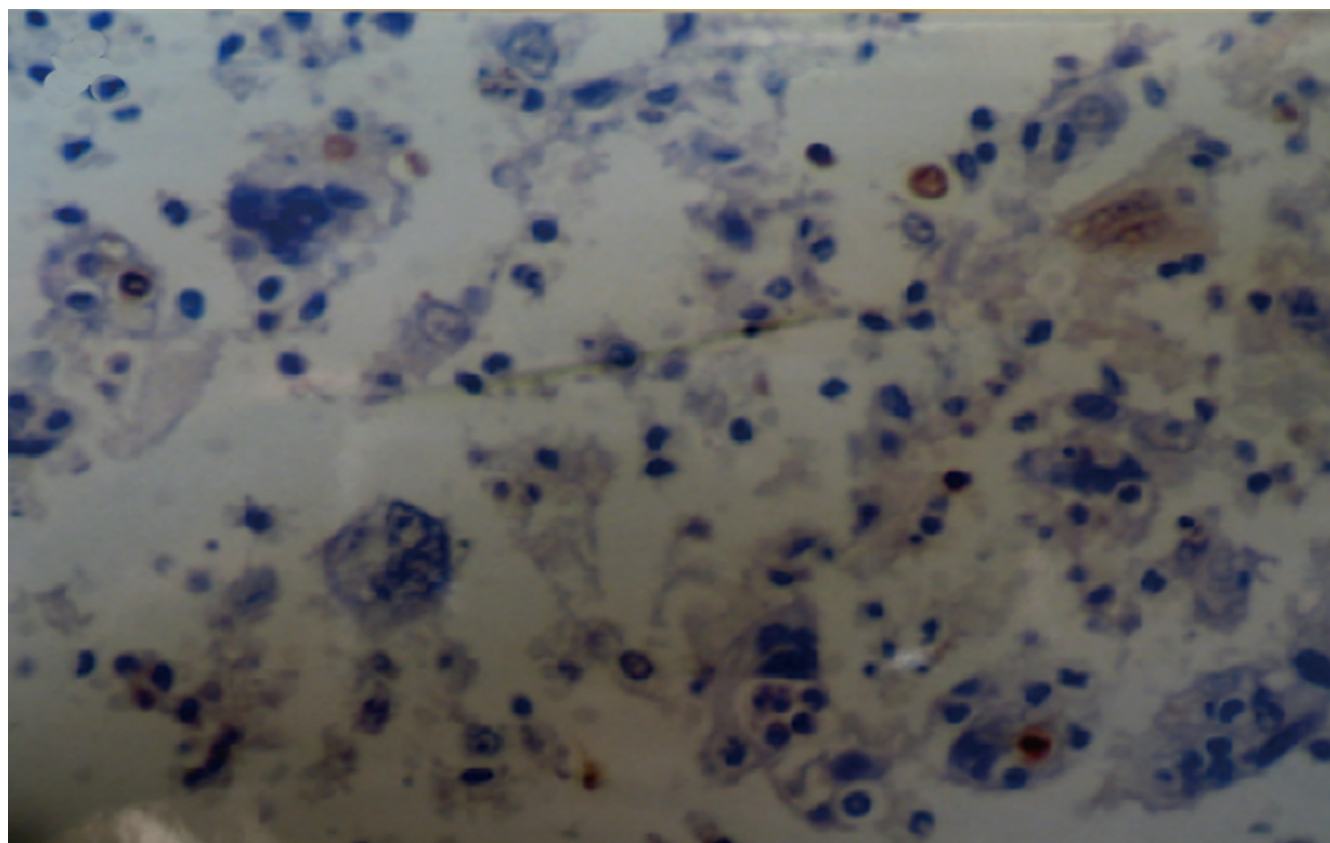


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2013 年 5 月 8 日 第 21 卷 第 13 期 (Volume 21 Number 13)



13 / 2013

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》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《Chemical Abstracts》，《EMBASE/Excerpta Medica》，《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员，由485位专家组成，分布在30个省市，自治区，特别行政区。其中，上海市81位、北京市71位、广东省40位、江苏省39位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位。

总顾问

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

名誉主编

潘伯荣教授

主编

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
白岚教授
卜平教授
陈国忠主任医师
陈洪副教授
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌教授
迟宝荣教授
崔立红教授
邓鑫教授
丁士刚教授
董蕾教授
杜雅菊主任医师
杜奕奇副教授
樊冬梅副主任医师
樊晓明教授
房静远教授

冯志杰主任医师

傅春彬主任医师

甘华田教授

高凌副教授

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

郝丽萍副教授

何继满教授

何松教授

洪天配教授

黄培林教授

黄晓东主任医师

黄颖秋教授

黄缘教授

李国忠教授

江米足教授

姜春萌教授

姜慧卿教授

姜相君主任医师

金瑞教授

蓝宇教授

李淑德教授

李瑜元教授

李玉民教授

廖家智副主任医师

林志辉教授

刘冰熔教授

刘凤斌教授

刘改芳主任医师

刘海峰主任医师

刘海林主任医师

刘亮明副教授

陆伦根教授

马红主任医师

马欣主任医师

毛恩强教授

毛高平教授

孟庆华教授

缪应雷主任医师

倪润洲教授

欧希龙副教授

潘秀珍教授

潘阳林副教授

朴云峰教授

秦成勇教授

任粉玉教授

任建林教授

邵先玉教授

沈琳主任医师

沈薇教授

施瑞华教授

宋军副教授

唐世刚教授

田宇彬教授

度必光教授

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

王蔚虹教授

王晓艳副教授

夏冰教授

夏时海副教授

徐灿霞教授

徐可树教授

杨建民教授

张国主任医师

姚树坤教授

张国梁主任医师

张军教授

张庆瑜教授

张小晋主任医师

张筱茵副教授

张志坚教授

郑培永教授

郑鹏远教授

郑素军副主任医师

郑勇教授

周国雄主任医师

周宇教授

邹晓平主任医师

诸琦教授

于珮主任医师

消化外科学

白雪副主任医师

白雪巍副主任医师

白玉作教授

蔡开琳副教授

蔡三军主任医师

曹杰主任医师

陈炳官教授

陈光教授

陈海龙教授

陈积圣教授

陈进宏副主任医师

陈凇教授

陈汝福教授

陈亚军主任医师

陈钟教授

程爱国教授

程树群副教授

崔云甫教授

戴朝六教授

戴冬秋教授

丁义涛教授

杜顺达副教授

房林教授

傅红副教授

傅华群教授

傅思源副教授

傅晓辉副教授

傅志仁主任医师

高毅主任医师

葛海燕教授

巩鹏副教授

谷俊朝主任医师

顾国利副主任医师

顾岩教授

韩天权教授

郝纯毅主任医师

郝立强副教授

何超教授

何向辉教授

何晓顺教授

何裕隆教授

胡安斌副教授

黄志勇教授

季加孚教授

姜卫东教授

姜波健教授

金山主任医师

康春博副主任医师

孔静副教授

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

李升平教授

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

李永翔教授

李正荣副教授

李志霞教授

李宗芳教授

梁力建教授

刘宝林教授

刘超教授

刘宏鸣副教授

刘建教授

刘亮副主任医师

刘颖斌主任医师

卢军华教授

陆云飞教授

禄韶英副教授

吕凌副教授

吕云福教授

麻勇研究员

齐清会教授

秦春宏副主任医师

秦华东教授

秦环龙教授

秦建民主任医师

邱伟华主任医师

仇毓东教授

崔清波副教授

单云峰副主任医师

沈柏用副教授

施宝民教授

施诚仁教授

施晓雷副主任医师

石毓君研究员

宋新明教授

宋振顺教授

孙诚谊教授

孙文兵教授

孙星副教授

孙学英教授

邵升副教授

谭晓冬教授

汤朝晖副主任医师

汤绍涛教授

唐南洪教授

田晓峰教授
汪波主任医师
汪根树副教授
王道荣主任医师
王德盛副主任医师
王凤山教授
王刚副研究员
王健生教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王悦华副主任医师
王振宁教授
王铮副研究员
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴泰璜教授
伍晓汀教授
谢敏主任医师
徐迅迪教授
徐泱副主任医师
许戈良教授
许剑民教授
薛东波教授
杨柏霖副主任医师
杨桦教授
杨家和主任医师
杨银学教授
殷正丰教授
于聪慧教授
俞继卫副主任医师
于则利教授
禹正杨副教授
喻春钊教授
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
张伟辉主任医师
赵刚副教授
赵青川主任医师
智绪亭教授
周伟平教授
周翔宇副主任医师
邹小明教授

消化感染病学

白浪副教授
陈国凤主任医师
陈红松研究员
陈建杰教授
陈志辉副主任医师

丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
范学工教授
方今女教授
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郭永红副主任医师
胡国信主任医师
靳雪源主任医师
林潮双副教授
刘正稳教授
彭亮副主任医师
钱林学主任医师
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
王建明副教授
王凯教授
王怡主任医师
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副教授
姚鹏副教授
张明辉副主任医师
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵秀英副教授
周陶友副教授
周霞秋教授
朱传武教授
庄林主任医师

消化中医药学

陈治水主任医师
杜群副研究员
扈晓宇主任医师
黄恒青主任医师
李军祥教授
李康副教授
李晓波教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘绍能主任医师
鲁玉辉副教授
南极星教授
牛英才研究员
谭周进教授
王富春教授
王来友副教授
王笑民主任医师

邢建峰副教授
徐列明教授
许玲教授
徐庆教授
袁红霞研究员
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰教授
曹志成院士
代智副研究员
侯风刚副教授
江建新副主任医师
蒋敬庭教授
李苏宜教授
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘炳亚研究员
刘平教授
刘云鹏教授
卢宁副主任医师
卢晓梅教授
朴龙镇副教授
沈克平主任医师
王阁教授
王锐副主任医师
吴建兵教授
向德兵副教授
肖文华主任医师
肖秀英副主任医师
谢丹教授
张凤春教授

消化影像学

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

消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师
李家平教授
刘杰民副主任医师
茅爱武教授
孙明军教授
万军教授

吴沛宏教授
余日胜主任医师
袁友红副教授
张火俊副教授

消化中西医结合学

范恒教授
唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
杨钦河教授
袁建业副研究员
张春虎副教授
朱西杰教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
陈敬贤教授
陈志龙教授
崔莲花副教授
段义农教授
樊红教授
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
郭长江研究员
郭俊明教授
何红伟副研究员
何敏教授
黄昆教授
黄文林教授
黄园教授
洪艳教授
李刚教授
李君文研究员
李孟森教授
李文贵副教授
李焱副研究员
李增山副教授
刘长征副教授
刘克辛教授
刘森副教授
宁钧宇副研究员
彭宗根副研究员
任超世研究员
任浩副教授
任晓峰副教授
邵华副主任药师
沈东炎副教授
沈涛副教授
斯坎德尔·白克力教授
台桂香教授
谭学瑞教授

汤静主管药师
滕旭副教授
田文静副教授
汪思应教授
王钦红教授
王书奎教授
魏继福研究员
文彬研究员
吴道澄教授
吴江锋副教授
吴军研究员
吴俊华副教授
吴志强副教授
夏敏教授
徐健副主任医师
徐宁志研究员
许文燮教授
杨晓明教授
阴赓宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬教授
曾柱教授
张红教授
张淑坤副研究员
赵平教授
赵铁建教授
周南进研究员
周素芳教授
周晓武副主任医师
朱益民教授
竺亚斌研究员

消化病理学

陈云昭副教授
邓昊副教授
杜祥教授
樊祥山副主任医师
郭炜教授
季菊玲副教授
李淳副教授
李晟磊副主任医师
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
门秀丽教授
莫发荣副教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵春玲副教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2013年5月8日 第21卷 第13期 (总第417期)

基础研究

- 1159 三氧化二砷粉针剂联合重组腺病毒介导的IkB α M治疗肝癌
杨雅雯, 刘丹, 刘婷, 胡丽红, 杜雅菊, 刘冰熔
- 1164 Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2在溃疡性结肠炎大鼠脾脏组织中的表达及乌梅丸的干预作用
柯琴梅, 吴霖, 范恒
- 1171 从溃疡性结肠炎大鼠肺损伤细胞凋亡机制探讨“肺与大肠相表里”
盛益华, 王新月, 闫昕, 朱立, 张良登

临床研究

- 1178 肝硬化并产超广谱 β 内酰胺酶大肠埃希菌感染的抗生素治疗
刘钰佩, 梁树人, 郭朝辉, 李顺天, 李嘉

文献综述

- 1185 Th17细胞与肝脏疾病关系的研究进展
薛芝敏, 姚冬梅
- 1191 VEGF与肝脏疾病的关系
阮四军, 邬林泉, 周凡
- 1197 肛裂治疗方式的选择
邓志灏, 赵宝明

研究快报

- 1205 活化大鼠肝星状细胞新表达甘丙肽2型受体拮抗甘丙肽增殖抑制作用
丁永年, 李邦红, 徐雷鸣, 熊静平, 陈源文, 范建高
- 1211 N-乙酰半胱氨酸在减轻大鼠重症急性胰腺炎肠损伤中的作用
牛天平, 王映珍, 曹云华, 王军, 李自力, 肖文, 张有成, 王世文
- 1218 胰腺癌干细胞差异基因的表达及生物信息学分析
江建新, 高珊, 王敏, 李旭, 孙诚谊
- 1226 戊己丸不同配伍方对炎症后肠易激综合征模型大鼠结肠运动及5-羟色胺含量的影响
王迎寒, 周淑媛, 王娅杰, 巩仔鹏, 杨庆, 阚晓溪, 阮从满, 张瑞杰, 朱晓新
- 1234 肠吉泰对腹泻型肠易激综合征大鼠下丘脑、结肠P物质mRNA表达的影响
丛军, 蔡淦, 林江, 张正利
- 1239 叶黄素对人结肠癌HT29细胞增殖的抑制及其机制
付蕾, 陈晓哲, 张慧娟, 张源渊, 王凌飞, 徐少博, 张玉杰, 王明臣

临床经验

- 1245 老年胃食管反流病患者食道动力及胃食管反流的特点
孙莎莎, 张琪, 赵坤, 张翠萍, 田宇彬
- 1250 正常胃黏膜菌群特征分析2例
王莉莉, 董开芯, 周建华, 于新娟, 贾盛佼, 董全江
- 1256 青年男性血清脂联素与非酒精性脂肪性肝炎的关系
张璐, 张琦, 方言, 朱奎轩, 李珍
- 1261 中国人肝淀粉样变性的临床特点
王慧慧, 田宇彬, 丁雪丽, 荆雪, 孔心娟, 张翠萍, 魏良洲, 赵清喜
- 1266 γ -射线立体定向体部放射治疗局限性胰腺癌65例
康晓黎, 王颖杰, 邵银剑, 李宏奇, 李平, 王济东, 王轩, 夏廷毅

附 录	I - V 《世界华人消化杂志》投稿须知 I 2013年国内国际会议预告
志 谢	I 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	1184 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》影响因子0.873 1190 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 1196 《世界华人消化杂志》栏目设置 1204 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.775 1210 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 1233 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号 1244 《世界华人消化杂志》正文要求 1249 《世界华人消化杂志》外文字符标准 1260 《世界华人消化杂志》参考文献要求 1265 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
封面故事	杨雅雯, 刘丹, 刘婷, 胡丽红, 杜雅菊, 刘冰焱. 三氧化二砷粉针剂联合重组腺病毒介导的IkB α M治疗肝癌. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1159-1163 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1159.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1159
本期责任人	编务 马帅; 送审编辑 鲁亚静, 闫晋利; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 黄新珍; 形式规范 审核编辑部主任 田滢; 最终清样审核总编 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2013-05-08

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

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

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

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

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

编辑部

田滢, 主任

《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: 010-59080035

传真: 010-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza, 315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

制作

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: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》,《中文核心期刊要目总览(2011年版)》,《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

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

特别声明

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

定价

每期68.00元 全年36期2448.00元

© 2013年版权归Baishideng所有

World Chinese Journal of Digestology

May 2013 Contents in Brief Volume 21 Number 13

BASIC RESEARCH	<p>1159 Inhibitory effect of As₂O₃ combined with adenovirus carrying IkBαM on proliferation of liver cancer cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> <i>Yang YW, Liu D, Liu T, Hu LH, Du YJ, Liu BR</i></p> <p>1164 Wumeiwan treatment alters the expression of delta-opioid receptor, β-arrestin1 and Bcl-2 in the spleen tissue of rats with ulcerative colitis <i>Ke QM, Wu J, Fan H</i></p> <p>1171 Discussion on theory of the lung and the large intestine being interior-exteriorly related from mechanism of apoptosis in lung injury in rats with ulcerative colitis <i>Sheng YH, Wang XY, Yan X, Zhu L, Zhang LD</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1178 Antibiotic application in cirrhotic patients with extended-spectrum β-lactamase producing <i>E. coli</i> infection <i>Liu YP, Liang SR, Guo ZH, Li ST, Li J</i></p>
REVIEW	<p>1185 Th17 cells and liver diseases <i>Xue ZM, Yao DM</i></p> <p>1191 Relationship between vascular endothelial growth factors and liver diseases <i>Ruan SJ, Wu LQ, Zhou F</i></p> <p>1197 Choice of treatments for anal fissure <i>Deng ZH, Zhao BM</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1205 Newly expressed galanin type 2 receptor suppresses proliferation of activated hepatic stellate cells <i>Ding YN, Li ZH, Xu LM, Xiong JP, Chen YW, Fan JG</i></p> <p>1211 N-acetylcysteine ameliorates severe acute pancreatitis-associated intestinal injury in rats <i>Niu TP, Wang YZ, Cao YH, Wang J, Li ZL, Xiao W, Zhang YC, Wang SW</i></p> <p>1218 Identification and bioinformatic analysis of differentially expressed genes in pancreatic cancer stem cells <i>Jiang JX, Gao S, Wang M, Li X, Sun CY</i></p> <p>1226 Influence of Wuji Wan in different compatibilities on colonic motility and 5-hydroxytryptamine contents in rats with post-infectious irritable bowel syndrome <i>Wang YH, Zhou SY, Wang YJ, Gong ZP, Yang Q, Kan XX, Ruan CX, Zhang RJ, Zhu XX</i></p> <p>1234 Effect of Changjitai decoction on expression of substance P mRNA in the colonic mucosa and hypothalamus of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome <i>Cong J, Cai G, Lin J, Zhang ZL</i></p> <p>1239 Mechanisms underlying suppressive effect of lutein on cell proliferation in human colon cancer cell line HT29 <i>Fu L, Chen XZ, Zhang HJ, Zhang YY, Wang LF, Xu SB, Zhang YJ, Wang MC</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>1245 Characteristics of esophageal motility and esophageal acid exposure in elderly patients with gastroesophageal reflux disease <i>Sun SS, Zhang Q, Zhao K, Zhang CP, Tian ZB</i></p> <p>1250 454-pyrosequencing analysis of normal gastric mucosal microbiota <i>Wang LL, Dong KX, Zhou JH, Yu XJ, Jia SJ, Dong QJ</i></p> <p>1256 Relationship between serum adiponectin and non-alcoholic steatohepatitis in young men <i>Zhang L, Zhang Q, Fang Y, Zhu KX, Li Z</i></p> <p>1261 Clinical characteristics of hepatic amyloidosis in Chinese patients <i>Wang HH, Tian ZB, Ding XL, Jing X, Kong XJ, Zhang CP, Wei LZ, Zhao QX</i></p> <p>1266 Efficacy and toxicity of γ-ray stereotactic body radiation therapy in management of locally advanced pancreatic carcinoma: Our experience with 65 cases <i>Kang XL, Wang YJ, Shao YJ, Li HQ, Li P, Wang JD, Wang X, Xia TY</i></p>

APPENDIX	I – V Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> I Meeting events calendar in 2013
ACKNOWLEDGMENT	I Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
COVER	<i>Yang YW, Liu D, Liu T, Hu LH, Du YJ, Liu BR.</i> Inhibitory effect of As ₂ O ₃ combined with adenovirus carrying IkB α M on proliferation of liver cancer cells <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> . <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2013; 21(13): 1159-1163 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1159.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1159
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Shuai Ma</i> Review Editor: <i>Ya-Jing Lu, Jin-Li Yan</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Xin-Zhen Huang</i> Proof Editor: <i>Ying Tian</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date May 8, 2013

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

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

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

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

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

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

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

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology,

Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

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

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

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

EDITORIAL OFFICE

Ying Tian, Director

World Chinese Journal of Digestology

Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-59080035

Fax: +86-10-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza,

315-321 Lockhart Road, Wan Chai,

Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpg@baishideng.com

<http://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited
Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue

RMB 2448 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2013 Baishideng. Articles published by this Open Access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

三氧化二砷粉针剂联合重组腺病毒介导的I κ B α M治疗肝癌

杨雅雯, 刘丹, 刘婷, 胡丽红, 杜雅菊, 刘冰熔

杨雅雯, 刘丹, 刘婷, 胡丽红, 杜雅菊, 刘冰熔, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科, 黑龙江省哈尔滨市 150086
杨雅雯, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的基础及临床研究。
哈尔滨市科技计划基金资助项目, No. 2004AA9CS196-13
作者贡献分布: 此课题由刘冰熔与杜雅菊设计与指导; 研究过程由杨雅雯、刘婷及胡丽红共同完成; 数据分析由刘丹完成; 刘丹完成论文撰写; 由刘冰熔审核。
通讯作者: 刘冰熔, 教授, 主任医师, 博士生导师, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学第二附属医院消化内科. liubingrong@medmail.com.cn
电话: 0451-86605980 传真: 0451-86605980
收稿日期: 2013-02-07 修回日期: 2013-03-07
接受日期: 2013-03-29 在线出版日期: 2013-05-08

Inhibitory effect of As₂O₃ combined with adenovirus carrying I κ B α M on proliferation of liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*

Ya-Wen Yang, Dan Liu, Ting Liu, Li-Hong Hu, Ya-Ju Du, Bing-Rong Liu

Ya-Wen Yang, Dan Liu, Ting Liu, Li-Hong Hu, Ya-Ju Du, Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by: the Science and Technology Project of Harbin City, No. 2004AA9CS196-13
Correspondence to: Bing-Rong Liu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Street, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. liubingrong@medmail.com.cn
Received: 2013-02-07 Revised: 2013-03-07
Accepted: 2013-03-29 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To analyze the inhibitory effect of arsenic trioxide (As₂O₃) combined with adenovirus carrying I κ B α M (Ad-I κ B α M) on proliferation of liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*.

METHODS: The effect of As₂O₃ combined with Ad-I κ B α M on liver cancer cell growth was assessed by MTT assay. Wistar rats were treated with diethylnitrosamine (DEN) for about 16 wk to induce liver cancer. The index of apoptosis was assessed by TUNEL assay.

RESULTS: As₂O₃ induced cellular toxicity in a dose- and time-dependent fashion in SMMC-7721

cells. MTT assay showed that the proliferation of SMMC-7721 cells was most significantly suppressed by As₂O₃ at a dose of 16 μ mol/L, and the reduced rate of cell proliferation was 17.7% \pm 5.3%, 40.7% \pm 2.5% and 62.8% \pm 5.4% at 48, 72 and 96 h, respectively. The reduced rate of cell proliferation at 72 and 96 h in cells treated with 16 μ mol/L As₂O₃ and Ad-I κ B α M was 68.3% \pm 2.1% and 81.9% \pm 3.0%, significantly higher than those in other groups (all $P < 0.01$). DENA treatment successfully induced tumors in rats at week 16. There was no significant difference in life span of liver cancer-bearing rats among each group. TUNEL assay demonstrated that treatment with As₂O₃ and Ad-I κ B α M greatly enhanced apoptotic cell death.

CONCLUSION: Ad-I κ B α M has a synergistic effect with As₂O₃ in inhibiting liver cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Ad-I κ B α M; Arsenic trioxide; Gene therapy; Liver cancer

Yang YW, Liu D, Liu T, Hu LH, Du YJ, Liu BR. Inhibitory effect of As₂O₃ combined with adenovirus carrying I κ B α M on proliferation of liver cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(13): 1159-1163
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1159.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1159>

摘要

目的: 探讨三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)粉针剂联合重组腺病毒介导的I κ B α M抑制肝癌细胞增殖及对大鼠肝癌的治疗效果。

方法: MTT法检测不同浓度As₂O₃联合Ad-I κ B α M对肝癌细胞增殖的抑制作用。探讨体内As₂O₃联合Ad-I κ B α M对二乙基亚硝胺诱发的大鼠肝癌的抑制作用, 并应用TUNEL法检测各处理组肝癌的凋亡指数。

结果: As₂O₃处理肝癌细胞SMMC-7721的细胞毒作用存在剂量依赖性以及时间依赖性, 16 μ mol/L的As₂O₃抑制率最高, 48、72、96 h

■背景资料

三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)是中国传统医药“砒霜”的活性成分, 能够诱导多种实体瘤细胞和白血病细胞的凋亡。本文将As₂O₃粉针剂与腺病毒介导的核因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)超抑制物I κ B α M联合应用于肝癌治疗, 观察其对肝癌增殖及凋亡的影响。

■同行评议者

施晓雷, 副主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院

■ 研发前沿

肝癌是严重威胁人类生命的恶性肿瘤之一,近年来肝癌的治疗模式逐渐向多元化发展,除占有重要地位的化疗,基因治疗也成为具有广泛应用前景的治疗手段之一。

分别为 $17.7\% \pm 5.3\%$ 、 $40.7\% \pm 2.5\%$ 、 $62.8\% \pm 5.4\%$ 。16 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 联合转染Ad-I κ B α M处理组在72 h和96 h,对肝癌细胞抑制率分别为 $68.3\% \pm 2.1\%$ 和 $81.9\% \pm 3.0\%$,显著高于16 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 联合Ad-I κ B α 组(P 值分别为0.004)。二乙基亚硝胺于第16周诱发大鼠肝癌,成瘤率约达80%。各处理组成瘤大鼠(包括无菌生理盐水组、 As_2O_3 组、 As_2O_3 +Ad-I κ B α 组以及 As_2O_3 +Ad-I κ B α M组)的生存期无明显差别。 As_2O_3 联合Ad-I κ B α M处理组肝癌的凋亡率较其他处理组均显著增高。

结论:腺病毒介导的I κ B α M与 As_2O_3 具有协同作用,转染Ad-I κ B α M可以明显增强 As_2O_3 的抑制肝癌细胞增殖作用以及体内抑瘤作用。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: Ad-I κ B α M; 三氧化二砷; 基因治疗; 肝癌

核心提示: 腺病毒介导的I κ B α M与三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)具有协同作用,转染重组腺病毒-I κ B α M可以明显增强 As_2O_3 的抑制肝癌细胞增殖作用以及体内抑瘤作用。

杨雅雯, 刘丹, 刘婷, 胡丽红, 杜雅菊, 刘冰熔. 三氧化二砷粉针剂联合重组腺病毒介导的I κ B α M治疗肝癌. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1159-1163 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1159.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1159>

0 引言

细胞核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种广泛存在于细胞中的具有多向调节作用的蛋白质因子,是恶性肿瘤抗凋亡的重要机制之一^[1,2]。三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)在肿瘤治疗中的研究,已经从血液系统肿瘤扩展到实体瘤,研究表明 As_2O_3 可选择性抑制多种人类肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡与分化^[3-8]。在前期工作中,我们用已经克隆成功的中国人I κ B α 基因定点诱变构建NF- κ B超抑制物I κ B α M,并在此基础上应用最新的腺病毒构建系统构建重组腺病毒-I κ B α M(adenovirus carrying-I κ B α M, Ad-I κ B α M)以及对照组腺病毒Ad-I κ B α ^[9]。本研究中我们应用粉针剂 As_2O_3 联合Ad-I κ B α M进行肝癌的治疗研究,为今后的肝癌基因治疗打下坚实的基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系SMMC-7721、人胚肾细

胞系293T均购自中科院上海细胞所细胞库;试验动物是6周龄Wistar大鼠,共25只,均为♂,体质量为 $110 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$,购自哈医大二院动物中心洁净动物房。分析纯的 As_2O_3 粉针剂购自北京五七六零一化工厂;二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DENA)为Sigma公司产品,用纯净水配制成95 mg/L溶液,每日新鲜配制并避光保存;TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒购自Roche公司;NF- κ B P65小鼠单克隆抗体(一抗)及鼠SP免疫组织化学染色试剂盒均购自北京中山金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的构建: 含Ser32和36位丝氨酸定点诱变为丙氨酸的中国人I κ B α 基因编码区cDNA序列并表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的Ad-I κ B α M、含未突变的中国人I κ B α 基因并表达GFP的重组腺病毒Ad-I κ B α ,均系刘冰熔博士构建^[9]。

1.2.2 试验动物及动物模型制备: 试验动物随机分笼饲养,每笼5只,每日正常饲料喂饲,将每日新鲜配制的DENA水溶液(浓度为95 mg/L)按每只大鼠20 mL/d药液饮饲(饮饲容器用避光容器)。所有动物均在相同条件下饲养。

1.2.3 肝癌细胞的体外增殖试验: 采用四甲基偶氮盐(MTT)方法检测,取对数生长期人肝癌细胞系SMMC-7721分别转染实验组腺病毒Ad-I κ B α M(2.0×10^8 pfu)和对照组腺病毒Ad-I κ B α (2.0×10^8 pfu)。转染后24 h将各组细胞接种于96孔板中,每组设6个复孔,1000-2000个细胞/孔,待细胞贴壁后分别加入不同浓度三氧化二砷使之终浓度为0、2、4、8和16 $\mu\text{mol/L}$ 。分别取4个时间点进行检测,分别为24、48、72和96 h。检测前首先更换培养液100 μL /孔在培养箱继续培养,MTT溶液10 mL/孔,反应1 h后,选择450 nm和630 nm双波长测定各孔的吸光度值。

1.2.4 成瘤大鼠的处理: 实验分 As_2O_3 联合Ad-I κ B α M组(注入药物为 As_2O_3 2.2 mg/kg、碘化油0.5 mL/kg、Ad-I κ B α M 2.0×10^8 pfu); As_2O_3 联合Ad-I κ B α 组(As_2O_3 2.2 mg/kg、碘化油0.5 mL/kg、Ad-I κ B α 2.0×10^8 pfu); As_2O_3 组(As_2O_3 2.2 mg/kg、碘化油0.5 mL/kg); 生理盐水对照组(等体积生理盐水)。术前大鼠禁食12 h,采用10 mg/mL戊巴比妥钠(按大鼠体质量30 mg/kg)腹腔注射麻醉。应用29 G胰岛素针经肝固有动脉注射各组药物。将各组大鼠分笼饲养2 wk后麻醉处死取出肝脏,10%中性甲醛固定,脱水、石蜡包埋处理。

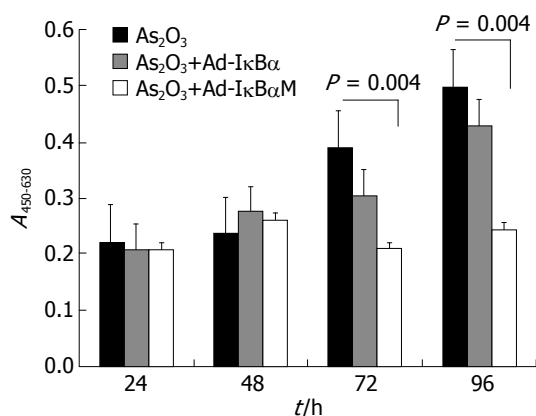


图1 体外转染Ad-IκBαM抑制肝癌细胞SMMC-7721增殖。
As₂O₃: 三氧化二砷。

1.2.5 免疫组织化学法检测NF-κB/P65的表达: 3% H₂O₂灭活、抗原修复、血清封闭、滴加1:100稀释的一抗, 4℃过夜; PBS洗涤3次, 每次5 min; 滴加二抗, 室温静置1 h, PBS洗涤3次; DAB显色5-10 min, 自来水浸洗终止反应, 苏木素复染2 min后盐酸乙醇分化、氨水返蓝, 封片, 读片。

1.2.6 TUNEL法检测凋亡: 3% H₂O₂灭活阻断内源性辣根过氧化物酶, PBS洗2次, 每次5 min, 2×SSC中80℃浸泡20 min, PBS洗2次, 每次5 min; 蛋白酶K消化0-20 min; PBS洗2次, 每次5 min, TdT缓冲液孵育10 min, TdT反应液37℃孵育1 h; 2×SSC溶液浸泡10 min, 终止反应; PBS洗2次, 每次5 min; 链卵白素标记的辣根过氧化物酶孵育30 min, PBS洗2次, 每次5 min; DAB显色5-10 min, 苏木素复染3-5 min, 封片。凋亡指数的计算: 随机计数高倍视野下细胞每100个细胞中的阳性细胞数。

统计学处理 数据结果均采用mean±SD表示, 组间差异显著性分析采用配对t检验, 应用SPSS10.0统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 MTT比色法测定As₂O₃联合Ad-IκBαM对肝癌细胞的抑制率 As₂O₃对肝癌细胞SMMC-7721增殖的抑制作用具有时间依赖性和浓度依赖性, 16 μmol/L的As₂O₃对肝癌细胞的抑制率最高, 48、72、96 h分别为17.7%±5.3%、40.7%±2.5%、62.8%±5.4%。如图1所示, 在72 h和96 h时间点, 16 μmol/L As₂O₃联合转染Ad-IκBαM处理组吸光度值显著低于16 μmol/L As₂O₃联合转染Ad-IκBα组, 前者抑制率分别为68.3%±2.1%和81.9%±3.0%, 二者比较具有显著统计学

表1 TUNEL方法检测不同处理组组织中肝癌细胞的凋亡百分率 (n=5, %)

不同处理组	凋亡指数	P值
生理盐水	1.18 ± 0.32	0.009 ^a
As ₂ O ₃	4.64 ± 1.16	0.032 ^c
As ₂ O ₃ + Ad-IκBα	4.66 ± 1.75	0.032 ^e
As ₂ O ₃ + Ad-IκBαM	7.52 ± 1.59	

^aP<0.05 vs As₂O₃ + Ad-IκBαM组; ^cP<0.05 vs As₂O₃ + Ad-IκBαM组; ^eP<0.05 vs As₂O₃ + Ad-IκBαM组。As₂O₃: 三氧化二砷。

差异(P值均为0.004)。

2.2 DENA诱发大鼠肝癌 喂饮DENA 16 wk后大鼠开始出现精神萎靡, 活动减少, 进食饮水减少以及体质量下降, 大鼠肝脏表面粗糙并形成肿瘤(图2A), 成瘤率约为80%。应用免疫组织化学方法检测各处理组肝癌中NF-κB/P65表达情况(图2C, D)。各处理组大鼠的生存期无显著差别。

2.3 TUNEL法检测各处理组肝癌组织中的凋亡情况 每个取材组织选取5个以上高倍视野, 每个视野计数100个细胞, 计算阳性细胞数(棕黄色)占全部细胞的百分数, 即凋亡指数(apoptosis index, AI)(图3, 表1)。

3 讨论

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是严重威胁人类生命的恶性肿瘤之一, 我国每年约有11万人死于肝癌, 占全球肝癌死亡人数的45%。尽管手术切除和肝移植是HCC首选治疗方式, 但多数患者诊断时已不具备手术适应症, 且术后肿瘤复发率高以及肝移植的高额医疗成本限制了其普遍应用。近年来肝癌的治疗模式逐渐向多元化发展, 除占有重要地位的化疗外, 基因治疗也成为具有广泛应用前景的治疗手段之一^[10]。

As₂O₃是中国传统医药“砒霜”的活性成分, 能够诱导多种实体瘤细胞和白血病细胞的凋亡^[11-14]。与以往对As₂O₃的研究一致, 我们的研究表明, 体外培养基中As₂O₃的浓度在2 μmol/L以上就可抑制肝癌细胞SMMC-7721的生长, 并且随着剂量的增加其抑制作用显著增强, 此外As₂O₃对细胞增殖的抑制作用具有明显的时间依赖性。

许多抗癌药物以诱导细胞凋亡作为治疗肿瘤的机制之一, 但是肿瘤细胞往往对抗癌药物诱导的细胞凋亡产生耐药性, 从而削弱治疗的效果^[15,16]。大量研究表明, 肿瘤细胞核转录因子

■ 相关报道

研究表明, NF-κB一旦被激活可以诱导凋亡抑制基因表达, 对抗化疗药物引起的细胞凋亡, 造成肿瘤细胞的化疗抵抗。因此, 抑制NF-κB通路的活化将在肿瘤治疗中发挥重要作用。

■创新盘点

As_2O_3 和 Ad-I κ B α M 联合无论在抑制肝癌细胞的增殖还是促进肿瘤细胞的凋亡方面均具有明显的协同作用。

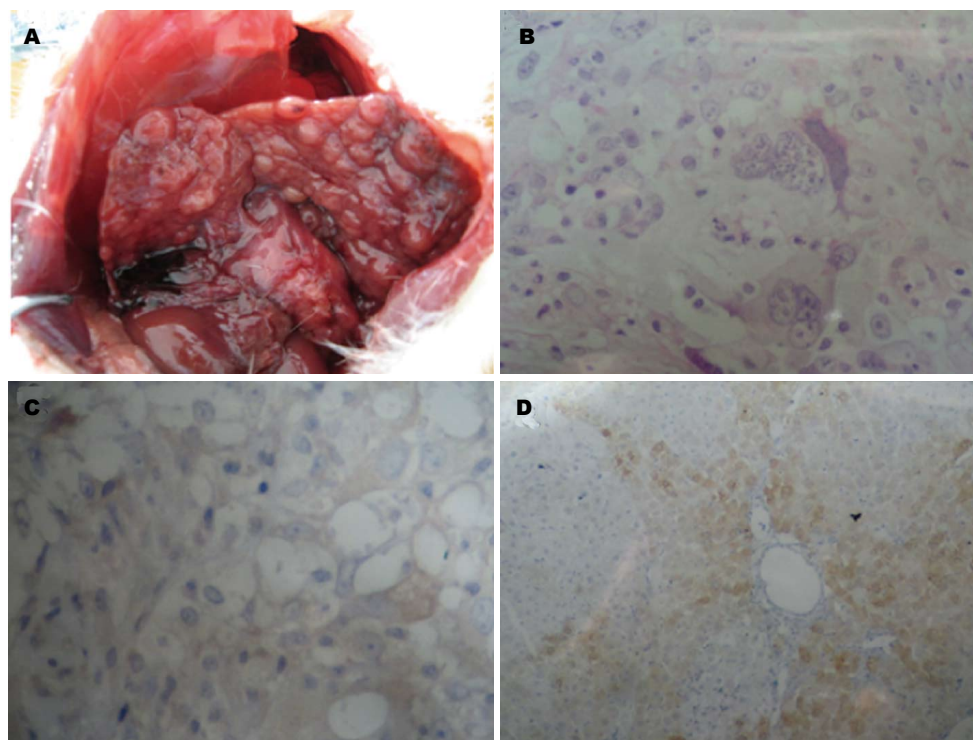


图2 大鼠肝癌模型的建立及鉴定. A: 大鼠肝脏上的原发癌结节; B: 原发癌结节的HE染色鉴定; C: As_2O_3 联合Ad-I κ B α M处理组肝癌中NF- κ B/P65的表达; D: As_2O_3 联合Ad-I κ B α M处理组肝癌中NF- κ B/P65的表达. NF- κ B: 核因子; As_2O_3 : 三氧化二砷.

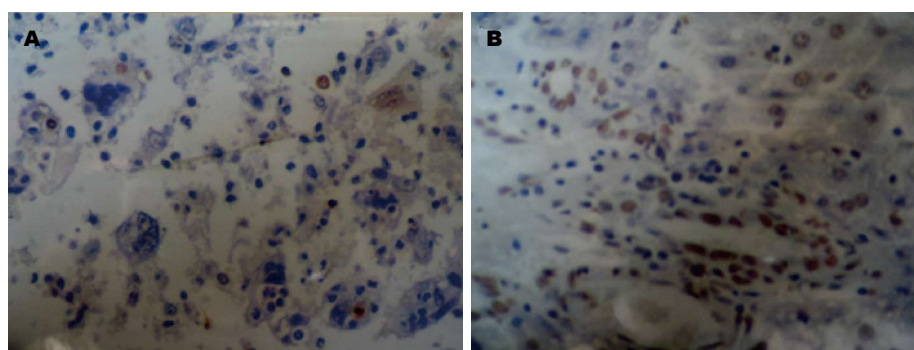


图3 转染Ad-I κ B α M能够促进肝癌细胞凋亡. A: As_2O_3 联合Ad-I κ B α M处理组肝癌细胞凋亡检测; B: As_2O_3 联合Ad-I κ B α M处理组肝癌细胞凋亡检测. Ad-I κ B α M: 重组腺病毒-I κ B α M; As_2O_3 : 三氧化二砷.

NF- κ B的活化是其耐药性产生机制之一. NF- κ B通常以二聚体形式与其抑制蛋白I κ B形成复合物, 以非活性形式存在于细胞质中, 在受到各种理化因素的作用后I κ B将被磷酸化、降解, 因而NF- κ B将会被解离、活化进入细胞核内发挥调节基因转录表达的作用, 参与免疫调节、细胞转化、肿瘤的发生发展和转移以及细胞凋亡. 因此, NF- κ B一旦被激活可以诱导凋亡抑制基因表达, 对抗化疗药物引起的细胞凋亡, 造成肿瘤细胞的化疗抵抗^[17-19]. 因此, 抑制NF- κ B通路的活化将在肿瘤治疗中发挥重要作用^[20-22].

在前期工作中我们应用新型腺病毒载体构建系统AdEasy system构建含突变的I κ B α 基因的

重组腺病毒Ad-I κ B α M, 他是NF- κ B的超抑制物, 是调控NF- κ B活性的有力武器. 本研究发现Ad-I κ B α M与 As_2O_3 具有协同作用, 转染Ad-I κ B α M可以明显增强 As_2O_3 的抑制肝癌细胞增殖作用以及体内抑瘤作用. 16 μ mol/L As_2O_3 联合转染Ad-I κ B α M处理组在72 h和96 h的抑制率分别为 $68.3\% \pm 2.1\%$ 和 $81.9\% \pm 3.0\%$, 显著高于16 μ mol/L As_2O_3 联合转染Ad-I κ B α 组. 经肝固有动脉注入 As_2O_3 和Ad-I κ B α M后肿瘤组织中的凋亡细胞显著增多. 由此可见, As_2O_3 和Ad-I κ B α M联合无论在抑制肝癌细胞的增殖还是促进肿瘤细胞的凋亡方面均具有明显的协同作用. 本研究中 As_2O_3 联合Ad-I κ B α M处理组荷瘤大鼠的生存期与其

他处理组相比没有显著延长, 其原因可能是各组试验动物较少以及观察时间较短. 总之, Ad-IκBαM重组腺病毒在肝癌治疗中的应用值得进一步研究.

4 参考文献

- 1 Yan X, Shen H, Jiang H, Hu D, Wang J, Wu X. External Qi of Yan Xin Qigong Inhibits Activation of Akt, Erk1/2 and NF-κB and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 2013; 31: 113-122 [PMID: 23363659 DOI: 10.1159/000343354]
- 2 Samy RP, Rajendran P, Li F, Anandi NM, Stiles BG, Ignacimuthu S, Sethi G, Chow VT. Identification of a novel Calotropis procera protein that can suppress tumor growth in breast cancer through the suppression of NF-κB pathway. *PLoS One* 2012; 7: e48514 [PMID: 23284617 DOI: 10.1371/journal.pone.0048514]
- 3 Maeda H, Hori S, Nishitoh H, Ichijo H, Ogawa O, Kakehi Y, Kakizuka A. Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As₂O₃) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5432-5440 [PMID: 11454688]
- 4 Nakagawa Y, Akao Y, Morikawa H, Hirata I, Katsu K, Naoe T, Ohishi N, Yagi K. Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. *Life Sci* 2002; 70: 2253-2269 [PMID: 12005185 DOI: 10.1016/S0024-3205(01)01545-4]
- 5 Jutooru I, Chadalapaka G, Sreevalsan S, Lei P, Barhoumi R, Burghardt R, Safe S. Arsenic trioxide downregulates specificity protein (Sp) transcription factors and inhibits bladder cancer cell and tumor growth. *Exp Cell Res* 2010; 316: 2174-2188 [PMID: 20435036 DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.04.027]
- 6 Kodigepalli KM, Dutta PS, Bauckman KA, Nanjundan M. SnoN/SkiL expression is modulated via arsenic trioxide-induced activation of the PI3K/AKT pathway in ovarian cancer cells. *FEBS Lett* 2013; 587: 5-16 [PMID: 23178716 DOI: 10.1016/j.febslet.2012.11.003]
- 7 Jang M, Kim Y, Won H, Lim S, K R J, Dashdorj A, Min YH, Kim SY, Shokat KM, Ha J, Kim SS. Carbonyl reductase 1 offers a novel therapeutic target to enhance leukemia treatment by arsenic trioxide. *Cancer Res* 2012; 72: 4214-4224 [PMID: 22719067 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1110]
- 8 Long YM, Ye S, Rong J, Xie WR. Nuclear factor kappa B: a marker of chemotherapy for human stage IV gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4739-4744 [PMID: 18720533 DOI: 10.3748/wjg.14.4739]
- 9 刘冰熔, 黄爱龙, 肖戡君. NF-κB超抑制物IκBαM重组腺病毒的构建. 免疫学杂志 2004; 20: 65-70
- 10 何年安, 王文平. 肝癌基因治疗的研究. 医学综述 2006; 13: 786-788
- 11 Zhang X, Su Y, Zhang M, Sun Z. Opposite effects of arsenic trioxide on the Nrf2 pathway in oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2012; 318: 93-98 [PMID: 22155346 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.12.005]
- 12 Chun YJ, Park IC, Park MJ, Woo SH, Hong SI, Chung HY, Kim TH, Lee YS, Rhee CH, Lee SJ. Enhancement of radiation response in human cervical cancer cells in vitro and in vivo by arsenic trioxide (As₂O₃). *FEBS Lett* 2002; 519: 195-200 [PMID: 12023044 DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02765-5]
- 13 Pu YS, Hour TC, Chen J, Huang CY, Guan JY, Lu SH. Arsenic trioxide as a novel anticancer agent against human transitional carcinoma—characterizing its apoptotic pathway. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 293-300 [PMID: 11984073 DOI: 10.1097/00001813-200203000-00011]
- 14 Jiang XH, Wong BC, Yuen ST, Jiang SH, Cho CH, Lai KC, Lin MC, Kung HF, Lam SK. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of p53 and activation of caspase-3. *Int J Cancer* 2001; 91: 173-179 [PMID: 11146441]
- 15 He H, Chen J, Xie WP, Cao S, Hu HY, Yang LQ, Gong B. Ketamine used as an anesthetic in human breast cancer therapy causes an undesirable side effect, upregulating anti-apoptosis protein Bcl-2 expression. *Genet Mol Res* 2013 Jan 4. [Epub ahead of print] [PMID: 23315866]
- 16 Kim HJ, Kim JC, Min JS, Kim MJ, Kim JA, Kor MH, Yoo HS, Ahn JK. Aqueous extract of Tribulus terrestris Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF-κB signaling in liver cancer cells. *J Ethnopharmacol* 2011; 136: 197-203 [PMID: 21549825 DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.060]
- 17 Hien TT, Kim HG, Han EH, Kang KW, Jeong HG. Molecular mechanism of suppression of MDR1 by puerarin from Pueraria lobata via NF-kappaB pathway and cAMP-responsive element transcriptional activity-dependent up-regulation of AMP-activated protein kinase in breast cancer MCF-7/adr cells. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54: 918-928 [PMID: 20077420 DOI: 10.1002/mnfr.200900146]
- 18 Kim HG, Hien TT, Han EH, Hwang YP, Choi JH, Kang KW, Kwon KI, Kim BH, Kim SK, Song GY, Jeong TC, Jeong HG. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the NF-κB pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. *Br J Pharmacol* 2011; 162: 1096-1108 [PMID: 21054339 DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01101.x]
- 19 苏剑东, 吴灵飞. NF-κB与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1411-1418
- 20 Shibata-Kobayashi S, Yamashita H, Okuma K, Shiraishi K, Igaki H, Ohtomo K, Nakagawa K. Correlation among 16 biological factors [p53, p21(waf1), MIB-1 (Ki-67), p16(INK4A), cyclin D1, E-cadherin, Bcl-2, TNF-α, NF-κB, TGF-β, MMP-7, COX-2, EGFR, HER2/neu, ER, and HIF-1α] and clinical outcomes following curative chemoradiation therapy in 10 patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2013; 5: 903-910 [PMID: 23426606]
- 21 Ke SZ, Ni XY, Zhang YH, Wang YN, Wu B, Gao FG. Camptothecin and cisplatin upregulate ABCG2 and MRP2 expression by activating the ATM/NF-κB pathway in lung cancer cells. *Int J Oncol* 2013; 42: 1289-1296 [PMID: 23381786 DOI: 10.3892/ijo.2013.1805]
- 22 Peinado C, Kang X, Hardamon C, Arora S, Mah S, Zhang H, Ngolab J, Bui JD. The NF-κB pathway down-regulates expression of the NKG2D ligand H60a in vitro: implications for use of NF-κB inhibitors in cancer therapy. *Immunology* 2013 Jan 28. [Epub ahead of print] [PMID: 23350962 DOI: 10.1111/imm.12080]

同行评价

本文具有较高的临床应用价值. 课题设计严谨, 观察指标能说明Ad-IκBαM联合As₂O₃粉针剂对肝癌细胞增殖和凋亡的作用.

编辑 田滢 电编 鲁亚静



Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2在溃疡性结肠炎大鼠脾脏组织中的表达及乌梅丸的干预作用

柯琴梅, 吴霁, 范恒

■背景资料

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种以肠道免疫功能紊乱为主的慢性非特异性炎症性肠道疾病。近20年来我国发病率呈逐年增加, 其发病是遗传、环境和免疫因素相互作用的结果, 其中免疫功能紊乱起关键性作用, 在遗传和环境因素的双重作用下, 机体对肠道菌群产生异常免疫反应, 最终导致肠道慢性炎症的发生, 但其确切的发病原因和机制还不明确, 治疗上也比较棘手, 因此对本病的发病机制和治疗上的研究显得十分必要。

柯琴梅, 华中科技大学同济医学院附属协和医院老年病科
湖北省武汉市 430022

吴霁, 南昌大学第三附属医院 江西省南昌市 330000

范恒, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科
湖北省武汉市 430022

柯琴梅, 副教授, 副主任医师, 主要从事老年中西医结合心血管与消化系统疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81072944

湖北省自然科学基金资助项目, No. 2011CDB386

作者贡献分布: 此课题由范恒与柯琴梅共同设计; 研究过程由柯琴梅与吴霁操作完成; 数据分析由吴霁完成; 论文写作由柯琴梅完成。

通讯作者: 范恒, 教授, 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中西医结合科。

fanheng009@yahoo.com.cn

电话: 027-85726395

收稿日期: 2013-02-15 修回日期: 2013-03-15

接受日期: 2013-04-17 在线出版日期: 2013-05-08

Wumeiwan treatment alters the expression of delta-opioid receptor, β -arrestin 1 and Bcl-2 in the spleen tissue of rats with ulcerative colitis

Qin-Mei Ke, Ji Wu, Heng Fan

Qin-Mei Ke, Department of Geriatrics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Ji Wu, the Third Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, Jiangxi Province, China

Heng Fan, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072944; the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2011CDB386

Correspondence to: Heng Fan, Professor, Chief Physician, Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. fanheng009@yahoo.com.cn

Received: 2013-02-15 Revised: 2013-03-15

Accepted: 2013-04-17 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of Wumeiwan treatment on the expression of delta-opioid receptor, β -arrestin 1 and Bcl-2 in the spleen tissue of rats with ulcerative colitis.

METHODS: Fifty-six SD rats were randomly divided into a control group, a colitis model group, a mesalazine group and a Wumeiwan group (14 rats in each group). Ulcerative colitis was induced in rats with 2, 4, 6-trinitrobenzene-sulfonic acid. Two days after induction of ulcerative colitis, the control group and colitis model group were administered intragastrically with normal saline, while the mesalazine group and Wumeiwan group were intragastrically given mesalazine (50 g/L) and Wumeiwan (0.51 g/L), respectively. All rats were treated for 15 d. Spleen tissue samples were taken to detect the mRNA and protein expression of delta-opioid receptor, β -arrestin 1 and Bcl-2 by quantitative RT-PCR and Western blot.

RESULTS: The relative expression levels of delta-opioid receptor, β -arrestin 1 and Bcl-2 mRNAs and proteins were significantly higher in the colitis model group than in the control group (mRNA: 2.50 ± 0.25 vs 1.11 ± 0.10 , 3.27 ± 0.41 vs 1.05 ± 0.06 , 2.48 ± 0.43 vs 1.06 ± 0.04 ; all $P < 0.05$; protein: 1.04 ± 0.17 vs 0.48 ± 0.08 , 1.50 ± 0.15 vs 0.62 ± 0.07 , 1.26 ± 0.20 vs 0.76 ± 0.10 ; all $P < 0.05$). Treatment with Wumeiwan (mRNAs: 1.54 ± 0.13 , 1.54 ± 0.14 , 1.57 ± 0.15 ; proteins: 0.68 ± 0.14 , 0.74 ± 0.19 and 0.93 ± 0.11) and mesalazine (mRNAs: 1.52 ± 0.09 , 1.63 ± 0.27 and 1.56 ± 0.09 ; proteins: 0.68 ± 0.17 , 0.77 ± 0.15 and 0.96 ± 0.16) significantly decreased the expression of delta-opioid receptor, β -arrestin1 and Bcl-2 mRNAs and proteins compared to the colitis model group (all $P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of these mRNAs and proteins between the Wumeiwan group and the mesalazine group (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Wumeiwan treatment attenuates ulcerative colitis possibly by significantly decreasing the mRNA and protein expression of delta-opioid receptor, β -arrestin 1 and Bcl-2 in the spleen tissue of rats with ulcerative colitis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

■同行评议者

刘凤斌, 教授, 广州中医药大学第一附属医院消化内科; 唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

Key Words: Wumeiwan; TNBS-induced colitis; Delta-opioid receptor; β -arrestin 1; Bcl-2

Ke QM, Wu J, Fan H. Wumeiwan treatment alters the expression of delta-opioid receptor, β -arrestin1 and Bcl-2 in the spleen tissue of rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1164-1170 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1164.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1164>

摘要

目的: 观察溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠脾脏组织Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达及乌梅丸的干预作用,旨在研究乌梅丸治疗结肠炎的机制。

方法: 56只SD大鼠随机分成空白对照组、结肠炎模型组、美沙拉嗪组、乌梅丸组(每组14只)。除空白对照组外,其他3组均应用2,4,6-三硝基苯磺酸灌肠。模型建成2 d后,空白对照组和结肠炎模型组分别以蒸馏水3 mL/只灌胃,美沙拉嗪组用美沙拉嗪混悬液(浓度50 g/L)、乌梅丸组用乌梅丸液(浓度0.51 g/L)以3 mL/只灌胃,连续给药15 d后取脾脏组织,应用Real time-PCR检测Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA的表达,应用Western blot技术检测Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2蛋白的表达。

结果: 空白对照组Delta阿片受体、 β -arrestin1及Bcl-2 mRNA的相对表达分别为 1.11 ± 0.10 、 1.05 ± 0.06 及 1.06 ± 0.04 ;蛋白的相对表达分别为 0.48 ± 0.08 、 0.62 ± 0.07 及 0.76 ± 0.10 。结肠炎模型组Delta阿片受体、 β -arrestin1及Bcl-2的mRNA的相对表达分别为 2.50 ± 0.25 、 3.27 ± 0.41 及 2.48 ± 0.43 ;蛋白的相对表达分别为 1.04 ± 0.17 、 1.50 ± 0.15 及 1.26 ± 0.20 。美沙拉嗪组Delta阿片受体、 β -arrestin1及Bcl-2 mRNA的相对表达分别为 1.52 ± 0.09 、 1.63 ± 0.27 及 1.56 ± 0.09 ;蛋白的相对表达分别为 0.68 ± 0.17 、 0.77 ± 0.15 及 0.96 ± 0.16 。乌梅丸组Delta阿片受体、 β -arrestin1及Bcl-2 mRNA的相对表达分别为 1.54 ± 0.13 、 1.54 ± 0.14 及 1.57 ± 0.15 ;蛋白的相对表达分别为 0.68 ± 0.14 、 0.74 ± 0.19 及 0.93 ± 0.11 。与空白对照组相比,结肠炎模型组Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达显著升高($P < 0.05$);与结肠炎模型组相比,乌梅丸组、美沙拉嗪组Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达显著下降($P < 0.05$),且乌梅丸组和美沙拉嗪组Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达均无显著差异($P > 0.05$)。

结论: 乌梅丸下调UC大鼠脾脏组织Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达发挥治疗结肠炎的作用。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 乌梅丸; TNBS诱导的结肠炎; Delta阿片受体; β -arrestin1; Bcl-2

核心提示: 乌梅丸下调溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)大鼠脾脏组织Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2的mRNA和蛋白表达发挥治疗结肠炎的作用。

柯琴梅, 吴霁, 范恒. Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2在溃疡性结肠炎大鼠脾脏组织中的表达及乌梅丸的干预作用. *世界华人消化杂志* 2013; 21(13): 1164-1170 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1164.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1164>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病的一种,其发病机制未完全明确。目前认为是遗传、感染、环境、免疫等多个因素相互作用的结果。UC是Th2型免疫反应,其产生的细胞因子主要是白介素-4(interleukin-4, IL-4)、IL-5、IL-13、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)等^[1]。正常情况时,机体通过T淋巴细胞活化增殖去除细菌、病毒等抗原,而通过细胞凋亡抑制T细胞过度活化与增殖,最终使免疫系统处于一种适合机体生存的平衡状态。若T细胞凋亡失衡,就会使体内T细胞过度活化与增殖,并分泌炎症因子导致局部组织损伤。因此T细胞的凋亡抑制是UC的重要因素。

Delta-阿片受体(delta-opioid receptor, DOR)是G蛋白偶联受体(G-protein coupled receptor, GPCR)的一种,在免疫系统和神经系统广泛表达。研究表明DOR通过 β -arrestin1影响CD4⁺ T细胞的生存和凋亡^[2,3]。 β -arrestin1氨基酸末端都有一个 β -折叠和一个 α -螺旋,在机体广泛表达,参与多种信号通路,对幼稚CD4⁺ T细胞和活化CD4⁺ T细胞的凋亡抑制基因Bcl-2的表达起关键性的调节作用^[3],在抗凋亡通路中起重要作用^[4]。廖奕等^[5]研究表明氧化苦参碱可下调结肠组织 β -arrestin1,抑制Delta阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2信号转导通路,治疗TNBS诱导的实验性大鼠结肠炎。众多临床观察研究^[6-8]表明乌梅丸治疗UC患者有显著疗效。范恒等研究表明乌梅丸可下调结肠组织 β 2AR、 β -arrestin2、核转录因

■ 研究前沿

UC的发病机制与免疫异常有关,T细胞凋亡抑制失衡,体内T细胞将过度活化与增殖,并分泌炎症因子导致局部组织损伤。脾脏组织T细胞的凋亡抑制是UC发生的重要机制。脾脏组织T细胞Delta阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2信号转导通路,可能是UC发生发展的关键点,对其进行研究为临床上开展中药治疗UC提供理论依据。

■相关报道

本课题组用乌梅丸治疗UC取得良好的临床效果。氧化苦参碱可下调结肠组织 β -arrestin1, 抑制Delta阿片受体- β -arrestin1-Bcl-2信号转导通路, 治疗TNBS诱导的实验性大鼠结肠炎。

子(nuclear factor κ B, NF- κ B)p65的表达, 减少肠道炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-6、IL-8和IL-10释放, 减轻肠道炎症损伤^[9-11]。既往研究均关注乌梅丸对结肠组织炎症因子及相关蛋白的影响, 而对作为T细胞居住的场所及细胞免疫应答的重要场所的脾脏组织的炎症因子及相关蛋白有何影响, 相关研究尚未见报道。因此本研究小组对此进行了系统研究。

本研究通过建立UC大鼠模型, 观察乌梅丸对UC大鼠脾脏组织DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达影响, 旨在研究乌梅丸治疗结肠炎的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠56只, SPF级, 体质量250 g \pm 20 g, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供, 实验动物质量合格证为SCXK(鄂)2004-0007, 使用许可证为SYXK(鄂)2004-0028; 5% 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)购自美国Sigma公司; TRIzol 购自Invitrogen公司; RNA提取试剂盒DP430、cDNA第一链合成试剂盒KR104-02以及RNase抑制剂DP418购自天根; 引物合成于金斯瑞; SYBR Green PCR Master Mix(2X) #K0242购自Fermentas; 实时荧光定量PCR仪ABI7500。引物由Primer6.0软件设计, 每对引物序列如下: DOR引物上游: 5'-agaccgcccacacatctac-3', 下游: 5'-gaagtcagggttgacag-3', 扩增片段长度为236 bp, 退火温度为55 °C; β -arrestin1引物上游: 5'-ctcaagcatgaggacacgaa-3', 下游: 5'-ttaggttgggtgcattag-3', 扩增片段长度为194 bp, 退火温度为54 °C; Bcl-2引物上游: 5'-ggtgtggagggaactctca-3', 下游: 5'-atgccgttcaggtactcag-3', 扩增片段长度为157 bp, 退火温度为53 °C; 内参 β -actin引物上游: 5'-gtccctcaccctcccaaaag-3', 下游: 5'-gctgctcaacacctcaacc-3', 扩增片段长度为265 bp, 退火温度55.7 °C。RIPA裂解液(强)、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天; PVDF膜购自Millipore; 相关一抗购自Biorworld; 二抗购自博士德; ECL底物液购自Thermo; 电泳槽、Millipore电转仪购自北京六一。美沙拉嗪(0.5 g \times 10袋/盒, 法国爱的发制药集团)。乌梅丸组成药物及剂量如下: 乌梅16 g、细辛6 g、干姜10 g、黄连16 g、当归49 g、附子69 g、蜀椒49 g、桂枝69 g、生晒参6 g、黄柏6 g, 组方中各味生药均购自武汉协和医院, 按传统方法配制含生药浓度为0.51 g/mL的水

煎剂。

1.2 方法

1.2.1 分组: 将56只大鼠随机分成空白对照组、结肠炎模型组、美沙拉嗪组、乌梅丸组, 每组14只, 各组体质量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在湿度为50%-70%、温度为20 °C动物房内饲养。

1.2.2 模型建立及药物干预: 依据Morris等^[12]与廖奕等^[5]及Fan等^[9,13]提出的方法进行造模, 具体操作如下: 除空白对照组外, 其他组大鼠均在禁食不禁饮24 h后, 给予2,4,6-三硝基苯磺酸灌肠。首先用10%的水合氯醛以3 mL/kg腹腔注射麻醉后, 将内径2 mm的橡胶导尿管缓缓插入大鼠肛门约8 cm, 将抽取好的50%的乙醇溶液注入0.25 mL后继续注入5% 2,4,6-三硝基苯磺酸液0.3 mL, 使药液缓慢进入肠道, 将大鼠提尾倒置30 s。然后让大鼠平躺, 待其清醒后自由饮食, 自由进水。模型建成后, 观察各组大鼠精神状态, 大便颜色、形状、皮毛等变化。2 d后, 美沙拉嗪组每天用美沙拉嗪悬液3 mL/只灌胃; 乌梅丸组每天用乌梅丸药液3 mL/只灌胃; 空白对照组和结肠炎模型组每天用蒸馏水3 mL/只灌胃, 1次/d, 连续灌胃15 d。每组大鼠死亡4只, 因此每组实验大鼠最后各剩10只。第16天每只大鼠禁食不禁水24 h后处死, 取大鼠的脾脏, 每个脾脏分为2份, 装于EP管中, 用液氮冰冻保存。取4组大鼠中有明显病变的结肠组织石蜡包埋切片并HE染色, 镜下观察4组大鼠结肠组织病理学改变。

1.2.3 RT-PCR方法检测结肠炎大鼠脾脏组织DOR、 β -arrestin1、Bcl-2的mRNA表达: 按RNA提取试剂盒DP430的方法提取脾脏组织的RNA, 并用分光光度计测量RNA的浓度, 取5 μ L模板RNA、Oligo(dT)15(10 μ mol/L)2 μ L、ddH₂O(Rnase free)6 μ L混匀后放入PCR仪中, 70 °C 5 min, 立即置于冰上1 min, 然后瞬时离心并加入以下试剂: 5 \times RT buffer 4 μ L、HRP(RRI)/RNase Inhibitor 0.5 μ L、M-MLV 0.5 μ L、dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L, 总体积为20 μ L的反应体系。逆转录条件: 42 °C 30 min, 99 °C 5 min, 4 °C 5 min。各对引物序列见前。扩增条件: 95 °C 60 s预变性, 进入PCR循环95 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 45 s, 40个循环, 以 β -actin为内参, 对DOR、 β -arrestin1、Bcl-2的产物相对定量, 读取Ct值, 使用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法进行相对定量分析。

1.2.4 Western blot检测脾脏标本中DOR、 β -arrestin1、Bcl-2的蛋白表达: 取适量(250-500 mg)

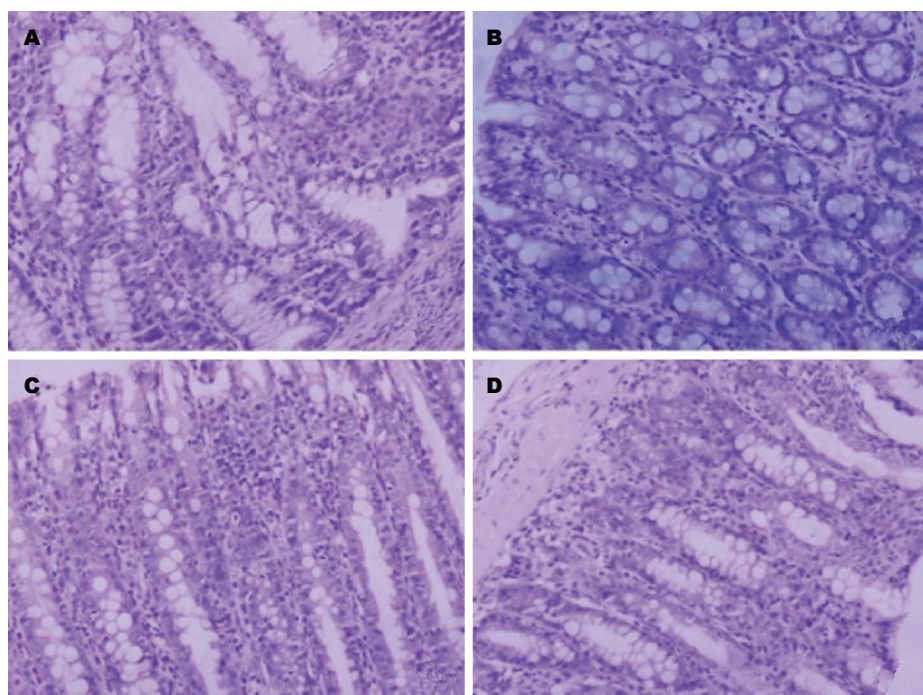


图1 各组大鼠结肠黏膜组织病理变化(HE, $\times 400$). A: 结肠炎模型组; B: 空白对照组; C: 乌梅丸组; D: 美沙拉嗪组.

■创新盘点

本文通过研究大鼠结肠和脾脏中DOR、 β -arrestin1、Bcl-2的表达来阐明溃疡性结肠炎的发病机制, 检测指标和UC密切相关, 为乌梅丸治疗UC提供理论依据和研究思路.

表1 大鼠脾脏组织中DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA的表达 (mean \pm SD)

分组	DOR	β -arrestin1	Bcl-2
空白组	1.11 \pm 0.10	1.05 \pm 0.06	1.06 \pm 0.04
模型组	2.50 \pm 0.25 ^a	3.27 \pm 0.41 ^a	2.48 \pm 0.43 ^a
美沙拉嗪组	1.52 \pm 0.09 ^c	1.63 \pm 0.27 ^c	1.56 \pm 0.09 ^c
乌梅丸组	1.54 \pm 0.13 ^e	1.54 \pm 0.14 ^e	1.57 \pm 0.15 ^e

^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$, ^e $P < 0.05$ vs 模型组. DOR: Delta-阿片受体.

脾脏组织, 剪碎加1 mL RIPA裂解液(强), 匀浆抽提总蛋白, 并按BCA蛋白定量试剂盒操作说明操作, 测定各组蛋白浓度. 各样品取70 μ g总蛋白上样电泳, 根据蛋白分子量配制不同浓度的PAGE胶电泳, β -arrestin1和DOR用10%的PAGE胶; Bcl-2用12%PAGE胶电泳, 根据预染Marker的显示, 判断目的蛋白得到充分分离后, 停止电泳. 取出凝胶根据Marker切下目的条带, 用蒸馏水冲洗, 剪与PAGE凝胶相同大小的PVDF膜和滤纸, PVDF膜用甲醇浸泡数秒后和滤纸一同浸泡于电转缓冲液中. 按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-纤维垫-白色板依次放好, 夹紧板后放入转膜仪内, 黑色板的一面对照黑色负极. 转膜条件: β -arrestin1、DOR 200 mA, 120 min; Bcl-2 200 mA, 80 min. 用含5%脱脂奶粉的TBST(封闭液)浸泡PVDF膜, 室温摇床封闭2 h. 一抗: 用封闭液稀释相应的一抗, 使PVDF膜浸泡于

一抗孵育液中, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜. DOR 1 : 500稀释, β -arrestin1 1 : 700稀释, Bcl-2与GAPDH 1 : 1000稀释. 二抗: TBST充分洗涤PVDF膜5-6次, 5 min/次用封闭液稀释羊抗兔二抗 1 : 10000稀释, 使PVDF膜浸泡于二抗孵育液中, 室温摇床孵育2 h. 显色曝光: TBST充分洗涤PVDF膜5-6次. 结果采用光密度扫描灰度值分析.

统计学处理 所有数据采用mean \pm SD表示, 应用国际标准统计软件SPSS17.0统计分析, 多组间两两比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 大鼠结肠组织病理改变 结肠炎模型组中固有层和黏膜层内可见弥漫性中性粒细胞、淋巴细胞、浆细胞浸润, 结肠黏膜腺体排列紊乱, 杯状细胞减少. 正常结肠组织黏膜和固有层结构完整, 腺体排列较整齐. 乌梅丸组和美沙拉嗪组淋巴细胞等炎性细胞浸润较模型组减轻, 黏膜及固有层结构相对完整, 杯状细胞较模型组多, 腺体排列相对整齐(图1).

2.2 大鼠脾脏组织中DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA的表达 各组大鼠脾脏组织中DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA的表达详见表1和图2. 与空白对照组相比, 结肠炎模型组DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA表达均升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与结肠炎模型组相比, 乌梅丸组、美沙拉嗪组DOR、 β -arrestin1、Bcl-2

■应用要点

本文研究发现乌梅丸和美沙拉秦均可以有效治疗UC, 特别是中药乌梅丸具有较好的治疗作用, 药物安全, 疗效理想, 有一定临床应用前景。

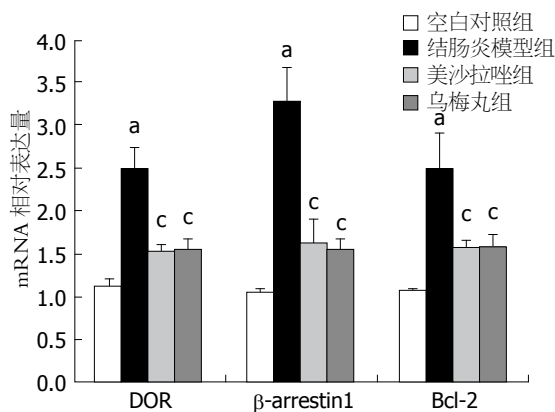


图2 大鼠脾脏组织中DOR、β-arrestin1、Bcl-2 mRNA的相对表达。^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^b $P < 0.05$ vs 模型组。DOR: Delta-阿片受体。

表2 大鼠脾脏组织中DOR、β-arrestin1、Bcl-2蛋白的表达 (mean ± SD)

分组	DOR	β-arrestin1	Bcl-2
空白组	0.48 ± 0.08	0.62 ± 0.07	0.76 ± 0.10
模型组	1.04 ± 0.17 ^a	1.50 ± 0.15 ^a	1.26 ± 0.20 ^a
美沙拉秦组	0.68 ± 0.17 ^c	0.77 ± 0.15 ^c	0.96 ± 0.16 ^c
乌梅丸组	0.68 ± 0.14 ^c	0.74 ± 0.19 ^c	0.93 ± 0.11 ^c

^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.05$ vs 模型组。DOR: Delta-阿片受体。

mRNA表达下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但乌梅丸组和美沙拉秦组DOR、β-arrestin1、Bcl-2 mRNA表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。2.3 大鼠脾脏组织中DOR、β-arrestin1、Bcl-2蛋白的表达 各组大鼠脾脏组织中DOR、β-arrestin1、Bcl-2蛋白的表达情况详见表2、图3及图4。与空白对照组相比, 结肠炎模型组DOR、β-arrestin1、Bcl-2的蛋白表达均升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与结肠炎模型组相比, 乌梅丸组、美沙拉秦组DOR、β-arrestin1、Bcl-2的蛋白表达量下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 但乌梅丸组和美沙拉秦组DOR、β-arrestin1、Bcl-2的蛋白表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

目前认为UC发病机制可能是易感患者肠道内环境改变导致体内T细胞的异常活化, 分泌大量的炎性细胞因子, 介导肠道的损伤^[14,15]。正常情况时, 机体通过细胞凋亡抑制T细胞的过度增殖和活化, 使肠黏膜免疫系统处于适应机体生存的

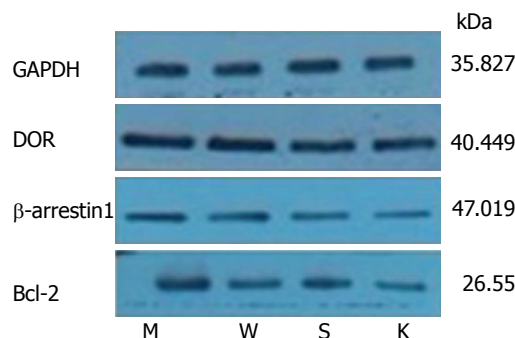


图3 大鼠脾脏组织中DOR、β-arrestin1、Bcl-2的蛋白表达。M: 结肠炎模型组; W: 乌梅丸组; S: 美沙拉秦组; K: 空白对照组。DOR: Delta-阿片受体。

平衡状态^[16]。若T细胞凋亡抑制失衡, 体内T细胞将过度活化与增殖, 并分泌炎性因子导致局部组织损伤。脾脏是免疫细胞特别是T细胞的居住场所, 同时也是细胞免疫应答的重要场所^[17], 脾脏组织T细胞数目及功能与机体免疫反应呈正相关^[18,19]。因此脾脏组织T细胞的凋亡抑制是UC发生的重要机制。

乌梅丸由乌梅、细辛、干姜、黄连、当归、附子、蜀椒、桂枝、党参、黄柏组成。乌梅丸出自仲景《伤寒论·厥阴病篇》, 方中以乌梅酸敛收固, 附子、干姜、桂枝扶阳以胜寒, 蜀椒、细辛通阳以破阴, 附子、干姜、蜀椒、桂枝、细辛, 辛热以助其阳, 温以祛寒; 黄连、黄柏之苦寒以坚其阴, 清以泻热, 党参、当归益气养血, 诸药合用, 使寒热邪去, 阴阳协调, 气血恢复。全方酸收熄风, 辛热助阳, 酸苦坚阴, 寒热温凉, 温清敛补, 攻补兼施, 诸药配伍, 调理阴阳寒热虚实, 使之归复于平和。郭洪波、谢微香等^[6,7,20,21]临床观察研究, 乌梅丸治疗UC患者有显著疗效。对于乌梅丸治疗UC的机制, 既往已有研究多关注乌梅丸对结肠组织而非脾脏组织的炎症因子及相关蛋白的影响^[8-11]。本研究主要针对作为T细胞居住的场所及细胞免疫应答的重要场所的脾脏组织, 研究乌梅丸治疗对其炎症因子及相关蛋白表达的影响。美沙拉秦是柳氮磺胺吡啶的一种, 常用于UC的治疗, 可抑制前列腺素的合成和炎性介质白三烯的形成, 显著抑制肠黏膜的炎症反应, 本研究中用来作为乌梅丸治疗的阳性对照。本研究结果发现乌梅丸组与美沙拉秦组较结肠炎模型组结肠黏膜及固有层结构相对完整, 腺体排列相对整齐, 杯状细胞多, 炎性细胞浸润较结肠炎模型组减轻, 表明乌梅丸与美沙拉秦对UC有较好的治疗作用。

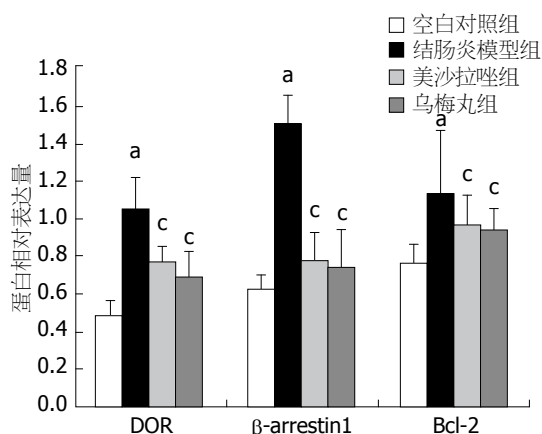


图4 大鼠脾脏组织中DOR、 β -arrestin1、Bcl-2蛋白的表达。
* $P < 0.05$ vs 空白组; $P < 0.05$ vs 模型组。DOR: Delta-阿片受体。

阿片受体可在某些神经细胞高表达,也可在中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和T细胞上低表达,其表达水平在调节一些生物学功能如快速诱导MAPK活化和细胞趋药性有重要意义^[22]。当配体与细胞膜上DOR结合后,G蛋白 α 亚基与GDP的亲合力降低而解离,与GTP的亲合力增加而结合,使异源三聚体G蛋白解离为 $G\alpha$ 和 $G\beta\gamma$,激活G蛋白,介导信号传导通路,传递生物学信息^[23,24]。HEK293细胞膜上DOR受刺激后,使细胞质 β -arrestin1转移至细胞核,募集乙酰化酶p300富集启动子(p27和c-fos等)区域,启动子结合的组蛋白乙酰化增强,导致相应的基因转录^[25]。T细胞受体受刺激后,可引起其免疫突触的脂筏(lipid raft)结构中的cAMP水平增高,增加PKA(蛋白激酶A)活化,使Csk(一种羧基端Src激酶)的S364位点磷酸化,激活Csk,使Lck(淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶)磷酸化并失活,阻碍TCR的 ξ 磷酸化,抑制T细胞的活性,这种反馈性抑制作用使T细胞不能完全活化。T细胞的TCR/CD28共刺激信号被激活后,使细胞质内 β -arrestin募集到TCR上,然后再通过两种途径使cAMP水平降低:(1)使Gs从活化的TCR上解偶联,降低腺苷酸环化酶活性,从而降低cAMP水平;(2)将PDE4(磷酸二酯酶4)募集到细胞膜的脂筏结构中,使cAMP降解。cAMP水平降低,可以下调抑制T细胞活化的cAMP-PKA-Csk抑制性信号,完全活化T细胞,使Csk移动到胞质中,信号进一步传导^[26-28]。TCR/CD28共刺激信号活化T细胞后,可激活TrkA/IP3/Akt/NF- κ B信号通路,诱导T细胞表达更多的DOR^[29]。

DOR是G蛋白偶联受体的一种,主要在神经系统和免疫细胞(如中性粒细胞、单核细

胞、巨噬细胞、T细胞等)表达。活化的DOR能诱导 β -arrestin1从T细胞浆内转移至细胞核内。 β -arrestin1属于Arrestin家族,有细胞质功能和细胞核功能。 β -arrestin1在细胞质参与GPCR的内化和脱敏,使GPCR信号通路终止; β -arrestin1在细胞核介导某些基因的转录。 β -arrestin1在机体广泛表达,可作为脚手架蛋白与连接分子(比如磷脂类和 β -衔接蛋白)连接,参与多种信号通路,在抗凋亡通路中起重要作用。细胞核内的 β -arrestin1可募集组蛋白乙酰化酶p300至Bcl-2基因的启动子,使编码基因Bcl-2的启动子序列区域组蛋白H4乙酰化作用增强,导致Bcl-2基因转录,促进抗凋亡蛋白Bcl-2表达^[2,3,19]。Bcl-2表达增加,Bcl-2/BAX比例升高,抗凋亡信号相对增强,抑制细胞质线粒体释放细胞色素C和半胱天冬酶(caspase)^[30]活化过程,从而抑制CD4⁺T细胞凋亡。T细胞数量增加,分泌更多的炎症细胞因子,介导肠道的炎症反应。

本研究结果显示结肠炎模型组DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达较空白对照组显著升高;乌梅丸组及美沙拉唑组DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达较结肠炎模型组显著下降,且乌梅丸组和美沙拉唑组DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达均无明显差异。提示乌梅丸下调UC大鼠脾脏组织DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白表达,使T细胞凋亡的抑制减弱,T细胞数量减少,炎症反应减轻,从而缓解UC的症状,发挥治疗结肠炎的作用。

总之,乌梅丸可能通过下调UC大鼠脾脏组织Delta阿片受体、 β -arrestin1、Bcl-2 mRNA和蛋白的表达量,使T细胞凋亡的抑制减弱,即使T细胞凋亡,从而改善UC的临床症状。

4 参考文献

- Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390-400 [PMID: 18200661]
- Beaulieu JM, Caron MG. Beta-arrestin goes nuclear. *Cell* 2005; 123: 755-757 [PMID: 16325568 DOI: 10.1016/j.cell.2005.11.010]
- Shi Y, Feng Y, Kang J, Liu C, Li Z, Li D, Cao W, Qiu J, Guo Z, Bi E, Zang L, Lu C, Zhang JZ, Pei G. Critical regulation of CD4⁺T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nat Immunol* 2007; 8: 817-824 [PMID: 17618287 DOI: 10.1038/ni1489]
- Povsic TJ, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 51334-51339 [PMID: 14534298 DOI: 10.1074/jbc]

同行评价

本文选题新颖,实验设计较严谨,讨论较充分,有一定科学意义。

- 5 廖奕, 范恒, 陈小艳, 张丽娟. β -arrestin1在实验性大鼠结肠炎发生机制中的作用及氧化苦参碱的干预作用. 中国中西医结合杂志 2010; 30: 1067-1072
- 6 谢微查, 卫永琪. 乌梅丸加减治疗溃疡性结肠炎39例. 河北中医药学报 2011; 26: 30
- 7 辛福兵. 乌梅丸治疗慢性溃疡性结肠炎47例. 现代中医药 2011; 31: 20-21
- 8 范恒, 梁丽, 唐庆, 陈小艳, 刘星星, 张丽娟, 钟敏, 朱习文. 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠STAT6表达的影响. 中西医结合研究 2011; 3: 127-131
- 9 Fan H, Shen L, Tang Q, Xiong P, Shou Z, Liao Y, Liang L, Chen X. Effect of Wumeiwan on cytokines TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 and expression of NF- κ Bp65 in rats with ulcerative colitis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2009; 29: 650-654 [PMID: 19821103 DOI: 10.1007/s11596-009-0523-4]
- 10 梁丽, 范恒, 段雪云. β 2AR、 β -arrestin2、NF- κ B p65在溃疡性结肠炎大鼠中的表达及乌梅丸的干预作用. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1650-1655
- 11 范恒, 段雪云, 庄雄, 吕建芳, 寿折星. 乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织NF- κ B p65的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 896-899
- 12 Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Sze-wczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795-803 [PMID: 2914642]
- 13 Fan H, Qiu MY, Mei JJ, Shen GX, Liu SL, Chen R. Effects of four regulating-intestine prescriptions on pathology and ultrastructure of colon tissue in rats with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4800-4806 [PMID: 16097047]
- 14 Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390-407 [PMID: 16819502 DOI: 10.1038/ncpgasthep0528]
- 15 Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T cells in health and disease. *Immunity* 2009; 31: 389-400 [PMID: 19766082 DOI: 10.1016/j.immuni.2009.08.012]
- 16 Zhang SZ, Zhao XH, Zhang DC. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 35-40 [PMID: 16549047]
- 17 Velásquez-Lopera MM, Correa LA, García LF. Human spleen contains different subsets of dendritic cells and regulatory T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2008; 154: 107-114 [PMID: 18727627 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03734.x]
- 18 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573 [PMID: 12042806 DOI: 10.1038/nm0602-567]
- 19 Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunol-ogy of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 495-549 [PMID: 11861611 DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816]
- 20 郭洪波, 罗玉梅, 王静波. 乌梅汤加减治疗溃疡性结肠炎44例. 新中医 2007; 39: 44
- 21 高天曙. 乌梅丸方证分析及临床新用. 中医临床研究 2011; 3: 49-50
- 22 Bohn LM, Belcheva MM, Coscia CJ. Mitogenic signaling via endogenous kappa-opioid receptors in C6 glioma cells: evidence for the involvement of protein kinase C and the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *J Neurochem* 2000; 74: 564-573 [PMID: 10646507 DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.740564.x]
- 23 Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 373-386 [PMID: 20431569 DOI: 10.1038/nrd3024]
- 24 Musnier A, Blanchot B, Reiter E, Crépieux P. GPCR signalling to the translation machinery. *Cell Signal* 2010; 22: 707-716 [PMID: 19887105 DOI: 10.1016/j.cellsig.2009.10.012]
- 25 Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, Zhang M, Bao G, Wang F, Zhang X, Yang R, Fan F, Chen X, Pei G, Ma L. A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 2005; 123: 833-847 [PMID: 16325578 DOI: 10.1016/j.cell.2005.09.011]
- 26 Abrahamsen H, Baillie G, Ngai J, Vang T, Nika K, Ruppelt A, Mustelin T, Zaccolo M, Houslay M, Taskén K. TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling. *J Immunol* 2004; 173: 4847-4858 [PMID: 15470025]
- 27 Nguyen K, Miller BC. CD28 costimulation induces delta opioid receptor expression during anti-CD3 activation of T cells. *J Immunol* 2002; 168: 4440-4445 [PMID: 11970987]
- 28 Taskén K, Stokka AJ. The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 476-479 [PMID: 16856837 DOI: 10.1042/BST0340476]
- 29 Chen YL, Law PY, Loh HH. Sustained activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor kappaB signaling mediates G protein-coupled delta-opioid receptor gene expression. *J Biol Chem* 2006; 281: 3067-3074 [PMID: 16316997 DOI: 10.1074/jbc.M506721200]
- 30 Shi Q, Hou Y, Yang Y, Bai G. Protective effects of glycyrrhizin against β -adrenergic receptor agonist-induced receptor internalization and cell apoptosis. *Biol Pharm Bull* 2011; 34: 609-617 [PMID: 21532146]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



从溃疡性结肠炎大鼠肺损伤细胞凋亡机制探讨“肺与大肠相表里”

盛益华, 王新月, 闫昕, 朱立, 张良登

盛益华, 王新月, 闫昕, 朱立, 张良登, 北京中医药大学东直门医院消化内科 北京市 100700

盛益华, 在读博士, 主要从事中医药防治胃肠疾病的研究。

“973”国家重点基础研究发展计划基金资助项目, No.

2009CB522700; No. 2009CB522705

作者贡献分布: 此课题由王新月设计; 研究过程由盛益华、闫昕及张良登操作完成, 朱立指导; 数据处理与分析由盛益华完成; 本论文写作由盛益华与王新月完成。

通讯作者: 王新月, 教授, 主任医师, 博士生导师, 100700, 北京市东城区海运仓5号, 北京中医药大学东直门医院消化内科。

wxy6687@sina.com

电话: 010-84013361

收稿日期: 2013-02-06 修回日期: 2013-03-27

接受日期: 2013-04-19 在线出版日期: 2013-05-08

Discussion on theory of the lung and the large intestine being interior-exteriorly related from mechanism of apoptosis in lung injury in rats with ulcerative colitis

Yi-Hua Sheng, Xin-Yue Wang, Xin Yan, Li Zhu, Liang-Deng Zhang

Yi-Hua Sheng, Xin-Yue Wang, Xin Yan, Li Zhu, Liang-Deng Zhang, Department of Gastroenterology, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Supported by: the National Basic Research Program of China (973 Program)-Lung and Large Intestine, Nos. 2009CB522700 and 2009CB522705

Correspondence to: Xin-Yue Wang, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, 5 Haiyuncang, Dongcheng District, Beijing 100700, China. wxy6687@sina.com

Received: 2013-02-06 Revised: 2013-03-27

Accepted: 2013-04-19 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To discuss mechanism of apoptosis of in lung injury in rats with ulcerative colitis and to further explore the theory of the lung and the large intestine being interior-exteriorly related.

METHODS: Sixty-six Wistar rats were randomly divided into two groups: normal group and model group. Both groups were observed at three time points (10 rats at each time point

for the normal group, and 12 rats for the model group). The model was established using immune complex and trinitrobenzenesulfonic acid. Pathological and morphological changes of the lung and the colon were dynamically observed on the 0, 2nd and 4th wk. Protein expression of Bcl-2 and Bax in the lung was tested by Western blot.

RESULTS: Compared to the normal group, intestinal index (week 0: 0.00252 ± 0.000557 vs 0.00564 ± 0.00119 , $P = 0.0000$; week 2: 0.00245 ± 0.000234 vs 0.00573 ± 0.00283 , $P = 0.0002$; week 4: 0.00237 ± 0.000284 vs 0.00524 ± 0.00310 , $P = 0.0014$) and lung index (week 0: 0.00404 ± 0.000399 vs 0.00473 ± 0.000634 , $P = 0.0088$; week 2: 0.00383 ± 0.000433 vs 0.00472 ± 0.00104 , $P = 0.0267$; week 4: 0.00347 ± 0.000444 vs 0.00440 ± 0.00106 , $P = 0.0017$) significantly increased in the model group at various time points. Compared to the normal group, obvious pathological changes appeared in the lung and the colon and there were decreased expression of Bcl-2 (week 2: 1.333 ± 0.114 vs 0.947 ± 0.068 , $P = 0.0072$; week 4: 1.594 ± 0.187 vs 0.982 ± 0.128 , $P = 0.0094$) and Bax (week 2: 0.521 ± 0.069 vs 1.078 ± 0.220 , $P = 0.0139$; week 4: 0.817 ± 0.179 vs 1.491 ± 0.323 , $P = 0.034$) and significantly reduced ratio of Bcl-2 to Bax (week 2: 12.570 ± 0.147 vs 0.895 ± 0.129 , $P = 0.0001$; week 4: 2.036 ± 0.586 vs 0.668 ± 0.0678 , $P = 0.016$).

CONCLUSION: Abnormal expression of Bcl-2 and Bax in the lung that induces cell apoptosis may be one of molecular mechanisms of lung injury in ulcerative colitis and may provide a theoretical basis for enteropathy inducing pneumonopathy.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Ulcerative colitis; Apoptosis; Interior-exteriorly related; Lung injury

Sheng YH, Wang XY, Yan X, Zhu L, Zhang LD. Discussion on theory of the lung and the large intestine being interior-exteriorly related from mechanism of apoptosis in lung injury in rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1171-1177

■背景资料

早在20世纪70年代,国外就有学者明确提出炎症性肠病可累及肺脏的观点,随后国内外陆续有文献报道溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者肺部病变的发生,但UC肺损伤的发病机理至今依然不明确,相关动物实验研究方面的报道亦较少见。

■同行评议者

缪应雷,主任医师,昆明医科大学第一附属医院消化内科;刘杰民,副主任医师,贵州省人民医院消化内科

■ 研发前沿

目前国内外关于UC的临床及动物实验研究均已发现UC肺损伤的存在,但UC肺损伤的发生机制尚不明确,且临床治疗仍多采用氨基水杨酸类药物和皮质类固醇药物,治疗效果不理想,因此明确UC肺损伤的发生机制非常重要。

URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1171.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1171>

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠肺损伤的细胞凋亡机制,进一步探究“肺与大肠相表里”理论。

方法: 66只Wistar大鼠,随机分为6组,3个观察时间点均设正常组与模型组,其中正常组均为10只,模型组均为12只,模型组大鼠采用结肠黏膜组织致敏加三硝基苯磺酸-50%乙醇灌肠的方法建立大鼠UC模型,于造模后第0、2、4周动态观察肺、结肠组织病理形态学改变,采用Western blot法动态观察大鼠肺组织中Bcl-2、Bax蛋白表达变化。

结果: 与正常组比较,各时间点模型组大鼠肠质量指数明显升高(第0周: 0.00252 ± 0.000557 vs 0.00564 ± 0.00119 , $P = 0.0000$; 第2周: 0.00245 ± 0.000234 vs 0.00573 ± 0.00283 , $P = 0.0002$; 第4周: 0.00237 ± 0.000284 vs 0.00524 ± 0.00310 , $P = 0.0014$)、肺质量指数增加(第0周: 0.00404 ± 0.000399 vs 0.00473 ± 0.000634 , $P = 0.0088$; 第2周: 0.00383 ± 0.000433 vs 0.00472 ± 0.00104 , $P = 0.0267$; 第4周: 0.00347 ± 0.000444 vs 0.00440 ± 0.00106 , $P = 0.0017$)、肺肠组织HE染色均出现明显病理变化,肺组织Bcl-2蛋白表达水平明显下降(第2周: 1.333 ± 0.114 vs 0.947 ± 0.068 , $P = 0.0072$; 第4周: 1.594 ± 0.187 vs 0.982 ± 0.128 , $P = 0.0094$)、Bax蛋白表达水平明显上升(第2周: 0.521 ± 0.069 vs 1.078 ± 0.220 , $P = 0.0139$; 第4周: 0.817 ± 0.179 vs 1.491 ± 0.323 , $P = 0.034$)、Bcl-2/Bax比值显著降低(第2周: 2.570 ± 0.147 vs 0.895 ± 0.129 , $P = 0.0001$; 第4周: 2.036 ± 0.586 vs 0.668 ± 0.0678 , $P = 0.016$)。

结论: 肺组织中Bcl-2和Bax蛋白表达异常并诱导肺组织细胞凋亡可能是UC肺损伤的分子机制之一,并可能为“肠病及肺”提供理论依据。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 溃疡性结肠炎; 细胞凋亡; 肺与大肠相表里; 肺损伤

核心提示: 肺组织中Bcl-2和Bax蛋白表达异常并诱导肺组织细胞凋亡可能是溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)肺损伤的分子机制之一。因此,以干预细胞凋亡信号转导途径为中心,对明

确UC肺损伤细胞凋亡的发生机制和“肠病及肺”的现代生物学机制将有较好的启示作用。

盛益华, 王新月, 闫昕, 朱立, 张良登. 从溃疡性结肠炎大鼠肺损伤细胞凋亡机制探讨“肺与大肠相表里”. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1171-1177 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1171.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1171>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称非特异性溃疡性结肠炎,是一种直肠和结肠黏膜的慢性非特异性炎症性病变,其病变主要累及结肠黏膜与黏膜下层^[1]。近年来,随着我国人民生活水平的提高和生活方式的改变,UC发病率逐年增加^[2]。UC的发病原因及发病机制尚未完全明确^[3],目前较公认的是机体免疫系统的激活造成炎症及组织损伤,并与遗传、环境、免疫、感染、心理等因素密切相关^[4]。其临床症状以反复发作的腹痛、腹泻、黏液脓血便为特点,病程常反复迁延^[5],并有多肠外表现^[6]。早在20世纪70年代, Kraft等^[7]就明确提出炎症性肠病可累及肺脏的观点,随后国内外陆续有文献报道UC患者肺部病变的发生^[8,9],但UC肺损伤的发病机制至今依然不明确,相关动物实验研究方面的报道亦较少见^[10]。本实验采用结肠黏膜组织致敏加三硝基苯磺酸-50%乙醇灌肠的方法制作UC大鼠模型,动态观察此模型肺、结肠组织的病理形态学改变及凋亡调控蛋白Bcl-2、Bax在肺组织中的表达,从而初步探讨UC大鼠肺损伤的细胞凋亡机制,进一步探究“肺与大肠相表里”理论。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级健康♂ Wistar大鼠66只,体质量 $200 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号SCXK(京)2012-0001],饲养于北京中医药大学SPF动物实验中心。健康♂新西兰家兔10只,体质量2.5 kg左右,购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司[许可证号SCXL(京)2010-0001]; 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)购自Sigma公司产品; 完全弗氏佐剂购自Sigma公司产品; 小鼠抗Bax抗体购自Santa Cruz公司; 兔抗Bcl-2抗体购自Santa Cruz公司; 小鼠抗GAPDH单抗购自中杉金桥; 山羊抗小鼠IgG/辣根酶标记购自中杉金桥; HRP标羊抗兔IgG二抗购自北京普利莱基

因技术有限公司; 无水乙醇等其他试剂均购自北京化学试剂公司; 湘仪TGL-16台式冷冻离心机购自湖南湘仪离心机仪器有限公司; VCXI30PB Sonics超声波细胞破碎仪(美国)购自上海斯高勒生物科技有限公司; HY-2调速多用振荡器购自江苏金坛金城国胜实验仪器厂; 垂直板电泳槽及电转槽购自美国伯乐(bio-rad)公司。

1.2 方法

1.2.1 造模: 模型组大鼠参照宫健伟、段征及景姍等^[11-13]制作UC模型的方法, 即肠黏膜组织致敏加三硝基苯磺酸-50%乙醇灌肠的方法复制大鼠UC模型。选择健康♂新西兰家兔, 以空气栓塞处死, 剖取结肠并刮取结肠黏膜组织, 加等质量生理盐水, 用超声波细胞破碎仪进行组织匀浆, 4℃, 3000 r/min离心, 30 min, 取上清, 双缩脲法进行蛋白定量, 加等体积的完全弗氏佐剂, 制备成抗原乳化液。分别于适应性饲养后第1、15、22天于大鼠双侧腹股沟、足跖部位注射抗原乳化液, 每次每只注射的抗原乳化液含抗原8 mg。将TNBS配成浓度为120 mg/mL的溶液, TNBS溶液与50%乙醇按体积1:1混合。第29天禁食不禁水24 h后以10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉, 三硝基苯磺酸-50%乙醇按TNBS 100 mg/kg体质量灌肠。用硅胶管(直径2 mm, 长约12 cm)由肛门缓慢地插入至肠腔内8 cm处, 每只0.6-0.8 mL, 快速(5 s内)注入, 并将大鼠倒置约1 min, 使药液达全结肠并防止液体流出。

1.2.2 分组UC大鼠模型制备: 66只大鼠适应性饲养1 wk后, 随机分为6组, 3个观察时间点均设正常组与模型组, 其中正常组均为10只, 模型组均为12只, 正常组与模型组同步观察饲养。

1.2.3 取材: 造模完成后, 将大鼠放回饲养笼内平躺直至自然苏醒, 后饲养于SPF级动物房内, 给予正常饮食, 每日观察大鼠精神状态、进食量、活动度、粪便性状等。造模完成后第3天(0周)、第2周、第4周末禁食不禁水24 h后, 称质量, 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉, 于冰上快速摘取肺及肛门上2-15 cm结肠组织, 4℃生理盐水冲洗清除肠内容物, 称取结肠、全肺湿质量, 计算结肠、肺质量指数, 肠质量指数 = 结肠湿质量/体质量×100%, 肺质量指数 = 肺湿质量/体质量×100%。然后取病变较明显处结肠组织约1.0 cm及部分右肺上叶组织, 10%福尔马林溶液固定, 常规石蜡包埋, 5 μm厚组织切片, HE染色, 光学显微镜下观察肺和结肠组织病理学变化。此外, 收集部分右肺上叶组织置于冻

存管内并标记, 于液氮中保存, 用于检测Bcl-2、Bax。

1.2.4 指标观察: 大鼠结肠黏膜组织、肺支气管病理形态学变化, 常规HE染色后光学显微镜下观察各时间点各组组织病理结构变化。Western blot法观察肺组织中Bax、Bcl-2蛋白的表达水平, 包括蛋白提取、电泳和转膜后免疫检测。第2、4周每组随机选取3个肺组织样品, 每个样品肺组织约50 mg, 将同一时间点同组的3个肺组织样品共约150 mg置于1.5 mL细胞裂解液中, 置于冰水中匀浆, 4℃, 12000 r/min, 离心15 min, 取上清, 分装后于-80℃保存备用。将提取的蛋白上清与5×loading buffer 4:1混合, 置于95℃水中煮5 min, 使蛋白变性。采用10%的SDS-PAGE凝胶进行电泳, 电压80 V, 30 min, 100 V, 1.5 h, 电泳结束后, PVDF膜甲醇中润湿后进行蛋白质转膜, 电流200 mA, 2 h。用5%脱脂奶粉制成封闭液室温下封闭PVDF膜1 h, 用TBST洗膜3次, 每次10 min。将膜与溶于TBST中的一抗4℃条件下置于摇床上摇动, 孵育过夜, 次日TBST洗膜3次, 每次10 min。二抗37℃孵育2 h, TBST洗膜3次, 每次10 min。加入超敏发光液(SuperECL plus)反应3 min, 用保鲜膜包裹, 暗室中进行X线胶片曝光、显影和定影。Bax和Bcl-2蛋白分子量分别为23 kDa和26 kDa。GAPDH蛋白作为内参, 该蛋白分子量为36 kDa。条带用Image J Analysis software计算灰度值, 以目的蛋白与内参GAPDH蛋白的灰度比值来表示目的蛋白表达的相对量。重复3次实验取平均值。

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件, 结果采用mean±SD表示, 采用单因素方差分析, 样本不符合正态分布或方差不齐时采用Wilcoxon Two-Sample Test检验, $P<0.05$ 为有显著统计学差异, $P<0.01$ 为有非常显著统计学差异。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况改变 各观察时间点正常组大鼠活动灵活, 反应灵敏, 皮毛润泽, 饮水进食良好, 粪便为褐色粒状且质地较硬, 无黏液脓血, 呼吸平稳正常。三硝基苯磺酸-50%乙醇灌肠后3 d(第0周), 模型组大鼠大部分出现脓血便, 有黏液, 粪便稀软、不成形, 甚至成水样便, 精神萎靡, 不喜活动, 毛色苍黄枯槁, 饮水量减少, 毛发疏松, 形体消瘦。2 wk末模型大鼠大部分粪便仍稀软、不成形, 部分夹有脓血、黏液, 倦怠少动, 毛色苍黄少泽, 体质量增长明显慢于正常组。

■ 相关报道

景姍报道了结肠黏膜组织致敏加三硝基苯磺酸-50%乙醇灌肠诱导复制UC大鼠模型后1 wk, 观察发现肺、结肠组织病理均表现出组织损伤, UC大鼠肺功能异常及sIgA明显降低, 提示肠病及肺。

■创新盘点

本实验通过建立肠黏膜组织致敏加三硝基苯磺酸-50%乙醇灌肠的方法复制大鼠UC模型,观察UC大鼠肺损伤的病理形态学改变,凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax在肺组织中的表达情况,初步探究UC肺损伤发生的可能的细胞凋亡机制。

表 1 大鼠结肠湿质量及肠质量指数比较 (mean ± SD)

时间	分组	n	结肠湿质量(g)	肠质量指数
第0周	正常	10	1.03 ± 0.19	0.00252 ± 0.000557
	模型	10	1.89 ± 0.39 ^b	0.00564 ± 0.00119 ^b
第2周	正常	10	1.10 ± 0.081	0.00245 ± 0.000234
	模型	10	2.41 ± 1.24 ^b	0.00573 ± 0.00283 ^b
第4周	正常	10	1.15 ± 0.22	0.00237 ± 0.000284
	模型	11	2.32 ± 1.32 ^b	0.00524 ± 0.00310 ^b

^b*P* < 0.01 vs 正常组。

表 2 大鼠肺湿重及肺质量指数比较 (mean ± SD)

时间	分组	n	肺湿质量(g)	肺质量指数
第0周	正常	10	1.68 ± 0.25	0.00404 ± 0.000399
	模型	10	1.59 ± 0.24	0.00473 ± 0.000634 ^b
第2周	正常	10	1.72 ± 0.14	0.00383 ± 0.000433
	模型	10	1.98 ± 0.36 ^a	0.00472 ± 0.00104 ^a
第4周	正常	10	1.65 ± 0.15	0.00347 ± 0.000444
	模型	11	1.97 ± 0.45 ^b	0.00440 ± 0.00106 ^b

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 正常组。

表 3 各组大鼠肺组织中Bax、Bcl-2相对表达量的比较 (mean ± SD)

时间	分组	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bcl-2/Bax
第2周	正常	0.521 ± 0.069	1.333 ± 0.114	2.570 ± 0.147
	模型	1.078 ± 0.220 ^a	0.947 ± 0.068 ^b	0.895 ± 0.129 ^b
第4周	正常	0.817 ± 0.179	1.594 ± 0.187	2.036 ± 0.586
	模型	1.491 ± 0.323 ^a	0.982 ± 0.128 ^b	0.668 ± 0.0678 ^a

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 正常组。

4 wk末模型大鼠粪便仍有部分质地较稀夹有黏液,反应迟钝,毛色欠佳。

2.2 动态观察各组大鼠肺、结肠湿质量及质量指数 第0周时模型组大鼠结肠湿质量、肠质量指数与正常组比较显著增加(*P* = 0.0000, *P* = 0.0000);第2周时模型组大鼠结肠湿质量、肠质量指数与正常组比较亦有显著增加(*P* = 0.0002, *P* = 0.0002),第4周时模型组大鼠结肠湿质量、肠质量指数与正常组比较仍有显著增加(*P* = 0.0043, *P* = 0.0014, 表1)。

第0周时模型组大鼠肺质量指数与正常组比较显著增加(*P* = 0.0088);第2周时模型组大鼠肺湿质量、肺质量指数与正常组比较有显著增加(*P* = 0.0348, *P* = 0.0267),第4周时模型组大鼠肺湿质量、肺质量指数与正常组比较仍有显著增加(*P* = 0.0083, *P* = 0.0017, 表2)。

2.3 组织病理观察

2.3.1 结肠组织病理观察:病理切片,HE染色,光学显微镜下观察,模型组第0周结肠表现为透壁性炎症,大量炎性细胞浸润,并浸润黏膜层、黏膜肌层、黏膜下层,自黏膜层到肌层结构疏松,黏膜下层水肿,黏膜固有层腺体萎缩甚至消失,甚至呈现透壁性坏死,形成溃疡。提示大鼠UC发生,模型制备成功(图1B)。第2周病变较第0周无明显改善,仍有溃疡、大量炎性细胞浸润(图1D)。第4周时结肠病变较第0周和第2周略有改

善,仍有炎性细胞浸润黏膜层、黏膜下层,溃疡形成(图1F)。

2.3.2 肺组织病理观察:模型组第0周表现为肺间质炎症,间质大量炎性细胞浸润,肺间质充血,小血栓形成,小气道损伤,肺泡间隔增宽,肺泡变形。支气管周围、血管周围炎性细胞浸润,淋巴细胞呈灶状(图1H)。第2、4周模型组大鼠肺组织病理改变无明显改善,肺间质炎性细胞浸润仍很明显,血管、支气管外周淋巴细胞呈灶状浸润,支气管壁增厚变形,血管壁增厚,间质纤维组织增生明显,部分肺组织肺泡融合,形成肺大泡(图1J, L)。

2.4 Bcl-2、Bax在肺组织中的表达 UC模型大鼠第2、4周时,UC模型大鼠肺组织Bcl-2的蛋白表达量与正常组比较有明显的下降(第2周*P* = 0.0072, 第4周*P* = 0.0094),Bax的蛋白表达量与正常组比较有明显上升(第2周*P* = 0.0139, 第4周*P* = 0.034),Bcl-2/Bax与正常组比较有明显的下降(第2周*P* = 0.0001, 第4周*P* = 0.016)(图2, 表3)。

3 讨论

中医脏腑表里相关理论的重要组成部分之一“肺与大肠相表里”的理论源自《黄帝内经》。近现代众多医家在“肺与大肠相表里”理论指导下进行了大量的临床实践和研究^[14-17],但该理论在现代医学研究领域,特别是通过动物

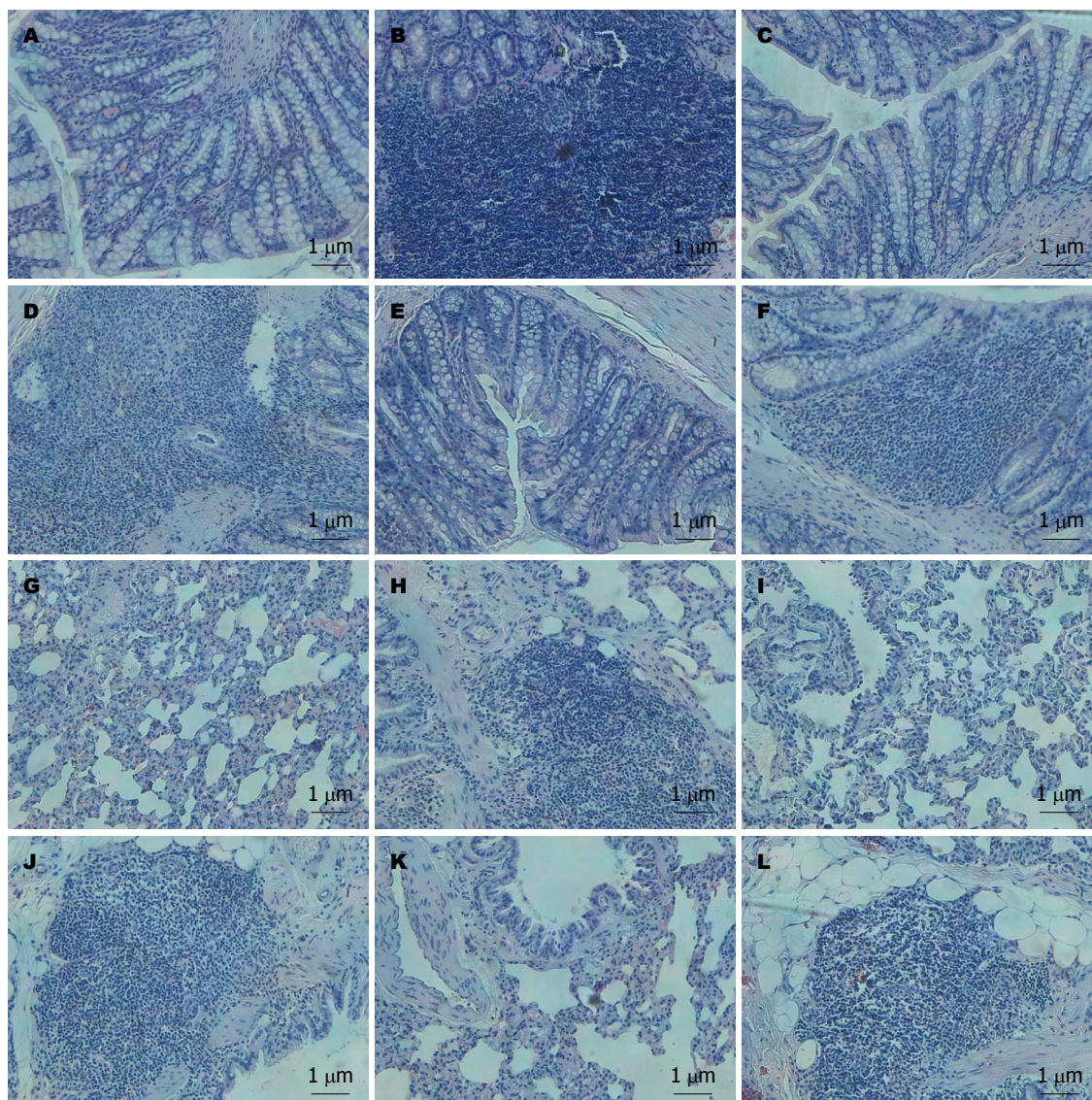


图 1 肺、结肠组织病理图片(HE, ×200). A: 正常组第0周结肠; B: 模型组第0周结肠; C: 正常组第2周结肠; D: 模型组第2周结肠; E: 正常组第4周结肠; F: 模型组第4周结肠; G: 正常组第0周肺; H: 模型组第0周肺; I: 正常组第2周肺; J: 模型组第2周肺; K: 正常组第4周肺; L: 模型组第4周肺.

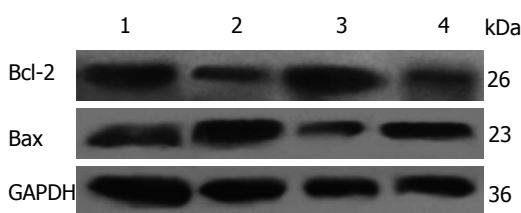


图 2 各组大鼠肺组织Bax、Bcl-2蛋白的表达. 1: 第2周正常组; 2: 第2周模型组; 3: 第4周正常组; 4: 第4周模型组.

实验在分子生物学水平对“肺与大肠相表里”理论的生物学基础研究仍十分欠缺.《灵枢·本输》中有“肺合大肠, 大肠者, 传导之腑”的记载,“肺合大肠”的理论基础源于肺与大肠在经络上的相互络属.《灵枢·经脉》:“肺手太阴之脉, 起于中焦, 下络大肠, 还循胃口, 上膈属肺”,

“大肠手阳明之脉, 起于大指次指之端……下入缺盆络肺, 下膈属大肠”可见肺与大肠在功能上通过经络建立了紧密的联系. 肺与大肠一脏一腑, 一阴一阳, 表现为生理功能上相得益彰, 互为表里. 肺气宣发肃降正常, 大肠得肺肃降之气的推动, 则大肠传导有节; 大肠传导正常则有助于肺气的宣肃. 同样, 两者在病理也互相影响, 大肠病可及肺, 腑气不通, 浊气上逆犯肺则肺失宣降, 可见咳嗽、咯痰、气促喘鸣等呼吸系统症状. 例如《内经·至真要大论》曰:“寒厥于肠, 上冲胸中, 甚则喘不能久立”, 说明邪犯大肠, 能上逆犯肺致喘, 又有《灵枢·四时气》:“腹中肠鸣, 气上冲胸, 喘不能久立, 邪在大肠”的论述. UC病位在大肠, 其发病病机多为饮

应用要点
本实验通过对UC大鼠肺组织病理及凋亡相关蛋白的观察, 初步明确细胞凋亡异常可能参与UC肺损伤的发生. 因此, 以干预细胞凋亡信号转导途径为中心, 抑制肺组织细胞凋亡, 可能是UC肺损伤及“肺与大肠相表里”相关研究的主要内容之一, 为临床治疗提供依据.

■同行评价

本文新颖性好,可读性佳,为“肠病及肺”提供了理论依据,为临床UC肺损伤“从肠而治”提供了思路,对后续研究有很好的启示作用。

食不节、感受外邪或情志失调^[18],导致肺气失于宣肃,肝气失于调达,脾胃失于运化,湿热、积滞等病邪客于肠道,与肠道气血搏结,大肠传导失司,气血凝滞,脂膜血络损伤,血败肉腐,壅滞成脓,内溃成疡,而形成本病^[19]。UC久病耗气,势必损伤肺脾之气,影响肺之宣发肃降,且肺主治节,为水之上源,不能通调水道、下输膀胱,水液停留而致痰饮积滞。

本实验采用TNBS-乙醇诱导复合结肠黏膜组织致敏UC大鼠模型,此模型可达到全身免疫异常与局部炎症病变共存,产生与人类UC较为接近的临床症状及肠道病变,符合人UC病变由B细胞介导的体液免疫反应和T细胞介导的细胞免疫反应共同作用的病变机制。本研究发现,与正常组比较,模型组肺质量指数显著升高,HE染色肺间质有大量的炎性细胞浸润、支气管壁增厚,纤维组织增生等病理变化,提示模型组大鼠可能由于湿热毒邪上扰,肺气宣肃不利,不能通调水道,水液停留,痰瘀互结,在一定程度上说明肠病及肺,从该角度为“肺与大肠相表里”提供了理论基础。

细胞凋亡是由一系列基因控制的细胞主动死亡的过程,接受来自细胞外部或内部的凋亡信号,使细胞内编码的自杀程序激活,从而促发凋亡的过程。近几年来,对调控细胞凋亡相关基因的基础研究已受到极大的关注与重视,因此也成为研究的热点。其中,原癌基因Bcl-2蛋白家族是极为重要的一类调控凋亡的因子,通过该家族成员相互之间或与其他凋亡因子的作用,发挥调控凋亡的作用。Bcl-2蛋白家族中的各凋亡因子也是在细胞凋亡相关基因的研究中被研究最多的一类凋亡因子^[20]。Bcl-2基因家族在细胞凋亡的基因调控网络中发挥关键性的作用^[21]。Bcl-2和Bax是凋亡调控基因Bcl-2家族的2个重要成员,Bcl-2家族中Bcl-2基因抑制凋亡,而Bax基因诱发凋亡。Bcl-2基因位于染色体18q21,编码产物分子量为26 kDa的蛋白。Bcl-2的主要生物学功能为延长细胞寿命,使细胞增加对各种凋亡刺激因素的抵抗性,Schwarz等^[22]基因转染实验显示Bcl-2高表达可广泛抑制大多数刺激剂诱导的细胞凋亡。Bax基因作为Bcl-2相关X蛋白基因,通过对抗Bcl-2的活性,可提高细胞的凋亡敏感性,能直接促进细胞凋亡,Bcl-2和Bax二者形成一个凋亡调控系统:当Bax形成同源二聚体时,诱导凋亡;随着Bcl-2蛋白表达量上升,Bcl-2和Bax形成异源二聚体,Bcl-2/Bax二者蛋白比例

可以调节细胞凋亡的速率,决定细胞存活或死亡^[21]。因此,减少Bax表达和升高Bcl-2/Bax比率有利于抵抗细胞凋亡的发生^[23-25]。

本实验第2、4周UC模型大鼠肺组织Bcl-2蛋白表达水平明显下降,Bax蛋白表达水平明显上升,Bcl-2/Bax比值显著降低,Bcl-2/Bax<1,细胞凋亡占优势^[26],提示Bcl-2、Bax蛋白表达异常并诱导肺组织细胞凋亡可能是UC肺损伤的重要病理机制之一。近年来关于Bcl-2、Bax和Caspase-3参与细胞凋亡信号转导的研究进一步深入^[27]。Bcl-2、Bax可调控cyt-c的释放和下游Caspase-3蛋白酶的活化,参与对Caspase-3活性的调节^[28,29]。其中,Caspase-3又称为半胱氨酸蛋白酶32(CPP32),是Caspase家族中重要的效应蛋白酶,也是多种凋亡途径的共同下游“死亡执行蛋白酶”,在细胞凋亡的发生过程中发挥关键的作用^[30]。活化后的Caspase-3酶解切割DNA依赖的蛋白激酶和聚腺苷二磷酸核糖多聚酶等,从而影响细胞DNA复制、转录和损伤修复^[31]。有研究表明,博来霉素诱导肺纤维化大鼠肺组织细胞中Bax蛋白表达明显上调,Bcl-2 mRNA及蛋白表达明显减弱,并且细胞凋亡明显增加^[32]。因此,本实验中Bcl-2与Bax的异常表达很可能是通过对Caspase-3的异常活化最终介导细胞的存活或死亡。

因此,以干预细胞凋亡信号转导途径为中心,抑制肺组织细胞凋亡,促进炎性细胞凋亡的研究,可能是UC肺损伤及“肺与大肠相表里”理论相关研究的主要内容之一,对明确UC肺损伤细胞凋亡的发生机制和“肠病及肺”的现代生物学机制将有较好的启示作用。然而,UC肺损伤的发病机制十分复杂,且肺与大肠表里关系是多种物质和机制共同作用的结果,仅仅从细胞凋亡角度开展研究尚不能全面揭示肺与大肠表里关系的生物学机制内涵,有待于今后从更广更深层面开展综合性的相关研究。

4 参考文献

- 1 张姬,夏冰,杨桂芳,李瑾. 溃疡性结肠炎黏膜组织CD8、Fas/FasL和Bcl-2/Bax的表达及关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1795-1798
- 2 王觅柱,郭彩虹. 核因子NF-κB与凋亡调控蛋白Bcl-2/Bax在溃疡性结肠炎表达及意义. 内蒙古医学杂志 2010; 42: 1034-1037
- 3 周枫,赵海梅,刘端勇. P38MAPK信号: 治疗溃疡性结肠炎的又一新策略. 江西中医学院学报 2011; 23: 84-86
- 4 赵旭东,张薇. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展. 现代医药卫生 2008; 24: 1501-1502

- 5 朱立, 王新月, 于玫, 安贺军. 120例溃疡性结肠炎患者病因及临床特征分析. 中国中医基础医学杂志 2009; 15: 841-842
- 6 杨雪, 王新月, 朱立. 炎症性肠病的肺部损害及机制探讨. 中国中西医结合消化杂志 2011; 19: 133-136
- 7 Kraft SC, Earle RH, Roesler M, Esterly JR. Unexplained bronchopulmonary disease with inflammatory bowel disease. *Arch Intern Med* 1976; 136: 454-459 [PMID: 1267553 DOI: 10.1001/archinte.1976.03630040056012]
- 8 王新月, 孙慧怡. 基于肺与大肠相表里理论探讨从肺论治溃疡性结肠炎. 北京中医药大学学报 2011; 34: 153-155
- 9 孙慧怡, 王新月, 吴健, 张雯, 刘大铭, 王建云. 溃疡性结肠炎肺功能损害和肺与大肠的表里关联性. 中国中西医结合杂志 2011; 31: 591-594
- 10 杨雪, 王新月, 朱立, 景珊, 周波, 杨舒. 从肺论治法对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织VIP水平的影响及意义. 中国中医基础医学杂志 2011; 17: 282-283
- 11 宫健伟, 苑述刚, 阮时宝. 对免疫方法制作溃疡性结肠炎动物模型的探讨. 中国实验方剂学杂志 2005; 11: 70-71
- 12 段征, 汪维伟, 姜蓉. 两种溃疡性结肠炎大鼠模型的比较. 重庆医科大学学报 2008; 33: 66-68
- 13 景珊, 王新月, 朱立. 从两种溃疡性结肠炎大鼠模型谈肺与大肠相表里. 中华中医药杂志 2011; 26: 1367-1369
- 14 王仲霞, 刘波. “肺与大肠相表里”的理论及临床研究进展. 北京中医 2006; 25: 438-440
- 15 贾君君, 陈旭, 解桔萍. “肺与大肠相表里”的现代研究概况. 中医药学报 2006; 34: 23-25
- 16 傅理均, 倪建江. 浅谈通便在肺系病证中的应用. 江西中医药 2007; 38: 16-17
- 17 丘梅清. “肺与大肠相表里”的理论在肺胀治疗中的应用. 黑龙江中医药 1997; 5: 9-10
- 18 王艳辉. 痛泻要方和四神丸加味治疗溃疡性结肠炎. 中国医疗前沿 2009; 8: 45
- 19 王新月, 田德禄. 溃疡性结肠炎病因病理特点与中医辨治思路对策. 北京中医药大学学报 2007; 30: 554-555
- 20 Ishii HH, Gobe GC, Yoneyama J, Mukaide M, Ebihara Y. Role of p53, apoptosis, and cell proliferation in early stage Epstein-Barr virus positive and negative gastric carcinomas. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1306-1311 [PMID: 15563673 DOI: 10.1136/jcp.2003.015081]
- 21 Cvejic D, Selemetjev S, Savin S, Paunovic I, Petrovic I, Tatic S. Apoptosis and proliferation related molecules (Bcl-2, Bax, p53, PCNA) in papillary microcarcinoma versus papillary carcinoma of the thyroid. *Pathology* 2008; 40: 475-480 [PMID: 18604733 DOI: 10.1080/00313020802026989]
- 22 Schwarz M, Andrade-Navarro MA, Gross A. Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? *Apoptosis* 2007; 12: 869-876 [PMID: 17453157]
- 23 Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Loh DY, Nakayama K, Nakayama K, Hickman JA. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995; 108: 2261-2271 [PMID: 7673346]
- 24 Itoh J, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 2001; 49: 35-41 [PMID: 11413108 DOI: 10.1136/gut.49.1.35]
- 25 张文俊, 李兆申, 许国铭, 龚燕芳, 满晓华, 屠振兴. 细胞凋亡调控蛋白Bcl-2和Bax在溃疡性结肠炎表达的研究. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 262-264
- 26 祝鹏辉, 雷蕾, 王晓梅. 溃结宁合剂对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织Bcl-2及Bax表达的影响. 实用中医药杂志 2011; 27: 740-741
- 27 董雅洁, 高维娟. Bcl-2、bax、caspase-3在细胞凋亡中的作用及其关系. 中国老年学杂志 2012; 32: 4828-4830
- 28 Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem* 2003; 85: 1026-1036 [PMID: 12716434]
- 29 Kawatani M, Imoto M. Deletion of the BH1 domain of Bcl-2 accelerates apoptosis by acting in a dominant negative fashion. *J Biol Chem* 2003; 278: 19732-19742 [PMID: 12644466]
- 30 Odonkor CA, Achilefu S. Modulation of effector caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy. *Cancer Invest* 2009; 27: 417-429 [PMID: 19241192 DOI: 10.1080/07357900802438585]
- 31 Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, Lotz M. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1749-1755 [PMID: 9336406 DOI: 10.1002/art.1780401004]
- 32 江瑛, 祁鑫, 王丽京, 邱桐. 博莱霉素肺损伤大鼠细胞凋亡及bcl-2/bax基因的表达. 西北师范大学学报(自然科学版) 2001; 2: 65-70

编辑 田滢 电编 鲁亚静



肝硬化并产超广谱β内酰胺酶大肠埃希菌感染的抗生素治疗

刘钰佩, 梁树人, 郭朝辉, 李顺天, 李嘉

■背景资料

肝硬化患者由于自身基础差及产超广谱β内酰胺酶(extended-spectrum beta-lactamase, ESBLs)大肠埃希菌对部分抗菌药物的耐药性不断增加, 导致患者发生自发性细菌性腹膜炎、败血症及其他感染的机率升高并可反复出现感染。目前在临床上肝硬化合并感染患者经验性选用抗菌药物仍主要以三代头孢为主, 其疗效并不理想。

刘钰佩, 郭朝辉, 李嘉, 天津医科大学研究生院 天津市 300070
刘钰佩, 梁树人, 李顺天, 李嘉, 天津市第二人民医院 天津市肝病研究所 天津市 300192

刘钰佩, 主要从事传染病的防治工作。

作者贡献分布: 刘钰佩与李嘉对此文所作贡献均等; 此课题由刘钰佩、李嘉及梁树人设计; 研究过程由刘钰佩与郭朝辉操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由李顺天提供; 数据分析由刘钰佩与郭朝辉完成; 本论文写作由刘钰佩完成。

通讯作者: 李嘉, 主任医师, 300192, 天津市南开区苏堤南路7号, 天津市第二人民医院。lijiadoctor1968@gmail.com
电话: 022-27468230

收稿日期: 2013-02-20 修回日期: 2013-03-11

接受日期: 2013-04-19 在线出版日期: 2013-05-08

Antibiotic application in cirrhotic patients with extended-spectrum β-lactamase producing *E. coli* infection

Yu-Pei Liu, Shu-Ren Liang, Zhao-Hui Guo, Shun-Tian Li, Jia Li

Yu-Pei Liu, Zhao-Hui Guo, Jia Li, Postgraduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Yu-Pei Liu, Shu-Ren Liang, Shun-Tian Li, Jia Li, Tianjin Second People's Hospital, Tianjin Hepatopathy Research Institute, Tianjin 300192, China

Correspondence to: Jia Li, Chief Physician, Tianjin Second People's Hospital, 7 Sudi South Road, Nankai District, Tianjin 300192, China. lijiadoctor1968@gmail.com

Received: 2013-02-20 Revised: 2013-03-11

Accepted: 2013-04-19 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To investigate the antibiotic application in cirrhotic patients with extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) infection.

METHODS: The data for cirrhotic inpatients with ESBL-producing *E. coli* infection from 2006 to 2011 were collected, and demographic profiles, clinical characteristics, and efficacy of anti-infection treatment were retrospectively analyzed.

RESULTS: A total of 911 infections were found among 4065 cirrhotic patients, of whom 455 were culture-positive. Fifty cirrhotic patients had ESBL-producing *E. coli* infection. Quinolones (mainly levofloxacin) were primarily used in 23

(46%) cases, third-generation cephalosporins in 16 (32%) cases, and β-lactam/β-lactamase inhibitors in 11 (22%) cases. These three groups of patients showed no significant difference in the clinical outcome ($P > 0.05$). A switch to another antibiotic was found in 28 (56%) cases. Twenty-two cases (56%) responded to antibiotic therapy, 13 cases (26%) did not respond, and nine cases (18%) died. Compared to the death group, the survival group had significantly different Child-Pugh A ($P < 0.05$) and initial use of quinolones ($P < 0.05$). Compared to the non-response group, the response group had significantly different Child-Pugh C ($P < 0.05$) and bacteremia ($P < 0.05$). Neither hepatic encephalopathy nor upper gastrointestinal hemorrhage differed significantly between the survival and death group.

CONCLUSION: The efficacy of initial use of empirical antibiotics is very low in cirrhotic patients with ESBL-producing *E. coli* infection. Compared to third-generation cephalosporins, quinolones are more effective as the first treatment. Liver function-protecting support therapy should be strengthened when treating such infection. Accurate bacterial identification and antimicrobial susceptibility test should be performed to provide timely targeted therapy.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Cirrhosis; *Escherichia coli*; Extended-spectrum beta-lactamase; Antibiotics

Liu YP, Liang SR, Guo ZH, Li ST, Li J. Antibiotic application in cirrhotic patients with extended-spectrum β-lactamase producing *E. coli* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1178-1184 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1178.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1178>

摘要

目的: 了解肝硬化患者合并产超广谱β内酰胺酶(extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)大肠埃希菌感染的抗生素应用情况。

方法: 收集2006-2011年我院住院肝硬化合并产ESBLs大肠埃希菌感染患者的资料, 对患者

■同行评议者

李勇, 副教授, 上海中医药大学附属市中医院消化科

的基本情况、临床特征、抗感染治疗及疗效进行回顾性分析。

结果: 4065例次肝硬化住院患者共发生911例次感染, 感染部位细菌培养阳性患者455例, 其中共有50例肝硬化无重复合并产ESBLs的大肠埃希菌感染患者, 有23(46%)例患者首用喹诺酮类(主要为左氧氟沙星), 16(32%)例首用三代头孢, 11(22%)例首用β内酰胺类/β内酰胺酶抑制剂(以下简称酶抑制剂), 3组患者临床转归未见明显差异($P>0.05$)。56%的患者换用抗生素。出院时28(56%)例治疗有效, 13(26%)例未愈, 死亡9(18%)例。感染患者生存组与死亡组相比, 肝硬化分级Child-Pugh A($P<0.05$)、首用喹诺酮($P<0.05$)两者存在显著差异($P<0.05$)。治疗有效组与无效组相比, 菌血症($P<0.05$)、肝硬化分级Child-Pugh C($P<0.05$)存在明显差异。肝性脑病、上消化道出血在生存与死亡组差异不明显。

结论: 肝硬化产ESBLs大肠埃希菌初始经验应用抗生素疗效有效率较低。喹诺酮类较三代头孢更适合第一线用药。抗感染的同时应积极予保肝支持治疗。微生物室应及时提供准确的细菌鉴定和药敏报告, 为临床进行靶向治疗提供依据。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 肝硬化; 大肠埃希菌; 产超广谱β内酰胺酶; 抗生素

核心提示: 肝硬化产超广谱β内酰胺酶大肠埃希菌初始经验应用抗生素疗效有效率较低。喹诺酮类较三代头孢更适合第一线用药。微生物室应及时提供准确的细菌鉴定和药敏报告, 为临床进行靶向治疗提供依据。

刘钰佩, 梁树人, 郭朝辉, 李顺天, 李嘉. 肝硬化并产超广谱β内酰胺酶大肠埃希菌感染的抗生素治疗. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1178-1184 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1178.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1178>

0 引言

肝硬化患者全身及局部免疫功能低下、肠道菌群失调和肠黏膜屏障降低, 长期门诊随访、反复多次住院均可导致患者可反复发生自发性细菌性腹膜炎和败血症及提高其他感染的发生几率, 从而增加了抗菌药物尤其是三代头孢菌素的使用率。目前在临床上肝硬化合并感染患者

经验性选用抗菌药物主要为三代头孢或喹诺酮类抗菌药物^[1-3], 而疗效并不是很理想, 分析原因除了与患者本身伴有的严重基础病及并发症等因素有关外, 耐药率的提高也应是影响预后的重要因素之一。

多重耐药菌引起的感染治疗失败、感染性休克、院内死亡率的发生率高^[4,5], 这是因为目前推荐的经验性的抗生素治疗以第三代头孢抗生素和阿莫西林克拉维酸为主, 延误了初始有效的治疗, 在医院感染的患者抗感染疗效失败的概率更高, 产超广谱β内酰胺酶(extended-spectrum beta-lactamase, ESBL)肠杆菌感染在肝硬化多重耐药菌感染患者中所占比例最高^[6]。本文拟对我院2006-2011年合并产ESBLs阳性大肠埃希菌感染肝硬化患者中抗生素应用规律及临床疗效进行分析。

1 材料和方法

1.1 材料 某三级甲等传染病专科医院, 主要收治各型肝炎、肝硬化及肝癌患者。以2006-2011年在我院住院的肝硬化合并经腹水、血、尿液、痰等培养证明为产ESBLs大肠埃希菌感染患者50例为研究对象, 对患者的临床资料进行回顾分析研究, 研究期间我院无产ESBLs大肠埃希菌感染暴发流行。

1.2 方法

1.2.1 一般情况: 收集患者的客观资料(年龄、性别等)、基础疾病、合并疾病、既往医疗保健、肝硬化Child-pugh评分、感染地点、抗生素应用情况、抗感染临床疗效等。

1.2.2 诊断标准: 肝硬化的诊断符合2000年(西安)全国传染病与寄生虫病和肝病学术会议修订的“病毒性肝炎防治方案”的标准。自发性腹膜炎是指患者腹水常规检查多形核细胞计数 $\geq 250/\text{mm}^3$, 排除腹腔穿孔及其他原因所致的继发性腹膜感染患者。原发性菌血症定义为有寒战、发热等症状, 并且血培养至少一种病原菌阳性, 没有其他感染灶。继发性菌血症是指在其合并他部位感染的同时, 血培养至少一种病原菌阳性。泌尿系感染定义为正规清洁中段尿细菌定量培养菌落 $\geq 10^5/\text{mL}$ 并且清洁离心中段尿沉渣白细胞数 ≥ 10 个/高倍视野或有泌尿系感染症状者。肺部感染定义为具有呼吸道感染的症状和体征, 放射性影像学检查提示肺部炎症反应和/或痰、血标本培养致病菌阳性。医院感染诊断标准按卫生部2001年下发的《医院感染诊

■ 相关报道

有研究提示产ESBLs肠杆菌是肝硬化患者中最常见的多重耐药菌。医院感染、长期应用诺氟沙星预防、多重耐药菌近期感染和最近应用β内酰胺类抗生素是多重耐药菌产生的独立危险因素。Skippen等研究认为先前抗生素使用、住院时间 >15 d、入住ICU等是导致产ESBLs肺炎克雷伯菌和大肠杆菌感染的独立危险因素。

■创新盘点

本文系统分析了近年感染产ESBLs的大肠杆菌的抗菌药物耐药情况、抗菌治疗疗效及临床结局,为合并感染的肝硬化人群初始选择抗菌药物提供依据。

表 1 2006-2011年肝硬化合并感染患者病原菌分布 (n)

	株数
大肠埃希菌	167
肺炎克雷伯菌	98
葡萄球菌属	85
铜绿假单胞菌	43
阴沟肠杆菌	35
其他	27
合计	455

断标准(试行)》确定,出院时抗感染治疗有效被定义为患者出院时感染症状明显缓解或消失,相应的化验检查指标明显趋于恢复正常或已正常。抗感染治疗未愈被定义为患者出院前感染症状或相应指标未消失,抗感染治疗无效者包括未愈和死亡的患者,排除抗感染治疗不满72 h的患者。

1.2.3 细菌鉴定和药敏试验:细菌分离培养按照《全国临床检验操作规程》进行,用法国生物梅里埃公司的Vitek-2型微生物分析仪进行菌株鉴定、体外药物敏感试验及ESBLs确定,仪器不确定者,再按美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的纸片扩散确证法确定产ESBLs菌株,质控菌株为大肠埃希菌ATCC51466,药敏纸片为英国OXOID公司生产。

1.2.4 抗生素应用:肝硬化合并感染患者抗感染经验用药主要依据我国抗生素应用指南,对肝硬化患者常见的合并感染包括自发性腹膜炎、尿路感染、菌血症及肺炎等,选择覆盖常见病原菌谱的广谱抗生素三代头孢抗生素或喹诺酮类,在48或72 h后及时评价抗感染疗效并根据细菌培养结果调整抗生素应用。若患者48或72 h抗感染治疗有效,不论细菌培养结果如何,继续使用先前所使用抗生素治疗;若患者48或72 h抗感染疗效不佳,则根据细菌培养结果调整抗生素,结果未回报的根据经验换药。

统计学处理 统计处理采用SPSS16.0软件,多组均数比较采用方差分析,计数资料比较采用Fisher精确检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本情况 2006-2011年共有4065例次肝硬化住院患者,共发生911例次感染,感染率为22.4%。感染部位细菌培养阳性患者455例,病原

菌分布见表1,其中50例为合并产ESBLs阳性大肠埃希菌培养阳性的感染患者,无重复感染患者(包括同一患者不同部位感染),产ESBLs阳性大肠埃希菌感染率约为11.0%,较实际感染率低。50例合并产ESBLs阳性大肠埃希菌肝硬化患者基本情况见表1。初始感染包括自发性腹膜炎、尿路感染、原发性菌血症、肺部感染,分别占58%、16%、16%和10%,继发性菌血症共10例,其中自发性腹膜炎合并菌血症6例,肺炎、尿路感染合并继发菌血症感染各2例,首用三代头孢、首用喹诺酮在4组感染患者中分别存在显著差异($P < 0.05$),尿路感染中全部为女性肝硬化患者,4组感染患者在抗生素应用和临床转归之间没有显著差异($P > 0.05$,表2)。

2.2 大肠杆菌标本来源及耐药 主要从患者4个部位中分离到细菌,其中腹水有29例,血液有18例,尿液有9例,痰有6例,腹水和血培养同时阳性的有6例,痰、尿液与血培养同时阳性的各2例,培养菌种均为单一菌。所有产ESBLs菌株均由分析仪确定,产ESBLs阳性大肠埃希菌药敏实验结果(表3)。药敏试验结果显示,体外抗菌药物敏感率最高的为亚胺培南(0%),其次为呋喃妥因(6.91%),对头孢吡肟发生耐药的比例最高(95.8%),其次为头孢唑林(95.7%),根据药敏试验结果,其中16例病例选择抗菌药物治疗有效(复查未检出菌为标准)的有10例,占62.5%。

2.3 抗生素应用 首用三代头孢类抗生素组16例患者,首用喹诺酮组23例,首用酶抑制剂组11例,均为单联用药。3组之间换药率没有明显差别($P > 0.05$),3组抗菌药物应用患者的临床结局之间没有显著区别;社区感染与医院感染患者在首用抗生素、肝硬化Child-pugh分级及死亡率之间没有显著区别;换用三代头孢和喹诺酮与换用酶抑制剂和亚胺培南后抗感染疗效转归没有明显差异($P > 0.05$)。

2.4 临床转归的单因素分析 肝硬化分级Child-pugh A、首用喹诺酮在生存组与死亡组感染患者间提示存在显著差异($P < 0.05$,表4)。抗感染最终结局有效与无效危险单因素分析提示菌血症、肝硬化分级Child-pugh C存在明显差异($P < 0.05$);肝性脑病、上消化道出血在生存与死亡两组之间差异不明显(表5)。

3 讨论

肝硬化患者免疫系统异常和细菌移位导致局部免疫反应改变,细菌过度生长,易合并细菌感染^[7]。

表 2 4组不同类型感染患者基本情况 (n)

	自发性腹膜炎	尿路感染	原发性菌血症	肺炎	P值
n	29	8	8	5	
年龄(岁)	55±3	60±4	53±2	55±3	0.712
男/女	15/14	0/8	6/2	4/1	0.008
HBV/HCV/免疫性/酒精性	26/3/0/0	4/2/1/1	5/2/0/1	3/1/1/0	0.137
医院感染	13	4	3	2	0.961
2型糖尿病	5	2	2	0	0.65
原发性肝癌	3	0	3	2	0.122
肝肾综合征	5	1	0	1	0.633
肝性脑病	6	2	0	0	0.330
上消化道出血	5	1	0	0	0.470
Child-pugh分级 A/B/C	0/11/18	4/2/2	2/3/3	2/2/1	0.014
前三月抗生素应用	20	5	4	2	0.549
首用三代头孢	12	2	1	1	0.039
首用喹诺酮	8	5	7	3	0.013
首用酶抑制剂	9	1	0	1	0.254
换用三代头孢	2	1	1	0	0.337
换用喹诺酮	4	1	0	0	0.631
换用酶抑制剂	3	2	0	3	0.164
换用亚胺培南	8	0	1	2	0.355
有效/未愈/死亡	15/8/6	6/0/2	5/2/1	2/3/0	0.359

■应用要点

喹诺酮类组的换药率低于三代头孢类抗生素, 并且喹诺酮类组患者死亡率明显低于其他两组, 因此在经验选用抗菌药物时, 应提高喹诺酮类药物在初始经验用药中的应用率。

表 3 50例产ESBLs大肠埃希菌耐药情况

	敏感(n)	中介(n)	耐药(n)	耐药率(%)
丁胺卡那霉素	16	1	19	52.7
妥布霉素	27	13	12	23.07
氨苄西林	12	1	37	74.0
氨苄西林舒巴坦	2	12	36	72.0
哌拉西林舒巴坦	34	8	4	8.6
环丙沙星	21	0	26	55.3
左氧氟沙星	20	0	28	58.3
头孢唑林	1	1	45	95.7
头孢呋辛钠	2	0	27	93.1
头孢呋辛酯	13	0	16	55.2
头孢曲松	2	0	31	93.9
头孢他啶	0	0	24	100
头孢吡肟	1	0	23	95.8
亚胺培南	40	0	0	0.0
哌喃妥因	27	0	2	6.91
复方新诺明	5	0	33	86.8
庆大霉素	14	0	27	65.9

表 4 生存组与死亡组患者单因素分析 n(%)

	生存	死亡	P值
n	41	9	
自发性腹膜炎	22(53.7)	7(77.8)	0.184
菌血症	13(31.7)	5(55.6)	0.177
医院感染	19(46.3)	3(33.3)	0.477
Child-pugh分级A	8(19.5)	0	0.002
Child-pugh分级B	16(39.0)	2(22.2)	0.342
Child-pugh分级C	17(41.5)	7(77.8)	0.282
原发性肝细胞癌	8(19.5)	1(11.1)	0.552
肝性脑病	5(12.2)	3(33.3)	0.887
上消化道出血	4(9.76)	2(22.2)	0.297
肝肾综合征	6(14.63)	3(33.3)	0.186
首用头孢	11(26.8)	5(55.6)	0.094
首用喹诺酮	22(53.7)	1(11.1)	0.020
首用酶抑制剂	8(19.5)	3(33.3)	0.365
换用酶抑制剂	8(19.5)	0(0)	0.148
换用亚胺培南	9(22.0)	2(22.2)	0.986

相关文献报道常见的感染有自发性腹膜炎约占25%, 尿路感染约占20%, 肺炎约占15%, 菌血症约占12%, 其余为蜂窝织炎和其他感染^[8-13]。有研究提示产ESBLs肠杆菌是肝硬化患者中最常见的多重耐药菌。医院感染、长期应用诺氟沙星预防、多重耐药菌近期感染和最近应用β内酰胺类抗

生素是多重耐药菌产生的独立危险因素。Skippen等^[14]研究认为先前抗生素使用、住院时间>15 d、入住ICU等是导致产ESBLs肺炎克雷伯菌和大肠杆菌感染的独立危险因素, 本研究资料中62%的患者住院前3 mo内曾经应用抗生素。

产ESBLs主要由肠杆菌科细菌产生, 以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为常见, 携带ESBLs

■同行评价

本文通过系统回顾分析方法,对肝硬化合并产ESBLs大肠埃希菌感染患者抗炎治疗疗效及临床结局进行了统计学分析,有一定临床意义。

表 5 有效组与无效组患者单因素分析 $n(\%)$

	有效	无效	P 值
n	28	22	
自发性腹膜炎	17(60.7)	12(54.5)	0.611
菌血症	6(21.4)	12(54.5)	0.015
医院感染	15(53.6)	7(31.8)	0.124
Child-pugh分级A	8(28.6)	0	0.704
Child-pugh分级B	12(42.9)	4(18.2)	0.063
Child-pugh分级C	19(67.9)	7(31.8)	0.002
原发性肝细胞癌	5(17.9)	3(13.6)	0.686
肝性脑病	4(14.3)	4(18.2)	0.709
上消化道出血	3(10.7)	3(13.6)	0.752
肝肾综合征	4(14.3)	5(22.7)	0.441
首用头孢	8(28.6)	8(36.4)	0.558
首用喹诺酮	14(50)	9(40.9)	0.522
首用酶抑制剂	6(21.4)	5(16.7)	0.912
换用酶抑制剂	6(21.4)	2(9.1)	0.238
换用亚胺培南	4(14.3)	7(31.8)	0.137

基因的质粒可同时携带氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类、磺胺类及氟喹诺酮类等耐药基因^[15],通过接合、转化和转导等形式使耐药基因在细菌中扩散。研究表明喹诺酮的耐药性可以由产ESBLs质粒携带喹诺酮耐药基因的转座子传播^[16]。临床研究结果提示,相比其他种类的抗菌药物,碳青霉烯类抗生素治疗产ESBLs细菌严重感染的临床疗效更为显著。一项国际多中心研究项目中,Paterson等^[17]前瞻性收集了455例肺炎克雷伯菌菌血症患者的数据,其中85例由产ESBLs菌株引起,相比其他抗菌药物,用碳青霉烯类抗生素治疗可显著降低14%的死亡率。有研究^[18-25]分析已发表的前瞻性队列研究文献得出,当阿莫西林克拉维酸或哌拉西林/三唑巴坦体外实验证实敏感时可以替代碳青霉烯类抗生素治疗产ESBLs大肠埃希菌菌血症且疗效肯定。本研究中50例合并产ESBLs大肠埃希菌感染患者初始经验使用三代头孢32%,喹诺酮46%,而换用抗生素中酶抑制剂和亚胺培南的应用率仅为68%,酶抑制剂和亚胺培南在初始经验用药和换药的应用率明显不足。首用三代头孢和喹诺酮在各感染比例中存在明显差异,可能是由于过分依赖经验用药,自发性腹膜炎的抗感染治疗过分依赖三代头孢抗生素。本研究中自发性腹膜炎、尿路感染、原发性菌血症、肺部感染,首用三代头孢、首用喹诺酮在4组感染患者中分别存在显著差异($P<0.05$),4组感染患者在抗生素应用和临床转归之间没有显著差异。第

三代头孢菌素是首选的抗生素,多数患者可获得治愈。但近年来,由于广泛大量应用第三代头孢菌素以及产ESBLs的大肠杆菌菌株的出现,第三代头孢菌素对其耐药性逐年增加。由耐药菌株感染者可选用哌拉西林舒巴坦或亚胺培南治疗^[26]。

本研究资料感染患者生存组与死亡组单因素分析提示肝硬化分级Child-pugh A、首用喹诺酮存在显著差异,抗感染最终结局好转组与无效组单因素分析提示菌血症、肝硬化分级Child-pugh C存在显著差异。细菌对喹诺酮类抗菌药的耐药率较高,世界各地的报道的耐药率从55%到100%不等^[27]。质粒介导的喹诺酮类耐药基因与编码ESBLs的基因有关联,这种现象在肠杆菌科细菌中普遍存在,其中以 $qnrB$ 基因为主^[28],因此治疗产ESBLs细菌感染时喹诺酮类的药物作用非常有限,但若体外实验证实菌株对喹诺酮类药物敏感,则可用喹诺酮类药物联合其他类抗生素治疗细菌感染,而 β 内酰胺类抗生素体外实验证实敏感也不能应用,因为产ESBLs细菌可能对多数 β 内酰胺类抗生素存在接种效应。由本研究资料中产ESBLs大肠埃希菌的药敏试验可以得知,左氧氟沙星的耐药率为58.3%,低于国内其他地区药敏实验的耐药率^[29],喹诺酮类组的换药率低于三代头孢类抗生素,且喹诺酮类组患者死亡率明显低于其他两组,因此在经验选用抗菌药物时,应提高喹诺酮类药物在初始经验用药中的应用率。

肝硬化Child-pugh分级是反应肝硬化患者病情和预后的国际公认的标准,住院患者的临床转归与其密切相关,抗感染疗效也会受其影响。因此本研究可能存在偏倚,感染患者的临床预后不佳可能与感染本身无直接关系,而是病情本身造成的,这需要进一步的研究。本研究中8例产ESBLs尿路感染均为老年女性患者,可能与其女性泌尿道特殊的解剖结构有关。国外有研究报道鉴于产ESBLs尿路感染患者的增多,大肠埃希菌的耐药性增加,磷霉素或者是呋喃妥因可作为初始经验性的社区获得尿路感染患者^[30,31]。本研究资料显示产ESBLs大肠埃希菌的呋喃妥因的耐药率为6.91%,低于哌拉西林他唑巴坦。尿路感染的微生物多由革兰阴性杆菌引起,可给予第三代喹诺酮类药物诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星或者传统有效的增效磺胺甲氧嘧啶,因为这些药物能明显抵抗革兰阴性菌,并在尿液的浓度很高。

本研究尚存在许多不足, 未对48 h或72 h的临床抗感染疗效进行评价, 未对患者换用抗生素时的临床特征进行分析. 且纳入病例数较少, 未进行多因素逻辑回归分析, 对感染患者的临床转归危险因素缺乏一定的说服力. 因为是回顾性研究, 尚有许多因素不可控制, 这都是以后的研究中需要注意的问题.

4 参考文献

- Fernández J, Gustot T. Management of bacterial infections in cirrhosis. *J Hepatol* 2012; 56 Suppl 1: S1-12 [PMID: 22300459 DOI: 10.1016/S0168-8278(12)60002-6]
- Bellot P, Jara Pérez López N, Martínez Moreno B, Such J. [Current problems in the prevention and treatment of infections in patients with cirrhosis]. *Gastroenterol Hepatol* 2010; 33: 729-740 [PMID: 20444525 DOI: 10.1016/j.gastrohep.2010.02.004]
- Liu BM, Chung KJ, Chen CH, Kung CT, Ko SF, Liu PP, Chang HW. Risk factors for the outcome of cirrhotic patients with soft tissue infections. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 312-316 [PMID: 18223491 DOI: 10.1097/MCG.0b013e31802dbde8]
- Fernández J, Acevedo J, Castro M, García O, de Lope CR, Roca D, Pavesi M, Sola E, Moreira L, Silva A, Seva-Pereira T, Corradi F, Mensa J, Ginès P, Arroyo V. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology* 2012; 55: 1551-1561 [PMID: 22183941 DOI: 10.1002/hep.25532]
- Cheong HS, Kang CI, Lee JA, Moon SY, Joung MK, Chung DR, Koh KC, Lee NY, Song JH, Peck KR. Clinical significance and outcome of nosocomial acquisition of spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1230-1236 [PMID: 19302016 DOI: 10.1086/597585]
- Vilstrup H. Cirrhosis and bacterial infections. *Rom J Gastroenterol* 2003; 12: 297-302 [PMID: 14726975]
- Talwani R, Gilliam BL, Howell C. Infectious diseases and the liver. *Clin Liver Dis* 2011; 15: 111-130 [PMID: 21111996 DOI: 10.1016/j.cld.2010.09.002]
- Navasa M, Rodés J. Bacterial infections in cirrhosis. *Liver Int* 2004; 24: 277-280 [PMID: 15287849]
- Yang YY, Lin HC. Bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Chin Med Assoc* 2005; 68: 447-451 [PMID: 16265857]
- Papp M, Farkas A, Udvardy M, Tornai I. [Bacterial infections in liver cirrhosis]. *Oro Hetil* 2007; 148: 387-395 [PMID: 17344166]
- Borzio M, Salerno F, Piantoni L, Cazzaniga M, Angeli P, Bissoli F, Boccia S, Colloredo-Mels G, Corigliano P, Fornaciari G, Marengo G, Pistrà R, Salvagnini M, Sangiovanni A. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis* 2001; 33: 41-48 [PMID: 11303974]
- Mathurin S, Chapelet A, Spanevello V, Sayago G, Balparda C, Virga E, Beraudo N, Bartolomeo M. [Infections in hospitalized patients with cirrhosis]. *Medicina (B Aires)* 2009; 69: 229-238 [PMID: 19435695]
- Almeida D, Lopes AA, Santos-Jesus R, Paes I, Bittencourt H, Paraná R. Comparative study of bacterial infection prevalence between cirrhotic patients with and without upper gastrointestinal bleeding. *Braz J Infect Dis* 2001; 5: 136-142 [PMID: 11506777]
- Skippen I, Shemko M, Turton J, Kaufmann ME, Palmer C, Shetty N. Epidemiology of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: a nested case-control study from a tertiary hospital in London. *J Hosp Infect* 2006; 64: 115-123 [PMID: 16859810]
- 罗燕萍, 张秀菊, 徐雅萍, 田芳, 沈定霞. 产超广谱β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌的分布及其耐药性研究. *中华医院感染学杂志* 2006; 16: 101-104
- Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 71-76 [PMID: 15616277]
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, Wagener MM, McCormack JG, Yu VL. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 31-37 [PMID: 15206050]
- Rodríguez-Baño J, Navarro MD, Retamar P, Picón E, Pascual Á. β-Lactam/β-lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli*: a post hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 167-174 [PMID: 22057701 DOI: 10.1093/cid/cir790]
- Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW. Bloodstream infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for mortality and treatment outcome, with special emphasis on antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4574-4581 [PMID: 15561828 DOI: 10.1016/j.ijid.2011.09.019]
- Kuster SP, Hasse B, Huebner V, Bansal V, Zbinden R, Ruef C, Ledergerber B, Weber R. Risks factors for infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary care university hospital in Switzerland. *Infection* 2010; 38: 33-40 [PMID: 20108162 DOI: 10.1007/s15010-009-9207-z]
- Demir S, Soysal A, Bakir M, Kaufmann ME, Yagci A. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in paediatric wards: a nested case-control study. *J Paediatr Child Health* 2008; 44: 548-553 [PMID: 18557808 DOI: 10.1111/j.1440-1754.2008.01326.x]
- Laurent C, Rodriguez-Villalobos H, Rost F, Strale H, Vincent JL, Deplano A, Struelens MJ, Byl B. Intensive care unit outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* controlled by cohorting patients and reinforcing infection control measures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 517-524 [PMID: 18510461 DOI: 10.1086/588004]
- Niumsup PR, Tansawai U, Boonkerd N, Polwichai P, Dejsirilert S. Dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Thai hospitals. *J Infect Chemother* 2008; 14: 404-408 [PMID: 19089552 DOI: 10.1007/s10156-008-0642-z]
- Nasa P, Juneja D, Singh O, Dang R, Singh A. An observational study on bloodstream extended-spectrum beta-lactamase infection in critical care unit: incidence, risk factors and its impact on outcome.

- Eur J Intern Med* 2012; 23: 192-195 [PMID: 22284253 DOI: 10.1016/j.ejim.2011.06.016]
- 25 Filozov A, Visintainer P, Carbonaro C, Agüero-Rosenfeld M, Wormser GP, Montecalvo MA. Epidemiology of an outbreak of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* at a tertiary care medical center. *Am J Infect Control* 2009; 37: 723-728 [PMID: 19501935 DOI: 10.1016/j.ajic.2009.02.006]
 - 26 Song KH, Jeon JH, Park WB, Park SW, Kim HB, Oh MD, Lee HS, Kim NJ, Choe KW. Clinical outcomes of spontaneous bacterial peritonitis due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: a retrospective matched case-control study. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 41 [PMID: 19361340 DOI: 10.1186/1471-2334-9-41]
 - 27 Pitout JD. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6: 657-669 [PMID: 18847404 DOI: 10.1586/14787210.6.5.657]
 - 28 Jeong HS, Bae IK, Shin JH, Jung HJ, Kim SH, Lee JY, Oh SH, Kim HR, Chang CL, Kho WG, Lee JN. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase in Enterobacteriaceae. *Korean J Lab Med* 2011; 31: 257-264 [PMID: 22016679 DOI: 10.3343/kjlm.2011.31.4.257]
 - 29 彭敬红, 孙自鏞, 周有利, 吕军. 产ESBLs大肠埃希菌的耐药性研究. *现代预防医学* 2007; 34: 3668-3669
 - 30 Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 26-42 [PMID: 18293275 DOI: 10.1055/s-2008-1040319]
 - 31 Meier S, Weber R, Zbinden R, Ruef C, Hasse B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative pathogens in community-acquired urinary tract infections: an increasing challenge for antimicrobial therapy. *Infection* 2011; 39: 333-340 [PMID: 21706226 DOI: 10.1007/s15010-011-0132-6]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》 影响因子 0.873

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07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, 2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6979次, 影响因子0.873, 综合评价总分88.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位; 其他指标: 即年指标0.219, 他引率0.89, 引用刊数619种, 扩散因子8.84, 权威因子2144.57, 被引半衰期4.7, 来源文献量758, 文献选出率0.94, 地区分布数26, 机构分布数1, 基金论文比0.45, 海外论文比0.71。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界胃肠病学杂志(英文版)》再度被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。根据2011年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD 2011)统计结果,《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获2011年“百种中国杰出学术期刊”称号。

Th17细胞与肝脏疾病关系的研究进展

薛芝敏, 姚冬梅

薛芝敏, 姚冬梅, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

薛芝敏, 硕士, 主要从事消化系疾病的研究。

作者贡献分布: 本文综述由薛芝敏完成; 姚冬梅负责审校。

通讯作者: 姚冬梅, 副教授, 硕士生导师, 050000, 河北省石家庄市新华区和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科。ydm8080@hotmail.com

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2012-11-01 修回日期: 2013-04-06

接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-08

Th17 cells and liver diseases

Zhi-Min Xue, Dong-Mei Yao

Zhi-Min Xue, Dong-Mei Yao, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Dong-Mei Yao, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Xinhua District, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. ydm8080@hotmail.com

Received: 2012-11-01 Revised: 2013-04-06

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-08

Abstract

In recent years, it has been demonstrated that T helper cells 17 (Th17) are closely related to the occurrence and development of many kinds of liver diseases such as viral hepatitis, autoimmune liver diseases and fatty liver diseases. Th17 cells are a new CD4⁺ T cell subset, which can interact with Th1, Th2 and Treg cells. There exists complex antagonistic or collaborative relationship among these cells. Understanding the role of Th17 cells in liver diseases will help explore the pathogenesis and treatment of these diseases.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Th17; IL-17; Immune response; Liver

Xue ZM, Yao DM. Th17 cells and liver diseases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(13): 1185-1190 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1185.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1185>

摘要

近年来研究发现, 辅助性T细胞17(T helper

cells 17, Th17)与病毒性肝炎、自身免疫性肝病以及脂肪性肝病等多种肝病的发生发展密切相关。Th17细胞是新发现的CD4⁺ T细胞亚群, 与调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)、Th1细胞及Th2细胞在分化发育上相互制约, 在功能上存在着拮抗或协同的复杂关系, 研究Th17细胞在多种肝病发生发展中的作用有助于进一步探索肝病的发病机制及治疗方法。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: Th17细胞; 白介素17; 免疫反应; 肝脏

核心提示: 辅助性T细胞17(T helper cells 17, Th17)参与了多种肝病的发病过程, 但Th17细胞在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)感染致肝损伤中的作用尚存争议, 循环Th17与丙型肝炎病毒(hepatitis C virus)相关肝纤维化关系尚不明确, Th17在慢性酒精性肝病发病中的作用机制可能不同。

薛芝敏, 姚冬梅. Th17细胞与肝脏疾病关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1185-1190 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1185.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1185>

0 引言

CD4⁺ T淋巴细胞依据其生物学特性, 可分为调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)、辅助性T细胞17(T helper cells 17, Th17)、Th1及Th2细胞4个亚群, Th17细胞是新发现的一类效应性T细胞, 与机体的炎症反应、自身免疫性疾病及肿瘤的发生发展密切相关。研究表明, Th17细胞参与了病毒性肝炎、自身免疫性肝病及脂肪性肝病等多种肝病的发病过程。本文将从Th17细胞在肝脏疾病中的作用研究进展作一综述。

1 Th17细胞的分化及调节

CD4⁺ T淋巴细胞在转化生长因子β(transforming growth factor β, TGF-β)、白细胞介素6(interleukin 6, IL-6)的协同作用下分化为Th17细胞, 孤儿核受体γt(Orphan nuclear receptor γt, RORγt)是其关键性的转录因子, IL-21、IL-23、信号转导

■背景资料

近年来, 辅助性T细胞17(T helper cells 17, Th17)与慢性炎症、自身免疫及纤维化等疾病的关系研究越来越多, 其在肝病中的作用引起人们的广泛关注, 明确Th17细胞在病毒感染、自身免疫、酒精及非酒精性肝病发病及进展中的作用, 可为其治疗提供新的研究方向。

■同行评议者

赵青川, 主任医师, 教授, 西京医院消化外科

■ 研发前沿

Th17细胞参与了多种肝病的发生发展过程,但在不同病因肝病中的作用不尽相同,急性酒精性肝损伤中白介素17的表达及作用机制尚不清楚, Th17细胞介导肝纤维化的具体作用机制尚不明确, Th17与丙型肝炎病毒致肝纤维化的关系尚不明确。

转录激活子3(signal transducer and activator of transcription3, STAT3)及干扰素调节因子4(interferon regulatory factor4, IRF4)促进Th17细胞分化, IL-4、 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)、IL-2、IL-12、IL-27、母亲DDP同源物(mothers against decapentaplegic homolog 3, Smad3)及细胞因子信号传递抑制蛋白3(suppressor of cytokine signaling 3, Socs3)等抑制Th17细胞的生成. Th17细胞分泌主要炎症介质IL-17, 参与炎症反应。

2 Th17细胞与肝病的关系

Th17细胞数量和/或功能的紊乱, 可导致多种免疫介导的肝脏疾病发生, Th17细胞分泌增加可能导致炎症反应加剧、自身免疫性疾病以及暴发性肝炎等, 而分泌减少则可能导致慢性病毒感染和肝癌的发生. 新近研究发现Th17细胞与非酒精性脂肪性肝病和酒精性肝病亦有关. 现分述如下。

2.1 病毒性肝炎 Th17细胞在慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)病程进展中发挥重要作用. 在乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)和丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染时, 病毒诱导的肝脏炎症反应与Th17细胞的浸润和激活以及抗病毒免疫反应所引发的肝损伤关系密切. 国内外多项研究^[1-3]发现, 在CHB患者中, 外周血和肝脏的Th17细胞数量及IL-17显著增加, 随肝病严重程度增加IL-17表达增高, 提示Th17细胞在乙型肝炎病毒感染引起的免疫反应中发挥重要作用, 与CHB进展相关^[4-7]. 因此, 从抗病毒防御和肝病进展角度来讲, 强烈的Th17反应同病毒负荷增加、血浆转氨酶水平增高以及血单核细胞和肝脏巨噬细胞激活有关, HCV亦引起相似的病理生理学反应^[8-11]. HCV患者应用聚乙二醇干扰素联合利巴韦林抗病毒治疗后导致Th17反应下降, 从而减轻HCV介导的肝脏炎症^[12], 但亦有少数研究显示CHB患者外周血中Th17细胞频率与健康人群的差异无统计学意义^[13], 甚至在急、慢性乙型肝炎患者未检测到病毒特异性IL-17⁺ T细胞^[14], 而慢性HCV感染的患者及动物模型中显示产IL-17的CD8⁺ T细胞具有肝脏保护功能^[15], 肝移植后丙型肝炎复发患者Th17细胞具有清除病毒功能^[16]. 对CHB机制研究发现Th17细胞可以通过上调抗凋亡分子, 抑制细胞毒性T淋巴细胞对靶分子的破坏, 从而增加病毒持续感染的时间^[17], 同时他可能刺激髓样树突状细胞(myeloid dendritic cells, mDCs)和单

核细胞释放炎症细胞因子IL-1 β 、IL-23、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)而介导肝脏免疫反应, 加重肝脏损伤, 进一步对乙型肝炎肝硬化患者研究发现^[18,19]IL-17水平与肝纤维化血清学指标例如透明质酸、层黏连蛋白及III型胶原等呈正相关, 因此提示IL-17在CHB中可能有促肝纤维化的作用^[20-22], 不同的是, 有研究发现, 丙型肝炎患者循环中IL-17水平增高与肝纤维化关系不明显^[23].

此外, Th17细胞分化、肝内IL-17⁺叉头翼状螺旋转录因子3(forkhead winged helix transcription factor 3, Foxp3)细胞比例增高在慢加急性肝衰竭(acute on chronic liver failure, ACLF)中亦发挥重要作用, 且与预后密切相关^[24-27]. 临床研究发现, HBV相关的慢性肝衰竭(HBV-related chronic liver failure, HBV-CLF)、ACLF及正常人群中, ACLF组肝组织汇管区IL-17⁺ T细胞浸润显著增强, IL-17⁺/CD4⁺ T细胞的比率显著高于CLF组及正常对照组, 循环中IL-17⁺ T细胞的频率随着CLF向ACLF进展而逐渐增加^[2], 提示Th17细胞介导的免疫反应与HBV感染的严重程度及肝细胞损伤有关, 血清中IL-17的水平可以作为新的评估急性肝损伤严重程度的标志物。

2.2 Th17细胞与自身免疫性肝病 Th17细胞在自身免疫性肝病中的作用已引起广泛关注, 目前研究主要集中在Th17细胞与原发胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)和自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)方面^[28-30]. 学者们观察到自身免疫性肝病患者血清中Th17相关细胞因子及肝脏IL-17⁺淋巴细胞浸润明显增加^[13,31], 但其作用机制尚不明确. IL-2R α 基因敲除小鼠是类似于人PBC的动物模型, 该模型小鼠Th17细胞产生增加, 同时伴随血清中IL-17的明显增加^[32], 而且同野生鼠相比, IL-2R α 基因敲除小鼠肝脏产生Th17细胞的数量明显增加, 且该细胞产生IL-17的水平亦明显高于野生鼠^[13], 此作用可能系由于缺乏IL-2的抑制效应所致, 但Th17细胞在肝脏诱导产生的机制仍不清楚, 进一步需要研究PBC产生是否真正系通过Th17细胞及IL-17水平升高所致^[13,33,34]. Harada等^[35]通过对人胆管上皮细胞(biliary epithelial cells, BECs)进行培养, 检测Th17相关细胞因子及趋化因子的表达, 并应用病原体相关的分子模式进行治疗观察其表达的变化, 发现BECs存在IL-17受体, 应用IL-17后可诱导IL-6、IL-1 β 和IL-23p19的产生. 在PBC患者受损胆管周围发现IL-17阳性细胞浸润及

诱导和维持Th17产生的细胞因子IL-6、IL-1 β 和IL-23的表达增加,从而诱导IL-17的产生,他可促进Th17等炎症细胞的移行,进一步加剧慢性胆管炎, PBC中胆管病变的病理发病机制仍需进一步深入研究^[13]。但Zenewicz等^[36]在ConA诱导的小鼠自身免疫性肝炎模型中发现Th17细胞并不起主要作用,研究发现Th17细胞所分泌的IL-22、IL-17 mRNA在肝脏及脾脏表达增加,进一步对IL-17缺乏小鼠注射ConA后观察到其引起的肝损伤同野生型小鼠相比无显著差异,而对IL-22和IL-17同时缺乏小鼠注射ConA后观察到其所引起的肝脏的损伤程度同单独IL-22缺乏小鼠并无显著差异,表明IL-17在ConA诱导的肝细胞损伤中似乎不发挥主要作用,而Th17细胞可作为媒介使IL-22在炎症部位聚集从而限制肝脏损伤,其机制可能与激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinase, AKT)和STAT3有关。虽然Th17细胞在ConA介导的AIH中不起主要作用,但多数研究观察到AIH时Th17相关细胞因子明显增加, Oo等^[37]观察到在AIH时IL-17⁺ T细胞浸润增加,同时趋化因子受体3(chemokine receptor 3, CXCR3)表达升高,他在人及小鼠肝损伤时均可促进Th17细胞从外周血至肝脏,继而依赖胆管上皮细胞分泌趋化因子配体20(chemokine ligand 20, CCL20)而聚集于胆道周围。Zhao等^[28]对AIH和CHB患者肝脏及外周血Th17细胞数量进行研究发现,二者Th17细胞数量均明显增加,但同CHB相比, AIH患者Th17细胞数量增加更为明显,且Th17细胞数量与肝脏炎症程度及纤维化程度明显相关,其机制可能与IL-17通过肝细胞诱导有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)依赖的IL-6表达有关,并可通过Th17细胞与肝细胞的正反馈作用促进炎症过程。在AIH中, IL-17可诱导肝脏IL-6的表达, IL-6与TGF- β 促进ROR γ t表达进而激活Th17通路。因此, Th17细胞增殖可能是AIH发病的启动因素^[29]。阻断Th17信号通路干扰IL-17的正反馈环可能为AIH的治疗提供潜在的治疗靶点。此外, Th17细胞与Tregs之间的平衡失调促进了自身免疫性疾病的发展^[34,38]。新近一项对从AIH患者中提取的CD25-Treg(CD25 negative Treg, CD25ngTreg)细胞进行研究发现, AIH患者IL-17⁺ ngTreg细胞的比例明显增加,抑制IL-17后可促进ngTreg的发育从而导致免疫抑制,对该机制的深入研究可能有助于AIH患者的治疗^[39]。

2.3 Th17细胞与酒精性肝病 Th17细胞在酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)中的研究相对较少^[40,41],虽然其机制目前尚未阐明,但中性粒细胞及T细胞在肝脏的浸润促进了酒精所致的肝损伤。Lemmers等^[9]证明Th17通路在酒精性肝病中发挥了重要作用。酒精中毒性肝损伤患者及酒精性肝硬化患者血浆中IL-17水平明显升高,他主要位于纤维化肝脏的界板区,且肝脏IL-17细胞数量同肝细胞损伤程度呈正相关^[33,42],其机制被认为是Th17细胞可通过产生IL-8和生长调节致癌基因 α 诱导中性粒细胞的聚集^[9]。现有研究认为长期摄入乙醇导致的IL-17的增加可进一步刺激表达IL-17受体的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC),进而引起TNF- α 和TGF- β 表达增加,进而促进细胞凋亡蛋白酶原3活化介导肝细胞凋亡、抑制自然杀伤细胞的活性而减弱其抗纤维化的作用。此外, HSC激活亦可促进IL-8等细胞因子分泌,进而诱导肝脏炎症,同时,乙醇可活化纤溶酶原激活抑制物-1发挥抗纤溶作用,与乙醇代谢产物乙醛的促胶原生成作用协同,促进肝纤维化的形成。因此, IL-17可促进酒精性肝病的进展,阻断IL-17可能是治疗酒精性肝病的有效治疗方案。与之相反,有研究表明,急性酒精摄入可改变树突状细胞的抗原提呈功能,影响适应性免疫应答,促进Foxp3生成,但抑制ROR γ t基因表达,低水平的IL-23/IL-17可能与肺炎克雷伯杆菌易感相关, IL-17可能发挥保护作用,急性酒精性肝损伤中IL-17的表达及作用尚不清楚^[43-45]。

2.4 Th17细胞与非酒精性脂肪性肝病 目前研究证实脂质代谢、胰岛素抵抗及瘦素水平等多种因素参与了非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的形成。虽然非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)的免疫病理机制尚未阐明,但多项研究表明炎症反应同肝损伤关系密切。脂肪肝相关的炎症反应系通过两个主要受体CXCR1或CXCR2介导从而增强中性粒细胞和淋巴细胞的聚集^[46,47]。汤艳丽等^[48]研究发现, NAFLD的关键因子瘦素可促进小鼠IL-17的产生,进而促进肝细胞IL-26的产生从而加重肝细胞脂肪变性。同时, IL-17和脂肪酸可协同促进IL-6的分泌。IL-6通过抑制胰岛素受体底物-1酪氨酸磷酸化,发挥胰岛素抵抗作用, IL-17加重了炎性损伤,促进了NAFLD的形成。总之, NASH时中性粒细胞浸润、IL-6信号通路、Th17的应答均表明脂肪肝

■相关报道

Lemmers等提出Th17细胞与酒精性肝病的炎症浸润及纤维化进展密切相关,为酒精性肝病的治疗提供了新的靶点。

■应用要点

本文总结了目前肝病研究中Th17细胞的重要作用,指出了尚存争议及未阐明的问题,为进一步深入研究肝病发病机制提供了方向。Th17细胞不同病因肝病发病机制中的作用不尽相同,为治疗研究提供了新的依据。

诱导的炎症反应同Th17免疫反应关系密切^[49-51]。

3 结论

Th17细胞通过分泌多种炎性因子介导机体免疫防御反应, Treg/Th17细胞失衡导致炎症反应过度,与多种自身免疫性疾病发生有关。调节Th17细胞的分化、Treg/Th17细胞的平衡对炎症性疾病、自身免疫性疾病以及肿瘤等的治疗具有重大意义。目前,尚有诸多问题等待我们去研究,对Th17细胞与慢性肝病的研究必将有利于我们进一步阐明慢性肝病的免疫学发病机制,为其免疫治疗提供靶点和治疗策略,因此具有非常重要的意义。

4 参考文献

- Ge J, Wang K, Meng QH, Qi ZX, Meng FL, Fan YC. Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B. *J Clin Immunol* 2010; 30: 60-67 [PMID: 19756987 DOI: 10.1007/s10875-009-9328-2]
- Zhang JY, Zhang Z, Lin F, Zou ZS, Xu RN, Jin L, Fu JL, Shi F, Shi M, Wang HF, Wang FS. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010; 51: 81-91 [PMID: 19842207 DOI: 10.1002/hep.23273]
- Wu W, Li J, Chen F, Zhu H, Peng G, Chen Z. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 750-757 [PMID: 20492330 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.06154.x]
- Zhang F, Yao S, Yuan J, Zhang M, He Q, Yang G, Gao Z, Liu H, Chen X, Zhou B. Elevated IL-6 receptor expression on CD4+ T cells contributes to the increased Th17 responses in patients with chronic hepatitis B. *Virol J* 2011; 8: 270 [PMID: 21639870 DOI: 10.1186/1743-422X-8-270]
- Huang Z, van Velkinburgh JC, Ni B, Wu Y. Pivotal roles of the interleukin-23/T helper 17 cell axis in hepatitis B. *Liver Int* 2012; 32: 894-901 [PMID: 22340646 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2012.02764.x]
- Ye Y, Xie X, Yu J, Zhou L, Xie H, Jiang G, Yu X, Zhang W, Wu J, Zheng S. Involvement of Th17 and Th1 effector responses in patients with Hepatitis B. *J Clin Immunol* 2010; 30: 546-555 [PMID: 20393789 DOI: 10.1007/s10875-010-9416-3]
- Wang Q, Zheng Y, Huang Z, Tian Y, Zhou J, Mao Q, Wu Y, Ni B. Activated IL-23/IL-17 pathway closely correlates with increased Foxp3 expression in livers of chronic hepatitis B patients. *BMC Immunol* 2011; 12: 25 [PMID: 21489307 DOI: 10.1186/1471-2172-12-25]
- Puel A, Döffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, Cobat A, Ouachée-Chardin M, Toulon A, Bustamante J, Al-Muhsen S, Al-Owain M, Arkwright PD, Costigan C, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Polak M, Bougnères PF, Kumararatne D, Marodi L, Nahum A, Roifman C, Blanche S, Fischer A, Bodemer C, Abel L, Lilic D, Casanova JL. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocuta-

neous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* 2010; 207: 291-297 [PMID: 20123958 DOI: 10.1084/jem.20091983]

- Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P, de Nadai P, Geerts A, Quertinmont E, Vercruysse V, Le Moine O, Devière J. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 646-657 [PMID: 19177575 DOI: 10.1002/hep.22680]
- Rowan AG, Fletcher JM, Ryan EJ, Moran B, Hegarty JE, O'Farrelly C, Mills KH. Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta. *J Immunol* 2008; 181: 4485-4494 [PMID: 18802051]
- Chang Q, Wang YK, Zhao Q, Wang CZ, Hu YZ, Wu BY. Th17 cells are increased with severity of liver inflammation in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 273-278 [PMID: 21592230 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06782.x]
- Jimenez-Sousa MA, Almansa R, de la Fuente C, Caro-Paton A, Ruiz L, Sanchez-Antolín G, Gonzalez JM, Aller R, Alcaide N, Largo P, Resino S, de Lejarazu RO, Bermejo-Martin JF. Increased Th1, Th17 and pro-fibrotic responses in hepatitis C-infected patients are down-regulated after 12 weeks of treatment with pegylated interferon plus ribavirin. *Eur Cytokine Netw* 2010; 21: 84-91 [PMID: 20483710 DOI: 10.1684/ecn.2010.0191]
- Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, Lian ZX, Yang GX, Hsu W, Moritoki Y, Ansari AA, Kemper C, Price J, Atkinson JP, Coppel RL, Gershwin ME. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2009; 32: 43-51 [PMID: 19101114 DOI: 10.1016/j.jaut.2008.11.001]
- Gehring AJ, Koh S, Chia A, Paramasivam K, Chew VS, Ho ZZ, Lee KH, Maini MK, Madhavan K, Lim SG, Bertolotti A. Licensing virus-specific T cells to secrete the neutrophil attracting chemokine CXCL-8 during hepatitis B virus infection. *PLoS One* 2011; 6: e23330 [PMID: 21876747 DOI: 10.1371/journal.pone.0023330]
- Grafmueller S, Billerbeck E, Blum HE, Neumann-Haefelin C, Thimme R. Differential antigen specificity of hepatitis C virus-specific interleukin 17- and interferon gamma-producing CD8(+) T cells during chronic infection. *J Infect Dis* 2012; 205: 1142-1146 [PMID: 22351943 DOI: 10.1093/infdis/jis018]
- Seetharam AB, Borg BB, Subramanian V, Chapman WC, Crippin JS, Mohanakumar T. Temporal association between increased virus-specific Th17 response and spontaneous recovery from recurrent hepatitis C in a liver transplant recipient. *Transplantation* 2011; 92: 1364-1370 [PMID: 22082818 DOI: 10.1097/TP.0b013e31823817f5]
- Hou W, Kang HS, Kim BS. Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection. *J Exp Med* 2009; 206: 313-328 [PMID: 19204109 DOI: 10.1084/jem.20082030]
- Xu Y, DU WJ, Qin LY, Xing ZZ, Qin XH, Chen SJ. [Expression of interleukin-17 in hepatitis B related liver fibrosis]. *Xibao Yu Fenzi Mianyixue Zazhi* 2009; 25: 133-135 [PMID: 19174010]
- 秦来英, 杜文军, 刘葵花, 王灿, 陈士俊. 白细胞介素17的肝内表达与慢性乙型肝炎肝纤维化的相关性. *中华肝脏病杂志* 2009; 17: 221-222
- Du WJ, Zhen JH, Zeng ZQ, Zheng ZM, Xu Y, Qin

- LY, Chen SJ. Expression of Interleukin-17 associated with disease progression and liver fibrosis with hepatitis B virus infection: IL-17 in HBV infection. *Diagn Pathol* 2013; 8: 40 [PMID: 23448394 DOI: 10.1186/1746-1596-8-40]
- 21 Li J, Qiu SJ, She WM, Wang FP, Gao H, Li L, Tu CT, Wang JY, Shen XZ, Jiang W. Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis. *PLoS One* 2012; 7: e39307 [PMID: 22745730 DOI: 10.1371/journal.pone.0039307]
- 22 Wang L, Chen S, Xu K. IL-17 expression is correlated with hepatitis B related liver diseases and fibrosis. *Int J Mol Med* 2011; 27: 385-392 [PMID: 21225222 DOI: 10.3892/ijmm.2011.594]
- 23 Foster RG, Golden-Mason L, Rutebemberwa A, Rosen HR. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 381-389 [PMID: 22183819 DOI: 10.1007/s10620-011-1997-z]
- 24 Qi ZX, Wang LY, Fan YC, Zhang JJ, Li T, Wang K. Increased peripheral ROR α and ROR γ t mRNA expression is associated with acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *J Viral Hepat* 2012; 19: 811-822 [PMID: 23043388 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2012.01603.x]
- 25 Wang LY, Meng QH, Zou ZQ, Fan YC, Han J, Qi ZX, Ge J, Xu AL, Wang SK, Wang K. Increased frequency of circulating Th17 cells in acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 667-674 [PMID: 21984439 DOI: 10.1007/s10620-011-1930-5]
- 26 Niu Y, Liu H, Yin D, Yi R, Chen T, Xue H, Zhang S, Lin S, Zhao Y. The balance between intrahepatic IL-17(+) T cells and Foxp3(+) regulatory T cells plays an important role in HBV-related end-stage liver disease. *BMC Immunol* 2011; 12: 47 [PMID: 21851644 DOI: 10.1186/1471-2172-12-47]
- 27 Yang B, Wang Y, Zhao C, Yan W, Che H, Shen C, Zhao M. Increased Th17 cells and interleukin-17 contribute to immune activation and disease aggravation in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Immunol Lett* 2013; 149: 41-49 [PMID: 23237940 DOI: 10.1016/j.imlet.2012.12.001]
- 28 Zhao L, Tang Y, You Z, Wang Q, Liang S, Han X, Qiu D, Wei J, Liu Y, Shen L, Chen X, Peng Y, Li Z, Ma X. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One* 2011; 6: e18909 [PMID: 21526159 DOI: 10.1371/journal.pone.0018909]
- 29 Yu H, Huang J, Liu Y, Ai G, Yan W, Wang X, Ning Q. IL-17 contributes to autoimmune hepatitis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2010; 30: 443-446 [PMID: 20714867 DOI: 10.1007/s11596-010-0446-0]
- 30 Chen Y, Deng RH, Zhou D, Sun J, Huang Y, Zeng X, Chen QB. [Peripheral blood Th17 cell and serum IL-17A in primary biliary cirrhosis]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2010; 18: 379-380 [PMID: 20510006 DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2010.05.016]
- 31 Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, Suzuki K. Interleukin-17 as a new marker of severity of acute hepatic injury. *Hepatol Res* 2007; 37: 248-254 [PMID: 17397512]
- 32 Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, Blank RB, Meylan F, Siegel R, Hennighausen L, Shevach EM, O'shea JJ. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26: 371-381 [PMID: 17363300]
- 33 Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 345803 [PMID: 21197451 DOI: 10.1155/2011/345803]
- 34 Rong G, Zhou Y, Xiong Y, Zhou L, Geng H, Jiang T, Zhu Y, Lu H, Zhang S, Wang P, Zhang B, Zhong R. Imbalance between T helper type 17 and T regulatory cells in patients with primary biliary cirrhosis: the serum cytokine profile and peripheral cell population. *Clin Exp Immunol* 2009; 156: 217-225 [PMID: 19302244 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03898.x]
- 35 Harada K, Shimoda S, Sato Y, Isse K, Ikeda H, Nakanuma Y. Periductal interleukin-17 production in association with biliary innate immunity contributes to the pathogenesis of cholangiopathy in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 261-270 [PMID: 19604266 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03947.x]
- 36 Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007; 27: 647-659 [PMID: 17919941]
- 37 Oo YH, Banz V, Kavanagh D, Liaskou E, Withers DR, Humphreys E, Reynolds GM, Lee-Turner L, Kalia N, Hubscher SG, Klenerman P, Eksteen B, Adams DH. CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *J Hepatol* 2012; 57: 1044-1051 [PMID: 22796894 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.07.008]
- 38 Zhao L, Qiu de K, Ma X. Th17 cells: the emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver. *J Dig Dis* 2010; 11: 126-133 [PMID: 20579216 DOI: 10.1111/j.1751-2980.2010.00428.x]
- 39 Longhi MS, Liberal R, Holder B, Robson SC, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25+ cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 2012; 142: 1526-1535.e6 [PMID: 22387392 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.02.041]
- 40 Albano E, Vidali M. Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Genes Nutr* 2010; 5: 141-147 [PMID: 19809845 DOI: 10.1007/s12263-009-0151-4]
- 41 Emanuele E, Bertona M. Interleukin-17-targeted treatment of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 50: 329-330 [PMID: 19437540 DOI: 10.1002/hep.22901]
- 42 Lafdil F, Miller AM, Ki SH, Gao B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2010; 7: 250-254 [PMID: 20305686 DOI: 10.1038/cmi.2010.5]
- 43 Heinz R, Waltenbaugh C. Ethanol consumption modifies dendritic cell antigen presentation in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: 1759-1771 [PMID: 17850646]
- 44 Karavitis J, Murdoch EL, Gomez CR, Ramirez L, Kovacs EJ. Acute ethanol exposure attenuates pattern recognition receptor activated macrophage functions. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28: 413-422 [PMID: 18597620 DOI: 10.1089/jir.2007.0111]
- 45 von Haefen C, Mei W, Menk M, Klemz R, Jones A, Wernecke KD, Spies CD. Ethanol changes gene expression of transcription factors and cytokine production of CD4+ T-cell subsets in PBMCs stimulated with LPS. *Alcohol Clin Exp Res* 2011; 35: 621-631 [PMID: 21143255 DOI: 10.1111/j.1530-0277.2010.01376.x]

■同行评价

Th17细胞与Treg在分化及功能上相互制约,在病毒性肝炎、自身免疫性肝病、脂肪性肝病的发生发展中发挥重要作用,了解Th17细胞在多种肝病发生发展中的作用有助于进一步探索肝病的发病机制及治疗方法。

- 46 Hübscher SG. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology* 2006; 49: 450-465 [PMID: 17064291]
- 47 Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 99-106 [PMID: 15085490]
- 48 汤艳丽, 邱德凯, 马雄. Th17细胞与肝细胞脂肪变性的相互作用初探. *肝脏* 2010; 15: 105-108
- 49 Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28: 454-467 [PMID: 18400188 DOI: 10.1016/j.immuni.2008.03.004]
- 50 Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev* 2008; 226: 80-86 [PMID: 19161417 DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00709.x]
- 51 Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q, Han X, Peng Y, Chen X, Shen L, Qiu D, Li Z, Ma X. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol* 2011; 166: 281-290 [PMID: 21985374 DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04471.x]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

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

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

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

VEGF与肝脏疾病的关系

阮四军, 郭林泉, 周凡

阮四军, 郭林泉, 周凡, 南昌大学第二附属医院 江西省南昌市 330006

阮四军, 主要从事肝胆胰脾疾病的研究。

作者贡献分布: 本文综述由阮四军完成; 周凡指导; 郭林泉审校。

通讯作者: 郭林泉, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 江西省南昌大学第二附属医院肝胆外科。

liubonc@hotmail.com

收稿日期: 2013-02-24 修回日期: 2013-03-26

接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-08

Relationship between vascular endothelial growth factors and liver diseases

Si-Jun Ruan, Lin-Quan Wu, Fan Zhou

Si-Jun Ruan, Lin-Quan Wu, Fan Zhou, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Lin-Quan Wu, Professor, Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Received: 2013-02-24 Revised: 2013-03-26

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-08

Abstract

Vascular endothelial growth factors play an important role in the processes of cell differentiation and maturation. As a kind of multi-functional factor, they are closely related to the occurrence and progression of liver diseases. They can not only promote postoperative liver regeneration but also repress the propagation of chronic hepatitis B and liver cirrhosis. In addition, they have a role in cancer diagnosis and treatment and graft rejection in liver transplantation. In this paper, we will give a brief introduction of vascular growth factors and their role in liver regeneration, cirrhosis, liver cancer and liver transplantation.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Vascular endothelial growth factors; Liver regeneration; Liver cirrhosis; Liver neoplasms; Liver transplantation

Ruan SJ, Wu LQ, Zhou F. Relationship between vascular endothelial growth factors and liver diseases. *Shijie*

Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(13): 1191-1196 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1191.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1191>

摘要

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 作为一种多功能因子, 在组织细胞分化成熟的过程中, 发挥着很大的作用。不论是在术后促进肝细胞再生, 还是抑制慢性乙型肝炎、肝硬化的发展、肿瘤的诊治与治疗、肝脏移植的排斥反应等方面, VEGF通过与各自组织细胞之间的相互作用, 与肝脏疾病的发生、进展和结局密切相关。本文就以肝脏为对象, 简要介绍血管内皮生长因子及其在肝脏的再生、硬化、肿瘤及移植等方面的进展情况。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 血管内皮生长因子; 肝再生; 肝硬化; 肝肿瘤; 肝移植

核心提示: 不论是在术后促进肝细胞再生, 还是抑制慢性乙型肝炎、肝硬化的发展、肿瘤的诊治与治疗、肝脏移植的排斥反应等方面, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)通过与各自组织细胞之间的相互作用, 与肝脏疾病的发生、发展和结局密切相关。

阮四军, 郭林泉, 周凡. VEGF与肝脏疾病的关系. *世界华人消化杂志* 2013; 21(13): 1191-1196 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1191.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1191>

0 引言

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)又称为血管渗透因子(vascular permeability factor, VPF), 最初是从牛的垂体滤泡星状细胞的条件培养基中纯化出来的, 随后在鼠垂体前叶源性肿瘤细胞系AtT20、人单核细胞、鼠神经胶质瘤细胞系也纯化出了VEGF^[1]. 在人类, VEGF包括主要5种类型, 分别

■背景资料

随着诊断治疗水平的进步, 肝切除的适应证和能够切除的范围不断扩大, 过去认为不能切除的巨大肝癌可以安全的切除, 这导致扩大性肝切除术在临床上的应用逐年增加. 如何提高肝脏术后的抗损伤修复能力, 一直是我们要关注的重点。

■同行评议者

郭俊明, 教授, 宁波大学医学院生物化学与分子生物学研究所; 周南进, 研究员, 江西省医学科学研究所

■应用要点

本文阐述血管因子多功能作用及与疾病的基本关系, 引发人们对疾病认识的进一步思考. 在组织细胞生长发育, 变性坏死方面意义重大.

为VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和placental growth factor(PGF). 其中, VEGF-A为刺激血管生成最有效的类型, 至少存在6个亚型, 各自对应着不同亲和力的受体, 起着不同功能作用^[2]. 在正常细胞中也存在, 但其表达的数量是相当小的, 一般不参与新生血管合成, 仅维持正常的血管密度和通透性. 只有在生理需要或病理情况下才出现其过度表达, 促使血管生成作用急剧增加^[3]. 目前, 综合资料显示, VEGF虽然研究比较多, 但是在肝脏基础研究与临床衔接方面的综合性还是较少的, 本文就VEGF与肝脏疾病的关系做一综述.

1 血管内皮生长因子与肝再生

1.1 肝再生的机制 肝再生过程虽然早就被Higgins和Anderson^[4]描述过, 但是关于肝脏再生能力的分子及细胞研究机制还不是很透彻. 肝部分切除后, 在起步阶段, 剩余成熟细胞通过旁分泌, 自分泌, 补体C3a, C5a激活巨噬细胞, 细菌内毒素, 分泌肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白介素6(interleukin-6, IL-6)等细胞因子, 激活JAK/STAT和MAPK通路启动肝细胞的再生^[5]. 肝细胞快速由静止状态G₀期开始肝细胞的再生, 一直持续到原肝质量的基本恢复.

肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)的活化与肝脏再生密切相关. Ding等和Wang等^[6,7]的研究表明, LSEC具有一种特殊VEGFR2⁺ VEGFR3⁺ CD34⁺ VE_cadherin⁺ FactorVIII⁺ CD4⁺表型, 在激活启动肝细胞再生过程中具有重要作用. 肝脏切除后, 在LSECs细胞的诱导下, VEGFR2激活, 启动Id1上调及HGF, Wnt2细胞外因子的释放并直接与肝窦内皮细胞、肝细胞联系. 随后, 通过VEGFR2-Id1途经, 毛细血管血管出芽增生, 用来保障肝脏不断增长所需的营养血液供养.

对于肝细胞及肝窦内皮细胞的再生, 适当的条件也是重要的. 当切除大鼠70%到90%的肝脏术后, 如果通路被ERK/MEK阻滞剂阻断, 会导致肝脏再生速度下降^[8]. 若肝切除术后突然出现大量再生反应, 则会使肝窦细胞窒息, 肝实质细胞大量沉积, 导致肝细胞及肝窦内皮细胞缺血缺氧, 引起肝功能损害.

1.2 肝再生的调节 (1)来源于脾、小肠的肝再生因子对肝实质细胞再生可能产生积极影响^[9,10]. Yamamoto等^[9]通过建立70%肝部分切除模型, 分别检测血液中VEGF蛋白、HIF-1 α 、肝细胞生

长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、HGFA mRNA及在脾脏、小肠、门静脉的表达水平, 结果显示: 术后VEGF mRNA、HIF-1 α 、HGF和HGFA mRNA的表达明显上升; (2)血小板能促进LSECs的增殖并诱导IL-6及VEGF的产生, 而LSECs又能产生HGF、IL-6、NO等生长因子和细胞因子, 当这些因子激活细胞膜上各自的受体, 转录因子和信号转导通路后, 肝脏产生有丝分裂反应, 肝细胞增殖. 其中Kupffer细胞, 肝星状细胞等均参与肝细胞的再生过程^[11,12]; (3)NO在调节VEGF的表达方面发挥着重要作用. 当阻滞NO合成时, VEGF蛋白的表达下降, 且具有与VEGF协调调节肝窦内皮细胞分裂增殖的作用^[13,14].

1.3 肝细胞替代治疗 基于肝脏再生的特点, 有些学者曾设想将肝细胞替代治疗来取代原位肝移植, 但目前, 这种技术治疗在治疗急性肝功能衰竭的疗效方面, 效果还不确定. 据研究, 要确切提高治疗效果, 联合使用肝内皮细胞、内皮干细胞和模拟支架, 应用肝实质细胞嫁接到脱细胞肝支架中, 再放入功能完好的内皮细胞, 比直接移植更有效^[15]. 显然, 血管生长因子对肝窦内皮细胞分裂的促进作用是不可或缺的.

在处理肝脏外伤及其他肝脏手术中, 我们经常因为无法修补或不能彻底止血而必须采用肝脏部分切除术. 因此, 不管是术后, 外伤, 还是慢性炎症, 中毒性损伤等, 对肝细胞再生的深入研究, 均具有重大的意义.

2 血管内皮生长因子与肝硬化

2.1 肝硬化形成的血管机制 肝硬化形成的分子机制目前尚未彻底阐明. 一方面, 肝硬化是一系列生长因子, 细胞因子及金属蛋白酶等在组织慢性修复中过表达的结果, 尤以血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF), 转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1), 纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF), VEGF对肝脏纤维化及血管生成的影响大^[16,17]. 在病理上, 主要表现为肝细胞的变性坏死, 慢性炎细胞的浸润, 纤维结缔组织的增生及肝细胞的结节状再生. 此外, integrins、 β -catenin、ephrins及其他黏附分子, 细胞外基质也参与此过程^[18]; 另一方面, 在持续的炎症反应中, 组织逐渐发生纤维化, 血管阻力增加, 对血液灌注产生影响, 降低组织间氧含量, 进而刺激VEGF的表达, 促进肝窦内皮细胞的有丝分裂,

细胞基质增加和新生血管生成. 随着肝硬化的进展, 肝细胞破坏, 纤维化加重, 血液灌注得不到有效缓解, HIF-1 α 再次被迅速活化, 进一步诱导下游靶基因VEGF、PDGF-J3、血管紧张素-II表达, VEGF通过与其受体VEGF-R2结合, 再通过蛋白激酶C途径激活细胞外信号调节激酶通路, 从而促进内皮细胞增殖, 使肝纤维化进一步加重^[19,20].

然而, 也有人认为肝内血管增生与纤维化之间的变化关系, 能为治疗肝硬化提供新的方法, 肝内血管增生和肝窦重建可作为慢性肝脏疾病门脉高压新的治疗靶标^[21]. 这可能与VEGF表达降低, 内脏和肝内炎症渗透减少, 肝星状细胞激活的减少密切相关.

2.2 血管内皮生长因子与门脉高压关系 数据显示门体静脉侧枝循环的建立及高压状态跟VEGF有较大关联. 在大鼠肝硬化模型中, 门静脉结扎后, VEGF、VEGFR-2、FLK-1及CD31的表达都不断增加. 同样, 在四氯化碳诱导的模型中, 在缺氧条件下, 肝细胞内血管不断生成, 同时伴有VEGF、angiopoietin-1、angiopoietin-2及PGF的过表达^[22].

2.3 肝硬化的治疗 根据肝硬化的发病机制, 很多分子靶向治疗方法正在研究之中. (1)主要针对纤维化发生及纤维化溶解方面的研究. 如金属蛋白酶组织抑制因子anti-TIMP-1, 抗血小板衍生生长因子anti-PDGF-b受体等阻断抑制性抗体; (2)对肝内起关键作用的细胞, 针对性地使用靶向药物, 如肝星状细胞, 通过维生素A的修饰后的脂质体等. 已有实验证明抗血管生成因子治疗, 如索拉菲尼、舒尼替尼能改善门体侧枝循环, 内脏血管机械力, 降低门静脉压力等. 其中血管紧张素-2、VEGF-A受体阻断剂及拉格唑拉等, 在抗纤维化动物模型, 及临床试验中, 证明有着很好的运用前景^[23-26]; (3)针对并发症的研究治疗, 如Sakamoto等和Kaur等^[27,28]将内皮祖细胞注射到肝硬化老鼠的静脉后, 不管是在门静脉压力的变化还是微循环的改变, 都得到了很大的改善. 干细胞的治疗, 将来不失为一种有效治疗肝硬化门脉高压的手段^[29].

3 血管内皮生长因子与肝癌关系

3.1 血管内皮生长因子与肿瘤的关系 原发性肝癌是肝脏的一种主要恶性肿瘤, 在肿瘤的进展, 侵袭及转移过程中, 对血管依赖性很强. 肝癌细胞的快速生长需要一个高营养的环境支持供

应. 而高度血管化则能适应肿瘤生长的需要. 这与血管生成表型的转换与血管生成正反方面的调节紊乱有关. 在肿瘤进展过程中, 当肿瘤逐渐缺血缺氧时, 肿瘤细胞分泌大量的促血管生成因子, 如VEGF、PDGF、PIGF及TGF- β 1, 而内源性表达抑制因子如TSP-1、endostatin和angiostatin的表达则下调, 激活内皮祖细胞干细胞从骨髓释放, 促进细胞外间隙和基底膜重建形成新的血管. 然而, 这些新生血管的功能结构并不完善, 时有渗出, 出血等, 并导致血流的方向混乱. 由于结构功能并不完善, 也为肿瘤细胞进入血液循环提供了一个通道, 因此极易转移^[30].

VEGF的表达水平与血管的侵袭及转移, 复发, 血管密度, 分化, 肿瘤的分期和预后等息息相关^[31-34]. Zhong等^[35]通过原发性肝癌术前术后血液及组织标本, 采用ELISA及免疫组织化学方法测定VEGF的表达量, 结果得出血液中的表达量明显高于正常组. 复发组明显高于未复发组. 在细胞质中, 复发组明显高于未复发组. 1, 2, 3年生存率明显VEGF(-)比VEGF(+)高.

目前, 肝脏肿瘤诊断运用比较多的是甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP), 为进一步研究评价AFP阴性肝癌患者治疗后的复发风险, Hu等^[36]收集了162例肝癌AFP阴性患者标本, 通过统计VEGF和PDGF在各组中表达的分析, 联合2项指标能够分别提高术后等治疗的复发率及生存时间的估计. 实践证明, 血清VEGF水平明显高于健康人, 有腹水转移者VEGF表达水平明显高于无腹水转移者. Jia等^[37]通过原发性肝癌患者血液术前术后HIF-1 α 和VEGF对比及相关性研究. 结果显示2因子高度相关, 数据显示两者血液量可能与门静脉血栓及转移成正相关性. 另外, HCC患者VEGF水平明显高于慢性肝炎和肝硬化患者, 也说明VEGF与肝癌早期血管增生密切相关.

可见VEGF水平有助于肝癌的诊断和转移监测, 与AFP联检可提高肝癌检出的阳性率. 不仅可以作为监测肿瘤转移的重要指标^[38], 而且可以作为术后及生物治疗疗效和预后判断提供依据^[39,40]. 临床上我们可以通过测定血清中VEGF浓度来了解肝细胞损伤程度及再生能力, 为判断肝硬化, 肝癌患者的病情和预后提供参考.

3.2 肿瘤的治疗 通过VEGF与肿瘤之间复杂关系的了解, 我们发现: VEGF高表达是肝癌的一个共性, 直接导致肿瘤血管增生和较差的预后. 针对肿瘤血管生成, 抗血管生长因子及通路阻断

■同行评价

血管内皮生长因子在多领域都有研究及应用, 本文就其在肝再生、肝硬化、肝癌、移植等近期研究进行了综述, 为临床及相关研究者提供了有价值的信息.

剂的研究应用,目前在临床上已取得不错的效果.如索拉菲尼、贝伐单抗等多酶抑制剂,能够显著地提高肿瘤患者的生存质量预后^[41-44],另外,Chan等^[45]通过抑制(HIF-1 α)表达试验,也证明了下调VEGF蛋白能减少肿瘤的血管生成和生长,提高患者生存率.

4 血管内皮生长因子与肝移植的关系

组织器官移植的成功与否,后期疗效好坏,并发症的发生.主要决定性因素还在于排斥反应的强弱及免疫耐受的产生.目前,有关VEGF在同种异体移植免疫反应的研究不多.肝移植术后急性排斥反应的发生主要是由于同种异体抗原识别捐赠者的淋巴细胞,导致T淋巴细胞激活,增值和分化,引发一系列的免疫反应,最终破坏移植肝脏.Aharinejad等^[46]注意到,在人体心脏移植反应中,VEGF与器官移植的急慢性排斥反应相关联.Berberat等^[47]发现在自体移植术中,VEGF对于白细胞的运输有着重要作用;当使用anti-VEGF则能有效地阻止急性排斥反应的进程,但是并不能防止人体T淋巴细胞的激活,只能阻止内皮细胞黏附分子及细胞因子如IP-10的表达.

通过对炎症介质的研究,也发现VEGF在移植反应中发挥着重要作用.如移植脂肪组织来源的干细胞后,能减少肝细胞的损伤,特别是肝窦内皮细胞凋亡,能保护小体积移植肝脏的微环境不受干扰,易于肝实质及内皮细胞的再生,提高患者的生存率^[48,49].包括介导IP-10,单核细胞趋化因子MCP-1、IL-8、E-selectin、ICAM-1、VCAM-1在体内体外的表达,所有这些分子都与急性排斥反应有关.大鼠实验证明,当阻断这些分子或者他们各自的配体后,能延长移植的生存率^[48].在减轻移植急性排斥反应中,VEGF可能成为一种靶向干扰治疗的方法^[3].近年来发现,肥胖,高脂血症,脂肪肝的发生也与VEGF有着密切的联系^[50].

5 结论

VEGF在肝硬化、肝癌、移植等方面已有了较多研究进展及应用.有理由相信,随着VEGF在人体中作用机制的深入研究,正确利用有利因素,避其不利,不论在术后促进肝脏再生,还是抑制慢性乙型肝炎、肝硬化、肝癌的发展,肿瘤的诊断和治疗,肝脏移植的排斥反应等方面

将提供多种全方位性、崭新的治疗方案.

6 参考文献

- 1 Plouët J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, Bayard F. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 1997; 272: 13390-13396 [PMID: 9148962]
- 2 Hermann DM, Zechariah A. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1620-1643 [PMID: 19654590 DOI: 10.1038/jcbfm.2009.100]
- 3 Zhou TB, Yang GS. Roles of vascular endothelial growth factor in acute rejection reaction following liver transplantation. *Transpl Immunol* 2011; 25: 207-209 [PMID: 21856421 DOI: 10.1016/j.trim.2011.08.001]
- 4 Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202
- 5 Moniaux N, Faivre J. Key role of sinusoidal endothelial cells in the triggering of liver regeneration. *J Hepatol* 2011; 55: 488-490 [PMID: 21349303 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.02.005]
- 6 Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, Mittal V, Kobayashi H, Shido K, Lyden D, Sato TN, Rabbany SY, Rafii S. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 2010; 468: 310-315 [PMID: 21068842 DOI: 10.1038/nature09493]
- 7 Wang L, Wang X, Wang L, Chiu JD, van de Ven G, Gaarde WA, Deleve LD. Hepatic vascular endothelial growth factor regulates recruitment of rat liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells. *Gastroenterology* 2012; 143: 1555-1563. e2 [PMID: 22902870 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.08.008]
- 8 Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, Ijichi H, Yonemura Y, Harada N, Soejima Y, Taketomi A, Shimada M, Maehara Y. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy. *Am J Transplant* 2010; 10: 1580-1587 [PMID: 20642684 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2010.03150.x]
- 9 Yamamoto C, Yagi S, Hori T, Iida T, Taniguchi K, Isaji S, Uemoto S. Significance of portal venous VEGF during liver regeneration after hepatectomy. *J Surg Res* 2010; 159: e37-e43 [PMID: 19394640 DOI: 10.1016/j.jss.2008.11.007]
- 10 da Rosa DP, Forgiarini LF, Baronio D, Feijó CA, Martinez D, Marroni NP. Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 879419 [PMID: 23226929 DOI: 10.1155/2012/879419]
- 11 Kawasaki T, Murata S, Takahashi K, Nozaki R, Ohshiro Y, Ikeda N, Pak S, Myronovych A, Hisakura K, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Activation of human liver sinusoidal endothelial cell by human platelets induces hepatocyte proliferation. *J Hepatol* 2010; 53: 648-654 [PMID: 20615569 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.04.021]

- 12 Takahashi K, Kozuma Y, Suzuki H, Tamura T, Maruyama T, Fukunaga K, Murata S, Ohkohchi N. Human platelets promote liver regeneration with Kupffer cells in SCID mice. *J Surg Res* 2013; 180: 62-72 [PMID: 23260232 DOI: 10.1016/j.jss.2012.11.030]
- 13 Ronco MT, Francés D, de Luján Alvarez M, Quiroga A, Monti J, Parody JP, Pisani G, Carrillo MC, Carnovale CE. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide in rat liver regeneration. *Life Sci* 2007; 81: 750-755 [PMID: 17706723]
- 14 Yoshida D, Akahoshi T, Kawanaka H, Yamaguchi S, Kinjo N, Taketomi A, Tomikawa M, Shirabe K, Maehara Y, Hashizume M. Roles of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase during revascularization and regeneration after partial hepatectomy in a rat model. *Surg Today* 2011; 41: 1622-1629 [PMID: 21969195 DOI: 10.1007/s00595-010-4484-9]
- 15 Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 425-456 [PMID: 21073339 DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130246]
- 16 Lau TY, Xiao J, Liong EC, Liao L, Leung TM, Nanji AA, Fung ML, Tipoe GL. Hepatic response to chronic hypoxia in experimental rat model through HIF-1 alpha, activator protein-1 and NF-kappa B. *Histol Histopathol* 2013; 28: 463-471 [PMID: 23322610]
- 17 Andrade Wde C, da Silva LF, Coelho MC, Tannuri AC, Alves VA, Tannuri U. Effects of the administration of pentoxifylline and prednisolone on the evolution of portal fibrogenesis secondary to biliary obstruction in growing animals: immunohistochemical analysis of the expression of TGF- β and VEGF. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; 67: 1455-1461 [PMID: 23295601]
- 18 Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009; 50: 604-620 [PMID: 19157625 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.12.011]
- 19 Grünewald FS, Prota AE, Giese A, Ballmer-Hofer K. Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 567-580 [PMID: 19761875 DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.09.002]
- 20 Kajdaniuk D, Marek B, Foltyn W, Kos-Kudła B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol Pol* 2011; 62: 444-455 [PMID: 22069106]
- 21 Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010; 53: 976-980 [PMID: 20800926 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.07.004]
- 22 Rosmorduc O. Antiangiogenic therapies in portal hypertension: a breakthrough in hepatology. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; 34: 446-449 [PMID: 20630674 DOI: 10.1016/j.gcb.2010.05.007]
- 23 Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J Hepatol* 2012; 56: 1171-1180 [PMID: 22245903 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.09.024]
- 24 Liu Y, Wang Z, Wang J, Lam W, Kwong S, Li F, Friedman SL, Zhou S, Ren Q, Xu Z, Wang X, Ji L, Tang S, Zhang H, Lui EL, Ye T. A histone deacetylase inhibitor, largazole, decreases liver fibrosis and angiogenesis by inhibiting transforming growth factor- β and vascular endothelial growth factor signaling. *Liver Int* 2013; 33: 504-515 [PMID: 23279742 DOI: 10.1111/liv.12034]
- 25 Li X, Cai S, Ning Z, Li Y, Zhang W, Zhang L. [Spironolactone inhibits hepatic sinusoid angiogenesis in rats with hepatic fibrosis]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2012; 32: 1135-1138 [PMID: 22931606]
- 26 Tamaki Y, Nakade Y, Yamauchi T, Makino Y, Yokohama S, Okada M, Aso K, Kanamori H, Ohashi T, Sato K, Nakao H, Haneda M, Yoneda M. Angiotensin II type 1 receptor antagonist prevents hepatic carcinoma in rats with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2012 Aug 14. [Epub ahead of print] [PMID: 22886508]
- 27 Sakamoto M, Nakamura T, Torimura T, Iwamoto H, Masuda H, Koga H, Abe M, Hashimoto O, Ueno T, Sata M. Transplantation of endothelial progenitor cells ameliorates vascular dysfunction and portal hypertension in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhotic model. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 168-178 [PMID: 22849788 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07238.x]
- 28 Kaur S, Tripathi D, Dongre K, Garg V, Rooge S, Mukopadhyay A, Sakhuja P, Sarin SK. Increased number and function of endothelial progenitor cells stimulate angiogenesis by resident liver sinusoidal endothelial cells (SECs) in cirrhosis through paracrine factors. *J Hepatol* 2012; 57: 1193-1198 [PMID: 22824816 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.07.016]
- 29 Wang Y, Lian F, Li J, Fan W, Xu H, Yang X, Liang L, Chen W, Yang J. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl4 in rats. *J Transl Med* 2012; 10: 133 [PMID: 22735033 DOI: 10.1186/1479-5876-10-133]
- 30 Zhou L, Wang DS, Li QJ, Sun W, Zhang Y, Dou KF. Downregulation of the Notch signaling pathway inhibits hepatocellular carcinoma cell invasion by inactivation of matrix metalloproteinase-2 and -9 and vascular endothelial growth factor. *Oncol Rep* 2012; 28: 874-882 [PMID: 22736202 DOI: 10.3892/or.2012.1880]
- 31 Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste C, Colle I, Van Vlierberghe H. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int* 2011; 31: 146-162 [PMID: 21073649 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02369.x]
- 32 Mukozu T, Nagai H, Matsui D, Kanekawa T, Sumino Y. Serum VEGF as a Tumor Marker in Patients with HCV-related Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* 2013; 33: 1013-1021 [PMID: 23482775]
- 33 Eveno C, Pocard M. VEGF levels and the angiogenic potential of the microenvironment can affect surgical strategy for colorectal liver metastasis. *Cell Adh Migr* 2012; 6: 569-573 [PMID: 23257830 DOI: 10.4161/cam.23247]
- 34 Gao DM, Sun L, Guo K, Li Y, Liu YK, Kang XN. [Applicability of the multiplex quantitative antibody array system for early diagnosis of hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2012; 20: 785-788 [PMID: 23207342 DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2012.10.016]
- 35 Zhong C, Wei W, Su XK, Li HD, Xu FB, Guo RP. Serum and tissue vascular endothelial growth factor predicts prognosis in hepatocellular carcinoma patients after partial liver resection. *Hepatogastroenterology* 2012; 59: 93-97 [PMID: 22251524 DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2012.10.016]

- 10.5754/hge10638]
- 36 Hu J, Xu Y, Shen ZZ, Wang Z, Lu Q, Yang GH, Ding ZB, Fan J, Zhou J. High expressions of vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor predict poor prognosis in alpha-fetoprotein-negative hepatocellular carcinoma patients after curative resection. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1359-1367 [PMID: 19350273 DOI: 10.1007/s00432-009-0577-5]
 - 37 Jia ZZ, Jiang GM, Feng YL. Serum HIF-1 α and VEGF levels pre- and post-TACE in patients with primary liver cancer. *Chin Med Sci J* 2011; 26: 158-162 [PMID: 22207924]
 - 38 Höpfner M, Schuppan D, Scherübl H. Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1-14 [PMID: 18176955]
 - 39 Qian LY, Li P, Li XR, Chen DJ, Zhu SH. Multivariate analysis of molecular indicators for postoperative liver metastasis in colorectal cancer cases. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3967-3971 [PMID: 23098501]
 - 40 Kwon SH, Jeong SW, Jang JY, Lee JE, Lee SH, Kim SG, Kim YS, Cho YD, Kim HS, Kim BS, Jin SY. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Clin Mol Hepatol* 2012; 18: 287-294 [PMID: 23091809 DOI: 10.3350/cmh.2012.18.3.287]
 - 41 Liu LP, Ho RL, Chen GG, Lai PB. Sorafenib inhibits hypoxia-inducible factor-1 α synthesis: implications for antiangiogenic activity in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 5662-5671 [PMID: 22929805 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0552]
 - 42 Majumder S, Pigué AC, Dufour JF, Chatterjee S. Study of the cellular mechanism of Sunitinib mediated inactivation of activated hepatic stellate cells and its implications in angiogenesis. *Eur J Pharmacol* 2013; 705: 86-95 [PMID: 23454556 DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.02.026]
 - 43 Yoshida M, Goto M, Kii T, Nishitani H, Kawabe S, Kuwakado S, Asaishi K, Miyamoto T, Higuchi K. Retrospective study as first-line chemotherapy combined anti-VEGF antibody with fluoropyrimidine for frail patients with unresectable or metastatic colorectal cancer. *Digestion* 2013; 87: 59-64 [PMID: 23343971 DOI: 10.1159/000343943]
 - 44 Ruan ZP, Xu R, Lv Y, Tian T, Wang WJ, Guo H, Nan KJ. PTEN enhances the sensitivity of human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Oncol Res* 2012; 20: 113-121 [PMID: 23193917]
 - 45 Chan SL, Mok T, Ma BB. Management of hepatocellular carcinoma: beyond sorafenib. *Curr Oncol Rep* 2012; 14: 257-266 [PMID: 22434314 DOI: 10.1007/s11912-012-0233-0]
 - 46 Aharinejad S, Krenn K, Zuckermann A, Schäfer R, Gmeiner M, Thomas A, Aliabadi A, Schneider B, Grimm M. Serum matrix metalloproteinase-1 and vascular endothelial growth factor--a predict cardiac allograft rejection. *Am J Transplant* 2009; 9: 149-159 [PMID: 19067665 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2008.02470.x]
 - 47 Berberat PO, Friess H, Schmied B, Kremer M, Gragert S, Flechtenmacher C, Schemmer P, Schmidt J, Kraus T, Uhl W, Meuer S, Büchler MW, Giese T. Differentially expressed genes in postperfusion biopsies predict early graft dysfunction after liver transplantation. *Transplantation* 2006; 82: 699-704 [PMID: 16969295]
 - 48 Ma T, Liu H, Chen W, Xia X, Bai X, Liang L, Zhang Y, Liang T. Implanted adipose-derived stem cells attenuate small-for-size liver graft injury by secretion of VEGF in rats. *Am J Transplant* 2012; 12: 620-629 [PMID: 22151301 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03870.x]
 - 49 Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M. The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. *J Surg Res* 2013; 180: 162-168 [PMID: 23117122 DOI: 10.1016/j.jss.2012.10.009]
 - 50 Lijnen HR, Scroyen I. Effect of vascular endothelial growth factor receptor 2 antagonism on adiposity in obese mice. *J Mol Endocrinol* 2013; 50: 319-324 [PMID: 23427287]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

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

肛裂治疗方式的选择

邓志灏, 赵宝明

邓志灏, 赵宝明, 北京中医药大学东直门医院肛肠科 北京市 100700

邓志灏, 北京中医药大学在读博士研究生, 主要从事中医药防治肛肠疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81072812

作者贡献分布: 本文选题及审校由赵宝明完成; 文献资料搜集与写作由邓志灏完成。

通讯作者: 赵宝明, 教授, 主任医师, 100700, 北京市东城区海运仓5号, 北京中医药大学东直门医院肛肠科。

zhaobaoming1951@126.com

电话: 010-84013137

收稿日期: 2012-12-27 修回日期: 2013-02-25

接受日期: 2013-04-07 在线出版日期: 2013-05-08

Choice of treatments for anal fissure

Zhi-Hao Deng, Bao-Ming Zhao

Zhi-Hao Deng, Bao-Ming Zhao, Department of Proctology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81072812

Correspondence to: Bao-Ming Zhao, Professor, Department of Proctology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, 5 Haiyuncang, Dongchen District, Beijing 100700, China. Zhaobaoming1951@126.com

Received: 2012-12-27 Revised: 2013-02-25

Accepted: 2013-04-07 Published online: 2013-05-08

Abstract

Chronic anal fissure (CAF) is one of the most common and painful proctologic diseases. Its treatment has long been discussed and several different therapeutic options have been proposed. The understanding of its pathophysiology has led to a progressive reduction of invasive and potentially invalidating treatments in favor of conservative treatment. Lateral internal sphincterotomy (LIS) is a surgical treatment that is considered the 'gold standard' therapy for CAF. It relieves CAF symptoms with a high rate of healing. The risk of incontinence after this procedure seems to be severe. Chemical sphincterotomy (CS) is safe, with the rapid relief of pain, no risk of surgery or anesthesia, but is a statistically less effective therapy for CAF than LIS. In recent years, fissurectomy coupled with CS has been demonstrated to be a satisfactory

treatment for chronic anal fissure and an alternative to lateral sphincterotomy when conservative measures fail.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Anal fissure; Treatment; Anal fissurectomy

Deng ZH, Zhao BM. Choice of treatments for anal fissure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1197-1204 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1197.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1197>

摘要

慢性肛裂是一种常见的肛门直肠疾病, 可以引起令人不快的疼痛。对于肛裂的治疗, 人们经过长期的研究, 建立了许多治疗肛裂的方法。随着对肛裂病理生理的研究不断深入, 手术治疗在逐渐减少, 而更倾向于应用药物保守治疗。内括约肌侧切术(lateral internal sphincterotomy, LIS)被认为是治疗肛裂的“金标准”, 但是术后可能导致肛门失禁; 化学性内括约肌切开(chemical sphincterotomy, CS)可以较快的缓解疼痛, 没有手术和麻醉的危险, 但是有效率不及LIS。近年来肛裂切除术联合术后CS作为一种新的治疗方式正在逐渐被人们所接受, 若药物治疗失败后, 其可以作为LIS的一种代替治疗方法。

© 2013版权归Baishideng所有。

关键词: 肛裂; 治疗方式; 肛裂切除术

核心提示: 肛裂切除术联合术后化学性内括约肌切开, 可以作为药物治疗肛裂失败后的首选治疗方式, 能够提高治愈率, 并且能够避免肛门失禁的危险。其可以作为肛门内括约肌侧切术的一种代替治疗方法。

邓志灏, 赵宝明. 肛裂治疗方式的选择. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1197-1204 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1197.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1197>

■背景资料

随着人们对生活质量要求的提高, 对肛裂的治疗也从单一的治愈变成治愈的同时能够最大程度的减少痛苦、缩短病程并减少术后并发症, 这就要求肛肠外科医生需要在众多的治疗肛裂的方法中选择最佳的方式。

■同行评议者

王正康, 教授, 中日友好医院普外科

■ 研发前沿

为了更好的预防和治疗肛裂, 人们在不断探寻肛裂的病因及病理生理, 而在治疗肛裂时越来越重视肛管内括约肌的保护, 故在提高治愈率的同时避免肛管内括约肌的损伤成为今后研究的重点和热点。

0 引言

肛裂的发病机制未明, 现在较为公认的肛裂的本质是缺血性溃疡, 可以概括为缺血-痉挛-缺血, 这一恶性循环。而对于肛裂的治疗一般采取的方式是括约肌切开, 包括化学性内括约肌切开(chemical sphincterotomy, CS)和手术括约肌切开。但是从远期疗效来看, CS治愈率低, 复发率高, 而行手术括约肌切开术则可能导致严重的并发症, 如肛门失禁等。所以如何在手术治疗慢性肛裂的同时最大程度地保留肛管内括约肌的功能就成为重要的课题。本文对肛裂产生的原因、病理生理及治疗方式的选择进行阐述。

1 肛裂

肛裂, 指肛管皮肤全层纵行裂开而形成的溃疡, 可见于各个年龄阶段, 其发生率无性别差异^[1], 如果肛裂6 wk未愈, 就被认为是慢性肛裂, 但是根据时间来判断肛裂的分期是不确切的^[2], 根据形态学来判断可能会更加合理, 如: 创缘增厚、溃疡较深、创缘底部内括约肌的暴露、肛乳头肥大、赘皮外痔, 这些都是由于慢性的感染及纤维结缔组织的增生引起的^[1-3]。

1.1 肛裂的病因 肛裂的病因目前仍不清楚, 比较多的从解剖学上进行了不懈的探索, 并提出了许多学说: Ball肛瓣学说、Miles栉膜带学说、Rankin肛窦学说、Blaisdell栅门学说、Arnous上皮学说、Shafik残留上皮学说、Eisenhammer内括约肌学说等。损伤学说认为: 干燥的粪便引起的创伤和内括约肌的痉挛是导致肛裂的最初原因。但在肛裂患者中, 仅有25%的患者存在便秘的情况^[4], 而6%的患者存在腹泻的情况^[3,4]。

山地车运动员由于长时间在车座上的颠簸, 导致肛管的裂口, 可引起慢性感染并形成肛裂^[5]; 有证据表明应用坐便器的喷水装置可引起前部肛裂^[6]; 3%-11%的肛裂的产生与分娩有关, 而且这种肛裂更易发生在肛门的前部^[7]。性虐待也和肛裂有一定的关系^[8]。应用尼可地尔(ATP敏感的钾离子通道开放剂)可能会增加患肛裂的风险^[9,10]。饮食情况会引起症状的改变, 如进食辛辣食物, 会加重肛裂患者的症状^[11]。调查显示饮食习惯、排便习惯及工作性质都会对肛裂的产生有一定的影响。

由于肛裂发生的部位特殊, 人们在肛裂产生时并没有在第一时间就诊。一项研究表明, 约40%的肛裂患者可以坚持数月甚至数年, 所以大部分患者来就诊时就已经发展到慢性肛裂。

1.2 肛裂产生的部位 肛裂最常见的部位是肛管后正中线, 仅有10%的女性及1%的男性发生前位肛裂^[3,4,12]。肛裂的位置有时发生在肛门侧方, 产生的原因可能是: 炎性肠病、肛门部手术、性病、皮肤病、感染或者肿瘤。

1.3 肛裂的病理生理 肛裂与肛管内括约肌的痉挛有关, 但是痉挛产生的机制未明。Schouten等^[13,14]研究发现肛管后正中线皮肤的血供与肛管静息压成负相关, 肛裂处皮肤的血流灌注要少于正常肛管后中线处的皮肤血供。Klosterhalfen等^[15]发现, 正常人两侧肛门动脉的分支在肛后连合处约85%的人无吻合, 形成乏血管区。

近代, 随着国内外对肛裂研究的深入, 越来越多的学者认可肛裂的本质是缺血性溃疡, 可以概括为缺血-痉挛-缺血, 这一恶性循环。所以内括约肌切断术可以降低肛管的压力, 增加肛管皮肤的血供, 从而促进肛裂的愈合。

肛裂的病理生理实质是高血压低血流。降低肛管静息压反射性地使内括约肌张力降低, 有利于恢复皮肤血供, 但有研究显示, 应用CS治疗肛裂时, 肛管静息压的下降未与肛裂的治愈率成正比^[16,17]。

如果肛管静息压下降而肛裂并未痊愈, 就需要另一种解释: 肛管静息压下降, 并不一定导致内括约肌在排便时完全扩张, 也未必改善局部血供, 因为肛裂局部的生化因素可能会影响到内括约肌的舒缩^[18]。

近年发现内皮细胞可以产生释放内皮源性血管舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF), 有研究指出EDRF为一氧化氮(NO)^[19]。若内皮完整, 二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、血小板活化因子、凝血酶、组胺、P物质等这些物质会导致NO和前列环素的释放, 会放松小动脉的肌膜, NO还可以增加血管流量而防止血小板聚集; 若内皮损伤, 有证据表明, 这些物质会收缩平滑肌细胞。对于肛裂区再生的细胞, 只能释放较少的NO, 并且对5-HT和 α_2 -肾上腺素受体激动剂特别敏感, 故肛裂区域生化环境的改变, 也会引起平滑肌的舒缩。

肛周皮肤的血流灌注与肛管静息压呈负相关, 但血流灌注并不仅仅与内括约肌的机械收缩有关, 而且与肛裂区域的生化环境有关^[20]。当肛管不能产生足够的扩张时, 组织就会被撕裂损伤, 从而改变肛裂区域局部的生化环境, 继而

导致血管平滑肌和内括约肌的收缩, 这是导致肛裂不能顺利愈合的原因. 所以治疗肛裂应该: 降低排便时内括约肌的张力, 改善肛裂区域的生化环境, 从而缓解血管平滑肌和内括约肌的痉挛性收缩.

2 肛裂的药物治疗

肛裂产生的病因有多种, 但最终导致肛门静息压的增高, 而肛门静息压有70%-80%是由肛管内括约肌维持的, 所以治疗肛裂首先要降低内括约肌的张力. LIS仍然被认为是治疗肛裂的金标准, 治愈率高且复发率<10%^[21], 但LIS可导致: 肛周感染、出血、尿潴留等并发症^[22-24], 当然这些并发症发生的概率较小, 但是排气和排便失禁仍值得注意^[25]. Hancke等^[26]研究显示: 内括约肌侧切术后3 mo轻微的肛门失禁(如: 排气、污物)为20%, 术后79 mo达47.6%, 甚至更高.

并发症的发生还有麻醉的风险, 导致了医生们要寻找另一种方式去模拟手术治疗肛裂, 故化学性内括约肌切开被广大医生认为是治疗肛裂的一线治疗方法^[2,27], 而且也降低了治疗的费用^[28]. 最常用的药物有: 肉毒毒素、一氧化氮供体和钙离子通道阻滞剂等.

2.1 肉毒毒素 肉毒毒素于1993年被用于慢性肛裂的治疗, 其主要作用是降低肛管压力, 但在疗效方面, 结果却不尽相同: 一些实验证明他的有效性, 一些实验则认为等同于安慰剂^[29], 大剂量的肉毒毒素可能比小剂量的效果好^[30,31]. 肉毒毒素可引起暂时性的排气失禁(18%), 排便失禁(5%), 肛周的血栓、血肿及全身症状(3%), 但对于并发症的报道, 结果也是不尽相同^[32,33]. Valizadeh等^[34]研究发现, 注射肉毒毒素术后1年的治愈率为48%; 术后3-4年复发率为40%-55%^[35]. 这种治疗方式在治愈率和并发症等方面存在争议, 剂量应用方面没有统一的标准^[36-38]以及注射的部位、注射的深度、注射针与内括约肌的角度都会影响疗效及预后^[39].

2.2 一氧化氮供体 自从发现NO可以缓解肛管内括约肌的痉挛以来^[40], 硝酸盐就被用于降低肛管压力, 并且在许多临床试验中, 作为治疗肛裂的一线药物使用^[41]. 在欧洲许多国家, 硝酸盐的局部使用, 明显减少了需要手术治疗肛裂的人数^[42]. Velson等^[43]研究指出: 局部应用硝酸盐治疗肛裂要显著优于安慰剂, 能够明显减轻疼痛^[44-46], 但是硝酸盐最主要的不良反应是头痛(20%-30%^[12], 甚至更高^[47]), 还会出现头晕、肛

门区灼热等, 随着药物浓度的增大(0.2%-0.4%)治疗效果未见明显提高, 但不良反应明显增加. 为了减少硝酸甘油的不良反应. Pérez-Legaz等^[48]研究发现: 0.4%硝酸甘油软膏肛内给药与肛周给药相比, 前者降低了头痛的发生率, 并提高了治愈率. 但这种治疗方式远期复发率较高, Carapeti等^[47]经过9 mo的观察, 复发率为33%. Lund等^[49]经过28 mo的观察, 复发率为27%. Kirkil等^[50]经过5年的观察, 复发率为52.3%.

2.3 钙离子通道阻滞剂 钙离子通道阻滞剂, 一般用于治疗心血管疾病. 口服或肛周局部应用钙离子通道阻滞剂(硝苯地平、地尔硫卓)可以缓解内括约肌痉挛, 降低肛管静息压. Cook等^[51]研究发现, 健康志愿者和慢性肛裂患者口服硝苯地平, 他们的肛管静息压都降低了1/3. Carapeti等^[52]研究发现: 口服地尔硫卓60 mg, 2次/d, 肛管静息压降低17%, 并且还对不同浓度的地尔硫卓软膏进行试验, 发现2%的软膏能发挥最大作用, 肛管静息压约降低28%, 一次应用效果可维持3-5 h. 钙离子通道阻滞剂与NO供体相比, 在治疗效果方面与硝酸甘油相当, 但可以降低不良反应的发生(头痛、肛门瘙痒等). 其不良反应较小的原因, 可能是因为局部应用, 全身系统吸收较少. Jawaid等^[53]研究发现: 运用2%盐酸地尔硫卓和0.2%硝酸甘油治疗慢性肛裂, 随访8 wk, 疗效没有显著差异, 且不良反应前者小于后者. 比较局部应用地尔硫卓和0.2%硝酸甘油的研究显示经过后者治疗无效的患者采用地尔硫卓外用, 其治愈率接近70%^[54,55]. 体外实验表明, 两者的联用效果更好^[56]. 高复发率是应用本类药物产生的主要问题, 在一项两年的随访试验中^[57], 复发率高达60%.

CS对肛裂的治愈率存在较大波动, 原因之一为: 应用药物的剂量和治疗时间的长短不同^[58-62]. Lysy等^[62]应用7.5 mg硝酸异山梨酯, 1 mo治愈率为83%; 另一项报道: 0.2%硝酸异山梨酯5 wk的治愈率为67%, 10 wk的治愈率为89%; Kirkil等^[50]运用5%和10%硝酸异山梨酯治疗40 d的治愈率分别为: 56.7%和63.3%. 另一个原因可能是未统一治愈标准, 如: 溃疡愈合为治愈还是症状消失为治愈? 有的医师建议后者为治愈, 因为对前者的评价增加了医师的主观因素. 非手术治疗的结果不同, 一定程度上也反应了药物的不稳定性.

CS可以较快的缓解症状, 并且没有手术和麻醉的危险, 但是从统计学上分析, 有效率不及

■ 相关报道

应用肛裂切除联合术后化学性内括约肌切开的方式来治疗肛裂, 国外对此研究较多, 能够减少对内括约肌的损伤, 提高治愈率, 并取得满意疗效.

■应用要点

明确肛裂各种治疗方式的适应症、治愈率、复发率及并发症,从而根据病情需要选择出最优治疗方式。

LIS^[63],并且有着较高的复发率。Abd Elhady等^[64],通过5年的随访:肛门内括约肌侧切术、局部应用地尔硫卓、硝酸甘油、肉毒毒素的复发率分别为:10.0%、65.0%、57.5%、52.5%。

2010年美国结肠与直肠外科医师协会(American Society of Colon and Rectal Surgeons, ASCRS)提出:肉毒毒素可以治愈60%-80%的肛裂患者,但是复发率高达42%。根据ASCRS,局部应用硝酸盐类药物的治愈率要高于安慰剂。虽然钙离子通道阻滞剂的不良反应少于硝酸盐类,但是没有充足的证据表明他优于安慰剂。Arroyo等^[65]指出行内括约肌切开术,手术要比CS疗效好。Nelson等^[24]的Meta分析指出:化学性括约肌切开的有效性可能稍高于安慰剂,但是远远要低于手术治疗。

综上所述,鉴于手术内括约肌切开术后的并发症与化学性内括约肌切开术后较高的复发率和不良反应,外科医师仍在寻找更好的治疗肛裂的方法。

3 肛裂的手术治疗

2004年, Lindsey等^[66]发明了一种新的术式,肛裂切除联合肉毒毒素(25 IU)内括约肌内注射,用来治疗应用药物治疗失败后的慢性肛裂,治愈率高达93%; Sileri等^[67]研究表明:肛裂切除联合肉毒毒素注射与内括约肌侧切术的治愈率分别为:83.3%和98.7%。

肛裂切除术,曾被报道用于儿童肛裂,但是很少有关于肛裂切除术单独用于治疗成人肛裂的研究报道。少量研究报道肛裂切除加内括约肌后位切开术获得较好效果^[68-71]。Meier等^[72]发现:肛裂切除术作为一个独立的术式,可取得令人满意的效果。对于肛裂切除的远期疗效, Schornagel等^[73]研究发现:肛裂切除术后5年治愈率为88.4%,且对肛门自制功能的影响较小。为评价肛裂切除术的疗效, Mousavi等^[74]通过对比肛裂切除术与内括约肌侧切术发现:术后1 wk两种术式疼痛、出血的症状消失;术后20 mo, 两组患者对手术的满意度分别为:87.5%和96.6%。现在内括约肌侧切术仍然是治疗肛裂的金标准,可获得非常好的效果:治愈率高达95%且术后疼痛较小。但是少数患者会出现排便失禁,虽然几率较小,一旦发生,治疗困难。

近几年肛裂切除术作为一种保护内括约肌的手术方式,取得了较好的治疗效果。现在肛裂切除术一般和其他治疗方式联用,如:药物或者手术。Patti等^[75]采用肛裂切除+肛门皮瓣推移成

形+内括约肌内30 IU肉毒毒素注射治疗肛门前方伴随肛管压力增高的慢性肛裂,术后30 d全部治愈,且术后肛管静息压显著下降。在之前的一些研究中,肛裂切除与术后NO供体联用,取得令人满意的效果,而且术后标本中仅有少量的内括约肌,肛门内超声也显示内括约肌并未受到损伤,这表明肛裂切除术对肛裂的治疗作用并不是直接作用于肛门内括约肌。Abramowitz等^[76]一项回顾性研究发现:肛裂切除联合肛门成形术后一年患者治愈率达100%。Patti等^[77]一项前瞻性研究发现:肛裂切除联合肛门皮瓣推移成形术后30 d全部治愈。Patel等^[78]在一项回顾性研究中发现:肛裂切除联合肛门皮瓣推移成形术与肛门内括约肌侧切术相比较,术后20 mo,前者治愈率为96%,后者为88%;症状的缓解分别为90%、72%。

4 肛裂治疗方式的选择

在治疗慢性肛裂方面,运用硝酸甘油、钙离子通道阻滞剂、肉毒毒素、内括约肌侧切术的顺序,于1999年在第七届欧洲联合胃肠病周上被提出^[79],在2001^[30]和2002^[33]年推广发行,随后考虑到药物的有效性和经济因素又在新英格兰杂志中发表^[79,80]。2005年Essani等^[28]从疗效和经济方面进行分析:采用这种顺序约有88%的患者不需要手术治疗就可痊愈,而且能够降低治疗费用。Gil等^[81]研究发现,慢性肛裂愈合的概率与收缩压和静息压百分比变化相关,若收缩压/静息压<150%则用药物治疗的可能性较小,需手术治疗。

从1999年, Madalinski等^[37,38,82]多次提出把大剂量应用肉毒毒素作为手术治疗肛裂前,化学性括约肌切开术的最后一道防线。2001年,在文献中第一次提到了联合硝酸甘油大剂量应用肉毒毒素(50-100 IU)可以提高慢性肛裂的治愈率^[67]。若应用大剂量肉毒毒素2-3 wk后,症状和注射之前没有明显的改善,就应该考虑内括约肌侧切术,但是在行内括约肌侧切术之前,肛裂切除术联合术后化学性内括约肌切开应被考虑。有研究表明在应用硝酸异山梨酯治疗肛裂失败以后,采取肛裂切除加局部应用硝酸异山梨酯,全部治愈,而且术后随访29 mo无一复发;肛裂切除联合肉毒毒素注射,随访16 wk,治愈率高达93%^[27]。

由于肉毒毒素价格昂贵且容易引起肛门失禁及肛周脓肿,越来越多的人希望用其他的替代方法去治疗肛裂。为了寻找更好的方法, Ar-

thur等^[83]研究发现肛裂切除配合40 IU肉毒毒素注射与肛裂切除配合术后8 wk的2%地尔硫卓外用, 治愈率分别为89.3%和82.6%, 无显著差异。肉毒毒素能够持久缓解肛门痉挛, 这是他的优势, 但同时也是他的劣势: 术后导致不同程度的肛门排气排便失禁, 故在选择这种术式的时候还是很谨慎的。虽然地尔硫卓的局部应用会导致肛门瘙痒, 但这是应用药物后导致肛门潮湿引起的, 而且是短暂的。

5 结论

在选择合适的方法治疗慢性肛裂的时候, 我们应该明白哪个阶段的肛裂适合化学性括约肌切开, 更应该明白内括约肌切开所带来的病理生理意义。随着社会发展, 对内括约切开后长时间随访研究的进行, 现在治疗肛裂越来越重视内括约肌的保护, 避免使其损伤。故在药物治疗肛裂失败后, 采用肛裂切除术联合术后化学性括约肌切开是一个较为理想的治疗方法。

6 参考文献

- 1 Dykes SL, Madoff RD. Benign Anorectal: Anal Fissure. In: Wolff BG, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD, editors. The ASCRS textbook of colon and rectal surgery. New York: Springer Science and Business Media LLC, 2007: 178-191 [DOI: 10.1007/978-0-387-36374-5_12]
- 2 Wollina U. Pharmacological sphincterotomy for chronic anal fissures by botulinum toxin a. *J Cutan Aesthet Surg* 2008; 1: 58-63 [PMID: 20300345 DOI: 10.4103/0974-2077.44160]
- 3 Brisinda G, Cadeddu F, Brandara F, Brisinda D, Maria G. Treating chronic anal fissure with botulinum neurotoxin. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2004; 1: 82-89 [PMID: 16265069 DOI: 10.1038/ncpgasthep0048]
- 4 Lund JN, Scholefield JH. Aetiology and treatment of anal fissure. *Br J Surg* 1996; 83: 1335-1344 [PMID: 8944447 DOI: 10.1002/bjs.1800831006]
- 5 Sauper T, Lanthaler M, Biehl M, Weiss H, Nehoda H. Impaired anal sphincter function in professional cyclists. *Wien Klin Wochenschr* 2007; 119: 170-173 [PMID: 17427020 DOI: 10.1007/s00508-006-0741-8]
- 6 Garg P. Water stream in a bidet-toilet as a cause of anterior fissure-in-ano: a preliminary report. *Colorectal Dis* 2010; 12: 601-602 [PMID: 19486098 DOI: 10.1111/j.1463-1318.2009.01867.x]
- 7 Jenkins JT, Urie A, Molloy RG. Anterior anal fissures are associated with occult sphincter injury and abnormal sphincter function. *Colorectal Dis* 2008; 10: 280-285 [PMID: 17655720 DOI: 10.1111/j.1463-1318.2007.01335.x]
- 8 Nzimbala MJ, Bruyninx L. Chronic anal fissure from suspected adult sexual abuse in a traumatic anal sex practice patient. *Acta Chir Belg* 2007; 107: 566-569 [PMID: 18074923]
- 9 Watson A, Al-Ozairi O, Fraser A, Loudon M, O'Kelly T. Nicorandil associated anal ulceration. *Lancet* 2002; 360: 546-547 [PMID: 12241662]
- 10 Baker RP, Al-Kubati W, Atuf M, Phillips RK. Nicorandil-induced severe perianal ulceration. *Tech Coloproctol* 2007; 11: 343-345 [PMID: 18060591 DOI: 10.1007/s10151-007-0378-2]
- 11 Gupta PJ. Consumption of red-hot chili pepper increases symptoms in patients with acute anal fissures. A prospective, randomized, placebo-controlled, double blind, crossover trial. *Arq Gastroenterol* 2008; 45: 124-127 [PMID: 18622465]
- 12 Perry WB, Dykes SL, Buie WD, Rafferty JF. Practice parameters for the management of anal fissures (3rd revision). *Dis Colon Rectum* 2010; 53: 1110-1115 [PMID: 20628272 DOI: 10.1007/DCR.0b013e3181e23dfe]
- 13 Schouten WR, Briel JW, Auwerda JJ. Relationship between anal pressure and anodermal blood flow. The vascular pathogenesis of anal fissures. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 664-669 [PMID: 8026232]
- 14 Schouten WR, Briel JW, Auwerda JJ, De Graaf EJ. Ischaemic nature of anal fissure. *Br J Surg* 1996; 83: 63-65 [PMID: 8653368]
- 15 Klosterhalfen B, Vogel P, Rixen H, Mittermayer C. Topography of the inferior rectal artery: a possible cause of chronic, primary anal fissure. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 43-52 [PMID: 2910660]
- 16 Thornton MJ, Kennedy ML, King DW. Prospective manometric assessment of botulinum toxin and its correlation with healing of chronic anal fissure. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1424-1431 [PMID: 15906131 DOI: 10.1007/s10350-005-0025-9]
- 17 Ho KS, Ho YH. Randomized clinical trial comparing oral nifedipine with lateral anal sphincterotomy and tailored sphincterotomy in the treatment of chronic anal fissure. *Br J Surg* 2005; 92: 403-408 [PMID: 15739214 DOI: 10.1002/bjs.4882]
- 18 Madaliński M, Chodorowski Z. Relation between botulinum toxin and nitric oxide donors in the treatment of chronic anal fissure. *Med Sci Monit* 2005; 11: HY1-HY5 [PMID: 15668639]
- 19 Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 9265-9269 [PMID: 2827174]
- 20 Madalinski M, Chodorowski Z. Why the most potent toxin may heal anal fissure. *Adv Ther* 2006; 23: 627-634 [PMID: 17050505]
- 21 Aivaz O, Rayhanabad J, Nguyen V, Haigh PI, Abbas M. Botulinum toxin A with fissurectomy is a viable alternative to lateral internal sphincterotomy for chronic anal fissure. *Am Surg* 2009; 75: 925-928 [PMID: 19886136]
- 22 Ogilvie JW, Ricciardi R. Complications of perineal surgery. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22: 51-59 [PMID: 20119557 DOI: 10.1055/s-0029-1202887]
- 23 Yüksel O, Bostanci H, Leventoglu S, Sahin TT, Menteş BB. Keyhole deformity: a case series. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 1110-1114 [PMID: 18213502 DOI: 10.1007/s11605-008-0471-5]
- 24 Nelson RL, Thomas K, Morgan J, Jones A. Non surgical therapy for anal fissure. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 2: CD003431 [PMID: 22336789 DOI: 10.1002/14651858]
- 25 Metcalf AM. Anal fissure. *Surg Clin North Am* 2002; 82: 1291-1297 [PMID: 12516855]
- 26 Hancke E, Rikas E, Suchan K, Völke K. Dermal flap

同行评价

本文介绍了肛裂治疗的最新进展, 对侧方内括约肌切开术、肛裂切除加皮瓣推移成形术、化学性内括约肌切开的优缺点进行了分析, 对临床实践具有一定的参考价值。

- coverage for chronic anal fissure: lower incidence of anal incontinence compared to lateral internal sphincterotomy after long-term follow-up. *Dis Colon Rectum* 2010; 53: 1563-1568 [PMID: 20940607 DOI: 10.1007/DCR.0b013e3181f0869f]
- 27 Lindsey I, Jones OM, Cunningham C, George BD, Mortensen NJ. Botulinum toxin as second-line therapy for chronic anal fissure failing 0.2 percent glyceryl trinitrate. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 361-366 [PMID: 12626912 DOI: 10.1007/s10350-004-6556-7]
 - 28 Essani R, Sarkisyan G, Beart RW, Ault G, Vukasian P, Kaiser AM. Cost-saving effect of treatment algorithm for chronic anal fissure: a prospective analysis. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 1237-1243; discussion 1237-1243 [PMID: 16332479 DOI: 10.1016/j.gassur.2005.07.007]
 - 29 Siproudhis L, Sébille V, Pigot F, Hémerly P, Juguet F, Bellissant E. Lack of efficacy of botulinum toxin in chronic anal fissure. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 515-524 [PMID: 12950424]
 - 30 Madalinski MH, Slawek J, Zbytek B, Duzynski W, Adrich Z, Jagiello K, Kryszewski A. Topical nitrates and the higher doses of botulinum toxin for chronic anal fissure. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 977-979 [PMID: 11490852]
 - 31 Brisinda G, Maria G, Sganga G, Bentivoglio AR, Albanese A, Castagneto M. Effectiveness of higher doses of botulinum toxin to induce healing in patients with chronic anal fissures. *Surgery* 2002; 131: 179-184 [PMID: 11854696]
 - 32 Jost WH, Schanne S, Mlitz H, Schimrigk K. Perianal thrombosis following injection therapy into the external anal sphincter using botulin toxin. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 781 [PMID: 7607047]
 - 33 Madaliński MH, Slawek J, Duzynski W, Zbytek B, Jagiello K, Adrich Z, Kryszewski A. Side effects of botulinum toxin injection for benign anal disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 853-856 [PMID: 12172405]
 - 34 Valizadeh N, Jalaly NY, Hassanzadeh M, Kamani F, Dadvar Z, Azizi S, Salehimarziyarani B. Botulinum toxin injection versus lateral internal sphincterotomy for the treatment of chronic anal fissure: randomized prospective controlled trial. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397: 1093-1098 [PMID: 22430300 DOI: 10.1007/s00423-012-0948-2]
 - 35 Arroyo A, Perez F, Serrano P, Candela F, Calpena R. Long-term results of botulinum toxin for the treatment of chronic anal fissure: prospective clinical and manometric study. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 267-271 [PMID: 15526113 DOI: 10.1007/s00384-004-0644-y]
 - 36 Schubert MC, Sridhar S, Schade RR, Wexner SD. What every gastroenterologist needs to know about common anorectal disorders. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3201-3209 [PMID: 19598294]
 - 37 Madalinski M. The treatment algorithm instead of the unknown optimal dose of botulinum toxin for chronic anal fissure. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 125; author reply 125-127 [PMID: 15225181 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2004.02011.x]
 - 38 Madalinski M. Botulinum neurotoxin and other treatments for fissure-in-ano and pelvic floor disorders (Br J Surg 2002; 89: 950-961). *Br J Surg* 2002; 89: 1620-1621; author reply 1821 [PMID: 12445078 DOI: 10.1046/j.1365-2168.2002.22515.x]
 - 39 Madalinski M. To predict and understand anal fissure healing. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 263 [PMID: 20549217 DOI: 10.1007/s00384-010-0983-9]
 - 40 Rattan S, Chakder S. Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* 1992; 262: G107-G112 [PMID: 1733256]
 - 41 Collins EE, Lund JN. A review of chronic anal fissure management. *Tech Coloproctol* 2007; 11: 209-223 [PMID: 17676270 DOI: 10.1007/s10151-007-0355-9]
 - 42 Lund JN, Nyström PO, Coremans G, Herold A, Karaitianos I, Spyrou M, Schouten WR, Sebastian AA, Pescatori M. An evidence-based treatment algorithm for anal fissure. *Tech Coloproctol* 2006; 10: 177-180 [PMID: 16969620 DOI: 10.1007/s10151-006-0276-z]
 - 43 Nelson R. A systematic review of medical therapy for anal fissure. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 422-431 [PMID: 14994109 DOI: 10.1007/s10350-003-0079-5]
 - 44 Kennedy ML, Sowter S, Nguyen H, Lubowski DZ. Glyceryl trinitrate ointment for the treatment of chronic anal fissure: results of a placebo-controlled trial and long-term follow-up. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1000-1006 [PMID: 10458121]
 - 45 Bailey HR, Beck DE, Billingham RP, Binderow SR, Gottesman L, Hull TL, Larach SW, Margolin DA, Milsom JW, Potenti FM, Rafferty JF, Riff DS, Sands LR, Senagore A, Stamos MJ, Yee LF, Young-Fadok TM, Gibbons RD. A study to determine the nitroglycerin ointment dose and dosing interval that best promote the healing of chronic anal fissures. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1192-1199 [PMID: 12352236 DOI: 10.1097/01.DCR.0000027060.14159.6E]
 - 46 Altomare DF, Rinaldi M, Milito G, Arcanà F, Spinelli F, Nardelli N, Scardigno D, Pulvirenti-D'Urso A, Bottini C, Pescatori M, Lovreglio R. Glyceryl trinitrate for chronic anal fissure--healing or headache? Results of a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 174-179; discussion 174-179 [PMID: 10696890]
 - 47 Carapeti EA, Kamm MA, McDonald PJ, Chadwick SJ, Melville D, Phillips RK. Randomised controlled trial shows that glyceryl trinitrate heals anal fissures, higher doses are not more effective, and there is a high recurrence rate. *Gut* 1999; 44: 727-730 [PMID: 10205213]
 - 48 Pérez-Legaz J, Arroyo A, Moya P, Ruiz-Tovar J, Frangi A, Candela F, Oliver MI, Calpena R. Perianal versus endoanal application of glyceryl trinitrate 0.4% ointment in the treatment of chronic anal fissure: results of a randomized controlled trial. Is this the solution to the headaches? *Dis Colon Rectum* 2012; 55: 893-899 [PMID: 22810476 DOI: 10.1097/DCR.0b013e31825a9f1f]
 - 49 Lund JN, Scholefield JH. Follow-up of patients with chronic anal fissure treated with topical glyceryl trinitrate. *Lancet* 1998; 352: 1681 [PMID: 9853449 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)61453-5]
 - 50 Kirkil C, Aygen E, Doğru O, İlhan YS, Ayten R, Camci C, Göğebakan O. The efficiency of various doses of topical isosorbide dinitrate in the treatment of chronic anal fissure and the long-term results: a prospective, randomized and controlled clinical trial. *Turk J Gastroenterol* 2012; 23: 28-32 [PMID: 22505376]
 - 51 Cook TA, Humphreys MM, McC Mortensen NJ. Oral nifedipine reduces resting anal pressure and heals chronic anal fissure. *Br J Surg* 1999; 86: 1269-1273 [PMID: 10540130 DOI: 10.1046/j.1365-2168.1999.01292.

- x]
- 52 Carapeti EA, Kamm MA, Phillips RK. Topical diltiazem and bethanechol decrease anal sphincter pressure and heal anal fissures without side effects. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1359-1362 [PMID: 11052511]
 - 53 Jawaid M, Masood Z, Salim M. Topical diltiazem hydrochloride and glyceryl trinitrate in the treatment of chronic anal fissure. *J Coll Physicians Surg Pak* 2009; 19: 614-617 [PMID: 19811710 DOI: 10.2009/JCPSP.614617]
 - 54 Griffin N, Acheson AG, Jonas M, Scholefield JH. The role of topical diltiazem in the treatment of chronic anal fissures that have failed glyceryl trinitrate therapy. *Colorectal Dis* 2002; 4: 430-435 [PMID: 12790914]
 - 55 Jonas M, Speake W, Scholefield JH. Diltiazem heals glyceryl trinitrate-resistant chronic anal fissures: a prospective study. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1091-1095 [PMID: 12195195]
 - 56 Jonas-Obichere M, Scholefield JH, Acheson A, Munday M, Tyler H, Wilson VG. Comparison of the effects of nitric oxide donors and calcium channel blockers on the intrinsic myogenic tone of sheep isolated internal anal sphincter. *Br J Surg* 2005; 92: 1263-1269 [PMID: 16044408 DOI: 10.1002/bjs.5070]
 - 57 Nash GF, Kapoor K, Saeb-Parsy K, Kunanadam T, Dawson PM. The long-term results of diltiazem treatment for anal fissure. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 1411-1413 [PMID: 16911570 DOI: 10.1111/j.1742-1241.2006.00895.x]
 - 58 Schouten WR, Briel JW, Boerma MO, Auwerda JJ, Wilms EB, Graatsma BH. Pathophysiological aspects and clinical outcome of intra-anal application of isosorbide dinitrate in patients with chronic anal fissure. *Gut* 1996; 39: 465-469 [PMID: 8949655]
 - 59 Lund JN, Scholefield JH. Glyceryl trinitrate is an effective treatment for anal fissure. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 468-470 [PMID: 9106698]
 - 60 Parellada C. Randomized, prospective trial comparing 0.2 percent isosorbide dinitrate ointment with sphincterotomy in treatment of chronic anal fissure: a two-year follow-up. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 437-443 [PMID: 14994114 DOI: 10.1007/s10350-003-0090-x]
 - 61 Oettlé GJ. Glyceryl trinitrate vs. sphincterotomy for treatment of chronic fissure-in-ano: a randomized, controlled trial. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 1318-1320 [PMID: 9369106]
 - 62 Lysy J, Israelit-Yatzkan Y, Sestiere-Ittah M, Keret D, Goldin E. Treatment of chronic anal fissure with isosorbide dinitrate: long-term results and dose determination. *Dis Colon Rectum* 1998; 41: 1406-1410 [PMID: 9823807]
 - 63 Madalinski M, Kalinowski L. Novel options for the pharmacological treatment of chronic anal fissure-role of botulin toxin. *Curr Clin Pharmacol* 2009; 4: 47-52 [PMID: 19149501]
 - 64 Abd Elhady HM, Othman IH, Hablus MA, Ismail TA, Aboryia MH, Selim MF. Long-term prospective randomised clinical and manometric comparison between surgical and chemical sphincterotomy for treatment of chronic anal fissure. *S Afr J Surg* 2009; 47: 112-114 [PMID: 20141067]
 - 65 Arroyo A, Pérez F, Serrano P, Candela F, Lacueva J, Calpena R. Surgical versus chemical (botulinum toxin) sphincterotomy for chronic anal fissure: long-term results of a prospective randomized clinical and manometric study. *Am J Surg* 2005; 189: 429-434 [PMID: 15820455 DOI: 10.1016/j.amjsurg.2004.06.045]
 - 66 Lindsey I, Cunningham C, Jones OM, Francis C, Mortensen NJ. Fissurectomy-botulinum toxin: a novel sphincter-sparing procedure for medically resistant chronic anal fissure. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 1947-1952 [PMID: 15622590]
 - 67 Sileri P, Stolfi VM, Franceschilli L, Grande M, Di Giorgio A, D'Ugo S, Attina' G, D'Eletto M, Gaspari AL. Conservative and surgical treatment of chronic anal fissure: prospective longer term results. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 773-780 [PMID: 20195915 DOI: 10.1007/s11605-010-1154-6]
 - 68 Bode WE, Culp CE, Spencer RJ, Beart RW. Fissurectomy with superficial midline sphincterotomy. A viable alternative for the surgical correction of chronic fissure/ulcer-in-ano. *Dis Colon Rectum* 1984; 27: 93-95 [PMID: 6697837]
 - 69 Abcarian H, Lakshmanan S, Read DR, Roccaforte P. The role of internal sphincter in chronic anal fissures. *Dis Colon Rectum* 1982; 25: 525-528 [PMID: 7117055]
 - 70 Abcarian H. Surgical correction of chronic anal fissure: results of lateral internal sphincterotomy vs. fissurectomy--midline sphincterotomy. *Dis Colon Rectum* 1980; 23: 31-36 [PMID: 7379649]
 - 71 Di Castro A, Biancari F, D'Andrea V, Caviglia A. Fissurectomy with posterior midline sphincterotomy and anoplasty (FPSA) in the management of chronic anal fissures. *Surg Today* 1997; 27: 975-978 [PMID: 10870590]
 - 72 Meier zu Eissen J. [Chronic anal fissure, therapy]. *Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr* 2001; 118: 654-656 [PMID: 11824335]
 - 73 Schornagel IL, Witvliet M, Engel AF. Five-year results of fissurectomy for chronic anal fissure: low recurrence rate and minimal effect on continence. *Colorectal Dis* 2012; 14: 997-1000 [PMID: 21955514 DOI: 10.1111/j.1463-1318.2011.02840.x]
 - 74 Mousavi SR, Sharifi M, Mehdikhah Z. A comparison between the results of fissurectomy and lateral internal sphincterotomy in the surgical management of chronic anal fissure. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1279-1282 [PMID: 19415396 DOI: 10.1007/s11605-009-0908-5]
 - 75 Patti R, Famà F, Tornambè A, Asaro G, Di Vita G. Fissurectomy combined with anoplasty and injection of botulinum toxin in treatment of anterior chronic anal fissure with hypertonia of internal anal sphincter: a pilot study. *Tech Coloproctol* 2010; 14: 31-36 [PMID: 20127381 DOI: 10.1007/s10151-009-0562-7]
 - 76 Abramowitz L, Bouchard D, Souffran M, Devulder F, Ganansia R, Castinel A, Suduca JM, Soudan D, Varastet M, Staumont G; for the GREP and the CREGG. Sphincter-sparing anal fissure surgery: A one-year prospective, observational, multicentre study of fissurectomy with anoplasty. *Colorectal Dis* 2012 Jul 7. [Epub ahead of print] [PMID: 22776322 DOI: 10.1111/.1463-1318.2012.03176.x]
 - 77 Patti R, Territo V, Aiello P, Angelo GL, Di Vita G. Manometric evaluation of internal anal sphincter after fissurectomy and anoplasty for chronic anal fissure: a prospective study. *Am Surg* 2012; 78: 523-527 [PMID: 22546122]
 - 78 Patel SD, Oxenham T, Praveen BV. Medium-term results of anal advancement flap compared with

- lateral sphincterotomy for the treatment of anal fissure. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 1211-1214 [PMID: 21562745 DOI: 10.1007/s00384-011-1234-4]
- 79 Kaiser AM. A comparison of botulinum toxin and nitroglycerin ointment for chronic anal fissure. *N Engl J Med* 1999; 341: 1701 [PMID: 10610441 DOI: 10.1056/NEJM199911253412217]
- 80 Vogel JD. A comparison of botulinum toxin and nitroglycerin ointment for chronic anal fissure. *N Engl J Med* 1999; 341: 1701 [PMID: 10610442]
- 81 Gil J, Luján J, Hernández Q, Gil E, Salom MG, Parrilla P. Screening for the effectiveness of conservative treatment in chronic anal fissure patients using anorectal manometry. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 649-654 [PMID: 20127340 DOI: 10.1007/s00384-010-0885-x]
- 82 Madalinski MH, Slawek J. The higher doses of botulinum toxin and the potentiate effect of its action after nitric oxide donors application for the treatment of chronic anal fissure. *Surgery* 2003; 133: 455; author reply 455-456 [PMID: 12717372 DOI: 10.1067/msy.2003.121]
- 83 Arthur JD, Makin CA, El-Sayed TY, Walsh CJ. A pilot comparative study of fissurectomy/diltiazem and fissurectomy/botulinum toxin in the treatment of chronic anal fissure. *Tech Coloproctol* 2008; 12: 331-336; discussion 336 [PMID: 19018466 DOI: 10.1007/s10151-008-0444-4]

编辑 李军亮 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 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 0.775

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07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, 2011年《世界华人消化杂志》总被引频次3871次, 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第5位、第7位、第5位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第65位、第238位、第138位; 其他指标: 即年指标0.081, 他引率0.82, 引用刊数526种, 扩散因子13.59, 权威因子1260.02, 被引半衰期4.3, 来源文献量642, 文献选出率0.93, 地区分布数29, 机构分布数302, 基金论文比0.45, 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“中国科技核心期刊”(《世界华人消化杂志》编辑部)。

活化大鼠肝星状细胞新表达甘丙肽2型受体拮抗甘丙肽增殖抑制作用

丁永年, 李郑红, 徐雷鸣, 熊静平, 陈源文, 范建高

丁永年, 熊静平, 新疆医科大学第二附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830028
李郑红, 徐雷鸣, 陈源文, 范建高, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科 上海市 200092
丁永年, 副教授, 主任医师, 主要从事慢性肝病防治方面的研究。新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目, No. 211233146-10
作者贡献分布: 丁永年与李郑红对此文所作贡献均等; 课题由徐雷鸣与陈源文设计; 研究过程由李郑红与熊静平完成; 研究所用试剂与分析工具由陈源文与范建高提供; 数据分析由丁永年与陈源文完成; 本论文写作由丁永年、李郑红及陈源文完成。
通讯作者: 陈源文, 副主任医师, 200092, 上海市控江路1665号, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科。shsmus@263.net
收稿日期: 2013-01-15 修回日期: 2013-04-01
接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-08

Newly expressed galanin type 2 receptor suppresses proliferation of activated hepatic stellate cells

Yong-Nian Ding, Zheng-Hong Li, Lei-Ming Xu, Jing-Ping Xiong, Yuan-Wen Chen, Jian-Gao Fan

Yong-Nian Ding, Jing-Ping Xiong, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830028, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Zheng-Hong Li, Lei-Ming Xu, Yuan-Wen Chen, Jian-Gao Fan, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 211233146-10

Correspondence to: Yuan-Wen Chen, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China. shsmus@263.net

Received: 2013-01-15 Revised: 2013-04-01

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of galanin receptors in hepatic stellate cells (HSCs) and their role in HSC proliferation.

METHODS: HSCs were isolated from rats by *in situ* liver perfusion with collagenase and pronase E and cultured for 1 wk. Cells were then harvested and the mRNA expression of galanin and its three receptors (GalR1, GalR2 and GalR3)

was determined by semi-quantitative RT-PCR. HSC-T6, an immortalized and activated rat liver stellate cell line, was cultured *in vitro* to confirm the presence of GalR2 protein by immunocytofluorescence. Cultured HSC-T6 cells were then treated with galanin at concentrations from 0 to 10000 nmol/L for 24 h, in the presence or absence of a GalR2 neutralization antibody (5 µg/mL). Cell proliferation was assessed by MTT assay.

RESULTS: Galanin mRNA and GalR3 mRNA were expressed by both quiescent and activated HSCs. GalR2 mRNA was undetectable in quiescent HSCs but was markedly expressed by activated HSCs. GalR1 mRNA was not detected in either quiescent or activated HSCs. The presence of GalR2 protein in activated HSC was further confirmed by immunocytofluorescence in HSC-T6 cells. Treatment with galanin at a concentration of 1, 10, 100 or 1000 nmol/L resulted in a reduction of cell proliferation to 86.7% ($t = 3.976$, $P = 0.028$), 83.1% ($t = 4.45$, $P = 0.012$), 78.1% ($t = 5.75$, $P = 0.006$) and 73.1% ($t = 5.38$, $P = 0.008$) of that of controls. Complete GalR2 neutralization enhanced the inhibitory effect of galanin, and the proliferation of cells treated with 1 or 10 nmol/L of galanin was reduced to 67.9% ($t = 5.11$, $P = 0.015$) and 73.1% ($t = 6.56$, $P = 0.003$) of that of controls. There was a further reduction of 21.7% ($t = 3.35$, $P = 0.028$) and 12.6% ($t = 2.78$, $P = 0.049$) compared with the corresponding galanin-treated group.

CONCLUSION: Newly expressed GalR2 counteracts GalR1-mediated inhibitory effect of galanin on the proliferation of activated HSCs.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Galanin; Hepatic stellate cells; Receptor; Proliferation

Ding YN, Li ZH, Xu LM, Xiong JP, Chen YW, Fan JG. Newly expressed galanin type 2 receptor suppresses proliferation of activated hepatic stellate cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1205-1210 URL:

■背景资料

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化是肝纤维化的中心环节, 瘦素促进HSC的促纤维化功能, 而甘丙肽是瘦素的内源性生理拮抗因子, 许多能量代谢相关生物学功能与瘦素相互拮抗, 但是甘丙肽是否也影响HSC功能参与肝纤维化的发病目前未见报道。

■同行评议者

金山, 主任医师, 内蒙古医学院附属医院普通外科

■ 研发前沿

HSC活化过程中
功能调控机制的
研究是肝纤维化
防治研究的热点。

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1205.asp> DOI:
<http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1205>

摘要

目的: 探讨甘丙肽受体在肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)中表达和对细胞增殖的影响。

方法: 使用胶原酶原位灌注法分离大鼠原代HSC体外培养, 半定量RT-PCR法检测静止期(0 wk)和培养活化(1 wk)HSC中甘丙肽及其3种受体(GalR1、GalR2和GalR3)表达变化。大鼠HSC-T6细胞株体外培养, 免疫荧光法检测GalR2蛋白在HSC-T6细胞中表达; 给或不给GalR2中和抗体(5 μ g/mL), MTT法观察不同浓度甘丙肽(0-10000 nmol/L)干预后甘丙肽对HSC增殖和活力的影响。

结果: 成功分离大鼠原代HSC和体外培养。静止期及活化的HSC均可检测到甘丙肽及GalR3 mRNA表达, 但无GalR1 mRNA表达, 而GalR2 mRNA在活化HSC中表达。细胞免疫荧光法进一步证实GalR2蛋白在HSC-T6中表达。甘丙肽处理时, HSC-T6增殖水平在1、10、100和1000 nmol/L甘丙肽时分别下降至对照组的86.7%($t = 3.976$, $P = 0.028$)、83.1%($t = 4.45$, $P = 0.012$)、78.1%($t = 5.75$, $P = 0.006$)和73.1%($t = 5.38$, $P = 0.008$); 给予GalR2中和抗体联合干预时, HSC-T6增殖抑制在甘丙肽1和10 nmol/L时即降至相应对照组67.9%($t = 5.11$, $P = 0.015$)和73.1%($t = 6.56$, $P = 0.003$), 与相应浓度甘丙肽组相比, 分别下降21.7%($t = 3.35$, $P = 0.028$)和12.6%($t = 2.78$, $P = 0.049$)。

结论: HSC活化时新表达GalR2拮抗GalR1介导的甘丙肽对HSC增殖抑制作用。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 甘丙肽; 肝星状细胞; 受体; 增殖

核心提示: 通过研究甘丙肽及其3种受体在不同活化状态下在肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)中的表达情况以及比较不同受体对HSC增殖活性的影响, 为甘丙肽在HSC生物学功能调控中的作用提供了实验基础, 且为甘丙肽在肝纤维化中的重要作用研究提供实验依据。

丁永年, 李郑红, 徐雷鸣, 熊静平, 陈源文, 范建高. 活化大鼠肝星状细胞新表达甘丙肽2型受体拮抗甘丙肽增殖抑制作用. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1205-1210 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1205.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1205>

0 引言

肝纤维化是慢性肝病发展至肝硬化的必由病理阶段, 其基本特征为过量细胞外基质沉积于肝脏^[1]。虽然肝纤维化时产纤维细胞来源目前存在一些争议, 但大多数研究认为由肝窦内静止期肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化转化而来的肌成纤维母细胞样(myofibroblast-like)细胞, 是肝纤维化时细胞外基质的主要来源^[2], 调控HSC功能是治疗肝纤维化关键靶点^[1,3]。HSC功能受细胞因子调控, 其中瘦素起重要的促纤维化作用。瘦素作用于活化HSC, 促进HSC增殖并抑制其凋亡^[4]、促进肝内转化生长因子- β 1表达、减少基质金属蛋白酶1形成抑制细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解和上调促炎症因子等, 导致肝纤维化进展^[4,5]。

甘丙肽是瘦素的内源性生理拮抗因子。甘丙肽由29个氨基酸残基组成, 目前已经克隆出3种甘丙肽受体(galanin receptor, GalR), 分别是GalR1, GalR2和GalR3^[6]。甘丙肽及其受体在哺乳动物组织中分布广泛, 作用多样, 包括参与学习记忆、能量代谢、摄食活动和抑制胰岛素释放^[7]、炎症反应调控^[8]、细胞增殖与凋亡^[9]等。甘丙肽的许多能量代谢相关生物学功能与瘦素相互拮抗^[10,11], 其分泌水平还存在负反馈调控^[12,13]。

甘丙肽在肝纤维化发生发展过程中的作用迄今未见报道, 也未见甘丙肽及其受体在HSC中的表达情况和功能的研究报道。为此, 本研究将通过分离大鼠原代静止期HSC和大鼠HSC-T6细胞株, 初步观察甘丙肽及其受体在HSC中的表达情况 and 对其增殖作用的影响, 为甘丙肽与肝纤维化关系研究提供细胞学基础。

1 材料与方法

1.1 材料 δ , SD大鼠6只, 购自中国科学院上海实验动物中心, 体质量300-350 g, 饲养于新华医院实验动物中心。

链酶蛋白酶(pronase E)、DNA酶 I、IV型胶原酶和Nycodenz为Sigma公司产品; 甘丙肽(C141H211N43O41)(产品批号114547-31-8)购自Sigma公司; TRIzol购自Invitrogen公司; PrimeScript RT reagent kit购自TaKaRa宝生物; 山羊抗大鼠GalR2单克隆抗体购自Abcam公司; Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)购自Gibco公司; 胎牛血清购自Gibco公司; 四甲基偶氮唑蓝[3-(3,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl

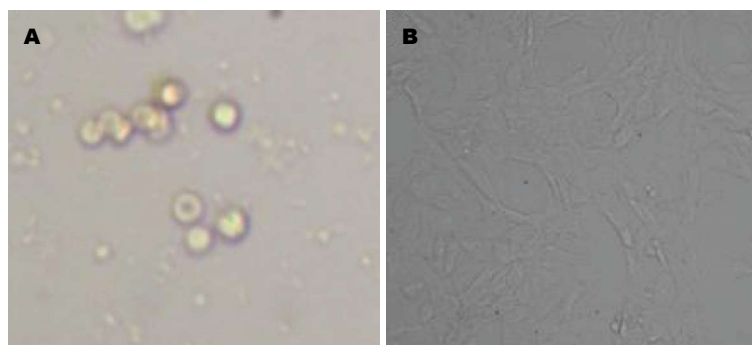


图1 原代肝星状细胞光镜下形态学变化($\times 100$)。A: 新鲜分离原代肝星状细胞形态; B: 培养7 d后肝星状细胞。

■ 相关报道

甘丙肽及其受体在脂肪性肝病中的表达动态变化, 但其与肝损伤修复的关系目前尚不明确。除能量代谢平衡调控外, 也发现瘦素与甘丙肽在脂肪细胞中与细胞增殖密切相关, 因此肝星状细胞是否与瘦素一样, 表达甘丙肽受体并产生生物学功能值得探讨。

tetrazolium bromide, MTT]为Sigma公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 原代HSC分离与培养HSC分离方式、纯度及活力鉴定参见先前报道^[14]。新分离HSC纯度和细胞活力均 $>90\%$ 。新分离HSC冻存于液氮或培养于6孔板细胞1 wk后用于抽提总RNA。

1.2.2 RT-PCR检测甘丙肽及其受体表达: 采用TRIzol抽提细胞总RNA, 用Takara公司RT-PCR试剂盒, 参照说明书对总RNA进行扩增。Galanin引物序列: 上游5'-TACCCCTGCCTGAGAGCAAT-3'; 下游5'-TCTTCTGAGGAGGTGGC-CAA-3', 扩增片段长度为118 bp。GalR1引物序列: 上游5'-TGCTTTTGCTATGCCAAGGTTTC-3'; 下游5'-TCGGTTCTTTTCTTTAGCATCGC-3', 扩增片段长度为359 bp。GalR2引物序列: 上游5'-TTCTGCCTCTGTTGGATGCC-3'; 下游5'-TCTACTCGAGGCTGTGCAGTTG-3', 扩增片段长度为362 bp。GalR3引物序列: 上游5'-AGCCAAGCAGTACCACAGAT-3'; 下游5'-GGTGAGGTAGATGAGCAGAT-3', 扩增片段长度为161 bp。内参GAPDH引物序列: 上游5'-CATGGTCTACACGTIECAGT-3'; 下游5'-GGCAAGCAGTTGGTGGTGC-3', 扩增片段长度为366 bp。退火温度分别为: 61℃、61℃、58℃、62℃、58℃, 扩增40循环后用1.2%琼脂糖凝胶电泳, 并以Bio-rad成像系统成像。

1.2.3 细胞免疫荧光法检测GalR2表达: 取培养皿中HSC-T6细胞爬片, 4%多聚甲醛固定, 山羊血清封闭后, GalR2一抗(1:50)4℃过夜, 以FITC标记二抗37℃孵育2 h, 荧光显微镜成像, 阳性细胞为绿色荧光。另设不加一抗的平行阴性对照。

1.2.4 MTT法检测甘丙肽及GalR2对HSC-T6细胞增殖的影响: HSC-T6细胞株培养于96孔板细胞(2000个/孔)24 h。甘丙肽处理组每孔加入甘丙肽工作液至终浓度为0、1、10、100、1000和

10000 nmol/L; 甘丙肽抗体组除加入上述浓度甘丙肽外, 另加5 $\mu\text{g/mL}$ 的GalR2抗体, 并确保为先加入抗体, 再加入甘丙肽; 对照组加入甘丙肽溶解媒PBS。培养基为10%胎牛血清DMEM, 各组3复孔。作用24 h后, 向每孔加入MTT原液(质量浓度5 g/L)20 μL , 继续孵育4 h后, 小心去除培养基, 然后每孔加入二甲基亚砷200 μL , 震荡裂解10 min, 二甲基亚砷空白对照调零, 酶标测试仪测定A值, 测定波长为492 nm, 参考波长为620 nm, $A = A_{492} - A_{620}$, 实验重复3次。

统计学处理 采用SAS6.0统计学软件进行分析, 计量资料用mean \pm SD表示, 组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 原代分离培养HSC形态学变化 新分离获得的HSC, 台盼蓝染色显示活细胞约95%, 细胞小而圆(图1A)。培养24 h后, 细胞开始贴壁。培养7 d时细胞膜状伸展, 活化为肌成纤维母细胞样细胞(图1B)。

2.2 甘丙肽及其受体在静止期及活化期HSC中差异表达 RT-PCR结果显示, 在静止期及培养7 d(活化期)HSC中均可检测到甘丙肽及GalR3 mRNA表达, 但均无GalR1表达。活化HSC中有显著GalR2 mRNA表达, 但并不见于静止期HSC中(图2)。

2.3 大鼠HSC-T6细胞株表达GalR2蛋白 免疫荧光细胞化学法结果显示, GalR2在HSC-T6细胞株胞膜及胞浆中呈高表达, 荧光显微镜下可见明显特异性绿色荧光, 而阴性对照组无特异性荧光(图3)。

2.4 甘丙肽及GalR2对HSC-T6活力的影响 不同浓度甘丙肽干预HSC-T6 24 h后, 当甘丙肽终浓度为10、100和1000 nmol/L时, A值与空白对照组相比有统计学差异($P < 0.05$), 且甘丙肽终浓度为100 nmol/L时, A值降到最低, 其余浓度甘丙肽

■应用要点

抑制甘丙肽2型受体, 将有效提高甘丙肽对活化HSC的增殖抑制效应, 恢复活化HSC对甘丙肽的正常生物学功能. 甘丙肽2型受体抑制剂可能有重要抗肝纤维化作用.

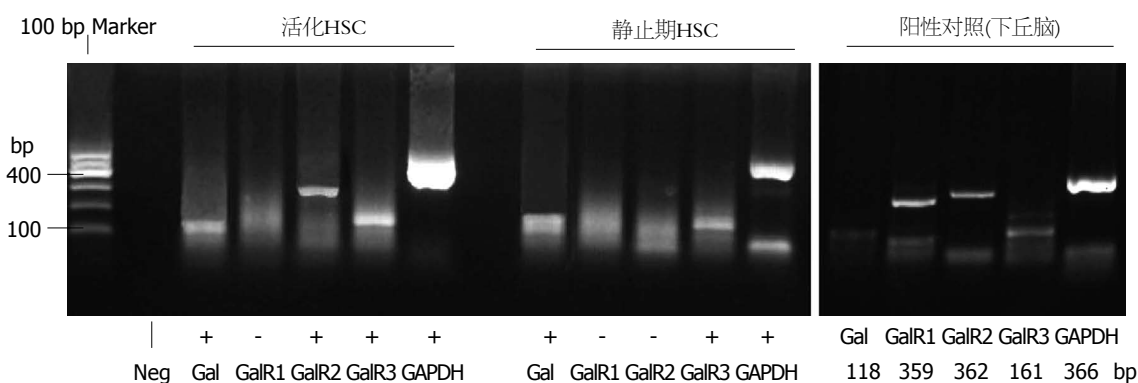


图2 甘丙肽及其受体在静止期及活动期HSC中表达. Neg: 无核酸水阴性对照; Gal: 甘丙肽; GalR1、2和3: 甘丙肽受体1、2和3型. +: 阳性表达; -: 无表达. HSC: 肝星状细胞.

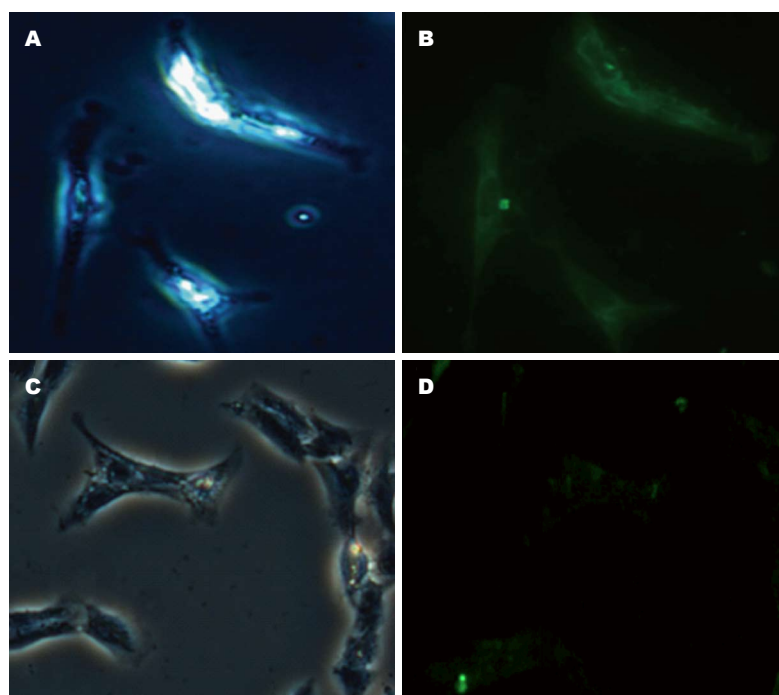


图3 HSC-T6中GalR2免疫荧光细胞化学染色($\times 100$). A: 抗GalR2抗体组倒置显微镜下HSC-T6形态; B: 抗体组, 荧光显微镜下显示蛋白在HSC-T6中阳性表达(绿色); C: 无一抗阴性对照组, 倒置显微镜下HSC-T6形态; D: 阴性, 无明显阳性表达.

对HSC-T6增殖无明显影响. 与单纯甘丙肽处理组相比, GalR2抗体中和组A值明显降低, 在1-10 mmol/L时差别有统计学意义($P < 0.05$, 图4).

3 讨论

本实验利用原代HSC分离培养和大鼠HSC-T6细胞系, 证实静止期和活化HSC均表达甘丙肽及GalR3受体. 更重要的是, 活化HSC新表达GalR2. 新表达GalR2可能拮抗甘丙肽通过GalR1受体介导的HSC增殖抑制作用. 因此, HSC活化过程中, 可通过改变甘丙肽受体表达类型, 改变甘丙肽对其生物学效应.

虽然在能量代谢上甘丙肽生物学功能与瘦素关系密切, 但是目前甘丙肽与瘦素在肝内生物学功能认识水平差距巨大. 瘦素在肝纤维化

进展中起重要作用. 瘦素作用于活化HSC, 可促进HSC增殖并抑制其凋亡^[4,5,15]. 瘦素还促进肝内转化生长因子- $\beta 1$ 、血小板衍生生长因子等细胞因子的表达; 减少基质金属蛋白酶1形成和促细胞外基质沉积; 并能上调促炎症因子和促血管因子, 促进肝纤维化进展^[4,5,15]. 然而, 甘丙肽在肝内作用的认识目前仅限于其参与糖原等能量代谢调控的交感神经肽功能, 甘丙肽在肝脏多种疾病(脂肪肝、肝纤维化、急性肝损伤等)发生发展过程中作用迄今鲜有报道^[16].

为明确甘丙肽及其受体是否直接参与调控肝纤维化发生发展, 首先需要了解甘丙肽受体是否在HSC中表达, 因为HSC活化增殖是肝纤维化发生的中心环节, 而受体表达是甘丙肽作用的物理基础. 本实验利用原代分离的静止

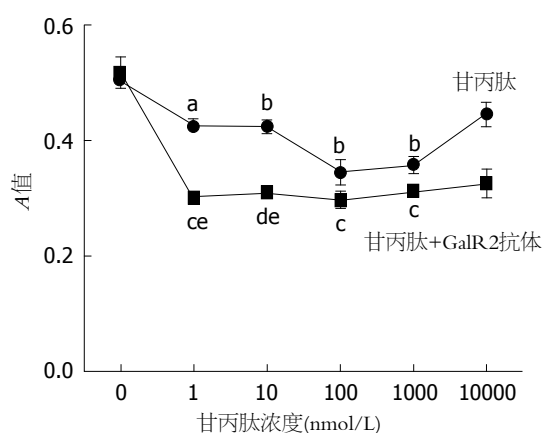


图4 甘丙肽和GalR2抗体对HSC-T6增殖影响. 单纯甘丙肽组中, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 相应对照组(甘丙肽浓度0); 甘丙肽+GalR2中和抗体组中, GalR2中和抗体浓度均为5 $\mu\text{g/mL}$, ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs 相应对照组(甘丙肽浓度0+对照IgG); ^e $P<0.05$ vs 相应浓度的单纯甘丙肽组.

期HSC、体外培养活化HSC和永生化大鼠活化HSC细胞系HSC-T6,发现甘丙肽及GalR3在静止期和活化HSC中均持续表达,而GalR2在HSC活化后全新表达. GalR2的表达变化在mRNA和蛋白水平均得到了证实. 我们的发现与Waters等^[17]的研究结果相似,他们在正常肝组织及静止期HSC中检测到GalR3 mRNA的表达;而我们曾经报道在肝组织中检测到GalR3和甘丙肽表达,且在脂肪性肝炎阶段才出现GalR2表达^[16]. 目前研究未能明确HSC新表达GalR2的分子机制,我们推测这可能是HSC活化时一系列基因表达改变的一部分,其意义与功能,值得深入研究.

甘丙肽不同受体存在生物学功能差异在其他研究中已有报道. 不同甘丙肽受体序列上的差异对于其偶联不同的G蛋白和下游信号系统至关重要. 在神经元细胞中, GalR2不仅可与Gq/11蛋白偶联,引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,及Cl-依赖的 Ca^{2+} 通道开放,也可以与Gi/o蛋白偶联,抑制腺苷酸环化酶活性^[18];而GalR3可与Gi/o蛋白偶联,抑制腺苷酸环化酶而激活与其共表达的内向整流钾通道,从而对情绪、摄食、代谢和垂体激素释放等生理过程起调节作用^[19]. 颈肿瘤细胞中GalR2介导细胞增殖抑制而非GalR1^[6]. Tofighi等^[9]在嗜铬细胞瘤PC12细胞株中发现,甘丙肽通过GalR2抑制细胞增殖、介导细胞凋亡,该机制与Gq/11 G-蛋白转导通路有关. 因此,在HSC活化增殖过程中,甘丙肽与其受体结合后可能正是通过Gq/11或Gi/o蛋白信号转导通路,激活和/或抑制肌醇磷脂转化率,对某些关键基因进行磷酸化/去磷酸化调控,发挥其调控HSC增

殖的作用.

甘丙肽、GalR2和GalR3在HSC中表达,为甘丙肽对HSC功能研究提供了坚实的结构基础. 本研究发现实验浓度(10-1000 nmol/L)甘丙肽不同程度抑制HSC-T6增殖,其中以100和1000 nmol/L作用最为明显. 这种作用是增殖抑制而非甘丙肽细胞毒作用,因为实验中未发现细胞出现明显的核固缩和悬浮,且MTT法也证实甘丙肽在100 nmol/L抑制作用达到最大,而后随着浓度的升高,抑制作用不但没有加强反而有所降低. GalR2中和抗体抑制GalR2时,活化HSC中GalR3的被甘丙肽单独激活表现为更加显著的增殖抑制,即使在低浓度甘丙肽(1 nmol/L)中亦如此. 这提示在HSC活化后,新表达的GalR2使甘丙肽通过GalR3介导的对HSC的增殖抑制作用显著减弱. 这是活化HSC功能转化的又一重要特征,其生物学意义尚待更深入研究.

总之,本实验初步证实甘丙肽及其GalR3存在于HSC中,且在HSC活化过程中新表达GalR2,影响HSC对甘丙肽的生物学反应. 新表达GalR2的重要生物学意义需要更深入研究,特别是其与HSC活化、增殖、抗凋亡和分泌等的关系,使甘丙肽可能成为预防及治疗肝纤维化的新靶点.

4 参考文献

- Kocabayoglu P, Friedman SL. Cellular basis of hepatic fibrosis and its role in inflammation and cancer. *Front Biosci (Schol Ed)* 2013; 5: 217-230 [PMID: 23277047]
- Brenner DA, Kisseleva T, Scholten D, Paik YH, Iwaisako K, Inokuchi S, Schnabl B, Seki E, De Minicis S, Oesterreicher C, Taura K. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012; 5 Suppl 1: S17 [PMID: 23259769 DOI: 10.1186/1755-1536-5-S1-S17]
- Li J, Ghazwani M, Zhang Y, Lu J, Li J, Fan J, Gandhi CR, Li S. miR-122 regulates collagen production via targeting hepatic stellate cells and suppressing P4HA1 expression. *J Hepatol* 2013; 58: 522-528 [PMID: 23178710 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.011]
- Wang J, Leclercq I, Brymora JM, Xu N, Ramezani-Moghadam M, London RM, Brigstock D, George J. Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. *Gastroenterology* 2009; 137: 713-723 [PMID: 19375424 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.04.011]
- Marra F, Navari N, Vivoli E, Galastri S, Provenzano A. Modulation of liver fibrosis by adipokines. *Dig Dis* 2011; 29: 371-376 [PMID: 21894007 DOI: 10.1159/000329799]
- Kanazawa T, Misawa K, Carey TE. Galanin receptor subtypes 1 and 2 as therapeutic targets in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14: 289-302 [PMID: 20148716]
- Poritsanos NJ, Mizuno TM, Lautatzis ME, Vrontakis M. Chronic increase of circulating galanin levels induces obesity and marked alterations in lipid me-

■同行评价

本文探讨了甘丙肽及其受体在大鼠原代HSC中的表达以及对细胞增殖的影响,具有重要的基础研究意义.

- tabolism similar to metabolic syndrome. *Int J Obes* (Lond) 2009; 33: 1381-1389 [PMID: 19773738 DOI: 10.1038/ijo.2009.187]
- 8 Lang R, Kofler B. The galanin peptide family in inflammation. *Neuropeptides* 2011; 45: 1-8 [PMID: 21087790 DOI: 10.1016/j.npep.2010.10.005]
- 9 Tofighi R, Joseph B, Xia S, Xu ZQ, Hamberger B, Hökfelt T, Ceccatelli S. Galanin decreases proliferation of PC12 cells and induces apoptosis via its subtype 2 receptor (GalR2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2717-2722 [PMID: 18272487 DOI: 10.1073/pnas.0712300105]
- 10 Barrachina MD, Martínez V, Wei JY, Taché Y. Leptin-induced decrease in food intake is not associated with changes in gastric emptying in lean mice. *Am J Physiol* 1997; 272: R1007-R1011 [PMID: 9087668]
- 11 Yuan CS, Dey L, Xie JT, Aung HH. Gastric effects of galanin and its interaction with leptin on brainstem neuronal activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 488-493 [PMID: 11961047]
- 12 Karatayev O, Baylan J, Leibowitz SF. Increased intake of ethanol and dietary fat in galanin over-expressing mice. *Alcohol* 2009; 43: 571-580 [PMID: 20004335 DOI: 10.1016/j.alcohol.2009.09.025]
- 13 Li RY, Song HD, Shi WJ, Hu SM, Yang YS, Tang JF, Chen MD, Chen JL. Galanin inhibits leptin expression and secretion in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 11-19 [PMID: 15291739]
- 14 Chen YW, Liu BW, Zhang YJ, Chen YW, Dong GF, Ding XD, Xu LM, Pat B, Fan JG, Li DG. Preservation of basal AcSDKP attenuates carbon tetrachloride-induced fibrosis in the rat liver. *J Hepatol* 2010; 53: 528-536 [PMID: 20646773]
- 15 Yang YY, Huang YT, Tsai TH, Hou MC, Lee FY, Lee SD, Lin HC. Kupffer cell depletion attenuates leptin-mediated methoxamine-stimulated portal perfusion pressure and thromboxane A2 release in a rodent model of NASH-cirrhosis. *Clin Sci (Lond)* 2012; 123: 669-680 [PMID: 22734967 DOI: 10.1042/CS20110572]
- 16 李郑红, 段晓燕, 陈源文, 徐雷鸣, 丁永年, 范建高. 甘丙肽在高脂饮食诱导脂肪性肝病大鼠循环中动态变化. *胃肠病学和肝病学杂志* 2012; 5: 458-461
- 17 Waters SM, Krause JE. Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues. *Neuroscience* 2000; 95: 265-271 [PMID: 10619483]
- 18 Kolakowski LF, O'Neill GP, Howard AD, Brousard SR, Sullivan KA, Feighner SD, Sawzdargo M, Nguyen T, Kargman S, Shiao LL, Hreniuk DL, Tan CP, Evans J, Abramovitz M, Chateaufneuf A, Coulombe N, Ng G, Johnson MP, Tharian A, Khoshbouei H, George SR, Smith RG, O'Dowd BF. Molecular characterization and expression of cloned human galanin receptors GALR2 and GALR3. *J Neurochem* 1998; 71: 2239-2251 [PMID: 9832121]
- 19 Smith KE, Walker MW, Artymyshyn R, Bard J, Borowsky B, Tamm JA, Yao WJ, Vaysse PJ, Branchek TA, Gerald C, Jones KA. Cloned human and rat galanin GALR3 receptors. Pharmacology and activation of G-protein inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 1998; 273: 23321-23326 [PMID: 9722565]

编辑 黄新珍 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 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. (《世界华人消化杂志》编辑部)

N-乙酰半胱氨酸在减轻大鼠重症急性胰腺炎肠损伤中的作用

牛天平, 王映珍, 曹云华, 王军, 李自力, 肖文, 张有成, 王世文

牛天平, 王军, 李自力, 肖文, 甘肃省紧急医疗救援中心 甘肃省兰州市 730030

王映珍, 王世文, 甘肃省第二人民医院重症医学科 甘肃省兰州市 730000

王映珍, 曹云华, 张有成, 兰州大学第二医院普外科 甘肃省兰州市 730030

牛天平, 主要从事内科急危重症的临床及科研工作.

甘肃省卫生行业科研计划管理基金资助项目, No. GWGL2010-14

作者贡献分布: 此课题由张有成、王世文及王军指导; 王映珍与牛天平设计; 研究过程由王映珍、曹云华、李自力及肖文完成; 研究经费由甘肃省紧急医疗救援中心提供; 数据分析与论文写作由王映珍完成.

通讯作者: 王映珍, 副主任医师, 730030, 甘肃省兰州市城关区和政西街1号, 甘肃省第二人民医院重症医学科. yingzhen-wang@hotmail.com

电话: 0931-8487315

收稿日期: 2013-02-04 修回日期: 2013-03-25

接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-08

N-acetylcysteine ameliorates severe acute pancreatitis-associated intestinal injury in rats

Tian-Ping Niu, Ying-Zhen Wang, Yun-Hua Cao, Jun Wang, Zi-Li Li, Wen Xiao, You-Cheng Zhang, Shi-Wen Wang

Tian-Ping Niu, Jun Wang, Zi-Li Li, Wen Xiao, Emergency Medical Rescue Center of Gansu Province, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Ying-Zhen Wang, Shi-Wen Wang, Second People's Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Ying-Zhen Wang, Yun-Hua Cao, You-Cheng Zhang, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Supported by: the Research Plan Management Project of Health Department of Gansu Province in 2010, No. GWGL2010-14

Correspondence to: Ying-Zhen Wang, Associate Chief Physician, Second People's Hospital of Gansu Province, 1 Hezheng West Street, Chengguan District, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. yingzhenwang@hotmail.com

Received: 2013-02-04 Revised: 2013-03-25

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of treatment with n-acetylcysteine (NAC) on plasma levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β)

and IL-10 and ICAM1 expression in small intestine tissue in rats with severe acute pancreatitis (SAP) and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Seventy Wistar rats were randomly divided into a sham operation group (SO, $n = 24$), a SAP group ($n = 24$) and a NAC treatment group ($n = 24$). SAP was induced in rats by injecting 5.0% sodium taurocholate into the biliary-pancreatic duct. Rats in the SO group were given an infusion of normal saline instead. Rats in the NAC group underwent SAP induction and were given an intraperitoneal injection of NAC 1 hour before the operation, and rats in the SO group and SAP group were given an intraperitoneal injection of normal saline. Eight rats were sacrificed 6, 12 or 24 h after operation in each group. Plasma levels of amylase (AMY), endotoxin, diamine oxidase (DAO), D-lactic acid, TNF- α , IL-1 β and IL-10 were measured. Pathologic changes in the small intestine were observed and scored. ICAM1 mRNA and protein expression in the small intestine was tested by real-time PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: Compared to the SAP group, plasma levels of AMY, TNF- α and IL-1 β were significantly lower at all three time points (all $P < 0.05$) and serum levels of endotoxin, DAO and D-lactic acid were significantly lower at 12 and 24 h (both $P < 0.05$) in the NAC group. Serum levels of IL-10 in the NAC group were increased compared to the SAP group at all three time points. The pathology score of the small intestine was significantly lower in the NAC group than the SAP group at 12 and 24 h. Although the mRNA expression of ICAM1 was increased at each time point in the SAP group compared with the SO group, it was significantly decreased in the NAC group compared with the SAP group (6 h: 1.13 ± 0.28 vs 2.37 ± 0.63 ; 12 h: 1.27 ± 0.34 vs 2.94 ± 0.82 ; 24 h: 1.19 ± 0.26 vs 2.68 ± 0.95 ; all $P < 0.05$). The protein expression of ICAM1 had the same trend as the mRNA expression between the NAC and SAP groups (6 h: 0.74 ± 0.11 vs 1.04 ± 0.25 ; 12 h: 0.88 ± 0.17 vs 1.25 ± 0.33 ; 24 h: 0.75 ± 0.13 vs 1.18 ± 0.22 ; all $P < 0.05$).

■背景资料

肠道是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者最易发生损害的脏器之一,而由此导致的肠屏障功能障碍是重症急性胰腺炎患者发生细菌移位、内毒素血症和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome)的始动因素,因此寻求有效的治疗措施,早期保护肠屏障功能对SAP的防治具有重要意义.

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外二科; 郭晓钟, 教授, 沈阳军区总医院消化内科; 陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院办

■ 研究前沿

本文通过建立大鼠SAP模型并应用N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)进行早期干预, 观察NAC对SAP大鼠血浆肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-10水平及小肠组织细胞间黏附分子1表达的影响, 以进一步探讨其对SAP时肠损伤的影响以及可能机制。

CONCLUSION: Administration of NAC ameliorates severe acute pancreatitis-associated intestinal injury in rats possibly by regulating plasma levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 and inhibiting ICAM1 expression in the small intestine.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: N-acetylcysteine; Severe acute pancreatitis; Intestinal injury; Intercellular adhesion molecules 1; Tumor necrosis factor-alpha; Interleukin-1beta; Interleukin-10

Niu TP, Wang YZ, Cao YH, Wang J, Li ZL, Xiao W, Zhang YC, Wang SW. N-acetylcysteine ameliorates severe acute pancreatitis-associated intestinal injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1211-1217 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1211.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1211>

摘要

目的: 观察N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠血浆肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-10及小肠组织细胞间黏附分子1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM1)表达的影响, 并探讨其对大鼠SAP相关肠损伤保护作用的机制。

方法: 72只Wistar大鼠随机分为假手术组(SO组)、SAP组及NAC干预组(NAC组)。每组再分为6、12、24 h共3个时相点, 每个时相点各8只大鼠。通过胰胆管逆行注射5%牛磺胆酸钠制作大鼠SAP模型, SO组用同样方法经胰胆管逆行注射生理盐水, NAC组大鼠在制作SAP模型前1 h经腹腔注射NAC, SO组及SAP组在术前1 h经腹腔注射同NAC等体积的生理盐水。动物分别于术后6、12、24 h麻醉后取材, 检测血浆淀粉酶(plasma amylase, AMY)、内毒素、D-乳酸、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、TNF- α 、IL-1 β 及IL-10含量, 观察小肠组织病理学变化并进行评分, 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测小肠组织ICAM1 mRNA的表达, Western blot法检测小肠组织ICAM1蛋白变化。

结果: NAC组各时相点大鼠AMY、TNF- α 及IL-1 β 水平均较SAP组各对应时相点降低, IL-10水平则明显增高, 内毒素、DAO和D-乳酸在12和24 h时也明显降低; SO组大鼠小肠组织无明显病理学改变, NAC组大鼠小肠病理改变较SAP组明显改善, 小肠组织病理学评分在12及24 h亦明显降低。NAC组大鼠小肠组

织中ICAM1 mRNA(6 h: 1.13 ± 0.28 vs 2.37 ± 0.63 ; 12 h: 1.27 ± 0.34 vs 2.94 ± 0.82 ; 24 h: 1.19 ± 0.26 vs 2.68 ± 0.95 , 均 $P < 0.05$)及蛋白(6 h: 0.74 ± 0.11 vs 1.04 ± 0.25 ; 12 h: 0.88 ± 0.17 vs 1.25 ± 0.33 ; 24 h: 0.75 ± 0.13 vs 1.18 ± 0.22 , 均 $P < 0.05$)的表达与SAP组相应时相点比较均明显减弱。

结论: NAC可以减轻SAP大鼠肠损伤, 其机制除其可以抑制TNF- α 、IL-1 β 并促进IL-10的释放外, 还可能与其对小肠组织ICAM1表达的调节作用有关。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: N-乙酰半胱氨酸; 重症急性胰腺炎; 肠损伤; 细胞间黏附分子1; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素10

核心提示: 抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine)可以减轻大鼠重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis)相关肠损伤, 其机制除可以调节促炎及抗炎因子的平衡外, 对小肠组织中细胞间黏附分子1(intercellular cell adhesion molecule-1)表达的调节亦发挥一定的作用。

牛天平, 王映珍, 曹云华, 王军, 李自力, 肖文, 张有成, 王世文. N-乙酰半胱氨酸在减轻大鼠重症急性胰腺炎肠损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 2013; 21(13): 1211-1217 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1211.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1211>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)约占急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的10%-15%, 死亡率可高达20%-30%^[1,2], 而多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)和感染是SAP相关死亡的主要原因^[3]. SAP时众多因素导致的肠屏障功能障碍(intestine barrier functional disturbance, IBFD)是发生细菌移位、内毒素血症和MODS的始动因素^[4,5], 因此早期保护肠屏障功能对SAP的防治具有重要作用^[6]. N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是一种含有巯基的抗氧化剂, 实验研究表明, NAC具有抗氧化自由基、稳定细胞膜、抑制炎症反应等广泛的生物学作用和活性^[7-11]. 本研究通过建立大鼠SAP模型并应用NAC进行干预, 观察NAC对SAP大鼠血浆肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-10水平及小肠组织细胞间黏附分子1(intercel-

lular cell adhesion molecule-1, ICAM1)表达的影响, 以进一步探讨其对大鼠SAP相关肠损伤保护作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠由兰州大学医学实验动物中心提供。动物术前禁食12 h, 自由饮水。NAC及牛磺胆酸钠购自Sigma公司; 内毒素(endotoxin)测定试剂盒购自厦门鲎试剂实验厂有限公司; TNF- α 、IL- β 及IL-10 ELISA试剂盒均购自北京达科为生物技术有限公司; RNAiso Plus及实时荧光定量PCR(real-time PCR)相关试剂购自大连宝生物公司; ICAM1引物由大连宝生物公司合成; ICAM1多克隆兔抗鼠抗体、 β -actin兔抗鼠抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗Ig G购自北京博奥森。

1.2 方法

1.2.1 实验分组: 72只健康Wistar大鼠, SPF级, 体重200-220 g, 雌雄不限, 随机分为SO组、SAP组、NAC组, 每组再分为3个时相点(6、12、24 h), 每个时相点8只大鼠。

1.2.2 动物模型的制备: 2%戊巴比妥钠溶液(0.25 mL/100 g体重)腹腔内注射麻醉后, 大鼠平卧位固定, 常规备皮、消毒铺巾。上腹部正中切口进腹, 仔细辨认十二指肠肠壁内侧潜行的十二指肠乳头后, 用5号注射针头于十二指肠乳头对侧缘无血管区肠壁刺一小孔, 用特制细塑硅胶管经小孔进入十二指肠肠腔后, 沿十二指肠乳头方向插入胰胆管, 以2枚血管夹分别夹持贴近十二指肠的胰胆管远段和肝门处胆总管后, 导管末端连接输液转换器, SAP组和NAC组以0.2 mL/min的速度向胰胆管内逆行注入5%牛磺胆酸钠溶液, SO组用生理盐水代替牛磺胆酸钠溶液, 剂量均为0.10 mL/100 g体重。注射完毕后, 停留5 min, 移去显微血管夹和细塑硅胶管, 缝合十二指肠外侧壁小孔, 观察SAP组和NAC组大鼠胰腺出现水肿伴出血灶后, 用消毒棉球吸干腹腔内残留麻药, 缝合腹壁各层。NAC组于术前1小时经腹腔注射NAC溶液500 μ g/kg(浓度50 μ g/mL, pH = 7.3), 即10 mL/kg, 而SO组及SAP组则于相同时间点经上述途径注射生理盐水10 mL/kg。大鼠术后禁食, 自由饮水。

1.2.3 标本采集及预处理: 各组动物于相应时相点麻醉后无菌条件下取右心室血5 mL加入灭热源的肝素抗凝管, 分离血浆后保存于-80 $^{\circ}$ C待检。取距回盲部2 cm处回肠组织长约5 cm, 置于冰冷

的生理盐水中, 沿纵轴剪开肠管, 冲洗干净肠内容物, 用滤纸吸干水后, 部分用10%中性甲醛固定做病理形态学检查, 其余装入用DEPC处理过的冻存管后即刻投入液氮内保存待检。

1.2.4 指标检测: (1)血浆淀粉酶检测, 用全自动生化分析仪测定; (2)血浆TNF- α 、IL- β 及IL-10检测: 采用双抗夹心ELISA法, 严格按照说明书操作, 用酶标仪测定A值后, 以标准品的浓度和A值绘制标准曲线, 从标准曲线计算样品对应浓度, 单位均为pg/mL; (3)血浆内毒素、DAO及D-乳酸检测: 改良的鲎试剂凝胶法测定血浆内毒素含量, 单位为ng/L; 分光光度法测定血浆DAO及D-乳酸含量, 单位分别为U/mL和 μ g/mL; (4)小肠组织病理形态学观察及评分: 小肠组织石蜡切片行苏木素-伊红染色(HE染色), 由两名病理医师盲法采用Chiu氏6级评分法^[12]评估损伤程度并评分, 取其平均值; (5)Real-time PCR法检测小肠组织ICAM1 mRNA的表达: 称取80-100 mg超低温冻结的小肠组织样品, 用RNAiso Plus提取总RNA并测定浓度, 取总量500 ng RNA进行反转录, 体系为10 μ L, 反转录反应条件如下: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。采取Real-time PCR扩增ICAM1 mRNA, 反应体系为25 μ L, 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C变性30 s; 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 共40个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。ICAM1引物: 上游引物5'-GGCGTCCATTTACACCTATT-3', 下游引物5'-TTCCTTTTCTTCTCTTGCTTG-3'(413 bp); β -actin引物: 上游引物5'-GCAAGTACTCTGTGTGGATTGG-3', 下游引物5'-AATCAAAGTCCTCAGCCACATT-3'(395 bp), 实验重复3次, 选用 β -actin作为内参。用Rotor-Gene 6000荧光定量PCR仪自带软件进行数据分析, 采用比较CT值法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)进行PCR相对定量; (6)Western blot检测小肠组织ICAM1蛋白表达: 取50-100 mg冰冻小肠组织用预冷的PBS洗涤2次, 离心弃去PBS, 置于玻璃匀浆器中剪成碎块, 加入0.5-1.0 mL预冷的蛋白裂解液, 用玻璃匀浆器充分匀浆后12000 g、4 $^{\circ}$ C离心30 min, 将上清转移到新的离心管中, 取适量上清用BCA蛋白浓度试剂盒进行定量, 剩余溶液溶于5 \times loading buffer后95 $^{\circ}$ C变性15 min, 取总量40 μ g蛋白, 用5%浓缩胶、15%分离胶进行电泳, 恒流20 mA下待溴酚蓝进入分离胶时改为恒流30 mA继续电泳, 直到溴酚蓝移至胶底时终止电泳。根据预染Maker指示, 恒压100 V、60 min将相应蛋白转移至PVDF膜上, 转膜结束后将PVDF膜立即移

■ 相关报道

国内外关于NAC在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)中的研究主要是从他通过清除氧自由基、抑制NF- κ B的激活、抑制MAPK的活性、降低腺细胞内钙离子浓度及减少细胞因子的合成和释放, 从而阻断胰腺炎的发生发展, 对AP具有重要的治疗保护作用等方面, 另外NAC对肠缺血再灌注、炎症性肠病、烧伤、感染及放化疗损伤等多种疾病导致的肠屏障功能障碍亦具有一定的防治作用。

■创新盘点

早期予以NAC对大鼠重症急性胰腺炎相关肠损伤具有一定的保护作用,其机制除与NAC可降低血浆促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 的水平,同时增加抗炎细胞因子IL-10的作用外,还与其对小肠组织细胞间黏附分子1的调节有关。

表 1 各组大鼠血浆淀粉酶及小肠组织病理学评分情况 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	淀粉酶(U/L)			肠组织病理学评分		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
SO组	1562.38 \pm 760.19	1572.50 \pm 635.90	1322.75 \pm 334.64	0.63 \pm 0.23	0.75 \pm 0.26	0.68 \pm 0.29
SAP组	3467.16 \pm 534.29 ^b	4578.33 \pm 614.09 ^b	4100.80 \pm 280.97 ^b	2.38 \pm 1.06 ^a	2.88 \pm 0.99 ^a	2.75 \pm 0.71 ^b
NAC组	3063.38 \pm 676.33	2477.00 \pm 262.25 ^d	2336.38 \pm 279.92 ^d	1.63 \pm 0.52	1.08 \pm 0.52 ^d	1.25 \pm 0.46 ^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SO组相应时间点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SAP组相应时间点。

表 2 各组大鼠血浆内毒素、DAO及D-乳酸检测结果 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	内毒素(ng/L)			DAO(U/mL)			D-乳酸(mg/L)		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
SO组	41.0 \pm 6.2	39.1 \pm 7.3	35.2 \pm 6.3	0.41 \pm 0.11	0.43 \pm 0.15	0.34 \pm 0.16	4.09 \pm 1.76	3.53 \pm 0.93	3.74 \pm 1.02
SAP组	137.5 \pm 19.0 ^b	168.6 \pm 20.6 ^b	173.4 \pm 21.1 ^b	0.99 \pm 0.50 ^a	1.94 \pm 0.42 ^b	2.81 \pm 0.80 ^b	9.74 \pm 1.96 ^b	11.73 \pm 2.71 ^b	15.39 \pm 3.05 ^b
NAC组	127.5 \pm 12.4 ^b	142.5 \pm 13.3 ^{bc}	128.7 \pm 15.2 ^{bd}	1.44 \pm 0.49 ^b	1.32 \pm 0.31 ^{bc}	1.26 \pm 0.24 ^{bd}	7.36 \pm 1.48 ^b	8.23 \pm 2.98 ^{bc}	10.24 \pm 1.65 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SO组相应时间点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SAP组相应时间点。

至5%脱脂牛奶封闭液中,室温下摇床上摇动封闭2 h。然后将封闭好的膜放入溶有兔抗鼠一抗(ICAM1 1:500; β -actin 1:1000)的新鲜配制的TBST中,室温下摇床上摇动1 h后4 $^{\circ}$ C孵育过夜。第2天取出置于摇床上室温下摇动1 h, TBST洗涤8 min \times 5次后,置于封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(IgG 1:10000)中,室温下摇床上摇动2 h, TBST洗涤8 min \times 5次。ECL显色后在暗室内曝光,显影定影,自来水冲洗晾干后胶片用扫描仪扫描成像,用Quantity-One软件测定灰度值,目的蛋白与 β -actin灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示,采用SPSS13.0进行统计学处理,组间差异比较采用方差分析,多重比较采用SNK法或LSD法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

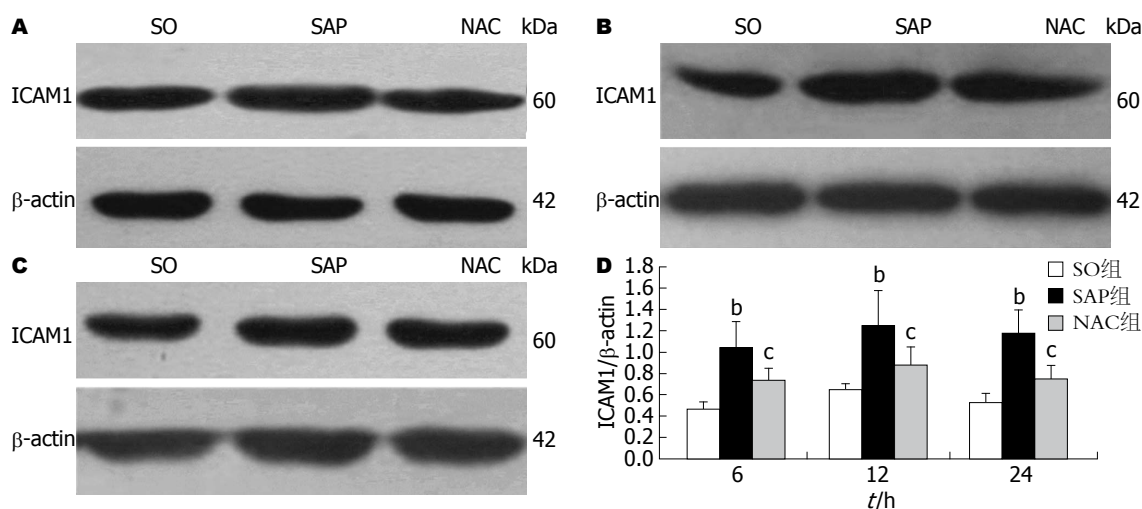
2.1 血浆淀粉酶(amylase, AMY) 结果示SAP组各时相点大鼠血浆AMY与SO组各相应时相点相比均显著升高(均 $P < 0.05$); NAC组6 h大鼠血浆AMY与SAP组相比虽然有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),而12和24 h时均明显降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),尤以12 h最为显($P < 0.01$, 表1)。

2.2 小肠组织损伤病理评分 小肠组织HE染色示SO组无明显病理改变; SAP组大鼠6 h即有小肠壁充血、水肿、伴少量炎症细胞浸润,少部分绒毛融合、脱落、缺损,此后上述改变逐渐加重,尤以24 h更明显; NAC组大鼠上述病理变化与SAP组相应时相点相比均明显减轻。SAP组大鼠小肠组织病理学评分较SO组各相应时相点均明显增高($P < 0.05$),而NAC组则较SAP组各相应时相点明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.3 血浆内毒素 SAP组大鼠血浆内毒素浓度与SO组各相应时相点相比均明显增高(均 $P < 0.01$),而NAC组大鼠血浆内毒素浓度在6 h虽较SAP组相应时相点为低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),12及24 h与SAP组相应时相点相比则明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。

2.4 血浆DAO水平变化 SAP组大鼠血浆DAO浓度与SO组各相应时相点相比均增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),尤以12和24 h为显($P < 0.01$)。NAC组大鼠在6 h与SAP组相应时相点相比仍处于较高水平,但12和24 h与SAP组相应时相点相比则明显下降,尤以24 h为显($P < 0.01$, 表2)。

2.5 血浆D-乳酸水平变化 SAP组大鼠血浆D-乳酸水平与SO组各对应时相点相比均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$); NAC治疗组与SAP组各相应时相比,6 h虽有所降低,但差异无统



■应用要点
NAC可以减轻大鼠SAP相关肠损伤的分子机制, 以期SAP相关肠损伤的治疗寻找一条新途径, 为临床上SAP的综合治疗提供实验依据和新思路。

图 1 NAC对各组大鼠小肠组织ICAM1蛋白表达的影响. A, B, C: 6、12、24 h各组大鼠小肠组织ICAM1蛋白Western blot分析典型图; D: 各组大鼠不同时相点小肠组织ICAM1蛋白的相对表达量. ^b $P<0.01$ vs SO组相应时间点; ^c $P<0.05$ vs SAP组相应时间点.

表 3 各组大鼠血浆TNF- α 、IL- β 及IL-10检测结果 ($n=8$, mean \pm SD)

分组	TNF- α (pg/mL)			IL- β (pg/mL)			IL-10(pg/mL)		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
SO组	42.9 \pm 9.6	36.4 \pm 8.9	42.1 \pm 10.3	36.5 \pm 9.6	40.1 \pm 10.7	42.6 \pm 8.8	79.6 \pm 14.9	74.3 \pm 10.6	80.5 \pm 15.8
SAP组	106.1 \pm 26.8 ^b	127.4 \pm 29.1 ^b	121.6 \pm 25.3 ^b	96.4 \pm 19.6 ^b	101.8 \pm 20.1 ^b	106.3 \pm 22.4 ^b	46.1 \pm 7.8 ^a	40.3 \pm 6.4 ^a	42.9 \pm 7.5 ^a
NAC组	65.3 \pm 13.2 ^{ac}	75.2 \pm 16.9 ^{ac}	70.7 \pm 11.8 ^{ac}	63.2 \pm 15.9 ^{ac}	70.1 \pm 16.4 ^{ac}	79.8 \pm 18.1 ^{bd}	56.8 \pm 11.2 ^a	57.7 \pm 9.6 ^{ac}	62.6 \pm 12.1 ^{ac}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs SO组相应时间点; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs SAP组相应时间点.

计学意义; 12和24 h时则均明显下降($P<0.05$), 尤以24 h最为显著($P<0.01$, 表2).

2.6 血浆TNF- α 、IL- β 及IL-10水平变化 标准曲线拟合度分别为0.9987, 0.9925和0.9936. SAP组大鼠血浆TNF- α 水平均明显高于SO组各相应时相点, 12 h达高峰, 而NAC组与SAP组各相应时相点相比均明显下降, 差异均有统计学意义($P<0.05$). SAP组大鼠血浆IL- β 水平均明显高于SO组各相应时相点, 24 h仍处于较高水平, NAC干预后各时相点均明显下降, 差异有统计学意义($P<0.05$). SAP组大鼠血浆IL-10水平与SO组各对应时相点相比均降低, 但NAC组与SAP组各对应时相点相比均增高, 差异有统计学意义($P<0.05$, 表3).

2.7 小肠组织中ICAM1 mRNA的表达 Real-time PCR结果显示, SAP组大鼠ICAM1 mRNA的表达明显高于SO组各相应时相点(6 h: 2.37 ± 0.63 vs 1; 12 h: 2.94 ± 0.82 vs 1; 24 h: 2.68 ± 0.95 vs 1)(均

$P<0.01$), 12 h即达高峰; NAC组大鼠与SAP组各相应时相点相比则明显下降(6 h: 1.13 ± 0.28 vs 2.37 ± 0.63 ; 12 h: 1.27 ± 0.34 vs 2.94 ± 0.82 ; 24 h: 1.19 ± 0.26 vs 2.68 ± 0.95), 差异均有统计学意义($P<0.05$).

2.8 小肠组织中ICAM1蛋白的表达 Western blot结果显示, 与SO组各相应时相点相比较, ICAM1蛋白的表达在SAP组大鼠均明显增高($P<0.01$), 尤以12 h最为显著; 而在NAC组与SAP各相应时相点相比则明显下降, 差异均有统计学意义($P<0.05$, 图1).

3 讨论

大量研究证实, 肠黏膜损伤、肠屏障功能损害引起的细菌及内毒素移位是导致SAP患者发生继发感染、全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、MODS及死亡率居高不下的主要原因^[3]. 而肠道血流减少和缺血再灌注损伤、内皮完整性破坏、肠道

■同行评价

本文对抗氧化剂NAC在大鼠SAP相关肠损伤中保护作用的机制进行了探讨,拓展了NAC的作用,另外对临床上应该早期重视肠道屏障功能的防护具有一定的提示作用。

微生态改变、自身抵抗力下降及肠黏膜免疫受损、肠动力异常、肠上皮细胞凋亡、胃肠运动及分泌功能障碍、氧化应激以及SIRS与代偿性抗炎反应综合征(compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS)的平衡失调等因素均参与了SAP时IBFD的发生^[3,4]。肠屏障功能一旦受损,肠道细菌及内毒素可以通过肠壁进入外周血循环,因此血浆内毒素水平可以作为肠屏障受损的敏感指标;DAO是人类和所有哺乳动物肠黏膜上层绒毛细胞胞浆中有高度活性的细胞酶,在外周血中活性稳定,他的变化可以反映肠黏膜屏障的完整性和损伤程度;D-乳酸是细菌发酵的代谢产物,肠道多种细菌均可产生,正常情况下很少被吸收,当肠黏膜通透性增加时,大量D-乳酸即通过受损黏膜入血,使血浆D-乳酸水平升高,因此监测他们在血液中的水平及变化可反映肠屏障损害程度和通透性变化^[13,14]。

NAC是天然氨基酸L-半胱氨酸与还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)的前体,是一种含有巯基的抗氧化剂。近年研究表明NAC具有干扰自由基生成,清除自由基,调节细胞的代谢活性、抗细胞凋亡、抑制炎症反应等多种生物学功能及活性^[9,11,15-17]。在NAC对AP作用的研究中发现,NAC可以通过清除氧自由基、抑制核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的激活、抑制MAPK的活性、降低腺细胞内钙离子浓度及减少细胞因子的合成和释放等作用从而可以阻断AP的发生发展^[18],另外NAC对肠缺血再灌注、炎症性肠病、烧伤、感染及放化疗损伤等多种疾病导致的IBFD亦具有一定的防治作用^[16,17]。

我们研究发现,SAP组大鼠血浆AMY水平较SO组相应时相点明显增高,反映肠屏障功能的指标内毒素、D-乳酸及二胺氧化酶亦明显增高;SAP组各时相点大鼠小肠组织病理评分亦明显高于SO组,小肠病理学检查均可见特征性病理改变,这说明SAP早期即存在肠屏障功能的改变。NAC组大鼠血浆AMY水平、小肠病理评分均较SAP组各对应时相点明显降低,小肠病理改变亦明显改善,这说明NAC对SAP所致肠损伤具有一定的保护作用,这与NAC对其他原因导致的IBFD均具有较好的防治作用的研究结果相一致。

SAP时过度释放的炎症介质是发生IBFD的主要原因,促炎因子如TNF- α 、血小板活化因子、IL-1 β 、IL-6、IL-8等的释放促进了全身炎性反应,这种过度的炎性反应引起抗炎物质释放增多,而这一过程可导致免疫抑制,他们共

同参与了IBFD的发生^[4,5,19,20]。本研究发现,SAP时血浆TNF- α 和IL-1 β 的水平均较SO组明显增高,而NAC干预后均可使其降低;另外血浆IL-10的水平在SAP各时相点大鼠均低于SO组,但在NAC组则明显增高,这说明NAC对SAP时肠损伤的保护作用至少部分是与其对促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 及抗炎细胞因子IL-10的调节相关的,在维持SIRS/CARS的平衡中发挥了一定的作用。

黏附分子是存在于细胞表面的一类具有复杂功能的糖蛋白,介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质相互识别、相互黏着及信号传递,在免疫及炎症反应等生理、病理过程中起重要作用^[21]。生理情况下,大多数组织不表达或仅低水平表达ICAM1,炎症反应时ICAM1水平上调且能促进中性粒细胞介导的细胞毒作用。SAP时肠黏膜内皮细胞ICAM1的表达可与白细胞表达的L-选择蛋白相互作用,从而促进了中性粒细胞的边集效应,并且中性粒细胞通过与整合素受体和配体ICAM-1的相互作用迅速黏附到内皮细胞,导致肠黏膜损伤的发生^[4]。本研究发现SAP时大鼠小肠组织中ICAM1 mRNA和蛋白的表达与SO组相应时相点比较均明显增强;而经NAC干预后其表达与SAP各对应时相点相比均明显减弱。这提示NAC可能通过对小肠组织ICAM1的表达的调控,从而抑制SAP导致的中性粒细胞黏附、游走和聚集,并减轻由于补体及中性粒细胞激活所介导的细胞毒性作用,避免肠黏膜内皮细胞受损,而对SAP所致的肠损伤具有一定的保护作用。

总之,本研究表明,NAC能够降低SAP大鼠内毒素血症的发生,对SAP相关肠损伤有一定的保护作用,其机制除与NAC可降低血浆促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 的水平,同时增加抗炎细胞因子IL-10的作用外,还可能与其对小肠组织ICAM1表达的调节作用有关。

4 参考文献

- 1 孙备,董承刚,王刚,姜洪池,孟庆辉,李军.重症急性胰腺炎死亡的高危因素分析.中华外科杂志 2007; 45: 1619-1622
- 2 急性胰腺炎协作组.中国6223例急性胰腺炎病因及病死率分析.胰腺病学 2006; 6: 321-325
- 3 Jha RK, Ma Q, Lei Z, Sha H. Resveratrol ameliorates the deleterious effect of severe acute pancreatitis. Cell Biochem Biophys 2012; 62: 397-402 [PMID: 22042732 DOI: 10.1007/s12013-011-9313-2]
- 4 Zhang XP, Zhang J, Song QL, Chen HQ. Mechanism of acute pancreatitis complicated with injury

- of intestinal mucosa barrier. *J Zhejiang Univ Sci B* 2007; 8: 888-895 [PMID: 18257123]
- 5 韩德五. 肠源性内毒素血症在胰腺炎发病中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2825-2829
- 6 王映珍, 王世文, 李培杰, 党登峰, 孙志江, 王先坤, 徐庆杰. 胰岛素样生长因子-1对重症急性胰腺炎大鼠小肠黏膜上皮细胞bax和bcl-2 mRNA表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1396-1401
- 7 Werner J, Hartwig W, Hackert T, Kaiser H, Schmidt J, Gebhard MM, Büchler MW, Klar E. Multidrug strategies are effective in the treatment of severe experimental pancreatitis. *Surgery* 2012; 151: 372-381 [PMID: 21982067 DOI: 10.1016/j.surg.2011.07.041]
- 8 Oz S, Okay E, Karadenizli A, Cekmen MB, Ozdogan HK. N-acetylcysteine improves intestinal barrier in partially hepatectomized rats. *ANZ J Surg* 2007; 77: 173-176 [PMID: 17305994]
- 9 Johnson ST, Bigam DL, Emara M, Slack G, Jewell LD, Obaid L, Korbitt G, Van Aerde J, Cheung PY. Effects of N-acetylcysteine on intestinal reoxygenation injury in hypoxic newborn piglets resuscitated with 100% oxygen. *Neonatology* 2009; 96: 162-170 [PMID: 19332996 DOI: 10.1159/000210089]
- 10 Takatsuka S, Morita T, Horikiri Y, Yamahara H, Saji H. Absorption enhancement of poorly absorbed hydrophilic compounds from various mucosal sites by combination of mucolytic agent and non-ionic surfactant. *Int J Pharm* 2007; 338: 87-93 [PMID: 17317052]
- 11 Nguyen-Khac E, Thevenot T, Piquet MA, Benferhat S, Gorla O, Chatelain D, Tramier B, Dewaele F, Ghrib S, Rudler M, Carbonell N, Tossou H, Bental A, Bernard-Chabert B, Dupas JL. Glucocorticoids plus N-acetylcysteine in severe alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2011; 365: 1781-1789 [PMID: 22070475 DOI: 10.1056/NEJMoa1101214]
- 12 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483 [PMID: 5457245]
- 13 崔培林, 吕栋, 张峻, 姚士伟, 王燕斌, 杨昭徐. 急性坏死性胰腺炎肠黏膜氧化应激损伤和HIF-1 α 的表达. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 24-30
- 14 栾正刚, 张成, 葛春林, 马晓春, 郭仁宣. 高迁移率族蛋白B1在重症急性胰腺炎肠屏障损害中的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3173-3177
- 15 Ancha HR, Kurella RR, McKimmey CC, Lightfoot S, Harty RF. Effects of N-acetylcysteine plus mesalamine on prostaglandin synthesis and nitric oxide generation in TNBS-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 758-766 [PMID: 18716872 DOI: 10.1007/s10620-008-0438-0]
- 16 Tayman C, Tonbul A, Kosus A, Hirfanoglu IM, Uysal S, Haltas H, Tatli MM, Andiran F. N-acetylcysteine may prevent severe intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2012; 47: 540-550 [PMID: 22424351 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.09.051]
- 17 Hou Y, Wang L, Zhang W, Yang Z, Ding B, Zhu H, Liu Y, Qiu Y, Yin Y, Wu G. Protective effects of N-acetylcysteine on intestinal functions of piglets challenged with lipopolysaccharide. *Amino Acids* 2012; 43: 1233-1242 [PMID: 22180025 DOI: 10.1007/s00726-011-1191-9]
- 18 Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, De Dios I. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1639: 177-184 [PMID: 14636949]
- 19 裴红红, 秦兆寅, 李小珍, 杨正安, 封英群. 实验性胰腺炎时核因子- κ B与p53、bcl-2表达的关系. *中国急救医学* 2003; 23: 20-21
- 20 王世文, 陈东东, 李培杰, 李忠信, 高宁, 张笠. 吗替麦考酚酯对重症急性胰腺炎大鼠脑损伤的保护作用研究. *中国急救医学* 2011; 31: 421-425
- 21 张宇, 严际慎, 张勤, 张琪, 裘华森. 重症急性胰腺炎肺损伤大鼠sICAM-1水平变化及其意义. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2345-2347

编辑 田滢 电编 鲁亚静



胰腺癌干细胞差异基因的表达及生物信息学分析

江建新, 高珊, 王敏, 李旭, 孙诚谊

■背景资料

胰腺癌进展快、预后差的主要原因 是其早期转移、对传统的治疗抵抗以及较易复发。当前的研究表明胰腺癌干细胞是上述现象的理论基础。

江建新, 孙诚谊, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550001

高珊, 贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550001
王敏, 李旭, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科中心 湖北省武汉市 430030

江建新, 副主任医师, 主要从事肝胆胰脾疾病的基础与临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 81160311

贵州省科技厅贵阳医学院社发联合基金资助项目, No. 黔科合[2010]3171

贵阳市科技局基金资助项目, No. 筑科合[2011]03 22号

贵州省肝胆胰疾病研究科技创新人才团队项目基金资助项目, No. 黔科合人才团队[2010]4010

作者贡献分布: 主要实验、资料分析、统计及文章撰写由江建新完成; 研究设计、文章修改及审阅由孙诚谊完成; 资料分析、样本处理及生物信息学分析由王敏、李旭及高珊完成。

通讯作者: 孙诚谊, 教授, 550001, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院肝胆外科。chengyisun@medmail.com.cn
电话: 0851-6773083

收稿日期: 2013-01-07 修回日期: 2013-04-01

接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-08

Identification and bioinformatic analysis of differentially expressed genes in pancreatic cancer stem cells

Jian-Xin Jiang, Shan Gao, Min Wang, Xu Li, Cheng-Yi Sun

Jian-Xin Jiang, Cheng-Yi Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Shan Gao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Min Wang, Xu Li, Department of Biliary-Pancreatic Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160311; the Social Development Joint Foundation of Science and Technology Department of Guizhou Province and Guiyang Medical College, No. [2010]3171; the Foundation of Guiyang City Science and Technology Bureau, No. [2011]03 22; the Liver and Pancreatic Disease Technological Innovation Talent Team Foundation of Guizhou Province, No. [2010]4010

Correspondence to: Cheng-Yi Sun, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 28 Guiyi Street, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. chengyisun@medmail.com.cn

Received: 2013-01-07 Revised: 2013-04-01

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To identify differentially expressed genes

in pancreatic cancer stem cells and to analyze them by bioinformatics.

METHODS: MIA-PaCa2 (TIC^{high}) and BxPc-3 (TIC^{low}) were used as tool cells in this study. Total RNA was prepared from MIA-PaCa2 (TIC^{high}) and BxPc-3 (TIC^{low}) cells. After quality identification and fluorescent labeling, RNA samples were hybridized with the Agilent human gene expression microarrays. Raw data were normalized using Quantile algorithm and Gene Spring Software 11.0. Gene Ontology database and KEGG database were used for GO and Pathway comments on differentially expressed genes, respectively.

RESULTS: A total of 7059 differentially expressed genes were identified ($P < 0.05$, fold change ≥ 2), including 3440 up-regulated and 3 619 down-regulated genes in MIA-PaCa2 (TIC^{high}) cells. These differentially expressed genes were mainly involved in polyamine metabolic process, nucleobase-containing small molecule interconversion, histone H4 acetylation, cell division, cell cycle, apoptotic process, and toll-like receptor signaling pathway. GO analysis demonstrated they are involved in cancer, endocytosis, O-glycan biosynthesis, pyrimidine metabolism, and glutathione metabolism. Pathway analysis showed the presence of crosstalk among several signaling pathways.

CONCLUSION: Differentially expressed genes identified in this study may be involved in the regulation of different signaling pathways and the genesis of pancreatic cancer stem cells. They might become new therapeutic targets for pancreatic cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Stem cell; Gene microarray; Bioinformatics

Jiang JX, Gao S, Wang M, Li X, Sun CY. Identification and bioinformatic analysis of differentially expressed genes in pancreatic cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1218-1225 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1218.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1218>

■同行评议者
王钦红, 副教授,
美国杜克大学医
学院肿瘤生物学系

摘要

目的: 筛选与胰腺癌干细胞相关的差异表达基因, 并进行生物信息学分析。

方法: 以MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})为研究胰腺癌干细胞的工具细胞制备总RNA, 经质量鉴定后进行荧光标记; 采用Agilent人全基因4*44K芯片进行杂交实验, 获得mRNA表达谱; 以Gene Spring Software 11.0软件和Quantile算法分析芯片实验数据, 筛选与胰腺癌干细胞相关的差异mRNAs; 基于Gene Ontology数据库进行GO注释, 基于KEGG数据库进行Pathway注释。

结果: 获得符合基因芯片实验质量标准的RNA样品, 基因芯片杂交及数据分析得到差异表达mRNAs 7059个($P < 0.05$, fold change ≥ 2), 其中MIA-PaCa2(TIC^{high})中上调表达3440个, 下调表达3619个。GO注释显示他们主要涉及多胺代谢过程、含碱基的小分子相互转换、组蛋白H4乙酰化、细胞分裂、细胞周期、凋亡、Toll样受体信号转导通路等。Pathway注释主要涉及癌症的途径、内吞作用、O-糖基化生物合成、嘧啶代谢、谷胱甘肽代谢等。信号通路调控网络图显示多条信号通路存在交叉对话。

结论: 筛选出的差异表达基因可能参与胰腺癌干细胞的发生发展, 参与不同信号通路的调控, 并有可能成为胰腺癌新的治疗靶点。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 胰腺癌; 干细胞; 基因芯片; 生物学信息

核心提示: 本文通过通路分析, 发现差异表达的基因显著性影响许多信号通路, 特别是涉及癌症的途径、嘧啶代谢。通过信号通路调控网络图分析, 显示上述信号通路存在交叉对话, 这有可能从整体角度揭示胰腺癌干细胞的发生与调控机制。

江建新, 高珊, 王敏, 李旭, 孙诚谊. 胰腺癌干细胞差异基因的表达及生物信息学分析. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1218-1225
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1218.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1218>

0 引言

胰腺癌是高度恶性、预后最差的恶性肿瘤之一, 5年生存率不到5%^[1]。大多数患者因确诊时伴有局部和/或远处的侵袭、转移而丧失手术时机^[2], 即使临床手术根治性切除的胰腺癌患者术后也

大多数因出现复发和远处转移预后极差, 其原因为术前就有微转移灶形成及其化疗抵抗^[3]。胰腺癌的早期转移、对传统的治疗抵抗以及较易复发是其致死的关键因素。肿瘤干细胞理论解释了上述现象。胰腺癌干细胞研究表明^[4]: 在原发肿瘤里存在一个亚群细胞, 这群细胞具有自我更新、分化潜能以及在异位重新成瘤能力。同时, 这群细胞还具有侵袭转移和化疗抵抗特性。最新的研究表明: 胰腺癌在形成之前通过上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)形成胰腺癌干细胞, 是其早期发生转移, 治疗抵抗, 复发的根本原因^[5]。已有的研究表明: 具有CD44⁺/CD24⁻表型的胰腺癌细胞具有肿瘤干细胞特性, 胰腺癌细胞系MIA-PaCa2的CD44⁺/CD24⁻表达率95.5%, 而BxPc-3的表达率17.5%。因此, MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})可以直接作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞, 不需要进一步富集^[6]。本研究采用miRNA芯片技术, 以MIA-PaCa2(TIC^{high})和BxPc-3(TIC^{low})为研究对象, 筛选胰腺癌干细胞相关的mRNAs, 并对其进行生物信息学分析, 为进一步研究胰腺癌干细胞的发生和调控机制, 寻找新的治疗靶点奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株BxPc-3(TIC^{low})和MIA-PaCa2(TIC^{high})由本室保存; 细胞培养按照文献[7,8]采用DMEM培养基(Gibco公司), 含10%的56 °C热灭活胎牛血清, 25 mmol/L HEPES, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 青霉素50 U/mL及链霉素50 µg/mL。

1.2 方法

1.2.1 RNA抽提、纯化和质检: 采用mirVana™ miRNA Isolation Kit(Ambion, Austin, TX, US)(专用于抽提普通组织、细胞的miRNA)并且根据生产厂商提供的标准操作流程进行样品总的RNA抽提, 抽提所得总RNA经Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)电泳质检合格后备用。

1.2.2 芯片杂交、扫描及数据提取(由上海生物芯片工程有限公司完成): 样品RNA采用Agilent表达谱芯片配套试剂盒, Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color(Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)和标准操作流程对样品总RNA中的mRNA进行放大和标记, 并用RNeasy mini kit(QIAGEN, GmbH, Germany)纯化标记

■ 研究前沿

目前关于胰腺癌干细胞相关基因差异表达谱可见部分文献报道, 作者的课题组也曾利用胰腺癌组织分选的原代胰腺癌干细胞裸鼠模型进行基因芯片分析过胰腺癌干细胞差异基因表达谱。

■相关报道

Kallifatidis等研究,认为具有CD44⁺/CD24⁻表型的胰腺癌细胞具有肿瘤干细胞特性;胰腺癌细胞系MIA-PaCa2的CD44⁺/CD24⁻表达率95.5%,而BxPc-3的表达率17.5%;并认为MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})可以直接作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞。秦仁义等采用分选的原代胰腺癌干细胞裸鼠模型进行基因芯片分析过胰腺癌干细胞差异基因表达谱,其中差异基因涉及细胞凋亡、细胞周期、代谢、细胞线粒体结构和耐药等多个方面。

表1 MIA-PaCa2(TIC^{high})/BxPc-3(TIC^{low}) EMT相关基因的差异表达

GeneSymbol	P值	改变倍数
<i>ST00A4</i>	0.0004723	161.8347
<i>VIM</i>	2.75E-05	59.54529
<i>SNAI1</i>	3.16E-05	18.09616
<i>CDH1</i>	2.64E-05	0.001399
<i>ACTA2</i>	0.25197	0.64338
<i>TJP1</i>	9.83E-05	0.268177
<i>CTNNA1</i>	2.41E-05	0.406122
<i>NFYA</i>	3.67E-06	1.954545

好的cDNA。按照Agilent表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒(Agilent technologies, Santa Clara, CA, US),用1.65 μg Cy3标记的cDNA与Agilent人全基因4*44K芯片滚动杂交,65℃,10 r/min,滚动杂交17 h。杂交后的芯片清洗扫描,洗片所用的试剂为Gene Expression Wash Buffer Kit(Agilent technologies, US),芯片结果采用Agilent Microarray Scanner(Agilent technologies, US)进行扫描,软件设置Scan resolution = 5 μm, PMT 100%, 10%, 16 bit。用Feature Extraction software 10.7(Agilent technologies, US)读取数据,采用Gene Spring Software 11.0(Agilent technologies, US)进行归一化处理,所用的算法为Quantile,杂交信号以数据形式输出。差异mRNA使用了limma进行显著性水平的计算,设置参数 $P < 0.05$, fold change ≥ 2 [Foldchange = Signal MIA-PaCa2(TIC^{high})/Signal BxPc-3(TIC^{low})].

1.2.3 生物信息学分析: (1)功能分析(GO-Analysis): 将上述基因差异表达的mRNA基于Gene Ontology数据库进行GO注释,得到基因参与的所有的GO。采用基于超几何分布(hypergeometric distribution)的Fisher exact test进行计算每个GO的显著性水平(P值),并对多重假设检验的结果进行校正并获得误判率(false discovery rate, FDR),筛选出差异基因所体现的显著性GO。显著性筛选的标准: $P < 0.01$ 。上调和下调差异基因分别进行显著性功能分析;然后上调和下调差异基因进行显著性功能富集; (2)通路分析(pathway-analysis): 将上述基因差异表达的mRNA基于KEGG数据库进行Pathway注释,得到差异基因所参与的所有的Pathway。利用Fisher精确检验计算每个Pathway的显著性水平,并对多重假设检验的结果进行校正并获得FDR,筛选出差异基因所显著参与的pathway,显著性筛选的标

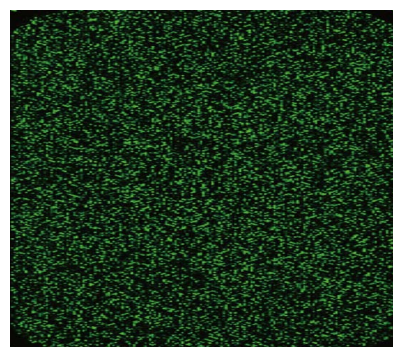


图1 mRNA芯片杂交代表性图像。

准: $P < 0.05$; (3)信号通路调控网络(path-act-network): 基于KEGG数据库对显著pathway之间的关系进行整理,从宏观方面得到显著性pathway之间的信号转导关系,然后构建显著性pathway之间的信号转导关系网络。该网络中Pathway显著性选择标准为 $P < 0.05$ 。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示。应用SPSS17.0统计软件分析,基因芯片分析进行t检验。

2 结果

2.1 基因芯片样品总RNA的质量鉴定 所抽提的总RNA,经分光光度计检测 $A_{260/280}$ 的吸光度,确定样品的浓度和纯度;运用Agilent2100系统进行电泳质检。经测定, RNA的 $A_{260/280}$ 比值介于2.03-2.09, 18S、28S电泳条带清晰, 28S条带无明显降解; RNA完整性评分(RNA integrity number)介于8.7-9.3, RNA样品平均浓度 >60 mg/L, 总RNA质量完好,结果合格,可以进行芯片实验。

2.2 基因芯片检测结果 mRNA芯片杂交代表性图像见图1,显示荧光信号分布均匀,信号点饱满,背景较低,杂交效果理想。将芯片扫描图像导入Feature Extraction software 10.7读取数据,从中共鉴定到41001个mRNAs,将数据导入Gene Spring Software 11.0分析,得到差异表达mRNAs 7059个($P < 0.05$, fold change ≥ 2),其中MIA-PaCa2(TIC^{high})中上调表达3440个,下调表达3619个。其中部分涉及EMT相关差异表达基因见表1。

2.3 生物信息学分析 上述筛选的差异表达基因基于Gene Ontology数据库进行GO注释,其中,其生物学功能主要涉及多胺代谢过程、含碱基的小分子相互转换、组蛋白H4乙酰化、细胞氨基酸生物合成过程、谷胱甘肽的代谢过程、染色体分离、有丝分裂早中期、有丝分裂细胞周期的M期、细胞分裂、细胞周期、信号转导、凋亡、Toll样受体信号转导通路、I型干

抗素介导的信号转导通路、semaphorin-plexin信号通路、血小板衍生生长因子受体信号转导途径、肿瘤坏死因子介导的信号转导通路、间充质干细胞分化、半桥粒装配、不依赖TAP的MHC I类外源性多肽抗原加工与提呈等。上调和下调差异基因分别进行显著性功能分析, 显著性功能富集等见图2。上述筛选的差异表达基因基于KEGG数据库进行Pathway注释, 上调和下调差异基因所显著参与的信号通路见图3。主要涉及癌症的途径、内吞作用、O-糖基化生物合成、嘧啶代谢、谷胱甘肽代谢等。基于KEGG数据库对显著pathway之间的关系进行整理, 得到信号通路调控网络见图4。

3 讨论

肿瘤发起细胞, 又称肿瘤干细胞, 具有成瘤、侵袭转移及治疗抵抗作用^[9]。Kallifatidis等^[6]从胰腺癌细胞标记分子CD44(+)/CD24(-), CD44(+)/CD24(+)或CD44(+)/CD133(+)的表达与裸鼠成瘤能力、分化程度、克隆性生长、肿瘤微球体形成、ALDH活性以及治疗抵抗等肿瘤干细胞特性的关系进行系列研究, 认为具有CD44⁺/CD24⁻表型的胰腺癌细胞具有肿瘤干细胞特性; 胰腺癌细胞系MIA-PaCa2的CD44⁺/CD24⁻表达率95.5%, 而BxPc-3的表达率17.5%; 并认为MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})可以直接作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞, 不需要进一步富集。因此, 本研究基于上述研究基础, 直接以MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞, 未做CD44(+)/CD24(-)标志物筛选。

新近的研究表明: 胰腺癌在形成之前, 源于具有潜在癌变分子基础的上皮细胞(如: PanIN 2和3级中胰腺上皮细胞), 在各种因素的作用(如: 慢性胰腺炎)下发生EMT, 导致细胞内相关基因发生重新编程, 获得侵袭转移能力和肿瘤干细胞的特性, 形成胰腺癌干细胞^[5]。其他许多研究也表明: EMT涉及肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)形成, 肿瘤干细胞具有EMT特性。例如, Gioffi等^[10]研究永生化的人乳腺上皮细胞(human mammary epithelial cell, HMLE)在外源性导入Twist或Snail转录因子, 或通过TGF-β1诱导EMT产生过程中, 获得了正常乳腺干细胞表型CD44^{high}/CD24^{low}, 并且具有干细胞的特性(如较强的自我更新能力、克隆微球的形成、成瘤

能力等); 此外, 通过对CD44^{low}/CD24^{high}表型的HMLEs诱导EMT产生过程中, 获得了同样的结果; 这表明EMT能够产生干细胞, 这些细胞也表达EMT相关标志分子(如N-cadherin、Fibronectin、vimentin、FOXC2、SIP1和Snail)。在HMLE中外源性导入HER2/neu癌基因(HMLEN cells), 再外源性导入Twist或Snail基因, 诱导EMT发生, 这些细胞能导致肿瘤形成, 而对照组(未导入Twist或Snail基因)不能成瘤; 这表明EMT能促进CSCs形成。Xie等^[11]研究IL-6介导的EMT导致了乳腺癌干细胞的形成, 认为EMT是癌细胞获得“干性”的关键机制, 非“干性”的癌细胞的EMT是CSCs的一个来源。Morel等^[12]研究证实表型CD44⁺CD24^{-low}的乳腺癌干细胞能够来源于表型CD44^{low}CD24⁺非致瘤性的乳腺上皮细胞, 其机制是通过激活Ras/MAPK信号途径和EMT。Kasimir-Bauer等^[13]研究表明: 侵入到循环系统中的乳腺癌细胞(circulating tumor cells, CTC)干细胞标志物和EMT分子标志物过表达, 具有肿瘤干细胞和EMT特性。此外, 许多实验证明在头颈部鳞状癌干细胞、宫颈癌干细胞以及肝癌干细胞与EMT紧密相关^[14-16]。Shah等^[17]通过对吉西他滨耐药的胰腺癌细胞研究发现, 这群细胞侵袭转移能力更强, EMT标志分子表达升高, 干细胞表型分子CD24、CD44和ESA表达升高。这表明化疗药物富集的胰腺癌干细胞具有EMT表型的分子基础。Bao等^[18,19]研究证实: 在胰腺癌细胞株AsPC-1中, 过表达Notch-1和FoxM1诱导EMT发生, 不仅上调了EMT标志分子(ZEB1、CD44、EpCAM、Hes-1), 也上调了CSC表面标志物(CD44和EpCAM)的表达, 增强了肿瘤细胞的侵袭转移、克隆形成、自我更新等能力; 上述这些研究表明EMT的发生与CSC表型的相关基因重新编程相关, 并有助于肿瘤的复发和耐药。我们运用芯片技术筛选高表达胰腺癌干细胞MIA-PaCa2(TIC^{high})和低表达胰腺癌干细胞BxPc-3(TIC^{low})的差异基因表达谱表明前者较后者, 与EMT相关的基因表达显著升高, 不仅证实了上述研究结论, 也从一个分子机制层面证实了MIA-PaCa2(TIC^{high})和BxPc-3(TIC^{low})作为胰腺癌干细胞的研究工具细胞具有一定的可靠性。

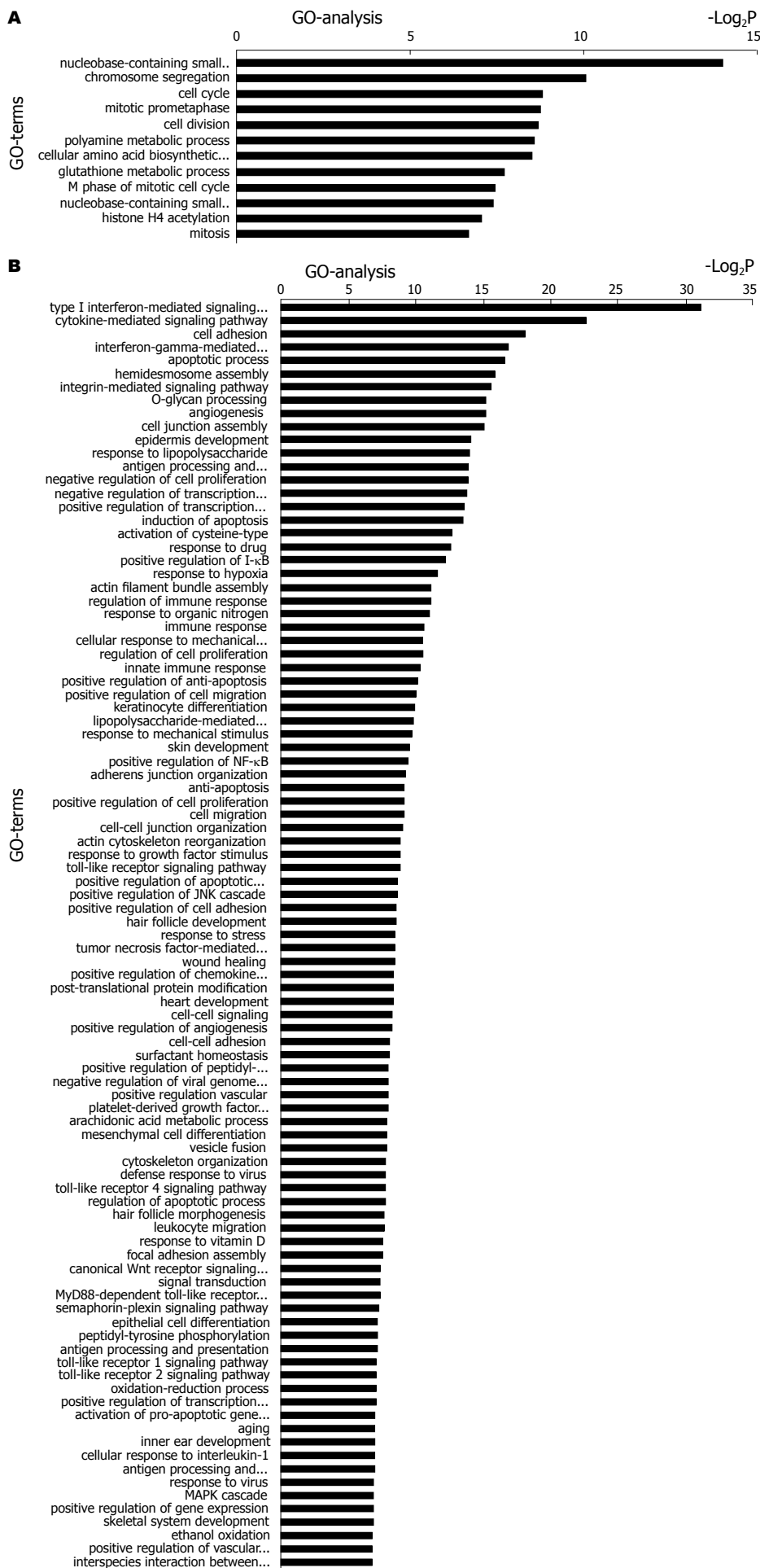
此外, 我们采用生物信息学方法对上述芯片结果进行了分析, 差异表达的基因显著性影响许多生物学功能, 特别是多胺代谢过程和不依赖TAP的MHC I类外源性多肽抗原加工与提

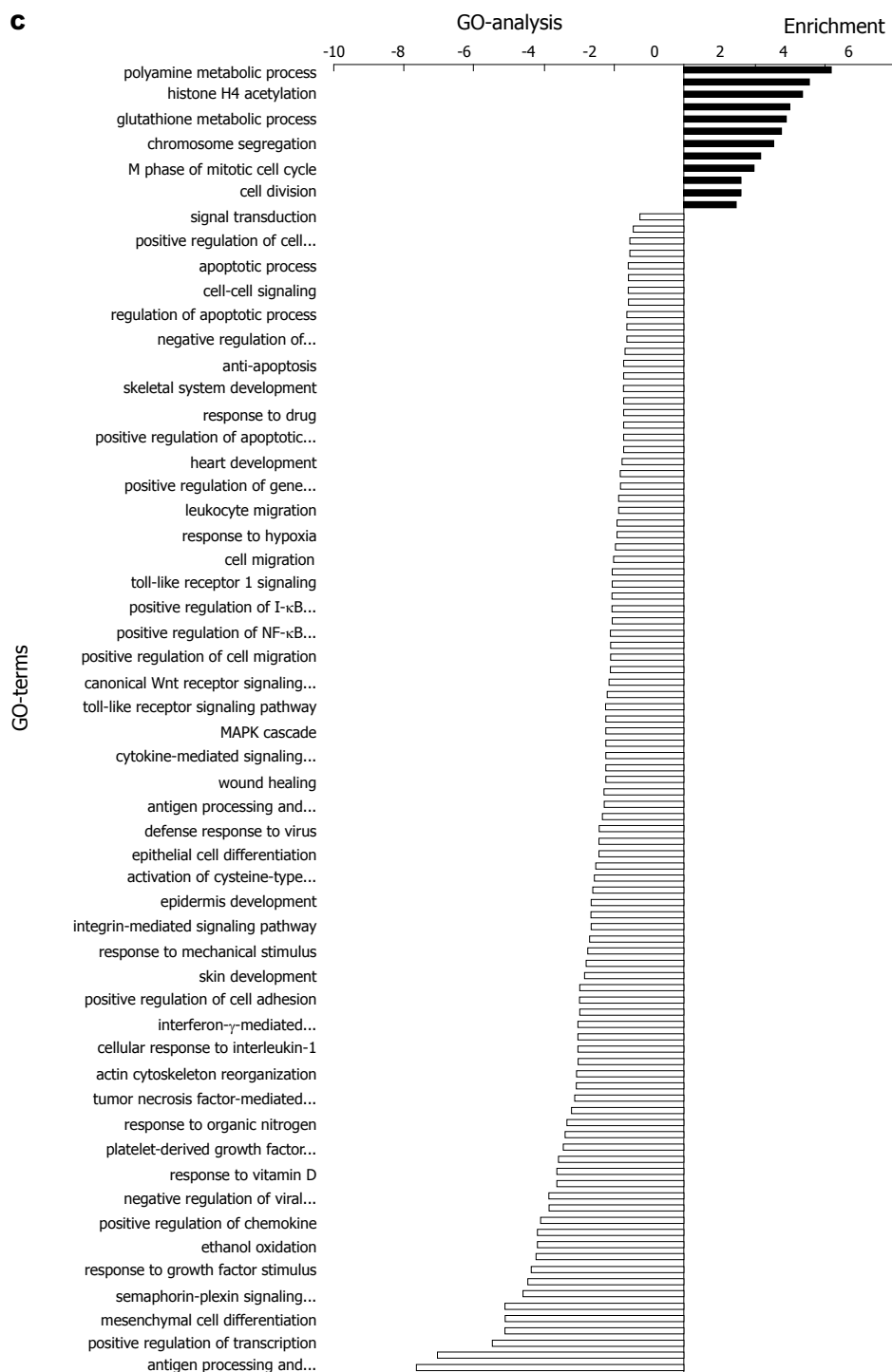
■创新盘点

目前关于采用胰腺癌细胞系MIA-PaCa2(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞, 采用基因芯片技术筛选、鉴定胰腺癌干细胞相关差异基因表达谱尚未见报道。本研究结合文献研究有助于发现新的与胰腺癌干细胞发生、发展相关的基因及其调控机制。

■名词解释

转录组学: 一门在整体水平上研究细胞中基因转录的情况及转录调控规律的学科, 是从RNA水平研究基因表达的情况, 是研究细胞表型和功能的一个重要手段。



**同行评价**

本文选题新颖, 研究方法合理, 对胰腺癌干细胞相关差异基因表达谱的探讨具有一定的创新, 有重大科研意义。

图 2 差异基因显著性功能分析图及显著性功能富集图. A: 上调差异基因显著性功能分析图; B: 下调差异基因显著性功能分析图; C: 显著性功能富集图.

呈, 表明影响上述两个生物学功能的差异表达基因更有可能参与胰腺癌干细胞的表型与发生. 通过通路分析, 发现差异表达的基因显著性影响许多信号通路, 特别是涉及癌症的途径、嘧啶代谢, 表明影响上述两个通路的差异表达基因更有可能揭示胰腺癌干细胞的发生与调控参与胰腺癌干细胞的发生与调控机制. 我们基于

KEGG数据库对显著pathway之间的关系进行整理, 得到信号通路调控网络图, 该图显示上述信号通路的交叉对话可能从整体角度揭示胰腺癌干细胞的发生与调控机制.

总之, 我们通过芯片技术筛选了7059条与胰腺癌干细胞相关的差异表达基因, 并对其进行了生物信息学分析, 这些基因的分子功能和参

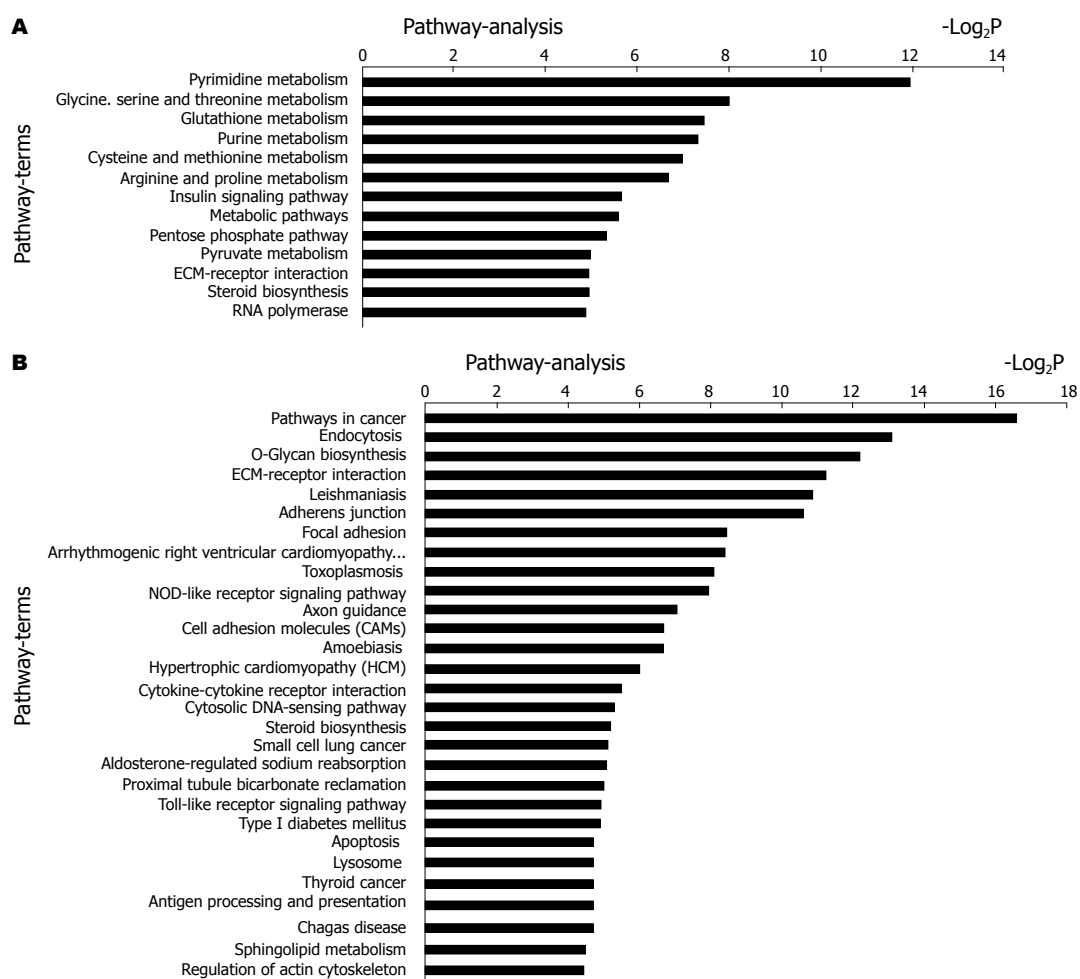


图 3 差异基因显著参与的信号通路图. A: 上调差异基因显著参与的信号通路图; B: 下调差异基因显著参与的信号通路图.

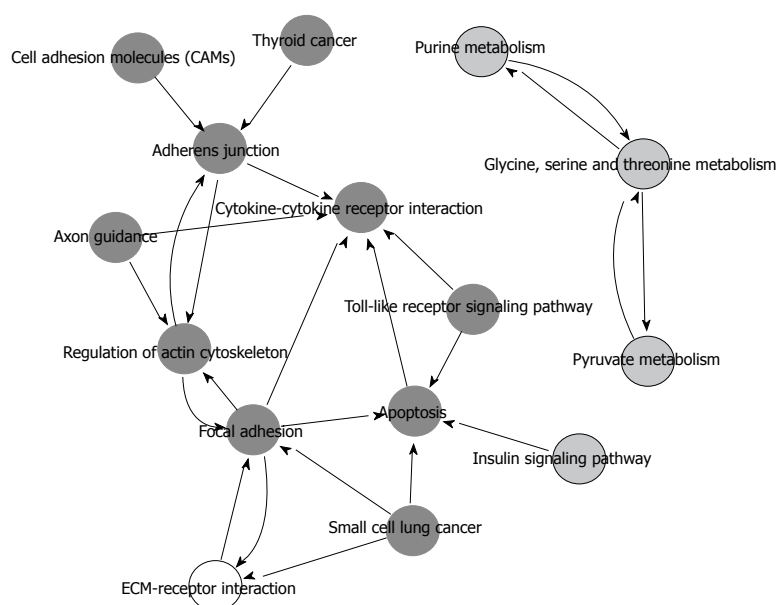


图 4 信号通路调控网络图. 浅灰色: 上调显著的Pathway; 深灰色: 下调显著的Pathway; 白色: 上下调均显著的Pathway.

与的信号通路可能涉及调控胰腺癌干细胞的各种生物学特性, 进一步对其生物学功能和调控

机制进行研究, 有助于从整体上分析胰腺癌干细胞的发生机制, 寻找并设计新的治疗靶点.

4 参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29 [PMID: 22237781 DOI: 10.3322/caac.20138]
- 2 Tuveson DA, Neoptolemos JP. Understanding metastasis in pancreatic cancer: a call for new clinical approaches. *Cell* 2012; 148: 21-23 [PMID: 22265397 DOI: 10.1016/j.cell.2011.12.021]
- 3 Lim KH, Chung E, Khan A, Cao D, Linehan D, Ben-Josef E, Wang-Gillam A. Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: the emerging paradigm? *Oncologist* 2012; 17: 192-200 [PMID: 22250057 DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0268]
- 4 Rasheed ZA, Matsui W. Biological and clinical relevance of stem cells in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2: 15-18 [PMID: 22320910 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.07015.x]
- 5 Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012; 148: 349-361 [PMID: 22265420 DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.025]
- 6 Kallifatidis G, Rausch V, Baumann B, Apel A, Beckermann BM, Groth A, Mattern J, Li Z, Kolb A, Moldenhauer G, Altevogt P, Wirth T, Werner J, Schemmer P, Büchler MW, Salnikov AV, Herr I. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signalling. *Gut* 2009; 58: 949-963 [PMID: 18829980 DOI: 10.1136/gut.2008.149039]
- 7 Rausch V, Liu L, Kallifatidis G, Baumann B, Mattern J, Gladkikh J, Wirth T, Schemmer P, Büchler MW, Zöller M, Salnikov AV, Herr I. Synergistic activity of sorafenib and sulforaphane abolishes pancreatic cancer stem cell characteristics. *Cancer Res* 2010; 70: 5004-5013 [PMID: 20530687 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0066]
- 8 Zhang C, Kolb A, Büchler P, Cato AC, Mattern J, Rittgen W, Edler L, Debatin KM, Büchler MW, Friess H, Herr I. Corticosteroid co-treatment induces resistance to chemotherapy in surgical resections, xenografts and established cell lines of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2006; 6: 61 [PMID: 16539710 DOI: 10.1186/1471-2407-6-61]
- 9 Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704-715 [PMID: 18485877 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1270]
- 10 Cioffi M, Dorado J, Baeuerle PA, Heeschen C. Ep-CAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 465-474 [PMID: 22096026 DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.027]
- 11 Xie G, Yao Q, Liu Y, Du S, Liu A, Guo Z, Sun A, Ruan J, Chen L, Ye C, Yuan Y. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol* 2012; 40: 1171-1179 [PMID: 22134360 DOI: 10.3892/ijo.2011.1275]
- 12 Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008; 3: e2888 [PMID: 18682804 DOI: 10.1371/journal.pone.0002888]
- 13 Kasimir-Bauer S, Hoffmann O, Wallwiener D, Kimnig R, Fehm T. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R15 [PMID: 22264265 DOI: 10.1186/bcr3099]
- 14 Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol* 2012; 48: 1-9 [PMID: 22070916 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.10.004]
- 15 López J, Poitevin A, Mendoza-Martínez V, Pérez-Plasencia C, García-Carrancá A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer* 2012; 12: 48 [PMID: 22284662 DOI: 10.1186/1471-2407-12-48]
- 16 Kim HM, Haraguchi N, Ishii H, Ohkuma M, Okano M, Mimori K, Eguchi H, Yamamoto H, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Increased CD13 expression reduces reactive oxygen species, promoting survival of liver cancer stem cells via an epithelial-mesenchymal transition-like phenomenon. *Ann Surg Oncol* 2012; 19 Suppl 3: S539-S548 [PMID: 21879266 DOI: 10.1245/s10434-011-2040-5]
- 17 Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU, Gallick GE. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 3629-3637 [PMID: 17909916 DOI: 10.1245/s10434-007-9583-5]
- 18 Bao B, Wang Z, Ali S, Kong D, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Miele L, Sarkar FH. Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2011; 307: 26-36 [PMID: 21463919 DOI: 10.1016/j.canlet.2011.03.012]
- 19 Bao B, Wang Z, Ali S, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Azmi AS, Miele L, Sarkar FH. Over-expression of FoxM1 leads to epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 2011; 112: 2296-2306 [PMID: 21503965 DOI: 10.1002/jcb.23150]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



戊己丸不同配伍方对炎症后肠易激综合征模型大鼠结肠运动及5-羟色胺含量的影响

王迎寒, 周淑媛, 王娅杰, 巩仔鹏, 杨庆, 阚晓溪, 阮从潇, 张瑞杰, 朱晓新

■背景资料

炎症后肠易激综合征(post-infectious irritable bowel syndrome, PI-IBS)是常见的消化系统疾病,多发生于青壮年,发病率高,目前临床上多采用对症治疗,效果不佳,复发率高,严重影响患者生活质量。

王迎寒, 周淑媛, 王娅杰, 巩仔鹏, 杨庆, 阚晓溪, 阮从潇, 张瑞杰, 朱晓新, 中国中医科学院中药研究所 北京市 100700

王迎寒, 承德医学院中药研究所 河北省承德市 067000

王迎寒, 主要从事中药药理学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 3093011

国家国际科技合作基金资助项目, No. S2011ZR0193

作者贡献分布: 此课题由朱晓新指导; 王迎寒进行文献检索及实验设计; 实验操作及数据采集由王迎寒、周淑媛、王娅杰、巩仔鹏、杨庆、阚晓溪、阮从潇及张瑞杰等共同完成; 数据分析及论文撰写由王迎寒完成; 实验指导及论文修改由朱晓新完成。

通讯作者: 朱晓新, 研究员, 博士生导师, 100700, 北京市东城区东直门内大街南小街16号, 中国中医科学院中药研究所。zhuxx59@yahoo.com.cn

电话: 010-64056154

收稿日期: 2013-02-26 修回日期: 2013-03-28

接受日期: 2013-04-18 在线出版日期: 2013-05-08

Influence of Wuji Wan in different compatibilities on colonic motility and 5-hydroxytryptamine contents in rats with post-infectious irritable bowel syndrome

Ying-Han Wang, Shu-Yuan Zhou, Ya-Jie Wang, Zi-Peng Gong, Qing Yang, Xiao-Xi Kan, Cong-Xiao Ruan, Rui-Jie Zhang, Xiao-Xin Zhu

Ying-Han Wang, Shu-Yuan Zhou, Ya-Jie Wang, Zi-Peng Gong, Qing Yang, Xiao-Xi Kan, Cong-Xiao Ruan, Rui-Jie Zhang, Xiao-Xin Zhu, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine Science, Dongzhimennei Dajie Nanxiaojie, Beijing 100700, China
Ying-Han Wang, Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30930114; the National International Science and Technology Cooperation Project, No. S2011ZR0193

Correspondence to: Xiao-Xin Zhu, Professor, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine Science, 16 South Alley, Dongzhimen Street, Beijing 100700, China. zhuxx59@yahoo.com.cn

Received: 2013-02-26 Revised: 2013-03-28

Accepted: 2013-04-18 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To evaluate the effect of Wuji Wan in different compatibilities on colonic motility and 5-hydroxytryptamine (5-HT) contents in rats with post-infectious irritable bowel syndrome

(PI-IBS).

METHODS: A rat model of PI-IBS was established by intracolonic instillation of acetic acid and restraint stress. Rats were divided into several groups. Wuji Wan in different compatibilities was given to rats in Wuji Wan groups, Pinaverium bromide tablets to rats in the positive group and water to the other two groups. BIOPAC MP150 polygraph was used to record colon motion curves and evaluate colonic motility using motility index and the change rate of the motility index. HPLC-ECD was used to determine the contents of 5-HT and the percent conversion of 5-HT in serum, colon, odobenus rosmarus, hypothalamus and frontal lobe. The number of mast cells was counted to calculate their degranulation rate by Toluene ammonia blue staining.

RESULTS: After treatment, the colonic motility index (1770.10, 1504.97, 1700.64, 1467.22 *vs* 2112.15) and the change rate of motility index (68.10, 40.16, 59.97, 39.33 *vs* 104.69) in middle- and high-dose Wuji Wan groups were significantly decreased (all $P < 0.01$). The content of 5-hydroxytryptamine in the colon (3493.38, 2640.41, 2086.08, 3255.63, 2688.69, 2129.13 *vs* 4168.36) was remarkably reduced (all $P < 0.01$) and the conversion rate of 5-HT in serum (3.20, 4.60, 6.61, 2.86, 3.40, 4.05 *vs* 2.08) was notably increased (all $P < 0.05$ or 0.01). In the middle- and high-dose groups, the contents of 5-HT in the limbic system (243.16, 295.03, 250.28, 303.61 *vs* 124.42; 303.51, 397.30, 339.94, 353.02 *vs* 198.58; 260.87, 302.75, 254.65, 298.92 *vs* 166.71) were increased (all $P < 0.01$) and the percent conversion of 5-HT (134.69, 98.61, 130.57, 95.87 *vs* 281.91; 209.43, 184.55, 189.56, 186.75 *vs* 262.01; 109.36, 86.52, 115.41, 88.47 *vs* 268.36) was decreased (all $P < 0.05$ or 0.01). The number of mast cells (6.40, 5.11, 6.48, 5.57 *vs* 10.47) and their degranulation ratio (23.81, 17.94, 23.25, 19.19 *vs* 34.10) were significantly decreased (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Wuji Wan in different compat-

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

ibilities exerts therapeutic effects on colonic motility in rats with post-infectious irritable bowel syndrome possibly by improving the contents of 5-HT and the abnormal condition of mast cells and therefore modulating the function of the brain-gut axis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Wuji Wan in different compatibilities; Post-infectious irritable bowel syndrome; Colonic motility; 5-hydroxytryptamine; Mast cells; Brain-gut axis

Wang YH, Zhou SY, Wang YJ, Gong ZP, Yang Q, Kan XX, Ruan CX, Zhang RJ, Zhu XX. Influence of Wuji Wan in different compatibilities on colonic motility and 5-hydroxytryptamine contents in rats with post-infectious irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1226-1233 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1226.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1226>

摘要

目的: 评价戊己丸不同配伍方对炎症后肠易激综合征(post-infectious irritable bowel syndrome, PI-IBS)模型大鼠结肠运动功能的作用, 并从5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)角度初步探讨其作用机制。

方法: 采用乙酸灌肠加束缚应激建立PI-IBS大鼠模型, 应用戊己丸不同配伍方进行干预, 应用BIOPAC MP150型多导生理记录仪描记大鼠结肠运动曲线, 计算结肠运动指数和运动指数变化率, 同时利用高效液相法检测血清、结肠、海马、下丘脑和额叶中5-HT的含量及5-HT转化率, 甲苯胺蓝染色法计算结肠肥大细胞数目和脱颗粒率。

结果: 经戊己丸治疗后, 中、高剂量组PI-IBS模型大鼠结肠运动指数(1770.10、1504.97、1700.64、1467.22 vs 2112.15)和运动指数变化率(68.10、40.16、59.97、39.33 vs 104.69)均显著下降($P<0.01$)。结肠组织中5-HT含量显著下降(3493.38、2640.41、2086.08、3255.63、2688.69、2129.13 vs 4168.36), 血清中5-HT转化率(3.20、4.60、6.61、2.86、3.40、4.05 vs 2.08)明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。中、高剂量组中枢边缘系统中5-HT含量(243.16、295.03、250.28、303.61 vs 124.42; 303.51、397.30、339.94、353.02 vs 198.58; 260.87、302.75、254.65、298.92 vs 166.71)显著升高($P<0.01$), 5-HT转化率(134.69、98.61、130.57、95.87 vs 281.91; 209.43、184.55、189.56、186.75

vs 262.01; 109.36、86.52、115.41、88.47 vs 268.36)明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。结肠黏膜肥大细胞数目(6.40、5.11、6.48、5.57 vs 10.47)和脱颗粒率(23.81、17.94、23.25、19.19 vs 34.10)亦明显下降($P<0.01$)。

结论: 戊己丸不同配伍方改善PI-IBS模型大鼠结肠运动功能的作用机制可能是通过改善5-HT含量及肥大细胞的异常状态, 从而调节脑-肠轴功能实现的。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 戊己丸不同配伍方; 炎症后肠易激综合征; 结肠运动; 5-HT; 肥大细胞; 脑-肠轴

核心提示: 通过研究戊己丸不同配伍方对炎症后肠易激综合征(post-infectious irritable bowel syndrome)模型大鼠结肠运动功能的作用, 并基于结肠和大脑边缘系统中5-羟色胺(5-hydroxytryptamine)的变化探讨其作用机制。证实戊己丸通过调节脑-肠轴功能改善模型大鼠结肠运动功能。

王迎寒, 周淑媛, 王娅杰, 巩仔鹏, 杨庆, 阙晓溪, 阮从潇, 张瑞杰, 朱晓新. 戊己丸不同配伍方对炎症后肠易激综合征模型大鼠结肠运动及5-羟色胺含量的影响. *世界华人消化杂志* 2013; 21(13): 1226-1233 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1226.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1226>

0 引言

戊己丸是《中国药典》2000年版(一部)收录的中医名方, 由黄连、制吴茱萸和土炒白芍组成, 具有泻肝和胃, 降逆止呕的功效, 用于肝火犯胃、肝脾不和所致的腹痛、泄泻、呕吐吞酸、胃脘灼热疼痛、口苦嘈杂等证。临床上常用于治疗肠易激综合征、胃溃疡等消化系统疾病。

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是临床上常见的慢性功能性消化系统疾病, 以腹痛、腹胀及排便异常为主要临床症状, 临床发现, 在胃肠道急性感染恢复后, 许多患者出现IBS相关症状, 被称为炎症后肠易激综合征(post-infectious irritable bowel syndrome, PI-IBS), 且患者往往伴有焦虑、抑郁等精神症状, 普通人群患病率为5%-11%^[1], 不同程度影响人们的工作和生活, 同时也耗费了大量的医疗资源。到目前为止, IBS的发病机制尚未阐明, 现在观点主要认为肠运动功能紊乱和内脏敏感性增高是其病理生理的主要方面, 心理社会因素在诱发或加重症状上

■ 研发前沿

至今肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的发病机制尚未完全阐明, 越来越多的研究证明, 脑-肠轴的调节作用在IBS的发病过程中起到非常重要的作用, 目前已经成为研究的热点。

■相关报道

Kilkens等证实,抑制5-HT再摄取能够影响腹泻型IBS患者和正常人的神经内分泌反应和认知功能,但对内脏的感知无明显影响,为临床治疗提供了有价值信息。

具有重要作用,其实质就是脑-肠互动异常,即胃肠运动功能紊乱、内脏敏感性改变及心理社会因素借助脑-肠轴的联系,通过脑-肠互动在肠易激综合征发病机制中起重要作用。研究认为,脑-肠之间的联系可能是通过分泌一些既存在于肠神经系统(enteric nervous system, ENS)也存在于中枢神经系统(central nervous system, CNS)的被称为“脑肠肽”的神经递质,在CNS与ENS以及胃肠道效应细胞间传递而实现,5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)广泛存在于大脑及肠道,参与脑-肠轴功能调节,对IBS的发病起关键作用。本实验拟采用Jun-Ho La的方法建立的PI-IBS大鼠模型,应用戊己丸不同配伍方进行治疗,评价各组大鼠的结肠运动功能,并从其改变5-HT含量的角度初步阐述其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠90只, SPF级, 体质量250 g±20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK(京)2012-0001。冰醋酸(北京化工厂, 批号: 2100603); 甲醛(国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20111128); 高氯酸(国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20100610); 偏重亚硫酸钠(天津市塘沽新华化工厂, 批号: 840717); 磷酸二氢钠(北京市旭东化工厂, 批号: 2009207); 辛烷磺酸钠(东京化成工业株式会社, 批号: I0346); 乙二醇四乙酸(北京化工厂, 批号: 840529); 氯化钾(北京市旭东化工厂, 批号: 20110516); 甲醇(Germany, 批号: 603-001-00-x); 乙腈(Germany, 批号: 608-001-00-3); 水合氯醛(北京市旭东化工厂, 批号: 040526)。戊己丸提取物: 黄连、制吴茱萸、炒白芍饮片购自北京卫仁饮片厂, 并经中国中医科学院中药研究所鉴定, 黄连醇提物、吴茱萸醇提物、白芍水提物由中日友好医院剂型室按照优选工艺分别进行提取; 将单味药按 $L_9(3^4)$ 正交表(黄连、吴茱萸、白芍各有3个剂量水平交互配比成戊己丸9个不同配伍方, 以戊己丸方中黄连、吴茱萸及白芍的比例分别为12:2:3, 12:1:12为受试的1[#]方和2[#]方^[2]。

得舒特: 法国苏威制药厂, 批号: 624464。MP150型多导生理记录分析系统, DA 100C通用放大器, 美国BIOPAC公司; YP200型压力换能器, 北京新航兴业科贸有限公司; 带导管的水囊(自制); JY92-II超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; DECADE II SDC检测器, Netherlands Antec Leyden; S2100 Solvent De-

livery System; S5200 SAMPLE INJECTOR; C18柱子, 3 μ m, 2.1 mm×100 mm, serial No. 344; FINESSE 325切片机, Thermo SCIENTIFIC; HISTOCENTRE 3石蜡包埋机, Thermo SCIENTIFIC; EXCELSIOR ES脱水机, Thermo SCIENTIFIC; BX51显微镜, OLYMPUS; 自动染色机, Varistan Gemini, Thermo SCIENTIFIC; SORVALL LEG-END RT+冷冻高速离心机, Thermo SCIENTIFIC。

1.2 方法

1.2.1 分组: 随机分成9组, 分别为正常组(NC)、模型组(M)、阳性对照组(PC)、戊己丸1[#]方高剂量组(W1-H)、戊己丸1[#]方中剂量组(W1-M)、戊己丸1[#]方低剂量组(W1-L)、戊己丸2[#]方高剂量组(W2-H)、戊己丸2[#]方中剂量组(W2-M)、戊己丸2[#]方低剂量组(W2-L)。

1.2.2 PI-IBS大鼠模型的建立方法: 参照Jun-Ho La建立的PI-IBS大鼠模型^[3]: 实验前24 h禁食, 不禁水, 乙醚麻醉后经肛门插入连接注射器的硅胶管(距肛门8 cm), 结肠内灌入40 mL/L的乙酸1 mL, 缓慢拔出硅胶管, 用手压迫肛门并将大鼠尾巴抬高30 s, 然后用0.01 mol/L PBS 1 mL冲洗结肠。恢复7 d。第8天用纸带束缚大鼠的前肩、前上肢、胸部, 限制前上肢搔抓头部, 但不限制其活动, 束缚时间1 h, 然后立即测量解束缚后1 h内的结肠运动。正常组: 实验前24 h禁食, 不禁水, 乙醚麻醉后经肛门插入连接注射器的硅胶管(距肛门8 cm), 结肠内灌入0.01 mol/L PBS 1 mL, 缓慢拔出硅胶管, 用手压迫肛门并将大鼠尾巴抬高30 s, 然后用0.01 mol/L PBS 1 mL冲洗结肠, 无束缚应激。

1.2.3 给药处理: 除正常组外, 其余各组在应激后, 按照分组给予不同的药物灌胃: 以1[#]方(12:2:3)、2[#]方(12:1:12)配伍比例配药, 以临床2倍量为中剂量, 即: 1[#]方以0.491 g/kg(2.824 g/kg, 按饮片量折算)为中剂量, 2[#]方以0.602 g/kg(4.152 g/kg, 按饮片量折算)为中剂量, 加倍、减半分别为大、小剂量, 得舒特0.0135 g/kg, 均以20 mL/kg灌胃给药, 模型组与正常组给与等量蒸馏水。灌胃每天早上08:00开始, 给药持续7 d。

1.2.4 观察指标: (1)结肠运动指数及运动指数变化率: 将橡胶小囊与塑料导管(直径2 mm)相连, 并用0号手术线扎紧, 将导管与一端接1 mL注射器, 而另一端接压力换能器的三通管相连接, 用注射器注入水, 排净气泡, 使整个管路密闭, 再将压力传感器与BIOPAC MP 150多导生

表 1 各组大鼠结肠运动指数和运动指数变化率的变化 (mean ± SD)

分组	运动指数(mmHg·S)			运动指数变化率(%)	
	建模前	应激后	治疗后	应激后	治疗后
NC	1073.40 ± 95.12	1096.65 ± 158.44	1086.22 ± 93.47	2.96 ± 17.85	1.82 ± 11.74
M	1039.15 ± 90.94	2092.27 ± 183.42 ^b	2112.15 ± 107.20 ^b	102.36 ± 21.09 ^b	104.69 ± 20.67 ^b
PC	1090.29 ± 105.93	2110.88 ± 179.30 ^b	1470.92 ± 86.85 ^{bd}	94.12 ± 12.00 ^b	35.70 ± 11.21 ^{bd}
W1-L	1090.51 ± 121.77	2094.32 ± 197.26 ^b	2050.09 ± 113.79 ^{bf}	93.98 ± 25.91 ^b	90.06 ± 23.24 ^{bf}
W1-M	1062.69 ± 128.69	2063.43 ± 249.82 ^b	1770.10 ± 85.29 ^{bdf}	94.65 ± 15.00 ^b	68.10 ± 15.45 ^{bdf}
W1-H	1082.70 ± 108.04	2050.40 ± 146.10 ^b	1504.97 ± 136.17 ^{bd}	90.21 ± 13.38 ^b	40.16 ± 18.05 ^{bd}
W2-L	1045.93 ± 100.93	1983.74 ± 230.12 ^b	2038.89 ± 136.94 ^{bf}	90.57 ± 23.75 ^b	96.58 ± 23.13 ^{bf}
W2-M	1062.96 ± 94.56	2048.49 ± 212.56 ^b	1700.64 ± 93.50 ^{bdf}	94.30 ± 28.87 ^b	59.97 ± 13.22 ^{bdf}
W2-H	1065.73 ± 150.41	2002.64 ± 249.52 ^b	1467.22 ± 118.53 ^{ad}	88.97 ± 17.32 ^b	39.33 ± 15.84 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs NC组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs M组; ^e $P < 0.01$ vs PC组。NC: 正常组; M: 模型组; PC: 阳性对照组; W1-H: 戊己丸1[#]方高剂量组; W1-M: 戊己丸1[#]方中剂量组; W1-L: 戊己丸1[#]方低剂量组; W2-H: 戊己丸2[#]方高剂量组; W2-M: 戊己丸2[#]方中剂量组; W2-L: 戊己丸2[#]方低剂量组。

理记录仪相连。实验前禁食24 h, 先将小囊中的水吸入注射器, 用液体石蜡润滑小囊及导管, 并在大鼠肛门内滴两滴液体石蜡, 轻轻将小囊连同导管从肛门插入大鼠肠道7 cm, 再用胶布将导管固定于鼠尾, 防止滑脱。缓慢往小囊内注入水, 观察记录仪描记情况, 选择描记曲线最敏感时停止注射。稳定30 min后, 描记结肠运动曲线。记录时间点为: 造模前、应激后、治疗后。计算5 min内结肠运动指数(motility index, MI)和运动指数变化率: 结肠运动指数即曲线下面积^[4](由BIOPAC软件自动计算)。计算方法: 连续测量6个5 min内的曲线下面积, 取其均值作用为MI; MI变化率 = (各组实验后的运动指数-实验前自身的运动指数)/实验前自身的运动指数 × 100%; (2)5-HT和5-HT转化率: HPLC法检测5-HIAA及5-HT含量。首先配制含高氯酸(0.15 mol/L)、Na₂S₂O₅(0.4%)、EDTA(0.04%)的蛋白沉淀液。最后一次测量后立即剖腹, 腹主动脉采血5 mL, 于距肛门8 cm处取结肠1 cm, 同时取脑, 冰上迅速分离海马、下丘脑及额叶, 放入干冰速冻; 血于4 °C静置2 h, 4 °C, 3500 r/min离心20 min, 取上清, 均置于-80 °C冰箱保存。检测时, 每100 μL血清, 加入500 μL蛋白沉淀液; 每100 mg结肠或脑组织加1 mL的蛋白沉淀液, 冰浴下剪碎, 用细胞破碎机破碎3次, 每次2 s, 中间间隔15 s, 然后均涡旋2 min, 12000 r/min, 4 °C离心10 min, 取上清液200 μL于内衬管中, 上机检测。检测色谱条件参照赵焕英等^[5]报道的方法, 并稍做改进。色谱柱: Antec Leyden BV C18色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3 μm);

流动相: 水-甲醇(85 : 15), 然后加入0.74 mmol/L 辛烷磺酸钠、100 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O、0.027 mmol/L EDTA和2 mmol/L KCl, 混匀, 再加1%乙腈和0.05%醋酸, 最后用H₃PO₄或者NaOH调节pH到3.32; 流速: 0.2 mL/min柱温: 30 °C; 电化学检测器: 工作电极为玻璃碳电极, 参比电极为银/氯化银(Ag/AgCl)电极, 工作电压为0.52 V; (3)肥大细胞计数及病理观察: 分别于距肛门和回结肠连接处2 cm取结肠2段, 立即投入10%福尔马林中固定。将固定好的结肠组织取材修块后, 经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋后, 4 μm切片, 远端结肠切片进行HE染色, 近端结肠切片行甲苯胺蓝染色。肥大细胞计数: 每张切片随机选取6个视野, 置于OLYMPUS BX51显微镜高倍镜(×400)下观察, 取其平均值, 计数每张切片的肥大细胞数、脱颗粒细胞数, 并计算其脱颗粒率。脱颗粒的判定标准: 胞膜破溃, 紫红色颗粒逸出胞外。脱颗粒率 = 脱颗粒细胞数/肥大细胞数 × 100%。

统计学处理 所有数据用mean ± SD表示, 应用SPSS17.0统计软件进行单因素方差分析, 两两比较, 方差齐者采用LSD检验, 方差不齐者用Dunnett's T3检验, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性标准。

2 结果

2.1 各组大鼠结肠运动指数及运动指数变化率的变化 由表1可知, 在建模之前, 各组大鼠之间的结肠运动指数无差异。应激后, 各建模组大鼠结肠运动显著加快, 结肠运动指数和结肠运动指数变化率与正常组相比, 差异非常显著($P < 0.01$)。治

■创新盘点

目前, 关于脑-肠轴在PI-IBS发病中的作用报道较少, 本文通过应用戊己丸干预PI-IBS模型大鼠, 考查了5-HT这一脑肠肽的变化及肥大细胞的状态, 初步揭示了戊己丸的作用机制。

■应用要点

戊己丸具有清肝和胃, 降逆止呕的作用, 临床上常用来治疗IBS, 本文为戊己丸的临床应用提供了理论依据。

表 2 各组大鼠血清和结肠中5-HT及5-HT变化率 (mean ± SD)

分组	血清			结肠		
	5-HIAA(ng/mL)	5-HT(ng/mL)	5-HT转化率(%)	5-HIAA(ng/g)	5-HT(ng/g)	5-HT转化率(%)
NC	82.67 ± 4.44	2071.75 ± 213.14	4.04 ± 0.61	750.30 ± 133.38	2174.38 ± 317.92	35.07 ± 8.11
M	65.74 ± 12.41 ^a	3222.28 ± 690.29	2.09 ± 0.39 ^b	1005.58 ± 112.25 ^b	4168.36 ± 635.80 ^b	24.51 ± 4.19
PC	80.16 ± 15.06 ^c	2402.49 ± 826.90	3.61 ± 1.12 ^d	850.99 ± 119.97 ^c	3088.26 ± 497.42 ^{bd}	27.83 ± 3.47
W1-L	76.43 ± 8.52	2453.03 ± 469.78	3.20 ± 0.69 ^c	890.35 ± 150.21	3493.38 ± 1064.29 ^{bc}	26.26 ± 3.60
W1-M	85.77 ± 7.73 ^d	1975.92 ± 506.98	4.60 ± 1.33 ^d	798.26 ± 120.25 ^d	2640.41 ± 459.79 ^d	30.64 ± 4.28
W1-H	92.37 ± 7.93 ^d	1428.82 ± 316.46 ^c	6.61 ± 0.82 ^{bdf}	734.58 ± 152.88 ^d	2086.08 ± 442.61 ^{df}	36.29 ± 9.07
W2-L	68.27 ± 11.20 ^a	2413.46 ± 451.00	2.86 ± 0.42 ^a	855.49 ± 131.42	3255.63 ± 527.84 ^{bd}	26.53 ± 3.96
W2-M	74.96 ± 15.16	2284.58 ± 584.61	3.40 ± 0.73 ^c	758.02 ± 120.23 ^d	2688.69 ± 227.17 ^d	28.36 ± 5.05
W2-H	78.56 ± 17.09	2001.02 ± 278.54	4.05 ± 1.37 ^d	713.29 ± 122.04 ^d	2129.13 ± 248.64 ^{df}	33.93 ± 7.63

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs NC组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs M组; ^e $P < 0.01$ vs PC组. NC: 正常组; M: 模型组; PC: 阳性对照组; W1-H: 戊己丸1[#]方高剂量组; W1-M: 戊己丸1[#]方中剂量组; W1-L: 戊己丸1[#]方低剂量组; W2-H: 戊己丸2[#]方高剂量组; W2-M: 戊己丸2[#]方中剂量组; W2-L: 戊己丸2[#]方低剂量组. 5-HT: 5-羟色胺。

疗后, 各治疗组大鼠结肠运动指数和结肠运动指数变化率均有所降低, 与M组相比, PC、W1-M、W1-H、W2-M、W2-H组大鼠结肠运动明显减慢, 差异显著($P < 0.01$)。W1-L和W2-L组大鼠结肠运动虽亦减慢, 但无显著差异。PC组与W1-L、W1-M、W2-L、W2-M组之间差异显著($P < 0.01$); 与W1-H、W2-H则无统计学差异。戊己丸1[#]方和戊己丸2[#]方的3个剂量组之间亦有明显差异, 但1[#]方和2[#]方的同剂量组间并无差异。

2.2 各组大鼠5-HT及5-HT变化率的变化 模型组大鼠血清中5-HT含量较正常组有所增高, 5-HIAA含量、5-HT转化率均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组相比, 各治疗组大鼠血清5-HT含量均不同程度降低, W1-H差异显著($P < 0.05$), W1-L与W1-H之间差异显著($P < 0.05$)。各治疗组5-HIAA的含量有不同程度的升高, PC、W1-M和W1-H组差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$); W1-L与W1-H、W1-H与W2-H间差异显著($P < 0.05$)。5-HT转化率较M组有不同程度的提高, 除W2-L组外均有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$); W1-H与PC组有显著差异($P < 0.01$); 1[#]方3个剂量组间差异显著, 2[#]方低、高剂量组间有显著差异, 1[#]方与2[#]方高剂量组间差异显著($P < 0.05$)(表2)。

模型组大鼠结肠中5-HT和5-HIAA含量较正常组明显增高($P < 0.01$), 而5-HT转化率虽有所降低, 但无显著差异; 与模型组相比, 各治疗组大鼠结肠组织中5-HT含量有不同程度降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), W2-H组较PC组明显下降, W1-L组与W1-M、W1-H有明显差异; W2-L与W2-H差异显著($P < 0.01$)。5-HIAA的含量亦较模

型组有不同程度的降低, PC、W1-M、W1-H、W2-M和W2-H组差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$), 1[#]方低、高剂量组间差异显著。各组5-HT转化率无统计学差异(表2)。

由表3可知, 模型组大鼠海马中5-HT含量较正常组明显降低($P < 0.01$), 5-HIAA含量和5-HT转化率明显升高($P < 0.01$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠海马组织中5-HT含量较模型组均有不同程度升高, 除W1-L组外均有显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。1[#]方和2[#]方中、高剂量组与PC组差异显著($P < 0.01$)。1[#]方和2[#]方3个剂量组间差异显著。各治疗组5-HIAA的含量较M组有不同程度的降低, PC、W1-H和W2-H组差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$); PC组与1[#]方和2[#]方低、中剂量组间有统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。1[#]方低、高剂量组间有显著差异($P < 0.01$)。5-HT转化率相对于模型组有不同程度的降低, 差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。1[#]方和2[#]方高剂量组较PC组下降更显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。W1-L与W1-M、W1-H之间有统计学差异, W2-L与W2-H间亦差异显著。

模型组大鼠下丘脑中5-HT和5-HIAA含量较正常组明显降低($P < 0.01$, $P < 0.01$), 5-HT转化率则明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组大鼠下丘脑组织中5-HT含量有不同程度升高, 除W1-L组外均有显著差异($P < 0.01$)。PC组与W1-H组比较差异显著($P < 0.05$)。5-HIAA的含量较M组有不同程度的升高, W1-M、W2-M组差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。5-HT转化率有不同程度的降低, 除W1-L组外差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$); 1[#]方低高剂量组间有统计学差异($P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠脑组织中5-HT及5-HT变化率 (mean ± SD)

分组	海马			下丘脑			额叶		
	5-HIAA (ng/g)	5-HT (ng/g)	5-HT转 化率(%)	5-HIAA (ng/g)	5-HT (ng/g)	5-HT转 化率(%)	5-HIAA (ng/g)	5-HT (ng/g)	5-HT转 化率(%)
NC	265.61 ± 21.06	280.26 ± 35.12	95.86 ± 13.21	668.40 ± 63.73	369.85 ± 47.23	182.30 ± 20.22	258.36 ± 40.93	280.75 ± 51.85	95.40 ± 26.32
M	343.54 ± 47.84 ^b	124.42 ± 18.52 ^b	281.92 ± 63.84 ^a	504.13 ± 42.56 ^a	198.58 ± 31.63 ^b	262.01 ± 65.67 ^b	425.46 ± 64.07 ^b	166.71 ± 58.64 ^b	268.36 ± 51.49 ^b
PC	269.28 ± 55.66 ^d	166.79 ± 35.16 ^{bc}	162.15 ± 11.57 ^{bd}	603.88 ± 61.90	317.04 ± 53.39 ^d	195.58 ± 40.71 ^d	305.61 ± 61.69 ^d	196.06 ± 26.39 ^a	157.06 ± 29.44 ^c
W1-L	351.97 ± 40.28 ^{bf}	162.88 ± 38.69 ^b	222.43 ± 37.16 ^{bd}	609.75 ± 89.58	258.45 ± 42.08 ^b	239.09 ± 39.68 ^a	339.95 ± 87.57 ^{ac}	191.17 ± 87.03 ^b	197.94 ± 79.39
W1-M	317.80 ± 23.94 ^{ae}	243.16 ± 47.50 ^{df}	134.69 ± 27.04 ^c	627.28 ± 59.18 ^c	303.51 ± 48.23 ^{ad}	209.43 ± 26.22 ^c	279.14 ± 25.39 ^d	260.87 ± 37.20 ^{de}	109.36 ± 21.84 ^d
W1-H	283.38 ± 40.74 ^d	295.03 ± 41.44 ^{df}	98.61 ± 24.65 ^{de}	722.69 ± 101.10	397.30 ± 64.64 ^{de}	184.55 ± 28.95 ^d	261.06 ± 42.49 ^d	302.75 ± 46.36 ^{df}	86.52 ± 9.26 ^{de}
W2-L	320.74 ± 39.90 ^{ae}	180.53 ± 16.59 ^{bd}	178.36 ± 23.18 ^b	642.89 ± 94.54	313.24 ± 74.53 ^d	212.88 ± 50.90 ^c	349.61 ± 56.55 ^{ac}	212.28 ± 40.97 ^a	167.50 ± 27.51 ^a
W2-M	321.93 ± 32.34 ^{ae}	250.28 ± 40.96 ^{df}	130.57 ± 18.72 ^c	633.87 ± 39.04 ^d	339.94 ± 55.15 ^d	189.56 ± 24.12 ^d	293.05 ± 62.28 ^d	254.65 ± 45.98 ^d	115.41 ± 16.69 ^d
W2-H	287.92 ± 31.24 ^c	303.61 ± 36.11 ^{df}	95.87 ± 15.77 ^{cf}	659.40 ± 124.99	353.02 ± 37.48 ^d	186.76 ± 27.42 ^d	261.75 ± 62.19 ^d	298.92 ± 70.55 ^{df}	88.47 ± 17.76 ^{de}

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs NC组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs M组; ^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ vs PC组. NC: 正常组; M: 模型组; PC: 阳性对照组; W1-H: 戊己丸1[#]方高剂量组; W1-M: 戊己丸1[#]方中剂量组; W1-L: 戊己丸1[#]方低剂量组; W2-H: 戊己丸2[#]方高剂量组; W2-M: 戊己丸2[#]方中剂量组; W2-L: 戊己丸2[#]方低剂量组. 5-HT: 5-羟色胺.

表 4 各组肥大细胞计数及脱颗粒百分率 (mean ± SD)

分组	肥大细胞(个/400HP)	脱颗粒率(%)
NC	3.80 ± 0.53	12.89 ± 3.78
M	10.47 ± 1.12 ^b	34.10 ± 3.97 ^b
PC	4.93 ± 1.17 ^{ad}	15.30 ± 3.22 ^d
W1-L	8.00 ± 1.01 ^{bdf}	27.85 ± 2.52 ^{bdf}
W1-M	6.40 ± 0.98 ^{bdf}	23.81 ± 2.54 ^{bdf}
W1-H	5.11 ± 1.07 ^{bd}	17.94 ± 3.39 ^{bd}
W2-L	8.17 ± 1.05 ^{bdf}	28.33 ± 2.18 ^{bdf}
W2-M	6.48 ± 0.75 ^{bdf}	23.25 ± 2.97 ^{bdf}
W2-H	5.57 ± 1.03 ^{bd}	19.19 ± 2.75 ^{bdf}

^b $P<0.01$ vs NC组; ^d $P<0.01$ vs M组; ^f $P<0.01$ vs PC组. NC: 正常组; M: 模型组; PC: 阳性对照组; W1-H: 戊己丸1[#]方高剂量组; W1-M: 戊己丸1[#]方中剂量组; W1-L: 戊己丸1[#]方低剂量组; W2-H: 戊己丸2[#]方高剂量组; W2-M: 戊己丸2[#]方中剂量组; W2-L: 戊己丸2[#]方低剂量组.

模型组大鼠额叶中5-HT含量较正常组明显降低($P<0.01$), 5-HIAA含量和5-HT转化率则明显升高($P<0.01$). 与模型组比较, 各治疗组大鼠额叶组织中5-HT含量有不同程度升高, W1-M、W1-H、W2-M和W2-H组有显著差异($P<0.01$).

■名词解释

脑-肠轴: 存在于胃肠道中的肠神经系统中可能含有传递自中枢神经系统至胃肠道的传入神经纤维和传递自胃肠道至中枢神经系统的传出神经纤维, 并通过交感和副交感神经相连接, 能通过各种神经递质(脑-肠肽)的释放和传递把胃肠道与中枢神经系统联系起来, 这一庞大而复杂的神经内分泌网络就是脑-肠轴.

W1-M、W1-H、W2-H组与PC组比较有明显差异($P<0.05$, $P<0.01$). W1-L与W1-M、W1-H之间, W2-L与W2-H之间有显著差异. 治疗组5-HIAA的含量相对于M组有不同程度的降低, 差异显著($P<0.05$, $P<0.01$). 1[#]方和2[#]低、高剂量间有统计学差异($P<0.05$). 治疗组5-HT转化率有不同程度的降低, PC、W1-M、W1-H、W2-M、W2-H组差异显著($P<0.05$, $P<0.01$). 戊己丸两个高剂量组较PC组下降更显著($P<0.05$). 2[#]方低高剂量组间有统计意义($P<0.01$).

2.3 结肠组织病理学观察结果 正常组的结肠黏膜形态完整, 肠黏膜上皮完整连续, 腺体排列规则, 结构清楚, 细胞形态未见异常, 固有层可见少量炎症细胞浸润. 模型组和各治疗组动物的结肠组织与正常组比较无明显差异.

2.4 各组大鼠近端结肠肥大细胞数量及脱颗粒率的变化 肥大细胞胞浆呈紫红色, 胞核呈蓝色, 主要分布在黏膜下层和黏膜肌层, 成群或成行排列, 或散在分布于血管、淋巴管及末梢神经周围, 细胞呈圆形、椭圆形、不规则形, 小细胞胞浆少, 边界清, 大细胞胞浆多, 边界不清, 紫色颗粒围绕细胞核散在分布或呈不规则形.

■同行评价

本文研究方法较新颖,对临床治疗PI-IBS有一定指导意义。

M组大鼠结肠黏膜下层的肥大细胞数与脱颗粒率较正常组明显增多($P<0.01$)。与模型组比较,各治疗组大鼠结肠黏膜组织中肥大细胞数目有不同程度降低,差异显著($P<0.01$)。1[#]方和2[#]方低中剂量组与PC组差异显著($P<0.01$)。1[#]方和2[#]方3个剂量组间亦有统计学差异。治疗组肥大细胞脱颗粒率亦有不同程度的降低,差异显著($P<0.01$)。治疗组中除W1-H外均与PC组有显著差异($P<0.01$); 1[#]方和2[#]方3个剂量组间亦有统计学差异(表4)。

3 讨论

戊己丸作为临床上常用于治疗肠易激综合征的有效方剂,只有黄连、制吴茱萸和土炒白芍三味药组成,其中黄连性苦寒,主入脾、胃、肝、胆经,善清热利湿、泻火解毒;吴茱萸辛、苦、热,有小毒,主入肝、脾、胃、肾经,可散寒止痛,降逆止呕,助阳止泻,与黄连一寒一热,相互佐制;白芍性平味甘酸,主入肝、脾经,经土炒后药性转温,可起到柔肝缓急止痛及补益肝脾的作用,三药合用,共达泻肝火和脾胃的作用。现代研究表明:黄连含多种生物碱,主要是小檗碱,又称黄连素,具有广谱抗菌作用,可通过提高髓过氧化物酶活性,来降低葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠损伤和结肠炎^[6]。吴茱萸水煎剂对大黄所引起的小鼠腹泻有明显的止泻效果,且对离体肠肌具有双向调节作用^[7],其所含吴茱萸次碱尚具镇痛作用;白芍对胃肠道具有调节胃肠运动、镇痛、抗病原微生物、抗应激等作用^[8];白芍总苷可剂量依赖性的促进豚鼠离体结肠平滑肌收缩^[9],还可以减轻2,4,6-三硝基苯磺酸诱导的大鼠溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的症状和炎性损伤,有望用于治疗UC^[10-12]。本实验所采用的PI-IBS大鼠模型的建立是在醋酸致结肠急性炎症的基础上,在炎症恢复以后再施以束缚应激,与人类PI-IBS的发病机制都存在着低水平炎症和心理应激这两个共同点,与戊己丸的药理作用特点相符。用戊己丸进行治疗后,各治疗组大鼠结肠运动指数和运动指数变化率均较模型组有所下降,但均未能降至正常水平,高剂量的戊己丸1[#]方和戊己丸2[#]方与阳性对照药得舒特药效比较,无统计学差异。说明戊己丸不同配伍方对PI-IBS模型大鼠结肠运动功能具有确切的改善作用。

5-HT是广泛存在于消化系和脑的众多脑肠肽之一,对脑-肠轴有重要的调节作用。在胃肠

道中,5-HT作为神经递质以及旁分泌信号分子作用于5-HT受体,能直接或者间接影响肠道的动力以及分泌功能,从而改变肠道运动与内脏敏感性,导致了IBS患者出现便秘或者腹泻、腹痛症状。此外,还能够刺激胆碱能神经元释放乙酰胆碱,使胃肠道平滑肌收缩,也能激活抑制硝基能的神经元释放一氧化氮,使平滑肌松弛,尚能参与迷走神经通路使胃松弛,而肠嗜铬细胞释放的5-HT则激活胃肠道迷走神经和内在传入神经纤维,使产生蠕动反射^[13]。在中枢神经系统,5-HT可能参与痛觉、情绪等生理功能的调节,其含量及功能异常可能与精神病和偏头痛等多种疾病的发病有关。本实验结果显示:经过戊己丸不同配伍方的治疗,各中药治疗组大鼠血清和结肠中5-HT、5-HIAA的含量均趋于正常。中枢边缘系统中5-HT、5-HIAA的含量亦有所改善,提示戊己丸不同配伍方对PI-IBS模型大鼠结肠运动的治疗作用机制可能是通过调节结肠、血清、海马、下丘脑及额叶中5-HT、5-HIAA的含量,从而起到治疗PI-IBS的作用,其调节作用可能与脑-肠轴有关,通过脑肠互动而达到的。

肥大细胞是一种能贮存和分泌多种介质的免疫细胞,能在肠道中作为一种抗原感受器参与肠黏膜的局部免疫。众多的研究表明,肥大细胞和肠易激综合征有非常密切的关系:首先,不同亚型IBS患者的不同肠段可表现出不同程度的肥大细胞数目和活化程度的改变^[14];其次,PI-IBS患者肠黏膜肥大细胞增多更明显^[15-17],可能是由于肠道感染和炎症激活了肥大细胞,促使其释放了组胺、前列腺素、五羟色胺、白三烯等,从而引发了一系列胃肠道不适症状;第三,肥大细胞是肠道局部神经-内分泌-免疫系统的重要调节点,能将刺激的免疫反应信息传达到神经系统,并接受神经系统的调控,反馈靶器官产生免疫应答^[18,19],可能在IBS中表现出以动力改变、感觉异常为特征的病理生理过程;此外,肥大细胞还与心理应激和食物过敏有关。本实验中戊己丸不同配伍方可使模型大鼠结肠黏膜肥大细胞数目和活化率下降,说明戊己丸不同配伍方能改善模型大鼠结肠黏膜的肥大细胞数目和活化率的异常,从而减轻IBS症状。

总之,戊己丸不同配伍方能改善PI-IBS模型大鼠的结肠运动,其作用机制可能是通过调节5-HT的含量及肥大细胞异常,使脑-肠轴功能趋于正常,从而使结肠运动恢复正常。

4 参考文献

- 1 Spiller R, Aziz Q, Creed F, Emmanuel A, Houghton L, Hungin P, Jones R, Kumar D, Rubin G, Trudgill N, Whorwell P. Guidelines on the irritable bowel syndrome: mechanisms and practical management. *Gut* 2007; 56: 1770-1798 [PMID: 17488783 DOI: 10.1136/gut.2007.119446]
- 2 王娅杰, 董宇, 朱晓新. 戊己丸提取物不同配伍方对豚鼠离体结肠运动影响的实验研究. *中国中药杂志* 2007; 32: 2161-2165
- 3 La JH, Kim TW, Sung TS, Kang JW, Kim HJ, Yang IS. Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2791-2795 [PMID: 14669335]
- 4 Iwa M, Matsushima M, Nakade Y, Pappas TN, Fujimiya M, Takahashi T. Electroacupuncture at ST-36 accelerates colonic motility and transit in freely moving conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G285-G292 [PMID: 16254048 DOI: 10.1152/ajpgi.00068.2005]
- 5 赵焕英, 段春礼, 范春香, 刘琦, 张韬, 杨慧. 高效液相色谱同时检测生物样本中8种单胺类神经递质. *分析化学* 2009; 37: 330-334
- 6 Yan F, Wang L, Shi Y, Cao H, Liu L, Washington MK, Chaturvedi R, Israel DA, Cao H, Wang B, Peek RM, Wilson KT, Polk DB. Berberine promotes recovery of colitis and inhibits inflammatory responses in colonic macrophages and epithelial cells in DSS-treated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 302: G504-G514 [PMID: 22173918 DOI: 10.1152/ajpgi.00312.2011]
- 7 严春临, 张季, 薛贵平. 中药吴茱萸药理作用研究概况. *河北北方学院学报(医学版)* 2009; 26: 78
- 8 李文艳, 黄山君, 王瑞. 中药白芍的药理作用和质量控制研究进展. *药学服务与研究* 2012; 12: 118-122
- 9 杨小军, 李建军, 轩原清史, 魏睦新. 白芍总苷对豚鼠结肠平滑肌作用机制的研究. *中国中西医结合消化杂志* 2002; 10: 151-153
- 10 周进. 白芍总苷对实验性结肠炎的影响及机制. 合肥: 安徽医科大学硕士论文, 2009: 23
- 11 王佐, 吴正祥, 杨九华, 杨枫, 吴强. 白芍总苷对大鼠实验性结肠炎Th17细胞相关因子的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 84-88
- 12 吴慧丽, 李慧. 白芍总苷对溃疡性结肠炎大鼠细胞因子影响的研究. *中南药学* 2010; 8: 128-131
- 13 何侠垠, 戴宁. 5-羟色胺与肠易激综合征关系的研究进展. *国际消化病杂志* 2010; 30: 1-3
- 14 霍涛, 胡团敏. 肥大细胞与肠易激综合征关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 494-497
- 15 Bercik P, Verdu EF, Collins SM. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 235-245, vi-vii [PMID: 15862932 DOI: org/10.1016/j.gtc.2005.02.007]
- 16 Spiller RC. Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 641-661 [PMID: 15324705 DOI: org/10.1016/j.bpg.2004.04.002]
- 17 Kim HS, Lim JH, Park H, Lee SI. Increased immunoendocrine cells in intestinal mucosa of postinfectious irritable bowel syndrome patients 3 years after acute Shigella infection--an observation in a small case control study. *Yonsei Med J* 2010; 51: 45-51 [PMID: 20046513 DOI: 10.3349/ymj.2010.51.1.45]
- 18 王利华, 方秀才, 潘国宗. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与神经纤维的关联. *中华消化杂志* 2003; 23: 332-335
- 19 董文珠, 李兆申, 邹多武, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 龚燕芳. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与P物质的相关性. *中华内科杂志* 2003; 42: 611-614

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》于 2012-12-26 获得 RCCSE 中国权威学术期刊(A+) 称号

本刊讯 《世界华人消化杂志》在第三届中国学术期刊评价中被武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)评为“RCCSE中国权威学术期刊(A+)”。本次共有6 448种中文学术期刊参与评价, 计算出各刊的最终得分, 并将期刊最终得分按照从高到低依次排列, 按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围。其中A+(权威期刊)取前5%; A(核心期刊)取前5%-20%; A-(扩展核心期刊)取前20%-30%; B+(准核心期刊)取前30%-50%; B(一般期刊)取前50%-80%; C(较差期刊)为80%-100%。

肠吉泰对腹泻型肠易激综合征大鼠下丘脑、结肠P物质mRNA表达的影响

丛军, 蔡淦, 林江, 张正利

■背景资料

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 的临床表现为腹痛或腹部不适伴排便习惯改变, 并且常规检查未发现可以解释上述症状的胃肠道功能性疾病, 其发病机制涉及胃肠动力、内脏感觉、炎症、感染、饮食、遗传、脑-肠轴神经内分泌等多个因素。

丛军, 蔡淦, 林江, 张正利, 上海中医药大学附属曙光医院消化科 上海市 200021

丛军, 主治医师, 主要从事功能性胃肠疾病中医药治疗的研究。

作者贡献分布: 此课题由丛军与蔡淦设计; 研究过程由丛军操作完成; 数据分析与论文写作由丛军、蔡淦、林江及张正利完成。

通讯作者: 蔡淦, 教授, 200021, 上海市普安路185号, 上海中医药大学附属曙光医院消化科, caiganp@126.com

收稿日期: 2012-11-23 修回日期: 2013-04-05

接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-08

Effect of Changjitai decoction on expression of substance P mRNA in the colonic mucosa and hypothalamus of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome

Jun Cong, Gan Cai, Jiang Lin, Zheng-Li Zhang

Jun Cong, Gan Cai, Jiang Lin, Zheng-Li Zhang, Department of Gastroenterology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

Correspondence to: Gan Cai, Professor, Department of Gastroenterology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 185 Puan Road, Shanghai 200021, China. caiganp@126.com

Received: 2012-11-23 Revised: 2013-04-05

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To detect the expression of substance P (SP) mRNA in the colonic mucosa and hypothalamus of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS-D), and to assess the therapeutic effect of traditional Chinese medicine Changjitai decoction on visceral hypersensitivity in rats with IBS-D.

METHODS: Sixty male Sprague-Dawley rats were equally and randomly divided into six groups: normal group, model control group, dicetel group, low-, medium-, and high-dose Changjitai groups. IBS-D was induced by restraint stress for 2 wk combined with intragastric administration of 2 mL of Radix Rhizoma Rhei leachate from the third day in rats of all groups except the normal group. After treatment with corresponding drug for 2 wk, rats

in the model group and treatment groups underwent colorectal distention immediately and then killed. The changes in defecation were monitored by measuring fecal pellets. The expression of SP mRNA in the hypothalamus and colon was detected by RT-PCR.

RESULTS: In the model control group, the frequency of defecation increased obviously compared to the normal group, and the characteristics of stools deteriorated simultaneously. The expression of SP mRNA in the hypothalamus and colon was significantly increased in the model group compared to the normal group (0.988 ± 0.192 vs 0.606 ± 0.151 , $P < 0.01$; 1.042 ± 0.293 vs 0.768 ± 0.116 , $P < 0.05$). After treatment with Changjitai decoction or dicetel, the frequency of defecation and the characteristics of stools ameliorated significantly (13, 17, 14 vs 24, $P < 0.05$). There were no significant differences in the above parameters between the Changjitai groups and dicetel group. SP mRNA levels were significantly reduced in the Changjitai decoction groups compared to the model control group (hypothalamus: 0.678 ± 0.103 , 0.733 ± 0.103 vs 0.988 ± 0.192 , $P < 0.01$; colon: 0.546 ± 0.278 , 0.500 ± 0.260 vs 1.042 ± 0.293 , both $P < 0.01$; 0.731 ± 0.199 vs 1.042 ± 0.293 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Changjitai decoction relieves diarrhea symptoms, ameliorates the stress state, inhibits bowel motility, and reduces visceral hypersensitivity in rats with IBS-D possibly by modulating the expression of SP mRNA in the hypothalamus and colon.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome; Visceral hypersensitivity; Substance P; Changjitai decoction

Cong J, Cai G, Lin J, Zhang ZL. Effect of Changjitai decoction on expression of substance P mRNA in the colonic mucosa and hypothalamus of rats with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1234-1238 URL: <http://www.wjgnet.com>

■同行评议者

刘占举, 教授, 同济大学附属上海市第十人民医院; 范恒, 主任医师, 教授, 博士生导师, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科

www.wjgnet.com/1009-3079/21/1234.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1234

摘要

目的: 观察肠吉泰对腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)大鼠下丘脑、结肠P物质mRNA表达的影响, 探讨其治疗机制。

方法: δ SD大鼠60只, 随机分为正常组、模型组、肠吉泰低、中、高剂量组和得舒特组。除正常组外各组大鼠予束缚应激加大黄泻下及结肠扩张的造模方法, 并予以相应药物治疗。实验过程中观察各组大鼠大便性状和次数; 大鼠处死后取下丘脑及结肠标本用RT-PCR半定量检测P物质mRNA的表达。

结果: 与正常组比较, 模型组大鼠的下丘脑、结肠P物质mRNA表达均有升高(0.988 ± 0.192 vs 0.606 ± 0.151 , $P < 0.01$; 1.042 ± 0.293 vs 0.768 ± 0.116 , $P > 0.05$); 与模型组比较, 肠吉泰治疗组大鼠P物质mRNA表达下调(下丘脑: 0.678 ± 0.103 , 0.733 ± 0.103 vs 0.988 ± 0.192 , $P < 0.01$; 结肠: 0.546 ± 0.278 , 0.500 ± 0.260 vs 1.042 ± 0.293 , $P < 0.01$; 0.731 ± 0.199 vs 1.042 ± 0.293 , $P < 0.05$)。得舒特组、肠吉泰高、中剂量组大便次数及性状明显改善(14、13、17 vs 24, $P < 0.05$), 且肠吉泰与得舒特组比较疗效无显著差异。

结论: 肠吉泰通过调节大鼠下丘脑、结肠P物质mRNA表达量, 改善内脏痛觉敏感状态, 及其对束缚应激反应导致肠动力的紊乱。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 腹泻型肠易激综合征; 内脏高敏感; P物质; 肠吉泰

核心提示: 肠吉泰治疗腹泻型肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)经长期临床验证取得良好疗效, 能有效改善患者腹泻、腹痛症状, 前期实验研究已发现肠吉泰能调节腹泻型IBS大鼠内脏高敏感性。本文进一步明确肠吉泰对P物质(substance P)、肥大细胞、5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine)等内脏敏感性相关指标的影响具有一致性。

丛军, 蔡淦, 林江, 张正利. 肠吉泰对腹泻型肠易激综合征大鼠下丘脑、结肠P物质mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1234-1238 URL: http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1234.asp DOI: http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1234

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是

一种常见的胃肠功能紊乱性疾病, 其发病机制目前尚不十分明确, 临床上缺乏有效的针对性药物治疗手段。上海市名中医蔡淦教授的经验方肠吉泰治疗腹泻型IBS, 经临床验证取得良好疗效, 能有效改善患者的腹泻、腹痛症状。本研究基于土虚木乘、抑木扶土的中医药理论指导, 以腹泻型IBS肝郁脾虚证模型大鼠为对象, 使用得舒特治疗作对照, 观察不同剂量肠吉泰对模型大鼠下丘脑及结肠P物质(substance P, SP)mRNA表达的影响, 并探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠60只, SPF级, 体质量200 g \pm 10 g, 由西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2003-0002, 合格证号: 0023082。饲养于曙光医院清洁级实验动物房, 恒定温度湿度, 室内温度控制在20 $^{\circ}$ C-25 $^{\circ}$ C。饲养期间每日8:00 AM-4:00 PM给予恒定灯光光线照射, 动物自由摄食及饮水。实验前2 wk动物予以适应实验环境。TRIzol Reagent(Invitrogen), 购自上海普飞生物技术有限公司; RevertAid First Stand CDNA Synthesis Kit及2 \times PCR Master Mix(Fermentas)购自晶美生物工程有限公司; 溴化乙锭(EB)溶液、Agarose(LowEEO)购自北京秀百生物科技有限公司; 氯仿、异丙醇、无水乙醇(均分析纯级)、DEPC购自上海鼎国生物技术有限公司; 生大黄(产地甘肃)、肠吉泰原药等均购自上海曙光医院中、西药房。得舒特(匹维溴胺)50 mg/粒(批号: 0020, 法国苏威制药)购自曙光国大药房。隔水式电热恒温培养箱(PYX-DHS-40 \times 50, 上海跃进医疗器械厂), PCR仪(PTC-200, 美国BIO-RAD DNA Engine); 紫外可见分光光度计(752s, 上海第三分析仪器厂); 电泳仪和电泳槽(DYY-7C, 北京市六一仪器厂); 低温高速离心机(5417R, 德国Eppendorf centrifuge); 凝胶成像系统(FR-200, 复日科技紫外与可见光分析装置)。

1.2 方法

1.2.1 药物制备: 肠吉泰方由陈皮、炒防风、炒白术、炒白芍、炙乌梅等药味组成, 全方生药含量48 g, 按公式换算^[1], 煎成浓度分别为2.0 g/mL(大剂量)、1.0 g/mL(中剂量)、0.5 g/mL(小剂量)的药液。生大黄2 kg以开水浸泡2 h后, 浸出液过滤后经低温旋蒸浓缩成200%的溶液, 每毫升含生药2 g, 过滤备用。得舒特50 mg/粒, 据大鼠与人有效剂量换算, 制成浓度为3.12 mg/mL混悬

■ 研发前沿

近期许多观点认为, 以感觉异常和动力改变为特征的内脏高敏感性成为IBS的特征性指标, 调节IBS患者内脏感觉为IBS的治疗带来新途径。

■ 相关报道

陈晓敏等研究IBS患者结肠黏膜中与痛觉和内脏高敏感相关的辣椒素受体VR1、P物质(substance P, SP)和肥大细胞的变化,发现IBS患者乙状结肠辣椒素受体VR1、回盲部和乙状结肠SP免疫阳性反应细胞以及回盲部肥大细胞数量显著多于正常对照组,且腹泻型IBS与便秘型IBS组间无明显差异,并推测三者可能参与了IBS内脏高敏感的发生机制。

表 1 各组大鼠大便次数、性状变化比较 (mean \pm SD, $n = 10$)

分组	1 h内大便性状/次数			
	成形便	软便	稀便	水样便
正常组	6	0	0	0
模型组	0 ^b	8 ^b	14 ^b	2 ^b
得舒特组	1 ^c	5 ^c	8 ^c	0 ^c
肠吉泰(高)	3 ^c	5 ^c	5 ^c	0 ^c
肠吉泰(中)	4 ^c	7 ^c	6 ^c	0 ^c
肠吉泰(低)	3	8	8	1

^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组。

液。以上药物均由曙光医院中药制剂中心(国家中医药管理局三级实验室)制备后冷藏保存。

1.2.2 动物模型制备及分组治疗: 将60只大鼠随机分为6组, 每组10只, 即正常组、模型组、肠吉泰高、中、低剂量治疗组和得舒特组。正常组和模型组大鼠每日予生理盐水1 mL灌胃1次; 肠吉泰高、中、低剂量治疗组大鼠分别予以相应浓度的肠吉泰煎剂1 mL(生药含量分别为2.0、1.0、0.5 g)灌胃, 1次/d; 得舒特组大鼠每日予得舒特混悬液1 mL(含生药3.12 mg)灌胃1次。每日灌胃30 min后, 除正常组外各组大鼠均予束缚应激造模, 根据Williams等^[2]的方法改良: 用绷带束缚大鼠前肩、前上肢及胸部, 限制前肢搔抓头面部, 但不控制其活动。每日持续束缚1 h, 共2 wk。造模第3天^[3,4]开始, 大鼠解束缚后予200%生大黄溶液2 mL灌胃, 1次/d。造模治疗期间记录大鼠的体质量、大便性状及行为学变化。造模第14天大黄灌胃后, 各组大鼠均予禁食, 20 h后乙醚麻醉; 除正常组外各组大鼠进行结直肠扩张^[4,5], 维持压力 ≥ 60 mmHg(不超过70 mmHg), 持续60 s, 间断放空球囊2 min, 反复10次。结直肠扩张结束大鼠脱颈椎处死。正常组大鼠不经结直肠扩张, 直接脱颈椎处死。

1.2.3 观察指标及检测方法: (1)大鼠行为学、体质量及大便次数、性状观察^[6]: 造模期间观察大鼠大便性状及行为学变化。记录大鼠造模前后体质量变化。造模结束后, 单只大鼠关入钢丝笼1 h, 笼下垫滤纸, 观察其间大鼠大便次数和性状(成形便、软便、稀便、水样便的频数)。以粪便污染滤纸形成的污迹直径分级。<1 cm为成形便, 1-3 cm为软便, 3-5 cm为稀便, ≥ 5 cm为水样便; (2)大鼠下丘脑及结肠SP mRNA表达的测定(RT-PCR法): 根据文献报道设计^[7], 由上海英

骏生物科技有限公司合成引物的DNA序列如下: SP上游引物: 5'-ATGAAA ATCTCTGTGG CGGT-3'; SP下游引物: 5'-AATGGG CAAAC-GGGATGCTG-3'; β -actin上游引物: 5'-GT-GGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; β -actin下游引物: 5'-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。采用TRIzol Reagent按操作程序提取下丘脑总RNA。用紫外分光光度计检测260 nm、280 nm波长下的光亮度值, 计算总RNA的浓度及纯度。将 $A_{260/280} = 1.8-2.0$ 的用于实验。取2 μ L RNA据RT试剂盒操作步骤进行RT反应合成cDNA。SP反应体系20 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C变性, 56 $^{\circ}$ C退火, 72 $^{\circ}$ C延伸, 35 cycles。扩增片段长度: 220 bp。 β -actin基因扩增反应体系25 μ L, 反应条件94 $^{\circ}$ C变性, 55 $^{\circ}$ C退火, 72 $^{\circ}$ C延伸, 循环数35 cycles; 扩增片段长度: 540 bp。PCR产物行2%琼脂糖凝胶电泳, 电压70 V。凝胶成像系统对电泳条带进行光密度扫描。以CRH扩增产物的吸光度与 β -actin的吸光度的比值作为mRNA水平的参数, 对扩增样品的mRNA表达进行半定量分析。

统计学处理 连续型变量以mean \pm SD表示, 组间比较采用SPSS13.0单因素方差分析(One-Way ANOVA), 经正态分布检验, 如果方差齐者采用LSD、SNK法, 方差不齐采用Tamhane's T2法。单项有序变量比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 一般情况观察 实验前各组动物活动、饮食正常, 造模过程中除正常组外的各组大鼠均出现少动蜷卧、嗜睡、毛色晦暗、进食减少、便溏、体质量减轻等脾虚证表现。同时表现出对外界刺激兴奋减少、淡漠、情绪不稳定、反应迟缓等肝郁证表现。以上症状在模型组表现更加突出。与正常组比较, 模型大鼠1 h内大便次数显著增加、大便性状显著不成形($P < 0.01$)。与模型组比较得舒特组和肠吉泰高、中剂量组大鼠大便次数显著减少、性状显著改善($P < 0.05$, 表1)。

2.2 大鼠下丘脑、结肠P物质mRNA表达的变化 与正常组比较, 其他各组大鼠下丘脑的SP mRNA表达均有升高, 其中模型组大鼠较正常组有极显著性差异($P < 0.01$), 肠吉泰低剂量组较正常组有显著差异($P < 0.05$), 而与模型组比较, 得舒特组和肠吉泰高、中剂量组的SP mRNA表达均降低, 有极显著性差异($P < 0.01$), 各治疗组之间比较无显著差异($P > 0.05$, 图1)。

大鼠结肠的SP mRNA表达在模型组及得

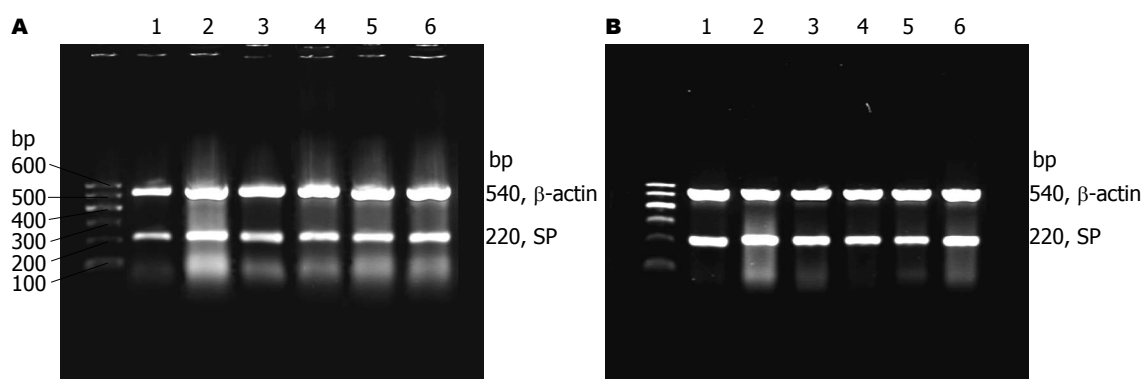


图1 各组大鼠下丘脑、结肠P物质及 β -actin mRNA表达. A: 下丘脑SP及 β -actin mRNA表达; B: 结肠SP及 β -actin mRNA表达. 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 得舒特组; 4-6: 肠吉泰高、中、低剂量治疗组. SP: P物质.

■创新盘点

本课题旨在探索中药复方肠吉泰治疗腹泻型IBS的疗效机制. 结果表明肠吉泰能下调D-IBS大鼠下丘脑、结肠SP mRNA表达量, 改善内脏痛觉敏感状态.

表2 各组大鼠下丘脑、结肠P物质mRNA表达(SP/ β -actin, mean \pm SD, $n = 5$)

分组	下丘脑SP mRNA	结肠SP mRNA
正常组	0.606 \pm 0.151	0.768 \pm 0.116
模型组	0.988 \pm 0.192 ^b	1.042 \pm 0.293
得舒特组	0.697 \pm 0.141 ^d	0.919 \pm 0.122
肠吉泰高剂量组	0.678 \pm 0.103 ^d	0.546 \pm 0.278 ^{de}
肠吉泰中剂量组	0.733 \pm 0.103 ^d	0.500 \pm 0.260 ^{df}
肠吉泰低剂量组	0.822 \pm 0.138 ^a	0.731 \pm 0.199 ^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 模型组;

^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs 得舒特组. SP: P物质.

舒特组均有升高趋势, 但与正常组比较无显著差异($P > 0.05$). 各肠吉泰治疗组大鼠的结肠SP mRNA表达较正常组及模型组均有不同程度的降低, 其中肠吉泰高、中剂量组SP表达量与模型组比较明显降低, 具有显著性差异($P < 0.01$). 肠吉泰低剂量组与模型组有显著性差异($P < 0.05$), 并且肠吉泰高、中剂量组结肠SP与得舒特组比较亦有显著降低($P < 0.05$), 但各治疗组与正常组比较均无显著差异($P > 0.05$, 表2).

3 讨论

中医学根据临床表现, 将IBS归属于“泄泻”、“腹痛”、“郁证”等范畴, 主要病机是土虚木乘、肝脾不和. 诚如《医方考》所云: “泻责之于脾, 痛责之于肝, 肝责之于实, 脾责之于虚, 脾虚肝实, 故令痛泻”. 故对本病的治疗多从抑肝扶脾着手. 中医药在治疗这一病证中有着悠久的历史, 优势明显, 我院上海市首届名中医蔡淦教授治疗IBS的经验方肠吉泰, 即是从治疗这一病证的经典方剂-痛泻要方发展而来, 根据“痛责之肝; 肝责之实”的理论, 加入甘草、

乌梅两味药以柔肝缓急, 甘草配芍药即《伤寒论》止痛名方芍药甘草汤, 而乌梅味酸, 入肝, 合甘草酸甘化阴亦可益肝阴, 全方以柔肝健脾, 缓急止痛为法, 治疗腹泻型IBS取得良好疗效^[8].

脑肠肽是一类同时存在于中枢神经系统和肠神经系统的胃肠肽类激素, 对胃肠运动和分泌起重要的调节作用. SP是第一个被发现的脑肠肽, 为速激肽家族中一个具有11个氨基酸的多肽, 主要分布于肠肌间神经丛和黏膜下神经丛, 储存于细的初级传入神经纤维内, 在细纤维受到刺激时可在传入神经的中枢和外周末端梢释放, 一方面参与痛觉信息的传递, 另一方面通过与其高亲和力受体(neurokinin1, NK1)结合对靶细胞发挥生物效应-调节胃肠道动力、腺体的分泌、血管渗透性以及疼痛刺激的敏感性, 因此被认为作为一种神经递质或调质在中枢和外周起作用^[9-11]. 目前多数学者认为, SP是第一级伤害性传入纤维末梢释放的兴奋性神经递质, 在神经系统中, SP作为一种神经递质调节因子发挥作用, 对消化系平滑肌有强烈的刺激作用, 可增强胃肠蠕动^[12]. 研究表明^[13]应用SP和NK1激动剂能显著增加大鼠的内脏敏感性, 促进粪便排泄. 张瑜等^[14]发现, SP阳性表达主要集中于结肠的肌肉纤维之间、结肠黏膜下层、腺体周围, 间质中, 胞浆着色, 在IBS患者结肠组织中的SP分布在愈近结肠腺体时愈加丰富、强度增强, 提示SP与结肠分泌功能有关. 本实验发现, 模型组大鼠下丘脑及结肠组织中的SP mRNA的表达量较正常组均有升高趋势(其中下丘脑 $P < 0.05$ 、结肠 $P > 0.05$), 而高、中剂量肠吉泰的肠吉泰对其有明显下调作用($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), 而且这一结果与各组大鼠排便次数及粪便性状的变化一致. 因此推测认为肠吉泰能通过对腹泻型IBS肝郁脾虚证模型大

■同行评价

本文研究了肠吉泰中药对腹泻性IBS大鼠模型中SP表达的影响和临床疗效,为探讨中药的作用机制有重要理论意义。

鼠SP表达的调节,发挥调节神经内分泌及胃肠道运动的作用,并改善腹泻型IBS的内脏敏感状态。陈晓敏等^[15]研究IBS患者结肠黏膜中与痛觉和内脏高敏感相关的辣椒素受体VR1、SP和肥大细胞的变化,发现IBS患者乙状结肠辣椒素受体VR1、回盲部和乙状结肠SP免疫阳性反应细胞以及回盲部肥大细胞数量显著多于正常对照组,且腹泻型IBS与便秘型IBS组间无明显差异,并推测三者可能参与了IBS内脏高敏感的发生机制。肖亚等^[16]认为,SP可激活血小板释放5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT),激活肥大细胞释放组胺,5-HT和组胺又能促使感觉神经末梢释放SP,降低疼痛和感觉阈值。SP可能以循环激素的方式作用于乙状结肠平滑肌,使其运动增强,引起腹泻。而我们既往的研究亦表明^[17],肠吉泰能调节腹泻性IBS大鼠结肠黏膜肥大细胞的稳定性,降低结肠5-HT表达量,与本实验中SP表达的变化相一致。国内外研究表明^[18-20]内脏高敏感性可能是IBS患者多种症状的原因,调节IBS患者内脏感觉可能为IBS的治疗带来新途径,而肠吉泰的药物组成与配伍起到柔肝缓急的作用,从现代医学研究的角度分析,正是调节内脏高敏感性的有力佐证。

4 参考文献

- 1 陈奇. 中药药理研究方法学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 31
- 2 Williams CL, Villar RG, Peterson JM, Burks TF. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1988; 94: 611-621 [PMID: 2828144]
- 3 乔明琦, 张惠云, 陈雨振, 韩秀珍, 姚泽贤, 刘长华, 宋承木. 肝郁证动物模型研究的理论思考. *中国医药学报* 1997; 12: 42-44
- 4 韩秋艳. 肝郁脾虚证动物模型的建立. *贵阳中医学院学报* 2001; 23: 59
- 5 郭玉婷, 李延青, 左秀丽, 郭宾, 张海燕, 卢雪峰, 李君曼. 肠易激综合征内脏感觉过敏动物模型的建立. *胃肠病学和肝病杂志* 2003; 12: 332-335
- 6 蔡淦, 张玉喜, 刘群, 雷云霞, 丛军, 张正利. 肝郁证、脾虚证、肝郁脾虚证下丘脑、蓝斑CRF含量变化研究. *上海中医药杂志* 2006; 40: 1-3
- 7 许新芳, 林琳, 陈娟, 张红杰, 林征, 王美峰. 糖尿病大鼠结肠组织内P物质含量变化的含义. *中国临床康复* 2006; 10: 94-97
- 8 李熠萌, 张亚楠, 蔡淦, 林江. 肠吉泰治疗腹泻型肠易激综合征的随机双盲安慰剂平行对照试验. *上海中医药杂志* 2010; 44: 33-45
- 9 Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinin receptors in the gut: physiological and pathological implications. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 583-590 [PMID: 11757813]
- 10 张世红, 赵晏. P物质的免疫调节作用. *生理科学进展* 2002; 33: 235-238
- 11 夏德雨, 王景杰, 黄裕新. IBS神经机制研究现状及展望. *胃肠病和肝病杂志* 2008; 17: 503-505
- 12 陈晓敏, 张燕华, 吴跃龙. 肠易激综合征结肠黏膜P物质和血管活性肽变化的研究. *实用临床医药杂志* 2008; 12: 48-50
- 13 Okano S, Nagaya H, Ikeura Y, Natsugari H, Inatomi N. Effects of TAK-637, a novel neurokinin-1 receptor antagonist, on colonic function in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 559-564 [PMID: 11454917]
- 14 张瑜, 卜平, 孔桂美, 陈洁, 徐敏, 李娜. 肠易激综合征中医病证与肠胆囊收缩素、细胞癌基因fos、P物质的相关性. *中医杂志* 2008; 49: 803-805
- 15 陈晓敏, 罗云, 吴跃龙, 江敏. 肠易激综合征患者结肠黏膜辣椒素受体、P物质和肥大细胞变化的研究. *胃肠病学* 2010; 15: 672-675
- 16 肖亚, 熊艾君, 何文智, 唐春燕, 李亮. 腹泻要方对腹泻型肠易激综合征大鼠胃肠激素的影响. *中国当代医药* 2010; 17: 20-22
- 17 丛军, 蔡淦, 张正利, 李莉. 肠吉泰对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠肥大细胞变化和5-羟色胺表达的影响. *安徽中医学院学报* 2010; 29: 47-51
- 18 肖晨, 王承党. 肠易激综合征内脏高敏感性发生机制中相关受体的作用. *国际消化病杂志* 2011; 30: 28-31
- 19 颜秀娟, 陈胜良. 肠黏膜肥大细胞参与感染后肠易激综合征内脏高敏感机制的研究进展. *胃肠病学* 2011; 16: 435-437
- 20 Piché M, Arsenault M, Poitras P, Rainville P, Bouin M. Widespread hypersensitivity is related to altered pain inhibition processes in irritable bowel syndrome. *Pain* 2010; 148: 49-58 [PMID: 19889500 DOI: 10.1016/j.pain.2009.10.005]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



叶黄素对人结肠癌HT29细胞增殖的抑制及其机制

付蕾, 陈晓哲, 张慧娟, 张源渊, 王凌飞, 徐少博, 张玉杰, 王明臣

付蕾, 陈晓哲, 张慧娟, 张源渊, 王凌飞, 徐少博, 张玉杰, 郑州大学药学院 河南省郑州市 450000
王明臣, 郑州大学基础医学院生物化学教研室 河南省郑州市 450000

付蕾, 副教授, 主要从事抗肿瘤药物细胞分子机制的研究。

河南省医学科技攻关基金资助项目, No. 20060078

作者贡献分布: 付蕾、陈晓哲及王明臣对此文献均等; 此课题由付蕾、陈晓哲及王明臣设计; 研究过程由付蕾、陈晓哲、张慧娟、张源渊、王凌飞、徐少博、张玉杰及王明臣操作完成; 研究所用试剂及分析工具由付蕾、陈晓哲及王明臣提供; 数据分析由陈晓哲完成; 本文写作由付蕾、陈晓哲及王明臣完成。

通讯作者: 王明臣, 教授, 450000, 河南省郑州市高新区科学大道100号, 郑州大学基础医学院生物化学教研室。

wangmc@zzu.edu.cn

收稿日期: 2013-03-17 修回日期: 2013-03-22

接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-08

Mechanisms underlying suppressive effect of lutein on cell proliferation in human colon cancer cell line HT29

Lei Fu, Xiao-Zhe Chen, Hui-Juan Zhang, Yuan-Yuan Zhang, Ling-Fei Wang, Shao-Bo Xu, Yu-Jie Zhang, Ming-Chen Wang

Lei Fu, Xiao-Zhe Chen, Hui-Juan Zhang, Yuan-Yuan Zhang, Ling-Fei Wang, Shao-Bo Xu, Yu-Jie Zhang, School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Ming-Chen Wang, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Supported by: the Medical Science and Technology Foundation of Henan Province, No. 20060078

Correspondence to: Ming-Chen Wang, Professor, Basic Medical College, Zhengzhou University, Kexue Road 100, Gaoxin District, Zhengzhou 450000, Henan Province, China. wangmc@zzu.edu.cn

Received: 2013-03-17 Revised: 2013-03-22

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To study the anti-proliferative effect of lutein on human colon cancer HT29 cells and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: HT29 cells were treated with different concentrations of lutein (20, 40, 80, 160 mg/L) for 24, 48 or 72 h. After treatment, cell proliferation was detected by SRB assay, cell cycle progression was analyzed by flow cytometry, cell apoptosis was detected by fluorescence

microscopy and Hoechst 33342/PI staining, and the levels of p-ERK and p-p38 proteins were determined by Western blot.

RESULTS: Lutein treatment inhibited the proliferation of HT29 cells in a dose- and time-dependent manner. After treatment of HT29 cells with lutein (80 mg/L) for 48 h, the percentage of cells at G₀/G₁ phase cells increased from 58.67% to 63.23%, and with the increase in drug concentration, the percentage of cells at G₀/G₁ phase increased significantly. When the lutein concentration was 160 mg/L, the percentage of cells at G₀/G₁ phase increased to 70.81%, indicating that lutein arrested HT29 cells in G₀/G₁ phase. Fluorescence microscopy and Hoechst 33342/PI staining suggested that lutein induced HT29 cell apoptosis in a dose-dependent manner. Western blot analysis showed that lutein down-regulated the expression of p-ERK and up-regulated the expression of p-p38 protein in dose-dependent manner (both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Lutein could significantly inhibit the proliferation of HT29 cells, induce apoptosis, and arrest cell cycle in G₀/G₁ phase. Down-regulation of p-ERK protein expression and up-regulation of p-p38 protein expression may be important mechanisms responsible for the apoptosis-inducing effect of lutein.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Lutein; Colon cancer; Proliferation; p-ERK; p-p38

Fu L, Chen XZ, Zhang HJ, Zhang YY, Wang LF, Xu SB, Zhang YJ, Wang MC. Mechanisms underlying suppressive effect of lutein on cell proliferation in human colon cancer cell line HT29. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1239-1244 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1239.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1239>

摘要

目的: 研究叶黄素对结肠癌HT29细胞的增殖抑制作用及可能的机制。

■背景资料

结肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 常规的治疗方法有手术切除, 放疗和化疗, 这些方法治愈率低, 而且给人体造成一定的不良反应和产生化疗药耐药性, 因此寻找一种高效低毒的天然植物药物对结肠癌的治疗具有重要的临床意义。

■同行评议者

白雪, 副主任医师, 中国人民解放军北京军区总医院普通外科; 周晓武, 副主任医师, 中国人民解放军空军总医院普外科

■ 研发前沿

叶黄素是一种含氧类胡萝卜素,在抗氧化、预防白内障、延缓动脉硬化以及抗癌等方面有重要作用,研究表明,叶黄素对乳腺癌、结肠癌、食管癌、前列腺癌等多种癌症具有抑制作用。

方法:用不同浓度的叶黄素(20、40、80、160 mg/L)和空白对照组(0 mg/L)干预处理培养的HT29细胞24、48、72 h,采用SRB法检测其对该细胞的增殖抑制作用;流式细胞仪检测细胞周期;Hoechst33342/PI荧光染色法检测细胞凋亡;Western blot检测磷酸化ERK(phosphorylation of ERK, p-ERK)、磷酸化p38(phosphorylation of p38, p-p38)蛋白表达水平的变化。

结果:叶黄素能抑制HT29细胞增殖,且有明显的剂量和时间依赖性。流式细胞仪检测细胞周期结果显示,叶黄素(80 mg/L)干预处理HT29细胞48 h后, G_0/G_1 期细胞由58.67%增加至63.23%,且随药物浓度增加, G_0/G_1 期细胞显著增加,当叶黄素浓度为160 mg/L时, G_0/G_1 期细胞增加至70.81%,表明叶黄素可将HT29细胞阻滞在 G_0/G_1 期;Hoechst33342/PI荧光染色法检测细胞凋亡结果显示,叶黄素可诱导HT29细胞凋亡;Western blot 检测结果显示叶黄素可下调p-ERK、上调p-p38蛋白的表达,有浓度依赖性($P < 0.01$)。

结论:叶黄素可显著抑制HT29细胞的增殖并诱导其凋亡,使细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期;下调p-ERK蛋白、上调p-p38蛋白的表达可能是其诱导细胞凋亡的重要机制。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词:叶黄素;结肠癌;增殖; p-ERK; p-p38

核心提示:叶黄素可显著抑制HT29细胞的增殖并诱导其凋亡,使细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期;下调磷酸化ERK蛋白、上调磷酸化p38蛋白的表达可能是其诱导细胞凋亡的重要机制。

付蕾, 陈晓茜, 张慧娟, 张源渊, 王凌飞, 徐少博, 张玉杰, 王明臣. 叶黄素对人结肠癌HT29细胞增殖的抑制及其机制. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1239-1244 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1239.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1239>

0 引言

结肠癌是一种常见的恶性肿瘤。随着人们生活方式和膳食结构的改变,结肠癌的发病率呈逐年上升趋势^[1]。目前结肠癌的主要治疗手段是根治性手术切除,辅以放疗、化疗等综合治疗,但是结肠癌手术病例中早期癌比例较低,术后总体生存率较低,放疗和化疗会对人体造成一定的不良反应,而且可能产生化疗耐药性。因此寻

找一种高效低毒的天然植物药物对结肠癌的干预阻断防治具有重要的理论意义和实用价值。叶黄素(lutein)是存在于膳食中的一种含氧类胡萝卜素,其作为一种肯定的抗氧化剂,在预防白内障、黄斑变性、心血管疾病及肿瘤的发生发展等方面有重要的作用^[2]。已有研究表明,叶黄素对乳腺癌、食管癌、皮肤癌、前列腺癌等多种肿瘤具有抑制作用。本研究旨在探讨叶黄素对人结肠癌HT29细胞的增殖抑制作用及可能机制,为叶黄素用于结肠癌的干预防治提供初步的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞株HT29由郑州大学生物工程系馈赠;叶黄素由Food Research Program, Agriculture and Agri-Food Canada提供,用DMSO溶解制成储备液,使用时稀释到适当浓度;细胞凋亡荧光Hoechst33342/PI双染试剂盒购自凯基生物公司;complete蛋白酶抑制剂混合片,PhosSTOP磷酸酶抑制剂混合片购自美国Roche公司;β-actin(兔抗人), p-ERK(兔抗人), p-p38(兔抗人)购自Santa Cruz Biotechnology, INC公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:将人结肠癌HT29细胞株常规培养于含体积分数为10%灭活小牛血清的RPMI 1640培养基中,置于37℃、5%CO₂浓度和饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 SRB法检测叶黄素对HT29细胞增殖的影响:取对数生长期的HT29细胞接种于96孔培养板,调整细胞密度为 3×10^4 个/mL,每孔200 μL,培养24 h后,分别加入终浓度为20、40、80、160 mg/L的叶黄素溶液,同时设DMSO溶剂对照组,每组6个复孔,重复3次。叶黄素分别作用细胞24、48、72 h后SRB染色,酶标仪515 nm的波长下测得各孔A值。抑制率(%) = (对照组A值 - 实验组A值) / 对照组A值 × 100%。

1.2.3 流式细胞仪检测叶黄素对细胞周期的影响:取对数生长期的HT29细胞,0.25%胰酶消化分散后,以 1×10^5 个/孔接种于6孔细胞培养板中。培养24 h贴壁后,分别加入终浓度为80、160 mg/L的药物,设DMSO溶剂对照组,药物作用48 h后,收集细胞,1000 r/min离心5 min, PBS洗涤2次, 70%冰乙醇1 mL重悬细胞,4℃固定24 h以上。依照细胞周期检测试剂盒说明书操作,12000 r/min离心5 min弃去冰乙醇, PBS洗2次,加入100 μL 0.1%的Triton X-100,室温孵育20 min, 20 mg/L Rnase

表 1 不同浓度叶黄素对结肠癌HT29细胞增殖的影响 ($n = 6$, mean \pm SD)

分组	24 h		48 h		72 h	
	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)	A值	抑制率(%)
对照组	0.217 \pm 0.029	—	0.341 \pm 0.049	—	0.658 \pm 0.052	—
20 mg/L组	0.214 \pm 0.032	1.51	0.330 \pm 0.037	3.39	0.604 \pm 0.071	8.14
40 mg/L组	0.206 \pm 0.053	5.14	0.263 \pm 0.022 ^a	22.96	0.504 \pm 0.075 ^b	23.35
80 mg/L组	0.152 \pm 0.031 ^b	30.21	0.224 \pm 0.021 ^b	34.44	0.307 \pm 0.039 ^b	53.36
160 mg/L组	0.124 \pm 0.010 ^b	43.10	0.108 \pm 0.024 ^b	68.34	0.123 \pm 0.019 ^b	81.37

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.表 2 不同浓度叶黄素对结肠癌HT29细胞周期分布的影响 ($n = 3$, mean \pm SD, %)

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	58.67 \pm 0.80	31.31 \pm 1.93	10.02 \pm 1.16
80 mg/L组	63.23 \pm 2.23	25.25 \pm 1.75	11.52 \pm 1.12
160 mg/L组	70.81 \pm 2.00 ^b	16.42 \pm 1.34 ^b	12.77 \pm 1.53

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

100 μ L, 孵育20 min, 20 mg/L的碘化丙啶(PI) 50 μ L, 室温避光标记5 min, 上机检测.

1.2.4 Hoechst33342/PI双染法检测细胞凋亡: 取对数生长期的细胞, 按 1×10^5 个/孔接种于6孔培养板中, 常规培养24 h后, 设药物浓度为20、40、80、160 mg/L, DMSO为溶剂对照组, 48 h后, 离心收集细胞, 将 10^5 - 10^6 个细胞悬浮于1 mL培养基中, 加入10 μ L Hoechst 33342染液, 37 $^{\circ}$ C孵育10 min, 4 $^{\circ}$ C, 1000 r/min离心5 min, 弃上清, 1mL Buffer A悬浮细胞, 加入5 μ L PI染液, 室温避光放置10 min后混匀. 荧光显微镜下拍照, 并用尼康NIS-Elements BR图像分析软件进行分析.

1.2.5 Western blot检测p-ERK、p-p38蛋白的表达: 取对数生长期的细胞接种于6孔板中, 次日加入终浓度分别为20、40、80、160 mg/L的叶黄素, 对照组为DMSO溶剂组, 48 h后, 每孔加入90 μ L细胞裂解液(RIPA: 磷酸酶抑制剂: 蛋白酶抑制剂 = 100 : 10 : 4), 冰上裂解30 min, 然后4 $^{\circ}$ C, 12000 r/min离心15 min, 上清液即为总蛋白. BCA蛋白试剂盒定量, 总蛋白与SDS-PAGE蛋白上样缓冲液4 : 1混合后, 煮沸5 min, 120 V恒压电泳, 300 mA恒流转膜, 一抗(1 : 2000, 兔抗人p-ERK; 1 : 1000, 兔抗人p-p38)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 二抗(1 : 10000, HRP标记的羊抗兔抗体), 室温条件下孵育2 h, ECL发光剂发光, 显影, 定影.

■相关报道

磷酸活化的ERK可介导c-Jun、c-fos、AP-1等转录因子的活化, 参与细胞的增殖、分化、细胞骨架的构建、细胞形态维持和细胞凋亡等多种生物学反应. p38MAPK可通过调节p53、Bax、caspase-9和caspase-3等因子启动抗细胞增殖及凋亡作用.

并用软件Image proplus 6.0比较条带的积分光密度(integrated optical density, IOD).

统计学处理 实验数据用mean \pm SD表示, 采用SPSS17.0软件进行统计分析. 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用LSD检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 叶黄素对HT29细胞的增殖抑制作用 叶黄素(浓度为40、80、160 mg/L)作用HT29细胞72 h后能显著抑制细胞的增殖, 且呈现时间、剂量依赖性($P < 0.01$, 表1).

2.2 叶黄素对HT29细胞周期的影响 流式细胞术检测结果显示, 当叶黄素(80 mg/L)干预处理HT29细胞48 h后, G₀/G₁期细胞由58.67%增加至63.23%, 且随药物浓度增加, G₀/G₁期细胞显著增加, 当叶黄素浓度为160 mg/L时, G₀/G₁期细胞增加至70.81%, 表现显著的G₁期阻滞($P < 0.01$). 同时, 随叶黄素浓度增加, S期细胞显著减少, G₂/M期细胞变化不明显. 结果表明叶黄素可阻滞HT29细胞于G₀/G₁期(图1, 表2).

2.3 叶黄素对HT29细胞凋亡的影响 Hoechst33342/PI染色后, 根据细胞被染成不同的颜色分辨出正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞, 正常细胞为低蓝光/低红光, 早期凋亡细胞为高蓝光/低红光, 晚期凋亡或坏死细胞为低蓝光/高红光. 由图1和表2结果显示, 对照组显示低蓝光/低红光, 为正常细胞, 当药物浓度为80 mg/L时, 显示高蓝光/低红光, 说明大量细胞凋亡, 坏死细胞不明显, 160 mg/L显示低蓝光/高红光, 说明晚期凋亡和坏死细胞都增多. 随着药物浓度的增加, 荧光强度逐渐增强, 结果表明, 叶黄素可诱导HT29细胞凋亡, 且有剂量依赖性(图2, 表3).

■ 创新盘点

本文从MAPK信号通路中ERK和p38磷酸化的表达变化,来观察叶黄素抑制结肠癌HT29细胞增殖及诱导细胞凋亡的作用,并探讨其可能的分子机制。

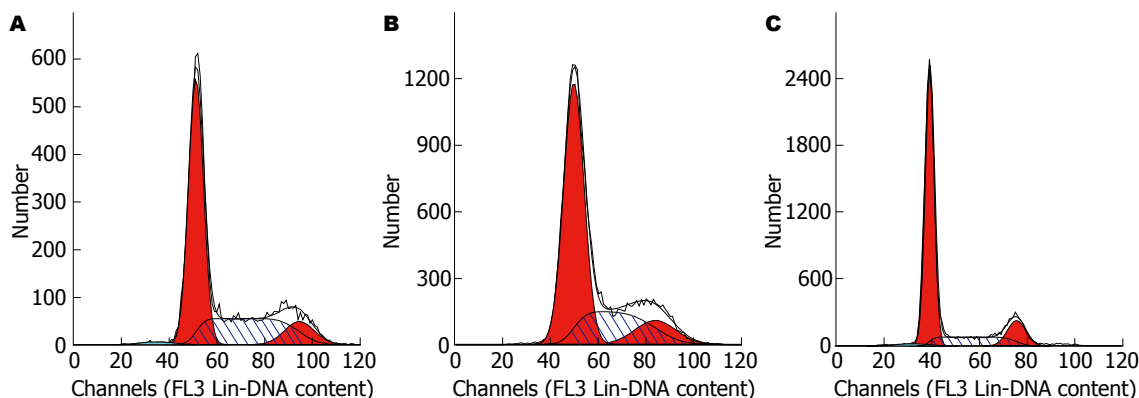


图1 不同浓度叶黄素对结肠癌HT29细胞周期的影响。A: 对照组; B: 80 mg/L组; C: 160 mg/L组。

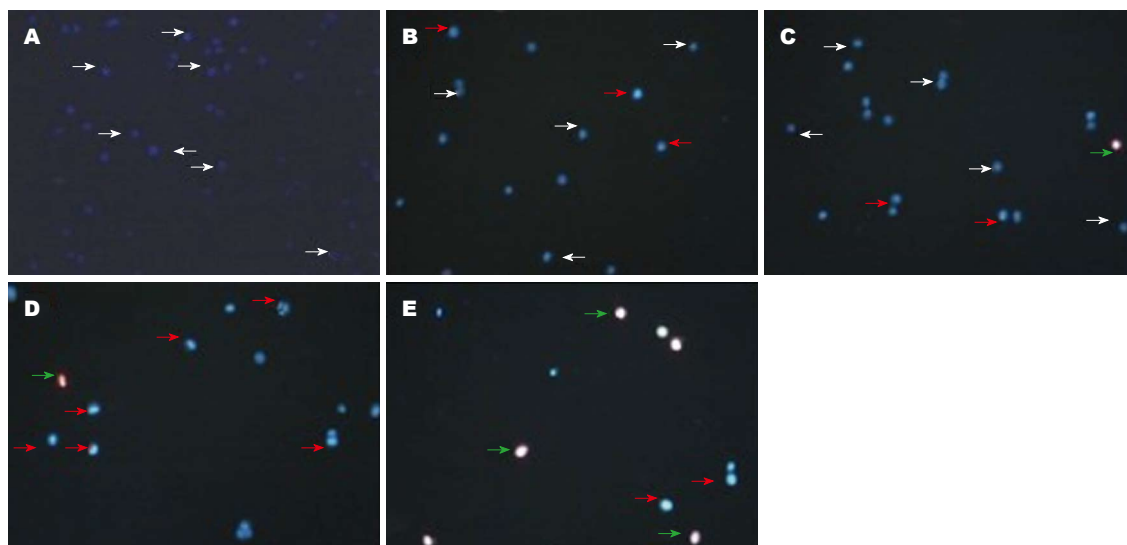


图2 不同浓度叶黄素对HT29细胞凋亡的影响($\times 100$)。A: 对照组; B: 20 mg/L组; C: 40 mg/L组; D: 80 mg/L组; E: 160 mg/L组; 白色箭头表示正常细胞; 红色箭头表示早期凋亡细胞; 绿色箭头表示晚期凋亡或坏死细胞。

表3 不同浓度叶黄素对HT29细胞荧光强度的影响 ($n = 3$, mean \pm SD)

分组	蓝光	红光
对照组	72.532 \pm 10.615	37.472 \pm 14.285
20 mg/L组	94.327 \pm 17.138 ^b	40.026 \pm 10.337
40 mg/L组	126.719 \pm 25.824 ^b	47.331 \pm 17.592 ^a
80 mg/L组	135.673 \pm 18.252 ^b	70.203 \pm 16.284 ^b
160 mg/L组	147.263 \pm 20.374 ^b	133.845 \pm 22.761 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

2.4 叶黄素对HT29细胞p-ERK、p-p38蛋白表达的影响 对照组、20、40、80、160 mg/L叶黄素对HT29细胞p-ERK蛋白表达的相对灰度值分别为: 0.912、0.644、0.517、0.361、0.079。p-p38蛋白的相对灰度值分别为: 0.194、0.218、0.386、0.749、0.856。结果显示, 不同浓度的叶

黄素处理HT29细胞48 h后, p-ERK的蛋白水平均显著降低($P < 0.01$), p-p38蛋白水平升高($P < 0.01$)。叶黄素可明显抑制ERK的磷酸化和激活p38的磷酸化, 且有良好的剂量依赖关系(图3)。

3 讨论

叶黄素是含氧类胡萝卜素。流行病学调查表明, 饮食中叶黄素的摄入与多种肿瘤的发生呈负相关。Slattery等^[3]研究表明叶黄素能降低结肠癌的发病率。本研究结果亦显示, 叶黄素对结肠癌HT29细胞亦有显著的增殖抑制作用, 且呈时间和剂量依赖性。进一步对叶黄素的增殖作用机制分析表明, 叶黄素可使HT29细胞周期阻滞在G₀/G₁期。近年研究发现, 细胞周期调控异常与肿瘤密切相关^[4]。在细胞增殖周期中, G₀/G₁期、S期和G₂/M期之间存在着影响细胞周期进行的调控点, 而药物可能通过影响这些调控点来影响

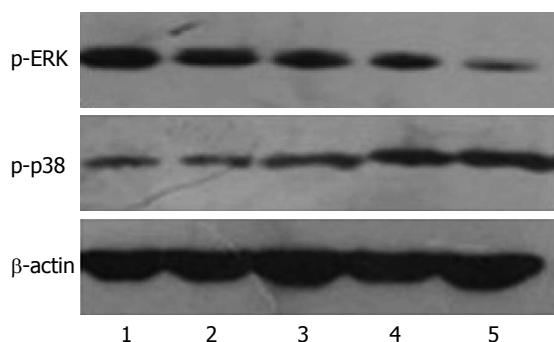


图3 不同浓度叶黄素对HT29细胞p-ERK、p-p38蛋白表达的影响。1: 对照组; 2: 20 mg/L组; 3: 40 mg/L组; 4: 80 mg/L组; 5: 160 mg/L组。

细胞的增殖, 不同的药物可影响细胞周期的不同阶段^[5,6]。叶黄素对细胞周期的阻滞可能是其对HT29细胞增殖抑制作用的机制之一。细胞凋亡是由死亡信号诱发的受调控的一种细胞死亡过程, 是一种细胞生理性死亡的方式。凋亡与增殖密切相关, 细胞的增殖和凋亡调节失控是肿瘤发生的主要原因^[7]。本研究结果显示, 随叶黄素剂量的增加, 细胞凋亡和坏死数目增多, 荧光强度增强, 表明叶黄素可剂量依赖的诱导HT29细胞凋亡, 可能是叶黄素抑制HT29细胞增殖的另一重要机制。

MAPK信号途径介导真核细胞增殖、分化及凋亡等多种生物学反应^[8], 是研究较多的蛋白激酶级联通路, 主要有3个成员: ERK、p38和JNK/SAPK。研究表明, 许多刺激因子, 如表皮生长因子可通过Ras/Raf/MEK/ERK途径磷酸活化ERK, 活化的ERK(p-ERK)将胞浆内信号导入胞核, 作用于c-Jun、c-fos、c-Myc等转录因子, 促进多种癌基因及细胞周期调节相关基因的表达^[9]。病理条件下, ERK信号通路的过度激活与肿瘤细胞的恶性增殖密切相关, 在乳腺癌、肝癌等多种肿瘤中ERK具有高水平的磷酸化^[10]。本研究表明叶黄素可下调HT29细胞ERK蛋白的磷酸化水平。p38信号通路是MAPK通路的一个重要分支。在环境应激因子和凋亡等信号作用下, p38通路被激活成磷酸化的p38^[11,12]。研究表明, p38MAPK可通过调节p53、Bax、caspase-9和caspase-3等因子启动抗增殖及凋亡作用^[13]。许多药物包括白藜芦醇^[14]、类视黄醇等, 可通过活化p38介导肿瘤细胞的死亡启动过程。磷酸化的p38MAPK能通过激活p53、ATF-2、CHOP-1和其他转录因子导致细胞周期停滞、凋亡等^[15]。本研究结果表明, 叶黄素可上调HT29细胞的p38蛋

白的磷酸化水平, 且有剂量依赖性。综合上述结果, 叶黄素可显著抑制结肠癌HT29细胞增殖, 阻滞细胞周期在G₀/G₁期, 并可诱导HT29细胞凋亡, 且其机制可能是通过下调ERK蛋白的磷酸化水平, 上调p38蛋白磷酸化水平而介导的。但是细胞内凋亡相关的信号通路存在复杂的交叉对话, 叶黄素导致ERK和p38MAPK蛋白表达变化的始动信号以及其下游信号的表达如何, 有待深入研究。

4 参考文献

- 1 梅庆步, 赵忠新, 郑立红, 陈萍, 刘丹. 染料木黄酮对人结肠癌SW620细胞生长的抑制. 世界华人消化杂志 2013; 21: 619-623
- 2 Roberts RL, Green J, Lewis B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clin Dermatol* 2009; 27: 195-201 [PMID: 19168000 DOI: 10.1016/j.clindermatol.2008.01.011]
- 3 Slattery ML, Benson J, Curtin K, Ma KN, Schaeffer D, Potter JD. Carotenoids and colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 575-582 [PMID: 10648274]
- 4 Rodriguez-Nieto S, Zhivotovsky B. Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 4411-4425 [PMID: 17168751 DOI: 10.2174/138161206779010495]
- 5 郭宇飞, 李新毅, 郭芬, 曹杜鹃. 中药远志对D-半乳糖致衰大鼠学习记忆及海马LTP的影响. 中国老年学杂志 2011; 31: 632-634
- 6 关彩宣, 孙文内, 曲鹏, 张朝东. 鹅膏蕈氨酸对大鼠海马神经元的毒性作用. 中国公共卫生 2006; 22: 1115-1116
- 7 Chlapek P, Redova M, Zitterbart K, Hermanova M, Sterba J, Veselska R. Enhancement of ATRA-induced differentiation of neuroblastoma cells with LOX/COX inhibitors: an expression profiling study. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 45 [PMID: 20459794 DOI: 10.1186/1756-9966-29-45]
- 8 Deng W, Sui H, Wang Q, He N, Duan C, Han L, Li Q, Lu M, Lv S. A Chinese herbal formula, Yi-Qi-Fu-Sheng, inhibits migration/invasion of colorectal cancer by down-regulating MMP-2/9 via inhibiting the activation of ERK/MAPK signaling pathways. *BMC Complement Altern Med* 2013; 13: 65 [PMID: 23506655 DOI: 10.1186/1472-6882-13-65]
- 9 Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 2010; 277: 2-21 [PMID: 19843174 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x]
- 10 Meier F, Schitteck B, Busch S, Garbe C, Smalley K, Satyamoorthy K, Li G, Herlyn M. The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 2005; 10: 2986-3001 [PMID: 15970553]
- 11 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 [PMID: 16709574 DOI: 10.1074/jbc.M510644200]

■应用要点

下调ERK的磷酸化水平和/或上调p38的磷酸化水平, 可能是叶黄素抑制结肠癌HT29细胞增殖并诱导细胞凋亡的机制之一, 本研究为进一步研究叶黄素抗肿瘤的作用机制提供依据。

■同行评价

本文研究的有关叶黄素与结肠癌关系的研究目前国内报道甚少, 研究本身具有重要的研究意义。本文设计严密, 结果可靠, 结论可信, 讨论得当。

- 12 李宁, 陈娟, 白研, 白文元. p38MAPK信号转导通路在EGF诱导食管腺癌SEG-1细胞表达u-PA中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1458-1462
- 13 Yu E, Ahn YS, Jang SJ, Kim MJ, Yoon HS, Gong G, Choi J. Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers. *Breast*

Cancer Res Treat 2007; 101: 269-278 [PMID: 16897432 DOI: 10.1007/s10549-006-9304-y]

- 14 张亚宏, 郭敬功, 郭子华, 谢松强. 白藜芦醇通过激活p38-p53通路诱导人乳腺癌MCF-7细胞凋亡. 药理学报 2011; 46: 1332-1337

- 15 邱建武, 郭薇, 申丽娟. p38MAPK在肝细胞癌中的研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 503-509

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t=4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5)志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

老年胃食管反流病患者食道动力及胃食管反流的特点

孙莎莎, 张琪, 赵坤, 张翠萍, 田字彬

孙莎莎, 张琪, 赵坤, 张翠萍, 田字彬, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003

孙莎莎, 在读硕士, 主要从事食管测压方面的研究.

作者贡献分布: 孙莎莎与张翠萍对此文所作贡献均等; 此课题由孙莎莎、张翠萍及张琪设计; 研究过程由孙莎莎与赵坤操作完成; 研究所用仪器由田字彬提供; 数据分析由孙莎莎与赵坤操作完成; 论文写作由孙莎莎、张琪及张翠萍完成.

通讯作者: 张翠萍, 教授, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化内科. rose201001@126.com

电话: 0532-82911304

收稿日期: 2013-02-23 修回日期: 2013-03-26

接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-08

Characteristics of esophageal motility and esophageal acid exposure in elderly patients with gastroesophageal reflux disease

Sha-Sha Sun, Qi Zhang, Kun Zhao, Cui-Ping Zhang, Zi-Bin Tian

Sha-Sha Sun, Qi Zhang, Kun Zhao, Cui-Ping Zhang, Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Cui-Ping Zhang, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. rose201001@126.com

Received: 2013-02-23 Revised: 2013-03-26

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of esophageal motility and esophageal acid exposure in elderly patients with gastroesophageal reflux disease (GERD).

METHODS: Twenty-five elderly patients and fourteen non-elderly patients with typical GERD symptoms were recruited and divided into a reflux esophagitis group and a non-erosive reflux esophagitis group. All patients underwent high-resolution manometry and 24 h pH monitoring.

RESULTS: The lower esophageal sphincter pressure (LESP) was significantly lower in elderly GERD patients than in non-elderly GERD patients ($9.81 \text{ mmHg} \pm 5.78 \text{ mmHg}$ vs 13.79

$\text{mmHg} \pm 4.40 \text{ mmHg}$, $P < 0.05$), especially in the elderly RE group. The speed of esophageal peristalsis transmission was slower ($62.99 \text{ cm/s} \pm 21.10 \text{ cm/s}$ vs $64.69 \text{ cm/s} \pm 14.03 \text{ cm/s}$, $P < 0.01$) and the peristalsis wave duration time was longer ($3.74 \text{ s} \pm 1.32 \text{ s}$ vs $2.94 \text{ s} \pm 0.66 \text{ s}$, $P < 0.05$) in elderly GERD patients than in non-elderly GERD patients. The supine time ($\text{pH} < 4$) ($9.10\% \pm 12.99\%$ vs $1.92\% \pm 2.56\%$) and DeMeester score in elderly patients were higher than those in non-elderly patients ($45.43 \text{ mmHg-cm-s} \pm 5.06 \text{ mmHg-cm-s}$ vs $16.06 \text{ mmHg-cm-s} \pm 23.66 \text{ mmHg-cm-s}$). There were no significant differences in other parameters between the two groups.

CONCLUSION: Compared with non-elderly patients, esophageal anti-reflux defense mechanism is weakened, the function of esophageal peristalsis declines and the degree of acid exposure aggravates in elderly GERD patients.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Elderly; Gastroesophageal reflux disease; Esophageal manometry; 24 h pH monitoring

Sun SS, Zhang Q, Zhao K, Zhang CP, Tian ZB. Characteristics of esophageal motility and esophageal acid exposure in elderly patients with gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1245-1249 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1245.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1245>

摘要

目的: 探讨老年胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)患者的食道动力及胃食管反流特点.

方法: 选取具有典型胃食管反流症状的老年患者25例及中青年患者14例, 根据消化系内镜检查结果, 两疾病组分别分为反流性食管炎组与非糜烂性反流病组. 所有患者均行高分辨率食管测压及24 h pH监测检查.

结果: 与中青年组相比, 老年组的食管下括约肌压力明显降低($9.81 \text{ mmHg} \pm 5.78 \text{ mmHg}$ vs

■背景资料

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是消化内科中的常见疾病, 老年人作为一个特殊的人群其GERD的发病率呈逐年上升的趋势, 而有关老年GERD患者食道动力方面的研究甚少.

■同行评议者

蓝宇, 教授, 北京积水潭医院消化科

■ 研发前沿

目前认为老年GERD患者食管运动功能及酸暴露情况与中青年人不同,有关老年GERD患者食管动力及胃食管反流方面的研究成为热点。

13.79 mmHg \pm 4.40 mmHg, $P<0.05$), 以老年RE组降低为著, 食管体部蠕动波传导速度较之减慢(62.99 cm/s \pm 21.10 cm/s vs 64.69 cm/s \pm 14.03 cm/s, $P<0.01$), 维持时间延长(3.74 s \pm 1.32 s vs 2.94 s \pm 0.66 s, $P<0.05$); 24 h pH监测数据中, 老年组卧位pH <4 时间百分比(9.10% \pm 12.99% vs 1.92% \pm 2.56%)以及DeMeester评分(45.43 mmHg-cm-s \pm 50.63 mmHg-cm-s vs 16.06 mmHg-cm-s \pm 23.66 mmHg-cm-s)均明显高于中青年组($P<0.05$), 其他各项指标无统计学意义。

结论: 与中青年相对比, 老年GERD患者食管抗反流防御机制下降, 食管体部蠕动功能减退, 酸暴露程度加重, 更容易发生胃食管反流。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 老年人; 胃食管反流病; 食管测压; 24 h pH监测

核心提示: 老年人由于受年龄的影响, 食管蠕动功能障碍明显减弱, 且与胃食管反流的程度呈密切正相关。食管酸暴露情况重于其他人群, 更易发生胃食管反流。

孙莎莎, 张琪, 赵坤, 张翠萍, 田字彬. 老年胃食管反流病患者食管动力及胃食管反流的特点. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1245-1249 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1245.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1245>

0 引言

胃食管反流病(gastro-esophageal reflux disease, GERD)是临床中的常见疾病, 是由多种因素导致的消化系动力障碍性疾病, 通常根据内镜下黏膜损害结果可将其分为非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)以及反流性食管炎(reflux esophagitis, RE). 目前已有国内研究表明, 老年GERD的发病率呈逐年上升的趋势, 而有关老年GERD患者食管动力方面的研究甚少, 本研究旨在通过高分辨率食管测压(high-resolution manometry, HRM)及24 h pH监测以分析老年人食管动力及胃食管反流的特点, 同时与中青年加以比较。

1 材料和方法

1.1 材料 选取来我院门诊就诊的具有反酸、烧心等典型胃食管反流症状的老年患者25例及中青年患者14例, 其中老年组男8例, 女17例, 年龄

在65-71岁, 平均63.8岁。中青年组男性8例, 女性6例, 年龄在27-50岁, 平均39.3岁。于我院门诊行胃镜检查, 根据内镜检查结果两疾病组再次分为RE组和NERD组, 其中老年RE组9例, NERD组16例, 中青年RE组5例, NERD组9例。最后均行食管测压及24 h pH监测检查。排除标准: 所有入选者均需排除器质性病变如消化性溃疡等及影响食管运动功能的其他全身性疾病如糖尿病、自身免疫性疾病等。应用36通道高分辨率食管测压系统(美国SSI公司, Sierra Scientific Instrument), 对食管体部的不同部位张力进行同步监测。通过ManoView Analysis分析软件分析获得相关数据。24 h食管pH监测使用便携式pH动态监测记录仪, 监测前将电极管应用pH 7.0及pH 4.0标准缓冲液进行电极校正。监测结果通过计算机进行分析。

1.2 方法

1.2.1 食管测压: 检查前停用抑酸药、胃肠动力药及其他影响胃功能药物(如钙通道阻滞剂、抗抑郁药)至少7 d, 经鼻腔插入测压导管, 总共收集10次湿咽, 每次咽水5 mL, 两次吞咽间隔时间 >30 s。主要记录指标: 食管下括约肌压力(lower esophageal sphincter pressure, LES), 食管远端蠕动收缩波幅(peristalsis amplitude, PA), 蠕动波持续时间(peristalsis duration, PD), 蠕动波传导速度(peristalsis velocity, PV), 远端收缩积分(the distal contractile integral, DCI)。食管动力障碍疾病的具体分类参考2009年芝加哥分类标准^[1]。

1.2.2 24 h pH监测: 于食管测压检查后进行。电极导管置于LES上方5 cm处。受试者可正常活动及饮食, 但应注意避免进食酸性食物及饮料。24 h后监测结果应用计算机进行分析。主要分析以下参数: 酸反流的总次数, 酸反流 >5 min的次数, 总计pH <4 的百分比, 立位pH <4 的百分比, 卧位pH <4 的百分比, 最长反流时间。最终以DeMeester评分 >14.72 和/或pH <4 的总时间超过4%判定为病理性酸反流。

统计学处理 应用统计学程序分析软件SPSS17.0进行统计学处理, 两组之间比较采用 t 检验方法, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 食管测压结果 LES在老年组明显低于中青年组, 以老年RE组降低为著, 两组间LES差异具有显著统计学意义($P<0.001$)。食管体部

表 1 老年组和中青年组食管测压结果 (mean ± SD)

	老年组	中青年组	P值
食管下括约肌压力(mmHg)	9.81 ± 5.78	13.79 ± 4.40	<0.05
食管远端蠕动收缩波幅(mmHg)	62.99 ± 21.10	64.69 ± 14.03	>0.05
蠕动波持续时间(s)	3.74 ± 1.32	2.94 ± 0.66	<0.05
蠕动波传导速度(cm/s)	3.30 ± 1.01	4.26 ± 1.02	<0.01
远端收缩积分(mmHg-cm-s)	1748.82 ± 626.17	1987.37 ± 559.04	>0.05

■ 相关报道

Behar研究发现食管酸清除时间延长与LESP降低有关联, Kraus等发现LESP与酸暴露程度无明显相关。

表 2 老年组及中青年组RE与NERD组食管测压结果比较 (mean ± SD)

分组	食管下括约肌压力 (mmHg)	食管远端蠕动收缩波幅 (mmHg)	蠕动波持续时间 (s)	蠕动波传导速度 (cm/s)	远端收缩积分 (mmHg-cm-s)
老年组					
RE组	8.60 ± 2.69	59.96 ± 14.91	3.36 ± 0.53	2.69 ± 0.59	1468.0 ± 460.45
NERD组	9.44 ± 3.23	69.34 ± 45.59	3.96 ± 1.58	3.26 ± 1.17	1905.7 ± 663.59
中青年组					
RE组	12.36 ± 3.73 ^a	57.78 ± 32.84	3.10 ± 1.07	4.42 ± 1.49	1866.8 ± 695.38
NERD组	14.58 ± 4.75 ^b	71.86 ± 27.82	2.84 ± 0.33 ^a	4.17 ± 0.74	2054.3 ± 501.93 ^a

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 老年RE组。

表 3 老年组与中青年组24 h pH监测结果 (mean ± SD)

	老年组	中青年组	P值
反流次数(次)	106.04 ± 86.65	78.37 ± 63.42	>0.05
反流>5 min次数	10.97 ± 14.95	6.18 ± 5.89	>0.05
总计pH<4时间(%)	11.67 ± 15.83	3.80 ± 4.77	>0.05
立位pH<4时间(%)	14.87 ± 19.27	5.11 ± 6.45	>0.05
卧位pH<4时间(%)	9.10 ± 12.99	1.92 ± 2.56	<0.05
最长反流时间(min)	27.28 ± 34.06	13.43 ± 13.22	>0.05
DeMeester评分	45.43 ± 50.63	16.06 ± 23.66	<0.05

的蠕动功能参数食管体部PD、PV老年组均明显低于中青年组, 两组间差异均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 而DCI虽明显低于中青年组, 但差异无显著性; 老年NERD组、中青年RE组、中青年NERD组LESP均高于老年RE组, 两组之间分别比较差异具有统计学意义, 其中以中青年NERD组显著($P<0.01$); 中青年两疾病组的PD均短于老年两疾病组, 以中青年NERD组为著, 与老年RE组相比较, 具有显著统计学意义($P<0.05$, 表1, 2)。

2.2 24 h pH结果 各项检查指标结果显示卧位pH<4时间百分比以及DeMeester评分老年组与中青年组间差别具有统计学意义; 酸反流总次数、酸反流>5 min次数、最长反流时间、总计pH<4的百分比, 立位pH<4的百分比无明显统

计学意义(表3)。

3 讨论

胃食管反流病是我国消化系的常见疾病之一, 其病理生理机制尚未真正明确, 但国内外已普遍认为GERD是由多种因素导致的消化系动力障碍性疾病^[2]。临床上, 许多患者都以反酸、烧心、胸骨后不适等典型胃食管反流症状就诊, 行消化系内镜检查却未见食道黏膜有损害, 而通过食管测压检查可以发现大部分患者食道蠕动功能存在障碍。国外报道约有一半的GERD患者食管体部蠕动功能存在障碍^[3]。本实验中, 我们对39例GERD患者进行食管测压检查, 结果发现22例患者存在食道蠕动功能障碍, 这一点与国外报道相一致。如今, 随着老龄化的发展, 人

■创新盘点

本文选用多项观察指标更全面的了解老年GERD患者的食道动力特点。

群中GERD的发病率有随年龄增高的趋势。老年胃食管反流病亦愈来愈引起社会的关注, 据调查统计, 目前我国GERD的发病年龄集中在31-71岁之间, 其中>70岁的占12.9%^[4], 由此看来, 重视对老年胃食管反流病的诊断与治疗显得尤为重要。

GERD的发病与多种因素有关, 包括食管下括约肌压力低下、频繁的一过性食管下括约肌松弛、食管酸清除时间延长等^[5]。食管下括约肌作为最主要的功能性抗反流屏障, 能有效地防止胃内容物反流入食管。LES压力过低则会导致胃或十二指肠内容物反流入食管, 进而损害食管黏膜引起一系列症状^[6]。有研究表明LES低张力可能是胃食管反流不容忽视的一个重要因素^[7]。老年人由于年龄的影响生理机能逐渐减退而导致LES压力减弱, 抗反流屏障功能减退。郭荣斌等^[8]观察到老年GERD患者的LESP明显低于正常对照组, 老年RE患者下食管括约肌功能障碍的严重程度明显重于非老年患者。本研究结果显示老年和中青年两疾病组LESP均降低, 且老年组的LESP明显低于中青年组($P<0.001$), 以老年RE组最为显著, 与文献报道一致。而老年NERD组与老年RE组, 两组间比较差异亦具有显著性($P<0.05$), 表明LESP降低在GERD的发病中具有重要意义, 老年人由于受年龄的影响, LES抗反流屏障功能失调, 导致食管酸暴露增加, 食管黏膜损害加重, 合并食管炎者LES功能障碍更明显。因此我们推测老年人比中年人更易患胃食管反流病。

食管体部的有效蠕动方式(包括原发性蠕动和继发性蠕动)以及正常的传导性收缩是食管正常清除功能的保障。当食管蠕动功能出现障碍则不能及时有效的将反流入食管的胃及十二指肠内容物清除, 从而使食管黏膜的酸及胆汁暴露时间延长而加重了对食管黏膜的损伤^[9]。GERD患者食管体部无效吞咽比例增加, 且出现双峰或多峰复合波, 蠕动功能明显减弱, 其波幅及传导速度均低于正常人^[10]。何素玉等^[11]报道与上述报道一致。食管黏膜损伤的严重程度与食管蠕动功能异常的发生率呈正相关, 重度反流性食管炎食管体部运动异常的发生率明显高于NERD患者^[12], 但王虹等^[13]的研究显示食管黏膜损害的程度与食管体部动力障碍间无因果关系。我们的研究显示, 老年组不仅LESP明显低于中年组, 食管体部蠕动功能参数蠕动波传导速度、维持时间两项指标与中年人相比均有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$), 提示老年人食管蠕动能

明显减弱, 导致酸廓清能力亦降低。本研究结果还显示中青年两疾病组的食管PD均短于老年两疾病组, 以中年NERD组为著, 与老年RE组相比较, 具有显著统计学意义($P<0.05$)提示老年人食管蠕动功能障碍与胃食管反流程度的加重呈密切正相关。

食管黏膜过度的酸暴露是GERD发病的另一个重要因素, 而24 h pH监测可比较准确的记录食管黏膜酸反流的程度。有报道合并有食管炎的GERD患者的异常酸暴露比无食管炎者严重^[14]。王智凤等^[15]也观察到食管黏膜损害极易出现在酸反流严重、食管动力障碍的GERD患者中。年龄作为GERD发病的一个独立的危险因素对食管酸反流亦存在一定影响。Fass等^[16]发现老年人与其他人群相比较, 食管酸暴露的多项指标均有明显升高。本研究结果显示在卧位pH<4时间百分比以及DeMeester评分两项指标方面老年疾病组均明显高于中年组($P<0.05$)其他各项指标无统计学意义。提示老年GERD患者存在明显胃食管反流现象, 食管黏膜酸暴露情况重于其他人群。但是我们的研究发现, 尽管如此, 老年GERD患者典型胃食管反流症状并不明显重于中年人, 而内镜下食管黏膜损害情况往往较后者严重, 食管外症状较多, 这提示我们在临床上应更加重视对GERD表现不典型老年患者的诊断。

4 参考文献

- 1 Pandolfino JE, Ghosh SK, Rice J, Clarke JO, Kwiatek MA, Kahrilas PJ. Classifying esophageal motility by pressure topography characteristics: a study of 400 patients and 75 controls. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 27-37 [PMID: 17900331 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2007.01532.x]
- 2 查慧, 谢小平, 侯晓华. 胃食管反流病患者酸反流与食管运动功能障碍的关系. *胃肠病学* 2006; 11: 41-44
- 3 Ho SC, Chang CS, Wu CY, Chen GH. Ineffective esophageal motility is a primary motility disorder in gastroesophageal reflux disease. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 652-656 [PMID: 11911355]
- 4 唐旭东, 王萍, 卞立群, 张引强. 胃食管反流病的流行病学研究. *现代消化及介入诊疗* 2008; 13: 22-26
- 5 张峻, 徐有青, 杨昭徐. Barrett's食管、糜烂性食管炎及非糜烂性反流病发生机制的比较. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 3249-3254
- 6 Trudgill NJ, Riley SA. Transient lower esophageal sphincter relaxations are no more frequent in patients with gastroesophageal reflux disease than in asymptomatic volunteers. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2569-2574 [PMID: 11569677 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2001.04100.x]
- 7 Eckardt VF, Dilling B, Bernhard G. The impact of open access 24-h pH-metry on the diagnosis and management of esophageal reflux disease. *Am J*

- Gastroenterol* 1999; 94: 616-621 [PMID: 10086640 DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.00923.x]
- 8 郭荣斌, 彭丽华, 程留芳, 王巍峰. 老年胃食管反流病患者食管运动功能改变. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 125-128
 - 9 夏宣平, 柯美云. 胃食管反流病的病因和发病机制. *胃肠病学* 2003; 8: 227-231
 - 10 Xenos ES. The role of esophageal motility and hiatal hernia in esophageal exposure to acid. *Surg Endosc* 2002; 16: 914-920 [PMID: 12163954 DOI: 10.1007/s00464-001-8208-5]
 - 11 何素玉, 陈拥军, 徐建玉, 唐毅, 姚勇, 孙怡, 丁晓梅. 非糜烂性反流病患者食管动力特征分析. *胃肠病学* 2011; 16: 487-489
 - 12 许军英, 谢小平, 侯晓华. 食管运动功能异常与食管黏膜损伤的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1502-1504
 - 13 王虹, 高建萍, 周磊, 顾清, 顾而立, 周慧. 食管体部动力异常在胃食管反流病中的作用. *胃肠病学* 2004; 9: 13-16
 - 14 林金坤, 胡品津, 朱雪茵, 陈旻湖, 李初俊, 任明. 食管测压及24h pH监测诊断GERD的价值. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 51-53
 - 15 王智凤, 柯美云, 蓝宇. 正常人和胃食管反流病患者的昼夜pH和动力变化. *中华消化杂志* 1998; 18: 242-243
 - 16 Fass R, Pulliam G, Johnson C, Garewal HS, Sampliner RE. Symptom severity and oesophageal chemosensitivity to acid in older and young patients with gastro-oesophageal reflux. *Age Ageing* 2000; 29: 125-130 [PMID: 10791446 DOI: 10.1093/ageing/29.2.125]

■同行评价

本文属实用类型文章, 其结果对临床认识胃食管反流病有一定指导作用。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

正常胃黏膜菌群特征分析2例

王莉莉, 董开芯, 周建华, 于新娟, 贾盛佼, 董全江

■背景资料

目前研究发现正常人的胃肠道菌群的细菌种类超过1000种, 数量约为 10^{14} 。胃肠道菌群能够促进人体肠道发育、营养吸收和病原体抵抗等, 并且可以直接参与调节小肠上皮细胞增殖、脂肪储存和炎症应答等机制。健康状态下, 胃肠道菌群与人体和胃肠道微环境保持着一个平衡状态。胃肠道微生物的过度缺失或者过度繁殖, 都会导致炎症性肠病、甚至癌症。

王莉莉, 董开芯, 于新娟, 贾盛佼, 董全江, 青岛大学医学院附属青岛市立医院消化内科及中心实验室 青岛市消化病重点实验室 山东省青岛市 266011

周建华, 青岛大学医学院附属青岛市立医院口腔医学中心 山东省青岛市 266011

王莉莉, 硕士, 主治医师, 主要从事胃肠道菌群方面研究。

作者贡献分布: 王莉莉、董开芯、周建华、于新娟、贾盛佼及董全江对本文均有贡献; 此课题由王莉莉与董全江设计; 研究过程由王莉莉、董开芯及周建华完成; 生物信息学分析由于新娟与贾盛佼共同完成; 本论文写作由王莉莉、董全江及周建华共同完成。

通讯作者: 董全江, 教授, 主任医师, 266011, 山东省青岛市东海中路5号, 青岛大学医学院附属青岛市立医院消化内科及中心实验室, 青岛市消化病重点实验室。jiangacer@126.com

电话: 0532-88905289

收稿日期: 2013-01-30 修回日期: 2013-03-10

接受日期: 2013-04-15 在线出版日期: 2013-05-08

454-pyrosequencing analysis of normal gastric mucosal microbiota

Li-Li Wang, Kai-Xin Dong, Jian-Hua Zhou, Xin-Juan Yu, Sheng-Jiao Jia, Quan-Jiang Dong

Li-Li Wang, Kai-Xin Dong, Xin-Juan Yu, Sheng-Jiao Jia, Quan-Jiang Dong, Department of Gastroenterology, Department of Central Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao Key Laboratory of Digestive Diseases, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Jian-Hua Zhou, Department of Stomatology, Qingdao Municipal Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Correspondence to: Quan-Jiang Dong, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Department of Central Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Medical College of Qingdao University; Qingdao Key Laboratory of Digestive Diseases, Qingdao 266011, Shandong Province, China. jiangacer@126.com

Received: 2013-01-30 Revised: 2013-03-10

Accepted: 2013-04-15 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To characterize the normal gastric microbiota.

METHODS: Genomic DNA was extracted from antral biopsies obtained from two patients who had histologically normal gastric mucosa. The 16S rRNA gene was amplified using PCR. The barcoded 454-pyrosequencing method was used to analyze the amplified products. To investigate

the community structure, diversity and abundance of gastric microbiota, sequence analysis was performed using bioinformatic methods including OTU hierarchical clustering and alpha diversity analysis.

RESULTS: High-throughout sequencing of the gastric microbiota from patients A and B obtained 20565 and 17487 sequences, respectively. The coverage was greater than 0.98. Gastric microbiota was composed of 638 and 667 OTUs, respectively. Alpha diversity analysis revealed that Chao and Shannon indices of gastric microbiota were slightly lower than those of fecal microbiota. For patient A, the gastric microbiota was composed of 58 bacterial genera belonging to 14 phyla. *Proteobacteria*, *Actinomycetes*, *Firmicutes* and *Bacteroides* were dominant in the gastric microbiota from patient A. The gastric microbiota from patient B had a similar bacterial composition, consisting of 64 bacterial genera belonging to 19 phyla. *Serratia* was the predominant genus in both patients.

CONCLUSION: Normal gastric microbiota shows a high diversity. *Proteobacteria* is the most abundant phylum, while *Serratia* is the predominant genus.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Gastric microbiota; 454-pyrosequencing analysis; *Proteobacteria*; *Serratia*

Wang LL, Dong KX, Zhou JH, Yu XJ, Jia SJ, Dong QJ. 454-pyrosequencing analysis of normal gastric mucosal microbiota. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1250-1255 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1250.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1250>

摘要

目的: 分析消化不良患者的正常胃黏膜菌群特征。

方法: 收集2例正常胃黏膜病理学消化不良患者的胃窦黏膜, 提取黏膜组织基因组DNA, 应用PCR方法扩增16S rRNA, 进行二代454焦磷

■同行评议者

谭周进, 教授, 湖南中医药大学

酸测序. 测序数据应用操作单元(operational taxonomic units, OTU)聚类分析、多样性分析和分类学分析等生物信息技术分析胃黏膜菌群的结构、多样性和丰度.

结果: 患者A和B胃黏膜菌群的高通量测序分析分别得到20565条和17487条优化序列, 测序覆盖深度>0.98. 经过97%相似度归并后分别得到638个OTUs和667个OTUs; 菌群多样性分析显示正常胃黏膜菌群的chao指数和shannon指数均低于粪便菌群. 患者A的胃黏膜菌群由58个属的细菌构成, 归属于14个门, 以变形菌门为主(99.49%), 其次为放线菌门、硬壁菌门和拟杆菌门等. 患者B胃黏膜菌群构成与患者A相似, 由64个属的细菌构成, 归属于19个门. 粘质沙雷(氏)菌为正常胃黏膜菌群的优势主导菌.

结论: 正常胃黏膜菌群多样性丰富, 以变形菌门为主, 沙雷(氏)菌为优势主导菌.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 胃菌群; 454焦磷酸测序; 变形菌门; 沙雷(氏)菌属

核心提示: 本研究运用高通量测序技术和生物信息学分析方法, 对两例胃黏膜组织学正常个体的胃菌群的结构、丰度、组成进行了分析. 结果发现正常胃黏膜菌群的丰度低于肠道菌群, 但具有高度的多样性. 胃菌群的组成以变形菌门为主, 沙雷(氏)菌属为优势主导菌, 这为研究胃黏膜菌群在慢性胃病发生中的作用奠定了基础.

王莉莉, 董开芯, 周建华, 于新娟, 贾盛佼, 董全江. 正常胃黏膜菌群特征分析2例. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1250-1255
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1250.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1250>

0 引言

人胃肠道内定居着大量的细菌, 他们构成维持人体正常生理功能所必需的胃肠道菌群. 目前, 研究^[1]发现健康人群胃肠道菌群的细菌种类超过1000种, 数量约为 10^{14} . 胃肠道菌群能够促进人体肠道发育、营养吸收和病原体抵抗等, 并且可以直接参与调节小肠上皮细胞增殖、脂肪储存和炎症应答等机制^[2,3]. 健康状态下, 胃肠道菌群与人体和胃肠道微环境保持着一个平衡状态. 当机体受到某些内因或外因的作用如不合理饮食、感染、应激等, 引起胃肠道菌群的结构、数量、比例、定位和代谢特征的变化等,

从而导致疾病的发生^[4]. 人体胃肠道微生物群落是一个复杂的系统, 传统的培养法无法提供全面的信息来探究其群落结构的组成^[5]. 本研究利用第二代454焦磷酸测序技术, 通过提取2例胃黏膜病理学检查正常的消化不良患者的胃黏膜菌群基因组DNA并扩增其16S rRNA, 进行高通量测序和生物信息学分析检测正常胃黏膜菌群的结构组成、多样性和丰度, 探讨生理状态下胃黏膜菌群的结构和优势主导菌, 为研究胃黏膜菌群与慢性胃部疾病的相关性提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 胃窦黏膜活检标本取自青岛市市立医院胃镜室行胃镜检查的2例消化不良患者: (1)有消化不良的上消化道症状; (2)病理检测胃窦黏膜无异常发现. 患者A, 男, 86岁; 患者B, 男, 37岁. 检查前1 mo内均未服用任何抗生素. 标本分别编号为A、B, 放入脑心浸出液(BHI)培养基中, -80 °C保存备用.

1.2 方法

1.2.1 胃黏膜菌群的基因组DNA提取: 采用E.Z.N.A DNA试剂盒(美国OMEGA公司)抽提胃黏膜菌群的基因组DNA, 步骤按说明书进行. 1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA完整性.

1.2.2 PCR扩增: 根据合成区域, 合成带有“5' 454 A、B接头-特异引物3'”的融合引物, 细菌16S rRNA引物序列为: 8F: 5'-AGAGT TTGATCCTG-GCTCAG-3'; 533R: 5'-TTACCGCGGCTGCTG-GCAC-3'(测序端). PCR反应体系为: 5 × FastPfu缓冲液4 μL, 正向引物5 μmol/L, 反向引物5 μmol/L, DNA 20 ng, dNTP 2.5 mmol/L, FastPfu 多聚酶0.4 μL, 加ddH₂O至总体积20 μL. PCR反应条件为: 95 °C 2 min; 25个循环包括95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s; 72 °C 5 min. 2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物.

1.2.3 高通量测序: PCR产物定量均一化后采用454焦磷酸高通量测序仪(瑞士Roche公司)进行高通量测序.

1.2.4 生物信息学分析^[6,7]: (1)优化序列数据统计: 去除序列末端的后引物和接头序列、多碱基N、polyA/T尾巴及低质量碱基; 去除所得序列的barcode标签序列、前引物序列; 丢弃长度短于200 bp、模糊碱基数>0、序列平均质量低于25的序列; (2)操作单元(operational taxonomic units, OTU)聚类分析: 提取非重复序列, 与silva

■ 研究前沿

人体胃肠道微生物群落是一个复杂的系统, 传统的培养法无法提供全面的信息来探究其群落结构的组成. 既往二代高通量测序研究主要聚焦于皮肤、口腔、食管和肠道等部位的菌群分析, 对国内正常胃黏膜菌群的二代高通量测序分析目前尚无报道.

■ 相关报道

Li等采用一代克隆测序分析5例健康人胃黏膜和5例胃炎患者胃黏膜菌群,在正常胃黏膜菌群中鉴定出硬壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和梭杆菌门等8个门,其中变形菌门所占比例最高(37%),其次为硬壁菌门(22%),而胃炎患者硬壁菌门(41%)所占比例最高,其次为拟杆菌门(25%),变形菌门(20%)。

表 1 样本454测序及多样性统计

测序量(条)		97%相似性水平					
		OTU	ace指数	chao指数	simpson指数	shannon指数	coverage指数
患者A	20565	638	1 209	994	0.22	2.93	0.99
患者B	17487	667	1 529	1 232	0.21	2.96	0.98

数据库^[8]中已比对的(16S/18S, SSU)核糖体序列数据库进行比对,去杂后生成分类操作单元(operational taxonomic units, OTU); (3)菌群多样性分析:根据OTU聚类分析结果,采用ace, chao, simpson, shannon, 评估指数分别对样本进行多样性分析^[9]。其中ace, chao指数是对菌群丰度进行评估; simpson, shannon指数对菌群多样性进行评估; (4)稀释性曲线分析:采用mothur软件^[10]在97%相似性水平绘制标本稀释性曲线,比较测序数量不同的样本物种的丰富度及样本的取样大小是否合理; (5)菌群分类学分析:采用mothur软件将OTU中全部序列与silva数据库进行比对,找出其最相近且可信度达80%以上的种属信息,并将每一个OTU中的所有序列进行类比,找出同一OTU中的不同序列的最近祖先的种属信息。根据silva库中的参考序列对OTU进行种属鉴定; (6)菌群群落结构分析:根据分类学分析比对结果,在属水平上对样品中群落结构进行菌群种类和丰度分析。

2 结果

2.1 测序质量评价 运用PCR方法扩增细菌16S rRNA基因进行高通量测序,患者A的胃黏膜菌群共获得23810条有效序列,优化序列为20565条,测序覆盖深度(coverage指数)为0.99,经过97% 相似度归并后得到638个OTUs;患者B的胃黏膜菌群得到20245条有效序列,经优化为17487条序列,coverage指数为0.98,经过97% 相似度归并后得到667个OTUs(表1)。稀释性曲线分析可见,尽管每个样品的多样性存在差异,但所有的曲线均趋于平缓、指数达到饱和(图1)。表明本实验每个样品的测序量足以完整描述该样品菌群的组成。

2.2 菌群多样性分析 患者A和B的胃黏膜菌群在97%相似性水平多样性指数详见表1。患者A胃黏膜菌群多样性的ace指数为1 209, chao指数为994, shannon指数为2.93, simpson指数为0.22;患者B胃黏膜菌群多样性的ace指数为1529, chao指数为1232, shannon指数为2.96, simpson指数为

0.21。两样本的chao指数和shannon指数均低于已有研究的粪便菌群多样性指数^[11]。

2.3 菌群分类学和群落结构分析 分类学分析结果显示,患者A胃黏膜菌群主要由58个属的细菌构成,归属于14个门,以变形菌门为主(99.49%),其次为放线菌门(0.32%)、硬壁菌门(0.04%)和拟杆菌门(0.03%)等。患者B胃黏膜菌群构成与患者A相似,由64个属的细菌构成,归属于19个门,以变形菌门为主(99.03%),其次为硬壁菌门(0.33%)、拟杆菌门(0.23%)和放线菌门(0.12%)等。

进一步在属水平上进行群落结构分析可见,患者A的胃黏膜菌群主要由沙雷(氏)菌属(*Serratia*, 92.01%)、黄单胞菌属(*Stenotrophomonas*, 4.53%)、消色杆菌属(*Achromobacter*, 1.57%)、丙酸菌属(*Propionibacterium*, 0.52%)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*, 0.23%)、戴尔福特菌属(*Delftia*, 0.17%)等组成。患者B的胃黏膜菌群主要由沙雷(氏)菌属(89.79%)、黄单胞菌属(5.85%)、消色杆菌属(1.60%)、普雷沃菌属(*Prevotella*, 0.3%)、戴尔福特菌属(0.25%)、链球菌属(*Streptococcaceae Streptococcus*, 0.21%)、梭状芽胞杆菌(*Clostridium*, 0.14%)、奈瑟(氏)菌属(*Neisseria*, 0.14%)、丙酸菌属(0.12%)、布克氏菌属(*Burkholderia*, 0.11%)和梭杆菌属(*Fusobacterium*, 0.11%)等组成(图2)。

3 讨论

过去人们认为胃内由于胃酸和其他抗菌因子的存在,处于“相对无菌”的状态^[12-14]。而胃内幽门螺杆菌的发现,打破了传统观念。目前研究表明,胃内存在细菌群落,并已经适应胃内环境^[15]。尽管胃内菌群对人体健康和疾病极其重要,但目前研究较少,而且多是依靠传统培养技术和一代测序技术手段为基础,对研究胃内菌群的多样性和基因多态性有较大偏差^[16,17]。随着基因组学和现代分子生物技术的飞速发展,以454测序技术为代表的高通量测序技术更能完全覆盖微生物群落,并能发现罕见的少数肠道微生物,使人类可以更清晰地研究和了解人体微生物菌

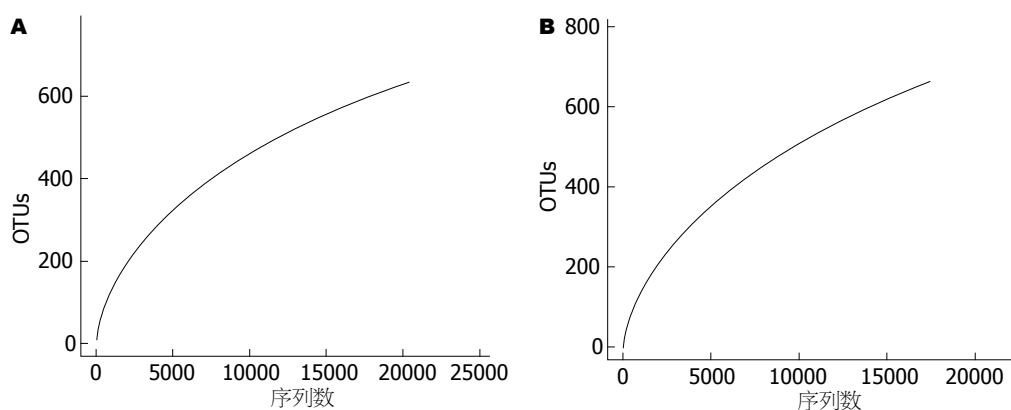


图 1 97%相似性水平稀释性曲线分析图. A: 患者A; B: 患者B.

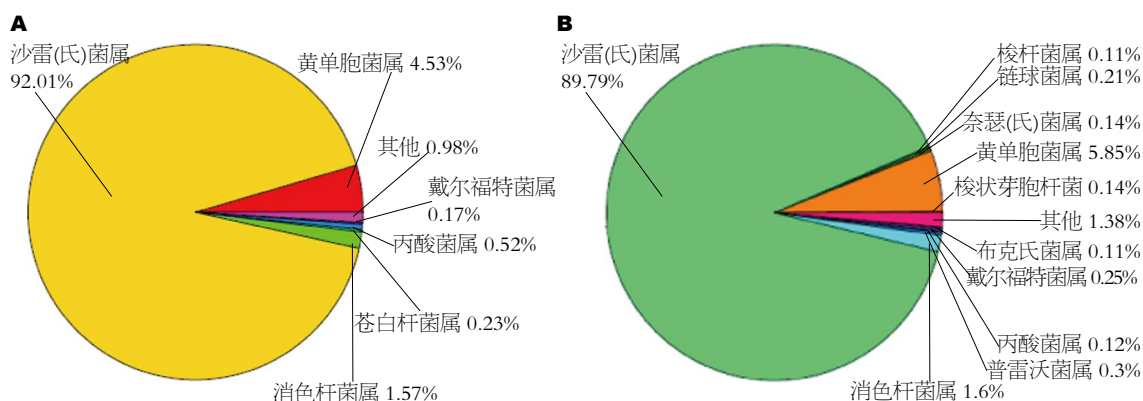


图 2 胃黏膜菌群群落结构分析图(属水平). A: 患者A; B: 患者B.

群的多样性和基因多态性^[18]. 既往二代高通量测序研究主要聚焦于皮肤^[19]、口腔^[20]、食管^[21]和肠道^[22,23]等部位的菌群分析, 对国内正常胃黏膜菌群的二代高通量测序分析目前尚无报道.

本研究通过提取两例正常胃黏膜的菌群基因组DNA并扩增其16S rRNA, 并进行高通量测序, 样本A得到20565条优化序列, 经过97%相似度归并后得到638个OTUs; 样本B得到17487条优化序列和667个OTUs. 两样本的coverage指数均在0.98以上, 可以认为样本中至少有98%微生物被检测到, 测序深度较为合理. 2005年, 学者Bik等^[24]从23例人胃黏膜活检标本提取细菌基因组DNA, 构建16S rDNA文库, 采用Sanger法一代测序技术只克隆出1833条序列和193.4个OTUs. 本研究每个样品得到的优化序列, 均远远高于Bik EM等克隆出的序列, 从而保证了微生物菌群多样性分析的深度和广度, 为后续的研究打下了坚实的基础. 通过菌群多样性指数比较分析, 样本A和B的chao指数高于Bik EM等的研究约50倍, chao指数是用chao1算法估计群落中含OTU数目的指数, 数值越大代表物种总

数越多, 因此可以认为本研究鉴定的正常胃黏膜中微生物菌群中的物种总数远高于Bik EM等的研究. Simpson指数用来估算样品中微生物的多样性指数之一, 在生态学中常用来定量的描述一个区域的生物多样性, Simpson指数值越大, 说明群落多样性越低. Bik EM等研究Simpson指数为5.2, 高于本研究结果, 因此可以说明本研究测序的微生物群落多样性较为丰富. chao指数和Simpson指数有利的证明了采用二代测序能够比一代测序更能深入了解人体微生物菌群的种类和多样性.

Nam等^[11]通过高通量测序技术研究正常的肠道粪便菌群并分析菌群多样性, chao平均指数为1500, shanno平均指数为4.99, 均高于本研究多样性结果. 粪便菌群代表了整个消化道菌群, 证明胃肠道菌群物种总数和多样性高于胃黏膜. 通过菌群分类学分析可见, 患者A和B的胃黏膜菌群在门水平上分析结果相似, 均以变形菌门为主, 分别占99.49%和99.03%, 放线菌门、硬壁菌门和拟杆菌门所占比例略有差异. 2011年学者Maldonado-Contreras等^[25]提取了12例人胃黏膜

应用要点

本研究采用高通量测序和生物信息学分析检测正常胃黏膜菌群的结构组成、多样性和丰度, 探讨生理状态下胃黏膜菌群的结构构成和优势主导菌, 为研究胃黏膜菌群与慢性胃部疾病的相关性提供理论依据.

■名词解释

高通量测序技术: 又称为“下一代”测序技术, 是对传统测序一次革命性的改变, 以能一次并行对几十万到几百万条DNA分子进行序列测定和一般读长较短等为标志。高通量测序技术因其高通量、低成本、高精度和易操作的优点, 已被广泛应用于菌群的结构分析。

细菌基因组DNA, 采用基因芯片技术对16S rRNA进行原位杂交, 并通过G2芯片分类法在门水平上分析, 按照比例从高到低依次为: 变形菌门、硬壁菌门、放线菌门和拟杆菌门。香港学者Li等^[26]采用一代克隆测序分析5例健康人胃黏膜和5例胃炎患者胃黏膜菌群, 在正常胃黏膜菌群中鉴定出硬壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和梭杆菌门等8个门, 其中变形菌门所占比例最高(37%), 其次为硬壁菌门(22%), 而胃炎患者硬壁菌门(41%)所占比例最高, 其次为拟杆菌门(25%), 变形菌门(20%)。以上二位学者在用不同方法对正常胃黏膜菌群的研究结果与本研究结果大体一致, 变形菌门细菌为正常胃黏膜菌群的优势主导菌。然而本研究变形菌门所占比例高于上述学者的研究, 主要原因可能与受试对象所在的地域、自然环境因素和饮食等相关。

Hong等^[27]经高通量测序技术研究, 认为正常结肠黏膜菌群主要由硬壁菌门(50.9%±21.3%), 拟杆菌门(40.2%±23.8%)和变形菌门(8.6%±4.7%)等组成; 属水平上分析含量最丰富前3位为拟杆菌属, 明串珠菌属和魏斯氏菌属, 但是不同个体和不同部位(左结肠、右结肠和直肠)比例差异较大。通过比较发现, 本研究正常胃黏膜菌群种类和结肠黏膜菌群大体相似, 但是所占比例不同; 属水平上的细菌差异较大, 优势菌各有不同。其原因可能是胃内和结肠生理环境的功能不一样, 导致不同的优势菌定植, 继而发挥各自的生理作用。

本研究中经属水平上进行群落结构分析, 患者A和B的胃黏膜菌群以沙雷(氏)菌为优势主导菌。沙雷(氏)菌包括9个种, 临床上最常见, 也是生化特征最明显的是粘质沙雷氏菌^[28]。粘质沙雷菌为革兰氏阴性菌, 周身鞭毛、能运动、无荚膜、无芽胞, 广泛分布于自然界, 是水和土壤中的常居菌群, 亦是临床上常见的条件致病菌, 在机体免疫功能降低时可引起肺部和尿道感染以及败血症^[29,30]。按Bergey氏分类法, 属于肠道细菌类。

有研究表明, 胃肠道微生物的过度缺失或者过度繁殖, 都会导致炎症性肠病、甚至癌症^[31]。因此, 胃肠道菌群与疾病的关系非常密切。胃部病理状态下如胃炎或者胃癌患者胃黏膜菌群是否与正常的胃黏膜菌群的结构、多样性和丰度有差别以及幽门螺杆菌存在是否对胃黏膜菌群是否有影响, 仍需要深入研究。随着上述问题的解决, 将进一步对慢性胃部疾病的发病机制、诊

断和临床治疗有重要的指导意义。

4 参考文献

- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5: e177 [PMID: 17594176 DOI: 10.1371/journal.pbio.0050177]
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15718-15723 [PMID: 15505215 DOI: 10.1073/pnas.0407076101]
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229-241 [PMID: 15260992 DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.002]
- Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* 2004; 12: 562-568 [PMID: 15539116 DOI: 10.1016/j.tim.2004.10.008]
- Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl Microbiol* 1974; 27: 961-979 [PMID: 4598229]
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480-484 [PMID: 19043404 DOI: 10.1038/nature07540]
- Kennedy DM, Stanton JA, García JA, Mason C, Rand CJ, Kieser JA, Tompkins GR. Microbial analysis of bite marks by sequence comparison of streptococcal DNA. *PLoS One* 2012; 7: e51757 [PMID: 23284761 DOI: 10.1371/journal.pone.0051757]
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: D590-D596 [PMID: 23193283 DOI: 10.1093/nar/gks1219]
- Lin YT, Whitman WB, Coleman DC, Chih-Yu C. Molecular characterization of soil bacterial community in a perhumid, low mountain forest. *Microbes Environ* 2011; 26: 325-331 [PMID: 21727759 DOI: 10.1264/jsme2.ME11114]
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 7537-7541 [PMID: 19801464 DOI: 10.1128/AEM.01541-09]
- Nam YD, Jung MJ, Roh SW, Kim MS, Bae JW. Comparative analysis of Korean human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One* 2011; 6: e22109 [PMID: 21829445 DOI: 10.1371/journal.pone.0022109]
- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315 [PMID: 6145023 DOI: 10.1016/S0140-6736(84)91816-6]
- Higuchi K, Fujiwara Y, Tominaga K, Watanabe T, Shiba M, Nakamura S, Oshitani N, Matsumoto T,

- Arakawa T. Is eradication sufficient to heal gastric ulcers in patients infected with *Helicobacter pylori*? A randomized, controlled, prospective study. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 111-117 [PMID: 12492739 DOI: 10.1046/j.1365-2036.2003.01402.x]
- 14 Sherwood PV, Wibawa JL, Atherton JC, Jordan N, Jenkins D, Barrett DA, Shaw PN, Spiller RC. Impact of acid secretion, gastritis, and mucus thickness on gastric transfer of antibiotics in rats. *Gut* 2002; 51: 490-495 [PMID: 12235069 DOI: 10.1136/gut.51.4.490]
 - 15 Merrell DS, Goodrich ML, Otto G, Tompkins LS, Falkow S. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2003; 71: 3529-3539 [PMID: 12761138 DOI: 10.1128/IAI.71.6.3529-3539.2003]
 - 16 Adamsson I, Nord CE, Lundquist P, Sjöstedt S, Edlund C. Comparative effects of omeprazole, amoxycillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 629-640 [PMID: 10552979 DOI: 10.1093/jac/44.5.629]
 - 17 Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* 2004; 134: 465-472 [PMID: 14747690]
 - 18 Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1135-1145 [PMID: 18846087 DOI: 10.1038/nbt1486]
 - 19 Roberson ED, Liu Y, Ryan C, Joyce CE, Duan S, Cao L, Martin A, Liao W, Menter A, Bowcock AM. A subset of methylated CpG sites differentiate psoriatic from normal skin. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 583-592 [PMID: 22071477 DOI: 10.1038/jid.2011.348]
 - 20 Goldman CG, Matteo MJ, Loureiro JD, Almuzara M, Barberis C, Vay C, Catalano M, Heredia SR, Mantero P, Boccio JR, Zubillaga MB, Cremaschi GA, Solnick JV, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Novel gastric helicobacters and oral campylobacters are present in captive and wild cetaceans. *Vet Microbiol* 2011; 152: 138-145 [PMID: 21592686 DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.04.023]
 - 21 Yang L, Francois F, Pei Z. Molecular pathways: pathogenesis and clinical implications of microbiome alteration in esophagitis and Barrett esophagus. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 2138-2144 [PMID: 22344232 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0934]
 - 22 Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, Gotteland M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 1307-1314 [PMID: 21050232 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04475.x]
 - 23 Manges AR, Labbe A, Loo VG, Atherton JK, Behr MA, Masson L, Tellis PA, Brousseau R. Comparative metagenomic study of alterations to the intestinal microbiota and risk of nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease. *J Infect Dis* 2010; 202: 1877-1884 [PMID: 21050115 DOI: 10.1086/657319]
 - 24 Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Relman DA. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 732-737 [PMID: 16407106 DOI: 10.1073/pnas.0506655103]
 - 25 Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, Brodie EL, Dominguez-Bello MG. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J* 2011; 5: 574-579 [PMID: 20927139 DOI: 10.1038/ismej.2010.149]
 - 26 Li XX, Wong GL, To KF, Wong VW, Lai LH, Chow DK, Lau JY, Sung JJ, Ding C. Bacterial microbiota profiling in gastritis without *Helicobacter pylori* infection or non-steroidal anti-inflammatory drug use. *PLoS One* 2009; 4: e7985 [PMID: 19956741 DOI: 10.1371/journal.pone.0007985]
 - 27 Hong PY, Croix JA, Greenberg E, Gaskins HR, Mackie RI. Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and micro-heterogeneity. *PLoS One* 2011; 6: e25042 [PMID: 21966408 DOI: 10.1371/journal.pone.0025042]
 - 28 Dauga C, Grimont F, Grimont PA. Nucleotide sequences of 16S rRNA from ten *Serratia* species. *Res Microbiol* 1990; 141: 1139-1149 [PMID: 2092365 DOI: 10.1016/0923-2508(90)90087-7]
 - 29 Arroyo JC, Milligan WL, Postic B, Northey J, Parker E, Bryan CS. Clinical, epidemiologic and microbiologic features of a persistent outbreak of amikacin-resistant *Serratia marcescens*. *Infect Control* 1981; 2: 367-372 [PMID: 7028654]
 - 30 Arslan U, Erayman I, Kirdar S, Yuksekkaya S, Cimen O, Tuncer I, Bozdogan B. *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Int* 2010; 52: 208-212 [PMID: 19664012 DOI: 10.1111/j.1442-200X.2009.02934.x]
 - 31 Grahn N, Hmani-Aifa M, Fransén K, Söderkvist P, Monstein HJ. Molecular identification of *Helicobacter* DNA present in human colorectal adenocarcinomas by 16S rDNA PCR amplification and pyrosequencing analysis. *J Med Microbiol* 2005; 54: 1031-1035 [PMID: 16192433 DOI: 10.1099/jmm.0.46122-0]

■同行评价
肠道微生物是目前研究的热点, 本文对2例病理检测正常的胃黏膜的菌群特征进行了研究, 具有一定科研价值。选题正确, 实验设计合理, 数据可靠。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静



青年男性血清脂联素与非酒精性脂肪性肝炎的关系

张璐, 张琦, 方言, 朱奎轩, 李珍

■背景资料

非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)好发于中青年, 病程可在10年以上, 部分患者可进展为肝硬化甚至肝癌, 严重威胁人民生命健康。由于目前尚无特异治疗方案, 对其发生发展机制的研究对于预防及治疗NASH具有重要意义。

张璐, 方言, 李珍, 清华大学生命科学学院 北京市 100084

张琦, 朱奎轩, 清华大学医院 北京市 100084

张璐, 硕士, 主要从事脂联素相关的代谢研究。

作者贡献分布: 张璐与张琦对此文所作贡献均等; 此课题由张琦、张璐与李珍设计; 研究过程由张璐、张琦、方言及朱奎轩操作完成; 研究所用新试剂与分析工具由张璐与李珍提供; 数据分析由张璐与张琦完成; 本论文写作由张璐、张琦及李珍完成。

通讯作者: 李珍, 副教授, 100084, 北京市海淀区清华园, 清华大学生命科学学院。lizhen@mail.tsinghua.edu.cn

电话: 010-62770581

收稿日期: 2013-02-05 修回日期: 2013-03-07

接受日期: 2013-04-07 在线出版日期: 2013-05-08

Relationship between serum adiponectin and non-alcoholic steatohepatitis in young men

Lu Zhang, Qi Zhang, Yan Fang, Kui-Xuan Zhu, Zhen Li

Lu Zhang, Yan Fang, Zhen Li, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Qi Zhang, Kui-Xuan Zhu, Tsinghua University Hospital, Beijing 100084, China

Correspondence to: Zhen Li, Associate Professor, School of Life Sciences, Tsinghua University, Qinghuayuan, Haidian District, Beijing 100084, China. lizhen@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 2013-02-05 Revised: 2013-03-07

Accepted: 2013-04-07 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between serum adiponectin and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in young men.

METHODS: The body mass index (BMI), alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total cholesterol (TCHO), triglyceride, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein (LDL), fasting plasma glucose and fasting plasma insulin were examined in 64 NASH patients and 46 healthy controls. The levels of adiponectin and high molecular weight (HMW) adiponectin were determined by ELISA and Western blot. The data were analyzed using SPSS19.0.

RESULTS: The level of total adiponectin and the ratio of HMW to total adiponectin were decreased in men with NASH, compared with controls (total adiponectin: 0.92 ± 0.17 vs 1.02 ± 0.16 , $P < 0.01$; HMW/total: 0.39 ± 0.14 vs $0.47 \pm$

0.11 , $P < 0.01$). The level of total adiponectin was decreased with the increase in the severity of NASH. Furthermore, the level of total adiponectin inversely correlated with TCHO ($r = -0.358$, $P < 0.01$) and LDL ($r = -0.339$, $P < 0.05$). The ratio of HMW to total adiponectin was inversely correlated with BMI ($r = -0.279$, $P < 0.05$), but positively correlated with HDL ($r = 0.266$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: The level of total adiponectin and the ratio of HMW to total adiponectin are directly related to NASH in young men. Adiponectin may play an important role in the development of NASH.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Non-alcoholic steatohepatitis; Adiponectin; High molecular weight; Aminotransferase

Zhang L, Zhang Q, Fang Y, Zhu KX, Li Z. Relationship between serum adiponectin and non-alcoholic steatohepatitis in young men. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1256-1260 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1256.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1256>

摘要

目的: 探究青年男性非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)患者血清脂联素总量及脂联素高聚体占总量的比例与NASH的关系。

方法: 测定64例NASH患者和46例健康患者对照组的转氨酶、血糖、血脂等生化指标及脂联素总量、脂联素各聚体含量, SPSS19.0分析统计。

结果: NASH患者血清脂联素总量和高聚体所占比例显著低于正常组, 且脂联素总量及高聚体比例随肝炎的严重程度递减。脂联素总量与总胆固醇、低密度脂蛋白负相关; 脂联素高聚体比例与体质量指数负相关, 与高密度脂蛋白正相关。

结论: 血清脂联素总量及高聚体占总量比例

■同行评议者

郝丽萍, 副教授, 华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

与青年男性NASH的严重程度密切相关。脂联素总量,尤其是高聚体在总量中所占比例的降低会加重NASH发展程度。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 脂联素; 高聚体; 转氨酶

核心提示: 血清脂联素总量及高聚体占总量比例与青年男性非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)的严重程度密切相关。脂联素总量,尤其是高聚体在总量中所占比例的降低会加重NASH发展程度。

张璐, 张琦, 方言, 朱奎轩, 李珍. 青年男性血清脂联素与非酒精性脂肪性肝病的关系. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1256-1260
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1256.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1256>

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)通常是指由肥胖、高脂等代谢因素所导致的肝组织学改变与酒精性肝病相似但无嗜酒史的慢性疾病,以肝细胞脂肪变性、坏死、炎症反应和纤维化为特征^[1,2]。临床上, NASH好发于中青年,病程可达10年以上,部分患者可进展为肝硬化甚至肝癌,严重威胁人民的生命健康^[3]。由于目前尚无特异治疗方案,对其发病机制的研究以及对于预防及治疗NASH有重要意义。研究表明,几乎所有NASH患者均伴随着胰岛素抵抗^[4,5],而近年发现的脂联素是一种由脂肪组织分泌的胰岛素增敏化激素,在肥胖、胰岛素抵抗、II型糖尿病患者中,脂联素含量下降^[6,7]。血清中脂联素蛋白主要以低聚体(low molecular weight, LMW)、中聚体(middle molecular weight, MMW)和高聚体(high molecular weight, HMW)3种形式存在,其中HMW被认为是最主要活性成分^[8]。2004年, Scherer课题组提出脂联素HMW/总量比值(S_A)与胰岛素敏感性高度正相关^[9]。但脂联素水平,尤其是脂联素的多聚体水平是否与NASH相关尚不清楚。本研究检测了青年男性NASH患者血清脂联素总量及多聚体水平,并进一步探讨了脂联素在NASH发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 64例NASH患者均来自2011-07/2012-12

在清华大学医院就诊的患者,男,年龄18-39岁,平均年龄24.4岁。所有入选患者均符合2010年修订的《非酒精性脂肪性肝病诊疗指南》^[10]的诊断标准,即无饮酒史或饮酒折合乙醇量 $<140\text{ g/wk}$,排除病毒性肝炎、药物性肝炎、自身免疫性肝病、肝豆状核变性、全胃肠外营养等可导致脂肪肝的特定疾病,腹部彩超证实脂肪肝存在,血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)持续增高超过半年。正常对照组46例,来自清华大学医院体检人员,男,年龄19-27岁,平均年龄22.1岁,两组年龄经统计学处理无显著性差异($P>0.05$)。

1.2 方法 研究对象在试验前日晚清淡饮食,禁止饮酒,采集隔夜空腹静脉血5 mL,全自动生化分析仪当天完成测定指标,测量指标包括ALT、AST、谷酰转肽酶(glutamyl transpeptidase, GGT)、总胆固醇(total cholesterol, TCHO)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、血糖(glucose, Glu)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)。预留血清、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备测血清脂联素;脂联素总量测定采用酶联免疫吸附法(ELISA),将血清按1:50000稀释包被在96孔酶标板上,并用能够识别脂联素高、中、低3种聚体的抗体进行检测。检测结果将一正常人血清脂联素读值设为1,其他样品读数相对于此正常人样品读数换算,记录相对值。脂联素各聚体检测:通过Western blot的方法,配制2%-15%的梯度胶在非还原非变性的条件下进行凝胶电泳,用能识别脂联素3种聚体的抗体检测,NIH Image J软件分析Western blot条带^[11]。计算指标:体质量指数(body mass index, BMI) = 体质量(kg)/身高的平方(m^2);脂联素高聚体占总量比例(S_A) = 脂联素高聚体/总量。

统计学处理 采用SPSS19.0软件分析,检验各组变量的正态分布情况,包括脂联素总量、脂联素高聚体/总量比值等指标均符合连续正态分布。计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,两组间均数的比较采用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(两两比较采用LSD方法),脂联素的相关因素分析采用Pearson相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

NASH患者组和对照组血转氨酶、血糖及脂

■ 研发前沿

已有研究表明, NASH患者均伴随着胰岛素抵抗,而近年发现的脂联素是一种胰岛素增敏化激素,由于其在调节血糖血脂、抗炎反应中表现出的巨大潜力受到越来越多的关注,也成为该领域的研究热点。探究脂联素与NASH发病的关系对于研究和治疗NASH具有重要价值。

■创新盘点

从研究群体来看,根据既往报道,中青年男性可能是NASH的相对易感人群,对此类人群的研究更具针对性。而从脂联素与NASH发病关系来看,类似的报道多从脂联素总量与NASH关系分析,而本研究就脂联素各聚体分离,证明脂联素高聚体占总量的比例与NASH密切相关。

表 1 NASH组与对照组肝功酶、血糖、脂联素总量及高聚体/总量(S_A)结果比较

分组	<i>n</i>	谷丙转氨酶(U/L)	谷草转氨酶(U/L)	血糖(mmol/L)	脂联素总量	脂联素 S_A
NASH组	64	102.68 ± 54.05	45.90 ± 22.02	5.50 ± 1.72	0.92 ± 0.17	0.39 ± 0.14
对照组	46	12.57 ± 5.31	17.76 ± 4.92	4.79 ± 0.29	1.02 ± 0.16	0.47 ± 0.11
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.007	0.002	0.002

NASH: 非酒精性脂肪性肝炎。

表 2 NASH不同组别脂联素总量及脂联素 S_A 结果比较

分组	<i>n</i>	脂联素总量	脂联素 S_A
重度组	12	0.83 ± 0.15 ^{bd}	0.34 ± 0.12 ^f
中度组	26	0.92 ± 0.15 ^b	0.38 ± 0.16 ^f
轻度组	23	0.98 ± 0.17	0.41 ± 0.14
对照组	46	1.02 ± 0.16	0.47 ± 0.11

^b*P*<0.01 vs 对照组; ^d*P*<0.01 vs 轻度组; ^f*P*<0.01 vs 对照组。

NASH: 非酒精性脂肪性肝炎。

联素总量检测结果见表1, NASH组肝功酶学指标ALT、AST和血糖Glu均显著高于对照组(*P*<0.01), 而脂联素总量显著低于对照组(*P*<0.01)。

通过Western blot检测NASH患者和对照组血清中脂联素蛋白高、中、低各种聚体, 结果如图1所示。不同组别脂联素中、低聚体差别不大, 高聚体变化明显。其中正常组(第1、3道)高聚体含量普遍较高, 重度NASH患者(第2、4道)高聚体普遍较低, 轻度(5、6道)和中度(7、8道)NASH患者高聚体含量居于重度患者及对照组之间, 并会表现出一定的个体差异, 如轻度组第5道患者体质量指数较低、B超检验结果为轻微脂肪肝, 其脂联素高聚体含量则更接近正常人。通过计算NASH组与对照组脂联素高聚体/总量(S_A), 由表1可见, NASH组脂联素 S_A 显著低于对照组(*P*<0.01)。

按彩色三维B超检验结果将NASH患者及对照组分: 第1组(重度)、第2组(中度)、第3组(轻度)、第4组(对照), 检验各组间脂联素总量及脂联素 S_A 差异, 结果如表2所示。脂联素总量的比较中, 第1组显著低于第3、4组, 第2组显著低于对照组(*P*<0.01)。对于脂联素 S_A , 随着NASH严重程度的减弱 S_A 值逐渐升高, 其中第1、2组 S_A 均显著低于对照组(*P*<0.01)。

在NASH患者中, 脂联素及脂联素 S_A 与血糖、血脂、肝功酶检测指标的相关性见表3, 脂联素总量与TCHO、LDL呈负相关(分别*P*<0.01

表 3 脂联素及脂联素 S_A 与血糖、血脂、肝功酶检测指标的Pearson相关性分析

	脂联素总量		脂联素高聚体/总量(S_A)	
	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
体质量指数	-0.122	0.345	-0.279 ^a	0.028
谷丙转氨酶	0.010	0.939	0.064	0.615
谷草转氨酶	0.072	0.574	0.045	0.725
谷酰转氨酶	-0.057	0.673	0.049	0.716
总胆固醇	-0.358 ^b	0.007	0.199	0.146
甘油三酯	-0.121	0.379	0.011	0.937
高密度脂蛋白	-0.010	0.941	0.266 ^a	0.046
低密度脂蛋白	-0.339 ^a	0.011	0.202	0.138
血糖	-0.168	0.212	-0.067	0.618
空腹胰岛素	0.139	0.304	0.017	0.898

^a*P*<0.05; ^b*P*<0.01。

和*P*<0.05), 脂联素 S_A 与BMI呈负相关(*P*<0.05), 与HDL呈正相关(*P*<0.05)。

3 讨论

随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变, 脂肪肝已成为我国最常见的慢性疾病之一, 据报道我国30-40岁城镇中青年男性居民中1/4患有脂肪肝^[2]。而脂联素作为一种在血液中大量存在的胰岛素增敏化激素, 由于其在调节血糖血脂、抗炎症反应中表现出的巨大潜力受到越来越多的关注^[12]。本研究结果显示, 患有NASH的青年男性患者血清脂联素含量显著低于正常人, 这与既往发现一致^[13]。在血清中, 脂联素3种聚体通过激活不同信号通路来发挥不同作用^[8]。Tsao等和Kadowaki等^[14,15]已经证明脂联素高聚体与外周组织胰岛素敏感性有非常密切正相关, 是脂联素调节糖脂代谢的主要活性成分。本研究结果证明, 脂联素高聚体占总量比例与非酒精性脂肪性肝炎密切相关。在NASH患者中, 脂联素高聚体所占比例低于正常组, 并随着NASH严重程度的增加, 高聚体含量逐渐减少。这种相关性之前在肥胖^[16]、II型糖尿病^[17]人群中曾有相似的报道,

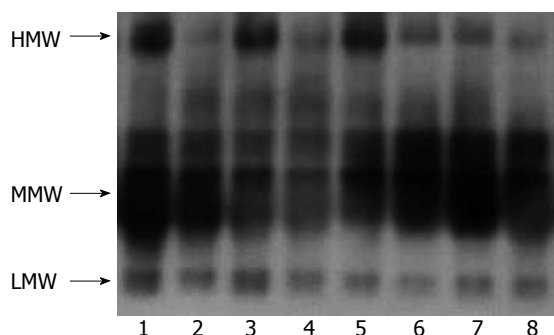


图1 Western blots检测不同程度NASH患者及对照组脂联素蛋白各聚体。1, 3: 对照组; 2, 4: 重度脂肪肝; 5, 6: 轻度脂肪肝; 7, 8: 中度脂肪肝。HMW: 高聚体; MMW: 中聚体; LMW: 低聚体。

但脂联素高聚体比例与NASH的关系很少有报道。本研究结果提示, 脂联素作为一种有活性的脂肪细胞因子, 在血清中的含量, 尤其是高聚体所占比例, 可能在NASH的发展中起重要作用。

尽管目前对NASH有很多报道, 但对其机制的研究尚不完全明确。一些研究者认为, NASH的发展过程中有两个关键点: 肝脏脂肪过度堆积和活性氧产生、肝内脂质过氧化^[1]。本研究发现, 脂联素总量与总胆固醇、低密度脂蛋白负相关, 结果与之前报道一致^[18], 而脂联素高聚体所占比例与高密度脂蛋白正相关, 这在之前报道中未发现。此外, 在游离脂肪酸氧化形成活性氧的过程中, 过氧化物酶体增殖激活受体 α (peroxisome proliferators-activated receptors α , PPAR α)、肿瘤坏死因子 α 等发挥重要调节作用, 炎症因子与抗炎因子的失衡易造成氧化压力导致肝细胞损伤^[1,19]。脂联素在肝脏细胞表面存在脂联素受体AdipoR2, 通过脂联素受体可以激活PPAR α 通路, 增强脂肪酸 β 氧化, 降低肝脏甘油三酯含量^[20]。同时有报道表明, 脂联素在保护肝脏减轻炎症反应中发挥重要作用^[21]。因此血清脂联素总量及高聚体比例可能与NASH发生发展密切相关, 针对脂联素或脂联素受体调控研究为深入了解NASH机制, 治疗NASH提供了新思路。

4 参考文献

- 1 Jansen PL. Nonalcoholic steatohepatitis. *Neth J Med* 2004; 62: 217-224 [PMID: 15554595]
- 2 白文元, 李宁, 白研. 非酒精性脂肪性肝病诊治进展. *胃肠病学* 2007; 12: 713-716
- 3 范建高. 非酒精性脂肪性肝病. *现代医药卫生* 2001; 17: 511
- 4 Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 2002; 35: 367-372

- 5 Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell GC, Holmes-Walker J, Hui JM, Fung C, Karim R, Lin R, Samarasinghe D, Liddle C, Weltman M, George J. NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology* 2002; 35: 373-379 [PMID: 11826411 DOI: 10.1053/jhep.2002.30690]
- 6 Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002; 8: 731-737 [PMID: 12068289 DOI: 10.1038/nm724]
- 7 Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Tomimaga M, Kato T. Decreased serum levels of adiponectin are a risk factor for the progression to type 2 diabetes in the Japanese Population: the Funagata study. *Diabetes Care* 2003; 26: 2015-2020 [PMID: 12832305]
- 8 Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schultness T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003; 278: 9073-9085 [PMID: 12496257 DOI: 10.1074/jbc.M207198200]
- 9 Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279: 12152-12162 [PMID: 14699128 DOI: 10.1074/jbc.M311113200]
- 10 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版). *中华肝脏病杂志* 2010; 18: 163-166
- 11 Li Y, Wang P, Zhuang Y, Lin H, Li Y, Liu L, Meng Q, Cui T, Liu J, Li Z. Activation of AMPK by berberine promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2011; 585: 1735-1740 [PMID: 21536037 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.04.051]
- 12 Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003; 144: 3765-3773 [PMID: 12933646]
- 13 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54 [PMID: 15239085 DOI: 10.1002/hep.20280]
- 14 Tsao TS, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderaman NB, Heuser JE, Lodish HF. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 50810-50817 [PMID: 14522956 DOI: 10.1074/jbc.M309469200]
- 15 Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-1792 [PMID: 16823476 DOI: 10.1172/JCI29126]
- 16 Kantartzis K, Staiger H, Machann J, Schick F,

■应用要点

本研究结果对于深入探究NASH机制, 治疗及检测NASH提供了新思路。

■同行评价

本文研究青年男性NASH与血清脂联素的相关性。该研究对于NASH病因学及治疗均有一定的实际意义。

- Claussen CD, Machicao F, Fritsche A, Häring HU, Stefan N. Adiponectin oligomers and ectopic fat in liver and skeletal muscle in humans. *Obesity* (Silver Spring) 2009; 17: 390-392 [PMID: 19169222 DOI: 10.1038/oby.2008.487]
- 17 Liu Y, Retnakaran R, Hanley A, Tungtrongchitr R, Shaw C, Sweeney G. Total and high molecular weight but not trimeric or hexameric forms of adiponectin correlate with markers of the metabolic syndrome and liver injury in Thai subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4313-4318 [PMID: 17698903 DOI: 10.1210/jc.2007-0890]
- 18 蒋海彬, 施亚雄. 脂联素与代谢综合征. *中国实用医药* 2010; 5: 234-238
- 19 Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 2003; 38: 413-419 [PMID: 12883485 DOI: 10.1053/jhep.2003.50316]
- 20 Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769 [PMID: 12802337 DOI: 10.1038/nature01705]
- 21 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100 [PMID: 12840063 DOI: 10.1172/JCI17797]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣等^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所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。

中国人肝淀粉样变性的临床特点

王慧慧, 田字彬, 丁雪丽, 荆雪, 孔心娟, 张翠萍, 魏良洲, 赵清喜

王慧慧, 田字彬, 丁雪丽, 荆雪, 孔心娟, 张翠萍, 魏良洲, 赵清喜, 青岛大学医学院附属医院消化科 山东省青岛市 266003

王慧慧, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由田字彬与王慧慧设计; 资料分析和论文撰写由王慧慧、丁雪丽及荆雪完成; 临床资料的收集由孔心娟、张翠萍、魏良洲及赵清喜完成; 文献检索由王慧慧完成; 审校由田字彬完成。

通讯作者: 田字彬, 教授, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化科. tianzb@qdumh.qd.sd.cn

电话: 0532-82911302

收稿日期: 2013-02-14 修回日期: 2013-03-08

接受日期: 2013-04-07 在线出版日期: 2013-05-08

Clinical characteristics of hepatic amyloidosis in Chinese patients

Hui-Hui Wang, Zi-Bin Tian, Xue-Li Ding, Xue Jing, Xin-Juan Kong, Cui-Ping Zhang, Liang-Zhou Wei, Qing-Xi Zhao

Hui-Hui Wang, Zi-Bin Tian, Xue-Li Ding, Xue Jing, Xin-Juan Kong, Cui-Ping Zhang, Liang-Zhou Wei, Qing-Xi Zhao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Zi-Bin Tian, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. tianzb@qdumh.qd.sd.cn

Received: 2013-02-14 Revised: 2013-03-08

Accepted: 2013-04-17 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To investigate the clinical characteristics of hepatic amyloidosis in Chinese patients.

METHODS: Relevant data for Chinese patients with hepatic amyloidosis diagnosed from 1981 to 2012 were retrieved from a Chinese biomedical database and analyzed.

RESULTS: Major clinical manifestations of hepatic amyloidosis were unspecific, including fatigue, abdominal distension, anorexia and weight loss. Hepatomegaly (95.5%), splenomegaly (34.8%) and shifting dullness (42.4%) were common in physical examination. Laboratory tests often revealed apparently elevated serum alkaline phosphatase ($662.94 \text{ U/L} \pm 620.86 \text{ U/L}$;

80.3%) and glutamyltranspeptidase ($687.34 \text{ U/L} \pm 873.91 \text{ U/L}$; 71.2%). Approximately 76.2% of patients had either a serum or urine monoclonal protein. Liver biopsy is the golden standard for the diagnosis of this disease. The Congo red staining was often positive. Amyloid deposition was mainly located in the sinusoid and interstitium (54.8%). The misdiagnosis rate was 45.5%. The major cause of death was multiple organic failure.

CONCLUSION: Patients with hepatic amyloidosis often show no specific clinical manifestations or laboratory and imaging features, which results in a high misdiagnosis rate. When a patient has hepatomegaly and elevated alkaline phosphatase and glutamyltranspeptidase, hepatic amyloidosis should be considered even if other liver function parameters are almost normal. Liver biopsy has been suggested to be the only means to confirm the diagnosis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Liver; Amyloidosis; Misdiagnosis; Biopsy

Wang HH, Tian ZB, Ding XL, Jing X, Kong XJ, Zhang CP, Wei LZ, Zhao QX. Clinical characteristics of hepatic amyloidosis in Chinese patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1261-1265 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1261.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1261>

摘要

目的: 分析中国人肝淀粉样变性的临床特点, 提高临床诊断率。

方法: 在中国医学文献数据库(CNKI)中检索1981-2012年中国人肝淀粉样变性临床资料并进行回顾性分析。

结果: 临床表现主要为乏力、腹胀、纳差、消瘦等非特异性症状。体格检查中肝大(95.5%), 脾大(34.8%), 移动性浊音(42.4%)多发。实验室检查中碱性磷酸酶明显升高, 平均 $662.94 \text{ U/L} \pm 620.86 \text{ U/L}$ (80.3%), 谷氨酰转肽

■背景资料

肝淀粉样变性临床误诊率高, 其原因主要是对肝淀粉样变性的认识不足, 肝淀粉样变性临床表现错综复杂, 临床特点及影像学检查缺乏特异性, 少数情况只浸润单一器官。早期诊断治疗有助于延长患者生存期。

■同行评议者

姚鹏, 副教授, 北京军区总医院全军肝病中心; 张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心(肝脏病学, 传染病学)

■研究前沿

肝淀粉样变性的发病机制尚不十分明确, 每种类型的肝淀粉样变性发病机制均不相同。认为年龄与肝淀粉样纤维形成有关, 存在一个与年龄相关的触发点, 一旦发病则进展迅速。性别与肝淀粉样变性无明显关系。

酶升高, 平均 $687.34 \text{ U/L} \pm 873.91 \text{ U/L}$ (71.2%)。轻链检测阳性率为76.2%。活检病理检查是唯一确诊手段, 刚果红染色阳性, 淀粉样物质沉积主要部位在窦状隙和间质(54.8%)。66例患者中, 误诊率达45.5%, 死亡原因主要是心、肝、肾多脏器功能衰竭。

结论: 肝淀粉样变性临床表现、辅助检查缺乏特异性, 临床误诊率高。肝脏明显肿大伴碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶明显升高, 其他肝功指标轻度异常时, 应考虑肝淀粉样变性, 及时肝活检可以避免误诊。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 肝脏; 淀粉样变性; 误诊; 活检

核心提示: 肝淀粉样变性通常表现不明原因的体重减轻、早饱、右上腹胀, 肝脏明显肿大、碱性磷酸酶升高。电子计算机体层摄影(computer tomography)、核磁共振成像(nuclear magnetic resonance imaging)等影像学检查无特异性改变。肝淀粉样变性临床表现、辅助检查缺乏特异性, 临床误诊率高。应注意同肝硬化、肝癌等疾病的鉴别。病理检查为肝淀粉样变性确诊的唯一依据。肝脏明显肿大伴碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶明显升高, 其他肝功指标轻度异常时, 应考虑肝淀粉样变性, 及时肝活检可以避免误诊。

王慧慧, 田宇彬, 丁雪丽, 荆雪, 孔心娟, 张翠萍, 魏良洲, 赵清喜. 中国人肝淀粉样变性的临床特点. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1261-1265 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1261.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1261>

0 引言

淀粉样变性是多种原因引起的一组临床症候群, 其特点为特异性糖蛋白纤维即淀粉样物质在细胞外组织中沉积, 可以沉积在局部或全身多器官, 病程可呈良性或恶性。淀粉样物质侵犯肝脏, 沉积于肝细胞之间或网状纤维支架时称为肝淀粉样变性。肝脏是淀粉样变性最常侵犯的部位之一。肝淀粉样变性误诊率高, 原因主要为临床表现缺乏特异性, 且临床医师对其认识不足, 延误诊治。本文收集了国内64例确诊肝淀粉样变性的个案报道^[1-15], 结合我院消化科确诊的2例肝淀粉样变性, 对其临床特点进行分析, 以指导早期诊断。

1 材料和方法

1.1 材料 以“肝淀粉样变”或“淀粉样变性”为主题词, 检索在中国知网(CNKI)全文数据

库、万方数据库、中国生物医学文献数据库、维普数据库等公开发表的中文文献, 并辅以文献追溯和手工检索的方法, 对相关的参考文献严格按照文献纳入、排除标准来筛选。文献纳入标准: (1)有关肝淀粉样变性的个案报道; (2)患者病史、体格检查、辅助检查等临床资料详尽; (3)经活检病理证实为肝淀粉样变性; (4)对重复报道的文献, 选择其中最为详尽的报道文献进行分析。文献排除标准: (1)临床特点分析及回顾性研究, 无具体病例资料; (2)其他器官淀粉样变性, 或未经病理证实合并肝淀粉样变性者; (3)病例资料交代不清楚。

1.2 方法 对肝淀粉样变性患者的一般资料、疾病分类、临床表现、辅助检查、确诊方法、误诊情况、治疗及预后各方面进行回顾性分析。

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行处理, 计数资料采用百分率表示, 计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。

2 结果

2.1 一般资料 收集符合标准的文献原文, 统计共64例, 我院消化科确诊2例, 共66例。其中男41例, 女25例, 年龄15-76岁, 平均51.1岁。

2.2 分类 原发性64例, 均未发现自身免疫病、慢性感染、恶性肿瘤或其他相关伴随病证据, 无家族遗传病史。继发性2例, 继发于多发性骨髓瘤, 其中1例行高锰酸钾试验。

2.3 临床表现 最常见的主诉症状依次为: 乏力(69.7%), 腹胀(69.7%), 纳差(56.1%), 体质量下降(47.0%), 双下肢水肿(30.3%)(表1)。66例肝淀粉样变性患者, 除肝、脾受累外, 还同时有肾脏、心脏及皮肤等受累的表现。以上受累脏器中, 以肾脏受累最多, 占53.0%。心脏其次, 占34.8%(表2)。肝大63例(95.5%), 脾大23例(34.8%)。

2.4 实验室检查 白蛋白降低者占54.5%, 平均 $25.31 \text{ g/L} \pm 5.80 \text{ g/L}$ 。碱性磷酸酶升高者占80.3%, 平均 $662.94 \text{ U/L} \pm 620.86 \text{ U/L}$; 谷氨酰转氨酶升高者占71.2%, 平均 $687.34 \text{ U/L} \pm 873.91 \text{ U/L}$; 天冬氨酸转氨酶升高者占54.5%, 平均 $115.53 \text{ U/L} \pm 85.31 \text{ U/L}$; 丙氨酸转氨酶升高者占27.3%, 平均 $142.07 \text{ U/L} \pm 158.21 \text{ U/L}$; 总胆红素升高者占47.0%, 平均 $127.62 \mu\text{mol/L} \pm 175.66 \mu\text{mol/L}$, 其中61.3%以直接胆红素升高为主。尿蛋白阳性者占63.6%。15例记录24 h尿蛋白结果, 平均 $4.96 \text{ g/24 h} \pm 6.47 \text{ g/24 h}$ 。28例血红蛋白降低, 其中男19例, 平均 $67.70 \text{ g/L} \pm 32.15 \text{ g/L}$; 女9例, 平均

表 1 66例肝淀粉样变性患者临床表现

主要临床表现	n	发生率(%)
一般表现		
乏力	46/66	69.7
体质量下降	31/66	47.0
累及肝脏表现		
腹胀	46/66	69.7
纳差	37/66	56.1
皮肤巩膜黄染	13/66	19.7
腹痛	13/66	19.7
恶心	7/66	10.6
上腹包块	7/66	10.6
尿黄	6/66	9.1
累及其他脏器表现		
双下肢水肿	20/66	30.3
尿少	11/66	16.7
心悸、气促	6/66	9.1

85.54 g/L \pm 18.02 g/L. 分别有15例患者出现白细胞、血小板增多. PT延长者占18.2%. 平均19.33 s \pm 5.21 s. 共有23例血沉增快, 其中男15例, 平均64.73 mm/h \pm 27.07 mm/h, 女8例, 平均51.88 mm/h \pm 38.72 mm/h. 25例患者行血脂检查, 发现18例血脂升高, 阳性率为75.0%. 21例患者通过免疫电泳, 尿本周蛋白或血、尿轻链定量等进行轻链检测, 有16例为阳性, 阳性率为76.2%, 5例行尿本周蛋白检测为阴性(表3).

2.5 其他辅助检查 骨髓穿刺: 29名患者行骨穿检查, 其中2例提示多发性骨髓瘤, 另有浆细胞增多者9例; B超和电子计算机体层摄影(computer tomography, CT)等影像学检查: 缺乏特异性, 多数提示肝、脾体积增大, 性质不明.

2.6 确诊方法 组织病理检查是确诊的依据. 66例患者均通过肝穿、手术取大体标本活检或尸检, 刚果红染色阳性, 最后确诊为肝淀粉样变性. 淀粉样物质沉积部位以窦状隙和间质为主者23例, 占54.8%, 广泛沉积于小叶及汇管区者13例, 占30.9%, 以血管壁为主者6例, 占14.3%, 其余24例未详细描述沉积部位.

2.7 误诊情况 66例患者中, 30例曾被误诊, 误诊率达45.5%. 其中, 误诊为肝硬化者12例, 占40.0%, 误诊为原发性肝癌者5例, 占16.7%. 其他误诊为脂肪肝、慢性肝炎、布加氏综合征、慢性肾炎和缩窄性心包炎等.

2.8 治疗和预后 66例肝淀粉样变病患者, 虽然经细胞毒性药物、对症支持、肝移植等多种治疗, 但预后欠佳. 能追踪到的死亡患者有20例, 从起

表 2 66例肝淀粉样变性患者受累部位

受累部位	n
肾脏	35
心脏	23
皮肤	5
骨髓	4
胃肠	3
胰腺	2
X因子缺乏	2
眼外肌	1
肺	1
子宫	1
肾上腺	1
血管	1

病到死亡, 平均时间仅7.7 mo. 其中4例因出院后未复诊, 死亡原因不详. 2例患者行肝移植, 均死于移植术后继发肺部感染. 余14例死亡原因主要是肾衰、心衰、肝衰等致多脏器功能衰竭, 占42.9%, 其他死亡原因还包括消化系出血、失血性休克、肺部感染以及胆道感染致感染性休克等.

3 讨论

肝淀粉样变性发病率很低, 仅为0.7%^[16]. 发病年龄>40岁, 男多于女^[17]. 本文66例肝淀粉样变性患者平均年龄为51.1岁, 男女之比为1.64:1, 与文献报道相符.

66例肝淀粉样变性患者中, 64例均未发现自身免疫病、慢性感染或其他伴随病, 无家族遗传史, 考虑为原发性可能性大. 2例经骨髓穿刺证实继发于多发性骨髓瘤. 原发性及继发于多发性骨髓瘤的淀粉样变性属AL型淀粉样变性, 与浆细胞过度增生有关, 蛋白前体为单克隆免疫球蛋白轻链. 前体蛋白异常折叠, 形成一种高度异常的纤维构型, 并自动聚集成原纤维. 前体蛋白能形成淀粉样原纤维在部分实验中已得到证实^[18]. 原纤维为不溶性, 沉积于不同组织及细胞外, 破坏了正常组织结构, 既剥夺细胞的生存空间又削弱器官的功能, 同时淀粉样纤维有一定的细胞毒性, 能促进细胞凋亡^[19], 形成不同组织器官的淀粉样变性和临床表现.

肝淀粉样变性多合并其他器官受累, 肾脏受累最常见, 表现为肾病综合征、肾功能下降; 其次为心脏受累, 表现为充血性心衰、心律失常等. 肝淀粉样变性临床症状多为非特异性, 表

■应用要点

国内有关肝淀粉样变性的文献多为个案报道或小样本临床特点分析, 此文针对国内确诊肝淀粉样变性的个案报道, 进行回顾性研究, 对指导临床医师进一步了解肝淀粉样变性的临床特点有重要意义.

■同行评价

本文选题贴近临床实践,有一定参考价值。

表 3 66例肝淀粉样变性患者实验室检查结果

实验室检查	n	发生率(%)
肝功能		
白蛋白降低(< 35 g/L)	36/66	54.5
碱性磷酸酶升高(> 125 U/L)	53/66	80.3
谷氨酰转氨酶升高(> 64 U/L)	47/66	71.2
天冬氨酸转氨酶升高(> 42 U/L)	36/66	54.5
丙氨酸转氨酶升高(> 60 U/L)	18/66	27.3
总胆红素升高(> 17.1 μmol/L)	31/66	47.0
尿蛋白阳性	42/66	63.6
血红蛋白降低	28/66	42.4
PT延长	12/66	18.2
血沉增快	23/66	34.8
血脂	18/24	75.0
轻链检测	16/21	76.2

现为乏力、腹胀、纳差、体质量下降等,双下肢水肿与肾病综合征引起低蛋白血症或心衰、梗阻性肝病有关。体格检查往往表现为肝脾重度肿大。辅助检查有意义的有:肝功能损害轻微,以碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶明显升高,且升高程度与肝脏大小不成正比为特点;白蛋白下降,与肝脏合成减少,尿液中丢失有关;尿蛋白阳性,与肾脏受累有关;血常规提示中度贫血;血沉增快;血脂升高;血或尿免疫固定电泳等轻链检测阳性;骨髓穿刺提示浆细胞增多或多发性骨髓瘤。

目前淀粉样变性无特异性的治疗方法。以对症、支持治疗为原则,抑制淀粉样物质的产生和异常沉积是治疗的目的。标准的治疗方案是口服美法仑和泼尼松,就总体而言治疗效果并不理想。某些细胞毒性药物也被证实具有减少淀粉样物质沉积的作用^[20]。目前认为最有效的治疗方案是大剂量美法仑联合自体干细胞移植,能有效改善AL型淀粉样变性患者的临床症状和器官功能,有效延长患者中位生存期。对于继发性肝淀粉样变性,积极治疗诱发本病的原发疾病最为重要。

肝淀粉样变性预后差,发病后未经治疗只能存活1-2年,国外报道,肝淀粉样变性的中位生存期是9 mo^[21]。累及肾脏、心脏等重要脏器,导致充血性心衰、肾衰,疾病本身可导致肝功能进行性衰竭。晚期多死于继发感染、心功能不全或多脏器功能衰竭。本文66例肝淀粉样变性患者,追踪到的死亡患者有20例,从起病到死亡,平均时间是7.7 mo,与国外报道相符。死亡原因

主要是肾衰、心衰、肝衰等多脏器功能衰竭。

肝淀粉样变性误诊率高,应注意同肝硬化、肝癌等疾病的鉴别。病理检查为肝淀粉样变性确诊的唯一依据。临床怀疑肝淀粉样变性的患者,如条件允许,应及时行活检病理检查以明确诊断。肝淀粉样变性往往合并身体其他部位淀粉样物质沉积,也可以用腹部皮下脂肪针吸或直肠活检进行诊断,这样可以有效降低肝穿出血等并发症的发生^[22]。肝淀粉样变性是一种少见病,由于其临床表现、实验室检查和影像学检查缺乏特异性,往往容易造成误诊。但只要对该病有充分认识,提高警惕,及时进行活检,就可以避免误诊。

4 参考文献

- 1 蔡瑞明, 严庆惠, 蔡晓青. 肝淀粉样变一例报告. 上海免疫学杂志 1981; 1: 42
- 2 赵洪川, 张道明, 张岚. 肝淀粉样变性2例报告. 中华肝病学会肝脏病杂志 1995; 3: 238
- 3 贾继珍, 王志强. 胸闷, 气短, 肝、脾、甲状腺肿大和腹水. 胃肠病学 1999; 4: 57-58
- 4 方秀才, 陶建瓴, 周旭东. 腹水、黄疸及少尿. 中华医学杂志 2001; 81: 629-632
- 5 马威, 赵景民, 王华明, 张军华, 韩铁铮. 肝淀粉样变性一例. 中华医学杂志 2002; 82: 466
- 6 蓝琳, 崔生达, 程天明, 白岚, 方容容. 肝淀粉样变性1例. 中华肝病杂志 2004; 12: 334
- 7 潘辰, 韩荔芬, 郑智勇. 肝严重淀粉样变一例. 中华传染病杂志 2004; 22: 282
- 8 郑瑞丹, 黄俊达, 杨铮, 徐成润. 肝内胆汁淤积为主要表现的肝淀粉样变1例. 中国中西医结合消化杂志 2005; 13: 200
- 9 杨立新, 吕红, 钱家鸣. 肝淀粉样变4例报告并国内文献分析. 中国实用内科杂志 2006; 26: 217-219
- 10 曲巍, 尤荣开. 原发性肝淀粉样变性肝穿刺出血致死一例. 中华内科杂志 2007; 46: 902
- 11 陈阳, 王才. 肝淀粉样变性1例. 临床与实验病理学杂志 2008; 24: 755
- 12 李春雨. 肝淀粉样变性一例. 中华全科医师杂志 2009; 8: 206-207
- 13 郝礼森, 郭剑, 郑力博, 朱芳丽, 刘小娟, 张晓岚, 秦玉彩. 肝淀粉样变1例. 世界华人消化杂志 2010; 18: 1287-1289
- 14 谷玉雷, 张水军, 赵永福, 冯留顺, 马秀现, 赵龙栓, 吴阳, 李捷. 原发性肝淀粉样变性合并重度肝内胆汁淤积性黄疸一例. 中华普通外科杂志 2011; 26: 271
- 15 劳敏曦, 王锦辉, 陈洁, 王淑冰, 陈旻湖. 肝淀粉样变性合并重度淤胆及角膜K-F环1例报告并文献复习. 中国实用内科学杂志 2012; 32: 721-723
- 16 闫军, 卢倩, 董家鸿. 肝肾序贯联合移植治疗淀粉样变性病(附1例报告). 消化外科 2004; 3: 307-333
- 17 郑琦, 江家骥, 刘豫瑞, 朱月永, 陈靖. 肝淀粉样变的临床和病理分析. 中国临床实用医学 2007; 1: 51
- 18 Adle-Biasette H, Vallat AV, Nochy D. [Amyloidosis: definition and classification]. Arch Anat Cytol Pathol 1996; 44: 101-105 [PMID: 8794589]
- 19 Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. Curr Opin Hematol 2000; 7: 64-69 [PMID: 10608507 DOI: 10.1097/00062752-200001000-00012]

- 20 Kyle RA, Gertz MA. Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol* 1995; 32: 45-59 [PMID: 7878478]
- 21 姚健, 张国艳, 刘玉兰. 肝脏淀粉样变性. 胃肠病学和肝病学杂志 2004; 13: 191-192
- 22 Gillmore JD, Lovat LB, Hawkins PN. Amyloidosis and the liver. *J Hepatol* 1999; 30 Suppl 1: 17-33 [PMID: 10370897]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology], 是一本由来自国内30个省、市、自治区、特别行政区的483位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

γ -射线立体定向体部放射治疗局限性胰腺癌65例

康晓黎, 王颖杰, 邵银剑, 李宏奇, 李平, 王济东, 王轩, 夏廷毅

■背景资料

胰腺癌是常见的消化系统恶性肿瘤, 但因其起病隐匿, 待肿瘤侵犯或压迫胆道出现黄疸、或侵犯周围组织出现疼痛症状而就诊时, 肿瘤往往已处于晚期。确诊时20%可获手术切除, 超过40%的患者为局部进展期, 其余患者均伴有远处转移。目前针对局部进展期胰腺癌采用常规放疗、单纯化疗、放疗+化疗等未见疗效明显改善, 仍有较高的远处转移和局部失败率, 中位生存期仅6-10 mo。因此, 积极探索局部进展期胰腺癌的治疗方法具有重要的临床意义。

康晓黎, 河北北方学院研究生院 河北省张家口市 075000
王颖杰, 邵银剑, 李宏奇, 李平, 王济东, 王轩, 夏廷毅, 中国人民解放军空军总医院肿瘤放疗科 北京市 100142

康晓黎, 主要从事肿瘤放疗的临床研究。

首都医学发展科研基金资助项目, No. 2009-2057

作者贡献分布: 本课题由王颖杰设计; 资料标本收集由王颖杰、康晓黎及邵银剑完成; 实验过程由康晓黎、王颖杰、邵银剑、李宏奇、李平、王济东、王轩及夏廷毅完成; 实验结果判定由康晓黎与王颖杰完成; 写作由康晓黎完成; 修改与审校由王颖杰完成。

通讯作者: 王颖杰, 副教授, 副主任医师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 空军总医院肿瘤放疗科。wangyj9999@163.com
电话: 010-68410099-6359

收稿日期: 2013-03-29 修回日期: 2013-04-14

接受日期: 2013-04-18 在线出版日期: 2013-05-08

Efficacy and toxicity of γ -ray stereotactic body radiation therapy in management of locally advanced pancreatic carcinoma: Our experience with 65 cases

Xiao-Li Kang, Ying-Jie Wang, Yin-Jian Shao, Hong-Qi Li, Ping Li, Ji-Dong Wang, Xuan Wang, Ting-Yi Xia

Xiao-Li Kang, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Ying-Jie Wang, Yin-Jian Shao, Hong-Qi Li, Ping Li, Ji-Dong Wang, Xuan Wang, Ting-Yi Xia, Department of Radiation Oncology, Air Force General Hospital, Chinese PLA, Beijing 100142, China

Supported by: the Capital Medical Research and Development Foundation, No. 2009-2057

Correspondence to: Ying-Jie Wang, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Radiation Oncology, Air Force General Hospital, Chinese PLA, 30 Fucheng Road, Haidian District, Beijing 100142, China. wangyj9999@163.com

Received: 2013-03-29 Revised: 2013-04-14

Accepted: 2013-04-18 Published online: 2013-05-08

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and toxicity of γ -ray stereotactic body radiation therapy in the management of locally advanced pancreatic carcinoma, and to analyze factors affecting prognosis of locally advanced pancreatic carcinoma.

METHODS: Sixty patients with locally advanced pancreatic carcinoma who were treated with

the γ -ray stereotactic body radiation therapy in our department were prospectively enrolled. Depending on tumor size, a total dose of 45-51 Gy was delivered at 3-5 Gy/fraction over 2-3 wk in 5 fractions per week to the 50% isodose line covering the planning target volume. Survival and prognostic factors were analyzed using the Kaplan-Meier method and Cox proportional hazard model, respectively. Univariate and multivariate analyses were performed to examine factors affecting clinical outcome.

RESULTS: Of all lesions, 15 (23%) completely disappeared, and 31 (48%) had a partial response. The total response rate was 71%. The overall 1-year survival rate was 52.4% and the median survival time was 13 mo. All patients tolerated the treatment well and completed the planned therapy. Grade I acute gastrointestinal toxicity developed in 33 (51%) patients, and grade II gastrointestinal toxicity was observed in 12 (18%) patients. Eighteen (28%) patients were diagnosed with grade I leukocytopenia, and 5 (8%) patients had grade II leukocytopenia. Multivariate analysis demonstrated that TNM stage and CA199 \geq 425.8 U/mL were independent prognostic factors for pancreatic cancer.

CONCLUSION: γ -ray stereotactic body radiation therapy can result in a good curative effect and local control in the treatment of locally advanced pancreatic cancer. No severe adverse events occurred. TNM stage and CA199 \geq 425.8 U/mL are independent prognostic factors for locally advanced pancreatic carcinoma.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Local advanced pancreatic cancer; γ -ray; Stereotactic body radiation therapy; Prognosis

Kang XL, Wang YJ, Shao YJ, Li HQ, Li P, Wang JD, Wang X, Xia TY. Efficacy and toxicity of γ -ray stereotactic body radiation therapy in management of locally advanced pancreatic carcinoma: Our experience with 65 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(13): 1266-1272 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1266.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i13.1266>

■同行评议者

康春博, 副主任医师, 北京大学航天临床医院普通外科

摘要

目的: 观察 γ -射线立体定向体部放射治疗局限期胰腺癌的疗效和放射治疗反应, 探讨影响其预后的相关因素。

方法: 这是一项前瞻性的临床研究, 对符合入组条件的65例局限期胰腺癌患者给予 γ -射线立体定向体部放射治疗。采用50%剂量线覆盖计划靶区(planning target volume, PTV), PTV边缘剂量3-5 Gy/次, 5次/wk, 总剂量45-51 Gy/2-3 wk的高分次剂量治疗模式。生存分析采用Kaplan-Meier法, 多因素分析采用Cox比例风险回归模型, 分析影响患者预后的相关因素。

结果: 全组患者原发灶完全缓解率23%、部分缓解率48%, 总有效率为71%。1年总生存率为52.4%, 中位生存期13 mo。放疗后急性消化系反应, 1级为51%, 2级为18%, 未见3级不良反应。骨髓抑制1级为28%, 2级为8%, 经对症处理后患者均能按计划完成治疗。多因素分析结果显示TNM分期、治疗前CA199 \geq 425.8 U/mL是胰腺癌患者独立预后因素。

结论: γ -射线立体定向体部放射治疗局限期胰腺癌采用3-5 Gy/次, 5次/wk, PTV边缘50%等剂量线处总剂量45-51 Gy的治疗模式是安全有效的, 对局限期胰腺癌可获得较好的局控率和生存率, 并可缓解疼痛, 提高生活质量。其TNM分期、CA199水平可为胰腺癌的预后判定提供参考依据。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 局限期胰腺癌; γ -射线; 立体定向放射治疗; 预后

核心提示: 本文采用具有独特聚焦性的体部伽玛刀治疗局限期胰腺癌, 计划要求50%剂量线覆盖100%计划靶区(planning target volume, PTV), 采用PTV边缘剂量3-5 Gy/次, 5次/wk, 总剂量45-51 Gy/2-3 wk的高分次剂量短疗程治疗模式是安全有效的, 且可以提高胰腺癌患者的局控率, 总生存率及无进展生存期, 疼痛明显缓解, KPS评分明显改善, 生活质量提高。

康晓黎, 王颖杰, 邵银剑, 李宏奇, 李平, 王济东, 王轩, 夏廷毅. γ -射线立体定向体部放射治疗局限期胰腺癌65例. 世界华人消化杂志 2013; 21(13): 1266-1272 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1266.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i13.1266>

0 引言

近几年胰腺癌发病率呈逐年增加趋势, 因其

起病隐匿、病情进展快、恶性程度高, 而有“癌中之王”之称。大量临床研究表明仅有10%-15%的患者可手术切除, 其中根治者仅占5.0%-7.5%, 胰腺癌患者中位生存时间不足6 mo, 5年生存率低于5%^[1,2]。文献报道^[3-5]常规放疗+化疗以及手术+放化疗等多种治疗手段的联合也未显著提高胰腺癌患者的生存率。随着放疗技术的发展, 精确放疗取得了巨大进步, 体部伽玛刀作为我国自主创新的立体定向放射治疗(stereotactic body radiation therapy, SBRT)技术, 在胰腺癌的治疗方面获得了巨大的进步^[6,7]。选取2010-01/2012-07符合入组条件的65例局限期胰腺癌患者行 γ -射线立体定向体部放射治疗, 初步效果良好, 现分析如下。

1 材料和方法

1.1 材料 自2010-01/2012-07共65例局限期胰腺癌入组, 男患者36例, 女29例; 中位年龄62岁(29-80岁)。入院后进行详细的病史询问、体格检查和相关辅助检查, 包括血常规、肝肾功、肿瘤标志物、腹部增强CT/MRI、颈部超声等, 部分患者行PET/CT检查。65例患者均签署放疗知情同意书。每周复查血常规、肾功能, 评估各种不良反应。

1.2 方法

1.2.1 入组标准: (1)年龄 \leq 85岁; (2)KPS评分: 60-100分; (3)组织学或细胞学或临床诊断为局限期胰腺癌; (4)外科会诊无手术指征, 或因内科疾病不能手术, 或患者拒绝手术; (5)有梗阻黄疸已行减黄处理后; 无远处转移或无胃肠广泛浸润, 无腹水; (6)65例患者均签署知情同意书。排除标准: (1)曾患其他恶性肿瘤; (2)有精神系统病变者; (3)有重要器官的严重疾病或严重感染; (4)受试者既往接受过放疗; (5)正在进行其他药物试验或入组前1 mo内参加其他新药临床试验者; (6)怀孕或哺乳期妇女、处于生育期而未采取有效避孕措施者。

1.2.2 治疗方法: 采用OUR-QGD型立体定向 γ 射线全身治疗系统, 简称体部 γ 刀(奥沃公司, 深圳)。定位前20 min口服浓度为2%的碘帕醇溶液100 mL, 以显示胃、十二指肠和小肠的位置。患者取仰卧位, 双手上举置于额头前, 用体位固定床和真空负压垫固定体位, 固定胸腹部, 体表标记重复摆位点, 扫描前5-10 s静脉注射碘帕醇100 mL。采用CT模拟定位技术, 在平静呼吸下行腹部CT增强扫描, 层厚5 mm, 层间距5 mm, 扫描

■ 研发前沿

目前应用体部伽玛刀技术, 采用高分次剂量短疗程的模式治疗不能手术的胰腺癌, 取得了很好的局控率。

■相关报道

夏廷毅教授在国内较早开展了胰腺癌的体部伽马刀治疗,为以后胰腺癌的体部伽马刀治疗及剂量模式的选择奠定了基础。

范围自膈顶至第四腰椎椎体水平,包括肿瘤范围、淋巴引流区和有可能涉及到的区域如:全肝、双侧肾脏、胃、十二指肠和部分肠道,CT图像经网络传输到全身 γ 刀治疗计划系统。由医生在增强CT图像上勾画靶区:肿瘤靶区(gross target volume, GTV)(包括原发肿瘤和转移的淋巴结);临床靶区(clinical target volume, CTV),在GTV基础上外扩5 mm;计划靶区(planning target volume, PTV),在CTV基础上外扩5 mm;勾画危及器官(肝脏、胃、十二指肠、小肠、肾脏、脊髓等)。

计划要求50%剂量线覆盖100%PTV, PTV边缘剂量3-5 Gy/次, 5次/wk, 总剂量45-51 Gy/2-3 wk的高分次剂量治疗模式。危及器官限量: 十二指肠50 Gy<3 cc, 45 Gy<5 cc; 小肠 \leq 45 Gy; 胃50 Gy<5 cc, 45 Gy<10 cc; 脊髓 \leq 30 Gy; 30%肝脏体积受照射剂量 \leq 30 Gy; 30%双侧肾脏体积受照射剂量 \leq 20 Gy, 10%双侧肾脏体积受照射剂量 \leq 50 Gy。对靶区和危及器官用剂量-体积直方图(dose-volume histogram, DVH)评价计划。

1.2.3 疗效及不良反应评价: 在治疗期间,每周记录患者的临床症状改善情况和放射治疗反应: VAS法记录疼痛评分、KPS评分情况,根据美国放射肿瘤治疗协作组(radiation therapy oncology group, RTOG)放射反应分级标准进行分级。评估近期疗效参照世界卫生组织(world health organization)实体瘤通用评价方法完全缓解(complete response)、部分缓解(partial response)、疾病稳定(stable disease)和疾病进展(progressive disease)作为疗效评价标准。

1.2.4 随访: 所有患者在放疗结束后第1、3、6 mo复查,以后每3 mo复查一次,最后随访时间为2012-12,中位随访时间10 mo(4-29 mo),随访率100%。

统计学处理 应用SPSS17.0统计软件包进行统计分析。对计量资料以中位数、mean \pm SD来描述,对计数资料以例数、百分比来描述。对局控率和生存率用Kaplan-Meier法计算,组间生存率比较用Log-rank检验,预后因素采用Cox多因素分析方法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

65例患者按UICC 2002临床分期标准: II期9例, III期56例,其中52例患者肿瘤位于胰头部,13例位于胰体尾部。18例经病理学诊断为腺癌,1例为神经内分泌癌。46例患者根据临床症状、影像学检查及肿瘤标志物检测诊断为胰腺癌。

其中49例行PET/CT检查确诊分期,58例患者CA199超出正常范围之内,全组患者CA199中位数为425.8 U/mL。临床出现腹痛症状56例,21例患者因黄疸就诊,其中行胆肠吻合减黄术5例,经皮肝穿刺胆道引流(percutaneous transhepatic cholangial drainage, PTCD),PTCD加胆道支架置入减黄16例,行剖腹探查无手术指征行胆肠吻合术5例。放疗中3例患者出现黄疸行PTCD加胆道支架置入术。2例患者在放疗后1年后因黄疸行PTCD加胆道支架置入术。49例患者治疗前体重下降超过5 kg。治疗前患有糖尿病者21例,临床资料见表1。

2.1 近期疗效 在放疗结束后1-3 mo全部病例行腹部增强CT检查,部分患者3-6 mo后行PET-CT检查评价疗效(表2)。疼痛缓解率89%(50/56),KPS评分改善率92%(60/65)。

2.2 生存率 全组患者1年总生存率为52.4%,中位生存期13 mo,1年局部无进展生存率为86.1%,1年无远转生存率为37.4%。

2.3 单因素风险分析 单因素风险分析示TNM分期($P=0.033$)、治疗前CA199升高 \geq 425.8 U/mL(中位数水平)($P=0.000$,图1,2)是影响胰腺癌患者预后的危险因素,而性别、年龄、肿瘤部位、疼痛程度、PET-CT分期检查、行减黄手术、放疗前体质量下降程度、合并糖尿病与胰腺癌患者的预后无关(表3)。

2.4 Cox多因素分析 Cox多因素分析表明TNM分期、治疗前CA199的水平是胰腺癌患者能否获得长期生存的独立预后因素,其中TNM分期越早的患者生存期越长,确诊时CA199<425.8 U/mL的患者生存期明显长于CA199 \geq 425.8 U/mL升高的患者(表4)。

2.5 放射治疗的不良反应 急性放射反应: 消化系统反应1级为51%(33/65),2级为18%(12/65),未见3级的反应。血液系统反应骨髓抑制1级为28%(18/65),骨髓抑制2级为8%(5/65)。所有的患者经对症支持治疗后症状基本消失,均能按计划完成放射治疗。晚期放射反应: 2例出现2级胃、十二指肠浅表性溃疡,经内科给予抗炎、抑酸、营养等治疗后好转,未见3级放射反应(表5)。

2.6 死亡因素分析 在死亡的46例患者中,因远处转移和/或多脏器功能衰竭死亡33例,占72%(33/46)。因肿瘤未控或局部复发导致死亡11例,占24%(11/46),其中肿瘤进展致胃、出血死亡占82%(9/11),胆道梗阻死亡占18%(2/11),2例患者死于心脑血管疾病。

表 1 65例患者的临床资料 (n)

分组	n	百分比(%)
性别		
男	36	55
女	29	45
年龄(岁)		
< 60	27	42
≥ 60	38	58
临床分期		
II期	9	14
III期	56	86
肿瘤部位		
头	52	80
体尾部	13	20
CA199(U/mL)		
≥ 425.8	33	51
< 425.8	32	49
疼痛分级		
无痛(0分)	9	14
轻度(1-3分)	19	29
中度(4-6分)	16	25
重度(7-10分)	21	32
PET-CT分期		
是	49	75
否	16	25
胆肠吻合术		
是	10	15
否	55	85
PTCD+胆道支架置入术		
是	19	29
否	46	71
体质量下降		
是	49	75
否	16	25
糖尿病		
是	21	32
否	44	68

表 2 放疗后患者的近期疗效(n)

完全缓解	部分缓解	疾病稳定	疾病进展	客观缓解
23(15/65)	48(31/65)	28(18/65)	2(1/65)	71(46/65)

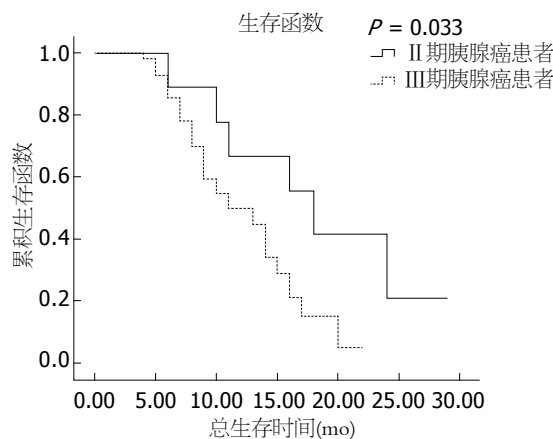


图 1 II期和III期患者的生存曲线分析.

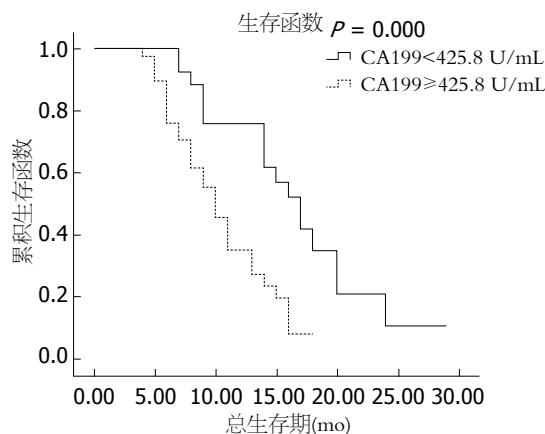


图 2 CA199 ≥ 中位数和 < 中位数的生存曲线分析.

■ 创新盘点

失去了手术机会的局部晚期胰腺癌患者, 传统治疗疗效不佳, 预后差, 生活质量下降, 病死率高. 应用我国自主知识产权的体部伽马刀技术, 采用高剂量短疗程的治疗模式, 达到了与手术切除相媲美的治疗结果, 且不良反应轻微, 生活获益率提高.

3 讨论

胰腺癌因其位置隐匿、早期症状不典型, 不易发现, 待肿瘤压迫胆道出现黄疸、或侵及周围组织出现疼痛症状而就诊时, 肿瘤往往已发展为晚期, 丧失手术治疗时机^[8]. 本组65例患者, 其中56例III期患者因肿瘤侵及大血管(腹腔干或肠系膜上动脉)而无法行手术治疗, 余9例II期患者因高龄、合并内科疾病或存在手术风险的其他疾病, 经外科会诊为手术禁忌, 或患者及家属拒绝行手术治疗. 因胰腺癌对化疗药物不敏感, 且不良反应大, 加之胰腺癌患者多存在上消化系症状, 使用全身化疗后不良反应更加明显, 耐受

差, 所以患者往往不愿意接受全身化疗. 到目前为止, 单一化疗可采用5-FU或吉西他滨等方案, 但效果均不理想^[9,10]. 由于受到周围正常组织的剂量限制(如胃、十二指肠、小肠、脊髓、肾脏、脾脏等), 常规放疗很难达到肿瘤的根治性剂量, 随着精确放疗技术的发展, 在给予肿瘤致死剂量的同时能够很好的保护周围正常组织, 因此对于改善胰腺癌患者预后、提高生存率发挥着极其重要的作用. 随着伽马刀技术的应用^[11,12], 其在聚焦方式、剂量分布、放射生物效应及适形度方面具有4方面优势: 对于胰腺癌的治疗存在着显著优势, 突破了胰腺癌放射治疗的瓶颈. OUR-QGD全身伽马刀有4大优势: (1)通过旋转锥面聚焦方式将30个钴-60放射源经准直器引导

■应用要点

本研究为早期胰腺癌患者提供了手术之外的治疗手段,为不能手术胰腺癌患者提供了放疗联合手术或化疗、靶向治疗、基因治疗的有利证据,并证实了TNM分期、治疗前CA199升高 ≥ 425.8 IU/mL是胰腺癌患者体部伽马刀治疗长期生存的独立预后因素。

表 3 胰腺癌患者预后单因素分析

分组	n	百分比(%)	1年生存率(%)	中位生存时间(mo)	P值
性别					0.497
男	36	55	50.9	14	
女	29	45	54.4	13	
年龄(岁)					0.181
<60	27	42	37.8	11	
≥ 60	38	58	64.3	14	
临床分期					0.033
Ⅱ期	9	14	66.7	18	
Ⅲ期	56	86	50.0	11	
肿瘤部位					0.400
头	52	80	56.0	14	
体尾部	13	20	38.9	10	
CA199(U/mL)					0.000
≥ 425.8	33	51	34.9	10	
<425.8	32	49	75.7	17	
疼痛分级					0.173
无痛(0分)	9	14	77.8	18	
轻度(1-3分)	19	29	57.4	13	
中度(4-6分)	16	25	39.1	9	
重度(7-10分)	21	32	45.0	11	
PET-CT分期					0.295
是	49	75	52.2	13	
否	16	25	53.0	14	
胆肠吻合术					0.890
是	10	15	60.0	14	
否	55	85	53.1	13	
PTCD+胆道支架植入术					0.943
是	19	29	51.0	13	
否	46	71	53.1	13	
体质量下降					0.368
是	49	75	48.5	16	
否	16	25	64.9	11	
糖尿病					0.203
是	21	32	58.1	16	
否	44	68	50.2	13	

向一点聚焦,使焦点处受到持续性的高剂量照射,焦点外受到瞬时低剂量照射;(2)剂量高度集中,肿瘤范围形成高剂量平台,剂量线以同心圆状向中心层层递增,周边剂量下降陡峭,类似于质子线的Bragg峰,有利于靶外正常组织的保护;(3)伽马刀可实施高分次剂量短疗程放疗,缩短总治疗时间,避免肿瘤细胞的加速再增殖及再群体化;(4)适形度方面,可通过不同孔径准直器的组合,实现靶区的全面包裹,肿瘤较小时采用单靶点照射.当肿瘤大,形状不规则时采用多个不同大小准直器的多靶点拟合照射,将准直器进行位置和权重的合理组合,可获得理想的剂

量分布,具有更好的适形度。

本组65例局限期胰腺癌患者应用体部伽马刀技术,采用高分次剂量短疗程的治疗模式,使得肿瘤剂量分布大大提升,同时周围正常组织剂量明显下降.56例患者在治疗初或治疗中具有上腹和/或腰背部疼痛症状,50例在放疗期间疼痛缓解,放疗后疼痛缓解率89%;放疗有效率71%,1年总生存率为52.4%,中位生存期13 mo,1年局部无进展生存率为86.1%;1年无远转生存率为37.4%;高于或等于国内外报道的SBRT治疗胰腺癌的结果^[13-15],也明显优于肖振中等^[16]、党亚正等^[17]的报道,提示体部伽马刀高分次剂量

表 4 胰腺癌患者预后Cox多因素分析

危险因素	B	SE	Wald	df	Sig	Exp(B)
CA199	-1.156	0.349	10.961	1	0.001	0.315
临床分期	-1.019	0.487	4.370	1	0.037	0.361

短疗程模式治疗局限晚期胰腺癌可进一步提高患者生活质量, 改善局控率和生存率。目前临床上TNM分期是公认的判断胰腺癌患者预后的指标之一。本研究进一步验证了TNM分期是胰腺癌患者预后的独立性因素。这一结果与张文仙等^[18]报道的TNM分期是胰腺癌患者预后的独立危险因素的结果一致。从最早Del Villano等^[19]报道的CA199对胰腺癌的诊断意义, 最近大量的研究证实CA199是胰腺癌最敏感和特异的指标肿瘤标志物, 与胰腺癌患者肿瘤的负荷与转移有关^[20-22]。Micke等^[23]报道的95例不能手术切除的局部晚期胰腺癌患者接受同步放化疗, CA199的敏感性为100%, 特异性为88%。治疗前CA199水平低于中位值(420 U/mL)的患者生存期较高于中位值者明显延长。本研究中, 低于CA199水平的中位值(425.8 U/mL)的患者生存期较高于中位值者明显延长(MST 17 mo vs 10 mo, $P=0.000$), 多因素分析进一步证明CA199为胰腺癌独立的预后危险因素, 与文献报道相似^[24,25]。有无阻塞性黄疸多与胰腺癌患者的生存期相关^[26,27], 但在本组临床资料中, 差异无统计学意义, 这可能是由于患者在出现黄疸早期已行胆道支架置入术或外科减黄手术治疗, 肝功能无明显受损, 使患者治疗的耐受性增加。

Schellenberg等^[28]研究的高剂量的SBRT较传统放疗有较好的局控率但是晚期不良反应较重。而本研究放疗副反应轻微, 这可能与合适的放疗剂量模式有关。本研究表明这种高分次剂量短疗程、靶中靶治疗的模式, 不仅能使肿瘤靶区获得高剂量, 且能更好的保护胰腺周围正常组织, 降低了不良反应, 提高了肿瘤局控率, 从而提高了生存率。本研究中死亡的46例患者中, 因远处转移并发多脏器功能衰竭而死亡33例, 占72%, 说明了远处转移是胰腺癌患者死亡的重要死因, 应进一步加强联合化疗、靶向、生物、基因等综合治疗的研究。

总之, 本研究表明采用体部伽玛刀治疗局限期胰腺癌的高分次剂量短疗程模式是安全的, 近期疗效较好, 不良反应轻微, 可缓解疼痛, 提高生活质量。随着离线验证技术、限制呼吸动

表 5 放疗后患者的不良反应(n)

毒性反应(分级)	0	1	2	3	4
急性反应					
消化系反应	20	33	12	0	0
血液学反应	42	18	5	0	0
晚期反应					
胃溃疡	64	0	1	0	0
十二指肠溃疡	63	0	2	0	0
十二指肠纤维化狭窄	0	0	0	0	0

度技术, 更优的分割剂量模式的应用, 胰腺癌的治疗一定会获得更好的疗效。

4 参考文献

- 夏廷毅, 康静波. 体部肿瘤伽玛刀治疗学. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 171-183
- Goldstein D, Carroll S, Apte M, Keogh G. Modern management of pancreatic carcinoma. *Intern Med J* 2004; 34: 475-481 [PMID: 15317546 DOI: 10.1111/j.1444-0903.2004.00658.x]
- Philip PA, Benedetti J, Corless CL, Wong R, O'Reilly EM, Flynn PJ, Rowland KM, Atkins JN, Mirtsching BC, Rivkin SE, Khorana AA, Goldman B, Fenoglio-Preiser CM, Abbruzzese JL, Blanke CD. Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3605-3610 [PMID: 20606093 DOI: 10.1200/JCO.2009.25.7550]
- Cascinu S, Berardi R, Labianca R, Siena S, Falcone A, Aitini E, Barni S, Di Costanzo F, Dapretto E, Tonini G, Pierantoni C, Artale S, Rota S, Floriani I, Scarotazzi M, Zaniboni A. Cetuximab plus gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone in patients with advanced pancreatic cancer: a randomised, multicentre, phase II trial. *Lancet Oncol* 2008; 9: 39-44 [PMID: 18077217 DOI: 10.1016/S1470-2045(07)70383-2]
- Brunner TB. Neoadjuvant therapy for potentially resectable pancreatic cancer: an emerging paradigm? *Curr Oncol Rep* 2013; 15: 162-169 [PMID: 23325567 DOI: 10.1007/s11912-012-0291-3]
- 夏廷毅, 孙庆选, 于湧, 常东妹, 崔纪青. 体部 γ -刀治疗52例胰腺癌的疗效分析. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 86-88
- 常东妹, 夏廷毅, 李平, 孙庆选, 王颖杰, 李宏奇, 范乃斌, 吴伟章. 全身 γ -刀治疗局限期胰腺癌临床结果分析. *中华放射肿瘤学杂志* 2009; 18: 470-473
- 殷蔚伯, 谷铁之. 肿瘤放射治疗学. 第四版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 837-854
- 张翼, 石欣. 胰腺癌化疗进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1422-1426
- Sun C, Ansari D, Andersson R, Wu DQ. Does gemcitabine-based combination therapy improve the prognosis of unresectable pancreatic cancer? *World J Gastroenterol* 2012; 18: 4944-4958 [PMID: 23002368 DOI: 10.3748/wjg.v18.i35.4944]
- 于金明, 于甬华, 尹勇, 王亚彬, 徐敏, 郭守芳. X射线立体定向放射治疗胰头癌13例分析. *中华放射肿瘤学杂志*

同行评价

本文具有一定的创新性与开拓性, 给无法手术切除的局限期胰腺癌提供了新颖的治疗方法, 该方法在疗效上确切, 又最大限度地减少了放疗的不良反应。

- 志 2001; 10: 125
- 12 孙新东, 于金明, 杨新华, 卢洁, 范晓丽. 体部 γ 刀治疗不能手术的胰腺癌28例疗效分析. 实用癌症杂志 2001; 16: 413-414
- 13 Gurka MK, Collins SP, Slack R, Tse G, Charabaty A, Ley L, Berzcel L, Lei S, Suy S, Haddad N, Jha R, Johnson CD, Jackson P, Marshall JL, Pishvaian MJ. Stereotactic body radiation therapy with concurrent full-dose gemcitabine for locally advanced pancreatic cancer: a pilot trial demonstrating safety. *Radiat Oncol* 2013; 8: 44 [PMID: 23452509 DOI: 10.1186/1748-717X-8-44]
- 14 Rwigema JC, Parikh SD, Heron DE, Howell M, Zeh H, Moser AJ, Bahary N, Quinn A, Burton SA. Stereotactic body radiotherapy in the treatment of advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Oncol* 2011; 34: 63-69 [PMID: 20308870 DOI: 10.1097/COC.0b013e3181d270b4]
- 15 刘智慧, 孙大庆. 全身 γ 刀治疗中晚期胰腺癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 2800-2805
- 16 肖振中, 赵瑞芬, 吴铁鹰, 武智刚, 曹婧, 杜辉. 体部 γ -刀立体定向放疗治疗晚期胰腺癌127例疗效观察. 解放军医药杂志 2012; 24: 29-31
- 17 党亚正, 杨洁, 费晋秀, 吴发伟, 雷续虎, 陆婉玲. 超级 γ -刀治疗胰腺癌46例临床结果分析. 现代肿瘤医学 2008; 16: 253-255
- 18 张文仙, 石海, 许建明. 胰腺癌患者临床病例分析与预后156例. 世界华人消化杂志 2011; 19: 3526-3531
- 19 Del Villano BC, Brennan S, Brock P, Bucher C, Liu V, McClure M, Rake B, Space S, Westrick B, Schoemaker H, Zurawski VR. Radioimmunometric assay for a monoclonal antibody-defined tumor marker, CA 19-9. *Clin Chem* 1983; 29: 549-552 [PMID: 6825270]
- 20 汪毅, 赵平, 王成锋, 单毅, 赵东兵, 田艳涛, 孙跃民, 车旭, 张建伟. 综合治疗在预后不良胰腺癌中的价值. 中华医学杂志 2009; 89: 2381-2385
- 21 Berger AC, Meszoely IM, Ross EA, Watson JC, Hoffman JP. Undetectable preoperative levels of serum CA 19-9 correlate with improved survival for patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004; 11: 644-649 [PMID: 15197014 DOI: 10.1245/ASO.2004.11.025]
- 22 Kim JE, Lee KT, Lee JK, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. Clinical usefulness of carbohydrate antigen 19-9 as a screening test for pancreatic cancer in an asymptomatic population. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 182-186 [PMID: 14731128 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03219.x]
- 23 Micke O, Bruns F, Kurowski R, Horst E, deVries AF, Hausler JW, Willich N, Schäfer U. Predictive value of carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic cancer treated with radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 90-97 [PMID: 12909220 DOI: 10.1016/S0360-3016(03)00524-8]
- 24 丁强, 胡先贵. 影响中晚期胰腺癌预后的多因素分析. 现代中西医结合杂志 2010; 19: 1450-1451
- 25 张会钦, 陈爱须, 乔钦增, 赵卫林. 中西医结合治疗对晚期胰腺癌的影响. 山西医药杂志 2011; 40: 109-110
- 26 黄祥忠, 高峰, 沈炜, 任冬青, 韩进. 经皮肝穿胆道引流术及胆道内支架植入术在恶性梗阻性黄疸治疗中的应用. 介入放射学杂志 2009; 18: 930-933
- 27 王小林, 陈颐, 程洁敏, 颜治平, 龚高全, 张峰, 钱昇. 胆道支架置放治疗恶性梗阻性黄疸的预后因素分析. 复旦学报(医学版) 2002; 29: 476-479
- 28 Schellenberg D, Goodman KA, Lee F, Chang S, Kuo T, Ford JM, Fisher GA, Quon A, Dessert TS, Norton J, Greco R, Yang GP, Koong AC. Gemcitabine chemotherapy and single-fraction stereotactic body radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72: 678-686 [PMID: 18395362 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2008.01.051]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



《世界华人消化杂志》投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569)》是一份同行评议和开放获取期刊(*Open Access Journal*, *OAJ*), 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版。《世界华人消化杂志》编辑委员会成员, 由483位专家组成, 分布在30个省市、自治区和特别行政区。

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章。最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平。

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(*Baishideng Publishing Group*, *BPG*)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上。OAJ最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊。论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本。BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑。目前编辑和出版42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平。

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts

Journals》和《Digital Object Identifier》收录。《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号。《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

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, 循证医学, 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

《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期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊。

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig。s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T, V_{max} 不能Vmax, μ 不写为英文u。需排斜体的外文字, 用斜体表示。如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种。如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylaniline(*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_{max} , C_{max} , V_d , $T_{1/2}$, *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应改为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用1 × 10¹²/L, WBC数用1 × 10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L。明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1 × 10⁻³ g与5 × 10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45 × 10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的

相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数 \pm 标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 平均数 \pm 标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$. 统计学显著性用 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$; 第三套为 $^eP < 0.05$, $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L \pm 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6 000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3 614.5 g \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq \text{分母} \leq 1\,000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

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志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

《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: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

《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。

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/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在论述的句末右上

角注码号. 如马连生^[1]报告……, 潘伯荣等^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

4 写作格式实例

4.1 述评写作格式实例

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

4.2 研究原著写作格式实例

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

4.3 焦点论坛写作格式实例

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

4.4 文献综述写作格式实例

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

4.5 研究快报写作格式实例

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

4.6 临床经验写作格式实例

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

4.7 病例报告写作格式实例

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

5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>. 无法在线提交的通过submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>. 审稿过程平均时间需要14-28天. 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.

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, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号

远洋国际中心D座903室

电话: 010-5908-0035

传真: 010-8538-1893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

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

2013年国内国际会议预告

2013-01-24/26

美国临床肿瘤学会胃肠肿瘤(ASCO GI)研讨会

会议地点: 美国旧金山

联系方式: www.gicasym.org

2013-02-10/15

2013年肠道微生物组: 免疫网络效应/法规Keystone Symposia 会议

会议地点: 美国

联系方式: info@keystonesymposia.org

2013-02-09/12

美国肠外与肠道营养学会(A.S.P.E.N.): 2013临床营养周(CNW 2013)

会议地点: 美国亚利桑那州凤凰城

联系方式: <http://www.nutritioncare.org/ClinicalNutritionWeek/index.aspx?id=508>

2013-02-22/23

国立压力性溃疡顾问委员会(NPUAP)全国双年会

会议地点: 美国休斯顿

联系方式: [http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11\[1\]](http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11[1])

2013-02-22/23

迈阿密大学肝胆疾病临床实践会议

会议地点: 美国

联系方式: cme.med.miami.edu/x88.xml

2013-03-01/31

2013年北京第七届疝和腹壁外科国际学术研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: zhshfbwkzz@yahoo.com.cn

2013-03-01/04

2013加拿大消化疾病周(CDDW)

会议地点: 加拿大

联系方式: www.cag-acg.org/cddw

2013-03-07/10

亚太肝脏研究协会(APASL)第23届会议

会议地点: 新加坡

联系方式: www.apaslconference.org

2013-03-15/17

2013年腹腔镜胃肠外科高峰论坛

会议地点: 深圳市

联系方式: ewancool@hotmail.com

2013-03-14/16

中部外科学会(CSA)2013年会

会议地点: 美国佛罗里达州阿米莉亚岛

联系方式: <http://www.centraalsurg.org/meeting/futuremtgs.html>

2013-04-12/14

2013中国肛肠创新论坛(CICS)

会议地点: 北京市

联系方式: www.crdinnovation.com

2013-04-19/23

2013第2届国际肿瘤学论坛

会议地点: 瑞士

联系方式: cihexpo@163.com

2013-05-23/25

2013第六届世界癌症大会

会议地点: 西安市

联系方式: bithuiyi@163.com

2013-05-20/22

2013年第三届内分泌与代谢大会

会议地点: 西安市

联系方式: nancy@bitconferences.cn

2013-05-31/06-04

2013美国临床肿瘤协会年会

会议地点: 美国芝加哥

联系方式: yangxinxue999@163.com

2013-06-07/09

中国国际肿瘤营养与支持治疗研讨会暨第一届全国肿瘤营养与支持治疗学术会议

会议地点: 武汉市

联系方式: csonsc@VIP.163.com

2013-06-21/23

中国消化科学论坛

会议地点: 张家界市

联系方式: casgmail@126.com

2013-07-13/14

中华医学会2013年肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 银川市

联系方式: lilyjia@163.com

2014-09-26/30

第39届欧洲临床肿瘤学会年会

会议地点: 西班牙

联系方式: <http://www.esmo.org/events/madrid-2014-esmo-congress.html>

2013-10-18/20

第二十二届亚太抗癌大会

会议地点: 天津市

联系方式: secretariat@apcc2013.com

志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈国忠 主任医师
广西中医学院第一附属医院消化内科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

程树群 副教授
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

党双锁 教授
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

杜奕奇 副教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院

樊晓明 教授
复旦大学附属金山医院消化科

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

高国全 教授
中山大学中山医学院生物化学教研室

高英堂 研究员
天津市第三中心医院

郝丽萍 副教授
华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

何向辉 教授
天津医科大学总医院普通外科

江建新 副主任医师
贵阳医学院附属医院肝胆外科

李淑德 教授
中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

李苏宜 教授
东南大学附属中大医院肿瘤科

李勇 副教授
上海中医药大学附属市中医医院消化科

刘炳亚 研究员
上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海消化外科研究所

刘绍能 主任医师
中国中医科学院广安门医院消化科

陆伦根 教授
上海交通大学附属第一人民医院消化科

吕凌 副教授
江苏省人民医院肝脏外科

门秀丽 教授
河北联合大学(原华北煤炭医学院)病理生理学教研室

彭亮 副主任医师
中山大学附属第三医院感染科

任粉玉 教授
延边大学附属医院消化内科

邵先玉 教授
泰山医学院附属医院消化内科

汤朝晖 副主任医师
上海交大医学院附属新华医院普外科

唐南洪 教授
福建医科大学附属协和医院肝胆外科研究所

万军 教授
中国人民解放军总医院南楼老年消化科

王阁 教授
中国人民解放军第三军医大学第三附属医院

吴君 主任医师
贵阳医学院附属医院感染科

夏敏 教授
中山大学北校区公共卫生学院

张伟辉 主任医师
哈尔滨医科大学一院微创胆道外科

《中文核心期刊要目总览》收录证书

《中文核心期刊要目总览》入编通知

尊敬的主编先生/女士：

我们谨此郑重通知：依据文献计量学的原理和方法，经研究人员对相关文献的检索、统计和分析，以及学科专家评审，贵刊《世界华人消化杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2011年版（即第六版）之临床医学/特种医学类的核心期刊。该书由北京大学出版社出版。书中按《中国图书馆分类法》的学科体系，列出了73个学科的核心期刊表，并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括：题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN号、CN号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。

评选核心期刊的工作，是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动，研究工作量浩大。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

课题组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究，进一步改进了核心期刊评价方法，使之更趋科学合理，力求使评价结果符合客观实际。对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标，选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种，统计到的文献数量共计221177余万篇次，涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

需要特别指出的是，该研究成果只是一种参考工具书，主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考，例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等，不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂
撰安

《中文核心期刊要目总览》2011年版编委会
代章：





百世登
Baishideng®

Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**

Flat C, 23/F., Lucky Plaza,

315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

