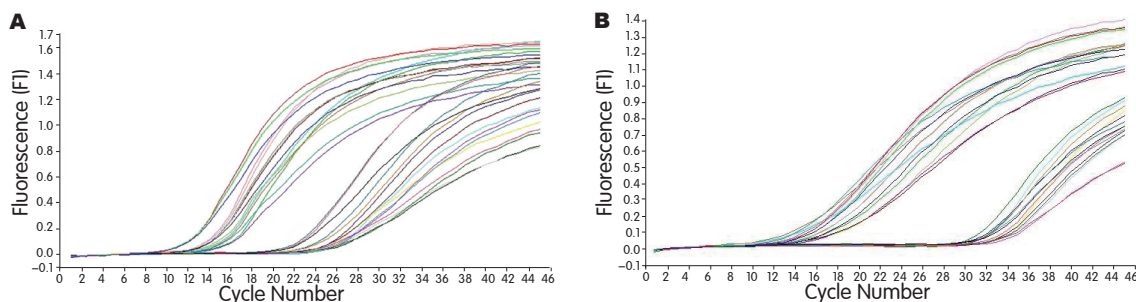


图 2 各组大鼠术后7 d肝组织TGF- $\beta$ 1 mRNA实时荧光定量扩增曲线。A: PCR扩增循环圈数较少, 肝组织TGF- $\beta$ 1 mRNA含量较高; B: PCR扩增循环圈数较多, 肝组织TGF- $\beta$ 1 mRNA含量较低。

棕黄色颗粒, 定位于细胞质。SO组术后各时点肝组织均可见少量的肝细胞呈阳性表达。OJ组随着胆总管结扎时间的延长, 术后肝组织中阳性细胞表达率逐渐升高且均高于SO组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); IL-10组肝组织中阳性细胞表达率明显低于OJ组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表2, 图3)。

**2.5 肝细胞的凋亡情况** SO组术后各时点肝组织均可见少量的凋亡细胞。OJ组随着胆总管结扎时间的延长, 术后肝细胞凋亡指数逐渐升高且均高于SO组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); IL-10组肝细胞凋亡指数明显低于OJ组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表2, 图4)。

### 3 讨论

肝功能衰竭是梗阻性黄疸患者的重要死亡原因,

随着细胞凋亡测定方法的改进, 越来越多的证据表明, 肝细胞凋亡在梗阻性黄疸肝功能衰竭中起着重要的促进作用。以肝细胞凋亡为靶点的治疗方向日益成为肝胆外科研究领域中的热点<sup>[14-18]</sup>。本实验研究结果提示, 大鼠在胆总管结扎3 d后, 即出现血清中ALT和AST明显升高, 肝组织TGF- $\beta$ 1表达量和肝细胞凋亡率大量增加; 至术后第7天血清生化酶指标进一步升高, 肝组织TGF- $\beta$ 1表达量和肝细胞凋亡率同步增加。由此可见, 梗阻性黄疸早期, 肝脏即出现大量的细胞凋亡, 肝功能进行性受损<sup>[7,19]</sup>。因此, 及早给予相应的治疗措施, 可望取得更理想的治疗效果。

IL-10是一种Th2细胞产生的免疫调节性细胞因子, 在多种实验性肝损伤模型中发现, IL-10可明显抑制多种炎症介质的表达而减轻肝损伤<sup>[9,10,20-22]</sup>。最近研究发现, IL-10可通过抑制肝组织TGF- $\beta$ 1的



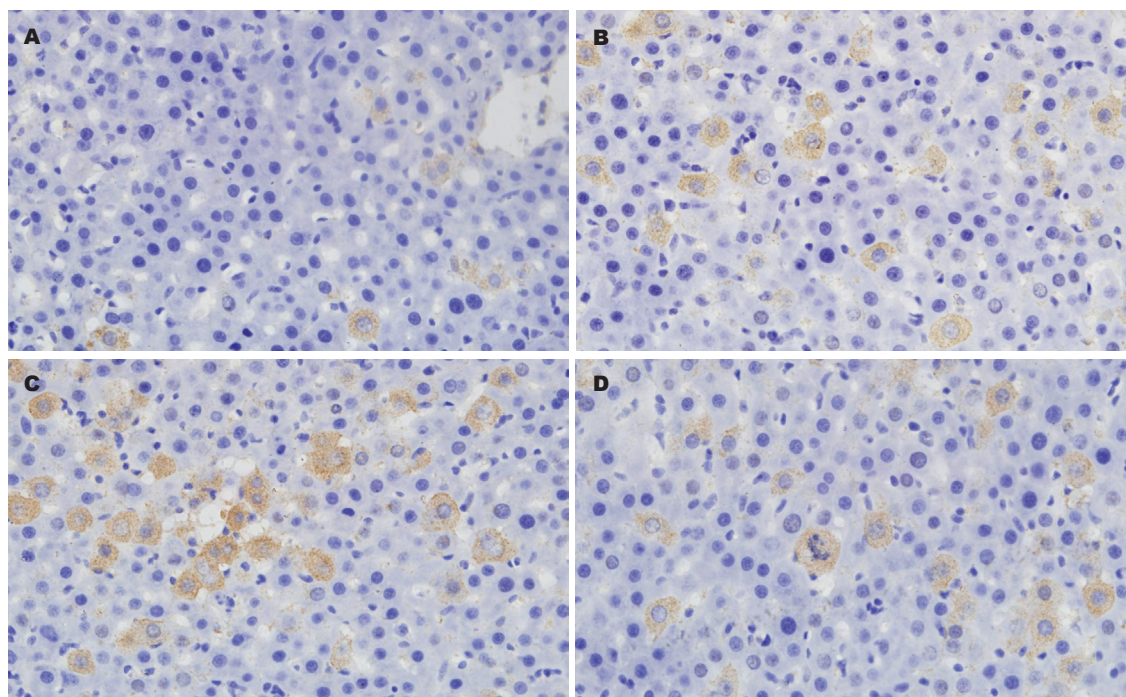


图 3 各组大鼠术后肝组织TGF- $\beta 1$ 的表达(SP  $\times 400$ ). A: SO组术后7 d; B: OJ组术后3 d; C: OJ组术后7 d; D: IL-10组术后7 d.

#### ■应用要点

本研究发现白介素-10可通过降低肝组织转化生长因子 $\beta 1$ 的表达抑制肝细胞凋亡并改善受损肝功能, 对以肝细胞凋亡为靶点治疗梗阻性黄疸受损肝脏具有一定的临床意义.

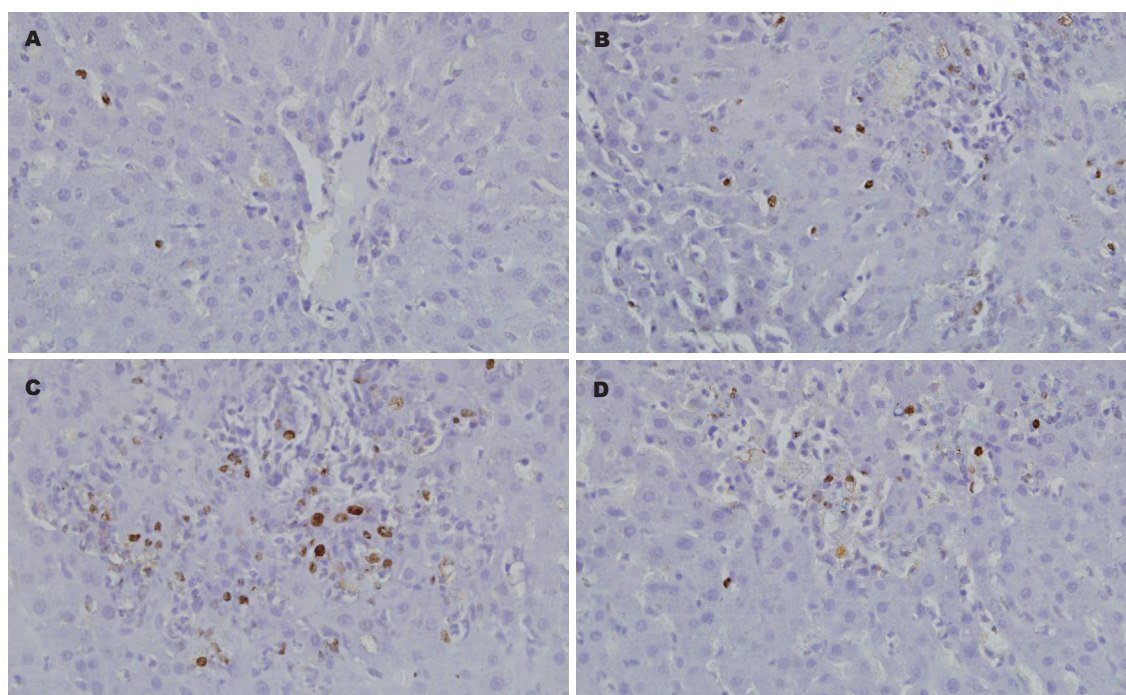


图 4 各组大鼠术后肝细胞的凋亡情况(TUNEL  $\times 400$ ). A: SO组术后7 d; B: OJ组术后3 d; C: OJ组术后7 d; D: IL-10组术后7 d.

表达而减少由内毒素引起的肝细胞凋亡<sup>[9]</sup>. Shi等<sup>[10]</sup>也发现外源性IL-10可通过抑制肝组织TGF- $\beta 1$ 的表达而改善肝纤维化. 此外, 谷俊朝等<sup>[22]</sup>研究还发现外源性IL-10可以抑制大鼠急性出血坏死性胰腺炎肝细胞凋亡. 在本实验中, 我们研究发现梗阻性黄疸大鼠应用IL-10治疗后, 与OJ组相比, 肝组织TGF- $\beta 1$ 的表达量明显下降, 肝细胞凋

亡率与肝功能均显著改善. 上述结果表明, IL-10可以抑制梗阻性黄疸肝细胞凋亡进而减轻肝功能损害, 这可能与IL-10抑制肝组织TGF- $\beta 1$ 的表达有关. 在实验过程中, 我们考虑到IL-10药物代谢半衰期较短<sup>[23,24]</sup>以及胆总管结扎术后早期腹腔内大量炎性液体渗出可能会影响IL-10的吸收情况, 因此, 在IL-10治疗组未设置术后3 d取材

# ■同行评价

本文选题较好, 实验设计较合理, 对以肝细胞凋亡为靶点治疗的梗阻性黄疸有一定的临床意义。

时间点。

正常肝脏中, TGF- $\beta$ 1主要由肝窦内皮细胞、库普弗细胞和肝星形细胞(hepatic stellate cell, HSC)表达<sup>[25]</sup>。当发生梗阻性黄疸时, 肝内HSC大量增殖活化, 并通过自分泌及旁分泌方式致肝组织TGF- $\beta$ 1大量表达, 此时, 肝组织中TGF- $\beta$ 1主要由活化的HSC表达<sup>[26,27]</sup>。翁山耕等<sup>[28,29]</sup>研究发现, 外源性IL-10可以抑制库普弗细胞诱导的HSC增殖活化。此外, Shi等<sup>[30]</sup>研究表明, 外源性IL-10可以抑制体外培养活化的HSC表达TGF- $\beta$ 1。但IL-10是否通过抑制HSC的增殖活化进而减少肝组织TGF- $\beta$ 1的表达, 尚需进一步证实。同时, 由于细胞因子的调节极其复杂, 其他细胞因子是否也参与IL-10抗梗阻性黄疸肝细胞凋亡的作用, 也值得深入探讨。

总之, 本研究中我们观察到梗阻性黄疸引起肝组织TGF- $\beta$ 1大量表达致肝细胞凋亡增加使肝功能受损, 应用IL-10治疗后, 肝细胞凋亡和受损肝功能均得到显著的改善, 这可能与IL-10降低梗阻性黄疸肝组织TGF- $\beta$ 1的表达有关。

## 4 参考文献

- Lalisang TJ, Sjamsuhidajat R, Siregar NC, Taher A. Profile of hepatocyte apoptosis and bile lakes before and after bile duct decompression in severe obstructive jaundice patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 520-523
- Crespo S, Raimondo M. The long term use of covered metal stents in managing malignant biliary obstruction. Are we changing outcomes? *Dig Liver Dis* 2010; 42: 765-766
- Gümüş M, Celebi F, Böyük A, Gürsan N, Akçay F. Dehydroepiandrosterone ameliorates hepatocellular damage in obstructive jaundice. *Cell Biochem Funct* 2010; 28: 515-520
- Dirlik M, Canbaz H, Düşmez Apa D, Çağlıküleki M, Yaylak F, Balli E, Tamer L, Kanik A, Aydın S. The monitoring of progress in apoptosis of liver cells in bile duct-ligated rats. *Turk J Gastroenterol* 2009; 20: 247-256
- Lee TY, Lee KC, Chang HH. Modulation of the cannabinoid receptors by andrographolide attenuates hepatic apoptosis following bile duct ligation in rats with fibrosis. *Apoptosis* 2010; 15: 904-914
- Wang DS, Dou KF, Li KZ, Gao ZQ, Song ZS, Liu ZC. Hepatocellular apoptosis after hepatectomy in obstructive jaundice in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2737-2741
- 谈景旺, 张绍庚, 王烈, 江艺, 姚和祥. 阻塞性黄疸中肝细胞凋亡及机制的研究. *外科理论与实践* 2003; 8: 129-132
- Fujiwara Y, Shimada M, Yamashita Y, Adachi E, Shirabe K, Takenaka K, Sugimachi K. Cytokine characteristics of jaundice in mouse liver. *Cytokine* 2001; 13: 188-191
- Zhong J, Deaciuc IV, Burikhanov R, de Villiers WJ. Lipopolysaccharide-induced liver apoptosis is increased in interleukin-10 knockout mice. *Biochim*

*Biophys Acta* 2006; 1762: 468-477

- Shi MN, Huang YH, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Relationship between transforming growth factor beta1 and anti-fibrotic effect of interleukin-10. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2357-2362
- Erguder BI, Kilicoglu SS, Namuslu M, Kilicoglu B, Devrim E, Kismet K, Durak I. Honey prevents hepatic damage induced by obstruction of the common bile duct. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3729-3732
- 徐锋, 戴朝六, 贾昌俊, 许永庆, 彭松林, 顾玺, 赵阳. 急性胆道梗阻大鼠肝细胞的死亡方式. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 240-245
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- Huang CY, Sheen-Chen SM, Ho HT, Tang RP, Eng HL. Antithrombin-III attenuates hepatocyte apoptosis in bile duct ligated rat: a striking cellular change. *Surg Innov* 2010; 17: 132-135
- Pi-Chieh Wang K, Lee LM, Lin TJ, Sheen-Chen SM, Lin JW, Chiu WT, Wang CC, Hung KS. Gene transfer of IGF1 attenuates hepatocellular apoptosis after bile duct ligation. *J Surg Res* 2011; 167: 237-244
- Margaritis VG, Filos KS, Michalaki MA, Scopa CD, Spiliopoulou I, Nikolopoulou VN, Vagianos CE. Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg* 2005; 29: 1329-1334
- 刘文生, 吴德全, 杨书龙, 许军. 精氨酸对梗阻性黄疸大鼠肝损伤的保护作用及其对肝细胞凋亡的影响. *肝胆胰外科杂志* 2009; 21: 439-442
- Sheen-Chen SM, Ho HT, Chen WJ, Eng HL. Effect of ZVAD-fmk on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2330-2333
- Grasl-Kraupp B, Rossmanith W, Ruttkay-Nedecy B, Müllauer L, Kammerer B, Bursch W, Schulte-Hermann R. Levels of transforming growth factor beta and transforming growth factor beta receptors in rat liver during growth, regression by apoptosis and neoplasia. *Hepatology* 1998; 28: 717-726
- Li JQ, Qi HZ, He ZJ, Hu W, Si ZZ, Li YN, Li DB. Cytoprotective effects of human interleukin-10 gene transfer against necrosis and apoptosis induced by hepatic cold ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2009; 157: e71-e78
- Dinant S, Veteläinen RL, Florquin S, van Vliet AK, van Gulik TM. IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation. *J Surg Res* 2007; 141: 176-182
- 谷俊朝, 王宇, 张忠涛, 薛建国, 李建设, 周延忠. 外源性白介素-10对急性出血坏死性胰腺炎大鼠肝脏Bcl-2、Bax表达和肝细胞凋亡的影响. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 260-262
- Wissing KM, Morelon E, Legendre C, De Pauw L, LeBeaut A, Grint P, Maniscalki M, Ickx B, Vereerstraeten P, Chatenoud L, Kreis H, Goldman M, Abramowicz D. A pilot trial of recombinant human interleukin-10 in kidney transplant recipients receiving OKT3 induction therapy. *Transplantation* 1997; 64: 999-1006
- Donckier V, Loi P, Closset J, Nagy N, Quertinmont E, Le Moine O, Devière J, Goldman M, Gelin M, Gianello P. Preconditioning of donors with interleukin-10 reduces hepatic ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in pigs. *Transplantation*



- 2003; 75: 902-904
- 25 Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995; 96: 447-455
- 26 Makino H, Shimizu H, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Ohtsuka M, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Sawada S, Miyazaki M. Changes in growth factor and cytokine expression in biliary obstructed rat liver and their relationship with delayed liver regeneration after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2053-2059
- 27 De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe RF. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology* 2007; 132: 1937-1946
- 28 翁山耕, 冷希圣, 魏玉华, 彭吉润, 张佑彬, 吕建锋, 杜如昱. 白介素10抑制枯否细胞诱导的肝星状细胞激活的研究. *中华医学杂志* 2002; 82: 104-107
- 29 Zhang X, Yu WP, Gao L, Wei KB, Ju JL, Xu JZ. Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 610-613
- 30 Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Effect of IL-10 on the expression of HSC growth factors in hepatic fibrosis rat. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4788-4793

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.



# 鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的纤维化相关基因表达和蛋白谱的影响

廖明, 莫财锋, 周怡, 何敏, 卓朗

## ■背景资料

迄今为止, 对肝纤维化的治疗尚缺乏理想的治疗方案。因为肝纤维化是一系列复杂的多因素过程, 许多药物由于抗肝纤维化作用靶位单一导致疗效并不理想, 而有些药物不良反应大于治疗作用, 不宜用于临床。因此, 将作用于肝纤维化发生发展不同环节、靶点的药物联合应用即鸡尾酒疗法以阻断肝纤维化发展, 达到保护肝脏的目的, 可能是抗肝纤维化药物研究的新方向。

廖明, 周怡, 何敏, 广西医科大学医学科学实验中心 区域性高发肿瘤早期防治研究重点实验室 广西壮族自治区南宁市 530021

莫财锋, 桂林医学院生物技术学院 广西壮族自治区桂林市 541004

卓朗, 新加坡国立生物工程和纳米技术研究院 新加坡 169483

廖明, 博士, 讲师, 主要从事肝脏蛋白质组学方面的研究。广西地方性高发疾病防治研究重点实验室开放基金资助项目, No. 0842009-K5

作者贡献分布: 此课题由廖明、何敏及卓朗设计; 研究过程由廖明与莫财锋完成; 数据分析由廖明与周怡完成; 本论文写作由廖明与莫财锋完成。

通讯作者: 廖明, 博士, 讲师, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学医学科学实验中心。lminggx@163.com

收稿日期: 2011-02-28 修回日期: 2011-04-14

接受日期: 2011-05-05 在线出版日期: 2011-06-18

## Alterations in fibrosis-related gene expression and proteomic expression profile in rat hepatic stellate cells exposed to the cocktail

Ming Liao, Cai-Feng Mo, Yi Zhou, Min He, Lang Zhuo

Ming Liao, Yi Zhou, Min He, Guangxi Medical University, Guangxi Key Laboratory for Early Prevention & Treatment of Endemic Tumors, Ministry of Education, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Cai-Feng Mo, Guilin Medical University, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Lang Zhuo, Institute of Bioengineering and Nanotechnology, Singapore 169483

Supported by: the Research Fund of Guangxi Key Laboratory for Prevention & Treatment of Regional High-Incidence Diseases, No. 0842009-K5

Correspondence to: Ming Liao, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lminggx@163.com

Received: 2011-02-28 Revised: 2011-04-14

Accepted: 2011-05-05 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To investigate changes in the expression of fibrosis-related genes and proteomic expression profile in rat hepatic stellate cells (HSCs) exposed to the cocktail to explore potential anti-hepatic fibrosis mechanisms of the cocktail therapy.

**METHODS:** After HSCs were cultured *in vitro*

and exposed to the cocktail for 24 h, the expression of TGF- $\beta$ 1, MMP-2 and TIMP-2 mRNAs and proteomic expression profile were measured by RT-PCR and SELDI-TOF-MS, respectively.

**RESULTS:** Compared to control cells, the expression level of MMP-2 mRNA significantly increased ( $0.094 \pm 0.051$  vs  $0.023 \pm 0.056$ ,  $P < 0.05$ ), and those of TGF- $\beta$ 1 and TIMP-2 mRNAs significantly decreased ( $0.301 \pm 0.025$  vs  $0.503 \pm 0.042$ ;  $0.719 \pm 0.03$  vs  $1.204 \pm 0.418$ , both  $P < 0.05$ ) in HSCs exposed to the cocktail. A total of 176 differential proteins were identified between control cells and treated cells, of which 32 were up-regulated and 3 down-regulated.

**CONCLUSION:** The cocktail therapy exerts anti-hepatic fibrosis activity possibly by regulating the expression of related genes and proteins.

**Key Words:** Hepatic stellate cells; Cocktail therapy; Gene expression; Protein expression

Liao M, Mo CF, Zhou Y, He M, Zhuo L. Alterations in fibrosis-related gene expression and proteomic expression profile in rat hepatic stellate cells exposed to the cocktail. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1780-1784

## 摘要

**目的:** 研究鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞(HSC)的纤维化相关基因表达及蛋白谱的变化, 探讨鸡尾酒疗法抗肝纤维化作用的机制。

**方法:** 鸡尾酒作用大鼠HSC-T6细胞株后, 采用半定量RT-PCR法检测细胞中TGF- $\beta$ 1、MMP-2和TIMP-2的mRNA表达水平。应用SELDI-TOF-MS技术分析HSC-T6细胞蛋白图谱的变化。

**结果:** HSC-T6细胞经鸡尾酒作用后, 与对照组相比MMP-2 mRNA表达水平明显增强( $0.094 \pm 0.051$  vs  $0.023 \pm 0.056$ ,  $P < 0.05$ ); TGF- $\beta$ 1和TIMP-2 mRNA表达水平明显降低( $0.301 \pm 0.025$  vs  $0.503 \pm 0.042$ ;  $0.719 \pm 0.03$  vs  $1.204 \pm$

## ■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

0.418, 均 $P<0.05$ ); 鸡尾酒作用后, 表达差异2倍以上的蛋白有35个, 包括32个表达上调的蛋白, 3个表达下调的蛋白。

**结论:** 鸡尾酒疗法的抗肝纤维化作用可能是通过调节相关基因和蛋白的表达变化来实现。

**关键词:** 肝星状细胞; 鸡尾酒疗法; 基因表达; 蛋白表达

廖明, 莫财锋, 周怡, 何敏, 卓朗. 鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的纤维化相关基因表达和蛋白谱的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1780-1784

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1780.asp>

## 0 引言

迄今为止, 对肝纤维化的治疗尚缺乏理想的治疗方案. 多年来针对肝纤维化的药物治疗在众多离体和动物模型实验中显示了一定的疗效, 主要包括抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的药物如干扰素<sup>[1]</sup>, 作用于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和细胞因子的药物<sup>[2-6]</sup>、抗氧化剂<sup>[7]</sup>、抗炎制剂<sup>[8]</sup>等. 但令众多学者困惑的是几乎所有的抗肝纤维化药物在动物模型有效而临床无效或效果很差, 这严重限制了抗肝纤维化药物的临床应用和治疗效果<sup>[9,10]</sup>. 肝纤维化是一系列复杂的多因素过程, 许多药物由于抗肝纤维化作用靶位单一导致疗效并不理想, 而有些药物不良反应大于治疗作用, 不宜用于临床<sup>[11,12]</sup>. 因此, 将作用于肝纤维化发生发展不同环节、靶点的药物联合应用即鸡尾酒疗法(Cocktail), 以阻断肝纤维化发展, 达到保护肝脏的目的, 可能是抗肝纤维化药物研究的新方向。

我们前期的研究表明, 牛磺酸(taurine)、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)和三羟基异黄酮(genistein)三者联合应用的鸡尾酒疗法具有抗大鼠肝纤维化的作用<sup>[13,14]</sup>. 本实验的目的是采用RT-PCR法分析鸡尾酒疗法对肝星状细胞株HSC-T6肝纤维化相关基因转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor-beta 1, TGF- $\beta 1$ )、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和组织金属蛋白酶抑制因子2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)表达的影响, 并利用SELDI-TOF-MS技术分析HSC-T6蛋白谱的变化, 以进一步探讨鸡尾酒疗法抗肝纤维化的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料 肝星状细胞系为HSC-T6, 为SV40转染

SD大鼠HSC, 为永生化细胞, 表型为活化的HSC, 具纤维化特性. 细胞由广西医科大学姜海行教授馈赠. EGCG(四川乐山禹伽茶业科技开发有限公司); DMEM(Gibco); 胎牛血清(Hyclone); TRIzol(Invitrogen); 逆转录试剂盒(Fermentas); taurine、genistein、二硫苏糖醇(DTT)、超纯尿素(Urea)、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-1-丙磺酸(CHAPS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、硫脲、三正丁基磷(TBP)、pH3-10两性电解质、抑肽酶(Apotinin)、乙腈(Acetonitrile, ACN)、无水醋酸钠(NaAc)、三氟乙酸(TFA)、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)、HPLC水、88%磷酸、950 mL/L乙醇均购于美国Sigma公司. 2 $\times$ PCR mix(TaKaRa). CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo); 高速冷冻离心机(美国Thermo); 相差倒置显微镜(德国Zeiss); PCR仪(美国Bio-Rad); 核酸蛋白测定仪(日本岛津); 凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad); 低压电泳仪(美国Bio-Rad); 蛋白芯片飞行时间质谱仪(Ciphergen公司), 蛋白质芯片CM10(Bio-Rad公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将冷冻保存于超低温冰箱中的HSC-T6复苏后接种于含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养液中, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养. 当细胞呈单层致密状时, 2.5 g/L胰蛋白酶消化后传代. 每次实验均在呈指数生长的细胞种中进行。

1.2.2 分组: 分为对照组和鸡尾酒组(taurine 60 mg/L+EGCG 70 mg/L+genistein 14 mg/L), 剂量参见文献廖明等<sup>[9]</sup>。

1.2.3 RT-PCR法检测TGF- $\beta 1$ 、MMP-2及TIMP-2 mRNA的表达: 将细胞以 $5\times 10^7$ /L接种于50 mL培养瓶中, 分为对照组和鸡尾酒组, 培养12 h后, 鸡尾酒组换鸡尾酒培养液继续培养24 h. 采用TRIzol法抽提细胞中总RNA. 用核酸蛋白测定仪测定RNA含量及纯度, 保证 $A_{260}/A_{280}=1.8-2.0$ . 取RNA 5  $\mu$ g, 采用M-MuLV逆转录酶将其逆转录成cDNA. 根据NCBI的GenBank基因序列自行设计引物, 引物序列为:  $\beta$ -actin: FP: 5'-AACCCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3', RP: 5'-TCATGAGGTAGTCTGTCTCAGGT-3', 产物长度: 240 bp; TGF- $\beta 1$ : FP: 5'-ATGGTGGACCGCAACAAC-3', RP: 5'-TGAGCACTGAAGCGAAAGC-3', 产物长度: 329 bp; MMP-2: FP: 5'-TGGAAGCATCAAATCGGACTG-3', RP:

### ■ 相关报道

戚合德等发现安络化纤丸联合恩替卡韦用药更有利于阻断或逆转肝纤维化的形成和发展; 曾佑祥等在采用阿米洛利联合苦参素预防大鼠肝纤维化的研究发现, 两者联用有一定的协同作用。

## ■创新盘点

本文在前期研究工作的基础上,采用RT-PCR法检测鸡尾酒作用大鼠肝星状细胞株HSC-T6后TGF- $\beta$ 1、MMP-2和TIMP-2的mRNA表达水平,利用SELDI-TOF-MS技术分析HSC-T6细胞全蛋白图谱的变化,进一步探讨鸡尾酒疗法的抗肝纤维化作用的机制。

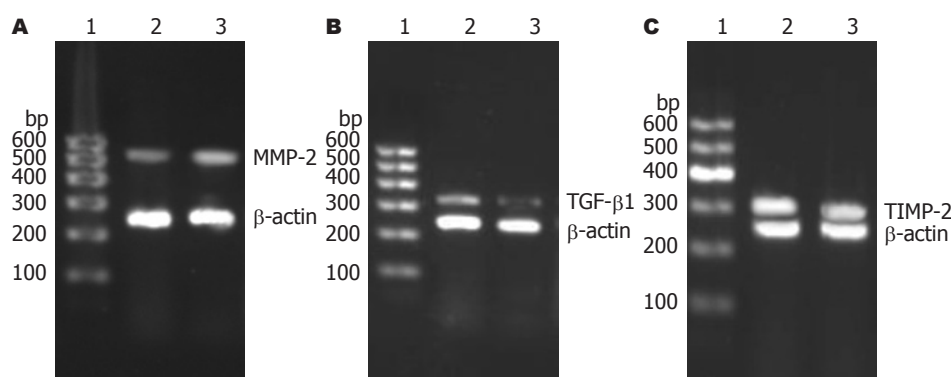


图1 鸡尾酒作用后HSC-T6的MMP-2、TGF- $\beta$ 1及TIMP-2 mRNA表达的变化. 1: Marker; 2: 对照组; 3: 鸡尾酒组.

5'-GCAAAGGGCAAACAAAGCA-3', 产物长度: 527 bp; TIMP-2: FP: 5'-CCAAAGCAGTGAGC-GAGAA-3', RP: 5'-TCCCAGGGCACAATAAAGTC-3', 产物长度: 262 bp; PCR扩增cDNA, 条件为: 94 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 各自退火温度(MMP-2为55 °C; TIMP-2、TGF- $\beta$ 1为52 °C)30 s, 72 °C延伸30 s, 72 °C延伸10 min, 总共30个循环; 所有PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上电泳后, 用凝胶成像系统拍照, Quantity One软件测定灰度值, 灰度值以各产物与 $\beta$ -actin的积分吸光度(A)的比值表示。

1.2.4 SELDI-TOF-MS分析: 收集培养的细胞, 经超声波破碎, 加入加裂解液裂解, 用快速混匀器混合5 s $\times$ 2次, 冰上静置30 min, 12 000 r/min 4 °C离心60 min, 取少量上清用测定总蛋白浓度, 其余上清液分装冻存于-80 °C备用。

将30  $\mu$ L上述样品加入90  $\mu$ L CM10 Buffer, 取100  $\mu$ L加入芯片的每个孔中; 置于振荡器上以200 r/min室温孵育60 min后甩出溶液, 每孔加200  $\mu$ L CM10缓冲液, 振荡孵育5 min 2次, 最后芯片用20 mmol/L HEPES(pH7.4)淋洗, 晾干芯片. 芯片每孔分2次加SPA 0.5  $\mu$ L, 2次之间自然晾干。

质谱仪参数设定为激光强度220, 灵敏度8, 优化范围800-20 000质荷比(m/z). 每条芯片取1点用同一正常人血清作内参照, 芯片间CV $\leq$ 10%. 检测前用ALLINONE多肽标准芯片校正, 系统质量偏差 $\leq$ 0.1%. 原始数据以Proteinchip 3.0软件校正。

**统计学处理** 基因表达的统计分析: 应用SPSS13.0软件进行统计分析, 数据均以mean $\pm$ SD表示, 组间比较采用t检验,  $P<0.05$ 表示存在统计学意义. 蛋白表达的统计分析: 采用Ciphergen Protein Chip软件和Biomarker Wizard软件对芯片检测得到的蛋白质相对含量及蛋白质质荷

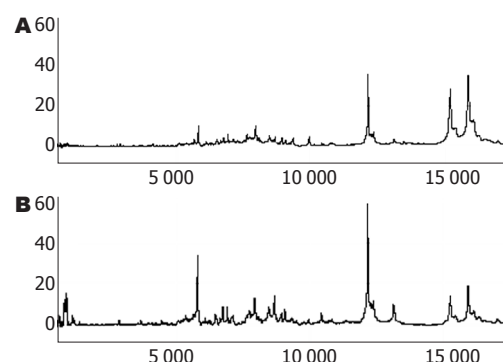


图2 细胞全蛋白SELDI-TOF-MS图谱. A: 对照组; B: 鸡尾酒组.

比数据按数据挖掘要求进行处理, 用Biomarker Wizard Software3.1软件和Biomarker Patterns Software 4.0.1软件对数据进行相关性分析, 比较两组之间蛋白质峰强度时,  $P<0.05$ 具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 鸡尾酒对HSC的TGF- $\beta$ 1、MMP-2及TIMP-2 mRNA表达的影响 与对照组比较, 鸡尾酒组的MMP-2 mRNA表达明显升高, 差别有统计学意义( $0.094\pm0.051$  vs  $0.023\pm0.056$ ,  $P<0.05$ ); 而TGF- $\beta$ 1和TIMP-2 mRNA表达明显降低, 差别有统计学意义( $0.301\pm0.025$  vs  $0.503\pm0.042$ ;  $0.719\pm0.03$  vs  $1.204\pm0.418$ ,  $P<0.05$ , 图1)。

2.2 SELDI-TOF-MS分析蛋白谱的变化 共检测到176种荷质比不同的蛋白峰, 与对照组相比, 鸡尾酒作用后, 有32个蛋白上调两倍以上, 有3个蛋白下调2倍以上, 相对分子质量为5 798.33, 6 499.74, 6 896.73的蛋白分别上调了3.96、4.22、4.28倍(图2, 3)。

## 3 讨论

目前认为ECM的过度增多和异常沉积是肝纤维化发生的主要机制<sup>[15-17]</sup>. 在正常肝脏组织中存在



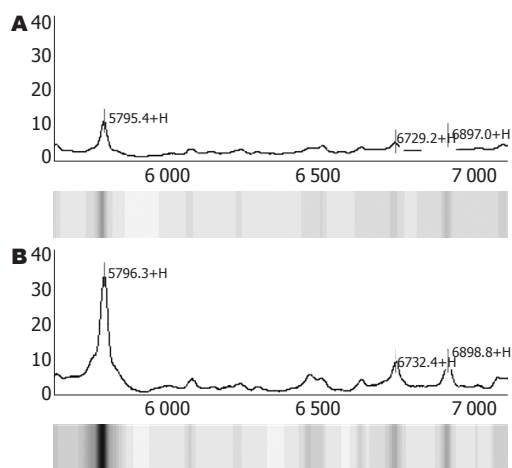


图3 表达量变化的蛋白质的峰图和模拟胶图, 相对分子质量为5 796、6 730、6 898的3个表达量上调的蛋白。A: 对照组; B: 鸡尾酒组。

着ECM的合成与降解的动态平衡。肝纤维化时纤维结缔组织的形成, 是由于各种不同致病因子导致ECM合成与降解的失衡所致。多项研究表明, TGF- $\beta$ 1是强有力的致纤维化细胞因子<sup>[18-20]</sup>, 在肝纤维化中表达明显增多, 可促进HSC的增殖和活化, 使ECM合成增多, 降解减少, 并存在正反馈放大效应, 促进肝纤维化的进程<sup>[21-25]</sup>。在我们的研究当中, 鸡尾酒干预HSC-T6后, 与对照组比较, TGF- $\beta$ 1的mRNA表达量明显降低, 具有统计学意义, 我们推断鸡尾酒可能是通过抑制TGF- $\beta$ 1的表达而发挥抗肝纤维化的作用。

MMPs是ECM降解的主要酶系, 而其TIMPs通过抑制MMPs, 阻止ECM的降解, 从而形成或促进肝纤维化<sup>[26-28]</sup>。MMP-2初次发现于小鼠转移性肿瘤细胞和兔骨细胞的培养过程中。较多的研究认为MMP-2在纤维化阶段升高, 而在肝硬化和肝纤维化恢复期逐渐降低<sup>[29-31]</sup>。朱跃科等<sup>[32]</sup>研究发现, 在肝纤维化的形成过程中MMP-2的基因表达、蛋白表达及酶活性均增高。MMP-2的表达与酶活性在肝纤维化逆转过程逐渐降低, 说明MMP-2与肝纤维化的发生发展密切相关, 而TIMP-2在肝纤维化发展过程中表达增强, MMP-2/TIMP-2的比值下降。在原代培养的HSC早期, TIMP-2不表达, HSC激活后TIMP-2表达增加。卢明芹等研究发现, 丹酚酸B盐可通过抑制TGF- $\beta$ 1和TIMP-2表达而促进肝纤维化的逆转<sup>[33]</sup>。张亚飞等<sup>[34]</sup>的研究发现通过抑制TIMP-2的表达, 可间接增强MMP-2的活性, 降低IV胶原在肝纤维化中的沉积, 减缓肝纤维化的发展。临床研究发现, 未经干扰素治疗的慢性丙型肝炎患者血清中的TIMP-2水平在6 mo后显著升高,

而经干扰素治疗6 mo后血清中的TIMP-2水平无明显变化<sup>[35]</sup>。而且, 在肝硬化及原发性肝癌未转移患者血清中TIMP-2的水平也明显升高<sup>[36]</sup>。在用鸡尾酒干扰HSC-T6后, 我们采用RT-PCR法检测MMP-2和TIMP-2的mRNA表达, 结果发现, 与对照相比MMP-2的表达量明显增多, 而TIMP-2表达下降。因此我们推测鸡尾酒可能是通过抑制调节MMP-2/TIMP-2的表达, 而发挥抗纤维化的作用。

肝脏是主要的蛋白质合成器官, 对肝脏组织蛋白的SELDI-TOF-MS研究可获悉鸡尾酒作用的作用靶点, 发现用于诊断的标志蛋白, 进而探索其作用机制。本实验采用SELDI-TOF-MS技术研究鸡尾酒作用后HSC-T6后蛋白谱的变化, 发现HSC-T6的蛋白谱发生了明显的改变, 有32个蛋白上调2倍以上, 有3个蛋白下调2倍以上。推测鸡尾酒疗法可能通过这些蛋白表达的变化, 从而达到抗肝纤维化的作用。

#### 4 参考文献

- 1 Weng H, Mertens PR, Gressner AM, Dooley S. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *J Hepatol* 2007; 46: 295-303
- 2 Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G631-G639
- 3 Seki E, Brenner DA. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 2008; 48: 322-335
- 4 Iimuro Y, Brenner DA. Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis. *Pharm Res* 2008; 25: 249-258
- 5 Dooley S, Hamzavi J, Ciucan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A, Breitkopf K, Weng H, Mertens PR. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* 2008; 135: 642-659
- 6 Inagaki Y, Higashi K, Kushida M, Hong YY, Nakao S, Higashiyama R, Moro T, Itoh J, Mikami T, Kimura T, Shiota G, Kuwabara I, Okazaki I. Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology* 2008; 134: 1180-1190
- 7 Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C. Isoprostanes and hepatic fibrosis. *Mol Aspects Med* 2008; 29: 43-49
- 8 Dumont JM, Maignan MF, Janin B, Herbage D, Perrissoud D. Effect of malotilate on chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in the rat. *J Hepatol* 1986; 3: 260-268
- 9 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 10 Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669
- 11 George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM.

#### ■应用要点

本研究探讨了鸡尾酒疗法对HSC的TGF- $\beta$ 1、MMP-2和TIMP-2的mRNA表达的影响和全蛋白图谱的变化, 为下一步的鸡尾酒疗法的临床前研究奠定基础。

## ■同行评价

本文科学性和可读性较好,为研究三者联合应用对肝星状细胞介导肝纤维化的抑制作用奠定实验基础。

- In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12719-12724
- 12 Préaux AM, Mallat A, Rosenbaum J, Zafrani ES, Mavier P. Pentoxifylline inhibits growth and collagen synthesis of cultured human hepatic myofibroblast-like cells. *Hepatology* 1997; 26: 315-322
- 13 廖明, 李彦, 舒伟, 卓朗. 鸡尾酒疗法对大鼠肝星状细胞的增殖及 I 型胶原、TIMP-1 mRNA 表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 751-755
- 14 廖明, 林兴, 陈兆霓, 李彦, 卓朗. 鸡尾酒疗法对肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- $\beta$ 1、COL I 及 COL III 表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1867-1872
- 15 Giannelli G, Antonaci S. Immunological and molecular aspects of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *Histol Histopathol* 2005; 20: 939-944
- 16 Friedman SL. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 98-105
- 17 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 18 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 19 Nakamura T, Ueno T, Sakamoto M, Sakata R, Torimura T, Hashimoto O, Ueno H, Sata M. Suppression of transforming growth factor-beta results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury. *J Hepatol* 2004; 41: 974-982
- 20 廖丹, 罗光汉, 吴继周, 江建宁, 黄钰全. TGF- $\beta$ 1 和 smad4 mRNA 在慢性肝炎、肝硬化、肝癌旁组织的表达及意义. 世界华人消化杂志 2004; 11: 2091-2094
- 21 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 22 Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2572-2576
- 23 Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Büschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1059-G1068
- 24 Schnur J, Oláh J, Szepesi A, Nagy P, Thorgeirsson SS. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 127-133
- 25 党双锁, 李亚萍. TGF- $\beta$ 1 在肝纤维化研究中的新进展. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1631-1636
- 26 韦燕飞, 彭岳, 谢海源, 赵铁建. 基于肝星状细胞分子机制的抗肝纤维化研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1745-1748
- 27 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 315-334, v-vi
- 28 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis--role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- 29 梁志清, 徐新宝, 何振平. 反义 Smad4 对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶及其抑制剂的调节. 重庆医学 2004; 33: 716-717
- 30 崔红燕. 基质金属蛋白酶与肝纤维化的研究进展. 国外医学·消化系疾病分册 2003; 23: 37-40
- 31 Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol* 2001; 35: 392-398
- 32 朱跃科, 王宝恩, 申凤俊, 贾继东, 马红. 实验性肝纤维化基质金属蛋白-2 基因表达与酶活性的变化. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 509-512
- 33 卢明芹, 潘陈为, 李骥, 陈永平. 丹酚酸 B 对肝纤维化大鼠 TGF- $\beta$ 1、MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3847-3851
- 34 张亚飞, 聂青和, 谢玉梅, 邵彬, 苟艳子, 周永兴. 抑制金属蛋白酶组织抑制因子-2 在肝组织中的表达对大鼠肝纤维化发展的影响. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 138-140
- 35 Ninomiya T, Yoon S, Nagano H, Kumon Y, Seo Y, Kasuga M, Yano Y, Nakaji M, Hayashi Y. Significance of serum matrix metalloproteinases and their inhibitors on the antifibrogenetic effect of interferon- $\alpha$  in chronic hepatitis C patients. *Intervirology* 2001; 44: 227-231
- 36 Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, Fransvea E, Quaranta M, Lupo L, Schiraldi O, Antonaci S. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 97: 425-431

编辑 李薇 电编 何基才

# 塞莱昔布对幽门螺杆菌蛋白质组的影响

高培培, 王蔚虹, 王静, 李江, 董欣红

高培培, 王蔚虹, 王静, 李江, 董欣红, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034

高培培, 硕士, 主要从事幽门螺杆菌相关疾病方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30770981

作者贡献分布: 王蔚虹与高培培对此文所作贡献均等; 此课题由王蔚虹设计; 实验操作由高培培、王静、李江及董欣红完成; 数据分析由高培培与王蔚虹完成; 本论文写作由高培培与王蔚虹完成.

通讯作者: 王蔚虹, 教授, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院消化内科.

wangweihong@medmail.com.cn

电话: 010-83572616 传真: 010-66518105

收稿日期: 2011-03-25 修回日期: 2011-05-07

接受日期: 2011-05-11 在线出版日期: 2011-06-18

## Proteomic profiling of *Helicobacter pylori* treated with celecoxib

Pei-Pei Gao, Wei-Hong Wang, Jing Wang, Jiang Li, Xin-Hong Dong

Pei-Pei Gao, Wei-Hong Wang, Jing Wang, Jiang Li, Xin-Hong Dong, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770981

Correspondence to: Professor Wei-Hong Wang, Department of Gastroenterology, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Avenue, Xicheng District, Beijing 100034, China. wangweihong@medmail.com.cn

Received: 2011-03-25 Revised: 2011-05-07

Accepted: 2011-05-11 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To perform a proteomic investigation of the effect of celecoxib on *Helicobacter pylori* (*H.pylori*).

**METHODS:** Total proteins of untreated and celecoxib-treated *H.pylori* 26695 were extracted and separated by 2-dimensionals polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE). Differential protein expression was detected using computer-assisted image analysis. Differential proteins were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-tandem mass spectrometry (MALDI-TOF-MS/MS). The levels of mRNA expression were measured by real-time polymerase chain reaction.

**RESULTS:** Seventeen differentially expressed spots were detected between untreated and celecoxib-treated *H.pylori* 26695. Seven spots were positively identified as three proteins: heat shock protein 60 (HSP60), elongation factor TU (EF-TU) and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT). The protein expression of HSP60, GGT, and EF-TU, and mRNA expression of GGT and EF-TU were down-regulated ( $0.07 \pm 0.06$  vs  $1.01 \pm 0.16$ ;  $0.31 \pm 0.13$  vs  $0.98 \pm 0.01$ , both  $P < 0.05$ ), while the mRNA expression of HSP60 was up-regulated in the presence of celecoxib ( $1.85 \pm 0.26$  vs  $1.07 \pm 0.27$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Celecoxib could down-regulate the protein expression of HSP60, GGT and EF-TU and mRNA expression of GGT and EF-TU in *H.pylori*; however, the mRNA expression of HSP60 was up-regulated. These results suggest that celecoxib might interfere with the pathogenicity of *H.pylori*.

**Key Words:** *Helicobacter pylori*; Celecoxib; Proteomics

Gao PP, Wang WH, Wang J, Li J, Dong XH. Proteomic profiling of *Helicobacter pylori* treated with celecoxib. *Shi-jie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1785-1790

## 摘要

**目的:** 探讨选择性COX-2抑制剂塞莱昔布对幽门螺杆菌(*H.pylori*)蛋白质组的影响.

**方法:** 双向凝胶电泳技术(2-DE)分离塞莱昔布处理前后的*H.pylori*标准株26695全菌蛋白, 银染法凝胶染色, 图像扫描分析软件识别差异蛋白, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)、串联质谱(MALDI-TOF-MS/MS)分析差异蛋白; SYBR Green I 实时定量PCR测定差异蛋白基因的表达变化.

**结果:** 塞莱昔布处理后, *H.pylori*标准株26695发现17个蛋白质斑点表达有差异. 7个蛋白质斑点得到阳性鉴定, 分别归为*H.pylori*的3种蛋白质: 热休克蛋白60(HSP60), 即groEL, 延伸因子(EF-TU), 谷氨酰转肽酶(GGT). 与DMSO

## ■背景资料

服用非甾体抗炎药(NSAIDs)的幽门螺杆菌(*H.pylori*)感染者在临床上常见, 二者共同存在时对胃黏膜的致病性及致病机制尚未明确.

## ■同行评议者

杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学上海医院消化内科



## ■相关报道

Wang等研究发现, 体外培养条件下, 阿司匹林剂量依赖性地抑制 *H. pylori* 的生长, 并提高 *H. pylori* 对抗生素的敏感性.

溶媒对照相比, 塞莱昔布处理后的 *H. pylori* HSP60(groEL)、EF-TU、GGT表达下调. 实时定量PCR测定显示, 编码 *H. pylori* EF-TU、GGT基因的mRNA水平降低( $0.07 \pm 0.06$  vs  $1.01 \pm 0.16$ ;  $0.31 \pm 0.13$  vs  $0.98 \pm 0.01$ , 均  $P < 0.05$ ), 而编码 *H. pylori* HSP60(groEL)基因的mRNA水平增加( $1.85 \pm 0.26$  vs  $1.07 \pm 0.27$ ,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 塞莱昔布通过下调 *H. pylori* EF-TU、GGT mRNA的表达减低其蛋白的表达; 而其对HSP60蛋白质表达的下调作用不发生在mRNA转录水平. 塞莱昔布可能通过调节 *H. pylori* 致病相关蛋白的表达影响其致病性.

**关键词:** 幽门螺杆菌; 塞莱昔布; 蛋白质组

高培培, 王蔚虹, 王静, 李江, 董欣红. 塞莱昔布对幽门螺杆菌蛋白质组的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1785-1790  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1785.asp>

## 0 引言

服用非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)的幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染者在临床上常见, 二者共同存在时对胃黏膜的致病性及致病机制尚未明确<sup>[1,2]</sup>. 通常认为, *H. pylori*和NSAIDs是导致胃黏膜损害的两个独立危险因素, 然而, 在胃内微环境中, NSAIDs和*H. pylori*共同存在将不可避免地影响对*H. pylori*的生物学性状甚至其致病性发生影响. 前期的体外研究显示, 阿司匹林和选择性的COX-2抑制剂塞莱昔布可剂量依赖性抑制*H. pylori*的生长, 抑制*H. pylori*尿素酶及空泡毒素的活性<sup>[3,4]</sup>, 降低*H. pylori*的鞭毛动力, 抑制*H. pylori*对胃癌上皮细胞株AGS细胞的黏附. 进一步的研究显示, 塞莱昔布可降低*H. pylori*鞭毛蛋白(flalA、flaB)mRNA表达, 增加尿素酶基因(*ureA*、*ureB*)及黏附素基因(*babA*、*sabA*、*alpA*、*alpB*、*hpaA*、*hopZ*)mRNA表达<sup>[4]</sup>. *H. pylori*的致病因子包括与定植相关的因子、黏膜损害相关的因子、免疫反应相关的因子等多种复杂的致病因子<sup>[5,6]</sup>. 为全面了解塞莱昔布对*H. pylori*多种致病因子及致病性的影响, 本研究应用蛋白质组技术研究塞莱昔布处理后*H. pylori*全菌蛋白质组的变化, 旨在确定塞莱昔布对*H. pylori*致病相关蛋白的影响, 为明确NSAIDs和*H. pylori*共同存在的致病性及致病机制提供线索.

## 1 材料和方法

1.1 材料 标准菌株*H. pylori*26695(购自American

Type Culture Collection, ATCC)由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所张建中教授惠赠. 塞莱昔布由北京医药研究开发中心惠赠, 溶于二甲基亚砜(DMSO)备用.

### 1.2 方法

1.2.1 细菌培养: 将在固体培养基中生长良好的 *H. pylori*26695菌株分别接种于含0.01 mmol/L塞莱昔布及二甲基亚砜(DMSO)(塞莱昔布的溶媒为DMSO, 故研究以同等浓度的DMSO作对照)溶媒对照(1/1 000)的布氏肉汤培养液中, 37 °C微需氧环境下, 空气摇床70 r/min, 培养24 h后, 用PBS洗涤菌体沉淀3次, 4 °C, 4 500 r/min×5 min离心, 弃上清, 备用.

1.2.2 提取菌体蛋白: 菌体沉淀内加适量蛋白裂解液, 混匀后冰浴超声5 min(超声2 s, 间隔3 s), 至完全溶解; 加入10 mL/L蛋白酶抑制剂冰上充分裂解1 h; 4 °C, 35 000 g 15 min离心, 上清备用. BCA法测定蛋白质浓度.

1.2.3 二维电泳: 等电聚焦(IEF)采用18 cm、pH3-10非线性干胶条<sup>[7,8]</sup>, 上样量为150 μg蛋白/胶条, 设置聚焦仪(Amersham Biosciences)程序为: 20 °C表面温度, 电流强度50 μA/胶条, 30 V、6 h; 60 V、6 h; 100 V、1 h; 600 V、1 h; 1 000 V、1 h; 8 000 V、10 h; 聚焦至VhT 8 000. 将胶条进行两步平衡后, 转至浓度为12.5%的聚丙烯酰胺凝胶, 进行第二项SDS-PAGE电泳: 25 °C自动泵, 2.5 W/胶, 30 min; 18 W/胶, 4.5 h; 银染. 以ImageMaster 2D Platinum5.0分析软件(Amersham Biosciences)采集图像. 每组样品做3块平行胶, 同一批制备的3组蛋白样品做差异比较, 肉眼观察选取差异点, 用ImageMaster 2D Platinum5.0软件分析获得蛋白点的丰度确认差异的比例, 以2-DE胶上匹配点占蛋白总量的百分比增加或降低至少3倍为差异标准, 切取平行胶中变化一致的差异点, 胰酶(Sigma)进行胶内酶解.

1.2.4 质谱鉴定: ABI 4700基质辅助激光电离解析飞行时间质谱仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)分析, Nd: YAG激光器, 335 nm, 200 Hz激光激发, 随后做二级质谱分析, 利用GPS工作站(GPS Explorer™ v3.6, mascot v2.1)搜索NCBI nr数据库, 结合双向凝胶电泳图谱上相应点的表观等电点、相对分子质量、匹配肽段的多少和氨基酸序列的覆盖率等综合分析确定可能的蛋白质.

1.2.5 荧光实时定量RT-PCR: 收集培养48 h的 *H. pylori*26695, 采用TRIzol试剂提取总RNA, 紫

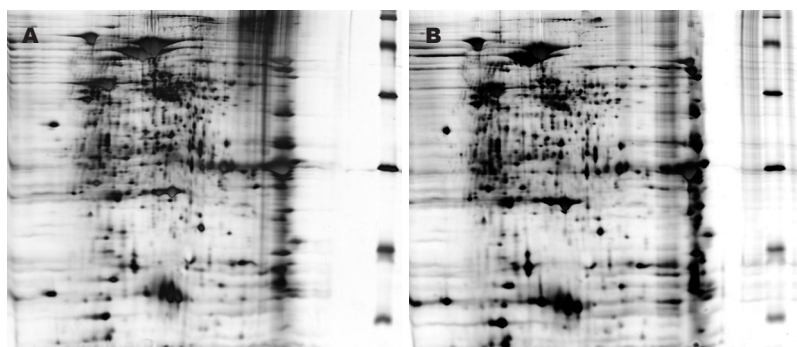


图1 塞莱昔布处理后*H.pylori* 26695蛋白质表达的差异. A: DMSO组; B: 塞莱昔布组.

**■创新盘点**  
本研究发现塞莱昔布下调*H.pylori* EF-TU、GGT的mRNA表达, 上调*H.pylori* HSP60的mRNA表达, 下调*H.pylori* HSP60(groEL)、EF-TU、GGT表达量, 从而可能影响*H.pylori*的致病性.

表1 *H.pylori*26695 HSP60(groEL)、EF-TU、GGT及管家基因引物核苷酸序列

引物名称	核苷酸序列(5'→3')
groEL-F	CGGTCATTTTCTCAGCGTTTG
groEL-R	AAGCTAAGGGCATTGAAGATGAA
EF-TU-F	CGCGCACTTCCATTCTACA
EF-TU-R	GTGCCTCACATCGTTGTTTTCTT
GGT-F	TCGGCAGCGATATGGATATTC
GGT-R	GCACGCATTTGATCCAGATTT
16S rRNA-F	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAA
16S rRNA-R	GGCGACCTGCTGGAACATTA

外分光光度法测定RNA浓度. 取RNA 2  $\mu$ g逆转录, 引物设计采用Primer Express3.0软件(Applied Biosystem Perkin-Elmer)(核苷酸序列见表1), 参照质谱鉴定结果, 检测热休克蛋白60(heat shock protein 60, HSP60) mRNA、谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, GGT) mRNA、延伸因子(elongation factor TU, EF-TU) mRNA、内参16S rRNA表达. 扩增条件: 95  $^{\circ}$ C, 10 min, 预变性; 95  $^{\circ}$ C, 15 s, 61  $^{\circ}$ C, 1 min, 40个循环; 熔解曲线95  $^{\circ}$ C, 15 s, 61  $^{\circ}$ C, 30 s, 96  $^{\circ}$ C, 15 s. 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算mRNA相对表达量.

**统计学处理** 分析实验结果以mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS13.0统计软件进行独立样本 $t$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 2-DE图谱分析塞来昔布处理前后*H.pylori* 26695** DMSO组和塞来昔布组中分别可以检测到1 614、1 503个蛋白质点, 两电泳胶所含蛋白质的理论pI值和MW分布范围大致相同, 分别为3 560-9 720 Da和13 380-98 430 Da. 两组2-DE图谱相似, 蛋白质斑点能很好地重叠, 但少数蛋白质含量有差异. 以3个平行处理样品中均存在差异的蛋白质点确定为蛋白表达差异, 发现与DMSO溶媒对照相比, 塞来昔布处理后, *H.pylori*

26695 2-DE图谱上共有17个蛋白质点表达量减少, 其表达量变化均 $\geq 3$ 倍.

**2.2 2-DE图谱差异蛋白的质谱鉴定**塞来昔布处理前后*H.pylori*26695 分析同一批次内塞来昔布处理与DMSO对照的差异, 切取3个平行样品中均存在差异的17个蛋白质点, 胶内酶解后经MALDI-TOF-MS, MS-MS鉴定. 以蛋白和离子的置信区间均高于95%, 且至少有两个肽段得分 $>50$ 或一个肽段得分 $>60$ 为可信蛋白. 7个蛋白质斑点得到鉴定(表2), 分别归为*H.pylori*的3种蛋白质: HSP60, 即groEL; EF-TU; GGT. 剩余的10个蛋白质斑点经Mascot搜索NCBI数据库后未得到阳性结果. 与DMSO对照处理比较, 塞来昔布处理后*H.pylori* HSP60(groEL), EF-TU, GGT表达量减少(图1).

**2.3 塞来昔布对*H.pylori*差异蛋白mRNA的影响** 选择质谱鉴定中与细菌致病性可能有关的蛋白质(HSP60、EF-TU、GGT)RT-PCR检测其mRNA的表达. 塞来昔布(0.01 mmol/L)处理后, *H.pylori* EF-TU, GGT的mRNA表达水平各降低39.6%、68.4%( $0.07\pm 0.06$  vs  $1.01\pm 0.16$ ,  $0.31\pm 0.13$  vs  $0.98\pm 0.01$ ,  $P<0.05$ ); *H.pylori* HSP60(groEL)蛋白基因mRNA表达水平增加72.9%( $1.85\pm 0.26$  vs  $1.07\pm 0.27$ ,  $P<0.05$ , 图2).

## 3 讨论

临床上服用NSAIDs的*H.pylori*感染者十分常见, 而NSAIDs和*H.pylori*共同存在时对胃黏膜的致病性作用尚不清楚. 我们前期研究发现, 体外培养条件下, 选择性COX-2抑制剂塞来昔布可导致*H.pylori*形态改变, 破坏细菌胞壁完整性, 显著降低*H.pylori*的鞭毛动力, 并剂量依赖性地抑制*H.pylori*对AGS细胞的黏附. 提示在胃内微环境中, 塞来昔布可能对*H.pylori*的生长及其致病性产生影响, 而细菌蛋白质表达的改变可能是其致病性改变的基础. 本研究采用2-DE技术比较塞来昔布处理前后*H.pylori*全菌蛋白表达谱差

### ■同行评价

本文选题恰当,对于深入了解幽门螺杆菌和NSAIDs这两个相对的胃黏膜损伤因素之间的关系有重要意义。

表 2 MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF-MS/MS技术鉴定*H.pylori*26695经塞莱昔布处理后差异蛋白信息

Spot ID	蛋白鉴定结果	变化趋势	Accession No.	等电点/分子量(Da)	序列覆盖率(%)
1021	HSP60	下调	397869	5.9/33205	41
1070	HSP60	下调	397869	5.6/31866	47
1255	HSP60	下调	397869	6.9/25008	41
542	EF-TU	下调	2494256	5.9/52917	42
627	EF-TU	下调	2494256	6.3/48183	37
768	EF-TU	下调	2494256	6.2/41888	41
1349	Chain B, Crystal Structure of <i>H.pylori</i>	下调	2314270	7.7/17905	52

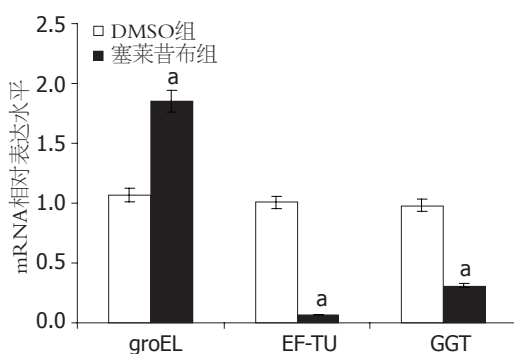


图 2 塞莱昔布处理前后*H.pylori*26695 groEL、EF-TU、GGT mRNA相对表达量。\* $P < 0.05$  vs DMSO组。

异,确定了3种致病相关蛋白质,即HSP60、GGT及转录与翻译相关蛋白EF-TU表达发生改变,为从蛋白质水平上明确塞莱昔布与*H.pylori*相互作用的致病机制奠定基础。

我们的前期研究结果显示,0.01 mmol/L的塞莱昔布可抑制*H.pylori*的生长,但不影响细菌的活菌数量<sup>[9]</sup>。塞莱昔布发挥其解热镇痛抗炎作用时,血药浓度为0.05 mmol/L,口服后在胃黏膜的局部浓度可能更高,因此,我们推测,在体内完全可以达到其降低*H.pylori* HSP60、GGT、EF-TU蛋白表达的浓度,但仍需体内试验进一步证实。有研究发现,服用塞莱昔布的风湿病患者HSP60与*H.pylori*在人胃黏膜的黏附定植密切相关,经抗HSP60的单克隆抗体H20处理后,*H.pylori*对MKN45细胞的黏附性明显降低<sup>[10]</sup>。GGT是存在于动植物体内的一种催化肽基转移作用的酶,具有异源多聚、糖基化和跨膜等结构特征,参与分泌和吸收过程<sup>[11,12]</sup>。作为新发现的免疫抑制剂GGT通过诱导细胞周期停滞在G<sub>1</sub>时相抑制T淋巴细胞的增殖,进而减弱CD4<sup>+</sup> T淋巴细胞对*H.pylori*的清除作用,从而增强*H.pylori*的定植<sup>[13]</sup>。本研究发现,塞莱昔布处理后*H.pylori* HSP60、GGT蛋白表达下调,提示在胃内共同存在时,塞莱昔布可能降低*H.pylori*的黏附、定植

能力,这也从蛋白质水平证实了我们之前的研究<sup>[4]</sup>。

HSP60是定位于线粒体的高度保守的蛋白质,人类的HSP60与细菌的HSP60之间有75%的同源性,可通过交叉免疫反应刺激胃黏膜γ/δ T淋巴细胞活化而导致胃黏膜免疫损伤,在严重的胃黏膜损害和胃黏膜萎缩的形成发展中发挥启动因子的作用<sup>[14]</sup>。HSP60通过与细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)<sup>[15]</sup>,相关的Toll样受体途径诱导炎性介质IL-8释放<sup>[16,17]</sup>,从而激活NF-κB<sup>[18,19]</sup>,进而引起炎症反应<sup>[20]</sup>。

有研究发现,服用NSAIDs的*H.pylori*感染者胃黏膜中性粒细胞浸润的数量较未服用者减少<sup>[21]</sup>,NSAIDs可抑制*H.pylori*感染诱导的AGS细胞IL-8产生,提示服用NSAIDs可减轻*H.pylori*阳性患者胃黏膜的炎症反应<sup>[22]</sup>。我们推测,服用NSAIDs可能通过下调HSP60的表达,参与减弱*H.pylori*感染诱发的胃黏膜局部免疫反应和炎症因子释放对胃黏膜的双重损害。本研究中,塞莱昔布处理后,*H.pylori* HSP60 mRNA和蛋白质表达变化趋势不一致,可能是翻译后修饰的存在使得塞莱昔布在基因和蛋白质水平上对HSP的表达调节不同。细菌常见的翻译后修饰有糖基化、磷酸化和乙酰化,糖基化涉及免疫保护、细胞生长、炎症产生等过程;磷酸化对信号转导、神经活动、细胞增殖分化和发育等生理病理过程起重要作用<sup>[23]</sup>;组蛋白的甲基化和乙酰化与转录调节有关<sup>[24]</sup>,各种翻译后修饰并不是孤立存在的,他们之间相互协调、共同发挥作用。SMA(modified spectral alignment)算法及质谱技术可进一步验证发生翻译后修饰的蛋白质及其相关位点<sup>[25-27]</sup>,目前国内外未见*H.pylori* HSP60翻译后修饰的相关报道。

一项体内研究也发现,服用NSAIDs 3 mo以



上可逆转*H.pylori*诱导的胃黏膜损害<sup>[21]</sup>, 另一方面, 研究发现, 服用NSAIDs可逆转*H.pylori*感染导致的胃黏膜上皮细胞的增殖和凋亡, 使细胞动力学趋于正常<sup>[28]</sup>. 来自动物模型和流行病学的研究均证实, COX-2上调促血管生长因子的表达, 促进新生血管的生成<sup>[29]</sup>, 诱发细胞的恶性表型改变. 体内外实验发现, COX-2过表达促进胃癌的发生发展<sup>[30]</sup>, COX-2抑制剂可预防胃癌的发生<sup>[31,32]</sup>. 新近研究显示, *H.pylori* GGT蛋白介导原发性胃癌上皮细胞和AGS胃癌细胞产生过氧化氢, 从而导致NF- $\kappa$ B的活化和IL-8的上调; HP-nGGT(*H.pylori* native GGT protein)上调8-羟基脱氧鸟苷(8-OH-dG)的表达, 从而导致DNA氧化应激损伤<sup>[33]</sup>, 进而引起*H.pylori*感染相关的胃黏膜损害. 我们的研究显示, 塞莱昔布可降低*H.pylori* GGT的表达, 从而可能拮抗*H.pylori*感染相关的慢性炎症反应及致癌作用.

EF-TU作为转录与翻译相关蛋白, 负责tRNA向核糖体A位点的移位, 从而参与肽链的延长即核蛋白体循环, 他还可调节GTP酶的水解, 从而影响蛋白翻译的速度和效率<sup>[34]</sup>. 本研究发现, 塞莱昔布下调*H.pylori* EF-TU的表达, 且可能通过降低EF-TU的表达, 参与塞莱昔布下调HSP60、GGT的代谢和翻译过程, 进一步证实了HSP60、GGT蛋白质的翻译速率降低, 导致其合成量减少.

本研究的7个差异蛋白质斑点中, 编号是542、627、768的蛋白点为EF-TU, 编号1021、1070、1255的蛋白点为HSP60, 显示同一种蛋白质表现出3种不同的等电点和相对分子质量, 但等电点和相对分子质量的波动范围小, 可能是蛋白质的化学修饰或降解所致, 这种蛋白质的修饰或降解可发生在细胞内执行功能时, 也可发生在样本处理过程中, 如2-DE过程中的温度及某些蛋白质溶解试剂的影响.

总之, 体外塞莱昔布可能通过干扰*H.pylori* HSP60、GGT、EF-TU表达, 影响*H.pylori*对胃黏膜上皮细胞的黏附定植能力、炎症反应和细胞的增殖凋亡, 从而影响*H.pylori*感染后的致病性.

#### 4 参考文献

- 1 Sokić-Milutinović A, Krstić M, Popović D, Mijalković N, Djuranović S, Culafić Dj. [Role of *Helicobacter pylori* infection and use of NSAIDs in the etiopathogenesis of upper gastrointestinal bleeding]. *Acta Chir Jugosl* 2007; 54: 51-62
- 2 Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of *Helicobacter pylori* infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis.

- Lancet* 2002; 359: 14-22
- 3 Blauch DN. Java classes for managing chemical information and solving generalized equilibrium problems. *J Chem Inf Comput Sci* 2006; 42: 143-146
- 4 Păunescu E, Mihăilescu P, Fonea M, Ciocan A, Serban G, Eliescu A, Serban S, Grigorescu C, Tiței I, Popescu M. [Remote (2-3 years) results in patients with pulmonary tuberculosis treated in operational conditions in combination with sinerdol-EH]. *Rev Ig Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol Pneumoftiziol Pneumoftiziol* 2010; 36: 137-144
- 5 Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 63-96
- 6 Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S. Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J* 2011; 278: 1190-1202
- 7 Larsson T, Bergström J, Nilsson C, Karlsson KA. Use of an affinity proteomics approach for the identification of low-abundant bacterial adhesins as applied on the Lewis(b)-binding adhesin of *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett* 2000; 469: 155-158
- 8 Enroth H, Akerlund T, Sillén A, Engstrand L. Clustering of clinical strains of *Helicobacter pylori* analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 301-306
- 9 马慧霞, 王蔚虹, 胡伏莲, 李江. 阿司匹林和塞来昔布对幽门螺杆菌的体外影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2747-2752
- 10 Yamaguchi H, Osaki T, Taguchi H, Hanawa T, Yamamoto T, Kamiya S. Relationship between expression of HSP60, urease activity, production of vacuolating toxin, and adherence activity of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 1998; 33 Suppl 10: 6-9
- 11 del Bello B, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A, Maellaro E. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J* 1999; 13: 69-79
- 12 Barnes IH, Bagnall MC, Browning DD, Thompson SA, Manning G, Newell DG. Gamma-glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by *Campylobacter jejuni*. *Microb Pathog* 2007; 43: 198-207
- 13 Schmees C, Prinz C, Treptau T, Rad R, Hengst L, Volland P, Bauer S, Brenner L, Schmid RM, Gerhard M. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 2007; 132: 1820-1833
- 14 Engstrand L, Gustavsson S, Schwan A, Scheynius A. Local and systemic immune response in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis before and after treatment. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28: 1105-1111
- 15 Basak C, Pathak SK, Bhattacharyya A, Mandal D, Pathak S, Kundu M. NF-kappaB- and C/EBPbeta-driven interleukin-1beta gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1beta release from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Biol Chem* 2005; 280: 4279-4288
- 16 Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010: 240365
- 17 Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Hirata I, Nakano H. Absence of Common Polymorphisms of Toll Like Receptor 4 (TLR4): Asp299Gly, Thr399Ile in Patients

- with Gastroduodenal Diseases in Japan. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40: 62-65
- 18 Tanigawa T, Watanabe T, Higuchi K, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Arakawa T. Lansoprazole, a Proton Pump Inhibitor, Suppresses Production of Tumor Necrosis Factor-alpha and Interleukin-1beta Induced by Lipopolysaccharide and Helicobacter Pylori Bacterial Components in Human Monocytic Cells via Inhibition of Activation of Nuclear Factor-kappaB and Extracellular Signal-Regulated Kinase. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 45: 86-92
- 19 Luo Y, Pollard JW, Casadevall A. Fcgamma receptor cross-linking stimulates cell proliferation of macrophages via the ERK pathway. *J Biol Chem* 2010; 285: 4232-4242
- 20 Zhao Y, Yokota K, Ayada K, Yamamoto Y, Okada T, Shen L, Oguma K. Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces interleukin-8 via a Toll-like receptor (TLR)2 and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway in human monocytes. *J Med Microbiol* 2007; 56: 154-164
- 21 Zhang LJ, Wang SY, Huo XH, Zhu ZL, Chu JK, Ma JC, Cui DS, Gu P, Zhao ZR, Wang MW, Yu J. Anti-Helicobacter pylori therapy followed by celecoxib on progression of gastric precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2731-2738
- 22 Leung AM, Redlak MJ, Miller TA. Aspirin-induced mucosal cell death in human gastric cells: role of a caspase-independent mechanism. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 28-35
- 23 Huang CH, Wang YT, Tsai CF, Chen YJ, Lee JS, Chiou SH. Phosphoproteomics characterization of novel phosphorylated sites of lens proteins from normal and cataractous human eye lenses. *Mol Vis* 2011; 17: 186-198
- 24 Xiong L, Wang Y. Mapping Post-translational Modifications of Histones H2A, H2B and H4 in Schizosaccharomyces pombe. *Int J Mass Spectrom* 2011; 301: 159-165
- 25 Pless O, Kowenz-Leutz E, Dittmar G, Leutz A. A differential proteome screening system for post-translational modification-dependent transcription factor interactions. *Nat Protoc* 2011; 6: 359-364
- 26 Chung C, Liu J, Emili A, Frey BJ. Computational refinement of post-translational modifications predicted from tandem mass spectrometry. *Bioinformatics* 2011; 27: 797-806
- 27 Viner RI, Zhang T, Second T, Zabrouskov V. Quantification of post-translationally modified peptides of bovine alpha-crystallin using tandem mass tags and electron transfer dissociation. *J Proteomics* 2009; 72: 874-885
- 28 Tanigawa T, Watanabe T, Higuchi K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Tarnawski AS, Arakawa T. Long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs normalizes the kinetics of gastric epithelial cells in patients with Helicobacter pylori infection via attenuation of gastric mucosal inflammation. *J Gastroenterol* 2009; 44 Suppl 19: 8-17
- 29 Wu K, Nie Y, Guo C, Chen Y, Ding J, Fan D. Molecular basis of therapeutic approaches to gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 37-41
- 30 Mrena J, Wiksten JP, Kokkola A, Nordling S, Ristimäki A, Haglund C. COX-2 is associated with proliferation and apoptosis markers and serves as an independent prognostic factor in gastric cancer. *Tumour Biol* 2010; 31: 1-7
- 31 Chakraborti AK, Garg SK, Kumar R, Motiwala HF, Jadhavar PS. Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far. *Curr Med Chem* 2010; 17: 1563-1593
- 32 Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Lam SK, Karlberg J, Wong BC. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1784-1791
- 33 Gong M, Ling SS, Lui SY, Yeoh KG, Ho B. Helicobacter pylori gamma-glutamyl transpeptidase is a pathogenic factor in the development of peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 2010; 139: 564-573
- 34 Krab IM, Parmeggiani A. EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1443: 1-22

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 血清补体C3和C4对慢性乙型肝炎患者肝组织病理状态的判断价值

张占卿, 陆伟, 王雁冰, 饶敏, 冯洁, 沈芳, 冯艳玲

张占卿, 陆伟, 王雁冰, 饶敏, 冯洁, 上海市公共卫生临床中心肝病二科 上海市 201508

沈芳, 上海市公共卫生临床中心检验科 上海市 201508

冯艳玲, 上海市公共卫生临床中心病理科 上海市 201508

国家863计划生物和医药技术领域重大/重点基金资助项目, No. 2006AA02A411

上海市科委科技计划基金资助项目, No. 09411965800

**作者贡献分布:** 张占卿与陆伟对此文所作贡献均等; 此课题由张占卿设计; 资料收集由张占卿、陆伟、王雁冰、饶敏及冯洁协作完成; 研究所用试剂由沈芳与冯艳玲提供; 资料整理由陆伟完成; 数据分析由张占卿完成; 本论文写作由张占卿完成。

**通讯作者:** 张占卿, 主任医师. 201508, 上海市, 上海市公共卫生临床中心肝病二科. doctorzzqsphc@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-04-05 修回日期: 2011-05-18

接受日期: 2011-05-24 在线出版日期: 2011-06-18

## Serum complement C3 and C4 levels for evaluation of hepatic pathological status in patients with chronic hepatitis B

Zhan-Qing Zhang, Wei Lu, Yan-Bing Wang, Min Rao, Jie Feng, Fang Shen, Yan-Ling Feng

Zhan-Qing Zhang, Wei Lu, Yan-Bing Wang, Min Rao, Jie Feng, Department of Hepatology (Division II), Shanghai Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China

Fang Shen, Department of Clinical Laboratory, Shanghai Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China

Yan-Ling Feng, Department of Pathology, Shanghai Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China

Supported by: the National 863 Program in Biological and Medical Technology Foundation, No. 2006AA02A411; and the Shanghai Committee of Science and Technology Project Foundation, No. 09411965800

Correspondence to: Zhan-Qing Zhang, Department of Hepatology (Division II), Shanghai Public Health Clinical Center Affiliated to Fudan University, Shanghai 201508, China. doctorzzqsphc@yahoo.com.cn

Received: 2011-04-05 Revised: 2011-05-18

Accepted: 2011-05-24 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To explore the possibility of using serum complement C3 and C4 levels to estimate the hepatic pathological status in patients with chronic hepatitis B.

**METHODS:** Four hundred and fifty-six patients

with pathologically proven chronic hepatitis B were enrolled in present study. Serum complement C3 and C4 levels were determined using the Beckman-Coulter Immage 800 immunochemistry system and auxiliary reagents (Beckman-Coulter Inc., USA). Bayes stepwise discriminant analysis was used for evaluation of serum complement C3 and C4 in discriminating hepatic pathological grade and stage.

**RESULTS:** Only serum C3 or C4 entered the Fisher's discriminant functions for discriminating hepatic pathological grade and stage according to the entry criteria of the independents (Wilks'  $\lambda = 0.967$ ,  $\chi^2 = 15.312$ ,  $P = 0.002$  and Wilks'  $\lambda = 0.938$ ,  $\chi^2 = 28.724$ ,  $P = 0.000$ ). The correctly classified rates of the originally grouped cases by the discriminant functions built with serum complement C3 and C4 were 46.34% for G1, 6.28% for G2, 20.61% for G3, 72.73% for G4 and 6.90% for S0, 46.51% for S1, 7.58% for S2, 8.91% for S3, 61.11% for S4, respectively. According to the discriminant functions for discriminating different pathological grades and stages, patients had a higher probability of G1 and G4 when serum complement C3 level was no less than 0.84 g/L and no more than 0.65 g/L, respectively, and of S1 and S4 when serum complement C4 level was no less than 0.18 g/L and no more than 0.14 g/L respectively.

**CONCLUSION:** Serum complement C3 and C4 levels have appreciable significance in discriminating hepatic pathological grade and stage in patients with chronic hepatitis B.

**Key Words:** Complement; Hepatitis B; Pathology; Non-invasive diagnosis

Zhang ZQ, Lu W, Wang YB, Rao M, Feng J, Shen F, Feng YL. Serum complement C3 and C4 levels for evaluation of hepatic pathological status in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1791-1795

## 摘要

**目的:** 探讨血清补体C3和C4判别慢性乙型肝炎

## ■背景资料

肝脏是合成补体成分的主要器官, 约90%的血浆补体成分及其调节因子来自肝脏。补体C3和C4主要由肝细胞合成, 因此, 理论上讲, 肝脏损伤可能导致血清C3和C4水平的下降。

## ■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系



## ■相关报道

Ali等的研究认为,慢性丙型肝炎在出现肝硬化之前,血清补体C3和C4水平有一定程度的升高,在出现肝硬化之后显著下降,但在肝硬化的基础上发生肝细胞癌后再度升高。

炎患者肝组织病理学分级和分期的价值。

**方法:** 456例经肝组织病理学检查的慢性乙型肝炎患者入选本研究。血清补体C3和C4采用Beckman-Coulter Immage 800免疫化学系统及其配套试剂测定。血清补体C3和C4判别病理学分级和分期的评价采用Bayes逐步判别分析。

**结果:** 符合模型纳入变量、进入判别不同病理学分级和分期的Fisher's判别函数的指标分别只有补体C3和C4(Wilks'  $\lambda = 0.967$ ,  $\chi^2 = 15.312$ ,  $P = 0.002$ ; Wilks'  $\lambda = 0.938$ ,  $\chi^2 = 28.724$ ,  $P = 0.000$ )。基于补体C3的判别函数判别病理学分级G1、G2、G3、G4和基于补体C4的判别函数判别病理学分期S0、S1、S2、S3、S4的符合率分别为46.34%、6.28%、20.61%、72.73%; 6.90%、46.51%、7.58%、8.91%、61.11%。根据判别函数,当患者补体C3  $\geq 0.84$  g/L和 $\leq 0.65$  g/L时,其肝组织病理学分级 = G1和G4的可能性较大;当患者补体C4  $\geq 0.18$  g/L和 $\leq 0.14$  g/L时,其肝组织病理学分期 = S1和S4的可能性较大。

**结论:** 血清补体C3和C4分别对慢性乙型肝炎患者肝组织病理学分级和分期有一定判别意义。

**关键词:** 补体; 乙型肝炎; 病理学; 无创诊断

张占卿, 陆伟, 王雁冰, 饶敏, 冯洁, 沈芳, 冯艳玲. 血清补体C3和C4对慢性乙型肝炎患者肝组织病理状态的判断价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1791-1795  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1791.asp>

## 0 引言

作为评估机体免疫状态的指标,血清补体C3和C4定量检测已经被广泛应用,但很少有文献研究其判别慢性肝炎患者肝组织病理学状态的价值。最近, Gangadharan等<sup>[1]</sup>和White等<sup>[2]</sup>采用血清蛋白组学方法筛选诊断肝纤维化生物标志物时发现,肝硬化或严重肝纤维化患者血清补体C3和C4水平显著下降。本文参照肝组织病理学诊断,通过对456例慢性乙型肝炎患者血清补体C3和C4水平进行分析,探讨血清补体C3和C4判别慢性乙型肝炎患者肝组织病理学分级和分期的价值。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 慢性乙型肝炎患者456例,均为2005-06/2010-12上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心住院患者。诊断符合2005年中华医学会肝病学

分会与感染病学分会联合制订的慢性乙型肝炎指南中的标准。合并其他病毒性肝炎、自身免疫性肝病、药物性肝病、遗传性肝病、血吸虫性肝病的患者被排除。所有患者均无失代偿性肝病的临床表现和实验室依据,并且没有妊娠、肾脏疾病、血液系统疾病,近3 mo内没有输血或血制品史。456例患者中,男352例,女104例,男:女 = 3.38:1;年龄13-72(平均37.89 $\pm$ 12.16)岁。

### 1.2 方法

**1.2.1 病理学诊断:** 肝组织活检采用1 s经皮肝穿刺法,标本采集后立即置塑料标本管内冰冻送检。肝组织置塑料包埋盒中,进行中性甲醛固定、梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡浸入和包埋、切片,苏木素-伊红染色和网状纤维染色。肝组织标本的质量评价和肝组织病理学诊断由1名有经验的病理学医师独立完成。肝组织病理学诊断参照2000年西安全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订的标准;病理学分级(grading, G)包括G0、G1、G2、G3、G4 5级,分期(staging, S)包括S0、S1、S2、S3、S4 5期。

**1.2.2 血清补体检测:** 所有患者于肝穿刺前后1 wk内早晨空腹采集静脉血,分离血清。血清补体C3和C4采用美国Beckman-Coulter公司生产的Beckman-Coulter Immage 800免疫化学系统及其配套试剂测定,检测方法为免疫比浊法,正常参考值分别为0.79-1.52 g/L和0.16-0.38 g/L。

**统计学处理** 统计分析采用SPSS13.0软件。血清补体C3和C4在性别之间的比较采用两独立样本的 $t$ 检验,与年龄之间的相关性采用Pearson相关分析。血清补体C3和C4在肝组织病理学分级和分期之间的比较采用单因素方差分析;根据方差齐性与否,血清补体C3和C4在不同病理学分期之间的两两比较分别采用LSD法和Tamhane T2法。血清补体C3和C4判别肝组织病理学分级和分期的评价采用Bayes逐步判别分析,分析方法采用Wilks'  $\lambda$ 法,模型纳入变量的 $F > 3.84$ ,剔除变量的 $F < 2.71$ 。

## 2 结果

**2.1 血清补体C3和C4与性别和年龄的相关性** 男女患者血清补体C3水平分别为(0.81 $\pm$ 0.29) g/L和(0.78 $\pm$ 0.22) g/L,两者之间差异无统计学意义( $t = 0.980$ ,  $P = 0.328$ ),男女患者血清补体C4水平分别为(0.16 $\pm$ 0.06) g/L和(0.15 $\pm$ 0.06) g/L,两者之间差异无统计学意义( $t = 1.352$ ,  $P = 0.177$ )。血清补体C3和C4水平与患者年龄之间均无显著相

表 1 血清补体C3和C4在肝组织不同病理学分级患者中的分布

病理学分级	<i>n</i>	血清补体C3(g/L)		血清补体C4(g/L)	
		mean ± SD	95%CI	mean ± SD	95%CI
G1	123	0.84 ± 0.24	0.79–0.88	0.17 ± 0.05	0.16–0.18
G2	191	0.83 ± 0.28	0.79–0.87	0.16 ± 0.05	0.16–0.17
G3	131	0.76 ± 0.30	0.71–0.81	0.15 ± 0.06	0.14–0.16
G4	11	0.55 ± 0.22	0.40–0.70	0.13 ± 0.06	0.09–0.17

## ■创新盘点

作为评估机体免疫状态的指标, 血清补体C3和C4定量检测已经被广泛应用, 但很少有文献研究其判别慢性肝炎患者肝组织病理学状态的价值。

表 2 血清补体C3和C4在肝组织不同病理学分期患者中的分布

病理学分级	<i>n</i>	血清补体C3(g/L)		血清补体C4(g/L)	
		mean ± SD	95%CI	mean ± SD	95%CI
S0	29	0.80 ± 0.27	0.69–0.90	0.16 ± 0.05	0.78–0.83
S1	86	0.87 ± 0.26	0.82–0.93	0.18 ± 0.06	0.14–0.17
S2	132	0.87 ± 0.26	0.82–0.91	0.17 ± 0.06	0.17–0.19
S3	101	0.76 ± 0.23	0.71–0.80	0.15 ± 0.05	0.16–0.18
S4	108	0.72 ± 0.32	0.66–0.78	0.14 ± 0.06	0.14–0.16

关性( $r = -0.057, P = 0.224; r = -0.045, P = 0.333$ ).

2.2 血清补体C3和C4与肝组织病理学分级和分期的相关性 血清补体C3和C4与肝组织病理学分级均呈负相关( $r_s = -0.190, P = 0.000; r_s = -0.162, P = 0.001$ ), 与病理学分期均呈负相关( $r_s = -0.242, P = 0.000; r_s = -0.246, P = 0.000$ ).

2.3 血清补体C3和C4在肝组织不同病理学分级和分期患者中的分布 血清补体C3和C4在肝组织不同病理学分级之间差异均存在统计学意义( $F = 5.186, P = 0.002; F = 3.382, P = 0.018$ ). 其中补体C3在G1与G2之间差异无统计学意义( $P = 0.713$ ), 在G1与G3、G4之间差异有统计学意义( $P = 0.029, 0.001$ ), 在G2与G3、G4之间差异有统计学意义( $P = 0.041, 0.001$ ), 在G3与G4之间差异有统计学意义( $P = 0.014$ ); 补体C4在G1和G2之间, G1和G4之间, G2和G4之间, G3和G4之间差异无统计学意义. 其在G1和G3之间, 在G2和G3之间差异有统计学意义( $P = 0.015, 0.021$ , 表1).

血清补体C3和C4在肝组织不同病理学分期之间差异均存在统计学意义( $F = 6.594, P = 0.000; F = 7.398, P = 0.000$ ). 其中补体C3在S0与S1、S2、S3、S4之间均差异无统计学意义( $P = 0.210, 0.210, 0.471, 0.162$ ), 在S1与S2之间差异无统计学意义( $P = 0.929$ ), 在S1与S3、S4之间差异有统计学意义( $P = 0.004, 0.000$ ), 在S2与S3、S4之间差异有统计学意义( $P = 0.002, 0.000$ ), 在S3与S4差异无统计学意义( $P = 0.309$ ); 补体C4在S0与S1、S2、S3、S4之间差异均无统计学意义( $P$

$= 0.065, 0.246, 0.680, 0.165$ ), 在S1与S2之间差异无统计学意义( $P = 0.250$ ), 在S1与S3、S4之间差异有统计学意义( $P = 0.001, 0.000$ ), 在S2与S3、S4之间差异有统计学意义( $P = 0.014, 0.000$ ), 在S3与S4差异无统计学意义( $P = 0.141$ , 表2).

2.4 血清补体C3和C4判别肝组织不同病理学分级和分期的判别函数 以病理学分级和分期作为因变量, 补体C3和C4作为自变量, 应用Bayes逐步判别分析, 构建Fisher判别函数. 结果, 符合模型纳入变量、进入判别肝组织不同病理学分级和分期的判别函数的指标分别只有补体C3和C4. 对判别不同病理学分级和分期的判别函数的有效性检验提示其均有显著性判别作用(Wilks'  $\lambda = 0.967, \chi^2 = 15.312, P = 0.002$ ; Wilks'  $\lambda = 0.938, \chi^2 = 28.724, P = 0.000$ ). 判别不同病理学分级的判别函数为:  $G1 = -6.036 + 11.109 \times C3$ ,  $G2 = -5.907 + 10.954 \times C3$ ,  $G3 = -5.236 + 10.108 \times C3$ ,  $G4 = -3.387 + 7.286 \times C3$ ; 判别不同病理学分期的判别函数为:  $S0 = -5.670 + 51.878 \times C4$ ,  $S1 = -6.883 + 59.121 \times C4$ ,  $S2 = -6.378 + 56.217 \times C4$ ,  $S3 = -5.426 + 50.295 \times C4$ ,  $S4 = -4.884 + 46.583 \times C4$ .

2.5 血清补体C3和C4判别肝组织不同病理学分级和分期的价值 采用留一交叉验证法分别将补体C3和C4回代入判别函数, 结果显示, 基于补体C3的判别函数的判别病理学分级G1、G4和基于补体C4的判别函数判别病理学分期S1、S4的符合率最高, 分别为46.34%、72.73%和46.51%、61.11%(表3, 4). 分别将血清补体C3和

## ■应用要点

肝脏强大的合成补体C3和C4的储备功能以及肝炎活动诱导补体C3和C4的合成增加可能是血清补体C3和C4在肝组织不同炎症活动度和纤维化程度之间的变化幅度不够显著的主要原因。

表 3 基于补体C3的判别函数的判别病理学分级与实际病理学分级的一致性

实际分级	预测分级							
	G1		G2		G3		G4	
	<i>n</i>	构成比(%)	<i>n</i>	构成比(%)	<i>n</i>	构成比(%)	<i>n</i>	构成比(%)
G1	57	46.34	7	5.69	37	30.08	22	17.89
G2	89	46.60	12	6.28	40	20.94	50	26.18
G3	44	33.59	5	3.82	27	20.61	55	41.98
G4	1	9.09	0	0.00	2	18.18	8	72.73

表 4 基于补体C4的判别函数的判别病理学分期与实际病理学分期的一致性

实际分级	预测分级									
	S0		S1		S2		S3		S4	
	<i>n</i>	构成比(%)	<i>n</i>	构成比(%)	<i>n</i>	构成比(%)	<i>n</i>	构成比(%)	<i>n</i>	构成比(%)
S0	2	6.90	7	24.14	2	6.90	5	17.24	13	44.83
S1	8	9.30	40	46.51	5	5.81	3	3.49	30	34.88
S2	8	6.06	57	43.18	10	7.58	11	8.33	46	34.85
S3	11	10.89	21	20.79	8	7.92	9	8.91	52	51.49
S4	4	3.70	21	19.44	5	4.63	12	11.11	66	61.11

C4回代入基于补体C3的判别病理学分级的判别函数和基于补体C4的判别病理学分期的判别函数,结果显示,当患者补体C3 $\geq 0.84$  g/L时,其肝组织病理学分级 = G1的可能性较大;当患者补体C3 $\leq 0.65$  g/L时,其肝组织病理学分级 = G4的可能性较大.当患者补体C4 $\geq 0.18$  g/L时,其肝组织病理学分期 = S1的可能性较大;当患者补体C4 $\leq 0.14$  g/L时,其肝组织病理学分期 = S4的可能性较大.

### 3 讨论

肝脏是合成补体成分的主要器官,约90%的血浆补体成分及其调节因子来自肝脏<sup>[3]</sup>.补体C3和C4主要由肝细胞合成<sup>[3]</sup>,因此,理论上讲,肝脏损伤可能导致血清C3和C4水平的下降.杨晋辉等<sup>[4]</sup>对比分析了不同临床类型乙型肝炎患者的血清C3和C4水平,结果指出,急性肝炎患者相近于健康对照,慢性和重型肝炎患者显著低于健康对照,重型肝炎患者显著低于慢性肝炎患者.说明血清C3和C4水平随肝脏损伤的加重而下降.本文资料显示,血清补体C3和C4与肝组织病理学分级和分期均呈显著负相关,血清C3和C4水平随肝组织病理学分级和分期的升高而逐步下降,提示血清C3和C4可能对慢性乙型肝炎肝组织病理学状态有判别作用.

本文采用判别分析进一步探讨了血清补体

C3和C4对慢性乙型肝炎肝组织不同病理学状态的判别效能,结果指出,符合模型纳入变量、进入判别肝组织不同病理学分级和分期判别函数的指标分别只有补体C3和C4.采用留一交叉验证法将血清补体C3和C4回代入判别函数,结果显示,基于补体C3的判别函数判别病理学分级G1、G4和基于补体C4的判别函数判别病理学分期S1、S4的符合率最高,分别为46.34%、72.73%和46.51%、61.11%.分别将血清补体C3和C4水平回代入判别函数,结果指出,当患者补体C3 $\geq 0.84$  g/L时,其肝组织病理学分级 = G1的可能性较大;当患者补体C3 $\leq 0.65$  g/L时,其肝组织病理学分级 = G4的可能性较大.当患者补体C4 $\geq 0.18$  g/L时,其肝组织病理学分期 = S1的可能性较大;当患者补体C4 $\leq 0.14$  g/L时,其肝组织病理学分期 = S4的可能性较大.提示血清补体C3和C4对慢性乙型肝炎肝组织不同病理学状态有一定判别意义.

虽然补体系统在保护机体抵御病毒感染中起一定作用,但他们在病毒性肝炎的发病和持续机制中的作用尚不清楚<sup>[3]</sup>.Talaat等<sup>[5]</sup>研究了慢性丙型肝炎不同发展阶段血清C1Q(主要来源于内皮细胞、纤维母细胞和单核/巨噬细胞<sup>[3]</sup>)、补体C3和C4水平的变化,结果显示,血清C1Q随肝组织炎症活动度和纤维化程度的升高而逐步升高,补体C3和C4随肝组织炎症活动度和纤维化



程度的升高而逐步降低;高永旺<sup>[6]</sup>的研究指出,血清补体C3在急性乙型肝炎早期(1-2 wk)显著高于健康对照,高峰期(3-4 wk)则接近于健康对照;慢性活动型乙型肝炎和重型乙型肝炎显著低于健康对照.本文资料显示,血清补体C3和C4水平在病理学分级G1和病理学分期S1最高,并且高于S0.提示补体C3和C4参与病毒性肝炎的发病机制,在肝脏出现肝组织显著炎症和显著纤维化(病理学分级 $\geq$ G2,病理学分期 $\geq$ S2)之前有一定程度地升高.

Baumann等<sup>[7]</sup>对比分析了不同程度的丙型肝炎相关失代偿性肝硬化患者的血清补体C3和C4水平,结果指出,血清补体C3和C4水平随Child分级的升高而逐步降低,并且在Child A级与Child B级、Child C级与Child B级之间均有显著性差异.Ali等<sup>[8]</sup>的研究认为,慢性丙型肝炎在出现肝硬化之前,血清补体C3和C4水平有一定程度地升高,在出现肝硬化之后显著下降,但在肝硬化的基础上发生肝细胞癌后再度升高.本文资料也提示,在肝脏功能出现严重炎症(病理学分级=G4)和肝硬化(肝组织病理学分期=S4)之前,血清补体C3和C4水平虽有下降,但降幅不够显著.肝脏强大的合成补体C3和C4的储备功能以及肝炎活动诱导补体C3和C4的合成增加可

能是血清补体C3和C4在肝组织不同炎症活动度和纤维化程度之间的变化幅度不够显著的主要原因.

#### 4 参考文献

- 1 Gangadharan B, Antrobus R, Dwek RA, Zitzmann N. Novel serum biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis C patients. *Clin Chem* 2007; 53: 1792-1799
- 2 White IR, Patel K, Symonds WT, Dev A, Griffin P, Tsokanas N, Skehel M, Liu C, Zekry A, Cutler P, Gattu M, Rockey DC, Berrey MM, McHutchison JG. Serum proteomic analysis focused on fibrosis in patients with hepatitis C virus infection. *J Transl Med* 2007; 5: 33
- 3 Qin X, Gao B. The complement system in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 333-340
- 4 杨晋辉, 李祥金. 乙型病毒性肝炎患者血清补体C3、补体C4的临床意义. *临床肝胆病杂志* 2007; 23: 355-356
- 5 Talaat RM, Daif AA, Salama MM. Serum levels of complement C1Q, C3 and C4 in patients at different stages of chronic hepatitis C viral infection. *World J Med Sci* 2007; 2: 88-95
- 6 高永旺. 补体C3的测定对乙型肝炎诊断价值分析. *实用医技杂志* 2006; 13: 2034-2035
- 7 Baumann M, Witzke O, Canbay A, Patschan S, Treichel U, Gerken G, Philipp T, Kribben A. Serum C3 complement concentrations correlate with liver function in patients with liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1451-1453
- 8 Ali OS, Abo-Shadi MA, Hammad LN. The biological significance of serum complements C3 and C4 in HCV-related chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Egypt J Immunol* 2005; 12: 91-99

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

#### ■同行评价

本文创新性较好,对临床医师有一定的参考价值.

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

# PNPLA3基因在非酒精性脂肪性肝病中的作用

李冬阳, 林连捷, 郑长青

## ■背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)在世界范围内发病率成日益上升趋势, 而NAFLD致病机制中的遗传易感性越来越得到人们关注. 多项实验证实PNPLA3基因突变与NAFLD密切相关, 但关于其致病机制仍无详细阐释.

李冬阳, 中国医科大学附属盛京医院 辽宁省沈阳市 110004  
林连捷, 郑长青, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004  
辽宁省科学技术基金资助项目, No. 2010225008  
辽宁省博士科研启动基金资助项目, No. 20081048  
沈阳市科学技术基金资助项目, No. F10-205-1-17  
作者贡献分布: 本文综述由李冬阳完成; 林连捷与郑长青审核.  
通讯作者: 郑长青, 教授, 主任医师, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科.  
zhengchangqing88@163.com  
收稿日期: 2011-04-23 修回日期: 2011-05-24  
接受日期: 2011-06-02 在线出版日期: 2011-06-18

## Advances in understanding the role of PNPLA3 in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease

Dong-Yang Li, Lian-Jie Lin, Chang-Qing Zheng

Dong-Yang Li, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Lian-Jie Lin, Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Supported by: the Science and Technology Project of Liaoning Province, No. 2010225008; the Doctor Scientific Research Foundation of Liaoning Province, No. 20081048; and the Science and Technology Project of Shenyang City, No. F10-205-1-17  
Correspondence to: Professor Chang-Qing Zheng, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhengchangqing88@163.com  
Received: 2011-04-23 Revised: 2011-05-24  
Accepted: 2011-06-02 Published online: 2011-06-18

## Abstract

The incidence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is rising worldwide. Investigation of genes involved in the pathogenesis of NAFLD is significant for replenishing treatment scheme and improving prognosis. Multiple studies have established a correlation between patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) gene mutation and the pathogenesis of NAFLD, suggesting that PNPLA3 may affect lipid metabolism. However, the precise mechanism remains to be elucidated. Some researchers believed that PNPLA3 as a patatin-like protein might have triglyceride hydrolysis activity and therefore affect fat metabolism in the liver, while some others

thought that PNPLA3 mutation might interfere with the lipid transfer process. In this paper, we give an overview of the PNPLA3 gene and its expression, and explore the correlation between PNPLA3 gene mutation and the pathogenesis of NAFLD.

**Key Words:** Patatin-like phospholipase domain-containing 3; Adiponectin; Non-alcoholic fatty liver disease; Gene mutation

Li DY, Lin LJ, Zheng CQ. Advances in understanding the role of PNPLA3 in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1796-1801

## 摘要

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)在世界范围内发病率成日益上升趋势, 其相关基因研究对完善其致病机制, 补充其治疗方案及改善预后至关重要. 目前, 国内外多项实验证实含patatin样磷脂酶域3(PNPLA3)基因突变与NAFLD密切相关, 考虑其与肝脏脂代谢有关, 但就其致病机制仍无详细阐释. 部分文献认为PNPLA3作为patatin样磷脂酶家族, 考虑其可能有三酰甘油水解酶活性从而影响肝脏脂肪代谢. 也有文献认为PNPLA3突变干扰了脂质转运的过程. 本文详细介绍PNPLA3基因及其表达, 并就PNPLA3基因突变与NAFLD相关性进行综述.

**关键词:** 含patatin样磷脂酶域3; 脂肪滋养蛋白; 非酒精性脂肪性肝病; 基因突变

李冬阳, 林连捷, 郑长青. PNPLA3基因在非酒精性脂肪性肝病中的作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19(17): 1796-1801  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1796.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史, 以肝实质细胞脂肪变性、坏死、炎性细胞浸润等为特征的临床病理综合征. NAFLD在世界范围内发病率成日益上升趋势, 流行病学调查示西方

## ■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院  
消化内科

国家NAFLD的发病率为20%-30%<sup>[1,2]</sup>,在我国上海地区NAFLD的发病率为15%<sup>[3]</sup>. NAFLD的致病机制一般认为与肥胖、2型糖尿病、高脂血症、胰岛素抵抗综合征等密切相关.但现在越来越明确基因突变也是NAFLD发病的危险因素之一.目前,国外很多研究证实PNPLA3基因突变与NAFLD发病密切相关,但中国仍鲜有这方面研究.对PNPLA3基因的深入研究对完善NAFLD致病机制,补充其治疗方案及改善预后至关重要.

## 1 PNPLA3基因

含patatin样磷脂酶域3(patatin-like phospholipase domain containing 3, PNPLA3)位于22号染色体上,所编码的蛋白又被称为adiponectin,蛋白由481个氨基酸组成的,属于patatin样磷脂酶家族<sup>[4]</sup>. patatin是一种可溶的蛋白质,在马铃薯根茎中广泛存在,具有脂肪酰化水解酶活性<sup>[5]</sup>. PNPLA3位于细胞膜与脂滴之间,两者紧密联系在一起,高盐、高pH值等无法将两者分开. PNPLA3可能有针对性的存在于内质网新生膜脂滴形成的专门区域.另外,PNPLA3也可能通过内质网转高尔基体转运机制,从内质网膜转运到脂滴上. PNPLA3也可能在膜和脂滴之间执行不同功能<sup>[6]</sup>. PNPLA3蛋白的生物学功能尚不十分清楚.生物结构上与PNPLA3结构最为类似的是PNPLA2, PNPLA2已被证实具有三酰甘油水解酶和酰基甘油转酰基酶活性<sup>[7]</sup>.部分体外实验证实PNPLA3有三酰甘油水解酶和部分酰基甘油转酰基酶活性,但其在体内所表达的生物学活性仍无统一结论.例如:人类肾脏胚胎细胞PNPLA3的过度表达并没有引起细胞内三酰甘油的改变<sup>[8]</sup>.小RNA干扰机制PNPLA3敲除也没有影响3T3-L1细胞中三酰甘油含量<sup>[9]</sup>.人类组织中cDNA的PCR表明,PNPLA3表达主要在肝脏,其次为皮肤和脂肪细胞.但在小鼠体内,PNPLA3的表达主要集中在脂肪组织.实验比较小鼠肝细胞和星状细胞PNPLA3的分布,发现PNPLA3 mRNA水平在星状细胞是含量只有肝细胞内的23%<sup>[10]</sup>.最近报道显示,PNPLA3在小鼠肝脏内皮细胞及库普弗细胞(Kupffer cells)中均没有表达<sup>[11]</sup>.因此,PNPLA3很可能主要在肝细胞内表达<sup>[10]</sup>. PNPLA3的表达由脂肪组织和肝脏的代谢所调控. PNPLA3 mRNA水平在空腹状态下很低,进食碳水化合物时显著升高<sup>[4,8,12]</sup>.相关实验表明,2 d的低热量饮食可以将PNPLA3

mRNA表达降低至原来的1/3<sup>[13]</sup>.另外有实验表明,PNPLA3 mRNA在肝脏中的表达与体质指数(BMI)成正相关<sup>[14]</sup>.而肥胖人群和消瘦人群PNPLA3 mRNA在脂肪组织中的表达未有统一结论,一些实验未见明显差异<sup>[15]</sup>,而一些实验表明肥胖人群中PNPLA3 mRNA表达水平增强<sup>[16]</sup>.

## 2 PNPLA3基因突变与NAFLD

2.1 PNPLA3基因突变与NAFLD 应用基因组相关性研究(genome-wide association studies, GWAS)方法研究NAFLD的历史并不长,目前完整GWAS在NAFLD方面研究的报道文献主要有2篇.1篇是对236例女性NAFLD患者的队列研究,该研究未设对照组,此项研究并未显示PNPLA3与NAFLD的相关性,其具体原因仍不清楚,研究者认为可能与样本过小以及研究对象只有女性有关<sup>[17]</sup>;另外1篇对来自4组研究[Old Order Amish; Age, Gene/Environment Susceptibility-Reykjavik study (AGES); Family Heart; Framingham Heart Studies]中的7 176个体进行了研究,充分证明了PNPLA3与NAFLD密切相关<sup>[18]</sup>.

目前关于PNPLA3突变[rs738409[G], 编码I148M]与NAFLD相关性研究结论主要为以下几个方面.首先,PNPLA3突变与肝脏脂肪含量的相关性显著,并且PNPLA3rs738409[G]纯合子者肝脏脂肪含量高于不携带者2倍多.若排除BMI、糖尿病、酒精摄入和种族等因素的影响,PNPLA3变异与肝脏脂肪含量的相关性仍非常显著<sup>[19-22]</sup>.其次,PNPLA3突变在一些人群中发现引起了肝脏相关酶学的升高. Romeo等<sup>[19]</sup>发现在西班牙裔美国人中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)升高,在其他非洲裔美国人和欧美裔美国人肝酶未有明显改变.而Yuan等<sup>[23]</sup>的相关研究表明PNPLA3突变在欧美白人和印度籍亚洲人都引起ALT的升高. Huang等<sup>[10]</sup>研究发现PNPLA3等位基因rs738409[G]与血清谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)浓度相关.另外, Romeo等<sup>[19]</sup>发现PNPLA3 rs738409突变在11 000欧裔美国人有总胆固醇累计效应.相关研究证实,经过多次修正实验后,PNPLA3基因突变与总胆固醇,低密度脂蛋白水平显著相关<sup>[24]</sup>.

2.2 PNPLA3基因突变在NAFLD致病机制方面研究 NAFLD的致病机制一般认为与肥胖、2型糖尿病、高脂血症、胰岛素抵抗综合征等密切相关.虽然肥胖人群中肝脏PNPLA3呈高表达,但其在脂肪代谢中的作用及其生理学底物仍未

### ■研究前沿

NAFLD的致病机制一般认为与肥胖、2型糖尿病、高脂血症、胰岛素抵抗综合征等密切相关.但现在越来越明确基因突变也是NAFLD发病的危险因素之一. PNPLA3基因突变与NAFLD的关系是现阶段研究热点,值得我们深入探讨.



# ■相关报道

2008年Rome等首次应用基因组相关性研究(GWAS)方法证明PNPLA3突变[rs738409(G), 编码I148M]与NAFLD发病相关, PNPLA3基因突变与肝脏脂肪含量增加显著相关并与肝脏炎症密切相关。

明确. PNPLA3相比其他器官在肝脏中的高表达水平, 意味着其在肝脏代谢中一个不为我们所知的作用. 相关研究示在体外培养PNPLA3-I148M突变肝细胞中三酰甘油含量增加且动物实验中PNPLA3突变小鼠的肝脏三酰甘油的含量也会增加. 细胞分离的研究显示, 90%的野生型PNPLA3存在与细胞膜和脂滴分割之间, 突变的PNPLA3没有改变蛋白质亚细胞的分布. 因此, 学者认为PNPLA3-I148M通过限制三酰甘油水解引起其在肝脏的聚集. 可能机制是PNPLA3突变将表达蛋白中异亮氨酸变为甲基氨酸, 这将限制底物与蛋白催化位点的结合, 从而限制了三酰甘油水解酶的活性. 这一猜测在生物学结构模型上得到了证实. 结构模型表明氨基酸的替代没有扰乱催化对残留(Ser-47和Asp-166)的位置或方向, 更确切地说, 是甲基氨酸的侧链的延伸到催化区域, 干扰丝氨酸与底物的结合<sup>[25]</sup>.

需要引起我们重视的是, 人类野生型PNPLA3的过度表达并没有改变小鼠肝脏三酰甘油的水平, 考虑PNPLA3可能不是肝脏中主要的三酰甘油水解酶. 而突变型PNPLA3的过度表达引起了小鼠肝脏中三酰甘油含量的升高. 这些实验表明小鼠三酰甘油在体内的聚集主要是因为PNPLA3突变后变异蛋白的表达, 而野生型蛋白活性的缺失并不是主要因素<sup>[25]</sup>.

另外, 研究者考虑PNPLA3的突变引起三酰甘油在肝脏中的聚集与影响水解酶辅酶因子的活性或影响底物与另外的脂酶结合有关. 许多三酰甘油水解酶, 包括在脂肪组织中起主要作用的PNPLA2都需要蛋白辅助因子来完成酶的活性. 但类似的PNPLA3辅助因子仍未被发现. 在体外实验中, 突变的酶并没有干扰野生型蛋白的作用, 但在体内是否和底物或必需的辅助因子相互作用仍不可知<sup>[25]</sup>. 也有研究表明肝脏的脂肪积聚可能是由于富含三酰甘油的脂蛋白从肝脏释放到血液循环的过程受到影响导致的, 相关结果表明, PNPLA3基因突变在欧亚混血儿人群中与apoB-containing脂蛋白分数密切相关. 研究表明每个等位基因PNPLA3变异可以使apoB载脂蛋白分数下降3%, 而在群体水平脂蛋白的浓度变异应该小于1%. 研究者考虑PNPLA3可能通过参与餐后肝脏脂蛋白包装而参与apoB脂蛋白的新陈代谢<sup>[24]</sup>. 也有文献证明PNPLA3突变可以抑制微粒体的转运蛋白从而影响肝脏脂肪含量<sup>[26]</sup>.

一些文章表明PNPLA3 rs738409[G]突变携

带者肝脏ALT水平升高, 实验中PNPLA3突变对肝酶的影响排除了血脂紊乱和其他肝脏疾病, 考虑其可能与肝脏炎症及肝细胞损伤相关<sup>[27,28]</sup>. 然而目前不清楚是PNPLA3的变异引起肝脏脂质存储导致使肝脏酶学升高, 或是PNPLA3本身的变异对肝功能有影响导致轻微的肝脏功能障碍和肝脏炎症. ALT是反映肝功能的指标中特异性和敏感性较高的, 因肝脂肪堆积产生的轻微肝功能损伤可能引起ALT的升高. 研究者还怀疑肝功能的受损也可能来自于胆固醇水平升高<sup>[28]</sup>.

最近研究考虑, 尽管PNPLA3在体外具有三酰甘油水解酶的作用, 但其在进食碳水化合物是的表达上调考虑其在体内可能是在脂肪形成方面起作用, 而不是脂质代谢方面<sup>[10]</sup>. 有研究表示, 服用特定的饮食后的低密度脂蛋白受体敲除小鼠PNPLA3的表达模式与葡萄糖六磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)的表达模式相近<sup>[11]</sup>. G6PD是细胞内参与磷酸戊糖途径催化酶, 他是NADP生成NADPH过程中的关键酶. NADPH作为体内的供氢体, 在三酰甘油合成过程中其重要作用<sup>[29,30]</sup>. 因为PNPLA3的表达模式与G6PD的表达模式相近, 考虑PNPLA3在脂质合成上起相应作用. 另外, PNPLA3与G6PD在不同代谢条件下相似变化也证明两者在脂质合成上的相关作用. 禁食时PNPLA3与G6PD在肝脏表达水平减低<sup>[31]</sup>. 在注射胰岛素后, 脂肪中PNPLA3和G6PD水平升高<sup>[15,32]</sup>. 假如我们认证PNPLA3与G6PD在脂质合成上具有相似的作用, 那PNPLA3突变引起脂肪在肝脏中聚集的现象又如何解释? 考虑其在PNPLA3的突变是否干扰了肝外脂质的合成以至于相对较多的脂肪在肝脏聚集, 但目前仍缺乏相关研究解释其具体机制.

总之, 目前关于PNPLA3突变与NAFLD致病相关机制研究热点主要在其脂质分解作用. 但部分学者考虑到PNPLA在进食碳水化合物后的高表达这一现象认为PNPLA3具有脂质合成作用. 除此之外, 目前仍不能排除PNPLA3突变对肝脏脂代谢转运过程影响及在分子生物水平上影响其他基因的调控, 干扰转录因子作用机制<sup>[33]</sup>.

2.3 PNPLA3基因突变在脂肪肝治疗方面意义  
PNPLA3基因变异rs738409(C→G)与肝脂肪沉积增加有关, 并在西班牙裔效果更加明显. 动物模型表明, PNPLA3表达可以通过饮食中碳水化合物来调节. 这些研究结果表明, 当饮食中碳

水化合物尤其是糖摄入过高, 携带着GG基因型的西班牙裔孩子对脂肪肝有明显易感性. 基于脂肪肝遗传易感性特殊饮食干预在该人群中治疗效果优于单纯脂肪肝治疗<sup>[34]</sup>. PNPLA3的表达在脂肪细胞分化时上调, 饮食和禁食时差异性调节, 考虑他的作用在能量动员, 脂肪组织和肝脏的脂肪储存作用可能是相似的. 生物学信息已揭示其突变将影响其蛋白质的功能. 因此, PNPLA3与肝酶的密切联系引导我们思考PNPLA3是否可以作为肝酶治疗的新的药物作用位点<sup>[28]</sup>. NAFLD的病态肥胖患者中, 相关尸检及肝脏穿刺活检表明, 只有10%-20%的患者肝脏表现为非单纯性脂肪肝, 出现了肝细胞变性、纤维化<sup>[35,36]</sup>. 这引发我们对NAFLD疾病预后相关因素的思考. 很多研究表明, PNPLA3突变是NAFLD疾病单纯性脂肪肝向脂肪性肝炎进展的危险因子, 可能影响肝脏纤维化进展过程<sup>[37-39]</sup>. 因此考虑PNPLA3可以作为NAFLD疾病预后预测因子<sup>[40]</sup>.

### 3 PNPLA3基因突变与其他肝脏疾病

一些文献表明PNPLA3与酒精性肝病严重性也有密切联系. 研究中PNPLA3突变者Child-Pugh分数增高. 因此, 考虑rs738409[G]突变不仅和肝脏脂肪量密切相关, 也加重酒精性肝病肝损伤及肝脏纤维化程度. 文献中作者大胆推论, PNPLA3 rs738409[G]突变结果与人类很多复杂疾病密切相关, 可能是人类那些可预防的致死疾病的最重要基因修饰<sup>[41]</sup>. 另外, 最新研究表明, PNPLA3突变推进了慢性丙型肝炎脂肪化及纤维化的进程, 考虑其可以作为慢性丙型肝炎预后预测因子及潜在的药物治疗靶点<sup>[42]</sup>.

### 4 结论

PNPLA3是patatin样磷脂酶家族一员, 体外实验证明其具有三酰甘油水解酶的活性, 但具体机制仍不清楚. PNPLA3基因变异rs738409(C→G)与NAFLD相关性于2008年首次报道后相关研究很多. PNPLA3突变影响NAFLD的具体机制目前主要考虑与脂质分解有关. 但PNPLA3突变是否影响肝脏脂代谢转运过程或在分子生物水平上影响其他基因的调控, 干扰转录因子等作用机制仍需更多的研究来探讨. PNPLA3基因突变研究提示我们发展NAFLD治疗的新的酶学位点药物的可能, 并扩展NAFLD预后危险因素研究的思路. 目前PNPLA3的研究仍处在起步阶段, 是西方NAFLD发病机制方面的研究热点, 但在

中国这方面研究仍很少. 中国关于NAFLD基因多态性的研究并未提及PNPLA3与NAFLD的相关性<sup>[43]</sup>. 但台湾关于肥胖儿童NAFLD研究表明, PNPLA3突变增加了肥胖儿童患NAFLD的危险性<sup>[44]</sup>. 而日本方面相关研究也证实了PNPLA3突变与NAFLD相关性<sup>[45]</sup>. 因此, PNPLA3突变对NAFLD的影响可能不存在种族差异, 值得我们进行深入研究.

### 5 参考文献

- 1 McCullough AJ. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 521-533, viii
- 2 Adams LA, Angulo P. Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease. *Diabet Med* 2005; 22: 1129-1133
- 3 Fan JG, Farrell GC. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease in China. *J Hepatol* 2009; 50: 204-210
- 4 Baulande S, Lasnier F, Lucas M, Pairault J. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem* 2001; 276: 33336-33344
- 5 Rydel TJ, Williams JM, Krieger E, Moshiri F, Stallings WC, Brown SM, Pershing JC, Purcell JP, Alibhai MF. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* 2003; 42: 6696-6708
- 6 Soni KG, Mardones GA, Sougrat R, Smirnova E, Jackson CL, Bonifacio JS. Coatamer-dependent protein delivery to lipid droplets. *J Cell Sci* 2009; 122: 1834-1841
- 7 Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 2004; 279: 48968-48975
- 8 Lake AC, Sun Y, Li JL, Kim JE, Johnson JW, Li D, Revett T, Shih HH, Liu W, Paulsen JE, Gimeno RE. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J Lipid Res* 2005; 46: 2477-2487
- 9 Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, Peroni O, Katic M, Flier JS. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 2006; 55: 148-157
- 10 Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, Hobbs HH. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 7892-7897
- 11 Hoekstra M, Li Z, Kruijt JK, Van Eck M, Van Berkel TJ, Kuiper J. The expression level of non-alcoholic fatty liver disease-related gene PNPLA3 in hepatocytes is highly influenced by hepatic lipid status. *J Hepatol* 2010; 52: 244-251
- 12 Rae-Whitcombe SM, Kennedy D, Voyles M, Thompson MP. Regulation of the promoter region of the human adiponutrin/PNPLA3 gene by glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402: 767-772
- 13 Liu YM, Moldes M, Bastard JP, Bruckert E, Viguerie

### ■创新盘点

本综述首次对PNPLA3突变与NAFLD相关性进行综述. 中国相关研究很少, 而对其深入研究对完善其致病机制, 补充其治疗方案及改善预后至关重要.

## ■应用要点

PNPLA3突变是NAFLD疾病单纯性脂肪肝向脂肪性肝炎进展的危险因子,可能影响肝脏纤维化进展过程。因此考虑PNPLA3可以作为NAFLD疾病预后预测因子。

- N, Hainque B, Basdevant A, Langin D, Pairault J, Clément K. Adiponutrin: A new gene regulated by energy balance in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2684-2689
- 14 Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, Roos C, Westerbacka J, Hamsten A, Bergholm R, Arkkila P, Arola J, Kiviluoto T, Fisher RM, Ehrenborg E, Orholm-Melander M, Ridderstråle M, Groop L, Yki-Järvinen H. A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia* 2009; 52: 1056-1060
- 15 Moldes M, Beauregard G, Faraj M, Peretti N, Duclezeau PH, Laville M, Rabasa-Lhoret R, Vidal H, Clément K. Adiponutrin gene is regulated by insulin and glucose in human adipose tissue. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 461-468
- 16 Johansson LE, Hoffstedt J, Parikh H, Carlsson E, Wabitsch M, Bondeson AG, Hedenbro J, Tornqvist H, Groop L, Ridderstråle M. Variation in the adiponutrin gene influences its expression and associates with obesity. *Diabetes* 2006; 55: 826-833
- 17 Chalasani N, Guo X, Loomba R, Goodarzi MO, Haritunians T, Kwon S, Cui J, Taylor KD, Wilson L, Cummings OW, Chen YD, Rotter JL. Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2010; 139: 1567-1576, 1576.e1-e6
- 18 Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, Gudnason V, Eiriksdottir G, Garcia ME, Launer LJ, Nalls MA, Clark JM, Mitchell BD, Shuldiner AR, Butler JL, Tomas M, Hoffmann U, Hwang SJ, Massaro JM, O'Donnell CJ, Sahani DV, Salomaa V, Schadt EE, Schwartz SM, Siscovick DS, Voight BF, Carr JJ, Feitosa MF, Harris TB, Fox CS, Smith AV, Kao WH, Hirschhorn JN, Borecki IB. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genet* 2011; 7: e1001324
- 19 Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 40: 1461-1465
- 20 Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Gianotti TF, Rosselli MS, Pirola CJ. A nonsynonymous gene variant in the adiponutrin gene is associated with nonalcoholic fatty liver disease severity. *J Lipid Res* 2009; 50: 2111-2116
- 21 Kantartzis K, Peter A, Machicao F, Machann J, Wagner S, Königsrainer I, Königsrainer A, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. Dissociation between fatty liver and insulin resistance in humans carrying a variant of the patatin-like phospholipase 3 gene. *Diabetes* 2009; 58: 2616-2623
- 22 Wagenknecht LE, Palmer ND, Bowden DW, Rotter JL, Norris JM, Ziegler J, Chen YD, Haffner S, Scherzinger A, Langefeld CD. Association of PNPLA3 with non-alcoholic fatty liver disease in a minority cohort: the Insulin Resistance Atherosclerosis Family Study. *Liver Int* 2011; 31: 412-416
- 23 Yuan X, Waterworth D, Perry JR, Lim N, Song K, Chambers JC, Zhang W, Vollenweider P, Stirnadel H, Johnson T, Bergmann S, Beckmann ND, Li Y, Ferrucci L, Melzer D, Hernandez D, Singleton A, Scott J, Elliott P, Waeber G, Cardon L, Frayling TM, Kooner JS, Mooser V. Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 520-528
- 24 Kollerits B, Coassin S, Beckmann ND, Teumer A, Kiechl S, Döring A, Kavousi M, Hunt SC, Lamina C, Paulweber B, Kutalik Z, Nauck M, van Duijn CM, Heid IM, Willeit J, Brandstätter A, Adams TD, Mooser V, Aulchenko YS, Völzke H, Kronenberg F. Genetic evidence for a role of adiponutrin in the metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4669-4676
- 25 He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin NV, Cohen JC, Hobbs HH. A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 2010; 285: 6706-6715
- 26 Wierzbicki AS, Hardman T, Prince WT. Future challenges for microsomal transport protein inhibitors. *Curr Vasc Pharmacol* 2009; 7: 277-286
- 27 Tilg H, Moschen A. Update on nonalcoholic fatty liver disease: genes involved in nonalcoholic fatty liver disease and associated inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 391-396
- 28 Kollerits B, Coassin S, Kiechl S, Hunt SC, Paulweber B, Willeit J, Brandstätter A, Lamina C, Adams TD, Kronenberg F. A common variant in the adiponutrin gene influences liver enzyme values. *J Med Genet* 2010; 47: 116-119
- 29 Park J, Rho HK, Kim KH, Choe SS, Lee YS, Kim JB. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5146-5157
- 30 Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 1999; 274: 35832-35839
- 31 Titanji VP, Ngogang J, Gouater P. The effects of alloxan diabetes, insulin and epinephrine on glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat liver and brain. *Ups J Med Sci* 1981; 86: 33-38
- 32 Kastrouni E, Pegiou T, Gardiki P, Trakatellis A. Activity changes of glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to diet and insulin. *Int J Biochem* 1984; 16: 1353-1358
- 33 Yuan HY, Chiou JJ, Tseng WH, Liu CH, Liu CK, Lin YJ, Wang HH, Yao A, Chen YT, Hsu CN. FAST-SNP: an always up-to-date and extendable service for SNP function analysis and prioritization. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: W635-W641
- 34 Davis JN, Lê KA, Walker RW, Vikman S, Spruijt-Metz D, Weigensberg MJ, Allayee H, Goran MI. Increased hepatic fat in overweight Hispanic youth influenced by interaction between genetic variation in PNPLA3 and high dietary carbohydrate and sugar consumption. *Am J Clin Nutr* 2010; 92: 1522-1527
- 35 Wanless IR, Lentz JS. Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 1990; 12: 1106-1110
- 36 Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology* 2001; 121: 91-100
- 37 Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, Nobili V, Mozzi E, Roviato G,



- Vanni E, Bugianesi E, Maggioni M, Fracanzani AL, Fargion S, Day CP. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 1209-1217
- 38 Santoro N, Kursawe R, D'Adamo E, Dykas DJ, Zhang CK, Bale AE, Calí AM, Narayan D, Shaw MM, Pierpont B, Savoye M, Lartaud D, Eldrich S, Cushman SW, Zhao H, Shulman GI, Caprio S. A common variant in the patatin-like phospholipase 3 gene (PNPLA3) is associated with fatty liver disease in obese children and adolescents. *Hepatology* 2010; 52: 1281-1290
- 39 Sookoian S, Pirola CJ. Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2011; 53: 1883-1894
- 40 Daly AK, Ballestri S, Carulli L, Loria P, Day CP. Genetic determinants of susceptibility and severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 5: 253-263
- 41 Tian C, Stokowski RP, Kershenovich D, Ballinger DG, Hinds DA. Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nat Genet* 2010; 42: 21-23
- 42 Trépo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, Gustot T, Lemmers A, Berthillon P, Amininejad L, Chevalier M, Devière J, Manns M, Trépo C, Sninsky J, Wedemeyer H, Franchimont D, Moreno C. Impact of PNPLA3 (rs738409 C > G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011 Apr 12. [Epub ahead of print]
- 43 Zhou YJ, Li YY, Nie YQ, Yang H, Zhan Q, Huang J, Shi SL, Lai XB, Huang HL. Influence of polygenic polymorphisms on the susceptibility to non-alcoholic fatty liver disease of Chinese people. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 772-777
- 44 Lin YC, Chang PF, Hu FC, Yang WS, Chang MH, Ni YH. A common variant in the PNPLA3 gene is a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease in obese Taiwanese children. *J Pediatr* 2011; 158: 740-744
- 45 Hotta K, Yoneda M, Hyogo H, Ochi H, Mizusawa S, Ueno T, Chayama K, Nakajima A, Nakao K, Sekine A. Association of the rs738409 polymorphism in PNPLA3 with liver damage and the development of nonalcoholic fatty liver disease. *BMC Med Genet* 2010; 11: 172

#### ■同行评价

本文创新性、可读性较好, 具有较好的科学和理论价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成t<sub>1/2</sub>或T<sub>1/2</sub><sup>1</sup>, V<sub>max</sub>不能V<sub>max</sub>, 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<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, V<sub>d</sub>, T<sub>1/2</sub> 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。

# 肝癌干细胞与肝癌复发转移的研究进展

邱谢武, 于聪慧

## ■背景资料

迄今为止针对肝癌的治疗缺乏行之有效的办法, 应用最多的手术切除肝癌其5年的复发转移率也十分高, 死亡率也居高不下。随着干细胞技术的发展, 人们对肝癌的转移和复发有了新的认识。肝癌的转移和复发可能与肝癌干细胞有密切的关系。

邱谢武, 安徽医科大学研究生学院 安徽省合肥市 230032  
于聪慧, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科 北京市 100700

首都医学发展科研基金资助项目, No. 2007-3024

作者贡献分布: 本文综述由邱谢武与于聪慧共同完成; 于聪慧审校。

通讯作者: 于聪慧, 教授, 主任医师, 100700, 北京市东城区朝内北小街2号, 中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科。

ychst@sina.com

电话: 010-66721896

收稿日期: 2011-04-26 修回日期: 2011-06-02

接受日期: 2011-06-10 在线出版日期: 2011-06-18

## Advances in understanding the relationship between liver cancer stem cells and metastasis and relapse of liver cancer

Xie-Wu Qiu, Cong-Hui Yu

Xie-Wu Qiu, Graduate School of Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China

Cong-Hui Yu, Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Beijing Military Command of Chinese PLA, Beijing 100700, China

Supported by: the Capital Medical Development Foundation of China, No. 2007-3024

Correspondence to: Professor Cong-Hui Yu, Department of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Beijing Military Command of Chinese PLA, 2 North Chaoneixiao Avenue, Dongcheng District, Beijing 100700, China. ychst@sina.com

Received: 2011-04-26 Revised: 2011-06-02

Accepted: 2011-06-10 Published online: 2011-06-18

## Abstract

Many factors may affect the prognosis of liver cancer, including late diagnosis, cirrhosis, and insensitivity of tumor cells to chemotherapy, and postoperative metastasis and relapse. Previous studies on the metastasis and relapse of liver cancer focused mainly on the migration and shedding of liver cancer cells, adhesion of liver cancer cells to surrounding tissue, and generation of peripheral vessels. The advances in research on liver cancer stem cells (LCSCs) have led to a better understanding of the metastasis and relapse of liver cancer. This paper gives a comprehensive review of LCSCs at the genetic level in terms of their origin and surface markers, signaling pathways involved, and treatment

implications.

**Key Words:** Liver cancer stem cells; Metastasis; Relapse; Signaling pathway; Surface marker; Targeted therapy

Qiu XW, Yu CH. Advances in understanding the relationship between liver cancer stem cells and metastasis and relapse of liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1802-1807

## 摘要

影响肝癌预后的因素很多, 其中包括确诊时间过晚、合并肝硬化、肿瘤细胞对放化疗不敏感以及术后的转移与复发等。以往对肝癌复发转移的研究重点在: (1)肝癌细胞的脱落、迁移; (2)肝癌细胞在局部组织的黏附; (3)肝癌细胞周围血管的生成。随着对肝癌干细胞的研究报道, 使我们对肝癌的转移和复发有了更进一步的认识。本文通过基因层面对肝癌干细胞进行分析, 从其来源、信号通路、标志物和治疗方面作一综述。

**关键词:** 肝癌干细胞; 转移; 复发; 信号通路; 表面标志物; 靶向治疗

邱谢武, 于聪慧. 肝癌干细胞与肝癌复发转移的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19(17): 1802-1807

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1802.asp>

## 0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上第5大常见癌症, 其平均生存时间为6-16 mo, 占原发性肝癌的90%。美国2009年的数据显示, 新发HCC和肝内胆管癌的数量为22 620例, 其中死亡18 160例<sup>[1,2]</sup>。在我国, HCC也是最为常见的恶性肿瘤之一, 我国的发患者数约占到全球总发患者数的55%, 其相关死亡率排名第二, 仅次于肺癌<sup>[3,4]</sup>。近年来, 人们对肿瘤复发和转移的认识来到了一个新的层面: 肿瘤的生长、发展及转移有可能通过肿瘤内部极少一部分具有干细胞(stem cells, SC)特征的肿瘤细胞的增殖和迁移所造成的。SC的一般特征如下: (1)以非对称的有

## ■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

丝分裂方式进行自我更新; (2)具有多潜能性和多向分化能力; (3)拥有处于长期的组织重组状态及可移植等能力<sup>[5,6]</sup>。随着对SC技术研究的不断深入, 对肝癌的生物学特性也有了新的认识。研究发现, 肝癌细胞中40%具有克隆性, 可能与其SC或祖细胞有关<sup>[7,8]</sup>。肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)提出已有40多年的历史, 对其认识还十分有限。其概念为存在于肿瘤组织中一类数量较少的SC样癌细胞亚群, 同时具有SC和癌细胞特征, 为肿瘤形成的起始细胞, 在肿瘤的形成、发展以及转移上起着决定性的作用<sup>[9]</sup>。到目前为止较为明确的CSCs只存在于骨髓恶性肿瘤和肝脏、乳腺、前列腺、脑及结肠等实体肿瘤<sup>[8-12]</sup>。本文通过对肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs)的生物学特性以及与HCC转移复发的关系方面作一综述。

## 1 LCSCs的来源及信号通路与HCC的复发转移关系

### 1.1 来源

卵原细胞(肝SC)位于肝脏的胆小管和汇管区的Hering小管部, 是一类具有椭圆形细胞核, 细胞质稀少的小型细胞, 可以分化为肝细胞和胆管。多数研究认为HCC和胆管癌的产生是由于人肝SC的变异<sup>[13,14]</sup>。Sell<sup>[15]</sup>通过使用化学致癌剂和癌基因对肝SC进行干预, 使其转化成癌前细胞最终转化为HCC。Dumble等<sup>[16]</sup>也通过诱导小鼠产生卵原细胞, 并将其分离移植到失去胸腺的小鼠体内, 产生出类似于HCC的肿瘤, 进一步对LCSCs的来源加以证实。而LCSCs形成的机制并不明确, 有两种可供参考: (1)突变的致癌基因伴随(或不伴随)其后天畸形可能限制正常SC的扩增; (2)致癌基因使正常SC产生变异, 让后者不再进入有丝分裂后的静止状态, 创造出一种具有自我更新能力并可进一步积累突变的细胞<sup>[17,18]</sup>。

Roskams等<sup>[19]</sup>的研究发现, 28%-50%的HCC组织中有SC标志物CK7和CK19表达, 对HCC组织中CK7和CK19高表达的患者行肝移植术后, 肿瘤的复发率明显增高, 预后差; 并且在这些肿瘤细胞中, 还发现存在一种细胞形态上与成熟肝细胞相似, 但表达上又趋向于SC的中间型细胞, 为对LCSCs分化的研究有重要提示作用。同期Durnez等<sup>[20]</sup>通过对109例肝癌标本进行分析也发现CK7或CK19阳性的细胞可能为LCSCs, 且CK19阳性的肝癌患者在肝移植后也出现复发率高, 预后差的现象。而Ye等<sup>[21]</sup>通过使用基因芯片技术, 发现肝癌的原发灶和其对应的癌栓组织中的基因表达谱十分类似。Glinsky等<sup>[22]</sup>通过对

多种转移灶基因分析也发现了多种与SC相关的基因都在转移灶中高表达, 这与我们目前所掌握的LCSCs可以导致肝癌复发和转移的观点十分吻合。以上信息均提示LCSCs在肝癌的生长发育过程中起着重要作用, 虽然肿瘤完全切除, 但只要仍存在LCSCs就有复发的可能性, 影响预后。通过对肝癌来源的研究对找出其对应的信号通路及标志物都起着十分重要的作用。

### 1.2 信号通路

肿瘤细胞的发生和发展是靠细胞间的信号通路调控的, 因此肿瘤的复发与转移与信号通路密不可分。参与细胞周期激活的信号通路主要有: Wnt/ $\beta$ -catenin、Notch以及TGF- $\beta$ 信号系统, 而目前认为处于G0期的肿瘤细胞也不例外。针对信号通路的靶点, 可以使用 $\beta$ -catenin、h-TERT、CDKs、Myb或c-Myc等进行调控, 通过改变肿瘤的生长通路, 调节肿瘤的生长, 加速或抑制肿瘤的凋亡。通过对CSCs及LCSCs信号通路的研究, 发现主要有2种信号通路可能对肝癌的复发与转移有着重要作用:

#### 1.2.1 Notch信号通路:

Notch基因是由Artavanis-Tsakonas于1919年发现的, 并提出其可能参与调节各种细胞分化发育及调控的信号途径, 对细胞的增殖、分化、凋亡以及血管的形成有重要作用<sup>[23]</sup>。Notch目前已知的有4种同源体: Notch1、Notch2、Notch3、Notch4。他们主要起着调控SC的自我更新和分化等作用<sup>[9,23-26]</sup>。1991人类T淋巴母细胞中首次鉴定出Notch1, 并提出Notch信号通路与肿瘤相关<sup>[27]</sup>。Nijjar研究发现正常成人肝脏以及病变肝脏上的Notch1、Notch2、Notch4表达无差异, 而Notch3则在病变肝脏上表达增高<sup>[28]</sup>。Giovannini等发现在肝癌中Notch3及Notch配体为高表达<sup>[29-31]</sup>。最近的证据表明, Notch1的信号激活将加强死亡受体5的表达从而对TRAIL诱导肝癌细胞凋亡起促进作用; Notch1信号的过度表达则使肝癌细胞株生长受到抑制以及通过诱导其体外和体内的细胞使其凋亡<sup>[32,33]</sup>。Qi等的研究同时发现, Notch1基因是肝癌细胞生长的抑制信号, 可能参与细胞周期的停止和凋亡<sup>[32]</sup>。而LCSCs的自我更新能力和多向分化能力直接影响到肝癌的复发和转移, 对Notch信号通路的研究为我们了解肝癌的复发和转移机制, 以及针对性的靶向治疗意义都十分重大。

#### 1.2.2 Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路:

Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路也对调节干/祖细胞的增殖起着至关重要的作用<sup>[11,34]</sup>。Wnt基因最初是在小鼠乳腺癌中发现

## ■相关报道

Song等通过研究发现CD133阳性的肝癌细胞的比例与肝癌患者血清AFP、肝癌的病理分级以及预后呈正相关。



## ■创新盘点

本文就国内外针对肝癌干细胞研究报道加以综述,重点对肝癌干细胞的来源、信号通路、标志物以及靶向治疗加以归纳总结,阐述其与肝癌转移复发的关系。

的。其家族共有19名成员,其中Wnt信号-1, -2, -3, -3A和10B条为具有代表性的Wnt信号通路,起着激活 $\beta$ -catenin/TCF介导的转录和诱导乳腺上皮细胞转化的作用<sup>[35,36]</sup>。人们其在对SC的调控认识主要还是通过对皮肤、肠以及造血细胞的分析得出的。Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在控制肝脏的生长和更新上也起着重要作用。Micsenyi等<sup>[37]</sup>的研究发现刚出生的小鼠 $\beta$ -catenin含量迅速升高,短时间内促进脏脏的生长。当大鼠2 mo大以后,肝脏肿瘤趋于稳定时 $\beta$ -catenin的值显著降低,比例与细胞增殖减少一致<sup>[38]</sup>。通过对人肝癌细胞的分析发现,有17%-40%的肿瘤细胞出现AXIN1、AXIN2的突变和缺失以及 $\beta$ -catenin、FZD-7的过度表达<sup>[39-43]</sup>。目前发现的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路主要是通过激活下游靶基因导致肝癌的发生和发展。在存在Wnt信号时, $\beta$ -catenin的多聚体复合物不易形成,而当 $\beta$ -catenin基因突变使可与转录因子TCF/LEF形成二聚体,介导靶基因转录。当 $\beta$ -catenin以及H-ras蛋白同时发生突变时,小鼠肝癌的发生率达到100%<sup>[44]</sup>。

1.2.3 其他通路:此外,Tang等<sup>[8]</sup>通过免疫组织化学染色以及共聚焦分析的方法对LCSCs进行标记,这些肿瘤的表达显示其与IL-6通路的激活有关,表明肝癌可能是由IL-6通过阻断TGF- $\beta$ 信号来调控LCSCs发展的。Tang等<sup>[45]</sup>研究还发现,通过破坏 $\beta$ 2信号肽去破坏TGF- $\beta$ 信号肽可以对治疗肝癌复发和转移有着决定性的作用。以上均说明了信号通路在对细胞周期的调控方面的能力以及对肿瘤的产生、发展、复发和转移均起到了至关重要的作用,但我们对现有的通路认识还十分有限,对其机制的了解也不是十分清楚,一定还有更多通路和作用等待我们去发掘。

## 2 LCSCs表面标志物与肝癌的复发转移

LCSCs与SC生物学性状十分相似,目前化疗的针对性不强、收效甚微,无法制止由LCSCs引发的复发和转移。靶向治疗是未来肝癌生物治疗的重要方法,也为治愈癌症提供了新的思路;寻找出特异性强,数量多的肿瘤细胞表面的标志物是靶向治疗成功的关键,同时肿瘤细胞表面的标志物也是诊断和预后判断的重要信息<sup>[46]</sup>。已知的LCSCs表面标志物分子结构及功能可大致分为单分子类和多分子联合类。单分子类研究的代表有催化酶类、细胞因子、表面抗原分化簇(cluster of differentiation, CD)、热休克蛋白家族等。其中CD家族成员CD90、CD44、CD45、

CD133、CD24等被认为与肝癌复发和转移的关系最为密切:

CD90是目前研究比较清楚的一个细胞因子,他是存在肝脏发育过程中肝SC表面的蛋白质,正常SC上极少表达,因此可作为LCSCs的标志物。Yang等<sup>[47]</sup>通过对肝肿瘤样本及血液中LCSCs的研究,发现CD90阳性的肝肿瘤细胞具有成瘤性,而CD90阴性的确不具有;研究也表明,CD90可能是一个重要的LCSCs的标志物。与此类似的还有CD44、CD45,他们都同样有可能作为肿瘤早期诊断的敏感性和特异性指标,为我们治疗肝癌提供可能<sup>[48]</sup>。尤其是CD44的亚型CD44v6的高表达更是可能与肝癌的复发与转移有关<sup>[49]</sup>。Endo等<sup>[50]</sup>通过免疫组织化学的方法对肝癌标本进行分析,发现高转移倾向组的CD44v6的表达水平要显著高于低转移倾向组,且表达程度与肿瘤的分化程度呈负相关。另有研究显示CD44v6阳性的肝癌患者转移率高、5年生存率低<sup>[51]</sup>。

另一个研究较为深入并且有价值的标志物是跨膜糖蛋白CD133。研究发现CD133在1%-5%的肝癌中表达,而正常组织则不表达<sup>[43]</sup>。Yin等<sup>[52]</sup>通过对SMMC-7721细胞株含有CD133的细胞进行分离,发现其比CD133阴性的肿瘤细胞更具有致瘤能力以及增值能力。Song等<sup>[53]</sup>通过研究发现CD133阳性的肝癌细胞的比例与肝癌患者血清AFP、肝癌的病理分级以及预后呈正相关。Yang等<sup>[54]</sup>和Cai等<sup>[55]</sup>经过研究则证实CD24可能与肝癌的侵袭转移有关,研究显示CD24过表达的肝癌细胞的转移潜能和侵袭能力明显增强,因此可以作为肝癌手术患者预后的重要标志。其他的如TGF- $\beta$ 通路成员TBRII、ELF和Smad4的表达缺失,加之胚胎SC的Nanog, STAT3以及Oct3/4基因同样可能是影响到肝癌预后的指标。

通过对LCSCs表面标志物的深入研究能够揭示肝癌的复发和转移的机制。但由于标志物的表达的复杂性和多样性,在他们缺失后细胞所表达出来的功能并不能完全被我们掌握,加之现有指标在不同人群中从前体细胞分化到对肝细胞的功能仍存在争议,目前特异性强的标志物并没有发现。相信随着研究的深入,我们可以为判断肝癌的预后以及为靶向治疗找出有效地特异性强的标志物。

## 3 结论

肿瘤的复发和转移是多因素共同作用的结果,

包括了多种遗传因素和表观遗传方面的变异. 尤其是LCSCs表现出来的生物学特性更是与肝癌患者的复发与转移有着密切关系. 目前针对肝癌的治疗, 除了通过手术, 缺乏其他有效的手段, 且手术切除后肝癌的复发与转移率高达70%, 严重影响着患者的预后. 未来对于癌症尤其是肝癌的治疗, 可把主要精力放在针对LCSCs特异性表面标志的靶向治疗上<sup>[56,57]</sup>. 通过对肝癌标志物的研究可以帮助我们筛选出更加适合患者的治疗方案. 目前的研究方向在于使肿瘤细胞产生更少的侵袭性和通过诱导使其定向分化. 特别是此技术在治疗急性早幼粒细胞白血病方面的应用取得了巨大的成功. 全反式维甲酸在治疗急性早幼粒细胞可使90%的患者病情得到缓解, 治愈率高达70%<sup>[58]</sup>. 但是, 靶向治疗的应用也是存在一定程度的争议. 由于肿瘤SC的各项特性我们还没有完全掌握, 使用时出现的结果我们往往不能预见, 这可能会出现诱导分化结果的不确定. 如当使用全反式维甲酸诱导乳腺癌细胞就可以转化成基因型与表型都与血管类似的细胞<sup>[59]</sup>. 因此使用靶向治疗的方法诱导分化LCSCs对于治疗肝癌是一个全新的有前途的领域, 但还需通过努力去确定LCSCs以及其分化途径.

目前针对癌症SC的研究还不多, 对他们的认识还十分有限, 但加大力度发展LCSCs的靶向治疗仍是十分有必要的. 通过对LCSCs的特性、信号通路以及表面标志物的了解, 掌握肝癌复发转移的机制及应用靶向治疗去治愈肝癌迫在眉睫.

#### 4 参考文献

- Lin L, Amin R, Gallicano GI, Glasgow E, Jogunoori W, Jessup JM, Zaslloff M, Marshall JL, Shetty K, Johnson L, Mishra L, He AR. The STAT3 inhibitor NSC 74859 is effective in hepatocellular cancers with disrupted TGF- $\beta$  signaling. *Oncogene* 2009; 28: 961-972
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-249
- 杨秉辉, 丛文铭, 周晓军, 陈孝平, 杨甲梅, 樊嘉, 王建华, 杨仁杰, 李槐, 蒋国梁, 曾昭冲, 陈敏华, 陈敏山, 梁萍, 吕明德, 罗荣城, 刘鲁明, 秦叔逵, 叶胜龙, 吴孟超, 汤钊猷, 孙燕, 管忠震. 原发性肝癌规范化诊治专家共识. *临床肿瘤学杂志* 2009; 14: 259-269
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006; 441: 1068-1074
- Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008; 132: 598-611
- Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, He AR, Shetty K, Johnson L, Reddy EP. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 318-329
- Tang Y, Kitisin K, Jogunoori W, Li C, Deng CX, Mueller SC, Resson HW, Rashid A, He AR, Mendelson JS, Jessup JM, Shetty K, Zaslloff M, Mishra B, Reddy EP, Johnson L, Mishra L. Progenitor/stem cells give rise to liver cancer due to aberrant TGF- $\beta$  and IL-6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2445-2450
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111
- Rando TA. The immortal strand hypothesis: segregation and reconstruction. *Cell* 2007; 129: 1239-1243
- Tsai RY. A molecular view of stem cell and cancer cell self-renewal. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 684-694
- Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 2008; 132: 681-696
- Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66
- Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; 33: 738-750
- Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 435-445
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 895-902
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008; 456: 593-598
- Roskams T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3818-3822
- Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, Lesaffre E, Libbrecht L, Desmet V, Roskams T. The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. *Histopathology* 2006; 49: 138-151
- Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, Simon R, Li Y, Robles AI, Chen Y, Ma ZC, Wu ZQ, Ye SL, Liu YK, Tang ZY, Wang XW. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2003; 9: 416-423
- Glinisky GV. "Stemness" genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2846-2853
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-776
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science* 1995; 268: 225-232
- Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RD. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature*

#### ■应用要点

本文从肝癌干细胞的来源、信号通路、标志物方面阐述其与肝癌转移和复发的关系, 为未来针对肝癌的靶向治疗提供理论依据.

## ■同行评价

本文内容全面详实, 有助于读者对肝癌干细胞和肝癌复发转移加深了解。

- 2006; 442: 823-826
- 26 Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. A Notch updated. *J Cell Biol* 2009; 184: 621-629
- 27 Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003; 22: 6598-6608
- 28 Nijjar SS, Crosby HA, Wallace L, Hubscher SG, Strain AJ. Notch receptor expression in adult human liver: a possible role in bile duct formation and hepatic neovascularization. *Hepatology* 2001; 34: 1184-1192
- 29 Giovannini C, Lacchini M, Gramantieri L, Chieco P, Bolondi L. Notch3 intracellular domain accumulates in HepG2 cell line. *Anticancer Res* 2006; 26: 2123-2127
- 30 Gramantieri L, Giovannini C, Lanzi A, Chieco P, Ravaioli M, Venturi A, Grazi GL, Bolondi L. Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2007; 27: 997-1007
- 31 Gao J, Chen C, Hong L, Wang J, Du Y, Song J, Shao X, Zhang J, Han H, Liu J, Fan D. Expression of Jagged1 and its association with hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 341-347
- 32 Qi R, An H, Yu Y, Zhang M, Liu S, Xu H, Guo Z, Cheng T, Cao X. Notch1 signaling inhibits growth of human hepatocellular carcinoma through induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer Res* 2003; 63: 8323-8329
- 33 Wang C, Qi R, Li N, Wang Z, An H, Zhang Q, Yu Y, Cao X. Notch1 signaling sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by inhibiting Akt/Hdm2-mediated p53 degradation and up-regulating p53-dependent DR5 expression. *J Biol Chem* 2009; 284: 16183-16190
- 34 Espada J, Calvo MB, Díaz-Prado S, Medina V. Wnt signalling and cancer stem cells. *Clin Transl Oncol* 2009; 11: 411-427
- 35 Shimizu H, Julius MA, Giarre M, Zheng Z, Brown AM, Kitajewski J. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 1349-1358
- 36 Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 145-158
- 37 Micsenyi A, Tan X, Sneddon T, Luo JH, Michalopoulos GK, Monga SP. Beta-catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* 2004; 126: 1134-1146
- 38 Tan X, Behari J, Cieply B, Michalopoulos GK, Monga SP. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* 2006; 131: 1561-1572
- 39 Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O, Belghiti J, Franco D, Binot F, Monges G, Thomas G, Bioulac-Sage P, Zucman-Rossi J. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 2001; 120: 1763-1773
- 40 Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DJ, Ross JA, Liu W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 2002; 21: 4863-4871
- 41 Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M, Shimizu Y, Kurihara T, Itamoto T, Kikuchi A, Okajima M, Asahara T. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol* 2004; 24: 1077-1083
- 42 Park JY, Park WS, Nam SW, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park CK. Mutations of beta-catenin and AXIN I genes are a late event in human hepatocellular carcinogenesis. *Liver Int* 2005; 25: 70-76
- 43 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- 44 Harada N, Oshima H, Katoh M, Tamai Y, Oshima M, Taketo MM. Hepatocarcinogenesis in mice with beta-catenin and Ha-ras gene mutations. *Cancer Res* 2004; 64: 48-54
- 45 Tang Y, Katuri V, Dillner A, Mishra B, Deng CX, Mishra L. Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* 2003; 299: 574-577
- 46 Yi SY, Nan KJ. Tumor-initiating stem cells in liver cancer. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 325-330
- 47 Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 153-166
- 48 Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, Li ML, Tam KH, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47: 919-928
- 49 Yang GH, Fan J, Xu Y, Qiu SJ, Yang XR, Shi GM, Wu B, Dai Z, Liu YK, Tang ZY, Zhou J. Osteopontin combined with CD44, a novel prognostic biomarker for patients with hepatocellular carcinoma undergoing curative resection. *Oncologist* 2008; 13: 1155-1165
- 50 Endo K, Terada T. Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, p53 expression, and patient survival. *J Hepatol* 2000; 32: 78-84
- 51 Jha RK, Ma Q, Chen S, Sha H, Ding S. Relationship of fibronectin and CD44v6 expression with invasive growth and metastasis of liver cancer. *Cancer Invest* 2009; 27: 324-328
- 52 Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D, Yang S, Zheng S, Gu J. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 2007; 120: 1444-1450
- 53 Song W, Li H, Tao K, Li R, Song Z, Zhao Q, Zhang F, Dou K. Expression and clinical significance of the stem cell marker CD133 in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1212-1218
- 54 Yang XR, Xu Y, Yu B, Zhou J, Li JC, Qiu SJ, Shi YH, Wang XY, Dai Z, Shi GM, Wu B, Wu LM, Yang GH, Zhang BH, Qin WX, Fan J. CD24 is a novel predictor for poor prognosis of hepatocellular carcinoma after surgery. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 5518-5527
- 55 Cai MY, Xu YF, Qiu SJ, Ju MJ, Gao Q, Li YW, Zhang BH, Zhou J, Fan J. Human leukocyte antigen-G protein expression is an unfavorable prognostic predictor of hepatocellular carcinoma following curative resection. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4686-4693
- 56 Spira AI, Carducci MA. Differentiation therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 338-343
- 57 Miletto-González KE, Chen S, Muthukumaran N,



- Saglimbeni GN, Wu X, Yang J, Apolito K, Shih WJ, Hait WN, Rodríguez-Rodríguez L. The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 6660-6667
- 58 Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol* 2006; 17: 1620-1624
- 59 Endo Y, Deonauth K, Prahalad P, Hoxter B, Zhu Y, Byers SW. Role of Sox-9, ER81 and VE-cadherin in retinoic acid-mediated trans-differentiation of breast cancer cells. *PLoS One* 2008; 3: e2714

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 招聘生物医学编辑部主任

**本刊讯** 百世登出版集团(Baishideng Publishing Group Co., Limited, BPG)已经为各位编辑部主任搭建好整体架构, 希望培养出对编辑与出版行业真正感兴趣甚至愿意将其作为终身事业的专业人才, 成为BPG的核心人物. 欢迎应届毕业生加盟BPG团队, 请将您的简历E-mail发至: j.l.li@wjgnet.com

#### ■ 工作职责

- 1 贯彻执行员工手册、编辑手册、编委手册和作者手册.
- 2 根据作者指南及学科发展动向和读者的需求, 制订期刊的总体发展规划, 负责编辑、出版、发行和经营管理.
- 3 策划年度编委会成员的社论和专题亮点等栏目约稿, 并按照计划负责监督落实.
- 4 负责期刊同行评议和定稿会, 按期编排、加工, 发排稿件, 发排后参与校对或审核校样、核红、签字付印.
- 5 组织期刊印刷版或网络版出版后审读, 发现问题及时修改.

#### ■ 职位要求

硕士及以上学历, 具有生物医学专业学科背景及丰富的写作和发表生物医学文章者优先录用.

#### ■ 薪资待遇面议

#### ■ 培训流程

第一步学习手册; 第二步编务; 第三步排版制作; 第四步编辑; 第五步投稿办公系统操作; 第六步期刊网络系统学习; 第七步期刊管理培训; 第八步BPG管理委员会考核; 第九步考核通过后正式签订劳动合同, 并颁发编辑部主任聘任书.

# 肠易激综合征与肠道细菌关系的研究进展

舒小闯, 王少东, 汪芳裕

## ■背景资料

肠易激综合征(IBS)是常见的功能性胃肠病, 症状迁延, 影响患者生活质量, 治疗效果不理想, 其病因未明, 发病机制复杂。目前, 肠道细菌与IBS的关系日益受到人们重视。

舒小闯, 王少东, 汪芳裕, 南京大学医学院临床学院(中国人民解放军南京军区南京总医院)消化内科 江苏省南京市 210002

作者贡献分布: 本综述由舒小闯完成; 王少东与汪芳裕审校。

通讯作者: 汪芳裕, 教授, 主任医师, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军南京军区南京总医院消化内科。

wangfangyu65@yahoo.com.cn

电话: 025-80860151

收稿日期: 2011-04-10 修回日期: 2011-05-17

接受日期: 2011-05-24 在线出版日期: 2011-06-18

## Advances in understanding the relationship between irritable bowel syndrome and intestinal bacteria

Xiao-Chuang Shu, Shao-Dong Wang, Fang-Yu Wang

Xiao-Chuang Shu, Shao-Dong Wang, Fang-Yu Wang, School of Medicine, Nanjing University; Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Professor Fang-Yu Wang, Department of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. wangfangyu65@yahoo.com.cn

Received: 2011-04-10 Revised: 2011-05-17

Accepted: 2011-05-24 Published online: 2011-06-18

## Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is a multifactorial functional disorder of unknown cause and pathophysiology. Commensal bacteria in the digestive tract and host co-exist in a mutually beneficial relationship. If this relationship is interrupted, various types of diseases will be caused. In recent years, the development of microecology has led to a better understanding of the relationship between intestinal bacterial flora and IBS. Many studies have suggested a close relationship between intestinal bacteria and IBS. In this article, we will review the role of alterations in intestinal bacterial flora in the pathogenesis of IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Intestinal bacteria; Dysbiosis

Shu XC, Wang SD, Wang FY. Advances in understanding the relationship between irritable bowel syndrome and intestinal bacteria. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011;

19(17): 1808-1812

## 摘要

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种复杂的多因素功能性疾病, 其病因和发病机制尚未明确。肠道共生菌与宿主和平共处, 互惠互利, 这种关系破坏直接或间接参与宿主多种疾病的发生与发展。近年来, 随着微生物学的发展, 肠道菌群与IBS发病的关系日益受到关注。大量研究显示, 肠道细菌与IBS关系密切。本文主要就IBS时肠道菌群的变化及肠道细菌参与IBS发病的可能机制予以综述。

关键词: 肠易激综合征; 肠道细菌; 微生物失调

舒小闯, 王少东, 汪芳裕. 肠易激综合征与肠道细菌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1808-1812

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1808.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一组以腹痛或腹部不适并同时伴有排便习惯及大便性状改变为主要特征的肠道功能性疾病<sup>[1]</sup>。目前尚缺乏公认的形态学、生化指标或基因的异常改变, 其病因和发病机制尚未明确, 可能与胃肠道动力异常、内脏敏感性增高、脑-肠轴调节异常、胃肠道感染和精神心理异常有关。大量研究显示, 肠道细菌与IBS关系密切。近年来, 随着微生物学的发展, 分子生物学技术应用对于肠道菌群进行定性定量分析, 使得IBS患者肠道细菌种群研究得以进一步深入。

## 1 肠道菌群

人体肠道是一个巨大复杂的微生态系统, 主要由细菌组成, 生理状态下, 正常成人肠道内约含有400多种细菌, 主要定植在结肠和末端小肠, 专性厌氧菌占主导。肠道中的细菌主要为肠道共生菌, 对人体是有益的, 参与食物的消化吸收过程和许多口服药物的代谢, 同时可以防御病原体侵犯; 另外还有少量细菌为病原菌, 长期定植的机会少, 多数为过路菌, 当达到一定数量时,

## ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化内科

即可致病. 条件致病菌介于两者之间, 当肠道生理、菌群紊乱时对人体有害. 肠道内种类繁多的大量细菌之间相互作用, 以维持肠道正常菌群的稳定性. 在进化过程中, 肠道正常菌群已形成宿主和微生物群和平共处、互惠互利的完善机制. 这种机制的破坏或微生态失调会引起宿主各种功能紊乱<sup>[2]</sup>, 有时甚至导致严重的疾病, 如炎症性肠病、伪膜性肠炎.

## 2 IBS与肠道细菌相关的证据

**2.1 感染后IBS** 20世纪50年代, Stewart发现胃肠道感染可以引起与IBS相似的慢性胃肠道症状. Chaudhry等在研究英国牛津地区IBS患者时, 首次提出了感染后IBS(post-infectious irritable bowel syndrome, PI-IBS)的概念. 后来, McKendrick等<sup>[3]</sup>研究发现高达30%的胃肠道感染患者在急性感染痊愈后会发展为IBS. 一系列研究中, 发现生物、行为因素在PI-IBS的发生和发展起到重要作用. 除流行病学证据外, 研究还发现PI-IBS患者结肠肥大细胞<sup>[4]</sup>、巨噬细胞、T淋巴细胞数量增加及IL-1 mRNA表达增强, 从而有了免疫学证据.

**2.2 IBS与肠黏膜低度炎症** 从动物到人体的研究证据都表明IBS患者肠道黏膜中存在低度炎症, 这种炎症能影响神经肌肉组织的功能. Bercik等<sup>[5]</sup>以动物模型的研究证实急性胃肠道感染可以导致长期的胃肠功能紊乱, 并且这种紊乱由某些炎性介质维持<sup>[6]</sup>. 随后又有大量证据表明有一部分IBS患者无论有无胃肠炎病史, 肠道都存在免疫活化和低度炎症. 这些论据支持了这么一种假说-至少一部分IBS患者, 如有急性胃肠道感染病史者, 肠黏膜低度炎症是慢性肠道功能紊乱和临床症状的病理生理基础<sup>[7]</sup>. 使这些患者保持低度炎症和慢性肠道功能紊乱的因素还不得而知. 一些观察结果使我们考虑肠道细菌可能是这些变化的诱因. 首先, 腹泻型IBS, 尤其是PI-IBS肠道通透性增加; 其次, 部分IBS患者存在肠道细菌酵解异常; 最后, 分子生物学方面的研究发现IBS患者肠道菌群较对照组存在差异<sup>[8]</sup>.

**2.3 IBS患者肠道菌群失调** 直接支持IBS存在微生态失调的证据是IBS患者呼出了异常的氢气和甲烷气体, 表明肠道细菌酵解出现了变化<sup>[9]</sup>. 肠道细菌酵解所产生的乙酸、丙酸可能与IBS患者腹部症状、生活质量低下和负面情绪相关<sup>[10]</sup>. 很多研究发现, IBS患者存在肠道菌群数量的增减和比例失调及菌种性质的变化. IBS与小肠细

菌过度生长(small intestinal bacterial overgrowth, SIBO)有联系的结论已被多个研究所证实. Balsari等对IBS患者粪便细菌研究得出, 患病组优势菌群较健康对照组存在显著差异, 如双歧杆菌、大肠杆菌和乳酸杆菌明显减少, 首次提出这种改变可能对IBS症状的维持和加重起作用. 后来, 运用分子生物学技术纵向研究也发现IBS患者肠道菌群组成存在不稳定性. 然而, Kerckhoffs等<sup>[11]</sup>最近采用如聚合酶链反应-变异梯度凝胶电泳和荧光定量PCR技术研究发现, IBS组与对照组相比肠道优势菌群并无明显不同, 而铜绿假单胞菌的含量显著增高. 由此可见, 目前对IBS肠道菌群失调尚无明确定论, 特别是对究竟哪一种或哪几种细菌的变化存在较大争议.

**2.4 抗生素、益生菌与IBS** 抗生素能改善部分IBS患者肠道症状, 然而一些学者却认为, 抗生素会导致菌群紊乱, 是IBS的一个危险因素, 同时与其复发有联系. 最近, 一项大规模多中心、随机、双盲、安慰剂对照临床研究得出, 不被吸收的抗生素-利福昔明能有效缓解无便秘IBS患者腹胀、腹泻、稀便、水样便等胃肠道症状<sup>[12]</sup>. 益生菌制剂也能在一定程度上改善IBS患者肠道菌群紊乱, 有助于内脏敏感性恢复及动力改善, 且部分患者疗效显著<sup>[13]</sup>.

## 3 肠道细菌参与IBS发病的可能机制

目前研究认为, 肠道细菌可能通过一种或多种途径参与IBS发病.

**3.1 肠道细菌使肠道动力异常** Dupont等进行的一项长期对照研究, 发现运用克隆技术培育的无菌动物肠道神经存在变化, 这表明肠道运动也可能出现变化. 肠道共生菌减少能改变肠道肌电活动, 反之, 肠道肌电活动也会影响共生菌在肠道中定植<sup>[14]</sup>. Bär等<sup>[15]</sup>研究发现, 用从一种益生菌-尼氏大肠杆菌(*Escherichia coli* Nissle 1917)中得到某些可溶解的因子能通过直接刺激平滑肌细胞提高结肠收缩性, 然而, 其中的机制需进一步明确. 在Guarino等<sup>[16]</sup>的研究中, 鼠李糖乳杆菌能使人体结肠平滑肌细胞出现由于乙酰胆碱刺激收缩引起的显著病损, 这种效果存在剂量和时间依赖性. Lesniewska等<sup>[17]</sup>用添加有菊苣菊粉的食物喂食大鼠, 后发现在回肠、盲肠和结肠中双歧杆菌的量增加了, 而大肠杆菌减少了, 在十二指肠和结肠中总的厌氧菌、乳杆菌的含量也增加了. 这样的处理同时也增加了小肠消化间期移行性复合运动(migrating motor complex,

### ■相关报道

Scott等研究证实肠道菌群变化会影响肠道感觉运动功能, 同时胃肠道正常生理紊乱也会导致肠道菌群组成变化.



### ■创新盘点

由于肠道菌群组成极其复杂和技术的限制,对IBS与肠道细菌之间关系的认识尚处在较为初级的阶段。

MMC)III期的收缩频率和传播速度,明显减少了MMC II期持续时间,但并没有改变I期和III期的时限,提示小肠转运时间加快。因此,通过饮食干扰肠道菌群可以改变肠道运动性。

**3.2 肠道细菌使内脏敏感性增高** 最近, Kamiya等<sup>[18]</sup>做了一项研究,用罗伊乳杆菌活菌、加热灭活的死菌和 $\gamma$ 射线照射过的菌喂食健康的SD大鼠,然后测量心脏自主应答和脊髓后根神经节释放的单个神经活动到达结直肠的时间。活菌、死菌和放射处理过的菌及细菌产物都能减轻疼痛反应。无论活菌还是死菌都能显著减弱脊髓后根神经节单个神经活动的传播。Kunze等<sup>[19]</sup>做了一项深入研究,给大鼠喂食罗伊乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*, LR),发现去极化动作电位的活性增加,减少了钙依赖K通道[IK(Ca)]的开放,同时有选择地减少了感觉神经元的慢后超极化(slow after-hyperpolarization, sAHP)。因此,罗伊乳杆菌把肠道感觉神经的离子通道作为靶点,通过该离子通道,罗伊乳杆菌可能影响内脏敏感性。Verdú等<sup>[20]</sup>给大鼠喂食抗生素干扰肠道菌群,研究得出内脏疼痛反应性出现变化。抗生素在很大程度上减少乳杆菌、拟杆菌和肠球菌的含量。这也同时增加了没有组织损害表现的肠道中髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的活性。使用抗生素可以增加肠肌丛中P物质(substance P, SP)的含量,和对结肠膨胀反应性。这些研究表明,原来稳定的肠道菌群出现紊乱会影响感觉功能和内脏敏感性。其中个别大鼠肠道菌群改变后会出现一些轻微的生理性炎症,肠道中炎症细胞轻度增加,但还不足以导致器质损害,这提示部分IBS患者肠黏膜中存在低度炎症。运用乳杆菌和地塞米松治疗后能纠正MPO、SP增多的情况和使内脏高敏感性恢复。在这个模型中,肠道菌群改变导致的感觉异常由变化的生理性炎症所调节<sup>[20]</sup>。另外, Weston等<sup>[21]</sup>发现IBS患者与健康对照组相比,IBS患者回肠末端组织中毗邻肠神经纤维的肥大细胞密度显著增加,肥大细胞可通过其分泌的神经递质,使神经纤维释放SP、降钙素基因相关肽等一些系列神经肽,影响肠动力和肠痛觉阈值,并将信息传至神经中枢,导致中枢敏感性增高,参与IBS的发病机制。因此,可以把肠道微生态失调、肠道低度炎症和内脏高敏感性联系在一个新的IBS概念模型里。

**3.3 肠道感觉运动功能与肠道细菌的相互依赖性** Scott等<sup>[22]</sup>研究证实肠道菌群变化会影响肠道感觉运动功能,同时胃肠道正常生理紊乱也会

导致肠道菌群组成变化。因此,肠道菌群的组成和稳定性与肠道感觉运动功能存在一种关键的内在相互依赖性。肠道生理稳定性对维持共生菌定植起一定作用,反之,IBS、硬皮病等引起的运动紊乱使正常生理出现改变,这会干扰共生菌群的栖息环境;若饮食、感染、抗生素等因素引起的菌群紊乱也会导致肠道平滑肌动力障碍和内脏感觉异常,这样就形成了一个恶性循环。因此,一个新的IBS肠道功能紊乱发生机制可能围绕微生态失调建立起来。在IBS患者中,肠道生理异常和低度炎症为肠道共生菌提供了一个不稳定的栖身环境,同时使微生态失调成为长期反复肠道功能紊乱的基础<sup>[23]</sup>。

**3.4 肠道细菌使黏膜屏障受损而增加肠道通透性** 最近研究发现,腹泻型IBS患者存在肠道黏膜通透性增高的现象<sup>[24]</sup>,其发生机制以及与临床症状的关系目前尚不清楚。紧密连接(tight junction, TJ)是肠道机械屏障的重要组成部分,与肠上皮细胞共同构成肠道的选择性屏障,肠道上皮间TJ结构一旦受损,肠黏膜通透性就会增加。目前,研究表明致病菌能导致TJ结构破坏。Shifflet等<sup>[25]</sup>以C57BL/6J大鼠感染模型研究发现致病性大肠杆菌(enteropathogenic *E. coli*, EPEC)可分泌EspF使回肠和结肠中TJ结构蛋白occludin重新分布,进而损害TJ功能。Nusrat等<sup>[26]</sup>深入研究发现,难辨梭菌(*Clostridium difficile*)分泌的肠毒素A、肠毒素B能引起ZO-1、occludin等TJ相关蛋白重新分布,引起细胞旁通透性改变。肠道上皮细胞可表达Toll样受体,他在介导细胞信号传导,识别微生物的病原体相关分子模式,以及先天性免疫过程中都起到了非常重要的作用。最近, Brint等<sup>[27]</sup>研究发现IBS患者结肠黏膜Toll样受体家族表达增多。Cario等<sup>[28]</sup>研究发现,肠道上皮细胞表达的TLT-2受体,能识别革兰氏阴性菌分泌的脂多糖,从而激活PKC- $\alpha$ 和PKC- $\zeta$ 导致ZO-1重新分布,改变TJ结构。上述研究发现,肠道细菌可增加肠黏膜通透性,使IBS患者出现腹泻、大便不成形等症状,这可能为IBS发病的一种病理生理机制。

**3.5 肠道细菌-精神疾病-IBS** 一系列研究表明,肠道细菌能影响机体对刺激的反应。第一,抗生素和缓泻药作为肝性脑病一线用药,提示肠道细菌能引起病理反应和酵解异常;第二,抑郁症患者出现肠道产气增多的现象,在饮食中除去某些碳水化合物后症状得到改善<sup>[29]</sup>;第三,用基因敲除技术培育的无菌大鼠的研究显示,脑部

海马区脑源神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA表达增加, 脑部神经递质出现改变<sup>[30]</sup>。基于这些研究, 也许可以把微生态失调归入一个IBS概念模型中, 该模型涵盖了60%的患者发生合并精神疾病的情况, 肠道微生态失调不但与肠道功能紊乱有关, 而且还可能与IBS患者其他临床症状紧密联系<sup>[31]</sup>。

#### 4 结论

IBS的发病错综复杂, 涉及诸多环节, 无论是从流行病学、临床对照研究、动物模型, 还是分子生物学研究, 都表明肠道细菌与IBS有联系, 肠道菌群异常可能是启动因素, 也可能是伴随因素或者后果。随着近年来微生态学的发展, 以及人们对人体肠道菌群作用认识的提高, 肠道细菌种类与IBS等慢性功能性紊乱疾病之间的联系正逐步明确。多方面证据表明肠道细菌参与了IBS发病, 但究竟是某种特异性细菌还是某组细菌起主要作用以及其具体作用机制, 尚有待进一步研究。

#### 5 参考文献

- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1480-1491
- Hawrelak JA, Myers SP. The causes of intestinal dysbiosis: a review. *Altern Med Rev* 2004; 9: 180-197
- McKendrick MW, Read NW. Irritable bowel syndrome--post salmonella infection. *J Infect* 1994; 29: 1-3
- 王承党, 郭朝书. 肥大细胞和类胰蛋白酶在腹泻型肠易激综合征升结肠黏膜中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1682-1686
- Bercik P, Wang L, Verdú EF, Mao YK, Blennerhassett P, Khan WI, Kean I, Tougas G, Collins SM. Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 2004; 127: 179-187
- Barbara G, De Giorgio R, Deng Y, Vallance B, Blennerhassett P, Collins SM. Role of immunologic factors and cyclooxygenase 2 in persistent postinfective enteric muscle dysfunction in mice. *Gastroenterology* 2001; 120: 1729-1736
- Spiller R, Garsed K. Infection, inflammation, and the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 844-849
- Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkiyuokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, Malinen E, Apajalahti J, Palva A. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 2007; 133: 24-33
- King TS, Elia M, Hunter JO. Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome. *Lancet* 1998; 352: 1187-1189
- Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 512-519, e114-e115
- Kerckhoffs AP, Ben-Amor K, Samsom M, van der Rest ME, de Vogel J, Knol J, Akkermans LM. Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome. *J Med Microbiol* 2011; 60: 236-245
- Pimentel M, Lembo A, Chey WD, Zakko S, Ringel Y, Yu J, Mareya SM, Shaw AL, Bortey E, Forbes WP. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *N Engl J Med* 2011; 364: 22-32
- Fan YJ, Chen SJ, Yu YC, Si JM, Liu B. A probiotic treatment containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* improves IBS symptoms in an open label trial. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7: 987-991
- Husebye E, Hellström PM, Midtvedt T. Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 946-956
- Bär F, Von Koschitzky H, Roblick U, Bruch HP, Schulze L, Sonnenborn U, Böttner M, Wedel T. Cell-free supernatants of *Escherichia coli* Nissle 1917 modulate human colonic motility: evidence from an in vitro organ bath study. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 559-566, e16-e17
- Guarino MP, Altomare A, Stasi E, Marignani M, Severi C, Alloni R, Dicuonzo G, Morelli L, Coppola R, Cicala M. Effect of acute mucosal exposure to *Lactobacillus rhamnosus* GG on human colonic smooth muscle cells. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42 Suppl 3 Pt 2: S185-S190
- Lesniewska V, Rowland I, Laerke HN, Grant G, Naughton PJ. Relationship between dietary-induced changes in intestinal commensal microflora and duodenojejunal myoelectric activity monitored by radiotelemetry in the rat in vivo. *Exp Physiol* 2006; 91: 229-237
- Kamiya T, Wang L, Forsythe P, Goettsche G, Mao Y, Wang Y, Tougas G, Bienenstock J. Inhibitory effects of *Lactobacillus reuteri* on visceral pain induced by colorectal distension in Sprague-Dawley rats. *Gut* 2006; 55: 191-196
- Kunze WA, Mao YK, Wang B, Huizinga JD, Ma X, Forsythe P, Bienenstock J. *Lactobacillus reuteri* enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 2261-2270
- Verdú EF, Bercik P, Verma-Gandhu M, Huang XX, Blennerhassett P, Jackson W, Mao Y, Wang L, Rochat F, Collins SM. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut* 2006; 55: 182-190
- Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner PB. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1590-1595
- Scott LD, Cahall DL. Influence of the interdigestive myoelectric complex on enteric flora in the rat. *Gastroenterology* 1982; 82: 737-745
- Collins SM, Denou E, Verdú EF, Bercik P. The putative role of the intestinal microbiota in the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 850-853
- Zhou Q, Zhang B, Verne GN. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 2009; 146: 41-46

#### ■应用要点

本文较为系统地总结了IBS与肠道细菌的关系, 并对其进行了梳理, 为将来的进一步研究起到一定的铺垫作用。

## ■同行评价

本文选题恰当, 结论可信, 对IBS有关发病机制的深入认识, 有利于对IBS的临床诊治。

- 25 Shifflett DE, Clayburgh DR, Koutsouris A, Turner JR, Hecht GA. Enteropathogenic *E. coli* disrupts tight junction barrier function and structure in vivo. *Lab Invest* 2005; 85: 1308-1324
- 26 Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA. Clostridium difficile toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect Immun* 2001; 69: 1329-1336
- 27 Brint EK, MacSharry J, Fanning A, Shanahan F, Quigley EM. Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 329-336
- 28 Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 2004; 127: 224-238
- 29 Ledochowski M, Widner B, Bair H, Probst T, Fuchs D. Fructose- and sorbitol-reduced diet improves mood and gastrointestinal disturbances in fructose malabsorbers. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1048-1052
- 30 Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: 255-264, e119
- 31 Folks DG. The interface of psychiatry and irritable bowel syndrome. *Curr Psychiatry Rep* 2004; 6: 210-215

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)



# JNK信号通路介导的凋亡在疾病中的作用

侯炳旭, 冯丽英

侯炳旭, 冯丽英, 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

作者贡献分布: 本文综述由侯炳旭完成; 冯丽英审校。

通讯作者: 冯丽英, 教授, 主任医师, 050000, 河北省石家庄市, 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. hysfly888@163.com  
电话: 0311-66002951

收稿日期: 2011-04-26 修回日期: 2011-06-01

接受日期: 2011-06-13 在线出版日期: 2011-06-18

## Role of JNK signaling pathway-mediated apoptosis in diseases

Bing-Xu Hou, Li-Ying Feng

Bing-Xu Hou, Li-Ying Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University; Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, Hebei Institute of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Professor Li-Ying Feng, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University; Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, Hebei Institute of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. hysfly888@163.com

Received: 2011-04-26 Revised: 2011-06-01

Accepted: 2011-06-13 Published online: 2011-06-18

## Abstract

C-Jun N-terminal kinases (JNKs), also referred to as stress-activated kinases (SAPKs), constitute a subfamily of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily. Apoptosis induced by a variety of extracellular stimuli (such as stress, Fas, TNF- $\alpha$ ) is mediated by JNK, and the JNK signaling pathway is involved in apoptosis of many cell types and plays an important role in the pathogenesis of many diseases and pathological injuries, such as neurodegenerative diseases, tumors, type I diabetes, chronic viral hepatitis B and ischemia/reperfusion injury. Therefore, components of the JNK signaling pathway represent potential molecular targets for the treatment of related diseases. This review aims to elucidate the basic composition of the JNK signaling pathway and mechanisms behind JNK-mediated apoptosis, and to highlight the role of JNK signaling pathway-mediated apoptosis in diseases.

**Key Words:** C-Jun N-terminal kinase; Signaling pathway; Apoptosis; Disease

Hou BX, Feng LY. Role of JNK signaling pathway-mediated apoptosis in diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1819-1825

## 摘要

c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNKs)家族是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)超家族的成员之一, 也被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated MAP kinases, SAPKs). JNK能介导多种胞外刺激(如应激、Fas、TNF- $\alpha$ 等)诱导的细胞凋亡, 参与了许多细胞凋亡的发生, 在神经退行性疾病、肿瘤、I型糖尿病、慢性乙型肝炎、缺血再灌注损伤等多种疾病和病理损伤的发生发展中起重要作用. 因此, JNK信号通路可作为临床上相关疾病的一个分子治疗靶点. 本文就JNK信号通路的基本构成、JNK介导细胞凋亡的机制及其在疾病中的作用作一综述.

**关键词:** c-Jun氨基末端激酶; 信号通路; 细胞凋亡; 疾病

侯炳旭, 冯丽英. JNK信号通路介导的凋亡在疾病中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1819-1825

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1819.asp>

## 0 引言

c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)家族是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 也被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated MAP kinase, SAPK), 是哺乳动物体内丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)超家族的一员<sup>[1]</sup>. JNK能介导多种胞外刺激(如应激、Fas、TNF- $\alpha$ 等)诱导的细胞凋亡, 参与了许多细胞凋亡的发生, 在神经退行性疾病、肿瘤、I型糖尿病、慢性乙型肝炎、缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤等多种疾病和病理损伤的发生发展中起重要作用. 因此, JNK信

## ■背景资料

JNK信号通路能介导多种胞外刺激诱导的凋亡, 参与了许多细胞凋亡的发生, 在神经退行性疾病、肿瘤、I型糖尿病、缺血/再灌注损伤等多种疾病及病理损伤的发生发展中起重要作用, 是正常与疾病状态时细胞的一个重要调节靶点, 可作为临床上相关疾病的分子治疗靶点. 但是, JNK信号通路在各种疾病中的作用机制还不十分清楚.

## ■同行评议者

王蒙, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外综合治疗一科

## ■研发前沿

JNK介导细胞凋亡的机制是多年来研究的重点,而JNK信号通路在各种疾病中的具体作用机制以及如何抑制JNK的激活和开发高特异性的抑制剂则是近年研究的热点。

号通路可作为临床上相关疾病的一个分子治疗靶。本文就JNK信号通路的基本构成、JNK介导细胞凋亡的信号途径及其在疾病中的作用作一综述。

## 1 JNK信号通路概述

编码JNK的基因有*jnk1*、*jnk2*和*jnk3*,其编码产物JNK1和JNK2在全身广泛表达,而JNK3只表达于脑、心脏、睾丸等组织<sup>[2-5]</sup>。JNK信号通路能够被多种细胞外刺激因素激活,包括生长因子、细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1等)、应激(如紫外线照射、高渗透压、I/R损伤)等<sup>[6]</sup>,而广泛参与调节细胞生命过程,如凋亡、增殖、代谢、运动及DNA损伤修复等,其功能的失调被认为与多种疾病和病理损伤的发生发展密切相关,如神经退行性疾病、肿瘤、I型糖尿病、I/R损伤等<sup>[7-10]</sup>。因此,JNK信号通路可作为临床上相关疾病的一个分子治疗靶。典型的MAPK信号通路均通过三级酶促级联反应而激活,即MAPK激酶的激酶(MAPK kinase kinase, MAPKKK)-MAPK激酶(MAPK kinase, MAPKK)-MAPK<sup>[11]</sup>。JNK的直接上游激酶MEK4(MKK4, JNKK1)和MEK7(MKK7, JNKK2)通过双磷酸化JNK的Thr183和Tyr185位点而激活JNK<sup>[12]</sup>,但在JNK信号通路中二者的功能不同,JNKK1优先磷酸化Tyr185位点<sup>[13,14]</sup>,而JNKK2优先磷酸化Thr183位点<sup>[14,15]</sup>。JNK信号通路的MAPKKK主要有:MAPK/ERK激酶的激酶1, 2, 3, 4(MAPK/ERK kinase kinase, MEKK1, 2, 3, 4)、混合连接激酶(mixed lineage kinase, MLK)、凋亡信号调节激酶(apoptosis signal regulating kinase, ASK)和TGF- $\beta$ 激活的蛋白激酶(TGF- $\beta$  activated protein kinase, TAK)<sup>[16,17]</sup>。JNK信号通路的模式可大致总结为:应激、紫外线等 $\rightarrow$ 生发中心激酶(germinal center kinase, GCK) $\rightarrow$ MEKK $\rightarrow$ MEK4/7 $\rightarrow$ JNK $\rightarrow$ 细胞凋亡、增殖、分化等。

在静止的细胞中,JNK主要定位于细胞质,当被刺激因素激活后,一部分活化的JNK就转位到细胞核中,通过磷酸化而激活多种核内转录因子,从而促进相关靶基因的转录和新蛋白质的合成,发挥相应的生物学效应。最初发现JNK时认为他是一种能够特异性磷酸化核内转录因子c-Jun的激酶,活化的JNK转位到细胞核后能够使c-Jun的第63和73位丝氨酸位点双磷酸化而激活,从而提高其转录活性,进一步提高活化蛋白1(activator protein 1, AP-1)的转录活性,发挥

生物学效应<sup>[18]</sup>。后来越来越多的核内转录因子被发现也是JNK的核内底物,如ATF2、P53、Elk-1和c-Myc2等<sup>[2,3,5,19]</sup>。近年来研究发现胞质中的某些成分也可能是JNK的作用底物,如Bcl-2家族(Bcl-2、Bcl-xL、Bim、BAD)等<sup>[20-22]</sup>。JNK胞质底物的发现具有重要的意义,表明JNK信号通路不仅可以调节核内靶基因的转录,还能够通过直接调节胞质底物的结构和功能而快速地发挥相应的生物学效应。

## 2 JNK介导细胞凋亡的信号途径

Xia等<sup>[23]</sup>发现去除神经生长因子可以使大鼠嗜铬细胞瘤PC-12细胞发生凋亡,而PC-12细胞中的JNK和p38通路是激活的,ERK通路却被抑制,由此得出结论:JNK-p38和ERK通路之间的动态平衡决定了细胞的凋亡或存活<sup>[23]</sup>,这是JNK促凋亡作用的首次发现。后来国内外许多实验都证明JNK能介导多种细胞外刺激诱导的凋亡,参与了许多细胞凋亡的发生<sup>[24]</sup>。目前认为其机制主要有两个,一是通过转录依赖的方式调节下游凋亡相关靶基因的转录和凋亡蛋白的表达而介导死亡受体途径及线粒体途径的细胞凋亡;二是通过非转录依赖的方式直接调节胞质内靶蛋白的活性(如Bim、Bcl-2等)而介导线粒体途径的细胞凋亡<sup>[25]</sup>。

**2.1 转录因子途径** JNK被刺激因素激活后一部分会从细胞质进入细胞核,通过磷酸化而激活转录因子AP-1蛋白(c-Jun、c-Fos等)、ATF-2等,从而调节下游凋亡相关靶基因的转录和凋亡蛋白的表达<sup>[25-28]</sup>。如活化的JNK进入细胞核激活相应转录因子后能诱导FasL、TNF等死亡配体的表达,从而启动死亡受体途径的细胞凋亡<sup>[27,29]</sup>:死亡配体(如FasL、TNF等) $\rightarrow$ 死亡受体(如Fas/CD95、TNFR家族等) $\rightarrow$ 死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex, DISC) $\rightarrow$ procaspase8 $\rightarrow$ caspase8 $\rightarrow$ procaspase3 $\rightarrow$ caspase3 $\rightarrow$ 细胞凋亡;活化的JNK进入细胞核激活相应转录因子后还可以诱导Bim、Bid等BH3-only蛋白的表达,从而活化Bax等促凋亡蛋白,使Bax从胞质转入线粒体,线粒体膜通透性破坏,致细胞色素C等释放而介导线粒体途径的细胞凋亡<sup>[30]</sup>。

**2.2 非转录因子途径-线粒体途径** 一部分活化的JNK也可以留在细胞质内通过磷酸化作用直接调节Bcl-2家族成员(Bim、Bax、Bcl-2等)的活性而介导线粒体途径的细胞凋亡<sup>[25,26,31,32]</sup>,此过程不依赖新基因的表达。Bcl-2家族是线粒体调

亡途径的主要调控者,分为3类:促凋亡蛋白,如Bak和Bax;抗凋亡蛋白,如Bcl-2和Bcl-xL以及Bim、Bid等BH3-only蛋白<sup>[25,33]</sup>,其中Bax是线粒体途径的主要介导者<sup>[34]</sup>。活化的JNK能够磷酸化激活Bax<sup>[25]</sup>,也可以通过磷酸化激活Bim等BH3-only蛋白和接头蛋白14-3-3、抑制Bcl-2等抗凋亡蛋白而激活Bax<sup>[25,31]</sup>。活化的Bax转位至线粒体外膜,使其通透性增加而释放细胞色素C、Smac/DIABLO和凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)等促凋亡线粒体蛋白<sup>[33]</sup>。释放到细胞质中的细胞色素C通过形成凋亡小体而启动caspase依赖的线粒体途径的细胞凋亡; Smac/DIABLO通过阻断凋亡抑制蛋白IAPs的活性而启动caspase依赖的线粒体途径的细胞凋亡; AIF可以进入细胞核直接剪切DNA而诱导caspase非依赖的线粒体途径的细胞凋亡<sup>[35]</sup>。

JNK的促凋亡作用已经在大量研究中被证实,但目前也有一些研究发现,在某些类型的刺激下,活化的JNK并不引起凋亡,而是可能促进细胞增殖分化。例如在某些肿瘤细胞凋亡的研究中就发现, JNK信号通路的激活会起到一定程度的抗凋亡作用。由此可见,不同的细胞类型,不同的刺激方式, JNK通路在细胞凋亡中发挥不同的作用,既能促凋亡,也能抑凋亡。对此的解释可能是:人体内可能存在多种JNK的同工酶,而他们在不同细胞和细胞发育不同阶段的表达不同,对刺激的反应方式也存在差异,担负的功能也不相同。

### 3 JNK介导的细胞凋亡在疾病中的作用

大量实验提示, JNK介导的细胞凋亡参与了人类多种疾病的发生发展过程,因此, JNK信号通路是正常与疾病状态时细胞的一个重要调节靶点,从而使JNK在临床上可作为一个潜在的分子治疗靶。而JNK抑制剂的应用更表现出了重要的治疗潜能。

**3.1 神经退行性疾病** 神经退行性疾病是一组以原发性神经元变性为基础的慢性进行性神经系统疾病,包括阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)、帕金森病(parkinson disease, PD)等,他们的典型病理特征就是神经元的异常凋亡。大量研究表明这些疾病神经元的凋亡与JNK的激活密切相关。

帕金森病的主要特征是中脑黑质致密部中多巴胺(dopamine, DA)神经元的选择性丢失。研究发现JNK通路的激活与帕金森病有关。在神

经毒素MPTP或6-OHDA诱导的小鼠PD模型以及PD患者死后的尸检中,均可以检测到活化的JNK<sup>[27,36]</sup>。JNK2<sup>-/-</sup>和JNK3<sup>-/-</sup>的小鼠比野生型小鼠更能抵制MPTP的毒性<sup>[37]</sup>。活化的JNK能通过死亡受体途径或线粒体途径介导DA神经元凋亡:有研究者在大鼠PD模型中发现, JNK能通过促进FasL的表达而介导死亡受体途径的DA神经元凋亡<sup>[27]</sup>;在MPTP诱导的大鼠PD模型中, JNK还能通过促进Bim蛋白的表达来激活Bax而介导线粒体途径的DA神经元凋亡<sup>[33]</sup>。

AD的主要病理特征是神经元的选择性丢失及因超磷酸化Tau蛋白和 $\beta$ 淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )在神经元内外的异常聚集而分别形成的神经元纤维缠结和老年斑<sup>[37]</sup>。在AD中JNK能被A $\beta$ 的异常聚集等因素激活<sup>[9,29,38]</sup>,而由其介导的神经元凋亡可能是患者认知功能减退的原因之一<sup>[29,39]</sup>。在AD动物模型和AD死者的脑中都能检测到大量p-JNK及其底物c-Jun<sup>[40]</sup>。Morishima等<sup>[29]</sup>研究大鼠AD模型时发现活化的JNK可以通过激活c-Jun、ATF-2、Elk-1等转录因子而介导A $\beta$ 诱导的大鼠胚胎皮质神经元凋亡。

**3.2 肿瘤** 许多研究发现在肿瘤细胞中有JNK的过度激活,表明JNK通路与肿瘤的发生密切相关<sup>[10]</sup>,其机制可能与其促进增殖的作用有关。有研究者在Ras/Raf诱导的果蝇肿瘤模型中发现JNK与Raf起协同作用来诱导细胞的异常增生<sup>[41]</sup>。Sakurai等<sup>[42]</sup>发现JNK1缺乏能明显降低二乙基亚硝胺引起肝癌的易感性。有研究显示86%的脑部肿瘤中存在JNK信号通路的异常,其机制可能是EGF激活了JNK信号通路,从而引起肿瘤细胞的增殖<sup>[43]</sup>。

此外,有许多研究报道JNK通路也可以促进肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤形成。研究发现JNK的表达缺失能导致小鼠肿瘤数目增加和生长速度加快,认为JNK通路可能通过诱导肿瘤细胞凋亡而抑制肿瘤的发生<sup>[44]</sup>。Bai等<sup>[45]</sup>研究发现JNK通路参与了ZBP-89诱导的人类胃肠道肿瘤细胞的凋亡。JNK抑制肿瘤形成的机制可能与其促凋亡机制或者影响CD8<sup>+</sup> T淋巴细胞免疫系统对肿瘤的监护作用有关<sup>[46]</sup>。

**3.3 I型糖尿病** 目前研究表明JNK与胰岛 $\beta$ 细胞凋亡、胰岛素基因表达障碍和胰岛素抵抗密切相关。I型糖尿病主要的发病机制是胰腺 $\beta$ 细胞的丢失,目前认为早期胰腺 $\beta$ 细胞死亡的主要方式是细胞凋亡。JNK通路在胰腺 $\beta$ 细胞凋亡过程中起到了重要作用<sup>[47]</sup>。研究发现阻断JNK信号通

**■相关报道**  
Mehrotra等研究发现应用JNK特异性抑制剂SP600125可以对抗流感表位特异性CTL发生的激活诱导细胞死亡(AICD)。



## ■创新盘点

本文系统阐述了JNK信号通路的基本构成以及JNK介导细胞凋亡的信号途径,详细总结了JNK信号通路在多种疾病及病理损伤中的作用机制的研究进展。

路能抑制IL-1 $\beta$ 诱导的 $\beta$ 细胞凋亡<sup>[48]</sup>。Fukuda等<sup>[49]</sup>报道剔除JNK1基因可显著下调MLD-STZ诱导的高血糖症模型小鼠的血糖水平,提示JNK通路是MLD-STZ诱导胰腺 $\beta$ 细胞凋亡而产生高血糖症所必需的。

**3.4 慢性乙型肝炎** 慢性乙型肝炎(chronic viral hepatitis B, CHB)的发病机制与机体的细胞免疫功能低下密切相关,但CHB患者细胞免疫功能低下的机制尚未完全阐明,近年来有研究提出与淋巴细胞的激活诱导细胞死亡(activation induced cell death, AICD)有关。AICD是指已活化的成熟淋巴细胞(T或B)再次受到激活信号(特别是TCR/CD3复合体)激活后所发生的细胞凋亡<sup>[50]</sup>。Nakamura等<sup>[51]</sup>发现CHB患者的外周血淋巴细胞发生AICD的比率比正常对照高,提示淋巴细胞可能在HBV特异性抗原刺激下被激活,再发生自身凋亡(即AICD),使淋巴细胞的数量减少或活性下降,从而导致CHB患者细胞免疫功能低下,这可能是导致HBV持续慢性感染的一个重要因素,也是形成HBV慢性感染免疫耐受的一个重要机制。因此如何通过调节AICD来减少淋巴细胞凋亡,改善CHB患者的细胞免疫功能,将是打破免疫耐受状态、清除慢性乙型肝炎患者体内HBV的可能途径。

关于CHB患者外周血淋巴细胞发生AICD的机制尚未完全阐明,目前关于其凋亡途径的研究主要集中于由Fas/FasL等介导的死亡受体凋亡途径和Bcl-2家族调控的线粒体凋亡途径。研究发现,CHB患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中的Fas、FasL、TNF- $\alpha$ 、TRAIL等表达增多,并认为死亡受体凋亡途径在CHB患者PBMC的AICD过程中起着重要的作用<sup>[52-55]</sup>。有研究发现CHB患者PBMC中caspase9的表达比对照组高,HBV DNA阳性组高于HBV DNA阴性组,且caspase9的表达与凋亡率呈正相关<sup>[56]</sup>。我们的前期研究发现CHB患者的PBMC在AICD过程中,Bim蛋白表达较正常人高,且与凋亡率呈正相关。因为caspase9和Bim都是线粒体凋亡途径的重要环节,所以推测线粒体凋亡途径也参与AICD的过程。

JNK信号通路能通过转录依赖或非转录依赖的方式介导死亡受体途径及线粒体途径的细胞凋亡。近年来研究证明JNK参与介导了多种疾病淋巴细胞的AICD过程。Mehrotra等<sup>[57]</sup>发现应用JNK特异性抑制剂SP600125可以对抗流感表位特异性CTL发生的AICD,表明JNK参与介导了流

感表位特异性CTL的AICD过程。Chhabra等<sup>[58]</sup>研究发现人类黑色素瘤表位特异性原始CTL发生的AICD是由JNK所介导的,伴随着凋亡诱导因子AIF的释放和大规模的DNA碎片裂,应用JNK特异性抑制剂SP600125能够阻碍凋亡诱导因子AIF的线粒体-核转位,并阻止CTL发生AICD。此外Zhang等<sup>[59]</sup>研究发现JNK参与介导了小鼠脾脏T淋巴细胞的AICD过程。但是关于JNK通路是否也参与介导了CHB患者PBMC的AICD过程还未见报道。我们以CHB患者PBMC为研究对象,体外模拟AICD过程,发现CHB患者存在JNK通路的过度激活,且JNK的表达量与PBMC的凋亡率成正相关,应用JNK特异性抑制剂sp600125阻断JNK通路后,可以降低PBMC凋亡率,说明JNK信号通路参与介导了CHB患者PBMC的AICD过程,是CHB患者PBMC凋亡增多的机制之一。

**3.5 其他疾病** 在对激光光凝诱导的大鼠单侧青光眼模型的研究中发现,随着JNK激活水平的升高,视网膜神经节细胞的凋亡也随之增多,提示JNK可能参与介导了青光眼引起的视网膜神经节细胞的凋亡<sup>[60]</sup>。另一项研究发现,在紫外线暴露下的视网膜色素上皮细胞中JNK通路被激活,而且JNK与紫外线诱导的视网膜色素上皮细胞的凋亡密切相关,应用JNK特异性抑制剂能够使凋亡率明显降低<sup>[61]</sup>。

JNK介导的细胞凋亡在后天性耳聋中可能起重要作用<sup>[62]</sup>。声创伤、氨基糖苷类抗生素及癌症化疗等均可以使耳蜗毛细胞发生坏死和凋亡,最终导致耳聋。JNK1抑制剂对声创伤诱导的新生小鼠和成年豚鼠耳蜗毛细胞的凋亡有保护作用<sup>[63,64]</sup>,表明JNK抑制剂可能是预防耳蜗毛细胞损伤和耳聋的重要治疗靶点。

在GalN/LPS诱导的暴发性肝衰竭小鼠模型中的研究发现,应用JNK特异性抑制剂sp600125能够阻止肝细胞凋亡,表明JNK可能参与了GalN/LPS诱导的肝细胞凋亡<sup>[65]</sup>。有研究者发现JNK特异性抑制剂sp60025能够使HIV病毒蛋白R诱导的外周血单个核细胞凋亡明显减少,表明JNK通路可能参与了HIV病毒蛋白R诱导的外周血单个核细胞凋亡<sup>[66]</sup>。

## 4 JNK介导的细胞凋亡在I/R损伤中的作用

I/R损伤是指缺血一定时间的组织和器官,在重新恢复血液供应之后,不仅不能使组织器官的功能得到恢复和改善,反而加重了功能代谢障碍以及组织结构的破坏,甚至其他组织器官的

损伤, 是包括脑、肝、心、肺在内的许多器官所面临的重要的临床问题。大量实验证明, JNK介导的细胞凋亡参与了多种组织器官I/R损伤的发生<sup>[8]</sup>。在沙鼠脑I/R模型中应用JNK抑制剂AS601245可以明显降低缺血再灌注引起的神经细胞凋亡<sup>[26]</sup>。有研究者建立了大鼠肝脏I/R模型, 发现I/R后JNK的活性明显提高<sup>[67]</sup>。Uehara等<sup>[68]</sup>的研究也表明, JNK信号通路是肝脏I/R损伤的一个主要介导者, JNK抑制剂可以减少肝细胞和肝窦内皮细胞的坏死和凋亡。有研究证实在大鼠心脏I/R损伤模型中, JNK抑制剂AS601245可以减少心肌细胞的凋亡和梗塞面积, 在此模型中, JNK的激活主要发生在再灌注期活性氧产生之后<sup>[69]</sup>。同样地, JNK抑制剂SP600125也可以改善大鼠肺移植后的I/R损伤<sup>[70]</sup>。

在I/R损伤过程中, 活性氧等激活的JNK能分别通过死亡受体途径和线粒体途径介导细胞凋亡。以神经元的I/R损伤为例: 一项对大鼠大脑局部I/R模型的研究发现, 缺血区JNK活性明显增加, JNK抑制剂sp600125可以阻断Bax从胞质转入线粒体, 抑制了脑缺血诱导的神经元凋亡, 病理改变减轻<sup>[71]</sup>。Carboni等<sup>[26]</sup>研究沙鼠脑I/R模型, 发现死亡受体途径和线粒体途径都参与了神经元的凋亡过程, 且用JNK抑制剂阻断JNK活性后对这两种细胞凋亡途径都有显著缓解作用。在大鼠脑I/R损伤模型中发现JNK能促进DP5的转录, 从而解除Bcl-2对Bax的结合抑制, 使Bax转位至线粒体而介导线粒体途径的细胞凋亡<sup>[30]</sup>。

## 5 结论

近年来JNK信号通路的研究取得了迅猛发展, 揭示了越来越多的上游激酶与下游底物。JNK信号通路在细胞凋亡中的作用十分复杂和多样, 依据组织背景、刺激源类型及涉及的JNK自身亚型的不同, 既能促凋亡, 也能抑凋亡。JNK介导的细胞凋亡在人体正常发育及多种疾病和病理损伤(如神经退行性疾病、I型糖尿病、耳聋、I/R损伤等)的发生发展中起着至关重要的作用, 是正常与疾病状态时细胞的一个重要调节靶点, 因此在临床上是一个潜在的干预治疗疾病的分子靶, 利用JNK抑制剂进行疾病治疗也取得了一定进展。广大科研工作者进一步的工作是确定JNK在各种疾病中的具体作用和分子机制, 探索从不同水平干预JNK信号通路或是研究开发JNK的高特异性抑制剂或激活剂, 来抑制各种疾病的相关病理过程而不影响JNK的正常生理功

能, 那么将会给这些疾病的治疗带来新的希望。

## 6 参考文献

- Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 1993; 7: 2135-2148
- Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40
- Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E131-E136
- Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* 2003; 25: 17-24
- Dougherty CJ, Kubasiak LA, Frazier DP, Li H, Xiong WC, Bishopric NH, Webster KA. Mitochondrial signals initiate the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by hypoxia-reoxygenation. *FASEB J* 2004; 18: 1060-1070
- Vallerie SN, Hotamisligil GS. The role of JNK proteins in metabolism. *Sci Transl Med* 2010; 2: 60rv5
- Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1341-1348
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 787-795
- Heasley LE, Han SY. JNK regulation of oncogenesis. *Mol Cells* 2006; 21: 167-173
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79: 143-180
- Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7337-7342
- Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL, Karin M. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 1995; 268: 286-290
- Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, Paterson A, Goedert M, Cohen P. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *Biochem J* 2000; 352 Pt 1: 145-154
- Tournier C, Dong C, Turner TK, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 2001; 15: 1419-1426
- Barr RK, Bogoyevitch MA. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 1047-1063
- Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* 2002; 12: 14-21
- Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A, Gillespie DA. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signal* 2002; 14: 585-593
- Karin M. The regulation of AP-1 activity by mito-

## ■应用要点

对JNK信号通路介导的细胞凋亡在各种疾病中具体作用机制的研究, 将有助于开发新的治疗途径及药物。

## ■同行评价

本文科学性较好,为JNK信号通路介导凋亡在疾病中的应用价值奠定了坚实的理论基础。

- gen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 16483-16486
- 20 Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 8469-8478
- 21 Maundrell K, Antonsson B, Magnenat E, Camps M, Muda M, Chabert C, Gillieron C, Boschert U, Vial-Knecht E, Martinou JC, Arkinstall S. Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J Biol Chem* 1997; 272: 25238-25242
- 22 Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J, Lin A. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 2004; 13: 329-340
- 23 Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270: 1326-1331
- 24 Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192: 1-15
- 25 Bogoyevitch MA, Kobe B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006; 70: 1061-1095
- 26 Carboni S, Antonsson B, Gaillard P, Gotteland JP, Gillon JY, Vitte PA. Control of death receptor and mitochondrial-dependent apoptosis by c-Jun N-terminal kinase in hippocampal CA1 neurones following global transient ischaemia. *J Neurochem* 2005; 92: 1054-1060
- 27 Pan J, Zhao YX, Wang ZQ, Jin L, Sun ZK, Chen SD. Expression of FasL and its interaction with Fas are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway in 6-OHDA-induced rat model of Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2007; 428: 82-87
- 28 Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 859-868
- 29 Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 2001; 21: 7551-7560
- 30 Guan QH, Pei DS, Xu TL, Zhang GY. Brain ischemia/reperfusion-induced expression of DP5 and its interaction with Bcl-2, thus freeing Bax from Bcl-2/Bax dimmers are mediated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Neurosci Lett* 2006; 393: 226-230
- 31 Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; 288: 870-874
- 32 Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 142-149
- 33 Perier C, Bové J, Wu DC, Dehay B, Choi DK, Jackson-Lewis V, Rathke-Hartlieb S, Bouillet P, Strasser A, Schulz JB, Przedborski S, Vila M. Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 8161-8166
- 34 Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 21256-21265
- 35 Solovyan VT. Characterization of apoptotic pathway associated with caspase-independent excision of DNA loop domains. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1347-1360
- 36 Hunot S, Vila M, Teismann P, Davis RJ, Hirsch EC, Przedborski S, Rakic P, Flavell RA. JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 665-670
- 37 Wilhelm M, Xu Z, Kukekov NV, Gire S, Greene LA. Proapoptotic Nix activates the JNK pathway by interacting with POSH and mediates death in a Parkinson disease model. *J Biol Chem* 2007; 282: 1288-1295
- 38 Smith WW, Gorospe M, Kusiak JW. Signaling mechanisms underlying Abeta toxicity: potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006; 5: 355-361
- 39 Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J Neurosci* 2005; 25: 1149-1158
- 40 Resnick L, Fennell M. Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. *Drug Discov Today* 2004; 9: 932-939
- 41 Uhlirva M, Jasper H, Bohmann D. Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a Drosophila tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13123-13128
- 42 Sakurai T, Maeda S, Chang L, Karin M. Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 10544-10551
- 43 Antonyak MA, Kenyon LC, Godwin AK, James DC, Emlet DR, Okamoto I, Tnani M, Holgado-Madruga M, Moscatello DK, Wong AJ. Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors. *Oncogene* 2002; 21: 5038-5046
- 44 Kennedy NJ, Sluss HK, Jones SN, Bar-Sagi D, Flavell RA, Davis RJ. Suppression of Ras-stimulated transformation by the JNK signal transduction pathway. *Genes Dev* 2003; 17: 629-637
- 45 Bai L, Yoon SO, King PD, Merchant JL. ZBP-89-induced apoptosis is p53-independent and requires JNK. *Cell Death Differ* 2004; 11: 663-673
- 46 Gao Y, Tao J, Li MO, Zhang D, Chi H, Henegariu O, Kaech SM, Davis RJ, Flavell RA, Yin Z. JNK1 is essential for CD8+ T cell-mediated tumor immune surveillance. *J Immunol* 2005; 175: 5783-5789
- 47 Major CD, Wolf BA. Interleukin-1beta stimulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in insulin-secreting cells: evidence for cytoplasmic restriction. *Diabetes* 2001; 50: 2721-2728
- 48 Størling J, Binzer J, Andersson AK, Züllig RA, Tonnesen M, Lehmann R, Spinas GA, Sandler S, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. *Diabetologia* 2005; 48: 2039-2050
- 49 Fukuda K, Tesch GH, Nikolic-Paterson DJ. c-Jun amino terminal kinase 1 deficient mice are protected from streptozotocin-induced islet injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 710-716
- 50 Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003; 193:



- 70-81
- 51 Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, Shijo H, Kimura N, Okumura M. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1996; 111: 156-164
- 52 魏然, 张玉琦, 周秀梅, 韩继举, 陈彬, 夏作理. 慢性乙型肝炎患者外周血单个核细胞肿瘤坏死因子检测. 泰山医学院学报 2003; 24: 211-215
- 53 刘征波, 胡国岭, 范学工, 李宁. FASL、TRAIL在慢性乙型肝炎患者外周血淋巴AICD中的作用. 实用临床免疫学 2003; 19: 135-137
- 54 毛丽萍, 王惠民, 张子玉, 吴月平, 章幼奕, 鞠少卿, 王陆军, 陈育凤. 外周血单个核细胞TRAIL mRNA和血清sTRAIL水平与HBV感染肝损伤的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15: 641-645
- 55 黄金文, 伍昌林. 慢性乙肝患者外周血CD4 T细胞凋亡相关蛋白的检测及临床意义. 实验与检验医学 2008; 26: 271-272
- 56 张浩畔, 万克青. caspase-9活性检测在慢性乙型肝炎患者PBMC凋亡中的意义. 中国感染控制杂志 2007; 6: 297-300
- 57 Mehrotra S, Chhabra A, Hegde U, Chakraborty NG, Mukherji B. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase rescues influenza epitope-specific human cytolytic T lymphocytes from activation-induced cell death. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 539-547
- 58 Chhabra A, Mehrotra S, Chakraborty NG, Dorsky DI, Mukherji B. Activation-induced cell death of human melanoma specific cytotoxic T lymphocytes is mediated by apoptosis-inducing factor. *Eur J Immunol* 2006; 36: 3167-3174
- 59 Zhang J, Gao JX, Salojin K, Shao Q, Grattan M, Meagher C, Laird DW, Delovitch TL. Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Exp Med* 2000; 191: 1017-1030
- 60 Levkovitch-Verbin H, Harizman N, Dardik R, Nisgav Y, Vander S, Melamed S. Regulation of cell death and survival pathways in experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 2007; 85: 250-258
- 61 Roduit R, Schorderet DF. MAP kinase pathways in UV-induced apoptosis of retinal pigment epithelium ARPE19 cells. *Apoptosis* 2008; 13: 343-353
- 62 Eshraghi AA, Van de Water TR. Cochlear implantation trauma and noise-induced hearing loss: Apoptosis and therapeutic strategies. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288: 473-481
- 63 Wang J, Van De Water TR, Bonny C, de Ribaupierre F, Puel JL, Zine A. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. *J Neurosci* 2003; 23: 8596-8607
- 64 Zine A, van de Water TR. The MAPK/JNK signaling pathway offers potential therapeutic targets for the prevention of acquired deafness. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2004; 3: 325-332
- 65 Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T, Aoyagi Y. An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. *Life Sci* 2007; 80: 1335-1344
- 66 Mishra S, Mishra JP, Kumar A. Activation of JNK-dependent pathway is required for HIV viral protein R-induced apoptosis in human monocytic cells: involvement of antiapoptotic BCL2 and c-IAP1 genes. *J Biol Chem* 2007; 282: 4288-4300
- 67 Shinoda M, Shimazu M, Matsuda S, Wakabayashi G, Tanabe M, Hoshino K, Kamei S, Koyasu S, Kitajima M. c-Jun N-terminal kinase activation during warm hepatic ischemia/reperfusion injuries in a rat model. *Wound Repair Regen* 2002; 10: 314-319
- 68 Uehara T, Bennett B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, Westwick JK, Brenner DA. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol* 2005; 42: 850-859
- 69 Ferrandi C, Ballerio R, Gaillard P, Giachetti C, Carboni S, Vitte PA, Gotteland JP, Cirillo R. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 953-960
- 70 Ishii M, Suzuki Y, Takeshita K, Miyao N, Kudo H, Hiraoka R, Nishio K, Sato N, Naoki K, Aoki T, Yamaguchi K. Inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activity improves ischemia/reperfusion injury in rat lungs. *J Immunol* 2004; 172: 2569-2577
- 71 Okuno S, Saito A, Hayashi T, Chan PH. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 2004; 24: 7879-7887

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 益生菌和胃肠道疾病

蒋 烨, 刘 俊, 任宏宇

蒋烨, 刘俊, 任宏宇, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

作者贡献分布: 本文综述由蒋烨完成; 刘俊与任宏宇审校。

通讯作者: 任宏宇, 副教授, 副主任医师, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科。

hongyuren@yahoo.com.cn

电话: 027-85726381

收稿日期: 2011-04-19 修回日期: 2011-05-23

接受日期: 2011-06-02 在线出版日期: 2011-06-18

## Probiotics and gastrointestinal diseases

Ye Jiang, Jun Liu, Hong-Yu Ren

Ye Jiang, Jun Liu, Hong-Yu Ren, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Associate Professor Hong-Yu Ren, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. hongyuren@yahoo.com.cn

Received: 2011-04-19 Revised: 2011-05-23

Accepted: 2011-06-02 Published online: 2011-06-18

## Abstract

The intestinal microbiota plays a key role in maintaining the normal function of the human gastrointestinal tract. Many probiotics are derived from human gut flora, and have been confirmed to be valuable in the management of gastrointestinal diseases. Probiotic effects are strain-specific, they do not act through the same mechanisms, and nor are all probiotics good for health. Nevertheless, they do have several common characters in that they exert anti-inflammatory effects, they employ different strategies to antagonize competing microorganisms, and they induce cytoprotective changes in the host either through enhancement of barrier function, or through up-regulation of the expression of cytoprotective host proteins. In this review we focus on several probiotics: a Gram-negative probiotic (*Escherichia coli* Nissle1917), a Gram-positive probiotic bacterium (*Lactobacillus Rhamnosus* GG, LGG), a bacterial mixture (VSL#3), and a yeast probiotic (*Saccharomyces boulardii*).

Key Words: Probiotics; Intestinal microbiota; In-

flammation; Colitis

Jiang Y, Liu J, Ren HY. Probiotics and gastrointestinal diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1813-1818

## 摘要

在人类的胃肠道功能中, 肠道微生物发挥了重要的作用。很多益生菌是从原有的肠道细菌中发现出来的, 并被证实对一些胃肠道疾病具有临床功效。益生菌的作用具有种株特异性, 既不是通过共同的机制发挥作用, 也不是所有的益生菌都有益于健康。在抗炎作用上, 他们有几种共同的功能, 如通过不同的方式和其他微生物竞争拮抗, 通过增强宿主细胞的防御功能或是正调节宿主细胞保护蛋白的表达, 从而激发宿主细胞的保护功能。本文选择介绍一些益生菌: 革兰氏阴性益生菌如尼氏大肠杆菌 (*Escherichia coli* Nissle 1917), 革兰氏阳性益生菌如鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG), 细菌混合物 (VSL#3) 和一种酵母益生菌如鲍氏酵母菌 (*Saccharomyces boulardii*)。

关键词: 益生菌; 肠道微生物; 感染; 结肠炎

蒋烨, 刘俊, 任宏宇. 益生菌和胃肠道疾病. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1813-1818

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1813.asp>

## 0 引言

细菌是人体正常功能的重要组成部分。多数益生菌都从人体内众多的共生细菌中分离出来。这些微生物在人体的新陈代谢和营养吸收中, 发挥了关键的作用。他们可以合成一些化合物如K和B族维生素; 分解胆固醇; 合成短链脂肪酸, 如丁酸盐类; 分解在人体内不能被吸收的多糖从而减少一些能量损失<sup>[1]</sup>。通过激发免疫系统中的树突状细胞, 增强宿主的免疫防御功能<sup>[2]</sup>, 并与病原菌竞争结合肠道上皮细胞, 而达到抑制病原菌的作用<sup>[3]</sup>。此外, 他们也产生一些细菌性产物, 例如被称作细菌素的小分子肽类, 杀灭其他的病原微生物<sup>[4]</sup>。人体的共生菌可以通过与一

## ■背景资料

人类体内细菌的数目远多于细胞数目, 胃肠道细菌的数目范围为 $10^{12}$ 数量级。这些微生物在人体的新陈代谢, 营养吸收, 宿主的免疫以及胃肠道的防御功能中都起到了不可或缺的作用。因此有人称益生菌为被遗忘的器官。益生菌的种类繁多, 无论是在科学研究、医疗应用以及人们的日常生活中, 益生菌都是一个热门话题。

## ■同行评议者

王江滨, 教授, 吉林大学中日联谊医院消化内科

## ■ 研发前沿

益生菌和宿主肠道之间的免疫关系是近年来研究的热点。益生菌和宿主的免疫系统之间的相互关系复杂。一些胃肠疾病如炎症性肠病、肠易激综合征的发病机制与肠道菌群失调有关,因此在临床上使用益生菌治疗胃肠道疾病也是近年来研究的重点。但是益生菌种类繁多,他们作用具有种株特异性,不是通过共同的机制发挥作用。

些病原菌竞争营养,而起到防御功能。总之,人体与共栖细菌和谐共处,人体给共栖细菌提供营养和住所,作为回报,他们对人体的新陈代谢和营养吸收起到很重要的作用,还可以防止病原菌的侵害。

益生菌的作用具有种株特异性,他们并不是通过同等的机制起作用,也不是所有的益生菌都有保健的功效。这篇文章难以全面介绍所有益生菌,将选择性重点介绍一些益生菌。

## 1 尼氏大肠杆菌1917

尼氏大肠杆菌1917(*E.coli* Nissle 1917)与其他益生菌不同,他是一种革兰氏阴性细菌,而大多数益生菌都是革兰氏阳性细菌。在常规抗生素应用之前,这个菌株已经在市场上用于治疗腹泻接近100年<sup>[5]</sup>。

1.1 基础实验 和其他致性病的大肠杆菌菌株不同,益生菌*E.coli* Nissle 1917缺乏与他同种的病原菌株中普遍存在的致病因子。相反,他却具有几种“适应因子”,使他与其他大肠杆菌种中致病或非致病菌种相比具有生存优势<sup>[5]</sup>。在大肠黏膜上,*E.coli* Nissle 1917具有抗炎和细胞保护功能,但是他发挥抗炎效应的机制还未清楚。一个采用葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的结肠炎模型实验中,试图明确Nissle对结肠炎症的保护作用是否由TLR介导。以含有Nissle的盐水作为对照来喂养野生型、TLR-2缺乏和TLR-4缺乏的小鼠,评估动物的疾病活性、黏膜损害情况和细胞因子的分泌。在野生型的小鼠中,*E.coli* Nissle 1917增加了结肠炎评分,降低了肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的分泌,但是没有增加疾病活动指数(disease activity index, DAI)的评分。在Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)2和TLR-4基因敲除老鼠,观察到镜下炎症或中性粒细胞的聚集<sup>[6]</sup>,表明*E.coli* Nissle 1917的抗炎机制可能通过由核因子 $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)介导的依赖TLR-2-TLR-4的途径产生。然而,另一个在人肠道上皮细胞HCT15的研究表明*E.coli* Nissle 1917抑制TNF- $\alpha$ 介导的白介素-8(interleukin-8, IL-8)表达,但他不影响NF- $\kappa$ B的活性、核易位或是DNA连接<sup>[7]</sup>。*E.coli* Nissle 1917发挥抗炎效应的机制仍有待研究。

另一研究证实,*E.coli* Nissle 1917可以增强人类 $\beta$ -防御素的表达<sup>[8]</sup>。防御素是一种由肠道产

生的抗菌肽,能保护和防御病原菌对宿主的入侵。炎症性肠病和防御素低表达水平是相关的<sup>[9]</sup>,因此*E.coli* Nissle 1917可通过防御素的机制来提供保护,如限制一些有害细菌对肠道上皮细胞的黏附作用。

1.2 临床研究 一些临床研究表明在维持溃疡性结肠炎的缓解治疗中,*E.coli* Nissle 1917具有与金标准美沙拉秦同样的功效<sup>[5,10-12]</sup>。1997年,120例静止期溃疡性结肠炎患者的双盲试验研究,口服美沙拉秦或是大肠杆菌制剂12 wk后,对比他们病情的复发率、无复发维持时间和总体评估。美沙拉秦组的复发率为11.3%,而*E.coli* Nissle组为16.0%,同时美沙拉秦组的无复发维持时间为103 d $\pm$ 4 d,而*E.coli* Nissle组的无复发维持时间为106 d $\pm$ 5 d。两组的总体评估和耐受性是相同的<sup>[10]</sup>。接下来进行了一个更大的临床双盲试验,327例溃疡性结肠炎缓解期的患者,随机接受美沙拉秦或是*E.coli* Nissle 1917治疗12 mo后,用内镜和组织学活动指标来评估结果。通过“每份治疗协议”来分析复发率,*E.coli* Nissle组复发率为40/110(36.4%)而美沙拉秦组的复发率为38/112(33.9%)( $P = 0.003$ )。用“意向治疗”分析,包括没严格按照协议但是每天至少服用1次研究药物的患者,*E.coli* Nissle组的复发率是45.1%,而美沙拉秦组的复发率是37.0%( $P = 0.013$ )。试验中没有严重不良事件被报道<sup>[11]</sup>。*E.coli* Nissle 1917用于治疗肠易激综合征同样具有临床功效<sup>[13]</sup>。

## 2 鼠李糖乳杆菌

乳酸杆菌是最普遍被用作益生菌的一种细菌。他们用于食物和乳品工业历史悠久,鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG)是被Sherwood Gorbach和Barry Goldwin发现的。他们从健康的志愿者粪便样本中分离出来,可以耐受胆汁和胃酸<sup>[14]</sup>。

2.1 基础实验 LGG可以增强宿主细胞的防御功能<sup>[15]</sup>。在一个对患有轻至中度活动性克罗恩病的儿童的研究中,通过甘露醇/纤维二糖的通透性测试,发现接受LGG治疗会改善肠道的通透性,在接受益生菌治疗12 wk后达到最大效果<sup>[16]</sup>。2 wk大的大鼠用牛奶、加有LGG的牛奶或水饲养后,用尤斯(using)灌流室分析他们肠道的通透性。在乳鼠上,发现LGG可以防止由牛奶导致的肠道通透性增加。在体外,LGG对上皮细胞预处理可以保护屏障功能免受肠道病原菌血清型



O157:H7的肠道出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *E.coli*, EHEC)侵害<sup>[17]</sup>. 在这个实验中, 细胞接受LGG预处理, 感染*E.coli* O157:H7后, 用电子显微镜检查细胞. 尽管不能阻止胞质空泡的形成, 但他可以保护细胞结构的完整, 尤其是防止由*E.coli* O157:H7造成的紧密连接的破坏. 通过检测跨膜电阻, 进一步发现LGG预处理后可以部分阻止由*E.coli* O157:H7介导的人肠道上皮细胞T84屏障功能的丧失. LGG起作用的另一潜在机制包括诱导热休克蛋白(heat shock protein, HSP)的表达<sup>[18]</sup>. 在肠道上皮细胞上LGG合成和分泌的小分子复合物诱导一种时间浓度依赖性的HSP25和HSP72的表达, 并且发现HSP72可以稳定和阻止细胞蛋白质的变性, 保护肠道上皮细胞免受氧化剂介导的损害<sup>[19]</sup>. 在体外LGG分泌的2种蛋白质P40和P70可以减轻过氧化氢对肠道上皮的氧化伤害作用<sup>[20]</sup>. 除此之外, 他们在阻止细胞因子诱导的人和老鼠上皮细胞的凋亡过程中起作用<sup>[21]</sup>. 总之, 这些体内和体外研究都提供了LGG保护肠道屏障功能的证据.

2.2 临床研究 几个临床试验已经将LGG用于治疗腹泻, 他被成功地用于治疗儿童的急性腹泻<sup>[22-25]</sup>. LGG治疗轮状病毒腹泻最有效, 在LGG处理组的患者中, 他可以缩短病程和减少腹泻的频率<sup>[26,27]</sup>. 他在治疗医源性和抗生素相关性腹泻(antibiotic associated diarrhea, AAD)上也有效<sup>[28,29]</sup>. 一个检测益生菌对AAD作用的Meta分析, 包括总数6个使用LGG的试验, 这些试验患者总数达817例. 计算加权比率, 得出防治1例不良事件的发生需治疗的总病例数(number need to treat, NNT)为6<sup>[30,31]</sup>, 即防止一个患者AAD的病情进展, 需要以LGG治疗6个接受抗菌素的患者.

### 3 益生菌VSL#3

益生菌VSL#3是由8种不同革兰氏阳性细菌组成的混合菌群, 他们是嗜热性唾液链球菌亚种(*Streptococcus salivarius subsp.thermophilus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、保加利亚德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*)、长双歧杆菌(*Bifidobacteria longum*)、幼儿双歧杆菌(*Bifidobacteria infantis*)和短双歧杆菌(*Bifidobacteria breve*).

3.1 基础实验 对VSL#3的研究发现他们分泌的产物抑制关键炎症转录因子NF- $\kappa$ B, 并且通过封闭

肠道上皮细胞蛋白酶的活性来抑制NF- $\kappa$ B抑制因子(inhibitor of NF-kappa B, I $\kappa$ B)的降解<sup>[32]</sup>. 此外, VSL#3的产物还能诱导HSP的表达, 这可以避免细胞受氧化剂的伤害. 通过激活转录因子热休克因子-1(heat shock factor-1, HSF-1)来诱导HSP表达. VSL#3活菌体及其分泌的细菌素都可以通过剂量依赖性的方式来诱导HSP在肠道上皮细胞上的表达<sup>[32]</sup>. 在2种不同的实验性结肠炎模型中, 测试了VSL#3细菌分离DNA的抗炎活性<sup>[33,34]</sup>. 第1个实验, 用从VSL#3菌群中分离出DNA喂养IL-10缺乏的老鼠, 2 wk后分析其取出的结肠. 结果表明, 接受VSL#3DNA喂养的动物与对照组相比, 组织学损伤更少, 以及出现了TNF- $\alpha$ 的降低<sup>[33]</sup>; 第2个实验, 采用DSS处理的实验性结肠炎模型, 在动物暴露于DSS前10 d, 动物先接受DNA酶, 然后接受VSL#3的DNA, 或是大肠杆菌的DNA预处理, 再以DSS处理7 d. 结果发现接受VSL#3益生菌DNA和*E.coli* DNA的DSS结肠炎模型, 后一组的结肠炎更严重. 进一步用TLR9缺乏的小鼠实验, 研究者认为TLR9信号肽在介导抗炎效应中起着必要的作用<sup>[34]</sup>. VSL#3可以通过下调 $\beta$ -防御素2的表达治疗小鼠结肠炎<sup>[35]</sup>.

3.2 临床研究 在一个开放性试验中, 为了明确VSL#3治疗活动性溃疡性结肠炎患者的价值, 这些轻至中度( $n = 34$ )溃疡性结肠炎的患者, 接受混合益生菌治疗6 mo后再次评估. 采用目的治疗分析, 在VSL#3治疗的患者中有53%的缓解率, 9%的患者没有变化, 9%患者症状加重, 5%的患者未完成最终评估<sup>[36]</sup>. 该研究的有趣环节是在活检组织中用16S rRNA的核酸标记序列来测定VSL#3菌种的表型. 在一个随机、双盲试验中, 144例轻至中度溃疡性结肠炎患者已经接受至少4 wk 5-氨基水杨酸治疗(美沙拉秦1.6 g/d或巴柳氮4.5/d), 或是接受免疫抑制剂[硫唑嘌呤1.5 mg/(d·kg)或是6-巯嘌呤1 mg/(d·kg)]治疗, 病情依旧复发. 实验组(71例)加用VSL#3  $3.6 \times 10^{11}$  CFU/d. 对照组(73例)服用安慰剂. 研究持续8 wk后VSL#3组溃疡性结肠炎DAI下降50%的患者明显多于对照组( $P = 0.031$ )<sup>[37]</sup>. VSL#3菌群对慢性憩室炎<sup>[38]</sup>, 及溃疡性结肠炎患者因急性肠炎起病行结肠切除、回肠储袋肛管吻合术后维持治疗均有临床功效<sup>[39]</sup>.

### 4 鲍氏酵母菌

鲍氏酵母菌(*Saccharomyces boulardii*), 是少数不

#### ■相关报道

一个检测益生菌对AAD作用的Meta分析, 包括总数6个使用LGG的试验, 这些试验患者总数达817例. 计算加权比率, 得出防治1例不良事件的发生需治疗的总病例数(NNT)为6, 即防止一个患者AAD的病情进展, 需要以LGG治疗6个接受抗菌素的患者.

## ■同行评价

本文选题新颖, 条理清晰, 有较好的可读性.

是细菌来源, 被普遍作为益生菌的微生物之一. *S.boulardii*是酿酒酵母菌的一个亚株, 他的最适生长温度是37℃, 并且能通过所有胃肠道存活, 他并不在结肠上长期定植<sup>[40,41]</sup>.

4.1 基础实验 *S.boulardii*可以黏附在上皮细胞的细胞壁, 通过胃肠道, 产生一种蛋白酶, 可以裂解难辨梭状芽孢杆菌毒素A和B<sup>[42,43]</sup>. *S.boulardii*可以刺激IgA的分泌并且诱导对难辨梭状芽孢杆菌毒素A特异性IgA的免疫应答<sup>[44,45]</sup>. 研究表明IgA具有抗毒素作用<sup>[46]</sup>, 因此*S.boulardii*在治疗难辨梭状芽孢杆菌相关性疾病(*Clostridium difficile* associated disease, CDAD)上有着重要意义. 一个实验表明*S.boulardii*可能合成和分泌另一种有待确定的物质, 他可以保护肠道上皮细胞免受伤害. 从*S.boulardii*培养物中提取热灭活的培养液, 可以在体外保护上皮细胞, 免受难辨梭状芽孢杆菌毒素A对其防御功能的破坏. 肠道上皮细胞Caco-2种植在Transwell型培养皿中, 加入难辨梭状芽孢杆菌毒素A前, 加入热灭活的*S.boulardii*条件培养基(conditioned media, CM)进行过夜预处理. 在加入毒物的1 h前和加入毒物后120 min, 每30 min用电位仪的电极测试细胞的跨膜电极的变化. 经过*S.boulardii* CM预处理的细胞与对照组相比细胞防御功能丧失的更少<sup>[47]</sup>.

4.2 临床研究 CDAD是由难辨梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*)造成的. 当病情严重时, CDAD会导致结肠炎, 威胁生命导致死亡. 很多患CDAD接受治疗的患者, 都会经历疾病的多次复发, 并且不能完全清除他的感染. 几个研究已经证实<sup>[32,41,48-50]</sup>, *S.boulardii*具有改善AAD和根除复发性CDAD临床的作用. *S.boulardii*已经被证实, 降低CDAD复发率, 尤其是治疗时, 联合使用大剂量的万古霉素, 可使CDAD的复发率降低至50%<sup>[51]</sup>. 使用这种活酵母菌作为益生菌, 必须要谨慎<sup>[52-54]</sup>. 一个关于在医院爆发的*S.boulardii*血流感染的报道, 发现*S.boulardii*有关的真菌血症发生在未接受*S.boulardii*治疗的患者身上<sup>[52]</sup>.

## 5 结论

当前的资料表明了益生菌可用于一些临床疾病, 例如*E.coli* Nissle 1917用于溃疡性结肠炎维持治疗, LGG和*L.reuteri*治疗轮状病毒腹泻<sup>[55]</sup>, VSL#3治疗储袋炎, *S.boulardii*治疗难辨梭状芽孢杆菌, LGG和*S.boulardii*治疗AAD等. 除了在临床作用和成分不同外, 益生菌他们作用的机制各不相同. 多数细菌都有细胞保护作用(诱导HSP和黏

蛋白的表达)和抗炎作用(通常是通过不同的步骤而作用于共同的NF-κB活化通路). 然而益生菌并不总是有益的<sup>[54,56-60]</sup>. 益生菌可能导致感染, 尤其是在留置静脉导管的患者上益生菌的使用增加了侵入性感染的风险<sup>[53,57]</sup>. 益生菌对胰腺炎的临床功效有待进一步研究<sup>[61,62]</sup>. 一个测试益生菌对胰腺炎功效的临床试验, 试验被迫很早就终止, 由于益生菌组病情进展的更坏. 在益生菌组有24例死亡, 而对照组有9例, 益生菌组报道有9例肠缺血坏死, 在对照组却没有<sup>[61]</sup>. 这个试验的结果给我们一个很好的启示, 我们仍然没有完全了解益生菌复杂的作用机制, 迫切需要更好的明确其机制的科学原理<sup>[63,64]</sup>. 通过对人类微生物的研究, 更好的理解宿主与细菌的相互关系<sup>[65-67]</sup>.

## 6 参考文献

- 1 Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-1920
- 2 Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168: 171-178
- 3 Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* 2008; 16: 107-114
- 4 Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 117-137
- 5 Schultz M. Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1012-1018
- 6 Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC, Erckenbrecht J, Raupach B, Sonnenborn U, Eckert J, Schumann RR, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun* 2006; 74: 4075-4082
- 7 Kamada N, Maeda K, Inoue N, Hisamatsu T, Okamoto S, Hong KS, Yamada T, Watanabe N, Tsuchimoto K, Ogata H, Hibi T. Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2008; 76: 214-220
- 8 Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* 2007; 75: 2399-2407
- 9 Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 202-208
- 10 Kruis W, Schütz E, Frick P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 853-858
- 11 Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B,

- Kascák M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53: 1617-1623
- 12 Henker J, Müller S, Laass MW, Schreiner A, Schulze J. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study. *Z Gastroenterol* 2008; 46: 874-875
- 13 Plassmann D, Schulte-Witte H. [Treatment of irritable bowel syndrome with *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN): a retrospective survey]. *Med Klin (Munich)* 2007; 102: 888-892
- 14 Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 1987; 70: 1-12
- 15 Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4985-4996
- 16 Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31: 453-457
- 17 Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM. Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infect Immun* 2008; 76: 1340-1348
- 18 Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB, Petrof EO. Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C1018-C1030
- 19 Musch MW, Sugi K, Straus D, Chang EB. Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 1999; 117: 115-122
- 20 Seth A, Yan F, Polk DB, Rao RK. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G1060-G1069
- 21 Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 50959-50965
- 22 Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armańska M, Mikołajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 2001; 138: 361-365
- 23 Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoekstra H, Kolacek S, Massar K, Micevic-Turk D, Papadopoulou A, de Sousa JS, Sandhu B, Szajewska H, Weizman Z. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 54-60
- 24 Basu S, Paul DK, Ganguly S, Chatterjee M, Chandra PK. Efficacy of high-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 208-213
- 25 Basu S, Chatterjee M, Ganguly S, Chandra PK. Efficacy of *Lactobacillus rhamnosus* GG in acute watery diarrhoea of Indian children: a randomised controlled trial. *J Paediatr Child Health* 2007; 43: 837-842
- 26 Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 333-338
- 27 Szajewska H, Skórka A, Ruszczyński M, Gieruszczak-Bialek D. Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 871-881
- 28 Beausoleil M, Fortier N, Guénette S, L'ecuyer A, Savoie M, Franco M, Lachaine J, Weiss K. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CI1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol* 2007; 21: 732-736
- 29 Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007; 335: 80
- 30 Ellison RT. Review: probiotics are effective for prevention of antibiotic-associated diarrhea and treatment of *Clostridium difficile* disease. *ACP J Club* 2006; 145: 46
- 31 McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 812-822
- 32 Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, Chang EB. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 2004; 127: 1474-1487
- 33 Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004; 126: 1358-1373
- 34 Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 520-528
- 35 常玉英, 欧阳钦, 强鸥. 益生菌VSL#3对Oxazolone小鼠结肠炎结肠黏膜中 $\beta$ -防御素2表达的影响. *西部医学* 2007; 19: 1015-1018
- 36 Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1539-1546
- 37 Tursi A, Brandimarte G, Papa A, Giglio A, Elisei W, Giorgetti GM, Forti G, Morini S, Hassan C, Pistoia MA, Modeo ME, Rodino' S, D'Amico T, Sebkova L, Sacca' N, Di Giulio E, Luzzza F, Imeneo M, Larussa T, Di Rosa S, Annese V, Danese S, Gasbarrini A. Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 2218-2227
- 38 Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, Poggioli G, Tambasco R, Calabrese C, Brigidi P, Vitali B, Stratorini G, Campieri M. High-dose probiotics for the treatment of active pouchitis. *Dis Colon Rectum*



- 2007; 50: 2075-2082
- 39 Holubar SD, Cima RR, Sandborn WJ, Pardi DS. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; CD001176
- 40 Surawicz CM. Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 775-783
- 41 Blehaut H, Massot J, Elmer GW, Levy RH. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. *Biopharm Drug Dispos* 1989; 10: 353-364
- 42 Castagliuolo I, LaMont JT, Nikulasson ST, Pothoulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect Immun* 1996; 64: 5225-5232
- 43 Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immun* 1999; 67: 302-307
- 44 Can M, Beşirbellioglu BA, Avci IY, Beker CM, Pahsa A. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective study. *Med Sci Monit* 2006; 12: PI19-PI22
- 45 Qamar A, Aboudola S, Warny M, Michetti P, Pothoulakis C, LaMont JT, Kelly CP. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect Immun* 2001; 69: 2762-2765
- 46 Johnson S, Sypura WD, Gerding DN, Ewing SL, Janoff EN. Selective neutralization of a bacterial enterotoxin by serum immunoglobulin A in response to mucosal disease. *Infect Immun* 1995; 63: 3166-3173
- 47 Petrof EO. Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2009; 8: 260-269
- 48 Segarra-Newnham M. Probiotics for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: focus on *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii*. *Ann Pharmacother* 2007; 41: 1212-1221
- 49 Billoo AG, Memon MA, Khaskheli SA, Murtaza G, Iqbal K, Saeed Shekhani M, Siddiqi AQ. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4557-4560
- 50 Thompson I. *Clostridium difficile*-associated disease: update and focus on non-antibiotic strategies. *Age Ageing* 2008; 37: 14-18
- 51 Surawicz CM. Treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 32-38
- 52 Cassone M, Serra P, Mondello F, Girolamo A, Scafetti S, Pistella E, Venditti M. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5340-5343
- 53 Muñoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Pérez MJ, Sánchez-Somolinos M, Rincón C, Hortal J, Peláez T. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1625-1634
- 54 Herbrecht R, Nivoix Y. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: an adverse effect of *Saccharomyces boulardii* probiotic administration. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1635-1637
- 55 Spinler JK, Taweechoitpatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008; 14: 166-171
- 56 Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, Koskela M. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1159-1160
- 57 Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Valtonen V. Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 775-780
- 58 Venugopalan V, Shriner KA, Wong-Beringer A. Regulatory oversight and safety of probiotic use. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1661-1665
- 59 Klein G. Antibiotic resistance and molecular characterization of probiotic and clinical *Lactobacillus* strains in relation to safety aspects of probiotics. *Foodborne Pathog Dis* 2011; 8: 267-281
- 60 Cilieborg MS, Thymann T, Siggers R, Boye M, Bering SB, Jensen BB, Sangild PT. The incidence of necrotizing enterocolitis is increased following probiotic administration to preterm pigs. *J Nutr* 2011; 141: 223-230
- 61 Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, Nieuwenhuijs VB, Bollen TL, van Ramshorst B, Witteman BJ, Rosman C, Ploeg RJ, Brink MA, Schaapherder AF, Dejong CH, Wahab PJ, van Laarhoven CJ, van der Harst E, van Eijck CH, Cuesta MA, Akkermans LM, Gooszen HG. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008; 371: 651-659
- 62 McClave SA, Heyland DK, Wischmeyer PE. Comment on: probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2009; 33: 444-446
- 63 Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol* 2003; 81: 1-10
- 64 Hamilton-Miller JM, Shah S. Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements. *Int J Food Microbiol* 2002; 72: 175-176
- 65 Tannock GW. Exploring the relationships between intestinal microflora and inflammatory conditions of the human bowel and spine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002; 81: 529-535
- 66 Tannock GW. The search for disease-associated compositional shifts in bowel bacterial communities of humans. *Trends Microbiol* 2008; 16: 488-495
- 67 Shanahan F. Probiotics in perspective. *Gastroenterology* 2010; 139: 1808-1812

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# 抗纤复方I号对乙醛刺激的肝星状细胞的细胞外基质及细胞因子分泌的干预作用

林红, 黄玉红, 李异玲, 傅宝玉, 王炳元

## ■背景资料

近年来酒精性肝病发病率呈现不断上升的趋势。酒精性肝纤维化是肝硬化的早期可逆阶段, 如不及时治疗则可能进展为失代偿期肝硬化并出现各种终末期肝病并发症。肝纤维化的发展是细胞外基质合成增加、降解减少的结果。肝星状细胞是分泌合成胶原的主要细胞。转化生长因子- $\beta$ 1是最强的促肝纤维化因子。中药复方的综合药理作用在抗肝纤维化治疗中显示出独特的优势。

## ■同行评议者

曹鹏, 副研究员, 江苏省中医药研究院细胞与分子生物学实验室

林红, 黄玉红, 李异玲, 傅宝玉, 王炳元, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

**作者贡献分布:** 此课题立题由林红与傅宝玉完成; 设计由林红与傅宝玉完成; 研究过程由林红与黄玉红完成; 数据分析由李异玲与林红完成; 论文撰写由林红完成; 实验指导及论文修改由傅宝玉与王炳元完成。

**通讯作者:** 林红, 副教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化内科. linhong69@hotmail.com

电话: 024-83282563

收稿日期: 2011-02-26 修回日期: 2011-05-31

接受日期: 2011-06-14 在线出版日期: 2011-06-18

## KangXian FuFang I inhibits acetaldehyde-stimulated extracellular matrix synthesis and cytokine secretion in cultured hepatic stellate cells

Hong Lin, Yu-Hong Huang, Yi-Ling Li, Bao-Yu Fu, Bing-Yuan Wang

Hong Lin, Yu-Hong Huang, Yi-Ling Li, Bao-Yu Fu, Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shengyang 110001, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Associate Professor Hong Lin, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shengyang 110001, Liaoning Province, China. linhong69@hotmail.com

Received: 2011-02-26 Revised: 2011-05-31

Accepted: 2011-06-14 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of KangXian FuFang I (KXI) on acetaldehyde-stimulated extracellular matrix synthesis and cytokine secretion in cultured hepatic stellate cells (HSCs).

**METHODS:** HSCs were isolated from rats and then primarily cultured and subcultured *in vitro*. Serum containing KXI was collected from normal rats intragastrically given the drug. HSCs were treated with acetaldehyde and the drug-containing serum. The contents of hyaluronic acid (HA) and transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in the media and expression of type I collagen  $\alpha$ 1 mRNA in stimulated HSCs were measured by radioimmunoassay, ELISA and reverse transcription polymerase chain reaction

(RT-PCR), respectively.

**RESULTS:** After HSCs were stimulated with acetaldehyde (100  $\mu$ mol/L), the expression level of type I collagen  $\alpha$ 1 mRNA ( $1.193 \pm 0.0344$  vs  $0.988 \pm 0.0208$ ,  $P < 0.05$ ) in HSCs and secreted levels of HA ( $1243.22$  ng/L  $\pm$   $58.13$  ng/L vs  $602.33$  ng/L  $\pm$   $194.06$  ng/L,  $P < 0.05$ ) and TGF- $\beta$ 1 ( $2734.43$  ng/L  $\pm$   $787.12$  ng/L vs  $559.92$  ng/L  $\pm$   $97.63$  ng/L,  $P < 0.01$ ) in the media significantly increased. Drug-containing serum (10%) significantly inhibited acetaldehyde-stimulated expression of type I collagen  $\alpha$ 1 mRNA ( $0.973 \pm 0.0605$  vs  $1.193 \pm 0.0344$ ,  $P < 0.05$ ) and secretion of HA ( $1032.667$  ng/L  $\pm$   $77.65$  ng/L vs  $1243.22$  ng/L  $\pm$   $58.13$  ng/L,  $P < 0.05$ ) and TGF- $\beta$ 1 ( $759.62$  ng/L  $\pm$   $205.34$  ng/L vs  $2734.43$  ng/L  $\pm$   $787.12$  ng/L,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** KXI could inhibit acetaldehyde-stimulated secretion of HA and TGF- $\beta$ 1 and expression of type I collagen  $\alpha$ 1 mRNA in cultured HSCs.

**Key Words:** Hepatic stellate cells; Acetaldehyde; Kangxian Fufang I; Type I collagen  $\alpha$ 1; Hyaluronic acid; Transforming growth factor  $\beta$ 1

Lin H, Huang YH, Li YL, Fu BY, Wang BY. KangXian FuFang I inhibits acetaldehyde-stimulated extracellular matrix synthesis and cytokine secretion in cultured hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1826-1829

## 摘要

**目的:** 研究乙醛对肝星状细胞(HSC)细胞外基质和细胞因子分泌的影响及中药抗纤复方I号(KXI)的干预作用。

**方法:** 采用大鼠肝脏原位灌流消化法获得并原代及传代培养HSC, 大鼠灌以KXI制备药物血清, 以乙醛和药物血清作用于HSC, 通过RT-PCR测定细胞内 $\alpha$ 1(I)型胶原mRNA的表达, 以放射免疫法和ELISA法分别测定培养上清中透明质酸(HA)和转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)的

含量.

**结果:** 100  $\mu\text{mol/L}$  乙醛刺激HSC后, HSC中 $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原mRNA的表达、上清中HA( $\text{ng/L}$ )及TGF- $\beta 1$ ( $\text{ng/L}$ )的含量增加( $1.193 \pm 0.0344$  vs  $0.988 \pm 0.0208$ ;  $1\,243.22 \pm 58.13$  vs  $602.33 \pm 194.06$ ;  $2\,734.43 \pm 787.12$  vs  $559.92 \pm 97.63$ , 均 $P < 0.01$ ). 而100 mL/L的药物血清则抑制 $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原mRNA的表达、HA( $\text{ng/L}$ )及TGF- $\beta 1$ ( $\text{ng/L}$ )的含量降低( $0.973 \pm 0.0605$  vs  $1.193 \pm 0.0344$ ;  $1\,032.667 \pm 77.65$  vs  $1\,243.22 \pm 58.13$ ;  $759.62 \pm 205.34$  vs  $2\,734.43 \pm 787.12$ , 均 $P < 0.01$ ).

**结论:** 乙醛能增加HSC中 $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原的表达, 并促进HSC分泌HA及TGF- $\beta 1$ , 而KXI则起抑制作用.

**关键词:** 肝星状细胞; 乙醛; 抗纤复方I号;  $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原; 透明质酸; 转化生长因子- $\beta 1$

林红, 黄玉红, 李异玲, 傅宝玉, 王炳元. 抗纤复方I号对乙醛刺激的肝星状细胞的细胞外基质及细胞因子分泌的干预作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1826-1829  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1826.asp

## 0 引言

酒精性肝病是由于长期大量饮酒所致, 包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、肝纤维化和肝硬化. 肝纤维化是肝硬化的早期可逆阶段, 如不及时治疗则可能进展成为失代偿期肝硬化并出现各种终末期肝病并发症<sup>[1]</sup>. 肝纤维化的发展是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增加、降解减少的结果. 肝星状细胞(hepatic stellate cell HSC)的活化是肝纤维化发生的中心环节<sup>[2]</sup>, 是分泌合成胶原的主要细胞. HSC激活受多种细胞因子的调控, 转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )为最强的促肝纤维化因子. 中药复方的多途径、多层次、多靶点的综合作用在抗肝纤维化治疗中显示出独特的优势. 本研究观察了中药抗纤复方I号(kangxian fufang I, KXI)对乙醛刺激的大鼠HSC分泌的ECM如 $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原和透明质酸(hyaluronic acid, HA)以及TGF- $\beta 1$ 的影响, 以期阐述KXI抗酒精性肝纤维化的部分作用机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** KXI(主要由丹参、黄芪、红花、汉防己、葛根、桃仁、甘草等10味药物组成)浓缩口服制剂, 含2.7 g生药/mL. 按11 mL/kg给大鼠灌

表 1 PCR引物序列

引物名称	引物序列	大小 (bp)
$\alpha 1(\text{I})$ 型胶原	F 5'-CCGTGGTGACAAGGGTGAGACAG-3' R 5'-TCAGGGCTGCGGATGTTCTCA-3'	471
$\beta$ -actin	F 5'-GATTGCCTCAGGACATTCTG-3' R 5'-GATTGCTCAGGACATTCTG-3'	690

服中药制剂, 每天1次, 持续给药1 wk, 末次给药后1 h无菌条件下由下腔静脉取血, 取血清, 56  $^{\circ}\text{C}$  灭活30 min, 分装-20  $^{\circ}\text{C}$  冻存. 另选正常大鼠喂以等量生理盐水, 以同样方法制备正常血清作对照. RT-PCR试剂盒购于大连宝生物工程有限公司.

## 1.2 方法

**1.2.1 HSC分离、培养及鉴定:** 采用大鼠肝脏原位灌流消化的方法分离HSC<sup>[3]</sup>. 细胞得率约为 $1 \times 10^7$ /肝, 经台盼蓝染色细胞存活率90%以上. 将细胞爬片用兔抗人Desmin抗体、SP法作免疫细胞化学染色以鉴定HSC, 胞质阳染者为HSC, 传代的HSC纯度 $> 98\%$ . 本次实验采用传2-4代HSC.

**1.2.2 放免法测定HA含量:** 以 $1 \times 10^6$ /瓶浓度接种在培养瓶(25  $\text{cm}^2$ )中的传代的HSC长满单层后, 分为正常血清对照组、正常血清+乙醛组及药物血清+乙醛组. 正常血清及药物血清加入无血清DMEM培养液中, 制成浓度为10%的正常血清及药物血清孵育液, 乙醛组加入乙醛后使终浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ , 培养瓶均用封口膜封严, 培养24 h后收集培养上清, 严格按说明操作(HA放射免疫测定试剂盒购于为上海海军医学研究所). JC-1200放射免疫 $\gamma$ 计数器上直接测定HA含量( $\mu\text{g/L}$ ), 取均值.

**1.2.3 HSC  $\alpha 1(\text{I})$ 型胶原mRNA测定:** HSC分为正常血清对照组、正常血清+乙醛组及药物血清+乙醛组, 按1.2.2方法处理后, 提取6 h和24 h的总RNA并逆转录成cDNA. 引物由北京奥科公司合成, 序列及扩增产物片段见表1. 总体积25  $\mu\text{L}$ , 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min变性 $\rightarrow$ 94  $^{\circ}\text{C}$  40 s $\rightarrow$ 62  $^{\circ}\text{C}$  1 min $\rightarrow$ 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共35个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  7 min终止反应; PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳、摄片、密度扫描(1D Kodak成像分析系统), 然后用其表定量与对应的 $\beta$ -actin表达量进行比较.

**1.2.4 双抗夹心ABC-ELISA法检测培养上清中细胞因子TGF- $\beta 1$ 的含量:** 检测试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供. 严格按试剂盒说明书操作. 测定TGF- $\beta 1$ 时需进行标本激活(因为

## ■ 研发前沿

酒精性肝纤维化的发病机制较复杂, 目前尚不清楚, 其治疗是研究纤维化分子治疗领域的重点、热点. 大多数化学药物仍处于动物实验或临床试验阶段, 但某些中药复方制剂在临床治疗肝纤维化方面已取得一定疗效, 复方中药的作用机制需进一步深入探讨.

## ■ 创新盘点

本文通过体外培养肝星状细胞, 直接检测乙醛对肝星状细胞合成细胞外基质及分泌细胞因子的影响, 探讨乙醛促肝纤维化的机制, 并同时给予中药复方制剂干预, 是一系列研究的一部分.



## ■应用要点

抗纤复方I号在动物体内及体外多项实验中均证实其在多层次上有抗肝纤维化作用,为临床应用其治疗肝纤维化提供有力的理论依据,但仍需深入探讨其作用机制及安全性。

表 2 各组HSC中 $\alpha 1(I)$ 型胶原mRNA表达的变化 (mean  $\pm$  SD)

	正常血清对照组	正常血清+乙醛组	药物血清+乙醛组	F值
6 h	0.889 $\pm$ 0.0466	1.187 $\pm$ 0.0289 <sup>a</sup>	1.023 $\pm$ 0.0689 <sup>b</sup>	25.839
24 h	0.988 $\pm$ 0.0208	1.193 $\pm$ 0.0344 <sup>a</sup>	0.973 $\pm$ 0.0605 <sup>b</sup>	25.753

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常血清对照组; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常血清乙醛组。

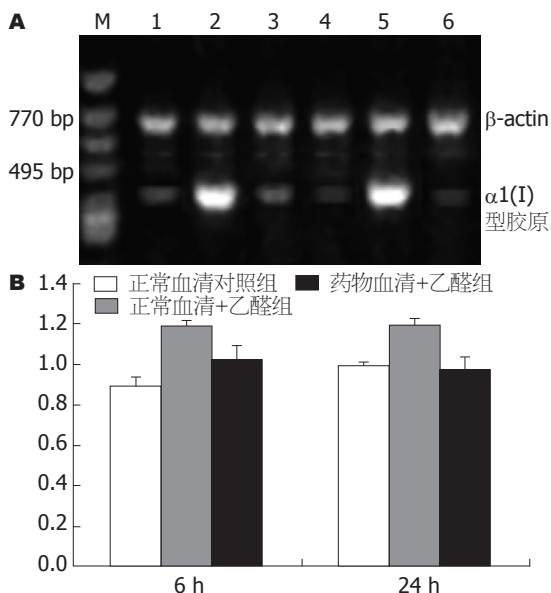


图 1 HSC中 $\alpha 1(I)$ 型胶原mRNA表达。A: M: Marker; 1-3: 6 h时正常血清对照组、正常血清+乙醛组和药物血清+乙醛组; 4-6: 24 h时正常血清+乙醛组和药物血清+乙醛组; B:  $\alpha 1(I)$ 型胶原及 $\beta$ -actin PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳、密度扫描后的强度之比。

TGF- $\beta 1$ 是以无活性的形式分泌的)即将标本用样品稀释液稀释10倍,总量500  $\mu$ L,加入20  $\mu$ L 1 mol/L HCL, 2  $^{\circ}$ C-8  $^{\circ}$ C放置60 min后,加入20  $\mu$ L 1 mol/L NaOH即用。计算结果时乘以稀释倍数( $\times 10$ )。酶标仪检测A值。

**统计学处理** 采用SPSS10.0软件包进行统计学分析,计量资料用mean  $\pm$  SD表示,采用方差分析、LSD检验和 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 乙醛及药物血清对HSC  $\alpha 1(I)$ 型胶原mRNA表达的影响** 乙醛浓度为100  $\mu$ mol/L时,刺激HSC 6 h  $\alpha 1(I)$ 型胶原mRNA表达显著增加,至24 h仍有较强的信号,100 mL/L药物血清能明显抑制 $\alpha 1(I)$ 型胶原mRNA表达(表2,图1)。

**2.2 乙醛及药物血清对HSC分泌HA的影响** 正常血清对照组HA分泌量为(602.334  $\pm$  194.062) ng/L,正常血清+乙醛组为(1 243.225  $\pm$  58.126)

ng/L( $t = 4.73$ ,  $P < 0.01$ ),药物血清+乙醛组为(1 032.667  $\pm$  77.658) ng/L( $t = 4.65$ ,  $P < 0.05$ )。

**2.3 乙醛及药物血清对HSC培养上清中TGF- $\beta 1$ 含量的影响** 100  $\mu$ mol/L乙醛刺激HSC 24 h后,培养上清中正常血清对照组TGF- $\beta 1$ 含量(559.9  $\pm$  97.6) ng/L,正常血清+乙醛组为(2734.4  $\pm$  787.1) ng/L( $t = 4.83$ ,  $P < 0.01$ ),药物血清+乙醛组为(759.6  $\pm$  205.8) ng/L( $t = 4.53$ ,  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

ECM包括胶原、非胶原糖蛋白及蛋白多糖等,ECM本身并非单纯作为一种组织结构存在,他具广泛的生理功能,是对细胞、组织和器官的形态、生长、分化和代谢等结构功能有重要影响的生物大分子<sup>[4]</sup>,肝细胞的正常功能和HSC保持静息状态均有赖于Disse间隙的正常间质成分<sup>[5]</sup>。胶原是ECM的主要成分,肝脏以I、III型为主。Pinzani<sup>[6]</sup>提出酒精性肝纤维化的形成模式为细胞周围型纤维化,由HSC产生纤维,形成肝窦毛细血管化,纤维形成并包绕肝细胞;HSC位于窦周Disse间隙,研究表明在肝损伤过程中激活经表型转化而成为肌纤维母细胞(myofibroblast, MFB),活化后的HSC的I、III、IV型前胶原mRNA表达明显增加;层粘连蛋白(laminin, LN)、HA和纤维连接蛋白(fibronectin, FN)的mRNA表达也增加。HSC活化后ECM成分发生改变,以I型胶原为主。实验表明随着酒精性肝纤维化的进展,血清中含量最多的是蛋白多糖中的HA,他与肝纤维化程度呈正相关<sup>[7]</sup>。乙醛是乙醇的直接代谢产物,而乙醛能通过多种途径造成肝脏的损伤。本研究中,用乙醛刺激体外传代培养的HSC,能明显促进HSC分泌HA, $\alpha 1(I)$ 型胶原mRNA表达亦显著增高,KXI能显著抑制乙醛引起的HA的分泌及 $\alpha 1(I)$ 型胶原mRNA表达,说明KXI有抑制乙醛引起的HSC分泌某些主要ECM增加的作用。

TGF- $\beta$ 是目前已知的重要致肝纤维化的细胞因子之一<sup>[8]</sup>,TGF- $\beta 1$ 有旁分泌和自分泌两种来源,刺激HSC产生I型胶原蛋白及其他基质组分的

能力最强<sup>[9]</sup>. 他既可促进ECM的合成, 又可抑制其降解, 在HSC激活过程中亦起重要作用<sup>[10]</sup>, 因此在肝纤维化形成和发展中起着重要作用<sup>[11]</sup>. 动物活体实验表明, 敲除了smad3(TGF- $\beta$ 受体的下游转录因子)的大鼠没有发展为肝纤维化<sup>[12,13]</sup>. 有学者研究显示中药冬虫夏草的提取物虫草多糖脂质体, 鳖甲、莪术等合剂抗纤软肝冲剂及中药复方护肝片既能分别下调TGF- $\beta$ 1的基因转录<sup>[14]</sup>和抑制TGF- $\beta$ 1蛋白的表达<sup>[15]</sup>, 又能在其基因转录、蛋白表达双水平同时起作用<sup>[16]</sup>. 酒精性肝纤维化中活化的库普弗细胞可分泌TGF- $\beta$ , 使之以旁分泌的形式作用于HSC, 还可通过TNF- $\alpha$ 诱导HSC自分泌TGF- $\beta$ <sup>[17]</sup>, 从而对其产生活化作用. 本研究发现乙醛能刺激体外培养的HSC分泌TGF- $\beta$ 1明显增加, 而KXI可抑制其作用.

目前, 抗氧化剂、TGF- $\beta$ 拮抗剂、信号转导抑制剂、干扰素等可抑制HSC活化的药物已应用于临床或处于试验阶段<sup>[18]</sup>. 此外, 可在多靶点抑制HSC活化的药物可能比单靶点药物更加有效, 已达到更好的抗肝纤维化疗效. 本实验提示乙醛能促进培养的HSC分泌 $\alpha$ 1(I)型胶原、HA等ECM及主要的致肝纤维化细胞因子TGF- $\beta$ 1, 中药KXI则起明显的抑制作用, 即可能从多方面抑制乙醛的致纤维化作用, 为进一步研究酒精性肝纤维化的发生机制及防治提供一定的实验依据.

#### 4 参考文献

- 1 Ismail MH, Pinzani M. Reversal of liver fibrosis. *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15: 72-79
- 2 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 3 林红, 傅宝玉, 王炳元, 傅炜昕, 李异玲, 崔巍. 抗纤复方 I 号对乙醛刺激的肝星状细胞增殖、胶原合成的干预. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 693-694
- 4 Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 618-624
- 5 Burt AD. Pathobiology of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol* 1999; 34: 299-304
- 6 Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 1999; 21: 475-490
- 7 崔巍, 李芳久, 王炳元, 曹艳雪, 傅宝玉. 抗纤复方I号对实验性酒精性肝病大鼠HA、IV-C的影响. *中国医科大学学报* 2001; 30: 64-65
- 8 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 9 Inagaki Y, Okazaki I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 2007; 56: 284-292
- 10 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106
- 11 Akiyoshi S, Ishii M, Nemoto N, Kawabata M, Aburatani H, Miyazono K. Targets of transcriptional regulation by transforming growth factor-beta: expression profile analysis using oligonucleotide arrays. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 257-268
- 12 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- 13 Breitkopf K, Godoy P, Ciuculan L, Singer MV, Doolley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 57-66
- 14 李泓俊, 彭欣辉, 吴应莲, 唐亮. 虫草多糖脂质体对小鼠免疫性肝纤维化TGF- $\beta$ 1 mRNA表达的影响. *医学临床研究* 2004; 21: 500-503
- 15 周正, 刘丽萍, 张赤志, 劳绍贤. 抗纤软肝冲剂对肝星状细胞自分泌转化生长因子 $\beta$ 1的影响. *中国中医药信息杂志* 2003; 10: 21-22
- 16 Wu XL, Zeng WZ, Wang PL, Lei CT, Jiang MD, Chen XB, Zhang Y, Xu H, Wang Z. Effect of compound rhodiola sachalinensis A Bor on CCl4-induced liver fibrosis in rats and its probable molecular mechanisms. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1559-1562
- 17 Neuman MG. Cytokines--central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 307-316
- 18 Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000; 35: 665-672

#### ■同行评价

本研究设计合理, 思路清晰, 但是缺少深度, 希望能进一步探索中药抗纤复方I号的干预机制.

编辑 李薇 电编 何基才

# 抑制JNK信号通路对结肠癌HT-29细胞增殖和凋亡的影响

张志永, 张谢夫

## ■背景资料

JNK是在哺乳动物细胞内广泛存在的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 属于促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族。近年的研究表明JNK信号途径可以调控细胞生长、细胞分化、细胞凋亡、癌基因转化等多个重要的生物学过程, 与多种疾病相关。

张志永, 张谢夫, 郑州大学第一附属医院普通外科 河南省郑州市 450052

作者贡献分布: 此课题由张志永与张谢夫共同设计; 实验及论文写作由张志永完成; 张谢夫指导。

通讯作者: 张谢夫, 教授, 主任医师, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学第一附属医院普通外科. zhangxiefu@medmail.com.cn  
电话: 0371-66292114

收稿日期: 2011-03-05 修回日期: 2011-05-23

接受日期: 2011-06-10 在线出版日期: 2011-06-18

## Inhibition of the JNK signaling pathway suppresses cell proliferation but promotes apoptosis in human colon carcinoma cell line HT-29

Zhi-Yong Zhang, Xie-Fu Zhang

Zhi-Yong Zhang, Xie-Fu Zhang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Xie-Fu Zhang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. zhangxiefu@medmail.com.cn

Received: 2011-03-05 Revised: 2011-05-23

Accepted: 2011-06-10 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway in the proliferation and apoptosis of human colon carcinoma HT-29 cells.

**METHODS:** HT-29 cells were divided into two groups: normal control group and JNK inhibitor group (pretreated with SP600125 for 24 h). MTT assay was used to detect cell proliferation, and TUNEL assay was used to detect apoptosis.

**RESULTS:** The proliferation of HT-29 cells of the JNK inhibitor group was lower than that of the normal control group ( $0.287 \pm 0.008$  vs  $0.479 \pm 0.012$ ,  $P < 0.01$ ). The apoptosis index of HT-29 cells of the JNK inhibitor group was higher than that of the normal control group ( $13.000 \pm 1.080$  vs  $1.000 \pm 0.147$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Inhibition of the JNK signaling pathway significantly inhibited cell proliferation

but promoted apoptosis in human colon carcinoma cell line HT-29.

**Key Words:** c-Jun N-terminal kinase; Colon carcinoma; Proliferation; Apoptosis

Zhang ZY, Zhang XF. Inhibition of the JNK signaling pathway suppresses cell proliferation but promotes apoptosis in human colon carcinoma cell line HT-29. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1830-1833

## 摘要

**目的:** 研究抑制JNK信号通路对结肠癌HT-29细胞增殖和细胞凋亡的影响。

**方法:** 将人结肠癌细胞株HT-29分为正常对照组和JNK抑制剂组(用SP600125预处理细胞24 h), 用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)检测细胞增殖水平, 用脱氧核酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL法)观察细胞凋亡情况。

**结果:** 使用SP600125处理后的HT-29细胞, Western blot法检测p-JNK表达水平。与正常对照组比较p-JNK表达明显降低( $0.246 \pm 0.044$  vs  $1.092 \pm 0.060$ ,  $P < 0.01$ )。与正常对照组比较, JNK抑制剂组细胞增殖水平明显下降( $0.287 \pm 0.008$  vs  $0.479 \pm 0.012$ ,  $P < 0.01$ ), 细胞凋亡指数明显升高( $13.000 \pm 1.080$  vs  $1.000 \pm 0.147$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 抑制JNK信号通路的激活, 可以显著降低人结肠癌细胞HT-29的增殖水平, 并能诱导其细胞凋亡。

**关键词:** c-Jun氨基末端酶; 结肠癌; 细胞增殖; 细胞凋亡

张志永, 张谢夫. 抑制JNK信号通路对结肠癌HT-29细胞增殖和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1830-1833  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1830.asp>

## 0 引言

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤。近几年由于人们饮食习惯和饮食结构的改变以及人口老龄化, 我国结直肠癌的发病率和病死率均保持上升趋势

## ■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属上海市第十人民医院普外科



势. 其中, 结肠癌的发病率上升尤为显著, 大多数患者发现时已属于中晚期<sup>[1]</sup>. 常规的治疗手段如手术、化疗、放疗疗效并不理想. 因此, 进一步阐明结肠癌的发病机制, 寻找有效的干预靶点已经成为国内广大研究者关注的焦点. 本研究初步研究了c-Jun氨基末端酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号转导通路对结肠癌发病的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人结肠癌细胞株HT-29来自中山大学医学院. 胎牛血清、RPMI 1640购自美国Gibco公司. JNK抑制剂SP600125购自上海碧云天公司. TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒及细胞全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物公司. p-JNK抗体购自北京博奥森公司. 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥公司. HRP标记β-actin购自武汉博士德公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组:** 将HT-29细胞冻存管从液氮罐中取出, 迅速置于37℃水浴中, 轻轻摇晃令其尽快融化; 使用无菌吸管吸出细胞悬液, 转移至无菌离心管中, 滴加10 mL培养基, 1 000 r/min离心5 min; 将上清倒去后, 加入培养基作适当稀释, 制成单细胞悬液, 再转入无菌培养瓶中37℃培养箱中培养. 细胞培养2-3 d后, 更换1次培养液, 待细胞长满至80%左右时, 使用胰蛋白酶消化, 使细胞至漂浮状态, 终止消化后1:2分瓶传代. 将HT-29细胞分为正常对照组、JNK抑制剂组. JNK抑制剂组处理前1 d将对数生长期细胞用胰蛋白酶消化后, 接种于6孔板, 保证每孔有 $5 \times 10^5$ 个细胞; 用DMSO将JNK抑制剂SP600125稀释后加入到细胞培养基中, 轻轻晃动使其均匀分布, 使其总浓度60 μmol/L, 培养24 h后收集细胞, 用于细胞增殖以及细胞凋亡检测.

**1.2.2 Western blot检测p-JNK蛋白的表达:** HT-29细胞用PBS清洗2遍; 抽提细胞总蛋白并定量. 取50 μg蛋白样品到10% SDS-PAGE胶上样, 电压90 V, 恒压电泳120 min; 跑好的胶在转膜液中浸泡20 min; 从下至上分别放入滤纸、胶、PVDF膜、滤纸, 夹子夹好放入倒好转膜液的转膜槽中, 电压90 V, 恒压电泳120 min. 将膜取出, 加入5%脱脂奶粉的PBS室温封闭1 h. 分别加入一抗p-JNK(1:200), β-actin(1:1 000)到5%脱脂牛奶中, 在室温下振荡孵育1.5 h, 然后洗膜4次: 1×PBS 15 min 1次; 5 min 3次; 分别加入二抗(1:3 000)到5%脱脂牛奶中, 在室温孵育1 h, 洗膜4

次: 1×PBS 15 min 1次; 5 min 3次; 以1:40比例混合显色基质B液和A液, 均匀滴加膜上, 静置2 min, 用保鲜膜将膜包好, 轻轻挤出多余显色基质, 放入暗盒, 曝光4 min后, 蛋白表达情况使用凝胶成像分析系统进行检测. 获得的图像用软件ImageTool 3.0测灰度值, 并与内参相比得其相对值, 取4次重复实验结果的均值进行比较.

**1.2.3 MTT法检测细胞增殖:** HT-29细胞计数后, 以 $2 \times 10^4$ 的密度接种到96孔细胞培养板中; 细胞预处理后培养24 h, 显微镜下观察贴壁生长良好后每孔加入100 μL的MTT试剂, 继续培养4 h; 除去培养液, 每孔加入150 μL的无血清的DMSO, 振荡10 min充分溶解结晶物; 选择570 nm波长, 在酶标仪上检测各孔吸光度值(A值). 每孔A值减去空白孔A值为测试孔A值. 活细胞数与A值成正比. 每组设4个复孔, 取其平均值.

**1.2.4 TUNEL法检测细胞凋亡:** 蒸馏水浸洗细胞爬片数次. 细胞爬片于PBS洗5 min×3次. 在细胞爬片上滴加TdT酶反应液, 37℃孵育1 h. 细胞爬片于PBS洗5 min×3次. 在细胞爬片上滴加streptavidin-HRP工作液, 37℃孵育30 min. 细胞爬片于PBS洗5 min×3次. DAB显色, 水洗终止反应. 苏木素复染1 min, 自来水冲洗5 min. 脱水、晾干、中性树胶封片, 结果观察. 结果分析方法: 选择10个典型视野, 高倍镜下计数至少1 000个肿瘤细胞, 凋亡指数(apoptosis index, AI) = TUNEL阳性肿瘤细胞数/肿瘤细胞数×100%. 每组设4个复孔, 取其平均值.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计学软件进行数据处理, 统计方法采用两独立样本t检验, 数据以mean±SD表示.

## 2 结果

**2.1 两组HT-29细胞p-JNK蛋白的表达** 正常对照组、JNK抑制剂组HT29细胞中p-JNK的相对表达强度分别是 $1.092 \pm 0.060$ 、 $0.246 \pm 0.044$ , 两组间差异具有统计学意义( $P < 0.01$ , 图1). 此结果表明, JNK抑制剂处理后, p-JNK蛋白的表达被抑制.

**2.2 两组HT-29细胞的增殖** JNK抑制剂组HT-29细胞的增殖明显弱于正常对照组( $0.287 \pm 0.008$  vs  $0.479 \pm 0.012$ ,  $P < 0.01$ ), 这提示抑制JNK信号通路后, 能阻止结肠癌HT29细胞的增殖.

**2.3 两组HT-29细胞的凋亡** TUNEL阳性细胞显示以下特点: 细胞呈圆形、皱缩、核固缩、整个细胞着色深、细胞核内有较强的TUNEL阳性染色, 部分细胞质内也呈现少量阳性染色(图2).

### ■研发前沿

近年来对JNK信号通路的研究主要集中在其激活后对多种生理过程的调节作用方面. 已经证明JNK信号功能的失调与神经退行性疾病、慢性炎症、出生缺陷、癌症等多种疾病的发生直接相关. JNK信号通路的调控方式, 以及和其他信号通路的相互作用是当前本领域的研究热点.

### ■相关报道

She等研究表明JNK基因对TPA诱导的皮肤癌有明显的抑制作用, 而Nateri等的实验却表明JNK磷酸化位点发生突变的小鼠小肠肿瘤变小, 寿命延长.

### ■创新盘点

本研究首次在人结肠癌HT-29细胞中研究了抑制JNK信号通路后其增殖和凋亡变化情况,间接提示了在结肠癌组织中JNK过度表达可能起到了促进细胞增殖,抑制细胞凋亡的作用。

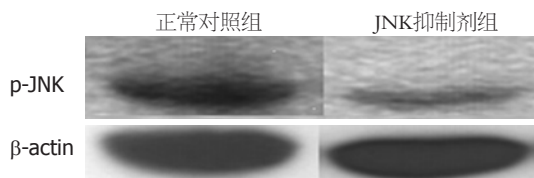


图1 两组HT-29细胞p-JNK的蛋白表达。

JNK抑制剂组的细胞凋亡指数比正常对照组升高( $13.000 \pm 1.080$  vs  $1.000 \pm 0.147$ ,  $P < 0.01$ ). 这说明抑制JNK信号通路后能促进结肠癌HT29细胞的凋亡。

### 3 讨论

JNK是1993年被Hibi等<sup>[2]</sup>发现的促分裂原活化蛋白激酶,是促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的主要成员之一, JNK信号途径可以调控细胞生长、癌基因转化、细胞分化和细胞凋亡等多种病理生理过程<sup>[3,4]</sup>。近年来研究表明, JNK与多种疾病发生机制有关,从而使JNK在临床上可作为一个潜在的分子治疗靶<sup>[5]</sup>。

目前许多实验都观察到在肿瘤组织中JNK活性增高, JNK与肿瘤发生密切相关<sup>[6,7]</sup>。Uhlirova等<sup>[8]</sup>通过致癌物Ras/Raf诱导果蝇肿瘤形成,发现Raf与JNK起协同作用,诱导细胞异常增生。Nateri等<sup>[9]</sup>剔除小鼠c-Jun基因或者改变JNK磷酸化位点时,能使小鼠肠道肿瘤变小,肿瘤细胞减少,并且延长小鼠的寿命。但She等<sup>[10]</sup>的研究却发现,在剔除了JNK基因的小鼠对TPA诱导的皮肤癌有显著敏感性,并且肿瘤数目多、直径大,表明JNK在皮肤癌的发生是一个重要的抑制物。这些研究结果提示JNK信号通路在肿瘤的发生重的作用可能相当复杂和多样化。

JNK信号通路与结肠和结肠癌的相关性也开受到关注。最近的研究发现结肠癌细胞JNK磷酸化可激活其下游成员使结肠癌基质金属蛋白酶的分泌增加,导致结肠癌细胞的运动和侵袭力增加,最终促进癌细胞的转移<sup>[11]</sup>。王若明等<sup>[12]</sup>通过免疫组织化学方法研究72例结直肠癌和40例正常大肠组织中JNK和MRP1蛋白表达及其关系。结果表明, JNK蛋白在结直肠癌组织中的阳性表达率为47.22%,明显高于在正常结肠组织中的表达(7.5%), JNK蛋白阳性表达还与肿瘤分化、淋巴结转移、远处转移及Dukes分期显著相关。以上研究已经说明JNK信号通路的激活可能在促进结肠癌的发生发展中发挥了重要作用。王晓艳等<sup>[13]</sup>研究指出抑瘤基因NGX6在结肠癌

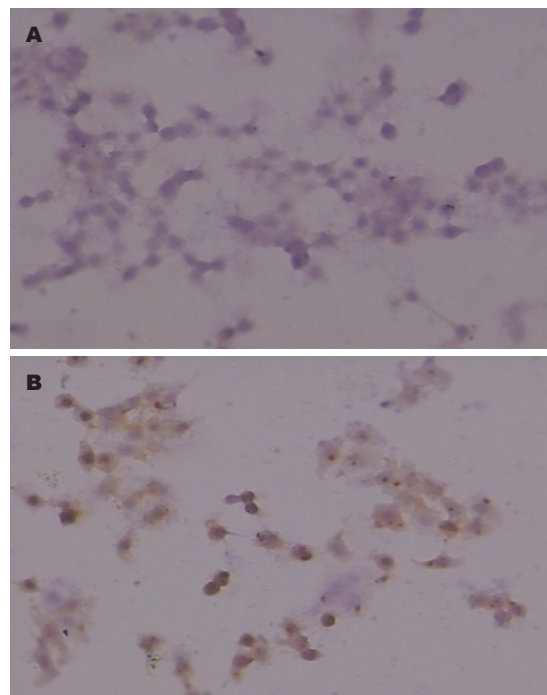


图2 JNK信号通路对结肠癌HT-29细胞凋亡的影响(TUNEL法×200)。A: 正常对照组; B: JNK抑制剂组。

中主要通过抑制JNK通路的活性而发挥其抑瘤作用,这提示阻断JNK信号通路对结肠癌具有一定的抑制作用。本研究采用JNK信号通路的特异性抑制剂SP600125预处理人结肠癌HT-29细胞后,肿瘤细胞的增殖明显得到抑制,结果证实了抑制JNK信号通路的激活可以抑制结肠癌的增殖。

细胞凋亡是一个多基因参与、复杂的生理和病理过程,研究肿瘤细胞的凋亡一直是肿瘤研究领域的重点和热点,细胞凋亡与结直肠癌的发生发展有重要关系<sup>[14]</sup>。目前,通过诱导肿瘤细胞凋亡来治疗肿瘤备受人们关注。郑江华等<sup>[15]</sup>探讨了JNK信号通路在δ氨基酮戊酸-光动力疗法诱导SW480细胞凋亡中的作用,发现激活JNK信号通路可以抑制该疗法诱导SW480细胞凋亡。本研究发现, JNK抑制剂组的人结肠癌HT-29细胞凋亡指数比正常对照组显著增强,说明抑制JNK信号通路后能促进肿瘤细胞凋亡,与郑江华等的报道结果一致。提示我们JNK通路可能成为治疗结肠癌的新靶点,抑制JNK通路的激活可以促进肿瘤细胞的凋亡从而发挥抗肿瘤效应。干预JNK信号通路可以成为防治结肠癌的又一种策略。

### 4 参考文献

- 1 卫生部医政司, 结直肠癌诊疗规范专家工作组. 结直肠癌诊疗规范(2010年版). 中华胃肠外科杂志 2010;

### ■应用要点

本研究证实JNK信号通路对结肠癌的发生发展起重要作用, JNK信号通路可能是结肠癌治疗的潜在靶点之一。

- 13: 865-875
- 2 Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 1993; 7: 2135-2148
- 3 Johnson GL, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1341-1348
- 4 Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 787-795
- 5 Mori Y, Gotoh Y. [Role of the JNK signaling pathway]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2008; 53: 1252-1257
- 6 Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 537-549
- 7 Heasley LE, Han SY. JNK regulation of oncogenesis. *Mol Cells* 2006; 21: 167-173
- 8 Uhlirova M, Jasper H, Bohmann D. Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a Drosophila tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13123-13128
- 9 Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A. Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. *Nature* 2005; 437: 281-285
- 10 She QB, Chen N, Bode AM, Flavell RA, Dong Z. Deficiency of c-Jun-NH(2)-terminal kinase-1 in mice enhances skin tumor development by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 2002; 62: 1343-1348
- 11 周燕红, 何小飞, 高卉, 王瑶芬. JNK信号通路在大肠癌侵袭和转移中的作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2142-2146
- 12 王若明, 杨振, 僧国珍. c-jun氨基末端激酶与多药耐药相关蛋白1在结直肠癌组织中的表达. *中国基层医药* 2009; 16: 1739-1740
- 13 王晓艳, 沈守荣, 刘芬, 彭娅, 李桂源, 范松青. 结肠癌中NGX6抑制EGFR/K-ras/JNK/c-Jun/cyclin D1信号通路的研究. *生物化学与生物物理进展* 2008; 35: 570-576
- 14 郁宝铭, 赵任. 大肠癌分子生物学研究的现状. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 173-175
- 15 郑江华, 陈开, 陈祖林. JNK信号通路在δ氨基酮戊酸-光动力疗法诱导SW480细胞凋亡中的作用机制. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3792-3795

#### ■同行评价

本文结构合理, 条理清晰, 讨论得当, 具有较好的实用价值。

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)



## 间苯三酚在食管疾病特殊内镜诊治中的应用价值

陈念钧, 程斌, 廖家智, 李荣香, 胡继芬, 杨玉珍

### ■背景资料

胃镜在上消化道疾病诊治中起着越来越重要的作用, 随着内镜设备的更新和技术的发展, 食管疾病中也逐步应用了一些新的内镜检查和治疗手段, 频繁的食管痉挛常常影响操作的顺利实施, 延缓操作时间, 甚至影响检查或治疗的效果。

陈念钧, 程斌, 廖家智, 李荣香, 胡继芬, 杨玉珍, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市430030

作者贡献分布: 陈念钧、程斌及廖家智对此文所作贡献均等; 此课题由程斌与廖家智设计; 研究过程由陈念钧、廖家智、李荣香、胡继芬、杨玉珍及程斌操作完成; 本论文写作由陈念钧、廖家智及程斌完成。

通讯作者: 廖家智, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

liaojiashi@tjh.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2011-03-24 修回日期: 2011-05-17

接受日期: 2011-05-24 在线出版日期: 2011-06-18

### Clinical application of phloroglucinol in special endoscopic treatment for esophageal diseases

Nian-Jun Chen, Bin Cheng, Jia-Zhi Liao, Rong-Xiang Li, Ji-Fen Hu, Yu-Zhen Yang

Nian-Jun Chen, Bin Cheng, Jia-Zhi Liao, Rong-Xiang Li, Ji-Fen Hu, Yu-Zhen Yang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Jia-Zhi Liao, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. liaojiashi@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2011-03-24 Revised: 2011-05-17

Accepted: 2011-05-24 Published online: 2011-06-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the application value of Phloroglucinol for Injection in special endoscopic treatment for esophageal diseases, such as narrow-band imaging (NBI) magnifying endoscopy, endoscopic ultrasonography (EUS) and argon plasma coagulation therapy.

**METHODS:** Ninety patients who were willing to accept NBI magnifying endoscopy, EUS or argon plasma coagulation therapy for esophageal diseases (e.g., Barrett's esophagus or early esophageal cancer) were randomly divided into two groups, one using phloroglucinol and the other using 654-2. The frequency of esophagism, operating time and side effects were compared between the two groups.

**RESULTS:** Compared to the 654-2 group, the frequency of esophagism was significantly lower ( $1.45 \text{ c.p.m} \pm 0.68 \text{ c.p.m}$  vs  $2.88 \text{ c.p.m} \pm 1.48 \text{ c.p.m}$ ,  $P < 0.01$ ) and the operating time was significantly shorter ( $174.77 \text{ s} \pm 48.63 \text{ s}$  vs  $225.00 \text{ s} \pm 59.48 \text{ s}$ ,  $P < 0.01$ ) in the phloroglucinol group. Patients of the 654-2 group developed adverse side effects such as dry mouth (5 cases), transient urinary retention (2 cases) and obviously increased heart rate, while patients of the phloroglucinol groups did not.

**CONCLUSION:** Phloroglucinol is likely capable of effectively relieving esophagism and shortening the operating time in special endoscopic treatment for esophageal diseases and causes no adverse side effects like increased heart rate, dry mouth and urinary retention.

**Key Words:** Phloroglucinol; Anisodamine hydrobromide; Endoscopic ultrasonography; Narrow-band imaging endoscopy

Chen NJ, Cheng B, Liao JZ, Li RX, Hu JF, Yang YZ. Clinical application of phloroglucinol in special endoscopic treatment for esophageal diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1834-1838

### 摘要

**目的:** 探讨在食管疾病特殊内镜诊治如窄带成像(NBI)染色放大内镜、超声内镜(EUS)检查以及Barrett's食管氩离子凝固(APC)治疗中注射间苯三酚的应用价值。

**方法:** 选择因食管疾病如Barrett's食管或早癌等进行NBI染色放大内镜检查、Barrett's食管内镜下行APC术以及EUS术等患者90例, 随机分为间苯三酚组和氢溴酸山莨菪碱(654-2)组, 比较观察两组间操作时食管痉挛频次与操作时间的差异, 并分别观察其不良反应情况。

**结果:** 间苯三酚组的食管痉挛频次、操作时间较654-2组显著减少( $1.45 \pm 0.68$  次/min vs  $2.88 \pm 1.48$  次/min;  $174.77 \text{ s} \pm 48.63 \text{ s}$  vs  $225.00 \text{ s} \pm 59.48 \text{ s}$ , 均 $P < 0.01$ ); 但654-2组较间苯三酚组心率显著增快, 且分别有口干(5例)和一过性尿潴留(2例)等不良反应, 而间苯三酚组未

### ■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

发现不良反应。

**结论:** 间苯三酚能有效缓解食管痉挛, 可缩短食管特殊内镜诊治操作时间, 且无心悸、口干与尿潴留等不良反应, 有推广应用价值。

**关键词:** 间苯三酚; 氢溴酸山莨菪碱; 超声内镜; 窄带成像内镜

陈念钧, 程斌, 廖家智, 李荣香, 胡继芬, 杨玉珍. 间苯三酚在食管疾病特殊内镜诊治中的应用价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1834-1838  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1834.asp>

## 0 引言

胃镜是上消化道疾病诊治的重要手段, 随着内镜技术的发展, 一些新的内镜检查和治疗手段逐步应用于食管疾病, 如窄带成像(narrow-band imaging, NBI)染色放大内镜应用于Barrett食管, 食管早癌, 内镜超声检查术(endoscopic ultrasonography, EUS)判断食管隆起性病变和食管癌TN分期, 氩离子凝固(organ plasma coagulation, APC)术治疗Barrett's食管<sup>[1-5]</sup>等。但频繁的食管痉挛常常影响操作的顺利实施, 延缓操作时间, 甚至影响检查或治疗的效果。常用的解痉药氢溴酸山莨菪碱(654-2)可在一定程度减轻食管痉挛, 但效果欠佳, 且因诱发心率加快也影响内镜观察和操作。另外还有引起口干、心悸、尿潴留等不良作用。间苯三酚(phloroglucinol)是一种非阿托品、非罂粟碱类纯平滑肌解痉药, 能直接作用于消化系统平滑肌, 解痉效果佳, 不良作用少<sup>[6]</sup>。本研究旨在观察注射用间苯三酚在食管疾病特殊内镜诊治中的应用情况。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集华中科技大学同济医学院附属同济医院2010-06/2010-11因食管疾病如Barrett's食管或早癌等进行NBI染色放大内镜检查、Barrett's食管内镜下APC以及EUS等的患者90例。男63例, 女27例, 中位年龄47(16-69)岁。根据就诊顺序随机分为间苯三酚组和654-2组, 其中间苯三酚组60例, 男42例, 女18例, 中位年龄47(18-69)岁; 654-2组30例, 男21例, 女9例, 中位年龄47(16-68)岁。间苯三酚组中染色放大内镜、APC治疗与EUS各20例, 654-2组中各10例。两组患者在性别、年龄、引起食管疾病及检查项目等方面均无统计学差异。

**1.2 方法** 内镜检查前常规禁食8 h以上。观察组于术前15 min肌注间苯三酚10 g/4 L, 对照组肌注氢溴酸山莨菪碱(654-2)注射液10 mg, 两组患者均于术前5-10 min口服胃镜用利多卡因胶浆10 mL。内镜检查和治疗由3名具有5年以上操作经验的内镜专家完成, 食管痉挛次数、操作时间等观察指标由专一护士按操作医师指令记录。

**1.2.1 食管痉挛次数与操作时间** 用药后15-20 min开始操作, 操作过程中观察记录每分钟食管痉挛次数, 并根据如下标准评级: 优: 0-1次/min; 良: 2-4次/min; 中: 5-8次/min; 差:  $\geq 8$ 次/min。操作完毕以秒为单位记录操作时间。

**1.2.2 对心率、血压、氧饱和度的影响** 操作过程中监护患者的心率、血压、氧饱和度等各项生命体征。操作结束后观察询问并记录患者有无过敏反应、口干、头晕、心悸、尿潴留等不良反应。

**统计学处理** 计数资料以频数及百分率表示, 应用SPSS13.0统计软件进行统计学分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 食管痉挛次数** 间苯三酚组的食管痉挛次数为 $(1.45 \pm 0.68)$ 次/min, 而654-2组的食管痉挛次数为 $(2.88 \pm 1.48)$ 次/min, 差异有极显著性( $P<0.01$ , 图1A); EUS检查中间苯三酚组的食管痉挛次数也明显少于654-2组 $(1.43 \pm 0.54$  vs  $3.35 \pm 1.56$ ,  $P<0.01$ , 图1B)。在NBI放大内镜和APC治疗内镜中, 两组的食管痉挛次数均存在显著差异 $(1.24 \pm 0.66$  vs  $2.80 \pm 1.87$ ,  $P<0.05$ , 图1C;  $1.69 \pm 0.76$  vs  $2.5 \pm 0.85$ ,  $P<0.05$ , 图1D)。

**2.2 操作时间** 间苯三酚组的操作时间为 $174.77 \pm 48.63$  s, 而654-2组的操作时间为 $225.00 \pm 59.48$  s, 差异有极显著性( $P<0.01$ , 图2A); 在NBI放大内镜和APC治疗内镜中, 两组的操作时间也存在显著差异 $(150.75 \pm 29.48$  s vs  $224.80 \pm 74.02$  s,  $P<0.05$ , 图2B;  $167.00 \pm 42.27$  s vs  $207.10 \pm 57.35$  s,  $P<0.05$ , 图2C); 但在EUS检查中间苯三酚组与654-2组间操作时间无显著差异 $(206.55 \pm 54.34$  vs  $243.10 \pm 43.71$ ,  $P>0.05$ , 图2D)。

**2.3 间苯三酚及654-2对心率、氧饱和度与血压的影响** 间苯三酚与654-2相比对患者氧饱和度与血压的影响均无显著差异, 但654-2组心率较间苯三酚组显著增快(表1)。

**2.4 间苯三酚与654-2不良反应比较** 操作结束后观察间苯三酚组无一例出现过过敏反应、口

### ■研究前沿

新的检查和治疗手段无疑都提高了食管疾病诊治水平, 但在进行这些食管疾病特殊内镜诊治操作过程中由于机械刺激和患者的紧张情绪, 往往会出现恶心、频繁的食管痉挛影响操作的准确性。

### ■应用要点

间苯三酚能有效缓解食管痉挛,可缩短食管特殊内镜诊治操作时间,且无心悸、口干与尿潴留等不良反应,有推广应用价值。

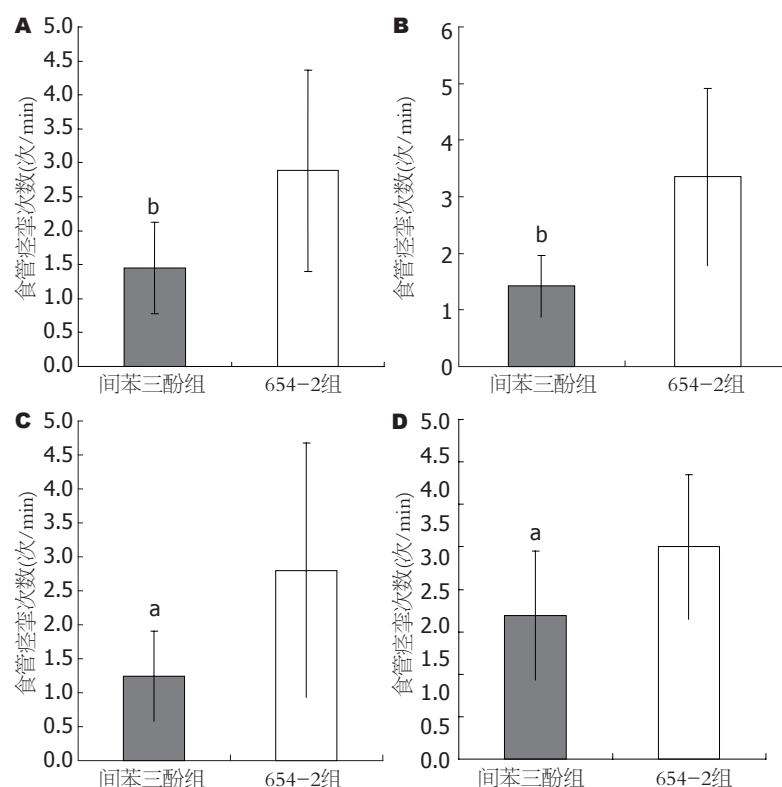


图1 间苯三酚和654-2在食管疾病特殊内镜检查和治疗中食管痉挛次数(次/min)的比较. A: 总体比较; B: EUS检查的比较; C: NBI放大检查的比较; D: APC治疗的比较. <sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 654-2组.

干、头晕、心悸、尿潴留等不良反应. 而30例654-2组患者中出现心悸13例(43.3%)、口干5例(16.7%), 一过性尿潴留2例(6.7%).

### 3 讨论

胃镜在上消化道疾病诊治中起着越来越重要的作用, 随着内镜设备的更新和技术的发展, 食管疾病中也逐步应用了一些新的内镜检查和治疗手段, 如应用乙酸染色放大内镜与NBI染色放大内镜检查Barrett's食管和食管早癌<sup>[9]</sup>、APC治疗Barrett's食管<sup>[10-17]</sup>、EUS判断各种食管隆起性病变和食管癌TN分期等<sup>[18,19]</sup>. 这些新的检查和治疗手段无疑都提高了食管疾病诊治水平, 但在进行这些食管疾病特殊内镜诊治操作过程中由于机械刺激和患者的紧张情绪, 往往会出现恶心、频繁的食管痉挛影响操作的准确性. 加上食管位于胸腔, 易受呼吸及心跳搏动的干扰, 这给需要精确定位和精细操作的食管染色放大内镜、EUS检查以及APC凝固治疗带来一定困难, 需要应用一些安全的药物来缓解这种刺激, 为顺利实施这些特殊的内镜诊治创造条件.

传统的方法是操作前注射安定缓解患者紧张情绪, 注射解痉药654-2缓解食管痉挛. 但在我们的临床实践中发现654-2虽可一定程度缓解食管平滑肌的痉挛, 但起效较慢, 且因其可致心率增快也影响了食管疾病特殊内镜诊治的精细操

作. 另外因654-2为胆碱受体阻滞剂, 不良反应较多, 如口干、心悸、尿潴留等, 尤其是老年人和青光眼患者, 其临床应用有局限性.

间苯三酚是一种亲肌性解痉药, 选择性作用于痉挛的平滑肌, 不影响平滑肌正常的生理收缩, 具有解痉镇痛快, 效果显著, 安全系数高和不良反应少等优点<sup>[6-8]</sup>. 本组选择因食管疾病如Barrett's食管或早癌等进行NBI染色放大内镜检查、Barrett's食管内镜下APC以及EUS等患者90例, 随机分为间苯三酚组(60例)和654-2组(30例), 分别观察两组患者每分钟食管痉挛次数和操作时间, 结果发现间苯三酚组的食管痉挛次数为(1.45±0.68)次/min, 较654-2组(2.88±1.48)次/min显著减少; 60例使用间苯三酚的病例平均操作时间为174.77 s±48.63 s, 而30例使用654-2组者为225.00 s±59.48 s, 二者差异也有显著性, 表明间苯三酚与654-2相比可更好地缓解食管痉挛, 缩短食管特殊内镜诊治的操作时间. 进一步分层分析发现, 在NBI放大内镜和APC治疗内镜中, 间苯三酚组食管痉挛次数较654-2组显著减少, 操作时间也明显缩短; 而在EUS检查中虽然间苯三酚组较654-2组的食管痉挛次数明显少于654-2组, 但两组间操作时间并无显著差异, 可能因为水是超声检查必需的介质, EUS检查需要食管病灶部位充分蓄水, 过分的解痉反而不利于食管腔内蓄水反而影响超声检查, 因此对食管



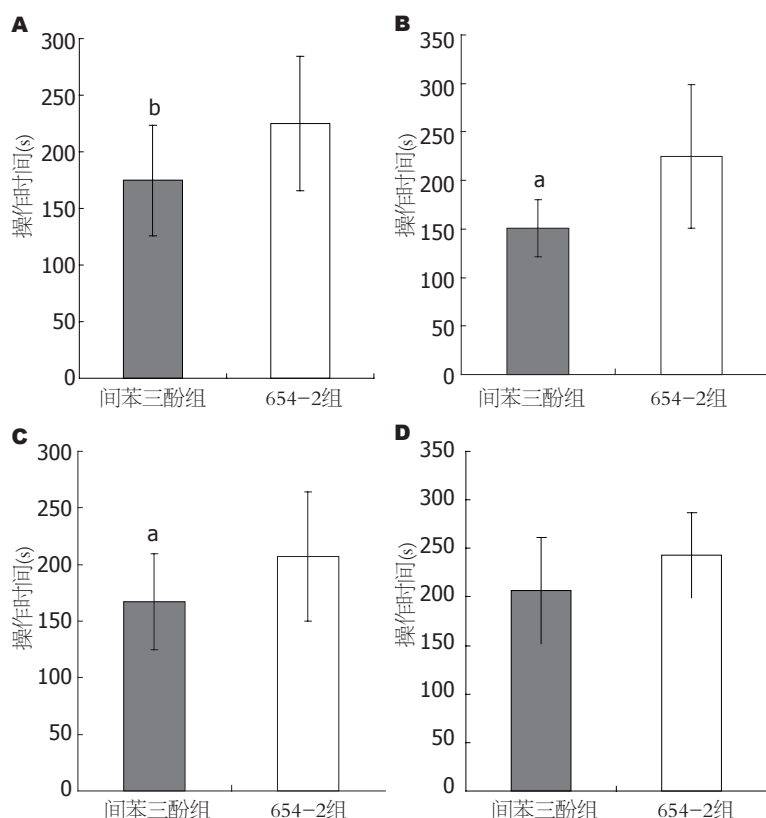


图2 间苯三酚和654-2在食管疾病特殊内镜检查和治疗中操作时间(s)的比较。A: 总体比较; B: NBI放大检查的比较; C: APC治疗的比较; D: EUS检查的比较; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 654-2组。

■ 同行评价  
本文选题新颖, 具有较大的实用价值和临床意义。

表1 间苯三酚组及654-2组心率、呼吸及血压的影响

分组	n	心率(次/min)	氧饱和度(%)	血压(mmHg)
间苯三酚组	60	74.5 ± 2.8	98.4 ± 1.2	133.3 ± 5.2/82.3 ± 3.6
654-2组	30	86.7 ± 3.5	97.8 ± 1.6	132.7 ± 6.4/79.6 ± 4.5
P值		<0.05	>0.05	>0.05

染色放大内镜检查和APC凝固治疗间苯三酚可通过良好的解痉作用为精细操作创造条件, 从而缩短操作时间, 而对EUS因解痉不利于蓄水反而延长操作时间。

本组研究还观察了间苯三酚与654-2不良反应间的差异, 动态监护显示两组间氧饱和度与血压均无显著差异, 但654-2组心率较间苯三酚组显著增快, 出现心悸13例(43.3%), 且分别有口干(5例, 16.7%)和一过性尿潴留(2例, 6.7%)等不良反应, 而间苯三酚组未发现副反应。提示间苯三酚在提高操作效率的同时也具有更好的安全性。

总之, 在食管疾病特殊内镜诊治前注射用间苯三酚, 能更有效地缓解食管痉挛, 明显缩短食管染色放大内镜检查和APC凝固治疗的操作时间; 对食管EUS检查因影响蓄水并未减少操作时间。与654-2相比, 间苯三酚具有更好的安全性。当然, 其费用相对较高, 且本组病例样本量

较少, 其可靠性还需进一步扩大样本, 开展多中心的研究进一步验证。

#### 4 参考文献

- 1 Yusoff I, Brennan F, Ormonde D, Laurence B. Argon plasma coagulation for treatment of watermelon stomach. *Endoscopy* 2002; 34: 407-410
- 2 Morice RC, Ece T, Ece F, Keus L. Endobronchial argon plasma coagulation for treatment of hemoptysis and neoplastic airway obstruction. *Chest* 2001; 119: 781-787
- 3 Wahab PJ, Mulder CJ, den Hartog G, Thies JE. Argon plasma coagulation in flexible gastrointestinal endoscopy: pilot experiences. *Endoscopy* 1997; 29: 176-181
- 4 Probst A, Scheubel R, Wienbeck M. Treatment of watermelon stomach (GAVE syndrome) by means of endoscopic argon plasma coagulation (APC): long-term outcome. *Z Gastroenterol* 2001; 39: 447-452
- 5 Subasinghe D, Samarasekera DN. A study comparing endoscopic ultrasound (EUS) and computed tomography (CT) in staging oesophageal cancer and their role in clinical decision making. *J Gastrointest Cancer* 2010; 41: 38-42
- 6 章昱, 陈小婧, 钟敏. 间苯三酚在胃镜检查术中的应用

- 效果观察. 河北医学 2010; 16: 720-721
- 7 高宝来, 余剑波. 间苯三酚在无痛胰胆管造影术中的应用. 中国中西医结合外科杂志 2010; 16: 362-364
- 8 方娟, 李小行, 韦文明, 杨佩然, 严衍伟. 肌注间苯三酚对结肠镜检查患者疼痛影响的研究. 医药与保健 2009; 7: 1-2
- 9 吴玉芳, 刘浩, 李铁西, 胡伟, 周晓黎, 毛德华, 时昭红. 染色放大内镜下氩气凝固治疗Barrett食管的治疗效果观察. 内科急危重症杂志 2009; 3: 154-155
- 10 于洪军. 无痛苦胃镜下APC治疗疣状胃炎的临床价值. 中国保健营养 2010; 5: 211-211
- 11 高云飞, 高伟, 宋伟, 周长江. 氩离子凝固术治疗消化道息肉的疗效观察. 临床急诊杂志 2005; 6: 22-23
- 12 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲. 内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉. 世界华人消化杂志 2004; 12: 481-483
- 13 汤淼, 吴文朝, 文丽彬, 黄瑞萍, 涂伟琼, 喻品开. 内镜下氩离子凝固术联合去甲肾上腺素喷洒治疗消化道出血的研究. 江西医药 2010; 45: 796-798
- 14 陈伟, 黄中华, 周旋光, 陈思杰, 薛鹏星, 陈子爱. 氩离子凝固术联合雷贝拉唑钠治疗Barrett食管疗效观察. 实用全科医学 2007; 5: 344-345
- 15 史伟, 韩树堂, 徐肇敏, 魏静义, 陈隆典. 氩离子凝固术对食管黏膜损伤的探讨. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 171-173
- 16 吴云林, 冯莉. 氩离子凝固术在内镜治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2000; 8: 607-609
- 17 贾爱芹, 尚瑞莲, 孙自勤, 陈桂荣, 刘晓峰. 氩离子凝固术在消化系统疾病中的应用. 解放军医学杂志 2006; 31: 1178-1179
- 18 后冬梅, 许良碧, 李娟, 段晨虹, 徐艳. 无痛苦食管小探头超声内镜检查的术中配合. 护士进修杂志 2008; 23: 448-449
- 19 徐永居, 朱海杭, 刘军, 陈娣, 汤东, 王道荣. 超声内镜(EUS)在上消化道疾病临床应用中的初步探讨. 实用临床医药杂志 2007; 12: 87-88

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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 0.625

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果11月26日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,2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次,影响因子0.625,综合评价总分49.4分,分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位,分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位;其他指标:即年指标0.112,他引率0.79,引用刊数473种,扩散因子15.72,权威因子1 170.03,被引半衰期4.0,来源文献量752,文献选出率0.93,地区分布数30,机构分布数30,基金论文比0.39,海外论文比0.01.

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊).(编辑部主任:李军亮 2010-11-28)

# 超声血流参数对肝硬化门脉高压症的诊断价值

雷震, 杨世梅, 李加平, 邱冬, 罗燕

雷震, 杨世梅, 李加平, 邱冬, 深圳市南山区人民医院超声科  
广东省深圳市 518052

罗燕, 四川大学华西医院 四川省成都市 610041

作者贡献分布: 此课题由雷震与罗燕设计; 研究过程、数据分析和解释、统计由雷震操作完成; 杨世梅、李加平及邱冬给予行政上支持性贡献; 本论文写作由雷震完成。

通讯作者: 罗燕, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院.  
luoyan77@vip.sina.com

电话: 028-85423192

收稿日期: 2011-03-27 修回日期: 2011-05-11

接受日期: 2011-06-02 在线出版日期: 2011-06-18

## Diagnostic value of hemodynamic parameters measured by ultrasound in patients with hepatic cirrhosis and portal hypertension

Zhen Lei, Shi-Mei Yang, Jia-Ping Li, Dong Qiu, Yan Luo

Zhen Lei, Shi-Mei Yang, Jia-Ping Li, Dong Qiu, Department of Sonography, Nanshan Hospital, Shenzhen 518052, Guangdong Province, China

Yan Luo, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Yan Luo, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. luoyan77@vip.sina.com

Received: 2011-03-27 Revised: 2011-05-11

Accepted: 2011-06-02 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To compare ultrasonic hemodynamic parameters with portal vein pressure measured via a catheter placed in transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) to search the optimal ultrasonic parameters.

**METHODS:** Twenty-five patients with hepatic cirrhosis (HC) were observed in this randomized double-blind trial. These patients were divided into experimental group (PVPG  $\geq 6.8$  cmH<sub>2</sub>O,  $n = 18$ ) and control group (PVPG  $< 6.8$  cmH<sub>2</sub>O,  $n = 7$ ). Intragroup differences were compared using single factor variance analysis. The ROC curve is used to evaluate the diagnostic value of ultrasonic parameters.

**RESULTS:** The diameters of the portal vein (PV), splenic vein (SV) and superior mesenteric vein

(SMV) were higher and that of the inferior vena cava (IVC) was lower in the experimental group than in the control group. PV flow velocity was lower and the blood flow volumes of the SV and SMV were higher in the experimental group than in the control group. ROC curve analysis showed that PV diameter is the optimum parameter for qualitative diagnosis of portal hypertension, with a sensitivity of 94.4%, a specificity of 57.1%, an accuracy of 84%, and a Youden index of 0.515.

**CONCLUSION:** Ultrasound has a high sensitivity and accuracy in qualitative diagnosis of portal hypertension.

**Key Words:** Cirrhosis; Portal hypertension; Transjugular intrahepatic portosystemic shunt; Ultrasound; Hemodynamics

Lei Z, Yang SM, Li JP, Qiu D, Luo Y. Diagnostic value of hemodynamic parameters measured by ultrasound in patients with hepatic cirrhosis and portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1839-1842

## 摘要

**目的:** 研究超声参数对门脉高压的诊断价值。

**方法:** 以经颈静脉门体静脉分流术(TIPS)中导管测量的门体静脉压差 $\geq 6.8$  cmH<sub>2</sub>O为诊断PHT(PHT)的金标准, 将25例肝硬化患者分为试验组(18例)和对照组(7例), 利用随机双盲法研究两组的超声血流参数, 使用单因素方差分析组间差异, 利用受试者工作曲线ROC曲线分析诊断门脉高压超声参数的最佳指标。

**结果:** 发现试验组PV、脾静脉、肠系膜上静脉内径大于对照组, 下腔静脉内径低于对照组。PV流速低于对照组, 而脾静脉及肠系膜上静脉的流量高于对照组。根据ROC曲线确定的最佳超声参数是PV内径, 以门脉内径 $\geq 1.45$  cm为诊断标准, 其诊断门脉高压的敏感度为94.4%、特异度为57.1%, 准确率为0.84, Youden指数为0.515。

**结论:** 超声对肝硬化门脉高压定性诊断敏感

## ■背景资料

在我国, 肝硬化最常见的病因是乙型肝炎, 其感染率高, 人口基数大, 具有潜在的危险性。而门静脉高压及其并发症如食管静脉曲张破裂出血是肝硬化患者死亡的主要原因, 并且门静脉高压的严重程度和患者的生存预后密切相关。研究门静脉高压血流动力学对揭示门静脉高压形成机制、指导临床治疗有重大意义。近年来, 有关门静脉高压症的血液动力学研究手段主要有门静脉压力测定、核磁共振血流显像(MRA)及超声检查。

## ■同行评议者

杨建民, 教授, 浙江省人民医院消化内科



## ■研发前沿

目前超声的研究主要集中在对门静脉高压定性和定量诊断, 定性诊断门脉高压研究较多, 但是多数研究的金标准未选取更稳定准确的门静脉压力测值, 这使得超声定性诊断门脉高压的准确性和效能性有一定的差异, 超声参数定性诊断门脉高压的标准未得到统一. 定量诊断门脉高压的研究较少, 目前超声定量估计门静脉压力方法还未能得到临床实际运用的认可.

## ■相关报道

有超声定性诊断门静脉高压的报道认为门静脉血流速度低于13 cm/s, 诊断门脉高压敏感性、特异性分别为83%和85%; 还有报道声称门静脉血流速度低于20 cm/s诊断门脉高压敏感性、特异性分别为100%和78%; 也有报道认为门脉高压组与正常组的门静脉内径、流速无统计学差异.

性及准确率较高.

**关键词:** 肝硬化; PHT症; 经颈静脉门体静脉分流术; 超声显像; 血流动力学

雷震, 杨世梅, 李加平, 邱冬, 罗燕. 超声血流参数对肝硬化门脉高压症的诊断价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1839-1842

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1839.asp>

## 0 引言

中国肝硬化最常见的病因是乙型肝炎, 其感染率高, 人口基数大, 具有潜在的危险性. 而门静脉高压(portal hypertension, PHT)及其并发症如食管静脉曲张破裂出血是肝硬化患者死亡的主要原因, 并且PHT的严重程度和患者的生存预后有着密切的关系. 超声能够研究门静脉(portal vein, PV)的血流动力学并且具有无创、快速便捷、经济的优点, 利用超声研究PHT具有非常重要的临床应用意义. 本实验目的是用超声观察肝硬化PHT的血流动力学, 如PV、脾静脉、肠系膜上静脉的内径、流速、流量, 并以经颈静脉门体静脉分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)中导管测量的门体静脉压差为诊断PHT的金标准, 利用ROC曲线研究超声血流参数定性诊断PHT的最佳指标.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2007-06/2008-02在本院成功进行TIPS手术的临床诊断为肝硬化PHT的患者25例. 以术中导管测量计算门体压差 $\geq 6.8 \text{ cmH}_2\text{O}$  (5 mmHg)共18例为试验组,  $< 6.8 \text{ cmH}_2\text{O}$  (5 mmHg)共7例为对照组. 超声研究仪器为德国西门子的SEQUOIA 512全身数字化彩色多普勒超声诊断仪.

### 1.2 方法

**1.2.1 超声参数测量:** 在TIPS术前检测PV、脾静脉及肠系膜上静脉主干的内径(D), 最大血流速度( $V_{\max}$ )并根据森安史典用同型号仪器实验得出的经验公式计算平均血流速度( $V_{\text{mean}} = 0.57 \times V_{\max}$ )和血流量( $Q = 1/4 \pi D^2 V_{\text{mean}} \times 60$ ); 使用2.0-6.0 M可变频凸阵探头, 超声测量严格遵循试验设计要求, 调节相应的技术参数如使用尽可能低的脉冲重复频率以防止混迭; 增大时间增益补偿以减少背景噪声; 取样容积应置于被研究血管管腔中间并根据血管内径调整大小至2-5 mm; 声束与血流方向夹角 $< 60^\circ$ . 患者检查前空

腹8 h以上, 检查体位为仰卧位及左侧卧位, 在剑下、右肋间及右肋缘下进行超声扫查.

**1.2.2 导管测压:** 取平卧位局麻后于TIPS术中穿刺导入多孔导管至下腔静脉肝后段及PV主干分叉前1 cm处, 以腋中线为零点, 采用玻璃管水柱压力表分别测量下腔静脉压力及PV压力.

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计学软件对所有结果进行统计分析. 两组年龄、性别、PV、脾静脉及肠系膜上静脉内径、流速和流量采用一维方差分析; 利用受试者工作曲线(ROC曲线)研究PV、脾静脉及肠系膜上静脉内径、流速和流量.

## 2 结果

**2.1 试验组与对照组之间血管内径、流速、流量的比较** 以门体压差 $\leq 6.8 \text{ cmH}_2\text{O}$  (5 mmHg)为试验组, 以门体压差 $> 6.8 \text{ cmH}_2\text{O}$  (5 mmHg)为对照组, 两组间差异采用单因素方差分析. 试验组PV、脾静脉、肠系膜上静脉内径大于对照组 ( $P < 0.05$ ). 试验组PV流速低于对照组 ( $P < 0.05$ ). 试验组脾静脉及肠系膜上静脉的流量高于对照组 ( $P < 0.05$ , 表1-3).

**2.2 利用ROC曲线确定超声血流参数诊断PHT的临界值** 由于PV、脾静脉及肠系膜上静脉的内径、流速及流量诊断PHT的公认参考值尚未确定, 故本研究用ROC曲线确定具有临床诊断意义的临界值, 研究其诊断PHT的效果. 本研究结果中PV流速、流量和脾静脉内径、流速、流量及肠系膜上静脉流量的ROC曲线下面积 $< 50\%$ , 没有临床诊断意义, 故未做进一步诊断性试验.

本研究发现PV内径、肠系膜上静脉内径及其流速ROC曲线下的面积 $> 50\%$ , 可认为有临床诊断意义, 以经TIPS术中导管直接测量的PV压力为金标准统计出PV内径、肠系膜上静脉内径及其流速以医学参考临界值分别为1.45 cm、1.15 cm, 17.55 cm/s, 其诊断PHT的敏感度分别为94.4%、44.4%、72.2%; 特异度分别为57.1%、71.4%、57.1%; 准确度分别为0.84、0.52、0.68; 根据受试者工作曲线ROC曲线确定的最佳超声参数是门脉内径, 以门脉内径 $\geq 1.45 \text{ cm}$ 为诊断标准, 其诊断PHT的敏感度为94.4%、特异度为57.1%, 准确率为0.84, Youden指数为0.515. 平行试验显示PV、肠系膜上静脉内径只要有1项阳性, 则诊断PHT的敏感度可提高到98.4%、特异度为40.7%; 序列试验显示PV内径、肠系膜上静脉内径及流速都为阳性时, 诊断PHT的特异度可

表 1 试验组与对照组二维超声测量血管内径的比较 (cm)

	试验组	对照组
下腔静脉	1.49 ± 0.11	1.60 ± 0.12 <sup>a</sup>
PV	1.60 ± 0.13	1.22 ± 0.17 <sup>b</sup>
脾静脉	1.09 ± 0.18	0.74 ± 0.23 <sup>b</sup>
肠系膜上静脉	1.14 ± 0.06	1.01 ± 0.16 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 试验组.

表 2 试验组与对照组多普勒超声测量血管流速的比较 (cm/s)

	试验组	对照组
下腔静脉	30.78 ± 5.60	29.56 ± 5.44
PV	11.89 ± 3.23	17.84 ± 2.99 <sup>b</sup>
脾静脉	17.16 ± 2.73	17.07 ± 3.65
肠系膜上静脉	17.32 ± 2.68	16.95 ± 2.06

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs 试验组.

提高到87.7%、敏感度为30.2%.

### 3 讨论

PHT是由于PV系统血液回流在肝内或PV主干内受到阻碍, 血流淤滞, 使PV系统的压力增高形成. PV压力取决于内脏的血流量、肝流出道的阻力及下腔静脉的压力, 其中肝脏血流阻力的增加是主要因素<sup>[1]</sup>. 近10年来, 随着各类PHT症动物模型的建立, 人们逐渐发现PHT症的发病机制与血液动力学之间存在着密不可分的关系<sup>[2]</sup>. 根据压力增加的原因, 人们提出了血流量因素(“前向血流”学说)和阻力因素(“后向血流”学说)的学说. “后向血流”学说首先被Whipple提出, 该学说认为PV压强的主要决定因素是PV血管阻力, PHT时脾静脉压力较周围静脉压力高2-5倍, 但PV系统血流量维持不变或减少, PHT的形成是由于PV血管阻力增加即PV系统被动充血所致<sup>[3]</sup>. “前向血流”的学说于1983年被Witte等提出, 该学说认为PV血管阻力增加是PHT的始动因素, 随着PV侧支循环的形成, PV血管阻力下降, PHT得以缓解, 随之以来的肠系膜高动力循环会增加PV血流量, 致使PHT的持续存在<sup>[4]</sup>. 1985年Benoit等通过老鼠实验发现, 血流量因素(“前向血流”<sup>[4]</sup>学说)和阻力因素(“后向血流”<sup>[3]</sup>学说)PHT形成相对重要性分别约为40%和60%, 说明两种机制对PHT形成均起作用<sup>[5]</sup>.

通过以上PHT的发病机制可知, PV压力

表 3 试验组与对照组超声估计血管流量的比较 (mL)

	试验组	对照组
下腔静脉	1 875.35 ± 351.13	2 015.5 ± 460.20
PV	789.36 ± 127.91	707.69 ± 92.34
脾静脉	556.56 ± 181.45	264.82 ± 138.13 <sup>b</sup>
肠系膜上静脉	604.56 ± 112.57	477.37 ± 154.35 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 试验组.

主要是由PV系血流量及血管阻力共同决定的. PHT时, 超声能获得的PV、脾静脉、肠系膜上静脉的血管内径, 平均流速, 从而计算血流量. 多数认为PHT时肝脏血流量会增加<sup>[6,7]</sup>. 有认为Child-Pugh A+B级的患者PV、脾静脉及肠系膜上静脉流量均会增加, 但Child-Pugh C级的患者脾静脉及肠系膜上静脉流量与正常对照组比较没有差异<sup>[8]</sup>. 还有认为PHT组的PV及脾静脉流量较正常组增加<sup>[9]</sup>, 这说明PHT症时内脏处于高流量循环状态, 符合“前向血流”机制.

本研究发现试验组(PHT)患者PV流量无差异, 而肠系膜上静脉和脾静脉血流量较对照组(非PHT)增加, 这说明PHT时内脏处于高流量循环状态, 符合“前向血流”机制.

多数研究发现PHT时肝脏血流量会增加, 但并未研究PV及其属支血流量定性诊断PHT的效果<sup>[6,7]</sup>, 本研究结果中PV、脾静脉及肠系膜上静脉流量ROC曲线下面积均<50%, 由于其差异没有临床诊断意义而未纳入, 其原因可能有2个: 一是本研究样本含量少, 未能反映总体的真实情况; 二是本研究纳入的样本多为较严重PHT患者, 可能由于门脉侧枝的开放, 门脉流量的变化开始受更多因素的影响. 有动物实验的压力流量曲线显示: 随着压力的升高, 曲线上有一部分压力变化十分明显, 但相应的流量变化并不明显<sup>[10]</sup>, 这也许可以部分解释本研究血流量差异没有临床诊断意义这一现象.

PV压力主要是由PV系血流量及血管阻力共同决定的. PHT时, 肝实质纤维化和小血管痉挛, 肝内阻力升高造成肝窦压力升高, 再扩散至门脉, 从而形成PHT<sup>[11]</sup>. 一般认为肝内阻力升高可间接表现为PV及其属支内径增宽, 流速减慢. 多数研究也都发现PHT PV、脾静脉、肠系膜上静脉内径增宽<sup>[12-14]</sup>, 本研究亦发现如此, 试验组患者PV、肠系膜上静脉和脾静脉内径较对照组增大, 以及PV流速较对照组降低, 而PV血流量两组无差异, 反映出PHT时血管阻力是主要

### ■创新盘点

本试验与其他相关、或类似文章、报道的不同点以及创新之处在于选用了经颈静脉门体静脉分流术(TIPS)中导管直接测量的门静脉压力为金指标与超声测量的血流动力学指标对比; 运用诊断性实验的ROC曲线分析超声定性诊断门静脉高压的价值; 采用双盲随机方法.

## ■同行评价

本文具有较好的临床实用价值和指导意义,值得推荐给广大读者。

因素, PV流量不变, 符合“后向血流”机制。本研究发PHT时PV内径、PV和肠系膜上静脉的血流量均增加并且PV流速减慢, 支持“前向血流”和“后向血流”机制均起作用的观点。

一般认为能够反映PV血流动力学变化的超声参数对PHT的定性诊断具有较好的准确度。但是具体是哪一个超声参数诊断的效果好以及用多大的医学参考值还未取得一致意见。比如PV流速定性诊断PHT的标准报道有差异: 有报道PV血流速度低于13 cm/s, 诊断PHT敏感性 & 特异性分别为83%和85%<sup>[15]</sup>; 还有报道称PV血流速度低于20 cm/s诊断PHT敏感性 & 特异性分别为100%和78%<sup>[16]</sup>; 也有报道认为试验组与对照组的PV内径、流速无统计学差异<sup>[17]</sup>。上述研究均采用临床表现诊断PHT的标准。而本研究PV流速ROC曲线下面积<50%, 故未做进一步诊断性试验。由于本研究样本量偏少, PV流速是否具有PHT诊断的临床意义还需更深入的探讨。

多数研究表明PHT时PV内径会增大, 但并未研究PV内径定性诊断PHT的效果<sup>[12-14]</sup>。本研究中以TIPS术中导管直接测压为诊断PHT标准, 发现门脉内径以 $\geq 1.45$  cm为诊断标准诊断PHT的敏感度为94.4%, 诊断准确率为84%, 可作为较好的诊断指标。但PV内径诊断PHT的特异性较低仅为44.4%, 诊断准确度84%为中等; 利用验后概率计算公式得知当门脉内径等于1.45 cm时, 存在PHT的概率为仅为61%。而肠系膜上静脉内径及流速的ROC曲线下面积均<0.70, 诊断准确度均较低。本研究PV内径表现出较高的PHT诊断敏感性和较低的特异性原因一可能是测量者事先知道试验对象均被临床诊断为PHT, 测量时可能会夸大测值, 降低了假阴性; 二是本研究由于压力必须通过创伤性手术获得, 使对照组样本收集困难, 样本量太少, 从而提高假阳性。从研究结果中可以看出, PV内径假阳性值集中在1.3-1.5 cm范围, 此范围内单凭PV内径 $\geq 1.45$  cm诊断PHT容易高估PV压力出现误诊, 序列试验显示此时若能结合肠系膜上静脉内径及流速可以提高诊断特异性, 以减少误诊。

超声参数能较好地定性诊断PHT已被多数研究所证实, 但是其诊断PHT超声参数标准尚未

统一, 进一步的研究尚需开展。

## 4 参考文献

- 1 顾树南. 门静脉高压症. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1987: 36-37
- 2 沈芳, 严宗毅, 张卫光. 肝门静脉高压症(PHT)血液动力学研究进展. 生物医学工程杂志 2003; 20: 332-335
- 3 Whipple AO. The Problem of Portal Hypertension in Relation to the Hepatosplenopathies. *Ann Surg* 1945; 122: 449-475
- 4 Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol* 1993; 17 Suppl 2: S38-S40
- 5 Benoit JN, Womack WA, Hernandez L, Granger DN. "Forward" and "backward" flow mechanisms of portal hypertension. Relative contributions in the rat model of portal vein stenosis. *Gastroenterology* 1985; 89: 1092-1096
- 6 Walsh KM, Leen E, MacSween RN, Morris AJ. Hepatic blood flow changes in chronic hepatitis C measured by duplex Doppler color sonography: relationship to histological features. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2584-2590
- 7 Zoli M, Magalotti D, Bianchi G, Ghigi G, Orlandini C, Grimaldi M, Marchesini G, Pisi E. Functional hepatic flow and Doppler-assessed total hepatic flow in control subjects and in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 23: 129-134
- 8 刘元水, 张俊勇, 李荔, 于振海, 李志强, 刘倩, 张钦. 门静脉高压症的定量诊断—门静脉压力直线回归方程的研究与建立. 中国超声诊断杂志 2001; 2: 19-20
- 9 李克, 阮长乐. 用超声多普勒观测PHT症手术前后血液动力学改变. 中华外科杂志 1990; 28: 155-157
- 10 朱糅, 许世雄. 肝循环门静脉系统的压力—流量关系. 中国生物医学工程学报 1992; 11: 157-166
- 11 García-Pagán JC, Bosch J, Rodés J. The role of vasoactive mediators in portal hypertension. *Semin Gastrointest Dis* 1995; 6: 140-147
- 12 许洪伟, 朱菊人, 孙成刚. 肝硬化患者门静脉系统血流动力学研究的临床价值. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 55-56
- 13 付雪琴, 姚兰杰, 阎秋丽, 时爱兰. 肝硬化患者门脉系统血流动力学测定. 郑州大学学报(医学版) 2005; 40: 562-563
- 14 杨占凤, 赵群, 王晓燕, 王允野. 食管静脉曲张套扎术前后门静脉血流的研究. 中华消化内镜杂志 2004; 21: 184-185
- 15 Iwao T, Toyonaga A, Oho K, Tayama C, Masumoto H, Sakai T, Sato M, Tanikawa K. Value of Doppler ultrasound parameters of portal vein and hepatic artery in the diagnosis of cirrhosis and portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1012-1017
- 16 Gorka W, Kagallwalla A, McParland BJ, Kagallwalla Y, al Zaben A. Diagnostic value of Doppler ultrasound in the assessment of liver cirrhosis in children: histopathological correlation. *J Clin Ultrasound* 1996; 24: 287-295
- 17 Sreenivas DV, Kumar A, Mannar KV, Babu GR. Results of Savary-Gilliard dilatation in the management of cervical web of esophagus. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 188-190

编辑 李军亮 电编 何基才



# 复方斑蝥胶囊对肝癌患者TACE治疗前后细胞免疫功能的影响

殷飞, 李进军, 曹凤, 姚树坤

殷飞, 李进军, 曹凤, 河北医科大学第四医院消化内科 河北省石家庄市 050011

姚树坤, 卫生部中日友好医院 北京市 100029

河北省科技厅科技攻关计划基金资助项目, No. 05276101D-63

**作者贡献分布:** 此课题由殷飞与姚树坤设计; 研究过程由李进军与曹凤操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由殷飞提供; 数据分析由李进军、曹凤及殷飞完成; 本论文写作由殷飞与李进军完成。

**通讯作者:** 殷飞, 教授, 050011, 河北省石家庄市健康路12号, 河北医科大学第四医院消化内科. yinfei\_4y@sina.com

电话: 0311-66696343

收稿日期: 2011-04-22 修回日期: 2011-05-30

接受日期: 2011-06-10 在线出版日期: 2011-06-18

## Fufang Banmao Capsules improve immunological status in patients with hepatocellular carcinoma before and after transcatheter arterial chemoembolization

Fei Yin, Jin-Jun Li, Feng Cao, Shu-Kun Yao

Fei Yin, Jin-Jun Li, Feng Cao, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Shu-Kun Yao, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Supported by: the Key Science and Technology Project of Hebei Province, No. 05276101D-63

Correspondence to: Professor Fei Yin, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, 12 Jiankang Road, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China. yinfei\_4y@sina.com

Received: 2011-04-22 Revised: 2011-05-30

Accepted: 2011-06-10 Published online: 2011-06-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the impact of the traditional Chinese medicine Fufang Banmao Capsules on immunological status in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) before and after transcatheter arterial chemoembolization (TACE).

**METHODS:** Fufang Banmao Capsules were administered to HCC patients before TACE or 1 wk or 1 mo after TACE. The proportions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cell subsets, NK cells, and serum levels of ALT, AST, TBIL were measured 4 week

after treatment.

**RESULTS:** The proportions of CD4<sup>+</sup> and NK cells were lower and that of CD8<sup>+</sup> cells was higher in HCC patients than in healthy persons (both  $P < 0.05$ ). After 1 wk or 1 mo of TACE therapy, the proportions of CD4<sup>+</sup> and NK cells were increased ( $33.1 \pm 7.5$ ,  $38.9 \pm 7.8$  vs  $27.1 \pm 5.6$ ;  $15.9 \pm 3.7$ ,  $17.9 \pm 5.3$  vs  $10.6 \pm 4.7$ , all  $P < 0.05$ ) and those of CD8<sup>+</sup> cells were decreased ( $29.9 \pm 3.2$ ,  $28.7 \pm 6.5$  vs  $34.8 \pm 5.6$ , both  $P < 0.05$ ) compared to pretreatment values. The proportions of CD4<sup>+</sup> and NK cells were significantly higher and that of CD8<sup>+</sup> cells was significantly lower in patients treated with Fufang Banmao Capsules for 1 month after TACE therapy than in those not receiving Fufang Banmao Capsules after TACE therapy (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The cellular immunological functions were inhibited in patients with HCC. TACE could reverse the immune suppression state in patients with HCC. The combination of TACE and Fufang Banmao Capsules could remarkably improve immunological functions in HCC patients.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Transcatheter arterial chemoembolization; T-lymphocyte subsets; Fufang Banmao Capsules

Yin F, Li JJ, Cao F, Yao SK. Fufang Banmao Capsules improve immunological status in patients with hepatocellular carcinoma before and after transcatheter arterial chemoembolization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1843-1846

### 摘要

**目的:** 探讨原发性肝癌(HCC)患者肝动脉插管化疗栓塞术(TACE)治疗前后及TACE后应用中成药复方斑蝥胶囊后细胞免疫功能变化。

**方法:** 所有HCC患者TACE治疗前及治疗后1 wk、1 mo, 服用复方斑蝥胶囊前及用药后4 wk用检测外周血T淋巴细胞亚群、NK细胞及

### ■背景资料

研晚期肝癌患者失去手术机会, 且对放化疗不敏感, 预后差。单纯肝动脉插管介入栓塞(TACE)术后仍有残癌存在, 远期效果不佳, 必须进行辅助药物治疗, 以重建机体免疫功能, 消灭残癌, 提高治疗效果。

### ■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

## ■相关报道

Yeh等认为NK细胞在抵抗免疫原性肿瘤中较特异性T淋巴细胞起重要作用。

ALT、AST、TBIL.

**结果:** HCC患者与健康对照者相比CD4<sup>+</sup>淋巴细胞、NK细胞显著降低( $P<0.05$ ); CD8<sup>+</sup>淋巴细胞明显升高( $P<0.05$ ). TACE治疗后1 wk及1 mo均较TACE治疗前CD4<sup>+</sup>淋巴细胞、NK细胞均显著升高( $33.1\pm7.5$ ,  $38.9\pm7.8$  vs  $27.1\pm5.6$ ;  $15.9\pm3.7$ ,  $17.9\pm5.3$  vs  $10.6\pm4.7$ , 均 $P<0.05$ ), CD8<sup>+</sup>淋巴细胞显著降低( $29.9\pm3.2$ ,  $28.7\pm6.5$  vs  $34.8\pm5.6$ , 均 $P<0.05$ ); TACE治疗后服用复方斑蝥胶囊1 mo与TACE治疗前比较, CD4<sup>+</sup>淋巴细胞和NK淋巴细胞显著增高( $42.0\pm8.4$  vs  $27.8\pm5.8$ ;  $21.2\pm3.6$  vs  $10.0\pm3.7$ , 均 $P<0.05$ ), CD8<sup>+</sup>淋巴细胞显著降低( $26.7\pm3.4$  vs  $36.7\pm5.7$ ,  $P<0.05$ ). TACE治疗后1 mo服用复方斑蝥胶囊组较未服用复方斑蝥胶囊组CD4<sup>+</sup>淋巴细胞、NK细胞均显著升高( $P<0.05$ ), CD8<sup>+</sup>淋巴细胞有降低趋势, 但无统计学差异。

**结论:** HCC患者抗肿瘤细胞免疫功能低下. HCC患者TACE治疗可使受抑制的细胞免疫功能部分恢复, 服用中成药复方斑蝥胶囊后细胞免疫功能进一步提高。

**关键词:** 原发性肝癌; 肝动脉插管介入栓塞术; T淋巴细胞亚群; 复方斑蝥胶囊

殷飞, 李进军, 曹凤, 姚树坤. 复方斑蝥胶囊对肝癌患者TACE治疗前后细胞免疫功能的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1843-1846

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1843.asp>

## 0 引言

肝动脉插管介入栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)通过碘化油栓塞供应肿瘤的动脉并作化疗的局部灌注, 适用于肝功能尚可而不能切除的肝癌. 由于肝癌存在双重血运供应及丰富侧枝循环, 单纯TACE治疗后仍有残癌存在, 远期效果不佳. 目前已经证实<sup>[1,2]</sup>肝癌的发生、发展过程, 始终存在着免疫系统的功能紊乱, 机体免疫功能低下, 主要表现为T淋巴细胞亚群和NK细胞数量的改变和各种亚群比例的失调, 如具有细胞毒性效应、可特异杀死靶细胞的CD8<sup>+</sup>淋巴细胞及具有辅助调节功能的CD4<sup>+</sup>淋巴细胞比例的失调. 为了减少TACE治疗肝癌后肿瘤复发及转移, 必须进行辅助药物治疗, 以重建机体免疫功能, 消灭残癌, 提高治疗效果. 筛选合适药物逆转肝癌患者免疫功能明显受抑状况, 增强宿主的抗癌免疫, 以增强肝癌的综合治疗效果。

表 1 HCC患者与对照组外周血T淋巴细胞亚群及NK细胞测定结果比较 (mean  $\pm$  SD)

	健康对照组( $n=30$ )	HCC( $n=60$ )
CD4 <sup>+</sup> 淋巴细胞	42.9 $\pm$ 5.9	31.6 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>
CD8 <sup>+</sup> 淋巴细胞	27.4 $\pm$ 5.6	33.3 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>
NK细胞	14.4 $\pm$ 5.3	10.2 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 健康对照组.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 参照2001年中国抗癌协会专业委员会修订的诊断标准和临床分期标准, 选择2003-07/2005-07河北医科大学第四医院住院原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)II-III期患者60例, 其中男42例, 女18例, 年龄25-65(平均50.76  $\pm$  10.89)岁, 不能手术但无任何治疗干预, 预计生存期超过3 mo. 采用随机数字表法将其随机分为治疗1组: 单用TACE治疗; 治疗2组: TACE后1 wk+复方斑蝥胶囊(国药准字Z19993294, 组方: 斑蝥、刺五加、半支莲、黄芪、人参等), 1 g/次, 3次/d, 连服4 wk. 每组30例, 两组间性别、年龄、临床分期及特点无显著性差异. 选用河北医科大学第四医院健康体检者30例[男18例, 女12例, 年龄27-63(平均48.97  $\pm$  11.99)岁]作为健康对照组。

**1.2 方法** 经股动脉穿刺, 超选择性将导管插入肿瘤供血动脉, 经造影确实导管位置后, 从导管缓慢注入羟基喜树碱, 吡喃阿霉素, 丝裂霉素, 5-氟尿嘧啶(5-FU), 顺铂等2-3种药物, 根据个体确定用药剂量. 再依照肿瘤大小, 血供类型注入碘油化疗药乳剂和明胶海绵行化疗栓塞. TACE术后除复方斑蝥胶囊外, 治疗1组和治疗2组常规治疗均相同. 治疗1组TACE治疗前及治疗后1 wk, 1 mo, 治疗2组TACE治疗前及服用复方斑蝥胶囊前及用药后4 wk, 检测外周血T淋巴细胞亚群、NK细胞及谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST).

**统计学处理** 所有资料用SPSS10.0软件包分析, 计量资料用mean  $\pm$  SD表示,  $t$ 检验比较两样本均数的差别, 检验水准 $\alpha=0.05$ .

## 2 结果

**2.1 HCC患者与健康对照者外周血T淋巴细胞亚群及NK细胞测定结果比较** CD4<sup>+</sup>淋巴细胞、NK细胞均显著低于健康对照组( $P<0.05$ ); CD8<sup>+</sup>淋巴细胞显著高于健康对照组( $P<0.05$ , 表1).

**2.2 治疗1组TACE治疗前后外周血T淋巴细胞亚**

表 2 治疗1组TACE治疗前后外周血T淋巴细胞亚群及NK细胞的变化 (mean  $\pm$  SD)

	TACE治疗前	TACE治疗后1 wk	TACE治疗后1 mo
CD4 <sup>+</sup> 淋巴细胞	27.1 $\pm$ 5.6	33.1 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	38.9 $\pm$ 7.8 <sup>ac</sup>
CD8 <sup>+</sup> 淋巴细胞	34.8 $\pm$ 5.6	29.9 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	28.7 $\pm$ 6.5 <sup>a</sup>
NK细胞	10.6 $\pm$ 4.7	15.9 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	17.9 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs TACE治疗前; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs TACE治疗后1 wk.表 3 HCC患者TACE后服用复方斑蝥胶囊4 wk前后外周血T淋巴细胞亚群及NK细胞的比较 (mean  $\pm$  SD)

	TACE治疗前	TACE治疗后1 wk	服用复方斑蝥胶囊后4 wk
CD4 <sup>+</sup> 淋巴细胞	27.8 $\pm$ 5.8	31.2 $\pm$ 8.9 <sup>a</sup>	42.0 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>
CD8 <sup>+</sup> 淋巴细胞	36.7 $\pm$ 5.7	30.7 $\pm$ 4.3 <sup>a</sup>	26.7 $\pm$ 3.4 <sup>ac</sup>
NK细胞	10.0 $\pm$ 3.7	15.7 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	21.2 $\pm$ 3.6 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs TACE治疗前; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs TACE治疗后1 wk.

群及NK细胞的变化 TACE治疗后1 wk及TACE治疗后1 mo均较TACE治疗前CD4<sup>+</sup>淋巴细胞、NK细胞均显著升高( $P < 0.05$ ), CD8<sup>+</sup>淋巴细胞显著降低( $P < 0.05$ ); TACE治疗后1 mo较TACE治疗后1 wk CD4<sup>+</sup>淋巴细胞显著升高( $P < 0.05$ ), NK细胞有升高趋势( $P > 0.05$ ), CD8<sup>+</sup>淋巴细胞有降低趋势, 但统计学没有显著差异( $P > 0.05$ , 表2).

2.3 治疗2组TACE治疗后服用复方斑蝥胶囊4 wk前后外周血T淋巴细胞亚群及NK细胞的比较 服用复方斑蝥胶囊4 wk后与TACE治疗前比较: CD4<sup>+</sup>淋巴细胞、NK细胞显著增高( $P < 0.05$ ), CD8<sup>+</sup>淋巴细胞显著降低( $P < 0.05$ ). 与TACE治疗后1 wk比较: CD4<sup>+</sup>淋巴细胞、NK细胞均增高( $P < 0.05$ ), CD8<sup>+</sup>淋巴细胞显著降低( $P < 0.05$ , 表3). TACE治疗后1 mo 治疗2组与治疗1组比较: CD4<sup>+</sup>淋巴细胞、NK细胞均显著升高( $P < 0.05$ ), CD8<sup>+</sup>淋巴细胞有降低趋势, 但统计学没有显著性差异( $P > 0.05$ , 表4).

2.4 两组患者TACE治疗前后外周血ALT、AST、TBIL变化的比较 TACE 治疗前后两组患者外周血ALT、AST、TBIL的变化统计学没有显著性差异( $P > 0.05$ , 表5).

### 3 讨论

恶性肿瘤患者普遍存在免疫功能低下, 并与肿瘤的发生、发展及预后密切相关。这种免疫低下以细胞免疫为主, 当T淋巴细胞亚群及NK细胞数量变化时, 可导致细胞免疫功能紊乱<sup>[3]</sup>. CD4<sup>+</sup>淋

表 4 TACE治疗后1 mo两组患者外周血T淋巴细胞亚群及NK细胞的比较 (mean  $\pm$  SD)

	治疗1组	治疗2组
CD4 <sup>+</sup> 淋巴细胞	38.9 $\pm$ 7.8	42.0 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>
CD8 <sup>+</sup> 淋巴细胞	28.7 $\pm$ 6.5	26.7 $\pm$ 3.4
NK细胞	17.9 $\pm$ 5.3	21.2 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 治疗1组.

巴细胞具有辅助调节功能, CD8<sup>+</sup>淋巴细胞具有细胞毒性效应, 可特异杀死靶细胞, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>细胞比值为中心的免疫调节细胞是机体免疫状态的中心环节<sup>[4]</sup>, 本研究结果显示, HCC患者与健康志愿者比较, CD4<sup>+</sup>淋巴细胞明显下降, CD8<sup>+</sup>淋巴细胞明显升高, 这与以往文献报道一致<sup>[5,6]</sup>. 裘宇容等<sup>[7]</sup>研究发现原发性肝癌患者CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞亚群的百分率升高是因为CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>升高所致, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>细胞可能是Ts细胞亚群, 具有免疫抑制作用<sup>[8,9]</sup>. 因此, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>细胞的长期升高, 最终导致机体免疫系统对新的肿瘤细胞的无反应性.

NK细胞是机体抗肿瘤免疫中的另一类重要细胞, 可直接杀伤肿瘤细胞, 其杀伤作用无肿瘤特异性和MHC限制性, 在免疫监视中发挥重要作用, 是机体抗肿瘤的第一道防线. Yeh等<sup>[10]</sup>认为NK细胞在抵抗免疫原性肿瘤中较特异性T淋巴细胞起重要作用. 已有报道Tabor<sup>[11]</sup>认为HCC患者术后易复发可能与NK细胞活性下降, 导致机体免疫功能下降有关. 本研究结果显示, HCC患者与健康对照者比较, NK细胞明显下降, 表现出肿瘤患者NK细胞非特异性杀瘤作用受限, 不能有效发挥杀伤肿瘤细胞的作用<sup>[12]</sup>.

TACE是手术无法切除的晚期肝癌患者治疗的主要手段, 他可栓塞肿瘤供养血管, 使肿瘤发生缺血坏死, 化疗药物积聚在肿瘤局部并缓慢释放, 直接产生细胞毒作用, 发挥强大的治疗效果. TACE治疗后短期可见部分免疫指标改善, 肿瘤局部浸润淋巴细胞面积及体积均增高, 抗肿瘤性改善<sup>[13]</sup>. 适量有效化疗则会提升免疫功能<sup>[14]</sup>. 本试验显示HCC患者TACE术后1 wk与术前相比CD4<sup>+</sup>淋巴细胞明显升高, CD8<sup>+</sup>淋巴细胞显著下降, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>平衡紊乱得以纠正, CD分子细胞向CD4<sup>+</sup>淋巴细胞方向偏移; 作为机体抗肿瘤第一防线的NK细胞的增高, 说明栓塞术后瘤负荷减少, 阻止肿瘤组织继续分泌相关细胞因子和聚集免疫细胞激发反应, 机体免疫功能部分恢

### ■应用要点

TACE联合中药复方斑蝥胶囊治疗原发性肝癌, 作为一种新兴的综合治疗手段能够逆转机体免疫异常, 以期较大幅度提高患者治愈率, 延长生存期和改善生活质量.



## ■同行评价

本文选题新颖独特,设计合理,具有一定的参考价值。

表 5 两组患者TACE治疗前后外周血ALT、AST、TBIL变化的比较 (mean ± SD)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(mmol/L)
治疗1组			
TACE治疗前	50.3 ± 10.2	49.3 ± 9.8	22.7 ± 7.2
TACE治疗后1 wk	51.6 ± 9.1	50.3 ± 10.2	24.1 ± 7.3
TACE治疗后1 mo	49.8 ± 11.2	51.2 ± 9.3	21.9 ± 8.1
治疗2组			
TACE治疗前	51.9 ± 9.3	52.0 ± 11.3	23.1 ± 8.1
TACE治疗后1 wk	50.3 ± 8.6	51.3 ± 8.6	23.6 ± 8.6
服用复方斑蝥胶囊后4 wk	50.2 ± 11.3	51.8 ± 10.5	22.6 ± 7.6

复。TACE术后1 mo患者体内栓塞肿瘤组织基本凝固坏死,机化,通过有效的抗肿瘤治疗可以使细胞免疫如NK细胞活性得到一定程度的恢复。本试验显示介入术后1 mo抗肿瘤免疫相关指标进一步改善如CD4<sup>+</sup>淋巴细胞, NK细胞的升高,说明栓塞部位的肿瘤坏死凝固失去活性,瘤负荷减少,肿瘤分泌释放肿瘤因子减少,对细胞免疫的抑制能力下降,受抑制的细胞免疫开始恢复,并逐渐恢复打击肿瘤组织,提高机体免疫力;而且肿瘤细胞变性坏死的分解产物被机体吸收后作为一种抗原<sup>[15]</sup>,刺激机体产生抗肿瘤的免疫功能,如增强NK细胞吞噬杀伤功能等。故也提示我们在临床工作中对介入术后短期患者慎用免疫抑制剂,选择适当的免疫调节剂比较合适。

肝癌患者在中医属“癥积”范畴,治疗上应扶正祛邪,标本兼治。有报道,中药联合TACE能提高肝癌患者细胞免疫功能<sup>[16]</sup>。复方斑蝥胶囊(组方:黄芪、女贞子、光慈姑、重楼、龙葵等)以扶正祛邪,益气活血,清热解毒为治法,标本兼治。本实验中服药后与服药前相比CD4<sup>+</sup>淋巴细胞, NK细胞显著上升,说明药物对正常细胞有保护作用,促进机体免疫细胞抗肿瘤功能的恢复,巩固介入治疗的效果,消除其不良反应,显著逆转HCC患者免疫功能受抑状态,增强机体抗病能力。CD8<sup>+</sup>淋巴细胞变化不明显可能是因为样本量太少,服药时间过短。

总之, TACE联合中药复方斑蝥胶囊治疗原发性肝癌,作为一种新兴的综合治疗手段能够有效控制肿瘤的生长,逆转机体免疫异常,以期较大幅度提高肝癌患者治愈率,延长生存期和改善生活质量。

## 4 参考文献

- 1 Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2005; 32: 75-85

- 2 Mizukoshi E, Nakamoto Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Tsuji H, Kuzushima K, Takiguchi M, Kaneko S. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2006; 43: 1284-1294
- 3 Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-640
- 4 Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg on tumor specific CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 124-136
- 5 陈卫昌, 顾国浩, 蔡衍郎. 肝硬化肝癌患者T细胞亚群变化. *江苏医药* 1996; 22: 576-578
- 6 Baumann MA, Milson TJ, Patrick CW, Libnoch JA, Keller RH. Correlation of circulating natural killer cell count with prognosis in large cell lymphoma. *Cancer* 1986; 57: 2309-2312
- 7 裘宇容, 杨春莉, 陈炼波, 王前. 原发性肝癌患者CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>细胞亚群的分析. *第一军医大学学报* 2002; 22: 72-73
- 8 黄茵, 陈智, 徐承槐, 祝桂琅, 费迎明, 施维群, 楼孝惠. 慢性HBV感染者T细胞CD28表达及相关细胞因子的检测分析. *中华微生物学和免疫学杂志* 2002; 22: 235-236
- 9 Colovai AI, Liu Z, Ciubotariu R, Lederman S, Cortesini R, Suciuc-Foca N. Induction of xenoreactive CD4<sup>+</sup> T-cell anergy by suppressor CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells. *Transplantation* 2000; 69: 1304-1310
- 10 Yeh KY, Pulaski BA, Woods ML, McAdam AJ, Gaspari AA, Frelinger JG, Lord EM. B7-1 enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity and inhibits tumor growth of a poorly immunogenic murine carcinoma. *Cell Immunol* 1995; 165: 217-224
- 11 Tabor E. Liver tumors and host defense. *Semin Liver Dis* 1997; 17: 351-355
- 12 梁艳, 邓安梅, 仲人前. NK细胞识别和杀伤机制研究进展. *中国免疫学杂志* 2007; 23: 284-287
- 13 秦建国, 韩本立, 潘世春, 庞家芳, 张翔, 韩民. 经入肝血管行化学药物治疗对原发性肝癌浸润淋巴细胞及其功能的影响. *中华普通外科杂志* 1999; 14: 25-27
- 14 卢伟, 李彦豪, 何晓峰, 陈勇, 曾庆乐, 裘玉容. 经导管动脉化疗栓塞术中化疗药物剂量对肝癌患者T细胞亚群的影响. *第一军医大学学报* 2002; 22: 524-526
- 15 Stehlin JS, Giovanella BC, de Ipoli PD, Muenz LR, Anderson RF, Gutierrez AA. Hyperthermic perfusion of extremities for melanoma and soft tissue sarcomas. *Recent Results Cancer Res* 1977; 59: 171-185
- 16 吕瑞民, 王静滨, 韩雪燕, 刘静霞, 聂浩劫. 中药联合TACE疗法对原发性肝癌免疫功能的影响. *中医药信息* 2010; 22: 33-35

# 活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样病变56例

陈文科, 邹兵, 王成文, 郭海, 郑爱萍

陈文科, 邹兵, 王成文, 郭海, 北京大学深圳医院消化内科 广东省深圳市 518036

郑爱萍, 北京大学深圳医院病理科 广东省深圳市 518036

作者贡献分布: 此课题由邹兵与陈文科设计; 内镜资料由陈文科、邹兵、王成文及郭海完成; 病理资料由郑爱萍完成; 数据分析和论文写作由陈文科完成; 审阅由邹兵完成。

通讯作者: 邹兵, 主任医师, 518036, 广东省深圳市福田区莲花路1120号, 北京大学深圳医院消化内科, chenwenkegd@126.com

电话: 0755-83923333-3703 传真: 0755-83089011

收稿日期: 2011-03-29 修回日期: 2011-05-26

接受日期: 2011-06-02 在线出版日期: 2011-06-18

## Biopsy forceps polypectomy for diminutive polypoid lesions of the upper gastrointestinal tract: an analysis of 56 cases

Wen-Ke Chen, Bing Zou, Cheng-Wen Wang, Hai Guo, Ai-Ping Zheng

Wen-Ke Chen, Bing Zou, Cheng-Wen Wang, Hai Guo, Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China

Ai-Ping Zheng, Department of Pathology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China

Correspondence to: Bing Zou, Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China. chenwenkegd@126.com

Received: 2011-03-29 Revised: 2011-05-26

Accepted: 2011-06-02 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and safety of biopsy forceps polypectomy in the management of diminutive polypoid lesions of the upper gastrointestinal tract.

**METHODS:** The gastroscopic data for 91 cases of upper gastrointestinal polypoid lesions which were removed by biopsy forceps polypectomy (diameter  $\leq 0.5$  cm) or by high frequency electric resection (diameter  $\leq 2.0$  cm) at our hospital from 2000 to 2009 were retrospectively reviewed to compare the rates of complications and recurrence between the two groups of patients.

**RESULTS:** Of 56 patients undergoing biopsy forceps polypectomy, 48 had single polypoid lesion and 8 had multiple lesions. Of 35 patients

undergoing high frequency electric resection, 23 had single polypoid lesion and 12 had multiple lesions. No upper gastrointestinal bleeding, perforation or other complications occurred in all cases. At six-month follow-up, a case of relapse occurred in the site of previous lesion in each group, and there was no significant difference in the recurrence rate between the two groups (1.5% vs 1.9%,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** There were no significant differences in therapy effectiveness and complications between biopsy forceps polypectomy and high frequency electric resection in the removal of diminutive polypoid lesions of the upper gastrointestinal tract.

**Key Words:** Polypoid lesions; Upper gastrointestinal tract; Biopsy forceps; Recurrence

Chen WK, Zou B, Wang CW, Guo H, Zheng AP. Biopsy forceps polypectomy for diminutive polypoid lesions of the upper gastrointestinal tract: an analysis of 56 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1847-1850

## 摘要

**目的:** 探讨活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样病变的疗效和安全性。

**方法:** 回顾性分析北京大学深圳医院2000-2009年电子胃镜检查发现上消化道小息肉样病变(直径 $\leq 0.5$  cm)并行活检钳钳除病例治疗和随访资料, 并与同期高频电切除病例资料(病变直径 $\leq 2.0$  cm)对比, 比较两种治疗方法的并发症和病变复发情况。

**结果:** 入选病例共91例。活检钳钳除组56例, 单发息肉样病变48例, 多发8例, 共计68枚病变。高频电切除组35例, 单发息肉样病变23例, 多发12例, 共计54枚病变。所有研究病例内镜治疗后均无上消化道出血、穿孔等并发症, 两组并发症发生率均为0.0%, 无显著性差异。半年以后的随访和胃镜复查中两组均各有1例复发, 两组复发率分别为1.5%、1.9%, 无显著性差异。

**结论:** 活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样

## ■背景资料

上消化道息肉样病变中包括了良性及恶性病变两部分, 临床多主张对绝大多数良性息肉样病变及部分早期恶性病变进行内镜下治疗。内镜下治疗方法有多种, 高频电切术是目前最常用和首选的方法, 活检钳钳除法虽然在临床上也为广泛应用, 但其疗效存在争议, 而目前缺少相关研究报道。

## ■同行评议者

万军, 主任医师, 中国人民解放军总医院南楼老年消化科

## ■相关报道

朱鸣、杨洁员等的研究表明消化道息肉摘除后可出现复发,复发率较高,达5%-36%。但有些研究在统计复发率时并未严格区分复发和再发,把再发病例也包括了进来,因此复发率的统计欠准确。

病变的疗效和并发症与高频电切除法相比无显著性差异。活检钳钳除法可彻底摘除上消化道小息肉样病变,临床疗效肯定,安全实用,是治疗上消化道小息肉样病变的有效手段。

**关键词:** 息肉样病变; 上消化道; 活检; 复发

陈文科, 邹兵, 王成文, 郭海, 郑爱萍. 活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样病变56例. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1847-1850

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1847.asp>

## 0 引言

随着消化内镜技术的不断进步和广泛普及,上消化道息肉样病变的发现越来越多。因部分病变可能为恶性病变或存在恶变风险(如腺瘤性息肉),越来越受到临床医生的重视和广大患者的关注,近年来主张大多数息肉病变发现后予以内镜治疗。内镜治疗方法有多种,其中活检钳钳除法在临床上应用广泛,一般是在内镜检查发现直径较小的息肉样病变时直接用活检钳钳除,同时具有诊断和治疗作用,操作简单、经济。但有不少学者<sup>[1]</sup>对其疗效表示怀疑,认为单纯活检难以完全、彻底摘除息肉病变,存在较高的复发风险和创面出血风险。我们对北京大学深圳医院消化内镜室近10年活检钳钳除法治疗的上消化道息肉样病变临床资料进行了总结、分析,并与同期高频电切除病例资料进行对比,以探讨活检钳钳除法对上消化道小息肉病变的疗效及并发症。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2000-2009年在北京大学深圳医院行电子胃镜检查发现上消化道息肉样病变并行活检钳钳除或高频电切除患者,选择病理和随访资料完善、半年后在北京大学深圳医院复查胃镜1次或1次以上病例作为研究对象,复发者再次胃镜下治疗。多发性息肉病变者只纳入5枚病变以下病例。根据治疗方法不同分为活检钳钳除组和高频电切除组。符合以上条件者共91例。活检钳钳除组56例,年龄26-77(平均46.0)岁,男26例,女30例,内镜下表现为扁平(山田I型)或无蒂息肉(山田II型),最大径0.2-0.5 cm。高频电切除组35例,年龄22-75(平均43.4)岁,男18例,女17例,息肉最大径0.2-2.0 cm;其中亚蒂(山田III型)和有蒂(山田IV型)息肉直接予圈套器电凝电切,扁平或无蒂息肉0.2-0.5 cm者予热活检钳除,0.6-2.0 cm者予黏膜下注射生理盐水后用圈套器

电凝电切(内镜下黏膜切除术)。

**1.2 方法** 分析所有研究对象的临床资料、上述两种治疗方法的并发症和复发情况,并对两种治疗方法之间并发症和病变复发率的差异进行比较。

**统计学处理** 采用SPSS12.0统计软件分析,组间率的比较采用卡方检验,  $P < 0.05$  为有统计学显著性差异。

## 2 结果

**2.1 活检钳钳除组病变情况** 单发息肉样病变48例,多发8例,共计68枚病变。病变部位及病理:食管息肉样病变7枚(10.3%),其中乳头状瘤6枚(8.8%),间质瘤1枚(1.5%);胃息肉样病变57枚(83.8%),其中炎性息肉31枚(45.6%),胃底腺息肉17枚(25.0%),增生性息肉6枚(8.8%),腺瘤2枚(2.9%),类癌1枚(1.5%);十二指肠息肉样病变4枚(5.9%),其中炎性息肉3枚(4.4%),类癌1枚(1.5%)。特殊病变具体情况:食管间质瘤直径为0.4 cm,位于黏膜肌层;胃类癌直径0.5 cm,位于胃体;十二指肠类癌直径0.2 cm,位于十二指肠球部。

**2.2 高频电切组病变情况** 单发息肉样病变23例,多发12例,共计54枚病变。病变部位及病理:食管息肉样病变3枚(5.6%),其中乳头状瘤2枚(3.7%),平滑肌瘤1枚(1.9%);胃息肉样病变48枚(88.9%),其中炎性息肉21枚(38.9%),胃底腺息肉13枚(24.1%),增生性息肉10枚(18.5%),腺瘤4枚(7.4%);十二指肠息肉样病变3枚(5.6%),均为增生性息肉。胃息肉中有1枚腺瘤出现轻度异型增生。特殊病变具体情况:食管平滑肌瘤直径0.4 cm,位于黏膜肌层。

**2.3 并发症情况** 所有研究病例内镜治疗后观察均无上消化道出血、穿孔等并发症,两组并发症发生率均为0.0%,无显著性差异。

**2.4 随访及胃镜复查情况** 所有病例内镜治疗后均进行了随访和胃镜复查,复查间隔时间最短6 mo,最长98 mo,活检钳钳除组平均16.9 mo,高频电切除组平均18.3 mo。复查中两组均各有1例复发。活检钳钳除组为贲门口炎性息肉,直径0.4 cm,摘除8 mo后复查原位见直径0.2 cm息肉病变,再次活检钳除,病理性质同前,1年后再次复查未见息肉病变。高频电切组为幽门管增生性息肉,直径2.0 cm,摘除15 mo后复查原位见0.4 cm息肉病变,再次高频电切,病理仍为增生性息肉,13 mo后复查未见息肉病变。初次治疗后活

## ■创新盘点

本文通过严格控制研究对象和统计指标,并与临床上最常用的高频电切法比较,对活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样病变的疗效和并发症进行了研究,探讨了活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样病变的可行性。



检钳钳除组复发率为1.5%, 高频电切除组复发率为1.9%, 无显著性差异. 食管间质瘤、平滑肌瘤及胃和十二指肠类癌胃镜复查最长间隔时间分别为19、21、27、15 mo, 均未见复发.

### 3 讨论

消化道息肉样病变是指消化系黏膜局限性隆起突向消化系管腔的病变, 上消化道以胃息肉较为常见. 胃息肉主要分为炎性息肉、胃底腺息肉、增生性息肉、腺瘤性息肉、错构瘤性息肉, 以前三种类型较为多见<sup>[2]</sup>. 此外, 上消化道息肉样病变临床上较为常见的尚有乳头状瘤、间质瘤、平滑肌瘤等, 有时也可见类癌. 临床上内镜下只能发现病变, 不能确定病变的病理类型, 部分病变可能为恶性病变或有恶变风险<sup>[3-5]</sup>, 需行活检或切除进行病理检查明确诊断及治疗. 消化道息肉样病变大多可通过内镜进行微创治疗, 内镜下治疗方法多种, 包括高频电切、微波、射频、激光、套扎、活检钳钳除等. 高频电切术是目前内镜下摘除息肉样病变最常用和首选的方法<sup>[6,7]</sup>, 由于电凝效应, 可使电切基底组织凝固、炭化, 较为完整地切除病变, 减少复发和恶变, 疗效肯定. 但操作不当仍会发生一定的并发症, 如出血、穿孔等<sup>[8]</sup>. 活检钳钳除法在临床中也很常用<sup>[9-11]</sup>, 在胃镜检查中发现小息肉样病变(一般指直径 $\leq 0.5$  cm病变)时可用活检钳直接钳除, 同时达到诊断和治疗的目的, 既简便、经济, 又减少了患者再次接受胃镜治疗的痛苦. 但有学者认为<sup>[1]</sup>活检钳钳除法疗效差, 难以把病变钳除干净, 存在病变复发可能. 这种疑虑有一定道理: 活检钳钳除法治疗深度和范围均较小, 且不像高频电切存在电凝效应, 有时肉眼所见病变“已摘除干净”, 实际上创面可能有肉眼难以观察到的微小组织残留, 随着时间发展可能逐渐长大再形成息肉病变引起复发, 并且可能出现术后消化系出血的风险. 然而我们通过大量的病例观察发现, 上消化道小息肉样病变活检钳除后很少出现消化系出血、穿孔等并发症, 复查胃镜时也很少出现复发病例, 但相关研究目前鲜见报道. 因此我们对活检钳钳除法的疗效和并发症进行了总结、分析, 并与临床上应用最广的高频电切法比较来进行研究.

消化道息肉样病变摘除后可出现复发. 许多研究报道息肉病变内镜治疗后复发率较高, 达5%-36%<sup>[12-14]</sup>. 但有些研究在统计复发率时并未严格区分复发和再发<sup>[14,15]</sup>, 把再发病例也包括

了进来, 在此暂称为广义的复发. 严格意义上的复发是指息肉摘除后相同部位再次出现组织病理类型相同的息肉(在此暂称为狭义的复发), 而发生在其他部位或相同部位但组织病理类型不同的息肉称为再发. 狭义的复发多与病变摘除不彻底、留有残基有关, 再发多考虑与患者存在好发息肉病变的素质有关. 因此在评估治疗效果时用狭义的复发率作为病变摘除是否彻底的指标较广义的复发率更为准确. 我们在本研究中把狭义复发率作为内镜治疗是否彻底的评估指标; 同时考虑息肉病变数目众多复查胃镜时难以判断再次出现的病变的部位与原病变部位的关系, 选择单发病变和少于5枚的多发病变作为研究对象, 以尽可能准确地反映内镜治疗效果. 经总结、分析, 活检钳钳除法和高频电切法半年后复发率均低于2%, 两组比较无显著性差异, 但明显低于许多报道, 考虑与研究对象和统计指标的选择较为严格有关. 我们的研究提示活检钳钳除法可彻底治疗上消化道小息肉病变. 此外, 在安全性上与高频电切一样风险均很小, 本研究两种治疗方法术后观察均未出现上消化道出血、穿孔等并发症. 但活检钳钳除法在操作上明显比高频电切简便, 治疗时间更短, 患者经济花费也更少.

活检钳钳除法没有电凝效应也能有效地治愈小息肉样病变, 其可能原因是: 息肉样病变大部分为良性病变, 病变深度和范围较为局限, 不像恶性肿瘤向黏膜下层和周边浸润, 直径0.5 cm以下的小病变用活检钳基本可以钳夹干净; 即使有微小组织残留, 由于活检后创面出现炎症反应, 炎症细胞聚集, 释放各种炎症介质和细胞因子, 对残存的微小病变组织、细胞有抑制和杀灭作用. 这也可解释临床上有时遇到恶性病变, 如“一点癌”、本研究中出现的一类癌, 经活检钳除后行内镜复查、内镜治疗(如黏膜下切除术或黏膜下剥离术)或外科手术治疗再也找不到病变组织. 当然, 远期疗效还需进一步长期追踪观察, 对于高度恶性病变最好还是扩大切除范围为妥, 如追加内镜治疗或外科手术治疗.

在内镜下进行活检钳除上消化道小息肉样病变时, 直径0.3 cm以下的病变大多可一次钳除, 直径0.4-0.5 cm的病变可能需要进行多次活检予以钳除. 第1次活检后常出现创面渗血, 有时不易观察清楚病变残留情况, 此时可以用冰生理盐水或8%去甲肾上腺素液表面喷洒止血后仔细观察, 如有残余病变再次活检, 直至肉眼观察息

### ■应用要点

本文通过研究表明活检钳钳除法治疗上消化道小息肉样病变的疗效和并发症与高频电切除法相比无显著性差异, 临床疗效肯定, 安全, 是治疗上消化道小息肉样病变的有效手段, 可用于指导临床.

## ■同行评价

本文学术性较好, 对于治疗上消化道小息肉样病变具有较好的实用价值, 值得推广。

肉病变消失、与周边组织黏膜基本持平或略凹陷。我们的研究表面初次治疗有效率达98.5%, 只有1例出现复发, 再次治疗后未再复发。复发病例为贲门口息肉, 考虑与治疗时患者呕吐反应较大、贲门收缩频繁和强烈致活检钳除时不易对准病变等因素有关。本研究中各有1例黏膜肌层的平滑肌瘤、胃体类癌、十二指肠球部类癌, 活检钳除后在至少15 mo的随访中均未见复发。对于直径大于0.5 cm的息肉样病变, 活检钳可能难以钳除干净, 建议采用高频电切等方法进行有效治疗。

总之, 我们的临床研究提示活检钳钳除法对上消化道小息肉病变的疗效是肯定的, 且操作简便、快速、安全, 经济, 是临床上治疗小息肉病变的有效手段。当然, 更有说服力的结果有待我们进一步增加研究病例和进行更长时间的随访观察。

## 4 参考文献

- 1 于皆平. 消化道息肉的内镜治疗. 中国医师进修杂志 1998; 21: 395-397
- 2 Park do Y, Lauwers GY. Gastric polyps: classification and management. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132: 633-640
- 3 Goddard AF, Badreldin R, Pritchard DM, Walker MM, Warren B. The management of gastric polyps. *Gut* 2010; 59: 1270-1276
- 4 张莉, 李元平, 王爱民, 付晓霞. 消化道息肉3314例临床、病理特点及内镜下治疗分析. 华北国防医药 2009; 21: 36-37
- 5 Schmitz JM, Stolte M. Gastric polyps as precancerous lesions. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1997; 7: 29-46
- 6 Ahmadi A, Draganov P. Endoscopic mucosal resection in the upper gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1984-1989
- 7 徐福星. 内镜诊治消化道息肉的进展. 中华消化内镜杂志 1999; 16: 133-134
- 8 毛云高, 魏艳翎, 叶昕. 胃肠息肉高频电摘除术并发症的原因与防治. 吉林医学 2007; 28: 398
- 9 李小会, 刘变英, 杨嫦娥, 范东俊, 王颖, 李改英. 内窥镜诊治胃息肉的临床研究. 肿瘤研究与临床 2008; 20: 488-490
- 10 张保环, 徐惠萍. 内镜治疗消化道息肉218例分析. 江西医药 2007; 42: 432-434
- 11 吴凌东, 毛伯能, 丁志辉. 消化道“微型息肉”内镜诊治探讨. 现代康复 1999; 3: 854-855
- 12 朱鸣, 宁守斌, 步晓华, 曹传平. 胃息肉的临床病理特征和内镜治疗随访观察. 胃肠病学 2009; 14: 751-753
- 13 姚健敏, 方英, 厉有名, 蔡曙萍, 王开明, 黄怀德, 吴国富. 内镜治疗胃息肉的初步研究. 胃肠病与肝病杂志 1996; 2: 24-25
- 14 杨洁员, 樊小勇, 王晓玲, 王伟红, 刘军, 戴苏英, 陈友贞. 内镜下高频电切除胃息肉术的临床研究. 中华腹部疾病杂志 2002; 2: 438-439
- 15 钟旭辉, 许岸高. 腺瘤性胃息肉内镜治疗及随访. 实用医学杂志 2002; 18: 635-636

编辑 李薇 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 汤姆森-路透公布 2009 年 WJG 影响因子 2.092

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

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

# 克罗恩病外科治疗19例

栾洋, 宗光全, 陈坚, 宣佶, 徐琳, 王伟, 王峰, 刘绪舜

栾洋, 宗光全, 陈坚, 宣佶, 徐琳, 王伟, 王峰, 刘绪舜, 中国人民解放军第八一医院 江苏省南京市 210002

**作者贡献分布:** 栾洋与宗光全对此文贡献均等; 此课题由宗光全设计; 具体病例提供、操作由刘绪舜、王峰、宗光全、王伟、陈坚、宣佶、徐琳及栾洋完成; 论文撰写由栾洋完成; 宗光全给予指导并提出宝贵意见。

**通讯作者:** 宗光全, 主任医师, 210002, 江苏省南京市, 中国人民解放军第八一医院. zgqj@sohu.com

电话: 025-80864032

收稿日期: 2011-03-30 修回日期: 2011-05-25

接受日期: 2011-06-02 在线出版日期: 2011-06-18

## Surgical treatment of Crohn's disease: an analysis of 19 cases

Yang Luan, Guang-Quan Zong, Jian Chen, Ji Xuan, Lin Xu, Wei Wang, Feng Wang, Xu-Shun Liu

Yang Luan, Guang-Quan Zong, Jian Chen, Ji Xuan, Lin Xu, Wei Wang, Feng Wang, Xu-Shun Liu, the 81<sup>st</sup> Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Guang-Quan Zong, the 81<sup>st</sup> Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. zgqj@sohu.com

Received: 2011-03-20 Revised: 2011-05-25

Accepted: 2011-06-02 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the diagnosis, surgical treatment and postoperative maintenance therapy of Crohn's disease.

**METHODS:** The clinical data for 19 patients with surgically and pathological proven Crohn's disease were analyzed retrospectively, including clinical manifestations, preoperative examination and diagnosis, intraoperative performance and diagnosis, and postoperative complications and maintenance therapy.

**RESULTS:** The rate of misdiagnosis of Crohn's disease was high. Only 3 patients were definitively diagnosed before operation, and the misdiagnosis rate was 84.21%. Crohn's disease showed atypical clinical manifestations. The symptoms of Crohn's disease were mainly abdominal pain and gastrointestinal tract symptoms. All patients had varying degrees of abdominal pain. Symptoms were related to dis-

eased region. Emergency surgery was performed in 3 (15.79%) cases, and elective operation in 16 (84.21%) cases. Reoperation was performed in 4 (21.05%) patients. Postoperative incision infection occurred in 2 cases, fat liquefaction of incision in 2 cases, and death in 1 case. The rate of postoperative complications was 26.32%. Postoperative maintenance of remission appeared in 12 (63.16%) cases, of which effective results were achieved in 5 cases and recrudescence occurred in 1 case.

**CONCLUSION:** The rate of misdiagnosis of Crohn's disease is high, mainly due to atypical clinical manifestations in the early period of the disease. Surgery can lead not only to a cure for the disease but also to verification of diagnosis. Surgical treatment can solve associated complications and improve patient's quality of life. Postoperative maintenance drug therapy can reduce recrudescence.

**Key Words:** Crohn's disease; Surgical treatment; Maintenance therapy

Luan Y, Zong GQ, Chen J, Xuan J, Xu L, Wang W, Wang F, Liu XS. Surgical treatment of Crohn's disease: an analysis of 19 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1851-1854

## 摘要

**目的:** 探讨克罗恩病诊断、手术及术后维持治疗。

**方法:** 回顾性分析19例经手术、病理证实的克罗恩病患者的临床表现、术前检查及诊断、手术情况及诊断、术后并发症及维持治疗等临床资料。

**结果:** 克罗恩病误诊率高, 术前明确诊断为克罗恩病的仅3例, 误诊率为84.21%。临床表现不典型, 临床表现以腹痛及消化系症状为主, 19例均有不同程度腹痛, 腹痛发生率为100%, 症状与病变部位有关。本组病例急诊手术3例, 择期手术16例, 急诊手术占15.79%。其中4例患者为2次手术, 占21.05%。术后切口感染2例, 切口脂肪液化2例, 术后死亡1例, 术后并发症

## ■背景资料

克罗恩病是一种发病原因不明的慢性肉芽肿性炎症, 可累及胃肠道的各个部位, 该病在西方国家较常见, 以往认为我国发病率较低, 但近年我国报道的病例有明显增多趋势, 该病病程长、误诊率高, 应引起医务工作者高度重视。

## ■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院普通外科



## ■相关报道

Bernell等和Farmer等的研究, 患病的13年里74%的患者将接受首次外科治疗, 术后随访的10年里50%的复发患者将接受再次手术。

发生率26.32%。术后维持缓解12例, 占63.16%, 有效5例, 复发1例。

**结论:** 克罗恩病有较高的误诊率, 病程早期临床表现不典型是该病易误诊的主要原因之一, 手术兼有治疗和明确诊断的双重意义。手术可解决相关并发症, 改善患者的生活质量, 术后恰当的药物维持治疗可望减少复发。

**关键词:** 克罗恩病; 手术; 维持治疗

栾洋, 宗光全, 陈坚, 宣估, 徐琳, 王伟, 王峰, 刘绪舜. 克罗恩病外科治疗19例. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1851-1854  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1851.asp>

## 0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种原因不十分清楚的胃肠道慢性炎性肉芽肿性疾病, 与溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)合称为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 于1932年由美国Crohn医生首先报道并命名。该病可累及胃肠道的各个部位, 但好发于末段回肠及邻近结肠。本病有终生复发倾向, 重症者迁延不愈。近年来我国文献报道该病患者人数不断增多, 值得引起临床医生高度重视。本研究通过对经手术治疗明确诊断为CD的19例病例回顾性分析其临床资料, 探讨其诊断、手术及手术后维持治疗的方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2005-06/2010-05中国人民解放军第八一医院手术的CD患者19例, 所有病例均经手术和(或)病理证实为该病, 其中男16例, 女3例, 年龄25-74(平均42)岁。部分患者术前给予腹部CT、电子肠镜、消化道造影检查及活检病理检查。围手术期加强营养支持改善患者营养状况, 术中尽可能保留肠管, 术后联合内科治疗, 除1例死亡外, 其余18例均获得随访。

**1.2 方法** 动回顾性分析19例患者临床表现、术前检查及诊断、围手术期处理、术中所见及手术方式、术后并发症及维持治疗。

## 2 结果

**2.1 临床表现** 腹痛19例(100%), 多为脐周及右下腹隐痛, 伴恶心呕吐6例(31.58%), 腹胀8例(42.11%), 腹泻6例(31.58%), 腹泻及便秘交替出现6例(31.58%), 便血5例(26.32%), 发热6例(31.58%), 3例为间断性低热(15.79%), 3例为反

复高热(15.79%)。合并贫血8例(42.11%), 合并内瘘1例(5.26%), 合并反复口腔溃疡1例(5.26%), 合并甲状腺腺瘤1例(5.26%), 合并肠系膜淋巴结结核1例(5.26%), 合并直肠癌1例(5.26%)。合并急性阑尾炎3例(15.79%)。

### 2.2 术前检查及术前诊断

**2.2.1 术前检查:** (1)腹部CT检查: 术前11例患者行CT检查, 多可见肠壁不规则或环形增厚, 肠管周围脂肪间隙模糊, 并有肠腔变形、狭窄。5例同时伴小肠不全梗阻。(2)电子结肠镜及消化道造影检查: 10例术前完成肠镜检查, 其中3例术前取得病理证据, 结合临床诊断为CD(15.79%); 12例术前完成消化道造影, 怀疑为CD的有6例(31.58%)。

**2.2.2 术前诊断:** 术前诊断为CD合并肠梗阻3例, 回盲部病变3例, 横结肠占位3例, 直肠上段癌1例, 原因不明肠梗阻及腹痛待查8例, 消化道穿孔1例, 误诊率为84.21%。

**2.3 围手术期处理** 所有患者均在围手术期加强营养支持治疗, 术后胃肠功能恢复后早期给予肠内营养支持及美沙拉秦维持治疗。

**2.4 术中所见及手术方式** 病变累及部位: 病变位于单纯回肠8例, 位于右半结肠、回盲部及回肠5例, 位于左半结肠3例, 位于回肠及横结肠3例。19例患者行急诊手术3例, 择期手术16例, 急诊手术占15.79%。其中4例患者为2次手术。手术方式: 回肠部分切除及吻合8例, 回肠部分切除及回盲部切除、回肠-升结肠端侧吻合术3例, 单纯阑尾切除2例, 左半结肠切除术3例(包括1例同时行直肠癌前切除), 部分回肠及横结肠切除3例。

**2.5 术后并发症** 术后切口感染2例, 切口脂肪液化2例, 术后感染性休克致多脏器功能衰竭于术后13 d死亡1例, 术后并发症发生率26.32%, 围手术期死亡率5.26%。

**2.6 随访结果** 18例患者均得到随访, 随访最长时间62 mo, 最短时间3 mo。术后缓解12例, 有效5例, 复发1例。1例复发经激素冲击治疗缓解后给予加大美沙拉秦剂量继续维持。

## 3 讨论

CD在欧美等西方国家发病率为1/10万至10/10万, 女性比男性约高20%<sup>[1]</sup>, 我国的发病率相对较低。但文献报道近年来我国发病率有上升趋势。CD确诊前病程长、误诊率高, 本组19例, 术前误诊16例, 误诊率高达84.21%。CD早期更缺乏特征性表现, 误诊率更高, 本组4例患者经2次手

术才经病理证实为该病, 我们分析其原因可能是: (1)CD临床表现多样且缺乏特异性是该病误诊的主要原因之一. 腹痛、腹泻是其常见的胃肠道表现, 消化道出血和肛周病变亦较多见, 肠外表现发生率较高, 且复杂多样, 以肝胆疾病、骨关节病、皮肤和口腔溃疡为主, 全身表现以贫血、体质量下降、发热和低蛋白血症多见, 急性起病者易误诊为外科急腹症. 慢性起病者多表现消瘦、贫血、发热、低蛋白血症及血沉增快等全身中毒症状和消耗性表现, 往往易与肠结核、淋巴瘤、肠癌及溃疡性结肠炎等混淆; (2)部分临床医生对该病缺乏充分认识, 过去该病我国发病率较低, 遇到不典型病例多未考虑本病可能性, 但近年来该病发病率有上升趋势, 值得引起高度重视; (3)本病早期病理缺乏特异性表现, 不易明确诊断, 也易漏诊、误诊. 到目前为止, CD的诊断多依靠临床表现、影像学、内镜、组织学及实验室诊断综合做出诊断, 缺乏“金标准”. CD部分患者因并发症而接受手术治疗, 我们认为术中发现与术前诊断不一致的可疑病变肠管, 应给予高度重视并想到本病可能性, 是提高本病确诊率及避免误诊的有效途径, 外科手术在治疗本病引起并发症的同时兼有诊断价值. 所以对于临床高度怀疑又无病理证据的患者, 我们要给予高度重视及适当干预. 这就表明CD的诊断不能以病理学诊断为唯一依据, 对阴性结果更需慎重<sup>[2]</sup>. 我们认为对下列情况要充分考虑存在CD的可能性: (1)表现不典型的阑尾炎, 行阑尾切除术, 术中发现阑尾病变轻微, 应注意探查回盲部有无异常, 特别要注意回肠末端情况, 以免延误CD诊治; 对于阑尾切除术后仍有局部疼痛不适及伴有消化道症状的患者, 不能单纯考虑肠粘连等术后并发症, 要考虑到存在本病的可能性并予以进一步检查; (2)缺乏病理依据的回盲部炎性占位性病变术后, 患者有腹泻、腹痛、便秘及肠梗阻等消化道症状时, 要考虑存在本病可能性; (3)对于有消化功能障碍, 消瘦及腹痛、腹泻的一类患者, 病因不明时, 要考虑到本病的可能性并予以重点排查. CD目前主要以内科综合治疗为主, 传统药物包括氨基水杨酸类、肾上腺糖皮质激素类、抗生素、免疫抑制剂类及生物制剂类等. 随着抗肿瘤坏死因子 $\alpha$ (英夫利昔)10余年的临床运用, 在CD诱导缓解和维持缓解方面具有一定的疗效, 同时可以避免传统疗法带来的一些不良反应, 但目前外科治疗在CD治疗过程中仍有不可

替代的地位. 排斥手术治疗将丧失宝贵的治疗时机, 因此应合理掌握手术适应证. 据统计大约80%的CD患者(尤其是病变部位位于回盲部)都要接受手术治疗<sup>[3]</sup>. 根据Bernell等<sup>[3]</sup>和Farmer等<sup>[4]</sup>的研究, 患病的13年里74%的患者将接受首次外科治疗, 术后随访的10年里50%的复发患者将接受再次手术. 何时采取手术目前还存在争议, 但一项包括136例患者中位随访时间16.6年的研究显示早期手术干预可取得较好的功能保留及症状的完全缓解以及较低发病率及病死率<sup>[5]</sup>. 手术治疗主要是针对并发症解决问题, 适用于内科积极治疗无效而病情危及生命或严重影响生存质量者, 以及有并发症(穿孔、梗阻、腹腔脓肿等)需要外科治疗者<sup>[6]</sup>.

外科手术主要手术方式有以下几种: (1)病变肠段的肠切除术; (2)狭窄成形术; (3)病变肠段旷置短路术; (4)回肠造口术; (5)回肠贮袋直肠吻合术等. 虽然手术方式多样, 但现在普遍共识是尽可能保留肠管, 仅切除引起症状的病变肠管, 尚未引起症状的病变肠管尽可能给予保留. 朱维铭<sup>[7]</sup>也指出手术并未改变CD的远期病程, 仅仅是解除并发症而已. 多次广泛切除易引起短肠综合征, 给患者带来更大痛苦. 肠管保留理念已被大多数外科医生接受. 我们的经验是术中探查发现有病变波及但尚未出现并发症的肠管尽量保留, 虽然患者日后存在再次手术风险, 但能尽量保留患者肠管, 避免短肠综合征的发生及改善患者生存质量, 在内科治疗的配合下, 尽量延长患者缓解期, 取得了满意的效果. 术中是否行阑尾切除术存在争议, 有的学者认为切除阑尾对回肠CD有治疗作用<sup>[8]</sup>. 相反的观点认为, CD炎症波及回盲肠同时行阑尾切除术易致肠痿. 本组2例行阑尾切除术的患者病变位于回盲部, 其中1例且合并有糖尿病及慢性肾功能不全, 因阑尾化脓必须切除, 而回肠末端虽有炎症但肠管未出现明显梗阻及狭窄, 术中给予保留回盲部, 术后无肠痿发生, 我们认为, 回盲部无明显病变者, 阑尾切除术是安全的.

CD内科治疗以往多采用逐级递增治疗方案: 对于轻、中度CD, 首选不良反应较小氨基水杨酸类制剂, 若无效, 再改用肾上腺糖皮质激素诱导缓解. 维持治疗也多采用氨基水杨酸类制剂, 无效时可改用免疫抑制剂. 对于中、重度CD, 则升级为全身肾上腺糖皮质激素诱导缓解, 维持治疗采用免疫抑制剂. 对上述治疗仍然无效者, 可以考虑肠内营养(enteral

#### ■应用要点

对于腹痛原因不明的患者要想到该病的可能性, 对于术中发现可疑病灶要给予重视, 尤其阑尾切除术时发现阑尾炎症与病情不符, 要注意探查回盲部及部分回肠, 排除该病可能, 避免误诊, 延误病情, 给患者造成痛苦.

## ■同行评价

本文设计合理, 有一定的临床应用及借鉴价值。

nutrition, EN)支持治疗, 有条件可予英夫利昔单抗治疗。在治疗CD过程中, 必须积极探索、灵活运用各种治疗措施, 制订合理的治疗方案, 方能取得满意的治疗效果, 提高CD治疗的整体水平。本组18例患者术后给予美沙拉秦口服维持治疗, 获得满意效果。CD患者多经内科治疗无效或出现并发症才行手术治疗, 患者术前多服用肾上腺皮质醇激素及营养状况差, 术后易发生吻合口瘘、感染、切口迁延愈合等并发症。我们的经验是术前逐渐减少肾上腺皮质醇激素剂量及通过营养支持尽量纠正患者低蛋白、贫血等营养不良状况, 术后适当给予小剂量肾上腺皮质醇激素治疗, 因CD患者大多需接受营养支持, 在治疗CD的营养支持方式上, 应首选EN。EN不但能改善患者的营养状态, 也可缓解急性发作症状, 延长疾病的缓解期<sup>[9]</sup>。EN可达到与激素相似的疾病缓解率, 而营养指标改善则优于激素组<sup>[10]</sup>。营养支持不但有利于诱导缓解, 对维持缓解也有效。EN诱导缓解后的维持时间甚至长于应用激素缓解的时间, 口服添加EN也有助于维持缓解<sup>[11]</sup>。而胃肠外营养的治疗效果并不优于EN, 仅适用于那些有EN禁忌证的患者。

在CD内科治疗取得可喜成绩的今天, 外科治疗目前仍有不可替代的地位, 对于该病早期, 临床表现不典型的病例, 手术兼有诊断和治疗作用。目前手术主要是解决相关并发症, 改善患者症状, 度过活动期, 延长缓解期, 手术成败关键是围手术期治疗, 只有内科治疗和外科治疗

相结合才能取得较满意疗效。

## 4 参考文献

- 1 Fichera A, Michelassi F. Surgical treatment of Crohn's disease. *J Gastrointest Surg* 2007; 11: 791-803
- 2 Bremner AR, Pridgeon J, Fairhurst J, Beattie RM. Ultrasound scanning may reduce the need for barium radiology in the assessment of small-bowel Crohn's disease. *Acta Paediatr* 2004; 93: 479-481
- 3 Bernell O, Lapidus A, Hellers G. Risk factors for surgery and recurrence in 907 patients with primary ileocaecal Crohn's disease. *Br J Surg* 2000; 87: 1697-1701
- 4 Farmer RG, Whelan G, Fazio VW. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease. Relationship between the clinical pattern and prognosis. *Gastroenterology* 1985; 88: 1818-1825
- 5 Nordgren SR, Fasth SB, Oresland TO, Hultén LA. Long-term follow-up in Crohn's disease. Mortality, morbidity, and functional status. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 1122-1128
- 6 欧阳钦, 胡品津, 钱家鸣, 郑家驹, 胡仁伟. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. 现代消化及介入诊疗 2008; 13: 139-145
- 7 朱维铭. 复杂克罗恩病的综合治疗. 中国实用外科杂志 2007; 27: 203-205
- 8 陈子清, 应则贵. 阑尾切除对回肠克隆病的影响. 浙江临床医学 2001; 3: 711-712
- 9 黎介寿. 克罗恩病外科治疗的特点. 中国实用外科杂志 2007; 27: 181-182
- 10 Nguyen GC, Laveist TA, Brant SR. The utilization of parenteral nutrition during the in-patient management of inflammatory bowel disease in the United States: a national survey. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 1499-1507
- 11 Lochs H, Dejong C, Hammarqvist F, Hebuterne X, Leon-Sanz M, Schütz T, van Gemert W, van Gossum A, Valentini L, Lübke H, Bischoff S, Engelmann N, Thul P. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Gastroenterology. *Clin Nutr* 2006; 25: 260-274

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)



# DNA修复基因XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感的Meta分析

梁天伟, 孙轶, 卢永刚

梁天伟, 孙轶, 卢永刚, 南方医科大学附属柳州医院普外一科 广西壮族自治区柳州市 545007

作者贡献分布: 梁天伟为本文的主要贡献者; 课题由梁天伟设计; 文献检索、数据提取、数据分析由梁天伟与孙轶共同完成; 论文写作由梁天伟完成; 卢永刚负责审核。

通讯作者: 梁天伟, 主治医师, 545007, 广西壮族自治区柳州市, 南方医科大学附属柳州医院普外一科。

liangtianwei66@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-04-03 修回日期: 2011-05-17

接受日期: 2011-05-24 在线出版日期: 2011-06-18

## Association between DNA repair gene XRCC3 Thr241Met single nucleotide polymorphisms and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis

Tian-Wei Liang, Yi Sun, Yong-Gang Lu

Tian-Wei Liang, Yi Sun, Yong-Gang Lu, Department of General Surgery I, Liuzhou Hospital Affiliated to Southern Medical University, Liuzhou 545007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Tian-Wei Liang, Department of General Surgery I, Liuzhou Hospital Affiliated to Southern Medical University, Liuzhou 545007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. liangtianwei66@yahoo.com.cn

Received: 2011-04-03 Revised: 2011-05-17

Accepted: 2011-05-24 Published online: 2011-06-18

### Abstract

**AIM:** To evaluate the association between single nucleotide polymorphisms of the X-ray repair cross-complementing group 3 (XRCC3) gene and colorectal cancer susceptibility.

**METHODS:** By searching EMBASE (1974-2010.11), Pubmed (1966-2010.11), CNKI (1994-2010.11) and CBM (1978-2010.11), We collected studies evaluating the association between XRCC3 gene polymorphisms and colorectal cancer susceptibility. The effect size was odds ratios (OR) of variant allele of XRCC3Thr241Met in the case and control groups. Random or fixed effect model was selected according to the results of heterogeneity test. The OR and publication bias were calculated using Review Manager 5.0 and

STATA11.0 software.

**RESULTS:** Nine case-control studies involving 3 294 cases and 3 947 controls were included. In the Met/Met versus Thr/Thr group, the odds ratio was 1.30 (95%CI: 0.86-1.98,  $P = 0.22$ ). For the dominant genetic model, the OR in the Met/Met+Met/Thr versus Thr/Thr group was 1.05 (95%CI: 0.67-1.66  $P = 0.83$ ). For the recessive genetic model, the OR in the Met/Met versus Thr/Thr+Thr/Met group was 1.45 (95%CI: 0.94-2.25,  $P = 0.09$ ).

**CONCLUSION:** There was no close association between XRCC3 Thr241 Met single nucleotide polymorphisms and colorectal cancer susceptibility.

**Key Words:** Colorectal cancer; X-ray repair cross-complementing group 3; Single nucleotide polymorphism; Meta-analysis

Liang TW, Sun Y, Lu YG. Association between DNA repair gene XRCC3 Thr241 Met single nucleotide polymorphisms and colorectal cancer susceptibility: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1855-1859

### 摘要

**目的:** 探讨DNA修复基因X线修复交叉互补因子3(XRCC3) Thr241Met单核苷酸多态性与结直肠癌易感性的关系。

**方法:** 检索EMBASE(1974/2010-11)、PubMed (1966/2010-11)、中国期刊全文数据库CNKI (1994/2010-11)、中国生物医学文献数据库CBM(1978/2010-11)公开发表的DNA修复基因XRCC3 Thr241Met单核苷酸多态性与结直肠癌易感性关系的研究。病例组及对照组XRCC3 Thr241Met等位基因分布的优势比(OR)为效应指标, 根据异质性检验结果, 选择随机效应模型或固定效应模型对OR进行合并, 同时进行偏倚评估。

**结果:** 共查到符合要求的文献9篇, 病例组3 294例, 对照组3 947例。分析结果显示:

### ■背景资料

结直肠癌是人类常见的恶性肿瘤, 其发病原因目前仍不清楚。环境因素和饮食习惯可能与发病有关。近年来结直肠癌的遗传背景受到越来越多的关注。单核苷酸多态性可能与个体易感性存在相关性。

### ■同行评议者

何敏, 教授, 广西医科大学医学科学实验中心

## ■研究前沿

单核苷酸多态性与某肿瘤人群易感性关系是近年来的研究热点。目前研究较多的与结直肠癌易感性的单核苷酸多态性位点有XRCC3 Thr 241 Met, CTLA-4+49G>A, MTHFR C677T等,但各研究结果间存在一定差异。

XRCC3 Thr241Met位点突变纯合子(Met/Met)患结直肠癌的风险与野生型纯合子(Thr/Thr)相比差异显著( $OR = 1.30$ , 95%CI: 0.86-1.98,  $P = 0.22$ );显性模式下, XRCC3 Thr241Met位点突变个体(突变纯合子+突变杂合子)(Met/Met)+(Met/Thr)患结直肠癌的风险与野生型纯合子(Thr/Thr)相比差异不显著( $OR = 1.05$ , 95%CI: 0.67-1.66,  $P = 0.83$ );隐性模式下, XRCC3Thr241Met位点突变纯合子(Met/Met)患结直肠癌的风险与野生型(纯合子+杂合子)(Thr/Thr)+(Thr/Met)相比差异显著( $OR = 1.45$ , 95%CI: 0.94-2.25,  $P = 0.09$ )。

**结论:** DNA修复基因XRCC3 Thr241Met位点单核苷酸多态性与结直肠癌易感性间存在明显相关性。

**关键词:** 结直肠癌; X线修复交叉互补因子3; 单核苷酸多态性; Meta分析

梁天伟, 孙轶, 卢永刚. DNA修复基因XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感性的Meta分析. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1855-1859  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1855.asp>

## 0 引言

人类DNA修复基因X线修复交叉互补因子3(X-ray cross-complementing group 3, XRCC3), 最初是从中国仓鼠卵细胞的突变体irs1SF株中分离得到的, XRCC3基因全长为19 843 bp, 其表达产物是一个含有346个氨基酸残基的蛋白质<sup>[1]</sup>. XRCC3基因有11个外显子, 位于该基因第7外显子18067位核苷酸C→T的突变使得第241位密码子编码的苏氨酸(Thr)替换为蛋氨酸(Met), 前者可能对维持蛋白的正常功能起重要作用. 有研究显示<sup>[2]</sup>携带基因型Met/Met突变纯合子的个体外周淋巴细胞的DNA加合物水平明显升高, 提示具有该基因型的个体DNA修复能力降低, 该基因的多态性在肿瘤发生中可能起着重要作用. XRCC3密码子241Met等位基因频率的增高可提高肺癌、膀胱癌等肿瘤的发病风险<sup>[3,4]</sup>, 但研究结果存在一定差异, 因此我们对XRCC3 Thr241Met位点单核苷酸多态性与结直肠癌易感性关系进行了Meta分析。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 检索CNKI、CBM、PubMed、EMBASE数据库, 收集公开发表的关于XRCC3 Thr241Met单核苷酸多态性与结直肠癌易感性

的研究, 中文文献检索词为: “X线修复交叉互补因子3”、“XRCC3”、“结直肠癌”; 英文文献检索词为: “XRCC3”、“X-ray cross-complementing group 3”、“colorectal cancer”, 分别作为主题词、自由词进行检索。

### 1.2 方法

**1.2.1 文献纳入标准:** 病理学确诊为结直肠癌与DNA修复基因XRCC3 Thr241Met单核苷酸多态性的队列研究或病例对照研究; 研究方法相似, 且均符合流行病学要求; 文献提供基因型频数, 优势比(odds ratio,  $OR$ )及95%CI, 或四格表资料用以计算 $OR$ ; 对同一人群或亚群进行的多次研究选择质量较高的最近发表的文献作为研究对象。

**1.2.2 文献排除标准:** 基因分型方法不可靠; 文献提供数据不完整, 无法提取四格表资料用以计算 $OR$ ; 同一研究重复发表的文献。

**统计学处理** 对各研究的基因分布进行Hardy-Weinberg遗传平衡检验, 按照要求整理原始文献并摘录数据. 首先, 以野生型纯合子Thr/Thr为参照, 评估突变型纯合子个体Met/Met患结直肠癌的发病风险(Met/Met) vs (Thr/Thr); 其次, 假设突变基因型为显性基因, 采用显性模式(dominant genetic model)对(Met/Met+Met/Thr) vs (Thr/Thr)进行统计分析; 第三, 假设突变基因型为隐性基因, 采用隐性模式(recessive genetic model)对(Met/Met) vs (Thr/Thr+Thr/Met)进行统计分析. 应用统计分析软件Review Manager 5.0计算合并 $OR$ 值及95%可信区间(95% confidence interval, 95%CI), 绘制 $OR$ 值分布森林图. 统计学异质性采用 $I^2$ 检验来分析, 双侧 $I^2 < 50\%$ 认为不存在明显的异质性, 采用固定效应模型, 反之采用随机效应模型. STATA软件的线性回归模型(Egger法)检验漏斗图的对称性, 评估发表偏倚。

## 2 结果

**2.1 一般资料** S共纳入符合标准的文献9<sup>[5-13]</sup>篇, 其中病例组3 294例, 对照组3 947例. 其中来自亚洲人群报道3篇<sup>[7,8,13]</sup>来自欧洲高加索人群报道6篇<sup>[5,6,9-12]</sup>. 病例诊断均符合WHO诊断标准, 基因分型均使用公认的、科学的检测方法(表1)。

**2.2 突变型纯合子(Met/Met)基因型与结直肠癌易感性的关系** 与野生型纯合子(Thr/Thr)为参照, 评估突变型纯合子(Met/Met)基因型与结直肠癌易感性的关系. 异质性检验:  $I^2 = 71\% > 50\%$ , 采用随机效应模型(图1)分析, 突变纯合子基因型

## ■相关报道

Zheng等的关于CTLA-4+49G>A单核苷酸多态性与结直肠癌易感性的Meta分析显示, 显性模式下, 野生型个体患结直肠癌的风险是突变型个体的1.24倍。

表 1 纳入研究的基本特征

作者	发表时间	18067 C>T		人群	病例(对照)			国家
		病例组	对照组		Thr/Thr	Thr/Met	Met/Met	
Krupa等 <sup>[5]</sup>	2004	51	100	高加索	1(11)	27(81)	23(8)	波兰
Tranah等 <sup>[6]</sup>	2004	835	1 161	高加索	331(442)	385(540)	119(179)	美国
Yeh等 <sup>[7]</sup>	2005	721	734	亚洲	660(658)	60(74)	1(2)	中国
Jin等 <sup>[8]</sup>	2005	140	280	亚洲	124(268)	15(11)	1(1)	中国
Stern等 <sup>[9]</sup>	2005	737	787	高加索	375(380)	285(515)	77(92)	美国
Skjelbred等 <sup>[10]</sup>	2006	399	157	高加索	138(64)	201(73)	60(20)	挪威
Moreno等 <sup>[11]</sup>	2006	361	316	高加索	140(111)	170(158)	51(47)	西班牙
Improta等 <sup>[12]</sup>	2008	109	121	高加索	40(67)	43(46)	26(8)	意大利
Wang等 <sup>[13]</sup>	2010	302	291	亚洲	213(197)	79(85)	10(9)	印度

## ■创新盘点

本文将XRCC3基因Thr241Met位点单核苷酸多态性与结直肠癌易感性关系所有的可能情况进行了假设考虑,避免了不同表型模式对两者关系的影响,同时按人种的区别人种进行了亚组分析,避免了不同人种对结果的影响。

表 2 分层分析不同模式下XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感性关系

人群	突变 vs 野生OR(95%CI)	隐性模式OR(95%CI)	显性模式OR(95%CI)
高加索人群	1.41(0.86-2.30)	1.57(0.95-2.60)	1.01(0.54-1.09)
亚洲人群	1.01(0.44-2.29)	1.04(0.46-2.35)	1.12(0.65-1.94)
整体人群	1.04(0.88-1.23)	1.09(0.93-1.28)	0.98(0.88-1.09)

Met/Met与结直肠癌的易感性无关联( $OR = 1.30$ , 95%CI: 0.86-1.98,  $P = 0.22$ , 图1)。

2.3 显性模式 假设突变基因为显性基因, 采用显性模式(dominant genetic model)对(Met/Met+Met/Thr)vs(Thr/Thr)进行分析, 评估突变型(包括突变纯合子Met/Met, 和突变杂合子Met/Thr)与结直肠癌易感性间的关系。异质性检验 $I^2 = 93\% > 50\%$ , 采用随机效应模型, 在显性模式下, 突变基因型(Met/Met+Met/Thr)与结直肠癌的易感性无关联( $OR = 1.05$ , 95%CI: 0.67-1.66,  $P = 0.83$ , 图2)。

2.4 分层分析 按亚洲人群和高加索人群的不同进行了分层分析, 结果在各种模式下均未显示出XRCC3Thr241Met多态性与结直肠癌易感性的关系(表2)。

2.5 隐性模式 假设突变基因为隐性基因, 采用隐性模式(recessive genetic model)对(Met/Met) vs (Thr/Thr+Met/Thr)进行分析, 评估突变型纯合子(Met/Met)与结直肠癌易感性间的关系。异质性检验 $I^2 = 78\% > 50\%$ , 采用随机效应模型分析, 在隐性模式下, 突变基因型(Met/Met)与结直肠癌的易感性无关联( $OR = 1.45$ , 95%CI: 0.94-2.25  $P = 0.09$ , 图3)。

2.6 发表偏倚识别 Stata软件的线性回归模型(Egger法), 评估发表偏倚。以各研究的OR自然对数值logOR与其标准误SelogOR的比值为应

变量, 以标准误的倒数为自变量, 进行线性回归分析。以野生型纯合子为参照, 偏倚系数(Coef)为9.26, 95%CI: -2.89-21.44, 可信区间包含0, 且 $P = 0.12 > 0.05$ , 说明不存在明显的发表偏倚; 显性模式, 偏倚系数(Coef)为5.03, 95%CI: 2.18-7.89, 可信区间不包含0, 且 $P = 0.004 < 0.05$ , 说明存在明显的发表偏倚; 隐性模式, 偏倚系数(Coef)为5.50, 95%CI: 3.65-14.65, 可信区间包含0, 且 $P = 0.198 > 0.05$ , 说明不存在明显的发表偏倚。

## 3 讨论

结直肠癌与其他实体肿瘤一样是我国乃至世界范围的重要疾病负担<sup>[14]</sup>, 其发病原因目前仍不十分清楚。XRCC3是重要的DNA损伤修复基因, 其表达产物是Rad-51相关蛋白家族的成员之一, 并与Rad-51相互作用, 参与同源序列的重组, 因此该基因正常表达产物对保持染色体的稳定性和损伤DNA的修复起重要作用<sup>[15]</sup>。我们对XRCC3基因Thr241Met位点单核苷酸多态性与结直肠癌易感性关系进行了Meta分析。将该基因此位点单核苷酸位点多态性的可能情况进行了假设考虑, 突变纯合子个体(Met/Met)与野生纯合子个体(Thr/Thr)进行比较; 显性模式下突变个体(Met/Met+Met/Thr)与野生型个体(Thr/Thr)之间的比较; 隐性模式下突变个体(Met/Met)与野生型个体(Thr/Thr+Thr/Met)进行比较。结果, 所有



## ■应用要点

本研究结果未显示出该位点多态性与结直肠癌易感性间存在相关性,说明某个或某几个基因的某个或某几个核苷酸多态性与肿瘤易感性之间的关系可能不足以在较小样本的情况下显现出来,因此,需要进一步加大研究的样本量,同时进行多基因多位点联合检测。

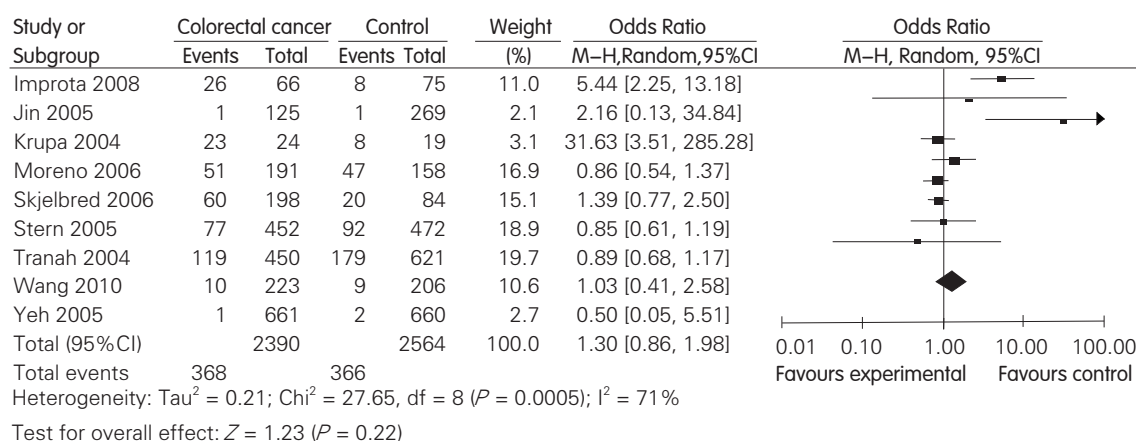


图1 以野生型纯合子(Met/Met)为参照, XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感性关系的森林图(Met/Met vs Thr/Thr).

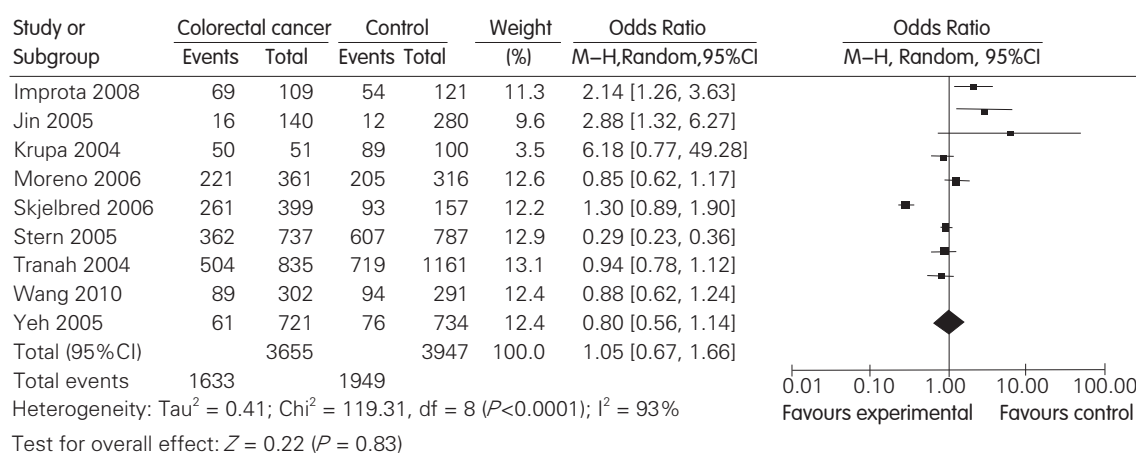


图2 显性模式下XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感性关系的森林图(Met/Met+Met/Thr vs Thr/Thr).

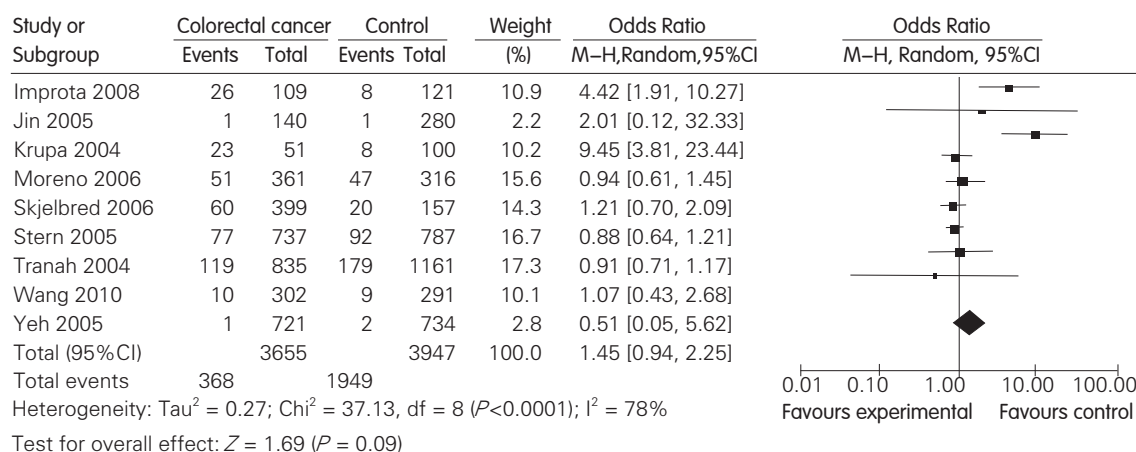


图3 隐性模式下XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感性关系的森林图(Met/Met vs Thr/Thr+Thr/Met).

情况下XRCC3基因Thr241Met位点单核苷酸多态性与结直肠癌易感性间均不存在明显相关性; 分层分析, 按亚洲人群和高加索人群的不同进行了分层分析, 结果在各种模式下均未显示出XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感性的关系。理论上, 肿瘤的遗传方式属于多基因遗传, 并不符合孟德尔单基因遗传的遗传规律。多个

微小效应的基因, 在某个或某些环境因子的作用下产生一个总效应从而导致肿瘤的发生, 他的遗传属于多基因遗传, 肿瘤的遗传并非肿瘤本身, 而是个体对肿瘤的遗传易感性<sup>[16]</sup>。因此某个或某几个基因的某个或某几个核苷酸多态性与肿瘤易感性之间的关系可能不足以在较小样本的情况下显现出来, 因此, 需要进一步加

大研究的样本量, 同时进行多基因多位点联合检测。根据联合检测结果建立生物统计模型, 筛查肿瘤易感人群, 从而为实现肿瘤的三级预防提供理论上的可行性依据, 真正做到早期发现易感人群, 对易感人群进行早期干预, 做到早期预防, 早期诊断, 早期治疗, 从根本上解决目前肿瘤诊断治疗过程中的被动局面。

该项Meta分析同时存在一定的局限性, 首先, 有2个研究<sup>[5,12]</sup>纳入研究的人数较少<300例, 可能距离进行遗传学研究样本量有一定的差距, 小样本量必然降低统计效能, 对结果的稳定性可能会有一定的影响; 第二, 各研究结果间在所有模式下均存在统计学异质性, 尽管这种统计学异质性可以通过随机效应模型进行修正但其结果会增大置信区间的范围, 对结论的稳定性还是会产生一定的影响; 第三, 显性模式下, 线性回归模型(Egger法), 认为存在发表偏倚, 该偏倚的存在, 降低了该模式下结论的可靠性。基于上述局限性, 有必要对DNA修复基因XRCC3 Thr241Met多态性与结直肠癌易感间的关系进行进一步的研究。

#### 4 参考文献

- 1 Tebbs RS, Zhao Y, Tucker JD, Scheerer JB, Siciliano MJ, Hwang M, Liu N, Legerski RJ, Thompson LH. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6354-6358
- 2 Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Peluso M, Malaveille C, Davico L, Piazza A, Vineis P. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer* 2001; 92: 562-567
- 3 Stern MC, Umbach DM, Lunn RM, Taylor JA. DNA repair gene XRCC3 codon 241 polymorphism, its interaction with smoking and XRCC1 polymorphisms, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 939-943
- 4 Misra RR, Ratnasinghe D, Tangrea JA, Virtamo J, Andersen MR, Barrett M, Taylor PR, Albanes D. Polymorphisms in the DNA repair genes XPD, XRCC1, XRCC3, and APE/ref-1, and the risk of lung cancer among male smokers in Finland. *Cancer Lett* 2003; 191: 171-178
- 5 Krupa R, Blasiak J. An association of polymorphism of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 with colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23: 285-294
- 6 Tranah GJ, Giovannucci E, Ma J, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ. XRCC2 and XRCC3 polymorphisms are not associated with risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1090-1091
- 7 Yeh CC, Sung FC, Tang R, Chang-Chieh CR, Hsieh LL. Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3, & XPD genes, and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan. *BMC Cancer* 2005; 5: 12
- 8 Jin MJ, Chen K, Song L, Fan CH, Chen Q, Zhu YM, Ma XY, Yao KY. The association of the DNA repair gene XRCC3 Thr241Met polymorphism with susceptibility to colorectal cancer in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 163: 38-43
- 9 Stern MC, Siegmund KD, Corral R, Haile RW. XRCC1 and XRCC3 polymorphisms and their role as effect modifiers of unsaturated fatty acids and antioxidant intake on colorectal adenomas risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 609-615
- 10 Skjelbred CF, Sæbø M, Wallin H, Nexø BA, Hagen PC, Lothe IM, Aase S, Johnson E, Hansteen IL, Vogel U, Kure EH. Polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XPD genes and risk of colorectal adenoma and carcinoma, in a Norwegian cohort: a case control study. *BMC Cancer* 2006; 6: 67
- 11 Moreno V, Gemignani F, Landi S, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Blanco I, González S, Guino E, Capellà G, Canzian F. Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2101-2108
- 12 Improta G, Sgambato A, Bianchino G, Zupa A, Grieco V, La Torre G, Traficante A, Cittadini A. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 and risk of lung and colorectal cancer: a case-control study in a Southern Italian population. *Anticancer Res* 2008; 28: 2941-2946
- 13 Wang J, Zhao Y, Jiang J, Gajalakshmi V, Kuriki K, Nakamura S, Akasaka S, Ishikawa H, Suzuki S, Nagaya T, Tokudome S. Polymorphisms in DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XPD, and colorectal cancer risk: a case-control study in an Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1517-1525
- 14 杨治力, 王志刚, 郑起. 结直肠癌干细胞研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 913-919
- 15 Pierce AJ, Johnson RD, Thompson LH, Jasin M. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev* 1999; 13: 2633-2638
- 16 实用肿瘤学编委会. 实用肿瘤学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 107-145

#### ■同行评价

本文写作层次清晰, 统计方法恰当, 其科学性、创新性和可读性能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

# Runx3基因甲基化及Runx3蛋白表达在结肠癌发生中的意义

何绍亚, 韩盛玺, 蒋仁发, 向阳生

## ■背景资料

甲基化部位常位于5'-CPG-3'二核苷酸。基因甲基化广泛存在于不同肿瘤中, 许多研究发现人类原发性恶性肿瘤抑癌基因存在高甲基化。

何绍亚, 蒋仁发, 向阳生, 安岳县人民医院消化内科 四川省资阳市 642350

韩盛玺, 四川省人民医院消化内科 四川省成都市 610072

作者贡献分布: 此课题的设计及写作是在韩盛玺老师指导下由何绍亚完成; 蒋仁发与向阳生作了部分协助工作。

通讯作者: 韩盛玺, 主任医师, 610072, 四川省成都市, 四川省人民医院消化内科。hansx@medmail.com.cn

收稿日期: 2011-05-06 修回日期: 2011-05-21

接受日期: 2011-06-02 在线出版日期: 2011-06-18

## Significance of methylation and protein expression of the Runx3 gene in colon carcinogenesis

Shao-Ya He, Sheng-Xi Han, Ren-Fa Jiang, Yang-Sheng Xiang

Shao-Ya He, Ren-Fa Jiang, Yang-Sheng Xiang, Department of Gastroenterology, Anyue People's Hospital, Ziyang 642350, Sichuan Province, China

Sheng-Xi Han, Department of Gastroenterology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan Province, China

Correspondence to: Sheng-Xi Han, Department of Gastroenterology, Anyue People's Hospital, Ziyang 642350, Sichuan Province, China. hansx@medmail.com.cn

Received: 2011-05-06 Revised: 2011-05-21

Accepted: 2011-06-02 Published online: 2011-06-18

## Abstract

**AIM:** To detect the methylation and protein expression of the Runx3 gene in sporadic colorectal cancer (SCRC), colonic adenoma, and normal colon tissue and to evaluate their clinical significance in colorectal carcinogenesis.

**METHODS:** Thirty-four colonic cancer specimens, 34 colonic adenoma specimens, and 34 normal colonic tissue specimens were used in this study. The CpG island methylation status of the Runx3 gene was detected by methylation-specific PCR in these specimens, and the protein expression of Runx3 was detected by immunohistochemistry.

**RESULTS:** The rates of methylation of the Runx3 gene in colonic cancer and colonic adenoma were significantly higher than that in normal

colonic tissue (23.5%, 20.6% vs 0.0%, both  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the rate of methylation of the Runx3 gene between colonic adenoma and colonic cancer ( $P > 0.05$ ). The positive rate of Runx3 protein expression was significantly lower in colonic cancer than in colonic adenoma and normal tissue (17.7% vs 61.8%, 76.5%, both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Methylation of the promoter CpG islands of the Runx3 gene is an important genetic event of colon carcinogenesis and may be associated with altered protein expression of Runx3.

**Key Words:** Runx3; Methylation; Colonic cancer

He SY, Han SX, Jiang RF, Xiang YS. Significance of methylation and protein expressions of the Runx3 protein in colon carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(17): 1860-1863

## 摘要

**目的:** 评价Runx3基因启动子区CpG岛甲基化状态及Runx3蛋白表达在结肠癌发生中的作用及临床意义。

**方法:** 应用DNA甲基化特异性PCR(MSP)技术检测结肠癌、结肠腺瘤、正常结肠黏膜Runx3基因CpG岛甲基化状态, 应用免疫组织化学法检测Runx3蛋白的表达。

**结果:** MSP方法检测发现Runx3基因CpG岛甲基化在结肠癌组、腺瘤组与正常组之间有显著性差异[23.5%(8/34), 20.6%(7/34) vs 0.0%(0/0), 均 $P < 0.05$ ], 而结肠癌组与腺瘤组之间无显著性差异。免疫组织化学检测发现结肠癌组中Runx3蛋白表达阳性率较腺瘤组、正常组之间有显著性差异[17.7%(6/34) vs 61.8%(21/34), 76.5%(26/34), 均 $P < 0.05$ ]。

**结论:** Runx3基因启动子区CpG岛甲基化是促进结肠癌发生的重要基因事件, 可能与Runx3蛋白失表达有关。

## ■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科



**关键词:** Runx3; 甲基化; 结肠癌

何绍亚, 韩盛玺, 蒋仁发, 向阳生. Runx3基因甲基化及Runx3蛋白表达在结肠癌发生中的意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(17): 1860-1863  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/1860.asp>

## 0 引言

DNA甲基化是最常见的表观遗传学改变方式. 他是由S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)提供甲基, 在DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化下, DNA C<sup>5</sup>位的胞嘧啶转变为5-甲基胞嘧啶(5-mC), 发生在转录水平不改变DNA一级结构的碱基修饰方式<sup>[1]</sup>. 甲基化部位常位于5'-CPG-3'二核苷酸. 基因甲基化广泛存在于不同肿瘤中, 许多研究发现人类原发性恶性肿瘤抑癌基因存在高甲基化. 本研究应用甲基化PCR法(MSP)对结肠癌、结肠腺瘤、正常结肠黏膜Runx3基因CpG岛甲基化率进行检测, 旨在探讨Runx3基因CpG岛甲基化在结肠癌发生中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集2008-10/2009-02四川省人民医院手术切除的结肠癌及结肠腺瘤组织标本68例, 正常组织源于肠镜下活检标本34例, 所有病例均经患者同意并签知情同意书, 均为首次诊治患者, 术前未行放疗、化疗或免疫治疗. 其中结肠癌34例, 腺瘤34例, 正常组织34例. 所收集新鲜组织标本均在20 min内保存于-183 °C液氮中以备用. 结肠癌组织中, 男18例, 女16例, 年龄38-78(平均58±2.5)岁; 结肠腺瘤组织中, 男17例, 女17例, 年龄28-73(平均53±2.7)岁. 正常结肠黏膜组织中, 男18例, 女16例, 年龄38-78(平均58±2.2)岁. TIANamp Genomic DNA Kit为北京天根生物科技有限公司产品; EZ DNA Methylation-Gold Kit试剂盒为北京天漠科技开发有限公司产品; DNA标志物λDNA/Hind III、50 bp DNA Labber、2×Taq PCR MasterMix为北京天根生物科技有限公司产品; 兔抗人单克隆抗体Runx3为中杉生物制品公司产品; DAB Kit为中杉金桥生物公司产品.

### 1.2 方法

**1.2.1 引物的合成及制备:** DNA序列参照GenBank, PCR引物参照文献[2]设计. Runx3甲基化前导引物序列(methylated-specific forward primers, MF)5'-TTACGAGGGGCGGTCGTACGC-

GGG-3'; Runx3甲基化反向引物序列(methylated-specific reverse primers, MR)5'-AAAACGACCGACGCGAACGCCTCC-3'; Runx3非甲基化前导引物序列(unmethylated-specific forward primers, UF)5'-TTATGAGGGGTGGTTGTATGTGGG-3'; Runx3非甲基化反向引物序列(unmethylated-specific reverse primers, UR)5'-AAAACAACCAACACAAACACCTCC-3'.

**1.2.2 DNA提取:** 本研究参照Herman等<sup>[3]</sup>使用的甲基化特异性PCR方法. 采用TIANamp Genomic DNA Kit提取组织标本DNA. DNA提取: 经EZ DNA甲基化试剂盒-Gold甲基化提取的组织DNA. Runx3M体系: 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL; Runx3 Mf 1 μL; Runx3 Mr 1 μL甲基化处理后的DNA 2.5 μL; ddH<sub>2</sub>O 8 μL; Runx3基因PCR反应条件: 94 °C 10 min预变性, 65 °C下退火45 s, 72 °C延伸10 min; 以扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 运用Gel Doc 1000凝胶图像成像仪(美国Bio-Rad公司).

**1.2.3 免疫组织化学检测Runx3蛋白的表达:** 实验步骤按说明书进行. (Runx3抗原修复均采用高压热修复), 采用PBS液代替一抗作为阴性对照, 采用已知的阳性片作为阳性对照.

**1.2.4 判断标准:** 扩增产物如出现在250 bp处显示电泳条带为阳性, 否则为阴性; 经Runx3基因非甲基化引物扩增的DNA产物如出现在240 bp处显示电泳条带为阳性, 否则为阴性<sup>[3]</sup>. Runx3蛋白在结肠癌组、结肠腺瘤组及正常组中的阳性表达为细胞核阳性, 呈棕黄色, 高倍镜下计数10个高倍视野, 其阳性计数>10%, 判定为阳性.

**统计学处理** 率的比较采用Fisher确切概率法进行统计学分析, 用SPSS13.0统计学软件对数据进行处理, 检验水准 $\alpha = 0.05$ ,  $P < 0.05$ 有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 各组织Runx3基因启动子CpG岛甲基化** Runx3启动子CpG岛甲基化阳性表达率在结肠癌和腺瘤中分别为23.5%(8/34)、20.6%(7/34), 正常组织中未测到Runx3基因CpG岛甲基化. 结肠癌组、腺瘤组与正常组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ). 结肠癌组与腺瘤组比较无显著性差异( $P > 0.05$ , 表1).

**2.2 Runx3蛋白表达** Runx3蛋白阳性表达率在结肠癌组、腺瘤组与正常组分别为17.7%(6/34)、61.8%(21/34)、76.5%(26/34). 结肠癌与结肠腺瘤

### ■ 相关报道

Ku等应用MSP技术对人结肠癌细胞株进行检测, 发现50%的人结肠癌细胞株Runx3蛋白表达下降或不表达.

## ■应用要点

Runx3基因启动子区CpG岛甲基化是促进结肠癌发生的重要基因事件,可能与Runx3蛋白表达有关.

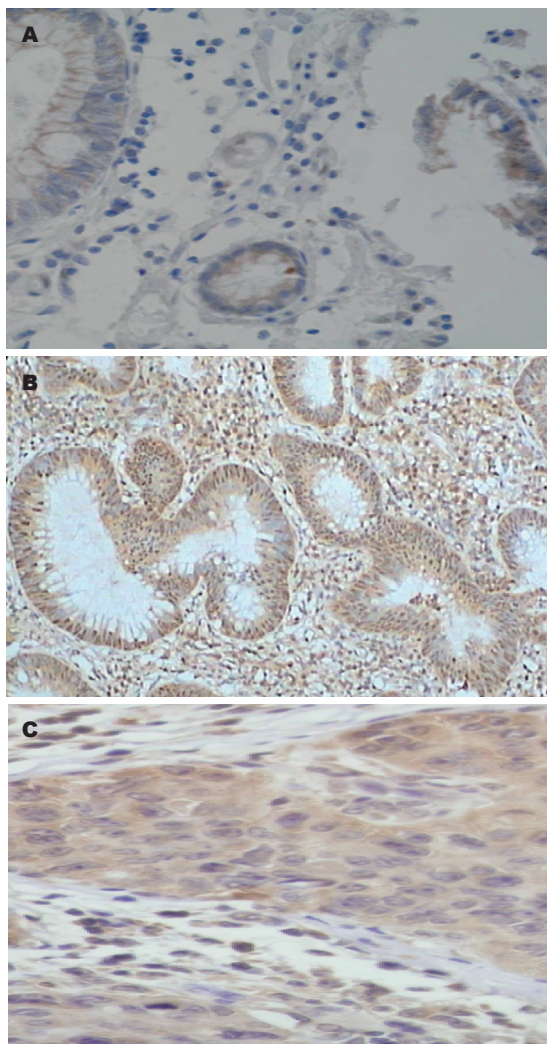


图1 Runx3蛋白在各组结肠组织中的表达(免疫组织化学×100). A: 正常结肠黏膜组织; B: 腺瘤组织; C: 结肠癌组织.

组、正常组比较有显著性差异( $P<0.05$ , 表2, 图1).

### 3 讨论

DNA甲基化与肿瘤发生密切相关, 是抑癌基因失活的机制之一<sup>[4]</sup>. Runx3基因是新近发现的抑癌基因, 是哺乳动物Runx基因家族中最原始亚型. 对上皮细胞生长、分化起调控作用, 对脊神经节发育和T细胞分化也发挥重要作用. Runx3蛋白是TGF- $\beta$ 信号转导通路中的一个转录因子, 直接与R-Smad(Smad受体)结合, 指导TGF- $\beta$ 1/Smad信号途径中被激活的Smad(一种凋亡因子)复合物从胞质转入胞核靶位点, 加强TGF- $\beta$ 1/Smad复合物和靶位点结合, 促进TGF- $\beta$ 1信号传导, 介导细胞正常凋亡, 协同TGF- $\beta$ 1对上皮细胞生长的负性调控, 在TGF- $\beta$ 1信号传导途径中发挥关键作用<sup>[5]</sup>. 国外学者研究发现Runx3基因在结肠癌中高甲基化, Runx3基因CpG岛甲基化导致Runx3基因失活与结肠肿瘤发生密切相关<sup>[6]</sup>.

表1 各组Runx3基因CpG岛甲基化阳性率( $n=34$ )

分组	Runx3基因CpG岛甲基化	
	阳性	阴性
结肠癌组织	8	26
腺瘤组织	7	27
正常组织	0	34

表2 各组Runx3蛋白表达阳性率( $n=34$ )

分组	Runx3蛋白表达	
	阳性	阴性
结肠癌组织	6	28
腺瘤组织	21	13
正常组织	26	8

Runx3蛋白缺失会导致TGF- $\beta$ 1信号通路阻断, 细胞对TGF- $\beta$ 1诱导的生长抑制作用和凋亡反应能力下降,  $\beta$ -catenin在胞质内积聚, Wnt信号通路激活, 细胞增殖和凋亡失衡, 遗传学上不稳定的细胞克隆扩增发生癌变, 促进肿瘤发生<sup>[7]</sup>. 已有研究发现敲除Runx3基因的小鼠其Runx3蛋白表达下降, 小鼠肿瘤发生率明显上升<sup>[8]</sup>. Ku等<sup>[9]</sup>应用MSP技术对人结肠癌细胞株进行检测, 发现50%的人结肠癌细胞株Runx3蛋白表达下降或不表达. 研究还发现人结肠癌、肝细胞癌、胆管癌、胰腺癌、肺癌、食管癌、内胚窦瘤、乳腺<sup>[10-17]</sup>等肿瘤中Runx3蛋白阳性表达率较相应正常组织的阳性表达率显著下降. 本研究发现34例结肠癌中有8例Runx3基因CpG岛甲基化, 甲基化率为23.5%(8/34), 与Ku等<sup>[9]</sup>采用MSP技术检测发现18.4%的结肠癌组织Runx3基因CpG岛甲基化, 正常结肠组织无Runx3基因CpG岛甲基化接近. 与Goel等<sup>[18]</sup>发现21%(19/91)的结肠癌病例存在Runx3基因CpG岛甲基化, 正常组未发现Runx3基因CpG岛甲基化相似. 本研究还发现正常结肠黏膜Runx3蛋白阳性表达率达76.5%(26/34), 腺瘤组Runx3蛋白阳性表达率为61.8%(21/34), 结肠癌Runx3蛋白阳性表达率只有17.7%(6/34), 结肠癌组明显低于腺瘤组及正常组, 且有显著性差异( $P<0.05$ ), 与Chen等<sup>[17]</sup>的报道相似. 本研究提示Runx3基因CpG岛甲基化可能发生于正常结肠黏膜→结肠腺瘤→结肠腺癌这一发展序列早期阶段, 是结肠癌发生早期分子事件. 结肠癌中Runx3蛋白低表达, 可能与结肠癌Runx3基因CpG岛甲基化有关.

## 4 参考文献

- 1 Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 55-60
- 2 Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 988-993
- 3 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- 4 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-3229
- 5 Vogelmann R, Nguyen-Tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A. TGFbeta-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *J Cell Sci* 2005; 118: 4901-4912
- 6 Subramaniam MM, Chan JY, Soong R, Ito K, Yeoh KG, Wong R, Guenther T, Will O, Chen CL, Kumarasinghe MP, Ito Y, Salto-Tellez M. RUNX3 inactivation in colorectal polyps arising through different pathways of colonic carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 426-436
- 7 Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene* 2004; 23: 4232-4237
- 8 Soong R, Shah N, Peh BK, Chong PY, Ng SS, Zeps N, Joseph D, Salto-Tellez M, Iacopetta B, Ito Y. The expression of RUNX3 in colorectal cancer is associated with disease stage and patient outcome. *Br J Cancer* 2009; 100: 676-679
- 9 Ku JL, Kang SB, Shin YK, Kang HC, Hong SH, Kim IJ, Shin JH, Han IO, Park JG. Promoter hypermethylation downregulates RUNX3 gene expression in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23: 6736-6742
- 10 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 11 Park WS, Cho YG, Kim CJ, Song JH, Lee YS, Kim SY, Nam SW, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Hypermethylation of the RUNX3 gene in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med* 2005; 37: 276-281
- 12 Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, Yang JO, Ito Y, Bae SC. RUNX3 inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res* 2005; 65: 9347-9354
- 13 Sato K, Tomizawa Y, Iijima H, Saito R, Ishizuka T, Nakajima T, Mori M. Epigenetic inactivation of the RUNX3 gene in lung cancer. *Oncol Rep* 2006; 15: 129-135
- 14 Hiramatsu T, Osaki M, Ito Y, Tanji Y, Tokuyasu N, Ito H. Expression of RUNX3 protein in human esophageal mucosa and squamous cell carcinoma. *Pathobiology* 2005; 72: 316-324
- 15 Vogiatzi P, De Falco G, Claudio PP, Giordano A. How does the human RUNX3 gene induce apoptosis in gastric cancer? Latest data, reflections and reactions. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 371-374
- 16 Kato N, Tamura G, Fukase M, Shibuya H, Motoyama T. Hypermethylation of the RUNX3 gene promoter in testicular yolk sac tumor of infants. *Am J Pathol* 2003; 163: 387-391
- 17 Chen W, Salto-Tellez M, Palanisamy N, Ganesan K, Hou Q, Tan LK, Sii LH, Ito K, Tan B, Wu J, Tay A, Tan KC, Ang E, Tan BK, Tan PH, Ito Y, Tan P. Targets of genome copy number reduction in primary breast cancers identified by integrative genomics. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46: 288-301
- 18 Goel A, Arnold CN, Tassone P, Chang DK, Niedzwiecki D, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Epigenetic inactivation of RUNX3 in microsatellite unstable sporadic colon cancers. *Int J Cancer* 2004; 112: 754-759

## ■同行评价

本文科学性较好, 具有较好的临床参考意义, 但可读性一般。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2011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)



# 《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56.00元, 全年2016.00元, 邮发代号82-262, 由世界华人消化杂志编辑部出版。《世界华人消化杂志》主要报道胃肠病学、肝胆病学、胰腺病学、内镜介入与消化外科等多学科的评论及基础研究和临床实践等各类文章, 具体内容涉及: 食管疾病, 如反流性食管炎、Barret's食管、食管静脉曲张和食管癌等; 胃部疾病, 胃食管反流性疾病、胃炎、胃动力障碍、胃出血、胃癌和幽门螺杆菌感染等; 肠道疾病, 如肠道出血、肠穿孔、肠梗阻、肠道炎症(如IBD/CD等)、肠道感染、大肠癌和大肠腺瘤等; 肝胆部疾病如病毒性肝炎、肝硬化、脂肪肝、肝纤维化、肝衰竭、胆石病、胆汁郁积、梗阻性黄疸、肝癌、胆囊癌、胆管癌和门静脉高压等; 胰腺疾病, 如胰腺炎和胰腺癌等; 全身性疾病涉及消化系统, 如自身免疫性及瘀胆性疾病、腹腔疾病、消化不良和代谢性疾病等; 以及与以上疾病相关的基因及基因组学、微生物及分子生物学、病因学、流行病学、免疫学、临床内外科诊断与治疗(如影像、化疗、移植、营养等); 除以上外, 本刊也报道诊断与筛选、内窥镜检查法、影像及先进技术。

《世界华人消化杂志》被国际检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析期刊(科技部选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》(2008年版)内科学类的核心期刊、《中国学术期刊评价研究报告-RCES权威、核心期刊排行榜与指南》和

中国知识资源总库收录。2009年《世界华人消化杂志》总被引频次3 009次, 影响因子0.625, 综合评价总分49.4分, 分别位居内科学类48种期刊的第6位、第9位、第6位, 分别位居1 946种中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)的第87位、第378位、第351位; 其他指标: 即年指标0.112, 他引率0.79, 引用刊数473种, 扩散因子15.72, 权威因子1 170.03, 被引半衰期4.0, 来源文献量752, 文献选出率0.93, 地区分布数30, 机构分布数30, 基金论文比0.39, 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<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, Vmax不能Vmax,  $\mu$ 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),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (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 $1 \times 10^{12}$ /L, WBC数用 $1 \times 10^9$ /L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以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、CO<sub>2</sub>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 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 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 =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(2010年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2008年版)收录的学术期刊.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-5908-0035, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

2.5 统计学符号 (1) $t$ 检验用小写 $t$ ; (2) $F$ 检验用英文大写 $F$ ; (3)卡方检验用希文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 $\pm$ 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数 $\pm$ 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3614.5 g  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg  $\pm$  0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm  $\pm$  0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 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



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:  $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP<0.05$ ,  $^dP<0.01$ ; 第3套为 $^eP<0.05$ ,  $^fP<0.01$ .  $P$ 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 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 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<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-262.

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

为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>. 文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/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](mailto: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](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2011年国内国际会议预告

2011-06-23/26

第十五次全国病毒性肝炎及肝病学术会议

会议地点: 沈阳市

联系方式: lijuyi@cma.org.cn

2011-06-24/26

第三届全国微创外科学术会议暨2011国际胃癌微创外科高峰论坛

会议地点: 重庆市

联系方式: xnyptwk@sina.com

2011-06-24/26

2011南方消化论坛暨第七届全国肠道疾病学术大会

会议地点: 广州市

联系方式: gwei203@yahoo.com.cn

2011-07-07

第八届全国大肠癌学术会议暨2011哈尔滨国际结直肠癌外科周

会议地点: 哈尔滨市

联系方式: rainy\_gg@yeah.net

2011-07-14/17

第五届地坛国际感染病会议

会议地点: 北京市

联系方式: info@bjditan.org

2011-07-14/17

2011年临床肿瘤学新进展高级研讨会

会议地点: 杭州市

联系方式: 0571-82888888

2011-07-22/24

第四届全国脂肪肝病专题研讨会

会议地点: 重庆市

联系方式: 010-85867619

2011-07-25/29

2011年第四届全国糖尿病及其并发症营养治疗新进展学习班

会议地点: 上海市

联系方式: tangyan8503@yahoo.cn

2011-07-29/30

肝脏疾病转化医学论坛(长春)暨第三届长春国际肝病高峰论坛

会议地点: 长春市

联系方式: gbgft@yahoo.cn

2011-08-04/07

第五届中国肿瘤内科大会

会议地点: 北京市

联系方式: 010-87788701

2011-08-20/22

第十五次全国中西医结合儿科学术会议

会议地点: 兰州市

联系方式: zxyek@sina.com

2011-08-31/09-02

腹腔间室综合征的护理进展

会议地点: 延吉市

联系方式: qiyang68@126.com

2011-09

中华医学会超声医学分会第十一次全国超声医学学术会议

会议地点: 青岛市

联系方式: <http://www.nccsum.org/>

2011-09-14/17

第六届全国疑难及重症肝病大会

会议地点: 兰州市

联系方式: office@cnsld.org

2011-09-14/18

第十四届全国临床肿瘤学大会暨2011年CSCO学术年会

会议地点: 福州市

联系方式: 010-67726451

2011-09-16/18

第七届全国消化系统中晚期恶性肿瘤学术年会

会议地点: 济南市

联系方式: xiaohuahuiyi@126.com

2011-10-13/16

2011年亚太地区国际肿瘤生物学和医学学术会议

会议地点: 上海市

联系方式: clinimmunchina@yahoo.com

2011-10-14/16

中华医学会第五次全国艾滋病、病毒性丙型肝炎暨全国热带病学术会议

会议地点: 重庆市

联系方式: www.nccsid.org

2011-10-21/23

中华医学会病理学分会第十七次学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: leighdai@cma.org.cn

2011-12-08/11

第11次全国消化系疾病学术会议

会议地点: 杭州市

联系方式: csgdabstract@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!

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

陈钟 主任医师

南通大学附属医院普外科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普通外科

管冬元 副教授

上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

郭晓钟 教授

中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科

何晓顺 教授

中山大学附属第一医院器官移植科

黄晓东 主任医师

武汉市中心医院消化内科

李淳 副教授

汕头大学医学院病理教研室

李永翔 主任医师

安徽医科大学第一附属医院普外科

陆云飞 教授

广西医科大学第一附属医院胃肠外科

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院消化科

马红 主任医师

首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心

单云峰 副主任医师

温州医学院附属第一医院肝胆外科

谭晓冬 副教授

中国医科大学盛京医院胰腺甲状腺外科

汤恢煊 教授

中南大学湘雅医院普外科

汤朝晖 副主任医师

上海交大医学院附属新华医院普外科

唐世刚 教授

大连大学附属中山医院内科

田晓峰 教授

大连医科大学附属第二医院普通外科

王炳元 教授

中国医科大学附属第一医院消化内科

王德盛 副教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

魏继福 副研究员

江苏省人民医院中心实验室

吴君 主任医师

贵阳医学院附属医院感染科

徐辉雄 教授

同济大学附属第十人民医院超声科

徐泱 副教授

上海复旦大学附属中山医院肝肿瘤外科

许玲 副教授

中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

张进祥 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院急诊外科

张俊 副教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院外科

张力为 主任医师

新疆医科大学第一附属医院胸外科