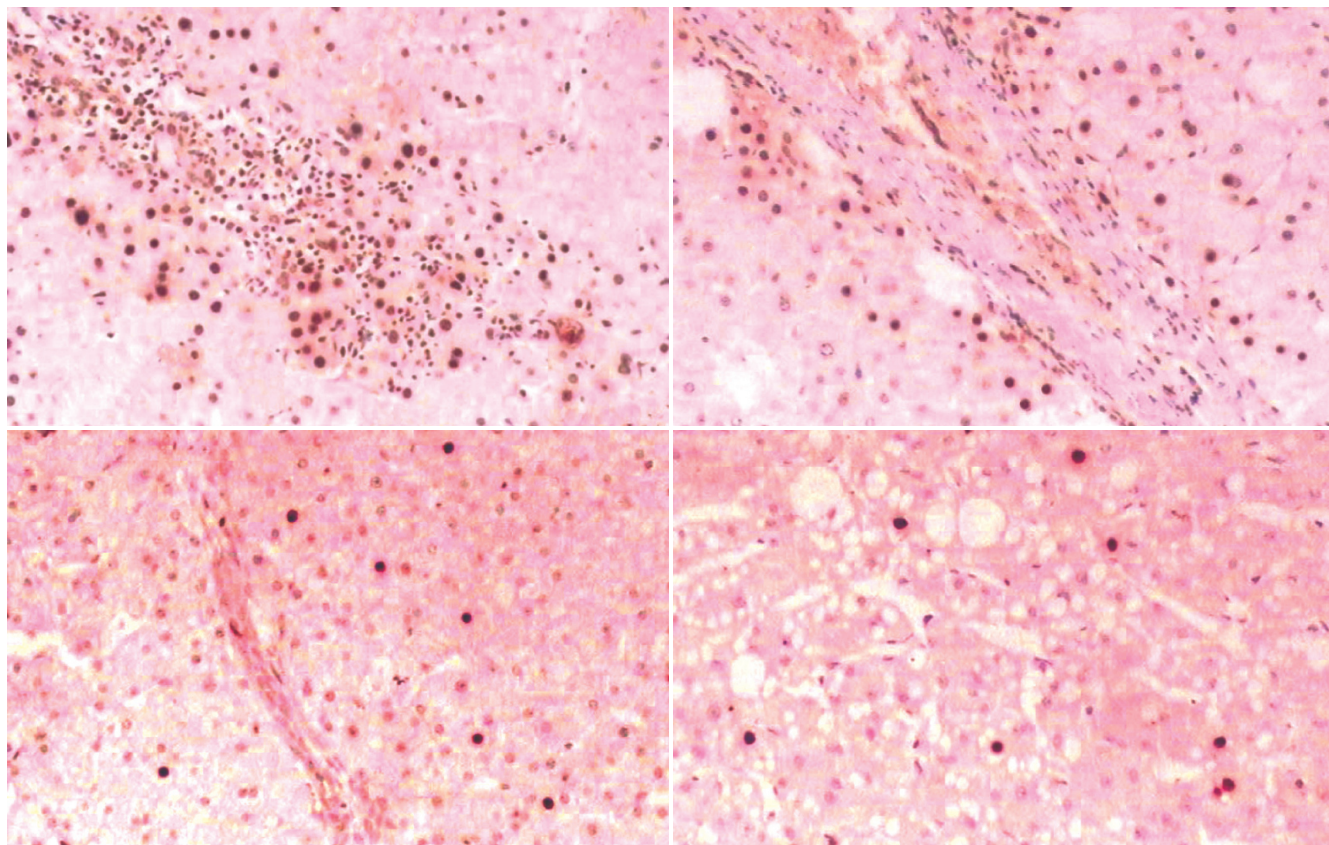


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 11 月 18 日 第 14 卷 第 32 期 (Volume 14 Number 32)



32 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》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》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》，荷兰《医学文摘库/医学文摘》，俄罗斯《文摘杂志》收录。

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授	北京
黄象谦教授	天津
黄志强教授	北京
裘法祖教授	武汉
王宝恩教授	北京
危北海研究员	北京
吴孟超教授	上海
杨春波教授	福州
周殿元教授	广州

名誉总编辑

潘伯荣教授	西安
-------	----

社长/总编辑

马连生教授	北京
-------	----

副总编辑

陈士葆教授	上海
房殿春教授	重庆
姜洪池教授	哈尔滨
王苑本教授	天津
吴云林教授	上海
徐克成教授	广州
杨思凤教授	吉林
姚希贤教授	石家庄
岳茂兴教授	北京
张万岱教授	广州
周学文教授	沈阳

常务编委

程英升副教授	上海
高毅主任医师	广州
江学良主任医师	上海
李岩教授	沈阳
刘连新教授	哈尔滨
吕宾教授	杭州
罗和生教授	武汉
聂青和副教授	西安
王小众教授	福州

编委

白爱平主治医师	广州
别平教授	重庆
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨
蔡淦教授	上海
蔡开琳副教授	武汉
曹洁副教授	上海
曹志成院士	香港
陈海龙教授	大连

陈红松副研究员	北京
陈积圣教授	广州
陈建荣副教授	南通
陈立波副教授	武汉
陈凇教授	北京
陈其奎教授	广州
陈强谱教授	滨州
陈仕珠主任医师	西安
陈卫昌教授	苏州
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
程树群副教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群副研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
巩鹏副教授	大连
谷俊朝主任医师	北京
关玉盘教授	北京
管冬元副教授	上海
郭克建教授	沈阳
郭晓钟教授	沈阳
郭新宁教授	银川
韩天权教授	上海
郝春秋副教授	西安
郝俊鸣副主任医师	北京
何超教授	杭州
何裕隆教授	广州
何振平教授	重庆
洪天配教授	北京

侯晓华教授	武汉
黄恒青主任医师	福州
黄金华副教授	广州
黄晓东副主任医师	武汉
黄颖秋教授	本溪
黄裕新教授	西安
黄志勇副教授	武汉
季国忠副教授	南京
季加孚教授	北京
姜慧卿教授	石家庄
蒋龙元副教授	广州
金瑞教授	北京
匡安仁教授	成都
兰平教授	广州
蓝宇教授	北京
劳绍贤教授	广州
李定国教授	上海
李东辉教授	厦门
李方儒教授	天津
李国威教授	西安
李继强教授	上海
李靖副教授	重庆
李军祥教授	北京
李奇林教授	广州
李胜研究员	济南
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李旭副教授	广州
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李瑗教授	南宁
李玉民教授	兰州
李增山副教授	西安
李兆申教授	上海
李志霞教授	北京
李宗芳教授	西安
梁力建教授	广州
林胜璋副教授	温州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘彬彬副研究员	上海
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘纪教授	重庆
刘铁夫教授	哈尔滨
刘颖斌副教授	杭州
刘占举教授	郑州
刘正稳教授	西安
刘作金副教授	重庆
龙致贤教授	北京

世界华人消化杂志®

编辑委员会

鲁华玉研究员	北京	唐采白副教授	徐州	严律南教授	成都
陆才德教授	宁波	唐芙爱教授	郑州	阎晓初副教授	重庆
陆伦根教授	上海	唐霓副研究员	重庆	杨冬华教授	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨广顺教授	上海
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨建勇教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨林副研究员	广州
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	杨维良教授	哈尔滨
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	杨希山教授	广州
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	杨永生教授	北京
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	姚登福教授	南通
梅林教授	北京	万军教授	北京	姚树坤教授	石家庄
孟庆华教授	北京	汪波副主任医师	北京	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
宁琴教授	武汉	汪思应教授	合肥	阴赓宏研究员	北京
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	于红刚副教授	武汉
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	余宏宇教授	上海
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	于健春教授	北京
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	于颖彦教授	上海
潘秀珍教授	福州	王健生副教授	西安	郁宝铭教授	上海
彭波副教授	西安	王鲁副教授	上海	喻荣彬副教授	南京
彭吉润主任医师	北京	王效民教授	厦门	展玉涛副主任医师	北京
彭曦副研究员	重庆	王晓艳副教授	长沙	张柏和教授	上海
彭心宇教授	石河子	王新月教授	北京	张方信主任医师	兰州
彭志海教授	上海	王学美研究员	北京	张吉翔教授	南昌
秦波教授	重庆	王正康教授	北京	张锦生教授	上海
秦成勇教授	济南	王志刚副主任医师	上海	张军教授	西安
秦环龙教授	上海	王忠裕教授	大连	张青云研究员	北京
钱建民教授	上海	卫洪波教授	广州	张群华教授	上海
秦仁义教授	武汉	魏经国教授	西安	张水军教授	郑州
卿三华教授	广州	魏来教授	北京	张绪清副教授	重庆
邱双健副教授	上海	闻勤生教授	西安	张学教授	北京
邱伟华副主任医师	上海	吴德全教授	哈尔滨	张宗明教授	北京
任超世研究员	天津	吴建国教授	武汉	赵桂珍教授	沈阳
任建安教授	南京	吴君主任医师	贵阳	赵景民教授	北京
任建林教授	厦门	吴萍主任医师	徐州	赵连三教授	成都
邵成浩讲师	上海	吴志勇教授	上海	赵平副教授	上海
邵先玉教授	泰安	席启主任医师	大同	郑民华教授	上海
邵永孚教授	北京	夏建川研究员	广州	郑鹏远教授	郑州
沈洪教授	南京	向德兵讲师	重庆	智发朝教授	广州
沈琳副教授	北京	肖恩华教授	长沙	周伯平教授	深圳
沈薇教授	重庆	谢晓华副教授	广州	周丁华主任医师	北京
施诚仁教授	上海	徐爱民副教授	上海	周国雄主任医师	南通
施瑞华教授	南京	徐迎新研究员	北京	周士胜教授	大连
石统东副教授	重庆	许春舫主任医师	苏州	周霞秋教授	上海
宋世兵主任医师	北京	徐存拴教授	新乡	周晓东研究员	广州
宋振顺教授	西安	徐大华副主任医师	北京	庄林主任医师	昆明
孙诚谊教授	贵阳	徐德忠教授	西安	朱传武副主任医师	苏州
孙殿兴主任医师	石家庄	徐列明教授	上海	朱春兰主任医师	哈尔滨
孙家邦教授	北京	徐小元教授	北京	朱立元教授	深圳
孙秀发教授	武汉	许玲副教授	上海	朱人敏教授	南京
孙学英教授	哈尔滨	许文燮教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
邵升副教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江	左国营副主任药师	昆明
谭学瑞教授	汕头	闫惠平研究员	北京		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 11 月 18 日 第 14 卷 第 32 期 (总第184期)

述 评

3071 丁酸和叶酸预防与治疗肠道疾病及其分子基础 李雄彪, 马庆英, 崔云龙

基 础 研 究

3081 化学合成经修饰抗TIMP-2小干扰RNA对CCl₄诱导肝纤维化动物模型的影响

胡迎宾, 李定国, 李光明, 孙超, 徐芹芳

3088 肿瘤坏死因子- α 增强肝肾综合征时肾脏 I 型1,4,5-三磷酸肌醇受体表达

闻颖, 马力, 刘沛

3093 促结肠动力中药筛选及其机制

衣兰娟, 田琳, 梁宁霞, 魏睦新

3098 实验性急性肝内胆胆汁淤积幼年大鼠胃肠消化间期移行性肌电复合波的变化

胡玉莲, 王晓东, 黄志华

临 床 研 究

3103 胃癌组织中5-脂氧合酶的表达及其与磷酸化Akt的相关性

李勇, 李建英, 王小众, 邹来玉, 陈治新

3107 肝海绵状血管瘤超微结构及其与临床特征的关系

孙晓力, 李国威, 杨少毅, 刘清峰, 王志亮, 李宗芳

3111 慢传输型便秘患者结肠中五羟色胺受体亚型的表达及意义

丁健华, 赵荣华, 傅传刚, 毕丽霞, 孟荣贵, 喻德洪

3116 感染后与非感染后IBS患者结肠黏膜SP与IL-2、IFN- γ 表达的相关性

鞠辉, 张小芳, 刘希双, 魏良洲

文 献 综 述

3121 炎症因子与胰岛素抵抗

张洁, 王方, 许海燕, 孟雁

3126 肝纤维化与TGF- β 及其为靶位点的治疗策略

谭淑萍, 吴晓东

3131 肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎

刘晓臣, 彭燕

研 究 快 报

3136 不同组织微环境中人胃癌异种移植瘤生物学行为及明胶酶的表达差异

李玉莲, 耿敬妹

3139 双歧杆菌在5-氟尿嘧啶作用下的适应性变化

刘俊康, 邓渝, 吴小兰, 魏海龙, 徐启旺

临 床 经 验

3143 东北地区汉族人群DNA修复基因XPD单核苷酸多态性与胃癌的相关性

姜毅, 宋清斌, 何向民

3147 丹参注射液对失代偿期肝硬化患者凝血功能的影响

胡国勇, 胡娟, 严志刚, 丁岩冰, 吴健, 肖炜明, 杨建国

3151 肝硬化患者肝组织中PCNA和Ki-67的表达

权春姬, 金仁顺, 朴东明

附 录	3155 世界华人消化杂志投稿须知
致 谢	3160 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	3080 第五届中国百种杰出学术期刊评选揭晓 3087 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 3097 2007中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知 3125 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》 3135 中国学术期刊综合引证报告(2006) 3142 《世界华人消化杂志》简介 3150 第十九届全国中西医结合消化会议征文通知
封面故事	权春姬, 金仁顺, 朴东明. 肝硬化患者肝组织中PCNA和Ki-67的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3151-3154 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3151.asp
国 际 会 议	New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com

 <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2006-11-18 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张焕兰 王晓瑜 电子编辑 张敏 李琪 本期责任编辑 王晓瑜</p>	<p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</p> <p>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</p>	<p>《世界华人消化杂志》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》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有</p>
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262 国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元 广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

November 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 32

EDITORIAL	<p>3071 Molecular basis of butyric acid and folic acid in prevention and treatment of gastrointestinal diseases <i>Li XB, Ma QY, Cui YL</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>3081 Effects of chemically modified small interfering RNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats <i>Hu YB, Li DG, Li GM, Sun C, Xu QF</i></p> <p>3088 Tumor necrosis factor-α enhances the expression of type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptors <i>Ying Wen, Li Ma, Pei Liu</i></p> <p>3093 Selection of Chinese medicine with procontractile activity on colonic muscle and its mechanism <i>Yi LJ, Tian L, Liang NX, Wei MX</i></p> <p>3098 Changes of gastrointestinal interdigestive migrating myoelectric complex in rat intrahepatic cholestasis induced by alpha-naphthyl-isothiocyanate <i>Hu YL, Wang XD, Huang ZH</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>3103 Expression of 5-lipoxygenase in gastric cancer and its correlation with phosphorylated Akt <i>Li Y, Li JY, Wang XZ, Zou LY, Chen ZX</i></p> <p>3107 Ultramicrostructure of hepatic cavernous hemangioma and its correlation with clinical characteristics <i>Sun XL, Li GW, Yang SY, Liu QF, Wang ZL, Li ZF</i></p> <p>3111 Expression of serotonin receptor subtypes and its significance in the colon of patients with slow transit constipation <i>Ding JH, Zhao RH, Fu CG, Bi LX, Meng RG, Yu DH</i></p> <p>3116 Correlations of substance P with interleukin-2 and interferon-γ expression in colonic mucosa of patients with post- and non-post-infectious irritable bowel syndrome <i>Ju H, Zhang XF, Liu XS, Wei LZ</i></p>
REVIEW	<p>3121 Relationship between inflammatory factors and insulin resistance <i>Zhang J, Wang F, Xu HY, Meng Y</i></p> <p>3126 Role of transforming growth factor-β and its targeted therapeutic strategies in liver fibrosis <i>Tan SP, Wu XD</i></p> <p>3131 Relationship between intestinal barrier dysfunction and severe acute pancreatitis <i>Liu XC, Peng Y</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>3136 Diversified biological behaviors and gelatinase expression of human gastric carcinoma xenografts in different organic micro-environment <i>Li YL, Geng JS</i></p>

	<p>3139 Adaptive changes of bifidobacteria in the presence of 5-fluorouracil <i>Liu JK, Deng Y, Wu XL, Wei HL, Xu QW</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>3143 Association of single nucleotide polymorphism in DNA repair gene XPD with gastric cancer in Han population from northeast region of China <i>Lou Y, Song QB, He XM</i></p> <p>3147 Effects of salvia miltiorrhiza injection on coagulation function of decompensated liver cirrhosis <i>Hu GY, Hu J, Yan ZG, Ding YB, Wu J, Xiao WM, Yang JG</i></p> <p>3151 Expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen in liver tissues of cirrhotic patients <i>Quan CJ, Jin RS, Piao DM</i></p>
APPENDIX	<p>3155 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>3160 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Quan CJ, Jin RS, Piao DM.</i> Expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen in liver tissues of cirrhotic patients. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(32):3151-3154 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3151.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>New York Society for Gastrointestinal Endoscopy 13-16 December 2006 New York www.nysge.org</p> <p>9th World Congress on Gastrointestinal Cancer 20-23 June 2007 Barcelona Imedex meetings@imedex.com</p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date November 18, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

丁酸和叶酸预防与治疗肠道疾病及其分子基础

李雄彪, 马庆英, 崔云龙

李雄彪, 马庆英, 青岛市微生态工程技术研究中心 山东省青岛市 266400

崔云龙, 青岛东海药业有限公司 山东省青岛市 266400

李雄彪, 中美联合培养博士研究生, 北京大学理学博士学位, 教授. 在国内外学术刊物上发表原始研究论文、综述评论、科学普及文章等50余篇.

通讯作者: 李雄彪, 266400, 山东省青岛胶南市上海中路8号, 青岛市微生态工程技术研究中心. xiongbiao@163.com.cn

电话: 0532-87199888 传真: 0532-87199788

收稿日期: 2006-07-20 接受日期: 2006-09-20

摘要

丁酸和叶酸是酪酸梭菌的主要代谢产物. 人体内丁酸的血清半衰期仅仅6 min. 肠道菌群合成的叶酸量是人从食物中摄取的叶酸量1.5倍. 产丁酸和叶酸的肠道菌群足以影响人体丁酸和叶酸的供应、吸收及代谢等生理状态. 酪酸梭菌产生的丁酸能抑制去乙酰化酶活性、产生的叶酸参与甲基化和去甲基化, 二者各自起到了调节宿主的基因表达, 预防和治疗肠炎、肠癌等肠道疾病的作用.

关键词: 丁酸; 叶酸; 肠炎; 肠癌; 基因表达; 去乙酰化酶; 甲基化; 表观遗传

李雄彪, 马庆英, 崔云龙. 丁酸和叶酸预防与治疗肠道疾病及其分子基础. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3071-3080

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3071.asp>

0 引言

联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)在2001年定义: 益生菌是“经适量服用后, 有益于其宿主健康的活的微生物^[1]. 酪酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*, 下简称酪酸梭菌)是1877年就已经开始被人们研究的益生菌^[2]. 属于人类肠道正常菌群^[3]. 日本国千叶医学院的Miyairi博士1933年分离到酪酸梭菌, 1940年实现其商业化生产. 此后, 酪酸梭菌先后被作为人用处方药、非处方药、兽药、饲料添加剂、食品添加剂等广泛应用. 酪酸梭菌的主要代谢产物有丁酸、叶酸和多种维生素等^[4]. 本文对丁酸和叶酸预防与治疗肠道疾病及其分子基础作一综述.

1 丁酸和叶酸的吸收与代谢

1.1 丁酸的吸收和代谢 短链脂肪酸(SCFA)一般是食物纤维或聚糖在结肠中经厌氧菌发酵后产生的^[5-6], 其速率 $>100 \text{ mmol/d}$ ^[7-8]. 与甲酸、乙酸、丙酸比较, 丁酸在SCFA中所占比例较高. 结肠内SCFA的浓度因人们食物不同而有差别, 因肠道微生态菌群不同而有变化. 近端结肠内SCFA浓度高达70-140 mmol/L, 而远端结肠内下降到20-70 mmol/L. 结肠上皮细胞优先吸收利用丁酸^[9-10]. 肝门循环中, 丁酸浓度较高^[11], 汗液和粪便中也含有微量丁酸^[6,12]. 一般食物中都不含丁酸, 但牛奶是人类的丁酸来源之一. 反刍动物是唯一的其奶中含有较多丁酸的动物. 全牛奶中含有的乳脂不到4%^[13-15]. 100 mol牛乳脂中含有7.5-13.0 mol丁酸^[15]. 人乳中的乳脂含量和牛、羊的近似, 但丁酸含量仅为乳脂的0.4%^[16], 比牛乳脂中的丁酸含量(3.1%)和羊的(2.6%)低得多^[17]. 用小猪体内研究表明, 丁酸只在结肠中合成, 其他内脏组织基本不合成丁酸. 核素示踪法^[18]研究SCFA吸收的结果表明, 人结肠中, SCFA的吸收和代谢能力很强, 其中尤以丁酸为快. 正是由于其代谢速度很快, 所以人体内丁酸的血清半衰期仅仅6 min^[19-20].

1.2 叶酸的吸收和代谢 叶酸是B族维生素之一, 由蝶啶对氨基苯甲酸和1个或多个谷氨酸结合而成. 人和其他哺乳动物都只能通过肠道吸收外源的叶酸而不能自身合成叶酸. 因此, 肠道在调节和控制叶酸的吸收与代谢、维持人体内叶酸的动态平衡方面起着决定性的作用^[21]. 人体内叶酸供应不足是全世界都很常见的现象, 而肠道内叶酸吸收过程发生障碍往往是其主要原因. 志愿者口服生理剂量的¹⁴C标记叶酸后, 10 min内就有被标记叶酸在血浆中出现^[22], 2 h内达到峰值. 口服剂量的90%被吸收. 42 d后, 口服剂量的75%以上的叶酸仍然保持在体内. 2004年Lin *et al*^[23]发现, 叶酸表观吸收系数为0.65到0.97, 均值0.79. 从食物中吸收的叶酸量为248-1762 nmol/d, 均值826 nmol/d. 在口服后4.2 min内受试者血浆中出现¹⁴C叶酸. 血浆中标

■背景资料

酪酸梭菌是一种越来越受到重视的益生菌. 其重要代谢产物丁酸和叶酸对于预防和治疗肠道疾病, 特别是肠癌, 显示出好的效果. 随着中国经济的持续发展和生活水平的逐步提高, 肠癌发生率呈日益升高的趋势. 因此, 充分利用益生菌预防和治疗肠道疾病具有重要的现实意义.

■研发前沿

丁酸如何通过抑制组蛋白去乙酰化酶的活性而实现其对基因表达的调控是目前的研究热点之一。结合病理学、药理学研究,在分子生物学水平阐明丁酸的作用机制必将推动微生态新药的研究和开发。

记叶酸的峰值在口服后2 h出现并随后开始下降。红细胞中出现 ^{14}C 标记是在口服标记叶酸后的第6天,第20天达到峰值,第80天后进入平台期,随后由于血液循环中红细胞的老化而不断下降。对于慢性腹泻或吸收不良的患者,胆汁中的叶酸分泌很可能导致叶酸缺乏。一天内胆汁可以给胃肠道供应227 nmol叶酸^[24]。2004年, kim *et al*发现^[25],婴儿固体排泄物中的叶酸占日摄取叶酸总量的63%。配方奶粉喂养婴儿(简称奶粉儿)的粪便中,叶酸的平均含量是完全母乳喂养婴儿(简称母乳儿)的2倍。这种差异的原因很可能是结肠中的肠道菌群不同,特别是合成叶酸的肠道菌和消耗叶酸的肠道菌的相对比例不同。母乳儿的粪便叶酸为 47.1 ± 36.9 nmol/d,其中有13.7-22.8 nmol来源于母乳,有24.3-33.4 nmol/d来源于肠道菌;而奶粉儿的粪便叶酸为 148.5 ± 109.3 nmol/d,其中有47.9-79.9 nmol来源于奶粉,有68.6-100.6 nmol/d来源于肠道菌。无论母乳儿或奶粉儿,其肠道菌群合成的叶酸量都大大超过从食物中摄取的叶酸量,前者大约是后者的1.5倍。由此可见,产叶酸的肠道菌群合成叶酸的总量足以影响人体叶酸供应、吸收和代谢等生理状态。叶酸对于组成核酸的嘌呤和嘧啶的生物合成以及包括高半胱氨酸在内的几种氨基酸的代谢都是必需的。叶酸作为酶代谢中最活跃的辅酶之一,参与蛋氨酸的代谢循环。叶酸还参与肾上腺素、胆碱、肌酸等有机物质的合成。叶酸在叶酸还原酶、二氢叶酸还原酶和其他酶的作用下,最终形成甲基四氢叶酸。甲基四氢叶酸为一碳单位的载体,参与组成DNA和RNA的嘌呤、嘧啶等重要物质的生物合成^[26]。在一碳代谢中,叶酸的作用至关重要。正常情况下,来自丝氨酸或甘氨酸的一碳单位被转移到四氢叶酸,形成5, 10-亚甲基四氢叶酸^[27]。5, 10-亚甲基四氢叶酸既可以被用于胸腺嘧啶脱氧核苷的生物合成,也可以氧化为甲酰四氢叶酸后用于嘌呤的生物合成,或者还原为5-甲基四氢叶酸后用于蛋氨酸的生物合成^[28]。在依赖于ATP的腺苷转移酶的作用下,将腺苷转移到蛋氨酸,形成S-腺苷蛋氨酸(SAM)。SAM极其重要,具有不稳定的甲基,可以为生物体内近100种甲基化反应提供其甲基。这些反应中就包括DNA、RNA和蛋白质的甲基化^[29]。

2 丁酸和叶酸预防与治疗肠道疾病

2.1 丁酸与肠道黏膜和肠炎 大量动物实验和人体临床研究表明,丁酸在修复肠黏膜和治疗肠

炎时发挥重要作用。经葡聚糖硫酸钠(DSS)处理后,急性结肠炎小鼠结肠内丁酸吸收减少,导致黏膜的完整性受到破坏^[30]。DSS诱发结肠炎的早期,黏膜通透性就开始增加,并伴随细胞存活率的下降和组织学的变化。而丁酸能够逆转黏膜通透性的增加^[31]。丁酸、乙酸等SCFA促进小鼠空肠^[32]和回肠^[33]的上皮细胞增殖。用SCFA滴注法^[34]证实了丁酸修复肠道黏膜的作用。大鼠模型也进一步证实,丁酸的确能减轻实验性肠炎对黏膜的损伤^[4]。灌肠实验表明,丁酸对功能失调和萎缩的大鼠黏膜表面有保护作用^[35]。如果肠上皮细胞发生丁酸饥饿,就可能引发溃疡性结肠炎或者其他炎症^[36]。丁酸和5-氨基水杨协同作用减少炎症因子转谷氨酰胺酶和血栓素的合成^[37]。大鼠结肠炎增加癌变的发生^[38],而丁酸具有很强的防止癌变的作用。随机双盲双模拟对照实验^[39]和临床研究^[40]表明,产丁酸的酪酸梭菌治疗急性慢性腹泻效果很好。丁酸对远端结肠炎患者有治疗作用^[41]。丁酸显著增加黏蛋白的合成^[42],从而对治疗效果产生很好的影响。溃疡性结肠炎患者的还原性细菌产生硫化物诱导黏膜的上部隐窝过度增殖,而丁酸能逆转这种硫化物诱导的致病性作用^[43]。丁酸灌肠也被用于有效的治疗顽固性溃疡性结肠炎^[44]和直肠乙状结肠炎^[45]。膳食纤维作为肠道菌的发酵底物,在促进肠道菌生长的同时,产生大量的SCFA,尤其是大量的丁酸。丁酸对防止肠炎和癌变有显著作用^[46]。抗性淀粉有利于治疗肠炎,其原因就是来源于抗性淀粉发酵的丁酸能恢复肠黏膜的完整性^[47]。因此,丁酸被认为是结肠黏膜的生长诱导剂和炎症抑制剂^[116]。土著东非人和相同环境下生活的欧洲人相比,罹患肠癌、心脏病等非感染性疾病的比例要低很多,其原因是土著东非人的膳食中,高含量膳食纤维有利于丁酸产生^[48]。2005年Ohkawara *et al*^[49]用1, 2-二甲肼(1, 2-dimethylhydrazine)诱发小鼠癌前病变,产生变性隐窝,再饲喂产丁酸的丁酸菌。结果发现,变性隐窝数和含3或4个变性隐窝的病灶数都减少了。说明产丁酸菌抑制了这种癌前病变。有趣的是这种菌被匀浆后就不起作用,提示了对于抑制癌前病变,完整的活细菌是必须的。我国吴恺 *et al*^[50]和程勇前 *et al*^[51]研究表明,酪酸梭菌能调节肠道菌群平衡,具有重新建立平衡的微生态环境的功能。

2.2 丁酸与肠癌 大约2千年前就有人猜测炎症是癌症发生的原因^[52]。19世纪, Rudolf Virchow证实

了肿瘤在慢性炎症部位发生^[53]。在肿瘤内或其周围微环境中, 某些细胞分泌促炎症因子TNF α , IL-1, IL-6, 和 IL-8等, 还分泌基质降解酶, 生长因子和活性氧。这些因子和活性氧导致DNA的损伤^[54], 最终导致癌症发生。酪酸梭菌产生大量丁酸, 在防治肠道疾病、特别是防治结肠直肠癌^[55-56]和调节基因表达等方面发挥十分重要的作用^[57]。在体外实验或人体研究中, 丁酸都能抑制多种癌细胞的增殖, 因此被认为是一种抗癌剂^[16]。丁酸的防癌作用主要集中于结肠癌^[58]。丁酸对于结肠上皮细胞保持正常的形态和完整的功能十分重要。丁酸的缺乏是结肠炎的主要原因^[59], 也可能导致结肠癌和自发性溃疡性结肠炎。在丁酸作用下, 结肠蛋白质合成增加, 从而促进肠上皮细胞愈合^[60]。丁酸在肠道中是一种保护剂, 降低肠癌发病风险^[61]。丁酸还能诱导细胞凋亡, 并能抑制肠癌发生^[62-63]。用丁酸治疗实体瘤的动物实验^[64]和临床研究^[65-66]几年前就已开始并逐步取得了进展^[67]。丁酸抑制癌细胞的增生^[68], 也能抑制表皮生长因子诱导的细胞增生, 并通过下调环氧合酶(cyclooxygenase)抑制人肠微血管内皮细胞的血管发生, 从而抑制癌的生长^[69]。丁酸钠能够抑制乳腺癌^[70], 在治疗恶性胶质瘤中也发挥作用^[71]。Clarke *et al*^[72]和Iacomino *et al*^[73]利用结肠癌模型发现, 丁酸的同型物三丁酸甘油酯(tributylin)通过活化细胞凋亡蛋白酶(caspase-3)而诱导癌细胞的凋亡。也有研究表明, 三丁酸甘油酯对人的肿瘤有治疗作用^[74-75]。丁酸抑制结肠癌细胞的生长^[76], 还能抑制人体侵袭性结肠癌细胞^[77]。联合应用丁酸和IL-2甚至能使晚期结肠癌发生逆转^[78]。

2.3 叶酸与肠道疾病 缺乏叶酸可能增加罹患结肠直肠癌、肺癌、胰腺癌、食道癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌以及成神经细胞瘤和白血球过多症的风险^[79]。大量的流行病学和临床研究提示, 从食物中吸收叶酸的量, 血液中叶酸的浓度都与结肠直肠癌发生的风险成反相关^[80-84], 叶酸缺乏引起肿瘤发生前的DNA低甲基化^[85]。食物叶酸浓度很低时, 人的淋巴细胞也发生DNA低甲基化现象。如果补充叶酸, 则DNA低甲基化现象被逆转^[86]。Freudenheim *et al*^[87]于1991年首先提出叶酸能减少癌症发生的风险。随后有研究表明, 叶酸缺乏增加了癌症发生的风险^[79]。对428例结肠癌和372例直肠癌进行的病例对照研究表明, 叶酸缺乏与癌症发生有密切关系^[87]。食物叶酸含量低时增加乳腺癌、胰腺癌和结肠癌发

生的风险^[88]。对121 000例55-69岁的受试者进行的15 a内长期补充叶酸的研究表明, 叶酸能够减少结肠癌的发生^[89]。溃疡性结肠炎、结肠癌与基因甲基化密切相关^[90], 溃疡性结肠炎和结肠癌患者有4个基因比没有肠炎和结肠癌的受试者(对照)的甲基化程度要高得多。溃疡性肠炎患者容易罹患结肠癌, 而叶酸供应不当可能是发生结肠癌的重要原因。Biasco *et al*^[91]给24个溃疡性结肠炎患者服用叶酸(15 mg/d) 或安慰剂, 结果发现, 叶酸有利于直肠细胞增殖, 而安慰剂没有作用。刘丽华 *et al*^[92]用叶酸干预性治疗萎缩性胃炎, 结果发现, 叶酸治疗组临床症状缓解快而持久, 患者血浆叶酸水平升高, 病理改变逆转, 有效率达61.6%。

3 丁酸和叶酸防治疾病的分子基础

3.1 丁酸调节基因表达 丁酸在分子和细胞水平上的作用机制得到了广泛的研究^[8,93-95]。在结肠中, 丁酸能够穿过结肠细胞的细胞质膜和细胞核膜, 再与其受体结合, 从而影响基因的转录, 最终导致结肠细胞的生理状态发生变化。丁酸调节基因的转录, 下调25种基因、上调88种基因的表达^[96]。在结肠癌细胞HT29中, 丁酸下调*c-myc*的表达, 抑制DNA合成^[97]。在11种分化诱导剂中, 只有丁酸能够增加人结肠癌细胞中的半乳糖凝集素-1的表达^[98]。这种结合半乳糖苷的凝集素与癌细胞的分化相关, 并且参与了细胞黏附。去氧胆酸是结肠癌的诱发因子。丁酸能抑制结肠中去氧胆酸诱导的细胞增殖^[99-100]。在肠道黏膜上覆盖着黏液层, 其主要成分是高分子量的黏蛋白。他们构成了肠腔内抵御有害微生物入侵的第一道防线。在基因转录水平, 丁酸上调黏蛋白基因的表达^[101]。丁酸盐增加酪氨酸羟化酶和前脑啡肽mRNA的转录水平^[102]。丁酸钠引起Burkitt's淋巴瘤的*c-myc*原癌基因永久性下调^[103-104]。丁酸钠也调控原癌基因*c-jun*的表达^[105]。

3.2 丁酸是组蛋白去乙酰化酶抑制剂 丁酸通过抑制组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)的活性而实现对基因表达的调控。通过这种抑制使转录作用受到调节的基因有很多种。例如: 钙结合蛋白(calbindin), 细胞周期调节蛋白, 也称周期素(cyclin), 周期素依赖性蛋白激酶的抑制剂P21等等。因为去乙酰化酶不仅在组蛋白的乙酰化中发挥作用, 而且对非组蛋白, 包括多个转录因子和高移动性的一些蛋白质的乙酰化也发挥作用。因此, 这就造成了

■相关报道

程留芳 *et al*用随机双盲双模拟对照方法, 在临床研究中表明, 酪酸梭菌对急性慢性腹泻的治疗有很好的效果。丁酸通过抑制组蛋白去乙酰化酶的活性而实现对基因表达的调控、叶酸影响基因表达等基础研究则初步说明了这种临床效果的分子基础。宏观和微观研究的深入将全面阐明酪酸梭菌的作用机制。

■创新盘点

针对肠道疾病,特别是急性腹泻和肠炎,常用的治疗药物是抗生素。滥用抗生素导致严重的问题已经被医药和科技界甚至一般公众所认识。因此,有人用中草药治疗或调理肠道疾病,然而其效果不能令人满意。对于肠癌等重大肠道疾病,人们只能依赖外科手术。利用益生菌调节肠道菌群的平衡,既可以避免其他治疗手段的诸多弊端,又可以安全有效的预防和治疗肠道疾病,是正在被日益重视的一种新趋势。

基因表达既有上调也有下调的现象^[106]。丁酸调节基因表达,可能发生在翻译水平,但更多的是在转录水平。而转录水平的调节主要在于丁酸抑制去乙酰化酶的活性^[95,107-108]。组蛋白的超乙酰化(hyperacetylation),特别是H3和H4的超乙酰化,往往与RNA转录本的积累和蛋白质的从头合成密切相关^[109-110]。用丁酸处理Hela细胞的研究表明,在转录因子结合到他们位于核小体内的识别部位这一过程中,组蛋白H4有重要作用^[111]。HDAC决定了染色质的乙酰化和去乙酰化状态^[112],保持着二者之间的平衡,最终调节基因的表达。由于HDAC的抑制剂能够通过调节转录过程而恢复被沉没了的基因的功能,所以关于HDAC抑制剂的研究极其重要。酪酸梭菌产生的丁酸就正是这样一种HDAC抑制剂。丁酸在人结肠中的浓度为2-12 mmol/L,具有生理作用^[5],是组蛋白去乙酰化酶抑制剂^[113-114]。用5 mmol/L丁酸处理HeLa细胞时,被乙酰化的组蛋白H4的含量是对照的3倍^[115],说明丁酸抑制了组蛋白去乙酰化酶的活性。组蛋白乙酰转移酶(HAT)和HDAC参与了细胞的很多生理过程,例如DNA复制、基因转录、基因沉默、细胞周期、细胞分化、和遗传毒性反应以及癌瘤的发生等等^[116]。因为丁酸是HDAC的抑制剂,因此对这些过程也产生影响。所以在临床上丁酸被作为一种安全的抗癌剂进行深入的研究。染色质上发生组蛋白去乙酰化的位置可能是其区域划分的位置^[117]。染色质的组蛋白发生乙酰化和去乙酰化,二者的平衡调节着基因的表达。HDAC决定了二者之间的平衡,因此,实际上HDAC在调节基因表达方面起着关键作用^[112]。例如,丁酸促进某些基因的超乙酰化,从而增加了这些基因的转录^[118]。

3.3 叶酸和DNA甲基化 DNA甲基化是DNA上胞嘧啶第5位碳原子和甲基间的共价结合,胞嘧啶由此被修饰为5甲基胞嘧啶(5-mC)。哺乳动物基因组DNA中5-mC约占胞嘧啶总量的2%-7%,绝大多数5-mC存在于CpG二联核苷(CpG doublets)中。结构基因5'端附近富含CpG二联核苷的区域称为CpG岛。基因调控元件(如启动子)所含CpG岛中的5-mC会阻碍转录因子复合体与DNA的结合,所以DNA甲基化一般与基因沉默相关联,非甲基化一般与基因的活化相关联,去甲基化则往往与一个沉默基因的重新激活相关联。

由于发生甲基化而使基因失活似乎是癌变的极早期事件,例如在结肠癌的癌前病变组织

中就发现过特定基因的甲基化,并观察到甲基化程度和整个病程演进过程中的相关性。肿瘤形成中表观遗传修饰的病理作用为我们提供了一种不涉及DNA序列改变的病因研究途径,也为我们提供了一种肿瘤治疗新手段。对于医师和药物研发企业来讲,他比基因治疗具有更大的吸引力。20多年前就已经发现,在癌细胞中存在DNA甲基化异常的现象^[119]。在人类癌细胞中,基因启动子区的超甲基化与基因的转录沉默有关。这种现象像DNA突变一样普遍,是一种使抑癌基因失活的机制^[120-121]。有一些候补的抑癌基因在通常情况下不能被突变作用所失活,但是却可以通过启动子区的超甲基化机制实现转录沉默^[120]。如果那些抑制肿瘤发生的基因被异常地甲基化,就会导致恶性肿瘤的发生^[122-123]。DNA甲基化是基因转录的一种非常重要的调节方式^[26]。在维持细胞正常的生理功能方面,DNA甲基化的作用至关重要。一旦DNA甲基化的方式发生异常,就很可能引起癌症的发生。5-甲基四氢叶酸(MTF)、二氢叶酸(DF)和四氢叶酸(TF)都是叶酸代谢中间产物。用叶酸(FA)或者上述叶酸代谢中间产物中的一种(10 mg/L)预先处理结肠癌HCT-116细胞株48 h,再将这些结肠癌细胞在存在或不存在100 mL/L胎牛血清的情况下,加入FA或者DF, TF, 5-MTF中的一种,继续培养48 h。结果表明,由于叶酸及其代谢中间产物5-MTF增强了甲基化作用,所以显著抑制了结肠癌细胞的表皮生长因子受体启动子的活性^[124]。因而,在结肠直肠癌发生发展过程中,叶酸实际上发挥了抑制癌瘤生长的作用。

3.4 叶酸和亚甲基四氢叶酸还原酶 亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)是甲基代谢过程的重要分枝点^[26],他决定了叶酸库中的叶酸是用于从高半胱氨酸合成蛋氨酸还是用于胸苷酸或其他分子的合成。MTHFR基因存在单核苷酸多型性(677C→T)。这个基因的单核苷酸多型性既与丙氨酸-缬氨酸取代有关,也与这种还原酶的活性有关^[125]。基因型为MTHFR677TT的个体,其细胞内主要积累5, 10-亚甲基四氢叶酸。而基因型为MTHFR677CC或者MTHFR677CT的个体,其细胞内以5-甲基四氢叶酸占优势^[126]。5, 10-亚甲基缺乏时,一磷酸脱氧尿苷不能足量的形成一磷酸脱氧胸苷,导致DNA聚合酶错误地将尿苷作为胸苷合成到DNA中。因此,如果有丰富的叶酸营养,因而能够增加5, 10-亚甲基四氢叶酸,则MTHFR 677TT基因型可能是有益的。然而,当

叶酸缺乏时, MTHFR677TT基因型就可能是有害的^[127]。正是由于叶酸缺乏能够引起DNA合成中发生错误, 还能影响DNA的甲基化, 所以, 叶酸与癌症的发生、发展以及预防和治疗有密切的联系。在4项关于MTHFR677C→T多型性与结肠癌的关系的研究^[128-131]中, 结果都表明, MTHFR677TT基因型个体在低风险食物(即叶酸含量高而乙醇含量低)情况下, 癌瘤发生的风险小。与此相反, 如果食物中叶酸含量低而乙醇含量高, MTHFR677TT基因型个体癌瘤发生的风险就高于其他基因型。

3.5 叶酸和基因表达 大鼠结肠中P53的表达因为叶酸缺乏而减少, 但当补充叶酸时, 其表达又超过了基线水平^[132]。P53转录的稳态水平与叶酸的供应呈正相关性。人鼻咽拟表皮癌细胞中, 叶酸缺乏导致5种基因表达被上调, 3种基因表达被下调^[133]。尽管叶酸缺乏时造成总体DNA低甲基化, 但是在5'CpG岛则被超甲基化, 并且导致H-钙黏蛋白基因表达的下调。年轻大鼠缺乏叶酸时, 84种基因表达被下调, 52种基因表达被上调; 而老年大鼠缺乏叶酸时, 21种基因表达被下调, 41种基因表达被上调^[134]。由此可见, 年轻的成鼠对于叶酸缺乏似乎有更强烈和宽广的反应。叶酸供应不足的情况下, 老化诱导几种免疫相关基因表达的下调作用。如果给叶酸供应不足的大鼠补充叶酸, 则P53和胰岛素样生长因子结合蛋白-3的基因表达就不再发生下调作用。由此可见, 充足的叶酸供应阻止了老化过程中某些关键基因的有害变化, 从而减少了与老化相关的癌症的发生风险。生物合成过程中的甲基化反应和核苷酸的生物合成之间存在着一种平衡, 如果这种平衡被打破就导致叶酸相关的癌变发生^[29]。例如, 5, 10-亚甲基缺乏时, 一磷酸脱氧尿苷不能充分足量的形成一磷酸脱氧胸苷, 导致DNA聚合酶错误的将尿苷作为胸苷合成到DNA中^[135]。在叶酸缺乏症患者的白血细胞DNA中, 每个细胞含约4 000 000个尿嘧啶分子。在患者补充叶酸后, 这个数字下降到200 000^[136]。补充叶酸还降低了染色体断裂的频率。这种错误地将尿苷合成到DNA中的现象会导致基因组异常, 例如增加自发突变^[137], 对破坏DNA的试剂更加敏感^[138]、染色体畸变率更高^[139-140]、DNA复制中的错误频率也会更高^[140-142]。用动物模型的研究表明, 缺乏叶酸的饲料饲喂大鼠后导致其基因组DNA的断裂, 引起P53基因的破坏^[143], 还诱导肠道细胞中P53肿瘤抑制基因的突变^[144]。

人的肠道内有 10^{13} 到 10^{14} 个微生物。他们的基因组所包括的基因数至少是人基因组所包括的基因数的100倍^[145]。他们极大的增强了多聚糖、氨基酸、外源性化学物质的代谢, 促进了甲烷生成, 有利于维生素和类异戊二烯的生物合成。而这些代谢产物中有很多被人体直接利用。实际上, 人体内发生的是人体代谢和微生物代谢交织在一起的混合代谢。因此, 整体的“人”实际上是一种“超级生物”(superorganism)。或者, 我们也可以把肠道微生物看作人体的“特殊器官”。深入细致的研究肠道微生物这一“特殊器官”, 不仅会推动人体生理、生化代谢、分子遗传、尤其是表观遗传等方面的基础研究, 而且必将在疾病预防、诊断和治疗以及新药开发方面获得令人满意的进展。人体内丁酸的血清半衰期极短, 而且60%-70%的丁酸被用于能量代谢。所以, 直接口服丁酸防治肠道疾病显然不是合适的方法, 而利用在肠道中产生丁酸的益生菌是日益受到重视的选择。肠道菌群合成的叶酸量大大超过了从食物中摄取的叶酸量。产叶酸的肠道菌群足以影响人体叶酸供应、吸收和代谢等生理状态。酪酸梭菌产生大量的丁酸和叶酸, 在调节肠道菌群平衡, 调控基因表达, 阻止肠恶变方面发挥了其他益生菌和药物不可替代的重要作用。

4 参考文献

- 1 FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 2001. Available from: URL: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf
- 2 Prazmowska: Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. Inaugural Dissertation. Hugo Voigt, Leipzig, 1880, pp: 1-58
- 3 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Fifty-second meeting Rome, 2-11 February 1999 Summary And Conclusions Available from: URL: http://www.who.int/pes/jecfa/summary_52.pdf
- 4 Araki Y, Andoh A, Takizawa J, Takizawa W, Fujiyama Y. Clostridium butyricum, a probiotic derivative, suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats. *Int J Mol Med* 2004; 13: 577-580
- 5 Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001; 81: 1031-1064
- 6 McIntosh GH, Le Leu RK, Royle PJ, Young GP. A comparative study of the influence of differing barley brans on DMH-induced intestinal tumours

■应用要点

人类正常膳食中的丁酸含量极微, 而丁酸在人体内的血清半衰期又仅仅只有6 min, 所以, 利用能在人肠道中产生丁酸的酪酸梭菌补充防治肠道疾病所需的丁酸, 是安全有效的一种选择。

同行评价

本文综述的内容很有参考价值, 立意较新, 基本都是新的研究成果, 资料详实可靠。

- in male Sprague-Dawley rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 113-119
- 27 Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987; 28: 1221-1227
- 8 Newmark HL, Lupton JR, Young CW. Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett* 1994; 78: 1-5
- 9 Roediger WE. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 1982; 83: 424-429
- 10 Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A, Besnard P. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem* 1996; 238: 368-373
- 11 SMYTH HF Jr, CARPENTER CP, WEIL CS, POZ-ZANI UC. Range-finding toxicity data: list V. *A M A Arch Ind Hyg Occup Med* 1954; 10: 61-68
- 12 Gamet L, Daviaud D, Denis-Pouxviel C, Remesy C, Murat JC. Effects of short-chain fatty acids on growth and differentiation of the human colon-cancer cell line HT29. *Int J Cancer* 1992; 52: 286-289
- 13 Catherine Stanton, R.P. Ross, J.J. Murphy, G.F. Fitzgerald R. Devery Available from: URL: <http://www.teagasc.ie/publications/2003/conferences/liquidmilk/paper03.htm>
- 14 University of Guelph (Canada) Dairy Chemistry and Physics Available from: URL: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/chem.html#overview>
- 15 Parodi PW. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J Dairy Sci* 1999; 82: 1339-1349
- 16 German JB, Dillard CJ. Saturated fats: what dietary intake? *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 550-559
- 17 Maree H.P. Goat Milk and Its Use as a Hypo-Allergenic Infant Food Available from: URL: http://goatconnection.com/articles/publish/article_152.shtml
- 18 Hoverstad T, Bohmer T, Fausa O. Absorption of short-chain fatty acids from the human colon measured by the $^{14}\text{CO}_2$ breath test. *Scand J Gastroenterol* 1982; 17: 373-378
- 19 Sumner CJ, Huynh TN, Markowitz JA, Perhac JS, Hill B, Coover DD, Schussler K, Chen X, Jarecki J, Burghes AH, Taylor JP, Fischbeck KH. Valproic acid increases SMN levels in spinal muscular atrophy patient cells. *Ann Neurol* 2003; 54: 647-54
- 20 Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehrubl FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2481-2489
- 21 Said HM, Chatterjee N, Haq RU, Subramanian VS, Ortiz A, Matherly LH, Sirotnak FM, Halsted C, Rubin SA. Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1889-C1895
- 22 Buchholz BA, Arjomand A, Dueker SR, Schneider PD, Clifford AJ, Vogel JS. Intrinsic erythrocyte labeling and attomole pharmacokinetic tracing of ^{14}C -labeled folic acid with accelerator mass spectrometry. *Anal Biochem* 1999; 269: 348-352
- 23 Lin Y, Dueker SR, Follett JR, Fadel JG, Arjomand A, Schneider PD, Miller JW, Green R, Buchholz BA, Vogel JS, Phair RD, Clifford AJ. Quantitation of in vivo human folate metabolism. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 680-691
- 24 Baker SJ, Kumar S, Swaminathan SP. Excretion of folic acid in bile. *Lancet* 1965; 10: 685
- 25 Kim TH, Yang J, Darling PB, O'Connor DL. A large pool of available folate exists in the large intestine of human infants and piglets. *J Nutr* 2004; 134: 1389-1394
- 26 Davis CD, Uthus EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 988-995
- 27 Scott JM, Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 223-227
- 28 Ross SA. Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 983: 197-207
- 29 Choi SW, Mason JB. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002; 132: 2413S-2418S
- 30 Moreau NM, Champ MM, Gouptry SM, Le Bizec BJ, Krempf M, Nguyen PG, Dumon HJ, Martin LJ. Resistant starch modulates in vivo colonic butyrate uptake and its oxidation in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Nutr* 2004; 134: 493-500
- 31 Venkatraman A, Ramakrishna BS, Pulimood AB, Patra S, Murthy S. Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1053-1059
- 32 Sakata T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation of isolated and denervated jejunal segment of the rat. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 886-890
- 33 Sakata T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br J Nutr* 1987; 58: 95-103
- 34 Ichikawa H, Shineha R, Satomi S, Sakata T. Gastric or rectal instillation of short-chain fatty acids stimulates epithelial cell proliferation of small and large intestine in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1141-1146
- 35 Kissmeyer-Nielsen P, Mortensen FV, Laurberg S, Hesseov I. Transmural trophic effect of short chain fatty acid infusions on atrophic, defunctioned rat colon. *Dis Colon Rectum* 1995; 38: 946-951
- 36 Wachtershauser A, Stein J. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr* 2000; 39: 164-171
- 37 D'Argenio G, Cosenza V, Sorrentini I, De Ritis F, Gatto A, Delle Cave M, D'Armiento FP, Mazzacca G. Butyrate, mesalamine, and factor XIII in experimental colitis in the rat: effects on transglutaminase activity. *Gastroenterology* 1994; 106: 399-404
- 38 D'Argenio G, Cosenza V, Sorrentini I, De Ritis F, Gatto A, Delle Cave M, D'Armiento FP, Mazzacca G. Butyrate, mesalamine, and factor XIII in experimental colitis in the rat: effects on transglutaminase activity. *Gastroenterology* 1994; 106: 399-404
- 39 程留芳, 崔云龙, 杨昭徐, 周荣斌, 汤旦林, 万阜昌, 吴少辉. 宝乐安散剂治疗急性慢性腹泻61例随机双盲模拟对照试验. *临床消化病杂志* 2005; 17: 214-216
- 40 程留芳, 甘立平, 董蕾, 汤旦林, 崔云龙, 梅巍, 万阜昌. 酪立宁胶囊治疗急性慢性腹泻70例. *中国新药杂志* 2002; 11: 317-319
- 41 Vernia P, Marcheggiano A, Caprilli R, Frieri G, Corrao G, Valpiani D, Di Paolo MC, Paoluzi P, Torsoli A. Short-chain fatty acid topical treatment

- in distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9: 309-313
- 42 Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA, Rhodes JM. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* 1995; 36: 93-99
 - 43 Christl SU, Eisner HD, Dusel G, Kasper H, Schepach W. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 2477-2481
 - 44 Patz J, Jacobsohn WZ, Gottschalk-Sabag S, Zeides S, Braverman DZ. Treatment of refractory distal ulcerative colitis with short chain fatty acid enemas. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 731-734
 - 45 Steinhart AH, Brzezinski A, Baker JP. Treatment of refractory ulcerative proctosigmoiditis with butyrate enemas. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 179-183
 - 46 Jacobs LR. Fiber and colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1988; 17: 747-760
 - 47 Moreau NM, Martin LJ, Toquet CS, Laboisie CL, Nguyen PG, Siliart BS, Dumon HJ, Champ MM. Restoration of the integrity of rat caeco-colonic mucosa by resistant starch, but not by fructo-oligosaccharides, in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Br J Nutr* 2003; 90: 75-85
 - 48 Burkitt DP. Some diseases characteristic of modern Western civilization. *Br Med J* 1973; 1: 274-278
 - 49 Ohkawara S, Furuya H, Nagashima K, Asanuma N, Hino T. Oral administration of butyrovibrio fibrisolvens, a butyrate-producing bacterium, decreases the formation of aberrant crypt foci in the colon and rectum of mice. *J Nutr* 2005; 135: 2878-2883
 - 50 吴恺, 王冰娟, 王兴鹏. 益生菌对急性坏死性胰腺炎大鼠肠道细菌移居的作用. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 883-886
 - 51 程勇前, 聂青和. 感染性腹泻的微生态疗法. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 932-934
 - 52 Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118: 285-296
 - 53 Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545
 - 54 Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867
 - 55 李雄彪, 崔云龙. 益生菌防治肿瘤有实验依据. *生物技术世界* 2005; 4: 38-39
 - 56 李雄彪, 马庆英, 崔云龙. 肠道菌群和肠癌研究进展. *生物技术世界* 2005; 8: 22-24
 - 57 李雄彪, 崔云龙. 丁酸防治结肠癌. *生物技术世界* 2005; 10: 23-24
 - 58 Clausen MR. Butyrate and colorectal cancer in animals and in humans (mini-symposium: butyrate and colorectal cancer). *Eur J Cancer Prev* 1995; 4: 483-490
 - 59 Soergel KH. Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Invest* 1994; 72: 742-748
 - 60 Frankel W, Lew J, Su B, Bain A, Klurfeld D, Einhorn E, MacDermott RP, Rombeau J. Butyrate increases colonocyte protein synthesis in ulcerative colitis. *J Surg Res* 1994; 57: 210-214
 - 61 Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 451S-455S
 - 62 Lupton JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* 2004; 134: 479-482
 - 63 Mann J. and Truswell SA. 2002. Essentials of human nutrition, 2nd edition. Oxford University Press Inc, New York, USA.
 - 64 Giermasz A, Makowski M, Nowis D, Jalili A, Maj M, Dabrowska A, Czajka A, Jakobisiak M, Golab J. Potentiated antitumor effects of butyrate and actinomycin D in melanoma model in mice. *Oncol Rep* 2002; 9: 199-203
 - 65 Patnaik A, Rowinsky EK, Villalona MA, Hammond LA, Britten CD, Siu LL, Goetz A, Felton SA, Burton S, Valone FH, Eckhardt SG. A phase I study of pivaloyloxymethyl butyrate, a prodrug of the differentiating agent butyric acid, in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2142-2148
 - 66 Douillard JY, Bennouna J, Vavasaur F, Deporte-Fety R, Thomare P, Giacalone F, Meflah K. Phase I trial of interleukin-2 and high-dose arginine butyrate in metastatic colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 56-61
 - 67 Reid T, Valone F, Lipera W, Irwin D, Paroly W, Natale R, Sreedharan S, Keer H, Lum B, Scappaticci F, Bhatnagar A. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pivaloyloxymethyl butyrate (Pivanex, AN-9) in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 45: 381-386
 - 68 Rephaeli A, Rabizadeh E, Aviram A, Shaklai M, Ruse M, Nudelman A. Derivatives of butyric acid as potential anti-neoplastic agents. *Int J Cancer* 1991; 49: 66-72
 - 69 Ogawa H, Rafiee P, Fisher PJ, Johnson NA, Otterson MF, Binion DG. Sodium butyrate inhibits angiogenesis of human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 inhibition. *FEBS Lett* 2003; 554: 88-94
 - 70 Louis M, Rosato RR, Brault L, Osbold S, Battaglia E, Yang XH, Grant S, Bagrel D. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces breast cancer cell apoptosis through diverse cytotoxic actions including glutathione depletion and oxidative stress. *Int J Oncol* 2004; 25: 1701-1711
 - 71 Robe PA, Jolais O, N'Guyen M, Princen F, Malgrange B, Merville MP, Bours V. Modulation of the HSV-TK/ganciclovir bystander effect by n-butyrate in glioblastoma: correlation with gap-junction intercellular communication. *Int J Oncol* 2004; 25: 187-192
 - 72 Clarke KO, Feinman R, Harrison LE. Tributyrin, an oral butyrate analogue, induces apoptosis through the activation of caspase-3. *Cancer Lett* 2001; 171: 57-65
 - 73 Iacomino G, Tecce MF, Grimaldi C, Tosto M, Russo GL. Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 1280-1289
 - 74 Schroder CP, Maurer HR. Tributyrin enhances the cytotoxic activity of interleukin-2/interleukin-12 stimulated human natural killer cells against LS 174T colon cancer cells *in vitro*. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 69-76
 - 75 Gaschott T, Steinhilber D, Milovic V, Stein J. Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. *J Nutr* 2001; 131: 1839-1843
 - 76 McBain JA, Eastman A, Nobel CS, Mueller GC. Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase

- inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1357-1368
- 77 Emenaker NJ, Calaf GM, Cox D, Basson MD, Qureshi N. Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J Nutr* 2001; 131: 3041S-3046S
 - 78 Perrin P, Cassagnau E, Burg C, Patry Y, Vavasseur F, Harb J, Le Pendu J, Douillard JY, Galmiche JP, Bornet F. An interleukin 2/sodium butyrate combination as immunotherapy for rat colon cancer peritoneal carcinomatosis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1697-1708
 - 79 Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem* 1999; 10: 66-88
 - 80 Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 511-519
 - 81 Harnack L, Jacobs DR Jr, Nicodemus K, Lazovich D, Anderson K, Folsom AR. Relationship of folate, vitamin B-6, vitamin B-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr Cancer* 2002; 43: 152-158
 - 82 La Vecchia C, Negri E, Pelucchi C, Franceschi S. Dietary folate and colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; 102: 545-547
 - 83 Konings EJ, Goldbohm RA, Brants HA, Saris WH, van den Brandt PA. Intake of dietary folate vitamins and risk of colorectal carcinoma: results from The Netherlands Cohort Study. *Cancer* 2002; 95: 1421-1433
 - 84 Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Speizer FE, Giovannucci EL. The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 227-234
 - 85 Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, Henning SM, Swendseid ME. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* 1998; 128: 1204-1212
 - 86 Trasler J, Deng L, Melnyk S, Pogribny I, Hiou-Tim F, Sibani S, Oakes C, Li E, James SJ, Rozen R. Impact of Dnmt1 deficiency, with and without low folate diets, on tumor numbers and DNA methylation in Min mice. *Carcinogenesis* 2003; 24: 39-45
 - 87 Freudenheim JL, Graham S, Marshall JR, Haughey BP, Cholewinski S, Wilkinson G. Folate intake and carcinogenesis of the colon and rectum. *Int J Epidemiol* 1991; 20: 368-374
 - 88 Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Fuchs C, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC. Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. *Ann Intern Med* 1998; 129: 517-524
 - 89 Christensen B. Folate deficiency, cancer and congenital abnormalities. Is there a connection? *Tidsskr Nor Lægeforen* 1996; 116: 250-254
 - 90 Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Brenner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 2001; 61: 3573-3577
 - 91 Biasco G, Zannoni U, Paganelli GM, Santucci R, Gionchetti P, Rivolta G, Miniero R, Pironi L, Calabrese C, Di Febo G, Miglioli M. Folic acid supplementation and cell kinetics of rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 469-471
 - 92 刘丽华, 吴汉平, 张方信, 刘斌, 董亮, 钱震. 叶酸治疗萎缩性胃炎并改变P16蛋白表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 630-633
 - 93 Prasad KN, Sinha PK. Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. *In Vitro* 1976; 12: 125-132
 - 94 Prasad KN. Butyric acid: a small fatty acid with diverse biological functions. *Life Sci* 1980; 27: 1351-1358
 - 95 Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* 1982; 42: 65-82
 - 96 Tabuchi Y, Arai Y, Kondo T, Takeguchi N, Asano S. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1287-1294
 - 97 Schroy PC, Rustgi AK, Ikonomu E, Liu XP, Polito J, Andry C, O'Keane JC. Growth and intestinal differentiation are independently regulated in HT29 colon cancer cells. *J Cell Physiol* 1994; 161: 111-123
 - 98 Ohannesian DW, Lotan D, Lotan R. Concomitant increases in galectin-1 and its glycoconjugate ligands (carcinoembryonic antigen, lamp-1, and lamp-2) in cultured human colon carcinoma cells by sodium butyrate. *Cancer Res* 1994; 54: 5992-6000
 - 99 Bartram HP, Englert S, Scheppach W, Dusel G, Richter F, Richter A, Kasper H. Antagonistic effects of deoxycholic acid and butyrate on epithelial cell proliferation in the proximal and distal human colon. *Z Gastroenterol* 1994; 32: 389-392
 - 100 Velazquez OC, Zhou D, Seto RW, Jabbar A, Choi J, Lederer HM, Rombeau JL. In vivo crypt surface hyperproliferation is decreased by butyrate and increased by deoxycholate in normal rat colon: associated in vivo effects on c-Fos and c-Jun expression. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1996; 20: 243-250
 - 101 Gaudier E, Jarry A, Blottiere HM, de Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, Labois C, Cherbut C, Hoebler C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1168-G1174
 - 102 Mally P, Mishra R, Gandhi S, Decastro MH, Nankova BB, Lagamma EF. Stereospecific regulation of tyrosine hydroxylase and proenkephalin genes by short-chain fatty acids in rat PC12 cells. *Pediatr Res* 2004; 55: 847-854
 - 103 Rottlieb C, Bornkamm GW, Polack A. Among 17 inducers of differentiation only sodium butyrate causes a permanent down-regulation of c-myc in Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 1995; 62: 697-702
 - 104 Rottlieb C, Hall C, Bornkamm GW, Polack A. Structure-activity relationship of 17 structural analogues of n-butyric acid upon c-myc expression. *Int J Cancer* 1996; 67: 724-729
 - 105 Iwai SA, Nishina Y, Kosaka M, Sumi T, Doi T, Sakuda M, Nishimune Y. The kinetics of induction of Hox1.6 and C-jun mRNA during three different ways of inducing differentiation in teratocarcinoma F9 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; 31: 462-466
 - 106 Ogawa H, Rafiee P, Fisher PJ, Johnson NA, Otterson MF, Binion DG. Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309:

- 512-519
- 107 Vidali G, Boffa LC, Bradbury EM, Allfrey VG. Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 2239-2243
- 108 Boffa LC, Lupton JR, Mariani MR, Ceppi M, Newmark HL, Scalmati A, Lipkin M. Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short chain fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. *Cancer Res* 1992; 52: 5906-5912
- 109 Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM. n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* 1977; 268: 462-464
- 110 Arts J, Lansink M, Grimbergen J, Toet KH, Kooistra T. Stimulation of tissue-type plasminogen activator gene expression by sodium butyrate and trichostatin A in human endothelial cells involves histone acetylation. *Biochem J* 1995; 310 (Pt 1): 171-176
- 111 Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane-Robinson C, Allis CD, Workman JL. Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*. *EMBO J* 1996; 15: 2508-2518
- 112 Acharya MR, Sparreboom A, Venitz J, Figg WD. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 917-932
- 113 Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 2001; 276: 36734-36741
- 114 Warrell RP Jr, He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1621-1625
- 115 Jansen MS, Nagel SC, Miranda PJ, Lobenhofer EK, Afshari CA, McDonnell DP. Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7199-7204
- 116 Chen JS, Faller DV, Spanjaard RA. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? *Curr Cancer Drug Targets* 2003; 3: 219-236
- 117 Chen L, Zhao H. Gene expression analysis reveals that histone deacetylation sites may serve as partitions of chromatin gene expression domains. *BMC Genomics* 2005; 6: 44
- 118 Griseri P, Patrone G, Puppo F, Romeo G, Ravazzolo R, Ceccherini I. Rescue of human RET gene expression by sodium butyrate: a novel powerful tool for molecular studies in Hirschsprung disease. *Gut* 2003; 52: 1154-1158
- 119 Brown R, Strathdee G. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol Med* 2002; 8: S43-S48
- 120 Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428
- 121 Tsou JA, Hagen JA, Carpenter CL, Laird-Offringa IA. DNA methylation analysis: a powerful new tool for lung cancer diagnosis. *Oncogene* 2002; 21: 5450-5461
- 122 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767
- 123 Kim Y, Mason JB. Folate, epithelial dysplasia and colon cancer. *Proc Assoc Am Physicians* 1995; 107: 218-227
- 124 Nagothu KK, Rishi AK, Jaszewski R, Kucuk O, Majumdar AP. Folic acid-mediated inhibition of serum-induced activation of EGFR promoter in colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G541-G546
- 125 Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113
- 126 Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13217-13220
- 127 Giovannucci E. Alcohol, one-carbon metabolism, and colorectal cancer: recent insights from molecular studies. *J Nutr* 2004; 134: 2475S-2481S
- 128 Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 513-518
- 129 Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Spiegelman D, Willett WC, Hunter DJ. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 4862-4864
- 130 Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 1098-1102
- 131 Le Marchand L, Donlon T, Hankin JH, Kolonel LN, Wilkens LR, Seifried A. B-vitamin intake, metabolic genes, and colorectal cancer risk (United States). *Cancer Causes Control* 2002; 13: 239-248
- 132 Kim YI, Shirwadkar S, Choi SW, Puchyr M, Wang Y, Mason JB. Effects of dietary folate on DNA strand breaks within mutation-prone exons of the p53 gene in rat colon. *Gastroenterology* 2000; 119: 151-161
- 133 Jhaveri MS, Wagner C, Trepel JB. Impact of extracellular folate levels on global gene expression. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 1288-1295
- 134 Crott JW, Choi SW, Ordovas JM, Dittelberg JS, Mason JB. Effects of dietary folate and aging on gene expression in the colonic mucosa of rats: implications for carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 69-76
- 135 Wickramasinghe SN, Fida S. Bone marrow cells from vitamin B12- and folate-deficient patients misincorporate uracil into DNA. *Blood* 1994; 83: 1656-1661
- 136 Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3290-3295
- 137 Weinberg G, Ullman B, Martin DW Jr. Mutator

- phenotypes in mammalian cell mutants with distinct biochemical defects and abnormal deoxyribonucleoside triphosphate pools. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 2447-2451
- 138 Meuth M. Role of deoxynucleoside triphosphate pools in the cytotoxic and mutagenic effects of DNA alkylating agents. *Somatic Cell Genet* 1981; 7: 89-102
- 139 Sutherland GR. The role of nucleotides in human fragile site expression. *Mutat Res* 1988; 200: 207-213
- 140 Fenech M, Rinaldi J. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid. *Carcinogenesis* 1994; 15: 1405-1411
- 141 Hunting DJ, Dresler SL. Dependence of u.v.-induced DNA excision repair on deoxyribonucleoside triphosphate concentrations in permeable human fibroblasts: a model for the inhibition of repair by hydroxyurea. *Carcinogenesis* 1985; 6: 1525-1528
- 142 James SJ, Basnakian AG, Miller BJ. *In vitro* folate deficiency induces deoxynucleotide pool imbalance, apoptosis, and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1994; 54: 5075-5080
- 143 Pogribny IP, Basnakian AG, Miller BJ, Lopatina NG, Poirier LA, James SJ. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. *Cancer Res* 1995; 55: 1894-1901
- 144 Smith ML, Yeleswarapu L, Scalamogna P, Locker J, Lombardi B. p53 mutations in hepatocellular carcinomas induced by a choline-devoid diet in male Fischer 344 rats. *Carcinogenesis* 1993; 14: 503-510
- 145 Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312: 1355-1359

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第五届中国百种杰出学术期刊评选揭晓

本刊讯 第五届中国百种杰出学术期刊评选日前揭晓, 周光召院士任主编的《科学通报》、韩启德院士任主编的《北京大学学报医学版》以及马连生任主编的《World Journal of Gastroenterology》等100种期刊入选“第五届中国百种杰出学术期刊”。中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》, 定期公布《中国科技论文与引文数据库》(CSTPCD)收录的中国科技核心期刊的十余项科学计量指标, 目前该数据库共收录中国科技核心期刊1652种。(记者 潘锋 2006-11-08)

化学合成经修饰抗TIMP-2小干扰RNA对CCl₄诱导肝纤维化动物模型的影响

胡迎宾, 李定国, 李光明, 孙超, 徐芹芳

胡迎宾, 李定国, 李光明, 孙超, 徐芹芳, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科 上海市 200092
胡迎宾, 2004年华中科技大学同济医学院硕士, 住院医师, 主要从事慢性肝病的研究。
上海市重点学科建设资助项目, No. Y0205
通讯作者: 李定国, 200092, 上海市, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科. dingguo_li@263.net
电话: 021-65790000-3361
收稿日期: 2006-07-23 接受日期: 2006-09-28

Effects of chemically modified small interfering RNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats

Ying-Bin Hu, Ding-Guo Li, Guang-Ming Li, Chao Sun, Qin-Fang Xu

Ying-Bin Hu, Ding-Guo Li, Guang-Ming Li, Chao Sun, Qin-Fang Xu, Department of Digestive Diseases, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Professor Ding-Guo Li, Department of Digestive Diseases, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China. dingguo_li@263.net
Received: 2006-07-23 Accepted: 2006-09-28

Abstract

AIM: To probe the effects of chemically modified small interfering RNA (siRNA) targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) on liver fibrosis as well as its possible mechanism in rats.

METHODS: A total of 42 male rats were randomly and averagely divided into 7 groups: a normal group, a negative control group, a sham-operated group, a model group and three siRNA-treated groups (treated with 0.05, 0.1, and 0.2 mg/kg siRNA via portal vein, respectively). Carbon tetrachloride (CCl₄) was used to induce liver cirrhosis. All the rats were sacrificed at 8 wk to collect liver tissue specimens, and the portal vein pressure (PVP) was measured.

The pathological changes of liver tissues were observed after HE and Van Gieson (VG) staining. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen type III (PCIII), collagen type IV (CIV) and hydroxyproline (Hyp) were measured. The mRNA expression of TIMP-2, collagen type I (COLI), collagen type III (COLIII) and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR). The protein expression of TIMP-2, α -SMA and MMP-2 were analyzed by Western blot or gelatin zymography.

RESULTS: In comparison with those in the model group, the pathological changes in the three siRNA-treated groups (treated with 0.05, 0.1, and 0.2 mg/kg siRNA, respectively) were markedly attenuated, and the levels of PVP (2.2 ± 0.1 , 1.9 ± 0.1 , 1.6 ± 0.1 kPa vs 2.7 ± 0.1 kPa, $P < 0.05$), ALT (2089.3 ± 154.5 , 1869.8 ± 138.0 , 1422.5 ± 139.7 nkat/L vs 2717.2 ± 193.8 nkat/L, $P < 0.05$), AST (3634.1 ± 242.7 , 2739.4 ± 141.3 , 2286.6 ± 145.5 nkat/L vs 4067.5 ± 251.5 nkat/L, $P < 0.05$), HA (176.0 ± 10.2 , 160.6 ± 9.3 , 109.9 ± 9.4 μ g/L vs 206.3 ± 17.0 μ g/L, $P < 0.05$), LN (93.1 ± 8.2 , 71.4 ± 7.5 , 55.9 ± 7.3 μ g/L vs 116.6 ± 10.8 μ g/L, $P < 0.05$), PCIII (71.2 ± 6.1 , 64.1 ± 5.1 , 53.6 ± 4.3 μ g/L vs 91.2 ± 8.9 μ g/L, $P < 0.05$), CIV (64.3 ± 5.4 , 50.7 ± 5.8 , 41.6 ± 4.4 μ g/L vs 80.3 ± 6.8 μ g/L, $P < 0.05$) and Hyp (328.7 ± 17.6 , 279.7 ± 16.3 , 230.4 ± 16.1 μ g/g vs 380.7 ± 20.6 μ g/g, $P < 0.05$) were significantly lowered. QRT-PCR showed that the mRNA expression of TIMP-2, COLI, COLIII and α -SMA in the three siRNA-treated groups were decreased significantly as compared with those in the model group (7.53 ± 0.83 , 5.04 ± 0.75 , 1.30 ± 0.49 vs 23.23 ± 2.14 , $P < 0.05$; 33.38 ± 2.85 , 22.80 ± 2.48 , 11.45 ± 1.27 vs 43.18 ± 3.32 , $P < 0.05$; 19.23 ± 1.95 , 13.21 ± 1.35 , 10.11 ± 1.09 vs 25.90 ± 2.23 , $P < 0.05$; 23.76 ± 2.06 , 15.33 ± 1.25 , 10.53 ± 1.02 vs 34.85 ± 3.16 , $P < 0.05$). Western blot or gelatin zymography showed that the protein expression of TIMP-2, MMP-2 and α -SMA in the three siRNA-treated groups were also decreased significantly

■背景资料

随着RNA干扰机制在哺乳动物中的发现, 一些研究者逐渐开始应用小干扰RNA(siRNA)进行HBV、HIV、恶性肿瘤、神经元退行性变等多种疾病的基因治疗。目前, 美国FDA已经批准siRNA进行III期临床试验, 用于治疗湿性老年性黄斑变性(AMD)的患者。2006年诺贝尔医学与生理学奖则授予了发现RNAi现象的两位美国科学家。因此, siRNA在临床和科研工作中将有广泛的应用前景。

■研究前沿

普通化学合成的 siRNA 存在一些不足, 例如脱靶效应, 非特异性效果以及不稳定性, 而化学合成经修饰 siRNA 将改善上述问题。

as compared with those in the model group (23.27 ± 3.06 , 14.13 ± 1.86 , 9.16 ± 1.33 vs 44.83 ± 5.45 , $P < 0.05$; 23.80 ± 2.14 , 15.58 ± 1.52 , 9.52 ± 0.93 vs 39.90 ± 3.23 , $P < 0.05$; 24.58 ± 2.59 , 19.29 ± 2.31 , 13.40 ± 1.98 vs 57.19 ± 7.07 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Chemically modified siRNA targeting TIMP-2 can down-regulate the expression of TIMP-2, decrease the contents of extracellular matrix, and inhibit the activation of hepatic stellate cells.

Key Words: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2; Small interfering RNA; Liver fibrosis; Gene therapy

Hu YB, Li DG, Li GM, Sun C, Xu QF. Effects of chemically modified small interfering RNA targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3081-3087

摘要

目的: 研究化学合成经修饰抗金属蛋白酶组织抑制剂-2(TIMP-2)小干扰RNA(siRNA)对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化的影响及其作用机制。

方法: SD大鼠42只随机平均分成7组: 正常组、阴性对照组、假手术组、模型组、治疗组(分3组, 分别用0.05、0.1、0.2 mg/kg siRNA尾静脉注射)。以400 mL/L CCl₄(3 μ L/g) sc诱导大鼠肝纤维化。8 wk后所有动物取肝组织标本, 测门静脉血压(PVP)并经腹主动脉取血。常规HE染色和Van Gieson(VG)胶原染色, 检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(CⅣ)和羟脯氨酸(Hyp)。应用荧光实时定量PCR法检测TIMP-2、Ⅰ型胶原纤维(COL Ⅰ)、Ⅲ型胶原纤维(COL Ⅲ)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA) mRNA的表达。应用Western blot或明胶酶谱法检测TIMP-2、 α -SMA 和MMP-2蛋白的表达。

结果: 各治疗组在应用抗TIMP-2 siRNA治疗后组织学病变减轻, PVP较模型组降低(2.2 ± 0.1 , 1.9 ± 0.1 , 1.6 ± 0.1 kPa vs 2.7 ± 0.1 kPa, $P < 0.05$), 血清ALT和AST减少(2089.3 ± 154.5 , 1869.8 ± 138.0 , 1422.5 ± 139.7 nkat/L vs 2717.2 ± 193.8 nkat/L, $P < 0.05$; 3634.1 ± 242.7 , 2739.4 ± 141.3 , 2286.6 ± 145.5 nkat/L vs 4067.5 ± 251.5 nkat/L, $P < 0.05$), 反映肝纤维化指标的HA, LN, PCⅢ, CⅣ和Hyp均显著低于模型组(176.0 ± 10.2 , 160.6 ± 9.3 , 109.9 ± 9.4 μ g/L

vs 206.3 ± 17.0 μ g/L, $P < 0.05$; 93.1 ± 8.2 , 71.4 ± 7.5 , 55.9 ± 7.3 μ g/L vs 116.6 ± 10.8 μ g/L, $P < 0.05$; 71.2 ± 6.1 , 64.1 ± 5.1 , 53.6 ± 4.3 μ g/L vs 91.2 ± 8.9 μ g/L, $P < 0.05$; 64.3 ± 5.4 , 50.7 ± 5.8 , 41.6 ± 4.4 μ g/L vs 80.3 ± 6.8 μ g/L, $P < 0.05$; 328.7 ± 17.6 , 279.7 ± 16.3 , 230.4 ± 16.1 μ g/g vs 380.7 ± 20.6 μ g/g, $P < 0.05$)。各治疗组TIMP-2, COL Ⅰ, COL Ⅲ和 α -SMA mRNA的表达较模型组明显减少(7.53 ± 0.83 , 5.04 ± 0.75 , 1.30 ± 0.49 vs 23.23 ± 2.14 , $P < 0.05$; 33.38 ± 2.85 , 22.80 ± 2.48 , 11.45 ± 1.27 vs 43.18 ± 3.32 , $P < 0.05$; 19.23 ± 1.95 , 13.21 ± 1.35 , 10.11 ± 1.09 vs 25.90 ± 2.23 , $P < 0.05$; 23.76 ± 2.06 , 15.33 ± 1.25 , 10.53 ± 1.02 vs 34.85 ± 3.16 , $P < 0.05$)。且TIMP-2, MMP-2和 α -SMA蛋白的表达也相应减少(23.27 ± 3.06 , 14.13 ± 1.86 , 9.16 ± 1.33 vs 44.83 ± 5.45 , $P < 0.05$; 23.80 ± 2.14 , 15.58 ± 1.52 , 9.52 ± 0.93 vs 39.90 ± 3.23 , $P < 0.05$; 24.58 ± 2.59 , 19.29 ± 2.31 , 13.40 ± 1.98 vs 57.19 ± 7.07 , $P < 0.05$)。

结论: 化学合成经修饰抗TIMP-2 siRNA能显著降低TIMP-2的表达, 促进细胞外基质的降解, 抑制肝星状细胞的活化。

关键词: 金属蛋白酶组织抑制剂-2; 小干扰RNA; 肝纤维化; 基因治疗

胡迎宾, 李定国, 李光明, 孙超, 徐芹芳. 化学合成经修饰抗TIMP-2小干扰RNA对CCl₄诱导肝纤维化动物模型的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(32):3081-3087

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3081.asp>

0 引言

金属蛋白酶组织抑制剂-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)是体内多种基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的特异性抑制剂之一。在肝纤维化时TIMP-2表达增加, 一方面他通过抑制MMPs的活性从而减少细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解, 导致ECM的过度沉积^[1]。另一方面, TIMP-2能够通过膜型MMP-1(membrane type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)介导活化MMP-2, 降解基底膜, 促进炎症细胞的侵袭和肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化^[2-3]。因此抑制TIMP-2在肝纤维化中的表达, 将有可能阻断肝纤维化的进一步发展。小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)是RNA干扰(RNA interference, RNAi)过程中的效应分子, 他能够高

效特异性的沉默同源性靶mRNA的表达, 从而达到基因沉默的目的. 本研究采用化学合成经修饰抗TIMP-2 siRNA防治CCl₄诱导的肝纤维化动物模型, 探讨其作用机制, 为siRNA应用于临床奠定实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂SD大鼠42只, 体质量240-260 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供. 化学合成经修饰抗TIMP-2 siRNA由美国Invitrogen Life Technologies公司设计合成. 抗TIMP-2 siRNA正义链: 5'-GCCAAGUUCUUUGCCUGCAUCAAGA-3'; 反义链: 5'-UCUUGAUGCAGGCAAAGAA CUUGGC-3'. 抗TIMP-2 siRNA阴性对照(control siRNA)正义链: 5'-GCCUUGUUCGUGUCUACACAAAGA-3'; 反义链: 5'-UCUUUGUGUAGACACGGAACAAGGC-3'. 转染试剂Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen Life Technologies公司. 定量RT-PCR试剂盒(ExScript RT-PCR Kit)购自大连TaKaRa公司. RNA抽提试剂TRIzol由上海生工生物工程技术服务有限公司提供. 抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体和抗TIMP-2抗体购自武汉博士德公司. 抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)购自美国Sigma公司. 辣根酶标记二抗购自美国Santa Cruz公司. SuperSignal West Pico化学发光底物购自美国Pierce Biotechnology公司. 透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层黏连蛋白(laminin, LN)、III型前胶原(procollagen type III, PCIII)、IV型胶原(collagen type IV, CIV)放射免疫分析试剂盒购自上海海研医学生物技术有限公司. 羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)试剂盒购自南京建成生物工程研究所.

1.2 方法 将动物随机分为7组, 每组6只. siRNA阴性对照组, 假手术组和模型组分别给予0.1 mg/kg control siRNA经鼠尾静脉注射, sc橄榄油(3 μ L/g)及sc 400 mL/L CCl₄(3 μ L/g), 每3天1次, 至第8周末. 治疗组分为3组, 分别予sc 400 mL/L CCl₄(3 μ L/g), 每3天1次, 2 wk后各治疗组分别同时给予0.05 mg/kg siRNA(治疗1组)、0.1 mg/kg siRNA(治疗2组)和0.2 mg/kg siRNA(治疗3组)以及相应剂量Lipofectamine 2000(10, 20, 40 μ L)经鼠尾静脉注射, 每3天1次, 至第8周末. 所有动物经门静脉测压(portal vein pressure, PVP), 腹主动脉取血, 同时取肝组织右叶约10 g. 采用HE常规染色和标准Van Gieson(VG)胶原染色, 光镜下观察肝细胞变性、坏死、炎症细胞浸润及胶原

沉积情况.

1.2.1 血清学和肝组织Hyp检查 血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)由美国Beckman LX20生化自动分析仪检测. HA, LN, PCIII, CIV和Hyp的检测分别按试剂盒说明书操作.

1.2.2 荧光实时定量PCR 用TRIzol试剂盒提取肝组织总RNA, 紫外分光光度计测定RNA浓度. 按定量RT-PCR试剂盒说明书取1 μ g总RNA逆转录合成cDNA, 然后以Sybr Green作为荧光标记物, 在LightCycler荧光实时定量PCR仪(Roche公司, 德国)上进行PCR反应. PCR引物: TIMP-2正义链, 5'-ACCCAGAAGAAGAGCCTAAACCA-3', 反义链, 5'-GTCCATCCAGAGGCACTCATC-3'; α -SMA正义链, 5'-CCGAGATCTCACCGACTAC C-3', 反义链, 5'-TCCAGAGCGACATAGCACAG -3'; I型胶原纤维(collagen type I, COL I)正义链, 5'-GAGGGCGAGTGCTGTCTT-3', 反义链, 5'-GGTCCCTCGACTCCTATGACTTC-3'; III型胶原纤维(collagen type III, COL III)正义链, 5'-TGAAGGAAATAGCAAATTCACCTACAC-3', 反义链, 5'-TCAAAGACTGTCTTGCTCCATTC-3'; 3'-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)正义链, 5'-GCATGGCCT TCCGTGTTCTACC-3', 反义链, 5'-GCCGCCTG CTTACACACCTTCT-3'. 反应条件如下: 预变性 95 $^{\circ}$ C 10 s; 30个循环中95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 5 s. 通过融解曲线分析和电泳确定目的条带, 使用正常SD大鼠肝组织制作外在标准曲线, 通过双标准曲线法进行相对定量, 即特异性基因表达量/管家基因表达量(GAPDH).

1.2.3 Western印迹检测TIMP-2和 α -SMA的表达 组织标本经裂解液提取蛋白后, 采用BCA法定量蛋白浓度. 蛋白变性后在100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离, 完毕后采用半干法将蛋白电转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上, 用50 g/L的脱脂奶粉封闭后, 先后加入特异性一抗和相对应的二抗, 最后经化学发光法在X片上显影并扫描结果条带, 测定光密度值. 采用特异性基因光密度/管家基因光密度(β -actin)相对定量.

1.2.4 明胶酶谱法检测MMP-2蛋白表达 细胞上清液浓缩后, 在Novex Zymogram Gels胶中进行非变性电泳, 复性缓冲液室温轻摇30 min后倾去, 显色缓冲液平衡30 min, 然后显色缓冲液37 $^{\circ}$ C过

■创新盘点

与其他TIMPs不同的是, TIMP-2可以活化MMP-2, 从而促进肝纤维化的发生、发展.

应用要点

本研究证明应用化学合成经修饰siRNA沉默TIMP-2的表达,促进ECM的降解,抑制HSC的活化,将为肝纤维化的治疗提供新的有效方法。

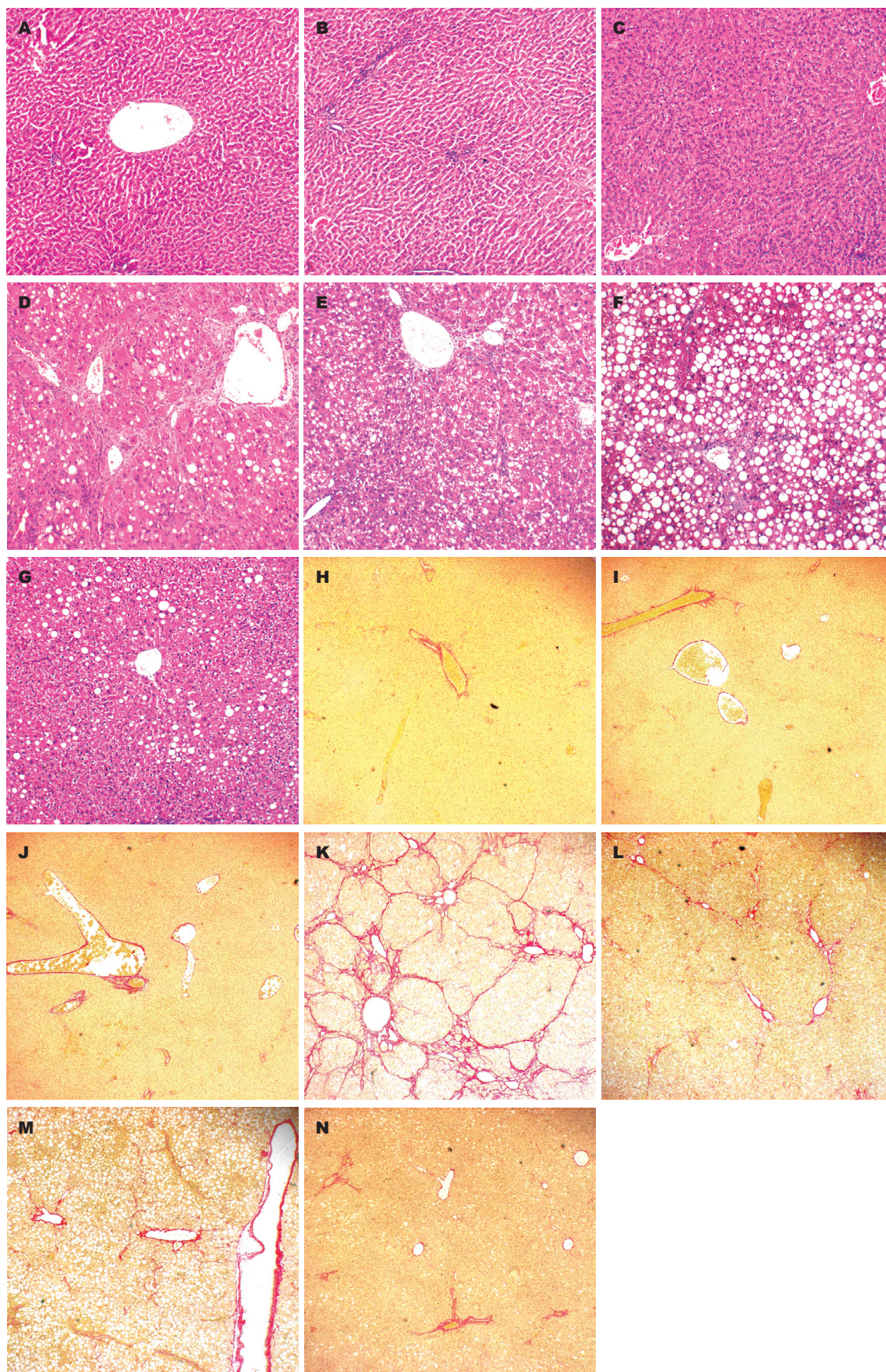


图 1 化学合成经修饰抗TIMP-2小干扰RNA病理形态学的改变. A-G: HE $\times 100$; H-N: VG $\times 40$; A, H: 正常组; B, I: 阴性对照组; C, J: 假手术组; D, K: 模型组; E, L: 治疗1组; F, M: 治疗2组; G, N: 治疗3组.

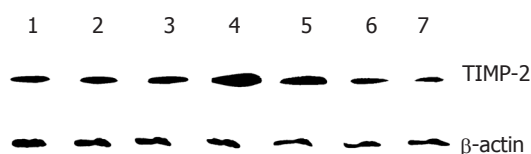


图2 Western印迹检测TIMP-2蛋白的表达. 1: 正常组; 2: 阴性对照组; 3: 假手术组; 4: 模型组; 5: 治疗1组; 6: 治疗2组; 7: 治疗3组.

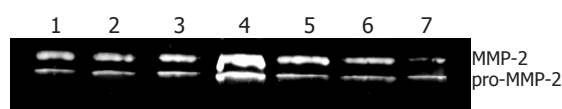


图3 明胶酶谱法检测MMP-2蛋白的表达. 1: 正常组; 2: 阴性对照组; 3: 假手术组; 4: 模型组; 5: 治疗1组; 6: 治疗2组; 7: 治疗3组.

表1 抗TIMP-2 siRNA对PVP, ALT, AST, HA, LN, PCIII, CIV和Hyp的影响

分组	PVP (kPa)	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	HA (μg/L)	LN (μg/L)	PCIII (μg/L)	CIV (μg/L)	Hyp (μg/g)
正常	1.1 ± 0.1	425.1 ± 96.5	575.1 ± 94.7	70.1 ± 7.2	30.3 ± 4.4	41.9 ± 5.2	11.0 ± 2.3	191.3 ± 15.2
阴性对照	1.2 ± 0.1	480.7 ± 109.8	683.5 ± 118.3	75.8 ± 4.5	34.4 ± 5.4	39.4 ± 5.0	10.7 ± 2.9	191.5 ± 16.4
假手术	1.2 ± 0.1	530.7 ± 129.3	736.3 ± 103.5	79.4 ± 5.1	35.6 ± 4.9	44.9 ± 4.1	11.9 ± 2.5	196.3 ± 15.4
模型	2.7 ± 0.1 ^a	2717.2 ± 193.8 ^a	4067.5 ± 251.5 ^a	206.3 ± 17.0 ^a	116.6 ± 10.8 ^a	91.2 ± 8.9 ^a	80.3 ± 6.8 ^a	380.7 ± 20.6 ^a
治疗1	2.2 ± 0.1 ^{bc}	2089.3 ± 154.5 ^{bc}	3634.1 ± 242.7 ^{bc}	176.0 ± 10.2 ^{bc}	93.1 ± 8.2 ^{bc}	71.2 ± 6.1 ^{bc}	64.3 ± 5.4 ^{bc}	328.7 ± 17.6 ^{bc}
治疗2	1.9 ± 0.1 ^{bc}	1869.8 ± 138.0 ^{bc}	2739.4 ± 141.3 ^{bc}	160.6 ± 9.3 ^{bc}	71.4 ± 7.5 ^{bc}	64.1 ± 5.1 ^{bc}	50.7 ± 5.8 ^{bc}	279.7 ± 16.3 ^{bc}
治疗3	1.6 ± 0.1 ^{bc}	1422.5 ± 139.7 ^{bc}	2286.6 ± 145.5 ^{bc}	109.9 ± 9.4 ^{bc}	55.9 ± 7.3 ^{bc}	53.6 ± 4.3 ^{bc}	41.6 ± 4.4 ^{bc}	230.4 ± 16.1 ^{bc}

^a*P* < 0.05 vs 正常组; ^{bc}*P* < 0.05 vs 模型组.

夜, 1 g/L考马斯亮蓝染色, 脱色, 拍照.

统计学处理 应用SAS 6.12软件包进行统计分析, 数据以mean ± SD表示, 组间差异使用方差分析, 两两比较采用Student-Newman-Kewls法, 以*P* < 0.05表示有统计学差异.

2 结果

正常组, 阴性对照组和假手术组肝小叶形态无异常, 未见肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润, VG染色未见纤维间隔形成; 模型组肝小叶正常结构消失, 有大量炎症细胞浸润, 可见肝细胞变性、坏死, VG染色可见纤维间隔, 假小叶形成; 治疗1组肝小叶形态异常, 有炎症细胞浸润, 可见肝细胞脂滴变性, VG染色可见少量纤维组织; 治疗2组可见大量肝细胞脂肪变性, VG染色可见少量纤维组织; 治疗3组可见少量肝细胞脂肪变性, VG染色未见明显纤维组织(图1).

2.1 PVP, ALT, AST, HA, LN, PCIII, CIV和Hyp的改变 正常组、阴性对照组和假手术组3组之间PVP, ALT, AST均无统计学差异, 各治疗组PVP, ALT, AST, HA, LN, PCIII, CIV和Hyp均显著低于模型组(*P* < 0.05, 表1), 且各治疗组之间的变化具有统计学差异(*P* < 0.05).

2.2 TIMP-2, COL I, COL III和α-SMA mRNA表达的影响 模型组TIMP-2 mRNA的表达显著高于正常组(*P* < 0.05, 表2), 各治疗组TIMP-2 mRNA的表达显著低于模型组(*P* < 0.05, 表2), 且治疗3组TIMP-2 mRNA的表达与正常组比较无统计学

差异; 模型组COL I、COL III和α-SMA mRNA的表达显著高于正常组(*P* < 0.05, 表2), 各治疗组COL I、COL III和α-SMA mRNA的表达显著低于模型组(*P* < 0.05, 表2).

2.3 TIMP-2, MMP-2和α-SMA蛋白表达的影响 模型组TIMP-2蛋白的表达显著高于正常组(*P* < 0.05, 表3), 各治疗组TIMP-2蛋白的表达显著低于模型组(*P* < 0.05, 表3), 且治疗2组和治疗3组TIMP-2蛋白的表达接近正常组水平(图2); 模型组MMP-2蛋白的表达显著高于正常组(*P* < 0.05, 表3), 各治疗组MMP-2蛋白的表达显著低于模型组(*P* < 0.05, 表3), 且治疗3组MMP-2蛋白的表达显著低于正常组(*P* < 0.05, 图3); 模型组α-SMA蛋白的表达显著高于正常组(*P* < 0.05), 各治疗组α-SMA蛋白的表达显著低于模型组(*P* < 0.05, 表3), 且治疗3组α-SMA蛋白的表达接近正常组(图4).

3 讨论

反义寡脱氧核苷酸、核酶和siRNA都是基因沉默的有效手段, 但是目前认为siRNA对基因表达的沉默效率高于反义寡脱氧核苷酸和核酶^[4-5], 因此应用siRNA进行基因治疗将有更广阔的前景. 然而普通标准的siRNA也存在一些不足, 如脱靶效应, 非特异性效果以及不稳定性. 为了解决这些问题, 最近一些研究者采用化学合成经修饰siRNA的方法, 在活体内进行基因沉默, 取得了明显的治疗效果^[6-7]. 本研究使用不同浓度的化学合成经修饰抗TIMP-2 siRNA进行实验性

■名词解释

1 小干扰RNA: 一种短片段双链RNA分子, 能够以同源互补序列的mRNA为靶目标降解特定的mRNA, 这个过程就是RNA干扰途径.

2 膜型基质金属蛋白酶: 是基质金属蛋白酶家族中的一类分子, 他们通过跨膜结构域或与糖基化磷脂酰肌醇锚连而定位于细胞表面.

■同行评价

本文研究了抗金属蛋白酶组织抑制剂-2小干扰RNA对CCl₄诱导的大鼠肝纤维化的影响及其作用机制。该方法是对抗纤维化的有益探索, 实验内容中检测标志物比较全面, 检测手段先进, 方案设计细致, 有较高学术价值。

表 2 抗TIMP-2 siRNA对TIMP-2, COL I, COL III和 α -SMA mRNA表达的影响

分组	TIMP-2	COL I	COL III	α -SMA
正常	1.87 ± 0.73	6.90 ± 1.05	3.81 ± 1.22	1.74 ± 0.94
阴性对照	2.07 ± 0.59	7.23 ± 1.10	4.08 ± 1.10	1.78 ± 0.92
假手术	2.17 ± 0.71	6.89 ± 1.34	4.03 ± 1.11	1.95 ± 0.86
模型	23.23 ± 2.14 ^a	43.18 ± 3.32 ^a	25.90 ± 2.23 ^a	34.85 ± 3.16 ^a
治疗1	7.53 ± 0.83 ^{ac}	33.38 ± 2.85 ^{ac}	19.23 ± 1.95 ^{ac}	23.76 ± 2.06 ^{ac}
治疗2	5.04 ± 0.75 ^{ac}	22.80 ± 2.48 ^{ac}	13.21 ± 1.35 ^{ac}	15.33 ± 1.25 ^{ac}
治疗3	1.30 ± 0.49 ^c	11.45 ± 1.27 ^{ac}	10.11 ± 1.09 ^{ac}	10.53 ± 1.02 ^{ac}

^a*P* < 0.05 vs 正常组; ^c*P* < 0.05 vs 模型组。

表 3 抗TIMP-2 siRNA对TIMP-2, MMP-2和 α -SMA蛋白表达的影响

分组	TIMP-2	MMP-2	α -SMA
正常	11.28 ± 1.59	15.02 ± 1.16	12.11 ± 1.83
阴性对照	12.08 ± 1.88	14.97 ± 1.02	12.87 ± 1.84
假手术	13.43 ± 1.58	15.03 ± 1.07	12.60 ± 1.72
模型	44.83 ± 5.45 ^a	39.90 ± 3.22 ^a	57.19 ± 7.07 ^a
治疗1	23.27 ± 3.06 ^{ac}	23.80 ± 2.14 ^{ac}	24.58 ± 2.59 ^{ac}
治疗2	14.13 ± 1.86 ^c	15.58 ± 1.52 ^c	19.29 ± 2.31 ^{ac}
治疗3	9.16 ± 1.33 ^c	9.52 ± 0.93 ^{ac}	13.40 ± 1.98 ^c

^a*P* < 0.05 vs 正常组; ^c*P* < 0.05 vs 模型组。

肝纤维化的防治, 证明能够有效抑制TIMP-2基因和蛋白的表达。

目前认为ECM合成与降解失衡是肝纤维化形成的根本原因, 而MMPs及其抑制剂TIMPs是调节ECM的关键酶^[8-9], 因此肝纤维化的防治包括2个方面: 促进ECM的降解(如增加MMPs的表达)和抑制ECM的合成(如减少TIMPs的表达)。国内外研究已经证实增加一种MMPs的表达或者减少TIMP-1的表达能够减轻实验性肝纤维化的发生、发展^[10-12]。然而已知的MMPs有20余种, 增加一种MMPs的表达无法考虑各种MMPs之间的相互作用, 并且表达合成的MMPs酶原如何高效转化为有活性的MMPs也是一个值得考虑的问题。虽然抑制TIMP-1的表达能够增加多种MMPs的活性, 但是TIMP-1无法像TIMP-2那样和MMP-2及MT1-MMP形成三联复合体, 而后者是MMP-2活化所必需的过程^[12,13]。因此, 抑制TIMP-2的表达将伴随MMP-2活化的减少, 这和我们在实验中发现应用抗TIMP-2 siRNA治疗后MMP-2蛋白的表达也随之减少相一致。

肝纤维化时以I型和III型胶原纤维增加为主, IV型胶原纤维、HA、LN、Hyp亦有所增加^[14]。在给予抗TIMP-2 siRNA干预6 wk后, 上述纤维化指标均明显降低, 表明抑制TIMP-2



图 4 Western印迹检测 α -SMA蛋白的表达。1: 正常组; 2: 阴性对照组; 3: 假手术组; 4: 模型组; 5: 治疗1组; 6: 治疗2组; 7: 治疗3组。

的表达能够显著减少ECM的沉积。本研究还发现, 经抗TIMP-2 siRNA治疗后, 各治疗组的门静脉压力显著低于模型组, 说明减少ECM的沉积, 从而避免假小叶的形成, 有利于改善肝纤维化时血流动力学的异常变化。目前研究认为, 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化与肝纤维化的发生密切相关, 而 α -SMA则是HSC活化的重要标志^[15]。我们应用抗TIMP-2 siRNA进行抗肝纤维化治疗, 能够降低 α -SMA基因和蛋白的表达, 间接证明活化HSC的数量明显减少, 这可能与抑制MMP-2的活化作用有关^[3]。总之, 通过从调节ECM平衡这一肝纤维化发生的最终环节入手, 应用化学合成经修饰siRNA沉默TIMP-2的表达, 促进ECM的降解, 抑制HSC的活化, 将为肝纤维化的治疗提供新的有效方法。

4 参考文献

- 1 Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G245-G249
- 2 Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Tryggvason K. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7414-7419
- 3 Theret N, Lehti K, Musso O, Clement B. MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 30: 462-468
- 4 Beale G, Hollins AJ, Benboubetra M, Sohail M, Fox SP, Benter I, Akhtar S. Gene silencing nucleic acids designed by scanning arrays: anti-EGFR activity of siRNA, ribozyme and DNA enzymes targeting a

- single hybridization-accessible region using the same delivery system. *J Drug Target* 2003; 11: 449-456
- 5 Drew HR, Lewy D, Conaty J, Rand KN, Hendry P, Lockett T. RNA hairpin loops repress protein synthesis more strongly than hammerhead ribozymes. *Eur J Biochem* 1999; 266: 260-273
- 6 Karagiannis TC, El-Osta A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 787-795
- 7 Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliansky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-178
- 8 李保森, 游绍莉, 赵志海, 辛绍杰, 赵景民, 王松山. 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 483-485.
- 9 郑伟达, 王小众. 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 428-431
- 10 Iimuro Y, Nishio T, Morimoto T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK, Brenner DA, Yamaoka Y. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology* 2003; 124: 445-458
- 11 Siller-Lopez F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, Garcia J, Vera J, Galvez J, Hernandez I, Ramos M, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 1122-33; discussion 949
- 12 Jiang W, Wang JY, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM. Effects of a plasmid expressing antisense tissue inhibitor of metalloproteinase-1 on liver fibrosis in rats. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 192-197
- 13 Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001; 20: 4782-4793
- 14 陆雄, 刘成海, 徐光福, 陈文慧, 刘平. 大鼠肝纤维化形成中肝窦壁层黏连蛋白及IV型胶原蛋白的变化. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 260-262
- 15 张锦生. 肝星状细胞激活的内在机制. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 831-834

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 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. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (世界胃肠病学杂志社2006-11-18)

肿瘤坏死因子- α 增强肝肾综合征时肾脏I型1,4,5-三磷酸肌醇受体表达

闻颖, 马力, 刘沛

■背景资料

肝肾综合征(HRS)时肾脏血流量明显减少,其主要原因是肾脏血管收缩,具体机制不十分清楚。肾血管平滑肌细胞及肾小球系膜细胞内有丰富的IP₃R。IP₃与IP₃R结合,促进细胞内储备Ca²⁺释放,引起肾血流减少。TNF- α 是引起重症肝炎发生的重要因子。那么TNF- α 能否上调肾脏I型IP₃R表达引起肾血管收缩呢?本文就这一问题研究了TNF- α 对肾脏I型IP₃R表达的影响。

■研究前沿

肾血管收缩是肝肾综合征时肾血流减少的主要原因,但其发生机制是目前研究的热点。许多因素参与其中,TNF- α 占有重要地位,但具体作用机制不清。

闻颖, 马力, 刘沛, 中国医科大学附属盛京医院传染科 辽宁省沈阳市 110004
闻颖, 2004年中国医科大学博士生, 主要从事肝肾综合征的研究。国家自然科学基金资助项目, No. 30270607
通讯作者: 刘沛, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院传染科, sylupei2003@yahoo.com.cn
电话: 024-83956981 传真: 024-83956451
收稿日期: 2006-08-23 接受日期: 2006-09-21

Tumor necrosis factor- α enhances the expression of type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptors

Ying Wen, Li Ma, Pei Liu

Ying Wen, Li Ma, Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30270607

Correspondence to: Pei Liu, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sylupei2003@yahoo.com.cn
Received: 2006-08-23 Accepted: 2006-09-21

Abstract

AIM: To clarify the mechanisms of renal vasoconstriction in hepatorenal syndrome (HRS) by investigating the effect of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on the expression of type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptors (IP₃R) in renal tissues.

METHODS: Ex vivo perfused rat kidney model was used in this study. Male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: control group (group A), heparin (10 mg/L) treatment group (group B), and TNF- α (1 μ g/L) treatment group (group C). After perfusion, immunohistochemical staining, Western blot, and real-time quantitative polymerase chain reaction (RTQ-PCR) were used to detect the distribution and expression of type 1 IP₃R in renal tissues.

RESULTS: Immunohistochemical staining

showed that type 1 IP₃R protein was localized at the plasma region of glomerular mesangial cells and vascular smooth muscle cells in rat kidney, and the number of positive cells was significantly higher in group C than that in group A ($U = 2.26, P < 0.05$). However, there was no marked difference between group A and B ($P > 0.05$). Western blot demonstrated a consistent result with immunohistochemistry did. The protein expression of type 1 IP₃R was significant higher in group C than that in group A (1.89 ± 0.11 vs $0.55 \pm 0.03, P < 0.05$), and there was no marked difference between group A and B ($P > 0.05$). RTQ-PCR showed that the mRNA expression of type 1 IP₃R was dramatically increased in group C as compared with that in group A (7.99 ± 0.12 vs $1.00 \pm 0.05, P < 0.05$), and no marked difference exists between group A and B ($P > 0.05$).

CONCLUSION: TNF- α can enhance the protein and mRNA expression of type1 IP₃R in glomerular mesangial cells and vascular smooth muscle cells from kidney.

Key Words: Hepatorenal syndrome; Tumor necrosis factor- α ; Heparin; Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors; Isolated kidney perfusion technique

Ying Wen, Li Ma, Pei Liu. Tumor necrosis factor- α enhances the expression of type 1 inositol 1,4,5-triphosphate receptors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3088-3092

摘要

目的: 通过观察TNF- α 对肾组织中I型IP₃R表达的影响来探讨肝肾综合征的发病机制。

方法: 制备大鼠离体肾灌注模型, 随机分成对照组(A组)、肝素处理组(B组)、TNF- α 处理组(C组), 留取的标本应用免疫组织化学技术、Western blot及实时定量PCR检测肾组织I型IP₃R蛋白的定位、表达及mRNA的变化。

结果: I型IP₃R主要分布于肾小球系膜细胞和血管平滑肌细胞的胞质内。免疫组化结果

显示, C组与A组相比棕褐色颗粒着色的阳性细胞明显增多, 有显著性差异($U = 2.26$, $P < 0.05$); B组与A组相比阳性染色细胞无明显减少($P > 0.05$); Western blot结果与免疫组织化学结果相一致: C组与A组相比I型IP₃R蛋白表达水平明显增高, 有显著性差异(1.89 ± 0.11 vs 0.55 ± 0.03 , $P < 0.05$); B组与A组相比无显著性差异($P > 0.05$); 实时定量PCR结果显示: C组与A组相比I型IP₃R mRNA的表达水平明显增高, 有显著性差异(7.99 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$); B组与A组相比无显著性差异($P > 0.05$).

结论: TNF- α 可增强肾小球系膜细胞和血管平滑肌细胞I型IP₃R蛋白的表达, 且I型IP₃R mRNA也呈增加趋势.

关键词: 肝肾综合征; 肿瘤坏死因子- α ; 肝素; 1,4,5-三磷酸肌醇受体; 离体灌注肾技术

闻颖, 马力, 刘沛. 肿瘤坏死因子- α 增强肝肾综合征时肾脏I型1,4,5-三磷酸肌醇受体表达. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3088-3092
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3088.asp

0 引言

肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)是重型肝炎严重并发症之一, 是由多种因素引起肾脏血流灌注减少所致的功能性肾衰竭, 其发病机制至今尚未完全阐明. 目前认为, 外周动脉扩张是导致肾功能损害的始动因素^[1], 肾血管收缩引起肾皮质血流量减少促进HRS的发生、发展^[2]. 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是引起重型肝炎发生的重要因子^[3]. TNF- α 可引起肾血管收缩^[4]. 1,4,5-三磷酸肌醇受体(inositol 1, 4, 5-triphosphate receptors, IP₃R)可介导细胞内钙释放和细胞外钙内流从而引起肾血管收缩^[5-6]. 已知很多细胞因子可上调或下调IP₃R蛋白的表达^[7]. 为了弄清TNF- α 能否影响肾脏I型IP₃R表达, 为了排除血浆中其他生物活性物质干扰, 我们应用离体灌注肾技术^[8](isolated perfused kidney technique, IPK)观察TNF- α 处理后大鼠肾脏I型IP₃R表达的变化, 探讨TNF- α 在肝肾综合征肾血管收缩机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠60只, 周龄10-12 wk、体重260-320 g(由中国医科大学实验动物中心提供). TNF- α (Sigma公司); I型IP₃R抗体(组化

用, Santa Cruz公司); I型IP₃R抗体(Western用, US biological); 免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司); DAB显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); 逆转录试剂盒ExScriptTM RT Reagent Kit、PCR试剂盒SYBR[®] premix EX TaqTM(TaKaRa); 大鼠I型IP₃R及GAPDH标准品、引物均由大连宝生物工程有限公司制备; BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司); BCIP/NBT liquid substrate system(Sigma公司).

1.2 方法

1.2.1 离体灌注肾模型制备^[8] 制备离体灌注肾模型及配制Kreb's灌流液. 动物随机分3组, 每组20只, 即: 单纯Kreb's液灌流(A组)、10 mg/L肝素Kreb's液灌流(B组)、1 μ g/L TNF- α Kreb's液灌流(C组), 灌流120 min. 本实验离体肾灌流120 min内血流动力学稳定, 即灌注压稳定在80 mmHg左右, 肾脏的水肿率 $< 30\%$; 且灌流后的肾脏标本经病理检查均未发现明显的器质性损伤. 灌流结束时, 1/2肾标本用40 g/L的多聚甲醛固定24 h, 石蜡包埋备组化用; 1/2肾标本置-70℃冰箱保存备组织蛋白及RNA的提取.

1.2.2 免疫组化染色检测 I型IP₃R用PBS液代替一抗做空白对照. 石蜡切片脱蜡水化; 30 mL/L双氧水室温20 min, PBS洗片; 1 g/L胰蛋白酶室温15 min, PBS洗片; 正常兔血清封闭37℃ 20 min, 勿洗; 一抗1:100(4℃, 过夜), PBS洗片; 二抗(生物素化兔抗羊IgG)37℃ 30 min, PBS洗片; SABC液(辣根酶标记链霉卵白素工作液)37℃ 15 min, PBS洗片; DAB显色室温10 min, 水洗; 苏木素复染, 脱水透明, 树胶封片. 免疫组化结果判断: 细胞胞质内棕褐色颗粒为阳性细胞. 在高倍镜下选择有代表性视野计数1000个肾皮质细胞中的阳性细胞数. 结果分为4级: 未见阳性细胞为(-), 阳性细胞数在0-250之间为(+), 阳性细胞数在250-500之间为(++), 阳性细胞数 > 500 为(+++).

1.2.3 Western blot分析 I型IP₃R蛋白表达 组织蛋白抽提: 100 mg新鲜组织剪碎, PBS洗两次. 加蛋白裂解液, 超声波匀浆4℃过夜, 12 000 g离心1 h, 收集上清液, -80℃保存. BCA法进行蛋白浓度测定. 用蒸馏水将蛋白样品调成相同浓度, 加入相同体积上样缓冲液, 沸水煮5 min进行蛋白变性. 加样孔注入提取液(蛋白30 μ g)及标准分子量蛋白, 100 V电泳3 h. 将电泳凝胶上的蛋白质电转印到PVDF上, 50 V电泳2 h; PBST洗膜两次, 用含50 g/L脱脂奶粉的PBST封闭过夜. PBST洗4次; PVDF膜上加一抗(1:1000兔抗大鼠I

■相关报道

HRS患者血中TNF- α 浓度升高. 许多文献报道TNF- α 可通过多种机制参与各种病理状态时的血管收缩, 如活化PKC及抑制NO等. I型IP₃R是胞内钙释放的通道, 其表达量的多少直接与肾血管收缩相关.

■创新盘点

目前, 对肝肾综合征时肾血管收缩机制的研究主要集中在多种神经体液因素对血流动力学的影响方面, 而对其分子水平发病机制及胞内信号转导还知之甚少. 关于肝肾综合征时TNF- α 对I型IP₃R表达的影响还没有相应报道.

■应用要点

本文发现TNF- α 明显增加I型IP₃R蛋白及mRNA表达,为进一步深入研究肾血管收缩机制提供了帮助。

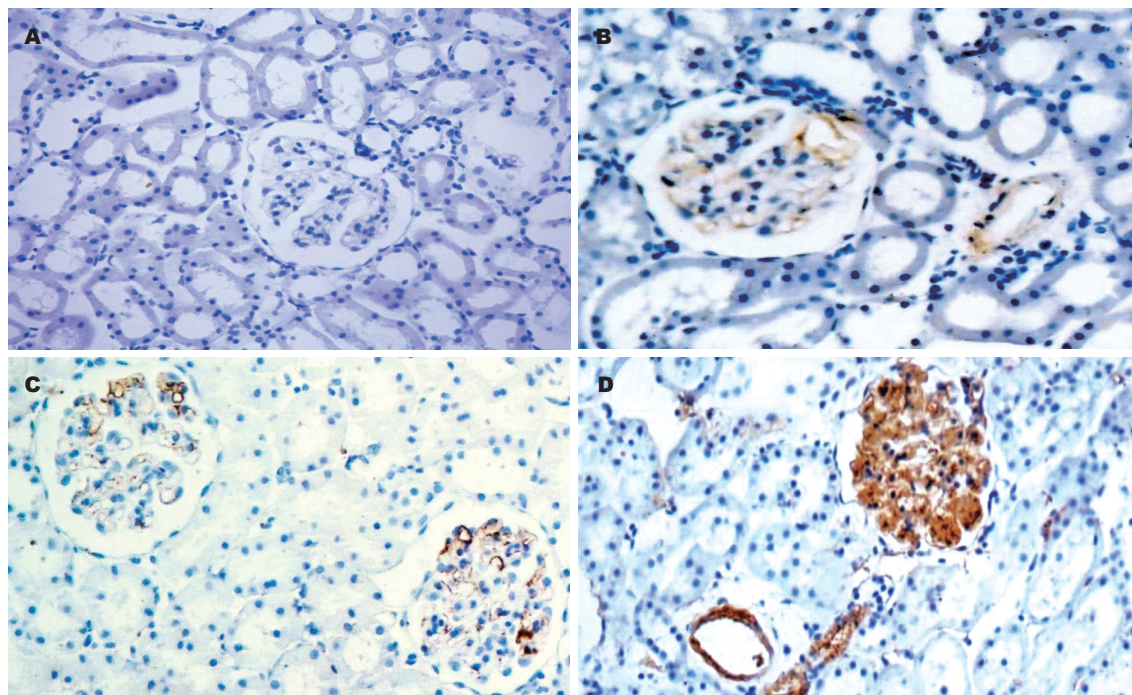


图1 免疫组化肾组织I型IP₃R的表达($\times 400$). 1: A: 阴性对照; B: 单纯Krebs's液灌流; C: 肝素Krebs's液灌流; D: TNF- α Krebs's液灌流。

型IP₃R)在室温孵育2 h; PBST洗膜; 加二抗 (1:2000碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG), 室温孵育2 h; PBST洗膜; 加BCIP/NBT底物显色, 观察相对分子质量230 kDa处蓝紫色蛋白印迹。以 β -actin作为内参, 相对分子质量45 kDa。IP₃R蛋白含量 = 样本IP₃R蛋白灰度值/同一样本 β -actin灰度值。

1.2.4 实时定量PCR 组织总RNA提取: TRIzol一步法提取总RNA, 分光光度法测定RNA纯度和量, 用RNA稀释液稀释成100 g/L。采用SYBR Green I 荧光染料嵌合法按照试剂盒说明两步法扩增I型IP₃R基因, GAPDH作内参。先将构建的目的基因(I型IP₃R基因)和管家基因(GAPDH)的RNA标准品梯度稀释(10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 copies/ μ L)作为模板进行Real Time RT-PCR反应, 制作标准曲线。再利用标准曲线对样品中的目的基因和管家基因分别进行定量。通过管家基因的校正, 检测各组肾组织中I型IP₃R基因的相对表达量。I型IP₃R mRNA的相对表达量 = I型IP₃R基因拷贝数/GAPDH基因拷贝数, 校正结果以对照组为1, 其余组与之相比较。引物序列如下: GAPDH-F: 5'-GACAACCTTTGGCATCGTGGA-3', GAPDH-R: 5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3', 产物片段133 bp; IP₃R-F: 5'-GGAAACAGCAGCCAAGAA GG-3', IP₃R-R: 5'-ACACACCTCTGGACTTGGA TGA-3', 产物片段122 bp。RT反应条件: 42°C 10

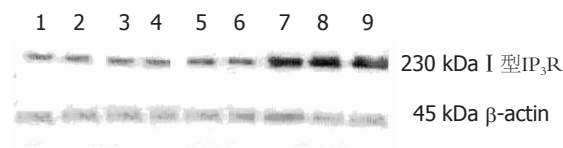


图2 IP₃R蛋白表达。1-3: A组; 4-6: B组; 7-9: C组。

min; 95°C 2 min。PCR反应条件: 95°C 10 s; 95°C 5 s, 60°C 20 s, 45 cycles。制作溶解曲线: 上述PCR产物进行60°C 1 min; 95°C 20 s, 在60-95°C之间梯度升温0.2°C/s绘制溶解曲线。I型IP₃R及GAPDH的溶解曲线均为单峰, 证明PCR产物单一。

统计学处理 计量资料实验数据以均值 \pm 标准差表示, 各组间的比较采用两样本等方差 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。等级资料(免疫组化法检测I型IP₃R)设4个强度, 采用非参数统计方法-校正公式的秩和检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 I型IP₃R免疫组化染色 棕褐色的阳性颗粒主要分布在肾小球系膜细胞和血管平滑肌细胞的胞质内。与对照组相比, TNF- α 处理组I型IP₃R的表达明显增强($U = 2.26$, $P < 0.05$); 而肝素处理组与对照组相比, I型IP₃R的表达未见明显减弱($P > 0.05$, 表1, 图1)。

2.2 Western blot结果 各组均可见230 kDa处特异性I型IP₃R的蛋白条带及45 kDa处 β -actin蛋白

表 1 A, B, C组免疫组化结果($n = 20$)

分组	-	+	++	+++
A组	10	5	3	2
B组	9	6	2	3
C组	0 ^a	5 ^a	7 ^a	8 ^a

^a $P < 0.05$ vs A组.

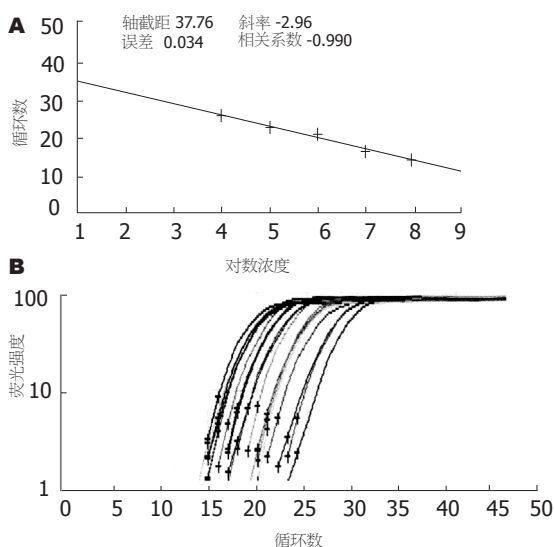


表 2 肾组织 I 型IP₃R mRNA与蛋白表达(mean \pm SD)

分组	n	蛋白表达	mRNA
A组	20	0.55 ± 0.03	1.00 ± 0.05
B组	20	0.60 ± 0.04	1.34 ± 0.10
C组	20	1.89 ± 0.11^a	7.99 ± 0.12^a

^a $P < 0.05$ vs A组.

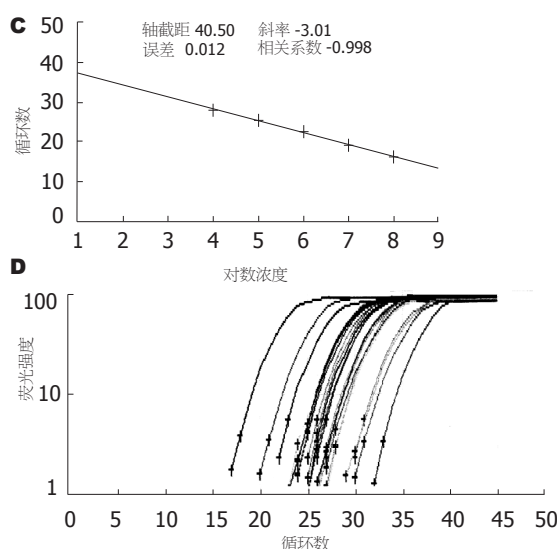


图 3 GAPDH与 I 型IP₃R的标准曲线. A: 标准品GAPDH; B: 样品GAPDH; C: 标准品 I 型IP₃R; D: 样品 I 型IP₃R.

条带, 对各条带进行灰度分析发现: C组与A组相比 I 型IP₃R蛋白的表达明显增高, 有显著性差异(1.89 ± 0.11 vs 0.55 ± 0.03 , $P < 0.05$); B组与A组相比无显著性差异($P > 0.05$, 表2, 图2).

2.3 实时定量PCR结果 C组与A组相比 I 型IP₃R mRNA的表达明显增高, 有显著性差异(7.99 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$); B组与A组相比无显著性差异($P > 0.05$, 表2, 图3).

3 讨论

重型肝炎和肝硬化晚期常并发HRS, 预后极差. 普遍认为, HRS发生是肾血管收缩造成的肾脏血流量锐减所致. HRS患者血清中许多缩血管活性物质(如儿茶酚胺、血管紧张素II、血管加压素、血栓素A₂、内皮素、白三烯等)均明显增高, 提供了HRS肾血管收缩的前提^[9-10]. 内皮素等缩血管活性物质是通过刺激胞内第二信使1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)产生发挥作用的^[11]. IP₃R是胞内钙贮库, 存在于内质网中. IP₃R与IP₃结合后发生构象改变^[12], 导致通道开放, 内质网中的储备钙被释放到细胞质中, 胞质游离Ca²⁺浓度升高引起细胞收缩^[13]. 细胞膜上也有IP₃R, 可

直接或间接介导钙内流. 因此肾脏IP₃R表达的多少与肾脏对缩血管物质的敏感性有着密切联系. IP₃R共有4种类型, 肾脏的 I 型IP₃R主要存在于肾小球系膜细胞、血管平滑肌细胞^[14]. 血管平滑肌细胞收缩引起肾血流量减少; 肾小球系膜细胞收缩不仅使肾小球血管阻力增加, 还可导致肾小球滤过面积减少; 两者均收缩导致肾小球滤过率急剧减少^[15]. HRS患者血中TNF- α 浓度升高并参与肾血管收缩^[16]; TNF- α 能增加肾脏对缩血管物质的敏感性^[17]; TNF- α 可增加细胞外Ca²⁺内流^[18]; TNF- α 可参与胞内钙释放^[19]. TNF- α 增加肾小球前小动脉平滑肌细胞IP₃R蛋白和IP₃RmRNA表达^[20]. 因此弄清TNF- α 与IP₃R的关系, TNF- α 是否通过上调 I 型IP₃R表达来增加肾脏对缩血管物质的敏感性是我们的研究方向. 本实验设立肝素处理组旨在与TNF- α 处理组形成对照, 因为肝素是IP₃R的竞争性抑制剂, 可抑制IP₃与IP₃R的结合, 舒张血管平滑肌^[21]. 本实验结果如下: I 型IP₃R主要存在于肾小球系膜细胞、血管平滑肌细胞的胞质内. TNF- α 灌流组免疫组化染色显示 I 型IP₃R表达明显增强, 且与Western blot半定量检测结果一致, 这证实了

■名词解释

1, 4, 5-三磷酸肌醇受体(IP₃R): IP₃R共有4种类型, 各组织及细胞内IP₃R的数量及类型不同. I 型IP₃R主要分布于肾小球系膜细胞、血管平滑肌细胞, 其收缩引起GFR明显下降.

■同行评价

本文立意新颖, 学术价值较好, 实验方法较先进, 实验结果能客观证实研究结论, 研究结论对于探讨肝肾综合征的发病机制有一定的理论价值。

TNF- α 可通过上调 I 型IP₃R表达来增加肾脏对缩血管物质的敏感性。实时定量PCR检测结果显示, TNF- α 处理组 I 型IP₃R mRNA水平明显升高, 提示TNF- α 能增强转录 I 型IP₃R的 mRNA。而肝素虽能舒张肾血管, 却对 I 型IP₃R蛋白及 mRNA 的表达无影响, 提示肝素对IP₃R的抑制不是通过影响 I 型IP₃R的表达来起作用的。

总之, TNF- α 可增强肾脏 I 型IP₃R蛋白的表达, 且 I 型IP₃R mRNA水平也呈上调趋势, 提示 I 型IP₃R蛋白的增加极可能是在转录水平进行调节的。因此HRS患者血中高浓度TNF- α 上调了肾脏 I 型IP₃R的表达, 增加了肾脏对缩血管物质的敏感性, 细胞内Ca²⁺水平骤然增高, 使肾小球前小动脉平滑肌细胞与肾小球系膜细胞收缩, 导致肾血流减少及肾小球滤过面积减少, 肾小球滤过率降低, 引发HRS。

4 参考文献

- Liu H, Gaskari SA, Lee SS. Cardiac and vascular changes in cirrhosis: Pathogenic mechanisms World. *J Gastroenterol* 2006; 12: 837-842
- 王静艳, 刘沛. 肝肾综合征的发病机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2668-2670
- Takeuchi S, Goto T, Mikami K, Miura K, Ohshima S, Yoneyama K, Sato M, Shibuya T, Watanabe D, Kataoka E, Segawa D, Endo A, Sato W, Yoshino R, Watanabe S. Genipin prevents fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality through the suppression of TNF-alpha production. *Hepatology* 2005; 33: 298-305
- LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, Cockrell K, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor-alpha. *Hypertension* 2005; 46: 1022-1025
- Michikawa T, Hamanaka H, Otsu H, Yamamoto A, Miyawaki A, Furuichi T, Tashiro Y, Mikoshiba K. Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 9184-9189
- Dellis O, Dedos SG, Tovey SC, Taufiq-Ur-Rahman, Dubel SJ, Taylor CW. Ca²⁺ entry through plasma membrane IP3 receptors. *Science* 2006; 313: 229-233
- McGowan TA, Sharma K. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by transforming growth factor-beta: implications for vascular dysfunction in diabetes. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S99-S103
- Taft DR. The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. *Curr Drug Discov Technol* 2004; 1: 97-111
- Anand R, Harry D, Holt S, Milner P, Dashwood M, Goodier D, Jarmulowicz M, Moore K. Endothelin is an important determinant of renal function in a rat model of acute liver and renal failure. *Gut* 2002; 50: 111-117
- Zaza S, Bonny O, Liaudet L. Hepatorenal syndrome in patients with liver cirrhosis. *Nephrol Ther* 2005; 1: 174-182
- Zhu Z, Arendshorst WJ. Angiotensin II-receptor stimulation of cytosolic calcium concentration in cultured renal resistance arterioles. *Am J Physiol* 1996; 271: F1239-F1247
- Hamada K, Miyata T, Mayanagi K, Hirota J, Mikoshiba K. Two-state conformational changes in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulated by calcium. *J Biol Chem* 2002; 277: 21115-21118
- White C, McGeown JG. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors modulate Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ store content in vas deferens myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285: C195-C204
- Monkawa T, Hayashi M, Miyawaki A, Sugiyama T, Yamamoto-Hino M, Hasegawa M, Furuichi T, Mikoshiba K, Saruta T. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the rat kidney. *Kidney Int* 1998; 53: 296-301
- Kuo HT, Shin SJ, Kuo MC, Chen HC. Effects of specific endothelin-1 receptor antagonists on proliferation and fibronectin production of glomerular mesangial cells stimulated with Angiotensin II. *Kaohsiung J Med Sci* 2006; 22: 371-376
- Giardina JB, Green GM, Cockrell KL, Granger JP, Khalil RA. TNF-alpha enhances contraction and inhibits endothelial NO-cGMP relaxation in systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R130-R143
- Wen Y, Wang JY, Liu P. Tumor necrosis factor-alpha enhances the effect of endothelin on renal vasoconstriction in isolated perfused rat kidney. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 583-585
- 王静艳, 李智伟, 刘沛. TNF- α 对大鼠肾小球前小动脉平滑肌细胞Ca²⁺内流的影响. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 805-808
- Yao YM, Hu SJ, Huang YW, Yang CH, Sun J, Zhu ZH, Wu T. Effects of tumor necrosis factor alpha on expression of phospholamban and intracellular calcium in cardiomyocytes. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2005; 27: 767-771
- 王静艳, 孙景春, 吕飒, 刘沛. 肿瘤坏死因子- α 增强大鼠肾小球前小动脉平滑肌细胞内 I 型1,4,5-三磷酸肌醇受体表达. *中华内科学杂志* 2002; 41: 86-89
- Ahmed T, Syriste T, Mendelssohn R, Sorace D, Mansour E, Lansing M, Abraham WM, Robinson MJ. Heparin prevents antigen-induced airway hyperresponsiveness: interference with IP3-mediated mast cell degranulation? *J Appl Physiol* 1994; 76: 893-901

电编 李琪 编辑 王晓瑜

促结肠动力中药筛选及其机制

衣兰娟, 田琳, 梁宁霞, 魏睦新

衣兰娟, 田琳, 梁宁霞, 魏睦新, 南京医科大学第一附属医院
中医科 江苏省南京市 210029
衣兰娟, 2002年山东中医药大学学士, 南京医科大学硕士研究生在读, 住院医师, 主要从事胃肠动力方面研究。
江苏省“135”工程重点人才项目, No. RC2002049
通讯作者: 魏睦新, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院中医科. yilanjuanhj@163.com
电话: 025-83716602 传真: 025-83716602
收稿日期: 2006-07-04 接受日期: 2006-07-31

Selection of Chinese medicine with procontractile activity on colonic muscle and its mechanism

Lan-Juan Yi, Lin Tian, Ning-Xia Liang, Mu-Xin Wei

Lan-Juan Yi, Lin Tian, Ning-Xia Liang, Mu-Xin Wei,
Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Supported by the Key Talent Foundation of the “135” Project from the Government of Jiangsu Province, No. RC2002049
Correspondence to: Dr. Mu-Xin Wei, Department of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. yilanjuanhj@163.com
Received: 2006-07-04 Accepted: 2006-07-31

Abstract

AIM: To determine the procontractile activity of six Chinese herbal medicines, including Rhizoma Atractylodis Macrocephalae (RAM), Fructus Foeniculi (FF), Herba Taraxaci (HT), Semen Raphani (SR), Pericarpium Arecae (PA) and Rhizoma Curcumae (RC) on the colonic muscle strips isolated from guinea pigs, and study the possible mechanisms.

METHODS: The colonic longitudinal muscle strips of guinea pigs were prepared. Sodium chloride (9 g/L) and acetylcholine were used in the controls. The effects of six Chinese herbal medicines (RAM, FF, HT, SR, PA, RC) and the control medicine on the contraction of isolated colonic strips from guinea pigs were observed. The results were expressed with contraction amplitude (g), contraction time, and area under curves (AUC, g · s), and the maximal wave

height was analyzed 5 min within the addition of drugs.

RESULTS: The six Chinese herbal medicines (PA, SR, HT, FF, RC, and RAM, respectively) induced a significant elevation of colonic contractile response in comparison with normal saline did (contraction amplitude: 0.97 ± 0.40 , 0.95 ± 0.26 , 0.87 ± 0.49 , 0.85 ± 0.26 , 0.78 ± 0.39 , 0.60 ± 0.25 vs 0.03 ± 0.04 , $P < 0.01$; AUC: 1.40 ± 1.00 , 0.75 ± 0.79 , 0.62 ± 0.54 , 0.64 ± 0.59 , 0.40 ± 0.37 , 0.29 ± 0.15 vs 0.11 ± 0.06 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$), of which PA had the strongest effect, and the contraction time was 175 ± 238.07 s. Atropine and verapamil caused an evident suppression of colonic contraction induced by the Chinese medicines ($P < 0.01$).

CONCLUSION: All the six Chinese herbal medicines PA, SR, HT, FF, RC, and RAM have procontractile activity on colon smooth muscle, which is mediated by M receptor and depends on the presence of extracellular calcium.

Key Words: Chinese herbal medicine; Gastrointestinal motility; Smooth muscle; Colon; Guinea pig

Yi LJ, Tian L, Liang NX, Wei MX. Selection of Chinese medicine with procontractile activity on colonic muscle and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3093-3097

摘要

目的: 探讨中药生白术、小茴香、蒲公英、莱菔子、大腹皮、莪术的促结肠动力作用, 以筛选出具有开发价值的促结肠动力药物, 并探讨其初步机制。

方法: 制备豚鼠结肠纵肌, 以9 g/L氯化钠溶液和乙酰胆碱为对照, 观察6味中药对离体结肠肌条收缩活性的效应。实验结果以振幅(g)、时间(s)和曲线下面积(g·s)表示。分析对象为加药后5 min内出现的最大波形。

结果: 该6味中药对肌条均有不同程度的兴奋效应, 中药组(依次为大腹皮、莱菔子、蒲公

■背景资料

中医中药有着2000余年经验的积累, 近年来人们对中药的胃肠动力影响及其调节机制也作了一些探索, 并提出了“胃肠动力中药”这一概念。从中药中探索寻找胃肠活性中药及其先导化合物, 将是一条高效的研发渠道, 国外对此也很关注。

■相关报道

近来一些学者作了一些实验研究,取得了一定的成绩。如在离体器官水平朱氏等通过测定标记物葡萄糖蓝在大鼠胃内的残留量及小肠推进情况,研究了15味中药的促胃肠动力作用。为我们中药研究提供了参考。

公英、小茴香、莪术、生白术)与生理盐水组相比,振幅峰值(0.97 ± 0.40 , 0.95 ± 0.26 , 0.87 ± 0.49 , 0.85 ± 0.26 , 0.78 ± 0.39 , 0.60 ± 0.25 vs 0.03 ± 0.04 , $P < 0.01$)和曲线下面积(1.40 ± 1.00 , 0.75 ± 0.79 , 0.62 ± 0.54 , 0.64 ± 0.59 , 0.40 ± 0.37 , 0.29 ± 0.15 vs 0.11 ± 0.06 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)均有显著性差异,以大腹皮作用最强,时间长达 175 ± 238.07 s。在阿托品和维拉帕米分别预孵育情况下,加入各中药后与单独中药组的肌条收缩幅度增强的幅度明显减弱,两组间差异有显著性(中药+拮抗剂组 vs 中药组, $P < 0.05$)。

结论:该6味中药对结肠平滑肌均有不同程度的兴奋效应,引起的收缩效应可被M受体阻断剂阿托品部分阻断,通过细胞外 Ca^{2+} 内流介导。

关键词: 中药; 胃肠动力; 平滑肌; 结肠; 豚鼠

衣兰娟, 田琳, 梁宁霞, 魏睦新. 促结肠动力中药筛选及其机制. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3093-3097
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3093.asp>

0 引言

脾胃为气血生化之源,后天之本。消化系统疾病与脾胃运化、升降失常有密切关系。消化道常见症状如胃脘痛、腹胀、纳呆、嗝气等均是脾胃运化失常的结果。研究中药的胃肠动力作用对消化系疾病的治疗具有重要意义。生白术、蒲公英、小茴香、莱菔子、大腹皮、莪术对在体胃肠运动及离体胃活动的影响已有一定报道^[1-4]。关于这些中药对离体结肠活动作用的报道较少。本文初步探讨上述6味中药对大鼠离体结肠纵肌肌条收缩活动的影响,并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Hartley系豚鼠(上海斯莱克实验动物有限公司提供),体质量 240 ± 30 g, ♂。生白术、蒲公英、小茴香、莱菔子、大腹皮、莪术(购自江苏省药材公司,符合《中华人民共和国药典》1995年版的有关规定)。氯化乙酰胆碱(Sigma公司),制备成 1×10^{-2} mol/L的溶液备用。生白术、蒲公英、小茴香、莱菔子4味中药先用4倍左右的蒸馏水浸泡1 h,然后煎煮2次,分别为30 min和20 min,合并煎液,水浴浓缩成100%的药液(含生药1 kg/L),4000 r/min离心30 min,取上清液,4℃保存备用。取配制好的生白术、蒲

公英、小茴香、莱菔子各1 mL 10倍稀释3次,浓度为0.1-0.001 kg/L。微量多导离体器官水平浴槽及配套器材(日本国立生理学研究所),RM-6240型四导生理记录仪及配套软件(成都仪器厂),肌肉张力换能器(JZ101型,新航机电设备有限公司),HL-2B数显恒流泵(上海沪西分析仪器厂有限公司)。

1.2 方法 动物购进且适应性饲养1 wk后,每次取豚鼠1只,禁食不禁水24 h,颈动脉放血处死,开腹,迅速自肛门上2 cm处取长约15 cm结肠,轻柔洗净,剪成小段置于4℃ Krebs液中,通950 mL/L O_2 加50 mL/L CO_2 备用。沿肠系膜剪开结肠,取肠系膜对侧结肠纵肌肌条(7 mm×1 mm),浴槽中同时悬挂4根肌条,每根肌条一端以非弹性细丝固定于浴槽(容积为4 mL)中,另一端与张力换能器相连。以1 mL/min的流速持续灌流Krebs液,并通950 mL/L O_2 加50 mL/L CO_2 。施加500 mg预初张力,平衡60 min,以结肠自律性收缩不明显或轻微时为平衡标准。平衡后,滴加药物于浴槽中。加药顺序如下: 9 g/L氯化钠溶液(空白对照)、 1×10^{-2} mol/L氯化乙酰胆碱(ACh)、生白术、小茴香、蒲公英、莱菔子、大腹皮、莪术(以上药物均为100%)。每种药物每次均加入40 μL 且重复2-3次,取均数后作为实验数据。平衡至基础张力引发的收缩基本回到零位后滴加下一药物。依次加入浓度为0.001-1 kg/L 4个梯度的生白术、小茴香、蒲公英、莱菔子,每一浓度加入40 μL ,观察不同浓度对肌条的收缩效应。加入 1×10^{-2} mol/L ACh 40 μL 以标化肌条活力(即同一肌条其加药收缩占ACh引发的收缩百分比作为实验数据)。RM6240型生理记录仪实时记录。实验结果以振幅、时间和曲线下面积表示。分析对象为加药后5 min内出现的最大波形。

统计学处理 所有数据均经SPSS 12.0软件处理并以mean±SD表示,采用配对t检验作各组比较。以ACh的观察指标为100%分别标准化相应纵肌的观察指标作图。

2 结果

2.1 中药对平滑肌纵肌的作用比较 各味中药对肌条均有不同程度的兴奋作用(实时记录曲线见图1,图中纵坐标表示收缩振幅,用g表示,每一格表示1 g,横坐标表示收缩时间,用s表示,每一格表示50 s),与NS对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。其中以大腹皮作用最强,峰值为 0.97 ± 0.40 g,收缩时间最长,为 175 ± 238.07 s。其他药

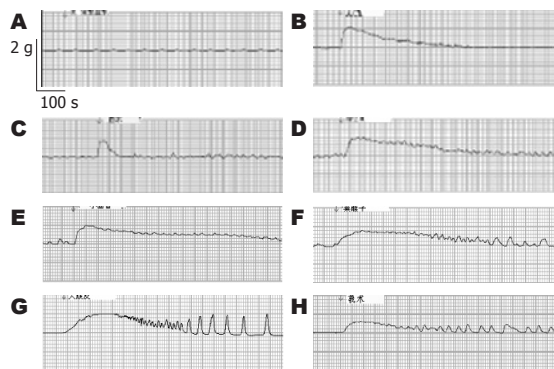


图1 各中药对结肠平滑肌收缩作用的实时描记曲线. A: NS; B: ACh; C: 生白术; D: 蒲公英; E: 小茴香; F: 莱菔子; G: 大腹皮; H: 莪术.

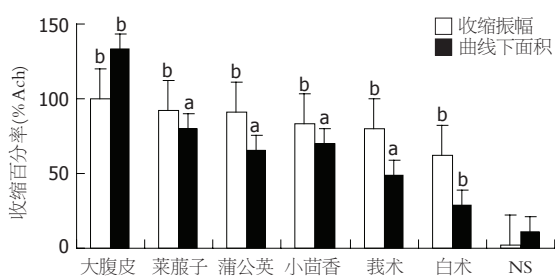


图2 不同中药对结肠纵肌收缩作用的影响(mean \pm SD, $n = 10$). ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs NS.

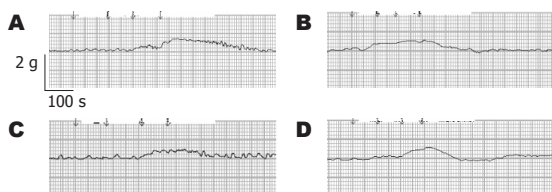


图3 中药的量效实时描记曲线. A: 莱菔子; B: 小茴香; C: 生白术; D: 蒲公英.

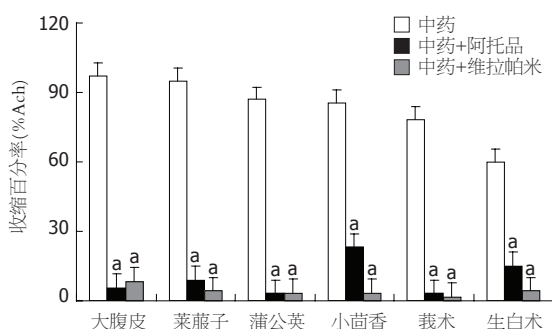


图4 不同阻断剂对中药增强纵肌收缩幅度的影响(mean \pm SD, $n = 6$). ^a $P < 0.05$ vs 中药组.

物对纵肌收缩效应的峰值由大到小依次为莱菔子、蒲公英、小茴香、莪术、生白术(表1, 图2). 莱菔子、小茴香、生白术、蒲公英的结肠平滑

表1 不同药物对纵肌的作用 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	峰值 (g)	收缩时间 (s)	曲线下面积 (g \cdot s)
大腹皮	0.97 \pm 0.40 ^b	175 \pm 238.07	1.40 \pm 1.00 ^b
莱菔子	0.95 \pm 0.26 ^b	162.91 \pm 91.69	0.75 \pm 0.79 ^a
蒲公英	0.87 \pm 0.49 ^b	74.75 \pm 31.12	0.62 \pm 0.54 ^a
小茴香	0.85 \pm 0.26 ^b	53.25 \pm 11.73	0.64 \pm 0.59 ^a
莪术	0.78 \pm 0.39 ^b	75.75 \pm 66.35	0.40 \pm 0.37 ^a
生白术	0.60 \pm 0.25 ^b	58.5 \pm 37.62	0.29 \pm 0.15 ^b
生理盐水	0.03 \pm 0.04	11.41 \pm 2.29	0.11 \pm 0.06

药物组 vs 空白对照组, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

肌收缩作用呈剂量依赖性的加强趋势(图3).

2.2 不同拮抗剂对收缩效应的影响 将 1×10^{-6} mol/L 阿托品和 1×10^{-6} mol/L 维拉帕米孵育肌条, 加入各中药后其收缩效应减弱, 与单独中药组相比, 两组间差异有显著性 ($P < 0.01$, 图4).

3 讨论

结肠是消化道的重要组成部分, 主要生理功能为吸收水分、某些电解质、短链脂肪酸和细菌的代谢产物, 贮存和排泄粪便. 结肠的精确运动形式主要表现为袋状往返运动、分节推进运动、多袋推进运动和蠕动等4种类型^[5]. 其运动的调控主要依赖于电活动在肠肌内的扩散, 肠内神经的反射, 交感、副交感神经的反射和激素调节. 当今许多疾病是由于结肠的动力紊乱引起或伴随有结肠动力的异常, 例如: 便秘、腹泻、肠易激综合征、结肠憩室症、溃疡性结肠炎等, 对结肠正常动力的研究将帮助我们了解多种结肠动力有关的结肠疾病, 并有助这些疾病的治疗. 在临床上常用的消化道动力药物中, 西沙必利由于对心脏和其他方面的毒副作用^[6-7], 使其应用受到限制, 传统中药可有效地治疗上腹胀满、纳差、嗝气等症状, 并且近些年的实验研究表明, 很多种类的中药如理气药、芳香化湿药、补益药、活血化瘀药等对胃肠动力具有不同程度的促进作用^[8]. 本研究着重于从传统药物中寻找有效的结肠动力药物, 有助于进一步指导临床, 并对其机制作初步探讨, 为深入发掘并开发具有我国自主知识产权的结肠动力中药打下基础. 从离体实验着手, 排除中枢神经、体液因素的影响, 观察各味中药对结肠收缩效应的影响.

本实验用 37°C 恒温、 950 mL/L O_2 加

■应用要点

本研究在方法学方面的研究成果, 可以广泛地运用于各种胃肠活性药物的研究, 以及其他平滑肌(如气管、胆囊、血管和子宫等)活性药物的研究. 除细胞学研究需要一定的条件外, 整体实验和平滑肌实验对实验室条件要求不高, 便于推广应用. 通过课题研究, 能够在胃肠活性中药先导化合物探索领域, 进行初步尝试, 构筑筛选研究的实验体系和实验平台, 为临床新药研发奠定基础.

在对古今中医医药文献记载的初步研究的基础上, 对槟榔、大腹皮、莱菔子、小茴香、生白术、蒲公英、莪术等相关中药胃肠动力作用进行药理活性的筛选, 并进行槟榔组分槟榔碱的胃肠活性研究, 研究结果为指导临床辨证论治用药提供了客观依据.

50 mL/L CO₂及Krebs液浸浴组织等方法模拟生态环境,记录到的离体肌条活动稳定可靠.以NS和ACh为对照,观察6味中药对豚鼠离体结肠平滑肌肌条的收缩活性的效应.结果表明,在6味中药的刺激下肌条均呈现兴奋性效应.其中以大腹皮的效应最强,峰值、作用时间、曲线下面积均超过标准对照品ACh,大肚皮兴奋肌条后,其兴奋作用维持时间较久,不易洗去.这种在一定范围内延长结肠收缩时间促进结肠收缩运动的方式,是一种缓解便秘较为温和的方式,具有重要临床意义.大肚皮属棕榈科植物槟榔的果皮部分,我们课题组曾对槟榔进行研究^[9],发现其收缩结肠的动力作用很强,故对大腹皮的进一步研究具有重要的临床意义.

消化道平滑肌上胆碱能受体均属M型,阿托品是最常用的M型受体阻断剂.上述6味中药对结肠的平滑肌的收缩效应可被阿托品阻断,提示各中药的作用部分由M受体介导.离子通道的信号传递也是细胞外信号调控胃肠道平滑肌细胞活动的一种重要途径,有赖于Ca²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻等多种离子的存在,其中Ca²⁺是肠道平滑肌的兴奋-收缩耦联者,当胞质内Ca²⁺浓度至一定水平时,即使没有膜电位变化,也可触发肠道平滑肌收缩. L型Ca²⁺通道是Ca²⁺进入结肠细胞的主要通道,应用调控离子通道类药物将是今后治疗胃肠动力类药的新方向^[10]. 现已明确, ACh是胃肠道最重要的神经递质之一,其可以与毒蕈碱的M₂型受体结合.副交感神经节后纤维释放ACh作用于平滑肌M受体后可开放质膜上L型Ca²⁺通道,产生内流致肌收缩^[11]. 加入Ca²⁺通道阻断剂维拉帕米后,6味中药对结肠的平滑肌的收缩效应明显减弱.

在以往报道中,具有促胃肠动力的中药绝大部分具有行气功能,但总体上难以寻找规律.我们在药物的选择上根据文献报道及药物不同的炮制方法会影响药效的发挥,在实验中选择生白术和炒莱菔子.古籍中记载治疗泄泻多用炒白术,治疗便秘以生白术居多.张印^{et al}^[12]报道,观察不同炮制品对小鼠小肠运动的影响,发现生白术水煎剂较炒白术有更明显的促进动物小肠运动的功能.丹溪云,“莱菔子治痰有冲墙倒壁之功,必取其生用耳……味辛能升,熟则能降,入肺生用,吐风痰散风寒,发疮疹,降则定喘嗽,调下痢后重止气痛.”李文惠^{et al}^[13]报道,莱菔子的不同制品均能使离体兔肠的收缩幅度增高,且临床常用炒制品,故在实验

中我们选取生白术和炒莱菔子.

关于实验中使用药物的最佳浓度,尚无统一的参考标准,我们根据临床用药的常用剂量进行折算,选择人体给药量的200倍作为最终灌流液的最高加药浓度,各实验药物出现剂量依赖性的收缩效应,拮抗剂的使用也呈现了明显的抑制效应,我们认为该方法可以作为离体器官的实验用药剂量参考,加以推广应用.实验中我们也对部分中药探讨最低效应浓度,发现最低有效剂量为最高活性加药浓度的1/1000.

本实验所用浴槽为多导微量离体器官浴槽,由日本国立生理研究所开发.在国内,由本实验室魏睦新教授率先引进并加以改进.此装置可将4根微小肌条置于同一浴槽中,实现了多标本药效作用的同步观察^[5],4根肌条可相互参照,大大提高了实验数据的准确性和可靠性及实验效率.浴槽容积仅4 mL,可在很大程度上节约昂贵的实验试剂,并且实现了试剂的均匀溶解,均匀作用.此外,由于标本水平配置,便于加装标本.该系统具有高效、操作简便、节约试剂等优点.

中药种类繁多,我们在实验中探讨了上述6种中药对结肠纵肌运动的影响,为临床用药提供了一定的理论依据,同时本实验观察了几种受体拮抗剂对上述6味中药作用的影响,为今后进一步研究他们的作用机制提供了一定的实验依据.另外,中药成分复杂,他对结肠收缩活动的兴奋作用与哪种成分有关,尚需进一步研究.中药作用程度、作用的肌条类型以及作用于结肠的部位均有一定的差异,从而决定其对结肠运动的作用非常复杂,其作用的有效成分、作用的有效浓度、作用靶点、作用机制等尚需要进一步的深入研究.

4 参考文献

- 1 朱金照,冷恩仁,陈东风,史洪涛,桂先勇. 15味中药促胃肠动力作用的筛选研究. 第三军医大学学报 2000; 22: 436-438
- 2 朱金照,冷恩仁,周文. 大肚皮促胃肠动力作用的机制研究. 解放军医学杂志 2000; 25: 133-134
- 3 王君,孔彦,王辉. 莱菔子对豚鼠离体回肠的动力作用. 大连大学学报 2000; 21: 80-81
- 4 魏兰福,邹百仓,魏睦新. 莪术对大鼠胃动力影响的实验研究. 湖南中医杂志 2003; 19: 58-59
- 5 Wei MX, Naruse S, Nokihara K, Ozaki T, Ando E, Wray V. A study of structure-activity relationship of PACAP. *China Natl J New Gastroenterol* 1996; 2: 131-133
- 6 Benatar A, Feenstra A, Decraene T, Vandenplas Y. Effects of cisapride on corrected QT interval, heart rate, and rhythm in infants undergoing polysomnography. *Pediatrics* 2000; 106: E85

- 7 Enger C, Cali C, Walker AM. Serious ventricular arrhythmias among users of cisapride and other QT-prolonging agents in the United States. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2002; 11: 477-486
- 8 沙建飞. 胃动力中药初探. *中国医药学报* 1993; 8: 5-7
- 9 司春峰, 魏睦新. 中药促结肠动力作用的筛选研究. *中国中西医结合消化杂志* 2003; 11: 346-348
- 10 李彩丽, 徐三平, 侯晓华. 匹维溴铵对人离体横结肠肌条的作用. *胃肠病学和肝病学杂志* 2005; 14: 137-140
- 11 周吕, 柯美云. *胃肠动力学基础与临床*. 北京: 科学出版社, 1999: 216
- 12 张印, 窦永起. 白术不同炮制品对小鼠小肠运动的影响. *国医论坛* 2005; 20: 13-14
- 13 李文惠, 黄维良, 朱训富, 胡昌江, 刘龙成, 谭世德, 叶功伟, 魏宏. 莱菔子不同炮制品对动物胃和小肠运动的影响. *成都中医学院学报* 1985; 2: 47-50

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2007 中华肝胆胰脾外科(国际)学术论坛征文通知

本刊讯 “2007中华肝胆胰脾外科(国际)论坛”应澳门特区外科学会的盛情邀请于2007-04-13/16在澳门举办, 现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1)肝癌诊断及外科与综合治疗: 新诊断技术-可切除与否的界定-综合治疗与序贯化思路-对复发转移的研究进展-微创技术实际应用的可能性; (2)医源性胆管损伤的预防-胆管下端功能状态对修复及重建的影响-肝胆管结石外科治疗的新经验-肝门胆管癌根治性切除的实施与效果; (3)胰腺炎-重症急性、出血坏死性、“凶险性”-治疗中早期复苏的策略与实施-相关并发症的预防和处理; (4)胰腺癌-早期诊断的思路与进展-根治术在当前的含义和尺度-术前减黄与并发症的处理; (5)脾功能研究进展-保脾和切脾含义和抉择-PH时单纯切脾的指征与价值; (6)肝移植-应用指征的决策-供肝切取与保存-技术性与非技术性并发症-再移植-远期存活的努力.

2 投稿要求及截稿日期

来稿请寄未曾公开发表过4000字以内全文及800字论文摘要各1份(无摘要不入汇编)并请在信封上注明“会议征文”. 截稿日期: 2007-01-31. 正式代表发论文证书并授一级继续教育学分. 来稿请寄: 《中华肝胆外科杂志》编辑部.

3 联系方式

地址: 北京市复兴路28号; 邮编: 100853; 电话: 010-66936223; 电传: 010-68177009; E-mail: zhgdwkzz@vip.163.com; 详情请登陆网站: www.zhgdwkzz.net.

实验性急性肝内胆胆汁淤积幼年大鼠胃肠消化间期移行性肌电复合波的变化

胡玉莲, 王晓东, 黄志华

■背景资料

近年来, 胃肠动力学研究是消化系统的一个新的研究热点。消化间期移行性复合运动是胃肠消化间期的一种特征性的运动形式。由于他在消化间期可周期性的出现, 从而被用作反映胃肠运动状况的特异指标。消化间期MMC的启动及调节包括神经及体液等多种因素。有研究认为, 胆汁在胃肠MMC的启动及调节中起重要的作用。有关消化间期胆汁排泌进入十二指肠对消化间期MMC的启动及调节作用, 人们进行了大量的研究, 但由于动物的种类不同、实验方法不同等各种原因, 目前仍没有完全统一的结论。

胡玉莲, 王晓东, 黄志华, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科 湖北省武汉市 430030

胡玉莲, 在读博士, 主要从事儿科消化系统疾病研究。

通讯作者: 黄志华, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科。zhhuang@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-88067030

收稿日期: 2006-07-23 接受日期: 2006-09-28

Changes of gastrointestinal interdigestive migrating myoelectric complex in rat intrahepatic cholestasis induced by alpha-naphthyl-isothiocyanate

Yu-Lian Hu, Xiao-Dong Wang, Zhi-Hua Huang

Yu-Lian Hu, Xiao-Dong Wang, Zhi-Hua Huang, Department of Pediatrics, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Zhi-Hua Huang, Department of Pediatrics, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zhhuang@tjh.tjmu.edu.cn

Received: 2006-07-23 Accepted: 2006-09-28

Abstract

AIM: To investigate the changes of gastrointestinal interdigestive migrating myoelectric complex (MMC) in the weaned rat models of acute intrahepatic cholestasis induced by alpha-naphthyl-isothiocyanate (ANIT).

METHODS: A total of 56 weaned Sprague Dawley rats were randomly divided into two groups: control group ($n = 16$) and toxication group ($n = 40$). Three pairs of bipolar silver electrodes were chronically implanted in the antrum, duodenum and jejunum of 8 rats from each group in random. Sham operation was performed in the other rats of both groups. Seven to ten days after the operation, MMC was recorded in all the rats with implanted electrodes. Then, all of the rats in toxication group received a single intragastric administration of ANIT (200 mg/kg) in order to induce acute intrahepatic cholestasis. The gastro-

intestinal MMC was recorded in conscious and fasting status 48, 96, 144, 192 h after ANIT was given. The levels of biliary flow, total bilirubin (TB) and alanine aminotransferase (ALT) were recorded at the same time.

RESULTS: Forty-eight hours after ANIT was given, the biliary flow of rats in toxication group was almost ceased completely while the levels of ALT and TB were increased remarkably. Then, they were all improved gradually till the 192th hour. A typical MMC pattern was seen in all the normal conscious and fasting rats, and disappeared temporarily after ANIT was given. One hundred and forty-four hours later, the MMC pattern began to restore gradually and recovered at the 192th hour. However, the prolonged cycle duration of MMC (911.67 ± 140.47 s vs 682.87 ± 77.39 s, $P < 0.05$) was observed in the toxication group at the 192th hour and characterized by an increased duration of phase II-like activity (414.12 ± 69.21 s vs 150.28 ± 35.45 s, $P < 0.05$) and decreased duration of phase III activity (121.21 ± 27.38 s vs 170.27 ± 38.98 s, $P < 0.05$).

CONCLUSION: MMC disappearance followed by a prolonged MMC is the pattern of MMC changes in the weaned rats with ANIT-induced intrahepatic cholestasis, and this may be related with the decrease of bile flow during the interdigestive periods.

Key Words: Intrahepatic cholestasis; Interdigestive period; Migrating myoelectric complex; Bile flow

Hu YL, Wang XD, Huang ZH. Changes of gastrointestinal interdigestive migrating myoelectric complex in rat intrahepatic cholestasis induced by alpha-naphthyl-isothiocyanate. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3098-3102

摘要

目的: 探讨异硫氰酸苯酯(ANIT)所致刚断乳大鼠急性肝内胆胆汁淤积胃肠消化间期移行性肌电复合波(MMC)的变化。

方法: 56只刚断乳SD大鼠被随机分为正常对照组($n = 16$)、中毒组($n = 40$)。两组分别随机取8只在胃窦、十二指肠、空肠分别慢性埋置三对银丝电极;其余大鼠同时行假手术。术后7-10 d,埋置电极组大鼠均在清醒、空腹、自由活动状态下记录胃肠道MMC。中毒组按200 mg/kg一次性灌服ANIT诱发大鼠急性肝内胆胆汁淤积病变,观察灌服ANIT后中毒组在48, 96, 144, 192 h胆汁流量、血中TB和ALT值及胃肠MMC的变化。

结果: 中毒组灌服ANIT后, 48 h时胆汁流量中断, 血清TB和ALT明显升高; 48 h后其胆汁流量逐渐增加, 血清TB和ALT逐渐下降, 于192 h基本恢复。在ANIT灌胃前, 埋置电极的所有大鼠在清醒、禁食状态下均记录到典型的MMC节律性电活动, 正常对照组与中毒组之间差异无显著性意义; 中毒组灌服ANIT后, MMC节律完全消失, 代之以II期样节律紊乱波; 144 h后, 中毒组MMC节律运动开始恢复; 192 h时中毒组MMC均为节律运动, 但中毒组MMC持续时间(911.67 ± 140.47 s)较正常对照组(682.87 ± 77.39 s)明显延长, 其中主要是II期持续时间延长(414.12 ± 69.21 vs 150.28 ± 35.45 s), 而III期持续时间略缩短(121.21 ± 27.38 s vs 170.27 ± 38.98 s), 差异有显著意义($P < 0.05$)。

结论: 急性肝内胆胆汁淤积时胃肠MMC表现MMC节律短暂消失或MMC周期延长; 其部分原因可能与消化间期胆汁流量减少有关。

关键词: 肝内胆胆汁淤积; 消化间期; 移行性肌电复合波; 胆汁流量

胡玉莲, 王晓东, 黄志华. 实验性急性肝内胆胆汁淤积幼年大鼠胃肠消化间期移行性肌电复合波的变化. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3098-3102

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3098.asp>

0 引言

胃肠消化间期运动表现为一种周期性、时相性、静息与收缩循环往复的运动, 称为消化间期移行性复合运动^[1]。以电活动为指标研究胃肠消化间期运动时, 将这种周期性变化称为消化间期移行性肌电复合波(migrating myoelectric complex, MMC)。近年来, 有关胆道阻塞时胃肠MMC变化的报道日益增多^[2-3], 而婴儿期急性肝内胆胆汁淤积时胃肠MMC的变化尚未见报道。我们以刚断乳的SD大鼠为对象, 在大鼠胃窦、

十二指肠、空肠慢性埋置电极后7-10 d, 一次性给予异硫氰酸萘酯(ANIT)诱导大鼠急性肝内胆胆汁淤积模型, 观察急性胆汁淤积时胃肠道MMC、胆汁流量的变化, 并初步探讨胃肠MMC的变化与胆汁淤积的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 健康刚断乳的SD大鼠(体质量100-120 g)56只, 雌雄各半, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。大鼠一天两次进食, 自由饮水。所有鼠实验前均适应性喂养3 d。ANIT购自美国Sigma公司, 临用前用麻油按4 g/L的浓度配制; 聚四氟乙烯薄膜包裹的AF-250A特种导线, 购自上海信息产业部电子第23研究所; 多导生理记录仪(RM-6240), 购自中国成都仪器厂。

1.2 方法 56只SD大鼠被随机分为正常对照组(16只)、中毒组(40只)。各组分别随机取8只在大鼠胃窦、十二指肠、空肠分别慢性埋置3对银丝电极;其余大鼠同时行假手术。电极的埋置方法如下: 将导线剪成约每根25 cm长, 每根导线距末端1 cm处小心的去除约1 mm长度的聚四氟乙烯外膜, 裸露出的银丝作为电极使用。实验前晚导线用0.1 g/L新洁尔灭浸泡过夜。大鼠实验前禁食12 h, 用氯胺酮(75 mg/kg, ip)麻醉后, 常规开腹, 以24 G的针头作套针正切的穿过肠壁浆肌层, 分别使每根导线的裸露段银丝停在胃肠肌层里作为记录电极。将导线用丝线扎紧, 防止电极移动脱落。每对电极相距约2 mm, 分别位于大鼠的胃窦(距幽门近端0.5 cm)、十二指肠(距幽门1.0 cm)、空肠(距幽门20 cm), 其连线与空腔脏器长轴垂直。在肩胛间区及右上腹之间用手术钳做皮下隧道, 钳夹包有6根导线的硅胶管(内径0.4 cm)通过皮下隧道。术中用生理盐水保持脏器湿润, 关腹前向腹腔内注入3 mL生理盐水以补充术中所丧失的液体量, 用1号丝线逐层关闭腹壁。术中严格遵循无菌操作。术后大鼠置37℃温室内2-4 h后将其分笼单独饲养。假手术组大鼠术前禁食12 h, 用氯胺酮(75 mg/kg, ip)麻醉后, 常规开腹, 翻动胃肠, 暴露腹腔约半小时后, 向腹腔内注入3 mL生理盐水以补充术中所丧失的液体量, 用1号丝线逐层关闭腹壁。术中严格遵循无菌操作。术后按手术组同样条件饲养。

术后7-10 d, 埋置电极大鼠均在清醒、空腹、自由活动状态下记录MMC。每次进行肌电活动记录前均禁食16-18 h, 置大鼠于一小笼内, 可自由活动, 在清醒状态下进行记录, 每只大鼠

■创新盘点

本文以幼年刚断乳的大鼠为研究对象, 以期初步了解婴儿期急性肝内胆胆汁淤积时胃肠MMC的变化, 这在国内目前尚未见报道。同时, 本篇文章利用ANIT在动物体内形成胆汁淤积具有时相性, 先引起胆流中断, 后胆流逐渐恢复的特点, 在不同胆汁流量的情况下观察了胆汁对胃肠MMC的影响。

■应用要点

本文以刚断奶的大鼠为研究对象,初步探讨了婴儿胆汁淤积时胃肠MMC的变化及部分可能的机制,为临床干预婴儿肝内胆汁淤积时存在的胃肠功能的改变有一定的指导意义。

表 1 对照组、中毒组平均胆汁引流量和血清TB, ALT平均浓度的变化 ($n=8$, mean \pm SD)

分组	n	胆汁流量(mL/h)	TB (μ mol/L)	ALT (nkat/L)
对照组	48 h	8 1.56 \pm 0.27	0.69 \pm 0.41	683.47 \pm 100.02
		8 0 ^b	113.00 \pm 12.82 ^b	26722.01 \pm 7701.54 ^b
实验组	96 h	8 0.34 \pm 0.11 ^b	73.16 \pm 9.79 ^b	14402.88 \pm 2017.07 ^b
	144 h	8 0.71 \pm 0.16 ^b	12.36 \pm 3.84 ^b	4367.54 \pm 1183.57 ^a
	192 h	8 1.19 \pm 0.27 ^b	7.21 \pm 3.82	1316.93 \pm 300.06

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs对照组。

每次记录1 h以上,期间至少记录到2-3个MMC。采用计算机控制的多道生理记录仪记录胃肠肌电活动。参数设置为:采样频率1 kHz,时间常数0.02 s,滤波频率100 Hz,信号幅度以 μ V记。然后,按200 mg/kg一次性给中毒组大鼠灌服ANIT来诱发大鼠急性肝内胆汁淤积病变。ANIT按4 g/L的浓度溶于麻油,正常对照组同时给予等量的麻油灌胃。于ANIT灌胃后48, 96, 144和192 h记录中毒组及正常对照组埋置电极大鼠胃肠MMC,并观察其变化。正常对照假手术组(8只)在ANIT灌胃后48 h,中毒组假手术大鼠在48, 96, 144和192 h各时间点(每一时间点8只为一亚组)、经水合氯醛(250 mg/kg, ip)麻醉后,胆总管插管引流胆汁并经股静脉采血1 mL,置少量肝素钠抗凝试管内,3000 r/min分离血浆采血,送检谷丙转氨酶(ALT)及总胆红素(TB)。所有假手术组大鼠在相应的时间点引流胆汁、采血后处死。

统计学处理 观察肝内胆汁淤积前后MMC变化、记录MMC周期恢复时间并在ANIT造模后192 h测量胃窦、十二指肠、空肠的MMC周期持续时间及I、II、III相的时程、III相的幅度等参数。数值以mean \pm SD表示。分析采用SPSS 12.0软件包进行显著性检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

喂养ANIT后的实验组大鼠均不同程度的表现为精神萎靡、毛发零乱失去光泽、活动量减少、食欲减退、尿色变黄等变化;对照组无明显变化。

2.1 胆汁引流量及ALT, TB的变化 正常大鼠胆汁引流量为1.56 \pm 0.27 mL/h; ANIT灌胃后48 h中毒组胆汁引流量为0, 48 h后逐渐恢复。ANIT灌胃后ALT, TB逐渐上升,于48 h达高峰,其后逐渐恢复,在192 h时基本恢复正常(表1)。

2.2 空腹大鼠的正常胃肠肌电活动 胃肠典型的

MMC可人为地划分为四相:I相为静止相,没有或仅有极少的峰电活动;II相有间歇的、不规则的峰电活动;III相有规律的、密集的、高波幅的峰电爆发;IV相峰电频率及波幅逐渐降低至I相水平。ANIT灌胃前,埋置了电极的所有大鼠在清醒、空腹、自由活动状态下,在胃窦、十二指肠、空肠均可清楚的记录到比较典型的MMC胃肠肌电活动(图1A),其MMC周期持续时间(682.87 \pm 77.39 s)、I, II, III, IV相的时程(分别为313.36 \pm 63.10 s, 150.28 \pm 35.45 s, 170.27 \pm 38.98 s, 50.62 \pm 17.68 s)、III相最大波幅(196.67 \pm 19.94 μ V)。

2.3 中毒组大鼠胃肠肌电活动的变化 ANIT灌胃后胃肠肌电活动紊乱,表现为MMC节律完全消失,代之以II相样节律紊乱波(图1B),持续一段时间后,MMC节律逐渐恢复;192 h时中毒组所有大鼠MMC节律恢复后,其周期与对照组比较,提示MMC周期延长,主要表现为II相明显延长,而III相持续时间略缩短(表2,图1C)。

3 讨论

由于ANIT诱发肝损伤的生物化学和病理改变与人肝内胆汁淤积性肝病相似,所以被广泛用于诱导肝内胆汁淤积模型^[4]。ANIT进入大鼠体内后,首先在肝脏内与谷胱甘肽结合并失去毒性。随后,ANIT-谷胱甘肽复合物被分泌到胆汁中。由于他们不太稳定,很快就发生分离。胆汁中出现高浓度的ANIT,直接损伤胆管上皮细胞。同时肝细胞和胆道上皮细胞间的紧密连接的通透性增加,一些具有渗透活性的物质从胆汁反流入血浆,引起肝细胞的损害。Kosser *et al*^[4]发现,ANIT引起的胆汁淤积有时相性变化。给予ANIT16-24 h后,表现为胆流几乎中断、血浆中胆汁成分增加,48 h时血浆中总胆红素、谷丙转氨酶达峰值,然后逐步恢复。我们的结果与此一致。

表 2 正常对照组、中毒组各部位MMC周期、II相和III相持续时间(秒, s)以及III相的波幅(微伏, μV)变化(mean \pm SD)

参数	胃窦		十二指肠		空肠	
	正常对照组	中毒组	正常对照组	中毒组	正常对照组	中毒组
MMC周期持续时间(s)	683.25 \pm 79.88	891.38 \pm 129.67 ^a	686.38 \pm 82.19	917.63 \pm 165.94 ^a	686.38 \pm 82.19	917.63 \pm 165.94 ^a
II期持续时间(s)	150.47 \pm 37.09	404.50 \pm 69.61 ^a	156.75 \pm 40.53	410.88 \pm 80.48 ^a	156.75 \pm 40.53	410.88 \pm 80.48 ^a
III期持续时间(s)	179.81 \pm 53.02	113.75 \pm 27.75 ^a	162.75 \pm 31.24	122.13 \pm 29.15 ^a	162.75 \pm 31.24	122.13 \pm 29.15 ^a
III期波幅(μV)	195.87 \pm 23.56	179.63 \pm 23.56	202.65 \pm 21.99	186.91 \pm 15.91	202.65 \pm 21.99	186.91 \pm 15.91

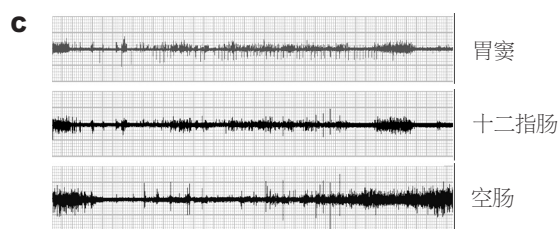
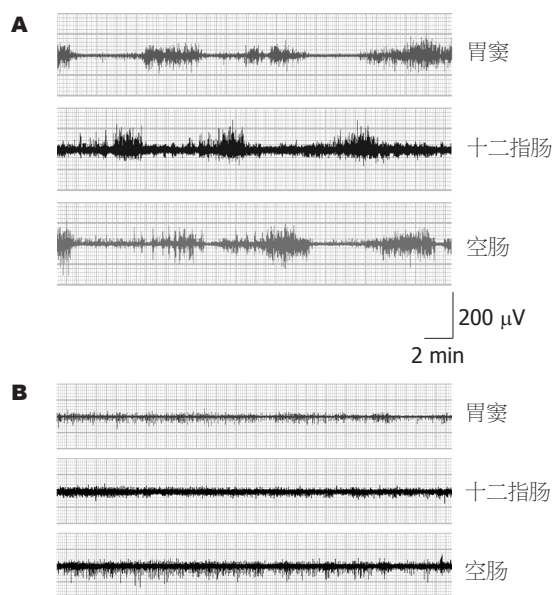
^a $P < 0.05$ vs 中毒组与正常对照组.

图 1 MMC图. A: 正常MMC图, 可见典型MMC节律, 并向离口方向传递(右侧标尺使用于本文中所有图); B: 中毒组ANIT灌胃后48 h, MMC节律消失, 表现为持续、低波幅的II期样运动; C: ANIT灌胃后192 h, MMC节律恢复, MMC周期延长, 以II期延长为主, III期略缩短.

同时, 我们的实验结果还提示: 在急性肝内胆胆汁淤积的大鼠, 他们的胃肠MMC发生了明显的改变: 给予ANIT后48 h, 胃肠MMC节律性运动完全消失, 代之以持续、不规则、低波幅的II期样运动. 持续4-6 d后, MMC节律性运动逐渐恢复, 但MMC周期较正常对照组明显延长, 其中主要为II期延长的结果.

自从1969年Szurszewski第一次详细的描述了狗的MMC以来, 人们对他进行了深入的研究^[1]. 但有关其产生和调节的机制目前仍不是很清楚. 近年的研究表明在消化间期, 胆汁排泌进入十二指肠及胆汁酸的肠肝循环在胃窦及十二指肠MMC III期的产生及调节中起重要作用. Ozeki *et al*^[5]完全外引流狗胆汁后, 发现狗十二指肠无MMC发生, 3天后空肠出现MMC并向远端传导; 恢复正常的胆汁流, 或者在引流胆汁情况下, 十二指肠或空肠内灌注狗自己或其他狗的胆汁, 十二指肠出现规律的MMC. 切除了十二指肠的狗,

其胃窦MMC完全消失, 代之以不规则、稀疏的II相样波^[6], 直接证明胆汁及其肝肠循环为启动MMC所必需的. Kajiyama *et al*^[7]完全外引流狗胆汁后胃肠MMC节律运动消失, 而外周静脉及门静脉输入熊去氧胆酸均能使胃肠MMC节律恢复. 他们推测在狗门静脉或肝胆道内, 存在感知一定胆酸浓度阈的感受器, 十二指肠的胆汁被小肠输送到回肠吸收. 吸收后的胆酸作用于这种感受器, 激发胃肠正常周期运动. Fang *et al*^[3]结扎大鼠胆总管造成胆汁阻塞后, 早期胃窦、十二指肠MMC节律消失, 代之以空肠起源的MMC; 4 d后十二指肠MMC节律逐渐恢复, 但MMC周期延长, 以II相延长为主. 在人类, 也有类似的发现: 十二指肠引流可使MMC III相减少, MMC周期延长^[8-9]; 用消胆胺人工清除健康人十二指肠胆酸盐后, 发现MMC周期及II相明显延长^[10]. 我们的实验证明, ANIT(200 mg/kg)灌胃后48 h时胆流中断, 胆汁引流量为0; 此时胃肠MMC节律消失, 这类似于胆汁完全外引流的情况; 随着肝脏损害的逐步恢复, 胆汁引流量逐步增加, 96 h时平均为0.34 \pm 0.11 mL/h, 排入肠腔的胆汁仍少, 此时MMC节律未恢复; 144 h时增加为平均0.71 \pm 0.16 mL/h, 此时部分大鼠MMC

■名词解释

消化间期移行性肌电复合波(MMC): 是消化间期胃肠平滑肌存在的周期性肌电活动, 他分为四期. I期: 带锋电位的慢波少于5%; II期: 带锋电位的慢波达5%-95%; III期: 带锋电位的频率和振幅明显增加, 几乎每个慢波都带锋电位, 收缩运动强烈; IV期: 带锋电位的数目突然减少, 是由第三期转入新周期的移行阶段. 他与消化间期移行性复合运动完全吻合, 只有在消化间期移行性复合电周期中出现峰电活动时才出现胃肠的机械收缩, 而且胃肠机械收缩的力量、时间与峰电位的频率、数量、振幅有关.

■同行评价

文章探讨急性肝内胆汁淤积胃肠消化间期移行性肌电复合波的变化,以此证明肝内胆汁淤积对胃肠动力的影响,提供了有意义的信息,具有重要的意义及价值,内容较新,符合伦理学的要求。

节律随着胆汁流量的增加,开始恢复;在中毒后192 h,胆汁引流量为 1.19 ± 0.27 mL/h,已明显恢复,此时所有大鼠可见MMC节律,但MMC周期延长,以II相延长为主,III相略缩短。由于大鼠胆汁淤积时胃肠MMC的改变与胆汁流量的变化在时间上的一致性,因此我们推测:急性肝内胆汁淤积时,肝细胞、毛细胆管受损,胆流明显减少或中断,消化间期进入十二指肠的胆汁过少,从而到达回肠胆汁相应的减少,致胆汁酸重吸收减少,不能激活相应的胆酸盐受体,从而不能引起MMC III相有关。MMC III相消失后表现为II相样运动的原因与MMC各相的产生机制有关^[11]。在MMC I, II, III, IV相中,II相活动是胃肠消化间期的背景活动。在神经、激素、肠腔内化学物质等的刺激下,胃肠道产生MMC III相活动,他通过小肠一小肠反射在一定距离的胃肠近端产生抑制作用,引起MMC I相活动,而MMC IV相可能是抑制作用逐渐解除的结果。故当十二指肠内胆汁减少时,胃肠道由于不能产生III相活动,从而不能引起I、IV相活动,表现出II相样活动。

Ozeki *et al*^[15]研究结果表明,无论是完全外引流胆汁,还是结扎胆总管,其胃肠MMC节律消失3-4 d后,空肠首先出现MMC节律运动,其后十二指肠MMC可逐渐恢复。有学者认为,胃窦MMC是由胆汁排泌入十二指肠,刺激胃动素释放引起的;而十二指肠MMC的起源有多种机制^[12]。空肠MMC在胃十二指肠节律消失后可代偿性出现^[3]。本实验结果显示,胃肠MMC节律消失时间持续较长,而且胃窦、十二指肠、空肠节律同时恢复。我们推测,尚有其他机制参与了急性肝内胆汁淤积时胃肠MMC的改变。有研究认为TNF- α , IL-1 β 等前炎症因子可抑制胃肠MMC活动^[13-14];结合我们前期的实验结果,ANIT诱导的急性肝内胆汁淤积在48 h, IL-6与TNF- α 等前炎症因子含量就明显升高^[15],故我们推测,急性肝内胆汁淤积时由于前炎症因子的增加,进一步抑制了胃肠MMC。

总之,急性肝内胆汁淤积时,胃肠MMC节律消失或周期延长。其原因可能与消化间期排泌入胃肠的胆汁流量减少及TNF- α , IL-1 β 等前炎症因子增多有关,但尚需进一步的深入研究。

4 参考文献

- 1 Szurszewski JH. A migrating electric complex of canine small intestine. *Am J Physiol* 1969; 217:

1757-1763

- 2 Nieuwenhuijs VB, van Dijk JE, Gooszen HG, Akkermans LM. Obstructive jaundice, bacterial translocation and interdigestive small-bowel motility in rats. *Digestion* 2000; 62: 255-261
- 3 Fang P, Dong L, Zhang WJ, Luo JY. Relationship between entero-hepatic bile acid circulation and interdigestive migrating myoelectrical activity in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5377-5380
- 4 Kossor DC, Meunier PC, Handler JA, Sozio RS, Goldstein RS. Temporal relationship of changes in hepatobiliary function and morphology in rats following alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT) administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 119: 108-114
- 5 Ozeki K, Sarna SK, Condon RE, Chey WY, Koch TR. Enterohepatic circulation is essential for regular cycling of duodenal migrating motor complexes in dogs. *Gastroenterology* 1992; 103: 759-767
- 6 Suzuki H, Mochiki E, Haga N, Shimura T, Itoh Z, Kuwano H. Effect of duodenectomy on gastric motility and gastric hormones in dogs. *Ann Surg* 2001; 233: 353-359
- 7 Kajiyama Y, Irie M, Enjoji A, Ozeki K, Ura K, Kanematsu T. Role of bile acids in duodenal migrating motor complexes in dogs. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2278-2283
- 8 Nilsson I, Svenberg T, Hedenborg G, Lordal M, Hellstrom PM. Inhibition of the migrating motor complex by duodenal drainage in man. *Neurogastroenterol Motil* 1995; 7: 31-37
- 9 Nilsson I, Svenberg T, Hellstrom PM. Duodenal drainage reduces cycling frequency of the migrating motor complex in humans. *Acta Physiol Scand* 1993; 149: 525-526
- 10 Portincasa P, Peeters TL, van Berge-Henegouwen GP, van Solinge WW, Palasciano G, van Erpecum KJ. Acute intraduodenal bile salt depletion leads to strong gallbladder contraction, altered antroduodenal motility and high plasma motilin levels in humans. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 421-430
- 11 Lang IM, Sarna SK, Condon RE. Generation of phases I and II of migrating myoelectric complex in the dog. *Am J Physiol* 1986; 251: G201-G207
- 12 Stolk MF, van Erpecum KJ, Smout AJ, Akkermans LM, Jansen JB, Lamers CB, Peeters TL, vanBerge-Henegouwen GP. Motor cycles with phase III in antrum are associated with high motilin levels and prolonged gallbladder emptying. *Am J Physiol* 1993; 264: G596-G600
- 13 Huang ZH, Huang X, Li Y. Changes and significance of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 level in plasma and bile during the formation of acute intrahepatic cholestasis in New Zealand white rabbits. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2003; 11: 313
- 14 Guerrero-Lindner E, Castro M, Munoz JM. Central tumour necrosis factor-alpha mediates the early gastrointestinal motor disturbances induced by lipopolysaccharide in sheep. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 307-316
- 15 Fargeas MJ, Fioramonti J, Bueno L. Central action of interleukin 1 β on intestinal motility in rats: mediation by two mechanisms. *Gastroenterology* 1993; 104: 377-383

电编 李琪 编辑 张焕兰

胃癌组织中5-脂氧合酶的表达及其与磷酸化Akt的相关性

李勇, 李建英, 王小众, 邹来玉, 陈治新

李勇, 李建英, 王小众, 邹来玉, 陈治新, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001
李勇, 福建医科大学附属协和医院2004级硕士研究生.
福建省科技人才创新基金资助项目, No. 2002J061
通讯作者: 李建英, 350001, 福建省福州市新权路29号, 福建医科大学附属协和医院消化内科. lyli99@hotmail.com
电话: 0591-83357896-8482
收稿日期: 2006-07-08 接受日期: 2006-09-20

Expression of 5-lipoxygenase in gastric cancer and its correlation with phosphorylated Akt

Yong Li, Jian-Ying Li, Xiao-Zhong Wang, Lai-Yu Zou, Zhi-Xin Chen

Yong Li, Jian-Ying Li, Xiao-Zhong Wang, Lai-Yu Zou, Zhi-Xin Chen, Department of Gastroenterology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by the Innovation Foundation for the Science and Technology Talents of Fujian Province, No. 2002J061
Correspondence to: Dr. Jian-Ying Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. jyli99@hotmail.com

Received: 2006-07-08 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To investigate the expression of 5-lipoxygenase (5-LOX) in human gastric cancer and its effect on phosphorylated Akt (p-Akt).

METHODS: Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of 5-LOX mRNA, and Western blot was conducted to evaluate 5-LOX and p-Akt protein in 30 pairs of fresh gastric cancer and adjacent normal tissues.

RESULTS: In gastric cancer, the expression of 5-LOX was significantly higher than that in the adjacent normal tissues both at mRNA (76.7% vs 40%, $P < 0.05$) and protein (56.7% vs 30%, $P < 0.05$) level. The expression of p-Akt protein was also markedly higher in the cancer tissues than that in the adjacent normal ones (56.7% vs 26.7%, $P < 0.05$). There was no obvious correlation between the expression of 5-LOX and p-Akt protein ($r = 0.186$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: The 5-LOX protein may promote the carcinogenesis and progression of gastric cancer, which is not correlated with PI3-K/Akt signaling pathway.

Key Words: Gastric cancer; 5-lipoxygenase; Phosphorylated Akt; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot

Li Y, Li JY, Wang XZ, Zou LY, Chen ZX. Expression of 5-lipoxygenase in gastric cancer and its correlation with phosphorylated Akt. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3103-3106

摘要

目的: 检测5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)在胃癌组织中的表达, 并探讨5-LOX对磷酸化Akt (phosphorylated Akt, p-Akt)表达的影响。

方法: 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测30例新鲜胃癌及癌旁正常组织标本中5-LOX mRNA表达水平; 免疫印迹法(Western blot)检测5-LOX和p-Akt蛋白的表达水平。

结果: 5-LOX在胃癌组织中的表达显著高于癌旁正常组织(76.7% vs 40%, $P < 0.05$, mRNA水平; 56.7% vs 30%, $P < 0.05$, 蛋白水平)。p-Akt蛋白在胃癌组织中的表达也显著高于癌旁正常组织(56.7% vs 26.7%, $P < 0.05$)。相关性分析表明, 胃癌组织中5-LOX蛋白表达和p-Akt水平间无明显相关性($r = 0.186$, $P > 0.05$)。

结论: 5-LOX蛋白对胃癌的发生、发展有一定促进作用, 但与PI3-K/Akt信号通路无关。

关键词: 胃肿瘤; 5-脂氧合酶; 磷酸化Akt; 逆转录-聚合酶链反应; 免疫印迹

李勇, 李建英, 王小众, 邹来玉, 陈治新. 胃癌组织中5-脂氧合酶的表达及其与磷酸化Akt的相关性. *世界华人消化杂志* 2006;14(32):3103-3106

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3103.asp>

0 引言

5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)是脂氧合酶同工酶的一种, 也是其中研究最为深入的一

■背景资料

胃癌是我国常见的恶性肿瘤, 近年来, 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)和胃癌发生发展之间的相关性已经引起人们的重视。因此, 研究5-脂氧合酶在胃癌形成中的作用及其作用机制具有重要意义。

■研发前沿

目前, 有关5-LOX在恶性肿瘤中的研究主要集中在结肠癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌, 在胃癌中的研究较少。

■创新盘点

本文通过5-LOX与p-Akt的相关性分析,研究5-LOX对靶基因转录的调控机制。

种,在人体内分布广泛,是机体催化花生四烯酸生成生物活性分子从而影响细胞信号传导及代谢的关键酶,在多种恶性肿瘤的研究中均显示出重要作用^[1-3]。Akt,也称为蛋白激酶B,是一种原癌基因,因其与致小鼠白血病病毒癌基因v-Akt高度同源而得名^[4-5]。由于处在细胞内多种信号途径的交叉口,因此Akt在各种肿瘤发病机制的研究中越来越受到关注,国内外对其在胃癌中的作用均有研究^[6-7]。目前,有关5-LOX在胃癌中的作用及其机制的研究较少,本实验拟用RT-PCR方法检测胃癌及癌旁正常组织中5-LOX mRNA的表达,Western blot方法检测5-LOX和p-Akt蛋白表达,通过探讨二者间的相关性,研究5-LOX在胃癌发生、发展中的作用及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 收集30例2004-06/2006-01通过外科手术切除胃癌组织的患者,其中女性5例,男性25例,平均年龄58.0岁。取癌组织及距肿瘤边缘5 cm正常癌旁胃黏膜组织(经病理证实)。液氮保存用于做RT-PCR及Western blot研究。羊抗人5-LOX多克隆抗体购于美国Santa Cruz公司(SC-8885),兔抗山羊二抗购于北京中山生物技术有限公司。小鼠抗磷酸化Akt抗体购于cell signal公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测 RNA的提取按RNA提取试剂盒说明书规范操作,提取组织总RNA,然后进行定量、检测纯度等。取RNA样品2 μ g, 42℃, 60 min, 99℃, 5 min合成cDNA。5-LOX基因上游引物: 5'-CCCGGGGCATGGAGAGCA-3', 下游引物: 5'-GCGGTGGGGCAGCGTGTC-3, 416 bp; 内参 β -actin基因上游引物: 5'-CTATTGGCAACGAGCGGTTC-3', 下游引物: 5'-CTTAGGAGTGGGGTGGCTT-3', 776 bp。取1 μ L cDNA进行PCR扩增(反应体系25 μ L)。5-LOX基因扩增条件: 94℃, 3 min; 94℃, 30 s; 63℃, 30 s; 72℃, 1 min; 32个循环; 72℃, 7 min。取8 μ L PCR产物,经12 g/L琼脂糖凝胶(含0.5 g/L溴化乙锭)中电泳分离,紫外灯下观察结果。

1.2.2 Western blot检测 将新鲜组织于冰盒上研磨,加入组织蛋白裂解液(10 g/L去氧胆酸钠, 10 g/L SDS, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, 1 mg/L亮氨酸leupeptin, 1 mg/L抑肽酶Aprotinin, 1 mg/L抑肽素Pepstatin, 0.1 mg/L

表1 胃癌组织与癌旁正常组织中5-LOX mRNA的表达(n/%)

组织类型	n	5-LOX mRNA	
		-	+
胃癌组织	30	7 (23.3%)	23 (76.7%) ^a
癌旁正常组织	30	18 (60.0%)	12 (40.0%)

$\chi^2 = 8.2971$, ^a $P < 0.05$ vs 癌旁正常组织。

苯甲基磺酰氟(PMSF)1000 μ L,充分混匀。4℃, 12 000 g,离心20 min,收集上清。Bradford比色法测定蛋白浓度。每孔25 μ g蛋白上样,100 g/L SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳。蛋白印迹包括电转膜、50 g/L脱脂奶粉封闭、TBST稀释的一抗4℃过夜(5-LOX, 15-LOX-1抗体浓度分别为1:200, 1:1000)、二抗(1:6000)室温轻摇60 min,用化学发光试剂盒(北京中山生物技术有限公司)进行蛋白信号检测, β -actin作为内对照。

统计学处理 采用SPSS 11.0统计分析软件进行 χ^2 检验、Spearman's等级相关检验。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 5-LOX mRNA在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达 RT-PCR产物电泳后观察,30例胃癌组织与癌旁正常组织中均可测到776 bp的 β -actin,其中5-LOX mRNA在胃癌组织中阳性表达率为76.7%(23/30),在癌旁正常组织中阳性表达率为40%(12/30)。上述结果经统计学分析,差异均有显著性意义($\chi^2 = 8.2971$, $P < 0.05$,表1,图1)。

2.2 5-LOX和p-Akt蛋白在胃癌组织与癌旁正常组织中的表达 在Western blot实验中,30例胃癌组织与癌旁正常组织中均可测到42 kDa的 β -actin蛋白,其中5-LOX蛋白在胃癌组织中阳性表达率为56.7%(17/30),在癌旁正常组织中阳性表达率为30%(9/30),差异有显著性意义($\chi^2 = 4.3439$, $P < 0.05$); p-Akt蛋白在胃癌组织中阳性表达率为56.7%(17/30),在癌旁正常组织中阳性表达率为26.7%(8/30),差异有显著性意义($\chi^2 = 5.5543$, $P < 0.05$)(表2,图2)。

2.3 5-LOX和p-Akt蛋白表达的相关性 5-LOX和p-Akt蛋白两者的表达呈正相关,但无统计学意义($r = 0.186$, $P = 0.326$,表3)。

3 讨论

胃癌作为我国常见的恶性肿瘤,其死亡率位居前列,然而其病因不清,临床上治疗胃癌的方法主

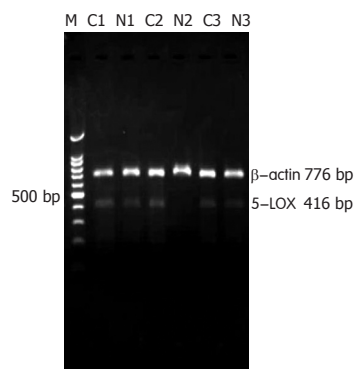


图 1 5-LOX mRNA电泳图. 图中显示C1, N1, C2, C3, N3中5-LOX表达阳性, N2表达阴性(C1, N1, C2, N2, C3, N3分别为配对的胃癌及其癌旁正常组织, M为DNA Marker).

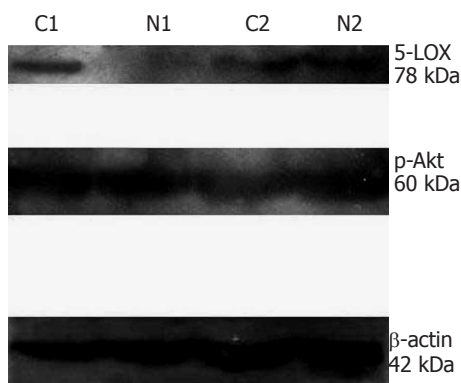


图 2 5-LOX, p-Akt蛋白在胃癌及其癌旁正常胃黏膜组织中表达. C1, C2, N2中5-LOX表达阳性, N1表达阴性; C1, N1, C2, N2中p-Akt表达阳性(C1, N1, C2, N2为两例配对的胃癌及其癌旁正常组织).

应用要点

本实验通过对5-LOX在胃癌中表达的深入研究, 为今后通过调节其活性对胃癌患者进行临床治疗奠定基础.

表 2 胃癌组织与癌旁正常组织中5-LOX, p-Akt蛋白的表达(n/%)

组织类型	n	5-LOX 蛋白		p-Akt蛋白	
		-	+	-	+
胃癌组织	30	13 (43.3%)	17 (56.7%) ^a	13 (43.3%)	17 (56.7%) ^a
癌旁正常组织	30	21 (70.0%)	9 (30.0%)	22 (73.3%)	8 (26.7%)

$\chi^2 = 4.3439$, ^a $P < 0.05$ vs 癌旁正常组织.

表 3 5-LOX蛋白和p-Akt蛋白表达的相关性(n)

5-LOX蛋白表达	n	p-Akt蛋白表达		r	P值
		-	+		
-	13	7	6	0.186	0.326
+	17	6	11		

要是采用手术为主、化疗和放疗为辅, 但效果并不理想, 缺乏特效的治疗方法. 因此加强对胃癌病因研究以开发新的有效防治胃癌的药物具有重要的临床意义. 随着研究的深入, 脂氧合酶代谢途径已经日益引起人们的广泛关注, 其中以5-LOX的研究最为深入, 普遍认为5-LOX在恶性肿瘤形成过程中具有促进作用. 人类5-LOX基因定位于第10号染色体p11.2亚带, 长度超过82 kb, 包括14个外显子和13个内含子, 可催化花生四烯酸转化为白三烯(leukotriene, LTs)和5-羟二十碳四烯酸(5-HETE)^[8-9]. 目前, 有关5-LOX的研究报道较多, 发现, 5-LOX及其主要下游产物5-HETE和LTB4在各种恶性肿瘤中高表达, 部分癌前病变亦有发现. Hong *et al*^[10]在结肠癌、肺癌、乳腺癌和前列腺癌多个细胞系中均检测到5-LOX的表达, 表达率高达100%. Hennig *et al*^[11]通过实验证实, 胰腺癌细胞系PANC-1, AsPC-1, MiaPaCa2均有5-LOX的表达; 与正常胰腺组织相比, 5-LOX在胰腺癌组织中表达显著增高. 有报道称, 5-LOX在食管癌组织中表达率为79%, 在所有8种食管癌细胞系中也都有高表达, 5-LOX抑制剂通过诱导凋亡抑制细胞增殖^[12-13]. 上述研究均提示5-LOX的促癌作用. 尽管5-LOX在多种恶性肿瘤中均有研究, 但在胃癌中的研

究报道较少.

本实验通过RT-PCR和Western blot方法检测发现, 胃癌组织中5-LOX mRNA和蛋白表达均明显高于癌旁胃组织, 从转录和翻译水平证实, 5-LOX在胃癌组织中高表达, 此结果与上述研究结果相吻合, 提示5-LOX高表达与胃癌形成密切相关. 在前期研究中我们通过免疫组化方法发现, 5-LOX 表达显著高于胃癌组织, 伴淋巴结转移者5-LOX蛋白阳性表达率显著高于无淋巴结转移者, TNM分期III-IV期患者5-LOX蛋白阳性表达率显著高于I-II期; 采用5-LOX选择性抑制剂AA861对胃癌AGS细胞株进行处理后发现, AA861可抑制其生长, 诱导其凋亡^[14]. 结合本次的实验结果, 我们认为5-LOX在胃癌发生、发展过程中有一定促进作用. 但5-LOX是如何发挥促癌作用的呢? 目前, 关于5-LOX在胃癌中促癌机制研究, 国外文献报道极少, 国内尚未见报道. Tong *et al*^[15]在胰腺癌, 食管癌细胞中外源性添加LTB4(5-LOX 的产物)进行处理, 发现LTB4

■同行评价

本文较好综述了5-LOX与p-AKT的关系,有一定理论与临床意义。

可促进Akt磷酸化,从而促进肿瘤细胞增殖,抑制凋亡。提示,5-LOX促肿瘤细胞增殖抑制其凋亡的机制可能涉及到三磷酸肌醇激酶(PI3K)/Akt级联反应。丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶蛋白激酶B(PKB/Akt)是1991年发现的一种对细胞代谢、细胞增殖和迁移等生命活动中信号转导有重要功能的蛋白激酶,近年来由于他参与由生长因子激活的PI3K介导的信号转导过程而日益受到关注。Akt经磷酸化作用生成p-Akt而激活,促进细胞生长和增殖。Akt蛋白的过度活化可使细胞发生恶性转化,从而参与各种肿瘤的形成、侵袭和转移^[16-18]。因此,我们进而采用Western blot方法检测了p-Akt蛋白在胃癌和癌旁正常组织的表达,结果表明,p-Akt在胃癌组织中的表达显著增高,提示活化的Akt在胃癌发生、发展过程中有着重要作用,这与一些研究结果相似^[16-17]。将胃癌组织中5-LOX与p-Akt蛋白表达情况进行相关性分析,发现二者间无相关性,提示5-LOX的促癌作用可能与p-Akt无关。

总之,5-LOX可促进胃癌的形成与发展,这一促癌作用可能不涉及三磷酸肌醇激酶(PI3K)/Akt这一信号传导通路。究竟5-LOX在胃癌形成过程中如何发挥促癌作用,其作用机制是如何?下一步,我们拟通过体外实验进一步研究。

4 参考文献

- 1 Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999; 274: 23679-23682
- 2 Jampilek J, Dolezal M, Opletalova V, Hartl J. 5-Lipoxygenase, leukotrienes biosynthesis and potential antileukotrienic agents. *Curr Med Chem* 2006; 13: 117-129
- 3 Claria J, Romano M. Pharmacological intervention of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. Impact on inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 3431-3447
- 4 Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997; 275: 661-665
- 5 Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal

- transduction. *Nature* 1995; 376: 599-602
- 6 周晓东, 于皆平, 于红刚, 于红刚, 罗和生, 吕农华, 朱莹. 蛋白激酶B在胃癌中的表达及其生物学意义. *中华消化杂志* 2005; 25: 401-405
- 7 Gao S, Yu BP, Li Y, Dong WG, Luo HS. Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2362-2365
- 8 李勇, 李建英, 王小众. 5-脂氧合酶促癌机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 800-804
- 9 谢正元, 文艺, 张吉翔. 5-脂氧合酶与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1905-1908
- 10 Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res* 1999; 59: 2223-2228
- 11 Hennig R, Ding XZ, Tong WG, Schneider MB, Standop J, Friess H, Buchler MW, Pour PM, Adrian TE. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am J Pathol* 2002; 161: 421-428
- 12 Hoque A, Lippman SM, Wu TT, Xu Y, Liang ZD, Swisher S, Zhang H, Cao L, Ajani JA, Xu XC. Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 2005; 26: 785-791
- 13 Chen X, Li N, Wang S, Hong J, Fang M, Youselfson J, Yang P, Newman RA, Lubet RA, Yang CS. Aberrant arachidonic acid metabolism in esophageal adenocarcinogenesis, and the effects of sulindac, nordihydroguaiaretic acid, and alpha-difluoromethylornithine on tumorigenesis in a rat surgical model. *Carcinogenesis* 2002; 23: 2095-2102
- 14 邹来玉, 李建英, 王小众, 陈治新. AA861对人胃癌细胞凋亡及与5-脂氧合酶mRNA表达的影响. *福建医科大学学报* 2006; 40: 14-18
- 15 Tong WG, Ding XZ, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE. LTB4 stimulates growth of human pancreatic cancer cells via MAPK and PI-3 kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335: 949-956
- 16 Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 2110-2115
- 17 Ringel MD, Hayre N, Saito J, Saunier B, Schuppert F, Burch H, Bernet V, Burman KD, Kohn LD, Saji M. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6105-6111
- 18 Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 3127-3134

电编 李琪 编辑 王晓瑜

肝海绵状血管瘤超微结构及其与临床特征的关系

孙晓力, 李国威, 杨少毅, 刘清峰, 王志亮, 李宗芳

孙晓力, 李国威, 刘清峰, 王志亮, 李宗芳, 西安交通大学医学院第二医院普外科 陕西省西安市 710004

杨少毅, 西安交通大学医学院电镜室 陕西省西安市 710051
孙晓力, 西安交通大学医学院外科学硕士, 博士研究生, 讲师, 主要从事肝胆外科工作。

陕西省科技攻关项目, No. 99K13-G28

通讯作者: 李国威, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二医院普外科. liguowei1964@sina.com

电话: 029-87678080

收稿日期: 2006-08-18 接受日期: 2006-09-30

Ultramicrostructure of hepatic cavernous hemangioma and its correlation with clinical characteristics

Xiao-Li Sun, Guo-Wei Li, Shao-Yi Yang, Qing-Feng Liu, Zhi-Liang Wang, Zong-Fang Li

Xiao-Li Sun, Guo-Wei Li, Qing-Feng Liu, Zhi-Liang Wang, Zong-Fang Li, Department of General Surgery, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University Medical College, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Shao-Yi Yang, Department of Electron Microscopy, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Supported by Science and Technology Development Foundation of Shaanxi Province, No. 99K13-G28

Correspondence to: Dr. Guo-Wei Li, Department of General Surgery, the Second Hospital of Xi'an Jiaotong University Medical College, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China. liguowei1964@sina.com

Received: 2006-08-18 Accepted: 2006-09-30

Abstract

AIM: To explore the origin for cavernous hemangioma of the liver (CHL) from the angle of ultramicrostructure, and probe the relationship between CHL ultramicrostructure and the clinical characteristics.

METHODS: A total of 8 CHL samples were selected, 1 of which 1 was prepared using routine method, while the other 7 samples was firstly stained by scytodepsic acid before routine management. After the ultrathin sections were prepared by LKB-V ultramicrotome, transmission electron microscope H-600 and JEOL-100SX and scanning electron microscope KYKY-2000 were used to observe the changes of tissue ultrastructure.

RESULTS: In CHL samples, endothelial cell monolayer covered the inner wall of blood sinus which was circuitous and showed labyrinth-like structure. The normal endothelial cells were thin and flat with pinocytotic vesicle, microfilament and fewer cell organelles. There were tight and bridge corpuscle junction. Elastic fibers were located under the endothelial cells, while collagenoblasts and smooth muscle cells were observed in tunica media. Collagen fibers were rich in tunica media and theca externa. These structures were similar to those of arteriole. The endothelial cells of CHL tissues were swelled with nucleoli moving aside, and pillar-like blood sinus existed. Cystoid changes of rough endoplasmic reticulum lasted till the necrosis of endothelial cells occurred. A great amount of collagen fibers proliferated in interstitial substance, which divided the elastic fibers and filled the blood sinus cavity in the position of necrotic endothelial cells through fibrosis. There was no normal hepatic cells and sinus hepaticus in CHL tissues. There were no hepatic lobules in CHL, and double blood-supply system didn't exist.

CONCLUSION: CHL is caused by vascular malformation of liver arteriole, and the blood-supply of CHL is through artery. Circuitous and labyrinth-like structure of the blood sinus cavity can elucidate the characteristics of its imaging results, including hepatic angiography and computed tomography. Anaplasia of endothelial cells and proliferation of collagen fibers in interstitial substance leads to the fibrosis and anolysis of CHL, which is the main mechanism of few natural disruptions in CHL.

Key Words: Hepatic cavernous hemangioma; Ultramicrostructure; Blood supply; Disruption; Fibrosis

Sun XL, Li GW, Yang SY, Liu QF, Wang ZL, Li ZF. Ultramicrostructure of hepatic cavernous hemangioma and its correlation with clinical characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3107-3110

摘要

目的: 从肝海绵状血管瘤(CHL)超微结构探讨

■背景资料

CHL为良性肿瘤,发病率达7%。绝大多数患者带瘤长期生存而无任何危害,临床手术者中大多数手术依据不足。CHL破裂出血多发生于医源性损伤,手术危险远大于疾病本身。CHL组织起源不明,对其生物学特性缺乏了解和认识,造成其治疗方法的混乱。本文以前期研究为基础,进一步明确CHL组织起源,并对其不会自发破裂出血,不恶变以及中年期后能自行纤维化萎缩的生物学行为的发生机制进行讨论,将对今后CHL治疗原则产生影响。

■研发前沿

研究CHL组织起源,发生、发展机制和转归是难点。外科治疗(含介入)指征和方法是热点。针对内皮细胞凋亡和胶原纤维增生两方面进行研究,寻求生物学治疗是方向。

■创新盘点

本文从超微结构研究进一步证实CHL来自肝内微动脉的血管畸形病变,完全由动脉供血,瘤内无肝窦状隙这一双重供血的组织学基础。上述结果可能解释CHL在肝血管造影、增强CT及肝血流池动态显像诊断中出现的影像特征,同时可以解释其不破裂、不恶变并能自行纤维化萎缩的机制。

CHL组织起源,以及组织结构与临床特征关系。

方法:对8例CHL切除标本进行电镜观察。1例按常规电镜样品制备,7例用弹力纤维特异染色的丹宁酸块染后,按常规电镜样品制备,经LKB-V超薄切片,用透射电镜H-600, JEOL-100SX和扫描电镜KYKY-2000进行观察。

结果:血窦腔由单层内皮细胞覆盖,血窦腔蜿蜒迂回,呈迷宫状结构组成。正常内皮细胞为扁平状,细胞器减少,有吞饮小泡和微丝,细胞间有紧密连接和桥粒连接。内皮细胞下有弹力纤维,中膜层可见成纤维细胞和平滑肌细胞,中、外膜层有丰富胶原纤维。此与微动脉结构相似。CHL内皮细胞多肿胀,核仁边移,突向血窦腔成柱状。随程度加重,粗面内质网囊泡样改变,直至内皮细胞由内膜层脱落,坏死。间质中大量胶原纤维增生,分割弹力纤维,并可由内皮细胞缺损处填充于血窦腔内,发生纤维化。瘤体中无正常肝细胞和肝窦结构。由于瘤内无肝小叶,所以瘤体无双重供血组织结构,CHL由动脉供血。蜿蜒迂回、迷宫样血窦腔,可以解释影像学特征(肝血管造影、CT增强)。内皮细胞退行性变化和间质中胶原纤维大量增生,导致CHL纤维化,并自行萎缩。

结论:CHL血窦腔结构类似微动脉,起源于肝脏微动脉血管畸形病变。CHL一般不需手术治疗,也不易自发破裂出血。

关键词:肝海绵状血管瘤;超微结构;血供;破裂;纤维化

孙晓力, 李国威, 杨少毅, 刘清峰, 王志亮, 李宗芳. 肝海绵状血管瘤超微结构及其与临床的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3107-3110

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3107.asp>

0 引言

疾病发生、发展、变化过程,都伴随组织结构和形态变化。作者在前期提出了肝海绵状血管瘤(cavernous hemangioma of liver, CHL)是来自肝动脉末梢微动脉血管畸形病变论点^[1-2]。以及CHL具有不恶变,不易自发破裂,能自行纤维化萎缩生物学特征。为进一步从超微结构进行认证和寻求解释依据,我们对8例CHL切除瘤组织进行了超微结构研究。

1 材料和方法

1.1 材料 CHL标本取自8例切除患者。男3例,女5例,年龄30-50.9(平均38.2)岁。切除剥脱瘤体最

大直径8-15 cm。

1.2 方法 切除瘤体组织样品当即切成1 mm³组织块,迅速置入25 g/L戊二醛进行前固定2 h,蒸馏水清洗后取出置入10 g/L O₅O₄进行后固定1 h。其中7例用弹力纤维特异染色的丹宁酸进行块染^[3],然后按常规电镜样品制备。另1例仅按常规电镜样品制备。经LKB-V超薄切片,用透射电镜H-600, JEOL-100SX和扫描电镜KYKY-2000进行观察。

2 结果

2.1 扫描电镜观察 CHL由不规则,蜿蜒迂回,呈迷宫状血窦腔(图1A)组成。血窦腔壁由单层内皮细胞覆盖,形同“鹅卵石路面”状(图1B)。

2.2 透射电镜观察 血窦腔内壁为单层内皮细胞,正常内皮细胞为扁平状内皮细胞,有丰富吞饮小泡,可见少量微丝,细胞间有紧密连接,桥粒连接。此为成熟内皮细胞(图2A)。此种内皮细胞的血窦腔宽,血窦腔间隔壁薄,内皮细胞下可见完整或较大段弹力纤维,中膜层中可见成纤维细胞和平滑肌细胞,中膜层薄,外膜层有丰富胶原纤维(图2B)。CHL这种结构与微动脉结构相似,应视为肝动脉末梢微动脉性瘤样血管畸形病变。电镜下未发现瘤体内有肝小叶结构。

2.3 丹宁酸染色 普遍现象是内皮细胞肿胀,核仁边移,由扁平状改变为柱状突入血窦腔,随程度加重,表现为内皮细胞由内膜层半剥离,细胞器由减少到溶酶体、线粒体完全消失。粗面内质网呈囊泡样改变,直至内皮细胞完全脱落,此为典型内皮细胞退化至坏死过程(图3A)。与此同时,间质中大量胶原纤维增生,将丹宁酸染色为电子密度极高的黑色之弹力纤维分割得支离破碎,胶原纤维可占满血窦腔壁全层,甚至由内皮细胞脱落处侵袭到血窦腔内,并可完全填充血窦腔(图3B)。内皮细胞损害,红细胞可大量渗透入间质中(图3C)。上述改变造成血窦腔逐渐狭窄致完全闭塞,血窦壁逐渐增厚,最后导致CHL纤维化及瘢痕形成。纤维化改变过程,经由中心部位开始发生(图4)。

3 讨论

对8例CHL切除标本的电镜观察表明,在血窦腔内皮细胞和间质结构没有发生明显退行性改变和胶原纤维大量增生破坏间质结构之前,内膜可见扁平内皮细胞并含有丰富吞饮小泡,少量微丝及细胞间连接,内皮细胞下有完整弹力纤维,中膜层可见少量平滑肌细胞,或成纤维细胞,

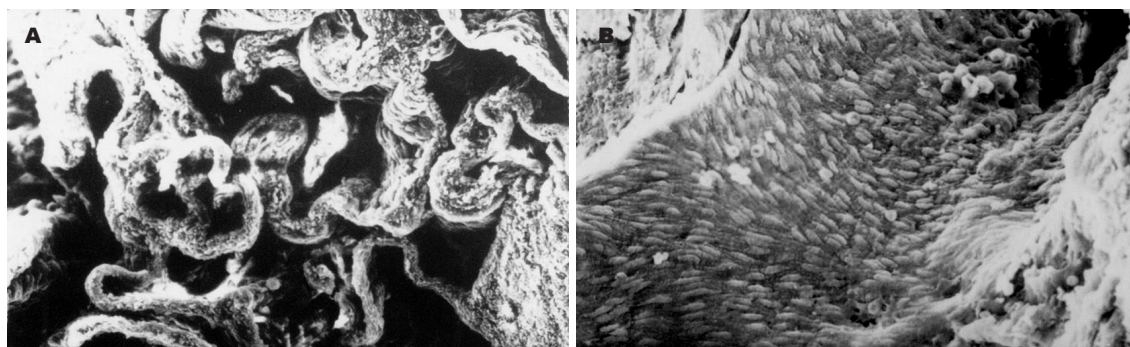


图 1 CHL超微结构(SEM). A: 蜿蜒迂回, 迷宫状血窦腔; B: "鹅卵石路面"状内皮细胞覆盖.

■应用要点
可以更科学的制定对CHL患者手术治疗的策略, 合理选择治疗方法, 丰富影像诊断学理论, 最大限度避免对CHL患者过度治疗和医源性损伤的发生.

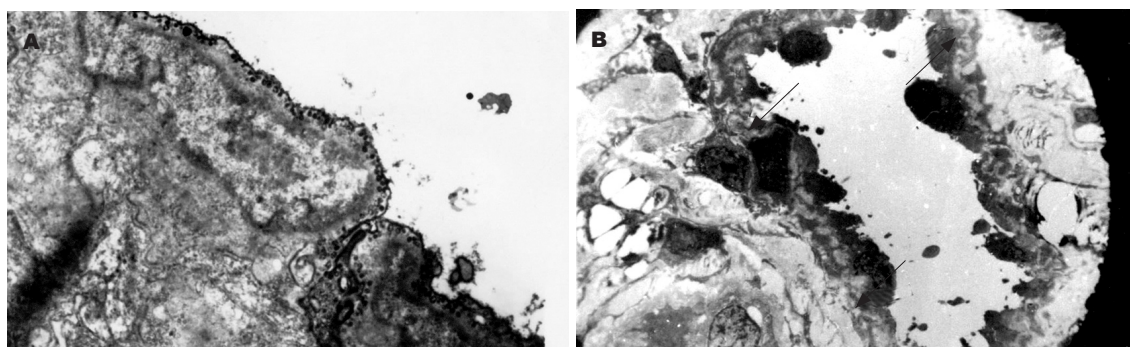


图 2 CHL超微结构(TEM). A: 细胞内可见吞饮小泡、微丝, 细胞间有紧密连接, 桥粒连接. ($\times 10000$); B: 内皮细胞下完整一圈弹性纤维波浪状, 中膜层内可见成纤维细胞和平滑肌细胞($\times 2500$).

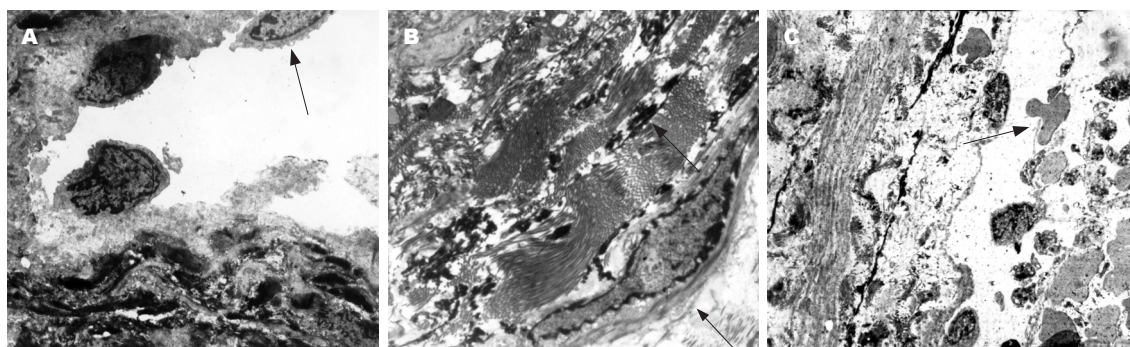


图 3 CHL丹宁酸染色. A: 脱落的内皮细胞($\times 2000$); B: 大量胶原纤维增生将黑色弹性纤维分割支离破碎, 胶原纤维占满血窦腔壁全层, 甚至侵入血窦腔内($\times 1500$); C: 红细胞从内皮细胞损害处大量渗透入间质, 可见红细胞游走全过程($\times 5000$).

中外膜关系不清晰, 其间有丰富胶原纤维. 上述结构与微动脉结构相似^[4], 为非动脉性和非静脉毛细血管结构. 从组织学结构上证实CHL来源于肝动脉末梢微动脉的血管畸形病变. 进一步肯定了作者前期术中肝动脉支插管造影, 瘤体立即显影和临时阻断肝动脉条件下, 进行门静脉连续造影观察, 造影剂不能进入瘤体; 再经门静脉注入亚甲兰、肝脏染色而瘤体色不变; 以及经肝静脉, 门静脉对切除标本铸型灌注后腐蚀观察瘤体脱落. 证实CHL瘤体完全由动脉供血, CHL来源于肝微动脉畸形病变的推论^[1-2]. CHL瘤体中不含肝小叶, 也就不存在肝窦(窦状

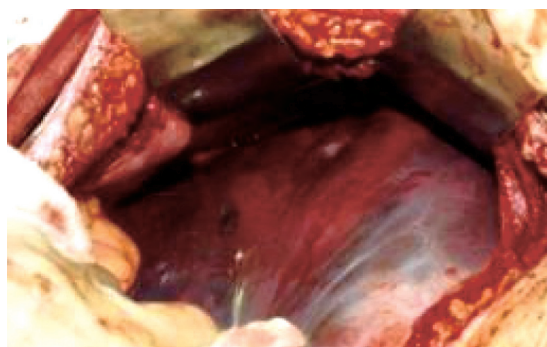


图 4 CHL中心部位纤维化及瘢痕形成.

■同行评价

本文采用电镜观察CHL的超微结构,进一步证明其一般不需手术治疗,也不易发生破裂出血的原因。构思新颖,有很强的说服力,对临床治疗有很好的指导作用。

隙)结构,也就不存在所谓瘤体双重供血的组织学基础。因此,CHL仅由肝动脉供血。国外仅见 Yamamoto *et al*^[5]认为,CHL组织结构似肝动脉,而与门静脉不同的报导。

CHL能自行纤维化萎缩^[6-8]。电镜观察到CHL病理改变均以内皮细胞退行性改变和间质中胶原纤维增生为特征。内皮细胞肿胀,核边移,细胞变成柱状突向血窦腔内,细胞器由减少到消失,粗面内质网呈囊状小泡改变,最后内皮细胞完全由内皮层脱落坏死。间质中胶原纤维增生可致血窦壁内、中、外三层结构消失,弹力纤维被分割。胶原纤维由内皮细胞脱落处侵入血窦腔,并可完全填充血窦腔,导致CHL纤维化形成,瘢痕化萎缩。这是CHL为什么中年期以后逐渐纤维化,萎缩的根据,也是CHL原则上一般不用手术治疗的原因。在临床上观察到只有极少数CHL由于某种因素刺激而增殖过快,从而产生症状,此种最多见于35岁以前的年轻人,尤其反复怀孕和长期口服雌激素类避孕药的育龄妇女^[9-11]。绝大多数CHL在40岁以后发现,多在查体或因其他疾病检查时发现。此时发现,CHL已开始发生退化改变。CHL因为瘤体巨大而影响劳动和给生活带来不便者极为罕见,且极少有CHL危及生命者。

CHL由迷宫状血窦腔组成,瘤体越大其容积越大,而入肝血流量并不加大,肝动脉不增粗,不迂曲,此点与肝癌截然不同。因此瘤体内血流量骤减,压力锐降,这一结构特征,当对CHL行肝血管造影诊断,表现出显影快而消退慢的“早出晚归”CHL特有的征象。CT增强扫描时,造影剂在瘤内由周边向中心缓慢弥散,瘤体密度显著高于周围肝实质,可持续达5 min以上的原因。正是由于瘤体血窦腔内血流极其缓慢,可以造成瘤体内缺氧,和代谢产物排出缓慢,从而损害成熟内皮细胞,造成内皮细胞肿胀,细胞器逐渐消失,粗面内质网囊泡样改变,最后脱落坏死。以及间质内胶原纤维大量增生,并由内皮细胞缺损处填充于血窦腔内,CHL最终纤维化萎缩。当瘤体内发生纤维化后,造影剂不能进入血窦腔内,在肝血管造影时,纤维化萎缩区域出现造影剂缺损低密度区。因此对CHL栓塞硬化治疗后,栓塞区域不

再显像,或者对CHL血流血池动态核素显像时出现核素不被填充的缺损区(冷区域)^[12]是判断疗效重要依据而不应单纯只以瘤体大小变化为准。CHL这一特征性结构,血窦腔内压力低,血流缓;血窦腔壁形成无数间隔,以及窦壁内丰富胶原纤维,这是临床上难以见到自发破裂出血的原因。CHL血窦壁内皮细胞为成熟内皮细胞,无增殖行为,因此,迄今为止尚未见到CHL恶变报导。

4 参考文献

- 1 Li GW, Zhao ZR, Li BS, Liu XG, Wang ZL, LIU QF. Source of blood supply of liver cavernous hemangioma and sclerosis and embolization treatment. *China Natl J New Gastroenterol* 1997; 3: 147-149
- 2 Li GW, Chen QL, Jiang JT, Zhao ZR. The origin of blood supply for cavernous hemangioma of the liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 367-370
- 3 WHO电子显微镜诊断学研究研修センター医学。生物研究のための電子顕微鏡学 I 玉藤田企画出版株式会社第1版, 1987: 42-44
- 4 钟慈声。细胞和组织的超微结构。第1版, 北京: 人民卫生出版社 1984; 103-105
- 5 Yamamoto K, Itoshima T, Ito T, Ukida M, Ogawa H, Kitadai M, Hattori S, Mizutani S, Nagashima H. Scanning electron microscopy of a liver cavernous hemangioma. *Gastroenterol Jpn* 1983; 18: 15-20
- 6 Kato M, Sugawara I, Okada A, Kuwata K, Satani M. Hemangioma of the liver. Diagnosis with combined use of laparoscopy and hepatic arteriography. *Am J Surg* 1975; 129: 698-703
- 7 Yamagata M, Kanematsu T, Matsumata T, Utsunomiya T, Ikeda Y, Sugimachi K. Management of haemangioma of the liver: comparison of results between surgery and observation. *Br J Surg* 1991; 78: 1223-1225
- 8 Pietrabissa A, Giulianotti P, Campatelli A, Di Candio G, Farina F, Signori S, Mosca F. Management and follow-up of 78 giant haemangiomas of the liver. *Br J Surg* 1996; 83: 915-918
- 9 Conter RL, Longmire WP Jr. Recurrent hepatic hemangiomas. Possible association with estrogen therapy. *Ann Surg* 1988; 207: 115-119
- 10 Trastek VF, van Heerden JA, Sheedy PF 2nd, Adson MA. Cavernous hemangiomas of the liver: resect or observe? *Am J Surg* 1983; 145: 49-53
- 11 Morley JE, Myers JB, Sack FS, Kalk F, Epstein EE, Lannon J. Enlargement of cavernous haemangioma associated with exogenous administration of oestrogens. *S Afr Med J* 1974; 48: 695-697
- 12 Jesic R, Radojkovic S, Tomic D, Krstic M, Jankovic G, Milinic N, Pavlovic A, Crnobaric M, Cvejic T, Aleksic T. Personal experience in embolization of liver hemangiomas. *Srp Arh Celok Lek* 1998; 126: 349-354

电编 李琪 编辑 潘伯荣

慢传输型便秘患者结肠中五羟色胺受体亚型的表达及意义

丁健华, 赵荣华, 傅传刚, 毕丽霞, 孟荣贵, 喻德洪

丁健华, 傅传刚, 孟荣贵, 喻德洪, 第二军医大学长海医院肛肠外科 上海市 200433
赵荣华, 美国克利福兰基金会佛罗里达医院肛肠外科 美国佛罗里达州 33331
毕丽霞, 中国人民解放军第二炮兵总医院肛肠外科 北京市 100088
教育部留学回国人员科研启动基金课题, 教外司留[2001]345号
通讯作者: 丁健华, 200433, 上海市, 第二军医大学长海医院肛肠外科, junyi93@yahoo.com.cn
电话: 021-25072073
收稿日期: 2006-06-14 接受日期: 2006-09-01

Expression of serotonin receptor subtypes and its significance in the colon of patients with slow transit constipation

Jian-Hua Ding, Rong-Hua Zhao, Chuan-Gang Fu, Li-Xia Bi, Rong-Gui Meng, De-Hong Yu

Jian-Hua Ding, Chuan-Gang Fu, Rong-Gui Meng, De-Hong Yu, Department of Colorectal Surgery, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Rong-Hua Zhao, Department of Colorectal Surgery, Cleveland Clinic, Florida 33331, the United States
Li-Xia Bi, Department of Colorectal Surgery, General Hospital of the Second Artillery of Chinese PLA, Beijing 100088, China
Supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, No. [2001]345
Correspondence to: Jian-Hua Ding, Department of Colorectal Surgery, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. junyi93@yahoo.com.cn
Received: 2006-06-14 Accepted: 2006-09-01

Abstract

AIM: To investigate the expression of serotonin receptor subtypes in the colon of patients with slow transit constipation (STC), and explore its role in the pathogenesis of STC.

METHODS: Using Envision immunohistochemical staining, we detected the expression and distribution of 5-HT1A receptor, 5-HT3 receptor and 5-HT4 receptor in the colon of 20 STC patients and 20 controls. IMS computer analysis system was used for semi-quantitative analysis.

RESULTS: 5-HT1A receptor was positively scattered in submucosa and muscular layer. The positive score in myenteric plexus had no significant difference between two groups ($P = 0.548$). 5-HT3 receptor was also positively scattered in submucosa and muscular layer. The positive score in myenteric plexus was significantly lower in STC group than that in the controls (65.2 ± 15.9 vs 94.3 ± 20.1 , $P < 0.01$). 5-HT4 receptor was positively scattered in mucosa, submucosa and muscular layer. In mucosa and myenteric plexus, the positive scores in STC group were significantly lower than those in the controls (57.8 ± 10.9 vs 78.5 ± 12.9 , $P < 0.01$; 77.5 ± 19.9 vs 119.2 ± 26.9 , $P < 0.01$). In STC patients, we didn't find any correlation between the expression level of 5-HT3 receptor and the remained marks at the 5th day of colonic transit study. However, there was a negative correlation between the expression level of 5-HT4 receptor and the remained marks at the 5th day of colonic transit study ($r = -0.782$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The expression levels of 5-HT3 and 5-HT4 receptors are decreased in the colon of STC patients, which may contribute to the pathogenesis of STC.

Key Words: Serotonin; Serotonin receptor; Slow transit constipation; Immunohistochemistry

Ding JH, Zhao RH, Fu CG, Bi LX, Meng RG, Yu DH. Expression of serotonin receptor subtypes in the colon of patients with slow transit constipation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3111-3115

摘要

目的: 研究主要5-HT受体亚型在慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)患者结肠中的表达,探讨其在慢传输型便秘发病机制中的作用。

方法: 采用免疫组化EnVision法,检测20例STC患者和20例对照组结肠组织中5-HT1A, 5-HT3和5-HT4受体的分布及表达水平,并采用IMS计算机辅助图像分析系统进行半定量分析。

■背景资料

由于STC的发病机制仍不清楚,目前以长期口服泻剂对症治疗为主,但疗效并不满意,部分患者最终需要手术切除大部分结肠。因此,深入研究STC的确切发病机制,成为目前迫切需要解决的问题。

■研究前沿

目前,STC发病机制的研究主要集中于各种胃肠道神经递质、神经结构、Cajal细胞等方面。已经发现多种因素与STC的发病有关。5-HT信号系统作为肠蠕动、分泌功能的始动因素,越来越受到重视。

■相关报道

近年发现, 5-HT信号系统与多种胃肠道功能性疾病密切相关. Miwa *et al*发现, 便秘型IBS患者结肠黏膜中, 5-HT含量显著高于腹泻型IBS和正常人. 此外, 腹泻、溃疡性结肠炎、功能性消化不良等患者结肠中也发现存在5-HT的异常

结果: 5-HT_{1A}受体分布于黏膜下层、肌层, 肌间神经丛5-HT_{1A}受体的表达在STC组和对照组间无显著差异($P = 0.548$). 5-HT₃受体分布于黏膜下层和肌层, 肌间神经丛STC组阳性指数显著低于对照组(65.2 ± 15.9 vs 94.3 ± 20.1 , $P < 0.01$). 5-HT₄受体分布于黏膜层、黏膜下层、肌层. 在黏膜层和肌间神经丛, STC组5-HT₄受体阳性指数均显著低于对照组(57.8 ± 10.9 vs 78.5 ± 12.9 , $P < 0.01$; 77.5 ± 19.9 , 119.2 ± 26.9 , $P < 0.01$). STC组中, 5-HT₃受体表达水平与结肠传输试验第5天体内残留标志物数量无关($P > 0.05$); 但5-HT₄受体表达水平与第5天体内残留标志物数量呈负相关($r = -0.782$, $P < 0.01$).

结论: STC患者结肠中存在5-HT₃和5-HT₄受体亚型的表达下调, 两者可能参与了STC的发病机制.

关键词: 五羟色胺; 五羟色胺受体; 慢传输型便秘; 免疫组化

丁健华, 赵荣华, 傅传刚, 毕丽霞, 孟荣贵. 慢传输型便秘结肠中五羟色胺受体亚型的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3111-3115

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3111.asp>

0 引言

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是由结肠传输功能障碍引起的一种常见疾病, 表现为排便次数减少、排便困难、腹胀等. 近年来, 一些研究分别从电生理学、组织学和胃肠神经内分泌学等方面对其发病机制进行了探讨, 但其确切发病机制尚不清楚^[1-3]. 五羟色胺(serotonin, 5-HT)是参与调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质. 我们最近的研究发现, STC患者结肠中, 5-HT及总5-HT受体的表达均存在异常^[4-5]. 由于5-HT受体包括多种亚型, 功能不同, 因此, 需要进一步对5-HT各受体亚型进行研究, 以深入探讨5-HT信号系统在STC发病机制中的作用. 我们对分布于肠神经元上的兴奋性5-HT₃受体、5-HT₄受体和抑制性5-HT_{1A}受体在STC患者结肠中的表达进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2001-03/2004-12经结肠传输实验证实为STC患者, 行次全结肠切除术的石蜡标本20例. 男6例, 女14例, 平均年龄46.5(18-70)岁. 对照组: 取我院2004-06/2004-12因升结肠癌行右

表 1 STC组及对照组结肠5-HT受体阳性指数(mean \pm SD)

5-HT 受体亚型	STC组	对照组
5-HT _{1A} 受体(肌间神经丛)	92.6 \pm 21.1	83.2 \pm 14.9
5-HT ₃ 受体(肌间神经丛)	65.2 \pm 15.9 ^b	94.3 \pm 20.1
5-HT ₄ 受体(黏膜层)	57.8 \pm 10.9 ^b	78.5 \pm 12.9
5-HT ₄ 受体(肌间神经丛)	77.5 \pm 19.9 ^b	119.2 \pm 26.9

^b $P < 0.01$ vs 对照组.

半结肠切除的石蜡标本10例, 因直肠癌或乙状结肠癌行部分左半结肠切除的石蜡标本10例, 均取距肿瘤5 cm以上的正常组织. 所有对照组患者术前无排便困难或其他胃肠道功能性疾病史, 男9例, 女11例, 平均年龄58.7(24-76)岁. 两组在性别和年龄构成上差异无统计学意义($P > 0.05$). 蜡块常规切片厚4 μ m. 兔抗人5-HT_{1A}, 3, 4受体的多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司, 即用型EnVision试剂盒购自丹麦DaKo公司, DAB显色剂购自北京中杉试剂公司.

1.2 方法 采用免疫组化EnVision法染色, 组织切片常规脱蜡至水后, 微波95 $^{\circ}$ C 10 min \times 2抗原修复, 3 mL/L H₂O₂抑制内源性过氧化物酶20 min, 再滴入相应一抗37 $^{\circ}$ C 1 h, 加入EnVision试剂37 $^{\circ}$ C 30 min, DAB显色后苏木素复染, 常规封片. 镜检阳性染色呈棕黄色颗粒. 阴性对照以PBS代替相应一抗. 采用IMS细胞图像分析系统进行计算机辅助半定量分析, 光镜下以目标区域为中心, 每张切片随机选取5个视野摄入计算机, 分别测定阳性区域面积比和光密度值(A), 计算阳性指数(阳性面积比 \times 光密度值 \times 100), 最后计算平均值.

统计学处理 采用SPSS 10.0分析软件进行统计学处理. 均数间的比较用 t 检验, 方差不齐者采用Wilcoxon秩和检验, 5-HT受体与结肠传输时间的关系采用Spearman等级相关分析. $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

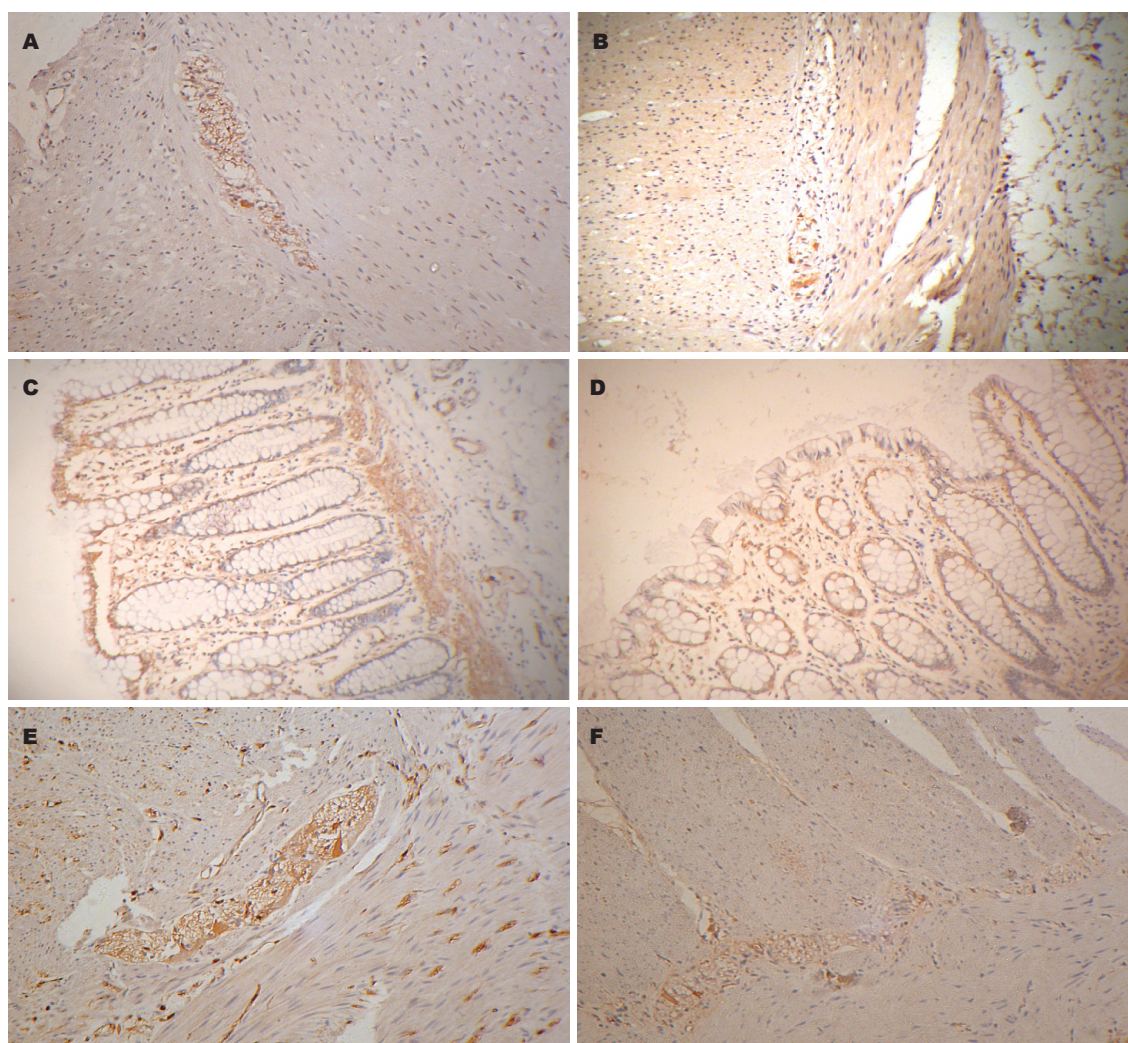
2.1 各5-HT受体亚型在结肠中的表达

2.1.1 5-HT_{1A}受体在结肠中的表达 5-HT_{1A}受体阳性染色分布于结肠黏膜下层、肌层, 其中以肌间神经丛明显. 以肌间神经丛为中心, 进行图像分析测定阳性染色指数后显示, STC组高于对照组, 分别为92.6 \pm 21.1, 83.2 \pm 14.9, 但统计学分析两组无显著性差异($P = 0.112$, 表1).

2.1.2 5-HT₃受体在结肠中的表达 5-HT₃受体阳性染色分布于结肠黏膜下层、肌层, 其中以肌间神经

■创新盘点

近年已有文献报道, 5-HT在STC结肠中存在表达变化, 但缺乏对5-HT信号链其他环节的进一步研究. 本文在前期工作的基础上, 继续对5-HT受体亚型展开了研究, 并探讨其意义, 国内外尚少有相关报道.



■应用要点

本研究发现, STC结肠中存在5-HT受体亚型的表达变化, 为STC发病机制研究提供了新的思路, 也为下一步5-HT信号系统的研究提供了基础. 同时, 也为临床应用选择性5-HT受体亚型激动剂治疗STC提供了理论依据.

图1 结肠组织中5-HT3和5-HT4受体的表达($\times 100$). A: 对照组肌间神经丛5-HT3受体表达; B: STC组肌间神经丛5-HT3受体表达; C: 对照组黏膜层5-HT4受体表达; D: STC组黏膜层5-HT4受体表达; E: 对照组肌间神经丛5-HT4受体表达; F: STC组肌间神经丛5-HT4受体表达.

丛明显. 以肌间神经丛为中心进行图像分析后显示, STC组阳性指数显著低于对照组, 分别为 65.2 ± 15.9 和 94.3 ± 20.1 ($P < 0.01$, 表1).

2.1.3 5-HT4受体在结肠中的表达 5-HT4受体阳性染色分布于结肠黏膜层、黏膜下层、肌层. 其中以黏膜层和肌间神经丛明显. 在黏膜层, 阳性染色主要分布于吸收性上皮细胞和部分腔面杯状细胞膜, 黏膜肌层阳性染色明显. 分别对黏膜层和肌间神经丛进行图像分析显示, STC组5-HT4受体阳性指数在黏膜层和肌间神经丛均显著低于对照组(57.8 ± 10.9 , 78.5 ± 12.9 ; 77.5 ± 19.9 , 119.2 ± 26.9 , $P < 0.01$) (图1, 表1).

2.2 5-HT3, 5-HT4受体的表达与结肠传输功能的关系 根据术前结肠传输实验结果(口服20粒不透光标志物后, 连续摄X片5 d, 观察体内残留标志物数目), 对STC组肌间神经丛5-HT3, 5-HT4受

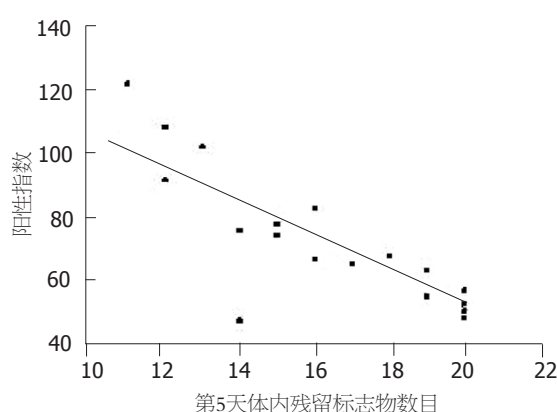


图2 STC组肌间神经丛5-HT4受体阳性指数和结肠传输实验的相关性($r = -0.782$, $P < 0.01$).

体阳性指数与结肠传输功能进行相关分析. 结果显示, 5-HT3受体表达水平与第5天内残留标志物数量无相关性($P > 0.05$); 但5-HT4受体表达水平与第5天内残留标志物数量呈负相关($r = -0.782$,

■同行评价

本文设计内容比较新颖, 讨论较全面, 有一定的指导意义。

$P < 0.01$, 图2)。

3 讨论

近年来, 5-HT对肠正常动力和分泌的调控作用越来越受到关注。肠蠕动、分泌反射的激发, 首先依赖于肠黏膜嗜铬细胞释放5-HT; 同时, 5-HT又是肠神经系统信号传递时重要的神经递质^[6-8]。愈来愈多的研究发现, 5-HT信号系统异常与胃肠道功能性疾病密切相关, 如慢性便秘、肠易激综合征、腹泻及功能性消化不良等^[9-15]。动物实验证明, 5-HT类似物能够加速结肠运动和传输, 促进黏膜上皮的分泌, 而其拮抗剂则具有明显的抑制作用^[16]。我们前期的研究发现, STC患者结肠中, 黏膜层5-HT阳性细胞显著多于正常对照组^[4]。而总5-HT受体的表达在结肠壁中呈下调趋势^[5]。然而, 5-HT对肠功能的调节依赖于不同的5-HT受体, 5-HT受体家族是神经递质受体中最复杂的家族之一, 共7个成员(5-HT1-5-HT7), 15个亚型。在胃肠道分布有5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT7受体, 其功能各异^[17-19]。目前, 有关5-HT受体亚型在STC结肠中表达的研究尚鲜有报道。由于5-HT1A, 5-HT3, 5-HT4受体的功能尤为重要、研究较为透彻, 我们遂选择这3种受体作为研究指标。5-HT1A受体分布于肠神经元, 是少有的抑制性5-HT受体。其主要功能为抑制快速兴奋性突触后电位, 从而抑制肠平滑肌动力。我们的前期研究发现, 5-HT受体在STC结肠壁各层中的表达均呈下调趋势, 但在环肌层中, 5-HT受体水平越高, 结肠传输速度却越慢^[5]。提示, STC患者结肠中可能存在某些抑制性或功能变异的5-HT受体亚型的表达上调。本研究显示, 5-HT1A受体在肠肌间神经丛及黏膜下神经丛有明显阳性染色, 黏膜上皮阴性。在肌间神经丛, STC组的5-HT1A受体表达有高于对照组的趋势, 但两者差异无统计学意义。因此尚不能确定STC结肠中存在5-HT1A受体的表达异常, 不排除因样本量较少等因素未能显示出这种趋势的统计学差异, 有待进一步研究。5-HT3受体是胃肠道各5-HT受体亚型中非常重要的一种, 分布于肠神经元。其主要作用为: (1)来源于迷走神经的肠外在感觉神经通过5-HT3受体介导, 将肠感觉信息传递至中枢神经系统。因此, 肠神经系统向中枢神经系统的感觉传递需要5-HT3受体的介导; (2)肠肌间神经丛的5-HT3受体也负责介导中间神经元快速兴奋性电位的传递; (3)胃结肠反射由5-HT3受体介导^[20-21]。因此, 5-HT3受体

一方面介导了肠感觉向中枢的传递, 另一方面也参与了肠动力的产生。研究结果显示, 5-HT3受体主要分布于黏膜下、肌间神经丛, STC结肠中5-HT3受体阳性染色较对照组明显减少、强度降低。提示STC结肠中存在5-HT3受体的表达下调。因此, 一方面使肠感觉向中枢传递受到影响, 导致了临床上STC患者便意减少。另一方面, 5-HT3受体的下调也影响了肌间神经丛5-HT传递, 影响了肠正常动力通路, 参与了便秘的发生。5-HT4受体是胃肠道各5-HT受体亚型中研究最为深入、功能非常重要的一种。其在胃肠道中的分布较为广泛, 肠神经元、肠平滑肌细胞、肠上皮细胞中均有发现^[22]。肠蠕动、分泌反射的激发, 即来自于肠黏膜层嗜铬细胞接受刺激后释放5-HT, 后者作用于黏膜下层神经末梢上的5-HT4和5-HT1P受体来介导完成^[23-24]。在肌间神经丛, 5-HT4受体促进胆碱能系统的神经递质释放, 导致平滑肌收缩^[25]。此外, 在一些肠平滑肌细胞上分布有5-HT4受体, 直接导致平滑肌舒张。分布于肠黏膜上皮细胞的5-HT4受体则介导了肠分泌功能^[26-28]。本研究显示, 在STC结肠中, 5-HT4受体阳性染色在黏膜层、黏膜下神经丛、肌间神经丛及肌层等均明显减少, 强度降低。提示STC结肠中存在5-HT4受体表达下降, 从而影响了肠蠕动、分泌反射的正常进行, 参与了STC的产生。对5-HT4受体基因敲除大鼠的研究发现, 其结肠动力明显下降。该大鼠结肠壁很薄, 主要为肌层变薄, 且总是较正常大鼠黏膜下和肌间神经元减少, 老年较年轻大鼠更为明显^[29]。提示长期缺乏5-HT4受体刺激可能导致结肠神经元和平滑肌萎缩。这与我们对STC行结肠次全切除术后病理标本见到的肠壁变薄、肠神经元减少相符合。进一步提示, 5-HT4受体表达异常可能与STC的发病密切相关。目前, 对结肠传输功能的评估除了根据临床症状外, 主要依靠结肠传输实验。正常人口服标志物后第5天应排出80%以上^[30]。我们对STC患者5-HT3和5-HT4受体的表达与结肠传输功能的相关分析显示, 5-HT3受体的表达与结肠传输功能未发现明显相关性, 提示两者间的关系比较复杂, 可能存在其他相关因素的影响, 尚有待进一步研究。而5-HT4受体的表达与第5天体内残留标志物数量呈负相关, 即STC患者结肠中, 5-HT4受体表达越少, 第5天体内残留标志物越多, 提示结肠传输功能越差。因此, 5-HT4受体的表达下降在STC的发病机制中可能具有较为重要的作用。

总之, STC患者结肠中存在5-HT₃和5-HT₄受体亚型的表达异常, 两者可能参与了STC的发病机制. 然而对5-HT受体亚型表达异常的产生机制, 尚有待进一步的深入研究.

4 参考文献

- 1 Kobayashi A, Yokota H, Kobayashi H, Yamataka A, Miyano T, Hayashida Y. Mucosal neuroendocrine cell abnormalities in patients with chronic constipation. *Asian J Surg* 2004; 27: 197-201
- 2 Bassotti G, Villanacci V. Slow transit constipation: a functional disorder becomes an enteric neuropathy. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4609-4613
- 3 Chan AO, Cheng C, Hui WM, Hu WH, Wong NY, Lam KF, Wong WM, Lai KC, Lam SK, Wong BC. Differing coping mechanisms, stress level and anorectal physiology in patients with functional constipation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5362-5366
- 4 Zhao RH, Baig MK, Mack J, Abramson S, Woodhouse S, Wexner SD. Altered serotonin immunoreactivities in the left colon of patients with colonic inertia. *Colorectal Dis* 2002; 4: 56-60
- 5 Zhao RH, Baig MK, Thaler KJ, Mack J, Abramson S, Woodhouse S, Tamir H, Wexner SD. Reduced expression of serotonin receptor(s) in the left colon of patients with colonic inertia. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 81-86
- 6 De Ponti F. Pharmacology of serotonin: what a clinician should know. *Gut* 2004; 53: 1520-1535
- 7 Tonini M, Pace F. Drugs acting on serotonin receptors for the treatment of functional GI disorders. *Dig Dis* 2006; 24: 59-69
- 8 Hansen MB. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* 2003; 92: 249-257
- 9 丁健华, 傅传刚, 赵荣华. 5羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2405-2408
- 10 Miwa J, Echizen H, Matsueda K, Umeda N. Patients with constipation-predominant irritable bowel syndrome (IBS) may have elevated serotonin concentrations in colonic mucosa as compared with diarrhea-predominant patients and subjects with normal bowel habits. *Digestion* 2001; 63: 188-194
- 11 Baig MK, Zhao RH, Woodhouse SL, Abramson S, Weiss JJ, Nogueras JJ, Wexner SD. Variability in serotonin and enterochromaffin cells in patients with colonic inertia and idiopathic diarrhoea as compared to normal controls. *Colorectal Dis* 2002; 4: 348-354
- 12 Chua AS, Keeling PW, Dinan TG. Role of cholecystokinin and central serotonergic receptors in functional dyspepsia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1329-1335
- 13 Cash BD, Chey WD. Review article: The role of serotonergic agents in the treatment of patients with primary chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 1047-1060
- 14 Borman R. Serotonergic modulation and irritable bowel syndrome. *Expert Opin Emerg Drugs* 2001; 6: 57-68
- 15 Gershon MD. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S184-S193
- 16 Grider JR, Foxx-Orenstein AE, Jin JG. 5-Hydroxytryptamine₄ receptor agonists initiate the peristaltic reflex in human, rat, and guinea pig intestine. *Gastroenterology* 1998; 115: 370-380
- 17 Read NW, Gwee KA. The importance of 5-hydroxytryptamine receptors in the gut. *Pharmacol Ther* 1994; 62: 159-173
- 18 Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46: 157-203
- 19 Gershon MD. Review article: serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 7: 3-14
- 20 Bjornsson ES, Chey WD, Ladabaum U, Woods ML, Hooper FG, Owyang C, Hasler WL. Differential 5-HT₃ mediation of human gastrocolonic response and colonic peristaltic reflex. *Am J Physiol* 1998; 275: G498-G505
- 21 Liu MT, Rayport S, Jiang Y, Murphy DL, Gershon MD. Expression and function of 5-HT₃ receptors in the enteric neurons of mice lacking the serotonin transporter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1398-G1411
- 22 Mader R, Kocher T, Haier J, Wiczorek G, Pfannkuche HJ, Ito M. Investigation of serotonin type 4 receptor expression in human and non-human primate gastrointestinal samples. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 945-950
- 23 Pan H, Gershon MD. Activation of intrinsic afferent pathways in submucosal ganglia of the guinea pig small intestine. *J Neurosci* 2000; 20: 3295-3309
- 24 Goyal RK, Hirano I. The enteric nervous system. *N Engl J Med* 1996; 334: 1106-1115
- 25 Leclerc PG, Prins NH, Schuurkes JA, Lefebvre RA. 5-HT₄ receptors located on cholinergic nerves in human colon circular muscle. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 366-375
- 26 Cooke HJ. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann NY Acad Sci* 2000; 915: 77-80
- 27 Briejer MR, Akkermans LM, Schuurkes JA. Gastrointestinal prokinetic benzamides: the pharmacology underlying stimulation of motility. *Pharmacol Rev* 1995; 47: 631-651
- 28 Talley NJ. Serotonergic neuroenteric modulators. *Lancet* 2001; 358: 2061-2068
- 29 Taniyama K, Makimoto N, Furuichi A, Sakurai-Yamashita Y, Nagase Y, Kaibara M, Kanematsu T. Functions of peripheral 5-hydroxytryptamine receptors, especially 5-hydroxytryptamine₄ receptor, in gastrointestinal motility. *J Gastroenterol* 2000; 35: 575-582
- 30 Bassotti G, de Roberto G, Castellani D, Sediari L, Morelli A. Normal aspects of colorectal motility and abnormalities in slow transit constipation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2691-2696

电编 李琪 编辑 王晓瑜

感染后与非感染后IBS患者结肠黏膜SP与IL-2、IFN- γ 表达的相关性

鞠辉, 张小芳, 刘希双, 魏良洲

■背景资料

神经-炎症/免疫学说是新近提出的IBS发生机制之一, 在肠黏膜内神经和免疫机制之间可能存在某种沟通的渠道或联接机制. 本研究旨在分析感染后IBS患者外周末梢神经与Th1细胞因子IL-2, IFN- γ 表达的关系, 为今后从神经-炎症/免疫方面分析研究IBS的发生机制提供理论依据.

鞠辉, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜中心 山东省青岛市 266003

张小芳, 烟台市牟平人民医院消化内科 山东省烟台市 264100

鞠辉, 2006年毕业于青岛大学医学院消化内科专业, 硕士, 现在青岛大学医学院附属医院内镜中心工作, 主要从事消化内镜诊治工作.

通讯作者: 魏良洲, 266003, 山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院消化内科. weiliangzhou62@126.com

电话: 0532-82911303, 82911525

收稿日期: 2006-08-10 接受日期: 2006-09-01

Correlations of substance P with interleukin-2 and interferon- γ expression in colonic mucosa of patients with post- and non-post-infectious irritable bowel syndrome

Hui Ju, Xiao-Fang Zhang, Xi-Shuang Liu, Liang-Zhou Wei

Hui Ju, Xi-Shuang Liu, Center of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Xiao-Fang Zhang, Department of Gastroenterology, Muping People's Hospital, Yantai 264100, Shandong Province, China

Correspondence to: Liang-Zhou Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China. weiliangzhou62@126.com

Received: 2006-08-10 Accepted: 2006-09-01

Abstract

AIM: To investigate relationship between substance P (SP) activity and expression of interleukin-2 (IL-2) and interferon- γ (IFN- γ) in colonic mucosa from patients with post-infectious irritable bowel syndrome (PI-IBS).

METHODS: Mucosal biopsy samples were obtained by colonoscopy from the descending colon and rectum of 77 patients ($n = 21$ and 52 , for PI-IBS and non-PI-IBS, respectively) and 30 controls. The expression of SP, IL-2, and IFN- γ were determined by immunohistochemistry.

RESULTS: The expressions of SP was significantly higher in the descending colon and rectum mucosa from PI-IBS patients than that from non-PI-IBS patients ($t = 2.321, 2.452, 2.414, 2.520, P < 0.05$) and controls ($t = 3.623, 3.722, 3.454, 3.561, P < 0.01$). The positive rates of IL-2 and IFN- γ were also markedly higher in PI-IBS patients than those in the controls ($\chi^2 = 13.781, 13.890, 14.012, 13.931, P < 0.01$) and non-PI-IBS patients ($\chi^2 = 10.010, 9.892, 9.984, 10.152, P < 0.05$). The expression of SP in PI-IBS patients with positive IL-2 and IFN- γ was significantly increased as compared with the controls ($t = 2.202, 2.220, 2.301, 2.252, P < 0.05$) and non-PI-IBS patients ($t = 2.182, 2.230, 2.194, 2.174, P < 0.05$). There were no significant differences between the controls and non-PI-IBS patients.

CONCLUSION: Gastrointestinal infection may take part in the pathogenesis of IBS through neuroimmune mechanism.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Substance P; Interleukin-2; Interferon- γ ; Immunohistochemistry

Ju H, Zhang XF, Liu XS, Wei LZ. Correlations of substance P with interleukin-2 and interferon- γ expression in colonic mucosa of patients with post- and non-post-infectious irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3116-3120

摘要

目的: 探讨肠道感染对IBS患者结肠黏膜SP, IL-2, IFN- γ 表达的影响.

方法: 77例IBS患者(PI-IBS组26例, 非PI-IBS组51例)及30例对照者, 结肠镜下活检降结肠和直肠黏膜标本, 采用免疫组化检测其肠黏膜SP与IL-2, IFN- γ 的表达情况.

结果: PI-IBS患者结肠黏膜SP的表达高于非PI-IBS患者($t = 2.321, 2.452, 2.414, 2.520, P < 0.05$)和对照组($t = 3.623, 3.722, 3.454, 3.561, P < 0.01$); PI-IBS患者结肠黏膜IFN- γ 和IL-2阳性率表达高于非PI-IBS患者($\chi^2 =$

10.010, 9.892, 9.984, 10.152, $P < 0.05$)和对照组($\chi^2 = 13.781, 13.890, 14.012, 13.931, P < 0.01$); IFN- γ 和IL-2阳性表达的PI-IBS患者结肠黏膜SP表达高于非PI-IBS患者($t = 2.182, 2.230, 2.194, 2.174, P < 0.05$)和对照组($t = 2.202, 2.220, 2.301, 2.252, P < 0.05$). 非PI-IBS患者结肠黏膜IFN- γ 和IL-2阳性SP的表达者与对照组比较无明显差异。

结论: 感染可能通过肠黏膜神经-免疫/炎症系统的改变参与了IBS的发病。

关键词: 肠易激综合征; P物质; 白细胞介素-2; 干扰素- γ ; 免疫组化

鞠辉, 张小芳, 刘希双, 魏良洲. 感染后与非感染后IBS患者结肠黏膜SP与IL-2、IFN- γ 表达的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3116-3120
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3116.asp>

0 引言

肠道急性感染后, 肠功能紊乱的发生率增高, 并伴随肠黏膜某些免疫细胞(如肥大细胞)的增多以及一些炎性介质表达的增高, 感染可能是肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的致病因素之一^[1-2]. 临床研究发现约1/3 IBS患者在其患病前曾有急性胃肠道感染史; 部分被肠道病毒、细菌或寄生虫感染的患者, 在病原体已清除及黏膜炎症消退后, 可发生IBS样的症状, 称之为感染后肠易激综合征(post-infective irritable bowel syndrome, PI-IBS)^[3-4]. P物质(substance P, SP)为肠道黏膜外周末梢神经, 可能诱导腹泻和腹痛的发生^[5-6]; 还可以通过与其受体结合可调节炎性细胞因子的释放和合成, 以促进Th1细胞因子表达上调为主^[7-8]. IL-2与IFN- γ 是主要的Th1细胞因子, 在Th1型反应中起重要作用^[9], 可能促进肠蠕动增加, 出现IBS样症状^[10]. 本研究采用免疫组化检测IBS患者肠黏膜SP, IL-2和IFN- γ 的表达, 分析感染在IBS发病机制中对SP与Th1细胞因子表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-09/2005-07青岛大学医学院附属医院消化内科门诊IBS患者77例, 男29例, 女48例, 平均年龄 40.6 ± 11.5 岁, 均符合IBS罗马II诊断标准^[11]. PI-IBS者26例, 男9例, 女17例, 平均年龄 39.9 ± 10.6 岁; 非PI-IBS者51例, 男20例, 女31例, 平均年龄 41.9 ± 12.0 岁, 男12例, 女20例. PI-

IBS纳入标准: (1)罗马II诊断标准; (2)出现IBS症状前至少1 d有胃肠道急性感染病史, 且治疗未超过5 d而治愈, 没有复发者. 排除标准: (1)有肠道器质性疾病及手术史者; (2)有全身其他系统器质性疾病者; (3)孕妇和哺乳期妇女. 设对照组30例, 男性12例, 女性18例, 平均年龄 38.45 ± 10.90 岁, 纳入标准: 为结肠息肉电切术后复查无异常发现者(术后至少半年)或因大便带少量鲜血行结肠镜检查诊断为痔疮者, 无其他消化道症状与体征, 无免疫疾病、感染病史, 无近期服药史. 兔抗人IL-2抗体、兔抗人IFN- γ 抗体及SABC试剂盒均购自武汉博士德生物工程公司, 抗人P物质多克隆抗体(ZA-0235北京中杉金桥生物技术有限公司提供)。

1.2 方法 分别取降结肠、直肠黏膜各2块, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 所有蜡块均行4 μ m连续切片, 每例每部位各取一张切片HE染色, 进行常规病理组织学诊断. 切片常规脱蜡, 梯度乙醇水洗, 氧水室温孵育10 min, 放入pH = 7的枸橼酸钾缓冲液中5 min, 后进行微波修复10 min, PBS缓冲液冲洗15 min, 去除PBS, 滴加兔抗人P物质多克隆抗体(兔抗人IL-2抗体、兔抗人IFN- γ 抗体), PBS缓冲液冲洗15 min, 滴加通用型IgG抗体(Fab段)-HRP多聚体, 37℃孵育20 min, PBS缓冲液冲洗5 min \times 3次, 去掉PBS, 滴加新鲜配置的DAB显色剂. 采用双盲法判断结果, 每张切片选择有代表性的区域, 并避开切片周边区域. 对IFN- γ , IL-2染色的判断, 根据阳性细胞百分数和染色强度进行分级^[12], 阳性细胞0%-5%, 计0分; 6%-25%, 计1分; 26%-50%, 计2分; 51%-75%, 计3分; >75%, 计4分. 同时根据胞质着色程度计分: 未染色0分; 淡黄色1分; 棕黄色2分; 棕褐色3分. 两组计分相加, 0-1分为阴性; 2-3分为弱阳性; 4-5分为阳性; 6-7分为强阳性. 对SP行定量分析用VIDAS图像分析系统, 检测其吸光度A值。

统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件包进行处理, 应用方差分析和 t 检验。

2 结果

IBS患者77例与对照者在内镜下结肠黏膜均未见明显充血、水肿、渗出等炎症改变. IBS患者降结肠、直肠黏膜均经HE染色, 显微镜下观察见黏膜上皮完整, 黏膜下及固有腺之间可见少量淋巴细胞及浆细胞浸润, 个别可见少量中性粒细胞浸润, 各组间及与对照组相比, 差异无显著性。

■ 研发前沿

现在国内外研究IBS发生机制主要集中于炎症因子与肠黏膜神经之间的关系, 炎症因子主要是Th1细胞因子IL-2, IFN- γ , IL-12等, 肠黏膜神经主要包括P物质、血管活性肠肽、神经特异性烯醇酶等。

■创新盘点

目前未有感染后IBS患者肠黏膜SP与IL-2, IFN- γ 相关性研究的报道. 本研究发现感染可能促进肠黏膜SP表达的增加, 而SP表达增加后, 又促使IFN- γ , IL-2的表达上调, 通过神经-炎症/免疫的途径诱导IBS的发生.

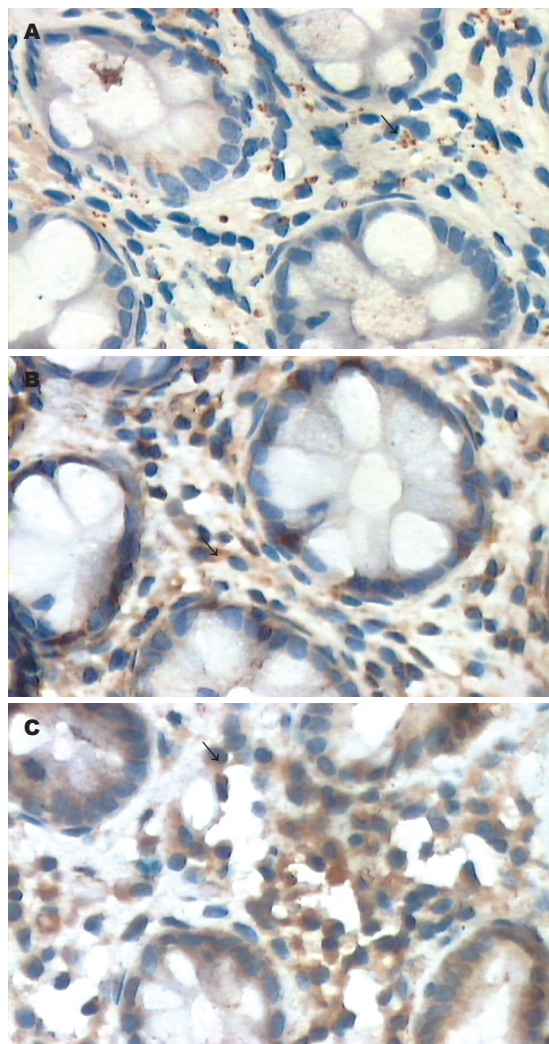


图1 PI-IBS患者结肠黏膜SP, IL-2, IFN- γ 表达(→) × 400. A: SP; B: IL-2; C: IFN- γ .

2.1 肠黏膜IFN- γ , IL-2的表达 IFN- γ , IL-2的表达在降结肠、直肠黏膜固有膜, 呈现棕黄色, 分布于腺体周围(图1B-C). PI-IBS患者降结肠、直肠的IFN- γ , IL-2阳性表达高于对照组($\chi^2 = 13.781, 13.890, 14.012, 13.931, P < 0.01$)、非PI-IBS组($\chi^2 = 10.010, 9.892, 9.984, 10.152, P < 0.05$); 非PI-IBS患者降结肠、直肠的IFN- γ , IL-2的阳性表达与对照组比较($\chi^2 = 2.280, 2.322, 2.190, 2.352, P > 0.05$), 差异无统计学意义(表1).

2.2 SP的表达 SP分布于腺体周围的固有层中, 呈散在点状或簇状分布(图1A). PI-IBS患者降结肠、直肠黏膜SP表达高于对照组($t = 3.623, 3.722, 3.454, 3.561, P < 0.01$)、非PI-IBS组($t = 2.321, 2.452, 2.414, 2.520, P < 0.05$); 非PI-IBS患者降结肠、直肠黏膜SP表达高于对照组($t = 2.152, 2.161, 2.157, 2.189, P < 0.05$, 表2). 降结肠、直肠黏膜IFN- γ , IL-2阳性表达的PI-IBS患者, SP阳

表1 IBS患者肠黏膜IFN- γ , IL-2的表达

		PI-IBS组(%) (<i>n</i> = 26)	非PI-IBS组(%) (<i>n</i> = 51)	对照组(%) (<i>n</i> = 30)
降结肠	IFN- γ	88.5 ^{ab}	47.0	30.0
	IL-2	84.6 ^{ab}	41.1	23.3
直肠	IFN- γ	80.7 ^{ab}	39.2	26.6
	IL-2	69.2 ^{ab}	31.3	20.0

^a $P < 0.05$ vs 非PI-IBS组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

性表达高于非PI-IBS组($t = 2.182, 2.230, 2.194, 2.174, P < 0.05$)和对照组($t = 2.202, 2.220, 2.301, 2.252, P < 0.05$). 降结肠、直肠黏膜IFN- γ , IL-2阳性表达的非PI-IBS患者与对照组比较, SP表达增加, 但是无显著性差异(表3).

3 讨论

IBS的病因和发病机制迄今还不完全清楚. 目前认为其病因与精神心理因素、胃肠动力异常、内脏感觉过敏、脑-肠轴的改变和炎症免疫等有关. 神经-炎症/免疫学说是新近提出的观点之一. SP是在脑和肠道中均存在的肽, 在肠道内主要存在于肠神经系统的内源性神经元. 我们的实验表明PI-IBS、非PI-IBS患者结肠黏膜SP均值和面积表达高于对照组, PI-IBS患者结肠黏膜SP比非PI-IBS患者表达增多, 与李兆申 *et al*^[13]的研究结果相似. SP是一种主要的促炎症性感觉性神经肽, 腹泻型IBS患者血浆中SP水平升高, SP可能以循环激素的方式作用于乙状结肠平滑肌, 使运动增强而致腹泻^[14]. 肠道发生感染后, 炎症可致使SP表达增加^[15]. SP表达增加后通过与非胆碱能的传递促进肠道的蠕动; 通过特异性受体活化内皮细胞钙离子依赖性NO合酶, 促进NO合成, 增加血管通透性; 刺激黏膜下分泌运动神经以增加黏膜离子的转运^[5], 从而发生腹泻. SP表达的增加还可以通过刺激胆碱能神经和依赖NO的抑制性神经系统, 引起肠道压力的升高^[6], 诱发痛觉过敏的发生. 王巍峰 *et al*^[16]报道SP在中枢及肠道可能参与C-IBS的病理生理过程, 而且SP能神经通路可能是参与肠道感觉或运动功能调节的神经传导通路之一. 我们的实验发现, PI-IBS患者降结肠、直肠黏膜的IL-2, IFN- γ 表达比对照组增加, 与李延青 *et al*^[12]的研究结果相似. 通过检测IBS患者外周血T淋巴细胞亚群水平的变化, 发现IBS患者存在T淋巴细胞功能减弱和调节紊乱, 细胞免疫异常可能参与IBS的发

表 2 IBS患者不同分型SP强度均值与面积的表达(mean \pm SD)

部位		PI-IBS组	非PI-IBS组	对照组
降结肠	SP强度均值	14.7 \pm 2.3 ^{ab}	12.3 \pm 2.7 ^c	8.8 \pm 2.2
	SP面积	2878.9 \pm 450.0 ^{ab}	2689.2 \pm 480.4 ^c	2200.5 \pm 432.0
直肠	SP强度均值	13.8 \pm 2.5 ^{ab}	10.0 \pm 2.6 ^c	8.8 \pm 2.0
	SP面积	2850.5 \pm 510.4 ^{ab}	2589.2 \pm 500.3 ^c	2120.8 \pm 456.4

^a $P < 0.05$ vs 非PI-IBS组; ^b $P < 0.01$; ^c $P < 0.05$ vs 对照组.

表 3 IBS患者结肠黏膜IFN- γ 、IL-2阳性表达与SP强度均值的关系(mean \pm SD)

部位	细胞因子	PI-IBS组	非PI-IBS组	对照组
降结肠	IFN- γ 阳性	15.0 \pm 3.2 ^{ab}	11.2 \pm 3.1	9.8 \pm 2.9
	IL-2阳性	14.9 \pm 3.2 ^{ab}	11.7 \pm 3.3	9.6 \pm 3.1
直肠	IFN- γ 阳性	14.5 \pm 3.0 ^{ab}	10.9 \pm 2.4	9.2 \pm 2.2
	IL-2阳性	15.0 \pm 3.2 ^{ab}	12.0 \pm 3.0	10.8 \pm 3.2

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 非PI-IBS组.

病^[17]. IBS患者存在Th1/Th2细胞因子的漂移^[12], 而且IBS发生与炎症有密切联系^[18]. PI-IBS患者肠黏膜IFN- γ 、IL-2表达增加, 二者可以促进血管通透性增加; 促使组织胺、花生四烯酸代谢产物(PGD2, LTC4, LTD4, TXE4)、血小板活化因子(PAF)表达增多, 使平滑肌收缩增强, 肠道蠕动增加^[10], 导致腹泻; 还可以介导局限于黏膜的轻微炎症反应, 干扰胃肠反射, 活化内脏感觉系统, 出现腹痛和直肠敏感性增加.

PI-IBS和非PI-IBS患者降结肠、直肠黏膜IFN- γ 和IL-2阳性表达的SP的表达增加, PI-IBS增加更著. PI-IBS患者肠黏膜IFN- γ 、IL-2阳性表达的SP表达高于对照组和非PI-IBS组, 而非PI-IBS患者肠黏膜IFN- γ 、IL-2阳性表达的SP表达与对照组比较有增加趋势, 无统计学差异. PI-IBS患者肠黏膜IFN- γ 、IL-2的表达与SP表达有关, 这可能是黏膜免疫系统和传入神经末梢之间交互作用. 感染可能促使SP表达增加, SP与炎症细胞表面的SP受体结合, 促进炎症因子的释放. SP与Th1细胞膜表面的SP受体(主要是neurokinin-1, NK-1)结合, 促使Th1细胞释放IFN- γ 、IL-2、IL-12等因子, 诱发Th1反应, 激活免疫细胞如T细胞、NK细胞等, 促进炎症因子的释放如IL-1 β , TNF- α , 前列腺素E₂等, 破坏肠黏膜上皮屏障功能. Th1反应增强还可能导致机体打破对肠道常住细菌的耐受状态, 使抗原微生物免疫和异物排斥反应增强. 感染的持续时间与IBS的发生风险有关, 感染持续2 wk或以上者发生IBS的OR值

明显高于1 wk者, 且回肠末端和直肠乙状结肠的IL-1 β mRNA表达也明显增加^[2].

在培养的细胞系中, 加入SP就可以使IL-2 mRNA的表达增加, 若加入SP拮抗剂后, 则抑制其表达^[7], 研究已证实了SP具有上调某些细胞因子表达的作用^[8]. 我们认为感染可引起的肠内免疫细胞数量或活性增加, 通过神经免疫机制, 产生持续的异常的黏膜免疫, 引发大量细胞因子的释放, 造成不同功能的细胞因子失去平衡, 从而产生相应的病理生理改变. SP可能只是调节细胞因子表达或释放的介质之一. 大量炎症因子释放作用于肠道神经元和平滑肌细胞, 导致肠黏膜化学感受器和机械感受器对各种刺激敏感性增加.

曾患痢疾/肠炎者1-2 a内发展为IBS者占痢疾患者的10.2%, 较同期未患肠道感染对照组IBS的发病率(0.8%)明显为高^[19]. 肠道感染对肠黏膜屏障、传入神经及免疫功能的影响, 最终导致肠道分泌功能、运动功能及内脏感知的改变. 急性胃肠炎后持续存在的低度炎症可破坏肠黏膜上皮屏障功能, 增加其通透性, 引起水钠吸收障碍而产生腹泻; 同时也引起抗原的过度暴露以及刷状缘的缺失, 从而激活肠黏膜免疫系统, 引起包括肥大细胞、淋巴细胞、内分泌细胞在内的各种炎症及免疫细胞增加, 释放多种细胞因子, 使炎症介质表达增加^[20]. 局限于黏膜的轻微炎症反应即可干扰胃肠反射, 活化内脏感觉系统. 炎症还可引起包括前列腺素、缓

■应用要点

本研究采用免疫组化检测IBS患者肠黏膜SP、IL-2和IFN- γ 的表达, 分析感染在IBS发病机制中对SP与Th1细胞因子表达的影响, 为今后研究神经-炎症/免疫因素在IBS发生机制中的作用提供一定的实验基础.

■同行评价

PI-IBS是目前研究的热点,但PI-IBS的诊断仍不明确,本文采用免疫组化检测其肠黏膜SP与IL-2、IFN- γ 的表达情况,探讨PI-IBS的发病机制,具有一定的临床意义。

激肽、神经生长因子、腺苷增加,张晓敏 *et al*^[21]报道D-IBS患者存在5-HT基因多态性,这些介质或直接作用于初级传入纤维或间接经由肥大细胞,启动活化和致敏机制的级联效应,使附近的伤害性感受器(外周传入纤维末梢)产生继发性的过敏^[12]。Wang *et al*^[11]通过对295例细菌性痢疾患者进行的队列研究发现,SP、神经特异性烯醇酶(NSE)和5羟色胺(5-HT)促进了PI-IBS患者肠黏膜IL-1 α , IL-1 β 的表达,提出细菌性痢疾是PI-IBS的一个病因,而且免疫和神经机制对PI-IBS的发生起重要作用。Collins *et al*^[22]认为,该研究首次在国际上报道了肠志贺菌感染与IBS的相关性,为说明神经-免疫联接机制在PI-IBS发病机制中的作用,提供了强有力的证据。感染可能促进肠黏膜SP表达的增加,而SP表达增加后,又促使IFN- γ , IL-2的表达上调,通过神经-炎症/免疫的途径诱导IBS的发生。不过不同病原的胃肠道感染(细菌感染或病毒感染)、感染的持续时间等对IBS结肠黏膜神经递质与炎症介质表达的影响,以及炎症在PI-IBS患者感觉动力障碍及症状发生中的作用有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 2004; 53: 1096-1101
- 2 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
- 3 肖海刚, 郭津. 细菌性痢疾与肠易激综合征相关性分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1012-1014
- 4 Neal KR, Barker L, Spiller RC. Prognosis in post-infective irritable bowel syndrome: a six year follow up study. *Gut* 2002; 51: 410-413
- 5 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; 4: 611-614
- 6 Scheurer U, Wenger F, Caliezi A, Drack E, Varga L, Halter F. Different motor actions of dynorphins and nonpeptide kappa opioid receptor agonists in the isolated rat colon. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 1324-1330
- 7 Kang H, Byun DG, Kim JW. Effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on interferon-gamma and interleukin-4 production in severe atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85: 227-232
- 8 Hommes DW, van Deventer SJ. Anti- and proinflammatory cytokines in the pathogenesis of tissue damage in Crohn's disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 191-195
- 9 丁桂凤. 免疫细胞与炎症介质在肠炎发病中的作用. *生理科学进展* 2001; 3: 233-239
- 10 Qian BF, El-Salhy M, Melgar S, Hammarstrom ML, Danielsson A. Neuroendocrine changes in colon of mice with a disrupted IL-2 gene. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 424-433
- 11 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II43-47
- 12 李延青, 张海燕, 左秀丽, 袁海鹏, 卢雪峰, 李君曼. 肠易激综合征患者肠黏膜Th1/Th2漂移的研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 728-731
- 13 李兆申, 董文珠, 邹多武, 满晓华, 邹晓平, 尹宁, 朱爱勇. 肠易激综合征肠黏膜SP、VIP、CGRP变化的研究. *第二军医大学学报* 2003; 24: 147-151
- 14 桂先勇, 潘国宗, 柯美云, 陈国钧. 胃肠肽在应激所致结肠动力紊乱中的作用. *中华医学杂志* 1997; 77: 31-34
- 15 Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves protein kinase Cdelta activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1393-1400
- 16 王巍峰, 杨云生, 孙刚, 彭丽华. 肠易激综合征大鼠P物质能神经通路的改变. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 214-218
- 17 贾勇, 王巧民, 戴海明. 肠易激综合征T淋巴细胞亚群变化及其意义. *临床消化病杂志* 2002; 14: 60-61
- 18 Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Corinaldesi R. A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i41-44
- 19 王利华, 方秀才, 潘国宗. 肠道感染与肠易激综合征. *中华内科杂志* 2002; 41: 90-93
- 20 Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; 47: 804-811
- 21 张晓敏, 林志辉. 5-羟色胺转运体基因多态性与肠易激综合征的相关性. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1790-1794
- 22 Collins SM, Barbara G. East meets West: infection, nerves, and mast cells in the irritable bowel syndrome. *Gut* 2004; 53: 1068-1069

电编 张敏 编辑 潘伯荣

炎性因子与胰岛素抵抗

张洁, 王方, 许海燕, 孟雁

张洁, 王方, 孟雁, 中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院生理学系 北京市 100005
张洁, 许海燕, 中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院生物医学工程系 北京市 100005
科技部专项基金, No.2004CB720004, No.2004CCA01400
国家自然科学基金, No.30370668
北京市自然科学基金, No.5062034
通讯作者: 孟雁, 100005, 北京市东单三条五号, 中国医学科学院基础医学研究所生理系, ymengsmile@yahoo.com
电话: 010-65265315 传真: 010-65265315
收稿日期: 2006-07-11 接受日期: 2006-08-22

摘要

近年, 代谢综合征(metabolic syndrome, MS)及其高发病率严重威胁着人类的健康和生命。代谢综合征病因学的核心是胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 然而, 其相关机制并不是十分清楚, 研究显示血浆中某些炎性因子(如: C反应蛋白、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α)浓度的升高与IR的发生密切相关, 表明炎性因子在IR过程中具有重要作用。本文将就这些炎性因子影响胰岛素敏感性的机制加以介绍。

关键词: 胰岛素抵抗; 炎症反应; 炎性因子

张洁, 王方, 许海燕, 孟雁. 炎性因子与胰岛素抵抗. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3121-3125
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3121.asp>

0 引言

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是指机体对胰岛素不敏感, 表现为外周组织尤其是肌肉、脂肪组织对葡萄糖利用降低。IR早期, 胰岛 β 细胞尚能代偿性增加胰岛素分泌以弥补其效应不足, 但久而久之, 胰岛 β 细胞功能逐步衰退, 导致糖耐量异常和糖尿病发生。炎症反应是指具有血管系统的活体组织对损伤因子所产生的防御反应。炎症反应时, 机体分泌大量炎性因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和C反应蛋白(C-reactive-protein, CRP)来实现对自身的保护。目前的研究显示, 代谢综合征(metabolic syndrome, MS)人群血浆中炎性因子水平明显升

高。例如, 在高血压、高血脂、动脉粥样硬化、2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus)及肥胖患者的血浆中, TNF- α 和IL-6水平明显升高^[1], 在肥胖模型动物的血浆中TNF- α 表达水平也明显升高^[2], 这些结果提示炎性因子参与了IR。

目前, 炎症反应与IR发生、发展的关系并不十分清楚, 一般认为: 炎性因子介导细胞内炎症反应的信号传导, 导致胰岛素敏感细胞(如肝细胞、肌肉细胞和脂肪细胞)内的胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrates-1, IRS-1)丝氨酸磷酸化, 抑制其酪氨酸磷酸化, 使胰岛素信号传导受阻, 从而诱发IR; 此外, 炎性因子进入脂肪组织, 引起脂质代谢异常(如TNF- α 的脂解作用), 从而使外周游离脂肪酸增加导致IR, 而肥胖患者的脂肪组织也可以增加炎性因子的释放, 从而使其他重要代谢性组织(如肝组织和肌肉)的功能受损^[3]。

1 炎性因子在IR进程中的作用

1.1 TNF- α TNF- α 主要由脂肪组织, 包括脂肪细胞和脂肪基质细胞在内的多种细胞产生^[4]。TNF- α 引起IR的作用机制目前研究得较为清楚, 大致分为以下几点: (1)抑制胰岛素信号传导: TNF- α 可诱导IRS-1丝氨酸磷酸化^[5], 降低IRS-1酪氨酸激酶活性, 使IRS-1的表达下调^[5-6]; 抑制IRS-1与胰岛素受体结合; 降低葡萄糖转运体4(glucose transporter 4, GLUT4)的含量^[5], 从而抑制脂肪细胞摄取葡萄糖, 产生IR。(2)促进脂解作用, 使外周游离脂肪酸增加, 从而抑制肌细胞糖代谢, 促进肝内糖原合成, 间接诱导IR^[7]。在小鼠体内, TNF- α 诱导脂解的最主要的机制是其降低抑制性G蛋白(Gi)的水平^[8]。(3)作用于其他细胞因子, 如刺激IL-6的生成^[9], 抑制脂联素、瘦素^[10]和过氧化物增殖因子受体- γ (PPAR- γ)的产生^[11], 引起IR。(4)刺激单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)的产生, 从而趋化巨噬细胞浸润脂肪组织, 导致炎性因子大量分泌, 引起IR^[4]。将小鼠TNF- α 基因敲除或给小鼠

■背景资料

代谢综合征病因学的核心是胰岛素抵抗, 目前对此领域的相关研究进行的较为深入, 然而, 其相关机制并不是十分清楚。

■创新盘点

与同类文章相比, 本文更为全面的总结和概括了胰岛素抵抗的炎症机制, 具有较好的参考意义.

注入TNF- α 阻断性抗体, 可观察到小鼠体内胰岛素敏感性升高. 然而, 糖尿病患者给予TNF- α 抗体注射后, 胰岛素敏感性并没有明显改善^[12], 临床角度对此现象的解释为: 人类脂肪细胞不分泌TNF- α 进入血液循环^[4,13].

TNF- α 诱导IRS-1丝氨酸磷酸化, 受另外一个炎症中间物IKK- β (Ikappa B kinase- β)的调控^[2,14]. 研究显示, IKK- β 纯合基因小鼠经高脂饮食饲喂或脂质注射后, 再给予大剂量的水杨酸盐(糖尿病治疗性药物), 肥胖小鼠体内IKK- β 活性被抑制, IR得到改善; 2型糖尿病患者给予大剂量水杨酸盐治疗2 wk后, 患者体内血糖快速降低, 机体对葡萄糖的摄取量显著增多^[15].

JNK (c-Jun N-terminal kinases) 是另外一个参与诱导IRS-1丝氨酸磷酸化的丝氨酸激酶^[2,16], 由炎症因子(如TNF- α)激活, 主要作用是诱导胰岛 β 细胞凋亡和对胰岛素信号传导的负向调节^[17]. 肥胖小鼠或肥胖人群脂肪组织中JNK活性增加^[18]; 饮食诱导不能引起JNK基因缺失的小鼠肥胖和IR; 遗传性肥胖小鼠JNK基因突变后变得消瘦, 血浆中葡萄糖和胰岛素的含量降低^[17]; 给予糖尿病小鼠和饮食诱导的IR小鼠一种细胞通透性JNK抑制肽, 其糖耐量和IR可得到明显改善^[18]. 目前, JNK引发IR的机制还并不十分清楚, 用腺病毒诱导JNK在肝细胞内过量表达或抑制, 证实JNK的活性与IRS-1丝氨酸磷酸化有关^[19], 另有实验证实肥胖导致内质网应激是诱导JNK活化、炎症反应和IR起始的基础^[20]. 这些研究使JNK有望成为一种联系炎症和IR的有效的药物靶点^[17].

1.2 IL-6 IL-6由脂肪细胞、脂肪基质细胞和胰岛 β 细胞产生^[21], 其中脂肪细胞是外周IL-6的主要来源, 全身30%的IL-6来源于脂肪组织^[22], 高血糖可促进胰岛 β 细胞分泌IL-6. 在炎症反应早期, 少量IL-6促进胰岛素产生, 导致高胰岛素血症; 在炎症反应晚期, IL-6抑制胰岛素产生, 从而促进糖尿病的发生和发展^[23]. IL-6通过以下机制诱导IR: (1)IL-6诱导IRS-1丝氨酸磷酸化, 抑制其酪氨酸磷酸化^[22,24], 使胰岛素信号传导受阻, 导致IR. (2)IL-6抑制脂联素表达(脂联素能提高胰岛素敏感性), 降低胰岛素敏感性, 导致IR^[4]. (3)IL-6受体与瘦素受体有共同的细胞信号传导通路, IL-6和瘦素具有竞争性抑制作用, IL-6增多可导致瘦素抵抗, 导致IR^[4]. (4)IL-6促进脂解作用使外周游离脂肪酸增加, 从而抑制肌细胞糖代

谢, 促进肝内糖原合成, 间接诱导IR. (5)最近发现, 在3T3-L1脂肪细胞、小鼠肝细胞和人HepG2细胞中, IL-6抑制GLUT4和磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI-3K)的活性, 进而抑制胰岛素信号传导, 导致IR^[23].

IL-6水平的升高是2型糖尿病发病的独立危险因素^[25]. 注射IL-6可诱发患者全身性脂解并抑制糖代谢^[26-27]. 然而, IL-6基因敲除小鼠可产生肥胖和IR的表型^[28], 这两种相反结果的发生机制有待进一步研究和探讨.

1.3 CRP CRP是由肝脏产生、分泌的重要防御分子, 是全身炎症反应的敏感性标志物, 其表达受某些炎症因子调控, 如IL-6和TNF- α 作为极强的促炎因子, 可刺激肝脏合成CRP. CRP主要通过以下机制参与IR的发生发展: (1)CRP介导促炎因子IL-1, IL-6的产生, 从而引起IR; (2)CRP促进TNF- α 释放, 从而抑制胰岛素信号传导, 导致IR. CRP水平的升高与体重指数(body mass index, BMI)增加、血浆脂质含量升高、血浆葡萄糖含量升高、高胰岛素血症和IR密切相关, 并与临床2型糖尿病高风险患病有关^[25,29-30].

IR患者血浆中CRP水平明显升高, 随着胰岛素敏感性的改善, 血浆CRP水平降低. CRP作为非特异性炎症反应标记物, 其水平可预测心血管事件发生的危险性^[25]. 一项对美国健康中年女性进行为期4 a的跟踪调查显示, CRP水平升高使2型糖尿病的发病风险增加了4倍^[4,30].

1.4 MCP-1 MCP-1是介导巨噬细胞激活和趋化的重要介质, 可诱导巨噬细胞由外周血液循环进入脂肪组织并使其激活. 巨噬细胞一旦被激活, 可分泌多种炎症因子, 如IL-6, TNF- α 等, 这些炎症因子均可抑制脂肪细胞的胰岛素信号传导, 还可进一步刺激巨噬细胞分泌大量炎症因子, 最终引起脂肪细胞广泛降解, 释放大游离脂肪酸, 导致IR. 高脂饮食饲喂的肥胖小鼠白色脂肪组织中MCP-1的表达有2次升高, 一次是喂饲高脂饮食后第3周, 另一次是与IR同时出现, 表明MCP-1通过引起小鼠白色脂肪组织中巨噬细胞的浸润诱发IR^[4].

1.5 核转录因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) NF- κ B普遍存在于细胞质, 与抑制性蛋白I κ B结合处于非活性状态, 他可被IL-6, TNF- α 和CRP激活. NF- κ B通过介导一氧化氮的合成及促进TNF- α 和IL-6的产生来加重炎症反应, 使炎症反应持续扩大, 导致IR^[31].

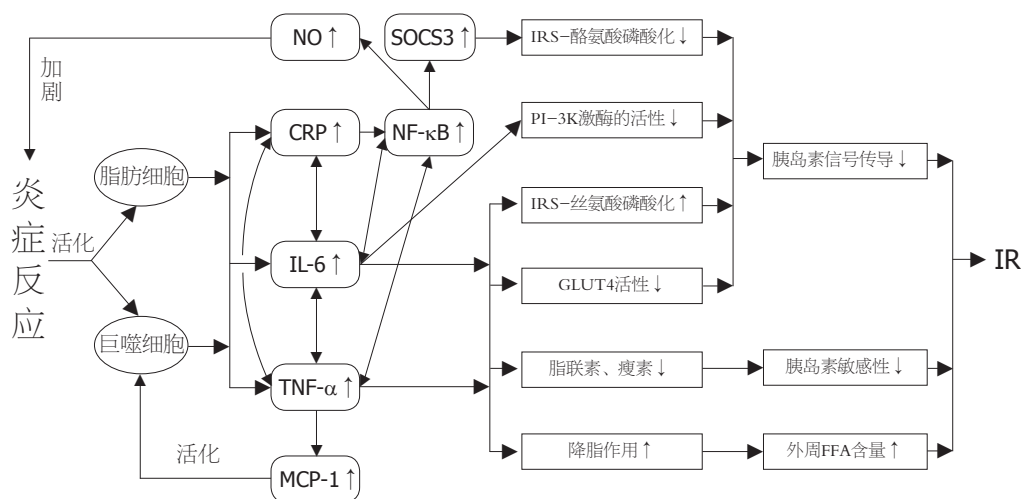


图1 炎症诱导胰岛素抵抗分子机制

■应用要点

在分子和基因水平上研究炎症引起胰岛素抵抗的机制, 有助于我们深入了解胰岛素抵抗的发生过程和病理生理学基础, 并为临床上预防、诊断和治疗与胰岛素抵抗相关的疾病提供有效的方法和手段。

1.6 细胞因子信号3抑制物 (suppressor of cytokine signaling 3, SOCS3) SOCS3是另外一个潜在的与肥胖、炎症、IR相关的因子, 参与胰岛素信号的负反馈调节^[32]。SOCS3的表达通常受NF- κ B介导的信号传导调控^[2]。肥胖小鼠体内SOCS3含量增加; 体外实验证实, SOCS3直接作用于胰岛素受体, 抑制IRS-1酪氨酸磷酸化导致IR并诱导瘦素抵抗^[32-33]。

2 肥胖伴随的慢性炎症诱发IR

肥胖主要的病理生理改变是脂肪细胞数目增多、脂肪细胞体积增大以及脂肪组织内大量巨噬细胞浸润^[34]。人类和小鼠肥胖个体的脂肪组织处于慢性炎症状态^[35-36]。肥胖可增加脂肪组织中巨噬细胞的浸润和炎症因子基因的大量表达。反之, 减重后, 皮下脂肪组织炎症因子基因表达恢复正常^[35]。超重和肥胖患者血清中TNF- α 、可溶性TNF受体P55(sTNF-R I)和血清可溶性TNF受体P75(sTNF-R II)的含量较健康人高; IL-6与BMI呈正相关, 在肥胖患者的血浆中, IL-6水平升高, 随着体重减轻IL-6水平下降^[37]。另外, 高热量饮食可加重炎症反应, 使血浆胰岛素水平明显升高, 而限制饮食则能减轻炎症反应^[36]。

肥胖引起IR的机制主要与脂肪细胞来源的炎症因子和炎症信号传导通路的激活有关^[4]。脂肪组织是炎症介质的主要来源, 脂肪细胞数量增多和脂肪细胞体积增大, 可刺激脂肪组织分泌CRP, TNF- α 和IL-6等炎症因子, 浸润的巨噬细胞作为炎症细胞分泌大量的炎症因子参与IR^[34]。另外, 脂肪细胞与巨噬细胞表达炎症因子的基

因有许多相似之处, 实验证实脂肪细胞和前脂肪细胞可转化为巨噬细胞^[35,38]。这些结果显示, 肥胖在IR发生、发展中具有重要的作用。

除上述炎症因子以外, 发现炎症反应同时还释放炎症抑制因子, 可抑制IR。目前发现的炎症抑制因子主要有: 可溶性肿瘤坏死因子受体(sTNFR)、IL-1受体拮抗物(IL-1ra)、IL-10、IL-4、IL-11、IL-13、转化生长因子- β (TGF- β)和克隆刺激因子(CSF)等。这些炎症抑制因子参与调节炎症因子的释放并调节促炎因子与抗炎因子的平衡, 对炎症反应的程度起决定作用。

总之, IR伴随着血浆中多种炎症标志物和促炎因子含量的升高, 如TNF- α 、IL-6、CRP、NF- κ B和MCP-1等, 而这些炎症因子又分别以不同的途径单独或协同作用诱导IR。图1为炎症诱导IR分子机制。炎症反应活化脂肪细胞和巨噬细胞, 从而激活炎症因子CRP、TNF- α 和IL-6; CRP、TNF- α 和IL-6又有相互协同的作用; 三者可分别激活NF- κ B, 促使NO合成加剧炎症反应; TNF- α 刺激MCP-1产生, 从而激活和趋化巨噬细胞; 最终, 炎症因子使胰岛素信号传导受阻和胰岛素敏感性降低, 并通过脂解作用使外周游离脂肪酸升高等途径导致IR的发生。因此, 在分子和基因水平上研究炎症引起IR的机制, 有助于我们深入了解IR的发生过程和病理生理学基础, 并为临床上预防、诊断和治疗与IR相关的疾病提供有效的方法和手段。

3 参考文献

- 1 Cosentino F, Assenza GE. Diabetes and

■名词解释

胰岛素抵抗(IR): 指机体对胰岛素不敏感, 表现为外周组织尤其是肌肉、脂肪组织对葡萄糖利用降低。

- inflammation. *Herz* 2004; 29: 749-759
- 2 Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 2005; 45: 828-833
- 3 Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 Suppl 3: S53-S55
- 4 Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines. *Curr Mol Med* 2005; 5: 333-339
- 5 Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 1997; 272: 971-976
- 6 Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665-668
- 7 Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 137-145
- 8 Gasic S, Tian B, Green A. Tumor necrosis factor alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem* 1999; 274: 6770-6775
- 9 Fasshauer M, Klein J, Lossner U, Paschke R. Interleukin (IL)-6 mRNA expression is stimulated by insulin, isoproterenol, tumour necrosis factor alpha, growth hormone, and IL-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Horm Metab Res* 2003; 35: 147-152
- 10 Kappes A, Loffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res* 2000; 32: 548-554
- 11 Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 447-455
- 12 Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 1996; 45: 881-885
- 13 Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4196-4200
- 14 Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389: 610-614
- 15 Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109: 1321-1326
- 16 Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420: 333-336
- 17 Liu G, Rondonone CM. JNK: bridging the insulin signaling and inflammatory pathway. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6: 979-987
- 18 Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y, Hori M. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* 2004; 10: 1128-1132
- 19 Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Hatazaki M, Miyatsuka T, Matsuoka TA, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J Biol Chem* 2004; 279: 45803-45809
- 20 Hotamisligil GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2: S73-S78
- 21 Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 847-850
- 22 Path G, Bornstein SR, Gurniak M, Chrousos GP, Scherbaum WA, Hauner H. Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2281-2288
- 23 Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003; 278: 45777-45784
- 24 Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 2002; 51: 3391-3399
- 25 Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-334
- 26 Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M, Steinberg GR, Macaulay SL, Febbraio MA, Pedersen BK. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans *in vivo* and in tissue culture *in vitro*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E155-E162
- 27 Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Defensor R, Mitsiadis CS, Chrousos GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4167-4170
- 28 Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 2002; 8: 75-79
- 29 Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000; 102: 42-47
- 30 Pradhan AD, Ridker PM. Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur Heart J* 2002; 23: 831-834
- 31 Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance,

- obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25: 4-7
- 32 Ueki K, Kondo T, Kahn CR. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5434-5446
- 33 Shi H, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS. Suppressor of cytokine signaling 3 is a physiological regulator of adipocyte insulin signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 34733-34740
- 34 Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1785-1788
- 35 Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808
- 36 Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, Sicard A, Rome S, Benis A, Zucker JD, Vidal H, Laville M, Barsh GS, Basdevant A, Stich V, Cancellor R, Langin D. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J* 2004; 18: 1657-1669
- 37 Bruun JM, Verdich C, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 535-542
- 38 Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1821-1830

■同行评价

文章综述了炎症诱发胰岛素抵抗的作用机制, 详细描述了炎症因子在胰岛素抵抗发生、发展过程中的作用机理, 对胰岛素抵抗相关研究具有一定的指导意义。

电编 张焕兰 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •**欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》**

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘 (Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志 (Abstracts Journals)》收录。

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务人员及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com。

肝纤维化与TGF- β 和以其为靶位点的治疗策略

谭淑萍, 吴晓东

■背景资料

肝纤维化是几乎各种慢性肝病的共同病理基础, 近年来引起了特别的重视, 成为肝脏疾病的研究热点, TGF- β 能够调节细胞生长和分化, 在肝纤维化的发生、发展过程中起重要作用, 是最重要的促肝纤维化细胞因子之一, TGF- β -Smads信号转导通路与肝纤维化的发病机制具有密切关系, 为肝纤维化的防治与治疗提供了新的有效途径。

谭淑萍, 中国科学院研究生院 北京市 100049 本元正阳基因技术有限公司 北京市 100176
吴晓东, 中国科学院研究生院 北京市 100049
通讯作者: 吴晓东, 100049, 北京市, 中国科学院研究生院.
wuxd@gucas.ac.cn
电话: 010-88256349
收稿日期: 2006-06-19 接受日期: 2006-08-14

摘要

肝纤维化是细胞外基质(ECM)在肝脏中过量堆积的结果, 是几乎各种慢性肝病的共同病理基础. 转化生长因子 β (TGF- β)是一类能够调节细胞生长和分化的多肽, 在肝纤维化的发生、发展过程中起着重要作用, 是最重要的促肝纤维化细胞因子之一. 在细胞及分子水平上, 肝纤维化主要以肝星状细胞(HSC)的活化和TGF- β 的异常活性为特征. TGF- β -Smads信号转导通路是肝纤维化的发病机制具有密切关系, 为肝纤维化的防治与治疗提供了新的有效途径. 我们综述了肝纤维化与TGF- β -Smads信号转导通路的关系和以TGF- β 为靶位点进行肝纤维化的治疗策略.

关键词: 肝纤维化; 转化生长因子 β ; 信号转导; 治疗

谭淑萍, 吴晓东. 肝纤维化与TGF- β 和以其为靶位点的治疗策略. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3126-3130
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3126.asp>

0 引言

肝纤维化由肝脏受到慢性损伤引起的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白的堆积所致, 这也是多种慢性肝脏疾病的特征^[1], ECM的堆积构成纤维疤痕, 破坏了肝脏的结构, 并发生肝实质细胞的结节, 导致肝硬化, 从而导致肝细胞的功能紊乱. 严重的肝纤维化导致肝硬化、肝衰竭等并常伴有肝脏移植^[2]. 肝纤维化的细胞和分子生物学机制研究已经取得较大的进展, 随着对这些机制与通路的理解, 在损伤、信号转导、活化和基因表达中的关键步骤被分子特征和其他分子或者基因治疗手段靶向化^[3], 使严重的肝纤维化被证实是可逆的^[4], 这激励了研究者去研发新的抗纤维化药物.

1 肝纤维化

肝纤维化是指肝脏内纤维性结缔组织异常增生, 是一种“创伤愈合”的慢性渐进的病理过程, 由于乙醇、缺血、寄生虫、HBV和HCV病毒感染、自体免疫攻击、非酒精性脂肪肝病、药物治疗, 以及肝毒素等因素诱发肝细胞损伤, 导致Kupffer细胞和其他类型肝细胞释放细胞因子和可溶因子, 这些因子导致肝星状细胞(hepatocellular stellate cell, HSC)或肝成纤维细胞(myofibroblasts, MFB)活化与膨胀, 合成大量ECM, 伴随慢性损伤和纤维化, 肝脏的结构和新陈代谢受到破坏, 最后出现硬化和肝癌^[3,5].

1.1 肝纤维化的形成机制 引起肝纤维化的刺激因素有物理的、化学的和生物等几个方面, 近年来的研究认为, HSC在这些刺激因素作用下引起的激活, 是肝纤维化发生发展的中心环节^[5]. HSC的激活可分为启动(initiation)和持久化(perpetuation)两个阶段. 在启动阶段, 肝细胞受损后释放丝裂原蛋白, 旁分泌作用于HSC, 引起HSC的增殖, 并使肝细胞生长丧失接触抑制, 随后, 活化的Kupffer细胞、内皮细胞及血小板释放细胞因子, 如转化生长因子(transforming growth factor, TGF)、血小板衍生长因子(PDGF)等, 促进HSC激活, 转化为肌成纤维细胞, 继而进入激活的持久化阶段, 在持久化阶段, HSC维持激活状态并产生纤维化, 此时, MFB分泌的TGF- β 和TGF- α 作用于其自身, 并促使未转化的HSC向肝成纤维细胞转化. TGF- β 是最主要的致病因子, 可以激活转录因子NF- κ B, 引起一系列靶基因的激活, 同时, MFB可产生 α -平滑肌收缩蛋白和多种ECM, 沉积于肝细胞间隙中, 是纤维化过程中ECM的主要来源. 激活的HSC还可以通过分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)及其抑制物(inhibitors of metalloproteinases, IMP), 引起ECM的增生和异常降解, 从而导致基质重构, 引起肝小叶的破坏. ECM还可能和整合素(integrin)相互作用, 影响有关细胞的结构与功能, 诱导基因表达, 刺激细胞的增殖, 进一步促

进肝纤维化的发展。

1.2 介导肝纤维化的胞内信号通路 调控肝纤维化的细胞内通路的数据主要来自于用培养的HSC细胞进行的研究。其细胞内通路的作用, 在用基因剔除小鼠进行的实验性纤维发生模型的研究中得到了发展^[6-7]。几个mitogen激活的蛋白激酶调控了HSC细胞的主要纤维化活性。研究证实, 实验刺激下导致肝损伤的细胞外调控激酶, 调节了HSC的增殖和转移^[8]。相反, c-Jun N-端粒酶调节了肝细胞的凋亡, 同时分泌发炎细胞因子^[9-10]。病灶性黏附激酶PI3K-Akt信号通路介导了HSC收缩导致的纤维化作用^[8]。TGF- β 1活化Smads信号通路刺激了实验性的肝纤维化, 是一个有潜力的肝纤维化治疗靶向^[11-12]。研究表明, PPAR通路也调控HSC活化和实验性的肝纤维化, PPAR- γ 配体抑制了HSC的肝纤维化作用, 并在体内实验中削弱了肝纤维化^[13-14]。NF- κ B在肝纤维化中可能有抑制作用^[15-16]。在HSC活化中, 还有其他转录因子可能参与了肝纤维化发生^[17]。近年的研究显示, 肝细胞内通路被Toll-like受体和 β -cathepsin信号化^[18-19]。

2 TGF- β -Smads信号转导通路与肝纤维化

在肝纤维化发生、发展过程中, TGF- β 具有活化HSC、促进胶原蛋白基因表达、促进ECM合成与沉积等作用, 是肝纤维化最重要的始动因子之一^[20-23]。大量研究证实, TGF- β -Smads信号转导通路是TGF- β 发挥生物学作用的主要通路。

2.1 TGF- β -Smads信号转导通路组成 哺乳动物TGF- β 共有3种: TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3。其中肝脏含量最高且具有生物活性的是TGF- β 1, 由两条相同的含112个氨基酸的亚单位通过-S-S-键连接成二聚体。正常成人肝脏的肝窦内皮细胞Kupffer细胞表达较高水平的TGF- β 1, TGF- β 2和TGF- β 3 mRNA则在相对较低但可以检出的水平表达; HSC正常状态下表达极少的TGF- β 。肝损伤后, 3种TGF- β 表达均显著增加, 是肝损伤时TGF- β 的主要来源^[24-25]。

HSC表面的TGF- β 超家族的受体有I型和II型两种类型, 其总体结构非常相似, 分别由N端区、胞外的富含半胱氨酸区、短的跨膜区、胞内的丝氨酸/苏氨酸激酶区和短的C端区组成。I型和II型两种类型受体分别由503个和567个氨基酸残基组成的受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 二者形成异源二聚体^[5,20]。II型受体(T β R II)的胞外端首先与配体结合, 其胞内段的丝氨酸

/苏氨酸激酶被活化, 进而使I型受体(T β R I)的GS结构域磷酸化, GS域为高度保守的丝氨酸-甘氨酸(Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly)序列, 是T β R I活化的关键部位, 典型的T β R I受体是激活素受体样的激酶5蛋白, 他被活化后成为丝氨酸/苏氨酸激酶, 将信号向细胞内传导。 β 聚糖(beta-glycan, 即先前的TGF- β III型受体)是附加受体, 为细胞表面表达最丰富的TGF- β 结合蛋白, 与TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3都有较高的亲和力, 可易化T β R I, T β R II与配体的结合。Endoglin也是一种附加受体, 与 β 聚糖结构相似, 易与TGF- β 1, TGF-3结合而不与TGF- β 2结合。

Smad蛋白有8种, 根据功能不同分为3类: 一是受体调节型Smad(R-Smad), 有Smad1, 2, 3, 5, 8; 二是通用型Smad(Co-Smad), 有Smad4; 三是抑制型Smad(I-Smad), 有Smad6, 7。在3类Smad中, 只有R-Smad能被I型受体直接磷酸化激活。Smad2, 3转导TGF- β 信号, Smad1, 5, 8转导BMP信号, Smad6抑制BMP的信号转导, Smad7则对TGF- β 与BMP信号转导都有抑制作用。TGF- β -Smads信号通路中各型Smads分子之间的作用精确协调, 共同完成生理及病理状态下TGF- β 的生物学效应。

2.2 TGF- β 信号转导的过程 首先, 由TGF- β 配体结合到细胞表面的TGF- β 的II型受体, 形成异源三聚体, II型受体磷酸化I型受体的丝氨酸/苏氨酸激酶区而激活I型受体, I型受体再次磷酸化而激活Smads蛋白, 激活的Smads蛋白进入细胞核, 和其他的核调节因子结合, 调节目的基因的转录^[22]。TGF- β 信号转导的具体过程为: (1)配体与受体结合: TGF- β 和II型受体有很高的亲和力, II型受体的胞外配体结合域首先和TGF- β 结合, 再和I型受体结合, 形成由1个配体二聚体、4个受体分子的受体配体复合物; (2)受体活化: 配体和受体的结合, 诱导受体胞内激酶域的结构发生变化, 从而磷酸化激活。II型受体可自我磷酸化, 处于持续活化状态, 目前自我磷酸化而持续活化的机制不明。活化的II型受体磷酸化I型受体GS区域的TTSGSGSG序列的多个丝氨酸/苏氨酸残基, 使其活化^[26]; (3)活化的T β R I使受体调节型Smads (R-Smad, 即Smad2、Smad3)磷酸化; (4)磷酸化的R-Smad与受体分离后, 和Smad 4结合, 形成Smad复合物进入细胞核, 完成Smad的核质穿梭; (5)Smad与DNA的结合及目的基因的选择: 与目标基因DNA结合, 调节其表达; (6)Smad蛋白转导信号的中止: 活化

■创新盘点

本文综述肝纤维化与TGF- β -Smads信号转导通路的关系, 讨论以TGF- β 为靶位点进行肝纤维化的治疗策略。

■同行评价

本文体现了近年肝纤维化的研究热点,文章表述清晰,总体水平较先进。

的R-Smad在磷酸酶作用下去磷酸而失活,通过泛素化和蛋白酶介导的降解来中止Smad蛋白转导的信号^[27]。Smad7可通过与R-Smad竞争性结合Smad4,从而阻断其信号转导作用。

2.3 TGF- β 信号转导的调控 在细胞中, TGF- β 信号的转导的每一步都存在着精确的调控。从信号开始到结束,如配体与受体结合、受体与Smads蛋白结合、Smads蛋白活化、Smads蛋白与DNA结合,以及转录控制等,有精确、复杂的调节^[27],以保证细胞信号转导的准确。从总体上说,涉及肝纤维化的细胞信号通路调节可以分为两类,一是TGF- β 信号通路本身的调节,二是与其他信号通路间的对话。在TGF- β 信号通路本身的调节中,有许多因子参与,如 β -聚糖、SARA(Smad anchor for receptor activation)、Disabled-2、Axin、ELF β 、FKBP12、Noggin和BAMBI(BMP and activin membrane bound inhibitor)等。在与其他信号通路间的关系上, TGF- β 信号与EGF、IFN- γ 、TNF、P38、JNK、Ras和Myc相互作用与影响,构成了复杂的信号网络,这也是目前研究的热点和重点。这两类调节都存在正性调节和负性调节。

2.4 TGF- β -Smads信号转导通路与HSC表型 HSC激活增生转化是肝纤维化的中心环节, TGF- β 是这一病理过程中必需的生物调节因子, Smads又是TGF- β 唯一的作用底物,故TGF- β -Smads信号通路与HSC产生的影响引起人们的极大关注^[11,28]。已知肝纤维化时, HSC是大量ECM的主要来源,肝细胞仅产生少量ECM。深入的研究揭示,在HSC内, Smad3 Sp1共同结合于 $\alpha 2(I)$ 胶原基因序列-313至-255位点,该位点有很强的增强子活性,结合Smad3 Sp1后胶原基因表达明显增加;而肝实质细胞则由Sp3结合于此位点,且不表现增强子活性,可能是导致不同细胞对TGF- β 刺激产生不同的胶原合成效应的原因之一。TGF- β 在肝损伤的不同时期也产生不同的效应^[29-30]。

3 以TGF- β 信号通路为靶位点的治疗策略

TGF- β 是提高肝纤维化最有效的细胞因子,他抑制了肝细胞的增殖,激发了HSC的活化,促进了ECM的产生,并调节肝细胞的凋亡^[22]。Smad3基因敲除小鼠没有发生肝纤维化^[31]。然而,过度表达TGF- $\beta 1$ 的小鼠,比野生小鼠更快发生了肝纤维化,撤出纤维化刺激因子后恢复更慢^[32-33]。许多不同分子治疗策略集中在通过阻止其合成,

用TGF- β 结合蛋白、可溶性受体,或者靶向他的下游信号转导通路,以抑制TGF- β 的作用。

3.1 以TGF- $\beta 1$ 为靶分子的抗肝纤维化 基于以上对肝纤维化分子机制的认识,可以从以下几方面入手,来以TGF- $\beta 1$ 为靶分子的抗肝纤维化:抑制TGF- $\beta 1$ 的产生;中和TGF- $\beta 1$ 蛋白的抗体;阻断TGF- β II型受体;调节胞内信号转导分子Smads的表达。针对TGF- $\beta 1$ 的治疗,可分为以下几种:(1)将TGF- $\beta 1$ 的反义核酸基因转移到HSC中。将人的TGF- $\beta 1$ 的cDNA反方向插入逆转录病毒载体,构成编码TGF- $\beta 1$ 反义RNA的逆转录载体pLATSN,然后转移入人的HSC,能抑制HSC的活性,减少内源性TGF- $\beta 1$ mRNA和ECM的产生;(2)采用内源性的可溶TGF- $\beta 1$ 受体阻断TGF- $\beta 1$ 信号的传导。Ueno *et al*^[34]构建了一种能表达装配在人IgG Fc段的TGF- β II型受体的腺病毒,然后将他转染到经DMN处理过的大鼠的臀大肌细胞中,在血液中可测得可溶性受体的表达,能抑制肝中TGF- $\beta 1$ 信号,明显改善纤维化症状,并且没有副作用;(3)就是使用TGF- $\beta 1$ 的抑制剂,如Decorin(一种蛋白多糖),可以抵抗组织的纤维化。Isaka *et al*^[35]将Decorin的cDNA转移到患有肾小球性肾炎的大鼠的臀肌细胞中,臀肌细胞中Decorin mRNA和蛋白的含量大大增加,并在肾内有Decorin的存在,而TGF- $\beta 1$ mRNA和TGF- $\beta 1$ 的含量显著下降,细胞基质的积聚减少,表明对肾小球性肾炎引起的纤维化有良好的治疗效果。

上述方法都可以很好的改善纤维化症状,但使用TGF- $\beta 1$ 阻断法作基因治疗也有其特有的不足,因为有TGF- $\beta 1$ 参与的信号通路很多,其中有好几条与机体的创伤愈合等生理功能有关,阻断后将影响其正常的功能,导致创伤愈合缓慢,机体恢复能力下降。所以,必须找到TGF- $\beta 1$ 通路的特异性阻滞方法,阻断TGF- $\beta 1$ 诱导纤维化的通路,减少其他的不良反应。

3.2 TGF- β -Smads信号转导通路与肝纤维化防治 正因为TGF- β -Smads信号转导通路在肝纤维化发病中起着举足轻重的作用,干预该信号通路就成为肝纤维化防治的理想选择。其中一些方法已经取得了满意的结果。所采用的靶向信号通路的策略为:破坏TGF- β 蛋白,妨碍T β R II,抑制T β R I和Smads3蛋白的消除等^[36]。其他的策略还包括Smads7的表达调控、TGF- β /Smads3通路的基因沉默和RNA干扰等。

在TGF- $\beta 1$ 受体水平调控方面,主要有如下

研究和实践: (1)可溶性T β R: 通过与细胞膜T β R竞争性结合, TGF- β 抑制TGF- β 信号的转导在肝纤维化动物模型中已取得初步疗效^[34,37]; (2)转染截短的T β R 基因: 转染的T β R 缺少大部分胞内段, 因而失去酶活性, 不能活化T β R, 从而阻断TGF- β 信号的转导. 但使用腺病毒载体, 可诱导机体迅速产生中和性抗体而失效且存在剂量依赖的毒性, 限制了这一方法的研究^[38]; (3)重组T β R: 将人IgG与T β R胞外部分拼接, 形成的嵌合分子可阻止TGF- β 的信号向胞内传导; (4)TGF- β 中和抗体仅对动物实验性肾纤维化有效^[39]; (5)重组LAP: 能够阻止活性TGF- β 过度表达引起的抗有丝分裂效应, 未观察抗纤维化疗效; (6)反义TGF- β : 利用逆转录病毒载体pLATS_N, 将反义TGF- β 基因导入HSC 细胞株LI90, 可见LI 90自分泌TGF- β 及产生ECM减少. 目前仅限于细胞实验^[39]; (7)减少TGF- β 的产生: 已报道许多西药和中药制剂能够降低肝脏TGF- β mRNA水平, 减少TGF- β 的产生, 这是颇有希望的抗纤维化措施之一.

4 展望

TGF- β 的持续过表达是肝纤维化的一个关键调控事件, TGF- β 的潜在纤维化作用导致ECM合成, 抑制基质降解. TGF- β 还改变了其他细胞因子的数量和表达, 并潜在地提高ECM的产生, 因此, 抗TGF- β -Smads信号转导通路的策略, 有望成为治疗肝纤维化和重建肝细胞的手段. 虽然TGF- β -Smads抑制剂在体内和体外实验中被证实对抗肝纤维化有效, 但在用于临床之前, 他们仍需要进行详细的安全性和有效性验证. 由于Smads3在TGF- β -Smads信号转导通路中的重要作用, 通过靶向Smads3来阻断TGF- β -Smads信号转导通路的药物用以治疗肝纤维化, 可能副作用最小. 考虑到基因治疗的安全性、有效性和可能的副作用, 利用Smads3小分子抑制剂治疗肝纤维化是最有吸引力的策略. 传统中药也是一个有应用价值的领域, 已有相关报道^[40-41], 其机制可能是中药提取物阻断了TGF- β -Smads信号转导通路^[42].

总之, 随着人们对TGF- β -Smads信号转导通路的进一步了解, 将提高基于这个重要的细胞因子的调控途径来治疗肝纤维化的安全性和有效性. 对TGF- β -Smads信号转导通路的深入研究, 不仅有助于进一步阐明肝纤维化的发病机制, 也为肝纤维化的防治研究提供了重要的途径.

5 参考文献

- Friedman SL. Liver fibrosis—from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38 Suppl 1: S38-S53
- Gines P, Cardenas A, Arroyo V, Rodes J. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 2004; 350: 1646-1654
- Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? *World J Gastroenterol* 2006; 12: 509-515
- Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001; 344: 418-423
- Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002; 7: d1720-d1726
- Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by *in vivo* liver injury in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 951-958
- Schwabe RF, Uchinami H, Qian T, Bennett BL, Lemasters JJ, Brenner DA. Differential requirement for c-Jun NH2-terminal kinase in TNFalpha- and Fas-mediated apoptosis in hepatocytes. *FASEB J* 2004; 18: 720-722
- Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001; 166: 6812-6819
- Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
- Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate pro-fibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 119: 466-478
- Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation *in vivo* and *in vitro*. *Gastroenterology* 2002; 122: 1924-1940
- Boya P, Larrea E, Sola I, Majano PL, Jimenez C, Civeira MP, Prieto J. Nuclear factor-kappa B in the liver of patients with chronic hepatitis C: decreased RelA expression is associated with enhanced fibrosis progression. *Hepatology* 2001; 34: 1041-1048
- Rippe RA, Schrum LW, Stefanovic B, Solis-Herruzo

- JA, Brenner DA. NF-kappaB inhibits expression of the alpha1(I) collagen gene. *DNA Cell Biol* 1999; 18: 751-761
- 17 Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50: 891-896
- 18 Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003; 37: 1043-1055
- 19 Canbay A, Guicciardi ME, Higuchi H, Feldstein A, Bronk SF, Rydzewski R, Taniai M, Gores GJ. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J Clin Invest* 2003; 112: 152-159
- 20 刘芳, 刘金星. 转化生长因子 β 1在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000; 8: 86-88
- 21 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGF- β -Smads信号转导通路与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003; 10: 1601-1605
- 22 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- 23 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. 世界华人消化杂志 2000; 8: 687-689
- 24 Kinnman N, Andersson U, Hultcrantz R. In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1294-1300
- 25 Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 618-633
- 26 Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791
- 27 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700
- 28 Inagaki Y, Mamura M, Kanamaru Y, Greenwel P, Nemoto T, Takehara K, Ten Dijke P, Nakao A. Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *J Cell Physiol* 2001; 187: 117-123
- 29 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002; 35: 49-61
- 30 许伟华, 吕晓霞, 朱菊人. 肝纤维化大鼠肝星状细胞凋亡的体内研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 972-974
- 31 Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2572-2576
- 32 Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1059-G1068
- 33 Schnur J, Olah J, Szepesi A, Nagy P, Thorgeirsson SS. Thioacetamide-induced hepatic fibrosis in transforming growth factor beta-1 transgenic mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 127-133
- 34 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 33-42
- 35 Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 1996; 2: 418-23
- 36 Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int* 2006; 26: 8-22
- 37 Yata Y, Gotwals P, Koteliensky V, Rockey DC. Dose-dependent inhibition of hepatic fibrosis in mice by a TGF-beta soluble receptor: implications for antifibrotic therapy. *Hepatology* 2002; 35: 1022-1030
- 38 Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology* 2001; 34: 859-867
- 39 Jiang W, Wang JY, Yang CQ, Liu WB, Wang YQ, He BM. Effects of a plasmid expressing antisense tissue inhibitor of metalloproteinase-1 on liver fibrosis in rats. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 192-197
- 40 Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, Odell MM, Bauer RL, Ren HP, Haugen HS, Yeh MM, Fausto N. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3389-3394
- 41 Xiao YH, Liu DW, Li Q. Effects of drug serum of anti-fibrosis I herbal compound on calcium in hepatic stellate cell and its molecular mechanism. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1515-1520
- 42 Gaedeke J, Noble NA, Border WA. Curcumin blocks multiple sites of the TGF-beta signaling cascade in renal cells. *Kidney Int* 2004; 66: 112-120

电编 李琪 编辑 张焕兰

肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎

刘晓臣, 彭燕

刘晓臣, 彭燕, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

通讯作者: 彭燕, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院 消化内科. Pengyan5336@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-04 接受日期: 2006-09-29

摘要

重症急性胰腺炎(SAP)常伴有肠屏障功能障碍(IBFD), IBFD可导致细菌、内毒素易位使SAP的病情进一步加重. SAP时IBFD的发生与炎症介质、微循环障碍、腹内高压、肠动力障碍、免疫功能障碍等因素有关, 保护肠黏膜屏障对改善SAP的预后具有重要意义.

关键词: 肠屏障功能; 重症急性胰腺炎; 细胞因子; 防治

刘晓臣, 彭燕. 肠屏障功能障碍与重症急性胰腺炎. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3131-3135

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3131.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)来势凶猛, 病程进展快, 死亡率高达20%-30%^[1]. 肠道是应激反应的中心器官之一, 大量研究显示SAP容易发生肠屏障功能障碍(intestine barrier functional disturbance, IBFD), IBFD是SAP并发感染、甚至形成腹腔脓肿, 诱发和加重全身炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能障碍综合征(MODS), 且死亡率居高不下的症结所在^[2-4]. 现就SAP时IBFD的研究进展作一综述.

1 肠黏膜屏障的结构及功能

肠道是人体最大的消化器官和免疫器官, 同时又是人体最大的“贮菌库”, 某些情况下肠道是细菌及毒素侵入人体的危险通道. 正常肠黏膜屏障由机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障组成, 其中最重要的是免疫屏障. 肠道黏膜上皮细胞及细胞间紧密连接、黏液、肠道蠕动等构成肠道机械屏障, 胃肠道分泌的大量消化液如胃酸、胆汁、多种消化酶、溶菌酶、黏多糖、糖蛋白和糖脂等是化学屏障的重要成分,

肠道节律性的定向蠕动与肠道黏液流的稀释冲洗肠腔形成“肠道液体动力系统”. 正常肠道内细菌达500种以上, 其中99%为专性厌氧菌, 约1%为需氧菌及兼性厌氧菌, 他们相互依赖相互制约构成肠道微生态系统, 即肠道生物屏障. 肠道专性厌氧菌的主要功能有: (1)黏附作用. 专性厌氧菌通过黏附作用与肠上皮紧密结合, 形成菌膜屏障, 防止外来菌在肠道的定植和易位; (2)降低肠道pH值. 专性厌氧菌分泌醋酸、乳酸、短链脂肪酸等, 降低肠道pH值与氧化还原电势, 抑制不宜在酸性环境中生长的病原菌; (3)抑制需氧菌的生长; (4)营养作用、抗炎及免疫增强作用^[5-7]. 近年研究显示, 肠道双歧杆菌具有抗肿瘤作用^[8-9].

肠道是全身最大的淋巴器官, 肠黏膜具有功能发达的局部免疫系统. 肠黏膜免疫屏障由肠相关淋巴组织和弥散免疫细胞组成, 其中起核心作用的是分泌型IgA(SIgA). SIgA是肠道分泌物中含量最丰富的免疫球蛋白, 能中和酶、毒素、病菌和其他生物活性抗原, 并与细菌结合形成抗原抗体复合物, 使细菌不能从肠腔进入肠壁. SIgA还具有包被细菌、溶解细菌、阻止细菌复制, 阻碍细菌与上皮细胞受体结合, 并刺激肠道分泌黏液等功能.

2 IBFD的发生及其机制

肠道黏膜结构的破坏是发生IBFD的基础. Ammori *et al*^[10-13]研究发现, SAP时可见肠黏膜水肿, 肠上皮细胞间紧密连接遭到破坏, 肠上皮细胞凋亡增加, 肠绒毛高度降低, 肠系膜血管收缩血流量减少, 严重者黏膜出现坏死、溃疡. 由于机体应激反应过度或失调, 肠黏膜屏障受损或衰竭, 寄生于肠道内的细菌及内毒素越过肠黏膜屏障, 大量侵入黏膜组织和肠壁、肠系膜淋巴结、门静脉及其它远隔脏器或系统, 这一过程称为细菌易位(bacterial translocation, BT). 研究显示, SAP时肠黏膜通透性增加发生在肠黏膜形态学改变之前, 大肠杆菌产生的内毒素较细菌本身更早地穿过肠上皮进入血循环. Yasuda *et al*^[13]

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)来势凶猛, 病程进展快, 死亡率高达20%-30%. 近年大量研究显示, SAP时常并发感染甚至形成腹腔脓肿, 诱发和加重全身炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能障碍综合征(MODS)等, 这与肠屏障功能障碍(IBFD)密切相关, 保护肠屏障功能对改善SAP的预后具有重要意义.

■创新盘点

SAP时发生IBFD并导致BT是个相当复杂的过程,本文着重阐述炎症介质、微循环障碍、腹内高压、肠动力障碍等因素在IBFD发生、发展过程中的作用,旨在对SAP的治疗提供新思路。

报道大鼠SAP发病后6 h肠黏膜开始出现通透性变化,18 h后发生BT. Nagpal *et al*^[14]利用糖分子探针针对SAP患者肠通透性进行研究,乳果糖/甘露醇的吸受比较轻型胰腺炎(MAP)患者增加近6倍,表明肠通透性明显增加,且于病程7 d达到高峰. SAP时IBFD的直接后果是肠道BT导致胰腺坏死组织及其他远隔脏器感染,而间接作用是肠道细菌、内毒素进入体循环导致肠源性内毒素血症,刺激已经活化的单核和巨噬细胞释放过量的细胞因子和炎症介质,促使SIRS的发生,对胰腺等脏器构成严重的“第二次打击”,甚至诱发和加重MODS.

SAP时IBFD的发生机制尚不完全清楚,可能主要与下列因素有关:

2.1 炎症介质与细胞因子 SAP早期胰腺内、肠黏膜即有白细胞的过度激活,产生的大量炎症介质及细胞因子如IL-1, IL-6和TNF- α 等,介导了肠黏膜的炎症反应. BT进一步促进细胞因子、炎症介质、蛋白酶类和氧自由基等大量释放. SAP时细胞因子一旦产生,不但可以自身激活,还能促进其他细胞因子和炎症介质的产生,引起连锁和放大效应,即瀑布效应(cascade). 细胞因子除加重SIRS引发MODS外,进一步损伤肠屏障功能. 多数学者认为核因子- κ B(NF- κ B)在SAP整个复杂的细胞因子调控网络中可能起枢纽性作用^[15-16].

2.2 微循环障碍 肠黏膜具有高代谢与绒毛微血管结构的特征,对灌注不足特别敏感. SAP早期患者常处于低血容量状态,导致肠缺血缺氧. 当液体复苏再灌注时激活中性粒细胞,直接或间接激发、放大炎症反应,进一步加重IBFD. Inoue *et al*^[17]研究证实,内皮素-1(ET-1)在IBFD中也具有重要的作用. Li *et al*^[18]发现,急性坏死性胰腺炎(ANP)大鼠肠微血管内皮Toll样受体-4(TLR4)表达增加,并认为TLR4可能介导微血管的收缩,与肠微循环障碍有关.

2.3 腹内高压 腹腔内压达到20-25 cmH₂O时称为腹内高压. 当腹内压达到25 cm H₂O且维持一定时间或继续升高,将严重影响心、肺、肾等器官血循环,导致器官功能不全或衰竭,临床称之为腹腔间隔室综合征(abdominal compartment syndrome, ACS)^[19-20]. SAP时由于肠麻痹、腹腔大量积液等因素,常致腹内高压,严重者发展为ACS. ACS可影响腹腔脏器血液灌流,导致肠系膜动脉血流减少,加重肠缺血缺氧. Samel *et al*^[21]证实腹内压增高将对肠黏膜微循环造成损害.

2.4 肠动力障碍 SAP时小肠、结肠致病菌大量繁殖导致肠道生物屏障破坏,其发生机制主要与肠运动减弱有关. Van *et al*^[22]报道,ANP大鼠十二指肠革兰氏阳性球菌、革兰氏阴性杆菌、厌氧菌均过度生长. 由于胰腺炎症坏死并胰周侵犯、肠植物神经受刺激、腹腔积液、腹膜炎等诸因素, SAP时出现肠运动减弱,部分发展为麻痹性肠梗阻. Van *et al*^[22]还发现ANP大鼠72 h后空肠肌移动复合波周期长度较对照组明显延长,并认为其发生原因可能与全身炎症反应有关. Wang *et al*^[23]研究发现, SAP患者全部和部分结肠通过时间(主要是右和左半结肠)较MAP患者及对照组明显延长,血清胃动素(motilin)、胆囊收缩素(CCK)浓度在SAP及MAP患者较对照组明显减低, SAP患者血清血管活性肠肽(VIP)浓度较对照组明显增高,并认为SAP患者肠动力障碍可能与上述胃肠激素的紊乱有关.

2.5 免疫功能障碍 SAP患者全身各器官处于高代谢状态,由于长期禁食、营养物质缺乏等因素,肠道相关淋巴组织的特异性与非特异性免疫功能受损,特别是SIgA分泌减少. 通常认为肥大细胞指数代表了肠黏膜免疫功能, Ammori *et al*^[10]发现, SAP患者回肠黏膜肥大细胞指数较对照组减少30%. 王兴鹏 *et al*^[24]研究发现ANP大鼠6 h后回肠Peyer集合淋巴结中存在大量凋亡淋巴细胞,提示肠道免疫屏障受损. 另外SAP患者周围循环淋巴细胞凋亡增加^[25]. SAP时肠道局部及全身的免疫力下降,容易导致BT.

2.6 长期禁食、胃肠减压与全胃肠外营养 SAP时禁食、胃肠减压时间如果超过1-2 wk,由于胃肠道长期处于无负荷状态,使胃酸、胆汁、溶菌酶、黏多糖、水解酶等产生减少,胃肠减压又导致上述物质大量丢失,肠黏膜化学屏障破坏. 长期禁食与全胃肠外营养引起肠黏膜营养物质的缺乏,出现黏膜细胞群减少、细胞萎缩、细胞间紧密连接分离增宽,绒毛高度减低,隐窝变浅,导致黏膜通透性增加.

3 IBFD的防治

肠道在SAP的发病中容易受到损伤, IBFD的发生是使SAP病情加重的关键因素. 早期保护肠屏障功能,有效防治IBFD的发生,对改善SAP的预后具有重要价值.

3.1 尽早恢复肠道动力 临床研究显示, 肠动力紊乱的改善、麻痹性肠梗阻的缓解与SAP患者恢复速度及并发症发生率、转外科手术率密切

相关^[26]. 尽管口服硫酸镁、乳果糖、莫沙必利等能够促进肠道动力, 但由于SAP时禁食等原因, 目前, 对恢复肠道动力尚无理想的西药. 中医学的观点认为中药对肠屏障功能的作用比较广泛, 是多层次多靶点的综合作用. 临床报道治疗IBFD较多的复方制剂有柴芍承气汤、大承气汤等^[26-27]. 现代中西医的研究显示复方中药对肠屏障功能的作用机制主要与其调节胃肠动力、改善微循环、抑制肠道BT、减轻肠黏膜炎症反应, 并促进黏膜修复、增强肠道局部免疫力等因素有关^[28-29]. 目前研究较多的治疗SAP的单味中药有大黄、丹参、川芎嗪等. 张莹 *et al*^[30]报道丹参能抑制胰腺ET-1mRNA的过度表达, 降低血ET-1的浓度, 从而改善肠血循环. 关于生大黄对IBFD的作用机制研究较多, 可能与下列因素有关: (1)调节肠道微循环, 改善胃肠道的血液灌注. (2)促进肠道蠕动, 清除细菌和内毒素, 减少BT的发生. 马涛 *et al*^[31]证实大黄素可直接作用于大鼠结肠环行平滑肌细胞, 使胞质内游离钙水平升高, 引起细胞收缩; (3)抗菌作用^[32]. 大黄除本身具有抗菌作用外, 还能促进SIgA的分泌; (4)保护肠上皮细胞. 大黄具有防止或修复肠黏膜损伤、保护细胞间紧密连接、维持细胞结构完整的作用.

3.2 调节肠道菌群 首选口服或静脉用抗菌素杀灭肠道内致病菌, 应选用窄谱、杀菌力强者, 疗程要短, 防止二重感染. 乳酸杆菌、双歧杆菌能调节肠道菌群, 减少BT. 研究发现, 双歧杆菌的某些菌株可能还具有抑制肠上皮细胞脂多糖诱导的NF- κ B的激活, 具有抗炎作用^[33-34].

3.3 早期肠内营养(enteral nutrition, EN) EN使代谢更符合生理, 同时能保护肠屏障功能. 近年大量临床及实验研究表明SAP患者早期EN可明显减少胰腺感染率、转手术率, 缩短住院日并改善预后^[35-37]. 适时的EN价廉且安全, 但正确的EN时机尚有争议, 一般认为当SAP病情稳定、肠功能恢复或部分恢复时即应开始从肠外营养向EN的逐步过渡, 提倡经鼻空肠管内注入要素营养, 开始时宜少量、低浓度、缓慢, 使肠道有一个适应过程^[38-39]. Xu *et al*^[33]主张给予免疫营养、生态免疫营养制剂以增强免疫屏障功能及全身免疫力, 注重补充谷氨酰胺、精氨酸、微量元素等肠上皮细胞生长的必需物质^[40]. Schneider *et al*^[41]报导将植物纤维加入生态营养制剂中, 因其具有促进肠蠕动、减轻肠黏膜炎症反应等作用, 可能更有利于肠屏障的保护.

3.4 腹腔减压 SAP患者腹腔积液过多时应穿刺抽液或腹腔灌洗引流, 必要时需B超或CT下定位操作. 对爆发性胰腺炎(fulminate pancreatitis)合并ACS, 内科治疗无效时应尽快手术开腹减压^[20,42], 术后引流并腹腔灌洗, 以防IBFD的发生.

3.5 其他 关于SAP时生长激素(growth hormone, GH)、生长抑素(somatostatin, SST)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、抗氧化剂等对IBFD的影响尚在研究中. 王兴鹏 *et al*^[43]研究显示, GH能显著降低ANP大鼠肠黏膜炎性细胞因子、黏附分子和趋化蛋白的转录, 发挥其肠道局部抗炎效应, 认为其机制与GH抑制NF- κ B活化有关. GH可能还有延缓肠上皮细胞凋亡的作用^[44]. 金纯 *et al*^[45]研究显示, SST可减轻ANP大鼠肠黏膜厚度及绒毛的改变, 肠道通透性降低, 对大鼠肠黏膜屏障有明显的保护作用. Jimenez *et al*^[46]发现, SST对肠黏膜细胞有明显的保护作用, 可能与其抑制炎性介质的合成, 促进奥狄氏括约肌舒张, 促进胰液、胆汁排放有关^[47]. 陈冬利 *et al*^[48]报道, EGF促进急性胰腺炎大鼠空肠黏膜蛋白合成, 肠道通透性及肠道BT减轻. Leveau *et al*^[49]报道, 血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)拮抗剂昔帕泛(lexipafant)能减少急性胰腺炎大鼠血中IL-1的浓度, 而且肠黏膜组织中白细胞的聚集减少, 肠通透性降低. 抗氧化剂可减轻氧自由基损伤、肠黏膜炎症反应, 对肠黏膜屏障有一定的保护作用.

总之, SAP时发生IBFD是个相当复杂的过程, 涉及诸多因素与环节. 近年来大量的动物实验和临床研究结果为IBFD的防治、改善SAP的预后提供了新思路. 但对SAP与IBFD的研究也仅仅是一个轮廓性的了解, 具体到参与其中的细胞、分子及相互间的作用等仍有许多不够明确之处, 有待进一步深入的研究与探讨.

■应用要点
注重发挥中药对肠屏障的保护作用, 掌握早期EN的时机及方式, 加强对ACS的防治.

4 参考文献

- 1 Gerlach H. Risk management in patients with severe acute pancreatitis. *Crit Care* 2004; 8: 430-432
- 2 Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 122-129
- 3 Dervenis C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 415-418
- 4 Furuya T, Soeno T, Komatsu M. Strategy for bacterial translocation in acute pancreatitis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2004; 101: 502-509
- 5 Acheson DW, Luccioli S. Microbial-gut interactions

■名词解释

1 细菌易位: 肠道内的细菌及内毒素越过受损的肠黏膜屏障, 大量侵入黏膜组织和肠壁、肠系膜淋巴结、门静脉及其他远隔脏器或系统, 这一过程称为细菌易位(BT). SAP时容易发生BT.

2 腹腔间隔室综合征: 当腹内压达到25cm H₂O且维持一定时间或继续升高, 将严重影响心、肺、肾等器官血循环, 导致器官功能不全或衰竭, 临床称之为腹腔间隔室综合征(ACS). SAP时由于肠麻痹、腹腔大量积液等, 常致腹内高压, 严重者发展为ACS. ACS可影响腹腔脏器血液灌注, 并导致IBFD.

- in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 387-404
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1131-1140
- Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion* 2006; 73 Suppl 1: 5-12
- Bermudes D, Zheng LM, King IC. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2002; 5: 194-199
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 495-512
- Ammori BJ, Cairns A, Dixon MF, Larvin M, McMahon MJ. Altered intestinal morphology and immunity in patients with acute necrotizing pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 490-496
- Andersson R, Wang XD. Gut barrier dysfunction in experimental acute pancreatitis. *Ann Acad Med Singapore* 1999; 28: 141-146
- Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 26-35; discussion 35-36
- Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzaki M, Sawa H, Nakajima T, Kuroda Y. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis. *J Surg Res* 2006; 135: 18-26
- Nagpal K, Minocha VR, Agrawal V, Kapur S. Evaluation of intestinal mucosal permeability function in patients with acute pancreatitis. *Am J Surg* 2006; 192: 24-28
- Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD. NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002; 122: 448-457
- Zhao ZC, Zheng SS, Cheng WL, Wang X, Qi Y. Suppressing progress of pancreatitis through selective inhibition of NF-KappaB activation by using NAC. *J Zhejiang Univ Sci* 2004; 5: 477-482
- Inoue K, Hirota M, Kimura Y, Kuwata K, Ohmura Y, Ogawa M. Further evidence for endothelin as an important mediator of pancreatic and intestinal ischemia in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 218-223
- Li Y, Zhou ZG, Zhang J, Chen YD, Li HG, Gao HK, Wang R, Hu TZ. Microcirculatory detection of Toll-like receptor 4 in rat pancreas and intestine. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 34: 213-219
- Vegar-Brozovic V, Stoic-Brezak J. Pathophysiology of abdominal compartment syndrome. *Transplant Proc* 2006; 38: 833-835
- Schachtrupp A, Jansen M, Bertram P, Kuhlen R, Schumpelick V. Abdominal compartment syndrome: significance, diagnosis and treatment. *Anaesthesist* 2006; 55: 660-667
- Samel ST, Neufang T, Mueller A, Leister I, Becker H, Post S. A new abdominal cavity chamber to study the impact of increased intra-abdominal pressure on microcirculation of gut mucosa by using video microscopy in rats. *Crit Care Med* 2002; 30: 1854-1858
- Van Felius ID, Akkermans LM, Bosscha K, Verheem A, Harmsen W, Visser MR, Gooszen HG. Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 267-276
- Wang X, Gong Z, Wu K, Wang B, Yuang Y. Gastrointestinal dysmotility in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 57-62
- 王兴鹏, 王冰娴, 吴 恺, 徐选福. 细胞凋亡在急性坏死型胰腺炎早期肠黏膜上皮细胞死亡中的作用. *中华消化杂志* 2001; 21: 267-270
- Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 1-10
- 彭燕, 王忠群, 李云, 李昌平, 邹义君. 柴芎承气汤对重症急性胰腺炎并发肠麻痹的治疗作用. *四川医学* 2003; 24: 571-572
- 齐清会, 王 简, 回建峰, 江 力, 吴咸中. 大承气汤和针刺治疗胃肠运动功能障碍疾病的研究. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 129-132
- 刘蓉, 唐方. 中药保护肠屏障功能研究概况. *上海中医药杂志* 2004; 38: 57-59
- Xia Q, Yuan L, Yang XN, Tang WF, Jiang JM. Comparison of integrated Chinese and Western medicine with and without somatostatin supplement in the treatment of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1073-1076
- 张莹, 石承先, 黄平, 任娟娟, 李玉祥. 丹参对重症急性胰腺炎内皮素-1 mRNA的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 35-38
- 马涛, 齐清会, 简序, 费乃昕. 大黄素对大鼠结肠环形平滑肌细胞[Ca²⁺]_i的影响. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1699-1702
- 李玉, 陈晓理, 张正, 黄兴兰, 闫兆平. 大黄对小鼠肠黏膜屏障保护作用的机制探讨. *四川大学学报(医学版)* 2005; 36: 210-212
- Xu GF, Lu Z, Gao J, Li ZS, Gong YF. Effect of ecoinutrition supports on maintenance of integrity of intestinal mucosal barrier in severe acute pancreatitis in dogs. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 656-661
- Riedel CU, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns BJ, Blum S. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3729-3735
- Marik PE, Zaloga GP. Meta-analysis of parenteral nutrition versus enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *BMJ* 2004; 328: 1407
- Chen J, Wang XP, Liu P, Wu K, Xu M, Yu XF, Wang GS. Effects of continuous early enteral nutrition on the gut barrier function in dogs with acute necrotizing pancreatitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84: 1726-1731
- 杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙. 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 953-957
- 熊炯妍, 王春友, 李晓辉, 陶京, 杨智勇. 分阶段营养支持对重症急性胰腺炎患者的影响. *中国实用外科杂志* 2005; 25: 44-46
- 赵刚, 王芳, 王春友, 熊炯妍, 陈立波. 免疫营养对重症急性胰腺炎患者免疫屏障的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1500-1502
- Bengmark S. Bio-ecological control of acute pancreatitis: the role of enteral nutrition, pro and synbiotics. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8: 557-561
- Schneider SM, Girard-Pipau F, Anty R, van der

- Linde EG, Philipsen-Geerling BJ, Knol J, Filippi J, Arab K, Hebuterne X. Effects of total enteral nutrition supplemented with a multi-fibre mix on faecal short-chain fatty acids and microbiota. *Clin Nutr* 2006; 25: 82-90
- 42 Wong K, Summerhays CF. Abdominal compartment syndrome: a new indication for operative intervention in severe acute pancreatitis. *Int J Clin Pract* 2005; 59: 1479-1481
- 43 王兴鹏, 王冰嫻, 吴恺, 徐选福, 谢传高, 徐敏. 急性坏死性胰腺炎肠黏膜NF κ B介导的细胞因子过度表达及生长激素的作用. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 45-49
- 44 Wang X, Wang B, Wu K, Xu M, Gong Z. Growth hormone downregulated the excessive apoptosis of ileal intestinal epithelial cells in rats during the early course of acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 205-209
- 45 金纯, 洪伟, 殷保兵, 马保金, 张群华, 蔡端. 生长抑素对大鼠坏死性胰腺炎GH-IGF-1-白蛋白轴的影响及其对肠黏膜屏障的保护作用. *肝胆胰外科杂志* 2004; 16: 97-99
- 46 Jimenez-Garcia A, Balongo-Garcia R, Alconero FF, Araji OA, Martinez GJ, Haba MG, Morales LC, Bevia JM, Martinez JC. Intestinal wall damage in simple ileus in rabbits: immune-modulator role of somatostatin. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1030-1036
- 47 Di Francesco V, Angelini G, Zoico E, Zamboni M, Frulloni L, Cavallini G. Effect of native somatostatin on Sphincter of Oddi motility in patients with acute recurrent pancreatitis. A pilot study with Ultrasound-Secretin test. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 268-271
- 48 陈冬利, 王为忠, 王俊义, 王涛. 表皮生长因子防治急性胰腺炎大鼠肠道细菌易位. *第二军医大学学报* 2002; 23: 410-412
- 49 Leveau P, Wang X, Sun Z, Borjesson A, Andersson E, Andersson R. Severity of pancreatitis-associated gut barrier dysfunction is reduced following treatment with the PAF inhibitor lexipafant. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1325-1331

■同行评价

本文参考文献全部援引了近6年的关于肠道功能、肠道屏障障碍发生机制以及肠道功能保护的研究结果, 内容先进、逻辑性强, 对临床具有参考价值。

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2006)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

不同组织微环境中人胃癌异种移植瘤生物学行为及明胶酶的表达差异

李玉莲, 耿敬姝

■背景资料

胃癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 癌细胞向局部淋巴结、腹腔和远处转移是导致死亡的主要原因。胃癌侵袭转移的机制非常复杂, 近年来研究人员通过大量工作认识到MMP-2、MMP-9在胃癌的侵袭和转移中有着不可忽略的作用。

李玉莲, 耿敬姝, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院 黑龙江省哈尔滨市 150081

黑龙江省自然科学基金资助项目, No.D2005-11

通讯作者: 李玉莲, 150081, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院. liyulian1@yahoo.com.cn
电话: 0451-86298115 传真: 0451-86298116

收稿日期: 2006-09-12 接受日期: 2006-09-25

Diversified biological behaviors and gelatinase expression of human gastric carcinoma xenografts in different organic micro-environment

Yu-Lian Li, Jing-Shu Geng

Yu-Lian Li, Jing-Shu Geng, Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China

Supported by Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D2005-11

Correspondence to: Yu-Lian Li, Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, Heilongjiang Province, China. liyulian1@yahoo.com.cn

Received: 2006-09-12 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To study the expression of gelatinase (matrix metalloproteinase, MMP) and its effect on the biological behaviors of human gastric carcinoma xenografts in different organic micro-environment.

METHODS: *In situ* hybridization was used to detect the mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 in tumors transplanted subcutaneously and intraperitoneally. HE staining was conducted to investigate the biological behaviors of the transplanted tumors.

RESULTS: The subcutaneous xenografts of human gastric carcinoma in nude mice presented an expanding growth style with limited invasion. In contrast, the intraperitoneal xenografts displayed an invasive growth pattern accompanied by more fibrous stroma. The mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 were negative in the

cells and intercellular substance of subcutaneous xenografts, but positive in the cytoplasm from the verge and envelope of intraperitoneal xenografts.

CONCLUSION: The tissue environment has definitive effects on the tumor phenotypes, and the expression of gelatinase is closely related to the growth pattern and invasion of tumor cells.

Key Words: Gelatinase; Tumor invasion; *In situ* hybridization; Neoplasm transplantation

Li YL, Geng JS. Diversified biological behaviors and gelatinase expression of human gastric carcinoma xenografts in different organic micro-environment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3136-3138

摘要

目的: 探讨不同组织微环境中明胶酶在异种移植瘤中的表达差异及其对移植瘤生物学行为的影响。

方法: 应用原位杂交方法分别检测皮下移植瘤及腹腔移植瘤中MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA的表达情况, 并应用常规HE染色观察不同移植瘤的生物学行为表现。

结果: 人胃癌裸小鼠皮下异种移植瘤呈膨胀性生长, 侵袭性不明显; 腹腔内移植瘤呈侵袭性生长; MMP-2及MMP-9 mRNA在皮下移植瘤细胞及间质表达阴性, 在腹腔移植瘤为阳性表达, 且表达呈部位特异性, 即癌巢边缘部位的癌细胞胞质和/或包膜阳性表达。

结论: 相同来源的瘤组织在不同的微环境中, 生长方式明显不同, 组织环境对肿瘤侵袭表型有很大影响; 明胶酶的表达与肿瘤生长方式及侵袭性有密切联系。

关键词: 明胶酶; 侵袭; 原位杂交; 肿瘤移植

李玉莲, 耿敬姝. 不同组织微环境中人胃癌异种移植瘤生物学行为及明胶酶的表达差异. 世界华人消化杂志

■研发前沿

近年来人们开始重视间质在肿瘤的形成、分化、侵袭及转移中的调节作用。然而, 间质-肿瘤细胞是一个复杂的生物系统, 两者之间有着密切的信号传递和相互诱导, 其生物学机制还未明了。

2006;14(32):3136-3138

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3136.asp>

0 引言

胃癌是危害人类健康的主要恶性肿瘤之一, 其中肿瘤转移是导致肿瘤治疗失败, 患者死亡的主要原因. 肿瘤转移必须破坏由细胞外基质(ECM)构成的组织屏障. 肿瘤细胞与ECM的相互作用在肿瘤的侵袭与转移中起关键作用, 多种蛋白水解酶参与降解ECM, 其中的基质金属蛋白酶(MMPs)包含20多个家族成员, 都能降解ECM^[1-4]. MMP-2, MMP-9是一种明胶酶(gelatinase), 主要水解底物是变性胶原及细胞外基质BM的主要成分IV型胶原和V型胶原等, 而IV型胶原和V型胶原是ECM及基膜的主要成分. 近年来日本及国内的学者在MMPs与胃癌侵袭转移的关系研究方面做了大量的工作, 认识到MMP-2, MMP-9在胃癌的侵袭和转移中起着十分重要的作用^[5-9]. 我们将人胃癌组织进行裸鼠皮下及腹腔种植, 观察在不同微环境下同一来源的癌组织其生物学行为的差别, 并用原位杂交方法分别检测皮下及腹腔移植瘤组织中MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA的表达情况.

1 材料和方法

1.1 材料 δ BALB/c裸小鼠由中国科学院实验动物研究所提供, 鼠龄5-12 wk, 体质量15-25 g. 于无菌室内恒温、恒湿层流架中饲养, 一切笼具及饲料均经灭菌处理. 人胃癌瘤株取材于哈尔滨医科大学肿瘤医院一手术切除的低分化胃腺癌原发灶. 于裸小鼠皮下接种成瘤, 当瘤组织传代稳定后, 将剪碎的瘤组织进行皮下游代的同时进行腹腔内接种和传代, 分别称为“皮下移植瘤”和“腹腔移植瘤”.

1.2 方法 处死的裸鼠均进行全身解剖检查, 取材, 经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 光镜观察. 然后进行MMP-2 mRNA及MMP-9 mRNA的检测, 本实验所用的皮下和腹腔移植瘤各10例取自第20-44代之间. 采用多相寡核苷酸探针和高敏感性标记技术, 经地高辛标记, AEC显色. MMP-2寡核苷酸探针序列为: (1)5'TTCTATGGCTGCC CCAAGGAGAGCTGCAAC3'; (2)5'GACAGCC CTGCAAGTTTCCATTCCGCTTCC3'; (3)5'GA ACCAAAGTCTGAAGTGCGTGAAGTTTGG3'; MMP-9寡核苷酸探针序列为: (1)TCCCTGCCCG AGACCGGTGAGCTGGATAGC3'; (2)5'CAACTC

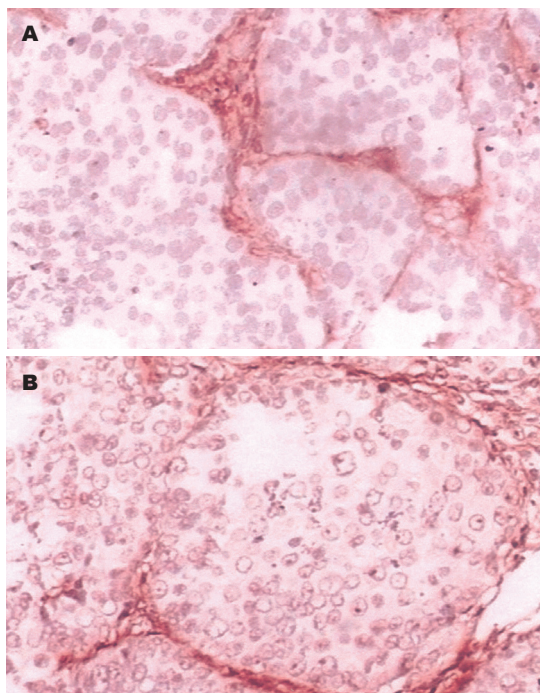


图1 MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA在腹腔移植瘤中的阳性表达.

GGCGGGAGAGCTGTGCGTCTTCCC3'; (3)5'CC AGGTGGACCAAGTGGGCTAGGTGACCTA3'. 以杂交缓冲液代替探针做阴性对照. 阳性标记为着红色.

统计学处理 采用成组设计等级资料两标本比较(Mann-Whitney Test)秩和检验.

2 结果

2.1 肿瘤生长方式 裸小鼠皮下移植瘤呈膨胀性生长, 有包膜, 与周围分界清楚, 易剥离, 为有限侵袭性的肿瘤; 光镜下瘤细胞虽保持原人癌细胞的形态特征, 但瘤细胞呈团巢状生长, 细胞多边形, 排列紧密, 瘤组织中间质结缔组织少, 边缘可见疏松的纤维结缔组织包膜; 膜腔移植瘤光镜下呈典型的低分化腺癌特点, 瘤细胞稍大为类圆形, 胞质染色淡, 核染色质增粗, 瘤细胞表现为明显的“条索状”浸润性生长, 癌周无明显包膜, 癌巢及癌细胞索间见有粗大的硬纤维分隔.

2.2 MMP-2 及MMP-9 mRNA表达 MMP-2 mRNA及MMP-9 mRNA在皮下移植瘤细胞及间质表达阴性, 在腹腔移植瘤为阳性表达, 且表达呈部位特异性, 即癌巢边缘部位的癌细胞胞质和/或包膜阳性表达(图1A-B); MMP-2 mRNA及MMP-9 mRNA在皮下移植瘤与腹腔移植瘤表达差异具有显著性($P<0.05$).

■创新盘点

裸小鼠体内人癌的异位和正位异种移植瘤可作为研究组织微环境中调节肿瘤细胞表型的非遗传因素的活体模型; 在不同组织微环境中生长的同一来源的肿瘤细胞, 其表型的差异也可表现在对间质细胞的诱导方面.

■应用要点

侵袭是肿瘤的恶性行为主要特征之一, 表现为肿瘤细胞侵袭性破坏宿主组织和向远处转移. 肿瘤细胞侵袭性实验研究方法分体内和体外两大类. 体内实验的特点是能显示癌细胞侵袭过程与宿主之间的关系. 本研究建立人胃癌裸鼠异种移植瘤模型, 旨在对肿瘤的发展、增殖、侵袭及转移等方面的研究提供途径.

■同行评价

本研究为该课题组系列性研究内容之一。文章不同于以往报道之处是应用分子病理手段检测了不同微环境下胃癌异种移植瘤中明胶酶的表达差异,从而进一步验证了组织微环境对肿瘤侵袭表型有很大影响,明胶酶在肿瘤转移中起一定作用。课题实验设计合理,研究结果可信,为阐明胃癌转移机制提供了又一佐证。

3 讨论

肿瘤细胞侵袭性实验研究方法分为体内和体外两大类,体内实验能显示癌细胞侵袭过程与宿主之间的关系。因为肿瘤的侵袭、转移是一个多步骤的自然选择过程,探讨间质在肿瘤的形成、分化、演进、侵袭与转移中的调节作用不可忽视^[10-13]。故我们采用体内实验方法,所用的人胃癌移植瘤具有稳定的细胞生长周期及DNA含量,且传代成瘤率几近100%,为胃癌的侵袭性研究提供了一个新的与人体环境更为接近的实验模型。在肿瘤的侵袭转移研究中,MMPs受到了高度重视,人们对MMP及其抑制剂进行了大量的研究,了解其生理及病理学方面的重要意义。明胶酶作为MMP的一个亚型,他的表达激活以及其功能的有效发挥,受内外环境多种因素的影响,尽管众多的研究表明其与消化系统肿瘤的侵袭和转移有密切的联系,但这一领域尚有许多未知的东西有待探讨。在明胶酶与胃癌相关研究方面,Monig *et al*^[14]对114例胃癌患者行根治性手术标本采用免疫组织化学半定量方法对MMP-2进行研究,结果显示,MMP-2的表达与肿瘤进展及胃癌淋巴结转移密切相关。张成武 *et al*^[15]采用S-P免疫组织化学方法检测20例正常黏膜上皮、20例异型增生、108例胃癌组及47例相应癌淋巴结MMP-9的表达情况,发现胃癌组织MMP-9阳性率为88.9%(96/108)明显高于正常胃黏膜和异型增生MMP-9阳性表达率20.2%和70%,差异具有显著性;癌转移淋巴结MMP-9表达阳性率为100%,明显高于胃癌原发灶;MMP-9表达强度与胃癌的生长方式、浸润程度、淋巴结转移、远处转移、脉管侵犯及病期密切相关,从而认为MMP-9的表达与胃癌侵袭转移及预后密切相关。本实验将相同来源的瘤组织(裸小鼠腹腔种植结节)分别在免疫缺陷的裸小鼠皮下及腹腔种植,前者出现明显的膨胀性生长,而后者表现为浸润性生长,不同的移植部位出现了显著的生物学行为差异。皮下转移瘤在皮下的微环境中丧失了人胃癌组织明显浸润性生长的特性,而腹腔移植瘤在腹腔的微环境中保持人胃低分化腺癌浸润性生长的生物学特性,并伴有活跃的纤维结缔组织增生。但是裸小鼠皮下与腹腔不同组织微环境究竟对肿瘤细胞侵袭性的调节机制是什么?检索国内外文献未见有深入的研究。我们观察到人胃癌腹腔

移植瘤中癌巢边缘及临近的间质细胞MMP-2, MMP-9 mRNA阳性表达,且主要表达在间质;皮下移植瘤以膨胀性生长为主,MMP-2, MMP-9 mRNA表达均为阴性。同一来源的肿瘤细胞在不同组织微环境中所呈现的侵袭性及MMP-2, MMP-9 mRNA表达均有显著性差异,提示了肿瘤细胞与相邻的间质细胞之间具有相互诱导作用,组织微环境对肿瘤表型可有决定性的影响,并且MMP-2, MMP-9 mRNA的表达与胃癌细胞的生长方式及侵袭性有密切联系,为我们研究胃癌的侵袭、转移提供了一个新思路。

4 参考文献

- 1 Price JT, Thompson EW. Mechanisms of tumour invasion and metastasis: emerging targets for therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2002; 6: 217-233
- 2 范玉晶, 韩明子. 基质金属蛋白酶和消化道肿瘤的相关性. *世界华人消化杂志* 2004; 9: 2174-2176
- 3 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43 Suppl: S42-S51
- 4 Liu HL, Li XH, Wang DY, Yang SP. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in fibrotic rat liver. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 881-884
- 5 蔡蓉, 卢健. 胃癌侵袭转移相关基因的研究进展. *生命科学* 2004; 4: 206-225
- 6 李莉, 张声, 林华, 林建银. 基质金属蛋白酶和组织金属蛋白酶抑制剂表达失衡与胃癌浸润转移的关系. *癌症* 2002; 3: 305-310
- 7 王璐, 张丽红, 李玉林, 李一雷, 刘湛. 基质金属蛋白酶-9及其mRNA在胃癌中的表达与血管新生的关系. *中华医学杂志* 2003; 9: 782-786
- 8 汪丽燕, 乔镇, 关景明. 基质金属蛋白酶与其抑制剂在消化道肿瘤中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2004; 11: 2674-2678
- 9 张晓东, 黄梅芳, 李传银, 金懋林. 胃癌侵袭和转移相关基因的研究现状. *肿瘤* 2001; 6: 477-479
- 10 Pupa SM, Menard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol* 2002; 192: 259-267
- 11 Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70: 561-573
- 12 Mueller MM, Fusenig NE. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation* 2002; 70: 486-497
- 13 Bindels EM, Vermey M, De Both NJ, van der Kwast TH. Influence of the microenvironment on invasiveness of human bladder carcinoma cell lines. *Virchows Arch* 2001; 439: 552-559
- 14 Monig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Holscher AH. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2001; 39: 597-602
- 15 张成武, 邹寿椿, 徐文娟, 赵仲生. 胃癌基质金属蛋白酶-9表达的临床意义. *中国胃肠外科杂志* 2000; 1: 25-27

电编 李琪 编辑 王晓瑜

双歧杆菌在5-氟尿嘧啶作用下的适应性变化

刘俊康, 邓渝, 吴小兰, 魏海龙, 徐启旺

刘俊康, 邓渝, 吴小兰, 魏海龙, 徐启旺, 第三军医大学医学检验系生物波研究室 重庆市 400038
重庆市科委自然科学基金计划资助项目, No. CSTC2006BB5068
通讯作者: 徐启旺, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号, 第三军医大学医学检验系生物波研究室. tmmubc@163.com
电话: 023-68752191
收稿日期: 2006-07-28 接受日期: 2006-08-22

Adaptive changes of bifidobacteria in the presence of 5-fluorouracil

Jun-Kang Liu, Yu Deng, Xiao-Lan Wu, Hai-Long Wei, Qi-Wang Xu

Jun-Kang Liu, Yu Deng, Xiao-Lan Wu, Hai-Long Wei, Qi-Wang Xu, Research Center of Bio-wave, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by the Natural Science Planning Foundation of Chongqing Science and Technology Committee, No. CSTC2006BB5068
Correspondence to: Qi-Wang Xu, Research Center of Bio-wave, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. tmmubc@163.com
Received: 2006-07-28 Accepted: 2006-08-22

Abstract

AIM: To observe the characteristics for the adaptive changes of bifidobacteria under the influence of 5-fluorouracil (5-FU).

METHODS: The growth and morphological characteristics of bifidobacteria in the presence of 5-FU were acquired by drug-sensitivity test, gram stain and atomic force microscopic scanning as well as the identification of the 5-FU-resistant isolates.

RESULTS: In the presence of 5-FU, bifidobacteria were lengthened with fewer ruptures, becoming filament-like, with a length of more than 10 μm . The bifidobacteria were ramose at both ends and the relative height was about 1 μm . The 5-FU-resistant bifidobacteria were also found within the inhibition zone. Given the normal growth conditions, the filament-like bifidobacteria restored to the normal growth again.

CONCLUSION: 5-FU can directly influence the

growth of bifidobacteria, whereas bifidobacteria exhibit significant adaptive changes to the action of 5-FU.

Key Words: Bifidobacteria; Chemotherapeutic drugs; 5-fluorouracil; Biological wave; Atomic force microscope

Liu JK, Deng Y, Wu XL, Wei HL, Xu QW. Adaptive changes of bifidobacteria in the presence of 5-fluorouracil. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3139-3142

摘要

目的: 研究双歧杆菌在5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)作用下的适应性变化特点。

方法: 采用药敏实验、染色形态观察、原子力显微镜扫描观察以及耐药菌株生长实验鉴定等方法观察双歧杆菌的生长情况及形态特征。

结果: 在5-FU作用下, 双歧杆菌菌体加长, 断裂减少, 转变成丝状体, 长度在10 μm 以上, 两端呈分枝状, 相对高度约1 μm , 并且在抑菌环内还产生了耐药菌株。这些丝状体在正常的生长条件下又可以恢复正常生长。

结论: 化疗药物可以直接影响双歧杆菌的生长, 而双歧杆菌对化疗药的作用可产生显著的适应性变化。

关键词: 双歧杆菌; 化疗药物; 5-氟尿嘧啶; 生物波; 原子力显微镜

刘俊康, 邓渝, 吴小兰, 魏海龙, 徐启旺. 双歧杆菌在5-氟尿嘧啶作用下的适应性变化. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3139-3142
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3139.asp>

0 引言

人体胃肠道对数量巨大而又动态变化的细菌群体而言是一个天然的生态环境^[1], 双歧杆菌作为肠道菌群的重要成员^[2], 占新生儿肠道细菌总量的91%, 成年人占到3%-7%, 发挥稳定肠道菌

■背景资料

双歧杆菌是人体内存的一种生理性细菌, 是人体有益菌中最值得重视和研究的一种, 只有在患病时或衰老时才有所减少; 5-氟尿嘧啶是通过抑制脱氧胸苷酸酶, 从而影响DNA的合成, 其对消化系统癌的疗效较好, 在临床中的应用广泛, 5-氟尿嘧啶对双歧杆菌的损伤作用较强, 在此背景下, 人们做了大量的研究来解决此问题, 最多的研究都集中在对体内双歧杆菌的补充上, 但这种方式仍然不能避免5-氟尿嘧啶的损伤作用, 因此本文希望通过一些独特的研究来选育出可以抗5-氟尿嘧啶的损伤的双歧杆菌来。

■创新盘点

潜生体是细菌在不利条件下的一种特殊生长状态,本文利用原子力显微镜结合常规细菌培养的方法,对此进行了深入的探索,结果发现在抑菌圈的周围出现了能耐药的菌株,虽然数量不多,但如果其拥有稳定的转种传代能力,这将为临床药物的应用及某些类似的消化类疾病作出不小的贡献,进一步的研究还在继续中。

群、产生特殊有机酸类物质来对抗致病菌^[3]、以寡聚糖抑制多种致病微生物、维持人体胃肠道正常功能等多方面作用^[4]。医院患者特别是肿瘤患者常常应用抗癌药物,在此过程中肠道功能会受到明显影响。文献报道可引起肠道菌群紊乱,导致艰难梭菌等条件致病菌的过生长,引发肠道感染^[5],也有文献报道化疗药应用使双歧杆菌数量减少^[6],但尚未见到化疗药物直接对双歧杆菌作用而引起其生物学形状改变的研究报道。因此,本文选用5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对此作了针对性研究,目的在于探索双歧杆菌对化疗药物作用的适应性变化特点,为临床上找到一条在应用化疗药物情况下,稳定双歧杆菌从而维持肠道功能正常的途径提供实验依据。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 青春型双歧杆菌,本室分离保存;改良BS培养基,依文献[7]的方法配置;5-FU,天津金耀氨基酸有限公司;Olympus多功能显微镜:日本Olympus公司,带有型号为UplanFL的10×, 20×, 40×, 100×平场消色差镜头;原子力显微镜:日本精工公司,型号SPI3800N-SPA400,应用原子力显微镜AFM的气相模式。在该种模式下使用了100 μm Scanner,其参数为:X: 115 μm, Y: 115 μm, Z: 29.97 μm,表示应用的Scanner在X轴、Y轴方向上的扫描移动范围最大值为115 μm,在Z轴方向上移动范围最大值为29.97 μm,应用AFM测定使用Triangle 200 nm的cantilever,使用相应的探针支架。柯达数码相机: Kodak EasyShare V603, 3倍光学变焦。

1.2 方法

1.2.1 5-FU作用下细菌的生长及形态观察 将5-FU制备成1, 5, 10 mg/L的水溶液,以5 μL/片的体积加在直径5 mm的药敏实验专用纸片上,制成药敏纸片,同时以环磷酸胺配制成0.5 g/L水溶液,同法制成药敏纸片。用棉签蘸取双歧杆菌悬液涂抹BS平板,并在平皿中心放置5-FU药敏纸片,于37℃厌氧环境中(800 mL/L N₂, 100 mL/L H₂, 100 mL/L CO₂)培养48 h,观察抑菌情况,并以革兰染色法观察抑菌环内外细菌形态。

1.2.2 原子力显微镜扫描观测法 在上述药敏实验形成的抑菌圈边缘取一接种环细菌,加入0.5 mL生理盐水制备成生理盐水菌悬液,均匀涂布于扫描专用玻片上干燥,以甲醇固定15 min,蒸馏水漂洗3次,每次1 min,待干,按照

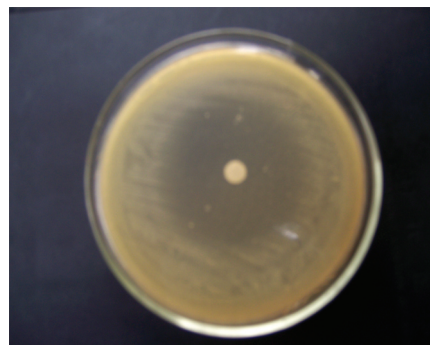


图1 5-FU对双歧杆菌药敏实验结果(×1)。从中心含有10 mg/L × 5 μL的5-FU药敏纸片向边缘延伸,显示出直径约2.5 cm的抑菌圈,在抑菌圈内可见散在生长的菌落。

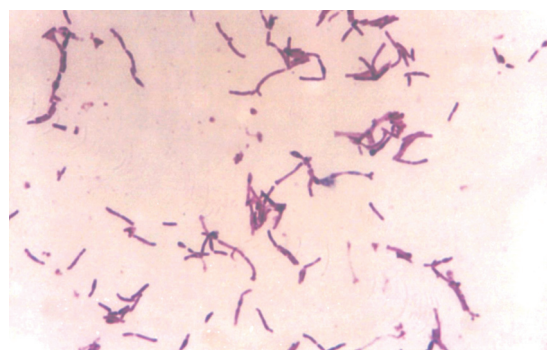


图2 5-FU纸片周围抑菌圈边缘细菌革兰染色表现出的菌体加长,断裂减少的丝状体特征(×1000)。

原子力显微镜操作程序扫描观测细菌形态特征。

1.2.3 细菌生长能力观察 抑菌环边缘处取细菌标本,接种改良BS培养基,37℃厌氧培养48-72 h,观察其复原生长情况;并对抑菌环内菌落再次进行5-FU耐药实验。

2 结果

2.1 双歧杆菌在5-FU作用下生长及形态观察结果 5-FU对双歧杆菌的生长显示出抑制作用,并且药量大者,其抑菌作用也增强,在抑菌圈内还可见散在生长的菌落(图1)。抑菌圈边缘处细菌常规涂片,革兰染色,表现出菌体加长,断裂减少的丝状体变化(图2),并且革兰染色为蓝紫色阳性反应特征减轻,总体上呈复染后的红色(图3),环磷酸胺纸片周围没有抑菌圈(图4),细菌形态呈分枝状,Y字形、V字形等形态特征,革兰染色呈阳性。

2.2 5-FU作用下形成的丝状体 由扫描结果可见,双歧杆菌的丝状体长度在10 μm以上,两端呈分枝状,相对高度约1 μm(图5)。

2.3 5-FU作用后细菌生长能力 以纸片法进行的

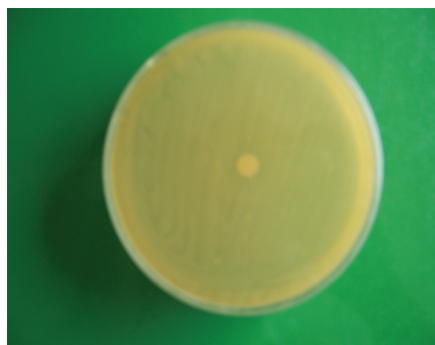


图 3 环磷酰胺对双歧杆菌药敏实验结果($\times 1$). 含0.5 mg/L $\times 5 \mu\text{L}$ 的环磷酰胺对双歧杆菌的生长无抑菌圈, 表明对双歧杆菌的生长无抑制作用.

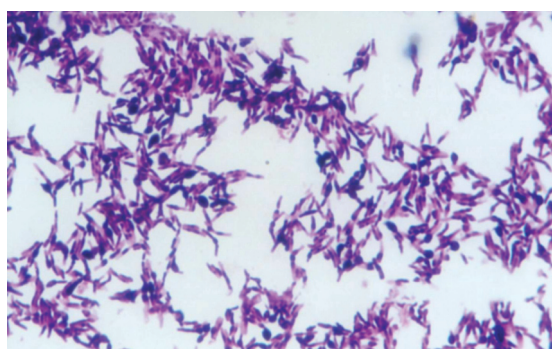


图 4 环磷酰胺作用下双歧杆菌革兰染色结果($\times 1000$).

5-FU药敏实验结果显示, 在含5-FU的纸片周围形成了抑菌圈, 在抑菌圈内有散在的菌落. 从抑菌圈外缘处挑取细菌涂片染色观察见多数为丝状体双歧杆菌. 转种培养48-72 h, 形成的菌落由正常形态细菌组成(图6); 转种于37℃厌氧环境中抑菌环内生长菌落再次进行5-FU药敏实验, 结果无抑菌环出现(图7).

3 讨论

本文在有关双歧杆菌传统研究的基础上^[7], 针对肿瘤患者应用化疗药物后, 肠道功能受损, 特别是双歧杆菌数量明显减少的问题^[8], 实验研究5-FU作用下双歧杆菌的适应性变化, 结果表明5-FU对双歧杆菌有抑制作用; 这种抑制作用使双歧杆菌适应性变化和耐药性显现出来. 其中, 适应性变化显示在形态和生长特点上. 形态方面由正常的革兰染色阳性的分叉状的短杆菌变为纤细的革兰染色阳性反应减弱的菌体形态. 实验也证明, 在给以合适条件时, 这种纤细状细菌能恢复生长, 形成正常的细菌形态. 另一方面, 耐药性的变化表现在5-FU纸片周围抑菌圈内出现散在菌落, 这些菌落再次进行5-FU药敏实验

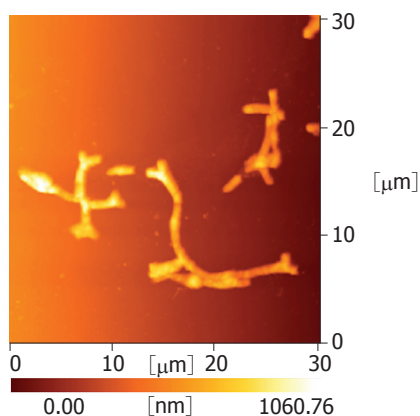


图 5 5-FU作用下形成的丝状体AFM扫描, 扫描面积30 μm \times 30 μm .

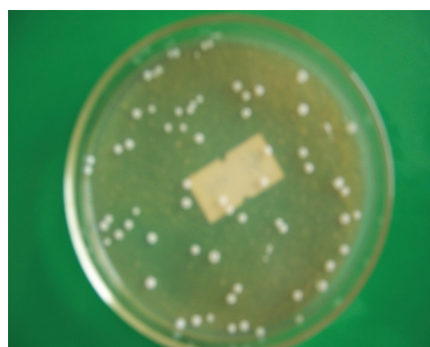


图 6 双歧杆菌丝状体转种后形成的菌落形态($\times 1$).

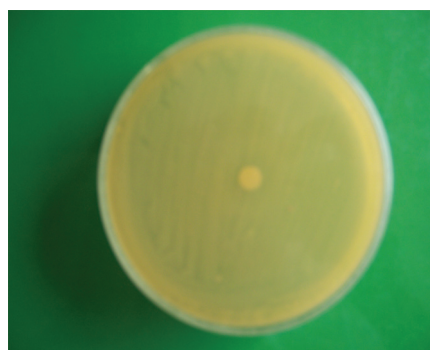


图 7 5-FU纸片周围抑菌圈内生长菌落再次进行5-FU药敏实验结果($\times 1$).

时, 仍然耐药.

由本实验可知, 虽然5-FU等化疗药物能够直接抑制或损伤双歧杆菌, 作为一种肠道重要的正常菌群^[9], 在生长进化中同样具备了适应变化能力, 其在抑菌圈周围出现的纤细状形态, 再结合其产生条件来看符合生物波研究中提出的有关潜生体的概念^[10], 是对抗不利环境的一种适应性变化形式. 另一方面, 也可以看出并非所有的双歧杆菌都对化疗药物敏感, 有的菌株表现

■创新盘点

本文将为临床药物的应用及某些类似的消化类疾病作出不小的贡献.

■同行评价

本文准确反映了研究工作的科学问题和特定内容, 简明而有特色, 文章的科学性、创新性和可读性反映了我国胃肠病学基础研究水平。

出天然的耐药性, 这些菌株的存在或者通过人工补充对应用化疗药物的患者应该有较为重要的作用。化疗药作用下双歧杆菌为何会发生形态的变化等有关的机制问题尚有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Ballongue J. Bifidobacteria and probiotic action. In: Salminen S, von Wright A, eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. New York: Marcel Dekker, 1998: 519-587
- 2 Biavati, Mattarelli P. The family Bifidobacteriaceae. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, eds. The prokaryotes. New York: Springer, 2001: 1-70
- 3 Gagnon M, Kheadr EE, Le Blay G, Fliss I. *In vitro* inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Int J Food Microbiol* 2004; 92: 69-78
- 4 De Vuyst L, Avonts L, Neysens P, Hoste B, Vancanneyt M, Swings J, Callewaert R. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species *Lactobacillus amylovorus* that is of interest for cereal fermentations. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 93-106
- 5 Kamthan AG, Bruckner HW, Hirschman SZ, Agus SG. *Clostridium difficile* diarrhea induced by cancer chemotherapy. *Arch Intern Med* 1992; 152: 1715-1717
- 6 张晓敏, 杨景云, 李丹红, 刘开蕾. 化疗安口服液对白血病患者化疗后免疫功能及肠道菌群影响的研究. *中国微生态学杂志* 2005; 17: 284-285
- 7 Wang Z, Xiao G, Yao Y, Guo S, Lu K, Sheng Z. The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats. *J Trauma* 2006; 61: 650-657
- 8 Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand* 2005; 63: 317-320
- 9 Topouzian N, Joseph BJ, Bezkorovainy A. Effect of various metals and calcium metabolism inhibitors on the growth of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984; 3: 137-142
- 10 徐启旺, 刘俊康. 生物波与人体抗癌能力诠释. 香港: 新青年出版社, 2005, 30-46

电编 张敏 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊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》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展。从1993-2005《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线<http://www.wjgnet.com>免费阅读全文。《世界华人消化杂志》综合介绍以下内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。《世界华人消化杂志》开通了<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能。

东北地区汉族人群DNA修复基因XPD单核苷酸多态性与胃癌的相关性

娄毅, 宋清斌, 何向民

娄毅, 中国医科大学基础医学院医学遗传学教研室 辽宁省沈阳市 110001

宋清斌, 中国医科大学附属第一医院普通外科 辽宁省沈阳市 110001

何向民, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

通讯作者: 娄毅, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 医学遗传学教研室. louyi_1963_1019@163.com

电话: 024-23256666-5324

收稿日期: 2006-09-01 接受日期: 2006-09-25

Association of single nucleotide polymorphism in DNA repair gene XPD with gastric cancer in Han population from northeast region of China

Yi Lou, Qing-Bin Song, Xiang-Min He

Yi Lou, Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Qing-Bin Song, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Xiang-Min He, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Yi Lou, Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. louyi_1963_1019@163.com

Received: 2006-09-01 Accepted: 2006-09-25

Abstract

AIM: To assess the relationship between XPD single nucleotide polymorphism (SNP) and susceptibility to gastric cancer in Han Chinese from northeast region via a hospital-based, case-control study.

METHODS: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis was used to determine the Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms of XPD gene in 238 patients with gastric cancer and 200 healthy controls. The adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated using multivariate logistic regression.

RESULTS: The polymorphism of Lys751Gln was not significantly different between gastric cancer patients and normal controls. The frequency of Asp/Asn and Asn/Asn genotypes in gastric cancer was significantly increased as compared with that in the controls ($P = 0.041$). Individuals carrying at least one 312Asn variant allele (Asp/Asn and Asn/Asn genotypes) tended to have an increased risk (1.901 times) for gastric cancer as compared with those with the Asp/Asp genotype (OR = 1.901, 95% CI: 1.119-3.229).

CONCLUSION: The Asp312Asn polymorphisms in XPD gene are risky factors of gastric cancer in Han Chinese from northeast region.

Key Words: Gastric cancer; XPD gene; Single nucleotide polymorphism; Northeast region

Lou Y, Song QB, He XM. Association of single nucleotide polymorphism in DNA repair gene XPD with gastric cancer in Han population from northeast region of China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3143-3146

摘要

目的: 研究核苷酸切除修复基因XPD单核苷酸多态性与东北地区汉族人群胃癌风险的关系。

方法: 以聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法分析了238例胃癌患者标本XPD基因Asp312Asn和Lys751Gln多态性, 比较不同基因型与胃癌风险的关系。

结果: Lys751Gln多态在胃癌患者中的分布和正常对照组差异不显著, 与胃癌风险无关。胃癌患者中Asp/Asn和Asn/Asn基因型频率明显高于正常对照组($P = 0.041$); 与携带312 Asp/Asp基因型者比较, 携带至少1个312 Asn等位基因者(即Asp/Asn和Asn/Asn基因型)罹患胃癌的风险增加1.901倍(95%CI: 1.119-3.229)。

结论: XPD基因Asp312Asn多态是东北地区汉

■背景资料

DNA修复基因多态作为个体损伤修复能力差异的分子遗传学基础, 可能是癌症的遗传易感因素。XPD作为进化保守的DNA解旋酶, 参与核苷酸切除修复和基因转录。细胞DNA常常遭受致癌物(致突变物)的刺激而引起损伤, 但细胞内有一系列DNA修复机制, 可修复这些损伤以保持基因组的稳定性。DNA修复能力缺陷或低下将增加基因突变和细胞癌变的风险。本文分析了东北地区汉族人群XPD基因单核苷酸多态及与胃癌风险的关系。

■研究前沿

XPD基因多态在东北地区人群中的分布及其与肿瘤发生的关系未见报道。本研究发

族人群胃癌遗传易感因素。

关键词: 胃癌; XPD基因; 单核苷酸多态

姜毅, 宋清斌, 何向民. 东北地区汉族人群DNA修复基因XPD单核苷酸多态性与胃癌的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3143-3146

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3143.asp>

0 引言

细胞DNA常常遭受致癌物(致突变物)的刺激而引起损伤, 但细胞内有一系列DNA修复机制, 可修复这些损伤以保持基因组的稳定性。DNA修复能力缺陷或低下将增加基因突变和细胞癌变的风险。XPD作为进化保守的DNA解旋酶, 参与核苷酸切除修复和基因转录。该基因第312密码子G→A多态和第751密码子C→A多态分别导致Asp312→Asn312和Lys751→Gln751氨基酸替代, 而且其突变表型与DNA损伤修复能力密切相关^[1-2]。DNA修复基因多态作为个体损伤修复能力差异的分子遗传学基础, 可能是癌症的遗传易感因素。XPD基因多态在东北地区人群中的分布及其与肿瘤发生的关系未见报道。我们分析了东北地区汉族人群XPD基因单核苷酸多态及与胃癌风险的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 238例标本为中国医科大学附属第一医院普外科2000-2005年手术切除的胃癌组织, 所有患者都经组织病理学确诊, 术前未经放射和抗癌药物治疗。238例胃癌组织均为腺癌。200例无肿瘤病史和体征的正常对照组外周静脉血随机选自同期体检的人群。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 明确两侧基因组序列及SNP是否引起酶切位点改变。应用Primer3软件设计引物(Sangon公司合成)。其引物序列、扩增片段长度及酶切后片段长度见表1。

1.2.2 基因组DNA提取 应用常规酚-氯仿法进行基因组DNA提取。

1.2.3 PCR反应扩增目的片段 反应液总体积25 μ L, 其中基因组DNA约40 ng, 10 \times 反应缓冲液(MgCl₂ 15 mmol/L) 2.5 μ L, dNTP(2.0 mmol/L) 2.0 μ L, 上下游引物(20 μ mol/L)各0.5 μ L, Taq酶1 nkat。循环参数: (1)Asp312Asn: 94 $^{\circ}$ C变性5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s 35个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸8 min; (2)Lys751Gln: 94 $^{\circ}$ C变性8 min, 94 $^{\circ}$ C

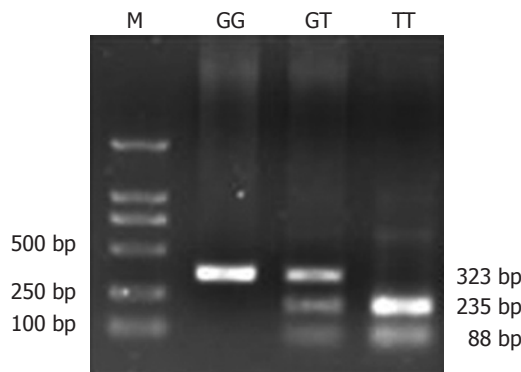


图1 Lys751Gln位点EarI酶切结果。

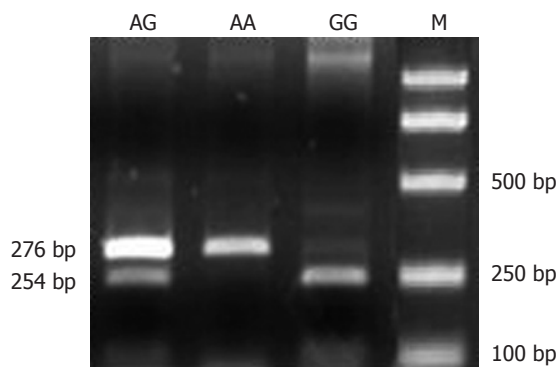


图2 Asp312Asn位点Hpy99I酶切结果。

50 s, 60 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s 35个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR产物分别经15 g/L和30 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测确认。

1.2.4 限制性内切酶酶切鉴定基因型 (1)EarI酶切鉴定Lys751Gln基因型。酶切反应体系20 μ L: 其中PCR产物8 μ L, EarI 5 U, 10 \times 缓冲液2 μ L。37 $^{\circ}$ C水浴过夜, 15 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型(图1); (2)Hpy99I酶切鉴定Asp312Asn基因型。酶切反应体系20 μ L: 其中PCR产物8 μ L, Hpy99I 5 U, 10 \times 缓冲液2 μ L。37 $^{\circ}$ C水浴过夜, 30 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定基因型(图2)。

统计学处理 应用SPSS 10.0软件统计分析患者组和对照组中多态位点基因型频率是否存在差异。

2 结果

我们分析了XPD两个多态位点Lys751Gln和Asp312Asn的基因型分布及其与胃癌风险的关系。胃癌病例组Asp/Asp, Asp/Asn, Asn/Asn的基因型频率分别为79.4%, 16.4%和4.2%, 正常对照组的基因型频率分别为88.0%, 10.5%和0.5%, 二者差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。与

■相关报道

XPD基因第312密码子G→A多态和第751密码子C→A多态分别导致Asp312→Asn312和Lys751→Gln751氨基酸替代, 而且其突变表型与DNA损伤修复能力密切相关。

表 1 2个SNP位点引物序列、扩增片段长度及酶切后片段长度

SNP名称	引物序列	长度	酶切后片段长度
Lys751Gln	AGGGGGTCTATCATCTCCTG/CCTCTCCCTTCCTCTGTTC	323 bp	235 bp/88 bp (EalI)
Asp312Asn	CCTGCAGAAGACGGTGCT/GCTCACCTGCAGCACTT	276 bp	254 bp/22 bp (Hpy99I)

表 2 患者组与正常对照组2个SNP位点基因型频率比较

项目	<i>n</i>	基因型频率(%)			χ^2	<i>P</i>
Lys751Gln		Lys/Lys	Lys/Gln	Gln/Gln		
胃癌组	238	205 (86.1)	30 (12.8)	3 (1.1)	4.51	>0.05
对照组	200	164 (82.3)	33 (16.2)	3 (1.5)		
Asp312Asn		Asp/Asp	Asp/Asn	Asn/Asn		
胃癌组	238	189 (79.4)	39 (16.4)	10 (4.2)	6.38	0.041
对照组	200	176 (88.0)	21 (10.5)	3 (0.5)		

表 3 胃癌患病风险与XPD基因型的关系

项目	<i>n</i>	基因型频率(%)		OR (95%CI)	<i>P</i>
Lys751Gln		Lys/Lys	Lys/Gln或Gln/Gln	0.733 (0.438–1.227)	>0.05
胃癌组	238	205	33		
对照组	200	164	36		
Asp312Asn		Asp/Asp	Asp/Asn或Asn/Asn	1.901 (1.119–3.229)	0.016
胃癌组	238	189	49		
对照组	200	176	24		

携带XPD312Asp/Asp基因型比较, 携带至少1个312Asn等位基因(即Asp/Asn和Asn/Asn基因型)的个体罹患胃癌的风险显著增加($P = 0.016$, 校正的 $OR = 1.901$, 95%CI: 1.119-3.229, 表3)。Lys751Gln多态在胃癌患者中的分布和正常对照组差异不显著。

3 讨论

人类肿瘤多数是环境和遗传因素共同作用的结果。环境致癌物或其代谢产物攻击机体细胞引起DNA损伤, 修复系统对损伤进行修复以保证基因组的完整性和稳定性。当DNA损伤不能及时有效的修复, 积累到一定程度导致基因组不稳定性升高, 引起细胞增殖和分化失控, 导致肿瘤的发生。因此, DNA修复与肿瘤发生有着密不可分的联系。研究资料表明, DNA修复能力的个体差异是决定肿瘤易感性的重要因素^[3-4]。许多DNA修复基因具有单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism, SNP), 导致氨基酸替代的SNP可能改变修复酶的活性。因此, DNA修复基因SNP是导致DNA修复能力个体差异的

重要原因。胃癌是我国最常见的消化道肿瘤, 占恶性肿瘤死亡率的第1位。胃癌的发生、发展是一个多因素、多基因作用的复杂过程。目前已发现很多胃癌相关基因, 如KAI1, nm23, c-Fos, c-Jun, p53, RB和hMLH1等^[5-8]。XPD基因位于19q13, 含有23个外显子, 长约5413 kb, 在该基因上有135个SNP位点。XPD基因编码的蛋白质相对分子质量为8619 kDa, 是由761个氨基酸组成的ATP依赖5→3 DNA解旋酶, 为生命活动所必不可少^[4]。已经发现XPD基因的编码区有6个SNP位点, 其中312密码子G→A和751密码子C→A多态均引起氨基酸替代, 其突变表型使DNA修复能力低下^[1-2]。流行病学研究结果显示, XPD基因密码子156, 312和751位点的多态性与肿瘤易感性密切相关^[9-12]。Xing *et al*^[13]研究了中国北京人群中Asp312Asn和Lys751Gln和肺癌和食管癌风险的关系, 认为Asp312Asn和Lys751Gln和肺癌风险有关, 而和食管癌的风险无关。目前, 国内尚未有该基因多态位点和胃癌风险的研究。在本研究中, 我们分析XPD基因两个位点单核苷酸多态(Asp312Asn和Lys751Gln)与胃癌

■创新盘点
XPD基因多态在东北地区人群中的分布及其与肿瘤发生的关系未见报道。

■应用要点
XPD基因的Asp-312Asn位点个体差异和胃癌风险有关, 因此临床上检测该基因的多态位点有助于胃癌的预防及早期诊断。

■同行评价

本研究设计合理, 实验方法得当, 结果分析条理清晰, 工作有一定的价值, 但需要进行合理并客观的分析。

易患性的关系。结果发现, 胃癌病例组Lys/Lys, Lys/Gln和Gln/Gln基因型频率分别为86.1%, 12.8%和1.1%, 正常对照组Lys/Lys, Lys/Gln和Gln/Gln基因型频率分别为82.3%, 16.2%和1.5%, Lys751Gln多态在胃癌患者中的分布和正常对照组差异不显著, 与胃癌的风险无关。Asp312Asn位点胃癌病例组Asp/Asp, Asp/Asn和Asn/Asn的基因型频率分别为79.4%, 16.4%和4.2%, 正常对照组的基因型频率分别为88.0%, 10.5%和0.5%, 二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。与携带XPD312Asp/Asp基因型比较, 携带至少1个312Asn等位基因(即Asp/Asn和Asn/Asn基因型)的个体罹患胃癌的风险显著增加($P = 0.016$, 校正的 $OR = 1.901$, 95%CI = 1.119-3.229)。XPD基因的Asp312Asn位点个体差异和胃癌风险有关, 因此临床上检测该基因的多态位点有助于胃癌的预防及早期诊断。

4 参考文献

- 1 Qiao Y, Spitz MR, Shen H, Guo Z, Shete S, Hedayati M, Grossman L, Mohrenweiser H, Wei Q. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis* 2002; 23: 295-299
- 2 Hemminki K, Xu G, Angelini S, Snellman E, Jansen CT, Lambert B, Hou SM. XPD exon 10 and 23 polymorphisms and DNA repair in human skin in situ. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1185-1188
- 3 Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366-374
- 4 许玲, 孙大志, 余志红. 肿瘤基因单核苷酸多态性研究及个体化医疗的思考. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 592-595
- 5 侯仁好, 初晓艺, 刘希双. c-Fos, c-Jun与Bcl-2蛋白在胃癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2448-2451
- 6 刘茗露, 刘斌, 邢传平, 陈一伟. 胃癌组织中KAI1、nm23及P53的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 491-496
- 7 肖桂珍, 刘希双. 胃癌和癌前病变中错配修复基因hMLH1的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2093-2097
- 8 凌霄华, 汪丽燕, 关景明, 刘颖, 于欣. 胃癌相关基因在癌前病变中的表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2102-2105
- 9 Arrand JE, Bone NM, Johnson RT. Molecular cloning and characterization of a mammalian excision repair gene that partially restores UV resistance to xeroderma pigmentosum complementation group D cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6997-7001
- 10 Tomescu D, Kavanagh G, Ha T, Campbell H, Melton DW. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. *Carcinogenesis* 2001; 22: 403-408
- 11 Sturgis EM, Zheng R, Li L, Castillo EJ, Eicher SA, Chen M, Strom SS, Spitz MR, Wei Q. XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 2219-2223
- 12 Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser H, Wei Q. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 1354-1357
- 13 Xing D, Tan W, Song N, Lin D. Genetic polymorphism in hOGG1 and susceptibility to esophageal cancer in Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2000; 17: 377-380

电编 张敏 编辑 王晓瑜

丹参注射液对失代偿期肝硬化患者凝血功能的影响

胡国勇, 胡娟, 严志刚, 丁岩冰, 吴健, 肖炜明, 杨建国

胡国勇, 严志刚, 丁岩冰, 吴健, 肖炜明, 杨建国, 扬州市第一人民医院消化内科 江苏省扬州市 225001
胡娟, 扬州市第一人民医院检验科 江苏省扬州市 225001
通讯作者: 胡国勇, 225001, 江苏省扬州市泰州路45号, 扬州市第一人民医院消化内科, huguoyongyz@yahoo.com.cn
电话: 0514-7907336
收稿日期: 2006-08-26 接受日期: 2006-09-26

Effects of salvia miltiorrhiza injection on coagulation function of decompensated liver cirrhosis

Guo-Yong Hu, Juan Hu, Zhi-Gang Yan, Yan-Bing Ding, Jian Wu, Wei-Ming Xiao, Jian-Guo Yang

Guo-Yong Hu, Zhi-Gang Yan, Yan-Bing Ding, Jian Wu, Wei-Ming Xiao, Jian-Guo Yang, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Yangzhou City, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China
Juan Hu, Department of Clinical Laboratory, the first People's Hospital of Yangzhou City, Yangzhou 225001, Jiangsu Province, China. huguoyongyz@yahoo.com.cn
Received: 2006-08-26 Accepted: 2006-09-26

Abstract

AIM: To evaluate the effect of salvia miltiorrhiza (SM) injection on the coagulation function of patients with decompensated liver cirrhosis.

METHODS: A total of 40 patients with decompensated liver cirrhosis were randomly and averagely divided into SM group and controls group. Besides comprehensive treatment, the patients in SM group also received SM injection for 2 wk. The indexes, including prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT) and fibrinogen (FIB) level were examined before and after treatment. Moreover, bleeding complication was observed in the two groups.

RESULTS: Before treatment, the values of PT, APTT and TT, and the level of FIB were 17.2 ± 5.9 s, 50.3 ± 5.1 s, 21.5 ± 2.5 s, 1.7 ± 1.2 g/L in

control group, and 17.5 ± 5.7 s, 50.1 ± 5.8 s, 21.3 ± 2.7 s, 1.7 ± 1.0 g/L in SM group, respectively. After treatment, the above markers were 15.8 ± 5.0 s, 47.2 ± 5.3 s, 19.2 ± 2.1 s, 1.8 ± 1.3 g/L in control group, and 14.5 ± 4.0 s, 44.2 ± 5.6 s, 17.2 ± 2.4 s, 2.0 ± 1.5 g/L in SM group, respectively. There were significant differences before and after treatment both in control group and SM group ($P < 0.05$), and furthermore, marked differences also existed between the two groups after treatment ($P < 0.05$). The incidence rate of bleeding complication was notably lower in SM group than that in control group (25% vs 50%, $P < 0.05$).

CONCLUSION: SM injection can improve the coagulation function and lower the rate of bleeding complication in patients with decompensated liver cirrhosis.

Key Words: Salvia miltiorrhiza; Decompensated liver cirrhosis; Coagulation function

Hu GY, Hu J, Yan ZG, Ding YB, Wu J, Xiao WM, Yang JG. Effects of salvia miltiorrhiza injection on coagulation function of decompensated liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3147-3150

摘要

目的: 评价丹参注射液对失代偿期肝硬化患者凝血功能的影响。

方法: 失代偿期肝硬化患者40例随机平均分为丹参治疗组和对照组, 前者在综合治疗的基础上加用丹参注射液治疗, 治疗前及治疗后2 wk测定凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)等凝血功能指标, 并观察两组治疗期间临床出血情况。

结果: 治疗前对照组和丹参组PT, APTT, TT和FIB测定值分别为: 17.2 ± 5.9 s, 50.3 ± 5.1 s, 21.5 ± 2.5 s, 1.7 ± 1.2 g/L和 17.5 ± 5.7 s, 50.1 ± 5.8 s, 21.3 ± 2.7 s, 1.7 ± 1.0 g/L, 治疗后对照组和丹参组PT, APTT, TT和FIB测定值分别为: 15.8 ± 5.0 s, 47.2 ± 5.3 s, 19.2 ± 2.1 s, 1.8

■背景资料

肝硬化是我国常见疾病和死亡原因之一, 尤其失代偿期患者尚无特效治疗, 主要以改善肝功能和对症治疗为主。以活血化瘀为主的中药均已证实有肯定的抗肝纤维化、保护肝细胞、减缓肝硬化进展的作用。丹参作为活血化瘀中药的主药, 近年来倍受研究者的关注。

■研发前沿

失代偿期肝硬化患者大多存在凝血功能的紊乱, 丹参具有活血化瘀之功能, 丹参在失代偿期肝硬化患者临床应用中是否能加重患者凝血功能, 从而增加患者的临床出血率, 是广大消化病医生面临的且急需解决的问题。

■相关报道

已有研究报道, 丹参具有双重调节凝血系统的作用, 此外丹参也并不延长华法林所引起的PT的延长, 提示丹参并不会增加凝血障碍紊乱的出血率。

± 1.3 g/L和 14.5 ± 4.0 s, 44.2 ± 5.6 s, 17.2 ± 2.4 s, 2.0 ± 1.5 g/L. 两组治疗前后PT, APTT, TT和FIB均有显著差异($P < 0.05$), 但丹参组比对照组对PT, APTT, TT和FIB的改善更为明显($P < 0.05$). 丹参组治疗期间出血发生率明显低于对照组(25% vs 50%, $P < 0.05$).

结论: 丹参注射液能够改善失代偿期肝硬化患者的凝血功能, 降低临床出血率, 提示丹参注射液治疗失代偿期肝硬化是安全有效的。

关键词: 丹参; 肝硬化失代偿; 凝血功能

胡国勇, 胡娟, 严志刚, 丁岩冰, 吴健, 肖炜明, 杨建国. 丹参注射液对失代偿期肝硬化患者凝血功能的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3147-3150

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3147.asp>

0 引言

大量的临床实验研究证实, 对于肝硬化患者, 丹参具有保护肝细胞, 缓解临床症状, 减缓肝硬化进展的作用^[1-9]. 但对于失代偿期肝硬化患者大多存在凝血功能的障碍, 而丹参具有活血化瘀之功能, 丹参在失代偿期肝硬化患者的临床应用是否能加重患者凝血功能的障碍, 从而增加肝硬化患者的出血率, 目前国内文献报道较少. 本研究应用丹参注射液治疗失代偿肝硬化患者, 观察治疗前后患者凝血功能的变化和治疗期间出血的发生率, 以探讨丹参注射液治疗失代偿肝硬化患者的安全性。

1 材料和方法

1.1 材料 选取我科从2004-01/2005-12确诊为失代偿肝硬化的患者40例, 所选病例均参照2000年西安第10次全国病毒性肝炎防治及肝病学术会议讨论修订肝硬化诊断标准, 同时根据child-pugh分级为B级和C级, 排除上消化道大出血、严重出血倾向和肝性脑病患者. 其中男性27例, 女性13例; 年龄28-69(平均52.3)岁; 乙肝后肝硬化24例, 丙肝后肝硬化5例, 酒精性肝硬化8例, 病因不明3例。

1.2 方法 将患者随机分成两组: 对照组(20例), 其中男性13例, 女性7例, 给予常规护肝、降酶和退黄等综合治疗, 必要时予以利尿和输注白蛋白; 丹参组20例, 其中男性14例, 女性6例, 在对照组的基础上加用丹参注射液30 mL加入250 mL葡萄糖液中静脉点滴, 疗程为2 wk. 疗程结束前后分别检测患者的PT, APTT, TT, FIB等凝血功能指标,

表 1 两组间临床资料的比较($n = 20$)

临床资料	对照组	丹参组
年龄(岁)	51.8 \pm 10.5	52.0 \pm 10.9
性别		
男/女	14/6	13/7
病因		
乙肝	11	13
丙肝	3	2
酒精	4	4
不明	2	1
Child-Pugh分级		
B级	12	11
C级	8	9
血小板减少	18	17
食管静脉曲张	12	12

表 2 两组治疗前后凝血功能的变化(mean \pm SD, $n = 20$)

	对照组		丹参组	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
PT	17.2 \pm 5.9	15.8 \pm 5.0 ^a	17.5 \pm 5.7	14.5 \pm 4.0 ^{bc}
APTT	50.3 \pm 5.1	47.2 \pm 5.3 ^a	50.1 \pm 5.8	44.2 \pm 5.6 ^{bc}
TT	21.5 \pm 2.5	19.2 \pm 2.1 ^a	21.3 \pm 2.7	17.2 \pm 2.4 ^{bc}
FIB	1.7 \pm 1.2	1.8 \pm 1.3 ^a	1.7 \pm 1.0	2.0 \pm 1.5 ^{bc}

^a $P < 0.05$, ^c $P < 0.05$ vs 同组治疗前; ^b $P < 0.01$ vs 对照组治疗后。

表 3 两组治疗期间出血发生率(n , %)

	对照组	丹参组
皮肤黏膜出血	7 (35)	3 (20) ^a
食管静脉曲张破裂	3 (15)	1 (5) ^a
总计	10 (50)	4 (25) ^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

并观察治疗期间患者皮肤黏膜出血(包括鼻衄、齿龈出血、皮肤紫癜、淤斑、镜下血尿和大便潜血)和食管静脉曲张破裂出血发生情况。

统计学处理 计量资料以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 均数的比较用 t 检验, 计数资料以率表示, 率的比较用 χ^2 检验. 所有数据均用SPSS 11.0统计软件进行统计分析。

2 结果

2.1 两组间临床资料 两组间临床资料具有可比性(表1)。

2.2 两组治疗前后凝血功能的比较 两组治疗前后, PT, APTT及TT均明显缩短而FIB则明显上升, 两者比较差异有显著性($P < 0.05$). 丹参组治疗后PT, APTT及TT缩短的值比对照组治疗后更为显著, 同时FIB则上升值比对照组治疗后更为明显。

■创新盘点

迄今, 关于丹参对失代偿期肝硬化患者凝血功能的影响及是否增加临床出血率国内外鲜有报道. 本研究首次证实丹参能够部分修复失代偿肝硬化患者肝细胞的功能, 从而改善患者凝血功能紊乱, 起到临床辅助止血的作用。

($P < 0.05$, 表2).

2.3 两组治疗期间出血发生率的观察 两组治疗期间, 对照组有7例出现皮肤黏膜出血, 其中鼻衄2例, 齿龈出血4例、皮肤紫癜、淤斑1例、镜下血尿1例和大便潜血1例, 食管静脉曲张破裂出血3例, 而丹参组3例出现皮肤黏膜出血, 其中鼻衄1例, 齿龈出血2例、皮肤紫癜、淤斑1例、镜下血尿和大便潜血0例次, 食管静脉曲张破裂出血1例(表3).

3 讨论

慢性肝病尤其肝硬化患者往往合并肝内高凝状态和微循环障碍, 导致肝细胞的变性、溶解和坏死, 从而引起肝细胞功能的减退^[10]. 肝细胞功能的减退又将引起凝血和纤溶系统的失衡, 导致不同程度的凝血功能障碍, 并与肝硬化程度密切相关, 随着肝功能损害程度的加重其凝血障碍愈明显^[11]. 临床上表现为出血倾向. 此外, 大部分肝硬化患者存在门脉高压性食管胃底静脉曲张, 可能导致上消化道大出血. 研究表明^[12], 丹参可以减轻肝内微循环血管痉挛, 减轻肝内高凝状态, 促使肝细胞的修复和肝细胞功能的好转. 此外, 丹参通过活血化淤, 改善血管内皮细胞血供, 修复损伤的血管内皮细胞, 从而改善肝硬化患者凝血系统的紊乱. 丹参对凝血系统的调节机制比较复杂, 至今尚未明确. 国内潘景业 *et al*^[13]研究丹参液在大鼠失血性休克合并凝血障碍紊乱的作用时发现, 丹参液既可用于弥漫性血管内凝血(DIC)高凝期又可用于继发性纤溶亢进期, 提示丹参具有双重调节凝血系统的作用, 并不会增加凝血障碍紊乱的出血率. 朱秉智 *et al*^[14]也研究发现, 丹参对兔全血黏度、红细胞和血小板聚集功能的影响与华法林相当, 但对PT, APTT, TT等凝血功能的影响不如华法林. 此外, 也有研究表明^[15], 丹参并不能延长华法林所引起的PT的延长. 基于上述理论, 本研究应用我们丹参注射液治疗失代偿肝硬化患者, 并观察治疗前后患者凝血功能的变化, 结果发现, 对于失代偿肝硬化患者即使合并血小板减少和凝血功能障碍的情况下, 丹参不仅不会加重失代偿肝硬化患者的凝血功能紊乱, 相反可改善患者的凝血功能, 可能与丹参改善肝细胞的功能、促进肝细胞合成凝血因子和调节凝血系统紊乱有关, 然而丹参如何改善患者凝血功能紊乱的具体机制还需进一步的深入研究. 此外丹参组患者出血率明显低于对照组, 且主要表现

为皮肤黏膜的出血, 仅1例为食管静脉曲张出血, 提示丹参可能起到临床辅助止血的作用.

食管胃底静脉曲张破裂出血是失代偿肝硬化患者常见而凶险的并发症, 而降低门静脉压力是目前公认的预防食管胃底静脉曲张破裂出血的主要措施. 国内胡乃中 *et al*^[1]研究证实, 丹参能减轻门脉系统阻力, 有效降低门、脾静脉压力, 改善内脏高动力循环状态, 从而有效降低食管静脉曲张破裂出血发生率. 我们研究也发现, 丹参组患者食管静脉曲张破裂出血的发生率较对照组明显降低, 进一步证实丹参具有预防失代偿肝硬化患者食管静脉曲张近期出血的作用, 关于丹参是否能够降低失代偿肝硬化患者的远期出血率及死亡率还需长期的随访研究来证实. 由于本实验的研究对象排除了上消化道大出血、严重出血倾向和肝性脑病患者, 我们建议对于此类患者丹参应慎用. 鉴于本研究样本量较少, 仅能初步证实丹参在失代偿肝硬化患者的应用是安全有效的, 还需大样本的随机对照研究来进一步证实.

4 参考文献

- 1 胡乃中, 孔德润, 许建明, 张磊, 王玲, 陈庆. 丹参对肝硬化门脉高压血流动力学影响的临床研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 625-626
- 2 郑元义, 戴立里, 王文兵, 贾丽萍, 周贤. 丹参素治疗肝纤维化及其作用机制研究. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 288-290
- 3 赵旭春, 刘颖翰, 张剑平, 谷海军, 朱丽英, 曹文智, 高秀英, 王伟. 丹参注射液治疗慢性乙型肝炎肝硬化血栓前状态的研究. *肝脏* 2006; 11: 209-210
- 4 Tan B, Zhang FX, Liu N, Guo XB. Inhibitory effect of Danshen-containing serum on proliferation of HSC-T6 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12: 1357-1360
- 5 Jiang SL, Yao XX, Lu T. Inhibitory effect of Danshen on lipid peroxidation in mitochondria of hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002; 10: 1253-1256
- 6 Lv T, Yao XX. Comparison of protocatechuic aldehyde in *Radix Salvia miltiorrhiza* and corresponding pharmacological sera from normal and fibrotic rats by high performance liquid chromatography. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2195-2200
- 7 Hsu YC, Lin YL, Chiu YT, Shiao MS, Lee CY, Huang YT. Antifibrotic effects of *Salvia miltiorrhiza* on dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2005; 12: 185-195
- 8 Yao XX, Lv T. Effects of pharmacological serum from normal and liver fibrotic rats on HSCs. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2444-2449
- 9 Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. *Salvia miltiorrhiza* monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 515-519
- 10 郝菁华, 王万忠, 朱菊人, 任万华, 石军, 韩国庆, 王书

■应用要点

本研究初步证实丹参在失代偿肝硬化患者的应用是安全有效的, 为丹参在临床中的应用提供了理论依据.

■同行评价

课题研究实验设计合理, 方法学可靠, 结果也可信. 国内尚缺乏此类报道, 具有一定创新性. 但样本例数偏少, 还需大样本的随机对照研究来进一步证实. 此外, 丹参是从哪一方面机制改善凝血功能的可进一步深入研究.

- 运, 谢英渤. 慢性乙型肝炎的肝脏微循环变化. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 275
- 11 丛玉隆, 魏玉香, 张立文, 殷宗健, 白洁. 肝硬化患者凝血、抗凝及纤溶指标的变化与Child-Pugh分级的关系. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 31-34
- 12 蒋立会, 刘亚文, 吴欣, 曹国军. 丹参注射液对门脉高压患者血流影响的临床观察. 中国热带医学 2006; 6: 500
- 13 潘景业, 张艳杰, 王明山, 金可可. 复方丹参液对大鼠失血性休克合并凝血功能紊乱的治疗作用. 中国实验血液学杂志 2005; 13: 456-459
- 14 朱秉智, 骆金华, 秦建伟, 杨国平. 丹参对兔血液流变性、血小板及凝血功能影响的实验研究. 南京医科大学学报 2001; 21: 170-171
- 15 Lo AC, Chan K, Yeung JH, Woo KS. The effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1992; 17: 257-262

电编 李琪 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十九届全国中西医结合消化会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2007-08下旬在石家庄市召开第十九届全国中西医结合消化学术交流会, 并同时举办全国中西医结合消化疾病诊治新进展学习班。

1 征文内容和要求

征文内容: (1)有关消化系统疾病包括食管、胃、肝、胰等诊疗、实验研究进展; (2)中西医结合对慢性肝炎(病)、肝纤维化临床诊治以及基础、实验研究; (3)中西医结合对消化系统肿瘤诊治经验与实验研究; (4)中西医结合对“淤血症”以及脾胃学说与脾虚证研究进展。征文要求: 来稿请附800字论文摘要, 并附软盘或发电子邮件至211zyke@163.com或czs.xiaohua@163.com(尽量以电子邮件发送)。征文请于2007-06-30前邮寄。

2 学习班招收对象

学习班招收对象: 从事中西医结合、中医或西医消化专业医师以上人员。参加学习班者授予国家继续教育学分12分; 在大会论文报告者另授继续教育学分6分。

3 联系方式

(1) 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路45号 解放军第211医院中医科(中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会), 邮编: 150080, 联系人: 李春雷, 贾云, 联系电话: 0451-57752440或86632450, 传真: 0451-86603878或0451-57752440; (2) 河北省石家庄和平西路215号河北医科大学附属第二医院, 邮编: 050000, 联系人: 姚希贤, 冯志杰, 联系电话: 0311-87222301或13333015658。

肝硬化患者肝组织中PCNA和Ki-67的表达

权春姬, 金仁顺, 朴东明

权春姬, 金仁顺, 朴东明, 延边大学附属医院病理科 吉林省延吉市 133000

通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街1327号, 延边大学附属医院病理科. pdm1117@hotmail.com
电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610
收稿日期: 2006-08-30 接受日期: 2006-09-20

Expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen in liver tissues of cirrhotic patients

Chun-Ji Quan, Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao

Chun-Ji Quan, Ren-Shun Jin, Dong-Ming Piao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Correspondence to: Dong-Ming Piao, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, 1327 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. pdm1117@hotmail.com

Received: 2006-08-30 Accepted: 2006-09-20

Abstract

AIM: To investigate the expression and significances of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in liver tissues of cirrhotic patients.

METHODS: SP immunohistochemical technique was performed to detect the expression of PCNA and Ki-67 in 58 liver specimens from patients with cirrhosis from hepatitis B ($n = 24$) and hepatitis C ($n = 22$), and chronic hepatitis ($n = 12$), and the labeling index (LI) of the positive cells was also determined. Sirius red staining was used to determine the area density of collagen in liver tissues.

RESULTS: The expression of PCNA and Ki-67 LI was significantly higher in chronic hepatitis than that in cirrhosis ($34.67\% \pm 8.6\%$ vs $10.38\% \pm 3.76\%$, $P < 0.001$; $2.81\% \pm 0.51\%$ vs $1.69\% \pm 1.03\%$, $P < 0.001$), and moreover, they were markedly higher in hepatitis C-induced cirrhosis than those in hepatitis B-induced one ($13.12\% \pm 1.42\%$ vs $6.32\% \pm 2.18\%$, $P < 0.001$; $2.48\% \pm 0.54\%$ vs $0.95\% \pm 0.77\%$, $P < 0.001$). The area density of

collagenous fiber was significantly increased in cirrhosis than that in chronic hepatitis (12.0 ± 3.1 vs 1.40 ± 1.0 , $P < 0.001$), but there was no difference between the two types of cirrhosis ($P > 0.05$). The area density of collagenous fiber had no significant correlation with the LI values of PCNA and Ki-6 in cirrhosis ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The proliferation rate of liver cells is lower in cirrhosis than that in chronic hepatitis, but it is higher in cirrhosis from hepatitis C than that in the one from hepatitis B. There is no significant correlation between the area density of collagenous fiber and the expression of PCNA and Ki-67.

Key Words: Liver cirrhosis; Chronic hepatitis; Proliferating cell nuclear antigen; Ki-67

Quan CJ, Jin RS, Piao DM. Expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen in liver tissues of cirrhotic patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(32):3151-3154

摘要

目的: 探讨乙型肝炎和丙型肝炎肝硬化患者肝组织中PCNA和Ki-67抗原的表达及意义。

方法: 选择58例(乙肝肝硬化24例、丙肝肝硬化22例、慢性肝炎12例)肝脏标本, 做H-E染色观察肝组织的病理改变; 利用天狼红染色切片检测肝组织内胶原纤维的面密度; 采用免疫组织化学SP法观察肝组织中PCNA和Ki-67抗原的表达, 并检测阳性细胞的标记指数(labeling index, LI)。

结果: 肝硬化胶原纤维的面密度百分比与慢性肝炎比较($12.2\% \pm 3.1\%$ vs $1.40\% \pm 1.0\%$, $P < 0.001$)明显增高, 乙型与丙型肝炎肝硬化胶原纤维的面密度百分比无明显差异($P > 0.05$); 慢性肝炎与肝硬化比较PCNA和Ki-67 LI ($34.67\% \pm 8.6\%$ vs $10.38\% \pm 3.76\%$, $2.81\% \pm 0.51\%$ vs $1.69\% \pm 1.03\%$, 均 $P < 0.001$)明显增高; 丙肝肝硬化与乙肝肝硬化比较PCNA和

■背景资料

PCNA和Ki67是用于显示细胞增殖状态的比较成熟的标记物, 目前多用于肿瘤的研究中。研究表明, 肝癌和癌旁肝硬化组织中PCNA表达高于单纯肝硬化组织, 认为PCNA是肝细胞癌发生的最强独立危险因素, 但在单纯肝硬化组织中PCNA的表达水平不一致, 因此深入研究肝硬化组织中肝细胞增殖活性, 对进一步阐明肝细胞癌的发生有重要意义。

■创新盘点

利用PCNA和Ki67抗原研究乙型和丙型肝炎肝硬化的研究尚少,本研究结果表明,单纯肝硬化组织中肝细胞增殖指数比慢性肝炎低,但丙型肝炎肝硬化的肝细胞增殖指数比乙型肝炎肝硬化高,肝硬化胶原纤维的面密度与PCNA和Ki-6 LI之间无相关性。

Ki-67 LI($13.12\% \pm 1.42\%$ vs $6.32\% \pm 2.18\%$, $2.48\% \pm 0.54\%$ vs $0.95\% \pm 0.77\%$, 均 $P < 0.001$)均明显增高;肝硬化胶原纤维的面密度与PCNA和Ki-6 LI之间无相关性($P > 0.05$)。

结论:肝硬化组织中肝细胞增殖指数比慢性肝炎低,但丙型肝炎肝硬化的肝细胞增殖指数比乙型肝炎肝硬化高;PCNA和Ki-67 LI与肝硬化胶原纤维面密度无相关性。

关键词:肝硬化;慢性肝炎;增殖细胞核抗原;Ki-67抗原

权春姬, 金仁顺, 朴东明. 肝硬化患者肝组织中PCNA和Ki-67的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(32):3151-3154
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3151.asp>

0 引言

增殖细胞核抗原(PCNA)和Ki-67抗原在肝癌和肝硬化有较多的研究报道,但在不同类型肝硬化中的研究较少. 本实验采用免疫组织化学方法观察46例肝硬化和12例慢性肝炎患者肝组织中PCNA和Ki-67抗原的表达,并检测两种抗原的标记指数(labeling index, LI),探讨两种抗原在乙型和丙型肝炎肝硬化中的表达及意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选择我科存档的手术切除肝病标本共58例,其中男22例,女36例,平均发病年龄40岁,平均病史10.5 a,全部病例经血清肝炎病毒学检查证实,其中乙肝肝硬化24例、丙肝肝硬化22例、慢性肝炎12例(乙肝、丙肝各6例),复习全部病例的病历档案. 鼠抗人PCNA mAb、兔抗人Ki-67 mAb及SP试剂盒均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.2 方法 全部标本均经40 g/L中性甲醛固定,常规石蜡包埋,4-5 μm 厚的连续切片,行HE染色观察肝组织的病理改变。

1.2.1 天狼猩红染色 切片常规脱蜡至水,天狼猩红-苦味酸饱和溶液(5 g/L天狼猩红溶液 10 mL,苦味酸饱和溶液90 mL)染30 min,无水乙醇分化脱水,中性树胶封片. 胶原纤维的面密度:采用彩色病理图象分析系统(北京航空航天大学CMIAS),利用天狼猩红染色的切片检测胶原纤维的面密度,用10倍物镜,每张切片随机选择5个视野,采集图象、分割处理、统计参数,计算胶原纤维面密度百分比。

1.2.2 免疫组织化学染色 采用SP法进行PCNA和

Ki-67的染色, DAB显色,以乳腺癌组织作PCNA, Ki-67的阳性对照;以PBS代替一抗作阴性对照. PCNA与Ki-67抗原阳性细胞LI: 每例选择染色均匀的视野,在40倍物镜下计数500个细胞中的阳性细胞,取平均值。

统计学处理 计量数据均用mean \pm SD表示,两样本均数的比较用 t 检验法。

2 结果

乙型肝炎肝硬化以水样变性多见,仅少数病例(20%)出现轻度脂肪变,丙型肝炎肝硬化大多数(75%)出现以大泡为主的脂肪变性。

2.1 胶原纤维的面密度 肝硬化胶原纤维的面密度百分比明显高于慢性肝炎($P < 0.001$),乙型与丙型肝炎肝硬化肝组织胶原纤维的面密度百分比无明显差异(表1)。

2.2 免疫组化染色结果 慢性肝炎PCNA阳性细胞多位于坏死灶周围,肝硬化在假小叶周边单个散在分布. 乙型肝炎肝硬化可见少量Ki-67阳性细胞单个散在分布,丙型肝炎肝硬化阳性细胞多位于脂肪变性的肝细胞周围(图1). 慢性肝炎PCNA与Ki-67 LI均高于肝硬化,丙型肝炎肝硬化PCNA与Ki-67 LI均高于乙型肝炎肝硬化(表1)。

3 讨论

PCNA和Ki-67抗原是近年来发展的显示细胞增殖状态的比较成熟的标记物,目前两种抗原多用于各种恶性肿瘤的研究中^[1-4]. PCNA的高表达提示细胞内进行旺盛的DNA合成反应,是S期细胞的良好标记物. Ki-67作为增殖细胞核抗原,除G₀期外各细胞周期都表达,其中G₂和M期表达最强. Donato *et al*^[5-6]利用PCNA研究了慢性肝炎和肝硬化病人的肝脏标本,发现PCNA能反应慢性病毒性肝炎病人的肝细胞增殖率,与肝病的严重性相关,并提出PCNA是肝细胞癌发生的最强独立危险因素. PCNA在肝癌和癌旁肝硬化的研究也有较多报道,大多数研究结果表明,PCNA在肝癌和癌旁肝硬化表达高于单纯肝硬化,但国内外的研究表明单纯肝硬化组织中肝细胞PCNA的表达水平不尽一致,郎振为 *et al*^[7]采用免疫组化法观察了肝硬化肝组织中PCNA的表达,结果表明,肝硬化时肝细胞的增殖能力相当低下;牛兆山 *et al*^[8]的研究结果表明,肝硬化组织中只有少量PCNA阳性细胞,呈单个散在分布,而癌旁增生性结节中PCNA阳性表达与肝硬化比较有显著性差异,认为是癌前病变,而肝硬化中的细胞大多处于静止状态,是一种

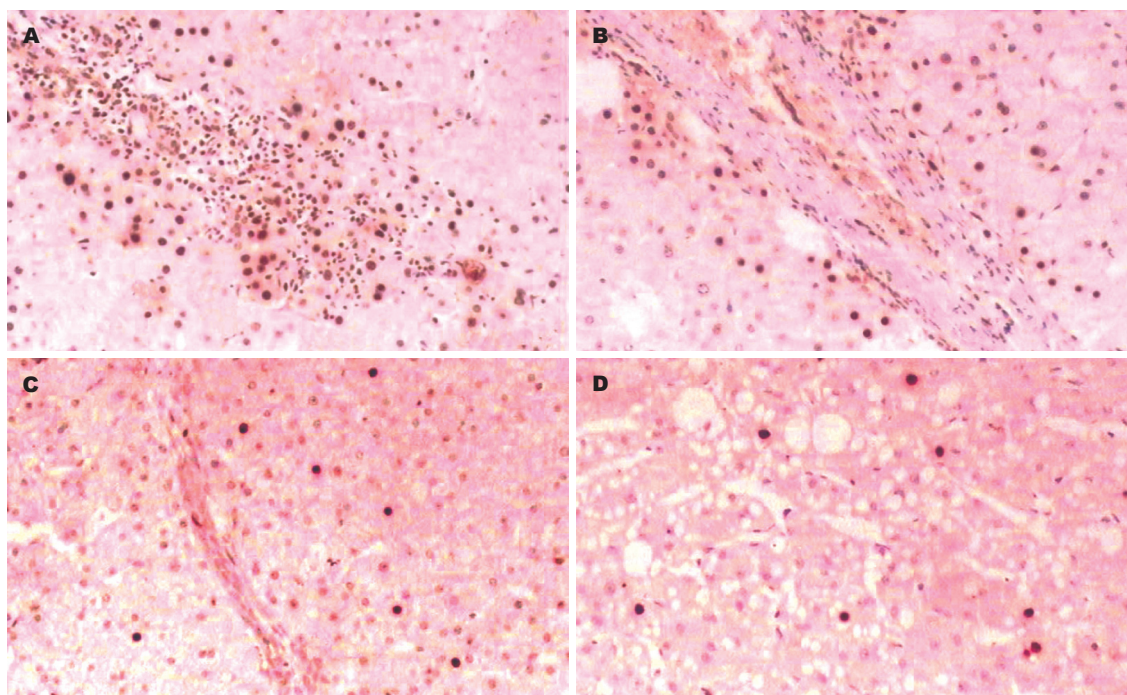


图 1 免疫组化染色结果(SP×100). A: 慢性肝炎PCNA的表达; B: 肝硬化PCNA的表达; C: 乙型肝炎肝硬化Ki67的表达; D: 丙型肝炎肝硬化Ki67的表达.

表 1 肝硬化组织中PCNA, Ki-67 LI与胶原纤维面密度检测结果(mean ± SD)

分组	n	PCNA LI	Ki-67 LI	胶原纤维面密度(%)
慢性肝炎	12	34.67 ± 8.6 ^b	2.81 ± 0.51 ^b	1.40 ± 1.0
肝硬化	46	10.38 ± 3.76	1.69 ± 1.03	12.0 ± 3.1 [†]
乙型肝炎肝硬化	24	6.32 ± 2.18	0.95 ± 0.77	11.8 ± 2.4
丙型肝炎肝硬化	22	13.12 ± 1.42 ^d	2.48 ± 0.54 ^d	12.2 ± 3.8

^b $P < 0.001$ vs 肝硬化, ^d $P < 0.001$ vs 乙型肝炎肝硬化, [†] $P < 0.001$ vs 慢性肝炎.

高度成熟细胞, 与肝细胞癌的发生没有直接关系, Kawakita *et al*^[9-10]的研究结果也相似, 而付晓梅 *et al*^[11-12]的研究则表明肝硬化时肝细胞PCNA的阳性表达率高于慢性肝炎组.

联合应用两种增殖细胞核抗原研究肝癌和肝硬化的研究报道较少^[13-14], 本组结果表明肝硬化肝细胞的PCNA和Ki-67指数明显低于慢性肝炎组, 二者有显著差异, 表明慢性肝炎时肝细胞增殖较肝硬化活跃. 在病毒性肝炎后期成熟的肝细胞广泛地被病毒感染, 而且被病毒感染的肝细胞常常失去增殖能力, 但仍在持续发生的肝细胞死亡要求肝组织持续地代偿性再生, 此时再生细胞的主要来源可能是干细胞-卵圆型细胞的增殖, Sun *et al*^[15]报道HCV+和HBV+的肝硬化中存在卵圆型细胞.

肝硬化的肝细胞增殖能力与肝纤维化程度

之间关系尚不清楚, 贾克东 *et al*^[16]对11例肝硬化组织进行纤维化程度SSS评分, 并与PCNA的结果进行相关性分析, 结果表明, 肝硬化的肝细胞增生与肝组织内纤维化程度之间无明显相关性. 本组检测了46例肝硬化胶原纤维面密度, 结果发现, PCNA和Ki-67LI与肝硬化胶原纤维面密度之间也无相关性, 与上述结果相似.

成军 *et al*^[17]报道慢性丙型肝炎中82.39%合并不同程度的肝脏脂肪变性, 本组两种类型肝硬化的形态学观察表明, 乙型肝炎肝硬化以水样变性为主, 而大多数丙型肝炎肝硬化肝细胞中出现了以大泡为主的脂肪变性. 本组丙型肝炎肝硬化PCNA与Ki-67 LI高于乙型肝炎肝硬化, PCNA与Ki-67阳性细胞多位于脂肪变性的肝细胞周围, 表明丙型肝炎肝硬化肝细胞增殖可能与脂肪变性有关. 研究表明, 肝组织中脂肪变的

存在除了影响抗病毒治疗效果以外,加速了肝脏病理损伤及纤维化的进程^[18],因此丙型肝炎病毒感染更易转为慢性过程,肝硬化的发生率(8%-46%)高于慢性乙肝(10%-20%)^[19],脂肪变还能促进肝细胞癌的发生^[20]。尽管肝硬化组织中肝细胞PCNA的表达水平不一致,但PCNA是肝细胞癌发生的最强独立危险因素,因此PCNA与Ki-67阳性率高的乙型和丙型肝炎肝硬化患者,应视为肝细胞癌的高危人群,需进行密切随访观察。

4 参考文献

- 1 Lyall MS, Dundas SR, Curran S, Murray GI. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1184-1191
- 2 Yamashita H, Toyama T, Nishio M, Ando Y, Hamaguchi M, Zhang Z, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H. p53 protein accumulation predicts resistance to endocrine therapy and decreased post-relapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R48
- 3 葛云洁, 吴淳, 纪霞. 肺癌组织中Fhit蛋白和PCNA蛋白表达及意义. *中国医刊* 2003; 38: 30-32
- 4 邹继彬, 黄广恩, 陈鸿莲. 食管癌Survivin和PCNA的表达及其临床意义. *中国医师杂志* 2005; 7: 898-899
- 5 Donato MF, Arosio E, Monti V, Fasani P, Prati D, Sangiovanni A, Ronchi G, Colombo M. Proliferating cell nuclear antigen assessed by a computer-assisted image analysis system in patients with chronic viral hepatitis and cirrhosis. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 197-203
- 6 Donato MF, Arosio E, Del Ninno E, Ronchi G, Lampertico P, Morabito A, Balestrieri MR, Colombo M. High rates of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with high liver cell proliferative activity. *Hepatology* 2001; 34: 523-528
- 7 郎振为, 金荣华, 孟忻, 李俊强, 张士杰. 肝硬化患者肝组织中增殖细胞核抗原的检测. *临床肝胆病杂志* 1996; 12: 141-143
- 8 牛兆山, 张昭成. AgNORs计数DNA含量及PCNA与肝硬化增生结节和肝癌的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 555-558
- 9 Kawakita N, Seki S, Sakaguchi H, Yanai A, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Monna T. Analysis of proliferating hepatocytes using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen/cyclin in embedded tissues from various liver diseases fixed in formaldehyde. *Am J Pathol* 1992; 140: 513-520
- 10 Ojanguren I, Ariza A, Llatjos M, Castella E, Mate JL, Navas-Palacios JJ. Proliferating cell nuclear antigen expression in normal, regenerative, and neoplastic liver: a fine-needle aspiration cytology and biopsy study. *Hum Pathol* 1993; 24: 905-908
- 11 付晓梅, 杨清绪, 邵春奎, 冯智英. 肝癌癌变过程中端粒酶逆转录酶、c-myc、PCNA表达和细胞凋亡观察. *南方医科大学学报* 2006; 26: 821-823
- 12 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST- π in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 459-462
- 13 刘军, 彭志海, 袁国强. 肝细胞癌和肝硬化组织中增殖细胞核抗原及Ki-67抗原的表达及意义. *山东医药* 2003; 43: 3-4
- 14 Gramantieri L, Trere D, Chieco P, Lacchini M, Giovannini C, Piscaglia F, Cavallari A, Bolondi L. In human hepatocellular carcinoma in cirrhosis proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is involved in cell proliferation and cooperates with P21 in DNA repair. *J Hepatol* 2003; 39: 997-1003
- 15 Sun C, Jin XL, Xiao JC. Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study. *Histopathology* 2006; 48: 546-555
- 16 贾克东, 石淑仙, 阮幼冰. 肝硬化和肝癌肝组织Survivin基因表达与增生的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 550-554
- 17 成军. 丙型病毒性肝炎与肝脏脂肪变. *辽宁医学杂志* 2004; 18: 63-64
- 18 Fernandez-Rodriguez CM, Gutierrez ML, Serrano PL, Lledo JL, Santander C, Fernandez TP, Tomas E, Cacho G, Nevado M, Casas ML. Factors influencing the rate of fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1971-1976
- 19 郎振为. 病理学检查在慢性丙型肝炎诊断和治疗中的重要地位. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2377-2379
- 20 Ohata K, Hamasaki K, Toriyama K, Matsumoto K, Saeki A, Yanagi K, Abiru S, Nakagawa Y, Shigeno M, Miyazoe S, Ichikawa T, Ishikawa H, Nakao K, Eguchi K. Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer* 2003; 97: 3036-3043

电编 李琪 编辑 张焕兰

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®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 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。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

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, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊, 中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *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30kDa(*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. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M_r*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或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; 七年, 7 a; 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年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

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±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P* <0.05, ^b*P* <0.01(*P* >0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则⁰*P* <0.05, ^d*P* <0.01; 第三套为^e*P* <0.05, ^f*P* <0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1 000-1 500 kg, 3.5 ± 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6 347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mean \pm SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ 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 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,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。完整的阿位伯数字不移行!

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个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。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,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。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 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 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 署名一般不超过8人。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

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起为周刊发行,每月7、14、21、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号: 82-261。WJG出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

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. wjgd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:
摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 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),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨, 高瑞丰, 李炳庆, 马连生, 梅立新, 吴玉珍, 刘凤芹, 廖振林. 胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。

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 图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值, 则^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$; 第3套为^e $P<0.05$, ^f $P<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^{\circ}\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号, 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 *et al*”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[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年核心期刊为准,引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达,请附引用文献网上摘要打印件,包括PMID编号(摘要的左下方)。按顺序编号装订,并考入磁盘内。在引用参考文献页码末尾注明PMID编号;无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者,请附首页复印件)。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。参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (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, 所有来稿均需接受同行审阅。

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的。

投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员。审稿过程大约需要1 mo。

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理。录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改。当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及磁盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

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

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献。

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>。邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行。1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号。

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 本刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹洁 副教授
第二军医大学微生物学教研室

陈红松 副研究员
北京大学人民医院, 北京大学肝病研究所

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

程爱国 教授
华北煤炭医学院附属医院临床医学系

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

巩鹏 副教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

季国忠 主任医师
南京医科大学第二附属医院消化科

金瑞 教授
北京佑安医院

蓝宇 教授
北京积水潭医院消化科

梁力建 教授
中山大学附属第一医院肝胆外科

刘冰熔 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

吕宾 教授
浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

聂青和 副教授
第四军医大学唐都医院传染病科、全军感染病诊疗中心

欧希龙 副教授
东南大学南京中大医院消化科

孙秀发 教授
华中科技大学同济医学院营养与食品卫生学系

谭学瑞 教授
汕大医学院第一附属医院院长室

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

吴君 主任医师
贵阳医学院附属医院感染科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

许玲 副教授
第二军医大学长征医院中医科

许文燮 教授
上海交通大学生命科学院生物医学工程系

闫惠平 研究员
首都医科大学附属北京佑安医院传染病重点实验室

姚登福 教授
南通大学附属医院分子医学中心

于颖彦 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

周学文 主任医师
辽宁中医药大学附属医院消化内科

朱春兰 主任医师
黑龙江省医院附属消化病医院消化二科